

· 论 著 ·

# HCV 核心和截短的包膜蛋白 E2 基因在昆虫细胞中的表达及其抗原性

朱诗应, 赵平, 任浩, 赵兰娟, 戚中田\*  
(第二军医大学基础医学部微生物学教研室, 上海 200433)

**[摘要]** 目的: 构建含 HCV 全长核心基因和截短的包膜蛋白 E2 基因的重组杆状病毒表达载体, 研究其表达和抗原性。方法: 以含 HCV 全长 cDNA 克隆的 pGEM-HCJ4 质粒为模板, PCR 扩增全长的 HCV 核心抗原基因和截短的 E2 基因片段, 插入转座载体 pFastBacHTa 构建重组转座质粒 pFB-CE2t, 转化 DH10Bac 大肠杆菌, 获得重组杆状病毒穿梭质粒 Bacmid-CE2t, 以之转染昆虫 Sf9 细胞进行外源基因的表达, 并对其抗原性进行 ELISA 检测。结果: SDS-PAGE 和 Western blot 分析表明 Bacmid-CE2t 在 Sf9 细胞表达了 HCV C-E2 蛋白, 并能利用细胞内蛋白酶将其裂解为单独的 C 蛋白和截短的 E2 蛋白。纯化后的蛋白能分别与 HCV C 蛋白、E2 蛋白单抗以及慢性丙型肝炎患者血清反应。结论: HCV 核心蛋白和截短的 E2 蛋白在昆虫细胞中成功表达并具有抗原性。

**[关键词]** 肝炎病毒, 丙型; 核心蛋白; 截短的 E2 蛋白; 昆虫 Sf9 细胞

**[中图分类号]** R 373.21 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 0258-879X(2004)09-0962-04

## Expression of hepatitis C virus core gene and truncated envelope 2 gene in insect cells and its antigenicity

ZHU Shi-Ying, ZHAO Ping, REN Hao, ZHAO Lan-Juan, QI Zhong-Tian\* (Department of Microbiology, College of Basic Medical Sciences, Second Military Medical University, Shanghai 200433, China)

**[ABSTRACT]** **Objective:** To construct recombinant baculovirus expression vector containing hepatitis C virus (HCV) core gene and envelope 2 (E2) gene, and to study its expression and antigenicity in insect cells. **Methods:** pGEM-HCJ4 plasmid containing full-length cDNA clone of HCV was used as the template to amplify HCV core gene and truncated E2 gene by PCR. The fragments were cloned into the transposed vector pFastBacHTa to construct a recombinant plasmid pFB-CE2t. pFB-CE2t was further transformed into DH10Bac *E. coli*, the recombinant Bacmid-CE2t was screened and transfected in the Sf9 cells for the expression of the heterologous gene. Antigenicity of recombinant proteins was detected by ELISA. **Results:** SDS-PAGE and Western blot analysis demonstrated that recombinant proteins were expressed and cleaved into the core protein and E2 protein in Sf9 cells. Purified protein reacted strongly with monoclonal antibody (mAb) against HCV core protein, mAb against HCV E2 protein and the serum of patients with chronic HCV respectively. **Conclusion:** HCV core protein and truncated E2 protein can be expressed in insect cells and have strong antigenicity.

**[KEY WORDS]** hepatitis C virus; core protein; truncated envelope 2 protein; insect Sf9 cells

[Acad J Sec Mil Med Univ, 2004, 25(9): 962-965]

\* 丙型肝炎病毒(HCV)能引起人类急、慢性肝炎、肝硬化及肝细胞癌,目前尚无有效的治疗方法和疫苗<sup>[1,2]</sup>。由于HCV组织培养相当困难,敏感动物黑猩猩来源稀少且价格昂贵,所以目前用于研究的HCV抗原主要来源于细菌、酵母及人类肿瘤细胞系的表达或多肽人工合成。国内外学者研究了HCV各基因的结构与功能,核心蛋白(C)和包膜蛋白E2与机体保护性免疫关系最为密切,是研制HCV疫苗的优先考虑的靶抗原<sup>[3]</sup>。

本研究构建了HCV全长C基因和截短的E2基因融合表达载体,利用杆状病毒表达系统在昆虫Sf9细胞中同时表达核心蛋白和截短的E2蛋白,检测其抗原性,为HCV疫苗的基础研究提供抗原材料。

### 1 材料和方法

1.1 Bac-TO-Bac 杆状病毒表达系统和其他材料  
转座载体 pFastBacHTa、大肠杆菌 DH10Bac、昆虫细胞转染试剂 Cellfectin、Sf-900 II SFM 培养基均为 Invitrogen 公司产品。Sf9 昆虫细胞用 Sf-900 II SFM 无血清培养基在 28℃ 培养并传代保存。慢性 HCV 感染者血清由解放军第 81 医院传染科提供。HCV E2 单抗 3E5-1 为美国 Chiron 公司 Michael Houghton 博士惠赠, HCV C 单抗由本教研室制备。蛋白质相对分子质量标准为 MBI 公司产品。长模板

\* [基金项目] 国家自然科学基金(30080020)。

[作者简介] 朱诗应(1966-),男(汉族),博士生,讲师

\* Corresponding author. E-mail: qizt@smmu.edu.cn



PCR 扩增系统为 Roche 公司产品。

1.2 HCV C 基因和截短的 E2 基因的 PCR 扩增  
HCV 1b 亚型 HcJ4 株全长 cDNA 克隆 pGEM-HcJ4 质粒由日本东京大学 Koike 博士惠赠。根据其序列合成 2 对引物,扩增完整的 HCV C 基因的上下游引物序列分别为 P1: 5'-GCG GGA TCC ATG AGC ACG AAT CC-3', P2: 5'-GCG TCT AGA AGC GGA AGC TGG GAT GG-3', P1、P2 引物中分别引入 *Bam*H I 和 *Xba*I 酶切位点。扩增截短的 E2 基因的上下游引物序列分别为 P3: 5'-GCG TCT AGA AGA ACC CAC ACG ACG-3', P4: 5'-GCG AAT TCA TTA TTC TAA CCT ATC CCT GTC C-3', P3、P4 引物中分别引入 *Xba*I 和 *Eco*R I 酶切位点。以 pGEM-HcJ4 质粒为模板,分别用 PCR 扩增出 C 基因和 E2 基因片段,再分别与 pMD18-T 载体 (TaKaRa 公司产品) 连接,得到重组质粒 pMD-C 和 pMD-E2t。DNA 测序由上海生工公司进行。

1.3 重组转座质粒的构建 用 *Bam*H I 和 *Eco*R I 双酶切载体 pFastBacHTa 使之线性化,用 *Bam*H I 和 *Xba*I 酶切 pMD-C,用 *Xba*I 和 *Eco*R I 酶切 pMD-E2t,分别回收酶切的 C 基因和 E2t 基因片段,与线性化的 pFastBacHTa 连接,转化受体菌 DH5 $\alpha$ ,筛选出同时具有氨苄青霉素、庆大霉素抗性的重组子,进行酶切鉴定,得到含有 C-E2t 融合基因的重组转座质粒 pFB-CE2t。

1.4 转座得到重组杆状病毒穿梭质粒 将 pFB-CE2t 转化 DH10Bac 大肠杆菌感受态细胞 (其内含有 1 个杆状病毒穿梭载体即 Bacmid, 以及另 1 个助手质粒), 37 $^{\circ}$ C 培养 4 h, 4 000 r/min 离心 5 min 后将沉淀稀释  $10^1$ 、 $10^2$ 、 $10^3$  倍,分别涂布含“三抗”(50  $\mu$ g/ml 卡那霉素, 7  $\mu$ g/ml 庆大霉素, 10  $\mu$ g/ml 四环素, 100  $\mu$ g/ml X-gal, 20  $\mu$ g/ml IPTG) 的 3 只 LB 平板, 37 $^{\circ}$ C 培养 24~48 h 后挑选白色菌落,接种 LB 液体培养基, 37 $^{\circ}$ C 摇床过夜后提取高相对分子质量的重组杆状病毒穿梭质粒 Bacmid-CE2t, 用 0.7% 琼脂糖凝胶电泳和 PCR 进行鉴定。

1.5 转染及外源蛋白的表达 用脂质体 Cellfectin 将 Bacmid-CE2t 转染贴壁的 Sf9 细胞。3 d 后在倒置显微镜下观察到细胞出现病变,分别收集细胞和培养上清,上清中含有重组杆状病毒颗粒 Bac-CE2t。细胞经裂解,煮沸后进行 12% SDS-PAGE。蛋白电泳后转膜进行 Western blot 分析,一抗分别为 1 800 稀释的 HCV C 单抗和 1 1 000 稀释的 HCV E2 单抗,二抗为 1 500 稀释的辣根过氧化物酶标记的羊抗鼠 IgG,显色底物为 DAB。

1.6 表达蛋白的纯化及抗原性测定 以 Bac-CE2t 作为毒种重新感染新鲜的 Sf9 细胞, 3 d 后收集细胞。用 2 种方法纯化蛋白:一是将细胞超声破碎后,用 Ni-NTA 树脂对表达的带有 6 个组氨酸的外源蛋白进行亲和层析;另一种是从 SDS-PAGE 凝胶上切下表达条带,研碎后装入透析袋电泳,再用丙酮沉淀,得到初步纯化的外源蛋白。将 2 种方法纯化的蛋白作为抗原,进行 1 100 稀释后包被聚苯乙烯条孔, 4 过夜后用间接 ELISA 法检测各类血清标本。

## 2 结果

2.1 重组转座质粒 pFB-CE2t 的鉴定 以 pGEM-HcJ4 质粒为模板,按常规 PCR 程序扩增获得全长 HCV C 基因,长度为 573 bp,截短的 E2 基因片段长度为 834 bp,两个基因连接在一起为 1 407 bp。用 *Bam*H I 和 *Eco*R I 双酶切 pFB-CE2t 所释放的片段,以及用引物 P1、P4 扩增得到的产物长度均与之完全相符 (图 1)。DNA 测序也显示截短的 E2 基因片段已正确克隆到 C 基因之后,表明该重组转座质粒内表达盒正确,可用于转座。

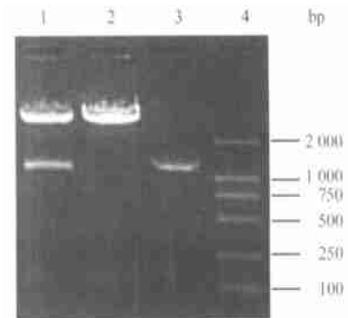


图 1 重组转座质粒 pFB-CE2t 的鉴定

Fig 1 Identification of recombinant transposed plasmid pFB-CE2t

1: pFB-CE2t/*Bam*H I + *Eco*R I; 2: pFB-CE2t;

3: PCR amplification of pFB-CE2t; 4: DL2000 DNA marker

2.2 重组杆状病毒穿梭质粒的鉴定 对所提取的 Bacmid 进行 0.7% 琼脂糖凝胶电泳, 50 V 电泳 1 h 后可以看到刚走出加样孔的高相对分子质量 DNA 条带 (> 130 kb)。使用长模板 PCR 扩增系统,以 pUCM13 正链引物和引物 P4 对其进行长片段扩增,得到的产物为 3.8 kb (结果未显示),与理论值完全吻合,即 Bacmid 上 2.4 kb 的表达元件与 1.4 kb 的 C-E2 基因同时被扩增出来,表明重组转座载体 pFB-CE2t 中的表达盒已正确转座到 Bacmid 之中,构成了重组杆状病毒穿梭质粒 Bacmid-CE2t。

2.3 转染后 Sf9 细胞病变 Bacmid-CE2t 转染 Sf9 细胞 3 d 后,倒置显微镜下可见 Sf9 细胞核膨大,

细胞折光性减低, 胞内颗粒增大直至破碎, 与正常 Sf 9 细胞差别明显(图 2)。

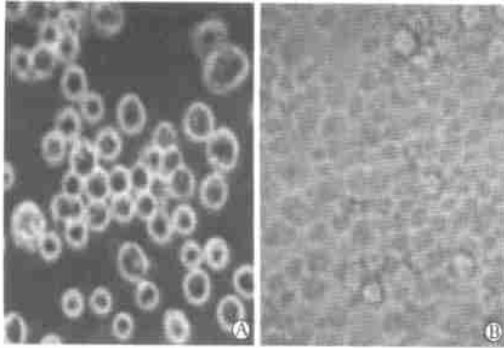


图 2 转染和未转染的 Sf 9 细胞的显微镜观察  
 Fig 2 Morphology of transfected and untransfected Sf 9 cells (×100)  
 A: Transfected cells; B: Uninfected cells

### 2.4 表达蛋白的鉴定与分析 转染的 Sf 9 细胞经

裂解后进行 SDS-PAGE, 用考马斯亮蓝 R-250 染色, 可见 2 条特异的表达蛋白带, 一条为相对分子质量约 21 000 的 HCV C 蛋白, 另一条相对分子质量约为 33 000 左右, 大小与 HCV 截短的 E2 蛋白分子大小相吻合, 对照的 Sf 9 细胞中未见这 2 条蛋白带(图 3A)。用 NiNTA 树脂进行亲和层析纯化后再进行 SDS-PAGE, 染色后仅出现 1 条相对分子质量约 21 000 的条带, 为 HCV C 蛋白, 表明 C 蛋白被 NiNTA 树脂捕获而得以纯化(图 3B)。Western blot 结果显示, 用 Bac-CE2t 感染的细胞经 SDS-PAGE、转膜后能先后与 HCV C 单抗和 E2 单抗发生反应而出现特异的 2 条带, 应分别为 C 蛋白和 E2 蛋白的检出信号, 而纯化蛋白泳道上只出现 1 条反应带, 为 C 蛋白与 C 单抗反应的结果, 表达带的大小均完全一致(图 3C)。上述结果证明 C-E2 融合蛋白在 Sf 9 细胞内得到了表达, 并在细胞内进行了正确的切割。

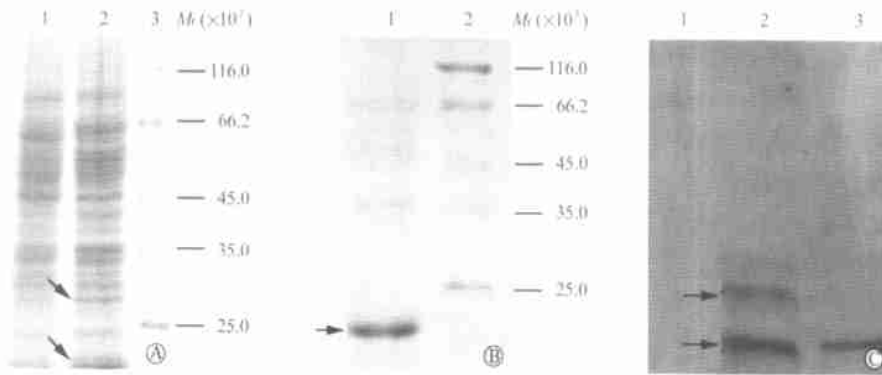


图 3 表达蛋白的 SDS-PAGE 电泳(A、B)和 Western 印迹(C)分析

Fig 3 SDS-PAGE(A, B) and Western blot(C) analysis of expressed protein

A: 1: Uninfected Sf 9 cells; 2: Sf 9 cells infected with Bac-CE2t; 3: Relative molecular mass marker;  
 B: 1: Purified protein; 2: Relative molecular mass marker; C: 1: Uninfected Sf 9 cells; 2: Sf 9 cells infected with Bac-CE2t;  
 3: Purified protein. A row s indicate the position of expressed protein band

2.5 表达的 HCV 蛋白抗原性 间接 ELISA 结果显示, 以纯化的 C 蛋白作为抗原, 在 8 份已知慢性 HCV 患者血清中检出阳性 6 份, 阳性率 75%; 以 C-E2 融合蛋白作为抗原检测相同 8 份血清, 全部出现阳性反应, 阳性率达 100%。而作为对照的 4 份 HBsAg 阳性血清、4 份正常人血清与这 2 种蛋白进行的 ELISA 结果均呈阴性反应。

### 3 讨论

HCV 是一种单正链 RNA 病毒, 基因组全长约 9.4 kb, 仅有一个开放读码框架(ORF), 编码一含 3 010~ 3 033 个氨基酸的多聚蛋白前体, 该前体蛋白在宿主信号肽酶及病毒蛋白酶作用下, 裂解为病

毒的结构蛋白与非结构蛋白。结构蛋白包括核心蛋白(C)、包膜蛋白 E1 和 E2 等 3 种成分。C 蛋白是 HCV 诸多抗原中最为保守的一种蛋白, 虽其诱导产生的特异性抗体无保护功能<sup>[4]</sup>, 但它含有多个特异的 CTL 表位以及辅助性 T 细胞抗原表位<sup>[5]</sup>, 其诱导的 CD4<sup>+</sup> 和 CD8<sup>+</sup> T 细胞免疫应答具有明确的保护作用; E2 中含有多个刺激宿主产生中和抗体的表位<sup>[6]</sup>, 说明 C 和 E2 蛋白在急性 HCV 感染后的病毒清除过程中均发挥了重要作用, 所以成为研究 HCV 疫苗的靶抗原。但原核表达的 HCV 重组蛋白或合成肽抗原属线性表位, 不是依赖于多肽折叠或翻译后加工才能形成的构像依赖性表位, 免疫原性较差。所以本研究选择 C 和 E2 基因作为表达对象, 构建

融合基因表达载体,利用杆状病毒表达系统能对蛋白进行表达后的修饰和加工以保持生物活性的优势,选择在昆虫细胞内表达<sup>[7]</sup>。我们考虑到完整的 E2 蛋白(384~746 aa)为一种跨膜蛋白,其 C 末端为疏水锚着区,不利于表达,所以我们表达截短的 E2 蛋白(384~661 aa),它是一段亲水的区域,并且 E2 蛋白的绝大多数中和表位也在此区域内,能很好地保留其免疫原性<sup>[8]</sup>。表达产物的 SDS-PAGE 结果表明 E2 蛋白在 Sf 9 细胞内发生了糖基化。

实验中用 2 种单抗对表达产物进行 Western blot 印迹分析时发现,先用 C 单抗与转印膜结合,洗涤后再用 E2 单抗与之结合,结果出现 2 条显色带,大小与 SDS-PAGE 结果一致。而表达产物用 NiNTA 树脂进行亲和层析纯化后再进行 SDS-PAGE 以及 Western blot,都只出现 1 条相对分子质量约为 21 000 的 C 蛋白带,表明 C-E2 融合蛋白在细胞内进行了裂解,分成了单独的 C 蛋白和 E2 蛋白,由于表达载体上的 6 个组氨酸是位于 C 蛋白的上游,所以只有 C 蛋白被 NiNTA 树脂捕获而纯化出来,这与 2 种单抗对表达产物进行的 Western blot 印迹结果完全吻合,综合结果表明 HCV C-E2 融合蛋白在昆虫细胞内表达成功。ELISA 结果显示纯化的单一 C 抗原与 HCV 阳性血清反应性为 75%,可能由于部分患者血清中 C 抗体水平本身太低,不足以检测出来,或者由于阳性血清标本过少而导致统计结果偏低。但表达的 C-E2 蛋白能 100% 地与 HCV 阳性血清反应,证实核心蛋白和截短的 E2 融合蛋白具有良好的抗原反应性,用该蛋白免疫小鼠考察其免疫原性的试验正在进行中,我们将另文

报告。本研究获得了较好的 HCV C-E2 蛋白,且我们选用的表达载体上带有 6 个组氨酸配体,易于亲和层析进行蛋白纯化,为深入研究 HCV 结构蛋白的抗原表位、致病机制、疫苗开发奠定了基础。

### [参考文献]

- [1] Leysen P, De Clercq E, Neyts J. Perspectives for the treatment of infections with *Flaviviridae* [J]. *Clin Microbiol Rev*, 2000, 13(1): 67-82
- [2] Charlene C. Infectious diseases: Hard-won advances spark excitement about hepatitis C [J]. *Science*, 2001, 294(5542): 506-507.
- [3] Ezelle HJ, Markovic D, Barber GN. Generation of hepatitis C virus-like particles by use of a recombinant vesicular stomatitis virus vector [J]. *J Virol*, 2002, 76(23): 12325-12334
- [4] Liu ZX, Nishida H, He JW, et al. Hepatitis C virus genotype 1b core protein does not exert immunomodulatory effects on virus-induced cellular immunity [J]. *J Virol*, 2002, 76(3): 990-997.
- [5] Ward S, Lauer G, Isba R, et al. Cellular immune responses against hepatitis C virus: the evidence base 2002 [J]. *Clin Exp Immunol*, 2002, 128(2): 195-203
- [6] Pileri P, Uematsu Y, Campagnoli S, et al. Binding of hepatitis C virus to CD81 [J]. *Science*, 1998, 282(5390): 938-940
- [7] Baumert TF, Ito S, Wong DT, et al. Hepatitis C virus structural proteins assemble into virus-like particles in insect cells [J]. *J Virol*, 1998, 72(5): 3827-3836
- [8] Heile JM, Fong YL, Rosa D, et al. Evaluation of hepatitis C virus glycoprotein E2 for vaccine design: an endoplasmic reticulum-retained recombinant protein is superior to secreted recombinant protein and DNA-based vaccine candidates [J]. *J Virol*, 2000, 74(15): 6885-6892

[收稿日期] 2004-01-05

[修回日期] 2004-05-09

[本文编辑] 尹 茶

(上接第 955 页)

瘤全身浸润,故给予 ESHAP 方案全身化疗,即:环磷酰胺 (CTX) 0.8 g (d1, iv), 吡柔比星 (THP) 40 mg (d1, iv), 长春地辛 (VDS) 4 mg (d1, iv), 泼尼松 20 mg (口服, 3 次/d, d1~d5)。目前化疗已行 9 次,体检示双眼睑未触及明显肿块,全身浅表淋巴结均未触及;眼部 B 超检查示左眼球上方可见瘢痕组织低回声区,双眼睑未见明显占位性病变。

2 讨论 恶性淋巴瘤是淋巴细胞增生性病病理类型之一,原发于淋巴结或淋巴组织,以单一的幼稚细胞或明显的异型淋巴细胞为特点,并见病理核分裂相。眼眶恶性淋巴瘤分原发性和继发性两类。继发性眼眶恶性淋巴瘤是全身恶性淋巴瘤在眼眶的局部表现。全身淋巴瘤患者中眼眶受累的发病率不高,据报告 1 269 例全身淋巴瘤尸检病例中,仅 16 例 (1.3%) 有眼眶受累的证据<sup>[1]</sup>。单纯手术治疗常造成局部在外观和功能上的影响,且易出现复发。因此手术的目的仅是为获得明确的病理诊断,术后一定要辅化疗或(和)放疗<sup>[2]</sup>,才能提高疗效,降低复发。放射治疗是眼眶恶性淋巴瘤

传统的局部治疗方法,而对全身广泛病变局部侵及眼眶者则需要进行全身化疗或(和)联合局部放疗。因此,对临床怀疑为眼眶恶性淋巴瘤或者已经确诊为眼眶恶性淋巴瘤的患者,全身系统检查和必要的影像学检查是必须的。如经检查揭示有全身淋巴瘤的证据,应行正规、足量的全身化疗,并定期检查、评价眼眶病变。本例虽然以双眼异物感、肿胀为首发症状,但入院后体格检查发现全身多处淋巴结肿大,经活检明确诊断后考虑为全身恶性淋巴瘤双眼睑浸润,因此行全身化疗。经过 ESHAP 方案 9 个疗程的治疗,病情明显缓解。

### [参考文献]

- [1] Rosenber SA, Diamond HD, Jalowitz B, et al. Lymphosarcoma: a review of 1 269 cases [J]. *Medicine*, 1961, 40(1): 31-84
- [2] 王绿化,顾大中,黄一蓉,等.眼眶原发性恶性淋巴瘤的放射治疗 [J]. *中华放射学杂志*, 1999, 8(1): 149-151.

[收稿日期] 2004-03-05

[修回日期] 2004-07-28

[本文编辑] 邓晓群