

进一步证实 LSCs CD47 阳性的 AML 患者易复发,生存时间缩短、预后差。

总之,AML 患者 LSCs 表面 CD47 普遍过表达,造成临床上治疗反应差,易复发、耐药、生存时间短、预后差。然而,CD47 在 LSCs 细胞中的高表达也为单克隆抗体靶向治疗 AML 提供了依据,目前相关体外研究及动物实验已取得重要进展。

#### 参考文献

- Jordan CT, Upchurch D, Szilvassy SJ, *et al.* The interleukin-3 receptor alpha chain is a unique marker for human acute myelogenous leukemia stem cells[J]. *Leukemia*, 2000, 14(10):1777-1784
- Van Rhenen A, Moshaver B, Kelder A, *et al.* Aberrant marker expression patterns on the CD34<sup>+</sup> CD38<sup>-</sup> stem cell compartment in acute myeloid leukemia allows to distinguish the malignant from the normal stem cell compartment both at diagnosis and in remission[J]. *Leukemia*, 2007, 21(8):1700-1707
- Hosen N, Park CY, Tatsumi N, *et al.* CD96 is a leukemic stem cell specific marker in human acute myeloid leukemia[J]. *Proc Nat Acad Sci USA*, 2007, 104(26):11008-11013

- Jin L, Hope KJ, Zhai Q, *et al.* Targeting of CD44 eradicates human acute myeloid leukemic stem cells[J]. *Nat Med*, 2006, 12(10):1167-1174
- Jaiswal S, Jaiswal CH, Pang WW, *et al.* CD47 is up regulated on circulating hematopoietic stem cells and leukemia cells to avoid phagocytosis[J]. *Cell*, 2009, 138(2):271-285
- Brown EJ, Frazier WA. Integrin associated protein (CD47) and its ligands[J]. *Trends Cell Biol*, 2001, 11(3):130-135
- Matozaki T, Murata Y, Okazawa H, *et al.* Functions and molecular mechanisms of the CD47/2S IRPalpha signalling pathway[J]. *Trends Cell Biol*, 2009, 19(2):72-80
- Barclay AN, Brown MH. The SIRP family of receptors and immune regulation[J]. *Nat Rev Immunol*, 2006, 6(6):457-464
- Cumano A, Godin I. Ontogeny of the hematopoietic system[J]. *Annu Rev Immunol*, 2007, 25:745-785
- Majeti R, Chao M P, Alizadeh AA, *et al.* CD47 is an adverse prognostic factor and therapeutic antibody target on human acute myeloid leukemia stem cells[J]. *Cell*, 2009, 138(2):286-299

(收稿:2011-10-31)

(修回:2011-11-11)

## 基因工程丁肝抗原的获取和鉴定

丁军颖 邱 丰 苏秋东 卢学新 伊 瑶 毕胜利

**摘 要** **目的** 获取有生物活性的基因工程丁肝抗原蛋白,探讨其作为诊断试剂的应用价值。**方法** 合成人工编码的丁肝小抗原基因;以 M48 为载体,构建重组表达质粒;进行原核表达;以亲和层析纯化并以 Western blotting 和 ELISA 鉴定该蛋白。**结果** 酶切鉴定构建的表达质粒正确;SDS-PAGE 电泳结果显示该蛋白与预期分子质量大小一致;Western blotting 和 ELISA 结果显示该蛋白能与丁肝抗体特异性结合。**结论** 成功获取了有生物活性的基因工程丁肝抗原蛋白,可以 1:1000 稀释度作为包被抗原替代丁肝抗体诊断试剂成分,用于 ELISA 检测。

**关键词** 基因工程 丁肝抗原 蛋白表达 亲和层析

**Obtain and Characterization of HDV Antigen by Gene Engineering** Ding Junying, Qiu Feng, Su Qiudong, *et al.* National Institute for Viral Disease Control and Prevention, Beijing 102206, China

**Abstract** **Objective** To obtain genetic engineering HDAg with biological activities and to study whether it can be used as the potential candidate for diagnosis reagent. **Methods** The objective small HDAg gene was synthesized. The recombinant expression plasmid of M48 vector was constructed with this gene. The corresponding protein was expressed in *E. coli*, purified by affinity chromatography and was identified by Western blotting and ELISA. **Results** Restriction enzyme digestion showed the expression plasmid was constructed successfully. SDS-PAGE indicated that the molecular weight of this protein was consistent with that of expected one. Western blotting and ELISA proved its specific affinity to HDV antibody. **Conclusion** The gene engineering HDAg with biological activities was obtained successfully, which provided a basis for research of HDV ELISA diagnosis reagent.

**Key words** Gene engineering; HDAg; Protein expression; Affinity chromatography

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:丁军颖和邱丰为共同第一作者)

通讯作者:毕胜利,高级研究员,电子信箱:jyd0311@126.com

随着人们对丁型肝炎病毒(HDV)研究的深入,采用基因工程技术获取具有生物活性的重组丁肝抗原(HDAg)成为解决丁肝诊断研究中 HDAg 来源困

难的一个重要途径。丁肝抗原的测定是诊断和监测丁肝的主要手段,为提高检测丁肝抗原的 ELISA 诊断试剂质量,高效低成本制备纯度好且效价高的 HD-Ag 尤为重要。为此,本实验采用人工编码的小分子质量丁肝抗原 (small-HDAg, S-HDAg) 基因,以本室改造的 M48 为载体,构建了表达质粒,并转化 BL21 筛选基因工程菌,最后,利用该载体自身具备的 6 个组氨酸标签进行纯化,以期得到有生物活性的基因工程丁肝抗原蛋白,供丁肝 ELISA 诊断试剂的研发使用。

### 材料与方法

1. 材料:丁肝小抗原优化基因(北京六合通公司);表达载体 M48 由本室从商品化质粒 PET43a 改造并留存; $T_4$  DNA 连接酶(北京六合通公司);限制性内切酶 *Nco* I 和 *Xho* I (北京六合通公司);DNA 提取试剂盒(美国, Promega);水平电泳系统(北京六一电泳仪厂);BL21 感受态(北京六合通公司);DH5 $\alpha$  感受态(北京六合通公司);XMTD-6000 电热恒温水槽(北京长风仪器仪表公司);LB 培养基(美国, Sigma);IPTG 诱导剂(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 Marker(中国科学院上海生命科学研究院);His 介质(美国, GE);蛋白预染 Marker(北京纽英伦生物技术北京有限公司);Gel Doc XR<sup>+</sup> 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);半干转膜仪(美国, BIO-RAD);兔抗人 IgG(北京乐博生物科技有限公司);牛血清白蛋白(北京毕特博生物技术有限责任公司);硝酸纤维素膜(北京欣经科生物技术有限公司);TMB(美国, Sigma);丁型肝炎病毒抗体诊断试剂盒(北京贝尔生物工程有限公司)。

2. 优化密码并全基因序列合成:人工编码 S-HDAg 基因序列,并在两端加酶切位点(5'为 *Nco* I;3'为 *Xho* I)和保护碱基。全基因序列由北京六合通公司合成,命名为 T-D。

3. 质粒构建并鉴定:将 T-D 用 *Nco* I 和 *Xho* I 进行双酶切,获取目的基因,将此基因连接 M48 载体,构建质粒 M48-D,转化感受态 DH5 $\alpha$ ,挑选阳性克隆,过夜培养,提取质粒,进行双酶切,1%琼脂糖电泳鉴定。同时送至北京六合通公司测序鉴定。

4. 蛋白表达并鉴定:将质粒 M48-D 转化 BL21 感受态,挑选阳性克隆接种于 1.5ml 含 100mg/L Amp 的 LB 培养基中,37 $^{\circ}$ C,240r/min,培养 3h,取菌留存;取该菌种按 1:1000 分别接种于含 100mg/L Amp 的 LB 培养基中,30 $^{\circ}$ C,240r/min,过夜培养;以含 200mg/L Amp 的 LB 培养基做倍比稀释,37 $^{\circ}$ C,240r/min,培养 1h 后加 IPTG 至终浓度为 0.25mmol/L,37 $^{\circ}$ C 诱导表达 1h,收获菌液。取 500 $\mu$ l 上述菌液,10000r/min,离心 1min,弃上清,以 50 $\mu$ l 双蒸水充分重悬,再加等体积 2 $\times$  Buffer,混匀,煮沸 3min,取样 20 $\mu$ l,以 5%浓缩胶和 12%分离胶进

行常规 SDS-PAGE

5. 蛋白纯化并鉴定:将上述菌液以 4000r/min,离心 10min,弃上清;以菌体裂解液(10mmol/L Tris-HCl,0.5% Triton X-100,500mmol/L NaCl)重悬,在冰浴中以 250W 超声破碎 15min(24 个循环)。以 12000r/min,离心 10min,上清过镍柱,以咪唑梯度洗脱,收集各峰,进行常规 SDS-PAGE,并以 Image Lab 软件分析。

6. Western blotting 检测蛋白生物学活性:将 SDS-PAGE 分离胶中的蛋白转至硝酸纤维素膜上,以丁肝阳性血清为一抗,兔抗人 IgG 为二抗,以 TMB 显色,进行常规 Western blotting。

7. ELISA 验证蛋白生物学活性:将本研究表达的基因工程丁肝蛋白包被于聚丙烯板,以牛血清作为本底对照,将两种物质均用 pH 值为 9.6 的碳酸盐缓冲液稀释,依次以 10.0, 8.0, 6.0, 4.0, 2.0 和 1.0 $\mu$ g/ml 的浓度进行梯度包被和封闭,开展 ELISA 结合研究;以北京贝尔生物工程有限公司丁肝抗体 ELISA 诊断试剂作对照。

### 结 果

1. 密码子优化与全基因序列合成:对 S-HDAg 进行人工编码,并在 5'和 3'端设置酶切位点 *Nco* I 和 *Xho* I,另加保护碱基,得到全基因,如下:

```
5' - CCCATGGGTC GTTCCGAATC ACGCAAA-
CAT CGTGGTGGCC GTGAAGAAGC TCTTGAGCAA
TGGATTTCTG GTCGTAAGAA ACTTGAAGAG CTT-
GAACGTG AGGCTCGTAA AATCAAAAAG AAAAT-
CAAGA AACTTGAAGA CGACAATCCT TGGCTTGGA
ACGTAAAGG TATTCTGGGC AAAAAGGACG AG-
GAAGGTGA AGGTGCACCT CCTGCTAAAC
GCGCTCGTAC CGACCAGATG GAAGTTGACA CCG-
GTCCGCG TAAGCGTCCT CTGCGTGGCG GTTTCACA-
GA CAAAGAGCGT CAAGACCATC GCCGTCGTAA
GGCTCTGGAA AATAAAAAGA AACAGCTTAC CG-
CAGGTGGT AAGTCTCTGT CTCGTGAGGA AGAG-
GAAGAG CTTAAACGTC TGACCGAAGA
GGACGAACGT CGCGAGCGTC GTGTTGCGGG
CCCCTCTGTT GGTGGTGTTA ACCCTCTGGA AGGTG-
GCTCC CGTGGTGCTC CTGGTGGTGG CTTCGTTCTT
TCTATGCAAG GTATCCCTGA ATCTCCTTTT ACCCG-
TACAG GTGAAGGTCT GGACGTTCTG GGTGGTCAGG
GTTTCCCCTG CGAGGC -3'.
```

2. 重组表达质粒的构建:北京六合通公司合成含目的基因序列的质粒(T-D),酶切后回收目的基因,连接到 M48 载体上。连接成功的质粒(M48-D)双酶切鉴定符合预期结果(图 1)。质粒送公司测序鉴

定,连接框架和准确性均符合要求,说明成功构建了 M48 - D 重组表达质粒。

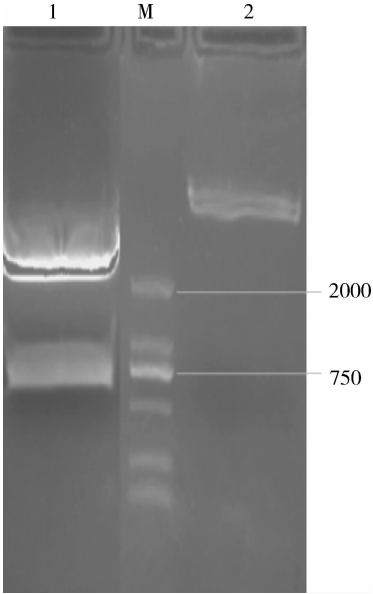


图 1 M48 - D 重组质粒及其双酶切产物  
1% 琼脂糖凝胶电泳图

1. 双酶切产物;M. DNA 标志 (DL2000); 2. M48 - D 质粒

3. 蛋白表达与纯化 :以重组质粒 M48 - D 转化 BL21 感受态细胞,经 IPTG 诱导,SDS - PAGE 显示有外源蛋白表达,表观分子质量与预期大小一致,约为 35kDa(图 2);经超声裂解证实,表达蛋白多为可溶性蛋白;裂解液重悬后离心收集上清,通过亲和层析以梯度咪唑洗脱,SDS - PAGE 电泳验证,300mmol/L 咪唑的洗脱峰主要是目的蛋白,收集此目的蛋白峰(图 3)。经 Image Lab 软件分析,获得的蛋白浓度约为 2g/L,纯度 >90%。

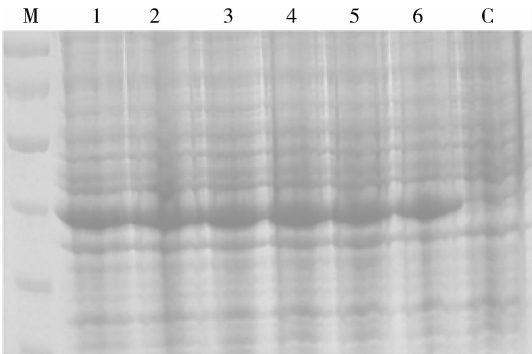


图 2 不同阳性克隆的蛋白表达 SDS - PAGE 结果  
M. 蛋白标准;1~6.6 个不同阳性克隆;C. 阴性对照

4. 蛋白生物学活性鉴定:Western blotting 实验结果(图 4)显示,表达和纯化的基因工程 S - HDAg 蛋

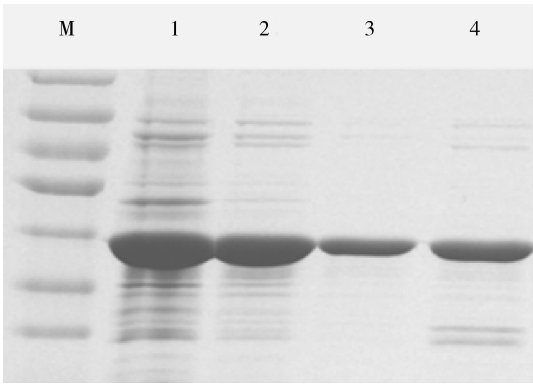


图 3 表达蛋白亲和层析的咪唑梯度  
洗脱 SDS - PAGE 结果

M. 蛋白标准;1. 菌体裂解离心的上清; 2. 流川;3. 300mmol/L 咪唑洗脱峰;460mmol/L 咪唑洗脱峰

白具备与丁肝抗体结合的生物活性。

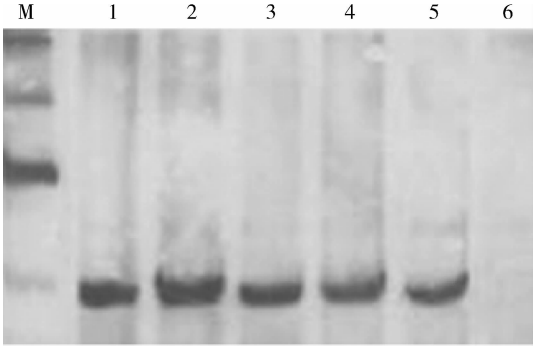


图 4 表达和纯化蛋白的 Western blotting 结果

M. 蛋白标准;1. 菌体裂解离心的上清; 2. 全菌;3. 流川;4. 300mmol/L 咪唑洗脱峰;5. 60mmol/L 咪唑洗脱峰;6. 阴性对照

5. 蛋白生物学活性验证:ELISA 结合试验结果显示,表达纯化的基因工程丁肝抗原蛋白与阳性血清能特异结合。梯度试验显示:显色浓度与包被蛋白浓度呈正相关,两者结合特异性较强。其中,当包被浓度为 2μg/ml(1:1000 稀释度)时,可替代北京贝尔生物工程有限公司的相应诊断试剂成分,用于 ELISA 检测。

讨 论

HDV 是 1977 年意大利的 Rizzetto 等<sup>[1]</sup>首先发现的。当时曾被误认为是乙肝病毒新的抗原系统。1979~1980 年经黑猩猩试验,证明是一种新病毒,需要嗜肝病毒(主要是乙肝病毒)辅助,尤其是外壳蛋白的合成,才能形成具有完整结构的病毒颗粒<sup>[2,3]</sup>。1984 年被正式命名为丁型肝炎病毒<sup>[4]</sup>。HDAg 存在小分子质量(24kDa)丁肝抗原(S - HDAg)和大分子质量(27kDa)丁肝抗原(long - HDAg, L - HDAg)两

种形式,目前认为可能是转录过程中存在特殊 RNA 编辑所致<sup>[5]</sup>。通过 RNA 编辑,S-HDAg 的终止密码子 UAG 变为 UGG,从而翻译成为 L-HDAg<sup>[6]</sup>。二者具有共同起始密码并具有共同氨基酸终末序列,具有不同的终止密码。除 L-HDAg C 端多 19 个氨基酸外,两基因在序列上完全相同,事实上两种形式来源于同一开放读码框(ORF),即反基因组 RNA 上的 ORF5<sup>[7]</sup>。本研究是依据在大肠杆菌中蛋白质密码子的使用频率,对 S-HDAg 基因进行人工编码后开展的,以期构建能高效表达的质粒。

本研究选用含硫氧还蛋白(Trx)的原核表达系统,此系统尤其适用大量表达可溶性蛋白<sup>[8]</sup>。Trx 相对分子质量为 12kDa,属于进化保守的家族,具有多个活性中心。其中,两个半胱氨酸经过可逆的氧化过程可将自身巯基转化为二硫键,在与 S-HDAg 目的蛋白进行融合表达时,有利于目的蛋白空间结构的正确折叠,为其能具有生物活性提供有利条件<sup>[9-11]</sup>。即借助硫氧还蛋白的分子伴侣作用,确保大量表达的 S-HDAg 蛋白能正确折叠且表现出全部生物学活性<sup>[12]</sup>。

经过不同载体的尝试,本研究最终采用改装后仍带有组氨酸标签(His-tag)的 M48 载体来表达目的蛋白,以利于高效纯化。该载体多克隆酶切位点上游有编码 6 个组氨酸的基因序列,重组质粒经诱导表达后,组氨酸可与外源插入基因融合表达<sup>[13-16]</sup>。依据组氨酸与金属镍(Ni)之间的亲和力所产生的螯合作用而设计的亲和层析方法,是纯化此种融合蛋白高效而简单的方法<sup>[17]</sup>。表达蛋白的细胞沉淀经裂解液溶解,上清经镍柱吸附,因咪唑与组氨酸有类似的化学结构,可与组氨酸竞争性结合金属镍,所以咪唑置换可洗脱下特异结合的 S-HDAg 蛋白,从而获取高纯度的基因工程丁肝抗原。

本研究成功构建了含 S-HDAg 优化基因的重组表达质粒和相应的工程菌,并在含硫氧还蛋白的原核表达系统获得高效表达,通过亲和层析纯化得到可与丁肝抗体结合的 S-HDAg 蛋白,为丁肝的 ELISA 诊断试剂研发奠定了基础。

#### 参考文献

- Rizzetto M, Canese MG, Aricò S, *et al.* Immunofluorescence detection of new antigen-antibody system (delta/anti-delta) associated to hepatitis B virus in liver and in serum of HBsAg carriers[J]. *Gut*, 1977,18(12):997-1003
- Rizzetto M, Hoyer B, Canese MG, *et al.* Delta Agent: association of delta antigen with hepatitis B surface antigen and RNA in serum of

- delta-infected chimpanzees[J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1980,77(10):6124-6128
- Rizzetto M, Canese MG, Gerin JL, *et al.* Transmission of the hepatitis B virus-associated delta antigen to chimpanzees[J]. *J Infect Dis*, 1980,141(5):590-602
- Novick DM, Farci P, Karayiannis P, *et al.* Hepatitis D virus antibody in HBsAg-positive and HBsAg-negative substance abusers with chronic liver disease[J]. *J Med Virol*, 1985,15(4):351-356
- Volchkova VA, Dolnik O, Martinez MJ, *et al.* Genomic RNA editing and its impact on Ebola virus adaptation during serial passages in cell culture and infection of guinea pigs[J]. *J Infect Dis*, 2011,204(3):S941-946
- Wong SK, Lazinski DW. Replicating hepatitis delta virus RNA is edited in the nucleus by the small form of ADAR1[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2002,99(23):15118-15123
- Shih KN, Chuang YT, Liu H, *et al.* Hepatitis D virus RNA editing is inhibited by a GFP fusion protein containing a C-terminally deleted delta antigen[J]. *The Journal of General Virology*, 2004,85(4):947-957
- 刘雷,尹钧. 硫氧还蛋白的研究[J]. *东北农业大学学报*, 2003,34(2):210-218
- Roos G, Foloppe N, Van Laer K, *et al.* How thioredoxin dissociates its mixed disulfide[J]. *PLoS Comput Biol*, 2009,5(8):e1000461
- Carvalho AT, Swart M, van Stralen JN, *et al.* Mechanism of thioredoxin-catalyzed disulfide reduction. Activation of the buried thiol and role of the variable active-site residues[J]. *J Phys Chem B*, 2008,112(8):2511-2523
- Bauer H, Massey V, Arscott LD, *et al.* The mechanism of high Mr thioredoxin reductase from *Drosophila melanogaster*[J]. *J Biol Chem*, 2003,278(35):33020-33028
- 黎明,宋馨宇,王晓娟,等. 双顺反子翻译偶联表达载体的构建及蚓激酶基因 F238 在大肠杆菌中的可溶性表达[J]. *微生物学通报*, 2011,38(7):1056-1062
- 夏海锋,张显,金雄华,等. 镍离子亲和层析介质的制备及其用于组氨酸标记蛋白质的纯化[J]. *江南大学学报*, 2010,9(6):685-689
- Randolph TW. The two faces of His-tag: Immune response versus ease of protein purification[J]. *Biotechnol J*, 2012,7(1):18-19
- Medrano G, Dolan MC, Condori J, *et al.* Quality assessment of recombinant proteins produced in plants[J]. *Methods Mol Biol*, 2012,82(4):535-564
- Fujishima SH, Nonaka H, Uchinomiya SH, *et al.* Design of a multi-nuclear Zn(II) complex as a new molecular probe for fluorescence imaging of His-tag fused proteins[J]. *Chem Commun (Camb)*, 2011,48(4):594-596
- 张培因,王燕媚,卫红飞,等. 金属螯合亲和层析填料的制备及其在重组六聚组氨酸融合蛋白中的应用[J]. *吉林大学学报*, 2008,34(2):340-342

(收稿:2012-01-12)

(修回:2012-01-17)