

原核表达系统真核化中的核定位信号对 乙肝病毒(HBV)基因免疫效果的影响

李永念¹ 熊思东^{2*} 袁志刚²

(¹ 贵阳医学院免疫学教研室 贵阳 550004)

(² 复旦大学上海医学院免疫学系 上海 200032)

摘 要 研究核定位信号对真核化的 T7 表达系统在真核细胞及基因免疫中表达 HBsAg 基因效率的影响。结果发现,在体外培养细胞中,无核定位信号的 T7 系统表达效率比有核定位信号组明显要高。基因免疫时,无核定位信号组诱发小鼠产生了针对 HBsAg 的特异性免疫应答,而含核定位信号的 T7 表达系统则未能诱发小鼠发生明显的免疫应答。提示 T7 系统是一种胞浆表达系统,将 T7RNA 聚合酶引入核定位信号后该系统的表达效率降低,甚至不能诱发特异性免疫应答。

关键词 核定位信号 T7 表达系统 乙肝病毒 基因免疫

中图分类号 Q78 **文献标识码** A **文章编号** 1001-6209(2003)06-0728-04

表达系统是基因工程的关键,也是影响基因免疫效果的重要因素。基于 T7 RNA 聚合酶与 T7 强启动子($\Phi 10$)间的特异性识别而建立起来的 T7 RNA 聚合酶/启动子偶联表达系统(简称 T7 系统)在大肠杆菌中已取得了令人满意的结果,是目前所知表达效率很高的原核表达系统之一。如何将该系统引入真核细胞表达外源基因是近年来的研究热点。最近,该系统已陆续在酵母、昆虫、植物和哺乳动物细胞中实现了高效表达^[1~3],为研究异种蛋白在哺乳动物细胞中的表达、基因疫苗的研制及基因治疗提供了有力工具。迄今,对 T7 系统的改造多未引入核定位信号,也实现了目的基因的表达。这是否提示该系统在真核细胞中表达外源基因无需核定位信号,转录和翻译无需在核内进行?核定位信号是否对其表达效率有影响,进而影响基因免疫的效果呢?为了回答此问题,我们进行了以下实验研究。

1 材料和方法

1.1 主要材料

pAR3132 质粒(含有 T7RNA 聚合酶基因及来源于 SV40 T 抗原的核定位信号)、pAR3126 质粒(只有 T7RNA 聚合酶基因而无来源于 SV40 T 抗原的核定位信号)和 pAVX1

基金项目 美国中华医学基金会(CMB)资助

* 通讯作者。Tel 86-21-54237749; E-mail: sdxiong@shmu.edu.cn

作者简介 李永念(1972-),男(仡佬族),贵州人,副教授,硕士,主要从事分子病毒免疫学研究。E-mail: liyongnian@yeah.net

收稿日期 2002-12-30,修回日期 2003-07-08

质粒(pT7 IRES/HBsAg 质粒的原骨架质粒 ,做为空载体对照)由英国伦敦大学 Dr. Eagles 惠赠。pT7 IRES/HBsAg 质粒(有 T7 启动子及 HBsAg 的 M 蛋白基因)由袁志刚构建并鉴定。大肠杆菌(*Escherichia coli*)DH5 α 购自 Gibco BRL 公司。C2C12 细胞株(C3H 小鼠成肌细胞 ,ATCC 编号 :CRL-1772)购自中国科学院上海细胞研究所。脂质体(Lipotransfectamine) 购自 Gibco BRL 公司。BALB/c 小鼠 ,雌性 ,6 ~ 8 周龄 ,体重 16 ~ 18g ,购自复旦大学上海医学院实验动物科学部。DOTs 点杂交图象处理系统购自上海天能科技有限公司。

1.2 质粒 DNA 提取

上述各质粒常规转化 DH5 α 宿主菌经增菌培养后 ,用经典碱裂解法提取质粒 DNA ,并测定其 OD_{260}/OD_{280} 介于 1.80 ~ 2.00 ,精确定量将质粒 DNA 浓度调整为 1 μ g/ μ L , - 20 $^{\circ}$ C 冻存备用。

1.3 目的基因(HBsAg)在体外培养细胞中的转染及表达

按脂质体转染试剂说明将质粒转染 C2C12 细胞。转染分组如下 A 组 :pAR3132 + pT7IRES/HBsAg ;B 组 :pAR3126 + pT7IRES/HBsAg ;C 组 :pT7IRES/HBsAg ;D 组 :pAR3132 + pAR3126 + pAVX1。

分别于转染 0h、24h、48h、72h 收集细胞培养上清液。上清液中 HBsAg 的表达采用斑点酶免疫试验(DOT-EIA)检测 ,点样纤维膜显色后用 DOTs 点杂交图象处理系统分析斑点灰度值。

1.4 HBsAg 的基因免疫

动物免疫分组同体外转染分组 ,各组质粒常规肌肉注射免疫。每只小鼠于质粒 DNA 免疫前 24h ,预先肌肉注射 100 μ L 0.25% 丁哌卡因 ,使局部肌肉坏死 ,24h 后再在同一部位注射上述各组质粒 DNA 生理盐水溶液(1 μ g/1 μ L) 100 μ L。免疫后每周经小鼠眼眶后眦静脉采血 ,收集血清 ,冻存待测。

1.5 基因免疫效果的测定

每周收集各组小鼠血清 ,采用 ELISA 法分别测定血清中 HBV 特异性 IgG、IgG1、IgG2a 滴度及其动态变化 ,共观察 9 周。

2 结果

2.1 HBsAg 在体外培养细胞中的表达情况

各组质粒转染 C2C12 细胞后 0h、24h、48h、72h 培养上清液中 HBsAg 的 DOT-EIA 灰度扫描分析结果见表 1。由表可见 ,T7 表达系统在有核定位信号时都可以在体外培养细胞中表达 HBsAg 基因 ,均在转染后 48h 达高峰。但无核定位信号组(B 组)的表达效率比有核定位信号组(A 组)更高。

2.2 HBsAg 基因免疫后小鼠免疫应答水平

2.2.1 HBsAg 基因免疫小鼠后不同时段小鼠血清中抗 HBS IgG 类总抗体的检测 :从图 1 可见 ,T7 表达系统用于 HBV 基因免疫时 ,无核定位信号组(B 组)可诱发小鼠产生针对 HBsAg 的特异性免疫应答 ,抗 HBS 于免疫后第 6 周开始出现 ,持续升高 ,直至第 9 周末。而含核定位信号的 T7 系统(A 组)则未能诱发小鼠发生明显的免疫应答。

表 1 质粒转染 C2C12 细胞后不同时段培养上清液中
乙肝表面抗原的 DOT-EIA 灰度扫描值

Table 1 The detection of HBsAg in the C2C12 cell after plasmids transfection by DOT-EIA				
Group	t/h			
	0	24	48	72
A	5.51	8.36	14.74	7.30
B	5.54	14.66	24.33	18.63
C	3.49	5.58	5.03	5.21
D	4.06	4.16	5.20	6.02
Positive control	15.52			
Negative control	5.19			

A. pAR3132 + pT7 IRES/HBsAg ; B. pAR3126 + pT7 IRES/
HBsAg ; C. pT7 IRES/HBsAg ; D. pAR3126 + pAR3132 +
pAVX1 ; Positive control. HBsAg ; Negative control. Dilution.

表 2 B 组小鼠血清中抗 HBs IgG
抗体亚类检测 OD 值

Table 2 The detection of anti-HBs IgG sort in the immuned mouse serum			
Group	OD ₄₉₀		
	IgG1	IgG2a	IgG2a/IgG1
B	0.661	0.770	1.17

3 讨论

我们实现了 T7 系统在体外培养真核细胞及动物体内表达 HBsAg 基因 ,同时对比研究了核定位信号对 T7 系统表达效率及基因免疫效果的影响。结果表明 ,虽然 T7 表达系统在有核定位信号时都可以在体外培养细胞中表达 HBsAg 基因 ,但无核定位信号组(B 组)的表达效率比有核定位信号组(A 组)明显要高。在进行动物体内基因免疫时 ,无核定位信号 T7 系统(B 组)可诱发小鼠产生针对 HBsAg 的特异性免疫应答 ,而含核定位信号的 T7 系统(A 组)则未能诱发小鼠发生明显的免疫应答。这提示 T7 表达系统引入真核细胞表达外源基因时 ,似乎无需进入核内。加入核定位信号后反而不能诱发小鼠产生特异性免疫应答。

T7 表达系统的工作原理基于 T7RNA 聚合酶与 T7 启动子间的特异识别^[4] ,而 T7RNA 聚合酶是原核生物 RNA 聚合酶 ,本身并不含有核定位信号肽信号 ,因此 T7RNA 聚合酶由质粒 pAR3126 转录并表达后 ,几乎全部停留在胞浆中。另外 ,含有 T7 启动子及目的基因的质粒 DNA 被真核细胞有效摄入细胞后 ,也主要分布在胞浆中 ,只有一小部分通过核膜进入细胞核。据此 ,有学者认为由 T7RNA 聚合酶和 T7 启动子组成的双质粒 T7 表达系统是一种胞浆表达系统^[5]。这也是真核化的 T7 原核表达系统 ,即便是没有核定位信号(如实验中 B 组) ,也能在真核细胞有效表达外源基因的原理。把 SV40 大 T 抗原核定位信号

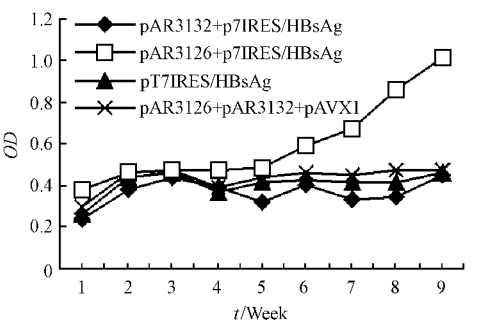


图 1 不同时段各组小鼠血清中抗
HBs IgG 抗体的动态检测

Fig.1 The detection of anti-HBS
IgG in the immuned mouse

2.2.2 HBsAg 基因免疫后小鼠血清中抗 HBs IgG 抗体亚类检测 :取第 8 周 B 组小鼠血清 ,测定其 IgG1 和 IgG2a 抗体滴度分析小鼠体内免疫应答类型 ,结果见表 2。可见无核定位信号的 T7 系统诱发小鼠既产生针对 HBsAg 的 Th1 细胞免疫应答 ,也产生 Th2 细胞介导的体液免疫应答 ,没有明显的免疫偏离现象。

引入 T7RNA 聚合酶(由 pAR3132 质粒转录表达)即可将 T7RNA 聚合酶定位于真核细胞核内^[6]。在此情况下 ,滞留于胞浆中的 T7 启动子及目的基因质粒很少甚至不被 T7RNA 聚合酶识别 ,难以启动下游 HBsAg 基因的转录和翻译 ,导致表达效率降低。所以不足以诱发针对 HBV 的特异性免疫应答。

总之 ,在本实验中观察到核定位信号对 T7 表达系统不是必需的 ,引入核定位信号反而影响其表达效率 ,甚至不能诱发针对 HBV 的特异性免疫应答。提示真核化的 T7 系统在真核细胞胞浆中表达外源基因 ,是一种胞浆表达系统。但是否在其它实验体系中也是如此 ,尚需更多的实验结果加以证实。

参 考 文 献

- [1] Chen X Z , Li Y S , Xiong K Y , *et al.* A self-initiating eukaryotic transient gene expression system based on cotransfection of bacteriophage T7 RNA polymerase and DNA vectors containing a T7 autogene. *Nucleic Acids Research* , 1994 , **22** (10) 2114 ~ 2120.
- [2] Deng H , Wolff J A. Self-amplifying expression from the T7 promoter in 3T3 mouse fibroblasts. *Gene* , 1994 , **143** 245 ~ 249.
- [3] 陈 峰 路子显 ,常团结 ,等. 利用修饰的 T7RNA 聚合酶基因建立一种植物偶联表达系统. 科学通报 ,2002 , **47** (10) 775 ~ 779.
- [4] Moss B , Elroy-Stein O , Mizukami T , *et al.* Product review : New mammalian expression vectors. *Nature* ,1990 , **348** 91 ~ 92.
- [5] Elroy-Stein O , Moss B. Cytoplasmic expression system based on constitutive synthesis of bacteriophage T7 polymerase in mammalian cells. *Proc Natl Acad Sci* , 1990 , **87** 6743 ~ 6747.
- [6] Dunn J , Krippel B , Bernstein K E , *et al.* Target bacteriophage T7 RNA polymerase to the mammalian cell nucleus. *Gene* , 1988 , **68** 259 ~ 266.

Influence of HBV Gene Immunization by Introduction of Nuclear Localization Signal into Eukaryonized T7 Expression System

Li yongnian¹ Xiong sidong² Yuan zhigang²

(¹ Department of Immunology , GuiYang Medical College , Guiyang 550004 , China)

(² Department of Immunology , Shanghai Medical College of Fudan University , Shanghai 200032 ,China)

Abstract : To investigate the effects of nuclear localization signal on immune response induced by eukaryonized T7 expression system. Nuclear localization signal (NLS) coding sequence was introduced into eukaryonized T7 expression system containing HBV M protein coding gene. Naked gene immunization was performed. The results showed that the expression efficiency of T7 system which containing nuclear localization signal in vitro was lower than that without NLS. In vivo study found that HBV specific immune response induced by NLS lacking eukaryonized T7 system was significantly higher than that in eukaryonized T7 expression system containing NLS. HBV specific Th1 and Th2 type immune responses were also observed in the mice immunized with T7-HBsAg plasmid lacking NLS , indicating that the nuclear localization signal might not be essential in T7 expression system.

Key words :Nuclear localization signal , T7 expression system , Hepatitis B virus , Gene immunization

Foundation item :CMB

* Corresponding author. Tel 86-21-54237749 ; E-mail :sdxiong@shmu.edu.cn

Received date 01-20-2003