

122-127

④

第13卷第2期
1998年6月中国病毒学
VIROLOGICA SINICAVol.13 No.2
Jun 1998

*

乙型肝炎病毒 adr 亚型 X 蛋白在大肠杆菌中的高效表达

房德兴 周宗安[✓] 翟春生 顾志香 王元伦 何亮

(南京军区军事医学研究所, 南京 210002)

12373.21

摘要 将 adr 亚型 HBV 的完整 X 基因克隆到表达质粒 pProEX-HTb 中, 实现了 X 蛋白在大肠杆菌中的高效融合表达。表达产物全长 179 个氨基酸残基(其中 X 蛋白部分 154 个氨基酸残基), 分子量约 19.7 kD, 约占细菌总蛋白的 34%。其氨基端融合部分含有 6 组氨酸肽段, 经 HisTrapTM 亲和层析纯化, 一步可达纯度 93%。Western 印迹分析表明, 该表达产物可与 HBV 感染患者体内的抗 X 抗体特异性结合。

关键词 乙型肝炎病毒, X 基因, 融合表达, Western 印迹

乙型肝炎病毒(HBV)基因组含有 4 个已知的开放阅读框架(ORF), 分别称为 C、S、P 和 X。其中 X ORF, 又称 X 基因, 编码 154 个氨基酸(个别毒株缺失 140~148 位氨基酸)的蛋白。1985 年, Moriarty 等首次报道了 X 蛋白的基因工程表达^[1]。以合成的 X 蛋白为抗原制备的抗 X 抗体(抗-HBx), 在 HBV 感染患者肝细胞中检测到 X 抗原(X 蛋白), 并在 HBV 携带者中发现抗-HBx^[1-5]。随着基因工程 X 蛋白的制备以及对该蛋白的深入研究, 人们已经开始了解其广泛的生物学作用。最引人注目的是其反式活化转录因子作用, 它不仅能活化 HBV 自身的启动子^[6,7], 而且还可活化一些异源性病毒^[7-10]和细胞^[11-13]启动子。尤其是 X 蛋白在激活细胞基因方面的作用, 已成为国内外研究的热点。

本研究将国内第一个经过全基因组核苷酸序列分析的 adr 亚型 HBV^[14] X 基因克隆于 ProEXTMHT 原核表达系统, 实现了在大肠杆菌中的高效融合表达, 表达产物氨基末端含有 6 组氨酸肽段, 很容易经 HisTrapTM 亲和层析纯化, 为进一步研究 X 蛋白的生物学功能奠定了基础。

材料与amp;方法

1 材料

1.1 质粒和菌种 含 adr 亚型 HBV 全基因组的重组质粒 pADR-1 DNA 由中国科学院上海生物化学研究所甘人宝先生惠赠^[14]。表达载体 pProEX-HTb DNA(GibcoBRL 产品)由本研究所李越希先生惠赠; *E. coli* JM15 菌种由本研究所保存。

1.2 工具酶和主要试剂 各种限制性核酸内切酶、T4 DNA 连接酶、Taq DNA 聚合酶、异丙基-β-D-硫代半乳糖苷(IPTG)和三磷酸脱氧核苷(dNTP)购自 Promega 公司; 抗-HBx 阳性血清和辣根过氧化物酶(HRP)标记羊抗人 IgG 分别由本研究所保存和制备; SILVER SEQUENCETM DNA 序列分析系统购自 Promega 公司; His-TrapTM 亲和层析纯化系统购自 Pharmacia 公司; ECL Western 印迹检测试剂(Amersham 产品)由本研究所保存。

· 收稿日期: 1997-07-07, 修回日期: 1997-10-20

生博士提供

2 方法

2.1 引物设计与合成 根据已发表的 adr 亚型 HBV 基因组序列^[14]合成 X 基因上游和下游引物,其序列分别如下,由中国科学院上海植物生理研究所协助合成。

PX1, 5'-CCATGACTGTGCTCGGGTGTG-3', 上游引物,相当于 1372~1390 nt,划线部分为 NcoI 酶切位点。

PX2, 5'-TCTAGATGATTAGGCAGAGG-3', 下游引物,相当于 1844~1828 nt,划线部分为 XbaI 酶切位点。

2.2 聚合酶链反应(PCR) 以 BamHI 完全酶切 pADR-1 DNA,回收 3.2 kb 的线性 HBV 基因组 DNA,经 T4 DNA 连接酶处理得到环状 HBV DNA,作为 PCR 模板。以上述 PX1 和 PX2 为引物进行 PCR,反应程序为:(1)95℃ 120 s,60℃ 60 s,72℃ 90 s;(2)94℃ 45 s,60℃ 45 s,72℃ 60 s,30 个循环;(3)72℃ 300 s。

2.3 X 基因的克隆与核苷酸序列分析 将上述 PCR 获得的 X 基因片段按常规方法^[15]克隆于 pUC18 DNA,获得重组质粒 pUCX。经 EcoRI-XbaI 双酶切后,回收 X 基因片段,克隆于 M13mp 18RF DNA,获得重组噬菌体 pM13X,常规制备重组噬菌体单链 DNA,进行核苷酸序列分析。

2.4 X 基因表达质粒的构建 将由 pUCX 重组质粒引出的 X 基因片段克隆于 pProEX-H1b 载体,构建重组表达质粒 pEXHX。

2.5 十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE) 按方法[15]进行。缓冲体系为 Tris-甘氨酸,丙稀酰胺与 N,N'-亚甲基丙稀酰胺比例为 29:1,浓缩胶浓度为 5%,分离胶浓度为 12%。经考马斯亮兰 R250 染色后进行薄层扫描分析。

2.6 表达蛋白的纯化 首先按方法[15]制备表达产物包含体。将其重溶于含 8 mol/L 尿素的磷酸缓冲液水(PBSU)中,以 HisTrapTM亲和层析柱进行纯化,获得氨基末端含有 6 组氨基酸肽段的融合蛋白(His-tag-X1 简称 HX 蛋白)。

2.7 Western 印迹分析 直接对上述亲和层析纯化的 HX 蛋白进行 SDS-PAGE 后,按方法[15]将分离的蛋白转移至硝酸纤维素膜上,经抗-HBx 和随后的 HRP 标记羊抗人 IgG 作用后,用 ECL Western 检测试剂进行发光法显色确定特异性印迹。

结 果

1 HBV X 基因的克隆与限制性酶切鉴定

以 HBV 基因组 DNA 为模板,PX1 和 PX2 为引物,经 PCR 扩增获得了预期 476 bp 片段(图 1)。将其以 Klenow 大片段处理后,与 SmaI 酶切的 pUC18 DNA 相连接,获得了重组质粒,其中包括正向和反向插入者。分别经 NcoI-XbaI 双酶切和 XbaI 单酶切鉴定,正向插入者命名为 pUCX,反向插入者命名为 pUCXr。两者均可经 NcoI-XbaI 双酶切获得 X 基因片段。

2 X 基因的核苷酸序列分析

以含 X 基因的重组噬菌体 pM13X 单链 DNA 为模板,用 pUC/M13 通用引物按试剂盒说明书进行核苷酸序列分析。结果表明 X 基因序列与预期的相一致(图 2)。

3 表达质粒 pEXHX 的构建

以 NcoI-XbaI 双酶切 pUCX DNA,回收 X 基因(474bp),与 NcoI-XbaI 双酶切的 pProEX-H1b DNA 相连接,获得重组表达质粒 pEXHX(图 3)。

4 HX 蛋白的表达与纯化

将表达质粒 pEXHX 转化菌过夜培养后,按 1:100 稀释于 TB 培养基,37℃ 振荡培养 2 h,加入 IPTG 至终浓度为 0.4 mmol/L,继续诱导培养 3 h。离心收集菌体,经 SDS-PAGE 考马斯

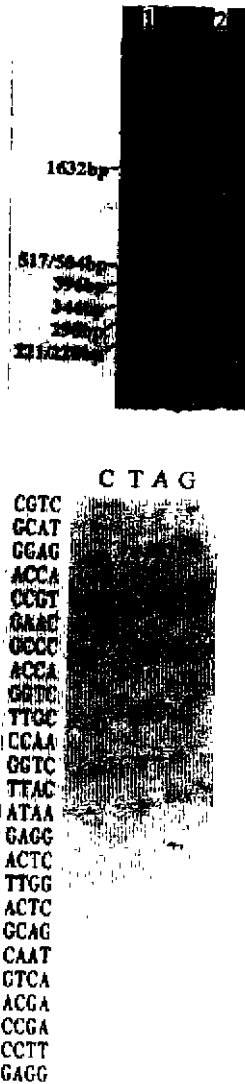


图 2 克隆的 X 基因部分核苷酸序列

Fig. 2 Partial nucleotide sequence of the X gene

图 1 HBV X 基因的 PCR 扩增
1. 标准 DNA 片段; 2. 显示扩增的 X 基因片段 (476 bp)

Fig. 1 Amplification of HBV X gene by PCR
Lane 1: DNA marker; Lane 2: Showing the X gene fragment (476 bp).

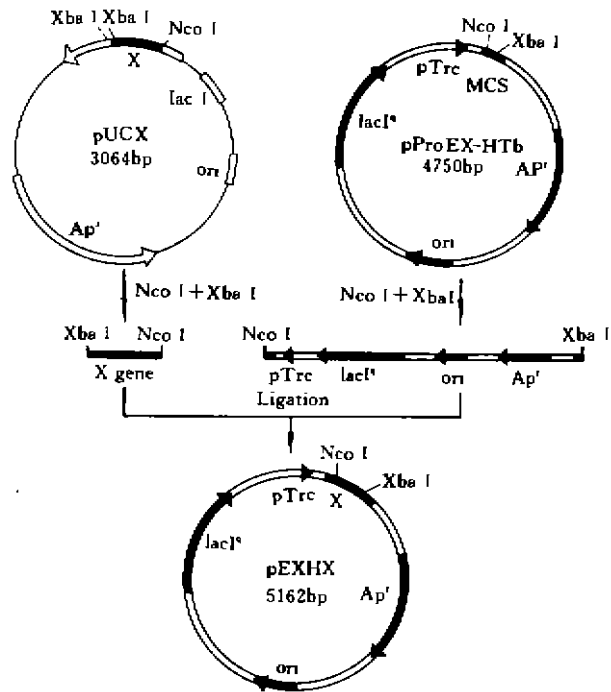


图 3 HBV X 蛋白表达质粒 pEXHX 的构建

Fig. 3 Construction of plasmid pEXHX expressing HBV X protein

亮兰染色后鉴定表明, 表达产物分子量与预期的相符合, 约为 19.7 kD。薄层扫描结果显示, 目的蛋白约占细菌总蛋白 34% (图 4A)。经 HisTrap™ 亲和层析纯化, 纯度可达 93% (图 4B)。

5 Western 印迹分析

经抗-HBx 阳性血清进行 Western 印迹分析, 结果可见到微弱的特异性印迹 (图 5)。

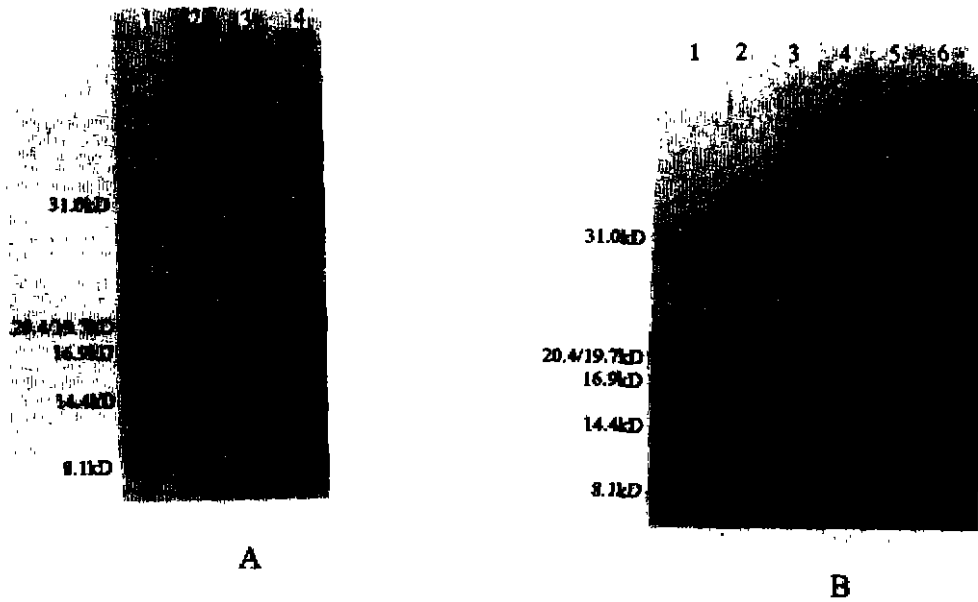


图 4 表达产物的 SDS-PAGE 分析

A:1. 蛋白质分子量标准;2. 大肠杆菌 DH5 α 总蛋白;3. 空质粒 pProEX-HTH 转化菌体总蛋白;4. 表达菌体总蛋白, 其中 HX 蛋白约占 34%;B:1. 蛋白质分子量标准;2~6. HisTrap 亲和层析的不同洗脱组分(1~5), 对第 4 条带的薄层扫描表明, 蛋白纯度约为 93%。

Fig. 4 SDS-PAGE analysis of the expressed His-tagged X protein (HX protein)

A: Lane 1, molecular weight marker; Lane 2, total proteins of *E. coli* DH5 α ; Lane 3, total proteins of the bacteria transformed by pProEX-HTH plasmid; Lane 4, total proteins of the expression of bacteria, the HX protein is about 34% of the total cellular proteins B: Lane 1, molecular weight marker; Lane 2~6, different elution sections (1~5) of the HisTrap affinity chromatography, the purity of the HX protein is about 93% measured by scanning lane 4.

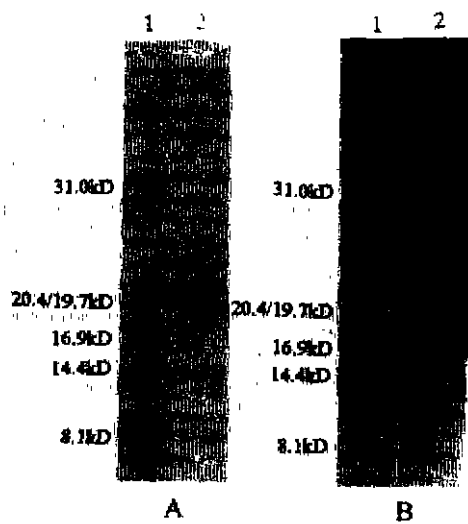


图 5 Western 印迹分析

A:1. 蛋白质分子量标准;2. 纯化的 HX 蛋白
B:1. 相对蛋白质分子量位置;2. 显示 Western 印迹信号(箭头)。

Fig 5 Western blotting analysis of the purified HX protein

A: Lane 1, molecular weight marker; Lane 2, purified HX protein. B: Lane 1, position of molecular weight; Lane 2, showing a weak blotting signal.

讨 论

- 1 本研究通过 PCR 技术直接扩增 HBV 全长 X 基因,避免了由 HBV 基因组经酶切获得的 X 基因 5'端缺失使表达的 X 蛋白被截短^[1,3-5]。这是保证 X 蛋白抗原性和天然生物学活性的基础。
- 2 基因工程表达产物的纯化是获得最终产品的关键,在纯化的第一步最大限度地去除细菌杂蛋白之最有竞争力的方法是亲和层析。本研究采用了能合成氨基末端含 6 组氨酸肽段(His-tag)融合蛋白的表达系统,其表达产物经 HisTrapTM凝胶亲和层析纯化,纯度可达 93%,这一纯度可适用于通常的研究目的,同时也将大大简化进一步纯化步骤。
- 3 在对 HX 蛋白进行 Western 印迹鉴定时,仅获得微弱的信号。分析原因有以下两个方面:首先,表达产物氨基末端含有 25 个氨基酸残基的融合肽段,可能部分影响到抗-HBx 的结合;其次,所用血清(第一抗体)非高效价血清(抗体);最后,也是最重要的,该蛋白在变性状态时与天然抗体的结合力显然低于复性状态时。事实上,利用复性后该 HX 蛋白建立的酶联免疫吸附试验(ELISA),在对 HBV 携带者抗-HBx 的调查中已取得进展(结果将另文发表)。
- 4 为了研究 X 蛋白的生物学活性,有必要去除此表达产物氨基末端的融合部分。ProEX HT 原核表达系统巧妙地利用了重组烟草蚀纹病毒(rTEV)蛋白酶裂解位点。就本研究的 HX 融合蛋白而言,在 X 蛋白与融合肽段之间为 rTEV 蛋白酶的特异性作用序列 ENLYFQG。利用 HisTrapTM柱将 HX 蛋白亲和吸附后,通过改变洗脱条件,并加 rTEV 蛋白酶于洗脱液,将获得更理想的目的蛋白 X 蛋白。

参 考 文 献

- 1 Montavry AM, Alexander H, Lerner RA *et al*. Antibodies to peptide detect new hepatitis B antigen: Serological correlation with hepatocellular carcinoma. *Science*, 1985, 227: 429-433
- 2 Kay A, Mandart E, Trepo C *et al*. The HBV *ix* gene expressed in *E. coli* is recognized by sera from hepatitis patients. *EMBO J*, 1985, 4: 1287-1292
- 3 Meyers ML, Trepo LV, Nath N *et al*. Hepatitis B virus polypeptide X: Expression in *Escherichia coli* and identification of specific antibodies in sera from hepatitis B virus-infected humans. *J Virol*, 1986, 57: 101-109
- 4 Chen ML, Lee YHW, Lo SJ. High-level production of hepatitis B viral X protein in *Escherichia coli* using gene II promoter of bacteriophage M13. *Gene*, 1988, 62: 315-322
- 5 金灵, 马贤凯. 乙型肝炎病毒的 X 蛋白在大肠杆菌中的高效表达. *病毒学报*, 1988, 5: 318-322
- 6 Colgnac R, Simon G, Ganeau J. Transcriptional activation of homologous and heterologous genes by the hepatitis B virus X gene product in cells permissive for viral replication. *J Virol*, 1989, 63: 4019-4026
- 7 Spaneau DF, Lee CH. Transactivation of viral enhancers by the hepatitis B virus X protein. *J Virol*, 1988, 62: 427-434
- 8 Zahra P, Hofschneider OH, Koshi R. The HBV X-ORF encodes a transactivator: A potential factor in viral hepatocarcinogenesis. *Oncogene*, 1988, 3: 169-177
- 9 Twu JS, Robinson WS. Hepatitis B virus X gene can transactivate heterologous viral sequences. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1989, 86: 2046-2050
- 10 Teyro M, Balsani C, Natali G *et al*. Hepatitis B virus X protein transactivates the long terminal repeats of human immunodeficiency virus type 1 and 2. *J Virol*, 1990, 64: 3082-3086
- 11 Twu JS, Solovinec RH. The unique nontransactivating function of hepatitis B virus. *J Virol*, 1987, 61: 3448-3450
- 12 Twu JS, Solovinec RH. Transcription of the human beta interferon gene is inhibited by hepatitis B virus. *J Virol*, 1989, 63:

3065-3071

13. Manzo S, Clementi M, Alloni F *et al*. Transactivation of prokaryotic growth factor gene by the hepatitis B virus X gene product. *Virology*, 1993, 196:878-882
14. 叶大兵, 褚奕瑾. 在体外高效表达的 adr 亚型乙型肝炎病毒 X 蛋白全序列. *中国医学(临床)*, 1986, 1:5-5
15. Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T. *Molecular Cloning: Laboratory Manual*, 2nd ed. New York: Cold Spring Harbor Laboratory, 1989

High-Level Expression of Hepatitis B Virus adr Subtype X Protein in *Escherichia coli*

Fang Dexing, Zhou Zongan, Zhu Chunsheng, Gu Zhixiang, Wang Yuanlan, He Liang
(Huaibei Research Institute for Medical Biotechnology, Nanjing 210002)

Abstract The X gene of a known adr subtype of hepatitis B virus (HBV) was cloned into the ProEX HT Prokaryotic Expression System (GibcoBRL), and the X protein of HBV, 154 amino acid residues, was expressed in a fusing fashion in *E. coli*. The fusion protein, named His-tagged X protein (shortly HX protein) contains 179 amino acid residues and its molecular weight is about 19.7 kilodaltons. It is easy to purify by the HisTrap affinity chromatography. The purity of the HX protein could reach 93% by one step of capturement. Western blotting showed that the HX protein could specifically be recognized by the human antibodies against HBV X antigen (protein).

Key words Hepatitis B virus, X gene, Fusion expression, Western blotting