

# 基因工程乙肝疫苗的研制

## ——I.MT-5 细胞的 HBsAg 表达特性初探

邱荣国 谢彦博

(生物化学教研室)

彭文伟

(肝炎研究室)

**提要** 作者对基因工程转化细胞株MT-5的 HBsAg 表达特性进行了观察分析。结果表明：细胞的连续传代对 HBsAg 的表达稳定性没有影响；MT-5的不同单细胞亚克隆株中的 HBsAg 表达量存在不均一性；HBsAg 的表达不但受重金属离子的诱导，而且细胞可以耐受较高浓度  $ZnCl_2$  的处理；MT-5 细胞表达的 HBsAg 具有糖基化多肽，是制备疫苗的理想材料；通过培养条件最优化，筛选高产亚克隆细胞株和采用最适重金属离子诱导浓度，HBsAg 的产量达到  $2.5mg/l$ ，即  $2.2 \times 10^{-12}g/细胞$ 。

**关键词** 基因工程疫苗 乙型肝炎表面抗原 表达特性

前文<sup>[1]</sup>报告，采用人摄金蛋白(MT-Ⅱ)启动子、HBsAg 基因、SV40 早期基因的剪接和 poly(A)信号与牛乳头瘤病毒(BPV-1)构成表达质粒 pdMTsAg-5。用此质粒转化C127细胞获得了能分泌 HBsAg 的MT-5细胞株。在此基础上，我们对影响表达的多种因素进行了比较，从而确立了这一体系中 HBsAg 的表达特性。现报告如下。

### 材料与方 法

**细胞培养** MT-5 和 C127 细胞<sup>[1]</sup>用改良 Eagle 培养基(DMEM)(GIBCO)辅以10%小牛血清(血清条件试验除外)培养。其它条件依实验要求进行调整。

**单细胞筛选** 将0.25%胰酶分散的 MT-5 细胞采用稀释法于96孔培养板(Linbro)上进行单细胞筛选。接种第二天换液，以后每48小时换液。单细胞长成单层后转入24孔培养板(Linbro)培养。依此法建立了Ca、Cb、Cc、Cd、Ce、Cf和Cg共7个MT-5的亚株。

**ELISA 测定** 采用一步夹心法<sup>[2]</sup>并用 Miniread II 酶标阅读器(Dynatech)测O.D450。每

次根据参比标准(HBsAg 阳性血清)作工作曲线，从曲线上获得各样品的 HBsAg 浓度。

**亲和层析** MT-5细胞上清中的 HBsAg 的初步纯化采用马抗人 HBs 偶联的 Sepharose 4B(Pharmacia Fine Chemical)柱层析。亲和层析参照 Pharmacia Fine Chemical 的方法。

**SDS-PAGE** 初步纯化的 HBsAg 的多肽成份用 SDS-PAGE 分析。电泳采用 Laemmli<sup>[8]</sup> 系统。人血清 HBsAg 由北京生研所提供。分子量标准系列购自 Sigma。电泳凝胶用氨银法<sup>[4]</sup>显色。

### 结 果

**一、HBsAg 表达的稳定性** 连续收获五代 MT-5 培养上清，每48小时收获一次，用 ELISA 测定 HBsAg 的量。结果表明五代细胞的 HBsAg 平均产率基本稳定 ( $P > 0.05$ )，说明细胞的连续传代对 HBsAg 表达分泌的稳定性没有影响(见表1)。另外我们还注意到，MT-5 细胞株建立至今已传了近三十代，但其 HBsAg 表达水平保持基本稳定。

**二、亚克隆株中 HBsAg 的表达差异** 通

通稀释法所建立的七个MT-5亚株的HBsAg产率见表1。其中,6f的产率最高,且与其他亚株的产率均有显著差异性( $P < 0.01$ ),说明MT-5细胞群体中HBsAg的表达存在不均一性,因此可以通过单细胞克隆筛选高产株。

### 三、某些培养条件的最优化

1. 收获间期 实验分三组,分别间隔24、48、72小时收获。比较三种情况下的HBsAg产率,以48小时收获最佳(见表1)。

2. 小牛血清量 用DMEM辅以不同浓度的小牛血清(广州凤凰农工商联合公司)培养细胞,每48小时收样。结果表明,从0%到10%,随着小牛血清浓度的增加,HBsAg表达量相应增加。当浓度增至15%时,表达量反而下降。因此最佳小牛血清量为10%(见表1)。

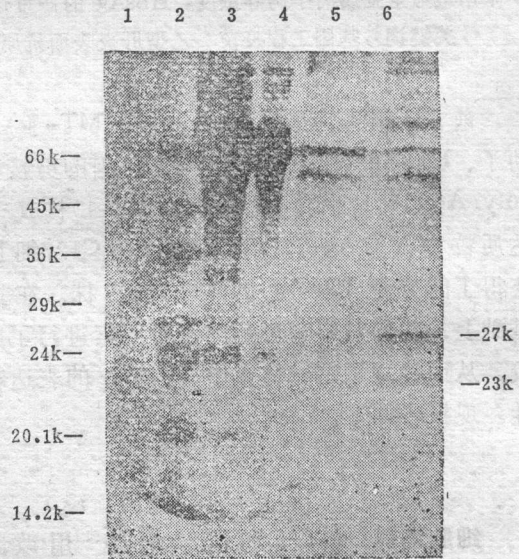
表1 不同条件下的HBsAg产率

细胞传代	p1	p2	p3	p4	p5		
产率(ng/ml)	275	500	400	400	320		
克隆亚株	Ga	6b	6d	6b	6e	6f	6g
产率(ng/ml)	235	150	475	300	325	750	400
收获间隔(h.)	24	48	72				
产率(ng/ml)	225	450	200				
小牛血清(%)	0	2	4	6	8	15	15
产率(ng/ml)	13	88	100	225	325	450	213
Cd <sup>2+</sup> 诱导(μM)	0	0.5	1	2	3	4	5
产率(ng/ml)	700	850	1500	800	500	400	0
Zn <sup>2+</sup> 诱导(μM)	0	70	80	90	100	200	500
产率(ng/ml)	700	875	1810	2000	2500	1400	0

3. 重金属离子的诱导浓度 前一工作<sup>[1]</sup>已经观察到MT-5细胞中HBsAg的表达可受Zn<sup>2+</sup>/Cd<sup>2+</sup>的诱导。为了进一步证实这一诱导作用,并建立最佳的诱导浓度,我们用不同浓度的CdCl<sub>2</sub>和不同浓度的ZnCl<sub>2</sub>以及二者相混合处理6f亚株。从表1可知,Zn<sup>2+</sup>的诱导强度较Cd<sup>2+</sup>的诱导强度大;细胞对Zn<sup>2+</sup>的耐受能力是对

Cd<sup>2+</sup>的100倍;最适Cd<sup>2+</sup>诱导浓度为1μM,诱导产率达1500ng/ml,诱导效率为210%;最适的Zn<sup>2+</sup>诱导浓度为100μM,诱导产率达2500ng/ml,诱导效率为350%。最高诱导产量用单位细胞数表示约为 $2.2 \times 10^{-12}$ g/细胞。单纯高浓度Zn<sup>2+</sup>对ELISA测定没有干扰作用。合并使用Zn<sup>2+</sup>和Cd<sup>2+</sup>处理的诱导结果较不规律,难以找到最佳的处理条件。

四、细胞表达的HBsAg的多肽组成 将经一次多抗亲和层析纯化的MT-5细胞表达的HBsAg作SDS-PAGE氨银染色分析。虽然初步纯化的样品仍呈现若干条蛋白带,但在分子量23K和27K处有两条明显的蛋白主带,与人血清HBsAg样品的电泳行为相同。而这两条带不存在于阴性对照C127培养上清中(附图)。



附图 表达产物的多肽分析

1—人血清 HBsAg 2—分子量标准  
3,4—C127培养上清  
5,6—初步纯化的的 MT-5 表达产物 HBsAg

说明这两条带即为MT-5细胞中表达的HBsAg的主要多肽及其糖基化形式。

### 讨 论

HBsAg 表达水平的高低,决定着基因工程乙肝疫苗的研制前景。而培养条件的最优

化,对产量的提高有着重要的作用。Hsiung et al<sup>[6]</sup>报告,采用旋转培养等方法,可以明显增加 HBsAg 的累积量;任贵方等<sup>[6]</sup>报告,用单层细胞培养法进行不同条件的比较研究,建立最佳条件,也可提高 HBsAg 的表达量。我们的这一工作,通过筛选单细胞克隆,采用重金属离子诱导并建立了多种培养条件的最优化,使 MT-5 细胞分泌 HBsAg 的量提高到了2.5 mg/l。这与迄今国内报道的基因工程方法于哺乳细胞中生产 HBsAg 的最高表达量<sup>[6]</sup>相近。另外,还可以进一步进行优化条件的研究,如温度、培养方式等,以期进一步提高表达水平。

MT-5细胞中 HBsAg 的表达不但受重金属离子的诱导,而且能够耐受较高浓度重金属离子。这样,就大大提高了 HBsAg 的表达量。我们的结果还说明,MT-5细胞表达的 HBsAg 具有糖基化多肽,这种产物是制备疫苗的理想原料。

这一初步研究结果表明,MT-5 细胞表达 HBsAg 具有以下特性:稳定性、糖基化、较高产量和可诱导性。因此可望用于生产基因工

程乙肝疫苗。

(本实验蒙姚集鲁副教授惠赠 ELISA 试剂。特此致谢)

### 参 考 文 献

- [1] 谢彦博,等。利用人摄金蛋白启动子和牛乳突瘤病毒在哺乳动物细胞中表达乙型肝炎表面抗原。病毒学报 1986, 2:1。
- [2] 姚集鲁,等。一步夹心法检测HBsAg的高灵敏度的单克隆试剂ELISA技术。中山医科大学学报 1987, 8(3):19。
- [3] Laemmli UK. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of the bacteriophage T4. Nature 1970, 227:680。
- [4] 蔡晓丹,等。一种改良的蛋白质双向电泳银染色法。生物化学与生物物理进展 1986, 3:66。
- [5] Hsiung N, et al. Efficient production of hepatitis B surface antigen using a bovine papilloma virus-metallothionein vector. J Mol Appl Genet 1984, 2:497。
- [6] 任贵方,等。B16 及其克隆亚系细胞分泌乙型肝炎表面抗原的稳定性、动态和最佳条件。病毒学报 1985, 1:38。

## Development of Genetic Engineering Hepatitis B Vaccine

### I. A Preliminary Study on the Expression Characteristics of HBsAg in MT-5 cells

Qiu Rongguo Xie Yanbo

(Mol Biol Research Lab)

Peng Wenwei

(Hepatitis Research Lab)

### Abstract

We observed and analysed the expression characteristics of HBsAg in the transformed cell line MT-5. The results revealed that the expression and excretion of HBsAg is stable; the cells could stand 200µm ZnCl<sub>2</sub> and the yield of HBsAg could be induced by ZnCl<sub>2</sub> up to 2.5mg/l, we established several subcloned cell lines of MT-5 and The expression yield of HBsAg is different in different sudline HBsAg expressed by MT-5 showed 23K and 27K polypeptides by SDS-PAGE analysis. It is evident that the HBsAg can be glycosylated in MT-5 cells.

Key words: Genetic engineering vaccine Hepatitis B surface antigen Expression characteristic