

丙型肝炎病毒基因组 C 区、NS3 区、NS4 区基因的融合、表达及初步应用

沈小川¹ 李 铭² 吴祥甫^{1*}

¹(中国科学院上海生物化学研究所, 上海 200031)

²(中国农业科学院上海家畜寄生虫病研究所, 农业部动物寄生虫重点开放实验室, 上海 200232)

摘 要 通过 PCR 技术从 HCV 全长基因组中扩增并克隆到 Core 区、NS4 区的部分优势表面抗原肽的基因和 C33a 基因。再将它们以 Core、C33c、NS4 的顺序和 C33c、NS4 的顺序分别拼接融合成融合抗原 CCN、CN。片段之间以-Gly-Gly-Gly-Gly-柔性连接肽连接。经核苷酸序列分析表明, 拼接点序列正确。将融合抗原 CN、CCN 基因分别克隆至 T7 启动子控制下的表达质粒 PET-2(a)+、PET-2(b)+ 中, 转化至大肠杆菌 BL21(DE3)后, 经 IPTG 诱导可高表达分子量约为 43kD、58kD 的融合抗原, 表达产物以包涵体形式存在。表达产物经 Ni²⁺-IDA 亲和柱纯化后, 并对融合抗原 CN、CCN 的抗原性做了初步的鉴定。

关键词 丙型肝炎病毒, 融合蛋白

中图分类号 Q512.6 文献标识码 A 文章编号 1000-3061(2001)01-0046-04

丙型肝炎病毒是一种广泛传播的血源性病毒, 是输血引发的肝炎、非甲非乙型肝炎的主要致病因。且与许多原发性肝癌、肝硬化、自身免疫性肝炎以及暴发性、病毒性肝炎均有密切关系。由于血清中 HCV 抗原量很少, 无法直接对其进行检测, 只能通过免疫学方法检测抗体和用 PCR 技术检测病毒 RNA 的存在。而检测抗体存在的 ELISA 试剂盒由于使用方便, 而得到广泛应用。1989 年的第一代试剂盒采用重组抗原 C100-3^[1], 第二代试剂盒则加入 C22、C33c、5-1-1^[2], 第三代试剂盒又加入了 NS5 区域的抗原^[3]。这些抗原分别位于相对保守的 C 区、NS3 区、NS4 区和 NS5 区。但是, 对于第三代检测试剂盒中加入的 NS5 抗原的评价却褒贬不一。利用基因工程技术, 将多个优势表面抗原肽基因融合表达, 则可以省去分别表达、纯化单个抗原的烦琐操作, 而且可以达到诊断试剂盒所要求的等摩尔比混合^[4]。如 Chien 等表达了融合抗原 C25^[5], 杨永平等表达了 C33c-CL^[6], 曹诚等表达了 4 价抗原^[7], 都表现了良好的抗原性和特异性。

本研究首先通过 PCR 技术, 从 HCV 基因组中分别扩增并克隆了核心抗原 N 端 89 氨基酸的 CS 基因、完整的 C33c 抗原基因、NS4 区抗原 N 端 129

氨基酸的 NS4 基因。然后, 构建了含有 CS 基因、C33c 基因、NS4 基因的融合基因 CCN 和含有 C33c 基因、NS4 基因的融合基因 CN(见图 1)。并分别在大肠杆菌中表达了融合蛋白。表达产物经过蛋白质印迹分析, 具有明显的抗原性和较高的特异性。

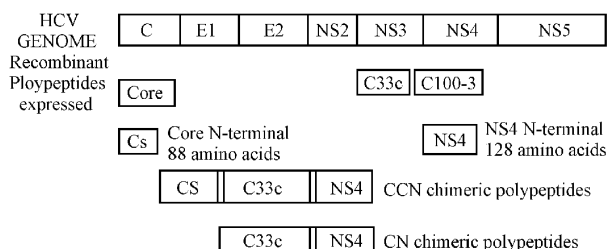


图 1 HCV 基因组和各抗原的定位

Fig. 1 The genetic organization of HCV and the relative location of recombinant-derived captive antigen

1 材料和方法

1.1 材料

含有 HCV 全基因组克隆的 pSK-HCV 质粒和抗 HCV 阳性血清由袁正宏教授惠赠; 大肠杆菌 TG1、BL21(DE3), 质粒 pBluescriptKS(+)、PET-24(a)+、PET-22(b)+ 由本室保存; 限制酶、T4 DNA

连接酶、Klenow 酶为 Gibco RBL 公司产品 ;Taq DNA 聚合酶为 AMI 公司产品 ;IDA-Sepharose 6B Fast Flow 为 Sigma 公司产品 ; α -³⁵S dATP 为 Amersham 公司产品 ;Sequence 试剂盒为 USB 公司产品。

1.2 方法

1.2.1 重组克隆及 DNA 序列测定 :基因工程操作参照文献 [12] 的方法稍加修改进行。DNA 测序方法参照 USB 公司推荐方法。

1.2.2 外源基因的表达 :将构建好的重组表达质粒转化大肠杆菌 BL21 ,接种于 2-YT 培养基中 ,37℃ 培养过夜。以 2% 的接种量转接于新鲜的 2-YT 培养基中 ,37℃ 培养 2~3h 至 A₆₀₀ 到 0.5~0.7 时 ,加入 IPTG 至终浓度为 1mmol/L ,继续培养 4h。离心收集菌体 ,按每 0.1 OD 样品加 10 μ L PBS 及等体积的 2 \times SDS PAGE 上样缓冲液的比例悬浮菌体 ,沸水浴 10min ,取 20 μ L 上样 ,进行 SDS PAGE 分析。

1.2.3 表达产物的性质分析 :离心收集菌体 ,按每 0.1 OD 样品加 10 μ L PBS 的比例悬浮菌体 ,超声波破菌 ,以 5000r/min 4℃ 离心 5min ,弃沉淀 ,收集上清 ,再以 39000g 离心 20min ,吸出上清加入等体积的 2 \times SDS PAGE 上样缓冲液 ,沉淀悬浮在与上清等体积的 PBS 及 2 \times SDS PAGE 上样缓冲液中 ,取 20 μ L 上样 ,进行 SDS PAGE 分析。

1.2.4 包涵体的纯化 :500mL 的表达菌 ,5000r/min 4℃ 离心 5min ,收集菌体。将菌体悬浮于 100mL PBS 中 ,冰上超声波破菌 30min ,39000g 4℃ 离心 20min ,收集沉淀。沉淀用 PBS 洗涤 3 次。

1.2.5 His6 融合蛋白的纯化 :将 500mL 菌体中的包涵体溶于 60mL Binding Buffer (20mmol/L Tris·Cl 5mmol/L 咪唑 ,pH 7.9 ,6mol/L Urea) 4℃ 过夜 ,39000 r/min 离心 20min ,弃沉淀 ,上清经 0.45 μ m 的微孔滤膜过滤后 ,上以 Binding Buffer 平衡的 Ni²⁺-IDA 亲和柱。然后先以 10 倍体积的 Binding Buffer 洗柱 ,再以 6 倍体积的 Washing Buffer (20mmol/L Tris·Cl ,60mmol/L 咪唑 ,pH7.9 ,6mol/L Urea) 洗柱。最后 ,以 6 倍体积的 Elute Bufer (20mmol/L Tris·Cl ,500mmol/L 咪唑 ,pH7.9 ,6mol/L Urea) 洗脱目的蛋白 ,收集洗脱液。洗脱液对含 4mol/L Urea、2mol/L Urea 的 PBS 和 PBS 进行梯度透析 ,冷冻干燥 ,−20℃ 保存。

1.2.6 表达产物的抗原性的初步鉴定 :以抗 HCV 阳性血清作为第一抗体 ,对表达产物进行蛋白印迹分析 ,初步鉴定表达蛋白的抗原性和特异性。

2 结 果

2.1 通过 PCR 技术获得 CS、C33c、NS4 的基因

根据文献报道^[8] ,由 C 区 N 端 89 个氨基酸组成的多肽 CS 其抗原性与完整的 core 蛋白相当 ,由此设计一对引物 P1 :TTGGATTCCCATGAGCACGAATCCTAAACCT ; P2 : AAGAATTCCACCAC-CACCCTCATTGCCATAGAGGGGCCAAGG。根据文献报道^[9] ,NS4 区抗原的表面抗原决定簇在 5-1-1 中 ,设计一对引物 P3 :TTGGATCCGGGAGGTGG-AGGAGGACCCACCCTTCATGGGTCAACACCT ; P4 : TTCTCGAGCGCAAGGGCCTTCTGCTT。根据已发表的 C33c 的 cDNA 序列^[10] ,设计一对引物 P5 : TTGAATTCAAGGGTACAAGGTGCTCGTC、P6 : TTGGATCCAAGCTGAAATCGACTGTTTG。再分别以 pSK-HCV 质粒为模板 ,扩增 CS、C33c、NS4 基因。PCR 反应条件 :94℃ 1min ,55℃ 1min ,72℃ 1min ,共 30 循环 ,最后 72℃ 延伸 10min。PCR 产物经 2% 的琼脂糖电泳检测后 ,克隆至 pSK 质粒中 ,核苷酸序列分析表明 ,基因及连接肽序列均正确。

2.2 PET24CN、PET22CCN 融合表达质粒的构建及在大肠杆菌中的表达

融合表达质粒 PET24CN 的图谱见图 2 (a) ,融合表达质粒 PET22CCN 图谱见图 2 (b)。在 CS 与 C33c、C33c 与 NS4 之间均以-Gly-Gly-Gly-Gly-柔性连接肽连接 ,这样可以增加 C33c、CS、NS4 之间的灵活性 ,减少它们之间的空间位阻 ,有利于保持三者原有的免疫活性。

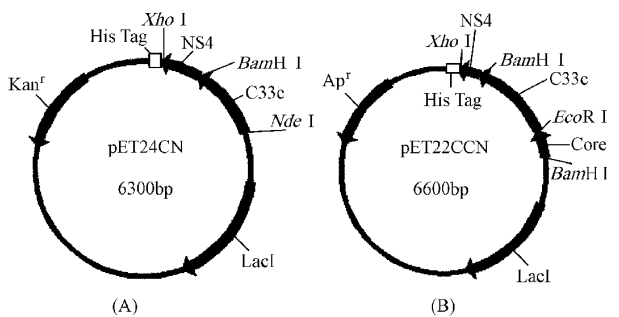


图 2 重组质粒 pET24CN 和 pET22CCN
Fig.2 Recombinant expression plasmids pET24CN ,pET22CCN
A. The fusion gene of C33c antigen and NS4 antigen was ligated into pET-24(a)+ ; B. The fusion gene of C33c antigen and Core and NS4 antigen was ligated into pET-22(b)+

将 PET22CCN、PET24CN 分别转化大肠杆菌 BL21 ,以终浓度 1mmol/L IPTG 诱导表达 ,并进行

SDS PAGE 分析。结果表明 ,分别在约 58kD 和 43kD 处有明显的表达条带(见图 3) ,与预期分子量一致 ,表达产物主要以包涵体的形式存在 ,蛋白印迹分析表明 ,表达产物与抗 His6 单抗有特异反应(见图 4A)。

2.3 表达产物的纯化

500mL 表达菌 经超声波破菌后 ,收集包涵体。将包涵体溶于 Binding Buffer 中 ,过 0.45μm 微孔滤膜后 ,上 Ni²⁺-IDA 亲和柱纯化。His6 融合蛋白可被 Ni²⁺-IDA 亲和柱完全吸附 ,流出液中基本无表达产物。结合了表达产物的 Ni²⁺-IDA 亲和柱可用低浓度的咪唑(60mmol/L)洗去非专一性吸附的杂蛋白。而用 500mol/L 咪唑洗脱表达产物。表达产物经纯化后 ,纯度可以达到 90 % 以上(见图 3)。

2.4 表达产物的抗原性的初步鉴定

将 PET22CCN、PET24CN 的表达全菌液及纯化的表达产物 ,经蛋白印迹分析 ,发现两蛋白均可以

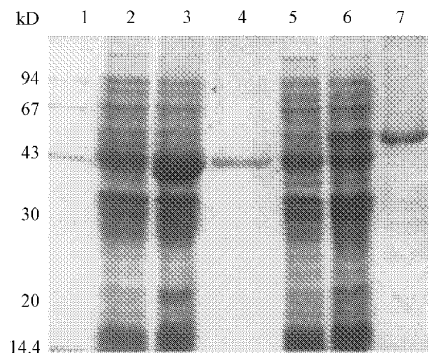


图 3 融合基因在大肠杆菌中的表达产物的 SDS 聚丙烯酰胺凝胶电泳

Fig.3 SDS PAGE analysis of fusion peptide expressed in bacteria

- 1. Protein molecular weight marker ;
- 2. Whole extract from BL21/pET24CN before induction ;
- 3. Whole extract from BL21/pET24CN after induction ;
- 4. Purified chimeric antigen CN ;
- 5. Whole extract from BL21/pET22CCN before induction ;
- 6. Whole extract from BL21/pET22CCN after induction ;
- 7. Purified chimeric antigen CCN



图 4 表达产物的蛋白质印迹分析

Fig.4 Analysis of Expression Fusion Protein by Western blot

- (A) Expressed products were probed with monocloned antibody directed against His6.
- 1. Protein molecular weight marker
 - 2. Whole extract from BL21 before induction
 - 3. Whole extract from BL21/pET24CN after induction
 - 4. Whole extract from BL21/pET22CCN after induction

- (B) Expressed products were probed with human sera directed against HCV.
- 1. Protein molecular weight marker
 - 2. Whole extract from BL21 before induction
 - 3. Whole extract from BL21/pET24CN after induction
 - 4. Whole extract from BL21/pET22CCN after induction
 - 5. Purified chimeric antigen CN
 - 6. Purified chimeric antigen CCN

和抗 HCV 阳性血清发生明显的特异反应(见图 4B)。说明 CCN、CN 均具有良好抗原性。

3 讨 论

目前 ,用于 HCV 检测的 ELISA 试剂盒主要包含 C 区、NS3 区、NS4 区的抗原 ,有的也包含 NS5 区的抗原。但对 NS5 区抗原作用的评价 ,却褒贬不一。Core、C33 抗原在抗原反应性上有很好的互补性。其联合检出率平均值可在 99 % 左右^[4] ,是研究 HCV 诊断试剂的重点区段。此外 ,抗 Core、C33c 抗

原的抗体发现得较早^[11] ,而 NS4 区抗原的抗体出现较晚^[4]。采用这 3 种抗原可检测出几乎所有的抗 HCV 阳性^[11]。故本研究构建了含有 C 区、NS33 区、NS4 区的表面优势抗原肽基因的融合表达质粒 PET24CN、PET22CCN。在不降低其免疫活性的基础上 ,减少其蛋白分子量 ,可使得其在大肠杆菌中易于表达 ,并增加蛋白稳定性。同时在 CS、C33c、NS4 之间加入柔性连接肽 ,可减少各多肽之间的空间位阻 ,也有利于保持各多肽原有的免疫活性。

本研究采用的表达系统为 pET6His 融合表达系

统。它不仅可以在天然状态下纯化可溶性表达产物,而且可以在变性条件下纯化不溶性的包涵体表达产物。而且 His6 融合表达系统的载体蛋白较小,故免疫原性较低,利于表达抗原蛋白,且还有抗 His6 单抗的商业产品。这些都使得表达产物的鉴定和纯化更加方便。

本研究表达的 CCN、CN 融合蛋白,经纯化后,在 6mol/L Urea 溶液中,4℃ 放置 4 星期,取样经 SDS-PAGE 分析表明无明显降解,显示了较好的稳定性。表达产物经蛋白印迹分析,表明融合蛋白 CCN、CN 与抗 HCV 阳性血清有特异反应,说明 CCN、CN 具有 HCV 抗原性。

REFERENCES (参考文献)

- [1] Kuo G ,Choo Q L ,Alter H J *et al.* An assay for circulating antibodies to a major etiologic virus of human non-A, non-B hepatitis , *Science* ,1989 **244** :362~364
- [2] Gaxi A ,Fiorentino G ,Di Marco *et al.* Second generation tests in diagnosis of chronic hepatitis C ,*Lancet* ,1991 **337** :1354
- [3] Garcia-Samaniego J ,Enriquez A ,Soriano V *et al.* Third generation recombinant immunoblot assay to confirm hepatitis C virus-indeterminate serological samples. *Vox Sang* ,1993 **64** :191~192
- [4] YANG Y F (杨永平) ,CHAO J A (曹经媛) ,JING D Y (金冬雁) *et al.* Development of a new type HCV EIA diagnostic KIT ,*Chinese Journal of Virology* (病毒学报) ,1994 **10** (2) :118~126
- [5] Chien D Y ,Choo Q L ,Tabrizi A *et al.* Diagnosis of hepatitis C virus (HCV) infection using an immuno dominant chimeric polyprotein to capture circulating antibodies :evaluation of the role of HCV in liver disease ,*Proc Natl Acad Sci USA* ,1992 **89** :10011~10015
- [6] YANG Y F (杨永平) ,JIANG Y Z (江永珍) ,BI S L (毕胜利) *et al.* cDNA chimeric fusion and prokaryotic expression of nucleocapsid and NS3 regions of hepatitis C virus genome and analysis of its antigenicity ,*Chinese Journal of Virology* (病毒学报) ,1994 **10** (3) :229~234
- [7] CHAO C (曹诚) ,SHI C H (石成华) ,LI F (李平) *et al.* Cloning , expression and application of a quadrivalent chimeric antigen of hepatitis C virus (HCV) ,*Chinese Journal of Virology* (病毒学报) ,1996 **12** (3) :199~206
- [8] YANG Y F (杨永平) ,LIU C H (刘崇柏) ,XIA N S (夏宁邵) *et al.* cDNA cloning ,sequencing and expression in *E. coli* of the C region of HCV genome derived from chinese patient with HCV infection. *Chinese Journal of Virology* (病毒学报) ,1994 **10** (2) :109~116
- [9] Antonella Cerino ,Mario U ,Identification of an immunodominant B cell epitope on the hepatitis C virus nonstructural region defined by human monoclonal antibodies ,*J Immuno* ,1991 **147** :2692~2696
- [10] YANG Y F (杨永平) ,LIU C H (刘崇柏) ,JING D Y (金冬雁) *et al.* *Science in China* (series B) ,1993 **23** :730~739
- [11] van der Poel C C L ,Cuypers H T M ,Reesink H W *et al.* Confirmation of hepatitis C virus infection by new four-antigen recombinant immunoblot assay ,*Lancet* ,1991 **337** :317~319
- [12] Sambrook J ,Fritsch E F *et al.* *Molecular Cloning :A Laboratory Manual* 2nd ed ,New York :Cold Spring Laboratory Press ,1989

Gene Chimeric Fusion and Expression of Nucleocapsid, NS3 Regions and NS4 Regions of Hepatitis C Virus Genome

SHEN Xiao-Chuan¹ LI Ming² WU Xiang-Fu^{1*}

¹ Shanghai Institute of Biochemistry ,Chinese Academy of Science ,Shanghai 200031 ,China)

² Shanghai Institute of Animal Parasitology ,Key laboratory of Animal Parasitology ,Minister of Agriculture ,Shanghai 200232 ,China)

Abstract Genes encoding HCV core and NS4 antigen epitopes and C33c antigen were cloned from HCV genome by PCR ,respectively. Two fused genes were constructed. One contained these three genes ,another contained genes encoding C33c antigen and NS4 antigen epitopes. These fused genes were cloned into expression plasmid pET-24(a)+ and pET-22(b)+ under T7 promoter and transformed into *E. coli* BL21(DE3) respectively. SDS-PAGE analysis revealed that these fused antigens CCN, CN were highly expressed after the induction by 1mmol/L IPTG. These Expression products were detected by western blotting with anti-HCV serum.

Key words hepatitis C Virus (HCV) , expression , fusion protein

Received : June 19 , 2000

* Corresponding author. Tel 86-21-64374430-292 ; Fax 86-21-64338357 ; E-mail :xfwu@sunm.shnc.ac.cn

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