

HBV X基因在大肠杆菌中高效表达及 血清抗 X 抗体检测

童贻刚 黄耀焯 邬光惠

(北京军区总医院肝病研究所分子生物学研究室, 北京 100700)

本文分别用大肠杆菌(*E. coli*)的Lpp启动子和M13噬菌体的 gene I 启动子表达了分子量约为 17 kDa 的HBx蛋白, 并以抗合成X多肽抗血清和抗X融合蛋白抗血清对该重组蛋白进行了分析鉴定(用ELISA法和Western印迹法), 然后用重组X蛋白检测肝病病人血清中抗 X 抗体。我们采用一种改进的ELISA方法检测了 212 份血清标本, 结果表明: 肝硬化、慢活肝、肝癌、慢迁肝和急性乙型肝炎病人血清中抗X抗体阳性率分别为 49.3%、47.6%、37.8%、29.6%和40.0%, 高滴度的抗体主要存在于肝硬化和慢活肝病人血清中。

关键词 HBV X基因; 基因表达; 启动子; 抗HBx抗体

人乙型肝炎病毒(HBV)属于嗜肝DNA病毒科, 该科除HBV外, 还有鸭乙型肝炎病毒、地松鼠肝炎病毒和土拨鼠肝炎病毒。这几种肝炎病毒都有类似的基因组结构, 除鸭乙型肝炎病毒外, 均含有4个ORF, 即S、C、P和X, 这些病毒的ORF X的核苷酸序列有一定的保守性, 而且其蛋白质二级结构非常相似, 这些特点表明X基因对这类病毒有重要作用, 因此在进化过程中变异较小。

本文以分子生物学和临床免疫学相结合的手段, 在大肠杆菌中高效表达了X蛋白, 并以之作抗原, 检测了不同类型肝病病人血清中抗X抗体, 试图为临床研究HBV感染提供一些新的研究工具和有用的实验数据。

材料与方 法

(一) 菌种和质粒

E. coli JM 101 为本实验室保存的受体菌, 质粒pUC18为本室保存, 质粒pAT

01(含HBV adw2亚型全长DNA)为中国科学院提供^[1], 质粒pIN II C3为美国M. Inouye博士赠送^[2]。

(二) 抗血清

兔抗HBx多肽抗体, 系用美国 Feitel-son 博士赠送的合成X多肽 No.99和 No.101 分别制备的兔抗血清^[3], 兔抗X融合蛋白抗体为美国 Chen 博士所赠。

(三) 肝病病人血清标本

本所病房邓燕林等医生和临床免疫组鲍秋莉技师提供了肝癌、肝硬化、慢活肝、慢迁肝和急性肝炎病人血清标本。

(四) 重组 X蛋白的提取与纯化

200 ml 工程菌培养液经离心收集菌体, 以少量A液(150mmol/L Tris-HCl, pH 8.0, 1 mmol/L NaCl)洗涤, 然后用 12ml B液(33mmol/L Tris-HCl pH8.0, 0.67%蔗糖, 0.1mol/L EDTA, 1mg/ml 溶菌酶)悬浮, 37℃保温 30 min, 再加 12 ml C液(50mmol/L Tris-HCl pH8.0, 0.1% Triton X-100, 6.25 mmol/L

本文于1991年12月26日收到。

EDTA),先在 0 °C 处理 15min, 再在 37 °C 处理 30min, 超声破碎细胞后高速离心, 取沉淀部分用 12 ml 1mol/L 尿素悬浮, 37 °C 保温 30min, 高速离心去掉上清, 再次取沉淀部分用 12ml 7mol/L 尿素悬浮, 37 °C 处理 30min, 高速离心所得上清, 即为重组 X 蛋白的粗制品。以此粗制品进行 SDS-PAGE, 电泳结束后切下含重组 X 蛋白的凝胶, 研碎后以少量 50 mmol/L Tris-HCl (pH 8.0) 溶液浸泡, 置 4 °C 过夜, 离心去除凝胶, 即得到纯化的 X 蛋白溶液。

(五) 工程菌表达产物的检测

以上述粗制品 X 蛋白作一序列稀释后包被酶联板, 4 °C 过夜, 用 PBS/Tween 20 洗三次, 以 2 % BSA/PBS 封闭 (37 °C 保温 2h), 加兔抗 X 抗血清, 37 °C 保温 1.5 h, 再加酶标羊抗兔 IgG 抗体, 37 °C 保温 1 h, 洗板 5 次后加底物显色。以上第一、二抗体均用含 0.5 % BSA、5 % 细菌蛋白 (即 JM101/PIN II C3 的 7 mol/L 尿素抽提物) 的 PBS 稀释。

(六) 重组 X 蛋白的 Western 印迹分析

重组 X 蛋白粗制品经 SDS-PAGE 分离后, 转移至硝酸纤维膜上, 用 PBS/Tween 20 洗膜 3 次, 将膜置于含 2 % BSA 的 PBS 中, 4 °C 过夜, 然后将膜依次与兔抗 X 抗血清及酶标羊抗兔 IgG 反应 (抗体稀释液与 ELISA 法相同), 最后将膜放入 10 ml 底物溶液 (50 mmol/L Tris-HCl, pH 7.4, 0.03 % H₂O₂, 0.05 % DAB) 中显色。以上每步操作之后均需用 PBS/Tween 20 洗 3—5 次。

(七) 血清抗 X 抗体的 ELISA 检测

用 SDS-PAGE 纯化的 X 蛋白包被酶联板。再用含 3 种动物混合血清 (10 % 马血清, 5 % 牛血清, 5 % 羊血清) 的包被

液 (碳酸盐缓冲液 pH 9.0) 进行封闭 (4 °C 过夜), 洗板后加入 1:10 稀释的血清标本, 最后加入酶标羊抗人 IgG 抗体, 洗板后加底物显色。抗体稀释液为含 5 % 细菌蛋白和 3 种动物混合血清 (浓度同上) 的 PBS, 每块酶联板以正常人血清设 3 个阴性对照, OD 值大于阴性对照均值加 3 倍阴性对照标准差之和 (NCx + 3δ) 则为阳性, 否则为阴性。

结 果

(一) 重组质粒的构建

质粒 pAT01 (含全长 HBV DNA) 大小约为 14.6 kb, 每个细胞中拷贝数较少, 我们用 EcoRI 将该质粒上 HBV DNA (长 3.2 kb) 切下克隆到 pUC 18 上, 得到一质粒 pUV 76。为防止表达产物被宿主细胞降解, 我们选择 pIN II C3 作表达载体, 将 X 基因插于 Lpp 启动子及其信号肽下游, 这样表达产物将被分泌到细胞的周质空间或外膜, 这样得到的正向重组质粒即 pNX 34 (图版 I-A, B)。

为提高 X 蛋白的表达量, 并使之易于纯化, 我们又将噬菌体 M13 gene II 启动子及其 N 端 29 个氨基酸的编码序列插入 pNX 34 之 X 基因上游, 得到正向重组质粒 pNXM9 (图 1)。质粒 pNX34 和 pNXM9 重组部位基因结构如图 1。

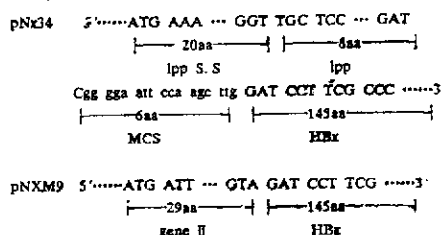


图 1 质粒 pNX34 和 pNXM9 重组部位基因结构
Fig.1 Nucleotide sequence of the recombinant region of plasmid pNX34 and pNXM9
SS: Signal sequence, MCS, Multiple cloning site

(二) 重组X蛋白的表达

将含有不同质粒的JM101菌体裂解液进行SDS-PAGE分析,与对照JM101/pIN II C3相比,工程菌JM101/pNX34和JM101/pNXM9均表达一条新的蛋白带(图版I-C, D),分子量约17—19kDa,薄层扫描分析表明,该带分别占各自菌体总蛋白的4%和20%左右。

(三) 重组X蛋白的分析鉴定

我们用ELISA法分析了高表达株JM101/pNXM9表达的X蛋白,为避免假阳性,我们在抗体稀释液中加入了适量的细菌蛋白,试验表明,该高表达株的X蛋白粗制品作1:5000稀释时仍有X抗原活性。我们又对表达产物进行了Western印迹分析,结果表明,在分子量约为19kDa处,工程菌株JM101/pNXM9显示出一条与抗X抗体呈阳性反应的蛋白带,而对照株无此带。

(四) 用重组蛋白检测肝病病人血清抗X抗体

用工程菌JM101/pNXM9表达的X蛋白粗制品进行SDS-PAGE,从胶上切下含X蛋白的凝胶,回收X蛋白,然后以此蛋白包被酶联板,用ELISA法检测了212份肝病病人血清中抗X抗体,结果见表1。根据P/N值高低可将阳性分为两类:一类是强阳性,其P/N值在4.0—10.0之间;另一类是弱阳性,其P/N值在2.0—4.0之间。强阳性主要存在于肝硬化和慢活肝病人中,总的阳性率也以这两种病人为高。

讨 论

就目前所发表的文献来看,大肠杆菌表达的HBx蛋白均以融合蛋白的形式存在,我们曾试图以非融合蛋白的形式来表达该蛋白,未获成功。后来改用分泌型表

表1 肝病病人血清中抗X抗体的检测
Table 1 Detection of anti-X antibodies in the sera of patients with liver diseases

Liver disease	Total No.	Negative No.	Positive						
			Weak* No.	Strong* No.	Total* No.				
LC*	69	35	50.7	22	31.9	12	17.4	3	49.3
CAH*	61	32	52.5	20	32.8	9	14.8	2	47.6
HCC*	45	28	62.2	15	33.3	3	4.4	17	37.8
CPH*	27	19	70.4	8	29.6	0	0	8	29.6
AH*	10	6	60.0	4	40.0	0	0	4	40.0
TOTAL	212	120		69		23		92	

* Positivity is divided into two groups, strong positivity and weak positivity.

* LC, liver cirrhosis, CAH, chronic active hepatitis, HCC, hepatocellular carcinoma, CPH, chronic persistent hepatitis, AH, acute hepatitis B.

达载体或以融合蛋白的形式均使X蛋白得到稳定的表达。在分泌表达时, lpp信号肽引导HBx序列穿过细菌内膜,进入周质空间或定位于外膜上,使之免受细菌内源蛋白酶的降解。用M13 gene II启动子表达时,X蛋白与M13蛋白II之N端29个氨基酸序列融合,这段来自噬菌体的序列可能对保护X蛋白起了主要作用。在检测表达产物时发现X蛋白活性仅存在于7 mol/L尿素抽提物中,而菌体裂解液上清无蛋白活性,这说明X蛋白可能是以包涵体的形式存在,这种存在方式也可能在一定程度上保护了X蛋白。

Chen等人^[4]首次用M13 gene II启动子高效表达了HBx蛋白,本文在不同条件下再次用该启动子高效表达了HBx蛋白,这说明该启动子确实是一个很强的启动子,可以在基因工程中推广应用。目前关于肝病病人肝组织和血清中X抗原/抗体的报道结果不大一致^[5-8],本文检测了部分肝病病人血清中抗X抗体,没有发现该项标记与其他HBV标记或肝

病类型有明显相关性。总之,肝病病人血清和肝组织中X抗原/抗体检测的临床意义还不十分清楚,这是一个值得进一步研究的课题。

参 考 文 献

- [1] Valenzuela, P. et al.: In: Field, B. et al (ed.) Animal virus genetics. Academic press, Inc. New York p. 57, 1980.
- [2] Masui, Y. et al.: In: M. Inouye (ed.) Experimental manipulation of gene expression. Academic press, Inc. New York p. 15, 1983.
- [3] Feitelson, M. A. et al.: *Hepatology*, 8(2):191, 1988.
- [4] Chen, M. L. et al.: *Gene* 62:318, 1988.
- [5] Wang, W. et al.: *Hepatology*, 14:29, 1991.
- [6] Katayama, K. et al.: *Gastroenterology*, 97:980, 1989.
- [7] Vitviski-Trepo, L. et al.: *Hepatology*, 12:1278, 1990.
- [8] Levrero, M. et al.: *Hepatology*, 13:143, 1991.

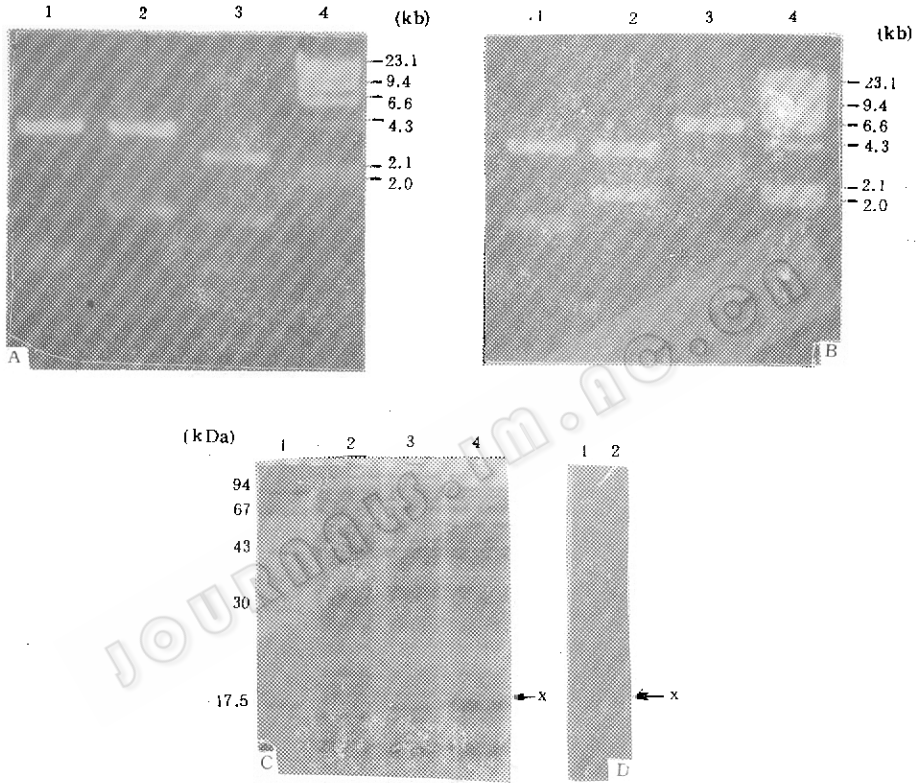
High Level Expression of HBV X Gene in *Escherichia coli* and Detection of Anti-HBx Antibodies in Sera of Patients with Liver Diseases

Tong Yigang Huang Yaoxuan Wu Guanghui

(Institute of Hepatology, General Hospital of Beijing Army, Beijing 100700)

HBV genome contains four open reading frames, that is ORF S, C, P and X. In this study, HBV X gene was cloned and expressed in *E. coli* using different vectors constructed with lpp and M13 gene II promoters. The X protein synthesized by *E. coli* was identified immunologically by ELISA and Western blot with anti-X antibodies elicited by synthetic X peptides and X fusion protein respectively. We then used the recombinant X protein to look for anti-X antibodies by ELISA in the sera of patients with liver diseases. A total of 212 serum samples were assayed. The positive rate in the patients with liver cirrhosis, chronic active hepatitis, hepatocellular carcinoma, chronic persistent hepatitis and acute hepatitis B were 49.3%, 47.6%, 37.8%, 29.6% and 40.0% respectively. Most of the anti-X antibodies with high titer were found in the sera of patients with liver cirrhosis and chronic active hepatitis.

Key words: HBV X gene; gene expression; promotor; anti-X antibody



A, B. Restriction analysis of plasmid pNX34 and pNXM9

- A. 1. pIN1 C3/BamH I
 2. pNX34/(BamH I + Bgl I)
 3. pUV76/(BamH I + Bgl I)
 4. λDNA/Hind III (Marker)
- B. 1. pNX34/(BamH I + Bgl I)
 2. pNXM9/(BamH I + Bgl I)
 3. M13/(BamH I + Bgl I)
 4. λ DNA/Hind III (Marker)

C, D. SDS-PAGE and Western blotting analysis of the HBx protein synthesized in E.coli

C. SDS-PAGE

1. Protein molecular weight marker; 2. JM101/pIN1 C3
 3. JM101/pNX34; 4. JM101/pNXM9

D. Western blotting

1. JM101/pIN1 C3; 2. JM101/pNXM9