

乙型肝炎病毒核心抗原在大肠杆菌中的构建及表达

张鹏艳, 叶 琳[△] (成都生物制品研究所生物技术室 610023)

【摘要】 目的 用基因工程的方法获得乙型肝炎病毒核心抗原(HBcAg)编码区的基因片段,构建重组质粒并在大肠杆菌中表达抗原蛋白。**方法** 用 PCR 法扩增 HBcAg 基因片段,构建含有 HBcAg 基因的克隆质粒及表达质粒,在大肠杆菌 BL₂₁(DE₃)plys 中以 IPTG 诱导重组蛋白的表达,并用 Western blot 对重组蛋白进行检测。**结果** 重组 HBcAg 在大肠杆菌中得到表达,Western blot 检测显示在预期位置出现特异性条带。**结论** 成功构建 HBcAg 原核表达系统并获得重组 HBcAg,为该重组蛋白的相关功能研究奠定了基础。

【关键词】 HBcAg; 大肠杆菌; 克隆; 表达

DIO:10.3969/j.issn.1672-9455.2010.17.005

中图分类号:R446.9

文献标志码:A

文章编号:1672-9455(2010)17-1802-02

Construction and expression of HBV core antigen in E. coli ZHANG Peng-yan, YE Lin[△]. Department of Bio-Technology Research, Chengdu Institute of Biological Products, Sichuan 610023, China

【Abstract】 Objective To obtain the gene fragment encoding HBcAg, construct recombinant plasmid and express the recombinant HBcAg protein in E. coli using genetic engineering methods. **Methods** The HBcAg gene fragment was amplified by PCR and the cloning and expression plasmids including HBcAg gene were constructed. Then the recombinant plasmid was transformed into E. coli BL21(DE3) host cell. The HBcAg fusion protein was expressed under the induction of IPTG and identified by Western blot. **Results** Recombinant HBcAg was expressed in E. coli. The special band of recombinant protein was showed at expectant position by Western blot. **Conclusion** A prokaryotic expression system for HBcAg gene is successfully constructed and the recombinant HBcAg protein is obtained. It lays a foundation of further study on the function of the recombinant protein.

【Key words】 HBcAg; E. coli; cloning; expression

乙型肝炎是由乙型肝炎病毒(HBV)引起的传染性疾病,在全球范围流行,危害十分严重。乙型肝炎病毒核心抗原(HBcAg)是 HBV 特异性的杀伤性 T 淋巴细胞(CTL)的主要靶抗原,在乙型肝炎的发病中起重要作用^[1]。HBcAg 具有高度免疫原性,含有丰富的体液和细胞免疫抗原表位,并能产生很强的细胞免疫反应^[2-5]。几乎所有 HBV 感染者都产生抗-HBc,同时有 T 细胞免疫应答,HBcAg 感染的肝细胞是细胞免疫效应攻击的靶细胞,对 HBcAg 的免疫应答在病毒清除中可能有重要作用。对 HBcAg 的强免疫原特性的认识,可以指导研制更有效的预防或治疗性乙型病毒性肝炎的疫苗。作者构建了 HBV/C 基因的表达载体,并在大肠杆菌中表达重组 HBcAg,为进一步研究重组蛋白诱导的免疫应答奠定了基础。

1 材料与方法

1.1 材料 pCR2.1-TOPO 质粒购自 Invitrogen 公司; pET15b、含 HBV DNA(adr 亚型)的 pHBV NC-1 质粒、大肠杆菌 DH5 α 及 BL₂₁(DE₃)PlysS 由成都生物制品研究所生物技术室保存。

1.2 试剂 Pfu DNA 聚合酶、Taq 酶、T4 DNA 连接酶、限制性核酸内切酶及 IPTG 购自 TaKaRa 公司; DNA marker 购自赛百盛基因技术有限公司;质粒提取及 DNA 回收试剂盒购自上海生物工程技术服务有限公司;羧苄青霉素(Carb)购自成都天泰生命科技有限公司;鼠抗-His tag 抗体购自 SEROTEC 公司;HRP 标记的羊抗鼠 IgG 购自晶美生物工程有限公司。

1.3 方法

1.3.1 引物设计及基因扩增 根据 HBcAg 的基因序列设计

引物。上游引物: CAT ATG GAC ATT GAC CCG TAT AAA GAA TTT GG, 引入 Nde I 酶切位点;下游引物: GGATCC CTA ACA TTG AGA TTC CCG AGA TTG AG ATC, 引入 BamH I 酶切位点。以质粒 pHBV NC-1 为模板,用 pfu 酶扩增 HBV/C 基因片段;PCR 反应条件:94 ℃ 热启动 5 min,94 ℃ 变性 30 s,65 ℃ 退火 30 s,72 ℃ 延伸 1 min,经 30 个循环后再 72 ℃ 延伸 5 min。扩增产物经琼脂糖凝胶电泳回收基因片段,得到 552 bp 的目的基因。

1.3.2 DNA 片段的 TA 克隆及测序 在回收的目的基因 3' 末端加 A,再经 TA 连接入克隆质粒 pCR2.1-TOPO;连接产物转化感受态大肠杆菌 DH5 α ,在氨苄青霉素(Amp)抗性培养板中 37 ℃ 温育过夜,挑选克隆,转接 LB 培养液摇菌扩增,提取重组质粒 pCR2.1HBc;经 EcoRI 酶切,电泳鉴定后交赛百盛公司测序。

1.3.3 含 HBV/C 基因的表达质粒构建及鉴定 挑选测序结果正确的 pCR2.1HBc 重组质粒,经 Nde I、BamH I 酶切回收 552 bp 目的片段,亚克隆入经同样双酶切的载体 pET15b 中,构建表达质粒 pET15b HBc,并经 Nde I、BamH I 双酶切、电泳鉴定目的片段的插入。

1.3.4 HBcAg 在大肠杆菌 BL₂₁(DE₃)PlysS 中的表达及电泳鉴定 重组质粒 pET15b HBc 经 CaCl₂ 法转化感受态表达菌 BL₂₁(DE₃)PlysS,挑取单菌落,接种到含 50 μ g/mL Carb 的 LB 培养液中,37 ℃ 震荡培养至 OD₆₀₀=0.8,加入终浓度为 1 mmol/L IPTG 于 30 ℃ 诱导 2 h;取诱导前后的样品,SDS-PAGE 鉴定。在 200 mL LB 中扩菌并诱导 HBcAg 蛋白的表

[△] 通讯作者, E-mail: yelin_cd@hotmail.com。

达,收集菌体,超声法裂解细菌,离心收集上清液,沉淀用 6 mol/L 尿素溶解收集包涵体。HBcAg 基因与 pET15b 载体上的 6His 基因融合表达,获得相对分子质量约 26×10^3 的融合蛋白。SDS-PAGE 及 Western blot 检测 HBcAg 融合蛋白的表达。

2 结 果

2.1 HBcAg 基因的扩增 经 PCR 反应扩增 HBcAg 基因,产物经琼脂糖凝胶电泳回收基因片段,得到 552 bp 的目的基因,电泳结果显示其大小与预计相符(图 1)。

注:1:Marker 200 bp ladder;2:PCR 产物。

图 1 PCR 扩增 HBcAg 基因

2.2 重组 HBcAg 克隆质粒的酶切鉴定 重组质粒 pC R2.1 HBc 经 EcoR I 酶切,得到约 569 bp 的插入片段,电泳结果显示其大小与预计相符;测序结果为 552 bp 目的基因片段与 Genbank 注册的 HBcAg 序列一致;电泳结果见图 2。

注:1:Marker 200 bp ladder;2:质粒 pC R2.1 HBc 经 EcoR I 的酶切产物。

图 2 重组克隆质粒 pC R2.1 HBc 经 EcoR I 酶切后电泳鉴定结果

2.3 pET15b HBc 表达质粒的鉴定 重组 pET15b HBc 质粒,经 Nde I、BamH I 双酶切,得到约 552 bp 的插入片段,电泳结果显示其大小与预计相符。

注:(A)1:Marker;2:可溶表达蛋白;3:包含体;(B)1:Marker;2:可溶表达蛋白;3:包含体。

图 3 重组 HBcAg 蛋白表达形式的 SDS-PAGE 鉴定(A)及 Western blot 分析(B)

2.4 HBcAg 在大肠杆菌 BL₂₁ (DE₃) PlysS 中的表达及电泳鉴定 将重组质粒 pET15b HBc 转化感受态表达菌 BL₂₁ (DE₃) PlysS, IPTG 诱导,菌体经超声法裂解,离心收集上清液,沉淀用 6 mol/L 尿素溶解,收集包涵体;SDS-PAGE 结果显示重组蛋白主要以包涵体的形式表达,在相对分子质量约 26×10^3 处有一条明显的条带,与预期结果一致;Western blot 结果表明,HBcAg 基因与 pET15b 载体上的 6His 基因融合表达,融合蛋白能与 anti-His 抗体结合,在预期位置出现条带(图 3A、B)。

3 讨 论

在乙型肝炎肝组织免疫损伤的应答中,HBcAg 是靶抗原,HBV/C 区基因可发生多位点多重类型的突变,影响 HBcAg 特异性的细胞毒 T 淋巴细胞(CTL)作用表位是 HBV 感染慢性化、肝细胞损伤加重的重要原因,与疾病活动有关^[6]。HBV 是嗜肝 DNA 病毒,完整的 HBV 颗粒又称 Dane 颗粒,球形,直径约 42 μm。HBV 基因组共有 4 个开放读码区(ORF),分别为 S、C、P、X; HBcAg 存在于 Dane 颗粒的核心,是 HBV 的结构蛋白即病毒核壳蛋白,由 HBV 基因组的 C 开放读码区(ORF)编码。HBcAg 具有高度免疫原性,极微量的 HBc(0.025 μg)在不添加任何佐剂的情况下即能激发小鼠产生抗体,接种 H-2 小鼠时,所有小鼠均产生高滴度的抗-HBc 和特异性 T 细胞反应^[2]。在 HBcAg 诱导下,外周血单个核细胞(PBMC)产生 Th1 类细胞因子量明显增高;在 HBcAg 诱导下,Th2 类细胞因子量明显增高。慢性 HBV 感染进行免疫调节治疗的一个目标就是使 HBcAg 特异性 T 细胞由 Th2 细胞主导型转化为 Th1 细胞型,HBcAg 有望打破 HBcAg 诱导的免疫耐受状态而增强 Th1 细胞优势表达达到治疗的目的。

基于对 HBcAg 的强免疫原特性的认识,构建了 HBV/C 基因的表达载体,并在大肠杆菌中成功地表达出重组 HBcAg 蛋白;接下来将进行培养条件的研究和优化,提高抗原表达量,并进行重组蛋白诱导免疫应答的研究。

参考文献

- [1] Ferrari C, Penna A, Bertoletti A, et al. Cellular immune response to hepatitis B virus-encoded antigens in acute and chronic hepatitis B virus infection[J]. J Immunol, 1990, 145(10): 3443-3449.
- [2] 余传霖,熊思东. 分子免疫学[M]. 上海:复旦大学出版社,上海医科大学出版社,2001:843-873.
- [3] Livingston BD, Crimi C, Fikes J, et al. Immunization with the HBV core 18-27 epitope elicits CTL responses in humans expressing different HLA-A2 supertype molecules[J]. Hum Immunol, 1999, 60(11): 1013-1017.
- [4] Heathcote J, Lee S. A pilot study of the CY-1899 T-cell vaccine in subjects chronically infected with hepatitis B virus[J]. Hepatology, 1999, 30(2): 531-536.
- [5] Vanlandschoot P, Cao T, Leroux-roels G, et al. The nucleocapsid of the hepatitis B virus: a remarkable immunogenic structure[J]. Antiviral Res, 2003, 60(2): 67-74.
- [6] 骆抗先,朱幼芙,杨洁,等. 乙型肝炎病毒感染时的 C 基因热点变异[J]. 中华实验和临床病毒学杂志, 1997, 11(1): 29-32.