维普资讯 http://www.cqvip.com

文章编号：0253-3626(2001)02-0122-04

乙肝HBsAg和结核杆菌HSP70融合表达载体的构建

梁增伟，李用国，任 红

（重从医科大学病毒性肝炎研究所 重庆 400010）

【摘 要】目的：构建乙肝HBsAg和结核杆菌HSP70融合表达质粒。方法：用PCR方法从结核杆菌H37Rv基因组中扩增出结核杆菌HSP70基因序列，应用T-A克隆技术，克隆到质粒pGEM-T vector，经DNA测序证实基因碱基无误后，亚克隆到真核表达质粒pcDNA3.1（+），构建成pcDNA3.1-HSP70重组质粒。然后，再用PCR方法，从质粒pEcob6中扩增出HBsAg基因，并克隆到质粒pcDNA3.1-HSP70，将HBsAg基因的C端与HSP70基因N端连接，构建HBsAg和HSP70融合表达质粒pcDNA3.1-S-HSP70。结果：经酶切鉴定和DNA测序证实重组质粒构建正确。结论：乙肝HBsAg和结核杆菌HSP70融合表达载体构建成功。

【关键词】乙型肝炎表面抗原；结核杆菌；热休克蛋白70；克隆；pcDNA3.1

【中国图书分类法分类号】R373.2+1 【文献标识码】A 【收稿日期】2000-08-28

Construction of an eukaryotic expression vector pcDNA3.1-S-HSP70

LIANG Zeng-wei, et al

(Institute of Viral Hepatitis, Chongqing Medical University)

【Abstract】 *Objective*: To construct an eukaryotic expression plasmid containing HBsAg and TB.Hsp70. *Methods*: By PCR and T-A cloning techniques, the full length gene of TB.Hsp70 from genome of Mycobacterium tuberculosis H37Rv was amplified and cloned directly into pGEM-T vector ,then the recombinant plasmid was digested with BamH I and EcoR I , and was subcloned into plasmid pcDNA3.1(-) (pcDNA3.1-HSP70).The HBsAg gene (without stop codon) was amplified from plasmid pEcob6 by PCR . After digested with Hind Ⅲ and BamH I , the PCR product was cloned into plasmid pcDNA3.1-HSP70. *Results*: Restriction enzyme digesting and DNA sequencing confirmed that the recombinant eukaryotic expression plasmid containing HBsAg and mycobacterium tuberculosis HSP70 (pcDNA3.1-S-HSP70) had been constructed correctly. *Conclusion*: An eukaryotic expression plasmid pcDNA3.1-S-Hsp70 has been constructed successfully.

【Key words】 HBsAg; Mycobacterium tuberculosis; Heat shock protein-70; pcDNA3.1; Cloning

乙型肝炎病毒（hepatitis B virus,HBV）感染是一个严重的公共卫生问题，全球约有3.5亿携带者，其中超过30%将发展成为慢性肝炎、肝硬化或原发性肝细胞癌[1]。目前，预防HBV感染最安全和有效的方法是接种乙肝疫苗。但目前使用的商售乙肝疫苗仍存在一些明显的缺陷，其中，一部分接种者不产生应答或应答低下，达不到免疫预防的效果，为此，研制出更加安全和有效的乙肝疫苗成为一个急待解决的问题。Wolff于1990年发现DNA免疫后，人们普遍认为一次新的疫苗革命即将来临。但随着研究深入，人们发现DNA疫苗也存在很多问题需要完善。各国学者对乙肝DNA疫苗进行了大量的研究，并取得了一定的研究成果，但存在着接种所需的质粒DNA的量较大，诱导产生的保护性免疫效果较低等缺点。为解决这些问题，各国学者进行了各种尝试。

结核杆菌热休克蛋白70（Heat shock protein 70，HSP70）是结核杆菌的主要抗原成分之一，其具有免疫优势抗原（immunodominant antigens）的特性，可诱导和增强机体体液免疫和细胞免疫的发生，并具有载体分子（carrier molecule）效应和免疫佐剂性质[2,3]。因此，有学者建议用其基因与一些传染病或寄生虫病病原体的抗原基因融合表达，以制备融合疫苗，借助HSP70的载体分子效应和佐剂作用，以提高病原体抗原的免疫原性和疫苗的免疫预防效果。本研究构建HBsAg和结核杆菌HSP70融合的真核表达载体，为进一步研究结核杆菌HSP70在乙肝DNA疫苗中的作用打基础。

作者介绍：梁增伟（1966- ），男，广西人，讲师，博士生，主要研究方向：乙型肝炎的发病机理和乙肝疫苗。

维普资讯 http://www.cqvip.com

1 材料和方法

1.1 主要试剂

T4 DNA连接酶、限制性内切酶BamH Ⅰ、EcoR Ⅰ、Pst Ⅰ、HindⅢ、Xba Ⅰ、高保真PCR系统、高纯度PCR模板提取试剂盒（德国Boehringer Mannheim公司）。胰蛋白胨、酵母浸出液（Oxoid公司）、琼脂糖、DNA Marker（上海生工）。PCR产物纯化试剂盒、胶回收试剂盒（上海华舜）。

1.2 菌种和质粒

结核杆菌H37Rv由重庆医科大学第二临床学院徐波博士提供；E.coli JM109为本所保存。pGEM-T Vector System (Promega公司)、质粒pcDNA3.1（+）为本所保存，质粒pEcob6（含乙肝病毒adw双拷贝全基因序列）由任红教授构建和提供。

1.3 PCR扩增HSP70目的基因

上游引物：

5' GCCCGGGATCCATGGCTCGTGCGGTCGGGAT 3'

含酶切位点BamH Ⅰ和起始密码ATG；

下游引物：

5' CAGCGAATTCCTTGTCAGTGACGGTTACCT 3'

含酶切位点EcoR Ⅰ，下游引物在HSP70的ORF终止密码之后；由上海生工公司合成。按高纯度PCR模板抽提试剂盒抽提结核杆菌基因组作为模板；按高保真PCR系统建立PCR反应体系，在PCR仪（PE2400）上进行PCR扩增目的基因。反应结束后取1.5μl产物在1.0%的琼脂糖凝胶中电泳，证实扩增出与预期大小相应的DNA片段后，进行PCR产物纯化。

1.4 HSP70 PCR产物T-A克隆，构建pGEM-HSP70

按pGEM-T Vector System建立反应体系：2×buffer 5μl、pGEM-T Vector 1μl、PCR product 3μl、T4 DNA ligase 1μl；4℃过夜。连接产物转化JM109感受态细胞、蓝-白斑筛选、摇菌，提质粒，经Pst Ⅰ酶切鉴定后，送上海基康公司测序。具体方法见文献[4]。

1.5 pcDNA3.1-HSP70的构建

pcDNA3.1（+）空质粒BamH Ⅰ、EcoR Ⅰ酶切，回收大片段。质粒pGEM-HSP70，BamH Ⅰ、EcoR Ⅰ酶切，回收小片段；连接反应体系：pcDNA3.1大片段1μl、pGEM-HSP70小片段4μl、10×Buffer 1μl、T4DNA连接酶1μl、去离子水3μl，共10μl。4℃过夜。第二天取连接产物转化JM109感受态细胞，并筛选出重组质粒，BamH Ⅰ、EcoR Ⅰ酶切鉴定。具体方法见文献[4]。

1.6 PCR扩增HBsAg目的基因

上游引物：

5' AGCTAAGCTTTCAATCTCCGCGAGGACTG 3'

含酶切位点HindⅢ，引物在ORF起始密码之前；

下游引物：

5' GTCAGGATCCAACAGCGGTATAAAGGGACT 3'

含酶切位点BamH Ⅰ，于终止密码之前；由上海生工公司合成。以质粒pEcob6为模板，在PCR仪（PE2400）上进行PCR扩增目的基因。反应结束后取1.5μl产物在1.7%的琼脂糖凝胶中电泳，证实扩增出与预期大小相应的DNA片段后，进行PCR产物纯化。

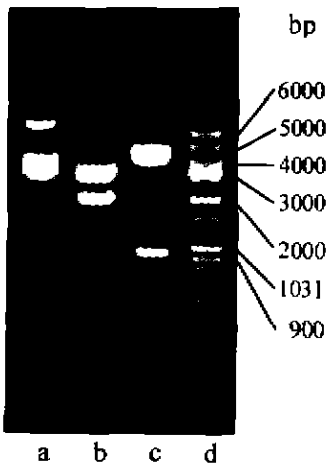
1.7 质粒pcDNA3.1-S-HSP70的构建

HBsAg PCR产物Hind Ⅲ和BamH Ⅰ酶切并纯化；pcDNA3.1-HSP70质粒HindⅢ和BamH Ⅰ酶切，回收大片断。连接反应体系：pcDNA3.1-HSP70大片段1μl、HBsAg PCR产物4μl、10×Buffer 1μl、T4DNA连接酶1μl、去离子水3μl，共10μl。4℃过夜。第二天取连接产物转化JM109感受态细胞，并筛选出重组质粒、Xba Ⅰ及HindⅢ和EcoR Ⅰ酶切鉴定。质粒送上海基康公司测序。具体方法见文献[4]。

2 结 果

2.1 结核杆菌HSP70 PCR产物T-A克隆和酶切鉴定

将PCR产物克隆入pGEM -T vector后，提取重组质粒、Pst Ⅰ酶切鉴定，由于质粒pGEM于73bp处有一Pst Ⅰ酶切位点，而HSP70于1051bp处有一Pst Ⅰ酶切位点，目的基因HSP70插入方向的不同，Pst Ⅰ可切出一条914bp（正向）或1088bp（反向）的片段；经Pst Ⅰ酶切鉴定，与预期的结果相符，切出一条约914bp片段；同时，用BamH Ⅰ、EcoR Ⅰ酶切鉴定，切出一条约2.0kb的目的基因片段（见图1），重组质粒pGEM-HSP70经上海基康公司测序，其结果与HSP70标准碱基序列完全一致。



a. pGEM-HSP70

b. pGEM-HSP70 digested with Bam H I and EcoR I

c. pGEM-HSP70 digested with Pst I

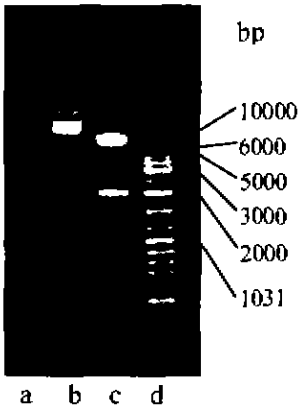
d. molecular marker

图1 pGEM-HSP70酶切鉴定

2.2 重组质粒pcDNA3.1-HSP70酶切鉴定

维普资讯 http://www.cqvip.com

BamH I 、EcoR I 消化重组质粒pGEM-HSP70，切下HSP70目的基因，亚克隆到pcDNA3.1(+)，提取质粒，再用BamH I 和EcoR I 酶切鉴定，切出约2.0kb的插入片段和5.4kb的载体片段，表明亚克隆成功，结果见图2。

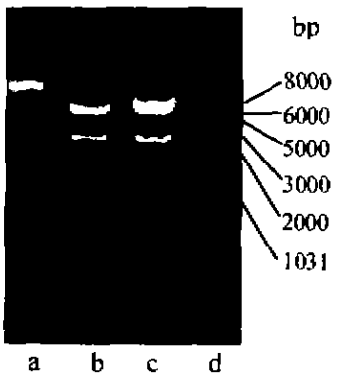


a. pcDNA3.1(-)
b. pcDNA3.1-HSP70
c. pcDNA3.1-HSP70 digested with B am H I and EcoR I
d. molecular marker

图2 pcDNA3.1-HSP70酶切鉴定

2.3 质粒pcDNA3.1-S-HSP70 酶切鉴定

重组质粒经Hind Ⅲ和EcoR I 酶切，切下约2600bp的片段，与预期切下的插入片段S+HSP70（2622bp）大小相符；S基因于93bp处有一Xba I 酶切位点，pcDNA3.1（+）于992bp处有一Xba I 酶切位点，Xba I 单酶切，切下一约2600bp片段，与预期切下2568bp 的片段相符，见图3。重组质粒经上海基康公司测序，证实重组质粒构建完全正确。



a. pcDNA3.1-S-HSP70
b. pcDNA3.1-HSP70 digested with Hind III and EcoR I
c. pcDNA3.1-HSP70 digested with Xba I
d. molecular marker

图3 pcDNA3.1-S-HSP70酶切鉴定

2.4 重组质粒pcDNA3.1-S-HSP70图谱

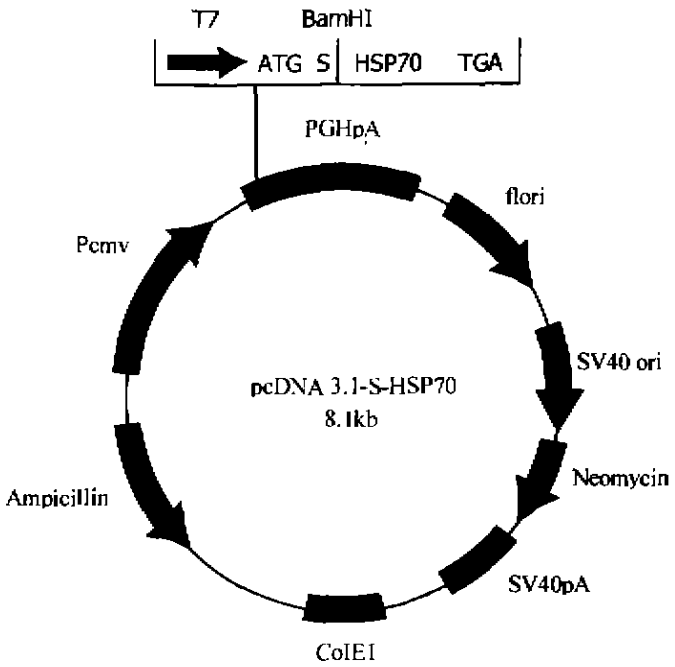


图4 重组质粒pcDNA3.1-S-HSP70图谱

3 讨 论

DNA疫苗的出现，普遍认为是传染病疫苗的第三次革命，因为DNA疫苗在体内不仅可诱导体液免疫的发生、还可诱导细胞免疫反应，故认为DNA疫苗不仅可作为预防性疫苗、还可作为治疗性疫苗，用于传染病的防治。在动物实验中，乙肝DNA疫苗显示了较好的免疫效果，其可诱导小鼠和大猩猩HBsAg特异性CTL反应和高滴度的抗-HBs产生[5~7]。后来，进一步研究发现，在动物实验中，与乙肝DNA疫苗同时注射一些细胞因子的真核表达质粒，如细胞因子GM-CSF、IFN-γ等，或B7-1共刺激分子的表达质粒，可显著提高血液中抗-HBs滴度和增强特异性CTL反应[7]。Chow .YH 等构建IL-2和HBsAg共表达载体，进行DNA免疫，也发现IL-2和HBsAg在同一质粒上共表达，可提高DNA疫苗的免疫效果[8]。

结核杆菌HSP70是一种非常强的抗原，具有免疫优势抗原的特性，可诱导和增强机体体液免疫和细胞免疫的发生，并具有载体分子的效应，在无免疫佐剂的情况下，能增强与之相结合的多肽或寡糖的免疫原性[9,10]。将其它传染病病原体的保护性抗原亚单位与结核杆菌HSP70 共价结合，以增强亚单位

维普资讯 http://www.cqvip.com

抗原的免疫原性，这在传染病疫苗的研制中具有重要意义。Young等[11]构建重组的结核杆菌HSP70表达载体；并在HSP70的N端融合进HIV-1 P24蛋白基因，结果发现，此表达载体表达的HIV-1 P24-HSP70融合蛋白，在无佐剂的情况下，免疫小鼠能增强小鼠对P24的免疫应答；并证明P24与HSP70共价结合是HSP70增强机体对P24免疫应答的基础。结核杆菌HSP65也有相似的作用。但结核杆菌HSP在DNA疫苗中的佐剂作用和载体分子效应未见有报道。

本研究通过PCR克隆技术将HBsAg和结核杆菌HSP70基因克隆入真核表达质粒pcDNA3.1（－），使HBsAg基因的C端与HSP70基因的N端相连接，构建成真核表达质粒pcDNA3.1-S-Hsp70，使HBsAg和HSP70融合表达。真核表达质粒pcDNA3.1（－）含CMV启动子，Amp+、neo+抗性基因及BGH polyA加尾信号和SV40早期启动子，可在大多数哺乳动物细胞中稳定表达。这为进一步研究结核杆菌HSP70在乙肝DNA疫苗中的作用打下了基础。

参 考 文 献

[1] Maynard JE, Kane MA, Hadlert SC. Global control of hepatitis B through vaccination: the role of hepatitis B vaccine in the Expanded Programme on Immunization[J]. Rev Infect Dis. 1989;2(suppl.3)s:574-575.

[2] Perraut R, Lussow AR, Gavoille S, et al. Successful primate immunization with peptides conjugated to purified protein derivative or mycobacterial heat shock proteins in the absence of adjuvants[J]. Clin.Exp. Immunol, 1993;93:382.

[3] Bonorino C, Nardi NB, Zhang XH, et al. Characterstics of the strong antibody response to mycobacterial HSP70: A primary, T cell-dependent IgG response with no evidence of natural primming or γ δ T cell involvement[J]. J Immunol, 1998;161:5210-5216.

[4] J.萨姆布鲁克，E.T.佛理奇，T.曼尼阿蒂斯. 分子克隆实验指南[M]. 科学出版社，1986:16-69.

[5] Bohm W, Kuhrober A, Paier T, et al. DNA vector constructs that prime hepatitis B surface antigen-specific cytotoxic T lymphocyte and antibody responses in mice after intramuscular injection[J]. J Immun Methods. 1996;193:29-40.

[6] Davis HL, Michael JM, John LG, et al. DNA vaccine for hepatitis B:Evidence for immunogenicity in chimpanzees and comparison with other vaccine[J]. Pron Natl Acad Sci USA. 1996;93:7213-7218.

[7] Davis HL, Cynthia LBM, Maryline M, et al. DNA-based immunization against hepatitis B surface antigen(HBsAg) in normal and HBsAg-transgenic mice[J]. Vaccine. 1997;15(8): 849-852.

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

[9] Barrios C, Lussow AR, van Embden J, et al. Mycobacterial heat shock proteins as carrier molecules. Ⅱ:The use of the 70-kDa mycobacterial heat shock protein as a carrier for conjugated vaccines can circumvent the need for adjuvants and Bacillus Calmette-Guerin priming[J]. Eur.J Immunol. 1992;22:1365-1372.

[10] Anthony LS, Wu H, Sweet H, et al. Primming of CD_8^+ CTL effector cells in mice by immunization with a stress protein-influenza virus nucleoprotein fusion molecule[J] .Vaccine. 1999;28.17(4):373-383.

[11] Young RA, Suzue K. Adjuvant-free HSP70 fusion protein system elicits humoral and cellular immune responses to HIV-1 P24[J]. J. Immunol, 1996;156:873-879.