

丙型肝炎病毒非结构3区基因
片段的克隆表达及抗原纯化鉴定

李越希 唐家琪 陶开华 乔仁良 李先富 潘秀珍

(南京军区军事医学研究所, 南京 210002)

R373-21, R392-33

A 摘要 通过逆转录 PCR 技术, 从中国江苏省丙型肝炎病人血清中扩增克隆了丙型肝炎病毒(HCV)的非结构3区的部分基因片段(C₃₃)。DNA 序列分析证实, 该片段全长 842bp。在合成的一对逆转录 PCR 引物上, 上游引物增加了 Nco I 酶切位点(内含起始密码子 ATG), 下游引物上增加了 Sal I 酶切位点及终止密码子 TAA。将克隆的 C₃₃ 基因片段克隆至表达载体 pBV221 内, 获得了表达 C₃₃ 抗原的工程菌, 表达 C₃₃ 抗原分子量为 30kD, 经尿素裂解纯化、分子筛分离纯化及复性后进行离子交换和反相亲和层析纯化, 获得的重组蛋白经 ELISA 和免疫印迹等证实有较好的抗原性和特异性。

关键词 丙型肝炎病毒, 非结构3区基因, 逆转录 PCR, 基因克隆表达, 抗原性鉴定

基因克隆; 抗原; 基因表达

自 1989 年 Choo^[1]首次证实丙型肝炎的病原为一单股正链 RNA 病毒至今, 对丙型肝炎病毒(HCV)的分子生物学、流行病学进行了很多研究。美国、日本^[2]等国家均已克隆分析了几株 HCV 的全长核苷酸序列, 并将不同部位的基因片段在不同宿主细胞内表达成功, 将提取纯化的重组抗原用于装配抗-HCV 试剂盒。继克隆表达了丙型肝炎病毒核心蛋白之后, 我们又用逆转录 PCR 技术克隆了非结构3区的基因片段(C₃₃), 并在大肠杆菌内表达成功, 表达的蛋白有较好的抗原性和特异性。

材料和方法

1 材料

1.1 血清标本 由江苏省卫生防疫站提供, 采自江苏献血员, 血清抗-HCV 强阳性, 用 RT-PCR 扩增 HCV 的 5' 非翻译区核酸片段为阳性。其它抗-HCV 阴、阳性血清来自南京红十字中心血站等单位。检测抗-HCV 质控血清购自中国药品生物制品检定所。

1.2 试剂与工具酶 各种限制性内切酶、连接酶为美国 Promega 或 Biolabs 公司产品, 逆转录试剂盒为美国 GIBCO 公司产品, PCR 试剂盒为 PE 公司产品, T₇DNA 序列分析试剂盒、Sephacryl S-200 凝胶、Sephacrose 4B 及 DEAE Sepharose Fast Flow 凝胶均为 Pharmacia 公司产品。其余试剂均为分析纯或酶级。

1.3 菌种与质粒 大肠杆菌 RR₁ 及 DH_{5α}, 由军事医学科学院三所及八所赠送。表达载体 pBV221 由本所朱敏生提供。

2 实验方法

2.1 引物设计与合成 将日本株 II 型 HCV 的 cDNA 序列输入计算机, 利用 PCR 引物选择软件(购自军事医学科学院情报所)检索合适的引物, 经核对选出一对其间含 C₃₃ 基因的引物, 经变换碱基增加酶切位点后(见表 1), 将该对引物输入 PCRDESN 程序和 PCFOLD 程序检验证实引物符合 PCR 要求。该对引物由中国科学院上海

细胞所帮助合成。

表1 选择合成的逆转录 PCR 引物
Tab. 1 Synthesis of selected RT-PCR primers

引物 Primers	碱基组成 Composition of bases	位置(cDNA) Position	G+C(%)
上游引物 Upstream primer	5'-GTTG <u>CCATGGCGGTGGACTTCATAC</u> -3' NotI	3556~3589	56%
下游引物 Downstream primer	5'-CG <u>TGTCGACT TAGCTGAAAGCGACTGTCTGGGTG</u> -3' Sal I Stop	4374~4407	53%

2.2 HCV RNA 提取 采用异硫氰酸胍/酚/氯仿^[3]法从抗-HCV 滴度较高的阳性血清中提取。

2.3 逆转录及 PCR 反应 以提取的 HCV RNA 为模板,用下游引物进行逆转录,37℃ 30min 后再 42℃ 逆转录 1h。逆转录反应按试剂盒说明书进行。将逆转录产物 99℃ 变性 5min 后,按 PCR 试剂盒说明书进行 PCR 扩增。PCR 条件为:96℃ 变性 4min,57℃ 2min,72℃ 5min;然后 95℃ 1min,57℃ 1min,72℃ 2min 扩增 40 个循环,最后一个循环 72℃ 延长至 7min。取 1 次 PCR 产物 1μl 进行第二次 PCR 扩增,仅复性温度改为 60℃,其余条件与第 1 次 PCR 相同。

2.4 分子克隆的一般方法 参照文献^[4]进行。

2.5 DNA 序列分析 用 T₇DNA 序列分析试剂盒,用双脱氧终止法进行序列分析。

2.6 表达非结构 3 区蛋白的纯化 阳性重组菌 30℃ 大量培养后,42℃ 迅速升温诱导 4h,冷却后离心收菌,用 PBS 洗菌体二遍后悬浮于裂解液内,加少量溶菌酶(4mg/ml),冰浴超声破菌后离心,弃上清,沉淀用 3mol/L 尿素洗一遍,再用 8mol/L 尿素裂解沉淀内包涵体,离心收集上清直接上样至 Sephacryl S-200 凝胶柱,紫外监测收集各峰蛋白,测定各峰蛋白分子量。将分子量为 30kD 的蛋白峰蛋白置复性液内放置 2h,然后上样至 DEAE Sepharose Fast Flow 离子交换凝胶柱(或直接与交联有正常人 IgG 的 Sepharose 4B 反复混合,吸附非特异组分)。分部收集各峰蛋白,测定抗原性,将抗原性较好的蛋白再上样至交联有正常人 IgG 的 Sepharose 4B 柱,收集穿过峰蛋白,ELISA 测定抗原性,将抗原性最好的蛋白浓缩至原始菌液的 1/10。

2.7 纯化表达蛋白 SDS-PAGE 及 Western Blotting 分析 取纯化蛋白进行 SDS-PAGE 电泳,在蛋白质标准两侧各加一孔,电泳后一孔用于免疫印迹,另一孔和标准蛋白用于考马斯亮蓝染色。从聚丙烯酰胺凝胶上将蛋白转移至硝酸纤维素膜(西德 Schleicher and Schuell 产品),采用 Pharmacia 公司生产的 MultiPhor II Nova Blot 电转移系统。转移后的硝酸纤维素膜用脱脂奶粉封闭,酶标抗人 IgG 为鼠抗人单克隆抗体,底物 DAB 为 Sigma 公司产品,具体反应条件参照文献^[4]进行。

2.8 抗原的 ELISA 测定 不同稀释度抗原 100μl 包被酶联反应板,4℃ 过夜。PBS-T 洗三遍后用含 20% 小牛血清的封闭液封闭(每孔 120μl),4℃ 封闭过夜或 42℃ 封闭 1h。PBS-T 洗三遍后空干。以后按常规方法检测待测血清。

结 果

1 PCR 扩增结果

取第二次 PCR 产物用 1.5% 琼脂糖电泳检测,结果(图 1)表明,扩增产物为一条约 0.8kb (842bp) 的 DNA 片段。这与预期扩增的 DNA 片段大小一致,初步证实此片段即为目的 cDNA 片段。



图1 PCR扩增产物用1.5%琼脂糖电泳检测

(1) DNA标准分子量,(2)~(5)分别加10 μ l,8 μ l,6 μ l,4 μ l PCR产物

Fig. 1 Analysis of PCR products by 1.5% agarose electrophoresis.

(1) DNA markers, (2)~(5) Add 10 μ l, 8 μ l, 6 μ l, 4 μ l of PCR products respectively

2 将扩增基因片段克隆至表达载体 pBV221

将PCR扩增产物用低熔点琼脂糖从1.5%的琼脂糖内回收。溶于5 μ l TE(10mmol/L Tris-HCl, 1mol/L EDTA, pH8.0)内,取2 μ l用Nco I和Sal I双酶切,电泳回收酶切基因片段。取质粒载体pBV221约1.5 μ g用Nco I和Sal I双酶切,电泳回收酶切载体。将回收酶切基因片段和回收酶切载体按约1:1的比例用T4DNA连接酶连接(16 $^{\circ}$ C 6h),将连接产物转化大肠杆菌DH $_{5\alpha}$,涂布含氨苄青霉素(60 μ g/ml)的LB平板,30 $^{\circ}$ C过夜生长。次日,挑取25个转化子提取质粒电泳检测,有21个质粒较对照质粒载体大,另外4个质粒与对照质粒载体一样大。从21个较大质粒中挑取两个大小约4.4kb的质粒(根据DNA标准分子量位置确定),用Nco I和Sal I酶切鉴定(图2)。结果两个质粒均为单个基因与单个载体的连接,相应的两个重组子编号为NS $_3$ -6和NS $_3$ -21。

3 克隆基因片段的DNA序列分析

以NS $_3$ -6质粒为模板,用合成的PCR引物从两端进行序列分析。将分析结果与日本株I型的相应区域cDNA序列进行比较证实,克隆的基因片段确为HCV的非结构3区基因片段,与日本株(I型)的DNA序列同源达92.9%,变异主要位于密码子的第三位碱基上,多数是T与C的互换或A与G的互换,前者概率更高。

4 重组子的诱导表达及表达蛋白的纯化

将重组子NS $_3$ -6及NS $_3$ -21按种LB培养基(含氨苄青霉素60 μ g/ml)30 $^{\circ}$ C培养至OD $_{500}$ =0.4~0.5,迅速升温至42 $^{\circ}$ C诱导培养。于诱导后1、2、3、4、5、6h时取样(1ml)收集菌体进行SDS-PAGE检测重组蛋白表达量,结果表明,两个重组子均表达一条分子量约30kD的蛋白带,诱导4h时表达量已达高峰,延长诱导时间表达量变化不大,薄层扫描分析表明表达的蛋白约占菌体蛋白总量17%。

将 8mol/L 尿素裂解获得的表达蛋白粗品上样 Sephacryl S-200 凝胶分离, 0.01mol/L PBS (pH7.2) 洗脱, 将分子量为 30kD 蛋白峰反复用正常人 IgG-Sepharose 吸附, 复性后再上正常人 IgG-Sepharose 4B 柱(或先用 DEAE 阴离子交换柱纯化), 洗脱后穿过蛋白, 有一个主峰(图 3)即为表达的 NS₃ 蛋白。

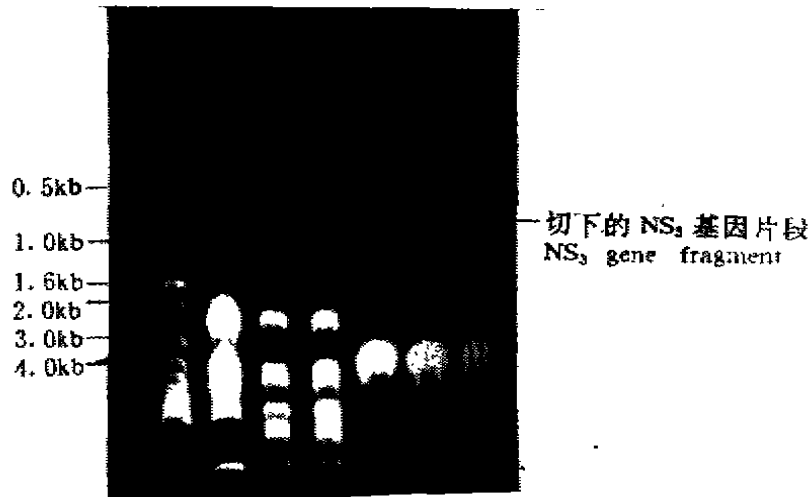


图 2 重组子 NS₃-6 和 NS₃-21 的质粒电泳和酶切鉴定

(1) DNA 标准分子量 (2) 对照载体 pBV221 (3) 重组子 NS₃-6 质粒 (4) 重组子 NS₃-21 质粒 (5) 质粒 pBV221 用 Nco I 和 Sal I 双酶切 (6) NS₃-6 质粒用 Nco I 和 Sal I 双酶切 (7) NS₃-21 质粒用 Nco I 和 Sal I 双酶切

Fig. 2 Identification of recombinant plasmids NS₃-6 and NS₃-21 by electrophoresis and enzyme cutting

(1) DNA markers (2) control plasmid pBV221 (3) Recombinant plasmid NS₃-6 (4) Recombinant plasmid NS₃-21 (5) Plasmid pBV221 cut with Nco I and Sal I (6) NS₃-6 plasmid cut with Nco I and Sal I (7) NS₃-21 plasmid cut with Nco I and Sal I

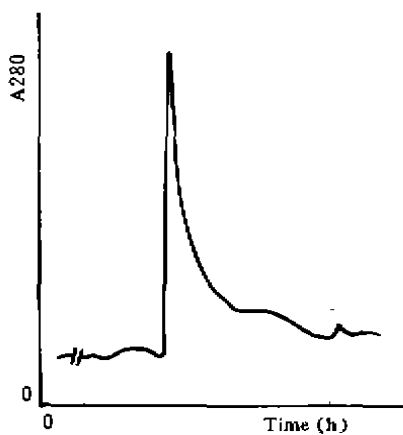


图 3 经 Sephacryl S-200 凝胶柱分离的 NS₃ 蛋白再上样 Sepharose 4B-IgG 凝胶柱, 用 0.01mol/L PBS (pH7.2)-0.1 mol/L NaCl 洗脱曲线。层析柱为 XK16/20, 流速为 0.1ml/min。

Fig. 3 Elution curves of NS₃ protein from Sepharose 4B-IgG column. Sample, NS₃ protein eluted from Sephacryl S-200, Elution buffer, 0.01mol/L PBS (pH7.2)-0.1mol/L NaCl, Column, XK16/20, Flow rate, 0.1ml/min.

5 纯化 NS₃ 蛋白纯度及抗原性

纯化 NS₃ 蛋白 SDS-PAGE 分析显示(图 4),为单一条蛋白带,分子量约 30kD。纯化蛋白电泳后免疫印迹检测亦仅在 30kD 处显示单一阳性斑(图 4)。

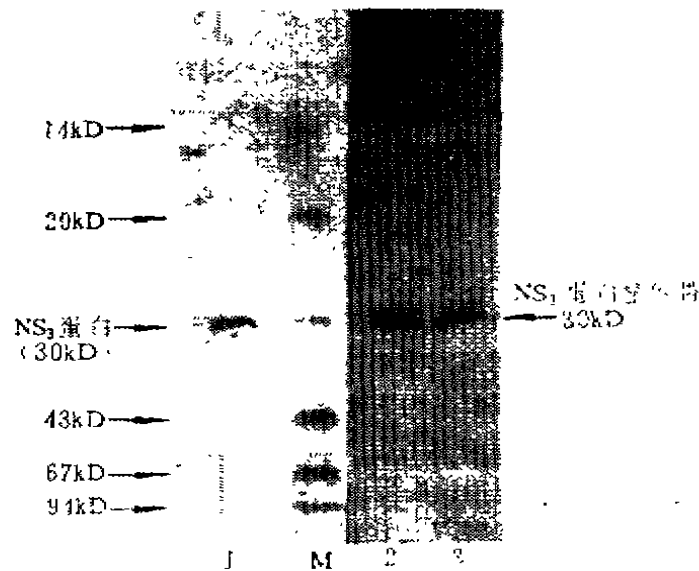


图 4 纯化 NS₃ 蛋白 SDS-PAGE 分析(1,M)和免疫印迹分析(2,3)

Fig. 4 SDS-PAGE and Western Blotting analysis of purified NS₃ protein

将纯化的 NS₃ 蛋白 1:10 梯度稀释后包被酶联反应板,ELISA 测定抗-HCV 阴、阳性血清,结果(表 2)表明,表达 NS₃ 蛋白 1:10000 稀释后仍有较好的抗原性,并且有较好的特异性。

表 2 纯化的 NS₃ 蛋白抗原性鉴定(ELISA)

Tab. 2 Identification of purified NS₃ protein antigen (ELISA)

包被 NS ₃ 蛋白稀释比例 Dilution of coated NS ₃ protein	1:10	1:100	1:1000	1:10000
抗-HCV 阳性血清 Anti-HCV positive serum	1.21	1.97	1.07	0.66
抗-HCV 阴性血清 Anti-HCV negative serum	0.13	0.08	0.04	0.04

讨 论

用逆转录 PCR 方法克隆扩增基因,最重要的一环是引物的设计和选择。根据 PCR 引物选择软件选出一对其间含 C₃₃ 抗原的引物,在改变碱基组成加入酶切位点后,必须重新进行验证,将引物对重新输入引物检验程序后发现,该对引物处在合格引物的边缘上,最令人担忧的问题是下游引物上有 5 个碱基反向重复可形成发夹结构(如果超过 5 个碱基即必须重新设计引

物),5个碱基对中有三个是GC对,更增强了结合力,如使用该对引物必需掌握好“退火”温度,“退火”温度不能太低,以尽量减少引物之间的互相结合。由于逆转录时温度为42℃,为防止引物本身已形成发夹结构或引物之间“退火”,在进行逆转录前先将模板和引物混合变性以增加引物和模板结合的概率。

国外文献报道NS₃区基因片的检出率远较核心区基因片的检出率低,在抗-HCV阳性血清中NS₃基因片的检出率仅在50%左右。因此,选择血清也是关键的因素。我们首先选用抗-HCV滴度较高的血清,然后再用逆转录PCR方法检测其5'非翻译区基因片段,将扩增5'非翻译区基因片段阳性血清用于提取扩增NS₃区基因片段模板。

将扩增克隆的NS₃区基因片段核苷酸序列与日本株(Ⅱ型)相应区域核苷酸序列相比,同源性达92.9%,变异的碱基主要位于密码子的第三个碱基上,变异方式多数是T与C的互换或A与G的互换,前者概率更高。由于密码子的第三位碱基变异是在同类碱基之间的互换,因此其编码的氨基酸很少发生变化,这就是不同株间NS₃区编码蛋白变异相对较小的原因。NS₃区基因编码蛋白变异小尤其适合作为抗原装配抗-HCV检测试剂盒,以便有较高的检出率,另外也提示该区蛋白对病毒的生长繁殖起重要的作用。

克隆的NS₃区基因片段在大肠杆菌内表达成功,表达的蛋白没有融合其它蛋白成份,这大大减小了非特异性反应的可能性。表达的蛋白以包涵体的形式存在,分离纯化更方便。

国内外的研究已表明,单独使用核心蛋白抗原或非结构区抗原检测抗-HCV,均会产生假阴性,两者合并起来应用会增加抗-HCV的检出率和灵敏度。

致谢 军事医学科学院情报研究所王槐春同志提供引物设计选择和检验程序,中国科学院上海细胞所王应魁同志帮助合成了PCR引物,在此一并致谢。特别感谢军事医学科学院基础医学研究所马贤凯教授在基因克隆方面提供了宝贵建议。

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, Hujikata M, Ootsuyama 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 Chomczynski P, Sacchi N. Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal Biochem*, 1987; 162: 156~159
- 4 Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T. *Molecular cloning*, 2nd ed. New York, USA; Cold spring harbor laboratory press, 1989
- 5 Yoshiora K, Karumu S, Warita T, *et al.* Detection of hepatitis C virus by polymerase chain reaction and response to interferon- α therapy; relationship to genotypes of hepatitis C virus. *Hepatology*, 1992; 16(2): 293~299

Cloning and Expression of NS₃ Gene Fragment of HCV and Identification of the Purified Products

Li Yuexi Tang Jiaqi Tao Kaihua *et al*

(*Nanjing Research Institute of Military Medicine, Nanjing 210002*)

The NS₃ gene fragment of HCV was cloned from the serum of hepatitis C patients in Jiangsu province by RT-PCR. DNA sequencing shows the cloned NS₃ cDNA contains 842bp. NcoI site and SalI site were added respectively to the upstream and downstream primers. The cDNA was cut with NcoI and SalI, and then cloned into the NcoI and SalI sites in plasmid pBV221. The recombinant plasmid was transformed into DH_{5α} for gaining the *E. coli* expressing NS₃ protein. Expressed NS₃ protein (30kD) was about 17% of total proteins of the *E. coli*, and the purified NS₃ protein by Sephacryl S-200 and IgG-Sepharose 4B chromatography (or DEAE Sepharose Fast Flow) has good antigenicity and specificity.

Key words HCV, NS₃ gene, RT-PCR, Gene cloning and expression, Identification of antigenicity