

## 丙型肝炎病毒非结构蛋白3的体外表达与纯化

金博 李楠 吴凯 张林 王艳梅 翟俊山 朱超慧 宋久刚

**【摘要】 目的** 构建丙型肝炎病毒非结构蛋白3(HCV NS3)表达质粒并在大肠杆菌中表达其全长蛋白。**方法** 克隆HCV NS3的核酸序列3420-5312位点,插入pQE-11质粒的Bam HI限制性酶切位点,将此重组质粒转入大肠杆菌表达,用Western blot方法筛选阳性克隆,将含有额外拷贝的argU、ileY和leuW的tRNA基因的pACYA质粒引入HCV NS3表达系统以提高HCV NS3蛋白的表达量。收集培养扩增的大肠杆菌菌体,用卵白溶菌酶裂解,收集含有HCV NS3重组蛋白的不溶性包涵体,将包涵体充分洗涤后,溶于含10 mmol/L二硫苏糖醇的缓冲液中。释放的可溶性蛋白用SDS-PAGE电泳分离、洗脱,用离心过滤方法浓缩,乙醇沉淀,重复洗涤去除内毒素。**结果** 用此方法克隆的HCV NS3全长基因片段表达的重组蛋白分子量为69 kD。含有额外拷贝的argU、ileY和leuW的tRNA基因的pACYA质粒引入HCV NS3表达系统后,HCV NS3蛋白的产出率可提高10倍以上。此方法生产的NS3纯化蛋白质产量,每升培养物为40 mg。内毒素含量低于20 EU/mg NS3蛋白。**结论** HCV NS3与HCV的免疫逃逸及感染的慢性化有密切关系,是HCV的抗病毒治疗和疫苗研究的重要靶点,全长HCV NS3蛋白的体外合成为HCV研究提供了一个有用的工具。

**【关键词】** 肝炎病毒属; 病毒非结构蛋白质类; 重组蛋白质类

***In vitro* expression and purification of hepatitis C virus non-structural protein 3** JIN Bo, LI Nan, WU Kai, ZHANG Lin, WANG Yan-mei, ZHAI Jun-shan, ZHU Chao-hui, SONG Jiu-gang. Department of Gastroenterology, The 309th Hospital of PLA, Beijing 100091, China

Corresponding author: JIN Bo, Email: bjbo.jin@gmail.com

**【Abstract】 Objective** This study was designed to construct the Hepatitis C virus non-structural protein 3 (HCV NS3) expression vector and introduce this vector into *Escherichia Coli* (*E. coli*) to produce the full-length HCV NS3 protein. **Methods** A full-length HCV NS3 gene encoding amino acids 1027-1657 (nucleotides 3420-5312) was inserted into the BamHI restriction enzyme site of plasmid pQE-11 and expressed in *E. coli* cells. Positive expressing clones were selected by Western blot. A pACYA plasmid with tRNA genes containing extra copies of argU, ileY and leuW was introduced into the HCV NS3 expression clone by transformation to increase the expression level of HCV NS3 recombinant protein. The expanded *E. coli* cells were collected and lysed by hen egg-white lysozyme. The insoluble inclusion bodies containing HCV NS3 recombinant protein were collected by centrifugation and dissolved in Tris-HCl buffer containing 10 mmol/L dithiothreitol to release the recombinant protein. The soluble recombinant protein released was purified by SDS-PAGE and concentrated by centrifugal filtration and ethanol precipitation. The contaminated endotoxin was removed by repeated washing with 0.9% NaCl, 10 mmol/L sodium deoxycholic acid. **Results** The molecule weight of this full-length recombinant HCV NS3 protein was 69 kD. After introduction of pACYC-based plasmid containing extra copies of argU, ileY and leuW tRNA genes, the production of HCV NS3 recombinant protein by HCV NS3 expression clone was increased 10 times more than that by its mother clone. The final production of purified HCV NS3 recombinant protein was 40 mg per liter of culture with the endotoxin level was less than 20 EU/mg NS3 protein. **Conclusions** HCV NS3, in cooperation with HCV NS4A, plays an important role in the immune evasion and chronic infection of HCV, and therefore, is one of the most important targets in the studies for anti-viral therapy and vaccine development. Thus, the production of full-length HCV NS3 recombinant protein provided a useful tool in HCV research.

**【Key words】** Hepacivirus; Viral nonstructural proteins; Recombinant proteins

丙型肝炎病毒(hepatitis C virus, HCV)感染是一个严重的全球性健康问题。据世界卫生组织的调查,全球有约一亿七千万人感染 HCV, 占世界人口的 3%<sup>[1]</sup>。HCV 在静脉吸毒人群中的感染率高达 60% ~ 80% 以上, 而我国的静脉吸毒者感染 HCV 的人数居世界首位<sup>[2]</sup>。

HCV 的核酸结构是一条开放读码框 RNA, 编码约 3000 个氨基酸的蛋白质。HCV 所编码的蛋白质可被裂解成为 10 个成熟的蛋白, 其中 3 个为结构蛋白, 即核心蛋白、包膜蛋白(envelope protein) 1 和 2, 其他 7 个为非结构蛋白(non-structure protein, NS), 即 p7、NS2、NS3、NS4A、NS4B、NS5A 和 NS5B 蛋白, 其中 NS 的作用是负责 HCV 核酸的复制以及把复制的基因装配到由结构蛋白组成的病毒衣壳中<sup>[3]</sup>。鉴于 NS 在 HCV 复制中的重要性, 近年来很多新的 HCV 治疗药物及疫苗研究都是以 HCV 为靶点。为了更好地研究 HCV NS 在抗 HCV 治疗中的作用, 我们克隆了全长 HCV NS3 蛋白的基因并在大肠杆菌中进行了表达。

## 材料和方法

### 一、全长 HCV NS3 蛋白表达质粒的构建

采用美国 Qiagen 公司的 QIAexpress System (Qiagen Inc., Valencia, CA, USA) 来构建全长 HCV NS3 蛋白表达质粒, 并将该质粒插入大肠杆菌进行 NS3 蛋白的表达。实验操作按产品说明书进行。简要步骤如下: 以 RT-PCR 方法获得编码 HCV 病毒蛋白第 1027 ~ 1657 位氨基酸序列(核酸序列 3420 ~ 5312, HCV H 株 1a 基因型)的 HCV NS3 基因(图 1), 插入用 DNA 聚合酶 I 的 Klenow 片段和细菌碱性磷酸酶预处理过的 pQE-11 质粒(Qiagen Inc., Valencia, CA, USA)的 Bam HI 限制性酶切位点, 构建成 pQE-HCV/NS3 重组质粒。

### 二、全长 HCV NS3 蛋白在大肠杆菌表达系统内的表达

为进一步提高 HCV NS3 重组蛋白的表达水平, 我们通过转化方法将含有额外拷贝的 argU、ileY 和 leuW 的 tRNA 基因的 pACYA 质粒引入 HCV NS3 表达系统内<sup>[4]</sup>, 这些基因可以识别精氨酸的 AGA 和 AGG 密码子、异亮氨酸的 AUA 密码子以及亮氨酸 CUA 密码子。

将 pQE-HCVNS3-RIL-3 表达系统置于 100 ml 含 100 μg/ml 青霉素、25 μg/ml 卡那霉素和 68 μg/ml 氯霉素的 LB 培养基中, 在 37 °C 摇床上 160 ~ 180 r/min 振荡过夜。然后将培养基加入 2 L 经过 37 °C 预热, 并含 50 μg/ml 青霉素、12.5 μg/ml 卡那霉素和 34 μg/ml 氯霉素的 LB 培养基中, 检测该培养基在 600 nm 的光密度值, 将培养基稀释至光密度 0.1。稀释过的培养基分装入 4 个 2 L 的烧瓶中, 每瓶 500 ml。将 4 个烧瓶置于 37 °C 摇床上 220 ~ 240 r/min 振荡培养至 A<sub>600</sub> 光密度达到 0.40 ~ 0.45, 然后加入异丙基硫代-β-D 半乳糖苷

(Isopropyl-D-thiogalactoside, IPTG) 至终浓度 1 mmol/L, 继续振荡 4 h。

### 三、全长 HCV NS3 蛋白的提取和纯化

以大肠杆菌 DH5αF' IQ 菌株作为表达载体。用 HCV 阳性患者血清作为抗体, 用 Western blot 方法筛选阳性克隆。离心收集菌体, 并重新混悬于 100 ml 的 50 mmol/L Tris-HCl, pH 8.0, 10 mmol/L EDTA, 并含 1:30 稀释的蛋白酶抑制剂复合物( protease inhibitor cocktail) P-8465 (St. Louis, MI, USA) 的缓冲液中, 再用 200 μg/ml 卵白溶菌酶 37 °C, 10 min 溶解菌体。在黏稠的细菌裂解物中分别加入 NaCl 和 Triton X-100 至终浓度 0.5 mol/L 和 1%。将裂解物冰浴 10 min, 再行超声降解(sonication)。然后 20 000 × g, 20 °C 离心 20 min, 收集含有 HCV NS3 重组蛋白的不溶性包涵体。离心沉淀物用超声降解法重悬于 100 ml 的缓冲液 II 中(0.1 mol/L 磷酸盐缓冲液, pH 8.0, 0.5 mol/L NaCl, 5 mmol/L EDTA, 1% Triton X-100, 及 30 倍稀释的 Sigma protease inhibitor cocktail P-8465), 再次离心, 并将包涵体重悬于 100 ml 的缓冲液 III 中(10 mmol/L Tris-HCl, pH 7.4, 5 mmol/L EDTA, 10 mmol/L 脱氧胆酸, 及 60 倍稀释的 Sigma protease inhibitor cocktail P-8465)。将混悬液于 17 000 × g, 20 °C 再次离心 20 min, 然后将包涵体溶于缓冲液 IV 中[10 mmol/L Tris-HCl, pH 8.0, 1 mmol/L EDTA, 0.5% SDS, 10 mmol/L 二硫苏糖醇(dithiothreitol, DTT)]。

包涵体中释放的可溶性蛋白经过 8% 的 SDS-PAGE 电泳分离。将含 NS3 蛋白的电泳条带切下, 用 2% 柠檬酸处理 10 min 去除染色剂, 然后将胶条放入透析袋内(分子量分离界值: 6000 ~ 8000) 进行电泳洗脱。洗脱后的 NS3 蛋白用离心过滤方法浓缩, 乙醇沉淀。沉淀物用 0.9% NaCl, 10 mmol/L 脱氧叶酸钠洗两遍, 再用 0.9% NaCl 洗一遍以去除残存的内毒素。每次洗涤均用超声降解法使沉淀分散成细微的颗粒而成为混悬液, 然后 17 000 × g, 20 °C 离心 20 min。将去除内毒素的 NS3 蛋白沉淀溶于 10 mmol/L Tris-HCl, pH 8.0, 1 mmol/L EDTA, 0.1% SDS, 10 mmol/L DTT 中。由于本实验中的 NS3 蛋白是使用大肠杆菌合成的, 为了解合成的 NS3 蛋白中大肠杆菌产物的残留情况, 我们对纯化的 NS3 蛋白中细菌内毒素进行了检测。细菌内毒素含量用鲎阿米巴样细胞裂解物动力学显色法内毒素检测试剂盒(BioWhittaker, Walkersville, MD, USA) 检测。

## 结 果

本实验选取 HCV H 株 1a 基因型的 NS3 全长基因片段进行克隆, 采用 pQE-11 质粒构建 HCV NS3 的表达质粒。HCV NS3 表达质粒导入大肠杆菌后, 以 HCV 慢性感染者的血清作为抗体, 用 Western blot 方法筛选

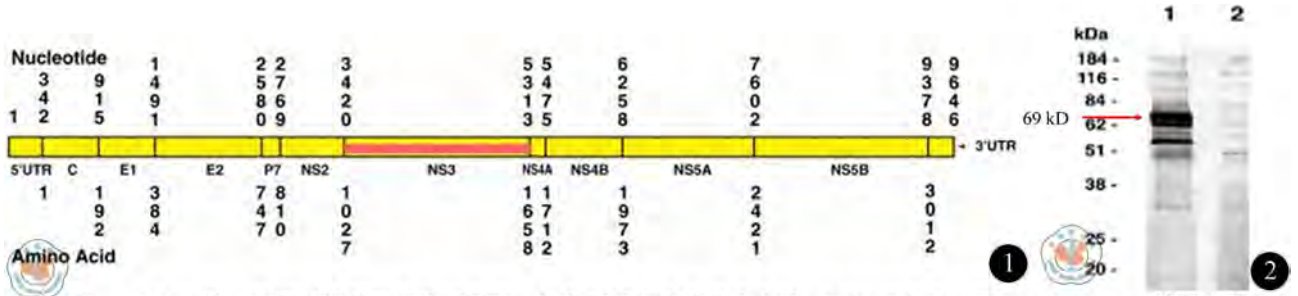


图1 HCV H76基因型的基因结构示意图。红色区域为本实验克隆的HCV NS3基因 图2 Western blot筛选阳性克隆, HCV NS3重组蛋白分子量为69 kD

阳性克隆, HCV NS3 重组蛋白的分子量为 69 kD (图2)。

通过转化机制将含有额外拷贝的 argU、ileY 和 leuW 的 tRNA 基因的 pACYA 质粒引入 HCV NS3 表达系统后,可以明显提高 HCV NS3 蛋白的表达量。pACYA 质粒是通过 BL21-CodonPlus-RIL 株细菌 (Stratagene, La Jolla, CA, USA) 产生的。通过对 10 个表达克隆的细胞溶解物进行 SDS-PAGE 电泳和考马斯亮蓝染色,用计算机对染成蓝色的电泳条带进行光密度测定,结果发现,该表达系统比亲代表达系统 HCV NS3 蛋白的产出率提高 10 倍以上。其中的一个克隆被命名为 pQE-HCVNS3-RIL-3,并被选出用于表达 HCV NS3 蛋白质。

提取大肠杆菌包涵体后,以超声降解法提取可溶性蛋白,释放出的可溶性蛋白用 8% 的 SDS-PAGE 电泳分离,电泳凝胶用咪唑-锌染色<sup>[5]</sup>,显示 HCV NS3 蛋白为主要蛋白,分子量约 69 kD。将此条带切下行电泳洗脱后的 NS3 蛋白用离心过滤方法浓缩,并用 0.9% NaCl,10 mmol/L 脱氧叶酸钠洗涤去除残留的大肠杆菌内毒素,最终获得的 HCV NS3 蛋白质浓度为 1~5 mg/ml。纯化的 NS3 蛋白储存于 -70 °C。经此方法纯化的 NS3 蛋白质产量,每升 pQE-HCVNS3-RIL-3 培养物为 40 mg。

纯化后的 NS3 蛋白质中内毒素的含量,经检测低于 20 EU/mg NS3 蛋白。

### 讨 论

HCV NS3 与 HCV 感染的慢性化有密切关系。它可与 HCV NS4A 发生非共价结合,HCV NS4A 在这种结合体中发挥辅助因子的作用,使得这种结合体具有丝氨酸蛋白酶的活性。这种丝氨酸蛋白酶可以识别 Toll 样受体 3 (Toll-like receptor 3, TLR3) 的细胞内适配体即含 Toll/白细胞介素-1 受体域诱导 β-干扰素的适配器 (Toll/IL-1 receptor domain-containing adapter inducing IFN-β, TRIF),将 TRIF 作为该丝氨酸蛋白酶的底物而发生水解反应,降解 TRIF。NS3/NS4A 蛋白酶对 TRIF 的水解作用阻断了作为病毒感染的病原相关分子

模式的双链 RNA 与 TLR3 结合后的反应通道,使得 HCV 发生免疫逃逸<sup>[6]</sup>,不能被机体的免疫系统识别和清除,从而造成 HCV 感染的慢性化。针对 NS3 的抗病毒治疗有可能抑制或减弱 NS3/NS4A 的蛋白酶活性,因而有可能抑制 HCV 的免疫逃逸,从而可能会有助于被感染者清除 HCV 病毒。因此,HCV NS3 蛋白的体外人工合成为针对 HCV NS3 的治疗研究提供了一个必需的工具。

美国 FDA 在 2011 年批准了 2 个针对 HCV 的抗病毒药物特拉匹韦 (Telaprevir) 和博赛波维 (Boceprevir),这 2 个抗 HCV 的药物都是作用于 HCV NS3/NS4A 的蛋白酶抑制剂。这 2 种抗病毒药物分别与聚乙二醇干扰素和利巴韦林联合治疗慢性 HCV 感染患者,取得了良好的疗效。对于初次治疗的 HCV 基因 1 型慢性感染者,这种三联疗法可获得 70%~80% 的持久病毒学应答<sup>[7-8]</sup>。因此,针对 HCV NS3/NS4A 的治疗是 HCV 抗病毒治疗的重要治疗靶点之一。

由于 HCV NS3/NS4A 在 HCV 的免疫逃逸和感染慢性化中发挥重要作用,在 HCV 的疫苗研究中,针对 HCV NS3/NS4A 的免疫研究也得到重视。利用 HCV NS3 蛋白抗原或 DNA 片段加上不同的免疫佐剂,诱导针对 HCV NS3 的特异性细胞免疫反应,在动物实验中取得了一定的成果<sup>[9-10]</sup>。因此,在今后的 HCV 疫苗研究中,HCV NS3 也会成为一个重要的抗原,在 HCV 的预防研究中发挥重要作用<sup>[11-12]</sup>。

精氨酸的密码子 AGA 和 AGG、异亮氨酸的密码子 AUA 以及亮氨酸的密码子 CUA 是大肠杆菌的稀有密码子,这些稀有密码子若存在于插入的外源基因中会严重影响外源性蛋白质在大肠杆菌中的表达。引入携带这些稀有密码子所编码的氨基酸的 tRNA,则会提高外源性蛋白质在大肠杆菌中的表达。据推测,其可能的机制是这几种氨基酸-tRNA 在大肠杆菌内含量不足,核糖体翻译合成外源性蛋白质到达这些稀有密码子时会出现停顿或延滞,额外补充这些稀有氨基酸的酰化-tRNA 的表达,会克服这种蛋白质翻译的停顿或延滞,从而提高大肠杆菌表达外源性蛋白质的产量<sup>[4]</sup>。这种翻译的迟滞还可导致移码 (frameshift) 翻译,造成移码

突变<sup>[4]</sup>。由于在这些大肠杆菌的稀有氨基酸密码子处的翻译延滞,核糖体会前移或后移一个密码子,继续进行翻译,此即+1或-1移码突变。我们在本实验中将含有额外拷贝的 argU、ileY 和 leuW 的 tRNA 基因的 pACYA 质粒引入 HCV NS3 表达系统后,克服了大肠杆菌在 NS3 蛋白翻译过程中的核糖体迟滞,大肠杆菌合成 HCV NS3 的产量提高了 10 倍以上。

总之,HCV NS3 是在 HCV 的感染慢性化及免疫逃逸中发挥重要作用的病毒非结构蛋白,在 HCV 的治疗和预防研究中都是重要的研究靶点。将含有额外拷贝的 argU、ileY 和 leuW 的 tRNA 基因引入大肠杆菌表达系统,可以显著地提高大肠杆菌表达目的蛋白的效率。全长 HCV NS3 蛋白的体外合成为 HCV 研究提供了一个有用的工具。

#### 参 考 文 献

- [1] Averhoff FM, Glass N, Holtzman D. Global burden of hepatitis C: considerations for healthcare providers in the United States. *Clin Infect Dis*, 2012, 55 Suppl 1: S10-15.
- [2] Nelson PK, Mathers BM, Cowie B, et al. Global epidemiology of hepatitis B and hepatitis C in people who inject drugs: results of systematic reviews. *Lancet*, 2011, 378: 571-583.
- [3] Matlock DL, Yeruva L, Byrd AK, et al. Investigation of translocation, DNA unwinding, and protein displacement by NS3h, the helicase domain from the hepatitis C virus helicase. *Biochemistry*, 2010, 49: 2097-2109.
- [4] Sivashanmugam A, Murray V, Cui C, et al. Practical protocols for production of very high yields of recombinant proteins using *Escherichia coli*. *Protein Sci*, 2009, 18: 936-948.
- [5] Castellanos-Serra L, Hardy E. Negative detection of biomolecules separated in polyacrylamide electrophoresis gels. *Nat Protoc*, 2006, 1: 1544-1551.
- [6] Torresi J, Johnson D, Wedemeyer H. Progress in the development of preventive and therapeutic vaccines for hepatitis C virus. *J Hepatol*, 2011, 54: 1273-1285.
- [7] Jacobson IM, McHutchison JG, Dusheiko G, et al. ADVANCE Study Team. Telaprevir for previously untreated chronic hepatitis C virus infection. *N Engl J Med*, 2011, 364: 2405-2416.
- [8] Poordad F, McCone J Jr, Bacon BR, et al. SPRINT-2 investigators. Boceprevir for untreated chronic HCV genotype 1 infection. *N Engl J Med*, 2011, 364: 1195-1206.
- [9] Jiao X, Wang RY, Feng Z, et al. DNA immunization encoding the secreted nonstructural protein 3 (NS3) of hepatitis C virus and enhancing the Th1 type immune response. *J Viral Hepat*, 2004, 11: 18-26.
- [10] Jin B, Wang RY, Qiu Q, et al. Induction of potent cellular immune response in mice by hepatitis C virus NS3 protein with double-stranded RNA. *Immunology*, 2007, 122: 15-27.
- [11] 温少芳, 张锦前, 孙荣华, 等. 人胰腺细胞 cDNA 文库中丙型肝炎病毒 NS4B 结合蛋白基因的筛选[J/CD]. *中华临床医师杂志: 电子版*, 2011, 5: 2523-2526.
- [12] 徐洪涛, 邢同京. miRNA 介导的丙型肝炎病毒与宿主相互作用研究进展[J/CD]. *中华临床医师杂志: 电子版*, 2011, 5: 3585-3587.

(收稿日期: 2012-08-06)

(本文编辑: 马超)

金博, 李楠, 吴凯, 等. 丙型肝炎病毒非结构蛋白 3 的体外表达与纯化[J/CD]. *中华临床医师杂志: 电子版*, 2012, 6(20): 6238-6241.

中 华 临 床 医 生 杂 志