

18 204-207

第15卷第2期
2000年6月中国病毒学
VIROLOGICA SINICAVol. 15 No. 2
Jun. 2000

丙型肝炎病毒 Core 与 NS3 基因的不同融合方式及其表达

李晔东¹, 梁布锋^{1*}, 祁自柏² ✓

R512.630.3

R373.21

¹(中国科学院武汉病毒研究所, 武汉 430071)²(中国药品生物制品检定所, 北京 100050)

关键词: 丙型肝炎病毒; Core 基因; NS3 基因; 基因融合; 表达

中图分类号: R512.63 文献标识码: A 文章编号: 1003-5125(2000)02-0204-04

丙型肝炎病毒(简称 HCV)是危害人类健康的传染性疾病, 预防该病的传播主要借助于 HCV 血清学诊断来筛选献血员和检测临床标本。从国内外已分离到的 HCV 株得知, HCV 核心蛋白(Core)和非结构蛋白 NS3 含有较强的优势抗原表位, 其相应的抗体出现早, 阳性率高, 已成为目前第二、第三代 HCV 免疫诊断试剂的重要成份^[1,2]。通常 Core 蛋白和 NS3 蛋白分别用基因工程方法表达, 然后作为固定化抗原, 检测人体内 HCV 的抗体。我们对 Core 和 NS3 的两种不同组合方式及其表达的研究, 对于发展新的 HCV 诊断试剂很有帮助, 现将结果报道如下。

1 材料和方法

1.1 质粒与菌种

含 HCV 的 Core 基因表达质粒 pHCV_C, cDNA 长为 392 bp, 含 NS3 基因表达质粒 pHCV_N, cDNA 长为 690 bp, 均为武汉病毒研究所构建^[3]。大肠杆菌 DH5 α 、*E. coli* 06、表达载体 pGEX 由武汉病毒研究所保存。

1.2 融合基因表达载体的构建

人工接头合成的核苷酸为: GGATCAGGATCAGGATCA, 用 BamHI 和 EcoRI 双酶分别切下 pHCV_C 的 Core 基因和 pHCV_N 的 NS3 基因, 回收后, 两基因通过接头序列进行连接反应, 插入载体 pGEX 中, 反应过程按文献进行^[4]。

1.3 重组质粒的筛选和酶切鉴定

1.3.1 用 PCR 方法筛选质粒, 合成 pHCV_C 的 Core 基因 cDNA 上游引物 P₁ 和下游引物 P₂, 合成 pHCV_N 的 NS3 基因 cDNA 上游引物 P₃ 和下游引物 P₄。用引物 P₁ 和 P₄ 扩增, 得到重组质粒 pHCV_{CN}; 用引物 P₃ 和 P₂ 扩增, 得到重组质粒 pHCV_{NC}。

1.3.2 两株表达菌株经小量提取质粒后, 用 BamHI、EcoRI 和 SacI 酶切分析。

1.4 表达产物的 SDS-PAGE 纯化及抗原活性分析

表达质粒在 *E. coli* 06 中按常规方法诱导表达, 菌体蛋白裂解后, 作 SDS-PAGE 制备电泳, 将制备胶中重

收稿日期: 1999-03-05, 修回日期: 1999-08-17

作者简介: 李晔东(1969年-), 男, 湖北省人, 助研, 从事病毒分子生物学研究。

* 通讯作者: 梁布锋(1947年-), 男, 广东省人, 研究员, 研究方向为病毒的生理生化

组蛋白条带切下,置小离心管中用 PBS 浸泡过夜,第二天 12 000 r/min 离心 15 min,所得上清即为含表达产物的粗提液。以此粗提液包被于 96 孔板上,取自备质控阳性血清和阴性血清进行间接 ELISA 检测。

2 结果与讨论

2.1 重组质粒的酶切鉴定

重组质粒 pHCV_{CN}和 pHCV_{NC}构建后的结构如图 1 所示。在 NS3 抗原基因 3'端 200 bp 处有一个 SacI 位点,将 pHCV_{CN}用 BamHI、EcoRI 和 SacI 酶切时,预计得到 4 950、900 和 200 bp 三片段。而 pHCV_{NC}用 BamHI、EcoRI 和 SacI 酶切时,预计得到 4 950、490 和 610 bp 三片段。pHCV_{CN}和 pHCV_{NC}用 BamHI 和 EcoRI 双酶切,预计得到 4 950 和 1 100 bp 两片段。实际电泳结果与预测完全一致(图 2),说明两个重组质粒构建正确。

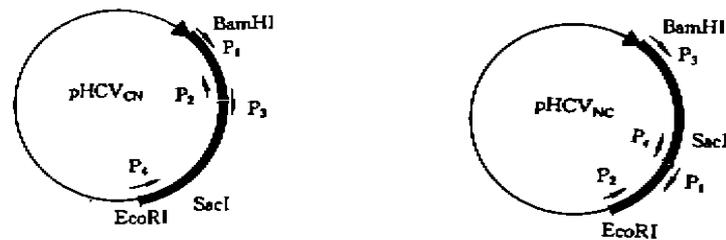


图 1 质粒 pHCV_{CN}和 pHCV_{NC}的结构

Fig. 1 The structure of plasmid pHCV_{CN} and pHCV_{NC}

2.2 重组蛋白的诱导表达

两株表达菌株在 LB 培养液中,培养至 OD₆₀₀ 为 0.6。每管加 IPTG 至终浓度为 1 mmol/L,再培养 5 h 后,收集菌体蛋白,作 SDS-PAGE 电泳分析。以 Core 基因 + NS3 基因方式获得的融合蛋白大小为 68 kD,与预测结果一致,且蛋白稳定,抗原活性较高。而以 NS3 基因 + Core 基因方式获得的融合蛋白大小为 66 kD,比预测的结果小(图 3),且蛋白不稳定,易降解,

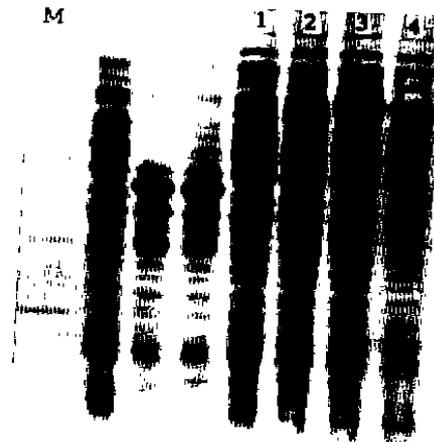


图2 pHCV_{CN}和 pHCV_{NC}的酶切鉴定

Fig. 2 Digested products of pHCV_{CN} and pHCV_{NC} by restriction enzyme

- 1, 2. pHCV_{NC}, B + E + S 3. pHCV_{CN}, B + E + S
4. pHCV_{NC}, B + E 5. pHCV_{CN}, B + E
6. λ DNA/HindIII
B: BamHI; E: EcoRI; S: SacI

图3 表达产物 SDS-PAGE 分析

Fig. 3 SDS-PAGE analysis of pHCV_{CN} and pHCV_{NC} expression products

- M: Marker of protein molecular weight (kD)
1, 2. Expression products of pHCV_{NC}
3, 4. Expression products of pHCV_{CN}

无法检测抗原活性。这两种基因的不同组合对其编码的融合蛋白空间结构有影响,因而影响了表达产物的理化性质和抗原活性。

2.3 抗原活性分析

将 pHCV_{CN}表达物以 1:50 稀释后包被 96 孔板,用 ELISA 方法检测自备质控血清中的 10 份阳性血清、10 份阴性血清。同时用上海实业科华公司的抗-HCV 抗体 ELISA 检测试剂盒作参照,检测结果见表 1(质粒 pHCV_{NC}表达抗原降解,未检测活性)。pHCV_{CN}表达抗原的粗提取物,已能明显地检测出阳性血清和阴性血清。用科华抗 HCV 第三代试剂平行检测,检出情况一致。但效果比科华产品差,同一阳性血清,科华测出数值较高;而同一阴性血清,科华测出的数值较低。考虑到科华试剂盒中包被抗原含有 Core、NS3、NS4、NS5 等区域,而本表达抗原仅有 Core 和 NS3 融合蛋白,且未经高度纯化。在检测后能有这样的结果,显示融合抗原具有良好的应用前景。作为一种单一的抗原,其表达产物的纯化和后续的包被,较多抗原组分的分散表达,包被和纯化要方便和简单得多。以 Core + NS3 为基础,继续融合其它抗原基因片段有可能进一步提高抗-HCV 的诊断水平。

表 1 HCV 阳性血清和阴性血清 ELISA 检测结果

Table 1 ELISA detection of HCV positive serum and negative serum

阳性血清号 Number of positive serum	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
科华产品 Product of KeHua	2.270	2.574	2.784	2.233	2.203	2.570	2.573	1.856	2.144	1.131
pHCV _{CN}	1.252	1.975	2.037	1.434	1.417	1.859	1.785	1.112	0.686	0.545
阴性血清号 Number of negative serum	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
科华产品 Product of KeHua	0.053	0.068	0.054	0.095	0.086	0.044	0.088	0.013	0.041	0.191
pHCV _{CN}	0.501	0.487	0.410	0.448	0.508	0.557	0.502	0.519	0.471	0.391

参 考 文 献

- [1] 毕胜利,白宛鹤,丛勉尔,等.中国人丙型肝炎病毒基因组的一级结构及其变异[J].病毒学报,1993,9(2):114~127
[2] Trowbridge R, Gowans E J. Molecular cloning of an Australian isolate of hepatitis C virus [J]. Arch Virol, 1998, 143:501~511
[3] 李晔东,梁布峰,祁自柏.丙型肝炎病毒北京株 NS3 基因的克隆及测序[J].生命科学研究,1999,3(1):53~57
[4] 萨姆布鲁克,弗里奇,曼尼阿蒂斯著.金冬雁等译.分子克隆实验指南[M].第二版.北京:科学出版社,1992.

Fusion Expression of Hepatitis C Virus Core Region and NS3 Region in *E. coli*

LI Wei-dong, LIANG Bu-feng, QI Zi-bai

¹(*Wuhan Institute of Virology, Academia Sinica, Wuhan 430071, China*)

²(*National Institute of the Control of Pharmaceutical and Biological Products, Beijing 100050, China*)

Abstract: The gene encoding the core and NS3 proteins of hepatitis C virus was amplified by PCR, respectively. Two genes were fused and formed the recombinant plasmid pHCV_{CN}(Core + NS3) and pHCV_{NC}(NS3 + Core). The fused plasmid were expressed in *E. coli* 06. The pHCV_{CN} plasmid expressed fusion protein was shown by a major band with a expected molecular weight about 68 kD on SDS-PAGE. However, the pHCV_{NC} plasmid expressed fusion protein was 66 kD in molecular weight. The results indicate that the pHCV_{NC} fusion protein differs from the pHCV_{CN} fusion protein in molecular weight. It suggests that the fusion way is important for the structure of recombinant proteins.

Key words: HCV; NS3 gene; Core gene; Fusion protein; Expression

新书《分子病毒学》已出版

由中国科学院院士裘法祖教授题写书名, 向近敏教授, 国际病毒分类委员会(ICTV)秘书长, 英国分子病毒学家 C. R. Pringle 教授分别作序, 徐耀先副教授等编者的《分子病毒学》一书已于 2000 年 1 月由湖北科技出版社正式出版。全书分为总论和各论两部分: 总论部分共有 10 章, 主要介绍了病毒分类, 病毒粒子的分子结构, 病毒的基因组结构特征, 基因组复制, 基因表达及其调控机制, 病毒感染对宿主细胞基因表达的影响和作用, 以及哺乳动物和人类干扰素系统抗病毒的分子基础; 各论部分共有 5 章, 主要介绍了噬菌体、植物病毒、动物病毒、肿瘤病毒和亚病毒的分子生物学。全书共有 83 万字, 重点反映了 90 年代以来分子病毒学的研究新进展和新成就。该书立意新颖, 内容丰富, 可读性强, 是病毒学, 分子生物学, 临床医学和农林专业工作者的必备参考书。精装本定价 96 元, 欲购者请与武汉市武昌东湖路 185 号湖北医科大学基础医学院徐耀先同志联系, 邮编 430071, 电话: 027 - 87335783, 87331145, 87869265。