

以 β -半乳糖苷酶为标记选出高效表达乙型肝炎病毒表面抗原的天坛株重组痘苗病毒*

刘庚起 曹 旭 朱既明 任贵方

李红梅 解燕乡 彭 薇

(中国预防医学科学院病毒学研究所,北京)

摘 要

我们从天坛株痘苗病毒的基因组中,分离编码 11K 及 25K 蛋白的双向转录启动子,以胸苷激酶(TK)基因为旁侧序列,插入到质粒 pAT153 中,构建成可以同时表达两个外源基因的载体质粒,并将乙型肝炎病毒表面抗原(HBsAg)基因及大肠杆菌的 β -半乳糖苷酶(LacZ)基因,插入该载体质粒,使它们分别在 11K 及 25K 启动子的控制下,构建成共表达质粒。用钙沉淀法将此质粒 DNA 同天坛株痘苗病毒在细胞内进行同源重组,在含 X-gal 的培养基挑蓝色蚀斑,简便、准确地选出重组痘苗病毒。所选到的重组痘苗病毒高效表达了 HBsAg。我们还把上述重组痘苗病毒接种动物,观察了它们的毒力及免疫原性。

关键词: β -半乳糖苷酶,乙型肝炎病毒表面抗原,重组痘苗病毒

应用痘苗病毒在全世界范围内消灭了天花。近几年来,痘苗病毒分子遗传学的研究取得了重要的进展^[1-5],使人们可以利用痘苗病毒作为表达外源基因的载体,从而为痘苗病毒的应用开辟了新的前景。不同学者相继报道了,在重组痘苗病毒中表达 HBsAg^[6-9]及其它外源基因。Paoletti 等^[10]还成功地获得同时表达三种外源基因的多价重组痘苗病毒。用这些重组痘苗病毒免疫动物,能诱发对这些外源抗原的抗体,或观察到免疫动物对相应感染的保护作用^[11]。因此,有可能应用重组痘苗病毒作为活疫苗,预防那些严重危害人的传染病。

近些年来,侯云德等^[12]对我国用来消灭天花的疫苗株——天坛株痘苗病毒的基因组,进行了克隆化和酶谱分析。在此基础上,我们用 WR 株的 Hind III F 片段作为旁侧序列,初步表达了 HBsAg^[9]。本文报道了应用天坛株痘苗病毒基因克隆,包括 11K 和 25K 双向启动子及其旁侧序列 TK 基因,构建的载体质粒和含有 HBsAg 基因及 LacZ 基因的表达质粒;以及以 β -半乳糖苷酶为标记选择重组痘苗病毒的方法和重组痘苗病毒对 HBsAg 的高效表达等。

在我们进行此工作期间,Chakrabarti^[13]和 Panical^[14]也先后报道了用 β -半乳糖苷酶选择重组痘苗病毒。

1988 年 8 月 11 日收到修改稿。

• 国家自然科学基金资助项目。

一、材料和方法

细胞和病毒 天坛株痘苗病毒 (TV), 由卫生部药品生物制品检定所惠赠, 病毒在鸡胚细胞增殖并纯化。人骨肉瘤胸苷激酶阴性 (TK⁻) 细胞 (H, 143B, 简称 143), 由中国科学院上海生物化学研究所转赠。CV-1 细胞购自美国 ATCC。

动物 家兔及昆明小白鼠均购自中国医学科学院动物中心。

酶和化学试剂 限制性内切酶分别购自西德 Boehringer mannheim 公司, 华美生物工程公司及中国医学科学院基础医学研究所。T4 DNA 连接酶及 T4 多核苷酸激酶购自中国科学院生物物理研究所。DNA 聚合酶 I (大片段), 放射性同位素 (α -³²P, d-ATP 购自 Amersham 公司。低熔点琼脂糖、X-gal (5-bromo-4-chloro-3-indolyl- β -D-galactopyranoside), 购自美国 BRL 公司。5-bromo-2-deoxyuridine (BUdR) 购自 Fluka 公司。AUSRIA II-125 放射免疫试剂盒, 购自美国 Abbott 公司。其它化学试剂用国产分析纯。

细菌和质粒 大肠杆菌 pMc 1061 和 K802 由中国科学院微生物研究所提供。质粒 pF710 和 pJ153 系 TV Hind III F 片段 (约 13.2kb) 和 Hind III J 片段 (约 5kb), 分别克隆到 pAT 153 的 Hind III 位点构成, 这两个质粒均由本所侯云德教授提供^[12]。质粒 pMc 1403 和 pPLCATI β gal 由比利时 Gent 大学分子生物学实验室 Remaut 博士惠赠。pSDHBr-1 由本室张一鸣大夫构建^[15], pA01 由国外引进^[16]。

常规分子生物学方法 各种酶反应、感受态细菌的制备及转化, 质粒 DNA 的制备、克隆分析、 α -³²P 标记探针及分子杂交等方法, 基本参照文献^[17]。用以标记探针的 DNA 系自质粒 pBHW7 (本所王淑凤大夫构建) 分离, 此质粒含乙型肝炎病毒 adw 亚型的全序列 DNA。

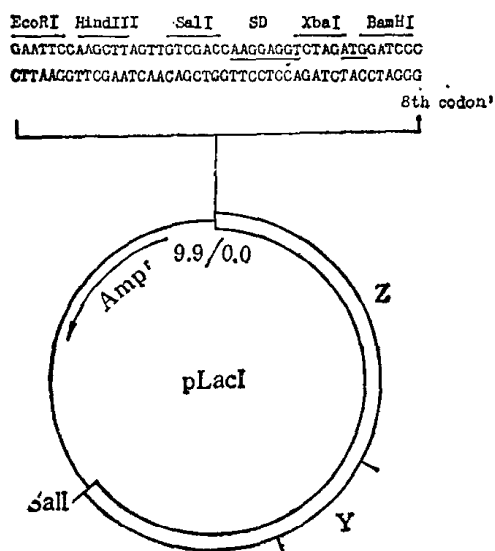


图 1 含 LacZ 基因的质粒 pLacI 结构

pLacI 质粒的构建 质粒 pLacI 是由 pMc1043^[18] 和 pPLCATI β gal 构建, 用 SalI 酶切可以分离含完整 Lac I 基因功能的 DNA 片段 (图 1)。

TK⁺ 天坛株痘苗病毒的分离及纯化

我们发现天坛株痘苗病毒是 TK⁺ 及 TK⁻ 病毒的混杂体, 因此必须分离纯化。首先将混合的天坛株病毒稀释并感染鸡胚细胞, 并在含 MTAGG (1 μ mol/L methotrexate/15 μ mol/L thymidine/50 μ mol/L adenosine/50 μ mol/L guanosine/10 μ mol/L glycine) 培养液中生长, 然后挑斑, 并且在 TK⁻ 143 细胞检查所挑病毒的 TK 性状。选择那些在含有 MTAGG 维持液中生长, 并且蚀斑滴度与在正常维持液中

生长病毒的滴度基本一致, 但在含 BUdR (25 μ g/ml) 的维持液中比在正常维持液中生长病毒的滴度低 4 个对数以上的蚀斑, 在鸡胚细胞中再用挑斑法纯化 2 代, 经进一步增殖后, 分装、冻存, 作为实验用 TK⁺ 病毒。

表 1 RIA 测定重组痘苗病毒表达的 HBsAg*

标 本	病毒感染量 (pFU/细胞)	测 定 时 稀 释 度	cpm	产 量 ($\mu\text{g}/5 \times 10^6$ 细胞)
TK ⁺ 病毒	0.5	1:5	99	—
	30	1:10	125	—
RVj114	0.5	1:5	3250	2.08
	30	1:10	9209	6.15
		1:20	4361	7.48
RVj129	0.5	1:5	2637	1.27
	30	1:10	8668	5.77
RVj103	0.5	1:1	7288	0.62

* 用 Abbott AUSRIAII-125 试剂测定,按 Abbott 标准计算产量。

TK⁺ 痘苗病毒与重组质粒 DNA 在细胞内重组 参照文献 [19]。以 X-gal 培养基选择重组病毒时,用磷酸钙沉淀法,将重组质粒 DNA 沉淀在 CV-1 或 143 细胞上,使其进入细胞并与已感染的 TK⁺ 天坛株痘苗病毒,在细胞内进行同源重组。将重组的病毒液稀释,并分别接种 TK⁻143 细胞,在含有 25 $\mu\text{g}/\text{ml}$ BUdR 的维持液中 37 $^{\circ}\text{C}$ 生长 2 天,出斑后铺含有 120—150 $\mu\text{g}/\text{ml}$ X-gal 的营养琼脂,37 $^{\circ}\text{C}$ 再培养 6h 至 2 天,可见蓝色蚀斑。挑出蓝斑并连续纯化 2 代,经增殖后为完全出蓝斑的重组病毒(见后面图 4)。

接种动物的痘苗病毒的制备 TK⁺TV 和 RVj114, RVj129 重组痘苗病毒,在 143 细胞(或鸡胚细胞)增殖。感染的细胞离心沉淀后,以磷酸盐缓冲液(PBS)重新悬浮,超声波打碎,离心去细胞碎片,将上清液滴定并冻存,作为接种动物用病毒。

二、结 果

1. 重组质粒的构建

如图 2 所示, pUF 1211 系由 TV DNA 分离的 Hind III F 片段最右端的 Hind III-RsaI 片段,克隆入质粒 pUC12 的 Acc I (经大片段聚合酶补平) 和 Hind III 位点所构建。pJ13 含有 TV DNA Hind III J 片段左端的 HindIII-XhoI 片段(TK 基因位于此片段),及在 ClaI 和 EcoRI 酶切位点之间插入的一段人工合成的多个酶切位点序列(包括 ClaI, BglII, XhoI, StuI, EcoRI)。质粒 pUF1211 中的 EcoRI 片段共 194bp, 含有 11K 编码基因 5' 端上游序列及其翻译起始密码子,并具有 P11 和 P25 两个启动子功能,将此片段插入到 pJ13 的 EcoRI 位点,即获得含双向启动子的载体质粒 pJ15。质粒 pJ16 是将 pUF1211 中的 XbaI 片段去除后,再与 pJ13 进行 EcoRI 位点的重组获得,此质粒也同时含有 P11 和 P25 双向启动子功能。从 pA01 及 pSDHBrI 分别分离含 HBsAg 基因 adw 亚型的 EcoRI—BglII 片段(2.0kbp),及 adr 亚型的 XhoI—BglII 片段(1.8 kbp)。将分离自 placI 的 LacZ 基因(SalI 片段及经化学合成接头修饰后的 BglII 片段)和 HBsAg 基因,分别插入到 pJ16 和 pJ15 的 P11 和 P25 下游的相应位点,构建成 pJ129, pJ114 和 pJ103 共 3 个表达质粒(图 2)。pJ129 和 pJ114 都是在 P11 下游插入 HBsAg 基因,在 P25 下游插入 LacZ 基因,不同之点是:除了 pJ129 的 P25 下游多 100bp 外,其 P11 下游插入的 HBsAg adw

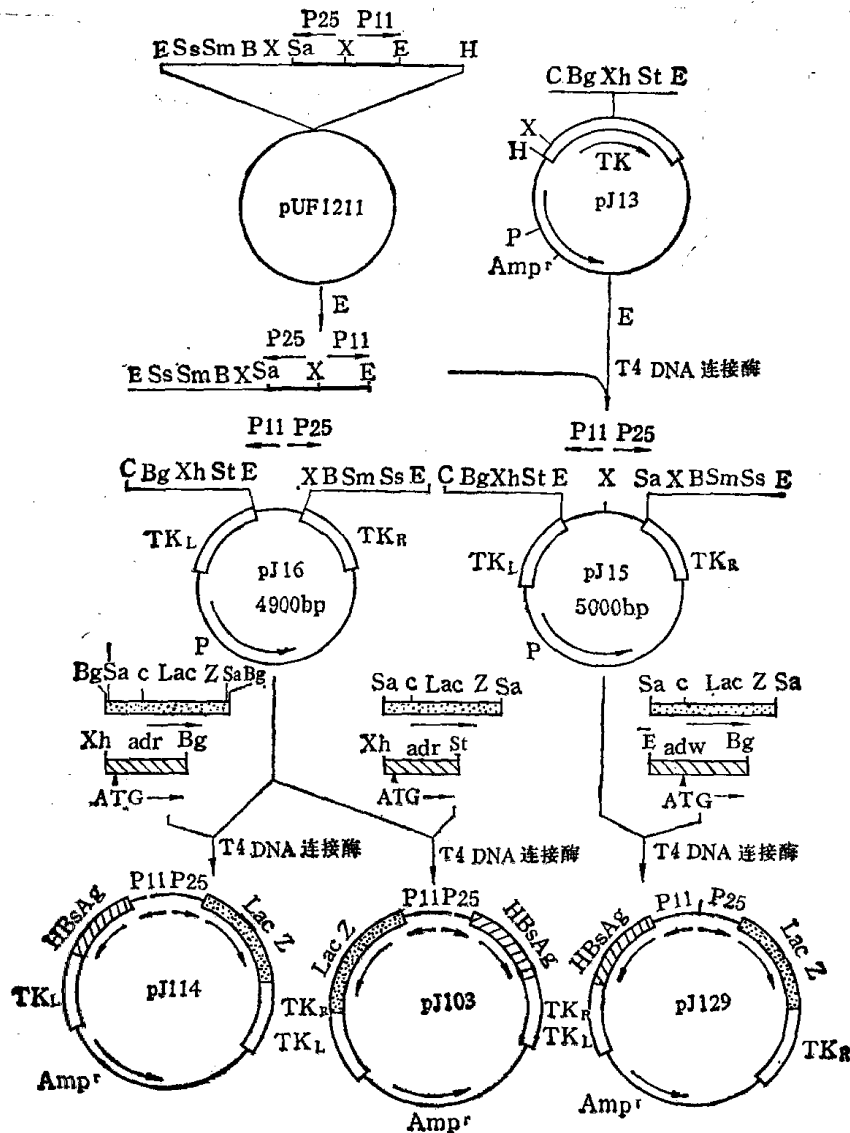


图2 在P11和P25双向启动子的下游分别插入HBsAg和LacZ基因后构建的重组质粒

(P25—25K启动子, P11—11K启动子。DNA核酸内切酶位点: E—EcoRI, Ss—SstI, Sm—SmaI, B—BamHI, X—XbaI, Sa—SalI, H—HindIII, C—ClaI, Bg—BglII, Xh—XhoI, St—StuI, P—PstI.

LacZ— β -半乳糖苷酶基因。

adr及adw—含adr亚型或adw亚型的HBsAg基因)

亚型片段,包含了完整的S基因及5'端缺少3个密码子的pre-S₂基因,当P11本身带有的ATG与pre-S₂的第4个密码子直接相连时,中间仅缺少第2和第3两个密码子(图3);而在pJ114中,除P25下游少了100bp外, P11下游插入的HBsAg adr亚型片段,只含完整的S基因;并且在P11的ATG的下游相隔2个密码子处有一个终止密码子TAG,因此S基因的翻译是独立起始的,不会形成融合蛋白(图3)。pJ103的启动子结构与pJ114相同,但在P11下游插入LacZ基因,而在P25下游插入HBsAg adr亚型的S基因。

2. 重组病毒的选择及对HBsAg的表达

用X-gal培养基选出出蓝斑的病毒后,经连续挑斑纯化2代,即为重组痘苗病毒(图4)(见

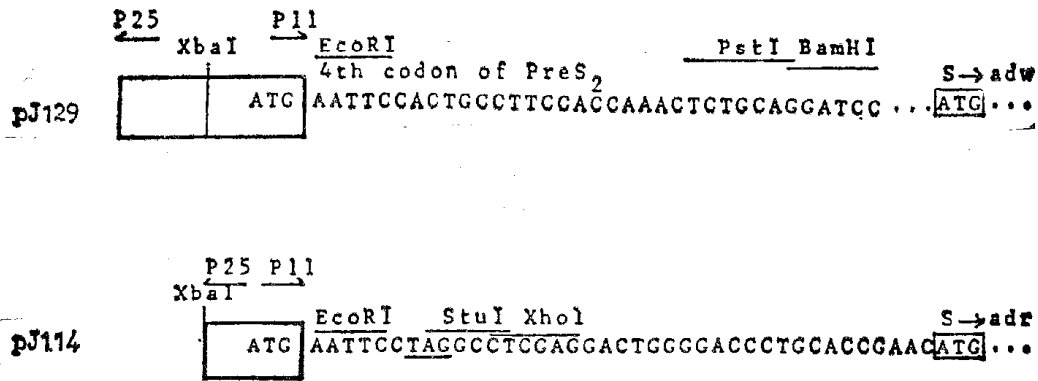
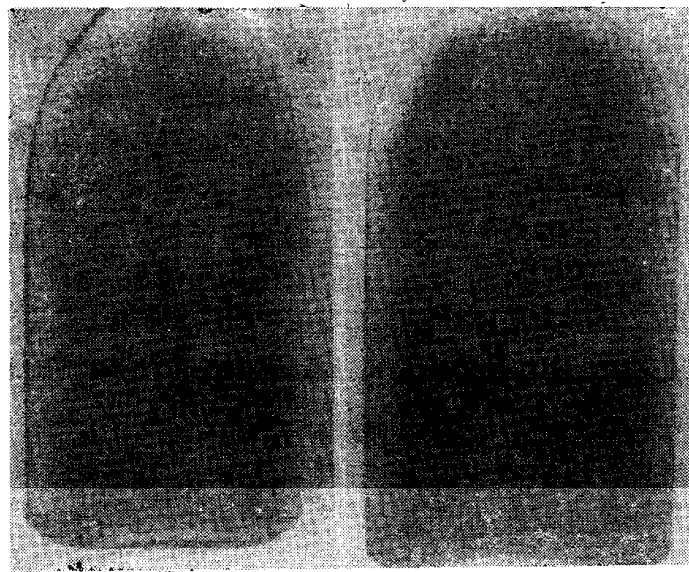


图 3 11K 启动子与 HBsAg 基因连接部位的 DNA 序列

(P11 和 P25 分别为 11K 及 25 启动子, 箭头所指的方向为启动子及外源基因转录方向)



(a)

(b)

图 4 出蓝斑的重组病毒

(含 LacZ 基因的重组痘苗病毒, 在铺有 X-gal 的营养琼脂培养基的 TK-143 细胞 (a) 及鸡胚细胞 (b) 呈现的蓝斑)

方法)。将重组的病毒接种细胞, 并在铺有 X-gal 的营养琼脂出蓝斑后, 去掉覆盖的琼脂, 经硝基纤维膜复印, 再与 ^{32}P 标记的含 HBsAg 基因的 DNA 探针杂交, 证明蓝斑的位置与杂交点相符。用 X-gal 法选出的几株重组病毒都同时测出有 HBsAg 表达。重组病毒对 HBsAg 的表达水平见表 1。表 1 表明, 当感染量 ($m.o.i$) 平均为 0.5 PFU/细胞时, HBsAg 基因在 P11 控制下的表达量 (RVj114), 比在 P25 控制下的表达量 (RVj103) 高 3—4 倍。当 $m.o.i$ 提高到 30 PFU/细胞时, RVj114 表达 HBsAg 的水平可高达 $7.48\mu\text{g}/5 \times 10^6$ 细胞。同样在 P11 的控制下, 但含有 pre-S₂ 及 S 基因的 RVj129 的 HBsAg 的表达量仅比只含 S 基因的 RVj114 略低。

3. 病毒的毒力及对家兔的免疫原性

毒力试验分别在家兔皮内及小鼠脑内进行。以不同稀释度的 TK^+ 痘苗病毒及 TK^- 重

组痘苗病毒 RVj114 及 RVj129, 在刚剃过毛的家兔皮内接种, 每个稀释度接种 0.2ml。在同一家兔的背部, 一侧接种 TK⁺ 的 TV, 另一侧接种 TK⁻ 的重组病毒。接种后连续观察 7 天, 以接种局部是否出现痘疱, 痘疱的大小及有无坏死, 为判定接种病毒的毒力指标。结果表明, TK⁻ 的重组痘苗病毒比 TK⁺ 的 TV 的毒力大约低 1—2 个对数。

小鼠脑内的毒力试验用 3 周龄昆明种小白鼠, 将上述已制备好的 10^3 PFU/ml 的病毒, 分别以 10^{-1} — 10^{-6} 共 6 个稀释度, 每个稀释度接种 5—6 只小鼠, 0.03ml/只, 连续观察 10 天, 记录小鼠死亡数, 接种后 24h 内死亡者, 为非特异死亡。观察结果表明, TK⁺ 的天坛株病毒与 TK⁻ 的重组病毒 (RVj129) 的小鼠脑内的半数至死量分别为 3.0 和 3.68, 它们的脑内毒力并无明显不同。

家兔的免疫试验分两组, 第一组用两只家兔, 以 10^3 PFU/ml 的 TK⁻ 的重组病毒 RVj114 及 RVj129 各接种一只, 在家兔的背部分 5 处皮内接种, 每处 0.2ml, 接种后每周采血, 连续采 6 周。第二组用上述做毒力试验的两只家兔, 接种病毒后每周采血, 连续采血 5 周; 于接种后的第 9 周, 以 10^3 PFU/ml 的 RVj114 及 RVj129, 分别皮内接种相应的家兔, 接种后连续采血 8 周。分离血清, 以北京生化免疫制剂中心生产的放射免疫药盒, 进行抗 HBs 检测, 结果见图 5。从图 5(a) 可以看出, 在第一组的试验中, 以 RVj114 接种的兔子, 在接种后第 5 及第 6 周, 只能测到可疑的 HBsAg 抗体反应, 而以 RVj129 接种的家兔, 接种后第 1 周即可测出 5×10^2 cpm 的 HBsAg 抗体, 并且在第 3 周到第 6 周, 抗体水平一直维持在 10^3 cpm。从图 5(b) 可以看出, 当应用做皮肤试验的小量病毒 ($< 10^6$ PFU) 接种家兔时, 于接种后的第 5 周, 仅 RVj129 接种的家兔出现可疑滴度的抗 HBs, 于第 9 周抗体升高到 10^3 cpm; 而 RVj114, 接种后第 9 周才测到可疑滴度的抗体。但是, 当以 10^3 PFU 的病毒再次接种后, 无论 RVj129 或 RVj114 免疫的家兔, 抗体水平都有急剧的升高, 且 RVj129 仍高于 RVj114。二者的抗体水平持续 8 周无明显下降。

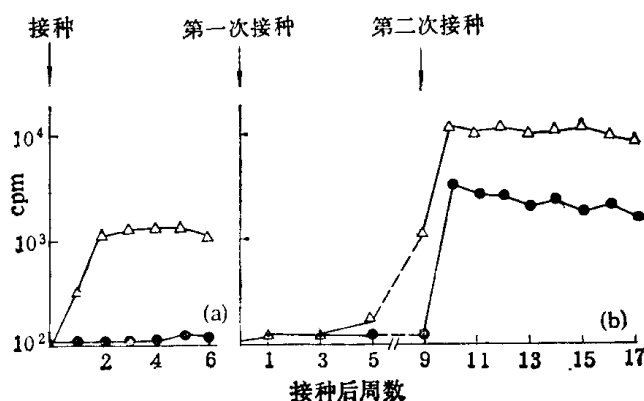


图 5 重组病毒 RVj129 和 RVj114 接种家兔后的 HBsAg 的抗体反应

(△—△为接种 RVj129; ●—●为接种 RVj114)

三、讨 论

本文报道了用天坛株痘苗病毒 11K 及 25K 双向启动子, 及大肠杆菌的 LacZ 基因和 HBsAg 基因构建共表达质粒, 在含 X-gal 的营养琼脂平皿中选蓝斑的方法, 挑选重组痘苗病毒。本方法比单用 TK 基因为标志选择重组病毒简便易行。采用表达 LacZ 基因选蓝斑的

方法,适用于包括 TK 基因在内的所有非必须区。我们曾用此法选择到在天坛株 HindIII F 片段左端的 BglIII 酶切位点插入 LacZ 基因的重组病毒。此外,还可以用测定 β -半乳糖苷酶短暂表达的方法,选择强弱不同的痘苗病毒启动子。也可以用表达 β -半乳糖苷酶的重组病毒作为母株感染细胞,而用在同一非必须区插入其它外源基因的重组质粒 DNA 进行转染,挑选白斑,以求获得不含 LacZ 基因,而含其它外源基因的重组病毒。当然,作为人用的重组痘苗病毒不应含 LacZ 基因。

在 RVj129 中,pre-S₂ 的第 4 个密码子直接与 11K 的 ATG 相连,因此它所翻译的蛋白缺少 pre-S₂ 序列中的第 2 和第 3 两个氨基酸(图 3)。我们用血球凝集检测多聚人血清白蛋白受体的方法,未测出 pre-S₂,其原因尚待进一步研究。RVj129 表达 HBsAg 的水平仅比 RVj114 略低一些(表 1),表明 pre-S₂ 的存在并未严重影响 S 基因的表达。但免疫家兔的结果却与它们的 HBsAg 表达量不一致,无论在一次接种或两次接种的家兔中都可以看到(图 5(a), (b)),以 RVj129 免疫家兔的 HBsAg 抗体反应,都比 RVj114 免疫的抗体反应明显地高。Milich 等报道^[20],少量的 pre-S₂ 能够显著地增加 HBsAg 的免疫原性,我们的结果与此相符,似乎表明 RVj129 可能有一定量的 pre-S₂ 表达,此点尚待进一步研究。

病毒的毒力试验表明,在 TK 基因插入外源基因,使 TK⁺ 的痘苗病毒变为 TK⁻ 后,在小白鼠脑内接种时,其毒力无明显改变,但在进行家兔皮内毒力试验时,其毒力有一定降低。这种毒力的降低,将会减少种痘后的反应,但是否也可能影响病毒在人体内的繁殖和免疫反应,只有实际进行人体接种观察后方能得知。

痘苗病毒是最大的动物病毒,它含有约 187kbp,至少可插入 25kbp 的外源基因;可插入外源基因的非必须区目前已知可达 16 个以上,并且它的宿主范围广,作为活疫苗,具有安全有效、接种简便等优点,因此是一个理想的构建多价活疫苗的病毒载体。但目前国内外多数实验室所用的 WR 株,是嗜神经性毒株,从未用于人体接种。所以我们选用在我国 60 年来一直用于预防天花的天坛株作为母株,用于同源重组的旁侧序列及表达外源基因的启动子等,皆由天坛株痘苗病毒分离。我们已成功地构建了可以同时表达两个外源基因的载体质粒,同时也获得了高效表达 HBsAg 的重组痘苗病毒,这就向制备能接种人体进行临床观察的重组痘苗病毒,大大地迈进了一步。

在本项工作中某些细胞内重组工作曾由景新、吴小军同志予以技术协助,特此铭谢。

参 考 文 献

- [1] Smith, G. L. & Moss, B., *Gene*, 25(1983), 21.
- [2] Perkus, M. E. et al., *Virology*, 152(1986), 285.
- [3] Hruby, D. E. & Andrew Ball, L., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 80(1983), 3411.
- [4] Cockran, M. A. Puckett, C. & Moss, B., *J. Virol.*, 54(1985), 30.
- [5] Sam, C. K. & Dumbell, K. R., *Ann. Virol. (Inst. Pasteur)*, 132E(1981), 135.
- [6] Smith, G. L., Mackett, M. & Moss, B., *Nature*, 302(1983), 490.
- [7] Paoletti, E. et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 81(1984), 193.
- [8] 汪垣等,生物化学与生物物理学报,16(1984),698.
- [9] 刘庚起等,病毒学报,1(1985),86.
- [10] Perkus, M. E. et al., *Science*, 229(1985), 981.
- [11] Moss, B. et al., *Nature*, 311(1984), 67.

-
- [12] Hou, Y. T., Yang, X. K. & Hu, Y. W., *J. gen. Virol.*, **66**(1985), 1819.
- [13] Chakrabarti, S., Brechling, K. & Moss, B., *Molecular and Cellular Biology*, **5**(1985), 3403.
- [14] Panicali, D., Grzelecki, A. & Huang, C., *Gene*, **47**(1986), 1193.
- [15] 张一鸣等, 病毒学报, **1**(1985), 213.
- [16] Otsuka, A., *Gene*, **13**(1981), 339.
- [17] Maniatis, T., Fritsch, E. F. & Sambrook, J., *Molecular Cloning*, Cold Spring Harbor laboratory, 1982.
- [18] Casadaban, M. J., Chou, J., & Cohen, S. N., *J. Bactiril*, **143**(1980), 971.
- [19] Weir, J. P., Bajszar, G. & Moss, B., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **79**(1982), 1210.
- [20] Milich, D. R. et al., *J. Immunol*, **137**(1986), 315.