

# 乙型肝炎病毒表面抗原基因在异源细胞中的表达研究

刘冬梅 沈孝宙

(中国科学院动物研究所, 北京 100080)

田开荣

(中国科学院微生物研究所, 北京 100080)

本研究构建了一系列乙型肝炎病毒表面抗原(HBsAg)基因的表达载体, 其中 HBsAg 基因的启动区被小鼠金属硫蛋白启动子取代, 而对HBsAg基因下游非编码区的几种基因元件则进行了不同的删除, 并且添加异源基因调控元件。利用HeLa细胞瞬时表达系统对各种构建物的表达水平进行分析。实验发现: 除了必须取代HBsAg基因原有的启动子外, 乙型肝炎病毒(HBV)增强子 I 及其多聚腺苷酸化 (poly A) 信号对HBsAg在非肝脏细胞中表达也至关重要。但HBsAg的poly A信号可用异源的 poly A信号及猴空泡病毒(SV 40) T 抗原基因的剪接信号取代。在HeLa细胞表达系统中, 这种取代可进一步提高HBsAg 的表达水平。反之, HBV增强子 I 在HeLa细胞中对HBsAg 基因的表达无显著作用。实验结果提示: 除了已报道的HBV增强子 I 能激活基因本身的启动子外, 很可能还存在另外的功能, 即对 HBsAg 转录体起稳定作用。

**关键词** 乙型肝炎病毒表面抗原基因; 增强子; 多聚腺苷酸化信号; 瞬时表达系统; HeLa细胞

乙型肝炎病毒表面抗原基因仅在人肝脏细胞中表达, 具有极强的组织特异性, 因HBsAg 基因的启动子只被人肝脏细胞中所存在的一种或几种独特的 异域效应 (trans-acting) 因子所激活<sup>[1,2]</sup>。由于不能建立HBV 体外复制模型, 对其基因表达的调控方式至今了解不多<sup>[3]</sup>, 尤其对HBsAg 基因下游非编码区的作用, 更缺乏直接的资料。以往的一些研究, 均是将HBsAg下游的增强子序列置于 CAT这类报讯基因 (reporter) 系统中研究, 不含HBsAg 本身的编码基因<sup>[1,3,4]</sup>。当选用哺乳动物细胞基因工程表达系统表达HBsAg 基因时, 许多研究者主要考虑的是删除HBsAg 基因的启动区, 代之以组织特异性不强的哺乳动物病毒启动子, 如SV 40 早期启动子<sup>[5-8]</sup>、牛痘病毒启动子<sup>[9]</sup>、腺病毒-2晚期主蛋白启动子<sup>[10]</sup>

或金属硫蛋白 (MT) 启动子<sup>[10-12]</sup>。事实证明这种启动子的取代是必不可少的。至于 HBsAg 基因下游非编码区在异源细胞中对 HBsAg 基因本身表达的作用, 尚缺少资料。近些年陆续发现 HBsAg 基因下游存在不止一段增强子序列<sup>[4,13,14]</sup>, 这使我们有可能定量地比较这些下游非编码区几种调控元件与其他来源的下游基因调控元件对 HBsAg 基因表达的影响, 以期阐明 HBsAg 基因下游非编码区调控元件的若干性质, 为构建 HBsAg 基因工程高效表达载体提供更多的依据。

## 材料与方 法

### (一)材料

本文于1992年9月8日收到。

本研究承中国科学院生物局资助, 并蒙中国科学院上海生化所李毅平、汪垣两位教授大力支持, 谨致谢忱。

质粒p-ADR 1(图1-A)含完整的 *adr* 亚型基因组, 由中国科学院上海生化所李载平教授提供。质粒载体pSMKA, pSM-BK及pSMBKA (图1-B, C, D) 系本实

验室构建的几种表达载体。重组 DNA 操作均在 DH 10 B 菌株中进行。各种限制酶、修饰酶、DMEM 培养基及胎牛血清购自美国GIBCO/BRL公司。

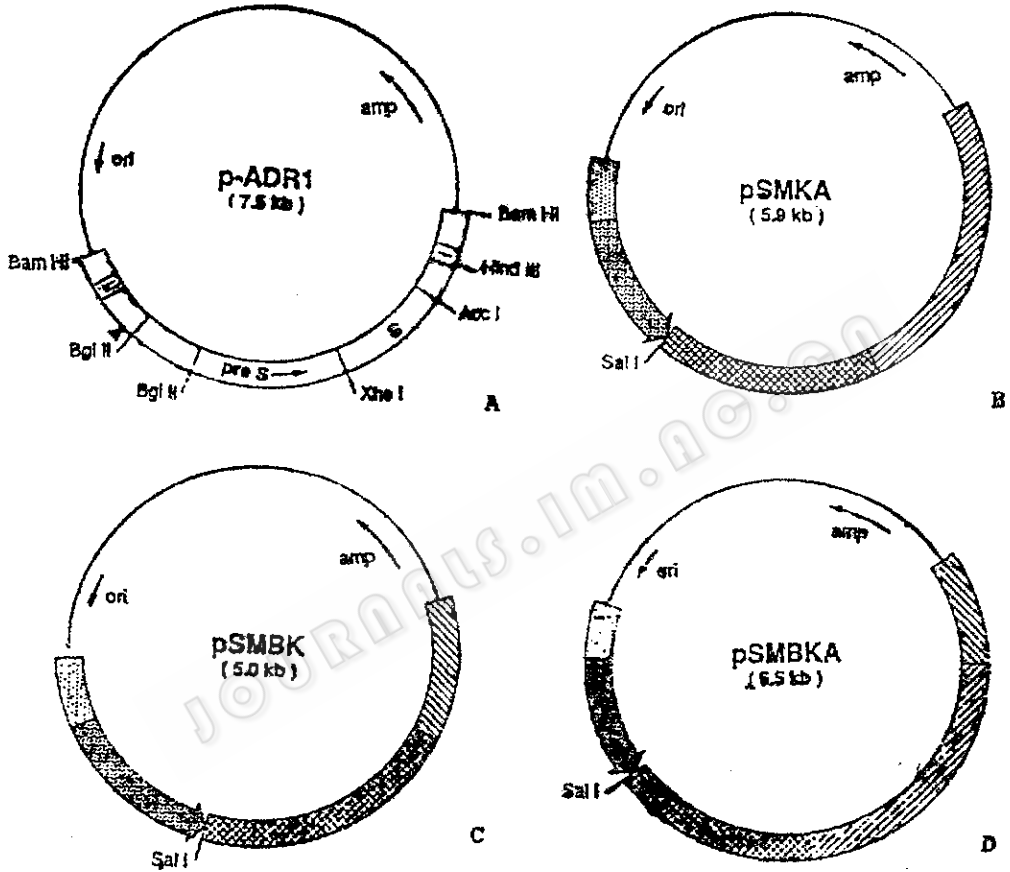










图 1 p-ADR 1和本研究所用的三种表达质粒的结构

Fig. 1 The structures of p-ADR 1 and three expression plasmids used in this study. The promoterless HBsAg gene was inserted in the Sal I site of each vector. The recombinants with proper orientation (e. g. the MT promoter located at the 5' end of HBsAg gene) were chosen for the transfection experiments

- |   |  |   |                                     |
|---|--|---|-------------------------------------|
|  | SV 40 enhancer                                     |  | Mouse metallothionein promoter      |
|  | SV 40 splicing signal                              |  | SV 40 poly A signal                 |
|  | Poly A signal from bovine growth hormone gene      |  | HBV enhancer I                      |
|  | HBsAg gene preS and S represent its coding regions |  | HBV enhancer II ▲ HBV poly A signal |

## (二) HBsAg 表达载体的构建

以 Bam HI 酶从质粒 p-ADR 1 上切出 3.2 kb 全长的 HBV 基因组, 经自身连接后再用 Bgl II 酶切出 2.8 kb 的片段, 次级克隆在质粒 pUC 18 的 Bam HI 位点, 得 pUHEV 质粒 (图 2-A)。再分别用不同的限制酶处理该重组质粒, 获得不含 HBsAg 自身启动区而下游非编码区长度不同的各种基因片段。如当用 Xho I 酶处理时, 可删除其上游启动区; 配合用 Sal I 双酶切, 可获得完整的 HBsAg 基因编码区及下游非编码区, 包括两个增强子元件及 poly A

信号; 用 Xho I 和 Bam HI 双酶切, 可删除 HBsAg 基因的启动区、增强子 II 和 poly A 信号; 用 Xho I 和 Hind III 双酶切, 则将 HBsAg 的启动区和下游两个增强子及 poly A 信号全部去除。然后将这些长度不一的 HBsAg 基因片段分别插入各种表达载体 (pSMKA、pSMBK 和 pSMBKA) 的 Sal I 位点 (过程略)。选择插入方向正确的重组体 (即 MT 启动子在 HBsAg 基因的上游), 获得 HBsAg 的 8 种表达载体, 其结构分别示于图 2-B-I。

为研究靠近 HBsAg 基因终止密码下

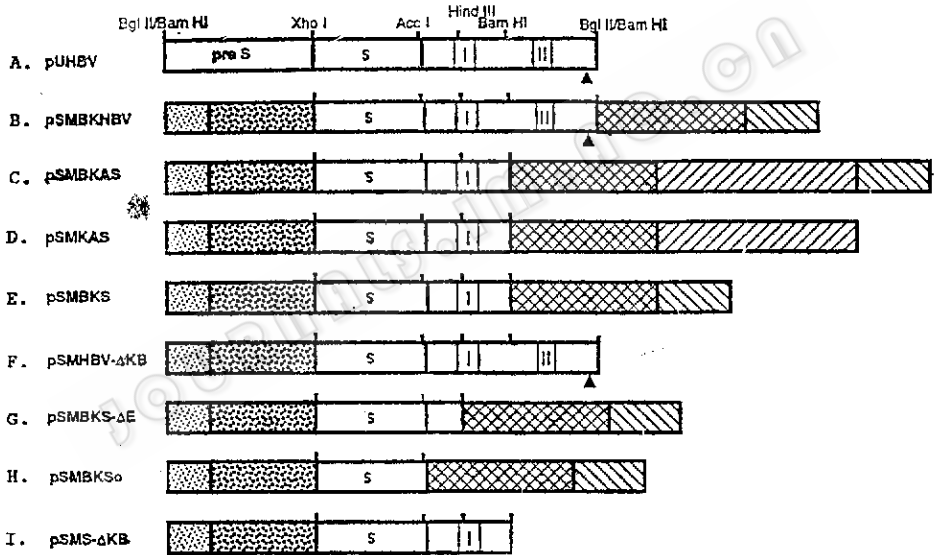


图 2 HBsAg 重组质粒结构示意图

Fig. 2 Schematic representations of the HBsAg recombinant plasmids which were used for analyzing the function of different genetic elements on 3' non-coding region of the HBsAg gene

The fragment of pBR 322 in each construct is not shown. The symbols are the same as described in the legend of Fig. 1

游非编码区序列对该基因表达的影响, 实验用 Acc I 酶在终止密码上游 7 bp 处切开, 删去 HBsAg 基因全部下游非编码区, 然后用一段合成的寡聚核苷酸连接物, 修复被 Acc I 切掉的 7 bp 序列和终止密码。序列分析结果证明修复的基因含有 Acc I 位点及被删除的 7bp 序列和终止密码, 与天

然基因的顺序完全相同, 但已不存在终止密码下游任何非编码序列 (资料从略)。最后将修复的完全不含下游非编码区的 HBsAg 基因插入表达载体 pSMBK 得到 pSMBKSo 表达质粒 (图 2-H)。

## (三) DNA 转染及表达水平的分析

实验以人 HeLa 细胞作瞬时表达的宿

主系统。转染用磷酸钙沉淀法<sup>[15]</sup>，并用15%甘油强化4 min，24 h后加2  $\mu\text{mol/L}$   $\text{CdCl}_2$ 诱导。在第72 h收集培养液，由卫生部生物制品研究所用放射免疫法测定HBsAg的含量。

## 结果与讨论

### (一) HBV增强子的作用

已发现HBV基因的增强子有两种，即增强子I和增强子II。本实验所构建的一系列HBsAg表达质粒中，含增强子I的几种质粒（如pSMBKHBV、pSMBKAS及pSMKAS），其HBsAg的表达水平（37.5—40 ng/ml，见表1）均明显高于不含增强子I的质粒（pSMBKS- $\Delta\text{E}$ 和pSMBKSo）后者HBsAg的表达量仅为2.5—5.0 ng/ml。这说明HBsAg增强子I虽然具有严格的宿主特异性，需要人肝脏细胞中所存在的一种或几种特异的异域效应因子才能表现其活性。但是在HeLa细胞，这类非肝脏细胞中进行瞬时表达时，尽管HBsAg基因自身的启动子已不存在，增强子I仍然对表达具有重要作用。提示在人肝脏细胞中，增强子I至少具有双重功能，即除了激活HBsAg基因原有的启动子外，可能对HBsAg转录体mRNA的稳定也起作用，因为增强子I本身就是HBsAg转录体的一部分。不过前一种功能需要人肝脏细胞特异的因子存在，后一种功能则无组织特异性。在HBsAg基因转染的HeLa细胞中，起作用的正是增强子I稳定转录体的功能。HBsAg基因是连续的，不存在内含子，故无剪接信号。通常无剪接信号的mRNA在真核细胞中很不稳定，因此在HBsAg mRNA下游非编码区具有这种稳定自身结构的序列是可能的。

虽然已有若干资料证明，增强子II也具有很强的组织特异性<sup>[4,14]</sup>，但是在本

表 1 9种重组质粒在HeLa细胞瞬时表达系统中HBsAg的表达水平

Table 1 The HBsAg expression levels of nine recombinant plasmids in a transient expression system using HeLa cells

No.	Plasmid for transfection	HBsAg level (ng/ml medium)	Relative activity (%)
1	Control	0	0
2	pUHBV	0	0
3	pSMBKHBV	40.0	133
4	pSMBKAS	40.0	133
5	pSMKAS	37.5	125
6	pSMBKS	35.0	117
7	pSMHBV- $\Delta\text{KB}$	30.0	100
8	pSMBKS- $\Delta\text{E}$	5.0	17
9	pSMBKSo	2.5	8
10	pSMS- $\Delta\text{KB}$	1.5	5

The control sample was taken from the medium of untransfected HeLa cells. The Relative activity values are compared against pSMHBV- $\Delta\text{KB}$  which contains an unmodified 3' non-coding segment of HBsAg gene

研究中，HBV增强子II在HeLa细胞中对HBsAg基因的表达并不表现任何作用。不含增强子II的质粒pSMBKAS与pSMKAS，其表达水平与含增强子II的质粒pSMBKHBV的表达水平无明显差别（见表1）。这说明HBV增强子II虽然也有很强的组织特异性，但是在性质上与增强子I不同，对稳定HBsAg的转录体并无作用，尽管它也存在于HBsAg的转录体中。

### (二) poly A信号的作用

HBsAg基因的3'端poly A信号不像多数真核基因，为AATAAA，而是一种变体：TATAAA，并且该poly A信号要求其两侧邻近区域存在几段特定的序列才能表现功能<sup>[16]</sup>。本实验所构建的表达质粒pSMS- $\Delta\text{KB}$ ，因已删去Bam HI和Bgl II之间约0.58 kb的序列，HBsAg基因在HeLa细胞中的表达能力丧失殆尽。这一段序列主要包括二套基因元件：一是增强子II，另一是poly A信号。由于本实验曾

用其他来源的 poly A 信号能完全代替 HBsAg 基因的 poly A 信号,说明在 HBsAg 基因下游 Bam HI 和 Bgl II 位点之间的这段序列对表达起主要作用的是 poly A 信号,而不是增强子 II。而且当 HBsAg 基因的 poly A 信号用哺乳类典型的 poly A 信号代替时,表达效果更好(表 1)。

### (三)几种异源非编码区基因元件的作用

在改造 HBsAg 基因下游非编码区序列的同时,本实验曾使用几种其他来源的基因元件,如来自 SV 40 病毒 T 抗原的剪接信号、poly A 信号和牛生长激素基因下游增强子序列(含 poly A 信号)。这些元件在若干真核基因表达系统中已证明均有较好的作用。本实验也发现利用这些基因元件不但可以完全取代 HBsAg 基因本身的 poly A 信号,而且还可以进一步明显提

高 HBsAg 的表达水平。如添加了外源增强子序列和剪接信号的质粒 pSMBKHBV,其表达水平比用 HBsAg 基因自身增强子 II 和 poly A 信号的质粒 pSMHBV-ΔKB 高出 33%(见表 1)。不过这些下游基因元件并不能代替 HBsAg 基因增强子 I 的作用,如在质粒 pSMBKS-ΔE 和 pSMBKSo 中无增强子 I 的序列,外源基因元件的作用就很弱(见表 1)。

我们曾将上述研究中 HBsAg 的一种表达质粒 pSMKAS 与 pSV<sub>2</sub>dhfr 共转染基因工程受体细胞 CHOdhfr<sup>-</sup>,经氨甲喋呤(MTX)放大导入的基因,一株 MTX 抗性细胞系,在培养液中 HBsAg 的表达水平达到 9 μg/10<sup>6</sup>细胞/24 h(作者与中国科学院发育所合作的待发表资料)。这就证明本研究对 HBsAg 基因上下游非编码区的改造是有效的。

## 参 考 文 献

- [1] Jameel, S. et al., *Mol. Cell. Biol.*, 6:710, 1986.
- [2] Bulla, G. A. et al., *J. Virol.*, 62:1437, 1988.
- [3] Shaul, Y. et al., *EMBO J.*, 4:427, 1985.
- [4] Wang, Y. et al., *J. Virol.*, 64:3977, 1990.
- [5] Crowley, C. W. et al., *Mol. Cell. Biol.*, 3:44, 1983.
- [6] 任贵方等:微生物学报, 24:326, 1984.
- [7] 张一鸣等:病毒学报, 1:210, 1985.
- [8] Michel, M. -L. et al., *Bio/Technology*, 3:561, 1985.
- [9] Denniston, K. J. et al., *Gene*, 32:357, 1984.
- [10] Hurwitz, D. R. et al., *Nucl. Ac. Res.*, 15:7137, 1987.
- [11] 谢彦博等:病毒学报, 2:1, 1986.
- [12] Israel, N. et al., *Gene*, 51:197, 1987.
- [13] Yee, J. K., *Science*, 246:658, 1989.
- [14] Yuh, C. H. et al., *J. Virol.*, 64:4281, 1990.
- [15] Sambrook, J. et al., in *Molecular Cloning: A Laboratory Manual* (2nd ed). CSH Laboratory Press, pp. 16-33, 1989.
- [16] Russnak, R. et al., *Gene and Development*, 4:764, 1990.

## The Role of 3' Non-coding Sequences of Hepatitis B Surface Antigen Gene in a Nonhepatic Cell Expression System

Liu Dongmei Shen Xiaozhou

(*Institute of Zoology, Academia Sinica, Beijing 100080*)

Tian Kairong

(*Institute of Microbiology, Academia Sinica, Beijing 100080*)

A series of expression vectors containing the hepatitis B surface antigen (HBsAg) gene were constructed in which the promoter region of the HBsAg gene was replaced by the mouse metallothionein promoter and the HBsAg 3' non-coding sequences were modified by various deletions and/or additions of the heterogenous genetic elements. The expression levels of the derivatives were evaluated in a transient expression system in HeLa cells. We have found that the enhancer I of hepatitis B virus (HBV) and the polyadenylation (poly A) signal are the most important elements for the expression of HBsAg gene in nonhepatic cells in addition to a need for replacing the original promoter of HBsAg gene. The heterogenous poly A signal in combination with the SV 40 splicing signal could substitute the poly A signal of the HBsAg gene and moreover could increase the expression level of the HBsAg gene in HeLa cells. On the contrary, the enhancer II of HBV has no effect on the expression of the HBsAg gene in HeLa cells. These results implicate another role of HBV enhancer I on the stability of HBsAg transcripts in addition to the demonstrated function of activating the promoter.

**Key words** Human hepatitis B surface antigen gene; hepatitis B virus enhancers; polyadenylation signals; transient expression; HeLa cells