

2000-2001

乙肝病毒表面抗原 preS1 与人肿瘤坏死因子 α 融合基因的表达

陈波¹ 刘惠¹ 任红玉¹ 苏成芝² 陈常庆¹

¹ (中国科学院上海生物工程研究中心, 上海 200233)

² (第四军医大学生化教研室, 西安 710032)

摘要 用 PCR 法获得了 HBsAg preS1(1-65) 肽段基因, 将该基因融合在肿瘤坏死因子(hTNF α) 之后, 插入表达载体 PSB-92 中, 使融合基因的 5' 端直接置于大肠杆菌 P_L 启动子下游, 采用 30 °C 培养, 42 °C 诱导, 获得了 TNF 与 preS1(1-65) 融合蛋白的表达产物。SDS-PAGE 电泳显示表达产物为 25 kD, 约占细菌总蛋白的 35%。表达产物经 Western-blot 验证, 能分别特异地与 hTNF α 抗体与 preS1 抗体结合, 稀释复性后, 该融合蛋白还具有 TNF 的生理功能(对 L-929 细胞的细胞毒活性)。经 DNA 序列测定, preS1(1-65) 肽基因正确地融合在 hTNF α 基因之后。该结果提供了一种制备 preS1 的新方法, 为进一步开展治疗肝癌和乙肝的导向药物打下基础。

关键词 乙肝病毒表面抗原, preS1(1-65) 基因, 人肿瘤坏死因子, 融合蛋白, 表达

众所周知, 乙肝表面抗原(HBsAg)是乙型肝炎病毒(HBV)外膜蛋白, 由 HBV 基因组的 S 开放阅读框架(S-ORF)所编码^[1]。HBsAg 含有大、中、小 3 种分子形式蛋白质, 这些蛋白质 C 端具有相同的序列^[1-3]。其中小分子蛋白(SHBs)即主要蛋白由 226 个氨基酸组成, 中蛋白是在主蛋白 N 端加上 55 个氨基酸的 preS2 区, 大分子蛋白(LHBs)则根据病毒亚型的不同在中蛋白的 N 端前面再加上由 108 或 119 个氨基酸组成的 preS1 区, 这三种蛋白都存在糖基化和非糖基化的形式。Lin^[4]和 Pontisso^[5]等实验结果表明, LHBsAg 的 preS1 区参与病毒与肝细胞膜的结合, Petit^[6]等指出 preS1(21-47) 肽段是病毒与含有肝细胞受体的肝细胞瘤细胞 HepG2 的结合位点, 但也可能还有 preS1(11-14) 肽段。Rhyum^[7]等认为, HBV adr 亚型 preS1(1-56) 肽含有 B 细胞和 T 细胞抗原决定簇, preS1 蛋白含有许多免疫原性比 S 蛋白更强的 T 细胞和 B 细胞表位^[8], preS1 特异性的细胞免疫可以帮助克服某些个体对 S 蛋白的免疫无反应状态, 或同时对 S 蛋白和 preS2 蛋白的双重无反应状态^[9]。实验还证明, 化学合成的 preS1(12-47) 肽段接种黑猩猩后, 能使黑猩猩对 HBV 攻击获得良好保护^[10], 因而有人提出基因工程疫苗也应带有 preS1 蛋白, 以期获得对 HBV 比较全面均衡的免疫效果^[11]。还有人报道, preS1 抗原的出现与病毒的复制水平密切相关^[16], 而且乙肝病毒表面抗原上的 preS1 表位只有在病毒完全消除之后才会消失, 从而可以用作指示病毒复制剂量以及预后和评价治疗效果的检验指标^[12]。为此, 汪垣等人采用化学合成的 preS1(20-47) 肽段^[13], Sidorkievicz^[14]等则采用与 β 半乳糖苷酶(450aa)融合表达得到的 preS1(20-49) 四串联肽段建立了 preS1 的

抗原-抗体检验试剂盒。

为了研究 preS1 多肽与肝细胞受体的相互作用,分离和鉴定 HBV 细胞受体,深入了解 HBV 感染肝细胞的机制,并建立更为有效的 preS1 抗原-抗体检测系统,选用这含有 B 细胞和 T 细胞抗原决定簇和与肝细胞结合的全部位点在内的肽段,可能是更为合适的。也就是说,这个肽段应包括 preS1N 端的 56 肽序列。考虑到 preS1 多肽在大肠杆菌中的表达较难,一般多采用将 preS1 基因与高表达的蛋白进行融合表达的方法^[14~16],我们则根据过去在表达降钙素基因相关肽(CGRP)时所建立的与人肿瘤坏死因子 hTNF α 进行融合表达的方法^[17]。将 preS1(1-65)肽段基因融合在 hTNF α 基因之后,构建成功 TpreS1 融合基因。然后插入表达载体 pSB-92 中,使融合基因的 5'端直接置于大肠杆菌 P_L 启动子下游,成功地实现 hTNF α 与 preS1(1-65)蛋白的融合表达。融合蛋白的表达量达到细菌总蛋白的 35% 以上。

材料和方法

1 材料

1.1 菌种与质粒 含 HBV adr1 基因的质粒由中国科学院典型培养物保藏委员会基因库提供,克隆质粒 pUC19、表达质粒 pSB-92,大肠杆菌 YK537、DH5 α 和含 hTNF α 基因的 pTK 均为本室构建或保存。

1.2 酶类 T4DNA 连接酶,限制性内切酶均购自 Promega 公司,Taq DNA Polymrease 购自华美公司。

1.3 主要试剂 DNA 合成成套试剂为 CPG 公司产品,鼠抗 preS1 抗体(滴度为 1:10⁵)为中科院生化所张祖传教授惠赠,鼠抗 hTNF α 抗体(滴度为 1:10⁵)为第四军医大学免疫教研室金伯泉教授惠赠,羊抗鼠 IgG-HRP(辣根过氧化物酶)购自华美公司,标准分子量蛋白质为上海生化所东风生化试剂厂产品。其它试剂为国产分析纯。

2 方法

2.1 一般方法 质粒 DNA 的小量制备、酶切、连接、感受态细胞处理、质粒 DNA 的转化和转化子的筛选以及 DNA 片段的回收。SDS-PAGE 电泳,Western-blot 均按文献^[18]进行。

2.2 preS1(1-65)肽基因的获得 根据 HBV adr 亚型基因的核苷酸顺序,设计两个 PCR 引物,其中 P1 位于 5'端并带有 Xho I 酶切位点,P2 互补于 preS1(1-65)肽段 C 末端氨基酸相应的基因序列,并含有终止密码子及 BamH I 酶切位点。PCR 反应以含 HBV adr1 基因的质粒 DNA 为模板,反应体积为 100 μ L,含有 100 pmol/L 的引物 P1 和 P2,10 μ L 10 \times Taq DNA 聚合酶缓冲液,200 pmol/L dNTP,反应于 PCR 自动反应仪(Thermolyne 公司产品),按反应程序自动反应 30 个循环,94 $^{\circ}$ C 30 s,50 $^{\circ}$ C 40 s,72 $^{\circ}$ C 40 s,最后于 72 $^{\circ}$ C 保温 10 min,反应产物经氯仿抽提,乙醇沉淀、备用。P1,P2 引物顺序见表 1。

表 1 引物序列

Table.1 The sequence of primers

引物名 primer	序列 sequence(5'-3')
P1	Xho I AAT CTC GAG ATG GGA GGT TGG TCT TCC AAA C
P2	BamH I CTC GGA TCC TCA TTA TGG CCC GAA TGC TCC GGC T
P3	EcoR I AG GAA TTC ATG GTA AAA TCT AGC TCT CGC
P4	Xho I AAT CTC GAG CAG AGC GAT AAT ACC GAA

2.3 PCR法改造肿瘤坏死因子(hTNF α)基因 TNF基因5'端和3'端分别为EcoR I和BamH I识别位点,并有自己的终止密码子TAA,为了使preS1(1-65)肽正确融合在hTNF α 基因之后,必须消除hTNF α 基因的终止密码子及改变hTNF α 3'端的BamH I识别位点,以便和preS1(1-65)肽的5'端Xho I位点相符,为此,我们设计了PCR突变引物P4改造hTNF α 的3'端,该引物引进了Xho I识别序列,同时消除了hTNF α 基因3'端的BamH I酶切位点和终止密码子TAA,5'端设计的引物P3含有EcoR I识别位点,在上述PCR仪上按以下程序反应30个循环,94 $^{\circ}$ C 40 s,52 $^{\circ}$ C 50 s,72 $^{\circ}$ C 70 s,最后于72 $^{\circ}$ C保温10 min,PCR反应产物经氯仿抽提,乙醇沉淀,备用。P3、P4引物序列见表1。

2.4 改造后的hTNF α 基因和preS1(1-65)肽融合基因(简称TpreS1)表达载体(pSB-TpreS1)的构建 分别用EcoR I/Xho I和Xho I/BamH I处理TNF基因和preS1(1-65)肽基因的PCR产物,同时用EcoR I/BamH I消化表达载体pSB-92,酶切回收后,一起在4 $^{\circ}$ C连接过夜,转化大肠杆菌YK537,酶切鉴定转化子,将含融合基因的转化子用于表达。

2.5 外源基因在大肠杆菌中的表达 含有重组质粒(pSB-TpreS1)的大肠杆菌YK537于30 $^{\circ}$ C活化过夜后,按1:100转接入2YT,30 $^{\circ}$ C培养至对数生长期,迅速转入42 $^{\circ}$ C诱导4~6 h,5000 r/min 3 min,收集菌体备用。

2.6 DNA序列的测定 由中科院植物生理所DNA序列中心完成。

2.7 融合蛋白的hTNF α 活性检测 96孔板每孔接 $1 \times 10^4 \sim 4 \times 10^4$ L-929细胞培养过夜,加入不同稀释度的重组融合蛋白样品及放线菌素D(终浓度为1 μ g/mL),继续解育培养16~24 h后观察,以杀伤50% L-929细胞的稀释度为1个活性单位。

结 果

1 PCR法获得preS1(1-65)肽基因

以含HBV adr基因序列的质粒DNA为模板,用P1、P2寡核苷酸引物,扩增preS1(1-65)肽基因,产物经8%非变性聚丙烯酰胺凝胶电泳鉴别,如图1所示,两次PCR产物条带均在分子量标准267~174之间,其大小与预计片段大小相符合。

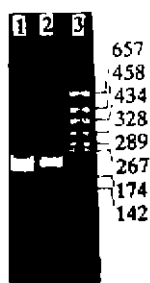


图1 PCR扩增所得的preS1(1-65)基因产物的聚丙烯酰胺电泳结果
1和2. PCR产物;3. 核酸分子量标准(7型)。

Fig 1 PAGE of PCR amplified gene fragment of preS1(1-65)
1 and 2. PCR products; 3. molecular weight markers VII

2 preS1(1-65)和hTNF α 融合基因的构建及其在大肠杆菌中的表达

2.1 hTNF α 基因的改造

以含hTNF α 基因的质粒为模板,用P3、P4寡核苷酸引物,通过PCR方法改造hTNF α 基因,使改造后的hTNF α 基因不含有终止密码子,并在5'端带有EcoR I识别序列,3'端带有Xho I识别序列,PCR产物经8%非变性聚丙烯酰胺凝胶电泳鉴别,如图2所示,PCR产物在458 bp条带附近,其大小与预计片段大小相符合。



图 2 PCR 扩增的 hTNF α 基因产物的聚丙烯酰胺凝胶电泳结果

1. PCR 产物; 2. 核酸分子量标准(7 型)。

Fig. 2 PAGE of PCR amplified hTNF α gene

1. PCR product; 3. molecular weight marker μ

2.2 融合基因表达载体的构建

分别用 EcoR I / Xho I 和 Xho I / BamH I 酶切 hTNF α 和 preS1(1-65) 基因的 PCR 产物, 并回收。与经 EcoR I / BamH I 酶切的表达载体 pSB-92 连接, 转化大肠杆菌 YK537, 经筛选, 并酶切鉴定得到重组质粒 pSB-TpreS1, 如图 3 所示。pSB-TpreS1 经 EcoR I / Xho I、Xho I / BamH I 及 EcoR I / BamH I 三组酶的双酶切, 分别切出稍大于 458bp、267~174 bp 之间大小及稍大于 657 bp 大小的三组片段, 与预计相符, 经 DNA 序列测定, 结果显示 preS1(1-65) 基因正确地融合在 hTNF α 基因之后, 见图 4。



图 3 重组质粒 pTPreS1 的限制性内切酶鉴定结果

1. pTPreS1 的 EcoR/BamH I 双酶切;
2. pTPreS1 的 EcoR I / Xho I 双酶切;
3. pTPreS1 的 Xho I / BamH I 双酶切;
4. DNA 分子量标准(7 型)。

Fig. 3 restriction digest is of recombinant plasmid pT PreS1

1. pTPreS1 EcoR I / BamH I digest;
2. pTPreS1 EcoR I / Xho I digest;
3. pTPreS1 Xho I / BamH I digest;
4. DNA molecular markers μ .

2.3 hTNF α 和 preS1(1-65) 肽融合基因的表达

将重组质粒 pSB-T preS1 转化大肠杆菌 YK537, 30 $^{\circ}$ C 培养, 42 $^{\circ}$ C 诱导, 离心、收集菌体, 悬于 SDS-PAGE 样品缓冲液中, 沸水中煮 5 min, 进行 SDS-PAGE 电泳, 用考马期亮蓝染色, 结果见图 5。菌体经 42 $^{\circ}$ C 热诱导后, 出现 25 kD 大小的表达蛋白条带; 不经热诱导的菌体中, 无此条带。诱导产生的条带与 hTNF α preS1(1-65) 融合蛋白分子量 25 kD 相符。蛋白电泳凝胶经激光灰度扫描, 表达量占菌体总蛋白的 35%。超声波破菌体、离心后上清和沉淀分别进行 SDS-PAGE 分析, 表达产物位于不溶部分, 沉淀中的表达产物在 Tris-HCl 缓冲液中不溶解, 表明表达的产物以包涵体形式存在, 这有利于产物的分离纯化。

2.4 融合蛋白的 Western-blot 分析

将 SDS-PAGE 胶分别电转于 2 张硝酸纤维素膜上, 转移后的硝酸纤维素膜分别用 hTNF α 单抗及抗 preS1 的单抗进行 Western-blot 分析, 结果只有融合蛋白的条带显阳性, 见图 6。证

ATG GTA AAA TCT AGC TCT CGC ACT CCA TCT GAC AAA CCA GTT GCT CAT GTT
 GTT GCT AAC CCA CAG GCT GAA GGT CAG CTG CAA TGG CTG AAC CGT CGT GCT
 AAC GCT CTG CTG GCT AAC GGT GTT GAA CTG CGT GAC AAC CAG CTT GTG GTA
 CCG TCT GAA GGT CTG TAC CTG ATC TAC TCC CAG GTT CTT TTC AAA GGT CAG
 GGT TGC CCA TCT ACA CAC GTT CTG CTT ACC CAC ACT ATC TCT CGT ATT GCT
 GTT TCC TAC CAG ACT AAA GTT AAC CTG CTG TCT GCG ATC AAA TCT CCG TGC
 CAG CGT GAA ACC CCA GAA GGT GCT GAA GCT AAA CCA TGG TAT GAA CCG ATT
 TAC CTT GGT GGT GTT TTC CAA CTG GAG AAG GGT GAC CGT CTG TCT GCT GAA
 ATC AAC CGT CCA GAC TAC CTT GAC TTC GCT GAA TCT GGT CAG GTA TAC TTC
 GGT ATT ATC GCT CTG CTC GAG ATG GGA GGT TGG TCT TCC AAA CCT CGA CAA
 GGC ATG GGG ACG AAT CTT TCT GTT CCC AAT CCT CTG GGA TTC TTT CCC GAT
 CAC CAG TTG GAC CCT GCG TTC GGA GCC AAC TCA AAC AAT CCA GAT TGG GAC
 TCC AAC CCC AAC AAG GAT CAC TGG CCA GAG GCA AAT CAG GTA GGA GCG GGA
 GCA TTC GGG CCA TAA TGA

图4 hTNF α -preS1 (1-65)融合基因的 DNA 序列分析

Fig. 4 Sequence analysis of TpreS1 fused gene

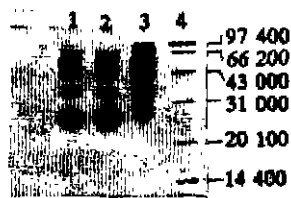


图5 融合表达蛋白的 SDS-PAGE 图谱分析
 1和2.表达的融合蛋白;3.阴性对照;
 4.蛋白分子量标准。

Fig. 5 SDS-PAGE analysis of fusion protein
 1and 2. pSB-TPreS1/YK537;
 3. Negative control;4. Protein marker



图6 部分纯化的 T PreS1 融合蛋白 SDS-PAGE 分析和
 Western-blot 结果

1.蛋白分子量标准;2.阴性对照;3和4.表达的融合蛋白;
 5. Western-blot(用 hTNF α 单抗);
 6. Western-blot(用 preS1 单抗)。

Fig. 6 SDS-PAGE and Western blot of partially
 purified fusion protein T PreS1

1. Protein molecular weight marker;
 2. Negative control 3 and 4 fused protein;
 5. Western-blot(with anti hTNF α McAb);
 6. Western-blot(with anti preS1 McAb).

明表达产物确为 hTNF α -preS1(1-65)融合蛋白。

2.5 融合蛋白的 TNF 活性测定

将纯化的 100 毫克包涵体溶解于 5 毫升含 8mol/L 尿素的 Tris-HCl(pH8.0)buffer 中,加入等体积的 50 mmol/L Tris-HCl(pH8.0),使尿素浓度为 4 mol/L,用 50 mmol/L Tris-HCl(pH 8.0)稀释 10 倍,透析复性,经活性测定粗纯化的融合蛋白的 TNF 细胞毒比活性为 2×10^5 U/mg。

讨 论

乙型肝炎是一种世界性的疾病,我国是高流行区,约有50%~70%的人群受过HBV感染,有8%~10%的人群为乙肝(HBsAg)携带者,而HBV的preS1区具有重要的生物学特性和诊断用途^[14],尤其是对于研究和阐明乙肝病毒感染的机制有着十分重要的理论和现实意义,这也是我们选择HBV的preS1区进行大量表达的原因。大肠杆菌表达是目前基因工程中应用最广泛的一种表达系统,因为它能大量安全地生产蛋白,价格低廉,纯化也比较简单。由于preS1为小分子量的多肽,一个十分可行的方法就是融合表达。由本文报道的hTNF α 与preS1的融合表达系统具有以下的几个优点:(1)当单独表达hTNF α 时,表达量可以达到菌体总蛋白的60~80%,这样可以预期融合蛋白也可能实现高的表达;(2)hTNF α 只含有157个氨基酸,分子量不大,因而在融合蛋白中所占的比重相对于一些大的融合蛋白来说,也会小一些;(3)它不含有甲硫氨酸,因而融合蛋白经溴化氢化学降解后,很容易从降解产物中分离纯化得到其产物preS1(1-65)。此外,该融合蛋白复性后也可能具有hTNF α 的活性,因而表达的融合蛋白不仅可以用已有的抗hTNF α 单抗试剂盒进行检测,还可通过hTNF α 的活性来进行检测,进而可以间接证明所融合的肽也可能是有活性的。我们实验室曾经成功地进行hTNF α 与降钙素相关肽(CGRP)的融合表达^[17],这次我们又尝试preS1与hTNF α 的融合表达,结果又获得了成功。表达产率达到35%以上。包涵体产物经8 mol/L尿素溶解,稀释复性后,经Western blot分析,它对preS1抗体和hTNF α 抗体检测均为阳性,表明融合蛋白具有preS1的抗原性,可作为一种有用的抗原试剂用于乙肝病人的血清学诊断,并很有可能发展成为兼具佐剂活性的免疫原性多肽。此外,复性后的融合蛋白仍然保持hTNF α 的细胞毒活性,其粗产物对L-929细胞的细胞毒比活达到 2×10^5 u/mg,可以推断复性蛋白中所融合的preS1肽段可能具有天然的构象,从而可以直接用于preS1与受体的结合研究。本文报道的preS1与hTNF α 融合表达的成功,提供一条制备preS1多肽的新方法,对于我们研究它与肝细胞受体之间的相互作用,并分离和阐明HBV细胞受体提供了条件。结果还提示有可能利用preS1多肽嗜肝的特性和hTNF α 的抗肿瘤活性,进一步开展治疗肝癌和乙肝的导向药物研究。

致谢 本论文的完成得到上海医科大学分子病毒室袁正宏老师给予的热情关心和帮助,在此谨致衷心感谢。

参 考 文 献

- 1 Albert A, Gerlich WH, Heermann K-H *et al*. Nature and display of hepatitis B virus envelope proteins and the humoral immune response. Springer Semin. Immunopathol, 1990, 12:5
- 2 Heermann K H, Goldmann U, Schwartz W *et al*. Large surface protein of HBV containing the PRES sequence. J. Virol, 1984, 52:396
- 3 Heermann K H, Kruse F, Seifer M, Gerlich WH *et al*. Immunogenicity of the gene's and preS domain in HBV and HbsAg filaments. Intervirology, 1987, 28:14
- 4 Liu Y, Liu YX, Cisto T *et al*. Expression and characterization of the PreS1 peptide of HBsAg in *Escherichia coli*. J Med Virol, 1991, 33:181
- 5 Pontusso P, Petit M-A, Bankowski *et al*. Identification of the attachment site for human liver plasma membranes on HBV parti-

- cles. *Virology*, 1989, 173:522
- 6 Petit MA, Dubanchet S, Capel F *et al*. Hep G2 cell binding activities of different HBV isolates: Inhibitory effect of anti-HBs and anti-PreS1(21-47). *Virology*, 1991, 180:483
 - 7 Rbyum, Jin BR, Park HR. *et al*. High level expression of hepatitis B virus preS1 peptide in *E. coli*. *J Biotechnol*, 36(3): 1994, 221-230
 - 8 Hollinger F. B Hepatitis virus' In: Fields B. N (ed.), *Virology*. New York: Raven Press, 1990. 2171-2236
 - 9 Neurath, A, R, Seto, B, Strick, N *et al*. Antibody to synthetic peptides from the PreS1 region of the HBV envelope protein are virus-neutralizing and protective Vaccine, 1989, 7:234-236
 - 10 Emni EA, Larson V, Eichberg J *et al*. Proctive effect of a synthesize peptide compromising the complete preS region of the HBV surface protein. *J. Med Virol*, 1989, 28:7
 - 11 Petit M-A, Zoulim, F, Capel, F, *et al*. Variable expression of preS1 antigen in serum during chronic hepatitis B virus infection: an accurate marker for the level of HBV replication. *Hepatology*, 1990, 11:809
 - 12 Lin Y, Liu YX, Cisló T *et al*. Expression and characterization of the PreS1 peptide of hepatitis B surface antigen in *Escherichia coli*. *J Med Virol* 1991, 33(3): 181-187
 - 13 杨海林, 张祖传, 汪垣等. 抗乙型肝炎病毒表面抗原 PreS1 (20-47) 多抗的制备、性质和应用. *生物化学和生物物理学报*, 1994, 26:3
 - 14 Sidorkiewicz M, Plucienniczak G, Plucienniczak A *et al*. Expression and characterization of the multiplied recombinant preS1 antigen of HBV. *Virology* 1995, 140:1935-1944
 - 15 Kim HS, Kim YK, Ryu SE *et al*. Production of hepatitis B virus pre S polypeptide in *Escherichia coli* by mutation of the 5'-end coding sequence and its purification and characterization. *Gene*, 177(1-2): 173-177(1996)
 - 16 Yuan Lin, Yan-Xin Liu, Teresa Cisló *et al*. Expression and characterization of the preS1 peptide of hepatitis B surface antigen in *Escherichia coli*. *Journal of Medical Virology* 33:181-187(1991)
 - 17 高长寿, 毛申兰, 陈常庆等. 人降钙素相关肽与肿瘤坏死因子的融合表达. *生物化学与生物物理学报*, 1995, 1:1-7
 - 18 Sambrook J, Frets EF, Mannades T *et al*. *molecular cloning*, 2nd ed. USA: cold spring harbor laboratory Press. 1989. 1. 21. 6. 30.

Fused Expression of Hepatitis B Virus preS1 Gene in *Escherichia coli*

Chen Bo¹ Liu Hut¹ Ren Hongyu¹ Shu Chengzhi² Chen Changqing¹

¹ (Shanghai Research Center of Biotechnology, Chinese Academy of Sciences, Shanghai 200233)

² (Department of Biochemistry, 4th Military Medical University, Xi-an 710032)

Abstract The gene encoding the N-terminal 1-65 amino acids of preS1 was amplified by PCR and fused to the 3' end of hTNF α gene to form a hTNF α -preS1 fused gene which was directly inserted into the expression vector pSB-92 between EcoR I and BamH I sites and under the control of P₁ promoter. The fused hTNF α -preS1(1-65) gene can be expressed in *E. coli* by temperature induction. The expression level was up to more than 35% and expressed fusion protein was shown by a major band with a expected molecular weight about 25 kD on SDS-PAGE, and also confirmed by Western blot analysis with anti-hTNF α monoclonal antibody and anti-preS1 monoclonal antibody. After renaturation, the fused protien displayed the hTNF α biological activity. The preS1(1-65) gene is found to be accurately fused to hTNF α by sequence analysis.

Key words HBsAg preS1(1-65) gene, hTNF, Fusion protein, Expression