

AcNPV 增强子 hr5 增强 HBsAg 基因表达的研究*

陈 茹 龙繁新 王珣章 庞 义 邓日强
(中山大学昆虫学研究所/生物防治国家重点实验室, 广州 510275)

摘 要 用形成包涵体 (OOC⁺) 并能利用人工合成启动序列和多角体 XIV 启动子表达外源基因的转移载体质粒 pSXIVVI⁺X3 将多角体基因、乙型肝炎病毒表面抗原 (HBsAg) 基因和苜蓿丫纹夜蛾核型多角体病毒 (AcNPV) 的增强子 hr5 部分序列同时插入无包涵体的粉纹夜蛾核型多角体病毒 TnNPV-SVI-G 基因组中, 得到两株高效表达 HBsAg 基因又形成包涵体的重组病毒 TnNPV-shr 35-OCC⁺ 和 TnNPV-shr 26-OCC⁺。对重组病毒的酶切鉴定、DNA 斑点杂交和 Southern blot 分析证实, 外源基因及其相应的启动子和增强子序列已正确插入病毒基因组中。插入顺序中, hr5 增强子是插入 HBsAg 基因下游, 多角体基因与 HBsAg 基因方向相反。¹²⁵I-固相放射免疫检测和 Western blot 结果表明, HBsAg 基因在昆虫离体细胞中得到高效表达并保留了抗原活性。TnNPV-shr 26-OCC⁺ 和 TnNPV-shr 35-OCC⁺ 表达的 HBsAg 蛋白与没有插入增强子序列的重组病毒 TnNPV-HBs85-OCC⁺ 的比较, 分别提高了 40% 和 46%。

关键词 增强子, 重组杆状病毒, 乙型肝炎病毒表面抗原基因, 增强作用

分类号 Q78

昆虫杆状病毒作为真核表达的理想载体, 已成为分子生物学和基因工程研究的热点^[1]。杆状病毒正如许多病毒一样, 含有增强子 (enhancer) 功能的重复序列多个, 如苜蓿丫纹夜蛾核型多角体病毒 (AcNPV) 有增强子 5 个。这些增强子均位于表达最强的基因, 即后期的多角体、p10、衣壳、核心碱性蛋白基因和早期的 p39 基因的侧翼, 其中增强子 hr5 可使滞早期 39K 启动子控制的氯霉素乙酰基转移酶 (CAT) 基因的表达增强 1000 倍^[2]。hr5 的增强作用与方向性无关, 并可在与启动子相隔一定距离的地方起作用; 还可调节异源启动子、调高转录受控基因的 RNA 聚合酶量等等^[2]。在瞬时检测体系中, hr5 对后期多角体基因的启动子亦有影响^[3]。

把增强子应用于重组杆状病毒的组建, 以提高外源基因的表达尚未见有报道。本研究是把 AcNPV 增强子 hr5 的部分序列分别插入重组粉纹夜蛾核型多角体病毒中后期表达的外源基因 HBsAg 基因下游以提高 HBsAg 的表达量, 并探讨人为插入增强子对病毒后期基因的调控与表达的影响。

* 国家自然科学基金高技术探索性项目和高等学校博士点专项基金资助项目

收稿日期: 1994-04-01 陈茹, 女, 26 岁, 硕士研究生, 现在广州动植物检疫局工作

1 材料与方法

1.1 病毒与细胞

粉纹夜蛾核型多角体病毒 (TnNPV) 引自英国自然环境研究委员会病毒所 (NERC, Institute of Virology, Oxford, England). 含合成启动子和 β -半乳糖苷酶基因的无包涵体粉纹夜蛾重组亲本毒株 TnNPV-SVI⁻G 由本实验室构建^[4].

所用昆虫细胞为草地夜蛾 (*Spodoptera frugiperda*) 细胞系 IPLB-21, 引自英国自然环境研究委员会病毒所. 重组病毒毒株在草地夜蛾离体培养细胞中的增殖均按前文^[5]所述方法进行.

1.2 质粒构建

质粒构建主要参考 Sambrook 等方法^[6]. 限制性内切酶和连接酶购自 Promega 和 Boehringer Mannheim 公司, 反应条件按厂家所附使用说明. 含乙型肝炎病毒 (adw 型) DNA 的质粒 pUC8/HBV 来自法国巴斯德研究所. 含 AcNPV 增强子 hr5 完整序列的质粒 pHIPQ 为美国 Georgia 大学 L. K. Miller 教授惠赠. 转移载体质粒 pSXIVVI⁺X3 (不含翻译起始密码子) 为本实验室构建^[4].

1.3 病毒的重组、筛选与鉴定

将构建的含 HBsAg 基因和 AcNPV hr5 增强子序列的质粒 DNA 和无包涵体的亲本毒株 TnNPV-SVI⁻G DNA 共转染草地夜蛾离体培养细胞, 在 X-gal 的 1% 琼脂糖半固体培养基中挑选形成包涵体的白色病毒蚀斑, 经反复空斑纯化, 得到含 HBsAg, hr5 序列和多角体基因的重组毒株.

病毒 DNA 的分离提纯、酶切电泳、DNA 斑点杂交按文献^[5]方法, DNA Southern 杂交分析则参照文献^[6]方法.

1.4 HBsAg 的检测与鉴定

病毒感染细胞的浓度和细胞浆液的制备按前文^[5]所述, 检测用¹²⁵I-乙肝表面抗原-抗体固相放免双检药盒 (北京中国原子能科学研究院同位素研究所产品), 反应条件按厂家所附使用说明. 检测仪器为 FJ-2008G/A 型自动 γ -免疫计数器.

Western 杂交分析参照文献^[6]. 其中, SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳, 分离胶浓度为 12%, 浓缩胶为 3%; 用抗 HBsAg 阳性人血清偶联的酶标 SPA 免疫反应检测结合到硝酸纤维素膜上的 HBsAg 蛋白.

2 结 果

2.1 含 HBsAg 基因与 hr5 序列的质粒构建

质粒构建如图 1 所示. 首先用 Bgl I 酶切质粒 pSXIVVI⁺X3, 接入正确方向的 pUC8/HBV DNA BamH I 片段, 得含 HBsAg 基因的转移载体质粒 pSXIVVI⁺X3-HBs. 然后将质粒 pHIPQ 用 EcoR V 和 Sal I 酶切, 得到 AcNPV 增强子 hr5 序列, 并将之插入 pSXIVVI⁺X3-HBs 的 SmaI-SalI 窗口, 遂构建成含 HBsAg 基因和 hr5 部分序列并能形成多角体的转移载体质粒 pSX⁺-shr 35 和 pSX⁺-shr 26.

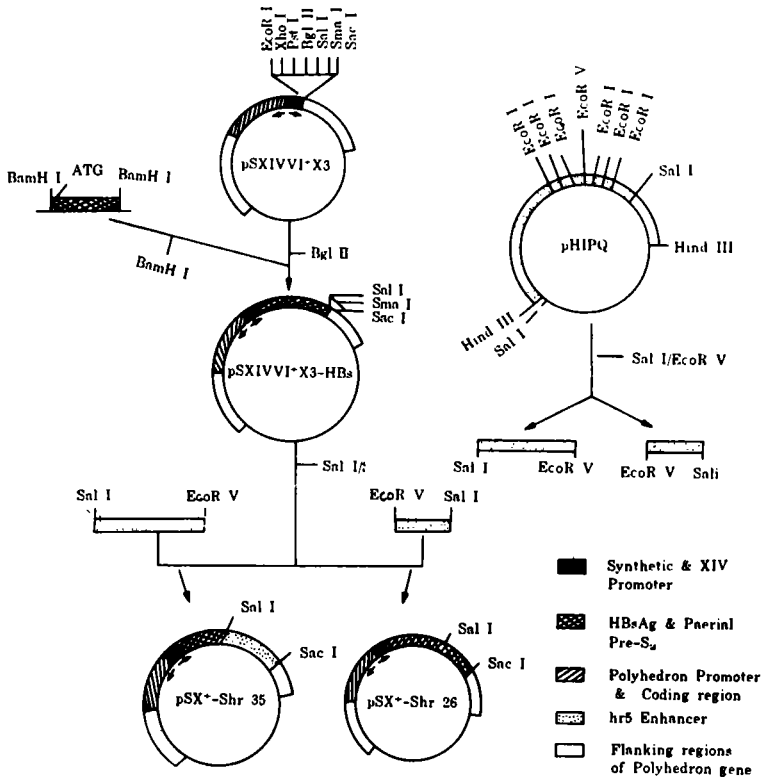


图 1 含 HBsAg 基因和 AcNPV hr5 序列形成多角体的转移载体质粒的构建

Fig. 1 Construction of the OCC⁺ transfer vector plasmids pSX⁺-shr 26 and pSX⁺-shr 35, containing a HBsAg gene and partial sequence of AcNPV hr5 enhancer

Sal I 酶切 pSX⁺-shr 26 和 pSX⁺-shr 35 的结果表明, 由于插入了 HBsAg 基因 (1.4kb) 和 hr5 的部分序列 (0.4 和 0.6kb), 因而它们分别增大为 7.6kb 和 8.0kb, 较 pSXIVVI⁺X3 增大 1.8kb 和 2.0kb, 而较 pSXIVVI⁺X3-HBs 增大 0.4 和 0.6kb (图未显示). 进一步对 pSX⁺-shr 35 和 pSX⁺-shr 26 用 Sac I 和 Sal I 双酶切鉴定结果, 表明上述两质粒 DNA 除产生与含 HBsAg 基因的质粒 pSXIVVI⁺X3-HBs DNA 大小相同 (7.2kb) 的酶切片段外, 还分别产生大小约 0.37kb 和 0.64kb 的酶切小片段 (图未显示). 据此, 可确认上述两个质粒为含 HBsAg 基因并分别插入 AcNPV hr5-大-小片段的重组质粒.

2.2 含 HBsAg 基因和 hr5 序列病毒的重组及其 DNA 分析

重组质粒 pSX⁺-shr 26 和 pSX⁺-shr 35 DNA 与带 β-半乳糖苷酶基因的多角体缺陷型亲本毒株 TnNPV-SVI⁻G DNA 共转染草地夜蛾细胞, 通过病毒空斑技术挑选形成多角体的病毒斑和反复空斑纯化, 得含 HBsAg 基因和 hr5 序列的重组病毒 TnNPV-shr 26-OCC⁺和 TnNPV-shr 35-OCC⁺. 经用含 X-gal 的半固体培养基做空斑测定, 证实无兰斑形成, 即不混有亲本毒株 TnNPV-SVI⁻G.

DNA 斑点杂交结果, 浓度为 0.1mg/L 的 TnNPV-shr 26-OCC⁺ 和 TnNPV-shr 35-OCC⁺ DNA 均可与 α -³²P 标记的 pUC8/HBC DNA 探针杂交, 而浓度为 0.1~1.0 mg/L 的转移载体质粒 pSXIVVI⁺X3 DNA 和亲本毒株 TnNPV-SVI⁻G DNA 则不能(图 2), 表明 HBsAg 基因已插入 TnNPV-SVI⁻G 基因组中。

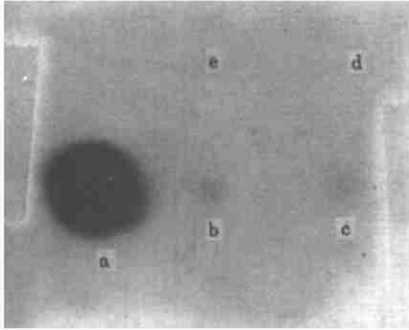


图 2 HBV 探针与重组病毒及质粒 DNA 的斑点杂交
Fig. 2 Dot hybridization of the recombinant viruses and two plasmids DNA with HBV probe
a plasmid pUC8/HBV DNA;
b TnNPV-shr 26-OCC⁺ DNA;
c TnNPV-shr 35-OCC⁺ DNA;
d TnNPV-SVI⁻G DNA;
e transfer vector plasmid pSXIVVI⁺X3 DNA

重组病毒 TnNPV-shr 26-OCC⁺ 和 TnNPV-shr 35-OCC⁺, TnNPV-HBs 85-OCC⁺ 以及野生型病毒 TnNPV 的 Bgl I 酶切分析结果详见图 3。TnNPV HBs85-OCC⁺ 系在野生型病毒 TnNPV DNA 的 Bgl I -C 片段 (约 14.4kb 大小) 中插入了带合成启动子序列与多角体 XIV 启动子的 HBsAg 基因 (不含 Bgl I 酶切点), 加上接上的是具有 BamH I 粘性末端的 HBsAg 片段, 而消除了原接头中的 Bgl I 酶切点, 致使其 DNA 的 Bgl I -C 片段增大至 16.0kb, 而 TnNPV-shr 26-OCC⁺ 和 TnNPV-shr 35-OCC⁺ 重组病毒则是在 HBsAg 基因下游又分别插入了增强子 hr5 的不同大小的片段, 因此, 两个重组病毒 DNA 的 Bgl I -C 片段更为增大, 分别达到 16.4 和 16.6kb (图 3, 箭头所示), 但由于 TnNPV-shr 26-OCC⁺ 的 Bgl I -C 片段 (16.4) 增大不多, 故电泳中与 TnNPV-HBs85-OCC⁺ 的 Bgl I -C 片段区别不明显。

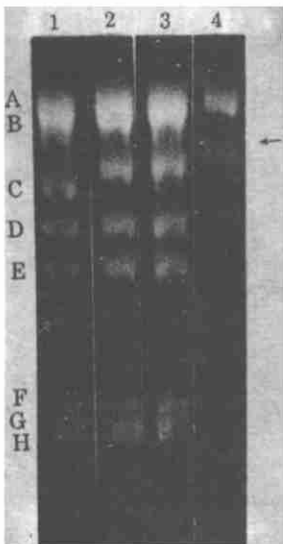


图 3 野生型 AcNPV 和 3 株重组病毒的 Bgl I 酶解图谱

Fig. 3 Bgl I cleavage pattern of three recombinant viruses DNA compered with wild-type TnNPV DNA. The arrow indicates the Bgl I -C fragment of TnNPV-shr 35-OCC⁺.

- 1 Wild-type TnNPV DNA;
- 2 TnNPV-HBs85-OCC⁺ DNA;
- 3 TnNPV-shr 26-OCC⁺ DNA;
- 4 TnNPV-shr 35-OCC⁺ DNA

将 TnNPV-shr 26-OCC⁺, TnNPV-shr 35-OCC⁺ 和 TnNPV-HBs85-OCC⁺ 的 Bgl I 酶切片段与用 α-³²P 标记的 pUC8/HBV 质粒 DNA 探针的 Southern 杂交结果, 3 株重组病毒的 Bgl I -C 片段均呈阳性, 而其余酶切片段和野生型病毒的 TnNPV 的则均为阴性 (图 4). 表明 HBsAg 基因与相应的启动子插入了 TnNPV-SVI⁻G 基因组中的正确位置.

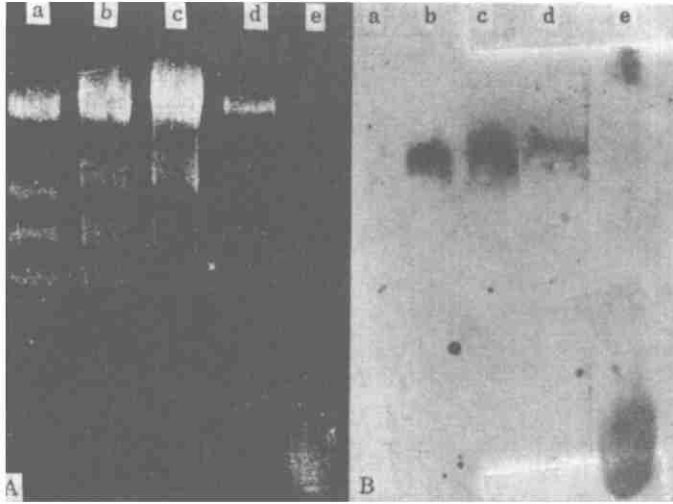


图 4 HBV 探针与重组病毒 Bgl I 酶切片段的 southern 杂交

Fig. 4 Southern blot of Bgl I digested the recombinant viruses DNA with HBV probe

A. Bgl I cleavage pattern of DNA, B. southern blot analyses

a Bgl I digested Wt TnNPV DNA, b Bgl I digested TnNPV-HBs85-OCC⁺ DNA, c Bgl I digested TnNPV-shr 26-OCC⁺ DNA, d Bgl I digested TnNPV-shr 35-OCC⁺ DNA, e pU8/HBV DNA; The arrow indicates the Bgl I -C fragment

2.3 HBsAg 表达量比较

将 TnNPV-shr 26-OCC⁺ 和 TnNPV-shr 35-OCC⁺ 与野生型病毒 TnNPV 和仅含 HBsAg 基因的重组病毒 TnNPV-HBs85-OCC⁺ 感染草地夜蛾离体培养细胞, 感染后不同时间用固相放射免疫法检测 HBsAg 活性, 结果如图 5 所示. 从图中可看出, 3 株重组病毒感染细胞后 24h, 均可检测到较高的 HBsAg. 感染后 96h, HBsAg 的表达量达最高, 之后 HBsAg 滴度下降. 在整个感染期间, 插入 AcNPV hr5 增强子的两株重组病毒 TnNPV-shr 26-OCC⁺ 和 TnNPV-shr 35-OCC⁺ 的 HBsAg 表达量一直较没有插入 hr5 增强子的 TnNPV-HBs85-OCC⁺ 要高, 至感

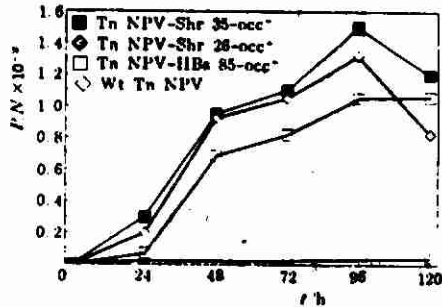


图 5 重组病毒感染草地夜蛾细胞经不同时间测定的 HBsAg

Fig. 5 Kinetics of HBsAg production in *Spodoptera frugiperda* cells infected with the recombinant viruses

染后 96h, 分别高出 40% 和 46%。

对上述两株重组病毒感染的细胞总蛋白 Western 杂交分析(图未显示)结果更表明, 感染细胞合成的 HBsAg 蛋白具有免疫原性, HBsAg 蛋白主要是由分子量为 18kD, 25kD 和 35kD 的多肽组成。

3 讨 论

杆状病毒载体系统均是以外源基因取代病毒复制后期高效表达的多角体基因或 p10 基因为基础而建立起来的^[4]。考虑到动物病毒中增强子具有调控后期基因转录的效能, 我们以含 HBsAg 基因并能形成多角体的重组病毒 TnNPV-HBs85-OCC⁺为基础, 组建了在 HBsAg 基因下游侧翼插入 AcNPV 增强子 hr5 部分序列的重组毒株 TnNPV-shr 26-OCC⁺和 TnNPV-shr 35-OCC⁺。插入 hr5 序列后, HBsAg 基因的表达获得明显提高, 提高幅度达 40%~46%。本研究中, 由于 HBsAg 基因是以人工合成启动子和多角体 XIV 启动子串联起动的, 故有理由认为, hr5 除对最晚期的多角体启动子有影响外, 应还对合成启动子转录起始序列(主要是依据晚期启因-衣壳基因的序列合成的^[7])起主要作用, 因此, HBsAg 在较早时期就获得了较高的表达。

还应指出的是, 在本研究中为方便转移载体质粒的构建, 是将 hr5 的完整序列酶切为一大一小的两个片段后再分别插入 HBsAg 基因下游的。重组的两株病毒中仅是增加了 hr5 的部分序列, HBsAg 基因的表达就得到了明显的增强作用, 这表明增强子 hr5 的部分序列除对前期启动子的表达有增强作用外^[3], 它对后期启动子(多角体 XIV 启动子和人工合成启动序列)启动的外源基因表达的增强作用亦并不需要其完整序列的存在。并且, 插入的 hr5 序列是在与多角体 XIV 启动子和合成启动序列相隔一定距离的地方起作用的, 这亦印证了杆状病毒增强子的调控增强作用除与受控基因的距离、方向无关外, 还可在与启动子相隔一定距离的地方起作用的论点^[3]。两重组病毒株中, 插入 hr5 大片段的 TnNPV-shr 35-OCC⁺表达的 HBsAg 量比插入 hr5 小片段的 AcNPV-shr 26-OCC⁺要高, 分析其原因可能主要在于 hr5 两片段中增强子序列的差异以及侧翼序列的影响。插入 hr5 增强子的完整序列能否更大幅度提高外源基因的表达, 正在进行研究中。

乙型肝炎病毒表面抗原(HBsAg), 无论血源的还是痘苗病毒和哺乳动物 CHO 细胞表达的, 都有两个基本的单体, 即分别为糖基化的 GP27 和无糖基化的 P24, CHO 细胞表达的还有双糖基化的 GP30 单体。本文应用 Western blot 检测到两株重组病毒表达的 HBsAg 蛋白主要由分子量为 25kD, 35kD 和 18kD 的多肽组成, 推测前 2 个多肽(P25 和 P35)应分别是无糖基化和糖基化的 HBsAg 单体, 而 P18 可能为上述多肽在昆虫细胞内受部分降解的产物。而分子量更低的一些阳性带, 亦应为降解产物或是由于翻译后修饰程度不一所致^[3]。在昆虫杆状病毒载体系统中, 重组 HBsAg 基因以两种以上形式表达的亦多有报道^[4]。

当前, 杆状病毒作为无公害生物杀虫剂已应用于农林害虫的防治。但由于杆状病毒的寄主较专一, 致死时间较长(一般要 5~6 d 以上), 因此, 大大影响了它的实际应用与推广。目前, 正通过基因工程方法加以改造, 以提高其杀虫广谱性的同时缩短其杀虫时间, 在重组病毒中人为插入增强子由于能使外源基因在较早(如感染后 24h 前)可获得

较高的表达, 因此, 这不失为一种可借鉴的方法.

参 考 文 献

- 1 Miller L K. Baculoviruses as gene expression vectors. *Annual Reviews of Microbiology*, 1988, 42: 177~199
- 2 Guarino L A. Complete sequence and enhancer function of the homologous DNA regions of *Autographa californica* nuclear polyhedrosis virus. *Journal of Virology*, 1986, 60: 224~229
- 3 Rankin C. Eight base pairs encompassing the transcriptional start point are the major determinant for baculovirus polyhedrin gene expression. *Gene*, 1988, 70: 39~40
- 4 王珣章. 形成多角体的杆状病毒载体系统的建立. *病毒学报*, 1991, 7 (3): 253~258
- 5 龙繁新. 乙型肝炎病毒表面抗原基因在昆虫体系中的表达. *生物工程学报*, 1991, 7 (1): 37~46
- 6 Sambrook J. *Molecular cloning: A Laboratory Manual*. 2nd edn. New York, 1989
- 7 王珣章. 人工合成杆状病毒后期启动子的探讨. *中国科学 (B 辑)*, 1992, 1: 39~46

A Study on AcNPV hr5 Enhancer Increasing Expression of HBsAg Gene in Insect Baculovirus Vector Systems

Chen Ru* Long Qingxin Wang Xunzhang Pang Yi Deng Riqiang

Abstract Two occluded (OCC⁺) recombinant Baculoviruses designated Tn NPV-shr 26-OCC⁺ and TnNPV-shr 35-OCC⁺ were successfully constructed that contains the gene coding the hepatitis B virus surface antigen (HBsAg) gene of the dual control of synthetic and XIV promoters and the AcNPV hr5 enhancer, that was used increasing HBsAg gene expression. The two correct recombinants were characterized by both DNA dot hybridization and southern blot analyses. Expression level of HBsAg gene in *Spodoptera frugiperda* cells infected with the two newly constructed recombinants was increased by 40% and 46% respectively, compared with that virus without additional the hr5 sequence. Western blot analysis indicated that the HBsAg proteins expressed by the baculovirus vector systems are antigenic properties identical to HBsAg secreted by human cells and molecular weights of about 18kD, 25kD and 35kD.

Keywords enhancer, recombinant *Trichoplusia ni* NPV, HBsAg, enhancement

* Institute of Entomology and State Key Laboratory for Biological Control, Zhongshan University, Guangzhou 510275