

HCV 结构蛋白在昆虫细胞中的表达及病毒样颗粒的组装*

王瑞青^{1,2}, 梁昌镛^{1,2}, 焦成松³, 宋建华^{1,2}, 陈新文^{1**}

(1. 中国科学院武汉病毒研究所分子病毒学重点实验室, 湖北武汉 430071; 2. 中国科学院研究生院, 北京 100039; 3. 中国人民解放军广州军区武汉总医院, 湖北武汉 430071)

Expression of HCV Structural Proteins and Self-assembly of

HCV-like Particles in Insect Cells

WANG Rui-qing^{1,2}, LIANG Chang-yong^{1,2}, JIAO Cheng-song³, SONG Jian-hua^{1,2}, CHEN Xin-wen^{1**}

(1. Key Laboratory of Molecular Virology, Wuhan Institute of Virology, CAS, Wuhan 430071, China; 2. Graduate School, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100039, China; 3. Department of Infectious Diseases, Wuhan General Hospital, Guangzhou Military Command, Wuhan 430070, China)

Abstract: In this work, a recombinant baculovirus containing *Hepatitis C virus* (HCV) structural protein coding sequence was constructed by Bac-to-Bac recombinant baculovirus expression system and it was proved to be able to produce HCV structural proteins directly in insect cells. RT-PCR assay showed that the transcription of the coding sequence began 16h post infection (hpi) and reached maximal level at 72 hpi. Analysis of insect cell lysates by SDS-PAGE and immunoblotting with monoclonal antibody against Core revealed that the expression of the structural proteins began at 48 hpi and reached maximal level also at 72hpi. In insect cells, HCV structural proteins assembled into spherical particles 50nm in diameter in large cytoplasmic vacuoles.

Key words: *Hepatitis C virus* (HCV); Structural proteins; Expression; Virus-Like Particles; Sf21 cell

摘要: 本文利用 Bac-to-Bac 杆状病毒表达系统构建了含有丙型肝炎病毒 (*Hepatitis C Virus*, HCV) 结构蛋白编码基因的重组杆状病毒 vAcHCVsp1, 并获得了 HCV 结构蛋白在昆虫细胞 Sf21 中的表达。HCV mRNA 转录和蛋白质表达时相分析表明, 感染后 16 h HCV 结构蛋白编码基因开始转录, 72 h 达最高峰; 蛋白质表达则是在感染后 48h 开始, 72 h 达到高峰。电镜观察表明 vAcHCVsp1 感染的 Sf21 细胞 96 h 时在细胞质中可见很多空泡, 空泡中可见 50nm 的球形颗粒, 为 HCV 结构蛋白组装的病毒样颗粒。

关键词: 丙型肝炎病毒; 结构蛋白; 表达; 病毒样颗粒; Sf21 细胞

中图分类号: R 512.6 文献标识码: A 文章编号: 1003-5125(2005)01-0005-06

丙型肝炎病毒 (*Hepatitis C virus*, HCV) 是输血后及散在性的非甲非乙型肝炎 (Non-A, Non-B Hepatitis, NANBH) 的主要病因^[1,2]。全世界目前约有 1.7 亿人被 HCV 感染, 急性感染者中有 80% 转为慢性, 其中 20% 在 10~20 年后将发展为肝硬化, 1%~5% 可能发展为肝细胞癌 (Hepatocellular Carcinoma, HCC)^[3]。到目前为止, 尚没有有效的治疗 HCV 慢性感染的药物和防止 HCV 感染的疫苗研制成功。

HCV 归属于黄病毒科 (*Flaviviridae*) 丙型肝炎病毒属 (*Hepacivirus*)^[4], 为有包膜的单股正链 RNA 病毒, 基因组全长 9.4~9.6kb, 包括一个单一的 9030~9099nt 的大开放阅读框, 其编码一个 3010~3033 a. a 的多聚蛋白前体^[2,5-7], 在宿主和病毒编码的蛋白酶的作用下, 多聚蛋白前体裂解为成熟的结构蛋白和非结构蛋白。从 N 端到 C 端, HCV 蛋白的排列顺序为: C-E1-E2-p7-NS2-NS3-NS4A-NS4B-NS5A-NS5B。蛋白质翻译起始依赖

收稿日期: 2004-06-21, 修回日期: 2004-06-28

* 基金项目: 湖北省自然科学基金 (2003ABA157); 国家自然科学基金杰出青年基金 (30325002)

作者简介: 王瑞青 (1978-), 女, 硕士研究生, 从事丙型肝炎病毒分子生物学研究。

** 通讯作者: 陈新文 (1964-), 男, 博士, 研究员. Corresponding author. Tel: 027-87199106, E-mail: chenxw@pentium.whiov.ac.cn

于 5' 非翻译区的核糖体进入位点 (internal ribosomal entry site, IRES) 和一小段 HCV 的编码区^[8]。HCV 结构蛋白包括核衣壳蛋白 (Core) 和两个包膜糖蛋白 (E1 和 E2)。结构蛋白从多聚蛋白前体上剪切下来依赖于宿主细胞的信号酶^[9], 而非结构蛋白的剪切则需要病毒自身编码的蛋白酶的参与^[10]。

虽然 HCV 基因组结构已经得到了详细的阐明, 对 HCV 结构特点的研究受到了缺乏病毒复制系统的阻碍。感染病人血清中和肝组织中极低的病毒载量使得在显微镜下直接观察病毒颗粒十分困难。与其它黄病毒科的病毒相类似, HCV 的病毒颗粒结构可能由核衣壳蛋白与 RNA 基因组构成的核衣壳和包裹于其外的包膜糖蛋白组成。过滤分析表明病毒粒子的直径在 30 ~ 60 nm^[11]。

昆虫杆状病毒表达系统已经被成功用于多种病毒的核衣壳的合成^[12-14]。此系统用于表达 HCV 蛋白具有两个明显的优点, 首先是在昆虫细胞中翻译后的修饰、蛋白质的正确折叠和寡聚化常常与哺乳动物细胞相似, 而且与哺乳动物细胞相比此系统可以合成大量的异源蛋白^[15]。在本研究中, 我们尝试了在昆虫细胞 Sf21 中利用 Bac-to-Bac 重组杆状病毒表达系统表达 HCV 结构蛋白, 并在其中装配病毒样颗粒。

1 材料与方法

1.1 昆虫病毒和细胞系

昆虫细胞 Sf21 为本室保存, 用含 10% 胎牛血清的 Grace 培养基 (GIBCO/BRL 公司) 培养于 28 细胞培养箱中。核型多角体野生型病毒 (AcMNPV) 由本室保存。AcMNPV Bacmid 来源于 Bac-to-Bac 系统 (GIBCO 公司)。

1.2 质粒与菌种

pFastBacDual 和大肠杆菌 DH10 来源于 Bac-to-Bac 杆状病毒表达系统试剂盒 (GIBCO 公司)。质粒 pBRTM/HCV1-3011 由广州军区武汉总医院焦成松博士惠赠, 包含有 HCV1b 全长基因组, pGEM-T Easy PCR 产物克隆试剂盒购自 Promega 公司。大肠杆菌受体菌 DH5 为本室冻存。

1.3 酶、生化试剂及抗体

各种限制性内切酶及 Ex Taq 为 Takara 公司产品, Trizol 试剂购于 Invitrogen 公司, 抗 Core 单克隆抗体由广州军区武汉总医院焦成松博士惠赠。

1.4 引物及 PCR

用于扩增结构蛋白基因的上游引物为 cp7F: GCACCA TGA GCACGAA TCCT (-5-15 nt), 下游引

物 cp7R: AA GCTTTACGTGTCCA G TGCGTATGCC (2418-2436nt), 斜体字部分为 HindIII 酶切位点。用于重组病毒鉴定的引物为 cp7F 和 M13 下游引物 M13R, 其中 M13R 序列为: AA GCTTTA GGCAA TA GCA GCA GCACTAC。RT-PCR 引物: Oligo (dT) 15。E1 基因上下游引物: E1F (CA T GCGCAA TTCCTCGGGCTTT) 和 E1R (AA GCT TTA GGCAA TA GCA GCA GCACTAC)。所有引物由上海博亚生物技术公司合成。

PCR 扩增的反应条件为: 94 预变性 5 min, 按照 94 1 min, 57 1 min, 72 3 min 设定 20 个循环, 最后 72 终延伸 10 min。

1.5 基因克隆与酶切鉴定

方法参照文献^[16]。

1.6 重组 Bacmid 的构建

利用 AcMNPV Bac-to-Bac 系统, 根据产品说明书构建重组 Bacmid (Invitrogen 公司)。具体过程简述如下: 利用供体质粒转座含 helper 质粒与 AcMNPV Bacmid 的大肠杆菌感受态细胞, 转座产物通过卡那霉素、庆大霉素与四环霉素三种抗生素筛选, 同时辅以蓝白斑筛选, 挑选三抗平板上长出的白色菌落, 得到含 HCV 结构基因的重组 AcMNPV bacmid DNA。提取重组 bacmid DNA, PCR 分析鉴定。

1.7 Sf21 细胞转染试验

利用脂质体 (Invitrogen) 将所构建重组 bacmid DNA 转染 Sf21 细胞得到重组病毒, 操作过程根据产品操作说明书进行。

利用 PCR 方法鉴定重组病毒: 取感染后 96h 的细胞上清 500 μL 上清, 加入 500 μL PEG8 000, 静置 30 min, 14 000 r/min 离心 15 min, 去上清, 沉淀加入 20 μL 去离子水, 80 μL 病毒裂解液, 5 μL 20 mg/mL 蛋白酶 K, 50 水浴 60 min。然后采用酚/氯仿/异戊醇法^[16] 提取病毒基因组 DNA。利用 M13R 和 cp7F 引物进行 PCR。

1.8 RT-PCR 方法检测基因转录时相

病毒感染 Sf21 细胞 (35 mm 培养皿) 后 16、24、48、72、96h 收集, 利用 Trizol 试剂提取总的 RNA, 方法参照产品说明书。总 RNA 充分溶解于 8 μL 无 RNA 酶的去离子水, 之后进行 DNA 消化处理, 方法参照无 RNA 酶 DNA 酶使用说明书。然后加入 Oligo (dT) 15 和 M-MLV 反转录酶等进行反转录, 具体步骤及体系参照产品说明书。

取反转录产物取 6 μL, 加入 E1 上下游引物 E1F 和 E1R、dNTP 和 TaqDNA 聚合酶, 95 预变性 5

min,然后 95 变性 50 sec,57 退火 40 sec,72 延伸 1 min,循环 30 次,再在 72 延伸 5 min。

1.9 HCV 结构蛋白表达的检测

取感染后 24、48、72、96 h 细胞,细胞裂解液进行 12% SDS-PAGE 电泳。电泳完毕后,将胶上的蛋白通过电转膜仪(12V,20 min)转移到硝酸纤维素膜上。膜在 0.2% 的脱脂奶粉的 TBS 中 4 封闭过夜,然后进行 Western-blot 实验,具体步骤见参考文献^[16]。最后采用 NBT 和 33 μ L BCIP 显色。

1.10 超薄切片和电镜观察

分别用 vAcHCVsp1 与 AcMNPV 以 MOI10 分别感染接种于六孔板的 Sf21 细胞,在感染后 96h 取感染的细胞,固定切片,在电子显微镜下观察细胞超薄切片。

2 结果

2.1 结构蛋白基因扩增及克隆

以 pBRTM/ HCV1-3011 为模板,PCR 扩增 HCV 结构基因并将其克隆到 pGEM-Teasy 载体上获得克隆 pTep7,经过酶切酶切分析鉴定正确(图 1),然后进行测序,结果表明获得的基因克隆完全正确。

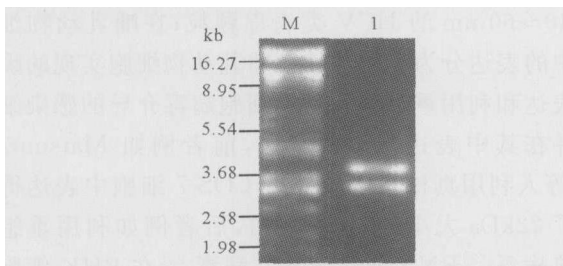


图 1 pTep7 的 *EcoRI* 酶切鉴定

Fig. 1 Identification of pTep7 by *EcoRI* digestion

M, DNA digested with *HindIII* + *EcoRI* + *BamHI*;

1, Positive clones.

2.2 构建转移质粒

EcoRI 和 *HindIII* 双酶切 pTep7,回收 2.4kb 的片段,连接到以相同酶切的 pFastBacDual 载体片段上得到 pFBDcp7(图 2)。HCV 结构基因位于 pFBDcp7 的 *ppolh* 启动子下游。

2.3 重组 AcMNPV Bacmid 的鉴定

重组 pFBDcp7 质粒转座含 AcMNPV bacmid 的大肠杆菌 DH10Bac,三抗和蓝白筛选得到阳性克隆,AcHCVsp1 bacmid。挑取 8 个克隆,提取 bacmid DNA,利用 M13R 与 HCV 结构基因上游引物 cp7F 进行 PCR 鉴定,发现 7 个克隆产生大小约 3kb 的产物(图 3),与预计的结果吻合,为重组 AcHCVsp1 bacmid。

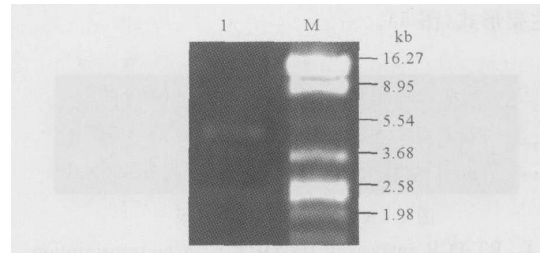


图 2 pFastBacDualcp7 酶切鉴定

Fig. 2 Identification of pFastBacDualcp7

M, DNA + *HindIII* + *EcoRI* + *BamHI*; 1, pFastBacDualcp7 + *HindIII* + *EcoRI*.

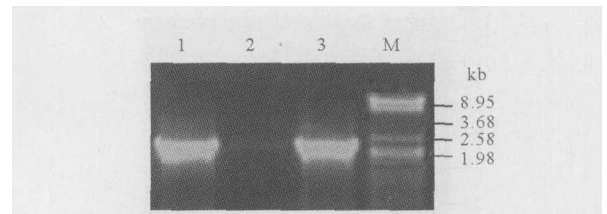


图 3 AcHCVsp1 Bacmid PCR 鉴定

Fig. 3 Identification of AcHCVsp1 Bacmid by PCR

M, DNA digested with *HindIII* + *EcoRI* + *BamHI*; 1, Positive control; 2, Negative control; 3, AcHCVsp1 bacmid.

2.4 重组 Bacmid 转染 Sf21 细胞

提纯的 AcHCVsp1 bacmid 基因组 DNA 转染 Sf21 细胞,第 2 天个别细胞开始出现细胞核增大等病理现象。第 3 天开始,细胞生长速度变慢,以上现象更为明显。到第 7 天,有 50% 以上细胞出现病理现象,细胞生长完全停止。取上清提取病毒基因组 DNA 并以其为模板,加入 M13 下游引物 M13R 和结构蛋白上游引物 cp7F 进行 PCR 鉴定,获得大小约 3kb 的产物,与预计的结果吻合,进一步表明获得了正确的重组病毒 vAcHCVsp1。取转染上清感染 Sf21 细胞以大量增殖病毒,并测定病毒的滴度。

2.5 HCV 结构蛋白基因转录分析

用 E1 的上下游引物对 vAcHCVsp1 感染后不同时相细胞总 mRNA 反转录产物进行 PCR,可得到预期的正确的 550bp 目的带,说明 vAcHCVsp1 可以正确转录 HCV 的结构蛋白基因。从不同时相的结果可知,从感染后 16h,基因开始转录,之后维持恒定转录水平,而在感染后 72h 转录水平达到最高,从 96h 开始转录水平有所下降,120h 下降较为明显(图 4)。

2.6 HCV 结构蛋白表达的 Western-blot 分析

用抗 Core 的单克隆抗体检测 HCV 结构蛋白表达的时相,发现 HCV 结构蛋白在重组病毒 vAcHCVsp1 感染 Sf21 细胞后 48h 开始表达,72h 表达量最大,96h 蛋白表达量下降。表达的 Core 蛋白有两种形式,分别为 21kDa 和 19kDa,且 19kDa

为主要形式(图 5)。

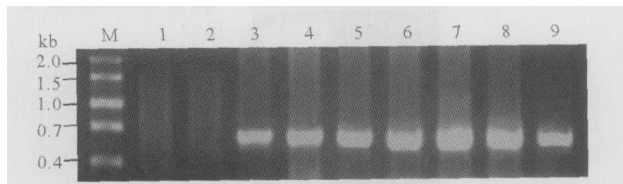


图 4 RT-PCR 分析 E1 转录

Fig. 4 RT-PCR analysis of the HCV E1 gene transcription M, DL2000 Marker; 1, Negative control; 2, Health Sf21 cells; 3, AcHCVsp1 Bacmid DNA; 4-9, Sf21 cells infected by vAcHCVsp1 at 16, 24, 48, 72, 96 and 120 hpi respectively.

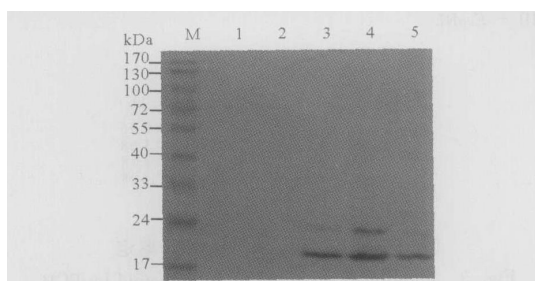


图 5 AcHCVsp1 感染后不同时相的蛋白表达分析

Fig. 5 Western blot analysis of HCV core protein expression in Sf21 cells

1, Normal Sf21 cells; 2-5, Sf21 cells infected by vAcHCVsp1 at 24, 48, 72 and 96 hpi respectively.

2.7 电镜下观察 HCV 类病毒颗粒的产生

vAcHCVsp1 感染 Sf21 细胞 96h 后,电镜下可看到细胞质中存在空泡状结构,其中包含有直径约 50nm 左右的球形颗粒(图 6),其位置、形状及大小与已报道的病毒颗粒十分相似^[17],初步判断此结构即为由 HCV 结构蛋白包装成的病毒样颗粒。除此之外,还观察到一种直径约 30nm 左右的球形颗粒,其在细胞质中和细胞核中都可见到,而在 AcMNPV 感染的 Sf21 细胞中则没有见到。

3 讨论

从 1989 年 HCV 全基因组克隆完成至今,HCV 结构蛋白得到了广泛深入的研究。其中由于 Core 蛋白在构成病毒粒子及调控宿主细胞功能具有重要作用而得到了更加细致的研究。不同系统可以得到不同形式的 Core 蛋白。Muraiso^[18]等人在大肠杆菌中表达的 Core 蛋白为 23kDa,解释为含有较多的脯氨酸;Falcon^[19]等人则在毕赤酵母中表达了 23kDa 和 21kDa 两种形式的 Core 蛋白,并发现其可包装成直径 20~30nm 的类核衣壳颗粒;Santolini^[20]则利用体外转录研究 Core 蛋白的表达,也得到了 21kDa 的蛋白。后来又有人将 HCV 结构蛋白在昆虫细胞和哺乳动物细胞中表达,例如 Baumert^[17]

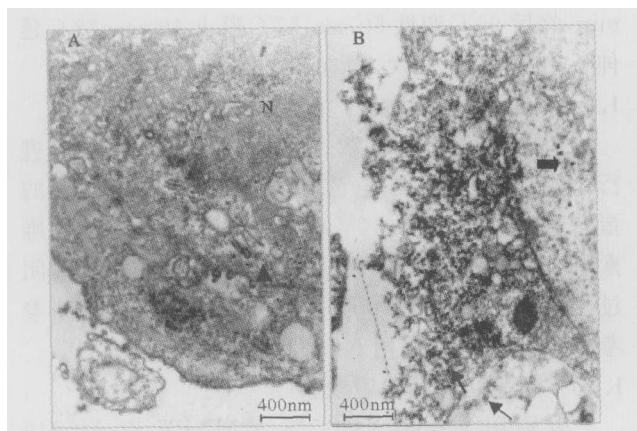


图 6 电镜下观察 HCV 病毒样颗粒的产生

Fig. 6 Electron Microscopy of HCV-like particles in Sf21 cells infected with vAcHCVsp1

A: Sf21 cells infected with AcMNPV (96hpi). EM demonstrates abundant replicative forms of baculovirus (). B: Sf21 cells infected with vAcHCVsp1 (96hpi). EM demonstrates some enveloped virus-like particles () 50nm in diameter in vacuole. In addition, some spherical particles () about 30nm in diameter can be seen in both cytoplasm and nucleus.

等人用昆虫杆状病毒表达系统在昆虫细胞系 Sf9 中表达了 HCV 的三个结构蛋白,其中 Core 为 22kDa,而且得到了由这些结构蛋白组装形成的直径 40~60 nm 的 HCV 类病毒颗粒;在哺乳动物细胞中的表达分为小质粒转染哺乳动物细胞实现的瞬时表达和利用重组哺乳动物细胞病毒介导的感染细胞并在其中表达蛋白的方法,前者例如 Matsuura^[21]等人利用真核表达载体在 COS-7 细胞中表达得到了 22kDa 大小的 Core 蛋白,后者例如利用重组黄热病毒^[22] RNA 或热带丛林病毒^[23] 在 BHK 细胞中也得到了所有 HCV 结构蛋白的表达。国内也有 HCV 结构蛋白单独表达的报道^[24]。用不同的方法在不同系统中产生不同大小的 Core 蛋白的原因可能是由于糖基化和磷酸化程度的不同。

本研究构建了含有 HCV 结构基因的重组病毒感染 Sf21 细胞,RT-PCR 检测获得了 E1 基因的高水平转录。我们曾经尝试用病人血清对病毒感染后的细胞裂解液进行 Western-Blot 分析所有的结构蛋白的表达情况,但由于所获取的 HCV 感染病人血清中的病毒抗体效价较低,甚至用阳性对照都没有很明显、特异的信号,因此没有得到很好的杂交结果。选用抗 Core 的单克隆抗体进行杂交分析,获得了 19kDa 和 21kDa 两种形式的 Core 蛋白 21kDa 的蛋白是 Core 蛋白的前体,经过 Sf21 细胞中的细胞因子的切割,生成了 19kDa 的成熟蛋白,此结果与报道相符^[25, 26]。19kDa 的信号带要明显浓于 21kDa 的信号带也说明了在两种形式 Core 蛋白中,

19kDa 为主要成熟形式,而随着时间的推移,到感染后 96h 时,21kDa 蛋白的信号很弱也说明了 Core 蛋白的剪切加工已经比较完全。由于缺乏抗 E1 或 E2 的抗体,我们无法用这两种抗体进一步检测 E1 和 E2 蛋白的表达情况,但根据 SDS-PAGE 结果(图片未显示),在胶上 E1 和 E2 蛋白预期大小的位置(分别约为 35kDa 和 70kDa)有加深的带,又因为转录分析中 PCR 的产物是 E1 编码区,证明 E1 可被正确转录,推测 E1 和 E2 蛋白也被正确表达,但此结果尚待 Western-Blot 的进一步证实。

电镜观察结果表明,vAcHCVsp1 感染的 Sf21 细胞中产生很多空泡,其只分布在细胞质中,在空泡中可见直径约 50nm 的球形颗粒,其位置、大小和形状等都与文献报道相似^[17],因此我们推测这种颗粒即为由 HCV 结构蛋白组装形成的类病毒颗粒。除此之外,在细胞质和细胞核中都可见一种直径约 30nm 的球形颗粒,在 AcMNPV 感染的 Sf21 细胞中不存在此种颗粒,这种颗粒有可能是另一种形式的由 HCV 结构蛋白组装形成的结构。电镜下可见完整的杆状病毒粒子,证明 HCV 结构蛋白的表达对杆状病毒的形态发生没有明显影响。

我们还对 RNA 转录和蛋白表达情况进行了时相的分析,发现在多角体蛋白启动子的作用下,转录从 16h 开始发生,随后逐渐增强,到 72h 左右达到最高,从 96h 开始降低;而蛋白表达则在 48h 开始,在 72h 达到最高水平,随后下降。因此我们推测,利用 Bac-to-Bac 重组杆状病毒表达系统表达外源基因的表达高峰出现在感染后 72h 左右。这与我们在感染后 96h 的电镜切片中观察到了类病毒颗粒的结果是相一致的,蛋白可能在 48h 到 72h 完成了表达,72h 之后表达的结构蛋白开始组装成类病毒颗粒。

参考文献

- [1] Alter H J, Purcell R H, Shih J W, *et al.* Detection of antibody to hepatitis C virus in prospectively followed transfusion recipients with acute and chronic non-A, non-B hepatitis[J]. *N Engl J Med*, 1989, 321:1 494-1 500.
- [2] Kato N, Hijikata M, Ootsuyama Y, *et al.* Molecular cloning of the human hepatitis C virus genome from Japanese patients with non-A, non-B hepatitis[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1990, 87:9 524-9 528.
- [3] Saito I, Miyamura T, Ohbayashi A, *et al.* Hepatitis C virus infection is associated with the development of hepatocellular carcinoma[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1990, 87:6 547-6 549.
- [4] Miller R H, Purcell R H. Hepatitis C virus shares amino acid sequence similarity with pestiviruses and flaviviruses as well as members of two plant virus supergroups[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1990, 87:2 057-2 061.
- [5] Choo 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, 244:359-362.
- [6] Choo Q L, Richman K H, Han J H, *et al.* Genetic organization and diversity of the hepatitis C virus[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1991, 88:2 451-2 455.
- [7] Takamizawa A, Mori C, Fuke I, *et al.* Structure and organization of the hepatitis C virus genome isolated from human carriers[J]. *J Virol*, 1991, 65:1 105-1 113.
- [8] Reynolds J E, Kaminski A, Kettinen H J, *et al.* Unique features of internal initiation of hepatitis C virus RNA translation[J]. *Embo J*, 1995, 14:6 010-6 020.
- [9] Hijikata M, Kato N, Ootsuyama Y, *et al.* Gene mapping of the putative structural region of the hepatitis C virus genome by in vitro processing analysis[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1991, 88:5 547-5 551.
- [10] Grakoui A, Wychowski C, Lin C, *et al.* Expression and identification of hepatitis C virus polyprotein cleavage products[J]. *J Virol*, 1993, 67:1 385-1 395.
- [11] He L F, Alling D, Popkin T, *et al.* Determining the size of non-A, non-B hepatitis virus by filtration[J]. *J Infect Dis*, 1987, 156:636-640.
- [12] Gheysen D, Jacobs E, de Foresta F, *et al.* Assembly and release of HIV-1 precursor Pr55gag virus-like particles from recombinant baculovirus-infected insect cells[J]. *Cell*, 1989, 59:103-112.
- [13] Kirnbauer R, Booy F, Cheng N, *et al.* Papillomavirus L1 major capsid protein self-assembles into virus-like particles that are highly immunogenic[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1992, 89:12 180-12 184.
- [14] Zeng C Q, Wentz M J, Cohen J, *et al.* Characterization and replicase activity of double-layered and single-layered rotavirus-like particles expressed from baculovirus recombinants[J]. *J Virol*, 1996, 70:2 736-2 742.
- [15] Luckow V A. Baculovirus systems for the expression of human gene products[J]. *Curr Opin Biotechnol*, 1993, 4:564-572.
- [16] Joseph S, David W R. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual* [M]. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press. 2001.
- [17] Baumert T F, Ito S, Wong D T, *et al.* Hepatitis C virus structural proteins assemble into virus like particles in insect cells[J]. *J Virol*, 1998, 72:3 827-3 836.
- [18] Muraiso K, Hijikata M, Ohkoshi S, *et al.* A structural protein of hepatitis C virus expressed in *E. coli* facilitates accurate detection of hepatitis C virus[J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 1990, 172:511-516.
- [19] Falcon V, Acosta-Rivero N, China G, *et al.* Ultrastructural evidences of HCV infection in hepatocytes of chronically HCV-infected patients[J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2003, 305:1 085-1 090.
- [20] Santolini E, Migliaccio G, La Monica N. Biosynthesis and bi-

- ochemical properties of the hepatitis C virus core protein [J]. *J Virol*, 1994, 68:3 631-3 641.
- [21] Matsuura Y, Harada S, Suzuki R, *et al.* Expression of processed envelope protein of hepatitis C virus in mammalian and insect cells [J]. *J Virol*, 1992, 66:1 425-1 431.
- [22] Molenkamp R, Kooi E A, Lucassen M A, *et al.* Yellow fever virus replicons as an expression system for hepatitis C virus structural proteins [J]. *J Virol*, 2003, 77:1 644-1 648.
- [23] Blanchard E, Brand D, Trassard S, *et al.* Hepatitis C virus-like particle morphogenesis [J]. *J Virol*, 2002, 76:4 073-4 079.
- [24] 余应龙,叶林柏,廖庆姣,等. HCV 核心蛋白诱导 Cos-7 细胞凋亡 [J]. *中国病毒学*, 2003, 18(4):326-329.
- [25] McLauchlan J, Lemberg M K, Hope G, *et al.* Intramembrane proteolysis promotes trafficking of hepatitis C virus core protein to lipid droplets [J]. *Embo J*, 2002, 21:3 980-3 988.
- [26] Weihofen A, Binns K, Lemberg M K, *et al.* Identification of signal peptide peptidase, a presenilin-type aspartic protease [J]. *Science*, 2002, 296:2 215-2 218.