

乙型肝炎病毒 e 抗原基因与绿色荧光蛋白基因的融合及其表达*

岳莉莉 齐义鹏** 邓岩卉 吕利群

(武汉大学病毒研究所, 武汉 430072)

邓小昭 ✓ R373.21

(南京军区军事医学研究所, 南京 210002)

A **摘要** 质粒 pS 65T 含有 T7 启动子驱动的绿色荧光蛋白突变型 gfpS 65T 基因, 经修饰后, 在其中插入乙型肝炎病毒 e 抗原(HBeAg)基因, 使两基因同框成为融合基因。在大肠杆菌 BL21 中由于 T7 启动子的控制, 高效表达了具有双功能(抗原性和发光性)的融合蛋白(GFP-HBeAg)。融合蛋白 MW 为 52 kDa, N 端有 6 个组氨酸残基, 因而用 Ni 金属螯合层析柱对融合蛋白进行了分离纯化, 利用诊断 HBV 的 ELISA 试剂盒检测了融合蛋白的抗原性, 在荧光显微镜下观察到了融合蛋白的绿色荧光。并探讨了用其组装成新型免疫诊断试剂的可能性。

关键词 乙型肝炎病毒 e 抗原基因, 绿色荧光蛋白基因, T7 噬菌体启动子, 双功能融合蛋白

近年来, 随着乙型肝炎病毒(Hepatitis B Virus, HBV)分子生物学的迅速发展, 尤其是肝炎病毒抗原基因克隆的成功, 对 HBV 病原学及血清学的检测工作起到了极大的促进作用。但由于目前常用的检测试剂存在工作量大, 操作繁杂, 条件难于控制, 需要特殊的仪器和设备等缺点, 因此建立一种既能在人群中开展普查以检测肝炎病毒携带者, 又能大大减少费用的血清流行病学方法, 具有重要的现实意义。HBeAg 阳性一般表示病毒在体内复制, 传染性强, 因此, HBeAg/抗 HBe 系统是检测乙型肝炎的重要指标。我们已将丙型肝炎病毒(Hepatitis C Virus, HCV)的核心抗原与绿色荧光蛋白(Green Fluorescent Protein, GFP)在基因水平上进行了融合与表达; 由基因工程菌生产的融合蛋白既具有 HCV 核心蛋白的抗原性, 又具有绿色荧光蛋白的发光性, 显示了建立一种新的快速免疫诊断新技术的可能性^[1]。为了进一步提高用 GFP 标记抗原的灵敏度, 建立易于标准化的试剂盒, 我们改用荧光更强的 GFP 突变体作为标记分子, 它是由野生型 GFP 第 65 位丝氨酸定点突变变成苏氨酸(65 Ser→Thr)而获得的, 称为 gfpS 65T, 其最大激发波长由原来的 390 nm 增加至 470 nm, 最大发射波长(506 nm)处的发光强度提高了 6 倍^[2], 这样不仅更有利于用荧光显微镜观察, 且在自然光源下即可见到强烈的绿色荧光。因此, 我们将 HBeAg 基因与 gfpS 65T 突变型基因嵌合, 在大肠杆菌中高效表达了带有等分子绿色荧光蛋白标记的乙肝 e 抗原, 并对其进行了分离和纯化。作为双功能蛋白, 我们检测了其抗原性和荧光性, 为乙肝的快速诊断开辟了新的途径。

收稿日期: 1996-12-19, 修回日期: 1997-04-21

* 世界银行贷款项目资助的课题

** 联系与负责作者

材料与方法

1 实验材料

1.1 质粒和菌株

携带有突变型 *gfpS* 65T 基因的质粒 pS 65T 由美国加州大学的 Tsien 博士赠送^[2], pGHe 质粒为本室所保存,它是将 HBeAg 基因的 PCR 扩增片段定向克隆在 pGEM3Zi(-)的 EcoRI - BamHI 位点上构建而成,在 PCR 片段两侧引物中分别设计有 EcoRI 和 BamHI 位点,即上游引物:5' TTTGAATTCATG 1901~1920nt 3', 下游引物:5' CCC GGATCC CTA 2348~2329nt 3'。

宿主细胞为大肠杆菌 BL21(DE3)菌株,其基因组上整合有噬菌体 T7 的 RNA 聚合酶基因,产生的 RNA 聚合酶能识别 T7 启动子,因此,凡是含有 T7 噬菌体启动子的表达载体在该菌株中均可被高效转录。

1.2 酶、试剂及溶液

各种酶和化学试剂主要购自于 Promega、GIBCO BRL Life Technologies、华美、原平等公司, NiSO₄ 及金属整合层析柱为 Invitrogen 公司产品。用于分离纯化融合蛋白的溶液包括:

溶液 A: 6 mol/L 盐酸胍, 0.1 mol/L NaH₂PO₄, 0.01 mol/L Tris, 用 NaOH 调 pH 至 8.0。

溶液 B: 8 mol/L 尿素, 0.1 mol/L NaH₂PO₄, 0.1 mol/L Tris, 用 NaOH 调 pH 至 8.0。

溶液 C、D、E 的成份同溶液 B, 但用 HCl 分别将 pH 值调至 pH 6.3、pH 5.9、pH 4.5。

溶液 F: 6 mol/L 盐酸胍, 0.2 mol/L 冰醋酸。

血清标本采自武汉市 HBV 感染者,测定 HBe 抗原酶标诊断试剂盒购于卫生部武汉生物制品研究所。

2 实验方法

2.1 DNA 的制备及分子克隆

质粒 DNA 的制备和消化按常规方法进行,片段回收采用 DE-81 膜法, DNA 的连接、转化均按分子克隆手册操作,在氨苄平板上筛选重组质粒,小量提取质粒 DNA 后酶切鉴定。

2.2 重组质粒的转化与筛选

将克隆有融合基因 *gfpS* 65T - HBe 的表达载体 pS 65TP - He 转化 *E. coli* BL21, 提取质粒 DNA 酶切鉴定阳性重组体。表达载体上融合基因在 T7 噬菌体启动子启动下可在大肠杆菌中表达 GFP - HBeAg 融合蛋白。进一步用 HBe/抗 HBe 试剂盒,以 ELISA 程序检测融合蛋白的抗原性,筛选阳性工程菌。

2.3 融合蛋白的分离、纯化

质粒 pS 65T 的亲本表达载体是 pRSET, 其上有 T7 噬菌体启动子控制的起始密码 ATG 和 6 个组氨酸 (His) 密码, 经克隆后可表达 N 端有 6 个 His 的融合蛋白。His 和金属 Ni 有很强的亲和能力, 因此可用整合树脂通过金属亲和层析柱有效一步纯化表达产物。

将活化过夜的工程菌按 1:50 稀释后室温培养 OD 值 ≈ 0.4, 加 IPTG 诱导 5 h 后室温或 4℃ 放置 1 d; 收获菌体经冻融后, 将细菌悬浮于溶液 A 中, 于室温搅拌 1 h; 离心取上清加入到已平衡过的 Ni - NTA 层析柱中; 分别用溶液 A 和溶液 B 平衡, 直至 A₂₈₀ < 0.01; 然后分别用 20 mL 的溶液 C、D、E、F 洗脱。将得到的 C、D、E 洗脱液分别对 PBS 透析 2 d, 浓缩后待用。

2.4 SDS - PAG 电泳及 ELISA 检测

用 12% SDS - PAG 进行电泳及 ELISA 试剂, 分析纯化前的融合蛋白及柱层析纯化的产物。

结 果

1. 表达载体 pS65TP - He 的构建

质粒 pS 65T 上由 T7 启动子控制的 *gfpS* 65T 基因含有完整编码区共 732 bp, 且 5' 末端带有 EcoRI 位点和起始密码 ATG, 3' 末端带有 2 个终止密码 (TAA; TAA) 和 BamHI 位点, 为了

使 450 bp 的 HBeAg 基因(亦带有起始密码和终止密码)与其融合并且同框,我们首先对 pS 65T 进行了修饰,因为 gfpS 65T 基因 3' 末端 69 bp 处有一个 Pvu II 位点载体的多克隆位点(MCS)上也有一个 Pvu II 位点,因此用 Pvu II 完全消化该质粒,可切去 gfpS65T 基因与末端 12 个氨基酸的编码序列及终止密码,回收留下的大片段,并使之自身环化后转化大肠杆菌 BL21,筛选经修饰后的质粒 pS 65TP,此质粒上的 gfpS 65T 基因不含终止密码子,可与 HBe 基因融合。根据已知序列经过计算可知,当将 HBeAg 基因的 EcoR I - Hind III 片段插入在 pS 65TP 的第二个 EcoR I 位点时,两个基因是同框的,因此,先用 Hind III 完全消化 pS 65TP,再加 EcoR I 部分消化,回收保留有 gfpS65T 基因的 Hind III - EcoR I 大片段;用 EcoR I - Hind III 双酶消化质粒 pGHe,回收 0.45 kb 的 HBeAg 基因小片段, T4DNA 连接酶连接这两个小片段,即构建成表达载体 pS65TP - He,构建过程见图 1。

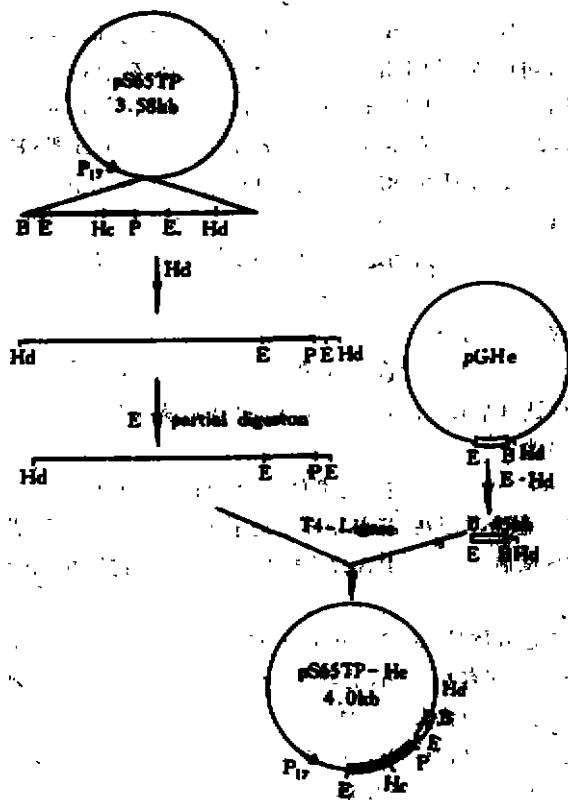


图 1 表达载体 pS65TP-He 的构建过程
 Fig. 1 Scheme for the construction of the expression vector pS 65TP - He
 B: BamHI, E: EcoRI, Hc: HincII, P: PstI, Hd: HindIII, pT7: T7 启动子

表达载体中的 gfpS 65TP - He 融合基因被插在 T7 噬菌体启动子下游。将它转化大肠杆菌 BL21 后提取 pS 65TP He DNA, 用 BamHI 充分消化, 可释放出一个 1.15 kb 的含有 gfpS 65T - HBe 融合基因, 若用 EcoRI/Hind III 双酶消化, 则应释放出 0.7 kb 的 gfpS65T 基因和 0.45 kb 的 HBeAg 基因, 酶切后的琼脂糖凝胶电泳图谱与推论的结果完全一致(图谱未显示)。

2 阳性工程菌株的筛选

挑取酶切鉴定阳性的 10 个单菌落培养过夜, 在大肠杆菌 BL21 中, gfpS 65TP - HBe 融合

基因在 T7 噬菌体强启动子趋动下,经 IPTG 诱导,应能表达 GFP-HBe 融合蛋白,离心收集菌体沉淀,用 4 mol/L 裂解液并反复冻融,制备菌体裂解液,1:50 稀释后滴加于 HBeAb 单克隆抗体包被的 ELISA 微孔板内,分别以阳性血清和正常血清为阳性和阴性对照,按操作程序进行加样、显色。被检测的 10 个菌落均显示了程度不等的阳性反应,其中以 1、2 号为强阳性。证明这些菌株能表达具有 HBe 抗原性的融合蛋白。

3 双功能融合蛋白的表达和电泳

选择 1 号、2 号工程菌作进一步的详细研究。分别用不同的菌体密度、不同的生长温度和时间测定融合蛋白的表达水平,结果表明活化状态好的菌株经 1:50 稀释后于室温 2 h 就达到对数生长期,菌体密度 OD 值 \approx 0.4, IPTG 诱导 5 h 的表达量为最优,37 $^{\circ}$ C 培养时,融合蛋白的表达水平最高,但在 30 $^{\circ}$ C 左右培养及 4 $^{\circ}$ C 放置 1~2 d 后产生的绿色荧光最为明显。将融合蛋白的粗提液及分离纯化后的洗脱液分别上样到 12% SDS-PAGE 中,20 mA 稳流电泳 4 h,经考马斯亮兰染色后可见 GFP-HBe 融合蛋白的 52 kDa(32+20kDa)的染色带出现(图 2A),C、D 洗脱液有两条带(48kDa 和 52kDa),可能是表达产物被宿主蛋白酶降解的结果,以洗脱液 D 的纯化效果较好(图 2B)。

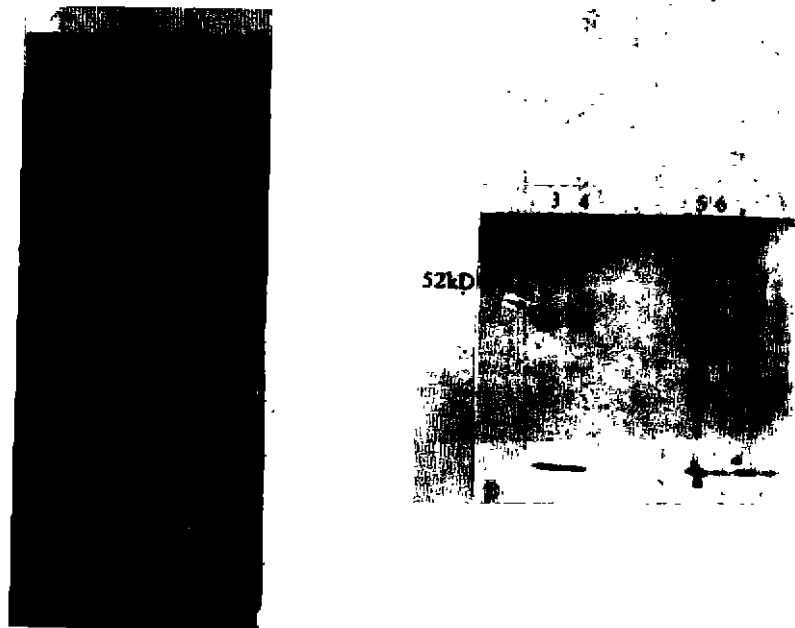


图 2 双功能融合蛋白纯化前(A)后(B)的 SDS-PAGE 分析

1. 亲本质粒 pRSET(对照) 2. 表达载体 pS65TP-He 3. 溶液 C 洗脱峰
4. 溶液 D 洗脱峰 5. 纯化前样品 6. 标准蛋白 MW

Fig. 2 12% SDS-PAGE analysis of the fusion protein

1. Parental plasmid pRSET (control) 2. Expressed vector pS65TP-He 3. Peak eluted with solution C

4. Peak eluted with solution D 5. Sample before purification 6. Standard protein MW

4 双功能融合蛋白的荧光特性

将表达载体 pS65TP-He 转化 BL21 菌株,于 4 $^{\circ}$ C 下放置 1~2 d,可见表达融合蛋白的菌株呈现绿色,其深浅与表达量成正比。涂片置荧光显微镜下观察,阳性细菌细胞发射强烈的绿

色荧光,而对照菌则无荧光。用 Shimadzu RF-500 型荧光光度计测定其荧光光谱,可见融合蛋白的最大激发波长为 390 nm,最大发射波长为 506 nm,结果见图 3。

5 双功能融合蛋白的抗原性分析

在 NC 膜上滴加待检血清,1%BSA 封闭后将 NC 膜侵入 1 mg/mL 的融合蛋白抗原内,37℃ 孵育 30 min,洗膜后置荧光显微镜下可见到阳性血清点样斑上融合蛋白发出的绿色荧光。同时我们也用 ELISA 试剂盒对其荧光和抗原性进行了检测,取双功能融合蛋白糖液 1 μL 倍比稀释后分别滴加在 ELISA 微孔中,37℃ 孵育 1 h,用洗涤液充分洗涤各孔 4×1 min,甩干,在荧光显微镜下可观察到孔底的荧光,说明双功能融合蛋白已同包被在微孔板上的 McHBeAb 单克隆抗体发生了特异性的结合。若每孔再加入 1 滴辣根过氧化物酶标记的第一种单克隆抗体,37℃ 孵育 1 h,洗涤 4×1 min,然后每孔加显色剂 A、显色剂 B 各 1 滴,37℃ 15~20 min 后,用目测法观察到了阳性免疫反应,进一步证明我们表达的融合蛋白可用来检测待检血清中的 HBV 抗体。

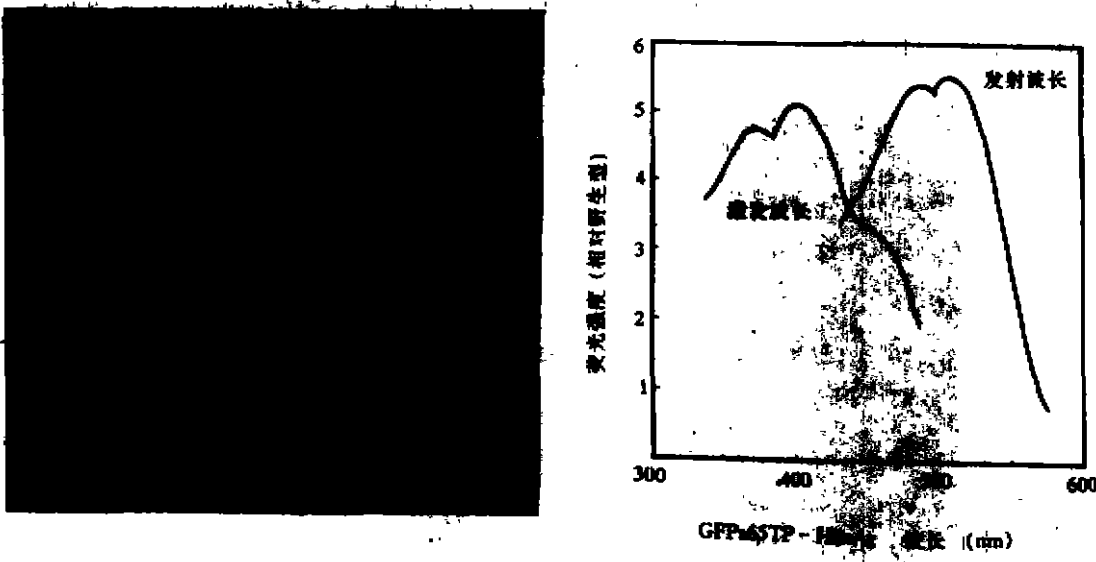


图 3 表达双功能融合蛋白的细菌细胞的荧光显微照片(10×40)及 GFP-HBeAg 融合蛋白的荧光光谱
Fig. 3 Photograph (A) of *E. coli* cells expressing bi-function fusion protein under fluorescent microscope and fluorescent spectrum (B) of GFP-HBeAg By fluorescent meter.

讨 论

我们以 pS 65T 为亲本质粒,经修饰后得到 pS 65TP,插入 HBe 基因,构建成表达载体 pS65TP-He,在大肠杆菌细胞中该表达载体上的融和基因 gfpS65TP-HBe 在 T7 启动子驱动下高效表达了融合蛋白 GFP-HBeAg。融合蛋白的表达水平除与工程菌(含 pS65TP-He)的活动状态、菌体密度和诱导时间相关外,不同培养温度对融合蛋白的荧光形成也有一定影响。在实验中我们发现采用较低的温度(室温)培养和放置较长的时间(1~2.d)更易于形成绿色荧光的融合蛋白。这可能是由于在 37℃ 培养及菌体密度较高时,产物较容易形成包涵体,这种产物即使被溶解再复性以后,仍无可见的荧光吸收峰^[4]。Heim 等(1995)^[5]的实验结果也表

明,在 *E. coli* 细胞内只有表达可溶性的 GFP 前蛋白才能正确地折叠,并在有氧环境中至少需要 4 h 通过自身环化和氧化;Gly-67 的 N 原子与 Ser-65 的 C 原子形成 N=C₂ 双键再脱氢,才能形成共扼的生色基团而发射绿色荧光。

包涵体内的 GFP 前蛋白因缺氧不能形成内部的生色基团而没有荧光产生,所以我们在大量制备可溶性融合蛋白时,采用 250 r/min 摇床室温(约 30 ℃)培养,4 ℃ 放置 1 d 使其绿色荧光充分显现,才能得到大量的双功能融合蛋白。

寻找简便而敏感的检查血液中乙型肝炎的方法,以降低受血者的肝炎发生率,是临床医生和检验人员长期以来渴望解决的问题。用绿色荧光蛋白标记的抗原直接测定血液中相应的抗体显示了诱人的前景。

实验证明,GFP-HBe 双功能融合蛋白既具有 HBeAg 的抗原性、又保持了 GFP 的荧光特性。利用双抗体 ELISA 夹心法试剂盒测定了融合蛋白的抗原性,同时在荧光显微镜下观察了由特异抗原抗体反应产生的绿色荧光,显示两种方法具有较好的一致性,揭示用 GFP 标记抗原检测技术具有较高的灵敏度。这种用 GFP 作标记物的直接、特异的抗原抗体反应,避免了传统标记技术中需要分离、纯化、化学计量等复杂的过程,避免由于二抗、类风湿因子等所带来的非特异性干扰;并可同时检测 IgG、IgM 等各类抗体。由于反应体系中无游离酶或游离荧光染料存在,使本底很低,也提高了特异性。

参 考 文 献

- 1 岳莉莉,齐义鹏,黄永秀等.绿色荧光蛋白与 HCV 核心蛋白的融合及在大肠杆菌中的高效表达.生物化学杂志 1997,4:
- 2 Heim R *et al.* Improved green fluorescence. *Nature*. 1995, 373:663~664
- 3 Maizuo *et al.* Clinical evaluation of HBeAg/Anti-HBe system in HBeAg positive chronic hepatitis. *Acta Hepatol, Suppl* 26:819
- 4 Ward W W *et al.* Reversible denaturation of Aequorea green-fluorescent protein: physical separation and characterization of the renatured protein. *Biochemistry*, 1982, 21: 4535~4550
- 5 Heim R *et al.* Wavelength mutations and posttranslational autooxidation of green fluorescent protein. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1994, 91:12501-12504. b.

Fusion of HBV e Gene with Green Fluorescent Protein Gene and Its Expression in *E. coli* Cells

Yue Lili Qi Yipeng Deng Yanhui Lu Liquan

(Institute of Virology, Wuhan University, Wuhan 430072)

Deng Xiaozhao

(Nanjing Institute of Military Medical Sciences, Nanjing 210002)

The bi-function fusion protein of hepatitis B virus e antigen and mutant green fluorescent protein was expressed in *E. coli* BL21 strain. The fusion protein was separated and its antigenicity was determined by ELISA kit for HBe, meanwhile the intensity of its luminescence could be observed. The approach in which the antigen was tagged by equal molecular GFP allows using the bi-function fusion protein to establish a new method for immunological diagnosis.

Key words HBeAg gene, Green fluorescent protein gene, T7 phage promotor, Bi-function protein