

乙型肝炎病毒表面抗原基因在杆状病毒载体与昆虫细胞体系中的表达

邱并生 裴美云

(中国科学院微生物研究所, 北京)

逯好英 马贤凯

(军事医学科学院基础医学研究所, 北京)

根据杆状病毒A组代表种苜蓿Y纹夜蛾核多角体病毒(*Autographa californica* Nuclear Polyhedrosis Virus, 简称 AcNPV) 的分子生物学资料, 我们采用分子剪裁和拼接手段, 对 AcNPV 多角体蛋白基因加以修饰, 并用人工合成定位探针, 获得大约在该基因的 ATG 转译起始密码子-9 处加有合成 BamHI 连接序列的转移载体质粒 pAc-MV。再与从乙肝病毒 adw 亚型的表面抗原基因 HBsAg 亚克隆株 pYPS-1 分出带有 BamHI 粘性末端的 HBsAg 基因, 构建表达载体质粒 pAc-MV-HBsAg。经与野生型 AcNPV DNA 对 *Spodoptera frugiperda* 细胞共转染, 借助同源交换, 获得插有 HBsAg 基因的多角体缺陷的重组病毒。根据 HBsAg 诊断血球凝集试验和 HBsAg 诊断酶标免疫测定, 表明重组病毒使 HBsAg 基因在昆虫细胞中得到了表达, 免疫电镜显示表达产物呈球状颗粒, 大小约为 22nm。表达产物粗制品按 1 μ g/鼠对 bal b/c 鼠免疫, 并于三周后强化免疫能产生抗体。由 HBsAg 纯样品酶标免疫法标定的标准曲线估计每升培养物的表达产物约 4-8mg, 细胞量为 1-2 $\times 10^6$ 个/ml。用重组病毒感染玉米螟 4 龄幼虫, 也获得 HBsAg 基因的表达, 展示了简易生产 HBsAg 诊断试剂和疫苗的可喜前景。

关键词 乙肝表面抗原基因; 杆状病毒载体; 昆虫细胞系; 表达

1983 年将隶属于杆状病毒 Baculovirus A 组的代表种: 苜蓿Y纹夜蛾核多角体病毒 (*Autographa californica* Nuclear Polyhedrosis Virus, 简称 AcNPV) 发展成为真核基因表达载体后, 相继有如下外原基因: 人 β -干扰素^[1], 人 α -干扰素^[2], β -半乳糖苷酶^[3], 大肠杆菌氯霉素乙酰转移酶^[4], 人 c-myc 蛋白^[5], 人白细胞间质素^[6], 流感病毒血凝素^[7,8], 淋巴细胞脉络丛脑炎嵌砂样病毒^[9], 乙型肝炎病毒表面抗原基因^[10]和兰舌病毒结构蛋白 S 等基因, 通过这种载体在昆虫细胞中获得高效表达。这种寄主范围只限于无脊椎动物, 实际上为鳞翅目昆虫的杆状病毒。表达载体具有高

效表达、表达产物的外泌性和N端糖基化优点, 特别对新型药物和基因工程疫苗, 在免疫原性, 安全性和后处理方面较之细菌、酵母、^[12]哺乳动物细胞^[11]等体系更具潜在优势。

本文介绍对 AsNPV 多角体蛋白基因修饰加工, 组建成转移表达质粒, 通过共转染获得插有乙型肝炎病毒表面抗原 (HBsAg) 基因的重组病毒, HBsAg 基因

本文于 1988 年 1 月 26 日收到。

田波和吴世宣同志对本工作给予多方关心和有益讨论, 中国科学院微生物研究所技术室合成定位探针和拍摄电镜照片, 北京医科大学人民医院肝病研究所协助进行放射免疫检测抗体实验, 在此谨致谢意。

本课题由中国科学院自然科学基金资助。

在这一载体和昆虫细胞体系中的表达水平以及对表达产物所做的特性鉴定。

材料和方法

(一) 细胞、病毒和 HBsAg 基因

野生型 AcNPV 毒株和 *Spodoptera frugiperda* 传代细胞系中国科学院上海昆虫研究所赠送。

AcNPV 多角体蛋白基因系 D. oerlfer 教授所赠。繁殖病毒和细胞传代用含 10% 胎牛血清的自配 TC-100 培养基。

载体质粒宿主 HB101。

HBsAg 基因来自 HBV-adw 亚型克隆株 pM15-HBV 全基因组,并在酵母-大肠杆菌穿梭质粒体系中进行的亚克隆株 pYPSS-1。

(二) 病毒 DNA 和质粒 DNA

用总量约为 500ml 的细胞培养液提纯病毒。低速离心除去细胞,上清经 80,000 \times g 离心 1h (4℃),取出病毒沉淀,悬浮后在 10—50% (w/v) 蔗糖梯度中 100000 \times g 离心 90min,纯化的病毒用蛋白酶 K 和 Sarkosyl (终浓度分别为 200 μ g/ml 和 1%) 裂解,经酚、氯仿等常规方法抽提病毒 DNA。

质粒 DNA 的制备采用常规的碱裂解法。

用作共转染的 AcNPV 转移载体质粒和病毒 DNA 经 CsCl 等密度梯度离心纯化。

(三) 共转染和重组病毒的筛选

S. frugiperda 细胞约长至 3/4 单层时,将 AcNPV DNA 与组建的含有 HBsAg 基因的转移表达质粒 DNA 按 Smith 等人介绍的方法进行共转染。28℃ 下培养 4 天,收取病毒进行蚀斑实验以及蚀斑杂交与常规的点杂交检测。再挑出无多角体表型和分子杂交阳性的蚀斑,经过有限稀释反复蚀斑实验三次,选出重组病毒。

(四) 重组病毒的蚀斑和点杂交

将形成蚀斑的琼脂平板转移到硝酸纤维素薄膜,各个有限稀释样品 100 μ l,经碱变性后,加注至 96 孔分子杂交板上,经抽滤转移到硝酸纤维素膜后按常规方法与 α -³²P-dCTP 标记的 HBsAg 基因探针进行蚀斑及点杂交。放射自显影标出阳性点作为再次蚀斑实验的出发毒源。

(五) HBsAg 血球凝集实验和免疫电泳

用 HBsAg 诊断血球和 HBsAg 诊断血清,参照使用说明,分别进行重组病毒感染细胞的血球凝集和 HBsAg 蛋白颗粒的免疫电泳检测。

(六) 表达产物的免疫原性的测定

由于酶联免疫法测出重组病毒感染的细胞内残留的基因产物高于外泌于培养液中的含量,因此测定表达产物的免疫原性时,先低速离心,收取重组病毒感染了 48—72h 的细胞,经过洗涤,冰冻和磨研,高速离心除去病毒粒子和细胞碎片,清液作为粗制抗原。由酶联免疫法标定出 HBsAg 的含量,以 1 μ g/鼠注射 Bal b/c 鼠,三周后行强化免疫,再经一周采血,用放射免疫双夹心法检测表达产物的抗体滴度。

(七) 重组病毒感染玉米螟

人工饲养的玉米螟购自中国农业科学院植保所,挑取 4 龄幼虫,用玻璃毛细管对其腹部作微量注射,3—4 天后,进行逐条幼虫的检测。

(八) 本实验中所用酶等生物制品及生化试剂

所用的限制性内切酶, T4DNA 连接酶, 核酸外切酶 Bal31 与 S1 以及人工合成的 BamHI 连接序列 (d5'-COGGATCCGG3') 等购自 Boehringer 和 BRL 等公司。

刻口翻译的 α -³²P-dCTP 系 Amersham 产品。

其它所用化学试剂均系国产分析纯产品。

HBsAg 血球诊断药盒, HBsAg 血清诊断药盒系北京生物制品研究所产品。HBsAg 酶标药盒为军事医学科学院基础医学研究所产品。HBsAg 纯样品购自北京医科大学人民医院肝病研究所。

结果和讨论

(一) AcNPV 表达载体质粒的构建

1. AcNPV 多角体蛋白基因的加工修饰: AcNPV DNA 分别经 *Eco*RI 和 *Hind*III 酶解后,用 pUC 13 克隆,以多角体蛋白基因作为探针,选出带有编码 AcNPV 多角体蛋白基因的 *Eco*RI-I 片段和 *Hind*III-F 片段的重组子,再经相应酶的剪裁和拼接,并借助设计的人工合成探针: d5'-

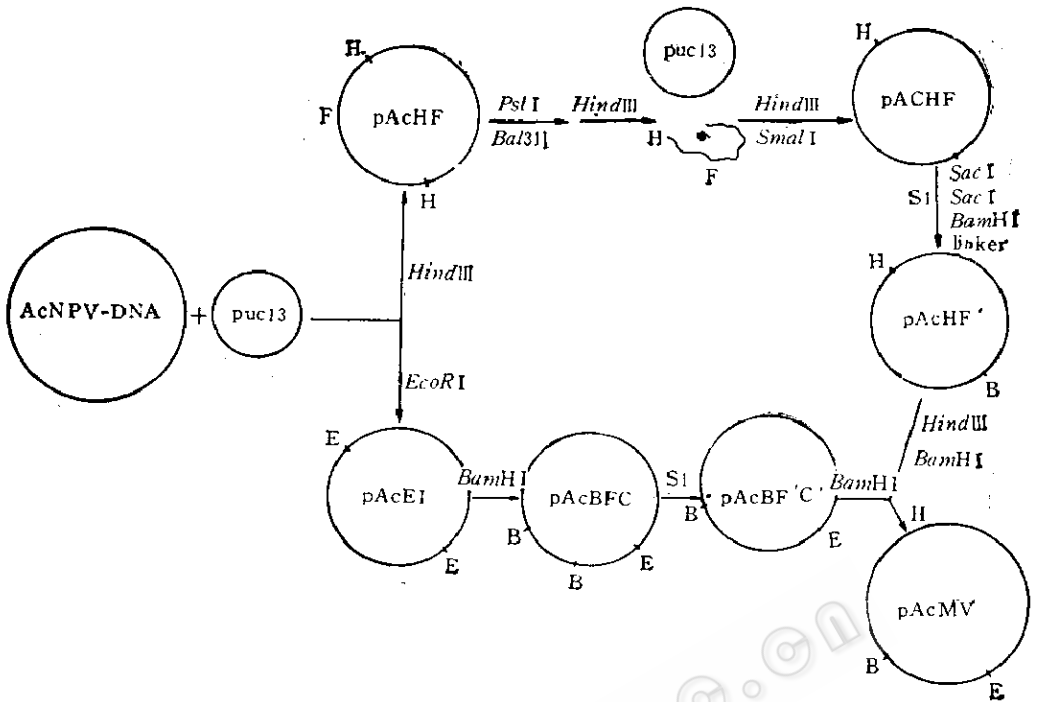


图1 重组转移质粒 pAcMV 的组建

Fig. 1 Construction of pAcMV recombinant transfer plasmid

CTATAATAATGCCGGA-3', d5'-TTGTAATAAAAAAC3' 的定位, 获得大约在 ATG 转译起始密码子-9 处加有合成 *Bam*HI 连接序列的转移载体质粒 pAc-MV, 其特点是缩短外源基因插入部位与起动子的距离以求外源基因的高效表达。下面附有 pAc-MV 的组建路线(图1)。

2. 在 pAc-MV 中组建 HBsAg 基因的重组转移载体质粒: 从 HBV-adw 亚型克隆株 DNA 分离出带有 *Bam*HI 粘性末端的 HBsAg 基因与 *Bam*HI 酶解的 pAc-MV 在 T4 连接酶作用下连接克隆。用 α -³²P-dCTP 标记的 HBsAg 基因探针进行原位分子杂交和酶解片段的薄膜转移杂交筛选出 HBsAg 基因插入的重组转移载体质粒 pAc-MV-HBsAg。

(二) HBsAg 基因在重组病毒感染细胞中的表达

1. pAc-MV-HBsAg 转移载体质粒

DNA 与野生型 AcNPV 基因组在 *S. frugiperda* 细胞中共转染, 发生同源交换, 形成多角体蛋白缺陷的重组病毒。图版 I-1, 2, 3 提供了重组病毒无包涵体表型特征的证据。图版 I-4, 5 显示分子点杂交检出有 HBsAg 基因插入的重组病毒形成的蚀斑点。

2. 重组病毒感染 48h 的细胞被 HBsAg 血球凝集吸附而野生型 AcNPV 感染的细胞则无此现象(图版 I-6, 7)。

3. 重组病毒感染细胞后, 起始以 12h 间隔, 48h 后以 1 天间隔, 取培养液 100 μ l, 用酶标法测出 HBsAg 外泌的增长, 至 72h HBsAg 外泌量达最高值并保持到第 5 天(图 2)。

4. 以 HBsAg 纯样品, 采用酶标法测绘出 HBsAg 不同含量的标准曲线。重组病毒感染细胞的培养中外泌的 HBsAg 随时间递增。72h, 细胞数为每毫升 $\times 10^6$ 个

表 1 用放射免疫双夹心法测定重组病毒在感染昆虫细胞的表达产物制备的抗 HBsAg 的免疫原性
Table 1 Detection of anti-HBsAg derived from excretes of infected cells with recombinant virus (RIA method)

抗体来源 Antibody derived from	cpm/ml		P/N	
	1	2	平均 Average	N = 30
试剂盒对照 Control	2587	2936	2761.5	92.05
健康 Healthy mice Bal b/c	0035	0013	24	0.80
人体血源纯 HBsAg Purified HBsAg from human blood	4367	4291	4329	144.3
感染重组病毒的昆虫细胞的分泌产物 Purified HBsAg from excretes of infected cells with recombinant virus	4010	4594	4302	143.4

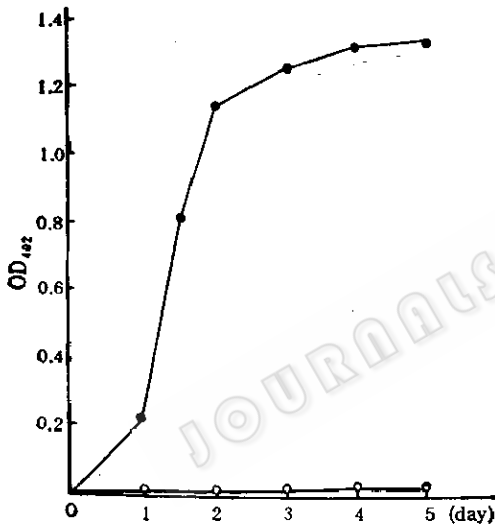


图 2 重组病毒在感染昆虫细胞后,不同时间分泌的 HBsAg 量

- 为野生病毒 AcNPV,
- 为重组病毒 AcRV-HBsAg

感染后 24、36 小时, 2、3、4 和 5 天分别用 ELISA 法测 HBsAg 分泌量

Fig. 2 Excretion of HBsAg gene in infected *S. frugiperda* cells

Cells were infected with AcNPV, (○) or AcRVHBsAg (●)

The amount of HBsAg was measured at 24, 36 hours, 2, 3 and 4 days by ELISA

时, HBsAg 量为 4ml/L。采用转瓶培养, 细胞数会增加, 估计 HBsAg 量也相应增加。

(三) 重组病毒表达产物的鉴定

1. 覆盖有 HBsAg 血清的铜网, 直接从重组病毒感染 48h 细胞培养液中特异性捕捉了 HBsAg 蛋白颗粒, 大小为 22nm (图版 1-8), 与 HBsAg 纯样品中的颗粒形状和大小及文献报道的相同, 由照片中颗粒的密布程度也显示出 HBsAg 基因在此体系中的高效表达。

2. 用重组病毒在感染昆虫细胞后表达产物粗制品, 免疫 Bal b/c 鼠, 所产生的抗体经放射免疫双夹心法测得表 1 结果, 说明其免疫原性与血源纯 HBsAg 不相上下。

(四) 重组病毒在玉米螟中表达的测定

4 龄的玉米螟虫微量注射重组病毒, 三天后, 从其匀浆液中, 经酶标免疫法测出了 HBsAg 基因在其中的表达, 表达水平高于细胞培养体系中的情况 (表 1)。

上述试验结果说明我们自行组建的杆状病毒载体: pAc-MV 提供了外源基因在昆虫细胞中表达的一个系统。HBsAg 基因在这一体系中表达的产物具有良好免疫原性, 其表达水平将随昆虫细胞培养条件的改进提高, 例如转瓶培养可以增加细胞

数。HBsAg 基因在虫体中通过重组病毒感染所表达的水平不低于细胞培养的初步结果展示了廉价生产 HBsAg 基因产物的前景。

参 考 文 献

- [1] Smith, G. E. et al.: *Mol. Cell Biol.*, 3: 2156—2165, 1983a.
- [2] Pennock, G. D. et al.: *Mol. Biol. Cell*, 3: 399—406, 1984.
- [3] Carbrnell, L. F. et al.: *J. Virol.*, 56: 153—160, 1985.
- [4] Maeda, S. et al.: *Nature*, 315: 592—594, 1985.
- [5] Miyamoto, C. et al.: *Mol. Cell Biol.*, 5: 2860—2865, 1985.
- [6] Smith, G. E. et al.: *PNAS*, 82: 8404—8408, 1985.
- [7] Kuroka, K. et al.: *EMBO J.* 5: 1359—1365, 1986.
- [8] Possee, R. D. et al.: *Virus Research*, 5: 43—59, 1986.
- [9] Matsukra, Y. et al.: *J. gen. Virol.*, 67: 1515—1529, 1986.
- [10] Cochran, M. A. et al.: *Proc. of 1986 Intern. Colloquium of Invertebr. Path.*, p. 383—386, 1986.
- [11] 谢彦博等: 病毒学报, 2: 1—9, 1986。
- [12] 沈绿萍等: 生物化学与生物物理学报, 19: 433—436, 1987。

USE OF BACULOVECTOR FOR THE EXPRESSION OF HBsAg GENE IN INSECT CELLS

Qiu Bingsheng Pei Meiyun

(Institute of Microbiology, Academia Sinica, Beijing)

Liu Haoying Ma Xiankai

(Institute of Basic Medical Sciences, Academy of Military Medical Sciences, Beijing)

Based on the informations of molecular biology of *Autographa californica* Nuclear Polyhedrosis virus (AcNPV), a recombinant transfer plasmid pAcMV was constructed by molecular procedures included using two synthetic localized probes, which provided an inserted position linked with *Bam*HI sequences nearly at polyhedrin initiating ATG codon. Then an expression vector pAcMV-HBsAg was reconstructed, it contained HBsAg gene from subclone pYPSS-1 derived from adwse-rototype of HBV. The recombinant virus containing HBsAg gene was isolated and purified through 3 cycles plaques and hybridization experiment after cotransfection of *Spodoptera frugiperda* cells with DNA of pAcMV-HBsAg and AcNPV.

The expression of HBsAg gene in *S. frugiperda* cells infected with recombinant virus AcRV-HBsAg was identified by ELISA as haemagglutination tests. The yield of

HBsAg excreted from *S. frugiperda* cells (an appropriate density usually between $1-2 \times 10^6$ cells/ml) after 48—72 h infected with AcRV-HBsAg was 4—8 mg/L. HBsAg harvested from the infected culture medium was shown immunoelectromicroscopy to be composed of spherical particles of about 22 nm diameter. Using this purified HBsAg, Bal b/c mice was immunized, the titer of anti-HBsAg serum measured measured by RIA was similar to that of purified HBsAg from human blood. Stable recombinant virus was isolated and could be shown to replicate in corn borer (*Ostrinia nubilalis*) larvae. All of these results can be expected that this expression vector system will be commercially developed to its fullest potential for diagnosis and vaccine HBsAg.

Key words

HBsAg gene; Baculovector; Insect cells; Expression

图 版 说 明

1. 正常昆虫细胞
2. 感染 AcNPV 的细胞充满了多角体
3. 重组病毒感染的细胞不出现多角体
4. 野生型 AcNPV 在昆虫细胞中形成的蚀斑
5. 野生型和重组病毒 (AcRV-HBsAg) 在昆虫细胞中形成的蚀斑以斜光光源的显微镜照片, 箭头所示无折射白色蚀斑
6. 野生型病毒感染昆虫细胞后的 HBsAg 血球凝集现象
7. 重组病毒感染昆虫细胞后的 HBsAg 血球凝集现象
8. 感染重组病毒的昆虫细胞分泌的 HBsAg 颗粒的免疫电镜 (X80,000)

Explanation of plate

1. Normal of *S. frugiperda* cells
2. Polyhedra are present in *s. frugiperda* cells infected with AcNPV
3. Not contain polyhedra in *s. frugiperda* cells infected with recombinant virus
4. Plaques produced with wild virus (AcNPV)
5. Plaques produced with recombinant virus (AcRV-HBsAg) and wild virus (AcNPV). Using inverted microscope illuminated at an acute angle. Arrow shows less rdfractile white plaques
6. Haemagglutination of infected cells with wild type virus (AcNPV)
7. Haemagglutination of infected cells with recombiant virus (AcRV-HBsAg)
8. IMF of HBsAg particles excreted from infected *S. frugiperda* cells with recombinant virus AcRV-HBsAg