维普资讯 http://www.cqvip.com

第17卷 1期
2002年2月

中 国 病 毒 学
VIROLOGICA SINICA

17(1):60－65
February 2002

# 丙型肝炎病毒NS5A基因在昆虫细胞中的表达及其分布研究*

冯磊，叶林柏**，阮华，郜金荣，徐进平，刘源洁，吴正辉
（武汉大学病毒研究所，武汉 430072）

# Study on Expression and Location of Hepatitis C Virus NS5A Protein in Insect Cells

FENG Lei, YE Lin-bai**, RUAN Hua, GAO Jin-rong, XU Jin-ping, LIU Yuan-jie, WU Zheng-hui
(*Institute of Virology, Wuhan University, Hubei, Wuhan* 430072, *China*)

**Abstract**: Full-length NS5A gene of Hepatitis C Virus was amplified by PCR, using plasmid pBAC25 containing HCV nonstructural protein genes as template. The amplified fragment (about 1.34kb) was cloned into transfer plasmid pBuleBacHisA. The recombinant plasmid DNA was cotransfected with genome DNA of wild type AcNPV to SF-9 insect cells. The recombinant baculovirus AcNS5A was obtained by plaque selection. Restriction analysis and PCR identification indicated that the NS5A gene was integrated into the genome of AcNS5A, and HCV NS5A gene was expressed as a 64kD protein in SF-9 cells infected with AcNS5A. This protein can be recognized by anti-NS5A antibody when identified by Western-blot. The Immune fluorescence assay and immune histo-chemistry assay were used to study the distribution of NS5A protein inside the cell. Distribution of NS5A protein are changed with the time in the recombinant virus infected SF-9 cells. NS5A protein are changed with the time in the recombinant virus infected SF-9 cells. NS5A protein is located at the cell membrance at 24 hours post infection and located at both the membrance and the nucleus after 48 hours, and full of the cells after 72 hours. The result suggests that NS5A protein was located on plasma membrance and in nucleus, it may play an important role in RNA replication and in controlling the expression of the cell genes during the replication of the virus.

**Key words**: HCV; NS5A; Expression; Immune fluorescence assay; Immune histo-assay

**摘要**：应用PCR方法从含有丙肝病毒全部非结构蛋白基因的质粒pBAC25中扩增出全长的NS5A基因DNA片段（约1.34kb），PCR扩增NS5A基因片段克隆到转移载体pBlueBacHisA中。重组转移质粒pBlueBacHis5A DNA与野生型杆状病毒(AcNPV)DNA共转染SF-9昆虫细胞，通过空斑纯化获得带有NS5A基因的重组病AcNS5A。对重组病毒基因组DNA进行酶切和PCR鉴定，证实HCV NS5A基因已插入重组病毒基因组中。AcNS5A感染SF-9细胞后，在细胞中表达出一条64kD的蛋白，用Western-blot分析，结果表明这种蛋白与抗HCV HS5A特异性抗体发生强烈反应，说明NS5A基因已在细胞中得到表达，应用免疫荧光技术与免疫组化技术进一步研究NS5A蛋白在昆虫细胞中不同时间的表达情况及其分布，结果表明，NS5A蛋白在AcNS5A重组病毒感染细胞24h后主要分布在细胞质膜上，而在48h后则同时分布于细胞质膜和细胞核内，在72h则完全布满整个细胞，我们认为NS5A蛋白定位于质膜和细胞核中，暗示着在病毒复制过程中NS5A蛋白可能参与病毒RNA在质膜上复制和细胞基因表达的调控。

**关键词**：NCV；NS5A；表达；免疫荧光；免疫组化

收稿日期：2001-07-20，修回日期：2001-07-16
* 基金项目：国家自然科学基金资助项目(30070175)
作者简介：冯磊(1973-)，男，河北石家庄籍，硕士研究生，从事医学病毒学研究。
** 通讯作者：叶林柏(1948-)，男，教授，从事医学病毒学研究。Correspondence author.

维普资讯 http://www.cqvip.com



中图分类号:Q78 文章标识码:A 文章编号:1003-5125(2002)01-0060-06

丙型肝炎病毒(HCV)是引起非甲非乙型肝炎的主要病原因子,可以引起急性感染和慢性肝炎,而HCV急性感染后约50%以上患者发展为慢性感染,并最终有20%的患者可能发展为肝硬化和肝癌[1]。迄今为止,对HCV慢性感染尚无高效特异性治疗方法,寻求一种预防和治疗HCV感染的方法迫在眉睫。HCV属黄病毒科,基因组为长约9.5kb的正链RNA,含有一个大的开放阅读框架,翻译产生长为3 000多个氨基酸的聚蛋白。在宿主蛋白酶及病毒编码的蛋白酶作用下,聚蛋白被切割为Core, E1, E2, P7, NS2, NS3, NS4A, NS4B, NS5A, NS5B 10种蛋白。其中NS5B为依赖于RNA的RNA多聚酶,非结构蛋白NS5A是一种由447个氨基酸组成的磷酸化蛋白、有磷酸化和超磷酸化两种形式,中间含有核定位序列,分子量为56kD/58kD[2,3],NS5A蛋白可降低干扰素治疗效果[9],人们推测它在HCV RNA复制过程中可能起一定的作用[10,11]。我们利用杆状病毒为高效表达载体,在昆虫细胞中表达HCV的NS5A基因,并且通过免疫荧光与免疫组化试验探讨了NS5A蛋白在昆虫细胞中的表达时间与分布,结果表明5A蛋白可定位于质膜和细胞核中,推测5A蛋白可能在病毒感染和复制过程中参与病毒RNA复制和细胞基因表达的调控。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

1.1.1 细胞 SF-9(Spodoptera frugiperda 9)细胞为本实验室保存,在含有10%胎牛血清(杭州四季青),100μg/mL氨苄青霉素的TC-100(GIBCO)培养基中27℃培养和传代。

1.1.2 酶及生化试剂 各种酶和生化试剂主要购自Promega、GIBCO BRL、华美等公司。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 病毒 野生型AcNPV为本实验室保存。

1.1.4 质粒 携带HCV全长非结构基因的质粒pBAC25由意大利De Francesco教授赠送;质粒pBlueBacHisA为本实验室保存。

1.1.5 检测用抗原、NS5A抗体及第二抗体 5A抗原为本实验室在*E. coli*中表达并纯化的HCV NS5A蛋白,HCV NS5A单克隆抗体由Charle M. Rice教授惠赠,羊抗兔IgG-HRP为华美生物工程公司产品。

1.1.6 实验动物 昆明种纯系兔由武汉大学生科院实验动物饲养中心提供。

1.1.7 菌株 大肠杆菌(*E. coli*)JM 109和DH5α菌株为本实验室保存。

1.1.8 免疫荧光和免疫组化主要试剂 异硫氰基荧光素(FITC)为Sigma产品(激发波长为497nm,发射波长为516nm);Histostain TM-Plus Kits为ZYMED公司产品;浓缩型DAB试剂盒为北京中山生物技术公司产品;抗原修复液1:柠檬酸盐缓冲液(储备液A:0.1mol/L柠檬酸溶液;储备液B:0.1mol/L柠檬酸钠溶液;工作液:9mLA+41mLB+450mL双蒸水,pH6.0±0.1);抗原修复液2:胰蛋白酶修复液:0.05g或0.1g胰酶溶于100mL0.05%或0.1%pH7.8$CaCl_2$溶液中。

### 1.2 方法

1.2.1 NS5A基因的扩增和重组转移质粒pBlueBacHis5A的构建 以pBAC25质粒DNA为模板,用常规PCR方法扩增出NS5A基因。上游引物为:5'-TTGCTCGAGATCTGCATGTCCGGCTCGTGG3';下游引物为:5'-TGGTACCAAGCTTCATGAGCAGCA3'。NS5A基因克隆到pBlueBacHisA质粒按照常规方法进行。用*Bgl* Ⅱ、*Hin*dⅢ双酶消化NS5A DNA片段和pBlueBacHisA质粒。然后用低熔点琼脂糖凝胶分别电泳回收;将回收的NS5A和pBlueBacHisA NDA进行连接后,转化DH5α菌株,通过*Bgl* Ⅱ、*Hin*d Ⅲ双酶消化鉴定重组质粒pBlueBacHis5A。

1.2.2 病毒DNA的提取 病毒按5PFU/cell感染细胞,感染72h后,收集培养液,4000r/min离心去除细胞及碎片。感染上清(含胞外病毒粒子)经12000r/min离心1h,沉淀悬浮于TE溶液(25mmol/L Tris. HCI pH8.0, 10mmol/L EDTA),加入10%SDS和蛋白酶K至终浓度分别为1%和0.5mg/mL,37℃保温2h。苯酚—氯仿抽提3—4次,加入十分之一体积3mol/L乙酸钠溶液(pH7.0),乙醇沉淀。

1.2.3 重组病毒的构建 DNA共转染采用lipofectin方法,转移载体DNA与野生型AcNPV DNA

维普资讯 http://www.cqvip.com



分子数之比为 20:1。转染 5d 后，收集上清作空斑分离，空斑分离在细胞培养Ⅲ中进行，细胞用 5-10μg 含病毒的上清感染 1.5h 后，用培养液洗 2～3 次。用 TC-100 培养基(含 10% 胎牛血清)配制的 1% 低熔点琼脂糖覆盖细胞，27℃ 培养 3～4d 后加入含 x-Gal 的上层琼脂，27℃ 继续培养 1～2d，挑出蓝色空斑，继续进行空斑纯化，经 3～4 次空斑纯化后，得到重组病毒的分离株，命名为 AcNS5A。

1.2.4 重组病毒 DNA 的酶切及 PCR 鉴定 分别从感染上清中提取重组病毒 AcNS5A DNA 及野生型 AcNPV DNA，然后用 *Bgl* Ⅱ和 *Hin*d Ⅲ酶切消化。同时以 AcNS5A DNA 为模板进行 PCR，其反应产物与上述两种酶切产物一起在 0.8% 琼脂糖凝胶中电泳。紫外灯下观察结果。

1.2.5 SDS-PAGE 及 Western-blot 病毒按 5 个 PFU 感染 SF-9 细胞，27℃ 培养 72h 后收获受染细胞，进行 12% 聚丙烯酰胺凝胶电泳。切下一半凝胶用考马斯亮蓝 R-250 染色后照相，另一半用于 Western-blot。转移后的尼龙膜用 4% 脱脂牛奶封闭。将兔抗 HCV NS5A 抗体在使用前用 PBS (pH7.5)稀释 200 倍，以 HRP 标记的山羊抗兔 IgG 为第二抗体，DAB-过氧化氢系统显色。

1.2.6 NS5A 蛋白抗体的制备 活化本实验室保存的 JM109 5A 工程菌种[13]，在 IPTG 诱导 8h NS5A 蛋白的表达量最高时离心收集菌体。经超声波破碎后，16 000r/min 离心去沉淀，取上清，用 Ni 金属离子螯合层析柱柱层析纯化，收集含 NS5A 蛋白的洗脱液，用 PEG6 000 浓缩 20 倍，SDS-PAGE 检查，只有一条分子量为 58kD 的 NS5A 蛋白带。将获得的 NS5A 蛋白经用生理盐水充分透析后，采用多点注射免疫兔子。初次免疫后，再加强免疫两次，两次间隔为 7d，每次免疫剂量为每只 100μg 蛋白。另外选取类似体重的同种的昆明种纯系兔用同样的方法注射生理盐水作为阴性对照。在抗体水平达到最高值时，耳静脉取血制备血清，用分步硫酸铵盐析分离法[12]在兔血清中收获 NS5A 蛋白的抗体并提高纯度。用 752 型分光光度计在 280nm 波长下检测 NS5A 蛋白抗体的浓度，4℃ 保存备用。

1.2.7 NS5A 蛋白抗体的荧光标记 把 NS5A 蛋白抗体溶于 1×PBS 中成 1mg/mL，置于透析袋中，将透析袋放入含 FITC 的缓冲液中 4℃ 浸泡 18－24h，然后用 Sephadex-G25 过柱，去除未结合的 FITC，获得荧光素 FITC 体外标记的 NS5A 蛋白抗体，用锡箔纸包裹，4℃ 保存备用。

1.2.8 免疫荧光试验 用 AcNS5A 病毒感染正常的 SF-9 昆虫细胞，分别于 24h，48h，72h 低速离心收集细胞，同时在相同条件下野生型 AcNPV 病毒感染 SF-9 昆虫细胞培养后收集作为对照。用 2% 多聚甲醛将细胞在 4℃ 固定 30min，离心吸去固定液，然后用含 0.1% Triton-X100 的 1×PBS 室温处理 10min。用 1×PBS 重悬细胞，经 PBS 充分洗涤后，加入经 FITC 体外标记的 NS5A 蛋白抗体，在 4℃ 反应 1h。用 PBS 洗涤三次，重悬于 PBS 中，将细胞悬液滴于多聚-L-赖氨酸覆层的载玻片上，加上盖玻片，在荧光显微镜下观察结果。

1.2.9 免疫组化实验 将感染了 AcNS5A 病毒 24、48 和 72h 的 SF-9 昆虫细胞低速离心收集，用 4% 多聚甲醛(pH7.3)固定过夜，1×PBS 洗涤，经梯度乙醇脱水等处理后，石蜡包埋并用石蜡切片机制备 5um 厚度连续切片，48℃～50℃ 展片，捞片后 60℃ 过夜，使组织牢固附着在玻片上。进行脱蜡，脱水，灭活内源性过氧化物酶，抗原修复及封闭过程后，滴加兔抗 HCV NS5A 的抗体进行反应，洗涤后滴加生物素标记的羊抗兔 IgG 进行反应；洗涤后，再滴加 HRP-链霉卵白素工作液反应；洗涤后再用 DAB 显色底物进行显色，流水冲片后，苏木素轻度复染，0.5% 盐酸酒精分色、经冲洗、返蓝、脱水，透明后中性树脂封片，显微镜下观察结果。

## 2 结果

### 2.1 NS5A 基因的扩增和重组转移载体 pBlueBacHis5A 的构建

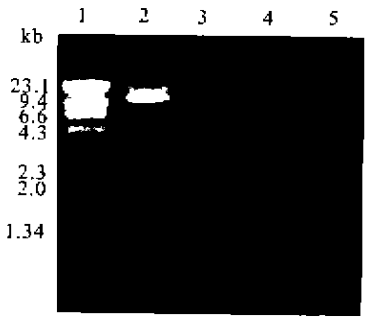


图 1 重组转移载体 pBlueBacHis5A 的鉴定

Fig.1 The Identification of the recombinant plasmid pBlueBacHis5A

Lane 1, λDNA/*Hin*dⅢ Marker; Lane 2, pBlueBacHis5A/*Bgl* Ⅱ + *Hin*d Ⅲ; Lane 3, pBlueBacHis5A/*Hin*d Ⅲ; Lane 4, pBlueBacHisA/*Bgl* Ⅱ + *Hin*dⅢ; Lane 5, PS5A PCR 片段

维普资讯 http://www.cqvip.com



长约 1.34kb 的 NS5A PCR 片段用 *Bgl* Ⅱ 和 *Hin*dⅢ 消化后,被定向克隆到转移质粒 pBlueBacHis5A(10.3kb)的多克隆位点上。重组转移质粒 pBlueBacHis5A 经酶切鉴定表明外源片段插入的方向和大小正确(图 1)。

**2.2　重组病毒 AcNS5A 的构建**

将含有 HCV NS5A 基因的重组转移质粒 pBlueBacHis5A 与野生型 AcNPV DNA 共转染 SF-9 昆虫细胞,转移质粒上 AcNPV 多角体基因的同源序列与 AcNPV 基因组上多角体基因在细胞内发生同源重组,HCV NS5A 基因被转移到 AcNPV 基因组中,取代了原来的多角体蛋白基因编码区,其表达受到多角体蛋白基因启动子的控制,所获得含有 HCV NS5A 基因的重组病毒被命名为 AcNS5A。重组病毒经四次空斑分离而得以纯化。在未纯化的重组病毒感染 SF-9 细胞所产生的蓝斑中,蓝色细胞内仍有多角体的出现,由纯化的重组病毒感染 SF-9 细胞,细胞中已不再有多角体存在。

**2.3　重组病毒 AcNS5A DNA 的酶切及 PCR 鉴定**

提取野生型 AcNPV 和重组病毒 AcNS5A DNA,分别用 *Bgl* Ⅱ 和 *Hin*dⅢ 双酶消化,同时以 AcNS5A DNA 为模板进行 PCR,将上述三种产物在 0.8% 的琼脂糖凝胶中电泳。紫外观察可见,在双酶消化 AcNS5A DNA 的产物中比双酶消化 AcDPV DNA 的产物多出了一条 DNA 带,其大小与 AcNS5A DNA 为模板的 PCR 产物(1.34kb)是一致的(见图 2),证实了 HCV 的 NS5A 基因已插入到重组病毒基因组中。

**2.4　NS5A 基因在重组病毒感染细胞中的表达**

分别用重组病毒 AcNS5A 和野生型 AcNPV 感染 SF-9 细胞,于不同的时间分别收集受染细胞,进行 12% SDS-PAGE 分析。蛋白质电泳结果显示,在重组病毒 AcNS5A 感染的 SF-9 细胞里已不存在野生型 AcNPV 感染所产生的 33kD 多角体蛋白,增加了一条分子量为 64kD 的 5A 蛋白质带(见图 3A),与超磷酸化 NS5A 融合蛋白的理论推算值相符。经 Western-blot 鉴定,这种 64kD 的蛋白能与兔抗 HCV NS5A 抗血清发生强烈反应(图 3B),证实此融合蛋白就是要表达的 HCV NS5A 蛋白,而且 NS5A 蛋白在多角体蛋白基因启动子控制下得以高效表达,72h 表达水平达到高峰。

**2.5　制备的 NS5A 蛋白抗体的特异性**

通过免疫兔获得的抗血清,用 Western-blot 分析检查抗体的特异性,该抗体只与 JM109 5A 中表达的 58kD 的 NS5A 蛋白发生特异性反应,而与细菌蛋白无反应,证明我们已经获得 NS5A 蛋白的抗体。

图 2　重组病毒 AcNS5A DNA 的酶切鉴定

Fig.2　R.E. identification of the plasmid AcNS5A

Lane 1, λDNA/ *Hin*d Ⅲ Marker; Lane 2, AcNS5A DNA/ *Bgl* Ⅱ + *Hin*d Ⅲ; Lane 3, AcNPV DNA/ *Bgl* Ⅱ + *Hin*d Ⅲ; Lane 4, 以 AcNS5A DNA 为模板的 PCR 产物

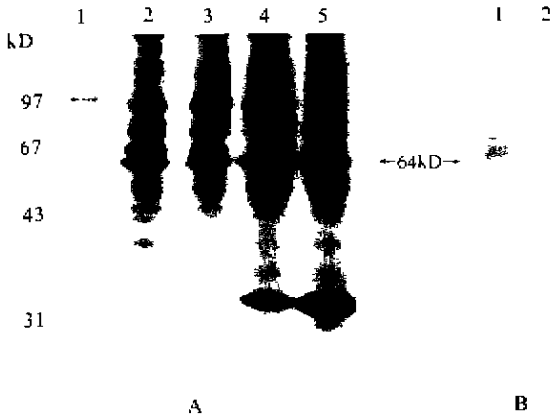


图 3　重组病毒 AcNS5A 在细胞中的表达(A)及 Western-blot 分析(B)

Fig 3　The SDS-PAGE(A) and Western-blot(B)

A. Lane 1, Molecular weight marker; Lane 2, the SF-9 cells infected by recombinant virus AcNS5A at 72 hours and Lane3, 48 hours; Lane 4, the SF-9 cells infected by wild virus AcNPV at 48 hours and (5) 72 hours; B. Lane 1, the SF-9 cells infected by recombinant virus AcNS5S at 72 hours; Lane 2, the SF-9 cells infected by wild virus AcNPV at 72 hours. The arrow shows the strong reaction of the 64kD protein and anti-NS5A antibody.

**2.6　感染 AcNS5A 病毒的昆虫细胞免疫荧光试验**

取经感染了 AcNS5A 病毒的昆虫细胞进行免疫荧光实验,结果如彩版 1 图 4 所示。感染了 Ac-

维普资讯 http://www.cqvip.com



NS5A 重组病毒的昆虫细胞与感染了野生型 AcNPV 病毒的阴性对照昆虫细胞相比较，在 NS5A 蛋白表达的细胞有着非常明亮的绿色荧光显示，而对照细胞中无荧光。说明 HCV NS5A 基因在 SF-9 昆虫细胞中进行了表达，并且在不同的时间分布于细胞的不同位置，结果表明，NS5A 蛋白在 AcNS5A 重组病毒感染 SF-9 细胞 24h 主要分布在细胞质膜，而在 48h 后则同时分布于细胞核内，在 72h 则分布于整个细胞内。

### 2.7 感染 AcNS5A 病毒的昆虫细胞免疫组化试验

取经感染了 AcNS5A 病毒的昆虫细胞进行免疫组织化学实验，以感染了原始野生型 AcNPV 病毒的昆虫细胞作为阴性对照，结果如彩版 I 图 5 所示。在感染 AcNS5A 重组病毒 24h 后，圆形的 SF-9 昆虫细胞的核均被苏木素染色蓝色，而在细胞质膜上有明显的阳性棕色着色；48h 后，细胞中的阳性棕色着色更为明显，主要集中分布在细胞膜部位和核内，而细胞质中有棕色着色；72h 后，细胞中充满了棕色着色，但仍以质膜和核内着色较深，说明 HCV NS5A 基因在 SF-9 昆虫细胞中产生阳性表达，主要分布在细胞膜及细胞核中。

## 3 讨论

丙型肝炎是一种严重危害人类健康的传染性疾病。对于丙型肝炎的病原体—HCV 尚缺乏敏感的细胞培养系统和经济实用的动物模型，目前对 HCV 蛋白的功能研究多有赖于体外实验。NS5A 蛋白与 NS5B 一样是个高度磷酸化蛋白。在体外实验中，NS5A 可以和 NS5B 发生免疫共沉淀[4]，并且 NS5A 蛋白具有潜在的转录激活作用[5]，这暗法 NS5A 蛋白可能在病毒 RNA 复制过程中起重要作用。NS5A 蛋白与 HCV 致病性、以及抗 IFN 疗效有密切的相关性，NS5A 蛋白的干扰素敏感决定区域（ISDR）可以与 IFN 诱导的 PKR 相互作用，造成 PKR 的功能受到抑制，阻止 eIF-2α 磷酸化，使利于病毒 RNA 的翻译，结果由于干扰素信号传导途径被阻断而导致病毒在受染细胞中大量繁殖[6]。另有研究报导，NS5A 蛋白上的几个脯氨酸丰富区与 Src 家族 3（SH3）的结合位置一致，暗示 NS5A 蛋白可能扰乱了生长因子受体结合蛋白 2（Grb2）所介导的信号途径，从而导致 HDV 引起肝脏病变[7]。此外，NS5A 蛋白不仅具有一个核定位信号（NLS），而且它还可以抑制细胞周期调控基因 p21WAF1 的转录，在体外将 NS5A 蛋白转化 NIF 3T3 细胞可以诱发裸鼠产生肿瘤，说明 NS5A 蛋白在细胞生长调控方面是有一定作用的[8]。NS5A 蛋白与 NS5B（HCV RNA 多聚酶）及 NS3 能相互结合，而 NS5B 和 NS3 是已知道的参与 RNA 复制的二种重要的蛋白，NS5A 蛋白很有可能参与形成 RNA 复制起始复合物。这些 NS5A 蛋白的潜在功能都与它的磷酸化修饰、蛋白分子构型有很大的关系。近两年来的研究已表明 HCV 的 NS5A 蛋白在病毒复制和致病过程中起极重要的作用，但有许多细节仍不清楚。

由于缺少有效的 HCV-细胞系统，对病毒蛋白质功能的深入研究造成极大的困难。我们成功地将 HCV NS5A 基因插入到 AcNPV 多角体蛋白基因强大启动子下，构建了重组病毒 AcNS5A。使 NS5A 基因在多角体蛋白基因启动子的控制下得以高效表达，而且表达出的 NS5A 蛋白在昆虫细胞里经过了翻译后的磷酸化修饰，可以形成与天然状态相似的分子构象并保持其良好的生物活性。我们还进一步用免疫荧光技术及免疫组化试验确定表达的 NS5A 蛋白在昆虫细胞中的定位，NS5A 蛋白在病毒感染后不同时间在细胞中有不同的分布，主要位于细胞的质膜与核中。免疫组化实验进一步证实了这一结论。正链 RNA 病毒的复制是与质膜相联系，NS5A 蛋白又能与 NS5B（RdRp）互相作用，我们证实了 NS5A 超磷酸化蛋白同时也定位于核中，暗示 NS5A 蛋白可能在核中调控宿主的基因表达，我们的研究结果为进一步研究这种蛋白的结构、性质及生物功能创造了很有利的条件，对于研究 NS5A 蛋白与其它 HCV 非结构蛋白的相互作用以及 RNA 复制和 HCV 致病机理，有着积极的意义。

### 参考文献

[1] Kuo G, Choo Q L, Alter H J, *et al*. An assay for circulating antibodies to a major edologic virus of non-A, non-B hepatitis[J]. Science, 1989, 244: 362 - 364.

[2] Hirowatari Y, Hijikata M, Tanji Y, *et al*. Expression and processing of putative nonstructural proteins of hepatitis C virus in insect cells using baculovirus vector[J]. Virus Res, 1995, 35: 43 - 61.

[3] Kaneko T, Tanji Y, Satoh S, *et al*. Prodiction of two physphoprotein from the NS5A region of the hepatitis C viral genome[J]. Biochem Biophys Res Commun, 1994, 205: 320 - 326.

[4] Tu H, Gao L, Shi S T, *et al* Hepatitis C virus RNA polymerase and NS5A complex with a SNARE-likeprotein [J]. Virology, 1999, 263: 30 - 41.

[5] Kato N, Hijikata M, Ootsuyama Y, *et al*. Molecular cloning of the

维普资讯 http://www.cqvip.com



human hepatitis C virus genome from Japanese patients with non-A, non-B hepatitis[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 1990, 87: 9524 = 9528

[6] Michael G J R, Kwieciszwski B, Dossett M, *et al* Antiapoptotic and Oncogenic potentials of hepatitis C virus are linked to interferon resistance by viral repression of PKR protein knase [J]. J Virol, 1999, 73: 6506 - 6516.

[7] Tan S L, Nakao H, He Y, *et al*. NS5A, a nonstructural protein of hepatitis C virus, binding growth factor receptor-bound protein 2 adaptor protein in a Src homology 3 domain/ligand-dependent manner and perturbs mitogenic signaling[J]. Cell Biology, 1999, 96: 5533 - 5538.

[8] Ghosh A K, Steele R, Meyer K, *et al*. Hepatitis C virus NS5A protein modulates cell cycle regulatory genes and promotes cell growth[J]. J Gen Virol, 1999, 80: 1179 - 1183.

[9] Gale M Jr, Blakely C M, Kwieciszewski B, *et al*. Control of PKR kinase by hepatitis C virus nonstructural 5A protein: Molecular mechanisms of kinase regulation[J]. Mol Celel Biol, 1998, 18: 5208 - 5218

[10] Yoshihiro I, Zhang L W, Chen M, *et al*. Characterization of the nuclear localization signal and subcellar distribution of hepatitis C virus nonstructural protein NS5A[J]. Gene, 1996, 182: 202 - 211.

[11] Fukuma T, Enomoto N, Marumo F, *et al*. Mutation in interferon-sensitivity determining region of hepatitis C virus and transcriptional acticity of the nonstructural region 5 A protein[J]. Hepatology, 1998, 28: 1147 - 1153.

[12] 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, 2(28): 364-365.

[13] 阮华, 邹金荣, 叶林柏, 等. HDV NS5A 基因表达及其在血清学检测中的应用评估[J] 中国病毒学, 2001, 16(2): 190-192.