

物以加强对该家族菌株的进一步研究。T 家族菌株是欧美地区的主要流行菌株,其在四川省的流行可能与近年该地区与欧美之间的贸易旅游比较频繁有关。

此外本研究中还发现了 4 株 MANU 家族结核分枝杆菌(3.77%)。MANU 家族菌株于 2004 年在印度首次报道,随后在其他一些国家和地区也发现了该基因家族的菌株,如马达加斯加岛、南非以及波兰等^[11]。SITVIT2 数据库中关于 MANU 基因家族(33~34 间隔区缺失)的菌株信息很少,仅占 0.4%。由于 MANU 家族为古典型的结核分枝杆菌,因此 MANU 家族菌株的发现对研究结核分枝杆菌的遗传进化具有重要的作用。

总之,本研究对四川省结核分枝杆菌的基因型构成及主要流行菌株的流行情况进行了初步描述,北京家族菌株为四川省的主要流行菌株,但同时还存在 T 家族菌株、MANU 家族菌株等其他家族的结核分枝杆菌。这对四川省结核病的流行趋势分析等具有重要的意义。

参考文献

- 1 Groenen PM, Bunschoten AE, van Soolingen D, *et al.* Nature of DNA polymorphism in the direct repeat cluster of *mycobacterium tuberculosis*; application for strain differentiation by a novel typing method [J]. *Mol Microbiol*, 1993, 10(5):1057-1065
- 2 Kamerbeek J, Schouls L, Kolk A, *et al.* Simultaneous detection and strain differentiation of *mycobacterium tuberculosis* for diagnosis and epidemiology [J]. *J Clin Microbiol*, 1997, 35(4):907-914
- 3 Tounghousssova OS, Sandven P, Mariandyshev AO, *et al.* Spread of drug-resistant *mycobacterium tuberculosis* strains of the Beijing geno-

- type in the Archangel Oblast, Russia [J]. *J Clin Microbiol*, 2002, 40(6):1930-1937
- 4 Glynn JR, Whiteley J, Bifani PJ, *et al.* Worldwide occurrence of Beijing/W strains of *mycobacterium tuberculosis*; a systematic review [J]. *Emerg Infect Dis*, 2002, 8(8):843-849
 - 5 van Soolingen D, Qian L, de Haas PE, *et al.* Predominance of a single genotype of *mycobacterium tuberculosis* in countries of East Asia [J]. *J Clin Microbiol*, 1995, 33(12):3234-3238
 - 6 Li WM, Wang SM, Li CY, *et al.* Molecular epidemiology of *mycobacterium tuberculosis* in China: a nationwide random survey in 2000 [J]. *Int J Tuberc Lung Dis*, 2005, 9(12):1314-1319
 - 7 Bifani PJ, Mathema B, Kurepina NE, *et al.* Global dissemination of the *mycobacterium tuberculosis* W-Beijing family strains [J]. *Trends Microbiol*, 2002, 10(1):45-52
 - 8 Filliol L, Driscoll JR, van Soolingen D, *et al.* Snapshot of moving and expanding clones of *mycobacterium tuberculosis* and their global distribution assessed by spoligotyping in an international study [J]. *J Clin Microbiol*, 2003, 41(5):1963-1970
 - 9 Singh UB, Suresh N, Bhanu NV, *et al.* Predominant tuberculosis spoligotypes, Delhi, India [J]. *Emerg Infect Dis*, 2004, 10(6):1138-1142
 - 10 Sola C, Filliol L, Gutierrez MC, *et al.* Spoligotype database of *mycobacterium tuberculosis*; biogeographic distribution of shared types and epidemiologic and phylogenetic perspectives [J]. *Emerg Infect Dis*, 2001, 7(3):390-396
 - 11 Mallard K, McNerney R, Crampin AC, *et al.* Molecular detection of mixed infection of *mycobacterium tuberculosis* strains in sputum samples from patients in Karonga District, Malawi [J]. *J Clin Microbiol*, 2010, 48(12):4512-4518

(收稿:2011-11-09)

(修回:2011-11-18)

不同温度、时间、IPTG 和菌种浓度对丁肝抗原蛋白表达量的影响

丁军颖 伊 瑶 卢学新 苏秋东 田瑞光 邱 丰 毕胜利

摘 要 目的 确定以大肠杆菌表达丁肝抗原的最佳条件,为规模生产以求研发丁肝 ELISA 诊断试剂奠定基础。**方法** 在不同温度、时间、IPTG 和菌种浓度条件下,分别进行蛋白表达,取等体积样本进行 SDS-PAGE 电泳,经 Image Lab 软件分析,比较目的蛋白表达量,确定最佳表达条件。**结果** 在 25℃、29℃、33℃ 和 37℃ 条件下,蛋白表达量无统计意义的差别;在添加 IPTG 后的 1、2、3、4、5 和 6h,表达量无统计意义的差别;在以 0.25、0.5、1、2 和 4mmol/L IPTG 诱导时,表达量无统计意义的差别。当添加

基金项目:国家科技重大专项基金资助项目(2008ZX10201)

作者单位:102206 北京,中国疾病预防控制中心病毒病预防控制所(注:丁军颖和伊瑶为共同第一作者)

通讯作者:毕胜利,研究员,电子信箱:jyd0311@126.com

诱导剂前,菌种的 OD_{600} 值分别为 1.236、0.772、0.542 和 0.384,目的蛋白表达量有显著意义的差别。以 OD_{600} 值为 1.236 和 0.772 时,表达量最高,两者之间无统计意义的差别; OD_{600} 值为 0.542 时,表达量次之; OD_{600} 值为 0.384 时,表达量最低。**结论** 温度、表达时间和 IPTG 浓度在一定范围内对丁肝抗原蛋白表达量无影响;菌种的浓度是影响蛋白表达量的决定性因素;当菌种浓度在 OD_{600} 值约为 0.7~1.2 时,以 0.25mmol/L IPTG 在 37℃,诱导表达 1h 为最佳表达条件。该条件下,目的蛋白表达量占菌体总蛋白的 41.5%。

关键词 丁肝 基因工程 抗原 表达

Effect of Different Temperature, Time and Different Concentration of IPTG and Strains on HDVAg Expression. Ding Junying, Yi Yao, Lu Xuexin, et al. National Institute For Viral Disease Control and Prevention, Beijing 102206, China

Abstract Objective To determine the optimum HDVAg expression condition in *E. coli* and to prepare for the study of HDV diagnosis reagent in large scale. **Methods** Protein was expressed in different conditions, including temperature, time, the concentration of IPTG and bacterial strain. The SDS-PAGE was made, then the target protein yields were compared with Image Lab Software. The optimum protein expression parameters were determined. **Results** In different temperature or time, the target protein yields had no statistic significance. In different concentration of IPTG, the protein yields had no statistic significance, too. Which OD_{600} was 1.236、0.772、0.542 or 0.384, the bacterial strain was induced by IPTG separately. The protein yields of these groups had statistic significance. The highest protein yield was achieved when the OD_{600} was 0.772 and 1.236, the lower was achieved when the OD_{600} was 0.542, while the lowest was got when the OD_{600} was 0.384 respectively. **Conclusion** Temperature, time, the concentration of IPTG have no effect on the HDVAg protein yield. The concentration of bacterial strain plays an important role in the protein expression. In the optimum expression conditions, the target protein takes 45% proportion of the total bacterial protein.

Key words HDVAg; Genetic engineering; Antigen; Express

丁型肝炎病毒(HDV)是一种缺陷型负链 RNA 病毒,需依赖乙型肝炎病毒(HBV)或其他嗜肝 DNA 病毒的帮助才能复制和传播^[1]。HDV 与 HBV 同时或重叠感染,可造成原有病情加重,或发展成为肝硬化甚至暴发性肝炎^[2]。我国是乙型病毒性肝炎的高流行区,当前乙型肝炎病毒表面抗原(HBAG)的阳性率仍大于 8%^[3],这说明丁型肝炎作为依托乙型肝炎病毒感染的疾病,仍严重威胁着我国人民的健康。

只有对丁型肝炎及时准确的诊断,才能为其治疗和防控工作奠定基础。以酶联免疫吸附实验(ELISA)测定丁肝抗原或抗体是诊断丁肝的主要手段^[4]。为提高和改进我国当前 HDV ELISA 诊断试剂的质量,大量获取高纯度、好活性的丁肝抗原是进一步开展研发工作的首要条件。本文从不同角度探讨温度、时间、诱导剂和菌种浓度等对丁肝抗原表达量的影响,从而确定其表达的最佳条件,为批量生产奠定基础。

材料与方法

1. 材料:丁肝抗原优化基因由北京六合通公司合成;表达载体 M48 由本室从商品化质粒 PET43a 改造并留存;BL21 感受态(北京六合通公司);LB 培养基(美国, Sigma);TZ-2H 台式恒温振荡培养箱(北京沃德创新医药科技中心);垂直电泳系统(美国, Bio-rad);蛋白彩色 Marker(纽英伦生物技术北京有限公司);蛋白 Marker(中国科学院上海生命科学研究院);Gel Doc XR+凝胶成像系统和 Image Lab 分析软件(美

国, Bio-rad);H-15FR 低温离心机(美国, KOKUSAN);GGT-900 超净工作台(北京半导体设备一厂);XMTD-6000 电热恒温水槽(北京市长风仪器仪表公司);酶标仪(美国, Thermo)。

2. 方法:(1)菌种的培养:将含丁肝抗原优化基因的 M48 质粒,常规转化 BL21 感受态,挑取单斑菌,接种于 1.5ml 含 100 μ g/ml Amp 的 LB 培养基中,37℃,240r/min,振荡培养 3h;再取该菌按 1:100 接种于 3ml 含 100 μ g/ml Amp 的 LB 培养基中,37℃,240r/min,振荡培养 2h;再取该菌按 1:1000 分别接种于 2.4L 含 100 μ g/ml Amp 的 LB 培养基中,30℃,240r/min,振荡培养过夜;以含 100 μ g/ml Amp 的 LB 培养基做倍比稀释,37℃,240r/min,振荡培养 1h 后,作为测定不同温度、时间和 IPTG 浓度对蛋白表达量影响的实验用菌种。不同菌种浓度对蛋白表达量影响的实验用菌,视过夜菌梯度稀释后,在 37℃,240r/min,振荡培养过程中的 OD_{600} 值而采集。(2)不同条件下的蛋白表达:取 100ml 的三角瓶,分装 30ml 上述菌种,分别添加 IPTG 至终浓度为 0.25、0.5、1、2、4mmol/L,同时设不加 IPTG 的对照,再依次分别置于 25℃、29℃、33℃ 和 37℃ 的恒温振荡培养箱内,240r/min,振荡培养,每种不同条件的样本均设 3 例。于培养 1、2、3、4、5 和 6h 时,以 EP 管分别取样 500 μ l,10000r/min,离心 1min,弃上清,-20℃冻存储备检。(3)电泳:将上述样本以 50 μ l 双蒸水充分重悬,再加等体积 2 $\times$ Buffer,混匀,煮沸 3min,取样 20 μ l,以 5% 浓缩胶和 13% 分离胶进行常规 SDS-PAGE。(4)软件分析:以 Gel Doc XR+凝胶成像拍照,留存;用 Image Lab 软件对蛋白条带进行分析。

结 果

1. 不同诱导剂浓度条件下蛋白表达结果: 在 IPTG 浓度分别为 0.25、0.5、1、2、4mmol/L 的条件下, 均有分子质量约为 35kDa 的外源性蛋白表达; 且经 Image Lab 软件分析, 其表达量无统计意义的差别, 如图 1 示。

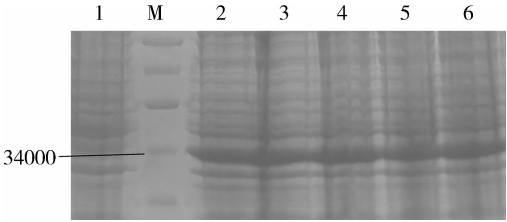


图 1 不同 IPTG 浓度在 37℃条件下诱导 1h 蛋白表达的 SDS - PAGE 结果

1. 0mmol/L IPTG; M. 标准品; 2. 0.25mmol/L IPTG; 3. 0.5mmol/L IPTG; 4. 1mmol/L IPTG; 5. 2mmol/L IPTG; 6. 4mmol/L IPTG

2. 不同温度条件下蛋白表达结果: 在 25℃、29℃、33℃和 37℃条件下, 均有分子质量约为 35kDa 的外源性蛋白表达; 且经 Image Lab 分析, 其表达量无统计意义的差别, 如图 2 示。

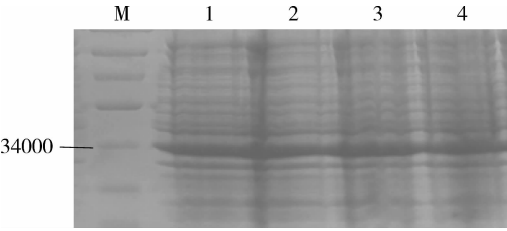


图 2 不同温度条件下以 0.25mmol/L IPTG 诱导 1h 蛋白表达的 SDS - PAGE 结果

M. 标准品; 1. 25℃; 2. 29℃; 3. 33℃; 4. 37℃

3. 不同表达时间蛋白表达结果: 当表达时间分别为 1、2、3、4、5 和 6h 时, 均有分子量质约为 35kDa 的外源性蛋白表达; 且经 Image Lab 分析, 其表达量无统计意义的差别, 如图 3 示。

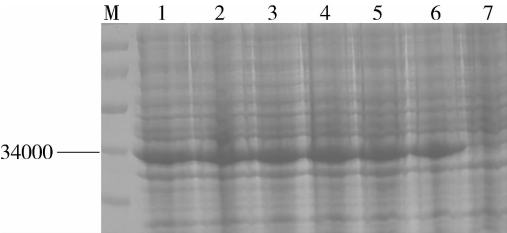


图 3 37℃条件下以 0.25mmol/L IPTG 诱导不同时间蛋白表达的 SDS - PAGE 结果

M. 标准品; 1. 1h; 2. 2h; 3. 3h; 4. 4h; 5. 5h; 6. 6h; 7. 0h

4. 不同菌种浓度蛋白表达结果: 诱导不同浓度的菌种, 均有分子质量约为 35kDa 的外源性蛋白表达; 经 Image Lab 分析, 其表达量有统计意义的差别。在 OD₆₀₀ 为 1.236 和 0.772 时, 表达量最高, 且两者之间无统计意义的差别; OD₆₀₀ 为 0.542 时, 表达量次之; OD₆₀₀ 值为 0.384 时, 表达量最低, 如图 4 示。

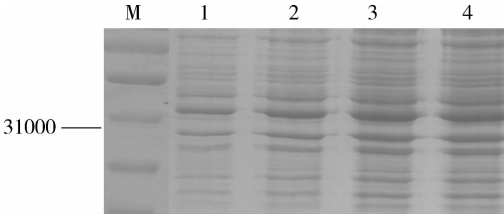


图 4 大肠杆菌在不同浓度以 0.25mmol/L IPTG 在 37℃诱导 1h 蛋白表达的 SDS - PAGE 结果

M. 标准品; 1. OD₆₀₀ 是 0.384; 2. OD₆₀₀ 是 0.542; 3. OD₆₀₀ 是 0.772; 4. OD₆₀₀ 是 1.236

5. 目的蛋白的含量: 以 Image Lab 对表达产物进行定量分析, 第 6 峰为目的蛋白(图 5), 约占菌体总蛋白的 41.5%。

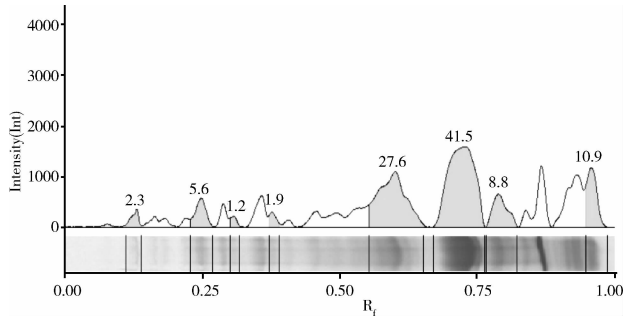


图 5 大肠杆菌在 OD₆₀₀ 为 0.772 时以 0.25mmol/L IPTG 37℃诱导 1h 表达蛋白的含量分析结果

讨 论

目前, 大肠杆菌已成为现代分子生物学研究中最常用的材料之一, 广泛用于外源蛋白的原核表达。外源蛋白在大肠杆菌中的表达受多种因素的影响^[5~8]。主要有外源基因的结构, 表达载体和宿主菌的选择, 表达条件及营养状况等。因此, 对不同的基因必须对诱导条件进行优化, 寻找适宜的表达条件, 才能获得最大程度的表达。

当异源目的基因的 mRNA 在大肠杆菌中过表达时, tRNA 的数量直接反映了 mRNA 的密码子偏倚性^[9]。不充足的 tRNA 库可能导致翻译延迟、成熟前翻译终止、翻译移码和氨基酸错配。尽管少量稀有密码子的出现通常不会给目的蛋白的合成造成太大影

响,不过如果一个基因中含有成串或多个大肠杆菌稀有密码子,外源蛋白的表达将非常低^[10-12]。为此,本研究所用基因采用人工编码,选用大肠杆菌的高频密码子,避免因 tRNA 的稀有或缺少而导致的翻译停止。汤少华等^[13]报道,丁肝病毒抗原蛋白编码区约 230bp 的基因表达即可获得有效的抗原蛋白,本研究所用基因优化后为 596bp,所获蛋白具有良好的抗原性(具体结果另文发表)。

本实验选用含硫氧还蛋白的 M48(系本室由 PET43a 改造而来)融合蛋白表达系统,借助硫氧还蛋白分子伴侣的作用^[14],表达出的蛋白既能正确折叠又能表现出全部生物学活性。M48 载体多克隆酶切位点的上游插入有编码 6 个组氨酸的序列,可与目的蛋白融合表达,利用 6 × His Tag 和金属镍的亲和力所产生的螯合作用而设计的亲和层析方法,可以有效纯化此蛋白;同时, M48 含 T7 强启动子,该启动子对 T7RNA 聚合酶启动转录具有特异性,不仅转录效率高而且转录物完整,保证了表达 rHDAg 的完整性和高效性。

一般认为,温度是影响蛋白表达的重要因素,温度越高,蛋白表达量越大,且易形成包涵体^[7,15,16]。本研究其他实验已证实,此蛋白 37℃ 表达依然可溶(结果另文发表)。本实验进一步证实,在一定范围内,温度变化对其表达量无明显影响。因 37℃ 是大肠杆菌的最适生长温度,所以确定在 37℃ 进行表达。

蛋白表达时间一直是备受关注的问题,时间太短表达量少;时间长了又因蛋白酶的释放而降解。因本研究采用 BL21 作为表达菌株,其蛋白酶含量极少,使表达蛋白不致被水解,为表达蛋白的稳定性提供了可靠保障。经本实验证实,表达时间在一定范围内对蛋白表达量无影响。

诱导剂 IPTG 是 β-半乳糖苷酶底物的类似物,可与阻遏蛋白结合成复合物,使阻遏蛋白构象发生改变,不能与 O 基因结合,从而促进基因表达。因 IPTG 有潜在毒性^[17],且价格昂贵,并不是表达蛋白的理想诱导物,目前因尚未找到合适替代品而沿用,但求用量减少。本实验结果与相关研究一致,一定范围内,增大 IPTG 的浓度并不能增加蛋白表达量^[18]。0.25mmol/L 是不影响蛋白表达量的最低浓度。

本研究证实,诱导时的菌种浓度是决定蛋白表达量的主要因素。当 OD₆₀₀ 为 0.772 时,诱导比较合适,细菌处于对数生长期,利于可溶性表达,且表达出的

目的蛋白占菌体总蛋白的比例最高,约占 41.5%。最终确定,当菌种生长至 OD₆₀₀ 约为 0.7 时,以 0.25mmol/L IPTG 在 37℃ 诱导 1h 为最佳表达条件,为丁肝抗原的大量表达奠定了实验基础。

参考文献

- 邵惠训. 一种缺陷病毒——丁型肝炎病毒[J]. 首都公共卫生, 2011,5(3):115-119
- 熊良仕,崔素芬,周京国. 各型肝炎病毒单纯及重叠感染的研究[J]. 中华肝脏病杂志,2004,12(7):395-396
- 卫生部疾病预防控制局. 全国人群乙型病毒性肝炎血清流行病学调查报告[M]. 北京:人民卫生出版社,2011:55
- 王春艳. 病毒性肝炎的诊断[J]. 中外健康文摘,2011,8(12):41-42
- 孙铭飞,覃宗华,谢明权,等. 不同表达条件对 *Eimeria tenella* 丙二酰单酰辅酶 A:ACP 转移酶活性的影响[J]. 畜牧兽医学报,2010,41(9):1158-1165
- 朱红裕,李强. 外源蛋白在大肠杆菌中的可溶性表达策略[J]. 过程工程学报,2006,6(1):150-155
- 王海峰,易忠,魏玉荣,等. 口蹄疫病毒 VP1 基因的原核可溶性表达[J]. 中国畜牧兽医,2009,36(10):50-54
- 王启斌,张志权,方建敏,等. 哺乳动物 CYP450 在大肠埃希氏菌上表达的研究进展[J]. 医药导报,2008,27(9):1083-1085
- 陈明杰,高明明,姚文兵,等. 大肠杆菌非偏爱密码子的数量及位置对外源蛋白表达的影响[J]. 中国药科大学学报,2008,39(6):553-556
- 尹春光,杜立新,赵桂平,等. Mx 基因稀有密码子和 mRNA 结构及大肠杆菌表达优化[J]. 遗传,2009,31(1):75-82
- 吴静,雷捷勇,张莲芬,等. 改善稀有密码子和氨基酸残基限制提高重组人 ADAM15 去整合素结构域蛋白表达水平[J]. 微生物学报,2008,48(8):1067-1074
- 郭斯启,奚永志,崔建武,等. 重组人干细胞因子在原核系统中高效表达的策略[J]. 中国输血杂志,2004,17(4):227-231
- 汤少华,从旭,张满仓,等. 中国丁型肝炎病毒四川株的抗原表达及其某些特征的研究[J]. 病毒学报,1993,9(4):316-324
- 程雷,陈宗梅,程备久,等. 玉米叶绿体依赖 NADPH 硫氧还蛋白还原酶的原核表达及活性分析[J]. 农业生物技术学报,2009,19(3):470-476
- 金元昌,刘利,苏晓艳,等. IPTG 诱导浓度、时间及温度对重组促性腺激素释放激素基因表达的影响[J]. 黑龙江畜牧兽医,2006,8:17-19
- 叶姣,陈长华,夏杰,等. 温度对重组大肠杆菌生长及外源蛋白表达的影响[J]. 华东理工大学学报,2002,28(2):364-367
- 向波,王理,王卫,等. 抗癌蛋白 NOR1 基因工程重组蛋白表达条件的优化和纯化[J]. 中南大学学报,2011,36(7):610-615
- 魏婕,易忠,魏玉荣,等. IPTG 诱导浓度、时间对 AsiaI 型口蹄疫病毒 VP1 蛋白表达的影响[J]. 中国畜牧兽医,2009,36(5):63-65

(收稿:2011-11-21)

(修回:2011-11-24)