

几种乙型肝炎病毒 DNA 重组质粒的改建及其在哺乳动物细胞高效表达乙型肝炎表面抗原

任贵方 阮力 张一鸣 平立华 解燕乡 朱纯 朱既明

(中国预防医学中心病毒学研究所,北京)

将 Bgl II 不完全水解 pTHBV-1 质粒产生的两种乙型肝炎病毒 (HBV) DNA 片段插入 pSV2-dhfr 质粒的 BglIII 切口,构造成 4 种重组质粒,其结构特点是: 1. 都含有 SV40 的 DNA 复制起点和早期启动子; 2. 都含有二氢叶酸还原酶基因 (dhfr); 3. 4 种重组质粒是在 dhfr 基因 3' 末端分别插入两种大小不同,方向相反的 HBV DNA 片段而成。使用这 4 种质粒 DNA 分别和 tk 质粒 DNA 共转化 Ltk⁻细胞,在 HAT 培养基选择压力下 4 种质粒都得到有效表达 HBsAg。通过换用氨甲喋呤并逐渐增加其药量,从氨甲喋呤抗性细胞中获得高效表达 HBsAg 的 B2 和 B16 细胞系。据固相放射免疫检测结果表明, B16 细胞系的 HBsAg 分泌量可达 $12.5\mu\text{g}/10^6$ 细胞/天。细胞传代 4 个月表达稳定。这些细胞在 HBsAg 诊断试剂和疫苗研制中具有潜在的应用价值。

关键词: 乙型肝炎病毒;质粒;改建;表达

乙型肝炎(以下简称乙肝)疫苗是预防乙型肝炎的重要手段。由于乙肝病毒至今不能在体外培养,目前使用乙肝病毒慢性携带者的血清制备的乙肝疫苗,由于血源有限,价格昂贵,而且具有潜在的不安全性,因此不是一种理想的疫苗。近年来,使用基因工程技术 HBsAg 基因已能在多种生物系统中表达,其中利用哺乳动物细胞^[1-4],酵母^[5,6]和病毒载体^[7,8]表达 HBsAg 都是有希望的乙肝疫苗研制途径,但目前要肯定那一种最为理想似为时尚早。利用无致癌性的哺乳动物传代细胞分泌的 HBsAg 颗粒制备乙肝疫苗,具有免疫原性强、抗原提纯简单和适于连续性大规模工业化生产的优点,但尚存在产量低等问题。因此,提高产量是目前利用哺乳动物细胞研制乙肝疫苗的关键步骤之一。本文报道使用 Bgl II 不完全水解 pTHBV-1 质粒^[2]产生的几种 HBV DNA 片段与含 SV40 DNA 复制起点和早期启动子及二氢叶酸还原酶

(dhfr) 基因的 pSV2-dhfr 质粒^[9]重组,建成几种重组质粒,并使用这些质粒在哺乳动物细胞中高效表达 HBsAg。

材料和方法

(一) 不同的 HBV DNA 片段与 pSV2-dhfr 质粒重组

质粒 pTHBV-1^[2]和 pSV2-dhfr^[9],前者含双拷贝首尾相连的 HBV DNA (dyw 亚型);后者含 SV40 的复制起点 (ori),早期启动子,剪接位点和多聚 A 位点以及 dhfr 基因(图 1)。参照文献方法^[10a],用 Bgl II 彻底水解 pSV2-dhfr,再用牛肠碱性磷酸酶处理制备载体。用 BglIII 不完全水解 pTHBV-1,经电泳分离后用电泳洗脱的方法^[10b]分别回收各种 HBV DNA 片段,不同的 HBV DNA 片段与 pSV2-dhfr 重组并参照文献方法^[10c,10d]转化 *E. coli* HB101。

本文于 1984 年 4 月 11 日收到。

Summers, W. C. 教授赠 pXI;梁伟才教授赠 pSV2-dhfr;谢颖情同志赠 pTHBV-1;刘崇柏同志提供 Abbott 试剂并协助做放射免疫实验;胥爱源同志协助电泳观察,在此一并致谢。

(二) 质粒 DNA 的制备

质粒 DNA 的大量提取和快速提取分别参照文献[11d, 10e]进行。

(三) DNA 转移杂交

pTHBV-1 用 EcoRI 水解, 经电泳分离后用

电泳洗脱的方法^[10b]。回收 3.2Kb 的 HBV DNA 片段, 参照 BRL 公司的方法, 用 α -³²PdCTP 标记 HBV DNA 作为探针。各种质粒用不同的酶水解^[11b], 经电泳分离后, 将 DNA 转移到硝基纤维素薄膜上与 HBV DNA 探针杂交^[10f]。

Figure A.

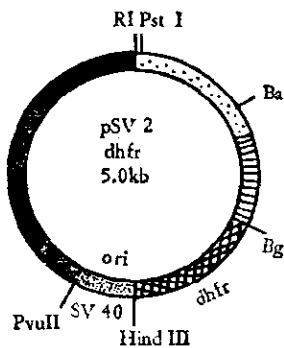


Figure B.

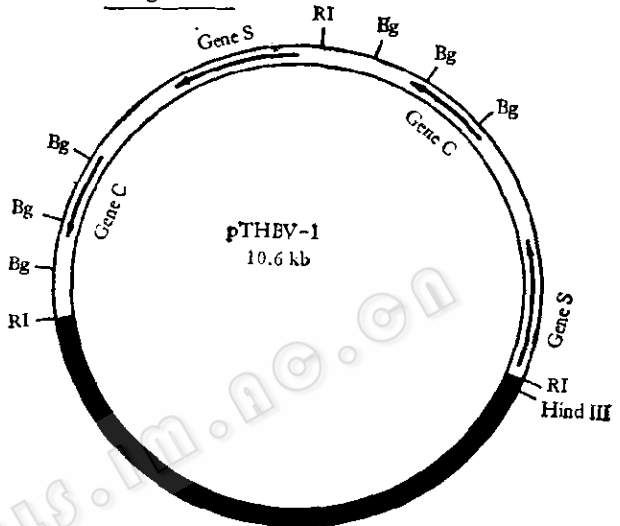


Figure C.

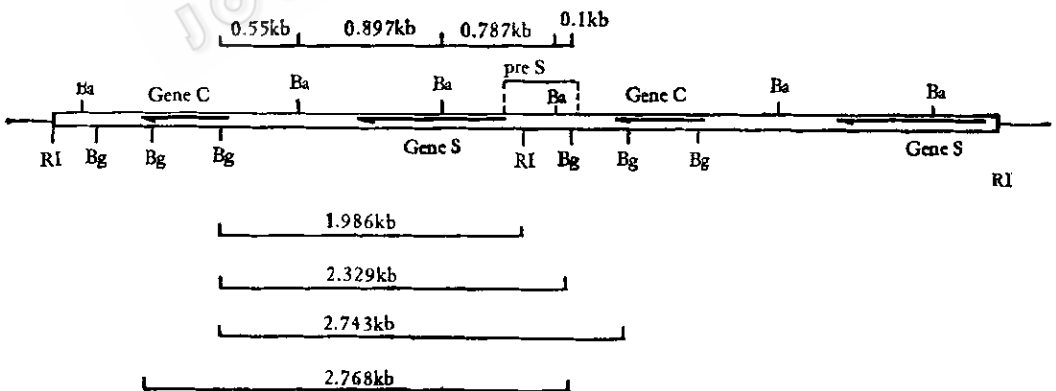


图 1 pSV2-dhfr 和 pTHBV-1 的结构示意图

Fig. 1 Schematic diagram of pSV2-dhfr and pTHBV-1

图 A 参考文献 [9], [20] 及 [21] 所绘; 图 B、C 参考文献 [2] 及 [15] 所绘

■ SV40 (复制起点), 0.32Kb; ▨ 二氢叶酸还原酶基因, 0.73Kb; ▨ SV40 的剪接位点, 0.63Kb; ▨ SV40 的多聚 A 位点, 1.0Kb; ■ pBR322 (包括复制起点), 2.3Kb. RI: EcoRI; Bg: Bgl II; Ba: Bam HI. Figure A was drawn according to reference [9], [20] and [21]; I SV40 (ori), 0.32kb; II dhfr, 0.73 Kb; III splicing site of SB40, 0.63 Kb; IV poly A site of SV40, 1.0Kb; V pBR322 (including ori), 2.3 Kb. Figure B and C were drawn according to reference (2) and (15). RI: EcoRI; Bg: Bgl II; Ba: Bam HI.

(四) 细胞培养及共转化

小鼠 LiK⁺ 细胞^[12]从国外引进, 常规在含 10% 小牛血清和 10^{-4} M 甘氨酸的 Eagle's 液中培养, 参照前文^[13]报道的方法用含 tk 基因的 pXI 质粒分别与四种新重组的质粒共转化 LiK⁺ 细胞, 加 HAT 选择培养基, 三周后挑出转化的细胞集落做进一步实验。

(五) HBsAg 的检测

分别使用固相放射免疫法 (RIA)^[14] 和酶标法 (ELISA)^[14] 检测细胞培养液中的 HBsAg, $P/N > 2.1$ 者判断为阳性。

(六) HBsAg 免疫电镜

参照前文^[15]报道的方法, 取未经浓缩的细胞培养液进行免疫电镜观察。

结 果

(一) 不同的 HBV DNA 片段与 pSV2-dhfr 质粒重组

质粒 pTHBV-1 经 Bgl II 不完全水解后电泳分离 (图版 I-1), 据文献报道^[2,16] pTHBV-1 质粒 DNA 经 Bgl II 不完全水解产生的 2.7Kb 片段包含两种不同的 HBV DNA 片段 (图 1): 一种为 2.743Kb 片段, 含有 S 基因和完整的前置 S, 是一种能单独在哺乳动物细胞中表达 HBsAg 的完整结构; 另一种为 2.768Kb 片段, 含有 S 基因, 部分 C 基因和不完整的前置 S, 是一种不能单独在哺乳动物细胞中表达 HBsAg 的结构。将 2.7Kb 片段用电泳洗脱方法回收。Bgl II 在 pSV2-dhfr 质粒上只有一个切点, 位于 dhfr 基因 3' 末端。用 Bgl II 彻底水解 pSV2-dhfr, 再用牛肠碱性磷酸酶处理, 取 $0.6\mu\text{g}$ 2.7Kb 片段 (含 2.743Kb 和 2.768Kb 两种片段) 与 $0.2\mu\text{g}$ 处理好的 pSV2-dhfr 混合, 加入 T4 DNA 连接酶, 10°C 反应 20h。转化用受体菌为 *E. coli* HB 101, 后者在 50 mM CaCl_2 及 10mM Tris-HCl (pH 8.0) 中 4°C 处理 16h, 然后加入 DNA 进行转化^[10d], 在含

氨基苄青霉素 ($100\mu\text{g}/\text{ml}$) 的琼脂板上获得 111 个转化菌落。用快速提取 DNA 的方法提取所有转化菌中的质粒 DNA, 然后与载体质粒 pSV2-dhfr 进行电泳比较。结果表明绝大多数转化菌落中都含有比载体质粒分子量明显增大的重组质粒。用 Bgl II 完全水解部分重组质粒 (图版 I-3), 结果表明绝大部分重组质粒都含有特异的 2.3Kb HBV DNA 片段。用 EcoRI 水解重组质粒初步筛选出含有 2.743Kb 和 2.768Kb 片段的, 且插入的拷贝数和连接方向可能不同的重组质粒, 挑出其中具有代表性的 4 种 (pSDHB2、pSDHB11、pSDHB 16 和 pSDHB17) 重组质粒进一步鉴定。

(二) 重组质粒的鉴定

1. 重组质粒的酶切鉴定: 质粒 pSDHB 2、pSDHB11、pSDHB 16 和 pSDHB 17 是用 2.743Kb 片段和 2.768Kb 片段的混合 DNA 与 pSV2-dhfr 重组产生。图版 II-1 显示多种内切酶鉴定结果。Hind III 在 HBV DNA 上无切点, 在 pSV2-dhfr 上只有一个切点, 水解这 4 种质粒都只产生分子量大小约为 7.7Kb 的一条带 (图版 II-1, Hind III 水解)。Bgl II 水解此 4 种质粒除产生与载体 pSV2-dhfr 质粒一致的 5.0Kb 片段外, 尚产生 2.3Kb 和 0.4Kb (后者在图版 II-1 中未显出) 的两条带 (图版 II-1, Bgl II 水解)。以上结果表明, 此四种质粒都是由一拷贝 2.743Kb 或 2.768Kb 的 HBV DNA 片段与 pSV2-dhfr 所构成。Eco RI 在 pSV2-dhfr 上只有一个切点, 在 2.743Kb 和 2.768Kb HBV DNA 片段上也均只有一个切点, 且切点两侧的 HBV DNA 片段的大小不同 (图 1), 所以 EcoRI 水解此四种质粒都只产生两条带, 通过比较这两个片段之大小, 不但能鉴别不同质粒中这两种片段插入的方向, 而且还能确定

插入的是那一种片段。EcoRI 水解 pSDHB2 产生 4.1Kb 和 3.6Kb 片段与水解 pSDHB16 产生的 4.0Kb 和 3.7Kb 片段 (图版 II-1, EcoRI 水解) 表明前者含 2.743Kb 片段, 后者含 2.768 片段, 二者 S 基因的转录方向均与 dhfr 基因一致。EcoRI 水解 pSDHB11 产生 5.3Kb 和 2.4Kb 片段与水解 pSVHB17 产生的 5.7Kb 和 2.0Kb 片段

(图版 II-1 EcoRI 水解) 表明前者含有 2.743Kb 的 HBV DNA 片段, 后者含有 2.768Kb 的 HBV DNA 片段, 二者 S 基因的转录方向均与 dhfr 基因相反。Bam HI 水解此四种质粒都产生 4 条带 (图版 II-1, Bam HI 水解), 这些条带间的差别进一步证实了 EcoRI 对这四种质粒鉴定的结果。

2. DNA 转移杂交

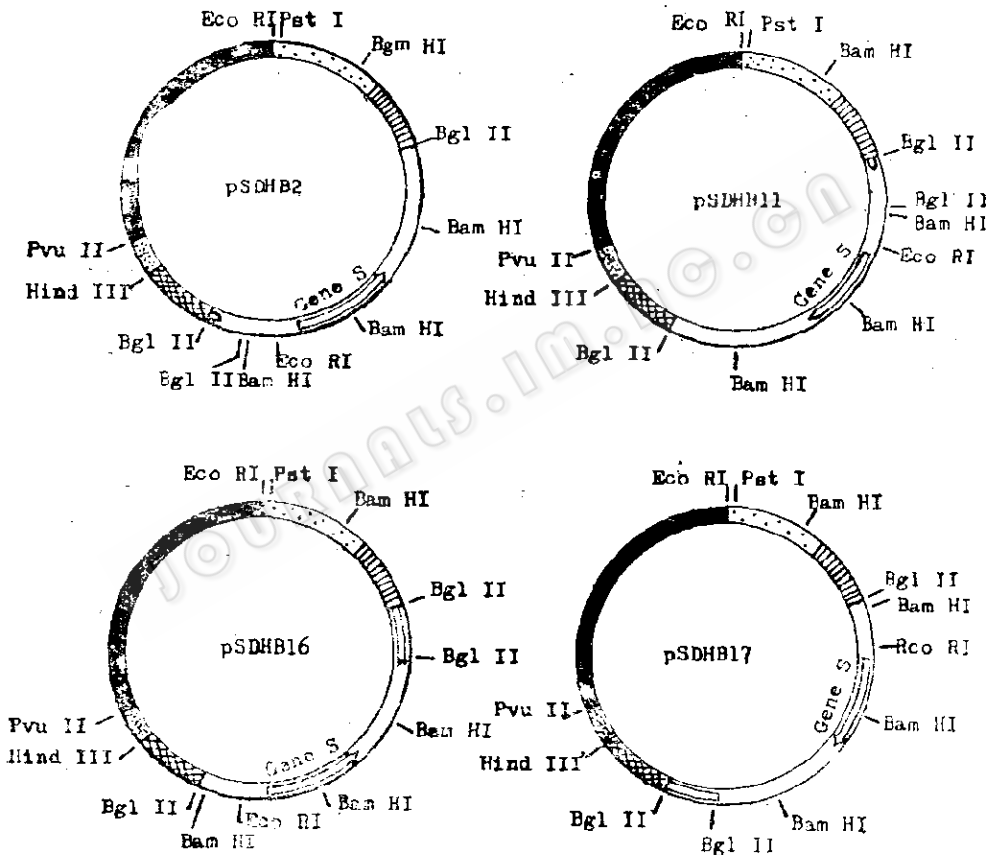


图 2 4 种新重组质粒的结构示意图

Fig. 2 Schematic diagram of four new recombinant plasmids

SV40 (复制起点)。二氢叶酸还原酶基因, SV40 的剪接位点, SV40 的多聚 A 位点。pBR322 (复制起点)。pSDHB2 及 pSDHB11 含 2.743Kb 的 HBV DNA 片段。pSDHB16 及 pSDHB17 含 2.768Kb 的 HBV DNA 片段。所有这些片段均由 HBV DNA 用 BglII 不完全消化而来。同一片段的转录方向在不同的质粒中不同。

SV40 (ori); dhfr; splicing site of SV40; poly A site of SV40; pBR322 (ori). pSDHB2 and pSDHB11 contain 2.743 Kb fragments of HBV DNA. pSDHB16 and pSDHB17 contain 2.768 Kb fragments of HBV DNA. All these fragments were recovered from HBV DNA partially digested with BglII. The orientation of the same fragment is different in different plasmids

将图版 II-1 中 Bgl II 水解的 pSDHB 2, pSDHB 11, pSDHB 16 及 pSDHB 17 和对照样品均转移到硝基纤维素薄膜上与 α -³²PdCTP 标记的 HBV DNA 探针杂交(图版 I-2), 结果表明这四种质粒产生的 2.3Kb 片段均系特异性的 HBV DNA 片段。综上鉴定结果绘制 4 种重组质粒示意图如图 2。

如上所述新重组的 4 种质粒具有以下几个特点: (1), 都含有 SV40 的 DNA 复制起点和早期启动子; (2), 都含有 dhfr 基因; (3), 在 dhfr 基因 3' 末端插入了不同的 HBV DNA 片段, 在不同的质粒中同一片段插入的方向不同。因此, 这些质粒可用于研究: (1), 不同的 HBV DNA 片段在哺乳动物细胞中表达 HBsAg 能力有何区别及 SV40 的复制起点和早期启动子对 HBsAg 表达的影响, 有助于阐明 S 基因的调控机制; (2), HBV DNA 片段能否随氨基嘌呤(MTX)的增加和 dhfr 基因一起扩增, HBsAg 表达量是否因此能被提高, 为此进行了下述的研究。

(三) HBsAg 在 4 种质粒转化的 Ltk⁻细胞中的表达

单独使用 pSV2-dhfr 转化 Ltk⁻细胞较难通过 MTX 选择出转化细胞克隆(未发表资料), 因此, 我们将新重组的 4 种质粒分别和含 tk 基因的质粒 pX1 共转化小鼠 Ltk⁻细胞。在加 HAT 培养基 3 周后, 转化细胞长成直径约 1—2mm 的克隆。从 B2 细胞(pSDHB 2 转化)、B11 细胞(pSDHB 11 转化)、B16 细胞(pSDHB 16 转化)及 B17 细胞(pSDHB 17 转化)4 系细胞中分别挑出部分克隆。各系剩余的细胞集落经胰酶消化并各自转种于新方瓶中, 3 天后细胞近乎成片(约 $2-5 \times 10^6$), 收集 24 h 的细胞培养液, 用 RIA 检测 HBsAg (表 1), 发现用 4 种质粒转化的

B2、B11、B16 及 B17 细胞系均能有效表达 HBsAg, 其 P/N 值均较前文^[4]报道的高。

各系细胞挑出的细胞克隆大量培养之后, 收集细胞成片后 48 h 的细胞(约 $0.8-1.2 \times 10^7$) 培养液, 分别用 ELISA 和 RIA 方法检测 HBsAg (表 2), 在检测的 36 个克隆中, 32 个 HBsAg 表达阳性, 表明 tk⁺ 细胞克隆中 90% 为共转化的细胞。在我们的条件下 ELISA 的敏感性较 RIA 约低 10 倍, 凡 ELISA 为阳性的样品, RIA 均为阳性; ELISA 为阴性的样品, 有些可能仍是 RIA 阳性, 但其 HBsAg 表达量均较低。因此, ELISA 方法可用来筛选 HBsAg 表达较高的细胞系(表 2)。

(四) 氨基嘌呤(MTX)对 HBsAg 表达的影响

对 B2, B11, B16 及 B17 细胞及其克隆亚系细胞进行了 MTX 扩增实验。各细胞系对 MTX 表现出两种不同的耐受情况: 一种对 MTX 极易耐受, 通常直接加终浓度为 $0.02 \mu\text{g/ml}$ 的 MTX 一周后即可将药量提高到 $0.2 \mu\text{g/ml}$, 再经过 2—3 周细胞已能在此药量中正常生长, 平均传 4—6 代细胞生长速度可达每周 1 传 10 的比例。细胞耐受 MTX 后收集成片前后 48 h 的培养液检测 HBsAg; 此类细胞有 B2 和 B16 及其克隆 B2-2、B2-11、B16-7、和 B16-12 等亚系(表 3), 它们均是 S 基因转录方向与 dhfr 基因转录方向一致的质粒 pSDHB2 和 pSDHB16 所转化的细胞。另一类对 MTX 较难耐受, 经 1—2 个月时间细胞只能耐受 $0.02 \mu\text{g/ml}$ 的 MTX (表 3 中的 B11 和 B17 细胞系), 有的经 1—2 个月仍不能耐受此药量(表 3 中的 B11-5、B11-10、B17-18 和 B17-11 细胞亚系); 这类细胞均系 S 基因转录方向与 dhfr 基因转录方向相反的 pSDHB11 和

表 1 用 4 种新重组质粒和 pXI 共转化 L_tK⁻ 细胞表达乙型肝炎表面抗原Table 1. Expression of HBsAg in L_tK⁻ cells cotransformed with four new recombinant plasmids and pXI

细胞 Cells	DNA (μg)/Flask						平均每瓶 TK ⁺ 细胞集落数 TK ⁺ Clonics Are./Flask	P/N
	pSDHB2	pSDHB11	pSDHB16	pSDHB17	pXI	SSDNA		
B2	5	—	—	—	0.5	10	25	79.3
B11	—	5	—	—	0.5	10	15	74.5
B16	—	—	5	—	0.5	10	85	126.7
B17	—	—	—	5	0.5	10	26	50.9

表 2 从不同的细胞系克隆的不同细胞分泌乙型肝炎表面抗原

Table 2 Expression of HBsAg in different clones from different cell lines

细胞 Cells	P/N		Cells	P/N	
	ELISA	RIA		ELISA	RIA
B2-1	25.9	103.6	B16-1*	2.0	1.5
B2-2	31.6		B16-2*	1.4	1.8
B2-3	20.0		B16-5	26.9	
B2-4	40.0		B16-6	43.6	
B2-5	4.6	33.0	B16-7	38.0	133.3
B2-6	12.0		B16-10	1.4	3.9
B2-7	10.0		B16-11	25.0	
B2-8	7.0	31.8	B16-12	34.4	116.3
B2-9*	2.0	1.6	B17-1	6.4	
B2-11	38.9	132.3	B17-2	38.3	
B2-12	56.0		B17-3	3.1	20.0
			B17-4	32.6	145.3
B11-1	20.6	84.0	B17-5*	2.0	1.2
B11-3	18.0		B17-6	11.6	
B11-4	21.6		B17-8	48.9	145.2
B11-5	47.3	84.0	B17-10	12.0	74.5
B11-7	1.7	7.5	B17-11	42.3	
B11-9	2.0	4.6			
B11-10	41.7	161.8			
B11-12	40.0				

B2-N, B11-N, B16-N 及 B17-N 细胞分别自 B2, B11, B16 及 B17 克隆。所有用 ELISA 法检测为 HBsAg 阴性的样品均用 RIA 作了复核, 以 RIA 的结果作标准。某些 ELISA 法测为 HBsAg 阳性的样品也用 RIA 法作了复核。标以“*”的 HBsAg 阴性的克隆 P/N 值按两法结果均 <2.1。

B2-N, B11-N, B16-N and B17-N cells were cloned from B2, B11, B16 and B17 cell lines respectively. All HBsAg⁻ samples by ELISA were checked by RIA and the results of RIA were taken as the standard. Some HBsAg⁺ samples by ELISA were also checked by RIA. “*” HBsAg⁻ clones according to the results of ELISA and RIA with P/N <2.1

pSDHB17 质粒所转化的细胞。对 MTX 耐受前后 HBsAg 分泌量的比较, 结果见表 3。极易耐受 MTX 的细胞株, MTX

耐受前后 HBsAg 的分泌量有明显的差别, 平均增加 5 倍左右, 其中 B16 增加最多, 接近 10 倍。根据 RIA 检测结果折算,

表 3 氢甲噻唑对转化细胞表达乙型肝炎表面抗原的作用

Table 3 Effect of methotrexate on expression of HBsAg in transformed cells

混合细胞系 Mixed cell lines	克隆细胞系 Cloned cell lines	原始样品的 P/N 值 P/N values of primary samples	抗不同浓度的 MTX 或在 HAT 中的 P/N 值 P/N Resistant to MTX at different concentrations or in HAT medium		
			HAT	MTX 0.02 μ g/ml	MTX 0.2 μ g/ml
B2		79.3			22.3++
	B2-2	6.7++	6.4++		26.5++
	B2-11	9.1++	2.7++		21.9++
B11		74.5		12.5++	
	B11-5	16.5++			
	B11-10	5.8++			
B16		126.7	5.8++		52.3++
			2.2+++		14.0+++
	B16-7	5.6++			28.5++
	B16-12	19.2++	9.8++		26.0++
B17		50.9		1.4++	
				3.9+	
	B17-18	17.4++			
	B17-11	10.8++	8.6++		

Samples without marker were collected from $2-5 \times 10^7$ cells cultured for 24 h and tested undiluted. Other samples were collected from $0.8-1.2 \times 10^7$ cells cultured for 48 h. "+" sample was 10 time diluted before test; "++" samples were 100 time diluted; "+++" samples were 500 time diluted.

表中未作标记的样品是自 $2-5 \times 10^6$ 细胞,培养 24 h 的收获液未作稀释所测得的 P/N 值。其它样品是自 $0.8-1.2 \times 10^7$ 细胞培养 48 h 的收获液;"+"稀释 10 倍;"++"稀释 100 倍;"+++"稀释 500 倍所测得的 P/N 值

B16 细胞在加 MTX 前 HBsAg 分泌量为 $1.5 \mu\text{g}/10^7$ 细胞/天,耐受 $0.2 \mu\text{g}/\text{ml}$ MTX 后,其分泌量可达 $12.5 \mu\text{g}/10^7$ 细胞/天;而一直在 HAT 中培养的细胞,HBsAg 的分泌量平均在 $1-2 \mu\text{g}/10^7$ 细胞/天之间。

(五) B16 细胞分泌的 HBsAg 的免疫电镜观察

取 B16 的 MTX 抗性细胞培养液 0.5ml 加等体积 1:100 稀释的马抗 HBsAg 血清,按前文报道的方法^[4],作免疫电镜检查,观察到直径约 22nm 的 HBsAg 颗粒(图版 II-2),说明使用新重组的质粒仍可获得与人血清中大小和形态近似的 HBsAg 颗粒(图版 II-3)。

讨 论

将 Bgl II 不完全水解 pTHBV-1 产

生的两种 HBV DNA 片段,一种为 Bgl II C 片段 (414bp) 与 A 片段 (2329bp) 相连的片段 (2743bp), 另一种为 Bgl II A 片段与 B 片段 (439bp) 相连的片段 (2768bp), 插入 pSV2-dhfr 质粒的 Bgl II 切口, 建成 4 种新的重组质粒。其中, pSDHB2 和 pSDHB 16 分别含有 2743 bp 和 2768 bp 片段, 二者 S 基因的转录方向和 dhfr 基因一致; pSDHB 11 和 pSDHB 17 也分别含有上述两种片段, 但它们的转录方向和 dhfr 基因相反。文献报道^[13] Bgl II 不完全水解 pTHBV-1 产生的 2743bp 片段能有效地在动物细胞中表达 HBsAg, 而 2768bp 片段则不能在动物细胞中表达 HBsAg, 并认为后者是由于缺少 S 基因的启动子和转录起始点之故。本文使用上述两种片段重组的 4 种质粒均能有效地表达

HBsAg, 说明在此 4 种质粒结构中有促进 HBsAg 表达的因子。SV40 的 DNA 复制起点和早期启动子区域含有 72 个核苷酸的重复序列能强化其邻近基因的表达^[16,17]。文中使用的 SV40 的 4 种质粒之所以能有效表达 HBsAg, 可能与 SV40 的此种结构的存在有关。但还有待于进一步研究。

研究中发现 S 基因转录方向与 dhfr 基因一致的质粒 pSDHB2 和 pSDHB16 转化的细胞很易耐受 MTX, 而二者方向相反的质粒 pSDHB11 和 pSDHB17 转化的细胞很难对 MTX 产生耐受, 似乎说明此现象可能是由质粒结构不同所引起。

文献报道^[2,19,20]使用 dhfr 基因与外源基因共转化的细胞中, 当培养基中逐渐增加 MTX 的浓度时, 随着对 MTX 抗性的增加 dhfr 基因与外源基因均明显扩增。我们在实验中也发现易于耐受 MTX 的细胞其 HBsAg 的分泌量较一直未加 MTX 培养的和增加 MTX 浓度前的细胞均明显升高。但是, HBsAg 分泌量的增加是由于 S 基因随着 dhfr 基因一起扩增或者是由于高浓度 MTX 压力有利于选择出同时含有较多 dhfr 基因和 S 基因拷贝数的转化细胞所致, 尚待进一步研究。

使用本文所述的新重组质粒与 L⁻tk⁻细胞和两级选择 (tk, dhfr) 的方法, 获得了高效表达 HBsAg 的细胞系 B16, 其日产量为 12.5 μ g/10⁷ 细胞, 细胞已连续传代 4 个月 HBsAg 表达较稳定。可以认为

pSDHB2 和 pSDHB16 两种重组质粒及其转化的 B2, B16 两细胞系在研制 HBsAg 诊断试剂和疫苗中具有潜在应用价值。

参 考 文 献

- [1] Dubois, M. F. et al.: *PNAS*, **77**: 4549, 1980.
- [2] Christman, J. K. et al.: *PNAS*, **79**: 1815, 1982.
- [3] Gough, N. F. et al.: *J. Mol. Biol.*, **162**: 43, 1982.
- [4] 阮力等: 中国医学科学院学报, **5**(5): 259, 1983.
- [5] Valenzuela, P. et al.: *Nature*, **298**: 347, 1982.
- [6] Miyano, A. et al.: *PNAS*, **80**: 1, 1983.
- [7] Moriarty, A. M. et al.: *PNAS*, **78**: 2606, 1981.
- [8] Smith, G. L. et al.: *Nature*, **302**: 490, 1983.
- [9] Subramani, S. et al.: *Mol. and Cell. Biol.*, **1**: 854, 1981.
- [10] Maniatis, T. et al.: (eds): *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, (a) pp133, (b) pp 164, (c) pp391, (d) pp250, (e) pp 366, (f) pp383. Cold Spring Harbor Laboratory, 1982.
- [11] Davis, R. W. et al. (eds): *A manual for Genetic Engineering, Advanced Bacterial Genetics*, (a) pp116, (b) pp227, Cold Spring Harbor Laboratory, 1980.
- [12] Kit, S. et al., *Exptl. Cell Res.*, **31**: 297, 1963.
- [13] Enquist, L. W. et al.: *Gene*, **7**: 335, 1979.
- [14] 李成明等: 中华微生物学免疫学杂志, **2** (6): 390, 1982.
- [15] Pourcel, C. et al.: *J. Virol.*, **41**: 100, 1982.
- [16] Fiers, W. R. et al.: *Nature*, **273**: 113, 1978.
- [17] Banerji, J. et al.: *Cell*, **27**: 299, 1981.
- [18] Wigler, M. et al.: *PNAS*, **77**: 3557, 1980.
- [19] Ringold, C. et al.: *J. Mol. and Appl. Genetics*, **1**: 165, 1981.
- [20] Lee, F. et al.: *Nature*, **294**: 228, 1981.
- [21] Berg, P. et al.: *Science*, **213**: 296, 1981.

RECONSTRUCTION OF RECOMBINANT PLASMIDS OF HEPATITIS B VIRUS DNA AND HIGH LEVEL EXPRESSION OF HEPATITIS B SURFACE ANTIGEN IN MAMMALIAN CELLS

Ren Guifang* Ruan Li Zhang Yiming Ping Lihua

Xie Yanxiang Zhu Chun Zhu Jiming**

(Department of Viral Genetics, Institute of Virology, China National
Centre for Preventive Medicine, Beijing)

Four new recombinant plasmids were reconstructed by inserting two different fragments of hepatitis B virus DNA from plasmid pTHBV-1 partially digested with Bgl II into plasmid pSV2-dhfr. The characteristics of these recombinant plasmids are as follows: (1) all contain SV40 early promoter and origin of DNA replication; (2) all contain dihydrofolate reductase (dhfr) gene; (3) the two different fragments of HBV DNA have been inserted into 3' end of dhfr gene either in the same orientation or in the opposite orientation in different plasmids. Ltk⁻ cells were cotransformed with these four recombinant plasmids DNA and a TK plasmid DNA. Under the selective pressure of HAT medium, HBsAg was expressed efficiently by using all four recombinant plasmids.

The B2, B16 cell lines which express HBsAg at highest levels were established by progressively increasing the amount of methotrexate in the culture medium after primary selection in HAT medium. The amount of HBsAg excreted by B16 per 10⁷ cells per day was 12.5 μ g. These cell lines have been passaged for four months with relatively stable levels of excretion of HBsAg. Thus, these cell lines may be useful for the preparation of HBsAg diagnostic and vaccine purposes.

Key words

Hepatitis B virus; plasmid; reconstruction; expression

*Jen, K. F.

**Chu, C. M.