

乙型肝炎表面抗原基因在酵母中的表达

何葆光 黄培仁 李育阳* 诸慧嘉 郎文华
吴国泰 戴耀勋 黎志豪**

(卫生部上海生物制品研究所, 上海)

本文报道用酵母磷酸甘油酸激酶 (PGK) 5'端侧翼顺序作为启动子与克隆化的乙肝病毒DNA或乙肝表面抗原 (HBsAg) cDNA 的HBsAg编码顺序相连, 组装成大肠杆菌-酵母穿梭质粒, 使酵母合成HBsAg。酵母表达的HBsAg装配成20nm颗粒并有免疫原性。

关键词: 乙型肝炎; 酵母; 基因表达; 磷酸甘油酸激酶启动子。

乙型肝炎简称乙肝, 是世界上广泛传播的一种病毒性疾病。我国属高发区, 仅带毒者就有一亿人左右。由于母婴之间能垂直传播乙肝, 婴儿免疫功能低, 感染后约有90%演变为慢性带毒者^[1], 故严重威胁后代的健康。不仅如此, 乙肝与原发性肝癌的发生有关, 故迫切需要乙肝疫苗来控制这两种疾病的发生。但采用一般制备病毒疫苗的组织培养方法研制乙肝疫苗, 至今尚未成功。目前市售的乙肝疫苗是用乙肝带毒者的血浆为原料, 经多步纯化及灭活后制成, 在安全性、原料来源及价格方面都存在一些问题。因此, 人们转向采用基因工程或人工合成的方法来研制疫苗, 其中最有可能的是基因工程疫苗。

乙肝病毒是直径为42nm的球形颗粒, 可分为表面的包被和27nm的核心两个部分。表面的包被无感染性, 其抗原称为乙肝表面抗原 (HBsAg)。提纯的HBsAg是乙肝疫苗的有效成分。在患者血中经常存在着单由病毒包被组成的直径为22nm的球形或长形颗粒。病毒的核心是有感染性的。核心中除乙肝核心抗原 (HBcAg) 外,

还含有乙肝病毒的基因组——一个长度约为3200核苷酸的部分双链DNA分子。

乙型肝炎病毒基因工程开始于1978年^[2], 至今乙肝的三个常见亚型 adw、adr、ayw 的病毒DNA均已克隆化^[3-8], 并定出其内切酶谱。三种亚型基因组的全长序列分析也已完成^[6-8], 故HBsAg和HBcAg编码顺序在整个基因中已能准确定位。由于HBcAg和HBsAg编码顺序二者相距1000多个核苷酸, 在基因加工中很容易把制备疫苗所需的HBsAg基因与HBcAg基因分开。

乙肝病毒DNA克隆成功以后, HBcAg很快就在大肠杆菌中得到表达^[9, 10]。但作为疫苗重要成分的HBsAg在大肠杆菌中的表达一直不顺利, 表达产物大部为融合蛋白。我们用cDNA在大肠杆菌中进行

本文于1984年10月24日收到。

* 复旦大学遗传学研究所, 上海

** 贝勒医学院 休斯敦, 美国

参加本工作的还有黄彩凤、贾立斌、徐国祥、王宸、韩志芳等同志。电镜照片由上海市防疫站测试中心陆秀英同志代为摄制。徐国祥同志制绘图表, 胡齐全同志帮助整理部分资料, 特此致谢。

表达试验,产物虽非融合蛋白但也不稳定^[11],难以成为疫苗原料。人们转向用真核细胞系统。目前最有希望的是酵母表达系统。自从 Valenzuela 等^[12]首先在 1982 年报道成功地使 HBsAg 在酵母中表达及装配成 22nm 颗粒以来,其他实验室也得到类似的结果^[13,14]。该工作迅速发展并用于乙肝疫苗的试生产。根据黑猩猩^[15]及人体试验^[16]的结果显示出酵母基因工程乙肝疫苗与市售从人血浆制备的乙肝疫苗效率相当,而安全性及原料来源较后者为优。

我们在 HBsAg 互补脱氧核糖核酸(cDNA)^[17]及乙肝病毒 DNA^[18]克隆成功的基础上,已使 HBsAg 分别在大肠杆菌^[11]、哺乳动物细胞^[18]及酵母^[19]中得到表达。本文报道用酵母磷酸甘油酸激酶(PGK)启动子使 HBsAg 在酵母中表达,其产物在酵母中装配成约 20nm 的颗粒,并诱发豚鼠产生特异性抗 HBsAg 抗体。

材料和方法

(一) 酶和其他重要试剂

所有限制性内切酶、T₄连接酶、BAL31核酸酶、寡聚核苷酸激酶、T₄DNA聚合酶及 Klenow 片段均购自 Bethesda Research Laboratories。接头(linker)购自 New England BioLabs。³²Pγ-ATP、³²Pα-dCTP 和 ³²Pα-TTP 购自 Amersham 或 New England Nuclear。蜗牛酶购自 Endo Laboratories INC。豚鼠及绵羊 HBsAg 抗血清,HBsAg 的抗原或抗体检测用酶标试剂、绵羊抗豚鼠 IgG 抗血清均由本实验室制备^[20]。

(二) 质粒加工的方法

限制性内切酶消化按 Bethesda Rese-

arch Laboratories 推荐条件进行。1μg DNA 用 1 单位酶消化 3—5h。用 1% 琼脂糖水平电泳,Tris-醋酸盐缓冲液 pH8.0^[21],或 5% 聚丙烯酰胺垂直电泳,Tris-硼酸盐缓冲液 pH8.4^[22],对酶消化后的 DNA 进行分析,溴化乙锭染色。所需 DNA 片段的制备是用 200μg 重组质粒 DNA 经内切酶消化,电泳分离,切去含所需片段的凝胶置透析袋中,用电泳洗脱法收集 DNA 片段,然后用冷酚抽提,乙醇沉淀,存于 10mM Tris-HCl pH7.5, 1mM EDTA 中。

重组质粒装配时,质粒用适当限制性内切酶切割后,再用细菌碱性磷酸酶处理。在 T₄连接酶作用下(0.1u/μg DNA)与插入 DNA 片段相连后转化入大肠杆菌 HB101 中,如 DNA 片段的两端要进行改造,则在片段抽提后先用 BAL31 核酸酶(0.005—0.01 u/μg DNA)从两端进行消化,用时间控制切去 DNA 的长度。按 Maniatis 等介绍的方法^[23],连上人工合成的接头,再与上述经酶处理的质粒相连后克隆化。缺口翻译法标记 DNA 是按文献[21]所描述的步骤进行的。DNA 探针的比活性为 0.5—4 × 10⁸cpm/μg。用探针进行原位杂交^[24],选出重组体。按 Birnboim 等法^[25]进行微量质粒分析。按 Katz 等法从澄清的细菌溶解物抽提重组质粒 DNA^[26]。用 Maxam 和 Gilbert 法进行核苷酸序列分析^[22]。

(三) 酵母中表达产物检定

酵母的转化按文献[27]描述的方法进行。用 ³²P 标记的 HBsAg DNA 为探针,以原位杂交筛选出阳性菌落,再用机械法打碎。上清液经高速离心澄清后,测定其 HBsAg 表达情况。

放射免疫双抗体法:用 ¹²⁵I 标记 HBsAg^[28],用豚鼠抗 HBsAg 第一抗体,

绵羊抗豚鼠IgG为第二抗体。用竞争法测定破碎菌上清液中HBsAg。

HBsAg 的对流免疫电泳及酶联免疫吸附分析法 (ELISA) 均按上海生物制品研究所的试剂盒产品操作常规进行。豚鼠HBsAg抗体的测定按 Voller等^[20]的改良法进行。

酵母破碎菌上清液中 HBsAg 的亲层析提纯法按文献[30]描述的方法进行。HBsAg 的分子量用豚鼠抗 HBsAg 及绵羊抗豚鼠IgG双抗体沉淀后经SDS 聚丙烯酰胺电泳测定^[31]。银染色法按文献[32]所述方法进行。

(四) 质粒的组建

1. HBsAg 基因的加工：用 *xho* I 和 *Bam*HI 限制性内切酶把含 HBV DNA (adr亚型) 的质粒^[8] pHBV 切为三段 (图 1)。即 4.3Kbp 的 pBR322 线性质粒、1.9Kbp 的含 HBsAg 编码区的 HBV DNA 大片段及 1.3Kbp 含 HBsAg 编码区的小片段。用制备电泳抽提出小片段。

用 *Pst* I 限制性内切酶把含 HBsAg cDNA (ad亚型) 的质粒^[7] pCHBs 中的 cDNA 切割并抽提出来。

用 BAL31 核酸酶切去以上两种含 HBsAg 全部编码的 DNA 片段两端的粘性末端，同时也切去末端附近的顺序。接上 *Eco*RI 接头，再克隆入 pBR322 的 *Eco*RI 位点。由于 BAL31 核酸酶切割的长度是随机的，得到的次级克隆中 HBsAg 基因长度不一。HBsAg 编码顺序中 *xha* I 的切点只有一个，离起始编码 100bp。故用微量质粒分析、5% 聚丙烯酰胺电泳查出 *xba* I 和 *Eco*RI 切点间的距离，凡大于 106bp 者，应含有起始编码 ATG。结合核苷酸序列分析得知接头准确位置。选择保留 HBsAg 全部编码顺序，同时 5' 端非编码顺序尽量少的质粒待用。

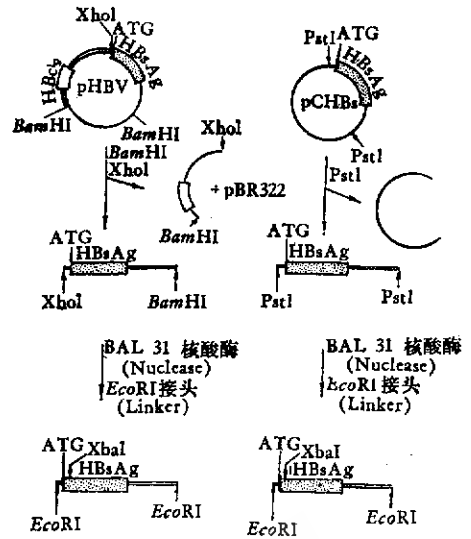


图 1 HBsAg 基因片段的制备
Fig1 The preparation of the HBsAg gene fragments

2. 启动子的加工：实验用启动子是从一含酵母磷酸甘油酸激酶 (PGK) 基因的质粒 pSBP-1 加工得来的，该质粒所含的 PGK 基因长度为 3.0Kbp 左右，内外各有一个限制性内切酶 *Eco*RI 切点。为消灭一个切点，我们用 *Eco*RI 对该质粒进行部分消化，收集含单切口的线性质粒，用 DNA 聚合酶 I Klenow 片段补齐末端，在 *T*₄ DNA 连接酶作用下，重新环化并克隆入大肠杆菌 RRI 中，选出并保留只在 PGK 基因内部有 *Eco*RI 单切点的菌株 (图 2)。抽提其质粒，用 *Eco*RI 内切酶切开，以 BAL31 核酸外切酶把 PGK 的编码顺序及 3' 端非编码顺序切去到适当长度。再接上 *Eco*RI 接头，重新环化并克隆化，得到许多含不同长度 PGK 基因片段质粒的菌株。用微量质粒分析结合核苷酸序列分析，对以上菌株中的质粒进行大量筛选工作，找到 PGK 编码的起始部位，选择 *Eco*RI 接头接在 PGK 起始编码附近的菌株，抽提质粒命名为 pPGK 待用 (图 3)

3. PGK 启动子与 HBsAg 基因的连

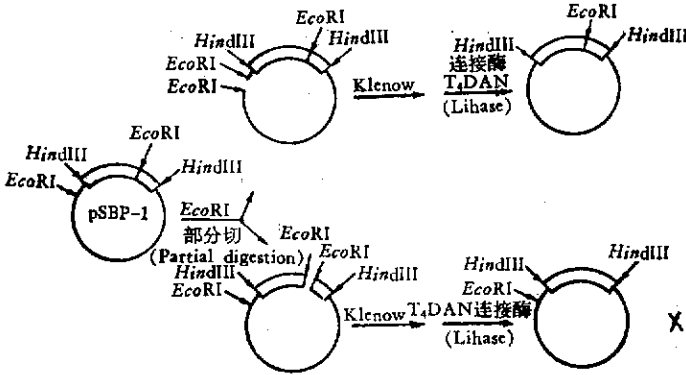


图2 PGK启动子的制备之一
Fig 2 The preparation of PGK promotor (1)

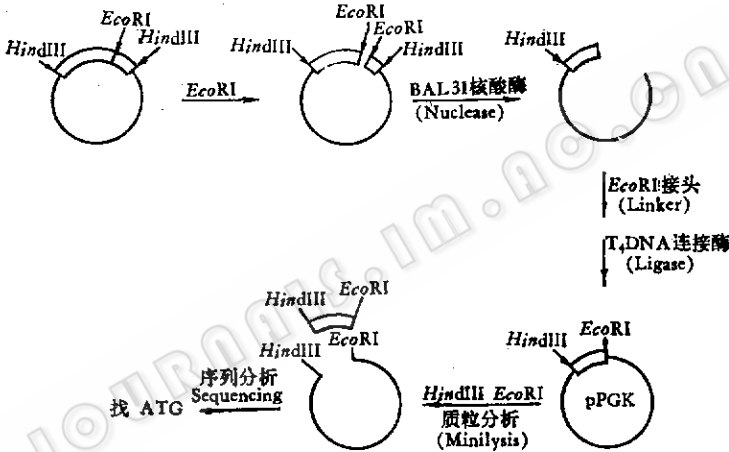


图3 PGK启动子加工之二
Fig 3 The preparation of PGK promotor (2)

接：pPGK质粒用EcoRI内切酶切开后与已带上EcoRI接头的HBsAg基因片段相连，克隆入大肠杆菌HB101。HBsAg基因与PGK启动子相接的机会会有正反两种。用 xba I、HindIII内切酶双切来鉴定，选出HBsAg基因是顺启动子的5'到3'方向排列的质粒(图4)。因 xba I切点离HBsAg的起始编码100个碱基对，故正接质粒的HindIII、 xba I小片段比原pPGK质粒的PGK启动基因片段(HindIII、EcoRI双切)只长100多个碱基对。若在pPGK质粒中带有PGK起始编码者，再用序列分析选出阅读框架正确的质粒。由于PGK启

动子及两种HBsAg基因都用过BAL31核酸酶进行加工，故均有长度不同的一些次级克隆。选择装配成十余种PGK启动子-HBsAg基因接头处核苷酸序列不同的质粒，统称pPHBs质粒。选用的序列范围是：(以起始编码ATG的A作为0，向5'端上游方向为负数，向3'端方向为正数)PGK启动区保留-14到+10位核苷酸者。HBsAg DNA片段保留-5到+1位者。HBsAg cDNA片段保留-26到-14位核苷酸者。接头处的核苷酸序列举二例如下：

1. 5' TTTTACAACAAATATAAAA GGAATTCC CATGGAGAACACA 3'
 PGK EcoR I HBsAg DNA

2. 5' AAAACAATGTCTTTATC GGAATTCC CGAGGACTGGGGACCCTGCACCGAACATGG-
 AGAACATT 3'
 PGK EcoR I 接头 HBsAg cDNA

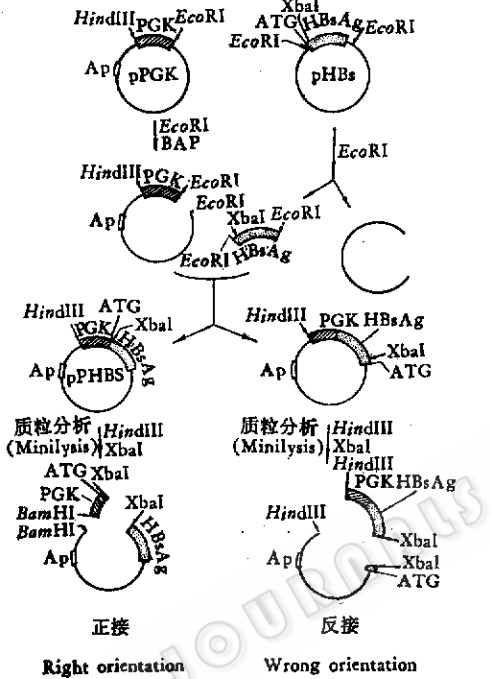


图4 PGK启动子与HBsAg基因片段的连接
 Fig4 The ligation of PGK promoter and HBsAg gene fragments

(五) 总装配

把含 PGK启动子和 HBsAg 基因的片段, 用 *Sal* I、*Hind* III 内切酶从 pPHBs 质粒中切割并抽提出来。克隆入含酵母 2 μ 质粒片段和亮氨酸基因的质粒 pY2L 中。后者用 *Hind* III 全切后, 再用 *Sal* I 部分消化。按图 5 所示进行装配。得到含 HBsAg 基因的酵母-大肠杆菌穿梭质粒。

或用另法装配: pYEP61 及 p2LSal 分别为带 *Hind* III 及 *Sal* I 粘性末端的酵母 2 μ 质粒及亮氨酸基因的质粒, 用 *Hind* III (或 *Sal* I) 把 2 μ 及亮氨酸顺序切出后直接克

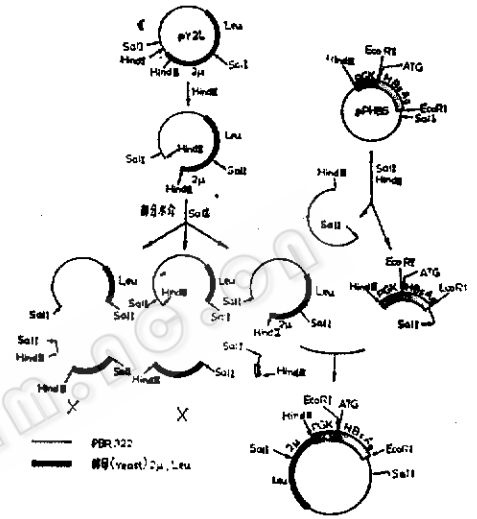


图5 HBsAg表达穿梭质粒总装配
 Fig5 The final construction of the shuttle plasmid for HBsAg expression

隆入 pPHBs 的 *Hind* III (或 *Sal* I) 位点, 组成穿梭质粒。

组装完毕的穿梭质粒输入酵母 DC04 ([*cir*⁺] *adel leu2-04*) 中, 用缺乏亮氨酸的培养基选出转化菌株。

结 果

对上述选择培养基上长出的酵母菌落进行检定。

HBsAg 基因片段经缺口翻译法用 ³²P 标记后为探针, 与菌落进行原位杂交。用杂交试验阳性的菌球 (被抽查者全为阳性) 进行表达产物的鉴定。

(一) 放射免疫分析

采用放射免疫双抗体法检测酵母破菌上清液中的 HBsAg。先制竞争抑制曲线(图6),然后测定10个阴性对照样品

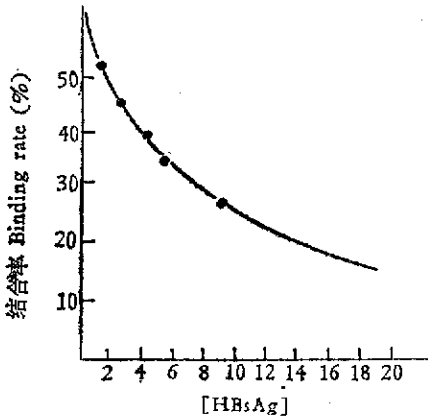


图6 放射免疫分析RIA双抗体法测定酵母菌产生的HBsAg

Fig.6 Detection of HBsAg produced by yeast cells using radiomunoassay (double antibody method)

最上面点: 10只阴性样品平均值减5个标准差
Average value of 10 negative control samples - 5x standard deviation
其他点: 产HBsAg酵母菌株的结果
Results from HBsAg produced by positive yeast strain

(除HBsAg与PGK接头的阅读框架错误外,其余均与实验样品相同)脉冲数,取其平均值,减去5个标准差($\bar{x} - 5SD$),得出其百分结合率。凡是测待样品的百分结合率低于该值($55\% - 3\% = 52\%$)者,就是HBsAg阳性表达菌。这样,选出了一批表达阳性的酵母菌株。以上为初期实验的结果。凡阅读框架正确的质粒,输入酵母后均能表达。但阅读框架不正确者,与原宿主菌株一样,均无表达。随着工作的进展,HBsAg表达量逐步增多。未用不含PGK本身起始编码的质粒,HBsAg表达量也高,用其他免疫学方法也能顺利检测,故常规测定改为酶联免疫分析ELISA和对流免疫电泳CEP法。

(二) 酶联免疫吸附分析(ELISA)

采用对流免疫电泳原倍的HBsAg阳性血清为阳性对照,以正常人血清及上述阴性酵母破菌上清为阴性对照。检测酵母上清液中的HBsAg的表达量。结果不论用HBsAg本身的起始编码或PGK基因的起始编码为翻译起始点者,其HBsAg浓度较阳性对照强8到50倍(2ml酵母上清液/g菌体湿重)。表达的HBsAg在酵母菌体内,培养液的HBsAg为阴性。

(三) 对流免疫电泳

用酵母上清液在琼脂糖上作对流免疫电泳,样品进行对倍连续稀释。图7表示各阳性转化菌溶菌上清的对流免疫电泳结果,在1:128稀释度均可见阳性沉淀弧。阴性对照菌则全无线条(图中未予显示)。从一个菌落扩大到30l培养,连续20批所得酵母上清液的HBsAg平均对流免疫电泳滴度略高于1:64(1.5ml上清液/g菌体湿重)。

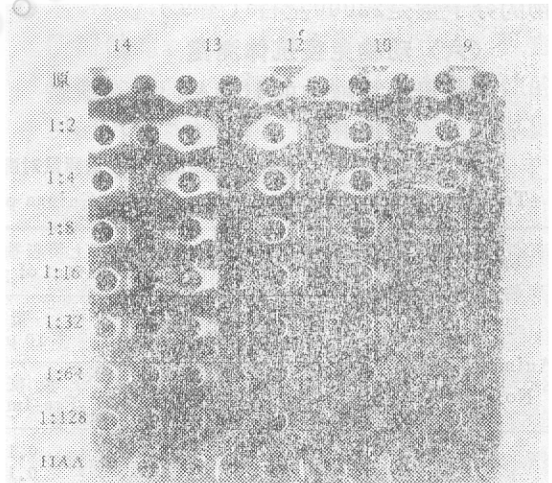


图7 酵母菌上清液中HBsAg对流免疫电泳结果
Fig.7 Detection of HBsAg in yeast supernatant by counter electrophoresis

(四) 电镜观察

阳性转化菌溶菌上清液通过由羊抗-HBs和Sepharose 4B交联的亲的和层析柱,清洗后用5M NaI解离经透析得到纯化样品,经电镜观察直径约20nm颗粒(图8)。

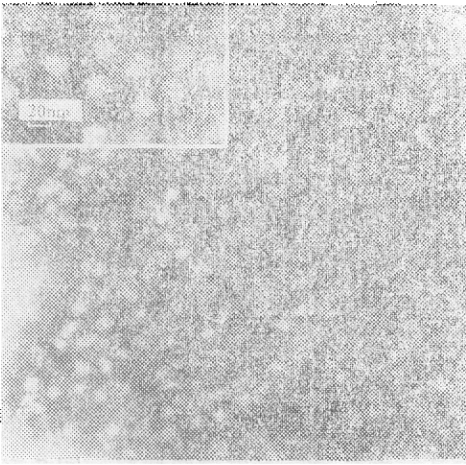


图8 酵母产生的HBsAg颗粒电镜照片

Fig. 8 Electron micrographs of HBsAg particles produced by yeast cells

(五) 分子量测定

HBsAg 表达阳性酵母菌及对对照菌溶菌上清, 用豚鼠抗-HBs血清及绵羊豚抗鼠IgG血清双抗体沉淀后, 经SDS聚丙烯酰胺电泳银染色法^[31, 32], 测得表达产物的分子量是23000左右(图9)。

(六) 动物免疫抗体测定

将酵母上清液中的HBsAg用硫酸铵

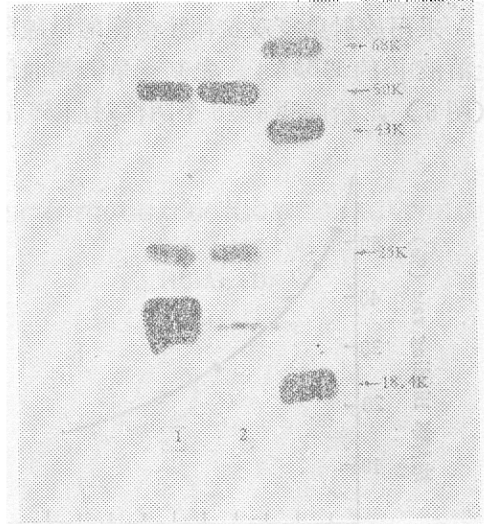


图9 SDS聚丙烯酰胺电泳银染色法测酵母HBsAg分子量

Fig. 9 Molecular weight of HBsAg from yeast cells by SDS polyacrylamide gel electrophoresis followed by silver staining

1. HBsAg 阳性酵母菌上清液的双抗体沉淀物
Precipitate of double antibody from positive yeast supernatant
2. 阴性对照酵母菌上清液的双抗体沉淀物
Precipitate of double antibody from negative yeast supernatant
3. 标准分子量蛋白质
Molecular weight of standard protein

表1 ELISA测定法豚鼠对酵母HBsAg的免疫应答反应

Table 1 Detection of immune response in Guinea pigs to HBsAg produced by yeast cells using ELISA

动物号 Animal No.	稀释度 Dilution	阳性菌溶菌上清粗抽提物 Crude extract from supernatant of positive yeast lysate				阴性菌溶菌上清粗抽提物 Crude extract supernatant of negative yeast lysate	
		蛋白含量 40μg/只 40μg protein/animal		蛋白含量 10μg/只 10 μg protein/animal		蛋白含量 100 μg/只 100μg/animal	
		免疫前 pre-immune	免疫一针后21天 21 days after one inoculation	免疫前 Pre-immune	免疫一针后21天 21 days after one inoculation	免疫前 Pre-immune	免疫一针后21天 21 days after one inoculation
1	1:4	0.165	> 2	0.109	> 2	0.061	0.138
	1:20	0.160	> 2	0.114	> 2	0.029	0.093
	1:80	0.129	> 2	0.071	> 2	0.033	0.063
2	1:4	0.093	> 2	0.112	> 2	0.100	0.086
	1:20	0.090	> 2	0.084	> 2	0.086	0.042
	1:80	0.094	> 2	0.065	> 2	0.052	0.030
3	1:4	0.094	> 2	0.099	> 2	0.070	0.060
	1:20	0.092	> 2	0.077	> 2	0.042	0.058
	1:80	0.084	> 2	0.066	> 2	0.035	0.038
平均 Average	1:4	0.117	> 2	0.107	> 2	0.077	0.095
	1:20	0.114	> 2	0.092	> 2	0.052	0.064
	1:80	0.102	> 2	0.067	> 2	0.040	0.044

等法初步提纯后, 免疫豚鼠。用阴性菌溶菌上清同法处理为对照。免疫21天后取血与同一豚鼠免疫前血清作对比。用ELISA法测定抗体, 包被聚苯乙烯96孔板用的纯HBsAg是用亲和层析法从患者血浆中提纯的^[30]。用相同纯抗原免疫豚鼠所得血清为阳性对照。阳性溶菌上清抽提物40 μ g组和10 μ g组经免疫一针后, 血清HBsAg抗体都有明显的增高, 比色结果见表1。

讨 论

本文报道的HBsAg在PGK启动子控制下在酵母中的表达与国外同类报道^[12-14]的结果相比都能形成颗粒状, 并有相似的分子量、抗原性及免疫原性。在用PGK的起始编码作为翻译起始点的表达试验看出, 阅读框架正确的, 酵母中有HBsAg出现; 阅读框架不对HBsAg就不出现。

本文所报道的HBsAg cDNA在酵母中的表达是以前未报道过的。表达产物的抗原性是好的, 分子量略小于HBsAg DNA的表达产物(另文报道)。

Hitzeman等^[14]用PGK启动子控制HBsAg在酵母中表达, 其表达产物只有2—5%是聚合型的。我们同样也用PGK启动子, 以超滤截留的现象来看, 绝大部分酵母HBsAg都不是游离的。在我们用Amicon XM100超滤膜(截留分子量10万)来浓缩酵母上清液时, 其滤出液中HBsAg用ELISA检测, 十余次全为阴性。与此同时截留液中HBsAg能回收80%或更多。由于颗粒形式的HBsAg的免疫原性较游离型高很多倍, 这可能是我们酵母表达的HBsAg免疫原性好的原因。

PGK启动子的完整性对HBsAg的表达是有影响的。如缺少起始编码前14个核

苷酸的表达量要低于有完整顺序的1—2倍。如缺得更多, 表达量更少。将另文讨论启动子完整性及总装配对表达量的影响。此外, ELISA测酵母HBsAg的结果往往比对流免疫电泳低1—2个滴度。这与国外同类报道中RIA测定的结果偏低相类似。

上述用HBsAg DNA本身的起始编码为翻译起始点的酵母产生的HBsAg为非融合蛋白。故可用于作为乙肝疫苗生产的原料。当然还需要进行氨基酸序列分析及表达质粒的核苷酸序列分析, 以便核对在重建质粒过程中HBsAg基因有无发生变异的情况。用酵母HBsAg制成的乙肝疫苗, 按目前发展的趋势来看, 将成为第一个人类用基因工程生产的疫苗。与用患者血浆所制乙肝疫苗相比酵母可大量无限繁殖, 成本低, 故从原料来源和价格来讲, 它是有可能解决人类乙型肝炎预防所需量的。由于酵母来源的HBsAg不直接取自人血, 可避免一些对人有危险性的引起AIDS的病毒, 乙肝病毒等。在基因工程加工过程中(图1)HBsAg基因已被切去, 制成的疫苗不可能使人感染肝炎, 故疫苗检定的步骤中可略去昂贵的黑猩猩试验。疫苗制备过程中也可不用象胃蛋白酶消化及尿素处理这类对抗原性影响大的处理步骤。尽管酵母产生的HBsAg没有糖化, 但制成的疫苗免疫原性可不差于血浆疫苗^[16]。我们的表达产物存于酵母细胞内, 提纯制备疫苗需要较多的步骤, 但对HBsAg聚合成免疫原性好的颗粒状是有好处的。

虽然我们得到了有较高表达能力的酵母菌株, 但尚有不少有待改进之处。如启动子与HBsAg接头处还有EcoRI接头存在, 还需更精细的加工。质粒的装配及分泌称高表达启动子的加工, 宿主菌株方面

也有不少工作有待进行。酵母的培养条件更需改进。据估计,经过改进,表达量还可进一步提高。

参 考 文 献

- [1] Beasley, R.P. et al.: *Am J. Epidemiol*, 105:94, 1977.
- [2] Fritsch, A. et al.: *C R Acad. Sc. Paris*, 287:1453, 1978.
- [3] Sninsky, J. et al.: *Nature*, 279:846, 1979.
- [4] Burrell, C.J. et al.: *Nature*, 279:43, 1979.
- [5] Valenzuela, P. et al.: *Nature*, 280:815, 1979.
- [6] Fujiyama, A. et al.: *Nucl. Acids Res.*, 11:4601, 1983.
- [7] Galibert, F. et al.: *Nature*, 281:646, 1979.
- [8] Valenzuela, P. et al.: *Animal Virus Genetics*, Fields, B. et al. eds, Academic Press N. Y., 1980, p57.
- [9] Pasek, M. et al.: *Nature*, 282:575, 1979.
- [10] Edman, J.C. et al.: *Nature*, 291:503, 1981.
- [11] 何葆光等:自然杂志, 7:478, 1984.
- [12] Valenzuela, P. et al.: *Nature*, 298:347, 1982.
- [13] Miyahara, A. et al.: *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 80, 1983.
- [14] Hitzeman, R. A. et al.: *Nucl. Acids Res.*, 11:2745, 1983.
- [15] McAleer, W.J. et al.: *Nature*, 307:178, 1984.
- [16] Scelnick, E.M. et al.: *JAMA*, 251:2812, 1984.
- [17] 何葆光等:中国科学, B辑, 1984年, 第5期, 441.
- [18] 何葆光等:自然杂志, 6:952, 1983.
- [19] 何葆光等:自然杂志, 6:879, 1983.
- [20] 上海生物制品研究所等:生物化学与生物物理学报, 9:347, 1977.
- [21] Lai, E.C. et al.: *Cell*, 16:201, 1979.
- [22] Maxam, A. M.: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 74:506, 1977.
- [23] Maniatis, T. et al.: *Molecular Cloning, A laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory, 1982, p396.
- [24] Grumstein, M. et al.: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 72:3961, 1975.
- [25] Birnboim, H.C. et al.: *Nucl. Acids Res.*, 7:1513, 1979.
- [26] Katz L. et al.: *Biochem*, 16:1677, 1977.
- [27] Sherman, F. et al.: *Methods in Yeast*, Cold Spring Harbor Laboratory, 1974, p.90.
- [28] 上海实验生物研究所等:生物化学与生物物理进展, 1975年, 第1期, 31.
- [29] Voller, A.: *J. Clin. path.*, 31:507, 1978.
- [30] 上海生物制品研究所:生物制品资料选编, 1975年, 第2期, 19.
- [31] Laemmli, U.K.: *Nature*, 227:680, 1970.
- [32] 张向明:生物化学与生物物理进展, 1983年, 第3期, 63.

THE EXPRESSION OF THE GENE CODING FOR HEPATITIS B SURFACE ANTIGEN IN YEAST

Ho Baokuang Huang Peiren Li Yoyang Zhu Huijia Lang Wenhua

Wu Guotai Dai Yaoxun Eugene C. Lai

(Shanghai Institute of Biological Products, Ministry of Public Health, Shanghai)

The hepatitis B surface antigen (HBsAg) has been synthesized in yeast by placing coding sequence for HBsAg from a hepatitis B virus DNA or a HBsAg cDNA clone, under the control of the 5' flanking region of yeast phosphoglycerokinase (PGK) as a pro-

motor in a *E. coli*-yeast shuttle plasmid. The expressed HBsAg produced in yeast were assembled into 20 nm particles and were immunogenic.

Key words

Hepatitis B; gene expression; PGK promoter