

# 中山醫學院毒理學研究所碩士論文

Master Thesis, Institute of Toxicology,  
Chung Shan Medical and Dental College

## 利用 D 型肝炎病毒之核酸蛋白複體研究 D 型肝炎病毒之複製

Study the Replication of Human Hepatitis D  
Virus with HDV RNP Complex

指導教授：許國堂 博士

( Gwo-Tarng Sheu, Ph. D. )

研究生：蘇岳行 撰

( Yueh-Hsing Shu )

中華民國九十年七月

# 目 錄

	頁次
壹、中文摘要	1
貳、英文摘要	3
參、前言	
一、D 型肝炎病毒之發現	5
二、D 型肝炎病毒結構組成	5
三、HDV 基因體結構	6
四、Hepatitis Delta Antigen (HDAg)	7
五、Delta 抗原之結構	8
六、HDV RNA 複製	9
七、HDV RNA 複製與 polymerase 的相關性	12
肆、研究動機	13
伍、材料與方法	
一、材料	
1.材料與藥品	14
2.常用儀器	15
二、方法	
1. S-HDAg 的表現	16
2. S-HDAg 的純化	16
3. 細胞培養、分盤	18
4. 體外轉錄作用( <i>In vitro</i> transcription)	19
5. cDNA 和 RNP 之轉殖(Transfection)作用	19
6. 製備細胞均質液	20
7. 蛋白定量分析法	20
8. 西方點墨法(Western Blot assay)	21
9. RNA 純化	23
10. 北方墨點法 ( Northern blotting )	24
陸、 結果	
一、從表現 S-HDAg 的 BL21DE3 <i>E. coli</i> 中純化 S-HDAg	26
二、以西方點墨法確認所純化的 S-HDAg 抗原	28
三、將所純化的 S-HDAg 以 RNP 方式轉染並觀察是否會 啟動細胞中 HDV 的複製	29
四、觀察 HDV cDNA 及 HDV RNP 在細胞中複製的持	30

	續性	
	五、使用不同長度 HDV 基因股 RNA 以 RNP 轉染方式 觀察複製情形	31
柒、	討論	32
捌、	圖表及圖表說明	
	圖 1. 使用 DEAE-cellulose 陰離子交換樹脂去純化 重組的 S-HDAg	37
	圖 2. 使用 phosphocellulose (P11) 陽離子交換樹脂 去純化重組的 S-HDAg	38
	圖 3. 比較通過不同離子交換樹脂的 recombinant S-HDAg 純度	39
	表一. 整合 recombinant S-HDAg 通過不同離子交換 樹脂所純化的量和回收率	40
	圖 4. 以西方點墨法來確認純化的 S-HDAg 抗原	41
	圖 5. 利用 <i>in vitro</i> transcription 將 HDV cDNA 轉錄成 HDV 基因股 RNA	42
	圖 6. 利用西方點墨法確認 HDV 在細胞中的複製	43
	圖 7. 以西方點墨法了解 HDV 在細胞中複製的持續性	44
	表二. 不同位置的 HDV primer 用來建造不同長度的 template	46
	圖 8. (A) HDV 經 PCR 複製後產生的電泳凝膠分析圖 (B) HDV 基因股 RNA 的電泳凝膠分析圖	47
	圖 9. 以北方墨法確認使用不同長度 HDV 基因股 RNA 以 RNP 轉染方式來觀察 HDV RNA 複製情形	48
	圖 10. 使用不產生 HDAg 的片段為探針以北方點 墨法確認 HDV RNA 複製情形	49
玖、	附錄	
	附圖一、HDV 的結構圖	50
	附圖二、HDV 在寄主細胞內透過 Double Rolling-Circle Replication	51
	附圖三、Delta 抗原的結構	52
拾、	參考文獻	53

## 縮寫

Ammonium persulfate	APS
Diethyl pyrocarbonate	DEPC
Dimethyl sulfoxide	DMSO
Dithiothreitol	DTT
Dulbecco' s Modified Eagle Medium	DMEM
Enhance chemiluminescence	ECL
Ethylene diaminetetraacetic acid	EDTA
Ethidium bromide	EtBr
Fetal bovine serum	FBS
Phosphate buffered saline	PBS
Polyacrylamide gel electrophoresis	PAGE
polymerase chain reaction	PCR
Sodium dodecyl sulfate	SDS
Tetramethyl ethylenediamine	TEMED
RNA/S-HDAg	RNP

## 中文摘要

D 型肝炎病毒(hepatitis delta virus, 簡稱 HDV)為 B 型肝炎的衛星病毒，因為病毒的包裝需要 HBV 的外膜參與。HDV 病毒顆粒含有 1.7-kb RNA 環狀分子和許多 HDAg 蛋白。而 HDAg 蛋白具有 2 種型式，分別為由 195 胺基酸(24 kDa)組成的 S-HDAg (Small-HDAg)，其功能為參與 HDV RNA 的複製；而另一個則是由 214 胺基酸(27 kDa)組成的 L-HDAg (Large-HDAg)，其功能為參與病毒的包裝和抑制 HDV RNA 的複製。相較於 S-HDAg，L-HDAg 在 C 端多了 19 個胺基酸，但二者調節病毒的功能是截然不同的。在較早的實驗都是使用 HDV cDNA 來轉染而得到對 HDV 的瞭解，但在 HDV 感染的細胞中 RNA 直接的複製仍不清楚。在本研究中，我們從表現 S-HDAg 的 *E. coli* 中純化出 S-HDAg 蛋白並以西方點墨法(Western blot)確認後，再將所純化的 S-HDAg 與 HDV 基因股 RNA 以 RNP 轉染方式到 Cos7 細胞中，並且使用西方墨點法與北方墨點法(Northern blot)觀察細胞內 HDV 的複製狀況。實驗結果證明，由表現 S-HDAg 的 *E. coli* 中所純化的 S-HDAg 具有啟動病毒複製的功能。接著我們再進一步分析 HDV cDNA 的轉染方式和 RNP 轉染方式中 HDV 在細胞的複製持續性，發現使用 HDV cDNA 轉染的方式中 HDV 在細胞中持續時間大於以 RNP 轉染的方式。最後以不同長度的 HDV 基因股 RNA (1.7-kb、

1.6-kb、1.2-kb) 以 RNP 轉染方式來觀察 HDV RNA 的複製能力是否會因為基因板模的縮小而影響 HDV RNA 的複製，結果發現最短的 1.2-kb 之 HDV RNA 仍會持續的複製，這個結果將會對 HDV 複製中對 RNA 板模之要求產生極重要的討論。

## 英文摘要

Human hepatitis delta virus (HDV) is a satellite virus of hepatitis B virus (HBV) and requires HBV envelope proteins for packaging. HDV particles contain a ribonucleoprotein core composed of the circular 1.7-kb RNA genome and multiple copies of the only HDV-encode protein, delta antigen. There are two forms of delta antigens. The small form is a 24 kDa (195 amino acids) of S-HDAg, which is essential for replication of RNA genome. The large form is L-HDAg, which is a 27 kDa (214 amino acids), essential for particle assembly and inhibition of HDV RNA replication. Although L-HDAg only contains an additional 19 amino acids at the C-terminus of S-HDAg, they regulate viral function differently. Early studies using HDV cDNA transfection have generated large amounts of information about RNA-dependent RNA replication but that in infected cells is still not clear. In this study, we showed the expression and purification of recombinant S-HDAg from *E. coli* by ion-exchange chromatography. To characterize the activity in the early stage of HDV replication, the *in vitro* synthesized HDV genomic RNA and purified S-HDAg was mixed as RNP complex and transfected into Cos7 cells. We demonstrated the ability of the RNP complex to initiate the replication of HDV by Western and Northern blot analysis. The persistence of HDV replication has been examined by using the cDNA and RNP transfection systems and both could maintain HDV replication up to 26 days although the cDNA system seem retained the replication activity longer than RNP system. Finally we used different lengths (1.7-kb 1.6-kb 1.2-kb) of HDV genomic RNA with purified recombinant

S-HDAg to study the template requirement of HDV replication. Surprisingly, the data showed that all three different lengths of HDV genomic templates were able to initiate HDV replication. The ability of the 1.2-kb RNA template for replication will generate important discussion in the field of HDV replication.



## 前 言

### 一、D 型肝炎病毒之發現

D 型肝炎病毒 (hepatitis delta virus, 簡稱 HDV) 是由 Rizzetto 等人在 1977 時從慢性 B 型肝炎病人肝組織的免疫螢光染色研究中, 測到 D 型肝炎病毒的 delta 抗原 (Rizzetto et al., 1977) 進而發現的。因為只在 HBsAg 存在下才可發現 D 型肝炎病毒, 所以又可視為 HBV 的衛星病毒。而其感染方式主要為輸血感染, 而分為兩種型式: 一種為共同感染(coinfection), 即 B 型肝炎病毒和 D 型肝炎病毒同時感染到寄主, 而導致急性肝炎(Govindarajan et al., 1984); 第二種為重疊感染(superinfection), 即 D 型肝炎病毒感染到 B 型肝炎病毒帶原者, 而大部份重疊感染者都會發展為慢性肝炎, 甚至肝硬化 (Hoofnagle et al., 1989)。

### 二、D 型肝炎病毒結構組成

HDV 顆粒為直徑大小約為 36 nm 的球狀顆粒, 而以 cesium chloride (CsCl) gradient 離心測得 HDV 顆粒密度為  $1.24-1.25 \text{ g/cm}^3$ , 而其沈降速度則在 HBV 和空的 HBsAg 顆粒之間 (Rizzetto et al., 1980; Bonino et al., 1984; Bonino et al., 1986), 其外層由 HBV 的表面抗原 (HBsAg) 所提供, 裏面為 nucleocapsid 組成, 而 nucleocapsid

為直徑大約 19 nm 的球狀顆粒 (Ryu et al., 1993) , 是由 HDV 基因體及 delta 抗原所組合而成。在病毒粒子被破壞後, 裏面的 nucleocapsid 會被釋放出來, 此時可以偵測到 HDAg (Bonino et al., 1986)。

### 三、HDV 基因體結構

HDV 之基因大小為 1.7 kb , 在沒有被破壞狀況下為單股環狀 RNA 分子, 此基因體有非常高的 GC (60%)含量, 且極高的核甘酸序列互補, 而在自然情況下有大約 70% 分子內鹽基配對, 摺疊成無分枝的桿狀結構 (Sharmeen et al., 1988 ; Kos et al., 1986 ; Makino et al., 1987 ; Wang et al., 1986) (附圖一), 不論在 RNA 基因股或 RNA 反基因股上皆有核酸酵素 (Ribozyme) 活性, 可以將自身或外來的 RNA 分子在特定的核甘酸序列上產生切割作用及接合作用, 在 RNA 基因股上切割位置為 688/689 和 RNA 反基因股的 903/904 切割, 且切割後可再自行連接成為單套環狀的 RNA (Kuo et al., 1988; Lazinski et al., 1994 ; Wu and Lai, 1989)。因此 HDV 在所有的動物界病毒中是獨一無二的。從細胞培養所收集的病毒顆粒分析中, 可以知道每一條的 RNA genome 均與 30-70 個 delta 抗原結合 (Ryu et al., 1993)。在 HDV 的基因股和反基因股上都含有幾個短的 open reading frames (ORF) , 而只有反基因股的 ORF 可以出做 HDAg 蛋白 (Wang et al., 1986 ;

Makino et al., 1987)。而 HDV 的基因型 (genotype)大致可分為 3 種型式：第一種型式分佈在世界的大部份區域，包括歐洲、北美洲、中東、東亞洲，都曾被証實過。而第二種型式與第一種型式有 75% 相似性，只有在亞洲的台灣和日本才發現存在 (Wu et al., 1998)。第三種型式與第一、二種型式有 60-65%的相似性，只存在南美洲(Casey et al., 1993 ; Imazeki et al., 1991 ; Wu et al., 1995)。

#### 四、Hepatitis Delta Antigen (HDAg)

D 型肝炎病毒唯一產生的蛋白質為 delta 抗原，是由 0.8 kb mRNA 產生的，可分為小型 delta 抗原及大型 delta 抗原，大型 delta 抗原由 214 個胺基酸組成，大小約為 27-kD，而小型 delta 抗原由 195 個胺基酸組成，大小約為 24-kD (Kuo et al., 1989)。兩者差別為大型 delta 抗原比小型 delta 抗原在 C 端多了 19 個胺基酸，而這是由於在寄主細胞內透過 Double Rolling-Circle Replication (附圖二) 時，經由 double-strand-RNA-adenosine deaminase (dsRAD) 作用的結果，使得基因股 RNA 的核苷酸從 AUC 轉變成 ACC，而讓反基因股 (antigenomic)上小型 delta 抗原的 open reading frame 的 amber 終止密碼發生突變，從 UAG 轉變成 UGG，進而多延續 19 個氨基酸，而二者在功能上卻有極大的差異，小型 delta 抗原與病毒的複製是息息相

關的 (Kuo et al., 1989 ; Chao et al., 1990) , 而大型 delta 抗原會抑制病毒複製 , 但與病毒顆粒形成過程卻是必要的(Bichko et al., 1996)。當大型與小型 delta 抗原比例為 1 : 10 時 , 會使病毒的複製能力下降 8 倍 , 這種現象可能是病毒感染上的自我限制 (Chao et al., 1990 ; Glenn et al 1991 ; Sureau and White, 1994)。

## 五、Delta 抗原之結構

Delta 抗原的 N-terminal 其 2/3 為正電荷 , 而 C 端 1/3 處為沒有電荷的。L-HDAg 而和 S-HDAg 有幾個共同的結構區域 (附圖三) , 分別為:(1) coiled-coil 結構位於 N 端第 31-52 的胺基酸間, 由 4 個 leucine 或 isoleucine 組成, 所以分類成 Leucine-zipper 序列, 其功能為使 HDAg 產生雙套體和多套體 (oligomers) (Wang and Lemon, 1993 ; Xia and Lai, 1992) (2) NLS (nuclear localization signal) 位於 N 端第 68-88 胺基酸間, 其功能為提供 HDAg 能進入細胞核, 而在胺基酸 35-50 間也有個隱藏的 NLS, 但沒有活性(Chang et al., 1992 ; Chou et al., 1998) (3) HLH (helix-loop-helix) 區域位於 108-135 胺基酸間, 會幫助蛋白與蛋白間的相互反應 (Chang et al., 1993) (4) Arginine-rich motif (ARM) 為 RNA 結合區域, 有 2 個 ARM 分別位於 97-107 和 136-146 的胺基酸間, 此外在第 2-27 胺基酸間也有隱藏的 RNA 結合區域 (Poisson et al.,

1995 ; Poisson et al., 1993)。HDAg 會結合桿狀結構的 HDV RNA , 而不管是 HDV 基因股或反基因股都會結合。L-HDAg 在 C 末端比 S-HDAg 多了 19 個胺基酸 , 而最後的 4 個胺基酸 CRPQ 中的 cystein 位置會進行 Isoprenylation 訊號而增加 farnesyl group (Otto et al., 1996 ; Glenn et al., 1992)。Isoprenylation 對於 HDV 病毒包裝是必要的 , 且會增加 L-HDAg 與 HBSAg 的反應。在 S-HDAg 的 C 端有一 epitope 可以被單株抗體 9E4 辨識 (Hadler et al., 1992) , 但同個 9E4 單株抗體卻不能辨識 L-HDAg , 顯示兩種 HDAg 的 C 端結構不相同。

## 六、HDV RNA 複製

在細胞中看 RNA 複製的情形 , 大都使用含有 foreign promoter 的雙套體 (dimer)或三套體 (trimer) HDV 基因的質體 cDNA 去轉染細胞 , 這方式可以偵測 HDV 基因股 (genome) RNA 和反基因股 (antigenome) RNA 和 HDAg (Macnaughton et al., 1993a ; Kuo et al., 1989) , 但這系統無可避免的會有不自然的 HDV DNA 干擾 , 而現在已有非 cDNA 轉染的方式 , 就是使用 RNA 轉染系統。此系統有二種方式可以使用 : 一種為 ribonucleotide (RNP) 複合物 , 即由純化的 S-HDAg 抗原和 HDV 基因 (genome) (Sheu and Lai, 2000)組成 , 此方式可以知道早期的 HDV 複製情形 , 但其轉染的效率較低 ( Bichko et

al., 1994 ; Dingle et al., 1998)。另一種方式為兩種 RNA 的複合物其為 HDV RNA 基因 (genome) 和 *in vitro* 轉錄的 mRNA (可以做出 S-HDAg 抗原) (Modahl and Lai, 1998)。而這些方式都是經由雙滾圈 (double rolling circle) 的機轉進行的 (Branch et al., 1984), 是先以環型基因股(genomic) RNA 為模板開始第一回的 RNA 複製, 產生 0.8-kb mRNA 和一個較基因股長的反基因股 (antigenomic RNA) 中間產物。此反基因股 RNA 中間產物藉由其本身 ribozyme 區域的活性, 先自我切割再自我接合成反基因股的環狀單體 (monomeric) RNA, 而此反基因股的環狀單體 (monomeric) RNA 分子再當作模板, 繼而進行第二回雙滾圈式複製, 產生環狀基因股的 HDV RNA。許多研究結果証實在轉染 D 型肝炎病毒 DNA 單體、雙套體的培養細胞中, 皆可偵測到 HDV RNA 的多套體 (multimer) (Kuo et al., 1989; Macnaughton et al., 1993 ; Tai et al., 1993)。而在 cDNA 轉染的模式中, 0.8-kb mRNA 是很難被偵測的, 因為環型基因股(genomic) RNA 會先產生 polyadenylation signal 再形成 0.8-kb mRNA, 然後產生 HDAg 而 HDAg 會再回去抑制 polyadenylation signal, 此時才會產生一個較基因股長的反基因股 (antigenomic) RNA 中間產物 (Hsieh et al., 1990 ; Hsieh et al., 1991)。這也解釋了為什麼 0.8-kb mRNA 量會這麼少 (Lai et al., 1995)。而在已感染 HDV 的病人或猩猩的肝組織或細胞中和基因轉殖

(transgenic)老鼠中，0.8-kb mRNA 量都非常少，甚至偵測不到 (Polo et al., 1995a ; 1995b)。RNA 轉染的系統中，這 3 種不同量的 RNA 都可被偵測到：基因股(genomic) RNA、反基因股 (antigenomic) RNA 和 0.8-kb mRNA。因為其 RNA 轉染系統的複製方式是不同的，當基因股 (genomic) RNA 為模板透過雙滾圈(double rolling circle) 的機轉進行第一回的 RNA 複製時，0.8-kb mRNA 和反基因股 (antigenomic) RNA 分別進行複製且不會互相影響(Modahl et al., 1998)。

而在老鼠實驗中已証實當靜脈注射大量 HDV cDNA 時，可以在肝臟中偵測到 HDV 複製 (Netter et al., 1993)，然而 HDV 感染的量非常低，且不會造成慢性感染或肝炎。而基因轉殖(transgenic)老鼠實驗中 HDV RNA 在大部份組織都有豐富的量，包括骨骼肌、腦、睪丸和腎臟，但是在肝臟中量卻非常的少。也有証據顯示 HDV cDNA 注射到老鼠肌肉中，HDV RNA 會在骨骼肌複製並產生 HDVAg 的抗體 (Polo et al., 1995b)。最近有實驗証實將 HDV cDNA 或 *in vitro* 轉錄的 RNA 打入老鼠尾巴中，在肝臟中會有豐富的表現 (Chang et al., 2001)。

## 七、HDV RNA 複製與 polymerase 的相關性

真核中 RNA 的合成被 RNA polymerase 、 和 所調節 (Roeder et al., 1976)。在以 cDNA 的轉染系統中，RNA polymerase (Pol ) 對 pre-mRNA 的轉錄反應是需要的，而 Pol 也曾被証實與植物 viroid 和 HDV 複製有關 (Robertson et al., 1987 ; Taylor 1992 ; Lai 1995)。在表現 HDV cDNA 的 HepG2 細胞中，HDV RNA 不會被 actinomycin D 所抑制，但卻會被  $\alpha$ -amanitin 抑制 (Macnaughton et al., 1990)。同樣的實驗也証實 HDV RNA 的合成會被細胞中的 RNA Polymerase (Pol ) 調節，因為 HDV RNA 的合成會被低濃度的  $\alpha$ -amanitin (1ug/ul) 所抑制住 ( Macnaughton et al., 1991)。但這實驗是在含有 HDV cDNA 三套體 (trimer) 的情況下，因為 cDNA 會首先轉錄成 HDV RNA，再透過 RNA-dependent RNA 合成來複製。所以無法知道  $\alpha$ -amanitin 會去抑制調節 HDV cDNA 的 Pol 或者是抑制 RNA-dependent RNA 的合成。而最近有研究証實以 RNA 轉染系統中，mRNA 的轉錄會被低濃度的  $\alpha$ -amanitin (3ug/ml) 所抑制，這結果顯示 Pol 會參與 mRNA 的轉錄作用，而反基因股 (antigenomic) RNA (1.7kb) 並不會被濃度高於 25 ug/ml 的  $\alpha$ -amanitin 所抑制，這也顯示 HDV 反基因股 (antigenomic) RNA 與 Pol 無關 (Modahl et al., 2000a)。



## 研究動機

由之前文獻知道一般觀察 HDV RNA 在細胞中複製情形所使用的轉染方式主要有三種方式，分別是 HDV cDNA (Lee et al., 1993)、RNP 複合物(基因股 RNA 與純化的 S-HDAg) (Sheu et al., 2000) 和二種 RNA 複合物(基因股 RNA 或反基因股 RNA 與產生 S-HDAg 的 mRNA) (Modahl et al., 1998), 其中以 RNP 的方式為最符合 HDV 本身複製的過程，因為沒有經過 DNA 的干擾。所以本實驗利用此方式來觀察 HDV RNA 在細胞中複製的狀況。我們先從表現 S-HDAg 的 BL21DE3 *E. coli* 中，使用不同的離子交換樹脂來純化 S-HDAg。將所純化的 S-HDAg 以西方點墨法確認為真的 S-HDAg 蛋白，接下來分別使用 HDV cDNA 與 RNP (1.9-kb genomic RNA 與純化的 S-HDAg) 方式來轉染到 Cos7 細胞株中，觀察一系列 HDV 複製的情況，最後將長度分別為 1.9-、1.7-、1.6-、1.2-kb 的基因股 RNA 分別與純化的 S-HDAg 結合轉染到 Cos7 細胞株中，藉以了解基因股板模的長度對 HDV RNA 複製的重要性。

## 材料與方法

### 1. 材料與藥品

Restriction enzymes、bovine serum albumin (BSA) 由 Promega 公司購得。Dulbecco' S Modified Eagle Medium (DMEM)、sodium pyruvate 由 BioWest 公司購得。Fetal bovine serum (FBS)、penicillin/streptomycin、TRIzol reagent 購自美國 GIBCO BRL 公司。agarose、dimethyl sulfoxide (DMSO)、phenylmethylsulfonyl fluoride (PMSF)購自 AMRESCO 公司。Ethidium bromide (EtBr) 購自 Pharmacia 公司。Ammonium persulfate (APS) , tetramethylethylenediamine (TEMED) , 由 CPC 公司購得 , *In vitro* transcription 的 Kit (T7 MEGAscript)購自 Ambicon 公司。Anti-HDV Antibody 由陽明大學生化所吳妍華教授所贈與 , anti-human IgG-HRP 由 DAKO 公司購得。Bio-Rad protein assay reagent 由 Bio-Rad 公司購得。MOPS 由美國 Sigma 公司購得 , 35mm 及 10 cm 培養皿由美國 CORNING 公司購得。質體 HDV1.9/PKS 由美國加州大學河濱分校 Michael M. C. Lai 所贈與( Jeng et al., 1996)。質體 S-HDV/PET3a 由美國加州大學河濱分校 Michael M. C. Lai 所贈與( Sheu et al., 2000)。COS7 細胞株是源自猴子腎臟細胞 , 由嘉義大學張德卿老師所贈與。

## 2. 常用儀器

37 恆溫細胞培養箱：Forma Scientific

倒立式顯微鏡：OLYMPUS-CK40

真空乾燥機：Savant speed vaccum sc110

分光光度計：Amersham Ultrospec 2100pro

鏈聚合 連鎖反應器：Perkin Elmer 2400 PCR system

中量離心機：Hermle 220 V-20 roter

37 恆溫迴旋式震盪培養箱：Firstek Scientific S300R

迷你垂直電泳槽：Hofer

電泳轉漬槽：BIO-RAD

pH meter：JENCO microcomputer model 6200

高壓殺菌斧：TOMIN TM322

無菌操作台：HIGH TEN SCIENTIFIC CORPORATION ,  
Laminarflow

SONIFIER 250 機器：BRANSON

## 方法

### 1. S-HDAg 的表現

將含有表現 S-HDAg 的 BL21DE3 *E. coli* , 在 37 °C 下培養隔夜 , 然後取 1ml 菌液及 Ampicillin (50 ug/ml LB) 加入 1000 ml LB 培養液中 , 培養在 37 °C 下直到 OD<sub>600</sub> 達到 0.6 時 , 再加入 IPTG (0.2 mM) 到 1000 ml LB 培養液中。於 28 °C 培養 18 小時 , 然後在 4 °C 下離心 5000g 15 分鐘 , 將上清液去除。而沉澱物用 80 ml 冰的 extract buffer (50 mM Tris, 1 mM EGTA, 1 mM EDTA, 10 % Glycerol, 1 mM PMSF) 打散。再將菌液放在冰上 , 用 SONIFIER 250 機器 sonicate 細胞 5 次 , 每次 20 秒 , 再以 4 °C 離心 12,000 rpm 15 分鐘 , 取上清液跑 12.5% 的 SDS-polyacrylamide gel, 然後染 Coomassie blue (0.1 % Coomassie Brilliant Blue R, 50 % Methanol, 7.5 % Glacial acetic acid)。

### 2. S-HDAg 的純化

#### (1). 使用 DEAE-cellulose column 純化 S-HDAg

先用 extract buffer 泡成的 0.15 M NaCl 100 ml (含 1 mM 的 PMSF 及 10 mM 的 2-Mercaptoethanol) 將 DEAE-cellulose column pre-equilibrate , 再將細菌上清液 40 ml 加入 column 中。用 extract buffer 泡成的 0.15M NaCl 200 ml (含 1 mM 的 PMSF 及 10 mM 的

2-Mercaptoethanol) 沖掉無法結合在 DEAE-cellulose column 上的蛋白。再收集用 extract buffer 泡成的 1M NaCl 200 ml (含 1 mM 的 PMSF 及 10 mM 的 2-Mercaptoethanol) 通出來的菌液。跑 12.5% 的 SDS-polyacrylamide gel , 然後染 Coomassie blue。

## (2). 使用 phosphocellulose (P11) column 純化 S-HDAg

先用 extract buffer 泡成的 0.15M NaCl 100 ml (含 1mM 的 PMSF 及 10 mM 的 2-Mercaptoethanol) 將 phosphocellulose (P11) column pre-equilibrate。將通過 DEAE cellulose column 的菌液 (含較高量 S-HDAg) 加入 , 再用 extract buffer 泡成的 0.15M NaCl 100ml 沖洗無法結合在 phosphocellulose (P11) column 上的蛋白 (含 1mM 的 PMSF 及 10mM 的 2-Mercaptoethanol) , 然後用 extract buffer 泡成的 1 M NaCl 100 ml (含 1mM 的 PMSF 及 10mM 的 2-Mercaptoethanol) 及用 extract buffer 泡成的 1 M NaCl 與 0.2 M  $K_2HPO_4$  100 ml (含 1mM 的 PMSF 及 10 mM 的 2-Mercaptoethanol) 將結合在 phosphocellulose (P11) column 上的蛋白置換出來。跑 12.5 % 的 SDS-polyacrylamide gel , 然後染 Coomassie blue。

### (3). 使用 Ammonium sulfate 濃縮 S-HDAg

取 40 ml 通過 phosphocellulose (P11) column 的 S-HDAg 純化液，加入 60% Ammonium sulfate 放在冰上使用旋轉棒攪拌使其溶解。在 4 °C 下離心 12,000 rpm 20 分，去上清液，沉澱物用冰的 0.8 ml extract buffer 溶出。跑 12.5 % 的 SDS-polyacrylamide gel，然後染 Coomassie blue。

### 3. 細胞培養、分盤

COS-7 細胞株培養於含有 5% FBS，100 uM sodium pyruvate，0.22% sodium bicarbonate，0.03% L-glutamine，100 unit/ml penicillin/streptomycin 之 DMEM 細胞培養液中，將細胞株置於含 5% CO<sub>2</sub> 的 37 °C 恒溫培養箱中培養，每二天更換一次新鮮的培養液，細胞株均隔三 四天分盤培養。

細胞分盤，首先將培養皿中舊的細胞培養液吸出，加入 10 ml 的 Phosphate Buffer Saline，(PBS，0.02% KCl、0.02% KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>、0.8% NaCl，and 0.216% Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>) 磷酸緩衝溶液清洗一下，然後將磷酸緩衝溶液吸出，再加入 1ml 1X 的 trypsin (含 0.05% trypsin、0.02% EDTA，為一種內切酶，能幫助細胞脫離培養皿)，當 trypsin 覆蓋所有細胞後，即馬上吸出(盡量吸乾，因為對細胞會有傷害)，置於 37

培養箱 5 分鐘，使細胞能脫離培養皿，5 分鐘後可利用顯微鏡觀察細胞是否已脫離培養皿(若尚未完全脫離，可用手輕輕拍打培養皿邊緣，以幫助細胞脫落)，細胞脫落後，再以 9 ml 含有血清的 DMEM 細胞培養液 (抑制 trypsin 繼續作用) 沖洗細胞，並將細胞吸出，置至於 15ml 離心管中，於 4 離心 900 rpm 5 分鐘後(Beckman GPR Centrifuge)，將上清液去除 (盡量吸乾)，再加入適當細胞培養液混合均勻後再種入培養皿中。

#### 4. 體外轉錄作用 (*In vitro* transcription)

將質體 HDV1.9 kb / PKS 的 DNA (全長 HDV Genomic 1.7kb 再加上 200 nucleotide 的 HDV sequence)，先使用 *EcoRV* 限制 切成直線狀，再用 MEGAscript transcription Kit (Ambicon) ，利用質體中的 T7 promoter 將 1.9-kb HDV DNA 轉錄成 1.9-kb 的 HDV genomic RNA。

#### 5. cDNA 和 RNP 轉殖(Transfection)作用

先將 COS-7 細胞株培養在 35mm 培養盤中，經 12 小時培養後，將欲轉殖的質體 DNA (3 ug HDV1.9/PKS)、RNP (2 ug *in vitro* transcribed 1.9-kb RNA 加上 0.5 ug 純化的 S-HDAg)及 GFP 3 ug 分別加入 eppendorf 中，其餘補 HBS (HEPES-buffered saline : 20mM HEPES、150 mM NaCl, pH7.4) 25 ul，混合均勻放於室溫 10 分鐘，

另外各取 DOTAP 試劑 ( ROCHE ) 45 ul 與 105 ul 的 HEPES 混合均勻(DOTAP-HEPES), 置於室溫作用 15 分鐘, 此時將各 DNA 與 50 ul 的 DOTAP-HEPES 充分混合, 將舊的培養液移去, 再用 1X PBS 清洗一次, 加入 1ml 培養液, 放於 37 培養箱中培養, 經過 17 小時後, 取出並移除舊的培養液, 4 天後收細胞進行分析。

## 6. 製備細胞均質液

將轉殖的細胞用冰的 2ml, 1X PBS 洗 3 次再將 PBS 吸乾淨, 然後加入 RIPA buffer 200 ul (1% NP40、0.5% sodium deoxycholate、0.1% SDS、50 mM Tris-HCl PH8.0、150 mM NaCl, 須加入蛋白抑制物 cocktail)。4 10 分鐘後, 以微量吸取器吸取細胞萃取液, 並上下沖洗培養皿, 直到細胞完全被沖下來為止。取出置於 1.5 ml 的 eppendorf 中, 100 10 分鐘使 protease 使去活性, 再離心 2,000 rpm 30 秒, 取上層液至 1.5 ml 的 eppendorf 中, 並以 Bio-Rad 試劑測定蛋白濃度。

## 7. 蛋白定量分析法

以 Bio-Rad 試劑測蛋白濃度。先以 1 : 4 之比例混合 Bio-Rad reagent 與水, 使其成為 Bio-Rad working reagent, 並取標準品( BSA ) 1 ug 3 ug 7u g 10 ug 和待測物 5 ul 與已經稀釋的 Bio-Rad working



reagent 混合均勻成 1 ml 後，以分光光度儀於波長 595 nm 測吸光  
值，再與標準品 ( BSA ) 比較以求得待測物之蛋白濃度 ( ug/ml )。

## 8. 西方點墨法 ( Western Blot assay )

### (1). SDS PAGE 的製備

本實驗選用 Hoefer 之器材製備 SDS PAGE, 首先製備 12.5% 下  
膠，依序加入二次水 6.6 ml、 4X low buffer (1.5 M Tris、 0.4% SDS ,  
pH 8.8 ) 5 ml、 30% acrylamide 8.4 ml , 10% ammonium persulfate  
(APS) 70 ul、 TEMED 10 ul 混合均勻後，然後緩緩加入 1.5 mm 厚度  
的直立式電泳槽膠台座中，加到約佔膠台四分之三高度時，加入水壓  
平下膠並靜置 40 分鐘後，再開始製備上膠，依序加入二次水 3.85 ml  
4X upper buffer ( 0.5 M Tris、 0.4% SDS , pH6.8) 0.65 ml , 30%  
acrylamide 0.55 ml 10% ammonium persulfate (APS) 38 ul TEMED 10  
ul, 混合均勻後，加入直立式電泳槽膠台座中，然後將梳狀膠片(comb)  
放入。

### (2). SDS PAGE 之電泳操作及轉漬(Transfer blot)

將製備好的膠，先用 1X SDS-running buffer (Tris 3 g、 Glycine  
14.4 g、 SDS 1 g 加水至 1000 ml) 補滿，之後將 sample (30 ug) 與  
SDS-loading buffer ( 0.5M Tris-HCL pH6.8、 2g SDS、 10 ml glycerol、 1

ml 1% bromphenol blue, 250 ul 1M DTT/ml) 5ul 混合, 置於 dry bath 100

將 protein denature 5 min , spin down。跑 12.5% SDS-PAGE GEL ,

先用 80 volt 跑到 sample 接近上膠處底部時, 再用 120 volt 跑到 sample 接近下膠底部時, 即可停止。將 Hybond-C membrane 拿出來, 用 transfer buffer (Tris 3.03 g, Glycine 14.4g , pH 值調到 9.2 , 加 d<sub>2</sub>H<sub>2</sub>O 至 800 ml 再加 200 ml 的 methanol) 浸泡 5 分鐘, 拿 2 片濾紙出來, 泡在 transfer buffer 中備用, 先鋪 1 片菜瓜布在白色面版上, 再鋪 1 片濾紙在菜瓜布上。將 Hybond-C membrane 放上去, 跑好的膠, 刮下來後平放在 membrane 上。再鋪上另外 1 片濾紙及另 1 片菜瓜布, 將黑色面版蓋上, 放入濕式轉漬器中 (electrophoretic transfer) 中, 倒滿 transfer buffer 並接上電源。電壓 100 伏特, 時間 60 分鐘, 然後將 transfer 好的 Hybond-C membrane 泡在 200 ml 含 5 % 脫脂牛奶的 1X TBS (Tris 6.07 g, Tween20 2 ml, NaCl 8.766 g, 將 pH 值調到 7.5 加水至 1000 ml) , 4 overnight。取 1X TBS buffer 洗 2 次, 每次 15 分鐘。將 membrane 放入 HDV-antibody 1:1000 含 5 % 脫脂牛奶的 1X TBS milk 中, 在室溫搖 1 小時, 取 1X TTBS buffer (Tris 6.07 g, Tween20 4 ml, NaCl 8.766 g, 將 pH 值調到 7.5 加水至 1000 ml) 洗 4 次, 每次 20 分。再將 membrane 放入二次抗體 (Anti-Human-HRP) 中以 5 % 脫脂牛奶的 1X TTBS 作 2000 倍稀釋, 室溫搖 1 小時。再用 1X 的 TTBS buffer

洗 3 次，每次 20 分鐘。使用 NEN 呈色劑呈色。

## 9. RNA 純化

將轉殖的 COS-7 細胞株加入 TRIzol Reagent (GIBCOBRL)，抽取 RNA。先移除 35 mm 培養皿中舊的培養液，以 1XPBS 洗二次後，再加入 1 ml 1X 的 trypsin，置於 37 °C 培養箱 5 分鐘，加入 6 ml 的 1X PBS。置至於 15 ml 離心管中，於 4 °C 離心 900 rpm 5 分鐘後，將上清液去除。加入 0.5 ml 的 TRIzol Reagent 使其完全覆蓋住培養皿，在室溫下靜置 5 分鐘(與細胞作用後會呈現黏稠狀)，將細胞移至已滅菌過的 eppendorf 中，加入 100 ul 的 chloroform 震盪混和後，於室溫靜置 10 分鐘。以 4 °C 離心 12,000 rpm 20 分鐘，將上層透明液吸出移至新的乾淨 eppendorf 中，再加入 0.5 ml 的 isopropanol 混合均勻，置於室溫靜置 15 分鐘，使 RNA 沉澱下來後。於 4 °C 離心 12,000 rpm 20 分鐘，將上清液去除，離心後 RNA 沉澱物以冰的 1 ml 75% 酒精洗去殘餘鹽類，於 4 °C 離心 12,000 rpm 5 分鐘，再將上清液去除，於室溫下風乾，溶於 1X TE buffer (10mM Tris-HCl、1mM EDTA)。利用分光光譜儀於 260nm/280nm 時測其吸光值。須注意的是所有與 RNA 有關的試劑必須用 DEPC 水 (0.1% DEPC 完全混合後 37 °C 隔夜以破壞 RNase 後，再經溼熱高壓滅菌除去 DEPC)，所有的器皿、用具都必須滅菌。

公式： $\mu\text{g RNA} = \text{吸光值}(\text{OD}_{260\text{nm}}) \times 40 \mu\text{g/ml} \times \text{稀釋倍數}$

## 10. 北方墨點法 (Northern blotting)

北方墨點法是一種偵測 RNA 表現程度的方法。製備 1.2% 膠，取 2.52g agarose 加入 182.7 ml 的 DEPC 水，置於微波爐中加熱至沸騰。然後加入 21 ml 10X MOPS buffer (41.8g MOPS、800 ml DEPC 水，調 pH 至 7.0，再加 16.6 ml 3 M sodium acetate、200 ml 0.5M EDTA pH8.0，加 DEPC 水至 1000 ml)，待溫度冷卻至以手可碰觸之溫度後再加入 6.3 ml 37% formaldehyde，混合均勻後倒入已調好水平之製膠槽內，清除液面氣泡待其凝固即可使用。將 RNA 樣品加入 20  $\mu\text{l}$  denature buffer (50% formamide、17.5% 的 37% formaldehyde、10% 10X MOPS)，混合均勻，置於 65 作用 15 分鐘，立即放置冰上冷卻，稍離心後再加入 5  $\mu\text{l}$  loading buffer，混合均勻。將凝固的膠體置於電泳槽內，倒入約 1X MOPS 使其剛好蓋住膠，再將製備好的 RNA 樣品注入齒槽中，以 100 安培電壓跑 3 小時。在進行轉印之前先將膠浸於 200 ml 10X SSC buffer (3M NaCl、0.3M sodium acetate、pH 7.0) 搖晃清洗 45 分鐘，洗去鹽類。剪一張 Hybond-C member 兩張濾紙，將其置於 10X SSC buffer 中浸泡至濕。再將膠置於由濾紙及 10X SSC buffer 組成之鹽橋上，依序再蓋上 Hybond-C member 及濾紙，以玻璃棒趕走各層間的氣泡。最後再放上一疊吸水紙，以重物壓在上面，於室溫下轉印隔夜。將轉印

好的 Hybond-C member 取出, 置於紙巾上風乾, 再將 Hybond-C member 面朝上置於 80 °C 烤箱 2 小時(使 RNA 與轉印膜緊密結合), 放入轉筒中再加入 10 ml prehybridization buffer ( 0.9 M NaCl, 50 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 5 mM EDTA、 0.5% SDS、 10X Denharts' solution、 50% formamide、 50 ug/ml salmon sperm DNA、 50 ug/ml yeast tRNA), 將其置於 42 °C 下 3 小時。製備 probe, 取 100 mg DNA (當作 template) 與 Random primer 2 ul 及 ddH<sub>2</sub>O 混合成 14 ul, 於 95 °C 加熱 5 分鐘 (進行 denature), 立刻放入冰上冷卻 5 分鐘 (以維持構形), 再加入 2.5 ul 10X bufferf, 2.5 ul dNTP mixture ( 含 dATP、 dTTP 及 dGTP ), 5 ul <sup>-32</sup>P dCTP (50 u Ci) 及 1ul Exo-free klenow fragment polymerase, 置於 37 °C 下 15 分鐘然後室溫隔夜, 將其通過以 Sephadex G-50 填充形成的 column 將完成 probe 置於 95 °C 加熱 5 分鐘, 加入轉筒中 prehybridization buffer, 再置於 55 °C 下 8-16 小時, 進行 hybridization。將完成 hybridizaion 的 Hybond-C member 置於 strength buffer (0.5% SDS, 2X SSC) 中清洗 1 次, 再將其置於 strength buffern (0.5% SDS, 0.2X SSC)清洗至蓋格計數器檢測, 直到游離之放射線同位素清洗乾淨為止。Hybond-C member 固定於感光夾中, 置入 X 光底片, 將感光夾放在, 80 °C 冰箱內, 壓片時間長短由放射線強弱決定, 壓片結束後沖洗 X-光底片即可。

## 實驗結果

### 一、從表現 S-HDAg 的 BL21DE3 *E. coli* 中純化 S-HDAg

為了了解 HDV RNA 複製的情形，我們使用了 RNP 及 cDNA 轉染系統，並且大量純化 recombinant S-HDAg。而 S-HDAg 的純化不容易的，因為 S-HDAg 會與其他蛋白質聚集在一起，所以我們使用了不同的離子交換樹脂去純化 S-HDAg。首先將含 S-HDAg 質體的 BL21DE3 *E. coli* 培養隔夜，然後在 28 加入 IPTG 去誘導表現 S-HDAg，18 小時後將 *E. coli* 收下並抽取蛋白。先用 DEAE-cellulose 陰離子交換樹脂去純化 S-HDAg，使用 extract buffer 泡成的 1M NaCl 將 S-HDAg 沖出，可以看出 S-HDAg 呈一線性濃度產生，但還有許多化合物與 S-HDAg 聚集在一起，結果表示於圖 1 (lane5-8)。所以接下來再使用 phosphocellulose (P11) 陽離子交換樹脂，先用 extract buffer 泡成的 1M NaCl 將 S-HDAg 沖出但所得的量不純且量較少，所以再使用 extract buffer 泡成的 1 M NaCl 與 0.2 M  $K_2HPO_4$  將在管柱中的 S-HDAg 完全沖下，結果表示於圖 2 (lane5,6)，可看 S-HDAg 有非常純的量且無其他化合物存在。接下來將通過 phosphocellulose (P11) 陽離子交換樹脂後純化的 S-HDAg 加入 60% Ammonium sulfate 濃縮，結果表示於圖 3 (lane4)。表一是整合 recombinant S-HDAg 通過不同離子交換樹脂所純化的量和回收率，可看出從表現 S-HDAg 的 500 ml *E.*

*coli* 菌液中得到了 409 mg 的蛋白量，經過 DEAE-cellulose 陰離子交換樹脂所得到的蛋白量剩下約 64.6 mg，而再通過 phosphocellulose (P11) 陽離子交換樹脂後只剩下了 3810 ug 的蛋白量，而最後經 Ammonium sulfate 濃縮後得到了 1853 ug 的蛋白量，其 S-HDAg 回收率只有 0.45 %。

## 二、以西方點墨法確認所純化的 S-HDAg 抗原

經由不同離子交換樹脂純化後的 S-HDAg，我們要先確認是否為真的 S-HDAg，所以將表現 S-HDAg 的 *E. coli* 上清液及通過 DEAE-cellulose 陰離子交換樹脂和加入 Ammonium sulfate 濃縮的 S-HDAg，以從 HDV 病人血清而來的抗體來確認所純化的 S-HDAg 是否為真的，結果見於圖 4，可以看 S-HDAg 可明顯被偵測，而 BL21DE3 的細胞液為 negative control，所以不會 S-HDAg 被偵測出。



### 三、 將所純化的 S-HDAg 以 HDV RNP 方式轉染並觀察是否會啟動細胞中 HDV 的複製

由圖 4 的結果知道所純化的 S-HDAg 為真的，所以接下來測試所純化的 S-HDAg 是否具有功能性。首先將 1.9-kb 的 HDV cDNA(為 1.7-kb 基因股 RNA 再加上 200 bp 的 Ribozyme domain)以 *EcoR* 限制處理成直線後，再利用其質體本身的 T7 promoter 以 *in vitro* transcription 的方式將 HDV cDNA 轉錄成 1.9-kb 的 HDV 基因股 RNA，結果見圖 5 再分別用 GFP HDV1.9/PKS cDNA 及 RNP (*in vitro* transcribed 1.9-kb RNA 加上純化的 S-HDAg)與 DOTAP 混合送入 Cos7 細胞後，經四天培養後以 RIPA buffer 收下細胞，先進行蛋白定量分析之後取 40 ug 的蛋白量做西方點墨法分析，以從 HDV 病人而來的抗體來辨認，結果表示於圖 6，可看出 GFP 為 negative control，所以不會有 HDAg 表現，而不管是 HDV cDNA 或 HDV RNP 轉染都會明顯表達 S-HDAg 和 L-HDAg，這也証實了所純化的 S-HDAg 具有功能性。

#### 四、觀察 HDV cDNA 及 HDV RNP 在細胞中複製的持續性

由圖 6 已知純化的 S-HDAg 具有功能性，所以接下來繼續觀察 HDV 在細胞中的複製可持續多久。分別將 HDV cDNA 與 HDV RNP 轉染到 Cos7 細胞株中，四天後以 1 TE 分盤，取 1/3 的細胞量分至下一個培養皿中再將剩下的 2/3 細胞量以 100 ul RIPA buffer 打散，每隔 4-6 天分盤一次，此方式持續進行 38 天左右，然後進行蛋白定量分析，分別取 40 ug 細胞蛋白量做西方點墨法並以從 HDV 病人而來的抗體來辨認，結果見於圖 7，可看出不管以 HDV cDNA 或 RNP 轉染的方式其 HDV 在細胞中複製都呈現一曲線關係，而以 HDV cDNA 轉染到細胞中複製 HDV 的時間可持續近 40 天，較 RNP 轉染到細胞中的 32 天維持較久的複製能力。

## 五、 使用不同長度 HDV 基因股 RNA 以 RNP 轉染方式觀察複製情形

接下來想觀察去除某些序列是否會影響 RNA 的複製，於是將 HDV-1.9/PKS cDNA 的質體分別以不同 primer (見表二)，經過 PCR 的複製後經電泳分析得到 1.9-kb、1.7-kb、1.6-kb 的片段，而 1.9-kb 的片段再以 *EcoR* 限制處理後以電泳分析得到一個 1.2-kb 及二個約 300bp 的片段。分別將膠上 1.7-kb、1.6-kb、1.2-kb 的片段切下純化，再分別以 *in vitro* transcription 的方式利用本身的 T7 promoter 使其轉錄成 1.7-kb、1.6-kb、1.2-kb 的 HDV 基因股 RNA，結果見圖 8。

分別將這些 HDV 基因股 RNA 以 RNP 方式轉染到 Cos7 細胞中，4 天後使用 TRIzol 抽 RNA 並取 30 ug 的 RNA 做北方點法，並將 HDV1.9/PKS 質體以 T7 及 SP6 的 primer 經 PCR 複製後的 1.9-kb HDV DNA 做 prob 去偵測，結果表示於圖 9，可看出這些不同長度的 genomic RNA 在細胞中都有表現 HDV 的 RNA，推測 1.2-kb 的基因股 RNA 仍然可以進行複製。接下來將 HDV1.9/PKS 的質體以 *EcoR* 限制處理後以電泳分析取 300 bp 左右的片段來做 probe，而此區段為不產生 HDAg 的片段，並以北方點墨析法偵測，結果表示於圖 10，可看出 1.9-kb 1.7-kb 和 1.6-kb 的 HDV RNA 都有表現，而 1.2-kb 的 HDV RNA 卻無表現，可見得 1.2-kb 的複製並無 1.6、1.7-和 1.9-kb 板模的污染。

## 討論

在這實驗中我們使用了 RNP 轉染的方式，避免了 DNA 的干擾並觀察 HDV RNA 在細胞中 RNA 直接合成的情形。所以我們首先純化了 S-HDAg。之前文獻指出 HDAg 可以在原核及真核系統中表現 (Chang et al., 1988 ; Lin et al., 1990 ; Kos et al., 1991)。曾有研究使用 Recombinant Baculoviruses 系統在 Sf9 細胞中大量表現 HDV 蛋白，並且証實 S-HDAg 和 L-HDAg 都為磷酸化蛋白，且 L-HDAg 磷酸化的量比 S-HDAg 大於 6 倍，但是利用此方式表現的 HDAg 不是水溶性的，這對於 HDAg 的結構及功能都有一定的影響 (Hwang et al., 1992)。之後有報告指出可以在 *E. coli* 中大量表現水溶性 S-HDAg 並純化 (Sheu and Lai, 2000)。於是我們利用此方式將在 *E. coli* 中表現水溶性 S-HDAg，利用 DEAE-cellulose chromatography 和 phosphocellulose (P11) chromatography 並以 Ammonium sulfate 濃縮後，大約可從 500 ml 表現 S-HDAg 的 *E. coli* 培養液中純化出 1.8 mg 的 S-HDAg，可看出經由 phosphocellulose (P11) chromatography 後很顯著性改變 S-HDAg 的純度。在自然界中 S-HDAg 在病毒複製中是必須的，如果將 HDV cDNA 轉染到細胞並使基因複製，也是需 cDNA 可以做出有功能性的 S-HDAg 蛋白才行 (Kuo et al., 1989)。之前有實驗証實只轉染 HDV RNA 到細胞中，然而其結果都不會造成基因 RNA

的複製,但是當細胞中已經含有 S-HDAg 後則複製情形便會產生(Kuo et al., 1989)。由之前的文獻很清楚知道在 *in vivo* 情況下 S-HDAg 可以穩定 HDV RNA 的環型結構(Lazinski and Taylor, 1995)和促進 ribozyme 的切割(Jeng et al., 1996a ; 1996b)。為了確定純化的 S-HDAg 之正確性,我們使用了抗 HDV 病人的抗體去確認所純化的 S-HDAg,並將確認後的 S-HDAg 蛋白應用到 HDV RNA 在細胞中最初的複製,這便能証實所純化的 S-HDAg 蛋白是否能與 HDV RNA 形成 RNP 的複合物,並具備生物功能去啟動 HDV RNA 在細胞中的最初複製。且經由實驗我們已証實了純化的 S-HDAg 蛋白與能 *in vitro* transcription HDV 基因股 RNA 在細胞中產生 HDV RNA 複製。Dingle 等人(1998)將所純化的 S-HDAg 與 HDV 基因股 RNA 以 RNP 的方式轉染到細胞中,並啟動 HDV 基因股和反基因股的 RNA 合成,其中以反基因股的 RNA 與純化-HDAg 的 RNP 轉染方式結果並未報告出來。另外的實驗由 Modahl 等人(2000a)使用基因股 RNA 或反基因股的 RNA 與能產生 S-HDAg 的 mRNA 以兩種 RNA 轉染方式到細胞中,結果都已証實能夠啟動 HDV RNA 在細胞中的複製。Sheu 等人(2000)証實了以純化的 S-HDAg 與基因股 RNA 能啟動 HDV RNA 在細胞中的複製,但以反基因股 RNA 與純化的 S-HDAg 則無法複製,其原因有可能是 S-HDAg 在細胞中新合成時,S-HDAg 產生了一些修飾作用,經此修飾作用使

得反基因股 RNA 與 S-HDAg 的轉染方式可以在細胞中複製。不只是 S-HDAg 會以不同型式存在，Modahl 等人(2000a)以兩種 RNA 轉染系統中也証實了 mRNA 和反基因股 RNA 的合成也有不同的酵素參與，因為 mRNA 的合成會被低濃度的  $\alpha$ -amanitin (3ug/ml) 所抑制，但是反基因股 RNA 則在  $\alpha$ -amanitin 高於 25ug/ml 都不會被抑制，這証實了反基因股 RNA 的合成不需 RNA Polymerase (Pol II) 參與可是 mRNA 的合成卻需 Pol II 的幫助。Modahl 等人(2000b)也証實了 L-HDAg 會抑制基因股 RNA 合成卻不會抑制反基因股 RNA 合成。在以 HDV cDNA 或 HDV RNP 轉染方式中 HDV RNA 在細胞中到第 18 天都有持續的複製性，在之前文獻中使用 HDV cDNA 轉染的系統中都只觀察到 20 幾天還有表現便沒有繼續觀察，所以我們繼續觀察到第 38 天。從我們的 HDV cDNA 轉染到 Cos7 細胞中可看出其複製的持續性呈一曲線性關係，而且在第 22 天時其 HDV RNA 複製能力達到最高，到了第 38 天時可看出 S-HDAg 已不存在，只剩下 L-HDAg 還有少量存在。這映對了當 HDV 複製到一限度時病毒的複製會自我限制，因此 L-HDAg 會大量產生並且啟動包裝病毒顆粒的步驟並抑制複製作用。之前文獻証實經過 RNA editing 所產生的 L-HDAg 可停止細胞中病毒 RNA 合成並使病毒粒子包裝(Lai et al., 1995)，而在以 HDV cDNA 為轉染的系統中當 L-HDAg 與 S-HDAg 比例為 1:10 時會完全

廢除 HDV 基因股 RNA 和反基因股 RNA 的合成(Chao et al., 1990 ; Glenn et al., 1991)。我們以 cDNA 轉染方式在 Cos7 細胞中的 HDV RNA 複製時間較 RNP 久，可能與本身內生性及外面含有 CMV promoter 與 SV40 有關。

我們以 RNP 轉染到細胞中其 HDV RNA 複製能力在 18 天時便達到最高接下來持續的減少，而在第 32 天時 L-HDAg 和 S-HDAg 都同時消失，這符合了之前研究証實的以 RNA 轉染的系統中 HDV 的 RNA 與 mRNA 都會同時進行有關。因為反基因股 RNA 產生 editing 而使 mRNA 產生 L-HDAg, 當 HDV RNA 複製能力失去時則 RNA 與 mRNA 同時也會消失，如此與 HDV cDNA 轉染方式失去 HDV RNA 複製時 HDAg 消失的情形也不同。從 RNA 轉染的系統中研究証實少量的 L-HDAg 已足夠抑制從反基因股 RNA 而來的 HDV 基因股 RNA 合成，但是從基因股 RNA 所合成的反基因股 RNA 和 mRNA 則不會被 L-HDAg 抑制，除非 L-HDAg 的量已大過 S-HDAg。這也解釋了為什麼 HDV RNA 在開始複製時，等量的 L-HDAg 和 S-HDAg 能同時存在，而且這也代表了基因股 RNA 與反基因股 RNA 合成的機制可能不同 (Modahl et al., 2000b)。

使用不同大小片段的 HDV 基因股 RNA 以 RNP 轉染到細胞中，然後以全單位 HDV 所做成的 DNA 探針都可以測得在細胞中 HDV

RNA 複製，其原因應該是這些不同片段的 HDV 基因股 RNA 都具備至少 2 個區域的 Ribozyme。因為 Ribozyme 可以幫助基因股 RNA 和反基因股 RNA 上的切割而形成單位長度的 RNA (Wu et al., 1989; Wu et al., 1998; Kuo et al., 1988; Sharmeen et al., 1988)，所以其對 HDV RNA 複製是必要的(Macnaughton et al., 1993a)。在 *in vitro* 和 *in vivo* 中 Ribozyme 的一些核苷酸突變會使得 HDV RNA 無法複製(Jeng et al., 1996b)。而在 *in vitro* 中的 Ribozyme 切割與 pH 值、溫度和離子存在下有相關性(Lazinski et al.,1995)。如果在 *in vivo* 下，HDAg 也被證實會促進 HDV 切割，所以只要在 Ribozyme 存在下便可促進其複製能力(Jeng et al., 1996a)。我們也以不產生 HDAg 的片段做探針，並以北方點墨析法偵測，結果顯示 1.9-kb、1.7-kb 和 1.6-kb 的 HDV RNA 都有表現，而 1.2-kb 的 HDV RNA 卻無表現，分析其原因為此探針的片段沒有在 1.2-kb 的序列上，所以導致無法偵測，但是 1.2-kb 的板模顯然足以啟動 HDV 的複製，而這也證明 1.2-kb 的複製並無 1.6-、1.7-和 1.9-kb 板模的污染。雖然以前的報告指出 HDV 的基因股互相對稱性很高，我們在此看到 1.2-kb 大小的 HDV 基因股 RNA 仍足以支持 HDV 複製的需要，可能是其中所需的 HDV mRNA 的必要序列從 1631 bp 開始仍包含在 1.2-kb RNA 中且 Ribozyme 也完整，所以可以進行 HDV 的複製。



## 圖表及圖表說明

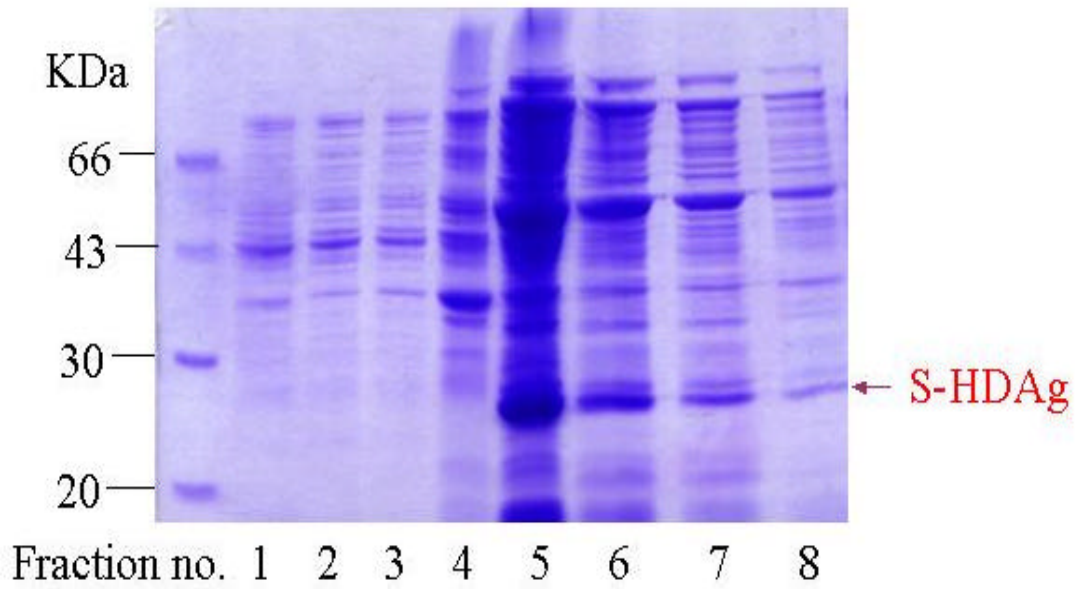


圖 1. 使用 DEAE-cellulose 陰離子交換樹脂去純化重組的 S-HDAg。  
利用 extract buffer 泡成的 1M NaCl 將 S-HDAg 沖出，將不同管的菌液跑 12.5% SDS-polyacrylamide gel 再染 coomassie blue。

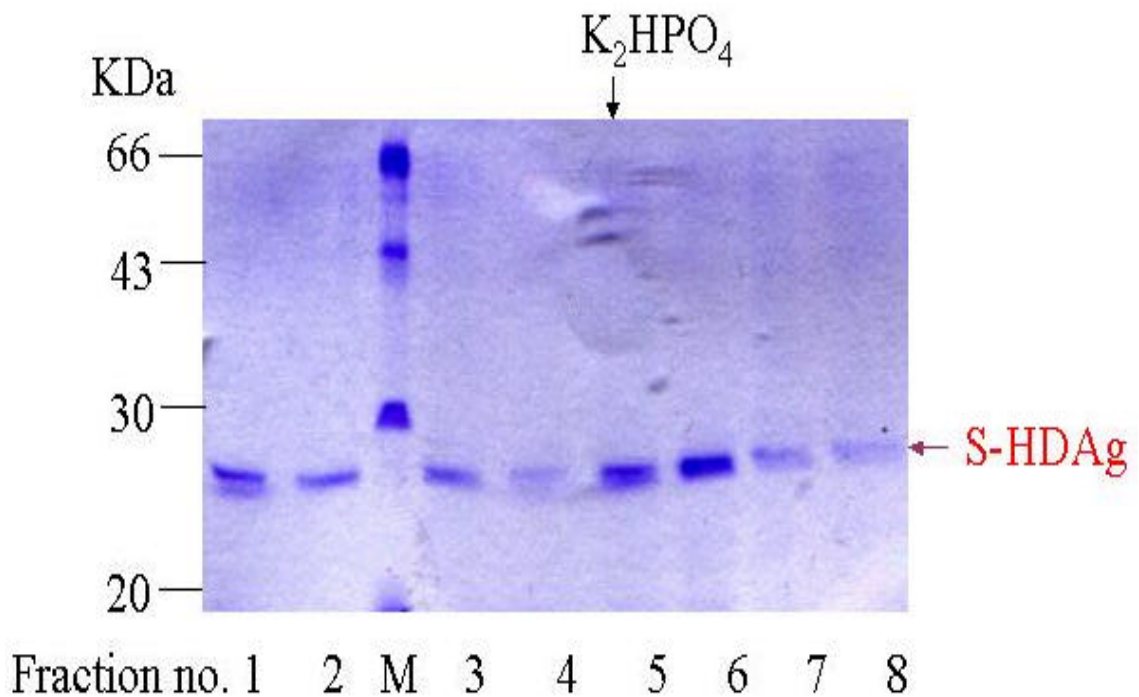


圖 2. 使用 phosphocellulose (P11) 陽離子交換樹脂去純化重組的 S-HDAg。

將通過 DEAE-cellulose 陰離子交換樹脂的菌液，用 extract buffer 泡成的 1 M NaCl 與 0.2 M  $K_2HPO_4$  沖出 S-HDAg 抗原。將不同管的菌液跑 12.5% SDS-polyacrylamide gel 再染 coomassie blue。

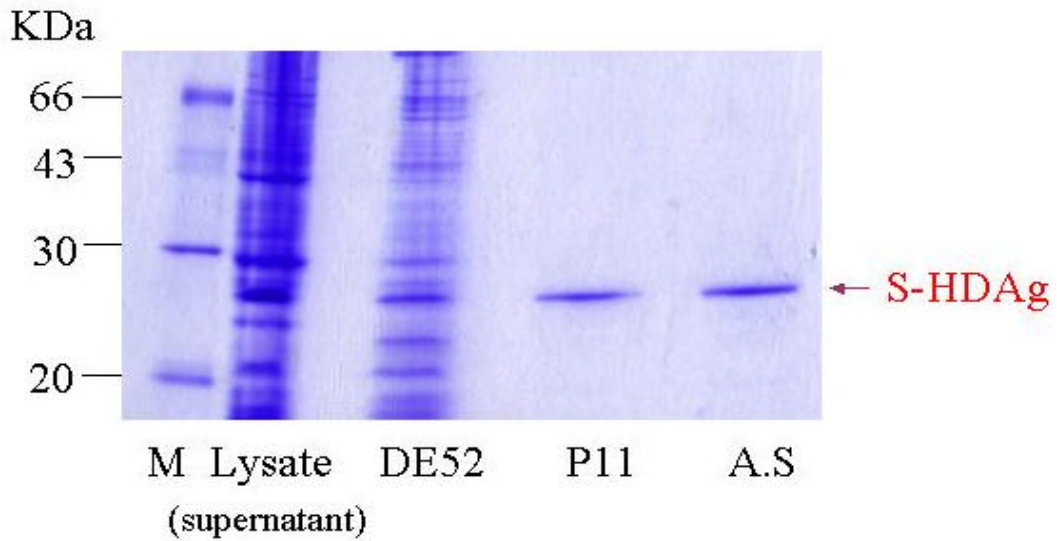


圖 3. 比較通過不同離子交換樹脂的 recombinant S-HDAg 純度。

Lysate 代表表現 S-HDAg 的 BL21DE3 *E. coli* 經 sonication 後離心取得的上清液。DE52 代表 Lysate 通過 DEAE-cellulose 陰離子交換樹脂的菌液 P11 代表通過 DE52 的菌液再通一次 phosphocellulose (P11) 陽離子交換樹脂所得的菌液。A.S 代表通過 phosphocellulose (P11) 陽離子交換樹脂的菌液加入 60% Ammonium sulfate 濃縮。

500ml LB	ml	ug/ul	total (ug)	Yield (%)
Lysate	45.0	9.10	409698.0	100
DE52	75.0	0.86	64604.40	15.77
P11	40.0	0.10	3810.12	0.93
Ammonium sulfate	0.8	2.32	1853.16	0.45

表一. 整合 recombinant S-HDAg 通過不同離子交換樹脂所純化的量和回收率。

Lysate 代表表現 S-HDAg 的上清液。DE52 代表通過 DEAE-cellulose 陰離子交換樹脂的菌液。P11 代表通過 phosphocellulose (P11) 陽離子交換樹脂所得的菌液。A.S 代表加入 Ammonium sulfate 後濃縮的 S-HDAg。

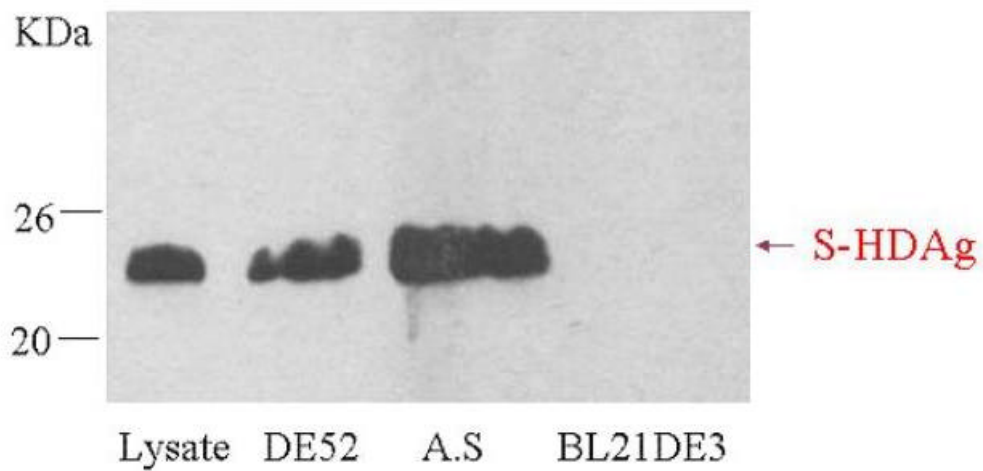


圖 4. 以西方點墨法來確認純化的 S-HDAg 抗原。

以 HDV 病人而來的抗體來偵測所純化 S-HDAg 的是否為真的 S-HDAg 抗原。Lysate 代表表現 S-HDAg 的 *E. coli* 上清液。DE52 代表通過 DEAE-cellulose 陰離子交換樹脂的菌液。A.S 代表通過濃縮的 S-HDAg BL21DE3 為不加 IPTG 的 *E. coli* 菌液當做 Negative control, 所以不會有 S-HDAg 被偵測出。

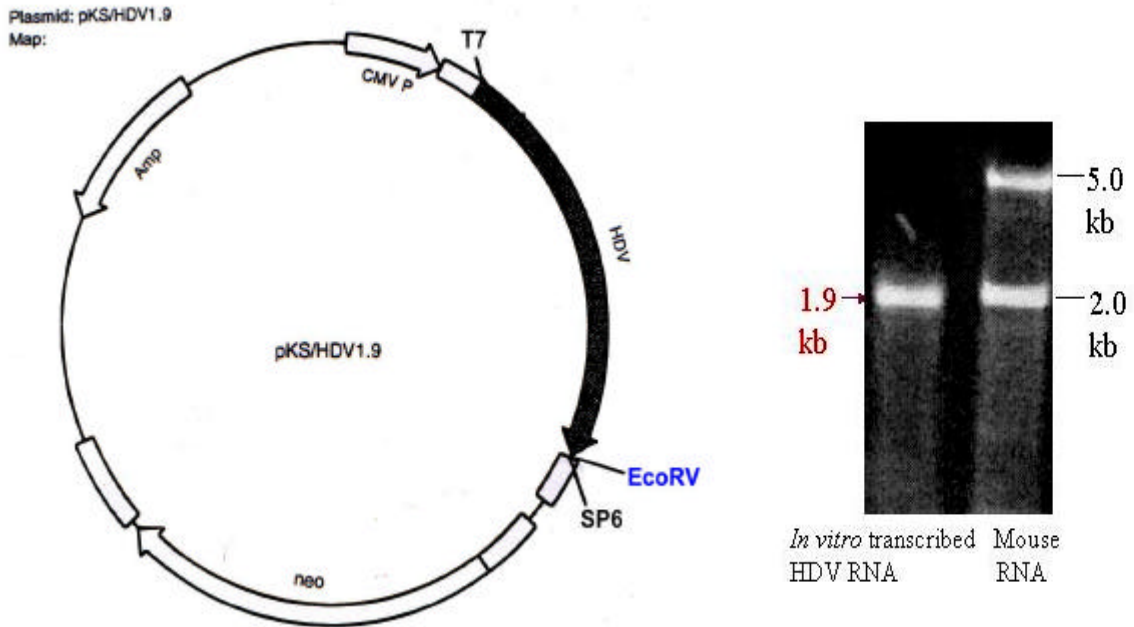


圖 5. 利用 *in vitro* transcription 將 HDV cDNA 轉錄成 HDV 基因股 RNA。

將 HDV1.9/PKS 的質體先用 *EcoR* 限制 切成直線狀，再利用其質體本身的 T7 promoter 以 *in vitro* transcription 的方式將 HDV cDNA 轉錄成 1.9-kb 的 HDV 基因股 RNA。Mouse RNA 是當作 Marker。

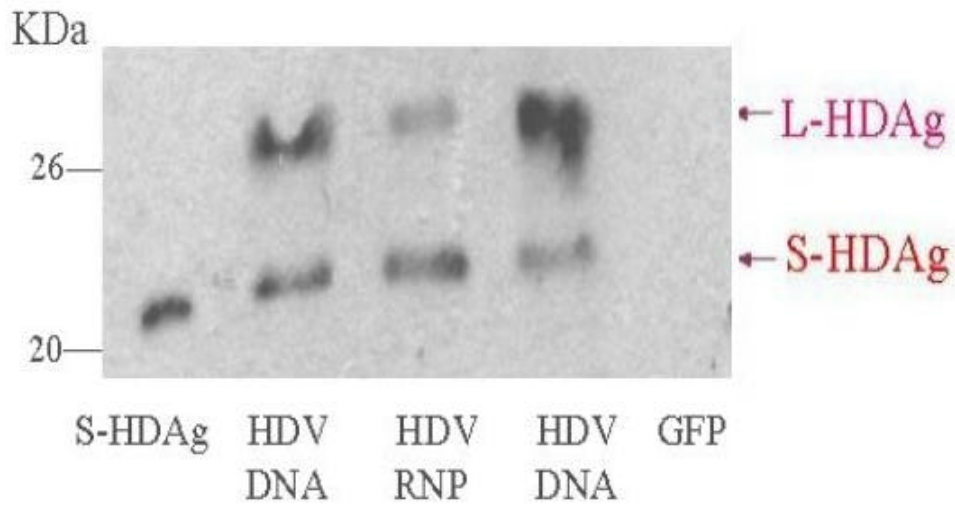


圖 6. 利用西方點墨法確認 HDV 在細胞中的複製。

分別將用 GFP、HDV cDNA 及 RNP 轉染到 Cos7 細胞後，四天後以 RIPA buffer 收下細胞，取 40 ug 的蛋白做西方點墨法分析，並以從 HDV 病人而來的抗體來辨認 HDV 代表 HDV1.9/PKS cDNA。HDV RNP 代表 *in vitro* transcribed 1.9-kb 基因股 RNA 加上純化的 S-HDAg。GFP 為 negative control。

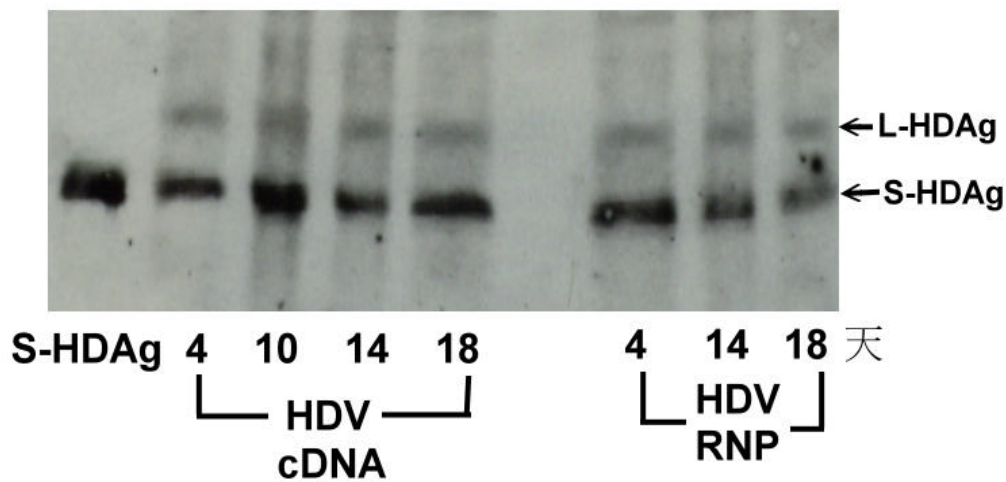
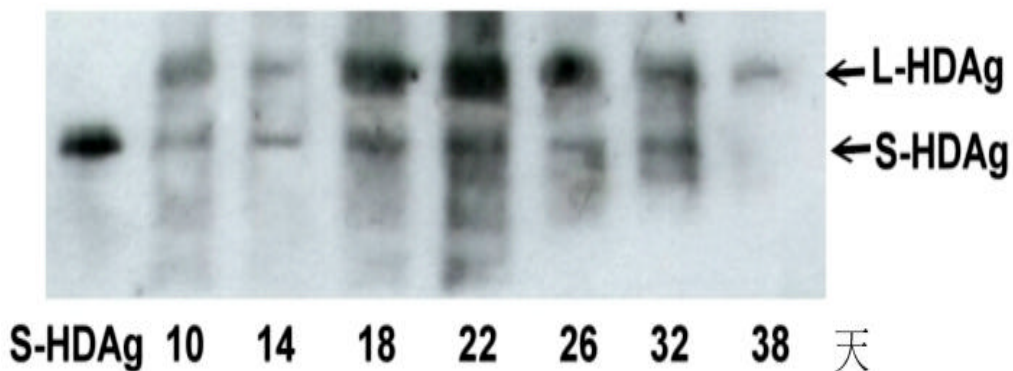


圖 7. 以西方點墨法了解 HDV 在細胞中複製的持續性。

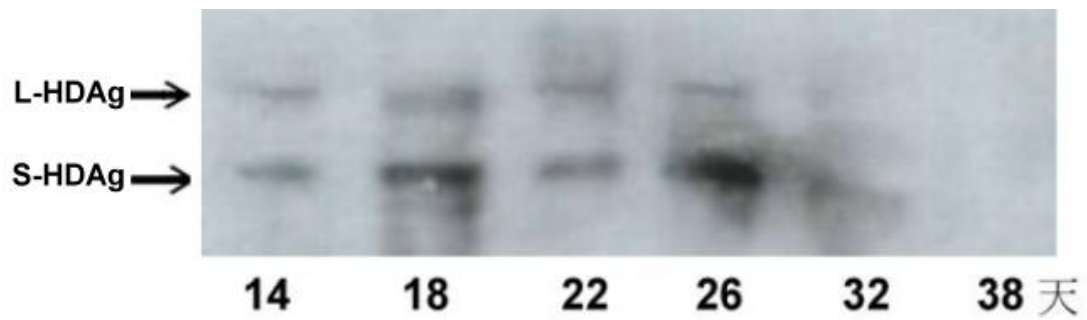
(A)以 HDV cDNA 及 HDV RNP 轉染到 Cos7 細胞中以西方點墨法分析。細胞培養時間從 4 天到 18 天，細胞每隔 4-6 天分盤，然後分別收集並以從 HDV 病人而來的抗體來辨認。



(B) 以 HDV cDNA 轉染到 Cos7 細胞中以西方點墨法分析。

為了進一步了解 HDV 的 cDNA 在細胞內複製之持續性，收集細胞之時間持續到 38 天，然後經西方點墨法測試。



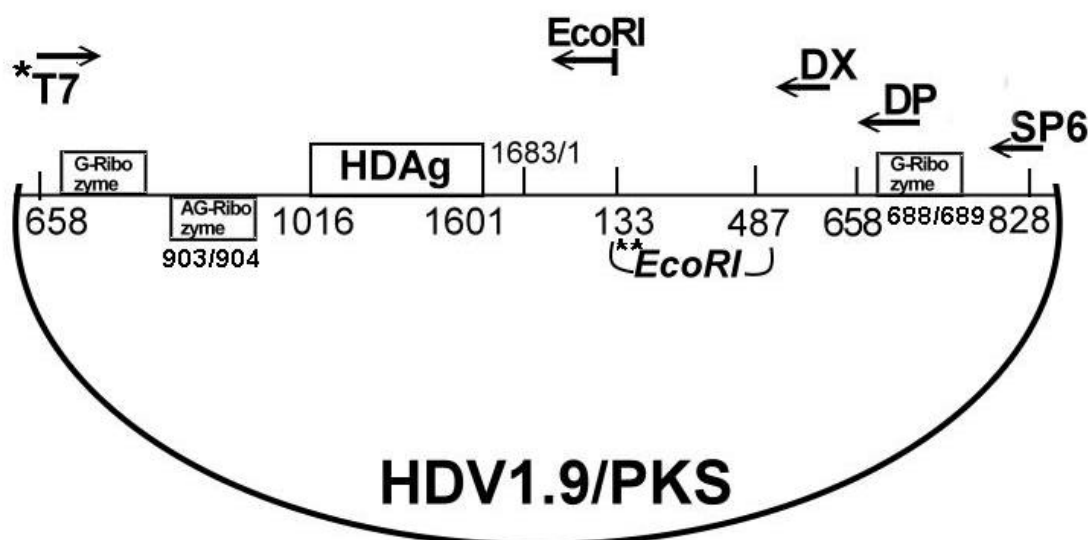


(C) 以 HDV RNP 轉染到 Cos7 細胞中以西方點墨法分析。

為了比較 RNP 與 cDNA 在細胞內持續複製是否有差異，所以將被 RNP 轉染的細胞持續培養 38 天，然後經西方點墨法測試。

表二. 不同位置的 HDV primer 用來建造不同長度的 template

HDV	primer sequences	length (kb)
(A) T7 :	5' - TAATACGACTCACTATAGGG - 3'	1.9
	SP6 : 5' - ATTTAGGTGACACTATAG - 3'	
(B) T7 :	5' - TAATACGACTCACTATAGGG - 3'	1.7
	DP(662) : 5' - ACCCTGCAGAGTGGGGTCCCG - 3'	
(C) T7 :	5' - TAATACGACTCACTATAGGG - 3'	1.6
	DX(600) : 5' - AATCTAGAGGAGCATCCCAT - 3'	
(D) T7- <i>EcoRI</i> :	fragment of (A) digested with <i>EcoRI</i> enzyme to generate a 1.2-kb fragment	1.2



Note : \* T7-SP6 fragment was used as probe for Northern blot analysis

\*\* EcoRI fragment was used as probe for Northern blot analysis

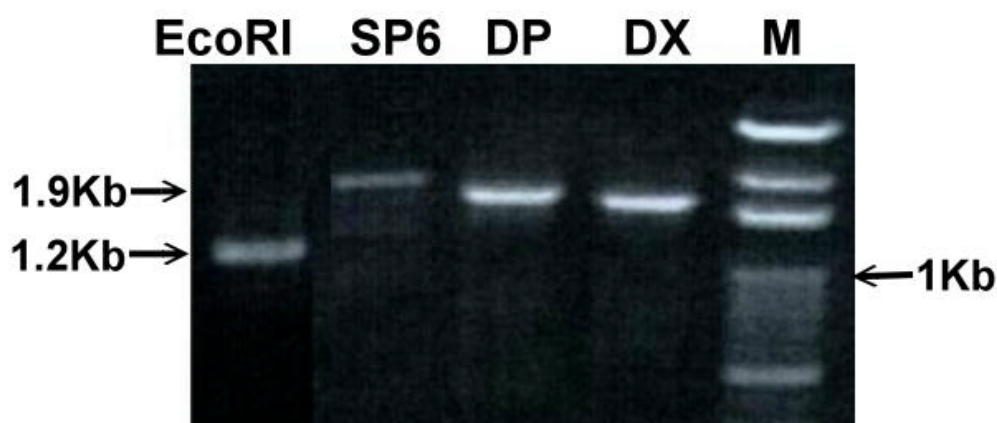


圖 8. (A) HDV 經 PCR 複製後產生的電泳凝膠分析圖。

以 HDV cDNA 為模板經由不同 primer 複製的 DNA 片段。SP6 為 1.9-kb。DP 為 1.7-kb。DX 為 1.6-kb。EcoRI 為 1.2-kb。

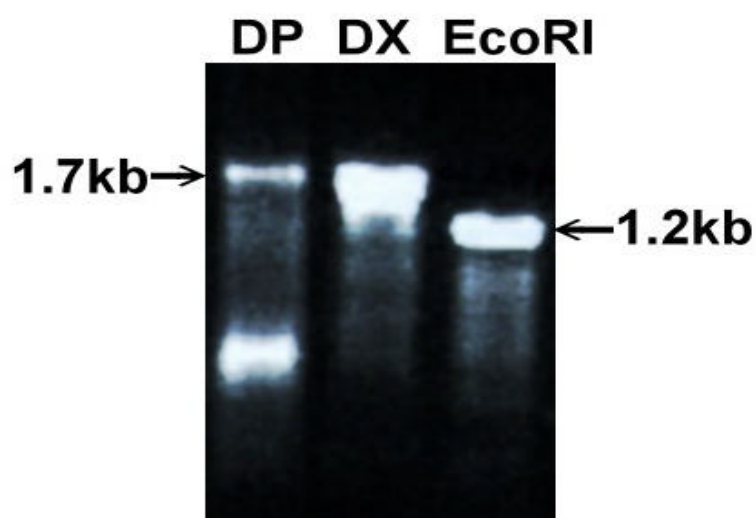


圖 8. (B) HDV 基因股 RNA 的電泳凝膠分析圖。

將圖 8 (A)的 1.7-kb 1.6-kb 1.2-kb 片段經由 *in vitro* transcription 後產生的 HDV 基因股 RNA 片段。DP 為 1.7-kb HDV 基因股 RNA。DX 為 1.6-kb HDV 基因股 RNA。EcoRI 為 1.2-kb HDV 基因股 RNA。

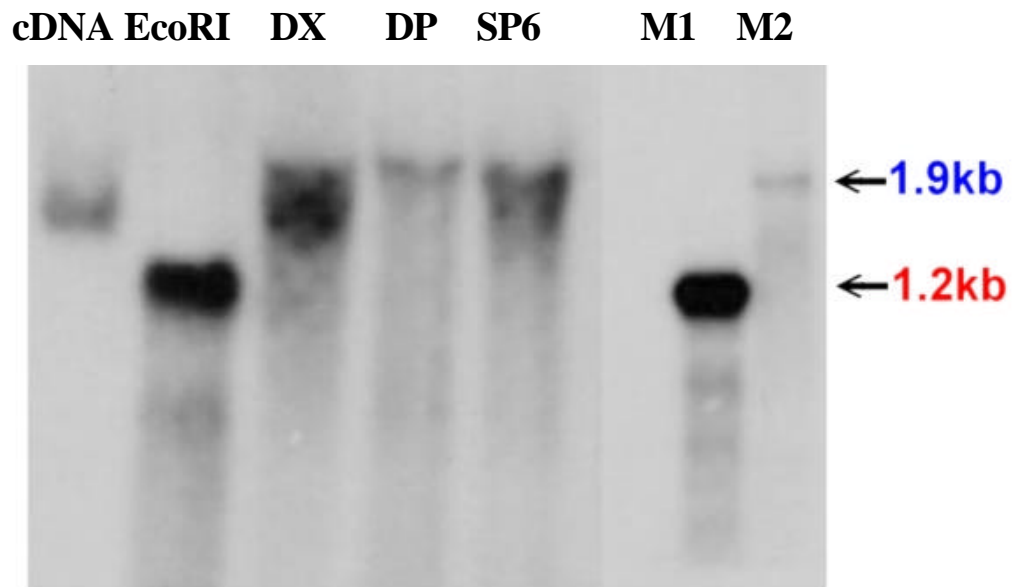


圖 9. 以北方墨法確認使用不同長度 HDV 基因股 RNA 以 RNP 轉染方式來觀察 HDV RNA 複製情形

SP6 代表 *in vitro* HDV genomic RNA 1.9-kb 加上純化的 S-HDAg。DP 代表 *in vitro* HDV genomic RNA 1.7-kb 加上純化的 S-HDAg。DX 代表 *in vitro* HDV genomic RNA 1.6-kb 加上純化的 S-HDAg。EcoRI 代表 *in vitro* HDV genomic RNA 1.2-kb 加上純化的 S-HDAg。cDNA 代表以 HDV1.9/PKS 質體直接轉染到細胞中。M1 代表 RNA 1.2-kb 位置。M2 代表 RNA 1.9-kb 位置。

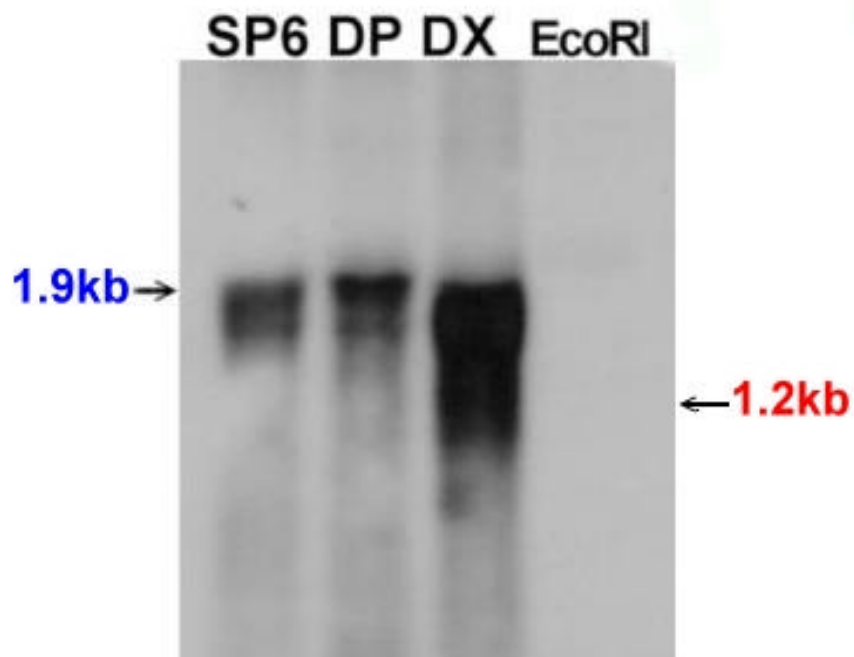
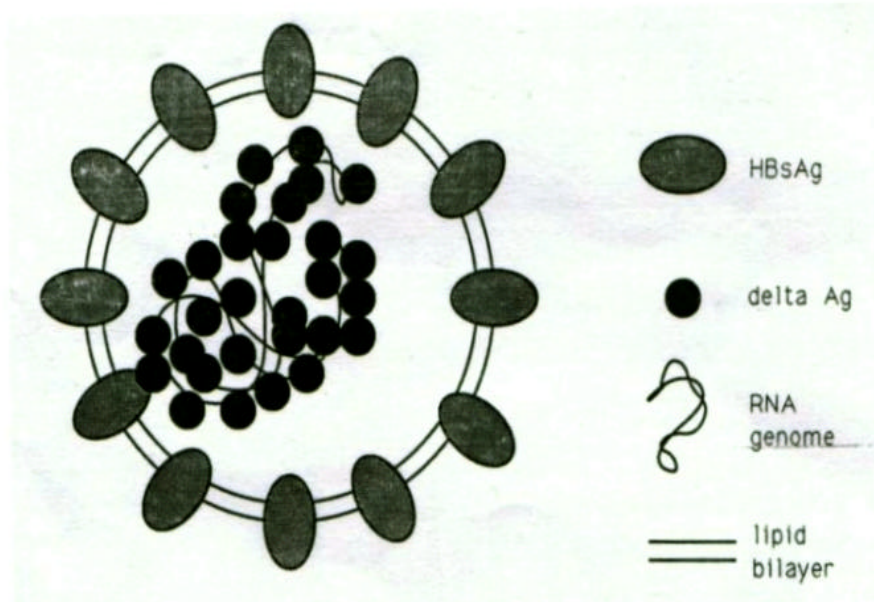


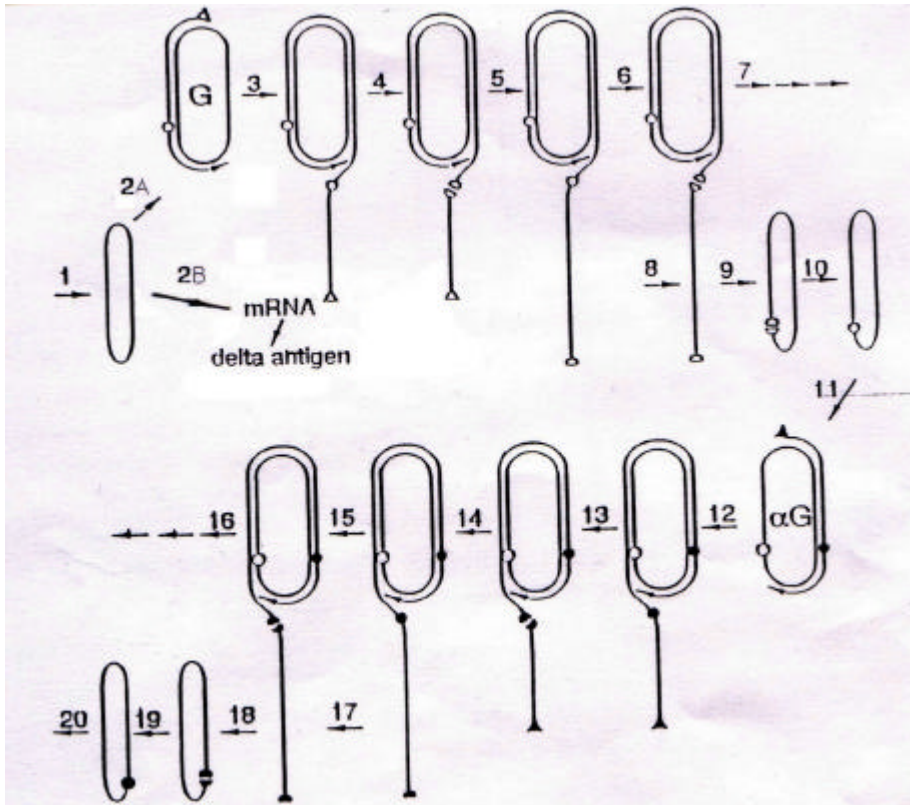
圖 10. 使用不產生 HDAg 的片段為 prob 以北方點墨法確認 HDV RNA 複製情形

SP6 代表 *in vitro* HDV genomic RNA 1.9-kb 加上純化的 S-HDAg。 DP 代表 *in vitro* HDV genomic RNA 1.7-kb 加上純化的 S-HDAg。 DX 代表 *in vitro* HDV genomic RNA 1.6-kb 加上純化的 S-HDAg。 EcoRI 代表 *in vitro* HDV genomic RNA 1.2-kb 加上純化的 S-HDAg。

## 附錄

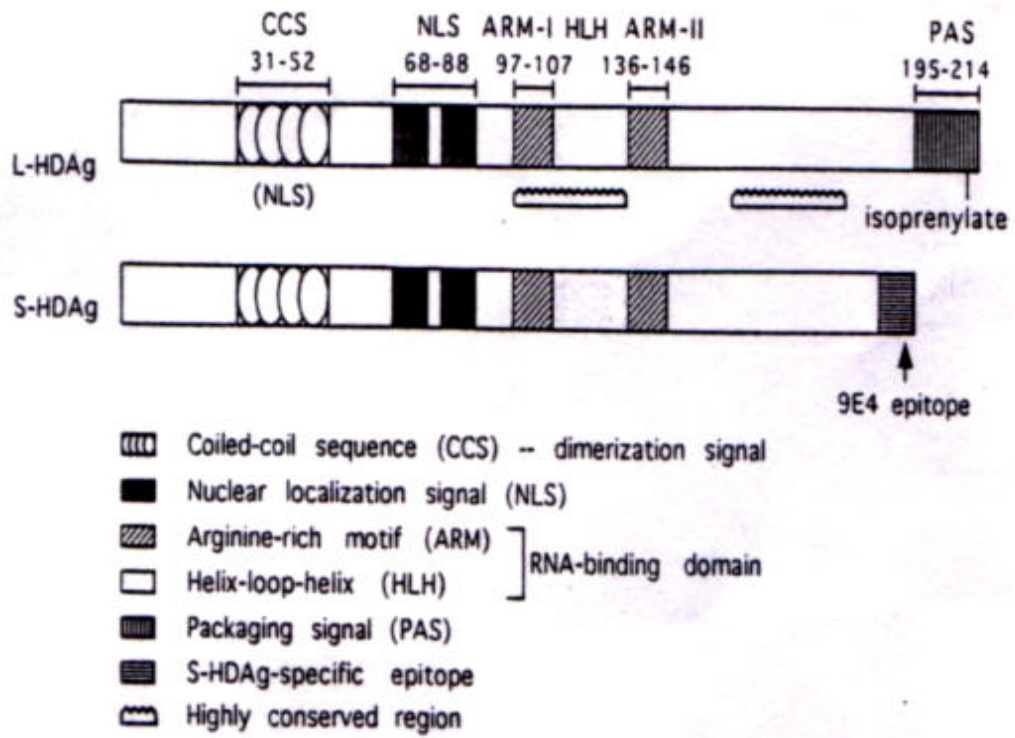


附圖一、HDV 的結構圖



附圖二、HDV 在寄主細胞內透過 Double Rolling-Circle Replication

代表基因股上 Ribozyme 切割位置。 代表反基因股上 Ribozyme 切割位置。



附圖三、Delta 抗原的結構



## 參考文獻

- Bichko V. Netter HJ. Taylor J. 1994. Introduction of hepatitis delta virus into animal cell lines via cationic liposomes. *Journal of Virology*. 68(8):5247-52.
- Bichko V. Khudyakov YE. Taylor JM. 1996. A novel form of hepatitis delta antigen. *Journal of Virology*. 70(5):3248-51.
- Bonino F. Hoyer B. Shih JW. Rizzetto M. Purcell RH. Gerin JL. 1984. Delta hepatitis agent: structural and antigenic properties of the delta-associated particle. *Infection & Immunity*. 43(3):1000-5.
- Bonino F. Heermann KH. Rizzetto M. Gerlich WH. 1986. Hepatitis delta virus: protein composition of delta antigen and its hepatitis B virus-derived envelope. *Journal of Virology*. 58(3):945-50.
- Branch AD. Robertson HD. 1984. A replication cycle for viroids and other small infectious RNA's. *Science*. 223(4635):450-5.
- Casey JL. Brown TL. Colan EJ. Wignall FS. Gerin JL. 1993. A genotype of hepatitis D virus that occurs in northern South America. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 90(19):9016-20.
- Chang MF. Baker SC. Soe LH. Kamahora T. Keck JG. Makino S. Govindarajan S. Lai MM. 1988. Human hepatitis delta antigen is a nuclear phosphoprotein with RNA-binding activity. *Journal of Virology*. 62(7):2403-10.
- Chang MF. Chang SC. Chang CI. Wu K. Kang HY. 1992. Nuclear localization signals, but not putative leucine zipper motifs, are essential for nuclear transport of hepatitis delta antigen. *Journal of*

- Virology*. 66(10):6019-27.
- Chang MF. Sun CY. Chen CJ. Chang SC. 1993. Functional motifs of delta antigen essential for RNA binding and replication of hepatitis delta virus. *Journal of Virology*. 67(5):2529-36.
- Chang J. Sigal LJ. Lerro A. Taylor J. 2001. Replication of the human hepatitis delta virus genome is initiated in mouse hepatocytes following intravenous injection of naked DNA or RNA sequences. *Journal of Virology*. 75(7):3469-73.
- Chao M. Hsieh SY. Taylor J. 1990. Role of two forms of hepatitis delta virus antigen: evidence for a mechanism of self-limiting genome replication. *Journal of Virology*. 64(10):5066-9.
- Chou HC. Hsieh TY. Sheu GT. Lai MM. 1998. Hepatitis delta antigen mediates the nuclear import of hepatitis delta virus RNA. *Journal of Virology*. 72(5):3684-90.
- Dingle K. Bichko V. Zuccola H. Hogle J. Taylor J. 1998. Initiation of hepatitis delta virus genome replication. *Journal of Virology*. 72(6):4783-8.
- Glenn JS. White JM. 1991. Trans-dominant inhibition of human hepatitis delta virus genome replication. *Journal of Virology*. 65(5):2357-61.
- Glenn JS. Watson JA. Havel CM. White JM. 1992. Identification of a prenylation site in delta virus large antigen. *Science*. 256(5061):1331-3.
- Govindarajan S. Chin KP. Redeker AG. Peters RL. 1984. Fulminant B viral hepatitis: role of delta agent. *Gastroenterology*. 86(6):1417-20.
- Hadler SC. Alcalá de Monzon M. Rivero D. Perez M. Bracho A. 1992. Fields H. Epidemiology and long-term consequences of hepatitis

- delta virus infection in the Yucpa Indians of Venezuela. *American Journal of Epidemiology*. 136(12):1507-16.
- Hoofnagle JH. 1989. Type D (delta) hepatitis. *JAMA*. 261(9):1321-5.
- Hsieh SY. Chao M. Coates L. Taylor J. 1990. Hepatitis delta virus genome replication: a polyadenylated mRNA for delta antigen. *Journal of Virology*. 64(7):3192-8.
- Hsieh SY. Taylor J. 1991. Regulation of polyadenylation of hepatitis delta virus antigenomic RNA. *Journal of Virology*. 65(12):6438-46.
- Hwang SB. Lee CZ. Lai MM. 1992. Hepatitis delta antigen expressed by recombinant baculoviruses: comparison of biochemical properties and post-translational modifications between the large and small forms. *Virology*. 190(1):413-22.
- Imazeki F. Omata M. Ohto M. 1991. Complete nucleotide sequence of hepatitis delta virus RNA in Japan. *Nucleic Acids Research*. 19(19):5439.
- Jeng KS. Su PY. Lai MM. 1996a. Hepatitis delta antigens enhance the ribozyme activities of hepatitis delta virus RNA in vivo. *Journal of Virology*. 70(7):4205-9.
- Jeng KS. Daniel A. Lai MM. 1996b. A pseudoknot ribozyme structure is active in vivo and required for hepatitis delta virus RNA replication. *Journal of Virology*. 70(4):2403-10.
- Kos A. Dijkema R. Arnberg AC. van der Meide PH. Schellekens H. 1986. The hepatitis delta (delta) virus possesses a circular RNA. *Nature*. 323(6088):558-60.
- Kos T. Molijn A. Blauw B. Schellekens H. 1991. Baculovirus-directed high level expression of the hepatitis delta antigen in *Spodoptera*

- frugiperda cells. *Journal of General Virology*. 72 ( Pt 4):833-42.
- Kuo MY. Sharmeen L. Dinter-Gottlieb G. Taylor J. 1988.  
Characterization of self-cleaving RNA sequences on the genome and antigenome of human hepatitis delta virus. *Journal of Virology*. 62(12):4439-44.
- Kuo MY. Chao M. Taylor J. 1989. Initiation of replication of the human hepatitis delta virus genome from cloned DNA: role of delta antigen. *Journal of Virology*. 63(5):1945-50.
- Lai MM. 1995. The molecular biology of hepatitis delta virus. *Annual Review of Biochemistry*. 64:259-86.
- Lazinski DW. Taylor JM. 1994. Expression of hepatitis delta virus RNA deletions: cis and trans requirements for self-cleavage, ligation, and RNA packaging. *Journal of Virology*. 68(5):2879-88.
- Lazinski DW. Taylor JM. 1995. Intracellular cleavage and ligation of hepatitis delta virus genomic RNA: regulation of ribozyme activity by cis-acting sequences and host factors. *Journal of Virology*. 9(2):1190-200.
- Lee CZ. Lin JH. Chao M. McKnight K. Lai MM. 1993. RNA-binding activity of hepatitis delta antigen involves two arginine-rich motifs and is required for hepatitis delta virus RNA replication. *Journal of Virology*. 67(4):2221-7.
- Lin JH. Chang MF. Baker SC. Govindarajan S. Lai MM. 1990.  
Characterization of hepatitis delta antigen: specific binding to hepatitis delta virus RNA. *Journal of Virology*. 64(9):4051-8.
- Macnaughton TB. Gowans EJ. Jilbert AR. Burrell CJ. 1990. Hepatitis delta virus RNA, protein synthesis and associated cytotoxicity in a

- stably transfected cell line. *Virology*. 177(2):692-8.
- Macnaughton TB. Gowans EJ. McNamara SP. Burrell CJ. 1991. Hepatitis delta antigen is necessary for access of hepatitis delta virus RNA to the cell transcriptional machinery but is not part of the transcriptional complex. *Virology*. 184(1):387-90.
- Macnaughton TB. Beard MR. Chao M. Gowans EJ. Lai MM. 1993. Endogenous promoters can direct the transcription of hepatitis delta virus RNA from a recircularized cDNA template. *Virology*. 196(2):629-36.
- Macnaughton TB. Wang YJ. Lai MM. 1993. Replication of hepatitis delta virus RNA: effect of mutations of the autocatalytic cleavage sites. *Journal of Virology*. 67(4):2228-34.
- Makino S. Chang MF. Shieh CK. Kamahora T. Vannier DM. Govindarajan S. Lai MM. 1987. Molecular cloning and sequencing of a human hepatitis delta (delta) virus RNA. *Nature*. 329(6137):343-6.
- Modahl LE. Lai MM. 1998. Transcription of hepatitis delta antigen mRNA continues throughout hepatitis delta virus (HDV) replication: a new model of HDV RNA transcription and replication. *Journal of Virology*. 72(7):5449-56.
- Modahl LE. Macnaughton TB. Zhu N. Johnson DL. Lai MM. 2000a. RNA-Dependent replication and transcription of hepatitis delta virus RNA involve distinct cellular RNA polymerases. *Molecular & Cellular Biology*. 20(16):6030-9.
- Modahl LE. Lai MM. 2000b. The large delta antigen of hepatitis delta virus potently inhibits genomic but not antigenomic RNA synthesis:

- a mechanism enabling initiation of viral replication. *Journal of Virology*. 74(16):7375-80.
- Netter HJ. Kajino K. Taylor JM. 1993. Experimental transmission of human hepatitis delta virus to the laboratory mouse. *Journal of Virology*. 67(6):3357-62.
- Otto JC. Casey PJ. 1996. The hepatitis delta virus large antigen is farnesylated both in vitro and in animal cells. *Journal of Biological Chemistry*. 271(9):4569-72.
- Polo JM. Lim B. Govindarajan S. Lai MM. 1995a. Replication of hepatitis delta virus RNA in mice after intramuscular injection of plasmid DNA. *Journal of Virology*. 69(8):5203-7.
- Polo JM. Jeng KS. Lim B. Govindarajan S. Hofman F. Sangiorgi F. Lai MM. 1995b. Transgenic mice support replication of hepatitis delta virus RNA in multiple tissues, particularly in skeletal muscle. *Journal of Virology*. 69(8):4880-7.
- Poisson F. Roingard P. Baillou A. Dubois F. Bonelli F. Calogero RA. Goudeau A. 1993. Characterization of RNA-binding domains of hepatitis delta antigen. *Journal of General Virology*. 74 ( Pt 11):2473-8.
- Poisson F. Roingard P. Goudeau A. 1995. Direct investigation of protein RNA-binding domains using digoxigenin-labelled RNAs and synthetic peptides: application to the hepatitis delta antigen. *Journal of Virological Methods*. 55(3):381-9.
- Rizzetto M. Canese MG. Arico S. Crivelli O. Trepo C. Bonino F. Verme G. 1977. Immunofluorescence detection of new antigen-antibody system (delta/anti-delta) associated to hepatitis B virus in liver and

- in serum of HBsAg carriers. *Gut*. 18(12):997-1003.
- Rizzetto M. Hoyer B. Canese MG. Shih JW. Purcell RH. Gerin JL. 1980. delta Agent: association of delta antigen with hepatitis B surface antigen and RNA in serum of delta-infected chimpanzees. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 77(10):6124-8.
- Robertson HD. Branch AD. 1987. RNA processing--a meeting review. *Genes & Development*. 1(5):415-7.
- Roeder RG. Schwartz LB. Sklar VE. 1976. Function, structure, and regulation of eukaryotic nuclear RNA polymerases. *Symposium of the Society for Developmental Biology*. (34):29-52.
- Ryu WS. Netter HJ. Bayer M. Taylor J. 1993. Ribonucleoprotein complexes of hepatitis delta virus. *Journal of Virology*. 67(6):3281-7.
- Sharmeen L. Kuo MY. Dinter-Gottlieb G. Taylor J. 1988. Antigenomic RNA of human hepatitis delta virus can undergo self-cleavage. *Journal of Virology*. 62(8):2674-9.
- Sheu GT. Lai MM. 2000. Recombinant hepatitis delta antigen from *E. coli* promotes hepatitis delta virus RNA replication only from the genomic strand but not the antigenomic strand. *Virology*. 278(2):578-86.
- Sureau C. Guerra B. Lee H. 1994. The middle hepatitis B virus envelope protein is not necessary for infectivity of hepatitis delta virus. *Journal of Virology*. 68(6):4063-6.
- Tai FP. Chen PJ. Chang FJ. Chen DS. 1993. Hepatitis delta virus cDNA monomer can be used in transfection experiments to initiate viral

- RNA replication. *Virology*. 197(1):137-42.
- Taylor JM. 1992. The structure and replication of hepatitis delta virus. *Annual Review of Microbiology*. 46:253-76.
- Wang KS. Choo QL. Weiner AJ. Ou JH. Najarian RC. Thayer RM. Mullenbach GT. Denniston KJ. Gerin JL. Houghton M. 1986. Structure sequence and expression of the hepatitis delta (delta) viral genome. *Nature*. 323(6088):508-14.
- Wang JG. Lemon SM. 1993. Hepatitis delta virus antigen forms dimers and multimeric complexes in vivo. *Journal of Virology*. 67(1):446-54.
- Wu HN. Lai MM. 1989. Reversible cleavage and ligation of hepatitis delta virus. *Science*. 243(4891):652-4.
- Wu JC. Chiang TY. Sheen IJ. 1998. Characterization and phylogenetic analysis of a novel hepatitis D virus strain discovered by restriction fragment length polymorphism analysis. *Journal of General Virology*. 79 ( Pt 5):1105-13.
- Wu JC. Choo KB. Chen CM. Chen TZ. Huo TI. Lee SD. 1995. Genotyping of hepatitis D virus by restriction-fragment length polymorphism and relation to outcome of hepatitis D. *Lancet*. 346(8980):939-41.
- Xia YP. Lai MM. 1992. Oligomerization of hepatitis delta antigen is required for both the trans-activating and trans-dominant inhibitory activities of the delta antigen. *Journal of Virology*. 66(11):6641-8.