维普资讯 http://www.cqvip.com

2000,15(4)

第15卷4期 中 国 病 毒 学 Vol 15 No.4
2000年12月 VIROLOGICA SINICA Dec. 2000

313-317

R512.63
R373.21

丙型肝炎病毒RNA多聚酶在昆虫细胞中的表达*

兰水云，郑玲洁，胡芸文，沈重，邱海军，袁正宏**

（上海医科大学医学分子病毒学重点实验室，上海 200032）

摘要：HCV NS5B基因片段克隆入Bac-to-Bac™重组杆状病毒表达系统的pFastHTc载体质粒，转化DH10Bac™感受态细菌获得重组的Bacmid质粒，将重组Bacmid质粒转染Sf9细胞，获得的重组杆状病毒可表达目的蛋白。免疫印迹和体外活性检测表明，所表达蛋白为HCV NS5B蛋白，具有多聚酶活性。

关键词：丙型肝炎病毒；RNA多聚酶；分子克隆；转染
中图分类号：R373.2；Q786 **文献标识码**：A **文章编号**：1003-5125(2000)04-0313-05

由于缺乏有效的HCV体外感染和复制型细胞系统，目前对HCV基因结构及功能的认识主要基于将HCV cDNA与其它已知病毒基因序列的比较、缺失突变、表达基因片段及对各片段蛋白质所作的功能研究。通过重组表达、活性测定等实验证实，HCV基因组NS5B含有依赖RNA的RNA多聚酶的保守功能域"GDD"，具有依赖RNA的RNA多聚酶的活性[1-6]。本室曾利用原核系统表达NS5B蛋白，虽可以高效表达，但是由于表达产物形成包涵体和原核系统不能进行蛋白的翻译后加工等原因，造成所得目的蛋白活性低下，不适用于进一步对HCV基因复制机制的研究[3]。利用重组杆状病毒表达系统表达外源蛋白具有许多优点，如表达量高、蛋白可溶，系统对人体安全，具有真核细胞的蛋白翻译后加工、糖基化、磷酸化、精确的蛋白折叠分泌、靶细胞定位等作用，所表达的蛋白具有与天然蛋白相同的结构和活性等等[8]。

在本研究中我们应用新近发展起来的Bac-to-Bac™重组杆状病毒表达系统对HCV NS5B蛋白进行表达，获得了具有多聚酶活性的目的蛋白。

1 材料与方法

1.1 材料 Bac-to-Bac™重组杆状病毒表达系统、Sf-900 II SFM培养基、Elongase长模板PCR系统、内切酶等均购自GIBCO/BRL公司，T4 DNA连接酶购自Boehringer Mannheim公司，柱离心式胶回收试剂盒购自上海华顺生物试剂公司，Sf9细胞由中科院上海生化所吴祥甫教授赠送，兔抗NS5B血清由美国华盛顿大学Charlie Rice教授赠送。

1.2 构建NS5B-杆状病毒重组转移载体 NS5B基因片段（约1.7 kb）从pET-32c(+)/NS5B重组质粒[3]中用*Bam*H I酶切获得，pFastHTc载体*Bam*H I酶切、去磷酸化。两者经柱离心式胶回收纯化后按载体和片段

收稿日期：1999-07-20，修回日期：1999-10-29
* 基金项目：上海市青年科技启明星计划(96QA14012)；上海市基础研究项目(98JC14023)
作者简介：兰水云(1974年-)，男，畲族，浙江籍，硕士，主要从事丙型肝炎病毒的分子生物学。
** 通讯作者：袁正宏(1966年-)，男，江苏籍，博士，研究员，主要从事肝炎病毒的分子生物学和DNA疫苗研究。

维普资讯 http://www.cqvip.com

的物质的量之比=1:3进行连接(4℃反应过夜)。连接产物转化DH5α感受态细菌,用*Eco*R I酶切筛选正向连接质粒。取正向连接质粒1 ng转化100 μL DH10BAC™感受态细菌,经转座反应获得重组Bacmid,可通过卡那霉素、庆大霉素和四环素三种抗性和蓝白斑筛选(阳性克隆为白色)。

按操作说明用碱变性法进行重组Bacmid DNA的抽提,然后经琼脂糖凝胶电泳和载体引物PCR鉴定。PCR按Elongase长模板PCR系统操作,所用引物位于Bacmid lacZ α互补区的转座子靶位点两侧,正向引物为5′-CCCAGTCACGACGTTGTAAAACG-3′,反向引物为5′-AGCGGATAACAATTTCACACAGG-3′

1.3 重组NS5B-Bacmid转染Sf9细胞 重组Bacmid抽提后用于转染Sf9细胞。组织培养板35 mm孔接种9×10^5个Sf9细胞,27℃粘附4 h。5 μL重组Bacmid和6 μL CELLFECTIN分别用Sf-900 Ⅱ SFM无血清培养液(GIBCO/BRL)稀释100 μL,室温置45 min。细胞用2 mL Sf-900 Ⅱ SFM淋洗一次;转染混合液中补加0.8 mL Sf-900 Ⅱ SFM,27℃培育7 h,换为2 mL含抗生素(氨苄青霉素100 μg/mL,链霉素100 μg/mL)的Sf-900 Ⅱ SFM,27℃培育72 h,病毒上清收集后4℃避光保存。

1.4 重组病毒的扩增和NS5B蛋白的表达 25 mL培养瓶种入6×10^6个Sf9细胞,新鲜Sf-900 Ⅱ SFM培养液加至6 mL,扩增病毒时加转染后的病毒上清(2×10^7 cfu/mL) 30 μL (MOI=0.1),27℃培育48小时后收集上清;NS5B蛋白表达时,每6×10^6个Sf9细胞需加病毒上清1.5 mL(MOI=5),27℃培育72 h后收集细胞。

1.5 表达产物的检测 6×10^5个感染重组病毒的Sf9细胞(不同时间段)裂解后,经7.5% SDS-PAGE电泳,按Western印迹法转移至硝酸纤维素膜,与1:200 PBS稀释的兔抗NS5B血清反应2 h,再用酶标记的SPA反应2 h后显色,待目的条带清晰显现,换ddH_2O终止反应。

1.6 表达产物的纯化 1.2×10^7个感染重组病毒的Sf9细胞(72 h)用300 μL Binding buffer(含20 mmol/L Tris-HCl pH7.9,500 mmol/L NaCl,5 mmol/L Imidazole,1% NP-40)重悬,超声破碎,10 000 r/min离心10 min,取裂解上清备用。200 μL Ni-NTA树脂用1 mL 50 mmol/L $NiSO_4$平衡后,加入裂解上清与之结合,100 mmol/L Imidazole洗涤后用100 μL 1 mol/L Imidazole洗脱。各流份经7.5% SDS-PAGE,进行Western blot分析。

1.7 多聚酶活性检测 6×10^6个Sf9细胞收集后用PBS洗涤一次,然后用200 μL Binding buffer重悬,超声破碎后,10 000 rpm离心10 min,取上清检测。10 μL裂解上清中加入1 μg Poly(C)-oligo$(dG)_{12}$模板,10 μCi α-^{32}P-dGTP,12.5 mmol/L dGTP 1 μl,1.25 μg放线菌素D,50 mmol/L $MgCl_2$ 2.5 μL,50 mmol/L DTT 0.5 μL,10× buffer (200 mmol Tris-HCl pH7.5,250 mmol/L KCl,10 mmol/L EDTA)2.5 μL,总反应体积25 μL。22℃反应2 h后加入100 μg鱼精DNA、1 mL 10%TCA,4℃置30 min,用玻璃纤维滤纸过滤,烘干后闪烁液闪仪读取cpm值。

2 结果

2.1 构建NS5B-重组杆状病毒转移载体

正向连接的pFastBacHTc/NS5B质粒用*Eco*R I酶切应有一1.1 kb片段。取正向连接的pFastBacHTc/NS5B转化DH10Bac™感受态细菌,经转座产生重组NS5B-Bacmid的DH10Bac™菌有三种抗性:卡那霉素、庆大霉素和四环素,并且失去α-互补作用,在Bluo-gal和IPTG平板上呈白色菌落。重组Bacmid DNA用PCR鉴定,Bacmid的PCR产物为300 bp,空载体pFastBacHTc-Bacmid为2.4 kb,pFastBacHTc/NS5B-Bacmid则为4.1 kb(图1)。

2.2 重组杆状病毒的获得与NS5B蛋白的表达

重组Bacmid转染Sf9后72 h上清中病毒滴度可达2×10^7 cfu/mL,按MOI=5感染Sf9细胞,分别于感染24、48、72 h后收集细胞,细胞裂解后收获上清作Western blot检测。结果见图2。镜检发现,72 h后Sf9细胞开始出现死亡。

维普资讯 http://www.cqvip.com

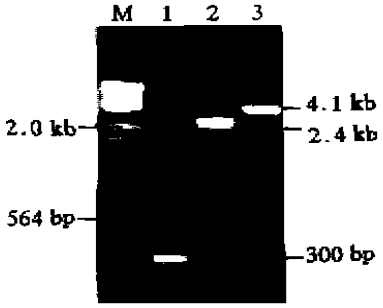

图 1　重组 Bacmid 的 PCR 鉴定

Fig. 1　PCR analysis of the recombinant Bacmid. M: λDNA/*Eco*R 1 + *Hind* Ⅲ Marker, Lane 1: Bacmid alone, Lane 2: Bacmid transposed with pFastBacHTc, Lane 3: Bacmid transposed with pFastBacHTc/NS5B(HTc 2.4 kb + NS5B 1.7 kb = 4.1 kb)

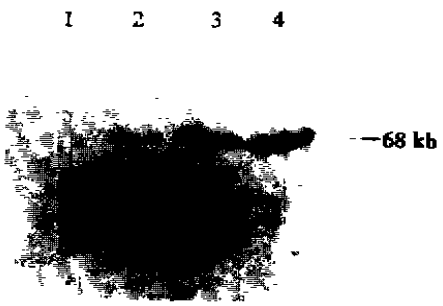

图 2　Sf9 细胞表达的 NS5B 蛋白的 Western blot 分析

Fig. 2　Western blot analysis of NS5B protein expressed in Sf9 cells

1: uninfected Sf9 cells; 2 ~ 4: Sf9 cells infected with NS5B recombinant baculovirus harvested at different times: 24h, 48h, 72h

2.3　表达产物的纯化

72 h 的 Sf9 表达细胞裂解上清用 Ni-NTA 树脂亲和层析柱纯化，各流份的 Western blot 分析发现，除细胞裂解液和过柱流出液中存在特异条带外，洗液和洗脱液中均不见特异条带，说明目的蛋白不能结合于 Ni-NTA 树脂亲和层析柱。

2.4　多聚酶活性检测

Poly(C)-oligo$(dG)_{12}$检测系统显示，与未感染 NS5B 重组杆状病毒的对照 Sf9 细胞裂解物相比，感染了重组病毒的 Sf9 细胞裂解物具有较强的多聚酶活性，cpm 值约为未感染的 Sf9 细胞裂解物 cpm 值的 10 倍。动态观察显示 cpm 值与时间呈线性反应关系，提示该酶的活性较为稳定(图 3、图 4)。

3　讨论

在本研究中我们应用 Bac-to-Bac™重组杆状病毒表达系统对 HCV NS5B 蛋白进行了表达，Western blot 检测为阳性，活性鉴定结果表明所表达蛋白具有多聚酶活性。

由于本研究采用的 Bac-to-Bac™重组杆状病毒表达系统的筛选重组体工作在细菌水平进行，省却了以往经细胞噬斑筛选的繁琐过程，使得很快就获得了带有 NS5B 基因的重组杆状病毒。Western blot 显示感染 24 h 重组 NS5B 蛋白即为阳性，随着时间的推移，NS5B 蛋白的表达量不断增加。至 72 h 可观察到 Sf9 细胞出现死亡，因此一般在感染 72 h 后收集细胞。

通过实验我们发现，与期望的结果相反，NS5B 在本系统中表达水平很低，仅可用 Western blot 检测出特异性条带。Liebman 等报道采用低 MOI 值进行感染并相应延长培养时间可提高目的蛋白的表达量[9]。他们用 MOI = 0.003 感染 Sf9 细胞，于 120 h 获得了组织蛋白酶 B 的最高表达量。在实验中我们也对感染剂量进行了探索，结果未发现低 MOI 值感染法可提高

维普资讯 http://www.cqvip.com

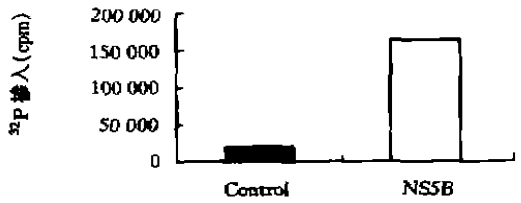

图3 NS5B蛋白RNA依赖的多聚酶活性检测

Fig. 3 Detection of the RNA polymerase activity of NS5B protein

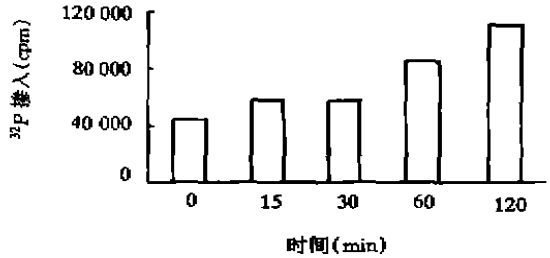

图4 时间对^{32}P-dGTP掺入(cpm)的影响

Fig. 4 Time course of ^{32}P-dGTP incorporation reaction

NS5B蛋白的表达量。因不同的细胞系对外源蛋白的表达量可有所差异，更换其它细胞系(如High5)有进一步提高NS5B蛋白表达量的可能。

NS5B表达产物用Ni-NTA树脂亲和层析柱纯化时发现，NS5B蛋白不能结合于Ni-NTA树脂介质。这可能是由于蛋白折叠时，六组氨酸"标签"(6xHis tag)被埋藏于蛋白内部，从而不能与Ni-NTA树脂结合。在本系统中六组氨酸"标签"位于表达蛋白氨基端，我们正准备将六组氨酸"标签"置于表达蛋白羧基端，使六组氨酸"标签"有可能在蛋白折叠时仍暴露于蛋白外部，从而可以用Ni-NTA树脂亲和层析柱纯化。

根据依赖RNA的RNA多聚酶的功能特点，测试病毒RNA多聚酶活性的系统可采用病毒基因非特异性的模板-引物系统(如Poly A -oligoU)和病毒基因特异性系统(可将克隆有病毒基因3′末端非编码区的质粒体外转录后制备RNA)。本室曾采用Poly(A)-oligo$(U)_{12}$及HCV 3′NCR的RNA转录体作为模板检测HCV RNA多聚酶均获得成功[3]。Lohmann等报道，HCV RNA多聚酶也可以Poly(C)-oligo$(G)_{12}$及Poly(C)-oligo$(dG)_{12}$作为模板-引物系统起始RNA和DNA的合成，且其掺入效率远高于Poly(A)-oligo$(U)_{12}$系统及病毒基因特异性模板系统[6]。我们在本实验中采用Poly(C)-oligo$(dG)_{12}$测试系统也检测到重组表达蛋白具有较高多聚酶活性(图3)。由于未能获得纯化的HCV多聚酶，我们在测试中采用了重组杆状病毒感染细胞的裂解上清。为避免细胞蛋白中DNA依赖的RNA聚合酶活性的干扰，我们在系统中加入可有效抑制其作用的放线菌素D。NS5B重组杆状病毒感染细胞上清所显示的高聚合酶活性强烈提示其聚合酶活性为表达的NS5B蛋白所致。

作为HCV基因复制的关键酶，依赖RNA的RNA多聚酶近年来得到了广泛重视。已证实NS5B为膜磷酸化蛋白[10]；NS5B、NS3、NS4A间可相互作用形成复合物[7]；可与人囊泡相关蛋白(human vesicle-associated protein 33, hVAP-33)结合。重组高活性HCV RNA多聚酶的获得将推动对HCV多聚酶与其它病毒蛋白、细胞蛋白间相互作用的研究，有助于HCV基因复制机制的进一步阐明和抗HCV药物的研制。

参 考 文 献

[1] Lohmann V, Korner F, Herian U, *et al*. Biochenical properties of hepatitis C virus NS5B RNA-dependent RNA poly-

维普资讯 http://www.cqvip.com

merease and identification of amino acid sequence motif essential for enzymatic activity [J]. J Virol, 1997, 71(11): 8416 - 8428

[2] Behrens SE, Tomei L, De Francesco R, *et al*. Identification and properties of the RNA - dependent RNA polymerase of hepatitis C virus [J]. EMBO J, 1996, 15(1): 12 - 22

[3] Yuan ZH, Kumar U, Thomas HC, *et al*. Expression, purification, and partial characterization of HCV RNA polymerase [J]. Biochem Biophy Res Com, 1997, 232(1): 231 - 235

[4] Yamashita T, Kaneko S, Shirota Y, *et al*. RNA-dependent RNA polymerase acting of the soluble recombinant hepatitis C virus NS5B protein truncated at the C-terminal region [J]. J Biol Chem, 1998, 273(25): 15479 - 15486

[5] Ferrari E, Wright-Minogue J, Fang JWS, *et al*. Characterization of soluble hepatitis C virus RNA-dependent RNA polymerase expressed in Escherichia coli [J]. J Virol, 1999, 73(2): 1649 - 1654

[6] Ishii K, Tanaka Y, Yap CC, *et al*. Expression of hepatitis C virus NS5B protein: characterization of its RNA polymerase activity and RNA binding [J]. Hepatology, 1999, 29(4): 1227 - 1235

[7] Ishido S, Fujita T, Hotta H. Complex formation of NS5B and NS4A proteins of hepatitis C virus [J]. Biochem Biophys Res Commun, 1998, 244(1): 35 - 40

[8] 林广云，王瑚章，Wong A，等. 利用杆状病毒表达系统表达金鱼生长激素 I 基因[J]. 生物工程学报, 1997, 13(2): 149 - 153

[9] Liebman JM, Lasala D, Wang WW, *et al*. When less is more: enhanced baculovirus production of recombinant protein at very low multiplicities of infection [J]. Bio Techniques, 1999, 26(1): 36 - 42

[10] Hwang SB, Park KJ, Kim YS, *et al*. Hepatitis C virus NS5B protein is a membrane-associated phosphoprotein with a predominantly perinuclear localization [J]. Virology, 1997, 227(2): 439 - 446

Expression of Hepatitis C Virus RNA Polymerase in Insect Cells

LAN Shui-yun, ZHENG Ling-jie, HU Yun-wen,
SHEN Zhong, QIU Hai-jun, YUAN Zheng-hong#

(*Laboratory of Medical Molecular Virology, Shanghai Medical University, Shanghai, 200032, China*)

Abstract A recombinant transposing vector pFASTHTc-NS5B was constructed by inserting HCV NS5B gene into pFASTHTc vector of BAC-TO-BAC™ recombinant baculovirus expression system. The plasmid pFASTHTc-NS5B was then transformed into DH10BAC™ competent cell. High molecular weight DNA, the recombinant bacmid, was prepared from the overnight cultures of selected E. coli DH10BAC™ colonies. By transfecting Sf9 cells with the recombinant bacmid the recombinant baculovirus from the superenatant was obtained, which could further infect Sf9 cells obtained and express the target protein. The expression of HCV NS5B was confirmed by Western blot and *in vitro* characterization showed that HCV NS5B possessed polymerase activity.

Key words: Hepatitis C virus, RNA polymerase; Molecular cloning; Transfection

corresponding author