第 20 卷第5期
2005 年 10月

中 国 病 毒 学
VIROLOGICA SINICA

20(5):480-484
October 2005

丙型肝炎病毒结构蛋白 E1 在昆虫细胞中的表达及定位

马 佳[1.2],王瑞青[1],宋建华[1.2],梁昌镛[1.2],陈新文**

(1. 中国科学院武汉病毒研究所 病毒学国家重点实验室,湖北武汉 430071; 2. 中国科学院研究生院, 北京 100039)

Expression and Localization of the HCV Structural Protein E1 in Insect Cells

MA Jia[1.2], WANG Rui-qing[1], SONG Jian-hua[1,2], LIANG Chang-yong[1,2], CHEN Xin-wen[1**]

(1. *State Key Laboratory of Virology, Wuhan Institute of Virology, Chinese Academy of Sciences, Wuhan* 430071, *China*; 2. *Graduate School, Chinese Academy of Sciences, Beijing* 100039, *China*)

Abstract: In this work, the truncated *Hepatitis C virus* (HCV) structural protein E1 fused with GST was expressed in *E. coli*. The fusion protein was used as an antigen to immunize rabbit to produce the antibody for detection. To express HCV E1 in insect cells, the recombinant baculovirus (vAcHCVE1) containing the HCV full length E1 gene was constructed by Bac-to-Bac recombinant baculovirus expression system. It was proved to be able to produce HCV structural protein E1 in insect cell Sf9. The expression protein was detected by Western blot analysis. The size of the product was 30 kDa, which was bigger than the predicted size of 20 kDa, implicating post-translational modification such as glycosylation. By using confocal microscope, it was observed that the E1 protein was localized in the cytoplasm and cellular membrane 48h after inflection.

Key words: *Hepatitis C virus* (HCV); E1; Expression; Sf9; Confocal microscope

摘要: 本文在大肠杆菌中表达了与 GST 融合无跨膜区的丙型肝炎病毒 (Hepatitis C Virus, HCV) E1 蛋白,并通过免疫兔制备了兔抗 E1 的抗血清。然后利用 Bac-to-Bac 杆状病毒表达系统构建了含有 HCV 结构蛋白 E1 基因的重组杆状病毒 vAcHCVE1。通过 Western blot 分析, E1 蛋白在 Sf9 细胞中表达分子量大小为 30kDa 大于预测的 20kDa,表明存在翻译后修饰如糖基化等。通过 Confocal 显微镜观察当感染 48h 后 E1 蛋白定位在细胞质和细胞膜上。

关键词:丙型肝炎病毒;E1;表达;Sf9 细胞;激光共聚焦显微镜

中图分类号:R373 **文献标识码**:A **文章编号**:1003-5125(2005)05-0480-05

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。

HCV 为黄病毒科(*Flaviviridae*)丙型肝炎病毒属 (*Hepacivirus*)的唯一成员[4],其为有包膜的单股正链 RNA 病毒,基因组全长 9.4～9.6kb,仅包含一个大开放阅读框,编码一个大约 3000 aa 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。HCV 结构蛋白包括核衣壳蛋白(Core)和两个包膜糖蛋白(E1 和 E2)。

HCV 结构蛋白 E1 为高度糖基化蛋白, 具有 5 个潜在的 N 糖基化位点, 分别位于氨基酸序列的 196、209、234、305 和 325 位。而第 5 个糖基化位点由于位于 Asn-Trp-Ser 后紧接 Pro 而阻止了核心糖链的增加[8]。E1、E2 是 HCV 的两个膜蛋白,而 E2

收稿日期:2004-03-31,修回日期:2005-04-19
作者简介:马佳(1979 -),男,硕士研究生,从事丙型肝炎病毒分子生物学研究
** 通迅作者:陈新文(1964 -),男,博士,研究员. Corresponding author. Tel: 027-87199106, E-mail: chenxw@pentium.whiov.ac.cn

© 1995-2006 Tsinghua Tongfang Optical Disc Co., Ltd. All rights reserved.

估计是 HCV 基因组上最高可变的区域[9]。而 E1 具有很高的保守性,蛋白的糖基化与蛋白的抗原性和受体结合有很大关系。因此 E1 有很好的成为 HCV 诊断试剂和疫苗的靶位潜力。

昆虫杆状病毒作为一种高效的真核表达载体得到广泛的应用。在昆虫细胞中翻译后的修饰、蛋白质的正确折叠和寡聚化与哺乳动物细胞系统相似,而且与哺乳动物细胞表达系统相比,昆虫杆状病毒表达系统表达异源蛋白水平更高[10,11]。在本研究中,我们尝试了在昆虫细胞 Sf9 中利用 Bac-to-Bac 重组杆状病毒表达系统表达 HCV 结构蛋白 E1,并研究了其在细胞中的定位。

1　材料与方法

1.1　昆虫病毒和细胞系

昆虫细胞 Sf9 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。AcMNPV Bacmid 来源于 Bac-to-Bac 系统(GIBCO 公司)。含有 HCV 全基因组的质粒 pBRTM/HCV3011 由广东军区武汉总医院的焦成松博士惠赠。表达增强荧光蛋白(eGFP)的重组 AcMNPV(vAceGFP)由本室构建。

1.2　HCV E1 基因的克隆

根据 HCV *E*1 基因序列,设计了三个引物,E_{1F}: CATGAATTCCTCGGGGCTTTACC,用于 E1 全长基因 PCR 的 E_{1R} (F): *AAGCTT*TTAGGCAAATAGCAGCAGCACTAC 和用于截断型无跨膜区 E1 基因 PCR 的 E_{1R} (NTRD): *AAGCTT*TTAAGCTACCACCAACGCTGC(斜体为引入的酶切位点 *Hin*d III)。所有引物由上海博亚生物技术公司合成。

以含有 HCV1b 全长基因组的质粒 pBRTM/HCV1-3011 为模板,利用引物 E_{1F} 和 E_{1R} (F) 合成完整的 *E*1 基因,引物 E_{1F} 和 E_{1R} (NTRD) 用于合成原核表达无跨膜区的 *E*1 基因。完整的 *E*1 基因 PCR 扩增的反应条件为:94 ℃预变性 5 min,按照 94 ℃1 min,57 ℃1 min,72 ℃1 min 设定 20 个循环,最后 72 ℃终延伸 10 min。无跨膜区的 *E*1 基因 PCR 扩增的反应条件为:94 ℃预变性 5 min,按照 94 ℃1 min,57 ℃45 s,72 ℃1 min 设定 20 个循环,最后 72 ℃终延伸 10 min。PCR 产物分别克隆到 pGEM-T Easy(Promega 公司)获得重组质粒:pTE1(F),pTE1(NTR),测序鉴定。

1.3　E1 的原核表达及抗体的制备

*Eco*RI 和 *Hin*dIII 双酶切 pTE1(NTR),回收 420 bp 的片段,连接到以相同酶切的 pGEX-KG 载体上得到 pGEX-KGE1(NTR)(图 4),将挑取的克隆培养过夜。后以 1 ∶100 转接到培养基,IPTG 0.5 mmol/L 30 ℃诱导 4 h。将诱导的蛋白从聚丙烯酰胺胶上割下,以 200 μg 的量免疫兔。每三周免疫一次,连续免疫 3 次。

取健康 Sf9 细胞超声波破碎后,加入兔抗 E1 血清 4 ℃静置一周,进行中和。

1.4　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。具体过程简述如下:采用 *Eco*R Ⅰ和 *Hin*d Ⅲ消化 pT-E1(F),将全长的 *E*1 基因克隆到改造的 pFastBacDual 载体(GIBCO 公司) pFastBacDual (eGFP) (eGFP 位于 p10 启动子下游)上 *Eco*R Ⅰ和 *Hin*d Ⅲ位点,这样 *E*1 基因受多角体蛋白基因(*pol*h)启动子控制,得到 pFastDE1 供体质粒。

利用供体质粒 pFastDE1 转座含 helper 质粒与 AcMNPV Bacmid 的大肠杆菌感受态细胞,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: AcHCVE1。提取重组 AcHCVE1 DNA, PCR 分析鉴定。

1.5　Sf9 细胞转染

利用脂质体(Invitrogen)将所构建重组 AcHCVE1 Bacmid DNA 转染 Sf9 细胞得到重组病毒 vAcHCVE1,操作过程根据产品操作说明书进行。利用试剂盒提供的 M13F 和 E1R 引物进行 PCR 鉴定,终点稀释法测定病毒的滴度,4 ℃保藏备用。

1.6　HCV 结构蛋白 E1 表达的检测

以 1 个感染复数的 vAcHCVE1 感染 Sf9 细胞,取感染后 72 h,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(12 V, 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。一抗为兔抗 E1 血清。二抗采用羊抗兔 IgG-AP (三鹰公司),最后采用 NBT 和 BCIP 显色。

1.7　免疫荧光定位

以 1 个感染复数的 vAcHCVE1 感染 Sf9 细胞,取感染 48 h 细胞用含 2 %甲醛的 PBS(pH 7.4) 20 ℃固定 15 min。用含有 0.2 % Triton X-100 和 1 % NGS 的 PBS 溶液在冰上透化 5 min。然后与中和的 E1 抗体室温温育 1 h 后与羊抗兔 IgG-Rhodamine (三鹰公司)二抗室温温育 1 h。在 Confocal 显

© 1995-2006 Tsinghua Tongfang Optical Disc Co., Ltd. All rights reserved.

微镜下观察(Leica 公司产品型号为 S2),具体步骤见参考文献[12]。只表达 eGFP 的重组病毒 vAceGFP 作为对照病毒。

2 结果

2.1 E1 基因扩增及克隆

HCV 全长和截短的 *E1* 基因通过 PCR 合成并克隆到载体质粒获得重组质粒 pTE1(F)和 pTE1(NTR),经过 *Eco*R I 酶切分析鉴定正确(图 1)(图 2),然后进行测序,结果表明获得的基因克隆完全正确,E1 基因全长为 561 bp,截断的基因为 420 bp。

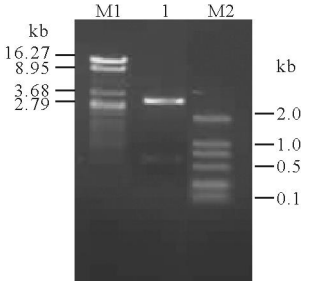

图 1 pTE1(F)的 *Eco*RI 酶切鉴定

Fig. 1 Identification of pTE1(F) by *Eco*RI digestion

M1,λDNA digested with *Hin*dIII + *Eco*RI + *Bam*HI; M2, DL2000; 1, Positive clones.

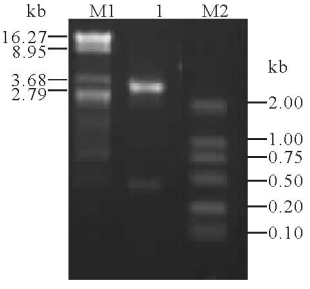

图 2 pTE1(NTR)的 *Eco*RI 酶切鉴定

Fig. 2 Identification of pTE1(NTR) by *Eco*RI digestion

M1,λDNA digested with *Hin*dIII + *Eco*RI + *Bam*HI; M2, DL2000; 1, Positive clones.

2.2 原核表达及抗体的制备

将截短的 E1 基因从 pTE1(NTR)克隆到表达载体得到 pGEX-KGE1(NTR),经过 *Eco*RI 和 *Hin*dIII 双酶切鉴定得到正确克隆(图 3)。在 IPTG,30 ℃诱导 4 h。经 12%聚丙稀酰胺检测,可见分子量为 42 kDa 表达带(图 4),GST 蛋白的大小为 26 kDa,无跨膜区 E1 蛋白大小为 16 kDa,融和蛋白的大小与预计的相符。采用 Western Blot 的方法检测抗兔血清,测得效价为 1:1000。

2.3 构建供体质粒

为了构建重组 AcMNPV 我们首先构建了供体质粒,即将全长的 *E1* 基因克隆到 p FastBacDual (eGFP)的 *Eco*RI 和 *Hin*dIII 位点得到 pFBDE1。pFastBacDual (eGFP)含有杆状病毒的两个晚期启动子 *pol*h 和 p10 启动子,同时 p10 启动子控制 eGFP 基因。所构建的质粒 pFBDE1 中 HCV *E1* 基因位于 *pol*h 启动子下游。

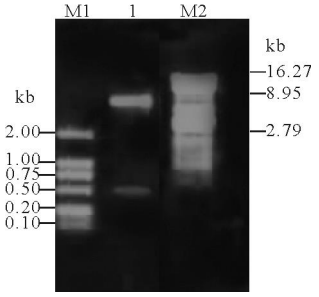

图 3 pGEXKG-E1(NTR)酶切鉴定

Fig. 3 Identification of pGEXKG-E1(NTR) by restriction enzymes digestion

M2,λDNA + *Hin*dIII + *Eco*RI + *Bam*HI; M1, DL2000; 1, pGEXKG - E1(NTR) + *Hin*dIII + *Eco*RI.

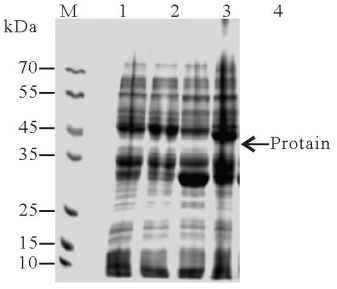

图 4 E1(NTR)在 *E. coli* 中的表达

Fig. 4 Expression of E1(NTR) in *E. coli*

M, Marker; 1, Uninduced pGEM-KG; 2, Uninduced pGEXKG-E1(NTR); 3, Induced pGEM-KG; 4, Induced pGEXKG-E1(NTR)

2.4 重组 AcMNPV Bacmid 的鉴定

重组 pFBDE1 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,AcHCVE1 bacmid。提取 bacmid DNA,利用 M13R 与 HCV E1F 进行 PCR 鉴定,得到一条大小为 1.3 kb 的产物,与预计的结果吻合。

2.5 重组 Bacmid 转染 Sf9 细胞

提纯的 AcHCVE1 BacmidDNA 转染 Sf9 细胞。转染一周后 50%细胞出现荧光。进一步扩增病毒,从 BV 中提取病毒基因组 DNA 为模板,E1F 和 M13R 为引物进行 PCR,得到大小为 1.3 kb 左右的目的带(图 5),与预计的结果吻合,表明获得了正确的重组病毒 vAcHCVE1。增殖病毒测定滴度。

2.6 HCV 结构蛋白表达

vAcHCVE1 感染 Sf9 细胞,用抗 E1 的抗体检测 HCV E1 表达,在 60 h 表达量最大,表达的 E1 蛋白大小为 30 kDa 左右(图 6)。而无跨膜区 E1

© 1995-2006 Tsinghua Tongfang Optical Disc Co., Ltd. All rights reserved.

(NTR)在 *E. coli* 表达的 Western blotting 分析可见与 GST 融合的 E1(NTR)在 42 kDa 有阳性带(图 6),其自身的大小为 16 kDa 与预计的一致。全长的 E1 预计为 20 kDa,但其表达对 *E. coli* 有毒性[14]。在 Sf9 细胞中全长 E1 表达蛋白大小为 30 kDa(图 6),比预计的分子量大,推测是蛋白糖基化的结果。

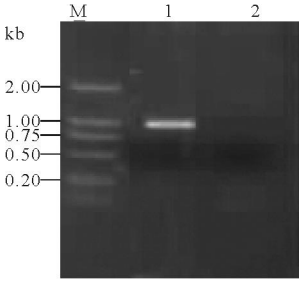

图 5　vAcHCVE1 PCR 鉴定

Fig. 5　Identification of vAcHCVE1 by PCR

M,DL2000;1, vAcHCVE1;2, Negative control.

2.7　免疫荧光定位

取被 vAcHCVE1 病毒感染 48h 的昆虫细胞,

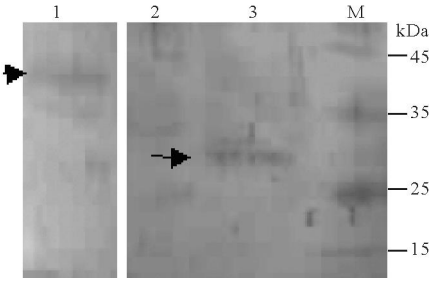

图 6　vAcHCVE1 感染后表达蛋白的分析

Fig. 6　Western-blot analysis of HCV E1protein expression in Sf9 cells

1,Induced pGEXKG-E1(NTR);2, Sf9 cells infected by vAceGFP; 3, Sf9cells infected by vAcHCVE1 at 48 h.

E1 抗体为一抗进行荧光标记激光共聚焦显微镜观察,结果显示,eGFP 在细胞内均匀分布,而表达的 E1 蛋白主要分布在细胞质和质膜上,同时在细胞质内可观察到蛋白的堆积现象。而只含有 eGFP 的 AcMNPV 重组病毒(vAceGFP)感染的细胞中,eGFP 在细胞内均匀分布,并无因为 E1 的表达而出现的特异性红色荧光(图 7)。

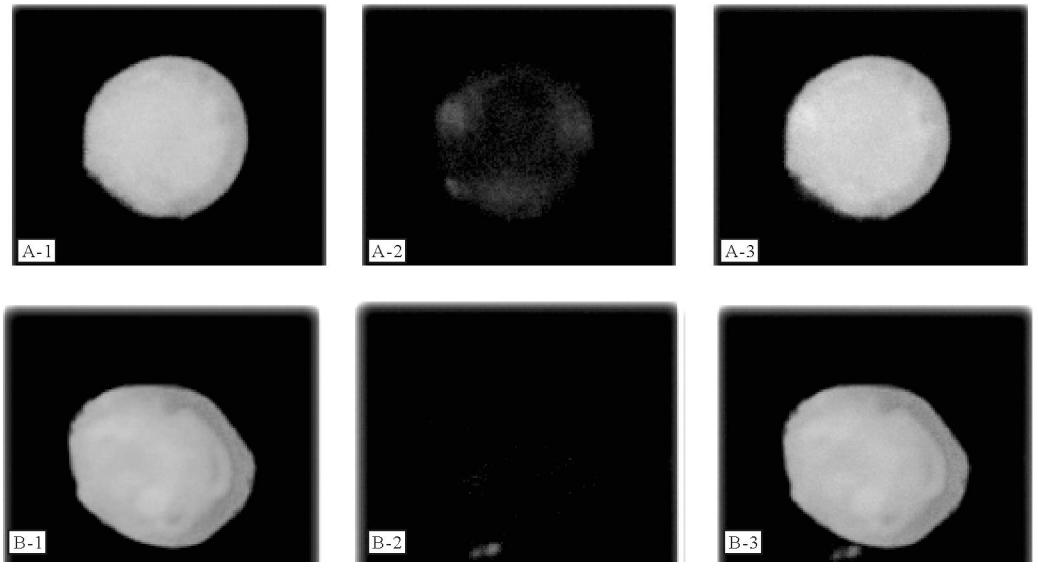

图 7　HCV 结构蛋白 E1 在 Sf9 细胞内的定位

Fig. 7　Location of HCV structural protein E1 in the Sf9 cells

A,AcE1 infected with the Sf9 cells;B,AceGFP infected with the Sf9 cells;1/2,Represent the e GFP and the Rhodamine respectively;3, overlay of 1 and 2.

3　讨论

研究显示 HCV E1 蛋白为高度 N 糖基化的膜结合蛋白[8]。通过原核表达 E1 制备的兔抗 E1 抗体检测在 Sf9 细胞表达的 E1,显示表达蛋白大小为 30 kDa 左右为已糖基化蛋白。HCV E1 蛋白与病人阳性血清反应率,因表达系统的差异而不同。曾有报道用杆状病毒表达的 HCV E1 抗原检测阳性血清的阳性率为 28 %[13]。本文采用杆状病毒表达系统表达的 E1 蛋白于阳性病人血清的反应率也很低(数据未显示)。初步分析可能是因为在表达过程中 E1 蛋白表达有错误折叠或糖基化不完全的情况,而导致于与阳性血清的反应率很低。

HCV E1 蛋白为膜蛋白,许多报道都有 E1 的结构预测并将其定位在膜上[18]。使用激光共聚焦显微镜对感染 48 h 的 Sf9 细胞进行免疫荧光观察

© 1995-2006 Tsinghua Tongfang Optical Disc Co., Ltd.　All rights reserved.

时。发现在细胞膜上有 E1 蛋白的存在,但大部分位于细胞质,且有聚集的现象,一种可能是表达的 E1 蛋白主要分布于细胞器膜上。研究过程中使用杆状病毒的强启动子 *polh* 在感染的晚期 E1 蛋白大量表达,当 E1 大量表达时会有折叠错误的现象[4],这也可能是 E1 没有被完全运输到细胞质膜而在细胞质内堆积的一个可能的原因。本实验采用杆状病毒载体在昆虫细胞中进行 E1 蛋白表达,由于表达的 E1 蛋白在昆虫细胞内的分布及定位与生理感染状态可能并不一致。因此其真实的定位还需要进一步的实验证明。

目前很多报道显示 E1 蛋白会引起大肠杆菌细胞裂解,昆虫细胞和哺乳动物细胞凋亡[4,15,16]在本实验中,当感染超过 60h 后会引起细胞死亡,E1 蛋白的表达可能引起细胞膜通透性的改变导致细胞死亡。同时也有文献显示 HCV 感染细胞会引起 ER 压力[17],因此大量的 E1 蛋白表达也可能引起 ER 紧张而导致细胞死亡。

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, 321:1494-1500.

[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, 87:9524-9528.

[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 U S A, 1990, 87:6547-6549.

[4] Christopher T M, Jack H N, *et al*, Evidence for a polytopic form of the E1 envelope glycoprotein of Hepatitis C virus [J]. Virus Res, 2004, 105:47-57.

[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, 88:2451-2455.

[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, 65:1105-1113.

[8] 朱 皑,孔玉英,李光地,等. 丙型肝炎病毒薄膜蛋白 E1 的分泌表达及性质 [J]. 生物化学和生物物理学学报 2004,33:634-640.

[9] Drazan K E. Molecular Biology of Hepatitis C Infection [J]. Liver Transplantation. 2000,6:396-406.

[10] Luckow V A. Baculovirus systems for the expression of human gene products [J]. Curr Opin Biotechnol, 1993, 4:564-572.

[11] 兰水云,郑玲洁,袁正宏,等. 丙型肝炎病毒 RNA 多聚酶在昆虫细胞中的表达 [J]. 中国病毒学 ,2000,15:313-317.

[12] 黄培德 细胞生物学实验指南 [M]. 北京:科学出版社,2001 1015-1016.

[13] Hsu H H, Donets M, Greenberg H B, *et al*. Characterization of hepatitis C virus structural proteins with a recombinant baculovirus expression system [J]. Hepatology. 1993, 17:763-771.

[14] Ciccagione A R, Marcantonio C, Rapicetta M, *et al*. Hepatitis C virus E1 protein induce modification of membrane permeability in *E. coli* cells [J]. Virology. 1998, 250:1-8.

[15] Ciccagione A R, Marcantonio C, Rapicetta M, *et al*, Mutagenesis of hepatitis C E1 protein affects its membrane-permeabilizing activity. [J]. J GenVirol, 2001, 82:2243-2250.

[16] Ciccagione A R, Marcantonio C, Rapicetta M, *et al*, The transmembrane domain of hepatitis C virus E1 glycoprotein induces cell death[J]. Virus Res2004, 104:1-9.

[17] Waris G, Tardif K D, Siddiqui A. Endoplasmic reticulum (ER) stress: hepatitis C virus induces an ER-nucleus signal transduction pathway and activates NF-kB and STAT-3 [J]. Biochem Pharmacol 2002, 64:1425-1430.

[18] Dubuisson J, Penin F, Moradpour D. Interaction of hepatitis C virus proteins with host cell membranes and lipids [J]. Tren in Cel Bio 2002;12:517-523.

© 1995-2006 Tsinghua Tongfang Optical Disc Co., Ltd. All rights reserved.