基础研究 文章编号:0253-3626(2011)03-0262-04

丙型肝炎病毒 P7 蛋白体外原核表达状况的研究

陈 可,胡接力,胡 源,张文露,王增产,汤 华,黄爱龙,蔡雪飞
(重庆医科大学感染性疾病分子生物学教育部重点实验室,重庆 400016)

【摘 要】目的:扩增丙型肝炎病毒(Hepatitis C virus,HCV)P7 蛋白基因,克隆到多个原核表达系统,观察 P7 蛋白在体外表达的情况,获取具有生物学活性的 HCV P7 重组蛋白。方法:设计扩增全长 HCV P7 基因片段的特异引物,以 H/FL 质粒 DNA(含 HCV 1a cDNA 全长序列)为模板,通过 PCR 扩增全长 HCV P7 基因,定向克隆到 pQE30、pGEX 4T-2、pET32a(+)3 种不同类型的原核表达载体中。将重组后包含 HCV P7 基因的原核表达载体转化表达型大肠杆菌 BL21(DE3) pLysS 或 SG13009(PREP4),并做异丙基硫化-β-D-半乳糖苷(Isopropyl-beta-D-thiogalactoside,IPTG)诱导表达,通过 SDS-PAGE 和 Western blot 鉴定 HCV P7 蛋白原核表达的情况。结论:获得可溶性的重组蛋白 GST-HCV P7 和 Trx-HCV P7,为进一步研究 P7 蛋白的生物学功能奠定基础。

【关键词】丙型肝炎病毒;P7 蛋白;原核表达
【中国图书分类法分类号】Q571.2 【文献标志码】A 【收稿日期】2011-01-17

Study on prokaryotic expression of hepatitis C virus P7 protein

CHEN Ke, et al
(*Key Laboratory of Molecular Biology on Infectious Diseases, Ministry of Education, Chongqing Medical University*)

【Abstract】*Objective*: To amplify HCV P7 gene and clone it into several prokaryotic expression systems, then investigate the effects of these working systems and harvest HCV P7 protein with biologic activity. *Methods*: Design Special primers were designed for the amplification of HCV P7 complete DNA sequence and amplify P7 DNA fragments were amplified with H/FL plasmid as template by PCR. The obtained P7 DNA fragments were directly cloned into

作者介绍:陈 可(1968-),男,实验师,研究方向:病毒分子生物学。
通信作者:蔡雪飞,男,助理研究员,Email:xfcaiii@163.com。
基金项目:国家自然科学基金资助项目(编号:81000732,30600405),重庆市教委科学技术资助项目(编号:KJ100309)。

sician,2007,76(3):391-396.
[10] Venkatakrishnan K,von Moltke L L,Greenblatt D J.Effects of the antifungal agents on oxidative drug metabolism: clinical relevance[J].Clin Pharmacokinet,2000,38(2):111-180.
[11] Zhou S F.Clinically important drug interactions potentially involving mechanism-based inhibition of cytochrome P450 3A4 and the role of therapeutic drug monitoring[J].Ther Drug Monit,2007,29(6):687-710.
[12] Wolfgang E,Thasler W E,Rania D,et al. Repression of cytochrome P450 activity in human hepatocytes in vitro by a novel hepatotrophic factor, augmenter of liver regeneration[J].The American Society for Pharmacology and Experimental Therapeutics,2006,316(2):822-829.
[13] 唐 琳,孙 航,郭 晖,等.人肝再生增强因子小干扰 RNA 表达质粒的构建和鉴定[J].中华肝脏病杂志,2004,12(9):534-537.
[14] Masters J R,Osbome E J,Walker M C,et al. Hypersensitivity of human tumor cell lines to chemotherapeutic drugs[J].Int J Canter,1993,53(2):340-346.
[15] Evarts R P,Nakatsuksa I I,Marsden E R,et al.Expression of transforming growth factor-alpha in regenerating liver and during hepatic differentiation[J].Mol Carcingen,1992,5(1):25-31.
[16] 李晓宇,刘皋林.CYP450 酶特性及其应用研究进展[J].中国临床药理学与治疗学,2008,13(8):942-946.
[17] Miyoshi Y,Taguchi T,Kim S J,et al. Prediction of response to docetaxel by immunohistochemical analysis of CYP3A4 expression in human breast cancers[J]. Breast Cancer,2005,12(1):11-15.
[18] 唐谢华,孙 航,刘 杞,等.肝再生增强因子对大鼠脾单个核细胞增殖及 IL-2 产生的影响[J].中国免疫学杂志,2007,23(5):467-470.
[19] 王新国,刘 杞,孙 航,等.ERK 在 ALR 抑制免疫过程中的变化及意义[J].免疫学杂志,2010,26(2):128-131.
[20] Tanigawa K,Sakaida I,Masuhara M, et al.Augmenter of liver regeneration (ALR) may promote liver regeneration by reducing natural killer (NK) cell activity in human liver diseases[J].J Gastroenterol,2000,35(2):112-119.
[21] Thasler W E,Schlott T,Thelen P,et al. Expression of augmenter of liver regeneration (ALR) in human liver cirrhosis and carcinoma [J]. Histopathology,2005,47(1):57-66.
[22] Scripture C D,Sparreboom A,Figg W N.Modulation of cytochrome P450 activity:implications for cancer therapy[J].Lancet Oncol,2005,6(10):780-789.

(责任编辑:冉明会)

pQE30, pGEX 4T-2 and pET32a (+) prokaryotic expression vectors and transform these recombinant plasmids were transformed into *E coli.* strain BL21 (DE3) pLysS or SG13009 (PREP4), and IPTG was added to induce recombinant *E coli.* expression. The expression products were identified with SDS-PAGE and Western blot. ***Results***: There was no track of non-fusion HCV P7 protein expression from recombinant *E coli*, including pQE30/HCV P7 or pET32a (+)-Nde/HCV P7 plasmid. But the study succeeded in the expression and purification of recombinant HCV P7 proteins, Both are all soluble and biologic activity, and are expected to use extensively in anti-HCV virus research.

【Key words】HCV; P7 protein; prokaryotic expression

丙型肝炎病毒(Hepatitis C virus,HCV)P7 蛋白由 63 个氨基酸组成,在 HCV 前蛋白翻译体中,介于结构蛋白 E2 和非结构蛋白 NS2 之间[1-3]。在早期的相关研究中,P7 蛋白在细胞体内表达后整合于内质网膜上,形成六聚体的阳离子通道,对 HCV 病毒颗粒的释放有一定的促进作用[1]。金刚烷胺和长烷基链的亚氨基糖衍生物可抑制 P7 蛋白形成的阳离子通道,从而可能会对 HCV 的治疗发挥重要作用[4]。关于 P7 蛋白的在 HCV 整个生活周期中扮演的角色和对宿主细胞的影响,目前对其生物学功能的研究还处于起始阶段。本研究将HCV P7 蛋白基因克隆于带组氨酸标签的原核表达载体 pQE30、pET32a(+)和带 GST 蛋白标签的原核表达载体 pGEX 4T-2,对表达的融合 HCV P7 蛋白进行鉴定和纯化,为深入研究HCV P7 蛋白的生物学功能奠定了基础。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 质粒与菌株 包含 HCV 1a 型 cDNA 的质粒 H/FL、原核表达质粒 pQE30、pGEX 4T-2 和 pET32a(+),克隆型大肠杆菌 DH5α、表达型大肠杆菌 BL21(DE3) pLysS 和 SG13009 (PREP4)均为本实验室保存。

1.1.2 试剂与耗材 限制性内切酶 *BamH* Ⅰ、*Hind* Ⅲ、*Nde* Ⅰ和 *Xho* Ⅰ购买自 NEB 公司;DNA 聚合酶 PrimerStar、T4 DNA 连接酶和 DNA Marker 2000 购自 TaKaRa 公司;Protein Marker 购自 Fermantens 公司;质粒小量纯化试剂盒、胶回收和 PCR 产物纯化试剂盒购自 Omega 公司;异丙基硫代-β-D-半乳糖苷(Isopropyl-beta-D-thiogalactoside,IPTG)购自上海生工公司;Ni-NTA 亲和层析柱购自 Qiagen 公司;GST 亲和层析柱购自 GE 公司;GST 标签蛋白单克隆抗体(Cat:71097-3)购自 Novagen 公司;6×His 标签单克隆抗体 (Cat:CW0082)购自康维世纪公司,羊抗鼠二抗购买自北京中杉公司;PVDF 膜(0.22 μm)购买自 Millipore 公司;ECL 显色试剂购买自默克公司;PCR 引物序列由上海英骏公司合成。

1.1.3 主要仪器 Bio-Rad Gel Doc 2000 凝胶成像系统,Bio-Rad Protean MP4+ 蛋白电泳和转印系统,Sonics Material VCX 750 超声波细胞破碎仪。

1.2 方法

1.2.1 引物设计 根据丙型肝炎病毒 P7 基因的读码框设计 PCR 扩增引物,并在上游引物中引入 *BamH* Ⅰ和 *Nde* Ⅰ酶切位点,在下游引物中引入 *Hind* Ⅲ和 *Xho* Ⅰ酶切位点。上游引物序列:5'-CGGATCCCATATGGCTTTGGAGAAC-3',下游引物序列:5'-ATCTCGAGAAGCTTTGCGTATGCCCGCT-3'。

1.2.2 HCV P7 基因的克隆 以 HCV 1a 型 cDNA 质粒 H/FL 为模板,按照以下反应体系进行 PCR。反应总体积 50 μl,含 5×Taq reaction buffer 10 μl,dNTP 2 μl,cDNA 模板 1 μl,特异性上下游引物各 1 μl,Taq 酶 (5 U/μl)0.5 μl, ddH_2O 34.5 μl。PCR 反应条件:95℃ 5 min 预变性;94℃ 30 s,60℃ 30 s,72℃ 30 s,循环 30 次,72℃延伸 5 min。

1.2.3 重组原核表达载体的构建及鉴定 PCR 产物分为 3 份,分别用 *BamH* Ⅰ和 *Xho* Ⅰ双酶切,*Nde* Ⅰ和 *Xho* Ⅰ双酶切,*BamH* Ⅰ和 *Hind* Ⅲ双酶切。以 1%琼脂糖凝胶电泳检测鉴定并做胶回收纯化。质粒 pET32a(+)分为 2 份,分别用 *BamH* Ⅰ和 *Xho* Ⅰ双酶切、*Nde* Ⅰ和 *Xho* Ⅰ双酶切,质粒 pGEX 4T-2 用 *BamH* Ⅰ和 *Xho* Ⅰ双酶切,质粒 pQE30 用 *BamH* Ⅰ和 *Hind* Ⅲ双酶切。琼脂糖凝胶电泳回收 DNA 大片段。将上述载体和目的基因片段用 T4 DNA 连接酶 16℃连接过夜。连接产物转化感受态大肠杆菌 DH5α,在含氨苄青霉素抗性的平板上筛选生长,挑取单菌落提取质粒,用各自对应的酶切位点做双酶切,以琼脂糖凝胶电泳鉴定、进一步经 DNA 测序确认为阳性克隆。

1.2.4 重组蛋白的诱导表 将测序正确的重组质粒 pET32a (+)/HCV-P7、pET32a(+)-Nde/HCV-P7 和 pGEX 4T-2/HCV-P7 转化表达型大肠杆菌 BL21(DE3) pLysS,将 pQE30/HCV P7 转化表达型大肠杆菌 SG13009(PREP4)。分别挑取阳性克隆,接种于 2 ml 含氨苄青霉素(终浓度:100 μg/ml)的 LB 液体培养基中,37℃,220 r/min 震荡培养。当 OD_{600}=0.6 左右时加入诱导表达剂 IPTG (终浓度:0.5 mmol/L),37℃条件下继续震荡培养 3 h。收集菌液,4 000 r/min 离心 10 min,弃上清。用 200 μl 的 1×Lysis buffer(1% SDS,150 mmol/L NaCl,50 mmol/L Tris-HCl pH8.0,1 mmol/L PMSF,2 mmol/L EDTA)重悬细菌,95℃变性 5 min,进行 SDS-PAGE,考马斯亮蓝染色。

1.2.5 表达蛋白的纯化和鉴定 挑取 pET32a(+)/HCV P7 和 pGEX 4T-2/HCV P7 转化表达型大肠杆菌 BL21(DE3) pLysS 的阳性克隆,接种于 2 ml 含 Amp(100 μg/ml)的液体培养基中,37℃条件下 220 r/min 过夜培养。次日按照 1:100(V/V)放大至 200 ml,培养至菌液浓度为 OD_{600}=0.6 左右,加入 IPTG 终

浓度达 0.1 mmol/L，22℃诱导培养 8 h，收集菌液，4 000 r/min 离心 20 min，弃上清。菌体沉淀用 20 ml PBS 重悬并洗涤，4 000 r/min 离心 20 min，弃上清。按照购买蛋白纯化亲和层析柱公司提供的方法，分别配制细菌裂解缓冲液，重悬细菌沉淀，超声破碎。14 000 r/min，20 min 分离破菌上清和沉淀，上清用 Ni-NTA 亲和层析柱或 GST 亲和层析柱进行蛋白纯化，沉淀用 8 mol/L尿素溶解。取适量纯化后的表达蛋白样品进行 SDS-PAGE，50 V 恒压过夜转印 PVDF 膜，然后用含 5%的脱脂奶粉 PBST 封闭 2 h，按照购买抗体公司所提供的方法加入一抗，4℃过夜孵育后，用 PBST 清洗 3 遍，加入二抗室温孵育 1 h，再用 PBST 清洗 3 遍，最后用 ECL 显色，暗室胶片曝光。

2　结　果

2.1　成功构建含 HCV P7 基因的 4 种原核表达重组质粒

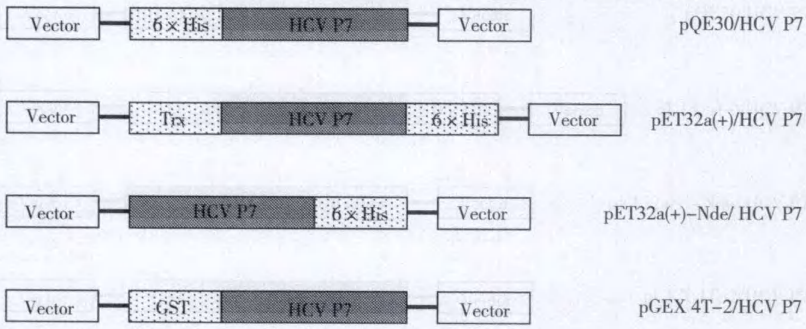
PCR 扩增出 HCV P7 全长 DNA 片段，PCR 产物和 3 种原核表达载体经双酶切反应后，连接产物转化克隆型大肠杆菌DH5α，成功获得阳性克隆菌株，提取质粒双酶切鉴定和测序鉴定为重组质粒。4 种重组质粒的结构如下（图 1）。

2.2　成功诱导表达 Trx-HCV P7 融合蛋白和 GST-HCV P7 融合蛋白

将构建好的 4 种含有 HCV P7 基因的重组原核表达载体转化表达型大肠杆菌，其中 pQE30/HCV P7 转化 SG13009（PREP4）菌株，其余 3 种重组质粒转化 BL21（DE3）pLysS 菌株。经 IPTG 诱导后，SDS-PAGE 电泳检测全菌蛋白。结果显示（图 2），含有 pET32a(+)/HCV P7 和 pGEX 4T-2/HCV P7 的重组表达菌有明显的外源蛋白生成。经蛋白分子量分析，特异表达的外源蛋白分子量与预期相符。

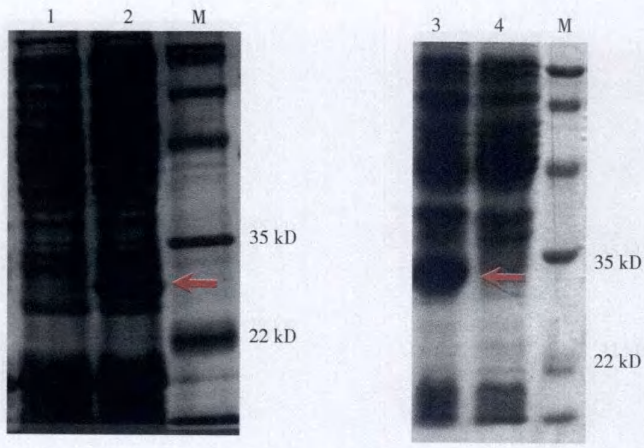
2.3　分离纯化获得可溶性 HCV P7 重组蛋白

通过 Ni-NTA 亲和层析柱纯化获得可溶性的 Trx-HCV P7 重组蛋白；通过 GST 亲和层析柱纯化获得可溶性的GST-HCV P7 重组蛋白。分别用抗 6×His 标签和抗 GST 标签的单克隆抗体，通过 Western blot 鉴定上述 2 个纯化后的蛋白，结果显示（图 3 和图 4），这 2 种重组蛋白在细菌体内表达分为可溶性蛋白和包涵体蛋白 2 种形式。



pQE30/HCV P7. N 端融合 6×His 标签；pET32a(+)/HCV P7. N 端融合 Trx 蛋白，C 端融合 6×His 标签；pET32a(+)-Nde/ HCV P7. C 端融合 6×His 标签；pGEX 4T-2/HCV P7. N 端融合 GST 蛋白

图 1　构建 4 种融合蛋白标签的 HCV P7 原核表达质粒



1. 包含 pET32a(+)/HCV P7 重组质粒的未诱导全菌蛋白；2. 包含 pET32a(+)/HCV P7 重组质粒的 IPTG 诱导全菌蛋白；3. 包含 pGEX 4T-2/HCV P7 重组质粒的 IPTG 诱导全菌蛋白；4. 包含 pGEX 4T-2/HCV P7 重组质粒的未诱导全菌蛋白；M 为蛋白分子量 Marker；左边红色箭头指示诱导表达的 Trx-HCV P7 融合蛋白，分子量约为 26 kD；右边红色箭头指示诱导表达的 GST-HCV P7 融合蛋白，分子量约为 33 kD

图 2　IPTG 诱导表达 HCV P7 融合蛋白



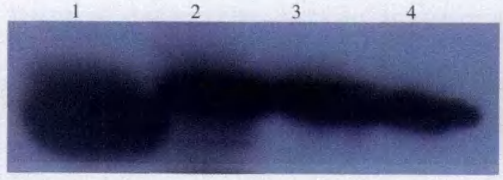
1. 本实验室纯化制备带有 6×His 标签的 Trx-HCV F 蛋白[3]，作为阳性对照；2. 含有 Trx-HCV P7 蛋白的破菌上清溶液；3. 经 Ni-NTA 柱纯化的可溶性 Trx-HCV P7 蛋白；4. 8 mol/L 尿素溶解破菌离心后沉淀的 Trx-HCV P7 蛋白包涵体

图 3　Western blot 鉴定 Trx-HCV P7 蛋白的表达和纯化

3　讨　论

在已有的报道中，通过细胞水平的实验，HCV P7 蛋白对于 HCV 病毒 RNA 的复制和装配并无必要性[4-6]，而在质膜上的六聚体组成的阳离子通道结构对病毒颗粒与细胞的结合和进入密切相关[7,8]。同时有研究发现，P7 蛋白对 HCV 核心颗粒组装和 E1/E2 包膜蛋白的组装，以及核心蛋白和包膜蛋白两者之间的结合起着重要的调节作用[9]。由于上述对 P7 蛋白的功能部分解析，使 P7 蛋白成为抗 HCV 病毒治疗的一个靶点[10]。金刚烷胺是目前发现的可能具有影响 P7 蛋白 6 聚体结构的化学物质[4]，在此基础上开发的衍生物可能具有很好的抗 HCV 病毒的作用。针对 P7 蛋白在治疗 HCV 感染中潜在的研究价值，制备高纯度的 P7 蛋白可以为相关研究提供很好的平台。

在本实验中，我们一共构建了 4 种 HCV P7 基因的重组表达载体，期望能够得到融合形式和非融合形式的两类 P7 重组蛋白。其中 pQE30/HCV P7 和 pET32a(+)-Nde/ HCV P7 是分别在 N 端和 C 端带 6×His 标签的非融合蛋白的目的质粒，而 pET32a(+)/HCV P7 是 N 端带有 Trx 蛋白（分子量约为 19 kD）融合的目的质粒，pGEX 4T-2/HCV P7 是 N 端带有 GST 蛋白（分子量约为 26 kD）融合的目的质粒。将这 4 种重组质粒转化相应的表达型大肠杆菌中，通过 IPTG 诱导表达，结果显示非融合形式的 P7 蛋白不能表达出来，而融合形式的 P7 蛋白能够顺利的得到表达，并且具有可溶性的状态。由于体外原核表达重组蛋白是否具有可溶性是对其性质的鉴定和功能的应用至关重要的因素，所以在我们的实验中获得的可溶性的 P7 融合蛋白将能够很好的支持后续的研究工作。



1. GST 蛋白，作为阳性对照；2. 含有 GST-HCV P7 蛋白的破菌上清溶液；3. GST 柱纯化的可溶性 GST-HCV P7 蛋白；4. 8 mol/L 尿素溶解破菌离心后沉淀的 GST-HCV P7 蛋白包涵体

图 4　Western blot 鉴定 GST-HCV P7 蛋白的表达和纯化

参　考　文　献

[1] T Asselah, I Bièche, A Sabbagh, et al. Gene expression and hepatitis C virus infection[J].Gut, 2009, 58: 846-858.

[2] 郭　江，成　军，赵龙凤.丙型肝炎病毒 p7 蛋白研究进展[J]. 世界华人消化杂志，2004，12(7)：1692-1694.

[3] 高亚丽，刘　娇，刘　湘，等，丙型肝炎病毒 F 蛋白原核表达载体的构建、表达和纯化[J]. 重庆医科大学学报，2009，34(4)：385-388.

[4] Chew C F, Vijayan R, Chang J, et al.Determination of pore-lining residues in the hepatitis C virus p7 protein [J].biophysical Journal, 2009, 96(2): 10-12.

[5] Brohm C, Steinmann E, Friesland M.Characterization of determinants important for hepatitis C virus p7 function in morphogenesis by using trans-complementation[J].Journal of Virology, 2009, 83: 11683-11693.

[6] Haqshenas G, Mackenzie J M, Dong X, et al.Gowansl, Hepatitis C virus p7 protein is localized in the endoplasmic reticulum when it is encoded by a replication-competent genome[J].Journal of General Virology, 2007, 88: 134-142.

[7] Griffin S D, Beales L P, Clarke D S.The p7 protein of hepatitis C virus forms an ion channel that is blocked by the antiviral drug[J].Amantadine, 2003, 535(1-3): 34-38.

[8] Ana J. Pérez-Berná, Jaime Guillén, Miguel R.Moreno, et al.Identification of the membrane-active regions of hepatitis C virus p7 protein[J]. The Journal of Biology Chemstry, 2009, 283(13): 8089-8101.

[9] Carrere-Kremer S, Montpellier-Pala C, Cocquerel L, et al.Subcellular localization and topology of the p7 polypeptide of hepatitis C virus[J]. Virol, 2002, 76: 3720-3730.

[10] 胡　巍，刘　文，凌世淦.p7 蛋白 - 丙型肝炎病毒潜在抑制靶点[J].中华微生物和免疫学杂志，2006，26(5)：478-480.

（责任编辑：关蕴良）