维普资讯 http://www.cqvip.com

文章编号:0253－3626(2003)03－0261－03

HBsAg 和 GM－CSF 融合表达质粒的构建

卿玉玲，赵嘉将，任　红

(重庆医科大学病毒性肝炎研究所,重庆　400010)

【摘　要】目的:构建乙肝 HBsAg 和 GM－CSF 的融合表达质粒,借助 GM－CSF 的免疫佐剂作用,提高乙型肝炎 DNA 疫苗的免疫效果。方法:用 PCR 方法分别从 pEcob6 和 pCD－hGM－CSF 中扩增出基因 S 和 GM－CSF,克隆到真核表达质粒 pcDNA3.1(＋)中,构建 pcDNA3.1－S 及融合表达质粒 pcDNA3.1－GM－CSF－S,然后以重组质粒转染真核细胞,研究重组质粒体外表达。结果:经酶切鉴定及 DNA 序列证实重组质粒构建正确,细胞转染试验表明重组质粒能在 COS－7 及 HepG－2 内表达。结论:乙肝 HBsAg 和 GM－CSF 的融合表达质粒构建成功,重组质粒能在真核细胞内表达。

【关键词】乙型肝炎;粒细胞、巨噬细胞集落刺激因子;质粒构建

【中国图书分类法分类号】R392－33　　【文献标识码】A　　【收稿日期】2002－08－29

Construction of plasmid coexpressing hepatitis B surface antigen and granulocyte macrophage－colony stimulating factor

QING Yuling, et al

(*Institute of Viral Hepatitis, Chongqing Medical University*)

【Abstract】 *Objective*: To construct plasmid coexpressing GM－CSF and HBsAg, enhance hepatitis B DNA vaccines antivirus effect. *Methods*: (1) The HBsAg－encoding fragment and GM－CSF－encoding fragment were created by PCR amplification from pEcob6 and pCD－hGM－CSF respectively, then were cloned into plasmid pcDNA3.1(＋), pcDNA3.1－S and pcDNA3.1－GM－CSF (without stop codon) were constructed. (2) HBsAg DNA fragment (with stop codon) was amplified by PCR, then was subcloned into plasmid pcDNA3.1－GM－CSF. *Results*: Recombinant pcDNA3.1－S and pcDNA3.1－GM－CSF－S were confirmed by using restriction enzymes and DNA sequencing. HBsAg was detected in the lysates and supernatants from cells transfected with pcDNA3.1－S and in the lysates from cells transfected with pcDNA3.1－GM－CSF－S. *Conclusion*: Two eukaryotic expression plasmids were constructed successfully and could express HBsAg.

【Key words】 DNA vaccine; HBsAg; GM－CSF; pcDNA3.1; Cloning

乙型肝炎病毒(Hepatitis B Virus, HBV)感染能导致急性、慢性肝炎,与肝硬化及肝细胞癌密切相关,是危及全球人类健康的疾病。近年来由于 α 干扰素的合理应用及核苷类似物的开发与应用,在乙肝的治疗方面已取得了较大的进展,但治疗效果不够理想。DNA 疫苗因能诱导特异性细胞免疫应答,且临床试验证明其具有很好的安全性,但作为治疗性疫苗其免疫效果尚需进一步提高。粒细胞、巨噬细胞集落刺激因子(granulocyte macrophage colony stimulating factor GM－CSF)能通过多种途径,在多个环节参与免疫调节,是最有前景的免疫佐剂之一。Sedegah[1－2]等的试验研究表明用 DNA 疫苗与质粒 GM－CSF 共注射与单独用 DNA 疫苗注射比较,前者抗体水平、IFN－γ 分泌水平及 CTL 活性均较后者高。Chow[3]等用 HBV DNA 疫苗与编码 GM－CSF 的质粒联合注射小鼠,使 Th1 细胞增殖,CTL 活性增强,并使 T 细胞反应增强 2－3 倍。Haddad[4]等的研究表明 pGM－CSF 的免疫增强作用可能与 APC 充实到注射位点有关。本研究构建 HBsAg 及 GM－CSF 的基因融合真核表达载体,拟通过基因融合技术增强乙肝 DNA 疫苗的免疫效果。

1　材料和方法

作者简介:卿玉玲(1963－),女,博士,
主要研究方向:病毒性肝炎治疗的基础研究。

基金项目:重庆市科委应用基金资助项目(渝科发计字[2001]74号)。

维普资讯 http://www.cqvip.com

1.1 主要试剂

T_4DNA 连接酶(Promega 公司),限制性内切酶 BamH Ⅰ、XhoⅠ、HindⅢ(BioLabs),PCR 系统(内含 TaqDNA 聚合酶、dNTP、buffer、$MgCl_2$,上海生工),DNA molecule marker (上海生工),PCR 产品纯化试剂盒、胶回收试剂盒、质粒小量提取试剂盒(上海华舜生物有限公司)。

1.2 菌种和质粒

pEcob6(含双拷贝乙肝病毒 adw 亚型基因全序列),为本所构建和保存。pCD-hGM-CSF(含编码人 GM-CSF144 个氨基酸残基的 DNA 序列),由中科院输血研究所馈赠。质粒 pcDNA3.1(+)及 E.coli JM109 为本所保存。

1.3 PCR 扩增 HBsAg 及 GM-CSF 目的基因

(1)质粒 pcDNA3.1-S 引物:

上游引物 SP1:5′GCAAGCTTAAC ATG GAGAACAT-CA 3′含 *Hind* Ⅲ酶切位点及起始密码。

下游引物 SP2:5′GCCTCGAGTTATGGTAACAGCG-GTA 3′含 XhoⅠ酶切位点及终止密码子。

(2)融合质粒(pcDNA3.1-GM-CFS-S)N 端引物

上游引物 GP1:5′GCAAGCTTCTCTGGAGGATGTGG3′含 Hind Ⅲ酶切位点及起始密码。

下游引物 GP2:5′ATGGATCCTCCTGAACCCTCCCAGC AGTCAAA 3′含 BamHⅠ酶切位点和基因接头 GGT TCA GGA GGA TCC,引物不含终止密码子。

(3)融合质粒(pcDNA3.1-GM-CFS-S)C 端引物

上游引物 SP3:5′GCGGATCCGAGAACATCACATCAG G 3′含 BamHⅠ酶切位点,引物不含起始密码子。

下游引物 SP2:同前

以 pEcob6 及 pCD-hGM-CSF 作为模板,以上述引物以 PCR 方法扩增出目的基因,反应结束后取 1.5μl PCR 产物于 1.0%的琼脂糖胶中电泳,证实 PCR 产物与预期 DNA 片段大小相符后,进行 PCR 纯化后备用。

1.4 构建质粒 pcDNA3.1-S

以引物 SP1 和 SP2 扩增 S 目的基因,对扩增片段及 pcDNA3.1(+)进行 HindⅢ和 XhoⅠ双酶切,置 1%琼脂糖凝胶电泳,胶回收大片段。以 T_4 DNA ligase 1 μl 连接酶切产物,4℃过夜,连接产物转化 JM109 感受态细胞,筛选重组质粒,并进行酶切及测序鉴定。

1.5 构建质粒 pcDNA3.1-GM-CSF-S

先以引物 GP1 和 GP2 扩增出融合质粒 N 端的 GM-CSF 基因,对扩增片段及 pcDNA3.1(+)进行 HindⅢ和 BamHⅠ双酶切,克隆到 pcDNA3.1(+)上构建质粒 pcDNA3.1-GM-CSF(不含终止密码)。再以引物 SP3 和 SP2 扩增出融合质粒 C 端的 S 基因,对扩增片段及 pcNDA3.1-GM-CSF 进行 BamHⅠ和 XhoⅠ双酶切,以 T_4 DNA ligase 1μl 连接酶切产物,连接产物转化 JM109 感受态细胞,筛选重组质粒 pcDNA3.1-GM-CSF-S(含终止密码),并进行酶切及测序鉴定。

2 结 果

2.1 重组质粒 pcDNA3.1-S 的鉴定

以 XhoⅠ和 HindⅢ对重组质粒 pcDNA3.1-S 进行双酶切,获 S 基因片段大小约 660bps,与预期片段大小相符,酶切产物电泳结果见图 1。

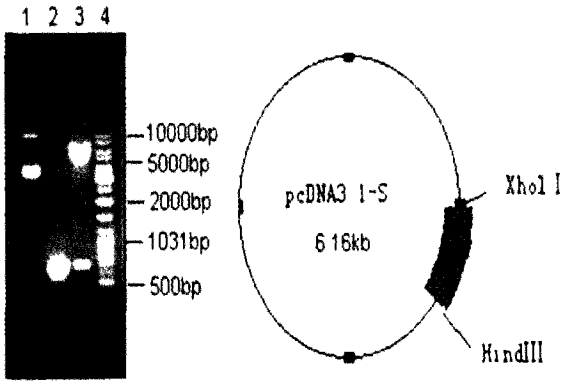


图 1 质粒 pcDNA3.1-S PCR 及酶切鉴定

1. pcDNA3.1-S 2. PCR of S gene 3. XhoⅠ and Hind Ⅲ digestion of pcDNA3.1-S 4. DNA molecular Marker

2.2 pcDNA3.1-GM-CSF-S 的酶切鉴定结果

分别以 XhoⅠ和 HindⅢ、HindⅢ and BamHⅠ和 XhoⅠ and BamHⅠ对 pcDNA3.1-GM-CSF-S 进行双酶切消化,所得基因片段大小与预期片段大小相符,酶切产物电泳结果见图 2。

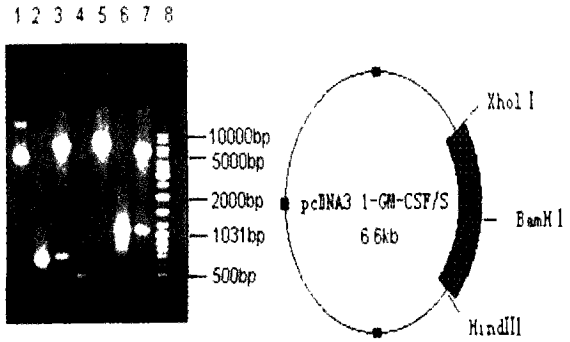


图 2 质粒 pcDNA3.1-GM-CSF-S PCR 及酶切鉴定

1. pcDNA3.1-GM-CSF-S 2. PCR of S gene 3. Xhol and BamHⅠ digestion of pcDNA3.1-GM-CSF-S 4. PCR of GM-CSF gene 5. HindⅢ Ⅰ and BamHⅠ digestion of pcDNA3.1-GM-CSF-S 6. PCR of GM-CSF-S gene 7. XhoⅠ and HindⅢ digestion of pcDNA3.1-GM-CSF-S 8. DNA molecular Marker

以上两个质粒经送上海生工测序鉴定,证实插入片段与片段标准碱基序列完全一致。

维普资讯 http://www.cqvip.com

2.3 重组质粒 DNA 转染细胞上清及细胞裂解液中 HBsAg 的表达

2.3.1 重组质粒 DNA 在 HepG2 细胞中的表达 ELISA 检测结果表明 pcDNA3.1-S 转染细胞培养上清及裂解液 HBsAg 均为阳性;pcDNA3.1-GM-CSF-S 转染细胞上清中 HBsAg 为阴性,细胞裂解液中 HBsAg 为阳性;空质粒 pcDNA3.1 转染细胞培养上清和细胞裂解液 HBsAg 均为阴性,结果见表 1(结果为三次转染平均值)。

表 1 重组质粒转染的 HepG2 细胞中的 HBsAg 的表达($\bar{x} \pm s$ $n=3$)

Groups	Supernatants A450nm($\bar{x} \pm s$)	P/N	Lysates A450nm($\bar{x} \pm s$)	P/N
PcDNA3.1-S	0.151±0.033	3.02	0.118±0.006	2.36
PcDNA3.1-GM-CSF-S	0.076±0.023	1.54	0.393±0.061	7.86
PcDNA3.1	0.037±0.02	0.74	0.035±0.026	0.7

阴性对照 A 450nm=0.045,P/N 值<2.1 为阴性;P/N >2.1 为阳性

表 2 重组质粒转染的 COS-7 细胞中 HBsAg 的表达($\bar{x} \pm s$, $n=3$)

Groups	Supernatants A450nm($\bar{x} \pm s$)	P/N	Lysates A450nm($\bar{x} \pm s$)	P/N
PcDNA3.1-S	0.113±0.018	2.26	0.137±0.013	2.74
PcDNA3.1-GM-CSF-S	0.039±0.014	0.78	0.463±0.054	9.26
PcDNA3.1	0.03±0.024	0.6	0.027±0.015	0.54

阴性对照 A 450nm=0.032,P/N 值<2.1 为阴性;P/N >2.1 为阳性

2.3.2 重组质粒在 COS-7 细胞中的表达 ELISA 检测结果表明 pcDNA 3.1-S 转染细胞培养上清及裂解液 HBsAg 均为阳性;pcDNA3.1-GM-CSF-S 转染细胞培养上清 HBsAg 为阴性,细胞裂解液 HBsAg 为阳性;空质粒 pcDNA 3.1 转染的细胞培养上清和细胞裂解液 HBsAg 均为阴性,结果见表 2(结果为三次转染平均值)。

3 讨 论

本研究选择编码五肽 G-S-G-G-S 的基因作为基因连接子,是因为甘氨酸是一种最简单的氨基酸,具有可及构象的广泛性,有利于运动,常出现在蛋白质中运动性大的区域,如绞链区;且体积小的特点又使其利于堆积,不易产生碰撞;丝氨酸则常出现在转角结构中。因而本研究设计由甘氨酸和丝氨酸组成活动度好的蛋白质接头,尽可能使 GM-CSF 和 HBsAg 折叠成天然三维结构,以适合与各自的受体结合点相互作用;编码五肽 G-S-G-G-S 的 DNA 序列中 GGA TCC 与 BamH Ⅰ 酶切位点的 DNA 序列相同,故本研究选用质粒 pcDNA3.1,将其多克隆酶切位点中的 BamH 酶切位点,设计在基因接头内,以利于鉴定和操作;本文选择细胞因子构建融合基因,拟通过细胞因子的作用,提高 DNA 疫苗诱导机体免疫应答的能力。目前大量试验已证明 GM-CSF 能通过活化 DC 等抗原提呈细胞,从而增强 DNA 疫苗的免疫效果。小鼠骨髓来源的 DC 能在 GM-CSF 的刺激下扩增[5],Haddad[4]等的研究发现 pGM-CSF 能诱导 APCs 的局部浸润,在注射 pGM-CSF 后 3~5 天观察到 DC 细胞 CDllc 印迹,注射后 1~14 天观察到巨细胞 CDllb、Mac-3、IA^d、E^d 及粒细胞 GR-1 印迹。Rakhmilevich[6]等的研究表明 GM-CSF DNA 与 gp100 共注射后,可减少 gp100 用量的情况下达到对肿瘤挑战保护作用。体外细胞转染试验表明,pcDNA3.1-S 表达蛋白为分泌型蛋白,可能与 HBsAg 主蛋白的一级结构中含有具有分泌功能的信号肽序列有关(signal peptide sequence),虽然 HBsAg 主蛋白中的信号肽不同于一般的专职信号肽,不存在由内壁上的信号肽酶将信号肽切下后将不含信号肽的蛋白质分泌到细胞外这种切割过程[7],在 pcDNA3.1-GM-CSF-S 中虽含有 GM-CSF 的 51 个碱基的专职信号肽序列,但却不能将表达的 HBsAg 分泌到细胞胞外,其原因有待进一步探讨。Chow[8]等的试验表明质粒表达蛋白能否分泌到胞外并不影响其免疫效果,我们将在今后的实验中,用上述重组质粒免疫小鼠,研究重组质粒表达及分泌蛋白与质粒免疫效果的关系。

参 考 文 献

[1] Sedegah M, Weiss W, Sacci JB Jr, et al. Improving protective immunity induced by DNA-based immunization: priming with antigen and GM-CSF-encoding plasmid DNA and boosting with antigen-expressing recombinant poxvirus [J]. J Immunol, 2000; 164(11): 5905-5912.

[2] Burger JA, Mendoza RB, Kipps TJ, Plasmids encoding granulocyte-macrophage colony-stimulating factor and CD154 enhance the immune response to genetic vaccines [J].

(下转第 266 页)

维普资讯 http://www.cqvip.com

用,在本实验中我们针对 RSV 基因组 RNA NS1 基因和 M2mRNA 设计了两种 AODN,用脂质体转染的方法将其导入细胞内,观察特异 AODN 抗 RSV 效应。首先以不同感染复数的 RSV 感染 9HTE 细胞,发现当 moi 在 0.1 以上时,细胞培养 5 天后大部分死亡,而感染复数为 0.01 时,细胞病变范围在 50%～75% 左右。在同一感染量(moi = 0.01)的 RSV 感染细胞后,分别加入两种反义核酸,浓度分别为 1μmol/L,5μmol/L,10μmol/L,15μmol/L,结果发现随着 AODN 浓度的增加,细胞存活率也逐渐增高,在 AODN 浓度为 15μmol/L 时显示出较强的抗病毒作用,细胞存活率分别为 74.94% 和 71.95%。

在研究中对 AODN 进行全硫代修饰,将寡核苷酸内极性的磷酸二脂键用硫原子修饰,转变为中性的磷酸二脂键,与天然的寡核苷酸相比具有更强的抗核酸酶水解和激活 Rnase H 的作用,是目前最为理想的反义核酸骨架修饰手段之一[6]。

本研究结果表明设计合成的两种 AODN 均显示出较强的抗 RSV 效应,同时也佐证了呼吸道合胞病毒的 NS1 基因和 M2 基因在病毒复制过程中具有重要作用。

参 考 文 献

[1] Shay DK, Holman RC, Newman RD, et al. Bronchiolitis-associated hospitalization among US children [J]. JAMA, 1999; 282(15): 1440-1443.

[2] Saghir A, Sudhir A. In vivo studies with antisence oligonucleotides [J]. Trends Pharmacol Sci, 1997; 18: 12-18.

[3] Nichols WG, Boeckh M. Recent advance in the therapy and prevention of CMV infection[J]. J Clin Virol, 2000; 16: 25-40.

[4] Oberbauer R. Not nonsence but antisence - application of antisence nucleotides in different fields of medicine [J]. Wein Klin Wochenschr, 1997; 109(2): 40-46.

[5] Player MR, Barnard DL, Torrence PF. Potent inhibition of respiratory syncytial virus replication using a 2-5A-antisence chimera targeted to signals within the virus genomic RNA [J]. Proc Natl Acad Sci USA, 1998; 95(15): 8874-8879.

[6] 储 淳,罗天学. 反义核酸的骨架修饰及其应用[J]. 国外医学分子生物学分册, 2000; 22(2): 115-120.

(上接第 263 页)

Vaccine, 2001; 19(15-16): 2181-2189.

[3] Chow YH, Chiang BL, Lee YL, et al. Development of Th1 and Th2 populations and the nature of immune responses to hepatitis B virus DNA vaccines can be modulated by codelivery of various cytokine genes [J] J Immunol, 1998; 160(3): 1320-1329.

[4] Haddad D, Ramprakash J, Sedegah M, et al. Plasmid vaccine expressing granulocyte macrophage-colony stimulating factor attracts infiltrates including immature dendritic cells into injected muscles [J]. J Immunol, 2000; 164: 3102-3111.

[5] Myordomo JI, Zorina WJ, Storkus L, et al. Bone marrow-derived dendritic cells pulsed with synthetic tumour peptides elicit protective and therapeutic antitumor immunity [J] Nat Med, 1995; 1: 1297.

[6] Rakhmilevich AL, Imboden M, Hao Z, et al. Effective particle-mediated vaccination against mouse melanoma by coadministration of plasmid DNA encoding Gp100 and granulocyte macrophage-colony stimulating factor [J]. Clin Cancer Res, 2001; 7(4): 952-961.

[7] 成 军,杨守纯. 现化肝炎病毒分子生物学[M],北京:人民军医出版社, 1997: 263.

[8] Chow YH, Huang WH, Chi WK, et al. Improvement of hepatitis B virus DNA vaccine by plasmids coexpressing hepatitis B surface antigen and interleukin-2[J]. J Virol, 1997; 71(1): 169-178.