389—396

11220(4)

第7卷第4期 中国病毒学 Vol.7 No.4
1992年12月 VIROLOGICA SINICA Dec.1992

表达乙型肝炎病毒表面抗原基因又形成多角体的杆状病毒*

何代芬 王珣章 谢伟东 陈 茹 龙繁新
邓日强 蒲蜇龙

S476·13

（中山大学昆虫学研究所、生物防治国家重点实验室，广州510275）

苏德明

（复旦大学病毒学研究室，上海200433）

提 要

用形成包含体（OCC+）并能利用人工合成启动序列和多角体XIV启动子表达外源基因的转移载体质粒pSXIVVI+X3，将乙型肝炎病毒表面抗原(HBsAg)基因和多角体基因同时插入无包含体的粉纹夜蛾核型多角体病毒TnNPV-SVI-G基因组中，得到表达HBsAg基因又形成包含体（多角体）的重组毒株TnNPV-HBs85-OCC+。与利用野生型多角体启动子表达HBsAg基因的无包含体毒株TnNPV-HBsD4不同，TnNPV-HBs85-OCC+由于具包含体，能以口服方式大规模感染粉纹夜蛾（*Trichoplusia ni*）幼虫，且HBsAg基因在草地夜蛾（*Spodoptera frugiperda*）离体细胞中的表达量要比前者高约37%，在虫体中的表达则更高。

关键词：乙型肝炎病毒表面抗原基因 多角体基因 人工合成启动子 粉纹夜蛾 草地夜蛾细胞

乙型肝炎，表面抗原，昆虫病毒

杆状病毒表达载体是少数几个有巨大发展潜力的真核基因表达载体之一[1,2]。由于用传统系统重组的杆状病毒无多角体形成，只能经注射感染昆虫，这就给实际应用增加了不少麻烦。为此我们建立了能在多角体蛋白基因前导序列、翻译起始密码子ATG上游-92碱基处，插入带人工合成启动序列以及多角体XIV启动子的外源基因并能形成多角体的粉纹夜蛾核型多角体病毒（TnNPV）表达载体体系[3,4]。本文用上述系统构建出含HBsAg基因和多角体基因的重组毒株TnNPV-HBs85-OCC+，研究在合成与XIV串联启动子驱动下，HBsAg基因在草地夜蛾（*Spodoptera frugiperda*）离体培养细胞与粉纹夜蛾（*Trichoplusia ni*）虫体中的表达规律，并与前文[5]报道的无包含体毒株

本文于1991年12月17日收到，1992年4月25日修回。
*国家自然科学基金与高等学校博士学科点专项科研基金资助项目。

TnNPV-HBsD4进行了比较。

材 料 与 方 法

一、病毒、细胞与寄主昆虫

含合成启动子和β-半乳糖苷酶基因的无包含体粉纹夜蛾重组病毒株 TnNPV-SVI-G 由本实验室构建[4]。重组毒株在草地夜蛾细胞[5]与粉纹夜蛾幼虫[5]中的增殖，均按前文[4,5]所述方法进行。

二、质粒之构建

质粒构建主要参考Sambrook等方法[7]。限制性内切酶和连接酶购自 BRL、Sigma或华美公司。含乙型肝炎病毒（adw亚型）DNA[8]的pUC8/HBV质粒引自法国巴斯德研究所。

三、病毒的重组、筛选与鉴定

用构建的质粒DNA与无包含体重组毒株DNA按Kelly和Wang的方法[9]共转染草地夜蛾离体培养细胞，在1%琼脂糖半固体培养基中，挑选形成包含体和白色（含X-gal培养基中）的病毒蚀斑，经反复空斑纯化，得含HBsAg基因和多角体基因的重组毒株。病毒DNA的分离提纯、酶切电泳以及杂交试验按文献[4,6]进行。

四、HBsAg的检测与定量测定

病毒感染细胞或虫体的浓度和数量，以及细胞（虫体）浆液的制备均按前文[5]所述方法，用^{125}I-HBsAg-抗体固相放免双测定药盒（北京中国原子能科学研究院）进行测定，反应条件按厂家所附使用说明。HBsAg定量测定参照谢彦博等[10]的方法，抗原标准品引自卫生部药品生物制品检定所。

结 果

一、含HBsAg基因质粒之构建

如图1所示，质粒 pUC8/HBV先用 Bam HI 酶切，低融点琼脂糖凝胶电泳分离回收相应片段（含部分 Pre-S2 及完整 HBsAg 基因）后，插入质粒 pSXIVVI$^+$X3 的 Bgl II 窗口，得到含 HBsAg 和多角体基因的转移载体质粒 pSXIVVI$^+$X3-HBs。EcoR V酶切结果表明（合成启动子和 XIV 启动子交界处以及 HBsAg 序列近5′端各含一个EcoR V 切点），质粒 pSXIVVI$^+$X3-HBs 含有正确方向的HBsAg基因（图未示出）。

二、TnNPV 的重组及其 DNA 分析

含HBsAg 和多角体基因的转移载体质粒 pSXIVVI$^+$X3-HBs DNA 与无包含体并带β-半乳糖苷酶基因的重组病毒TnNPV-SVI$^-$G DNA 共转染草地夜蛾细胞，通过空斑技术挑选形成多角体的病毒斑后，经反复纯化，得重组毒株 TnNPV-HBs85-OCC$^+$，经用含 X-gal 的半固体培养基作空斑测定，证实无蓝斑形成，即不混有亲本毒株 TnNPV-SVI$^-$G。

DNA 斑点杂交结果表明，不同浓度（196，65，6.5μg/ml）的 TnNPV-HBs85-OCC$^+$ DNA 均能与 α-^{32}P 标记的 HBV DNA 探针杂交，而TnNPV-SVI$^-$G 则不能（图2B）。为了进一步证实 HBsAg 基因与相应的启动子均插入TnNPV-SVI$^-$G基因组内正确位点，我们酶切分析了野生型病毒TnNPV 与重组毒株 TnNPV-HBs85-OCC$^+$ DNA。如图

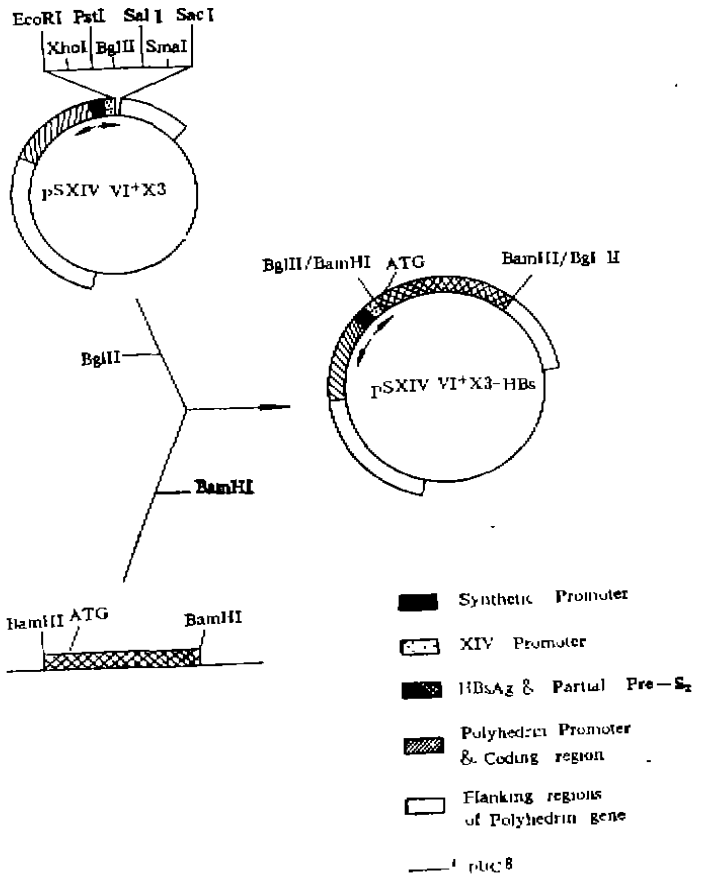

图1．含HBsAg基因形成多角体转移载体质粒pSXIVVI+X3-HBs 之构建

Fig1. Construction of the OCC+tranfer veotor plasmid pSXIVVI+X3-HBs containing a HBsAg gene. The arrow indicates the direction of corresponding promoters

2 A所示，大小约14.4kb的野生型TnNPV Bgl II-C 片段，由于插入了带合成启动序列与XIV启动子的HBsAg 基因（不含 Bgl II酶切点），加上接上的是具有Bam HI 粘性末端的 HBsAg 片段，因而消除了原接头中的 BgI II 酶 切点，致使重组毒株 TnNPV-HBs 85-OCC+的 Bgl II-C 片段增大（16.0kb，图 2 A箭头所指的片段）。启动子与 HBsAg编码区前导序列接合部的碱基顺序则见图 3。

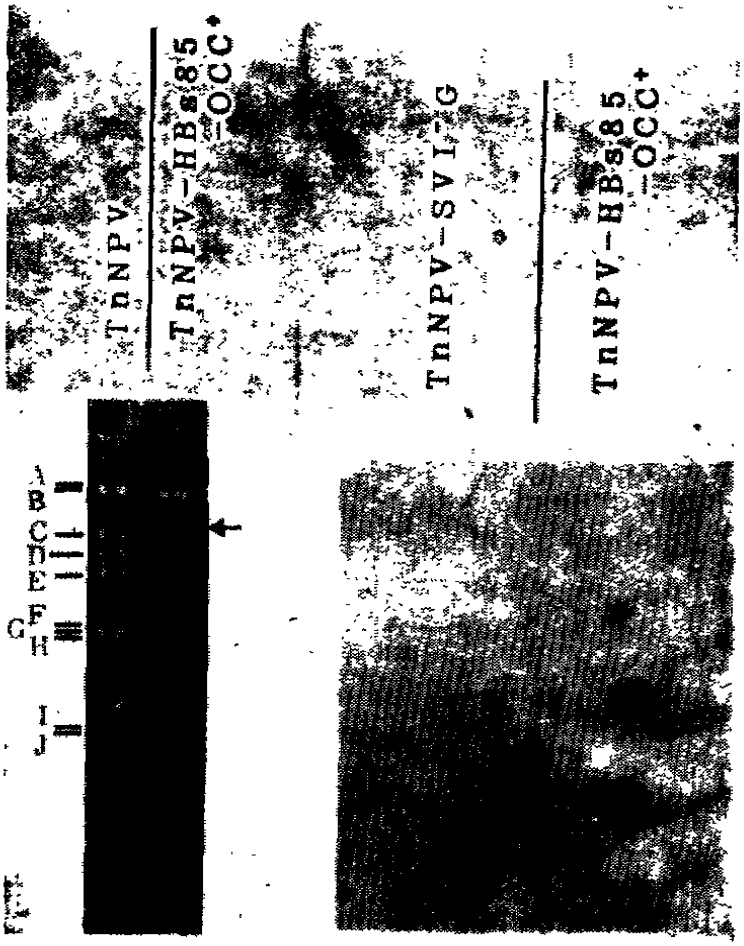

图2. A. TnNPV与TnNPV-HBs85-OCC+ DNA 的Bgl II酶解电泳图谱

Fig2. A. Bgl II cleavage patterns fo TnNPV-HBs85-OCC+ DNA compared with wild-type TnNPV DNA. The arrow indicates the Bgl II-C fragment of TnNPV-HBs85-OCC+.

B. HBV 探针与TnNPV-SVI-G或TnNPV-HBs85-OCC+DNA的斑点杂交

B. Dot hybridization of TnNPV-SVI-G and TnNPV-HBs85-OCC+ DNA with HBV probe. Baculovirus DNA are applied as 30ng/dot, 300ng/dot or 900ng/dot respectively.

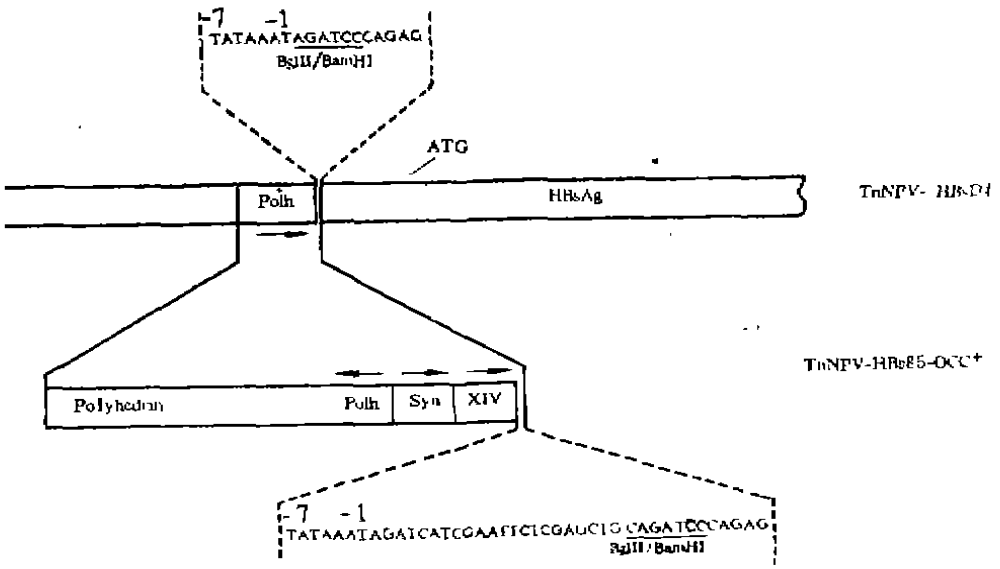

图3. 启动子组件的构成及其与HBsAg前导序列接合部的碱基序列

Fig3. Composition of the promoter cassette and the nucleotide sequences of the promoter and HBsAg gene junction. *Polh—polyhedrin promoter Syn—synthetic promoter XIV—XIV promoter.*

三、HBsAg表达量之比较

将形成多角体的重组病毒毒株TnNPV-HBs85-OCC⁺与不形成多角体的重组毒株TnNPV-HBsD4[8]分别感染草地夜蛾细胞与粉纹夜蛾幼虫，感染后不同时间收集细胞或幼虫，检测HBsAg活性，结果如图4和图5所示。

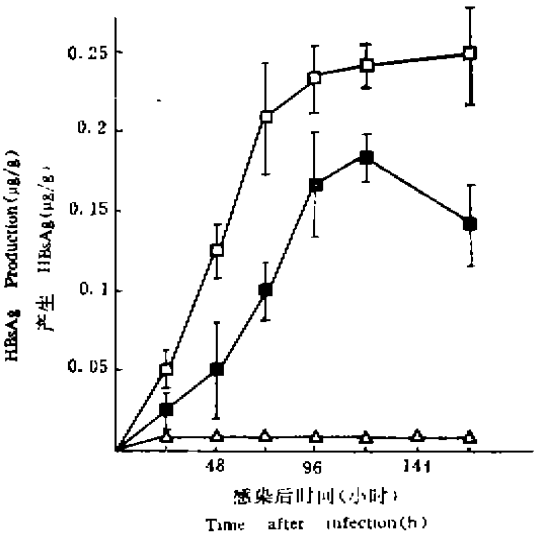

图4. 重组毒株感染草地夜蛾细胞经不同时间测定的HBsAg合成量。HBsAg量是以三次独立实验结果计平均值而得，其标准差大小用竖线表示。△——△亲本毒株TnNPV-SVI-G；■——■无包含体毒株TnNPV-HBsD4；□——□形成包含体毒株TnNPV-HBs85-OCC⁺。

Fig 4. Kinetics of HBsAg production in *Spodoptera frugiperda* cells infected with the recombinant viruses. Values are averages of three independent infections and the vertical lines represent Standard Deviation. △——△TnNPV-SVI-G; ■——■TnNPV-HBsD4; □——□TnNPV-HBs85-OCC⁺.

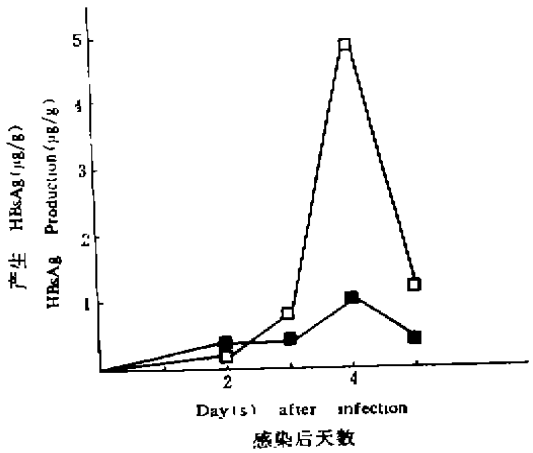

图5. 重组毒株感染粉纹夜蛾幼虫经不同时间测定的HBsAg合成量。■——■无包含体毒株TnNPV-HBsD4；□——□形成包含体毒株TnNPV-HBs85-OCC⁺。

Fig 5. Kinetics of HBsAg production in *Trichoplusia ni* larvae infected with the recombinant viruses. ■——■TnNPV-HBsD4; □——□TnNPV-HBs85-OCC⁺.

从图中可看出，两株毒株感染草地夜蛾细胞，形成多角体毒株TnNPV-HBs85-OCC⁺的HBsAg表达量总比无包含体毒株TnNPV-HBsD4的要高，例如前者在病毒感染后24、48、96小时的表达量就分别相当于后者在48、72、120小时的表达量，且每毫升HBsAg合成量达0.2μg之后，TnNPV-HBsD4的HBsAg滴度缓慢下降，而TnNPV-HBs85-OCC⁺感染的细胞则不然，其值仍继续上升，感染168小时后可达每毫升0.28μg之多，比无包含体的峰值高约37%（图4）。这两株毒株分别感染粉纹夜蛾幼虫2天后，HBsAg合成量开始上升，感染后4天同时达峰值，但TnNPV-HBs85-OCC⁺的量要比TnNPV-HBsD4的高4—5倍（图5）。感染后5天，HBsAg滴度急剧下降，仅及其峰值的25—30%左右。

讨 论

前文[5]曾报道HBsAg基因在昆虫体系中表达，本研究用新构建的形成多角体杆状病毒载体系统[4]表达HBsAg基因，并与上述的无包含体载体系统作比较。为了使HBsAg前导序列不致于影响这两个系统的比较结果，我们采用与构建TnNPV-HBsD4相似的技术路线，即用BamHI酶切质粒pUC8/HBV的方法，将含HBsAg基因的pHBV-BamHI片段整合入合成启动子与XIV启动子下游，这样构建的TnNPV-HBs85-OCC⁺毒株从启动子下游起至翻译起始密码子ATG止的HBsAg前导序列长度为150bp，仅比TnNPV-HBsD4的相应长度多23bp。因此，HBsAg表达量的高低可认为主要是因启动子不同或含反方向的多角体启动与编码序列所致。

应用带组合启动子的形成多角体杆状病毒载体系统[4]，不但能大规模口服感染昆虫及易于筛选出重组毒株，还具有能提高外源基因表达量的优点，这在本研究中已进一步得到证实。在应用常规的以野生型多角体启动子驱动的杆状病毒载体系统中，HBsAg基因是表达量较低的外源基因之一，表达的HBsAg蛋白仅占细胞总蛋白的2%左右[11]，而CAT基因是表达量适中的外源基因[12]。我们发现，处于合成启动子与XIV启动子下游的CAT基因，在草地夜蛾细胞中的表达量要比只在野生型启动子带动下高约16%[3,4]。本研究结果表明，同样应用这种组合启动子，HBsAg的表达量比用传统多角体启动子的高37%左右。因此，表达效率越低的外源基因，应用上述双启动子载体系统，外源基因表达量的增加幅度越大，这是否是一个普遍规律，值得深入探讨。至于外源基因表达水平得以提高的机理，我们认为除了组合启动子含多一个特异的转录起始序列AATAAG外，还与合成启动子的其它序列及反方向的多角体基因等有关[3]。

应用形成多角体的杆状病毒载体系统在虫体中表达HBsAg基因，测得的HBsAg量要比感染无包含体毒株TnNPV-HBsD4的高4—5倍，其原因估计除了组合启动子因素外，还可能与口服或注射感染有关。由于无包含体的毒株只有经注射才能引起感染，且因粉纹夜蛾幼虫太小（四龄幼虫体重仅0.2克），注射易引起幼虫的非病毒感染死亡。因此，若考虑上述因素，将来大规模应用形成多角体并带组合启动子的杆状病毒载体系统，在虫体中大量生产外源基因表达产物时，其产量的提高幅度可能要比上述的4—5倍还多，原因在于除了组合启动子本身能提高外源基因表达水平之外，用人工注射体重仅0.2克幼虫的方法来大规模感染昆虫，将不可避免会引起更大量幼虫的非正常（非重组病毒感染）死亡，且处理大量虫尸的生产过程中，极难区分出感染死亡与非正常死亡的幼虫，致使应用无包含体系统在虫体中大量生产外源基因表达产物时，特别是应用虫体较小的昆虫幼虫，其产量将远远达不到原来小规模试验的水平。另一方面，HBsAg在虫体中极易失活，当滴度达到峰值后，若不及时收获，表达量可降低3—4倍之多，估计这是虫体中的多种酶解作用所致。因此，能否及时收获感染幼虫，是今后设计昆虫体系生产工艺流程必须重点考虑的关键问题之一。由于HBsAg蛋白和许多有较大经济价值的真核基因表达产物一样，不具有与杆状病毒结构蛋白多肽类似的结构，因此，应用本系统表达生产的HBsAg等蛋白质不可能像杆状病毒结构多肽那样被多角体蛋白包埋而难于

纯化。从TnNPV-HBs85-OCC⁺感染的虫体中分离提纯HBsAg蛋白的工艺已研制出（另文发表）。感染病毒虫体匀浆应用温和的物理化学方法澄清后，再经单克隆抗体亲和柱层析，就可得到分子量为25、27、35与39KD的HBsAg糖蛋白。

值得注意的是，对野生型杆状病毒而言，增强子均与表达最强的基因相邻，如AcNPV含五个增强子序列，均位于表达最强的基因（后期的多角体、p10、衣壳、核心碱性蛋白以及早期的p39基因）侧翼[18]。因此，人为插入多一个增强子的方法，是否能进一步提高HBsAg基因在昆虫体系中的表达水平值得进一步研究。此外，前人已报道乙型肝炎病毒Pre-S2基因表达产物能提高表面抗原免疫原性[14]，为探讨这一规律，应用新构建的形成多角体并带组合启动子及翻译起始密码子ATG的转移载体质粒[4]，表达Pre-S2＋S基因的研究正在进行之中。

参考文献

〔1〕 Luckow V A and Summers M D., 1988, *Biotechnology*, 6：47.

〔2〕 Gluzman Y and Hughes S H (Eds)., 1988, Viral Vectors, Cold Spring Harbor Laboratory.

〔3〕 王珣章等，1992，中国科学，(1)：39。

〔4〕 王珣章等，1991，病毒学报，(7)：253。

〔5〕 龙絮新等，1991，生物工程学报，(7)：37。

〔6〕 Vaughn J L et al., 1979, *In Vitro*, 13：213.

〔7〕 Sambrook J et al., 1989, Molecular Cloning：A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York.

〔8〕 Ono Y et al., 1983, *Nucl Acids Res*, 11：1747.

〔9〕 Kelly D C anb Wang X., 1981, *Annales de Virologie*, 132E：247.

〔10〕 谢彦博等，1986，病毒学报，(2)：1。

〔11〕 Takehara K et al., 1988, *J.Gen.Virol*, 69：2763.

〔12〕 Rankin C et al., 1988, *Gene*, 70：39.

〔13〕 Guarino L K et al., 1986, *J.Virol*, 60：224.

〔14〕 Millich D R et al.,1985, *Science*, 228：1195.

Expression of Hepatitis B Virus Surface Antigen Using a Baculovirus Vector with the Polyhedrin Gene

He Dai-fen Wang Xun-zhang Xie Wei-dong Chen Ru
Long Qing-xin Deng Ri-qiang Pu Zhe-long

(*Institute of Entomology, Zhongshan University and National Laboratory of Biological Control, Guangzhou* 510275)

Su De-ming

(*Virology Research Unit, Fudan University, Shanghai* 200433)

Using a polyhedrin-positive transfer plasmid and a nonoccluded (OCC^-) parental recombinant, an occluded (OCC^+) recombinant baculovirus designated TnNPV-HBs85-OCC^+ was successfully constructed which contained the gene coding for the hepatitis B virus surface antigen under the dual control of the synthetic and XIV promoters. Infection of *Trichoplusia ni* larvae with TnNPV-HBs85-OCC^+ can be introduced as a contaminant of the diet rather than the conventional baculovirus OCC^- expression vector in which the recombinant viruses must be injected into the host hemocoel individually. The expression level of HBsAg gene under the control of the synthetic and XIV promoters in *Spodoptera frugiperda* cells has been increased by 40% compared with that of the wild-type polyhedrin promoter alone. When *T. ni* larvae are used the expression level of HBsAg gene may increase to four to five folds of that by the wild-type polyhedrin promoter.

Key words, Hepatitis B virus surface antigen Polyhedrin synthetic promoter *Trichoplusia ni* *Spodoptera frugiperda* cells