

研究工作

人巨细胞病毒糖蛋白 52kD 抗原编码区段在大肠杆菌中高效表达*

吴 均 陈俊杰 唐泽媛

(华西医科大学儿科教研室和生物化学教研室, 成都 610041)

顾建人 万大方 马安卿 曲淑敏 李宏年

(上海市肿瘤研究所生物化学与分子生物学研究室)

提 要

采用聚合酶链反应, 从人巨细胞病毒重组质粒克隆 pBH 中扩增并分离了含糖蛋白 52kD 抗原编码区段; 扩增产物经纯化和 EcoR I 酶切后, 与相同酶切的高效表达质粒 pBV-220 重组, 构成含人巨细胞病毒糖蛋白 52kD 抗原编码区段的高效表达质粒 pHCMV 52; 用此重组表达质粒转化大肠杆菌 JM101, 经增殖和 42℃ 温度诱导以及筛选。阳性克隆经 12.5% SDS-PAGE 表明, 外源基因表达蛋白质量占菌体溶解液中蛋白质总量 20%。蛋白质印迹 (Western blot) 杂交证实该表达产物具有免疫原性。

关键词 人巨细胞病毒 (HCMV), 糖蛋白, 表达质粒, 聚合酶链反应 (PCR)

人巨细胞病毒 (HCMV) 感染极为普遍, 如下:

孕妇感染可引起胎儿早产和先天畸形, 婴幼儿感染则导致血液、呼吸、肝脏和神经等多种疾病。HCMV 也是使免疫抑制个体如肿瘤、接受器官移植和艾滋病等患者致死的重要原因^[1]。HCMV 糖蛋白 52kD 是该病毒已知具有免疫原性强的蛋白质之一。近年研究表明, 急性 HCMV 感染患者血清中存在高滴度抗糖蛋白 52kD 抗体^[2]。研究 HCMV 糖蛋白 52kD 基因片段及其体外表达, 有助于阐明 HCMV 致病及免疫机理, 对于 HCMV 感染的诊断、急性与非活动期的鉴别以及防治等具有实用价值。作者在构建 HCMV 糖蛋白 52kD 基因片段的重组质粒 pBH 基础上, 采用近代新技术——聚合酶链反应 (polymerase chain reaction, PCR), 扩增该糖蛋白抗原编码区段, 构建重组表达质粒并在宿主菌中获得表达产物。现报道

1 材料和方法

1.1 材料

含 HCMV 糖蛋白 52kD 基因片段的重组质粒 pBH 由本实验组构建^[3]。高效表达质粒 pBV-220 由预防医学科学院病毒所张志清赠送。DNA 引物由中国科学院上海分院细胞生物化学研究所合成。限制性内切酶 EcoR I (BRL), T₄ DNA 连接酶 (中国医学科学院基础医学研究所), 小牛肠碱性磷酸酶 (华美生物工程公司), Taq DNA 聚合酶 (上海复旦大学遗传所), protein A 及 ¹²⁵I (Boehringer-Mannherim Biochemicals), 其它试剂均为国产分析纯。

* 国家教委博士点专项基金资助项目。

收稿日期: 1990-12-12 修回日期: 1991-06-18

1.2 方法

1.2.1 质粒 DNA 提取制备 按常规方法^[4]进行。

1.2.2 聚合酶链反应扩增并分离 HCMV 糖蛋白 52kD 抗原结构域编码区段 根据对 HCMV 糖蛋白 52kD 基因全序列分析,设计并合成了位于核苷酸 1846—2877 之间的一对引物。其序列分别为 5'-AAAGAATTCATGAA-CGTGAAGGAATCG-3'(上游引物), 5'-ATA-AAGCTTAATTCAGACGTTCTCTTCTTC-3'(下游引物)。按本室常规方法^[5]进行扩增。

1.2.3 DNA 片段连接和转化 上述 PCR 产物经 EcoR I 酶切,与相同酶切的表达载体 pBV-220 按 1:4 比例混合,反应总体积 10 μ l,其中含 2 μ l 5 $\times$ ligation buffer (250m mol/L Tris-Cl, pH7.6, 50m mol/L MgCl₂, 5m mol/L ATP, 5m mol/L DTT, 25% (W/V) PEG-8000), 1 μ l (~16U) T₄ DNA 连接酶。置于 12 $^{\circ}$ C 水浴 24h,再于 4 $^{\circ}$ C 冰箱 6h。克隆转化按 Hannahan 等^[6]方法进行。

1.2.4 ¹²⁵I 标记蛋白质^[4] 取 20 μ l (~1 μ g) 蛋白 A,加入 50 μ l 0.4mol/L PBS (pH7.4)中,再加 2mCi Na ¹²⁵I,混匀,加 25 μ l (~1 μ g)新配制的氯胺 T,于 4 $^{\circ}$ C 振摇 2min 后,加入 100 μ l 用 PBS 配制的偏重亚硫酸钠(2.4 μ g/ μ l)终止反应,再加 50 μ l 用上述磷酸缓冲液 (PBS)液配制的 KI (2 μ g/ μ l)作载体。总反应体积 270 μ l。经 Sephadex G-50 层析柱 (1cm $\times$ 20cm),收集第一个放射高峰即 ¹²⁵I-蛋白 A 备用。

1.2.5 人工合成 HCMV 多肽抗体制备 根据 HCMV 糖蛋白 52kD 基因序列的微机系统分析,调出其相应的氨基酸序列及其亲水性与疏水性图谱,人工合成 25 个氨基酸的多肽(位于第 677—701 残基之间)。其序列为: Phe-Asp-Leu-Glu-Glu-Ile-Met-Arg-Glu-Phe-Asn-Ser-Tyr-Lys-Gln-Arg-Val-Lys-Tyr-Val-Glu-Asp-Lys-Val-Val。用此多肽免疫家兔,获得抗血清效价为 1:400。

1.2.6 菌落原位杂交和 Western 转移

作菌落原位杂交用的硝酸纤维素膜制备按本室常规方法^[7]。将固定菌落的薄膜浸入 20ml PBS 预结合液(含 1.5m mol/L KH₂PO₄, 8m mol/L Na₂HPO₄, 3m mol/L KCl, 140m mol/L NaCl, 0.5% BSA, 5% 脱脂奶粉),于室温振摇 1h,再将膜转入 10ml 含有抗人工合成 HCMV 多肽的抗血清 400 μ l 的 PBS 中,室温振摇 3h 后,再由 0.1% NP 40-PBS 漂洗 3 次, PBS 漂洗 2 次,每次为 30min。将膜浸入 15ml 含有 ¹²⁵I-蛋白 A 200 μ l 的 PBS 中,在 4 $^{\circ}$ C 振摇孵育 3h 后,用 0.1% NP 40-PBS 漂洗 3 次,每次 1h,再用流水冲洗 2h,自然干燥后放射自显影,筛选出阳性表达克隆。

1.2.7 表达产物提取和检测^[8] 阳性克隆挑入 5ml 含氨苄青霉素 (50 μ g/ml) 的 Luria-Bertani 培养基中,于 37 $^{\circ}$ C 振摇过夜。按 1:50 比例转种至 50ml LB,再于 37 $^{\circ}$ C 振摇培养 2—3h,转至 42 $^{\circ}$ C 诱导 2—6h,随后于 4 $^{\circ}$ C 5000 r/min 离心 10min 收集沉淀,加 100 μ l 0.9% NaCl 悬浮细胞,再加等体积 2 $\times$ SDS gel-loading buffer(含 100m mol/L Tris-Cl pH6.8, 8% 甘油, 0.01% 溴酚蓝, 100mmol/L β -巯基乙醇, 0.1% SDS, 0.9% NaCl),于 100 $^{\circ}$ C 煮沸 20min,离心留上清液。取 5 μ l 上清液按常规测蛋白质含量^[9],另取约含 60 μ g 蛋白质的上清液作 SDS-PAGE,考马斯蓝 R-250 染色,用 LKB 2202 Ultrosan 激光密度仪于 632.8 nm 波长扫描。用含质粒 pBV-220 的细菌溶解液作空白对照,表达阳性克隆特异蛋白区带百分含量减去对照相应部位的蛋白区带百分含量,即得插入基因片段蛋白质表达的百分含量。

2 结果与讨论

2.1 HCMV 糖蛋白 52kD 基因抗原编码区表达质粒的构建

HCMV 是人细胞感染最为普遍的也是最大的一种疱疹病毒。该病毒基因组为线形双链 DNA 分子,分子量为 150 $\times$ 10⁶,长 225kb,理论上它编码的蛋白质多达 100 种以上, HCMV

感染可导致宿主异常免疫反应如自身免疫反应和免疫抑制。病毒糖蛋白是导致宿主对病毒感染产生免疫反应的重要因素^[10,12]。急性 HCMV 感染患者血清中存在高滴度的抗糖蛋白 52kD 抗体。Cranage 等^[13]报道 HCMV 糖蛋白 B 基因(简称 gB) 序列共 3 125bp, 起始密码 AUG 由第 158 至终止密码第 2 860 个核苷酸处, 共编码 907 个氨基酸, 并发现该基因与单纯疱疹病毒 (HSV) B 基因具同源性。他们将该基因全序列与含痘苗病毒启动子的质粒 pGS 62 体外重组, 首次构建了这一基因片段 (3125bp) 的表达质粒, 在感染重组痘苗病毒的细胞表面检出其表达产物, 用此产物免疫家兔产生中和抗体, 而且此抗体滴度足以保护家兔免于致死性 HCMV 感染。这表明 HCMV gB 基因产物具有重要的生物学意义。Ripalti 等^[2]采用 λ gt11

为载体构建了类似上述的重组表达质粒。鉴于痘苗病毒为载体获得 HCMV B 基因表达产物, 需要较为繁杂的培养程序而且难获大量产物; λ gt11 为载体, 其表达效率也低。故我组采用 pBR₃₂₂ 为载体, 先构建了含 HCMV B 基因的重组质粒 pBH I; 同时对该基因全序列进行微机系统分析, 结果显示该糖蛋白基因序列中存在 13 种限制性内切酶位点^[3]。根据报道, HCMV 诱导中和抗体产生的抗原决定基位于糖蛋白 52kD 第 461—680 氨基酸残基之间^[13]。因此, 我组选择了该基因序列第 1846—2214 核苷酸片段作为插入片段, 长 369bp, 共编码 123 个氨基酸。根据该基因片段意义链和反意义链各自的 5' 端序列合成一对 DNA 引物, 采用 PCR 扩增并分离纯化这一片段(见图 1)。

本文采用高效表达质粒 pBV-220 含有 2

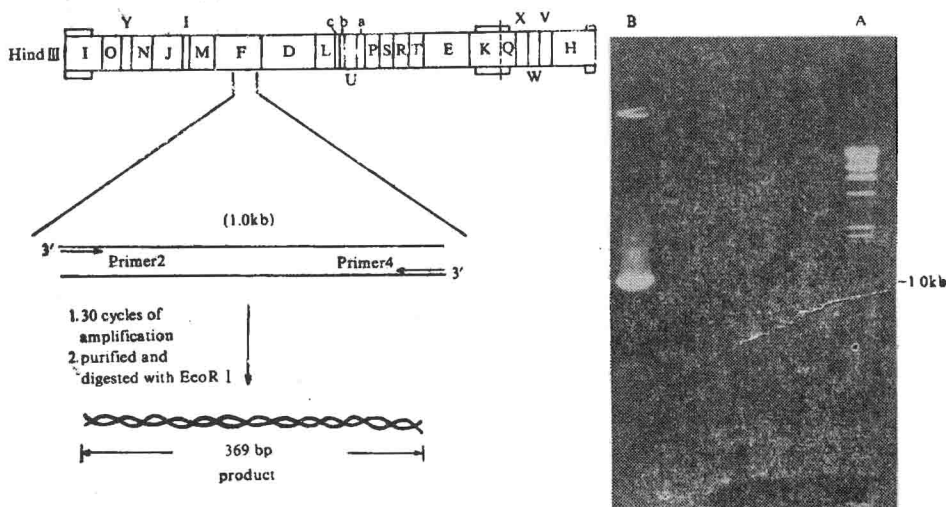


图 1 HCMV 糖蛋白 52kD 抗原编码区扩增和电泳分离

Fig. 1 Diagrammatic representation of amplification and electrophoretic isolation of the human cytomegalovirus (HCMV) glycoprotein 52kD antigenic coding region

A. λ DNA-Hind III marker B. PCR product (1.0kb)

噬菌体的 P_RP_L 双启动子, 它是目前已知的最强的大肠杆菌启动子。但该质粒的启动子下游不含起始密码。因此, 在正向引物设计时, 于 EcoR I 酶接序列下游补加起始密码 AUG。PCR 产物经纯化后用 EcoR I 酶切, 与相同酶切的 pBV-220 连接, 构建了高效表达质粒 pHCMV 52。当此片段正向插入时即可表达。

2.2 pHCMV 52 蛋白质表达的检测和含

量

重组质粒 pHCMV 52 转化大肠杆菌 JM 101, 阳性表达克隆在 37℃ 培养让宿主菌大量增殖, 转至 42℃ 分别诱导 2、4 和 6h, 促外源基因表达, 制备细胞溶解液并经 12.5% SDS-PAGE 和考马斯蓝染色, 结果发现 C₀ 克隆株在分子量约 13kD 处有特异区带, 它与预估的外源基因表达产物长度相近。诱导后该蛋白质表达量占

细胞溶解液中蛋白质总量的 20%。延长诱导时间(超过 2h), 对其表达量无明显影响 (见图 2)

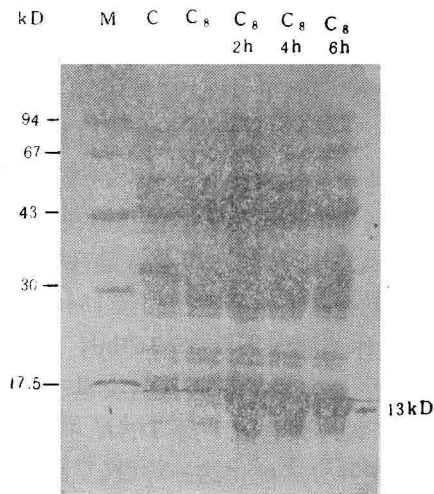


图 2 诱导 2—6h 大肠杆菌溶解液中蛋白质 SDS-PAGE 分析

Fig. 2 12.5% SDS-PAGE analysis of the proteins expressed *E. coli* JM 101 after induction for 2—6 h

M: 标准分子量
C: 含质粒 pBV-220 的 JM 101 作对照
C₈: 含重组体 pHCMV 52 的 JM 101
M: Molecular weight markers
C: JM 101 containing plasmid pBV-220 as a control
C₈: JM 101 containing recombinant pHCMV 52

2.3 抗血清鉴定及其滴度测定

上述 C₈ 克隆株经大量增殖、温度诱导, 溶解液经 SDS-PAGE 制备电泳和考马斯蓝染色定位, 切下相应于 13kD 的特异区带, 凝胶置适量体积 PBS 中捣碎制成匀浆, 按 1:1 比例与不完全福氏佐剂混合, 免疫家兔, 15d 注射一次, 共 3 个月。免疫血清与 HCMV 标准株 AD₁₆₉ 抗原斑点反应, 结果表明 C₈ 克隆株外源基因表达的蛋白质产物具有免疫原活性(见图 3)。经 Western 转移, 硝酸纤维膜上的表达产物与兔抗人工合成 HCMV 多肽的抗血清(效价 1:400)和抗表达产物的抗血清(效价 1:320)反应区带一致(见图 4)。从图 3 和图 4 看出, 用 SDS-PAGE 纯化的抗原所制备的抗体, 不仅与变性抗原也与 HCMV AD₁₆₉ 天然抗原反应。

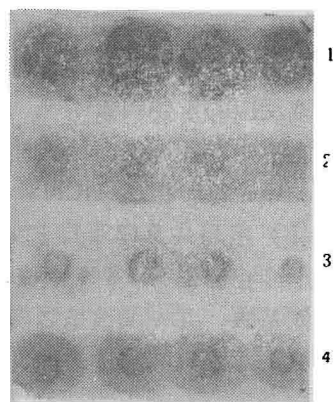


图 3 表达产物的抗血清鉴定(¹²⁵I-标记蛋白 A 检测)

Fig. 3 Identification of antisera to the expressed protein using ¹²⁵I-labelled protein A

1—3 HCMV AD 169 抗原分别与三支兔抗血清反应 4 HCMV AD 169 抗原与 HCMV-ELISA 阳性血清反应

1—3 HCMV AD 169 antigen on nitrocellulose filter reacted respectively with antiserum from three rabbits

4 HCMV AD 169 antigen on nitrocellulose filter reacted with ELISA positive serum from HCMV infected patient

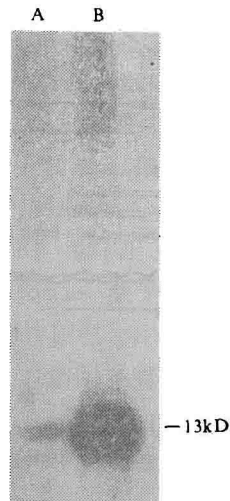


图 4 表达产物抗血清的蛋白质印迹鉴定 (¹²⁵I 标记蛋白 A 检测)

Fig. 4 Western blotting identification of antiserum to the expressed protein detected by using ¹²⁵I-protein A

A. 表达产物与兔抗人工合成 HCMV 多肽抗血清反应;
B. 表达产物与兔抗表达产物的抗血清反应

A. The expressed protein reacted with antiserum to the synthetic polypeptide
B. The expressed protein reacted with antiserum to the expressed protein from C₈ clone

作者以 12 例已知 ELISA-HCMV-IgM 阳性血清和 4 例阴性血清作为受检对象,与经 Western 转移的表达产物反应,用非同位素即辣根过氧化物酶 (HRP) 标记马抗人血清 IgG 取代¹²⁵I-蛋白 A,临床初步检测证实,它与 HCMV-ELISA 实验结果完全一致。上述表明,该表达克隆含有 HCMV 糖蛋白 52kD 抗原决定基的编码序列。

这是国内首次采用基因工程方法制备 HCMV 糖蛋白 52kD 抗原及其抗血清,它为进一步探索其生物学功能及其临床应用奠定了基础。

参 考 文 献

1 Schuster V, Bertifried M, Wiegand H *et al.* *J*

Infect Dis, 1986; **154** (2): 309

2 Ripalti A, Landini Mp, Macarski ES *et al.* *J Gen Virol*, 1989; **70**: 1247

3 吴均,陈俊杰,唐泽媛等. 华西医学报, 1990; **21**(3): 252

4 Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T. *Molecular Cloning*, 2nd ed, New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989: 18. 1—63

5 吴均,陈俊杰,唐泽媛等. 华西医学报, 1991; **22**(2): 117

6 Hanahan D. *J Med Biol*, 1983; **166**: 557

7 吴均,陈俊杰,唐泽媛等, 华西医学报, 1990; **21**(2): 117

8 吴均,唐泽媛,陈俊杰等, 华西医学报, 1992; **23**(1): 13

9 Spector T. *Anal Biochem*, 1987; **86**: 142

10 Greenaway P J, Oram J D, Downing R G *et al.* *Gene*, 1982; **18**: 355

11 Mach M, Utz U, Fleckenstein B. *J Gen Virol*, 1986; **67**: 1461

12 Griffiths P D, Grundy J E. *Biochem J*, 1987; **241**: 313

13 Banks T, Huo B, Kousoulas K *et al.* *J Gen Virol*, 1989; **70**: 979

HIGH-LEVEL EXPRESSION OF GLYCOPROTEIN 52 kD ANTIGENIC DOMAIN OF HUMAN CYTOME- GALOVIRUS IN *ESCHERICHIA COLI*

Wu Jun Chen Junjie Tang Zeyuan

(Department of Pediatrics and Department of Biochemistry, West China University
of Medical Sciences, Chengdu 610041)

Gu Jianren Wan Dafang Ma Anqing Qu Shumin Li Hongnian

(Department of Biochemistry and Molecular Biology, Shanghai Cancer Institute)

ABSTRACT

The human cytomegalovirus (HCMV) glycoprotein 52 kD gene was cloned and the DNA sequence of antigenic domain of this gene was amplified with polymerase chain reaction (PCR) technique. The sequences of oligonucleotide primers are 5'-AAAGAATTC-ATGAACGTGAAGGAATCG-3' (upstream primer) and 5'-ATAAAGCTTAATTCAGACGTT-CTCTTCTTC-3' (downstream primer). The PCR product was purified and digested with EcoR I, and then inserted into the EcoR I digested expression plasmid pBV-220. The cloned gene was expressed under control of the hybrid P_hP_L promoter in *E. coli* following induction at 42°C for 2h, 4h and 6h, respectively. The proteins in the lysate of bacteria were analysed by using 12.5% SDS-PAGE. The predicted protein 13kD expressed from the cloned gene in *E. coli* was observed and harvested. Up analysing the antigenic domain of HCMV glycoprotein 52 kD, a polypeptide in length of 25 amino acids was synthesized, of which sequence is Phe-Asp-Leu-Glu-Glu-Ile-Met-Arg-Glu-Phe-Asn-Ser-Tyr-Lys-Gln-Arg-Val-Lys-Tyr-Val-Glu-Asp-Lys-Val-Val. The expressed protein and synthetic polypeptide were used to immunize rabbits respectively, and two kinds of antisera reacted

with the expressed antigen and HCMV AD 169 antigen detected by using ^{125}I -labelled protein A. The results of Dot-blot and Western transfer show that the protein expressed from the cloned gene has the same band in size and specificity of antigen as those of the synthetic poly-peptide. By using horse radish peroxidase (HRP) labelled IgG instead of ^{125}I -protein A, preliminary result indicated the diagnostic value of the expressed protein and its antiserum for the HCMV infection.

Key words Human cytomegalovirus (HCMV), Glycoprotein, Expression plasmid, Polymerase chain reaction (PCR)

人血清白蛋白与金属离子作用的荧光光谱研究

杨斌盛 杨频

(山西大学分子科学研究所, 太原 030006)

提 要

通过金属离子对人血清白蛋白内源荧光的猝灭, 探讨了金属离子 Cu^{2+} , Mn^{2+} , Ni^{2+} , Co^{2+} , Cr^{3+} 等与人血清白蛋白的结合; 基于 Förster 无辐射能量转移机理, 得出了人血清白蛋白第一类 Cu^{2+} 结合部位与 214 位色氨酸残基间的距离。

关键词 荧光猝灭, 人血清白蛋白, 金属离子

约占人血浆蛋白 60% 的人血清白蛋白 (HSA) 在人体内起着重要的贮存和输运作用。它与许多内源、外源化合物结合。这些化合物可以是有机化合物, 如脂肪酸、溶血卵磷脂、胆红素、色氨酸、甲状腺素、药物、染料、甾族化合物等^[1], 也可以是无机离子, 如人血清白蛋白与 Cu^{2+} , Ni^{2+} , Ca^{2+} , Zn^{2+} , Pb^{2+} 等离子的结合^[2-7]。关于人血清白蛋白与金属离子的结合研究, 其研究方法多采用示踪法、pH 滴定法、离子探针法^[8]等。本文通过观察金属离子对人血清白蛋白内源荧光的猝灭, 探讨了金属离子与人血清白蛋白的结合。

1 基本原理

荧光猝灭可由动态猝灭、静态猝灭效应及无辐射能量转移所引起。

当荧光体与猝灭体由于热运动等发生碰撞时, 可引起荧光体的荧光猝灭, 这种动态猝灭服从 Stern-Volmer 方程:

$$F_0/F = 1 + K_q\tau_0[Q] = 1 + K_D[Q] \quad (1)$$

其中 F_0 为猝灭体不存在的荧光强度, F 为加入猝灭体后的荧光强度, K_q 为双分子猝灭常数, $[Q]$ 为猝灭体浓度, τ_0 为猝灭体不存在时荧光体的荧光寿命, K_D 为 Stern-Volmer 常数, 且有:

$$K_D = K_q\tau_0 \quad (2)$$

当荧光体与猝灭体间形成不发荧光的复合物时, 根据化学平衡关系可得静态猝灭所服从的关系如下:

$$F_0/F = 1 + K_s[Q] \quad (3)$$

K_s 为荧光体与猝灭体间的结合常数。由方程 (1) 和 (3) 可知, 若为纯的动态或静态猝灭时, F_0/F 对 $[Q]$ 作图将给出一条斜率为 K_D 或 K_s 的直线。

静态猝灭除荧光体与猝灭体间形成不发荧光的复合物外, 还可能有无辐射能量转移过程的出现, 反映在荧光光谱上的是荧光体的荧光被部分猝灭, 猝灭的程度取决于荧光体(能量给