



杆状病毒载体介导的氯霉素乙酰转移酶基因在HepG2中的表达

杆状病毒载体具有外源基因容量大等优点, 已广泛用于昆虫细胞的表达研究。杆状病毒(Baculovirus)是昆虫病毒, 一般认为只能感染昆虫细胞。但是有学者曾尝试用改造后的杆状病毒作载体转染肝细胞[1][2], 可以有外源基因表达。作为昆虫病毒对人的肝细胞特异性如何, 是否对肝细胞有不良作用? 对此, 我们应用苜蓿夜蛾蚊杆状病毒(AcMNPV)作为载体, 用氯霉素乙酰转移酶(CAT)报告基因指示该载体在HepG2细胞中的基因转移和表达。

1 材料和方法

1.1 杆状病毒载体构建

构建巨细胞病毒(CMV)启动子驱动的报告基因CAT基因重组杆状病毒穿梭质粒: 用PCR方法以pCDNA3.1/CAT(Invitrogen)质粒为模板, 用F1、F3扩增获得CMV启动子和CAT基因, 将该PCR片段插入杆状病毒穿梭质粒pCRBac(Invitrogen)中, 构建pVCAT重组质粒; 为了构建NF κ B启动子和增强子驱动的CAT质粒, 合成寡核苷酸引物F2含NF κ B启动子、增强子序列(30 bp)及CAT启动子5'末端序列(20 bp), 引物F3含CAT基因3'端序列, 用PCR方法以pCDNA3.1/CAT(Invitrogen)质粒为模板扩增获得NF κ B启动子和增强子驱动的CAT报告基因片段, 将该PCR片段插入杆状病毒穿梭质粒pCRBac(Invitrogen)中, 构建质粒pBcat。用试剂盒Bac-N-Blu(Invitrogen)通过同源重组获得杆状病毒载体BacVcat和BacBcat。用Sf5细胞扩增重组病毒。

1.2 重组病毒感染HepG2细胞及Sf5细胞

1×10^6 细胞接种于6孔板中, 培养24 h后, 加入病毒悬液2 ml(MOI为10)感染细胞, 90 min后换新细胞培养基, 继续培养24 h后收集细胞。对照孔细胞中不加病毒感染, 过程同上。重组杆状病毒BacBcat感染HepG2.2.15细胞方法同上。

1.3 CAT活性测定

弃细胞培养液, 用PBS洗细胞2次, 用2 ml细胞裂解液裂解细胞后收集, 60 °C加热10 min灭活内源性氯霉素乙酰转移酶活性, 离心后取上清100 μ l, 加3 μ l(14C)氯霉素及5 μ l丁酰辅酶A, 0.25 mol/L Tris-HCl, pH8.0 17 μ l使终体积达125 μ l。37 °C反应20 h, 用300 μ l二甲苯抽提, 离心后小心取200 μ l上液相(二甲苯)至闪烁瓶内, 加入0.5 ml闪烁液, 液闪计数器计数cpm值。

2 结果

2.1 CAT重组杆状病毒在Sf5细胞中表达

病毒野株和对照孔CAT表达为背景水平, cpm计数小于200; BacVCAT病毒载体CAT表达为3 450 cpm左右(图1)。提示病毒载体构建成功。

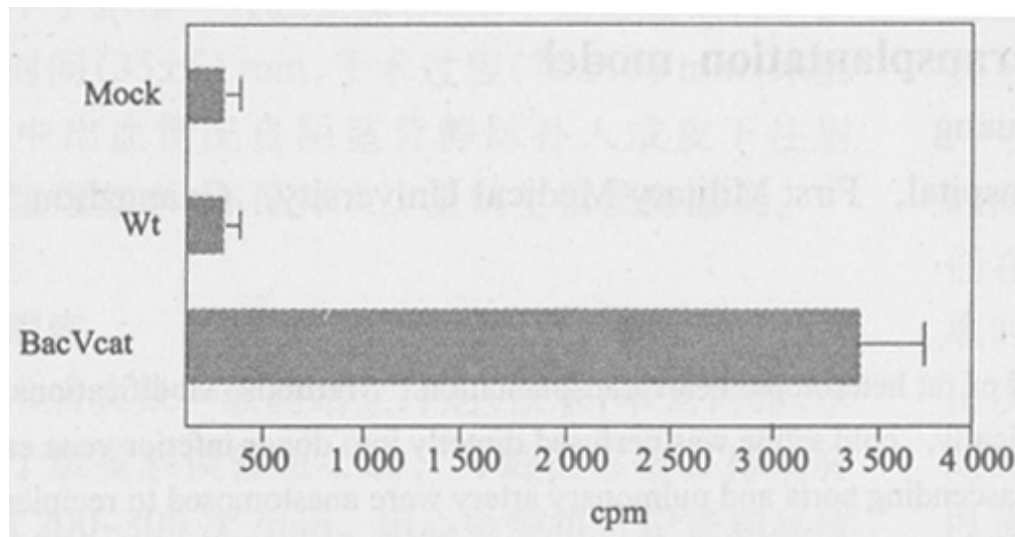


图1 杆状病毒载体在Sf5细胞中表达

Fig.1 Expression of CAT in Sf5 cells

Mock is virus-free blank Sf5 cell control. Wt is wild type baculovirus infected Sf5 cells. BacVcat is baculovirus reconstructed with CAT gene controlled by promoter of CMV

2.2 CAT重组杆状病毒在人肝癌细胞中表达

病毒载体BacBcat表达CAT为350 cpm左右，而对照及野株测cpm小于50；BacBCAT在HepG2细胞中仅有极低的CAT活性，在HepG2.2.15细胞中CAT活性达400 cpm(图2)。

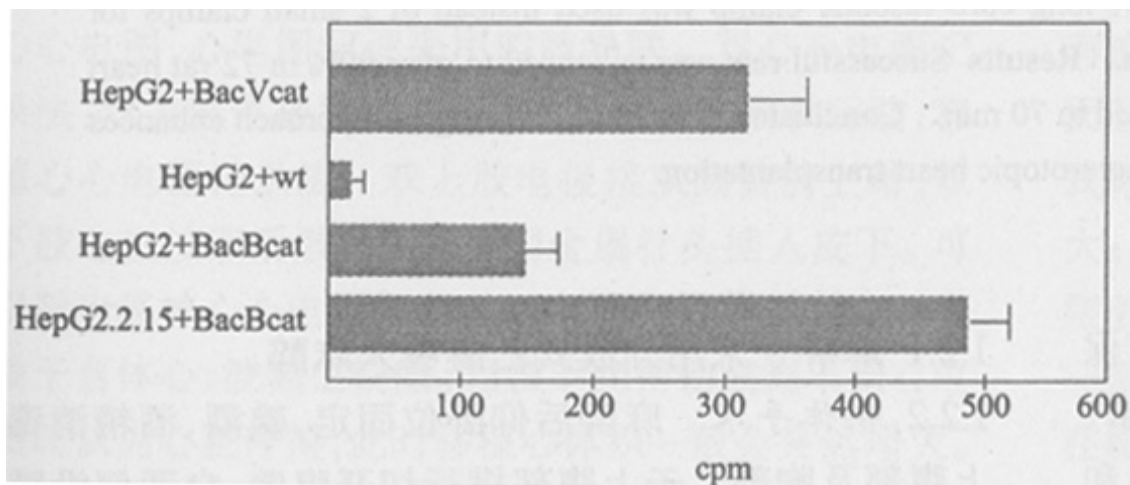


图2 重组杆状病毒在肝癌细胞中的表达

Fig.2 Expression of CAT recombinant baculovirus in HepG2 cell lines

BacVcat is CAT recombinant baculovirus under control of CMV promoter. BacBcat is CAT recombinant baculovirus under control of NFκB promoter. Wt refers to wild type of baculovirus. HepG2.2.15 is HepG2 cell line transfected with double copies of hepatitis B virus genome

3 讨论

杆状病毒作为昆虫病毒，有较严格的宿主特异性。作为载体具有外源基因容量大、表达效率高、操作方

便、对人畜无害等优点，被广泛应用[1][2]。有学者曾尝试用杆状病毒作为载体转染肝细胞[3][4]。作为昆虫病毒对人的肝细胞特异性如何，是否能在HBV感染肝细胞中特异表达也尚无定论。本研究显示，重组杆状病毒能感染人肝癌细胞，并表达外源基因。

乙型肝炎病毒X蛋白具有较广泛的反式激活作用。利用HBx蛋白反式激活NF κ B启动子而设计的旨在提高抗病毒治疗的特异靶向性杆状病毒载体。本研究设计中用HepG2. 2. 15细胞具有HBV复制与表达特性，利用HBV X蛋白的表达反式激活CAT表达。实验结果显示，重组病毒BacBcat在HepG2. 2. 15中的CAT表达活性远高于在无HBV感染的HepG2细胞。所构建的杆状病毒载体中的NF κ B启动子和增强子可被乙肝病毒X蛋白激活。而在无HBV感染的同一肝癌细胞中无明显激活作用。利用其在人肝细胞中进行基因转移且病毒基因自身不能复制特性，可作为较理想的基因转移载体。

参考文献:

[1] Su F, Schneider RJ. Hepatitis B virus HBx protein activates transcription factor NF- κ B, by acting on multiple cytoplasmic inhibitors of rel-related proteins[J]. J Virol, 1996, 70: 4558-66.

[2] Harvey TJ, Macnaughton TB, Park DS, et al. A cellular protein which binds hepatitis B virus but not hepatitis B surface antigen[J]. J Gen Virol, 1999, 80 (Pt 3): 607-15.

[3] Delaney, Miller TG, Isom HC. Use of the hepatitis B virus recombinant baculovirus-HepG2 system to study the effects of (-)-beta-2',3'-dideoxy-3'-thiacytidine on replication of hepatitis B virus and accumulation of covalently closed circular DNA[J]. Antimicrob Agents Chemother, 1999, 43(8): 2017-26.

[4] Delaney WE, Isom HC. Hepatitis B virus replication in human HepG2 cells mediated by hepatitis B virus recombinant baculovirus[J]. Hepatology, 1998, 28(4): 1134-46.

参考文献:

[1] Su F, Schneider RJ. Hepatitis B virus HBx protein activates transcription factor NF- κ B, by acting on multiple cytoplasmic inhibitors of rel-related proteins[J]. J Virol, 1996, 70: 4558-66.

[2] Harvey TJ, Macnaughton TB, Park DS, et al. A cellular protein which binds hepatitis B virus but not hepatitis B surface antigen[J]. J Gen Virol, 1999, 80 (Pt 3): 607-15.

[3] Delaney, Miller TG, Isom HC. Use of the hepatitis B virus recombinant baculovirus-HepG2 system to study the effects of (-)-beta-2',3'-dideoxy-3'-thiacytidine on replication of hepatitis B virus and accumulation of covalently closed circular DNA[J]. Antimicrob Agents Chemother, 1999, 43(8): 2017-26.

[4] Delaney WE, Isom HC. Hepatitis B virus replication in human HepG2 cells mediated by hepatitis B virus recombinant baculovirus[J]. Hepatology, 1998, 28(4): 1134-46.