

• 基础实验研究论著 •

人巨细胞病毒 *gB* 基因的构建、表达及鉴定

彭杰雄¹, 谭洪², 陆建国², 林连成², 邓兆享¹, 林文浩¹

(1. 武警广东边防总队医院检验科, 广东深圳 518029; 2. 深圳市赛尔生物技术有限公司, 广东深圳 518055)

摘要:目的 构建人巨细胞病毒(HCMV)*gB* 基因, 并对 pET28a/*gB* 重组质粒进行诱导表达, 鉴定表达的目的蛋白。方法 根据 Genbank 中 HCMV 核苷酸序列设计引物, 并在引物的 5'、3'端分别加入 *Bam*H I、*Eco*R I 限制性内切酶位点。特异性扩增 *gB* 编码基因片段, 同时构建含 HCMV *gB* 编码基因的原核表达载体, 对重组质粒进行诱导表达, 用间接酶联免疫吸附测定(ELISA)法对纯化的 Ni/*gB* 融合蛋白的灵敏度和特异度等生物活性进行鉴定, 灵敏度可达 95%, 特异度达 96.7%。结果 目的蛋白经诱导后表达于上清液中, 经鉴定, 目的蛋白保留了天然蛋白原有的生物活性。结论 Ni/*gB* 融合蛋白的获得, 为研制以重组蛋白代替传统全病毒作为检测抗原的新型 HCMV 特异性免疫学检测试剂盒奠定了基础。

关键词:巨细胞病毒; 载体; 重组蛋白质类

DOI:10.3969/j.issn.1673-4130.2014.04.003

文献标识码:A

文章编号:1673-4130(2014)04-0390-03

Construction, expression and identification of the *gB* gene of human cytomegalovirus

Peng Jiexiong¹, Tan Hong², Lu Jianguo², Lin Liancheng², Deng Zhaoxiang¹, Lin Wenhao¹

(1. Department of Clinical Laboratory, Guangdong Provincial Frontier Defence Corps Hospital of Armed Police Force, Shenzhen, Guangdong 518029, China; 2. Shenzhen Sciarray Biotech Co., Ltd, Shenzhen, Guangdong 518055, China)

Abstract: **Objective** To construct and identify the procaryotic expression vector of *gB*. Trying to induce the pET28a/*gB* and identify the expressed protein. **Methods** According to the nucleotide sequence of HCMV in Genbank, a pair of primers with *Bam*H I and *Eco*R I sites at 5'-terminal 3'-terminal were designed and synthesized respectively and a HCMV *gB* DNA fragment was amplified by PCR. The amplified *gB* gene fragment was subcloned into pET28a vector by a series of molecular biological methods including restriction digest and ligation, and transfection. The recombinant plasmid was induced under optimum conditions, then the expressed production was identified by SDS-PAGE. The recombinant strain was lyzed by ultrasonic and harvested by centrifugation. The sensitivity(95%) and specificity(96.7%) of pET28a/*gB* protein were identified by indirect ELISA. **Results** The interest protein was found in the supernatant, and its original biological activity is retained when compared with native protein. **Conclusion** The pET28a/*gB* protein was successfully expressed and it is a solid foundation for developing new type-specific serological detection of HCMV.

Key words: cytomegalovirus; victor; recombinant proteins

人巨细胞病毒(HCMV)属于疱疹病毒 β 亚科, 人群中的感染率高达80%~90%, 感染的初期是一个潜伏状态或低量的慢性、非典型的隐性感染^[1], 感染在免疫功能不成熟或缺陷的人群中可引起严重疾病, 其先天性感染还可引起流产、死胎、畸形、发育迟缓等^[2]。研究表明, *gB* 蛋白是 HCMV 表面重要的糖蛋白之一, 在病毒与宿主细胞膜的黏附、融合以及病毒进入细胞和在细胞间的转移中起重要作用^[3]。史文元等^[4]证实 HCMV *gB* 核酸疫苗能诱导小鼠产生较强的体液免疫应答。本研究利用分子生物学方法, 将 HCMV *gB* 编码基因插入原核表达载体 pET28a 中, 构建了重组表达载体 pET28a/*gB*, 对重组质粒进行诱导表达。用 ELISA 间接法对纯化的 Ni/*gB* 融合蛋白的灵敏度和特异度等生物活性进行鉴定。为研制以重组蛋白代替传统的全病毒作为检测抗原的新型 HCMV 特异性免疫学检测试剂盒奠定了基础。

1 材料与方法

1.1 材料 人巨细胞 AD169 标准株购自武汉病毒研究所; 含 pET28a 载体质粒的基因工程菌 DH5 α 、大肠杆菌表达菌株

BL21(DE3), 由深圳市赛芯生物技术研究所有保存; 120 例临床血清样本(阳性 60 例、阴性 60 例), 由中国人民武装警察部队广东省边防总队医院检验科收集; HCMV IgM 抗体检测试剂盒(酶联免疫法), 购自美国 Trinity 公司; ST-360 酶标仪, 购自上海市科华实验系统有限公司。

1.2 方法

1.2.1 引物的设计及合成 根据 HCMV AD169 株基因库序列^[5], 设计了 1 对寡聚核苷酸引物, 上游引物 P1: 5'-CGG GAT CCT TAG CCG TGA CCA TCT ACT ACC TG-3'; 下游引物 P2: 5'-CGG AAT TCT TAG TTT CCG AAG CCG TAG CA-3' (在上游增加酶切位点 *Bam*H I; 在下游增加酶切位点 *Eco*R I), 由上海生工生物工程技术服务有限公司合成。

1.2.2 PCR 扩增 按如下组分配制 PCR 反应液: 5 $\times$ Prime-STARTM 缓冲液(含 Mg²⁺) 10 μ L, dNTP 混合物(2.5 mmol/L) 4 μ L, 上游引物(10 μ mol/L) 1 μ L, 下游引物(10 μ mol/L) 1 μ L, HCMV 病毒 DNA 模板 0.5 μ L, PrimeSTARTM HS DNA 聚合酶(2.5 U/ μ L) 0.5 μ L, 灭菌蒸馏水 33 μ L, 总体积 50 μ L。按

如下反应条件进行 PCR 扩增: 98 ℃ 变性 5 min; 98 ℃ 10 s, 66 ℃ 15 s, 72 ℃ 60 s, 30 个循环; 72 ℃ 延伸 10 min。

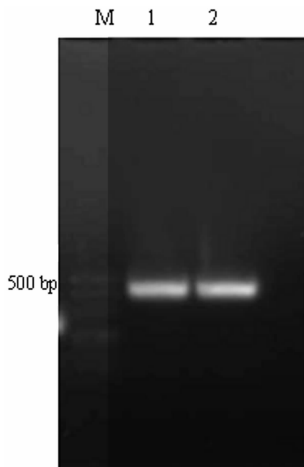
1.2.3 重组质粒的构建及鉴定 将用“UNIQ-10 柱式 PCR 产物纯化试剂盒”纯化的 PCR 产物以及用“UNIQ-10 柱式质粒小量抽提试剂盒”提取的 pET28a 载体质粒 DNA, 分别经 *Eco*R I 和 *Bam*H I 双酶切, 并用“UNIQ-10 柱式 DNA 胶回收试剂盒”纯化回收双酶切产物, 然后用“TaKaRa DNA Ligation Kit Ver 2.0”对两者进行连接, 构建重组质粒 pET28a/gB, 转化大肠杆菌 BL21 感受态细胞。经过 PCR 鉴定, 同时进行测序确认后提取重组质粒备用。

1.2.4 重组质粒的诱导表达 将转化有 pET28a/gB 重组质粒的大肠杆菌 BL21 (DE3), 以确立的最佳诱导条件 ($A_{600} = 0.6 \sim 0.7$, IPTG 终浓度为 0.8 mmol/L, 37 ℃ 诱导培养 4 h) 进行目的蛋白的诱导表达, 将诱导后的菌液以冰浴超声波法^[6]进行细菌破碎, 超声离心后上清和沉淀分别进行 SDS-PAGE 电泳, 以确定目的蛋白的表达形式。

1.2.5 重组蛋白的活性鉴定 用 Ni/gB 融合蛋白作包被抗原, 以确定的最佳反应模式 (蛋白包被浓度为 40 ng/孔、HRP 标记鼠抗人 IgM 单抗浓度为 1 : 2 000), 用 ELISA 间接法对 120 例对照血清进行检测, 分析重组蛋白生物活性。

2 结 果

2.1 目的片段的扩增 以 HCMV 基因组 DNA 为模板, P1/P2 为引物进行 PCR 扩增, PCR 产物用 0.7% 琼脂糖凝胶电泳, 结果显示在 420 bp 处有一条特异性扩增条带, 与预期片段大小 (417 bp) 基本相符。见图 1。



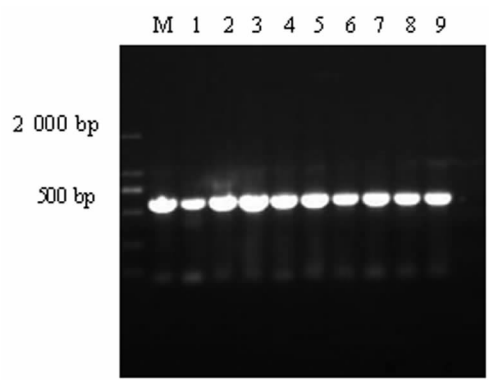
M: 500 bp DNA 标准带; 1~2: PCR 扩增产物。

图 1 目的基因片段的 PCR 扩增产物电泳图

2.2 重组质粒的鉴定及测序 以选择培养基上的单菌落为模板, 用特异性引物经 PCR 扩增得到 420 bp 左右的 DNA 条带, 与预期片段大小一致, 见图 2; 其中 9 个克隆子都成功扩增, 筛选出含有目的基因的阳性克隆进行测序。将鉴定含 pET28a/gB 重组质粒的阳性菌送上海生工生物工程技术服务有限公司进行 DNA 测序, 结果显示重组质粒的 DNA 序列与 HCMV 基因序列的相应部分完全相符 (M28350.1), 且阅读框架正确见附图 1 (结果图见《国际检验医学杂志》网站主页“论文附件”)。

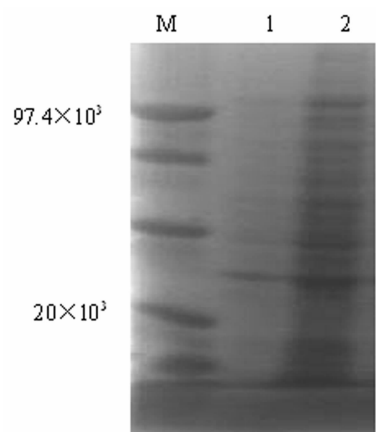
2.3 重组质粒的诱导表达 经 12% SDS-PAGE 电泳发现, 含 pET28a/gB 重组质粒的 BL21 (DE3) 经诱导后表达相对分子质量约为 22×10^3 的 Ni/gB 融合蛋白, 与预期结果相符; Ni/gB

融合蛋白以可溶性蛋白形式存在于超声离心后的上清中, 见图 3。



M: 2 000 bp DNA 标准带; 1~9: PCR 扩增产物。

图 2 PCR 扩增产物电泳鉴定图



M: 蛋白质相对分子质量标准带; 1: 超声裂解诱导产物的离心沉淀; 2: 超声裂解诱导产物的离心上清。

图 3 重组质粒表达的 SDS-PAGE 电泳分析

2.4 重组蛋白的活性鉴定 对已知 60 例阳性血清、60 例阴性血清进行检测, 57 例阳性符合, 58 例阴性符合, 见附图 2、3 (结果图见《国际检验医学杂志》网站主页“论文附件”)。pET28a/gB 融合蛋白作为检测抗原的灵敏度为 95.0% (57/60); 特异度为 96.7% (58/60)。

3 讨 论

经鉴定, pET28a/gB 融合蛋白以 95.0% 的较高灵敏度和 96.7% 的高特异度与相应对照血清发生反应。初步证明, 虽然原核表达系统在蛋白表达后期缺乏糖基化、磷酸化等修饰过程, 表达蛋白与天然蛋白的构象差距往往较大, 生物学活性难以较好地保存^[7], 但本研究中表达的 pET28a/gB 融合蛋白却很好地保留了 gB 天然蛋白相应的生物活性。

HCMV 在其编码的 65 种糖蛋白中, gB 蛋白的抗原性研究最为清楚, 其中共发现了 3 个线性化抗体结合位点: AD-1 (560~640)、AD-2 (64~72) 和 AD-3 (50~54)^[8], 可诱导机体产生中和抗体, 因此许多学者将其作为疫苗研制的靶抗原。

本文根据 HCMV AD169 株全基因序列设计引物, 扩增主要抗原区域, 获得了高特异度和高灵敏度的抗原, 不仅对提高目前 HCMV 免疫学检测的灵敏度和特异度具有重要实用价值, 同时对研制 HCMV 基因工程疫苗也具有重要指导意义。接下来, 本研究组仍将继续加大对对照血清样本量, 对重组蛋白进行更广泛的活性鉴定, 以期最终开发出以重 (下转第 393 页)

以上的精子,每样本检测 2 次并取平均值。流式细胞仪测定精子凋亡率,设定阴、阳性对照。将正常精液作为阴性对照,用氨甲蝶呤诱导精子凋亡(即接触 6 h)的精液作为阳性对照^[6]。

1.4 统计学处理 采用 SPSS10.0 软件进行统计学分析,计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间比较采用 *t* 检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

少精子症组凋亡率为 $(27.0 \pm 11.2)\%$,弱精子症组凋亡率为 $(16.8 \pm 9.8)\%$,精子畸形组凋亡率为 $(23.0 \pm 9.9)\%$,分别与相应的作为对照的正常组进行比较,差异均有统计学意义 ($P < 0.01$);正常生育组与不育症组的凋亡率分别为 $(16.0 \pm 7.5)\%$ 、 $(8.4 \pm 9.4)\%$,差异有统计学意义 ($P < 0.01$)。见表 1~4。

表 1 不同精子密度组间凋亡率比较($\bar{x} \pm s$)			
分组	<i>n</i>	精子密度($\times 10^6$ /mL)	凋亡率(%)
少精子症组	40	13.4±1.8	27.0±11.2*
精子密度正常组	12	99.7±77.7	12.7±7.9

*: $P < 0.01$,与精子密度正常组比较。

表 2 不同 PR%组间凋亡率比较($\bar{x} \pm s$)			
分组	<i>n</i>	PR%	凋亡率(%)
弱精子症组	36	38.2±11.8	16.8±9.8*
PR%正常组	16	67.5±9.0	8.9±8.8

*: $P < 0.01$,与 PR%正常组比较。

表 3 不同精子形态组间凋亡率比较($\bar{x} \pm s$)			
分组	<i>n</i>	精子正常形态率(%)	凋亡率(%)
精子畸形组	8	3.5±0.8	23.0±9.9*
精子形态正常组	44	12.7±5.6	11.8±7.3

*: $P < 0.01$,与精子形态正常组比较。

表 4 不同生育结局组间凋亡率比较($\bar{x} \pm s$)			
分组	<i>n</i>	年龄(岁)	凋亡率(%)
不育症组	36	30.1±4.3 [△]	16.0±7.5*
正常生育组	16	29.0±5.0	8.4±9.4

*: $P < 0.01$,与正常生育组比较;[△]: $P > 0.05$,与正常生育组比较。

3 讨 论

在体外,不同个体的精子凋亡差异较大^[7]。精子凋亡在不同生理或病理状况下表现不同,如果要将精子凋亡作为一项男性不育的检测指标,应严格控制受检对象的纳入标准,如存在静脉曲张等男性疾病,可能导致结果出现较大偏差。

笔者采用了胡静等^[3]等建立的流式细胞术检测法,进行了精子凋亡的检测。发现精子凋亡率在少精子症、弱精子症、精子畸形组中均有不同程度的升高。精子质量差的患者一般伴随有精子凋亡的异常,而异常的精子凋亡可能影响患者的生育结局。本研究检测的例数偏少,还需要通过增加标本量或采用荟萃分析的方法进行验证。

精子凋亡与男性不育有着非常密切的关系。但需要注意的是精子凋亡率的检测由于方法学的缘故个体差异较大,影响检测结果的影响因素较多,目前只建议作为精子生育力评估的一项参考指标。

参考文献

[1] 崔进,张雅洁,胡欣荣,等. 病理学[M]. 北京:北京科学出版社, 2007:16-17.

[2] 王雪松,张才田,崔毓桂,等. 采用 TUNEL 检测人精子凋亡及其初步应用[J]. 江苏医药,2008,34(1):91.

[3] 胡静,范立青. 精子凋亡检测技术的研究进展[J]. 中国医师杂志, 2007,9(11):1577-1579.

[4] 世界卫生组织. 世界卫生组织男性不育标准化检查与诊疗手册 [M]. 北京:人民卫生出版社,2007.

[5] 世界卫生组织. 世界卫生组织人类精液检查与处理实验室手册 [M]. 5 版. 北京:人民卫生出版社,2011.

[6] Baccetti B, Collodel G, Piomboni P, et al. Apoptosis in human ejaculated sperms cells[J]. J Submicrosc Cytol Pathol, 1996, 28(4): 587-596.

[7] 岳焕勋,李福平,蒋敏,等. 精液中凋亡精子与精液分析参数的相关性研究[J]. 中华男科学杂志,2007,13(11):1032-1034.

(收稿日期:2013-10-12)

(上接第 391 页)

组蛋白代替传统的全病毒作为检测抗原的实用型 HCMV 特异性免疫学检测试剂盒。

参考文献

[1] Jose J, Garcla-Ramirez G, Ruchti F. Dominance of virus over host factors in Cross-Species activation of human cytomegalovirus early gene expression[J]. J Virol, 2001, 75(1): 26-35.

[2] Ogawa H, Suzutani T, Baba Y, et al. Etiology of severe sensorineural hearing loss in children: Independent impact of congenital cytomegalovirus infection and GJB2 mutations[J]. J Infect Dis, 2007, 195(6): 782-788.

[3] 许丽锋, 张中洋, 李秀玲, 等. 人巨细胞病毒 gB 基因真核表达载体的构建与鉴定[J]. 中国生物制品学杂志, 2004, 17(5): 284-286.

[4] 史文元, 颜复生, 曾焱华, 等. 人巨细胞病毒 gB 和 ppl50 融合基因表达载体的构建及其免疫活性研究[J]. 中华实验和临床病毒学

杂志, 2010, 24(3): 187-191.

[5] Lehner R, Meyer H, Mach M. Identification and characterization of a human cytomegalovirus gene coding for a membrane protein that is conserved among human herpesviruses[J]. J Virol, 1989, 63(9): 3792-3800.

[6] 陆健. 蛋白质纯化技术及应用[M]. 北京: 化学工业出版社, 2005: 12-15.

[7] 王正茂, 李琳, 管文燕, 等. 单纯疱疹病毒 I 型糖蛋白 D 胞外区的真核表达及生物学活性分析[J]. 生物工程学报, 2010, 26(5): 657-663.

[8] Jacobson MA, French M. Altered natural history of AIDS-related opportunistic infections in the era of potent combination antiretroviral therapy[J]. AIDS, 1998, 12 Suppl A: S157-163.

(收稿日期:2013-10-07)