

## 具有蛋白酶及解旋酶活性的 HCV-NS3 重组蛋白的纯化及活性分析

李体远<sup>1\*\*</sup>, 徐宜英<sup>1</sup>, Kevin Philips<sup>2</sup>

(1. 暨南大学医学院附二院深圳市人民医院临床医学研究中心, 深圳, 518020; 2. Department of Biochemistry, Ohio State University, Columbus, Ohio 43210, USA)

Purification and Enzymatic Analysis of the Recombinant Hepatitis C Virus  
NonStructure Protein 3 with Protease and Helicase ActivityLI Ti-yuan<sup>1</sup>, XU Yi-ying<sup>1</sup>, Kevin Philips<sup>2</sup>(1. Shenzhen People's Hospital, 2<sup>nd</sup> Affiliated Hospital of Medical College, Jinan University, Shenzhen 518020, China; 2. Department of Biochemistry, Ohio State University, Columbus, Ohio 43210, USA)

**Abstract:** To study the enzymatic activity, the recombinant HCV NS3 protein with both protease and helicase activity was expressed and purified. The nonstructure gene 3 (NS3) of HCV was amplified and inserted into plasmid pPIC9 and the recombinant plasmid pPIC-NS3 was transformed into *Pichia pastoris* strain GS115. Recombinant protein was produced by induction of the AOX1 promoter with methanol. The recombinant protein was first purified by Hitrap SP cation exchange and then by Mono S HR column. *In vitro* cleavage assay showed that the recombinant protein has protease and helicase activity.

**Key words:** Hepatitis C virus (HCV); Non structure protein 3; Purification, Enzymatic activity analysis

**摘要:** 为深入探讨 HCV-NS3 蛋白的酶动力学性质, 制备了具有蛋白酶及解旋酶活性的 HCV NS3 重组蛋白。利用 PCR 扩增 HCV 非结构基因 NS3, 插入 pPIC9, 测序分析。携带 NS3 基因的重组质粒(pPIC9-NS3)转化毕氏酵母菌株 GS115, 甲醇诱导表达 NS3 蛋白。重组蛋白首先采用 Hitrap chelating 柱进行亲和分离, 之后使用 Mono S HR 柱进一步纯化。对纯化后的 NS3 重组蛋白的酶活性进行分析, 结果表明, 获得的重组蛋白分别具有蛋白酶及解旋酶活性。本研究为深入探讨 NS3 编码酶的功能和开发抗病毒药物创造条件。

**关键词:** 丙型肝炎病毒; 非结构蛋白 3; 纯化; 酶活性分析

中图分类号: R512.6

文献标识码: A

文章编号: 1003-5125 (2004)04-0325-04

丙型肝炎病毒(Hepatitis C virus, HCV)感染已经成为全球性严重的社会公共卫生问题, 迫切需要寻找有效的治疗方法和预防措施。HCV 为单链 RNA 病毒, 基因组全长约 9.5kb。HCV 表达的前体蛋白必须经过切割后, 才能形成成熟蛋白并发挥各自功能。对丙型肝炎病毒(HCV)基因组成及复制机制的研究表明, 位于非结构基因 3(NS3)区 N 端的蛋白酶、位于 NS3 区 C 端的解旋酶 (helicase) 对于 HCV 功能蛋白的释放具有重要作用, 有可能成为有效抗病毒治疗和药物筛选的靶分子<sup>[1,2]</sup>。我们利用酵

母系统表达并获得了具有活性的 HCV 蛋白酶和解旋酶, 为深入研究 NS3 编码酶的功能和筛选抗病毒药物创造条件。

## 1 材料与amp;方法

## 1.1 实验材料

pPIC9 酵母表达质粒、毕氏巴斯德酵母菌株 GS115 购自 Invitrogen 公司。质粒 pBT-HCV、pG-N4 A/5B、pGE-1 及 pS-6 由本室保存。

AKTA FPLC 快速蛋白纯化系统和 Hitrap-chela-

ting 柱、Mono S HR5/5 柱为 Pharmacia 公司产品。MD 培养基、YPD 培养基、BMGY 培养基、BMMOL/LY 培养基均购自 Invitrogen 公司。各种限制性内切酶和 DNA 连接酶购自 Promega。

### 1.2 HCV-NS3 基因的扩增及酵母表达载体构建

含有 HCV 基因的质粒 pBT-HCV 由本实验室构建、保存。设计 HCV NS3 基因 PCR 引物, 上、下游引物 5' 端分别添加 *EcoR* I 和 *Xho* I 位点。为便于纯化, 上下游引物均融合 6×His tag。PCR 产物经酶切后插入 pPIC9 酵母表达质粒, 重组质粒 N、C 端融合 6×his, 命名为 pPIC-HCVNS。经测序分析, 插入 HCV 基因片段序列正确。

### 1.3 重组质粒的转化和阳性克隆的筛选

采用电转法将 pPIC-HCVNS 转化到酵母菌株 GS115 中。载体中的 HIS4 基因补偿 GS115 代谢组氨酸的缺陷, 经组氨酸缺陷培养基培养初步筛选后, 使用 French Press(高压细胞均质机)破碎细胞(1000psi)三次, 提取酵母菌基因组 DNA 作为模板, HCV-NS3 引物做 PCR 扩增筛选阳性克隆株, 产物用琼脂糖电泳鉴定。

### 1.4 NS3 重组蛋白的表达

挑取单个阳性菌落接种于 BMGY 培养基中, 250 r/min~300r/min, 30℃ 振荡。待细胞处于对数生长期后(OD<sub>600</sub>=2~6), 重悬于 BMGY 培养基中继续生长, 每 24h 加入 100% 甲醇至终浓度为 0.5%, 进行蛋白质的诱导表达。诱导后 24、48、72 和 96h 分别取 1mL 培养物, 离心分离上清, 采用 Western Blot 进行测定。筛选出表达量相对较高的菌株, 并确定其达到最高诱导表达量的时间。此时停止甲醇诱导, 离心收集上清液, 4℃ 透析过夜并包埋于聚乙二醇 10000 中浓缩。浓缩产物进行 SDS-PAGE 电泳和银染分析, 并应用凝胶成像扫描系统分析蛋白的相对含量。

### 1.5 重组蛋白的纯化

重组蛋白经两步层析纯化: FPLC 蛋白纯化系统, Hitrap-chelating 柱(10 mL)。用 5 倍柱体积的缓冲 A 液(20 mmol/L KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, pH7.4, 1M NaCl, 10% 甘油, 5 mmol/L β-巯基乙醇和蛋白酶抑制剂)平衡后, 上样 3 mL。依次使用 100mL 含有 10mmol/L、35 mmol/L 咪唑的缓冲 A 液洗柱。之后用含有 35-108mmol/L 咪唑的缓冲 A 液梯度洗脱目的蛋白, 留取部分样品进行银染, 然后进行 Western Blot 分析 [10% SDS-PAGE 胶, 每泳道上样 25 μg 总蛋白, 100V 恒压分离后转 PVDF 膜。封闭膜, 然后与 HCV NS3 抗体(1:500, Research Diagnostics Inc)室温结合

1hr。洗膜, 与二抗结合后, 化学发光法检测, 曝光于 X 光片]。纯化产物使用 PEG10000 浓缩洗脱液后, 透析过夜(透析袋分子截留为 3500)。使用 FPLC, Sephadex G-25 柱, 5×5 mL 缓冲 A 液(其中含 100 mmol/L KCl)脱盐。将获得的蛋白重载于 Mono S HR 5/5 柱, 30mL KCl 梯度洗脱(100-400mmol/L), 收集目的蛋白, PEG 10000 浓缩、待用。

### 1.6 重组 NS3 蛋白酶活性分析

含有 HCV NS4A/5B 编码序列的质粒 pG-N4A/5B 先使用 *Xho* I 酶切线性化, 经 T7 RNA 聚合酶转录形成的 RNA 使用兔网织红细胞裂解物 (Promega), 同时加入 <sup>35</sup>S 标记的蛋氨酸 30℃ 进行体外翻译 1h (Amersham Pharmacia Biotech), 之后加入无 RNA 酶的 DNA 酶 (Boehringer Mannheim) 和环己亚胺于 30℃ 作用 15 min 终止反应。

于 20mL 反应体系加入 2mL <sup>35</sup>S 标记的翻译底物和纯化后的重组蛋白酶。反应体系中含有 50mmol/L MOPS(pH 7.5), 300mmol/L NaCl, 0.1% NP-40, 10% 甘油和 1mmol/L DTT, 30℃ 孵育 1 至 2h 后, 煮沸 3 min 终止反应。15% SDS-PAGE 电泳分析产物切割效果, 然后使用 Phosphor Imager 定量 (Molecular Dynamics)。

### 1.7 RNA 解旋酶底物制备

RNA 解旋酶底物包括两条互补的单链 RNA。参照试剂盒说明 (Promega), 单链 RNA 分别使用 SP6 或者 T7 RNA 聚合酶经体外转录生成, 退火后经胶纯化。退火后的双链 RNA (dsRNA) 底物使用 T4 多核苷酸激酶 (Polynucleotide kinase, Amersham Pharmacia Biotech) 和 γ-<sup>32</sup>P ATP 标记。简述如下: 质粒 pGE-1 经 *Pvu* II 消化后, 使用 SP6 RNA 聚合酶体外转录生成一条 98 碱基的单链 RNA。质粒 pS-6 经 *Xba* I 消化后, 使用 SP6 RNA 聚合酶体外转录生成一条 38 碱基的单链 RNA。两条单链 RNA 含有一段 29 碱基的互补区。将两条 RNA 退火后, 纯化待用<sup>[3]</sup>。

### 1.8 RNA 解旋酶活性分析

在 20mL 反应体系中, 分别加入 NS3 重组蛋白和其他必须组分进行 RNA 解旋酶分析, 简述如下: 在 50mmol/L Tris-HCl (pH 7) 缓冲体系内, 分别加入 50 fmol 标记的 dsRNA 底物, 1mmol/L MgCl<sub>2</sub>, 2mmol/L ATP, 2mmol/L DTT, 0.1 mg/mL 牛血清白蛋白, 4U RNA 酶抑制剂 (Promega)。将混合物于 37℃ 孵育 1h, 加入 5mL 终止液 (100 mmol/L HEPES, pH 8; 20 mmol/L EDTA; 0.1% NP-40; 30% 甘油; 0.3% 溴酚蓝) 终止反应。将 RNA 产物进行 4%~

20%聚丙烯酰胺-TBE 胶(Novex, San Diego)电泳分析。干胶后, 使用放射自显影(Autoradiography)检测释放出的经  $^{32}\text{P}$  标记的 RNA, 然后使用 Phosphor Imager 定量。

## 2 结果

### 2.1 HCV-NS3 重组质粒的构建

从含有 HCV 基因的质粒 pBT-HCV 中扩增出了 NS3 基因并使其 N、C 末端均融合  $6\times\text{His Tag}$  以利于重组蛋白的纯化。重组质粒经测序分析, 证实插入的 NS3 片段基因序列正确。

### 2.2 重组 HCV-NS3 蛋白的表达、纯化及鉴定

筛选出的高效表达菌株经诱导表达后, 经 French Press 裂解, 离心分离后经两步层析纯化。SDS-PAGE 图谱经图像处理系统分析表明, 纯化前目的蛋白 NS3 主条带面积占酵母菌体蛋白总量约 3.8%(图 1)。最终纯化产物经 Western Blot 分析表明, NS3 基因表达产物具有明显的 3 条带, 其中两条分别与推测的 HCV NS3、HCV 解旋酶相对分子质量接近, 其它推测为降解产物(图 2)。

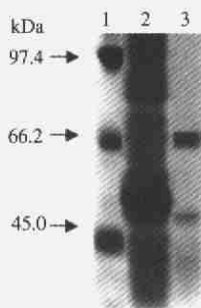


图 1 酵母表达产物及纯化的 NS3 SDS-PAGE 分析  
Fig. 1 SDS-PAGE results for crude yeast extracts and affinity chromatography purified NS3 protein  
1, Protein marker; 2, Crude yeast extracts, 3, Affinity chromatography purified NS3 protein.

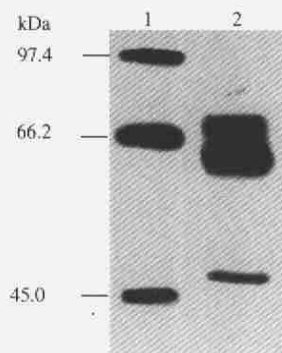


图 2 纯化的 NS3 重组蛋白 Western Blot 分析  
Fig. 2 Western Blot results of the purified NS3 recombinant protein  
1, Protein Marker 2, Affinity chromatography purified protein.

### 2.3 重组蛋白的蛋白酶活性分析

使用体外翻译的方法合成了 HCV NS3 蛋白酶底物, 并使用  $^{35}\text{S}$  标记。将纯化后的重组蛋白酶与体外合成的底物作用后进行放射自显影分析。结果, 约 91% 的 HCV NS3 蛋白酶底物被切割, 表明重组蛋白具有较高的蛋白酶活性(图 3)。

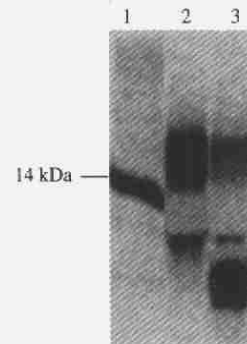


图 3 HCV-NS3 重组蛋白的蛋白酶活性分析  
Fig. 3 Protease activity assay of the recombinant HCV-NS3  
1, Protein marker; 2, Recombinant NS4A/5B; 3, NS4A/5B+NS3.

### 2.4 重组蛋白的解旋酶活性分析

使用体外转录的方法合成了两条互补的单链 RNA, 使用  $^{32}\text{P}$  标记, 退火后作为 HCV NS3 解旋酶的底物。利用纯化后的重组蛋白进行的解旋分析表明, 可见底物中的双链 RNA 被解旋后成为单链 RNA(图 4)。

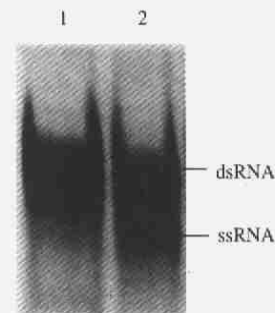


图 4 HCV-NS3 重组蛋白的解旋酶活性分析  
Fig. 4 Helicase activity assay of the recombinant HCV-NS3  
1, dsRNA substrate; 2, dsRNA substrate+Recombinant NS3 recombinant protein

## 3 讨论

HCV 基因组编码一条长约 3010 个氨基酸的蛋白前体, 病毒蛋白前体通过宿主细胞内质网的信号肽酶和病毒编码的蛋白酶(NS2/NS3 金属蛋白酶和 NS3 丝氨酸蛋白酶)的裂解, 产生至少 10 种不同的成熟蛋白。研究证明, HCV NS3 蛋白包括 631 个氨基酸, 其 N 端为丝氨酸蛋白酶, C 端则表现为 NTP/RNA

解旋酶活性<sup>[4]</sup>。体外实验和哺乳动物细胞的瞬时转染实验都证实, NS3编码的丝氨酸蛋白酶负责HCV基因组表达的前体蛋白的非结构区的切割加工(包括NS3, NS4A, NS4B, NS5A和NS5B)。由于释放这些非结构成熟蛋白是HCV复制、包装的必要前提条件, 因此NS3丝氨酸蛋白酶在HCV的生命周期中具有极其重要的作用, 并且成为抗病毒治疗的重要目标。

研制直接靶向于HCV病毒的小分子抑制剂已经成为HCV抗病毒研究的热点。深入研究HCV NS3丝氨酸蛋白酶及-RNA解旋酶<sup>[5,6]</sup>的功能及酶学动力学性质对于开发HCV复制的抑制剂具有重要意义。然而, 由于目前缺乏经济适用的HCV动物模型, 制备具有丝氨酸蛋白酶和RNA解旋酶活性的NS3重组蛋白对于HCV抗病度药物的开发具有重要价值。

我们利用酵母系统表达并纯化了 NS3 蛋白。重组蛋白的蛋白酶活性和解旋酶活性实验结果表明, 获得的重组蛋白具有丝氨酸蛋白酶和 RNA 解旋酶活性。本研究为深入探讨 NS3 编码酶的生物功能、酶学动力学性质和开发抗病毒药物创造了条件。

## 参考文献

- [1] Portal-Nunez S, Gonzalez-Navarro C J, Garcia-Delgado M, *et al.* Peptide inhibitors of hepatitis C virus NS3 protease[J]. *Antivir Chem Chemother*, 2003, 14: 225-233.
- [2] Frick D N. Helicases as antiviral drug targets Drug[J]. *News Perspect*, 2003, 16: 355-362.
- [3] Kim, D. W, Y. Gwack, J. H. Han, *et al.* C-terminal domain of the hepatitis C virus NS3 protein contains an RNA helicase activity[J]. *Biochem. Biophys. Res. Commol/Lun*, 1995, 215: 160-166.
- [4] Grakoui A, McCourt D W, Wychowski C, *et al.* Characterization of the hepatitis C virus-encoded serine proteinase: determination of proteinase-dependent polyprotein cleavage sites[J]. *J Virol*, 1993, 67: 2832-2843
- [5] Lamarre D, Anderson P C, Bailey M, *et al.* An NS3 protease inhibitor with antiviral effects in humans infected with hepatitis C virus[J]. *Nature*, 2003, 426:186-189.
- [6] Borowski P, Schalinski S, Schmitz H. Nucleotide triphosphatase/helicase of hepatitis C virus as a target for antiviral therapy[J]. *Antiviral Res*, 2002, 55: 397-412.
- [7] Nizi E, Koch U, Ponzi S, *et al.* Capped dipeptide alpha-ketoacid inhibitors of the HCV NS3 protease[J]. *Bioorg Med Chem Lett*, 2002, 12: 3325-3328.