

國立台灣大學醫學院微生物學研究所



碩士論文

Graduate Institute of Microbiology

College of Medicine

National Taiwan University

Master Thesis

探討 B 型肝炎病毒剪接 RNA 衍生之蛋白質對病毒複製  
之影響

Investigate the Function of HBV Spliced RNA Derived  
Protein Product in Viral Replication

邱宜亭

Yi-Ting Chiu

指導教授：葉秀慧 教授

Advisor: Shiou-Hwei Yeh, Ph.D.

中華民國 106 年 7 月

July 2017

國立臺灣大學 (碩) 博士學位論文  
口試委員會審定書

中文題目：探討B型肝炎病毒剪接RNA衍生之  
蛋白質對病毒複製之影響。

英文題目：Investigate the function of HBV spliced RNA  
derived protein product in viral replication

本論文係邱宜亭君(學號r04445106)在國立臺灣大學微生物學所完成之碩(博)士學位論文，於民國106年7月26日承下列考試委員審查通過及口試及格，特此證明

口試委員：

葉永慧

(簽名)

(指導教授)  
陳培哲

吳慧琳

系主任、所長

邱建福

(簽名)

## 誌謝



首先很感謝葉秀慧老師給予我進入實驗室參與研究的機會。老師總是充滿著正能量，並有耐心地不斷鼓勵及給予我實驗上的指導。在老師的帶領下我學習邏輯地思考，做研究的方法與態度，以及如何在台上完整且精彩的報告、表達。另外也很感謝陳培哲老師及吳慧琳老師透過幾次的報告及口試，在研究領域上給予我指導及寶貴意見。

同時感謝實驗室的學長姐們；思嘉學姐、聖涵學長、瑜珊學姐、雅筠學姐、雅紋學姐、巧玲學姐、楷為學長、慕帆學長、Toby 學姐、卓嶽學長、柔辰學姐，以及幫我們處理實驗室繁瑣事物跟材料訂購等的行政助理雲露姐姐，無論是生活上還是實驗上在我遇到困難時，學長姐總是有耐心地解說、替我解惑，不但教導我實驗技術上的操作技巧，使我少走冤枉路，我也從學長姐身上學到許多終身受用態度與習慣。最後感謝一起奮鬥的好夥伴禹杉、承彧，以及季伶、玉婷、怡君學妹們的包容與陪伴。在實驗室兩年的時光，大家一同分享開心的事，一同努力，彼此遇到挫折時互相加油打氣，一起朝前邁進，覺得有你們真好！

最後要感謝我的母親，從小給予我支持，更是我溫暖牢靠的避風港，使我能無後顧之憂的學習。在此祝福大家身體健康，事事順心。

## 摘要

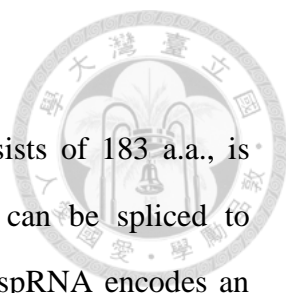
B 型肝炎病毒(Hepatitis B virus; HBV)之 pregenomic RNA (pgRNA)可直接轉譯出核殼蛋白(HBV core protein; HBc)，或經剪接(splicing)產生 SP1 spRNA 再轉譯出相較於 wild-type HBc 缺少 C 端最後一個胺基酸 Cys183 之 truncated HBc (HBc')。由於 wild-type HBc 與 SP1 spRNA 所產生的 HBc'蛋白質在負責病毒 nucleocapsid 組裝的 N-terminal domain 胺基酸序列完全相同，因此推論在 HBV 進行複製過程中，HBc'可能會與 wild-type HBc 形成 dimer，進一步組裝成 capsid，而同時存在於 HBV capsid 中。然而 HBV capsid 中 HBc 及 HBc'蛋白在病毒複製過程中所扮演的功能性角色有無差異仍有待進一步釐清。

本研究利用點突變建構只表現 HBc 及 HBc'的 HBV replicon 質體，並分析其所組成的 capsid 對於 HBV replication cycle 中各個步驟，包括 RNA encapsidation、DNA 複製，至後續進行包膜(envelopment)並釋出到細胞外之可能功能是否有差異。比較 WT 及 HBc-與 HBc'- HBV replicon 於細胞中複製情形時，為確認細胞中 capsid 含量，進一步以 sucrose gradient 分離 HBc (HBc')之 dimer form 與 capsid form，結果發現 HBc-與 HBc'- HBV replicon 之 capsid 相較於 WT replicon 有減少現象。但藉由分析細胞內 capsid-RNA 及 capsid-DNA 的表現量，發現 HBc 及 HBc'對於 RNA encapsidation，及進行後續反轉錄(reverse transcript)以產生 capsid-DNA 之病毒複製步驟上無顯著功能之差異。進一步探討 HBc 與 HBc'是否會影響已經完成複製的 capsid 進行後續 envelopment，並且釋放至細胞外之過程，結果發現 HBc-HBV 與 HBc'-HBV replicon 釋放至細胞外的病毒顆粒有所差異，指出 wild-type HBc 可能參與 capsid 進行 envelopment 並釋放至細胞外的過程。

本研究結果首度指出 HBV capsid 中 HBc 及 HBc' 蛋白在病毒複製過程中可能扮演不同的角色，未來將針對 HBc-與 HBc'- HBV replicon 所產生之 capsid 減少的機制及 HBc 蛋白決定 capsid 成功 envelopment 之假說進行進一步探討。

**關鍵詞：**B 型肝炎病毒、核殼蛋白、RNA 剪接、病毒複製

## Abstract



The hepatitis B virus (HBV) core protein (HBc), which consists of 183 a.a., is encoded by the viral pregenomic RNA (pgRNA). The pgRNA can be spliced to generate several splicing RNAs (spRNAs). Among them, the SP1 spRNA encodes an HBc homolog, namely HBc', which is lack of only one cysteine residue at the very C terminal end of HBc. The HBc protein contains two functional domains, the N terminal 1-149 a.a. responsible for nucleocapsid assembly and the C terminal 150-183 a.a. attributing to the nucleic acid binding. Therefore, both HBc and HBc' proteins contain the identical N terminal assembly domain, which could form dimer and be assembled into the capsids. It will be interesting to address if any functional difference between HBc and HBc' proteins in capsid in the viral replication cycle.

This study took the approach to generate the HBV replicon constructs, which express either HBc or HBc' protein only, to examine the functional effect on each viral replication step, including the RNA encapsidation, reverse transcription of RNA to viral DNA, and also the envelopment/release of virion. We have also conducted the sucrose gradient analysis to examine the amount of dimer and capsids for each construct. Compared with the wild type replicon, though the capsid amount in HBc- and HBc'-replicon transfected cells is decreased, both the RNA encapsidation and the DNA synthesis is not affected by depletion of either HBc or HBc'. However, we found that the envelopment of the capsids is different between HBc-replicon and HBc'-replicon, indicating a critical role of HBc in the viral envelopment process.


The preliminary results of this study indicated that the HBc and HBc' protein in the capsid might play distinct function in viral replication cycle. It forms a basis for future investigation of the functional role and mechanism for HBc and HBc' in determination of amount and envelopment of viral capsids.

**Keywords:** hepatitis B virus, nucleocapsid, RNA splicing, viral replication.

# 目錄



誌謝 .....	i
摘要 .....	ii
Abstract .....	iii
圖表目錄 .....	vi
第一章 序論 .....	1
1.1 Hepatitis B virus (HBV)簡介 .....	1
1.2 HBV 的生活史 .....	1
1.3 HBV 核殼蛋白之結構與功能 .....	2
1.4 HBV RNA 剪接(Splicing).....	4
1.5 SP1 spRNA 所轉譯之 truncated HBc 介紹 .....	4
第二章 研究假說與策略 .....	6
第三章 實驗材料與方法 .....	7
2.1 質體 .....	7
2.2 點突變 (Site-directed mutagenesis).....	8
2.3 細胞培養 (Cell culture) .....	9
2.4 細胞轉染 (Transfection).....	10
2.5 蛋白質抽取 .....	10
2.6 細胞外病毒顆粒之純化 .....	11
2.7 Sucrose gradient.....	11
2.8 西方墨點法 (Western blot) .....	11
2.9 HBV capsid 之偵測 .....	12
2.10 細胞 RNA 萃取 .....	12
2.11 純化 HBV nucleocapsid 內之 DNA .....	13
2.12 純化 HBV nucleocapsid 內之 RNA.....	13
2.13 北方墨點法 (Northern blot) .....	14
2.14 南方墨點法 (Southern blot) .....	15
第四章 實驗結果 .....	16



4.1 建構只表現 HBc 及 HBc' 的 HBV replicon 質體.....	16
4.2 分析不同抗體對 HBc 與 HBc' protein 及 capsid 之辨認性.....	16
4.3 比較 WT 及 mutant HBV replicon 於細胞中複製情形.....	17
4.4 利用 Sucrose gradient 比較 WT 及 mutant HBV replicon 於細胞中所生成 capsid 量的多寡.....	18
4.5 比較細胞轉染 WT 及 mutant HBV replicon 後釋放至細胞外之不同病毒顆粒之特性.....	19
4.6 破壞病毒 splicing acceptor site 487/488 探究 HBc' 之功能.....	21
4.7 藉由 Hydrodynamic injection mouse model <i>in vivo</i> 驗證 HBc' 於病毒複製之功能.....	21
4.8 HBV capsid 中 wild-type HBc 及 HBc' 功能之假說.....	22
4.9 於 HBc' replicon 共轉染 HBc 表現質體探討 HBc 對 capsid envelopment 之重要性.....	23
4.10 藉由抑制 lysosome、autophagy 降解路徑檢驗 HBc' 於穩定 HBc-capsid 之功能.....	24
<b>第五章 討論.....</b>	<b>25</b>
<b>參考文獻.....</b>	<b>27</b>
<b>圖表.....</b>	<b>33</b>

## 圖表目錄

圖一、建構只表現 HBc 及 HBc' 的 HBV replicon 質體.....	33
圖二、分析不同抗體對 HBc 與 HBc' protein 及 capsid 之辨認性.....	35
圖三、比較 WT 及 mutant HBV replicon 於 Huh7 細胞中複製情形 .....	36
圖四、利用 sucrose gradient 分析 WT 及 mutant HBV replicon 於細胞中 HBc (HBc')-dimer form 與 capsid form 之比例.....	37
圖五、比較細胞轉染 WT 及 mutant HBV replicon 後釋放至細胞外之不同病毒顆粒 .....	39
圖六、於 Huh7 細胞破壞病毒 splicing acceptor site 487/488 對 HBV 之影響 .....	40
圖七、藉由 Hydrodynamic injection mouse model <i>in vivo</i> 驗證 HBc' 於病毒複製之功 能.....	41
圖八、HBV capsid 中 wild-type HBc 及 HBc' 功能之假說 .....	43
圖九、利用 HBc' replicon 共轉染 HBc 表現質體探討 HBc 對 capsid envelopment 之 重要性.....	44
圖十、藉由抑制 autophagy、lysosome degradation 檢驗 HBc' 於穩定 HBc-capsid 之 可能功能.....	46



# 第一章 序論



## 1.1 Hepatitis B virus (HBV)簡介

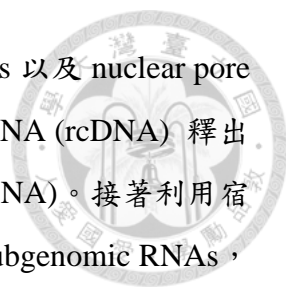
B 型肝炎病毒(Hepatitis B virus ; HBV)屬於 Hepadnaviridae family，其遺傳物質為部份雙股環狀(partially double-stranded circular) DNA，約 3.2 kb，包含一股全長的負股 DNA 及另一股較短的正股 DNA (1)，依基因序列差異分成八種基因型(genotypes)，包括基因型 A – H (2)。

儘管目前已有 HBV 疫苗，全世界約有 3.5 億人為 HBV 帶原者，HBV 帶原者臨床可發展成慢性肝炎、肝硬化(cirrhosis)或是肝細胞癌(hepatocellular carcinoma；HCC)，而在台灣約 80%之肝細胞癌與 HBV 感染有關，且全球每年約有 60 萬人死於 HBV 所引起的相關疾病，是全球重要的健康議題之一 (3, 4)。

HBV 基因體具有四個部份重疊的 open-reading frames (ORFs): Polymerase (P)、Surface (S)、Core (C)及 X ORF，可轉錄出 pregenomic RNA (pgRNA)以及 subgenomic RNAs。pgRNA 約為 3.5 kb，除了作為 HBV 反轉錄(reverse transcript)的 template 以外，還可轉譯出 DNA 聚合酶(polymerase)及 core protein (HBc)。HBc 可組裝形成直徑為 27 nm 的二十面體 nucleocapsid，裡面包裹 HBV 基因體以及聚合酶。除了 pgRNA 外，包括 3.5 kb、2.4kb、2.1kb、及 0.7-kb 四條 subgenomic RNA 亦各會轉錄出不同病毒蛋白質：3.5 kb 的 precore mRNA 會產生 N 端帶有訊息胜肽(signal peptide)的 precore protein，25-kDa precore protein 會被帶往內質網進行切割修飾，首先切除 N 端的 signal peptide 產生 22-kDa precore protein，接著再切除 C 端，最終形成 17-kDa HBe antigen 分泌到細胞外(5)；2.4 及 2.1 kb 的 pre-S/S mRNAs 則產生三種表面蛋白：large、middle 以及 small surface protein，共同組成病毒顆粒的外套(2, 6, 7)；而最小的 0.7-kb mRNA 則會產生 X protein，參與調控病毒與宿主基因的轉錄，可促進 HBV 複製(8-10)。

## 1.2 HBV 的生活史

目前已知 HBV 會利用其外套膜上的表面抗原與表現在肝臟細胞表面的穿膜運輸蛋白 sodium taurocholate cotransporting polypeptide (NTCP)接受器結合以進入肝



臟細胞中(11)，之後 nucleocapsid 會經由 nuclear transport receptors 以及 nuclear pore complexes 的幫忙，進到核孔脫殼，將遺傳物質 relaxed circular DNA (rcDNA) 釋放到細胞核中(12)，並修補成 covalently closed circular DNA (cccDNA)。接著利用宿主的 RNA polymerase II 轉錄出 pregenomic RNA (pgRNA) 以及 subgenomic RNAs，再送出至細胞質轉譯出病毒蛋白，包括聚合酶(polymerase)、核殼蛋白(core protein)、precore protein、表面蛋白(surface protein)、以及 X protein。

其中 pgRNA 轉譯出 core protein 以及聚合酶，聚合酶會和 pgRNA 上的  $\epsilon$  stem-loop 結合，而後 core protein 會進行 encapsidation，將 pgRNA 與聚合酶一同包裹於其中(13-17)。接著利用聚合酶的反轉錄酶(reverse transcriptase)活性以其位置 63 的 tyrosine 當作引子，啟動負股 DNA 合成(18-20)；當負股 DNA 合成完成，會利用聚合酶帶有的 Rnase H 活性將 pgRNA 分解，殘留 5' 端約 17 個核苷酸的 RNA 當作引子，以負股 DNA 為模板，引子會結合到負股 DNA 5' 端的 11 個核苷酸 DR2 序列，此過程稱為 primer translocation (21, 22)，啟動正股 DNA 合成，起初會往模板的 5' 端合成，接著會轉移到模板的 3' 端繼續合成出正股 DNA，此過程稱為 circularization，最後形成 rcDNA (22, 23)。之後成熟的 nucleocapsid 會經由 Nedd4、 $\gamma$  2-adaptin 的幫忙移動到 multivesicular body (MVB)，藉由 endosomal sorting complex required for transport (ESCRT) system 於 MVB 途徑進行包膜(24, 25)，形成完整具感染性的病毒顆粒(Dane particle)釋放到細胞外。

另外，受 HBV 感染的細胞還會分泌由表面蛋白組成的 HBsAg particles、不具外套膜的 naked capsid particles，以及 HBe antigen (26, 27)。Naked capsid 和具有外套膜的完整病毒顆粒之釋放機制不同，Naked capsid 釋放不需要 ESCRT 的參與，但可能受到 Alix (apoptosis-linked gene 2 (ALG-2)-interacting protein)的調控(28)。

### 1.3 HBV 核殼蛋白之結構與功能

HBV core protein (HBc)依據不同 genotype 由 183 或 185 個胺基酸組成，約 21-kDa，主要可分成兩個功能區：第 1-149 個胺基酸(N-terminal domain；NTD)為 assembly domain，主要負責病毒 nucleocapsid 之組裝。首先 2 個 core protein 單體(monomer)會藉由位置 61 的 Cysteine 以 disulfide bond 連結形成二聚體(dimer)，並以二聚體為聚合單位，組成 T (Triangulation number) = 3 (含有 90 個二聚體)或 4 (含

有 120 個二聚體)的 nucleocapsid。在 Dane particle 中的 nucleocapsid 大部分為 T = 4，約佔 95% (29-31)。研究發現在 *Escherichia coli* (*E. coli*) 只表現 NTD 時，便能組裝形成完整的 nucleocapsid，且與 full-length core protein 組成的 nucleocapsid 外觀型態無異(32, 33)，然而 nucleocapsid 結構的穩定性仍然會受到 HBc C-terminal domain (CTD) 的影響(34)。

HBV core protein 第 150-183/185 個胺基酸(CTD)富含帶正電荷的 arginine，具有可跟帶負電荷的核酸結合的能力(35)，為 nucleic acid binding domain，或稱為 arginine-rich domain (ARD)，負責病毒 reverse transcriptase-pgRNA complex 之包裹(encapsidation)。先前研究利用建構表現各種不同長度的 C-terminally truncated core protein 之質體，來分析 core protein C 端之重要性，結果發現當只有 core protein N 端 1-149 這段胺基酸序列時，組成的 nucleocapsid 不具有包裹 HBV 核酸之能力(36)；而利用 RNase protection assay，顯示 core protein C 端 144-164 這段胺基酸序列對 pgRNA 之包裹是必須的(37)。

HBV core protein 除了作為 HBV 主要的結構蛋白，還參與病毒的複製，由於 HBV pgRNA 必須先和 viral polymerase 一同被包裹至 capsid 才能進行反轉錄，因此當缺乏 HBV capsid 時，HBV polymerase 便無法將 pgRNA 反轉錄成 rcDNA genome (38-40)，另外，在 HBV core protein -CTD 有三段重複序列：SPRRR motifs，S155、S162、S170 為其主要的磷酸化位點(41)，研究指出 HBV core protein -CTD 的對於病毒的複製是相當重要的，包含利用 endogenous polymerase reaction 之實驗，指出 core protein C 端 165-173 這段胺基酸序列對於 HBV DNA 合成是重要的(37)，以及突變 HBV core protein-CTD 上的 Arginine clusters 和磷酸化位點都會影響 HBV 複製(42-47)。

另外有研究利用 deletion 方式，指出 nucleocapsid 中 HBV core protein -CTD 最後十個胺基酸是引發抗病毒免疫反應的關鍵。於 hydrodynamics-based mouse model 之實驗在缺乏 HBV core protein、HBV core protein 無法形成 nucleocapsid、以及 nucleocapsid 形成但 CTD 缺少十個胺基酸時，皆無法產生對抗 HBV 的免疫反應，並導致 HBV persistence (48, 49)。進一步研究發現 HBV core 對於 tumor necrosis factor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) 的產生扮演重要角色，並可促進免疫系統清除 HBV (50)。



## 1.4 HBV RNA 剪接(Splicing)

HBV 除了會產生 pregenomic RNA (pgRNA) 以及 subgenomic RNAs 等未經剪接 (unspliced) 之 RNA 外，還有許多經剪接 (spliced ; sp) 之 HBV RNAs 在 HBV 感染的肝臟、HBV DNA-transfected cell lines 以及 HBV-transgenic mice 被報導(51-58)。

大部分的 spliced HBV RNA 皆由 3.5 kb precore RNA 及 pgRNA 產生，且至目前為止已有 5 個 splice donor sites 及 5 個 splice acceptor sites 被發現，可組合產生 single-spliced、double-spliced 甚至是 triple-spliced RNA (59, 60)。這些 spliced RNAs 可做為 translation templates，產生許多 non-canonical HBV 蛋白質，而從 pgRNA 產生的 spliced RNA 因具有完整的  $\varepsilon$  stem-loop 結構，還可於病毒複製過程中被包裹至 capsid，進一步反轉錄成 HBV DNA，產生 defective HBV (dHBV) particles (57, 60-62)。有研究顯示慢性 B 型肝炎病人血清中 dHBV particles 的含量與肝病嚴重程度及肝細胞癌 (hepatocellular carcinoma ; HCC) 發展有關(63, 64)。然而目前只有少數的 spliced HBV RNAs 被進一步研究，因此 spliced HBV genome 之生物意義及許多 splice-generated proteins 之功能皆尚待釐清。

1989 年 Dr. Su 研究團隊首先在 HBV DNA-transfected cell lines 發現的 2.2-kb SP1 為最常被偵測到的 spHBV variant，此 spliced HBV RNA 是由 precore/pgRNA 去除 1.3-kb intron (2447/489) 所產生(53)。2013 年的研究分析 HBV-producing hepatoma cells 內含的 spliced RNAs，發現 SP1 佔 spliced viral transcripts 的 20~30%，且依不同 genotype 會有所差異(65)。而 SP1 可能轉譯出 non-canonical HBV proteins 包含 truncated HBc/precore (C 端缺少最後一個胺基酸 Cys183)，N-terminal-truncated Pol (RT'-RH)，以及 HBV splice-generated protein (HBSP) (53) 【圖一；A】。

## 1.5 SP1 spRNA 所轉譯之 truncated HBc 介紹

SP1 由於 2447/489 位點 splicing 導致 Core ORF 最後一個胺基酸改變為終止密碼子(stop codon)，因此所轉譯出的 truncated HBc 相較於 wild-type HBc 缺少 C 端最後一個胺基酸 Cys183 (以下簡稱 HBc')。先前研究利用 complementation test，在無法表達 HBc 的 HBV DNA-transfected cell 回補能產生 HBc' 的 SP1，並利用 endogenous polymerase activity 分析，發現在培養液中含有 HBV-like particles，顯示 HBc' 能形成包裹病毒 genome 的 capsid 並釋出細胞(53)。但由於 HBc' 與 wild-type

HBc 蛋白質胺基酸序列十分相似，因此不易區分，直到近年 Dr. Suzuki 研究團隊利用 thiol-modifier 區分含有四個 Cys 的 wild-type HBc 及三個 Cys 的 HBc'蛋白質，結果顯示 HBV-producing hepatoma cells 內含有四個及三個 Cys 的兩種 HBV core 蛋白質。

HBc'蛋白的功能 1989 年在 HBV DNA-transfected cell lines 以 loss of function 的方式，突變 splice acceptor site 並以 endogenous polymerase activity 分析 HBV-like particles，認為此 splicing 的產物對於病毒複製不是必需的，但其功能仍須進一步研究(53)。另外，2015 年 Dr. Yuan 團隊利用建構無法產生 spliced RNA 之質體，*in vivo* 探討其對 HBV 病毒產生之影響。此研究將 splicing acceptor site 及其附近的序列 CCAG/GA (488/489) 改變成 CGTCCA 並且使 splicing donor site 及其附近的序列 AAT/GTT (2447/2448) 改變成 ATCCTT。然而此無法產生 spliced RNA 之質體其 HBc protein 最後兩個胺基酸序列從 Gln-Cys 改變成 His-Pro。實驗結果顯示無法產生 spliced RNA 的 HBV 其釋放至血清中之 HBV DNA、HBsAg 以及 HBeAg 皆與 WT HBV 無明顯差異(66)。因此直到現在，HBc'蛋白確切的功能仍沒有結論。

## 第二章 研究假說與策略



由於 wild-type HBc 與 SP1 spRNA 所產生的 HBc'蛋白質在負責病毒 nucleocapsid 組裝的 N-terminal domain 胺基酸序列完全相同，且 HBc'蛋白質仍然保有 dimerization 所需要的第 61 個胺基酸 Cysteine，因此推測細胞中可能存在 HBc/HBc' dimer (capsid 組裝的基本單位)，進而推論在 HBV life cycle，HBc'可能與 wild-type HBc 同時存在於 HBV capsid。先前研究利用在無法表達 HBc 的 HBV DNA-transfected cell 回補能產生 HBc'的 SP1，利用 endogenous polymerase activity 分析，結果顯示病毒 genome 與 polymerase 能被 capsid 包裹並釋出細胞，因此推測在 HBV life cycle 中病毒 genome 亦可能被 HBc'所形成之 capsid 包裹並進行複製。故 capsid 中 HBc 與 HBc'於病毒複製過程中所提供之不同功能值得被進一步探討。

先前 Dr. Yuan 研究團隊以 loss of function 的方式，利用突變 HBV replicon 之 splice donor site (2447/2448)及 splice acceptor site (488/489)去除 HBV 中 HBc'蛋白之表現，以探討 HBc'的功能，結果發現於 Hydrodynamic injection mouse model 及質體轉染細胞之系統，此突變病毒株所產生之 HBV 病毒 DNA 量以 qPCR 偵測沒有顯著差異(66)。然而先前之研究並未針對去除 HBc'所造成在 replication 過程中特定步驟之影響進行分析，因此 HBV capsid 中 HBc 及 HBc' 蛋白到底有無功能上的差異，及在病毒 replication 過程中所扮演特定的功能性角色仍有待進一步釐清。

本研究因此提出利用點突變方式改變 HBV replicon 中特定基因體序列，去除細胞中 HBc 及 HBc'蛋白質之生成，造成細胞中分別產生只有 wild-type HBc 及 HBc'的 HBV capsid，以探討失去 HBc 及 HBc'所組成的 capsid 對於 HBV replication cycle 中各個步驟，包括細胞內 RNA encapsidation 及 DNA 複製，至後續進行 envelopment 並釋出到細胞外之可能功能所造成之影響，藉以釐清 HBc 及 HBc'所扮演的功能性角色。

## 第三章 實驗材料與方法



### 2.1 質體

(A) pAAV-HBV1.2 WT :

含有 1.2 fold over-length HBV genotype A genome (nt 1400.3182/1.1989) , 為 replication-competent HBV plasmid 。

(B) pAAV-HBV1.2 precore null :

含有 1.2 fold over-length HBV genotype A genome (nt 1400.3182/1.1989) , 為 replication-competent HBV plasmid , 但將 HBV precore protein 胺基酸序列之 start codon ATG (methionine)突變成 ATT (isoleucine) , 因此不會產生 precore protein 。

(C) pAAV-HBV1.2 A487C :

含有 1.2 fold over-length HBV genotype A genome (nt 1400.3182/1.1989) , 為 replication-competent HBV plasmid , 但將 HBV genome 487 位點由 A 突變成 C , 此突變會破壞 487/488 splicing acceptor site (AG→CG) , 導致利用此位點的 splicing 作用皆無法發生 , 但不影響 ORF 涵蓋此處的 polymerase 及 HBs 胺基酸序列 。

(D) pAAV-HBV1.2 precore null - A487C :

含有 1.2 fold over-length HBV genotype A genome (nt 1400.3182/1.1989) , 為 replication-competent HBV plasmid , 但同時含有 precore protein 胺基酸序列之 start codon 突變(ATG→ATT)以及 487/488 splicing acceptor site 突變(AG→CG) 。

(E) HBV precore null - A487C - V50D :

於 pAAV-HBV1.2 precore null - A487C 質體增加 HBc protein 最後一個胺基酸由 TGT (Cysteine)突變成 TGA (stop) , 導致其所作出的 HBc protein 缺少最後一個胺基酸 C , 並導致 polymerase 胺基酸序列改變(V50N) , 及影響 2448/2449



splicing donor site (GT→GA)。

(F) HBV precore null - A487C - V50N :

於 pAAV-HBV1.2 precore null - A487C 質體增加 HBc protein 最後一個胺基酸由 TGT (Cysteine)突變成 TAG (stop), 導致其所作出的 HBc protein 缺少最後一個胺基酸 C, 並導致 polymerase 胺基酸序列改變(V50N), 及影響 2448/2449 splicing donor site (GT→AG)。

(G) HBV precore null - A487C - V50S :

於 pAAV-HBV1.2 precore null - A487C 質體增加 HBc protein 最後一個胺基酸由 TGT (Cysteine)突變成 TAA (stop), 導致其所作出的 HBc protein 缺少最後一個胺基酸 C, 並導致 polymerase 胺基酸序列改變(V50S), 及影響 2448/2449 splicing donor site (GT→AA)。

(H) pCMV-HBcWT :

以 pcDNA3.1 作為載體, 含有 HBV genotype A 全長 core protein 序列, 在細胞內藉由啟動 CMV promoter 表現出 HBV core protein, 並可組裝形成 capsid。

(I) pCMV-HBc' :

以 pcDNA3.1 作為載體, 含有 HBV genotype A core protein 1-184 序列, 在細胞內藉由啟動 CMV promoter 表現出缺少最後一個胺基酸 Cys 的 core protein, 並可組裝形成 capsid。

## 2.2 點突變 (Site-directed mutagenesis)

利用 QuickChange II XL Site-Directed Mutagenesis Kit (Agilent, CA), 將 pAAV-HBV1.2 precore null - A487C 質體之 HBc protein 最後一個胺基酸由 TGT (Cysteine)突變成三種 stop codon。

引子名稱	序列
pol-V50D	5'-CTCAATCTCGGGAATCTCAATGATAGTATTCCTTGGACTCATAAGG-3'
pol-V50N	5'-CTCAATCTCGGGAATCTCAATAATAGTATTCCTTGGACTCATAAGG-3'
pol-V50S	5'-CTCAATCTCGGGAATCTCAATAGTAGTATTCCTTGGACTCATAAGG-3'





試劑	最終濃度	反應體積 (μl/反應)
ddH <sub>2</sub> O	—	13.36
10x Reaction buffer	1X	2.50
Template (pAAV-HBV1.2 precore null - A487C 質體)	200 ng	0.89
F primer (10 uM)	0.8 uM	2.00
R primer (10 uM)	0.8 uM	2.00
QuickSolution	—	2.00
dNTP (10 mM)	0.5 mM	1.25
PfuUltra	—	1.00
total	—	25

接著，利用以下條件進行反應

	時間	溫度(°C)	循環數
Denature	1 min	95	—
Denature	50 secs	95	18
Annealing	50 secs	60	
Extension	15 min	68	
Extension	7 min	68	—
Hold	∞	4	—

反應結束後，於原管加入 DpnI (10U/μl) 於 37°C 作用一小時去除 template DNA。再取 2 μl 之產物，加至已用 β-ME 處理 30 分鐘的 XL10-Gold Ultracompetent cell 中進行轉型，於 12-16 小時挑單一菌落，抽取質體送定序確認突變點是否突變成功及其他序列的相符性。

## 2.3 細胞培養 (Cell culture)

將 Huh7 細胞培養於含有 DMEM、10% fetal bovine serum (FBS)、non-essential amino acids solution (NEAA)、QPSA 混合而成的培養液中，培養於 37°C、5% CO<sub>2</sub> 培養箱。繼代培養時，先去除培養液，以 1X PBS 清洗細胞一次，接著加入 trypsin 於培養箱中作用 2 分鐘，之後輕柔拍打使細胞懸浮再加入培養液中和，並將細胞

混合液置於 15 mL 離心管，以 1000 rpm 離心 2 分鐘，最後將上清液吸除，以培養液打散細胞後，以固定比例持續培養。



## 2.4 細胞轉染 (Transfection)

將細胞以約 7-8 成滿的量培養於 6-well plate (每 well 總體積 2 mL) 中，於 37 °C、5% CO<sub>2</sub> 培養箱中培養一天。隔日，將 4 μg replicon plasmid DNA 稀釋於 100 μl Opti-MEM 中；另外將 Lipofectamine 2000 reagent (Invitrogen) 稀釋於 100 μl Opti-MEM 中，靜置 5 分鐘。之後將含有 plasmid DNA 的 Opti-MEM 加入含有 Lipofectamine 的 Opti-MEM 中混合，靜置 20 分鐘。等待期間，將前一日培養於 6-well plate 的細胞之培養液換成不含 10% FBS 以 QPSA 的培養液，之後將 200 μl /well plasmid DNA 混合液直接加至細胞培養液中，搖勻後置於培養箱中培養。再於 5-6 小時後將培養液換成含有 10% FBS 以及 QPSA 的培養液，於 37°C、5% CO<sub>2</sub> 培養箱中培養。

## 2.5 蛋白質抽取

將細胞以 PBS 清洗一次，再加入 1 mL PBS 將細胞刮下來並移至離心管，在 4°C 下以 1000 rpm 離心 2 分鐘，去除 PBS 再加入 lysis buffer (8M urea 或 NET lysis buffer)，於冰上作用 10 分鐘並震盪以打破細胞。之後於 4°C 以 13000 rpm 離心 30 分鐘，收取上清液，並利用 Pierce™ BCA Protein Assay Kit (Thermo Scientific) 測定蛋白質濃度。

- (A) 8M urea lysis buffer：8M urea，使用前再加入 protease inhibitor、phosphatase inhibitor 及最終濃度為 2 mM DTT，此 lysis buffer 可完全打破 capsid，使 HBc 變成 monomer。
- (B) NET lysis buffer：50 mM Tris、1mM EDTA、100 mM NaCl 以 NaOH 調至 pH 8.0，再加最終濃度為 0.5% NP40，使用前加入 protease inhibitor 及 phosphatase inhibitor。



## 2.6 細胞外病毒顆粒之純化

收取細胞培養液，在 4°C 下以 2500 rpm 離心 20 分鐘，收取上清液，並以 0.22 mm filter 過濾，之後將 sample 以 PBS 補體積至 9 mL 並移入 Ultra centrifuge tube (Beckman coulter, SW-41)，後取 1 ml 20% sucrose 以自動吸管插入離心管底部並緩慢加入，以 Beckman Coulter Optima Ultracentrifuge L-90K 機台離心 25000 rpm，4°C，16 小時。離心完後將 centrifuge tube 中上清液倒掉，加入 1x PBS 於底部，並以 parafilm 封口，置於 4°C 回溶一天，隔日收取。

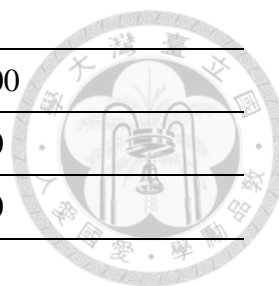
## 2.7 Sucrose gradient

於 Ultra centrifuge tube (Beckman coulter, SW-41) 內依序加入各 2 ml 之 15%、30%、45%、60% sucrose (配置於 gradien buffer: 50 mM pH 7.5 Tris-HCl, 50 mM NaCl, 1 mM pH 8.0 EDTA)，並將以 NET lysis buffer 抽取之蛋白質樣品 1 ml 放置於最上層。以 Beckman Coulter Optima Ultracentrifuge L-90K 機台離心 40000 rpm，4°C，6 小時。離心完後溶液密度會由上往下遞增，並從最上層往下收集樣品，共分成 13 個 Fraction。

## 2.8 西方墨點法 (Western blot)

於蛋白質樣品加入 protein loading dye 在 99°C 下加熱 10 分鐘使之變性，並利用 SDS 聚丙烯醯胺膠體電泳 (SDS-PAGE)，使變性之蛋白質樣品依分子量分離蛋白質，再透過濕式電泳轉漬法將膠體上的蛋白質轉漬 (transfer) 到以 methanol 浸潤過 polyvinylidene difluoride (PVDF) membrane。之後進行 blocking，以 5% 牛奶作用 1 小時，再加入一級抗體於 4°C 作用，隔日，以 washing buffer 清洗 10 分鐘三次；加入二級抗體作用 1 小時，之後以 washing buffer 清洗 10 分鐘三次。最後加入 enhanced chemiluminescent (ECL) substrates 呈色，於暗房以底片偵測訊號。

抗體	稀釋倍數
Rabbit anti-S155-HBc #cs155 (濁水溪)	1:15000
Mouse anti-total-HBc #11H10 (廈門大學)	1:2500
Mouse anti-total-HBs #13H10 (廈門大學)	1:2500



Mouse anti-p62/SQSTM1 (Abnova)	1:10000
Goat anti-cathepsin D (Santa Cruz Biotech)	1:2500
Rabbit anti-LC3A/B (Cell Signaling)	1:2500


## 2.9 HBV capsid 之偵測

以 1× Tris-borate-EDTA (TBE) buffer 配置 1.2% agarose gel (Merck ; CAS 9012-36-6), 而待測蛋白質樣品加入 loading dye (含 10× TBE buffer、glycerol、ddH<sub>2</sub>O、bromophenol blue) 後不須加熱, 以 1× TBE buffer 為 running buffer, 70V 跑 6 小時。電泳結束後, 將膠體上的蛋白質轉漬到以 methanol 浸潤過的 PVDF membrane。隔日, 取出 membrane, 以 5% 牛奶作用 1 小時; 再加入一級抗體, 以 washing buffer 清洗 10 分鐘三次; 加入二級抗體作用 1 小時, 之後以 washing buffer 清洗 10 分鐘三次。最後加入 enhanced chemiluminescent (ECL) substrates 呈色, 於暗房以底片偵測訊號。

抗體	稀釋倍數
Rabbit anti-S155-HBc #cs155 (濁水溪)	1:15000
Rabbit anti-HBc #Dako (Dako)	1:10000
Rabbit anti-S162-HBc #162NP (濁水溪)	1:2500
Goat anti-HBs (Bioss)	1:50000

## 2.10 細胞 RNA 萃取

將 cell pellet 加入 1 ml Rezol, 接著再加入 200  $\mu$ l choloform 混合均勻, 在 4°C 下以 13000 rpm 離心 5 分鐘。取出上清液, 以 1:1 比例加入 isopropanol, 置於 -80°C 一天。隔日, 取出直接在 4°C 下以 13000 rpm 離心 15 分鐘後, 去除上清液, 接著加入 500  $\mu$ l 70% 酒精 (配製在 DEPC water 中), 在 4°C 下以 13000 rpm 離心 5 分鐘後, 去除上清液, 此步驟重複一次, 最後在 4°C 下以 13000 rpm 再離心 1 分鐘, 吸乾上清液, 置於抽風櫃內風乾 5-10 分鐘。最後加入 DEPC water 置於 55°C, 10 分鐘回溶 RNA。



為去除因轉染作用所含之質體，我們將上述回溶之 RNA 加入 MgCl<sub>2</sub> (最終濃度 5 mM)、DNase I 於 37°C 反應 30 分鐘，並以 DEPC water 補體積至 100μl，接著加入等體積加入 phenol : chloroform : isoamylalcohol (25:24:1, pH6.7) 搖勻，在 4°C 下以 13000 rpm 離心 5 分鐘，將上清液收集至新的離心管中，再加入等體積 chloroform 搖勻，在 4°C 下以 13000 rpm 離心 5 分鐘，將上清液收集至新的離心管中。接著，依序加入 0.1 倍體積 NaOAc (pH5.2, 3M)、2.5 倍體積 100% Ethanol、0.001 倍體積 Glycogen (20μg/μl) 搖勻，置於 -80°C 一天。隔日，取出直接在 4°C 下以 13000 rpm 離心 30 分鐘後，去除上清液，接著加入 500μl 75% 酒精 (配製在 DEPC water 中)，在 4°C 下以 13000 rpm 離心 10 分鐘，去除上清液，置於抽風櫃內風乾 5-10 分鐘。最後加入 DEPC water 置於 55°C，10 分鐘回溶 RNA。純化的 RNA 放置於 -80°C 冰箱中保存以待進一步分析。

## 2.11 純化 HBV nucleocapsid 內之 DNA

將 cell pellet 以 NET lysis buffer 抽取細胞蛋白質，在 4°C 下以 13000 rpm 離心 30 分鐘，收取上清液；加入 2 μl Micrococcal nuclease (New England BioLabs)、最終濃度為 6 mM 的 CaCl<sub>2</sub>，於 37°C 作用 30 分鐘；再加入最終濃度 25 mM 的 pH8.0 EGTA，於 65°C 作用 15 分鐘。接著加入 Proteinase K、SDS 及 RNase A 於 50°C 作用 3 小時。

接著加入等體積 phenol : chloroform : isoamylalcohol (25:24:1, pH8.0) 搖勻，在 4°C 下以 13000 rpm 離心 5 分鐘，將上清液收集至新的離心管中，再加入等體積 chloroform 搖勻，在 4°C 下以 13000 rpm 離心 5 分鐘，將上清液收集至新的離心管中。接著，依序加入 0.1 倍體積 NaOAc (pH5.2, 3M)、2.5 倍體積 100% Ethanol、0.001 倍體積 Glycogen (20μg/μl) 搖勻，置於 -80°C 一天。隔日，取出直接在 4°C 下以 13000 rpm 離心 30 分鐘後，去除上清液，接著加入 500μl 75% 酒精，在 4°C 下以 13000 rpm 離心 10 分鐘，去除上清液，置於抽風櫃內風乾 5-10 分鐘。最後加入 0.1 倍 TE buffer 置於 50°C，30 分鐘回溶 DNA。純化的 DNA 放置於 -20°C 冰箱中保存以待進一步分析。

## 2.12 純化 HBV nucleocapsid 內之 RNA

將 cell pellet 以 NET lysis buffer (配置於 DEPC water 中) 抽取細胞蛋白質，在 4°C 下以 13000 rpm 離心 30 分鐘，收取上清液；加入 2 μl Micrococcal nuclease (New

England BioLabs)、最終濃度為6 mM的CaCl<sub>2</sub>，於37°C作用30分鐘；再加入最終濃度25 mM的pH8.0 EGTA，於65°C作用15分鐘。接著加入Proteinase K、SDS於50°C作用1小時。

接著加入等體積phenol : chloroform : isoamylalcohol (25:24:1, pH6.7) 搖勻，在4°C下以13000 rpm離心5分鐘，將上清液收集至新的離心管中，再加入等體積chloroform搖勻，在4°C下以13000 rpm離心5分鐘，將上清液收集至新的離心管中。接著，依序加入0.1倍體積NaOAc (pH5.2, 3M)、2.5倍體積100% Ethanol、0.001倍體積Glycogen (20µg/µl)搖勻，置於-80°C一天。隔日，取出直接在4°C下以13000 rpm離心30分鐘後，去除上清液，接著加入500µl 75%酒精(配置於DEPC water)，在4°C下以13000 rpm 離心10分鐘，去除上清液，置於抽風櫃內風乾5-10 分鐘。最後加入DEPC water置於55°C，10分鐘回溶RNA。純化的RNA放置於-80°C冰箱中保存以待進一步分析。

## 2.13 北方墨點法 (Northern blot)

配製1.5% 100 ml Formaldehy gel，首先稱1.5 g GTG agarose 加入84.6ml DEPC water，置於室溫，待溫度冷卻至50~60°C，在抽風櫃內(需避光)依序加入10ml 10x MOPS buffer、5.4ml 37% Formaldehy，混勻後倒入凝膠盒，置於抽風櫃內(需避光)40 min，之後置於4°C 冰箱10min，即可使用。接著配製Denature buffer (250 µl Formamide、83 µl 37% Formaldehy、50 µl 10x MOPS、15 µl DEPC water)，Denature buffer與待分析的RNA 以3:1 的比例混合，於65°C作用10min，再於冰上作用2分鐘，加入RNA loading dye 後置於冰上準備跑膠。電泳以1x MOPS Running buffer，70 volt 跑3.5 小時。跑完電泳後，將膠取出以20x SSC於室溫下清洗10 分鐘兩次，之後將膠體上的RNA 轉漬到Nylon Membrane上。隔日，取出membrane以2x SSC浸潤，之後用濾紙拭乾membrane殘餘的SSC，以UV corss-link (1800 µJ)。以10 ml Pre-warmed DIG Easy Pre-hybridization buffer 於50°C搖1小時；之後以Pre-warmed probe於50°C搖一天。隔日，取出membrane以2x SSC/0.1% SDS 清洗5 分鐘兩次，再以Pre-warm 0.5x SSC/0.1% SDS 於60°C下清洗15分鐘兩次；之後以1x maleic acid buffer浸潤2 分鐘，以1x blocking buffer 作用30min，再以含有Anti-DIG Antibody (1:10000)之blocking buffer作用30min，以1x washing buffer 清洗10 分鐘三次，以

1x Detection buffer浸潤3分鐘，將membrane 放入袋中再加入substrate CDP封袋，入暗房顯影。



## 2.14 南方墨點法 (Southern blot)

以1× Tris-acetate-EDTA (TAE) buffer 配置1.2% agarose gel (SeaKem GTG agarose)，並將待測DNA樣品加入loading dye後，以1× TAE buffer為running buffer，70V跑6小時。跑完電泳後，將膠取出以depurination buffer (0.2N HCl) 於室溫下搖晃至dye顏色改變，並以二次水浸潤1分鐘兩次；接著以Denaturation buffer (0.5M NaOH, 1.5M NaCl) 於室溫下搖晃10分鐘兩次(dye變回原本顏色)，並以二次水浸潤1分鐘兩次；最後以Neutralization buffer (1M Tris, pH=7.5, 1.5M NaCl) 於室溫下搖晃10分鐘。接著將膠體上的DNA轉漬到Nylon Membrane上。隔日，取出membrane以2x SSC浸潤，之後用濾紙拭乾membrane殘餘的SSC，以UV cross-link (1800 mJ)。以10 ml Pre-warmed DIG Easy Pre-hybridization buffer 於42°C搖1小時；之後以Pre-warmed probe於42°C搖一天。隔日，取出membrane以2x SSC/0.1% SDS 清洗5分鐘兩次，再以Pre-warm 0.5x SSC/0.1% SDS 於55°C下清洗15分鐘兩次；之後以1x maleic acid buffer浸潤2 分鐘，以1x blocking buffer 作用30min，再以含有Anti-DIG Antibody (1:10000)之blocking buffer作用30min，以1x washing buffer 清洗10 分鐘三次，以1x Detection buffer浸潤3分鐘，將membrane 放入袋中再加入substrate CDP封袋，入暗房顯影。

## 第四章 實驗結果



### 4.1 建構只表現 HBc 及 HBc' 的 HBV replicon 質體

由於 wild-type HBc 與由 SP1 產生的 HBc' 在胺基酸序列上僅差在 HBc' 少了最後一個 Cysteine，而負責病毒 nucleocapsid 組裝的 N-terminal domain 是完全相同的，因此推測在 HBV life cycle 中 HBc' 與 wild-type HBc 有可能同時存在於 HBV capsid 中。為了探討 wild-type HBc 及 HBc' 於 capsid 中的功能，本研究利用點突變影響病毒蛋白的表現，產生分別只有 wild-type HBc 及 HBc' 的 HBV replicon，並探討其於 capsid 中在 HBV life cycle 所扮演的角色。


HBV 會利用宿主細胞 splicing 的機制產生許多 spliced RNAs，AG (487/488) 為 HBV 最常使用的 splice acceptor site，至少有 8 種 spliced RNAs 藉由此 splice acceptor site 產生，其中又以 SP1 佔最大比例(60)。若於 HBV replicon 進行點突變(A487C)破壞此 splicing acceptor site，將使一半以上的 spliced RNAs 無法產生，並且無法表現 HBc' 【圖一；A】。因此實驗室以 genotype A 之 precore null HBV replicon plasmid (HBV-PC null) 為 template，建構 HBV-PC null-A487C 質體，為一只會表現 HBc 而不會表現 HBc' 的 mutant HBV replicon。

另外為探討 HBV capsid 中 HBc 蛋白之功能，我們在 HBV-PC null-A487C 質體中進一步以 3 種方式將 Core 之 ORF 最後一個胺基酸改變為終止密碼子(stop codon)，使 HBV 不僅不能利用 AG (487/488) 進行 splicing，且只能表現 HBc'，無法表現 wild-type HBc。為了確認 mutant constructs 可以表現 HBc 及 HBc' 蛋白質，我們於 Huh7 細胞轉染 mutant constructs，並藉由 Western blot 分析。結果顯示所有的 constructs 皆可於細胞內表現蛋白質並且被 anti-HBc 抗體偵測到，說明這些 constructs 可表現 HBc 或 HBc' 蛋白質【圖一；B】。然而此三種點突變皆會影響到 Polymerase 之 ORF，造成第 50 個胺基酸改變，其對病毒複製之影響，有待進一步分析確認。

### 4.2 分析不同抗體對 HBc 與 HBc' protein 及 capsid 之辨認性

於細胞質轉譯產生之 core protein 單體(monomer)，首先會形成二聚體(dimer)，





再組裝成 capsid。為確認辨識 core protein 的抗體對於 wild-type HBc 和 HBc' protein，以及其所形成的 capsid 是否有辨認上的差異，我們以單純只會表現 wild-type HBc 和 HBc' protein 的 pCMV-HBcWT 及 pCMV-HBc' 質體來進行抗體辨識性的分析。實驗為了模擬真實 HBV replicon 中同時存在 wild-type HBc 和 HBc' protein，我們將 pCMV-HBcWT 及 pCMV-HBc' 質體分別或等量混合進行共轉染(cotransfection)至 Huh7 cell line (human hepatoma cell line)中表現，在 48 小時後萃取細胞蛋白質液，以 SDS-PAGE 分離蛋白質，將 blot 分別用 11H10 及 cs155 抗體進行 hybridization，分析此二種抗體對細胞中之 total-HBc protein 的辨識性。結果顯示 11H10 及 cs155 抗體皆可辨識 denatured form 之 HBc 與 HBc'，且於 HBc 與 HBc' 之間辨識度無明顯差異。然而，當我們將上述的蛋白質萃取液進行 agarose gel 電泳，分析 anti-capsid Dako 抗體以及 cs155 抗體對於 HBc 與 HBc' 所形成之 capsid 的辨認性。結果發現 cs155 抗體相較於 anti-capsid Dako 抗體對於 wild-type HBc-capsid 產生之訊號較弱，而對於 HBc'-capsid 產生之訊號較強【圖二】。此結果顯示 cs155 抗體對於 HBc' 所形成之 capsid 具有較高的辨識度；換個角度，cs155 抗體對 HBc 所形成之 capsid 辨識度較低。

### 4.3 比較 WT 及 mutant HBV replicon 於細胞中複製情形

為探討 HBc' 及 HBc 在 capsid 中扮演的角色，我們比較 WT HBV replicon 與分別只表現 wild-type HBc 或 HBc' 的 HBV replicon 在細胞內的複製情況。由於已知在細胞內 25-kDa precore protein 會進行切割修飾產生 22-kDa 及 17-kDa 的產物，與 21-kDa core protein 大小相近，於 western blot 之分析上易干擾 core protein 之偵測，且 precore mRNA 跟 pgRNA 具有一樣的 splice donor/acceptor site，也可能表現 spliced form，會增加結果判讀的複雜性，因此這部分實驗所使用之質體皆為 precore null (PC null)，不會表現 precore protein 之質體。實驗將 HBV-PC null、HBV-PC null-A487C、HBV-PC null-A487C-V50D、HBV-PC null-A487C-V50S、HBV-PC null-A487C-V50N 質體各別轉染至 Huh7 細胞中，在 48 小時後收取細胞，後續分析表現 HBc 及 HBc' 之 replicon 於細胞中複製情形，包括 RNA encapsidation 及 reverse transcription 等步驟是否有所差異。

我們首先確認各個質體於細胞中表達之 total HBV RNA，結果顯示無法產生

HBc'之 HBV replicon (PC null-A487C)所表達之 total HBV RNA 與 WT replicon (PC null)相比，沒有明顯差異；無法產生 wild-type HBc 之 HBV replicon (PC null-A487C-V50D/S/N)表達之 total HBV RNA 與 WT replicon 相比有些許減少【圖三；A】。然而各個 replicon 表現之 HBs 含量皆差不多，但 mutant HBV replicon 表現之 HBV HBc (HBc')皆較 WT replicon (PC null)有些許減少【圖三；B】。

我們進一步確認 HBV RNA 是否能被 encapsidation 於 mutant HBV replicon 之 capsid，並於 capsid 內進行複製，因此分離出細胞中之 capsid，並檢測其中是否存在病毒之 pgRNA 及 DNA。實驗結果顯示各個 mutant HBV replicon 之 RNA 皆能被 encapsidation，並能進行反轉錄(reverse transcript)以產生 capsid-DNA，顯示 HBc 及 HBc'於這此兩個病毒複製步驟上無顯著功能上之差異。然而 HBc'-HBV replicon (PC null-A487C-V50D/S/N)其 capsid-DNA 有減少，由於此三個質體於 polymerase 第 50 個胺基酸突變，因此可能影響反轉錄起始的 priming 能力【圖三；C】。

另外為了分析細胞中 capsid 含量，實驗利用 total lysate 進行 agarose gel 電泳，並將 blot 分別用 cs155 及 Dako 抗體進行 hybridization。結果顯示 HBc-HBV replicon (PC null-A487C) 細胞內的 capsid 以 cs155 及 Dako 抗體分析訊號皆比 WT replicon (PC null) 弱；然而 HBc-HBV replicon (PC null-A487C-V50D/S/N) 細胞內的 capsid 以 cs155 抗體分析訊號較 WT replicon (PC null) 強，但以 Dako 抗體分析訊號卻較弱【圖三；D】。由於先前抗體辨認性之分析發現 anti-capsid Dako 抗體與 cs155 抗體對於 wild-type HBc 及 HBc' 之 capsid form 有辨識性差異，而 WT replicon 同時含有 wild-type HBc 和 HBc'，因此根據上述我們無法確認於 agarose gel 電泳分析細胞內 capsid 時得到的抗體訊號強弱是顯示 capsid 含量多寡，或是抗體對於 wild-type HBc 和 HBc'之 capsid form 的辨識性差異所造成。

#### **4.4 利用 Sucrose gradient 比較 WT 及 mutant HBV replicon 於細胞中所生成 capsid 量的多寡**

為了解決抗體對於 wild-type HBc 和 HBc'之 capsid form 有辨識上的差異，我們利用 sucrose gradient 將 total lysate 以 sucrose gradient 進行 fractionation，細胞中的 HBc (HBc') protein 會依據密度停留在不同的 fraction，dimer form 會位於密度較小之 fraction (主要在 2、3 fraction) (67)；capsid form 會位於密度較大之 fraction (主

要在 8、9、10 fraction)。分層收集不同的 fraction 後，再用 SDS-PAGE 以 denature gel 形式分析不同 fraction 之 core protein 含量。實驗結果顯示 mutant HBV replicon 在細胞內的 capsid 含量皆較 WT replicon (PC null) 減少，並且發現於表現 WT replicon (PC null) 和 HBc-HBV replicon (PC null-A487C) 時，細胞中 capsid form 比例較多；但表現 HBc'-HBV replicon (PC null-A487C-V50N) 時，細胞中 dimer form 比例卻比 capsid form 多【圖四；A、B】。

為確認抗體對於 wild-type HBc 和 HBc' 形成之 capsid 的辨識性，我們進一步將 capsid form 主要位於 fraction (8、9、10) 以等體積混合均勻後，利用 SDS-PAGE 及 agarose gel 電泳分析。結果發現 anti-capsid Dako 抗體辨識 agarose gel 上之 capsid signal 強弱與 SDS-PAGE 以 denature gel 形式確認之 capsid 含量是一致的，顯示 anti-capsid Dako 對於 wild-type HBc 和 HBc' 之 capsid form 的辨識性是一致的；然而以 SDS-PAGE 分析顯示含量最少的 HBc'-HBV replicon (PC null-A487C-V50N)，以 agarose gel 分析時，cs155 抗體卻產生較強的訊號，再次支持 cs155 抗體對 HBc'-capsid form 有較高的辨識性。【圖四；C】

綜合上述結果指出 Dako 抗體可以於 agarose gel 真實反映 capsid 的量，並顯示於 HBc-HBV replicon 及 HBc' -HBV replicon 轉染之細胞中 capsid 含量相較於 WT-HBV replicon 減少。同時藉由分析 sucrose gradient 中 capsid 的分佈，只有 WT-HBV replicon 於 fraction 8 含有 capsid，顯示 WT-HBV replicon 和 HBc - 及 HBc' -HBV replicon 所形成的 capsid 是不同的，造成三者所形成 capsid 之密度差異的機制值得進一步探討。

#### **4.5 比較細胞轉染 WT 及 mutant HBV replicon 後釋放至細胞外之不同病毒顆粒之特性**

由上述結果已知於 HBc 與 HBc' 缺失的 HBV replicon，HBV 皆可於其細胞內 capsid 中進行 RNA 及 DNA 複製，接著我們想探討 HBc 與 HBc' 是否會影響已經完成複製的 capsid 進行後續包膜(envelopment)，並且釋放至細胞外之過程。實驗將 WT-HBV replicon (PC null)、HBc-HBV replicon (PC null-A487C)、三種 HBc'-HBV replicon (PC null-A487C-V50D/N/S) 質體各別轉染至 Huh7 細胞，再收取含有病毒顆粒之細胞培養液，並以 20% sucrose cushion 純化後，進行細胞外病毒顆粒數量及

成分組成之分析。

首先進行 SDS-PAGE 電泳分析細胞外病毒顆粒之 total core protein 含量，並以 qPCR 檢測細胞外病毒顆粒之 HBV DNA 含量。結果顯示 HBe-HBV replicon 與 HBe'-HBV replicon 釋放至細胞外之 total HBe (HBe') 含量皆相較 WT-HBV replicon (PC null) 減少；並且 HBV DNA 相較 WT-HBV replicon (PC null) 減少 1.5~3.5 倍【圖五；A】。此結果顯示 HBe-HBV replicon 與 HBe'-HBV replicon 和 WT-HBV replicon (PC null) 一樣會釋放具有 HBV DNA 的病毒顆粒至細胞外，而且細胞內 capsid 減少並非為增加病毒釋放所造成。

為進一步分析 WT 及 mutant HBV replicon 釋放至細胞外之不同病毒顆粒結構或成分組成上是否有所差異，實驗將轉染各個 WT 及 mutant HBV replicon 質體的 Huh7 細胞蛋白質萃取液，以及細胞外培養液所純化之病毒顆粒以 agarose gel 電泳分析，再分別用 anti-capsid Dako、cs155、162NP 等不同抗體進行偵測病毒之 capsid，並利用 anti-HBs 抗體偵測病毒表面蛋白。結果發現 WT replicon (PC null) 釋放至細胞外之病毒顆粒以 anti-capsid Dako、cs155 抗體偵測時，訊號最強位置較細胞內 capsid 高，且與 HBs 抗體訊號位置一致【圖五；B】，顯示其為與 HBs 蛋白進行 enveloped 之 capsid 的位置；以 162NP 抗體偵測時，可見與細胞內 capsid 等高處有細胞外病毒顆粒訊號，顯示其為未進行 enveloped 之 naked capsid 的位置【圖五；B】。此結果因此指出 WT replicon (PC null) 釋放至細胞外之病毒顆粒大部分為 enveloped capsid，僅有少量的 naked capsid 被釋放至細胞外。

而針對 HBe- 及 HBe'-HBV replicon 釋放至細胞外之病毒顆粒進行 agarose gel 電泳結果分析則發現，HBe-HBV replicon 實驗組以 anti-capsid Dako、cs155 抗體偵測時，enveloped capsid 訊號較 WT replicon (PC null) 減弱；以 162NP 抗體偵測時則完全無法偵測到 naked capsid 之訊號。而 HBe'-HBV replicon 實驗組以 anti-capsid Dako、cs155 抗體偵測時，則幾乎無法偵測到 enveloped capsid 之訊號；以 162NP 抗體則可偵測到與 WT replicon (PC null) 相比較弱之 naked capsid 訊號【圖五；B】。

綜合以上結果，相對於 WT replicon (PC null) 實驗組細胞外培養液所包含之病毒顆粒大部分為 enveloped capsid，僅有少許的 naked capsid，而 HBe'-HBV replicon 實驗組細胞外培養液所包含之病毒顆粒卻主要為 naked capsid，幾乎無 enveloped 之 capsid，因此指出 wild-type HBe 可能參與 capsid 進行 envelopment 並釋放至細

胞外的過程，扮演重要角色。相反的在 HBc-HBV replicon 實驗組細胞外培養液所包含之病毒顆粒則大部分為 enveloped capsid，幾乎無法偵測到 naked capsid 之存在，此結果亦支持上述假說，即 capsid 中 HBc 蛋白可能決定 capsid 之成功 envelopment 並釋放至細胞外，此項假說值得進一步研究。

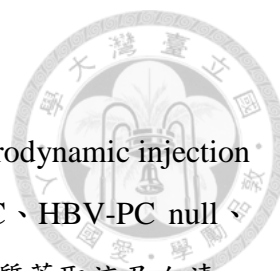
#### 4.6 破壞病毒 splicing acceptor site 487/488 探究 HBc' 之功能

由前述以 sucrose gradient 比較 WT 及 mutant HBV replicon 於細胞中 capsid 含量多寡之結果顯示 HBc-HBV replicon 相較於 WT-HBV replicon 細胞中 capsid 含量減少，因此指出 HBc' 可能有穩定 capsid 之功能。在進一步研究前，我們首先確認所發現在 mutant HBV replicon 表現之 HBc (HBc') 皆較 WT replicon (PC null) 有些許減少的現象並非是由於使用之質體皆為 precore null，不會表現 precore protein 所造成，我們同樣以會表現 precore protein 的 HBV replicon (WT) 及 HBc-HBV replicon (A487C) 進行實驗，確認破壞病毒 splicing acceptor site 487/488 對 HBV 造成之影響。

我們首先將 HBV-WT、HBV-A487C、HBV-PC null、HBV-PC null-A487C 質體各別轉染至 Huh7 細胞中，並將細胞蛋白質萃取液以 SDS-PAGE 電泳分析細胞內 total core protein 含量，並以 agarose gel 電泳分析細胞內 capsid 含量。結果顯示無論有無表現 precore 的 replicon，於 487 位點突變後，total HBc (HBc') protein 皆有減少；並且皆於 agarose gel 中顯示 capsid form 減少情況較 total HBc (HBc') 更為明顯【圖六；A】。另外實驗進一步分析各種 HBV replicon 釋放至細胞外的病毒顆粒及其中的 HBV DNA 含量，結果發現，無論有無表現 precore，於 A487C 突變後，釋放至細胞外之病毒顆粒皆有減少。然而以 qPCR 測定之病毒顆粒 DNA 卻發現沒有明顯差異【圖六；B】。

綜合上述實驗結果，precore protein 不影響病毒 capsid 於細胞中之含量以及病毒複製、釋出細胞。然而值得注意的是當 487 位點突變後，細胞內外 capsid 含量減少，但細胞外病毒顆粒中 DNA 卻沒有減少，顯示 splicing acceptor site 487/488 參與的 splicing 可能影響 HBV encapsidation 或病毒複製之效率，需進一步釐清。

#### 4.7 藉由 Hydrodynamic injection mouse model *in vivo* 驗證



## HBc'於病毒複製之功能

為了於 *in vivo* 驗證 HBc'於病毒複製之功能，實驗利用 Hydrodynamic injection 方式於 C57BL/6 小鼠肝臟細胞各別表現 HBV-WT、HBV-A487C、HBV-PC null、HBV-PC null-A487C 質體，兩天後犧牲小鼠取得肝臟細胞蛋白質萃取液及血清，將肝臟細胞蛋白質萃取液以 SDS-PAGE 分析細胞內 total core protein 含量，並以 agarose gel 電泳分析細胞中之 capsid 含量，結果顯示無論有無表現 precore 的 replicon，於 487 位點突變後，total HBc (HBc') protein 及 capsid form 於小鼠肝臟細胞內皆有明顯減少【圖七；A】。然而，實驗進一步以 Northern blot 及 Southern blot 分析 capsid 內 encapsidated HBV RNA 及 capsid 內複製之 DNA 含量，結果發現 HBc-HBV replicon (HBV-A487C 及 HBV-PC null-A487C)之 capsid 內的 RNA 及 DNA 並沒有隨細胞內 capsid 明顯減少【圖七；B】。另一方面實驗將小鼠血清直接以 SDS-PAGE 分析細胞外 total core protein 含量，並以 agarose gel 分析細胞外之病毒顆粒，以及利用 qPCR 偵測小鼠血清中病毒顆粒 HBV DNA 含量。結果發現 HBc-HBV replicon 釋放至細胞外之 total HBc (HBc')含量減少，enveloped capsid 維持不變，然而利用 qPCR 測得之血清中 HBV DNA 相較 WT-HBV replicon 卻增加 6.5~11 倍【圖七；C】。

綜合以上於小鼠肝臟細胞內外的分析結果，顯示當 HBV capsid 不含有 HBc'時，可能影響 HBV RNA encapsidation 效率，此與 *in vitro* 結果一致。因此指出一個 HBc'可能的功能在於確保正確的 encapsidation，值得進一步研究。

## 4.8 HBV capsid 中 wild-type HBc 及 HBc'功能之假說

根據目前研究結果我們針對 HBV capsid 中 HBc 及 HBc' 蛋白在病毒 replication 過程中所扮演特定的功能提出假說。【圖八】

由於 wild-type HBc 和 HBc'蛋白皆具有 dimerization 所需要的第 61 個胺基酸 Cysteine，因此可能形成 HBc / HBc' dimer，此具有正確 HBc 及 HBc'比例的 dimer 進而以一定的效率正確包裹 HBV RNA 形成 capsid (encapsidation)，接著進行 DNA 複製及後續 envelopment 並釋出到細胞外。當 HBV replicon 無法表現 HBc 或 HBc'時，可能因 capsid 不易形成或形成之 capsid 不穩定，導致 capsid 量減少而影響 HBV encapsidation 效率。雖然 HBc-capsid 及 HBc'-capsid 包裹之 HBV RNA 皆可完成

HBV DNA 複製，HBc-capsid 也能順利 envelopment 並從細胞釋出，但 HBc'-capsid 可能因缺乏 HBc 導致無法順利 envelopment，以 naked capsid 的形式釋出到細胞外。

針對目前之假說我們將進一步探討 HBc 蛋白對於 capsid envelopment 之重要性以及 HBc' 穩定 HBc-capsid 之功能。

#### 4.9 於 HBc' replicon 共轉染 HBc 表現質體探討 HBc 對 capsid envelopment 之重要性

為確認 HBc 蛋白對於 capsid envelopment 之重要性，我們將 WT replicon (PC null)、HBc-HBV replicon (PC null-A487C)、HBc'-HBV replicon (PC null-A487C-V50N) 各別於 Huh7 細胞中表現，並利用於 PC null-A487C-V50N 質體分別共轉染兩種比例 pCMV-HBc 的方式，探討 HBc 是否能幫助 HBc'-HBV replicon 進行 envelopment 並釋放出細胞。首先我們藉由利用 SDS-PAGE 分析細胞內 total core protein，來確認蛋白質於細胞內的含量，結果顯示 HBc-HBV replicon 及 HBc'-HBV replicon 於細胞中 HBc (HBc') 含量皆相較於 WT-HBV replicon 稍微減少，此與先前實驗結果一致，並且於 HBc'-HBV replicon 共轉染 pCMV-HBc 之實驗組 anti-HBc 抗體訊號依轉染比例增強，顯示細胞內有成功表達 HBc'-HBV replicon 以及 HBc 蛋白【圖九；A】。另外，以 SDS-PAGE 分析細胞外病毒顆粒含量，結果顯示實驗組細胞外病毒顆粒與細胞內 HBc (HBc') 含量一致，顯示所有實驗組細胞中之 capsid 皆可釋放至細胞外【圖九；B】。

進一步以 agarose gel 電泳分析各實驗組細胞內 capsid 以及釋放至細胞外之不同病毒顆粒結構或成分組成上是否有所差異，結果顯示，於 HBc'-HBV replicon 共轉染 pCMV-HBc 之實驗組細胞中形成大量 capsid，然而其釋放至細胞外之病毒顆粒為 naked capsid【圖九；C】。上述實驗結果並不支持我們提出之 HBc 蛋白決定 capsid envelopment 之假說，而造成 HBc-HBV replicon 與 HBc'-HBV replicon 共轉染 pCMV-HBc 於細胞中產生之 capsid 差異值得進一步探討。

#### 4.10 藉由抑制 lysosome、autophagy 降解路徑檢驗 HBc' 於穩定 HBc-capsid 之功能

經由 Sucrose gradient 比較 WT 及 mutant HBV replicon 於細胞中 capsid 含量多寡之結果顯示 HBc-HBV replicon 相較於 WT-HBV replicon 細胞中 capsid 含量減少，指出 HBc' 可能有穩定 capsid 之功能。為檢驗此假說我們將 WT replicon (PC null) 及 HBc-HBV replicon (PC null-A487C) 各別轉染至 Huh7 細胞中表現，並以 lysosome、autophagy 降解路徑抑制劑：Bafilomycin A1 (Baf A1) 及 3-Methyladenine (3MA) 處理細胞，再萃取細胞蛋白質液分別以 SDS-PAGE 進行 Western blot 分析 total HBc 含量；Non-denature gel 分析 dimer-HBc 含量；及 agarose gel 分析細胞中 capsid 含量。結果顯示，於 HBc-HBV replicon 未處理降解路徑抑制劑之 DMSO 實驗組與 WT replicon 相比，細胞中 total-HBc 含量減少；但 dimer-HBc 及 capsid 含量皆沒有顯著差異。進一步分析抑制 lysosome、autophagy 降解路徑對 WT-dimer、HBc-dimer 以及 WT-capsid、HBc-capsid 的影響，實驗結果顯示僅以 3MA 抑制 autophagy 降解路徑可增加細胞中 WT-capsid 含量，然而 WT-dimer、HBc-capsid、HBc-dimer 皆不受影響；以 Baf A1 抑制 autophagy 降解路徑亦不影響 WT replicon 及 HBc-HBV replicon 中各種形式 HBc (HBc') 之含量。綜合以上此實驗結果顯示 autophagy、lysosome 降解路徑並非 HBV replicon 主要之降解路徑，因此 HBc' 是否可穩定 HBc-capsid 仍需進一步實驗釐清。



## 第五章 討論



HBV capsid 不僅作為病毒主要的結構蛋白，還參與病毒的複製，包括病毒 RNA encapsidation、DNA 複製，以及最終需要被病毒表面蛋白(HBs)包裹才能從細胞釋放出，產生具有感染性的病毒顆粒。然而先前的研究對於 capsid 中可能共同存在之 wild-type HBc 與 HBc' 蛋白在病毒複製過程中各別扮演的角色仍不清楚。本研究利用點突變方式改變 HBV replicon 中特定基因體序列，造成細胞中分別產生只有 wild-type HBc 及 HBc' 的 HBV capsid，以探討失去 HBc 及 HBc' 所組成的 capsid 對於 HBV replication cycle 中各個步驟，包括細胞內 RNA encapsidation 及 DNA 複製，至後續進行 envelopment 並釋出到細胞外之可能功能所造成之影響。

我們比較 WT HBV replicon 與分別只表現 wild-type HBc 或 HBc' 的 HBV replicon 在細胞內的複製情況，發現 HBc 及 HBc' 對於 RNA 能被 encapsidation，並能進行反轉錄(reverse transcript)產生 capsid-DNA 之病毒複製步驟上無顯著功能上之差異【圖三；C】。然而以 sucrose gradient 分析各種 HBV replicon 細胞內 capsid 時，發現只表現 HBc 或 HBc' 之 replicon，其細胞內 capsid 皆相較於 WT replicon 減少，並且於只有 HBc' 之 replicon 實驗組發現其細胞內 dimer form 比例高於 capsid form【圖四；B】，顯示只有 HBc' 之 dimer 不易形成 capsid。另外藉由 sucrose gradient 中 capsid 的分佈，只有 WT-HBV replicon 於 fraction 8 含有 capsid【圖四；B】，顯示 WT-HBV replicon 此 fraction 內之 capsid 和 HBc -及 HBc' - HBV replicon 所形成的 capsid 是不同的。造成 WT-HBV replicon 相較於 HBc -及 HBc' - HBV replicon 含有一群密度較低的 capsid 之原因我們推測有三個可能，其一為 capsid 內的 HBV genome 含量或性質不同；其二為 capsid 有不同的 post-translational modification；其三為 capsid associated protein 不同。針對 capsid 中 HBV genome 量與性質的差異，我們可初步利用 RT-qPCR、DNA qPCR 分析 WT-HBV replicon 於 8、9、10 fraction 的 capsid-RNA 及-DNA 含量，並以 Northern blot 及 Southern blot 進行確認。另外我們可利用 Lambda phosphatase 反應，並以 Western blot 分析此三個 fraction 中 capsid 的磷酸化程度，若 capsid 的磷酸化不同，亦可能影響其 associated protein。同時我們於 *in vitro*【圖六；B】及 *in vivo*【圖七；A、B】發現 HBc' - HBV replicon 進行 encapsidation 的效率較 WT- HBV replicon 好，亦支持上述 WT-HBV replicon

與 HBc'-HBV replicon 所形成 capsid 可能因其內 genome 含量不同而造成 capsid 密度不同之假說。

我們進一步探討 HBc 與 HBc' 是否會影響已經完成複製的 capsid 進行後續包膜 (envelopment)，並且釋放至細胞外之過程。結果發現 HBc'-HBV replicon 主要為 naked capsid，幾乎無 enveloped 之 capsid，指出 wild-type HBc 可能參與 capsid 進行 envelopment 並釋放至細胞外的過程【圖五；B】。

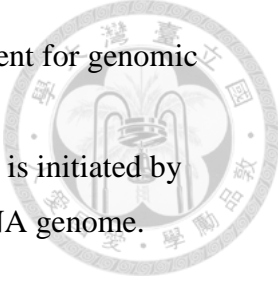
以目前的研究結果，我們針對 HBV capsid 中 HBc 及 HBc' 蛋白在病毒 replication 過程中所扮演特定的功能提出假說。當 HBV replicon 無法表現 HBc 或 HBc' 時，可能因 capsid 不易形成或形成之 capsid 不穩定，導致 capsid 量減少而影響 HBV encapsidation 效率。目前初步以抑制 lysosome、autophagy 降解路徑檢驗 HBc' 於穩定 HBc-capsid 之功能，但結果顯示 autophagy、lysosome 降解路徑並非 HBV replicon 主要之降解路徑【圖十】，因此 HBc' 是否可穩定 HBc-capsid 仍需進一步實驗釐清。

另一方面針對 capsid 中 HBc 蛋白可能決定 capsid 之成功 envelopment 並釋放至細胞外。我們進一步於 HBc'-HBV replicon 共轉染 pCMV-HBc 之實驗結果發現，細胞內已有許多 HBc-capsid，但其釋放至細胞外之病毒顆粒仍然無法 envelopment，為 naked capsid【圖九；C】。顯示 pCMV-HBc 與 HBc-HBV replicon 質體於細胞表現之 HBc 蛋白有所不同，以 pCMV-HBc 質體表現的 HBc 含量明顯高於正常情況 HBV replicon 所表現的 HBc，所以可能造成 HBc 及其所形成的 capsid 本質有所不同，例如磷酸化的程度及 capsid 內 genome 有無，這些可能性亦值得未來進一步探討。


## 參考文獻

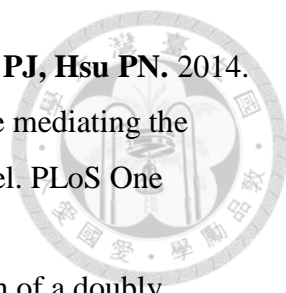


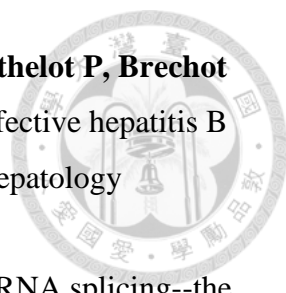
1. **Howard CR.** 1986. The biology of hepadnaviruses. *J Gen Virol* **67** ( Pt 7):1215-1235.
2. **Locarnini S.** 2004. Molecular virology of hepatitis B virus. *Semin Liver Dis* **24 Suppl 1**:3-10.
3. **Scaglione SJ, Lok AS.** 2012. Effectiveness of hepatitis B treatment in clinical practice. *Gastroenterology* **142**:1360-1368 e1361.
4. **El-Serag HB.** 2012. Epidemiology of viral hepatitis and hepatocellular carcinoma. *Gastroenterology* **142**:1264-1273 e1261.
5. **Garcia PD, Ou JH, Rutter WJ, Walter P.** 1988. Targeting of the hepatitis B virus precore protein to the endoplasmic reticulum membrane: after signal peptide cleavage translocation can be aborted and the product released into the cytoplasm. *J Cell Biol* **106**:1093-1104.
6. **Liang TJ.** 2009. Hepatitis B: the virus and disease. *Hepatology* **49**:S13-21.
7. **Seeger C, Mason WS.** 2000. Hepatitis B virus biology. *Microbiol Mol Biol Rev* **64**:51-68.
8. **Twu JS, Schloemer RH.** 1987. Transcriptional trans-activating function of hepatitis B virus. *J Virol* **61**:3448-3453.
9. **Keasler VV, Hodgson AJ, Madden CR, Slagle BL.** 2007. Enhancement of hepatitis B virus replication by the regulatory X protein in vitro and in vivo. *J Virol* **81**:2656-2662.
10. **Tang H, Delgermaa L, Huang F, Oishi N, Liu L, He F, Zhao L, Murakami S.** 2005. The transcriptional transactivation function of HBx protein is important for its augmentation role in hepatitis B virus replication. *J Virol* **79**:5548-5556.
11. **Yan H, Zhong G, Xu G, He W, Jing Z, Gao Z, Huang Y, Qi Y, Peng B, Wang H, Fu L, Song M, Chen P, Gao W, Ren B, Sun Y, Cai T, Feng X, Sui J, Li W.** 2012. Sodium taurocholate cotransporting polypeptide is a functional receptor for human hepatitis B and D virus. *Elife* **1**:e00049.
12. **Schmitz A, Schwarz A, Foss M, Zhou L, Rabe B, Hoellenriegel J, Stoeber M, Pante N, Kann M.** 2010. Nucleoporin 153 arrests the nuclear import of hepatitis B virus capsids in the nuclear basket. *PLoS Pathog* **6**:e1000741.
13. **Bartenschlager R, Junker-Niepmann M, Schaller H.** 1990. The P gene

- 
- product of hepatitis B virus is required as a structural component for genomic RNA encapsidation. *J Virol* **64**:5324-5332.
14. **Bartenschlager R, Schaller H.** 1992. Hepadnaviral assembly is initiated by polymerase binding to the encapsidation signal in the viral RNA genome. *EMBO J* **11**:3413-3420.
  15. **Chiang PW, Jeng KS, Hu CP, Chang CM.** 1992. Characterization of a cis element required for packaging and replication of the human hepatitis B virus. *Virology* **186**:701-711.
  16. **Junker-Niepmann M, Bartenschlager R, Schaller H.** 1990. A short cis-acting sequence is required for hepatitis B virus pregenome encapsidation and sufficient for packaging of foreign RNA. *EMBO J* **9**:3389-3396.
  17. **Pollack JR, Ganem D.** 1993. An RNA stem-loop structure directs hepatitis B virus genomic RNA encapsidation. *J Virol* **67**:3254-3263.
  18. **Gerlich WH, Robinson WS.** 1980. Hepatitis B virus contains protein attached to the 5' terminus of its complete DNA strand. *Cell* **21**:801-809.
  19. **Wang GH, Seeger C.** 1992. The reverse transcriptase of hepatitis B virus acts as a protein primer for viral DNA synthesis. *Cell* **71**:663-670.
  20. **Zoulim F, Seeger C.** 1994. Reverse transcription in hepatitis B viruses is primed by a tyrosine residue of the polymerase. *J Virol* **68**:6-13.
  21. **Seeger C, Ganem D, Varmus HE.** 1986. Biochemical and genetic evidence for the hepatitis B virus replication strategy. *Science* **232**:477-484.
  22. **Will H, Reiser W, Weimer T, Pfaff E, Buscher M, Sprengel R, Cattaneo R, Schaller H.** 1987. Replication strategy of human hepatitis B virus. *J Virol* **61**:904-911.
  23. **Morikawa K, Suda G, Sakamoto N.** 2016. Viral life cycle of hepatitis B virus: Host factors and druggable targets. *Hepatology Res* **46**:871-877.
  24. **Lambert C, Doring T, Prange R.** 2007. Hepatitis B virus maturation is sensitive to functional inhibition of ESCRT-III, Vps4, and gamma 2-adaptin. *J Virol* **81**:9050-9060.
  25. **Watanabe T, Sorensen EM, Naito A, Schott M, Kim S, Ahlquist P.** 2007. Involvement of host cellular multivesicular body functions in hepatitis B virus budding. *Proc Natl Acad Sci U S A* **104**:10205-10210.
  26. **Chai N, Chang HE, Nicolas E, Han Z, Jarnik M, Taylor J.** 2008. Properties

- of subviral particles of hepatitis B virus. *J Virol* **82**:7812-7817.
27. **Prange R.** 2012. Host factors involved in hepatitis B virus maturation, assembly, and egress. *Med Microbiol Immunol* **201**:449-461.
28. **Bardens A, Doring T, Stieler J, Prange R.** 2011. Alix regulates egress of hepatitis B virus naked capsid particles in an ESCRT-independent manner. *Cell Microbiol* **13**:602-619.
29. **Wynne SA, Crowther RA, Leslie AG.** 1999. The crystal structure of the human hepatitis B virus capsid. *Mol Cell* **3**:771-780.
30. **Zhou S, Standring DN.** 1992. Hepatitis B virus capsid particles are assembled from core-protein dimer precursors. *Proc Natl Acad Sci U S A* **89**:10046-10050.
31. **Stannard LM, Hodgkiss M.** 1979. Morphological irregularities in Dane particle cores. *J Gen Virol* **45**:509-514.
32. **Gallina A, Bonelli F, Zentilin L, Rindi G, Muttini M, Milanese G.** 1989. 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* **63**:4645-4652.
33. **Zlotnick A, Cheng N, Conway JF, Booy FP, Steven AC, Stahl SJ, Wingfield PT.** 1996. Dimorphism of hepatitis B virus capsids is strongly influenced by the C-terminus of the capsid protein. *Biochemistry* **35**:7412-7421.
34. **Le Pogam S, Chua PK, Newman M, Shih C.** 2005. Exposure of RNA templates and encapsidation of spliced viral RNA are influenced by the arginine-rich domain of human hepatitis B virus core antigen (HBcAg 165-173). *J Virol* **79**:1871-1887.
35. **Hatton T, Zhou S, Standring DN.** 1992. RNA- and DNA-binding activities in hepatitis B virus capsid protein: a model for their roles in viral replication. *J Virol* **66**:5232-5241.
36. **Birnbaum F, Nassal M.** 1990. Hepatitis B virus nucleocapsid assembly: primary structure requirements in the core protein. *J Virol* **64**:3319-3330.
37. **Nassal M.** 1992. 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* **66**:4107-4116.
38. **Lanford RE, Notvall L, Beames B.** 1995. Nucleotide priming and reverse transcriptase activity of hepatitis B virus polymerase expressed in insect cells. *J*

- 
- Viol **69**:4431-4439.
39. **Seifer M, Standring DN.** 1993. Recombinant human hepatitis B virus reverse transcriptase is active in the absence of the nucleocapsid or the viral replication origin, DR1. *J Virol* **67**:4513-4520.
40. **Tavis JE, Ganem D.** 1993. Expression of functional hepatitis B virus polymerase in yeast reveals it to be the sole viral protein required for correct initiation of reverse transcription. *Proc Natl Acad Sci U S A* **90**:4107-4111.
41. **Liao W, Ou JH.** 1995. Phosphorylation and nuclear localization of the hepatitis B virus core protein: significance of serine in the three repeated SPRRR motifs. *J Virol* **69**:1025-1029.
42. **Gazina EV, Fielding JE, Lin B, Anderson DA.** 2000. Core protein phosphorylation modulates pregenomic RNA encapsidation to different extents in human and duck hepatitis B viruses. *J Virol* **74**:4721-4728.
43. **Lan YT, Li J, Liao W, Ou J.** 1999. Roles of the three major phosphorylation sites of hepatitis B virus core protein in viral replication. *Virology* **259**:342-348.
44. **Melegari M, Wolf SK, Schneider RJ.** 2005. Hepatitis B virus DNA replication is coordinated by core protein serine phosphorylation and HBx expression. *J Virol* **79**:9810-9820.
45. **Lewellyn EB, Loeb DD.** 2011. Serine phosphoacceptor sites within the core protein of hepatitis B virus contribute to genome replication pleiotropically. *PLoS One* **6**:e17202.
46. **Jung J, Hwang SG, Chwae YJ, Park S, Shin HJ, Kim K.** 2014. Phosphoacceptors threonine 162 and serines 170 and 178 within the carboxyl-terminal RRRS/T motif of the hepatitis B virus core protein make multiple contributions to hepatitis B virus replication. *J Virol* **88**:8754-8767.
47. **Lewellyn EB, Loeb DD.** 2011. The arginine clusters of the carboxy-terminal domain of the core protein of hepatitis B virus make pleiotropic contributions to genome replication. *J Virol* **85**:1298-1309.
48. **Lin YJ, Huang LR, Yang HC, Tzeng HT, Hsu PN, Wu HL, Chen PJ, Chen DS.** 2010. Hepatitis B virus core antigen determines viral persistence in a C57BL/6 mouse model. *Proc Natl Acad Sci U S A* **107**:9340-9345.
49. **Lin YJ, Wu HL, Chen DS, Chen PJ.** 2012. Hepatitis B virus nucleocapsid but not free core antigen controls viral clearance in mice. *J Virol* **86**:9266-9273.

- 
50. **Tzeng HT, Tsai HF, Chyuan IT, Liao HJ, Chen CJ, Chen PJ, Hsu PN.** 2014. Tumor necrosis factor-alpha induced by hepatitis B virus core mediating the immune response for hepatitis B viral clearance in mice model. *PLoS One* **9**:e103008.
51. **Chen PJ, Chen CR, Sung JL, Chen DS.** 1989. Identification of a doubly spliced viral transcript joining the separated domains for putative protease and reverse transcriptase of hepatitis B virus. *J Virol* **63**:4165-4171.
52. **Choo KB, Liew LN, Chong KY, Lu RH, Cheng WT.** 1991. Transgenome transcription and replication in the liver and extrahepatic tissues of a human hepatitis B virus transgenic mouse. *Virology* **182**:785-792.
53. **Su TS, Lai CJ, Huang JL, Lin LH, Yauk YK, Chang CM, Lo SJ, Han SH.** 1989. Hepatitis B virus transcript produced by RNA splicing. *J Virol* **63**:4011-4018.
54. **Su TS, Lui WY, Lin LH, Han SH, P'Eng F K.** 1989. Analysis of hepatitis B virus transcripts in infected human livers. *Hepatology* **9**:180-185.
55. **Suzuki T, Kajino K, Masui N, Saito I, Miyamura T.** 1990. Alternative splicing of hepatitis B virus RNAs in HepG2 cells transfected with the viral DNA. *Virology* **179**:881-885.
56. **Suzuki T, Masui N, Kajino K, Saito I, Miyamura T.** 1989. Detection and mapping of spliced RNA from a human hepatoma cell line transfected with the hepatitis B virus genome. *Proc Natl Acad Sci U S A* **86**:8422-8426.
57. **Terre S, Petit MA, Brechot C.** 1991. Defective hepatitis B virus particles are generated by packaging and reverse transcription of spliced viral RNAs in vivo. *J Virol* **65**:5539-5543.
58. **Wu HL, Chen PJ, Tu SJ, Lin MH, Lai MY, Chen DS.** 1991. Characterization and genetic analysis of alternatively spliced transcripts of hepatitis B virus in infected human liver tissues and transfected HepG2 cells. *J Virol* **65**:1680-1686.
59. **Sommer G, van Bommel F, Will H.** 2000. Genotype-specific synthesis and secretion of spliced hepatitis B virus genomes in hepatoma cells. *Virology* **271**:371-381.
60. **Gunther S, Sommer G, Iwanska A, Will H.** 1997. Heterogeneity and common features of defective hepatitis B virus genomes derived from spliced pregenomic RNA. *Virology* **238**:363-371.

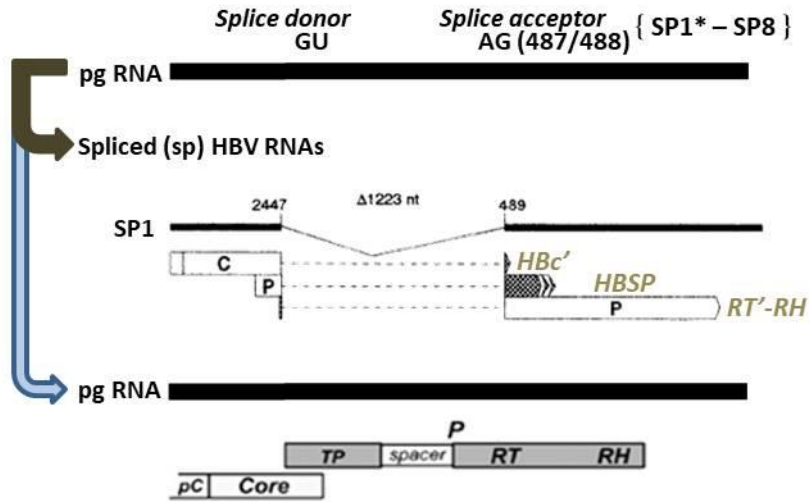
- 
61. **Rosmorduc O, Petit MA, Pol S, Capel F, Bortolotti F, Berthelot P, Brechot C, Kremsdorf D.** 1995. In vivo and in vitro expression of defective hepatitis B virus particles generated by spliced hepatitis B virus RNA. *Hepatology* **22**:10-19.
62. **Lee GH, Wasser S, Lim SG.** 2008. Hepatitis B pregenomic RNA splicing--the products, the regulatory mechanisms and its biological significance. *Virus Res* **136**:1-7.
63. **Redelsperger F, Lekbaby B, Mandouri Y, Giang E, Duriez M, Desire N, Roque Afonso AM, Brichler S, Dubreuil P, Dobrin A, Perlemuter G, Prevot S, Bacon N, Grange JD, Zatlá F, Le Pendeven C, Pol S, Strick-Marchand H, Di Santo J, Kremsdorf D, Soussan P.** 2012. Production of hepatitis B defective particles is dependent on liver status. *Virology* **431**:21-28.
64. **Soussan P, Pol J, Garreau F, Schneider V, Le Pendeven C, Nalpas B, Lacombe K, Bonnard P, Pol S, Kremsdorf D.** 2008. Expression of defective hepatitis B virus particles derived from singly spliced RNA is related to liver disease. *J Infect Dis* **198**:218-225.
65. **Huang CC, Kuo TM, Yeh CT, Hu CP, Chen YL, Tsai YL, Chen ML, Chou YC, Chang C.** 2013. One single nucleotide difference alters the differential expression of spliced RNAs between HBV genotypes A and D. *Virus Res* **174**:18-26.
66. **Chen J, Wu M, Wang F, Zhang W, Wang W, Zhang X, Zhang J, Liu Y, Liu Y, Feng Y, Zheng Y, Hu Y, Yuan Z.** 2015. Hepatitis B virus spliced variants are associated with an impaired response to interferon therapy. *Sci Rep* **5**:16459.
67. **Ludgate L, Liu K, Luckenbaugh L, Streck N, Eng S, Voitenleitner C, Delaney WEt, Hu J.** 2016. Cell-Free Hepatitis B Virus Capsid Assembly Dependent on the Core Protein C-Terminal Domain and Regulated by Phosphorylation. *J Virol* **90**:5830-5844.



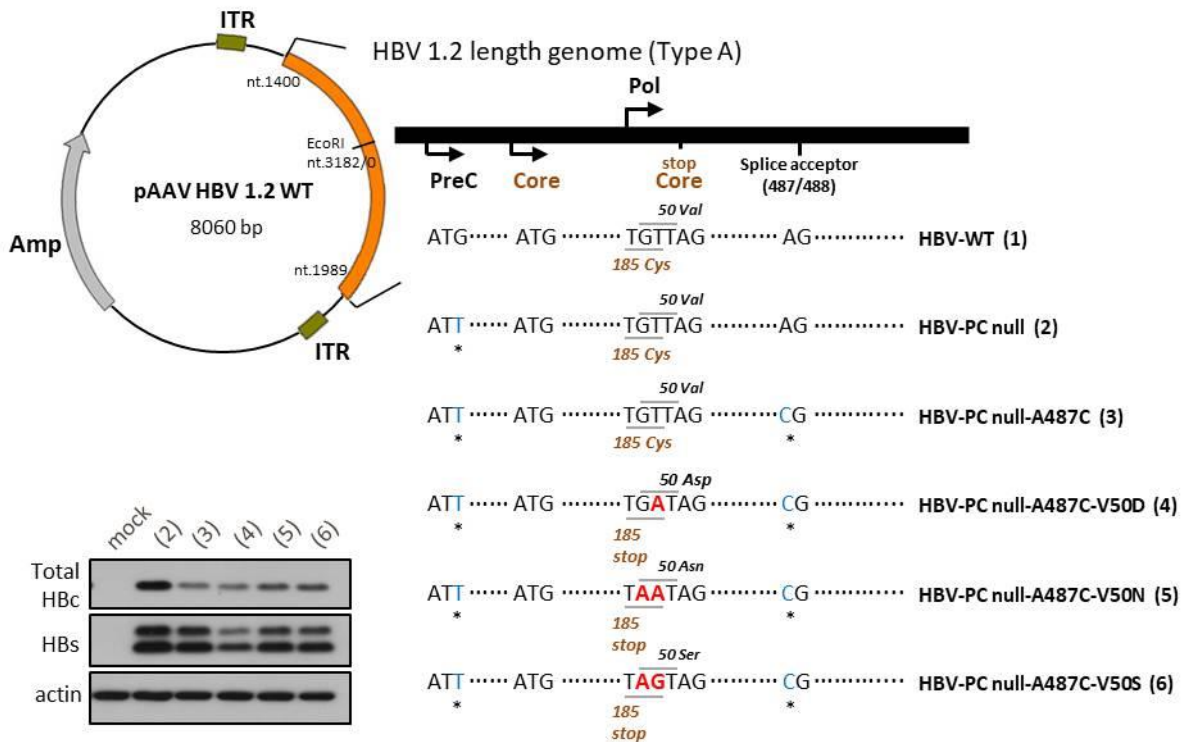
# 圖表



(A)



(B)

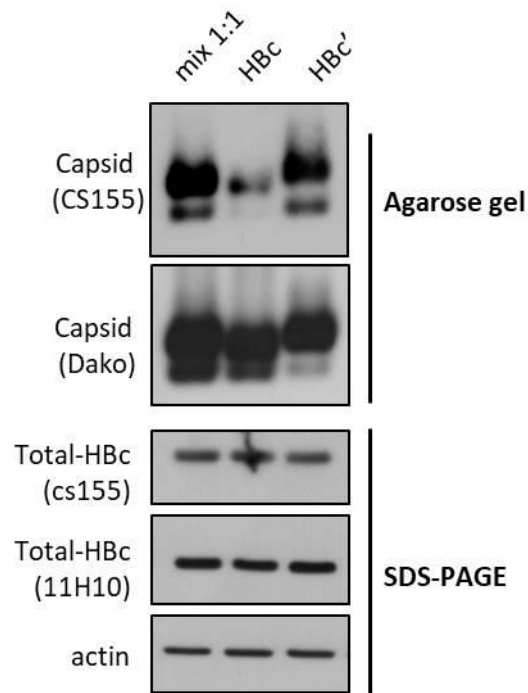


圖一、建構只表現 HBc 及 HBc' 的 HBV replicon 質體

(A) pgRNA 利用 splice acceptor site (487/488) 產生 SP1 及其表現之蛋白質示意圖。

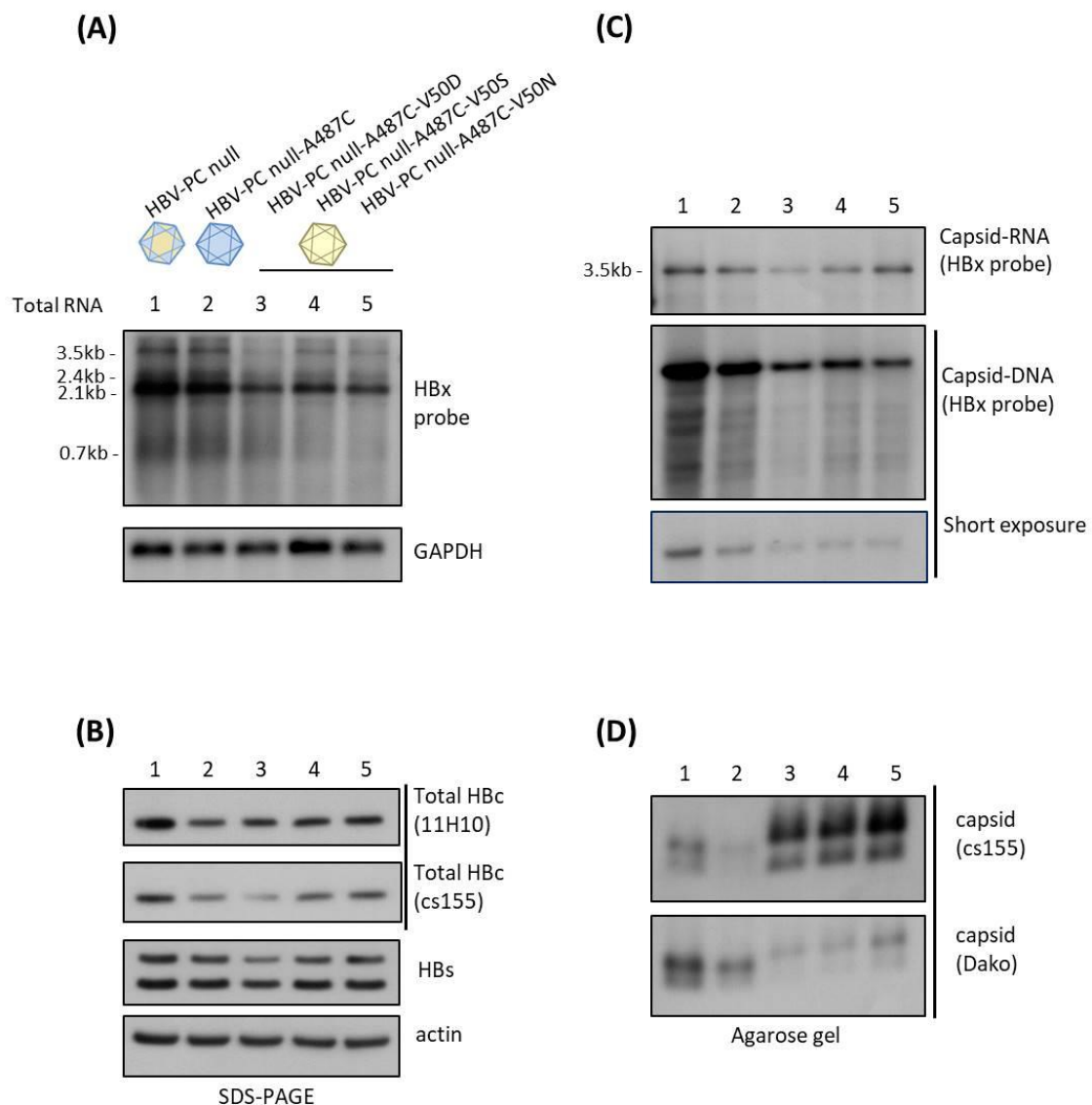
pgRNA 利用 AG (487/488)可產生至少 8 種 spliced RNAs,其中以 SP1 佔最大比例, SP1 可轉譯出 HBc', HBSP 及 RT'-RH 三種蛋白質;而未經過 splicing 的 pgRNA 可轉譯出 HBc 及 polymerase。

(B) 圖示 WT HBV replicon 及各種 mutant HBV replicon。(1) HBV-WT 為 AAV vector, 並含有 1.2 fold over-length HBV genotype A genome; (2) HBV-PC null 為將 HBV-WT plasmid 上 precore start codon ATG (methionine)突變成 ATT (isoleucine), 因此不會產生 precore protein; (3) HBV-PC null-A487C 為將 HBV-PC null plasmid 上 HBV genome 487 位點由 A 突變成 C, 此突變會破壞 487/488 splicing acceptor site (AG→CG), 導致利用此位點的 splicing 作用皆無法發生, 但不影響 ORF 涵蓋此處的 polymerase 及 HBs 胺基酸序列, 此質體可表現只有 HBc 沒有 HBc'的 HBV replicon; (4) (5) (6) HBV-PC null-A487C-V50D/N/S 為將 HBV-PC null-A487C plasmid 上 HBc protein 最後一個胺基酸由 TGT (Cysteine)突變成 stop codon, 導致其所作出的 HBc protein 缺少最後一個胺基酸 Cysteine, 並導致 polymerase 第 50 個胺基酸序列改變, 此三個質體可表現只有 HBc'沒有 HBc 的 HBV replicon。左下圖為以 Western blot 確認建構之質體可表現 HBV protein, 質體各別轉染至 Huh7 細胞中表現, 在 48 小時後萃取細胞蛋白質液, 並以 SDS-PAGE 分離蛋白質, 將 blot 分別用 Total HBc 抗體(cs155)及 HBs 抗體(13H10)進行 hybridization。



## 圖二、分析不同抗體對 HbC 與 HbC' protein 及 capsid 之辨認性

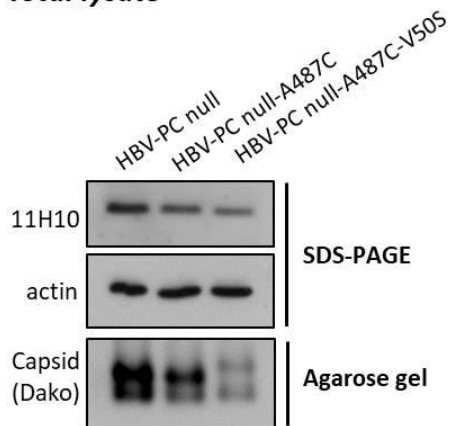
將 pCMV-HbC 及 pCMV-HbC' 分別或等量同時轉染至 Huh7 細胞中表現，在 48 小時後萃取細胞蛋白質液，並以 agarose gel 分離蛋白質，將 blot 分別用 cs155 及 Dako 抗體進行 hybridization，分析細胞中之 capsid；另外以 SDS-PAGE 分離蛋白質，將 blot 分別用 cs155 及 11H10 抗體進行 hybridization，分析細胞中之 total-HbC protein。



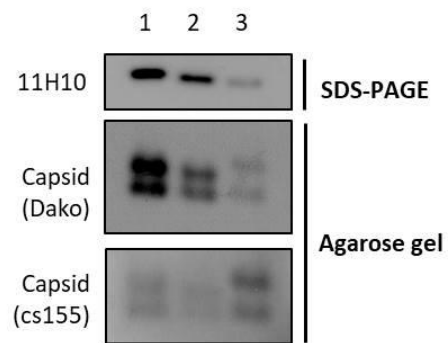
**圖三、比較 WT 及 mutant HBV replicon 於 Huh7 細胞中複製情形**

將 HBV-PC null、HBV-PC null-A487C、HBV-PC null-A487C-V50D、HBV-PC null-A487C-V50S、HBV-PC null-A487C-V50N 質體各別轉染至 Huh7 細胞表現，在 48 小時後收取細胞，(A)以 Northern blot 分析 total HBV RNA。(B)以 SDS-PAGE 進行 Western blot 分析細胞內 HBs protein 及 total core protein 表現量，將 blot 分別用 cs155 及 11H10 抗體進行 hybridization。(C)以 Northern blot 分析 encapsidated HBV RNA 含量。(D)以 agarose gel 分析細胞中之 capsid 含量，將 blot 分別用 cs155 及 Dako 抗體進行 hybridization。

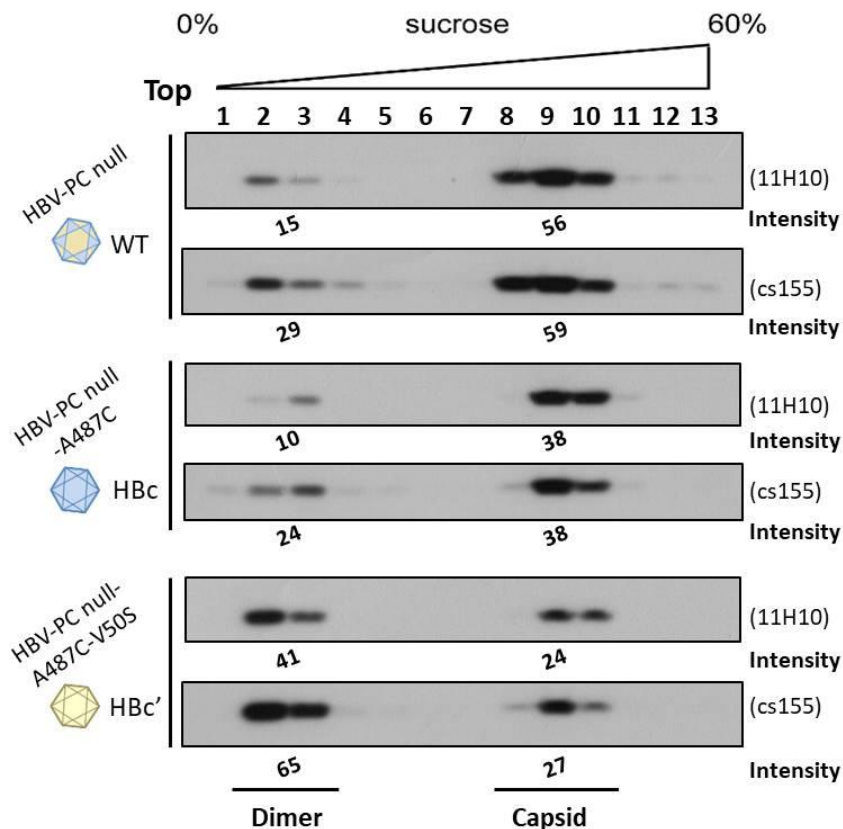
(A) Total lysate



(C) Capsid fraction




(B)

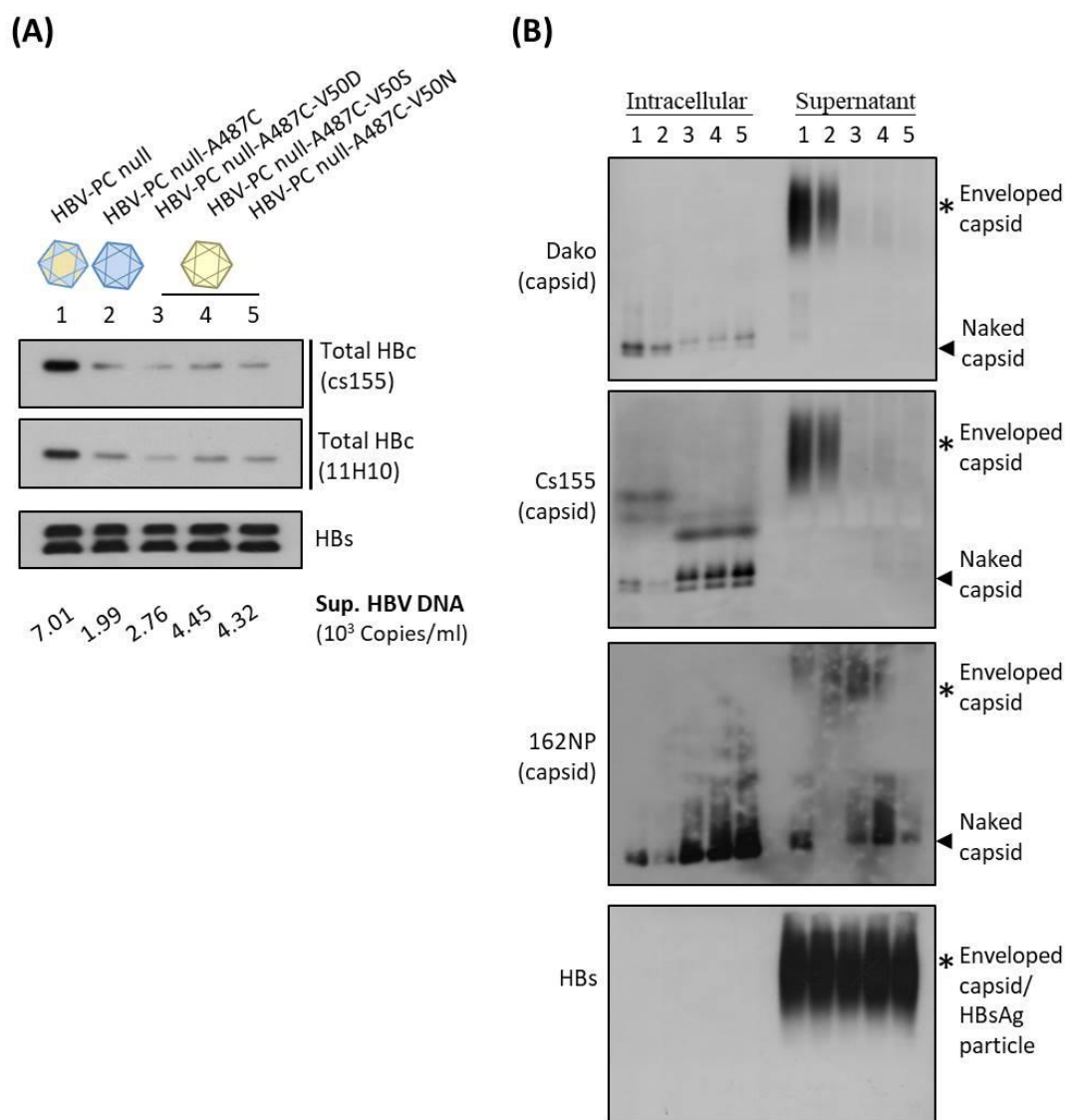


圖四、利用 sucrose gradient 分析 WT 及 mutant HBV replicon 於細胞中 HBC (HBC')-dimer form 與 capsid form 之比例

將(1) HBV-PC null、(2) HBV-PC null-A487C、(3) HBV-PC null-A487C-V50S 質體各別轉染至 Huh7 細胞表現，在 48 小時後萃取細胞蛋白質液，(A)將 total lysate 進行 SDS-PAGE 分析細胞內 total core protein 含量以及用 agarose gel 分析細胞中之

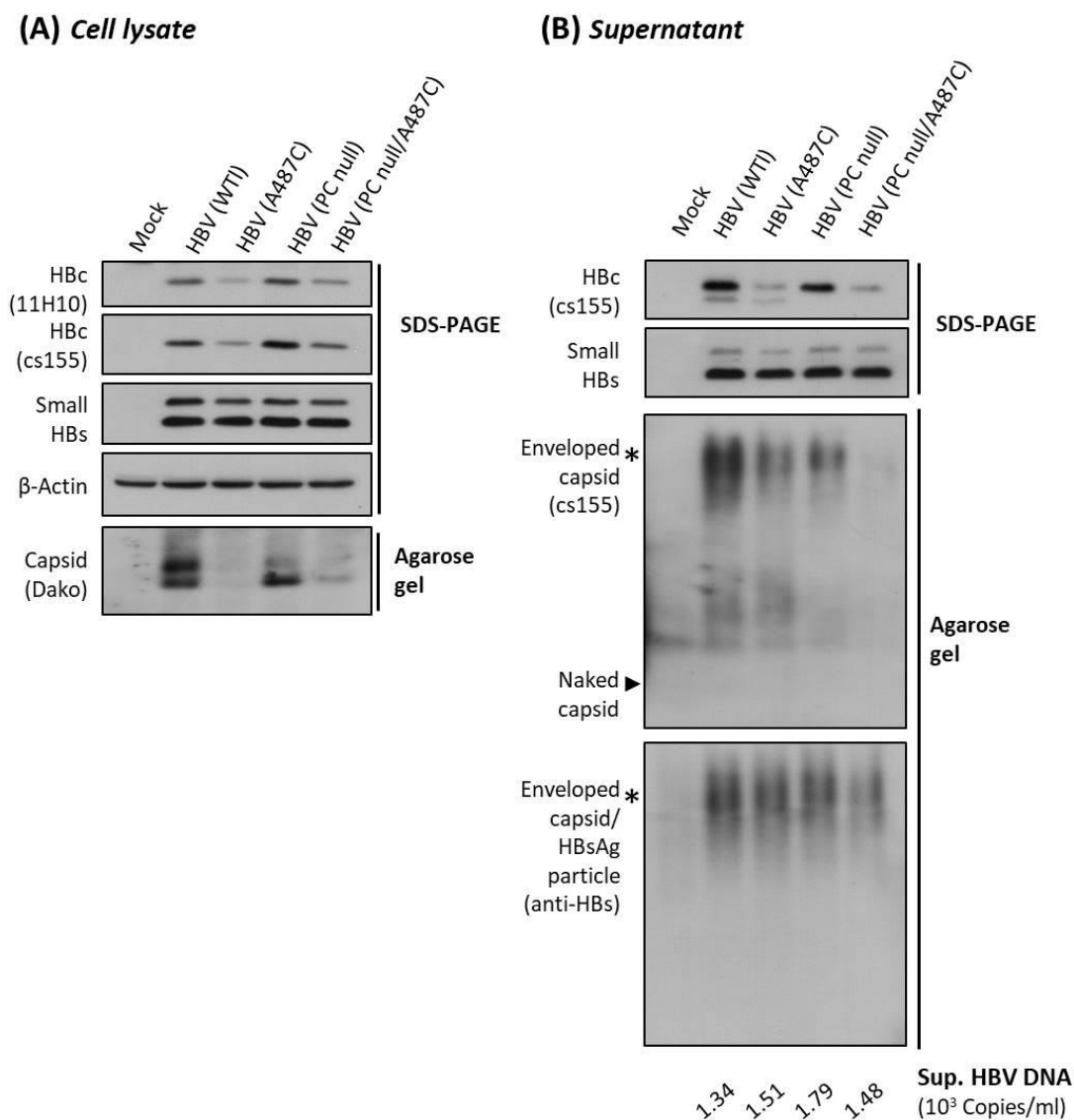


capsid。 (B)將 total lysate 以 0 至 60% sucrose gradient 進行 fractionation，再以 SDS-PAGE 分析不同 fraction 之 core protein 含量，dimer form 會位於密度較小之 fraction (主要在 2、3 fraction)；capsid form 會位於密度較大之 fraction (主要在 8、9、10 fraction)，將 blot 分別用 cs155 及 11H10 抗體進行 hybridization，斜體數字為 dimer form (fraction 2、3)或 capsid form (fraction 8、9、10) 的 signal intensity 總和。 (C) 將轉染 HBV-PC null 質體 (lane 1)、HBV-PC null-A487C 質體 (lane 2)、HBV-PC null-A487C-V50S 質體 (lane3)之細胞 lysate 的 capsid fraction (fraction 8、9、10)等體積混合均勻後，以 SDS-PAGE 及 agarose gel 分析 total HBc protein 及 capsid 含量。



圖五、比較細胞轉染 WT 及 mutant HBV replicon 後釋放至細胞外之不同病毒顆粒

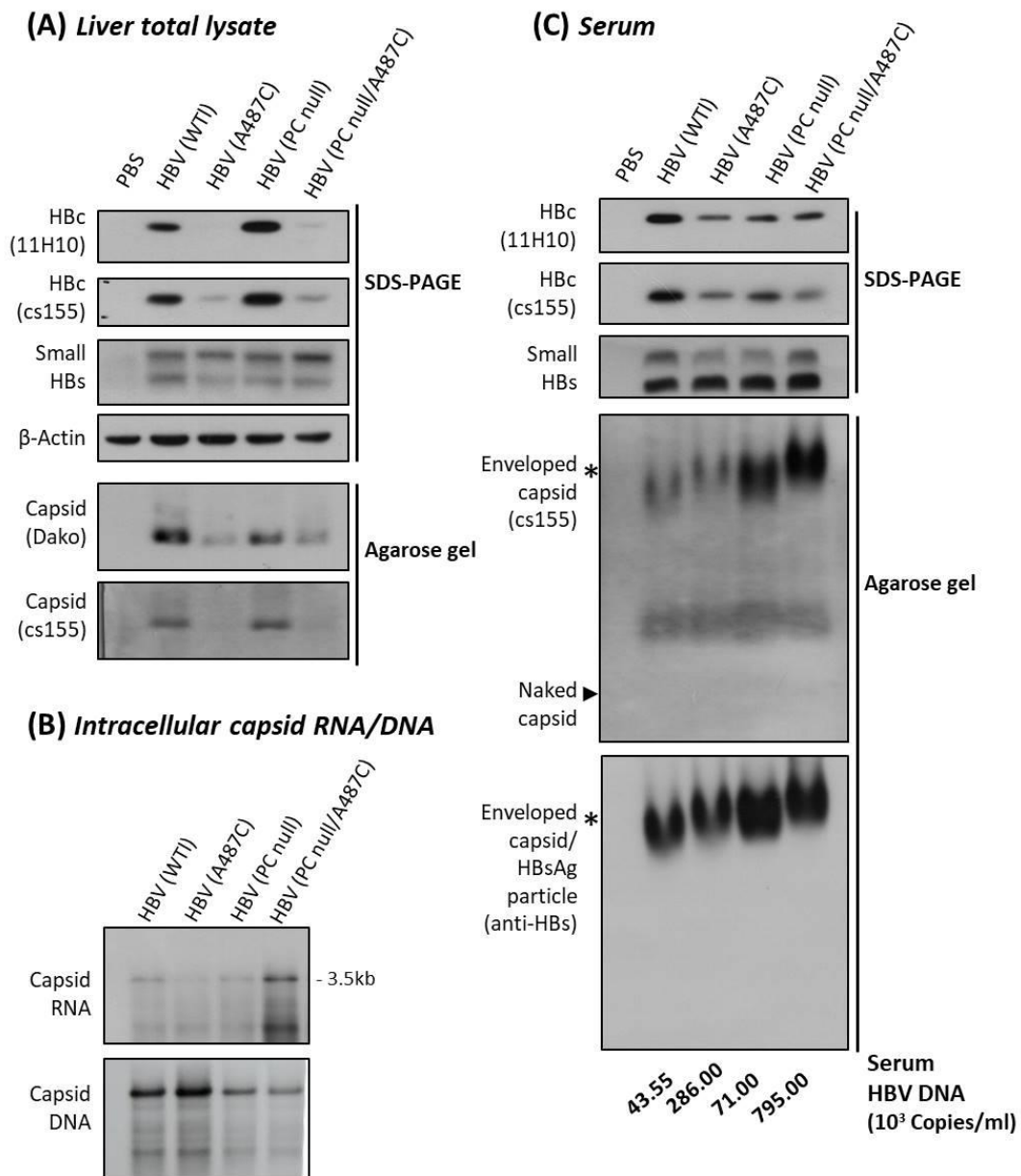
將(1) HBV-PC null、(2) HBV-PC null-A487C、(3) HBV-PC null-A487C-V50D、(4) HBV-PC null-A487C-V50N、(5) HBV-PC null-A487C-V50S 質體各別轉染至 Huh7 細胞表現 48 小時，再收取含有病毒顆粒之細胞培養液，以 20% sucrose cushion 純化後，(A) 進行 SDS-PAGE 分析細胞外 total core protein 含量，下方斜體數字為細胞外病毒純化後，利用 qPCR 測得之細胞外病毒顆粒相對 HBV DNA 含量。(B) 將細胞外病毒純化後以 agarose gel 分析細胞外之病毒顆粒 (左側為相對應之細胞內 capsid 含量分析)，細胞外含有 HBs 之病毒顆粒(enveloped capsid 及 HBsAg particle) 將位於 blot 上方「\*」標示處；naked capsid 則位於 blot 下方箭頭標示處。



圖六、於 Huh7 細胞破壞病毒 splicing acceptor site 487/488 對 HBV 之影響

將 HBV-WT、HBV-A487C、HBV-PC null、HBV-PC null-A487C 質體各別轉染至 Huh7 細胞表現，在 24 小時後收取細胞及含有病毒顆粒之細胞培養液，(A)將細胞蛋白質萃取液以 SDS-PAGE 分析細胞內 HBs protein 及 total core protein 含量；以 agarose gel 分析細胞中 capsid 含量，將 blot 用 Dako 抗體進行 hybridization。(B)將含有病毒顆粒之細胞培養液，以 20% sucrose cushion 純化後，以 SDS-PAGE 分析細胞外 total core protein 含量，並以 agarose gel 分析細胞外病毒顆粒，下方斜體數字為細胞外病毒純化後，利用 qPCR 測得之細胞外病毒顆粒相對 HBV DNA 量。

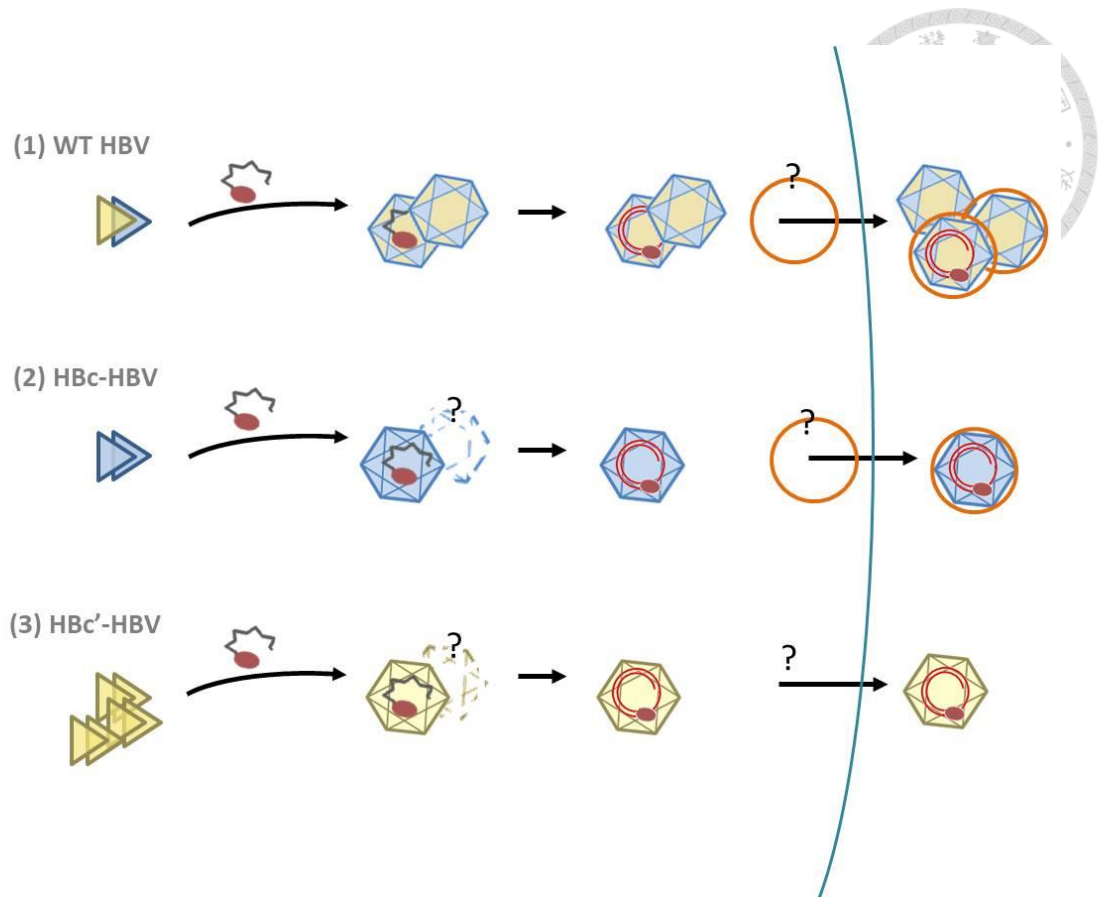




圖七、藉由 Hydrodynamic injection mouse model *in vivo* 驗證 HBc'於病毒複製之功能

利用 Hydrodynamic injection 於 C57BL/6 小鼠肝臟細胞各別表現 HBV-WT、HBV-A487C、HBV-PC null、HBV-PC null-A487C 質體，兩天後犧牲小鼠取得肝臟細胞蛋白質萃取液及血清，(A) 將肝臟細胞蛋白質萃取液以 SDS-PAGE 分析細胞內 HBs protein 及 total core protein 含量，另外以 agarose gel 分析細胞中之 capsid 含量，將 blot 分別用 Dako 及 cs155 抗體進行 hybridization。(B) 抽取細胞蛋白質萃

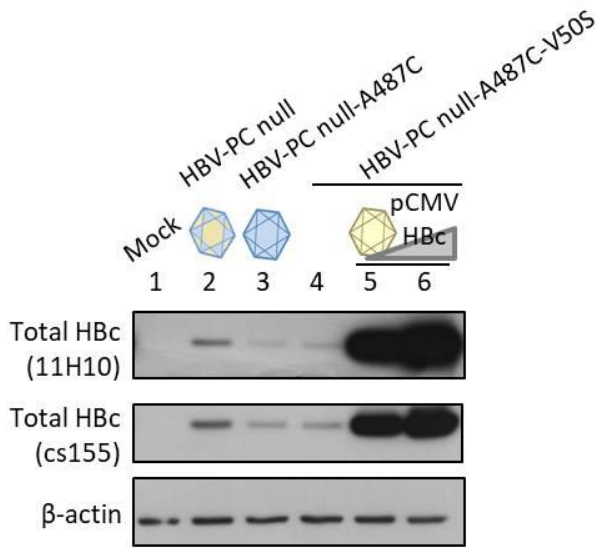
取液中 capsid RNA 及 capsid DNA 後，以 Northern blot 分析 encapsidated HBV RNA 含量；另外以 Southern blot 分析 encapsidated HBV DNA 含量。(B) 將小鼠血清直接以 SDS-PAGE 分析細胞外 total core protein 含量，並以 agarose gel 分析細胞外之病毒顆粒，下方斜體數字為利用 qPCR 測得之小鼠血清病毒顆粒 HBV DNA 含量。



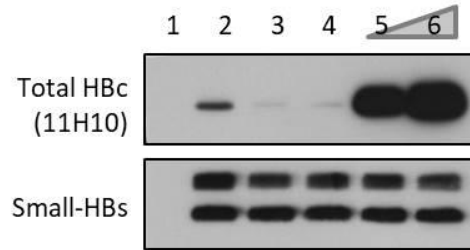
**圖八、HBV capsid 中 wild-type HBc 及 HBc' 功能之假說**

由於 wild-type HBc 和 HBc' 蛋白皆具有 dimerization 所需要的第 61 個胺基酸 Cysteine，因此可能形成 HBc / HBc' dimer，此具有正確 HBc 及 HBc' 比例的 dimer 進而以一定的效率正確包裹 HBV RNA 形成 capsid (encapsidation)，接著進行 DNA 複製及後續 envelopment 並釋出到細胞外。當 HBV replicon 無法表現 HBc 或 HBc' 時，可能因 capsid 不易形成或形成之 capsid 不穩定，導致 capsid 量減少而影響 HBV encapsidation 效率。雖然 HBc-capsid 及 HBc'-capsid 包裹之 HBV RNA 皆可完成 HBV DNA 複製，HBc-capsid 也能順利 envelopment 並從細胞釋出，但 HBc'-capsid 可能因缺乏 HBc 而導致無法順利 envelopment，以 naked capsid 的形式釋出到細胞外。

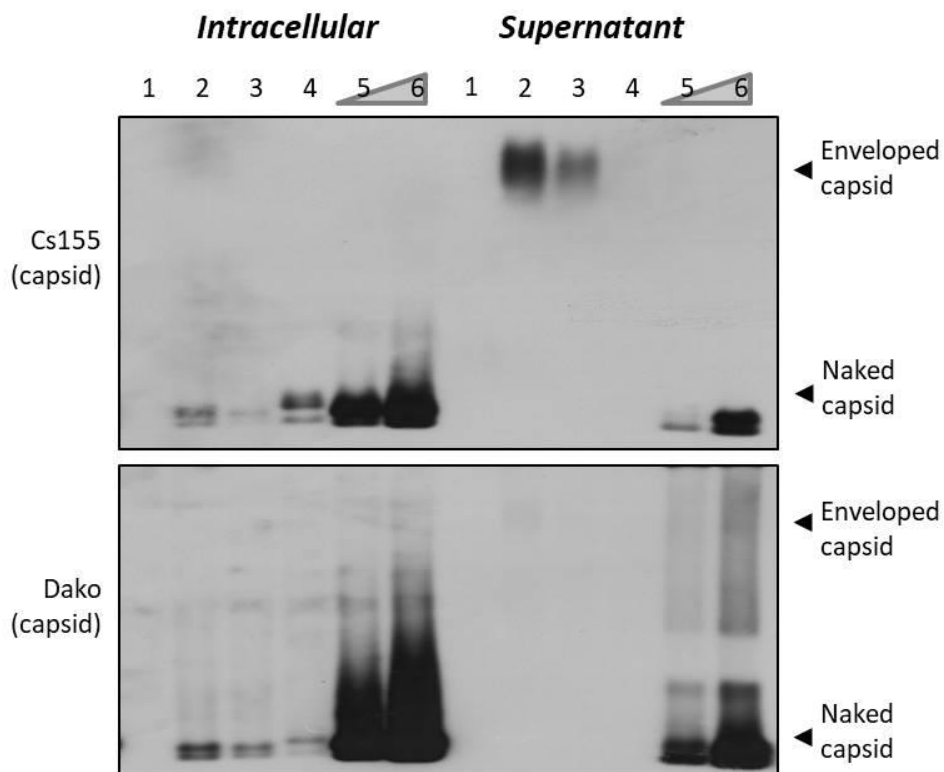
**(A) Intracellular**



**(B) Supernatant**

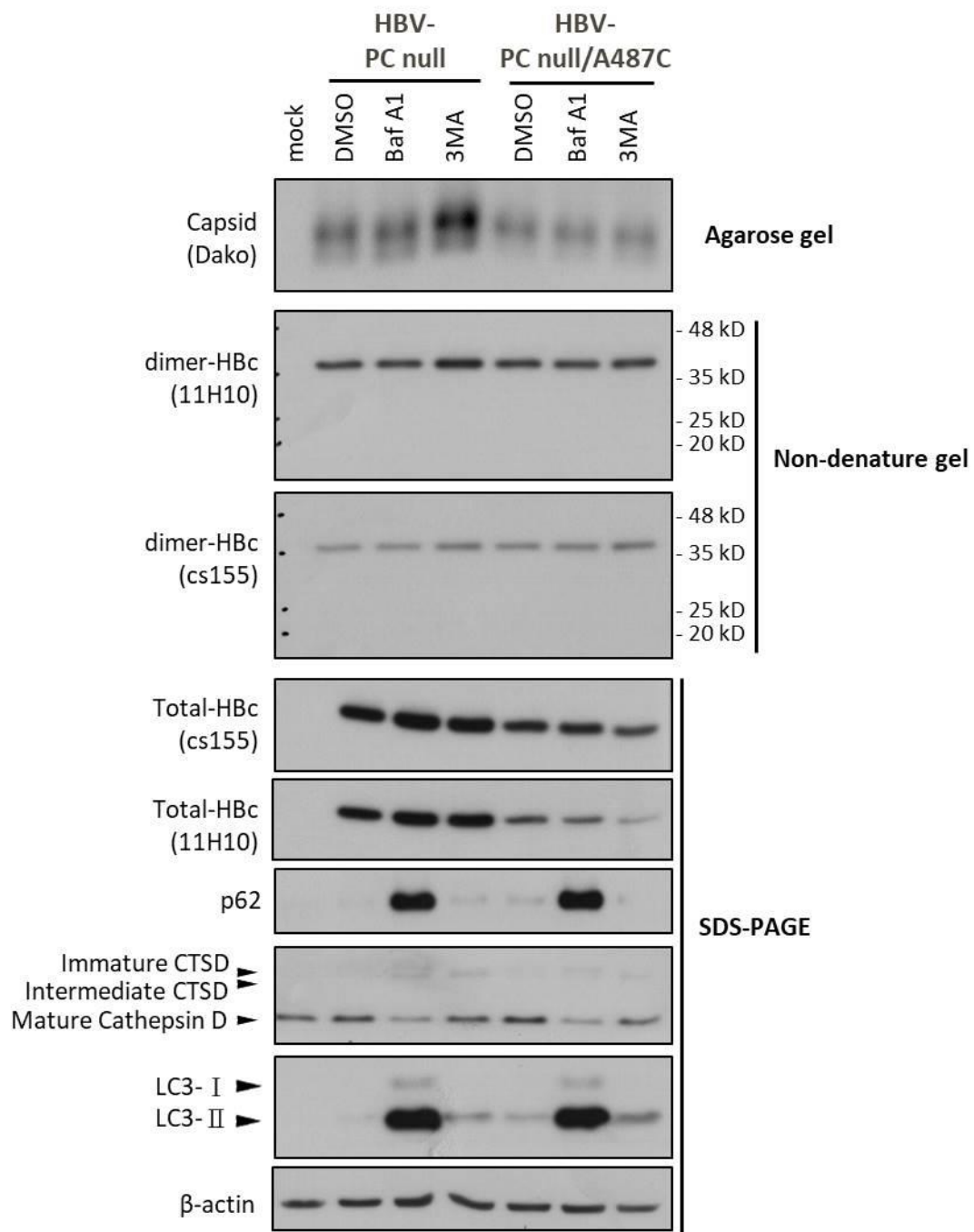


**(C)**



圖九、利用 HbC' replicon 共轉染 HbC 表現質體探討 HbC 對 capsid envelopment 之重要性

將(2) HBV-PC null、(3) HBV-PC null-A487C、(4) HBV-PC null-A487C-V50N 質體各別轉染以及(5) HBV-PC null-A487C-V50N 質體混合 1/20 量的 pCMV-HBc、(6) HBV-PC null-A487C-V50N 質體混合 3/20 量的 pCMV-HBc 共轉染至 Huh7 細胞中表現，在 48 小時後收取細胞，及含有病毒顆粒之細胞培養液，(A)將細胞蛋白質萃取液以 SDS-PAGE 分析細胞內 total core protein 含量，(B) 將含有病毒顆粒之細胞培養液，以 20% sucrose cushion 純化後，以 SDS-PAGE 分析細胞外 total core protein 含量，(C) 以 agarose gel 分析細胞中 capsid 以及細胞外純化病毒顆粒，將 blot 分別用 cs155 Ab 及 Dako Ab 進行 hybridization。



**圖十、藉由抑制 autophagy、lysosome degradation 檢驗 HBC'於穩定 HBC-capsid 之可能功能**

將 HBV-PC null、HBV-PC null-A487C 各別轉染至 Huh7 細胞中表現 48 小時，於最後 16 小時加入 lysosome、autophagy 降解路徑抑制劑：Bafilomycin A1 (Baf A1；100 nM)及 3-Methyladenine (3MA；5 mM)，萃取細胞蛋白質液分別以 agarose gel 分析

細胞中 capsid 含量；non-denature gel 分析 dimer-HBc 含量；以 SDS-PAGE 進行 Western blot 分析 total HBc 含量。p62、LC3 及 cathepsin D 分別作為 autophagy 及 lysosome 降解路徑抑制指標。

