

# -3 位碱基对 HBV c 基因在昆虫细胞中表达的影响<sup>\*</sup>

李迎秋 张晓馨 龙蔡新 王珣章

(中山大学生物防治国家重点实验室, 广州 510275)

**摘要** 应用 PCR 定点突变技术, 分别扩增出 -3 位碱基是 A 或 T 的乙肝病毒核心抗原基因 c1, c2, 平端克隆到自行构建便于 PCR 产物克隆的通用载体 pBlueoS 中后, 利用经 PCR 引物在 c1 及 c2 末端引入的酶切位点, 切出 c1, c2 基因, 构建出 pX3-c1 和 pX3-c2. 在 Sf9 细胞中瞬时表达 c1, c2 基因, 乙肝核心抗原放免检测结果表明, 两种形式的 c 基因的表达无明显差异. 说明 -3 位是否为 A 对 c 基因在昆虫细胞中的表达量没有影响.

**关键词** PCR, 乙肝核心抗原基因, -3 位碱基, 杆状病毒, 瞬时表达

**分类号** Q 78

如何提高外源基因的表达量, 原核系统中研究比较深入. 有研究表明, 将真核基因 mRNA -3 位的嘌呤 (A 或 G) 换成嘧啶 (U 或 C), 翻译量均大幅度下降<sup>[1]</sup>. 分析不同杆状病毒的 12 种含量较高的后期晚期基因 mRNA 中与 AUG 相邻的顺序, 得出与真核 mRNA 类似的序列, 即 -3 位通常是 A<sup>[2]</sup>, 将外源基因的 -3 位碱基突变成 A, 能否提高其在杆状病毒载体系统中的表达量, 尚未见有报道.

本研究以乙肝病毒核心抗原基因 (hepatitis B virus core antigen gene, HBV c) 作报告基因, 采用瞬时表达分析法<sup>[3]</sup>, 在昆虫细胞中表达并比较 -3 位碱基分别是 A 或 T 的 HBV c 基因的表达量, 期望获得高表达的基因方式, 并试图为如何提高杆状病毒表达系统中外源基因的表达量积累经验.

## 1 材料与方法

### 1.1 质粒与菌株、病毒与昆虫细胞

质粒 pBluescriptM13 菌株 DH5 $\alpha$  本室保存, pUC8/HBV 引自法国巴斯德研究所. 表达非融合基因的质粒 pSXIVVI X3 (pX3) 及含合成启动子和  $\beta$ -半乳糖苷酶基因的无包涵体夜蛾重组株 TnNPV-Occ<sup>-</sup>-Gal<sup>I</sup> 由本实验室构建<sup>[4]</sup>. 草地夜蛾 (*Spodoptera frugiperda*, Sf) Sf9 细胞引自英国自然环境研究委员会病毒研究所.

### 1.2 PCR

参照 HBV c 基因序列, 设计并合成 3 条引物: ① 5' -GGgatccAGCATGGACATT-

<sup>\*</sup> 广东省自然科学基金 (960059) 资助项目

收稿日期: 1997-09-10 李迎秋, 女, 30 岁, 讲师

GACCCTTA-3'; ② 5' -TGggaatccATGACATTGACCCTTA-3'; ③ 5' -AAgtcgac-CATTGAGATTCCCGAG-3'. 引物①, ③与引物②, ③分别用于扩增-3位碱基为 A或 T的 c1或 c2基因片段, 为了方便克隆, 分别在上下游引物中引入 *Bam* H I, *Sal* I 酶识别序列 (小写表示), 以 pUC8/HBV 为模板, PCR扩增条件为: 94℃变性 30 s, 55℃退火 30 s, 72℃延伸 1 min, 共 30个循环.

### 1.3 瞬时表达

将 5 $\mu$ g 含外源基因的重组质粒经磷酸钙沉淀法转化 *Sf*-9细胞, 27℃培养 6 h后, 弃去转化液, 加入适量的 TC-100培养基, 继续培养 24 h, 再用 2 m. o. i. 的亲本病毒 TnNPV-Occ<sup>-</sup>-Gal<sup>+</sup> 感染后 96 h, 收集细胞, 溶于适量的 PBS (pH 7.5) 缓冲液中, 反复冻溶, 置 -20℃备用.

### 1.4 HBcAg放免检测

参照中国原子能科学研究所生产的乙肝核心抗原 (HBcAg) 固相放免药盒 (竞争抑制法) 说明进行, 即表达的 HBcAg 与药盒中的 HBcAg 包被珠及 <sup>125</sup>I 抗-HBc, 形成中和抑制反应体系, 平衡后, 将小球洗净吸干, 测量小球的每分钟计数值, 由原理可知, 小球的每分钟计数值与表达的 HBcAg 的量成反比, 当样品值小于阴性对照平均值的 1/2时, 样品为 HBcAg 阳性; 反之, 则为阴性.

## 2 结果与讨论

### 2.1 HBcAg基因的克隆

(1) PCR产物克隆通用载体的构建: PCR的原理决定了其产物不具有粘性末端, 故只能进行平端连接克隆, 为提高克隆效率, 通常在 PCR引物的 5' 端引入限制性内切酶的识别序列, 以进行 PCR产物的粘端连接克隆, 然而由于末端的酶切受到多种因素的影响, 许多研究者并不能得到满意的结果. 本文在克隆 c基因时, 也没有成功. 后参照末端加磷法, 先将基因连接到 pBluescriptM 13-, 再经 *Bam* H I, *Sal* I 酶切重组质粒, 但由于载体的多克隆位点也含有这两种酶切位点, 且存在酶切不彻底的可能, 因此对于得到的酶切片段是否有准确的酶切末端, 难以鉴定. 为解决这一问题, 对 pBluescriptM 13进行改造: 先经 *Kpn* I / *Pst* I 双酶切质粒 pBluescriptM 13-, 补平连接得到质粒 pBlue1, 再经 *Bam* H I, *Sma* I 双酶切 pBlue1, 补平连接得到质粒 pBlueoS. 该质粒仅含唯一的 *Sma* I 克隆位点 (图 1).

将 PCR扩增的 -3位碱基各为 A和 T的 c1, c2 基因片段, 经 T4磷酸激酶作用分别在 5', 3' 端加磷, 与 *Sma* I 酶切的 pBlueoS 连接, 转化 DH5 $\alpha$ , 得到重组子 pBlueoS-c1, pBlueoS-c2的比例大大提高, 且酶切片段能够准确地切出. 与国外用于克隆产物的“T载体”、“克隆药盒 TA”、“双脱氧 T尾端载体”相比, 简便易行, 更适合一般实验室使用.

(2) 重组转移载体质粒的构建: 质粒 pBlueoS-c1, pBlueoS-c2分别经 *Bam* H I, *Sal* I 酶切出 c1, c2, 再分别将插入到 pX3的 *Bgl* II, *Sal* I 酶切出的窗口, 构建出表达载体质粒 pX3-c1, pX3-c2 (图 1).

### 2.2 HBV c基因在 Sf细胞中的瞬时表达检测

将 PEG纯化<sup>[5]</sup>的质粒 pX3-c1, pX3-c2, pX3 (空白对照) 导入 *Sf* 9细胞, 再以杆状病毒 TnNPV-Occ<sup>-</sup>-Gal<sup>+</sup> 感染细胞, 培养 96 h后, 收集细胞, 并反复冻融, 制备检测用样品. HBV c基因表达产物 HBcAg 的放免检测结果如表 1.

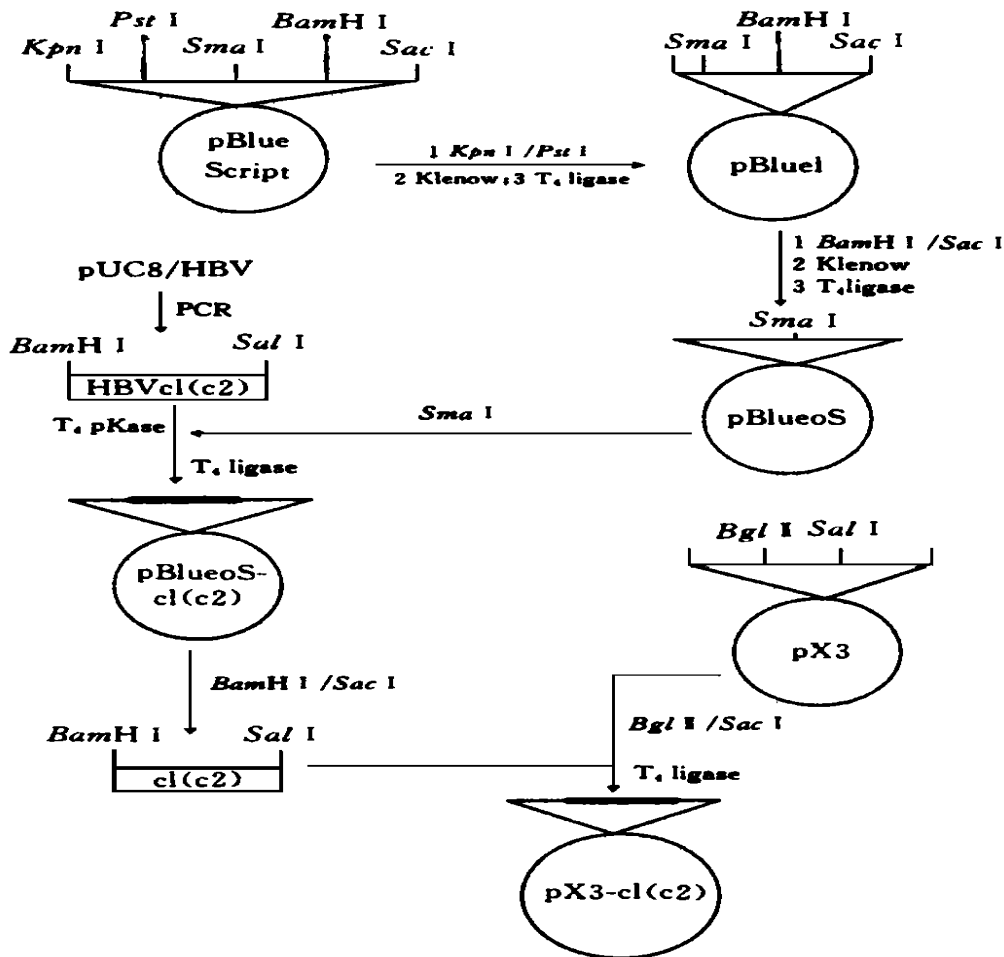


图 1 质粒 pBlueoS 与 pX3-cl (c2) 的构建

Fig. 1 The construction of pBlueoS and pX3-cl (c2)

表 1 HBV c基因在 Sf9 细胞中瞬时表达的检查结果

Tab. 1 Radioimmunoassay of FBV c gene's transient expression in Sf9 cells

| 质粒     | 1     | 2     | 3     | 4     | 5     | 6   | 7   | 8   |
|--------|-------|-------|-------|-------|-------|-----|-----|-----|
| pX3-c1 | 944   | 892   | 858   | 801   | 780   | 775 | 690 | 674 |
| pX3-c2 | 910   | 872   | 852   | 822   | 783   | 763 | 757 | 689 |
| pX3    | 3 233 | 3 029 | 3 015 | 2 987 | 2 861 |     |     |     |

经统计学处理,  $P > 0.05$ , 两者无明显差异. 说明 HBV c 基因 -3 位是否是 A, 与其在昆虫细胞中的表达量无明显的相关性. 虽然将真核 mRNA 的 -3A 改变成嘧啶, 基因的翻译量会下降 10 倍, 但反过来, 将 -3 位的嘧啶换成嘌呤, mRNA 的翻译量是否能提高, 则未见有研究报道. 有人将 EPO 基因的 ATG 的周序优化为真核基因的偏好序列 ACCATGG, 其中 -3 位从 T 改变成 A, 使其在 COS7 细胞中的瞬时表达量明显提高<sup>[6]</sup>. 本文认为单独将 -3 位

碱基优化为 A, 并不能提高外源基因的表达量, 推测 -3A 可能是提高外源基因表达量的首要条件, 只有与周序配合时, 才能提高外源基因表达量. 将 HBV<sub>c</sub> 基因 ATG 的周序改变成 ACCATGG 是否能提高其在昆虫细胞中的表达量, 正在作进一步的研究.

### 参 考 文 献

- 1 Kozak M. Structural features in *Eukaryotic* mRNA that modulate the initiation of translation. *The Journal of Biological Chemistry*, 1991, 266: 19867~19870
- 2 王珣章. 昆虫杆状病毒的基因工程. 王宽诚教育基金会 (学术讲座汇编), 1991, 3: 119~131
- 3 Monsma S A, Oomens A G P, Blissard G W. The gp64 envelop fusion protein is an essential baculovirus protein required for cell-to-cell transmission of infection. *J Virology*, 1996, 70: 4607~4616
- 4 王珣章, 龙紫新, 谢伟东, 等. 形成多角体的杆状病毒载体系统的建立. *病毒学报*, 1991, 7: 253~261
- 5 李迎秋, 施先宗, 吴文言, 等. 一种构建重组杆状病毒的简易方法. *生物化学与生物物理进展*, 1996, 23: 477~478
- 6 童涌, 周向军, 曹韞旭, 等. 转译优化对 EPO 基因在 COS7 细胞中表达的影响. *生物工程学报*, 1994, 10: 342~345

## The Influence of Nucleotide in Position -3 on HBV c Gene's Expression in Insect Cells

Li Yingqiu\* Zhang Xiaoxin Long Qingxin Wang Xunzhang

**Abstract** Hepatitis B virus core antigen genes (HBV c) with A or T in position -3 were amplified by PCR point mutation technique and cloned into self-constructed universal vector pBlueoS by blunt end ligation. HBV c gene were cleaved out through restriction sites carried by PCR primers and inserted into pSXIVVIX3 (pX3). The recombinant plasmid pX3 $\tau$ 1 (-3 position is A) and pX3 $\tau$ 2 (-3 position is T) were transfected into insect *Sf9* cells to transiently express c1 and c2 gene. Radio assay showed that there was no difference between these two types of genes. It is suggested that A in position -3 is important but not enough for foreign gene's high expression in insect cells.

**Keywords** PCR, HBV c gene, nucleotide in position -3, baculovirus, transient expression