

## · 基础论著 ·

# 乙型肝炎病毒 X 抗原结合蛋白 1 的原核表达及亚细胞定位

樊万虎 成军 刘小静 张树林 王琦

**【摘要】 目的** 应用酵母双杂交及生物信息学技术筛选乙型肝炎病毒 X 抗原结合蛋白 1 (HBXBP1) 并进行克隆, 探讨其在大肠埃希菌 BL21 中表达及亚细胞定位。**方法** 应用反转录 PCR (RT-PCR) 技术, 以 HepG2 细胞 mRNA 为模板, 扩增获得 HBXBP1 基因片段, 连接到 pGEM-T 载体, 双酶切鉴定及测序正确后克隆至原核表达载体 pET-32a(+) 中, 转化大肠埃希菌 BL21, 通过 IPTG 诱导表达以获得 HBXBP1 融合蛋白, 并经 SDS-PAGE 及 Western blot 分析证实融合蛋白的特异性; 构建 HBXBP1 基因的绿色荧光蛋白表达质粒 pEGFP-C1-HBXBP1, 转染 HepG2 细胞, 24 h 后于荧光显微镜下观察表达蛋白的亚细胞定位。**结果** RT-PCR 扩增获得 921 bp 的 HBXBP1 基因片段, 插入原核表达载体 pET-32a(+) 中, 转化大肠埃希菌 BL21, 经 IPTG 诱导成功获得约 56 kD 的重组蛋白, 经 Western blot 分析证实其具有良好的特异性; 成功构建 HBXBP1 基因的绿色荧光蛋白表达质粒 pEGFP-C1-HBXBP1, 其表达蛋白定位于细胞质。**结论** pET-32a(+)-HBXBP1 原核表达载体在大肠埃希菌 BL21 中诱导表达 HBXBP1 融合蛋白; HBXBP1 基因可表达 HBXBP1 蛋白且定位于细胞质, 为研究 HBXBP1 蛋白的免疫原性和生物学特性奠定了一定的理论基础。

**【关键词】** 肝炎病毒 X 抗原, 乙型; 结合蛋白; 原核细胞

**Subcellular location and prokaryotic expression of a novel binding protein 1 of HBxAg** FAN Wan-hu, CHENG Jun, LIU Xiao-jing, ZHANG Shu-lin, WANG Qi. Department of Infectious Diseases, The First Affiliated Hospital of Medical School, Xi'an Jiaotong University, Xi'an 710061, China  
Corresponding author: CHENG Jun, Email: chengjdt@ccmu.edu.cn

**【Abstract】 Objective** To clone the human gene of hepatitis B virus X antigen binding protein 1 (HBXBP1), which was screened with yeast two-hybrid system and bioinformatics techniques, and to construct prokaryotic expression vector of pET-32a(+)-HBXBP1, and to discuss the expression of recombinant protein in *E. coli* BL21 and subcellular location. **Methods** The DNA fragment of HBXBP1 with about 921 bp was amplified by reverse transcription PCR (RT-PCR), taking the mRNA extracted from HepG2 cells as the template, and cloned into pGEM-T vector. After identified by restriction enzyme digestion and sequenced, the correct target DNA fragment was inserted into inducible prokaryotic expression vector pET-32a(+) and then transformed into competent *E. coli* BL21. After analyzed by restriction enzyme digestion and PCR, the positive transformed clones were identified and induced with IPTG to obtain fusion protein. The HBXBP1 fusion protein was analyzed by Western blot hybridization. Green fluorescent protein (GFP) expression vector pEGFP-HBXBP1 was constructed and transfected into HepG2 cells and the subcellular location of the proteins expressed by HBXBP1 were analyzed through green fluorescent microscopy after 24 hours. **Results** The 921 bp DNA fragment of HBXBP1 was amplified by RT-PCR. The recombinant expression vector pET-32a(+)-HBXBP1 was constructed successfully. After transformed with pET-32a(+)-HBXBP1 and induced with IPTG, the recombinant target protein with about 56 kD was obtained, which was consistent with our anticipation and was specific varified by Western blot assay. The pEGFP-HBXBP1 vector was successfully cloned, HBXBP1 protein was expressed in cells and subcellularly

DOI:10.3877/cma.j.issn.1674-1358.2012.05.001

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (No. 30371288); 国家重点基础研究项目 (973 项目) (No. 2004CB518908)

作者单位: 710061 西安市, 西安交通大学第一附属医院感染科 (樊万虎、刘小静、张树林); 首都医科大学附属北京地坛医院传染病研究所 (成军、王琦)

通讯作者: 成军, Email: chengjdt@ccmu.edu.cn

located in cytoplasm. **Conclusions** The recombinant prokaryotic expression vector pET-32a(+) -HBXBP1 was constructed, and the HBXBP1 gene was cloned successfully. The HBXBP1 fusion protein could be expressed in prokaryotic expression system of *E. coli*. HBXBP1 gene could express HBXBP1 protein which locates in cytoplasm subcellularly. These results lays a foundation for studying on the immunogenicity and biological characteristics of HBXBP1 protein.

**【Key words】** Hepatitis B X antigen; Binding protein; Prokaryotic cells

乙型肝炎是由乙型肝炎病毒(HBV)感染导致的肝脏炎性损害,全世界慢性HBV感染者约有3.5亿人口<sup>[1]</sup>。乙型肝炎病毒X基因(HBV X)是HBV中最小的一个基因,位于HBV基因组内功能重叠最明显的1374~1838位核苷酸,全长465 bp,决定了其编码的X蛋白(HBx)的多功能性。HBx由145~154个氨基酸组成,分子量约17 kD,能够调节和影响HBV功能基因的表达,并通过干预钙通道等作用影响HBV的复制。越来越多的研究表明,HBx是一种多功能病毒调节蛋白,能够直接或间接与宿主细胞的靶位点结合,参与细胞的各种调控机制<sup>[2-6]</sup>。研究发现肝细胞性肝癌(hepatocellular carcinoma, HCC)的发生与HBx高度相关。58.8%的HCC患者癌组织中可检测到HBx野生型和变异型片段<sup>[7]</sup>。体外研究表明,HBx可诱导鼠类永久性肝细胞和成纤维细胞的转化;将HBV X基因转入小鼠体内,可诱发转基因小鼠肝细胞癌的形成<sup>[8]</sup>。本研究应用大肠埃希菌的表达系统,使新克隆的基因得以表达,为下一步纯化具有免疫原性的XBPI蛋白和多克隆抗体奠定实验基础;将HBXBP1基因克隆到pEGFP-C1中并在细胞内表达后,用荧光显微镜观察基因所表达蛋白在细胞内的定位。为HBV感染的检测、疫苗设计、HBV进入肝细胞机制、宿主抗感染机制和HCC产生机制的研究提供一定的理论依据。

## 材料与方法

### 一、主要实验材料和试剂

引物合成及DNA测序由北京奥科生物技术有限责任公司完成。肝母细胞瘤细胞系HepG2及大肠埃希菌DH5 $\alpha$ 、BL21为首都医科大学附属北京地坛医院传染病研究所保存;Taq酶购于上海鼎国生物技术有限公司;抗-His购自Santa Cruz公司;辣根过氧化物酶标记的羊抗鼠IgG(HRP-IgG)购自北京中杉生物公司;DAB显色液购自上海碧云天生物技术有限公司;PVDF膜购自Millipore公司;Wizard Pure-Fection磁珠法质粒提取试剂盒, Lipofectamine细胞转染试剂盒均购自美国Promega公司; pEGFP荧光表达载体购自Clontech公司;丙酮酰胺、N,N'-亚甲双丙酮酰胺、T4 DNA连接酶、pGEM-T载体和IPTG及X-Gal购于Promega公司;玻璃奶回收试剂

盒购自北京博大泰克生物基因技术有限责任公司; DNA marker和限制性核酸内切酶购自TaKaRa公司。

### 二、方法

1. XBPI基因的扩增:XBPI原核表达有义链引物为5'-GCCGAATTCATGGCCAAGGACTTTCAAGA-3',反义链引物为5'-TAAGTGCAGCTCAGGCCACCTCGCCGGTGGC-3';pEGFP-C1 in-frame表达需有义链引物5'-GCCGAATTCGATGGCCAAGGACTTTCAAGA-3',反义链引物5'-TAAGGATCCTCAGGCCACCTCGCCGGTGGC-3' PCR扩增,玻璃奶试剂盒回收目的片段。

2. pET32a(+)-XBPI原核表达载体的构建:将回收的目的基因片段与pGEM-T载体按T4 DNA连接酶说明书操作于16℃连接过夜,连接产物转化大肠埃希菌DH5 $\alpha$ 感受态细胞,铺于LB/Amp/IPTG/X-Gal平板上,37℃孵育16 h后进行蓝白斑筛选。

挑取白色菌落行PCR检测,阳性菌落增菌,应用碱裂解法提取细菌质粒DNA,行EcoRI/SalI双酶切鉴定,证明目的基因片段已插入pGEM-T载体中后测序。测序正确后回收经酶切的目的片段,与经EcoRI/SalI双酶切的pET-32a(+)表达质粒相连接,转化表达菌株大肠埃希菌BL21,铺于LB/Amp固体平板上,37℃孵育16 h,挑取单菌落碱裂解法抽提质粒,采用EcoRI/SalI双酶切鉴定。

3. pET32a(+)-XBPI强阳性克隆的进一步筛选:将鉴定正确的pET32a(+)XBPI重组子菌液在含150  $\mu$ g/ml氨苄青霉素的LB培养皿中进行四区划线,37℃培养过夜后,挑取较大的单克隆于200  $\mu$ g/ml氨苄青霉素的液体LB中摇菌,再将其在含250  $\mu$ g/ml氨苄青霉素的LB培养皿中进行四区划线,挑取单克隆在含300  $\mu$ g/ml氨苄青霉素的液体LB中培养,进行菌液PCR,由此筛选出的重组子抗性比较高,更适于原核表达。

4. 重组蛋白的诱导表达<sup>[9]</sup>:挑取单个、新鲜的阳性菌落及转化了pET-32a(+)空载体的菌落接种于含有羧苄青霉素的LB液体培养基中,37℃培养过夜。次日按1:100扩大,37℃培养至细菌密度为 $A_{600}=0.6$ 时,加入IPTG(终浓度为1 mmol/L),继续

培养 2、3 和 4 h。取 3 ml 培养液离心集菌, 100  $\mu$ l Tris-HCl (1 mol/L, pH6.8) 悬浮沉淀, 加入 100  $\mu$ l 的 2 $\times$ SDS 凝胶上样缓冲液及 5  $\mu$ l 的  $\beta$ -巯基乙醇, 煮沸 10 min, 短暂高速离心后取 15  $\mu$ l 进行 SDS-PAGE 电泳分析。

5. 重组蛋白的抗原性检测: 以抗-His 与 HRP-IgG 分别按 1:200、1:2500 稀释作为第一、第二抗体。常规 SDS-PAGE 电泳, 转膜, 5% 脱脂奶粉封闭过夜, 分别经第一、第二抗体孵育后, 再加入显色液, 室温下轻摇反应, X 光片曝光。

6. XBP1 绿色荧光蛋白表达载体的构建: XBP1 与 pGEM-T 质粒连接后, 对提取的连接产物进行 *Eco*RI/*Bam*HI 酶切鉴定, 酶切片段与预期一致。回收该酶切片段, 与 pEGFP 的 *Eco*RI 和 *Bam*HI 酶切产物连接后, 再次进行 *Eco*RI 和 *Bam*HI 酶切鉴定及 DNA 序列测定。磁珠法纯化提取转染级质粒。将 XBP1 基因的全序列双酶切后连接入绿色荧光载体 pEGFP, 转化大肠埃希菌, 鉴定正确后提取纯化的质粒准备转染细胞。

7. XBP1 基因表达产物亚细胞定位: 将提纯的转染级质粒转染 HepG2 细胞, 以空载体作空白对照。转染 24 h 后, 荧光显微镜下数码相机拍照, 分析 XBP1 的亚细胞定位。

## 结 果

一、HBXBP1 基因的 PCR 扩增及 pET32a(+)-XBP1 质粒的酶切鉴定

PCR 扩增产物约 921 bp, 与理论片段大小符合 (图 1); 重组表达载体 pET-32a(+)-XBP1 经 *Eco*RI 和 *Sal*I 双酶切后, 显示正确的酶切图谱 (图 2)。

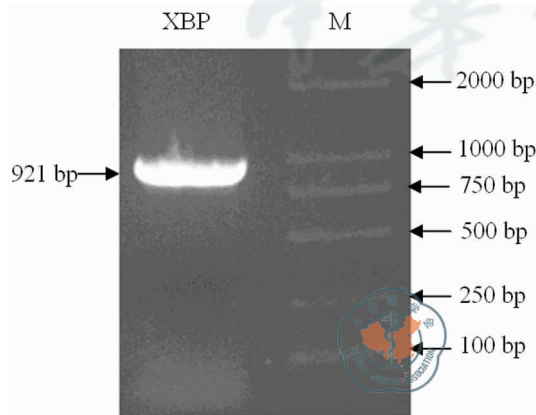


图 1 XBP1 基因的 PCR 电泳

注: XBP: XBP1 的 PCR 产物; M: Marker DL200

二、pET-32a(+)-XBP1 质粒转化宿主大肠埃希

菌 BL21 的鉴定分析

利用菌落 PCR 鉴定重组表达载体 pET-32a(+)-XBP1 转化宿主大肠埃希菌 BL21 的情况。挑取 4 个菌落进行 PCR 分析, 结果表明扩增片段与 XBP1 基因的理论大小一致。

三、表达产物的 SDS-PAGE 电泳鉴定结果

大肠埃希菌 BL21 中经 IPTG 诱导表达的 pET-32a-XBP1 重组蛋白行 12.5% PAGE 凝胶电泳分析, 结果显示, 经 IPTG 诱导的 BL21 表达蛋白集中在 56 kD 左右, 与预期重组蛋白质分子量相同, 明显抑制非目的蛋白的表达, 而在未诱导时, 可见多种大肠埃希菌 BL21 中不同分子量蛋白表达 (图 4)。

四、Western blot 免疫印迹分析

BL21-pET32a(+) 和 BL21-pET32a(+) XBP1 细菌蛋白经 Western blot 检测发现, 前者于 21.8 kD 处可见明显条带, 后者于 55.6 kD 处可见明显条带, 均符合预期蛋白分子量大小, 证实其原核表达产物具有良好的免疫反应性 (图 5)。

五、pEGFP-C1-XBP1 表达载体构建及酶切鉴定

本研究中 XBP1 新基因成功连接入 pEGFP-C1, 重组表达载体 pEGFP-C1-XBP1 经 *Eco*RI/*Bam*HI 双酶切和 *Eco*RV 单酶切鉴定后, 显示正确的酶切图谱 (图 6)。

六、XBP1 在 HepG2 细胞内的定位

pEGFP-XBP1 表达质粒成功地在 HepG2 细胞中表达, 荧光显微镜下可观察到在转染细胞胞浆内有弥漫分布的绿色荧光, 而细胞核内无绿色荧光蛋白表达, 进而推测 XBP1 亚细胞定位于细胞浆中 (图 7)。

## 讨 论

HBx 是一种多功能调节蛋白, 包含有 N-端的负性调节区域和 C-端的转录激活区域, 细胞内的亚定位研究显示 HBV 感染肝细胞后, HBx 蛋白主要表达于肝细胞浆, 少数位于胞膜或胞核或同时存在于胞浆、胞膜及核内<sup>[10-11]</sup>。近年研究报道, HBx 蛋白表达部位与表达量有关, 当 HBx 蛋白在细胞内低表达时, 主要位于核内, 而当其表达量增加时, 大部分位于胞浆, 或可以穿梭于胞核和胞浆之间<sup>[12]</sup>。HBx 蛋白的这种动态分布与其在 HBV 生命周期中的多重作用相关。HBx 是一种反式作用因子, 其本身不能与双链 DNA 直接结合, 而是通过蛋白与蛋白之间的相互作用来行使功能, 对促进肝细胞增殖、抑制其凋亡、细胞的转化及病毒复制均有重要的作用<sup>[13-15]</sup>, HBx 基因以直接或间接的方式与宿主或病毒作用, 发挥其生物学功能<sup>[16-17]</sup>。HBx 基因在肝细胞的增殖



以及肝细胞癌发生中起着重要的作用<sup>[18]</sup>,抑癌基因 p53 功能丧失,抑制 p53 依赖的细胞凋亡,从而导致肿瘤发生。  
p53 内有两个 HBx 结合位点,HBx 与之结合后导致

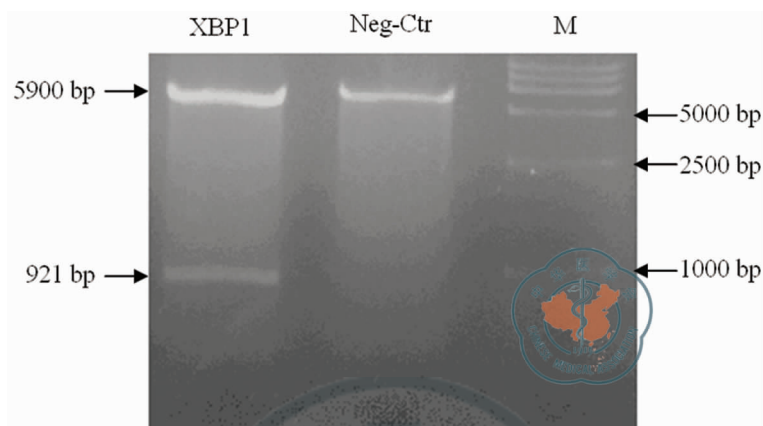


图2 pET-32a(+)-XBP1 的 *Eco* R I 和 *Sal* I 酶切图谱

注: XBP1:pET32a(+)-XBP1 酶切;Neg-Ctr:pET32a(+)-XBP1 酶切;M:Marker DL15000

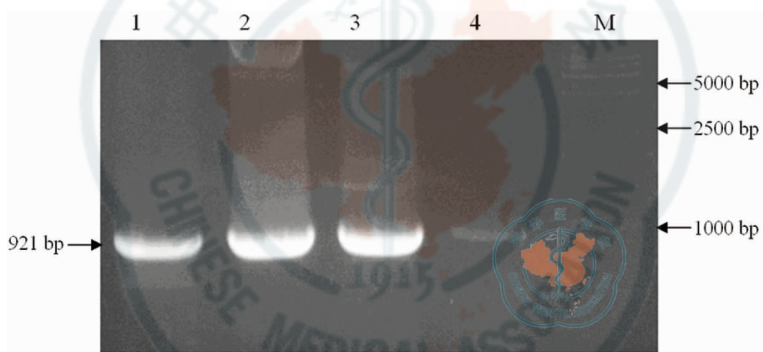


图3 重组质粒转化宿主 BL21 的菌落 PCR

注: 1~4 泳道:XBP1 的菌落 PCR 产物;M:Marker DL15000

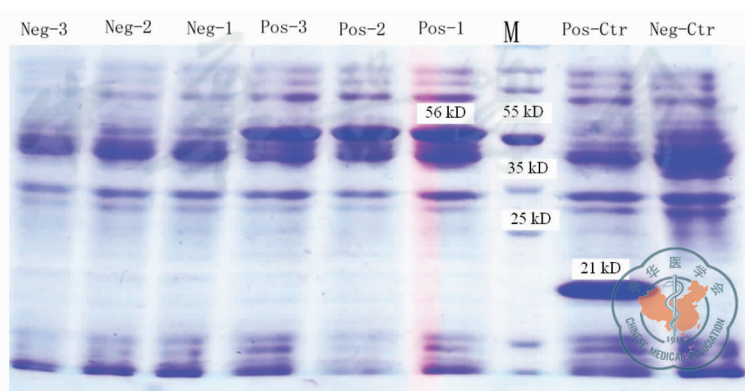


图4 pET32a-XBP1 蛋白 PAGE 胶电泳检测蛋白表达

注: Neg-3~1:pET-32a(+)-XBP1 未诱导组;Pos-3~1:分别为 pET-32a(+)-XBP1 诱导 3、4 和 5 h 的结果;Pos-Ctr 和 Neg-Ctr 分别为:pET-32a(+)-空质粒诱导和未诱导结果

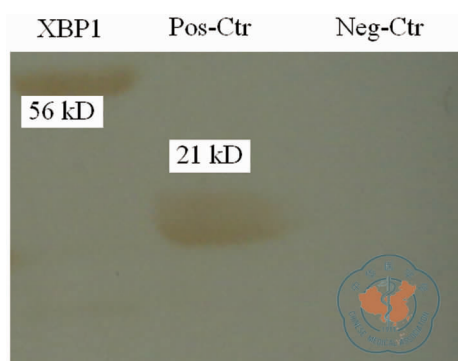


图 5 pET32a(+)XBP1-Western blot 检测结果  
注: XBP1: 实验组, pET-32a(+)-XBP1 诱导 5 h;  
Pos-Ctr: 阳性对照组, pET-32a(+)空质粒诱导 5 h;  
Neg-Ctr: 阴性对照组, pET-32a(+)空质粒未诱导 5 h

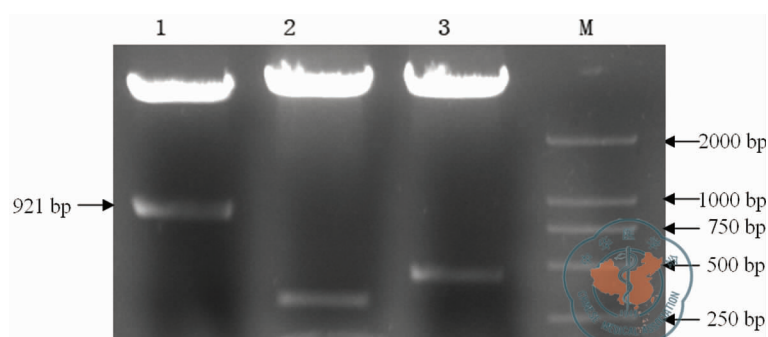


图 6 pEGFP-C1-XBP1 的酶切鉴定图

注: 1: pEGFP-C1-XBP1 双酶切; 3: pEGFP-C1-XBP1 单酶切; M: Marker DL2000

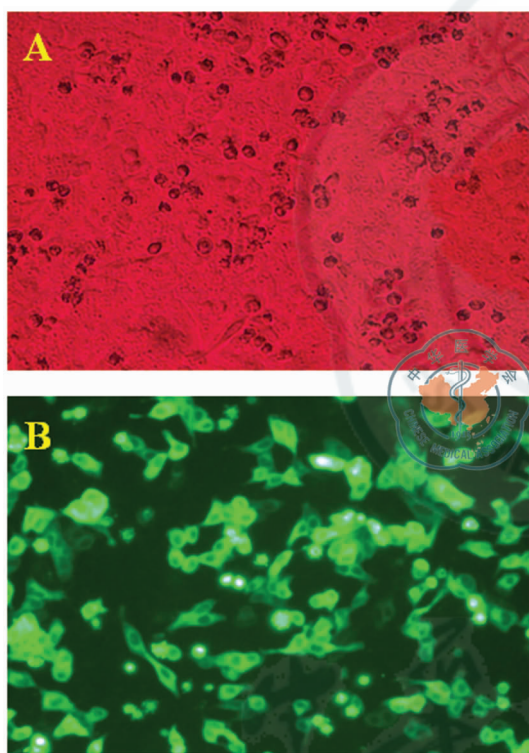


图 7 XBP1 于 HepG2 细胞中的定位

注: A 图为光镜下视野( $\times 200$ ); B 图荧光显微镜视野( $\times 200$ )

本研究通过 PCR 扩增获得 HBx 基因, 与原核表达载体 pET32a(+) 连接构建 pET32a(+)HBx 原核表达载体, BL21 表达获得重组融合蛋白, 经切胶透析纯化后, 应用重组蛋白 HBx 建立检测血清中抗-HBx 的间接 ELISA 法, 分别检测健康人和乙型肝炎患者血清抗-HBx 水平, 可确切反映乙型肝炎患者病情的变化<sup>[9]</sup>。本研究应用大肠埃希菌系统对乙型肝炎病毒 x 抗原结合蛋白的新基因 XBP1 蛋白进行表达, 经 Western blot 分析验证, BL21-pET32a(+)

XBP1 细菌蛋白质于 55.6 kD 处可见明显条带, 均符合预期蛋白分子量大小, 证实其原核表达产物具有良好的免疫反应性。为研究 HBx 蛋白对宿主的免疫功能影响奠定前期实验基础。本课题组将通过原核表达获得的 XBP1 免疫小鼠进行动物接种, 制备 XBP1 的多克隆抗体并行免疫组织化学研究, 从而赋予 XBP1 新的生物学和医学意义。XBP1 基因成功连接入 pEGFP, 经酶切鉴定正确; pEGFP-XBP1 表达质粒在 HepG2 细胞中成功表达, 荧光显微镜下可观察到在转染细胞胞浆内有弥漫分布的绿色荧光, 而细胞核内无绿色荧光蛋白表达, 进而推测 XBP1 亚细胞定位于细胞质中, 为进一步探讨 XBP1 的生物学功能提供依据。

#### 参 考 文 献

- 1 Kara B, Doran F, Kara IO, et al. Expression of c-kit protooncogene in hepatitis B virus-induced chronic hepatitis, cirrhosis and hepatocellular carcinoma: has it a diagnostic role? Int J Clin Pract, 2008, 62(8): 1206-1211.
- 2 Tang H, Oishi N, Kaneko S, et al. Molecular functions and biological roles of hepatitis B virus X protein. Cancer Sci, 2006, 97(10): 977-983.
- 3 Zhang X, Zhang H, Ye L. Effects of hepatitis B virus X protein on the development of liver cancer. J Lab Clin Med, 2006, 147(2): 58-66.
- 4 Yoo YG, Cho S, Park S, et al. The carboxy-terminus of the hepatitis B virus X protein is necessary and sufficient for the activation of hypoxia-inducible factor-1 alpha. FEBS Lett, 2004, 577(1-2): 121-126.
- 5 Zhang X, Dong N, Zhang H, et al. Effects of hepatitis B virus X protein on human telomerase reverse transcriptase expression and activity in hepatoma cells. J Lab Clin Med, 2005, 145(2): 98-104.
- 6 Tanaka Y, Kanai F, Kawakami T, et al. Interaction of the hepatitis B virus X protein (HBx) with heat shock protein 60 enhances HBx-mediated apoptosis. Biochem Biophys Res Commun, 2004, 18

- (2):461-469.
- 7 Su Q, Schoder CH, Hofmann WJ, et al. Expression of hepatitis B virus X protein in HBV-infected human livers and hepatocyte carcinoma. *J Hepatology*, 1998, 27(4):1109.
- 8 Arbuthnot P, Kew M. Hepatitis B virus and hepatocellular carcinoma. *Int J Exp Pathol*, 2001, 82(2):77-100.
- 9 黄培堂译. 分子克隆实验指南. 3 版. 北京: 科学出版社, 2002: 1217-1270.
- 10 Henkler F, Hoare J, Waseem N, et al. Intracellular localization of the hepatitis B virus HBx protein. *J Gen Virol*, 2001, 82(4): 871-882.
- 11 Hoare J, Henkler F, Dowling JJ, et al. Subcellular localization of the X protein in HBV infected hepatocytes. *J Med Virol*, 2001, 64(4):419-426.
- 12 Tang H, Delgermaa L, Huang F, et al. The transcriptional transactivation function of HBx protein is important for its augmentation role in hepatitis B virus replication. *J Virol*, 2005, 79(9):5548-5556.
- 13 Park SG, Chung C, Kang H, et al. Up-regulation of cyclin D1 by HBx is mediated by NF- $\kappa$ B2/BCL3 complex through  $\kappa$ B site of cyclin D1 promoter. *J Biol Chem*, 2006, 281(42):31770-31777.
- 14 Zhang JL, Zhao WG, Wu KL, et al. Human hepatitis B virus X protein promotes cell proliferation and inhibits cell apoptosis through interacting with a serine protease Hepsin. *Arch Virol*, 2005, 150(4):721-741.
- 15 Chan DW, Ng O. Knock-down of hepatitis B virus X protein reduces the tumorigenicity of hepatocellular carcinoma cells. *J Pathol*, 2006, 208(3):372-380.
- 16 Li H, Cao HF, Wan J, et al. Growth inhibitory effect of wild-type K ras 2 gene on a colonic adenocarcinoma cell line. *World J Gastroenterol*, 2007, 13(6):934-938.
- 17 Bouchard MJ, Schneider RJ. The enigmatic X gene of hepatitis B virus. *J Virol*, 2004, 78(12):12725-12734.
- 18 Chen YB, Yan ML, Gong JP, et al. Establishment of hepatocellular carcinoma multidrug resistant monoclonal cell line HepG2/mdr1. *Chin Med J*, 2007, 120(8):703-707.
- 19 任锋, 靳海英, 郭向华, 等. 乙型肝炎病毒 X 基因的原核表达及血清抗 HBx 抗体的检测. *胃肠病学和肝病学杂志*, 2006, 15(3): 239-241.
- (收稿日期:2011-11-28)  
(本文编辑:孙荣华)

樊万虎, 成军, 刘小静, 等. 乙型肝炎病毒 X 抗原结合蛋白 1 的原核表达及亚细胞定位[J/CD]. 中华实验和临床感染病杂志: 电子版, 2012, 6(5):375-380.

CHINESE MEDICAL ASSOCIATION  
1915  
中华医学会