

丙型肝炎病毒核心蛋白基因在大肠杆菌内的表达及应用

李越希 唐家琪 史江 赵学忠 乔仁良

(南京军区军事医学研究所,南京 210002)

R373.21

A

提要 将从中国丙肝病人血清中扩增克隆的丙型肝炎病毒核心蛋白基因(408bp)酶切处理后插入表达载体 pJLA502 内,获得高表达核心蛋白的重组工程菌。将重组菌经 42℃ 热诱导 5h, SDS-PAGE 分析表明,表达的核心蛋白占菌体蛋白总量的 20%。经分子筛和吸附层析纯化后获得的核心蛋白, ELISA 检测证实有较好的抗原性和特异性。用表达的核心抗原加用表达的 NS₃ 抗原(C₃₃)装配的抗-HCV 试剂盒,经用标准血清验证及与国外第二代抗-HCV 试剂盒比较,证实符合丙肝诊断试剂要求。

关键词 丙型肝炎病毒,核心蛋白基因表达,大肠杆菌,抗原性,抗-HCV 检测

核心蛋白基因表达

1989年,在日本东京召开的国际非甲非乙型肝炎和经血传播的传染病学会议上,将经血传播的非甲非乙型肝炎命名为丙型肝炎。同年,美国 Chiron 公司的 Choo^[1]首次证实丙型肝炎的病原为一种单股正链 RNA 病毒,并克隆了部分基因片段。此后,美国和日本等学者对丙型肝炎病毒(HCV)的分子生物学进行了大量研究。1990年美国株和日本株^[2]全部核苷酸序列已被分析清楚。根据 HCV 的核苷酸序列,国外学者合成了各种引物^[3-5]用于扩增及检测 HCV 的不同基因片段,并将基因片段在各种细胞内表达成功^[6-7]。中国株 HCV 的全长核苷酸序列未见发表,我们参照日本株 HCV 的核苷酸序列合成了二对引物,利用逆转录-PCR 技术从中国病人血清中扩增克隆了 HCV 核心蛋白基因,序列分析后与日本和美国株 HCV 的对应核苷酸序列进行了比较。本文介绍克隆的核心蛋白基因在大肠杆菌内的高效表达及表达蛋白的抗原鉴定。

材料和方法

- 1 菌种与质粒** 大肠杆菌 RR₃、DH_{5α}、HB101 由军事医学科学院三所和八所赠送。表达载体 pJLA502 及载体上的一对引物由西德 GBF 公司 McCarthy 博士惠赠,质粒 pUC18/19 购自华美公司。
- 2 试剂与工具酶** 限制性内切酶、T₄DNA 连接酶、T₄DNA 聚合酶为美国 Promega 公司或 Biolabs 公司产品。 α -³²P dATP 为美国 Amersham 公司产品。Sephadex G200 及 Sepharose 4B 为瑞典 Pharmacia 公司产品。NS₃ 区抗原(C₃₃)为本室用工程菌生产,抗原全长 275 个氨基酸,位于 cDNA^[2]的 3565~4406bp 处,RT-PCR 克隆的 cDNA 片段长 842bp。
- 3 一般方法** 质粒提取纯化、限制性内切酶反应、DNA 片段回收、DNA 粘末端的补平或削平、T₄DNA 连接酶反应、质粒转化、琼脂糖凝胶电泳、SDS-PAGE、核酸探针标记及杂交均参照文献^[8]进行。
- 4 核酸探针的标记及杂交** 以扩增的基因片段 1.5 μ g 为模板,用 Nick 翻译法掺入 α -³²P dATP 制备探针,菌落原位杂交时,预杂交液为:50%甲酰胺、1 \times SSC、1 \times Denhardt's 液、0.1%SDS、120 μ g/ml 鲑鱼精子 DNA。42℃

本文于 1993 年 3 月 9 日收到,9 月 7 日修回

• 参加本工作的还有本所于明明、李先富、潘秀珍三位同志。

预杂交 5 小时。将标记的核酸探针煮沸 3 分钟，加入预杂交液内即为杂交液，42℃ 杂交 24 小时。杂交膜先用 2 × SSC、0.1% SDS 洗二次(40℃)，每次 15 分钟，再用 0.1 × SSC 洗一次(55℃)，凉干后-70℃ 自显影 24 小时。

5 表达产物的纯化 将表达重组菌 42℃ 热诱导 4 小时，离心(6000r/m, 4℃ 10 分钟)，将菌体悬浮于 PBS 溶液(pH7.2)中，超声破菌后离心(4000r/m, 4℃ 10 分钟)，回收上清后离心(12000r/m, 4℃ 10 分钟)，弃上清。沉淀依次用 2mol/L、4mol/L、8mol/L 尿素处理，最后一次 37℃ 水浴 30 分钟，离心(10000r/m, 4℃ 10 分钟)后上清即为表达核心蛋白粗品，置透析袋内透析除去尿素成分。

将透析后样品浓缩后，上样至用 PBS(pH7.0)平衡好的 Sephadex G200 柱上(XK26/70)，PBS(pH7.0)洗脱后(0.3ml/min)收集分子量为 16kD 的蛋白峰，再上样至交联有正常人 IgG 的 Sepharose 4B 柱上(16/70)，PBS(pH7.0)洗脱后(0.1ml/min)收集穿过蛋白峰，ELISA 测定蛋白抗原性，收集抗原性较好蛋白峰。

6 纯化蛋白抗原效价测定及中和试验 用纯化的核心蛋白抗原 1:10 梯度稀释后包被酶联反应板(4℃ 24h)，小牛血清及白蛋白封闭后(4℃ 24h)，用 ELISA 法测定抗原效价。中和试验：先用 10μl 纯化抗原或受体菌蛋白 10μl 与 5μl 阳性血清加入 90μl 样本稀释液内，42℃ 反应 15 分钟，然后再分别测定阳性血清被纯化抗原或受体菌蛋白阻断前后的 OD 值，分别计算中和效率。

7 装配抗-HCV 试剂盒的灵敏度及特异性测定 将纯化的核心蛋白抗原用包被液(0.05mol/L 碳酸盐缓冲液, pH9.6)1:250 稀释，与用包被液 1:200 稀释的纯化 US₃ 区抗原(C₃₃)等量混合，以每孔 100μl 包被酶联板(4℃, 24h)，用 20% 小牛血清封闭后(4℃ 12h)，用 PBS-T 缓冲液洗 5 次，真空抽干即为抗原预包被板。用预包被板条测定抗-HCV 标准血清(10 份阳性血清和 10 份阴性血清，3 份灵敏度确定血清，均购自中国药品生物制品检定所)，血清用样本稀释液 1:20 稀释后每孔加样 100μl，43℃ 温育 30min，PBS-T 洗三遍，加酶标二抗(鼠抗人 IgG-HRP)100μl/孔，43℃ 反应 20min，洗板三次后加新配 OPO 底物 100μl，室温放置 5~10min，加 2N H₂SO₄ 终止反应后用酶联仪(西德, Σ960 型)测定 OD 值。

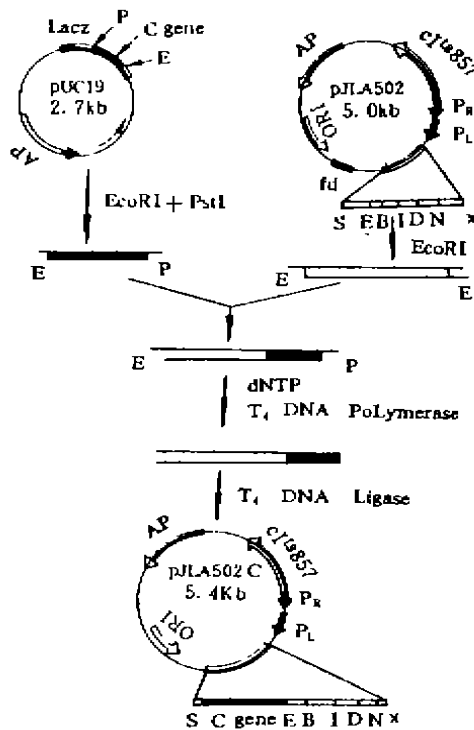


图 1 表达核心蛋白基因质粒构建示意图

P: PstI, E: EcoRI, X: XhoI, N: NcoI
D: NdeI, I: SphI, B: BamHI, S: Sall

Fig. 1 The construction schedule of the plasmid expressing core protein gene of HCV

结 果

1 表达核心蛋白的重组质粒构建 在PCR扩增核心蛋白基因时,设计合成了内外两对引物。在内引物对的上游引物上加上了EcoRI酶切位点,在下游引物上加上了终止密码子TAG及PstI酶切位点。扩增的基因片段经EcoRI及PstI双酶切后,已插入质粒pUC19内,该质粒已大量扩增制备。表达载体pJLA502含有强启动子 P_R 、 P_L ,在其多克隆位点内含有NcoI、EcoRI等酶切位点(图1)。经计算扩增基因片段用EcoRI和PstI酶切后,连接至pJLA502的EcoRI位点,其核心蛋白的翻译阅读框架正好和载体启动子后的第一个ATG(NcoI位点内)的起始翻译一致,因而构建后可表达一个含有13个载体氨基酸序列的融合蛋白,含有核心蛋白的115个氨基酸及5'非翻译区的6个氨基酸,全长共134个氨基酸,构建流程见图1。

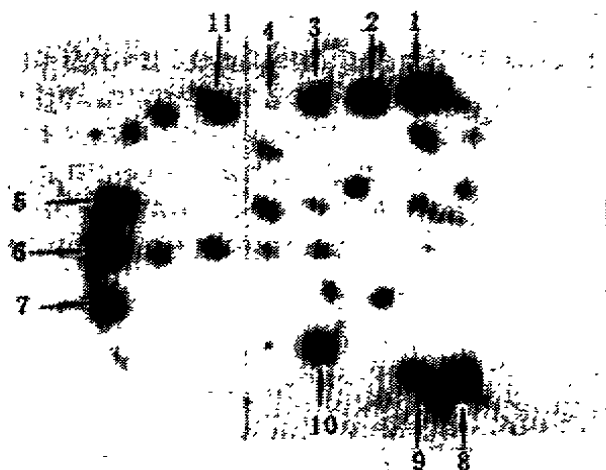


图2 转化子原位杂交结果

1、2、3号为含扩增片段的阳性菌对照, 4号为受体菌RR₁对照,
5、6、7号为扩增的基因片段直接点样, 8、9、10、11号为杂交强阳性的重组子。

Fig. 2 Hybridization of ³²P-labeled HCV DNA probe to the transformation clones

Nos. 1, 2 and 3 are positive controls. No. 4 is negative control

Nos. 5, 6 and 7 dropping directly amplified gene fragments onto the membrane

Nos. 8, 9, 10 and 11 are positive recombinant clones.

2 重组子的转化及筛选 将连接重组的质粒转化大肠杆菌RR₁,涂布含有AP的LB平板,30℃过夜生长,次日,将菌落转种至格式化的高压硝酸纤维素膜上,置LB平板上30℃生长过夜,揭下硝酸纤维素膜经变性、中和等处理进行原位杂交。34个转化子中4个杂交呈强阳性(图2)。挑4个强阳性菌落接种至LB培养基大量培养,提取质粒DNA,取2个质粒(8号,9号)用EcoRI和SalI双酶切,结果两质粒均切下一条约0.4kb基因片段(图3),证明这两个质粒均为正向插入单个核心蛋白基因的重组质粒。

3 重组菌的诱导表达 将酶切正确的重组质粒转化至大肠杆菌DH5 α ,挑单菌落接种至3ml LB培养基内(含AP 60 μ g/ml),30℃生长过夜,次日按1%接种量转接种至含200ml LB培养基的三角烧瓶内,30℃振荡培养约4小时,水浴迅速升温至42℃,再置42℃摇床内振荡培养6h。

分别于 42℃ 热诱导的 0、1、2、4、5、6 小时取样,用全菌进行 SDS-PAGE 分析,结果表明,经 42℃ 热诱导后表达出一条约 16kD 的蛋白带,在诱导 4h 时产量达高峰,延长诱导时间表达量变化不大(图 4)。经蛋白扫描表明,表达核心蛋白占菌体蛋白总量的 20%。

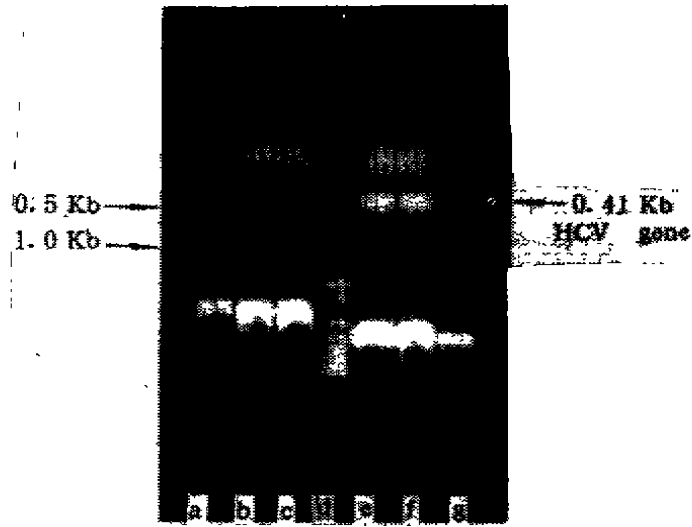


图 3 质粒的酶切鉴定

a: 质粒 pJLA502, b: 重组子 8 质粒, c: 重组子 9 质粒, d: DNA 标准分子量,
e: 重组子 8 质粒 + EcoR I + Sal I, f: 重组子 9 质粒 + EcoR I + Sal I, g: 质粒 pJLA502 + EcoR I + Sal I.

Fig. 3 Identification of the recombinant plasmids by EcoR I and Sal I cutting

a, Plasmid pJLA502. b, No. 8 recombinant plasmid. c, No. 9 recombinant plasmid. d, DNA markers.

e, No. 8 recombinant plasmid cut by EcoR I and Sal I. f, No. 9 recombinant plasmid cut by EcoR I and Sal I.
g, pJLA502 plasmid cut by EcoR I and Sal I.

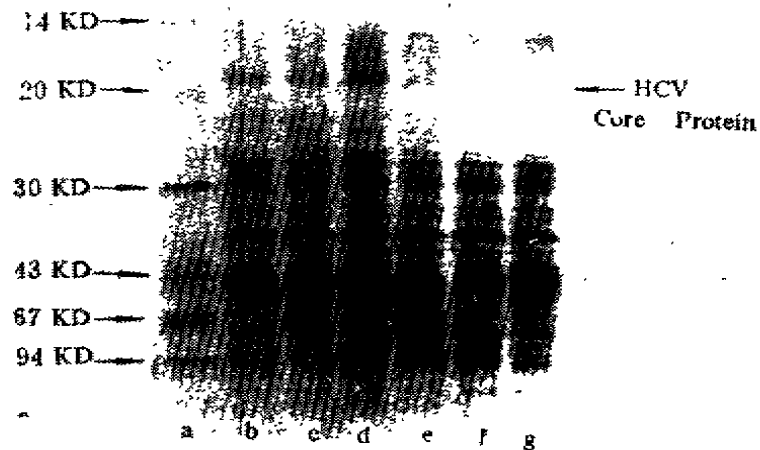


图 4 重组菌 42℃ 热诱导不同时间进行 15% SDS-PAGE 分析

a: 标准蛋白分子量, b, c, d, e, f, g 分别为诱导 6、5、4、2、1 和 0 小时的结果。

Fig. 4 Analysis on the core protein expressed by recombinant plasmid with 15% SDS-PAGE
a, protein markers. b, c, d, e, f, g express respectively the results of inducing the recombinant 6, 5, 4, 2, 1 and 0 hours at 42°C.

4 表达核心蛋白的抗原性鉴定 表达的核心蛋白经包涵体纯化和亲和层析二次处理后, 获得较好的蛋白抗原。纯化抗原经 1: 10000 稀释后仍有较好的抗原性(表 1), 中和试验结果(表 2)表明, 表达的蛋白抗原能较好地中和血清中的抗 HCV 抗体, 阻断效率达 77%, 而受体菌蛋白的阻断率仅有 7.5%。

表 1 表达核心蛋白抗原效价测定(OD₄₉₀值)

Table 1 Titre measuring of expressed antigen by ELISA(OD₄₉₀ value)

包被抗原稀释 Coating antigen dilution	1: 10	1: 100	1: 1000	1: 10000
表达蛋白抗原 Expressed antigen	2.05	1.75	1.12	0.65
受体菌蛋白 Protein of <i>E. coli</i>	0.18	0.13	0.09	0.08

表 2 表达核心蛋白抗原中和试验结果(OD₄₉₀值)

Table 2 Neutralization tests of expressed antigen to the antibody against HCV(OD₄₉₀ value)

阳性对照(未中和) Positive control (no neutralization)	1.51
表达蛋白抗原中和试验 Neutralization test (with expressed antigen)	0.35
受体菌蛋白中和试验 Neutralization test (with protein of <i>E. coli</i>)	1.30
阴性对照 Negative control	0.09

5 装配抗-HCV 试剂盒的灵敏度及特异性 用装配的抗-HCV 试剂盒测定 10 份阳性和 10 份阴性标准血清, 结果符合率均为 100%。测定 1[#]、2[#]、3[#]灵敏度标准血清, 其效价分别为 1: 64、1: 512、1: 512。三批试剂盒的变异系数均 ≤ 10.26%。

6 表达核心抗原和表达 NS₃ 抗原(C₃₃)检测抗-HCV 的比较 分别用核心抗原(1: 500 稀释)和 NS₃ 抗原(1: 400 稀释)包被酶联板检测抗-HCV, 检测 180 例阴、阳性血清, 结果见表 3。表 3 结果表明 180 份血样中有 97 份用二种抗原检测均阳性, 有 19 份仅核心抗体阳性, 12 份仅抗-NS₃(C₃₃)阳性, 说明两个抗原检测的抗体谱并不相同。用两种抗原混合装配的抗-HCV 试剂盒检测该 180 份血清, 结果阳性例数 129 例, 比单独核心抗原和 NS₃ 抗原测定抗-HCV 阳性总和(126 例)多检出 3 例, 这说明两种抗原不仅能互补, 混合后还能提高检出率。按 129 例为阳性总数计算, 用核心抗原检测抗-HCV 的检出率为 93%(116/129), 用 NS(C₃₃)抗原检测抗-HCV 检出率为 83%(109/129)。

表 3 核心抗原和 NS₃ 抗原检测抗-HCV 的比较Fig. 3 Comparison of core antigen and NS₃ antigen for detection of anti-HCV

用核心抗原检测抗 HCV Detection of anti-HCV with core antigen	NS ₃ 抗原检测抗-HCV Detection of anti-HCV with NS ₃ antigen		小计 Subtotal
		+	-
+	97	19	116
-	12	52	64
小计 Subtotal	109	71	合计 Total 180

7 装配抗-HCV 试剂与其它试剂盒的比较 用美国 Abbott 公司、UBI 公司及日本国际试剂株式会社的抗-HCV 试剂盒分别检测同一批血清(共 180 份阴、阳性血清),将测定结果与装配抗-HCV 试剂盒的测定结果分别进行比较,结果装配抗-HCV 试剂盒与 Abbott 试剂盒符合率为 95.00%,与 UBI 试剂盒符合率 94.22%,与日本国际试剂株式会社试剂盒的符合率为 98.33%。上述结果表明装配的抗-HCV 试剂盒与国外第二代抗-HCV 试剂盒基本一致,尤其与日本的抗-HCV 试剂盒较接近。

讨 论

对不同株 HCV 的核苷酸序列及氨基酸序列研究表明,编码的氨基酸序列以核心蛋白区最为保守。因此装配抗-HCV 试剂盒采用此区抗原应有较高的检出率。此外,核心抗体出现相对较早,也会增加抗 HCV 检出率。美国 Chiron 公司的第一代抗-HCV 试剂盒仅用非结构区抗原(C₁₀₀),其检出率较低。Abbott 公司第二代试剂盒加用了核心蛋白抗原,检出率显著提高,其使用的核心抗原和非结构区抗原(C₃₃)均由工程菌表达。我们用自己表达的核心抗原和非结构区抗原装配抗-HCV 试剂盒,通过标准血清验证及与国外试剂盒比较,证实装配的试剂盒符合诊断要求。

虽然核心蛋白抗原保守性较高,但单独使用也会产生假阴性,因为部分血清仅存在有非结构区抗原的抗体。只有加用非结构区抗原才能达到较高的抗-HCV 检出率。本文中检测 180 份血样有 12 份血样仅 NS₃ 抗体阳性,有 19 份血样仅核心抗体阳性,说明单独使用任一抗原均会产生漏检,单独使用核心抗原检出率要高于单独使用 NS₃ 区抗原检出率。

表达的核心蛋白融合了表达质粒载体上的 13 个氨基酸和 HCV 5'非编码区的 6 个氨基酸,它们对核心蛋白的抗原性和特异性均无较大影响。表达的核心蛋白纯化后可完全代替合成的核心区抗原,用于装配抗-HCV 试剂盒。

参 考 文 献

- 1 Choo QL, Kuo G, Weiner AJ, *et al.* Isolation of a cDNA clone derived from a blood-borne non-A, non-B viral hepatitis genome. *Science*, 1989; 244: 1-3
- 2 Kato N, Higikata M, Ootsyama Y, *et al.* Molecular cloning of the human hepatitis C virus genome from Japanese patients with non-A, non-B hepatitis. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1990; 87: 9524-9528
- 3 Kaneko S, Unoura N, Kobayashi K, *et al.* Detection of serum hepatitis C viral RNA. *Lancet*, 1990; 335: 976

- 4 Weiner AJ, Kuo G, Bradley DW, *et al.* Detection of hepatitis C viral sequences in non-A, non-B hepatitis. *Lancet*, 1990;335:1—3
- 5 Garson JA, Tedder RS, Briggs M, *et al.* Detection of hepatitis C viral sequences in blood donations by "nest" polymerase chain reaction and prediction of infectivity. *Lancet*, 1990;355:1419—1422
- 6 Muraio K, Hijiata M, Ohroski S, *et al.* A structural protein of hepatitis C virus expressed in *E. coli* facilitates accurate detection of hepatitis C virus. *Biochem Biophys Res Commun*, 1990 Oct30; 172(2):511—516
- 7 Harada S, Watanabe Y, Takeuchi K, *et al.* Expression of processed core protein of hepatitis C virus in mammalian cells. *J Virol*, 1991, 65(6):3016—3021
- 8 Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T, *et al.* Molecular cloning. 2nd ed. New York, USA: Cold spring harbor laboratory press, 1989

Expression of HCV Core Protein in *E. coli* and Its Application

Li Yuexi Tang Jiaqi Shi Jiang *et al*

(Nanjing Military Medical Research Institute, Nanjing 210002)

The cloned HCV core protein gene was inserted into the plasmid vector pJLA502 at EcoRI site, and the recombinant plasmid was transformed into *E. coli* DH_{5α}. After inducing 5hrs at 42°C, SDS-PAGE analysis showed that the expressed core protein is twenty percent of total protein of *E. coli* DH_{5α}; the purified core protein by Sephadex G200 gel filtration and Sepharose-4B-IgG affinity chromatography has excellent antigenicity and specificity, and is good for detecting anti-HCV.

Key words HCV, Core protein gene expression, *E. coli*, Antigen, Anti-HCV detection