

· 简 报 ·

HCV 包膜蛋白基因的体外表达^①李 刚^② 姚集鲁 彭文伟

(中山医科大学传染病学教研室,广州,510630)

主题词 肝炎病毒组,丙型;克隆,分子;序列分析,DNA;基因表达

中图分类号 R 512.62; Q 523.1

从广东省一慢性丙型肝炎病人血清中获得 HCV 包膜蛋白基因区(E1)489 bp 的片段,插入 pUC18 和 pUC19 质粒后进行序列测定,并将此片段亚克隆进 pGEMEX-1 融合表达载体。重组质粒转染大肠杆菌 JM109(DE3),IPTG 诱导表达,菌体裂解液电泳后发现预定的表达产物条带。表达的融合蛋白可为 HCV 感染提供新型的诊断试剂。

1 材料和方法

血清取自广东省阳春县43岁男性患者,临床诊断为慢性丙型肝炎。无输血史。所用引物序列及位置如下:

F6+5' GACGGCGTGAACCTATGC 3' (478~494)

F7-5' CATATCCCAAGCCATGCG 3' (949~966)

PCR 产物的获取方法参见文献[1]。将产物分别克隆和亚克隆入测序载体和表达载体^[2]。489 bp 的 PCR 产物经 Klenow 酶补齐后插入 pUC18 的 Sma I 切点,获得重组体 pUF1。pUF1 用 *EcoR* I 和 *Pst* I 消化,切出片段插入 pUC19 的相同位置,得到重组质粒 pUF2。为使表达载体 pGEMEX-1 的 T₇ 启动子与目的基因表达框架相吻合,将 pUF1 和 pGEMEX-1 分别经 *EcoR* I、Klenow、*Bam*H I 消化,然后进行一侧平端一侧粘端连接,获得重组体 pGF。以 pUF1 和 pUF2 为模板测定核苷酸序列,方法参见文献[1]。

pGF 转染 JM109(DE3) 表达菌株,转化菌在 37℃ 增殖至吸光度(A)值为 0.3~0.4 时,加入 IPTG 诱导,菌体裂解液在 5% 浓缩胶和 10% 分离胶中进行 SDS-PAGE,凝胶经考马斯亮蓝染色,脱色后观察结果。

2 结 果

PCR 产物鉴定、重组体鉴定、核苷酸序列及同源性分析(略)。E1 区融合表达产物的鉴定:pGEMEX-1 可表达 T₇ 基因蛋白 10,约 255 个氨基酸,插入目的基因后,产生的融合蛋白约 426 个氨基酸,表达产物经 SDS-PAGE 和考马斯亮蓝染色后发现,在 42.7k~55k 间见有一条浓带,而空载体表达的 T₇ 基因蛋白 10 稍小于 40ku(图 1)。

3 讨 论

HCV 包膜蛋白是 HCV 与机体免疫系统、肝细胞膜或外界环境直接接触的部位。国外实验证实,抗包膜蛋白的抗体是在病毒血症或病毒复制期间出现的^[3],利用表达的包膜蛋白检测相应抗体可反映 HCV 在体内处于活动性复制状态,可作为临床诊断和疗效评估的一种重要指标。另外,包膜蛋白可能作用于肝细胞膜上的表面受体或特异性结合蛋白,在体外表达此蛋白将有助于肝细胞膜表面 HCV 受体的研究。同时,有人认为此蛋白内的抗原性位点能诱导机体产生保护性抗体^[4],在疫苗研制中可能有参考意义。

作者从广东省一患者血清中获得 HCV 包膜蛋白区 489 bp 的基因片段,克隆后测序,发现此株核苷酸序列与 HCV I 型的同源性介于 90.04%~92.80%,氨基酸序列为 91.08%~94.90%。将此片段亚

① 广东省科委基金资助课题; ② 第一作者,1964年出生,男,博士,讲师

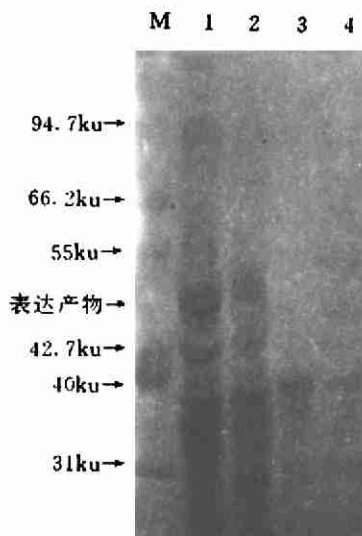


图1 HCV E1区融合蛋白的表达

M: Mid-Range protein MW marker; 1: pGF 阳性克隆菌株诱导4h后; 2: pGF 阳性克隆菌株诱导0h后; 3: 含 pGEMEX-1 菌株诱导4h后; 4: 含 pGEMEX-1 菌株诱导0h后

克隆进融合表达载体 pGEMEX-1, IPTG 诱导表达, SDS-PAGE 发现在标准蛋白42.7ku~55ku间

有一条浓带, 不含重组质粒的菌株则无此条带, 此条带与预定的融合蛋白分子量相符, 初步鉴定为 E1 区表达蛋白, 表达蛋白在诱导4h后最大, 此融合蛋白的进一步鉴定、纯化及抗原性检测正在进行之中。

参 考 文 献

- 1 李刚, 彭文伟, 姚集鲁, 等. 肝癌病人血清中丙型肝炎病毒 E2/NS1 基因区 cDNA 的克隆及序列分析. 病毒学报, 1995, 11(1): 27
- 2 Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T, *et al.* Molecular cloning, A Laboratory manual. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989
- 3 Hsu HH, Deets M, Greenberg HB, *et al.* Characterization of hepatitis C virus structural protein with a recombinant baculovirus expression system. Hepatology, 1993, 17(5): 763
- 4 Shimizu YK, Hijikata M, Iwamoto A, *et al.* Neutralizing antibodies against hepatitis C virus and the emergence of neutralization escape mutant viruses. J Virol, 1994, 68: 1494

(1996-01-02收稿 1996-05-02修回)