

乙肝表面抗原和弓形虫棒状体分泌抗原 多功能真核表达载体的构建与鉴定

魏庆宽, 肖 婷, 李 瑾, 马丽萍, 王 林, 王英婷, 闫运琴, 高建丽,
朱 嵩, 仲维霞, 尹 昆, 付 斌, 张佃波, 闫 歌, 黄炳成

基金项目: 山东省自然科学基金资助项目(编号:2009ZRC03083;2009ZRC03050); 山东省科技攻关项目(编号:2010GWZ20232); 济宁市科技发展计划项目(编号:济科 2009-56-21)

作者单位: 272033 济宁, 山东省医学科学院, 山东省寄生虫病防治研究所, 山东省医学科学院寄生虫病分子免疫学重点实验室, 世界卫生组织组织淋巴丝虫病、绦囊虫病合作中心(魏庆宽, 肖 婷, 李 瑾, 朱 嵩, 仲维霞, 尹 昆, 付 斌, 张佃波, 闫 歌, 黄炳成); 济宁市第一人民医院(马丽萍, 王 林, 王英婷, 闫运琴, 高建丽)

作者简介: 魏庆宽(1969-), 男, 大学本科, 医学学士, 副研究员, 研究方向: 寄生虫病与消化病分子生物学和免疫学。E-mail: weiqing-kuan@yahoo.com.cn

通讯作者: 黄炳成(1962-), 男, 医学硕士, 研究员, 硕士生导师, 研究方向: 寄生虫病分子生物学和免疫学。E-mail: hbc863@hotmail.com

[摘要] **目的** 探讨通过体外扩增乙肝表面抗原(HBsAg)基因, 构建真核表达载体 pcDNA₃-HBsAg-ROP₂ 的可行性。**方法** 根据乙肝 S 基因序列及 pcDNA₃-p30-ROP₂ 酶切位点等情况设计、合成引物, 应用聚合酶链反应(PCR)技术, 扩增 HBsAg 基因片段; 应用回收、纯化、酶切、连接等技术, 将 HBsAg 基因替换 pcDNA₃-p30-ROP₂ 中的 p30 基因, 并进行酶切、PCR 扩增及测序鉴定。**结果** PCR 扩增出约 0.7 kb 的目的基因 HBsAg, 成功构建 pcDNA₃-HBsAg-ROP₂ 重组载体。PCR、酶切结果与理论相符, 重组体包含了 HBsAg 和 ROP₂ 基因的完整序列。**结论** 利用体外扩增乙肝表面抗原, 可成功构建乙肝和弓形虫多功能重组载体 pcDNA₃-HBsAg-ROP₂。

[关键词] 乙肝表面抗原(HBsAg); 弓形虫; 棒状体分泌抗原 2(ROP₂); 真核表达载体 pcDNA₃; 基因重组

[中图分类号] R 512.6⁺2 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1674-3806(2013)03-0191-05
doi:10.3969/j.issn.1674-3806.2013.03.01

Construction and identification of multifunctional eukaryotic expression vector of HBsAg and ROP₂ WEI Qing-kuan, XIAO Ting, LI Jin, et al. Shandong Academy of Medical Sciences, Shandong Institute of Parasitic Disease, Shandong Academy of Medical Science Key Laboratory of Molecular Immunology of Parasitic Disease, WHO Collaborating Centre for Lymphatic Filariasis and Taeniasis/Cysticercosis, Jining 272033, China

[Abstract] **Objective** To construct eukaryotic expression vector pcDNA₃-HBsAg-ROP₂ by amplifying HBsAg by PCR. **Methods** According to the specific sequence of HBsAg and restriction sites of pcDNA₃-p30-ROP₂, the primers were designed and synthesized. HBsAg was amplified by PCR, then purified HBsAg gene was inserted into vector instead of p30 by enzyme digestion and ligation, and the construct was identified by enzyme digestion, PCR and sequencing. **Results** 0.7 kb of HBsAg was aquired, and the pcDNA₃-HBsAg-ROP₂ eukaryotic expression recombinant plasmid was constructed. The results of PCR and digestion showed that HBsAg and ROP₂ in the recombinant plasmid contained the complete genes sequences. **Conclusion** The recombinant plasmid pcDNA₃-HBsAg-ROP₂ was successfully constructed.

[Key words] HBsAg; Toxoplasma gondii; Rhoptry protein 2(ROP₂); pcDNA₃; Gene recombinant

乙肝在我国广泛流行,严重危害人民群众的健康。1992 年全国第二次病毒性肝炎血清流行病学调查结果表明,山东省人群 HBsAg 携带率为 7.20%。据估计,全国每年用于肝炎和肝病的直接医疗费用高达 1 000 亿元人民币,是许多家庭因病致贫、因病返贫的重要原因,是我国现阶段最为突出的公共卫生问题之一。为做好全国乙肝的防治工作,卫生部在《2006-2010 年全国乙型肝炎防治规划》中要求积极开展乙肝防治的应用性研究,尤其是乙肝疫苗免疫效果和免疫持久性的评估以及新型乙肝疫苗的研制。近年来国内外学者相关研究发现,HBsAg 是乙肝疫苗的理想候选分子,可诱导机体产生较强针对乙肝病毒的免疫保护作用;且 HBsAg 可作为基因工程疫苗的理想载体,在其不同部位插入外源基因,可成功表达多种 HBsAg 融合蛋白;还同时起着佐剂样作用,进一步提高了插入的外源基因的免疫原性^[1]。人畜共患弓形虫病世界流行,我国人群及家畜具有较高的弓形虫感染率,给社会带来严重危害。家畜弓形虫病的传播与流行,不仅给畜牧业造成严重损失,更严重的是将成为人类感染弓形虫的重要传染源^[2]。目前弓形虫病尚无良好防治药物,近年疫苗防治成为弓形虫病防治的热点,尤其是基因疫苗。弓形虫棒状体抗原 2 (ROP₂) 为棒状体分泌的一组抵抗弓形虫侵入宿主细胞的可溶性蛋白,10 余种弓形虫株感染小鼠体内均检测到该抗原抗体,说明 ROP₂ 抗原具有高敏感性,更强适应性的特点。本研究选用乙肝 HBsAg 和弓形虫 ROP₂ 作为靶基因,将其联合重组到具有诸多优点的真核表达载体 pcDNA₃ 中,以期获得在抵抗乙肝病毒基础上,同时具备抗弓形虫感染能力的多功能重组体。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 菌株及质粒 E. coli DH5 α 、pcDNA₃ 真核表达质粒为本实验室保种,pcDNA₃-p30-ROP₂ 重组质粒为本实验室制备。

1.1.2 主要试剂 限制性内切酶 Xba I、EcoR I、Hind III、Not I、T₄ DNA 连接酶、Taq DNA 聚合酶购于宝生物工程(大连)有限公司,DNA 提取纯化试剂盒和胶回收试剂盒分别购于德国 QiaGene 基因公司和北京天为时代科技有限公司,其它常规试剂均为国产分析纯。

1.2 方法

1.2.1 引物设计与合成 根据 pcDNA₃-p30-ROP₂ 和 S 基因序列设计引物。由于构建的 pcDNA₃-p30-ROP₂

把多数常用位点已去除,在 T7 启动子与 ROP₂-p30 片段之间只有一个 Hind III 位点,S 基因只能用 Hind III 位点进行克隆。考虑 pcDNA₃-p30-ROP₂ 中引入了 GATG 四个碱基,为了使融合的 HBsAg-ROP₂ 能表达出目标蛋白质,宜在下游引物处再引入 tg 两个碱基,使密码框不移位。特设计 HBsAg 基因的引物如下:S₁:5'-AT AAGCTT ATGGAGAACATCACATCA-GGATTC-3' (Tm 62 °C)。S₂:5'-AgT GAATTC TGCC-CAAAGACAAAAGAAAATTGG-3' (Tm 60.3 °C)。引物由上海生工生物工程公司合成。

1.2.2 乙肝病毒基因组 DNA 的提取 采集济宁市第一人民医院 HBV 阳性血样 41 份,挑取 DNA 拷贝数 >10² 的 19 份样本,按试剂盒说明书提取乙肝基因组 DNA。

1.2.3 PCR 高保真扩增乙肝 HBsAg 基因 以提取的乙肝病毒基因组 DNA 为模板,扩增 HBsAg 基因片段。扩增体系:50 μ l 反应体系,乙肝病毒基因组 DNA 0.5 μ l,上、下引物 S₁ (15 pmol/ μ l)、S₂ (15 pmol/ μ l) 各 2 μ l,5 $\times$ PrimeStar Taq buffer (含 MgCl₂) 10 μ l,2.5 mM dNTP Mix 4 μ l,PrimeStar Taq 酶 (5 U/ μ l) 0.8 μ l,ddH₂O 30.7 μ l。反应条件:94 °C,5 min;30 cycles (94 °C,30 sec,55 °C,30 sec,72 °C,40 sec);72 °C,10 min。

1.2.4 多基因重组载体 pcDNA₃-HBsAg-ROP₂ 的构建 通过对酶切产物进行连接、转化,成功构建 pcDNA₃-HBsAg-ROP₂,同时对转化克隆菌落进行编号,并利用 HBsAg 扩增引物对转化克隆子进行 PCR 初筛,并对初筛阳性的部分克隆进行酶切验证。分别进行基因片段 HBsAg 和 pcDNA₃-HBsAg-ROP₂ 的 Hind III + EcoR I 双酶切。酶切体系为:反应体系 50 μ l,其中 HBsAg PCR 产物 30 μ l,ddH₂O 11 μ l,NE Buffer2 5 μ l,Hind III + EcoR I 各 2 μ l;反应体系 30 μ l,其中 pcDNA₃-HBsAg-ROP₂ 15 μ l,ddH₂O 11 μ l,NE Buffer2 3 μ l,Hind III + EcoR I 各 0.5 μ l。37 °C 反应 2 h。酶切产物的回收和连接:使用 DNA 回收试剂盒分别对酶切片段进行相应的片段回收,将双酶切后的 pcDNA₃-HBsAg-ROP₂ 与 HBsAg 连接,把 HBsAg 替换 pcDNA₃-HBsAg-ROP₂ 中的 p30 基因片段。连接反应体系 20 μ l,其中 pcDNA₃-HBsAg-ROP₂/Hind III + EcoR I 回收产物 4 μ l,HBsAg/Hind III + EcoR I 回收产物 13 μ l,T₄ DNA 连接酶 Buffer 2 μ l,T₄ DNA 连接酶 1 μ l。置于 16 °C 中过夜连接。

1.2.5 转化 常规法制备感受态大肠杆菌,把连接产物与感受态细胞混合,摇匀、冰浴 30 min,42 °C 水

浴中热击 90 s,迅速冰浴冷却 3 ~ 5 min。向管中加入 1 ml SOC 液体培养基(不含抗生素),混匀,37 ℃ 振荡培养 1 h。摇匀后取菌液 100 μ l 涂布于含 Ampicillin 的筛选平板上,正面向上放置 30 min,待菌液完全被培养基吸收后倒置培养皿,37 ℃ 培养 16 ~ 20 h,仔细观察转化结果。从 LB-Ampicillin 平板上挑取单个白色菌落接种于 LB-Ampicillin 液体培养基,37 ℃ 摇床 220 r/min 振荡 8 ~ 10 h 至吸光度(A_{600} 值) = 0.6 左右时,15 000 r/min 离心 1 min,收菌,用 QIA-prep Spin Miniprep Kit 试剂盒按说明书提取、收集重组质粒,并进行酶切、PCR 鉴定。

1.2.6 转化子的 PCR 初筛 利用 HBsAg 扩增引物对上述转化克隆子进行 PCR 初步筛选,对部分转化克隆子进行编号(1,2,3,4,5 等),在同样编号的 PCR 管中加入 15 μ l 水,用牙签挑取克隆子到相应的含水 PCR 管中(不要完全挑完)。扩增体系:20 μ l 反应体系用牙签挑取克隆菌少许做 DNA 模板,上、下引物 S_1 (15 pmol/ μ l)、 S_2 (15 pmol/ μ l) 各 0.8 μ l,10 $\times$ Taq 酶 buffer(含 $MgCl_2$) 2.0 μ l,2.5 mM dNTP Mix 1.6 μ l,Taq DNA 聚合酶(5 U/ μ l) 0.2 μ l,ddH₂O 15.0 μ l。反应条件:94 ℃,5 min;30 cycles(94 ℃,30 sec,55 ℃,30 sec,72 ℃,40 sec);72 ℃,5 min。

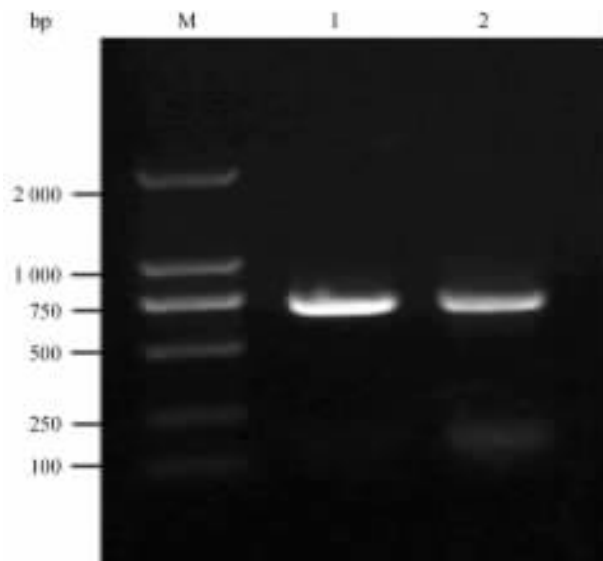
1.2.7 初筛阳性部分克隆的酶切验证 取 pcDNA₃-HBsAg-ROP₂ 克隆 1,2,3 号接种 5 ml ampicillin 抗性液体 LB 培养,提取质粒。酶切,20 μ l 体系:NE Buffer 2.2 μ l,pcDNA₃-HBsAg-ROP₂ 10 μ l,H₂O 7.5 μ l,Xba I 0.5 μ l。按上述配好反应体系,置于 37 ℃ 中酶切 2 h。

1.2.8 重组质粒测序验证 经酶切验证的 pcDNA₃-HBsAg-ROP₂ 克隆(S_3 -1 和 S_3 -2)在含 Ampicillin 抗性的液体 LB 培养后,取 1 ml 菌液送华大公司测序。应用 Blastn 程序进行序列分析。

1.2.9 菌种保藏 挑取平板培养单菌落于适量培养基(Ampicillin 抗性)中,37 ℃ 摇床 220 r/min 振荡 8 ~ 10 h 至吸光度(A_{600} 值) = 0.6 左右时,取 1.5 ~ 3 ml 培养物,12 000 r/min 离心收集菌体沉淀。加入新鲜液体培养基(Ampicillin 抗性),同时加入无菌甘油至终浓度约 20%,悬浮菌体颠倒均匀。标明菌体名称、保存时间等,置 -70 ℃ 冰冻保存。

2 结果

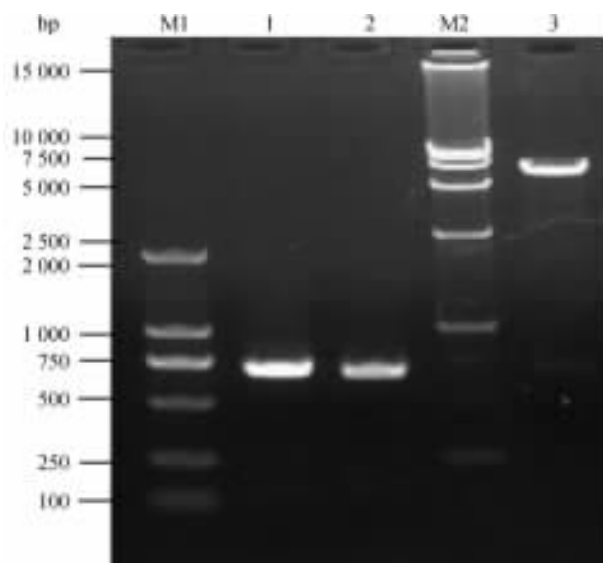
2.1 HBsAg 基因片段的体外扩增结果 用上述引物和方法,以乙肝基因组 DNA 为模板进行 PCR 扩增,扩增结果经电泳检测,在约 700 bp 处出现一扩增带,符合预期大小。见图 1。



M:DNA Marker(DL2000); 1,2:HBsAg 基因的扩增片段

图 1 乙肝 HBsAg 基因的扩增产物

2.2 HBsAg 基因和 pcDNA₃-HBsAg-ROP₂ 重组载体酶切结果 HBsAg 基因和 pcDNA₃-HBsAg-ROP₂ 重组载体分别被 Hind III + EcoR I 双酶切,酶切结果电泳图见图 2。

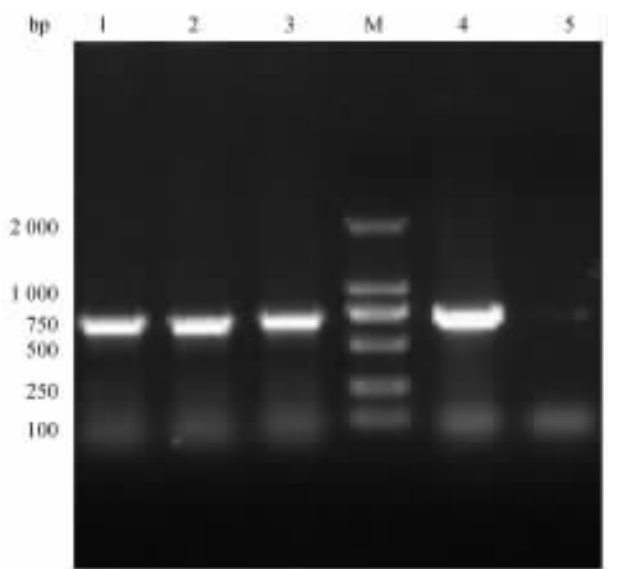


M1:DNA Marker(DL2000); 1,2:Hind III + EcoR I 双酶切后的 HBsAg 基因(~672 bp); M2:DNA Marker(DL15 000); 3:Hind III + EcoR I 双酶切后的 pcDNA₃-HBsAg-ROP₂ 载体(~6.6 kb 和 690 bp 两带,小带为去除的 P30 基因片段)

图 2 HBsAg 基因和 pcDNA₃-HBsAg-ROP₂ 载体双酶切电泳图

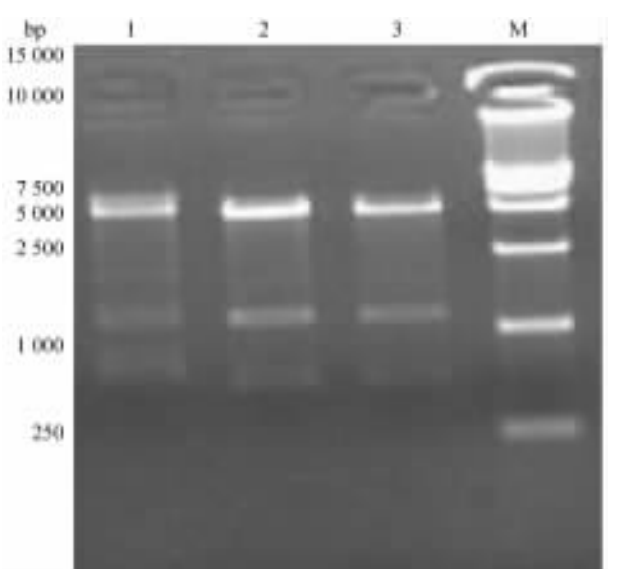
2.3 构建真核表达载体 pcDNA₃-HBsAg-ROP₂ 的初筛扩增和酶切鉴定结果 通过对酶切产物进行连接、转化,成功构建 pcDNA₃-HBsAg-ROP₂,同时对转化克隆菌落进行编号,并利用 HBsAg 扩增引物对转化克隆子进行 PCR 初筛,并对初筛阳性的部分克隆

进行酶切验证。PCR 初筛扩增结果,在约 700 bp 处出现 1 条明显电泳带,符合 HBsAg 基因片段的长度(理论 672 bp)(见图 3)。初筛结果显示:大多数为阳性克隆,如 1,2,3,4 号转化子,但 5 号阴性,为非阳性克隆。对重组质粒 pcDNA₃-HBsAg-ROP₂ 用 Xba I 进行酶切,酶切电泳结果显示,出现约 700 bp、1 200 bp 和 5 400 bp 处 3 条带,与正确克隆酶切完全时理论应得到 672 bp(HBsAg)、1 212 bp(ROP₂)及 5 400 bp(pcDNA₃)三种片段相符(见图 4)。由此可见 1,2,3 号转化子 PCR 初筛扩增、酶切鉴定结果均完全正确,为真正的阳性克隆。



M: DNA Marker(DL 2 000); 1,2,3,4: pcDNA₃-HBsAg-ROP₂ 克隆的 PCR 扩增的 HBsAg 基因片段; 5: 阴性对照

图 3 pcDNA₃-HBsAg-ROP₂ 克隆的 PCR 鉴定



1,2,3: Xba I 酶切后的 pcDNA₃-HBsAg-ROP₂ 重组载体(酶切完全时应得到 672 bp、1 212 bp 及 5 400 bp 三种片段); M: DNA Marker(DL15 000)

图 4 pcDNA₃-HBsAg-ROP₂ 克隆的酶切鉴定

2.4 pcDNA₃-HBsAg-ROP₂ 的基因测序结果 将重组克隆的 pcDNA₃-HBsAg-ROP₂ 基因测序,结果证明重组的 HBsAg-ROP₂ 基因正确,重组体包含了 HBsAg 和 ROP₂ 基因的完整序列,外加引入的保护碱基和酶切识别碱基等,共 1 903 个碱基。

3 讨论

3.1 乙型肝炎是由乙肝病毒感染引起的一种世界性传染病,它不仅可引起急性肝炎,还可导致慢性肝炎、肝硬化甚至肝癌。多年的国内外研究成果证实接种乙肝疫苗是控制乙肝流行的最有效措施,它可以促进机体产生较强的细胞免疫和体液免疫,以抵御 HBV 病毒的攻击^[3]。HBV 病毒的包膜蛋白 HBsAg,不仅具有良好的免疫原性,还可作为基因工程疫苗的理想载体,现已成功构建多种重组核酸疫苗^[4~6]。

3.2 弓形虫棒状体蛋白为棒状体分泌的一组可溶性蛋白,在弓形虫的速殖子、缓殖子和子孢子期等均能够分泌表达;其组成有 11 种不同组分,ROP₂ 蛋白国内外研究较多,它能诱导对弓形虫应答的 T 细胞克隆(TCC)增生,刺激 T 细胞介导的免疫反应及诸多细胞因子的产生^[7,8];ROP₂ 原核重组克隆在大肠埃希菌中能大量稳定表达,其表达产物能被小白鼠的免疫血清所识别^[9]。本课题组研制的弓形虫 ROP₂ 核酸疫苗具有较强的免疫原性,能产生良好的免疫保护作用^[10]。有人研究以重组表达的 ROP₂ 蛋白作为包被抗原进行弓形虫病 ELISA 诊断,敏感度高达 89%^[11],可见 ROP₂ 蛋白具有高保守性和免疫原性。

3.3 自 1990 年 Wolff 等^[12]发现小鼠骨骼肌细胞能摄取外源质粒 DNA 并能表达外源基因以来,核酸免疫技术得到不断完善,核酸疫苗研究取得长足进展。本研究就是把乙肝表面抗原基因联合弓形虫棒状体蛋白 2 基因构建的多功能核酸疫苗 pcDNA₃-HbsAg-ROP₂,该多基因重组载体包含了乙肝表面抗原基因和弓形虫棒状体蛋白 2 的完整序列,为下一步转染真核细胞及通过动物试验验证该重组疫苗的免疫保护作用奠定了基础。

参考文献

1 Wunderlich G, Moura IC, del Portillo HA. Genetic immunization of BALB/c mice with a plasmid bearing the gene coding for a hybrid merozoite surface protein 1-hepatitis B virus surface protein fusion protects mice against lethal Plasmodium chabaudi chabaudi PCI infection[J]. Infect Immun, 2000, 68(10): 5839 - 5845.

2 吴 昆,陈晓光,李 华,等. 弓形虫 ROP2 基因的体外扩增及真

核表达重组质粒的构建[J]. 第一军医大学学报,2002,22(7): 620-623.

3 詹万雷,林 影,郑文岭. 基因工程乙肝疫苗研究进展[J]. 中国生物工程杂志,2003,23(4):62-64.

4 周建勋,邢来田,韩金祥,等. 重组腺病毒载体乙肝疫苗的免疫学研究[J]. 中国微生态学杂志,2004,16(6): 336-337.

5 戴建威,刘松财,任晓慧,等. 生长抑素与乙肝表面抗原真核表达载体构建及其对 Vc 獭兔生长的影响[J]. 中国兽医学报,2006,26(1):1-4.

6 张芳婷,尹 文,汤惠茹,等. 乙型肝炎病毒表面抗原(HBsAg)基因重组杆状病毒的构建及鉴定[J]. 现代肿瘤医学,2004,12(1): 10-11.

7 Leyva R, Herion P, Saavedra R. Genetic immunization with plasmid DNA coding for the ROP2 protein of Toxoplasma gondii[J]. Parasitol Res,2001,87(1):70-79.

8 Roque-Reséndiz JL, Sales R, Herion P. MVA ROP2 vaccinia virus recombinant as a vaccine candidate for toxoplasmosis[J]. Parasitology, 2004,128(Pt 4):397-405.

9 Hongfa Wang, Quan Liu, Keyi Liu, et al. Immune response induced by recombinant Mycobacterium bovis BCG expressing ROP2 gene of Toxoplasma gondii [J]. Parasitology International, 2007,56(4): 263-268.

10 魏庆宽,李 瑾,傅婷霞,等. 弓形虫 ROP2 核酸疫苗免疫保护作用的研究[J]. 中国寄生虫学与寄生虫病杂志,2006,24(5): 337-341.

11 van Gelder P, Bosman F, de Meuter F, et al. Serodiagnosis of toxoplasmosis by using a recombinant from of the 54-kilodalton rhoptry antigen expressed in Escherichia coli[J]. J Clin Microbiol,1993,31(1):9-15.

12 Wolff JA, Malone RW, Williams P, et al. Direct gene transfer into mouse muscle in vivo[J]. Science,1990,247(4949 Pt 1):1465-1468.

[收稿日期 2012-12-17][本文编辑 黄晓红 韦 颖]

课题研究 · 论著

尼莫通对大鼠急性脑缺血再灌注损伤后缺血半暗带神经元 Na⁺-K⁺-ATP 酶活性影响的研究

唐士婷, 李吕力, 张丽香, 罗永坚, 肖继东, 陈 渊, 黄 浩, 蔺心敬

基金项目: 广西自然科学基金资助项目(编号:桂科自 0991212)

作者单位: 530021 南宁,广西壮族自治区人民医院神经内科

作者简介: 唐士婷(1987-),女,在读研究生,研究方向:脑血管疾病的诊治。E-mail:tst-tingting@163.com

通讯作者: 蔺心敬(1963-),男,医学博士,主任医师,硕士研究生导师,研究方向:脑血管疾病的诊治。E-mail:Linxj63@163.com

[摘要] **目的** 研究尼莫通对大鼠急性脑缺血再灌注损伤后缺血半暗带神经元 Na⁺-K⁺-ATP 活性的影响。**方法** 选取 450 只雄性 Wistar 大鼠随机分为 3 组(对照组、尼莫通组、假手术组),每组大鼠根据缺血后再灌注不同时间又分为缺血 2 h 再灌注 6 h、24 h、48 h、72 h、7 d 五个亚组(30 只/亚组)。采用线栓法制备大鼠缺血 2 h 再灌注模型,仅尼莫通组采用药物进行干预。分别于再灌注 6 h、24 h、48 h、72 h 及 7 d 断头取脑,观察缺血半暗带脑组织 Na⁺-K⁺-ATP 酶活性、脑组织水肿程度、脑梗死范围及神经症状评分的变化。**结果** 三组间和不同时间点之间各项观察指标比较差异均有统计学意义($P<0.01$);尼莫通组 24 h、48 h、72 h 各时间点 Na⁺-K⁺-ATP 酶活性及脑组织含水量与对照组相应时间点比较差异有统计学意义($P<0.05$),尼莫通组 24 h、48 h、72 h、7 d 各时间点脑梗死面积及神经症状评分较对照组相应时间点显著降低,差异有统计学意义($P<0.05$)。对照组大鼠脑缺血半暗带神经元 Na⁺-K⁺-ATP 酶活性于 6 h 开始降低,48 h 达最低值,72 h 稍有回升,7 d 趋于稳定。**结论** 尼莫通对大鼠急性脑缺血再灌注损伤后缺血半暗带神经元具有保护作用,其机制不仅与拮抗 Ca²⁺ 超载有关,同时还可能与改善能量代谢有关。

[关键词] 缺血再灌注损伤; 缺血半暗带; Na⁺-K⁺-ATP 酶; 尼莫通

[中图分类号] R 743.3 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1674-3806(2013)03-0195-05

doi:10.3969/j.issn.1674-3806.2013.03.02