

乙型肝炎病毒核心基因克隆及其重组体的构建

韦 嘉, 杨 林, 姚集鲁, 姚春澜, 卢建溪

(中山医科大学附属第三医院传染科, 广东 广州 510630)

摘 要:【目的】构建含乙型肝炎病毒(HBV)编码核心蛋白(HBcAg)的核心(C)基因的真核表达重组体, 以进行核酸免疫及相关研究。【方法】以含HBV(ayw亚型)全基因序列的质粒pHBV1为模板, 用PCR的方法获得编码HBcAg的C基因片段(nt1889~2457), 该基因片段两端设计了BamHI和EcoRI的限制性内切酶位点, 以便通过定向克隆将其插入真核表达质粒载体pcDNA3相应的多克隆位点。【结果】经BamHI和EcoRI酶切后琼脂糖凝胶电泳鉴定, 以及重组体插入片段的DNA序列测定, 证实成功地构建了含C基因的真核表达重组体pcDNA3-HBc。【结论】pcDNA3-HBc的构建成功为研究其表达及进行动物免疫研究提供了物质基础。

关键词: 肝炎病毒, 乙型/免疫学; 基因, 扩增/聚合酶链反应; 核酸, 重组

中图分类号: R 512.6 文献标识码: A 文章编号: 1000-257X(2000)03-0199-03

Amplification of Hepatitis B Virus Core Gene by PCR and Creating Eukaryotic Expression Vector Construct

WEI Jia, YANG Lin, YAO Ji-lu, YAO Chun-lan, LU Jian-xi

(Department of Infectious Diseases, Third Affiliated Hospital, Sun Yat-sen University of Medical Sciences, Guangzhou 510630, China)

Abstract:【Objective】To create Hepatitis B virus C gene eukaryotic expression construct, in order to study DNA-mediated immunization in mouse and related issues research. 【Methods】Using plasmid pHBV1 which contained hepatitis B virus (ayw subtype) whole DNA sequences as the source of viral genes, HBV DNA fragment (nt1889~2457) encoding for nucleocapsid protein (HBcAg) was polymerase chain reaction cloned as BamHI-EcoRI fragment. The gene was inserted into the multiple cloning site of eukaryotic expression plasmid vector pcDNA3. 【Result】The recombinant plasmid was cleaved with EcoRI and BamHI. Agarose gel electrophoresis, and sequencing the insert fragment in pcDNA3 showed that pcDNA3-HBc eukaryotic expression construct is successfully created. 【Conclusion】The recombinant construct pcDNA3-HBc provides available conditions for further study about its expression and immune response.

Key words: hepatitis B virus/immunology; gene/amplification/PCR; DNA/recombinant

核酸(DNA)免疫是近年研究的热点, 通过内源性产生抗原和加工提呈的途径, DNA免疫可产生较强的体液和细胞免疫应答, 不仅有预防而且还可能有治疗功效^[1]。DNA疫苗在防治乙型肝炎的研究方面, 对编码表面抗原(HBsAg)的S基因有较多报道, 对C基因的研究相对较少^[2]。有证据表明, 人类感染HBV后核心蛋白对B细胞、Th(辅助性T细

胞)和CTL(杀伤性T细胞)的应答均具有很高的免疫原性^[3-5], 因此, 对C基因DNA免疫的研究具有十分重要的意义。

1 材料与方 法

1.1 质粒载体及关键试剂

收稿日期: 1999-07-16

基金项目: 国家自然科学基金(39770681)和广东省自然科学基金(980094)资助课题

作者简介: 韦 嘉(1963-), 男, 广西右江人, 硕士, 在职博士生, 讲师。

含 HBV_{ayw} 亚型)全基因序列的质粒 pHBV1、真核表达载体质粒 pcDNA3、大肠杆菌 HB101 为本室所保存;限制性内切酶 *EcoRI*、*BamHI*、T4DNA 连接酶、*Taq* 酶均购自 Promega 公司;DNA 回收及纯化试剂盒 Prep-Gene-A 购自 Bio-Rad 公司。荧光测序试剂盒为 PE 公司产品。

1.2 PCR 引物的设计及扩增条件

根据 HBV_{ayw} 亚型基因序列^[5]设计一对引物,由上海细胞生物所合成,在上、下游引物中加入 *BamHI*、*EcoRI* 限制性酶切位点,以便于克隆基因插入到真核表达载体 pcDNA3 中,上游引物为 5'-TTAC CGATTCTGGCTTTGGGCATGGA-C-3',下游引物为 5'-CTCGAATTCATACTAACATTGAGATTC-3'以质粒 pHBV1 为模板在 MJ 公司 PTC-100™ 热循环仪上按下列步骤进行 PCR 扩增 C 基因:共 30 个循环,每一循环 94 °C 变性 40 s, 55 °C 退火 40 s, 72 °C 延伸 1 min。

1.3 真核表达重组体的构建

PCR 产物和质粒 pcDNA3 经 Prep-Gene-A 试剂盒纯化后,分别用 *BamHI*、*EcoRI* 酶切,酶切后同样经 Prep-A-Gene 回收纯化,用 T4DNA 连接酶连接目的基因 HBV C 和 pcDNA3 载体。连接物转化 *CaCl₂* 法制备的大肠杆菌 HB101 感受态细胞,在含氨苄青霉素的琼脂培养板上铺板,37 °C 过夜培养。挑选单菌落提取质粒进行酶切鉴定。

1.4 DNA 序列测定

上述 PCR 扩增的引物,用 PE 公司的双脱氧法测序试剂盒在 ABI PRISM 310 型基因分析仪上进行 DNA 测序。

2 结果

2.1 PCR 扩增 HBV C 基因

以含 HBV_{ayw} 亚型全基因序列的质粒 pHBV1 为模板扩增 HBV 核心(C)基因,PCR 产物经 10 g/L 琼脂电泳鉴定,在 569 bp 处可见到清晰条带,与理论上 C 基因的大小完全符合(图 1)。

2.2 pcDNA3-HBVc 重组体的构建及鉴定

目的基因 HBV C 和载体质粒经酶切、连接及转化后,将挑选到的单菌落扩大培养,提取质粒,用 *BamHI* 和 *EcoRI* 双酶切鉴定,琼脂糖凝胶电泳显示空载体酶切为 1 条带;重组体酶切为两条带,1 条 5.4 kb,为载体质粒;1 条为 569 bp,与插入的目的

基因大小完全相同,表明 HBV C 基因真核表达重组体 pcDNA3-HBVc 构建成功(图 2)。



图 1 PCR 产物的琼脂糖凝胶电泳

Fig. 1 Agarose gel electrophoresis of the PCR product

M: 100 bp DNA ladder; A: PCR product

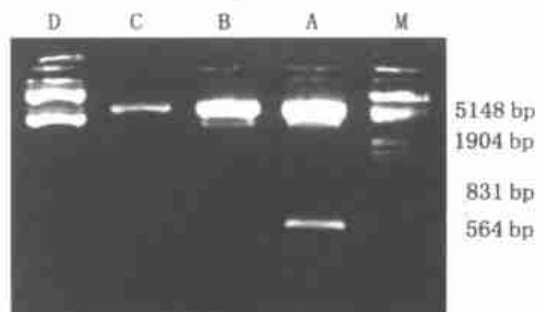


图 2 重组质粒的鉴定

Fig. 2 Identification of recombinant plasmid

M: λ DNA/ *EcoRI* + *HindIII*; A: recombinant plasmid/ *EcoRI* + *BamHI*; B: recombinant plasmid/ *EcoRI*; C: plasmid pcDNA3/ *EcoRI* + *BamHI*; D: plasmid pcDNA3

2.3 重组体中插入的 DNA 片段序列测定

测序结果表明插入的片段与文献报道^[6]的 HBV_{ayw} 亚型)编码核心抗原的序列一致。

3 讨论

乙型肝炎病毒持续感染的原因之一,是由于感染者未能产生针对 HBV 结构蛋白的细胞免疫^[3]。DNA 免疫由于具有良好的诱导细胞免疫作用而在乙肝防治策略研究上倍受关注。

乙型肝炎病毒(HBV)核心(C)基因编码的核心抗原(HBcAg),由 183 个氨基酸自身聚集而成,为 20 面体衣壳。包装 HBV 的核酸及多聚酶外层覆盖病毒包膜后自肝细胞释放。HBcAg 还可在感染的肝细胞浆和肝细胞膜表面表达,成为机体特异性杀伤

T细胞(CTL)攻击的靶抗原。核心蛋白诱导的细胞免疫对清除病毒感染的细胞以及病理损伤方面均具有重要作用。

pDNA3 是含 CMV 启动子的高水平真核表达质粒载体,与其他真核表达载体(如 pAp031)比较,由于 pDNA3 上所含有氨苄青霉素抗性基因包含一个短免疫刺激 DNA 序列而有利于 DNA 免疫后体液和细胞免疫应答的产生^[1]。对 HBV S 基因的 DNA 免疫研究提示,以 pDNA3 为载体的 S 区 DNA 免疫所诱导的抗体转化率高于其他载体^[2]。pDNA3-HBVc 重组体的构建成功,为探讨 HBV C 基因的 DNA 免疫研究,选择优势载体及进行与 C 基因相关的免疫病理机制研究提供了物质基础。

参考文献:

- [1] Geissler M, Tokushige K, Wands J. Polynucleotide based immunization: study of the cellular and humoral immune response to hepatitis B virus(abstr)[J]. Hepatology, 1995, 22(4): 324A.
- [2] Geissler M, Tokushige K, Chante C G *et al*. Cellular and humoral immune response to hepatitis B virus structural pro-

teins in mice after DNA-based immunization[J]. Gastroenterology, 1997, 112(4): 1307.

- [3] Chisari F V, Ferrari C. Hepatitis B virus immunopathogenesis [J]. Annu Rev Immunol, 1995, 13: 29.
- [4] Rehmann B, Chang K M, McHutchinson J, *et al*. Differential cytotoxic T lymphocyte responsiveness to the hepatitis B and C chronically infected patients [J]. J Virol, 1996, 70(10): 7092.
- [5] Tsai S L, Chen P J, Lai M Y, *et al*. Acute exacerbation of chronic type B hepatitis are accompanied by increased T cell responses to hepatitis B core and e antigens. Implication for hepatitis B e antigen seroconversion [J]. J Clin Invest, 1992, 89(1): 87.
- [6] Ono Y, Onda H, Sasada R, *et al*. The complete nucleotide sequences of the cloned hepatitis B virus DNA; subtype adr and adw [J]. Nucleic Acids Research, 1983, 11(6): 1747.
- [7] Sato Y, Roman M, Tighhe H, *et al*. Immunostimulatory DNA sequences necessary for effective intradermal gene immunization [J]. Science, 1996, 273(5273): 352.

(编辑 关淡庄)

(上接第 167 页)

BAC₅ 单抗结合;②噬菌体间的差异:来自不同克隆的噬菌体,由于递呈的氨基酸序列不一样,其表面多肽所形成的构象之间会有差异,因此与液相中外源 BAC₅ 单抗的亲合力也会有差别。如果大部分噬菌体与包被在板上的 BAC₅ 单抗的亲合力比较高,则不容易受外加抗体的影响。因此,大部分的噬菌体克隆在加入外源 BAC₅ 单抗后也就不显示出对原有 ELISA 结果的“抑制”。

BAC₅ 单抗只与 C2、C17 和 C29 的 M₁₃ 噬菌体有阳性反应,对 VC_{SM}₁₃ 和 RPLM₁₃ 呈阴性反应,阳性与阴性反应的光吸收值(A₄₉₀)之比大于 2.1。导致这一特异性识别的原因是因为 VC_{SM}₁ 是辅助性噬菌体,不存在外源随机多肽的 DNA 序列,因此表面蛋白构象没有特异性改变,不被 BAC₅ 所识别。虽然 RPLM₁₃ 噬菌体重组了外来随机多肽的 DNA 序列,但未进行淘洗,含特异序列的噬菌体的比例必定大大地低于经过 BAC₅ 单抗反复淘洗后所获得的 C2、C17 和 C29 克隆,因此 RPLM₁₃ 也呈现阴性反应。

通过 3 次淘洗和 ELISA 选择后所获得的,来自 C2、C17 和 C29 克隆的噬菌体不仅能被酶标板上的 BAC₅ 单抗所俘获,还能与液相中的 BAC₅ 单抗相结

合。从它们有别于来自 VC_{SM}₁₃ 和 RPLM₁₃ 的噬菌体的特点推测,这 3 个克隆的噬菌体表面可能具有相似的,能被 BAC₅ 单抗所识别的抗原表位。至于它们之间所递呈的外源肽段是否具有相同的氨基酸序列,其中哪一个能作为免疫原诱导实验动物产生相应的可定位于低分化/未分化癌细胞表面的抗体,还有待进一步研究。

(北京军事医学科学院微生物与流行病学研究所王海涛教授、杜勇博士对本工作给予了热情的指导和帮助,特此致谢)

参考文献:

- [1] 肖锡宾,张昌卿,刘长征,等. BAC₅ 单抗的制备及其在鼻咽癌细胞上的反应 [J]. 中山医科大学学报, 1996, 17(1): 75.
- [2] 刘北一,富宁. 噬菌体表位文库在免疫学中的应用 [J]. 国外医学免疫学分册, 1997, 20(5): 252.
- [3] 杜勇,王海涛. 应用噬菌体随机肽库研究丙型肝炎病毒核心蛋白 B 细胞抗原表位 [J]. 中华微生物学和免疫学杂志, 1999, 19(1): 4.

(编辑 黄小延)