

# HBsAg 及 B7-1 双表达重组逆转录病毒载体的构建

周 智, 姚集鲁, 杨 林, 邓练贤, 卢建溪

(中山医科大学附属第三医院传染病科, 广东 广州 510630)

**摘要:**【目的】为探索共刺激分子 B7-1 增强 HBsAg 真核表达载体基因免疫的效果, 并用于消除乙肝免疫耐受。【方法】用高保真 PCR 法扩增目的基因片段 B7-1 及接头和启动子的 IRES-HBs 基因片段, 亚克隆到 pBluescript KS<sup>+</sup> 载体中测序, 再克隆到逆转录病毒载体 PLXSN 中。【结果】所扩增的目的基因片段经测序证实, 未发现序列有改变。先将 B7-1 通过 *EcoRI*、*XhoI* 插入 plxsn 中, 构建成 plxsn-B7-1, 再用 *XhoI*、*BamHI* 将 IRES-HBs 插入, 构建成 plxsn-B7-1-HBs。【结论】成功构建了共表达 HBsAg 及 B7-1 抗原的重组逆转录病毒载体, 可行体外真核基因表达, 研究目的抗原表达的特性, 或行基因免疫, 研究 B7-1 对 HBsAg 免疫反应的影响, 进一步可用于防治乙肝的研究。

**关键词:** 肝炎表面抗原, 乙型; 共刺激分子<sup>\*</sup>; 逆转录病毒载体<sup>\*</sup>

中图分类号: R512.36; Q784 文献标识码: A 文章编号: 1000-257X(2000)04S0-0074-03

## Construction of HBsAg and B7-1 Coexpression Retroviral Vector

ZHOU Zhi, YAO Ji-lu, YANG Lin, DENG Lian-xian, Lu Jian-xi

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

**Abstract:** 【Objective】 To investigate the enhanced role of B7-1 in gene immunization of eukaryotic vector which expressing HBsAg, and the possibility of it's use in elimination of immunotolerance to hepatitis B virus. 【Method】 B7-1 and IRES-HBs with linker and promoter sequence prior to HBs gene were amplified with high fidelity PCR, then subcloned into plasmid pBluescript KS<sup>+</sup>, which was used to sequence. The eukaryotic expression vector was constructed by inserting B7-1 and IRES-HBs into retroviral vector plxsn. 【Result】 No change was found in the sequences of target genes amplified by high fidelity PCR compared with the known sequences. Plxsn-B7-1-HBs was constructed by first inserting B7-1 into plxsn with *EcoRI* / *XhoI*, then IRES-HBs was inserted in the same way with *XhoI* / *BamHI*. 【Conclusion】 The retroviral vector which expressing B7-1 and HBsAg simultaneously was constructed successfully. It may be used to study the character of target genes expression in cell lines in vitro. Also it may be used to conduct gene immunization and investigate the role of B7-1 on HBsAg immune response, which may be further used for prevention and therapy of hepatitis B.

**Key words:** hepatitis B surface antigen (HBsAg); costimulatory molecule<sup>\*</sup>; retroviral vector<sup>\*</sup>

乙型肝炎病毒感染后在机体内持续存在, 成为慢性的主要原因是由于机体产生了特异性的免疫耐受, 这种耐受以 T 细胞耐受为中心环节。如能激发有效的细胞免疫反应, 就能清除感染的乙型肝炎病毒。基因免疫后, 重组质粒被机体细胞摄取, 在细

胞内合成、加工目的抗原, 能激发细胞毒性 T 细胞反应, 因此深入研究基因疫苗可能是防治乙肝最有效的措施之一。我们曾构建表达 HBsAg 的重组逆转录病毒载体, 在体外真核细胞中高效表达, 基因免疫后, 在小鼠体内成功诱导出体液免疫和细胞免

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, 已发表论文 10 余篇。

疫反应<sup>[1,2]</sup>。为增强基因免疫的效果,本研究将共刺激分子B7-1基因引入重组逆转录载体中,构建共表达HBsAg及B7-1的真核载体,结果如下。

## 1 材料和方法

### 1.1 材料

1.1.1 质粒、菌株 pLXSN为逆转录病毒载体,基本骨架来自pBR322,含SV40早期启动子,控制G418抗性基因的表达,插入的外源基因表达受逆转录病毒LTR中启动子控制,pBluescript KS<sup>+</sup>, pILN-huB7含人B7-1cDNA受体菌x11-blue,均为重庆医科大学肝炎研究所惠赠。

1.1.2 琼脂糖 加拿大真达公司产品。

1.1.3 各种酶来源 限制性内切酶BamHI、EcoRI、XhoI、SalI、T4DNA连接酶购于promega公司。

1.1.4 试剂盒 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。

1.1.5 PCR模板及引物 表达B7-2-IRES-HBs的重组腺病毒载体作PCR扩增IRES-HBs的模板。

扩增IRES-S: P1 5' AATA GTCGAC GCC CCT CTC CCT CCC 3' (上游引物含SalI位点); P2 5' GCGC GGATCC TAG GGT TTA AAT GTA TAC C 3' (下游引物含BamHI位点)。

扩增B7-1: P3 5' CGTA GAATTC AAG CTT CCA TGG GCC AC 3' (上游引物含EcoRI位点); P4 5' ACTG CTC GAG TCT AGA TTA TAC AGG GC 3' (下游引物含XhoI位点)

### 1.2 方法

1.2.1 目的基因制备及克隆 重组腺病毒DNA的提取、目的基因的扩增、亚克隆及测序另文报道。

1.2.2 酶切目的基因片段 反应式如下:

EcoRI / XhoI 酶切 B7-1 buffer D 3 μL, buffer E 3 μL, EcoRI 3 μL, XhoI 3 μL, B7-1 DNA 48 μL, 37 °C温浴 2 h, 再用 10 g/L 的琼脂糖电泳回收目的基因。

SalI / BamHI 酶切 IRES-HBs buffer D 3 μL, buffer E 3 μL, SalI 3 μL, BamHI 3 μL, IRES-HBs DNA 48 μL, 37 °C温浴 2 h, 再用 10 g/L 的琼脂糖电泳回收目的基因。

EcoRI / XhoI 酶切载体 plxsn buffer D 1.5 μL, buffer E 1.5 μL, EcoRI 1.5 μL, XhoI 1.5 μL,

plxsn DNA 24 U, 37 °C温浴 2 h, 再用 10 g/L 的琼脂糖电泳回收目的基因。

XhoI / BamHI 酶切载体 plxsn-B7-1 buffer D 1.5 μL, buffer E 1.5 μL, SalI 1.5 μL, BamHI 1.5 μL, plxsn-B7-1 DNA 24 μL, 37 °C温浴 2 h, 再用 10 g/L 的琼脂糖电泳回收目的基因。

### 1.3 重组逆转录病毒载体构建

先将B7-1通过EcoRI、XhoI插入plxsn中,构建成plxsn-B7-1,再用XhoI、BamHI将IRES-HBs插入,构建成plxsn-B7-1-HBs。

### 1.4 重组质粒克隆

连接、转化及重组质粒鉴定参考文献[3]进行。

## 2 结果

### 2.1 目的基因扩增、亚克隆及测序

用高保真Taq酶Taq Plus I扩增所得目的基因片段大小与设计相符,经测序证实,每个反应约500个碱基,未发现序列改变(PCR扩增方法及测序策略另文报道)。

### 2.2 重组逆转录病毒载体的酶切鉴定

以EcoRI、XhoI将B7-1插入plxsn载体的相应位点,构建成plxsn-B7-1,如图1A。用XhoI、BamHI酶切plxsn-B7-1,与用SalI及BamHI酶

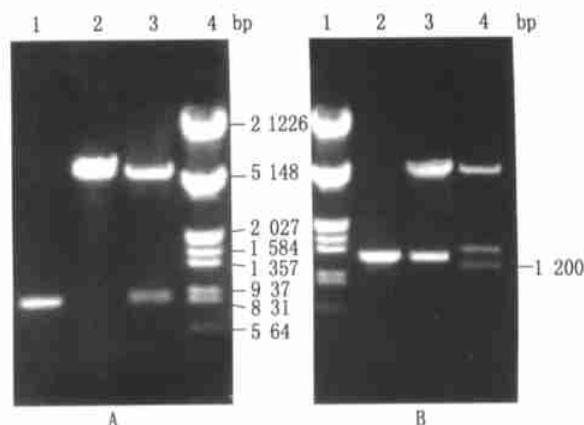


图1 plxsn-B7-1-HBs的酶切鉴定

Fig. 1 Restriction enzyme analysis of plxsn-B7-1-HBs

A HindIII酶切鉴定 plxsn-B7-1: 1. B7-1; 2. plxsn经EcoRI、XhoI酶切; 3. plxsn-B7-1经EcoRI、XhoI酶切; 4. DNA标准。 plxsn-B7-1 cut by HindIII: 1. B7-1; 2. plxsn cut by EcoRI、XhoI; 3. plxsn-B7-1 cut by EcoRI、XhoI; 4. DNA marker.

B HindIII酶切鉴定 plxsn-B7-1-HBs: 1. DNA标准; 2. IRES-HBs; 3. plxsn-B7-1经HindIII酶切; 4. plxsn-B7-1-HBs经HindIII酶切。 plxsn-B7-1-HBs cut by HindIII: 1. DNA marker; 2. IRES-HBs; 3. plxsn-B7-1 cut by HindIII; 4. plxsn-B7-1-HBs cut by HindIII

切的 IRES-HBs 连接, 即构成 plxsn-B7-1-HBs 如图 1B。

### 3 讨论

*Taq plus I* 即是将 *Taq* 与 *pfu* DNA 聚合酶组成的混合物。*Pfu* 来源于高温嗜热菌 (*pyrococcus furiosus*), 有 3'-5' 外切活性, 能修正、剪切错误掺入的碱基, 从而确保正确扩增目的基因。是目前已发现的所有高温 DNA 聚合酶中在扩增 DNA 时出错率最低的 ( $1.6 \times 10^6$ ), 能扩增 10~30 kb 的目的基因。利用高保真度的 *Taq plus I* 系统扩增 B7-1 (约 880 bp), IRES-HBs (约 100 bp), 经测序证实, 未发现碱基变异, 最后成功构建了共表达 HBsAg 及 B7-1 抗原的重组逆转录载体 (plxsn-B7-1-HBs), 为进一步研究在逆转录病毒载体中引入 B7-1 能否增强 HBsAg 基因免疫的效果打下基础。

本研究构建共表达 HBsAg 及 B7-1 的真核表达载体目的是为了实现在慢性乙肝的基因免疫和基因治疗。在逆转录病毒载体 plxsn 中能否同时表达两种抗原, 它们之间有无相互影响正在研究之中。在 DNA 疫苗载体中引入细胞因子或共刺激分子可增强基因免疫的效果。共同免疫编码乙型肝炎表面抗原的重组质粒和 IL-2 或 GM-CSF 表达质粒, 显著提高机体对乙型肝炎表面抗原的体液免疫和细胞免疫<sup>[4]</sup>; 表达 IL-2 和 GM-CSF 的重组质粒与编码丙型肝炎病毒核心蛋白的质粒共免疫后也取得相似的结果<sup>[5]</sup>; 共免疫表达 GM-CSF 与狂犬病毒糖蛋白<sup>[6]</sup> 或癌胚抗原<sup>[5]</sup> 的 DNA 疫苗后, 其抗体滴度较单纯表达目的抗原的疫苗高。共注射共刺激分子 B7-1、B7-2 与表达结核杆菌 hsp65 和癌胚抗原的 DNA 疫苗也诱导出较高的抗体反应<sup>[7]</sup>。He 等<sup>[8]</sup> 构建共表达 B7-1 与 HBs 抗原的重组腺病毒载体, DNA 免疫后, B7-1 明显增加对 HBsAg 的体液免疫及细胞免疫反应。我们曾构建表达 HBsAg 的重组逆转录病毒载体, 在体外真核细胞中

高效表达, 基因免疫后, 在小鼠体内成功诱导出体液免疫和细胞免疫反应<sup>[1]</sup>。本研究在逆转录病毒载体中引入 B7-1, 目的是增强 HBsAg 基因免疫的效果, 开发治疗性疫苗, 更好地防治乙肝。

#### 参考文献:

- [1] 周智, 张定凤, 任红. 乙型肝炎病毒 S 基因重组逆转录病毒载体诱导小鼠体液和细胞免疫反应 [J]. 中华肝脏病杂志, 1999, 7(1): 3.
- [2] 周智, 张定凤, 任红. HBV-SAg 特异性靶细胞系的构建 [J]. 中华实验和临床病毒学杂志, 1999, 13(3): 231.
- [3] Struh K. Enzymatic manipulation of DNA and RNA. In: Ausubel F M, Brent R, Kingston R E, et al ed. *Shor Protocols in Molecular Biology (M)*. 3rd ed. New York: John Wiley & Sons Inc, 1995. 3.1~3.50.
- [4] Geissler M, Schirmbeck R, Reimann J, et al. Cytokine and hepatitis B virus DNA coimmunizations enhance cellular and humoral immune responses to the middle but not to the hepatitis B virus surface antigen in mice [J]. *Hepatology*, 1998, 28(1): 202.
- [5] Geissler M, Gesien A, Wands J R. The inhibitory effects of chronic ethanol consumption on cellular immune responses to hepatitis C virus core protein is reversed by genetic immunizations augmented with cytokine expressing plasmids [J]. *J Immunol*, 1997, 159(10): 5107.
- [6] Xiang Z Q, Ertl H. Manipulation of the immune response to a plasmid-encoded viral antigen by coinoculation with plasmids expressing cytokines [J]. *Immunity*, 1995, 2(1): 129.
- [7] Conzy R M, Widera G, Cobuglio A F, et al. Selected strategies to augment polynucleotide immunization [J]. *Gene Therapy*, 1996, 3(1): 67.
- [8] He X S, Chen H S, Chu K, et al. Costimulatory protein B7-1 enhances the cytotoxic T cell response and antibody response to Hepatitis B surface antigen [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1996, 93(14): 7274.

(编辑 关淡庄)

(上接第 55 页)

- [8] Koch W J, Rockman H A, Samama P, et al. Cardiac function of mice overexpressing the  $\beta$ -adrenergic receptor kinase or a  $\beta$ -ARK inhibitor [J]. *Science*, 1995, 268: 1350.
- [9] Akhter S, Skare C A, Kypson A P, et al. Restoration of beta-adrenergic signaling in failing cardiac ventricular

myocytes via adenoviral-mediated gene transfer [J]. *Proc Natl Acad Sci*, 1997, 94(22): 12100.

- [10] 唐铁军, 别平华, 陈镜合, 等. 实验性冠心病大鼠模型的制作和应用 [J]. 国际心血管杂志, 1999, 1(4): 318.

(编辑 关淡庄)