

乙肝病毒核心抗原基因在大肠杆菌中的高表达

张林元 邓小昭 何亮 张志敏

(华东医学研究所分子遗传室, 南京 210002)

关键词 乙肝核心抗原; 乙肝核心抗原基因; 基因克隆; 基因表达

乙肝核心抗原在大肠杆菌表达由 Michael Nassal 完成, 国内马贤凯等人成功地使乙肝核心抗原在 Lac 启动子控制下高表达。本文使乙肝核心抗原基因在 P_LP_R 启动子控制下, 用温敏法诱导产生 HBcAg, 该菌株能稳定地高表达。可以代替肝提取的 HBcAg, 菌产 HBcAg 经过冻干有效期达 2~3 年, 已用于检测乙肝核心抗体的试剂盒。

1 材料和方法

1.1 材料 限制性酶、外切酶 BAL 31, T₄ DNA Ligase 均为 New England Biolabs 产品, EcoRI Linker, dNTP DNA Polymerase I L. F 为 Boehringer 公司产品; 低熔点琼脂糖购自 BRI; 蛋白胨, 酵母粉为 Oxoid 公司产品; 溶菌酶为 Sigma 产品。

菌株和质粒: 带全长乙肝病毒基因组的重组质粒为本室构建。JM 103 为 Pharmacia LKB 公司的。pJLA 502 为复旦大学遗传所赠。细菌 LB 培养基: 10 g 蛋白胨, 5 g NaCl, 加水至 1000 ml, 调 pH 至 7.2, 高压灭菌待用。固体培养基在 LB 培养基中加 1.2% 的日本琼脂粉。

1.2 质粒 DNA 的提纯及重组 DNA 的方法

对质粒 DNA 提纯均用 LB 培养基培养 12~16 h, 碱变性法粗提质粒 DNA, 再用 Beckman XL-80 超高速离心机 45000 r/min, 20℃, 离心 40 h, 在紫外灯下侧面穿刺, 抽取质粒

带, 用正丁醇去 EB, 透析去 CsCl₂, 回收 DNA 片段, 用 BAL 31 消化, 分别终止, 取样, 用酚去酶, 乙醇沉淀, 加 dNTP、DNA Polymerase I (L. F)、磷酸化的 EcoRI Linker, 用 EcoRI 消化, 再与同酶消化的 pJLA502 质粒连接, 钙离子法转化到 JM 103, Ap 平板上选出白菌落, 快速鉴定并用 ELISA 法检测 HBcAg, 选出高表达的工程菌。

1.3 重组质粒 DNA 的鉴定 挑取 AP^r 的菌落接种到 5 ml 种子管, 加 20 μg/ml 的 AP, 30℃ 振荡培养过夜, 取 1.5 ml, 4℃, 14000 r/min 离心 5 min, 去上清, 加 ST 0.1 ml (25% 蔗糖, 50 mmol/L Tris-HCl, pH 8.0), 加 2% SDS 0.1 ml, 0.2 mol/L NaOH, 10 min 后加 3 mol/L KAc 0.1 ml, pH 4.8, 混匀, -20℃ 置 20 min, 14000 r/min 4℃ 离心 10 min, 加二倍体积的 95% 乙醇, -20℃ 置 20 min, 离心, 沉淀电泳鉴定。

1.4 工程菌 pZD 8703 表达产品的检测 用 ELISA 双抗体夹心法测定表达产物 HBcAg 的滴度, 先用纯化的抗 HBc IgG 包被聚乙烯 40 孔板, 然后加倍比稀释的经超声破碎的培养菌液, 43℃ 孵育 1 h 后洗板, 加底物邻苯二胺-H₂O₂ 系统显色, 以带原质粒的受体菌液经超声破碎作阴性对照, 以尸肝的 HBcAg 作阳性对照, 以 PIN ≥ 2 的为阳性。

1.5 免疫电镜观察乙肝核心抗原颗粒 方法同一般文献, 放大 1 万倍。

收稿日期 1992-07-15

2 结果与讨论

2.1 重组质粒的构建 见图 1。

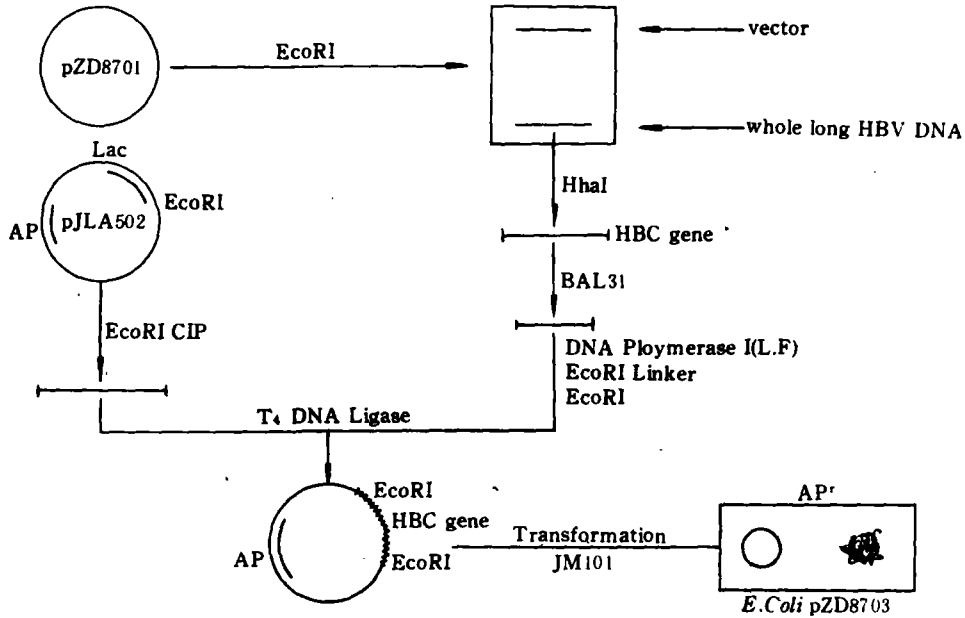
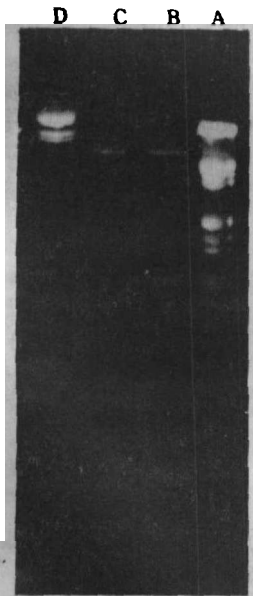


Fig 1. Construction of recombinant plasmid

2.2 重组质粒 DNA 电泳分析 见图 2。



- A. λDNA + Hind III + EcoRI
- B. pZD8703 + EcoRI
- C. pJLA502 + EcoRI
- D. pZD8703

Fig 2. Agarose gel electrophoresis of recombinant plasmid

从图中可以看出 pJLA502 用 EcoRI 消化成一条线,而重组质粒 pZD8703 用 EcoRI 酶消化

平行的一条带,另一条较小的为 HBcAg 编码的基因片段。

2.3 电子显微镜观察 结果表明基因工程菌生产的 HBcAg 和从人的尸肝提取的 HBcAg 都有相似的颗粒形态。

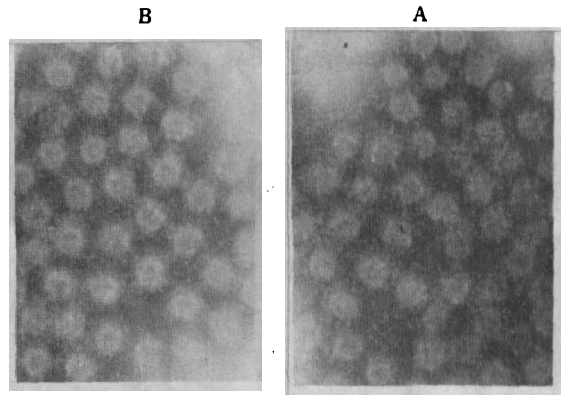


Fig 3. Electro micrograph of HBcAg partical

- A. HBcAg produced by *E. coli* pZD 8703
- B. HBcAg extracted from dead body liver

2.4 ELISA 测定工程菌产生的 HBcAg 滴度 结果见图 4。

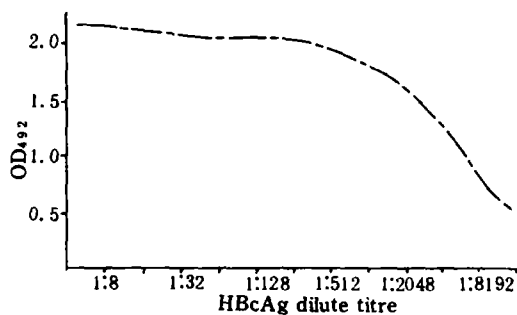


Fig 4. Titre of HBcAg produced *E. coli* pZD 8703

图中所示结果,菌产 HBcAg 的终滴度在 1 : 16384 以上, OD₄₉₅ 大于 1.0 的最高稀释度为 1 : 4096。

可以看出编码乙肝核心抗原的基因经修饰、重组到高表达的 P_LP_R 启动子控制下的

pJLA 502 质粒上,筛选出高表达的重重组体 *E. coli* pZD 8703,其原液经超声破碎,用 ELISA 法测定 HBcAg 的稀释度高达 1 : 16384,工作滴度 1 : 4096。电镜及血清学鉴定其 HBcAg 与肝中提取的 HBcAg 相同。菌产的 HBcAg 已作发酵罐生产,其冻干制剂经国内 10 多家医院应用,效果良好。

参考文献

- 1 Michael Nassaal. Total chemical syntesis of a gene for hepatitis B virus core protein and its functional characterization. *Gene*, 1983, (66):279
- 2 左平,马贤凯. 乙型肝炎病毒核心抗株高表达质粒的构建. *生物化学杂志*, 1985, (1), 47
- 3 Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T. *Molecular Cloning, A Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1982

High Expression of Hepatitis B Core Gene in *E. coli*

Zhang Linyuan, Deng Xiaozhao, He Liang, Zhang Zhiming

Huadong Medical Research Institute, Nanjing 210002

HBc gene was isolated from whole long HBV DNA and digested with nuclease BAL 31, and then dNTP, DNA polymerase I(L. F), phosphorylated EcoRI linker were added. The HBc DNA was digested by EcoRI and was then inserted into the EcoRI site of pJLA502 plasmid. Recombination DNA was then transformed into *E. coli* JM 103. High expression recombinant was selected and named *E. coli* pJLA502 detected by argrose gel electrophoresis. The HBcAg produced by recombinant and extracted by dead body liver was determined with ELISA and observed with electro micrograph. The HBcAg was very specific and may be used in clinical detecting kit.

Key words HBcAg; HBcAg gene; Gene cloning; Gene expression