

HCV core 1b 亚型和 HA 共表达重组腺病毒载体的构建与鉴定 *

蒋丽娜 李航 谷雨 叶菁[△] 李青[△]

(第四军医大学基础部病理学与病理生理学教研室 陕西 西安 710032)

摘要 目的:构建 HCV core 1b 亚型和 HA 共表达的腺病毒载体并予以鉴定。方法:合成 HCV 核心蛋白 1b 亚型的核苷酸, 连接入 pcmv5-HA 质粒中。用 Xho 单酶切, 后用 Klenow 酶补平, 再用 Hind 单酶切下 HA-HCV core 1b 片段, 连入 pShuttle-cmv 穿梭质粒中, 构建穿梭质粒 pShuttle-CMV-HA core 1b。将 pShuttle-CMV-HA core 1b 转化至含有 AdEasy-1 的 BJ5183 感受态细菌中进行同源重组。Pac 酶切线性化重组质粒 pAd-HA-HCV core 1b 并转染 AD293 细胞进行病毒包装和扩增。用 RT-PCR 检测 HA-HCV core 1b 的 mRNA 的表达水平, 并用 Western blot 检测融合表达蛋白 HA-HCV core 1b 的表达水平。结果:穿梭质粒 pShuttle-CMV-HA-HCV core 1b 经 PCR 和测序证实构建成功。重组腺病毒载体经 AD293 细胞包装后, 可观察到 CPE 现象。用获得的重组腺病毒载体感染 AD293 细胞, 经 RT-PCR 检测, 在 mRNA 水平上有表达; 经 Western blot 检测, HCV core 1b 亚型腺病毒载体 (Ad-HA-HCV core 1b) 感染组与未感染腺病毒载体组及空白对照组相比, 只有 Ad-HA-HCV core 1b 感染组有融合蛋白 HA-HCV core 1b 的表达。结论:通过分子克隆体外重组技术, 成功构建了 HCV core 1b 亚型和 HA 共表达的重组腺病毒载体 Ad-HA-HCV core 1b。为进一步研究丙型肝炎病毒 1b 亚型引起丙肝感染中胰岛素抵抗的作用机制提供了方法。

关键词: HCV core 1b 亚型, 重组腺病毒载体, 分子克隆

中图分类号: R512.63, Q75, Q78 文献标识码: A 文章编号: 1673-6273(2011)01-8-04

Construction and Identification of Recombinant Adenovirus Vector
Co-expressing HCV Core 1b and HA*JIANG Li-na, LI Hang, GU Yu, YE Jing[△], LI Qing[△]

(Pathology and Pathophysiology Department, Forth Military Medical University, Xi'an, 710032, Shanxi, China)

ABSTRACT Objective: To construct and identify the recombinant adenovirus vector of co-expression HCV core 1b and HA. **Methods:** The HCV gene was cloned and inserted into a pcmv5-HA plasmid, then was connect into pShuttle-CMV plasmid and transformed the plasmid into E.coli DH5 α . The recombinant plasmid pShuttle-CMV-HA-HCV core 1b was screened and transformed into BJ5183 to perform homologous recombination with pAdEasy-1. A recombinant adenovirus vector was acquired. Then it was transfected into AD293 cells to prepare the replication deficient adenovirus Ad-HA-HCV core 1b. AD293 cells was infected with Ad-HA-HCV core 1b and the expression of HA-HCV core 1b was detected by RT-PCR and western blot. **Results:** (1) The recombinant plasmid pShuttle-CMV-HA-HCV core 1b were constructed successfully. (2) After recombination of pShuttle-CMV-HA-HCV core 1b and pAdEasy-1, the product was digested by restriction endonuclease PacI. In gel electrophoresis, they performed as the 3.0 kb segment which was as the same segment as prospect. (3) Ad-HA-HCV core 1b could infect AD293 cells and the extrinsic genes can be expressed in cells. **Conclusion:** The recombinant adenoviral vector Ad-HA-HCV core 1b was constructed successfully.

Key words: HA-HCV core 1b vector construction, Recombinant adenovirus, Molecular cloning

Chinese Library Classification(CLC): R512.63, Q75, Q78 **Document code:** A

Article ID: 1673-6273(2011)01-8-04

前言

目前认为丙型肝炎病毒(HCV)感染是一种与脂质代谢, 氧化应激和线粒体功能相关的系统性疾病。有研究表明, HCV 感染会增加糖尿病或胰岛素抵抗的风险^[1]。基础研究, 临床研究和流行病学研究证明丙型肝炎对胰岛素抵抗有独立的作用。特别是 Moucari 等人证实, 丙肝病毒 1 型对胰岛素抵抗有独立的作用。研究显示, 利用转基因小鼠表达 1b 亚型丙肝病毒, 病毒蛋

白可以不导致非酒精性脂肪肝而直接损伤胰岛素信号通路^[2], 继而导致胰岛素抵抗。核心蛋白(core)是区分 HCV 病毒类型的重要蛋白, 在病毒感染中发挥重要作用^[3]。本文利用 AdEasy 腺病毒的同源重组载体系统, 构建 HCV core 1b 与 HA 共表达的重组腺病毒载体, 并在 AD293 细胞中验证其感染效率^[4,9]。

1 材料和方法

1.1 材料

* 基金项目: 国家自然科学基金 81000171/H0316

作者: 蒋丽娜, 女(1984-), 硕士研究生, 研究方向: 肿瘤分子病理与代谢综合征, Email: jiangln@fmmu.edu.cn, 13759960150

[△]通讯作者: 李青, 女(1955-), 教授, 博士, 肿瘤分子病理与代谢综合征, liqing@fmmu.edu.cn, 13572981585

[△]共同通讯作者: 叶菁, 男(1973-), 副教授, 博士后, 肿瘤分子病理与代谢综合征, yejing@fmmu.edu.cn, 15829616565

(收稿日期: 2010-10-07 接受日期: 2010-10-30)

AD 293 细胞、空病毒、穿梭质粒 pShuttle-CMV、pAdEasy-1、菌种 BJ5183 均为本实验室保存。Pme 酶、Pac 酶、购自美国 NEB 公司, Xho, Sma 等限制性内切酶, Klenow 酶和 T4 DNA 连接酶, DNA Maker 等购自日本 Takara 公司。DMEM 胎牛血清为 GIBICO 公司产品。转染试剂购自 Invitrogen 公司。小提质粒试剂购自美国 OMEGA 公司。

1.2 方法

1.2.1 穿梭质粒 pShuttle-CMV-HA-core1b 的构建 根据 Genbank 公布的 HCV core 1b(EU155369.2) 基因 cDNA 编码序列, 由北京奥科公司全基因合成 HCV core 1b 基因序列。所得片段经限制性内切酶 Hind 酶切后, 用 Klenow 酶补平, 再用 Nde 单酶切。将 pcmv5-HA 质粒用 Nde 和 Sma 双酶切。分别胶回收, 用 T4 DNA 连接酶连接 pcmv5-HA 与 HCV core 1b 片段 4℃ 过夜, 转化入大肠埃希菌 DH5α 中, 筛选阳性克隆, 小提质粒, 酶切并测序鉴定重组子, 得到 pcmv5-HA-HCV core 1b 质粒。将测序正确的 pcmv5-HA-HCV core 1b 用酶 Hind 单酶切后, 用 Klenow 酶补平, 然后再用酶 Xho 单酶切, 胶回收。将 pShuttle-CMV 质粒用 Xho 和 Ecor 双酶切, 分别胶回收。用 T4 DNA 连接酶连接 pShuttle-CMV 与 HA-HCV core 1b 4℃ 过夜, 转化入 DH5α 中, 筛选阳性克隆。小提质粒, PCR 和测序鉴定重组子。

1.2.2 重组腺病毒质粒 pAdEasy-HA-core1b 的构建 用 Pme 酶切上述鉴定正确的 pShuttle-CMV-HA core 1b 重组质粒, 使之线性化, 凝胶纯化。将回收的线性化载体电转入 BJ5183(已转化了 pAdEasy-1) 的感受态细胞中, 筛选合适的阳性克隆, 小提质粒, Pac 酶切和测序鉴定重组子。挑选最好的阳性重组子, 转化入 DH5α 感受态细胞中, 大量扩增该重组腺病毒质粒。

1.2.3 重组腺病毒质粒的包装和扩增 实验室所使用的腺病毒载体不能自我包装成具有感染能力的病毒颗粒, 必须借助包装细胞 AD293 进行包装。取 5μg 重组腺病毒质粒经 Pac 酶切, 异丙醇纯化后, 溶于 20 微升无菌双蒸水中, 用 Lipofectamine 转染 AD293 细胞。待细胞出现 CPE 现象后, 收获细胞, 800r/min, 4min, 用 1ml PBS 重悬。在 37℃ 和 -80℃ 甲醛中反复冻融 4 次, 10000r/min 离心 15min, 上清液即为原代病毒液。用 20μL 原代病毒液感染 100mm 培养皿中约 80% 丰度的 AD293 细胞, 按上述方法反复冻融, 收获病毒液, 保存 -80℃ 冰箱中。

1.2.4 重组腺病毒的纯化及滴度测定 取待测病毒液 10μL, 用 90μL 10% FBS-DMEM 稀释, 10¹, 10², 10³, 10⁴, 10⁵, 10⁶, 10⁷, 10⁸, 10⁹, 10¹⁰ 稀释度依次梯度稀释。培养 AD293 细胞于 6 孔板中至 80% 融合度, 各稀释度病毒液分别取 10μL 加入各孔中, 37℃, 5% CO₂ 孵箱中培养过夜, 吸出含病毒的培养液, 分别用等体积含 0.6% 琼脂的 DMEM 固体培养基覆盖。隔天更换 DMEM 全培养液。培养 5-7 天。镜下观察, 以空斑数少于 10 个的孔为准, 计算病毒滴度。腺病毒滴度 = 平均空斑数 × 稀释倍数。

1.2.5 重组腺病毒 pAd-HA-HCV core 1b 的扩增及提取 取对数增长期的 AD293 细胞, 弃培养液, 加入 7-8mL 无血清培养基。按 MOI=100 计算, 将 20 微升重组腺病毒 pAdEasy-HA-HCV core 1b 原液(≥ 1 × 10⁹ PFU/ML, PFU 为空斑形成单位) 加入培养皿中轻晃混匀, 饥饿培养 4~6h 弃培养液, 加 10%

FBS-DMEM 培养液继续培养。每天观察, 当细胞出现明显 CPE 反应, 并有 50% 以上细胞脱落时即可收集细胞。吹打使其完全脱落。将细胞及上清液并收集于 10mL 干净离心管中, 800r/min 离心 5min, 弃上清, 加入 1mL PBS 重悬, 密封后采用 37℃ 水浴和 -80℃ 甲醇反复冻融 4 次, 10000r/min 离心 15min, 收集上清于 1ml EP 管中, 0.22 微米微孔滤膜过滤处菌, -80℃ 保存。

1.2.6 Ad-HA-HCV core 1b 重组腺病毒产物的检测 取对数生长期的 AD293 细胞 2 × 10⁵/ml 接种 1ml/ 孔于 6 孔板中, 待细胞生长至 80% 后, 分别用空腺病毒和 Ad-HA-HCV core 1b 感染细胞。

1.2.7 HA-HCV core 1b mRNA 水平的表达 提取细胞 RNA, 并进行 RT-PCR。HA-HCV core 1b 通过其特异性引物进行 PCR。Forward-1b: ATGATCCCCCGCCATGTACCCT, Reverse-1b: AGCGGAAGCTGGGATGGTCAAPCR 程序设计 95℃ 3min, 94℃ 30s, 55℃ 30s, 72℃ 1min, 30 次循环, 72℃ 5min。0.8% 的琼脂糖凝胶电泳检测 PCR 产物。Western blot 检测 HA-HCV core 1b 蛋白水平的表达。收集细胞, 用细胞裂解液裂解细胞, 加入 1 × SDS 上样缓冲液, 煮沸 10min, 12000r/min, 4℃ 离心, 取上清。12% 的聚丙烯酰胺凝胶电泳分离蛋白, 然后将蛋白转移到 PVDF 膜上, 5% 脱脂牛奶封闭 1h, 然后按 1:5000 分别加入小鼠抗 HA 抗体, 4℃ 孵育过夜。用 TBST 洗涤三遍后, 按 1:3000 加入 HRP 标记的抗小鼠的二抗, 室温孵育 1h。TBST 漂洗两遍, ECL 显色。

2 结果

2.1 重组质粒 pShuttle-cmv-HA-HCV core 1b 的构建和鉴定

合成 HCV core 1b 基因片段, 酶切后与 pcmv5-HA 质粒连接, 并用 pShuttle-CMV 通用引物进行 PCR 鉴定, 经 0.8% 的琼脂糖凝胶电泳可见约 1400bp 的片段, 与 CMV+ 目的条带大小相符(图 1), HA-HCV core 1b 测序结果正确, 表明重组质粒 pShuttle-CMV-HA-HCV core 1b 构建成功。

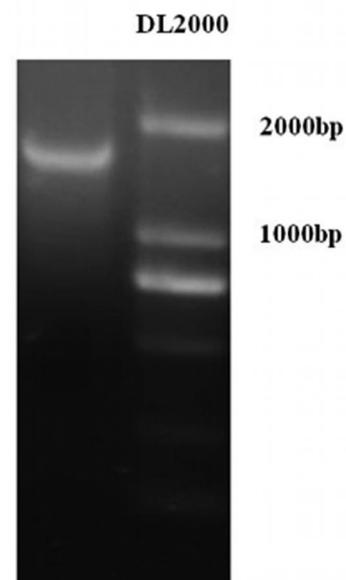


图 1 pShuttle-CMV 通用引物 PCR 后得到大约 1400bp 片段, 并且测序正确, 证明目的片已成功连入穿梭质粒中

Figure 1 Construction of recombinant plasmid pShuttle-CMV-HA-HCV core 1b

2.2 重组腺病毒质粒 pAdEasy-HA-HCVcore1b 的构建和鉴定

构建正确的重组质粒 pShuttle-CMV-HA-HCV core 1b 经 Pme 酶切以线性化后,电转入含 AdEasy-1 的 BJ5183 的感受态细胞中,经过细菌内同源重组产生 pAdEasy-HA-HCV core 1b. 经 Pac 酶切,0.8%琼脂凝胶电泳可见大小约 3000bp 的片段,HA-HCV core 1b 测序结果正确(图 2),证明带目的基因的穿梭质粒已经整合到腺病毒基因组中了。

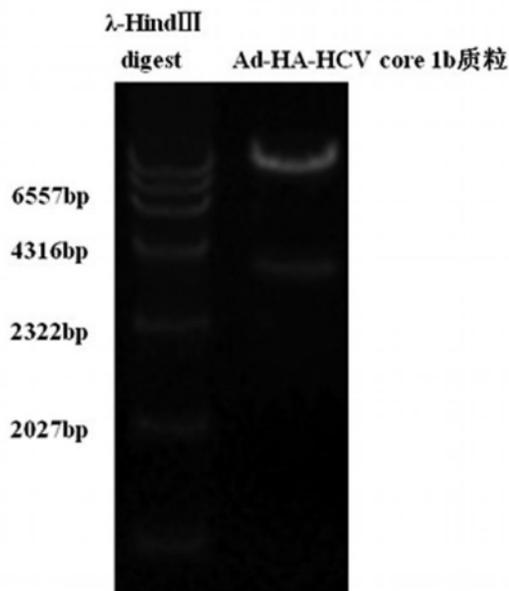


图 2 Pac 酶切鉴定腺病毒载体 Ad-HA-HCV core 1 质粒,有一 3000bp 大小的片段。

Figure2 Restriction enzyme digestion analysis if viroplasm Ad-HA-HCV core 1b

2.3 重组腺病毒的制备

线性化的重组腺病毒质粒 pAd-HA-HCV core 1b, 经过 Lipofectamine 脂质体转染入 AD293 细胞中,11d 开始细胞出现 CPE 现象,主要表现为细胞变大变圆,出现空斑,成葡萄串,极易脱落等(图 3)。将收获的重组腺病毒重新感染 AD293 细胞以扩增。

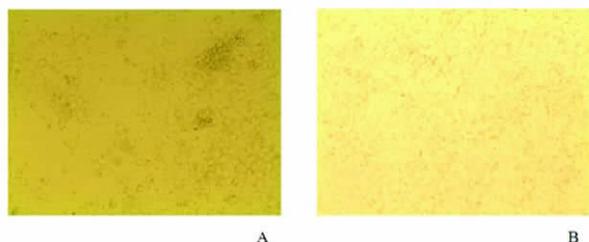


图 3 A 图为包装腺病毒的细胞出现 CPE 现象 B 图为正常 AD293 细胞对照

Figure 3 CPE of viral pack cell AD293

2.4 Ad-HA-HCV core 1b 重组腺病毒感染 AD293 细胞后,检测表达产物

用扩增纯化后的重组腺病毒感染 HEK293 细胞,24 小时后提细胞 RNA、蛋白,进行 RT-PCR,Western blot 检测

Ad-HA-HCV core 1b 组与空腺病毒感染组和空白对照组中 HA-HCV core 1b 在 mRNA 水平和蛋白质水平的表达。转染了 Ad-HA-HCV core 1b 的细胞中,有 HA-HCV core 1b 表达,而其他两个对照组无表达。(图 4)。

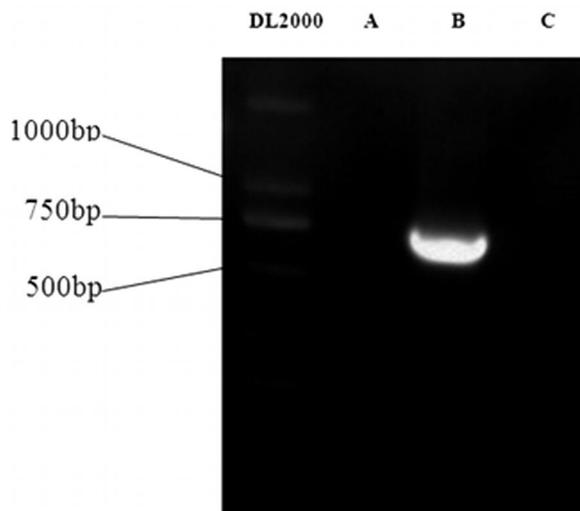


图 4 A: 空白对照 B: Ad-HA-HCV core 1b, C: 空白病毒对照

Figure 4 Detection of mRNA of Ad-HA-HCV core 1b by RT-PCR HA-HCV core 1b 蛋白水平、mRNA 水平的表达,表明 Ad-HA-HCV core 1b 感染 AD293 细胞,重组缺陷型腺病毒 Ad-HA-HCV core 1b 构建成功。(图 5)

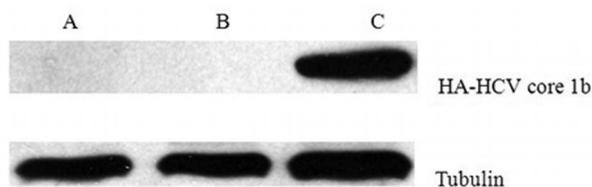


图 5 A: Ad-HA-HCV core 1b; B: 空腺病毒对照组; C: 空白对照

Figure 5 Detection of expression of Ad-HA-HCV core 1b by Western blotting

3 讨论

胰岛素抵抗(insulin resistance, IR)是指胰岛素敏感组织和细胞如肝、骨骼肌、脂肪等组织细胞受胰岛素介导的葡萄糖摄取和利用效能减低的一种病理生理状态,些组织细胞对胰岛素的敏感性出现不同程度的下降。胰岛素抵抗是代谢综合征、糖尿病和动脉粥样硬化的共同病理生理改变^[5]。基础研究、临床研究和流行病学研究证明丙型肝炎病毒感染与胰岛素抵抗有关。特别是在 Moucari 等人证实,丙肝病毒 1 型对胰岛素抵抗有独立的作用^[6]。其作用机制的研究成为当今的重要课题。

丙型肝炎病毒(HCV)感染与脂质代谢、氧化应激和线粒体功能相关,目前有研究表明,HCV 感染者患糖尿病或胰岛素抵抗的风险会大大增加^[7]。单一变量分析显示,胰岛素抵抗和高病毒载量有关。在没有超重和明显的肝纤维化时,稳态评估胰岛素抵抗模型 HOMA-IR 与血清 HCV RNA 水平显著相关,说明病毒复制量对于胰岛素抵抗有直接作用。病毒蛋白如何直接损

伤胰岛素信号通路有待研究。核心蛋白是丙肝病毒各个亚型的重要区分标志,是丙肝病毒作用的重要位点。研究核心蛋白的作用机制对于研究各个亚型对胰岛素抵抗的区别有重要意义^[3]。我们构建此腺病毒载体以探索丙肝病毒 1 型区别于其他亚型,进而引起胰岛素抵抗的关键机制,为进一步研究 HCV 感染与胰岛素抵抗的关系打下基础,并对治疗学有重要意义。

目前,脂质体的转染效率较低,且只能感染分裂期的细胞,表达时间也较短,不利于细胞和体内实验的持续观察和基因表达量的要求。因此我们引进了腺病毒载体系统,属于目前发展较快的载体系统^[8]。该系统不整合入细胞基因组,属于复制缺陷型重组腺病毒载体,安全性高,感染细胞范围广,感染效率高,对分裂及未分裂期细胞均有较高的感染效率^[9]。

本实验构建的 Ad-HA-HCV core 1b 重组腺病毒载体,携带有 HA 基因,在腺病毒转化包装细胞后可以直接通过 HA 融合蛋白的表达情况检测感染是否成功及其效率,HA 蛋白对应的抗体稳定特异,为实验和应用提供了便利。本实验采用 AdEasy 系统,构建一种表达 HA-HCV core 1b 的重组腺病毒复制缺陷型载体^[9,10],以用于 HCV 1b 亚型对于胰岛素抵抗的体外、体内机制研究。

参考文献(References)

- [1] Okuda M, Li K, Beard MR, et al. Mitochondrial injury, oxidative stress, and antioxidant gene expression are induced by hepatitis C virus core protein[J]. *Gastroenterology*, 2002, 122(2): 366-75
- [2] Moucari R, Asselah T, Cazals HD, et al. Insulin resistance in chronic hepatitis C: association with genotypes 1 and 4, serum HCV RNA level, and liver fibrosis[J]. *Gastroenterology*, 2008, 134(2): 416-23
- [3] Bukh J, Purcell RH, Miller RH. Sequence analysis of the core gene of

- 14 hepatitis C virus genotypes[J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1994, 91(17): 8239-43
- [4] Jager L, Ehrhardt A. Emerging adenoviral vectors for stable correction of genetic disorders[J]. *Curr Gene Ther*, 2007, 7(4): 272-83
- [5] Mlinar B, Mlinar B, Marc J, et al. Molecular mechanisms of insulin resistance and associated diseases [J]. *Clin Chim Acta*, 2007, 375(1-2): 20-35
- [6] Wang CS, Wang ST, Yao WJ, et al. Hepatitis C virus infection and the development of type 2 diabetes in a community-based longitudinal study[J]. *Am J Epidemiol*, 2007, 166(2): 196-203
- [7] Camma C, Bruno S, Di Marco V, et al. Insulin resistance is associated with steatosis in nondiabetic patients with genotype 1 chronic hepatitis C[J]. *Hepatology*, 2006, 43(1): 64-71
- [8] 许波群,李瑛,薛凯等. 人 SET 基因小分子干扰 RNA 重组腺病毒载体的构建与鉴定[J]. *医学研究生学报*, 2010, 23(2): 117-122
Xu Bo-qun, Li Ying, Xue Kai, et al. Construction and identification of human SET adenovirus. delivered siRNA vector [J]. *J Med Postgrad*, 2010, 23(2): 117-122
- [9] Mahanivong C, Krüger JA, Bian D, et al. A simplified cloning strategy for the generation of an endothelial cell selective recombinant adenovirus vector[J]. *J Virol Methods*, 2006, 135(1): 127-35
- [10] 李小兰,徐向上,李兆明,等. HAX1 和 EGFP 共表达重组腺病毒载体的构建、鉴定[J]. *医学分子生物学杂志*, 2010, 7(1): 16-22
Li Xiao-lan, Xu Xiang-shang, Li Zhao-ming, et al. Construction and Identification of Recombinant Adenovirus Vector. Co-expressing HAX1 and Enhanced Green Fluorescent Protein [J]. *J Med Mol Biol*, 2010, 7(1): 16-22