维普资讯 http://www.cqvip.com

第18卷6期 中国病毒学 18(6):530—533
2003年12月 VIROLOGICA SINICA December 2003

中国人血清中丙型肝炎病毒聚合酶全长基因的克隆表达及鉴定*

杨 振[1]，蒋建东[2]，祁自柏[1]，陈鸿珊[2]，张华远[1]，李河民[1]

（1. 中国药品生物制品检定所，北京，100050；2. 中国医学科学院医药生物技术研究所，北京，100050）

Cloning, Expression and Analysis of HCV Ns5b Polymerase gene from Chinese serum

YANG Zhen[1], JIANG Jiang-dong[2], QI Zi-bai[1], CHEN Hong-shan, Zhang Hua-yuan, LI He-ming

(1. National Insititute for the Control of Pharmaceutical and Biology Products,Beijing 100050, *China; 2. Chinese Academy of Medical Sciences and Peking Union Medical College, Beijing* 100050, *China)*

Abstract: To amplify *Hepatitis C virus*(HCV) polymerase sequence and express HCV NS5b protein in order to, in the next, establish a molecular model of HCV replication. RT-PCR method was used to amplify HCV NS5b polymerase gene from a Chinese HCV(+) patient's serum. The polymerase fragment was constructed in the plasmid pET-30a and expressed in *E.coli*. HCV NS5b protein was identified by Western blot with a monoclonal antibody against HCV NS5b. Sequence analysis showed that the isolate had 69%-95% and 89%-97% homologies to the reported HCV sequences in respect to nucleotide and amino acid respectively. HCV NS5b gene was expressed at a high level and the molecular weight of the expressed product was 65kDa, which was within the range of expectation. This protein was confirmed to be HCV NS5b by Western blot. HCV NS5b from a Chinese patient can be success- fully cloned and expressed with pET-30a plasmid and *E.coli*.This protein could be used to establish a molecular model of HCV replication.

Key word: *Hepatitis C virus*; Gene clone; Expression; Activity of enzyme; HCV inhibitor

摘要：构建中国人丙型肝炎病毒(HCV)复制的RNA聚合酶原核表达载体pET30aNS5b,并在大肠杆菌中获得NS5B聚合酶蛋白的高效表达，为建立HCV NS5b聚合酶细胞外分子复制模型的方法创造条件。使用高保真Pfu DNA聚合酶进行反转录及套式PCR扩增，从我国HCV RNA阳性血清中扩增出HCV NS5b RNA多聚酶全基因序列，经*Bam*HI 和*Sal*I酶切,将其克隆至同样酶切的 pET-30a 载体中；转化大肠杆菌BL21，IPTG诱导表达。用抗 HCV NS5b 单克隆抗体做 Western-Blot 进行鉴定。结果表明构建了原核表达载体,pET30aNS5bpET30aNS5b 明显表达出12-His-NS5b 聚合酶蛋白。测序结果表明，与已发表的相关HCV NS5b RNA聚合酶序列比较，其核苷酸和氨基酸的同源性分别在69%～92.7%及88.8%～96.8%之间。在最佳表达条件下，可高效诱导表达融合蛋白（65kDa），最高表达量占菌体蛋白18.9%。Western-Blot结果显示表达蛋白为HCV NS5b酶。HCV聚合酶蛋白全长基因可以成功地克隆在pET-30a载体上并有效表达出目的蛋白，为研究建立HCV NS5b聚合酶细胞外分子复制模型奠定了基础。

关键词：丙性肝炎病毒；非结构区NS5b蛋白；基因克隆；原核表达；融合蛋白

中图分类号：R512.6 **文献标识码：**A **文章编号：**1003-5125(2003)06-0530-04

丙肝病毒(*Hepatitis C virus*, HCV)携带者中有40%～60%的感染者发展为慢性肝炎，并较快地进展为肝硬变和肝癌等终末期肝病。由于缺乏理想的HCV的体外感染细胞模型和HCV感染的动物模

收稿日期：2003-06-16，修回日期：2003-09-10
* 基金项目：国家863课题(2001AA234021)
作者简介：杨 振（1965-），男，助理研究员，硕士，从事丙型肝炎病毒方面的研究。

维普资讯 http://www.cqvip.com

型，对该病毒的生物学特性，致病作用，抗病毒药物研制和疫苗的制备等研究受到限制。NS5b 蛋白是 RNA 依赖性的 RNA 多聚酶（RDRP），因此阻断在病毒复制周期发挥关键作用的 NS5b 聚合酶，可抑制病毒复制，是我们开展抗病毒药物研发的有用工具和理论依据。本研究主要目的是利用基因重组技术构建含 HCV-NS5b 的原核表达载体，在大肠杆菌中表达 NS5b 聚合酶蛋白，为今后建立以 NS5b 聚合酶蛋白为靶位的抗 HCV 药物高通量筛选分子模型研究创造条件。

1 材料与方法

1.1 实验材料

血清样本来源于河南洛阳血站，由河南华美生物公司提供，是该公司 HCV RNA 10^6 拷贝/mL 内部参考血清，用于 HCV RNA 的提取。Tris、酵母粉和胰蛋白胨,琼脂糖、SDS、甘氨酸、EB、氨苄青霉素、IPTG，DTT、卡那霉素、pfuDNA 聚合酶，T4DNA 连接酶为 Promega 公司分析纯产品；pET-30a 表达载体，大肠杆菌 BL21(DE3)菌株由中国预防医学科学院病毒所毕胜利教授提供。

1.2 引物设计

经过比较多株 I 型至Ⅵ型 HCV 基因组序列[1]设计扩增引物如下：

正向引物(7236-7263)

5'-GCCAGTGAGGACGTCTGCTGCTCAATG- 3'

反向引物(9036-9025)

5'-TTGTGTCGACTCACCGGTTGGGGAG- 3'

正向引物(7261-7274)

5'-TATGGATCCTCGATGTCCTATTCCTG- 3'

反向引物(9042-9016)

5'-TCCTCACCGGTTGGGGAGGAGGTAGAT- 3'

1.3 PCR 扩增及质粒构建

取已提取的 RNA 模板，反应体系中依次加入 0.5μL AMV 反转录酶，1μL pfu DNA 聚合酶，2μL 10mmol dNTP 等，总反应体系为 50μL。PCR 参数：42℃ 30min 反转录；95℃变性 1.5min，60℃退火 1.5min，72℃延伸 4.5min，35 个循环；最后 72℃延伸 10min。第二次扩增：第一次扩增产物 2μL 等，加 ddH_20 至总反应体系为 50μL。PCR 参数： 95℃变性 1.5min，56℃退火 1min，72℃延伸 4.5min，35 个循环；最后 72℃延伸 10min。PCR 产物玻璃奶法纯化，将纯化的 HCV NS5bPCR 产物与 pET-30a 载体连接。

1.4 重组蛋白的表达和检测

在重组蛋白的诱导表达及表达量的确定中，选用不同时间，不同温度，不同 IPTG 终浓度表达。分别取各种条件下上清及菌体，用常规方法 SDS-PAGE。重组蛋白的免疫印迹分析(Western Blot,)按常规方法进行。

生物素标记的检测 HCV NS5b 聚合酶活性的 ELISA 法对酶活性进行分析，加入不同浓度 HCV 聚合酶作用模板的 DNA-BAND 培养板 96 孔板，将纯化后的聚合酶梯度稀释，分别加入 PolyA，BIO-UTP ，NTP，和一定浓度的反应缓冲液，选择不同的最佳底物浓度(PolyA)及离子浓度，pH 值，温度按上述操作分别包板反应。测定 HCV 聚合酶的米式常数。

2 结果

2.1 HCV NS5b 全长基因 PCR 扩增及表达质粒构建

我们利用 RT-PCR 法扩增并得到了 HCV RNA 聚合酶的全基因序列，与我们设计扩增的片段的大小一致，其电泳条带位于 1770～1800bp 的区域，进一步的通过序列分析与读码框架分析确定所测上游序列与文献报道相同，框架正确。图 1 为我们构建表达质粒的示意图。

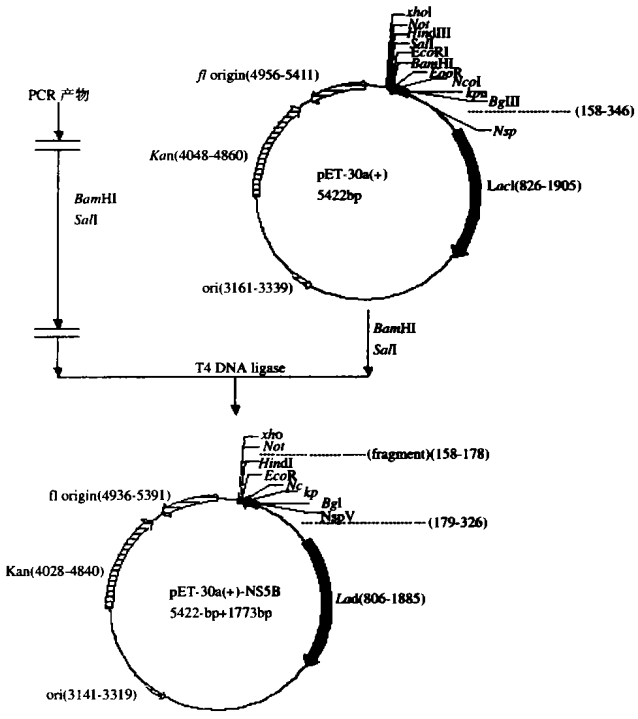

图 1 重组质粒 Pet-30A/NS5B 的构建示意图

Fig. 1 Construction of Pet-30a/NS5B

2.2 扩增 NS5b 序列与其它 HCV NS5b 核苷酸及氨

维普资讯 http://www.cqvip.com

基酸序列比较

将我们扩增并得到的 HCV RNA 聚合酶的全基因序列与 GenBank 中已发表的 HCV 6 个型别的 HCV RNA 聚合酶的全基因序列进行核苷酸及氨基酸序列比较，并进行了同源性进化树分析，结果见表 1 及表 2。

表 1 不同株 HCV NS5b 区核苷酸的同源性比较(%)

Table 1 Homologue comparision of NS5b region nucleotide in different HCV strains (%)

	NS5B-HGS	X61596	D28917	D26556	D14853	D10749	D01221
NS5BHGS		92.7	70.6	69	80.2	81.2	69.5
X61596	7.3		69.8	69.1	78	78.6	68.3
D28917	29.4	30.2		78	69.3	69.3	66.8
D26556	31.0	30.9	22.1		68.9	68.9	66.4
D14853	19.8	22.0	30.7	31.3		79.9	68.7
D10749	19.8	21.4	30.7	31.3	20.1		67.9
D01221	18.8	31.7	33.2	33.6	31.3	32.1	

表 2 不同株 HCV NS5b 聚合酶氨基酸的同源性比较(%)

Table 2 Homologue comparision of NS5b polymerase amino acid in different HCV strains (%)

	NS5B-HGS	X61596	D28917	D26556	D14853	D10749	D01221
NS5B-HGS		96.8	90.1	88.8	94.5	95.1	89.3
X61596	3.2		89.8	89.1	93.7	92.6	88.3
D28917	9.9	10.2		91.2	89.3	90.3	86.8
D26556	11.2	10.9	8.8		88.9	86.9	86.4
D14853	5.5	6.7	10.7	11.1		89.9	88.7
D10749	4.9	7.4	9.7	13.1	10.1		87.9
D01221	10.7	11.74	13.2	13.6	11.3	12.1	

我们克隆的 NS5b 核苷酸与其他 6 个型别 NS5b 的核苷酸(X61596 为 1b 型,D28917 为 3a 型, D26556 为 3b 型,D14853 为 1c 型,D10749 为 1a 型,D01221 为 2b 型）同源性分别为 69%～92.7%，7 株 HCV NS5b 氨基酸的同源性在 89%～96.8%之间(表 1 和 2)。

7 株 HCV NS5b 氨基酸的同源性进化树比较见图 2。从图 2 同源性进化树比较分析来看，我们克隆的 NS5BHG 与代表 1b 型的 X61596 最为接近。

2.3 重组蛋白的诱导表达及表达量的确定

取各种表达条件下菌液离心收集菌体及上清，做 SDS—PAGE 凝胶电泳（见图 3），对表达产物进行凝胶扫描分析。结果表明，所表达的蛋白与预期分子量 65kDa 基本一致。我们反复改变了实验条件，以选定最佳的表达条件。在最佳的表达条件下，最大的表达量可占菌体总蛋白的 18.9%。但表达产物主要以包涵体形式存在,上清中含量很低,在以后蛋白纯化中,要充分考虑到这点。

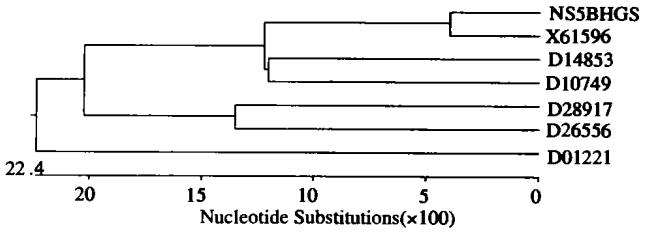

图 2 HCV NS5b 氨基酸的同源性进化树比较

Fig. 2 Phylogenetic tree of NS5B HGS and other isolates

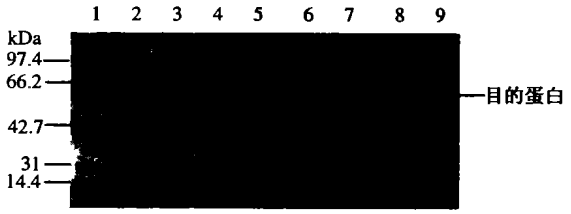

图 3 表达蛋白的凝胶电泳图谱

Fig. 3 Analysis of the expressed products of pET-30a/NS5B

Lane1, Standard protein molecular weight marker; 2, Total proteins of the bacteria transformed by pET -30a-NS5b plasmid; 3/4, Total proteins of the expression bacteria transformed by pET-30a-NS5b plasmid; 5/6, Total proteins of Ecoli BL21; 7/8/9, Total proteins of the expression bacteria transformed by pET-30a-NS5b plasmid by the different expression methods.

重组蛋白经免疫印迹分析(Western Blot，WB)可见有特异的印迹反应，在约 65kDa 处形成显色条带；空白载体对照未见明显显色带。与我们的预期目标条带一致。

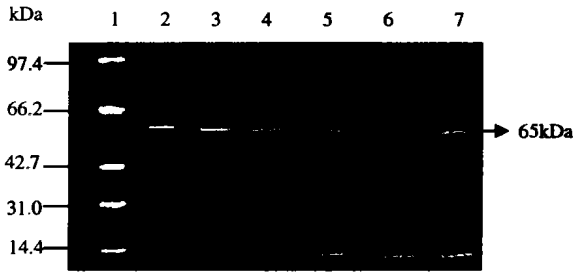

图 4 重组蛋白的免疫印迹分析结果

Fig. 4 Westewrn blot result of HCVNS5B

Lane1, Bl21 bacteria transformed by pET-30a plasmid; 2, Standard protein molecular weight marker; 3/4/5/6/7/8, The purified HCV NS5b polymerase protein.

维普资讯 http://www.cqvip.com

2.4 利用生物素标记的检测 HCV NS5b 聚合酶活性的 ELISA 法对酶活性进行分析

测定`HCV 聚合酶的米式常数来确定酶的活性，对同一批次酶三次实验测定米氏常数的结果表明横轴的截距分别为-0.187，-0.241，-0.337。该批酶的米氏常数为 4.12±0.12μmmol/L，上述结果表明我们表达的酶活性较高，可以用于 HCV 聚合酶细胞外药物筛选模型的应用。

3 讨论

国内虽然也曾有研究表达过 HCV RNA 多聚酶（RDRP），由于使用的表达系统等原因，活性和稳定性不能应用于 HCV 药物筛选模型研究[2]。我们克隆的 HCV NS5b 核苷酸与其他 6 个型别 NS5b 的核苷酸（X61596 为 1b 型，D28917 为 3a 型，D26556 为 3b 型，D14853 为 1c 型，D10749 为 1a 型，D01221 为 2b 型）同源性分别为 69%-92.7%，7 株 HCV NS5b 氨基酸序列的同源性在 89%-96.8%之间(表 2-1 和 2-2)。代表其活性的 GlyAspAsp 三联体结构序列均高度保守，预示该区在病毒复制过程中起重要的作用，这与相关的研究结果一致[3]。同源性进化树比较分析来看，我们克隆的 NS5BHGS 与代表 1b 型的 X61596 最为接近。而与 1b 基因型同源性最高，1b 型[4]在中国人中占 49.5%，(1a 7.0%，2a 23.8%，2b 1.9% 3a 2.9%，1b+2a 9.5%，未定型 4.8%)，所占比例最大，因此我们利用中国人血清克隆，表达 HCV NS5b 聚合酶全基因序列来为以后建立聚合酶细胞外分子复制模型是正确的。WB 实验发现，在蛋白印迹中 6，7，8 条带存在一条最低端显色带，与蛋白质分子量标准最下端 14.4kDa 平行，但阴性对照在 14.4kDa 的蛋白带并未显色，看来封闭不好造成假阳性的可能较小，应是存在蛋白降解[5]，造成最低端显色带。HCV NS5b 基因编码的 NS5b 蛋白具有 RNA 依赖的 RNA 聚合酶（RdRp）活性，该酶是病毒复制中的关键酶，且人体细胞内不存在类似的 RdRp 指导的 RNA 合成过程[6]，针对抑制 RdRp 活性的抗病毒药物不会影响宿主细胞的正常生理功能，因此 RdRp 及其编码基因是抗 HCV 感染研究的理想靶位。我们在选择最佳表达条件下，诱导表达融合蛋白（65kDa），其最高表达量占菌体蛋白 18.9%。HCV 聚合酶全长基因的克隆和蛋白的有效表达，为研究建立 HCV NS5b 聚合酶细胞外分子复制模型奠定了基础。

参考文献

[1] 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 reported isolates for conserved and divergent regions[J]. Gen Virol, 1991, 72: 2697-2704.

[2] 魏 来，陈红松，陈 勇，等. 互补引物/模板评价毕加酵母表达的丙型肝炎病毒 RNA 依赖的 RNA 聚合酶[J]. 病毒学报，2002, 18: (1) 21-23.

[3] Ago H, Adachi T, Yoshida A, *et al*. Crystal structure of the RNA-dependent RNA polymerase of hepatitis C virus[J]. Structure Fold Des. 1999, 7(11): 1417-1426.

[4] Chayam K, Tsubota A, Arase Y, *et al*. Genotypic subtyping of hepatitis C virus [J]. J Gastroentrol Hepatol, 1993, 8: 150-156.

[5] Keiler K C, Waller P R H, Sauer R T. Role of a peptide tagging system in the degradation of proteins synthesized from damaged messenger RNA[J]. Science 1996, 271: 990-993.

[6] Johnson R B,Sun X L,Hockman M A.*et al*. Specificity and mechanism analysis of hepatitis C virus RNA-dependent RNA polymerase[J]. Arch Biochem Biophys, 2000, 1; 377(1): 129-134.