

HBsAg 基因在酵母细胞中的表达

敖世洲 周翎钟 甘人宝
储美瑾 戴培桦 李载平

(中国科学院上海生物化学研究所, 上海)

先前从酵母染色体 DNA 中获得一个作用较强的启动基因片段, 使 HBsAg 基因在其控制下, 构建了大肠杆菌-酵母细胞穿梭质粒。这种质粒转化的酵母细胞能生产和装配 HBsAg 颗粒。经放射免疫分析, 超离心沉降研究和电子显微镜观察, 酵母产生的 HBsAg 颗粒与人血清中的 HBsAg 颗粒十分相似。

关键词 HBsAg; 酵母; 表达

先前我们在大肠杆菌系统中研究了不同启动基因控制下 HBsAg 基因的表达, 细菌能产生含 HBsAg 的杂合蛋白^[1-3]。酵母细胞为新近发展的外源基因表达系统, 能使 HBsAg 基因获得稳定的表达^[4-6]。为发酵生产 HBV 疫苗提供了新的前景。我们从酵母染色体 DNA 中获得一个较强的启动基因片段^[7], 构建大肠杆菌-酵母穿梭质粒, 研究了启动基因控制 HBsAg 基因在酵母细胞中的表达, 获得了 HBsAg 颗粒, 并与人血清 HBsAg 颗粒作了比较。

材料与amp;方法

(一) 质粒 DNA 的制备^[8], 酶制剂及其作用条件^[9], 大肠杆菌转化^[10], 酵母细胞转化^[11]

均按文献报道的方法进行。

(二) 核苷酸序列测定

质粒 pYPH-203 用 Sal I 作用, 磷酸酯酶脱去 5' 端磷, 用 T₄ 多核苷酸激酶以

[γ -³²P] ATP 标记 pYPH-203 5' 端, 再用 Hind III 作用, 分离标记的 2.2 kb 片段 DNA。按 Maxam 和 Gilbert^[12] 化学降解法测定核苷酸序列。

(三) HBsAg 产物的测定和分离

含 pYPH-SE 的 AH2 及对照酵母细胞, 分别接种于 SD 培养液中, 30°C 振荡培养 24h, 再以 10% 的接种量转入 200ml Y-PD 培养液中, 30°C 振荡培养 12h。3000 rpm 离心 5 min, 收集酵母细胞, 用 PBS 缓冲液 (20mM 磷酸缓冲液, pH7.0, 0.14M NaCl) 洗一次, 最后悬于 10ml PBS 中用 Soniprep 150 超声波发生器, 破碎细胞 10 min, 再 15000 rpm 离心 15min, 上清用 Abbott 药箱作放射免疫和酶标免疫检测。产物分离先放大 31 培养液, 菌体悬于 50ml PBS 中超声波破碎 15min, 15000 rpm 离心 15min。上清再经 45000 rpm 超离心 4h。

本文于 1984 年 10 月 24 日收到。

王静英、丁红珍参加部分技术工作。本室工具酶组提供各种酶制剂, 特此致谢。

沉淀再悬于50ml PBS中，通过交联抗HBs的 Sepharose-4B柱作产物的纯化^[13]。

(四) CsCl超离心分析

纯化的酵母细胞产生的HBsAg和来自人血清的HBsAg分别混合于含20mMTris-HCl (pH7.4), 0.5mMEDTA的20% CsCl (W/W)中，用日立55P-72超离心机的RPS40T转头，45000rpm离心64h。管底打洞，分部收集样品，透析除去CsCl，作放射免疫活性测定。

(五) HBsAg颗粒电子显微镜观察

含纯化的酵母HBsAg颗粒或人血清HBsAg颗粒样品滴在铜网上，用1%磷钨酸染色，在H300电子显微镜下观察拍照。

结果和讨论

(一) HBsAg表达质粒的构建

先前我们从酵母染色体DNA中克隆了一个作用较强的启动基因片段^[7]。这个启动基因片段的下游有一个Sal I切点，adr HBV DNA的HBsAg基因前有一个Xho I切点^[14] Sal I和Xho I的粘性末端相同，两者可以重组连接。pYPH-203为含作用较强的酵母启动基因的重组质粒^[7]，pADR-1'为adr HBV DNA克隆株^[2]，按照图1流程构建重组体pYPH-S，使HBsAg基因在酵母启动基因控制下，再从质粒YEp-13^[15]上用EcoR I部

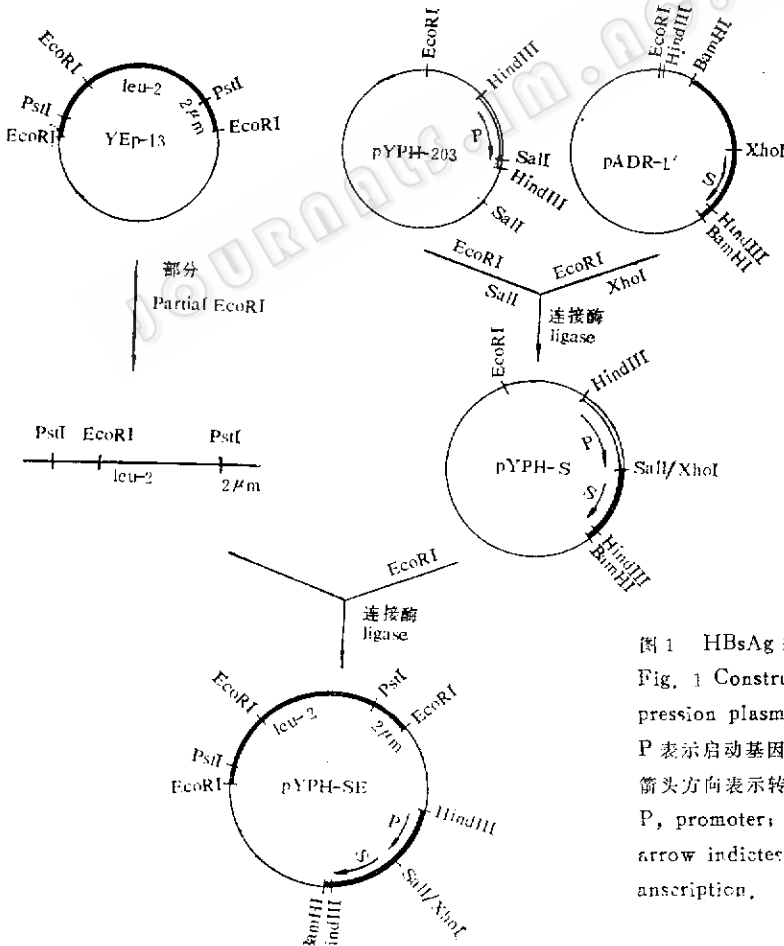


图1 HBsAg表达质粒的构建
Fig. 1 Construction of HBsAg expression plasmid
P表示启动基因，S表示HBsAg基因，箭头方向表示转录方向。
P, promoter; S, HBsAg gene; the arrow indicates the direction of transcription.

分酶切, 获得一个含 2 μm 复制起始区和 Leu-2 基因的片段, 插入到 pYPH-S 的 EcoR I 切点内, 得到一个大肠杆菌-酵母细胞穿梭质粒 pYPH-SE。

(二) 启动基因和 HBsAg 基因连接点

TCGTATCCAĀGAAGTAACA ĆTCGGAGAGTĜCTTTTGGGAĊGGCGAA ATĜGAACCGAGAT
CA TACAAA ĆACTTCGAGG ĀGAACCTATTĬCTTACAGAAĊCAACAGAAGĀCATACG GATT
CTCTCCTTTĀACGCTCTTĜAGCTCG TCGĀ ĜGACTGGGGĀCCCTGCACĊGAAC ATGGA

← 酵母序列 yeast sequences HBV 序列 HBV sequences →

图 2 pYPH-SE 中酵母启动基因与 HBsAg 基因连接部位的核苷酸序列

Fig. 2 DNA sequences of the yeast promoter-HBsAg gene junction present in pYPH-SE

pYPH-SE 中 HBsAg 基因的起始密码前 111 个核苷酸起有一个 TACAAA 序列, 可能是一个非典型的 TATA box。另外在 HBsAg 基因起始密码 ATG 之前相隔 123 个核苷酸外也有一个 ATG 序列。从所测定的核苷酸序列来看, HBsAg 基因表达有两种可能: 一是 TACAAA 起 TATA box 作用, HBsAg 直接表达; 二是 HBsAg 以杂合蛋白形式产生, 前一个 ATG 起起始密码作用。只有对产物 N 端作氨基酸的序列测定才能作出结论。

(三) HBsAg 在酵母细胞内的合成

以酵母 AH2 (Leu 2-3, Leu 2-112, his 4-519, can 1-101) 为受体菌, 按 Ito 等人醋酸锂处理的方法^[11], 将重组质粒 pYPH-SE 转入酵母细胞, 在缺乏 leu 的基础培养基平板上筛选转化株。分别培养对照菌 AH2 和含 pYPH-SE 的转化株。200ml 培养物做成 10ml PBS 抽取物, 再分别作 10 和 100 倍稀释。用 Abbott 药箱作放射免疫和酶标免疫检测, 并与纯化的人血清 HBsAg 比较。从表 1 的结果来看, 对照菌 AH2 的抽提物, 用放射免疫方法测定 cpm 数很低, 接近本底读数, 酶标免疫分析的吸光度读数也很低。含 pYPH-SE 的酵母菌抽取物, 用放射免疫和酶标免疫检测都给出

的序列安排

用 Maxam 和 Gilbert^[12] 化学降解法测定酵母启动基因和 HBsAg 基因连接点上游的核苷酸序列, 可以看出它们间的核苷酸的序列, 图 2 结果显示在表达质粒

表 1 酵母抽取物中 HBsAg 的免疫分析

Table 1 Immunoassay of HBsAg from yeast extracts

样 品 Samples	RIA (cpm)	ELIA (A)
酵母 AH2 yeast AH2	577 875	0.05 0.03
含 pYPH-SE 的酵母 AH2 yeast AH2 containing pYPH-SE	47,556 43,480	2.09 2.09
1:10 稀释 diluted to 1:10	10,334 14,880	2.09 2.09
1:100 稀释 diluted to 1:100	9,562 9,844	1.56 1.43
纯化的人血清 HBsAg 颗粒 purified HBsAg particles	12,576 12,650	
100 ng/ml		8,030 8,182
10 ng/ml		

较高的读数, 再作 10 倍和 100 倍稀释所测得的结果相当于纯化人血清 HBsAg 颗粒 100ng/ml 和 10ng/ml, 每升酵母抽提物可获得 HBsAg 50μg。表达水平与 Valenzuela 等人^[4] 用醇脱氢酶启动基因控制 HBsAg 基因表达和 Hitzeman 等人^[5] 用磷酸甘油酸激酶启动基因控制 HBsAg 基因表达水平相似。但与 Miyanochara 等人^[6] 用酸性磷酸酯酶启动基因控制 HBsAg 基因表达水平相比偏低。对我们所获得的这个酵母启动基因作些改造, 能否提高表达水平, 值得进一步探讨。

(四) 表达产物的纯化及鉴定

培养 31 HBsAg 表达酵母菌，超声波破碎制成 50ml 裂解液，45000 rpm 超离心 4 h 沉降 HBsAg 颗粒，最后悬于 50ml PBS 中，上交联抗 HBs 的 Sepharose 4 B 柱^[13]，初步纯化酶母表达的 HBsAg 产物。纯化的酵母 HBsAg 产物作 CsCl 超离心分析和电子显微镜观察。

图 3 结果显示酵母产生的 HBsAg 颗粒与人血清的 HBsAg 颗粒超离心行为极为相近，上浮密度约为 1.20g/ml。图版 I 是电子显微镜观察结果，酵母产生的 HBsAg 颗粒与人血清 HBsAg 颗粒在大小和形态上基本相同。这些结果说明酵母表达的 HBsAg 产物，在细胞内能够装配成与人血中 HBs-

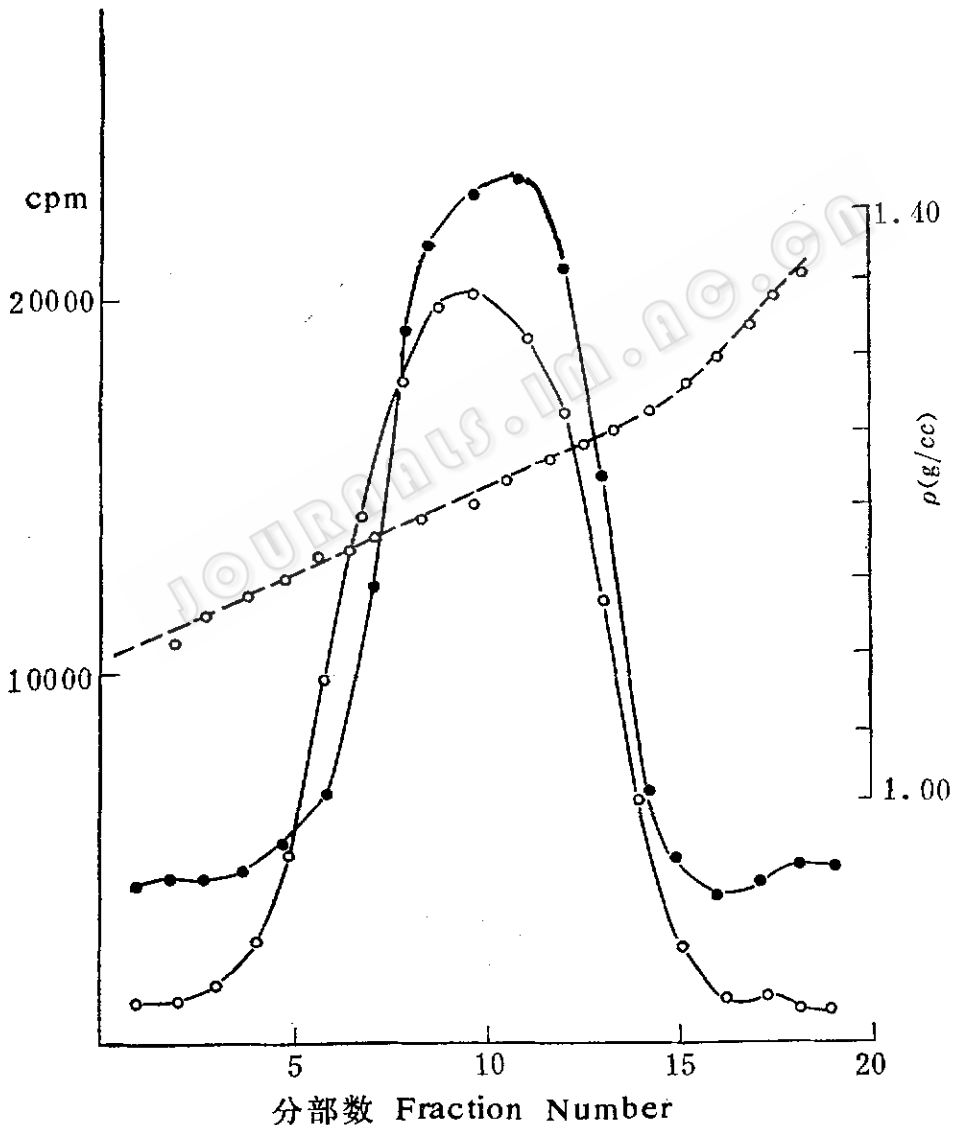


图 3 酵母产生的 HBsAg 颗粒 (◦) 和人血清的 HBsAg 颗粒 (•) 超离心沉降分析
 Fig. 3 CsCl gradient sedimentation of HBsAg particles from yeast extracts (◦) and the serum of hepatitis B virus carrier (•)

Ag一样的颗粒。从这一方面讲,用酵母细胞系统发酵生产HBV疫苗是十分有利的。我们^[1-3]和其它几个实验室^[16-18]利用大肠杆菌研究HBsAg基因表达,只能获得含HBsAg的杂合蛋白,而且极不稳定很容易被蛋白酶水解,在应用上有很大困难。酵母细胞为真核细胞,发展HBV疫苗

的发酵生产有明显的优点,克服了大肠杆菌系统中的障碍。

我们从酵母染色体DNA中获得一个启动基因控制HBsAg基因表达,使酵母细胞产生和装配HBsAg颗粒。这个启动基因的鉴定,结构改造,摸索提高表达效率的途径等待进一步研究。

参 考 文 献

- [1] 敖世洲等: 遗传学报, 10: 254—260, 1983.
- [2] 敖世洲等: 中国科学B辑, 9: 825—830, 1984.
- [3] 敖世洲等: 中国科学B辑, 排印中.
- [4] Valenzuel, P., et al.: *Nature*, 298: 347—350, 1982.
- [5] Hitzeman, R.A., et al.: *Nucleic Acids Res.*, 11: 2745—2763, 1983.
- [6] Miyanochara, A., et al.: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 80: 1—5, 1983.
- [7] 敖世洲等: 生物工程学报, 待发表.
- [8] 敖世洲等: 遗传学报, 10: 85—90, 1983.
- [9] 敖世洲, 高美华: 生物化学与生物物理学报, 14: 121—126, 1982.
- [10] Cohen, S. N., et al.: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 69: 2110—2114, 1972.
- [11] Ito, H., et al.: *J. Bacteriol.*, 153: 163—168, 1983.
- [12] Maxam, A. H. and W. Gilbert: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 74: 560—564, 1977.
- [13] 周翔钟等: 上海医学, 3: 7—12, 1980.
- [14] 甘人宝等: 中国科学B辑, 12: 1114—1122, 1983.
- [15] Broach, J. R., et al.: *Gene*, 8: 121—133, 1979.
- [16] Charnay, P., et al.: *Nature*, 286: 893—895, 1980.
- [17] Edman, J. C., et al.: *Nature*, 291: 503—506, 1981.
- [18] Mackay, P., et al.: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 78: 4510—4514, 1981.

EXPRESSION OF HBsAg GENE IN YEAST

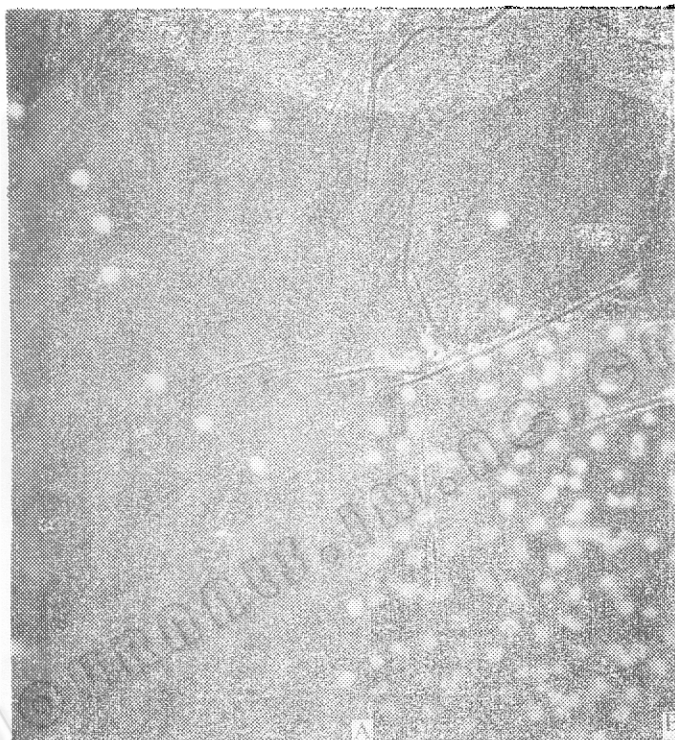
Ao Shizhou Zhou Yizhong Gan Renbao
Chu Meijin Dai Peihua Li Zaiping

(Shanghai Institute of Biochemistry, Academia Sinica)

Using a high efficiency promoter from yeast chromosomal DNA, we have studied the expression of HBsAg gene in yeast. The HBsAg gene under the control of this yeast promoter was introduced into a shuttle plasmid capable of autonomous replication and selection in both the yeast *Saccharomyces cerevisiae* and *Escherichia coli*. Yeast cells containing this plasmid produce and assemble the HBsAg particles which could be detected by radioimmunoassay. This material is similar in size, density and shape to 22 nm particle, isolated from the plasma of human hepatitis carriers.

Key words

HBsAg; Yeast; Expression



A. 酵母产生的HBsAg颗粒电子显微镜照片

B. 人血清的 HBsAg 颗粒电子显微镜照片

Electron micrograph of HBsAg particles from yeast (A) and the serum of hepatitis B virus carrier (B).