

HBsAg 重组腺病毒载体的包装和表达*

周 智, 姚集鲁, 卢建溪, 陈文思, 刘淑芳
(中山医科大学附属第三医院 传染病科实验室, 广东 广州 510630)

摘 要: 为探索腺病毒载体在基因治疗中的应用及其表达目的抗原的有效性. 用 *Bam*HI、*Eco*RI 双切质粒 pBluscript KS⁺-HBs, 回收 S 基因片段, 定向克隆插入质粒 pACCMVpL 中相应的酶切位点, 通过快速抽提、酶切鉴定筛选重组质粒. 将重组质粒与 pJM17 共转染 293 细胞进行包装, 挑取单个空斑感染 24 孔板中的 293 细胞, 取上清 HBsAg A 值最高的重组病毒扩大培养, 纯化和滴度测定. 并感染 PA317、HePG2、Vero 细胞, 检测 HBsAg 的表达. 挑取的 20 个空斑感染 293 细胞后, 9 个 HBsAg 阳性. 扩大培养、纯化后测得其滴度为 9.6×10^8 pfu/mL, 感染 PA317、HePG2、Vero 细胞后 72 h, 其上清中 HBsAg A 值分别为 0.53、0.89、0.52. 成功地构建了表达 HBsAg 基因的重组腺病毒载体, 在 293 细胞中进行了包装, 并在其它真核细胞中得到了表达.

关键词: 病毒性肝炎, 乙型; 腺病毒载体; DNA 重组

中图分类号: R512.36; Q784 **文献标识码:** A

基因治疗已经开始用于遗传病、肿瘤及病毒性疾病等的治疗试验, 基因转移方法是基因治疗的基础和关键. 目前有物理化学法、病毒载体转移法. 前者转移效率低使用受限, 腺病毒载体作为基因治疗的运载系统具有宿主范围广、繁殖滴度高、不整合、对静止期细胞也能感染及相对安全等特点, 近年来发展很快^[1]. 本研究构建 E1 区缺失的重组腺病毒载体, 在 293 细胞中表达、包装, 然后纯化病毒, 并在 PA317、HePG2、Vero 细胞中表达, 拟用于基因治疗实验, 现将结果报道如下.

1 材料和方法

1.1 材 料

1.1.1 质粒、菌株和细胞 pACCMVpL 大小为 8.8 kb, 含 5 型腺病毒部分 E1 区及包装信号, 氨苄青霉素耐药 (中山医科大学附属第三医院传染病科实验室保存); pBluscript KS⁺-HBs, 含 HBV adw 亚型部分 preS 和 S 基因, 受体菌 *xl1-blue*; pJM17 含腺病毒 5 型基因组, 并在 E1 区插入 pBRX (4.3 kb) (重庆医科大学肝炎研究所惠赠), 因其超过包装长度, 在细胞中不能包装成病毒颗粒. 293 细胞, 为人胚肾细胞, 用 EMEM 培养基培养; HepG2 细胞: 为人肝癌传代细胞系, 用 DMEM 培养基培养; Vero 细胞 (非洲绿猴肾细胞), 由中山医科大学微生物教研室陈元博士惠赠. PA317 是 NIH/3T3 TK⁻ 细胞用逆转录病毒的包装信

* 基金项目: 第 26 届中国博士后基金资助项目 ([1999] 17); 中山医科大学科研启动基金资助项目
收稿日期: 2000-09-18; 作者简介: 周智 (1966~), 男, 医学博士, 讲师; 研究方向: 乙型肝炎基因治疗、基因免疫和治疗性乙肝疫苗的研究.

号和单纯疱疹病毒的 TK 基因转化而来, 中山医科大学附属第三院传染病科实验室保存.

1.1.2 各种酶来源 限制性内切酶 *Bam*H I、*Eco*R I、*T*₄ DNA 连接酶购于 Promega 公司.

1.1.3 试剂及其它 琼脂糖, 加拿大真达公司. 快速质粒提取试剂盒、胶回收试剂盒分别购于宝灵曼公司和 BIO-RAD 公司. Bacto 琼脂、EMEM 及 DMEM 培养基 GIBCOLBRL 公司. ProFection (Mammalian Transfection system[®] calcium phosphate E1200) 购于 Promega 公司. 6 孔板、24 孔板购于 Costar 公司.

1.2 方 法

1.2.1 重组质粒的构建 用 *Bam*H I、*Eco*R I 从 pBluscript KS⁺-HBs 质粒中切取 S 基因片段, 插入载体 pACCMVpL 中相应的酶切位点, 如图 1.

1.2.2 重组载体与 pJM17 共转染 293 细胞及空斑挑取鉴定 用 6 孔板培养细胞, 待细胞 80%~90% 融合时, 按转染试剂盒说明书进行操作, 于转染后 4~5 h, 吸去细胞培养基, 在细胞表面覆盖 (42~45) °C $\rho=0.8\%$ 的营养琼脂, 待空斑出现后挑取空斑, 感染 24 孔板中的 293 细胞, 细胞完全出现病变后, 取上清测定 HBsAg, 选其 A 高者扩大培养, 扩增重组病毒.

1.2.3 重组腺病毒载体扩大培养、初步纯化及滴度测定

(1) 重组腺病毒扩增. 细胞大约 80%~90% 融合, 吸去培养基, 加入适当浓度的病毒液 (0.5 mL/100 mL 培养瓶), 其 moi (multiplicity of infection) 为 (1~10) pfu/细胞. 放入 CO₂ 孵箱中, 每 30 min 轻摇混匀 1 次, 共 2 h, 然后加入含 $\varphi=2\%$ 牛血清的 EMEM, 每天观察细胞形态 2 次, 待细胞完全出现病变 (变圆), 尚未完全自瓶壁脱落, 约 48 h, 收集细胞悬液, 1 000 r/min 离心 5 min, 细胞沉淀用 PBS 洗 3 次, 收集细胞, 冻存于 -70 °C.

(2) 重组腺病毒纯化. 用 5 mL 0.1 mol/L Tris-HCl 重悬沉淀, 反复冻融, 再用注射器抽吸打断细胞 DNA, 即得到初步纯化的重组腺病毒, 进一步用 CsCl 超速离心.

(3) 重组病毒滴度测定. 空斑实验 (plaque-forming unit, pfu) 参照文 [2].

1.2.4 重组腺病毒载体在 PA317、HePG2 及 Vero 细胞中表达 感染方法同上, 于感染后 24 h、72 h 取上清检测 HBsAg.

2 结 果

2.1 重组载体的构建、鉴定

如图 2 所示, 重组体经 *Bam*H I、*Eco*R I 酶切后有 2 条带, 大片段与空载体在同一位

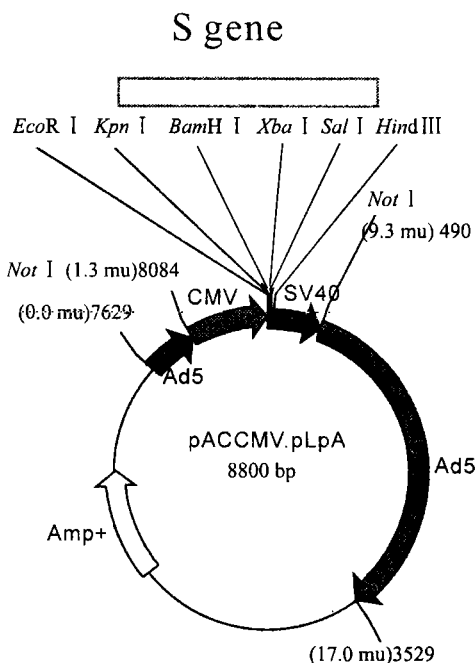


图 1 pACCMVpL-HBs 重组体的构建技术路线

置, 而小片段与 S 基因在同一位置, 载体约 8.8 kb, 目的基因约 950 bp, 说明重组体构建成功。

2.2 重组载体的包装、

空斑挑起及滴度测定

重组载体与 pJM17 共转染 293 细胞后 (3~4) d, 空斑开始出现, 第 6 d 最明显。随机挑取 20 个空斑感染 293 细胞后, 9 个感染孔细胞上清 HBsAg 阳性, 取 HBsAg A 最高的 2 孔 (分别为 0.45, 0.63) 病毒液感染 293 细胞进一步扩大培养, 纯化后 3 次测得重组病毒滴度为 1.2×10^9 , 8.8×10^8 , 7.9×10^8 , 平均为 9.6×10^8 pfu/mL。

2.3 重组载体在真核中表达

重组病毒感染真核细胞后不同时间 HBsAg 的表达如表 1 (检测波长 450 nm, cutoff 值 = 0.10)。

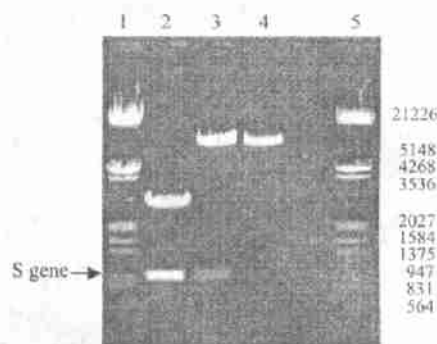


图 2 PACCMVpl-HBs 重组体的酶切鉴定

表 1 重组腺病毒载体在 PA317、HePG2 及 Vero 细胞中的表达 A 值¹⁾

Cell/h	24	72
PA317	0.35	0.53
HePG2	0.57	0.89
Vero	0.38	0.52

1) 为 3 次测定的平均值

3 讨 论

乙型肝炎病毒感染后易成为慢性, 且反复发作, 病情迁延, 最终导致肝硬化、肝癌。虽然在抗病毒治疗方面有一些进展, 干扰素、核酸类似物仅在治疗期间显示一定疗效, 但停药后反跳, 难以取得持续长久的疗效。核酶、反义核酸仅仅停留在体外细胞水平, 尚难在临床实施, 因此寻找更为有效的乙型肝炎防治方法显得非常重要。近年来随着分子生物学的飞速发展, 乙型肝炎基因疫苗、基因治疗的研究, 给乙型肝炎防治开辟了一条新途径。腺病毒载体宿主范围广泛, 繁殖滴度高, 不整合, 对静止期细胞亦能感染, 并且易于扩增和制备, 近年来发展较快, 已用于体外及临床试验, 未见明显毒副作用^[3,4]。重组腺病毒载体构建有 2 种方式, 一是将含目的基因的腺病毒的一段 DNA 与另一段 DNA 体外直接连接, 再转染 293 细胞包装, 其缺点是腺病毒 DNA 较大, 约 36 kb, 操作困难。二是将含腺病毒部分 DNA 及目的基因的质粒与含腺病毒 DNA 另一部分的质粒 (如 pJM17) 共转染 293 细胞, 两质粒通过在细胞内同源重组, 得到重组病毒, 此方法相对简单, 但效率较低。本研究构建表达 HBsAg 的重组腺病毒载体, 与 pJM17 共转染 293 细胞后, 得到了成功包装, 在其它真核细胞中亦有效地表达了目的抗原, 为进一步用于基因治疗实验, 消除乙肝免疫耐受奠定了基础。

已发现人类腺病毒 (Ad) 49 个血清型, 用于构建基因转移载体的多为 Ad2 和 Ad5 型。腺病毒基因组 E_1 、 E_3 及 E_4 起始区和右侧端 LTR 之间都可以插入外源基因构建重组体。 E_1 区载体容量稍大, 在体内不能复制, 但重组病毒产量较低, 而且只能在 293 细胞中才能复制、扩增; E_3 区载体不影响病毒复制, 产量高, 可口服, 但该类载体病毒基因删除少, 病毒基因产物多, 免疫原性强。本研究将外源基因插入 E_1 区, 主要从安全性方面考虑。

参考文献:

- [1] 周智,张定凤. 重组腺病毒载体研究现状[J]. 中华肝脏病杂志, 1998, 6(1): 57.
- [2] GRAHAM F L, PREVEC L. Manipulation of adenovirus vectors. In: MURRAY E J Ed. Methods in Molecular Biology: Gene Transfer and Expression Protocols. Vol. 7. Clifton, NJ: The Humana Press Inc, 1991, 109 ~ 128.
- [3] LIU G Q, KATHERINE J D, EXCOFTON A, et al. Efficient adenovirus-mediated ectopic gene expression of human lipoprotein lipase in human hepatic (HepG2) cells[J]. Human Gene Therapy, 1997, 8(1): 205.
- [4] MAGOVERN C J, MACK C A, ZHANG J, et al. Regional Angiogenesis induced in nonischemic tissue by an adenoviral Vector expressing vascular endothelial growth factor[J]. Human Gene Therapy, 1997, 8(1): 215.

Package of HBsAg-Expressing Recombinant Adenoviral Vector and It's Expression

ZHOU Zhi^{*}, YAO Ji-lu, LU Jiang-xi, CHEN Wen-si, LIU Shu-fang

Abstract: To explore the use of adenoviral vector in gene therapy and the effectiveness of target antigen expression in it. S gene was released from pBluscript KS⁺-HBs by *Bam*H I、*Eco*R I cutting, then inserted directionally into plasmid pACCMVpL. The recombinant vector was identified by restriction endonuclease analysis. Recombinant vector was packaged by cotransfected into 293 cells with pJM17, and 293 cells in 24 wells plate were infected with the selected plaque. Recombinant virus expressing HBsAg highest were further propagated, purified, and titrated. HBsAg expression of the recombinant vector was also tested in PA317, HePG2, and Vero cells. Nine of the 20 plaques selected expressed HBsAg positively, and the titre of the purification recombinant virus was 9.6×10^8 pfu/mL. HBsAg A values in the supernatants of PA317, HePG2, and Vero cells were 0.53, 0.89, 0.52 respectively 72 hours after infection. The recombinant adenoviral vector expressing HBsAg was constructed and packaged in 293 cells successfully, which was confirmed to express HBsAg in other eukaryotic cells.

Keywords: hepatitis B virus; adenoviral vector; DNA recombinant

^{*} Department of Infectious Diseases, The Third Affiliated Hospital, Sun Yat-sen University of Medical Sciences, Guangzhou 510630, China