基础研究 文章编号:0253-3626(2009)04-0385-04

丙型肝炎病毒 F 蛋白原核表达载体的构建、表达和纯化

高亚丽,刘 娇,刘 湘,汤 华,陈 沂,蔡雪飞,唐 霓
(重庆医科大学感染性疾病分子生物学教育部重点实验室 重庆医科大学病毒性肝炎研究所,重庆 400016)

【摘 要】目的:构建丙型肝炎病毒(Hepatitis C virus,HCV)F 蛋白的原核表达载体,表达 pET32a(+)-HCVF 融合蛋白。方法:根据丙型肝炎病毒 F 基因的全序列设计引物,以 HCV1a 型 cDNA 质粒 H/FL 为模板,通过 PCR 方法扩增得到 F 基因的编码区序列,将其定向克隆于含有 6×His tag 的原核表达载体 pET32a(+),转化大肠杆菌 JM109,经菌落 PCR 筛选,双酶切和测序鉴定阳性克隆后,转化大肠杆菌 BL21,采用 IPTG 诱导表达融合蛋白,表达产物经 SDS-PAGE 电泳分析和 Western-blot 检测鉴定,并用 Ni-NTA 亲和层析柱纯化。结果:F 基因以正确的方式插入到 pET32a(+)载体中,重组质粒转化大肠杆菌 BL21 后经 IPTG 诱导表达,出现了与预期分子量相符的蛋白条带,该蛋白通过 Western blot 检测具有 6×His tag 蛋白的免疫学活性。结论:成功构建了丙型肝炎病毒 F 蛋白的原核表达载体 pET32a(+)-HCVF 并表达和纯化出重组融合蛋白,为进一步研究 F 蛋白的生物学功能奠定了基础。

【关键词】丙型肝炎病毒;F 蛋白;原核表达
【中国图书分类法分类号】R512.6 【文献标识码】A 【收稿日期】2008-07-10

Prokaryotic expression, identification and purification of HCV F protein

GAO Ya-li, et al
(*Key Laboratory of Infectious Diseases Designated by Chinese Ministry of Education, Institute for Viral Hepatitis, Chongqing Medical University*)

【Abstract】*Objective*: To construct a prokaryotic expression plasmid containing HCV F gene, and purify the recombinant fusion protein in E.coli system. *Methods*: F gene of Hepatitis C virus was amplified by PCR method from plasmid H/FL (containing full length cDNA sequence of HCV 1a subtype), cloned into pET32a (+) vector, and then transformed into E.coli JM109. After identified by restriction digestion and DNA sequencing, recombinant plasmid was transformed into E.coli BL21 and induced with IPTG. The fusion protein trxA-F was further confirmed by Western blot analysis and purified by affinity chromatography method. *Results*: Restriction digestion and PCR screening showed that HCV F gene was cloned into pET32a(+) successfully. After BL21 was transformed with recombinant vector pET32a (+)-HCVF and induced with 0.5mmol/L IPTG, a 35.4kD protein band was found by SDS-PAGE. And this recombinant protein showed a highly specific and strong reaction with anti-His monoclonal antibody by Western blot analysis. *Conclusion*: The prokaryotic expression plasmid pET32a(+)-HCVF was successfully constructed, which will be helpful for further research.

【Key words】Hepatitis C virus; F protein; Prokaryotic expression

丙型肝炎病毒(Hepatitis C virus,HCV)核心基因是 HCV 基因组中最保守的区段,它编码的核心蛋白除组成 HCV 核衣壳外,还具有诱导细胞转化、调控病毒和宿主基因转录等功能[1]。近年来研究发现,HCV 核心基因密码子富含腺嘌呤核苷酸,翻译过程中核糖体可能发生-2/+1 框移而产生 F 蛋白。F 蛋白是一种新的 HCV 编码蛋白,在丙型肝炎病毒自然感染过程中产生,目前对其生物学功能的研究还处于起始阶段。本研究将 HCV F 蛋白基因克隆于带组氨酸标签的原核表达载体 pET32a(+),对表达的融合 F 蛋白进行鉴定和纯化,为了解 F 蛋白的生物学功能奠定了基础。

作者介绍:高亚丽(1982-),女,硕士,
研究方向:病毒性肝炎发病机理。
通讯作者:唐 霓,女,副研究员,E-mail:nitang809@hotmail.com。
基金项目:国家自然科学基金资助项目(30400374,30600405)。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 质粒与菌株 扩增模板 HCV 1a 型 cDNA 质粒 H/FL、表达质粒 pET32a(+)、大肠杆菌 JM109、BL21 均为本实验室保存。

1.1.2 主要试剂 Taq DNA 聚合酶、限制性内切酶 *BamH* Ⅰ和 *Hind* Ⅲ、T4 连接酶、DNA Marker 购自 TaKaRa 公司；Protein Marker 购自 Tiangen 公司；质粒纯化试剂盒、胶回收和 PCR 产物纯化试剂盒购自 Omega 生物公司。异丙基硫代 -β-D-半乳糖苷(IPTG)为上海生工公司产品，Ni-NTA 亲和层析柱和 6×His tag 检测试剂盒(Ni-NTA HRP Conjugate)购自 Qiagen 公司。PCR 引物序列由上海英骏公司合成。

1.2 方法

1.2.1 引物设计 根据丙型肝炎病毒 F 基因的读码框设计 PCR 扩增引物，并分别在上下游引物中引入 *BamH* Ⅰ和 *Hind* Ⅲ酶切位点。上游引物序列：5'-CGGATCCCATATGAGCACGAATCCTAAACCTCAAAGAAAACCAAACGTAAC-3'，下游引物序列：5'-TAAAGCTTCGCCGTCTTCCAG-3'。

1.2.2 HCV F 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 10×Taq reaction buffer 5 μl，dNTP 4 μl，cDNA 模板 1 μl，特异性引物各 1 μl，Taq 酶(5 U/μl)0.5 μl，ddH_2O 38 μl。PCR 反应条件：95℃ 5 min 预变性；94℃ 30 s，57℃ 30 s，72℃ 30 s，循环 30 次；72℃延伸 10 min。

1.2.3 重组原核表达载体的构建及鉴定 PCR 产物经 *BamH* Ⅰ和 *Hind* Ⅲ双酶切，以 1%琼脂糖凝胶电泳鉴定并胶回收[1]。质粒 pET32a(+)同样用 *BamH* Ⅰ和 *Hind* Ⅲ双酶切、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。连接产物转化大肠杆菌感受态 JM109，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 *BamH* Ⅰ和 *Hind* Ⅲ双酶切，以琼脂糖凝胶电泳鉴定，进一步经 DNA 测序确认。

1.2.4 融合蛋白的诱导表达 将测序正确的重组质粒 pET32a-HCVF 转化大肠杆菌菌株 BL21，分别挑取阳性克隆，接种于 100 ml 含 Amp(100 μg/ml)的液体培养基中，37℃ 200 r/min 震荡培养。当 OD_{600}=0.6 左右时取 1 ml 作对照，在剩余的培养物中加入 IPTG(终浓度为 0.5 mmol/L)30℃继续震荡培养 8 h。收集菌液，4 000 r/min 离心 20 min，弃上清。用 20 ml 的 1×Lysis buffer 重悬细菌，超声破碎后进行 12% SDS-PAGE，考马斯亮蓝染色，并通过凝胶薄层扫描测定表达量。

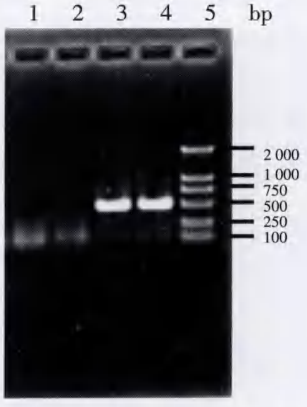
1.2.5 表达产物的鉴定 取适量诱导表达蛋白样品进行 SDS-PAGE，转膜后用含 5%的脱脂奶粉 TBST 封闭 2 h，按照 6×His tag 检测试剂盒(Ni-NTA HRP Conjugate)使用手册的方法加入一抗，37℃孵育 30 min 后直接用 4-氯-1 萘酚(上海生工)染色。结果由 BIO-RAD 图像分析仪分析。

1.2.6 表达蛋白的纯化与复性 挑取 pET32a-HCVF 转化大肠杆菌菌株 BL21 的阳性克隆，接种于 2 ml 含 Amp(100 μg/ml)的液体培养基中，37℃ 200 r/min 过夜培养。次日按照 1:50(V/V)放大至 100 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，37℃诱导培养 5 h，收集菌液，4 000 r/min 离心 20 min，弃上清，用尿素浓度梯度(1 mol/L、2 mol/L、3 mol/L、4 mol/L、5 mol/L、6 mol/L、8 mol/L，pH=8.0)溶液依次洗涤沉淀，每次洗涤后 12 000 r/min 离心 20 min，保留上清。最后 8 mol/L尿素洗涤后弃沉淀。SDS-PAGE 电泳检测包涵体蛋白在尿素浓度梯度中的分布情况，选取包含体蛋白含量最多的部分，用同等浓度的尿素溶液稀释至蛋白浓度为100 μg/ml，装入截流量为 0.8 kU 的透析袋，按 1:100(V/V)于复性缓冲液(50 mmol/L Tris，50 mmol/L NaCl，5%甘油，0.5 mmol/L EDTA，1%甘氨酸，1 mmol/L 还原性谷胱甘肽，0.1 mmol/L 氧化性谷胱甘肽)，4℃透析 24 h，然后按 1:100(V/V)置于 300 mmol/L NaCl，20 mmol/L Tris-HCl (pH=8.0)的缓冲液中 4℃透析 12 h。透析后的蛋白溶液于 4℃，12 000 rpm 离心 20 min。上清用 Ni-NTA 亲和层析柱按 Qiagen 公司使用手册方法纯化(Binding buffer:300 mmol/L NaCl，20 mmol/L Tris-HCl pH8.0，10 mmol/L Imidazole. Washing buffer：300 mmol/L NaCl，20 mmol/L Tris-HCl，20 mmol/L Imidazole. Elution buffer：300 mmol/L NaCl，20 mmol/L Tris-HCl pH8.0，20 mmol/L Imidazole.)，收集并用 SDS-PAGE 电泳检测纯化产物。

2 结 果

2.1 PCR 扩增产物鉴定

以含 HCV 1a 型 cDNA 的质粒 H/FL 为模板，经 PCR 扩增，扩增产物电泳在 483 bp 处有特异性扩增条带，与预期扩增片断大小相符(图 1)。



1、2. 阴性对照；3、4. 质粒模板 H/FL 扩增的 F 基因；5. 分子量标准

图 1 PCR 扩增 HCV F 基因

2.2 重组质粒酶切与 PCR 鉴定

重组质粒 pET32a(+)-HCVF 的菌落 PCR 鉴定

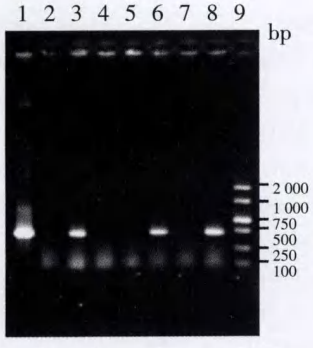
（图 2）和纯化质粒经 *BamH* Ⅰ和 *Hind* Ⅲ双酶切产生 483 bp 的 DNA 条带（图 3）的结果，提示 F 基因成功构建入 pET32a(+)。测序结果也证实插入到 pET32a(+)载体中的 F 基因序列完全正确。

2.3 F 蛋白的诱导表达及 SDS-PAGE 分析

采用 IPTG 于 37℃诱导含 pET32a(+)-HCVF 质粒的 BL21 菌株 5 h，经 12%SDS-PAGE，结果显示在 36 kD 处出现表达的新蛋白条带，与预期的分子量相符（图 4）。经凝胶薄层扫描分析，测得重组蛋白约占菌体总蛋白量的 20%。对表达蛋白的可溶性分析表明，融合表达产物主要以不可溶的包涵体形式存在。

2.4 融合蛋白的 Western blot 鉴定

Western 结果显示在大约 35.4 kD 处出现特异的显色条带为目的蛋白 trxA-F，对照为 pET32a(+)空质粒诱导表达蛋白 trxA(20.4 kD)。Western blot 结果证实 trxA-F 融合表达蛋白能与抗 His 单克隆抗体特异性结合，具有良好的免疫学活性（图 5）。



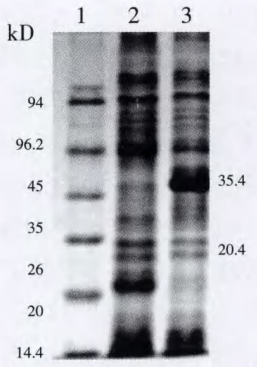
1. 阳性对照质粒 H/FL；3.6.8. 阳性克隆；2.4.5.7. 阴性克隆；9. 分子量标准

图 2 PCR 筛选含重组质粒 pET32a(+)-HCV F 的阳性菌落



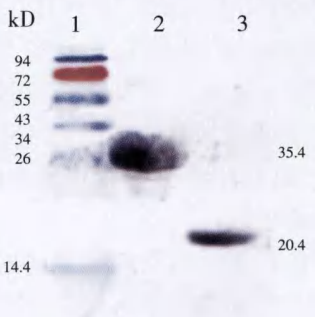
1. *BamH* Ⅰ和 *Hind* Ⅲ双酶切质粒 pET32a(+)；2. *BamH* Ⅰ和 *Hind* Ⅲ双酶切重组质粒 pET32a(+)-HCVF；3. 分子量标准

图 3 双酶切鉴定重组质粒 pET32a(+)-HCV F



1. 蛋白质分子量标准；2. IPTG 诱导转染 pET32a (+)的 BL21 菌；3. IPTG 诱导转染 pET32a(+)-HCVF 的 BL21 菌

图 4 SDS-PAGE 鉴定诱导表达的重组融合蛋白

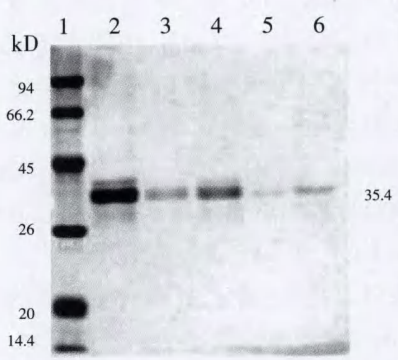


1. 蛋白质分子量标准；2. trxA-F 融合蛋白；3. trxA 蛋白

图 5 Western blot 鉴定重组表达蛋白

2.5 表达蛋白的复性与亲和层析纯化

包涵体蛋白经尿素浓度梯度洗涤后复性，复性蛋白用 Ni-NTA 亲和层析柱纯化，得到纯度达 85%以上的可溶性 F 蛋白（图 6）。



1. 蛋白质分子量标准；2~6. 洗脱液洗脱的 trxA-F 蛋白

图 6 Ni-NTA 亲和层析柱纯化 trxA-F 蛋白

3 讨 论

Xu 等[2]认为 HCV F 蛋白在原核及非细胞系统

中表达是由核糖体移位所致。在体外无细胞翻译体系中,它以 C 蛋白的 AUG 为起始密码子,按照 C 蛋白的阅读框翻译至第 10 位 aa 时发生核糖体移位,以 C+1 阅读框翻译至终止密码子出现,由此生成前 10 位 aa 与 C 蛋白相同的新蛋白。事实上,在不同的翻译环境中,产生的 F 蛋白有多种情况。Banlant 等[3]在大肠杆菌中表达 HCV 1b 编码的 C 蛋白时,发现 C 蛋白与 F 蛋白的嵌合体,即 1~44 aa 为 C 蛋白序列,43 位 aa 处发生 C+1 阅读框移位,到达 144 位 aa 时再次移位,重新按照 C 蛋白阅读框翻译至终止子出现。在真核细胞内,Baril 和 Brakier-Gingras[4]发现,F 蛋白的产生是利用细胞基因区内部的非 AUG 密码子直接启动翻译,他们证实,核糖体在 26 位 aa 处发生+1 的阅读框移位,以 GUG 或 GCG 为起始密码子,翻译出 F 蛋白;另外,Vassilaki 等[5]还发现有短片段 F 蛋白产生(翻译起始点是从 C 蛋白的 80 位 aa 附近的非密码子 AUG),此外,上面所提到的嵌合体在真核细胞中也有发现。

F 蛋白和 C 蛋白具有部分共同的翻译密码子,C 蛋白能调控病毒基因转录、细胞增殖与死亡,干预脂质代谢及抑制宿主免疫反应等[6],另外,HCV 的 C 蛋白还能促进 Ras 癌基因介导啮齿类动物细胞转化,使表达 HCV 核心蛋白的转基因小鼠发生 HCC[7,8],那么,与 C 蛋白伴生的 F 蛋白在这些事件中是否扮演了某种角色呢? Bain 等[9]研究表明 F 蛋白具有良好的抗原性,可引起体液免疫应答和细胞免疫应答。Xu 等[10]证实 F 蛋白分布在内质网上,其半衰期为 10 min,因其寿命短暂而推测该蛋白可能作为调节因子而存在。又由于 HCV 的 C 蛋白、NS5A 蛋白等七种蛋白组成的蛋白复合体也分布于内质网上,该复合体是作为 HCV 病毒的复制场所而存在,所以推测 F 蛋白可能参与调节 HCV RNA 的复制及病毒颗粒形成。Branch 等[11]通过比较发现干扰素可以刺激 HCV 感染细胞表达 F 蛋白。由上述这些研究结果可以推断,对 F 蛋白的研究可能是推动深入了解 HCV 分子致病机制的一个新领域。

目前关于 F 蛋白的以下问题值得我们进一步深入研究:(1)F 蛋白产生的机制:核心蛋白的一些功能是否需要 F 蛋白的参与,两者之间的关系如何?(2)F 蛋白引起的免疫应答是否具有保护性? F 蛋白是否调节 HCV RNA 的复制? F 蛋白与干扰素之间的作用机制等等。本实验以 pET32a(+)为载体,克隆 HCV F 基因转化大肠杆菌,经 IPTG 诱导后高效表达了 F 蛋白,为今后深入研究 F 蛋白生物学功能奠定了基础。

参 考 文 献

[1] 徐 蕾,帖儒修,王 爽,等.结核分枝杆菌 Rpf4 蛋白的原核表达.鉴定和纯化[J]. 重庆医科大学学报,2008,33(5):560-561.

[2] Xu Z,Choi J,Yen T S,et al. Synthesis of a novel hepatitis C Virus protein by ribosomal frameshift [J]. EMBO J,2001,20(14):3840-3848.

[3] Boulan T S,Becchi M,Penin F,et al.Unusual multiple recod lng events leading to alternative forms of hepatitis C virus core protein from genotype lb[J]. J Biol Chem,2003,278: 45785-45792.

[4] Baril M,Brakier-Gingras L.Translation of the F protein of hepatitis C virus is initiated at a non AUG code in a +1 reading frame relative to the poly protein[J]. Nucleic Acids Res,2005,33:1474-1486.

[5] Vassilaki N,Mavlxtlnara P.Two alternative translation mechanisms are responsible for the expres sion of the ARFP/F/core+1 coding open reading frame[J]. J Biol Chem,2003,278: 40503-40513.

[6] Papapetropoulos A,Fulton D,Mahboubi K,et al. Angiopoietin-1 inhibits endothelial cell apoptosis via the Akt/survivin pathway[J]. J Biol Chem,2000,275(13):9102-9105.

[7] Marnsawa H,Hijikata M,Chiha T,et al.Hepatitis C virus core protein inhibits Fas-and tumor necrosis factor alpha-mediated apoptosis via NF-kappaB activation[J]. J Virol,1999,73(6): 4713-4720.

[8] Ray R B,Meyer K,Ray R.Suppression of apoptotic cell death by *hepatitis C virus core protein*[J]. *Virology*,1996,*226*(2):176-182.

[9] Bain C,Parroc he P,Lavergne J P,et al. Memory T-cell-mediated immune responses specific to an alternative core protein in hepatitis C virus infection[J]. J Virol,2004,78:10460-10469.

[10] Xu Z,Choi J,Lu W,et al.Hepatitis C virus F protein is a short-lived protein associated with the endoplasmic reticulum[J]. J Virol,2003,77:1578-1583.

[11] Branch A D,Walewski J L,Gutierrez J A,et al. HCV alternate reading frame proteins (ARFPs) may be virulence factors that help the virus survive adverse conditions[J]. Hepatology,2003,38:468A-469A.

(责任编辑:冉明会)