

# HBsAg 重组腺病毒载体的构建、鉴定

周 智, 姚集鲁, 杨 林, 邓练贤, 陈雪娟

(中山医科大学附属第三院传染病科实验室, 广东 广州 510630)

**摘 要:**【目的】为探索腺病毒载体在基因治疗中的应用及其表达目的抗原的有效性。【方法】用 *Bam*HI、*Eco*RI 双切质粒 pBluscript KS<sup>+</sup>-HBs, 回收 S 基因片段, 定向克隆插入质粒 pACCMVpL 中相应的酶切位点, 通过快速抽提酶切鉴定筛选重组质粒。【结果】挑取的 8 个克隆经 *Bam*HI、*Eco*RI 酶切鉴定, 有 950 bp 的目的基因片段, 证明为重组体。【结论】成功构建表达 HBsAg 基因的重组腺病毒载体。

**关键词:** 病毒性肝炎, 乙型; 腺病毒载体\*; DNA 重组\*

中图分类号: R512.36; Q784 文献标识码: A 文章编号: 1000-257X(2000)04S0-0072-02

## Construction of Recombinant Adenoviral Vector expressing HBsAg

ZHOU Zhi, YAO Ji-lu, YANG Lin, DENG Lian-xian, CHEN Xue-juan

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

**Abstract:** 【Objective】To explore the use of adenoviral vector in gene therapy and the effectiveness of target antigen expression in it. 【Method】S gene was released from pBluscript KS<sup>+</sup>-HBs by *Bam*HI、*Eco*RI cutting, then inserted directionally into plasmid pACCMVpL. The recombinant vector was identified by restriction endonuclease analysis. 【Result】All the 8 clones selected were recombinant vector, which release about 950 bp target gene fragment by *Bam*HI、*Eco*RI digestion. 【Conclusion】The adenoviral vector which expressed HBsAg was constructed successfully.

**Key words:** hepatitis B virus; adenoviral vector\*; DNA recombinant\*

腺病毒载体作为基因治疗的运载系统具有宿主范围广、繁殖滴度高、不整合、对静止期细胞也能感染及相对安全等特点, 近年来发展很快<sup>[1]</sup>。本研究构建 E1 区缺失的重组腺病毒载体, 拟在 293 细胞中表达、包装, 然后纯化病毒, 用于基因治疗实验, 现将结果报道如下。

### 1 材料和方法

#### 1.1 材 料

1.1.1 质粒、菌株 pACCMVpL 大小 8.8 kb, 含 5 型腺病毒部分 E1 区及包装信号, 氨苄青霉素耐

药(本室保存), pBluscript KS<sup>+</sup>-HBs, 含 HBV adw 亚型部分 preS 和 S 基因, 受体菌 xll-blue, 重庆医科大学肝炎研究所惠赠。

1.1.2 琼脂糖 加拿大真达公司。

1.1.3 各种酶来源 限制性内切酶 *Bam*HI、*Eco*RI、T4 DNA 连接酶购于 promega 公司。

1.1.4 试 剂 快速质粒提取试剂盒、胶回收试剂盒分别购于宝灵曼公司和 BIO-RAD 公司。

#### 1.2 方 法

1.2.1 获取 S 基因片段 pBluscript KS<sup>+</sup>-HBs 划线后, 挑取单菌落, 加入 5 mL LB 中(含氨苄青霉素 100 μg/L), 振摇过夜, 按试剂盒说明书操作抽提

收稿日期: 2000-03-18

基金项目: 第 26 届中国博士后基金资助项目([1999] 17 号); 中山医科大学科研启动基金资助项目(2000 年)

作者简介: 周 智(1966-), 男, 四川南充人, 医学博士, 讲师。主要从事乙型肝炎基因治疗、基因免疫和治疗性乙肝疫苗的研究, 已发表文章 10 余篇。©2019 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

质粒,取 48  $\mu$ L 酶切。multicore buffer 6  $\mu$ L, *Eco*R I 3  $\mu$ L, *Bam*H I 3  $\mu$ L, pBluscript KS<sup>+</sup>-HBs 48  $\mu$ L, 37  $^{\circ}$ C 温浴 2 h, 电泳回收 S 基因片段。

1.2.2 获取载体 pACCMVpL 质粒提取方法同上, multicore buffer 3  $\mu$ L, *Eco*R I 1.5  $\mu$ L, *Bam*H I 1.5  $\mu$ L, PACCMVpL 24  $\mu$ L, 37  $^{\circ}$ C 温浴 2h, 电泳回收 PACCMVpL 载体片段。

1.2.3 连接反应 10 $\times$  T4 连接 Buffer 2  $\mu$ L, T4 DNA 连接酶 1.5  $\mu$ L, PACCMVpL 4  $\mu$ L, pBluscript KS<sup>+</sup>-HBs 12.5  $\mu$ L, 15  $^{\circ}$ C 过夜。

1.2.4 重组体转化 挑取 XL1-Blue 单菌落振荡过夜, 于次日取 100  $\mu$ L 加入 3 mL LB 培养基振荡 3 h, A 值约 0.4~0.6 时, 收获细菌, 加 200  $\mu$ L 0.1 mol 的 CaCl<sub>2</sub>, 冰浴 2 h, 加连接产物, 再冰浴 30 min, 42  $^{\circ}$ C 热击 2 min, 再冰浴 2 min, 室温置 5 min, 加 800  $\mu$ L LB 培养基, 180 r/min 摇 1 h, 铺板。

1.2.5 重组克隆筛选、鉴定 随机挑取 8 个克隆, 振荡过夜, 快速抽提, 然后酶切鉴定, 重组体应有约 950 bp 的片段出现。

## 2 结果

### 2.1 重组载体构建

技术路线从略。

### 2.2 重组克隆鉴定

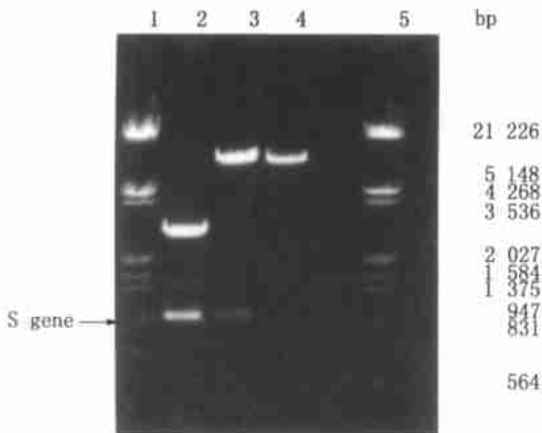


图 1 PACCMVpL-HBs 重组体的酶切鉴定

Fig. 1 Restrict enzyme analysis of PACCMVpL-HBs

1, 5 DNA maker; 2 pBluscript KS<sup>+</sup>-HBs cut by *Bam*H I、*Eco*R I; 3 pACCMVpL-HBs cut by *Bam*H I、*Eco*R I; 4 pACCMVpL cut by *Bam*H I、*Eco*R I

如图 1 所示, 重组体经 *Bam*H I、*Eco*R I 酶切后有 2 条带, 大片段与空载体在同一位置, 而小片段与 S 基因在同一位置, 载体约 8.8 kb, 目的基因约 950 bp, 说明重组体构建成功。

## 3 讨论

近年随着分子生物学的飞速发展, 乙型肝炎基因疫苗、基因治疗的研究, 给乙型肝炎防治开辟了一条新途径。腺病毒载体宿主范围广泛, 繁殖滴度高, 不整合, 对静止期细胞亦能感染, 并且易于扩增和制备, 近年来发展较快, 已用于体外及临床试验, 未见明显毒副作用<sup>[2,3]</sup>。本研究的目的是构建重组腺病毒载体, 研究目的抗原表达的有效性, 以期用于基因治疗实验, 消除乙肝免疫耐受。

已发现人类腺病毒(Ad)49 个血清型, 用于构建基因转移载体的多为 Ad<sub>2</sub> 和 Ad<sub>5</sub> 型。腺病毒基因组 E<sub>1</sub>、E<sub>3</sub> 及 E<sub>4</sub> 起始区和右侧端 LTR 之间都可以插入外源基因构建重组体。E<sub>1</sub> 区载体容量稍大, 在体内不能复制, 但重组病毒产量较低, 而且只能在 293 细胞中才能复制、扩增; E<sub>3</sub> 区载体不影响病毒复制, 产量高, 可口服, 但该类载体病毒基因删除少, 病毒基因产物多, 免疫原性强。本研究将外源基因插入 E<sub>1</sub> 区, 主要从安全性方面考虑。该重组腺病毒载体构建成功, 为进一步研究腺病毒载体的包装及在乙型肝炎病毒基因治疗中的作用奠定基础。

### 参考文献:

- [1] 周智, 张定凤. 重组腺病毒载体研究现状[J]. 中华肝脏病杂志, 1998, 6(1): 57.
- [2] Liu G Q, Katherine J D, Excofton A, et al. Efficient adenovirus-vediated ecotopic gene expression of human lipoprotein lipase in human hepatic (HepG2) cells[J]. Human Gene Therapy, 1997, 8(1): 205.
- [3] Magovern C J, Mack C A, Zhang J, et al. Regional Angiogenesis induced in nonischemic tissue by an adenoviral Vector expressing vasculer endothelial growth factor[J]. Human Gene Therapy, 1997, 8(1): 215.

(编辑 关淡庄)