

一种新的丙型肝炎病毒单链丝氨酸蛋白酶基因的构建、表达与鉴定

杜桂鑫, 侯利华, 陈万荣, 刘树玲, 张永国, 孙大铭, 王海涛*

(军事医学科学院微生物流行病学研究所, 北京 100071)

摘要 根据丙型肝炎病毒(HCV)丝氨酸蛋白酶晶体结构特点,设计并构建了一种新的单链型丝氨酸蛋白酶分子.该分子由辅因子 NS4A 的核心序列、柔性连接子 GSGS 和 NS3 丝氨酸蛋白酶结构域组成.利用设计的 3 条引物,通过 2 轮 PCR 获得单链丝氨酸蛋白酶基因,插入原核表达载体 pQE30 中,转化大肠杆菌 M15,获得重组克隆.经低剂量诱导和低温培养,目的基因获得高水平可溶表达.以金属螯合层析法纯化的重组蛋白纯度达 95% 以上.间接 ELISA 法检测 98 份血清证实,该蛋白具有良好的抗原性和特异性;以重组蛋白底物 NS5ab 和单链丝氨酸蛋白酶建立了简便、实用的丝氨酸蛋白酶体外活性检测系统;以该系统观察了 PMSF 和 EDTA 对蛋白酶活性的影响.结果表明,PMSF 能够抑制蛋白酶的酶切活性,而 EDTA 不能抑制酶的活性.单链型 HCV 丝氨酸蛋白酶的成功表达以及体外活性检测系统的建立,为丝氨酸蛋白酶抑制剂的研制奠定了物质基础.

关键词 丙型肝炎病毒,丝氨酸蛋白酶,基因表达

中图分类号 R373.3+3

Construction, Expression and Identification of Gene of a Novel Single-chain Serine Protease of Hepatitis C Virus in *E. coli*

DU Gui-xin, HOU Li-hua, CHEN Wan-rong, LIU Shu-ling,

ZHANG Yong-guo, SUN Da-ming, WANG Hai-tao*

(Beijing Institute of Microbiology & Epidemiology, Beijing 100071, China)

Abstract Based on the crystallographic structure of hepatitis C virus(HCV) serine protease, a novel single-chain serine protease was designed in which the central sequence of cofactor NS4A was linked to the N-terminus of NS3 serine protease domain via a flexible linker GSGS. The fusion gene was obtained by two-step PCR carried out with three primers and then cloned into the prokaryotic expression vector pQE30. The recombinant clone was verified by DNA sequencing. The single-chain recombinant protease was over-expressed as soluble protein when the *E. coli* was induced at low dosage of IPTG and cultured at low temperature. The protein was purified to homology using Ni-NTA agarose metal affinity resin. The purity was estimated to be over 95%. The purified protein was used as antigen to detect the specific antibodies in blood donors. It was found that over seventy-four percent of blood donors had specific antibodies. A cleavage system was established with recombinant substrate NS5ab and purified protease *in vitro*. When it was used as model to evaluate some compounds, PMSF was found to inhibit the activity of serine protease, while the EDTA was not. Thus, the purified single-chain serine protease and the *in vitro* cleavage system make it possible to develop enzyme inhibitors.

Key words hepatitis C virus, serine protease, gene expression

收稿日期:2001-07-03,接受日期:2001-08-31

国家自然科学基金重点项目资助(No. 39630020)

*联系人 Tel:010-66948580, Fax:010-66948563, E-mail:wanght@nic.bmi.ac.cn

杜桂鑫,男,1972年2月生,博士,助理研究员

Received:July 3, 2001; Accepted:August 31, 2001

Supported by the National Natural Science Foundation of China, No. 39630020

* Corresponding author Tel: 010-66948580, Fax:010-66948563, E-mail:wanght@nic.bmi.ac.cn

丙型肝炎病毒(HCV)为一单股正链RNA病毒,属黄病毒科成员,是导致输血后肝炎的主要病原体.其基因组全长9.6 kb左右,编码一个约3000氨基酸的多聚蛋白;该多聚蛋白在宿主信号肽酶和病毒编码的蛋白酶切割下形成10个成熟的病毒蛋白,其中羧基端5个非结构蛋白(NS3、NS4A、NS4B、NS5A和NS5B)的切割成熟由病毒的NS3/4A丝氨酸蛋白酶介导完成.由于HCV的复制和多聚蛋白加工相偶联,如果干扰多聚蛋白的加工过程将破坏病毒的复制过程,从而实现抗病毒作用.基于这种想法,人们已将NS3/4A丝氨酸蛋白酶作为HCV抗病毒药物研究的首选靶标,对它进行了深入研究^[1].

研制和开发HCV丝氨酸蛋白酶的抑制剂,首要前提是制备大量具有良好活性的蛋白酶纯品.已经证实,NS3/4A丝氨酸蛋白酶是由NS3和辅因子NS4A形成的异源二聚体,在结构上属于糜蛋白酶超家族成员^[2],酶的活性依赖于两部分同时存在.尽管有研究表明,单独表达的丝氨酸蛋白酶结构域具有一定的活性,但是这种活性是不完全的,只能低效率切割NS5A/B位点,而对NS4A/B和NS4B/5A没有活性^[3].为了获得具有良好活性的丝氨酸蛋白酶,在本研究中,我们根据已发表的晶体结构数据,构建了一种新的单链型丝氨酸蛋白酶并使之在大肠杆菌中获得了高水平可溶性表达,随后对其抗原性和酶学活性进行了鉴定.

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 质粒和菌株 带有6个组氨酸表达标签的原核表达载体pQE30购自德国QIAGEN公司;含有HCV NS3₁₋₁₈₁的原核表达质粒pGEX-3X-NS3N^[4],由本室构建;大肠杆菌M15[pREP]由本室保存.

1.1.2 试剂 金属螯合亲和层析柱(Ni-NTA agarose)购自德国QIAGEN公司;重组蛋白底物NS5ab为本室制备并保存;限制性内切酶BamH和Hind、T4 DNA连接酶、Taq酶均为大连宝生物公司产品;HRP-羊抗人多抗购自Pierce公司;显色试剂TMB购自北京耀华生物技术有限公司;PCR Pure核酸回收试剂盒为Clontech公司产品;第三代HCV抗体检测试剂盒购自华美生物工程公司;其它试剂均为国产分析纯.

1.2 方法

1.2.1 单链丝氨酸蛋白酶基因的获得 表达质粒

pGEX-3X-NS3N含有HCV NS3 N端181个氨基酸的编码基因,为了引入NS4A核心序列,设计3条引物用于融合基因的扩增. P1:5'-C GGATCC GGT TCT GTT ATT GTT GGT AGA ATT ATT TTA TCT GGT-3'; P2:5'-ATT ATT TTA TCT GGT AGT GGT AGT ATC ACG GCC TAC TCC CAA-3'; P3:5'-CCC AAGCTT TTA GGA CCG CAT GGT AGT TTC-3'. (GGATCC, BamH切点; AAGCTT, Hind切点;阴影部分为重叠序列)其中P2和P3扩增NS3丝氨酸蛋白酶第3~181位氨基酸的编码基因,其扩增产物作为模板用P1和P3扩增即可获得NS4A核心序列与NS3丝氨酸蛋白酶序列相融合的基因.

1.2.2 重组表达质粒的构建与鉴定 按常规方法将单链型丝氨酸蛋白酶基因克隆至原核表达载体pQE30,获得重组克隆pQENS3N4A.

1.2.3 重组单链丝氨酸蛋白酶的表达和纯化 阳性克隆在含抗生素的LB培养基(氨苄青霉素100 mg/L,卡那霉素40 mg/L)中,37℃培养至A₆₀₀ = 0.8时,加入IPTG至终浓度0.2 mmol/L,20℃诱导6 h后收集菌体.加入裂解缓冲液(50 mmol/L Tris-HCl pH 7.4, 100 ml/L甘油, 0.3 mol/L NaCl, 2 mmol/L β-巯基乙醇, 5 ml/L NP-40),重悬菌体并加入溶菌酶至终浓度为1 g/L;冰浴30 min后,超声裂解细菌(150 W × 1 min × 10次),4℃ 12 000 r/min离心20 min,弃去沉淀;上清用0.22 μm微孔滤膜过滤后与1 ml预先用裂解缓冲液平衡的Ni-NTA Agarose混匀,4℃反应1 h,使目的蛋白充分结合到柱基质上,装柱;然后以10个柱床的裂解缓冲液、20个柱床缓冲液W(50 mmol/L Tris-HCl pH 7.4, 100 ml/L甘油, 1 mol/L NaCl, 20 mmol/L咪唑, 2 mmol/L β-巯基乙醇, 5 ml/L NP-40)洗去杂蛋白;用5个柱床的缓冲液E(50 mmol/L Tris-HCl pH 7.4, 100 ml/L甘油, 1 mol/L NaCl, 250 mmol/L咪唑, 2 mmol/L β-巯基乙醇, 5 ml/L NP-40)洗脱目的蛋白并分步收集.取各管洗脱液30 μl,加入等量的2×上样缓冲液,加热后进行15% SDS-PAGE,将含有目的蛋白的各管合并;然后对透析缓冲液D(50 mmol/L Tris-HCl pH 7.4, 100 ml/L甘油, 1 mol/L NaCl, 2 mmol/L β-巯基乙醇, 5 ml/L NP-40)进行透析(5 h × 3次).紫外吸收法测定蛋白质含量:

蛋白质浓度(g/L) = 1.45 × A₂₈₀ - 0.74 × A₂₆₀.

1.2.4 ELISA法鉴定重组蛋白的抗原性 以包被液(50 mmol/L NaHCO₃, pH 9.6)稀释纯化后的重组蛋

白酶至终浓度 1 g/L, 包被酶联板, 每孔加入 150 μ l, 4 湿盒过夜; 次日用封闭液 (3% 脱脂奶粉, PBS pH7.6), 37 $^{\circ}$ C 封闭 1 h; PBST (0.5% Tween-20) 洗板, 加入 100 μ l 用稀释液 (2% 脱脂奶粉, PBS, 0.5% Tween-20) 1:100 稀释的人血清, 37 $^{\circ}$ C 湿盒内反应 1 h; PBST 洗板; 加入 100 μ l 适当稀释的 HRP 标记的羊抗人多抗, 37 $^{\circ}$ C 温育 1 h, 洗板, 以 TMB 显色 10 min, 2 mol/L H_2SO_4 终止反应, 测定 A_{450} 值。

1.2.5 丝氨酸蛋白酶体外酶切活性测定 100 μ l 反应体系中含有重组单链丝氨酸蛋白酶 20 μ g, 重组蛋白底物 NS5ab 20 μ g, 25 mmol/L Tris-HCl pH 7.4, 100 ml/L 甘油, 0.5 mol/L NaCl, 10 mmol/L DTT, 5 ml/L NP-40, 室温反应不同时间; 酶反应结束后, 立即加入等体积的 2 \times 电泳上样缓冲液, 90 $^{\circ}$ C 10 min 灭活, 进行 SDS-PAGE。

1.2.6 蛋白酶抑制剂抑制试验 将蛋白酶与适当浓度的苯甲磺酰氟 (PMSF) 或 EDTA 在室温下共同温育 30 min; 随后加入底物 NS5ab, 使最终反应体系含 25 mmol/L Tris-HCl pH 7.4, 10% 甘油, 0.5 mol/L NaCl, 10 mmol/L DTT, 0.5% NP-40, 5 mmol/L PMSF (或 5 mmol/L EDTA), 室温反应 45 min, 酶反应结束后, 立即加入等体积的 2 \times 电泳上样液, 加热灭活, 进行 SDS-PAGE。

2 结果

2.1 PCR 扩增单链丝氨酸蛋白酶基因

以 pGEX-3X-NS3N 为模板, 用 3 条引物经过两次 PCR 扩增, 最终将 NS3N 和 NS4A 核心序列组装成融合分子。两次 PCR 产物条带清晰, 大小与预期相符合, 分别为 564 bp 和 594 bp 左右 (见 Fig. 1)。

2.2 重组表达质粒的构建与鉴定

PCR 产物经纯化、酶切后克隆到表达载体 pQE30 中, 阳性克隆命名为 pQENS3N4A。测序证实, 其序列和阅读框架完全正确, 表明该克隆可以用于后续的表达研究。Fig. 2 为重组表达质粒构建图。

2.3 单链丝氨酸蛋白酶的表达和纯化

阳性克隆经 0.2 mmol/L IPTG, 20 $^{\circ}$ C 诱导 6 h, 收集细菌进行 SDS-PAGE, 在 23 kD 位置出现 1 条强表达带。可溶性分析表明, 重组蛋白同时以可溶性和包涵体形式存在, 其中可溶部分约占细菌可溶蛋白 15.6%, (见 Fig. 3)。目的蛋白 N 端融合了 His₆ 表达标签, 可以采用金属螯合亲和层析法进行纯化。经过细菌培养、裂解、吸附、洗涤、洗脱和透析等步骤, 从 500 ml 培养物中获得 7.5 mg 纯蛋白, 薄层扫描分析

其纯度可达 95% 以上 (图略)。

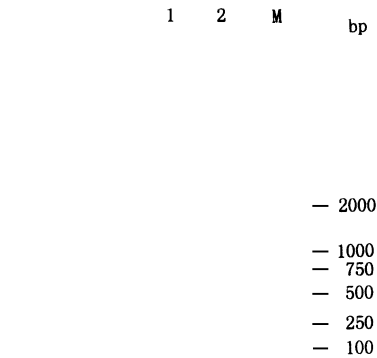


Fig. 1 Identification of the two-step PCR products
M. Marker DL-2000; 1. First round PCR product; 2. Second round PCR product

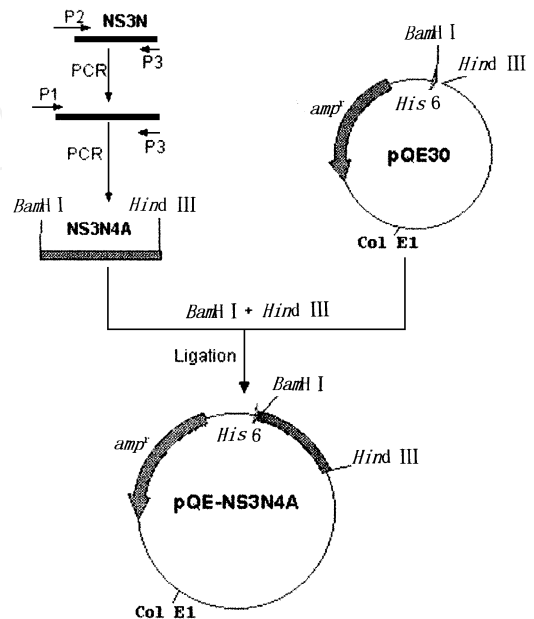


Fig. 2 Scheme for the construction of pQENS3N4A plasmid

2.4 ELISA 法鉴定重组蛋白的抗原性

为了解表达的单链丝氨酸蛋白酶的抗原性, 以纯化的重组蛋白包被酶联板, 检测 86 份来自献血员的血清和 12 份健康人的血清, 同时以市售第三代丙肝抗体检测试剂盒作为参照, 结果 12 份正常人血清全部为阴性, 说明抗原的特异性是很好的。在 73 份试剂盒判定为阳性的血清中, 54 份反应为阳性 (73.9%), 说明表达的蛋白具有良好的抗原反应性。在 13 份试剂盒判定为阴性的血清, 有 1 份也和重组蛋白反应, 见 Table 1。为了排除假阳性, 用 RT-PCR 方法对该份血清进行了 HCV 基因扩增, 结果 PCR 扩增阳性 (图略)。表明此份血清确实为 HCV 感染后血

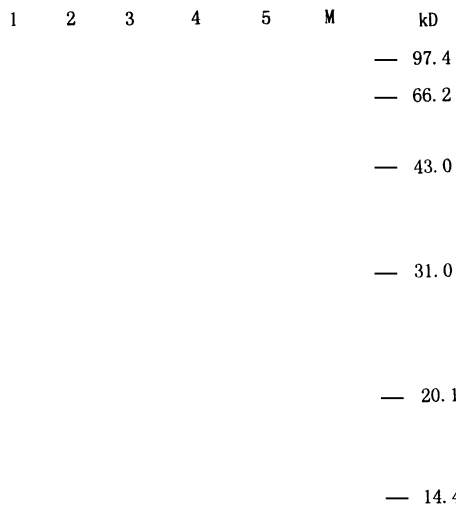


Fig. 3 SDS-PAGE analysis for the expression and purity of single-chain serine protease

1. Noninduced cells; 2. Cells induced with IPTG; 3. Cleared lysate; 4. Flow-through; 5. Purified single-chain serine protease; M. Low molecular weight markers

清. 分析出现这种情况的原因可能是目前所使用的第三代试剂盒不包括丝氨酸蛋白酶抗原, 以至于无法检测出针对该区域抗原的血清标本.

Table 1 Antigenic analysis of the single-chain serine protease

Serine protease	Commercial kit		Total
	Positive	Negative	
Positive	54	1	55
Negative	19	12	31
Total	73	13	86

2.5 纯化蛋白的体外切割活性测定

以单链丝氨酸蛋白酶和重组蛋白底物 NS5ab 为材料建立了体外酶切系统, 用于评价丝氨酸蛋白酶的酶切活性. 该系统所采用的底物涵盖了丙型肝炎病毒 NS5A 羧基端和 NS5B 氨基端序列. 将适量的蛋白底物与前面纯化的单链丝氨酸蛋白酶混合, 室温反应不同的时间后取样, 进行 SDS-PAGE. 从 Fig. 4 可以看出, 蛋白底物 NS5ab 能够被表达的单链丝氨酸蛋白酶裂解成分子量为 24 kD 和 12 kD 的两条带, 而且随着反应时间延长, 底物逐渐减少, 表明单链丝氨酸蛋白酶确实具有较好的酶学活性.

2.6 蛋白酶抑制剂对 HCV 丝氨酸蛋白酶抑制作用

为了观察已知的蛋白酶抑制剂 (PMSF 和 EDTA) 对单链丝氨酸蛋白酶切割活性的影响, 在体外酶切系统中加入 PMSF, 结果发现 PMSF 在 5 mmol/L 的浓

度下能够完全抑制丝氨酸蛋白酶的活性; 而金属螯合剂 EDTA 在 5 mmol/L 的浓度时对蛋白酶活性无明显抑制作用. 这表明, 尽管 HCV 丝氨酸蛋白酶在结构上需要锌离子但是不能通过 EDTA 的螯合作用影响酶活性 (见 Fig. 5).

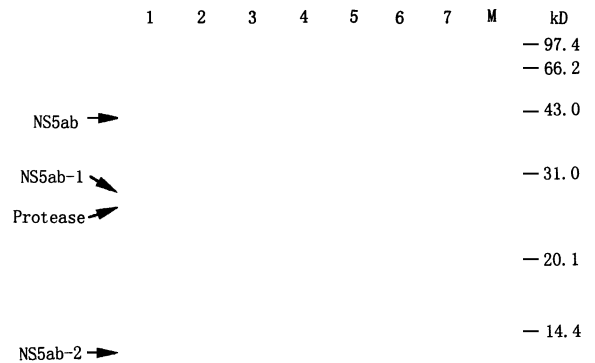


Fig. 4 The *in vitro* cleavage activity of single-chain serine protease 1—5. Cleavage reaction after 10, 20, 30, 45 and 60 min; 6. Protein substrate NS5ab; 7. Single-chain serine protease; M. Low molecular weight markers

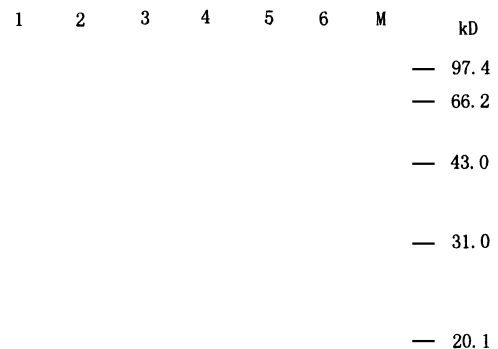


Fig. 5 The inhibitory effect of PMSF and EDTA on single-chain protease activity

1. Single-chain serine protease; 2. Protein substrate NS5ab; 3. Without PMSF; 4. With 5 mmol/L PMSF; 5. Without EDTA; 6. With 5 mmol/L EDTA; M. Low molecular weight markers

3 讨论

通常有两种方法用于制备具有完全活性的 HCV 丝氨酸蛋白酶. 一是在真核细胞中表达全长的 NS3₁₋₆₃₁ 和 NS4A₁₋₅₄ 融合分子, 其优点是所得到的酶活性很高, 不过, 真核系统表达水平较低, 工作量大, 要获得足够数量的蛋白用于检测、功能和结构研究很困难^[5]; 二是先在大肠杆菌中单独表达丝氨酸蛋白

酶结构域,然后在体外与过量的 NS4A 核心肽温育,形成异源二聚体^[6]. 这种方法的优点是周期短,成本低,可以得到大量的材料,然而其不足之处在于,得到的酶分子活性比真核表达的酶低许多倍. 近来的研究表明,体外形成的异源二聚体酶分子活性不高主要是由于 NS4 核心肽对蛋白酶结构域的亲和力比全长的 NS4A 蛋白低几个数量级,导致形成的复合物很不稳定,从而影响了酶的活性^[7]. 鉴于此,我们认为应该将上述两种方法结合起来,即:将 NS4 辅因子与 NS3 融合,在原核系统进行表达. 从而解决大量制备具有良好活性的蛋白酶的问题.

有两种融合方式. 第一种,NS4A 置于 NS3 的羧基端. Inoue 等人的研究表明,尽管这种单链分子在活性和稳定性方面都优于单独的丝氨酸蛋白酶结构域,但其表达产物以包涵体形式存在,需要复性而且产量很低^[8]. 第二种,NS4A 置于 NS3 的氨基端. 此种方式在结构上更趋合理,因为从已发表的 NS3 丝氨酸蛋白酶结构域和 NS4A 合成肽复合物的晶体结构 (Fig. 6A) 上看,NS4A 蛋白的核心心肽恰好插入到丝氨酸蛋白酶氨基端所形成的沟槽内,其羧基端距离蛋白酶的氨基端很近,有可能借助适当的柔性连接子把 NS4A 核心序列的羧基端和 NS3 丝氨酸蛋白酶的氨基端连接起来,使 NS4A 和 NS3N 之间原有的分子间作用变成分子内作用 (Fig. 6B). 本研究中,我们将 NS4A 蛋白的核心肽序列通过 GSGS 柔性连接子连接到 NS3 蛋白酶结构域的 N 端,所形成的重组分子能够在体外切割含有 NS5A/B 连接点的重组蛋白 NS5ab,表明此种融合方式是合理可行的.

单链丝氨酸蛋白酶在大肠杆菌中以可溶形式高水平表达可能与下面两个因素有关:第一,低剂量诱导和低温培养能够降低了蛋白的合成速度,促进蛋白的正确折叠^[9]. 第二,NS3 丝氨酸蛋白酶结构域获得可溶性表达可能与其 N 端融合了 NS4A 核心肽有关. 因为,我们曾经在多个原核表达载体/系统对单独的丝氨酸蛋白酶结构域进行过表达,尽管也采用过诸如低温诱导和降低诱导剂浓度等措施,但都未获得可溶性表达(内部资料,未给出);而同样条件下,融合 NS4 核心肽后获得可溶性表达. 究其原因可能是: NS4A 核心序列能够改变丝氨酸蛋白酶结构域的构象,使 N 端从原本无序结构变化为有序的结构,促进蛋白的折叠过程; NS4A 核心肽序列疏水性较强,一定程度上降低了新生肽链的合成速度,也有利于肽链的正确折叠.

(A)

(B)

Fig. 6 The crystal structure of serine protease domain and NS4A central sequence
(A) Cocrystal structure of the NS3₁₋₁₈₁/NS4A₂₁₋₃₂ complex [adapted from Reference 13]
(B) Cocrystal structure of the NS3₁₋₁₈₁/NS4A₂₁₋₃₂ complex with a flexible linker

1998 年 Chen 等^[10]用 HCV 丝氨酸蛋白酶抗原检测了 40 份 HCV 病人血清,结果仅有 10% 的病人血清含有针对丝氨酸蛋白酶的特异性抗体,这与我们的实验结果 (73.9%) 有较大差异. 我们认为本实验所得出的高阳性率并非由假阳性反应造成,因为:(1) 12 份正常人血清均为阴性;(2) 经市售试剂盒判定为阴性的献血员血清有 12 份也为阴性. 造成差异的最大可能是由抗原所致,因为,Chen 在研究中所使用的丝氨酸蛋白酶是包涵体经过复性后得到,尽管可溶,但不能够保证其具有酶活性和正确的构象^[11],而正确的构象对于抗原检测抗体的效能具有极大的影响;我们所采用的抗原是以可溶形式存在的具有高度蛋白酶活性的抗原,其构象更接近于酶的天然构象. 从本实验的结果不难看出:(1) HCV 感染人群中针对丝氨酸蛋白酶的特异抗体阳性率较高;(2) 表达的丝氨酸蛋白酶具有良好的抗原性和特异性.

与常见的 HCV 丝氨酸蛋白酶体外酶切系统相比,我们建立的系统以 SDS-PAGE 和考马斯亮蓝 R-

250(CCB R250) 染色检测切割效果,具有操作简单、直观和成本低的优点. 无需使用昂贵的仪器和试剂就可以评价抑制剂对蛋白酶活性的影响. 利用该系统,我们检验了最常见的两种蛋白酶抑制剂 PMSF 和 EDTA 对 HCV 丝氨酸蛋白酶活性的影响,结果发现 5 mmol/L 的 PMSF 能够完全抑制蛋白的活性,而金属螯合剂 EDTA 在 5 mmol/l 的浓度下无明显的抑制作用,与文献报道相一致^[12]. 这个结果还表明:我们建立的体外切割系统可以用于评价化学物质和生物分子对蛋白酶活性的抑制作用以及蛋白酶抑制剂的筛选.

参考文献 (References)

- Bartenschlager R. The NS3/4A protease of the hepatitis C virus: unravelling structure and function of an unusual enzyme and a prime target for antiviral therapy. *J Viral Hepat*, 1999, **6**(3): 165 ~ 181
- Kim J L, Morgenstern KA, Lin C, Fox T, Dwyer MD, Landro J a, Chambers S P. Crystal structure of the hepatitis C virus NS3 protease domain complexed with a synthetic NS4A cofactor peptide. *Cell*, 1996, **87**: 343 ~ 355
- Tanji Y, Hijioka M, Satoh S, Kaneko T, Shimotohno K. Hepatitis C virus-encoded nonstructural protein NS4A has versatile functions in viral protein processing. *J virol*, 1995, **69**: 1575 ~ 1581
- 陈庄, 徐静, 宋宏彬, 周育森, 王海涛. HCV NS3 区丝氨酸蛋白酶基因的克隆和序列分析. 中华肝病杂志 (Chen Zhuang, Xu Jing, Song Hong-bin, Zhou Yr-sen, Wang Hai-tao. Cloning and sequence analysis of hepatitis C virus NS3 serine protease. *Chin J Hepatol*), 1998, **6**(2): 114 ~ 115
- Sali D L, Ingram R, Wendel M, Gupta D, McNemar c, Tsarbopoulos A, Chen J W, Hong Z, Chase R, Risano C, Zhang R, Yao N, Kwong A D, Ramanathan L, Le H V, Weber P C. Serine Protease of hepatitis C virus expressed in insect cells as the NS3/4A complex. *Biochemistry*, 1998, **37**(10): 3392 ~ 3401
- Vishnuvardhan D, Kakiuchi N, Urvil PT, Shimotohno K, Kumar P K, Nishikawa S. Expression of highly active recombinant NS3 protease domain of hepatitis C virus in *E. coli*. *FEBS Lett*, 1997, **402**(2-3): 209 ~ 212
- Yan Y, Li Y, Munshi S, Sardana V, Cole J L, Sardana M, Steinkuehler C, Tomei L, De Francesco R. Complex of NS3 protease and NS4A peptide of BK strain hepatitis C virus: a 2.2 Å resolution structure in a hexagonal crystal form. *Protein Sci*, 1998, **7**(4): 837 ~ 847
- Inoue H, Sakashita H, Shimizu Y, Yamaji K, Yokota T, Sudo K, Shigeta S, Shimotohno K. Expression of a hepatitis C virus NS3 protease-NS4A fusion protein in *Escherichia coli*. *Biochem Biophys Res Commun*, 1998, **245**(2): 478 ~ 482
- 常磊, 马康涛, 张迺衡. 淀粉样前体蛋白和 LRP6 在大肠杆菌中的表达及其体外相互作用. 中国生物化学与分子生物学报 (Chang Lei, Ma Kang-tao, Zhang Nai-heng. Expression of amyloid precursor protein and LRP6 in *E. coli* and interaction *in vitro*. *Chin J Biochem Mol Biol*), 2001, **17**(2): 185 ~ 188
- Chen M, Sallberg M, Sonnerborg A, Jin L, Birkett A, Peterson D, Weiland O, Milich D R. Human and murine antibody recognition is focused on the ATPase/helicase, but not the protease domain of the hepatitis C virus nonstructural 3 protein. *Hepatology*, 1998, **28**(1): 219 ~ 224
- Jin L, Peterson D L. Expression, isolation, and characterization of the hepatitis C virus ATPase/RNA helicase. *Arch Biochem Biophys*, 1995, **323**(1): 47 ~ 53
- Steinkuehler C, Tomei L, De Francesco R. *In vitro* activity of hepatitis C virus protease NS3 purified from recombinant Baculovirus-infected Sf9 cells. *J Biol Chem*, 1996, **271**: 6367 ~ 6373
- Francesco R D, Steinkuehler C. Structure and function of the hepatitis C virus NS3-NS4a serine proteinase. In: Hagedorn C H, Rice C M eds. *Current Topics in Microbiology and Immunology: The Hepatitis C Virus*. Berlin, Heidelberg, Springer-Verlag, 2000: 149 ~ 169