

人类 HBxAg 蛋白反式激活基因 5 的原核表达及其蛋白纯化

蓝贤勇^{1,2}, 成 军², 陈 宏^{1,3}, 张黎颖², 陶明亮^{1,2}, 伦永志^{2,4}, 洪 源², 郭 江²

(1 西北农林科技大学 动物科技学院, 陕西 杨凌 712100; 2 北京地坛医院 传染病研究所, 北京 100011;

3 徐州师范大学 细胞与分子生物学研究所, 江苏 徐州 221116; 4 大连大学 医学院, 辽宁 大连 116622)

[摘 要] 为了更深入研究 XTP5 蛋白(也称人类次要组织相容性抗原(mHA-8))的生物学功能,以 Hep G2 细胞总 RNA 为模板、应用 RT-PCR 技术获得 XTP5 基因,再利用基因工程技术对其进行克隆和原核重组表达载体构建和诱导表达,成功克隆 XTP5 基因,并成功构建原核重组表达空载体 pET-32a(+)-XTP5;阳性重组质粒转化大肠杆菌 *E. coli* BL21 后,在 37 °C 经终浓度 1 mmol/L IPTG 诱导 5 h 后,受体菌大量表达 76.88 ku XTP5 重组蛋白;Western-blot 证实宿主菌表达的蛋白特异性好;肝素亲和层析柱纯化表达产物 XTP5 蛋白效果良好。结果表明,成功克隆了人类 XTP5 基因,并获得纯度较高的融合蛋白 XTP5。

[关键词] 乙型肝炎病毒(HBV);X 蛋白反式激活;XTP5 基因(mHA-8)

[中图分类号] Q78

[文献标识码] A

[文章编号] 1671-9387(2007)11-0015-05

Prokaryotic expression and protein purification of human XTP5 gene transactivated by X protein of hepatitis virus B

LAN Xian-yong^{1,2}, CHENG Jun², CHEN Hong^{1,3}, ZHANG Li-ying², TAO Ming-Liang^{1,2},
LUN Yong-zhi^{2,4}, HONG Yuan², GUO Jiang²

(1 College of Animal Science and Technology, Northwest A & F University, Yangling, Shaanxi 712100, China;

2 Institute of Infectious Diseases, Ditan Hospital, Beijing 100011, China; 3 Institute of Cellular and Molecular Biology, Xuzhou Normal University, Xuzhou, Jiangsu 221116, China; 4 Medical College, Dalian University, Dalian, Liaoning 116622, China)

Abstract: To study biological function of XTP5 (mHA-8) further, the RT-PCR and bioengineering were used to clone and express XTP5 gene. XTP5 gene (1 527 bp) and its recombinant expression vector (pET-32a(+)-XTP5) were successfully carried out. Moreover, pET-32a(+)-XTP5 was expressed for five hours with 1.0 mmol/L IPTG (final concentration) at 37 °C. The recombination protein showed identical molecular weight with 76.88 ku and was confirmed by Western-blot. The purified recombinant protein was acquired by the protein purification system. Cloning and prokaryotic expression and the purified protein of XTP5 gene were successfully performed.

Key words: Hepatitis B virus (HBV); X protein transactivation; XTP5 gene (mHA-8).

乙肝病毒(HBV)是一种严重危害人类健康的 致病因子,是导致急性慢性肝炎、肝硬化、肝细胞癌

[收稿日期] 2006-08-04

[基金项目] 国家自然科学基金项目(C03011402;C30070689);军队回国留学人员启动基金项目(98H038);军队“九五”科技攻关项目(98D063);军队“十五”科技攻关项目(01MB135);军队“十五”科技攻关青年基金项目(01Q138)

[作者简介] 蓝贤勇(1979-),男,江西南康人,在读博士,主要从事遗传学研究。E-mail:lan342@163.com

[通讯作者] 成 军(1963-),男,山东淄博人,教授,博士生导师,主要从事病毒性肝炎致病机理研究。

E-mail:cj@genetherapy.com.cn

(HCC)的主要原因,然而关于 HBV 引发病毒性肝炎的机理还不太清楚。因此,与 HBV 相关的新基因克隆和功能研究,是病毒性肝炎致病机理研究领域的重要组成部分。最近研究发现,具有反式激活细胞内相关基因表达作用的 HBxAg 蛋白,对肝细胞正常基因表达谱有影响,提示其可能与 HBV 致病机理有关^[1-3]。

抑制性消减杂交(SSH)技术是一项有效地分离和扩增低丰度特异表达基因的新兴生物技术,在短时间内可得到理想试验结果,与传统方法相比,具有周期短、操作简便、可靠性高、假阳性率低等特点^[4-6]。刘妍等^[3]利用 SSH 及生物信息学技术,发现了 HBxAg 蛋白反式激活新基因 5(Human gene 5 transactivated by HBV X protein, XTP5, GenBank 登录号:AF490254)。目前,XTP5 基因也被称为次要组织相容性抗原基因 *mHA-8*(Minor histocompatibility antigene *mHA-8*, *mHA-8*)^[7]。研究表明,XTP5 蛋白在同种组织器官移植中,特别是在造血干细胞移植中,扮演着主要角色^[7-11]。XTP5 蛋白是 HBxAg 蛋白反式激活作用的基因,而 HBxAg 蛋白在病毒复制、肝细胞癌方面具有十分重要的作用,提示 XTP5 蛋白可能与促进慢性病毒性肝炎发病密切关系^[12]。目前,国内外关于 XTP5 蛋白的功能知之甚少。为此,本研究对 XTP5 基因进行了克隆、原核表达和纯化研究,以期为更深入地阐明 XTP5 蛋白的生物学功能提供依据。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

肝母细胞瘤细胞系 Hep G2 及大肠杆菌 DH5、*E. coli* BL21 和原核表达空质粒 pET-32a(+)均为北京地坛医院传染病研究所实验室保存;胎牛血清(FBS)购自 Hyclone 公司;总 RNA 提取试剂盒、反转录试剂盒、*Taq* DNA 聚合酶、T4 DNA 连接酶和 pGEM-T 载体购自 Promega 公司;玻璃奶回收试剂盒购自博大泰克公司;*EcoR*、*Sal*、*Pst* 购自 Takara 生物公司;抗-His 的单克隆抗体购自 Santa Cruz 公司;辣根过氧化物酶标记羊抗鼠 IgG 购自北京中山生物公司;化学发光底物购自 PIERCE 公司;P 膜购自 MILLIPORE 公司;丙烯酰胺、N、N-亚甲双丙烯酰胺、IPTG 及 X-Gal 和蛋白纯化试剂等化学试剂均为国内外分析纯级生化试剂。

1.2 Hep G2 细胞的培养

参考文献^[13]方法复苏 Hep G2 细胞,用 V(血

清) V(FBS) = 10 1 培养液进行传代培养。

1.3 人类 HBxAg 蛋白反式激活新基因 5(XTP5) 基因的 RT-PCR 扩增

1.3.1 引物的设计与合成 根据 XTP5 基因开放读码框(ORF)和原核表达空载体 pET-32a(+)序列设计 1 对引物,由上海生工公司合成。引物序列如下:上游 Pf: 5-CG GAA TTC ATG TGG GAG ATT TTA AGA AGA AAA G3 (下划线表示 *EcoR* 酶切位点),下游 Pr: 5-GC GTC GAC TGT GCT CAG TTT TTC AAG TAG AAT-3 (下划线表示 *Sal* 酶切位点)。

1.3.2 RT-PCR 扩增 当 Hep G2 细胞传至 3 代时,用总 RNA 提取试剂盒提取其总 RNA,然后用 Promega 反转录试剂盒合成 cDNA 模板。25 μ L RT-PCR 反应体系为:双蒸水 17.3 μ L, 10 \times 缓冲液(含 20 mmol/L MgCl₂) 2.5 μ L, 2.5 mmol/L dNTP 2.5 μ L, 10 mmol/L 上、下游引物各 1.0 μ L, cDNA 模板 0.2 μ L, *Taq* DNA 聚合酶(5 U/ μ L) 0.5 μ L。PCR 扩增条件:95 预变性 5 min;94 变性 30 s,55 退火 45 s,72 延伸 1 min 40 s,35 个循环;72 延伸 10 min;4 保存;扩增产物用 10 g/L 琼脂糖凝胶电泳检测。

1.4 pET-32a(+)-XTP5 重组表达载体的构建

根据玻璃奶回收试剂盒说明书回收 XTP5 基因 RT-PCR 产物,然后将其与 pGEM-T 载体按 10 1 的比例(体积比)混合,在 T₄ DNA 连接酶作用下于 16 连接过夜,构建 pGEM-T-XTP5 重组载体。

将 pGEM-T-XTP5 重组载体转化到 CaCl₂ 法制备的感受态细胞 DH5 中^[13],在铺有 100 mL IPTG 和 20 mL X-Gal 的 Amp 琼脂糖平板上进行蓝、白斑筛选。然后,挑取白色菌落于含抗生素的 LB 液体培养基中摇动 12 ~ 16 h (220 r/min, 37)^[13]。

碱裂解法提取质粒 DNA^[13],用 *EcoR* 和 *Sal* 酶切克隆载体(pGEM-T-XTP5)获得带双酶切位点的 XTP5 基因(酶切体系:2 μ L 10 \times H buffer, 1 μ L *EcoR* 酶(10 U/ μ L), 1 μ L *Sal* 酶(10 U/ μ L), 10 μ L 质粒,补双蒸水至 20 μ L)。10 g/L 琼脂糖凝胶电泳分离质粒酶切后的片段,并利用玻璃奶法纯化^[13]。

将携带 *EcoR* 和 *Sal* 酶切位点的目的片段克隆到相同酶切位点的 pET-32a(+)线性化载体上,构建重组表达载体 pET-32a(+)-XTP5;再利用 *EcoR*、*Sal* 和 *Pst* 酶进行酶切鉴定。最后将正

确表达的重组质粒 pET-32a(+)-XTP5 转化大肠杆菌 *E. coli* BL21(羧苄青霉素抗性),利用菌落 PCR 和酶切质粒法进行鉴定^[13]。

1.5 重组表达载体 pET-32a(+)-XTP5 的诱导表达

将阳性重组质粒 pET-32a(+)-XTP5 转化大肠杆菌 *E. coli* BL21,挑取单个菌落接种于含有抗生素的 LB 液体培养基中(含羧苄青霉素 100 mg/mL),220 r/min、37 过夜培养;次日,按体积比 1%~5%接种量接种,220 r/min,37 培养菌至 A₆₀₀ 为 0.4~0.6 时,加入终浓度 1 mmol/L IPTG 进行诱导,继续于 37 条件下培养,然后分别于培养的 3,4,5 h 收集 1.0 mL 菌液,10 000 r/min 离心 5 min;弃上清液,加 100 mL Tris-HCL (pH=6.8) 悬浮沉淀,加 100 mL 2×SDS 凝胶加样缓冲液及 5 mL 巯基乙醇,煮沸 10 min,10 000 g 离心 5 min,取 15 mL 上清液进行 SDS-PAGE 分析。SDS-PAGE 电泳方法参见文献[13]进行。

1.6 XTP5 重组蛋白的 Western blot 检测

SDS-PAGE 电泳后将凝胶转膜,50 g/L 脱脂奶粉封闭过夜,分别经第一抗体(体积比为 1:200 的抗-His 单克隆抗体)、第二抗体(体积比为 1:5 000 的羊抗鼠 HRP-IgG)孵育,再加入显色液,室温下轻

摇反应,X 光片曝光^[13]。

1.7 XTP5 重组蛋白的纯化

收集发酵罐 37 诱导表达 5 h 的菌液 2.5 L,离心弃上清液,加 TE 缓冲液,经 3~4 次冻融,超声破菌。接着,离心弃上清液,沉淀用 9 倍体积洗涤液悬浮洗涤包涵体。室温放置后离心吸出上清液,用缓冲液溶解包涵体,室温放置。最后,于室温条件下 12 000 r/min 离心 15 min。收集上清液进行肝素亲和层析^[13]。以双蒸去离子水膨化 CL-6B,除气后装柱,再用磷酸盐缓冲液平衡^[13]。然后上样,使之缓慢通过柱体,反复几次使蛋白质与柱充分结合。再利用磷酸盐缓冲液冲洗,以 1 mol/L NaCl 洗脱、透析除盐。纯化后的样品进行 SDS-PAGE 电泳检测^[13]。

2 结果与分析

2.1 人类 XTP5 基因的 RT-PCR 扩增与 pET-32a(+)-XTP5 载体的构建

结果见图 1,由图 1 可知,扩增出了 1 527 bp 的片段,与预期结果一致;重组表达载体 pET-32a(+)-XTP5 经 *EcoR* 和 *Sal* 双酶切后,表现出正确的酶切图谱(图 2)。

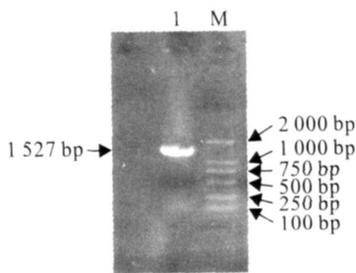


图 1 人类 XTP5 基因的 RT-PCR 产物电泳结果
1. XTP5 PCR 产物;M:DL2000 Marker
Fig. 1 RT-PCR electrophoresis for XTP5 gene
1. XTP5 PCR product;M:DL2000 Marker

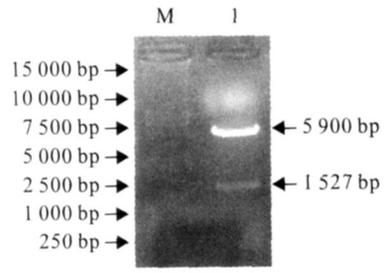


图 2 pET-32a(+)-XTP5 的 *EcoR* 和 *Sal* 酶切结果
M:DL15000 Marker;1.pET-32a(+)-XTP5 酶切产物
Fig. 2 Digestion electrophoresis of pET-32a(+)-XTP5 with *EcoR* and *Sal*
M:DL15000 Marker;1. Digestion for pET-32a(+)-XTP5

2.2 pET-32a-XTP5 重组载体的酶切鉴定分析

利用 Vector NTI 绘制重组质粒 pET-32a(+)-XTP5 DNA 序列的酶切图谱,结果见图 3。为进一步鉴定重组质粒,利用 *EcoR* 和 *Pst* 限制性酶酶切重组载体 pET-32a(+)-XTP5,由于目的片段和载体序列上均有 *Pst* 位点,所以理论上应该切出片段大小为 4 560,1 627 和 1 124 bp 条带,实际酶切结果见图 4。由图 4 可知,pET-32a

(+)-XTP5 重组载体的酶切结果与理论完全相符,表明原核表达载体 pET-32a(+)-XTP5 构建成功。

2.3 pET-32a(+)-XTP5 质粒转化宿主大肠杆菌 *E. coli* BL21 的鉴定结果

利用菌落 PCR 鉴定重组表达载体 pET-32a(+)-XTP5 转化宿主大肠杆菌 *E. coli* BL21 的情况。挑取 5 个菌落进行菌落 PCR 分析,结果表明,扩增片段大小与 XTP5 基因理论值一致;提取

阳性菌落 PCR 宿主菌质粒 DNA ,酶切结果证明构

建的重组表达载体 pET-32a(+)-XTP5 是正确的。

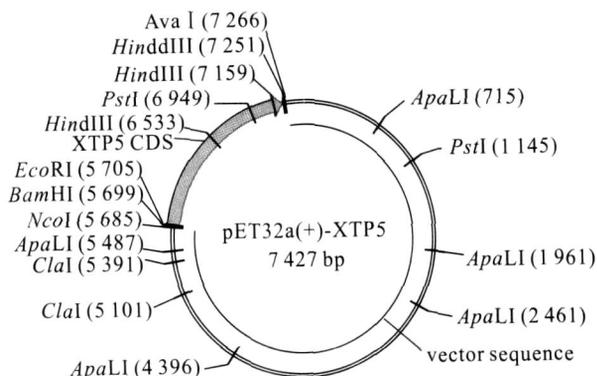


图 3 pET-32a(+)-XTP5 的重组质粒

Fig.3 Recombinant vector map of pET-32a(+)-XTP5

2.4 XTP5 融合蛋白的 SDS-PAGE 电泳和 Western-Blot 检测结果

图 5 显示,对照无表达,而诱导后大肠杆菌 BL21 顺利表达;空质粒表达 21 ku 蛋白,pET-32a(+)-XTP5 表达约 76.88 ku 蛋白,均与理论大小相符;pET-32a(+)-XTP5 诱导产物表达的最佳条件是 37 诱导 5 h。Western-blot 检测结果(图 6)表明,XTP5 融合蛋白特异性强且条带清晰。

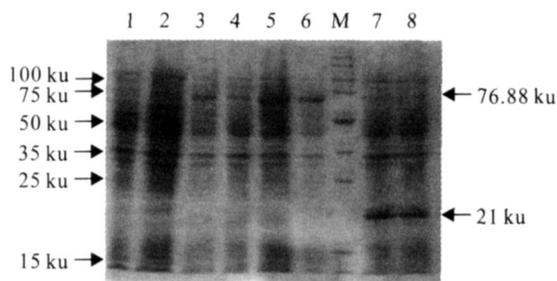


图 5 XTP5 融合蛋白的 SDS-PAGE 电泳结果

1,2. pET-32a(+)-XTP5 未诱导组(37 和 30);3~5. 分别为 pET-32a(+)-XTP5 诱导 3,4,5 h 表达产物(37);
6. pET-32a(+)-XTP5 诱导 5 h 表达产物 (30);
7. pET-32a(+)-空质粒 37 诱导表达产物;8. pET-32a(+)-空质粒 30 诱导表达产物. M. 蛋白 Marker

Fig.5 SDS-PAGE of XTP5 recombinant protein
1,2. No induced groups (37 and 30);3- 5. Induced group (3,4,5 h) (37);6. Induced group (5 h,30);
7. Induced control vector group (37);8. Induced control vector group (30);M. Protein Marker

2.5 XTP5 融合蛋白的纯化结果

图 7 显示,肝素亲和层析柱纯化表达产物 XTP5 纯化效果良好。

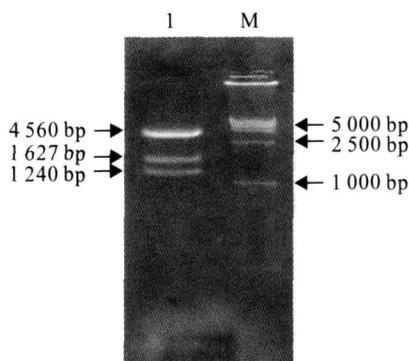


图 4 pET-32a(+)-XTP5 EcoR 和 Pst 的酶切结果

1. EcoR 和 Pst 酶切质粒结果;M. DL15 000 Marker
Fig.4 Digestion of pET-32a(+)-XTP5 with EcoR and Pst
1. Result of EcoR and Pst Digestion;M. DL15000 Marker

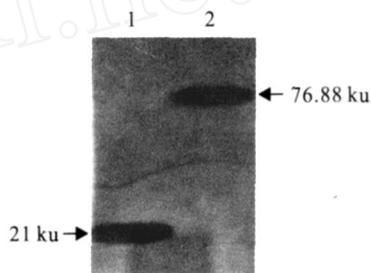


图 6 XTP5 融合蛋白的 Western-blot 检测结果

1. pET-32a(+)-空质粒诱导 5 h 产物;2. pET-32a(+)-XTP5 诱导 5 h 产物。

Fig.6 Western-blot of XTP5 recombinant protein
1. Control group (Induce for 5 h);2. Recombinant vector group (Induce for 5 h)

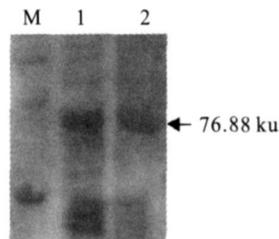


图 7 纯化 XTP5 融合蛋白的 SDS-PAGE 电泳结果

M. 蛋白 Marker ;1. 未纯化 XTP5 融合蛋白;
2. 纯化后 XTP5 融合蛋白

Fig.7 SDS-PAGE for purifying XTP5 recombinant protein
M. Protein Marker ;1. Not purified protein;
2. Purified XTP5 Protein

3 讨论

XTP5 基因是成军课题组 2002 发现的 DNA 序列,利用生物信息学已对其进行了 CpG 岛、启动

子活性和转录终止信号分析^[14-15],确定其为未知基因。本研究结果表明,XTP5 基因片段大小为 1 527 bp,测序结果与 GenBank 公布的结果(登录号 AF490254)吻合,证实该新基因的存在。由此可知,作者成功克隆了人类 XTP5 基因。

HBV 感染引起肝细胞癌变(HCC),不仅部分通过 HBV DNA 与肝细胞基因组 DNA 之间的整合,可造成 HBV 感染肝细胞的过度生长,而且 HBxAg 蛋白等反式调节蛋白的反式激活作用对肝细胞正常状态下的基因表达谱也产生影响。此时,HBV 感染的肝细胞成为机体免疫系统识别与攻击的对象。由于主要组织相容性抗原(MHC)具有参与免疫调节等功能,所以推测次主要组织相容性抗原也参与肝细胞免疫反应^[7-11],但还需进一步证实。为此,本研究对 XTP5 基因进行克隆、表达研究,具有重要的理论和临床实践意义。

由于次要组织相容性抗原不一定是在细胞表面上表达,故没有同种抗血清或可靠的单克隆抗体来检测。目前,一般使用特异性的 T 细胞反应检测次要组织相容性抗原,然而这种检测费用昂贵、操作繁琐,不是十分理想的检测手段^[7-11]。此外,作为次要组织相容性抗原之一,由于 XTP5 是一种功能知之甚少的抗体,不存在商品化的检测试剂盒,因而利用基因工程的方法表达 XTP5 基因制备多克隆抗体用于临床检测是必经之路^[16]。pET-32a(+)载体含有一段辅助蛋白基因,该辅助蛋白包括 Trx 和 His 等标签序列,有利于目的蛋白表达效率的提高和表达产物的检测。因此,本研究选用其作为表达载体高效表达融合蛋白。本研究成功构建 pET-32a(+)-XTP5 原核表达载体,且其融合蛋白表达产物 $M_r=76.88$ ku,与预期结果相符;进一步 Western blot 分析证实,此融合蛋白包含 His 组氨酸标签,表明 XTP5 成功表达;经过优化试验发现,该基因重组原核表达条件为:37 诱导 5 h;且 XTP5 融合蛋白易纯化,且保留免疫原性,可不经复性作为检测 His 抗体诊断试剂盒的包被抗原。表明 XTP5 基因在大肠杆菌中成功表达,获得高纯度重组蛋白产物,不仅为研究 XTP5 与细胞内蛋白的相互作用奠定理论基础,而且为下一步制备多抗应用于免疫组织化学和酶联免疫吸附的检测奠定了基础;更深入地研究 XTP5 功能,将对临床肝炎病毒感染标本检测、肝炎治疗药物的开发和 HCC 机制研究等领域产生重大

影响。

[参考文献]

- [1] Ganem D, Varmus H E. The molecular biology of the hepatitis B viruses[J]. Annu Rev Biochem, 1987, 56: 651-693.
- [2] 成军, 刘妍, 洪源, 等. 基因表达谱芯片技术筛选乙型肝炎病毒 X 蛋白反式调节基因[J]. 世界华人消化杂志, 2003, 11(7): 920-924.
- [3] 刘妍, 成军, 陆荫英, 等. 乙型肝炎病毒 X 蛋白反式激活基因克隆化的研究[J]. 中华肝脏病杂志, 2003, 11(1): 5-7.
- [4] Diatchenko L, Lukyanov S, Lau Y F, et al. Suppression subtractive hybridization: a versatile method for identifying differentially expressed genes[J]. Methods Enzymol, 1999, 303: 349-380.
- [5] George P Y, Douglas T R. Combining SSH and cDNA microarrays for rapid identification of differentially expressed genes[J]. Nucleic Acids Research, 1999, 27: 1517-1523.
- [6] Ji W, Wright M B, Cai L, et al. Efficacy of SSH PCR in isolating differentially expressed genes[J]. BMC Genomics, 2002, 3(1): 12.
- [7] Holloway P A, Kaldenhoven N, Henriette M, et al. A class II-restricted cytotoxic T-cell clone recognizes a human minor histocompatibility antigen with a restricted tissue distribution[J]. British Journal of Hematology, 2005, 128(1): 73.
- [8] Araki J, Oashi J, Muramatsu M. Application of discordant sib-pair linkage analysis for mapping minor histocompatibility antigen loci in a novel graft-vs-host-disease model[J]. Tissue Antigens, 2004, 64(3): 243.
- [9] Warren E H, Otterud B E, Linterman R W, et al. Feasibility of using genetic linkage analysis to identify the genes encoding T cell-defined minor histocompatibility antigens[J]. Tissue Antigens, 2002, 59(4): 293-303.
- [10] Brickner A G, Warren E H, Caldwell J A, et al. The immunogenicity of a new human minor histocompatibility antigen results from differential antigen processing[J]. J Exp Med, 2001, 193(2): 195-206.
- [11] Hoja M R, Wahlestedt C, Hoog C. A visual intracellular classification strategy for uncharacterized human proteins[J]. Exp Cell Res, 2000, 259(1): 239-246.
- [12] Chan D W, Ng I O. Knock-down of hepatitis B virus X protein reduces the tumorigenicity of hepatocellular carcinoma cells[J]. J Pathol, 2006, 208(3): 372-80.
- [13] 萨姆布鲁克 J, 拉塞尔 D W. 分子克隆实验指南[M]. 3 版. 黄培堂, 译. 北京: 科学出版社, 2002.
- [14] 李巍. 生物信息学导论[M]. 河南: 郑州大学出版社, 2004.
- [15] 蒋彦, 王小行, 曹毅, 等. 基础生物信息学及应用[M]. 北京: 清华大学出版社, 2003.
- [16] 陈宏. 基因工程原理与应用[M]. 北京: 中国农业出版社, 2005.