

重组 EB 病毒 DNA 酶的生物学特性 及其应用的初步研究^①

朱振宇^{1,②} 黄迪² 陈瑞君¹ 侯孟君 陈尚武¹ 严世荣¹ 欧敬华¹ 马润泉¹

(1 中山医科大学生物化学教研室; 广州, 510089 2 中山医科大学肿瘤研究所生化室)

摘要 经温度诱导含正向目的基因工程菌粗提液的 DNA 酶活性比宿主菌本身的 DNA 酶活性高 7 倍以上, 且比等蛋白含量激发的 Raji 细胞粗提液 DNA 酶活性高 2 倍以上; 阳性血清对重组 EB 病毒(EBV)-DNA 酶的中和率高达 83.5%; 用重组酶粗提液和 Raji 细胞 DNA 酶检测的 106 例鼻咽癌(NPC)病人血清抗 EBV-DNA 酶抗体(EDAb)水平, 结果无显著性差异, 检出鼻咽癌的效率亦无显著性差异; 表明重组酶经进一步提纯并标准化定量后可用于临床常规检测及大规模普查。

主题词 脱氧核糖核酸酶类/分析; 基因表达; 疱疹病毒 4 型, 人/酶学; 鼻咽肿瘤/诊断

中图分类号 R739.630.4

本室已在基因水平鉴定证实了 EB 病毒(EBV)特异性 DNA 酶的完整基因在大肠杆菌 JM103 中克隆成功, 即工程菌中含有目的基因与质粒的正向连接的重载体^[1]。但克隆的最终目的是使目的基因在新的宿主中获得(高效)表达, 即由宿主细胞合成目的基因所编码的蛋白质; 同时还须对表达产物的活性、抗原性等特性进行进一步研究。本文着重研究工程菌的粗提液中 DNA 酶含量、活性及抗原性检测, 并应用于检测鼻咽癌(NPC)门诊病人血清中 EDAb 水平, 以期获得可应用于临床检测的高活性、良好抗原性的重组 DNA 酶。

1 材料与方 法

1.1 生物材料

含 pBV221 大肠杆菌株及工程菌株, 均由本室制备; 巴豆油和正丁酸激发的 Raji 细胞 EBV-DNA 酶^[2,3], ³H-大肠杆菌 DNA($167 \times 10^9 \text{ s}^{-1} \cdot \text{kg}^{-1}$)及标准鼻咽癌病人血清均由本校肿瘤研究所生化室制备。

1.2 主要试剂及缓冲液的配制

1.2.1 DNA 酶抽提缓冲液 0.05 mol/L Tris-HCl (pH7.5), 0.2 mol/L KCl, 2×10^{-3} mol/L MgCl₂, 2×10^{-3} mol/L ATP, 3×10^{-3} mol/L DTT。

1.2.2 DNA 酶消解缓冲液 0.05 mol/L Tris-HCl (pH7.5), 0.01 mol/L MgCl₂, 0.01 mol/L 2-巯基乙

醇。

1.2.3 液闪液 对次苯基苯恶唑(para-phenylene-phenyloxazole POPOP), 4.0 g; 双苯恶唑(diphenyloxazole, PPO), 0.24 g 溶于 1 L 二甲苯中。

1.2.4 其他溶液 3 mol/L 三氯乙酸; 0.25 g/L 小牛胸腺 DNA。

1.3 主要仪器设备

超净工作台, 恒温自动摇床, 台式低温离心机, 本室设备; 超声发生器, 液体闪烁计数仪, 本校肿瘤研究所提供使用。

1.4 实验方法

1.4.1 DNA 酶粗提液的制备^[4] ①将含 pBV221 的宿主菌和工程菌分别接种于 5×10^3 L Luria-Bertani(LB, 含 5×10^{-2} g/L 的氨苄青霉素)培养基中, 37℃恒温振荡至细菌密度在 600 nm 吸光度(A)为 0.8; ②分别以 1:100 的稀释比例接种于 0.5 L 的 LB 中, 30℃恒温预培养至 600 nm 吸光度为 0.5, 迅速转至 42℃诱导 4 h; ③4℃, 8 000 r/min 离心 5 min 收集菌体, 0.01 mol/L PBS 洗 3 遍, 去上清; ④加入 20 倍菌体体积的 4℃DNA 酶抽提缓冲液, 混匀, 冰浴 10 min; ⑤超声波(20 micros)破碎菌体 4 次, 每次作用 30 s, 间隔冰浴 60 s; ⑥4℃, 8 000 r/min 离心 10 min, 取上清, 加入 1.6 mol/L 灭菌甘油, 混匀即为酶粗提液, 分装, -70℃保存备用。

1.4.2 酶粗提液蛋白质浓度测定^[5] 用电泳纯的

① 国家教委博士点基金资助课题; ② 第一作者, 1966 年出生, 男, 博士, 副教授

牛血清白蛋白为标准,各样品酶粗提液及以相同方法制备的激发的 Raji 细胞 EBV-DNA 酶粗提液,以复管测定 595 nm 吸光度数值为纵坐标,以蛋白质含量为横坐标绘制标准曲线,直线回归,从该标准曲线求得各样品的蛋白质含量和浓度,经适当比例稀释后,配制成浓度为 0.2 g/L 的应用液。

1.4.3 酶粗提液中 DNA 酶总活性测定^[6] ①4 个平行管,分别将³H 标记的大肠杆菌 DNA 2 μg 溶解在 180 μL DNA 消解缓冲液中,分别加入各种酶粗提液(等蛋白含量的激发 Raji 细胞粗提液)10 μL,空白对照管加入 10 μL 三蒸水,混匀,37 °C 水浴 60 min;②加入 4 °C 预冷的 250 g/L 小牛胸腺 DNA 25 μL 及 3 mol/L 三氯乙酸 25 μL,混匀,10 000 r/min 离心 5 min;③取上清到纤维滤纸上,80 °C 烘干 30 min;④将纸片放入液闪瓶中,加入 5×10⁻³ L 液闪液,并将其移至液闪计数器中;⑤静置 4 h 开始检测并连续打印记录计数结果。

1.4.4 酶粗提液抗原性测定 4 个平行管中,各加入标准鼻咽癌血清(阳性血清)10 μL 与 10 μL 酶粗提液混合,室温放置 20 min,使抗原抗体充分作用,而对照管以等量正常人血清(阴性血清)代替阳性血清;以下步骤除 1.4.3 ①改为 37 °C 水浴 40 min 外,②~⑤完全相同。

1.4.5 酶粗提液初步临床应用 复管,以待测血清代替等体积阳性血清,其余同 1.4.4。

2 结果

2.1 重组酶粗提液中 DNA 酶总活性

重组酶粗提液中 DNA 酶总活性的测定结果见表 1。

表 1 3 种酶粗提液中 DNA 酶总活性 ($\bar{x} \pm s$)

酶液种类	上清液 min ⁻¹	总酶活性 (nmol·s ⁻¹ ·L ⁻¹)
空白对照管(加三蒸水)	749±38	—
含 pBV221 的 JM103 粗提液	2 392±217	4.1±0.5
诱导培养工程菌酶粗提液	13 743±875	36.0±2.3
激发的 Raji 细胞酶粗提液	4 435±328	10.2±0.8

由表 1 可见,工程菌粗提液的 DNA 活性比宿主菌本身的 DNA 酶活性[空白质粒标本的放射性核素计数值(min⁻¹)可初步反映]高出 7 倍以上,且比等蛋白含量激发的 Raji 细胞粗提液 DNA 酶活性高出 2

倍以上。

2.2 重组酶粗提液的抗原性

重组酶粗提液的抗原性检测结果见表 2。

表 2 重组酶粗提液抗原性测定结果 ($\bar{x} \pm s$)

酶粗提液来源	血清	上清液 min ⁻¹
含 pBV 221 的 JM103	阴性	1 739 (a)±187
含 pBV 221 的 JM103	阳性	1 620 (b)±174
诱导培养的工程菌	阴性	8 585 (c)±711
诱导培养的工程菌	阳性	2 746 (d)±276

阳性血清对重组 DNA 酶的特异中和率= $[(c-a)-(d-b)]/(c-a) = 83.5\%$;阳性血清对宿主自身的 DNA 酶的中和率= $(a-b)/a = 6.8\%$ 。说明重组酶具有良好的抗原性,可初步试用于临床检测。

2.3 重组酶粗提液的初步临床应用

用重组 DNA 酶粗提液作为抗原检测 106 例鼻咽癌门诊病人血清中 EDAb 水平(以抗酶率, AER 表示)并与 Raji 细胞粗提 DNA 酶比较结果见表 3。

表 3 用两种 DNA 酶液检测 106 例病人 EDAb 结果

血清 EDAb 水平(AER)	<25%	25%~29%	≥30%
用重组 DNA 酶(例)	44(3) ¹⁾	5(2)	57(38)
用 Raji-DNA 酶(例)	39(3)	4(1)	63(39)

1)括号内的数字为同时作病理学检测所诊断的鼻咽癌例数

尽管阳性血清对重组 EBV-DNA 酶的中和率为 83.5%,但从表 3 可见,重组酶和 Raji 细胞 DNA 酶检测的 106 例 NPC 病人血清 EDAb 结果无显著性差异,对检出鼻咽癌的效率亦无显著性差异。这与鼻咽癌病人的 EDAb 滴度分布曲线^[7]有关,因为绝大多数病人具有高滴度 EDAb 抗体(AER>50%),而滴度在 30%~50%者较少,这样即使重组酶活性仅能被中和 83.5%,竟能检出 EDAb>35%的鼻咽癌病人,但有些抗体滴度较低(30%~35%)的鼻咽癌病人易漏诊。

3 讨论

3.1 有关表达产物的生物学特性

已有文献报道用 RNA 反转录获得的目的基因或用内切酶消化 EBV 基因组以获得编码 DNA 酶基

因片段的主要部分在原核细胞克隆表达,其表达产物均具有较高的 DNA 酶活性,可以在适宜的条件下降解³H 标记的大肠杆菌 DNA^[3,4],但抗原性均发生了改变——无论用血清免疫学方法还是原位杂交(免疫印迹法)均证实^[8,9]其表达产物的抗原性减弱为 50%~70%。本文通过 PCR 扩增所获得编码 DNA 酶的完整的基因片段,选用高效表达载体将其转化到大肠杆菌 JM103 中,经诱导实现了高效表达(表达量占宿主菌蛋白总量的 20%~23%)^[10],在经温度变化诱导后,用超声波破碎宿主菌,证实其粗提液中含有很高的 DNA 酶活性,但抗原性则稍有减弱(为 83.5%)而较文献^[8,9]报道的为高,可能与本研究所表达的蛋白质完整、准确有关,但其具体机制尚待进一步研究。

3.2 重组酶应用于临床检测尚需解决的问题

本研究所得的重组 EB 病毒特异性 DNA 酶具有高产、稳定及廉价等优点。通过对 106 例门诊病人血清中 EDAb 水平的检测,其结果与常规用的激发 Raji 细胞粗提酶检测的结果比较,两种检测方法对鼻咽癌的检出效果经统计学检验,差异无显著性,这为重组酶应用于临床提供了可能性。但由于重组酶抗原性较弱,每批粗提液中酶的浓度和活性均较难控制,若直接用重组酶进行大规模普查或常规临床检测,必将导致灵敏度降低,容易使抗体水平较低的鼻咽癌(尤其是早期病例)漏诊,可见要应用于临床常规及大规模检测尚需将粗提的重组酶进一

步提纯并标准化定量,以提高检测效率。

参 考 文 献

- 1 朱振宇,严世荣,黄迪等. EBV-DNA 酶全基因扩增克隆和鉴定. 中山医科大学学报, 1995, 16(4): 5
- 2 Cheng YC, Chen TY, Glaser R, *et al.* Frequency and levels of antibodies to Epstein-Barr virus-specific DNase are elevated in patients with nasopharyngeal carcinoma. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1979, 77: 6162
- 3 Nutter LM, Grill SP, Li JS, *et al.* Induction of virus enzymes by phorbol esters and nbutyrate in Epstein-Barr virus genome-carrying Raji cells. *Cancer Research*, 1987, 47: 4407
- 4 陈海峰,黄迪. 鼻咽癌患者血清中抗 Epstein-Barr 病毒特异性 DNA 酶抗体检测方法探讨. 生物化学杂志, 1989, 5: 131
- 5 鲁子贤. 蛋白质和酶学研究方法. 北京: 科学技术出版社, 1989. 1~328
- 6 Clough W. AN endonuclease isolated from Epstein-Barr virus-producing human lymphoblastoid cells. *Proc Nat Acad USA*, 1980, 77: 6194
- 7 黄迪,陈丽珍,张锦明,等. Epstein-Barr 病毒特异性 DNA 酶抗体水平检测在鼻咽癌早期发现中的提示性. 中华肿瘤杂志, 1993, 15: 189
- 8 Stolzenberg MC, Ooka T. Purification and properties of Epstein-Barr virus DNase expressed in *Escherichia coli*. *J Virol*, 1990, 64: 96
- 9 Chen MR, Hsu TY, Lin SW, *et al.* Cloning and characterization of cDNA clones corresponding to transcripts from the Bam HI G region of the Epstein-Barr virus genome and expression of BGLF2. *J Gen Virol*, 1991, 72: 3047
- 10 侯孟君,朱振宇,陈尚武,等. EB 病毒特异性 DNA 酶基因在大肠杆菌中的高效表达. 中山医科大学学报, 1997, 18(2): 110

(1996-04-17 收稿 1997-03-28 修回)

PRELIMINARY RESEARCH ON BIOLOGICAL PROPERTIES OF RECOMBINANT EBV-DNASE AND ITS APPLICATION

Zhu Zhenyu Huang Di Chen Ruijun Hou Mengjun
Chen Shangwu Yan Shirong Ou Jinghua Ma Jianquan

(Department of Biochemistry, Sun Yat-sen University of Medical Sciences, Guang zhou, 510089)

The activity of crude recombinant Epstein-Barr virus specific DNase (rDNase) obtained from transformed *E. coli*, induced with changing temperature was 7 and 2 times higher than those of control group and the Raji-cell-DNase with same amount of protein respectively. rDNase activity could be specifically neutralized more than 83.5% by standard sera from nasopharyngeal carcinoma patients. The EBV-DNase antibody levels of 106 nasopharyngeal patients detected with rDNase and crude Raji-cell-DNase were coincide, indicating that this rDNase preparation could be widely used in clinical detection and general survey with its purification and standardized quantitation.

Subject headings deoxyribonucleases/ analysis; gene expression; herpesvirus 4 human/enzymology; nasopharyngeal neoplasms/ diagnosis