第12卷第1期 中 国 病 毒 学 Vol.12 No.1
1997年3月 VIROLOGICA SINICA Mar. 1997

# 克隆鸭乙型肝炎病毒DNA双体体内转染的研究*

邓卫文 谢 弘
(中国科学院上海细胞生物学研究所,上海 200031)
闻玉梅
(上海医科大学分子病毒学实验室,上海 200032)

**提 要** 用一种含头尾相连DHBV DNA双体的质粒体内转染2日龄芙蓉鸭,大多数鸭(86%)产生了短暂病毒血症。血清DHBs/pre S Ag和DHBV DNA于转染后第9天出现,第12～14天达峰值,第28天时多数转阴;少数鸭的病毒血症可持续50天以上。转染鸭肝组织中也检测到复制中间型DHBV DNA的存在。用转染鸭病毒血症期的血清作磷钨酸负染电镜观察,找到了完整的DHBV病毒颗粒,并且用此血清腹腔注射1日龄鸭,60%的鸭被感染成功,证明体内转染后有生物活性的DHBV病毒颗粒的产生。该研究方法的建立,对于研究DHBV变异株,DHBV基因结构与功能的关系等,均有一定理论意义及应用价值。

**关键词** 鸭乙型肝炎病毒,DNA双体,体内转染

鸭乙型肝炎病毒(Duck Hepatitis B Virus, DHBV)是研究人乙型肝炎病毒(HBV)的重要模型之一[1]。用DHBV DNA双体体内转染幼龄鸭,不但可在鸭体内直接分析DHBV基因结构与功能,而且还可获得单一来源、基因序列清楚的病毒株,用于研究不同来源DHBV DNA变异株的感染性,了解整体内病毒复制、抗原表达及病毒感染的全过程[2,3]。鉴于上述目的,我们用头尾相连的DHBV DNA双体质粒作幼龄鸭体内转染,并对DHBV的复制过程进行了动态观察,获得满意结果。

## 材料与方法

1 **克隆DHBV DNA双体** 由法国里昂INSERM 271研究所的Dr. Li J-S惠赠,将两个拷贝的DHBV DNA头尾相连后在EcoR I位点插入载体pBR 322,DHBV DNA序列参阅Mandart 1984[4],此双体质粒称pFDHBV质粒。

2 **鸭源** 芙蓉鸭(樱桃谷鸭与北京鸭杂交后代),于出壳当天自胫静脉取血,经检测血清DHBV S抗原/前S抗原(DHBs/preS Ag)、DHBV DNA均阴性的鸭用于体内转染。

3 **体内转染方法** 在200 μl pH7.0的DMEM培养液(用5.6% $NaHCO_3$ 调节pH)中加入12.5 μL DEAE-Dextran(Sigma公司产品,分子量$5\times10^5$,提前一天将5 mg DEAE-Dextran溶于1 mL无菌蒸馏水,4℃过夜),混匀,静置15 min;再加25 μg DHBV DNA双体(相当于$2.5\times10^{12}$病毒拷贝数),混匀,此时总体积约250

收稿日期:1996-04-15,修回日期:1996-07-28
* 本研究由"863"基金资助

μL，DEAE－Dextran 终浓度约为 250 μg/mL，静置 30 min～60 min，当液体呈现云雾状但未出现絮状时用 4# 注射器针头分三点经皮作鸭肝内注射。

4　**血清 DHBs/pre S Ag 的检测**　参照张维等[5]的斑点酶免疫测定法(Dot EIA)。

5　**血清及肝组织 DHBV DNA 的检测**　血清 DHBV DNA 的检测采用 Dot blot 杂交(每点加 50 μL 血清)，肝组织 DHBV DNA 的检测采用 Southern blot 杂交(DNA 抽提参照 Mason 1983[6]，每孔加 20 μg DNA 电泳)，参照 Boehringer Mannhein 公司提供的 Digoxigenin 检测试剂盒说明书用随机引物延链法制备地高辛(Dig)标记的 DHBV DNA 探针，然后用酶免疫显色法检测杂交结果。

6　**血清 DHBV 病毒颗粒的检测**　用磷钨酸负染法电镜观察转染鸭血清，寻找 DHBV 病毒颗粒。

## 结　果

### 1　转染后产生的病毒血症的动态变化

共转染了 14 只 2 日龄鸭，12 只出现病毒血症，转染成功率为 86%(12/14)。每只鸭均于转染后第 5 天起，隔日自胫静脉采血，到第 28 天止。用 Dot EIA 法检测血中 DHBs/pre S Ag，Dot blot 杂交法检测血中 DHBV DNA，结果见表 1。

表 1　pFDHBV 质粒体内转染 2 日龄鸭的结果(共转染 14 只鸭)

Tab 1　The result of *in vivo* transfection of 2－day old ducklings with pFDHBV plasmid (totally transfected 14 ducks)

| 转染后天数 Days after transfection | 1～7 | 8～14 | 15～21 | 22～28 | 29～50 |
|---|---|---|---|---|---|
| 血清 DHBs/pre S Ag 阳性鸭数 No. of serum DHBs/pre S Ag + ducks | 0 | 12 | 12 | 2 | 2 |
| 血清 DHBV DNA 阳性鸭数 No. of DHBV DNA + ducks | 0 | 12 | 12 | 2 | 2 |

由表 1 可以看出，大多数鸭(10/14)于转染后产生了短暂病毒血症，病毒血症一般于转染后第 9 天出现，第 12～14 天达峰值，以后逐渐减弱，第 28 天呈弱阳性或阴转(根据 Dot EIA 或 Dot blot 斑点显色的颜色深浅可判断病毒血症的强弱)，且血清 DHBs/pre S Ag 与血清 DHBV DNA 的消长呈平行关系。另外，我们还发现有 2 只鸭于转染后呈现高滴度的持续性病毒血症，到转染后第 50 天血清 DHBs/pre S Ag、DHBV DNA 仍阳性。将病毒血症期(转染后第 14 天)的转染鸭血清作磷钨酸负染电镜观察，找到园球状 DHBV 病毒颗粒，直径约 40 nm，证明转染后有完整病毒颗粒的产生，见图 1。

### 2　转染鸭肝组织中复制中间型 DHBV DNA 的检测

于转染后第 28 天将实验鸭处死，提取肝组织 DNA，电泳，Southerm blot 转移，用地高辛标记的 DHBV DNA 探针杂交检测，发现转染鸭肝组织中有自短而长拖尾状延伸排列的 DHBV DNA(0.5 kb～3 kb)，表明肝中有复制中间型 DHBV DNA 的存在，见图 2。

### 3　转染鸭血清感染性的检测

将病毒血症期(转染后第 14 天)的转染鸭血清腹腔注射 1 日龄鸭，共注射 10 只(0.5 mL 血清/鸭)，6 只(60%)于注射后第 3 周血中检测到 DHBs/pre S Ag、DHBV DNA；而对照组用 DHBV 阴性的正常鸭血清腹腔注射 1 日龄鸭，均不能感染成功，从而证明转染鸭血清有感染性。

图1 pFDHBV质粒转染鸭血清磷钨酸负染电镜照片
(放大倍数×50000)

Fig 1 EM photograph of the serum from pFDHBV plasmid transfected ducks

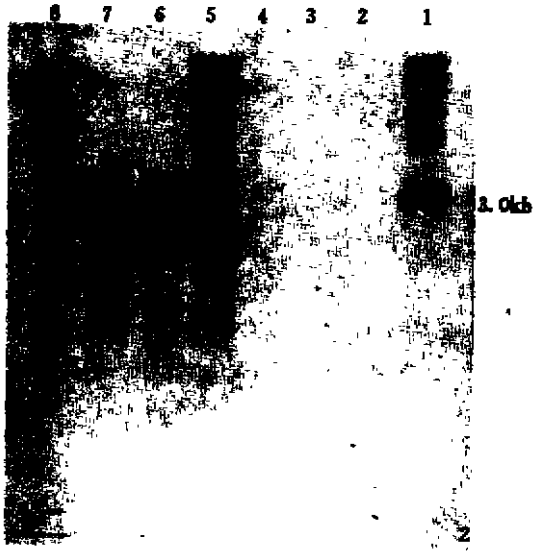


图2 pFDHBV质粒转染鸭肝组织DNA Southern blot杂交图

1:纯化的DHBV DNA 2:λDNA/Hind Ⅲ

3:正常鸭肝组织DNA 4:转染失败鸭肝组织DNA

5~8:转染成功鸭肝组织DNA

Fig 2 Southern blot hybridization of the liver tissue DNA from pFDHBV plasmid transfected ducks

1: purified DHBV DNA, positive control

2: DNA molecular weight marker (λDNA/Hind Ⅲ)

3: normal duck liver tissue DNA, negative control

4: unsuccessfully transfected duck's liver tissue DNA

5~8: successfully transfected duck's liver tissue DNA

## 讨 论

DHBV感染的特点以先天性感染为主(在易感鸭群中先天感染率可达10%),后天性感染则以幼龄鸭易感,大龄鸭对DHBV的感染有抵抗力[6]。DHBV感染的启始环节是DHBV与肝细胞表面的DHBV受体的有效结合[7,8]。感染能否顺利建立还与鸭免疫系统的完善及肝细胞的发育程度即与鸭龄有关,并且随着鸭龄的增大,感染成功率降低[9]。

本实验转染产生短暂病毒血症的原因在于：体内转染后病毒血症达峰值时已是转染后第12～14天，此时鸭的免疫系统发育较为完善，肝细胞的发育也较成熟，从转染的肝细胞中释放出的新生 DHBV 在全身性的抗病毒应激反应的作用下，不能有效地感染周围正常的肝细胞，反而被机体免疫系统所杀灭，而那些经 DHBV DNA 双体转染且有病毒复制的受损肝细胞，也能逐步地被机体清除，因此体内转染后只能导致一个周期的病毒复制，产生短暂病毒血症。然而，在本研究中也发现少数鸭于转染后产生了高滴度的持续性病毒血症，其原因不明；可能与病毒基因的整合或幼鸭的个体差异有关，如转染后病毒释放入血液较早或释放的病毒量较大，免疫系统或肝细胞的先天发育缺陷等，导致了病毒的二次感染，产生持续性病毒血症。

这一体内转染系统的建立有许多用处。首先，可用于研究比较不同来源 DHBV 野生株及不同序列 DHBV 变异株的感染性，了解整体内病毒复制、抗原表达及病毒感染的全过程。其次，可用于作整体内 DHBV 基因结构与功能的分析，将体外诱变获得的突变基因组进行体内转染，通过研究病毒复制及抗原表达来分析某基因片段的功能。最后，还可获得单一来源、基因背景清楚的 DHBV 病毒株，用于进一步研究病毒与细胞的相互作用及筛选抗病毒药物[10～12]。

## 参 考 文 献


1 Mason W－S, Seal G, Summers J. Virus of Pekin ducks with structural and biological relatedness to human hepatitis B virus J Virol, 1980, 36(3):829～836

2 Sprengel R, Kuhn C, Manso C *et al*. Cloned duck hepatitis B virus DNA is infectious in Pekin ducks. J Virol, 1984, 52(3): 932～937

3 Sprengel R, Varmus H－E, Ganem D. Homologious recombination between hepadnaviral genomes following *in vivo* DNA transfection: implications for studies of viral infectivity. Virology, 1987, 159(2):454～456

4 Mandart E, Kay A, Galibert F Nucleotide sequence of a cloned duck hepatitis B virus genome: comparison with woodchuck and human hepa itis B virus sequences. J Virol, 1984, 49:782～792

5 张维，闻玉梅，李自力等. 一种快速、简便检测鸭乙型肝炎病毒抗原、抗体的方法. 上海医科大学学报，1988;15(6):413～415

6 Mason W－S, Halpern M－S, England J－M *et al* Experimental transmission of duck hepatitis B virus Virology, 1983, 131:375～384

7 Tuttleman J－S, Pugh J－C, Summers J *In vitro* experimental infection of primary duck hepatocyte cultures with duck hepatitis B virus. J Virol, 1986, 58:17～24

8 Pugh J－C, Qu D, Mason W－S *et al*. Susceptibility to duck hepatitis B virus infection is associated with the presence of cell surface receptor sites that efficiently bind viral particles J Virol, 1995, 69(8):4814～4822

9 Pugh J－C, Simmons H. Duck hepatitis B virus infection of Muscovy duck hepatocytes and nature of virus resistance *in vivo* J Virol, 1994, 68(4): 2487～2494

10 Li J－S, Cova L, Buckland R *et al*. Duck hepatitis B virus can tolerate insertion, deletion, and partial frameshift mutation in the distal pre－S region. J Virol, 1989, 63(11):4965～4965

11 Wildner G, Fernholz D, Sprengel R *et al*. Characterization of infectious and defective cloned avian hepadnavirus genomes Virology, 1991, 185(1):345～353

12 Chen Y, Robinson W－S, Marion P－L. Naturally occurring point mutation in the C terminus of the polymerase gene prevents duck hepatitis B virus RNA packaging. J Virol, 1992, 66(2):1282～1287

# The Research of *in vivo* Transfection of Cloned Duck Hepatitis B Virus DNA Dimer

Deng Weiwen Xie Hong

(*Shanghai Institute of Cell Biology, Chinese Academy of Sciences, Shanghai* 200031)

Wen Yumei

(*Laboratory of Molecular Virology, Shanghai Medical University, Shanghai* 200032)

*In vivo* transfection with a plasmid - linked tandem DHBV DNA dimer on 2 - day old DHBV - free Furong ducklings was carried out. Most of the animals (86%) developed transient viremia. Serum DHBs/pre S Ag and DHBV DNA appeared on 9th day, reached to its peak on 12th~14th day and disappeared on 28th after transfection. Whereas, there were a few ducks whose viremia persisted for more than 50 days. DHBV DNA replicative intermediates were also found in the liver tissue of transfected ducks. DHBV intact viral particals were detected in viremic sera under electronic microscope. Intraperitoneal injection of the transfected ducks' viremic sera into 1 - day old DHBV - free ducklings resulted in productive DHBV infection on 60% animals, demonstrating the production of biologically active virus after *in vivo* transfection. The establishmant of this method is valuable for the research of DHBV variant and the relation between DHBV gene structure and its function.

**Key words** DHBV, DNA dimer, *in vivo* transfection