

丙型肝炎病毒 JFH1 适应性突变株全长 cDNA 的构建

赵 方¹, 刘映霞¹, 李 刚^{2*}

(1. 深圳市第三人民医院感染科, 广东 深圳 518112; 2. 中山大学附属第三医院感染科)

摘要: **目的** 构建丙型肝炎病毒 JFH1 全长 cDNA 克隆, 获取突变位点信息。 **方法** 应用长片段 RT 长片段 RT-PCR 技术对不同时期传代的 JFH1 病毒株进行分段扩增。通过共同酶切位点连接成 9.7Kb 从 DNA 片段, 与 pBlueScript2ks(+) 形成克隆载体, 进一步测序分析。 **结果** 获取丙型肝炎病毒 JFH1 系列适应性突变株全长 cDNA 模板, 共发现 23 个单核苷酸突变。 **结论** 丙型肝炎病毒 JFH1 系列存在单核苷酸突变位点, 为进一步了解 HCV JFH1 适应性突变位点功能奠定基础。

关键词: 丙型肝炎病毒; JFH1 株; 适应性突变; 全长 cDNA

中图分类号: **文献标识码:** A

Construction of Full-length Complementary DNAs of Hepatitis C Virus JFH1 Strains with Adaptive Mutations

ZHAO Fang, LIU Yingxia, LI Gang

(Department of Infectious Diseases, Shenzhen Third People's Hospital, Shenzhen 518112, China)

Abstract: **Objective** To construct the full length complementary DNAs of HCV JFH1 strains with adaptive mutations. **Methods** Three HCV gene fragments (1.5 kb, 4.1 kb and 4.1 kb) were amplified by long RT-PCR, then fused and connected together to produce a 9.6 kb complete HCV genome, which was further cloned into a pBlueScript2ks(+) vector. The cDNAs were analyzed by sequencing and compared with the original HCV JFH1 strain. **Results** Successful got the adaptive HCV JFH1's full length cDNAs and found 23 single-nucleotide mutations. **Conclusion** Our findings will provide further insights into the function of adaptive mutations of the HCV JFH1.

Key words: Hepatitis C Virus (HCV), JFH1 strain, adaptive mutation, full-length complementary DNA

丙型肝炎病毒(HCV)为单股正链RNA病毒,其基因组全长约为9.6kb。由于HCV仅感染人类和黑猩猩,缺少有效小动物模型来研究HCV复制及其致病机制,严重阻碍了对HCV感染过程、发病机制、抗病毒药物和疫苗的研究。2005年HCV研究领域一个里程碑的重大突破就是建立了JFH1-huh7.5细胞培养体系^[1]。在这个体系中能产生具有感染性的病毒颗粒,对病毒-受体识别、穿入、基因组包装、病毒颗粒装配、成熟和释放等HCV感染过程的研究打下基础。但该系统的主要缺点是产生感

染性病毒颗粒颗粒较低^[1,2],然而人们发现JFH1株可以很容易地在huh7.5细胞培养传代过程中产生适应性突变(adaptive mutation),使得病毒产量得以增加^[3,4],HCV RNA通过适应性突变不断增强其感染能力,这个过程非常类似病毒在患者体内形成准种,其形成过程可能由于HCV RNA聚合酶缺乏校对功能,RNA在复制过程中错配概率很高,致使丙肝病毒表现为高度的遗传异质性,在细胞免疫压力下形成优势株为主的同源变异株群^[3]。本研究应用长片段RT-PCR技术对不同时期传代的JFH1病毒株进行分段扩增,获取3个相互重叠的扩增子(amplicons),通过相互共同酶切位点连接,构建全长HCV JFH1病毒株cDNA克隆,进一步序列分析获得适应性突变位点的信息。

收稿日期:2014-12-09;修回日期:2015-03-30

基金项目:深圳市科技计划项目(201302096);深圳市新发传染病重点专科基金。

* 通讯作者, E-mail: ligang131@hotmail.com

1 材料和方法

1.1 细胞及细胞培养 肝 Huh7.5.1 细胞来自 Dr. Charles Rice 惠赠 (Rockefeller University, New York)。细胞培养于含 10% 胎牛血清的 DMEM 培养基和 1% 氨苄青霉素/链霉素/左旋谷氨酰胺, 于 37 ℃, 饱和湿度, 5% CO₂ 的细胞培养箱中培养。

1.2 HCV RNA 的提取 感染 HCV JFH1 不同传代的 Huh7.5.1 细胞, 加入 1 mL/10 cm² Trizol, 室温放置 5 min, 使其充分裂解。12 000 rpm 离心 5 min, 弃沉淀。取上清, 按 200 μL 氯仿/ml Trizol 加入氯仿, 振荡混匀后室温放置 15 min。吸取上层水相, 至另一离心管中。加入 0.5 mL 异丙醇混匀, 室温放置 5 ~ 10 min。4 ℃ 12 000 g 离心 10 min, 弃上清, RNA 沉于管底。加入 75% 乙醇, 清洗一次, 室温晾干, 可用 50 μL H₂O, TE buffer 或 0.5% SDS 溶解 RNA 样品。总 RNA 用紫外分光光度计检测浓度, 并用 1% 琼脂糖 MOPS 胶电泳以检测其完整性和纯度。

1.3 引物及克隆策略 根据 HCV JFH1 基因全长序列 (GenBank: AB047639.1), 设计了 3 对扩增 HCV 全长 cDNA 模板的引物, 分别扩增 3 段 HCV cDNA, 包括 Spe I 和 Hind III 用于连接 3 个片段。在两末端引物分别加入 EcoR I 和 Xba I 两个酶切位点, 用于载入质粒 pBluescript2Ks (+)。引物见 (表 1), 克隆策略见 (图 1)。

表 1 扩增丙型肝炎病毒全长 cDNA 模板的引物位置及序列

引物 (+) (-)	位置	序列 5' ~ 3'
1f	+ nt1 - 25	CCGGAATTCACCTGCCCTAATAGGGGCG
1r	- nt4108 - 4131	GCAGCTACCGAGGGGTAAAGCAC
2f	+ nt3978 - 3999	CTTTCAGTGACAACAGCACGC
2r	- nt8262 - 8286	GCTTTCAAGAGATACTCCACCCGT
3f	+ nt8138 - 8156	CGCCTCATCGTTTACCCT
* 3r	- nt9658 - 9678	CTAGTCTAGAACATGATCTGCAGAGAGACC

* 同时为 RT 反应的引物; 下划线代表加入到引物中的酶切位点

1.4 逆转录反应 20 μL cDNA 合成反应体系中, 加入 9 μL RNA 模板, 再加入 10 μL 反应液 (1 μmol/L 引物 3 r, 5 mmol/L DTT, 0.5 mmol/L dNTP)。65 ℃ 预变性 5 min 后加入 1 μL Superscript III (200 U/μL, Invetrogen) 及 0.2 μL RNasin (40 U/μL, Promega), 50 ℃ 孵育 75 min, 70 ℃ 15 min 终止反应。随后加入 RNaseH 1 μL, 37 ℃ 20 min。

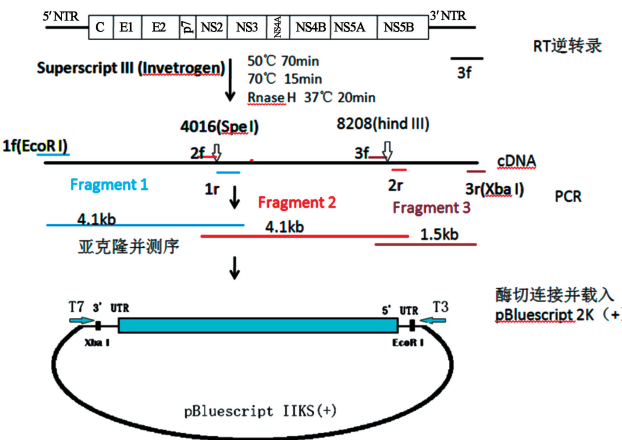


图 1 长 RT-PCR 克隆策略扩增 HCV 全基因组

1.5 PCR 采用罗氏公司的延伸高保真 PCR 系统来进行 PCR 取 2 μL RT 产物配制成 20 μL 反应体系 (上下游引物个 20 pmol, 2 μL 10 × PCR 缓冲液, 200 μM dNTPs, 5 U 高保真聚合酶)。94 ℃ 预变性 5 min, 94 ℃ 变性 45 s, 55 ℃ 退火 1 min, 68 ℃ 延伸 4 min (片段 1、2) 或 1.5 min (片段 3), 30 个循环; 1% 的琼脂糖凝胶上电泳, 溴化乙锭 (EB) 染色, 紫外灯下观察结果。

1.6 PCR 产物纯化回收和载体双酶切及连接 PCR 产物用 1% 的琼脂糖凝胶电泳后, 将目的条带切下用 Promega Wizard SV Gel and PCR Clean-up System 进行纯化回收。用 EcoR I 和 Spe I、Spe I 和 Hind III 及 Hind III 和 Xba I 分别酶切 3 种 PCR 产物及 pBlueScript2ks (+) 载体。酶切后的 PCR 产物及 pBlueScript2ks (+) 线性质粒以 3:1 的比例用 T4 DNA Ligase 在 16 ℃ 12 ~ 16 小时连接。

1.7 阳性克隆的筛选及鉴定 每管感受态细胞悬液取 200 μL 加 10 μL 连接产物 (含 50 ng DNA), 冰中放置 30 min。42 ℃ 热休克 90 s, 冰浴 2 min, 37 ℃ 摇床上 (200 rpm) 45 min 以使细菌复苏, 50 μL 已转化感受态细胞转移至含氨苄青霉素 (100 μg/mL) 及蓝白筛选试剂 (X-gal 和 IPTG) 的 90 mm 琼脂培养板上。37 ℃ 培养, 12 ~ 16 h 后可出现菌落。挑取 10 个白色单菌落, 加入有 4.0 mL LB 液体培养基 (含 100 μg/mL 的氨苄青霉素) 的试管中, 37 ℃ 250 rpm 摇菌 12 ~ 16 h。Omega 质粒小量提取试剂盒提取质粒 DNA, 酶切鉴定。

1.8 HCV 全基因组核酸序列分析 经酶切鉴定含 HCV JFH1 株的阳性单克隆, 送 ACGT 公司进行序列测定。所获得 HCV cDNA 序列采用 Vector NTI

6.0、DNA Star 及 Bioedite 软件进行比对及分析。

2 结 果

2.1 长片段 RT-PCR 扩增 HCV 全基因组片段

提取不同传代 HCV JFH1 RNA。通过优化 RT, 利用 primer3r 合成的 HCV cDNA。从合成的 HCV cDNA 中扩增出 3 段 PCR 产物, 其长度分别是 4.1 kb, 4.1 kb, 1.5 kb (图 2)。3 段产物之间相互重叠, 覆盖了 HCV 全基因组序列。

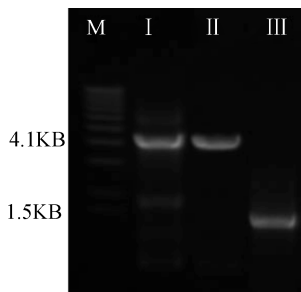


图 2 长片段 RT-PCR 扩增 HCV 全基因组片段 I: HCV 基因组片段 1; II: HCV 基因组片段 2; III: HCV 基因组片段 3; M: 1 Kb Plus DNA Ladder

2.2 pBS-HCVJFH1 (FZ) 系列株 cDNA 克隆质粒的构建及鉴定

三段 HCV PCR 产物通过基因组上特异的酶切位点, 逐步拼接 HCV 全长基因: 首先, 片段 1 通过 EcoR I 和 Spe I 两个酶切位点, 与 pBlue-script2KS(+) 克隆载体相连, 构建 pBS-HCVJFH1-F1 质粒。随后片断 2 通过 Spe I 和 Hind III 两个酶切位点, 与 pBS-HCVJFH1-F1 相连, 构建 pBS-HCVJFH1-F1-F2 质粒。最后, 片断 3 通过 Hind III 和 Xba I 两个酶切位点, 与 pBS-HCVJFH1-F1-F2 相连, 构建 pBS-HCVJFH1 (FZ)-full 质粒 (图 3)。连接转化后, 挑选的单克隆菌落扩大培养, 提取重组质粒。用 EcoR I 和 Xba I 双酶切鉴定重组质粒, 1% 琼脂糖凝胶电泳显重组体被消化为两条带, 一条 9.6 Kb 的片段为 HCV JFH1 全基因组, 另一条 3 Kbp 的带为载体质粒 (图 3 ~ 4), 证明 HCV 全基因组与载体连接成功。将 pBS-HCVJFH1 (FZ) 系列克隆质粒送 AGCT 公司测序, DNA 序列分析结果证明插入的目的基因片段确为 HCV 全基因组。

2.3 HCV JFH1 (FZ) 系列株 cDNA 克隆全基因组序列分析及保守性分析 HCV JFH1 (FZ) 系列株克隆经测序, 与 HCV JFH1 原始序列比较分析, 共发现 23 个单核苷酸突变, 其中 15 个点突变导致开放

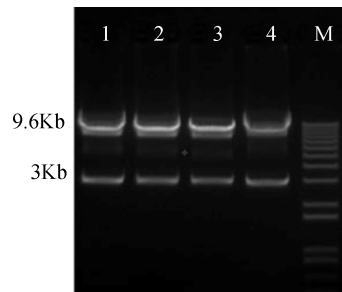


图 3 重组质粒 pBS-HCVJFH1 (FZ) 的酶切鉴定 1 ~ 4: pBS-HCVJFH1 (FZ) 系列株 cDNA 克隆质粒被 EcoR I 和 Xba I 双酶切后, 一条为 3 Kb 载体质粒, 一条为 9.6 Kb 的 HBV 全基因。M: 1 Kb Plus DNA Ladder

性阅读框氨基酸的改变。其中 E2 含有 2 个突变, P7 含有 1 个突变, NS3 含有 1 个突变, NS5A 含有 5 个突变, NS5B 含有 4 个突变。

3 讨 论

由于 HCV JFH1 基因组全长 9.6 kb, 常规 RT-PCR 难于获得大于 3 kb 的基因片段, 常需将普通 RT-PCR 法获得的大量短 cDNA 片段, 互相连接起来而得到全长基因。但由于 HCV 准种的原因, 得到的 HCV 基因组容易发生基因重组现象。有多篇研究^[5-8]报道成功应用长 RT-PCR 获得 HCV 全长基因。综合文献报道, 影响长 RT-PCR 成功的因素主要有病毒滴度、引物的 T_m 值及二级结构、逆转录条件及 PCR 扩增系统等。HCV 在 5' 非翻译区和 3' 非翻译区都存在大量的二级结构^[9,10], RNA 二级结构是影响逆转录反应的一个重要因素。在预实验时, 我们对逆转录条件进行了优化, 首先 65 °C RNA 模板先预变性 10 min 充分打开 RNA 的二级结构, 随后加入 Rnase H 阴性的 Superscript III 以 50 °C 延伸 70 min, 70 °C 变性 15 min 完成逆转录。Superscript III 是众家推荐长片段 RT 首选的逆转录酶^[11], 最高可在 55 °C 温度下保持逆转录活性, 55 °C 更有利于打开 RNA 的二级结构, 但可能会导致 RNA 模板部分降解, 所有采用 50 °C, 既考虑了二级结构问题, 又避免了模板的降解。而且 Superscript III 缺乏 3' → 5' Rnase 活性, 这样有助于保证逆转录过程中 RNA 模板的完整性, 在 RT 反应后再加入 RnsaeH 酶, 37 °C 20 min 去除模板 RNA。HCV RNA 的浓度和纯度也是长片段 RT-PCR 的关键因素^[12], 这也是感染细胞中提取病毒 RNA 作为模板进行 RT-PCR 的

成功率要明显高于从培养液上清提取的模板的原因之一。

通常 PCR 采用非保真酶的突变率大约为 10^{-4} , 而高保真酶由于具有 $3' \rightarrow 5'$ 外切酶活性, 能校对并切除错配的碱基, 其突变率大约为 10^{-6} 。为了保证构建 HCV cDNA 克隆不被 PCR 引入突变, 我们采用罗氏公司的高保真 PCR 系统来进行 PCR, 取得较好的结果。长模板 PCR 系统的主要缺点为非特异性扩增, 优化引物使 T_m 值增高, 有可能克服此缺陷为获得 HCV 全长基因组, 我们曾试图从合成的 HCV cDNA 中直接扩增 HCV 全长或分成 2 段的产物扩增, 均未能成功。最后从合成的 HCV cDNA 中扩增出 3 段 PCR 产物, 3 段产物之间相互重叠, 覆盖了 HCV 全基因组序列。在设计扩增片段时, 选择片段重叠覆盖区有且只有单一的酶切位点(在 HCV 基因组中)的策略, 以方便将片段通过酶切位点连接。选取了 4016 位的 Spe I 和 8208 位的 Hind III, 同时两端分别加入 EcoR I 和 Xba I 两个不存在 JFH1 基因组的酶切位点, 以便插入到载体中。

我们通过构建全长的 HCV JFH1 (FZ) 系列株 cDNA 克隆, 不仅可以得以保存这些适应性突变病毒株, 同时找到了一批适应性突变的候选位点, 这些突变位点主要集中在 NS5A 和 NS5B 区域。很多证据表明, NS5A 与细胞抗病毒状态有关, 而 NS5B 是 HCV RNA 聚合酶, 直接控制着 HCV 的复制。NS3, NS5A 和 NS5B 在 HCV 感染和复制过程中占据重要地位, 是目前抗病毒治疗药物的主要靶标^[13]。这些提示我们发现的突变位点可能存在重要功能, 为下一步验证和了解这些位点功能奠定理论和实验基础。

参考文献:

- [1] Wakita T, Pietschmann T, Kato T, et al. Production of infectious hepatitis C virus in tissue culture from a cloned viral genome. *Nat Med*, 2005, 11: 791-796.
- [2] Zhong J, Gastaminza P, Cheng G, et al. Robust hepatitis C virus infection in vitro. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2005, 102: 9294-9299.
- [3] Zhong J, Gastaminza P, Chung J, et al. Persistent hepatitis

C virus infection in vitro; coevolution of virus and host. *J Virol*, 2006, 80: 11082-11093.

- [4] Kaul A, Woerz I, Meuleman P, et al. Cell culture adaptation of hepatitis C virus and in vivo viability of an adapted variant. *J Virol*, 2007, 81: 13168-13179.
- [5] Sheehy P, Scallan M, Kenny-Walsh E, et al. A strategy for obtaining near full-length HCV cDNA clones (assemblies) by assembly PCR. *J Virol Methods*, 2005, 123: 115-124.
- [6] Fan X, Xu Y, Di Bisceglie AM. Efficient amplification and cloning of near full-length hepatitis C virus genome from clinical samples. *Biochem Biophys Res Commun*, 2006, 346: 1163-1172.
- [7] Appel N, Pietschmann T, Bartenschlager R. Mutational analysis of hepatitis C virus nonstructural protein 5A: potential role of differential phosphorylation in RNA replication and identification of a genetically flexible domain. *J Virol*, 2005, 79: 3187-3194.
- [8] 毛红霞, 胡芸文, 吴瑛, et al. 丙型肝炎病毒全长 cDNA 模板的构建及鉴定. *中华实验和临床病毒学杂志*, 2004, 18: 122-126.
- [9] Brown EA, Zhang H, Ping LH, et al. Secondary structure of the 5' nontranslated regions of hepatitis C virus and pestivirus genomic RNAs. *Nucleic Acids Res*, 1992, 20: 5041-5045.
- [10] Smith DB, Mellor J, Jarvis LM, et al. Variation of the hepatitis C virus 5' non-coding region: implications for secondary structure, virus detection and typing. The International HCV Collaborative Study Group. *J Gen Virol*, 1995, 76 (Pt 7): 1749-1761.
- [11] Lu L, Nakano T, Smallwood GA, et al. A refined long RT-PCR technique to amplify complete viral RNA genome sequences from clinical samples: application to a novel hepatitis C virus variant of genotype 6. *J Virol Methods*, 2005, 126: 139-148.
- [12] Rispeter K, Lu M, Lechner S, et al. Cloning and characterization of a complete open reading frame of the hepatitis C virus genome in only two cDNA fragments. *J Gen Virol*, 1997, 78 (Pt 11): 2751-2759.
- [13] Pol S, Corouge M. Treatment of hepatitis C: Perspectives. *Med Mal Infect*, 2014, 44 (10): 449-454.

(此文编辑: 秦旭平)