

· 基础论著 ·

基因 1b 型不同准种株 HCV 核心蛋白原核表达质粒 pTrc-CKS 构建及诱导表达

汪明珊 颜学兵 周林福 侯晓丽 李杨霞 温晓芳 姜云水 陈智

【摘要】 目的 为研究与不同准种 HCV 核心蛋白(Core)相互作用的细胞蛋白质组,构建并表达基因 1b 型的不同准种 Core 的原核表达质粒 pTrc-CKS。**方法** 用聚合酶链反应(PCR)扩增并获得等长度片段的基因 1b 型的不同准种株丙型肝炎病毒(HCV)Core 基因,氨基酸(aa)长度分别为癌中心株(T):1~172 aa、癌旁株(NT):1~172 aa 及 C191(HCV-J6):1~172 aa。扩增产物用 *Bam* H I 及 *Eco* R I 双酶切后插入到原核表达质粒 pTrc-CKS 中。阳性克隆转化到大肠埃希菌 Top 10F' 中,异丙基- β -D-S-代半乳糖苷(IPTG)诱导表达获得融合蛋白 CKS-Core-His,经 Ni^{2+} 10F' 柱纯化并经 Western blot 验证。**结果** PCR 及双酶切验证表明 3 个基因为 1b 型的不同准种 Core 基因成功构建到原核质粒 pTrc-CKS 中,体外诱导并获得了相应的融合蛋白。**结论** 构建不同准种 Core 基因的原核表达质粒获得成功,体外诱导表达并纯化获得了 CKS-Core-His 融合蛋白,为后续研究与 Core 相互作用的细胞蛋白质组奠定了基础。

【关键词】 丙型肝炎病毒;核心蛋白;pTrc-CKS;质粒构建

Construction and expression of plasmids containing the truncated core protein of different quasispecies genotype 1b hepatitis C virus WANG Ming-shan, YAN Xue-bing, ZHOU lin-fu, HOU Xiao-li, LI Yang-xia, WEN Xiao-fang, JIANG Yun-shui, CHEN Zhi. Department of Infectious Diseases, the First Affiliated Hospital of Xuzhou Medical College, Xuzhou 221002, China

Corresponding author: YAN Xue-bing, Email: yxbxuzhou@126.com

【Abstract】 Objective To study the proteomic profiling of cellular proteins interacting with the hepatitis C virus core protein (HCV Core), plasmids containing the truncated core protein of different quasispecies of genotype 1b hepatitis C virus were constructed and induced to express. **Methods** The gene sequences of different quasispecies genotype 1b Core were amplified from plasmids containing core sequences derives from tumor (T) and non-tumor (NT) tissues from one patient infected with HCV. Amino acid (aa) lengths of HCV T were 1-172 aa, NT of 1-172 aa and HCV

基金项目:江苏省自然科学基金(BK2007031);江苏省高校自然科学基金(08KJB320017)

作者单位:221002 徐州市,徐州医学院附属医院感染病科(颜学兵、汪明珊);浙江大学医学院附属第一医院传染病研究所(周林福、侯晓丽、李杨霞、温晓芳、姜云水、陈智)

通讯作者:颜学兵, Email: yxbxuzhou@126.com

C191(HCV J-6) of 1-172 aa. PCR products were cleaved with restriction enzymes *Bam* H I and *Eco* R I and cloned into pTrc-CKS. Positive clones were transfected into *E. coli* Top 10F' and CKS-Core-His fusion proteins were expressed with isopropylthio- β -D-galactoside (IPTG) induction, then purified and verified by Western blot.

Results Three different HCV quasispecies were correctly inserted into pTrc-CKS vector respectively and the fusion proteins were expressed well in vitro. **Conclusions** Successful construction of different CKS-Core-His expression plasmids lays a basis for future study of the proteomics interaction with the Core.

【Key words】 Hepatitis C virus; Core protein; pTrc-CKS; Vector construction

丙型肝炎病毒(HCV)是我国慢性肝病的主要致病病原体之一,为单股正链RNA病毒,编码包括核心蛋白(Core)在内的数个结构蛋白和非结构蛋白,其中Core为病毒的核衣壳蛋白,主要位于细胞质中,在慢性肝炎、肝硬化及肝细胞癌(HCC)的致病过程中起到重要作用^[1,2]。HCV易变异,体内存在6种基因型及60余种基因亚型,即使是同一感染者体内亦存在不同准种株,相关研究表明HCV Core在不同基因型或同一基因型不同准种株之间的致病机制存在差异。我国主要流行的是基因1b型病毒株,为此我们从1例单纯由基因1b型HCV感染导致HCC的患者癌中心株(T)、癌旁株(NT)及C191(HCV-J6)中扩增并构建的质粒中扩增不同准种Core基因,进一步构建同一基因型不同准种株Core基因的原核质粒并在大肠埃希菌中获得表达,为进一步研究与Core相互作用的细胞蛋白质组奠定了基础。

材料与方法

一、材料

大肠埃希菌 DH5 α 菌株、Top 10F'、质粒 pTrc-CKS 购自深圳勤宝升生物公司,异丙基- β -D-S-代半乳糖苷(IPTG),蛋白分子量标准、DNA marker 及限制性内切酶 *Bam* H I 及 *Eco* R I 购自 TaKaRa 公司,质粒的抽提、纯化及 PCR 产物的纯化采用上海华瞬公司生产的试剂盒进行,抗-Core 购自英国 Abcam 公司,蛋白纯化采用美国 GE 公司 AKTA 蛋白纯化仪、Ni-NTA 琼脂糖凝胶柱,硝酸纤维素膜购自美国 Sigma 公司,其他试剂为国产分析纯。

二、方法

1. Core 基因的扩增:从质粒 pEGFP-N1/T、-/NT、-/C191 中扩增 Core 基因, pEGFP-N1/T、-/NT 分别含有从 1 例因单纯 HCV 感染致肝硬化并发肝癌患者的癌中心(T)、癌旁组织(NT)中的 HCV 病毒株 Core 基因, pEGFP-N1/C191 含有基因 1b 型 HCV-J6 的 Core 基因,作为基因 1b 型对照研究。根据 T、NT、C191(HCV-J6)的序列分析,三者都属于基因 1b 型。参照相应序列设计引物(表 1)。PCR 反应体系(50 μ l):双蒸水 34.5 μ l,缓冲液(10 \times)5 μ l, dNTP(25 mmol/L)4 μ l, Mg²⁺ 3 μ l,模板 DNA(45 ng)1 μ l,上、下游引物(10 pmol/L)各 1 μ l,高保真酶 Taq 酶

(TaKaRa)0.5 μ l。PCR 循环条件:94℃ 2 min,94℃ 30 s,50℃ 30 s,72℃ 30 s,10 循环后,94℃ 30 s,55℃ 30 s,72℃ 30 s,20 循环,72℃ 7 min。PCR 产物于1% 琼脂糖凝胶进行电泳。

表1 不同准种 HCV Core 基因扩增引物

片段名称	上游引物(片段位置)5'→3'	下游引物(片段位置)5'→3'
CI91(1~172)	CGCGGATCCATGAGCACAAATCC(1~14 bp)	CCGGAATTCGCAACCGGGC(505~516 bp)
T(1~172)	CGCGGATCCATGAGCACGAATCC(1~14 bp)	CCGGAATTCGCAACCGGGCAG(505~516 bp)
NT(1~172)	CGCGGATCCATGAGCACGAATCC(1~14 bp)	CCGGAATTCGCAACCGGGCAG(505~516 bp)

注:其中 GGATCC 为 *Bam* H I 酶切位点,GAATTC 为 *Eco* R I 酶切位点

2. 质粒的构建及鉴定:PCR 产物及质粒 pTrc-CKS 经纯化后用限制性内切酶 *Bam* H I 及 *Eco* R I 酶切,37℃ 2 h,酶切后1% 琼脂糖电泳,采用上海华瞬公司的 DNA 凝胶回收试剂盒分别回收目的片段及质粒 DNA,操作步骤按说明书进行。PCR 及质粒 pTrc-CKS 酶切回收产物,采用 T4 DNA 连接酶,16℃ 2 h,构建质粒。重组质粒转化到感受态细胞 DH5 α 并筛选氨苄青霉素(Amp⁺)抗性克隆,采用菌落 PCR 及质粒双酶切进行阳性克隆的筛选和鉴定,初步鉴定的阳性克隆送 Invitrogen 公司测序。不同表达质粒构建示意图见图1。

3. CKS-Core-His 融合蛋白诱导表达及纯化:经测序鉴定正确的阳性重组质粒转化到大肠埃希菌 Top10F' 中,挑选阳性克隆到含有 120 μ g/ml 氨苄青霉素及 0.2% 葡萄糖的新鲜 TB 培养基中,用 IPTG 诱导目的蛋白表达,并对诱导温度、IPTG 浓度及诱导时间进行优化,确定最佳诱导条件。将诱导有明显表达的阳性克隆转接到 30 ml 新鲜培养基中过夜培养,次日取 10 ml 转接到 1000 ml 新鲜培养基中,调整培养箱温度到 30℃,200 r/min,培养约 3.5 h,测 A_{600} 值约 0.8,加入 IPTG 至终浓度 0.5 mmol/L,继续培养约 4 h,收集细菌菌体,4℃,9000 r/min 离心 10 min,沉淀用 50 ml 预冷缓冲液 1(50 mmol/L Tris-HCl, pH 8.0;0.1 mol/L NaCl;1 mmol/L DTT;1 mg/ml 溶菌酶)洗两次,以去除残留培养基。菌体用缓冲液 1 重新悬浮后,室温放置约 30 min 后,冰上超声震荡 10 min(超声 2 s,间隔 3 s),4℃ 以 13 000 r/min 离心 30 min,包涵体沉淀用缓冲液 2(50 mmol/L Tris-HCl, pH 10.0;0.1 mol/L NaCl;2 mol/L 尿素;1% Triton X-100)洗两次,每次室温下磁力搅拌约 30 min,再次离心,弃上清,沉淀用缓冲液 3(50 mmol/L PBS, pH 7.4;0.5 mol/L NaCl;8 mol/L 尿素;20 mmol/L 咪唑)溶解,室温下温和搅拌至过夜,次日 4℃,13 000 r/min 离心 30 min,收集上清液。采用 AKTA 蛋白纯化仪经 Ni-NTA 琼脂糖柱纯化目的蛋白:上样之前及上样结束后分别用缓冲液 3 平衡 3~4 个柱体积。然后按线性梯度缓慢降低尿素浓度至 0 使融合蛋白在柱上复性,最后目的蛋白用缓冲液 4(50 mmol/L PBS, pH 7.4;0.5 mol/L NaCl;200 mmol/L 咪唑)洗脱。收集上样流穿液及洗脱峰液,进一步行 SDS-PAGE 分析。蛋白浓度采用 BioRad 法测定,纯化蛋白分装冻存于 -80℃。

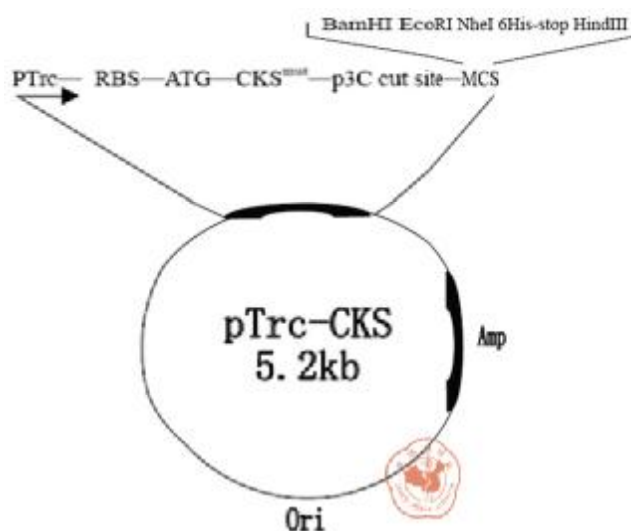


图1 Core 原核表达质粒构建示意图(酶切位点 *Bam* H I、*Eco* R I)

4. CKS-Core-His 融合蛋白及 Western blot 鉴定: 各取约 0.5 μ g CKS-Core-His 融合蛋白, 10% SDS-PAGE 电泳约 1.5 h, 采用半干转膜的方法将融合蛋白转移到硝酸纤维素膜上, 恒流 24 V, 60 min, 5% 脱脂牛奶封闭约 1 h, 一抗为抗-Core 抗体 1:1000 稀释, 4 $^{\circ}$ C 过夜, 二抗为抗-鼠辣根酶标记抗体 1:3000 稀释, 37 $^{\circ}$ C 2 h。ECL 显色, 暗室曝光。

结 果

一、原核质粒 pTrc-CKS/Core 的构建及鉴定

Core 基因经 PCR 扩增后均获得了相应的目的条带(图2), 重组质粒经双酶切鉴定可见一条大小约 516 bp 的 DNA 片段, 与目的基因大小一致(图3), 重组质粒经测序后证实与目的基因序列一致。



图2 PCR 扩增产物电泳

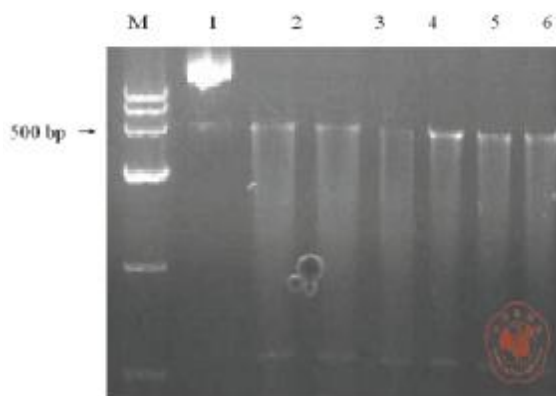


图3 重组质粒双酶切鉴定图

M: DNA marker; 1: 阳性克隆未酶切; 2~7: 阳性克隆双酶切

二、CKS-Core 融合蛋白的表达与纯化

T、NT、C191 的 CKS-Core-his 融合蛋白在大肠埃希菌中获得了很好的表达,在相应的蛋白分子量附近出现明显的条带,大小约 49 kD 可溶性分析表明融合蛋白主要以包涵体形式表达(图 4)。包涵体蛋白经洗涤后获得较纯蛋白,尿素溶解后经 Ni-NTA 琼脂糖凝胶柱纯化,柱上复性后获得纯的融合蛋白(图 5)。

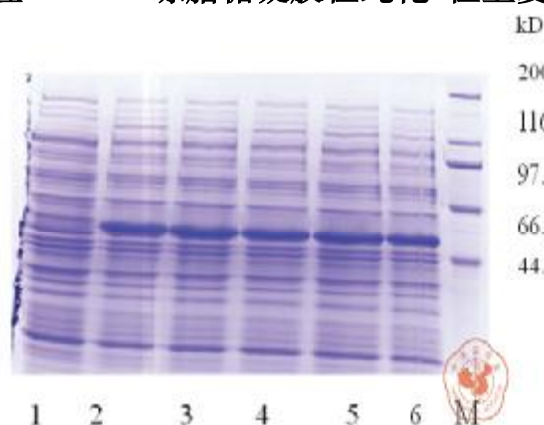


图 4 重组融合蛋白诱导表达

1: T 诱导前; 2~4: T 诱导 2 h、4 h、6 h; 5: NT 诱导 2 h; 6: C191 诱导 2 h; M: 蛋白分子量 marker

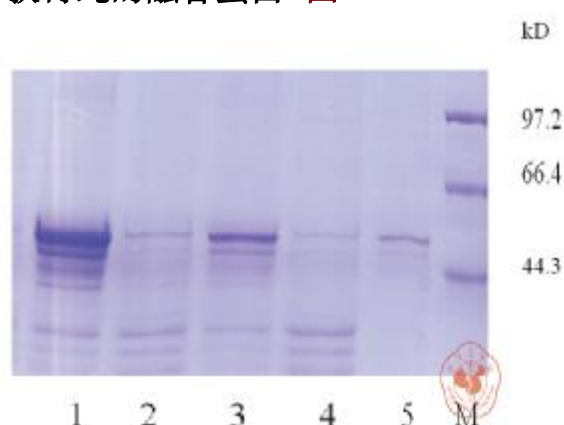


图 5 融合蛋白的纯化

1: 融合蛋白包涵体(T); 2: 低浓度尿素洗涤包涵体上清; 3: 亲和纯化前经尿素溶解后的融合蛋白(T); 4: 亲和纯化流穿蛋白; 5: 亲和纯化后的融合蛋白; M: 蛋白分子量 marker

三、Western blot 鉴定

融合蛋白经 Western blot 分析,存在与特异性抗-Core 单抗发生特异性的免疫反应条带(图 6)。

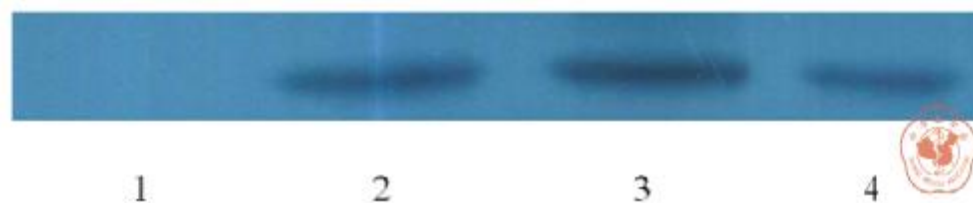


图 6 融合蛋白的 Western blot 鉴定

1: 融合蛋白(T)未诱导; 2~4: 诱导后融合蛋白(T、NT、C191)

讨 论

HCV 为 RNA 病毒,易变异,在体内存在多种基因型及基因亚型,即使是同一基因型感染者体内也存在不同的准种。Core 为病毒的核衣壳蛋白,结构最为保守,不仅参与病毒基因组 RNA 的包装,在 HCV 感染及致病过程中亦发挥极为重要的作用,如:Core 可诱导转基因小鼠体内 PPAR α 自发性持续性激活并与其相互作用诱导小鼠多中心 HCC 的发生^[3]; Core 通过激活肝正常细胞和肝癌细胞

SREBP1 及 PPAR γ 诱导肝脂肪变性^[4]; Core 通过与 TNF- α 、NF- κ B 等细胞因子相互作用调控细胞凋亡等。进一步研究发现, Core 发生多种生物学作用主要是通过其与宿主细胞内多种蛋白质发生相互作用而实现: Kang 等^[5]应用蛋白质组学方法研究发现有 40 余种细胞内蛋白可以与 Core 发生直接或间接相互作用, 但研究内容并未涉及不同基因型或准种之间的差异。此外既往研究还发现癌中心株 Core 可以激活宿主细胞并明显减弱 TGF- β 报道基因活性 PKR、STAT3 等, 而癌旁株则不能^[6,7], 二者在诱导宿主细胞凋亡和坏死率方面亦存在明显差异^[8], 提示不同准种 Core 在 HCV 致病过程中机制不同。本研究中, 我们成功构建并表达纯化了基因 1b 型 3 个不同准种 Core: T、NT、C191, 为从蛋白质组学水平研究与不同准种 Core 相互作用的细胞蛋白质, 从而进一步揭示 HCV 的致病致癌机制奠定了基础。

Core 的 C-端 120 ~ 179 aa 具有高度疏水性, 分析 Core 的氨基酸序列后发现其所含的碱性氨基酸较多, 其中精氨酸和赖氨酸约占 15%, 不利于蛋白的可溶性表达或表达后容易降解, Seong 等^[9]甚至认为全长 1 ~ 191 aa 的 Core 在大肠埃希菌中难以表达。实验发现随着 Core 氨基酸片段延长, 其蛋白表达量呈下降的趋势, 当完全去除掉 C-端疏水氨基酸后, Core 可呈高水平表达^[10]。我们构建的 3 个 Core 表达质粒为去除了 C-端较强疏水氨基酸的截短型质粒, 与经蛋白质工程改造过的可溶性蛋白 CKS 融合表达, 在体外获得了较高的表达, 但融合蛋白在大肠埃希菌中仍主要以包涵体形式存在, 通过降低融合蛋白表达速率如调整诱导温度 (25 ~ 37 $^{\circ}$ C)、诱导剂 IPTG 浓度、诱导时间等主要可能影响其表达的因素后仍不能获得较好的可溶性表达, 考虑仍与 C-端较强疏水性氨基酸的存在导致新合成的目的蛋白不能迅速正确折叠等因素有关。目的蛋白在 0.5 mmol/L IPTG 浓度诱导 2 h 后即获得较好的表达, 延长诱导时间、增加或降低诱导剂 IPTG 浓度并不能明显提高融合蛋白的表达量。以包涵体形式为主表达的融合蛋白在其理论等电点附近经低浓度尿素洗涤后可以去除部分杂蛋白, 使融合蛋白得到初步纯化, 有利于进一步的亲和纯化。

人体感染 HCV 后, 病毒与宿主细胞相互作用的过程对病毒株具有筛选作用, 筛选获得的病毒优势准种株有助于细胞的恶性转化, 即使是 HCV 基因组中最为保守的 Core 基因亦可存在变异, 本研究采用的 T、NT 及 C191 准种株 Core 基因及氨基酸序列比较发现, 准种变异性以 T 最大, NT 次之, 氨基酸序列的不同导致不同 Core 功能的差异: 导致蛋白的三级机构不同, 进一步导致与不同的宿主蛋白相互作用。进一步应用比较蛋白质组学结合生物信息学软件的方法研究并找到与不同准种 Core 相互作用的细胞蛋白质, 对揭示不同准种 HCV Core 在 HCV 持续感染及致癌中的机制具有重要的作用。

参 考 文 献

- 1 Yasui K, Wakita T, Tsukiyama-Kohara K, et al. The native form and maturation process of hepatitis C virus core protein. J Vir-

- ol, 1998, 72: 6048-6055.
- 2 Lo SY, Masiarz F, Hwang SB, et al. Differential subcellular localization of hepatitis C virus core gene products. *Virology*, 1995, 213:455-461.
- 3 Tanaka N, Moriya K, Kiyosawa K, et al. PPARalpha activation is essential for HCV core protein-induced hepatic steatosis and hepatocellular carcinoma in mice. *J Clin Invest*, 2008, 118:683-694.
- 4 Kim KH, Hong SP, Kim K, et al. HCV core protein induces hepatic lipid accumulation by activating SREBP1 and PPARgamma. *Biochem Biophys Res Commun*, 2007, 355:883-888.
- 5 Kang SM, Shin MJ, Kim JH, et al. Proteomic profiling of cellular proteins interacting with the hepatitis C virus core protein. *Proteomics*, 2005, 5:2227-2237.
- 6 Delhem N, Sabile A, Gajardo R, et al. Activation of the interferon-inducible protein kinase PKR by hepatocellular carcinoma derived-hepatitis C virus core protein. *Oncogene*, 2001, 20:5836-5845.
- 7 Pavo N, Battaglia S, Boucreux D, et al. Hepatitis C virus core variants isolated from liver tumor but not from adjacent non-tumor tissue interact with Smad3 and inhibit the TGF-beta pathway. *Oncogene*, 2005, 24:6119-6132.
- 8 Yan XB, Mei L, Feng X, et al. Hepatitis C virus core proteins derived from different quasispecies of genotype 1b inhibit the growth of Chang liver cells. *World J Gastroenterol*, 2008, 14:2877-2881.
- 9 Seong YR, Lee EK, Choi S, et al. Overexpression and simple purification of a truncated, immunologically reactive GST-HCV core (1-123) fusion protein. *J Virol Methods*, 1996, 59:13-21.
- 10 颜学兵, 陈智, Bourceux D, 等. 癌周及癌中心不同截短片段丙型肝炎病毒核心蛋白表达质粒的构建和表达. *中华肝脏病杂志*, 2004, 12:643-647.

(收稿日期:2008-11-06)

(本文编辑:温少芳)

汪明珊, 颜学兵, 周林福, 等. 基因 1b 型不同准种株 HCV 核心蛋白原核表达质粒 pTrc-CKS 构建及诱导表达[J/CD]. *中华实验和临床感染病杂志: 电子版*, 2009, 3(2):131-137.