

乙肝病毒核心蛋白钉突部位基因工程改造对其功能的影响

陈江燕, 黄荣, 陶颖, 黄媛, 罗英英, 黄爱龙, 胡接力

重庆医科大学 感染性疾病分子生物学教育部重点实验室, 重庆 400016

陈江燕, 黄荣, 陶颖, 等. 乙肝病毒核心蛋白钉突部位基因工程改造对其功能的影响. 生物工程学报, 2013, 29(11): 1663-1671.

Chen JY, Huang R, Tao Y, et al. Impacts on hepatitis B virus replication by gene engineering at apical loop region of capsid protein. Chin J Biotech, 2013, 29(11): 1663-1671.

摘要: 通过在乙肝病毒核心蛋白钉突部位插入标签蛋白 EGFP 及小片段多肽, 研究各种改造对 HBc 功能的影响。采用 RLIC 方法, 构建野生型 HBc、HBc 钉突部位带不同接头的 EGFP 融合重组体、缩短的 EGFP 融合重组体, 并构建与 HBc 功能互补的质粒 HBV1.1c⁻, 将不同重组体与 HBV1.1c⁻ 共转染 HEK293 细胞, 通过观察荧光及 Southern blotting 检测病毒复制中间体, 判断相应基因工程改造对重组蛋白中不同结构域功能的影响。RLIC 方法可有效地用来进行片段缺失, 且缺失片段大小及位置无明显限制。带柔性或刚性接头的重组 HBc-EGFP 均可产生绿色荧光, 但荧光在细胞内分布形态不同, 两种重组 HBc-EGFP 均不能支持正常的 HBV 复制, 各种截短的插入片段以及 aa79-80 单独缺失体亦不能支持 HBV 复制。结果表明 RLIC 方法是一种基因工程改造的有力工具, 不同类型接头对重组蛋白的结构和功能有不同影响, aa79-80 对维持 HBc 的主要功能之一——支持 HBV 复制有重要作用。

关键词: 乙型肝炎病毒, 核心蛋白, 绿色荧光蛋白, 基因工程

Received: February 23, 2013; **Accepted:** August 20, 2013

Supported by: National Natural Science Foundation of China (No. 81000732), Natural Science Foundation Chongqing (No. cstc2011jjA10005).

Corresponding author: Jieli Hu. Tel: +86-23-68486780; E-mail: hujieli1977@163.com

国家自然科学基金 (No. 81000732), 重庆市自然科学基金 (No. cstc2011jjA10005) 资助。

网络出版时间: 2013-09-13

网络出版地址: <http://www.cnki.net/kcms/detail/11.1998.Q.20130913.0913.003.html>

Impacts on hepatitis B virus replication by gene engineering at apical loop region of capsid protein

Jiangyan Chen, Rong Huang, Ying Tao, Yuan Huang, Yingying Luo, Ailong Huang, and Jieli Hu

Key Laboratory of Molecular Biology on Infectious Diseases, Ministry of Education, Chongqing Medical University, Chongqing 400016, China

Abstract: Hepatitis B virus (HBV) DNA replication takes place in the viral capsid that consists of 180 or 240 copies of HBV capsid (HBc or core) protein. The monomeric core protein contains an apical loop region that forms the spikes on the surface of viral capsid upon core dimerization and capsid assembly. To investigate the impact on HBV DNA replication through gene engineering at the spike of HBV capsid, plasmids expressing engineered HBc with linker-fused enhanced green fluorescent protein (EGFP) or shortened EGFP insertion at the spike region were constructed by Restriction Digestion and Ligation-independent Cloning (RLIC). The wildtype or mutant HBc construct was cotransfected with HBV1.1c, a plasmid containing 1.1 unit-length HBV genome with deficiency in HBc expression, into HEK293 cells, respectively. GFP signal was observed through a fluorescence microscope and HBV DNA replicative intermediates were assayed by Southern blotting to determine the expression and functions of different recombinants. Our results demonstrated that the RLIC method was effective to generate deletion or insertion in the apical loop region of HBc. Both HBc-EGFP recombinants with different linkers produced green fluorescence but with different subcellular distribution pattern. However, HBV DNA replication was not detected with the trans-complementation of these two HBc recombinants. In addition, other recombinants including the one only with the deletion of aa79-80 failed to support HBV replication. Taken together, our results suggest that RLIC is a robust method which can be broadly applied in gene engineering; different peptide linkers may have different influences on the functions of an engineered fusion protein; and HBc aa79-80 play a critical role for HBc to support HBV DNA replication.

Keywords: hepatitis B virus, core protein, green fluorescence, gene engineering

乙型肝炎病毒 (HBV) 是一种重要的病原体, 可导致一系列慢性肝病^[1-2]。HBV 为直径 42 nm 的球形颗粒^[3], 呈双层壳结构, 外壳主要由 3 种表面蛋白 (HBs) 构成^[4], 内层核衣壳由核心蛋白 (HBc) 组成, 为正 20 面体结构^[5], 该结构包含 90 或 120 个 HBc 二聚体, 每个二聚体由 HBc 单体通过二硫键连接^[6-7]。HBc 由 4 个 α 螺旋 (aa13-30, aa50-60-78, aa82-93-110, aa112-123-128) 和 C 端精氨酸区组成^[8]。第 2 和第 3 个 α 螺旋转折形成钉状突起, aa80 是尖突顶, 位于核衣壳最表面 (图 1)^[9-11]。HBc 在 HBV 复制过程中必不可少, 它所构成的核衣壳

是包装前基因组 RNA (Pregenomic-RNA, pgRNA) 和病毒聚合酶的场所^[12], 另外, HBc 还介导病毒基因组 DNA 进入细胞核, 继而生成共价闭合环状 DNA (Covalently closed circled DNA, cccDNA) 作为复制的初始模板^[13]。

HBc 因其作用重要, 一直是 HBV 复制研究中的重要对象, 然而, 由于缺乏稳定且特性好的抗 HBc 抗体, 很多研究不便开展。本研究针对这一问题, 拟利用绿色荧光蛋白 (EGFP) 对 HBc 进行基因工程改造, 试图达到以下目的: 1) 能对 HBc 表达情况进行监控; 2) 使得用免疫学方法检测 HBc 以及捕获核心颗粒 (含有

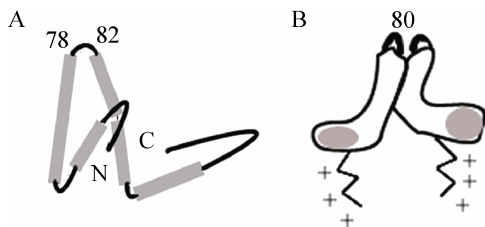


图1 HBc 蛋白二维结构示意图^[10]

Fig. 1 Diagram of HBc structure^[10]. (A) HBc monomer, aa78-82 is at the spike. (B) HBc dimer.

HBV 基因组 DNA 及聚合酶的核衣壳) 成为可能; 3) 与此同时, 不影响 HBc 自身功能, 即经过改造的 HBc 仍能支持 HBV 复制。为达到以上目的, 我们认为, EGFP 标签需表达于核衣壳表面, 以便被抗 EGFP 抗体识别和捕获。从核衣壳的冷冻电镜结构^[8]可知, 位于其最表面的部分是 HBc 钉突部位 (aa78~82), 而不是 C 末端或 N 末端。因此, 若在钉突位置插入 EGFP, 有可能使其暴露于核衣壳表面。但是, 在一个蛋白的中间位置插入另一蛋白序列, 有可能使这两种蛋白的三维结构都受到影响, 不能正确折叠, 从而影响甚至破坏二者的功能。Kratz 等^[14]的研究表明, 对于截去 C 末端 40 aa 的 HBc, 当其钉突处 aa79~80 替换成 GFP 时, 超过 40% 的融合 GFP 折叠正确, 能产生绿色荧光, 同时亦能形成与天然核衣壳类似的颗粒结构, 然而, 截去 C 末端的 HBc 并不能支持 HBV 复制^[15], 我们在本研究中将以完整 HBc 为基础进行改造, 考察这些融合蛋白是否保留了 HBc 的正常功能, 同时, 我们还探讨了不同类型接头以及不同大小插入片段对 HBc 蛋白功能的影响。

1 材料与方法

1.1 材料

质粒 pCH9/3091 由第三军医大学西南医院

感染病研究所兰林博士馈赠, 德国 Nassal^[16]课题组构建; HEK293 细胞、质粒 pEGFP-N1 为本实验室保存; Southern blotting 检测试剂盒、Xtreme HP 转染试剂购自罗氏公司; 内切酶 *Dpn* I 购自 Promega 公司。

1.2 方法

1.2.1 构建 HBV1.1c⁻ 质粒

采用不依赖酶切与连接的分子克隆方法 (RLIC)^[17-18]。以质粒 pCH9/3091 为模板, 设计突变引物, 使其 HBc 第 40 位氨基酸突变为终止密码, 上游引物为: 5'-GATACCGCCTCAGCTCTGTATCGGTAAGCCTTAGAGTCTCCTGAGCATTG-3', 下游引物为: 5'-CTCGTCGTCTAACACAGTAGTCT-3', 进行 PCR 扩增。用 QIAGEN 胶回收试剂盒回收扩增片段。回收片段带有突变碱基, 作为大引物, 用来替换模板质粒 pCH9/3091 中相应片段。反应体系: 300 ng 回收片段, 50 ng pCH9/3091 模板, 0.5 μL *PrimeSTAR* 聚合酶等。反应条件: 95 °C 预变性 2 min; 95 °C 15 s, 55 °C 15 s, 72 °C 3 min, 18 个循环。扩增产物用 Roche PCR 产物纯化试剂盒纯化, 取 13 μL 纯化产物用 *Dpn* I 于 37 °C 消化 5 h, 取 2 μL 消化后产物电转化 JM109 感受态细胞, 获得的克隆测序鉴定。

1.2.2 构建 HBc 质粒

以 pCH9/3091 为模板, 设计引物, 上游引物为: 5'-CAATCTCGGGAATCTCAATGTTAGGAGATTAGGTTAAAGGTCTTTGTAC-3'; 下游引物为: 5'-GTACAAAGACCTTTAACCTAATCTCCTAACATTGAGATTCCCGAGATTG-3', 作反向替换 (等同大片段缺失突变), 具体方法与前述类似。挑取克隆测序鉴定。

1.2.3 其他重组质粒的构建

将 HBc aa79~80 替换成 EGFP 有两种设计:

1) HBc gfp-flex, 由柔性接头连接 EGFP 两端并插入 HBc 中 (替换 aa79~80)。首先以 pEGFP-N1 为模板, 用引物 FHBc gfp-flex1、RHBc gfp-flex1 PCR 扩增, 取 0.1 μ L 扩增产物为模板, 用引物 FHBc gfp-flex2、RHBc gfp-flex2 再次 PCR 扩增, 得到两端加上柔性接头的 EGFP 基因片段, 其末端带有与 HBc aa79~80 两侧序列同源的序列, 然后以该片段为大引物, 替换插入到 HBc 中。方法类似 1.2.1。2) HBc gfp-heli, 在 HBc gfp-flex 基础上, EGFP 两端各增加一段 α 螺旋的刚性接头, 改变融合蛋白间的连接方式。构建方法大体与 1) 类似, 但因该刚性接头序列较长且多重碱基, 难以直接用 PCR 将外侧序列

加到上一轮 PCR 扩增片段两侧 (即 heli2 引物不能较好扩增 heli1 的扩增产物), 因此需在每轮扩增后, 增加一次克隆过程, 共进行了 3 次克隆。

此外, 我们还在 HBc gfp-flex 基础上, 将插入的外源片段逐步缩短, 构建 3 种重组质粒:

1) HBc gfp15-flex, 为 HBc gfp-flex 删除 EGFP 中间部分, 仅保留 EGFP15 个氨基酸的重组 HBc。2) HBc flex, 在 HBc gfp15-flex 的基础上进一步将重组蛋白减短, 融合多肽为 2 个 G4S。3) HBc 7980⁻ 为第 79、80 位氨基酸缺失的 HBc 蛋白。均采用与 RLIC 原理相同的反向替换法。

1.2.4 HEK293 细胞培养及转染

细胞培养及转染: HEK293 细胞使用含 10% 胎牛血清的 DMEM 培养基, 于 37 $^{\circ}$ C, 含 5% CO₂, 相对湿度大于 95% 的无菌孵箱中培养。转

表 1 其他重组质粒构建所用引物

Table 1 Primers used in the construction of other recombinants

Plasmid name	Primer name	Primer sequence (5'-3')
HBc gfp-flex	FHBc gfp-flex1	<u>GGTGGTGGAGGCTCTGGAGGCGGAGGTACCATGGTGAGCAAGGGCGAGGAG</u> ¹⁾
	RHBc gfp-flex1	<u>TCCACCACCACCAGAACCACCTCCTCCCTTGTACAGCTCGTCCATGCCGA</u>
	FHBc gfp-flex2	<u>CCTGGGTGGGTGTTAATTTGGAAGATGGTGGTGGAGGCTCTGGAGGCGGA</u> ²⁾
	RHBc gfp-flex2	<u>GACATAACTGACTACTAGGTCTCTAGATCCACCACCACCAGAACCACCTC</u>
HBc gfp-heli	FHBc gfp-heli1	<u>AGGCTGCTGCTAAAGAAGCCGCTGCTAAAGCTGCTGCTATGGTGAGCAAGG</u> <u>GCGAGGAG</u>
	RHBc gfp-heli1	<u>CTTAGCAGCAGCCTCCTTAGCAGCAGCTTCTGCAAGCTTGTACAGCTCGTCC</u> <u>ATGCCGA</u>
	FHBc gfp-heli2	<u>TTGCAGAAGCTGCCGCAAAGAGGCTGCTGCTAAGGAGGCTGCTGCTAAAG</u> <u>AAGCCGCT</u>
	RHBc gfp-heli2	<u>AGCAGCAGCTTAGCAGCAGCCTCCTTAGCAGCAGCCTCCTTAGCAGCAGC</u> <u>CTCCTTAG</u>
HBc gfp15-flex	FHBc gfp-heli3	<u>GATGGTGGTGGAGGCTCTGGAGGCGGACTTGCAGAAGCTGCCGCAAAG</u>
	RHBc gfp-heli3	<u>CTAGATCCACCACCACCAGAACCACCTCAGCAGCAGCTTTAGCAGCAGC</u>
HBc flex	FHBc gfp15-flex	<u>ATGGTGAGCAAGGGCGAGGAGCTCGGCATGGACGAGCTGTACAAG</u>
	RHBc gfp15-flex	<u>CTTGTACAGCTCGTCCATGCCGAGCTCCTCGCCCTTGCTCACCAT</u>
HBc 7980 ⁻	FHBc flex	<u>TGGAGGCTCTGGAGGCGGAGGTACCTCTAGAGACCTAGTAGTCAGTTATG</u> <u>CTCGTCTCTAACACAGTAGTCT</u>
	Rc457	<u>GTTAATTTGGAAGATTCTAGAGACCTAG</u> <u>CTCGTCTCTAACACAGTAGTCT</u>

¹⁾ The underlined sequences are homologous with pEGFP-N1. ²⁾ The italic sequences are homologous with HBc.

染质粒前, 先将细胞接种于 6 孔板, 密度约为 1.5×10^5 个/孔, 培养约 20 h, 换新鲜培养基。配制转染体系: 质粒与脂质体以 1:3 的比例混匀 ($2 \mu\text{g DNA} : 6 \mu\text{L}$ 脂质体), 转染各孔, 24 h 后换液。继续培养 4 d, 收细胞。

1.2.5 Southern blotting 检测 HBV DNA 复制中间体

细胞转染 5 d 后, 提细胞内核心颗粒 HBV DNA: 用 500 μL 细胞裂解液 (10 mmol/L Tris-HCl pH 8.0, 1 mmol/L EDTA, 1% NP40, 50 mmol/L NaCl, 2% 蔗糖) 37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 10 min, 收集裂解物, 15 000 $\times g$ 离心 4 min, 取上清, 加 5 μL 1 mol/L MgCl₂, 50 U DNase I 于 37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 5 h, 加 200 μL 沉淀剂 (35% PEG 8000, 1.5 mol/L

NaCl), 置冰上 40 min, 13 000 $\times g$ 离心 10 min 后弃去上清, 再用 Proteinase K 消化过夜, 经酚氯仿抽提, 异丙醇沉淀, 将得到的产物溶于 8 μL 超纯水, 用 Southern blotting 检测 HBV DNA, 具体操作步骤详见文献[19]。

2 结果

2.1 HBV1.1c⁻ 及 HBc 质粒的构建

构建 HBc 表达缺失的 HBV 1.1 倍体的目的, 是为了后续检测各种经过改造的 HBc 是否保留正常功能, 即支持 HBV 复制。我们在含 1.1 倍体 HBV 基因组的 pCH9/3091 基础上, 将 HBc 蛋白的第 40 个氨基酸突变成终止密码, 同时不干扰 HBV 其他基因的表达^[20] (图 2)。

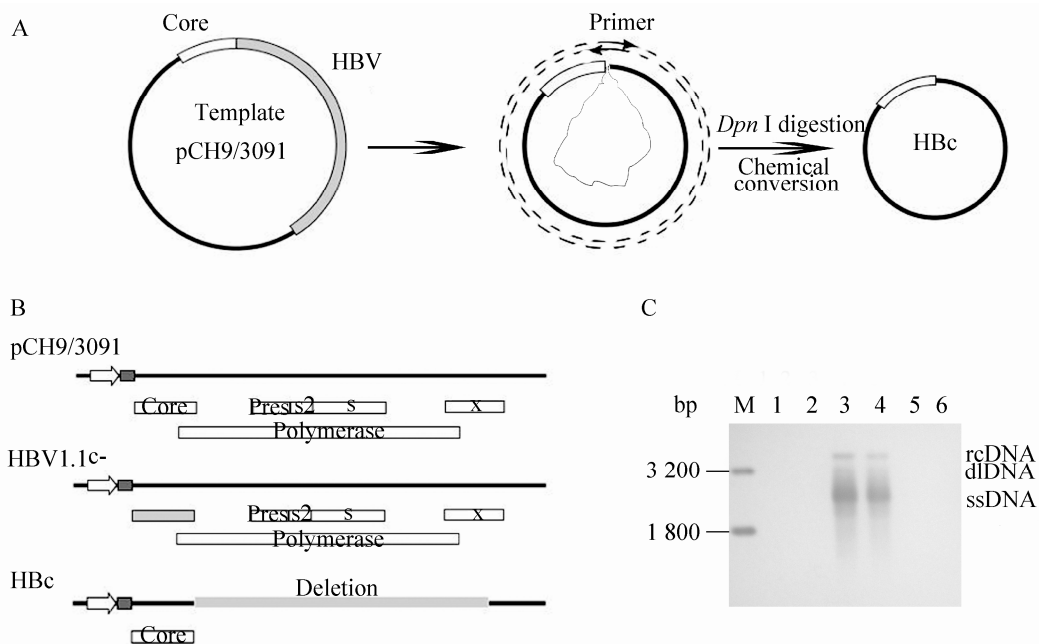


图 2 HBV1.1c⁻ 及 HBc 的构建及功能鉴定

Fig. 2 Construction of HBV1.1c⁻ and HBc and functional characterization. (A) The principle of RLIC to delete a fragment from a plasmid. (B) Diagram of pCH9/3091, HBV1.1c⁻ and HBc. (C) Detection of HBV DNA by Southern blotting. M: marker; 1-4: HBV DNA extracted from HEK293 cells cotransfected with different clones of HBc and HBV1.1c⁻. 1: HBc1+HBV1.1c⁻4; 2: HBc1+HBV1.1c⁻5; 3: HBc3+HBV1.1c⁻4; 4: HBc3+HBV1.1c⁻5; 5 and 6: negative control (transfection only with HBV1.1c⁻4 or HBV1.1c⁻5). HBc1 and HBc3 are two different clones of HBc. HBV1.1c⁻4 and HBV1.1c⁻5 are two different clones of HBV1.1c⁻. ssDNA: single stranded DNA.

HBc 质粒仅需带有 HBVc 基因及转录终止信号,我们以 pCH9/3091 为基础,使用类似 RLIC 原理的方法(图 2),具体为:设计一对完全互补的引物,引物两端序列分别与缺失目标序列两端同源,用该对引物进行替换反应,以去掉除了 HBc 及终止信号^[21]以外的其他 HBV DNA。选择测序正确的 HBc 克隆质粒 HBc1、HBc3,分别与 HBV1.1c⁻克隆质粒 HBV1.1c⁻4、HBV1.1c⁻5 共转染 HEK293 细胞,对二者进行功能鉴定,二者具有正常功能的标准为:能支持 HBV 复制。HBV 复制中间体的

Southern blotting 结果显示(图 2),HBc3 与 HBV1.1c⁻4/5 共转染后,可观察到复制中间体形成^[22],提示二者均保留了正常功能,支持 HBV 复制。

2.2 钉突部位融合 EGFP 的重组 HBc 功能鉴定

在将 HBc aa79-80 替换成 EGFP 时,为了尽可能降低插入蛋白和本体蛋白在三维结构上的相互干扰,以减小对各自功能的影响,我们在插入位置设计了两种连接接头。一种是柔性接头,即在 EGFP 与 HBc 的两侧连接处,分别以多甘氨酸 2G₄S 连接^[14](HBc gfp-flex, 图 3),另

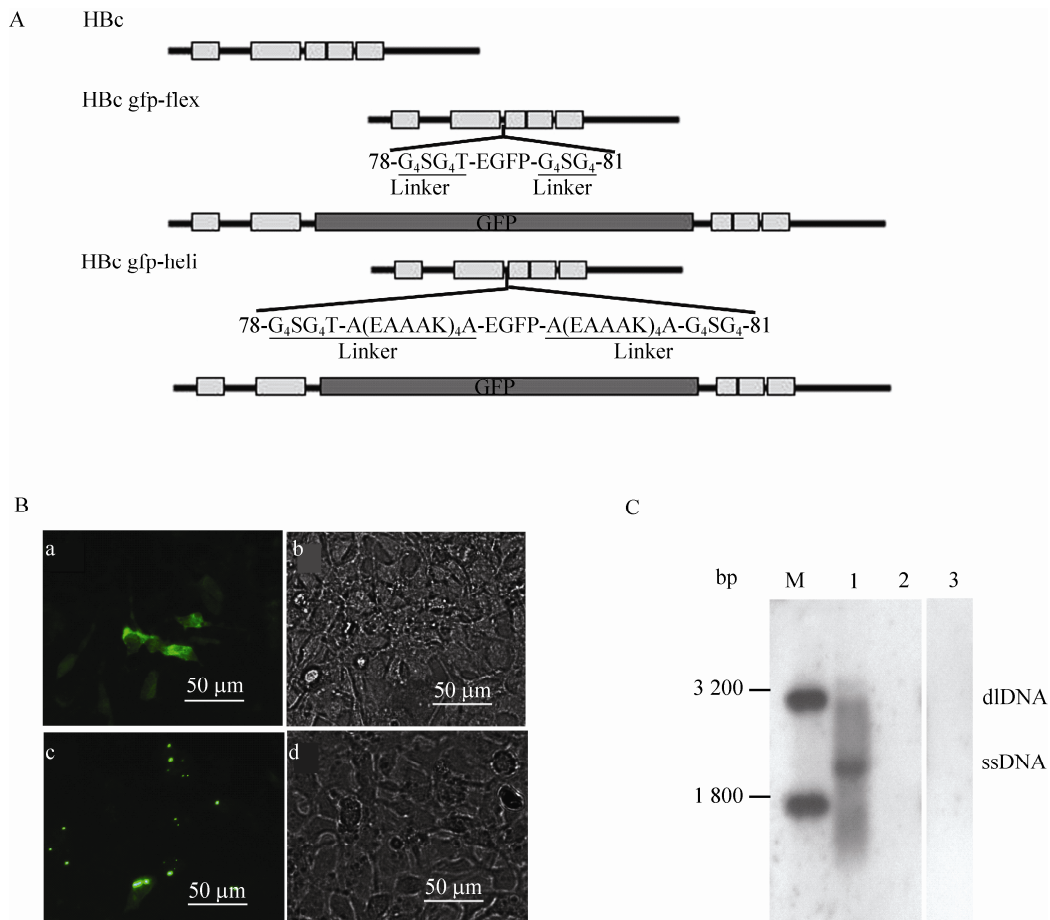


图 3 HBc-EGFP 的功能鉴定

Fig. 3 Functional characterization of HBc-EGFP. (A) Structure of HBc, HBc gfp-flex and HBc gfp-heli. (B) Observation of green fluorescence in HEK293 cells transfected with different constructs (a, b: HBc gfp-flex; c, d: HBc gfp-heli). (C) Detection of HBV replication intermediates by Southern blotting: M: marker; 1: HBc+HBV1.1c⁻; 2: HBc gfp-flex+HBV1.1c⁻; 3: HBc gfp-heli+HBV1.1c⁻.

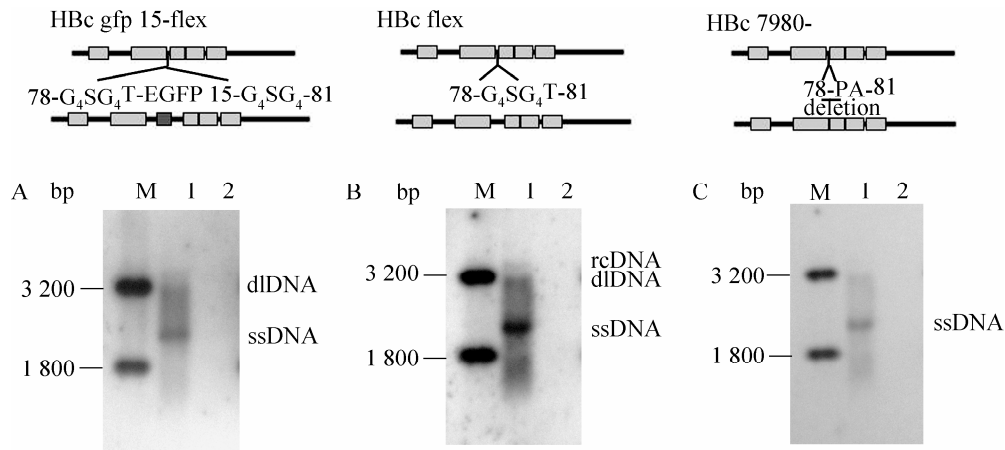


图4 HBc aa79~80 短片段替换及缺失对其功能的影响

Fig. 4 Impact of short insertion or deletion at aa79-80 of HBc on its function. (A) The structure and functional assay of HBc gfp15-flex. M: marker; 1: positive control HBc+HBV1.1c⁻; 2: HBc gfp15-flex+HBV1.1c⁻. (B) The structure and functional assay of HBc flex. (C) The structure and functional assay of HBc7980⁻.

一种是柔性+刚性接头，即在 2G4S 与 EGFP 之间，分别增加一段可形成 α 螺旋的序列 A (EAAAK)₄A^[23] (HBc gfp-heli, 图 3)。测序正确的 HBc gfp-flex/HBc gfp-heli 重组质粒，分别与 HBV1.1c⁻ 以 1 : 1 (摩尔比) 共转染 HEK293 细胞，转染 24 h 后开始观测到荧光，随时间延长，荧光增强。图 3 所示为 48 h 的荧光情况。HBc gfp-flex 产生的荧光蛋白在细胞内分布均匀，强度较转染 pEGFP-N1 弱，提示受融合蛋白间的相互影响，正确折叠的 EGFP 减少。HBc gfp-heli 产生的荧光表现不同，在细胞内呈现分散的点状荧光。

2.3 aa79-80 位置短片段替换影响 HBc 的正常功能

由于钉突部位融合 EGFP 的重组 HBc 可产生绿色荧光，但不支持 HBV 复制，提示尽管至少部分 EGFP 可进行正确折叠 (正确的三维结构是其发荧光的前提)^[24]，但至少部分 HBc 未

获得正确折叠。我们接下来希望知道，是否是因为插入的 EGFP 片段过大，而影响了 HBc 的正常功能？为此，我们将插入片段逐步缩小，使替换的片段分别为 EGFP 的 15 个 aa+柔性接头 (HBc gfp15-flex), 10aa 柔性接头 (HBc flex), 以及仅缺失 aa79~80 (HBc 7980⁻)。将这些质粒分别与 HBV1.1c⁻ 共转染 HEK293 细胞，然后提取细胞内核心颗粒 DNA, Southern blotting 检测 HBV 复制中间体。结果显示，这 3 种结构的质粒均未检测到病毒复制信号，而阳性对照 (野生型 HBc+HBV1.1c⁻) 可见明显复制。

3 讨论

HBc 三维结构中的钉突部位 (aa78~82) 位于核衣壳表面，其部位的抗原充分暴露，非常有利于与抗体结合，常作为植入外源抗原的部位^[25]，但通常植入这些抗原的目的，是为了利用 HBc 可聚合成较大颗粒的特性，获得更好的免疫原性，并不关心是否保留 HBc 的主要功能，

即支持 HBV 复制。本研究旨在对 HBc 钉突 aa79~80 处进行改造, 插入标记蛋白 EGFP, 希望在对 HBc 进行标记的同时, 保留 HBc 支持 HBV 复制的正常功能。

在本研究中, 我们首先采用类似 RLIC 原理的大片段缺失方法, 构建了一系列重组质粒, 包括 HBc 及 3 种 HBc-EGFP 截短质粒。该方法利用同源序列退火和线性扩增, 原理本质上仍是 RLIC, 区别只是用短的片段替换目标载体上较长的片段, 而 RLIC 是用大的片段替换载体上的较短区域, 结果一个是基因缺失, 一个是基因插入。该方法使用时, 对缺失片段大小及缺失位置无限制, 本研究中的几种缺失片段大小为数百或数千 bp, 这些结果显示, RLIC 是一种基因工程改造的有力工具。

我们在插入蛋白两端设计了两种连接接头, 一种柔性接头和一种刚性接头。两种重组 HBc 转染 HEK293 细胞后均能发出绿色荧光, 提示至少部分 EGFP 均获得了正确折叠。然而, 两种 HBc-EGFP 重组体所呈现的荧光表现明显不同, 柔性接头连接者荧光均匀, 而刚性接头者荧光呈分散点状, 我们推测, 导致荧光点状分布的原因可能有: 1) HBc-EGFP 分子间自发聚集成团, 导致荧光成点状; 2) 重组蛋白滞留在某种细胞器, 不能进行正常运转。究竟何种机制导致这种表型尚待进一步研究, 无论如何, 这种表型的改变应该与刚性接头的加入有关。在对 HBc-EGFP 的功能进行检测时, 我们未能检测到病毒复制信号, 可能的原因是融合的 EGFP 破坏了 HBc 的正确结构, 或者仅有少部分保留了正确结构而不足以被检测到。为了验证是否因为 EGFP 为较大的分子 (238 aa) 而影响了 HBc 蛋白的结构与功能, 我们缩短融合蛋

白分子, 其中一种仅为缺失 aa79~80, 发现这些分子仍不支持 HBV 复制, 这提示 aa79~80 对于维持 HBc 的正常功能较为重要。Matthias 等^[26]证明, HBc 蛋白缺失第 80 位氨基酸可支持 HBV 复制, 因此我们认为 aa79 可能为 HBc 支持 HBV 复制不可缺失的氨基酸。

致谢 感谢美国 Drexel 大学医学院 Dr. Guo Haitao 对本文的审阅。

REFERENCES

- [1] Liaw YF, Chu CM. Hepatitis B virus infection. *Lancet*, 2009, 373(9663): 582-589.
- [2] McMahon B. Epidemiology and natural history of hepatitis B. *Semin Liver Dis*, 2005, 25(Suppl 1): 3-8.
- [3] Dane DS, Cameron CH and Briggs M. Virus-like particles in serum of patients with Australia-antigen-associated hepatitis. *Lancet*, 1970, 295(7649): 695-698.
- [4] Heermann KH, Goldmann U, Schwarz W, et al. Large surface proteins of hepatitis B virus containing the pre-s sequence. *J Virol*, 1984, 52(2): 396-402.
- [5] Steven AC, Conway JF, Cheng NQ, et al. Structure, assembly and antigenicity of hepatitis B virus capsid proteins. *Adv Virus Res*, 2005, 64: 125-164.
- [6] Chang C, Zhou S, Ganem D, et al. Phenotypic mixing between different hepadnavirus nucleocapsid proteins reveals C protein dimerization to be cispreferential. *J Virol*, 1994, 68(8): 5225-5231.
- [7] Pumpens P, Grens E. Hepatitis B core particles as a universal display model: a structure-function basis for development. *FEBS Lett*, 1999, 442(1): 1-6.
- [8] Crowther RA, Kiselev NA, Bottcher B, et al.

- Three-dimensional structure of hepatitis B virus core particles determined by electron cryomicroscopy. *Cell*, 1994, 77(6): 943–950.
- [9] Konig S, Beterams G, Nassal M. Mapping homologous interaction sites in the hepatitis B virus core protein. *J Virol*, 1998, 72(6): 4997–5005.
- [10] Wynne SA, Crowther RA, Leslie AGW. The crystal structure of the human hepatitis B virus capsid. *Molecular Cell*, 1999, 3(6): 771–780.
- [11] Conway JF, Cheng N, Zlotnick A, et al. Hepatitis B virus capsid: localization of the putative immunodominant loop (residues 78 to 83) on the capsid surface, and implications for the distinction between c and e-antigens. *J Mol Biol*, 1998, 279(5): 1111–1121.
- [12] Pollack JR, Ganem D. An RNA stem-loop structure directs hepatitis B virus genomic RNA encapsidation. *J Virol*, 1993, 67(6): 3254–3263.
- [13] Yeh CT, Liaw YF, Ou JH. The arginine-rich domain of hepatitis B virus precore and core proteins contains a signal for nuclear transport. *J Virol*, 1990, 64(12): 6141–6147.
- [14] Kratz PA, Bottcher B, Nassal M. Native display of complete foreign protein domains on the surface of hepatitis B virus capsids. *Biochemistry*, 1999, 38(5): 1915–1920.
- [15] Gallina A, Bonelli F, Zentilin L, et al. A recombinant hepatitis B core antigen polypeptide with the protamine-like domain deleted self-assembles into capsid particles but fails to bind nucleic acids. *J Virol*, 1989, 63(11): 4645–4652.
- [16] Nassal M. The arginine-rich domain of the hepatitis B virus core protein is required for pregenome encapsidation and productive viral positive strand DNA synthesis but not for virus assembly. *J Virol*, 1992, 66(7): 4107–4116.
- [17] Huang Y, Tao Y, Zhang WL, et al. A new method for DNA molecular cloning. *Sci Sin Vitae*, 2011, 41(9): 722–729 (in Chinese).
- 黄媛, 陶颖, 张文露, 等. 一种新的 DNA 分子克隆方法. *中国科学*, 2011, 41(9): 722–729.
- [18] Aslanidis C, de Jong PJ. Ligation-independent cloning of PCR products (LIC-PCR). *Nucleic Acids Res*, 1990, 18(20): 6069–6074.
- [19] Cui J, Hu JL, Zhang WL, et al. Analysis of hepatitis B virus replication in vitro by chemiluminescent detection method. *Biotechnology*, 2009, 19(2): 44–46 (in Chinese).
- 崔静, 胡接力, 张文露, 等. 化学发光法检测体外 HBV 复制. *生物技术*, 2009, 19(2): 44–46.
- [20] Seeger C, Mason WS. Hepatitis B virus biology. *Microbiol Mol Biol*, 2000, 64(1): 51–68.
- [21] Paran N, Ori A, Haviv I. A composite polyadenylation signal with TATA box function. *Mol Cell Biol*, 2000, 20(3): 834–841.
- [22] Rieger A, Nassal M. Specific hepatitis B virus minus-strand DNA synthesis requires only the 5' encapsidation signal and the 3'-proximal direct repeat DR1. *J Virol*, 1996, 70(1): 585–589.
- [23] Arai R, Ueda H, Kitayama A, et al. Design of the linkers which effectively separate domains of a bifunctional fusion protein. *Protein Eng*, 2001, 14(8): 529–532.
- [24] Niwa H, Inouye S, Hirano T, et al. Chemical nature of the light emitter of the aqueous green fluorescent protein. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1996, 93(24): 13617–13622.
- [25] Borisova G, Arya B, Dislers A, et al. Hybrid hepatitis B virus nucleocapsid bearing an immunodominant region from hepatitis B virus surface antigen. *J Virol*, 1993, 67(6): 3696–3701.
- [26] Koschel M, Oed D, Gerelsaikhan T, et al. Hepatitis B virus core gene mutations which block nucleocapsid envelopment. *J Virol*, 2000, 74(1): 1–7.

(本文责编 郝丽芳)