

HBV PreS2 + S/IFN- α 融合基因真核表达载体的构建及其表达

陈红梅,白雪帆,潘蕾,李光玉,韦三华,黄长形

(第四军医大学唐都医院感染科,陕西西安 710038)

Construction and Expression of Eukaryotic Expression Vector Bearing Fusion Gene of HBV PreS2 + S Gene and IFN- α Gene

CHEN Hong-mei, BAI Xue-fan, PAN Lei, LI Guang-yu, WEI San-hua, HUANG Chang-xing

(Department of Infectious Diseases, Tangdu Hospital, Fourth Military Medical University, Xi'an 710038, China)

Abstract: To construct a recombinant eukaryotic expression vector bearing fusion gene of *Hepatitis B virus* (HBV) S2 + S gene and IFN- α gene, technique of splicing by overlapping extension and two times PCR were used. Fusion gene fragment was obtained and directly cloned into pcDNA3.1 V5/His TOPO TA cloning vector to get recombinant eukaryotic expression vector pcDNA3.1 S2S/IFN- α . Then the recombinant vector was transferred into Vero E6 cells using LipofectAMINE. The recombinant vector was constructed and correctly checked by digestion with restriction enzymes and polymerase chain reaction. The vector bearing fusion gene could be expressed in eukaryotic cells detected by indirect immunofluorescence technique. The relative efficient expression of the fusion gene in Vero E6 cells might provide an experimental basis for specific immunotherapy for HBV infection.

Key words: *Hepatitis B virus*; IFN- α ; Fusion gene; Gene expression

摘要: 构建含HBV PrdS2 + S和IFN- α 融合基因的真核表达载体pcDNA3.1.S2S/IFN- α 并在真核细胞中进行表达。应用重叠延伸剪切技术(splicing by overlapping extension,简称SOE)经两次PCR获得嵌合基因片段S2S/IFN- α ,回收后直接克隆到pcDNA3.1 V5/His TOPO TA克隆载体,得到真核重组载体pcDNA3.1.S2S/IFN- α 。然后用脂质体法转染Vero E6细胞。对重组载体进行了限制性酶切及PCR鉴定,证明连接正确;经间接免疫荧光检测证实该重组载体能在真核细胞中表达插入的外源性基因编码的融合蛋白。真核表达载体pcDNA3.1.S2S/IFN- α 的成功构建及在Vero E6细胞中的有效表达,为进一步探讨HBV感染的特异性免疫治疗提供了实验依据。

关键词: 乙型肝炎病毒; α -干扰素;融合基因;基因表达

中图分类号:Q786 文章标识码:A 文章编号:1003-5125(2002)04-0312-04

目前,基因免疫在流感、艾滋病、乙丙型肝炎等感染性疾病的治疗研究中表现出广阔的前景。体内外实验表明基因疫苗可以同时诱导针对病原的体液和细胞免疫反应^[1~5]。*Hepatitis B virus* (HBV)是嗜肝DNA病毒,包膜蛋白由HbsAg, preS1Ag和preS2Ag组成,中和表位位于S区。preS1Ag和preS2Ag也均含有T细胞和B细胞表位,可增强S抗原的免疫原性^[6]。而IFN- α 作为细胞因子具有抗病毒和免疫调节的生物学效应。因此,我们采用分子克隆技术,将HBVprS2S基因与IFN- α ,以期通过

表达的融合蛋白发挥二者的协同作用达到抗病毒效应,清除慢性肝炎患者体内的病毒。

1 材料与方法

1.1 质粒、宿主菌、细胞和试剂

质粒p1.2Ⅱ(含HBV全基因)由上海生化所郑文超博士惠赠。含有人IFN- α 13编码基因的pDO-NEO239质粒由北京302医院成军博士惠赠。重组质粒pcDAN3.IFN- α 由本室构建。Vero E6细胞由

本室保存。

1.2 试剂

各种限制性内切酶, Taq DNA 聚合酶购自 Promega 公司。WizardTM PCR Preps DNA Purification System, WizardTM Plus Minipreps DNA Purification System 均购自 Promega 公司。pcDNA 3.1/V5-His TOPO TA CloningTM Kit 购自 Invitrogen 公司。脂质体转染试剂盒 LIPOFECTAMINETM 2000 购自 GIBCOBRL 公司。人抗 HbsAg 购自上海生物制品研究所, 小鼠抗人 IFN- α 为第四军医大学免疫教研室产品。FITC 标记羊抗鼠 IgG、羊抗人 HRP-IgG 均由中国人民解放军军事医学科学院制备。胰蛋白胨、酵母提取物为英国 Oxford 产品。其余生化试剂均为常规分析纯的进口或国产试剂。RPMI1640 和 DMEM 培养基, 胎牛血清均购自 GIBCOBRL 公司。

1.3 真核表达载体 pcDNA3.1.S2S/IFN- α 和 pcDNA3.1.S2S 的构建

1.3.1 参照文献^[7], 用重叠延伸剪接术(splicing by overlap extention, 简称 SOE)经两次 PCR 获得嵌合基因片段 S2S/IFN- α , 回收后, 直接克隆到 pcDNA3.1 V5/His TOPO TA 克隆载体, 转化大肠杆菌 JM109。

引物的设计、合成 根据 HBV-adr 亚型中国株基因序列和 IFN- α 13 基因序列合成并纯化 4 条引物, 引物由上海基康生物技术有限公司合成。引物序列如下:

上游引物 HF1: 5'-CGGAAGCTTTGCAGTG
GAACTCCACAAC-3'

中间引物 HF2: 5'-CTTTGGGTATACATTGC
CTCGCCTGCCCTTGCT-3'

中间引物 HF3: 5'-AGCAAAGGGCGAGGCAA
TGTATACCAAAG-3'

下游引物 HF4: 5'-CCGGAATTCTCAATAAG
AAT TGTTC-3'

HF1 为 HBV preS2S 基因的上游引物(1811-1830nt), 引入 Hind III 酶切位点; HF2 和 HF3 是完全互补的, 分别含 HBV S 基因 C 端 15bp(2639-2653nt) 和 IFN- α 13N 端去掉始码和信号肽后的 15bp(70-84nt), 共 30bp 的序列; HF4 为 IFN- α 13 的下游引特(586-603nt), 引入 EcoR I 酶切位点。

1.3.2 PCR 过程 第一次, PCR, 以质粒 p1.2 II 为模板, 用引物 HF1 和 HF2 扩增 HBV preS2S 基因片段(约 850bp)。以重组质粒 pcDNA3.1 IFN- α 为模

板, 用引物 HF3 和 HF4 扩增 IFN- α 基因片段(约 540bp)。反应条件: 94℃ 预变性 5min, 94℃ 变性 45s, 55℃ 退火 45s, 72℃ 延伸 45s, 35 个循环, 最后 72℃ 延伸 10min。用 1% 的琼脂糖凝胶电泳分离上述 PCR 产物后, 以 WizardTM PCR Preps DNA Purification System 回收产物。第二次 PCR, 以第一次 PCR 产物为模板, 各取 100ng, 用引物 HF1 和 HF4 扩增, 获得基因片段 S2S/IFN- α 。反应条件: 94℃ 预变性 5min, 94℃ 变性 45s, 52℃ 退火 1min, 72℃ 延伸 2min, 35 个循环, 最后 72℃ 延伸 30min。回收第二次 PCR 产物。

1.3.3 目的片段 S2S/IFN- α 与 pcDNA3.1 V5/His TA 克隆载体的具体连接步骤 按照操作说明书进行。

1.3.4 阳性克隆的鉴定 挑取单克隆菌落于 3mL 含 Amp 的 LB 培养基中, 震荡过夜, 用 WizardTM PCR Preps DNA Purification System 提取质粒, 取 1 μ L 进行 PCR 鉴定。分别用 Hind III 和 Hind III⁺ Xba I 进行单、双酶切鉴定插入方向和插入片段的大小。

1.4 真核表达质粒 pcDNA3.1S2S/IFN- α 在 E-6 细胞中的瞬时表达

1.4.1 细胞培养及转染用质粒的制备 用含 10% 胎牛血清的 DMEM 培养基, 于 37℃, 5% CO₂ 孵箱中培养。用 WizardTM PCR Preps DNA Purification System 提取质粒。

1.4.2 重组质粒的转染 用脂质体介导转染法进行。按照脂质体转染试剂盒 LIPLFECTAMINETM 2000 Reagent 的操作说明书。1) 将处于数生长期的 E-6 细胞 3×10^5 重悬于 0.5mL 完全培养基中, 接种至 24 孔板。孔内放置一无菌载玻片。同时设置一未加细胞的空白对照孔和只转染空载体细胞的阴性对照孔。2) 培养 18~24h, 使细胞达 90%~95% 融和。3) 无菌 Ep 管中制备, 0.8~1.0 μ g 无血清、无抗生素的 DMEM 中。将此两溶液在 5min 内混合。4) 用无血清、无抗生素的 DMEM 洗涤细胞两次。加入 0.5mL 无血清、无抗生素的 DMEM。5) 将 Lipofectamine + DNA 混合物 100 μ L 小心滴加至细胞上。6) 37℃, 5% CO₂ 孵箱中培养 4~6h 后, 换为完全培养基继续培养。7) 转染 48~72h 内检测重组质粒的表达。

1.4.3 用间接免疫荧光法检测抗原的表达 参照文献^[8]的方法, 用间接免疫荧光法抗原的表达, 荧

光显微镜下观察。

2 结果

2.1 pcDNA3.1S2S/IFN- α

第一次 PCR 产物分别为 850bp、540bp, 第二次 PCR 产物为 1.4kb, 与预期结果一致; 重组质粒分别经 *Hind* III 和 *Hind* III + *Xho* I 单双酶切, 可见与理论结果一致的 6.9kb, 5.5kb 和 1.4kb 的电泳条带(见封 3 彩图 1)。

2.2 融合基因 S2S/IFN- α 在真核细胞中瞬时表达的检测

用间接免疫荧光法, 在荧光显微镜下观察到了抗原的表达(见封 3 彩版图 2)。

3 讨论

研究表明, 慢性乙型肝炎的发病与免疫机制有关。因此, 要想清除患者体内的病毒, 应从抗病毒和提高机体免疫反应两方面入手。基因免疫研究表现出了诱人的前景, 但单纯用只含特异性抗原的基因疫苗效果并不理想, 而与细胞因子联合免疫可以显著增强其免疫效果。细胞因子具有免疫调节活性, 能够不同程度的调节体液或细胞免疫反应^[8]。多项研究表明, IL-12 可以增强由编码 HIV 和流感病毒抗原的 DNA 疫苗诱发的特异 CTL 反应^[9~12]; IL-2 和 GB-GSF 可以增强由 HCV 的 DNA 疫苗诱发的细胞免疫反应^[13,14]。IL-2 基因与 preS2S 基因进行融合表达时, 特异性的免疫反应至少可以增加 100 倍^[15]。干扰素作为临床一线抗病毒药物有一定的作用, 但临床疗效并不理想。我们成功构建了含 HBV preS2S 与 IFN- α 融合基因的真核表达载体 pcDNA 3.1S2S/IFN- α , 并在 Vero E6 细胞中进行了有效的表达, 拟在后续的研究中鉴定融合蛋白的生物学活性及进行动物学实验, 以期通过 IFN- α 增强的基因免疫达到彻底清除病毒的目的。

参考文献

- [1] McDonnell W M, Askari F K. DNA vaccines [J]. N Engl J Med, 1996, 334:42~45.
- [2] Lagging L M, Meyer K, Hoft D, et al. Immune responses to plasmid DNA encoding the hepatitis C virus core protein [J]. J Virol, 1995, 69:5859~5863.
- [3] Ulmer J B, Donnelly J J, Pader S E, et al. Heterologous protection against influenza by injection of DNA encoding a viral protein [J]. Science, 1993, 259:1745~1749.
- [4] Wang B, Ugen ke, Srikantan V, et al. Gene inoculation generates immune responses against human immunodeficiency virus type1 [J]. Proc Natl Acad Sci USA, 1993, 90:4156~4160.
- [5] Michel M L, Davis H L, Schieff M, et al. DNA - mediated immunization to the hepatitis B surface antigen in mice; aspects of the humoral response mimic hepatitis B viral infection in humans [J]. Proc Natl Acad Sci USA, 1995, 92:5307~5311.
- [6] Chenghua S, Cheng C, Jingsheng Z, et al. Gene fusion of cholera toxin B subunit and HBV pre S2 epitope and the antigenicity of fusion protein [J]. vaccine, 1995, 13:933~937.
- [7] Krudkall M S, Alper C A, Awdeh Z, et al. The immune response to hepatitis B vaccine in humans: Inheritance patterns in families [J]. J Exp Med. 1992, 175:495~502.
- [8] Barouch D H, Craib A, Kuroda M J, et al. Augmentation of immune responses to HIV - 1 and simian immunodeficiency virus DNA vaccines by IL - 2/Ig plasmid administration in rhesus monkeys [J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2000, 97:4192~4197.
- [9] Raz E A, Watanabe S M, Barid R A, et al. Systemic immunological effects of cytokine genes injected into skeletal muscle [J]. Proc Natl Acad Sci USA, 1993, 90:4523~4527.
- [10] Kin J J, Ayyavoo M L, Bagarazzi M A, et al. In vivo engineering of a cellular immune response by coadministration of IL - 12 expression vector with a DAN immunogen [J]. J Immunol, 1997, 158:816~826.
- [11] Tsuji T, Hamajima K, Fukushima J, et al. Enhancement of cell-mediated immunity against HIV - 1 induced by coinoculation of plasmid - encoded HIV - 1 antigen with plasmid expressing IL - 12 [J]. J Immunol, 1997, 158:4008~4013.
- [12] Iwasaki A, Stiernholm B J, Chan A K, et al. Enhanced CTL response mediated by plasmid DNA immunogens encoding costimulatory molecules and cytokines [J]. J Immunol, 1997, 158:4591~4601.
- [13] Okada E, Sasaki S, Ishii N, et al. Intranasal immunization of a DNA vaccine with IL - 12 and granulocyte - macrophage colony - stimulating factor(GM - CSF) - expressing plasmids in liposomes induces strong mucosal and cell - mediated immune responses against HIV - 1 antigens [J]. J Immunol, 1997, 159:3638~3647.
- [14] Geissler M, Gesien A, Wands J R, et al. Enhancement of cellular and humoral immune responses to hepatitis C virus core protein using DNA - based vaccines augmented with cytokine - expressing plasmids [J]. J Immunol, 1997, 158:1231~1237.
- [15] Geissler M, Gesien A, Tokushige K, et al. Inhibitory effects of chronic ethanol consumption on cellular immune responses to hepatitis C virus core protein are reversed by genetic immunizations augmented with cytokine - expressing plasmids [J]. J Immunol, 1997, 159:5107~5113.
- [16] Chow Y H, Huang W L, Chi Y D, et al. Improvement of hepatitis B virus DNA vaccines by plasmids coexpressing hepatitis B surface antigen and interleukin 2 [J]. J Virol, 1997, 71:169~178.