

HIV-1B 亚型包膜糖蛋白 gp120 基因真核表达载体的构建及其在 HepG2 细胞中的表达

李德良, 马文丽, 师永霞, 李凌, 张宝, 郑文岭 (南方医科大学基因工程研究所, 广东 广州 510515)

摘要:目的 克隆人类免疫缺陷病毒 I 型 B 亚型包膜糖蛋白 gp120 基因, 构建真核表达载体, 并在真核细胞中表达, 进一步为制备自行设计的以 λ 噬菌体作为载体的 HIV 核酸疫苗奠定基础。方法 以克隆好的 HIV-1B 亚型 U26942 全基因组质粒 DNA 作为模板, 根据 Genbank 中 gp120 基因的核苷酸序列设计引物, 并在引物的 5' 端分别引入 BamH I 及 Xho I 酶切位点, 特异性地扩增 gp120 基因。TA 克隆后经双酶切、测序等鉴定重组质粒, 再经双酶切、连接构建含 gp120 编码基因的真核表达载体, 并进行酶切鉴定分析 pcDNA3.1(+)/gp120。在脂质体介导下转染 HepG2 细胞, 经 G418 压力筛选建立稳定转染 gp120 基因的细胞系, 用 RT-PCR 及 Western blotting 检测其在 HepG2 细胞中的表达。结果 重组质粒经 BamH I、Xho I 双酶切成 5.4 kb 与 1.44 kb 的片段, 表明表达载体 pcDNA3.1(+) 中插入了 gp120 基因片段, 测序结果表明编码框正确。RT-PCR 及 Western blotting 证实稳定转染 gp120 基因的 HepG2 细胞系中有该基因的表达。结论 成功构建了 HIV-1B 亚型包膜糖蛋白 gp120 基因的真核表达载体 pcDNA3.1(+)/gp120, 并在 HepG2 细胞中获得稳定表达。

关键词: 人类免疫缺陷病毒; pcDNA3.1(+); gp120; 基因表达

中图分类号: Q78 文献标识码: A 文章编号: 1673-4254(2006)12-1724-04

Construction of a eukaryotic expression plasmid containing gp120 gene of HIV-1 subtype B and its expression in HepG2 cells

LI De-liang, MA Wen-li, SHI Yong-xia, LI Ling, ZHANG Bao, ZHENG Wen-ling

Institute of Genetic Engineering, Southern Medical University, Guangzhou 510515, China

Abstract: **Objective** To construct an eukaryotic expression plasmid containing gp120 gene of HIV-1 subtype B and obtain gp120 gene expression in HepG2 cells. **Methods** According to the published gp120 gene sequence in Genbank, a pair of primers was designed and synthesized. The PCR amplification product of gp120 gene was cloned into pMD-18T vector using TA cloning followed by BamH I and Xho I digestion and sequence analysis. The target gene was then subcloned into a highly efficient eukaryotic expression vector pcDNA3.1(+). The recombinant plasmid was sequenced and identified by restrictive endonuclease digestion, and transfected into HepG2 cells via liposome. The expression of gp120 gene was analyzed by RT-PCR and Western blotting, respectively. **Results** Restriction endonuclease digestion and sequence analysis verified successful construction of the recombinant vector pcDNA3.1(+)/gp120. The target fragment gp120 was identical with U26942 in Genbank, and the expression of gp120 gene was detected in the lysate of the transfected HepG2 cells by RT-PCR and Western blotting. **Conclusion** The eukaryotic expression plasmid for gp120 has been constructed successfully, which is capable of stable expression in HepG2 cells.

Key words: HIV; pcDNA3.1(+); gp120; gene expression

从 1985 年中国大陆发现第一例艾滋病病毒感染者的开始, 艾滋病病毒感染者的数字呈几何级数的增长, 到 2002 年底, 艾滋病感染人数全球达到了 5000 万, 死亡超过了 2600 万, 而且没有特别有效的药物出现, 所以 AIDS 的防治, 尤其疫苗的研发, 一直都是研究的热点^[1]。包膜糖蛋白 gp120 是人类免疫缺陷病毒

的主要结构蛋白之一, 它在病毒与宿主细胞的吸附和结合过程中发挥重要作用^[2], 其表面存在大量的抗原决定簇, 可以刺激机体产生体液免疫和细胞免疫, 因此成为人们研究艾滋病疫苗的主要靶蛋白。核酸疫苗是近年来才发展起来的新型疫苗, 可以激发强烈的免疫应答, 并在动物模型中取得了满意的结果^[3]。HIV 核酸疫苗的研究很多, 所用载体一般为质粒或者病毒载体, 而 λ 噬菌体作为一种全新的核酸疫苗的载体研究甚少, 尤其口服疫苗的研究就更少。本研究旨在采用 pcDNA3.1(+) 载体构建包膜糖蛋白 gp120 真核表达载体, 使 gp120 基因在 CMV 启动子的控制之下, 并在肝癌细胞 HepG2 中获得稳定表达, 为进一步制备 λ 噬菌体作为载体的核酸疫苗的研制奠定基础。

收稿日期: 2006-01-03

基金项目: 国家博士后基金资助项目

Supported by National Postdoctoral Research Foundation of China (2005037168)

作者简介: 李德良 (1974-), 男, 博士, 电话: 020-61648209, E-mail: lidlkm@yahoo.com

通讯作者: 马文丽, 教授, 博士生导师, 电话: 020-61648210, E-mail: wenli@fimmu.com

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 质粒载体 实验中选用的基因组为 HIV-1B 亚型 U26942 全基因 DNA, 该质粒由美国 Jean K Carr 博士惠赠, 真核表达质粒 pcDNA3.1 (+) 购自 Invitrogen 公司, 克隆载体 pMD-18T vector 购自大连宝生物科技公司。

1.1.2 细胞株 大肠杆菌菌株 XL1-blue 及肝癌细胞系 HepG2 由本室保存。

1.1.3 引物的设计与合成 上游引物: 5'GGATCCGCATGGAAAAATTGTGGGTC-ACAGT 3' 中引入了 BamH I 酶切位点。下游引物: 5'CTCGAGTTATCTTTTTTCTCTC-TGCACCACTCT 3' 中引入了 Xho I 酶切位点。RT-PCR 引物 上游引物: 5'CAATTTATAAACATGTGGCAGGAA 3', 下游引物: 5'CCTTGGTGGGTGCTACTCCTA 3'。PCR 引物由上海博亚生物科技公司合成。

1.1.4 工具酶和主要试剂 高保真 PCR 试剂盒购自 Roche 公司。限制性内切酶 BamH I 和 Xho I, T4DNA 连接酶均购自大连宝生物科技公司。质粒纯化试剂盒、DNA 切胶回收试剂盒、DL2000 Marker 及 λ-EcoT14 I DNA digest Marker 购自大连宝生物公司。TRIZOL 总 RNA 提取试剂盒, 脂质体 Lipofectamine™ 2000 及 G418 购自 Invitrogen 公司。兔抗 HIV-1 gp120 多克隆抗体 (本室自制), Western blotting 检测试剂盒购自武汉博士德生物工程有限公司。Superscript preamplification system、DMEM 培养液及胎牛血清购自 Gibco BRL 公司。琼脂糖和 LB 培养基购自 Life Technology 公司。其他试剂均为国内分析纯。

1.2 方法

1.2.1 质粒的扩增及纯化 氯化钙法制备感受态细胞 XL1-blue; HIV-1B 亚型 U26942 全基因 DNA 质粒, pcDNA3.1 (+) 质粒转化宿主菌、筛选阳性菌落、小量制备质粒 DNA, 琼脂糖凝胶电泳分析选出含相应质粒的阳性细菌克隆。

1.2.2 目的基因的扩增及纯化 用 PCR 方法以 HIV-1B 亚型 U26942 全基因 DNA 为模板扩增 gp120 基因序列, 在上游引入 BamH I 酶切位点, 在下游引入 Xho I 酶切位点。gp120 的上游引物为 5'GGATCCGCCATGGAAAAATTGTGGGTCACAGT 3'; 下游引物为 5'CTCGAGTTATCTTTTTTCTCTCTGCACCACTCT 3'; PCR 的反应程序如下: 94℃ 变性 30 s; 50℃ 复性 30 s; 72℃ 延伸反应 120 s, 共循环 30 次。最后于 72℃ 延伸反应 7 min, 产物经电泳切胶回收纯化。

1.2.3 克隆载体的构建与鉴定 以 pMD18-T 为克隆载体, 与 gp120 的 PCR 产物连接, 产物转化 XL1-blue 细菌, 经氨苄青霉素及 α-互补蓝白斑筛选阳性克隆, 扩大培养, 提取质粒, 酶切鉴定并进行测序 (由本室完成)。

1.2.4 真核表达载体的构建与鉴定 用 BamH I 和 Xho I 双酶切 pcDNA3.1 (+) 质粒及 pMD18-T/gp120 质粒, 琼脂糖电泳回收片断, 用 T4DNA 连接酶将两目的片断连接, 产物转化 XL1-blue 细菌, 经氨苄青霉素培养基筛选, 挑取阳性克隆进行质粒的小量制备, 将重组质粒进行双酶切鉴定及测序分析。

1.2.5 细胞转染及稳定细胞系的建立 HepG2 细胞采用含 10% FCS 的 DMEM 培养液常规培养。分别用 pcDNA3.1 (+) 空载体质粒及 pcDNA3.1 (+)/gp120 质粒进行细胞转染。具体操作: 在转染前, 用胰酶消化细胞, 按 2×10^6 /孔接种细胞于 6 孔板中, 在指数生长期细胞 90% -95% 汇片时, 每孔分别取质粒 2 μg 和脂质体 Lipofectamine™ 2000 6 μl 用无血清培养液稀释至 200 μl, 两者混匀在室温放置 20 min, 使之形成复合物后加入, 6 h 后每孔补加 2 ml 含 10% FCS 的 DMEM 继续培养。48 h 后加入 G418 (浓度为 500 μg/ml) 选择培养基, 对细胞进行稳定筛选。

1.2.6 表达产物的鉴定 分别用 RT-PCR 及 Western blot 方法对表达产物进行鉴定。RT-PCR 具体操作: 分别收集空白 HepG2 细胞组、转染 pcDNA3.1 (+) 质粒的 HepG2 细胞组及转染 pcDNA3.1 (+)/gp120 质粒的 HepG2 细胞组, 提取 RNA 进行逆转录, 以各自的 cDNA 为模板, 用 RT-PCR 引物 (上游引物: 5'CAATTTATAAACATGTGGCAGGAA 3'; 下游引物: 5'CCTTGGTGGGTGCTACTCCTA 3') 进行 PCR 扩增, PCR 的反应程序如下: 94℃ 变性 30 s; 55℃ 复性 30 s; 72℃ 延伸反应 60 s, 共循环 25 次。最后于 72℃ 延伸反应 7 min, 产物经电泳检测。Western blot 具体操作: 取上述空白 HepG2 细胞组、稳定转染 pcDNA3.1 (+) 质粒的 HepG2 细胞组及稳定转染 pcDNA3.1 (+)/gp120 质粒的 HepG2 细胞组各约 3×10^7 , 消化、收集后加 100 μl 裂解液, 混匀后 4℃ 放置 20 min, 再加入 25 μl 的 5x 加样缓冲液混匀, 沸水煮 10 min, 离心后进行 12% SDS-PAGE, 电泳结束后用半干转移仪将蛋白从凝胶上转移到硝酸纤维素膜上, 用封闭液封闭。一抗为 1:3000 兔抗 HIV-1 gp120 多克隆抗体, 二抗为 1:200 的 HRP 标记的羊抗兔 IgG, DAB 显色进行 Western blot 分析。

2 结果

2.1 gp120 基因的扩增和 TA 克隆双酶切、测序鉴定

以 HIV-1B 亚型 U26942 全基因 DNA 为模板进行 PCR 扩增,PCR 产物进行 1% 琼脂糖电泳,对照 DNA 相对分子质量标准,扩增出约 1.44 kb 的单一一条带,与预计片断大小相同(图 1)。PCR 产物经纯化回收后与 pMD18-T 载体相连接,转化 XL1-blue 挑取阳性菌落,将质粒纯化后经 *Bam*H I、*Xho* I 双酶切鉴定重组体,可见约 2.69 kb 及 1.44 kb 两条特异性的带,跟扩增的 *gp*120 基因目的片断大小相符(图 2)。测序结果与 HIV-1U26942 的阅读框序列一致。2.2 pcDNA3.1(+)/*gp*120 真核表达载体构建的酶切鉴定及测序分析

将重组质粒 pMD18-T/*gp*120 双酶切后,用琼脂糖凝胶电泳回收 *gp*120 片段,与同样经 *Bam*H I 和 *Xho* I 双酶切的真核表达载体 pcDNA3.1(+) 进行体外连接反应,并对转化成功后的阳性重组质粒经 *Bam*H I and *Xho* I 双酶切电泳鉴定,结果重组质粒 pcDNA3.1(+)/*gp*120 产生 5.4 kb 和 1.44 kb 两条特异性带。测序及同源性分析表明,重组质粒中的 *gp*120 基因与 HIV-1U26942 中的 *gp*120 基因序列完全同源,部分核酸序列测定见图 3。

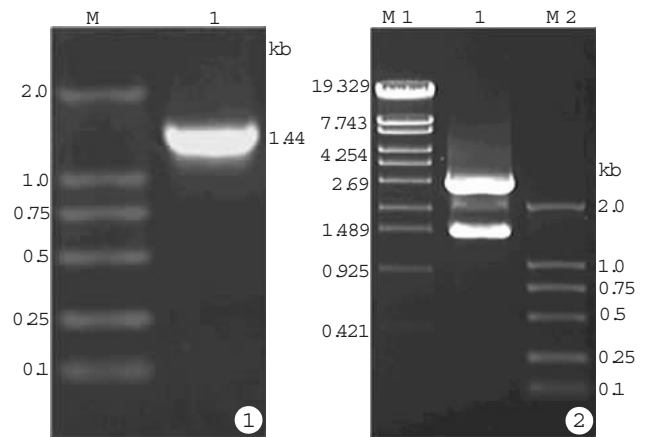


图 1 HIV-1B 亚型 U26942 全基因 DNA 为模板 PCR 扩增 *gp*120 基因

Fig.1 PCR amplification of *gp*120 gene with HIV genome DNA as the template

M : 2 kb M aiker; Lane 1: PCR product of *gp*120 gene

图 2 pMD18-T/*gp*120 克隆载体的鉴定

Fig.2 Identification of pMD18-T/*gp*120 recombinant plasmid

M 1: λ -EcoT14 I digested DNA M aiker; Lane 1: pMD18-T/*gp*120 plasm id digested w ith *Bam*H I and *Xho* I ;M 2: 2 kb M aiker

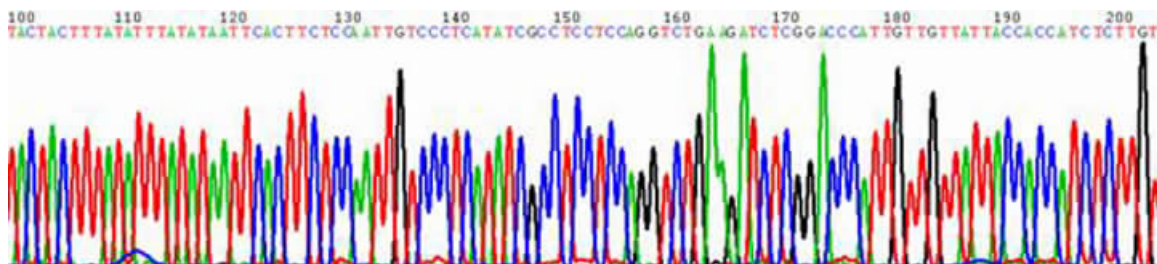


图 3 HIV-1B 亚型 *gp*120 基因部分核酸序列测定结果

Fig.3 Part of the sequence analysis results of the *gp*120 gene from HIV-1B subtype

2.3 稳定转染 HepG2 细胞系的建立及表达

用 pcDNA3.1(+)/*gp*120 质粒转染 HepG2 细胞,并同时以 pcDNA3.1(+)为对照,G418 筛选,4 周后建系成功。分别以空白 HepG2 细胞组、转染 pcDNA3.1(+) 质粒的 HepG2 细胞组及转染 pcDNA3.1(+)/*gp*120 质粒的 HepG2 细胞组的 cDNA 为模板,进行 PCR 扩增,结果表明只有转染 pcDNA3.1(+)/*gp*120 质粒的 HepG2 细胞,可以扩增出 *gp*120 基因的片断,约 0.24 kb。Western blotting 结果表明,pcDNA3.1(+)/*gp*120 稳定转染的细胞有预期 120 000 大小的特异性条带,而转染 pcDNA3.1(+)空载体的细胞无此条带(图 4)。

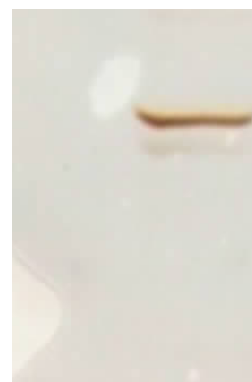


图 4 pcDNA3.1(+)/*gp*120 表达产物的 Western blot 分析

Fig.4 Western blot analysis of the expressed product

Lane 1: Lysate of HepG2 cells transfected w ith pcDNA 3.1 (+); Lane 2: Lysate of HepG2 cells transfected w ith pcDNA 3.1 (+)/*gp*120

3 讨论

艾滋病的流行非常快,范围非常广,所以艾滋病的防治就显得尤为重要。HIV 疫苗是预防艾滋病流行最有效的一条途径^[1]。目前核酸疫苗(包括活载体疫苗)的研究受到广泛的重视,其最大的优点是疫苗抗原可能在靶细胞内以天然的方式合成、加工并呈递给免疫系统,刺激机体产生细胞免疫^[4]和体液免疫^[5],尤其是活载体本身还可作为免疫佐剂^[6]。常用的核酸疫苗的载体有质粒、腺病毒和牛痘病毒等。以质粒为载体的核酸疫苗虽然有易于制备、生产工艺简单等优点,但它在较大的动物中引起的免疫应答水平较弱^[7];诱导免疫产生需要的 DNA 疫苗的量较大;携带外源基因的质粒载体上具有抗生素标记;提高 DNA 转染效率的措施提高了该疫苗的成本和生产的困难。病毒载体疫苗的缺点是能够在宿主的机体组织内进行复制。近 20 年来,全世界很多国家投入了亿万资金,科学家们投入了大量的精力和时间对 HIV 疫苗进行了广泛而深入的研究,已研制超过 40 种 HIV 疫苗,并对数十种疫苗进行了一期和二期临床试验,由于上述种种原因,至今仍没有一种可以完全预防艾滋病的有效疫苗。最近噬菌体介导的 DNA 疫苗的出现,恰恰克服了这些核酸疫苗的缺陷,噬菌体不但具有生产工艺简单、制备快速容易、自然条件下储存比较稳定(4℃ 稳定保存至少 6 个月)、在宿主的真核组织中不能复制、避免了抗生素携带和可通过口服途径呈递抗原等优点,而且能够容纳较大的外源片断(长达 23 kb)和多个疫苗基因,因此这类疫苗将成为以后几年内研究的热点,并且具有广泛的应用前景^[8]。

gp120 位于 HIV-1 包膜糖蛋白的 gp160 的基因编码区,前体为包膜糖蛋白的 gp160,经蛋白酶裂解成 gp120 和 gp41,分别形成成熟病毒颗粒的表面棘突和跨膜部分,可刺激机体产生相应的抗体^[9]。gp120 有 5 个高变区(V1-V5)和 6 个保守区(C1-C6)。高变区中的 V3 环区以及 CD4 结合区是阻断 HIV 传播的中和抗体结合的主要靶位。gp120 与 gp41 的 N 端以非共价键结合,当 HIV 感染 T 淋巴细胞或巨噬细胞时,gp120 首先与细胞表面的 CD4 分子结合,导致空间构象发生改变,使 gp41 的 C 末端与 N 末端相互作

用形成六螺旋束,与细胞膜充分接触而发生病毒与细胞膜的融合^[10]。因此,gp120 已成为抗 HIV 理想的药靶,也是我们研制 HIV 核酸疫苗理想的靶基因。

本实验克隆了人类免疫缺陷病毒 I 型 B 亚型包膜糖蛋白 gp120 基因并采用 pcDNA3.1(+)载体构建 gp120 真核表达载体,使 gp120 基因在 CMV 启动子的控制之下,DNA 测序结果显示,读码框架和插入方向完全正确,在两端成功插入了正确的起始和终止密码子,保证了表达产物的正确性,并用脂质体转染 HepG2 细胞,RT-PCR 及 Western 印迹证实稳定转染 gp120 基因的 HepG2 肝癌细胞系中有该基因的表达,为进一步制备 λ 噬菌体作为载体的核酸疫苗奠定了基础。另外还为 HIV 的免疫诊断试剂和靶向 gp120 的抗 HIV 药物的研制开发等提供重要的物质基础。

参考文献:

- [1] Amara RR, Robinson HL. A new generation of HIV vaccines[J]. Trends Microbiol, 2002, 8(10):489-95.
- [2] Rizzuto CD, Hendrickson WA, Sodroski J. A conserved HIV gp120 glycoprotein structure involved in chemokine receptor binding[J]. Science, 1998, 280(5371):1949-53.
- [3] Mokeb PH. Vaccines coming of age after 200 years [J]. FEMS Microbiol Rev, 2000, 24(1):9-20.
- [4] Dietrich G, Gentschev I, Hess J. Delivery of DNA vaccines by attenuated intracellular bacteria[J]. Immunol Today, 1999, 20(6):251-3.
- [5] Wolff JA, Malone RW, Williams S, et al. Direct gene transfer into mouse muscle *in vivo* [J]. Science, 1990, 247(4949):1465-8.
- [6] Tighe H, Conrath M, Roman M, et al. Gene vaccination: plasmid DNA is more than just a blueprint[J]. Immunol Today, 1998, 19(2):89-97.
- [7] Manickan E, Kazem KL, Rouse BT. DNA vaccines—a modern gem or a boon to vaccinology[J]? Crit Rev Immunol, 1997, 17(2):139-54.
- [8] Jenson CD, March JB. Bacteriophage lambda is a highly stable DNA vaccine delivery vehicle[J]. Vaccine, 2004, 22(19):2413-9.
- [9] Vomhagen R, Hinderer W, Nebel-Schickel H, et al. Development of efficient HIV-specific test systems using recombinant viral antigens [J]. Biotech Bull, 1990, 4:91-6.
- [10] Chan DC, Fass D, Berger. Core structure of gp41 from the HIV envelope glycoprotein[J]. Cell, 1997, 89:263-73.