

基于乙型肝炎病毒核心蛋白的颗粒性肽 展示载体的构建

杨海杰,陈 敏,何水珍,程 通,顾 颖,管保全,张 军,夏宁邵*

(厦门大学细胞生物学与肿瘤细胞工程教育部重点实验室,
福建省医学分子病毒学研究中心 厦门大学,福建 厦门 361005)

摘要: 为提高 HBV preS1 aa21-47 的免疫原性,将 1~6 拷贝的 preS1 (21-47) 片段以串联方式插入 HBcAg 的 aa78 和 aa82 之间,在大肠杆菌中进行表达和纯化。携带 1~3 拷贝的重组抗原 CI、CII 和 CIII 的表达产量约占菌体总蛋白的 20%,而携带 4~6 拷贝的重组抗原则未见明显表达。电镜检测显示重组抗原 CI、CII 和 CIII 可以形成形态与 HBcAg 类似的类病毒颗粒,颗粒直径在 30~34 nm 之间。ELISA 分析显示这 3 种 VLP 抗原具有很强的 preS1 抗原的免疫反应性,而对 HBc 单克隆抗体则基本失去反应性。提示外源多肽 pre(21-47) 可被有效地递呈至类 HBc 颗粒的表面,且外源多肽的插入使 HBc 主要的免疫优势表位遭到了破坏。这些证据表明利用 HBcAg 的专一性呈递能力来构建多价抗原可作为免疫原设计时的一种策略。

关键词: preS1; 核心蛋白; 免疫原性; 类病毒颗粒; 原核表达

中图分类号: Q 71

文献标识码: A

由乙型肝炎病毒(Hepatitis B Virus, HBV)感染引发的慢性肝病和肝癌是人类最严重的健康问题之一。研究发现 HBV preS1 抗原上的 aa21-47 位置可能是 HBV 感染肝细胞的受体结合位点之一,其抗体具有体外病毒中和能力。同时,抗 preS1 抗体是 HBV 清除的早期血清标志物,其出现常预示着病程的良好进展^[1]。因此在预防性或治疗性疫苗中引入该片段可能是解决对 HBsAg 疫苗无应答问题以及慢性乙肝患者治疗性疫苗的有效途径之一。已有数篇报道曾提及携带 HBV preS1 抗原的疫苗的效果,但其抗 preS1 抗体的产生均较弱^[2,3],故而未见对现有 HBsAg 疫苗的明显改善^[4]。由此可见,如何去提高 preS1 (21-47) 肽段弱免疫原性,继而诱发 HBV 携带者产生病毒中和抗体对乙肝疫苗的研制来说是一个很有价值的课题。

HBV 的核心抗原(HBcAg)具有很强的 T 细胞免疫原性^[5],同时又能够在体外自发装配成类病毒颗粒(virus-like particle, VLP),故可被用作免疫载体来提高插入片段的免疫原性。研究显示 HBcAg 上 aa78-83 位置(主要免疫优势区, MIR)暴露于颗粒表面。在该部位插入外源片段后基本不影响 HBcAg 颗粒的装配特性,且插入片段通常暴露于颗粒表面,因此被作为外源表位插入位点的首选^[6]。本研究利用 HBcAg 含高免疫原性的 T 细胞表位及其能够在体外自发装配等特性,将多个含 HBV preS1 (21-47) 区域的多肽片段插入 HBcAg 的 MIR 区,以提高 preS1 (21-47) 肽段的免疫原性。

1 材料和方法

1.1 菌种和质粒

大肠杆菌 ER2566 和 T 载体 pMD 18-T 分别购自 New England Biolabs 公司和 TAKARA 公司。表达载体 pTO-T7 由我室构建^[7]。含 HBV adw2 亚型(GenBank 号为 AF233236)基因片段的多个 pMD 18-T 克隆质粒由本实验室构建。质粒 pT-21-47*1、pT-21-47*2、pT-21-47*3、pT-21-47*4、pT-21-47*5、pT-21-47*6 含串联的 1~6 次拷贝 HBV preS1 (21-

收稿日期:2004-03-15

基金项目:国家重点科技(攻关)计划(96-920-37-09)

作者简介:杨海杰(1972-),男,博士。

* Corresponding author,

E-mail: nsxia@jingxian.xmu.edu.cn

47)片段。

1.2 免疫试剂

多种抗 HBc、HBe 单抗和 HRP 标记的羊抗鼠 IgG 由北京万泰生物制药有限公司提供。抗 preS1 (21-47) 单抗 4D11 及 HRP 标记的 4D11 由我室制备。由德国 MMG 公司固相合成 HBV adw2 亚型 preS1 区段的 21-47 多肽: PLGFFPDHQLDPAF-GANSNNPDWDFNP。

1.3 质粒构建

将 HBcAg N 端 (1-149) 编码片段克隆至 pTO-T7 的 *Bam*H I / *Eco*R I 位点间, 得到表达质粒 pC149/wt。用 Taq DNA 聚合酶、pC149/wt 及以下引物, 通过 PCR 对 HBc (1-149) 进行定点突变: 5' ⁻GTGGTACT GGA TCCGGTGGTGGAGGTTCAAGAGGAGGTGGTAGGGAA TTAGTAGTCAG 3' (正链)、5' ⁻CC GGA TCCAGTACCACCACCTCCAGAACCACCTCCACCATCTTCCAAATTACTTCC-3' (负链) 及两个 HBc 末端的引物 5' ⁻GGATCC CATATG GACATTGACCCA)、5' ⁻GAATTC TTAACAACAAGTAGTTTCCGG。 *Nde* I / *Eco*R I 双酶切处理 C149/mut 片段后克隆入 pTO-T7, 获得重组质粒 pC149/mut。

1.4 重组 HBV 蛋白在 *E. coli* 中的表达

将 1 mL 过夜培养的含 HBV 基因片段表达质粒的工程菌接种于 500 mL 新鲜配制的 LB 培养基中, 37 °C 培养, 摇床转速为 210 r/min。当菌液 OD_{600} 值达 0.8 左右时, 加入 IPTG 使其终浓度为 0.2 mmol/L, 32 °C 诱导表达 3 h 后收获菌体, 并进行 13.5% 的 SDS-PAGE 分析。

1.5 HPLC 纯化重组蛋白

超声破碎菌体, 高速离心取上清进行纯化。超声上清用 40% 的饱和硫酸铵沉淀。沉淀用 PBS (pH7.4) 溶解并用 PBS 透析 4 次。接着先后利用 TSK-GEL SW3000 柱 (TOSOH) 进行分子筛纯化和 DEAE-5PW 柱 (TOSOH) 进行阴离子交换纯化, 纯化蛋白于 -20 °C 保存备用。

1.6 电镜观察

纯化的重组蛋白样品经高速离心后进行负染电镜分析。样品滴加到 200 目的铜栅上, 结合 5 min。纯水洗涤铜栅 2 次, 凉干, 用 1.5% 的乙酸铀染色 5 min 后直接进行电镜观察。

1.7 ELISA 检测

按 1 μg/孔的用量将 5 种纯化的 VLP 抗原用碳

酸盐缓冲液稀释后包被到微孔板中, 37 °C 温育 2 h。携带 pGFP 质粒的 ER2566 裂解液 (10 μg/孔) 作为阴性包被对照。用封闭液 (含 1% BSA 的 PBST) 在 37 °C 封闭 2 h。加入 3 种不同来源的抗 HBe 和 3 种抗 HBc 单抗, 在 37 °C 作用 30 min。加入 HRP 标记的羊抗鼠 IgG 37 °C 作用 30 min 后显色。用 50 μL 的 2 mol/L H₂SO₄ 终止显色, $OD_{450/620}$ 读值。

2 结果

2.1 HBcAg 肽展示载体的构建

用定点突变方法获得 HBcAg aa79-81 编码序列缺失的 DNA 片段 C149/mut。酶切处理 C149/mut 片段后克隆入 pTO-T7, 获得重组质粒 pC149/mut。经 DNA 测序后证实插入片段的核苷酸序列与预期结果一致。目的片段 C149/mut 所编码的氨基酸序列为 HBc (1-78)-G₄S_{G₄}T-GS-G₄S_{G₄}-HBc (82-149)。在 C149/mut 片段中, HBcAg 的 3 个氨基酸 (79-81) 被富含甘氨酸的柔性连接肽 G₄S_{G₄}T-GS-G₄S_{G₄} 替代 (图 1)。

2.2 不同拷贝数 21-47 肽展示颗粒的构建

用 *Bgl* II / *Bam* HI 消化质粒 pT-21-47*1、pT-21-47*2、pT-21-47*3、pT-21-47*4、pT-21-47*5、pT-21-47*6 后, 将 1~6 次拷贝的 preS1 (21-47) 片段亚克隆至 *Bam* HI 消化后的质粒 pC149/mut, 构建到 6 种表达质粒 pC149/21-47*1、pC149/21-47*2、pC149/21-47*3、pC149/21-47*4、pC149/21-47*5、pC149/21-47*6。这里仅代表性地列举重组质粒 pC149/21-47*6 的构建过程 (图 1)。

2.3 不同拷贝数 21-47 肽展示颗粒的表达和纯化

将以上构建的 2 个携带 HBV core 基因和 6 个携带 HBV core-preS1 (21-47) 区段的表达质粒 (表 1), 共 8 个重组表达质粒转化大肠杆菌进行诱导表达。结果 (图 2) 显示, 其中 5 个重组抗原 C149-wt、C149/mut、CI、CII 和 CIII 表达量约 20%, 产物主要以可溶性形式存在, 而 CIV、CV 和 CVI 均无明显表达。4 种重组蛋白 C149/mut、CI、CII 和 CIII 经 40% 的饱和硫酸铵沉淀后, 进一步用 TSK-GEL 柱和 DEAE-5PW 柱纯化, 结果显示所有 4 种重组抗原的纯度高于 85%。

2.4 肽展示颗粒的电镜观察

将这 5 种重组蛋白样品进行负染电镜观察 (图 3), 可见所有 5 种重组蛋白均以大量的类 HBV 核

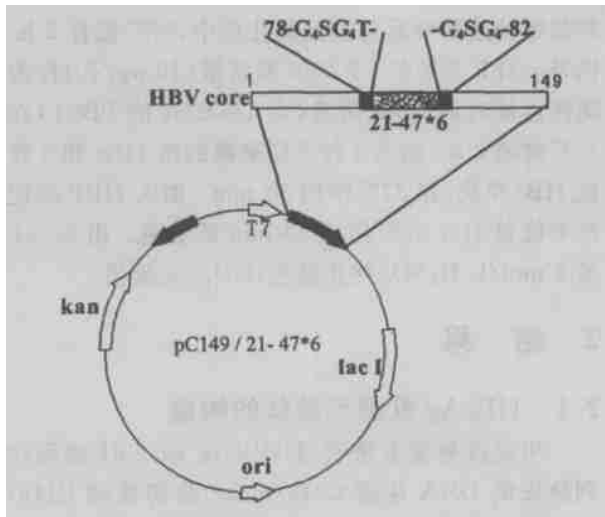


图 1 质粒 pC149/21-47*6 的构建示意图

*水平条表示嵌合的 HBc-preS1 (21-47) 蛋白。外源 DNA 片段 21-47*6 片段插在 aa79-81 缺失的 HBcAg 的主要免疫优势区 (MIR), 其两侧是富含甘氨酸的柔性连接肽

Fig. 1 Construction of plasmid pC149/21-47*6

心蛋白球形空心颗粒形式存在, 平均直径约 30 ~ 34 nm. 各种颗粒大小、形状十分均一。

2.5 肽展示颗粒上外源多肽的活性检测

各重组抗原与抗 HBc、抗 HBe 和抗 preS1 单克隆抗体的反应性检测按“材料与方法”进行。阴性对照(含 GFP 蛋白的细菌裂解液)同所有 7 种单抗均无反应(图 4)。所有 5 种类病毒抗原同抗 HBe 单抗均有着良好的反应性, 但同抗 HBc 单抗的反应性却存在很大差异。天然 HBc 类病毒颗粒(C149/wt)对 3 种抗 HBc 单抗的反应强烈, 但是, 变异的 HBc 类

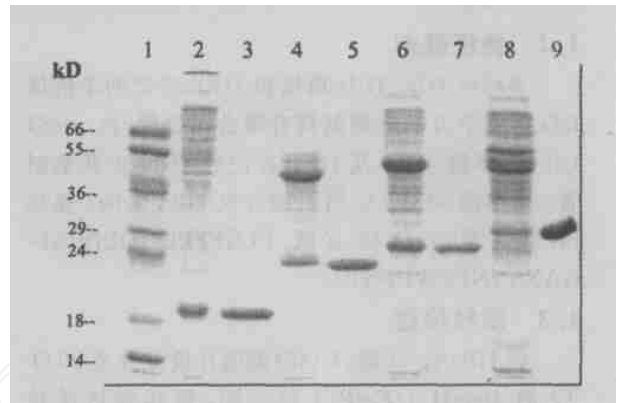


图 2 纯化重组抗原的 SDS-PAGE(13.5%)分析

1. 蛋白分子量 marker; 2. C149/mut; 3. 纯化的 C149/mut; 4. CI; 5. 纯化的 CI; 6. CII; 7. 纯化的 CII; 8. CIII; 9. 纯化的 CIII

Fig. 2 13.5% SDS-PAGE analysis of purified recombinant antigens

病毒颗粒(C149/mut)仅对 1 种 HBc 单抗有微弱反应。3 种 HBc-preS1 (21-47) 嵌合 VLP 同所有 3 种抗 HBc 单抗均无反应。以上结果表明 HBc 的优势 B 细胞表位由于其 MIR 区 3 个氨基酸的缺失而被破坏, 而外源表位的插入又使其进一步被破坏。3 种 HBc-preS1 (21-47) 嵌合类病毒颗粒同抗 preS1 单抗反应良好, 提示外源表位 preS1 (21-47) 可被有效地递呈至类 HBc 颗粒的表面。

3 讨论

外源片段插入 HBc 多个部位后, 无论在真核细胞或原核细胞均能正确地折叠和自发装配成类病毒颗粒(VLP)^[5,8]。HBc 载体为外源表位提供了很强

表 1 表达质粒上插入片段的来源

Tab. 1 Source of inserted fragments in expression plasmids

编号	质粒	重组抗原	插入片段
1	pC149/wt	C149/wt	
2	pC149/mut	C149/mut	
3	pC149/21-47*1	CI	One copy of preS1 (21-47)
4	pC149/21-47*2	CII	Two copies of preS1 (21-47)
5	pC149/21-47*3	CIII	Three copies of preS1 (21-47)
6	pC149/21-47*4	CIV	Four copies of preS1 (21-47)
7	pC149/21-47*5	CV	Five copies of preS1 (21-47)
8	pC149/21-47*6	CVI	Six copies of preS1 (21-47)

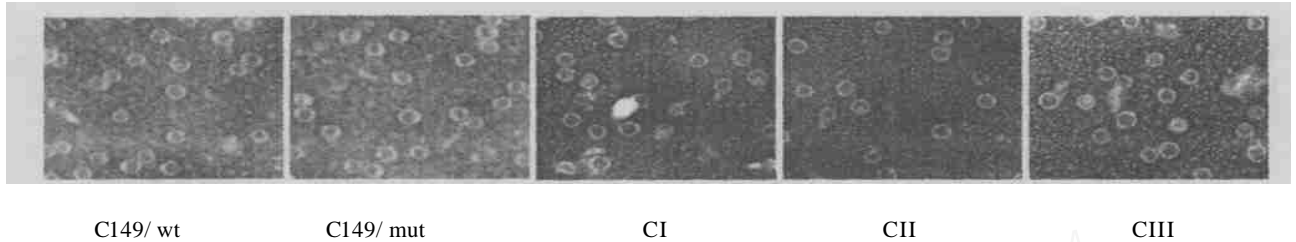


图 3 类病毒颗粒抗原的透射电镜

*类病毒颗粒用 1.5% 乙酸铀负染后进行电镜观察,放大倍数为 67 000

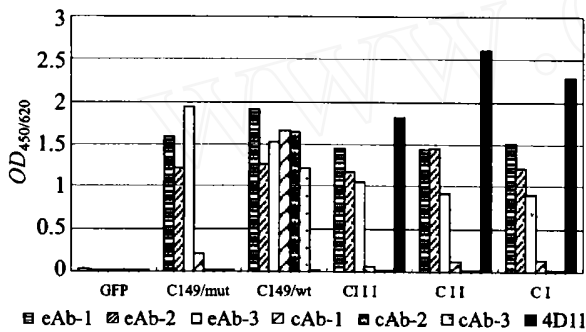
Fig. 3 Transmission electron microscopy of VLP antigens purified from *E. coli*

图 4 ELISA 分析重组抗原与 HBV 单抗的反应性

* GFP, 含重组 GFP 的细菌裂解物,阴性包被抗原 (100 μ g/mL); 重组抗原 C149/wt, C149/mut, CI, CII 和 CIII 均作为包被抗原 (10 μ g/mL); eAb-1, eAb-2, eAb-3, 3 种 HBc 单抗; cAb-1, cAb-2, cAb-3, 3 种 HBc 单抗; 4D11, preS1 (21-47) 单抗

Fig. 4 Reactivity of recombinant antigens with different HBV McAbs by ELISA

的 T、B 细胞辅助,因而和其它已知的颗粒载体相比,HBc 作为外源多肽的展示载体具有很大的优越性。HBc 可分为装配区 (aa1-149) 和核酸结合区 (aa150-183),删除核酸结合区的 HBc 仍可装配成 VLP。本研究首先克隆出 HBc 的装配区 (aa1-149),随后删除了其 MIR 区的 3 个氨基酸 (aa79-81),以减弱该表位对外源片段特异的免疫应答的干扰。结果获得的 C149/mut 抗原成功去除了 HBc 最主要的 B 细胞表位,对 3 个不同来源的抗 HBc 单抗均失去了反应性。

将 1~6 个拷贝的 HBV preS1 (21-47) 片段以串联方式分别插入 pC149/mut 的 MIR 编码区,并进行了原核表达。结果携带 1~3 个拷贝的重组抗原 CI、CII、CIII 可以形成形态与 HBc 类似的类病毒颗粒,而携带 4~6 个拷贝的重组抗原则未见明显表达。在 Kratz 等^[8]的研究中,长达 238 个氨基酸残基

的绿色荧光蛋白插入 HBc MIR 后,在 *E. coli* 中仍能高效表达,而 4 个 preS1 (21-47) 片段的总长度仅为 164 个氨基酸,提示 HBc 对不同外源蛋白的容纳能力存在差别。

我们的研究证实,利用 HBcAg 对外源多肽的展示能力可作为疫苗设计时一种策略。蛋白质抗原免疫识别研究表明,蛋白质并非通过完整分子发挥作用,而是通过表位体现其特异性。鉴于此,表位疫苗越来越多地受到重视。比之完整抗原分子疫苗,表位疫苗诱发的免疫特异性大大提高,但由于表位疫苗分子量小,故免疫原性会相应降低。我们所构建的 3 种含 preS1 (21-47) 肽段的表位疫苗 CI、CII 和 CIII,很好地解决了这一问题。这 3 种 preS1 抗原在缺失 HBcAg 原有的优势 B 细胞表位的同时,仍保留了 HBcAg 特异的高免疫原性的 T 细胞表位。而这些 HBcAg 特异的 T 细胞表位可通过载体效应提高 preS1 特异的免疫应答。接下来我们将通过动物实验 (小鼠和猕猴),来进一步研究这 3 种颗粒性抗原作为辅助预防性或治疗性疫苗的潜在可行性。

参考文献:

- [1] Wei J, Wang Y Q, Lu Z M, et al. Detection of anti-preS1 antibodies for recovery of hepatitis B patients by immunoassay [J]. World J. Gastroenterol, 2002, 8: 276 - 281.
- [2] Madalinski K, Sylvan S P, Hellstrom U, et al. Antibody responses to preS components after immunization of children with low doses of BioHepB [J]. Vaccine, 2001, 20: 92 - 107.
- [3] Leroux-Roels G, Desombere I, Cobbaut L, et al. Hepatitis B vaccine containing surface antigen and selected preS1 and preS2 sequences. 2. Immunogenicity in poor responders to hepatitis B vaccines [J]. Vaccine, 1997, 15(16): 1732 - 1736.
- [4] Eyigun C P, Yilmaz S, Gul C, et al. A comparative trial of two surface subunit recombinant hepatitis B vaccines vs

- a surface and PreS subunit vaccine for immunization of healthy adults [J]. *J. Viral Hepat*, 1998, 5: 265 - 269.
- [5] Pumpens P, Grens E. HBV core particles as a carrier for B cell/ T cell epitopes[J]. *Intervirology*, 2001, 44: 98 - 114.
- [6] Zlotnick A, Cheng N, Stahl S J, et al. Localization of the C terminus of the assembly domain of hepatitis B virus capsid protein: implications for morphogenesis and organization of encapsidated RNA [J]. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1997, 94(Sep1): 9 556 - 9 561.
- [7] 罗文新,张军,杨海杰,等. 一种带增强子的原核表达载体的构建及初步应用[J]. *生物工程学报*, 2000, 16(5): 578 - 581.
- [8] Kratz P A, Bottcher B, Nassal M. Native display of complete foreign protein domains on the surface of hepatitis B virus capsids[J]. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1999, 96: 1 915 - 1 920.

Construction of Peptide Display Vector Based on HBV Core Protein

YANG Hai-jie, CHEN Min, HE Shui-zhen, CHENG Tong, GU Ying,
GUAN Bao-quan, ZHANG Jun, XIA Ning-shao

(The Key Laboratory of Education Minister for Cell Biology and Tumor Cell Engineering of Xiamen University, Research Center of Medical Molecular Virology of Fujian Province, Xiamen University, Xiamen 361005, China)

Abstract : To improve the immunogenicity of HBV preS1 aa21-47, 1 ~ 6 tandem copies of HBV preS1 (21-47) fragment were inserted into HBcAg at the sites of amino acid 78 and 82, and expressed in *E. coli* and purified by gel filtration and anion exchange chromatography. The yields of three recombinant proteins, CI, CII, CIII, carrying 1 ~ 3 copies of HBV preS1 (21-47) individually were about 20 % in total bacterial proteins. While recombinant antigens carrying 4 ~ 6 copies of HBV preS1 (21-47) were poorly expressed in *E. coli*. Negative stain electron microscopy showed recombinant antigens CI, CII, CIII could form virus-like particles (VLPs), similar to HBcAg morphologically. These particles have an average diameter of 30 ~ 34 nm. ELISA results indicated that all three VLP antigens could strongly recognize anti-preS1 (21-47) monoclonal antibodies, but were lack of immunoreactivity with anti-HBc monoclonal antibodies. It indicates that foreign epitope preS1 (21-47) could be displayed on the surface of HBV core-like particles, and that dominant B cell epitope of HBc was destroyed because of the deletion of MIR and further destroyed by insertion of foreign epitopes. It might be a feasible strategy in immunogen designs for improving the immunogenicity of specific peptides in virtue of the display capability of HBcAg.

Key words : preS1; core protein; immunogenicity; virus-like particles; prokaryotic expression