

3-8-311

17

R512.63
R512.63

HCV 全长 NS3 基因表达及在抗体检测中的应用

张斌, 叶林柏*, 郜金荣, 徐进平, 阮华, 王晓玲, 赵月娥

(武汉大学病毒学研究所, 武汉 430072)

关键词: 丙型肝炎病毒; NS3; 表达; 抗体检测**中图分类号:** R512.63 **文献标识码:** A **文章编号:** 1003-5125(2000)03-0308-04

丙型肝炎病毒(HCV)是引起非甲非乙型肝炎的主要病原因子。被 HCV 感染的病例中, 超过 50% 以上会引起持续性感染、慢性肝炎, 最终可能引起肝硬化和肝细胞癌^[1]。HCV 严重威胁人类健康, 但目前对丙肝患者尚缺乏有效的治疗手段, 因此, 严格把好血源关, 提高对丙肝患者检出的灵敏度, 是阻止丙肝血源传播的有效手段。

丙型肝炎病毒基因组为单股正链 RNA, 核苷酸长约 9.5 kb, 仅含一个开放阅读框, 翻译成一个大的聚蛋白前体, 由宿主细胞信号肽酶和病毒蛋白酶加工成多个成熟蛋白。其中非结构蛋白 NS3 分子量为 70 kD, 有丝氨酸蛋白酶和 RNA 解旋酶活性^[2,3], 参与聚蛋白前体加工和 RNA 复制过程。NS3 蛋白较早被用于 HCV 的血清学检测, 但目前广泛采用的 NS3 工程蛋白都是 C 端半长, 分子量为 33 kD 左右。本研究在大肠杆菌中表达全长 NS3 蛋白, 通过抗体检测比较证明, 运用全长的 NS3 蛋白比半长的 NS3 蛋白更为优越。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 质粒和菌株 携带全长非结构蛋白基因的质粒 pBAC25 由意大利 De Francesco 教授惠赠, pQE30 质粒为本室保存, 它在多克隆位点上游含 lac 启动子和 6 个缬氨酸密码, pGEM-T 载体为 Promega 公司产品。大肠杆菌 DH5 α 、JM109 菌株由本室保存。

1.1.2 酶及生化试剂 各种酶和化学试剂主要购自 Promega、GIBCO BRL、Life Technologies、华美、原平等公司。Ni 金属离子螯合层析柱为 Invitrogen 公司产品, 用于分离纯化蛋白。

1.1.3 HCV 抗体诊断国家参考品 购自卫生部北京药检所, 批号 97001, -20℃ 保存。

1.1.4 病人血清样品 从湖北省人民医院、湖北医科大学第二附属医院、武汉市第三人民医院、武汉市第一人民医院收集, -20℃ 保存。

1.1.5 半长 NS3 蛋白 购自北京精华公司, 日本东瀛公司产品, -20℃ 保存。

1.2 方法

1.2.1 NS3 基因扩增和克隆 用 pBAC25 质粒 DNA 为模板, 按常规 PCR 方法扩增。上游引物设计有 EcoRI

收稿日期: 1999-05-20, 修回日期: 2000-03-01

* 通讯作者: 叶林柏 (1948 年-), 男, 教授, 广东东莞人, 主要研究方向为医学病毒学。

作者简介: 张斌 (1975 年-), 男, 硕士, 研究方向为丙型肝炎病毒。

和 *Bam*H I 位点,下游引物设计有 *Hind* III 和 *Kpn*I 位点,即上游引物:5' GAATTCGGATCCATGCCCGTCTCCGCCCGAAGG3';下游引物:5' GGTACCAAGCTTCTACCGTATGAGACACTTCCA3'。解链温度 94 ℃,退火温度 55 ℃,延伸温度 72 ℃,重复 40 个循环。PCR 产物经 0.8% 低熔点琼脂糖凝胶电泳分离后,回收 1.8 kb 的 DNA 片段,与 pGEM-T 载体连接,转化大肠杆菌 DH5 α ,通过蓝白斑筛选含重组质粒 pGEM-T-NS3 的菌株,提取质粒 DNA,经酶切鉴定获得重组质粒 pGEM-T-NS3。

将重组质粒 pGEM-T-NS3 的 DNA 用 *Bam*H I、*Hind* III 双酶不完全消化,回收全长 1.8 kb 片段,与 *Bam*H I、*Hind* III 双酶切的 pQE30 表达质粒连接,转化大肠杆菌 JM109,获得具有表达 NS3 蛋白能力的工程菌株 JM109NS3。

1.2.2 NS3 蛋白的表达和纯化 接种 JM109NS3 到 20 mL 2YT 培养液 37 ℃ 培养过夜,按 1:20 接种,37 ℃ 摇床培养约 1 h,加 1 mmol/L IPTG 诱导,继续振荡培养 5 h。收获菌体,悬浮于 20 mmol/L Tris, 0.5 mol/L NaCl 溶液中,冻融后超声波破碎,离心收集沉淀,溶于 8 mol/L 脲中,按照 Invitrogen 公司产品说明进行 Ni-agarose 柱层析提纯 NS3 蛋白。表达和 NS3 蛋白纯化用 SDS-PAGE 分析检查,用 Western blot 验证。

1.2.3 Western-blot 分析 对 JM109NS3 诱导表达的蛋白进行 Western-blot 分析,按常规方法进行,一抗为 HCV 抗体阳性血清病人血清,二抗用辣根过氧化物酶标记的鼠抗人 IgG 单抗,以 3,3'-二氨基苯胺显色。

1.2.4 HCV 抗体检测 柱层析纯化的产物用碳酸缓冲液 1:50 稀释,半长 NS3 蛋白用碳酸缓冲液 1:1000 稀释,包被酶标板。用间接酶标法检测 HCV 抗体诊断国家参考品和临床病人血清,OPD 显色,酶标仪测定 A_{492} 值,cutoff 值计算:阴性对照均值 $> 2 + 0.1$, A_{492} 值高于 cutoff 值为阳性。

2 结果与讨论

2.1 全长 NS3 基因的扩增和克隆

PCR 产物经琼脂糖凝胶电泳后,在紫外灯下可见特异的目的产物,大小在 1.8 kb 左右。与预计大小完全相符,由于发现 PCR 获得的 NS3 DNA 内部存在 *Bam*H I 切点,所以先将 PCR 产物克隆到 pGEM-T 载体中,从 pGEM-T-NS3 DNA 中用 *Hind* III 切割后,用 *Bam*H I 部分消化获得完整的 NS3 片段,再与 pQE30 表达载体连接转化 JM109 菌株,从转化的 JM109 NS3 中提取质粒 DNA,用 *Bam*H I 和 *Hind* III 双酶切鉴定,获得 3.4 kb 的 pQE 载体 DNA 带和 1.3、0.5 kb 的 NS3 DNA 带,与预期结果相符,证实 NS3 DNA 已被正确克隆到表达载体 pQE30 中。

2.2 NS3 基因的诱导表达和 NS3 蛋白的纯化

分别用不同的菌体密度、不同的生长时间和时间测定融合蛋白的表达水平,结果表明活化状态好的菌株经 1:20 稀释,37 ℃ 培养 1 h 可达到对数生长期,IPTG 诱导 5 h 表达量最高。12% 聚丙烯酰胺凝胶电泳检查,考马斯亮蓝染色在诱导表达的细胞样品中可见分子量约 70 kD 的全长 NS3 蛋白带,约占细胞的 30%。Western-blot 分析表明,该蛋白带可与抗血清发生特异性反应,表明 NS3 蛋白已获得正确的高效表达。经柱层析纯化后,获得提纯的 NS3 蛋白。电泳检查结果见一条分子量 70 kD 的带。NS3 蛋白的表达,Western-blot 鉴定和 NS3 蛋白纯化的结果见图 1。

2.3 全长 NS3 蛋白与半长 NS3 蛋白对 HCV 抗体检测比较

分别用全长 NS3 蛋白和 C 端半长 NS3 蛋白包被,平行检测 HCV 抗体诊断国家参考品(阳性参考品和阴性参考品各 40 份);对 40 份 HCV 抗体阳性参考品,全长 NS3 蛋白检测的符合率为 80% (32/40),而半长 NS3 蛋白检测符合率为 75% (30/40);对 40 份阴性参考品,两种抗原的检测符合率均为 100% (40/40)。由于包被时所用全长 NS3 蛋白量比半长 NS3 蛋白量

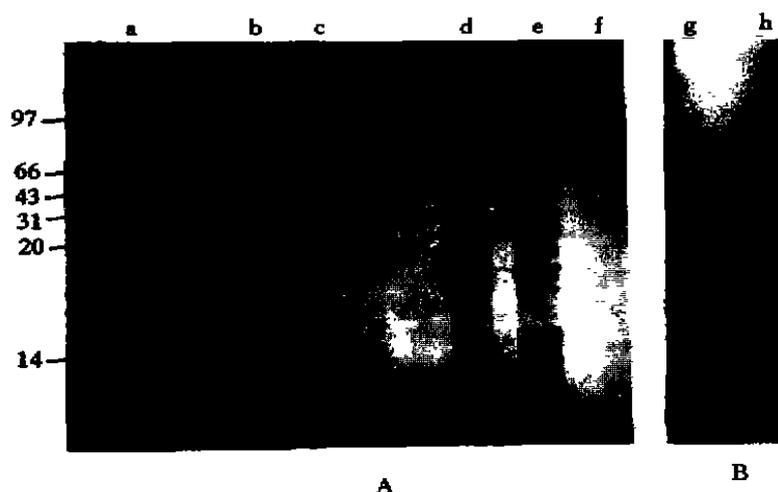


图1 SDS-PAGE分析表达产物(A)和免疫印迹分析(B)

Fig. 1 SDS-PAGE analysis of expression product (A) and Western-blot (B)

a molecular weight marker (kD); b induced JM109 strain containing pQE30-NS3; c non-induced JM109 strain containing pQE30-NS3; d induced JM109 strain containing pQE30; e JM109 strain; f purified protein using chelating resin; g induced JM109 strain containing pQE30-NS3; h induced JM109 strain containing pQE30.

要少,则可在不影响检测符合率的情况下提高检测 OD 值。全长 NS3 蛋白不能检出的阳性血清为 2、12、27、33、35、36、38、40 号;半长 NS3 蛋白不能检出的阳性血清为 11、12、13、19、24、25、27、34、36、40 号。二者均不能检测出的阳性血清为 12、27、36、40 号,说明两种蛋白抗原性存在差异。

目前国内外丙肝抗体诊断试剂,所用的组合抗原包括核心、NS3 和 NS5 区段,其中的 NS3 抗原为 C 端半部,分子量 33 kD,尽管血源经血站和医院双重检查把关,仍有不少人输血后患丙型肝炎,进一步提高丙肝抗体检测的灵敏度是有很大意义的。全长 NS3 蛋白分子量 70 kD, N 端半部具有蛋白酶活性,参与 HCV 蛋白质切割, C 端半部有 RNA 解旋酶活性,参与 RNA 复制。N 端半部也含多个抗原表位,从理论上推测用全长的 NS3 蛋白为抗原检测血清中的 HCV 抗体,应比用半长的 NS3 检测抗体更灵敏、更全面,且全长的 NS3 与 C 端半部的 NS3 蛋白在血清学检测比较研究方面,在国内外都未见报道。我们在大肠杆菌中成功的高效表达的全长 NS3 蛋白和获得高纯度的蛋白,并用大肠杆菌表达的全长 NS3 蛋白与 C 端半部 NS3 进行 HCV 抗体检测比较,结果表明,检测国家 HCV 阳性血清参比品全长 NS3 蛋白的阳性检测率比 C 端半部 NS3 提高 5%,而二者的阴性符合率都为 100%,表明用全长 NS3 蛋白在提高检测的灵敏度同时,也保持了高度的特异性。我们认为,全长的 NS3 抗原在 HCV 抗体检测上具有推广应用价值。并且为进一步针对 NS3 活性研究抗 HCV 药物,以及研究 NS3 在 HCV RNA 复制中的作用,提供了良好的基础。

参 考 文 献

- [1] Saito I, Miyamura T, Ohbayashi A, *et al.* Hepatitis C virus infection is associated with the development of hepatocellular carcinoma [J]. PNAS USA, 1990, 87:6547
- [2] Grakoui A, McCourt D W, Wychowski C, *et al.* Characterization of the hepatitis C virus-encoded serine proteinase; determination of proteinase-dependent polyprotein cleavage sites [J]. J Virology, 1993, 67:2832
- [3] Kim D W, Gwack Y, Han J H, *et al.* C-terminal domain of the hepatitis C virus NS3 protein contains an RNA helicase activity [J]. Biochem Biophys Res Commun, 1995, 215:160
- [4] 金冬雁,黎孟枫译,侯云德校.分子克隆实验指南[M].第二版,北京科学出版社,1993
- [5] 孙家华,盛蕾,袁桂玉.丙型肝炎实验室诊断研究进展[J].国外医学病毒学分册,1998,5(4):113
- [6] Ishido S, Fujita T, Hotta H. Complex formation of NS5B with NS3 and NS4A proteins of hepatitis C virus [J]. Biochem Biophys Res Commun, 1998, 244:35
- [7] Jin L and Peterson D L. Expression, isolation, and characterization of the Hepatitis C Virus ATPase/RNA Helicase [J]. Arch Biochem Biophys, 1995, 323:47

Expression of Full-length HCV NS3 Gene in *E. coli* and Its Application in HCV Antibody Detection

ZHANG Bin, YE Lin-bai, GAO Jin-rong, XUE Jing-ping, RUAN Hua
WANG Xiao-ling, ZHAO Yue-e

(*Institute of Virology, Wuhan University, Wuhan 430072, China*)

Abstract: Full-length NS3 gene of a hepatitis C virus was amplified by PCR using plasmid pBAC25 containing HCV nonstructural protein gene as template. The amplified fragment (about 1.8 kb) was cloned into plasmid pQE30 and the recombinant plasmid was expressed in JM109. The NS3 protein was purified by NiSO₄ metal chelating resin, and its antigenicity was determined by ELISA, the results showed that the full-length NS3 protein was more sensitive than the commercial carboxy-terminal domain of NS3 protein in HCV antibody detection.

Key words: Hepatitis C virus; NS3; Expression; Antibody detection