

乙肝病毒 S 基因在家蚕细胞及蚕体内高效表达

周耐明 张颖 金伟 李载平 吴祥甫

(中国科学院上海生物化学研究所 上海 200031)

摘要 把人乙型肝炎病毒 (adr) 的表面抗原 S 基因插入到家蚕核型多角体病毒基因组中, 构建了重组病毒 BmNPVS。用重组病毒感染家蚕细胞, 测得每毫升培养物 (1×10^6 细胞) HBsAg 表达量达 $35.5 \mu\text{g}$; 感染家蚕幼虫和蛹, 经检测表明 HBsAg 产量平均为每头蚕约 $750 \mu\text{g}$, 每只蛹约为 $690 \mu\text{g}$ 。初步纯化的表达产物经 Western blotting 和电镜观察证实, 表达产物是直径为 22nm 的颗粒, 并主要以糖基化形式存在。表达产物的浮力密度为 1.2g/ml , 与病人血清的 HBsAg 一致。

关键词 乙型肝炎病毒表面抗原, 基因表达, 重组家蚕核型多角体病毒, 家蚕

乙型肝炎是由乙型肝炎病毒 (HBV) 感染引起的, 对人类健康危害极大。HBV 的 S 基因编码由 226 个氨基酸组成的 S 蛋白 (主蛋白); PreS₂ 和 S 区基因共同编码 281 个氨基酸的分子量中等的蛋白; 由 398 个氨基酸组成的分子量较大的蛋白是由 PreS₁、PreS₂ 和 S 区基因编码^[1~2]。乙肝表面抗原已分别在大肠杆菌^[3]、酵母^[4]和哺乳动物细胞系统^[5]中得到表达, 但选用合适的基因工程表达系统大量生产乙肝疫苗仍具有重要意义。

随着对昆虫杆状病毒分子生物学研究的不断深入, 建立了昆虫杆状病毒表达系统^[6~7]。家蚕核型多角体病毒 (BmNPV) 表达系统具有独特的长处。BmNPV 作为表达载体能在家蚕幼虫和蛹体内表达外源基因, 表达效率明显高于昆虫培养细胞。发育后期的家蚕幼虫血淋巴含有蛋白酶抑制剂^[8], 对表达产物的稳定性很有利。特别是家蚕人工饲养技术的发展, 可以进行大规模工业化无菌饲养, 为低成本大量生产生物工程产品创造了条件。我们将 HBV (adr) S 基因通过 BmNPV 转移载体重组到 BmNPV 基因组中构建了重组病毒, 在家蚕细胞、家蚕幼虫和蛹体内高效表达 HBsAg, 为今后利用家蚕大量生产乙肝疫苗提供了一条新的途径。

1 材料和方法

1.1 材料

质粒 pBm030 由 Maeda^[7]博士馈赠, HBV (adr) S 基因来自 PMS-3^[9]。野生型 BmNPV 和试验用蚕由中国农业科学院蚕业研究所提供。家蚕细胞株 Bm-N 由 K. Iatrou 教授馈赠。

1.2 方法

1.2.1 质粒 DNA 和病毒 DNA 的制备和操作: 质粒 DNA 的制备和操作按 Maniatis 实

本文为国家重点科技项目 (攻关) 计划生物技术实用化研究资助项目。

本文于 1994 年 2 月 1 日收到。

验手册^[10]的方法进行,受体菌为 *E. coli* JM103。病毒 DNA 的制造按照 Summers 实验手册^[11]进行。

1.2.2 细胞培养: Bm-N 细胞培养用 Tc-100 培养基,补加 10% 的胎牛血清,27℃ 恒温培养。

1.2.3 共转染: 接种 1×10^6 个细胞于 25cm² 培养瓶中,贴壁生长 4 h 后,用不含胎牛血清(FBS)的培养基漂洗 3 次,加 3ml 无 FBS 培养基。取野生型的病毒 DNA 2μg,重组转移质粒 DNA 1μg 与 Lipofection buffer 50μl 轻轻混匀后,静止 15 min,然后将上述混合液逐滴加入培养瓶中,27℃ 培养 4 小时,最后补加 3ml 无 FBS 培养基和 600μl FBS。27℃ 继续培养 4 d,收集上清液用于空斑筛选。

1.2.4 重组病毒的筛选和纯化: 按文献 [11] 方法进行。

1.2.5 聚合酶链式反应 (PCR): 按文献 [10] 方法进行。引物 1 设置区域为 S 基因结构基因内部,即 HBV 基因组位置的 415~432nt 处,而引物 2 在 S 基因的 3' 旁侧顺序,基因组位置为 869~887nt 处。

引物 1: 5'-CTGCTATGCCTCATCTTC-3'

引物 2: 5'-TATCCCATGAAGTTAAGGG-3'

DNA 合成仪合成,常规方法纯化后溶于无菌水中 (50pmol/μl), -20℃ 保存备用。

1.2.6 家蚕的感染和样品的处理: 取 5 龄起蚕和刚蜕皮的嫩蛹,表皮消毒后,穿刺接种每头约 10^6 PFU 重组病毒。按试验要求在不同时间收集血淋巴,经 10000r/min 离心 10min,除去血球细胞及脂质,上清液用于检测。整体幼虫或蛹在 PBS 中匀浆后, -80℃ 至、37℃ 反复冻融 3 次,15 000r/min 离心 10min 后,取上清液检测。

1.2.7 HBsAg 的检测: HBsAg 的含量用 RIA 药盒 (卫生部北京生物制品研究所生产) 检测。

1.2.8 CsCl 密度梯度超离心分析: 病蚕或病蛹的血淋巴上清液经高速离心去除细胞碎片后,按 230mg/ml 加入 CsCl,使密度达 1.2g/ml。4℃,40000r/min 离心 10~48h,分管收集,RIA 测定 HBsAg,以确定 HBsAg 颗粒的活力峰。

1.2.9 蛋白质凝胶电泳和蛋白免疫印迹分析: SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳 (SDS-PAGE) 参照 Laemmli 的方法^[12],凝胶浓度为 10%,考马斯蓝染色。Western blotting 参照 Towbin 的方法^[13],豚鼠抗 HBsAg 抗血清 (购自上海医药化学研究所) 作第一抗体,辣根过氧化物酶标的蛋白 A 作第二抗体。

1.2.10 HBsAg 的纯化: 经过 CsCl 密度梯度超离心的样品,用交联有抗乙肝表面抗原主蛋白的单抗 IgG 的亲亲和层析柱纯化。

2 实验结果

2.1 重组转移载体质粒的构建

质粒 pUAcHis-5 的 1kb BamH I 片段含有 HBV S 基因全顺序及 3' 端旁侧顺序。该片段插入家蚕重组病毒转移载体 pBm030 的 Bgl I 位点,经转化 JM103 筛选和验证 pBm030,上多角体蛋白基因启动子 (Ph) 与 S 基因转录方向一致,由此获得含 S 基因的表达型转移质粒—pBmHS-6 (图 1)。

pBmHS-6 中 Ph 启动子和 HBV S 基因拼接顺序如下:-

AACCTATAGAT cctctag TCGAGGACTGGGGACCCTGCACCGAACATGGAGAACAC

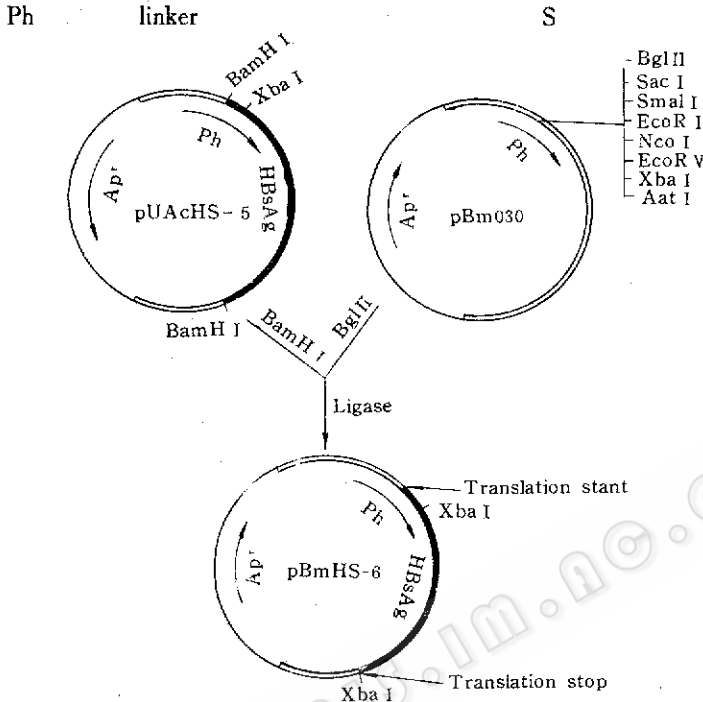


图1 重组转移载体质粒 pBmHS-6 构建

Fig. 1 Construction of recombinant transfer vector pBmHS-6

2.2 重组病毒 BmNPVS 的组建和鉴定

将 pBmHS-6 重组转移载体质粒 DNA 与野生型 BmNPV DNA 共转染家蚕培养细胞, 经空斑筛选和纯化, 得到了带有 HBV (adr) S 区基因的重组病毒 BmNPVS。

用重组病毒 BmNPVS 感染 Bm-N 细胞, 提取细胞总 DNA, 经 PCR 法能扩增出 470bp 的 DNA 片段, 这与以含 phes-S 基因及其 3' 端旁侧顺序的 pMS-3 质粒为模板扩增出的片段大小一致。该扩增片段能与 α - ^{32}P 标记的 S 基因片段杂交 (见图版 I-A, B)。重组病毒 DNA 能被 Xba I 酶切出一条 1 kb 大小的片段, 同样能与 S 基因探针杂交 (图略)。由此表明重组病毒 BmNPVS 含有 HBVS 基因。在引物限定的区域内 S 基因部分并未因细胞内重组而造成明显的缺失或重组。

2.3 重组病毒 BmNPVS 在培养细胞中的表达

家蚕培养细胞系 Bm-N 受重组病毒 BmNPVS 感染后, 细胞内和培养基中所产生的 HBsAg 的时相曲线如图 2。

感染初期, 细胞内 HBsAg 量缓慢增加, 第 4 天后急剧增加, 第 5 天达到高峰值, 以后却趋下降。培养上清中的 HBsAg 量增加趋势大致与细胞相同, 只是第 5 天后仍呈增加的趋势。这些现象说明 HBsAg 在 Bm-N 细胞中不是被分泌的, 而是随着培养后期细胞的裂解被动释放于培养液中。

当细胞密度为 1×10^5 /ml 时, 感染后第5天, 以阳性对照为参照标准, 测得细胞中的 HBsAg 量为 $22 \mu\text{g}$, 上清中为 $13.5 \mu\text{g}$, 表达总量高约 $35.5 \mu\text{g}$ 。

2.4 重组病毒 BmNPVS 在家蚕幼虫和蛹体中的表达

5龄起蚕幼虫或刚蜕皮的嫩蛹穿刺接种 1×10^6 PFU 重组病毒 BmNPVS。感染后第3天出现病毒感染发病症状, 第4天全部发病。病蚕的外观症状与野生型 BmNPV 感染的病蚕几乎无异。5 d 后开始陆续死亡。病蚕的血淋巴呈浓汁乳白色。镜检表明血淋巴中不含多角体, 但有大量的组织碎片和脂滴。

用 RIA 法测定感染 BmNPVS 后家蚕幼虫血淋巴中 HBsAg 产生的动态变化结果如图3所示。感染第3天后, 血淋巴中 HBsAg 呈直线增加, 第5天达到高峰。幼虫整体匀浆后, 测得3条蚕平均每条可生产 $750 \mu\text{g}$ 左右的 HBsAg。

蛹期感染重组病毒后, 随着感染时间的延长, 血淋巴中的 HBsAg 不断增加和积累, 至第7天, 血淋巴表达产物高达 $240 \mu\text{g}/\text{ml}$ 。每头蛹平均生产 $690 \mu\text{g}$ 的 HBsAg (见表1)。

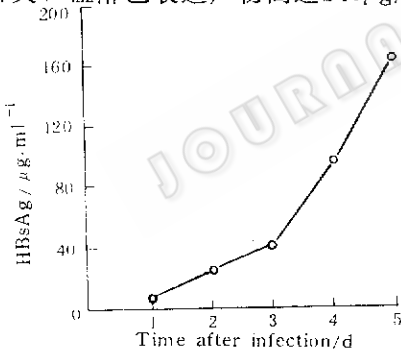


图3 HBsAg 在家蚕幼虫体内的表达动态

Fig. 3 Kinetic of HBsAg production in silkworm larvae infected by the recombinant BmNPV

2.5 表达产物 HBsAg 的纯化和鉴定

乙肝表面抗原颗粒在病人血清中主要以 22nm 颗粒存在, 其浮力密度约 $1.2 \text{g}/\text{ml}$ 。将家蚕幼虫和蛹感染重组病毒后的血淋巴高速离心, 取其上清液进行 CsCl 密度梯度离心, 结果见图4。家蚕幼虫或蛹表达的 HBsAg 主要集中在密度为 $1.2 \text{g}/\text{ml}$ 区带处。

CsCl 离心得到的样品, 再用亲和层析法进行纯化。纯化产物做了 SDS-PAGE 分析和 Western blotting 鉴定 (图版 I -C、D)。由图中可见, 纯化的 27kDa 蛋白能与 HBsAg 特异性抗体结合, 这就表明, 在家蚕幼虫和蛹体表达的 HBsAg 主要是糖基化的 gP30 形式, 尚

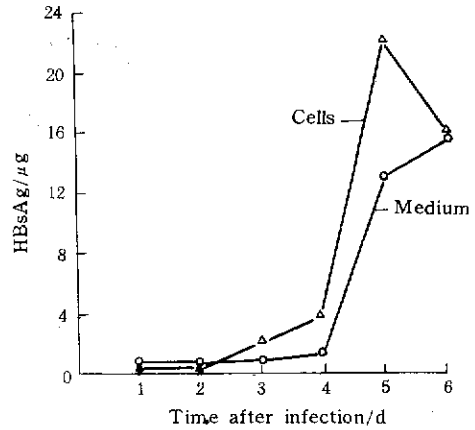


图2 HBsAg 在家蚕培养细胞中的表达时相曲线
Fig. 2 Kinetics of HBsAg production in Bm-N cells infected by the recombinant BmNPV

表1 HBsAg 在蚕蛹中的表达

Table 1 HBsAg production of silkworm pupa infected with recombinant BmNPV (S)

Sample	Weight of body	HBsAg (μg)
1	1.380	910
2	1.345	510
3	1.397	650
Total	1.374	690

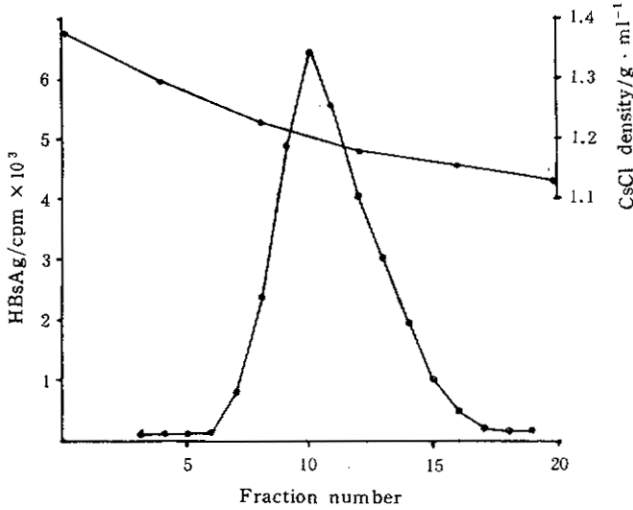


图4 表达产物 HBsAg 的 CsCl 密度梯度离心分析

Fig. 4 CsCl purification of HBsAg produced by silkworm larvae infected by recombinant BmNPV 有部分为糖基化不完全的。纯化产物的电镜观察结果见图5, 所得到的纯化样品是大小均一的颗粒, 直径22nm。

3 讨论

含乙肝表面抗原基因的重组家蚕核型多角体病毒感染家蚕培养细胞, HBsAg 在细胞 (10^6) 中的表达量高达 $35.5\mu\text{g}$, 感染家蚕幼虫和蛹, 平均每条蚕的 HBsAg 表达量在 $750\mu\text{g}$, 而每只蛹可达 $690\mu\text{g}$, 是目前已有基因工程研究中表达量最高的一个。对表达产物进行的 CsCl 密度梯度离心, Western blotting 分析和电镜观察, 表明重组病毒感染家蚕幼虫和蛹产生的 HBsAg 与病人血清中的 HBsAg 颗粒一致。

Kang^[14] 构建了含乙肝表面抗原 S 区基因的重组苜蓿尺蠖核型多角体病毒, 在悬浮培养 sf 细胞中表达 HBsAg 时观察到 HBsAg 能分泌到细胞外。Lanford^[15] 观察到重组 AcNPV 在单层贴壁和悬浮培养 sf 细胞表达 HBsAg, 表达产物均不能向细胞外分泌。试验结果表明在家蚕培养细胞表达 HBsAg, 在感染重组病毒后 1~2 d 内细胞并未出现裂解而培养上清中的 HBsAg 量高于细胞内, 暗示了表达产物 HBsAg 有可能部分分泌于细胞外。但在感染后期, HBsAg 大量产生时, 大部分表达产物滞留在细胞内, 这可能是因 HBsAg 表达量太高, 超过了昆虫培养细胞的分泌能力和培养昆虫细胞所需温度较低引起的^[15]。

用重组 AcNPV 在 sf 细胞中表达得到未糖基化和糖基化两种 HBsAg^[15]。本试验表

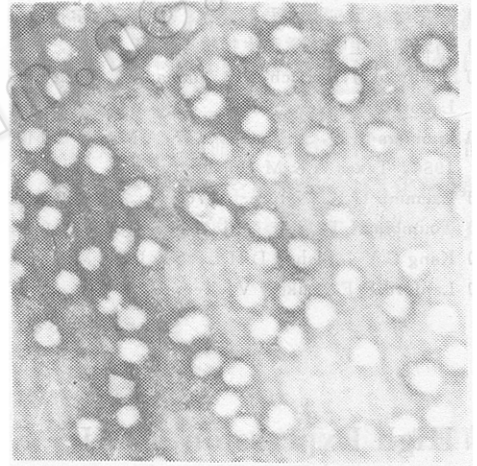


图5 HBsAg (22nm) 颗粒电镜照片
Fig. 5 Electron micrographs of HBsAg particles (22nm)

明,在家蚕幼虫和蛹体表达的 HBsAg,主要以糖基化形式存在。家蚕虫体中初步纯化的 HBsAg PAGE 图谱显示主要的 HBsAg 为 30kDa 糖蛋白,并有 28、29kDa 的糖蛋白,但缺乏 24kDa 的非糖基化蛋白。人源糖基化 HBsAg 主要是 27kDa,但任贵方等曾发现 CHO 细胞中生产的 HBsAg 组分中有相当比例的 30kDa 糖基化 HBsAg,因而在不同表达系统中,由于细胞或生物糖基化能力和糖链的不同,可以形成分子量不同的糖蛋白。由于家蚕虫体糖基化能力较强,故主要产物为 8gP30。

我们组建了带有乙肝表面抗原基因的重组家蚕核型多角体病毒,在家蚕培养细胞、家蚕幼虫和蛹体均得到了高效表达,有希望成为理想的乙肝疫苗生产途径。

参 考 文 献

- [1] Heerman H K, Goldmann U, Schwartz W *et al.* *Virology*, 1984, **52**: 396~402.
- [2] Perrison D L. *J Biol Chem*, 1981, **256**: 6975~6983.
- [3] 敖世州,丁晓华,周翊钟等. *中国科学 (B 辑)*, 1985, **2**: 252~258.
- [4] 沈绿萍,杨志勇,谢伟军等. *生物化学与生物物理学报*, 1987, **19**: 433~439.
- [5] 阮薇琴,任贵方,梅亚芳等. *病毒学报*, 1985, **1**: 281~282.
- [6] Smith G E. *Molec Cell Bio*, 1983, **3**: 2156~2165.
- [7] Meada S, Kawai T, Obinata M *et al.* *Nature*, 1985, **315**: 502~504.
- [8] 巫爱珍,王平,毛昌群等. *生物工程学报*, 1990, **6**: 277~281.
- [9] 冯宋铭. *生物化学和生物物理学报*, 1987, **19**: 428~432.
- [10] Sambrook J, Fritsch E F, Maniatis T. *Molecular cloning: A Laboratory Manual*, 1989, Cold Spring Harbor Laboratory, New York.
- [11] Summers M D, Smith G E *et al.* *A Manual of Methods for Baculovirus Vectors and Insect cell culture Procedures*, 1986, Texas A & M University.
- [12] Laemmli U K. *Nature*. 1970. **2**, **27**: 680~685.
- [13] Toubin H T. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1979, **76**: 4350~4354.
- [14] Kang C Y, Bishop D H L, Seo J S *et al.* *J Gen Virol*, 1987, **68**: 2607~2613.
- [15] Lanford R E, Lukow V, Kennedy R C *et al.* *J Virol*, 1989, **63**: 1549~1557.

High Expression of HBV S Gene in Bm Cell and Silkworm

Zhou Naiming Zhang Ying Jing Wei Li Zaiping Wu Xiangfu

(Shanghai Institute of Biochemistry, Academia Sinica Shanghai 200031)

Abstract The coding sequence of the hepatitis B virus (adr) surface antigen were inserted in the genome of BmNPV to construct recombinant BmNPV which were used to infect silkworm cells larvae and pupae. The level of HBsAg synthesis in cell cultures infected with the recombinant BmNPV was estimated at 35.5 μ g/ml cell culture (10^6 cell), 750 μ g per larva and 690 μ g per pupa. Western blot and electron microscope show that primarily purified products are 22nm (diameter) glycosylated particles. It's buoyant density is 1.2g/ml which is consistent with that of HBsAg in the plasma of patients.

Key words HBV surface antigen, recombinant BmNPV, gene expression, silkworm



Identification of recombinant BmNPV by PCR technology
 (A) and Southern hybridization (B)

- | | |
|---------------------------|--------------------|
| 1. λ DNA/Hind III | 2. Wide-type BmNPV |
| 3. Recombinant BmNPVS | 4. pMS-3 |

SDS-PAGE (C) and Western blotting (D) analysis of HBsAg produced by silkworm larvae
 infected by recombinant BmNPV

1. Standard marker
2. Sample of purified HBsAg product from silkworm larvae infected by recombinant BmNPV.
3. Haemolymph of normal silkworm larvae