

丙型肝炎病毒 C, E2, NS3 区基因 嵌合重组载体的构建

张海红, 姚集鲁, 杨林, 李刚, 郭万里, 卢建溪

(中山医科大学传染病学教研室, 广东 广州 510630)

摘要: 【目的】构建包含丙型肝炎病毒(HCV)C区、E2区及NS3区的嵌合重组载体。【方法】设计合成3对寡核苷酸引物,用PCR法从HCV重组质粒pHCVc、pBE2和pGMXNS3-5中特异扩增出编码HCV C区、E2区和NS3区抗原的部分基因片段(501、603和900 bp),分别用 *Hin*dIII、*Bam*HI、*Eco*RI 和 *Xho*I 酶切后,逐个定向连接到质粒 pcDNA3 中,转化宿主菌 XL1-Blue,分别用上述内切酶酶切及 DNA 测序鉴定重组质粒。【结果】酶切鉴定示所切下的片段大小均与预计相符,测序结果与文献报道序列及预计结果一致,证实符合表达框架。【结论】成功构建了 HCV 嵌合重组质粒 pcDNA3-C-E2-NS3。

关键词: C 型肝炎样病毒属; DNA, 重组; 质粒 pcDNA3-C-E2-NS3; 序列分析, DNA

中图分类号: R512.6 文献标识码: A 文章编号: 1000-257X(2001)02-0103-03

Construction of the Chimeric Recombinant Plasmid Vector Encoding C, E2, NS3 Antigens of Hepatitis C Virus

ZHANG Hai-hong, YAO Ji-lu, YANG Lin, LI Gang, GUO Wan-li, LU Jian-xi

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

Abstract: 【Objective】To construct the chimeric recombinant plasmid vector encoding C, E2 and NS3 antigens of HCV. 【Methods】The specific primers were designed and synthesized to amplify the DNA fragments (PCR method) of C, E2 and NS3 antigen genes from the recombinant plasmids pHCVc, pBE2 and pGMXNS3-5 of HCV respectively. The length of the acquired fragments were 501 bp, 603 bp and 900 bp. After being digested by appropriate restriction endoenzymes (*Hin*dIII, *Bam*HI, *Eco*RI and *Xho*I), the generated fragments of C, E2 and NS3 genes were cloned into pcDNA3 one by one according to their specific orientations. Then the recombinant plasmid was identified by DNA sequencing and digesting of endoenzymes. 【Results】The fragments digested by endoenzymes were as large as the predicted results. DNA sequencing was the same with the sequence reported on the literatures. 【Conclusion】The chimeric recombinant plasmid pcDNA3-C-E2-NS3 was successfully constructed.

Key words: hepatitis C-like virus; DNA, recombinant; plasmid pcDNA3-C-E2-NS3; sequence analysis, DNA

丙型肝炎病毒(HCV)高度变异, 准种感染多, HCV 的分子特性决定 HCV 疫苗可能为几个抗原组成的嵌合疫苗或混合疫苗。HCV 基因组为单股正链 RNA, 长约 9 500 bp, 编码一个大的前体蛋白,

此蛋白水解后产生特异性病毒基因产物, 包括结构蛋白(C、E1、E2)和非结构蛋白(NS2-5)^[1]。结构蛋白内含重要的中和抗原表位与细胞免疫抗原表位, 与 HCV 的免疫致病及防御密切相关, HCV C 区相

收稿日期: 2000-11-2

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(39770681)

作者简介: 张海红(1970-), 女, 安徽淮南人, 博士生。

对保守,是疫苗研究的靶抗原。非结构蛋白 NS3 有许多 CD₄⁺及 CD₈⁺T 细胞识别位点,可能与病毒清除有关。我们将编码 HCV 的 C 区、E2 区和 NS3 区的部分基因片段共同克隆入同一真核表达载体 pcDNA3 中,为进一步了解 3 个基因的表达及 DNA 免疫研究打下基础。

1 材料与方 法

1.1 载体与宿主菌

HCV 质粒 pHCVc、pBE2²¹和 pGMXNS3-5 由李刚教授惠赠,真核表达载体 pcDNA3 为本室保存;大肠杆菌 XL1-Blue 由周智博士惠赠。

1.2 主要试剂

PCR 扩增试剂(加拿大真达公司);限制性内切酶 *Hind* III, *Bam* HI, *Eco* RI, *Xho* I (华美公司);DNA 纯化试剂盒(Bio-Rad);T₄DNA 连接酶(Promega);λDNA/*Hind* III+*Eco* RI (天象人公司)。

1.3 引物的设计与合成

根据已知序列设计,由上海生工生物工程有限公司合成。

引物 1: 5'-GCAAGCTTATGAGCACGAATCCTAAAC-
Hind III
C-3'(1-20 nt)(+);引物 2: 5'-TCGGATCCATGTGCCAGG-
Bam HI
CCCTGCAAG-3'(483-501 nt)(-);引物 3: 5'-TA-GGATCC
Bam HI
ATGGGCCTTGACGGGAGCACCC-3'(1138-1156 nt)(+);
引物 4: 5'-CTGAATTCGGTCAAGGTGTTGTTGCCG-3'
Eco RI
(1722-1740nt)(-);引物 5: 5'-GCCAATTCATGGAAA-
Eco RI
CCAATATGCGGTCC-3'(3601-3622nt)(+);引物 6: 5'-
GCCTCGAGTTACCTGTAGATGCCTCTCCTG-3'(4482-
Xho I
4500 nt)(-)

其中引物 1、2 对扩增 C 区,为 501 bp;引物 3、4 对扩增 E2 区,为 603 bp;引物 5、6 对扩增 NS3 区,为 900 bp。

1.4 PCR 扩增目的基因

将含目的基因片段即 HCV C、E2 和 NS3 区的各重组质粒 pHCVc、pBE2 和 pGMXNS3-5 摇菌过夜,碱裂解法提取质粒 DNA 作为模板。PCR 反应总体积 50 μL,含 ddH₂O 34.6 μL,10×buffer 5 μL,

2 mmol dNTP 5 μL, DNA 模板 2 μL,各区特异引物对各 1.5 μL(10 μmol), *Taq* 酶 2 U,反应条件:96 °C 6 min 预变性,94 °C 45 s,55 °C 45 s,72 °C 90 s 循环 32 次,72 °C 再延伸 7 min,以此条件扩增 C 区和 E2 区,扩增 NS3 区时稍作改动:96 °C 10 min 预变性,循环 35 次。扩增产物取 2 μL 电泳,紫外线下观察结果。

1.5 PCR 产物的分子克隆及鉴定

1.5.1 pcDNA3-C 的构建及鉴定 用内切酶 *Hind* III 和 *Bam* HI 同时消化 pcDNA3 和纯化后的 C 区 PCR 产物,琼脂糖电泳,切下相应条带处的琼脂糖凝胶,以试剂盒回收 DNA,连接反应总体积 20 μL,目的基因与载体比为 3:1,T₄DNA 连接酶 3 U,16 °C 连接过夜后,转化宿主菌 XL1-Blue,过程见文献 [3],在含氨苄青霉素的 LB 平板上随机挑取 6~8 个单菌落,用 *Hind* III 及 *Bam* HI 双酶切鉴定阳性克隆。

1.5.2 pcDNA3-E2 的构建及鉴定 方法同上,仅将内切酶换为 *Bam* HI 和 *Eco* RI。

1.5.3 pcDNA3-E2-NS3 的构建及鉴定 以内切酶 *Eco* RI 和 *Xho* I 同时消化质粒 pcDNA3-E2 和 NS3,连接和转化过程同上。鉴定时分别用 *Bam* HI 单酶切及 *Bam* HI、*Eco* RI 和 *Xho* I 3 酶切。

1.5.4 pcDNA3-C-E2-NS3 的构建及鉴定 以 *Bam* HI 和 *Xho* I 消化 pcDNA3-E2-NS3,将切下的片段 E2-NS3 纯化回收后连接到经 *Bam* HI 和 *Xho* I 消化后的 pcDNA3-C 上,鉴定时分别用 *Bam* HI 单酶切,*Hind* III 和 *Xho* I 双切。由北京赛百盛生物公司对所连上的 C-E2-NS3 进行全基因序列测定,测序引物 2 个来自 pcDNA3,3 个来自 HCV 特异引物,以最终确定阳性重组子。

2 结 果

2.1 目的基因片段 PCR 扩增结果

重组质粒 pHCVc、pBE2 和 pGMXNS3-5 经 PCR 扩增后,分别获得 501 bp、603 bp 和 900 bp 片段,10 g/L 琼脂糖电泳,大小与预计相符(图 1)。

2.2 阳性重组质粒的鉴定结果

HCV E2 区 603 bp 片段插入 pcDNA3 载体的多克隆位点 *Bam* HI 和 *Eco* RI 之间,重组质粒 pcDNA3-E2 经 *Bam* HI 单酶切后泳动速度较空载体 pcDNA3 慢,用 *Bam* HI 和 *Eco* RI 两种酶同时切,双切出 1 条 603 bp 的带,与预计相符(图 2)。

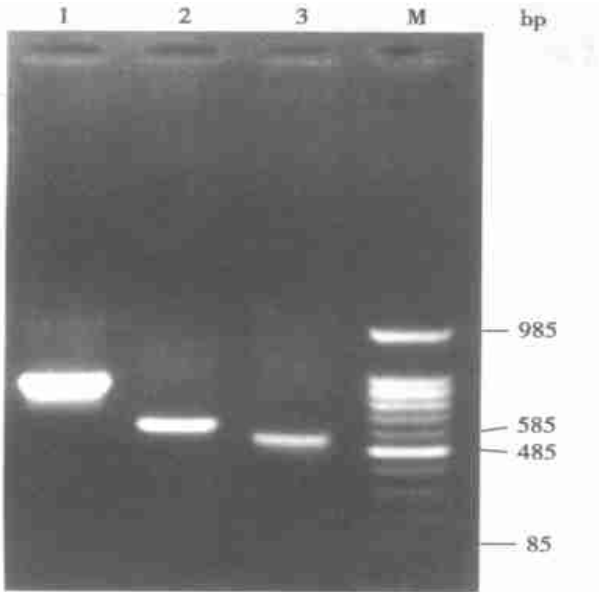


图 1 PCR 扩增 HCV C, E2 和 NS3 区基因

Fig. 1 HCV C, E2 and NS3 were amplified by PCR

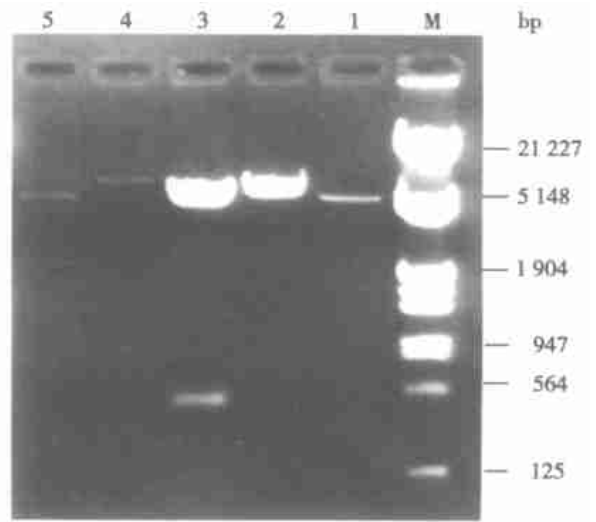


图 3 限制性内切酶酶切鉴定重组体 pcDNA3-C 和 pcDNA3-C-E2-NS3

Fig. 3 pcDNA3-C and pcDNA3-C-E2-NS3 were identified by restriction enzyme map

M: λ DNA/ *Hind* III+ *Eco* R; 1: pcDNA3 digested by *Bam* H I; 2: pcDNA3-C digested by *Bam* H I; 3: pcDNA3-C digested by *Hind* III and *Eco* R I; 4: pcDNA3-C-E2-NS3 digested by *Bam* H I; 5: pcDNA3-C-E2-NS3 digested by *Hind* III and *Xho* I

位点正确, 符合表达框架, 序列与已知相符。

3 讨论

1989 年明确 HCV 感染以来, 国内外学者一直在致力于 HCV 疫苗的研究。有研究显示 HCV 核心蛋白 C 所诱导的 CD4⁺ T 细胞反应与慢性丙型肝炎的症状减轻及良好的干扰素反应有关^[4,5], 并由于它高度保守而被选为疫苗的重要组成部分, 它的主要抗原表位位于 N 端 120 氨基酸残基内。但另有研究表明 C 蛋白是反式调节因子, 它的 C 末端疏水区是抑制活性必需的^[6], 故我们选用包括它的主要抗原表位在的, 去除了部分 C 末端疏水区的 1~167 位氨基酸残基间的区域为目标抗原之一。HCV E2 蛋白高变区 (HVR1 383~408 氨基酸残基) 含有中和表位, 用它免疫可以产生保护性抗体^[7]。除 HVR1, E2 的 504~554 氨基酸残基等亦含有限制性免疫原性簇, 可产生有效的免疫反应^[8]。我们选用包括高变区及主要抗原识别表位在的 380~580 氨基酸残基间区域为另一目标抗原。虽然现在以 HCV E2 DNA 或 HCV E2 重组作为疫苗已达成共识, 但 HVR1 变异性大, 对异源毒

(下转第 110 页)

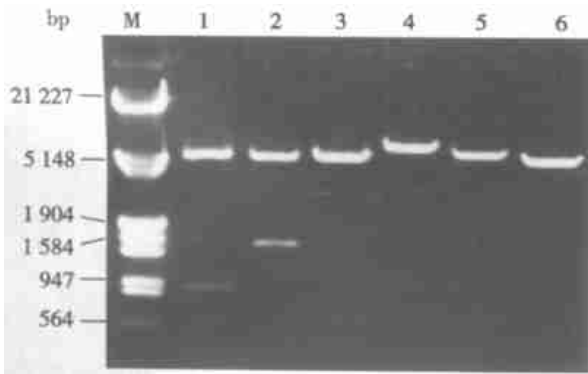


图 2 限制性内切酶酶切鉴定重组体 pcDNA3-E2 和 pcDNA3-E2-NS3

Fig. 2 pcDNA3-E2 and pcDNA3-E2-NS3 were identified by restriction enzyme map

M: λ DNA/ *Hind* III+ *Eco* R I; 1: pcDNA3-E2-NS3 digested by *Bam* H I, *Eco* R I and *Xho* I; 2: pcDNA3-E2-NS3 digested by *Bam* H I and *Xho* I; 3: pcDNA3-E2 digested by *Bam* H I and *Eco* R I; 4: pcDNA3-E2-NS3 digested by *Bam* H I; 5: pcDNA3-E2 digested by *Bam* H I; 6: pcDNA3 digested by *Bam* H I

重组质粒 pcDNA3-E2-NS3 经 *Bam* H I 单酶切后泳动速度较 pcDNA3 和 pcDNA3-E2 慢, 以 *Bam* H I、*Eco* R I 和 *Xho* I 3 种酶同时酶切, 得到 603 bp 和 900 bp 的 2 个片段, 均与预计相符(图 2)。

重组质粒 pcDNA3-C 经 *Bam* H I 单酶切后泳动速度较 pcDNA3 慢, *Hind* III 和 *Bam* H I 双切出 1 条 501 bp 的片段, 与预计相符(图 3)。重组质粒 pcDNA3-C-E2-NS3 经 *Bam* H I 单酶切后泳动速度较 pcDNA3 慢, *Hind* III 和 *Xho* I 双切出片段为 2 004 bp, 与预计相符(图 3)。测序结果示各连接

Med 1998, 43(3): 164.

- [3] Reese K A, Reddy S, Rock J A. Endometriosis in an adolescent population: the experience[J]. J Pediatr Adolesc Gynecol, 1996, 9(3): 125.
- [4] Laufer M R, Goitein L, Bush M, *et al.* Prevalence of endometriosis in adolescent women with chronic pelvic pain not responding to conventional therapy[J]. J Pediatr Adolesc Gynecol 1997, 10(4): 199.
- [5] Vernon M W, Wilson E A. Studies on the surgical induction of endometriosis in the rat[J]. Fertil Steril 1985, 44

(5): 684.

- [6] Rajkumar K, Schott P W, Simpson C W, *et al.* The rat as an animal model for endometriosis to examine recurrence of ectopic endometrial tissue after regression[J]. Fertil Steril 1990, 53(5): 921.
- [7] 苗明三. 实验动物的繁殖. 见: 苗明三主编. 实验动物和动物实验技术[M]. 北京: 中国中医药出版社, 1997. 323 ~ 324.

(编辑 关淡庄)

(上接第 105 页)

株的交叉免疫力仅 20%, 应用受到限制。近年来人们发现, NS3 蛋白所诱导的特异性 CD_4^+ T 细胞反应与急性 HCV 感染者病毒清除密切相关, 并对异源毒株在 T 细胞水平有较高的交叉免疫反应^[9], 现已证实它的 CD_4^+ T 细胞识别位点分别位于 1 207 ~ 1 278 氨基酸残基和 1 271 ~ 1 488 氨基酸残基, 故我们选用 1 201 ~ 1 500 氨基酸残基间的区域为又一目标抗原。

我们在设计引物时, 为便于定向连接于载体中, 提高连接效率, 在各引物 5' 端均引入相应的限制性内切酶酶切位点。我们在构建嵌合重组质粒 pcDNA3-C-E2-NS3 时, 采用逐个定向连接的方法, 虽然较费时费力, 但易保证连接及亚克隆的正确性, 测序结果示该重组质粒与已知序列相符, 符合表达框架, 为下一步的真核细胞表达打下了基础。

参考文献:

- [1] 毕胜利, 白宽鹤, 丛勉系, 等. 中国人丙型肝炎病毒基因组的一级结构及其变异[J]. 病毒学报, 1993, 9(2): 114.
- [2] 李刚, 姚集鲁, 彭文伟, 等. HCV 广东株包膜蛋白区 cDNA 的序列测定[J]. 病毒学报, 1997, 13(1): 24.
- [3] 姜泊, 张亚历, 周殿元, 主编. 分子生物学常用实验方法[M]. 北京: 人民军医出版社, 1996. 2~4.

- [4] Patrizia B, Mauerizia R, Maria A, *et al.* T-lymphocyte response to hepatitis C virus in different clinical course of infection[J]. Gastroenterology, 1993, 104(2): 580.
- [5] Robert M, Helmut M, Reinhart Z, *et al.* Mapping of immunodominant CD_4^+ T lymphocyte epitopes of hepatitis C virus antigens and their relevance during the course of chronic infection[J]. Hepatology, 1995, 21(3): 632.
- [6] Shih C M, Lo S J, Miyamura T, *et al.* Suppression of hepatitis B virus expression and replication by hepatitis C virus core protein in HuH-7 cells[J]. J Virol, 1993, 67(10): 5823.
- [7] Choo Q L, Kuo G, Ralston R, *et al.* Vaccination of chimpanzees against infection by the hepatitis C virus[J]. Prol Natl Acad Sci USA, 1994, 91(4): 1294.
- [8] Isao N, Geert M, Marian E, *et al.* Immunization with plasmid DNA encoding hepatitis C virus envelope E2 antigenic domains induces antibodies whose immune reactivity is linked to the injection mode[J]. J Virol, 1997, 71(9): 7101.
- [9] Helmut M, Reinhart Z, Robert M, *et al.* Possible mechanism involving T-lymphocyte response to non-structural protein 3 in viral clearance in acute hepatitis C virus infection[J]. The Lancet, 1995, 346(8981): 1006.

(编辑 黄小延)