

· 论著 ·

文章编号: 1007-8738(2013)05-0469-04

HBV 融合抗原真核表达载体 pIRES-neo-HBAG 的构建及表达

王琳¹, 王宇², 吴昊², 朱晓明², 于继云², 蒋建利^{1*}, 阎瑾琦^{2*}¹第四军医大学细胞工程研究中心, 陕西 西安 710032; ²军事医学科学院基础医学研究所, 北京 100850

[摘要] 目的 构建 HBV 融合抗原真核表达质粒 pIRES-neo-HBAG, 并验证其在 293T 细胞中的表达。方法 以含有 HBV 融合抗原的质粒 pVAX1-HBV 为模板, PCR 扩增该融合基因。PCR 产物经纯化后, 将其克隆至载体 pMD18-T 中, 构建 pMD18-T-HBV 质粒, 经酶切和测序鉴定后, 将其定向克隆入真核表达载体 pIRES-neo, 获得真核表达质粒 pIRES-neo-HBAG。将该重组表达质粒瞬时转染人 293T 细胞, 采用 Western blot 法、流式细胞术和免疫荧光细胞化学技术验证 HBV 融合抗原的表达。结果 成功构建了 HBV 融合抗原真核表达质粒 pIRES-neo-HBAG, Western blot 法、流式细胞术和免疫荧光细胞化学技术结果显示融合抗原能够在 293T 细胞中表达。结论 成功构建了 HBV 融合抗原真核表达质粒 pIRES-neo-HBAG。

[关键词] 乙型肝炎病毒; HBV 融合抗原; 真核表达; pIRES-neo; 293T 细胞

[中图分类号] R392.12, R512.6+2 **[文献标志码]** A

Construction and expression of eukaryotic expression plasmid pIRES-neo-HBAG carrying HBV fusion antigen gene

WANG Lin¹, WANG Yu², WU Hao², ZHU Xiaoming², YU Jiyun², JIANG Jianli^{1*}, YAN Jinqi^{2*}¹Cell Engineering Research Center, Fourth Military Medical University, Xi'an 710032; ²Institute of Basic Medical Sciences, Academy of Military Medical Sciences, Beijing 100850, China

[Abstract] **Objective** To construct a eukaryotic expression plasmid harboring HBV fusion antigen gene, and to express it in 293T cells. **Methods** The HBV fusion gene fragment was amplified by PCR from the plasmid pVAX1-HBV containing HBV fusion gene. After purified, the product was cloned into pMD18-T vector. The recombinant plasmid was confirmed by endonuclease digestion and sequencing analysis, and then subcloned into eukaryotic expression vector pIRES-neo. Then the recombinant expression plasmid pIRES-neo-HBAG was transferred into 293T cells by Lipofectamine™ 2000. The expression of HBV fusion antigen was identified by Western blotting, flow cytometry and immunofluorescence cytochemistry. **Results** The eukaryotic expression vector pIRES-neo-HBAG was constructed successfully. The expression of fusion antigen could be detected in the pIRES-neo-HBAG transfected 293T cells by Western blotting, immunofluorescence cytochemistry and flow cytometry. **Conclusion** The eukaryotic expression plasmid pIRES-neo-HBAG is successfully constructed and the fusion antigen is expressed in 293T cells.

[Key words] hepatitis B virus; HBV fusion antigen; eukaryotic expression; pIRES-neo; 293T cells

慢性乙型肝炎治疗性药物的研发取得了长足发展,但是却不能彻底消除肝细胞中乙型肝炎病毒(hepatitis B virus, HBV)持续感染的主要元凶共价闭合环状 DNA (covalently closed circular DNA, cccDNA),导致病毒反复反弹^[1-3]。治疗性疫苗则能够通过激活细胞毒性 T 淋巴细胞(cytotoxic T lymphocytes, CTL)^[4-5]和 IFN- γ 等 Th1 类细胞因子^[6-7],在不引发病毒感染肝细胞损伤的情况下,直接抑制和清除

感染细胞内的病毒 DNA 复制(包括 cccDNA),称为“非溶细胞清除机制”,是其他药物和治疗方法所不具备的独特优势,为彻底治愈乙肝提供了全新途径^[7-9]。国际上前期研究主要集中在多肽类疫苗,我国也有“抗原抗体复合物疫苗”、“模拟抗原合成肽”疫苗等蛋白多肽类疫苗相继进入 II-III 期临床试验,但临床效果都证明不够理想,证明蛋白类型疫苗在研究治疗性疫苗方面并不具备显著优势,而基于

收稿日期: 2012-11-14; 接受日期: 2013-02-21

基金项目: 国家自然科学基金(31100655)

作者简介: 王琳(1978-),女,青海西宁人,硕士研究生

Tel: 010-66932316; E-mail: drlinwang@163.com

*Corresponding authors, 蒋建利, jiangjl@fmmu.edu.cn; 阎瑾琦, yanjingqi@sohu.com

核酸和病毒载体递送系统研究新型治疗性疫苗,则是将来的重要发展方向。

本研究室前期基于复制子 DNA 疫苗载体系统和 HBV 融合抗原基因,创新研究获得的一种新型乙肝治疗性 DNA 疫苗,初步药效学取得了较为理想的清除病毒的效果。作为治疗性疫苗,评价其 CD8⁺T 细胞免疫反应极为重要,目前有多种手段进行该方面的检测,其中 CTL 杀伤实验是非常重要的和直观的评价指标,是细胞免疫评价中常用方法。在建立 CTL 杀伤实验时,获得一个稳定的靶细胞是前提条件。因此,本研究拟构建 HBV 融合抗原基因的真核表达载体,并在细胞中验证其表达,为进一步筛选稳定转染 HBV 融合基因的细胞系,作为将来治疗性乙肝可复制型 DNA 疫苗药效学中 CTL 杀伤实验的靶细胞奠定基础。

1 材料和方法

1.1 材料 含有 HBV 融合抗原基因的真核表达质粒 pVAX1-HBV 为本研究室前期构建和保存;真核表达载体 pIRES-neo 购自 Clontech 公司;大肠杆菌 DH5 α 感受态细胞为本室保存;Ex Taq 酶、T4 DNA 连接酶为 TaKaRa 公司产品;DNA 限制性内切酶 *Nhe* I、*Bam*H I 购自 NEB 公司;PCR 产物纯化试剂盒、片段胶回收试剂盒、质粒提取试剂盒均购自北京三博远志科技有限公司;转染试剂 LipofectamineTM2000 为 Invitrogen 公司产品;RPMI1640 培养基购自 Gibco 公司;新生牛血清购自杭州四季青公司;小鼠抗 His 抗体,PE 标记的山羊抗小鼠 IgG 和 HRP 标记的山羊抗小鼠 IgG 均购自北京中杉金桥公司;细胞打孔液购自 BD 公司;Western blot 超敏发光液购自北京普利莱基因技术有限公司。

1.2 方法

1.2.1 引物设计与合成 上游引物为 HBV-F1: 5'-GCTA-GCCACCATGGACATTGACCCCTTAT-3', 下游引物为 HBV-R1: 5'-CAATTCGTGGTGGTGGTGGTGGTGGAGACAAAAAGAAATTGCTAAC-3'。上游引物和下游引物的 5'端分别引入 *Nhe* I 和 *Eco*R I 酶切位点(下划线部分),并且在下游引物中(融合抗原 C 端)引入了 His 标签序列(斜体加粗部分),以便于作为检测标签进行融合抗原表达的检测,引物由 Invitrogen 公司合成。

1.2.2 人 HBV 真核表达载体的构建 以本室前期构建保存的含有 HBV 融合基因序列的质粒 pVAX1-HBV 为模板扩增 HBV 融合基因。PCR 反应体系参照 TaKaRa 公司 Ex Taq 酶说明书,反应条件:95 $^{\circ}$ C 预变性 5 min;94 $^{\circ}$ C 变性 30 s,58 $^{\circ}$ C 退火 30 s,72 $^{\circ}$ C 延伸 1 min,30 个循环,最后 72 $^{\circ}$ C 延伸 7 min。将本室保存的 pIRES-neo-PSCA 质粒分别用限制性内切酶 *Nhe* I 和 *Eco*R I 双酶切,琼脂糖凝胶电泳分离、胶回收纯化大片段(pIRES-neo 线性片段),将 PCR 得到的 HBV 融合基因和回收得到的 pIRES-neo 线性片段经 T4 DNA 连接酶连接后转化大肠杆菌 DH5 α 感受态细胞,氨苄青霉素培养皿筛选,挑取单

克隆提取质粒后进行双酶切鉴定,阳性克隆质粒经测序后命名为 pIRES-neo-HBAG。

1.2.3 重组质粒 pIRES-neo-HBAG 瞬时转染 293T 细胞 取对数生长期的 293T 细胞,胰酶消化后接种于 6 孔板,待细胞汇合度达 50%~70% 时,将提取的转染级质粒 pIRES-neo-HBAG 和空载体 pIRES-neo,在 LipofectamineTM2000 介导下转染细胞,于 37 $^{\circ}$ C,50 mL/L CO₂ 培养箱中培养 48 h,然后收集细胞进行后续实验。

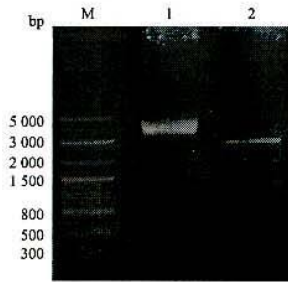
1.2.4 Western blot 法检测 HBV 融合抗原的表达 转染 48 h 后,弃培养上清,收集对数生长期的细胞,100 μ L 三蒸水重悬后,加入 3 \times 蛋白处理液 50 μ L 裂解细胞,样品经处理后进行 SDS-PAGE 电泳分离(恒压 80 V,2 h)。电泳分离后将胶上蛋白转移至 PVDF 膜上(恒流 180 mA,2 h),用含 50 g/L 脱脂奶粉的 TBST 室温封闭 2 h,与 1:1 000 稀释的小鼠抗 His 抗体 4 $^{\circ}$ C 孵育过夜;PBST 洗膜 3 次,然后与 1:5 000 稀释的 HRP 标记的山羊抗小鼠 IgG 室温孵育 2 h,PBST 洗膜 3 次;洗涤后加 ECL 显色,暗室中显影和定影。

1.2.5 流式细胞仪检测 转染细胞 48 h 后,2.5 g/L 胰酶消化 6 孔板中的细胞,用预冷的含有 20 mL/L 新生小牛血清的 PBS 洗涤细胞 3 次,加入 500 μ L 打孔液(1:10 稀释),混匀后室温打孔 6 min,加入含 20 mL/L 新生小牛血清的 PBS 终止反应,细胞用小鼠抗 His 抗体,4 $^{\circ}$ C 孵育 60 min,用预冷的含有 20 mL/L 新生小牛血清的 PBS 洗涤细胞 2 次,然后用 PE 标记的山羊抗小鼠 IgG 抗体,4 $^{\circ}$ C 孵育 30 min。孵育结束后,用预冷的含有 20 mL/L 新生小牛血清的 PBS 洗涤细胞 2 次,最后用 40 g/L 的多聚甲醛重悬细胞,流式细胞仪检测融合抗原的表达情况。

1.2.6 免疫荧光检测 用 2.5 g/L 胰酶消化转染 48 h 后的细胞,用预冷的含有 20 mL/L 新生小牛血清的 PBS 清洗细胞 3 次,加入 500 μ L 打孔液(1:10 稀释),混匀后室温打孔 6 min,加入含 20 mL/L 新生小牛血清的 PBS 终止反应,实验组和对照组的细胞均用小鼠抗 His 抗体,4 $^{\circ}$ C 孵育 60 min,用预冷的含有 20 mL/L 新生小牛血清的 PBS 洗涤细胞 2 次,然后用 PE 标记的山羊抗小鼠 IgG 抗体,4 $^{\circ}$ C 孵育 30 min,最后用 40 g/L 的多聚甲醛重悬细胞,将细胞悬液滴到载玻片上,封片剂封片;激光共聚焦显微镜检测重组质粒的表达情况。

2 结果

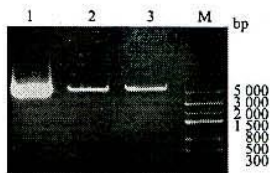
2.1 HBV 融合抗原基因的 PCR 扩增及鉴定 以本研究室前期构建的含有 HBV 融合抗原基因的质粒 pVAX-HBV 为模板,经 PCR 反应,得到 1 个约 1 200 bp 的片段,与预期的片段大小相符。琼脂糖凝胶回收 PCR 扩增产物,回收产物与 pMD18-T 载体连接,连接产物转化获得阳性克隆,提取质粒 DNA 进行双酶切鉴定(图 1),阳性质粒送测序,经过序列比对,扩增出的 HBV 融合抗原基因,与原序列序列完全一致。



M: DL5000 DNA marker; 1: pMD18-T-HBAG 质粒; 2: pMD18-T-HBAG 质粒双酶切.

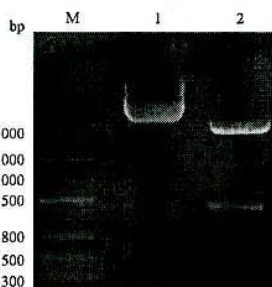
图1 pMD18-T-HBAG 双酶切鉴定琼脂糖凝胶电泳图

2.2 pIRES-neo-HBAG 质粒的构建 利用引物上引入的酶切位点 *Nhe* I 和 *Eco*R I, 将 HBV 融合抗原基因从 pMD18-T-HBAG 质粒中切下, 并插入到经 *Nhe* I 和 *Eco*R I 双酶切的 pIRES-neo-PSCA 质粒回收的大片段中(图2), 构建真核表达质粒 pIRES-neo-HBAG。筛选重组成功的菌株进行扩大培养, 提取质粒, 用 *Nhe* I 和 *Eco*R I 双酶切鉴定重组质粒 pIRES-neo-HBAG, 得到与预期相符的条带(图3), 表明本试验成功构建了含有 HBV 融合基因的重组质粒载体。



1: pIRES-neo-PSCA 质粒; 2, 3: pIRES-neo-PSCA 质粒双酶切; M: DL5000 DNA marker.

图2 pIRES-neo-PSCA 双酶切鉴定琼脂糖凝胶电泳图

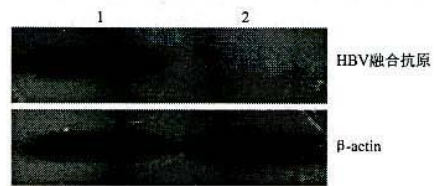


M: DL5000 DNA marker; 1: pIRES-neo-HBAG 质粒; 2: pIRES-neo-HBAG 质粒双酶切.

图3 pIRES-neo-HBAG 质粒双酶切鉴定琼脂糖凝胶电泳图

2.3 Western blot 法检测结果 将本实验所构建的重组质粒 pIRES-neo-HBAG 瞬时转染 293T 细胞后, 经免疫印迹检测, 重组质粒 pIRES-neo-HBAG 转染后的细胞裂解液能够显示出特异条带, 而空载体转染的细胞裂解液未现特异条带。HBV 融合抗原相对分

子质量(M_r)约 22 000(图5), 与预期大小基本一致。该实验表明, 所构建的 HBV 融合抗原基因真核表达载体 pIRES-neo-HBAG 能够在真核细胞中表达。



1: pIRES-neo-HBAG 转染后细胞裂解液; 2: 空载体转染后细胞裂解液.
图4 HBV 融合抗原 Western blot 法检测

2.4 瞬时转染细胞的流式细胞仪分析 将转染后 48 h 的细胞用小鼠抗 His 抗体, 4℃ 孵育 60 min, 然后用 PE 标记的山羊抗小鼠 IgG 抗体进行孵育, 用以检测 HBV 融合基因在 293T 细胞中的表达。流式细胞仪检测发现转染 48 h 后, HBV 融合基因在 293T 细胞中的阳性表达率为 39.56% (图5)。

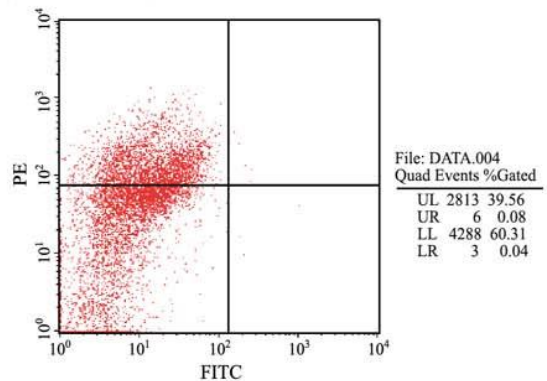
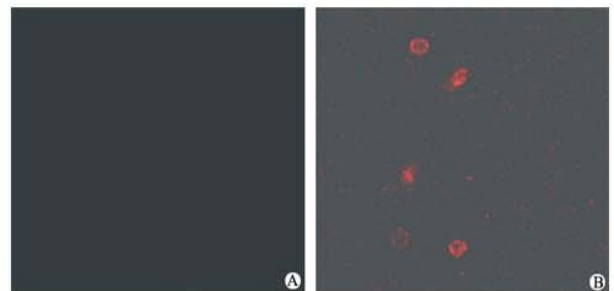


图5 流式细胞术检测重组质粒 pIRES-neo-HBAG 的表达

2.5 瞬时转染细胞的免疫荧光检测 将瞬时转染 48 h 后的 293T 细胞与小鼠抗 His 抗体, 4℃ 孵育 60 min, 然后用 PE 标记的山羊抗小鼠 IgG 抗体进行孵育, 激光共聚焦显微镜检测结果见图6。用 PE 波长检测时, 转染后的 293T 细胞呈现红色荧光(图6), 证明 HBV 融合基因可以在 293T 细胞中有效表达。



A: 空白对照; B: pIRES-neo-HBAG 转染后的 293T 细胞.

图6 激光共聚焦显微镜检测重组质粒 pIRES-neo-HBAG 的表达

3 讨论

HBV 感染呈全球性分布, 而我国更是高发区^[10]。目前对慢性乙型肝炎及其继发性病变如肝硬化、肝癌等尚无理想的治疗方法^[11-12]。近年迅速发展起来的核酸疫苗, 由于其能够模拟病毒的自然感染过程(同时又无病毒感染的风险), 在细胞内表达抗原并通过 MHC I 类途径内源性递呈, 激活 CD8⁺T 细胞反应^[13-14], 是研究治疗性疫苗的理想方式, 这也为慢性乙型肝炎的防治开创了新的思路。

本研究室前期基于甲病毒复制子 DNA 疫苗载体系统进行了创新性研究, 获得了一种新型乙肝治疗性 DNA 疫苗, 初步免疫效果检测显示: 该新型疫苗有较强的免疫原性, 能够诱导机体产生较强的体液和细胞免疫应答, 然而, 乙型肝炎病毒感染后病毒的清除主要靠 CTL^[4-5] 和 CTL 所释放的细胞因子^[6-7]。为了检测 HBV 基因免疫 BALB/c 小鼠产生的特异性 CTL 应答, 必须获得 CTL 应答的靶细胞, 即能稳定表达 HBV 抗原的细胞系^[15]。为此, 首先需要构建一个含有 HBV 融合抗原的真核表达质粒并验证该融合抗原的真核表达情况。

本研究从含有 HBV 融合抗原基因的质粒 pVAX1-HBV 中扩增出该 HBV 融合抗原基因片段, 通过限制性内切酶双酶切及测序鉴定后, 将其克隆入真核表达载体 pIRES-neo, 成功获得了 pIRES-neo-HBAG 真核表达质粒。将质粒 pIRES-neo-HBAG 在 LipofectamineTM2000 介导下转染至 293T 细胞。通过 Western blot 法检测表明, pIRES-neo-HBAG 转染的细胞裂解液中存在 M_r 约为 22 000 的 HBV 融合抗原的表达, 与预期完全一致。同时, 通过流式细胞仪检测, pIRES-neo-HBAG 瞬时转染的 293T 细胞中, 表达 HBV 融合抗原的阳性细胞率达到 39.56%。另外, 免疫荧光检测结果也进一步证明了该融合抗原能够在 293T 细胞中有效表达。

总之, 本实验成功构建了含有 HBV 融合抗原基因的真核表达载体, 且在 293T 细胞中证明了其表达情况。实验结果为建立和筛选稳定转染 HBV 融合抗原基因的细胞系奠定了一定的实验基础。

参考文献:

- [1] Xie YH, Hong R, Liu W, et al. Development of novel therapeutics for chronic hepatitis B[J]. *Viral Sin*, 2010, 25(4): 294-300.
- [2] Dybowska D, Kozielowicz D, et al. Forecasting of efficacy of chronic hepatitis B therapy[J]. *Przegl Epidemiol*, 2012, 66(1): 45-48.
- [3] Michailidis E, Kirby KA, Hachiya A, et al. Antiviral therapies: focus on hepatitis B reverse transcriptase[J]. *Int J Biochem Cell Biol*, 2012, 44(7): 1060-1071.
- [4] Chuai X, Chen H, Wang W, et al. Poly(I:C)/alum mixed adjuvant priming enhances HBV subunit vaccine-induced immunity in mice when combined with recombinant adenoviral-based HBV vaccine boosting[J/OA]. *PLoS One*, 2013, 8(1): e54126.
- [5] Jin HJ, Li HT, Sui HX, et al. Nicotine stimulated bone marrow-derived dendritic cells could augment HBV specific CTL priming by activating PI3K-Akt pathway[J]. *Immunol Lett*, 2012, 146(1-2): 40-49.
- [6] Im SJ, Sung YC. Action mechanism in immunopathogenesis and clearance of HBV[J]. *Korean J Hepatol*, 2006, 12(2): 154-162.
- [7] Proto S, Taylor JA, Chokshi S, et al. APOBEC and iNOS are not the main intracellular effectors of IFN-gamma-mediated inactivation of Hepatitis B virus replication[J]. *Antiviral Res*, 2008, 78(3): 260-267.
- [8] Martinot-Peignoux M, Lapalus M, Asselah T, et al. The role of HBsAg quantification for monitoring natural history and treatment outcome[J]. *Liver Int*, 2013, 33(1): 125-132.
- [9] Wang M, Qiu N, Lu S, et al. Serum hepatitis B surface antigen is correlated with intrahepatic total HBV DNA and cccDNA in treatment-naïve patients with chronic hepatitis B but not in patients with HBV related hepatocellular carcinoma[J]. *J Med Virol*, 2013, 85(2): 219-227.
- [10] Kim H, Lee SA, Kim DW, et al. Naturally occurring mutations in large surface genes related to occult infection of hepatitis B virus genotype C[J/OA]. *PLoS One*, 2013, 8(1): e54486.
- [11] Walsh R, Locamini S. Hepatitis B precore protein: pathogenic potential and therapeutic promise[J]. *Yonsei Med J*, 2012, 53(5): 875-885.
- [12] 苏雯静, 张野, 刘博, 等. 乙型肝炎疫苗联合 B7-H1 蛋白疫苗对 HBV 转基因小鼠抗 HBsAg 免疫应答的影响[J]. *细胞与分子免疫学杂志*, 2012, 28(2): 113-116.
- [13] Liu MA. DNA vaccines: an historical perspective and view to the future[J]. *Immunol Rev*, 2011, 239(1): 62-84.
- [14] Saade F, Petrovsky N. Technologies for enhanced efficacy of DNA vaccines[J]. *Expert Rev Vaccines*, 2012, 11(2): 189-209.
- [15] Jiang W. Blockade of B7-H1 enhances dendritic cell-mediated T cell response and antiviral immunity in HBV transgenic mice[J]. *Vaccine*, 2012, 30(4): 758-766.