

⑧

庚型肝炎病毒包膜糖蛋白 E2 基因在昆虫细胞中的表达

朱诗应 潘卫 戎中日

上海第二军医大学微生物学教研室, 上海 200433

摘要 用 PCR 扩增出 HGV E2 全基因, 克隆进杆状病毒表达载体 pF_{AS1}B_{AC}HTa 中, 构建成重组转座载体 pF_{AS1}B_{AC}-E2, 转化 DH10B_{AC} 大肠杆菌感受态细胞, 筛选阳性菌落, 抽提大分子质粒 DNA, 获得含 HGV E2 基因的重组杆状病毒穿梭载体, 转染昆虫草地夜蛾 Sf9 细胞, 出现细胞病变后, 收集含有重组病毒颗粒的培养上清, 重新感染草地夜蛾 Sf9 单层细胞及甜菜夜蛾幼虫, 分别收集 Sf9 细胞和甜菜夜蛾幼虫体内的血淋巴细胞, 进行 12% SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳, 可见表达的融合蛋白带, 经亲和层析进行蛋白纯化, 用 ELISA 方法检测谷类血清标本, 初步研究 HGV E2 糖蛋白的抗原性。

关键词 庚型肝炎病毒, 包膜糖蛋白 E2, 昆虫细胞, 基因表达

近年来发现的庚型肝炎病毒(HGV)属黄病毒科成员之一, 其包膜糖蛋白 E2 含有产生中和抗体的抗原表位, HGV 感染者出现 E2 抗体往往伴随着病毒血症的消失, 是疾病恢复的重要标志^[1]。HGV E2 抗体的检测可以动态地反映 HGV 感染者的病情发展及转归。所以获取高活性的 HGV E2 蛋白, 在研究 HGV 抗原表位、致病机理以及研制完善的诊断试剂等方面具有重要意义。我们选用最新建立 BAC-TO-BAC 杆状病毒表达系统^[2], 首次在昆虫细胞中表达了 HGV E2 糖蛋白。

1 材料与方

1.1 BAC-TO-BAC 杆状病毒表达系统

表达载体 pF_{AS1}B_{AC}HTa 和大肠杆菌 DH10B_{AC} 草地夜蛾 Sf9 细胞及甜菜夜蛾幼虫虫卵均由武汉大学病毒学研究所齐义鹏教授提供。Sf9 细胞用含有 10% 胎牛血清的 Grace's 培养基(GIBCO/BRL 公司产品)在 28℃ 培养并传代保存。

1.2 HGV E2 全基因

经过计算机分析并设计扩增 HGV E2 全基因的 PCR 引物, 上游引物序列为 5'GTCAGAATTCCGTC-CCGCCCTCCTGTTG 3', 5'端加 EcoRI 酶切位点; 下游引物序列为 5'ACGCAAGGCTTCTCA-GAACTGCCAGCTGGCTTAA 3', 5'端加 HindIII 酶切位点。以含有 HGV E2 全长 DNA 的 BAC 质粒为模板, 按常规 PCR 程序扩增获得 1.2 kb 的 HGV E2 全基因。

1.3 重组转座载体的构建

用 EcoRI 和 HindIII 分别双酶切 HGV E2 全基因和转座载体 pF_{AS1}B_{AC}HTa 质粒, 用琼脂糖凝胶电泳回收、纯化, 连接后转化受体菌 DH5 α , 选育同时抗 Amp^r 和抗 tetr 的重组子, 进行酶切鉴定, 得到含 HGV E2 全长

收稿日期: 1998-05-04, 修回日期: 1998-09-13

本课题受国家自然科学基金(资助号 39770343)和军队杰出人才基金资助

因的重组转座载体,命名为 pF_{AST}B_{AC}-E2。

1.4 重组杆状病毒穿梭载体的获得

将 pF_{AST}B_{AC}-E2 转化 DH10B_{AC} 大肠杆菌感受态细胞(其中含有一个杆状病毒穿梭载体,简称 Bacmid,还有一个助手质粒),37℃ 4h 复苏后,稀释 10⁻¹、10⁻²、10⁻³ 倍,分别涂布含“三抗”(50 μg/mL 卡那霉素、7 μg/mL 庆大霉素、10 μg/mL 四环素、100 μg/mL X-gal、20 μg/mL IPTG)的 LB 平板,37℃ 培养 24~48 h 后挑选白色菌落,接种 LB 培养基,37℃ 摇床过夜后提取高分子量质粒,获得插入 HGV E2 基因的重组杆状病毒穿梭载体,称为 Bacmid-E2。

1.5 Bacmid-E2 转染 Sf9 细胞及 E2 蛋白的表达

每 10 mL 细胞瓶接种 1.5 × 10⁶ 个 Sf9 细胞,使用 Grace's 培养基在 28℃ 培养,待细胞贴壁后,用 Lipofectin 法将 Bacmid-E2 转染 Sf9 细胞,倒置显微镜下观察到 Sf9 细胞病变后,收集含有重组杆状病毒颗粒的培养上清,作为毒种重新感染 Sf9 单层细胞,2~3 d 后收集细胞,经煮沸裂解后进行 12% SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳。

1.6 重组杆状病毒感染甜菜夜蛾幼虫及 E2 蛋白的表达

将甜菜夜蛾幼虫虫卵在 25℃ 孵化成幼虫,分装于青霉素瓶内以人工饲料喂养 4~6 d 后,每头幼虫注射上述毒种 1~2 μL,4~5 d 后感染的幼虫全身肿胀,消毒后剪幼虫倒数第二对腹足收集血淋巴液,离心后将细胞和上清液进行 12% SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳。

1.7 E2 糖蛋白的纯化及抗原性测定

将重组杆状病毒感染的 Sf9 细胞和甜菜夜蛾幼虫血淋巴细胞进行超声波破碎后,用 Ni-NTA 树脂对表达的带有 6 个组氨酸的 E2 融合蛋白进行亲和层析,具体步骤按试剂盒(GIBCO/BRL 公司产品, Cat: No. 10608-016)说明书操作。对纯化的蛋白进行 1:100 稀释后包被条排孔,4℃ 过夜后用间接 ELISA 法检测各类血清标本。

2 结果

2.1 重组转座载体的构建及鉴定

具体构建过程如图 1 所示。用 EcoRI 和 HindIII 双酶切重组转座载体 pF_{AST}B_{AC}-E2,所释放的片段大小与 HGV E2 基因相符(图 2)。

2.2 重组杆状病毒穿梭载体的鉴定

pF_{AST}B_{AC}-E2 转化 DH10B_{AC} 大肠杆菌感受态细胞,筛选平板上的白色菌落接种 LB 培养基,摇床过夜后提取质粒,紫外透射仪下见高分子量的 DNA 条带,将其稀释 10³ 倍后作为 PCR 模板,用上述引物进行 PCR,能扩增出特异的 HGV E2 片段(图 3),证实 Bacmid-E2 为插入 HGV E2 基因的重组杆状病毒穿梭载体。

2.3 Bacmid-E2 转染 Sf9 细胞

Bacmid-E2 转染 Sf9 细胞 4 d 后,倒置显微镜下可见转染 Sf9 细胞核膨大,细胞折光性减低,胞内颗粒增大直至破碎,与正常 Sf9 细胞差别明显(图 4),此时收集的培养上清,即含有大量的重组杆状病毒。

2.4 HGV E2 糖蛋白在 Sf9 细胞及甜菜夜蛾幼虫体内的表达

所收集的重组杆状病毒感染的 Sf9 单层细胞以及甜菜夜蛾幼虫血淋巴细胞,裂解后进行 12% SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳,经考马斯亮兰 R-250 染色,均可见分子量约为 54 000 D 的融合蛋白带,表达蛋白的大小与 HGV E2 糖蛋白理论值相符,而对照 Sf9 细胞及甜菜夜蛾幼虫血淋巴液上清电泳未见此蛋白带(图 5)。

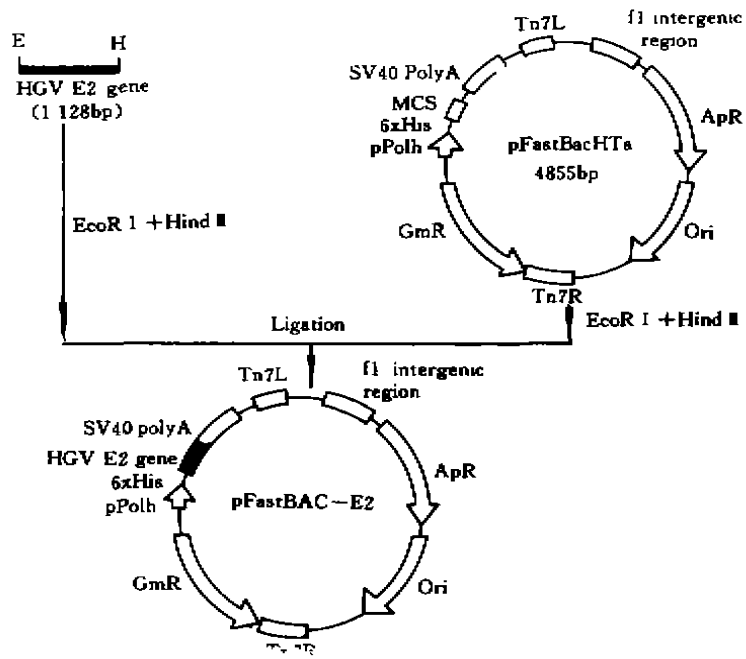


图 1 重组转座载体的构建

Fig. 1 Construction of recombinant transposing vector. pFASTBAC-E2

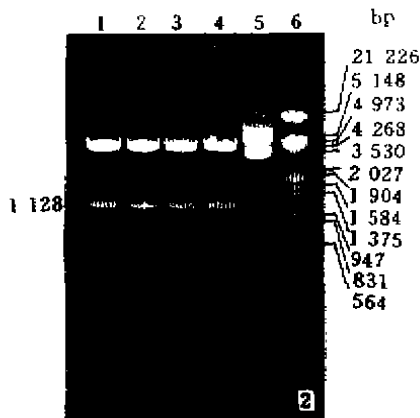


图 2 重组转座载体的酶切鉴定

Fig. 2 Restriction endonuclease digestion of recombinant transposing vector

1~4: pFASTBAC-E2/EcoRI + HindIII; 5: pFASTBACHTa; 6: lambdaDNA/EcoRI + HindIII marker.

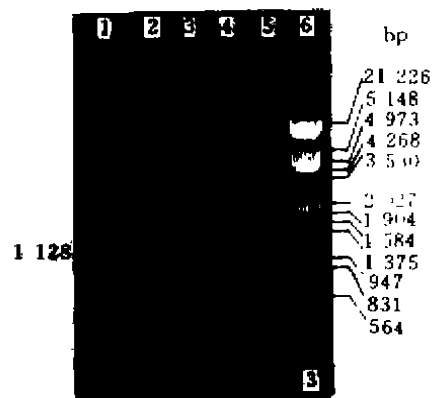


图 3 Bacmid-E2 PCR 产物琼脂糖凝胶电泳

Fig. 3 Electrophoresis of PCR product of Bacmid-E2

1: PCR products of Bacmid-E2; 2: Positive control; 3~5: Negative control; 6: lambdaDNA/EcoRI + HindIII marker

2.5 HGV E2 糖蛋白抗原的 ELISA 检测

5 份经 RT-PCR 检测为 HGV RNA 阳性的血清标本, 抗 HGV E2 抗体均呈阴性反应; 16

份肝炎患者(丙肝或乙肝)血清中,抗 HGV E2 抗体阳性者 3 份;在 22 例血透病人血清中抗 HGV E2 抗体阳性者 6 例;48 例正常对照血清中测出抗 HGV E2 抗体阳性 1 份。

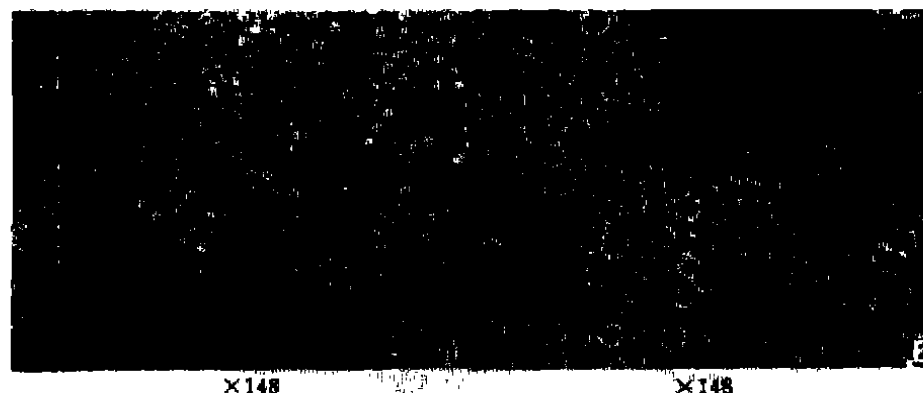


图 4 Sf9 细胞的显微镜观察

Fig 4 Observation of Sf9 cells under light microscope
1: Normal Sf9 cells; 2: Bacmid-E2 transfected Sf9 cells



图 5 表达蛋白的 SDS-PAGE 电泳结果
Fig 5 SDS-PAGE analysis of expressed protein
1: normal Sf9 cells; 2: Sf9 cells infected with recombinant virus; 3: Low molecular weight protein marker (97 400, 66 200, 43 000, 31 000, 20 000); 4-5: hemolymph cells from larvae of *Stodoptera exigua* infected with recombinant virus; 6-7: hemolymph fluid from larvae of *Spodoptera exigua* infected with recombinant virus
* the arrow shows HGV E2 protein band, molecular weight is approximately 54 000

3 讨论

HGV 为单股正链 RNA 病毒,基因组全长 9.4 kb 左右,仅有一个开放阅读框架(ORF),编码一个约 2 900 个氨基酸的多聚蛋白前体^[4],其中结构区在宿主细胞蛋白酶的切割下,可加工成多个结构蛋白(如 E1 和 E2 蛋白)^[5-6]。文献报道原核系统表达的 HGV 重组蛋白对 HGV 阳性者的抗体反应性只达 25% 左右^[7],这可能是由于原核表达的蛋白多为线性抗原,缺乏依赖于多肽折叠或翻译后加工才能形成的抗原表位。真核表达系统也存在细胞培养烦琐、表达量不高等缺陷。因此我们首次选用最新的 BAC-TO-BAC 杆状病毒表达系统,利用细菌转座子原理将转座载体上的表达盒定点转座到能够在大肠杆菌中增殖的杆状病毒穿梭载体上,通过细菌蓝白斑筛选后,直接少量提取阳性菌落质粒 DNA,转染 Sf9 细胞所得到的子代病毒即为重组病毒,随后可用于感染新鲜昆虫 Sf9 细胞进行蛋白质的表达、纯化及分析。该表达系统操作简单、快速,表达量高,还能对蛋白进行表达后的修饰和加工,保持表达蛋白的生物活性。而且我们选用新的表达载体上带有 6 个组氨酸配体,易于用亲

和层析进行蛋白纯化。用纯化的 E2 蛋白进行 ELISA 检测结果表明,在丙肝和乙肝患者中存在部分 HGV 共感染者,血透病人构成了 HGV 感染的高危人群之一,更有意义的是抗 E2 抗体的产生和 HGV 病毒血症的出现呈现此消彼长的特点,表明抗 E2 抗体对体内病毒的清除具有十分重要的作用,因此深入研究 HGV E2 蛋白对确定 HGV 的中和抗原表位、致病机理、疫苗及诊断试剂的开发都具有重要意义。

致谢 研究过程中得到武汉大学病毒研究所齐义鹏教授及朱应博士的热情指导,深表谢忱!

参 考 文 献

- 1 Pilot-Matias T J, Carrick R J, Coleman P F *et al.* Expression of the GB virus C E2 glycoprotein using the Semliki Forest virus vector system and its utility as a serologic marker. *Virology*, 1996, 225:282~292
- 2 Luckow V A, Lee S C, Barry G F *et al.* Efficient generation of infectious recombinant baculoviruses by site-specific transposon-mediated insertion of foreign genes into a baculovirus genome propagated in *Escherichia coli*. *J Virol*, 1993, 67:4566~4579
- 3 Shao L, Shinzawa H, Ishikawa K *et al.* Sequence of hepatitis G virus genome isolated from a Japanese patient with non-A-E hepatitis: amplification and cloning by long reverse transcription-PCR. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 1996, 228, 785~791
- 4 Pilot-Matias T J, Muernhoff A S, Simons J N *et al.* Identification of antigenic regions in the GB hepatitis viruses GBV-A, GBV-B and GBV-C. *J Med Virol*, 1996, 48:329~338
- 5 Leary T Y, Muernhoff A S, Simons J N *et al.* Sequence and genomic organization of GBV-C, a novel member of the flaviviridae associated with human non-A-E-hepatitis. *J Med Virol*, 1996, 48:60~67
- 6 Ehle B T, Surowy T K, Gutierrez R A *et al.* ELISA for the detection of antibodies to the E2 protein of GBV-C. *J Infect Dis*, 1997, 175:458~461
- 7 Dawson G J, Schlauder G G, Pilot-Matias T J *et al.* Prevalence studies of GB virus-C infection using reverse transcriptase polymerase chain reaction. *J Med Virol*, 1996, 50:97~103

Expression of E2 Glycoprotein Gene of Hepatitis G Virus in Insect Cells

Zhu Shiyang Pan Wei Qi Zhongtian

(Department of Microbiology, Second Military Medical University, Shanghai 200433)

Abstract Hepatitis G virus E2 glycoprotein gene was amplified by polymerase chain reaction, and was inserted into baculovirus expression vector pF_{AST}B_{AC}HTa, constructing a recombinant transposing vector pF_{AST}B_{AC}-E2. The plasmid pF_{AST}B_{AC}-E2 was transformed into DH10B_{AC} competent *E. coli* cells. High molecular weight DNA was prepared from the overnight cultures from the selected *E. coli* colonies, which was recombinant baculovirus shuttle vector containing HGV E2 gene, named Bacmid-E2. The Bacmid-E2 was transfected into *Spodoptera fragiperda* (Sf9) cells to get the recombinant virus. Fresh insect Sf9 cells and larvae of *Spodoptera exigua* were infected with the recombinant virus to express the target protein. The E2 glycoprotein recovering from the Sf9 cells and hemolymph cells of larvae of *Spodoptera exigua* exhibited a molecular mass of approximately 54 000 D. Purified HGV E2 glycoprotein using affinity chromatography was used to develop an ELISA for detection of HGV E2 antibodies in human sera.

Key words Hepatitis G virus, Envelope glycoprotein E2, Insect cells, Gene expression