

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*

张敏睿¹ 朱娟莉^{2,3} 董兆麟¹ 陈超^{1,2,3**}

(西北大学生命科学学院 西安 710069)¹ (国家微检测系统工程技术研究中心 西安 710069)²
(陕西西大北美基因股份有限公司 西安 710069)³

摘要: 为获得丙型肝炎病毒的核心蛋白(Core), 将克隆有Core基因的表达载体pBVIL1-Core转化大肠杆菌HB101, 温度诱导表达Core蛋白。同时利用PCR方法以含有丙型肝炎病毒全基因的质粒PBR™/HCV为模板扩增Core基因, 克隆进表达载体pPICZαA, 构建表达载体pPICZαA-Core, 转化毕赤酵母(*Pichia pastoris*) GS115, 在甲醇诱导下表达Core蛋白。Western-blot显示Core蛋白在大肠杆菌中高效表达, 表达蛋白量占菌体总蛋白的20%; 在酵母培养上清中存在Core蛋白, 证明Core蛋白在酵母系统中成功表达。

关键词: 丙型肝炎病毒, 核心蛋白, 基因表达, 大肠杆菌, 毕赤酵母

中图分类号: Q93 **文献标识码:** A **文章编号:** 0253-2654 (2006) 05-0080-04

Expression of Hepatitis C Virus Core Protein in *E. coli* and in *Pichia pastoris**

ZHANG Min-Rui¹ ZHU Juan-Li^{2,3} DONG Zhao-Lin¹ CHEN Chao^{1,2,3**}

(College of Life Science, Northwest University, Xi'an 710069)¹
(National Engineering Research Center for Miniaturized Detection Systems, Xi'an 710069)²
(Shaanxi Lifegen Co. LTD, Xi'an 710069)³

Abstract: Hepatitis C virus (HCV) is a kind of serious infectious source to harm the health of the humans. The HCV Core protein plays an important role in disease caused by HCV. In order to compare the expression of Core protein in *E. coli* with in yeast, the recombinant plasmid pBVIL1-Core was transfected into *E. coli* HB101 and induced on temperature. Moreover Core gene was cloned into pPICZαA vector, and then the recombinant plasmid was transfected into *Pichia pastoris* GS115. As a result, Core protein was highly expressed in *E. coli* with yields of 20% of total proteins. Core protein was secretively expressed in yeast with weak yields, and it was proved to be specific antigenicity detected by Western-blot.

Key words: Hepatitis C virus, Core protein, Expression, *E. coli*, *Pichia pastoris*

丙型肝炎病毒(Hepatitis C virus, 简称HCV)是导致散发性非甲非乙型肝炎的主要病原, HCV感染主要由输血引起, 易转为慢性肝炎, 与肝癌(HCC)及肝硬化关系密切, 对人类危害巨大^[1]。目前对HCV感染的治疗除了重组α干扰素(INF-α)有一定疗效外, 仍然没有确切的治疗方法及预防的疫苗^[2], 对HCV感染的确诊基本依赖于实验室诊断, 以血清抗-HCV抗体及HCV RNA检测为主。由于抗-HCV抗体阴性的血源中存在感染“窗口期”的血样, 且PCR检测HCV RNA不适于大规模筛查, 有可能导致漏检, 因此筛选献血员及早期临床诊断对有效控制丙型肝炎的发生具有重要意义。

HCV为单股正链RNA病毒, 编码一个约3,011个氨基酸的多聚蛋白前体, 可裂解

* 国家高技术研究发展计划项目 (“863项目”) (No. 2005AA205220)

** 通讯作者 Tel: 029-88303800, E-mail: chaochen@lifegen.com

收稿日期: 2005-12-28, 修回日期: 2006-02-10

为各种结构及非结构蛋白^[3], 其中 Core 蛋白最为保守、免疫原性最强且抗体出现较早, 以 Core 蛋白作为包被抗原对 HCV 感染诊断具有足够的早期性和可靠性。为此我们以重组原核表达载体 pBVIL1-Core 为基础, 在大肠杆菌中诱导表达了 Core 蛋白, 同时构建毕赤酵母表达体系。毕赤酵母具有真核细胞的翻译后修饰功能, 表达外源蛋白可分泌到胞外并糖基化, 使蛋白质更加稳定, 便于产品的分离纯化。

1 材料与方法

1.1 材料

菌株及质粒: 大肠杆菌 HB101 为本室保存; 毕赤酵母 GS115 及质粒 pPICZ α A 购自 invitrogen 公司。重组质粒 pBVIL1-Core (含有 Core 基因 450bp) 及 Core 蛋白单克隆抗体由西北工业大学生命科学学院薛小平教授惠赠。含有 HCV 全基因的质粒 PBRTM/HCV 由第四军医大学杜德伟博士惠赠。

限制性内切酶、Tag 酶、T4 连接酶均购自 TaKaRa 公司; 辣根过氧化物酶标记的山羊抗小鼠 IgG (HRP-IgG) 购自鼎国公司; Anti-myc 单克隆抗体购自 invitrogen 公司。

1.2 方法

1.2.1 Core 基因在大肠杆菌中的表达、SDS-PAGE 及 Western-Blot 分析: 将 pBVIL-Core 表达质粒转化入大肠杆菌 HB101, 挑单菌落 28℃ 培养过夜, 按 1:50 转接含氨苄青霉素的 LB 培养基, 28℃ 培养至 $OD_{600} = 0.6$, 立即转移至 42℃ 摇床培养 5h。收集菌体并裂解进行 SDS-PAGE, 同时转移到 PVDF 膜上。5% 脱脂牛奶封闭 1h, Core 蛋白单克隆抗体为一抗 (1:200 稀释), 4℃ 反应过夜; 山羊抗小鼠 HRP-IgG (1:2,000 稀释) 为二抗, 室温反应 1h。D、D-二氨基联苯胺 (DAB) 为底物显色, 未经诱导表达的重组菌为阴性对照。

1.2.2 Core 基因的 PCR 扩增: 根据已发表的 HCV H 株^[4] 设计特异性引物: 上游引物为: 5' - CG GAATTC ATGAGCACGAATCCTAAACCT -3' (含 EcoRI 位点); 下游引物为: 5' - CG TCTAGA TCGATGACCTTACCCAAATT -3' (含 XbaI 位点)。PCR 反应体系 (50 μ L): 模板 10ng/ μ L, dNTP 200 μ mol/L, 上游、下游引物终浓度 200nmol/L, Taq DNA 聚合酶 2 U。反应参数: 94℃ 预变性 3min; 94℃ 45s, 55℃ 45s, 72℃ 1min, 30 个循环后 72℃ 延伸 10min。

1.2.3 毕赤酵母表达载体的构建: 将 Core 基因经 EcoRI/XbaI 双酶切后插入 pPICZ α A 载体中, 构建重组表达载体 pPICZ α A-Core, 转化大肠杆菌 TOP10F', 在含有抗生素 Zeocin (25 μ g/mL) 的 LB 平板上筛选重组质粒。

1.2.4 重组质粒的鉴定: 以 EcoRI/XbaI 双酶切重组质粒 pPICZ α A-Core, 将酶切验证正确的重组质粒送上海奥科生物技术公司测序。

1.2.5 重组质粒 pPICZ α A-Core 转化毕赤酵母: SacII 内切酶线性化的重组质粒 pPICZ α A-Core 及空质粒 pPICZ α A 各 10 μ g 分别与感受态 GS115 细胞 (山梨醇法制备) 80 μ L 混匀, 加入电转杯中, 冰浴 5min。在 2,000V、25 μ F、200 Ω 条件下电击, 立即加入 1mL 的预冷的 1mol/L 的山梨醇溶液混匀, 30℃ 放置 1h, 取 200 μ L 转化物涂布于含抗生素 Zeocin (1,000 μ g/mL) 的 YPDS 选择平板上, 30℃ 培养 2~4d, 观察转化单菌落的长出。

1.2.6 Core 基因在毕赤酵母中的表达: 挑取酵母转化单菌落, 接种于 20mL BMGY 培养基中, 摇床培养过夜。室温 6,000r/min 离心 5 min, 用 50mL BMMY 培养基重悬菌体, 使 $OD_{600} = 1.0$, 重新放入摇床进入诱导阶段。每 24h 补加甲醇至终浓度为 1.0%,

连续诱导 72h (培养条件均为 30℃、250r/min)。

1.2.7 表达产物的 Western-Blot 分析: 取 1 mL 诱导酵母菌液 6,000r/min 离心 5 min, 上清用 20% 三氯乙酸浓缩, 并用 80% 丙酮洗涤。浓缩产物进行 SDS-PAGE, 并转移至 PVDF 膜。5% 脱脂牛奶封闭 1h, Anti-myc 抗体为一抗 (1: 8,000 稀释), 4℃ 反应过夜; 山羊抗小鼠 HRP-IgG 为二抗 (1: 15,000 稀释), 室温反应 1h, 用 ECL 化学发光法进行曝光显影。

2 结果

2.1 Core 基因 PCR 产物的电泳分析

PCR 产物经 1.2% 琼脂糖电泳显示, 在约 369bp 处有一特异扩增条带 (图 1), 分子量大小与预计值一致, 测序表明与已发表的 HCV H 株完全一致。

2.2 pPICZαA-Core 的酶切鉴定

重组质粒 pPICZαA-Core 经 *EcoRI/XbaI* 双酶切 (图 2), 产物大小与预期一致。说明 Core 基因正确克隆入载体 pPICZαA。

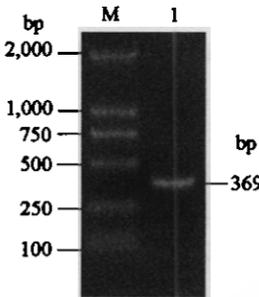


图 1 PCR 电泳图谱
1 PCR 产物, M DL2,000

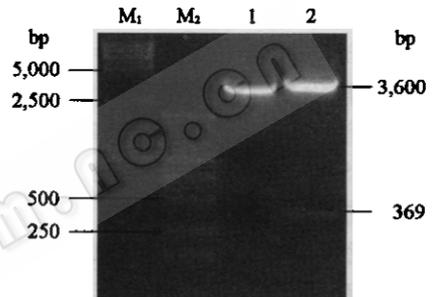
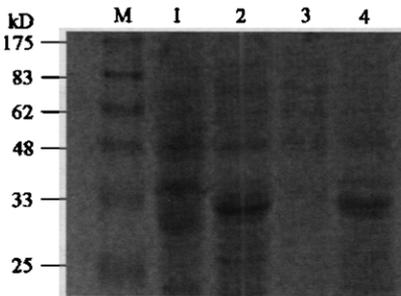


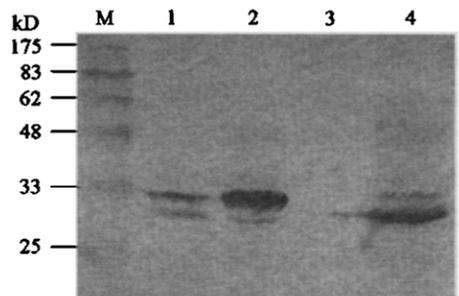
图 2 酶切鉴定图谱
1 pPICZαA 双酶切, 2 pPICZαA-Core 双酶切
M₁ DL15,000, M₂ DL2,000

2.3 pBVIL1-Core 表达产物的 SDS-PAGE 及 Western-blot 分析

pBVIL1-Core 转化子的表达产物经 SDS-PAGE 出现一条约 31kD 的带, 与预期 Core 蛋白的分子量相符, 表达量占菌体总蛋白的 20%, 且表达蛋白存在于包涵体中 (图 3A)。Western-blot 显示诱导后菌体在相应位置出现特异性杂交带 (图 3B)。



A



B

图 3 pBVIL1-Core 表达产物 SDS-PAGE 及 Western-blot 图谱

A SDS-PAGE 和溶解形式分析, 3 Western-blot 分析

M 标准蛋白, 1 温度诱导前, 2 温度诱导 5h, 3 裂解液上清, 4 裂解液包涵体

2.4 pPICZ α A-Core 表达产物的 Western-Blot 分析

Western - Blot 分析表明, 诱导 72h 培养上清中, pPICZ α A - Core 转化酵母出现特异性杂交带, 大小约为 29kD, 比预期值 25kD 大一些, 而空质粒对照则未出现特异性杂交带 (图 4)。

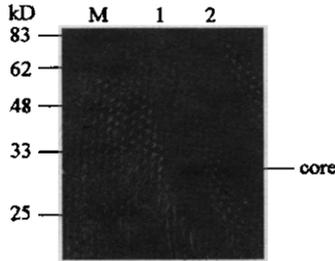


图 4 pPICZ α A-Core 表达产物 Western-blot 图谱
M 标准蛋白, 1 空质粒对照, 2 pPICZ α A-Core 诱导 72h

3 讨论

蛋白质翻译后的活性依赖于形成正确的二硫键并折叠成高级结构, 大肠杆菌不具有真核生物基因表达调控机制和蛋白质加工修饰能力, 表达的 Core 蛋白形成无活性的包涵体, 需要经过变性、复性等处理才能应用。与大肠杆菌相比, 毕赤酵母是单细胞真核生物, 既具有原核生物生长快、遗传操作简单的特点, 又有比较完备的翻译后加工修饰功能, 能有效克服大肠杆菌的不足。表达载体 pPICZ α A-Core 在毕赤酵母中诱导表达后, 经 Western-blot 分析, 在诱导培养上清中用 Anti-myc 单克隆抗体检测到 Core 蛋白, 说明 Core 蛋白在毕赤酵母中表达成功并分泌到胞外, 但大小比预期值 25kD 大出约 4kD, 分析可能原因主要有:

(1) 本研究使用的表达载体 pPICZ α A 有信号肽 α 因子序列, 能引导融合蛋白分泌表达并糖基化, 使表达产物的分子量增大、空间结构趋于复杂, 从而降低了电泳迁移率; (2) Core 蛋白没有糖基化位点, 但是 α 因子中含有 3 个 N-糖基化位点和一个 Kex2 蛋白酶加工位点 (该酶可将 α 因子切除), 当此酶对融合蛋白加工不完全时, 可导致其分子量增大^[5,6]。但是 α 因子能否被完全正确切割, 还必须通过氨基酸末端测序才能确定, 对分泌型 Core 蛋白的糖基化形式还有待探讨。

从表达量上看, Core 基因在大肠杆菌中得到了高效表达, 而在毕赤酵母中仅通过 Western-blot 在培养上清中检测到微弱的表达, 这可能与 Core 蛋白具有细胞毒性有关。总之, 本研究成功地在在大肠杆菌表达系统中表达了 Core 蛋白, 并在毕赤酵母表达系统中做了 Core 蛋白可溶性表达的对比, 我们将在此基础上对两个系统表达的 Core 蛋白进行抗原性对比分析, 这将为进一步发展 HCV 诊断试剂奠定基础, 也为研究 Core 蛋白的功能提供了可能。

参 考 文 献

- [1] 李凌奋译. 全球丙型肝炎流行概况. 海峡预防医学杂志, 1998, 4 (1): 67.
- [2] 熊新宇. 国外医学病毒学分册, 2004, 11 (3): 90~95.
- [3] 王迪, 张雪, 杨复华, 等. 中国病毒学, 2004, 19 (5): 526~530.
- [4] Grakoui A, Wychowski C, Lin C, et al. J Virol, 1993, 67 (3): 1385~1395.
- [5] 顾园, 诸欣平, 王少华. 生命的化学, 2004, 24 (4): 353~355.
- [6] Cereghino J L, Cregg J M. FEMS Microbiology Reviews, 2000, 24: 45~66.