

# HBV PreS2S/Fc融合基因真核表达载体的构建及表达

陈红梅, 白雪帆, 黄长形, 李光玉, 洪 沙

陈红梅, 白雪帆, 黄长形, 李光玉, 洪沙, 中国人民解放军第四军医大学唐都医院感染科 陕西省西安市 710038

陈红梅, 女, 1975-06-16 生, 山东省阳信县人, 汉族, 1998 年滨州医学院本科毕业, 1998-2004 年于第四军医大学攻读硕、博士学位. 主要从事乙型肝炎防治的研究.

项目负责人: 陈红梅, 710038, 陕西省西安市, 中国人民解放军第四军医大学唐都医院感染科.

电话: 029-87259845

收稿日期: 2003-11-26 接受日期: 2004-01-08

## Construction and expression of eukaryotic vector bearing fusion gene of HBV PreS2S and Fc fragment

Hong-Mei Chen, Xue-Fan Bai, Chang-Xing Huang, Gang-Yu Li, Sha Hong

Hong-Mei Chen, Xue-Fan Bai, Chang-Xing Huang, Gang-Yu Li, Sha Hong, Department of Infectious Diseases, Tangdu Hospital, Fourth Military Medical University, Xi'an 710038, Shaanxi Province, China

Correspondence to: Hong-Mei Chen, Department of Infectious Diseases, Tangdu Hospital, Fourth Military Medical University, Xi'an 710038, Shaanxi Province, China.

Received: 2003-11-26 Accepted: 2004-01-08

## Abstract

**AIM:** To construct and express a recombinant eukaryotic expression vector bearing fusion gene of HBV S2S and Fc fragment.

**METHODS:** The technique of splicing by overlapping extension and twice PCR were used, and fusion gene fragment was obtained and cloned into pGEM-T Easy TA cloning vector to get suited enzyme sites. Recombinant eukaryotic expression vector pcDNA3 S2S/Fc was constructed by double adhesive terminal ligation. Then the recombinant vector was transferred into SP2/0 cells by using Lipofectamine.

**RESULTS:** The recombinant vector was identified by digestion with restriction enzymes and confirmed by DNA sequencing analysis. And the vector bearing fusion gene could be expressed in eukaryotic cells detected by indirect immunofluorescence technique.

**CONCLUSION:** The relative efficient expression of the fusion gene in SP2/0 cells may provide an experimental basis for specific immunotherapy for HBV infection.

Chen HM, Bai XF, Huang CX, Li GY, Hong S. Construction and expression of eukaryotic vector bearing fusion gene of HBV PreS2S and Fc fragment. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2004;12(5):1081-1084

## 摘要

**目的:** 构建含 HBV PreS2S 和 Fc 融合基因的真核表达载体 pcDNA3 S2S/Fc 并在真核细胞中进行表达.

**方法:** 应用重叠延伸剪切技术(splicing by overlapping extension, 简称 SOE)经两次 PCR 获得嵌合基因片段 S2S/Fc, 回收后克隆到 pGEM-T Easy TA 克隆载体, 获得合适的酶切位点, 再采用双粘端连接法转克隆入真核表达载体 pcDNA3 中, 得到真核重组载体 pcDNA3 S2S/Fc. 然后用脂质体法转染 SP2/0 细胞.

**结果:** 对重组载体进行了限制性酶切鉴定及测序分析, 证明连接正确; 经间接免疫荧光检测证实该重组载体能在真核细胞中表达插入的外源性基因编码的融合蛋白.

**结论:** 真核表达载体 pcDNA3 S2S/Fc 的成功构建及在 SP2/0 细胞中的有效表达, 为进一步探讨 HBV 感染的特异性免疫治疗提供了实验依据.

陈红梅, 白雪帆, 黄长形, 李光玉, 洪沙. HBV PreS2S/Fc 融合基因真核表达载体的构建及表达. *世界华人消化杂志* 2004;12(5):1081-1084

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/12/1081.asp>

## 0 引言

乙型病毒性肝炎是一种发病率高、严重危害人类健康的传染病<sup>[1-10]</sup>. 25% 的慢性乙肝患者可发展为肝硬化和肝癌<sup>[11-15]</sup>, 至今尚无一种真正有效的治疗药物<sup>[16]</sup>. 目前, 基因免疫在流感、艾滋病、乙丙型肝炎<sup>[17-18]</sup>等感染性疾病的治疗研究中呈现出广阔的应用前景. 体内外实验表明基因疫苗可以同时诱导针对病原的体液和细胞免疫反应. 已知乙型肝炎病毒(HBV)是嗜肝 DNA 病毒, 其包膜蛋白由 HBsAg, preS1Ag 和 preS2Ag 组成, 中和表位位于 S 区. preS1Ag 和 preS2Ag 也均含有 T 细胞和 B 细胞表位, 可增强 S 抗原的免疫原性<sup>[19]</sup>. 而免疫球蛋白的 Fc 片段可以通过受体途径提高抗原的提呈效率<sup>[20]</sup>. 因此, 我们采用分子克隆技术, 将 HBV preS2+S 基因与 Fc 基因重组成融合基因, 构建了真核表达载体 pcDNA3 S2S/Fc, 以期通过表达的融合蛋白发挥二者的协同作用, 增强基因疫苗诱导的免疫反应.

## 1 材料和方法

**1.1 材料** 含有人 Fc 片段编码基因的 pCMVsFc 质粒由陈思毅教授(*J Immunol* 2000;165(8):4581-91)惠赠. 含 HBV 全基因的质粒 p1.2 II 载体质粒 pcDNA3 及 SP2/0 细胞由本室保存. 高保真 polybest DNA 聚合酶购自 TaKaRa 公司. 各种限制性内切酶, Taq DNA 聚合酶, Wizard<sup>TM</sup> PCR Preps DNA Purification System 和 pGEM-T Easy Vector

Systems 均购自Promega 公司. 小提质粒试剂盒购自华舜公司. 脂质体转染试剂盒Lipofectamine™2000 Reagent 购自GIBCO 公司. 人抗HBsAg 购自上海生物制品研究所, 小鼠抗人Fc 为第四军医大学免疫学教研室产品. FITC 标记山羊抗鼠IgG、兔抗人IgG 均为北京中山生物技术有限公司进口分装试剂. 胰蛋白酶、酵母提取物为英国Oxford 产品. 其余生化试剂均为常规分析纯的进口或国产试剂. RPMI1640 和DMEM 培养基, 均购自GIBCO 公司. 胎牛血清购自杭州四季青生物制品公司.

**1.2 方法** 真核表达载体pcDNA3 S2S/Fc的构建参照文献(J Exp Med 1992;175:495-502), 用重叠延伸剪接术(splicing by overlap extention, SOE)经两次PCR 获得嵌和基因片段S2S/Fc, 回收后, 克隆入pGEM-T Easy TA 克隆载体, 转化大肠杆菌JM109, 挑选阳性克隆酶切鉴定后, 酶切目的片段转克隆入真核表达载体pcDNA3 中. 根据HBV-adr 亚型中国株基因序列和Fc 基因序列合成并纯化4条引物, 引物由上海基康和Takara 生物技术有限公司合成. 引物序列如下: 上游引物F: 5' -CGGAAGCTTA TGCAGTGGAA CTCCACAAC-3' 中间引物M1: 5' -GCATGTGTGA GTTTTAATGT ATACCCAAAG-3'; 中间引物M2: 5' -CTTTGGGTAT ACATTAAAAC TCACACATGC-3'; 下游引物R: 5' -TATTATCATT TACCCGGAGA CAG-3'. F 为HBV preS2S基因的上游引物, 引入Hind III 酶切位点; 中间引物M1 和M2 是完全互补的, 分别含HBV S 基因C 端15 bp (2 639 nt-2 653 nt)和Fc N 端去掉起始码和信号肽后的15 bp, 共30 bp 的序列; R 为Fc 片段的下游引物. 第1次PCR, 以质粒p1.2 II 为模板, 用引物F 和M1 扩增HBV preS2S基因片段(约850 bp). 以质粒pCMVsFc 为模板, 用引物M2 和R 扩增Fc 基因片段(634 bp). 反应条件: 94 °C 预变性5 min, 94 °C 变性45 s, 55 °C 退火45 s, 72 °C 延伸45 s, 35 个循环, 最后72 °C 延伸10 min. 用10 g/L 琼脂糖凝胶电泳分离上述PCR 产物后, 以Wizard™ PCR Preps DNA Purification System 回收产物. 第2次PCR, 以第1次PCR 产物为模板, 各取100 ng, 用引物F 和R 扩增, 获得基因片段S2S/Fc. 反应条件: 94 °C 预变性5 min, 94 °C 变性45 s, 58 °C 退火1 min, 72 °C 延伸1 min, 35 个循环, 最后72 °C 延伸30 min. 回收第2次PCR 产物. 目的片段S2S/Fc 与pGEM-T Easy TA 克隆载体的连接, 按操作说明书进行. 挑取单克隆菌落于3 mL+Amp 的LB 培养基中, 震荡过夜, 用小提质粒试剂盒提取质粒. 分别用Eco R I 进行单、双酶切鉴定插入片段的大小. 将目的片段转克隆入真核表达载体pcDNA3 中, 用Hind III 和EcoR I 双酶切pGEM-T EasyS2S/Fc 质粒和载体pcDNA3, 得到目的片段和线形载体, 采用双粘端连接法连接, 转化新鲜的感受态菌JM109. 挑取单克隆菌落于3 mL+Amp 的LB 培养基中, 震荡过夜, 用小提质粒试剂盒提取质粒. 分别用Hind III 和EcoR I+Hind III 进行单、双酶切鉴定. 并送上海生

物工程有限公司测序.

**1.2.1 pcDNA3 S2S/Fc 在SP2/0 细胞中的瞬时表达** 用含100 mL/L 胎牛血清的DMEM 培养基, 于37 °C, 50 mL/L CO<sub>2</sub> 孵箱中培养. 用小提质粒试剂盒提取质粒. 重组质粒的转染用脂质体介导转染法进行. 按照脂质体转染试剂盒LIPOFECTAMINE™2000 Reagent 的操作说明书, (1) 将SP2/0 细胞接种于25 mL 培养瓶内; (2) 培养18-24 h, 使处于对数生长期的细胞达90-95% 融和; (3) 无菌Ep 管中制备, 10 µg DNA 溶于100 µL 无血清、无抗生素的DMEM 中; 15 µL Lipofectamine 溶于85 µL 无血清、无抗生素的DMEM 中. 将此两溶液在5 min 内混合; (4) 用无血清、无抗生素的DMEM 洗涤细胞2 次. 加入1.8 mL 无血清、无抗生素的DMEM; (5) 将Lipofectamine+DNA 混合物200 µL 小心滴加至细胞上. (6) 37 °C, 50 mL/L CO<sub>2</sub> 孵箱中培养4-6 h 后, 换为完全培养基继续培养; (7) 转染48-72 h 内检测重组质粒的表达. (8) 同时设置一空白和空载体对照孔.

**1.2.2 用间接免疫荧光法检测抗原的表达** 参照实用免疫细胞化学与核酸分子杂交技术(四川科学技术出版社, 1994), (1) 将转染细胞悬液滴加至用多聚赖氨酸预处理的载玻片上, 风干后, 置冷丙酮中固定10 min; (2) 用pH 7.2 的PBS 冲洗5 min × 2 次; (3) 滴加含50 mL/L 胎牛血清的PBS 封闭30 min; (4) 分别滴加未标记的第一抗体人抗HBsAg 和鼠抗Fc(按1:50 稀释)于固定细胞上, 置湿盒中37 °C 作用1 h; (5) 用PBS 冲洗5 min × 3 次; (6) 分别滴加FITC 标记的兔抗人和山羊抗鼠的第二抗体(按1:100 稀释), 置37 °C 湿盒中作用1 h; (7) 用PBS 冲洗5 min × 3 次; (8) 风干后, 用含500 mL/L 甘油, 500 mL/L 0.01 mol/L, pH 7.2 的PBS 溶液封片, 荧光显微镜下观察.

## 2 结果

**2.1 pcDNA3 S2S/Fc 重组体的鉴定** 重组质粒分别经Hind III 和Hind III +EcoR I 单双酶切, 可见与理论结果一致的6.8 kb, 5.4 kb 和1.4 kb 的电泳条带(图1), 测序确证.

**2.2 融合基因S2S/Fc 在真核细胞中的瞬时表达** 用间接免疫荧光法, 在荧光显微镜下观察到了融合抗原的表达(图2).

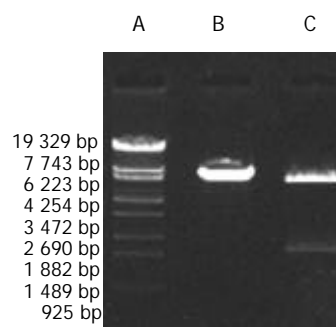


图1 重组质粒pcDNA3 S2S/Fc 测序. A: λ -EcoT14I digest marker; B: pcDNA3 S2S/Fc digested by Hind III; C: pcDNA3 S2S/Fc digested by Hind III +EcoRI.

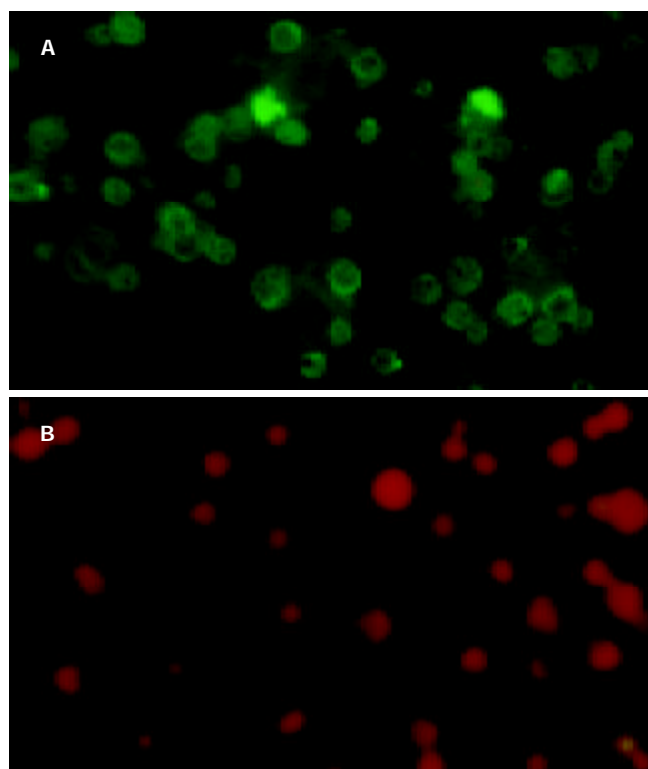


图2 重组质粒pcDNA3 S2S/Fc转染SP2/0细胞融合蛋白的表达. A: 细胞膜阳性; B: 阴性对照.

### 3 讨论

HBV S基因含前S1, 前S2和HBsAg基因, 分别编码前S1, 前S2和HBsAg, 他们是HBV包膜的主要成分, 可诱导机体产生相应的抗体, 这些抗体能保护机体免受HBV的感染, 产生保护性免疫. 近年来研究表明, 在HBV感染过程中, 前S2可能起着非常重要的作用. 阻断前S2的作用将可能阻止HBV的感染. 研究表明, 含前S1, 前S2和HBsAg的第三代重组疫苗的免疫原性较强, 能诱导机体产生较高的抗-HBs水平和免疫保护能力<sup>[21]</sup>. 应用前S2/HIVgp120嵌合基因<sup>[22]</sup>和前S2/HCV嵌合基因<sup>[23]</sup>的DNA疫苗可诱导小鼠产生很强的抗-HIV和抗-HCV的体液和细胞免疫反应, 显示前S2可能是一种广谱的免疫佐剂.

DNA疫苗诱导免疫反应的效率相对较低, 尤其是对于大动物种系和人类, 这削弱了他们的实际应用. 尽管花费了相当大的努力来提高DNA疫苗的运输效率, 但在接种DNA疫苗后仅少量抗原能够表达发挥免疫功效. 目前应用的提高和调节DNA疫苗诱导的免疫反应补充策略之一是, 通过与细胞表面受体分子结合的抗原融合将DNA疫苗编码的抗原靶向导入到细胞表面. 通过与MHCII类分子结合将抗原靶向到APCs, 以增强靶向蛋白的免疫原性. 诱导对靶向蛋白的体液免疫反应的水平 and 反应的速度都能被极大的提高, 尤其是应用低剂量的抗原时<sup>[24-30]</sup>.

基于以上的研究策略, 我们成功构建了含HBV preS2S与Fc融合基因的真核表达载体pcDNA3 S2S/Fc, 并在SP2/0细胞中进行了有效的表达, 为进一步提高

HBV DNA的免疫效果创造了条件.

### 4 参考文献

- 1 Wang FS. Current status and prospects of studies on human genetic alleles associated with hepatitis B virus infection. *World J Gastroenterol* 2003;9:641-644
- 2 Tang ZY. Hepatocellular carcinoma-cause, treatment and metastasis. *World J Gastroenterol* 2001;7:445-454
- 3 Hou CS, Wang GQ, Lu SL, Yue B, Li MR, Wang XY, Yu JW. Role of activation-induced cell death in pathogenesis of patients with chronic hepatitis B. *World J Gastroenterol* 2003;9:2356-2358
- 4 Wang RX, Boland G, Guo Y, Lei SP, Yang CH, Chen J, Tian J, Wen JY, Du KH, van Hattum J, de Gast GC. Is a low dose of hepatitis B vaccine enough for a rapid vaccination scheme? *World J Gastroenterol* 2003;9:2353-2355
- 5 Bai YJ, Zhao JR, Lv GT, Zhang WH, Wang Y, Yan XJ. Rapid and high throughput detection of HBV YMDD mutants with fluorescence polarization. *World J Gastroenterol* 2003;9:2344-2347
- 6 Gao PJ, Piao YF, Liu XD, Qu LK, Shi Y, Wang XC, Yang HY. Studies on specific interaction of beta-2-glycoprotein I with HBsAg. *World J Gastroenterol* 2003;9:2114-2116
- 7 Wang JY, Liu P. Abnormal immunity and gene mutation in patients with severe hepatitis-B. *World J Gastroenterol* 2003;9:2009-2011
- 8 Wang NS, Wu ZL, Zhang YE, Guo MY, Liao LT. Role of hepatitis B virus infection in pathogenesis of IgA nephropathy. *World J Gastroenterol* 2003;9:2004-2008
- 9 Li XM, Yang YB, Hou HY, Shi ZJ, Shen HM, Teng BQ, Li AM, Shi MF, Zou L. Interruption of HBV intrauterine transmission: a clinical study. *World J Gastroenterol* 2003;9:1501-1503
- 10 Chen XS, Wang GJ, Cai X, Yu HY, Hu YP. Inhibition of hepatitis B virus by oxymatrine in vivo. *World J Gastroenterol* 2001;7:49-52
- 11 Rabe C, Pilz T, Klostermann C, Berna M, Schild HH, Sauerbruch T, Caselmann WH. Clinical characteristics and outcome of a cohort of 101 patients with hepatocellular carcinoma. *World J Gastroenterol* 2001;7:208-215
- 12 Yang X, Tang XP, Lei JH, Luo HY, Zhang YH. A novel stop codon mutation in HBsAg gene identified in a hepatitis B virus strain associated with cryptogenic cirrhosis. *World J Gastroenterol* 2003;9:1516-1520
- 13 Shen LJ, Zhang HX, Zhang ZJ, Li JY, Chen MQ, Yang WB, Huang R. Detection of HBV, PCNA and GST-pi in hepatocellular carcinoma and chronic liver diseases. *World J Gastroenterol* 2003;9:459-462
- 14 Assy N, Paizi M, Gaitini D, Baruch Y, Spira G. Clinical implication of VEGF serum levels in cirrhotic patients with or without portal hypertension. *World J Gastroenterol* 1999;5:296-300
- 15 Han LH, Sun WS, Ma CH, Zhang LN, Liu SX, Zhang Q, Gao LF, Chen YH. Detection of soluble TRAIL in HBV infected patients and its clinical implications. *World J Gastroenterol* 2002;8:1077-1080
- 16 Lu LG, Zeng MD, Mao YM, Li JQ, Wan MB, Li CZ, Chen CW, Fu QC, Wang JY, She WM, Cai X, Ye J, Zhou XQ, Wang H, Wu SM, Tang MF, Zhu JS, Chen WX, Zhang HQ. Oxymatrine therapy for chronic hepatitis B: a randomized double-blind and placebo-controlled multi-center trial. *World J Gastroenterol* 2003;9:2480-2483
- 17 Maier I, Wu GY. Hepatitis C and HIV co-infection: a review. *World J Gastroenterol* 2002;8:577-579
- 18 Wang QC, Nie QH, Feng ZH. RNA interference: antiviral weapon and beyond. *World J Gastroenterol* 2003;9:1657-1661
- 19 Shi CH, Cao C, Khig JS, Li J, Ma QJ. Gene fusion of cholera toxin B subunit and HBV pre S2 epitope and the antigenicity of fusion protein. *Vaccine* 1995;13:933-937
- 20 You Z, Huang XF, Hester J, Rollins L, Rooney C, Chen SY. Induction of vigorous helper and cytotoxic T cell as well as B cell response by dendritic cells expressing a modified antigen

- targeting receptor-mediated internalization pathway. *J Immunol* 2000;165:4581-4592
- 21 Pride MW, Bailey CR, Muchmore E, Thanavala Y. Evaluation of B and T-cell responses in chimpanzees immunized with hepagene, a hepatitis B vaccine containing Pre-S1, Pre-S2 gene products. *Vaccine* 1998;16:543-550
- 22 Fomsgaard A, Nielsen HV, Bryder K, Nielsen C, Machuca R, Bruun L, Hansen J, Buus S. Improved humoral and cellular immune responses against the gp120 V3 loop of HIV-1 following genetic immunization with a chimeric DNA vaccine encoding the V3 inserted into the hepatitis B surface antigen. *Scand J Immunol* 1998;47:289-295
- 23 Major ME, Vitvitski L, Mink MA, Schleef M, Whalen RG, Treppe C, Inchauspe G. DNA-based immunization with chimeric vectors for the induction of immune responses against the hepatitis C virus nucleocapsid. *J Virol* 1995;69:5798-5805
- 24 Wang H, Griffiths MN, Burton DR, Ghazal P. Rapid antibody responses by low-dose, single-step, dendritic cell-targeted immunization. *Proc Natl Acad Sci USA* 2000;97:847-852
- 25 Schjetne KW, Gundersen HT, Iversen JG, Thompson KM, Bogen B. Antibody-mediated delivery of antigen to chemokine receptors on antigen-presenting cells results in enhanced CD4+ T cell responses. *Eur J Immunol* 2003;33:3101-3108
- 26 Robson NC, Beacock-Sharp H, Donachie AM, Mowat AM. The role of antigen-presenting cells and interleukin-12 in the priming of antigen-specific CD4+ T cells by immune stimulating complexes. *Immunology* 2003;110:95-104
- 27 Creusot RJ, Thomsen LL, Tite JP, Chain BM. Local cooperation dominates over competition between CD4+ T cells of different antigen/MHC specificity. *J Immunol* 2003;171:240-246
- 28 Storni T, Bachmann MF. On the role of APC-activation for in vitro versus in vivo T cell priming. *Cell Immunol* 2003;225:1-11
- 29 Preynat-Seauve O, Coudurier S, Favier A, Marche PN, Villiers C. Oxidative stress impairs intracellular events involved in antigen processing and presentation to T cells. *Cell Stress Chaperones* 2003;8:162-171
- 30 Wauben MH, 't Hoen EN, Taams LS. Modulation of T cell responses after cross-talk between antigen presenting cells and T cells: a give-and-take relationship. *Novartis Found Symp* 2003;252:211-220

## World Journal of Gastroenterology 稿件来源及论文资助情况

随着我国科学研究整体水平的提高, 质量较高的论文逐年增加, 来自名牌大学、研究院所, 特别是具有良好科学记录的实验室、课题组和科学家的论文增长幅度较大. 2003-04-01/2003-10-01 以来《World Journal of Gastroenterology, WJG》共收到论文 618 篇, 其中国内论文 501 篇(81.06%), 国际论文 117 篇(18.93%). WJG 2003 年 1-10 期共发表论文 521 篇, 其中文献综述 21 篇, 食管癌 27 篇, 胃癌 54 篇, 肝癌 65 篇, 大肠癌 39 篇, 病毒性肝炎 46 篇, 幽门螺杆菌 20 篇, 基础研究 115 篇, 临床研究 62 篇, 研究快报 62 篇, 病例报告 8 篇, 读者来信 2 篇. 发表国内论文 450 篇(86.37%), 发表国际论文 71 篇(13.62%). 作者共 2949 人, 国际作者占 14.41%, 国内作者占 85.90%. 发表论文分布 34 个国家和地区, 包括阿根廷、澳大利亚、巴基斯坦、巴西、比利时、波兰、丹麦、德国、法国、芬兰、韩国、荷兰、加拿大、克罗地亚、美国、南非、南斯拉夫、日本、瑞典、瑞士、沙特阿拉伯、泰国、土耳其、西班牙、希腊、新加坡、匈牙利、伊朗、意大利、印度、英国、中国、中国台湾、中国香港. 基金资助论文 292 篇(56.04%), 各项目基金论文共 440 篇(84.45%), 其中国际基金论文 25 篇(4.79%), 国家 973、863、国家自然科学基金资助论文 180 篇(34.54%), 部、省级基金资助论文 235 篇(45.10%). WJG 2002 年共发表论文 226 篇, 分布为 26 个地区, 国内论文占 93.36%, 国际论文占 6.63%, 基金论文占 60.61%. WJG 2001 年共发表论文 173 篇, 分布 20 个地区, 112 个机构, 国际论文占 35%, 基金论文占 55%. WJG 2000 年共发表论文 205 篇, 基金论文占 50%. WJG 1999 年共发表论文 144 篇, 分布 20 个地区, 100 个机构, 国际论文占 23%, 基金论文占 50%. WJG 1998 年共发表论文 183 篇, 11 个地区分布, 国际论文占 9.84%, 基金论文占 59.56%.