

## · 基础论著 ·

# 丙型肝炎病毒核心蛋白在大肠埃希菌中的表达及其纯化

刘秀财 王克霞 成军 洪源 王琦 杜佳菊 季生吉

**【摘要】** 目的 建立稳定表达丙型肝炎病毒(HCV)核心蛋白的原核表达系统,获得高产量的纯化核心蛋白。方法 以HCV株全长cDNA序列为模板,PCR扩增获得核心蛋白基因,构建原核表达载体pET-32a(+)-HCV-Core。转化大肠埃希菌DH5 $\alpha$ ,提取质粒,验证正确后,再次转化大肠埃希菌BL21中,IPTG诱导表达,SDS-PAGE、Western blot验证融合蛋白的表达。超声破碎表达菌,Ni<sup>+</sup>-亲和柱对表达蛋白进行纯化及柱上复性。结果 成功构建了原核表达载体pET-32a(+)-HCV-Core,并表达了预期分子量大小的目的蛋白。结论 成功表达、纯化HCV核心融合蛋白,为进一步研究其生物学功能奠定了坚实的基础。

**【关键词】** 核心蛋白;原核表达;蛋白纯化

**Expression and purification of HCV core fusion protein in *E. coli*** LIU Xiu-cai, Wang Ke-Xia, CHENG Jun, HONG Yuan, WANG Qi, DU Jia-ju, JI Sheng-ji. Department of Etiological Microbiology, Anhui Ligong University, Huainan 232001, China Corresponding author: WANG Ke-xia, Email: cpli001@126.com; CHENG Jun, Email: cj@genetherapy.com.cn

**【Abstract】 Objective** To construct a prokaryotic expression vector of HCV core protein and to express and purify it. **Methods** DNA of HCV core protein gene was amplified by polymerase chain reaction (PCR) using cDNA of HCV as template. After sequencing, the correct DNA fragment was inserted into inducible prokaryotic expression vector pET-32a (+) and the vector was transformed into the competent *E. coli* BL21. The expression of HCV was induced by IPTG, and cell lysate was analyzed by SDS-PAGE and Western blot. Expressed bacteria were quassationed by super-sound and analyzed by SDS-PAGE. The expressed product was purified and renatured by Ni<sup>+</sup>-affinity column chromatography. **Results** The prokaryotic expression vector was constructed successfully. HCV core fusion protein was expressed and purified with expected molecular weight. **Conclusions** The successful expression and purification of HCV core fusion protein will be useful for further study on its biological function.

作者单位:232001 淮南市,安徽理工大学医学部病原微生物学教研室(刘秀财、王克霞);北京地坛医院传染病研究所(成军、洪源、王琦、杜佳菊、季生吉)

通讯作者:王克霞 Email: cpli001@126.com

成军 Email: cj@genetherapy.com.cn

【Key words】 Core protein; Prokaryotic expression; Protein purification

丙型肝炎病毒(HCV)感染所致丙型肝炎是慢性肝病的主要病因之一,主要由输血引起,与肝细胞癌(HCC)及肝硬化关系密切,对人类危害巨大。目前全球范围内感染HCV的患者约有1.7亿人,我国约4000万左右。HCV感染已成为严重的世界公共卫生问题之一,但迄今尚无疫苗和特异有效的治疗药物。HCV是一种单股正链RNA病毒,其基因组长约9.4 kb,其核心蛋白位于病毒多肽的氨基末端,被宿主的信号肽酶切割后产生,由191个氨基酸残基组成<sup>[1,2]</sup>。此蛋白被认为是病毒的核壳蛋白,与HCV其它的结构与非结构蛋白相比,其氨基酸序列高度保守。核心蛋白高度碱性,无糖基化位点,且具有细胞毒性<sup>[3,4]</sup>,其结构特点使其难以在真核系统中表达。为了探讨核心蛋白对免疫反应的影响,本研究拟构建HCV核心蛋白的原核表达载体、并将表达蛋白进行纯化,以期为进一步研究其生物学功能奠定基础。

## 材料和方法

### 一、主要实验仪器、材料和试剂

大肠埃希菌 DH5 $\alpha$ 、BL21、pET-32a(+ )、HCV 株全长 cDNA 为本实验室保存。Taq 酶购于鼎国生物公司,丙烯酰胺、N,N'-亚甲双丙烯酰胺、T4 DNA 连接酶、IPTG 及 X-Gal 购于 Promega 公司,玻璃奶回收试剂盒购于博大泰克公司,DNA Marker、蛋白 Marker,限制性核酸内切酶购于 TaKaRa(大连)公司。AKTA purifier 100、His Trap\_FF 亲和层析柱为 GE 公司产品,抗-His 单克隆抗体、HRP 标记羊抗鼠 IgG、HRP 标记羊抗兔 IgG 均购于北京中杉金桥生物公司,ECL 化学反光试剂盒购于 GE 公司,PVDF 膜购于 MILIPORE 公司。蛋白分析试剂盒购于 Sigma 公司。其余化学试剂均为国产分析纯和生物化学试剂。引物合成及 DNA 测序由北京奥科生物公司完成。

### 二、方法

1. HCV 核心蛋白基因的扩增:PubMed 查询 HCV 核心蛋白基因序列,在编码区的上游和下游设计一对寡聚核苷酸引物(P1 5' - cgggatccatgagcaccaatc -3' 和 P2 5' - cggaattcaggctgaagcgg -3'),引物两端分别引入 *Eco* R I / *Bam* H I 酶切位点。酶切位点前边加保护碱基,以实验室保存的 HCV 株全长 cDNA 序列为模板进行 PCR 扩增,具体反应条件为:95 $^{\circ}$ C 5 min,94 $^{\circ}$ C 30 s,63 $^{\circ}$ C 30 s,72 $^{\circ}$ C 45 s,35 个循环、72 $^{\circ}$ C 7 min。1% 琼脂糖凝胶电泳鉴定结果,切胶玻璃奶纯化回收目的 DNA 片段。

2. HCV 核心蛋白重组表达载体的构建:将 PCR 回收的目的基因片段连接 pGEM-T 载体转化 DH5 $\alpha$  感受态细胞,铺氨苄青霉素 LB 琼脂平板进行抗生素筛选。挑取单克隆菌落于 1% 氨苄青霉素的 LB 培养基中增菌,应用碱裂解法提取质粒 DNA 后进行 *Eco* R I / *Bam* H I 双酶切,回收目的基因片段,将酶切正确的阳性克隆送奥科生物公司测序。测序验证正确后,将已回收片段与经 *Eco* R I /

*Bam* H I 双酶切的 pET-32a(+) 表达质粒连接, 转化大肠埃希菌 BL21, 同样经抗生素筛选后进行菌落 PCR 鉴定并将阳性菌落增菌, 应用碱裂解法提取质粒 DNA 再次进行 *Eco* R I / *Bam* H I 双酶切鉴定。

3. HCV 核心融合蛋白的诱导表达: 挑取阳性重组基因单克隆菌落与 pET-32a(+) 空载体菌液分别接种于含氨苄青霉素的 LB 液体培养基中, 37℃ 250 r/min 培养过夜; 次日, 按 1:100 扩大, 37℃ 250 r/min 培养至细菌密度为  $A_{600} \approx 0.5$  时, 加入 IPTG 至终浓度为 1 mmol/L, 继续培养 4 h, 3 ml 培养液离心集菌, 冰浴 5 min 后, 12 000 r/min 离心 5 min, 弃上清, 100  $\mu$ l 1 mmol/L Tris-HCl (pH 6.8) 悬浮菌体沉淀, 加 40  $\mu$ l 5 $\times$  SDS 凝胶上样缓冲液及 5  $\mu$ l  $\beta$ -巯基乙醇, 煮沸 10 min, 12 000 r/min 离心 5 min。取 25  $\mu$ l 进行 SDS-PAGE 分析。

4. HCV 核心融合蛋白的 Western blot 检测: SDS-PAGE 电泳后将凝胶按常规方法转膜(45 V, 1.5 h), 5% 脱脂奶粉封闭过夜, 抗-His 单克隆抗体 1:200 稀释作为第一抗体孵育 3 h, TBST 洗膜 3 次(10 min/次); HRP 标记羊抗鼠 IgG 1:5000 稀释为第二抗体孵育 1 h, TBST 洗膜 3 次(10 min/次), ECL 显色, X 光片曝光。

5. HCV 核心融合蛋白的大量获得: 按方法 3(诱导时间为 4 h) 大量诱导表达 HCV 核心融合蛋白。将离心所得菌体反复冻融 3 次, 称重后加入超声缓冲液(20 mmol/L Tris-HCl pH 8.0, 0.5 mmol/L EDTA)(10 ml/g 湿菌液)。混匀置冰上, 超声法破碎菌体, 超声条件如下: 功率 200 w, 超声 10 s、停 10 s 为一个循环, 每 15 个循环后暂停 5 min, 共 60 个循环。完成后取 1 ml 4℃ 分离上清、沉淀, 分别按常规方法制取样品后取 25  $\mu$ l 进行 SDS-PAGE 分析。离心收集超声裂解产物沉淀。

6. HCV 核心融合蛋白的柱上复性和纯化: 配制尿素浓度分别为 0.5 mol/L、1 mol/L、2 mol/L、4 mol/L 的包涵体洗液(其余成分为 20 mmol/L Tris-HCl pH 8.0, 0.5 mmol/L EDTA、100 mmol/L NaCl、1% Triton), 探索最佳洗液条件并依此条件洗涤沉淀 3 次, 离心收集洗涤后包涵体。A 液(8 mol/L 尿素、0.5 mol/L NaCl、20 mmol/L PB、20 mmol/L 咪唑)充分溶解包涵体(置摇床低速转摇助溶)。过夜后离心收集上清, 经 0.2  $\mu$ M 滤膜滤过后进行复性和纯化。具体步骤如下: 将样品加入经 A 液洗涤的亲层析柱, 然后用 B 液(20 mmol/L 咪唑、0.5 mol/L NaCl、20 mmol/L PB)逐渐按线性梯度降低尿素浓度至零, 进行蛋白柱上复性(共 40 ml 复性液, 流速为 5 ml/min), 最后以 20~500 mmol/L 咪唑线性梯度洗脱已复性的融合蛋白, 分别收集洗脱峰, 得到融合蛋白纯品, 通过蛋白分析试剂盒(BCA Protein Assay kit)以及酶标仪测定纯化融合蛋白浓度, SDS-PAGE 分析蛋白纯度。

## 结 果

### 一、pET-32a(+)-HCV-Core 基因的 PCR 扩增及质粒酶切鉴定结果

以实验室保存的质粒为模板, 经 PCR 扩增获得预期的 573 bp 大小的基因片段, 且无非特异性扩增现象。*Eco* R I / *Bam* H I 酶切鉴定, pET-32a(+) 载体和核心蛋白基因大小正确(图 1、2)。

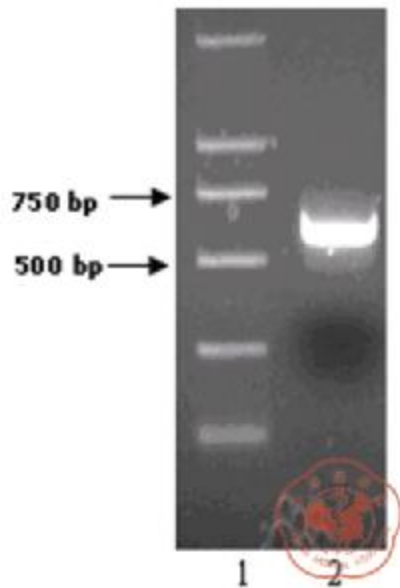


图1 HCV 核心基因的 PCR 扩增结果

1. Marker 2000; 2. 模板 PCR 结果

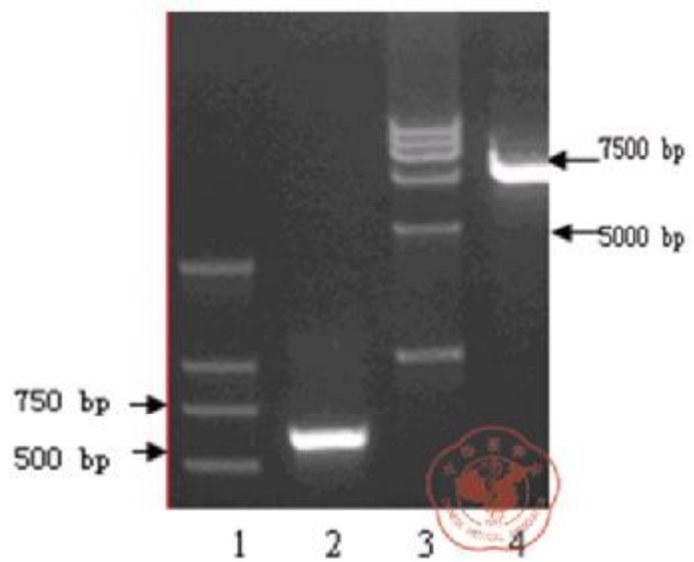


图2 双酶切鉴定结果

1. Marker 2000; 2. 核心基因的 PCR 回收后酶切结果;  
3. Marker 15000; 4. pET-32a 载体酶切后结果

## 二、HCV-核心基因重组蛋白表达的 SDS-PAGE 分析

HCV-核心重组蛋白在诱导剂作用下表达了预期分子量大小的蛋白(约 40 kD)(图3)。

## 三、HCV 核心基因重组蛋白表达的 Western blot 分析

HCV 核心重组蛋白表达量大,目的带清晰(图4)。

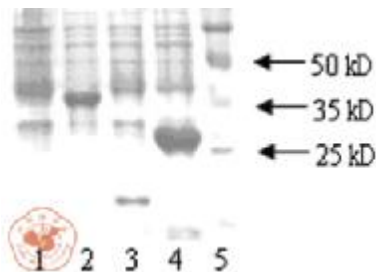


图3 HCV 核心基因重组蛋白表达 SDS-PAGE 分析

1. 带有 pET-32a (+)-HCV-Core 的非诱导菌株; 2. 带有 pET-32a (+)-HCV-Core 的诱导菌株; 3. 带有空 ET-32a (+)载体的诱导菌株; 4. 带有空 ET-32a (+)载体的非诱导菌株; 5. Marker

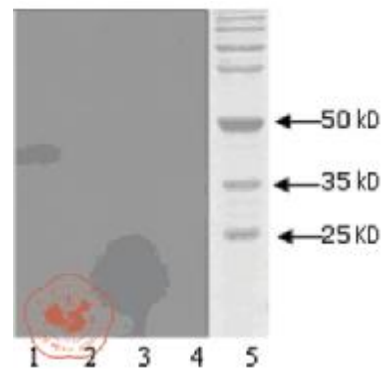


图4 重组蛋白 Western blot 分析

1. 带有 pET-32a (+)-HCV-Core 的诱导菌株; 2. 带有 pET-32a (+)-HCV-Core 的非诱导菌株; 3. 带有空 ET-32a (+)载体的诱导菌株; 4. 带有空 ET-32a (+)载体的非诱导菌株; 5. Marker



#### 四、HCV 核心融合蛋白的柱上复性和纯化

超声后离心分离沉淀,不同浓度的包涵体洗涤液洗涤沉淀,发现尿素浓度为 0.5 mol/L 时洗涤效果最好(图 5),收集充分洗涤后的包涵体,包涵体溶解液充分溶解,上清经  $\text{Ni}^{2+}$ -亲和层析柱纯化、复性。取 10  $\mu\text{l}$  纯化融合蛋白进行 SDS-PAGE 分析(图 6),经比较将峰 2 蛋白浓缩,分析试剂盒测定蛋白浓度为 1.1 g/L。

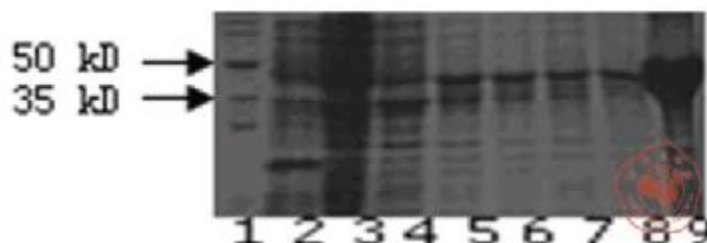


图 5 蛋白过  $\text{Ni}^{2+}$ -前 SDS-PAGE 分析

1. 蛋白 Marker; 2. 带有空 pET-32a (+) 载体的诱导菌株; 3. 蛋白超声后上清液; 4、5、6. 蛋白 0.5 m 尿素洗涤 3 次效果; 7、8. 蛋白经无菌水洗涤效果; 9. 8 m 尿素过夜后蛋白上清液

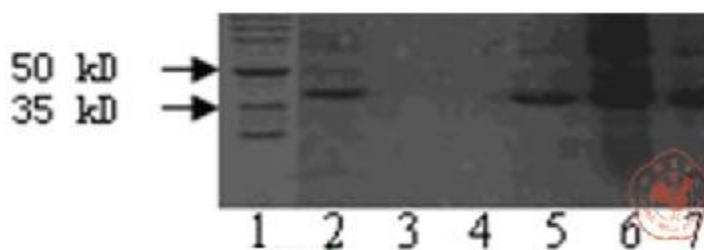


图 6 蛋白过蛋白过  $\text{Ni}^{2+}$ -SDS-PAGE 分析

1. Marker; 2. 峰 1; 3、4. 空白; 5. 峰 2; 6. 蛋白穿透液; 7. 峰 3

### 讨 论

多项研究均表明 HCV 核心蛋白能够导致肝细胞恶变和肿瘤的发生,除了参与病毒核衣壳的形成,HCV 核心蛋白还能调节基因转录,影响细胞分化,细胞信号转导途径,抑制宿主免疫反应<sup>[5-7]</sup>等。核心蛋白氨基酸序列上有多个 B、CTL 和 T 细胞的抗原表位<sup>[8]</sup>,能诱导不同病毒株的交叉免疫应答<sup>[9]</sup>,并具有调控多种细胞基因、影响细胞生长、增生及凋亡的能力,可能是引起宿主细胞癌变的重要因素<sup>[10]</sup>。因此,核心蛋白具有的多种功能促使人们从不同角度对其进行研究,以期探讨 HCV 的致病机制,为预防和治疗 HCV 感染提供新的策略。

本研究从 HCV 全长基因中克隆出核心蛋白基因,把核心蛋白与 His 标签基因片段在大肠埃希菌表达载体中融合且表达成功。以目前广泛使用的原核表达系统大肠埃希菌来构建 HCV 核心基因的表达式载体。同真核表达系统相比,大肠埃希菌具有较多的优点,其表达目的蛋白快速、高效、经济。其本身繁殖力强。但由于原核细胞缺乏真核细胞所特有的翻译后加工修饰系统,如糖基化等,使不少具有生物活性的糖蛋白不能利用原核表达系统表达;而且蛋白的高水平表达常形成包涵体,而包涵体的溶解纯化步骤繁琐,也正因为如此,以包涵体形式表达的重

组蛋白的分离纯化、以及融合蛋白的复性成为了原核表达系统应用过程中遇到的主要障碍之一。本课题组 pET-32a(+) 表达载体含有一段辅助蛋白基因, 该辅助蛋白包括 Trx、Tag、His 等有助于提高目的蛋白的表达效率。His 标签也容易为多数抗体所识别, 因此我们选用 pET-32a(+) 作为表达载体, 再将表达载体同目的基因融合后, 在大肠埃希菌 BL21 中获得了高效表达的融合蛋白。SDS-PAGE 电泳显示融合蛋白的表达产物分子量约为 40 kD, 与预测的融合蛋白大小相吻合; 同时通过 Western blot 分析证实此融合蛋白包含 His 标签, 分子大小与预期一致, 从而间接证实了 HCV 核心蛋白的表达。在下一步大量表达纯化蛋白, 洗涤包涵体, 超声破碎菌体, 用镍柱对融合蛋白纯化进行了亲和层析和柱上复性, 为免疫实验动物制备抗体奠定了基础。

通过以上实验操作我们得到了 HCV 核心蛋白的纯化抗原, 对深入了解 HCV 核心蛋白的结构与功能有重要意义。

### 参 考 文 献

- 1 焦成松, 周永兴. 丙型肝炎病毒 C 蛋白研究进展. 国外医学病毒学分册, 2000, 7: 127-128.
- 2 李克, 王琳, 成军, 等. 丙型肝炎病毒核心蛋白基因的表达载体构建及在酵母中的表达. 军医进修学院学报, 2002, 23: 1-3.
- 3 McLauchlan J. Properties of the hepatitis C virus core protein: a structural protein that modulates cellular processes. J Viral Hepat, 2000, 7: 2-14.
- 4 Lai MM, Ware CF. Hepatitis C virus core protein: possible roles in viral pathogenesis. Curr Top Microbiol Immunol, 2000, 242: 117-134.
- 5 胡刚, 薛小平. 丙型肝炎病毒核心蛋白在大肠杆菌中的表达. 生物技术, 2004, 114: 4-6.
- 6 成军. 丙型肝炎病毒核心蛋白结合蛋白的研究进展. 国外医学病毒学分册, 2000, 7: 123-127.
- 7 Basu A, Meyer K, Ray RB, et al. Hepatitis C virus core protein is necessary for the maintenance of immortalized human hepatocytes. Virology, 2002, 298: 53-62.
- 8 张敏睿, 朱娟莉, 董兆麟, 等. 丙型肝炎病毒核心蛋白在大肠杆菌和毕赤酵母中表达的比较. 微生物学通报, 2006, 33: 80-83.
- 9 Koike K. Molecular basis of hepatitis C virus-associated hepatocarcinogenesis: lessons from animal model studies. Clin Gastroenterol Hepatol, 2005, 3: S132- S135.
- 10 Lerat H, Honda M, Beard MR, et al. Steatosis and liver cancer in transgenic mice expressing the structural and nonstructural proteins of hepatitis C virus. Gastroenterology, 2002, 122: 352-365.

(收稿日期: 2008-12-04)

(本文编辑: 王丹静)

刘秀财, 王克霞, 成军, 等. 丙型肝炎病毒核心蛋白在大肠埃希菌中的表达及其纯化[J/CD]. 中华实验和临床感染病杂志: 电子版, 2008, 2(2): 21-26.