

研究简报

三种丙型肝炎病毒转基因小鼠系的同时制备

谭文杰 陈刚 李光三¹⁾ 刘晔¹⁾ 丛郁苗 季杜森¹⁾ 詹美云

(中国预防医学研究院病毒学研究所, 北京 100052)

摘要 为研究丙型肝炎病毒的致病致瘤机理及结构基因与非结构基因 3 区 (NS3) 的功能及其在 HCV 感染致病中的作用, 建立一个 HCV 分子治疗的动物模型, 构建了含金属硫蛋白启动子和 HCV 结构基因或 NS3 基因的质粒, 将两者等量混合后用显微注射法接种于昆明白小鼠受精卵内制备转基因小鼠. 通过 PCR 筛选获得三种整合 HCV 结构基因或/和 NS3 基因的首建鼠. 结果表明: a. 注射后卵存活率与仔鼠出生率分别为 81%、30%; b. 检测 60 只 G0 代小鼠, 结构基因整合鼠 6 只 (10%), NS3 基因整合鼠 4 只 (6.7%), 双基因整合鼠 9 只 (15%), 总整合率为 31.7%; c. RT-PCR 法检测阳性鼠肝中有靶基因 mRNA 的转录; d. 4 只首建鼠与正常鼠回交获得 38 只 G1 小鼠, 其中 20 只为整合鼠, 整合率为 52.6%; e. 转基因鼠表型迄今无明显异常. 表明一次显微注射同时获得了三种整合 HCV 结构基因或/和 NS3 基因的转基因小鼠.

关键词 丙型肝炎病毒, 转基因小鼠, 结构基因, 非结构基因 3

学科分类号 Q78.5

丙型肝炎病毒 (HCV) 是引起输血后肝炎的主要病原, 并可导致肝硬化与肝癌^[1]. 其基因组为单股正链 RNA, 长 9.4 kb 左右, 编码一个 3010~3033 氨基酸的多聚蛋白^[1,2], 其结构蛋白包括核壳蛋白与包膜糖蛋白, 内含重要的中和抗原表位与细胞免疫抗原表位, 与 HCV 的免疫致病及防御密切相关. 同时核壳蛋白可作为细胞内转录调节因子, 可能与肝细胞损伤及肝癌发生相关^[3]; 非结构基因 (NS2~NS5) 编码的蛋白主要参与病毒的复制与装配. 其中 NS3 基因编码两个重要的功能酶: 其 N 端 1/3 编码丝氨酸蛋白酶, C 端 2/3 编码 NTP 依赖解旋酶. 此外日本学者最近证明 NS3 基因转染小鼠 NIH3T3 细胞可致瘤样变^[4,5]. 故 HCV 结构基因及 NS3 基因的表达调控与功能研究是近年来探索 HCV 致病机制与防御治疗途径的焦点. 本文旨在通过建立丙型肝炎病毒结构基因与非结构基因 3 的转基因小鼠系, 为同时从时间和空间角度探讨这两个重要功能基因的表达调控及表型效应, 并为进

一步探索 HCV 的致病机理及治疗防御途径提供基础和手段.

1 材料与方法

1.1 实验动物与试剂来源

昆明小白鼠由中国科学院发育生物学研究所动物中心提供, 生化试剂为国产分析纯, 分子生物学工具酶购自 Promega 公司.

1.2 靶基因的构建纯化与鉴定

HCV5'UTR 与全结构基因 (C+ E1+ E2) 来源于中国河北株质粒 pHCS (本室构建)^[2]; NS3 基因来源于美国株 (HCV-1) 质粒 pTM3/HCVNS3 (由王海林博士惠赠), 并经 PCR 扩增获得 (前向引物: 5'-ATCGGATC-CATGGCGCCCATCACG-3'; 反向引物: 5'-GATCCTAGGTCATCCCGTGACGAC-3', 下划线为 BamHI 切点). 表达载体 pMT 由中

¹⁾中国科学院发育生物学研究所, 北京 100080.

收稿日期: 1997-05-09, 修回日期: 1997-07-10

国医学科学院基础医学所琦祖和教授提供。HCV5UTR+C+E1+E2 (-318~-2187nt) 基因或 HCV NS3 (M+1027~1656aa) 基因正向插入至 pMT 的 *Xba* I 与 *Hind* III 或 *Bgl* II

与 *Bam* HI 位点间 (图 1)。质粒经酶切线性化用 Wizard 柱纯化, 溶于 TE 缓冲液 (10 mmol/L Tris-HCl, pH 7.4, 0.1 mmol/L EDTA), 电泳定量并调整浓度至 1 mg/L 左右。

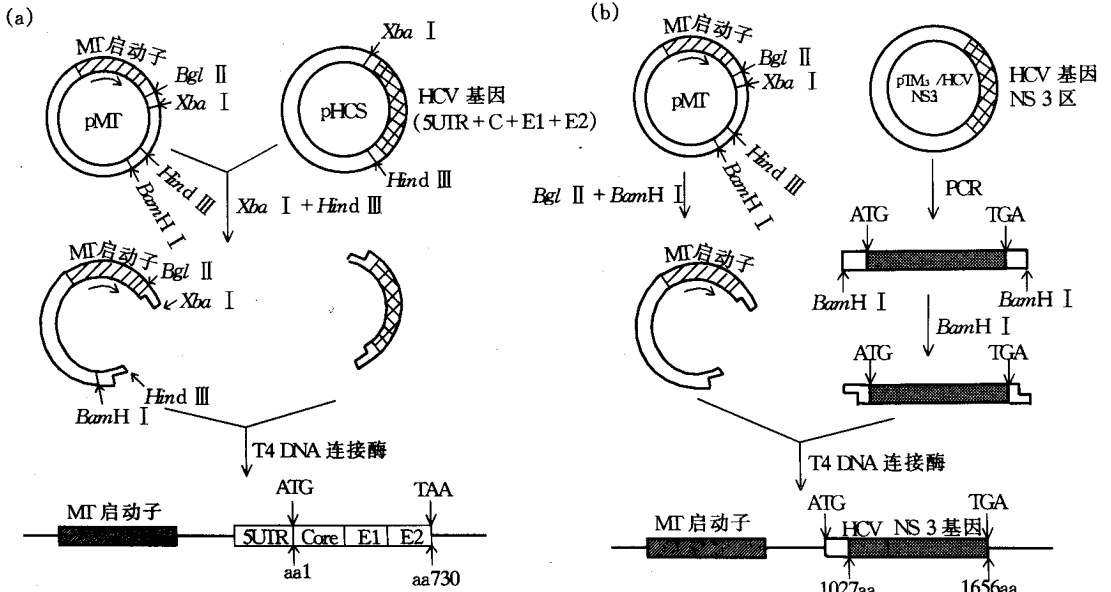


图 1 转基因小鼠注射用靶基因的构建

(a): 携带结构基因的靶基因的 pMTCE 的构建; (b): 携带 NS3 基因的靶基因的 pMTNS3 的构建。

1.3 前核显微注射

将两种靶基因等量混合, 用显微注射法将待转基因注入小鼠受精卵雄性前核中, 注入量为 1~2 pL/卵^[6], 再移植到 6 周龄假孕母鼠输卵管中, 每侧 20 枚左右, 待其发育后产仔。

1.4 转基因鼠的检测鉴定

1.4.1 转基因鼠 DNA 整合检测 (PCR 法)

结构基因的整合检测见文献 [7]; NS3 基因的整合方法同文献 [7], 检测用引物为 N3F1: 5'-ATCACCAGCCTGACTGGC-3'; N3R1: 5'-AAGTCCACC GCCTTGGTCA-3'; N3R2: 5'-TCGTAACCAGGTAAAGGTC CGA-3'.

1.4.2 靶基因在小鼠肝内转录的检测 (RT-

PCR 法) 见文献 [7]. 引物同 1.4.1.

2 实验结果

2.1 转基因小鼠的制备

共注射 373 枚受精卵, 注射培养后存活 304 枚, 存活率 81%; 分别植入 40 只假孕母鼠输卵管中, 共有 12 只怀孕, 产下 90 只幼仔, 出生率为 30%; 存活 86 只, 表型无异常。

2.2 转基因小鼠的整合分析

我们对 60 只小鼠进行检测, 结果见表 1. 结构基因单整合率为 10%, NS3 基因单整合率为 6.7%, 结构基因与 NS3 基因双整合率为 15%, 总整合率为 31.7%。

表 1 三种 G0 代转基因小鼠的整合检测结果

HCV 结构基因区整合鼠		HCVNS3 区整合鼠		HCV 结构基因+ NS3 区双整合鼠		
12#	13#	19#	51#	11#	18#	23#
39#	43#	53#	57#	26#	28#	29#
48#	56#			30#	32#	34#
6/60 (10%)		4/60 (6.7%)		9/60 (15%)		

2.3 转基因小鼠肝组织中的转录分析

我们分别选取 12# (结构基因单整合小鼠)、19# (NS3 基因单整合小鼠)、34# (双基因整合小鼠) 和 42# (正常对照鼠) 处死后取肝组织, 匀浆后提取 RNA, DNase 处理后进行 RT-PCR, 在 mRNA 水平上检测外源基因是否转录表达. 结果表明: 上述阳性整合小鼠皆可扩增出相应基因的特异性大小片段, 且与相应探针杂交呈阳性.

2.4 G1 代转基因小鼠的获得

将 39#、51#、29#、32# 转基因阳性鼠与正常昆明小鼠配种后共获得 38 只 G1 代仔鼠, 经 PCR-Southern 检测 20 只为整合阳性小鼠 (表 2). 说明 G0 代转基因小鼠能将整合基因遗传给后代, 并符合孟德尔定律.

表 2 G1 代转基因小鼠的制备

配种	产仔	G1 代整合仔鼠数	整合率 / %
39# (♂) × 正常鼠 (♀)	8	4	50
51# (♀) × 正常鼠 (♂)	10	6	60
29# (♂) × 正常鼠 (♀)	10	5	50
32# (♀) × 正常鼠 (♂)	10	5	50

3 讨 论

鉴于 HCV 结构基因与 NS3 基因在病毒复制装配中的重要作用及其在病毒自然感染史中的地位^[4], 这两个区段是近年来人们探索 HCV 分子与基因治疗的热点靶位^[9,10], 研究 HCV 致病机理与 HCV 相关 HCC 肿瘤发生机理的焦点所在^[3,5,11]. 我们应用本室制备的第

一代结构基因转基因小鼠模型证实 HCV 核壳蛋白的表达与 Fas 抗原的表达相关, 提示 HCV 结构蛋白通过 Fas 系统参与细胞内信号传导与细胞凋亡^[11]; 但因靶基因所采用的启动子是 CMV 早期启动子^[7], 缺乏明显组织特异性^[8], 不能诱导, 无法研究表达产物量效关系. 而本文报道的 HCV 第二代转基因小鼠所采用的载体 pMT 内含小鼠金属硫蛋白启动子, 该启动子所诱导的基因表达不仅具有明显组织特异性 (以肝脏最高, 肾次之), 而且具有高度可诱导性^[8], 可受到重金属离子 (如 Zn、Cd、Cu 等) 和激素类的诱导. 应用这种小鼠研究目的基因表达调控及其表型效应或作为治疗用药物筛选模型将更为适用.

显微注射法将外源基因导入动物受精卵的雄性原核是生产转基因动物最常用的方法^[6], 注射存活率与仔鼠整合率受到许多因素影响 (注射浓度、缓冲液、DNA 构象与纯度、动物品系等). 本研究通过优化实验条件, 获得了 81% 的存活率与 31% 的较高整合率; 同时, 将两个基因混合后注射, 通过筛选获得了三种整合小鼠 (结构基因单整合 Tg 鼠、NS3 基因单整合 Tg 鼠、双基因整合 Tg 鼠), 大大减少了生产转基因小鼠的时间与成本, 并可用这三种阳性整合鼠来研究结构基因与 NS3 基因在 HCV 感染致病中的单独作用与协同作用.

致谢 感谢琦祖和教授、毕胜利副研究员与王海林博士对本研究的帮助.

参 考 文 献

- 1 Choo Q L, Kuo G, Weiner A J *et al.* Isolation of a cDNA

- clone derived from a blood-borne non-A non-B viral hepatitis genome. *Science*, 1989, **244**: 359~ 362
- 2 毕胜利, 白宪鹤, 从勉尔等. 中国人丙型肝炎病毒基因组的一级结构及其变异. *病毒学报*, 1993, **9**: 114~ 126
 - 3 Ray R B, Lagging L M, Keith M *et al.* Transcriptional regulation of cellular and viral promoters by hepatitis C virus core protein. *Virus Res*, 1995, **37**: 209~ 220
 - 4 Van Doorn L J. Review: molecular biology of hepatitis C virus. *J Med Virol*, 1994, **43**: 345~ 356
 - 5 Daitoku S, Toru F, Tsutomu T. Hepatitis C virus nonstructural protein NS3 transforms NIH3T3 cells. *J Viro*, 1995, **69**: 3893~ 3896
 - 6 Hogan B, Constantini F, Lacy E. *Manipulating the mouse embryo: A laboratory manual*. New York: Laboratory, 1986. 80~ 203.
 - 7 谭文杰, 从郁, 李光三等. 丙型肝炎病毒结构基因转基因小鼠的建立. *病毒学报*, 1997, **13**: 19~ 23
 - 8 Liang C, Pamela R Z, Yang N S. *In vivo* promoter activity and transgene expression in mammalian somatic tissues evaluated by using particle bombardment. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1993, **90**: 4455~ 4459
 - 9 Andre L, G-Y He, S-J Polyak *et al.* Elimination of hepatitis C virus RNA in infected human hepatocytes by adenovirus-mediated expression of ribozymes. *J Virol*, 1996, **70**: 8782~ 8791
 - 10 Kim J L, Morgenstern K A, Lin C *et al.* Crystal structure of the hepatitis C virus NS3 protease domain complexed with a synthetic NS4A cofactor peptide. *Cell*, 1996, **87**: 343~ 355
 - 11 谭文杰, 郎振为, 从郁等. 丙型肝炎病毒核壳蛋白在转基因小鼠中的表达及与 Fas 抗原关系的初步研究. *中华临床与实验病毒学杂志*, 1997, **11** (3), 205~ 207
 - 12 Peter B, Katrin O, Max H *et al.* Nonstructural protein 3 of hepatitis C virus blocks the distribution of the free catalytic subunit of cyclic AMP-dependent protein kinase. *J Virol*, 1997, **71**: 2838~ 2843

Production of Three Transgenic Mouse Lineages Which Simultaneously Carries Structural Gene and/ or Non-structural Gene 3 (NS3) Region of Hepatitis C Virus.

TAN Wen-jie, CHEN Gang, LI Guang-san¹⁾, LIU Ye¹⁾, CONG Yu, MIAO Ji, DU Miao¹⁾, ZHAN Mei-yun (*Institute of Virology, Chinese Academy of Preventive Medicine, Beijing 100052, China;*
¹⁾*Institute of Developmental Biology, The Chinese Academy of Sciences, Beijing 100080,*

China).

Abstract Hepatitis C virus (HCV) is a major causative agent of non-A non-B chronic hepatitis and also associated with the development of hepatocellular carcinoma. To understand the mechanism of pathogenesis and tumorigenesis of HCV and the role of the structural protein and NS3 protein in the HCV infection, three lines of transgenic mice carrying the HCV structural gene or/ and NS3 gene, in which these genes are expressed under the control of the mouse metallothionein promoter, were produced simultaneously. These animals were produced by microinjecting into the pronuclei of fertilized mouse eggs with the mixture of construct carrying the structural gene and NS3 gene of HCV. The results were as follow: 1) The zygote's survival rate and birth rate were 81% and 30%, respectively; 2) After screening 60 mice that developed from the microinjected eggs by PCR, 6 (10%) mice carrying the structural gene, 4 (6.7%) mice carrying NS3 gene and 9 (15%) carrying double genes. The total integrate rate was 31.7%; 3) The expression of transgene in the liver of Tg mice was analyzed by detection of the mRNA using RT-PCR; 4) 38 G1 mice were obtained by crossbred founder mice and normal mice, 20 mice were integrated (52.6%) with transgene; 5) No phenotypic abnormalities have been seen to date. The model may create the opportunity to examine the role of the structural and NS3 protein in HCV pathogenesis and tumorigenesis, and to assess the antiviral potential of the pharmacological agents and vaccine. **Key words** hepatitis C virus, transgenic mice, structural gene, non-structural gene 3 (NS3)