维普资讯 http://www.cqvip.com

第16卷3期 中国病毒学 16(3):283-285
2001年9月 VIROLOGICA SINICA September 2001

丙型肝炎病毒CS,NS3 NS4区抗原融合基因的构建及其在大肠杆菌中的表达*

李铭[1],沈小川[2],林娇娇[1],倪振亚[1],苑纯秀[1],刘金明[1],
杨冠珍[2],蔡幼民[1]**,吴祥甫[2]**
(1.上海动物生物技术研究中心,中国农业科学院上海家畜寄生虫病研究所,农业部动物寄生虫学重点开放实验室,上海 200232; 2.中国科学院上海生化研究所,上海 200031)

Construction of a Chimeric Gene encoding Core, NS3 and NS4 Region Antigens of Hepatitis C Virus and Its Expression

LI Ming[1], SHEN Xiao-chuan[2], LIN Jiao-jiao[1], NI Zhen-ya[1], YUAN Chun-xiou[1], LIU Jin-ming[1], YANG Guan-zhen[2], CAI You-min[1]**, WU Xiang-fu[2]**
(*1. Shanghai Research Center for Animal Biotechnology, Shanghai Instghai Institute of Animal Parasitology, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Shanghai 200322, China; 2. Shanhai Institute of Biochemistry, Chinese Academy of Sciences; Shanghai 200031, China*)

Abstract: DNA fragments of Core(300bp) and NS4(400bp), encoding the nucleocapsid region(Core) protein CS and nonstructural region(NS4) protein NS4a of HCV, have been obtained from HCV genome by PCR, both of the two fragments were liked with C33c(700bp) and formed a chineric gene C33c-Core-NS4(HCV-CCN). The chimeric gene was recombined with expression vector pET24a(+) and was expressed in *Escherichia coli*. The expressed protein was purified by Ni(+)NTB affinity chromatography. Its molecular weight was about 58kD. Western blotting analysis showed that the chimerical antigen had good antigenicity, which could play an important role in anti-HCV assay.

Key words: Hepatitis C virus(HCV); Fusion gene; Protein expression; Western blotting analysis
关键词:丙型肝炎病毒(HCV);融合基因;蛋白表达;免疫印迹试验
中图分类号:R512.63 **文献标识码**:A **文章编号**:1003-5125(2001)03-0283-03

丙型肝炎病毒是与输血有关的非甲非乙肝病毒[1];是全世界输血后获得性肝炎的重要病因之一,并与急慢性肝炎、肝硬化和肝癌有关。由于主要通过输血的传播,会给人民的身体健康尤其输血事业带来极大危害。

采用基因工程技术,表达含有多段抗原的融合蛋白作为HCV检测试剂的抗原,可以简化多种抗原的表达及纯化过程,并提高了试剂的均一性[2]。研究表明,在HCV的抗原基因中,核心蛋白Core、NS3区的C33c抗原、NS4区基因编码的抗原免疫原性最强,相应抗体出现早,分布广,亲和力强。因此,我们构建了含有中国人HCV序列的Core、C33c及NS4抗原的融合基因,并在大肠杆菌中表达了融合蛋白。该融合蛋白具有良好的抗原性,有望发展成为新型HCV酶联免疫诊断试剂盒。

1 材料与方法

1.1 菌株与质粒

大肠杆菌TG1和BL21(DE3),质粒PSK(+),PET24a(+)、HCV-NK、PET-C33c由中科院上海生

收稿日期:2000-06-29,修回日期:2000-12-14
* 基金项目:上海市科技兴农重点攻关项目(农科攻字2000第5-8号)
作者简介:李铭(1973-),女,黑龙江省籍,硕士,从事病毒分子生物学研究。
** 通讯作者:吴祥甫(1936-),男,浙江省籍,研究员,从事病毒分子生物学研究。
蔡幼民(1940-),男,江苏省籍,研究员,从事分子生物学研究。Correspondence author.

维普资讯 http://www.cqvip.com

化所218组保存。

1.2 PCR引物

根据现已报道的中国人丙型肝炎病毒序列[3]设计核心蛋白Core区CS多肽基因的上游和下游引物P_1,P_2及非结构蛋白NS4区NS4a抗原基因的上游和下游引物P_1,P_2。为了便于克隆和表达,在Core区引物P_1和P_2的两端分别设计了*Bam*H I和*Eco*R I位点;在NS4区引物P_1和P_2的两端分别设计了*Eco*R I和*Xho* I位点。在2个P_1的5'端分别添加了4个间隔氨基酸Gly-Gly-Gly-Gly的密码子。引物均由中国科学院上海生物工程研究中心合成。

1.3 聚合酶链反应(PCR)

以HCV全长基因(HCV-NK)为模板进行。反应条件为:94℃1min,55℃40s,72℃1min,共30个循环、循环结束后自动延伸10min.

1.4 PCR产物的克隆和鉴定

将2种PCR产物利用产物两端的位点,参照文献[4]的方法,分别克隆到pAK(+)质粒上.按USB测序试剂盒说明书操作,测定其核甘酸序列,与文献报道序列[3]相比较鉴定。

1.5 融合基因的构建

分别用*Xba* I和*Bam*H I,*Bam*H I和*Eco*R I、*Eco*R I和*Xho* I从相应的重组质粒上切出C33c,Core和NS4片段,以C33c-Core-NS4顺序插入到pET24a(+)质粒中,使片段均正确连接。

1.6 融合基因在大肠杆菌中的表达

将含融合基因的重组质粒转化表达宿主菌BL21(DE3),按常规方法诱导表达[4],制备菌体蛋白。同时制备可溶组分和包含体成分。进行SDS-PAGE凝胶电泳分析。用抗His的单抗进行免疫印迹试验鉴定6×His融合蛋白。

1.7 融合基因表达产物的纯化

融合基因表达产物与载体pET24a中的6×His融合蛋白,可选用Ni(+)-NTB亲和柱纯化。

1.8 融合蛋白抗原性测定

将人HCV阳性血清与重组表达产物进行免疫印迹反应,鉴定表达产物的抗原性。

2 结果与讨论

2.1 抗原基因的克隆及鉴定

以中国人HCV全长基因为模板,根据Core和NS4区优势抗原簇基因序列设计引物,用PCR方法扩增出一条300bp左右的片段和一条400bp左右的片段,分别将它们克隆到pSK(+)质粒上(图1).经测序分析证明所获片段基因序列与文献报道序列相一致.

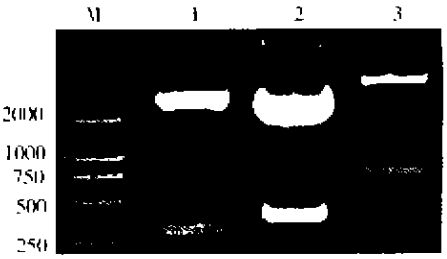

图1 pSK-Core,pSK-NS4和pET-C33c限制酶分析

Fig.1 Restriction endonuclease analysis of 1 pSK-Core, pSK-NS4 and pET-C33c

M,marker;1,pSK-Core/*Bam*H I + *Eco*R I;2,pSK-NS4/*Eco*R I + *Xho* I;3,pET-C33c/*Xba* I + *Bam*H I

2.2 融合基因的构建

将C33c基因用*Xba* I和*Bam*H I,Core基因用*Bam*H I和*Eco*R I,NS4基因用*Eco*R I和*Xho* I分别从相应重组质粒中切出、插入到质粒pET24a(+)中的相应位点(图2),该重组质粒称为PET-CCN。

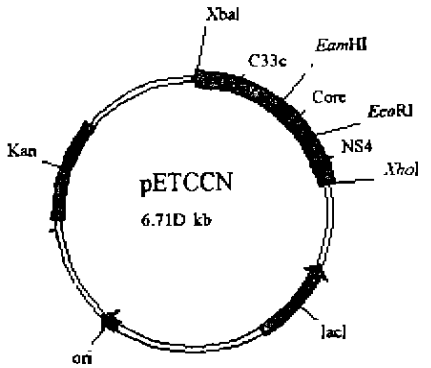

图2 NS3,Core和NS4区抗原融合基因的构建

Fig.2 Construction of the fusion gene of NS3, Core and NS4 antigens (CCN)

2.3 融合基因的表达

该融合基因C33c-Core-NS4的重组质粒PET-CCN在大肠杆菌BL21(DE3)中表达(图3)。与对照相比较,表达菌的SDS-PAGE图谱上于58kD处有1条明显的蛋白条带、与预计分子量一致。但在40和18kD处也有2条蛋白条带。表达产物基本上以不溶性包涵体存在。用抗His的单抗和HCV阳性血清分别进行免疫印迹试验鉴定融合蛋白,表明部分表达蛋白在近N端降解为18kD和40kD蛋白(图4、图5)。但是当表达蛋白纯化后,在4℃放置一周后仍未有明显降解。说明融合蛋白是在菌体内部被部

维普资讯 http://www.cqvip.com

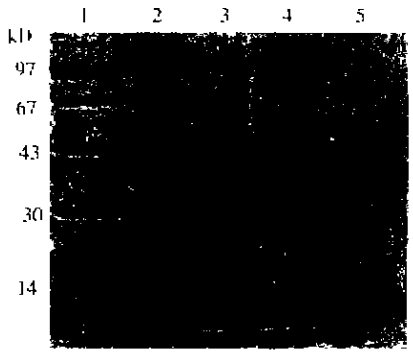

图 3　融合基因表达产物的 SKS-PAGE 凝胶电泳

Fig.3　SDS-PAGE pattern of pET-CCN expression product

1, Protein marker; 2, pET24a(+)/BL2I; 3, pET-CCN/BL2I in induction time 0h; 4, pET-CCN/BL21 in induction time 4h; 5, Purified HCV-CCN protein

分降解，但纯化后是比较稳定的。

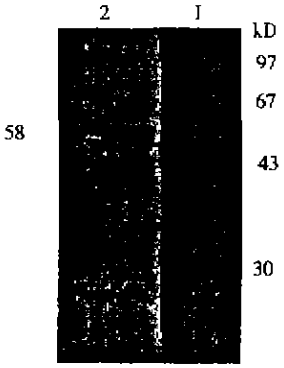

图 4　用抗 His 的单抗识别 6 × His 融合蛋白的免疫印迹试验

Fig.4　Western blot analysis of 6 × His fusion protein with anti-His monoclonal antibodies

1, Protein marker; 2, pET-CCN/BL21.

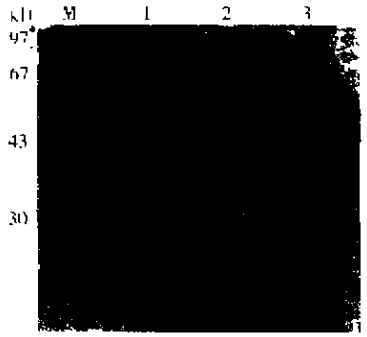

图 5　免疫印迹试验，用人 HCV 阳性血清识别 HCV 三段抗原融合基因(HCV-CCN)

Fig.5　Western blot analysis of three HCV antigens fusion protein (HCV-CCN) with human anti-HCV positive serum

M, protein marker; 1, pET-24a/BL21; 2, pET-CCN/BL21; 3, Purified HCV-CCN

2.4　表达产物的纯化

表达产物用 Ni(+)-NTB 亲和柱纯化后，进行 SDS—PAGE 分析(图 3)。纯度可达 95%以上。根据紫外分光光度法 A_{280} 值计算，重组表达产物的纯化表达量为 30mg/L 大肠杆菌培养物。参于融合的 pET-6 × His 蛋白很小，不会影响重组蛋白的抗原性、却十分利于融合蛋白的纯化和鉴定。

2.5　表达产物的抗原性分析

以重组质粒表达菌及纯化产物作抗原与人 HCV 阳性血清进行免疫印迹试验，表达菌和纯化产物在 58kD 处均有明显的反应条带(图 5)，说明该融合蛋白具有较强的抗原性。在 HCV 抗原中 Core 和 C33c 抗原免疫原性强，相应抗体出现早、分布广，其联合检出率可达 99%左右[5]。NS4 抗原免疫原性是最强的，但抗体出现较晚。采用上述三种抗原基本上可检测出所有的 HCV 阳性感染血清样品[2]。因此本研究构建了含有 Core 区，NS3 区及 NS4 区优势抗原决定簇基因的融合表达质粒。包括 Core 区 CS 多肽、NS3 区完整的 C33c 抗原及 NS4 区 NS4a 抗原，基因片段的大小不同于国内外其它同类试剂。在不降低抗原性的基础上，减少蛋白分子量，可使其在大肠杆菌中的表达量提高，并增加稳定性。在 C33c 与 Core 之间，Core 之间，Core 与 NS4 之间，加入 Gly-Gly-Gly-Gly 柔性连接肽，有利于保持各抗原之间的灵活性和免疫原性。本研究成功地研制了重组嵌合抗原 HCV-CCN，初步的免疫印迹试验表明该融合抗原具有良好的抗原性，可望成为新型 HCV 酶联免疫诊断试剂的优选抗原。

参考文献

[1] Chao Q L, Kuo G, Weiner A J, *et al*. Isolation of a cDNA clone derived from a blood-borne non-A non-B viral hepatitis genome[J]. Science, 1989, 244-259.

[2] Chien D Y, Choo Q L, Tabrizi A, *et al*. Diagnosis of hepatitis C virus (HCV) infection using an immunodominant chimeric polyprotein to capture circulating antibodies. Reevaluation of the real of HCV in liver disease[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 1992, 89: 10011-10015.

[3] 毕胜利，白宪鹤，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.

[4] Sambrook J, Fritsch E F, Maniatis T. Molecular cloning: A Laboratory Manual[M]. 2nded, New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989.

[5] 杨永平，江永珍、毕胜利，等. 丙型肝炎病毒基因组 C 区和 NS3 区基因的融合及其在大肠杆菌中的表达及初步应用[J]. 病毒学报，1994，10(8)：229-234.