DOI:10.16016/j.1000-5404.1996.02.001

丙型肝炎病毒外膜 E_2/NS_1 区基因在大肠杆菌中的表达*

论著

沈定霞 邬 飞 逯好英** 李梦东 马贤凯** (第三军医大学附属西南医院传染病专科中心)重庆,630038

提 要 将丙型肝炎病毒外膜 E_2/NS_1 基因亚克隆至融合型表达载体,在大肠杆菌中进行表达,表达的重组蛋白经 Western Blot 和 ELISA 鉴定具有丙型肝炎病毒外膜蛋白的抗原性,能与丙型肝炎病毒感染血清发生特异性结合反应,为研究外膜蛋白抗体的意义创造了条件。

关键词 丙型肝炎病毒;外膜蛋白;基因表达
中图法分类号 R512.6

丙型肝炎易转成慢性,并可能发展为肝硬化及肝细胞癌。寻找丙型肝炎病毒(HCV)具有保护性的抗原表位以研制疫苗来预防 HCV 感染是当前 HCV 研究领域的重要课题。HCV 基因组是一单股正链 RNA,具有一个大的开放阅读框架,编码一条由 3010～3033 个氨基酸组成的多聚前蛋白,再由宿主和病毒的蛋白酶共同加工形成 HCV 病毒蛋白[1,2],包括核心蛋白 C、外膜蛋白 E_1 和 E_2/NS_1 以及非结构蛋白 NS_2～NS_5。其中 E_2/NS_1 基因在 HCV 基因组中不仅变异最大,而且具有特异性细胞毒 T 淋巴细胞以及与体液免疫反应有关的 B 淋巴细胞的表位,是体内免疫系统作用的主要部位[3,4]。本研究在大肠杆菌中表达了 HCV E_2/NS_1 基因,用 Western Blot 和 ELISA 鉴定了所表达的重组外膜蛋白的抗原性。

1 材料与方法

1.1 菌株和质粒

E.Coli HB101 和 JM101,表达质粒 PRX_1 和 PGEX-2T 由军事医学科学院三所三室提供。含有 HCV E_2/NS_1 基因的重组质粒 PGEM-T-E_2 由本室构建(资料待发表)。

1.2 工具酶和试剂

限制性核酸内切酶购自 Promega 公司,连接酶和 DNA Marker 购自协和医科大学基础所,蛋白质 Marker 购自原平生物技术工程公司,酶标羊抗人 IgG 购自军事医学科学院五所。3^{β}-吲哚丙烯酸(IAA)和异丙基 β-D-硫代半乳糖苷(IPIG)为 Sigma 公司产品。

1.3 一般分子生物学实验方法

质粒的提取、DNA 片段的回收和连接、连接物的转化、质粒 DNA 的限制性内切酶分析等按文献[5]操作。

1.4 外源基因在大肠杆菌中的表达

含表达质粒 PRX_1-E_2 和 PGEX-2T-E_2 的 E.Coli HB101 和 E.Coli JM101 分别在 M9 和 LB 培养液中用 IAA 和 IPTG 进行诱导表达。

1.5 表达蛋白的 SDS-PAGE 和 Western Blot 分析

按文献[5],表达蛋白经 12%SDS-PAGE 后,一半凝胶用考马斯亮蓝 R250 染色,另一半凝胶经电转印至硝酸纤维素膜上,封闭后分别与 1∶100 稀释的 HCV 感染阳性血清及酶标抗体反应,二氨基联苯胺显色。HCV 感染阳性血清是经逆转录聚合酶链反应(RT-PCR)和重组免疫印迹试验(4·PIBA)分别证实有 HCV RNA 和抗 HCV 存在[6]。

1.6 ELISA 检测 HCV 感染阳性和阴性血清中的 HCV 外膜蛋白抗体

将诱导表达的细菌培养液离心,沉淀经悬浮后用超声波破碎,再离心后分别收集上清和沉淀包被酶联板,与 5 份 HCV 感染阳性血清和 20 份 HCV 感染阴性血清及酶标抗体先后孵育后显色,同时设置空白对照、正常对照血清及不含 E_2/NS_1 基因的空载体对照。血清分别来自不同临床类型的肝炎病人,其 HCV 感染阳性和阴性鉴定方法同上。

2 结果

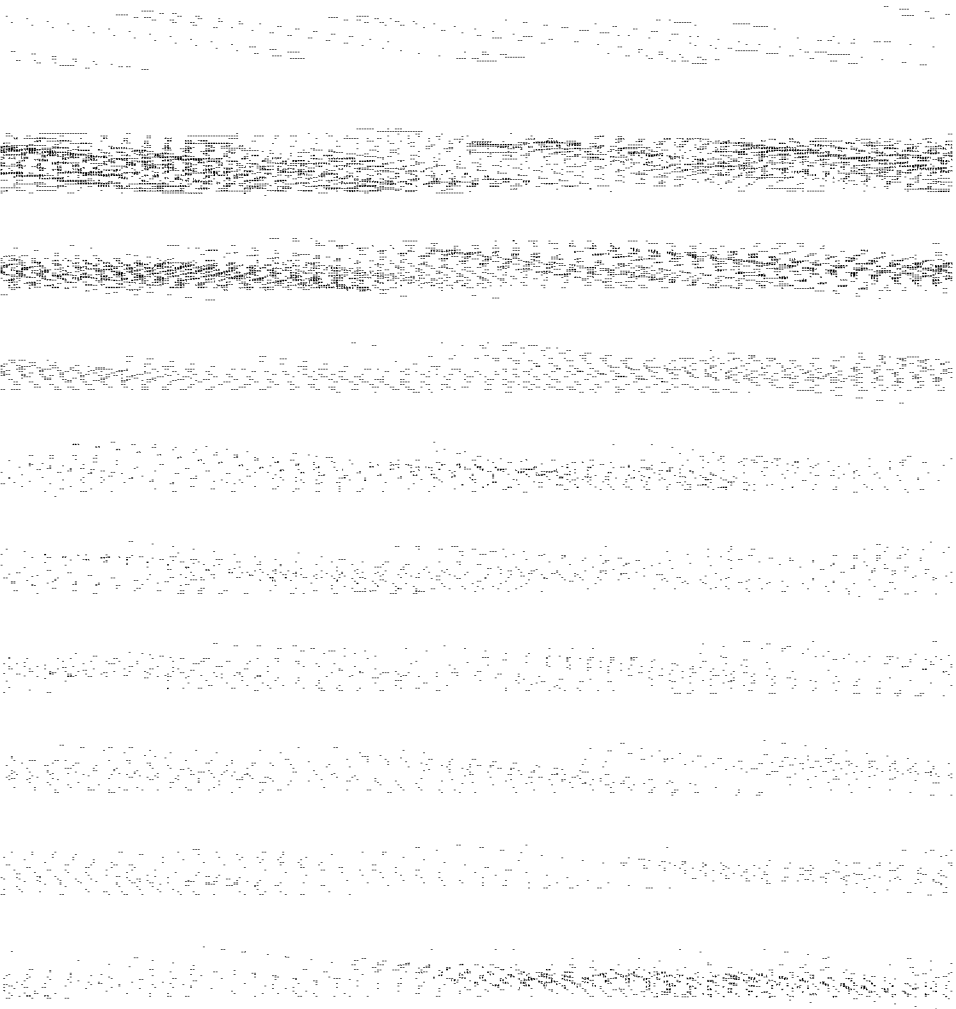
2.1 HCV E_2/NS_1 基因表达质粒的构建

2.1.1 PRX_1-E_2 重组质粒的构建 用 EcoRI 和 BamHI 双酶消化质粒 PRX_1 和 PGEM-T-E_2,从低熔点琼脂糖凝胶中回收 PRX_1(2.88 kb)及 HCV E_2/NS_1 基因片段(931 bp),二者用 T_4DNA 连接酶连接后转化 E.Coli HB101,获得含重组质粒 PRX_1-E_2 的克隆子(图 1)。

2.1.2 PGEX-2T-E_2 重组质粒的构建 先将 HCV E_2/NS_1 基因亚克隆至质粒 PBacPAK9 中,再用 BamHI 从 PBacPAK9-E_2 质粒上切下该基因片段并将其插入式连接至 PGEX-2T 的 BamHI 位点中。用 EcoRI 酶切,鉴定片段插入的方向,能切下约 931 bp 片段者为正向连接,否则为反向连接(图 2)。

* 国家科委 863 资助项目
** 军事医学科学院三所三室 北京,100850

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net



?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

2.3 Western Blot 鉴定重组 HCV 外膜 E_2/NS_1 蛋白

经 Western Blot 鉴定，含重组质粒 PRX_1-E_2 和 PGEX-2T-E_2 的工程菌经诱导后表达的重组蛋白质均能与部份 HCV 感染血清发生反应，反应显色带的位置与在 12%SDS-PAGE 中重组蛋白质表达带的位置相对应，对照菌与阳性血清不反应。

2.4 ELISA 检测 HCV 感染阳性和阴性血清中的抗 E_2/NS_1 蛋白抗体

5 份 HCV 感染阳性血清有 2 份 E_2/NS_1 蛋白抗体检测阳性，20 份 HCV 感染阴性血清有 3 份检测阳性，正常对照血清和用不含 E_2/NS_1 基因的空载体检测均阴性。

3 讨论

本文在获得含 HCV E_2/NS_1 基因的克隆子并经序列测定证实所克隆的基因为 HCV 外膜蛋白基因（资料待发表）的基础上，将 HCV E_2/NS_1 基因亚克隆入表达载体 PRX_1 和 PGEX-2T 中[7,8]，在大肠杆菌中进行表达，经 Western Blot 和 ELISA 鉴定，表达的重组蛋白具有 HCV 外膜蛋白的抗原性。PGEX-2T-E_2 在 E. Coli 中表达的蛋白质分子量（31000 u）虽比预计分子量（59000 u）低，但除去融合蛋白谷胱甘肽 S 转移酶（GST）26000 u 外，E_2/NS_1 端部分基因仍然得到了表达，且表达的这部分蛋白能与 HCV 感染血清发生反应，说明 HCV E_2/NS_1 蛋白 N 端具有 HCV 共同的抗原表位。

关于 HCV 外膜蛋白抗体是否具有中和保护功能，目前尚有争议[9,10]。我们应用 ELISA 检测了 HCV 感染阳性和阴性血清，发现阳性和阴性血清中均可检出 E_2/NS_1 蛋白抗体，尤其是 HCVRNA 阳性血清中可检出 E_2/NS_1 蛋白抗体。因此，HCV E_2/NS_1 蛋白抗体是否具有中和保护作用，以及其检出的临床意义仍需深入研究。E_2/NS_1 重组蛋白的获得以及在此基础上建立了 ELISA 检测 E_2/NS_1 蛋白抗体的方法，无疑为探讨 E_2/NS_1 蛋白的意义创造了条件。

参考文献

1 Houghton M, Weiner A, Han J *et al*. Molecular biology of the hepatitis C viruses: Implications for diagnosis, development and control of disease. Hepatology, 1991; 14(2): 381

2 Hijikata M, kato N, Ootsuyama Y *et al*. Gene mapping of the putative structural region of the hepatitis C virus genome by in vitro processing analysis. Proc Natl Acad Sci USA, 1991; 88(13): 5547

3 Koziel MJ, Dudley D, Afdhal N *et al*. Hepatitis C virus (HCV)-specific cytotoxic T lymphocytes recognize epitopes in the core and envelope proteins of HCV. J Virol, 1993; 67(12): 7522

4 Kato N, Sekiya H. Humoral immune response to hypervariable region 1 of the putative envelope glycoprotein (gp70) of hepatitis C virus. J Virol, 1993; 67(7): 3923

5 金冬雁，黎孟枫译. 分子克隆实验指南. 第2版. 北京：科学出版社，1992：19～322

6 郝　飞，宋　霞，Thaler MM 等. 合成肽与重组抗原检测丙型肝炎病毒抗体的对比研究. 中华传染病杂志，1995；13(2)：69

7 David L, Rimm, Thomas DP. New plasmid Vectors for high level synthesis of eukaryotic fusion proteins in Escherichia coli. Gene, 1989; 75(2): 323

8 Smith DB, Johnson KS. Single-step purification of polypeptides expressed in E. Coli as fusions with glutathione transferase. Gene, 1988; 67(1): 31

9 Yokosuka O, Ito Y, Imazeki F *et al*. Detection of antibody to hepatitis C E_2/NS_1 protein in patients with type C hepatitis. Biochem Biophys Res Commun, 1992; 189(1): 565

10 Shimizg Y, Hijikata M, Iwamoto A *et al*. Neutralizing antibodies against hepatitis C virus and the emergence of neutralization escape mutant viruses. J Virol, 1994; 68(3): 1494

（收稿：1995-12-14；修回：1996-03-01）

（编辑　沈锡庚、王　红）

Expression of hepatitis C virus E_2/NS_1 gene in E. coli

Shen Dingxia, Hao Fei, Lu Haoying, Li Mengdong, Ma Xiaokai (Center of Infectious Disease. Southwest Hospital. Third Military Medical University. Chongqing, 630038)

Abstract The E_2/NS_1 gene of hepatitis C virus (HCV) was subcloned into 2 categories of fusion expression vectors and was successfully expressed in E. coli. The findings of Western blot and ELISA indicate that the expressed recombinant protein possessed the antigenicity of HCV envelope and could specifically react with the serum of individuals infected with HCV. It can be used to investigate the significance of the antibodies to E_2/NS_1 protein.

Key words hepatitis C virus; envelope protein; gene expression

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.cnki.net