

用DNA重组技术获得乙型肝炎病毒 e 抗原及其在临床检测中的应用

邬光惠 黄耀焯 倪丽平 段陵浔 贾克明

(北京军区总医院肝病研究所, 北京)

HBeAg和抗-HBe是乙型肝炎的经典标志物。HBeAg基因与HBcAg基因在DNA C区上相重叠。为要获得重组DNA衍生的HBeAg, 本文从adw₂亚型HBV 3.2 kb 全长DNA上切取带有HBc基因的BamHI-EcoRI片段, 用Bal31和Hpa I 酶处理产生一系列长度不同的片段, 与载体pUR222和pUC 18 构成不同的重组质粒, 转化到大肠杆菌。通过平板筛选、质粒酶切图谱和抗原抗体反应等筛到高效表达HBeAg的转化株YG301和 YG302, 中和试验证明了重组HBeAg的血清学特异性。用凝胶过滤、离子交换层析和亲和层析对其进行提纯并用聚丙烯酰胺凝胶电泳结合Western印迹法进行纯度鉴定、含量分析和分子量测定。重组HBeAg制品具有高活性、稳定和安全等特点, 实验证明它可以代替血源 HBeAg 制成酶联药盒用于乙肝诊断检测。

关键词 DNA重组; HBeAg; 基因表达

现已知道乙型肝炎病毒核心抗原(HBcAg)和e抗原(HBeAg)的基因均在HBV DNA的C区上并相重叠, 但它们是两种不同的抗原体系^[1-4]。文献报道HBcAg多肽C端去掉一定长度氨基酸序列可使失去HBcAg活性而获得HBeAg活性, 但用DNA重组技术产生HBeAg迄今仅见Mimm等的报道^[5]。他们在HBc基因的3'端去掉120个核苷酸。在国内则尚未见有类似报道。

本文从adw₂亚型的3.2kb乙肝病毒(HBV)DNA上获得带有HBc基因的DNA片段, 经用Bal31酶降解和内切酶Hpa II修饰后, 产生的一系列不同长度的片段与载体质粒重组, 转化到大肠杆菌并筛选到高表达的转化株YG301和YG302, 在其裂解液中可测到高的HBcAg活性, 而且该活性只能为抗-HBe特异抑制。经分析工程菌产的HBcAg在菌裂解液总蛋白中的含量约为16%。实验结果证明我们得到的重组

HBeAg制品不但效价高而且具有比血源HBeAg更高的稳定性, 它可代替血源HBeAg用于乙肝临床检测并已在实际工作中得到应用。

材料与 方法

(一) 菌株与质粒

大肠杆菌JM101和BMH71-18为本室保存的受体菌菌株。载体质粒pUC18和pUR222以及带有HBV DNA的重组质粒pAT01均为本室保存。

(二) 工具酶和人工接头

Bal31、EcoR I、Hpa II、BamH I、DNA多聚酶I大片段(Klenow fragment)、T4连接酶、牛肠碱性磷酸单酯酶(CIP)及EcoR I人工接头为BRL和BioLab产品。

(三) 质粒DNA制备

带有pAT01质粒的工程菌培养物经氯

本文于1989年6月14日收到。

霉素扩增后用氯化铯-溴化乙锭密度梯度法制备pAT01质粒DNA。重组表达质粒pHW301和pHW302采用Sephacryl S1000柱层析法提纯。

(四) 人抗-HBe IgG 和抗-HBe 单克隆抗体

采乙肝患者抗-HBe阳性血清经硫酸铵4次沉淀后通过DEAE-Sephadex A-50柱外吸附提纯。抗-HBe单克隆抗体为日本山口宣夫博士惠赠, IgG有两亚类: IgG2b和IgG1。

(五) HBeAg/抗-HBe和HBcAg/抗-HBc的检测

ELISA测HBeAg/抗HBe用上海医化所和北京华美公司产的药盒, 测HBcAg/抗-HBc用军事医学科学院产的药盒, RIA法测定均用北京福瑞公司产的药盒。

(六) 菌产HBeAg的分离

工程菌在含有氨基青霉素的LB中, 37°C振荡培养20h后离心收菌, 用20mmol/L pH7.4 PBS洗涤后悬浮在pH8.0 TE中, 处理以溶菌酶, 超声破碎, 提溶, 离心收集上清并测HBeAg活性。上清用硫酸铵或其他盐沉淀、提溶、去盐得到粗提物, 必要时用层析法作进一步提纯^[6,7]。

(七) 聚丙烯酰胺凝胶电泳(PAGE)与SDS-PAGE

用垂直板电泳装置按文献方法进行。

(八) 免疫沉淀

用重组HBeAg制品与抗HBe单克隆抗体按文献方法进行^[8]。

(九) Western印迹法

菌产HBeAg粗制品经SDS-PAGE分离后, 将凝胶上各蛋白区带转移到硝酸纤维素膜上, 然后用酶标抗-HBe鼠单克隆抗体与之作用, 检出重组HBeAg并计算其分子量。

结 果

(一) 带有HBe基因的重组质粒的构建

从带有adw₂亚型3.2kb HBV全长DNA的pAT01重组质粒上用EcoR I切得3.2kb片段, 后用BamH I处理获得带有HBc基因的BamH I-EcoR I DNA片段。该片段用Bal31酶在37°C下作用不同时间后分别再以Hpa II处理, 这样得到一系列不同长度的DNA片段, 与载体质粒pUR222或pUC18构建重组质粒。采用的重组途径有两个, 一是先在上述DNA片段上接以人工合成的EcoR I接头, 后用EcoR I切, 与载体进行EcoR I粘性末端连接。另一途径取上述酶处理的DNA片段用EcoR I和Kleno·片段处理, 后与载体进行平末端连接, 构成带有Amp抗性的重组质粒。转化、筛得高效表达的重组质粒pHW301和pHW302的构建图见图1。

(二) 重组质粒在受体菌中表达

上述带有HBe基因的DNA片段与pUR222和pUC18构建成的重组质粒分别转化到受体菌BMH71-18和JM101, 在Xgal筛选平板上筛选白色菌落, 用快速抽提的方法从白色菌落的培养物中提取质粒进行琼脂糖电泳和酶切图谱鉴定(图版I-A)。如图所示pHW302重组质粒上插入有经改造过的HBc基因DNA片段, 后者有Bgl II酶切位点。同时从这些白色菌落培养物中收集菌体、裂解、检测裂解液中HBeAg活性、筛选高表达菌株。从中筛得分别带有pHW301和pHW302重组质粒的转化株YG301和YG302。ELISA测裂解液上清HBeAg效价达 1×10^4 以上。

(三) 菌产HBeAg的血清学特异性

转化株YG301和YG302的菌裂解液、

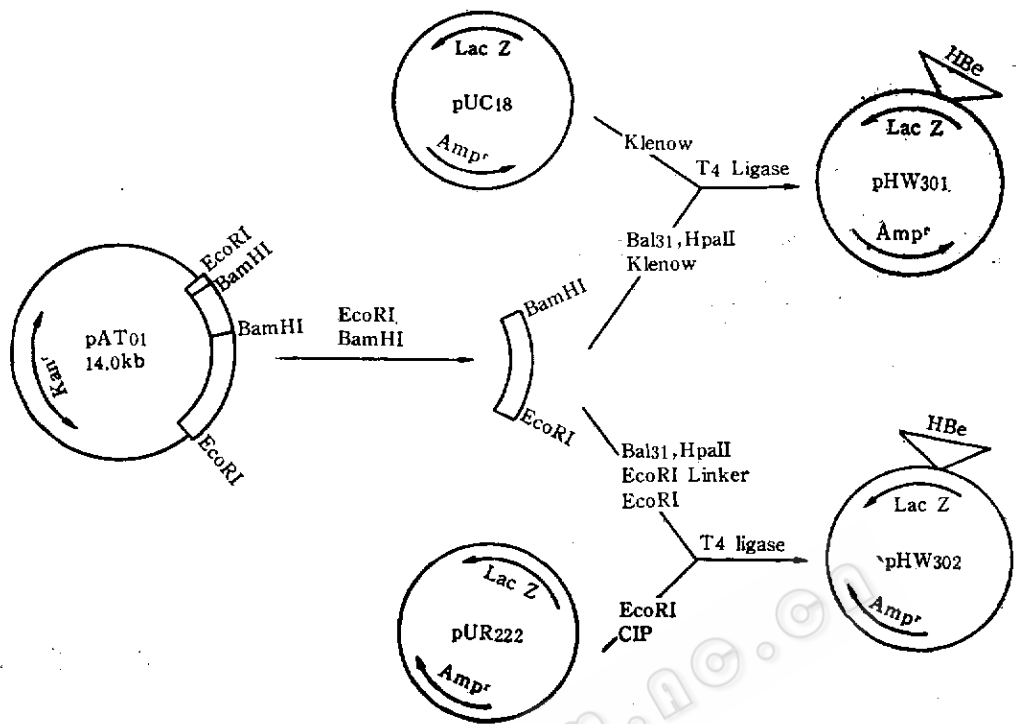


图1 带有HBe基因的重组质粒的构建

Fig.1 Construction of the recombinant plasmids carrying HBe gene

人血HBeAg和人肝HBcAg分别与抗-HBe单克隆抗体、人抗-HBe、人抗-HBc、人抗-HBs阳性血清和正常人血清在43℃保温1.5h,然后作ELISA检测。从表1可见,转化株裂解液的HBeAg活性和人血HBeAg的活性只能为抗-HBe血清和抗-HBe单克隆抗体所抑制,证明菌产HBeAg的血清学特异性。但应指出在粗提物中也测到一些HBcAg活性,这是由于HBc基因与HBe基因有重叠的缘故。HBeAg活性比HBcAg高两数量级。

(四)大肠杆菌合成HBeAg的层析提纯

菌产HBeAg粗提物中混有大量菌体蛋白,DEAE层析可使得得到部分提纯。DEAE-DE52柱(2×40cm)以0.01mol/L pH7.0 PB平衡,粗提物亦用PB平衡后上柱,用盐浓度梯度洗脱(0—0.7mol/L

表1 大肠杆菌合成HBeAg的中和试验

Table 1 Neutralization test of *E.coli* derived HBeAg

Treatment	ELISA			
	Lysate of strain YG301	Lysate of strain YG302	Human plasma derived HBeAg	Human liver derived HBeAg
Monoclonal anti HBe antibody	-	-	-	+
Human anti HBe (+) serum	-	-	-	+
Human anti HBc (+) serum	+	+	+	-
Human anti HBs (+) serum	+	+	+	+
Normal human serum	+	+	+	+

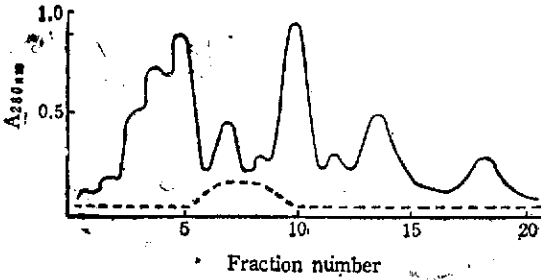


图 2 大肠杆菌合成HBeAg的DEAE层析提纯
Fig.2 Purification of HBeAg synthesized in *E. coli* by DEAE chromatography
DEAE-DE52 5.0ml/tube
—A280nm,HBeAg activity

NaCl), 每管收 5.0ml, 层析图谱见图 2。图上可见HBeAg活性分布较宽, 电泳分析表明HBeAg活性部分的混合液中仍含有很多细菌蛋白, 但核酸类物质得到较好分离, 为了获得更纯的制品, 用亲和层析作进一步处理, 该法从乙肝患者血清中提取抗-HBe IgG, 取IgG溶液 30ml 对 pH8.0 0.1mol/L NaHCO₃ (含 0.5mol/L NaCl) 透析平衡后与经 0.001mol/L HCl 处理的溴化氰激活 Sepharose 4B (瑞典 Pharmacia 产品) 进行偶联, 在 4℃ 下用上述 NaHCO₃ 溶液洗涤 3 次, 加 12ml 1mol/L pH8.0 氨基乙醇封闭, 后用 pH4.0 1mol/L 醋酸缓冲液 (含 1mol/L NaCl) 和 pH8.0 0.2mol/L 硼酸缓冲液 (含 0.5mol/L NaCl) 交替洗涤, 然后装柱。柱体用后一种缓冲液平衡, 工程菌裂解液亦用该缓冲液平衡后上柱。洗脱、收集、测活等步骤均按前文所述进行^[6]。结果表明, 工程菌合成的 HBeAg 能特异地为人抗-HBe IgG 所吸附, 通过亲和层析与其他杂蛋白分离而得到提纯, 回收率在 40% 左右。

(五) 电泳分析与分子量测定

菌产 HBeAg 粗制品的 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳 (SDS-PAGE) 图谱表明中含蛋白组分较多, 蛋白区带在 20 条以上。为

了鉴定重组 HBeAg 的区带我们采用了免疫电泳的方法。抗-HBe 单克隆抗体或人抗-HBe 血清与菌产 HBeAg 粗制品反应, 抗-HBe IgG 与重组 HBeAg 形成免疫复合物, 经裂解后进行 SDS-PAGE, 电泳图谱显示除 IgG 区带外, 在相当分子量 38kd 处有一蛋白区带 (图版 I-B), 另在 19kd 左右有一淡的区带。我们认为该两蛋白区带是重组 HBeAg。亲和层析所得制品在相应位置出现了主要蛋白区带, 电泳凝胶条分段提取液 ELISA 检测表明在上述蛋白区带相应区域测到 HBeAg 活性。根据电泳凝胶的紫外扫描图 (图版 I-C) 计算结果表明重组 HBeAg (38kd) 的含量约占细菌总蛋白的 16%。我们发现若将制品用 β-巯基乙醇处理后再作 SDS-PAGE, 38kd 蛋白区带位置下移。为了进一步确定其分子量, 将电泳凝胶上的蛋白区带电转移到硝酸纤维素膜上作 Western 印迹分析, 用酶标抗-HBe 鼠单克隆抗体检出两条重组 HBeAg 区带 (图版 I-D), 在纤维膜上可以看出上一区带的密度明显高于下一区带, 根据分子量标准计算其分子量分别为 38kd 和 19kd。这进一步证明我们所得到的菌产 HBeAg 以双体形式存在, 其单体分子量在 19kd 左右。

(六) 重组 HBeAg 的稳定性及其初步应用

工程菌 YG302 株合成的重组 HBeAg 具有较高的稳定性, 放置室温 1 个月活性未见明显下降。

应用重组 HBeAg 代替人血 HBeAg 制成的乙肝诊断试剂具有安全、稳定和来源充足等优点。本文在用抗-HBe IgG 和抗其他 HBV 抗原的抗体 IgG 分别包被的 ELISA 板上, 采用竞争法以菌产重组 HBeAg 检测抗-HBe 阳性和阴性的病人血清, 结果只有在用抗-HBe IgG 包被的 ELISA

板上能作出阳性或阴性的判断。以此重组HBcAg与酶标单克隆抗-HBe IgG制成检测HBcAg/抗-HBe ELISA药盒与用血源HBcAg制成的ELISA药盒(国产)平行检测618份血清标本,HBcAg的符合率达99%,抗-HBe的符合率达95%以上(表2)。

表2 重组HBcAg与血源HBcAg ELISA药盒平行检测抗-HBe的比较

Table 2 Comparison of the detection of anti-HBe using ELISA kits made with rHBcAg and hpHBcAg

No.	Number of sample	anti-HBe(+)		Coincidence (%)
		hpHBcAg kit	rHBcAg kit	
1	28	4	3	98.43
2	35	8	7	97.20
3	35	5	6	97.20
4	35	5	7	94.30
5	35	2	2	100.00
6	35	6	6	100.00
7	34	8	9	97.10
8	30	8	6	94.30
9	36	5	6	97.20
10	36	7	7	100.00
11	36	7	6	97.23
12	36	2	3	97.23
13	36	6	7	97.23
14	170	44	47	95.84
	618	117	122	97.23

rHBcAg: recombinant HBcAg

hpHBcAg: human plasma derived HBcAg

讨 论

在乙型肝炎标志物中了解得最少的是HBcAg和抗-HBe。近年来对这一系统的研究有较大进展。HBcAg和HBcAg的基因相重叠。文献报道HBcAg^[10]经一定条件化学处理后可转化为HBcAg(P15.5)^[9,10]。应用DNA重组技术获得的HBcAg作相似处理时,也观察到相同的结果^[11,12]。研究者从HBc基因的核苷酸顺序推测出HBcAg的结构,包含有183—

185个氨基^[13,14]。HBcAg含有HBcAg N端149个氨基酸残基,但缺失P19 C端的34个氨基酸残基。上述研究结果倾向于认为HBcAg是HBcAg的另一种形式或是它的一种衍生物。本研究结果证明我们已成功地克隆了HBe基因并得到高水平表达,为进一步研究HBe基因及HBeAg与HBcAg的关系提供了条件。

HBeAg分子是多样性的,较早的有1978年日本学者Takahachi等发现HBeAg在体内是以游离型和与IgG结合的两种形式存在。后来Yamada等^[15]报道游离小分子HBeAg有两种,一种分子量为30kd(单体),另一种90kd(三体),而与IgG结合的大分子由于结合的IgG分子数目不同,有24万、40万和54万道尔顿3种。Williams和Le Bouvier在抗原性研究中发现肝脏和血清中的HBeAg可以分为HBeAg/1和HBeAg/2两种亚型,它们虽抗原性不同,但理化性质相似,分子量为32kd的多肽具有这两种亚型的特性。Yamada等报道^[15]将上述分子量为32kd的多肽经100℃加热后,在有盐酸胍存在下通过凝胶过滤又可分为分子量为16kd的更小基本多肽单位。我们用DNA重组技术获得的带有HBe基因的重组质粒未作DNA序列分析,但所得菌产重组HBeAg通过免疫沉淀结合SDS-PAGE和Western印迹两种方法分析,证明存在有两种形式即二体和单体,其分子量分别为38kd和19kd。根据PAGE的紫外扫描图计算38kd部分占工程菌粗提物中总蛋白的16%左右。菌产HBeAg不但效价高而且较血源HBeAg稳定,以液体形式贮放4℃可较长期保存,即使放室温1个月活性亦未见明显下降。用本制品制成ELISA药盒,测试一定数量专科门诊血清标本并与国产ELISA药盒平行检测比较,结果证明菌产HBeAg具有活性高,稳定和

安全等优点, 可以代替血源HBeAg用于临床检测和流行病学调查。

参 考 文 献

- [1] Takahashi, K. et al.: *J. Gen. Virol.*, 57: 325, 1981.
- [2] Takahashi, K. et al.: *J. Immunol.*, 130: 2903, 1983.
- [3] Uy, A. et al.: *Virology*, 155: 89, 1986.
- [4] Will, H. et al.: *J. Virol.*, 50: 335, 1984.
- [5] Mmims, L. et al.: 1987 病毒性肝炎与肝病国际讨论会(英国伦敦)文摘汇编中文本, p.97, 1987.
- [6] 黄耀煌等: 生物化学与生物物理学报, 17(4):470, 1985.
- [7] 黄耀煌等: 生物工程学报, 1(2): 154, 1985.
- [8] Inouye, S. et al.: *J. Bacteriol.*, 127: 555, 1976.
- [9] Takahashi, K. et al.: *J. Immunol.*, 123: 1415, 1979.
- [10] Budkowska, A et al.: *J. Med. Virol.*, 13: 269, 1984.
- [11] Mackay, P. et al.: *J. Med. Virol.*, 8: 237, 1981.
- [12] 黄耀煌等: 生物化学杂志, 1(3): 23, 1985.
- [13] Pasek, M. et al.: *Nature*, 282: 575, 1979.
- [14] Valenzuela, P. et al.: *Nature*, 281:646, 1979.
- [15] Yamada, E. et al.: *J. Gen. Virol.*, 64: 895, 1983.

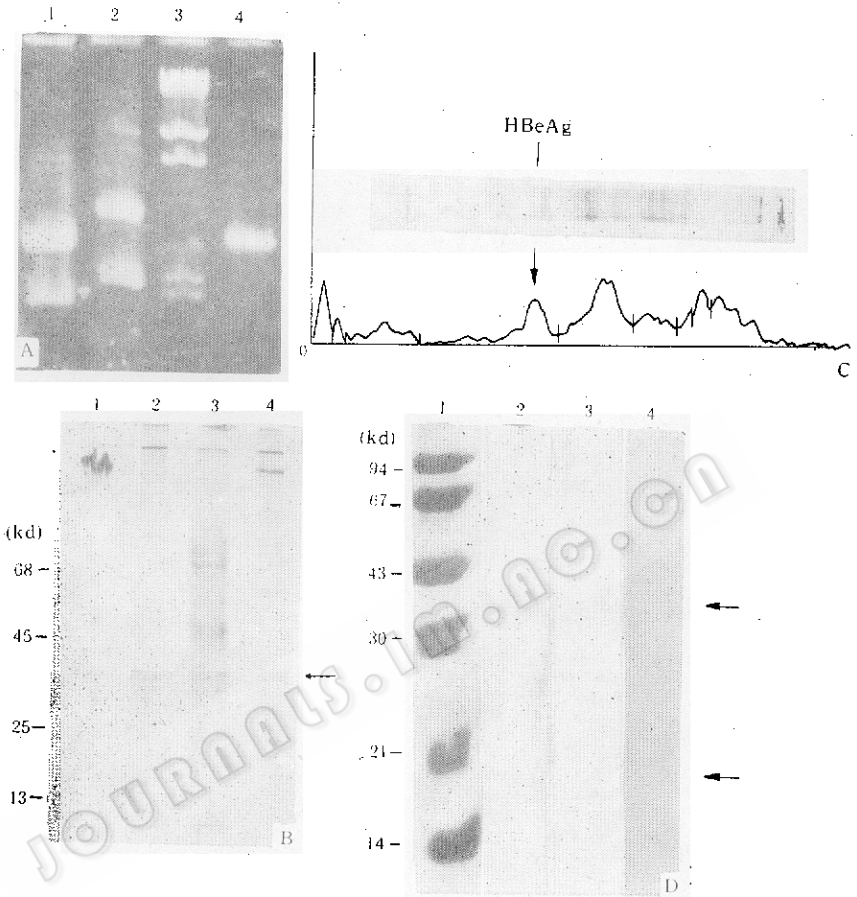
SYNTHESIS OF A RECOMBINANT DNA DERIVED HEPATITIS B VIRUS e ANTIGEN AND APPLICATION ON DIAGNOSIS

Wu Guanghui Huang Yaoxuan Ni Liping Duan Lingxun Jia Keming
(Institute of Hepatology, Beijing Army General Hospital, Beijing)

The HBeAg/anti-HBe system are now widely used in clinical and epidemiological study of hepatitis B. HBeAg is now considered to be coded by HBc gene. In this paper, fragment carrying HBc gene from adw₂ HBV DNA was digested with Bal31 and Hpa II, a series of fragments was produced and cloned to pUR222 and pUC18 vectors to construct various recombinant plasmids. After transforming to *E. coli* we selected the recombinants which direct the synthesis of HBeAg at high level in *E. coli*. The derived HBeAg was purified by chromatographing the crude extract through DEAE column and affinity chromatography column, the preparation obtained have been identified by electrophoresis, Western blot and immunochemical analysis. The recombinant HBeAg is useful in the development of the diagnostic agent for detecting anti-HBe and HBeAg.

Key words

DNA recombinant; HBeAg; gene expression



A. 重组质粒的酶切图谱 Restriction map of recombinant plasmid

1. Plasmid pUR222, 2. Recombinant plasmid pHW302, 3. Molecular weight markers, 4. pHW302 cutted with Bgl I

B. 菌产HBeAg及其免疫复合物的SDS-PAGE SDS-PAGE of *E. coli* derived HBeAg and its immunocomplex

1. Human anti-HBe IgG, 2. Lysate of *E. coli* derived HBeAg immunocomplex, 3. Crude extract of *E. coli* derived HBeAg, 4. Lysate of the immunocomplex of *E. coli* derived HBeAg and monoclonal anti-HBe IgG

C. 菌产HBeAg PAGE的紫外扫描 UV scanning of the PAGE of the crude extract of *E. coli* derived HBeAg

D. 菌产HBeAg的Western印迹 Western blot of *E. coli* derived HBeAg

1. Molecular weight markers, 2. rHBeAg + mouse monoclonal anti-HBe IgG, 3. rHBeAg + human anti-HBe IgG, 4. Normal mouse serum IgG

箭头指处为重组HBeAg的位置 Arrows indicate the position of rHBeAg