

(16) R 512.63
R 373.21

丙型肝炎病毒中国株非结构蛋白 2~3 部分基因 cDNA 克隆序列分析及表达*

400-404

范涛, 高建恩, 陶其敏

(北京医科大学人民医院肝病研究所, 北京 100044)

关键词: 丙型肝炎病毒; 非结构蛋白; 序列测定; 基因表达**中图分类号:** R512.63 **文献标识码:** A **文章编号:** 1003-5125(2000)04-0400-05

丙型肝炎病毒(Hepatitis C virus, HCV)是输血后和许多社区获得性非甲非乙肝炎的主要致病因子。HCV为单股正链RNA病毒,其基因组长约9.5 Kb,编码区含一个大开放读码框,编码3 010-3 033氨基酸残基的多蛋白前体,经宿主蛋白酶和病毒蛋白酶加工成具有生物学功能的成熟蛋白。HCV各区域的分布顺序是:C-E1-E2-p7-NS2-NS3-NS4A-NS4B-NS5A-NS5B^[1]。本文我们应用RT-PCR方法从HCV患者血清中扩增编码病毒蛋白酶的非结构蛋白(NS2-NS3)部分基因,对其核苷酸序列进行了分析,并在大肠杆菌中获得了良好表达。

1 材料与方 法

1.1 血清标本来源 HCV感染者血清来自本院门诊。

1.2 菌种和质粒 pcDNA3为Invitrogen公司产品,pBV220为预防医学科学院病毒研究所张智清教授惠赠。

1.3 PCR引物设计 PCR引物参考HCV-J序列,合成内、外两组引物,在内引物对的5'端和3'端分别引入EcoRI和XbaI酶切位点及起始密码子和终止密码子,其序列为:外引物FR(HCV-J参考位置4 117~4 134):GACATATACGCTCCAAAG,FF(2 943-2 961):TGCCATCATCCTCCTTACA;内引物TR(4 096~4 112):GACTCTAGATTATGTGGCGGCAACGGACG,TF(3 021-3 035):CAGGAATTCATGCCGTCATGGTGCTC。由CyberSyn公司合成。

1.4 RT-PCR 采用异硫氰酸胍-酚-氯仿法提取HCV RNA。提取的RNA溶于含RNasin(1 u/μL)的DEPC双蒸水中。于70℃变性2 min,再加入逆转录反应液,10 μL反应体系中,含1 μL AMV-RT逆转录酶缓冲液,外引物FR 50 pmol,dNTP终浓度各为200 μmol/L,逆转录酶2 u,于42℃ 1 h后,95℃ 20 min。在逆转录产物中加入一次PCR反应液,50 μL反应体系中镁离子终浓度为1.5 mmol/L,dNTP终浓度各为200 μmol/L,Taq-P为2 u,引物FF 50 pmol。第二次PCR仍为50 μL反应体系,取第一次PCR产物5 μL,内引物TR和TF各为50 pmol,余同第一次PCR。PCR循环条件为94℃变性1 min,55℃退火1.5 min,72℃延伸2 min,35个循环。6% PAGE检测扩增产物。

1.5 核苷酸序列测定 扩增产物用EcoRI和XbaI双酶切克隆至pcDNA3载体,重组质粒以EcoRI和

收稿日期:1999-06-28,修回日期:2000-01-12

* 基金项目:CMB基金资助项目(NO 93582)

作者简介:范涛(1964年-),男,湖南隆回人,助理研究员,博士,研究方向为HCV的分子生物学。

Xba I 双酶切鉴定后,提取纯化后,采用 Sanger 双脱氧链终止法,以 SP6 和 T7 通用引物进行双向测序测定。

1.6 重组表达载体的构建和表达 用 *Eco*R I / *Xba* I 切下目的基因片段,亚克隆引入 *Sal* I 酶切位点,亚克隆至 pBV220 的 *Eco*R I / *Sal* I 位点之间,构建重组表达载体 pBV220-NS2-3。挑取含重组载体 pBV220-NS2-3 的单个菌落置于 LA 液体培养基中,30 ℃ 培养过夜,次日加入等量预温的培养基,42 ℃ 培养 4 h。经 SDS-PAGE 后,Coomassie 亮蓝染色观察结果。

1.7 Western blot 鉴定 蛋白经电泳分离后,电转移至硝酸纤维素膜上,以 5% 脱脂奶粉封闭,HCV 抗体阳性血清为一抗,将碱性磷酸酶标记的羊抗人 IgG 酶标抗体为二抗,用 NBT/BCIP 显色系统显色。

```

ATG  CCGCT  CATGG  TGCTC  CAGGC  TGGCA  TAACT  AGAGT  GCCGT  ACTTC
    GTGCG  CGCTC  ATGGG  CTCAT  TCGTG  CGTGC  ATGCT  ATTGC  GGAAA
    GTTGC  TGGGG  GTCAT  TATGT  CAAA  TGGCA  CTCAT  GAAGC  TGGCC
    GCACT  GACAG  GTACG  TACCT  CTATG  ACCAT  CTTAC  TCCAC  TGCAG
    TATTG  GGCC  ACGCG  GGCTT  ACGAG  ACCTC  GCGGT  GGCG  TAGAG
    CCCGA  CATCT  TCTCT  GACAT  GGAGA  TCAGG  ATCAT  CACCT  GGGGG
    GCAGA  TACTG  CAGCG  TGTGG  AGACA  TCATT  CAGGG  TTTGC  CCGTT
    TCCGC  CCGGA  GGGGA  AAGGA  GATAC  TCCTG  GGGCC  GGCCG  ATAGT
    TTTGA  AGGGC  AGGGG  TGGCG  ACTCC  TTGCG  CCTAT  TACGG  CCTAC
    GCCCA  ACAGA  CGCGG  GGCTT  ACTTG  GTTGC  ATCAT  CACTA  GCCTC
    ACAGG  CCGGG  ACAAG  AACCA  GGTCG  AGGGG  GAGST  TCAAG  TGGTC
    TCCAC  CGCAA  CACAA  TCTTT  CCTGG  CGACC  TGCAT  CAACG  GCGTG
    TGTTG  GACTG  TCTAT  CATGG  CGCTG  GCTCA  AAAAC  CTTAG  CCGGC
    CAAA  AGGCC  CAATC  ACCCA  AATGT  ACACC  AATGT  AGACC  AGGAC
    CTCGT  CGGCT  GGCAG  CCGCC  CCCC  GGGCG  CGTTC  CCTAA  CACCA
    TGCAC  CTGCG  GCAGT  TCGGA  CCTTT  ACTTG  GTCAC  GAGAC  ATGCT
    GATGT  CATT  CGGTG  CGCCG  TCGAG  GCGAC  AGTAG  GGGGA  GTTTA
    CTCTC  CCCC  GGCCT  GTCTC  CTACC  TGAAG  GGCTC  GTCGG  GGGGG
    CCACT  GCTCT  GCCCC  TCGGG  GCACG  TTGCA  GGCAT  CTTTC  GGGCT
    GCTGT  GTGCA  CCCGG  GGGGT  TGCGA  AGGCG  GTGGA  TTTCA  TACCC
    GTTGA  GTCCA  TGGAA  ACTAC  CATGC  GGTCT  CCGGT  CTTCA  CAGAC
    AACTC  ATCCC  CCCC  GCCGT  ACCGC  AGACA  TTCCA  AGTGG  CCCAT
    CTACA  CGCTC  CTACT  GGCAG  CGGCA  AGAGC  ACTAA  AGTGC  CGGCT
    GCATA  TGCGG  CCCAA  GGGTA  CAAGG  TGCTC  GTCCT  GAACC  GGTCC
    GTTGC  CGCCA  CATAA
  
```

图1 NS2-NS3 核苷酸序列

Fig.1 Nucleotide sequence of NS2-NS3

```

M  PLMVL  QAGIT  RVPYF  VRAHG  LIRAC  MLLRK  VAGGH  YVQMA  LMKLA
    ALTGT  YLYDH  LTPLQ  YWAHA  GLRDL  AVAVE  PDIFS  DMEIR  IITWG
    ADTAA  CGDII  QGLPV  SARRG  KEILL  GPADS  FEGQG  WRLLA  PITAY
    AQQTR  GLLGC  IITSL  TGRDK  NQVEG  EVQVV  STATQ  SFLAT  CINGV
    CWTVY  HGAGS  KTLAG  PKGPI  TQMYT  NVDQD  LVGMQ  PPPGA  RSLTP
    CTCGS  SDLYL  VTRHA  PVIPV  RRRGD  SRGSL  LSPRP  VSYLK  GSSGG
    PLLCP  SGHVA  GIFRA  AVCTR  GVAKA  VDFIP  VESME  TTMSR  PVFTD
    NSSPP  AVPQT  FQVAH  LHAPT  GSGKS  TKVPA  AYAAQ  GYKVL  VLNRS  VAAT
  
```

图2 演绎的 NS2-NS3 氨基酸序列

Fig.2 Putative amino acid sequence of NS2-NS3

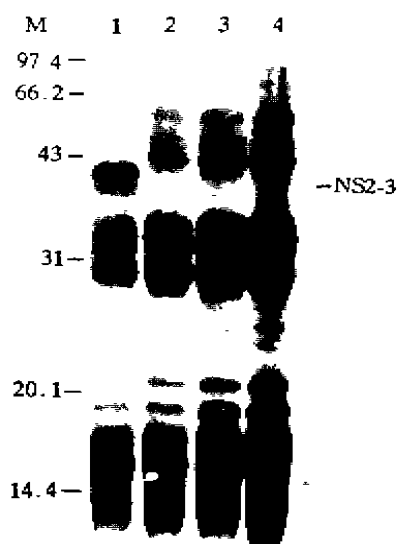


图3 SDS-PAGE分析HCV NS2-3蛋白在*E. coli*中的表达

Fig.3 Analysis of the expression of HCV NS2-3 protein in *E. coli* by SDS-PAGE

M, molecular weight marker

Lane1, DH5 α transformed with pBV220-NS2-3(induced)

Lane2, DH5 α transformed with pBV220-NS2-3(uninduced)

Lane3, DH5 α transformed with pBV220(induced)

Lane4, DH5 α transformed with pBV220(uninduced)

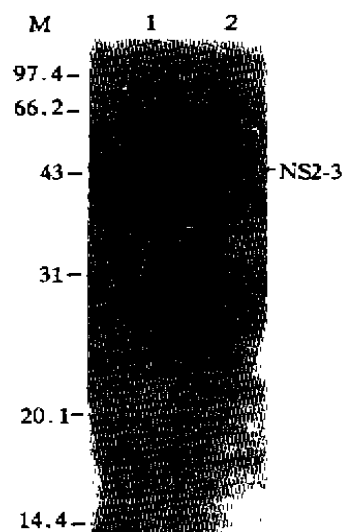


图4 Western blot分析HCV NS2-3蛋白在*E. coli*中的表达

Fig.4 Analysis of the expression of HCV NS2-3 protein in *E. coli* by Western blot

M, molecular weight marker

Lane1 DH5 α transformed with pBV220-NS2-3(induced)

Lane2 DH5 α transformed with pBV220(uninduced)

2 结果与讨论

2.1 RT-PCR 扩增目的基因 cDNA 片段

本实验设计扩增 HCV 3'021-4112 nt 基因,加上两端的修饰序列长度为 1116 bp。经 RT-PCR 扩增后,获得的产物经 6% PAGE,位于核酸分子量参照物 X174 DNA/*Hae* III 1353 bp 和 1078 bp 之间,与预期大小相符(图略)。

2.2 重组载体的构建及鉴定

挑选阳性克隆,小量提取质粒,用 *Eco*R I 和 *Xba* I 双酶分别酶切 pcDNA3-NS2-3 以及 pBV220-NS2-3 后,经电泳后可见一条 1100 bp 左右的条带,与目的片段长度基本一致(图略),表明 NS2-3 片段已克隆至相应的载体上。

2.3 核苷酸序列分析及同源性比较

在不同的 HCV 分离株中,其基因组具有高度的异源性,这种现象可能是由于 RNA 病毒在其复制的过程中 RdRp 缺乏自身校正功能,以及病毒在宿主的免疫压力下发生变异所致^[7]。在 HCV 整个基因组中,5'非编码基因高度保守,而 3'非编码基因变异程度较高。编码基因中,C 区最保守,非编码基因次之,E1、E2 高度变异。我们以 pcDNA3 T7 和 SP6 启动子通用引物

对克隆的 HCV NS/NS3 区基因组进行双向测序,核苷酸序列结果见图 1。演绎的氨基酸序列见图 2。经与已经报道的 I-IV 型 HCV 株 HCV-1^[2]、HCV-J^[3]、HC-C2^[4]、HCV-J6^[5]、HCV-J8^[6] 核苷酸序列对比分析,其同源性依次为 73.72%、90.20%、91.02%、64.56%、63.37%;氨基酸同源性依次为 83.24%、92.09%、93.13%、70.88%、67.86%。所克隆的 HCV 基因属于 HCV II 型。

2.4 NS2-3 基因在 *E. coli* 中的表达

含重组载体 pBV220-NS2-3 的 *E. coli* 经温控诱导后,经 SDS-PAGE, Coomassie 亮蓝染色显示,表达了大小约 4.1 kD 的 NS2-3 蛋白,见图 3。Western blot 结果显示,该蛋白条带为 HCV 特异蛋白,见图 4。

随着 HCV 分子生物学研究的深入,对 HCV 非结构蛋白结构和功能的研究正逐渐成为新的研究热点之一,病毒编码的蛋白酶, RNA 螺旋酶, NTP 酶, 依赖 RNA 的 RNA 合成酶等与病毒蛋白的合成加工、病毒基因组的复制,以及病毒的整个生命周期均有着密切的关系。研究表明, NS2 和 NS3 基因编码病毒 Zn^{2+} 依赖性金属蛋白酶和丝氨酸蛋白酶。 Zn^{2+} 依赖性金属蛋白酶介导 NS2/NS3 位点的裂解^[8], 丝氨酸蛋白酶介导非结构蛋白其余位点的裂解^[9]。对 NS3 区氨基酸序列的分析表明,该区内含有丝氨酸蛋白酶催化中心基序(HDS)。本研究我们在对编码 HCV 蛋白酶的基因进行克隆和序列分析的基础上,将该基因在大肠杆菌中进行表达,为进一步研究其生物学性质打下了基础。

参 考 文 献

- [1] Neddermann P, Tomei L, Steinkuhler C, *et al.* The nonstructural proteins of the hepatitis C virus: Structural and functions [J]. *Biol Chem*, 1997, 378: 469 - 476
- [2] Choo KH, Richman JH, Han K, *et al.* Genetic organization and diversity of the hepatitis C virus [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1991, 88: 2451 - 2455
- [3] Kato N, Hijikata M, Ootsuyama Y, *et al.* Molecular cloning of the human hepatitis C virus genome from Japanese patients with non-A, non-B hepatitis [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1990, 87: 9524 - 9528
- [4] Wang Y, Okamoto H, Tsuda F, *et al.* Prevalence, genotype, and an isolate (HC-C2) of hepatitis C virus in Chinese patients with liver disease [J]. *J Med Virol*, 1992, 40: 254 - 260
- [5] Okamoto H, Okada S, Sugiyama Y, *et al.* Nucleotide sequence of the genomic RNA of hepatitis C virus isolated from a human carrier; comparison with the reported isolates for conserved and divergent regions [J]. *J Gen Virol*, 1991, 72 (Pt 11): 2697 - 2704
- [6] Okamoto H, Kurai K, Okada SI, *et al.* Full-length sequence of a hepatitis C virus genome having poor homology to the reported isolates; Comparative study of four distinct genotypes [J]. *Virology*, 1992, 188: 331 - 341
- [7] Weiner J, Geysen HM, Christopherson C, *et al.* Evidence for immune selection of hepatitis C virus (HCV) putative envelope glycoprotein variations; potential role in chronic HCV infection [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1992, 89: 3468 - 3472
- [8] Grakoui A, McCourt DW, Wychowski C, *et al.* A second hepatitis C virus encoded proteinase [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1993, 90: 10583
- [9] Mori A, Yamada K, Kimura J, *et al.* Enzymatic characterization of purified NS3 serine proteinase of hepatitis C virus expressed in *Escherichia coli* [J]. *FEBS*, 1996, 378: 37

Cloning, Sequence Analysis and Expression of Partial HCV Nonstructural Protein 2, 3 Gene

FAN Tao, GAO Jian-en, TAO Qi-min

(*Institute of Hepatology, People's Hospital, Beijing Medical University, Beijing 100044, China*)

Abstract: Complementary DNA of partial HCV NS2-NS3 protein gene which encodes viral Zn^{2+} dependent metalloprotease and serine protease was amplified by RT nested-PCR from serum of a Chinese patient with chronic hepatitis C. The product was digested with *EcoR* I / *Xba* I and cloned into pcDNA3. The nucleotide sequence was determined. Comparison of NS2-NS3 with the reported typical isolates HCV-1, HCV-J, HC-C2, HCV-J6, HCV-J8 showed as 73.72%, 90.20%, 91.02%, 64.56%, 63.37% identity in nucleotide sequence and 83.24%, 92.09%, 93.13%, 70.88%, 67.86% identity in amino acid sequence respectively, so the isolate could be classified as HCV genotype II. This gene fragment was cloned into pBV220 to construct recombinant expression vector pBV220-NS2-3. It was expressed efficiently in *E. coli*. The cloning and expression of HCV NS2-NS3 may contribute to the investigation of the relation between structure and function of viral encoded protease.

Key words: Hepatitis C virus(HCV); Nonstructural protein; Sequencing; Gene expression