中国科学（C 辑）
第 28 卷 第 2 期 SCIENCE IN CHINA (Series C) 1998 年 4 月

一种改造的同时含有 preS1, preS2 抗原决定簇的乙肝病毒表面抗原*

惠静毅 李光地 孔玉英 汪 垣
（中国科学院上海生物化学研究所，上海 200031）

摘要 利用 PCR 方法合成的编码乙肝病毒表面抗原 preS1 区氨基酸第 21～47 位和 preS2 区第 120～146 位肽段的基因片段同时分别与 S 基因的 5′端和 3′端(相当于第 223 位氨基酸)融合. 融合基因被置于痘苗病毒通用载体 pGJP-5 上的 P7.5 启动子下游，并通过体内同源重组，经筛选获得重组痘苗病毒 vS2SS1. vS2SS1 感染哺乳动物细胞后，融合蛋白 S2SS1 获得表达. 对 S2SS1 蛋白的表达水平、分泌性、抗原性和颗粒性分析结果表明，S2SS1 蛋白能够形成同时具有 preS1, preS2 和 S 抗原性的颗粒，并能有效地从细胞中分泌，其表达和分泌水平与重组痘苗病毒单独表达的 S 蛋白接近.

关键词 乙肝病毒表面抗原 preS1, preS2 抗原决定簇 融合蛋白 颗粒 重组痘苗病毒

乙型肝炎病毒(HBV)的外膜蛋白由主蛋白(S)、中蛋白(M)和大蛋白(L)3 种蛋白组成[1]. 主蛋白携带转移宿主脂类、形成亚颗粒以及分泌亚颗粒的所有信息，它作为载体已成功地表达了单纯疱疹病毒、人类免疫缺失病毒、脊髓灰质炎病毒和疟原虫等外源抗原. 同样，主蛋白也可以作为载体制备包含 HBV 本身抗原决定簇的多价免疫原.

目前仅由主蛋白组成的疫苗虽然已显示了较好的免疫保护作用，但是许多实验结果表明 preS 区所拥有的 B 和 T 细胞抗原决定簇具有很高的免疫原性，可以增强对 S 蛋白的免疫反应，克服对 S 蛋白的无反应性[2]. Neurath 等人在 1986 年证实肝细胞受体结合位点存在于 preS1(21～47)顺序中[3]，preS1(21～47)合成肽的抗血清具有体外中和病毒的能力，用含有这段顺序的合成肽免疫猩猩可保护其抵制 HBV 侵染[4]. 他们还证实在 preS2(120～145)顺序中有能够中和病毒的抗原决定簇[5]. 这段顺序中还同时含有 B 细胞和 T 细胞识别位点[6]. 因此，若将这 2 段顺序引入疫苗将可能增强现有疫苗的免疫效果. 然而，含有完整 preS 区的天然大蛋白很难在哺乳动物细胞中表达，分泌性差且不稳定. 为了改善 preS 的表达，我们曾成功地构建了含 preS1(21～47)与乙肝表面抗原在羧端第 223 位融合的重组痘苗病毒，表达的融合蛋白具双重抗原性[7,8]. 在此，我们将 preS2(120～146)肽段对的 DNA 片段融合于主蛋白对应的 S 基因的 5′端，同时在其 3′端与 preS1(21～47)肽段对应的 DNA 片段相融合. 在重

1997-01-11 收稿，1997-03-04 收修改稿
* 国家“八六三”高科技资助项目

组痘苗病毒体系中，实现了该融合蛋白的稳定分泌表达，对表达的融合蛋白的分泌性、抗原性和颗粒性进行了研究.

1　材料与方法

1.1　引物

第 1 组：用于扩增编码 preS1(21～47)DNA 片段的引物顺序为：5′引物 CTTTCTGTTGTATACCCTCTGGG，其中划线部分为引入的 AccⅠ切点. 3′引物 CCAGTGAT AAGCTTAGGGGTTG，其中划线部分为引入的 Hind Ⅲ切点.

第 2 组：用于扩增编码 preS2(120～146)DNA 片段的引物顺序为：5′引物 GTCATCCTGGATCCATGCAGTG，其中划线部分为引入的 BamH Ⅰ切点. 3′引物 GTTCCGGCCATGGAGCCACC，其中划线部分为引入的 NcoⅠ切点.

第 3 组：用于扩增含完整 S 基因 DNA 片段的引物顺序为：5′引物 GCACCGACCATGGAGAGCAC，其中划线部分为引入的 NcoⅠ切点. 3′引物 GGAGGTGTGGATCCGAGAGAG.

1.2　试剂

限制性内切酶、T4 连接酶、PCR 反应试剂盒均购自 Boehringer 公司. ^{35}S-甲硫氨酸使用 Amersham 公司产品. 抗 preS1(21～47)单抗 125E$_{11}$[9]由本所张祖传教授提供. 抗 preS2 单抗 Q19/10 由德国 Gerlich 教授赠送.

1.3　质粒、细胞株、病毒株

克隆载体 pWR13，pWR33 由中国科学院上海细胞生物研究所郭礼和教授赠送. 含有完整乙肝病毒 adr 亚型基因的质粒 pADR-1[10]由本所吴祥甫教授构建，痘苗病毒通用载体质粒 pGJP-5[11]由本实验室构建. 猴肾细胞株 CV-1 由德国马普生物化学研究所赠送. 猴肾细胞株 Vero 和痘苗病毒天坛株由卫生部北京生物制品研究所提供. 重组痘苗病毒 vSS1(即 vSA-28)[7]和 vTH-2[12]均为本实验室构建.

1.4　DNA 重组

所用 DNA 重组技术均按《分子克隆》一书中方法进行[13].

1.5　细胞的转染

Vero 细胞经痘苗病毒天坛株以 MOI 为 0.1 感染 1h 后，采用磷酸钙共沉淀的方法进行.

1.6　重组痘苗病毒的筛选

胸腺嘧啶核苷激酶缺失(TK$^-$)的重组痘苗病毒用人 TK$^-$143 细胞在 5 溴尿嘧啶核苷(5-BUdR)存在下进行空斑筛选纯化.

1.7　病毒 DNA 的抽提及 Southern blot 鉴定

经重组痘苗病毒感染的 Vero 细胞用裂解缓冲液(1% SDS，20% 蔗糖，0.1 mmol/L 巯基乙醇，50 mmol/L Tris-HCl，pH7.8)和蛋白酶 K 于 37℃ 处理 4h，再分别用酚、氯仿除去蛋白，经乙醇沉淀后获得痘苗病毒 DNA. 用 ECL 法对重组痘苗病毒 DNA 进行 Southern blot 分析，具体操作按 Amersham 公司提供的方法进行.

1.8　^{35}S-甲硫氨酸脉冲标记及免疫沉淀分析

基本按徐谐等人方法进行[8]. CV-1 细胞经重组痘苗病毒以 MOI 为 0.1 感染 20h 后，用 ^{35}S-甲硫氨酸标记 5h. 将培养液和细胞裂解液先分别与抗 preS1(21～47)单抗 125E$_{11}$杂交，再

用 Staph-ProteinA(Boehringer 公司)沉淀. 经 SDS-PAGE 后放射自显影.

1.9 HBsAg, preS1 和 preS2 抗原的检测

HBsAg 用华美公司酶联试剂盒测定, preS1 抗原测定按杨海林等的方法[9]进行. preS2 抗原通过用抗 preS2 单抗 Q19/10 包被后, 用酶联抗 S 抗体检测.

1.10 CsCl 密度梯度超离心分析

每管自底部依次加入 0.5 mL 重量比为 45%～10% 的 CsCl 溶液(间隔为 5%, 1.08～1.41g/mL), 再加入经初步纯化的样品 300 μL, 45 000r/min 于 8℃ 离心 48h(日立, RPS65T 转头). 由底部打孔, 分管收集(每管约 170 μL), 由阿贝折光仪测得旋光度后计算密度.

1.11 电子显微镜观察

经 CsCl 密度梯度超离心的样品, 用醋酸铀负染, 在日立电子显微镜下进行观察.

2 结果

2.1 preS1(21～47), preS2(120～146)基因同时与 S 基因融合克隆的构建

以含有完整 HBV adr 亚型基因的质粒 pADR-1 为模板, 先后使用第 1, 2, 3 组 3 对引物, 通过 PCR 方法分别扩增了编码 preS1(21～47), preS2(120～146)以及含 S 基因的 DNA 片段. 先将含有 preS2(120～146)DNA 片段的扩增产物经 BamH Ⅰ, Nco Ⅰ 酶切后回收的 S2 片段(图 1(a))与含有 S 基因的扩增产物经 Nco Ⅰ, Hind Ⅲ 酶切后回收的 S 片段(图 1(b))共同插入质粒 pWR13, 获得重组质粒 pWRS2S(图 1(c)). 然后将含有 preS1(21～47)DNA 片段的扩增产物经 Acc Ⅰ, Hind Ⅲ 酶切后回收的 S1 片段(图 1(d))与用 Acc Ⅰ, Hind Ⅲ 酶切后的 pWRS2S 连接, 获得 preS2(120～146)与 S 基因 5′端, 同时 preS1(21～47)与 S 基因 3′端 Acc Ⅰ 位点(相当于第 223 位氨基酸)融合的克隆 pWRS2SS1(图 1(e)). pWRS2SS1 经酶切与测序鉴定, 证明阅读框架与设计完全相符.

为了便于在重组痘苗病毒通用载体 pGJP-5 上克隆, 将大小为 0.8 kb 的融合基因片段 S2SS1 经 BamH Ⅰ, Hind Ⅲ 酶切克隆入质粒 pWR33 过渡, 再经 BamH Ⅰ, EcoR Ⅰ 切出, 插入质粒 pGJP-5 的 BamH Ⅰ, EcoR Ⅰ 位点上, 并置于 P7.5 启动子的调控下, 从而构建了重组表达质粒 pGJPS2SS1(图 1(f)).

2.2 带有融合基因的重组痘苗病毒 vS2SS1 的构建

Vero 细胞经痘苗病毒天坛株感染后, 转染表达质粒 pGJPS2SS1 后, 48h 收获细胞. 并进行空斑法筛选. 同时通过检测感染细胞分泌的 HBsAg 表达量进一步确认, 经过 2 次空斑纯化, 得到重组痘苗病毒 vS2SS1.

抽提出的重组病毒 DNA 用 BamH Ⅰ, EcoR Ⅰ 双酶切后, 以 PCR 扩增的 S 片段为探针, 进行 Southern blot 杂交鉴定. 结果如图 2 所示, 在 vS2SS1DNA 中有 1 条与 S 基因杂交呈阳性的条带, 这和重组质粒 pGJPS2SS1DNA 经同样酶切后的条带大小相同, 都为 0.8 kb, 这正是融合基因 S2SS1 的长度. 而在对照痘苗病毒天坛株 DNA 中则没有明显的杂交条带. 这清楚地说明重组痘苗病毒 vS2SS1 DNA 中已正确地插入了 preS2(120～146), preS1(21～47)基因同时与 S 基因融合的 DNA 片段.

2.3 表达的融合蛋白的^{35}S-甲硫氨酸标记和免疫沉淀分析

用^{35}S-甲硫氨酸标记与免疫沉淀分析的方法对表达的融合蛋白 S2SS1 进行了分析. 在细

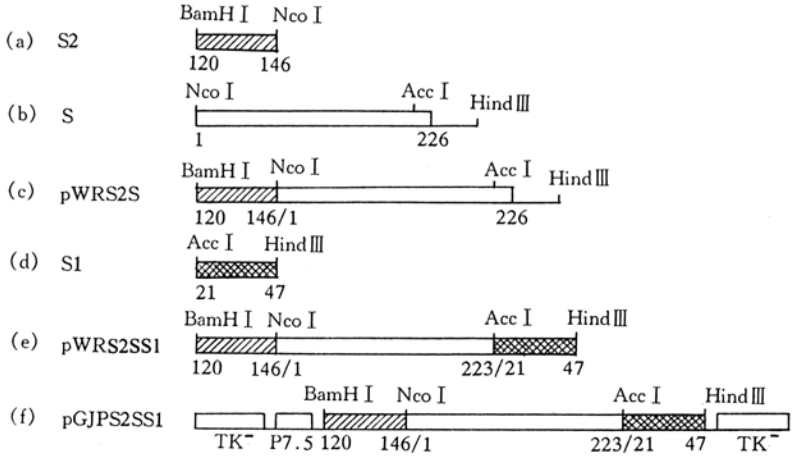

图 1　含有 HBsAg 融合基因的重组质粒构建图

(a)～(f)分别代表基因片段和重组质粒名称．▭为 S 基因；▨为 preS1(21～47)基因；▨为 preS2(120～146)基因

胞培养液和裂解液中的 S2SS1 蛋白均能被 preS1(21～47)的单抗 $125E_{11}$ 所沉淀，作为对照的痘苗病毒天坛株感染的细胞则检测不到特异条带，结果见图 3．由在培养液中呈现的相当强的特异条带(GP27，GP29 和 GP33)可以看出，S2SS1 蛋白能够有效地从胞内分泌到胞外．

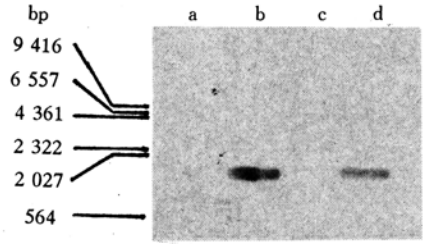

图 2　S2SS1 的 Souther blot 鉴定

a 为 pGJP-5，b 为 pGJPS2SS1，c 为痘苗病毒天坛株 DNA，d 为 vS2SS1 DNA

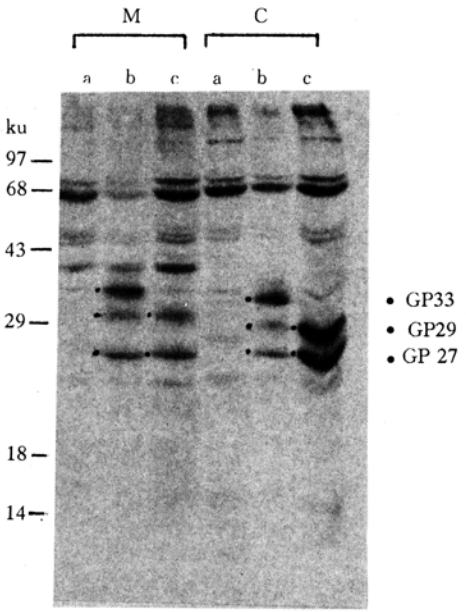

图 3　^{35}S-甲硫氨酸标记的重组蛋白与单抗 $125E_{11}$ 的免疫沉淀反应

M 为培养液，C 为细胞裂解液．a 为未感染病毒的 CV-1 细胞，b 为 S2SS1，c 为 SS1

vSS1(相当于 vSA-28[7])是能够表达 S 蛋白 C 端在其第 223 位氨基酸与 preS1(21～47)融合的 SS1 蛋白的重组痘苗病毒. 其表达产物 SS1 蛋白也能被单抗 $125E_{11}$ 沉淀(GP27 和 GP29). 由于编码 S2SS1 蛋白融合基因在 preS2 和 S 基因的 5′端各有 1 个 ATG 起始密码子, 所以 S2SS1 蛋白除了有分子量比 SS1 蛋白更大的条带(GP33)外, 还有与 SS1 蛋白大小相等的 2 条带(GP27 和 GP29).

2.4 表达的融合蛋白的 ELISA 分析

重组痘苗病毒 vS2SS1 以 0.1MOI 感染 1×10^6 的 Vero 细胞, 96h 后分出培养液和细胞. 细胞用与培养液等体积的 PBS 悬浮后, 经液氮反复冻融后, 离心获得的上清液即细胞裂解液. 我们用 ELISA 的方法对细胞培养液和裂解液中的 S2SS1 蛋白的 HBsAg 抗原性进行了测定, 结果见图 4. 其中 vTH-2 是仅能够表达 S 蛋白的重组痘苗病毒[12]. vS2SS1 表达的融合蛋白 S2SS1 其表达和分泌水平与 vTH-2 表达的 S 蛋白接近, 由胞外的表达量与总表达量相比后可以看出, 约有 60% 以上的蛋白是分泌到胞外的.

同时, 我们用 ELISA 的方法对融合蛋白中的 preS1, preS2 的抗原性也进行了检测, 结果列于表 1. 在细胞培养液和裂解液中的 S2SS1 蛋白具有相应的 preS1, preS2 抗原性. 由于 vTH-2 只表达 S 蛋白而不含有 preS 区, 所以检测不到 preS1, preS2 抗原性.

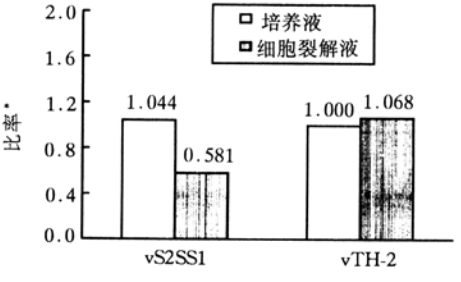

图 4 S2SS1 蛋白在 Vero 细胞中的表达和分泌

以细胞培养液中 vTH-2 表达的 S 蛋白的 HBsAg 量作为 1.000

表 1 S2SS1 蛋白的 preS1 和 preS2 抗原性[a)]

病毒	preS1-(A_{450})		preS2-(A_{450})	
	M	C	M	C
vS2SS1	0.870	0.692	0.311	0.231
vTH-2	0.034	0.034	0.013	0.027

a)M 为培养液, C 为细胞裂解液. 用于检测 preS1 抗原的样品以 1:10 稀释, 而 preS2 抗原则以原液样品检测

2.5 融合蛋白的 CsCl 密度梯度超离心分析和电子显微镜观察

融合蛋白经 CsCl 密度梯度超离心后, 分管收集, 用 ELISA 的方法分别测定了每管中 HBsAg, preS1 和 preS2 的抗原性, 结果见图 5. 由图中可以看出, HBsAg, preS1 和 preS2 抗原阳性峰都处在密度为 1.22 g/mL 处, 略大于 vTH-2 表达的 S 蛋白密度 1.20 g/mL[7]. 这说明融合蛋白 S2SS1 可形成密度为 1.22 g/mL 的颗粒, 该融合颗粒同时具有 HBsAg, preS1 和 preS2 的

三重抗原性.

取密度为 1.22g/mL 阳性峰的样品经负染后，用电子显微镜进行观察(图 6)，可以清楚地看到均匀的球形颗粒，直径约为 22 nm. 这表明 S2SS1 融合蛋白是以颗粒形式存在，它的形状和大小类似于在病人血清中观察到的球形乙肝病毒颗粒.

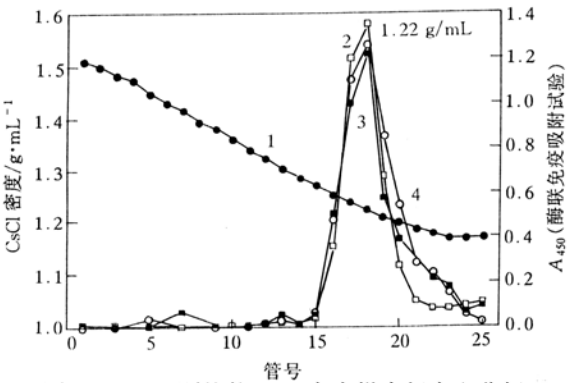

图 5　S2SS1 颗粒的 CsCl 密度梯度超离心分析

1 为 CsCl，2 为 HBsAg，3 为 preS1，4 为 preS2

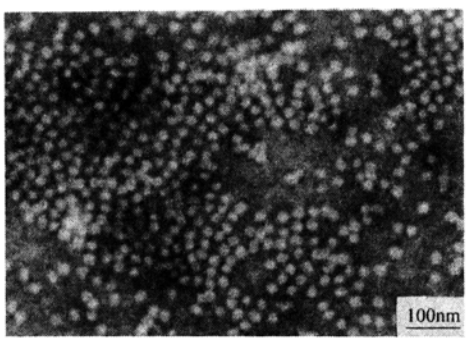

图 6　S2SS1 颗粒的电子显微镜照片

3　讨论

越来越多的数据表明在新型乙肝疫苗中引入 preS 区是非常必要的. 然而，大蛋白很难在哺乳动物细胞中获得表达. 因此，我们采用了去除 preS1 区的滞留顺序和尽可能减少 preS2 区的蛋白酶敏感位点的设计思想，在 preS 区选择了肝细胞受体结合位点 preS1(21～47)和含有 B 和 T 细胞表位的 preS2(120～146)2 段抗原决定簇与 S 蛋白融合，并且重排了它们在天然大蛋白中的次序. 这个经改造的新的抗原结构，国内外尚未见报道.

我们实验室徐谐等[7,8]曾将 preS1(21～47)与 S 蛋白 C 端第 223 位氨基酸融合，融合蛋白具有双重抗原性，能有效分泌，并能形成颗粒. 新构建的 S2SS1 蛋白是在 SS1 蛋白前再增加了一段 preS2(120～146). S2SS1 蛋白不仅具有三重抗原性，而且仍然能够分泌，并能组装成颗粒，这表明 S2SS1 蛋白的融合结构对其表达、分泌以及颗粒的组装都没有明显影响.

Prange 等[14]将 preS1 区 N 端 42 个氨基酸与 S 蛋白 C 端 223 位融合，在哺乳动物细胞中进行暂时表达，表达产物也能分泌. 但当将 preS1(1～42)融合至中蛋白的 C 端后，融合蛋白的分泌则完全被抑制. 他们认为后者是由于缺少穿膜信号造成的. 我们构建的融合基因与之相比，除在 S 蛋白 C 端融合的 preS1 片段短了约一半外，在 S 蛋白的 N 端融合的 preS2 片段也仅为完整 preS2 的一半左右，其分泌性和颗粒性都未明显受影响. 我们的设计较好地解决了既具有 S，preS1 和 preS2 三重抗原性，又能分泌表达并形成颗粒的难题. 另外可以看出，融合片段的大小及其一级结构可能会造成融合蛋白构型的改变，进而影响融合蛋白的分泌. 这对于研究如何利用 S 蛋白作为载体有效地表达外源抗原的规律有重要意义. 对该融合颗粒的纯化和免疫原性的研究以及用作乙型肝炎的预防和治疗的可能性尚在进一步研究中.

致谢　感谢张祖传教授提供单抗 $125E_{11}$，德国 Gerlich 教授赠送单抗 Q19/10.

参 考 文 献

1 Ganem D, Varmus H E. The molecular biology of hepatitis B virus. Annu Rev Biochem, 1987, 56: 651～693

2 Milich D R. T-and B-cell recognition of hepatitis B viral antigen. Immunology Today, 1988, 9: 380～386

3 Neurath A R, Kent S B, Strick N, et al. Identification and chemical synthesis of a host cell receptor binding site on hepatitis B virus. Cell, 1986, 46: 429～436

4 Neurath A R, Seto B, Strick N. Antibodies to synthetic peptides from the preS1 region of the hepatitis B virus (HBV) envelope(env) protein are virus-neutralizing and protective. Vaccine, 1989, 7: 234～236

5 Neurath A R, Kent S B, Parker K, et al. Antibodies to a synthetic peptide from the preS 120～145 region of the hepatitis B virus envelope protein are virus neutralizing. Vaccine, 1986, 4: 35～37

6 Schodel F, Weimer T, Will H. HBV: molecular biology and immunology, Biotest Bulletin, 1990, 4: 63～83

7 Xu X, Li G D, Kong Y Y, et al. A modified hepatitis B virus surface antigen with the receptor-binding site for hepatocytes at its C terminus: expression, antigenicity and immunogenicity. J Gen Virol, 1994, 75: 3 673～3 677

8 徐 谐,李光地,孔玉英,等. 乙肝病毒 preS1 片段与乙肝表面抗原羧端的融合表达. 生物化学与生物物理学报,1995, 27:523～528

9 杨海林,曹蕙婷,李默漪,等. 完整乙肝病毒 Dane 颗粒标志物 preS1 蛋白检测药盒的研制. 上海医学检验杂志,1995, 10:204～206

10 吴祥甫,周翊钟,冯宗铭,等. 人乙型肝炎病毒——HBV adr 亚型基因组的克隆和限制性酶切图谱. 中国科学,B 辑, 1983,(2):162～167

11 吴 雪,李光地,冯宪铭,等. 痘苗病毒通用表达载体 pGJP-5 的组建. 生物化学与生物物理学报,1987,19:397～405

12 钟武威,吴 雪,孔玉英,等. 用 LacZ 基因作标记在原代细胞中构建乙肝-痘苗重组病毒. 生物化学与生物物理学报, 1989,21:277～283

13 Sambrook J, Fritsch E F, Maniatis T. Molecular Cloning. 2nd Edition. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989

14 Prange R, Werr M, Birkner M, et al. Properties of modified hepatitis B virus surface antigen particles carrying preS epitopes. J Gen Virol, 1995, 76: 2 131～2 140