

HBV 基因T1862突变真核表达载体的构建及在Cos7细胞中的表达

HBeAg是乙型肝炎病毒(HBV)感染的重要血清标志物,为HBV特异性的杀伤性T淋巴细胞(CTL)的重要靶抗原,在病毒性乙型肝炎的发病机理中起着重要作用。HBV第1862位碱基由G变为T(T1862),使前C区第17位密码子由缬氨酸变为苯丙氨酸,缬氨酸位于信号酶裂解切点。该点突变使HBV在肝细胞中翻译的HBeAg前体(P22)不能被信号酶裂解成分泌性的HBeAg,导致HBV感染者血清HBeAg阴性但病情趋于恶化。本研究构建HBV前C/C区T1862点变异真核表达载体,并检测其在Cos7细胞中表达。

1 材料和方法

1.1 质粒菌体细胞

质粒EBO-p1pp由美国Scripps研究所Francis V.Chisari博士惠赠。其结构示意图参见文献[1],受体菌XL-1、含ayw亚型的HBV全基因的PcP10质粒及Cos7细胞均为本室保存。

1.2 试剂

Kpn I、HindIII、Dra I内切酶及T4DNA连接酶均购于Promega公司,Taq DNA聚合酶购于军事医学科学院。定点突变试剂盒为美国STRATAGENE产品,质粒提取及胶上回收试剂盒为Qiagen公司产品,DMEM及脂质体(用于细胞培养和转染)购于GIBCO BRL。

1.3 引物设计

Pee1、Pee2为克隆引物,P1、P2为突变引物;P3、P4为筛检T1862变异的错配引物。具体序列见表1。

表1 突变载体构建及筛检所用的引物

Tab.1 Primers used in construction and detection of mutant vector

Sequence of primers	The site of HBV
Pee1: 5'-CGTAAGCTTTTACCAGCACCATGCAAC-3'	nt1 803-1 820 (AAGCTT: the site of enzyme <i>Hind</i> III)
Pee2: 5'-GCGGGTACCCTAACATTGAGATTCCCG-3'	nt2 450-2 432 (GGTACC: the site of enzyme <i>Kpn</i> I)
P1: 5'-CATGTCCTACTTTTCAAGCCTC-3'	nt1 851-1 873 (T: mutation base)
P2: 5'-GAGGCTTGAAAAGTAGGACATG-3'	nt1 873-1 851 (A: mutation base)
P3: 5'-AAATTGGTCTGTTCACCAGC-3'	nt1 791-1 810
P4: 5'-AAGGCACAGCTTGGAGGCTTAA-3'	nt1 885-1 863 (T: mutation base)

1.4 EBO-Pre-C/C载体的构建

以引物Pee1和Pee2扩增质粒PcP10中的Pre-C/C片段,反应条件:93℃预变性120s,93℃变性50s,55℃退火50s,72℃延伸60s,35个循环后72℃延伸5min。产物用Hind III和Kpn I 37℃双酶切过夜,1.5%

胶上电泳，按试剂盒操作说明从胶上回收酶切产物。同样将EBO载体经Hind III和Kpn I 双酶切后电泳，回收。把回收的Pre-C/C片段和EBO载体用T4DNA连接酶在16 °C 连接过夜。连接体用CaCl₂转化法转化感受态XL-1菌，在含氨苄青霉素的培养基上培养。用PCR和酶切方法筛选阳性克隆，并与对照组比较。

1.5 定点突变

提取经筛选为阳性克隆的质粒进行测序，结果用DNASIS软件与标准序列比较，选取符合率为100%的克隆提取质粒进行定点突变反应。(1)突变反应：质粒DNA模板5 μl(质粒浓度约为5 ng/μl)，引物P1、P2各5 μl(浓度均约为25 ng/μl)，dNTP 1 μl，Pfu聚合酶1 μl，总体积50 μl，反应条件为95 °C预变性30 s，95 °C变性 30 s，56 °C退火60 s，72 °C 延伸 22 min，扩增12个循环。(2)消化：在扩增产物中加入1 μl Dpn I 酶，37 °C 1 h以消化其中未发生突变的模板。(3)转化：吸取2~3 μl经Dpn I 酶消化的突变产物转化感受态XL-1菌，在含氨苄青霉素的培养基上培养。

1.6 错配PCR-RFLP鉴定突变重组体

提取经突变反应的质粒，用错配反向引物P4及正向引物P3扩增，反应条件为92 °C预变性120 s，92 °C变性 45 s，55 °C退火45 s，72 °C延伸50 s，35个循环后72 °C延伸150 s。产物为94 bp，由于P4引入错配碱基，当1 862点由G变为T时，扩增的PCR产物便可在引物的3' 端形成Dra I 酶切位点(图1)。

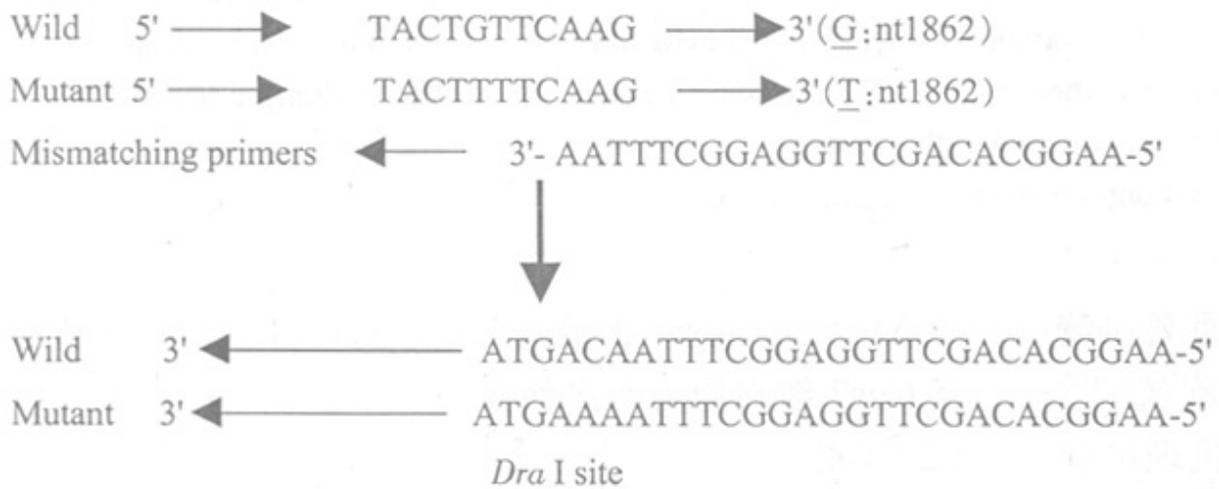


图1 错配PCR-RFLP鉴定T1 862突变示意图
Fig.1 Sketch map of mismatch PCR-RFLP detecting T1862 mutation

1.7 测序

选择经错配PCR-RFLP筛检初步确定为突变的质粒送上海基康生物公司测序，以最终确定突变的克隆。

1.8 转染细胞

以突变前EBO-Pre-C/C质粒为阳性对照，EBO空载体为阴性对照，与突变后的EBO-Pre-C/C质粒一起以脂质体介导方法转染Cos7细胞，经潮霉素筛选后稳定表达。

1.9 目的蛋白检测

重组质粒转染Cos7细胞并稳定表达后，取细胞培养上清用酶联免疫吸附方法(ELISA)检测HBeAg。结果判定：标本与阴性对照的D_λ值之比大于2.1判定为阳性。

2 结果

2.1 重组质粒EBO-Pre-C/C的鉴定

重组质粒用Hind III、Kpn I 双酶切，1.5%胶上电泳，结果显示重组质粒被切成一大一小两条带，大的带与EBO载体相同，小的带与Pre-C/C片段相同(图2)。

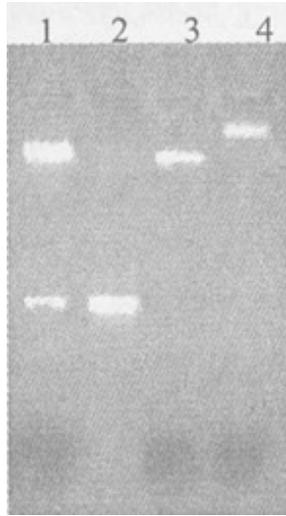


图2 EBO-Pre-C/C酶切鉴定结果(HindIII、Kpn I 双酶切)
Fig.2 EBO-Pre-C/C was digested by Hind III and Kpn I

1: Two-enzyme digestion of Ebo-Pre-C/C;
2: PCR product of Pre C/C; 3: Empty EBO vector; 4: Profile of EBO-Pre-C/C

2.2 错配PCR-RFLP筛检EBO-Pre-C/C重组质粒突变体

用引物P3和P4扩增经突变的重组质粒，在限制性内切酶Dra I 的作用下被切成 73 bp和21 bp的片段，而未突变的片段不能被Dra I 识别，在3%的TBE胶上电泳可区分开(图3)。

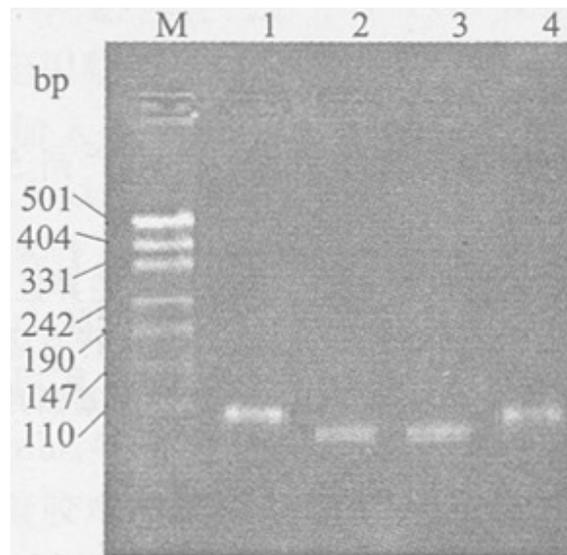


图3 错配PCR-RFLP鉴定T1862变异

Fig.3 Detection of T1862 mutation by mismatch CR-RFLP

M: PCR marker; Lane 1, 4: Non-mutant recombinant plasmid; Lane 2, 3: Mmutant recombinant plasmid

2.3 测序

由错配PCR-RFLP筛检为T1862变异的克隆与测序结果吻合率为100%。

2.4 检测重组质粒在Cos7细胞的表达

细胞培养上清经ELISA法检测，除未突变的EBO- Pre-C/C重组质粒HBeAg阳性外，转染EBO空载体和EBO-Pre-C/C重组质粒突变体的细胞上清均未能检测到HBeAg。

以往的研究大多认为HBeAg阳性是HBV在体内复制旺盛的一项重要指标，而HBeAg由阳性转为阴性是部分病毒被清除以及肝病缓解的结果。但实际上并非所有HBeAg阳性转为阴性的HBV感染者病情都趋于好转；相反，相当部分重型和爆发性乙型肝炎的发生与HBeAg阴性存在一定的关系。HBV基因组多个位置的碱基变异均可导致HBeAg阴性。其中HBV基因T1862突变导致前C/C基因第17位密码子由缬氨酸变为苯丙氨酸，由于缬氨酸位于信号酶裂解切点，其变异的结果使HBeAg前体不能被信号酶裂解，导致HBeAg加工和分泌障碍，因此血清中HBeAg阴性。大量的HBeAg前体在肝细胞内积聚。HBeAg是CTL的靶抗原，CTL集中攻击过度表达HBeAg前体的肝细胞，导致肝细胞急性大块状坏死，临床上可表现为急性重症肝炎或慢性肝炎急性加重[2]。

用EB病毒质粒EB0-p1pp构建的HBV前C区T1862点突变的真核表达载体可在体外进一步研究HBV T1862点突变在病毒致病过程中的作用机制。EB0-p1pp质粒是真核细胞稳定表达载体，它含有潮霉素和氨苄青霉素抗性基因，在真核细胞中以附着体的形式存在，独立复制与表达，不受宿主细胞的影响[3]。因此，用EB0-p1pp构建的重组质粒不仅可以在Cos7细胞中短暂表达，还可以在Cos7细胞中进行稳定表达，有利于研究目的基因变异引起的生物学意义的改变。

参考文献：

- [1] 周福元, 隋礼丽, 骆抗先. HBV 前C/C基因EB病毒载体的构建及在Cos7细胞中的表达[J]. 第一军医大学学报, 1999, 19 (2): 97-100.
- [2] 侯金林, 骆抗先, 章 廉, 等. 乙型肝炎病毒e抗原阴性重型肝炎病人前C基因信号酶位点变异[J]. 中华内科杂志, 1995, 34(11): 735-8.
- [3] Guihot H, Fowler P, Portillo G, et al. Hepatitis B virus(HBV)-specific cytotoxic T-cell response in humans: production of target cells by stable expression of HBV-encoded protein in immortalized human B-cell lines[J]. J Virol , 1992, 66(5): 2670-7.

参考文献：

- [1] 周福元, 隋礼丽, 骆抗先. HBV 前C/C基因EB病毒载体的构建及在Cos7细胞中的表达[J]. 第一军医大学学报, 1999, 19 (2): 97-100.
- [2] 侯金林, 骆抗先, 章 廉, 等. 乙型肝炎病毒e抗原阴性重型肝炎病人前C基因信号酶位点变异[J]. 中华内科杂志, 1995, 34(11): 735-8.
- [3] Guihot H, Fowler P, Portillo G, et al. Hepatitis B virus(HBV)-specific cytotoxic T-cell response in humans: production of target cells by stable expression of HBV-encoded protein in immortalized human B-cell lines[J]. J Virol , 1992, 66(5): 2670-7.