

HCV 核心蛋白在昆虫细胞中的表达  
及其免疫学特性的初步评价

项金忠 郭亮 张鹏飞

(卫生部北京生物制品研究所, 北京 100024)

R373.21

R512.630.3

~~R373.21~~

**A** 提 要 通过逆转录-聚合酶链反应(RT-PCR)从丙肝患者的血清中分离出编码完整 HCV 核心蛋白(C区)的 cDNA 片段,并将其克隆到杆状病毒转移质粒中。重组转移质粒 DNA 与线性的杆状病毒 DNA 共转染 Sf9 昆虫细胞,经蚀斑筛选获得了带有编码全部核心蛋白基因的重组杆状病毒。重组病毒感染细胞后表达 HCV 核心蛋白,其分子量约为 20 kD。免疫印染和酶联免疫实验表明,此重组蛋白能被人 HCV 阳性血清所识别。动物实验表明此重组蛋白能诱导小鼠产生特异性抗体。

**关键词** 丙型肝炎病毒,核心蛋白,杆状病毒,昆虫细胞

免疫学特性

自从 Choo<sup>[1]</sup>等分离出第一个 HCV cDNA 克隆以来,HCV 的分子生物学研究得到了飞速发展,世界不同地区包括中国的 HCV 基因序列相继发表<sup>[2,3]</sup>,HCV 蛋白的结构与功能逐渐得以阐明,应用免疫学方法测定血清抗体及利用 PCR 法检测病毒核酸的 HCV 特异性诊断方法已经建立。尽管如此,HCV 的基础研究还十分薄弱;有关 HCV 的感染与免疫、以及 HCV 与宿主细胞的相互作用、致病机理的研究进展不大;抗 HCV 疫苗的研制似乎仍很遥远。流行病学调查表明,我国是一个 HCV 感染较严重地区,加强 HCV 基础研究,研制特异性好、灵敏度高、价格合理的 HCV 诊断试剂,开展 HCV 临床检验及流行病学调查仍然是当前我国 HCV 研究的重要课题。

HCV 基因组编码 3010~3033 个氨基酸的多蛋白前体,经加工修饰后成为有不同功能的结构蛋白和非结构蛋白<sup>[4]</sup>。由于目前尚未建立 HCV 的组织培养系统,因此缺少这些蛋白的直接证据。目前的资料大多来自比较研究和基因表达系统。C 蛋白为病毒的核衣壳蛋白,约 190 个氨基酸组成,分子量为 20~22 kD,无糖基化位点,含碱性氨基酸。前 80 个氨基酸构成两个大的亲水峰为衣壳蛋白的主要抗原决定簇所在。

有关核心蛋白的表达及其特性的研究很多<sup>[5]</sup>,近几年来由于杆状病毒-昆虫细胞表达系统表达产物的生化理化和生物学特性与天然产物相似,具有糖基化、磷酸化、信号肽和蛋白切割等后加工修饰功能,而且表达产量高,细胞培养简单,适合大规模生产等优点,已被广泛地用于各种外源基因的表达,包括各种病毒、细菌、细胞因子和植物等<sup>[6]</sup>。在我们的研究中使用杆状病毒-昆虫细胞表达系统表达了非融合的 HCV 核心蛋白并对其免疫原性进行了评价。我们将编码 HCV 核心蛋白基因克隆到转移载体 pBacPAK9 杆状病毒多角体起动机下游,用这个重组的转移质粒 DNA 和线性杆状病毒 DNA 一起共转染 Sf9 昆虫细胞,通过体内同源重组而获得

含有 HCV 核心蛋白基因的重组杆状病毒。重组杆状病毒感染 Sf9 昆虫细胞后表达了核心蛋白,此重组蛋白能被人 HCV 阳性血清识别。用此重组蛋白免疫小鼠能诱导特异性抗体产生。

## 材料与方 法

1 细胞与病毒 Sf9 昆虫细胞 (*Spodoptera frugiperda*, ATCC) 于 27℃ 培养在含有 2% 胰蛋白胍肉汤 (Tryptose phosphate broth, GIBCO), 1% 二性霉素 (Amphotericin B, GIBCO), 10% 牛血清 (GIBCO), 50 u/mL 庆大霉素的 IPL-41 (GIBCO) 营养液中。每周 1:5 传代。转移质粒 (pBacPAK9) DNA, 核多角体野病毒 (AcMNPV C6) 和载体病毒 (BacPAK6) 购于 CLONTECH Laboratories, Inc。

2 基因克隆与重组转移质粒的构建 用异硫氰酸胍冷酚法从 HCV 阳性血清中提取病毒 RNA, 以巢式 PCR 调取 HCV 的 C 区 cDNA。巢式 PCR 引物依据中国 HCV 序列<sup>[3]</sup>设计。在内引物的 3' 端和 5' 端分别加入了 BamHI 和 PstI 限制性酶切位点以便于定向克隆, 负链的 5' 端加入了终止密码子。

外引物: P1: 5' - CTGCCTGATAGGGTGCTTGCAGAGTGCC - 3'

P2: 5' - GAGCAGTCGTTCTGTGACATGGTATATC - 3'

内引物: P1: 5' - ATTAAGGATCCATGAGCACGAATCCTAAACCT - 3'

BamHI(298 - 318)

P2: 5' - CAATTCTGCAGTTAAGCGGAAGCTGGGGTGGT - 3'

PstI(871 - 854)

逆转录使用了 M-MLVH 逆转录酶, 37℃ 下反应 60 min, 94℃ 灭活 5 min, 然后进行 PCR 循环; PCR 反应条件为: 94℃, 1 min; 50℃, 2 min; 72℃, 1 min, 40 个循环。两次 PCR 反应条件相同。PCR 产物经低熔点凝胶纯化回收后, 酶切鉴定。转移质粒和 PCR 产物分别用相应的内切酶酶切, 连接后转化到大肠杆菌 HB101 感受态细胞中。挑选含有插入片段的克隆进行酶切鉴定, 所获重组质粒经纯化后备用。实验中使用的各种工具酶均购自 Premega 公司。

3 重组病毒的构建 采用 CLONTECH 的 BacPAK 杆状病毒表达系统。在 35 mm<sup>2</sup> 组织培养板上接种 1.5 × 10<sup>6</sup> 的 Sf9 昆虫细胞, 27℃ 放置 4 h。形成细胞单层后去上清, 用无血清、无抗生素 IPL-41 培养液洗细胞单层两次。取 500 ng 含插入片段的重组转移质粒 DNA 混 5 μL Bsu361 酶解的 BacPAK6 病毒 DNA 混合, 再与 50 μL 转移试剂混合后室温放 15 min, 然后再与 1.5 mL 无血清、无抗生素细胞培养液混合加到细胞单层上, 27℃ 放置 5 h, 加 1.5 mL 完全培养液 27℃ 培养 3 d, 收集共转染培养液用于重组病毒的筛选。在 35 mm<sup>2</sup> 组织培养皿中, 加 2 × 10<sup>6</sup> 的细胞并使其形成细胞单层。将共转染培养液上清稀释至 10<sup>-1</sup>、10<sup>-2</sup>、10<sup>-3</sup>, 分别取 100 μL 小心加至单层细胞表面, 室温放置 1 h。将 42℃ 2% 的灭菌琼脂糖与预热至 42℃ 的细胞培养液 1:1 混匀后, 加 1.5 mL 凝胶到上述的培养皿中, 待凝胶后加 1.5 mL 完全培养液, 27℃ 培养 5 d。通过 0.03% 中性红染色, 观察蚀斑。挑取蚀斑重新感染细胞。收集培养上清和细胞备用。

4 重组病毒的鉴定 重组病毒和野病毒感染 72 h 的 Sf9 细胞 (1 × 10<sup>6</sup> cells) 用 PBS 洗两次, 加 100 μL K bufer (500 mmol/L KCl, 15 mmol/L MgCl<sub>2</sub>, 100 mmol/L Tris-HCl pH 8.2, 0.5% Tween 20, 100 μg/mL protein K), 56℃ × 45 min, 95℃ × 10 min, 然后以酚、氯仿去蛋白, 乙醇沉淀获取病毒 DNA。使用内引物进行 PCR 扩增, 凝胶电泳检定 PCR 产物。将 Sf9 细胞 (2.5 × 10<sup>5</sup> cells/mL) 接种 96 孔细胞培养板, 每孔 100 μL。病毒培养液稀释 10<sup>-3</sup> 至 10<sup>-6</sup>, 每孔加入 10 μL。培养一周后统计、计算重组病毒滴度。

5 重组蛋白的表达 重组病毒接种 Sf9 细胞 (M. O. I. = 1), 等量分至 5 只培养瓶中培养。每隔 24 h 收获一瓶培养细胞, SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳后进行免疫印迹实验, 以确定不同时间重组蛋白的表达量。

6 免疫印迹实验 (WB) 感染病毒 72 h 的细胞和上清液 (细胞用 PBS 洗两次), 加入样品缓冲液煮沸 3 min,

15%的 SDS-PAGE 进行电泳。然后转膜,电转条件为 125 mA, 2 h。转印后的硝酸纤维膜用 5% 的脱脂牛奶封闭 1 h, 与人 HCV 抗体阳性血清(1:10)4℃ 孵育过夜, PBS 洗膜, 加生物素标抗 IgG(1:1000, Vector Laboratories, Inc)37℃ × 1 h, 再加 HRP-亲合素(1:1000)及底物 4-氯-1-萘酚显色, 水洗中止反应。

7 酶联免疫吸附实验(EIA) 重组病毒感染 72 h 的 Sf9 细胞( $1 \times 10^7$  cells)用 PBS 洗两次后溶于 2 mL 超声波缓冲液中(50 mmol/L Tris-HCl, pH 8.0, 2 mmol/L EDTA, 0.1 mmol/L DTT, PMSF 100 μg/mL)。超声波破碎, 低速离心取上清, 加 33% 硫酸铵 4℃ × 4 h, 5000 r/min 离心 30 min, 沉淀溶于 2.5 mL 的碳酸盐包被液(0.015 mol/L NaCO<sub>3</sub> pH 9.6)。每孔 100 μL 包被 96 孔酶标板, 37℃ × 2 h 4℃ 过夜, 用含 5% 马血清的 Tween-PBS 缓冲液(0.02 mol/L pH 7.4)37℃ 封闭 1 h。HCV 阳性血清 1:10 至 1:1280 稀释后, 每孔 100 μL, 37℃ × 45 min。洗板后加入辣根过氧化物酶标羊抗人 IgG 及底物显色。在 492 nm 波长下测定 OD 值。

8 动物免疫实验 重组病毒感染 72 h 的 Sf9 细胞经反复冻融, 与福氏完全佐剂乳化后, 腹腔免疫小鼠( $1 \times 10^6$  cells/只)。10 d 后使用福氏不完全佐剂, 以同样剂量的感染细胞加强免疫。10 d 后采血, 收集血清。采用丙肝病毒抗体酶联免疫测定试剂盒(北京生物制品研究所)进行分析, 以羊抗鼠代替羊抗人酶标抗体检测小鼠免疫血清。

## 结 果

### 1 重组杆状病毒的构建

杆状病毒-昆虫细胞表达系统是先外源基因克隆到带有与杆状病毒同源序列的转移质粒中而获得重组转移质粒, 然后将重组转移质粒与杆状野病毒 DNA 共转染细胞, DNA 在体内发生同源重组而获得重组杆状病毒, 此病毒带有很强的多角体起动力, 感染后的昆虫细胞表达重组蛋白(图 1)。我们按照我国 HCV 的序列设计引物, 用 RT-PCR 方法从 HCV 阳性人血清中调出完整的核蛋白基因。RT-PCR 扩增的 C 区 cDNA 片段全长 573 nt, 位于 HCV 多蛋白前体 1-191aa 之间。将此基因经限制性内切酶鉴定后插入转移质粒, 获得重组转移质粒并命名为 pTHCVc(图 2)。重组转移质粒与杆状野病毒 DNA 共转染 Sf9 细胞, 经克隆筛选得到重组杆状病毒。为了证实重组杆状病毒中确实含有 HCV 核蛋白基因, 使用 PCR 方法从病毒感染后的细胞中扩增核蛋白基因, 结果表明重组病毒的基因组含有 HCV 核蛋白基因(图 2)。

### 2 重组蛋白的表达

通过蚀斑筛选获得了重组病毒并命名为 BVHCVc。将重组病毒感染的 Sf9 细胞经 SDS-PAGE 电泳和免疫印迹试验分析, 结果表明由重组病毒感染的 Sf9 细胞在分子量约为 20 kD 处有一特异的蛋白带能被人 HCV 阳性血清所识别, 而由野病毒感染的 Sf9 细胞则无任何反应出现。重组蛋白的分子量大小与理论推导值相符(图 3)。为了解重组病毒感染 Sf9 细胞后不同时间重组蛋白的动态表达, 取重组病毒感染后不同时间的细胞进行免疫印迹检测。结果表明, 重组病毒感染 Sf9 细胞 24 h 后重组蛋白开始表达, 72 h 间达到高峰, 此时细胞较完整, 随着感染的时间增长细胞出现裂解。

### 3 重组蛋白的抗原性和免疫原性分析

为了解由昆虫细胞产生的 HCV 核蛋白是否可用于 HCV 感染后的检测, 我们将重组病毒和野病毒感染 72 h 的 Sf9 细胞裂解, 经粗提后作为抗原包被酶标板, 使用已确认的 HCV 阳性血清和正常人血清, 通过间接 EIA 对重组蛋白的抗原性作了分析。结果表明, 重组病毒感染的细胞裂解物与 HCV 阳性和阴性血清反应的比值高于野病毒感染的细胞裂解物(表 1)。重组蛋白在 EIA 中能被人 HCV 阳性抗体所识别。

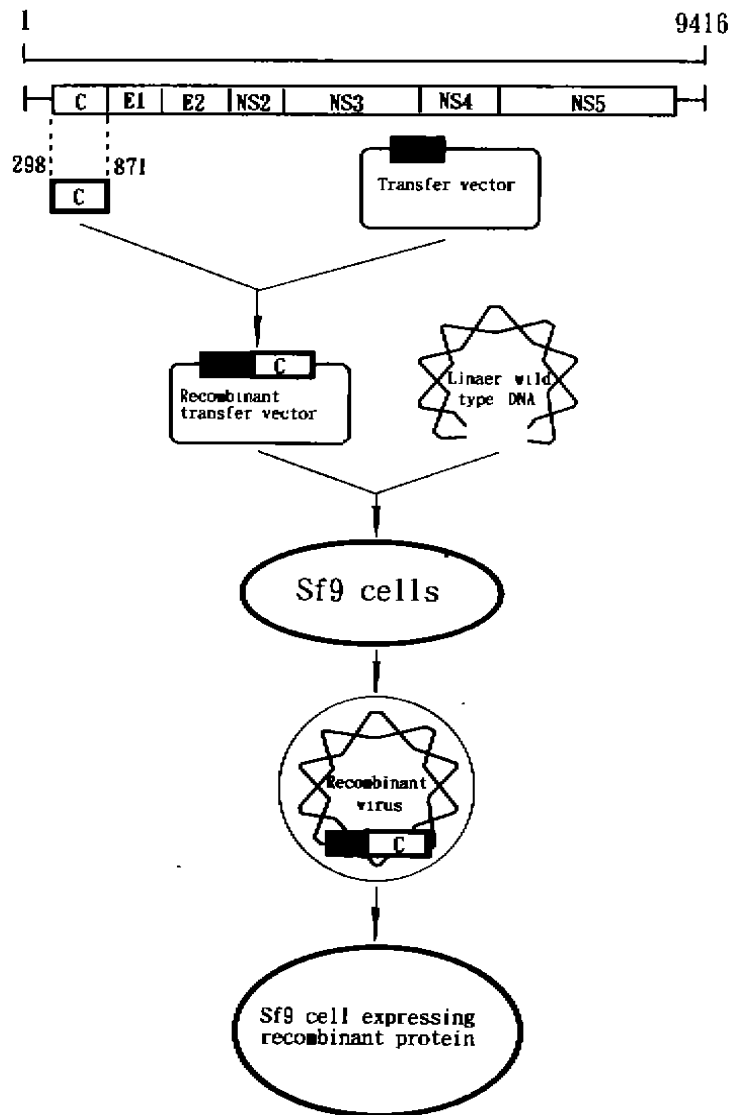


图1 重组杆状病毒 BVHCVc 的构建

Fig 1 Construction of recombinant baculovirus BVHCVc

为了分析重组核蛋白是否能作为抗原而诱导特异抗体的产生,我们将重组病毒和野病毒感染的 Sf9 细胞冻融后免疫小鼠。用已知含有核蛋白的 HCV EIA 检测试剂测定小鼠血清中特异性抗体。结果表明由重组病毒感染细胞免疫血清随着稀释度提高 OD 值下降,表现出良好的线性关系,而野病毒感染细胞免疫血清则不明显。说明此重组核蛋白诱导的特异抗体能被试剂盒中的 C11 抗原(大肠杆菌表达的 C 区部分基因产物)<sup>[7]</sup>所识别(表 2)。

表1 重组 HCV 核蛋白与人 HCV 阳性血清的 EIA 实验

Table 1 EIA reactivity of recombinant HCV core protein with human HCV positive serum

血清稀释度 Dilution of serum	AcMNPV <sup>*</sup>			BVHCVc <sup>#</sup>		
	Pos. serum	Neg. serum	P/N	Pos. serum	Neg. serum	P/N
1:40	0.21 <sup>‡</sup>	0.21	1.0	0.45	0.20	2.2
1:80	0.20	0.19	1.0	0.32	0.16	2.0
1:160	0.15	0.15	1.0	1.1	0.20	0.18
1:320	0.05	0.14	0.4	0.09	0.14	0.6

\*野病毒感染的 Sf9 细胞裂解物。AcMNPV infected Sf9 cell lysate.

#重组病毒感染的 Sf9 细胞裂解物。BVHCVc infected Sf9 cell lysate.

‡在 492nm 的光吸收值。Value of optical density at 492 nm.

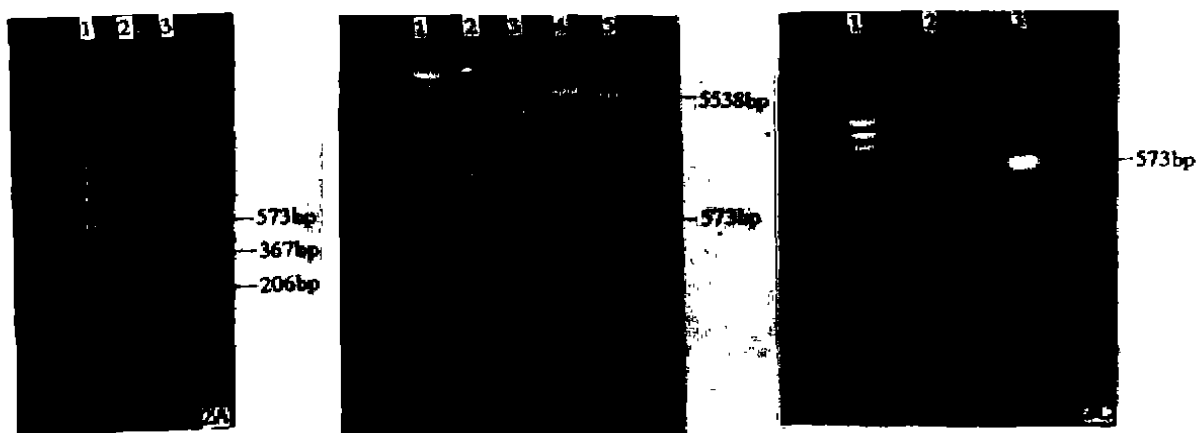


图 2 重组转移质粒的酶切分析和重组杆状病毒 HCV 核蛋白基因的 PCR 分析

Fig 2 Enzymes digestion analysis of recombinant transfer plasmid and PCR analysis of HCV core protein gene from recombinant baculovirus

Panel (A): Lane 1, marker( $\Phi$ X174DNA/Hae III); Lane 2, HCV core protein gene amplified from HCV positive human serum by PCR; Lane 3, HCV core protein gene digested with Cla I enzyme.

Panel (B): Lane 1 and 2, markers( $\lambda$ DNA/Hind III,  $\Phi$ X174DNA/Hae III); Lane 3, recombinant transfer plasmid; Lane 4, recombinant transfer plasmid digested with Bam HI enzyme; Lane 5, recombinant transfer plasmid digested with Bam HI and Pst I enzymes.

Panel (C): Lane 1, marker( $\Phi$ X174DNA/Hae III). Lane 2, Sf9 cells infected with wild type virus, Lane 3, Sf9 cells infected with BVHCVc.

表 2 重组核蛋白小鼠免疫血清的测定

Table 2 EIA reactivity of mouse sera immunized with recombinant core protein

血清稀释度 Dilution of serum	BVHCVc*	AcMNPV <sup>#</sup>	P/N
1:10	0.38 <sup>§</sup>	0.14	2.7
1:20	0.40	0.14	2.8
1:40	0.35	0.11	3.1
1:80	0.28	0.10	2.8
1:160	0.20	0.10	2.0
1:320	0.16	0.10	1.6
1:640	0.11	0.10	1.0

\* 野病毒感染的 Sf9 细胞。Sf9 cells infected with AcMNPV.

<sup>#</sup> 重组病毒感染 Sf9 细胞。Sf9 cells infected with BVHCVc.

<sup>§</sup> 在 492nm 的光吸收值。Value of optical density at 492 nm.

从表 1 和表 2 可以看出, 重组病毒在昆虫细胞 Sf9 细胞所表达的重组蛋白具有与天然蛋白相似的抗原性和免疫原性。

## 讨 论

HCV 核心蛋白对于丙型肝炎临床诊断有很高的应用价值, 特别

是对早期诊断<sup>[8]</sup>。因此国内外有关核心蛋白的表达和研究的报道很多, 但大多采用大肠杆菌或哺乳细胞作为表达系统。杆状病毒表达系统是目前得到广泛使用的表达系统之一, 它具有表达外源蛋白的效率高、安全、操作简便、能糖基化、费用低等优点。我们从中国的 HCV 阳性人血清中克隆出核心蛋白区的基因, 构建重组杆状病毒, 在昆虫细胞中表达 HCV 的核心蛋白。不同的表达系统所表达的 HCV 核心蛋白在电泳迁移率上有所不同, 范围在 20~22 kD,



图3 重组 HCV 核蛋白的电泳和免疫印迹分析

Fig3 Analysis of recombinant HCV core protein by SDS-PAGE and Western blot

Panel (A): SDS-PAGE. Lane 1, Sf9 cells infected with BVHCVc; Lane 2, Sf9 cells infected with AcMNPV; Lane 3, Marker.

Panel (B): Western blot. Lane 1, Sf9 cells infected with BVHCVc; Lane 2, Sf9 cells infected with AcMNPV; Lane 3, Marker (pre-stained protein molecular weight standards, GIBCO BRL).

我们的表达产物为 20 kD。此重组 HCV 的核心蛋白在变性(WB)和非变性(EIA)的条件下,都能被 HCV 阳性血清所识别。由于在试验中使用的是未经提纯细胞裂解物,且尚未能对其表达量作出评价,但无论是用其作为抗原还是免疫原,从试验结果看与对照组都有明显的区别,说明由此重组病毒感染昆虫细胞所产生的重组核心蛋白具有抗原活性和免疫原活性。目前大部分 HCV 诊断试剂的抗原来源是合成肽或大肠杆菌表达重组蛋白。合成肽抗原由于缺乏蛋白的天然构形而影响其敏感性,大肠杆菌表达重组蛋白需高度提纯以保证其特异性。由于重组杆状病毒是非人源性病毒,昆虫细胞又远离脊椎动物属,故与人源少有交叉反应。从免疫印迹结果看,未经提纯的感染细胞与血清反应只出现一条特异性区带,因此是一个良好的抗原来源系统。这一重组蛋白的表达量及提纯后抗原的免疫学评价正在进行中。

### 参 考 文 献

- 1 Choo QL, Weiner L K, Overby L R *et al.* Isolation of a cDNA clone derived from a bloodborn non-A, non-B viral hepatitis genome. *Science*, 1989, 244: 259
- 2 Choo QL, Richman KH, Han JH *et al.* Genetic organization of and diversity of the hepatitis C virus. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1991, 88: 3451 ~ 3455
- 3 毕胜利, 白宪鹤, 刘崇柏等. 我国丙型肝炎病毒河北株基因组的克隆及 cDNA 全序列的测定与分析. *中华实验和临床病毒学杂志*, 1992, 6: 425
- 4 Takamizawa A, Mori C, Fake S *et al.* Structure and organization of the hepatitis C virus genome isolated from human carriers. *J*

Viol, 1991, 65:1105

- 5 Harada S, Watanabe Y. Expression of processed core protein of hepatitis C virus in mammalian cells. *J Virol*, 1991, 65:3015
- 6 Luckow VA. *Recombinant DNA technology and application*. McGrawHill, 1997. 97
- 7 程达荣, 纪颖韬, 于春等. 三种重组抗原检测抗丙型肝炎病毒抗体诊断价值的比较. *中华微生物学和免疫学杂志*, 1993, 13(2):97
- 8 Chiba J, Ohba H, Matsuura Y *et al.* Serodiagnosis of hepatitis C virus infection with an HCV core protein molecularly expressed by a recombinant baculovirus. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1991, 88:4641~4645

## Expression of HCV Core Protein in Insect Cells and Evaluation of Its Immunological properties

Xiang Jinzhong    Guo Liang    Zhang Penfei

(National Vaccine and Serum Institute, Beijing 100024)

The full-length cDNA coding HCV core protein was isolated from human HCV positive serum by RT-PCR and inserted into baculovirus transfer vector. Sf9 insect cells were co-transfected with the recombinant transfer vector plasmid and wild type baculovirus DNA. The recombinant baculoviruses containing gene of HCV core protein were obtained by plaque screening. The recombinant HCV core proteins (20 kD) were expressed by Sf9 cells infected with recombinant viruses. Western blot and EIA revealed that the recombinant proteins can be recognized by human HCV positive sera, and the recombinant protein can elicited specific anti-HCV antibody in animals.

**Key words** HCV, Core protein, Baculovirus, Insect cells