

## 绿色荧光蛋白与 HCV 核心蛋白的融合 及在大肠杆菌中的高效表达

岳莉莉 齐义鹏\* 林宏 苏霏

(武汉大学病毒研究所 武汉 430072)

邓小昭

(南京军区军事医学研究所 南京 210002)

**摘 要** 利用基因工程重组技术获得了绿色荧光蛋白(gfp)基因与 HCV 核心蛋白(core)基因的嵌合体,并在大肠杆菌中高效表达了 48kDa 的融合蛋白,经 Dot-ELISA 和 Western blot 免疫活性分析证实,融合蛋白仍具有 core 抗原的三个免疫活性部位,同时用荧光显微镜观察并用荧光光度计测定了大肠杆菌表达的融合蛋白的荧光光谱,结果证实,我们在大肠杆菌中表达的 GFP-core 融合蛋白既能发射易于检测的绿色荧光,又具有 HCV 核心蛋白的抗原活性,实现了用绿色荧光蛋白等分子标记抗原,为免疫诊断新方法的建立,打下了理论基础。

**关键词** HCV, 核心蛋白基因, 绿色荧光蛋白基因, 融合蛋白, 荧光光谱

自 1974 年首次报道丙型肝炎病毒(Hepatitis C Virus, HCV)以来,许多学者致力于寻找丙型肝炎的病原体并试图建立特异性诊断方法。由于患者血中 HCV 的抗原量太少,无法进行抗原检测,故只能测其抗体。目前已从 HCV cDNA 克隆中获得多种基因工程抗原片段,促进了 HCV 免疫诊断技术的发展<sup>[1,2]</sup>。但传统的诊断技术都是首先将纯化的抗原或抗体与酶或其它标记物结合,再加相应的底物通过显色来检测其对应的抗体或抗原。这种化学计量和染料附着的部位常很难控制,操作复杂,成本也较高,不利于开展大规模的流行病学调查或筛选献血员。另一方面,1994 年 Chalfie 等<sup>[3]</sup>首次在大肠杆菌中克隆表达了水母的绿色荧光蛋白(Green fluorescent protein, GFP)基因,这是一种在长波紫外光或蓝光激发下能发出绿色荧光的发光蛋白。文章在 Science 上发表后, GFP 作为新型报道基因引起了广泛的关注。1995 年,朱反修等<sup>[4]</sup>首次昆虫细胞中表达了 GFP, 本文就是在这些工作基础上将 gfp 基因与 HCV core 抗原基因嵌合在一起,在大肠杆菌中高效表达带有等分子绿色荧光蛋白的标记抗原,既保留其抗原性又保留其发光性,用以取代传统的标记技术,建立特异、敏感、简便、快速的免疫诊断新方法,以便更适应于临床的需要。

### 1 材料与方法

#### 1.1 质粒和菌株

质粒 pGFP10.1 由美国哥伦比亚大学 Chalfie 教授赠送。含有 HCV 核心蛋白(core

自然科学基金资助项目。

\* 联系与负责作者。

本文于 1996 年 12 月 10 日收到。

蛋白)基因的质粒 pNC 及表达质粒 pBV220 由中国预防医学科学院病毒所杨永平先生赠送,克隆载体 pGEM 3Zf(-)购自 Promega 公司,大肠杆菌 TG1, DH5a 为本室保存菌种。

## 1.2 酶和化学试剂

限制酶、T4 DNA 连接酶、胰蛋白酶、酵母粗提物均购自 Promega 公司, IPTG、X-gal 购自 Gibco 公司,生物素标记试剂盒及显色试剂盒购自北京医科大学,一般化学试剂均为国产分析纯产品。

## 1.3 血清标本

人阳性血清采自武汉市 HCV 感染者,已用 ELISA 试剂盒证实血清样品为 HCV 抗体阳性,根据 HCV 核心蛋白三个抗原活性功能区(即按 Okamoto 的氨基酸序列,它们分别位于 1~22aa、51~70aa 和 99~115aa)制备的抗合成肽免疫兔血清 HCV-1、HCV-2、HCV-3 由德国海德堡大学的 Goesser 博士惠赠<sup>[5]</sup>。

## 1.4 质粒 DNA 的提取与片段的回收

质粒 DNA 转化大肠杆菌 TG1,挑单菌落接种于 LB 液体培养基过夜培养,取 1.5ml 培养物用碱解法提取 DNA,在合适的内切酶消化后,1%琼脂糖凝胶电泳至 DNA 片段充分分开,采用低熔点琼脂糖法或 DE-81 膜法回收所需的 DNA 片段。

## 1.5 DNA 的重组和阳性重组子的筛选

按分子克隆常规程序进行 DNA 酶切、连接与转化,将 gfp 基因和 HCV core 基因插入 pGEM 3Zf(-)的合适位点,使其融合在一起,转化大肠杆菌 TG1,通过蓝白斑筛选阳性重组体,限制酶消化鉴定插入片段的大小。

## 1.6 DNA 序列的测定

为了证实两个嵌合基因的密码子是否同框,用 Promega 公司的 ddNTP 链终止/PCR 扩增/银染测序试剂盒并按说明书操作,测定嵌合基因的连接区序列。

## 1.7 表达质粒的构建及鉴定

用双酶消化法从克隆载体 pGC-2 上切下 gfp-core 嵌合基因,亚克隆到 pBV220 的  $P_{RPL}$  双启动子下游,用生物素标记的 gfp cDNA 片段作探针,按分子克隆手册进行原位杂交和显色反应。选择着色深的阳性克隆,提取质粒 DNA,限制性酶切分析鉴定插入片段的大小及方向。

## 1.8 融合蛋白的表达及检测

表达载体 pBV220 的双启动子  $P_{RPL}$  是用  $\lambda$  噬菌体温敏基因 *clts857* 调控的,因此嵌合基因 gfp-core 可以在  $P_{RPL}$  双启动子控制下进行温控表达。将单菌落接种于含 100  $\mu$ g Ampicillin/ml 的 LB 培养基内,30℃ 过夜培养,次日以 1:50 稀释,接种到同样培养基继续培养直到对数中期,然后升温到 40℃ 诱导融合蛋白表达。采用 SDS-PAGE 法检测表达蛋白并用荧光光度计测定荧光强度。用混合的人抗 HCV 阳性血清进行 Dot-ELISA 法及 Western blot 法测定融合蛋白的抗原活性。

# 2 结 果

## 2.1 携带嵌合基因克隆载体的构建

为了使 gfp 基因与 HCV core 基因的编码序列同框,以便表达两者编码的融合蛋白,

我们利用克隆载体 pGEM 3Zf(-)进行了多次克隆。通过蓝白斑筛选,构建了 gfp-core 嵌合基因克隆载体,过程如图 1(b)所示:

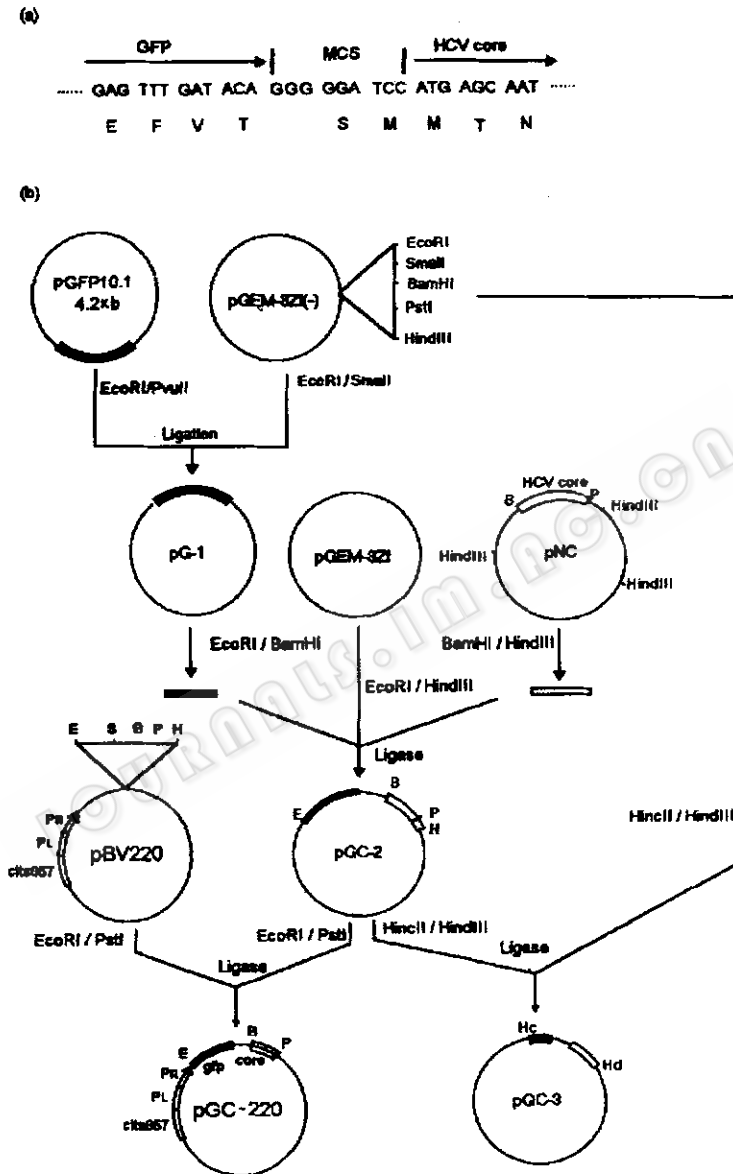


图 1 克隆载体 pGC-2、pGC-3 及表达载体 pGC-220 的构建过程(b), (a)为嵌合基因的连接区序列  
Fig. 1 Scheme for the construction of the cloning vector pGC-2, pGC-3 and expression vector pGC-220(b).  
(a) The sequences of the chimeric genes at their fusion sites  
E: EcoRI, S: SmaI, B: BamHI, P: PstI, H: HindIII

根据图 1(b), 先用 EcoRI 单酶消化 pGFP10.1, 回收 1kb 的 gfp cDNA 片段, 在该片段的 702bp 处有一 Pvu II 位点, 用 Pvu II 再次酶切, 去掉 gfp cDNA 3' 末端编码 12 个氨基酸

的序列及非编码区,保留 gfp 的生色基团编码区(217~226bp)及绝大部分编码区共约 0.7kb。将此 0.7kb 的 gfp EcoRI-Pvu II 大片段亚克隆到 pGEM 3Zf(-) DNA 的 EcoRI-SamI 位点,得到 pG-1 质粒。我们根据已发表的 gfp 基因和 HCV core 基因序列以及 pGEM 3Zf(-)多克隆位点序列,经详细分析设计,再从 pG-1 质粒上回收 0.7kb 的 gfp EcoRI-BamHI 片段;从 pNC 质粒上回收 HCV core 基因的 BamHI-Hind III 片段,将两个片段与经 EcoRI-Hind III 双酶消化的 pGEM 3Zf(-)连接,构建成带有共同阅读框的 gfp-core 嵌合基因的克隆载体 pGC-2。

## 2.2 嵌合基因连接区的 DNA 序列

为了确证 gfp 基因与 core 基因编码序列是同框的,我们利用 gfp 基因第 500bp 处的 Hinc II 位点,用 Hinc II 和 Hind III 双酶消化 pGC-2,回收约 700bp 的片段(该片段含有与 core 完整基因相连接的 200bp gfp 片段),亚克隆到 pGEM 3Zf(-)的多克隆位点上,得亚克隆载体 pGC-3(图 1(b))。

用 ddNTP 链终止/PCR 扩增/银染法测定了嵌合基因的接头序列,图 1(a)是 gfp-MCS-core 基因三者连接区的部分序列。

从图 1(a)可以看出,从 gfp 密码 GAG TTT GTA ACA G 经过载体 MCS 的 GG GGA TCC 到 HCVcore 基因 5'端的 ATG AGC ACG AAT 正好是同框的,未发生码组移动,证实实验设计是正确的。

## 2.3 表达载体 pGC-220 的构建

用 EcoRI-PstI 双酶消化 pGC-2 质粒,回收含有 gfp-core 嵌和基因的 1.2kb 片段,定向插入到表达质粒 pBV220(3.7kb)的双启动子  $P_{RPL}$  下游 MCS 的 EcoRI-PstI 位点处,使 gfp-core 嵌合基因处于  $P_{RPL}$  启动子控制之下,构建成 4.9kb 的表达载体 pGC-220(图 1(b))。

通过菌落原位杂交和斑点杂交初筛阳性重组体,图 2 是菌落原位杂交的结果,探针为生物素标记的 gfp cDNA EcoRI 片段,着色斑为含有外源片段的菌落,挑选着色深的原位杂交菌落,提取重组质粒 pGC-220 的 DNA 并经限制酶 EcoRI+PstI 双切产生一条约 1230bp 大小的 gfp-core DNA 带,和 3.7kb 的亲本质粒 pBV220(图 3,C),若用 BamHI+PstI 双切则产生 530bp 的 HCV core DNA 和一条 4.4kb 带(pBV220 3.7+gfp 0.7,图 3,B),若用 BamHI+EcoRI 切,则可得到 700bp 的 gfp 带及 530bp 的 HCV core cDNA 带,表明质粒 pGC-220 限制酶谱分析与原设计相符(见图 3)。

## 2.4 表达产物的测定

将 pGC-220 表达载体转化大肠杆菌 DH5 $\alpha$ ,热诱导培养 5h,收集菌体直接溶于 Laemmli 样品缓冲液中,各取 30 $\mu$ l 进行 12% SDS-PAGE,用考马斯亮蓝染色,分析产物的表达量及大小,结果见图 4(a)。由图 4(a)B 可见,在 48kDa 的位置上可以观察到一条明显的 GFP-core 融合蛋白带,带位显著高于 pNC-220 表达的 core 蛋白带(图 4(a)C),显然这是 29kDa 的 GFP 与 19kDa 的 core 抗原相加产生的嵌合蛋白。Western blot 和 Dot-ELISA 结果表明,此蛋白可与人的 HCV 阳性血清和免疫兔血清 HCV-1、HCV-2、HCV-3 起反应(见图 4(b),E)。说明 GFP 与 Core 蛋白的融合不影响核心蛋白具备的三个抗原决定簇(1~22aa、51~70aa 和 99~115aa)的活性。

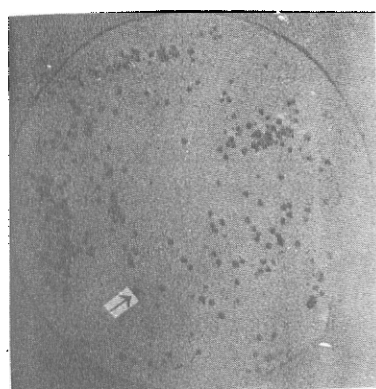


图2 菌落原位杂交筛选阳性克隆 pGC-220

Fig.2 Screening for positive clones of pGC-220 by *in situ* hybridization

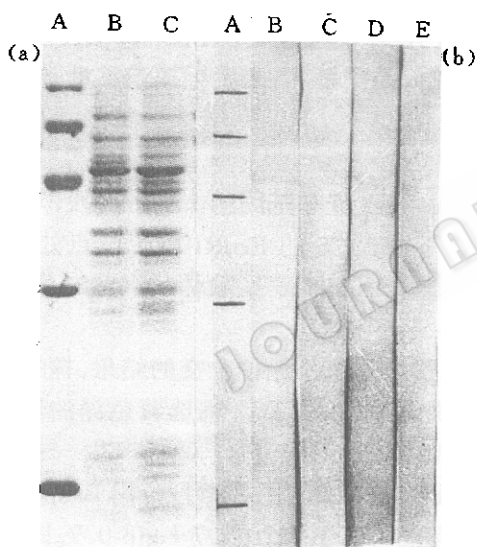


图4 融合蛋白的 SDS-PAGE(a)和 Western blot(b)分析

Fig.4 SDS-PAGE(a) and immunoblot analysis(b) of the fusion protein

(a) A. The marker of protein molecular weight; B. Expression protein of pGC-220; C. Expression protein of pNC-220 carrying only core gene

(b) A. The marker of protein molecular weight (97, 67, 43, 30, 17, 5kDa); B. With anti-HCV positive human sera; C. With rabbit anti-HCV-1; D. With rabbit anti-HCV-2; E. With rabbit anti-HCV-3

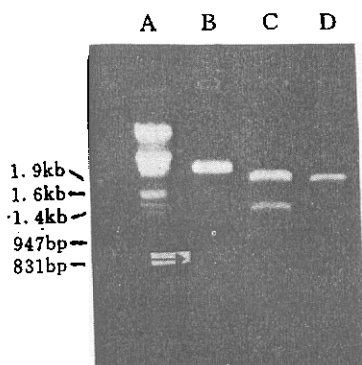


图3 阳性克隆的酶切鉴定

Fig.3 Restriction map of positive clones

A.  $\lambda$  DNA EcoRI + HindIII as Marker

B. BamHI + PstI

C. EcoRI + PstI

D. EcoRI + BamHI + PstI

## 2.5 表达产物的荧光显微镜观察及荧光光谱分析

将诱导 5h 后的菌体细胞涂片置荧光显微镜下观察,可见在暗视野中,表达融合蛋白的细菌细胞发射绿色荧光,而对照细菌则无荧光(见图 5)。用 Shimadzu RF-500 型荧光光度计,测定其荧光光谱,可见其最大激发波长为 390nm,在 470nm 处有一小峰;最大发射波长为 490~510nm。这个结果与 Clalfie 等<sup>[3]</sup>用大肠杆菌和朱反修<sup>[4]</sup>等在昆虫细胞中表达的 GFP 测定的结果基本一致。证明我们在大肠杆菌中表达的 GFP-core 融合蛋白除了不影响 HCV 的抗原性外,也不影响 GFP 的发光功能。

## 3 讨 论

近年来,因献血、输血及血源制品造成的丙型肝炎血源性传播的情况日益突出,其危害程度已超过了乙型肝炎的传染,约有 50% 以上的感染者发展为慢性肝炎,并与肝硬化、肝癌密切相关<sup>[6]</sup>。但由于抗 HCV 检测试剂价格昂贵,目前我国仅在一些大城市的血站和大医院开展了抗 HCV 检测,一些地区虽用 ALT 和抗 HBV 检

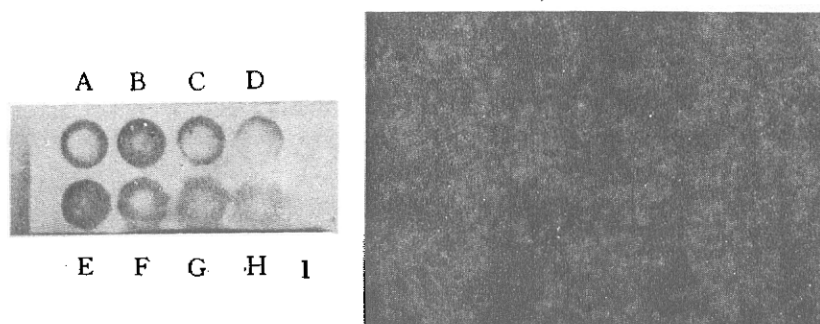


图 5 融合蛋白的抗原性的 Dot-ELISA 测定和工程菌细胞的荧光显微照片  
Fig.5 Detection of fusion protein by Dot-ELISA and fluorescent microscope photograph of the engineered bacteria  
A,B,C,D,F,G,H were different clones of pGC-220, E was positive control. I was negative control, B was strong positive

测作为替代,但效果欠佳<sup>[7]</sup>。因此寻找一种既能在人群中筛选抗 HCV,又能大大减少检测费用的血清流行病学方法,具有重要的现实意义。

pBV220 是一个含有  $P_{RPL}$  串联强启动子的非融合性表达载体,同时 *clts857* 基因(温敏突变型负调节基因)与  $P_L$  启动子同在一个载体上,使载体能在高温(40~42℃)状态下表达插入的外源基因,同时高温状态下又能抑制宿主蛋白的表达,所以选用该原核表达载体可通过温度诱导来控制表达,我们最初使用宿主菌是大肠杆菌 TG1,但热诱导后未见明显的表达带,可能是由于表达产物的毒性作用引起了宿主细胞对表达的抑制和对表达产物的降解。于是我们改用可形成包涵体的宿主菌 DH5 $\alpha$  从而提高了表达量和表达产物的稳定性。

HCV 基因组 core 区编码的核心蛋白,分子量为 21kDa。该蛋白含有 191 个氨基酸,是 HCV 最为保守的蛋白,具有较强的免疫原性,其相应的抗体出现早,阳转率高,抗体反应强,为国际上 HCV 诊断试剂首选的主要抗原<sup>[8]</sup>。我们克隆的 core 基因带有自己的起始密码 ATG 和终止密码 TAG,含有 168 个氨基酸,多肽的 N 端包含有 C 区基因产物的三个亲水域即三个抗原活性功能区<sup>[9]</sup>,C 端为一个疏水域组成的一个疏水核,具有稳定多肽构象的功能。与 Goesser 等<sup>[5]</sup>的实验结果不同的是,他们曾将不同长度的 Core 蛋白与 GST(谷胱甘肽转移酶)基因融合后表达,只检测到抗 HCV-1 和抗 HCV-2 的活性,而我们克隆的 core 基因与 *gfp* 基因融合后表达的融合蛋白经 Dot-ELISA 和 Western blot 证实仍具有较强的抗原反应性,融合后的 GFP 并没有覆盖 Core 抗原的三个抗原活性部位(即 1~22aa、51~70aa 和 99~115aa)。

从水母体内分离的绿色荧光蛋白(GFP)基因是 1994 年发现的一种新型报道基因,它只编码 238 个氨基酸,是目前唯一能在异源细胞内表达后自发产生荧光的蛋白,GFP 在各种荷性条件下都很稳定,比如能用酸、碱或盐酸胍处理,一旦恢复中性 pH 环境,或是除去变性剂,荧光即可恢复并具有和原来一致的发射光谱。用 GFP 标记抗原具有如下优点:1.GFP 是一种稳定的、可溶性的蛋白,对光稳定。2.GFP 的存在不影响融合蛋白的活

性。3. 对抗原或抗体的标记效率为 100%。4. GFP 只需要用光激发, 无需再加任何酶或底物, 因而方便、快速, 且没有背景的干扰。我们利用基因工程重组技术表达的 GFP-core 融合蛋白, 兼具有荧光和抗原活性, 实现了用绿色荧光蛋白等分子标记 HCV 抗原的目的。通过对融合蛋白的纯化、复性, 可望能建立一种特异、敏感、简便、快速的免疫诊断新技术。

### 参 考 文 献

- [1] Kuo G, Choo Q L, Alter H J, *et al.* Science, 1989, 244: 362~364.
- [2] Harada S, Watanabe Y, Takeuchi K *et al.* J Virol, 1991, 65: 3015~3021.
- [3] Chalfie M, Tu Y, Euskirchen G *et al.* Science, 1994, 263: 802~805.
- [4] 朱反修, 齐义鹏等. 微生物学报, 1997, 37(1): 15~19.
- [5] Goeser T, Muller H M, Ye J *et al.* Virology, 1994, 205: 462~469.
- [6] Saito I. *et al.* Proc Natl Acad Sci USA, 1990, 87: 6547~6549.
- [7] 马贵明, 谈 维. 中国输血杂志, 1992, 5(4): 204.
- [8] Chemello L, Cavalletto D *et al.* Hepatology 1993, 17: 179~182.
- [9] Muller H M, Goeser T. *et al.* J Med Virol, 1993, 74: 669~676.

## The Fusion Expression of Green Fluorescent Protein and HCV Core Antigen in *Escherichia coli* Cells

Yue Lili Qi Yipeng Lin Hong Su Fei

(Institute of Virology, Wuhan University, Wuhan 430072)

Deng Xiaozhao

(Nanjing Institute of Military Medical Science, Nanjing 210002)

**Abstract** A chimeric gene of the green fluorescent protein and hepatitis C virus core antigen was constructed and expressed in *E. coli* cells. The expressed fusion protein was examined by Dot-ELISA and Western blot and the three antigenic determinants were detected. The GFP-core fusion protein has not only the striking green fluorescence under natural light but also the HCV antigenic activity. A new method of immunological diagnosis is highly expected on the light of the fusion protein which can be seen as HCV antigen tagged by equal green fluorescent protein.

**Key words** HCV core gene, green fluorescent protein gene, fusion protein, fluorescent spectrum