

重组痘苗病毒表达乙肝核心抗原基因的研究

韩素文 祝庆余* 赵立权 方继明

(军事医学科学院生物工程研究所, 北京)

pMM2066质粒以EcoR I酶切回收ATG前只有12bp的乙肝核心抗原基因片段, 将此基因片段插入痘苗转移载体pGJP-5的P7.5启动子后, 组成P5-C2066质粒, 通过细胞内同源重组技术, 于BUdR存在条件下用人TK⁻143细胞筛选出三株能表达HBcAg的重组痘苗病毒株。感染细胞上清液1:64稀释时仍能用ELISA法测到HBcAg活性, 同时也能测到滴度相近的HBeAg活性。免疫电镜可见平均为26.6nm的HBcAg颗粒。进行了不同量的重组痘苗病毒感染不同细胞, 和不同培养温度对HBcAg表达影响的观察。

关键词 重组痘苗病毒; HBcAg及HBeAg

1982年美国Moss及Paoletti^[1,2]实验室相继报道了重组痘苗病毒表达乙肝表面抗原基因以来, 迄今至少已有34种外源基因被重组到痘苗病毒中并获得表达^[3,4]。一方面重组痘苗病毒在感染细胞后其基因表达产物或在细胞表面或分泌至培养液中, 另一方面由于重组痘苗病毒仍具有痘苗病毒的感染性, 有希望发展成一种新型的经济而有效的活疫苗, 因而受到国内外学者重视。乙肝核心抗原(HBcAg)基因在大肠杆菌获得高表达, 国内外已报道^[5,6]。但以痘苗病毒为载体表达HBcAg基因的研究甚少, 国内尚未见报道。本文简要报道HBcAg基因在重组痘苗病毒中表达的一些研究结果。

材料与 方法

(一) 材料

1. 病毒: 痘苗病毒天坛761株, 来自卫生部北京生物制品检定所, 由医科院病毒研究所惠赠。病毒在鸡胚细胞繁殖并纯化TK⁺病毒。

2. 细胞: 人TK⁻143细胞, 由上海生化所汪垣教授提供。在含10%小牛血清及25μg/ml5'-溴脱氧尿苷(BUdR)的DMEM培养液中生长。CV-1细胞由本院五所四室赠, 在含10%小牛血清的DMEM培养液中生长。

3. 质粒: pGJP-5由上海生化所汪垣教授等构建^[7]并提供。pMM2066由我院马贤凯教授等构建^[8]并惠赠。

4. 试剂及工具酶: 限制性内切酶EcoR I、Ava I, T4DNA连接酶购自华美生物工程公司, 小牛肠碱性磷酸酯酶(CIP)购自Boehringer mannheim公司。乙肝ELISA检测试剂盒由本院四环公司生物制剂厂提供。5'-溴脱氧尿苷(BUdR)为Boehringer mannheim公司产品, 琼脂糖购自美国Serva公司, 其他试剂均系分析纯级别。

(二) 方法

1. 质粒DNA的提取与纯化: 质粒

本文于1988年8月29日收到。

本文受中国自然科学基金资助。

*本院微生物流行病学研究所进修生。

DNA 的粗制品参照侯云德^[8]方法获得, 质粒DNA纯化用 CsCl 密度梯度离心法。小量煮沸法快速提取质粒 DNA 按 Maniatis^[9]方法进行。

2. P5-C2066 重组质粒的构建及鉴定: pGJP-5质粒 DNA 用EcoR I 酶切, CIP处理去5'末端磷与从 pMM2066 质粒DNA以EcoRI酶切回收的 HBcAg 基因片段连接重组, 转化JM-83受体菌, 重组子以快速质粒DNA提取法初步筛选, 选出有插入的重组子再以AvaI酶切分析, 鉴定HBcAg基因的插入方向, 选出HBcAg与P7.5启动子转录方向一致的重组子。

3. 细胞体内同源重组, 筛选重组痘苗病毒: Tk⁺痘苗病毒与重组质粒DNA在细胞体内同源重组基本按MOSS所述方法^[10], CV-1细胞传代20—24h后, 细胞约70%成片, 用Tk⁺痘苗病毒感染(0.05pfu/细胞), 2h后倾去培养液, 将1ml磷酸钙重组质粒DNA沉淀物(20—40μg DNA溶于10mmol/L Tris-HCl pH7.05, 0.5ml 2×HeBS pH7.05缓冲液, 加双蒸水, 滴加2mol/L CaCl₂, 使终浓度为125mmol/L, 总体积为1ml, 室温静止10—30min, 可见极细小的白色雾状沉淀)加在细胞层上, 室温30min, 加入培养液4ml, 37℃培养4—6h, 换新鲜培养液, 培养48h后将细胞和部分培养液一起收获, 液氮冻融三次, 将此病毒液稀释为10⁻¹, 10⁻²感染人Tk⁻143细胞, 在含50μg/ml的BUdR, 5%小牛血清及1%琼脂的DMEM培养基, 37℃孵育48h, 中性红(0.2%)染色, 待出现病毒噬斑后, 分别挑取单个噬斑感染人Tk⁻143细胞, 培养液中含50μg/ml BUdR, 细胞出现病变后, 再同样传代一次, 当细胞病变3个加号以上时, 将培养液以ELISA法测有无HBcAg的表达。表达阳性的病毒株, 用病毒噬斑法纯化两

次, 即得到含HBcAg基因的Tk⁻重组病毒。

4. 表达产物的检测: 重组痘苗病毒感染细胞后, 当出现明显病变时, 收上清液, 稀释成不同的稀释度, 用ELISA夹心法检测HBcAg及HBeAg, 492nm光波测定, P/N值>2.1为阳性。

5. 免疫电镜: VWC-1 重组痘苗病毒感染的细胞培养液上清, 经PEG20000浓缩, 加适量的抗HBcIgG, 37℃保温1h形成复合物, 用0.1mol/L PBS pH7.4稀释, 48000g离心1h, 其沉淀溶于0.1mol/L PBS, 滴在1%琼脂糖盐水凝胶片上, 形成液珠, 把带有Formvar膜的铜网膜面朝下盖于液珠上, 当液珠将要被吸尽时取下铜网, 用2%磷钨酸液(pH6.8)负染1min, 自然干燥后电镜观察, 见文献[11]。

结 果

(一) 含HBcAg重组质粒 P5-C2066 的构建

P5-C2066 重组质粒的构建如图1所示, 从pMM2066质粒DNA以EcoR I酶切, 电泳回收HBcAg基因片段(~870bp, EcoRI切点在C抗原基因ATG前12bp处。)插入至pGJP-5质粒P7.5启动子后的EcoRI酶切位点上, 转化至Ecoli JM-83细菌, 用煮沸法小量快速抽提重组质粒DNA, 琼脂糖凝胶电泳, 选出大于pGJP-5的质粒。因在pGJP-5靠近BamHI处有一个AvaI切点, 所以用AvaI酶切电泳鉴定C抗原基因插入方向。当C抗原基因与P7.5启动子转录方向一致时, 应显示一条563bp和一条4857bp电泳带(图版I-1中c,d)。如反向插入时, 则呈现323bp和5097bp二条带(图版I-1中b,e)。

(二) 表达 HBcAg 的重组痘苗病毒的获得

含有 HBcAg 基因的重组质粒 P5-C2066 与痘苗病毒在细胞体内同源重组, 由于外源基因的插入, 造成了 Tk 基因灭活, 重组痘苗病毒应为 Tk⁻ 表型, 在 50 μ g/ml BUdR 存在条件下, 筛选出单个的 Tk⁻ 重组痘苗病毒斑, 经繁殖及纯化后感染细胞, 当细胞产生明显病变时 (图版 I-2), 收集上清液, 16 份重组病毒感染的细胞上清液检测出三株强阳性表达 HBcAg 的病毒株, 三株重组痘苗病毒株表达的水平大致相同, 我们选其中的 VMC-1 病毒株作为以后的实验用。

(三) 不同量重组痘苗病毒感染细胞后 HBcAg 的表达

以感侵比 (Multiplication of Infections, M. O. I) 为 1pfu/细胞, 5pfu/细胞, 10pfu/细胞, 20pfu/细胞及 30pfu/细胞的 VMC-1 病毒感染人 Tk⁻143 细胞及鸡胚纤维母细胞 (5×10^6 细胞/瓶)。当出现明显病变时, 收上清液测 HBcAg 的表达 (表 1)。随着感染细胞的病毒量增加, HBcAg 表达水平也随之增高, 当 M. O. I 为 20pfu/细胞时, 上清液 1:64 稀释仍为明显阳性。两种细胞的表达水平大致相同。

表 1 不同病毒感侵比 (M. O. I) 对 HBcAg 表达的影响

Table 1 Effect of different multiplication of infections on the expression of HBcAg

感 侵 比 M.O.I (Pfu/cell)	上清液 HBcAg 测定 Assay for HBcAg in supernatant (P/N)							
	人 TK ⁻ 143 细胞 Human TK ⁻ 143 cells				鸡 胚 纤 维 母 细 胞 Chicken embryo fibroblast cells			
	1:16	1:32	1:64	1:128	1:16	1:32	1:64	1:128
1	7.8	4.0	3.2	—	7.8	4.0	2.8	—
5	8.4	5.6	1.2	—	5.6	3.8	2.0	—
10	12.8	7.4	3.4	3.4	16.4	7.6	4.2	1.4
20	30.8	14.6	7.4	1.6	51.0	18.8	10.4	5.4
30	48.0	21.0	10.2	6.0	31.4	14.8	7.6	2.0

(四) 病毒感染细胞后不同培养温度对 HBcAg 表达的影响

VMC-1 感染鸡胚细胞 (10pfu/细胞) 后, 分别置于 32 $^{\circ}$ C、37 $^{\circ}$ C、40 $^{\circ}$ C 培养, 待

细胞明显病变时收上清, HBcAg 表达情况见表 2。随着培养温度的升高, HBcAg 活性表达有升高趋势, 但增加的幅度不大。

表 2 细胞感染后不同温度培养下 HBcAg 的表达

Table 2 Expression of HBcAg in infected cells cultivated under different temperature

温 度 ($^{\circ}$ C)	细胞上清液中 HBcAg 测定结果 Assay for HBcAg in cell supernatants (P/N)				
	1:4	1:8	1:16	1:32	1:64
32	48.8	24.4	14.4	9.0	4.6
37	41.2	32.8	20.4	10.2	5.6
40	51.4	51.4	23.6	14.6	9.2

(五) HBcAg及HBeAg的表达活性检测

VMC-1 重组痘苗病毒感染细胞后,

不但可以测到 HBcAg 的活性,同时也可以测到HBeAg活性,HBeAg活性与HBcAg相近或略高一点(表3)。

表 3 VMC-1 病毒感染细胞上清液 HBcAg 及 HBeAg 活性的测定

Table 3 Assay of HBcAg and HBeAg activities in cell supernatant infected with recombinant virus VMC-1

样 品 Sample	HBcAg 活性 HBcAg activity (P/N)				HBeAg 活性 HBeAg activity (P/N)			
	1:4	1:8	1:16	1:32	1:4	1:8	1:16	1:32
Supernatant NO. 1	21.0	7.2	3.8	0.6	24.2	12.0	6.4	2.8
Supernatant NO. 2	35.8	16.2	8.4	4.8	50.0	18.4	11.8	7.6

(六) 混合感染VWC-1及VMS-1重组痘苗病毒后, HBcAg 及 HBsAg的表达

我们曾构建了 VMS-1 重组痘苗病毒株,证明能够表达乙肝表面抗原(HBsAg)^[12]。用VMS-1及 VMC-1同

时感染细胞,与单独以VMS-1及 VMC-1感染比较,HBcAg 及 HBsAg 的表达结果见表4。混合感染后能分别测到 HBcAg 及 HBsAg,表达水平比单独感染者略低。

表 4 混合感染 VMC-1 及 VMS-1 后 HBcAg 及 HBsAg 的表达

Table 4 Expression of HBcAg and HBsAg by mixing infection the cells with recombinant viruses VMC-1 and VMS-1

病毒及感侵比 Viruses and M. O. I	抗原活性检测 Assay for antigen	不同稀释度上清液测定结果 Results of assay in various dilution of supernatant (P/N)					
		1:2	1:4	1:8	1:16	1:32	1:64
VMC-1 10 pfu/cell	HBcAg	—	51.6	28.2	17.4	11.2	5.4
VMS-1 10 pfu/cell	HBsAg	36.4	20.6	12.4	7.0	—	—
VMC-1 10 pfu/cell + VMS-1 10 pfu/cell	HBcAg	—	34.0	25.0	14.0	9.2	3.8
	HBsAg	19.6	12.8	6.6	4.2	—	—

(七) 免疫电镜观察

重组痘苗病毒VMC-1表达的 HBcAg 呈颗粒状,平均直径为 26.6nm,与人乙肝HBcAg及大肠杆菌表达的 HBcAg 大小形态相同^[13](见图版 I-3)。

研究中,一般认为外源基因的ATG愈靠近痘苗病毒的启动子,表达效果愈好。我们所插入的 HBcAg基因片段 ATG 前只有 12bp^[14]。从细胞上清液稀释1:64仍呈阳性来看,HBcAg的表达是相当高的。由于没有HBcAg标准定量的参照品,故暂未能定出HBcAg表达的准确含量。

由于HBcAg具有很好的免疫原性,

讨 论

在以痘苗病毒为载体表达外源基因的

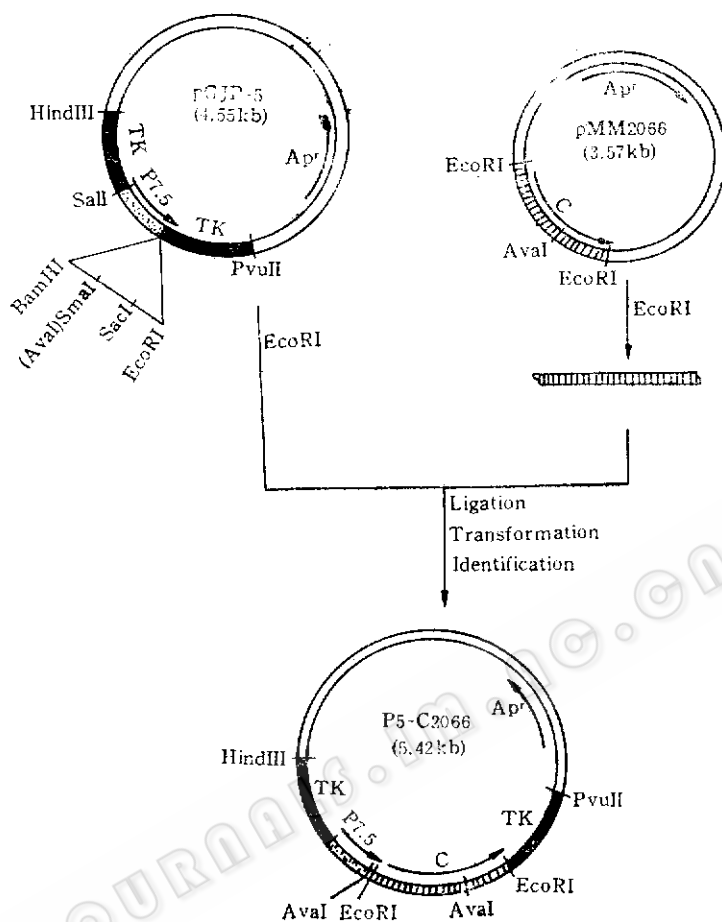


图 1 P5-C2066 重组质粒的构建

Fig. 1 Construction of P5-C2066 recombinant Plasmid

Clarke (1987)^[15] 将人工合成的相应于外壳蛋白第142—160氨基酸的 FMD 核苷酸序列(含ATG)连接于乙肝C抗原基因ATG前第6个氨基酸相应的核苷酸处,用痘苗病毒表达,结果表达出的融合蛋白具有非常好的免疫原性。对于免疫原性很弱

的多肽(人工合成的基因片段)有可能利用HBcAg基因形成融合蛋白而获得强的免疫原性。高表达HBcAg重组痘苗病毒(VMC-1)的获得,可能为预防乙肝增添新的手段,对乙肝的免疫研究也将有其重要用途。

参 考 文 献

- [1] Mackett, M. et al.: *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 79:7415, 1982.
- [2] Panicali, D. et al.: *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 79:4927, 1982.
- [3] Smith, G.L. et al.: *J. gen. Virol.*, 67:2067, 1986.
- [4] 方继明, 程度胜: *生物工程进展*, 5:6—15, 1988.
- [5] Stahl, S. et al.: *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 1:47—52, 1982.
- [6] 左平, 马贤凯等: *生物化学杂志*, 1(6):47—52, 1985.

- [7] 吴 雪等: 生物化学及生物物理学报, 19(5):340, 1987.
[8] 侯云德: 病毒基因工程原理与方法, 人民卫生出版社, p. 88—90, 1985.
[9] Maniatis, T. et al.: *Molecular Cloning*, Maniatis, T., Fritsch, E.F., Sambrook, J. (eds), 88—106, 1982.
[10] Mackett, M. et al.: *J. Virol*, 49: 857—864, 1984.
[11] 黄翠芬: 遗传工程理论与方法, 科学出版社, p. 224—225, 1987.
[12] 韩素文, 方继明等: 军事医学科学院院刊, 12(5):397—402, 1988.
[13] 于公义等: 中国医学检验杂志, 7(4): 195—198, 1984.
[14] 马贤凯等: 中国科学B辑, 1:63—68, 1987.
[15] Clarke, B.E. et al.: *Nature*, 330: 381, 1987.

EXPRESSION OF HEPATITIS B CORE ANTIGEN GENE BY RECOMBINANT VACCINIA VIRUS

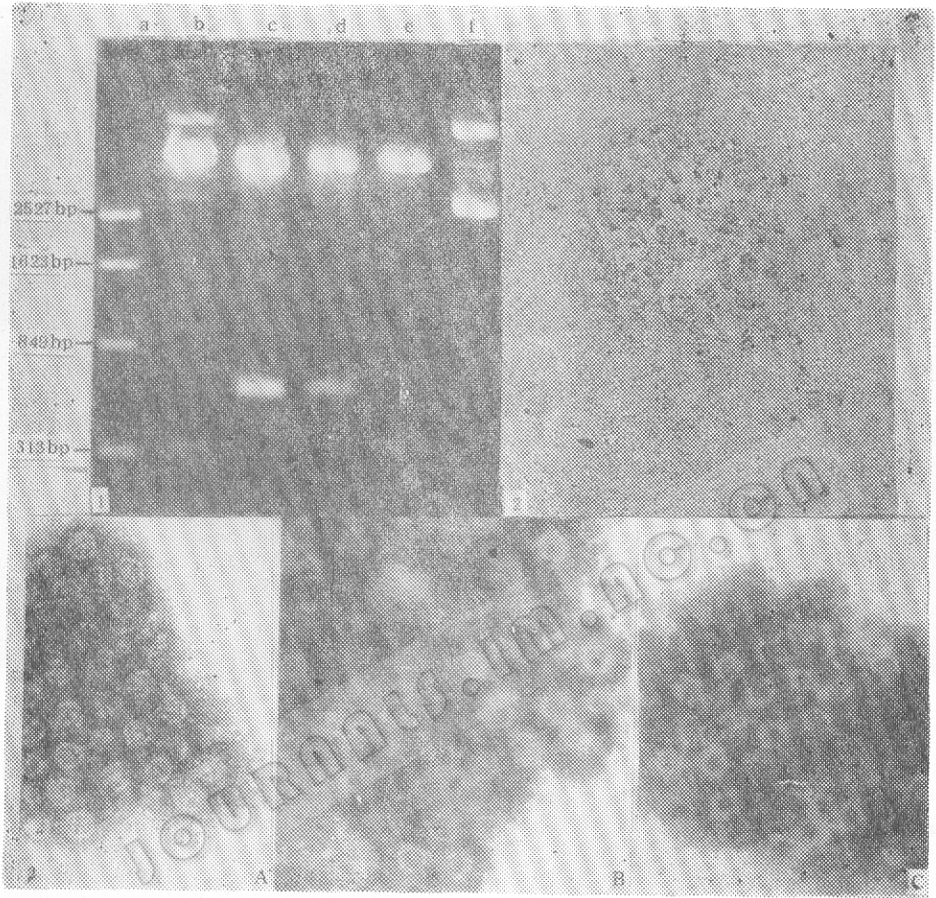
Han Suwen Zhu Qingyu Zhao Liquan Fang Jiming

(*Institute of Biotechnology, Academy of Military Medical Sciences, Beijing*)

Plasmid pMM2066 was digested with EcoR I restriction enzyme and the 870 bp fragment which containing 12 bp upstream to the ATG codon and structure gene of C antigen was separated. This DNA fragment was then inserted into the transfer vector pGJP-5 just downstream to the P7.5 promoter. Thus, the recombinant vector P5-C2066 was constructed. Using homologous recombination technique 3 TK⁻ recombinant vaccinia viruses expressing HBcAg were isolated by plaque assay in TK⁻143 cell in the presence of BUdR. Up to 1:64 dilution of supernatant of cells infected with recombinant virus still showed significant positive results by using ELISA method. About the same titer of the HBcAg activity was also detected. 26.6 nmHBcAg particles were visualized by electron microscopy. In addition, the effects of M.O.I, kinds of cell cultures and cultivated temperature on the expression level of HBcAg had also been investigated.

Key words

Recombinant vaccinia virus; HBcAg and HBeAg



1. *Ava*I 酶切鉴定 P5-C2066 质粒电泳图

Identification of plasmid P5-C2066 by endonuclease *Ava*I

a. M13RFDNA-Hae III marker f. P5-C2066, c. d. P5-C2066 + *Ava*I b. e. Recombinant Plasmid + *Ava*I

2. 重组痘苗病毒VMC-1感染人TK⁻143细胞后的细胞病变

Cytopathogenic effect of TK⁻143 cells after infection by recombinant vaccinia virus VMC-1 (low magnification 100 ×)

3. 不同来源的 HBcAg 免疫电镜图

Immunoelectron microscopy of HBcAg particles from various sources (180000 ×)

A. HBcAg particles from *E. coli*

B. HBcAg particles from Human liver

C. HBcAg particles from Vaccinia virus