

丙型肝炎病毒包膜蛋白 E2 的原核表达及鉴定

代志琰¹, 李 刚¹, 徐启桓¹, 姚集鲁¹, 韩晓燕², 杨 林¹, 陈文思³
(中山大学附属第三医院 1. 感染病科; 2. 中心实验室; 3. 检验科, 广州 510630)

摘 要:【目的】构建丙型肝炎病毒(HCV)包膜蛋白 E2 基因的重组原核表达质粒,并获得 E2 蛋白的高效表达。【方法】通过 RT-PCR 法从 HCV RNA 阳性的血清标本中扩增出 HCV E2 区基因 595 bp, PCR 产物分别经 BamH 和 Hind 双酶切后连接到经同样酶切的原核表达载体 PET22b(+),转化大肠杆菌 DH5 菌株,获得阳性重组质粒 PETB,阳性质粒转化 BL21(DE3),IPTG 诱导表达,表达产物经 SDS-PAGE 和 Western blot 鉴定。【结果】成功地克隆了 HCV E2 区基因,构建了其原核表达质粒,并在 BL21(DE3)菌中表达 HCV E2 重组蛋白,Western blot 显示表达蛋白具有抗原性。【结论】HCV E2 重组蛋白的表达和鉴定为进一步了解 HCV 糖蛋白 E2 的功能及其与 CD81 二者的相互关系打下基础。

关键词: 丙型肝炎病毒; 包膜蛋白; 原核表达

中图分类号: R37; Q81

文献标识码: A

文章编号: 1672-3554(2006)01-0083-03

Expression and Identification of Hepatitis C Virus Envelope Protein E2

DAI Zhi-yan¹, LI Gang¹, XU Qi-huan¹, YAO Ji-lu¹, HAN Xiao-yan², YANG Lin¹, CHEN Wen-si³
(1.Department of Infectious Diseases, 2.Medical Research Center, 3.Central Laboratory, The Third Affiliated Hospital, SUN Yat-sen University, Guangzhou 510630, China)

Abstract: 【Objective】To study the expression and identification of hepatitis C virus envelope protein E2 in prokaryotic expression systems. 【Methods】The HCV E2 gene was amplified by RT-PCR and was digested by BamH and HindIII. The fragment was inserted into an Escherichia coli expression vector, pET22b (+), and used to transform E coli DH5. The positive recombinant plasmid was obtained. The target protein was expressed in BL21 (DE3) and induced by IPTG. The antigenicity of the protein was demonstrated by SDS-PAGE and Western blot analysis. 【Results】Prokaryotic expression plasmid of HCV E2 was constructed successfully. The expression of protein E2 was induced by IPTG. The results of Western blot analysis suggested that the protein E2 had antigenicity. 【Conclusion】The expression and identification of HCV E2 protein set a basis for studying HCV glycoprotein function and the interaction between HCV E2 and CD81.

Key words: hepatitis C virus; envelope protein; gene expression

[J SUN Yat-sen Univ(Med Sci), 2006, 27(1):83-85, 89]

HCV是慢性肝炎的主要病因之一,60%~80%的HCV感染者将发展为慢性肝炎,约25%在3~20年后可能发展成肝硬化,部分患者可进展为肝细胞癌。在HCV基因组中,包膜蛋白E2区基因变异最大,E2蛋白不仅在HCV吸附宿主细胞过程中发挥重要作用,而且还参与了信号转导过程。研究显示CD81能与HCV E2结合,认为CD81可能是HCV的受体。本研究对HCV E2区基因进行了克隆、原核表达及鉴定,为进一步了解包膜蛋白E2的功能及其与CD81的相互关系打下基础。

1 材料与方法

1.1 血清标本

取自本科住院病人,为33岁女性,ALT 102.6 IU/L,HCV RNA 4.72 × 10³ copies/mL,anti-HCV IgG(+),anti-HCV IgM(-),临床诊断慢性丙型肝炎,诊断标准按照2000年西安第十次全国病毒性肝炎及肝病学术会议制定的《病毒性肝炎防治方案》,无输血史及抗病毒治疗史,其他肝炎病毒标志物检

收稿日期: 2005-06-08

基金项目: 国家教育部高等学校骨干教师资助计划基金资助项目(2000)

作者简介: 代志琰(1973-),女,四川泸州人,博士生,讲师;姚集鲁,教授,导师。E-mail: wn9898@163.com

测阴性。

1.2 试剂

E.coli DH5, BL21(DE3) 等菌株由本室保存, PET22b(+)质粒购自 Novagen 公司, anti-His 单克隆抗体购自 Invitrogen 公司, anti-HCVE2 单克隆抗体购自 Biodesign 公司, 各种酶及主要生化试剂购自 Invitrogen、MBI、Takara、Qiagen、Omiga、KPL、Promega 等公司。

1.3 方法

1.3.1 PCR 引物设计 根据 Enomoto 等^[1]报道的 HCV-1b 序列设计了特异性的引物。由广州赛百盛公司合成。S3: 5'-TCA GGA TCC TCC AGT GTA TTG CTT CAC-3'; S4: 5'-TGC AAG CTT CAG GTA TTG CAC GTC CA-3'; (划线处分别为 BamH、Hind 酶切位点)。用巢式 PCR, 即外引物为 P1、P6, 内引物为 P3、P4, 目的片段长度为 595 bp。

1.3.2 HCV RNA 的提取、逆转录和 PCR 扩增 E2 基因 运用 MBI 公司逆转录试剂盒, 按操作步骤制备终体积为 20 μ L 的产物 cDNA 置-20 保存备用。PCR 参数如下: 94 5 min 预变性, 94 30 s 变性, 58 40 s 退火, 72 1 min 延伸, 共 25 个循环, 72 总延伸 10 min。将 PCR 产物在 2% 的琼脂糖凝胶中电泳鉴定。

1.3.3 原核重组表达载体构建 将 PCR 扩增 HCV E2 区 DNA 片段分别经 BamH、Hind 双酶切后连接到经同样酶切原核表达载体 PET22b(+)上, 转化大肠杆菌 DH5 菌株, 获得阳性重组质粒 PETB, 测序工作由大连宝生物技术公司完成。

1.3.4 包膜蛋白 E2 在 DE3 菌株中的表达 将含有重组质粒 PETB 的 DE3 单菌落接种于 3 mL 的 LB 培养基中, 37 培养过夜, 取 0.06 mL 过夜菌接种于 6 mL 培养基中, 37 振荡 2.5~3 h, 加入 IPTG 至终浓度为 1 mmol/L, 诱导 4~8 h。诱导后的细菌超声波裂解, 经 SDS-PAGE 凝胶电泳, 分析 E2 蛋白表达情况。

1.3.5 Western blot 检测融合蛋白 含重组质粒 PETB 的菌体蛋白经 SDS-PAGE 凝胶电泳后电转移至 PVDF 膜上。将膜置于封闭液中 37 封闭 2 h, 然后加鼠抗的 anti-His 单克隆抗体 (或鼠抗的 anti-HCV E2 单克隆抗体) 在 37 孵育 1 h, 漂洗后再加入辣根过氧化物酶标记的山羊抗鼠 IgG, 在 37 孵育 1 h, 充分漂洗后用底物 TMB 显色。

2 结果

2.1 原核重组表达载体的构建及鉴定

HCV E2 基因经过序列特异性引物的 PCR 扩增, PCR 产物分别经 BamH、Hind 双酶切后连接到经同样酶切的原核表达载体 PET22b(+)上, 获得阳性重组质粒 PETB。阳性克隆提取质粒经 BamH、Hind 双酶切鉴定, 与目的片段长度吻合(图 1)。以重组质粒为测序模板, 用 T7 启动子引物和 T7 终止子引物正反向测定重组质粒序列, 经测序鉴定, 证明插入片段序列与目的片段序列相符, 并且读码框架与载体相吻合。

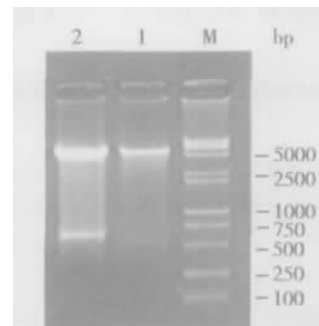


图 1 阳性重组质粒 PETB 的双酶切鉴定

Fig.1 Restriction analysis of recombinant plasmid
M: DNA marker; 1: Plasmid PET22b(+) digested with BamH and Hind ; 2: Recombinant plasmid PETB digested with BamH and Hind

2.2 包膜蛋白 E2 在 DE3 中的表达

携带重组质粒 PETB 的 DE3 菌株, 经 IPTG 诱导后经 SDS-PAGE 电泳分析证实表达了命名为

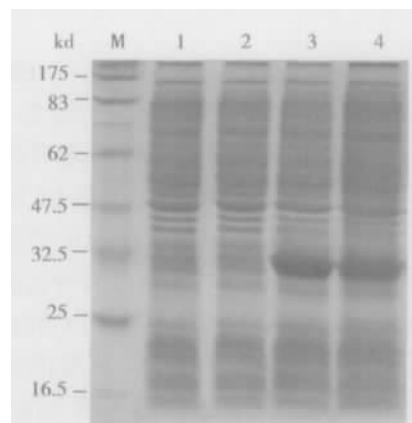


图 2 原核表达蛋白质 PB 的 SDS-PAGE 鉴定

Fig.2 SDS-page analysis of fusion protein expression
M: Protein marker; 1: Negative bacteria; 2: Preinduction of fusion protein; 3: Induction of fusion protein for 4 h; 4: Induction of fusion protein for 8 h

PB的重组蛋白。由于 PB 在菌体内以细胞周质成分存在, 主要位于细菌裂解液的上清部分, 表明这种蛋白呈可溶表达(图 2)。

2.3 Western blot 检测融合蛋白

分别以 anti-His 单克隆抗体、anti-HCV E2 单克隆抗体为一抗进行 Western blot, 检测证实该融合蛋白具有抗原性, 显色可见 PB 的菌体蛋白有单一条带, 其分子量约为 30 ku, 与所预计的融合蛋白大小一致(图 3, 4)。

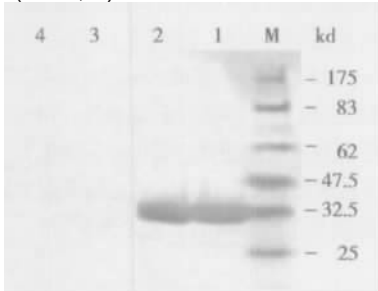


图 3 蛋白质 PB 的 Western blot 鉴定 (一抗为 anti-His 单克隆抗体)

Fig.3 Western blot analysis of fusion protein expression (Histay monodonal antibody)

M: Protein marker; 1: Induction of fusion protein for 8 h; 2: Induction of fusion protein for 4 h; 3: Preinduction of fusion protein; 4: Negative bacteria

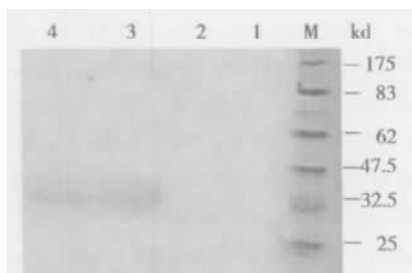


图 4 蛋白质 PB 的 Western blot 鉴定(一抗为 anti-HCV E2 单克隆抗体)

Fig.4 Western blot analysis of fusion protein expression (Histay monodonal antibody)

M: protein marker; 1: negative bacteria; 2: preinduction of fusion protein; 3: induction of fusion protein for 8 h; 4: induction of fusion protein for 4 h

3 讨论

HCV 属黄病毒科丙型肝炎病毒属, 其基因组为单股正链 RNA, 全长约 9.4 kb, 含一个开放读码框架(ORF), 编码的蛋白质为结构蛋白(包括核心蛋白 C 和包膜蛋白 E1、E2) 及非结构蛋白(NS2、NS3、NS4A、NS4B、NS5A、NS5B)^[2]。随着 HCV 全基

因组得到克隆化, 人们对 HCV 进行了广泛的研究。但在 HCV 的致病机制、特异性药物的研制、疫苗的开发等方面仍然进展缓慢。究其原因, HCV 的受体一直未得到鉴定也是其中之一。1998 年 Pileri 等^[3]认为 HCV 包膜蛋白 E2 可与 CD81 发生特异性结合, 提出 CD81 可能是丙型肝炎病毒的细胞受体。HCV 与 CD81 的结合可能在介导病毒附着、侵入人体细胞的过程中起关键作用。从而引起了人们的广泛重视。随后的一系列研究都集中在 E2 蛋白的表达及与 CD81 的相互作用上^[4-8]。

E2 蛋白有多个抗原表位, 一些位于高变区, 一些位于相对保守区。因为在 CD81 中结合部位是细胞外大环, 此区域在人类和黑猩猩中是非常保守的, 因此 E2 蛋白与 CD81 结合的抗原表位也可能是在相对保守区^[9]。由此, 我们根据 Enomoto 等^[1]报道的 HCV-1b 序列设计了引物, 扩增出目的基因区 B。经构建重组质粒及测序, 所得序列与 GeneBank 中 HCV 多个已发表的各血清亚型序列进行同源性比较, 证实目的序列针对 E2 相对保守区域, 且涵盖能与 CD81 特异性结合的位点。与多个已知分离株的相应序列的核苷酸同源性在 90%~94% 之间, 推导的氨基酸序列同源性在 83%~91%, 为中国人常见的 1b 亚型。

我们选用原核表达载体 PET22b (+) 来表达 HCV E2 蛋白, 克隆入该载体的外源基因经诱导后, 通过 6 His 和信号识别肽融合表达目的蛋白, 带有 pelB 信号肽序列的目的蛋白被运送到细胞周质中, 增加了蛋白的可溶性, 同时更有利于蛋白折叠和二硫键的形成产生活性, 不仅可以大量表达目的蛋白, 为目的蛋白的纯化及蛋白质的生物学活性分析带来了便利。

本研究成功完成了 HCV 包膜蛋白 E2 基因的克隆并进行原核表达, 在表达蛋白质的过程中, 我们通过摸索获得了有利于蛋白高效、大量、可溶性表达的适合条件, 虽在诱导过程中出现细菌生长缓慢, 但未影响蛋白的表达量。分别以 anti-His 单克隆抗体、anti-HCVE2 单克隆抗体为一抗做 Western blot 检测, 显色可见 PB 的菌体蛋白条带, 与所预计的融合蛋白大小一致, 证实该融合蛋白具有抗原性。由此可以判定已成功表达 HCV E2 区包膜蛋白。

完成 HCV E2 包膜蛋白的原核表达及活性鉴

(下转第 89 页 to page 89)

空腹 FFA 却无明显改变, 那格列奈降低空腹 FFA 的作用可能并非由改善早期胰岛素分泌所引起。

未经药物干预时空腹 FFA 与 BMI、TG、HOMA-IRI 呈正相关, 与胰岛素敏感性呈负相关^[5]。短期胰岛素泵强化治疗可改善 2 型糖尿病患者胰岛 B 细胞功能, 减轻胰岛素抵抗, 降低 TG 及空腹 FFA^[6]。本研究中, 那格列奈及瑞格列奈对胰岛 B 细胞功能、胰岛素抵抗的改善程度相似, 同时瑞格列奈组及那格列奈组体重及 BMI 无明显变化, TG 及空腹胰岛素水平均有下降趋势, 但两组之间比较无明显差异, 而那格列奈组与瑞格列奈组相比空腹 FFA 明显降低, 可见那格列奈对空腹 FFA 的下降作用可能独立于 BMI、TG 及空腹胰岛素水平改变之外。瑞格列奈组的空腹血糖降低比那格列奈更显著, 但对空腹 FFA 作用两者相反, 那格列奈降低空腹 FFA 的作用也并非由降糖作用引起。综上所述, 那格列奈对 2 型糖尿病患者空腹 FFA 的下降作用不能完全用促进胰岛素分泌和降低血糖、改善胰岛功能来解释, 其机制有待进一步研究。

参考文献:

[1] MACHO L, FICKOVA M, ZORAD S, et al. Effects of new hypoglycemic agent A-4166 on lipolysis and

lipogenesis in rat adipocytes[J]. *Endocr Regul*, 2000, 34(3): 119- 126.

[2] MORI Y, KITAHARA Y, MIURA K. et al. Comparison of voglibose and nateglinide for their acute effects on insulin secretion and free fatty acid levels in OLETF rat portal blood after sucrose loading[J]. *Endocrine*, 2004, 23(1):39- 43.
[3] MORI Y, KURIYAMAG, TAJIMAN. Effects of nateglinide on the elevation of postprandial remnant-like particle triglyceride levels in Japanese patients with type 2 diabetes assessment by meal tolerance test [J]. *Endocrine*, 2004, 25(3):203- 206.
[4] BRUCE D G, CHISHOLM D J, STORLIEN L H, et al. Physiological importance of deficiency in early prandial insulin secretion in non insulin-dependent diabetes [J]. *Diabetes*, 1988, 37(6):736- 744.
[5] 张翼飞, 洪洁, 顾卫琼, 等. 血清游离脂肪酸水平在不同体重指数及糖耐量个体中与胰岛素敏感性及相关指标的关系[J]. *中华内科杂志*, 2003, 42(11): 793- 796.
[6] 李延兵, 廖志红, 许雯, 等. 胰岛素泵治疗对初诊 2 型糖尿病患者糖脂代谢的影响[J]. *中山大学学报: 医学科学版*, 2004, 25(4): 359- 363.

(编辑 张恩健)



(上接第 85 页 from page 85)

定为进一步研究 HCV 包膜蛋白的功能、筛选 HCV 的受体以及研究 HCV 与 CD81 的相互作用奠定了基础。

参考文献:

[1] ENOMOTO N, SAKUMA I, ASAHINA Y, et al. Comparison of full-length sequences of interferon-sensitive and resistant hepatitis C virus 1b. Sensitivity to interferon is conferred by amino acid substitutions in the NS5A region[J]. *J Clin Invest*, 1995, 96(1):224- 230.
[2] 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(4902): 359- 362.
[3] PILERI P, UEMATSU Y, CAMPAGNOLI S, et al. Binding of hepatitis C virus to CD81[J]. *Science*, 1998, 282(5390): 938- 941.
[4] NAKAJIMA H, COCQUEREL L, KIYOKAWA N, et al. Kinetics of HCV envelope proteins' interaction with

CD81 large extracellular loop[J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2005, 328(4):1091- 1100.

[5] BRAZZOLI M, HELENIUS A, FOUNG S K, et al. Folding and dimerization of hepatitis C virus E1 and E2 glycoproteins in stably transfected CHO cells[J]. *Virology*, 2005, 332(1):438- 453.
[6] 李刚, 姚集鲁, 彭文伟. HCV 包膜蛋白基因的体外表达[J]. *中山医科大学学报*, 1996, 17(4): 314- 315.
[7] 张申英, 张欣欣, 刘晶, 等. 重组丙型肝炎病毒包膜蛋白 2 抗体检测的临床意义[J]. *中华肝脏病杂志*, 2002, 10(4):282.
[8] YURKOVA M S, PATEL A H, FEDOROV A N. Characterisation of bacterially expressed structural protein E2 of hepatitis C virus [J]. *Protein Expr Purif*, 2004, 37(1):119- 125.
[9] FLINT M, MAIDENS C, LOOMIS-PRICE L D, et al. Characterization of hepatitis C virus E2 glycoprotein interaction with a putative cellular receptor, CD81[J]. *J Virol*, 1999, 73(8):6235- 6244.

(编辑 黄小延)