

doi:10.3969/j.issn.2095-4344.2013.02.013 [http://www.crter.org]

吴劲风, 叶冬平, 戴丽冰, 梁伟国. 人端粒酶反转录酶重组绿色荧光表达载体转染椎间盘正常髓核细胞[J]. 中国组织工程研究, 2013, 17(2): 259-263.

## 人端粒酶反转录酶重组绿色荧光表达载体转染椎间盘正常髓核细胞\*\*\*

吴劲风, 叶冬平, 戴丽冰, 梁伟国

暨南大学第四附属医院, 广州市红十字会医院, 广东省广州市 510220

### 文章亮点:

- 1 运用人端粒酶反转录酶转染髓核细胞构建永生髓核细胞, 构建的髓核细胞加入重组绿色荧光蛋白质粒, 可以随时示踪, 检测人端粒酶反转录酶的表达。
- 2 实验将增强型绿色荧光蛋白-人端粒酶反转录酶重组质粒转染髓核细胞, 并通过荧光显微镜动态检测转染髓核细胞的增强型绿色荧光蛋白-人端粒酶反转录酶表达
- 3 建立一种能够长期培养、表型稳定的永生髓核细胞株, 希望能为细胞组织工程研究领域提供标准髓核细胞。

### 关键词:

组织构建; 脊柱组织构建; 髓核细胞; 人端粒酶反转录酶基因; DH5 $\alpha$ 感受态大肠杆菌; 转染; 永生化; 目的基因; 髓核细胞转染退行性椎间盘病; 省级基金; 组织构建图片文章

### 摘要

**背景:** 椎间盘髓核细胞分离培养困难, 老化较快, 迫切需要一种标准细胞株用于实验研究。

**目的:** 探讨人端粒酶反转录酶重组绿色荧光表达载体的构建及其转染正常髓核细胞构建永生化细胞的可行性研究。

**方法:** 通过目的基因克隆、真核表达质粒中目的基因序列测定、目的基因真核表达质粒的构建、转染人端粒酶反转录酶表达检测等步骤进行实验。

**结果与结论:** 构建出人端粒酶反转录酶重组绿色荧光表达载体, 成功转染正常髓核细胞并在细胞中稳定表达。结果表明运用人端粒酶反转录酶转染椎间盘髓核细胞构建永生化细胞是一种可行的方法。

吴劲风, 男, 1962年生, 广东省广州市人, 汉族, 副主任医师, 主要从事组织工程椎间盘研究。  
yedongping927@126.com

通讯作者: 梁伟国, 硕士, 主任医师, 暨南大学第四附属医院, 广州市红十字会医院, 广东省广州市 510220  
yedongping927@126.com

中图分类号:R318

文献标识码:A

文章编号:2095-4344

(2013)02-00259-05

收稿日期: 2012-07-11

修回日期: 2012-08-12

(20110911007/D·W)

## Recombinant green fluorescent protein plasmids expressing human telomerase reverse transcriptase transfect normal nucleus pulposus cells in the intervertebral disc

Wu Jin-feng, Ye Dong-ping, Dai Li-bing, Liang Wei-guo

Fourth Affiliated Hospital of Jinan University, Guangzhou Red-Cross Hospital, Guangzhou 510220, Guangdong Province, China

### Abstract

**BACKGROUND:** Nucleus pulposus cells are difficult to be isolated and cultured from the intervertebral disc, and the cells age rapidly. An urgent standard cell line is required for experimental research.

**OBJECTIVE:** To investigate the construction of recombinant green fluorescent protein plasmid expressing human telomerase reverse transcriptase and to assess the feasibility of constructing immortalized human nucleus pulposus cell line.

**METHODS:** Target gene cloning, target gene sequencing in eukaryotic expression plasmids, construction of eukaryotic expression plasmids expressing target genes, and transfection of human telomerase reverse transcriptase were performed in order.

**RESULTS AND CONCLUSION:** Nucleus pulposus cells transfected with recombinant green fluorescent protein

Wu Jin-feng, Associate chief physician, Fourth Affiliated Hospital of Jinan University, Guangzhou Red-Cross Hospital, Guangzhou 510220, Guangdong Province, China yedongping927@126.com

Corresponding author: Liang Wei-guo, Master, Chief physician, Fourth Affiliated Hospital of Jinan University, Guangzhou Red-Cross Hospital, Guangzhou 510220, Guangdong Province, China yedongping927@126.com

Supported by: the Major Medicine and Health Program of Guangzhou City, No. 2009-zdi-04\*; the Natural Science Foundation of Guangdong Province in 2010, No. 10151022001000005\*; the Natural Science Foundation of Guangdong Province in 2011, No. S2011010000910\*

Received: 2012-07-11  
Accepted: 2012-08-12

plasmid expressing human telomerase reverse transcriptase have a stable expression. It is anticipated that human telomerase reverse transcriptase can be useful for creating the immortalized nucleus pulposus cells.

**Key Words:** tissue construction; spinal cord tissue construction; nucleus pulposus cells; human telomerase reverse transcriptase gene; DH5 $\alpha$  competent *Escherichia coli*; transfection; immortalized; target gene; nucleus pulposus cells transfection in degenerative disc diseases; provincial fund; tissue construction photographs-containing paper

Wu JF, Ye DP, Dai LB, Liang WG. Recombinant green fluorescent protein plasmids expressing human telomerase reverse transcriptase transfect normal nucleus pulposus cells in the intervertebral disc. *Zhongguo Zuzhi Gongcheng Yanjiu*. 2013;17(2): 259-263.

## 0 引言

端粒酶的长度决定细胞的增殖能力<sup>[1]</sup>。外源性人端粒酶反转录酶可以有效激活目的细胞端粒酶, 维持端粒长度, 细胞染色体稳定而直接逾越M2期, 发生永生生化<sup>[2]</sup>, 且人端粒酶反转录酶介导的永生生化细胞是正常细胞, 保持了更多的已分化功能和更少的染色体损伤, 安全性更高<sup>[3]</sup>。

椎间盘退变引起的椎间盘突出和慢性腰腿痛是骨科的常见病, 其具体退变机制不详<sup>[4]</sup>。通过组织工程学的方法修复或重建退变椎间盘组织是目前国内外进行的一项热点研究工作, 并被认为是未来一种有希望的治疗方法<sup>[5-6]</sup>。椎间盘髓核细胞的培养与构建在研究髓核细胞生物学、转基因治疗以及组织工程等方面日渐成为一种不可缺少的技术<sup>[7-8]</sup>。实验采用外源性端粒酶反转录酶基因转导入椎间盘正常髓核细胞激活端粒酶的方法, 探讨一种新的获得永生生化髓核细胞株的组织工程技术, 为进一步研究退行性椎间盘病的病变机制提供标准细胞株; 为临床采用组织工程再生的方法修复退变的椎间盘组织, 恢复功能提供基础; 为提高国内对退变性椎间盘病的整体防治水平提供新的思路。

## 1 材料和方法

**设计:** 细胞学体外组织构建实验。

**时间及地点:** 实验于2009年8月至2011年6月在广州市创伤外科研究所完成。

**材料:**

外源性端粒酶反转录酶基因转导入椎间盘正常髓核细胞的主要试剂、仪器及来源:

Main reagents and instruments used in the experiment of transfecting normal nucleus pulposus cells with exogenous telomerase reverse transcriptase gene:

试剂及仪器	来源
肝癌组织、DH5 $\alpha$ 感受态大肠杆菌、人椎间盘髓核细胞株	凯诺生物科技有限公司
RNA 试剂盒	TaKaRa
小提质粒试剂盒、胶回收试剂盒、限制性内切酶、T <sub>4</sub> DNA 连接酶、Taq 聚合酶	MBI 公司
western blot 试剂盒	GE Healthcare 公司
一抗人端粒酶反转录酶	abcam 公司
二抗 mouse-HRP	博士德公司

外源性端粒酶反转录酶基因转导入椎间盘正常髓核细胞引物的设计:

Primer design in the experiment of transfecting normal nucleus pulposus cells with exogenous telomerase reverse transcriptase gene:

RT-1: 5'-tggaaggagtctcgatccgcgcgctcccgcctg-3'	加入 <i>Xmn</i> 1酶切位点
RT-2: 5'-caccctcgaggtgagacgctcgg-3'	带 <i>Xho</i> 1酶切位点
RT-3: 5'-acctcgagggtgaaggcactgttca-3'	带 <i>Xho</i> 1酶切位点
RT-4: 5'-cgctcgagctagctccaggatggtctgaagtct-3'	带 <i>Xho</i> 1酶切位点

### 实验方法:

**目的基因克隆:** 用RNA提取试剂盒从肝癌组织中按试剂盒说明提取总RNA, oligo(dT)为引物, 以总RNA为模板, 在禽源性反转录酶(M-MULV)作用下反转录1 h, 获得cDNA; 然后以RT-1和RT-2、RT-3和RT-4引物, 分别进行PCR反应, 扩增目的基因。PCR产物经1%琼脂糖凝胶电泳分离、鉴定, 按快速凝胶回收试剂盒说明书方法回收纯化PCR产物, 获得目的基因PCR产物与载体T-Easy (T载体)按比例进行连接<sup>[9]</sup>。

**真核表达质粒中目的基因序列测定:** 从重组体T-人端粒酶反转录酶中提取质粒, 挑选经初步鉴定的重组体, 由上海生工公司采用双向测定法测序。用DNASIS 软件对所测的基因序列和氨基酸序列与GenBank 公布的序列进行同源性比较。

**目的基因真核表达质粒的构建:** ①应用Xmn1和Xho1分别完全消化T-人端粒酶反转录酶和载体pAAV-MCS质粒DNA, 1%琼脂糖凝胶电泳分离, 并回收纯化目的DNA片段, 然后进行连接, 并转化DH5 $\alpha$ 感受态大肠杆菌, 从含卡那霉素的LB平板上, 初选阳性克隆, 并酶切鉴定pAAV-人端粒酶反转录酶质粒。②应用Not I完全消化pAAV-人端粒酶反转录酶质粒和绿色荧光蛋白质粒DNA, 将目的基因人端粒酶反转录酶表达盒和增强型绿色荧光蛋白真核表达质粒从胶中切取, 纯化回收, 然后进行连接并转化DH5 $\alpha$ 感受态大肠杆菌, 从含卡那霉素的LB平板上, 初选阳性克隆, 并酶切鉴定, 构建成绿色荧光蛋白-人端粒酶反转录酶真核表达质粒。

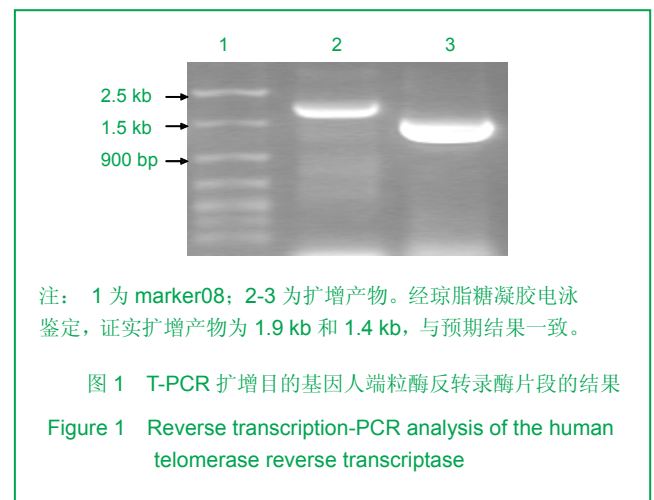
**转染人端粒酶反转录酶表达检测<sup>[10]</sup>:** 按照说明书实验步骤进行, 用BIOMIGA质粒提取试剂盒提取增强型绿色荧光蛋白质粒-人端粒酶反转录酶真核表达, 细胞转染按试剂Lipofect-amine 2000操作说明书进行。转染增强型绿色荧光蛋白质粒-人端粒酶反转录酶真核表达至髓核细胞24 h后换液, 加G418(250 mg/L)的培养液进行筛选, 每2 d换液1次。转染时, 设置转染空载体增强型绿色荧光蛋白质粒组。①以Oligo(dT)为反转录引物, 以提取的总RNA为模板, 在AMV催化下特异反转录出cDNA。以人端粒酶反转录酶的RT-3和RT-4引物扩增目的基因, 设定反应条件, 行PCR反应。产物在1.5%琼脂糖凝胶(含溴化乙锭5 g/L)中电泳, 凝胶成像系统下观察照相。②western blot, 10%SDS-PAGE胶上样, 电压90 V, 恒压电泳120 min, 电泳转移到0.45  $\mu$ m的PVDF膜上; 加一抗人端粒酶反转录酶(1:500), 二抗mouse-HRP(1:3 000), 洗膜, 用ECL试剂反应显影分析。

**主要观察指标:** RT-PCR扩增目的基因人端粒酶反

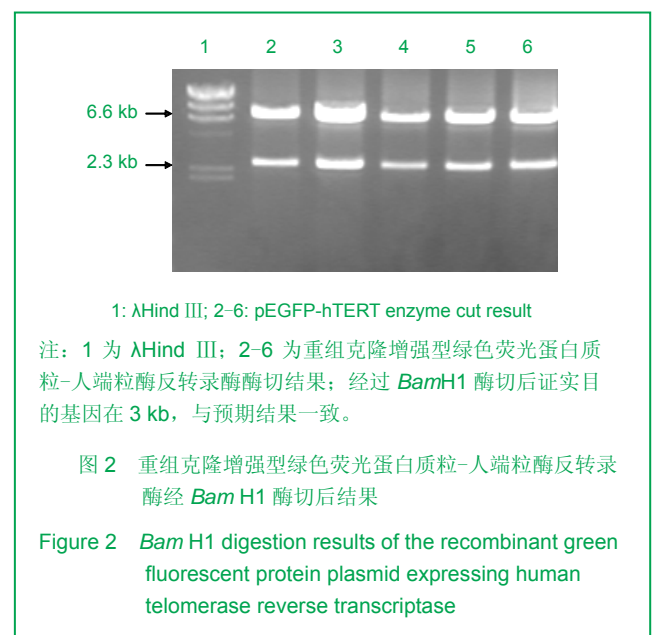
转录酶片段的的结果, 重组克隆增强型绿色荧光蛋白质粒-人端粒酶反转录酶鉴定, 转染增强型绿色荧光蛋白质粒-人端粒酶反转录酶后髓核细胞人端粒酶反转录酶表达情况, 观察转染质粒的表达情况。

## 2 结果

**2.1 RT-PCR 扩增目的基因人端粒酶反转录酶片段的的结果** PCR 扩增完的DNA 经琼脂糖凝胶电泳鉴定, 证实扩增产物为1.9 kb和1.4 kb, 与预期结果一致, 见图1。

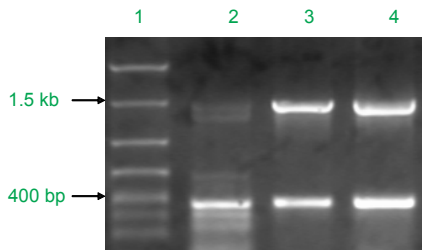


**2.2 重组克隆增强型绿色荧光蛋白质粒-人端粒酶反转录酶鉴定结果** 重组克隆增强型绿色荧光蛋白质粒-人端粒酶反转录酶反转录酶经过 BamH1酶切后证实目的基因在3 kb, 与预期结果一致, 见图2。



**2.3 转染增强型绿色荧光蛋白质粒-人端粒酶反转录酶后髓核细胞人端粒酶反转录酶表达情况** 增强型绿

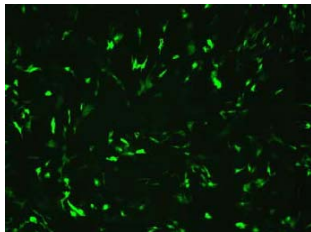
色荧光蛋白质粒-人端粒酶反转录酶转染细胞后经过RT-PCR证实目的产物在1.5 kb, 引用RT-3和RT-4两对引物完成, 内参在370 bp, 与预期的一致, 见图3。24 h后荧光显微镜下分析报告基因绿色荧光蛋白转染效率, 见图4。



注: 1 为 Marker; 2 为阴性对照组; 3 为细胞转染后 24 h 情况; 4 为细胞转染后 72 h 情况。经过 RT-PCR 证实目的产物在 1.5 kb, 引用 RT-3 和 RT-4 两对引物完成, 内参在 370 bp, 与预期的一致。

图3 增强型绿色荧光蛋白质粒-人端粒酶反转录酶转染细胞后, RT-PCR 扩增人端粒酶反转录酶基因片段结果

Figure 3 Reverse transcription-PCR amplified fragment of human telomerase reverse transcriptase gene after transfection of normal nucleus pulposus cells with recombinant green fluorescent protein plasmid expressing human telomerase reverse transcriptase



注: 绿色荧光蛋白在基因转染后 24 h 后, 即可见绿色的较高表达

图4 转染增强型绿色荧光蛋白质粒-人端粒酶反转录酶后, 髓核细胞人端粒酶反转录酶绿色荧光表达情况( $\times 100$ )

Figure 4 Expression of green fluorescent protein following transfection with recombinant green fluorescent protein plasmid expressing human telomerase reverse transcriptase ( $\times 100$ )

### 3 讨论

国外Papanikolaou等<sup>[11]</sup>将外源性人端粒酶反转录酶导入人视网膜色素上皮细胞和包皮成纤维细胞, 细胞体外培养寿命延长20倍以上。人端粒酶反转录酶已成功永生化人乳腺上皮细胞、肺成纤维细胞系IMR90、新生

儿成纤维细胞株(BJ)、人脐带动脉平滑肌细胞、微血管内皮细胞、卵巢上皮细胞、胚胎滋养层细胞、人肝脏细胞、神经干细胞、表皮细胞、骨髓间充质干细胞<sup>[12-20]</sup>。国内方泽强等<sup>[21]</sup>将端粒酶反转录酶转染获得的永生软骨细胞和经诱导向软骨分化的间充质干细胞分别与 $\beta$ -磷酸三钙复合后在裸鼠体内成功地构建了工程化的软骨组织, 表明应用转染人端粒酶反转录酶的永生软骨细胞和间充质干细胞作为软骨组织工程的种子细胞构建工程化软骨具有可行性。

目前, 美国Clontech与Geron公司转染人端粒酶反转录酶至人视网膜色素上皮细胞, 合作推出第1种商品化的永生正常细胞系人端粒酶反转录酶RPE1, 其较正常细胞增殖快, 平均每周达5-6 PDs。同时, 该细胞系近于汇合时S期细胞比例是转染前的两倍。目前其传代多于150代, 其中有3个克隆多于300代<sup>[22-24]</sup>。

Zongaro等<sup>[25]</sup>报道通过腺病毒转染SV40基因的方法成功构建了永生的人髓核细胞株, 细胞培养超过5个月, 传20代以上, 形态学和功能特性仍保持不变, 且无致瘤性, 可作为组织工程椎间盘的种子细胞。但病毒、癌基因、原癌基因等主要通过抑制M1期机制, 细胞绕过M1期继续生长。细胞经过20-30群体倍增次数后, 进入危机期(crisis, M2期), 细胞出现退化凋亡, 并非永生人端粒酶反转录酶介导的永生细胞是正常细胞, 并非转化细胞<sup>[26]</sup>。它们具有正常生长率、核型, 呈现接触抑制和锚着依赖性, 不具有致癌性和软琼脂克隆形成能力等。且TERT介导的永生细胞已通过了M1期和M2期, 同生殖干细胞一样, 是真正意义上的永生<sup>[27-28]</sup>。因此实验将pIRES2-增强型绿色荧光蛋白-人端粒酶反转录酶重组质粒转染髓核细胞, 通过荧光显微镜动态检测转染髓核细胞的pIRES2-增强型绿色荧光蛋白-人端粒酶反转录酶表达, 建立一种能够长期培养, 表型稳定的永生髓核细胞株, 提供标准髓核细胞, 对组织工程学研究将带来深远的影响。

**致谢:** 广州市凯诺生物科技有限公司。

**基金资助:** 广州市医药卫生重点项目(2009-zdi-04); 2010年广东省自然科学基金(10151022001000005); 2011年广东省自然科学基金(S2011010000910)。

**作者贡献:** 该课题由第一作者设计, 第二作者撰写文章, 第三作者开展实验, 第四作者指导实验的实施及文章的撰写。第一作者对文章负责。

**利益冲突:** 课题未涉及任何厂家及相关雇主或其他经济组

织直接或间接的经济或利益的赞助。

**伦理要求:** 该实验所需人体细胞均购自广州市凯诺生物科技有限公司, 已通过伦理委员会答辩。

**作者声明:** 文章为原创作品, 数据准确, 内容不涉及泄密, 无一稿两投, 无抄袭, 无内容剽窃, 无作者署名争议, 无与他人课题以及专利技术的争执, 内容真实, 文责自负。

#### 4 参考文献

- [1] Shay JW, Wright WE. Senescence and immortalization: role of telomeres and telomerase. *Carcinogenesis*. 2005;26(5): 867-874.
- [2] Shukla S, Acharya S, Rajput D, et al. Iomere--the twilight to immortality. *J Assoc Physicians India*. 2010;58:553-560.
- [3] Jaitner S, Reiche JA, Schäffauer AJ, et al. Human telomerase reverse transcriptase (hTERT) is a target gene of  $\beta$ -catenin in human colorectal tumors. *Cell Cycle*. 2012;11(17).
- [4] Wang Z, Yi J, Li H, et al. Extension of life-span of normal human fibroblasts by reconstitution of telomerase activity. *Shi Yan Sheng Wu Xue Bao*. 2000;33(2):129-140.
- [5] Zhang WX, Ni JJ. *Zhongguo Zuzhi Gongcheng Yanjiu yu Linchuang Kangfu*. 2008;12(2):335-338.  
张文祥,倪家骧.细胞因子在椎间盘源性疼痛中的作用及其机制[J]. *中国组织工程研究与临床康复*,2008,12(2):335-338.
- [6] Tiaden AN, Klawitter M, Lux V, et al. Detrimental role for human high temperature requirement serine protease A1 (HTRA1) in the pathogenesis of intervertebral disc (IVD) degeneration. *J Biol Chem*. 2012;287(25):21335-21345.
- [7] Paul CP, Zuiderbaan HA, Zandieh Doulabi B, et al. Simulated-physiological loading conditions preserve biological and mechanical properties of caprine lumbar intervertebral discs in ex vivo culture. *PLoS One*. 2012;7(3):e33147.
- [8] Liu GZ, Wu JJ, Zhu TY, et al. *Disan Junyi Daxue Xuebao*. 2008;30(3):189-191.  
刘官智,伍津津,朱堂友,等. 外源性人端粒酶反转录酶基因转染对正常人毛乳头细胞的影响[J]. *第三军医大学学报*,2008,30(3): 189-191.
- [9] Li K, Liu RM, Han XF, et al. *Zhongguo Zuzhi Gongcheng Yanjiu yu Linchuang Kangfu*. 2007;23(7):2173-2177.  
李克,刘瑞敏,韩雪飞,等. 端粒酶反转录酶基因修饰人骨髓间质干细胞的实验[J]. *中国组织工程研究与临床康复*, 2007,23(7): 2173-2177.
- [10] Shigeishi H, Sugiyama M, Tahara H, et al. Increased telomerase activity and hTERT expression in human salivary gland carcinomas. *Oncol Lett*. 2011;2(5):845-850.
- [11] MacKenzie KL, Franco S, May C, et al. Pass cultured human fibroblasts overexpressing hTERT encounter a growth crisis following an extended period of proliferation. *Exp Cell Res*. 2000 ;259(2):336-350.
- [12] Papanikolaou V, Athanassiou E, Dubos S, et al. hTERT regulation by NF- $\kappa$ B and c-myc in irradiated HER2-positive breast cancer cells. *Int J Radiat Biol*. 2011;87(6):609-621.
- [13] Li S, Tian J, Liu J, et al. Biological characteristics of human umbilical artery smooth muscle cells cultured in vitro and the preestablishment of immortalized cell line. *Sichuan Da Xue Xue Bao Yi Xue Ban*. 2003;34(2):189-192.
- [14] Buser R, Montesano R, Garcia I, et al. Bovine microvascular endothelial cells immortalized with human telomerase. *J Cell Biochem*. 2006;98(2):267-286.
- [15] Li NF, Broad S, Lu YJ, et al. Human ovarian surface epithelial cells immortalized with hTERT maintain functional pRb and p53 expression. *Cell Prolif*. 2007;40(5):780-794.
- [16] Omi H, Okamoto A, Nikaido T, et al. Establishment of an immortalized human extravillous trophoblast cell line by retroviral infection of E6/E7/hTERT and its transcriptional profile during hypoxia and reoxygenation. *Int J Mol Med*. 2009; 23(2):229-236.
- [17] Wege H, Le HT, Chui MS, et al. Telomerase reconstitution immortalizes human fetal hepatocytes without disrupting their differentiation potential. *Gastroenterology*. 2003;124(2): 432-444.
- [18] Li Y, Li J, Dou L. *Zhongguo Shengwu Gongcheng Zazhi*. 2008; 28(6):7-12.  
李勇,李军,窦琳.转染hTERT基因的大鼠神经干细胞生物学特性研究[J]. *中国生物工程杂志*,2008,28(6):7-12.
- [19] Liu GZ, Wu JJ, Zhu TY. *Linchuang Pifuke Zazhi*. 2008;37(2): 69-71.  
刘官智,伍津津,朱堂友. hTERT基因转染激活人毛乳头细胞端粒酶的实验研究[J]. *临床皮肤科杂志*,2008,37(2):69-71.
- [20] Xu Y, Mu XL. *Zhongguo Zuzhi Gongcheng Yanjiu yu Linchuang Kangfu*. 2007;11(33):6552-6556.  
徐燕,慕晓玲.建立永生化解骨髓间充质干细胞株[J]. *中国组织工程研究与临床康复*,2007,11(33):6552-6556.
- [21] Mondello C, Chiesa M, Rebuzzini P, et al. Karyotype instability and anchorage-independent growth in telomerase-immortalized fibroblasts from two centenarian individuals. *Biochem Biophys Res Commun*. 2003;308(4): 914-921.
- [22] Fang ZQ, Wang CY, Li HZ. *Zhongguo Jiaoxing Waikexue Zazhi*. 2003;11(2):24-27.  
方泽强,王常勇,李慧增.基于永生化解骨细胞和骨髓基质干细胞的工程化软骨形成的实验研究[J]. *中国矫形外科杂志*, 2003, 11(2):24-27.
- [23] Bian ZM, Elner SG, Khanna H, et al. Expression and functional roles of caspase-5 in inflammatory responses of human retinal pigment epithelial cells. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2011;52(12):8646-8656.
- [24] Daisuke S, Joji M, Yukihiko Y, et al. Immortalization of human nucleus pulposus cells by a recombinant SV40 adenovirus vector. *Spine*. 2004;29(14):1515-1523.
- [25] Zongaro S, de Stanchina E, Colombo T, et al. Stepwise neoplastic transformation of a telomerase immortalized fibroblast cell line. *Cancer Res*. 2005;65(24):11411-11418.
- [26] Zongaro S, de Stanchina E, Colombo T, et al. Stepwise neoplastic transformation of a telomerase immortalized fibroblast cell line. *Cancer Res*. 2005;65(24):11411-11418.
- [27] Li HM, Man C, Jin Y, et al. Molecular and cytogenetic changes involved in the immortalization of nasopharyngeal epithelial cells by telomerase. *Int J Cancer*. 2006;119(7):1567-1576.
- [28] Yip YL, Tsang CM, Deng W, et al. Expression of Epstein-Barr virus-encoded LMP1 and hTERT extends the life span and immortalizes primary cultures of nasopharyngeal epithelial cells. *J Med Virol*. 2010;82(10):1711-1723.