乙型肝炎病毒 S-preS1-C 融合基因在酵母中的表达及抗原性分析

黄维金,王佑春**,张华远

(中国药品生物制品检定所,北京 100050)

Expression of Fusion Gene Containing HBV S, pre-s1 and C Fragments in Yeast and Analysis of its Antigenicity

HUANG Wei-jin, WANG You-chun**, ZHANG Hua-yuan.

(*National Institute for the Control of Pharmaceutical and Biological Products, Beijing* 100050, *China*)

Abstract: PCR method was used to Construct multi-epitope gene ss1c containing HBV S(1-222AA), preS1(10-50AA) and C(1-30AA) gene. The fusion *ss1c* gene was cloned into the expression vector pPIC3.5k. The recombinant vector was transformed into the host cell of GS115 with electroporation method. After screening with G418 and inducing with methanol, the product was analyzed with Western blot and EIA. The fusion gene (SSIC) with the length of 906bp was successfully expressed in yeast system. The molecular weight of SS1C expressed protein was about 31kDa and virus-like particles with diameter of about 22nm were formed. The product had specific reaction with anti-HBs, anti-preS1 and anti-HBc mAbs. Whether SS1C is a promising candidate for therapeutic vaccine for control of chronic HBV infection needs to be further studied.

Key words: *Hepatitis B virus*(HBV); preS1; Core antigen; Antigenicity

摘要:以 HBV 全基因组质粒为模板,扩增出目的区段:S(1-222AA),preS1(10-50AA)和 C(2-30AA),以酶切-PCR 的方法进行连接,克隆入表达载体 pPIC3.5k,电穿孔转化后利用 G418 加压筛选出多拷贝整合菌株,诱导表达并对表达产物进行检测。结果显示融合后的基因为 ss1c,长度约为 906bp。在酵母中成功地进行了表达,表达产物(SSIC)的大小约为 31kDa,并形成直径约为 22nm 的病毒样颗粒。表达产物与 HBs 抗体、preS1 抗体和 HBc 抗体均有特异反应。为进一步研究治疗性疫苗提供了重要的基础。

关键词:乙型肝炎病毒;前 S1 抗原;核心抗原;抗原性

中图分类号:R373　　**文献标识码**:A　　**文章编号**:1003-5125(2005)05-0485-05

乙型肝炎的治疗仍是世界难题,研制治疗性的乙肝疫苗是众多尝试中的一种。研究表明在乙肝病毒感染恢复过程中,细胞免疫和体液免疫均发挥了重要作用,中和抗体在疾病恢复中起到重要作用,但细胞免疫出现得更早[1],伴随着 ALT 的升高和 HBeAg 和 HBsAg 的清除,这些免疫反应均由 CD4+和 CD8+的 T 细胞介导,细胞杀伤性途径[2]、非细胞毒性的途径、细胞因子介导的免疫机制[3]等对病毒的清除起到了重要作用,而且感染恢复以后,乙型肝炎病毒(*Hepatitis B virus*, HBV)特异的 T 细胞在机体中可存在几十年[4]。但慢性乙肝病毒感染者的 HBV 特异性细胞免疫水平相当低[5],因此对慢性乙肝的治疗诱导 HBV 特异性细胞免疫反应是关键环节之一。本研究旨在对能诱导产生中和抗体的表位、能诱导细胞免疫的 $CD8^+$ 特异性 CTL 表位和 Th1 表位进行融合构建,将融合基因在酵母系统中表达并对表达产物的抗原性进行分析。现将研究结果报告如下。

1 材料与方法

1.1 目的片段的 PCR 扩增

以含有 HBV 全基因组且无突变的质粒为模

收稿日期:2005-04-07,修回日期:2005-05-25

作者简介:黄维金(1977-),男,硕士,主要从事乙肝病毒和戊肝病毒的研究。

** 通迅作者:王佑春(1964-),男,研究员,博士生导师,主要从事肝炎病毒和人类免疫缺陷病毒的研究。

Corresponding author. Tel: 010-67017755-415, E-mail: wangyc@nicpbp.org.cn

© 1995-2006 Tsinghua Tongfang Optical Disc Co., Ltd. All rights reserved.

板[6],S区以C基因型的质粒Q60(GenBank序列号:AF479684)为模板,C、preS1以B基因型的质粒Q50(GenBank序列号:AF473543)为模板。采用Vent DNA聚合酶(Gene)扩增,切胶回收目的片段,S和preS1经限制性内切酶 *Pst* 1酶切(NEB),电泳回收,T_4 DNA连接酶(Promega)连接,连接产物适当稀释后取5μL作为模板,用引物sup和s1dp扩增出ss1片段,同样将ss1片断与C片断均经 *Eco*R V(NEB)酶切、回收、连接、引物sup和cdp扩增,得到ss1c融合基因片断。扩增的引物序列为:

S区引物 sup: *gcgaattca*ccatggagagcaccacatcagg

引物 Sdp: *cacgctactgca*gacaaaagaaaattggtaataagc

preS1区引物 s1up: *gttctgcag*ggcatggggacaatcttc

引物 s1dp: *cacgcggccgc*ctagatatccttgttgggttgaagtc

Core区引物 cup: *aggatatcg*acattgacccgtataaag

引物 cup: ctggcggccgctaaagatcacgaatggaagg

鉴定引物 5′AOX: gactggttccaattgacaagc

引物 3′AOX: ggcaaatggcattctgacatcctc

1.2 表达质粒的构建

ss1c融合基因的PCR产物与原始pPIC3.5k(Invitrogen)质粒分别用 *Eco*R I和 *Not* I双酶切(NEB),电泳回收,T4 DNA连接酶连接,连接产物转化DH5α感受态细胞,酶切鉴定筛选阳性克隆,得到酵母表达质粒命名为pPIC3ss1c。阳性克隆经测序证明无突变后诱导表达。

1.3 酵母细胞的转化

电转化感受态GS115细胞的制备:1)接种GS115单菌落于5mL YPD,30 ℃过夜培养。2)取0.1～0.5mL培养物接种于200mL YPD,培养至 OD_{600} 为1.3～1.5,离心后的菌体加入含25mmol/L DTT的YPD20mL,30 ℃摇30min。3)4 ℃,1500g离心5min,沉淀重悬于200mL预冷的无菌水。4)4 ℃,1500g离心5min,沉淀重悬于100mL冰预冷的电转缓冲液(10mmol/L Tris-HCl, pH 7.0, 270mmol/L蔗糖, 1mmol/L $MgCl_2$),重复两次。5)细胞用1mL的电转缓冲液重悬(10^9 cells/mL);电穿孔转化:取5～10μL(5-20μg)经 *Sal* I内切酶(NEB)线性化的DNA,与60μL感受态细胞混合,冰上孵育2 min,BTX830,电压280V,12ms,电击一次,立即加入1mL YPD培养基,转至1.5mL离心管,30 ℃摇床200r/min培养1h,涂于3～5个MD平板,30 ℃培养,2～5d菌落长出。

1.4 多拷贝整合转化子的筛选

1mL灭菌水冲洗MD培养基上的菌落,适当稀释,涂于不同浓度的YPD-G418平板,30 ℃培养48h,在高浓度的G418-YPD平板上生长最快的转化子,即为整合了高拷贝表达质粒的转化子。

1.5 直接PCR法筛选阳性克隆

取单菌落溶于10μL水,加5μL lyticase(5U/μL,sigma),30 ℃温浴20 min,液氮1 min,煮沸5 min,离心,取5μL作为模板。利用5′AOX1引物和3′AOX引物扩增,PCR循环条件为:95 ℃1 min、54 ℃1 min、72 ℃1 min,30个循环,72 ℃10 min。空质粒pPIC3.5K整合的菌落扩增产物大小为220bp,阳性克隆转化子的大小为表达蛋白的基因长度加上220bp。

1.6 重组蛋白在P. pastoris中的表达

Mut^+表型(甲醇快利用表型,MD和MM平板上生长没有差异)菌株的诱导:1)单菌落接种于25mL BMGY,28-30 ℃培养至OD值为2.0～6.0。2)1500-3000g室温离心5 min,细胞沉淀用100mL BMMY重悬至OD值约为1.0。3)28-30 ℃培养,转速不低于250r/min。4)每天加100%的甲醇至终浓度1%。5)间隔12h取样1.0mL,离心分离上清和细胞,诱导结束,破碎酵母细胞检测胞内表达产物。

1.7 发酵罐发酵培养

无机盐培养基(每升含有:H_3PO_4 8.9mL、$CaSO_4$ 1.0g、K_2SO_4 17.9g、$MgSO_4$ 14.7g、KOH 4.1g、甘油23.5mL)3L,121 ℃20min在线灭菌,氨水调节pH值至5.5,加15ml的微量元素PTM1(每升含有:$CuSO_4 \cdot 5H_2O$ 6.0g、NaI 0.08g、$MnSO_4 \cdot H_2O$ 3.0g、Na_2MoO_4 0.2g、硼酸0.02g、$CoCl_2$ 0.5g、$ZnCl_2$ 20g、$FeSO_4 \cdot 7H_2O$、Biotin 0.2g、H_2SO_4 5.0mL,过滤除菌)。

接种单菌落于400mL的BMGY培养基中,培养至 *OD* 值约8.0,收获菌体,转入发酵罐。开始转速400r/min,温度30 ℃,每3～4h监测记录溶氧、温度、pH值、菌体重量/mL、补料,并留样待发酵后分析。根据菌液的溶氧、pH值、*OD* 值变化,调节转速、空气、纯氧的加入量,选择甘油(葡萄糖)耗尽点进入诱导期。

1.8 抗原性的检测

取1mL诱导后的菌液5000g离心,菌体中加等量0.45mm的玻璃珠(Sigma),震荡器上剧烈震荡30s,冰浴30s,反复10次以上,离心,上清10倍系列稀释,乙型肝炎表面抗原和preS1抗原酶联免疫

© 1995-2006 Tsinghua Tongfang Optical Disc Co., Ltd. All rights reserved.

(ELISA)检测试剂盒检测融合蛋白中 S 和 preS1 部分,并且用 Western Blot 方法(Vector Laboratories 公司 ABC 试剂盒)检测其抗原性,anti-HBs 为中国药品生物制品检定所细胞室惠赠,anti-preS1 为上海新新生物制品公司惠赠。融合蛋白中 C(2-30AA)抗原部分利用检测 anti-HBc 的 ELISA 检测试剂盒(包被 HBcAg,标记 anti-HBc),表达产物与酶结合物首先在 37 ℃反应 60min,然后加入包被抗原的酶标板反应 60min,其余操作按试剂说明书进行。

1.9 电镜观察融合蛋白

将诱导后的酵母细胞,高压匀浆机破碎,离心取上清,加入等量 100 倍效价的单克隆抗体(anti-HBs,anti-preS1),37 ℃ 1h,4 ℃过夜,2 %磷钨酸负染后电镜观察。

2 结果

2.1 融合基因片段与表达质粒的构建

S 区(700bp)、preS1 区(146bp)、C 区(107bp)的 PCR 产物大小与预计长度一致。ss1 融合基因(817bp)和 ss1c 融合基因(906bp)的 PCR 产物大小也与预计的大小一致。将 ss1c 转化后细菌后挑选表达质粒阳性克隆,经双酶切鉴定筛选,说明获得了含 ss1c 基因的表达质粒。表达载体转化 GS115 后,挑选 MD 平板上的菌落,PCR 鉴定是否整合了表达盒,PCR 扩增后琼脂糖凝胶电泳的结果见图 1,空质粒 pPIC3.5K 整合后 PCR 产物大小为 220bp,整合 pPIC3ss1c 后为 1126bp。

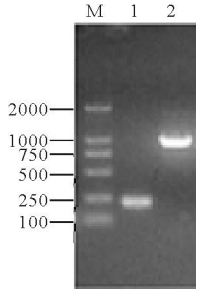

图 1 直接 PCR 鉴定阳性转化子

Fig 1 Direct PCR analysis of recombinant yeasts

Lane 1, Wild-type AOX1 gene alone from pPIC3.5k; Lane 2, 1126bp containing the gene of insert (ss1c) and flanking AOX1 sequence (220bp) from GS115/pPIC3.5k.

2.2 表达菌株的筛选和抗原性分析

采用乙型肝炎表面抗原和 preS1 抗原酶联免疫(ELISA)检测试剂盒对表达菌株进行筛选,共筛选 70 余株酵母可表达 HBsAg,其中有 18 株表达量较高,检测结果见表 1。对 18 株表达产物的 pre-s1 抗原也进行了检测,结果 preS1(10-50AA)与 S(1-222AA)间抗原性的反应强度具有较高相关性,利用 Pearson 检验,100 倍稀释和 200 倍稀释的相关性为 0.75,属于高度相关(0.7 以上为高度相关),10 倍稀释时检验结果为低度相关(相关性小于 0.3),可能是样品在 10 倍稀释时,由于抗原抗体反应的前带现象,未在 ELISA 的线性范围内。同时对融合蛋白的 C(2-30AA)抗原部分也进行了检测,显示也具有 C 抗原的活性。

表 1 18 株工程菌表达产物 S 和 preS1 片段的抗原性分析(S/CO)

Table 1 Antigenicity of S and preS1 determined by ELISA (S/CO)

Strains	10		100		200	
	preS1	S	preS1	S	preS1	S
1	12.6	20.6	6.8	15.8	1.7	3.6
2	16.5	21.9	14.0	19.6	3.9	10.5
3	15.0	20.5	8.2	15.9	1.7	5.8
4	15.5	21.6	7.1	18.3	2.2	6.5
5	13.9	20.2	5.6	16.3	1.2	4.2
6	15.7	21.6	15.4	23.4	4.9	17.1
7	17.4	19.8	13.9	22.0	4.4	14.8
8	17.7	21.4	14.8	21.7	3.8	12.6
9	18.7	20.2	18.8	22.3	8.8	12.2
10	16.8	24.3	15.4	20.4	4.8	10.3
11	17.5	21.0	8.3	12.2	2.2	3.6
12	17.9	23.2	7.5	17.7	3.3	5.6
13	10.6	23.0	3.6	18.2	0.8	7.4
14	17.0	23.3	10.8	20.2	4.9	16.0
15	17.7	22.3	13.4	20.7	4.2	9.6
16	16.8	23.4	14.1	20.3	4.2	8.8
17	18.7	23.9	17.8	21.7	7.6	19.7
18	15.9	22.5	9.3	14.4	2.7	3.6

2.3 诱导表达条件的优化选择

对酵母表达的动态进行了分析,在摇瓶培养的条件下,诱导以后培养 84h HBsAg 的表达量达到高峰。同时,对无机盐培养基高密度发酵后的抗原表达动态也进行了分析,在相同条件下破碎菌体,离心后取上清,10 倍稀释后检测 HBsAg,结果见图 2,可

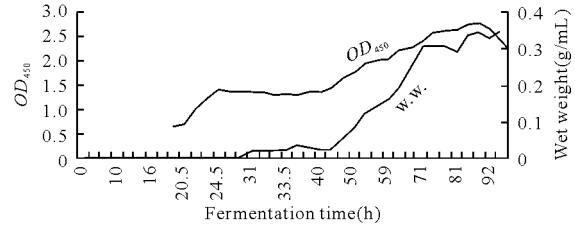

图 2 发酵罐发酵曲线图

Fig. 2 EIA results of HBsAg and weight of wet fungus at different fermentation time

© 1995-2006 Tsinghua Tongfang Optical Disc Co., Ltd. All rights reserved.

见在诱导3d后表达量达最高,同时菌体密度此时亦接近最高状态,故选在3d后收获菌体。

2.4 表达蛋白的抗原性及分子量的分析

选取一株表达量最高的菌株在优化条件下进行了高密度发酵,3d后收集菌体并破碎,然后取其上清进行WesBern blot的检测,结果见图3。图3-1为anti-HBs作为第一抗体的结果,可见表达蛋白对anti-HBs有特异性反应,图3-2为anti-preS1作为第一抗体的结果,可见表达蛋白对anti-preS1有特异性反应,SS1C融合蛋白分子量为31kDa,与预计目的蛋白的大小一致。

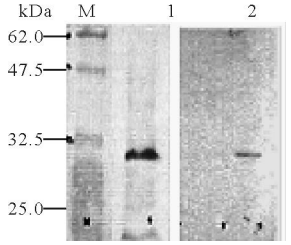

图3 重组蛋白Western Blot鉴定

Fig. 3 Western Blot (WB) analysis with protein of pPIC3ss1c.

M, Prestained protein standards; 1&2 indicate the protein of pPIC3ss1c was reactive to the monoclonal antibodies against HBs and anti-preS1 respectively

2.5 电镜观察SS1C融合蛋白

pPIC3ss1c的无机盐发酵产物,高压匀浆机破碎,加入等量1∶100效价的鼠anti-HBs和anti-preS1两种抗体,37℃1h,4℃过夜后进行磷钨酸负染,电镜观察。电镜观察到颗粒,类似S蛋白的颗粒,约为22nm。电镜照片如图4。

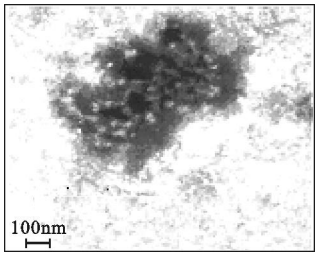

图4 SS1C融合蛋白表达产物的电镜观察照片(42.0K)

Fig. 4 Electron micrograph (×42,000) of fusion protein SS1C

3 讨论

临床试验表明,HBV核心区的CD8+T细胞表位(C18-27AA)和Th表位(破伤风类毒素)融合后形成的脂肽疫苗,在健康人和慢性乙肝感染者中均能诱导产生CD8+特异的T细胞反应,但不足以清除病毒[7]。同时脂肽疫苗的研究发现,HTL表位对于打破HBV抗原特异的免疫耐受具有重要的作用[8],preS1(21-47AA)是肝细胞膜结合位点,其抗体或单独的肽即能阻断HBV与肝细胞的结合;另外该表位也是Th1细胞免疫表位[9,10],对于辅助产生CD4+的体液免疫和CD8+的细胞免疫均具有非常重要的辅助作用。在急性乙肝恢复过程中,虽然细胞免疫的出现早于中和抗体(anti-HBs)的产生,但中和抗体在疾病恢复中也起到了重要作用[1],故本研究融合了CD8+的CTL表位(C18-27AA)、Th1辅助细胞表位(preS121-47AA)和中和抗体表位S,希望能打破乙肝的免疫耐受,激发HBV特异的细胞免疫和体液免疫,特别是CTL反应,达到清除病毒的作用。

Xu等将preS1融合在S的C端,在CV-1细胞中表达的SS1蛋白能形成22nm的颗粒,免疫小鼠能产生针对S和preS1的抗体[11]。本研究采用毕赤酵母表达系统,为促进基因的转录和表达,在融合基因起始子前增加了Kozak序列[12]。诱导后,SS1C成功地进行了表达,并形成了22nm左右的颗粒样结构。利用ELISA和WB检测证明了重组蛋白SS1C含有S/preS1/C三部分的抗原性。而且获得的工程菌株经过无机盐高密度发酵,在对表达产物进行检测时对破菌的pH、菌体重量、缓冲体系、破碎等条件进行有效控制下,工程菌的绝对表达量较高,有进一步研究其免疫原性的价值。

参考文献

[1] Rehermann B, Fowler P, Sidney J, *et al*, The cytotoxic T lymphocyte response to multiple hepatitis B virus polymerase epitopes during and after acute viral hepatitis [J]. J Exp Med, 1995, 181: 1047-1058.

[2] Moriyama T, Guilhot S, Klopchin K, *et al*, Immunobiology and pathogenesis of hepatocellular injury in hepatitis B virus transgenic mice[J]. Science, 1990, 248: 361-364.

[3] Guidotti L G, Rochford R, Chung J, *et al*, Viral clearance without destruction of infected cells during acute HBV infection[J]. Science, 1999, 284: 825-829.

[4] Rehermann B, Lau D, Hoofnagle J H, *et al*, Cytotoxic T lymphocyte responsiveness after resolution of chronic hepatitis B virus infection[J]. J Clin Invest, 1996, 97: 1655-1665.

[5] Chisari F V, and Ferrari C. Hepatitis B virus immunopathogenesis[J]. Annu Rev Immunol. 1995, 13: 29-60.

[6] 黄维金, 张华远, 王佑春, 等. 乙型肝炎病毒全基因克隆及序列分析发现一D/C基因型重组株[J]. 中华微生物学和免疫学杂志, 2003, 23: 418-422.

[7] Heathcote J, McHutchison J, Lee S, *et al*, A pilot study of the CY-1899 T-cell vaccine in subjects chronically infected with hepatitis B virus[J]. Hepatology, 1999, 30: 531-536.

© 1995-2006 Tsinghua Tongfang Optical Disc Co., Ltd. All rights reserved.

[8] Livingston B D, Alexander J, Crimi C, *et al*, Altered Helper T Lymphocyte Function Associated with Chronic Hepatitis B Virus Infection and its Role in Response to Therapeutic Vaccination in Humans[J]. J Immunol, 1999, 162: 3088-3095.

[9] Qiao M, Macnaughton T, Gowans E J. Adosorption and penetration of hepatitis B virus in a nonpermissive cell line[J]. Virology, 1994, 201: 356-363.

[10] Milich D R, Hughes J L, McLachlan A, *et al*, Hepatitis B synthetic immunogen composed of nucleocapsid T-cell response sites and an envelope B cell epitope[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 1988, 85: 1610-1614.

[11] Xu X, Li G D, Kong Y Y, *et al*, Mimovirus: a novel form of vaccine that induces hepatitis B virus-specific cytotoxic T-lymphocyte responses in vivo[J]. J Gen Virol, 1994, 75: 3673-3677.

[12] Kozak M. Point mutations define a sequence flanking the AUG initiator codon that modulates translation by eukaryotic ribosomes[J]. Cell, 1986, 44: 283-292

《真菌传播的植物病毒》出版发行

由中国工程院院士郭予元、陈宗懋作序,陈剑平研究员等编著的《真菌传播植物病毒》一书日前由科学出版社出版。该书是我国首部真菌传播的植物病毒专著。全书共分 14 章,以作者多年在禾谷多黏菌及其传播的麦类病毒研究成果基础上,结合国内外真菌传植物病毒研究现状编著而成。第 1 章是总论。第 2～9 章介绍由真菌传播的 40 多种植物病毒生物学、血清学、分子生物学和防治的知识,第 10～14 章对目前已知的真菌介体特征、培养和操作方法、传播病毒特性和传播病毒分子基础进行描述。此外,书后还附了 170 余版制作精美,特征明显的病害症状彩色照片和病毒粒子、真菌介体超微结构电子显微镜照片。

全书基本上反映了真菌传播的植物病毒研究历史和全貌,可供从事植物病毒学、植物病理学、真菌学、生物学、分子生物学、植物检疫和电子显微镜的科研教学工作者、高等院校师生和农业生产技术人员参考。

该书为大 16 开精装,共 629 页,148 万字,每本订价 230 元。需要订阅者,请与浙江省农业科学院病毒学与生物技术研究所程晔联系。

地　　址:杭州市石桥路 198 号
邮　　编:310021
联系电话:0571-86404258。E-mail:chengye1969 @163.com

© 1995-2006 Tsinghua Tongfang Optical Disc Co., Ltd. All rights reserved.