技术与方法 文章编号:0253-3626(2011)02-0181-04

乙肝病毒抗原基因真核表达载体的构建及表达

仝 君,张大志
(重庆医科大学附属第二医院病毒性肝炎研究所,重庆 400010)

【摘 要】目的:构建乙肝病毒(Hepatitis B virus,HBV)相关抗原基因真核表达载体,检测各抗原基因在体外真核细胞中的表达情况。方法:以含有 1.3 倍的 HBV 全基因组序列的质粒 PcDNA3.1- HBV 为模板,PCR 扩增 HBV 的各抗原基因片段,通过连接至中间克隆载体 Peasy-T1- Simple,酶切及测序鉴定正确后,再将目的片段插入真核表达载体 pcDNA3.1(+)中,构建包含 HBV 抗原基因的重组表达质粒 pcDNA3.1(+)-HBs,pcDNA3.1(+)- HBe,pcDNA3.1(+)-HBc。阳性克隆用限制性内切酶酶切鉴定正确后用脂质体 2000 分别瞬时转染 HepG2 细胞, 同时转染 LO2 细胞作为对照,Western blot 和免疫荧光技术分别检测各抗原基因产物在细胞内的表达。结果:成功扩增出 HBV 各抗原基因片段,通过酶切测序鉴定证明成功构建了包含 HBV 抗原基因的重组表达质粒 pcDNA3.1(+)-HBs,pcDNA3.1(+)- HBe,pcDNA3.1(+)-HBc,Western blot 和免疫荧光检测到目的蛋白在转染细胞中的正确表达。结论:本实验成功构建包含 HBV 抗原基因的真核表达载体,并能在体外真核细胞中表达相关抗原蛋白,为进一步研究各抗原的生物学功能奠定了实验基础。

【关键词】乙肝病毒;抗原基因;真核表达载体;瞬时转染
【中国图书分类法分类号】R512.6 【文献标志码】A 【收稿日期】2010-09-26

Construction and expression of eukaryotic expression vectors of HBV antigen genes

TONG Jun, et al
(*Institute of Viral Hepatitis, the Second Affiliated Hospital, Chongqing Medical University*)

【Abstract】*Objective*: To analyze the expression of HBV antigen genes in eukaryotic cells in vitro, eukaryotic expression plasmids containing HBV antigen genes were constructed. *Methods*: The fragments of HBV antigen genes were amplified by PCR from the plasmid PcDNA3.1- HBV which contains 1.3 fold HBV whole genome sequence. Then the PCR fragments were cloned into Peasy-T1- Simple vector following the routine procedures. After identification by enzyme digestion and DNA sequence analysis, the interested gene fragments were inserted into the eukaryotic expression vector PcDNA3.1(+). The resultant recombinant plasmids were confirmed by restriction enzyme digestion and the correct ones were transiently transfected into HepG2 cells, and LO2 cells as a control. Western blot and Immunofluorescence were used to analyze the expression of HBV gene products in the transfected cells. *Results*: The fragments of HBV antigen genes were correctly amplified. Restriction enzyme digestion and DNA sequence analysis confirmed that the recombinant plasmids containing HBV antigen genes were successfully constructed. Western blot and Immunofluorescence confirmed that the interested genes could be correctly expressed in transfected cells. *Conclusion*: The construction of eukaryotic expression plasmids containing HBV antigen genes and the antigen gene expression in eukaryotic cells in vitro provide a solid experimental foundation for further research on the biological function of HBV antigens.

【Key words】hepatitis B virus; antigen genes; eukaryotic expression vector; transient transfection

在全球范围内,乙型肝炎病毒(Hepatitis B virus,HBV)感染者大约有 4 亿人,并且是急性和慢性肝病的主要诱因。我国 HBV 携带者达 1.3 亿,慢性肝炎患者高达 30 001 万人,每年约 25 ~ 30 万人死于乙型肝炎相关性疾病[1]。乙肝表面抗原(HBsAg),乙肝 e 抗原(HBeAg),乙肝核心抗原(HBcAg)作为 HBV 感染的病毒学标志物被广泛应用于临床,可反应患者的免疫应答状态及治疗效果,也可反应病毒变异的情况,具有重要的临床价值。HBV 不能在体外培养,其感染宿主范围窄,制约了 HBV 研究方法的进展[2-4]。本实验通过构建包含HBV 3 种抗原基因的真核表达质粒,监测抗原基因在体外真核细胞中的表达,而不是将 HBV 全基因组转染入真核细胞,为分别研究各抗原的生物学功能及对免疫细胞功能的影响奠定了实验基础。

作者介绍:仝 君(1986-),女,硕士,
研究方向:病毒性肝炎的发病机制及治疗。
通信作者:张大志,男,教授,Email:zhangdazhi_1014@163.com。
基金项目:国家自然科学基金资助项目(编号:30872250);重庆市卫生局医学科研项目(编号:2008-2-201)。

1 材料与方法

1.1 主要的试剂

宿主菌大肠杆菌 DH5α，人肝癌细胞 HepG2，正常肝细胞 LO2 由重庆医科大学病毒性肝炎研究所保存。pcDNA3.1(+)质粒由重庆医科大学感染性疾病实验室惠赠。ExTaq DNA 聚合酶、T4 DNA 连接酶、*EcoR* Ⅰ和 *Xho* Ⅰ限制性内切酶购自 Takara 公司。凝胶回收试剂盒购于 Promega 公司，质粒提取试剂盒购自 Qiagen 公司；脂质体 Lipofectamine™ 2000 购自 Invitrogen 公司；一抗(小鼠抗人 HBsAg 单克隆抗体，兔抗人 HBeAg 多克隆抗体，小鼠抗人 HBcAg 单克隆抗体)，二抗(辣根过氧化物酶标记的羊抗兔 IgG，兔抗小鼠 IgG)购自 Abcam 公司，二抗(FITC 标记的羊抗小鼠 IgG，羊抗兔 IgG)及 4',6-联脒-2-苯基吲哚二盐酸盐（4',6-diamidono-2-pheny lindole，DAPI)购自 Sigma 公司。胎牛血清，DMEM 购自 GIBCO 公司，引物合成及 DNA 测序由上海博尚公司完成。

1.2 实验步骤

1.2.1 目的基因的获取和中间克隆载体的构建 设计和模版 PcDNA3.1- HBV 相匹配的上下游引物，用 PCR 的方法扩增 HBV 3 个抗原基因片段，引物序列及产物长度见表 1，划线处分别为 *EcoR* Ⅰ和 *Xho* Ⅰ酶切位点，上游引物插入 *EcoR* Ⅰ酶切位点，下游引物插入 *Xho* Ⅰ酶切位点。PCR 反应条件：94℃预变性 3 min，94℃变性 40 s，58℃退火 40 s，72℃延伸 1 min，30 个循环，72℃后延伸 5 min。PCR 产物经电泳，纯化回收后，连接到中间克隆载体 Peasy- T1- Simple 中，并转化感受态大肠杆菌 DH5α，提取阳性重组质粒，行 *EcoR* Ⅰ和 *Xho* Ⅰ双酶切鉴定。

表 1 PCR 实验使用的引物序列

基因名称	引物序列
HBs	forward:GAATTCGAGAACATCGCATCAGGA
	reverse: CTCGAGTTAAATGTATACCCAAAGACA
HBe	forward: GAATTCCAACTTTTTCACCTCTGCCTA
	reverse: CTCGAGCTAACATTGAGATTCCCGAGA
HBc	forward: GAATTCGACATTGACCCGTATAAAGAA
	reverse: CTCGAGCTAACATTGAGATTCCCGAGA

1.2.2 重组质粒的构建 分别小量制备中间克隆载体 Peasy-T1-Simple-HBs，Peasy-T1-Simple-HBe，Peasy-T1-Simple -HBc和真核表达载体 pcDNA3.1(+)的质粒 DNA，并行 *EcoR* Ⅰ和 *Xho* Ⅰ双酶切，经琼脂糖凝胶电泳，分别回收目的片段，用 T4 DNA 连接酶将各抗原基因片段与线性化的 pcDNA3.1(+)空载体进行连接，转化感受态大肠杆菌 DH5α，筛选氨苄青霉素抗性菌落的重组质粒，行 *EcoR* Ⅰ和 *Xho* Ⅰ双酶切及测序鉴定。

1.2.3 重组质粒的鉴定及测序 用限制性内切酶 *EcoR* Ⅰ和 *Xho* Ⅰ进行双酶切鉴定，由于合成的抗原基因片段两端分别含有 *EcoR* Ⅰ，*Xho* Ⅰ酶切位点，而线性化的 pcDNA3.1(+)质粒没有这 2 种酶的识别位点，因此用 *EcoR* Ⅰ和 *Xho* Ⅰ酶切重组质粒可将目的片段切下，电泳观察酶切片段的分子量大小初步鉴定，然后送上海博尚公司测序，测序正确的质粒分别命名为 pcDNA3.1(+)-HBs，pcDNA3.1(+)-HBe，pcDNA3.1(+)-HBc。

1.2.4 细胞培养与瞬时转染 人肝癌细胞 HepG2 和正常肝细胞 LO2 分别培养于含 10%胎牛血清，1%青/链霉素的 DMEM 和 1640 培养基中，将 HepG2 和 LO2 细胞分别接种于 6 孔培养板中(5×10^5 个/孔)，24 h 后待细胞汇合度达 95%左右时按 Lipofectamine™ 2000 说明书进行转染，分别将上述构建的重组质粒及 pcDNA3.1(+)空质粒转染 HepG2 细胞，并转染 LO2 细胞做为对照，同时转染 pEGFP-C1(含有 EGFP 标记基因)质粒监测转染效率。分别于转染后 24、48 h，于荧光显微镜下随机选择 5 个细胞区域内视野，计数绿色荧光细胞数及总细胞数，计算绿色荧光细胞发生率 =(绿色荧光细胞数/总细胞数)×100 %。

1.2.5 蛋白提取和 Western blot 检测 提取 pcDNA3.1(+)-HBs，pcDNA3.1(+)-HBe，pcDNA3.1(+)-HBc 分别转染 HepG2 细胞后 48、72 h 蛋白，转染 LO2 细胞后 48 h 蛋白，经 Bradford法测定蛋白浓度，设立空白和阴性对照。每组分别取总量为 30 μg 的蛋白样品，SDS-PAGE 电泳分离蛋白，湿转将蛋白条带转移至 PVDF 膜上，5%脱脂奶粉封闭 1 h，加入对应的一抗4℃孵育过夜，洗膜后加入相应的二抗，室温慢摇孵育 1 h；DAB 显色。Western blot 检测结果，以 BandScan5.0 图像分析软件进行扫描分析，相对表达量以各组 HBs，HBe，HBc 抗原与自身内参 β-actin 灰度值的比值计算。

1.2.6 细胞免疫荧光 取对数生长期的 HepG2 细胞以 5×10^5 个/孔的密度种植在六孔板玻片上，24 h 后待细胞汇合度达 95%左右时按上述方法将重组质粒和空质粒 pcDNA3.1(+)转染入 HepG2 细胞，48 h 后用预冷的磷酸盐缓冲液(PBS)冲洗细胞，经 4%多聚甲醛固定，0.2% 曲拉通 X-100(TritonX-100) 通透，5%山羊血清室温封闭后，与相应的稀释为合适浓度的 HBV 各抗原蛋白一抗 4℃孵育过夜，次日 PBS 洗涤细胞 3 次后，与相应的稀释为合适浓度的异硫氰酸荧光素(FITC)标记的二抗室温避光孵育 1 h，PBS 洗涤 3 次，DAPI稀释液孵育细胞 1 min，以 PBS 缓冲液冲洗，封片后用激光共聚焦显微镜观察 3 种抗原在细胞内的表达。

1.2.7 统计学分析 使用 SPSS 11.0 统计软件进行统计分析，实验数据以均数 ± 标准差表示，2 组间比较采用 t 检验，多组之间比较采用方差分析，$P<0.05$ 表明差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 PCR 产物及中间克隆载体的鉴定

PCR 扩增产物经 1%琼脂糖凝胶电泳后结果显示其产物片段大小与预计相符，符合 HBs 681 bp、HBe 639 bp、HBc 552 bp 大小的清晰条带，已得到 HBV 各抗原基因片段(图1)。Peasy-T1-Simple 载体全长 3 829 bp，具有一个突出的带 T 碱基的缺口，可以直接连接 3'末端带有突出 A 碱基的 PCR 产物。PCR 产物经纯化回收后，连接到克隆载体 Peasy-T1-Simple 上，构建成中间克隆载体，经 *EcoR* Ⅰ和 *Xho* Ⅰ酶切，可获得

克隆载体 Peasy-T1-Simple 大片段与目的基因小片段，大小与预期一致(图 2)，构建成中间克隆载体 Peasy-T1-Simple-HBs，Peasy-T1-Simple-HBe，Peasy-T1-Simple-HBc。

2.2 重组质粒的酶切鉴定与测序

重组质粒经 pcDNA3.1(+)-HBs，pcDNA3.1(+)-HBe，pcDNA3.1(+)-HBc *EcoR* Ⅰ和 *Xho* Ⅰ双酶切鉴定，分别切出与对应目的基因大小相符的条带，空载体 pcDNA3.1(+)仅见约 5 400 bp 的一条带(图 3)，经测序分析，结果显示各连接位点以及阅读框架正确，序列与对应已知序列相符。成功构建了携带 3 种抗原基因的重组质粒，重组质粒构建成功。

2.3 重组质粒的瞬时转染及转染效率的监测

按 Lipofectamine™2000 说明书，分别将上述构建的重组质粒及含有 EGFP 标记基因的质粒 pEGFP-C1 转染至HepG2 细胞，转染后 48 和 72 h，均有绿色荧光蛋白的表达，转染效率均在 30%左右，未转染的 HepG2 细胞未观测到荧光表达(图4)。

2.4 Western blot 分析各抗原蛋白的表达

正常的 HepG2，LO2 细胞及转染 pcDNA3.1(+)的HepG2，LO2 细胞不表达 HBs，HBe，HBc 抗原(图 5，1、2、5、6 道)，携带 3 种抗原基因的重组质粒转染 HepG2 细胞后 48、72 h 均检测到相应抗原的表达，符合 HBs 抗原 25 kD，HBe 抗原 19 kD，HBc 抗原 21 kD(图 4，3、4 道)的位置，3 种抗原蛋白的相对表达量提示转染后不同时间点目的蛋白的表达量没有明显差异($P>0.05$)，上述真核表达载体转染 LO2 细胞后 48 h 也有相应抗原的表达(图 4，7 道)，说明构建的重组质粒可以在体外培养的细胞中成功表达。

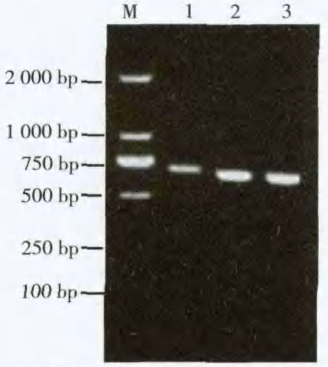
2.5 免疫荧光分析各抗原蛋白的表达

免疫荧光检测重组质粒转染 48 h 后 HepG2 细胞中抗原蛋白的表达，可见转染细胞均呈阳性反应(图 6)，且观察到着色部位主要分布于胞质中，胞核胞膜中仅有少量着色。转染了 pcDNA3.1(+)的 HepG2 细胞及正常的 HepG2 细胞未见明显着色，表明重组质粒转染 HepG2 细胞后有相应抗原蛋白的表达，且表达的蛋白主要分布于胞浆中，胞核胞膜中仅有少量分布。正常的及转染了空载体的 HepG2 细胞不能表达抗原蛋白，与 Western blot 结果一致。

3 讨 论

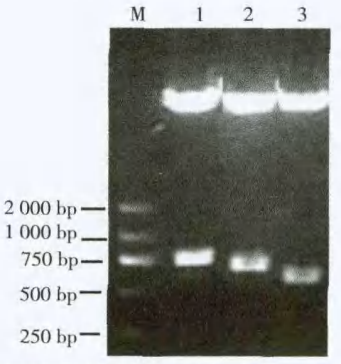
HBV 感染宿主范围有限，目前体外对 HBV 的研究多采用 2 种方法：一种方法是研究 HBV 稳定转染的细胞系，如 HepG2.2.15 细胞系，是将 HBV 基因组(含有 4 个头尾相连的 HBV 四聚体)转染肝癌细胞 HepG2，经 G418 稳定筛选后，得到的阳性克隆，可稳定表达 HBV 各抗原蛋白[5]；另一方法是将携带 HBV 基因的病毒载体系统转染靶细胞，触发 HBV 目的基因的表达[6]。

本实验通过构建分别包含 HBV 各抗原基因片段的真核表达质粒，瞬时转染 HepG2 细胞，监测到较高的转染效率和相应抗原蛋白的表达，表明瞬时转染这种方法，也可得到大量的目的蛋白，相比常见的稳定筛选细胞系的建立更为快捷[7,8]，并同时转染正常肝细胞 LO2，检测到目的蛋白在肝癌细胞和正常肝细胞中都有表达，充分说明了瞬时转染方法切实可行。通过 Western blot 验证了转染后 48、72 h 目的蛋白的表达量无明显差异，荧光显微镜下也观察到 48、72 h 的转染效率未见明显差异($P<0.05$)，为后续实验提供了指导，相似的报道仍较少见。本实验不同于将整个 HBV 基因组转染入真核细胞的方法，分别转染各抗原基因入真核细胞，排除了各抗原间的相互影响，为分别研究各抗原的生物学功能提供了可



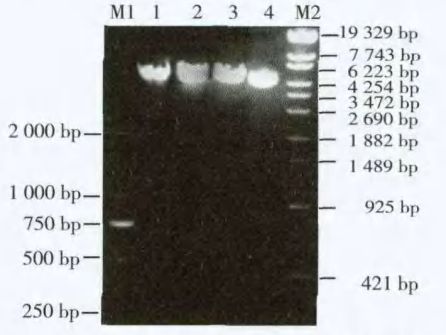
M. DNA Marker DL2 000；1. HbsAg gene；2. HBeAg gene；3. HBcAg gene

图 1 PCR 扩增 HBV 各抗原基因片段



M. DNA Marker DL2 000；1. Peasy-T1-Simple-HBs；2. Peasy-T1-Simple-HBe；3. Peasy-T1-Simple- HBc

图 2 中间克隆载体经 *EcoR* Ⅰ和 *Xho* Ⅰ双酶切鉴定



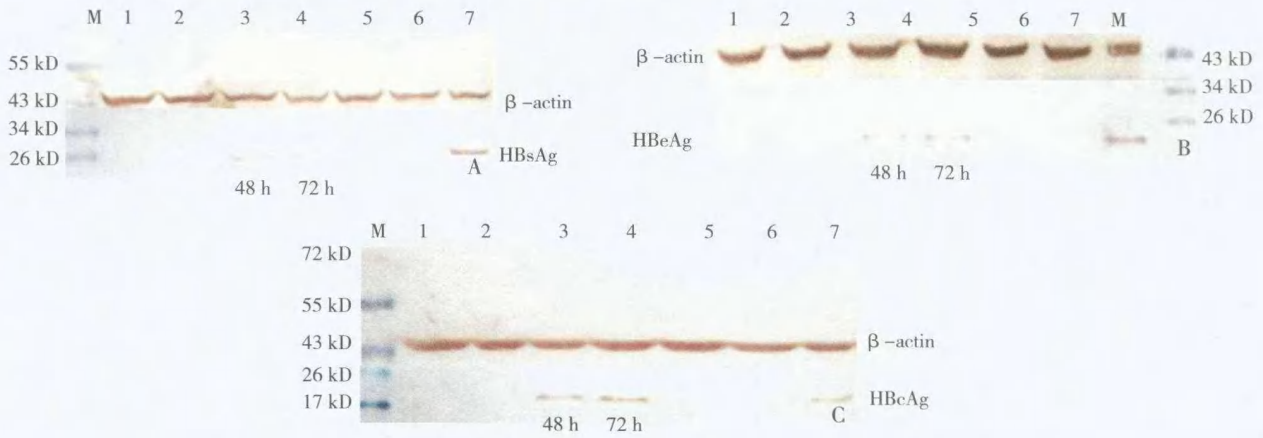
M1. DNA Marker DL2 000；1. pcDNA3.1(+)-HBs；2. pcDNA3.1(+)-HBe；3. pcDNA3.1(+)-HBc；4. pcDNA3.1(+)vector；M2. DNA Marker λ -EcoT14 I digest

图 3 重组质粒经 *EcoR* Ⅰ和 *Xho* Ⅰ双酶切鉴定



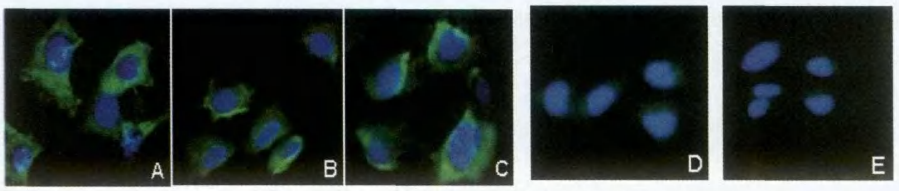
A. HepG2 细胞转染后 48 h；B. HepG2 细胞转染后 72 h；C.未转染的 HepG2 细胞

图 4 HepG2 细胞转染后 48、72 h 荧光表达情况



M.蛋白质 Marker;1. 未转染的 HepG2 细胞;2. 转染 pcDNA3.1(+)的 HepG2 细胞;3. 转染重组质粒 48 h 的 HepG2 细胞;4. 转染重组质粒 72 h 的 HepG2 细胞;5. 未转染的 LO2 细胞;6. 转染 pcDNA 3.1(+)的 LO2 细胞;7.转染重组质粒 48 h 的 LO2 细胞

图 5 Western blot 分析各抗原蛋白的表达



A.转染 pcDNA3.1(+)-HBs 的 HepG2 细胞;B.转染 pcDNA3.1(+)-HBe 的 HepG2 细胞;C.转染 pcDNA3.1(+)-HBc 的 HepG2 细胞;D. 转染 pcDNA3.1(+)的 HepG2 细胞;E.未转染的 HepG2 细胞

图 6 免疫荧光分析各抗原蛋白的表达

靠的新方法。

pcDNA3.1(+)载体为真核表达载体,可在体外培养的细胞中稳定表达其所携带的外源基因,其结构中包含 CMV 早期启动子/增强子,经体外实验证实是最强的真核启动子之一,可使外源基因得以在真核细胞中高效表达。同时 CMV 诱导的表达无严格的组织特异性,适于其表达的细胞类型较多,因此可以解决 HBV 感染宿主范围窄的局限,使携带的外源基因在真核细胞中有效表达[9~11]。

HBV 相关抗原,在 HBV 感染致病及 HBV 相关肝癌的发生中是重要的疾病监测指标,本文采取瞬时转染 HBV 相关抗原基因入真核细胞的方法,通过不同途径监测 3 种抗原蛋白的成功表达,为体外研究各抗原的生物学功能提供了实验平台, 可继续研究各抗原对免疫细胞功能的影响及在 HBV 感染慢性化中的作用。

参 考 文 献

[1] Wang C C, Liu C J, Lai M Y, et al. Dynamics of Hepatitis Be Antigen Index Ratio Correlate With Treatment Response in Chronic Hepatitis B Patients[J].Liver Int,2007,27(2):235-239.

[2] Munoz N,Bosch F X,de Sanjose S,et al.Epidemiologic classification of human papillomavirus types associated with cervical cancer[J].Engl J Med,2003,348(6):518-527.

[3] Jansen K U,Shaw A R. Human papillomavirus vaccines and prevention of cervical cancer[J].Annu Rev Med,2004,55(3):19-31.

[4] Dienstag J L,Schiff E R,Wright T L,et al. Lamivudine as initial treatment for chronic hepatitis B in the united States[J].Engl J Med,1999,341(17):1256-1263.

[5] Netter H J,Chang S F,Michael B.Host range and patho-genicity of hepatitis B viruses [J].Fut Virol,2008,3(1):83-94.

[6] Lucifora J,Durantel D,Belloni L,et al.Initiation of hepatitis B virus genome replication and production of infectious virus following delivery in HepG2 cells by novel recombinant baculovirus vector[J].Gen Virol,2008,89(10):1819-1828.

[7] Villa L L,Costa R L,Petta C A,et al.High sustained efficacy of a prophylactic quadrivalent human papillomavirus types 6/11/16/18 L1 virus-like particle vaccine through 5 years of follow-up[J].Cancer,2006,95(11):1459-1466.

[8] Kuck D,Leder C,Kern A,et al.Efficiency of HPV 16 L1-E7 DNA immunization:influence of cellular localization and capsid assembly[J]. Vaccine,2006,24(15):2952-2965.

[9] Pokorna D,Cerovska N,Smahel M,et al.DNA vaccines based on chimeric potyvirus-like particles carrying HPV16 E7 peptide (aa 44-60) [J].Oncol Rep,2005,14(4):1045-1053.

[10] Milich D R, Schoodel F,Hughes J L,et al.The hepatitis B virus core and e antigen elicit different Th cell subsets: Antigen structure can affect Th cell phenotype[J]. Virol,1997,71(3):2192-2201.

[11] George J M W,Stephanie R,David B,et al. Longitudinal Analysis of CD+8 T Cells Specific for Structural and Nonstructural Hepatitis B Virus Proteins in Patients with Chronic HepatitisB:Implications for Immunotherapy[J].Virol, 2004,78(11):5707-5719.

(责任编辑:张学颖)