

## 丙型肝炎病毒 *ns2* 基因的克隆及其表达\*

刘超红<sup>1</sup>, 焦成松<sup>2</sup>, 陈新文<sup>1\*\*</sup>

(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.广州军区武汉陆军总医院, 湖北武汉 430071)

### Cloning of HCV *ns2* Gene and its Expression in Prokaryotic and Mammalian cells

LIU Chao-hong<sup>1</sup>, JIAO Chen-song<sup>2</sup>, CHEN Xin-wen<sup>1\*\*</sup>

(1.State Key Laboratory of Virology, Institute of Virology, Chinese Academy of Sciences, Wuhan 430071, China; 2. Wuhan General Hospital of Guangzhou Command. Wuhan 430071, China)

**Abstract:** The full-length and truncated *ns2* gene (2881-3078 bp) were gained through PCR using p90-HCV as template. The truncated *ns2* gene was cloned into the prokaryotic expression vector PET32a. The fusion protein Trx-His-NS2C expressed in a soluble form in *E.coli*, and then was purified by His resin. Highly specific and efficient antibody was produced by immunizing the rabbit with purified fusion protein. In addition to this, recombinant adenovirus containing the full-length *ns2* gene was constructed. The NS2 protein was expressed successfully in a size of 23.2kDa by infecting 293 and HepG2 cells with recombinant adenovirus. These results had set a base for the further studies on the structure and function of the NS2 protein.

**Key words:** NS2A; Hepatitis C virus (HCV); Antibody; Expression; Adenovirus

**摘要:** 以 p90-HCV 为模板, 通过 PCR 分别得到全长和截短(2881-3078 bp) *ns2* 基因。将截短 *ns2* 基因克隆到 pET32a 原核表达载体, 并在大肠杆菌中获得了 Trx-His-NS2C 融合蛋白的可溶性高表达。通过 His 树脂纯化得到融合蛋白, 免疫家兔获得高效价高特异性的抗体。同时构建了含有全长 *ns2* 基因的重组腺病毒, 利用该重组病毒感染 HepG2 和 293 细胞成功的表达 23.2kDa 的 NS2 蛋白。本文的研究为进一步开展 NS2 蛋白的结构与功能研究奠定了良好的基础。

**关键词:** NS2; HCV; 抗体; 表达; 腺病毒

中图分类号: R512.6

文献标识码: A

文章编号: 1003-5125(2006)03-0217-04

丙型肝炎病毒 (Hepatitis C virus, HCV) 是传染性肝炎的重要病原体, 全世界估计约 2% 的人是携带者, 大部分 HCV 感染的个体将导致慢性肝炎并可能导致肝癌。HCV 基因组翻译产生长约 3000 个氨基酸的多聚蛋白, 在宿主及病毒自身编码的蛋白酶作用下多聚蛋白被切割为 3 个结构蛋白及 6 个非结构蛋白, 分别是结构蛋白 C、E1、E2, 非结构蛋白 NS2、NS3、NS4A、NS4B、NS5A、NS5B<sup>[1]</sup>。现在最新的结果发现 P7 和 F 蛋白存在<sup>[2,3]</sup>。

研究表明, 非结构蛋白 NS2 是一个 23.2kDa 的疏水膜蛋白, 位于多聚蛋白 810-1026aa<sup>[4]</sup>。宿主信号肽酶催化 p7/NS2 之间的切割, 而 NS2 羧基端的切割由 NS2 自身和非结构蛋白 NS3 丝氨酸蛋白酶共同催化, NS2-3 的自催化活性依赖于锌元素<sup>[1]</sup>。NS2-3 蛋白酶和 NS3 丝氨酸蛋白酶之间的活性是相互独立的, 因为 NS2 上单个氨基酸突变可以使 NS2-3 蛋白酶失活, 却不影响 NS3 丝氨酸蛋白酶的活性<sup>[5]</sup>; 另一方面, NS3 丝氨酸蛋白酶的突变也不

收稿日期: 2005-11-22, 修回日期: 2005-12-14

\* 基金项目: 湖北省卫生厅重大项目 (JX1B027)

作者简介: 刘超红 (1980-), 男, 湖北省籍, 硕士研究生, 研究方向为丙肝病毒非结构蛋白与宿主因子的相互作用。

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

影响 NS2/3 之间的切割加工<sup>[5]</sup>。此外 NS2 还有以下几方面的功能：与 CIDE-B 蛋白结合抑制细胞的凋亡<sup>[6]</sup>，促进 NS5A 蛋白的磷酸化过程<sup>[7]</sup>，能够抑制乙肝病毒复制及感染<sup>[8]</sup>。到目前为止关于 HCV 病毒复制感染机制还没有详细阐明，主要原因是由于缺乏理想的细胞模型和小动物模型。体外的蛋白相互作用实验是探索上述问题的一个比较简单的途径。Pull-down 技术就是将纯化的带有标签的蛋白固定在一种基质上，然后与细胞裂解液孵育后再通过洗脱得到与目的基因相互作用的蛋白，通过末端测序技术和质谱分析获得相应的蛋白序列，从而为揭示基因某一特定功能的机制奠定基础。本实验以 pET32a 为原核表达载体，在大肠杆菌中表达截短 NS2 蛋白（C 端 66 aa），并通过 Ni-NTA 树脂纯化得到的截短 NS2 蛋白，制备了相应的抗体。同时构建了重组腺病毒质粒，获得了高滴度的重组腺病毒，在哺乳动物细胞中表达全长 *ns2* 基因，为深入研究 NS2 蛋白功能奠定了基础。

## 1 材料与方 法

### 1.1 实验材料

p90-HCV（包含感染型 HCV 分离株 H77 全长基因组），质粒 pET32a，穿梭载体 pAD-track 及腺病毒骨架 pAdeasy（本元正阳公司）为商业产品，由本室保存。293 细胞和 HepG2 细胞用含 10% 的胎牛血清（GIBICO）的 Grace（GIBICO）培养基培养。Ni-NTA His 树脂购自 Novagen 公司，各种酶及生化试剂主要购自 Takara、Biostar 等公司。

### 1.2 *ns2* 基因的分别克隆

为在原核中高效表达 *ns2* 基因，设计引物，采用 PCR 的方法合成并克隆 198bp 的截短 *ns2* 基因片段（2881-3078）。根据 *ns2* 序列（GI:2316097）利用 Primer 5.0 设计引物：上游引物 *ns2F1*（GGGGATATC CACAACGGCCTGCGAGAT（位于 p90-HCV 2881-2899bp），下游引物 *ns2R1*（GGGAAGCTTTTACAGCA ACCTCCACCCCTTAAG（位于 p90-HCV 3058-3078 bp），引物中分别引入 *EcoR* V 和 *Hind* III 酶切位点（斜体部分），在下游引物 *ns2R1* 中引入终止密码子 TAA（黑体部分），然后 p90-HCV 为模板进行 PCR。PCR 条件：94℃ 3 min, 20 个循环（94℃ 45 s, 57℃ 45 s, 72℃ 40 s）, 72℃ 5 min。PCR 产物经 *EcoRV* 和 *Hind*III 酶消化克隆到 pET32a 载体。*EcoRV* 和 *Hind*III 双酶切鉴定，测序正确的质粒为 pET32a-NS2C。为获得完整 *ns2* 基因设计一对引物 *ns2F2*（GGGGATATCCTGGACACGGAGGTGGCCGCG）

和 *ns2R2*（GGGAAGCTTTTACAGCAACCTCCACCCC TTAAG），引物中分别引入 *Kpn*I 和 *Xba*II 酶切位点，在下游引物 NS2R2 中引入终止密码子 TAA（黑体部分）。然后以 p90-HCV 为模板进行 PCR，反应条件同上。PCR 产物经 *Kpn*I 和 *Xba*II 酶切，克隆到穿梭载体 pAD-track，*Kpn*I 和 *Xba*II 酶切鉴定，测序正确质粒命名 pAD-NS2。

### 1.3 NS2 C 端截短蛋白在原核细胞中的表达及特异抗体制备

质粒 pET32a-NS2C 转化到 BL21（DE3）中，诱导表达。NS2 在 N 端与载体的 Trx-His tag 融合，利用 Ni-NTA His 树脂纯化获得融合 Trx-His tag 的 NS2 C 端部分蛋白，15%SDS-PAGE 检测纯化蛋白。纯化的 NS2C 端部分蛋白辅以弗氏佐剂免疫昆明纯种兔获得抗血清，Western-blotting 检测抗血清的特异性及效价。

### 1.4 重组质粒的构建

穿梭载体 pAD-NS2 经 *Pac*I 内切酶线性化转化含腺病毒骨架质粒 pAdeasy 的 DH5a 感受态。按一定稀释度涂板到含有 Kan 抗生素的平板上，挑取最小的白色的菌落。利用 *ns2F2* 和 *ns2R2* 引物 PCR 鉴定重组腺病毒质粒，重组腺病毒质粒命名为 pAdeasy-NS2。

### 1.5 重组病毒构建

1μg 纯化的 pAdeasy-NS2 DNA 利用 lipofectin（Invitrogen）转染 293 细胞，具体的操作参考 lipofectin 产品说明书。37℃ 培养，每隔 2 d 换一次培养液，直到成团细胞产生荧光，扩增病毒，通过反复冻融的方法获得重组腺病毒。

### 1.6 重组腺病毒滴度的测定

通过 CCID<sub>50</sub> 方法测定病毒滴度<sup>[9]</sup>。在 96 孔板中加（每孔）入不同稀释度病毒及 2×10<sup>4</sup> 个 293 细胞，37℃ 培养 2 d，计数每个病毒稀释度的荧光阳性孔，计算 CCID<sub>50</sub> 值。

### 1.7 NS2 在哺乳动物细胞中表达检测

以 5 个 MOI 重组腺病毒分别感染 293 细胞和 HepG2 细胞，37℃ 培养 2 d 后，收集细胞，PBS 清洗 3 次并重悬细胞，用 5 倍的 SDS-PAGE 样品缓冲液裂解细胞，然后 Western-blotting 分析。

## 2 结果

### 2.1 *ns2* 基因的克隆

已有的研究表明，跨膜蛋白很难在大肠杆菌中表达<sup>[10]</sup>。通过蛋白质软件分析 NS2 蛋白为跨膜蛋白，在 C 端 66aa 位于膜外，为了获得 *ns2* 基因在细菌中

的高效表达使用引物 *ns2F1* 和 *ns2R1* 通过 PCR 的方法获得截短 *ns2* 基因(编码 NS2 蛋白 C 端 66 aa), 将其克隆到表达载体 pET32a 上得到质粒 pET32a-NS2C, 酶切鉴定和序列测定质粒完全正确, 截短的 NS2 与载体中的 Trx-His tag 融合。另外, 利用引物 *ns2F2* 和 *ns2R2* 合成全长为 651 bp *ns2* 基因, 并通过 *KpnI* 和 *XbaI* 克隆到 pAD-track 得到 pAD-NS2, *KpnI* 和 *XbaI* 酶切鉴定 pAD-NS2 正确, 测序结果表明序列完全正确。

## 2.2 NS2 截短蛋白的原核表达、纯化和抗体的制备

将含有 pET32a-NS2C 质粒的 BL21 (DE3) 菌株在 1 mmol/L IPTG 中诱导表达获得 29 kDa 的诱导产物(图 1A), 与预计的融合蛋白的分子量一致(Trx-His tag 分子量为 22 kDa, 截短型 NS2 蛋白分子量为 7.05kDa)。诱导 4 h, 蛋白表达量最大。表达的蛋白经 Ni-NTA 树脂纯化, 获得截短的 Trx-His- NS2 融合蛋白。在咪唑浓度为 200 mmol/L 时, 洗脱的蛋白浓度和纯度是最佳的(图 1B)。

将纯化的蛋白免疫兔获得抗血清, Western-blotting 分析发现抗体能与纯化后的蛋白发生特异性反应, 抗体效价达 1:15000。

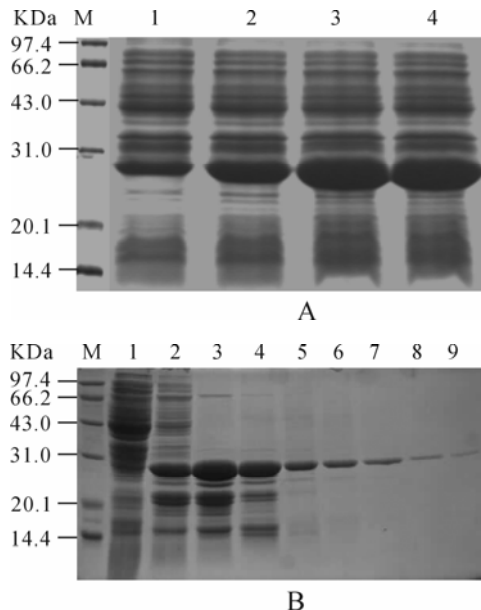


图1 截短 NS2 蛋白原核表达及纯化

Fig.1 Expression and purification of truncated NS2 protein  
A: Expression of the NS2C-His fusion protein, 1-4, *E.coli* induced at 1h, 2h, 4h and 6h, respectively; B: Purification of the NS2C-His fusion product by column chromatography, 1-9, The elution products with imidazole concentration at 20 mmol/L, 40 mmol/L, 60 mmol/L, 80 mmol/L, 100 mmol/L, 125 mmol/L, 150 mmol/L and 200 mmol/L, respectively; M, Protein marker.

## 2.3 重组病毒的构建

将穿梭质粒 pAD-NS2 转化含有 pAdeasy 的 DH5a 中, 在含有 Kan 抗生素的 LB 固体平板上,

挑选白色的阳性菌落, 提取 DNA 用 *ns2F2* 和 *ns2R2* 引物进行 PCR 鉴定, 所有克隆子均产生 651 bp 的产物, 表明目的基因正确转移到腺病毒载体上, 获得的重组质粒命名为 pAdeasy-NS2。

将纯化的 pAdeasy-NS2 DNA 转染 293 细胞, 转染 10 d 后, 可以观察到成团细胞产生绿色荧光, 表明已获得重组腺病毒 Adeasy-NS2。反复冻融裂解细胞, 含重组腺病毒 Adeasy-NS2 的细胞裂解液上清分别感染 293 和 HepG2 细胞(图 2 A 和 B), 对照细胞无荧光产生。扩增病毒并测定病毒的滴度, 滴度达  $10^9$  PFU/mL, 重组腺病毒 Adeasy-NS2 置  $-80^{\circ}\text{C}$  保藏备用。

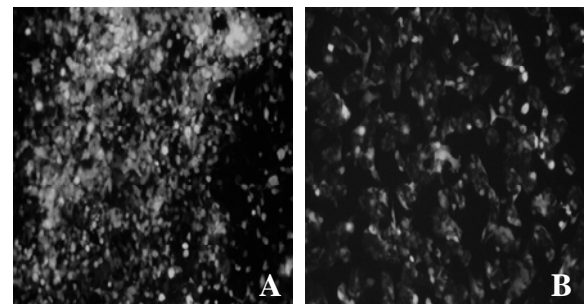


图2 重组腺病毒感染细胞  
Fig.2 recombinant adenovirus infects cells  
A. 293 cell; B. HepG<sub>2</sub> cell.

## 2.4 ns2 基因在哺乳动物细胞中的表达

重组腺病毒 Adeasy-NS2 分别感染 293 和 HepG2 细胞, 2 d 后收集细胞进行 SDS-PAGE, 用所制备的抗 NS2 血清作为一抗进行 Westernblotting 分析, 在重组腺病毒感染的 293 和 HepG2 细胞中有一条分子量为 23.2kDa 的蛋白带(图 3), 说明 NS2 获得正确的表达。

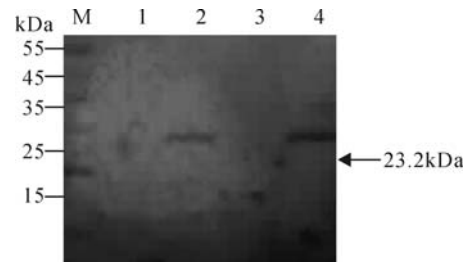


图3 重组腺病毒 Adeasy-NS2 的表达分析  
Fig.3 Analysis of recombinant adenovirus expression  
1, 293 cells; 2, 293 cells infected by recombinant Adeasy-NS2; 3, HepG<sub>2</sub> cells; 4, HepG<sub>2</sub> cells infected by recombinant Adeasy-NS2; M, marker.

## 3 讨论

非结构蛋白 NS2 在 HCV 病毒复制感染过程中起着重要的作用,具有多重功能,首先 NS2 能够与促进细胞凋亡的因子 C-IDEB 结合抑制细胞的凋亡,从而破坏细胞的正常功能<sup>[6]</sup>, C-IDEB 主要通过线粒体释放细胞色素 C 介导的 caspase 途径引起细胞的凋亡, NS2 能够抑制细胞色素 C 的释放<sup>[6]</sup>。另外, NS2 的 N 端能抑制 HBV 基因的表达和 HBV 基因组的复制,而且很有可能, NS2 蛋白对肝细胞某些特异性启动子的抑制与慢性肝病有关<sup>[8]</sup>。此外, NS2 还具有蛋白酶的功能, NS2/NS3 形成的复合体能够自身切割多聚蛋白形成 NS2 和 NS3 单体<sup>[5]</sup>。由此可见,对 NS2 蛋白功能的研究能够进一步阐明 HCV 的复制及感染机理。

为了深入研究 HCV NS2 的结构与功能,我们首先在原核和真核两种不同的表达系统中表达了 NS2 并制备了特异性的抗体。研究表明在细菌中表达含有跨膜结构的蛋白有一定的难度,本实验截取 NS2 膜外的部分蛋白所对应的基因进行表达,得到大量可溶性蛋白,利用亲和柱获得高纯度的目的蛋白。同时利用纯化的蛋白免疫家兔制得了高效价的抗体,而且所制备的抗体和原核及真核表达的 NS2 蛋白均能特异性的反应,不仅为 NS2 蛋白的结构与功能的分析奠定了基础;同时制备的高特异性抗血清和抗原可望用于开发 HCV 新型的诊断试剂盒。

腺病毒作为一套成熟的表达系统广泛用于各类基因的表达。腺病毒作为表达载体的最大一个优点就是腺病毒的高滴度,通常能够达到  $10^9$  PFU/mL。另外腺病毒具有广谱的宿主性,能够在肝细胞内大量扩增,本研究成功的构建了表达 NS2 的重组腺病毒,并获得了 NS2 在肝细胞 (HepG2) 和非肝细胞 (293) 中的高效表达,为以后的实验打下基础。

**致谢:** 感谢中国科学院武汉病毒研究所动物实验中心安学芳及朱幼玲老师在制作兔抗血清过

程中给予的帮助。

## References

- [1] Bartenschlager R, Lohmann V. Replication of hepatitis C virus [J]. *J Gen Virol*, 2000, 81 (18): 1631-1648.
- [2] Sakai A, Claire M S, Faulk K, *et al*. The p7 polypeptide of hepatitis C virus is critical for infectivity and contains functionally important genotype-specific sequences [J]. *PNAS*, 2003, 100(20):11646-11651.
- [3] Juan C, Fernando L, Gonzalo M, *et al*. Hepatitis C virus F protein sequence reveals a lack of functional constraints and a variable pattern of amino acid substitution [J]. *J Gen Virol*, 2005, 86(10):115-120.
- [4] Santolini E, Pacini L, Fipaldini C, *et al*. The NS2 protein of hepatitis C virus is a transmembrane polypeptide [J]. *J Virol*, 1995, 69 (12): 7461-7471.
- [5] Pieroni L, Santolini E, Fipaldini C, *et al*. In vitro study of the NS2-3 protease of hepatitis C virus [J]. *Virology*, 1997, 71(9): 6373-6380.
- [6] Lars E, Nathalie F, Herve L, *et al*. The hepatitis C virus NS2 protein is an inhibitor of CIDE-B-induced apoptosis [J]. *Biol Chem*, 2003, 278(20): 18256-18264.
- [7] Koch J O, Bartenschlager R. Modulation of hepatitis C virus NS5A hyperphosphorylation by nonstructural proteins NS3, NS4A, and NS4B [J]. *J Virol*, 1999, 73 (9): 7138-7146.
- [8] Dumoulin F L, von dem Bussche A, Li J, *et al*. Hepatitis C virus NS2 protein inhibits gene expression from different cellular and viral promoters in hepatic and nonhepatic cell lines [J]. *Virology*, 2003, 305(2): 260-269.
- [9] Wood R, Goens S, Carman P, *et al*. Effect on hematopoietic tissue of experimental infection of calves with noncytopathic type 2 bovine viral diarrhea virus [J]. *Can J Vet Res*. 2004, 68 (1): 42-48.
- [10] Loeb J A, Khurana T S, Robbins J T, *et al*. Expression patterns of transmembrane and released forms of neuregulin during spinal cord and neuromuscular synapse development [J]. *Development*. 1999, 126 (4) : 781-791.