

丙型肝炎病毒功能基因在 CHO 细胞中的表达研究

Expression and Study of the Functional Proteins of Hepatitis C Virus in CHO Cell Line

郭 佳 鄢 然 ,徐国东 ,郑从义 *

GUO Jia ,YAN Ran ,XU Guo-Dong and ZHENG Cong-Yi *

武汉大学生命科学学院 ,病毒学国家重点实验室 ,武汉 430072

State Key Laboratory of Virology ,College of Life Sciences ,Wuhan University ,Wuhan 430072 ,China

摘 要 丙型肝炎病毒(HCV)与宿主细胞因子的相互作用已经成为国内外研究的热点和难点。近期研究已经证实 HCV 的感染对宿主多种途径中基因的转录均能产生影响。为了进一步研究究竟是 HCV 中的哪些功能基因在与特定细胞因子的相互作用中起主导作用 构建了分别含有 HCV Core、E1、E2、p7、NS2、NS3、NS4A、NS4B、NS5A 和 NS5B 基因的真核表达质粒 ,分别转入宿主细胞 CHO-K1 中 在 G418 的选择压力下筛选获得稳定表达 HCV 单个蛋白的细胞系(10 株)。PCR 和 RT-PCR 可分别从稳定细胞系中检测到相应的 HCV 基因的 DNA 和 mRNA ,冻存和复苏不会造成 HCV 基因的丢失。Western-blot 检测到稳定细胞系中表达 E1、E2 和 NS5B 蛋白 ,说明 HCV 基因在 CHO-K1 中已经形成稳定表达。薄层层析(TLC)结果显示 ,含有不同 HCV 基因的稳定传代细胞系中 ,UDP-葡萄糖神经酰胺葡萄糖基转移酶(UGCG)活性均发生了不同程度的变化 ,其中 E2 和 p7 的表达使胞内 UGCG 的活性提高了约 1 倍 ,NS2 和 NS5A 则使 UGCG 的酶活提高了约 0.6 倍。该稳定细胞系的建立为研究病毒与宿主因子的相互作用及药物筛选奠定了基础。

关键词 丙型肝炎病毒 ,真核表达 ,稳定细胞系 ,UDP-葡萄糖神经酰胺葡萄糖基转移酶

中图分类号 Q786 文献标识码 A 文章编号 1000-306X(2007)06-0995-05

Abstract Recently the interactions between hepatitis C virus(HCV)genes and the host cell factors were the focus of this field. Cell factors in the different biochemical pathway were approved to be interfered when HCV infection. To make sure which HCV gene(s) was the major factor during the interaction process ten eukaryotic expression plasmids containing different functional genes of HCV :Core ,E1 ,E2 ,p7 ,NS2 ,NS3 ,NS4A ,NS4B ,NS5A and NS5B were transfected into the CHO-K1 cells respectively. Then ten stable cell lines expressing different HCV functional proteins were constructed under the selective pressure of G418. DNA and mRNA of the HCV genes were both detected by PCR and RT-PCR respectively in the corresponding stable cell lines ,freezation and anabiosis would not lose the HCV genes. Besides ,the E1 ,E2 and NS5B proteins were detected by Western-blot which demonstrated that the HCV genes have formed stable expression in the host cells. The activity of UDP-glucose ceramide glucosyltransferase (UGCG) in the stable cell lines increased in different degree by TLC assay. For example ,the activity of UGCG in CHO-K1-E2 and CHO-K1-p7 was doubled according to the control cells ,and in CHO-K1-NS2 and CHO-K1-NS5A was about 1.6 times compared with the control cells. The establishment of the stable cell lines containing different single HCV gene will provide foundation for

Received : January 11 ,2007 ; Accepted : March 12 ,2007 .

This work was supported by the grants from the National High Technology Research and Development Program of China ("863" Programme) (No. 2002AA216031) and the National Basic Research Program of China (973 Program) (No. 2006CB504300).

* Corresponding author. Tel : +86-27-68754001 ; Fax : +86-27-68754833 ; E-mail : cctcc202@wuh.deu.cn

国家高技术研究发展计划资助项目(863 计划)(No. 2002AA216031)和国家重点基础研究发展规划项目(No. 2006CB504300)资助

investigating the interactions between the virus and the host factors and for the filtration of antiviral medicine.

Key words hepatitis C virus, eukaryotic expression, stable cell line, UDP-glucose ceramide glucosyltransferase

丙型肝炎病毒(Hepatitis C Virus, HCV)是引起人类丙型肝炎的病原体,其感染往往发展成肝硬化或肝癌,严重威胁人类健康^[1,2]。目前还没有针对HCV的有效疫苗,而且只有部分HCV感染者对IFN- α 和病毒唑的联合治疗有效。由于缺乏有效的支持HCV增殖的体外培养体系,对病毒入侵宿主细胞后如何影响宿主的各种代谢和信号通路,以及包装释放等生理过程知之甚少,有待深入研究。

利用基因转染的方法,人们发现了HCV的Core和NS5A蛋白分别在细胞的MAPK/ERK以及SAPK/JNK信号通路中发挥了激活的作用;在ERK信号通路中Core和NS5A却分别抑制了Raf-14-3-3和Grb2的活性,同时Core又激活了转录因子Elk-1和STAT-3;在凋亡信号通路中,Core表现出激活NF κ B的活性,而NS5A表现出激活PI3K的活性^[3]。Chisari研究组通过HCV感染黑猩猩试验,测定了感染过程中宿主基因表达的变化,发现很多由IFN- α 诱导的基因表达与HCV RNA的复制量呈现出一定的线性关系。同时,在感染的早期,宿主脂代谢中的很多基因转录也产生了不同的变化^[4]。

Chisari等的研究结果揭示了一个值得关注的科学问题,即HCV的感染与宿主的脂代谢密切相关,其间存在相互作用的关系。因此,HCV感染与宿主脂代谢途径间相互作用的研究成为近年研究的热点^[5,6],研究者通过各种手段试图了解HCV基因表达对宿主脂质代谢的影响,取得了一些进展。但是到底是HCV的哪些功能基因影响了宿主的脂代谢,尚未深入研究。

本文通过构建10个HCV功能基因真核表达质粒,并将这些质粒分别整合到CHO-K1宿主细胞的基因组上,筛选得到稳定传代的细胞系,研究了这些基因表达对宿主细胞中UDP-葡萄糖神经酰胺葡萄糖基转移酶(UGCG)的影响,获得有意义的研究结果。为近一步研究HCV功能基因与宿主脂代谢中其他因子的相互作用奠定了基础,同时为HCV感染机制研究和抗病毒药物筛选提供了细胞模型。

1 材料和方法

1.1 细胞系

中国仓鼠卵巢癌细胞系CHO-K1由武汉大学中国典型培养物保藏中心(CCTCC)提供。CHO-K1细

胞系于含10%FBS的D/F12培养基中常规培养并传代。

1.2 真核表达质粒的构建

真核表达质粒pcDNA3.1(+)(含neo筛选标记)由本室保存。以含有HCV全长基因组的质粒HCV-WHU^[7]为模板,针对HCV的10个功能基因序列分别合成10对引物(表1),在上游引物(FP)中引入起始密码ATG和酶切位点,在下游引物(RP)中也引入终止密码TAA和酶切位点,利用PCR扩增到相应的片段,经限制性内切酶(TaKaRa)酶切后连接到pCDNA3.1(+)载体。分别以双酶切鉴定和序列测定(上海鼎安生物科技有限公司)的方法鉴定所构建的10个质粒,并对其命名(表1)。

1.3 HCV功能基因的稳定表达

根据pcDNA3.1(+)操作手册的要求(www.invitrogen.com),按照以下步骤建立稳定表达HCV功能基因的细胞系:分别将含有HCV单个基因的pcDNA3.1(+)质粒线性化,线性化使用的限制性内切酶见表1,按照Lipofectamine2000(Invitrogen)说明书要求转染状态良好的CHO-K1细胞,同时转染不含有任何HCV基因的空载体pcDNA3.1(+)-mock(Pvu I线性化)作为对照。转染后的细胞在含有G418的培养基中筛选并传代,最终形成具有G418抗性的稳定传代细胞系。

1.4 稳定表达细胞系中HCV单基因的鉴定

胰酶消化贴壁生长的CHO-K1细胞,用含蛋白酶K和RNaseA的细胞裂解液(10mmol/L Tris-Cl, 150mmol/L NaCl, 10mmol/L EDTA, 0.4% SDS)重悬细胞,56℃水浴过夜后酚/氯仿抽提除去蛋白,上清用乙醇沉淀后得到细胞的总DNA。分别以10株稳定表达细胞系的总DNA为模板,用相应基因的克隆引物FP和RP通过PCR反应,检测稳定表达细胞中的HCV基因。

1.5 稳定表达细胞系中HCV基因转录mRNA检测

CHO-K1细胞中总RNA的提取按Trizol试剂盒(Invitrogen)说明书操作。提取的RNA用DNase I于37℃水浴处理20min,以去除DNA的干扰。以总RNA为模板,分别以相应基因的克隆引物RP为逆转录引物合成第一条cDNA链,再以FP和RP通过PCR反应对相应的cDNA进行外源基因的扩增。

表 1 构建含有 HCV 功能基因表达质粒的引物
Table 1 Primers for expression clones construction

Name of the expression plasmids ^a	Length of insert genes (bp)	Primers for clones	Enzymes
pcDNA3.1(+) -Core	573	CFP 5'-CGCAAGCTTGGCCACCATGAGCACAAATCCAAAACC-3'(HindⅢ) CRP 5'-GCGGATTCCTTAGGCGGAAGCTGGGATGG-3'(BamHⅠ)	PvuⅠ
pcDNA3.1(+) -E1	576	E1FP 5'-CGGAATTCGCCACCATGTACCAAGTGC CGCAACCGCTG-3'(EcoRⅠ) E1RP 5'-GCGCTCGAGTTACCCGTCAACACCGCGCAAG-3'(XhoⅠ)	ScaⅠ
pcDNA3.1(+) -E2	1089	E2FP 5'-GCGAAGCTTGGCCACCATGGGGACCCACGTGACAGGGG-3'(HindⅢ) E2RP 5'-GCGGATCCTTAGGCCTCAGCTTGGCTATC-3'(BamHⅠ)	ScaⅠ
pcDNA3.1(+) -p7	189	p7FP 5'-GCGAAGCTTGGCCACCATGGCCTTGGAGAACCTGCTGGTC-3'(HindⅢ) p7RP 5'-GCGGATCCTTAGGCGTACGCCCGTGGCGG-3'(BamHⅠ)	PvuⅠ
pcDNA3.1(+) -NS2	651	NS2FP 5'-CGGAATTCGCCACCATGGACCGGAGATGGCTG-3'(EcoRⅠ) NS2RP 5'-GCGCTCGAGTTAAAGGAGTGC CCACCCCTGC-3'(XhoⅠ)	PvuⅠ
pcDNA3.1(+) -NS3	1893	NS3FP 5'-CCGAAGCTTGGCCACCATGGCGCCATCAGCGCTAC-3'(HindⅢ) NS3RP 5'-GCGGATCCTTAAGTGACGACCTCTAGGTCAG-3'(BamHⅠ)	PvuⅠ
pcDNA3.1(+) -NS4A	162	4AFP 5'-CCGAAGCTTGGCCACCATGAGCACTTGGGTGCTGG-3'(HindⅢ) 4ARP 5'-GCGGATCCTTAGCACTCTTCCATTTCATCG-3'(BamHⅠ)	PvuⅠ
pcDNA3.1(+) -NS4B	783	4BFP 5'-CCGAAGCTTGGCCACCATGGCCTCGCACCTCCCTTAC-3'(HindⅢ) 4BRP 5'-GCGGATCCTTAGCATGGCGTGGAGCAGTCTCTC-3'(BamHⅠ)	PvuⅠ
pcDNA3.1(+) -NS5A	1341	5AFP 5'-CCGAAGCTTGGCCACCATGTCCGGCTCGTGCTCAG-3'(HindⅢ) 5ARP 5'-GCGCTCGAGTTAGCAGCAGACGACGCTCTCGC-3'(XhoⅠ)	PvuⅠ
pcDNA3.1(+) -NS5B	1773	5BFP 5'-CCGAAGCTTGGCCACCATGTCTGATGTCTACACATG-3'(HindⅢ) 5BRP 5'-GCGGATCCTTATCGGTTGGGAGCAGGTAG-3'(BamHⅠ)	PvuⅠ

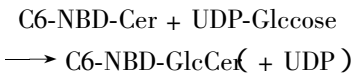
a 'plasmids were named according to the HCV functional protein'; - "restricted enzyme site in the primers.

1.6 稳定表达细胞系中 HCV 蛋白的免疫印迹

筛选得到的细胞系在含有 G418 的培养基里正常传代 ,用 Mammalian Protein Extraction Reagent (M-PER)试剂盒(PIERCE)提纯蛋白 ,冷冻干燥获得浓缩的细胞总蛋白。Western-blotting 按文献 [8]的方法进行 ,同时选用 GAPDH 作为系统对照。一抗采用兔抗 HCV E1、E2、NS5B 蛋白的多克隆抗体(武汉大学叶林伯教授赠送) ,兔抗 GAPDH(武汉三鹰生物技术有限公司)多克隆抗体 ;二抗为碱性磷酸酶标记的驴抗兔 IgG(武汉三鹰生物技术有限公司) ,利用 NBT-BCIP 显色。

1.7 稳定传代细胞系中 UDP-葡萄糖神经酰胺葡萄糖基转移酶(UGCG)活性分析

UGCG 的检测按文献 [9]提供的薄层层析法 (TLC)进行。反应原理是带有硝基苯 二唑 (nitrobenzoxadiazole ,NBD)标记的神经酰胺参与糖基转移反应 ,生成带荧光标记的 NBD-GlcCer。



经过计数的细胞溶解在 10mmol/L Tris-HCl 缓冲液 (pH 7.5)中 ,再加入 10μL 脂质体 500μmol/L 的 UDP-Glc 和 1mmol/L 的 EDTA ,于 32℃保温 1h ,氯仿/甲醇 (2:1/V:V)中止反应后取下层有机相做 TLC ,最后于 Variable Mode Imager Typhoon 9200 ,520nm 波长进

行荧光扫描 ,分析稳定传代细胞系中 UGCG 酶活性。

2 结果

2.1 含有 HCV 功能基因真核表达质粒的鉴定

根据表 1 中 10 个不同基因上游和下游引物上的酶切位点 ,分别对相应的重组质粒进行双酶切鉴定 电泳结果显示(图 1) ,HCV 的 Core、E1、E2、p7、NS2、NS3、NS4A、NS4B、NS5A 和 NS5B 基因都分别成功地克隆到 pcDNA3.1(+)中 ,双酶切得到的片段大

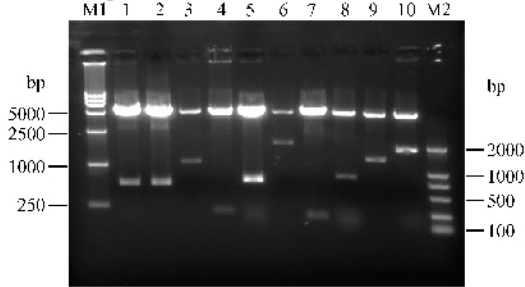


图 1 HCV 单基因真核表达质粒的双酶切鉴定

Fig.1 Identification of the expression plasmids containing different genes of HCV by restricted enzymes

M1 :DL15000 ; M2 :DL2000 ; 1 :pcDNA3.1 (+)-Core , 573bp ; 2 :pcDNA3.1 (+)-E1 , 576bp ; 3 :pcDNA3.1 (+)-E2 , 1089bp ; 4 :pcDNA3.1 (+)-p7 , 189bp ; 5 :pcDNA3.1 (+)-NS2 , 651bp ; 6 :pcDNA3.1 (+)-NS3 , 1893bp ; 7 :pcDNA3.1 (+)-4A , 162bp ; 8 :pcDNA3.1 (+)-4B , 783bp ; 9 :pcDNA3.1 (+)-5A , 1341bp ; 10 :pcDNA3.1 (+)-5B , 1773bp

© 中国科学院微生物研究所期刊联合编辑部 http://journals. im. ac. cn

小与病毒基因的大小相符。测序结果显示,所克隆的 10 个质粒中 HCV 基因的序列没有发生缺失、替换和移码突变(Data not shown),可以用于下游实验。

2.2 HCV 基因稳定表达细胞系的筛选

限制性内切酶线性化的真核表达质粒分别转染 CHO-K1 细胞, G418 筛选获得具有抗性的细胞系。筛选得到的细胞系在形态和生长速度与正常的细胞没有明显差别, 分别命名为 CHO-K1-Core、CHO-K1-E1、CHO-K1-E2、CHO-K1-p7、CHO-K1-NS2、CHO-K1-NS3、CHO-K1-NS4A、CHO-K1-NS4B、CHO-K1-NS5A、CHO-K1-NS5B, G418 筛选浓度为 600μg/mL。

2.3 稳定传代细胞系中 HCV 基因 DNA 和转录 mRNA 的检测

PCR 检测结果显示,在筛选的传代细胞系中分别扩增到与 HCV 单个基因大小相符的片段(图 2),表明 HCV 基因已经整合到 CHO-K1 细胞的基因组上;同时 RT-PCR 结果显示,在筛选的传代细胞系中分别扩增到与 HCV 单个基因大小相符的片段(图 2)表明整合在 CHO-K1 基因组上的 HCV 基因可以转录表达。在细胞传代至 20 代后,均能检测到相应的 HCV 基因;将细胞冻存后复苏,PCR 和 RT-PCR 同样能检测到相应的 HCV 基因(Data not shown),表明冻存和复苏过程中没有造成外源基因的丢失。

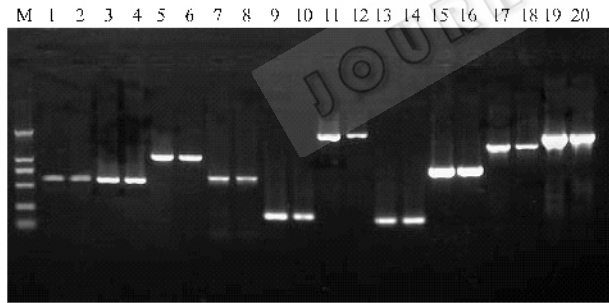


图 2 PCR 和 RT-PCR 检测稳定传代细胞系中 HCV 基因的 DNA 和 mRNA

Fig.2 Detection of the DNA and RNA of HCV genes in the stable cell lines by PCR and RT-PCR

M :DL2000 ;1,2 :Core, 573bp(DNA/RNA);3,4 :E1, 576bp(DNA/RNA);5,6 :E2, 1089bp(DNA/RNA);7,8 :NS2, 651bp(DNA/RNA);9,10 :p7, 189bp(DNA/RNA);11,12 :NS3, 1893bp(DNA/RNA);13,14 :NS4A, 162bp(DNA/RNA);15,16 :NS4B, 783bp(DNA/RNA);17,18 :NS5A, 1341bp(DNA/RNA);19,20 :NS5B, 1773bp(DNA/RNA).

2.4 稳定传代细胞系中 HCV 基因表达产物的检测

为了鉴定得到的稳定传代细胞中 HCV 基因是否成功表达成相应的蛋白,我们选取 CHO-K1-E1、CHO-K1-E2、CHO-K1-NS5B 三株细胞系,在传至 10 代、20 代和冻存复苏后,分别进行 Western-blotting 分

析。结果显示,三株细胞系中能分别检测到 HCV E1、E2 和 NS5B 蛋白,且蛋白质分子量与文献报道相符^[10](图 3)。表明 HCV 基因在宿主细胞中已经形成稳定表达。

2.5 稳定表达细胞系中 UDP-葡萄糖神经酰胺葡萄糖基转移酶酶活分析

稳定表达细胞系中 UGCG 的酶活用薄层层析方法检测,结果见图 4。与含有空载体的 CHO-K1 细胞(ck)相比,含有 HCV 不同功能单基因的细胞中,UGCG 的酶活性均有不同程度的提高。其中 CHO-K1-E2 和 CHO-K1-p7 两株细胞系中 UGCG 酶活提高的幅度最大,为对照细胞系的约 2 倍,而 CHO-K1-NS2 和 CHO-K1-NS5A 两株细胞中 UGCG 的酶活是对照细胞系的 1.6 倍左右。其余稳定细胞系中 UGCG 酶活的提高幅度都小于 0.5 倍。说明 HCV 单基因蛋白的表达均有提高宿主细胞内 UGCG 酶活性的功能。

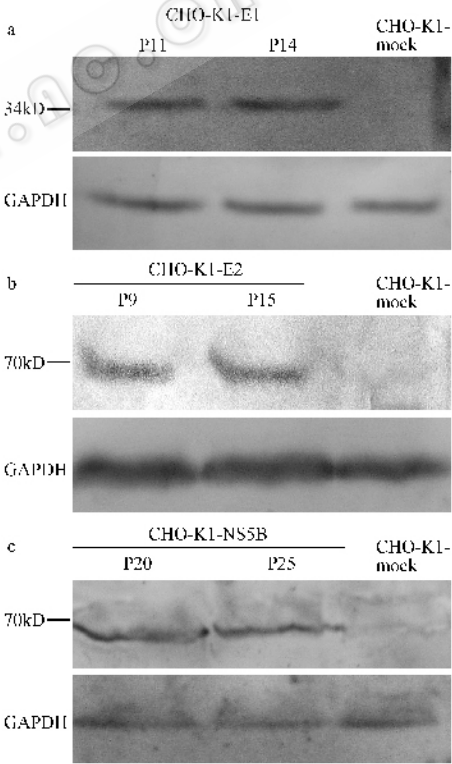


图 3 免疫印迹检测稳定传代细胞系中 HCV 蛋白的表达

Fig.3 Detection of the HCV protein(s) expression in the stable cell lines by Western blot

CHO-K1 cells with mock vector worked as the system control and GAPDH worked as the experiment control. (a) Detection of the HCV E1 protein (~ 35kD) expression in the stable cell line CHO-K1-E1. (b) Detection of the HCV E2 protein (~ 70kD) expression in the stable cell line CHO-K1-E2. (c) Detection of the HCV NS5B protein (~ 68kD) expression in the stable cell line CHO-K1-NS5B. The passage number presents at the top, the molecular weight at the left.

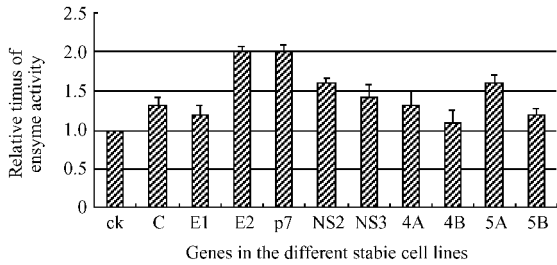


图 4 稳定表达细胞系中 UGCG 酶活的检测

Fig.4 Detection of the UGCG activity in the stable cell lines

Measurements were done twice and the error bars are shown at the top of each column.

3 讨论

HCV 与宿主相互作用的研究一直以来进展缓慢,原因是缺乏有效的支撑 HCV 增殖的体外培养体系,各国学者在这方面作出了很多探索,也取得的一些进展^[11-15]。本研究通过构建含有 HCV 功能基因的真核表达质粒,在 G418 的筛选压力下建立了稳定表达 HCV 功能蛋白的稳定细胞系,为研究 HCV 功能基因与特殊宿主细胞因子相互作用的关系提供了便利的平台。

为了鉴定外源的 HCV 基因是否已经整合到细胞的基因组上,我们分别于培养的不同代次检测了细胞内相应的 HCV 基因的 DNA,结果表明相应的基因已经整合到宿主基因组上。为了证实整合的基因是否能在宿主细胞内正常转录并表达,我们检测了稳定传代细胞内相应的 HCV 基因的 mRNA,结果表明所有的 HCV 基因都得到了转录。由于缺乏所有的 HCV 单个蛋白的抗体,我们只检测了 CHO-K1-E1、CHO-K1-E2 和 CHO-K1-NS5B 三株细胞系中 E1、E2 和 NS5B 蛋白的表达,检测的结果也显示,HCV 的蛋白在宿主细胞中已经形成稳定的表达。同时,经过冻存并复苏的细胞仍能检测到其相应的 DNA、mRNA 以及蛋白的表达,说明冻存和复苏并不会造成外源基因的丢失。可见,我们已经获得 10 株含有 HCV 单个功能基因的稳定传代细胞系。

为了探讨 HCV 功能基因表达对宿主细胞脂质代谢的影响,我们检测了所有稳定表达细胞系中,脂质代谢途径中 UDP-葡萄糖神经酰胺葡萄糖基转移酶的酶活性。已有研究表明,HCV 感染与宿主脂代谢密切相关。实验结果显示,所有整合有病毒基因的细胞系中 UGCG 的酶活性均高于对照细胞系,尤其是 CHO-K1-E2 和 CHO-K1-p7 两株细胞系。说明

病毒基因的表达能提高细胞内的 UGCG 酶活,从某种意义上说,活跃了细胞的脂质代谢。这与感染 HCV 的黑猩猩体内 UGCG 的表达量与 HCV RNA 水平呈正相关^[4]的结果是一致的。鉴于以上的结果,UGCG 酶活的提高有两种可能,一是底物的积累,二是 UGCG 蛋白本身的表达被上调了,究竟是哪种机制还需要深入的研究,但是初步的研究已经把起主要作用的病毒基因锁定在 E2、p7、NS2 和 NS5A 上了,具体病毒基因表达和细胞脂代谢之间是直接作用还是间接作用还需要进一步的实验验证。

REFERENCES(参考文献)

[1] Poynard Y ,Ratziu V ,Benhamou Y ,et al . Natural history of HCV infection . *Best Practice Res Clin Gastroenterol* 2000 ,**14** :211 - 228 .
[2] Bartenschlager R ,Lohmann V . Replication of hepatitis C virus . *J Gen Virol* 2000 ,**81** :1631 - 1648 .
[3] Panteva M ,Korkaya H ,Jameel S . Hepatitis viruses and the MAPK pathway : is this a survival strategy ? *Virus Research* ,2003 ,**92** (2) : 131 - 140 .
[4] Andrew IS ,John PP ,Lisa W ,et al . Genomic analysis of the host response to hepatitis C virus infection . *Proc Natl Acad Sci USA* , 2002 ,**99** :15669 - 15674 .
[5] Sharookh B ,Francis VC . Hepatitis C virus RNA replication is regulated by host geranylgeranylation and fatty acids . *Proc Natl Acad Sci USA* 2005 ,**102** :2561 - 2566 .
[6] Hiroshi S ,Koichi O ,Masahiro A , et al . Host sphingolipid biosynthesis as a target for hepatitis C virus therapy . *Nature Chemical Biology* 2005 ,**1** (6) :333 - 337 .
[7] Li XQ (李信墙) ,Li Y (李研) . Chinese Patent ,ZL 02 1 17666.3 , 1-01-21 .
[8] Sambrook J ,Fritsch EF ,Manitatis T . *Molecular Cloning : a Laboratory Manual* ,2nd ed . ,New York : Cold Spring Harbor Laboratory Press ,1989 ,pp. 15.3 - 15.108 .
[9] Shinichi I ,Hisako S ,Gen S ,et al . Expression cloning of a cDNA for human ceramide glucosyltransferase that catalyzes the first glycosylation step of glycosphingolipid synthesis . *Proc Natl Acad Sci USA* ,1996 ,**93** :4638 - 4643 .
[10] Myung J ,Khalap N ,Kalkeri G ,et al . Inducible model to study negative strand RNA synthesis and assembly of hepatitis C virus from a full-length cDNA clone . *J Virol Meth* 2001 ,**94** :55 - 67 .
[11] Jin Z ,Pablo G ,Guofeng C ,et al . Robust hepatitis C virus infection in vitro . *Proc Natl Acad Sci USA* 2005 ,**102** :9294 - 9299 .
[12] MinKyung Y ,Rodrigo AV ,David LT ,et al . Production of infectious genotype 1a hepatitis C (Hutchinson strain) in cultured human hepatoma cells . *Proc Natl Acad Sci USA* 2006 ,**103** :2310 - 2315 .
[13] Brett DL ,Matnew JE ,Angrew JS ,et al . Complet replication of hepatitis C virus in cell culture . *Science* 2005 ,**309** :623 - 626 .
[14] Theo H ,Satoru S ,Jonathan A ,et al . An in vitro model of hepatitis C virion production . *Proc Natl Acad Sci USA* ,2005 ,**102** :2579 - 2583 .
[15] Jin Z ,Pablo G ,Josan C ,et al . Persistent hepatitis C virus infection in vitro : co-evolution of virus and host . *J Virol* 2006 ,**80** :11082 -