

## 人绒毛膜促性腺激素 $\beta$ 亚基单一 B-细胞表位( $\beta 5$ 、 $\beta 9$ 或 $\beta 8$ ) 融合蛋白的表达和纯化

徐万祥\* 何亚萍 何 远 王丽婷 孙志达

(上海市计划生育科学研究所生殖生物学研究室, 上海 200032)

季朝能 顾少华 陈金中 应 康 谢 毅\*

(复旦大学生命科学院遗传所遗传工程国家重点实验室, 上海 200433)

**摘 要** 作为开发新型实用性人绒毛膜促性腺激素(hCG)疫苗的一种尝试, 我们已构建若干组合靶抗原三个线性 B-细胞表位和外源强 T-细胞表位的基因工程 hCG 嵌合肽。为了检测用这些嵌合肽免疫的动物血清中是否能产生抗各表位的三种抗体, 本研究选用能在大肠杆菌中高表达和与生物素亲和性强且特异(方便通过亲和层析纯化)的链霉亲和素为载体, 分别构建了三种含  $\beta$ -hCG 不同单一线性 B-细胞表位( $\beta 5$ ,  $\beta 9$  和  $\beta 8$ )的融合蛋白。在链霉亲和素基因下游多克隆区 *EcoR* I 和 *Hind* III 位点插入各表位编码基因片段(带 TAA 终止密码子)的 pTSA-18 重组质粒, 转化 BL21(DE3)pLysS 宿主菌后, 它们在 IPTG 诱导下均能以较高水平表达各自目的融合蛋白, 而且它们的表达产物在 Western blot 鉴定中都能被抗各表位特异的多抗或单抗或抗报告表位单抗识别。用改良的制备性 PAGE 方法可以一步纯化电泳均一性高于 95% 的三个融合蛋白, 它们的收得率相对 1L 培养物约为 5 mg。作为化学合成表位肽的替代物,  $\beta$ -hCG 三个单一 B-细胞表位融合蛋白的可获得性将有助于所构建 hCG 基因工程嵌合肽以及其他 hCG 疫苗, 也包括它的 DNA 疫苗的免疫原性分析。

**关键词** hCG $\beta$  亚基, 线性表位, 链霉亲和素, 融合表达, 免疫印迹, 纯化

**中图分类号** R392.11 **文献标识码** A **文章编号** 1000-3061(2004)01-0049-05

人绒毛膜促性腺激素(human chorionic gonadotropin, hCG)是胎盘滋养层细胞分泌的一种由  $\alpha$  和  $\beta$  两个亚基组成的糖蛋白激素, 它为胚胎的子宫内着床和维持妊娠所必需。作为最有希望的人用避孕疫苗原之一, 以  $\beta$ -hCG 为抗原的异源二聚体(HSD)-hCG 疫苗已于 90 年代初完成了人临床 II 期试验<sup>[1]</sup>, 从而第一次证实通过免疫手段调控人类生殖的可行性。

但是, 由于其抗原获得成本高、制剂复杂不易制备和该疫苗在受试对象中约有 20% 的育龄妇女不应答等原因, 因而阻碍了该 HSD-hCG 疫苗以抗生育为目的的实际应用。从那时起又开始了研制新型实用性 hCG 疫苗的进程, 其中构建组合靶抗原三个线性 B-细胞表位和若干外源广谱性 T-细胞表位的基因工程嵌合肽疫苗是其发展趋势之一<sup>[2,3]</sup>。

本文在已通过基因工程表达了 hCG 嵌合肽的

基础上<sup>[4,5]</sup>, 选择可在大肠杆菌中高表达的链霉菌(*Streptomyces avidinii*)链霉亲和素(Streptavidin, Stv)为载体<sup>[6]</sup>, 分别构建各含 hCG $\beta$  亚基一个 B-细胞表位( $\beta 5$ 、 $\beta 9$  或  $\beta 8$ )的融合蛋白(Stv- $\beta E$ ), 以为今后检测用目的 hCG 嵌合肽, 包括 hCG DNA 疫苗免疫的动物血清中是否存在抗三个表位的抗体奠定基础。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

**1.1.1 菌种与质粒** 大肠杆菌 TG1 菌株为复旦大学遗传工程国家重点实验室保存, BL21(DE3)pLysS 菌株购自 Novagen 公司(Darmstadt, Germany); 具 T7 启动子的 IPTG 诱导型 pTSA18 表达载体由上海市计划生育科学研究所保存。

**1.1.2 鉴定用抗体** 兔抗化学合成  $\beta$ -hCG 环肽<sup>[38-57]</sup>(含  $\beta 5$  抗体中和表位<sup>[45-52]</sup>)多克隆抗体(多抗, pAb

RS-4157)<sup>[7,8]</sup>由美国 Ohio 州立大学 Vernon Stevens 教授惠赠,识别  $\beta$ -hCG 羧基端  $\beta$ 9 表位<sup>[113-116]</sup>的单克隆抗体(单抗,mAb FB12)<sup>[9]</sup>由法国 Gustave-Roussy 研究所 Bidart J-M 博士提供,识别  $\beta$ -hCG 羧基端肽<sup>[133-139]</sup>(可作为  $\beta$ 9 表位<sup>[137-144]</sup>表达的报告顺序)的 mAb OT3A<sup>[10]</sup>由荷兰 Organon 公司的 Wim Stevens 博士赠与。羊抗兔和鼠 IgG/HRP 二抗购自华美生物工程公司。

1.1.3 常用生化试剂和工具酶:*Eco*R I 和 *Hind* III 限制性内切酶以及 T4 DNA 连接酶购自 Boeringer Mannheim 公司(Germany);Taq DNA 聚合酶由复旦大学遗传工程国家重点实验室制备;蛋白质分子量标

准购自华美生物工程公司;其他生化试剂均为国产分析纯。特制的分析制备两用型 PAGE 电泳装置购自华泳生化科研工贸所。

1.1.4 编码各 B- 细胞表位的寡聚核苷酸片段设计:目的表位编码片段的合成分成在 *Hind* III 位点之前有无 TAA 终止密码子二组,后者的表达利用多克隆区后设有的终止密码子。另外,为使合成片段有一定的长度,以利于它们正负链退火复性及与载体连接,各目的表位前后都带上了载体 *Eco*R I 和 *Hind* III 之间的碱基序列。DNA 片段合成由上海生工公司完成。各表位化学合成编码序列见表 1。

表 1 合成 DNA 片段中  $\beta$ -hCG 三个线性 B- 细胞表位的有意链编码序列

Table 1 The sense strand sequences of  $\beta$ 5,  $\beta$ 9 and  $\beta$ 8 epitopes of  $\beta$ -hCG

Epitope	Amino acid sequence	Synthetic oligonucleotides
$\beta$ 5	LQGVLPAL <sup>45-52</sup>	5'-TTGCAAGGTGTTTTCCTGCTTTG-3'
$\beta$ 9	PRFQ <sup>113-116</sup>	5'-CCTAGATTCCAA-3'
$\beta$ 8*	RLPGSDTPILP <sup>133-144</sup>	5'-AGATTGCCAGGTGCCATCCGACACTCCAATCTTGCCA-3'

Note: The  $\beta$ 8\* sequence<sup>[133-144]</sup> includes a reporter sequence<sup>[133-139]</sup> of  $\beta$ 8<sup>[137-144]</sup> that can be recognized by mAb OT3A.

1.2 方法

1.2.1 各目的表位融合基因重组质粒的构建和 DNA 测序鉴定:二组 6 对正负链 DNA 合成片段先用水溶解成 20pmol/L 浓度后两两配对进行退火复性,再在 T4 DNA 连接酶作用下将它们两边带 *Eco*R I 和 *Hind* III 粘性末端的双链片段分别直接定向重组插入经用同样两个酶双酶切的 pTSA18 质粒中,最后将各连接液转化感受态 TG1 宿主菌。具体操作方法见文献[11]。因为在 pTSA18 质粒双酶切自连接转化的对照平板上未见生长菌落,所以将那些目的转化平板上的单个菌落直接送联合基因科技公司进行插入片段 DNA 测序。

1.2.2 两组 BL21/pTSA18/Stv- $\beta$ 5、BL21/pTSA18/Stv- $\beta$ 9 和 BL21/pTSA18/Stv- $\beta$ 8 工程菌的诱导表达:用质粒纯化 Kit 抽提经测序验证的各目的重组质粒,然后将它们转化 BL21(DE3)pLysS 宿主菌。诱导表达条件:挑各工程菌单菌落接种于加入氨苄青霉素(Ap)的 3 mL LB 培养液中,30℃培养过夜,翌日晨以 0.75/100(V/V)的比例转接入 50 mL LB(Ap<sup>+</sup>)培养液,待约 2 h 培养物的 OD 值升至 0.7 时左右时加入终浓度为 1 mmol/L 的 IPTG 诱导表达 4 h,最后收集菌体进行目的表达产物的 SDS-PAGE 分析。

1.2.3 各  $\beta$ -hCG 目的表位融合表达产物的 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳(PAGE)分析和蛋白印迹鉴定:所

采用方法参见文献[11]。

1.2.4 各  $\beta$ -hCG 目的表位融合蛋白的分离纯化:收集 IPTG 诱导菌体超声破菌,用 1 mol/L 尿素洗涤菌体离心沉淀物后再用 8 mol/L 尿素溶解之,再次超声悬浮沉淀物,继而离心取上清进行下行和上行二次连续的 PAGE 电泳,最后分步收集的 9 管收集液取样经 SDS-PAGE 和 Western blot 分析,归并电泳均一性大于 95% 的单一目的蛋白条带收集管液。用于简易的制备性 PAGE 方法的电泳装置参见文献[5]。

2 结果

2.1  $\beta$ -hCG 单一表位融合基因的构建和测序鉴定 长度不等二组 12 个含  $\beta$ -hCG 单一线性表位的正负链 DNA 合成片段(56~70 bps),在退火复性形成两边带 *Eco*R I 和 *Hind* III 粘性末端的双链片段后,通过一步 T4 DNA 连接酶反应被分别重组插入 pTSA18 质粒中可高表达的链霉素亲和素基因 3'-端下游多克隆区 *Eco*R I 和 *Hind* III 位点。所构建二组 6 个链霉素亲和素- $\beta$ -hCG 单表位(Stv- $\beta$ E<sup>+</sup>和 Stv- $\beta$ E<sup>-</sup>)融合基因的目的表位编码序列及其余合成片段序列都通过了 DNA 测序验证(测序图未列出)。

2.2 各  $\beta$ -hCG 单一表位 Stv- $\beta$ E 融合蛋白的诱导表达

Sam 等构建的 pTSA18 质粒属于 T7 表达系统

在 IPTG 诱导下可高表达对生物素具有强且特异亲和性的链霉亲和素蛋白,也可与其他靶蛋白重组表达目的融合蛋白<sup>[6]</sup>。在本研究中,用 IPTG 诱导 4 h 后,插入片段引入 TAA 终止密码子的 Stv- $\beta 5^+$ 、Stv- $\beta 9^+$  和 Stv- $\beta 8^+$  融合基因都获得了特异性高表达,而且在 SDS-PAGE 分析凝胶上它们各自的表达产物所显示的分子量与各自约 15 kD 的理论分子量一致(图 1)。但是,为比较两者表达水平而未引入 TAA 的另一组,各 Stv- $\beta E^-$  融合基因(多编码 22 个 aa)在同样的诱导条件下,在 SDS-PAGE 凝胶上却未能辨别出它们特异蛋白的表达,用各特异多抗和单抗的免疫印迹检测证实了它们在大肠杆菌中确实未表达。

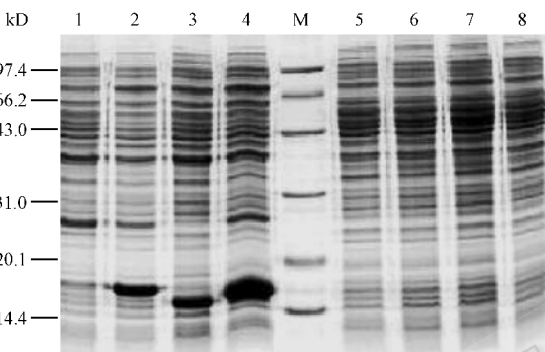


图 1 二组 6 种 Stv- $\beta E$  融合蛋白诱导表达后的 SDS-PAGE 分析

Fig. 1 SDS-PAGE analysis of six Stv- $\beta E$  fusion proteins expressed in *E. coli*

M: protein molecular weight marker; 1: un-induced BL21/pTSA18-Stv- $\beta 5^+$ ; 2~4: induced BL21/pTSA18-Stv- $\beta 5^+$ , /pTSA18-Stv- $\beta 9^+$  and /pTSA18-Stv- $\beta 8^+$ ; 5: un-induced BL21/pTSA18-Stv- $\beta 5^-$ ; 6~8: induced BL21/pTSA18-Stv- $\beta 5^-$ , /pTSA18-Stv- $\beta 9^-$  and /pTSA18-Stv- $\beta 8^-$ . Note: + and - symbols indicate the presence or absence of TAA codon in the inserted target  $\beta$  epitope fragments

2.3 Stv- $\beta 5^+$ 、Stv- $\beta 9^+$  和 Stv- $\beta 8^+$  融合表达蛋白的抗原性测定

为了进一步证实 SDS-PAGE 凝胶上相对未诱导工程菌总蛋白显示的特异条带就是所期待的目的 Stv- $\beta E^+$  融合蛋白表达,将另外进行的 3 块 SDS-PAGE 凝胶上的蛋白电转印到硝酸纤维素膜上,丽春红染料染色 1 min 后打点标明蛋白分子量标准和各目的表达产物条带位置,再用 ddH<sub>2</sub>O 冲洗膜后进行抗原抗体印迹反应。结果用抗  $\beta 5$  RS-4157 抗血清和抗  $\beta 9$  FB12 单抗的检测清晰地证明了 Stv- $\beta 5^+$  和 Stv- $\beta 9^+$  融合蛋白在大肠杆菌中的特异表达(图 2-A 和-B),使用特异识别  $\beta$ -hCG<sup>133-139</sup> 表位(作为- $\beta 8$  表位的报告顺序)的 OT3A 单抗也证实了 Stv- $\beta 8^+$  融合蛋白的表达(图 2-C)。

2.4 Stv- $\beta 5^+$ 、Stv- $\beta 9^+$  和 Stv- $\beta 8^+$  融合表达蛋白的分离纯化

虽然目的融合表达蛋白中的链霉亲和素对生物素有强亲和性,Stv- $\beta 5^+$ 、Stv- $\beta 9^+$  和 Stv- $\beta 8^+$  表达产物可因此通过亚氨基生物素(2-aminobiotin)亲和层析柱进行分离纯化,但由于它们的表达量高且分子量不大(15kD 左右)本研究目的表达产物的纯化仍都采用更为简便和经济的制备性 PAGE 改良方法<sup>[5]</sup>。结果经制备性 PAGE 一步纯化可获取各约 5 mg/L 的 Stv- $\beta 5^+$ 、Stv- $\beta 9^+$  和 Stv- $\beta 8^+$  融合蛋白。各 Stv- $\beta E^+$  纯化蛋白的 SDS-PAGE 分析见图 3。

3 讨论

迄今为止在所有人类生殖调控候选靶抗原中,唯 HSD-hCG 疫苗真正通过并显示重大理论意义的临床 II 期试验。同时,该疫苗制剂中  $\beta$ -hCG 免疫原的抗原表位研究也是最为详尽的,即在 145 个氨基酸(aa)构成的亚基上共鉴定出 9 个 B-细胞表位,

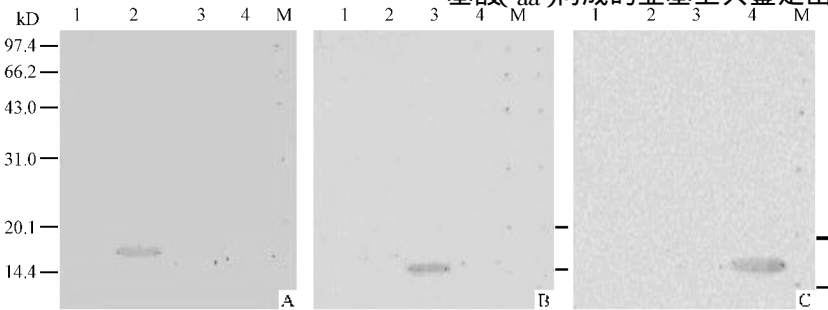


图 2 Stv- $\beta 5^+$ 、Stv- $\beta 9^+$  和 Stv- $\beta 8^+$  融合表达蛋白的蛋白印迹鉴定

Fig. 2 Western blot of expressed Stv- $\beta 5^+$ , Stv- $\beta 9^+$  and Stv- $\beta 8^+$  fusion proteins

M: protein molecular weight marker; 1: un-induced BL21/pTSA18-Stv- $\beta 5^+$ ; 2~4: induced BL21/pTSA18-Stv- $\beta 5^+$ , /pTSA18-Stv- $\beta 9^+$  and /pTSA18-Stv- $\beta 8^+$ . Notes: The antibodies used in Fig. 2A, 2B and 2C were pAb RS-4157 to  $\beta 5$  epitope, mAb FB12 to  $\beta 9$  epitope and mAb OT3A to reporter sequence for  $\beta 8$  epitope respectively

© 中国科学院微生物研究所期刊联合编辑部 <http://journals.im.ac.cn>

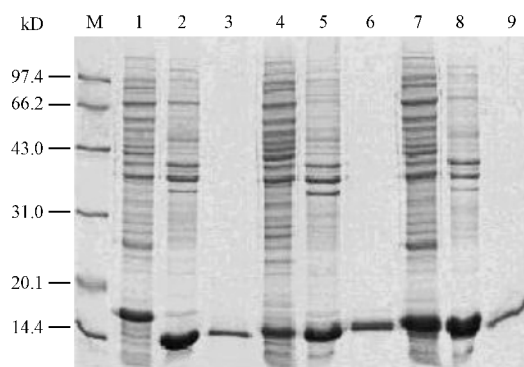


图3 Stv-β5<sup>+</sup>、-β9<sup>+</sup>和-β8<sup>+</sup>纯化蛋白的 SDS-PAGE 分析

Fig.3 SDS-PAGE analysis of purified Stv-βE<sup>+</sup> fusion proteins  
M. Protein molecular weight marker ; 1, 4 and 7 : Induced BL21/pTSA18- Stv-β5<sup>+</sup>, -Stv-β9<sup>+</sup> or -Stv-β8<sup>+</sup> ; 2, 5 and 8. Each inclusion body proteins containing Stv-β5<sup>+</sup>, Stv-β9<sup>+</sup> or Stv-β8<sup>+</sup> fusion protein ; 3, 6 and 9. Purified Stv-β5<sup>+</sup>, Stv-β9<sup>+</sup> or Stv-β8<sup>+</sup> fusion protein.

其中 β5、β9 和 β8 为线性表位<sup>[7-9]</sup>。但令人费解的是,在 HSD-hCG 疫苗受试妇女的抗血清中并未检测到抗三个线性表位的抗体<sup>[12]</sup>。有报道说目的抗血清同其表位合成肽本应发生的抗原抗体反应,有时会因某些不可知因素而未产生预期的实验结果<sup>[13,14]</sup>。因此,为了便于检验我们所设计表达的含三个线性 B- 细胞表位的嵌合肽抗原在受试动物体内能否被正确地加工处理,即目的表位不被破坏地产生各自的表位抗体,作为合成费用贵且测定方法要求特殊的单表位化学合成肽的替代物,本研究构建表达了分别嵌入 β-hCG 单一线性表位的三种链霉亲和素融合蛋白。

克隆在 pTSA18 质粒中的成熟 Stv<sup>16-133</sup> 蛋白 (GenBank 显示的对应顺序是 Stv<sup>25-157</sup>),可利用其基因下游多克隆区后的 TAA 终止子完成它的表达<sup>[6]</sup>。因此在最初的研究中,是将 β5、β9 和 β8 表位肽编码基因片段分别直接插入 Stv 基因 3'- 端下游的多克隆区,结果出乎意料,即无论是 SDS-PAGE 分析还是蛋白印迹试验都未发现或鉴定到这些 Stv-βE<sup>+</sup> 的表达。而后在插入片段的 Hind III 位点前嵌入 TAA 终止密码子(相比前者都约减少 22 个 aa),则三个 Stv-βE<sup>+</sup> 同时实现了它们的高表达。这一现象是有趣的。虽然目前尚不清楚造成此奇特现象的具体原因,但本研究提示在利用 pTSA18 及其 Stv 基因构建表达目的表位融合蛋白的场合,设计短抗原表位肽或其他目的短肽编码基因片段时最好在其 3'- 端添加 TAA 终止密码子。

本研究中另一奇特现象是,在分析各 Stv-βE<sup>+</sup> 纯

化蛋白纯度的 PAGE 凝胶上,包涵体蛋白中的和纯化的 Stv-β5<sup>+</sup> 电泳条带与诱导菌总蛋白中的目的条带不在同一平行位置(图 3),但在重新进行的蛋白印迹试验中它们却又都能被抗 β5 表位抗体所识别(资料未显示)。这一电泳迁移率明显差异在重组蛋白表达研究中是罕见的,目前尚无法解释。

总之,本研究探讨了利用 pTSA18 载体构建 Stv 和 β-hCG 抗原单表位融合蛋白的可行性。作为化学合成表位肽的替代物,最终三个 β-hCG 单个线性 B- 细胞表位融合蛋白的可获得性,将为 hCG 嵌合肽及其他 hCG 蛋白或 DNA 疫苗的免疫原性分析提供便利。另外,这一研究也可发展为替代化学合成肽鉴定靶抗原线性 B- 细胞表位的新方法。

致谢(Acknowledgments):The authors are grateful to Prof Vernon Stevens (Ohio State University, USA), Dr. Bidart J-M (Gustave-Roussy Institute, France) and Dr. Wim Stevens (Organon Technika, The Netherlands) for kindly providing polyclonal antibody RS-4157, FB12 monoclonal antibody (mAb) and OT3A mAb respectively.

## REFERENCES (参考文献)

- [1] Talwar GP, Singh OM, Pal R *et al.* A vaccine that prevents pregnancy in women. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1994, **91**: 8532 - 8536
- [2] Stevens VC. Progress in the development of human chorionic gonadotropin antifertility vaccines. *Am J Reprod Immunol*, 1996, **35**: 148 - 155
- [3] Xu WX. Trends in the development of chimeric peptide vaccines containing B- and T- cell epitopes. *US Chin J Microbiol Immunol*, 2000, **2**: 95 - 100
- [4] Xu WX(徐永祥), Xiong Y(熊艳), Sun ZD(孙志达) *et al.* Construction and prokaryotic expression of the synthetic gene coding for hCG chimeric peptide(CP). *Chin J Immunol* (中国免疫学杂志), 2002, **18**(2): 96 - 97
- [5] Zou YS(邹永水), Xu WX(徐永祥), He Y(何远) *et al.* Preparation of polyacrylamide gel electrophoresis for human chorionic gonadotropin chimeric peptide 12 expressed in *E. coli*. *Acta Biochim Biophys Sin* (生物化学与生物物理学报), 2002, **34**: 671 - 674
- [6] Sano T, Cantor CR. Expression vectors for streptavidin - containing chimeric proteins. *Biochem Biophys Res Commun*, 1991, **176**: 571 - 577
- [7] Stevens VC, Chou WS, Powell JE *et al.* The identification of peptide sequences of human chorionic gonadotropin containing a conformational epitope. *Immunol Lett*, 1986, **12**: 11 - 18
- [8] Dimhofer S, Madersbacher S, Bidart J-M *et al.* The molecular basis for epitopes on the free β- subunit of human chorionic gonadotropin (hCG), its carboxyl- terminal peptide and the hCGβ- core fragment.

- [ 9 ] Bidart J-M , Bellet DH , Alberici GF *et al.* The immune response to a synthetic peptide analogous to the 109 – 145  $\beta$ hCG carboxyl-terminus is directed against two major and two minor regions. *Mol Immunol* , 1987 , **24** : 339 – 345
- [ 10 ] Porakishvili N , Jackson AM , de Souza JB *et al.* Epitopes of human chorionic gonadotropin and their relationship to immunogenicity and cross-reactivity of  $\beta$ - chain mutants. *Am J Reprod Immunol* , 1998 , **40** : 210 – 214
- [ 11 ] Sambrook J , Fritsch EF , Maniatis T. *Molecular Cloning : A Laboratory Manual* , 2<sup>nd</sup> ed. New York : Cold Spring Harbor Laboratory Press , 1989
- [ 12 ] Talwar GP , Singh OM , Gupta SK *et al.* The HSD-hCG vaccine prevents pregnancy in women : Feasibility study of a reversible safe contraceptive vaccine. *Am J Reprod Immunol* , 1997 , **37** : 153 – 160
- [ 13 ] Su H , Caldwell HD. Immunogenicity of a Chimeric peptide corresponding to T helper and B cell epitopes of the *Chlamydia trachomatis* major outer membrane protein. *J Exp Med* , 1992 , **175** : 227 – 235
- [ 14 ] Arnon R , van Regenmortel MHV. Structural basis of antigenic specificity and design of new vaccines. *FASEB J* , 1992 , **6** : 3265 – 3274

## Expression and Purification of Three Fusion Proteins Containing a Single B-cell Epitope ( $\beta 5$ 、 $\beta 9$ or $\beta 8$ ) of Human Chorionic Gonadotropin $\beta$ Subunit

XU Wan-Xiang\* HE Ya-Ping HE Yuan WANG Li-Ting SUN Zhi-Da

( Department of Reproductive Biology , Shanghai Institute of Planned Parenthood Research , Shanghai 200032 , China )

JI Zhao-Neng GU Shao-Hua CHEN Jin-Zhong YING Kang XIE Yi\*

( State Key Laboratory of Genetic Engineering , Institute of Genetics , School of Life Science , Fudan University , Shanghai 200433 , China )

**Abstract** The possibility of using a subunit or fragment of human chorionic gonadotropin ( hCG ) as an immunogen for birth control has been actively explored for many years. This protein hormone is produced by the fertilized egg and is required for implantation of the blastocyst into the maternal uterus and the maintenance of pregnancy. In previous studies , several bio-synthesized hCG chimeric peptides ( CP ) that contain three linear B- cell epitopes (  $\beta 5$  ,  $\beta 9$  and  $\beta 8$  ) of  $\beta$ -hCG subunit together with various foreign ' promiscuous ' T- cell epitopes were constructed and expressed as potential new hCG vaccine immunogens. In order to detect antibodies to each of the individual B-cell epitopes present in the animal antiserum raised against the hCG CPs , we decided to construct three recombinant proteins , each contains a single target B- cell epitope (  $\beta E$  ) of  $\beta$ -hCG. Two sets of DNA fragments were chemically synthesized encoding the  $\beta 5$  ,  $\beta 9$  and  $\beta 8$  epitopes (  $\beta E$  ) 45 ~ 52 , 113 ~ 116 or 133 ~ 144 of  $\beta$ -hCG subunit and were inserted into the downstream of streptavidin ( Stv ) gene in pTSA18 separately , with or without an extra TAA codon at the 3' - terminals of the genes. SDS-PAGE analysis revealed that only Stv- $\beta E$  ( -  $\beta 5$  , -  $\beta 9$  or -  $\beta 8$  ) fusion genes set with the TAA codon can be expressed in *E. coli* BL21( DE3 ) pLysS strain at high level after 1mM IPTG induction for 4 hours. Additionally , these fusion proteins can all be recognized by specific polyclonal antiserum ( RS-4157 ) generated upon immunization with the loop peptide 38 ~ 57 of  $\beta$ -hCG , monoclonal antibody ( mAb ) FB12 to  $\beta 9$  epitope and mAb OT3A that specially recognizes reporter sequence 133 ~ 139 of  $\beta 8$  epitope 137 ~ 144. Each of the proteins can be purified to 95% relative homogeneity using an improved method of preparative gel polyacrylamide gel electrophoresis. The yields were 5 mg per 1L culture. The three target Stv- $\beta E$  fusion proteins will be useful in determining the immunogenicity of designed hCG CPs and hCG vaccines , including hCG DNA vaccines.

**Key words**  $\beta$ -hCG subunit , B-cell epitopes , streptavidin , fusion expression , purification

Received : 07-23-2003

This work was supported by grants from the National Natural Science Foundation of China ( No.39870856 and No.30070792 ).

\* Corresponding author. XU Wan-Xiang Tel : 86-21-64042641 ; E-mail : xuwx@sippr.stc.sh.cn

XIE Yi Tel : 86-21-55520025 ; E-mail : yxie@fudan.edu.cn