维普资讯 http://www.cqvip.com

92,17(2)

重庆医科大学学报 1992年第17卷第2期

乙型肝炎病毒核心抗原在大肠杆菌中的表达研究

病毒性肝炎研究所

黄爱龙 贾小平 张定凤
G.B.Thornton*

R512.62

提 要 本文报道采用高效表达载体PBS(tac启动子)在大肠杆菌（E·coli）中表达乙型肝炎病毒核心抗原（HBcAg）的方法。重组质粒在异丙基—硫代半乳糖苷（IPTG）的诱导下，其表达效率提高近1000倍；经溶菌酶—SDS破壁、DNase处理后，离心上清液中含有大量HBcAg。通过对IPTG诱导浓度、诱导时间及细菌起始诱导浓度等因素的研究，我们找到一系列高效表达HBcAg的条件，表达滴度高达1:25600，达到国内同类先进水平

关键词 乙型肝炎；核心抗原；基因表达
中图分类号 R392—33；R512.62

HBcAg是乙肝病毒核衣壳中的主要蛋白，与病毒的复制、组装有密切关系。过去一直从患者或实验感染的黑猩猩肝脏或血液中分离纯化HBcAg，作为临床检测抗HBcIgG和IgM的试剂，但由于材料来源困难，分离步骤复杂，以及成本较高等因素，影响了该诊断方法的推广和研究工作的开展。近年来，国内外学者[1-9]采用基因工程的方法相继从克隆的HBV基因组中进一步克隆出HBcAg基因，并成功地在大肠杆菌中表达出核心抗原，但真正高效表达HBcAg的工程菌不多，能用于临床诊断乙型肝炎的就更少。为此我们与美国Johnson&Johnson药理研究所合作，以近年来广泛使用的高效表达系统PKK223-2和pBluescribe（简称PBS）质粒为载体（两者都带有至今最强的tac启动子），采用常规基因克隆技术和新近建立的PCR扩增技术在E·coli受体菌JM105中克隆并表达HBcAg，并对影响表达的外部因素进行了初步的研究，现将有关结果简要报告如下。

材料和方法

1. 菌种和质粒

受体菌为JM105，载体PKK223-2购自Pharmacia，PBS购自Stratagene。

2. 重组质粒的构建

质粒AM-1为HBVDNAadw亚型部分基因组（x和c基因）同PBR322在BamH1位点连接而成的重组质粒；

质粒AM-12为HBVDNAayw亚型全基因组同PBR325在EcoRI位点连接而成的重组质粒；

质粒HBcadw是以AM-1为模板，经PCR扩增后，克隆到PKK223-2的EcoRI-PstI位点组建的重组质粒；

质粒HBcayw是以AM-12为模板，经PCR扩增后，克隆到PKK223-2的EcoRI-PstI位点组建

*G.B.Thornton：美国Johnson & Johnson药理研究所副所长，曾于90年11月来我所讲学。

维普资讯 http://www.cqvip.com

的重组质粒；

质粒Clone11是将580bp的HBc基因克隆到PBS的SmaI位点组建的重组质粒。

以上质粒和菌种均由美国Johnson&Johnson药理研究所副所长Thornton教授赠送。

3. 试剂

主要购自华美生物工程公司。

4. 细菌培养

挑种细菌菌落于2mlLB(AP，50ug/ml)中，37℃振摇过夜。取20ul过夜培养物加入10mlLB，37℃振摇至A600 0.3-0.5，加入20ul 0.1MIPTG，继续振摇6小时收获。

5. 细菌裂解液的制备[10]

将上述培养物4℃，10,000g离心20′，沉淀用1ml PBS(PH7.2，Sigma)洗涤，然后加入200ulA液(500mM glucose、25mMTris·ClPH8.0,10mMEDTAPH8.0，临用前加4mg/ml lysozyme)，混匀，室温放置15′后，加入250ulB液(50mMTris·ClPH8.0，1%TritonX-100，6.25mMEDTAPH8.0，0.4%脱氧胆酸钠，0.2%SDS)，旋涡混匀后，-20℃10′裂解、37℃5′复融；然后加入50ul DNase(1mg/ml，50mMTris·ClPH7.4,10mMMgCl$_2$)，37℃作用2hr，最后15,000g离心10′，取上清检测HBcAg。

6. HBcAg检测

以载体菌裂解液作为阴性对照，以市售HBcAg（军科院生产）为阳性对照，采用双抗体夹心法检测HBcAg，求样品和阳性对照A492数值之比，也称P/N值。当P/N值≥2.1时，判为阳性，该样品稀释倍数的倒数即为该样品HBcAg的滴度。

结　果

1. 不同表达HBcAg菌株的筛选

前述提到，Thornton等采用常规基因工程技术和多聚酶链反应技术分别克隆了乙肝病毒adw和ayw亚型的HBc基因。现选取其中表达滴度较高，并具有一定代表性的三株菌进行比较，结果如下：

表 1　重组体转化子表达HBcAg水平比较

样品	ELISA 结果	
	原倍	1:100（稀释度）
PBS（阴性对照）	0.113	0.026
军科院HBcAg（阳性对照）	＞2	0.058
Clone 11	＞2	1.876
HBc adw	＞2	0.231
HBc ayw	＞2	0.557

由上表可看出，载体菌裂解液几乎检测不到HBcAg，在三株不同重组体裂解液中均含有大量HBcAg，经1:100稀释后，可见Clone11表达滴度最高。

2. Clone11表达HBcAg滴度测定

用上述方法制备Clone11裂解液，经连续稀释后测定HBcAg，滴度高达1:25600，结果见图1。因A492＞2时，酶标阅读仪无法打印具体数值，所以难以计算确切的P/N值，图中虚线表示P/N≥44.44(2/0.045)。

3. 细菌起始诱导浓度对HBcAg表达的影响

在Clone11重组体培养的不同时期（不同A600反映），分别取样10ml加入100ul 0.1MIPTG诱导，经培养相同时间（7h）后，制备裂解液，测定HBcAg，结果见表2。

实验中，我们发现IPTG能抑制细菌生长，但作用不明显；另外，由上表可看出，在Clone11培养过程中，加入IPTG的时期

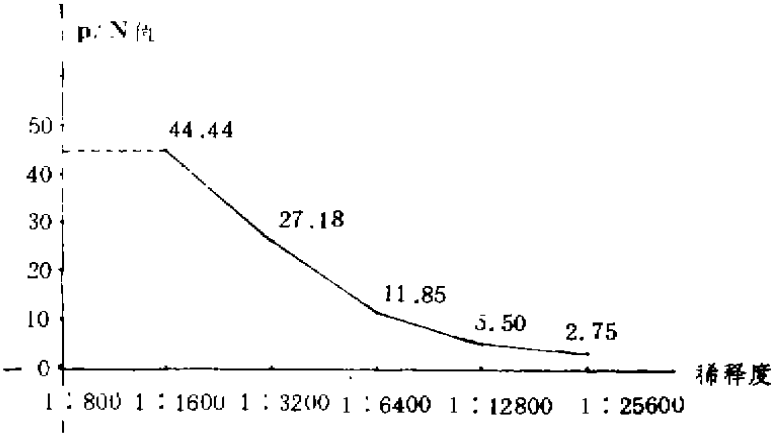


图1 Clone11裂解上清液表达HBcAg滴度测定

表 2 起始诱导浓度对HBcAg表达的影响

样品 (A600)	ELISA 结果 (A492) 原倍	1:100 (稀释度)
0.046	> 2	1.774
0.126	> 2	1.712
0.268	> 2	> 2
0.379	> 2	> 2
0.458	> 2	> 2
0.530	1.173	0.076
0.696	1.200	0.183

不同，重组体表达HBcAg的量具有明显差异，随A600的增加，HBcAg表达量增加，但A600>0.5时，表达量又急剧下降，因此在Clone11生长至A600 0.3-0.5之间时，加入IPTG诱导，其表达HBcAg的水平最高。由此可见HBcAg在重组体中的表达，不仅同IPTG的加入有关，而且同IPTG加入的时间，亦即加入时细菌的生理生化状态有极为密切的关系。

4. IPTG诱导浓度对HBcAg表达的影响

照前述方法进行细菌培养，待A600至0.3-0.5之间时，分别加入0，10，20，50，100，400ul 0.1M IPTG，继续培养6hr

表 3 IPTG 诱导浓度与 HBcAg 表达的关系

IPTG 浓度	ELISA 结果 (A492) 原倍	1:100 (稀释度)
不加 IPTG	1.514	0.583
1×10^{-4}M	> 2	1.868
2×10^{-4}M	> 2	> 2
5×10^{-4}M	> 2	1.914
1×10^{-3}M	> 2	1.441
4×10^{-3}M	> 2	1.966

维普资讯 http://www.cqvip.com

收获，制备Clone11裂解液测HBcAg。实验表明，IPTG作为tac启动子的诱导物能有效地提高HBcAg的产量，与不加IPTG的对照比较，其表达效率至少提高1000倍（数据未公布），但IPTG诱导浓度（$>10^{-4}$M前提下）却对HBcAg的表达无明显影响，结果如表3所示。

5. IPTG诱导时间对HBcAg表达的影响

照前述方法培养Clone11重组体，加入IPTG后，分别诱导1，3，5，7h取样制备裂解液测定HBcAg。结果表明，加入IPTG后诱导5-8h，效果最佳，这与Frost等人报道的结果相一致（参见图2）。

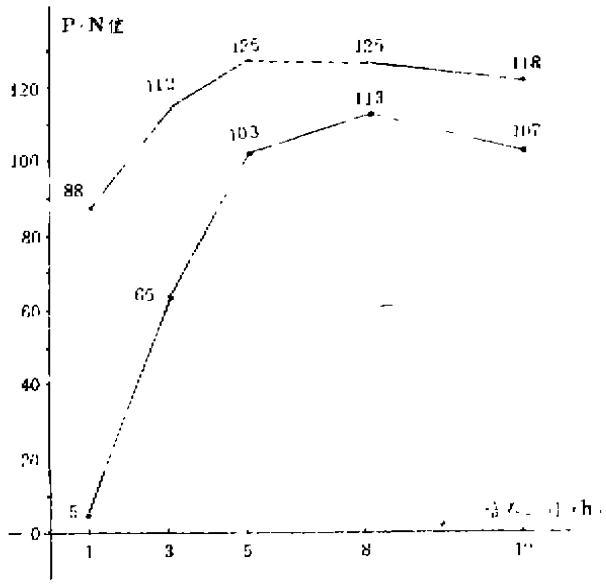


图2. IPTG诱导时间对HBcAg表达的影响

（图中虚线意义同前，● 原倍 ○ 1:100稀释）

讨　论

1979年以来，曾有多起应用基因工程技术合成HBcAg的报道，但最初表达水平均较低。究其原因，发现在HBcAg基因上游Pre-C区域内有一呈部分回文的顺序，当转录成mRNA时可形成一环茎二级结构，阻碍HBcAg基因的高效表达。目前国内外各实验室多采用核酸外切酶Bal31从基因外部随机消化去除该结构，以提高HBcAg的表达。采用该方法，国内表达滴度最高的是军事医学科学院，为1:16384[11]，国外为联邦德国报道的1:32000[12]。我们采用ATG直接起始的HBcAg基因片段（不含Pre-C）直接装入载体中表达，也获得了理想的高效表达系统，最高滴度为1:25600。

从上述构建的三株重组体来看，以Clone11表达HBcAg水平最高，这可能和所用载体PBS有关。因为如此构建的重组质粒表达的是含有乙肝病毒核心抗原的融合蛋白，其N端带有大肠杆菌β-半乳糖苷酶N端的33个氨基酸残基，因此避免了大肠杆菌蛋白酶体系对外源蛋白质HBcAg的降解，使HBcAg能在E·coli体内大量积累。目前，为提高外源基因在原核细胞内的表达效率，多采用这种融合蛋白的形式。据报道[11]，作为免疫诊断试剂，融合蛋白仍保持外源蛋白完整的免疫原性。

IPTG（乳糖类似物）作为乳糖操纵子的安慰诱导物，除具有很强的正调控作用外，还具有本身不被代谢的特点，因此只需保持极低的IPTG浓度就能解除阻遏物同操纵基因的结合，诱导HBcAg基因的表达[13]。从本实验亦可看出，同不加IPTG的对照比较，加入IPTG能将HBcAg的表达水平提高至少1000倍，但在IPTG浓度大于10^{-4}M时，HBcAg的表达量并不随IPTG浓度的增加而增加，说明10^{-4}MIPTG足以解除阻碍物同操纵基因的特异性结合。

据Amann[14]等人报道，在大肠杆菌培养至A600 0.7时，加入IPTG诱导2h，tac启动子表达外源基因的效果最好，而我们对Clone11进行的研究结果则与之有所不同，认为在Clone11培养至A600 0.3-0.5之间加入IPTG诱导5-8h时，HBcAg产量最高。这一结果与Frost[15]等人报告相一致；

维普资讯 http://www.cqvip.com

当然由于使用菌株不同，表达条件肯定会有所差异，并且相同A600数值在不同菌株中，很可能反映不同的生理生化状态。因此在表达外源基因时，除应考虑载体及受体菌选取，重组体的构建等制约基因表达的内在因素外，还应研究诱导剂量、诱导时间以及诱导时细菌的生理状况等外部因素，否则即使得到一个好的重组体，也难以取得令人满意的表达效果。

综上所述，我们在三株表达HBcAg的重组体中，选取表达最高的Clone11为对象，对影响HBcAg基因表达的一系列外部因素进行了较为详尽的研究，得到如下结论：在细菌培养至A600 0.3-0.5之间时，加入10^{-4}M IPTG诱导5-8hr，Clone11表达HBcAg的水平最高，滴度高达1:25600，并且1:100稀释后，仍和作为阳性对照的HBcAg水平相当，因此有希望成为临床检测抗HBc IgG和IgM的一种很好的诊断试剂，目前正在进行分离纯化和免疫活性检测等方面工作。

参考文献

[1] Burrell, C.J.et al.Nature, 1979; 279: 43

[2] Pasek, M.et al.Nature, 1979; 282:575

[3] Hardy, K.et al.Nature, 1981; 293:481

[4] Edman, J.C.et al.Nature, 1980; 286: 535

[5] Stahl, S.et al.PNAS, 1982; 79:1606

[6] 马贤凯，等.上海免疫学杂志，1984; 3(4):129

[7] 高美华，等.生物化学与生物物理学报，1985; 1(17):62

[8] 安淑方，等.病毒学报，1985; 1:135

[9] 龚 毅，等.生物化学与生物物理学报，1989; 21:470

[10] 黄耀煊，等.生物化学与生物物理学报，1985; 17:469

[11] 马贤凯，等.中国科学（B辑），1987; 61

[12] Angela, U.Y. et al.Virology, 1986; 155:89

[13] 杰弗里·佐贝编（曹凯鸣等译），生物化学（下册），1989; 274，复旦大学出版社

[14] Amann, E, et al.Gene, 1983; 25:167

[15] Frost, J.W, et al.Biochemistry, 1984; 23:4470

（收稿日期 1991-06-07）

THE HIGH EXPRESSION OF HBV CORE ANTIGEN IN E. COLI

Huang Ainong, et al

Viral Hepatitis Inatitute

A method which uses high-level expression vector PBS (tac promoter) to express the HBV core antigen gene has been reported. Under the induction of isopropylthio-β-D-galactoside(IPTG), the expression level of recombinant plasmid has been increased 1000 times. After treatment with lysozyme-SDS-DNase system, the supernatant of crude bacterial lysate includes a large a mount of HBcAg. Through the studies of IIPTG induction concentration, IPTG induction time and the bacterial state of initial induction, we have found a series of conditions to express the HBcAg gene efficiently. The highest titer of HBcAg is 1:25600

KEY WORDS Hepatitis B Virus; Core Antigen; Gene Expression