

· 论 著 ·

人巨细胞病毒 pp65 基因片段的原核表达及鉴定

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 利用基因工程方法表达人巨细胞病毒 pp65 基因片段, 并对表达的目的蛋白进行鉴定。方法 根据 genebank 所查的 HCMV PP65 基因和相关文献选取特异性反应的基因片段, PCR 扩增目的基因, 将 PCR 产物切胶回收后与 pET-28a 载体连接, 转化 BL21, 筛选。对重组质粒进行诱导表达, 采用 ELISA 间接法鉴定纯化的 GST/pp65 融合蛋白的抗原性进行鉴定。结果 目的蛋白经诱导后表达于上清液中, 经鉴定目的蛋白具有预期的抗原活性。结论 GST/pp65 融合蛋白的获得, 为进一步研制以重组蛋白代替传统的全病毒作为检测抗原的新型人巨细胞病毒特异性免疫学检测试剂盒奠定了基础。

关键词:人巨细胞病毒; pGEX-4T-1 质粒; 表达; 鉴定

DOI:10.3969/j.issn.1673-4130.2015.16.022

文献标识码:A

文章编号:1673-4130(2015)16-2344-03

Construction, expression and identification of the pp65 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 pp65 by inducing the pGEX-4T-1/pp65 and identifying the expressed Protein. **Methods** According to the gene sequence of HCMV PP65 on Genebank and the gene sequence reported in articles which encoding protein, the target gene was selected and the entire gene sequence was amplified with PCR reaction. PCR products were collected and purified, ligated with pGEX-4T-1 vector, and was transfected into BL21. The recombinant plasmid was induced with the optimum condition, and then the expressed product was identified by SDS-PAGE. The antigen activity of pET28a/gB protein was identified by indirect ELISA. **Results** The target protein is in the supernatant, and it remained antigen activity which could be used in IgG detection. **Conclusion** The GST/pp65 protein is successfully expressed and it is hopeful antigen for the type-specific serological detection of HCMV IgG.

Key words: human cytomegalovirus; pGEX-4T-1 vector; expression; identification

人巨细胞病毒(HCMV)属双链 DNA 病毒,属疱疹病毒家族成员之一,在人群中的感染十分普遍,目前研究认为其感染率高低与诸多因素有关(经济水平、习俗等)^[1]。当感染发生在免疫功能不成熟或缺陷的人群中时,可引起严重疾病, HCMV 可经母体胎盘感染胎儿,引起流产、死胎、畸形、发育迟缓等先天性疾病^[2]。研究报道, pp65 蛋白是晚期基因 UL83 编码的一种分子质量为 65×10^3 的被膜蛋白,属于低基质磷酸化蛋白。Pepperl 等^[3]报道, pp65 是被膜蛋白抗原重要的一种,是病毒血症中的主要蛋白抗原。据 Rha 等^[4]报道,国外普遍采用 pp65 抗原血症检测法,也是现在对 HCMV 检测最可靠的方法。因进口试剂价格昂贵,目前国内主要以检测血清中 HCMV 抗体为主, pp65 蛋白为 HCMV 表达的一种早期结构蛋白,是表明 HCMV 活动性感染的一项早期指标。

本研究是将 HCMV pp65 编码基因插入原核表达载体 pGEX-4T-1 中,构建重组表达载体 pGEX-4T-1/pp65, 然后对重组质粒进行诱导表达,采用 ELISA 间接法对 GST/pp65 融合蛋白的抗原活性进行鉴定。为制备大量 HCMV pp65 单克隆抗体和建立 pp65 抗原血症检测提供依据,为研制以重组蛋白作为检测抗原的人巨细胞病毒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 含 pGEX-4T-1 载体质粒的基因工程菌 DH5a、大肠杆菌表达菌株 BL21(DE3),由深圳市赛尔生物技术研究

保存;人巨细胞 AD169 标准株购自武汉病毒研究所;临床血清样本来自中国人民武装警察部队广东省边防总队医院检验科其中阳性 60 份,阴性 60 份,共 120 份;迈康准 TM 巨细胞 IgG 抗体检测试剂盒(酶联免疫法),购自 Trinity 公司。ST-360 酶标仪,购自上海市科华实验系统有限公司。UNIQ-10 柱式病毒 DNA 抽提试剂盒、UNIQ-10 柱式 PCR 产物纯化试剂盒、UNIQ-10 柱式质粒小量抽提试剂盒、UNIQ-10 柱式 DNA 胶回收试剂盒均购自上海生工生物工程技术有限公司。

1.2 方法

1.2.1 引物的设计及合成 根据人巨细胞病毒 AD169 株基因库序列^[5],设计了 1 对寡聚核苷酸引物,上游引物为 P1:5'-CGG GAT CCT ACT TTA CGG GCA GCG AGG TG-3';下游引物为 P2:5'-CGG AAT TCT TAG GCC GGA TTG TGG ATT TCG TT-3'(在上游增加酶切位点 BamH I;在下游增加酶切位点 EcoR I),由上海生工生物工程技术有限公司合成。

1.2.2 PCR 扩增 PCR 反应体系如下: $5 \times$ PrimeSTARTM Buffer(Mg^{2+} plus)取 $10 \mu L$, dNTP Mixture(各 2.5 mmol/L)取 $4 \mu L$, 上游引物($10 \mu \text{mol/L}$)取 $1 \mu L$, 下游引物($10 \mu \text{mol/L}$)取 $1 \mu L$, HSV-1 病毒 DNA 模板取 $0.5 \mu L$, PrimeSTARTM HS DNA Polymerase($2.5 \text{ U}/\mu L$)取 $0.5 \mu L$, 灭菌蒸馏水取 $33 \mu L$, 轻轻混匀,总体积为 $50 \mu L$ 。按以下条件进行 PCR 扩增: 98°C 预变性 5 min ; 98°C 变性 10 s , 68°C 复性 15 s , 72°C 延伸 60 s ,

30 个循环;最后 72 °C 延伸 10 min。

1.2.3 重组质粒的构建及鉴定 将纯化 PCR 产物和 pGEX-4T-1 载体质粒 DNA, 分别经 EcoR I 和 Bam H I 双酶切, 用“TaKaRa DNA Ligation Kit Ver 2. 0”连接, 构建重组质粒 pGEX-4T-1/pp65, 转化大肠杆菌 BL21 感受态细胞。经酶切鉴定, 并同时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 将已确认转化含有 pGEX-4T-1/pp65 重组质粒的大肠杆菌 BL21(DE3), 在最适的诱导条件 ($A_{600}=0.6\sim 0.7$, IPTG 最适浓度为 0.6 mmol/L, 37 °C 诱导培养 4 h) 下, 进行目的蛋白的诱导表达, 取诱导后的菌液, 采用冰浴超声波法破碎细菌^[6], 然后进行超声离心, 分别取上清和沉淀进行 SDS-PAGE 电泳鉴定, 以确立目的蛋白的表达情况。

1.2.5 表达产物的纯化 取 100 mL 诱导菌液, 离心沉淀, 超声破菌, 洗涤, 沉淀溶于 8 mol/L 尿素中, 取上清液, 加样于金属螯合亲和层析柱, 用咪唑竞争法洗脱目的蛋白。

1.2.6 重组蛋白的活性鉴定 选用 GST/pp65 融合蛋白作为包被抗原, 以已经确立的最佳反应条件(蛋白包被浓度最适为 45 ng/孔、HRP 标记鼠抗人 IgG 单抗浓度最适稀释比例为 1:3 000), 用 ELISA 间接法对 120 份临床对照血清进行检测, 分析重组蛋白的抗原活性。

2 结 果

2.1 目的片段的扩增 选择 HCMV 基因组 DNA 作为模板, P1/P2 作为引物扩增目的片段, 用 0.8% 琼脂糖凝胶对 PCR 产物进行电泳分析, 结果表明, 在相对分子量约为 1 200 bp 处有一条清晰的特异性扩增条带, 与预期大小(1 200 bp)基本一致。见图 1(见《国际检验医学杂志》网站主页“论文附件”)。

2.2 重组质粒的鉴定及测序 选取筛选得到的阳性菌, 用 UNIQ-10 柱式质粒小量抽提试剂盒提取质粒 DNA, 然后用 EcoR I 和 BamH I 进行双酶切鉴定重组质粒, 0.8% 琼脂糖凝胶电泳结果显示, 可见约 4 900 bp 的载体片段和约 1 200 bp 的目的片段两条带, 见图 2(见《国际检验医学杂志》网站主页“论文附件”), 与理论片断大小一致。鉴定此菌为含有 pGEX-4T-1/gG-1 重组质粒的阳性菌。将鉴定含有 pGEX-4T-1/pp65 重组质粒的阳性菌送往上海生工生物工程技术有限公司进行 DNA 测序, 结果表明, 重组质粒的 DNA 序列与 HCMV 基因序列的相应部分完全一致(AY301013. 1), 且阅读框架正确。

2.3 重组质粒的诱导表达 含 pGEX-4T-1/pp65 重组质粒的 BL21(DE3)的诱导表达产物经 12% SDS-PAGE 电泳发现, 在相对分子量约为 71×10^3 处有一条带, 可能为 GST/pp65 融合蛋白, 与预期结果一致;通过对上清和沉淀进行离心电泳分析, GST/pp65 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(见《国际检验医学杂志》网站主页“论文附件”)。

2.4 重组蛋白的活性鉴定 已知的 60 份阳性、阴性血清是经美国 Trinity 公司的巨细胞 IgG 抗体检测试剂盒(酶联免疫法)确认的, 本研究对这 120 份血清进行检测, 检测结果为 54 份阳性符合, 56 份阴性符合, 表 1、2(见《国际检验医学杂志》网站主页“论文附件”)。GST/pp65 融合蛋白作为检测抗原的灵敏度 = $54/60\times 100\% = 90.0\%$; 特异度 = $56/60\times 100\% = 93.3\%$ 。表明该蛋白作为检测抗原, 结果与美国 Trinity 公司的巨细胞 IgG 抗体检测试剂盒有较高的一致性, 可作为检测 HCMV 试剂的原料。

3 讨 论

人巨细胞病毒感染率为 80%~90%, 感染初期大多呈潜

伏状态或隐性状态, 一般不表现临床症状, 因此, 实验室诊断变得越来越重要。在用 ELISA 方法检测相应抗体时, 酶标板上包被的抗原是决定该方法敏感度和特异度最重要的因素。Weber 等^[7]研究发现, 采用不同的 CMV 重组抗原和全病毒纯化抗原进行包被, 且分别对 CMV-IgG 抗体进行检测, 通过比较发现, 其敏感度和特异度基本无差异。但是, 国内外也有研究发现^[8], 包被重组抗原要比包被全病毒纯化抗原效果好。pp65 蛋白是 HCMV 激发机体保护性体液和细胞免疫的主要靶蛋白^[9]。本文亦通过重组抗原进行鉴定, 实验结果显示, pGEX-4T-1/pp65 融合蛋白与对照血清发生反应, 敏感度和特异度分别高达 90.0% 和 93.3%, 与美国 Trinity 公司的巨细胞 IgG 抗体检测试剂盒有较高的一致性, 可作为检测 HCMV 试剂的原料。初步研究证明, 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^[10], 但表达的 pGEX-4T-1/pp65 融合蛋白却很好地保留了 pp65 天然蛋白相应的生物活性。

本研究根据 genbank 所查的 HCMV PP65 基因和相关文献选取特异性反应的基因片断, PCR 扩增目的基因, 将 PCR 产物切胶回收后与 pET-28a 载体连接, 转化 BL21, 筛选。重组质粒经诱导表达后制备得 GST/pp65 融合蛋白, 该抗原可稳定保存, 并通过 ELISA 方法验证了抗原的活性, 不仅对提高目前 HCMV 免疫学检测的灵敏性和特异性具有重要实用价值, 同时对研制 HCMV 基因工程疫苗也具有重要指导意义。随着对 HCMV 研究的深入, 对重组蛋白功能及特性的了解, 研制出的重组抗原的效果可与进口试剂检测效果相一致, 且低廉的价格更适宜在国内推广应用。GST/pp65 融合蛋白的获得, 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人巨细胞病毒特异性免疫学检测试剂盒奠定了基础。

参考文献

- [1] Plotkin SA. Human cytomegalovirus vaccine is an orphan[J]. Dev Biol(Basel), 2002, 110(2): 73-80.
- [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(2): 782-788.
- [3] Pepperl S, Munster J, Mach M, et al. Dense bodies of human cytomegalovirus induce both humoral and cellular immuneresponses in the absence of viral gene expression[J]. J Virol, 2000, 74 (13): 6132-6146.
- [4] Rha B, Redden D, Benfield M, et al. Correlation and clinical utility of pp65 antigenemia and quantitative polymerase chain reaction assays for detection of cytomegalovirus in pediatric renal transplant patients[J]. Pediatr Transplant, 2012, 16(6): 627-637.
- [5] Chee MS, Bankier AT, Beck S, et al. Analysis of the protein-coding content of the sequence of human cytomegalovirus strain AD169[J]. Curr Top Microbiol Immunol, 1990, 154(2): 125-169.
- [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] Weber B, Berger A, Rabenau H. Human cytomegalovirus infection: diagnostic potential of recombinant antigens for cytomegalovirus antibody detection[J]. J Virol Methods, 2001, 96(2): 157-170.
- [8] Grangeot Keros L, Cointe D. Diagnostic and prognostic markers of HCMV infection [J]. J Clin Virol, 2001, 21(3): 213-221.
- [9] Provenzano M, Moeillin S, Bettinotti M, et al. (下转第 2348 页)

合能力改变的结构,在缺血发生 6~10 min 后即可在血清中检测到,优点在于它是基于心肌细胞死亡后才能检测到,可及时逆转心肌细胞死亡,临床上有效预防心肌梗死的发生。本次试验病例组患者 IMA 水平高于对照组,但 P 值无意义,考虑原因可能为样本量不足造成的假阴性结果,收集的患者为发病至入院小于 24 h 患者,患者入院时间参差不齐,IMA 灵敏度高、半衰期短,故可能已降至正常范围。有研究报道,IMA 对于 UA 早期诊断,危险分层有一定意义^[5]。如果联合肌钙蛋白及心电图诊断,诊断效能可达到 80%~100%^[6]。美国 FDA 已批准 IMA 作为早期诊断心肌缺血的标志物。

H-FABP 在心脏、骨骼肌、平滑肌、乳腺上皮细胞、大动脉、肾脏、肺脏、大脑、胎盘和卵巢等组织中都有表达,但主要对脂肪酸有高度需求的组织,如心肌、骨骼肌等,只有当细胞开始利用脂肪酸作为能源时 H-FABP 才迅速上升,而且 H-FABP 的表达随着对脂肪酸依赖性代谢的增强而提高^[7]。H-FABP 在心肌损伤后 0.5~2 h 释放入血,可早期诊断 UA^[8]。本次研究结果显示,病例组与对照组相比,H-FABP 水平差异有统计学意义($P < 0.05$),各危险分层水平差异无统计学意义($P > 0.05$),与多数研究结果一致^[9]。有前瞻性研究报道,H-FABP 浓度增高可能使患者再发心血管事件风险显著增加,H-FABP 浓度增高可能是 ACS 患者预后的独立预测因子^[10]。

BNP 是心脏内分泌激素,当心室血容积增加和左心室压力超负荷时即可刺激 BNP 基因高度表达,造成 BNP 合成、分泌、释放增加。本实验结果表明对照组与病例组 BNP 水平差异有统计学意义($P < 0.05$),在危险分层后发现高危组 BNP 水平高于低危组和中危组,差异有统计学意义($P < 0.05$),说明 BNP 水平可以评价心功能,结论与多数试验一致^[11]。国外研究表明,血浆 BNP 水平升高幅度与 HF 严重程度是一致的^[12]。国内有前瞻性研究表明,BNP 水平是患者心血管事件发生的独立危险因素,不同 BNP 水平对患者的预后影响不同,界值超过 1 910 ng/L 的患者预后较差^[13]。

Hcy 是一种含硫氨基酸,作为蛋氨酸代谢的中间产物,其本身并不参与蛋白质的合成,其重新生成蛋氨酸的过程是已知的体内能利用 N5 甲基四氢叶酸的唯一反应,与体内一碳单位代谢有着密切关系,其作为心血管疾病的独立危险因子被临床广泛认同。本实验结果表明对照组与病例组 Hcy 水平差异有统计学意义($P < 0.05$),各危险分层中 Hcy 水平差异无统计学意义($P > 0.05$)。不少研究结果表明 Hcy 浓度检测可作为 ACS 患者的常规检测指标,其浓度水平变化对心功能分级具有一定参考价值^[14]。近期国内有相关研究数据表明,ACS 患者 Hcy 显著升高,亚甲基四氢叶酸还原酶 C677TTT 基因突变是主要决定因素^[15]。

综上所述,H-FABP、BNP 及 Hcy 对临床诊断 UA 有一定意义,BNP 对患者病情危险程度有提示作用。本次试验 IMA 阴性结果及 Hcy 在危险分层中无差异的结果,考虑主要与样本量不足有关,待进一步完整试验。

参考文献

- [1] Bhagavan NV, Lai EM, Rios PA, et al. Evaluation of human serum albumin Cobalt binding assay for the assessment of myocardial ischemia and myocardial infarction[J]. Clin Chem, 2003, 49(4): 581-585.
- [2] 郭继鸿. 急性冠脉综合征心电图[J]. 临床心电学杂志, 2006, 15(2): 128-137.
- [3] 薛萍, 孔健, 王霞. 探讨肌红蛋白的测定对于临床诊断不稳定型心绞痛的价值[J]. 中国实验诊断学, 2014, 18(4): 608-610.
- [4] 中华医学会心血管病学分会·中华心血管杂志编辑委员会. 不稳定型心绞痛和非 ST 段抬高心肌梗死诊断与治疗指南[J]. 中华心血管病杂志, 2007, 35(4): 295.
- [5] Seth H, Maximilian F, Harald G, et al. Snitroso human serum albumin reduce ischemia/reperfusion injury in pig heart after unprotected warm ischemia[J]. CRAAP, 2007, 10(22): 1326.
- [6] Peacock F, Morris DL, Anw AS, et al. Meta-analysis of ischemia-modified albumin to rule out acute coronary syndromes in the emergency department[J]. Am Heart, 2006, 152(2): 253-262.
- [7] 陈志辉, 徐良梅, 单安山. 脂肪酸结合蛋白及其基因[J]. 东北农业大学学报, 2006, 37(5): 689-692.
- [8] Nakata T, Hashimoto A, Hase M, et al. Human heart-type fatty acid-binding protein as an early diagnostic and prognostic marker in acute coronary syndrome[J]. Cardiology, 2003, 99(2): 96-104.
- [9] 李洁琪, 李晓翔, 吴立荣. 心脏型脂肪酸结合蛋白在不稳定型心绞痛患者危险分层诊断中的价值[J]. 山东医药, 2009, 49(9): 1-2.
- [10] 刘海波, 郭小芳, 张丽梅, 等. 心肌脂肪酸结合蛋白浓度对急性冠脉综合征临床转归的预测价值[J]. 中国病理生理杂志, 2011, 27(2): 238-242.
- [11] 章小军. 血浆 BNP 检测对心力衰竭患者心功能分级评价中的作用[J]. 中国实验诊断学, 2012, 16(3): 472-474.
- [12] Palazzuoli A, Gallotta M, Quatrini I, et al. Natriuretic peptides (BNP and NT-proBNP): measurement and relevance in heart failure[J]. Vasc Health Risk Manag, 2010, 6(2): 411-418.
- [13] 邓新桃, 石桂良, 王如兴, 等. B 型利钠肽水平对慢性心力衰竭患者预后的影响[J]. 中华心血管病杂志, 2012, 40(6): 462-464.
- [14] 雷登顺. 探讨同型半胱氨酸和高敏 C 反应蛋白作为慢性心力衰竭危险因子的临床意义[J]. 中国实验诊断学, 2013, 17(8): 1434-1436.
- [15] 尹春琳, 徐东, 魏嘉平, 等. 急性冠状动脉综合征患者同型半胱氨酸与亚甲基四氢叶酸还原酶基因多态性及其与冠心病其它危险因素的相关分析[J]. 中国循环杂志, 2013, 28(4): 254-257.

(收稿日期: 2015-05-29)



(上接第 2345 页)

657-663.

Identification of immune dominant cytomegalovirus epitopes using quantitative realtime polymerase chain reactions to measure interferon-gamma production by peptide-stimulated peripheral blood mononuclear cells[J]. J Immunother, 2002, 25(4): 342-351.

(收稿日期: 2015-03-15)

[10] 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):

