

## 庚型肝炎病毒 NS5 cDNA 片段的表达及其免疫原性的研究\*

龚睿<sup>1</sup>, 马辉文<sup>1\*\*</sup>, 童立恒<sup>2</sup>

(1. 武汉大学生命科学院, 湖北武汉 430072;

2. 武汉市生物技术研究开发中心, 湖北武汉 430033)

Expression in *E. Coli* and Antigenicity of HGV NS5 ProteinGONG Rui<sup>1</sup>, MA Hui-wen<sup>1\*\*</sup>, TONG Li-heng<sup>2</sup>

(1. College of Life Sciences, Wuhan University, Wuhan 430072, China;

2. Wuhan R &amp; D Center for Biotechnology, Wuhan 430033, China)

**Abstract:** A 880 bp cDNA localized to the putative NS5 region of HGV genome was expressed in *E. coli* BL21(DE3). The cDNA fragment was inserted into a plasmid pGEX-5X-1, at the downstream of the DNA sequence encoding *Schistosoma japonicum* glutathione S-transferase (GST), in the same reading frame with the gene of GST. A 60KD GST-NS53 fusion protein was expressed at 37°C in a form of inclusion bodies amounting to 30 percent of total host protein whereas at 20°C mainly in a form of soluble protein. The fusion protein was extracted and purified to homologue. The purified GST-NS53 fusion protein could be specifically recognized with either the sera from the patient infected by HGV or the antisera directed against GST.

**Key word:** HGV NS5 protein; Gene expression; Antigenicity

**摘要:** 一段长度为 880 bp 的庚型肝炎病毒 cDNA 在大肠杆菌 BL21(DE3) 菌株中得到表达。此 cDNA 被插入到表达质粒 pGEX-5X-1 中, 位于编码日本血吸虫谷胱甘肽硫转移酶(GST)的 DNA 序列下游, 并与 GST 处于同一阅读框。用乳糖在 37°C 下诱导表达出以包涵体形式存在的 GST-NS53 融合蛋白, 并用脲溶法提取了该蛋白; 在 20°C 诱导时, 表达出的蛋白大部分可溶, 用谷胱甘肽 Sepharose-4B 亲和层析柱对可溶性的融合蛋白进行了纯化。免疫印迹实验证明, 此融合蛋白能被庚型肝炎病人的血清和自制的抗 GST 血清特异性地识别。用 PC gene 软件对 NS53 氨基酸序列的亲水性和抗原决定簇进行了分析。本研究为庚型肝炎 ELISA 诊断试剂研制打下了基础。

**关键词:** 庚肝病毒非结构蛋白; 基因表达; 免疫原性

**中图分类号:** R373.21 **文献标识码:** A **文章编号:** 1003-5125(2001)02-0114-05

庚型肝炎病毒(HGV)是近年来发现的主要经血液、体液传播的单正链 RNA 病毒, 受感染人群遍布世界各地。它与 HCV 同属黄病毒科。其基因组约 9.4 kb, 由单一的阅读框编码约 2 900 个氨基酸的多聚前体蛋白质<sup>[1]</sup>。Leary 等人将根据 cDNA 序列推导出的 HGV 变种 GBV-C 的蛋白质划分为 N

端的 E1 和 E2 包膜蛋白区和其后的 NS1-NS5 五种非结构蛋白区<sup>[2]</sup>。Pilot-Matias 等人报道 GBV-C 的 NS3, NS4, NS5 的基因在大肠杆菌中表达产物具有免疫原性<sup>[3]</sup>。王佑春等采用 RT-PCR 技术从中国庚肝病人血清中克隆出一段长为 880 bp 的 NS5 区 cDNA 片段, 取名为 NS53。

收稿日期: 2000-02-21 修回日期: 2000-12-11

\* 基金项目: 武汉市科委资助项目(976004044)

作者简介: 龚睿(1974-), 男, 湖北省籍, 硕士, 研究方向为基因工程及生物工程下游技术。

\*\* 通讯作者: 马辉文(1943-), 男, 河南省籍, 教授, 博士, 研究方向为基因工程药物。Correspondence author

我们将 NS53 亚克隆入大肠杆菌高效表达载体 pGEX-5X-1 上, 位于编码日本血吸虫谷胱甘肽硫转移酶 (GST) 的序列下游, 获得重组质粒 pGEX-NS53。该质粒在大肠杆菌中可高效表达 GST-NS53 融合蛋白。该融合蛋白在 37℃ 诱导表达时, 以包涵体形式存在, 用脉冲法能简便提取; 在 20℃ 诱导表达时, 大部分可溶, 可通过谷胱甘肽 Sepharose-4B 亲和层析柱纯化。免疫印迹实验表明, 该融合蛋白可被抗 GST 抗体和庚肝病人血清所识别。并用 PC gene 软件分析了 NS53 肽段的亲水性和抗原决定簇。

## 1 材料和方法

### 1.1 菌株, 质粒和试剂

大肠杆菌菌株 DH5 $\alpha$  和 BL21(DE3) 为本研究室保存菌株。质粒 pinpoint<sup>TM</sup>Xal-T NS53 为含有 HGV NS5 区 cDNA 片段的质粒, 由中国药品及生物制品检定所王佑春等人提供。质粒 pGEX-5X-1 和谷胱甘肽亲和柱购自 Pharmacia 公司。

免疫学及分子生物学试剂均购自华美生物工程和 Promega 公司。庚肝病人的血清为采用 RT-PCR 技术确诊的病人血清, 由中国药品及生物制品检定所和同济医院提供。阴性对照血清来自经临床检测非庚肝病人的健康人。

### 1.2 重组质粒的构建

用限制性内切酶 *Bam*H I 和 *Eco*R I 双酶切质粒 pinpoint<sup>TM</sup>Xal-T NS53, 分离出 884 bp 含 NS53 cDNA 的片段。用玻璃奶法回收该片段, 并连接到表达载体 pGEX-5X-1 的相应位点上。转化 *E. coli* DH5 $\alpha$  后, 提取质粒, 经 *Bam*H I、*Eco*R I 和 *Pst*I 酶切鉴定, 得到阳性重组质粒, 命名为 pGEX-NS53。并将该质粒转化入 *E. coli* BL21(DE3) 菌株中, 同样提取质粒酶切鉴定。

### 1.3 重组质粒在 37℃ 和 20℃ 下的诱导表达

将 BL21 pGEX-NS53 单菌落接种于含有氨苄青霉素 (Amp, 100 mg/L) 的 LB 培养液中, 经 37℃ 过夜培养后, 以 1:10 的接种量接种含 Amp 的新鲜 LB 培养液, 在 37℃ 下振荡培养至 OD<sub>600nm</sub> = 1.0, 添加 10% 的乳糖至终浓度为 0.1%, 分别于 37℃ 和 20℃ 下诱导培养 5 h 和 14 h, 收集菌体, 经煮沸裂解后进行 12% SDS-PAGE 检测。

### 1.4 包涵体的提纯及溶解

将经 37℃ 乳糖诱导的 BL21(DE3) pGEX-NS53

菌液离心收获菌体, 按 3 mL/g(湿重) 加入裂解液, 反复冻融后, 超声碎菌。在 4℃ 下, 4 000 r/min 离心 10 min 去除菌体残渣。上清在 4℃ 下, 13 000 r/min 离心 15 min。上清和沉淀分别进行 SDS-PAGE 检测。沉淀用 0.5% Triton-100 和 0.5 mol/L 尿素各洗涤一次后用 8 mol/L 尿素在 25℃ 溶解, 13 000 r/min 离心 15 min, 除去不溶物, 得包涵体溶解液。

### 1.5 在 20℃ 下表达的可溶性蛋白的亲亲和层析纯化

将在 20℃ 下诱导的 BL21(DE3) pGEX-NS53 菌体按 3 mL/g(湿重) 加入含 1 mmol/L EDTA, 0.5 mmol/L PMSF 的 PBS。超声碎菌后, 13 000 r/min 离心 15 min, 上清按照制造商建议的方法过谷胱甘肽亲和层析柱纯化, 洗脱液上样进行 SDS-PAGE 检测。

### 1.6 抗谷胱甘肽硫转移酶 (GST) 血清制备及表达产物的免疫印迹分析

将含有质粒 pGEX-5X-1 的大肠杆菌菌株 DH5 $\alpha$  接种于含 Amp(100 mg/L) 的 LB 培养液中, 在 37℃ 下振荡培养至 OD<sub>600nm</sub> = 1.0 时, 添加 IPTG 至终浓度为 1 mmol/L, 诱导表达 4 h, 4℃ 下收获菌体, 按 3 mL/g(湿重) 加入 PBS, 反复冻融, 超声碎菌, 4 000 r/min 离心 10 min。上清过谷胱甘肽亲和层析柱纯化, 获得纯化的 GST 蛋白。将纯化的 GST 与等量的完全弗氏佐剂混合, 用赵永芳<sup>[4]</sup>描述的方法免疫家兔和制备抗血清。

将经诱导表达的 DH5 $\alpha$  pGEX-5X-1、BL21(DE3) pGEX-NS53 细胞裂解液和纯化的蛋白按 Sambnook 等<sup>[6]</sup>描述的方法进行免疫印迹实验。

### 1.7 表达产物的抗原性分析

以庚肝病人的血清为探针, 以 HRP 标记的羊抗人 IgG 为第二抗体, 对 BL21(DE3) pGEX-NS53 细胞裂解液进行免疫印迹分析。

### 1.8 用 PC gene 软件对 NS53 亲水性和抗原决定簇进行分析

## 2 结果

### 2.1 pGEX-NS53 质粒的构建和鉴定

重组质粒 pGEX-NS53 用 *Bam*H I 和 *Eco*R I 双酶切以及 *Pst*I 单酶切鉴定。双酶切结果表明该重组质粒 *Bam*H I/*Eco*R I 之间有插入片段, 其大小约 0.9 kb, 与用玻璃奶回收的 pinpoint<sup>TM</sup>Xal-T NS53 双酶切小片段大小相当; *Pst*I 酶切所得片段大小分别为 4.1 kb、1.4 kb 和 0.3 kb, 与理论计算值相同。以上结果表明 NS53 cDNA 片段被正确的亚克隆到

质粒 pGEX-5X-1 中。

## 2.2 重组蛋白的表达和纯化

BL21(DE3) pGEX-NS53 分别在 37℃ 和 20℃ 下经乳糖诱导表达,均表达出分子量约为 60 kD 的 GST-NS53 融合蛋白见图 1。两种温度下诱导表达的融合蛋白存在形式见图 2。在 37℃ 下诱导表达的 GST-NS53 融合蛋白绝大部分存在于 13 000 r/min 离心的沉淀中,即主要以包涵体的形式存在,采用离心,洗涤,脲溶法可得到部分提纯,经薄层扫描分析其纯度为 61.9%。在 20℃ 下诱导的 NS53-GST 融合蛋白大部分以可溶性蛋白的形式存在。通过谷胱甘肽亲和柱得到了纯化,其纯度为 92.0%。

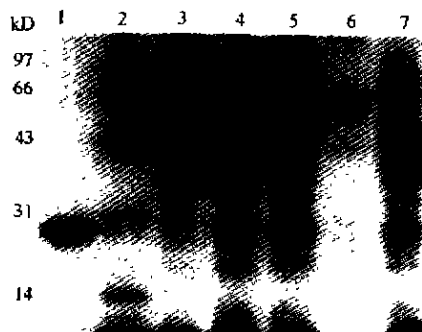


图 1 表达蛋白的 SDS-PAGE 电泳结果

1, 亲和柱纯化的 GST; 2, 蛋白分子量标准; 3, 脲溶的 GST-NS53 包涵体; 4, 37℃ 诱导的 BL21(DE3) pGEX-NS53 细胞裂解液; 5, 20℃ 诱导的 BL21(DE3) pGEX-NS53 细胞裂解液; 6, 亲和柱纯化的 GST-NS53; 7, 未诱导的 BL21(DE3) pGEX-NS53 细胞裂解液

Fig. 1 SDS-PAGE analysis of expressed protein

1, Affinity-purified GST; 2, Protein molecular weight marker; 3, Partially purified inclusion body containing GST-NS53; 4, Lysate of BL21(DE3) pGEX-NS53 induced at 37℃; 5, Lysate of BL21(DE3) pGEX-NS53 induced at 20℃; 6, Affinity-purified GST-NS53; 7, Lysate of BL21(DE3) pGEX-NS53 uninduced

## 2.3 抗 GST 血清对重组蛋白的识别

免疫印迹实验表明,自制的抗 GST 血清能特异性地识别各种条件下表达的重组蛋白,见图 3。GST-NS53 融合蛋白分子量是 60 kD。

## 2.4 GST-NS53 融合蛋白能够被庚肝病人血清识别

以庚肝病人的血清作探针对 GST-NS53 融合蛋白进行了免疫印迹分析,见图 4。结果表明,庚肝病人的血清可特异性地识别经乳糖诱导的 BL21(DE3) pGEX-NS53 细胞裂解液中的 GST-NS53 融合蛋白,分子量约为 60 kD,而经 IPTG 诱导的 DH5αpGEX-5X-1 细胞裂解液中的 GST 对应位置并不显带。

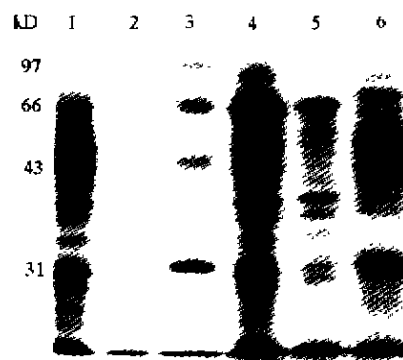


图 2 表达蛋白的存在形式

1, 20℃ 诱导的 BL21(DE3) pGEX-NS53 细胞裂解液上清; 2, 20℃ 诱导的 BL21(DE3) pGEX-NS53 细胞裂解液沉淀; 3, 蛋白分子量标准(97 kD, 66 kD, 43 kD, 31 kD); 4, 37℃ 诱导的 BL21(DE3) pGEX-NS53 细胞裂解液; 5, 37℃ 诱导的 BL21(DE3) pGEX-NS53 细胞裂解液沉淀; 6, 37℃ 诱导的 BL21(DE3) pGEX-NS53 细胞裂解液上清

Fig. 2 Existing forms of expressed protein

1, Supernatant of BL21(DE3) pGEX-NS53 induced at 20℃; 2, Pellet of BL21(DE3) pGEX-NS53 induced at 20℃; 3, Protein molecular weight marker (97 kD, 66 kD, 43 kD, 31 kD); 4, Lysate of BL21(DE3) pGEX-NS53 induced at 37℃; 5, Pellet of BL21(DE3) pGEX-NS53 induced at 37℃; 6, Supernatant of BL21(DE3) pGEX-NS53 induced at 37℃

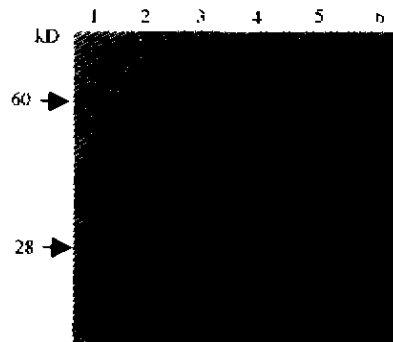


图 3 表达蛋白与抗 GST 血清的免疫反应

1, 20℃ 诱导的 BL21(DE3) pGEX-NS53 细胞裂解液; 2, 亲和柱纯化的 GST-NS53; 3, 37℃ 诱导的 BL21(DE3) pGEX-NS53 细胞裂解液; 4, 脲溶的 GST-NS53 包涵体; 5, 亲和柱纯化的 GST; 6, 未诱导的 BL21(DE3) pGEX-NS53 细胞裂解液

Fig. 3 Western-blot of expressed protein probed with anti-GST serum  
1, Lysate of BL21(DE3) pGEX-NS53 induced at 20℃; 2, Affinity-purified GST-NS53; 3, Lysate of BL21(DE3) pGEX-NS53 induced at 37℃; 4, Partially purified inclusion body containing GST-NS53; 5, Affinity-purified GST; 6, Lysate of BL21(DE3) pGEX-NS53 uninduced

## 2.5 PC gene 软件对 NS53 亲水性和抗原决定簇分析

根据 Hopp 等人<sup>[6]</sup>的研究,蛋白质的抗原决定

簇应位于其氨基酸序列中亲水性较高的区域。应用核酸蛋白质分析软件 PC gene 对 NS53 亲水性和抗原决定簇分析结果表明 NS53 多肽中第 225~230 的 ESEEKR, 第 121~126 位的 ETEDSE 和第 192~198 位的 ESSSDEK 为最高亲水区, 这三个区域极可能是 NS53 多肽上的抗原决定簇。



图4 GST-NS53 融合蛋白与庚肝病人血清的免疫印迹反应

1. 以庚肝病人血清为探针针对 IPTG 诱导的 DH5 $\alpha$  pGEX-5X-1 细胞裂解液; 2. 以健康人血清为探针针对乳糖诱导的 BL21(DE3) pGEX-NS53 细胞裂解液; 3. 以庚肝病人血清为探针针对乳糖诱导的 BL21(DE3) pGEX-NS53 细胞裂解液; 4. 蛋白质分子量标准(氨基黑染色<sup>[11]</sup>)

Fig 4 Analysis of GST-NS53 fusion protein by western blot

1. Lysate of DH5 $\alpha$  pGEX-5X-1 induced with IPTG probed with serum from hepatitis G patient; 2. Lysate of BL21(DE3) pGEX-NS53 induced with Lactose probed with serum from healthy human; 3. Lysate of BL21(DE3) pGEX-NS53 induced with Lactose probed with serum from hepatitis G patient; 4. Protein molecular weight marker (stained with amino black<sup>[11]</sup>).

### 3 讨论

在重组质粒 pinpoint<sup>TM</sup> Xal-T NS53 中, 编码 NS53 的 DNA 序列与质粒编码生物素化蛋白的序列不在同一阅读框, 不能正确表达 NS53。通过 BamHI 和 EcoRI 酶切将 NS53 亚克隆入 pGEX-5X-1 后, NS53 与该质粒编码 GST 的序列同框, 这样不仅能正确表达 NS53, 而且 GST-NS53 以融合蛋白形式存在, 表达量高, 表达产物稳定, 可用易获得的 GST 抗体对表达产物进行初检。可溶性的 GST-NS53 融合蛋白可以简便地用谷胱甘肽亲和柱纯

化。

按常规方法在 37 $^{\circ}$ C 下诱导表达的 GST-NS53 融合蛋白主要以包涵体形式存在, 用脲溶法可部分纯化, 但纯度不高, 且易使目的蛋白变性, 从而影响了其免疫原性。该融合蛋白分子量大, 变性后复性较困难。有文献报道降低表达时的培养温度可以提高可溶性蛋白的比例<sup>[7]</sup>。我们尝试在 37、35、30、25、20 $^{\circ}$ C 下诱导和不同的诱导表达时间, 发现在 25 $^{\circ}$ C 以上的温度下诱导时, 融合蛋白主要以包涵体的形式存在; 在 20 $^{\circ}$ C 下诱导表达 14-16 h, GST-NS53 融合蛋白的表达量虽然比 37 $^{\circ}$ C 下表达量低(前者约占细胞蛋白总量的 11.1%, 后者占 28.9%), 但大部分以可溶性的形式存在于细胞中, 因此很容易通过谷胱甘肽亲和层析从细胞裂解液中一步纯化, 并保持其蛋白质的天然构象和良好的免疫原性。在 20 $^{\circ}$ C 下诱导 pGEX 重组质粒表达可溶的融合蛋白目前尚未见报道。

对 GST-NS53 融合蛋白的抗原性检测结果表明, 用本表达系统表达和提纯的 GST-NS53 融合蛋白中的 NS53 肽段有很好的免疫原性, 能被确诊的庚肝病人阳性血清识别, 而 GST 的存在对免疫识别反应并无干扰(无交叉反应)。若需要纯净的 NS53 蛋白, 可用 Factor Xa 酶解去除融合蛋白中的 GST 部分<sup>[8]</sup>。

PC gene 分析表明 NS53 的高疏水区较多。这可能是导致该蛋白水溶性差的原因之一。NS53 的疏水区主要在 N 端和 C 端, 若截短 NS53, 去除部分疏水性氨基酸的编码序列, 将有助于改善所表达蛋白的溶解性而不影响其抗原决定簇。

HGV 与 HCV 十分相似, 但 HGV 却不具有象存在于 HCV 衣壳蛋白中的强线性抗原表位<sup>[2]</sup>。HGV 的蛋白质对宿主的免疫性较差<sup>[9]</sup>, 因此用免疫方法诊断庚肝比诊断丙肝困难。目前, 在实验室诊断方面, 除依靠 RT-PCR 外, 还有以 CHO 细胞和昆虫细胞表达的 E2 蛋白为抗原, 用 ELISA 法检测血清中抗病毒抗体<sup>[10, 11]</sup>。但当抗 E2 膜蛋白的抗体出现后, 病毒很快受到抑制或清除, 所以抗 E2 抗体仅可作为病毒清除的标志<sup>[12]</sup>。然而, 由于非结构蛋白诱发的抗体往往与病毒 RNA 同时存在, 因此可考虑作为临床诊断病毒感染的一项指标。表达 NS53 区的 cDNA 片段并确定其免疫原性对建立 HGV 免疫学诊断系统有重要的意义。

## 参考文献

- [1] Linnen J, Wages J, Zhang K Z, *et al*. Molecular cloning and disease association of Hepatitis G Virus; A transfusion-transmissible agent[J]. *Science*, 1996, 271, 505 - 508.
- [2] Leary T P, Muerhoff S A, 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]. *J Med Virol*, 1996, 48:60 - 67.
- [3] Pilot-Matias T J, Muerhoff S A, Simons F N, *et al*. Identification of antigenic regions in the GB Hepatitis Viruses GBV-A, GBV-B, GBV-C[J]. *J Med Virol*, 1996, 48:329 - 333.
- [4] 赵永芳. 生物化学技术原理及其应用[M]. 武汉:武汉大学出版社, 1994.
- [5] Sambrook J, Fritsch E. F., Maniatis T. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual* (2nd ed)[M]. Cold Spring Harbor: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989.
- [6] Hopp T P, Woods K R. Prediction of protein antigenic determinants from amino acid sequences[J]. *Proc Natl Acad Sci*, 1981, 78(6):3824 - 3828.
- [7] Schein C H. Production of soluble recombinant proteins in the cytosol[J]. *Biotechnology*, 1989, 7: 1141 - 1147.
- [8] 颜子颖, 王海林. 精编分子生物学实验指南[M]. 北京: 科学出版社, 1998.
- [9] Sato K, Tana K T, Okamoto H, *et al*. Association of circulating Hepatitis G Virus with lipoproteins for a lack of binding with antibodies [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 1996, 229: 719 - 725.
- [10] Robim A G, George J D, Isa KM. Elisa for detection of antibody to the E2 Protein of GB Virus C[J]. *J Virol Meth* 1997, 69:1 - 6.
- [11] 朱诗应, 潘卫, 戚中田. 庚型肝炎病毒包膜糖蛋白 E2 基因在昆虫细胞中的表达[J]. *中国病毒学*, 1999, 14(2):135 - 139.
- [12] Pilot-Matias T J, Carrick R T, Coleman P F, *et al*. Expression of the GB Virus C E2 glycoprotein using the Semliki Forest virus vector system and its utility as serologic marker[J]. *Virology*, 1996, 225:282 - 292.
- [13] Horlow E D, David L. *Antibodies: A Laboratory Manual* [M]. Cold Spring Harbor: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1988.