

λ噬菌体 P_L 启动子控制的乙型肝炎病毒核心抗原基因在大肠杆菌中的表达

马清钧 于秀琴 周建光 熊凌霜 马贤凯

(军事医学科学院基础医学研究所,北京)

从 pMM206, pPLa2311 构成杂交质粒 pMM-HBC83, 使乙型肝炎病毒核心抗原基因在 P_L 启动子控制下, 在大肠杆菌中能高效表达, 对数生长期细菌合成核心抗原的能力较静止期高, 诱导前更换新鲜培养基能提高产量。

关键词 启动子;乙型肝炎;大肠杆菌

应用乙型肝炎核心抗原(HBcAg)对其相应的抗体(抗-HBc)及抗-HBcIgM 的检测,对乙型肝炎的临床诊断、分型、流行病学调查以及对乙肝疫苗完全性鉴定等都具有重要意义,但因 HBcAg 来自乙型肝炎病人的尸肝或富含 Dane 颗粒的病人血清中,因此来源困难,不能大量生产。1981年以来,国外报导了应用基因工程技术在大肠杆菌中合成 HBcAg 来检测抗-HBc,取得较好结果^[1-3]。我们实验室于1982年构建了 adw 亚型 HBV 无性繁殖系^[4]。随后采用 bla 启动子使 HBcAg 在大肠杆菌中获得表达,以这种抗原用 ELISA 方法检测乙型肝炎病人血清中抗-HBcIgM,获得比较满意的效果^[5]。在此基础上,应用基因工程技术构建更高表达 HBcAg 的工程菌株,本文报告采用 λ噬菌体 P_L 启动子,使 HBcAg 基因在大肠杆菌中表达。

材料和方法

(一) 材料

RR1 (pMM206) 为本实验室构建的 HBcAg 基因克隆的大肠杆菌菌株,能表达 HBcAg^[4]。pPLa2311 系带有 λ噬菌体 P_L 启动子的质粒,3.8 kb, Ap^r, Km^r。K12ΔH1Δtrp 系带有 λ噬菌体

温敏抑制基因 CI 的大肠杆菌。

*Pst*I 限制酶, T4 DNA 连接酶, 脱氧核糖核酸酶 I, DNA 多聚酶 I 均为 BRL 公司产品。

(二) 方法

质粒提取, *Pst*I 限制酶酶解, DNA 体外连接和转化, 质粒快速鉴定, 菌落杂交, 琼脂糖凝胶电泳分子杂交均按文献^[1]进行。HBcAg 表达菌落的检测, HBcAg 的 ELISA 检测按文献^[2]进行。

结 果

(一) 表达 HBcAg 质粒的构建和转化

将表达 HBcAg 的 pMM206 菌株之表达质粒, 用限制性内切酶 *Pst*I 酶解后, 以琼脂糖凝胶电泳分离, 将其含有 HBcAg 基因的 1.85kb 酶解片段, 经电泳洗脱, 酚抽提和乙醇沉淀。载体质粒 pPLa 2311 DNA 用 *Pst*I 酶解切开, 经酚抽提, 乙醇沉淀。然后取 *Pst*I 酶切的 HBcDNA 片段和 pPLa2311 DNA 各 200ng, 用 1.5 单位 T4 连接酶, 在连接反应条件下于 10℃

本文于 1985 年 1 月 28 日收到。

本工作承黄翠芬教授指导, 赵立权同志进行电镜观察和摄影, 王光荣同志提供纯核心抗原血清, 特此致谢。

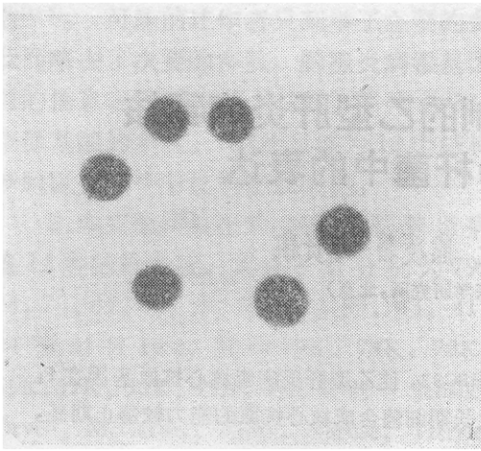


图1 含有 HBcAg 基因转化子的菌落原位杂交的放射自显影

Fig. 1 Radioautography of *in situ* colony hybridization of transformants containing HBcAg gene

24 小时进行连接, 转化致大肠杆菌 K12ΔH1Δtrp 菌株, 在卡那霉素 (Km) 固体培养基皿上获得 121 个转化菌落。

(二) 表达 HBcAg 菌株的筛选

从 121 个 Km^r 转化菌株中, 进行青霉素敏感试验, 挑出对其敏感的 (AP^s), 即 *Pst*I 位点上呈插入重组的转化菌, 然后进行菌落原位杂交 (图 1), 琼脂糖凝胶电泳分子杂交 (图 2), 菌落原位固相免疫及 ELISA 检测, 筛选出 6 个能表达 HBcAg 的菌落, 经过传代, 均能稳定地表达 HBcAg, 以 pMM-HBc83 号表达较好。

(三) pMM-HBc83 表达 HBcAg 的检测

pMM83 号菌培养于肉汤培养基增殖后, 离心收集菌体, 悬于 1/10 原体积的

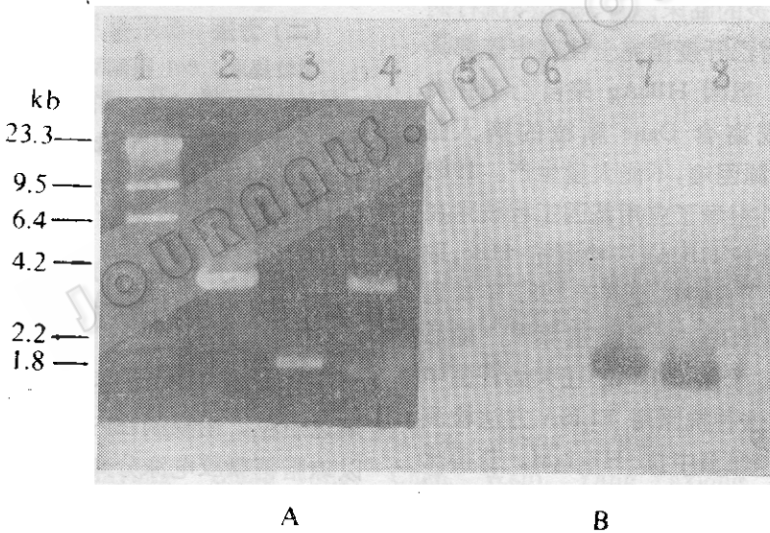


图2 pMM-HBc83 DNA 的电泳分析

- A. EB 染色
 B. 同一样本用 [α^{32} P] HBV DNA 杂交的结果
 1, 5. *Hind*III 酶解的 λ DNA 作为分子量标记
 2, 6. *Pst*I 酶解的 pPla2311 DNA
 3, 7. 从 pMM206 分离的 HBcAg DNA
 4, 8. *Pst*I 酶解的 pMM83 重组质粒 DNA

Fig. 2 Gel electrophoresis of pMM-HBc 83 DNA and its Southern autoradiogram

- A. Ethidium Bromide Stain
 B. The same sample hybridized with [α^{32} P] HBV DNA
 1, 5. *Hind*III-digested λ DNA as marker
 2, 6. *Pst*I-digested pPla2311 DNA
 3, 7. HBcAg DNA isolated from pM206
 4, 8. *Pst*I-digested recombinant plasmid DNA of pMM-HBc 83

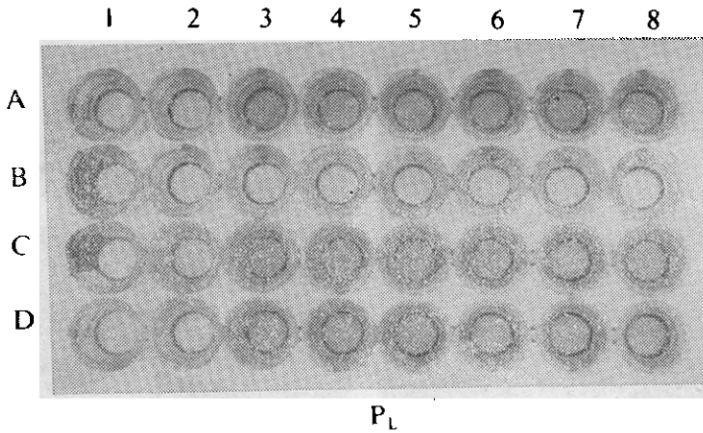


图 3 ELISA 测定细菌合成的 HBcAg
 A, C. 用夹心法测定
 B. 加抗-HBc 血清的阻断试验
 D. 加正常人血清的阻断试验
 1. 空白对照 2. 含 pPLa2311 的受体菌
 3-8. 表达 HBcAg 的菌株

Fig. 3 ELISA test for HBcAg antigen synthesized by bacteria
 A, C. Detecting of HBcAg with sandwich method
 B. Inhibitory test with anti-HBc serum
 D. Inhibitory test with human serum
 1. Control
 2. Recipient strain containing pPLa2311
 3-8. The strains of expressing HBcAg

25% 蔗糖, 50mM Tris-HCl (pH7.5)、0.12 mM EDTA (PH7.5) 的缓冲液中, 经裂解离心取上清即为 HBcAg 的提取物, 对

HBcAg 进行了免疫学检测。

1. ELISA 测定: 用双抗体夹心法测定细菌 HBcAg 的提取物, 结果为阳性, 作

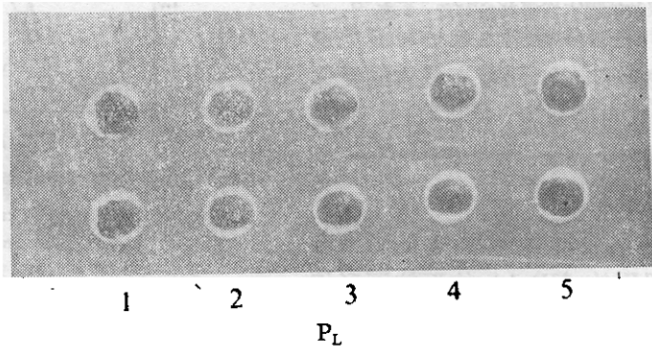


图 4 对流免疫电泳对特异的 HBcAg 的分析
 1, 5. 含 pPLa2311 受体菌的提取物
 2, 3. pMM-HBc83 的细菌提取物
 4. 由人肝提取的 HBcAg

Fig. 4 Counter immuno-electrophoresis for specific HBcAg
 1, 5. Bacterial extract from K12 Δ H1 Δ trp containing pPLa2311
 2, 3. Bacterial extract from pMM-HBc 83
 4. HBcAg extracted from human liver

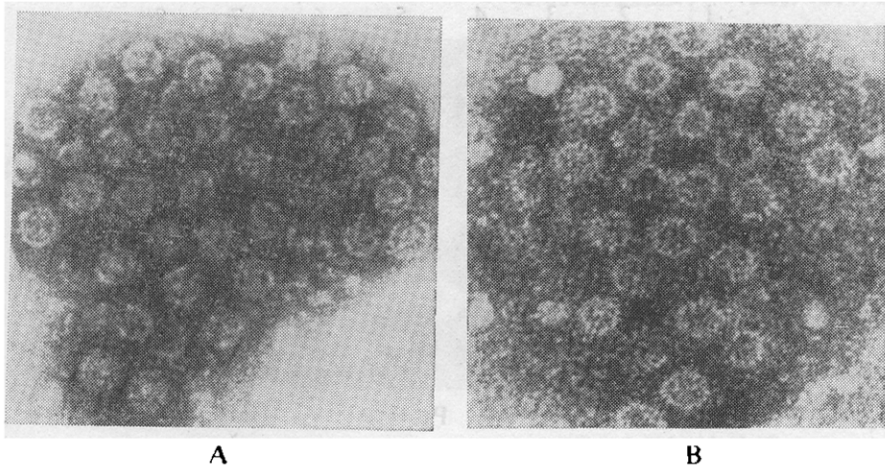


图5 pMM-HBc83 和肝脏的 HBcAg 颗粒的免疫电镜照片

A. pMM83×184,000

B. 人肝脏×184,000

Fig. 5 Electron micrography of spherical HBcAg particles

A. From clone pMM83×184,000

B. From human liver×184,000

为对照的含 pPLa 2311 质粒受体菌为阴性(图 3)。如在提取物标本中光加入含抗-HBc 的人血清进行阻断试验,测定结果转为阴性,而加入正常人血清仍为阳性(图 3),表明 HBcAg 的反应是特异的。

2. 对流免疫电泳测定: 将细菌的 HBcAg 提取物和乙型肝炎病人的 HBcAg 与抗-HBc 血清,在 1% 琼脂上进行对流免疫电泳,出现免疫沉淀线,而带有载体的受体菌,经同法裂解的提取物,与抗-HBc 血清不产生沉淀线(图 4)。

3. 免疫电镜观察:

结果见图 5,显示有 HBcAg 的凝聚颗粒,与肝脏提取的 HBcAg 的颗粒图形相似。

(四) pMM-HBc83 合成 HBcAg 蛋白条件的观察

1. 菌龄对合成 HBcAg 蛋白的影响: 在测定 pMM-HBc 83 菌株生长曲线(图 6)基础上,比较了不同生长期的细菌,对 HBcAg 蛋白合成的影响,将对数早期(A

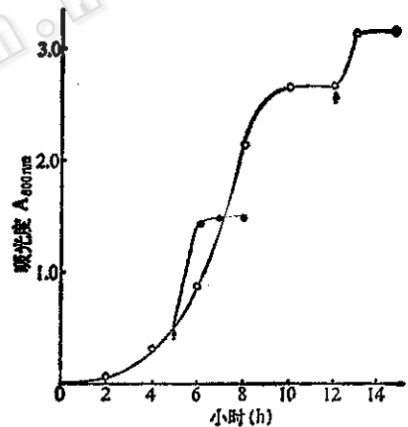


图 6 83 号菌生长曲线

Fig. 6 The growth curve of pMM-83 strain
↑ 42°C 诱导 Induction at 42°C

— 0.5—0.6, 7—8 × 10⁸ 细菌/ml)与静止期(A = 2.5—2.6)细胞经 42°C 诱导 1 小时后,对其合成的 HBcAg,采用 ELISA 双抗体夹心法进行测定,以吸光度 A 代表其抗原蛋白量,显示经诱导后对数早期的细菌数,较静止期要少一倍,而合成抗原蛋白量且提高 75%(图 7)。

2. 诱导不同时间对 HBcAg 蛋白合成

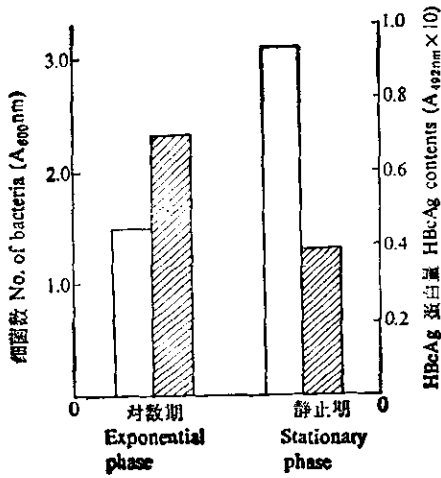


图7 不同菌龄细菌合成 HBc 抗原蛋白的比较
Fig. 7 Comparison of synthesizing HBcAg contents by bacteria of different growth phase

□ 细菌数
▨ HBcAg 蛋白量
No. of bacteria
HBcAg contents

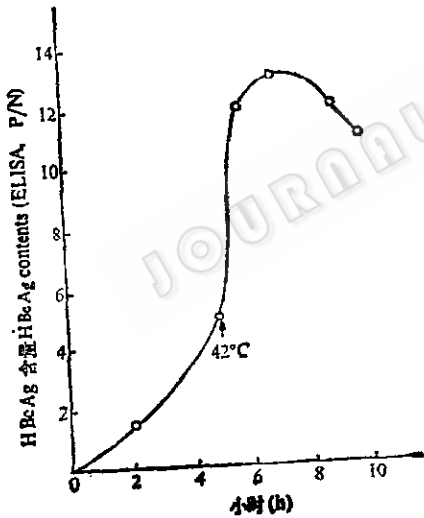


图8 83号菌合成 HBcAg 的增长曲线
Fig. 8 Incremental curve of HBcAg synthesized by pMM 83

的影响: 将 pMM-HBc83 菌株培养于肉汤培养基, 分别在生长 2 小时、5 小时, 在 42°C 诱导后 0.5、1、2、3、4、5 小时之培养物, 测定 HBcAg 的含量, 结果(图8)显示, 经 42°C 诱导 0.5 小时, 合成量即急剧上升, 诱导 1—3 小时达高峰, 4 小时后开始下

降。

3. 诱导前更换培养基对 HBcAg 蛋白合成的影响: 将对数早期细菌培养物, 离心收集菌体, 悬于加有 0.5% 葡萄糖和 0.005% 色氨酸的新鲜肉汤培养基, 42°C 振荡诱导 1 小时后, 应用 ELISA 对其合成 HBcAg 量进行检测, 结果(表 1)可见更换培养基可以提高合成抗原量约 50%。

表 1 更换培养基对 HBc 抗原蛋白合成的影响

Table 1 The influence of changing fresh media on the HBcAg synthesis

酶联分析 ELISA	不更换培养基 No changing	更换培养基 Changing
A_{492nm}	0.66	0.95
P/N	16	24

比较了不同生长期的细菌培养物, 更换培养基后诱导不同时间, 对产生 HBcAg 量的效果(表 2)。对数早期细菌经诱导后明显提高其抗原产量, 诱导 1—3 小时无明显差别, 而静止期细菌经诱导后未能提高其抗原产量, 随诱导时间的延长产生抗原量反而下降。

表 2 更换培养基对不同菌龄培养物合成 HBcAg 蛋白量(酶联分析 P/N 值)的比较

Table 2 The effect of replacing media on the synthesis of HBcAg by using different phase cultures

	对数期 Exponential Phase	静止期 Stationary Phase
诱导前 Before Induction	94 ± 19	52 ± 2
诱导 Induction		
1 小时(h)	224 ± 21	47 ± 9
2 小时(h)	212 ± 31	34 ± 7
3 小时(h)	232 ± 35	35 ± 8

(五) pMM-HBc83 与 pMM206 菌株 HBcAg 蛋白产量的比较

将 pMM-HBc83 与 pMM206 菌株, 按

其最适条件,分别培养于 50ml 肉汤培养基中, pMM-HBc83 培养 5 小时经 42℃ 诱导 2 小时、pMM206 培养 18 小时后收集菌体,应用 ELISA 测定其提取物的 HBcAg 蛋白产量,结果列于表 3,可见 pMM-HBc83 的抗原蛋白产量为 pMM206 的 2.7 倍,培养周期缩短 11 小时。

表 3 pMM-HBc 83 与 pMM 206 菌株 HBcAg 蛋白产量(酶联分析, P/N 值)的比较

Table 3 Comparison of HBcAg productivity between pMM-HBc83 and pMM206

实验 Experiment	pMM83	pMM206
I-1	56	18
I-2	50	19
I-3	44	23
II-1	164	48
II-2	144	66
II-3	160	56
平均 Average	103	38

(六) 化学裂解与超声破碎菌体效果的比较

构建的基因工程菌株,合成的功能蛋

表 4 化学裂解与超声破碎菌体效果(酶联分析 P/N 值)的比较

Table 4 Comparison of ultrasonics and chemicals to disrupt the bacteria cells

试验 Experiment	超声破碎 Ultrasonics	化学破碎 Chemical disruption
1	24	28
2	30	26
3	40	44
4	28	33
5	25	24
6	30	20
7	10	16
8	13	16
9	14	12
平均 Average	23	24

白不属分泌蛋白时,均需破碎菌体提取,通常用超声波进行,但破碎大量菌体时,除特殊情况外,我们应用 0.1% 溶菌酶和 0.2%

的 NP40 化学裂解法,也取得了同样的效果(表 4)。并观察了化学裂解提取的 HBcAg 蛋白的稳定性,保存在 -20℃ 四周未发现活性下降。

讨 论

噬菌体 P_L 启动子是一个较强的启动子^[6-7]。我们成功地构建了 P_L-HBc 重组质粒,并转化到大肠杆菌,使其能合成 HBcAg 蛋白,其产量为 pMM206 菌株的 2.7 倍。

采用对数早期的细菌,生产的 HBcAg 抗原量较静止期为高。说明产生抗原蛋白不完全与菌量相平行,还与每个细菌合成能力及宿主菌的蛋白酶对合成的 HBcAg 蛋白水解有关。采用对数早期细菌,可缩短培养周期,在生产中有其实用价值。细菌培养物诱导前如更换新鲜培养基,则能提高抗原蛋白的产量,表明应用发酵罐培养时,采用连续培养是可取的。

现构建的 pMM-HBc83 克隆,没有对其 SD 序列与 HBcAg 基因转译起始信号之间的核苷酸距离进行调节,根据调节最适距离获得高效表达的实例^[8-10],在此基础上进行调节改建,将能选择到更高效表达 HBcAg 的菌株。

参 考 文 献

- [1] 马潜钧等: 生物化学杂志, 1: 28, 1985。
- [2] 马贤凯等: 上海免疫学杂志, 4: 129, 1984。
- [3] Peutherer, J. F. et al.: *Med. Lab. Sci.*, 38: 355, 1981。
- [4] Stahl, S. et al.: *PNAS*, 79: 1606, 1982。
- [5] Roggendorf, M. et al.: *J. Virol. Meth.*, 6: 61, 1983。
- [6] Remant, E. et al.: *Gene*, 15: 81, 1981。
- [7] Remant, E. et al.: *Nucl. Acids. Res.*, 11: 4677, 1983。
- [8] Backman, K., and M. Ptashne: *Cell*, 13: 65, 1978。
- [9] Roberts, T. M. et al.: *Cell*, 20: 543, 1980。
- [10] Taniguchi, T. et al.: *PNAS, USA*, 77: 5230, 1980。

EXPRESSION OF HEPATITIS B VIRUS CORE ANTIGEN GENE IN *E. COLI* CONTROLLED BY THE P_L PROMOTER OF COLIPHAGE LAMBDA

Ma Qingjun Yu Xiuqin Zhou Jianguang Xiong Lingshuang Ma Xiankai
(Institute of Basic Medical Science, Academy of Military Medical Sciences, Beijing)

A new hybrid plasmid has been constructed from pM206 and pPla2311. This makes use of the leftward promoter (P_L) of phage λ to provide higher expression of HBcAg gene in *Escherichia coli*. The synthesized HBcAg by bacteria of exponential growth phase is higher than that of

stationary growth phase. The yields of HBcAg can be increased by changing fresh media before induction at 42°C.

Key words

Promoter; Hepatitis B; *E. coli*