

· 研究原著 ·

文章编号 1000-2790(2006)11-1018-03

不同缺失突变的丙型肝炎病毒核心蛋白基因在大肠杆菌中的表达

沈才飞,白雪帆,牟丹蕾,黄长形 (第四军医大学唐都医院全军感染病诊疗中心,陕西西安710038)

Expressions of different deletion mutated HCV core protein genes in *E. coli*

SHEN Cai-Fei, BAI Xue-Fan, MOU Dan-Lei, HUANG Chang-Xing

PLA Center for Infectious Diseases, Tangdu Hospital, Fourth Military Medical University, Xi'an 710038, China

【Abstract】 AIM: To construct the recombinant plasmids expressing full-length HCV core protein gene and 3 different deletion mutated hepatitis core protein genes and to express them in *E. coli*. METHODS: Entire HCV core protein gene and 3 different deletion mutated gene fragments from HCV core protein which respectively coded 1 - 191aa, 1 - 59aa plus 81 - 191aa, 1 - 169aa, 1 - 59aa plus 81 - 169aa were amplified by PCR and cloned into expression vector pRSET-A, thus forming different recombinant plasmids (pRSET-A-C573, pRSET-A-C510, pRSET-A-C507, pRSET-A-C444), which were transformed into *E. coli* BL-21 (DE3) pLysS and induced by IPTG. SDS-PAGE and Western blot were used to test and identify expressed 6 × His-fusion proteins. RESULTS: Restriction analysis and sequencing confirmed that the 4 recombinant plasmids expressing entire HCV core protein gene and 3 different deletion mutated hepatitis core protein genes were successfully constructed. Both SDS-PAGE and Western blot analysis showed entire HCV core protein gene and 3 different deletion mutated hepatitis core protein genes were expressed, and the respective molecular weights of the products were about 21×10^3 , 19×10^3 , 19×10^3 and 16.5×10^3 . The fusion protein production accounted approximately for 20% of total bacterial protein. CONCLUSION: Different deletion mutated HCV core protein genes were expressed efficiently in *E. coli*.

【Keywords】 hepatitis C virus; core proteins; mutation; prokaryotic expression

【摘要】目的:构建丙型肝炎病毒(HCV)全长及3种不同缺失突变的丙型肝炎病毒核心蛋白基因的原核表达载体,并在大肠杆菌中表达。方法:用PCR方法扩增基因型为1b型的HCV核心蛋

白的全长及3种不同缺失突变的基因片段,对应氨基酸分别为C573:1-191aa, C510:1-59aa+81-191aa, C507:1-169aa, C444:1-59aa+81-169aa。将其克隆到高效表达载体pRSET-A中构成重组质粒(pRSET-A-C573, pRSET-A-C510, pRSET-A-C507, pRSET-A-C444),转化大肠杆菌BL-21(DE3)pLysS。IPTG诱导表达6×His融合蛋白,表达产物经SDS-PAGE及Western blot检测和鉴定。结果:经酶切鉴定及测序证实全长及3种不同缺失突变的丙型肝炎病毒核心蛋白基因的原核表达载体构建正确。经SDS-PAGE及Western blot显示在 M_r 约为 21×10^3 , 19×10^3 , 19×10^3 , 16.5×10^3 处出现融合表达条带。融合蛋白的表达量约占菌体蛋白总量的20%。结论:全长及3种不同缺失突变的丙型肝炎病毒核心蛋白基因均在大肠杆菌中得到有效表达。

【关键词】丙型肝炎病毒 核心蛋白 突变 原核表达

【中图分类号】R512.630.27 **【文献标识码】**A

0 引言

丙型肝炎病毒(hepatitis C virus, HCV)感染已成为全球性的社会公共卫生问题,迄今尚无有效的预防性疫苗。HCV核蛋白基因相对保守^[1]并且能诱导CTL反应及ADCC,有可能用于开发HCV预防及治疗性疫苗。我室曾扩增羧基末端的20个氨基酸和(或)第60~80位氨基酸多肽基因缺失的核蛋白基因,并在真核细胞中表达成功,初步证实突变掉上游两个肽断能提高机体免疫反应^[2-3]。为进一步探讨不同缺失突变核心蛋白对免疫反应的影响,我们构建了HCV核心基因不同缺失突变基因片段的原核表达载体并在大肠杆菌中进行了表达。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 质粒与菌株 源质粒pCI-573, pCI-510, pCI-507, pCI-444系本室将不同缺失突变的核蛋白基因克隆入真核表达载体pCI-neo中构建而成,其中分别插入了自西安地区患者血清中克隆的1b型HCV完整的核蛋白基因(573 bp), 60~80位氨基酸缺失的核蛋白基因片段(510 bp), 羧基末端20位氨基酸缺失的核蛋白基因片段(507 bp), 同时突变掉60~80位氨基酸和羧基末端20位氨基酸的核蛋白基因片段(444 bp)。原核表达载体pRSET-A为

收稿日期 2006-03-06; 接受日期 2006-04-05

基金项目 国家教育部归国人员启动基金项目(2002HG003)

通讯作者:黄长形。Tel (029)84777652 Email:CHANGXING-H@hot-mail.com

作者简介:沈才飞。硕士生(导师白雪帆)。Tel (029)84777595

Email shencf@fmmu.edu.cn

Invitrogen 公司产品,中间克隆载体 pGEM-T easy 为 Promega 公司产品. *E. coli* JM109 由本室保存, BL21 为 Invitrogen 公司产品.

1.1.2 工具酶及主要试剂 DNA 快速提取试剂盒购自上海华舜生物工程公司、高保真 PCR 试剂盒、DNA 分子量标准、蛋白分子量标准均为大连宝生物工程公司产品, *Hind* III, *Bam* H I, T4 DNA 连接酶、胶回收试剂盒购自 Promega 公司. 抗-His 抗体购自 Invitrogen 公司, 二抗及显色试剂购自 Sigma 公司.

1.2 方法

1.2.1 PCR 引物设计 根据源质粒 pCI-573, pCI-510, pCI-507, pCI-444 中 HCV 核心蛋白基因起始密码子下游及终止密码子上游核苷酸序列设计了 3 条引物(上海鼎安生物技术有限公司合成): 上游引物 P1 : 5' GTCCGGATCCATGAGCACGAATCCTAAAC 3', 下游引物 : P2 : 5' TCGCAAGCTTTCACAAATTTCCCTGTTGTTGCATA 3', P3 : 5' TCGCAAGCTTTCACAAAGCGAAGCTGGGGTGGTCAG 3'. 在其上游引物引入 *Bam* H I 酶切位点、下游引物引入 *Hind* III 酶切位点.

1.2.2 目的片段的扩增 分别以质粒 pCI-573, pCI-510, pCI-507, pCI-444 为模板进行 PCR 扩增, 扩增过程中模板与引物对应如下: pCI-573, pCI-510 为 P1, P2; pCI-507, pCI-444 为 P1, P3. 循环参数为 94℃ 5 min, 94℃ 1 min, 55℃ 50 s, 72℃ 1 min 共进行 30 个循环, 最后于 72℃ 延伸 10 min. 取 5 μL PCR 反应液在 10 g/L 的琼脂糖凝胶电泳上进行扩增产物检测分析.

1.2.3 重组质粒的构建及鉴定 将 4 种 PCR 产物按 1:3 与中间载体 pGEM-T easy 连接, 转化感受态细胞 JM109, 挑阳性克隆接种扩增, 少量提取质粒 DNA, 并以 *Hind* III, *Bam* H I 双酶切进行鉴定后交上海鼎安生物技术有限公司测序. 测序正确后将中间连接产物 pGEM-T easy573, pGEM-T easy510, pGEM-T easy507, pGEM-T easy444 用 *Hind* III, *Bam* H I 双酶切, 胶回收酶切产物与经相应双酶切的 pRESET-A 质粒连接. 转化感受态细菌 JM109, 挑阳性克隆接种扩增, 少量提取质粒 DNA, 并以 *Hind* III, *Bam* H I 双酶切进行鉴定后交上海鼎安生物技术有限公司做序列测定.

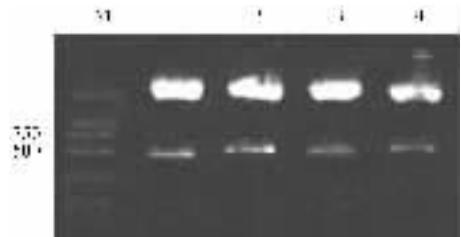
1.2.4 融合蛋白的诱导表达 将重组质粒 pRSET-A-C573, pRSET-A-C510, pRSET-A-C507, pRSET-A-C444 转化 BL-21 感受态细菌. 30℃ 振摇扩增转化细菌 3 h 后 ($A_{600\text{nm}}$ 约为 0.6) 加 IPTG 至终浓度为 1 mmol/L 诱导表达, 分别于 1, 3, 5 和 7 h 后收菌. 12 000 g 离心 5 min, 菌体沉淀重悬于 100 μL 20

mmol/L 磷酸盐缓冲液中, 于液氮中和 42℃ 反复冻融 4 次, 以最大速度 4℃ 离心 10 min, 然后分别在上清和沉淀中加入 100 μL 及 200 μL 1 × SDS-PAGE 上样缓冲液, 置于 -20℃ 备用.

1.2.5 SDS-PAGE 融合蛋白定量及 Western blot 检测融合蛋白 用 18% 的分离胶 SDS-PAGE 电泳后将蛋白转移到 NC 膜上, 以 50 g/L 脱脂奶-TBST 封闭, 以小鼠抗-His 抗体 (1:100) 为一抗, 生物素标记的抗-鼠抗体 (1:500) 为二抗进行抗原抗体反应. 然后将 NC 膜浸入含链酶亲和素-过氧化物酶 (1:500) 的 TBST 中室温振摇 1 h, 最后用葡萄糖氧化酶-DAB-硫酸镍氨法显色.

2 结果

2.1 表达载体的构建及鉴定 亚克隆重组质粒 pGEM-T easy573, pGEM-T easy510, pGEM-T easy507, pGEM-T easy444 以及终载体 pRSET-A-C573, pRSET-A-C510, pRSET-A-C507, pRSET-A-C444 用 *Hind* III, *Bam* H I 双酶切后, 用琼脂糖凝胶进行电泳, 分别在约 573, 510, 507 和 444 bp 处出现条带, 与预期分子量相符(图 1). DNA 双向测序证实插入片段序列及读码框均正确, 表明质粒构建成功.

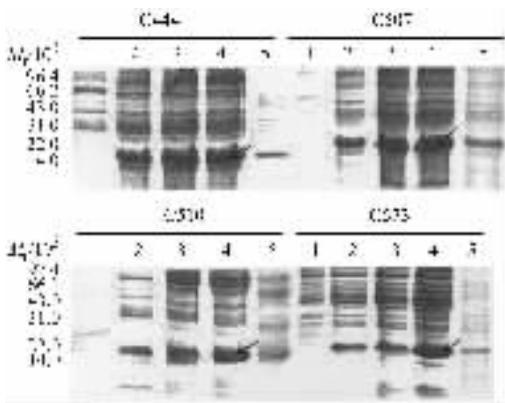


M : DNA marker DL2000 ; 1 : pRSET-A-C444 ; 2 : pRSET-A-C507 ; 3 : pRSET-A-C510 ; 4 : pRSET-A-C573.

图 1 重组质粒的限制性酶切分析

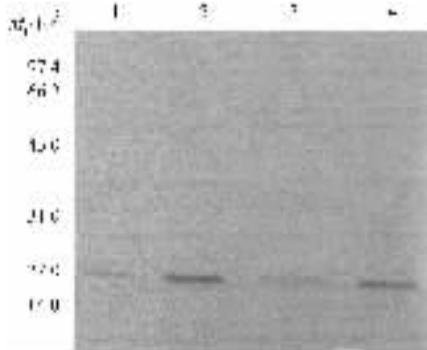
2.2 融合蛋白的表达与分析 经 SDS-PAGE 电泳检测, 在 M_r 约 21×10^3 , 19×10^3 , 19×10^3 , 16.5×10^3 处出现条带, 均与预期的目的条带分子量一致. 条带随诱导时间延长颜色加深, 经 IPTG 诱导 5 h 时目的蛋白量最多. 经薄层扫描测定, 融合蛋白的表达量约占菌体总蛋白的 20%. 表达蛋白大部分以包涵体形式存在于菌体沉淀中, 上清中也可见明显蛋白条带(图 2).

2.3 融合蛋白的 Western blot 结果 显色后 M_r 约 21×10^3 , 19×10^3 , 19×10^3 , 16.5×10^3 处出现蓝色条带, 与预期的所要表达的 6 × His 融合不同缺失突变核蛋白分子量大小相符, 表明目的蛋白在大肠杆菌中得到了有效表达(图 3).



1: 诱导前沉淀; 2: 诱导后 3 h 沉淀; 3: 诱导后 5 h 沉淀; 4: 诱导后 7 h 沉淀; 5: 诱导后 5 h 上清。

图 2 融合蛋白表达的 SDS-PAGE 分析



1: C573; 2: C510; 3: C507; 4: C444.

图 3 融合蛋白的 Western blot 分析

3 讨论

近年来, 核心蛋白的抗病毒免疫成为丙型肝炎的一个研究热点, 但研究发现全长的核心蛋白不能诱导有效的 CTL 效应。有学者推测核心蛋白的某些区段对机体免疫反应有抑制作用, 为证实这一推断, 国内外学者^[4-7]对 HCV 核心蛋白各个区段的功能作了大量研究。有研究^[8]用截去 HCV 基因羧基末端的核心蛋白(1~176 位氨基酸)的表达产物免疫小鼠, 发现核蛋白特异性抗体滴度在初次免疫第 16 周时急剧升高到 1:8000 并至少持续到 27 wk, 同时诱导出特异性 T 细胞增殖反应。另一研究小组^[9]研究证明: 截去羧基末端的核心蛋白基因的质粒免疫小鼠能够刺激 IFN- γ 的产生, 并诱导出强烈的核蛋白特异性迟发性超敏反应。Langhans 等^[10]报告来源于 HCV 核心蛋白第 59~83 氨基酸合成肽具有抑制 HCV 感染者外周血 T 细胞针对核心蛋白的增殖反应。作者认为该多肽片段干扰了对核蛋白的抗原提纯。为进一步探讨不同缺失突变核心蛋白对免疫反应的影响, 我们将全长及 3 种不同缺失突变的核蛋白基因在大肠杆菌中进

行大量表达。

我们采用了原核表达载体 pRSET-A, 该载体有两个特点: 一是含有 T7 启动子, 可被 T7 RNA 聚合酶识别, T7 RNA 聚合酶的转录效率比大肠杆菌 RNA 聚合酶高 5 倍, 能够高效转录 mRNA, 大量表达目的蛋白。二是载体上携带有 6 个 His 残基, 分子量仅为 840, 对目的蛋白的结构和生物学活性影响很小, 而且便于纯化。本研究用该载体获得了目的蛋白的高效表达, 同时还观察到 IPTG 最佳诱导时间为 5 h。为减少核心蛋白本身的细胞毒性作用, 采取了 30 $^{\circ}$ C 诱导。总之, 本研究成功构建了不同截短核心蛋白基因的原核表达载体, 获得了正确的表达蛋白, 为进一步研究 HCV 核心蛋白各区域的免疫学功能打下了基础。

【参考文献】

- [1] Hijikata M, Kato N, Ootsuyama Y, et al. Gene mapping of the putative structural region of the hepatitis C virus genome by *in vitro* processing analysis[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 88(1991): 5547-5551.
- [2] 洪 沙, 黄长形, 杨为松, 等. 第 60~80 位氨基酸多肽片断缺失的 HCV 核蛋白在真核细胞中的表达[J]. 第四军医大学学报, 2005 26(12): 1101-1104.
- [3] 洪 沙. 缺失突变对丙型肝炎核心蛋白免疫的影响[D]. 西安: 第四军医大学博士论文集, 2005.
- [4] Klein KC, Dellos SR, Lingappa JR. Identification of residues in the hepatitis C virus core protein that are critical for capsid assembly in a cell-free system[J]. J Virol, 2005, 79(11): 6814-6826.
- [5] Kim HS, Lee JK, Yang IH, et al. Identification of hepatitis C virus core domain inducing suppression of allostimulatory capacity of dendritic cells[J]. Arch Pharm Res, 2002, 25(3): 364-369.
- [6] Yang XB, Chen Z, Luo DH, et al. Proapoptotic and pronecrosis effect of different truncated hepatitis C virus core proteins[J]. J Zhejiang Univ Sci, 2005 6B(4): 295-300.
- [7] Suzuki R, Sakamoto S, Tsutsumi T, et al. Molecular determinants for subcellular localization of hepatitis C virus core protein[J]. J Virol, 2005, 79(2): 1271-1281.
- [8] Duenas-Carrera S, Alvarez-Lajonchere L, Alvarez-Obregon JC, et al. A truncated variant of the hepatitis C virus core induces a slow but potent immune response in mice following DNA immunization[J]. Vaccine, 2000, 19(7-8): 992-997.
- [9] Acosta-Rivero N, Duenas-Carrera S, Alvarez-Lajonchere L, et al. HCV core protein-expressing DNA vaccine induces a strong class I-binding peptide DTH response in mice[J]. Biochem Biophys Res Commun, 2004, 314(3): 781-786.
- [10] Langhans B, Lechmann M, Ihlenfeldt H, et al. A hepatitis C virus (HCV) core protein derived peptide inhibits HCV specific lymphocyte proliferation[J]. Eur J Med Res, 2000, 5(3): 115-120.

编辑 王小仲