

70-76

第13卷第1期  
1998年3月中国病毒学  
VIROLOGICA SINICAVol. 13 No. 1  
Mar. 1998

## 用杆状病毒载体在家蚕细胞中表达 HBeAg 基因\*

邓小昭 刁振宇<sup>1</sup> 何亮 乔仁良 张林元

(南京军区军事医学研究所, 南京 210002)

RS-12-620-1

**摘要** 以 PCR 技术扩增含有 Pre-C 信号肽序列及完整的 HBeAg 基因的序列(即 HBcAg 基因 5' 端 447 bp), 在 5' 端加上合适的酶切位点, 克隆到家蚕核多角体病毒转移载体 pBm030 上, 与野生型 BmNPV DNA 共转染家蚕 BmN 细胞, 空斑纯化后得到多角体基因失活的重组病毒。ELISA 法测定表明培养液上清中 HBeAg 效价达 1:32 000, 细胞内 HBeAg 效价为 1:2 000, 培养液及细胞内的 HBcAg 含量极低(<1:160)。研究结果表明, BmN 细胞能正确识别与切割 HBeAg 信号肽序列, 所表达的 HBeAg 效价高, 纯度好, 明显优于大肠杆菌表达系统。

**关键词** 乙型肝炎 e 抗原, 家蚕核多角体病毒载体, 基因表达

杆状病毒

2型肝炎病毒

1972 年发现在 HBsAg 携带者的血清中存在有 HBeAg/抗 HBe 系统, 由于对 HBeAg 的基因定位一直不能肯定, 有关 HBeAg 的报道较少。1986 年 Miyanochara 等<sup>[1]</sup>最早用酵母表达系统表达了具有 HBeAg 活性的产物, 其他研究者相继在非洲蟾蜍卵细胞<sup>[2]</sup>、COS 细胞<sup>[3]</sup>、大肠杆菌<sup>[4]</sup>、枯草杆菌<sup>[5]</sup>中表达 HBeAg 基因。研究结果使得对 HBeAg 基因有了较为明确的认识。HBeAg 由 HBcAg 氨基端的 149 个氨基酸组成, C 基因编码的 HBcAg 有 183 个氨基酸, 在 C 基因上游有一个 89 bp 的前 C 序列, 它与 C 基因的共同表达产物(前 C 蛋白)在内质网膜经蛋白水解酶的作用, 去掉 N 端的信号肽及 C 端的强碱性区域, 形成可分泌的 HBeAg<sup>[6]</sup>。其中最值得重视的是前 C 区编码的信号肽序列指导了 HBeAg 的加工和分泌, 这一结论提示, 要获得高活性高纯度的 HBeAg, 必需借助真核表达系统。原核表达系统由于不能识别并正确切割信号肽序列, 所表达的产物大部分是细胞内的 C 抗原。目前国内乙肝 HBeAg/抗-HBe 诊断试剂盒中所采用的 HBeAg 大都是大肠杆菌工程菌生产的, 其中 HBcAg 的含量较高, 影响了诊断试剂的质量。

近年来, 用昆虫杆状病毒作载体, 在昆虫细胞或虫体内高效表达外源基因的技术已得到广泛的推广应用。这一系统安全、高效、容量大, 表达的产物具有生物活性, 已有数百种动物、植物、微生物、病毒的基因在这一系统中成功表达<sup>[7]</sup>。我们<sup>[8]</sup>曾用人  $\alpha$ -干扰素基因置换家蚕核多角体病毒(*Bombyx mori* nuclear polyhedrosis virus, BmNPV)的多角体蛋白基因编码序列, 结果表明家蚕细胞能够识别人  $\alpha$ -干扰素基因的信号肽序列并正确切割, 表达产物 99% 均分泌到细胞培养液中。由于 HBeAg 蛋白需要分泌加工程序, 才能形成成熟蛋白, 我们推测 BmNPV-BmN 将是一个较为理想的表达系统。为此, 我们用 PCR 法扩增含有 Pre-C 信号肽序列以

收稿日期: 1997-05-28, 修回日期: 1997-09-05

\* 江苏省自然科学基金课题(BK95140306)

及与 HBeAg N 端同源的 149 个氨基酸编码序列,在 5'端和 3'端加上合适的酶切位点,克隆到家蚕核多角体病毒载体 pBm 030 上,与野生型 BmNPV DNA 共转染家蚕 BmN 细胞,空斑纯化得到了高表达 HBeAg 的重组病毒。

## 材料和方法

### 1 病毒和载体

BmNPV 和转移载体 pBm030 以及家蚕细胞由武汉大学病毒研究所提供。细胞用 TC-100(含 10% 胎牛血清)培养并传代保存。乙型肝炎病毒 e 抗原(HBeAg)基因是用 PCR 技术以武汉大学病毒所的 HBV 基因文库 pHB24<sup>[9]</sup>为模板扩增得到。

### 2 DNA 的提取与片段回收

转移载体 pBm030 和重组转移载体 pBmHBe DNA 按常规法<sup>[10]</sup>从 *E. coli* 细胞中提取。以 BmNPV DNA 感染家蚕细胞,27℃培养 5~7 d,镜检观察到部分细胞中出现多角体后,低速离心,取含有病毒粒子(即芽生病毒 BV)的上清再次感染 BmN 细胞,同样培养,镜检观察到细胞中有多角体出现时,离心取细胞和上清,按 Summers<sup>[7]</sup>程序,分别从多角体和病毒粒子提取 BmNPV DNA。PCR 扩增片段和酶切片段均在 0.7~1.0% 琼脂糖凝胶上电泳并用 DE81 膜法回收<sup>[10]</sup>。

### 3 PCR 扩增

人工合成 HBV e 基因 3'、5'两侧序列各 30 bp 作为引物。引物(+)5'端加 Bgl II,引物(-)5'端加 Xba I-TAA-Sma I 位点。

引物 1(+):5' AGATCTCATGGAAGCTTTTACCTCTGCCT 3'

引物 2(-):5' CCCGGTTATCTAGAAACAACAGTAGTTTCCGGAA 3'

用上述引物,从含有 HBV 全基因组的质粒 pHB24 上按常规 PCR 程序,扩增 5'端为信号肽序列的 HBV e 基因。用 0.7% 琼脂糖凝胶电泳检测 PCR 扩增产物。

### 4 序列测定

为了鉴定 PCR 扩增片段,用 ddNTP/PCR/银染法测序系统对扩增片段进行序列测定。取纯化的 537 bp 片段作模板,用同样引物,在一种 ddNTP 存在下,按 Promegier 公司的银染测序程序进行 PCR 扩增。然后加样在 8% PAG 凝胶上进行电泳。电泳结束后按试剂盒程序进行固定、染色、显色并阅读 DNA 序列。

### 5 克隆连接与转化

用 Bgl II 和 Sma I 消化 PCR 扩增产物和质粒 pBm030 DNA,按常规方法<sup>[10]</sup>进行连接反应,转化大肠杆菌感受态细胞,在 AP/IB 平板上筛选抗性菌落。提取重组质粒 DNA 后用 Bgl II 和 Sma I 双酶消化,在 1.0% 琼脂糖凝胶上鉴别阳性重组子。

### 6 转移载体与野生型 BmNPV DNA 共转染 BmN 细胞

将提取的重组转移载体 DNA 与野生型(Wt)BmNPV DNA 按 5:1 克分子比混合,以我们以前叙述的方法<sup>[11]</sup>用 Lipfectin 介导共转染贴壁良好的新鲜 BmN 培养细胞,2 h 后,倾去共转染液,加 TC-100(含 10% 胎牛血清),27℃培养 7~10 d。镜检观察含有重组病毒的细胞。然后用琼脂平板进行空斑纯化,挑选不产多角体的 O<sup>-</sup>(occlusion)表型的空斑,即为阳性重组病毒。

### 7 HBeAg 的表达与检测

用重组病毒感染 BmN 细胞,27℃培养 4 d,离心收获细胞和上清,按常规方法<sup>[10]</sup>进行 5% SDS-PAG 电泳,考马斯亮兰染色,观察蛋白质的表达。

细胞用盐酸胍破壁,收获裂解液,离心取上清,同时取培养细胞上清,用南京军区医学研究所的抗 HBe、HBeAg 试剂盒分别进行 ELISA 检测,以乙肝患者 HBeAg 阳性血清及工程菌生产的 HBeAg 作为阳性对照,分别以正常受体 BmN 细胞裂解液及培养上清作为阴性对照。根据 OD 值计算出 P、N 值,以 P/N $\geq$ 2 判为阳性。

## 结 果

### 1 HBeAg 基因的 PCR 扩增和序列测定

用合成引物以质粒 pHB24 为模板, 多次 PCR 实验, 每次均能扩增出一条 0.5 kb 左右的片段, 经 ddNTP/PCR/银染法测序后发现, 扩增片段与 HBeAg 基因序列有一致的同源性, 从 5' 端开始, 在已测定的 361 bp 序列中仅 1 处(357 位 T→A) 不一致。图 1 是扩增片段从 273~361 的 88 bp 序列。结果证明, 所扩增片段确为 HBeAg 基因。从 5' 端信号肽序列扩增的 e 基因长 537 bp。为便于克隆, 在 5' 端设计了 Bgl II 位点, 在 3' 端设计了 Xba I、Sma I 位点。

```

TGG GGG GAA TTG ATG ACT
CTA GCT ACC TGG GTG GGT
AAT AAT TTG GAA GAT CCA
GCA TCT AGG GAT CTT GTA
GTA AAT TAT GTT AAT ACT
  
```

图 1 PCR 扩增的 HBeAg 基因部分序列

Fig 1 Partial sequence of HBeAg replicated by PCR

### 2 携带 HBeAg 基因的嵌合载体的构建及鉴定

BmNPV 转移载体 pBm030 长约 6.3 kb, 在其多角体基因(plh)启动子下游有多克隆位点。用 Bgl II/Sam I 双酶消化 pBm030 DNA 和 PCR 扩增的 HBeAg 基因片段, 用 T<sub>4</sub>DNA 连接酶连接, 使 e 基因插在 pBm030 多克隆位点中并处于 plh 启动子控制之下, 其构建过程见图 2。

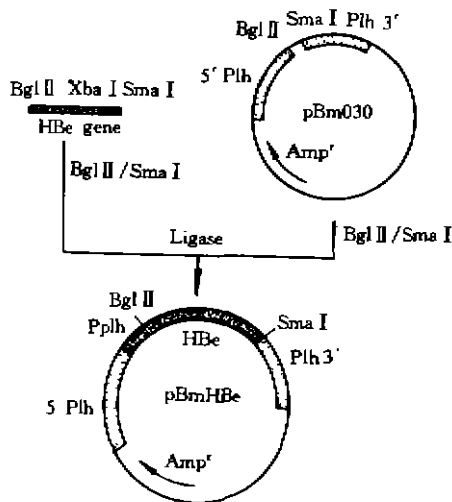


图 2 重组转移载体 pBmHBe 的构建

Fig 2 Construction of recombinant vector pBmHBe

将以上连接混合物转化大肠杆菌, 筛选阳性菌落。用 Bgl II/Sma I 双酶消化重组转移载体 DNA, 在琼脂糖凝胶上一条 0.5 kb 的片段从 pBmHBe DNA 中释放出来(图 3), 证明 HBeAg 基因的克隆是成功的。



图 3 重组转移载体 pBmHBe 的酶切鉴定

1: pBmHBe/Bel II, 线性化; 2:  $\lambda$ DNA/Hind III 作标准;  
3: pBmHBe/Bgl II + Sma I, 释放 0.54 kb HBe 基因

Fig 3 Restriction endonuclease analysis of recombinant plasmid pBmHBe

1: pBmHBe/Bgl II, linearization; 2.  $\lambda$ DNA/Hind III marker;

3: pBmHBe/Bgl II + Sma I, released 0.54 kb HBeAg gene

### 3 携带 HBeAg 基因的重组病毒的构建

用重组转移载体 pBmHBe DNA 与 Wt-BmNPV DNA 共转染 BmN 细胞, 在显微镜下可观察到多数细胞出现多角体, 这是 Wt-BmNPV DNA 转染的结果, 也是共转染成功的标志。另一些细胞出现感染病理特征, 如细胞和细胞核膨大, 细胞内含物凝聚, 出现许多不规则颗粒, 但看不到多角体, 这是 O<sup>-</sup> 重组病毒感染的典型特征。说明在共转染之后, pBmHBe DNA 的 3'、5' 两侧的 plh 基因序列与 Wt-BmNPV plh 基因同源序列发生了同源重组, 由 plh 启动子控制的 HBeAg 基因的表达盒 (Pplh/HBe), 被整合到 Wt-BmNPV 的 plh 基因位相并使其被置换。经空斑纯化后得到的重组病毒命名为 rBmHBe。

### 4 HBeAg 在家蚕细胞中的表达及检测

以重组病毒 rBmHBe 感染家蚕细胞, 培养 72 h 后, 收获细胞和上清进行 SDS-PAGE 电泳 (图 4)。

从图 4 看出, Wt-BmNPV 能产生 32 kDa 的多角体蛋白, 而重组病毒 rBmHBe 由于 plh 基因被置换, 所以没有多角体蛋白产生, 代之以 HBeAg 基因在昆虫细胞中表达, 产生 MW 约 18 kDa 的 e 抗原 (图 4-2)。用培养上清液作样品同样观察到 HBeAg 的表达, 但分子量较小, 可见表达的大部分 HBeAg 在 N 端信号肽引导下跨膜分泌到细胞外。

我们对细胞裂解液和培养上清进行了 ELISA 试验 (表 1), 检测表达 HBeAg 的抗原活性。发现当稀释细胞裂解液 1:2 000 时亦可见阳性反应, 上清中 HBeAg 抗原活性较高, 稀释度可

表 1 HBeAg 抗原性 ELISA 检测

Table 1 HBeAg antigenicity detection with ELISA

样品 Sample	稀释度 Dilution						
	1:1 000	1:2 000	1:4 000	1:8 000	1:16 000	1:32 000	1:64 000
细胞培养液 Cell culture medium	+	+	+	+	+	+	-
细胞裂解物 Cell broken material	+	+	-	-	-	-	-

+ : 阳性, - : 阴性 + . Positive; - : Negative

达到 1:32 000。检测结果还表明,培养液上清中未测出 HBcAg,培养细胞裂解液中 HBcAg 滴度 < 1:160。

以上试验结果清楚说明我们在家蚕细胞中表达了具有抗原活性的 HBe 抗原。



图4 家蚕细胞中表达的 HBeAg 的 PAG 电泳

1 和 2: rBmHBe 感染后的 BmN 细胞, 箭头示 HBeAg 蛋白, ~ 18kDa;

3: 分子量标准蛋白 (94, 67, 43, 30, 17.5kDa)

4 和 5: 野生型 BmNPV 感染的细胞, 箭头示多角体蛋白带, ~ 32 kDa;

6: rBmHBe 感染细胞后的上清, 箭头示 HBeAg 蛋白, ~ 18 kDa

Fig 4 PAG Electrophoresis analysis of HBeAg protein expressed in BmN cells

1 and 2: BmN cells infected with rBmHBe, the arrow shows HBeAg protein, ~ 18 kDa;

3: standard protein molecular weight marker (94, 17, 43, 30, 17.5 kDa);

4 and 5: BmN cells infected with wt-BmNPV, the arrow shows ~ 32 kDa polyhedra protein;

6: culture medium, the arrow shows HBeAg protein

## 讨 论

我们用 PCR 扩增的 HBeAg 基因片段构建成转移载体 pBmHBe, 并与 Wt-BmNPV 共转染家蚕细胞, 获得携带 HBe 抗原基因的重组病毒。扩增的 HBeAg 基因长 537 bp, 包括 5' 端信号肽 89 bp, 直到 e 基因 3' 端, 它与 C 基因的关系见图 5。

从图 5 可看出, 在家蚕细胞中表达 HBeAg 时, 信号肽在粗面内质网膜被切割, 去除 19 个氨基酸, e 抗原跨膜分泌至培养液中<sup>[6]</sup>。实验结果表明也还有部分未分泌的抗原存在于细胞内。根据我们测得的 HBeAg 基因序列, 发现在信号肽 5' 端有一个 ATG, 3' 端亦有一个 ATG, 而且第二个 ATG 完全符合 Kozak 规则。因此, 当核糖体 40 S 亚基在扫描到第一个 AUG 时, 部分 40 S 亚基与 60 S 亚基装配成核糖体而起始翻译, 得到具有信号肽的蛋白, 并被加工分泌到细胞外, 成为可溶性 HBeAg。另一部分 40 S 亚基继续扫描, 直到第二个 AUG 并与 60 S 亚基结合而起始翻译, 得到的表达产物由于不含有信号肽序列而被留在细胞内。这一结果与 mRNA 翻译起始调控的基础理论是一致的<sup>[2]</sup>。根据 C 基因的序列分析, 胞内的表达产物应该是 HBcAg, 而 ELISA 检测结果却表明, 其中大部分为 HBeAg (1:2 000), 小部分为 HBcAg (< 1:160)。这一现象证明在 HBc 基因羧基末端富含精氨酸的区域对于 HBcAg 的表达是非常重要的

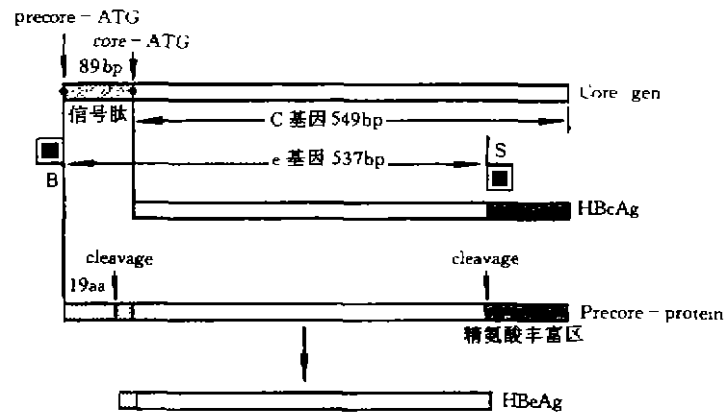


图 5 HBeAg 基因的结构及 PCR 扩增设计

B: Bgl II ; S: Sma I ; [ ]: 引物; [ ]: 信号肽; [ ]: 精氨酸丰富区

Fig. 5 Structure of HBeAg gene and PCR design

B: Bgl II ; S: Sma I ; [ ]: Primer; [ ]: Signal Peptide; [ ]: Arginine rich area

的,该区参与 HBe 抗原蛋白自我装配成核心颗粒。我们所扩增的 e 基因片段不包括这一精氨酸丰富区,因此所得到的表达产物中的 HBeAg 含量很低。

### 参 考 文 献

- 1 Miyahara A. Expression of hepatitis B virus core antigen in *Saccharomyces cerevisiae*: synthesis of two polypeptides translated from different initiation codons. *J Virol*, 1986, 59:176-180
- 2 Standring DJ. A signal peptide encoded within the precore region of hepatitis B virus directs the secretion of a heterogeneous population of e antigens in *Xenopus oocytes*. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1988, 85:8405-8409
- 3 Ou J H, Yen C T, T S Benedict Yen. Transport of hepatitis B virus precore protein into the nucleus after cleavage of its signal peptide. *J Virol*, 1989, 63:5238-5243
- 4 邓小昭,张林元,何亮等.乙型肝炎病毒 e 抗原基因在大肠杆菌中高表达. *中国药科大学学报*, 1992;23(5):290-293
- 5 齐义鹏,马晓雯,黄永秀等.乙型肝炎病毒 e 基因在枯草杆菌细胞中的克隆和表达. *武汉大学学报*, 1993(4):99-106
- 6 Gerlich W H, Heermann K H. Function of hepatitis B virus protein and virus assembly. In: Gerlich W H *et al* ed. *Viral Hepatitis and Liver Disease*. New York:1991. 121-134
- 7 Luckow VL, Summers MD. Trends in the development of baculovirus expression vectors. *Bio/Technology*, 1988, 6:47-55
- 8 邓小昭,张林元,于明明等.重组家蚕核多角体病毒(rBmNPV)的复制及所载 H $\alpha$ IFN- $\alpha$  基因的表达. *武汉大学学报*, 1995, 41(2):234-238
- 9 齐义鹏,黄永秀,魏中一.乙型肝炎病毒 ayw 亚型基因文库的构建. *武汉大学学报*, 1989(2):112-116
- 10 齐义鹏,黄永秀,梁明山编著. *基因工程原理和方法*. 四川大学出版社, 1988. 229-230
- 11 Summers ND, Smith GE. A manual of methods for baculovirus insect cells culture procedures. *Texas agricultural experimental station bulletin*, 1987, 1555

## Expression of HBeAg Gene with Baculovirus Vector in Silk Worm Cells

Deng Xiaozhao    Diao Zhenyu    He Liang  
Qiao Renliang    Zhang Linyan

(*Nanjing Command Military Medical Institute, Nanjing 210002*)

**Abstract** A HBeAg gene fragment, which has some restriction endonucleated sites on both 5' ends, including pre-c signal peptide sequence and 5' 447 bp of the HBcAg gene was amplified by PCR. The HBeAg gene fragment was cloned into the BmNPV transfer vector pBm030 and the chimeric vector pBmHBe was constructed. The BmN cells were co-transfected with pBmHBe and Wt-BmNPV DNA, therefore, the recombinant viruses were obtained by plaque purification. Analysis of the HBeAg antigenicity by ELISA showed that the highest titer in the cell cultural medium was up to a dilution of 1:32 000. Although HBeAg protein also presents in the BmN cells the titer was only 1:2 000. The HBcAg protein was fewer than HBeAg (< 1:160) whatever in culture medium and in cells. the results showed that the BmN cells can recognize the HBeAg signal peptide sequence and cut it correctly for HBeAg. The BmN-PV-BmN cell system is considered to be much better than *E. coli* system for producing HBeAg protein.

**Key words** HBeAg, BmNPV vector, Gene expression