维普资讯 http://www.cqvip.com

重组丙型肝炎病毒基因载体的构建与表达

病毒性肝炎研究所 周卫平* 张大志 张定凤
浙江医科大学传染病研究所 刘 勇

提 要 应用基因重组技术，从载体CDZ2酶切获得1.73kb DNA片段(含1693bp的HCV结构区cDNA，其特异性已为southern blot证实)。将HCV cDNA片段插入载体pcDNA3，构建HCV重组体。经在大肠杆菌中表达，筛选、酶切分析，获得重组HCV(pcDNA3－HCV)。以重组质粒转染H9细胞(CD$_4^+$淋巴细胞系)，用G418筛选出抗性细胞。经RT－PCR、dot－ELISA验证表明，pcDNA3－HCV能在H9细胞中进行复制、转录和表达。这为丙型肝炎发病机理的研究提供了一个有用模型。

关键词 丙型肝炎病毒；转染；基因重组；表达
中图分类号 R512.33

慢性病毒性肝炎是危害我国人民身体健康的常见病、多发病。丙型肝炎病毒(Hepatitis C virus，HCV)是慢性肝炎的主要病原体之一。为研究HCV致肝炎慢性化的机理，拟构建重组HCV基因载体，转染H9淋巴细胞(CD$_4^+$T淋巴细胞)株，建立HCV体外模型。

1 材料和方法

1.1 主要材料

1.1.1 DNA载体 1.CDZ2：定向插入1693bp HCV cDNA片段，主要为HCV结构基因，核苷酸序号(nt)317～2009，含HCV核心区的启动子(ATG)，基因型为HCV－J型，德国Lubeck医科大学微生物研究所惠赠。2.哺乳动物细胞表达载体：pcDNA3，具氨苄青霉素及新霉素抗性，能在原核及真核细胞穿梭表达。北京医科大学基础医学研究所惠赠。

1.1.2 PCR引物 HCV引物：根据HCL－J基因型序列设计，其正、负链nt序号为493～521和682～710，扩增产物为209bp。

1.1.3 限制性内切酶EcoRl、Bam H1、Xba1及质粒提取药盒、地高辛(DIG)核酸检测试剂盒购自德国Boehringer mannherm公司。

1.1.4 H9细胞株(人CD$_4^+$淋巴细胞系)和JM109菌株：德国Lubeck医科大学赠送。

1.2 实验方法

1.2.1 重组体的构建和筛选

重组HCV表达载体构建过程如图1所示。

用JM101大肠杆菌扩增后，常规方法纯化CDZ2质粒，以限制性内切酶EcoR1消化CDZ2质粒，电泳分离纯化1693bp HCV cDNA片段。切开pcDNA3质粒(EcoR1酶切位点)，去磷酸化处理，用T4连接酶插入169bp HCVcDNA片段，将重组质粒转化到JM101大肠杆菌，用含氨苄青霉素LB培养基扩增筛选。抽提质粒，用限制性内切酶Bam H1、Xba1酶切鉴定分析，将正确插入的重组体命名为pcDNA3－HCV。

1.2.2 在H9细胞的转染与表达 采用常规的磷酸钙转染法。将pcDNA3－HCV制备DNA－磷酸钙沉淀物，加入内有1×10^7 H9细胞的细胞培养皿，再加含10%FCS的RPMI 11640培养基进行培养。转染细胞培养48小时后，转至含G418的选择培养基(含20%FCS、G418 100mg/ml的RPMI 1640 pH7.4)培养，获得G418抗性阳性细胞克隆。

1.2.3 pcDNA3－HCV转染H9细胞及细胞表达产物的鉴定 收获培养上清液，真空冷冻干燥后，溶于50ml 1%SDS溶液；收获阳性细胞克隆细胞(5×10^6)，抽提细胞总RNA和蛋白质。

1.2.3.1 RT－PCR 以DNase I(Boehringer Mannheim公司)处理后的总RNA抽提液为模板，逆转录反应引物为oligo(dT)15，按常规进RT－PCR[1]。

1.2.3.2 dto ELISA 在硝酸纤维素(NC)膜上，点滴5m

* 男，1956－05出生，副教授

维普资讯 http://www.cqvip.com

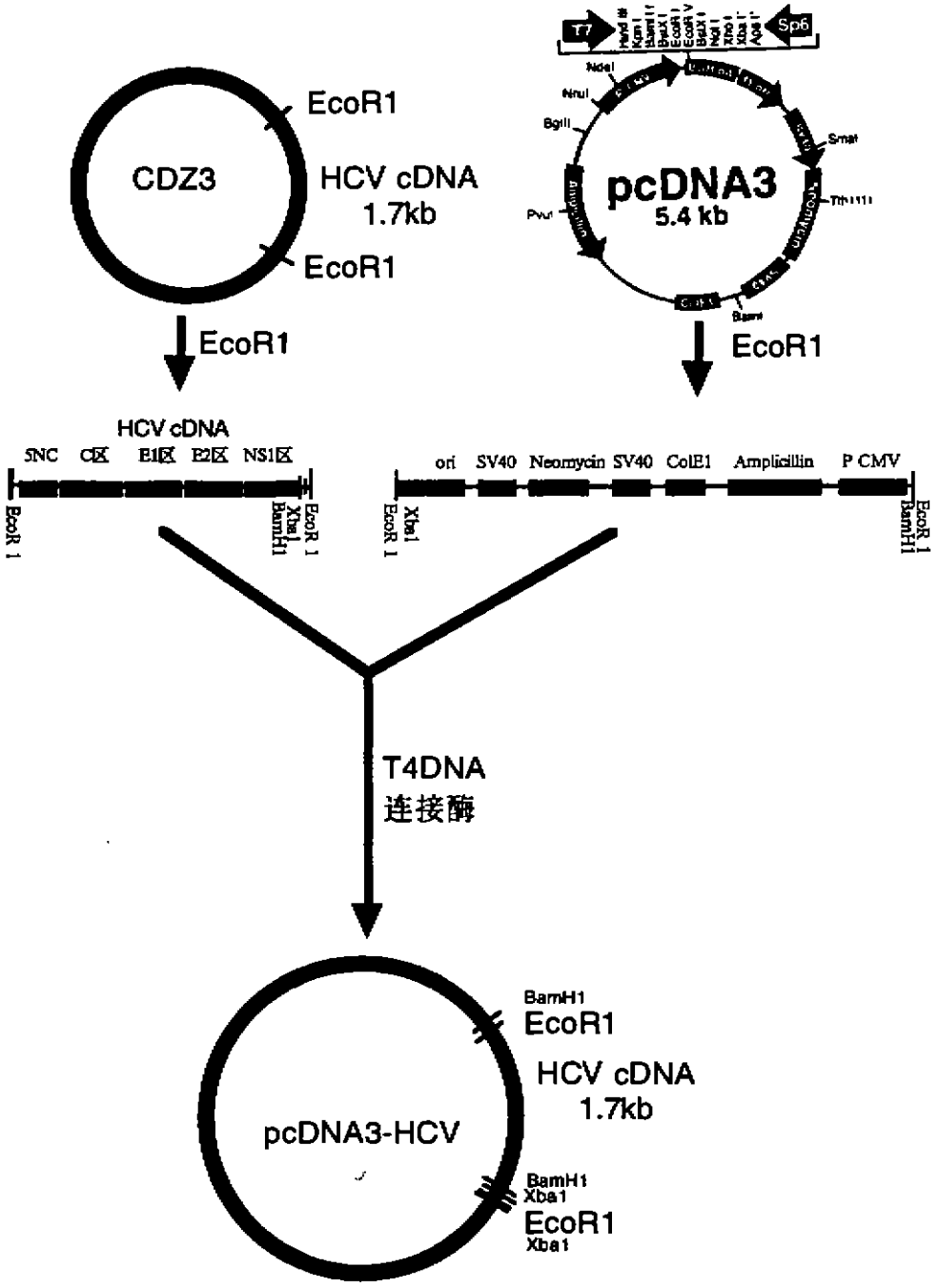


图1 重组HCV基因载体的构建

1细胞蛋白提取液、浓缩上清液、兔血清和阴、阳性对照(RPMI 1640培养基、HCV核心区抗原),按常规进行dot ELISA。一抗为抗－HCV兔血清(1:500稀释),二抗为HRP标记的羊抗兔IgG。

2 结 果

2.1 HCV cDNA的获取和证实

维普资讯 http://www.cqvip.com

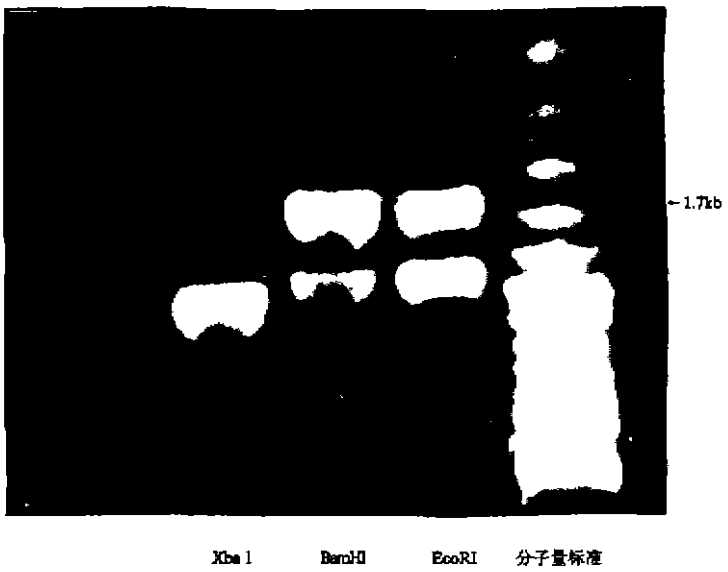


图2 HCV基因重组载体的酶切鉴定

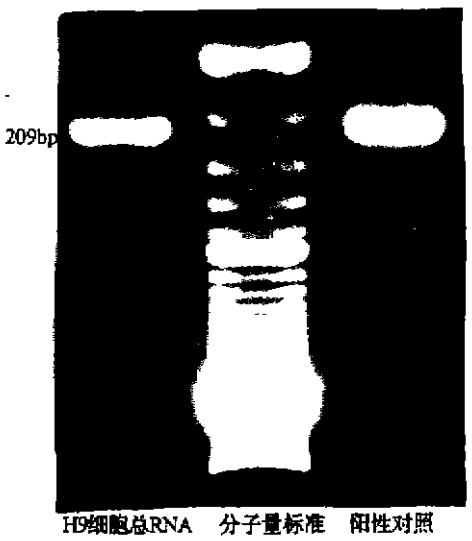


图3 RT－PCR扩增结果

以CDZ2为模板经PCR扩增出1.73kbDNA，而阴性对照模板未扩增出此DNA。经Southern blot检测，1.73kb DNA条带处显色。

2.2 重组体筛选

转化重组体和pcDNA3的JM109菌株均在含有AP的LB固体培养基中生长出菌落，而空白对照和感受态细菌未生长。经重级体的酶切图谱分析，EcorI、BamHI酶切重组体后出现约1.73kbDNA(图2)，将正确方向插入HCVcDNA的重组体命名为pcDNA3－HCV。

2.3 RT－PCR结果

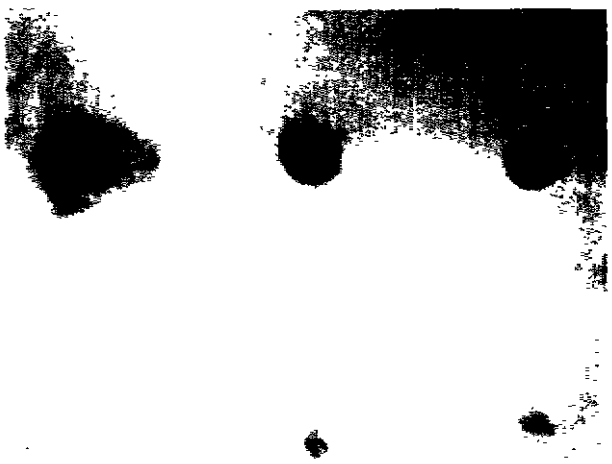
以转染pcDNA3－HCV的H9细胞总RNA为模板经RT－PCR扩增后，出现209bpHCVcDNA，与阳性对照一致(图3)。

2.4 dot ELISA结果

转染pcDNA3－HCV的H9细胞的培养基的浓缩上清液和细胞蛋白提取液均为阳性，而转染pcDNA3的H9细胞的蛋白提取液及其浓缩上清液为阴性(图4)。

3 讨 论

丙型肝炎病毒是引起慢性肝炎的主要病原体之一，但导致病毒性肝炎慢性化的机制尚不明了。免疫耐受和免疫逃避通常被认为是病毒性肝炎尤其是乙型病毒性肝炎慢性化的主要机制，近



上：左为阳性对照，中为转染pcDNA3－HCV的H9细胞蛋白提取液，右为培养上清(浓缩)
下：左为阴性对照，中为H9细胞蛋白提取液，右为培养上清(浓缩)

图4 dot ELISA结果

维普资讯 http://www.cqvip.com

年认为病毒的"肝外库"亦是病毒性肝炎慢性化不可忽略的因素。已发现丙型肝炎病毒能感染人类T淋巴细胞系，并在T细胞内复制[3]。认为淋巴细胞是HCV肝外组织重要的复制场所之一，与其致病机理和预后密切相关[3,4]。因此，建立重组HCV基因转染的淋巴细胞模型，对进行抗HCV治疗、预防HCV感染以及丙肝的发病机理等研究均具有一定的价值。

利用DNA重组技术，选择能在原核和直核细胞穿梭表达的pcDNA3为载体，构建HCV重组体。由于pcDNA3具有多克隆位点，通过不同酶切后形成不同的电泳图谱，大大方便了重组体的筛选工作。pcDNA3被EcoR I酶切后，切点下游Xba I和下游BamH I酶切位点被分割在两端。Xba I位点与HCV插入片段3′端Xba I位点毗邻；而BamH I则下插入片段3′端的BamH I位点遥相对应，重组体转入JM109菌扩增后，分别用XbaI和BamHI酶切，显示出不同酶切图谱。对正确连接的重组体，BamH I切割为近似原载体(5.4kb)和插入片段(1.7kb)的两条电泳带，而Xba I两个切点毗邻，电泳图上仅能看见近乎于重组体大小(约7.1kb)的一条带。

由于pcDNA3带有Neomycin基因，给转染重组体的细胞克隆筛选带来了便利。用G418筛选后结合免疫斑点杂交，准确快速地获得表达HCV核心抗原的淋巴细胞株。

Hiramatsu等[5]应用DNA重组，用PRC/CMV质粒，将HCV基因转染到人肝癌细胞系(HepG2)中，使其表达CZA NS3、NS4、NS5抗原和正负链HCV DNA，为HCV的研究提供了一个体外肝细胞模型。将HCV重组体转染淋巴细胞系并获得复制与表达，与肝细胞源细胞模型互为补充，有助于深入开展对丙型肝炎发病机理的研究，弄清发病过程中淋巴细胞与肝细胞的交互作用机制，了解"肝外库"在丙型肝炎慢性化过程中的作用和意义。

致谢：本课题部分工作在浙江医科大学传染病研究所完成，谨表谢意。

参 考 文 献

1.Sambrood著，金冬雁等译.分子克隆实验指南 第二版，北京：科学出版社，1993，672－683.
2.Shimizu YK, Iwamoto A, Hijkata M. Evidence for in vitro replication of hepatitis C virus genome in a human T cell line. Proc Sci USA, 1992, 89:2477.
3.Kato N, Nakazawa T, Mizutani T, et al. Susceptibility of human T lymphotropic virus type I－infected cell line MT－2 to hepatitis C virus infection. Biochem Biophys Res Commun, 1995, 206:863.
4.Gil B, Qian C, Civeira MP, et al. Hepatic and extrahepatic HCV RNA strands in chronic hepatitis C: different patterns of response to interferon treatment. Hepatology, 1993, 18: 1 050.
5.Hiramatsu N, Dash S, Getber MA. HCV cDNA transfection to HepG2 cells. J Viral Hepat, 1997, 4(suppl 1):61.

(收稿日期 1997－09－22)

Construction and expression of a recombinant hepatits c virus gene vector

Zhou Weiping, et al
Institute for Viral Hepatitis

By inserting 1693bp HCV cDNA (total structure region genes) from CDZ2 into pcCNA3 vector, the recombinant HCV expressive vector pcDNA3－HCV was constructed. To identify the recombinant HCV, it was intoduced into JM109 E.coli strain, then restriction enzyme reaction was carried out respectively. H9 cell line(CD4 T cell) was transfected by the recombinant HCV expressive vector pcDNA3－HCV and G418 resistant cell clones were identified. RT－PCR, dot ELISA showed that the pcDNA3－HCV was replicated, transcribed and expressed in H9 cells. The construction of the H9 cell model transfected by pcD－HCV was successful.

KEY WORDS Hepatitis C virus; Recombinant; Transfection; Expression