

乙型肝炎病毒表面抗原基因在昆虫体系中的表达

龙紫新 王珣章 谢伟东 何代芬 蓝德安
庞 义 苏德明* 蒲蛰龙

(中山大学昆虫学研究所, 广州)

(复旦大学病毒研究室, 上海)*

利用组建的苜蓿尺蠖核型多角体病毒 (AcNPV) 非融合蛋白基因转移载体将乙型肝炎病毒表面抗原 (HBsAg) 基因成功地插入粉纹夜蛾 (Tn)NPV 中, HBsAg 基因在感染了重组病毒的草地夜蛾 (*Spodoptera frugiperda*) 离体细胞以及粉纹夜蛾和蓖麻蚕等虫体中获得了表达, 免疫电镜下观察到典型的乙型肝炎病毒表面抗原 22nm 颗粒。感染重组病毒的蓖麻蚕预蛹每克蛹重可产 HBsAg 蛋白 1.6 μ g。表达产物经 DEAE-纤维素层析得到的 HBsAg 粗提物可作临床检测用, 再经抗体亲和柱层析可得到纯的 HBsAg。

关键词 乙型肝炎病毒表面抗原基因; 重组病毒; 粉纹夜蛾; 蓖麻蚕; 草地夜蛾细胞

以昆虫杆状病毒为载体, 昆虫细胞或虫体为受体的基因工程由于具有独特的优点和巨大的发展潜力^[1], 已日益为各国学者所重视。至今, 已有几十种外源基因通过杆状病毒载体在昆虫离体细胞或虫体中得到了表达^[2], 其中与人类疾病有关的有乙型肝炎病毒表面抗原 (HBsAg) 基因^[3]、流感病毒血凝素基因^[4]、副流感病毒 HN 蛋白基因^[5]、人 T 细胞白血病病毒 P40X 蛋白基因^[6]等, 而以昆虫细胞生产的艾滋病基因工程疫苗在美国已被批准上人体试验^[2]。本文报道了含 HBsAg 基因的粉纹夜蛾重组病毒的组建, HBsAg 基因在草地夜蛾 (*Spodoptera frugiperda*) 离体细胞和粉纹夜蛾、蓖麻蚕虫体中的表达, 以及从虫体分离纯化 HBsAg 的方法。

材料与方 法

(一) 质粒构建

主要参考 Maniatis 等的方法^[7]

所有内切酶、连接酶等均为 Boehringer Mannheim 公司出品, 反应条件按厂家所附使用说明。含乙型肝炎病毒 (adw 亚型) DNA^[8]的 pUC8/HBV 质粒来自法国巴斯德研究所, 氯霉素乙酰基转移酶 (CAT) 基因为美国 Georgia 大学 L.K. Miller 教授所赠。质粒 DNA 小量提取按 Homes 和 Quigley 的方法^[9], 大量提取方法见文献^[7]。

(二) 细胞和寄主昆虫

1. 细胞和细胞培养: 所用昆虫细胞为草地夜蛾细胞系 IPLB-21, 引自英国自然环境研究委员会病毒研究所 (NERC, Institute of Virology, Oxford, England), 用自配的加有 10% 胎牛血清 (GIBCO 产品) 和 100 μ g/ml (最终浓度) 的青霉素和链霉素的 TC100 培养液培养。大量培养病毒则用 10% 小牛血清 (深圳市光明农场产品) 代替胎牛血清。细胞在 26 $^{\circ}$ C 下培养和传代。

本文于 1989 年 11 月 6 日收到。

2. 寄主昆虫: 粉纹夜蛾(*Trichoplusia ni*) 引自湖北荆州地区微生物研究所, 经室内采用人工饲料饲养3代以上。蓖麻蚕(*Philosamia cynthia ricini*) 幼虫由广东省农科院蚕业研究所提供。斜纹夜蛾(*Spodoptera litura*) 采自广州市郊, 已在室内用人工饲料饲养17代以上。柞蚕(*Antheraea pernyi*) 蛹由农科院植保所提供。大蜡螟(*Galleria mellonella*) 由广东省昆虫研究所提供。玉米螟(*Pyrausta nubilalis* Hübner) 由中国农业科学院植保所提供。

(三) 含HBsAg基因重组病毒的组建

1. 病毒毒种: 为粉纹夜蛾核型多角体病毒(TnNPV), 属多粒包埋型, 引自英国自然环境研究委员会病毒研究所。

2. 重组病毒的组建: 参考 Kelly 和 Wang 等^[10]以及 Smith 等^[11]的方法, 将转移载体质粒DNA和TnNPV DNA共转染草地夜蛾传代的单层细胞而得以实现重组。含HBsAg基因的重组病毒的挑选和纯化则通过空斑技术反复挑选和纯化得到^[12]。

(四) 重组病毒的DNA检测

采用DNA斑点杂交方法, 具体操作详见文献^[13]。

(五) 蛋白的同位素标记和放射自显影

参照 Smith 等^[14]的方法, 细胞感染病毒后经不同时间, 用PBS轻洗2次, 30mm培养皿加入0.5 ml含有30 μ Ci/ml ³⁵S-蛋氨酸(Amersham产品, 800 Ci/mmol)的TC100(缺蛋氨酸)培养基, 27 $^{\circ}$ C培养2 h, 弃去培养基并用PBS轻洗2次, 然后进行含12%分离胶的SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳。电泳后, 凝胶经7%醋酸固定1 h, 荧光增强剂(Amersham产品)处理15min, 凝胶干燥器干燥, 贴于X-

光软片(CRONEX牌)置于-70 $^{\circ}$ C自显影7天。

(六) 重组蛋白的免疫沉淀分析

参照 Kuroda 等^[4]的方法。用RIPA缓冲液(1% Triton X-100, 1% 脱氧胆酸钠, 0.15mol/L NaCl, 0.05mol/L Tris-HCl, 0.01mol/L EDTA, 0.1% SDS, pH7.4)提取³⁵S-蛋氨酸标记的细胞内蛋白。100 μ l的RIPA提取物加20 μ l的HBsAg单克隆抗体, 冰浴1 h, 加25 μ l 10% (w/v)的葡萄球菌, 4 $^{\circ}$ C孵育1 h, 10000 rpm离心15min, 沉淀用预冷的RIPA洗涤3次, 加样品混合液并经沸水浴处理3 min, 10000rpm离心15min去沉淀, 然后按上述方法进行SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳和放射自显影。

(七) HBsAg的电镜制备

以10⁷ pfu/ml重组病毒感染草地夜蛾细胞, 96h后收集, 1000rpm离心10min, 沉淀中加入PBS混合, 超声破碎仪(W-375型, 美国产)破碎细胞, 3000rpm离心10 min, 取上清18000 rpm离心1 h。去沉淀, 取上清100 μ l, 加等量HBsAg抗血清与之混合, 室温下静置12—16h, 12000 rpm离心30—40min, 弃上清。沉淀作电镜观察。

(八) 离体细胞和虫体表达的HBsAg蛋白的测定

用重组病毒TnNPV-HBsD₄和野生型病毒TnNPV分别感染草地夜蛾细胞, 并注射感染粉纹夜蛾、蓖麻蚕幼虫或蛹, 感染剂量细胞为10⁷ pfu/ml, 虫体为10⁴ pfu/g体重。28 $^{\circ}$ C下培养细胞或饲养感染病毒幼虫, 定时取样, 超声波破碎细胞(虫体先经匀浆, 再破碎), 5000rpm离心10—30min, 取上清用下列方法检测HBsAg。

1. 放射免疫测定: 采用¹²⁵I-HBsAg

-抗体固相放免双测定药盒(中国原子能科学院供应)进行测定。样品用PBS稀释,程序和方法依说明书所述,使用仪器为FH-454自动定标器(北京核仪器厂出品)。HBsAg标准品引自卫生部药品生物制品检定所,定量测定参照谢彦博^[16]等的方法。

2. 反向血凝试验:以冻干HBsAg诊断血球(卫生部北京生物制品研究所供应)进行检测。方法和步骤按说明书所述

进行。测定设阳性和阴性对照,阳性凝集终点为 2^{11} ,不反应者为阴性,据此计算出样品中的HBsAg滴度。

结 果

(一) 含HBsAg基因转移载体质粒的构建

质粒的构建如图1所示。含苜蓿尺蠖核型多角体病毒(AcNPV)基因的转移载

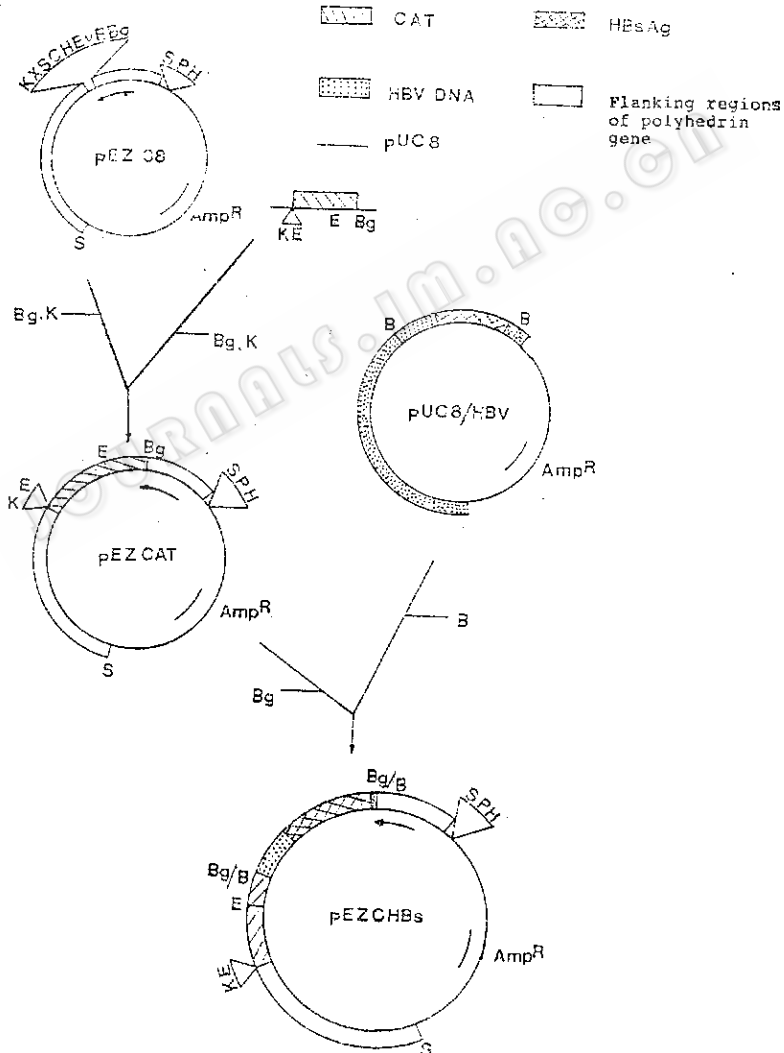


图1 转移载体pEZCHBs的构建

Fig.1 Construction of transfer vector plasmid pEZCHBs B-BamHI, Bg-BglII, K-KpnI. The arrow indicates the direction of polyhedrin promoter

体质粒pEZ38^[10] DNA和含 CAT 基因的质粒 DNA 经 Bgl II 和 Kpn I 完全酶解后, 连结并转化大肠杆菌HB101, 得到含 CAT 基因的质粒pEZ CAT, 用 Bgl II 酶解 pEZ CAT 并插入质粒pUC8/HBV 含 HBsAg 基因及其相邻 HBV DNA 序列的 Bam HI酶切片段, 遂组建成含HBsAg基因的转移载体质粒 pEZCHBs。 DNA 酶

切电泳结果表明, 质粒pEZCHBs 含有正确方向的HBsAg基因。

(二) 含HBsAg基因的粉纹夜蛾NPV的重组及重组病毒DNA分析

含HBsAg基因的转移载体质粒 pEZ CHBs DNA 与野生型 TnNPV DNA 共转染草地夜蛾细胞, 通过空斑技术进行挑选和纯化结果得不产生多角体的重组病毒

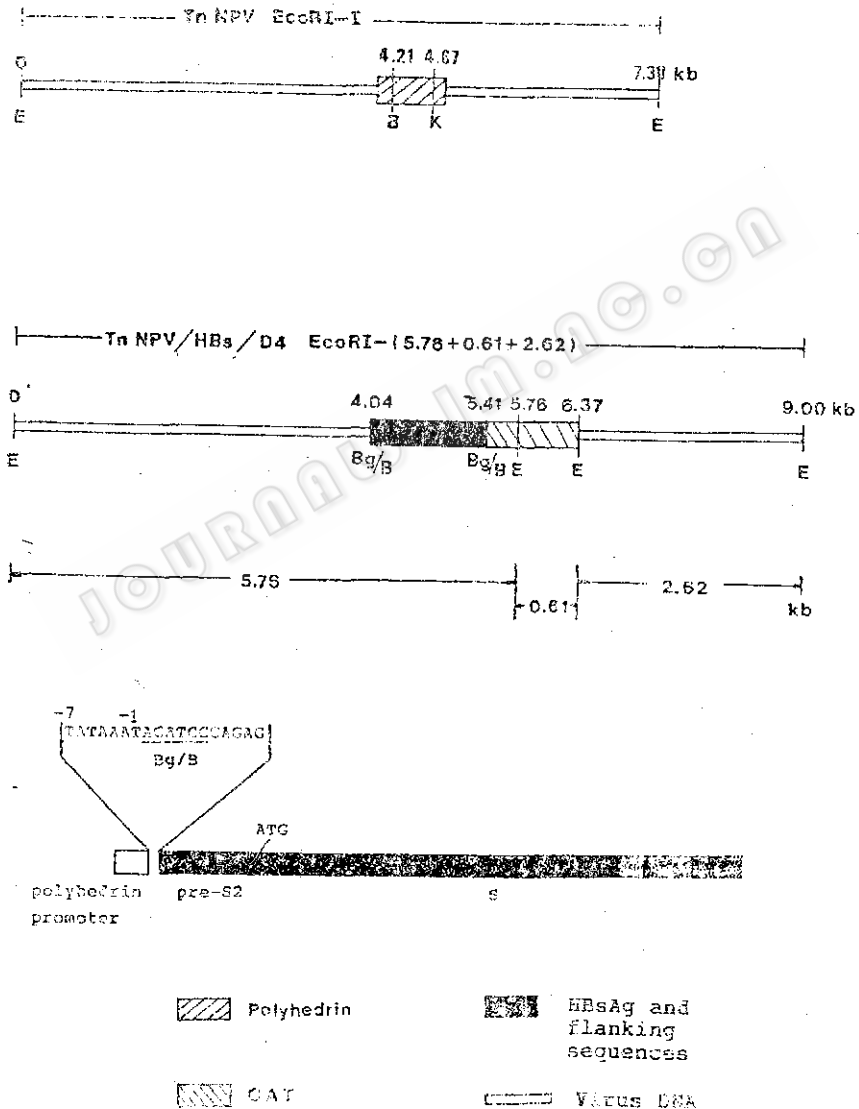


图 2 HBsAg基因插入TnNPV DNA EcoR I - I 片段的模式图及多角体启动子与HBsAg基因接合部的碱基序列

Fig.2 Diagram of insertion of HBsAg gene into TnNPV DNA EcoR I - I fragment and nucleotide sequences of polyhedrin promoter and HBsAg gene junction

毒株 TnNPV-HBsD₄。TnNPV-HBsD₄ 的 EcoR I 酶解分析表明，野生型病毒 TnNPV 基因组的 EcoR I - I 片段 (7.3 kb) 已为三个更小的片段，即 5.76kb、2.62kb和0.61kb (照片中未显示) 所取代 (图版 I -A, 图 2)，其中5.76kb片段包含了HBsAg基因及相邻的HBV DNA序列和一部分 CAT 基因。经连续多次传代证明，重组病毒 TnNPV-HBsD₄ 在遗传上是稳定的。

DNA 斑点杂交检测结果，TnNPV-HBsD₄ 不同浓度的 DNA (196、65、6.5 μg/ml)均能与 α-³²P 标记的 HBV DNA 探针进行杂交，而野生型病毒 TnNPV相同浓度的 DNA 则不能与HBV DNA探针杂交 (图版 I -B)，说明HBsAg基因已插入TnNPV的基因组中。

(三) HBsAg基因在昆虫离体细胞中的表达

以10⁷pfu/ml 细胞的重组病毒感染草地夜蛾单层细胞，用 TC100培养不同时间

间，12h 后可检测到乙肝表面抗原，24h 后迅速增加，72h达最高峰，HBsAg 的滴度为每毫升培养细胞P/N值22.4，一直维持到96h(图 3)。约有10%的 HBsAg分泌到培养基中，摇动培养可使 HBsAg 的分泌量增加。感染 TnNPV-HBsD₄ 的细胞裂解液 (超声波破碎后的上清液) 与适量

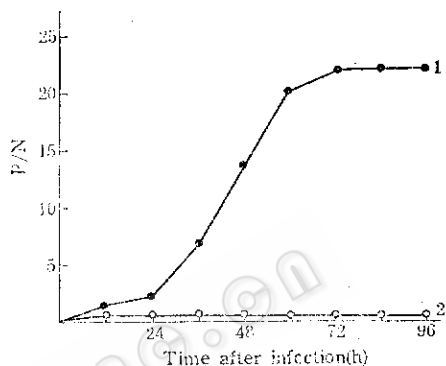


图 3 重组病毒 TnNPV-HBsD₄ 感染的草地夜蛾细胞经不同时间测定的HBsAg
Fig.3 Kinetics of HBsAg production in *S. frugiperda* cells infected with the recombinant virus TnNPV-HBsD₄. 1. Infected with TnNPV-HBsD₄, 2. Infected with TnNPV

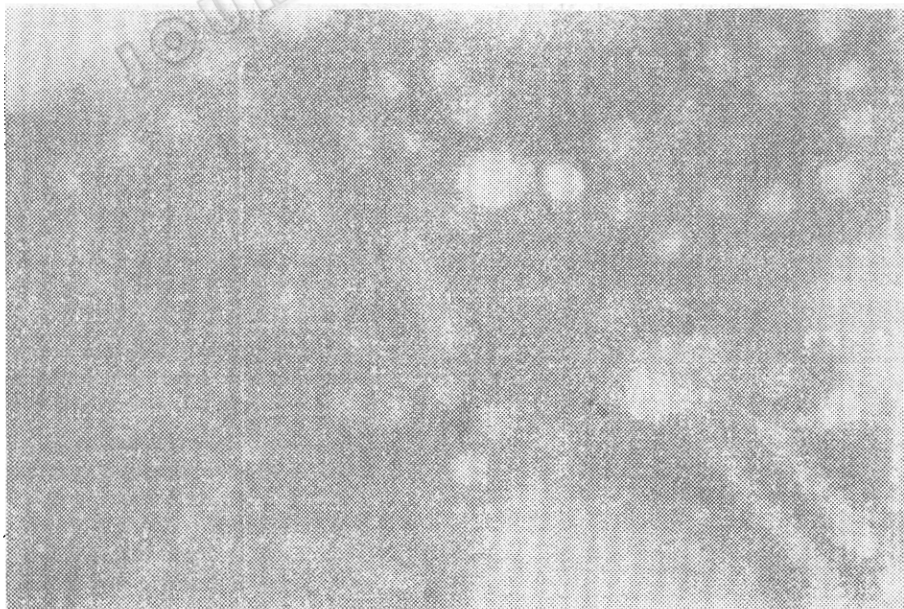


图 4 HBsAg颗粒的电镜观察
Fig.4 Electron micrographs of HBsAg particles produced by *S. frugiperda* cells infected with the recombinant virus TnNPV-HBsD₄

HBsAg抗血清作用制备的免疫复合物,在电镜下可看到典型的22nm颗粒(图4)。

^{35}S -蛋氨酸标记的感染细胞蛋白,经SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳和放射自显影(图版I-C)显示,感染重组病毒TnNPV-HBsD₄后期的细胞主要是合成分子量为22kd的HBsAg蛋白和其他蛋白,其中分子量为72kd、21kd与20kd的是病毒结构性蛋白^[17],不合成分子量为34kd的多角体蛋白。

用乙肝表面抗原单克隆抗体与 ^{35}S -蛋氨酸标记的感染细胞蛋白作用,结果选择性沉淀分子量为22kd蛋白(图版I-C),进一步证实TnNPV-HBsD₄感染的细胞产生的22kd蛋白是HBsAg蛋白,具有乙肝表面抗原的免疫原性。

(四) HBsAg基因在整体虫体中的表达

1. 在寄主虫体中的表达:注射接种重组病毒TnNPV-HBsD₄的粉纹夜蛾4龄幼虫(3×10^5 pfu/头),12h后可检测到HBsAg,36h后迅速增加,72h达最高峰,每克虫体产生的HBsAg滴度为P/N值592(图5)。

2. 在其他种昆虫虫体中的表达:以TnNPV-HBsD₄注射感染蓖麻蚕、玉米螟、大蜡螟、斜纹夜蛾和柞蚕的4龄幼虫,虫体匀浆液均可检测到HBsAg,其中以蓖麻蚕的为最高,其后依次为斜纹夜蛾、柞蚕、玉米螟。蓖麻蚕幼虫接种病毒后96h,每克虫体表达的HBsAg滴度P/N值为600,与寄主昆虫粉纹夜蛾的相同(图6)。

对蓖麻蚕3至5龄各期幼虫,预蛹和蛹注射感染重组病毒TnNPV-HBsD₄的结果,以感染预蛹的HBsAg表达量为最高。接种后7天,感染预蛹的每克虫体匀浆液HBsAg滴度达P/N值820(图7),其

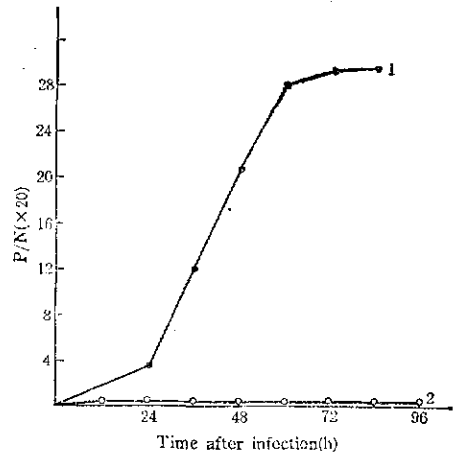


图5 重组病毒TnNPV-HBsD₄感染的粉纹夜蛾幼虫经不同时间测定的HBsAg

Fig.5 Kinetics of HBsAg production in *T. ni* larvae infected with the recombinant virus TnNPV-HBsD₄.
1. Infected with TnNPV-HBsD₄.
2. Infected with TnNPV

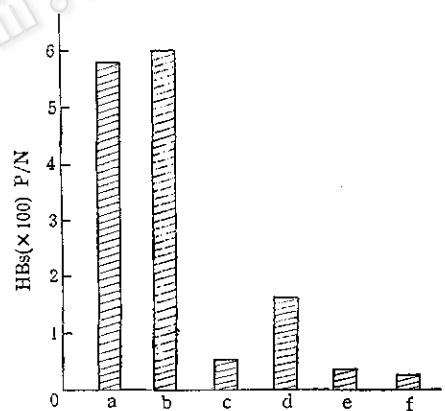


图6 重组病毒TnNPV-HBsD₄注射感染6种幼虫后测定的HBsAg滴度P/N值

Fig.6 HBsAg production by six species of lepidopteran larvae when infected with the recombinant virus TnNPV-HBsD₄.
a. 粉纹夜蛾 *Trichoplusia ni*;
b. 蓖麻蚕 *Philosamia cynthia ricini*;
c. 柞蚕 *Antheraea pernyi*;
d. 斜纹夜蛾 *Spodoptera litura*;
e. 玉米螟 *Pyrausta nubilalis*;
f. 大蜡螟 *Galleria mellonella*

中血淋巴中的HBsAg滴度为P/N值204,约占整个虫体匀浆液的25%。

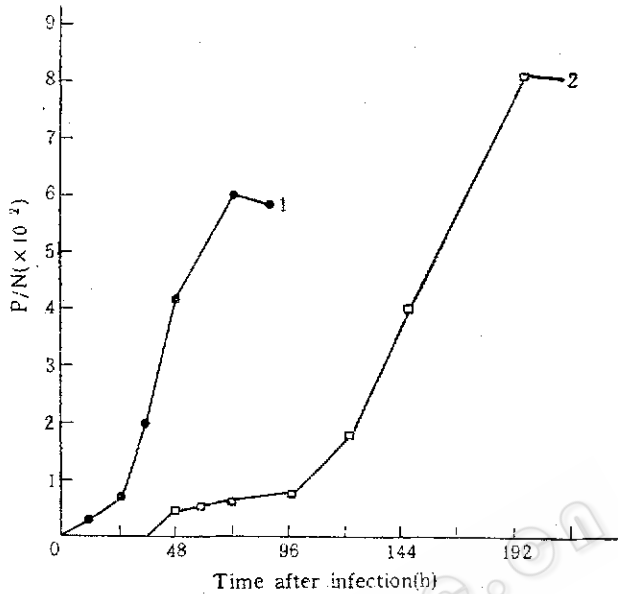


图 7 重组病毒TnNPV-HBsD₄感染的蓖麻蚕幼虫、预蛹经不同时间测定的HBsAg

Fig.7 Kinetics of HBsAg production in *P.cynithia ricini* larvae and prepupae infected with the recombinant virus TnNPV-HBsD₄.

1. 幼虫 Larvae 2. 预蛹 Prepupae

(五) HBsAg的分离纯化

1. HBsAg的粗提纯: 接种TnNPV-HBsD₄ 7天的蓖麻蚕预蛹匀浆、过滤后, 18000rpm离心30min, 上DEAE-纤维素柱, 经PBS平衡洗脱, 再分别用含0.5、1、1.5和2 mol/L NaCl的0.01mol/L磷酸盐缓冲液洗脱, 蛋白及HBsAg活性分布结果如图8所示。合并HBsAg阳性部分, 用20—50%饱和度的(NH₄)₂SO₄进行沉淀, 收集沉淀, 用PBS溶解, 对PBS透析后对PEG 6000反透析浓缩, 冻存。用上述方法分离提取HBsAg, 提纯倍数37.6倍, 得率73%; 而改以DEAE-纤维素搅拌吸附、洗脱的方法, 提纯倍数6.9倍, 得率为78%。

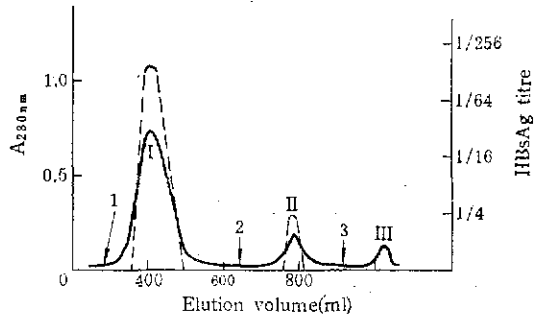


图 8 HBsAg的 DEAE-纤维素柱层析图

Fig.8 Isolation of HBsAg proteins from *P. cynithia ricini* prepupae infected with TnNPV-HBsD₄ by running through a DEAE-cellulose column

I、II、III. — Protein peak
HBsAg titre
 1. 0.5mol/L NaCl 2. 1.0mol/L NaCl
 3. 1.5mol/L NaCl

我们初步试验结果, 以粗提纯的HBsAg取代血源HBsAg应用于HBsAg酶标诊断试剂盒(McAb-ELISA应用系列),

用以检测乙肝患者血清中的乙肝表面抗体(HBsAb), 灵敏度高。

2. HBsAg的纯化: 粗提纯的HBsAg

经一次马抗 HBsAg 抗体亲和柱层析, 可得到纯化(图 9), 得率约为 98%。亲和柱层析后的 HBsAg 蛋白经 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳、考马斯亮蓝染色结果, 主要蛋白带的分子量为 22kd。

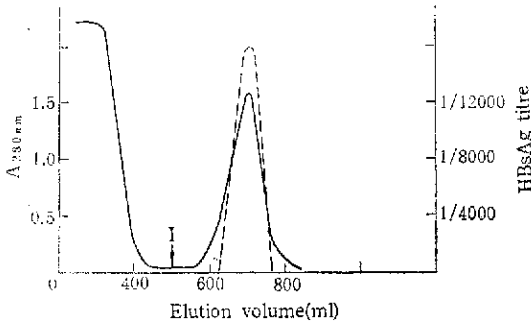


图 9 HBsAg 的抗体亲和柱层析图

Fig.9 Purification of HBsAg from extract of infected *P. cyathia ricini* prepupae by running through an anti-HBs IgG-conjugated affinity column
 ——A_{280nm}
HBsAg titre
 I. 5 mol/L NaI

讨 论

我们在前文^[1,8]中曾提出杆状病毒的重组及外源基因的插入并非必须使用同源病毒的转移载体的论点。本研究利用 AcNPV 非融合蛋白基因转移载体和 TnNPV DNA 通过共转染草地夜蛾培养细胞成功地组建出了含 HBsAg 基因的粉纹夜蛾重组核型多角体病毒, 重组病毒遗传上稳定, HBsAg 基因在离体培养细胞和虫体中均获得表达, 这一研究结果为上述论点提供了新的依据。

感染重组病毒 TnNPV-HBsD₄ 的草地夜蛾细胞静置培养, HBsAg 部分分泌于细胞外, 改为摇动培养, 分泌于细胞外的抗原增加, 结果与 Kang 等^[5]的报道相似。其原因不清楚, 但可以肯定, 摇动培养与搅拌培养是增加 HBsAg 分泌于细胞

外的有效办法之一。

目前用于表达外源基因的昆虫体系有 AcNPV-草地夜蛾离体细胞系统^[2-6,14]、家蚕 BmNPV-家蚕幼虫系统^[10]以及 TnNPV-粉纹夜蛾幼虫和草地夜蛾离体细胞系统^[20]。本文提出了一个新的昆虫个体表达系统, 即 TnNPV-蓖麻蚕预蛹或粉纹夜蛾幼虫系统。利用昆虫虫体表达外源基因具有表达水平更高、成本更低等优点, 其表达水平通常要比离体细胞高 10 倍以上^[19-21]。本研究结果, 用 TnNPV-HBsD₄ 感染粉纹夜蛾 4 龄幼虫, 每克虫体表达的 HBsAg 是每毫升草地夜蛾细胞 (10⁶ 细胞/ml) 表达量的 25 倍, 而前者的成本费还不到后者的 1%。而蓖麻蚕预蛹表达的 HBsAg 又比粉纹夜蛾或蓖麻蚕幼虫要高。蓖麻蚕蛹体个体大, 注射感染操作方便。我国已有 30 多年的蓖麻蚕饲养经验, 人工饲料也已解决。因此, 用本文提出的系统, 以蓖麻蚕预蛹取代粉纹夜蛾幼虫表达、生产 HBsAg 具有更大的优越性。

通过几种分离提纯 HBsAg 方法的比较, 虫体(预蛹)匀浆液经高速离心后直接用 DEAE-纤维素搅拌吸附, NaCl 洗脱是个有效方法。粗提后的 HBsAg 可用于临床检测。粗提样品再经抗体亲和柱层析, 可得以纯化, 方法简便、效果好。经纯化、浓缩的 HBsAg 蛋白作凝胶电泳分析, 除分子量为 22kd 的主要蛋白带外, 还有分子量为 72、64、60、54、28 和 18、13kd 的蛋白带。高分子量的蛋白带可能是 22kd 蛋白的聚合物^[22-25], 分子量 13kd 的蛋白带则可能是 22、28Kd 蛋白的解聚体或是由于翻译后修饰程度不一所致^[26]。今后研究有待进一步分离高纯度的 HBsAg, 以供研制乙肝基因工程疫苗用。

参 考 文 献

- [1] Miller, D.W. et al.: In "Genetic Engineering", Vol.8 (J.K.Setlow & A.Hollaender eds.) pp. 227—298. Plenum Publ. Corp., New York, 1986.
- [2] Luckow, V.L. and Summers, M.D.: *Bio/Technology*, 6:47—55, 1988.
- [3] Kang, C.Y. et al.: *J.Gen. Virol.*, 68:2607—2613, 1987.
- [4] Kuroda, K. et al.: *EMBO J.*, 5:1359—1365, 1986.
- [5] Coelingh, K.L.V.W. et al.: *Virology*, 160:465—472, 1987.
- [6] Jeang, K. et al.: *J.Virol.*, 61:708—713, 1987.
- [7] Maniatis, T. et al.: *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor Laboratory, New York, 1982.
- [8] Ono, Y. et al.: *Nucl. Acids Res.*, 11:1747—1757, 1983.
- [9] Homes, D.S. & Quigley, K.: *Anal. Biochem*, 114:193—197, 1981.
- [10] Kelly, D.C. & Wang, X.: *Annales de Virologie*. 132E:247—259, 1981.
- [11] Smith, G.E. et al.: *J.Virol.*, 46:584—593, 1983.
- [12] Pennock, G.D. et al.: *Mol.Cell.Biol.*, 4:399—406, 1984.
- [13] Kafatos, F.C. et al.: *Nucl. Acids Res.*, 7:1541, 1979.
- [14] Smith, G.E. et al.: *Mol.Cell.Biol.*, 3:2156—2165, 1983.
- [15] 谢彦博等: 病毒学报, 2: 1—9, 1986.
- [16] 王珣章等: 中山大学学报(自然科学版), 4: 105—107, 1989.
- [17] Kelly, D.C. and Lescott, T.: *Microbiologica*, 4:35—37, 1981.
- [18] 庞义等: 中山大学学报(自然科学版), 2: 104—106, 1987.
- [19] Maeda, S. et al.: *Nature*, 315:592—594, 1985.
- [20] Pang, Y. (庞义) et al.: In "Recent Advances in Biotechnology and Applied Biology" (Shu-ting Chang et al. eds.) pp. 637—648, Chinese University Press. Hong Kong, 1988.
- [21] Marumoto, Y. et al.: *J.Gen.Virol.*, 68:2599—2606, 1987.
- [22] Koistinen, V.U.: *J.Virol.*, 35(1):20—23, 1980.
- [23] Shiraishi, H. et al.: *J.Gen.Virol.*, 48:31—38, 1980.
- [24] 徐肇明等: 病毒性肝炎研究进展(第一版), pp.364—368, 上海科学出版社, 1980.
- [25] 张 维: 病毒学报, 3(1): 8—12, 1987.
- [26] Miller, L.K.: *Annual Reviews of Microbiology*, 1988.

Expression of Hepatitis B Virus Surface Antigen Gene in Insect Baculovirus Vector Systems

Long Qingxing Wang Xunzhang Xie Weidong He Daifen
Lan Dean Pang Yi Su Deming* Pu Zhelong

(Research Institute of Entomology, Zhongshan University, Guangzhou)
(Virology Research Unit, Fudan University, Shanghai)*

The gene coding for the hepatitis B virus surface antigen (HBsAg) under the control of *Autographa californica* nuclear polyhedrosis virus polyhedrin promoter was successfully inserted into the genome of *Trichoplusia ni* nuclear polyhedrosis virus. Infection of *Spodoptera frugiperda* cells with this recombinant virus produced significant amount of HBsAg protein and secreted 22 nm particles containing the HBsAg. HBsAg gene

expression was also obtained both in *Trichoplusia ni* larvae and in *Philosamia cynthia ricini* prepupae when infected with the recombinant virus. The HBsAg proteins expressed by baculovirus vector systems are morphological and antigenic properties identical to the 22 nm particles secreted by human cells.

Key words

Hepatitis B virus surface antigen; recombinant baculovirus; *Trichoplusia ni*; *Philosamia cynthia ricini*; *Spodoptera frugiperda* cells

图 版 说 明

Explanation of Plate I

- A. TnNPV-HBsD₄ DNA 和 TnNPV DNA 的 EcoRI 酶解图谱
Restriction endonuclease EcoRI cleavage patterns of TnNPV-HBsD₄ DNA compared with wild-type TnNPV DNA
a. TnNPV-HBsD₄; b. wild-type TnNPV
1. TnNPV DNA EcoRI-I fragment
2,3. Specific fragments of TnNPV-HBsD₄ DNA
- B. 重组病毒 TnNPV-HBsD₄ DNA 斑点杂交分析
Dot hybridization analysis of TnNPV-HBsD₄ DNA with HBV probe
a. TnNPV-HBsD₄ DNA (32.5 ng/dot, 325 ng/dot, 980 ng/dot);
b. wild-type TnNPV DNA (33 ng/dot, 330 ng/dot, 1000 ng/dot)
- C. TnNPV HBsD₄ 和 TnNPV 感染的草地夜蛾细胞蛋白³⁵S-蛋氨酸标记及免疫沉淀放射自显影图
Autoradiography of SDS-PAGE of ³⁵S-labelled proteins produced during *S. frugiperda* cells infected with TnNPV-HBsD₄ and wild-type TnNPV.
a. Proteins from uninfected cells; c(24h post-infection), e(48h post-infection), g(60h post-infection) and h(72h post-infection) show proteins from TnNPV-HBsD₄ infected cells; b(24h post-infection), d(48h post-infection) and f(72h post-infection) show TnNPV infected cells; i shows immunoprecipitation of HBsAg protein from TnNPV-HBsD₄ infected cells by using anti-HBsAg monoclonal antibody

龙紫新等：乙型肝炎病毒表面抗原基因在昆虫体系中的表达

Long Qingxing et al.: Expression of hepatitis B virus surface antigen gene in insect baculovirus vector systems

图版 I

Plate I

