维普资讯 http://www.cqvip.com

文章编号:0253-3626(2004)03-0273-03

HBX 基因重组腺病毒载体的构建

冯 涛[1], 何通川[2], 宋文鑫[1]

(1.重庆医科大学基础医学院生物化学教研室,重庆 400016;2.芝加哥大学医学中心分子肿瘤研究室,美国 60637)

【摘 要】目的:构建携 HBX 基因的腺病毒载体,为进一步研究 HBX 基因的功能,为阐明 HBV 感染导致肝癌的机制研究建立基础。方法:采用 PCR 技术从 HBV 全基因组 DNA 中扩增 HBX 基因;将 HBX 基因亚克隆至质粒 pHAHA,构建质粒 pHAHA-HBX,酶切 pHAHA-HBX 质粒,将 HAHA-HBX 片段克隆到腺病毒载体 pAd-Track-CMV 中,得到 pAdTrack-CMV-HBX,同时与 pAdEasy-1 共转染 293 细胞,确定转染效率。检测培养上清病毒中 HBX 的存在。结果:将 PCR 扩增 HBX 片段成功克隆到腺病毒载体中,并经序列分析证实;建立了产病毒细胞株,证实重组病毒中含有 HBX 基因。结论:成功构建了携 HBx 基因的腺病毒载体。

【关键词】基因;HBX;HBV;腺病毒载体;乙型肝炎

【中国图书分类法分类号】Q781;R512.6+2 【文献标识码】A 【收稿日期】2003-11-19

Construction of a recombinant adenovirus vector containing HBX gene

FENG Tao, et al

(*Department of Biochemistry, College of Basic Medicine, Chongqing Medical University*)

【Abstract】*Objective*: To establish a recombinant adenovirus vector carrying HBX gene for investigation of the functions of HBX gene on the hepatocellular carcinoma. *Methods*: HBX gene was amplified from genomic DNA of HBV by polymerase chain reaction(PCR) technique, and subcloned to plasmid pHAHA to construct recombinant plasmid pHAHA-HBX. subcloned HAHA-HBX into a shuttle vector pAdTrack-CMV. After being identified by endonuclease, and subsequently cotransformed into E. coli. 293 cells with an adenoviral backbone plasmid, e.g. pAdEasy-1. *Results*: HBX gene was cloned from HBV genome by PCR successfully, and proved by sequence determination. A vector producing cell line 293/HBX was established. An HBX gene integration was detected by PCR in the recombinant adenovirus vectors. *Conclusion*: A recombinant adenovirus vector containing HBX gene was successfully constructed.

【Key words】Gene; HBX; HBV; Adenovirus vector; Hepatitis B

病毒性肝炎是严重威胁人类健康的世界性传染病。目前世界上近 20 亿人感染 HBV;每年被 HBV 感染而致死的人数 100 万左右。HBV 感染导致 3.5 亿人患上严重慢性病毒性乙型肝炎,并且转为慢性乙肝的患者存在着极高的患肝硬化及肝癌的危险[1]。

HBV 的全部基因组序列都是蛋白质编码区。分别编码核心蛋白、S 蛋白、前 S1 蛋白和前 S2 蛋白以及 X 蛋白(HBX),HBX 大多都由 154 个氨基酸组成,HBX 具有多种调控功能,激活宿主细胞和病毒自身基因的转录、调控凋亡、抑制细胞中受损 DNA 的外切修复反应以及激活细胞中信号转导通路,有必要进一步研究 HBX 对病毒自身的复制与增殖以及宿主细胞中基因的表达与调控、细胞的凋亡与癌变等过程的机制[2]。

利用 pAd-Easy 腺病毒载体系统[3],通过 PCR 扩增 HBX 基因,克隆到腺病毒载体 pAd-Track-CMV 中,通过 pAdTrack-CMV-HBX 与 pAdEasy 共转染 293 细胞,构建携带 HBX 的重组腺病毒,为进一步在体内体外研究 HBX 基因功能奠定基础。

1 材料与方法

1.1 材 料

腺病毒表达系统 PAd-Easy,293 细胞为美国芝加哥大学医学中心分子肿瘤研究室保存;DMEM 等购自 Microbix

作者介绍:冯 涛(1963-),男,副教授,硕士,主要研究方向:肿瘤发生机制及基因治疗。

基金项目:国家自然科学基金资助项目(30371274)。

维普资讯 http://www.cqvip.com

Biosystems(Canada)；限制性核酸内切酶、T_4DNA 连接酶、T_4DNA 聚合酶等购自 NEB、Promega 和 Takara 公司。克隆 HBV 全长编码区基因的质粒 pHBV－DNA 由 Klein A(Freie Universitat Berlin, Germany) 惠赠。G418 购自 Boehringer Mannheim 公司。

1.2 HBX 基因亚克隆

根据 HBX 基因全序列设计引物，5′端引物(TCH205, HBXFwd w/*Hind* Ⅲ site)：5′—CCCAAGCTTGGGCATGGCTGCTAGGGTGTGCTGC－3′，3′端引物，(TCH206：HBXRev w/Xho Ⅰ Site)：5′CCGCTCGAGTAAGGCAGAGGTGAAAAAGTTGC－3′，以质粒 pHBV－DNA 为模板，PCR 反应体积为 100μl，其中含 2.5 mmol/L 4×dNTP 8 μL，5′和 3′引物各 100 pmol/L，Taq DNA 聚合酶 3 U，反应条件为 94℃ 45 s、50℃ 45 s、72℃ 1 min，35 个循环。反应结束后，10 g/L 琼脂糖凝胶电泳，柱层析纯化 PCR 产物。pHAHA 质粒用 Hind Ⅲ和 Xho Ⅰ酶切，PCR 扩增的 HBX 基因片段同时用 Hind Ⅲ和 Xho Ⅰ酶切，用连接酶连接。连接产物转化 DH 10B 细胞，纯化阳性克隆质粒，酶切鉴定，筛选构建正确的克隆，通过测定 DNA 序列证实。

1.3 HBX 基因重组腺病毒载体的构建

pAdTrack－CMV－HBX 的构建：Sal Ⅰ酶切 pHAHA－HBX 质粒，得到 HAHA－HBX 片段，克隆到腺病毒载体 pAd－Track－CMV(同样用 Sal Ⅰ酶切)中，卡那霉素选择培养基筛选阳性克隆。为验证重组质粒 pAdTrack－CMV－HBX 插入序列及读码框架的正确性，进行测序鉴定。构建流程如图 1 所示。得到重组腺病毒载体质粒 pAd－Tracker－CMV－HBX。

1.4 pAdTrack－CMV－HBX 与 pAdEasy 的共转化

pAdTrack－HBX 用 Pme Ⅰ酶切，线性化，电转化(Bio－Rad Gene Pulser electroporator, 2, 500V, 200 Ohms)到 BJEasy 细胞(该细胞已经带有 pAdEasy－1)，筛选与 pAdEasy－1 整合 AdTrack－CMV－HBX，挑选 10—20 个最小的克隆，加入 2ml LB(含 25mg/L Kan)，37℃ 振摇 15h。传统裂解法抽提质粒。Pac Ⅰ酶切鉴定，候选重组大(30kb)、小(3.0 或 4.5kb)两个片段。以 DH10B 为宿主细胞，电转化 1μl 正确的重组 pAd－Tracker－CMV－HBX，裂解法制备质粒，经 PEG8000 纯化后转染 293 细胞。设置阴性对照组为空载体 pAdTrack－CMV，用 Pme Ⅰ酶切线性化后与 padEasy－1 同源重组。

1.5 重组腺病毒在 293 细胞内的包装、扩增、纯化

Pac Ⅰ酶切线性化的 pAd－Tracker－CMV－HBX 转染 293 细胞，12 孔细胞培养板种入 2×10^4 细胞，待细胞密度达到 60%，除去培养基，用不含小牛血清的 DMEM 洗涤细胞(5min)，加入 1 ml 不含小牛血清的 DMEM 与 1 μg pAdTrack－CMV－HBX 和 5μl Lipofectamine reagent 的混合物(混合 10min 后加入)，空白对照用 pAd－Track－CMV 载体转染，37℃，5%CO_2 培养 2～4h 后，加入含小牛血清的 DMEM(完全培养基)，第二天开始观察 GFP 的表达，确定转染效率。

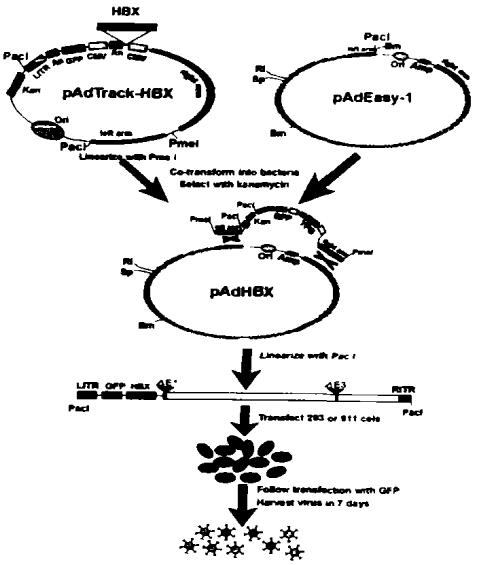


图 1 HBX 基因重组腺病毒载体的构建流程示意图

1.6 Western Blot

SDS－PAGE 电泳后，把已经分离开来的蛋白从胶上转移到杂交膜上；用含 5%脱脂牛奶的缓冲液封闭杂技膜上的非特异位点；膜依次与一抗(抗 pHAHA 抗体，间接说明 HBX 的表达)、二抗(带酶活性)以及显荧光试剂孵育；用成像系统检测荧光条带。

2 结 果

2.1 根据 HBX 基因全序列设计引物，5′端引物(TCH205, HBXFwdw/Hind Ⅲ site)和 3′端引物(TCH206：HBXRev w/Xho Ⅰ Site)，以质粒 pHBV－DNA 为模板，PCR 产物为单一条带，大小约 450bp。见图 2。用 Hind Ⅲ和/Xho Ⅰ酶切该 PCR 扩增的 HBX 基因片段用连接酶与 pHAHA 质粒(同时用 Hind Ⅲ和 Xho Ⅰ酶切)，筛选构建正确的克隆，通过测定 DNA 序列证实，pHAHA－HBX 的碱基序列与文献报道一致。

2.2 pAdTrack－CMV－HBX 的构建

酶切 pHAHA－HBX 质粒，将 HAHA－HBX 片段，克隆到腺病毒载体 pAd－Track－CMV 得到重组腺病毒载体质粒 pAd－Tracker－CMV－HBX。酶切鉴定筛选到的阳性克隆，其构建正确。线性化的 pAdTrack－CMV－HBX 穿梭质粒与骨架质粒 PadEasy－1 共转化感受态细胞，提取质粒，用 Pac Ⅰ分别酶切 PadEasy－1 及重组质粒，0.5%琼脂糖凝

维普资讯 http://www.cqvip.com

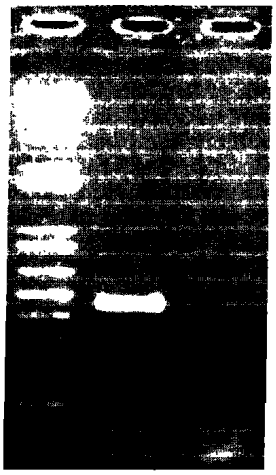


图 2 PCR 扩增 HBX 片段

1. marker 2. 扩增产物 3. 空白

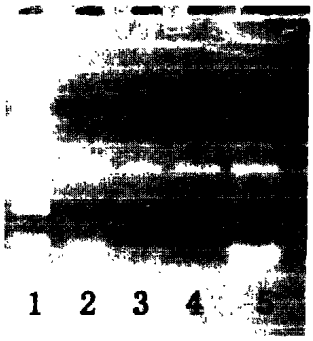


图 3 PCR PCR 检测重组病毒基因组中的 HBX

1. Marker 2. 阳性对照(以 pAdTrack - CMV - HBX 为模板) 3. 转染后 2 天 4. 转染后 5 天 5. 转染后 10 天

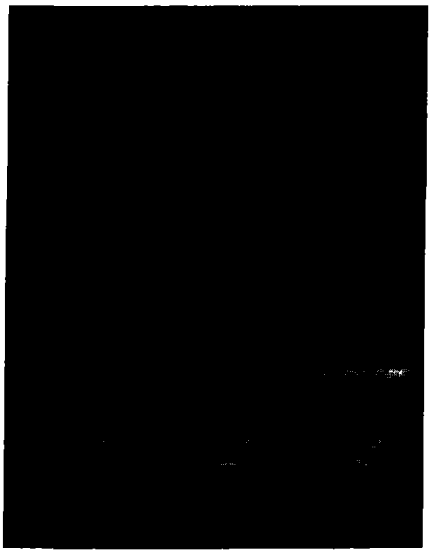


图 4 Western Blotting

1. pAdTrack - CMV 转染(阴性对照) 2. 阳性对照 3. pAdTrack - CMV - HBX 转染后

胶电泳鉴定。由于 pAdEasy - 1 上只有 1 个 Pme I 位点,酶切后被线性化,会产生一条约 30kb 的带;而同源重组后的质粒有两个 Pme I 位点,酶切后会产生 35kb 和 4kb 左右的两条带。pAdTrack - CMV - HBX 与 pAdEasy 的共转化后,质粒经 Pac I 酶切鉴定,选择 30kb 和 4.5kb 两个片段,筛选正确的重组 pAd - Tracker - CMV - HBX,纯化后转染 293 细胞。24 ~ 48h 后即可见示踪标记绿色荧光蛋白(GFP)的表达,6 ~ 7 天可见灶状的 GFP 强阳性细胞团,8 ~ 10 天强阳性细胞团处可见较明显的噬斑形成。

2.3 转染 293 细胞后细胞裂解粗提物中提取重组病毒 DNA,PCR 鉴定证实重组病毒基因组中含有目的基因 HBX(图 3)。

2.4 Western Blotting

pAdTrack - CMV - HBX 在构建时,在 HBX 基因与 pHAHA 基因相连,表达 HAHA - HBX 融合蛋白质,因此用抗 pHAHA 抗体做 Western Blotting,可间接说明 HBX 的表达。结果说明 HBX 在细胞中有较高的表达(图 4)。

3 讨 论

采用的腺病毒载体质粒上带有独立、完整的 GFP 表达系统,以 GFP 作为示踪标记,使重组病毒的包装、转染的状况可以直接观察,简便了操作。我们利用该系统,我们已经初步转染了 HBX 到 293 细胞,通过观察 GFP 的表达,以及通过 western blotting 分析,并且已经得到了 HBX 表达的阳性结果,证实了转染的效率和 HBX 表达。为该研究的完成奠定了基础。

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。本研究构建 E1 区缺失 HBX 的重组腺病毒载体,在 293 细胞中表达、包装,纯化病毒后,成功构建了携带 HBX 重组腺病毒。并且初步结果表明该重组病毒在体外能有效感染正常肝细胞株 L02,受感染细胞能表达重组 HBX 蛋白质(另文报道),为下一步进行研究 HBX 对病毒自身的复制与增殖以及宿主细胞中基因的表达与调控、细胞的凋亡与癌变等过程的机制研究建立了基础。

(下转第 278 页)

维普资讯 http://www.cqvip.com

基因疫苗是分子免疫学和分子生物学的新兴研究领域,由于制备简单、可持续诱导体液及细胞免疫反应等特点成为结核病疫苗研究中的优先领域和热点[1]。Ag85B、MPT64 属于 MTB 的分泌性蛋白,是结核病预防和治疗性疫苗研制的理想候选抗原[2]。Ag85B 又称 MPB59、α－Ag,与结核杆菌细胞壁的合成有关;Ag85B 具有多个 T 细胞表位,能诱导机体产生保护性的免疫应答从而抵抗 MTB 和 BCG 的攻击[3]。MPT64 也是重要的 T 细胞抗原,主要刺激特异性 CTL 形成和 IFN－γ 产生,同样也能诱导机体抵御 MTB 的攻击[4,5]。1999 年 Kamath 等发现,Ag85B、MPT64、ESAT－6 三种基因疫苗联合免疫较各自单独免疫的保护效果明显增强,由此可见 MTB 多个基因疫苗的联合应用可诱导更为有效的免疫保护作用[5]。

将多个携带不同基因的独立载体系统同时转染靶细胞,有着可以自由调节各表达载体比例的优点,但是其转染效率很低。而在同一载体上构建、表达多个基因可提高转染及表达效率,此种载体称为多基因共表达载体。多启动子表达载体由于其构建简便、方法可靠,是目前多基因共表达载体构建中最常用的方法,它将带有各自独立启动子的多个表达盒构建于一个载体上,能转录出多种不同的 mRNA 并翻译出不同的蛋白质[6]。pBudCE4.1 是一多启动子真核表达载体,含有双启动子、双克隆位点和双 polyA,可同时插入和表达两个外源基因。

我们将 MTB Ag85B、MPT64 基因同时克隆入 pBudCE4.1,构建共表达质粒 pBud85B－MPT,转染 COS－7 细胞,采用 RT－PCR 的方法在 mRNA 水平检测到 Ag85B、MPT64 基因的表达;为进一步对目标基因的表达进行检测,我们将纯化 Ag85B、MPT64 的原核表达产物,免疫动物制备多克隆抗体,在蛋白质水平检测 pBud85B－MPT 的表达情况为进一步研究 pBud85B－MPT 作为结核病基因疫苗的可能性打下基础。

参 考 文 献

[1] Tighe H, Corr M, Roman M, et al. Gene vaccination: plasmid DNA is more than just a blueprint[J]. Immunol Today, 1998;19(2):89－97.

[2] Orme IM, Mcmurray DN, Belisel JT. Tuberculosis vaccine development: recent progress[J]. Trends Microbiol, 2001;9(3):115－118.

[3] Huygen K, Content J, Denis O, et al. Imunogenocity and protective efficacy of tuberculosis DNA vaccine[J]. Nat Med, 1996;2(8):857－859.

[4] Wiker HG, Nagai S, Harboe M, et al. A family of cross－acting proteins secreted by Mycobacterium tuberculosis[J]. Scand J Immunol, 1992;36(2):307－319.

[5] Kamath AT, Feng CG, Macdonald M, et al. Differential protective efficacy of DNA vaccines expression secreted proteins of Mycobacterium tuberculosis[J]. Infect Immun, 1999; 67:1702－1707.

[6] 曹慧青,丁金凤. 多基因共表达载体的构建策略[J]. 国外医学分子生物学分册,2002;24(1):1－4.

(上接第 275 页)

参 考 文 献

[1] Arbuthnot P, Kew M. Hepatitis B virus and hepatocellular carcinoma[J]. Int J Exp Pathol, 2001;82(2):77－100.

[2] Koike K, Tsutsumi T, Fujie H, et al. Molecular mechanism of viral hepatocarcinogenesis[J]. Oncology, 2002;62 Suppl 1:29－37.

[3] Tong—chuan He, Shibin Zhou, Luis T. Da Csta, et al. A simplified system for generating recombinant adenoviruses[J]. Proc. Natl. Acad. SCi. USA, 1998; Vol. 95, pp. 2509－2514.