

乙型肝炎病毒 ayw 亚型基因在大肠 杆菌细胞中的克隆与表达*

齐义鹏 黄永秀 王 兵*

(武汉大学病毒学系, 武昌)

林胜清

(湖北医学院附属第一医院, 武昌)

提 要

将克隆的乙型肝炎病毒 (HBV) ayw 亚型基因组 DNA 插入到质粒 pBR322 的 EcoRI 位点, 经 DNA 分子杂交和限制性酶切分析表明, 阳性重组体含有 HBV DNA, 方向为 5' 末端近 BamHI 位点, 在大肠杆菌细胞中, 插入片段能表达 HBcAg 和 HBeAg 及微量的 HBsAg。

乙型肝炎是人类的严重传染病, 对乙型肝炎病毒 (HBV) 的研究受到许多国家的高度重视。国内从 1983 年^[1] 就开始了 HBV 基因工程的研究工作, 陆续在大肠杆菌 (*E. coli*)^[2]、酵母^[3] 和哺乳动物细胞^[4] 中表达了 HBV 抗原。一般认为^[5], 在大肠杆菌中表达的 HBsAg 不稳定, 不能装配成 22nm 的颗粒; HBcAg 和 HBeAg 的表达已有不少报道^[6,7]。我们在利用昆虫杆状病毒作运载体、昆虫细胞作表达系统, 试图表达乙肝病毒抗原的过程中, 将克隆的 HBV 基因组与质粒 pBR322 进行亚克隆, 在 *E. coli* 细胞中发现了乙肝病毒抗原基因的表达。

材料与 方法

材料 我们以胡裕文 副研究员赠送的 HBV DNA 克隆与质粒 pBR322 在 EcoRI 位点连接, 转化 *E. coli* HB101 菌株, 用 Dot blot 和 Southern blot 杂交筛选阳性重组体。用 BamHI 消化重组质粒, 经琼脂糖凝胶电泳, 确定 HBV DNA 片段的插入方向。

方法 挑取阳性重组菌落, 在 LB (蛋白胨 1%, 酵母膏 1%, NaCl 0.5%) 液体中培养, 收集细胞, 进行 SDS-聚丙烯酰胺凝胶 (PAGE) 电泳和凝胶扫描, 观察表达的蛋白质带。用溶菌酶裂解法和化学裂解法^[8] 破碎细胞, 以 ELISA 检测细胞裂解液中和

本文于 1987 年 7 月 14 日收到

*国家自然科学基金资助的课题

*湖北老年医学研究所进修生

培养上清液中的 HBV 抗原, 根据细胞裂解原液计算, 最终稀释比为 1 : 225 (溶菌酶裂解法) 和 1 : 300 (化学裂解法)。

结 果

一、HBV DNA 的亚克隆与筛选

在含氨苄青霉素 (AP) 20 ug/ml 的 LB 平板上得到转化菌落 466 个, 以 Dot blot 杂交法筛选到阳性重组体 6 个。用 EcoRI 消化阳性重组体 pHB18 DNA, 在琼脂糖凝胶上呈现 4.3kb 的质粒 DNA 和 3.2kb 的 HBV DNA。根据 Dot blot 结果, 选用阳性重组体 pHB31 DNA 制备放射性探针, 以 Southern blot 法与上述 pHB18 DNA 的 EcoRI 片段杂交, 结果发现, pHB18 显示 HBV DNA 和质粒 DNA 两条杂交带; 阴性转化体只有一条质粒 DNA 杂交带。进一步证实了 HBV 基因组 DNA 插进了 pBR322 的 EcoRI 位点之中 (图 1)。

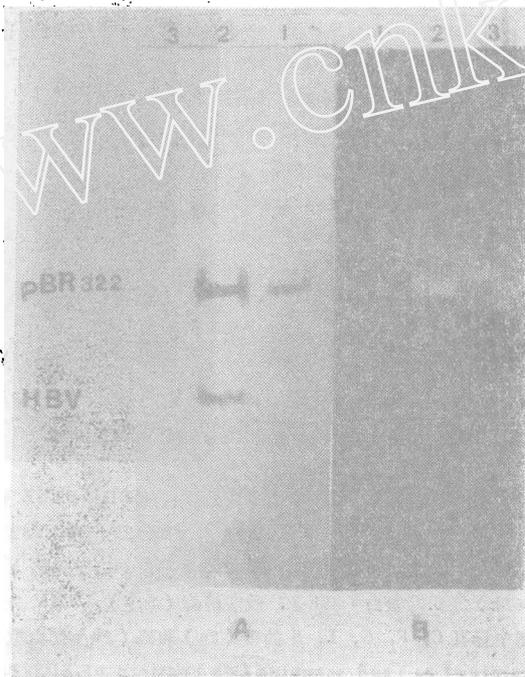


图 1 阳性重组体 pHB18 的限制性消化 (1b, EB 染色) 和 Southern 转膜杂交, (1a, 放射自显影)。另一个阳性重组体 pHB31 作为 ^{32}P 探针。1. 阴性重组体显示一条质粒 DNA 带, 2. 阳性重组体显示质粒和 HBV 两条带, 3. 以 EcoRI/HindIII 消化的 λ DNA, 不能和探针杂交

Figure 1, Restriction digestion (1b, stain by EB) and Southern blot hybridization (1a, by autoradiograph) of positive recombinant pHB18. Other recombinant pHB31 is as probe. 1, Negative transformant showing only plasmid DNA band, 2, Positive recombinant pHB18 showing two bands of plasmid and HBV DNA; 3, λ DNA digested by EcoRI/HindIII was not hybridized with probe DNA.

二、HBV DNA 片段的插入方向

用 BamHI 消化重组质粒 pHB43 DNA, 得到 A (4.6kb), B (2.2kb) 和 C (1.0kb) 等三条带(图 2)。其中 A 片段是质粒 3.93kb (BamHI-EcoRI 大片段) 和 HBV DNA 的 0.52kb (BamHI-EcoRI 3' 末端小片段) 之和; B 片段是由质粒 DNA 0.37kb (BamHI-EcoRI 小片段) 和 HBV DNA 1.79kb (BamHI-EcoRI 5' 末端大片段) 构成的。结果说明, HBV DNA 在 pBR322 的 EcoRI 位点插入时, 其 3' 末端 (0.52 kb BamHI 片段) 连接在质粒氨基青霉素酶基团一端, 5' 末端 (BamHI 1.79 kb 片段) 连接在质粒抗四环素基因一端 (图 2)。

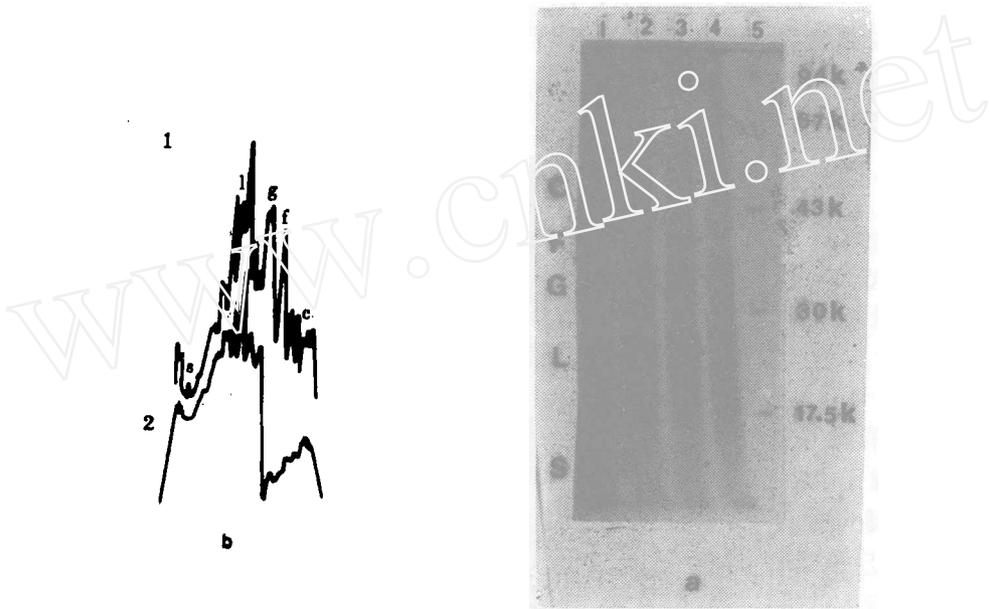


图2 重组质粒和 pBR322 在 *E. coli* 细胞中表达蛋白的 SDS-PAGE 染色图谱 (2a) 和扫描图谱 (2b)。2a1, 2a4 和 3b2 由 pBR322 产生; 2a2 和 2b1, 由 pHB43 产生; 2a3, 由 pHB18 产生, 2a5, 标准蛋白: 磷酸化酶 b (94k), 卵清蛋白 (67k), 肌动蛋白 (43k), 碳酸酐酶 (30k), TMV 外壳蛋白 (17.5k)。图中标有 C, F, G, L, S 的带 (2a) 和峰 (2b) 仅由重组质粒产生。
Figure 2, Staining (2a) and scanning (2b) pattern of SDS-PAGE with proteins expressed by recombinants and pBR322 DNAs in *E. coli* cells. 2a1, 2a4 and 2b2, by pBR322; 2a2 and 2b1, by pHB43; 2a3, by pHB18; 2a5, Markers for molecular weight; phosphorylase b (94k), albumin, (67k), actin, (43k), carbonic anhydrase, (30k), TMV outer coat protein, (17.5k) The bands or peaks, C, F, G, L, S are produced only by positive recombinant but not by pBR322.

三、HBV 基因在 *E. coli* 细胞中的表达

从 SDS-PAGE 图谱 (图 3a) 和凝胶扫描图谱 (图 3b) 看出。阳性重组体 pHB43

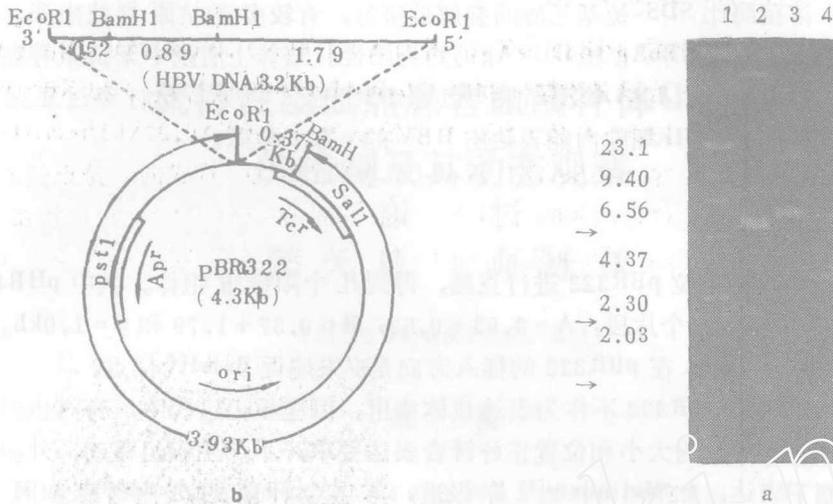


图3 重组质粒 pHB43 的限制性消化 (3a) 及 HBV DNA 片段在 pBR322 中的克隆方向 (3b)。3a1, HindIII 消化的 λDNA, 3a2, BamHI 消化的 pHB43 DNA 片段 (箭头); 3a3, 未消化的 pHB43 DNA, 3a4, 未消化的 pBR322 DNA, 3b 显示, HBV DNA 以 3'→5' 方向插入 pBR322 的 EcoRI 位点。

Figure 3, Restriction digestion of recombinant pHB43 DNA (3a) and orientation of HBV DNA fragment inserted into pBR322 (3b): 3a1, λ DNA digested by HindIII; 3a2, pHB43 DNA digested by BamHI (arrows for three bands); 3a3, pHB43 DNA; 3a4 pBR322 DNA. The orientation of HBV DNA fragment with 3'→5' inserted into pBR322 at EcoRI site is shown in 3b.

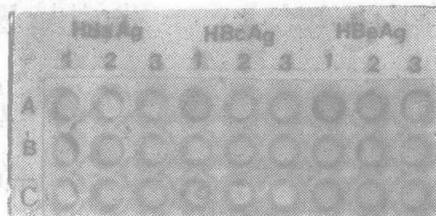


图4 重组质粒 pHB43 表达抗原的 ELISA 反应。A1, 溶菌酶破壁的 pHB43; A2, 化学破壁的 pHB43, A3, pHB43 的培养上清液, B1, 3 阴性对照, B2, 阳性对照, C1, 溶菌酶破壁的 pBR322, C2, 化学破壁的 pBR322, C3, pBR322 的培养上清液。Figure 4, ELISA reactions for expressional proteins by recombinant pHB43 in *E. coli* cells. A1, pHB43 treated by lysozyme; A2, pHB43 treated by chemicals; A3, pHB43 supernatant; B1 and B3, Negative control; B2, Positive control; Control C1, pBR322 treated by lysozyme; C2, pBR322 treated by chemicals; C3, pBR322 supernatant.

有 21 条胞内蛋白带, 阴性转化体 (含 pBR322) 只有 17 条。前者比后者多了 C (50k), F (43k), G (35.5k), L (23k), S (13k) 等 5 条带, 尤以 43 k, 35.5 k 和 23 k dalton 等三条带最显著。多次实验, 结果相同。培养上清液中无可测定的蛋白带。

用 ELISA 试剂 (武汉市第七医院试剂盒) 多次检测, 发现细胞裂解液内有 HBV 抗原 (图 4)。溶菌酶比 SDS-巯基乙醇的裂解效果好, 有较多的抗原释放出来。将溶菌酶裂解液稀释 225 倍, HBcAg 和 HBeAg 仍然为阳性。培养上清液中无抗原存在。阴性转化细胞为阴性反应。ELISA 检测结果与电泳结果一致。可见, 我们经过亚克隆组建的 HBV 工程菌, 在 *E. coli* 细胞内能表达出 HBV 的 c 和 e 抗原。

讨 论

以 HBV DNA 与质粒 pBR322 进行克隆, 得到几个阳性重组体。其中 pHB43 DNA 经 BamHI 消化后呈现三个片段: A = 3.93 + 0.52; B = 0.37 + 1.79 和 C = 1.0kb。由此而得出结论, HBV DNA 在 pBR322 的插入方向是 5' 末端近 BamHI 位点。

一般说来, 质粒 pBR322 不作为表达载体使用。但在重组过程中, 有时也出现某种特殊情况, 即插入片段的大小和位置正好符合表达要求, 不产生移码移动, 外源基因则在载体控制下表达, 如 McInden^[8] 等报道, 苏芸金杆菌的 δ -内毒素基因与质粒 pBR322 重组, 在 *E. coli* HB101 细胞内表达出晶体蛋白, 并具有生物活力, 与我们的结果相同。因此, HBV DNA 与 pBR322 克隆, 转化 *E. coli* HB101 细胞并表达 HBV 抗原 (主要是 c 和 e 抗原) 是完全可能的。

参 考 文 献

- [1] 吴祥甫等, 1981, 中国科学 (B 辑), 3: 162,
- [2] 敖世洲等, 1983, 遗传学报, 10: 254,
- [3] Valenzaela P., et al., 1985, *Nature*, 298: 347,
- [4] Marie Michel M-L., et al., 1985, *Biotechnology*, 3: 561.
- [5] 何宝光等, 1985, 生物工程学报, 1(1): 20,
- [6] 黄耀煌等, 1985, 生物化学与生物物理学报, 17(4): 469,
- [7] 安淑芳, 胡裕文, 1985, 病毒学报, 1(2): 185,
- [8] McInden J. H. et al., 1985, *Appl. Environ. Microbiol.*, 50(3): 623,

Expression of Hepatitis B Virus ayw Subtype Genome Cloned in *E. coli* Cells*

Qi Yi-peng Huang Young-xui Wang Bing
(Department of Virology, Wuhan University, Wuhan)

Lin Sheng-qin
(First Hospital, Hubei Medical College, Wuhan)

A cloned Hepatitis B virus (HBV) ayw subtype genome DNA has been inserted into EcoRI site of the plasmid pBR322. The 5' end of the inserted fragment, which was confirmed in positive recombinants by molecular hybridization and restriction digestion, closes to BamHI site in the plasmid. We have demonstrated that HBV genome inserted into pBR322 is able to express antigens of HBV in *E. coli* HB101 cells.

*This program is supported by grant from National Science Foundation.