

遺傳工程

與 肝炎疫苗

(張居正)

前言

「記憶反應 (memory response) 是免疫系統中一個極為重要的反應。人體首次被某種外來物質侵入後，免疫系統就能「記住」這個外來的物質，當該外來物質再次入侵時，便引發較首次入侵時更強烈的抵抗反應，迅速產生大量抵抗它的抗體。因此為了預防某種疾病，可先將與此病原類似的物質注入人體，使免疫系統能在真正的病原入侵後，迅即合成大量消滅病原的抗體，這些與病原類似的物質就可做為疫苗。B型肝炎是由B型肝炎病毒 (hepatitis B virus, HBV) 所引起的肝炎，由於迄今對濾過性病毒尚無有效的藥劑，所以疫苗的預防注射就成為防治B型肝炎最有效的方法。

HBV 為球型的病毒，外披一層蛋白質稱為「外鞘」，外鞘上有一種由病毒合成的蛋白質稱為表面抗原 (hepatitis B surface antigen HBs Ag)，此表面抗原以前稱為「澳洲抗原」，其分子有糖基化作用 (glycosylation) 的 P₂ 型分子及未糖基化作用的 P₁ 分子，其分子量分別為 27 千道爾頓及 23 千道爾頓。在 B 型肝炎病患的血液中，可分離到平均直徑為 22 nm (10⁻⁹ m) 的表面抑原顆粒，經過純化後的顆粒可做為 B 型肝炎的疫苗，唯

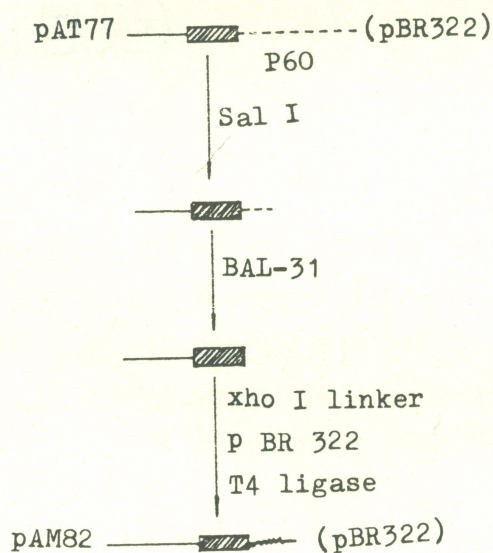
成本較高。

HBV 到目前為止只能在人及黑猩猩的肝臟內繁衍，因此不易從其族群中篩選到低毒性而可做疫苗的品系，所以目前乃藉遺傳工程的技術來製造 B 型肝炎疫苗，並期望能經動物及臨床實驗成功後推展運用於 B 型肝炎的防治上。

在生物體內製造

遺傳工程簡單地說：就是把生物的某段基因以特定的酶切下之後接到另一個生物體的基因上，並適當的控制其生長環境，使這段基因能在新的個體內表現其功能。科學家將 B 型肝炎表面抗原基因切下後嫁接到適當的質體 (plasmids, 一些能與細菌或低等真核單細胞生物共生的雙股圓形 DNA) 。由於質體上多帶有抗藥的基因，故在爾後的實驗中，將可能帶有此質體的細菌培養在含藥的培養基上，則那些在此條件下存活的個體，就必定也帶有表面抗原基因，這就是以抗藥基因做為「篩選標記」 (selecting mark) 的原理。此外一段基因的表現要受到其基因上某一段稱為 (促進子) (promotor, PO) 的控制，所以接上一段強而有力的

促進子，便能大大提高表面抗原生成的機會。質體上的 DNA 經過這些步驟的修改後，再將其種入寄主細胞內，便可在其子代細胞中得到所要的基因產物。HBV 表面抗原即利用以上的原理，成功地將酵母菌和大腸桿菌中合成能激發人體產生抗體的表面抗原顆粒。同時在牛痘病毒 (vaccinia virus) 的 DNA 上亦能接上表面抗原基因，並且將此新合成的病毒注射在兔子體內能激發大量抗體的產生。下面就將這些結果做進一步的說明。



圖一：由質體 pAT77 修改而得到新質體 pAM82。

pAT77 上帶有 Apase 的基因——P60 (-----)，及其促進子 ApasePO (▨)。首先以酶 Sal I 切掉 P60 的大部分基因，再以 BAL-31 將剩餘的 P60 切去，利用 T₄ 連接酶的作用，先後接上一段有 xho I 作用序列的连接區 (xho I linker, ~~~~~) 及質體 pBR322，而得到新的質體 pAM82。

在酵母菌中合成

最近關於在酵母菌中合成 HBV 表面抗原的報導很多，我們在此介紹日本宮野原 (Miyano-hara) 教授所完成的工作：

P60 是一種酵母菌內的酸性磷酸酶 (acid phosphatase)，這種酶能在酸性的條件下水解磷酸鹽。此基因的促進子 (Apase PO) 會因環境中無機磷酸鹽的濃度降低而促進 P60 的生成。宮野原等人推想若將 P60 的促進子與 HBV 表面抗原基因連接，則可降低培養液中磷酸鹽的濃度，誘發重組質體的酵母菌，將 HBV 表面抗原基因活化並生成大量的表面抗原。

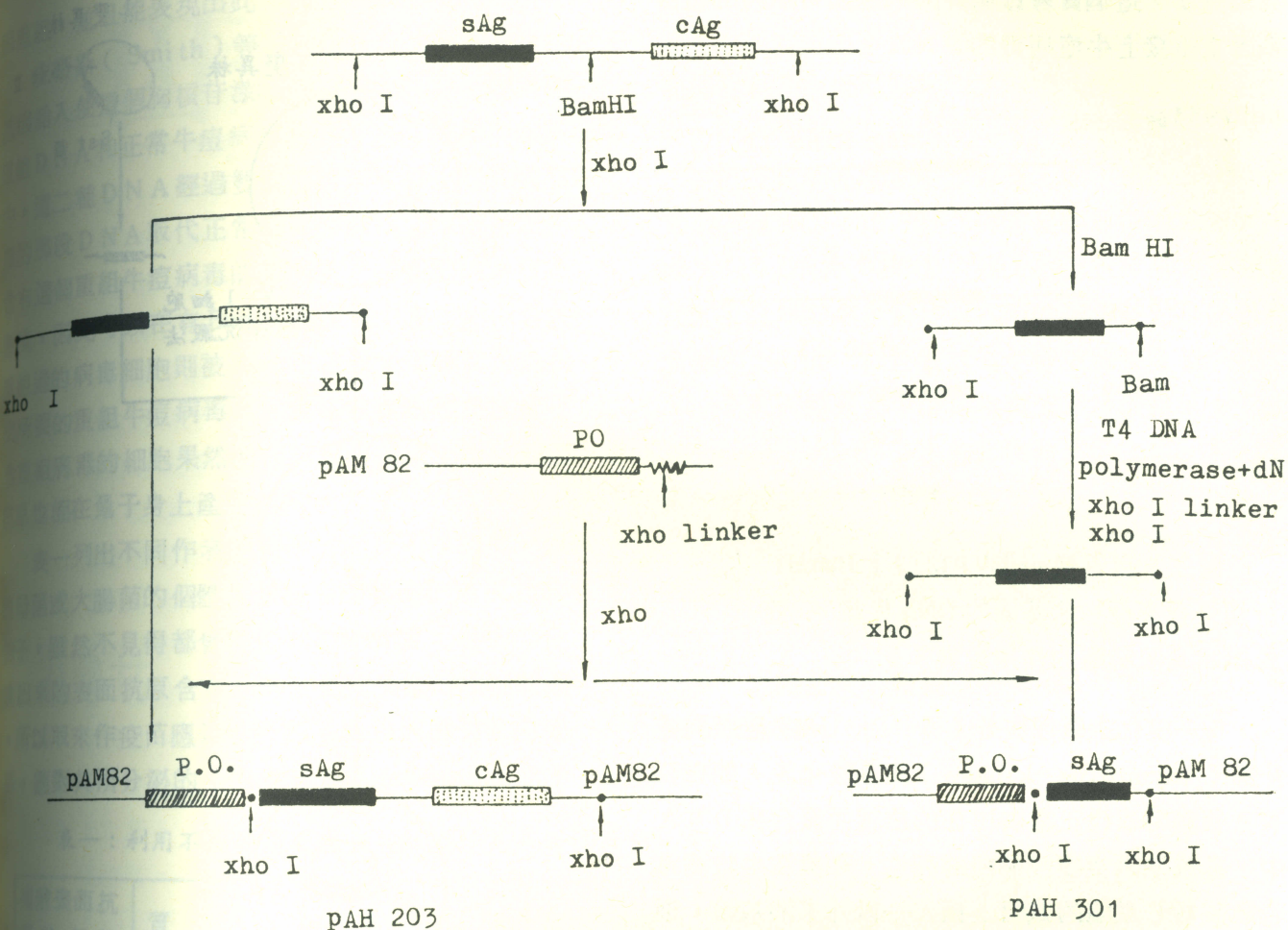
他們用重組的質體 (見圖一、圖二) 去接種酵母菌，果然發現當培養劑中無機磷酸的濃度降低時，P60 促進子便啟動表面抗原基因的表現，以免疫放射測定法 (radioimmunoassay, RIA) 在酵母菌測得表面抗原的生成。在電子顯微鏡下觀察到新生成的表面抗原的生成。在電子顯微鏡下觀察到新生成的表面抗原為 22 nm 的顆粒。

在大腸桿菌中合成

已往以大腸桿菌來做為遺傳工程的材料有兩個問題，一是無法直接從大腸桿菌的培養液中測得表面抗原的生成，必須將細胞打破再以 RIA 來檢驗。其次是許多合成出來的表面抗原往往有抑制細胞生長或不穩定的現象，所以日本的藤澤 (Fujisawa) 等人即針對以上的缺點而有新的嘗試。

他們先將一段長度為 1372 核苷對 (bp) 含表面抗原基因的核酸用 BamHI 質體 PHB 上切下，然後再以 HpaI、HincII 及 XbaI 繼續切割得三段長度分別為 933 核苷對、744 核苷對及 721 核苷對的 DNA (見圖三)。這些 DNA 片段的長度差異造成表面抗原基因的長短，結果合成之表面抗原其胺基端 (amino terminal) 便不相同，作者藉此可了解胺基端對大腸桿菌生存的影響。

其次將這些 DNA 片段與促進子中 trp 基因連接成三種質體，依其所接 DNA 的大小分別為：P、SS-6、PTRP SS-39 及 PTRP SS-39。



圖二：自質體 pACYC177 上切下表面抗原基因與質體 pAM 82 連接，得到新質體 pAH203 及 pAH301。圖中箭頭所表示者為酸素的作用位置；表面抗原基因 (sAg)、核心抗原基因 (cAg) 及 pAM80 的 PO 分別以 、、 表示。pACYC177 被 xho I 作用後的片段，其中之一直接與 pAM80 合成 pAH 203，另一則先經 BamHI 切去核心抗原基因後，再與 pAM 82 連接得到 pAH301。

以這三種質體接種在大腸桿菌 K-12 內，發現帶有最完整表面抗原基因的質體 PTRP SS-6 會有抑制 K-12 生長的現象，且表面抗原的產量也很低。以大腸桿菌中的重組質體合成 HBV 表面抗原困難仍多，猶待改進。

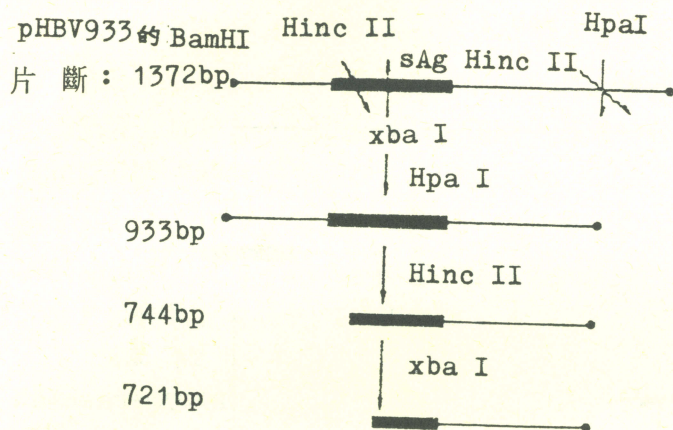
牛痘病毒生產的疫苗

人類早在十九世紀就利用牛痘病毒與天花病毒相似性以「種牛痘」的方式製成了醫學史上第一

個疫苗。

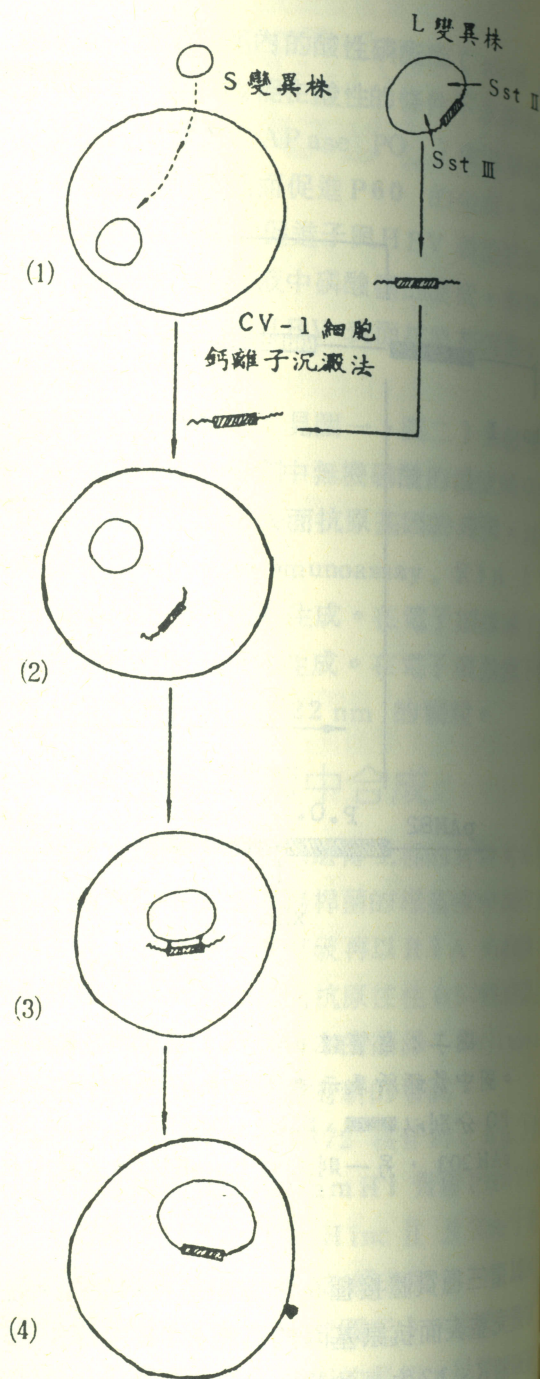
牛痘病毒在培養時會產生變種 (mutant strain) L 型和 S 型病毒，後者的 DNA 比前者少了一段。長野 (nakano) 等人曾將 L 型的 DNA 用 Sat II 酶切割得到 S 型短缺的那一段 DNA，他們將 S 型病毒感染 CV-1 細胞，再將 L 型 DNA 切下的 DNA 片斷以「鈣離子沉澱法」同樣種入 CV-1 細胞內，結果發現那一段 DNA 竟與 S 型病毒的 DNA 發生「雙重基因互換」而恢復 L 型 DNA 的構造 (

見圖四)。這個實驗證明外來的基因可順利的經由基因重組接上牛痘病毒的DNA。



圖三：自質體 pHBV933 以上 BamHI 所切得含表面抗原基因的 DNA 片段。筭頭所示為限制酶的作用位置。

5-溴化去氧尿核苷 (5-Br Urd) 經過胸核糖苷酶 (thymidine kinase) 的磷酸化後，能在 DNA 複製時取代正常胸核糖苷的位置而聚合在 DNA 中，造成基因突變或個體的死亡。如果在牛痘病毒合成胸核糖苷酶的基因上插入一段外來的基因，則原來的基因，則原來胸核糖苷酶基因的功能便受到破壞而不能合成胸核糖苷酶，如將此牛痘病毒接種在缺乏胸核糖苷酶的細胞變異株中並加入 Brd Urd 培養，則因為病毒及細胞兩者都無胸核糖苷酶，子代細胞的生長不會受到抑制。反過來說，如果外接的基因未能插入牛痘病毒的胸核糖苷酶基因上，則後代的子細胞將因為磷酸化的 Brd Urd 聚合 DNA 中而導致死亡，故胸核糖苷酶便成一個實用的篩選指標。維爾 (Weir) 等人即據上述的原理，將無胸核糖苷酶基因的牛痘變異株，再將正常牛痘病毒上含胸核糖苷酶基因的 DNA 片段以鈣離子沉澱法種入 R 970-5 細胞內，結果在後代的 R 970-5 細胞中能找到有完整胸核糖苷酶基因的牛痘病毒，證明此外加的 DNA 片段和原來的牛痘病毒變異株有基



圖四：S 變異株能與外來的 DNA 片段經變重基因互換恢復 L 株的 DNA 結構。(1) S 株 CV-1 細胞。(2) 以鈣離子沉澱法將自 L 株上以 SstII 所切下的 DNA，導入經 S 株感染的 CV-1 細胞。(3) S 株的 DNA 與 SstII 所切片段發生變重基因互換。(4) 重組後的病毒與 L 株相同。

重組，並且能表現出此外加基因的功能。
 史密斯 (Smith) 等人就將 HBV 表面抗原的
 基因插入使這個胸核苷激酶基因喪失功能，把這段
 組 DNA 和正常牛痘病毒的 DNA 同時種入細胞
 ，這二種 DNA 經過雙重重組即可以把含表面抗
 原的那段 DNA 取代正常病毒的胸核苷激酶基因。
 有這個重組牛痘病毒的細胞缺乏了正常的胸核苷
 激酶，因此可以在有 Bud R 的環境中生長，但含未
 重組過的病毒細胞則被 Bud R 毒殺，這樣就可以找
 到所要的重組牛痘病毒來。最後的實驗結果證實了
 重組病毒的細胞果然能合成表面抗原，而且表面
 抗原也能在兔子身上產生抗體。

表一列出不同作者的製作方式及重要結果。以
 酵母菌或大腸菌的個體來製造表面抗原已有成功的
 例子，雖然不見得都曾經做過動物實驗，但由於合
 成出來的表面抗原含有可誘發免疫反應的顆粒狀態
 所以取來作疫苗應是可行的。惟以大腸菌取得疫
 苗，應對其所分泌的「內毒素」 (endotoxin) 予

以謹慎處理。所以大腸菌做材料雖然有內毒素的顧
 忌，由於大腸菌本是人體大腸中共生的細菌，如果
 能將帶有表面抗原基因的大腸菌族群替換原有的族
 群，則人體腸道內就能取得所需要的疫苗。

已往在哺乳動物中作遺傳工程，多以 SV40 病
 毒做為媒介 (vector) 攜帶實驗所需的基因，可
 惜 SV40 DNA 的容量有限，因此近年來才逐漸嘗
 試以牛痘病毒來做為外源基因的攜帶者。目前已有
 能攜帶 25000 核苷酸對的牛痘病毒被重組成功了
 。因此有人提議將牛痘病毒做成「多價疫苗」 (p-
 olyvalent vaccine) 上面攜帶部份 B 型肝炎、霍
 亂、疱疹及流行性感感冒的 DNA 。

B 型肝炎疫苗的商業成品，已在美國及法國製
 造出售，惟售價偏高，所以目前國內許多的生物科
 學家正改進 B 型肝炎疫苗的製作技術，期望能從酵
 母菌、大腸菌及培養細胞中獲得良好的成果，改善
 國人的健康。

表一：利用不同的攜帶體合成 B 型肝炎表面抗原的比較

攜帶表面抗 原的個體	質 體	寄 主	促 進 子	產 量	動物實驗 (註二)
酵 母 菌	pAH 301	AH 22 pho 80	Apase PO(註一)	$1.13 \mu\text{g} / 5 \times 10^6$ 細胞	+
大 腸 桿 菌	pTRP SS-6	C 600	trp	$1.0 \sim 1.5 \times 10^3$ 分子/細胞	-
	pTRP SS-39			$30 \sim 45 \times 10^{-9}$ 克/每毫升細胞	
	pTRP SS-50				
牛 痘 病 毒	pHB s-2	CV-1	作者未說明	2.6×10^{-6} 克/ 5×10^6 細胞	+
	pHB s-4				

註一：作者未給予代號，故轉以 Apase PO 來代替合成 P 60 的促進子。

註二：「-」表示未做動物實驗。