

110-115 Q939.4 R373
汉坦病毒 H8205 部分核壳蛋白基因在 *E. coli* 中的表达

沈昌贤 李钟铎 杨瑞馥 祝庆余

(军事医学科学院微生物流行病学研究所, 北京 100850)

摘要 根据汉坦病毒 H8205 株 NP 基因的序列, 设计一对引物, 扩增 NP 前 292 个氨基酸多肽基因片段, 克隆于表达载体 pGEX-3X, 与载体中 26 kD 的谷胱甘肽硫基转移酶(GST)融合表达。SDS-PAGE 显示表达产物(GST-NP)主要以包涵体形式存在。Western-blotting 表明此融合蛋白有抗原性。包涵体经分离、洗涤、溶解后, Sepharose 6B 层析纯化, 用此融合蛋白作抗原, 进行 ELISA 法检测临床 HFRS 病人标本的 IgG 和 IgM, 有很好的特异性和敏感性。有生物活性的汉坦病毒 H8205 NP 的体外表表达成功, 为汉坦病毒基因工程抗原的大量制备奠定了基础, 也为汉坦病毒的临床检测和流行病学调查提供了一种廉价、安全、可靠的抗原。

关键词 汉坦病毒, 基因工程核衣壳蛋白, 酶联免疫吸附试验(ELISA)

汉坦病毒是负链、单股、RNA 病毒, 基因组由 L、M、S 三个片段组成, 分别编码多聚酶(Polymerase), 胞膜糖蛋白(G1, G2)和核衣壳蛋白(NP)。S 基因在汉坦病毒属中保守性高, 其编码产物 NP 在病毒颗粒中含量高, 免疫原性强, 是用作 HFRS 的理想诊断抗原^[1]。肾综合征出血热(HFRS)是一种病情急、病死率高的急性传染病, 病人的早期确诊是治疗的关键。国外已用重组 NP 做抗原检测病人血清特异性抗体^[2-5], 国内对 S 基因已分别在原核系统、杆状病毒系统和痘苗病毒中进行了表达和初步应用^[6,7]。本研究对人源汉坦病毒 H8205 株的 S 基因部分片段进行表达, 以便用于汉坦病毒的血清学诊断。

汉坦病毒 H8205 株是 1982 年李钟铎自我国东北一 HFRS 病人血清中用 Vero E6 细胞直接分离的毒株, 同国内大部分省市的 HFRS 病人血清都可发生很强的免疫学反应, 采用该株的 NP 做抗原, 能较好地诊断流行于中国的汉坦病毒^[8,9]。本研究根据 H8205 株病毒的 S 基因的序列, 把 NP 前 292 氨基酸的片段克隆于表达载体 pGEX-3X, Western-blotting 和 ELISA 试验证明表达产物的抗原性好和特异性强, 对汉坦病毒抗原性研究及用于 HFRS 血清学诊断具有一定的理论与实用价值。

1 材料与方法

1.1 材料 含汉坦病毒 H8205 株 S 基因 NP 编码区的克隆质粒 pUC19/HTNS 由本室构建, 表达质粒 pGEX-3X 为本室保存。内切酶 EcoR I、BamH I、T4 DNA Ligase(连接酶)、CIP(去磷酸化酶)均购自 Promega 公司, HFRS 病人血清分别从山东、河北、陕西和浙江等地肾综合征出血热病人采集, HFRS 阴性血清由解放军 307 医院提供, 抗人 IgG-McAb-HRP 及抗人 IgM-McAb-HRP 由本室自制。

1.2 目的基因的扩增 根据汉坦病毒 H8205 株 S 基因 NP 编码区的序列, 设计一对引物(引物序列见结果)

扩增 H8205 株 S 基因前 876 bp 片段。提取质粒 pUC19/HTNS, 然后 PCR 扩增: 95 °C 3 min, 94 °C 1 min, 60 °C 1 min, 72 °C 2 min, 进行 30 个循环。最后 72 °C 延伸 10 min^[2,4]。

1.3 表达质粒 pGEX-3X/HTNS 的构建 PCR 产物纯化后 EcoR I 酶切, 连接于表达质粒 pGEX-3X 的 EcoR I 位点, 与载体中 26 kD 的谷胱甘肽巯基转移酶(GST)融合表达^[10], 此质粒命名为 pGEX-3X/HTNS。

1.4 融合蛋白 GST-NP 诱导表达 质粒 pGEX-3X/HTNS 转化大肠杆菌 DH5 α , IPTG 诱导表达, SDS-PAGE 电泳确定融合蛋白 GST-NP 的表达形式, Western-blotting 测定表达产物的抗原性^[3,4,10]。

1.5 融合蛋白 GST-NP 纯化及复性 融合蛋白 GST-NP 的诱导表达后, 对包涵体进行提取、洗涤和溶解, Sepharose 6B 凝胶层析纯化。

1.6 ELISA 检测 HFRS 病人血清标本抗体 IgG 和 IgM 纯化后的 GST-NP 蛋白适当稀释后 4 °C 包被过夜, 1% 小牛血清封闭, 依此加病人血清和抗人-IgG-McAb-HRP 或抗人 IgM-McAb-HRP, 以空白对照调零, 测波长 495 nm 处 OD 值^[11,13]。

2 结果

2.1 汉坦病毒 H8205 株核衣壳蛋白基因的亚克隆

汉坦病毒 H8205 株 NP 基因序列的计算机分析, 发现其抗原决定簇主要位于 NP 的 N 端 (33~42)(待发表), 据此我们合成一对引物 PH03-PH04, 扩增 H8205 株 NP 前 292 个氨基酸的核苷酸片段, 引物 PH03: 5'GCGAATTCGATGGCAACTATGGAGGAATTA 3', 引物 PH04: 5'GCGAATTCTGCATGCTGGCGTA 3', 5'端都含 EcoR I 酶切位点, 扩增的核苷酸片段为 876bp(图 1)。以克隆质粒 pUC19/HTNS 为模板进行 PCR 扩增, 1.0% 琼脂糖回收 876bp 的特异带, EcoR I 酶切后连接到相同酶切的表达质粒 pGEX-3X 的 EcoR I 克隆位点。转化受体菌 DH5 α , 挑选平板上生长的菌落作 PCR 及 BamH I 酶切鉴定(图 2)。此克隆质粒命名为 pGEX-3X/HTNS, 其构建过程见图 3。

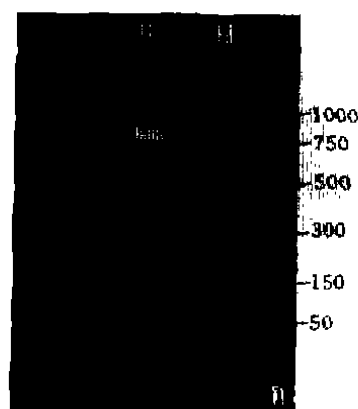


图 1 H8205 株 NP 基因 PCR 扩增结果

Fig. 1 Amplification of the S genome segment of Hantavirus H8205 by PCR with the primers PH03-PH04

1. Amplified product
2. DNA markers: PCR marker

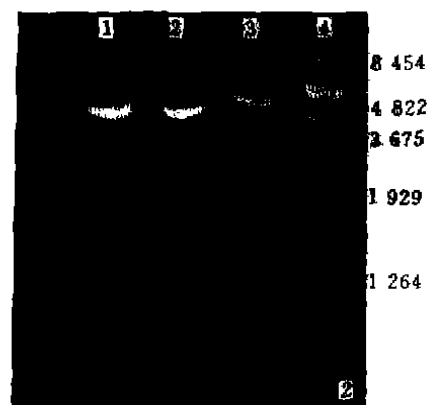


图 2 表达质粒 pGEX-3X/HTNS 的酶切鉴定

Fig. 2 Restriction endonuclease analysis of pGEX-3X/HTNS

1. Vector pGEX-3X
2. Negative direction pGEX-3X/HTNS/BamHI
3. Positive direction pGEX-3X/HTNS/BamHI
4. DNA markers: λ DNA/BstEII

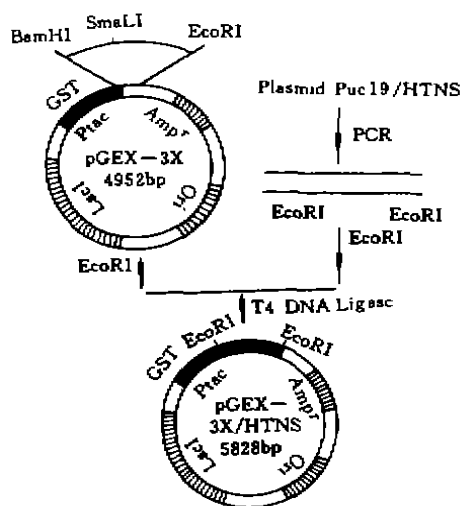


图3 表达质粒 pGEX-3X/HTNS 的构建

Fig. 3 Construction of expression plasmid pGEX-3X/HTNS

载体菌则未出现特异带(图5)。

2.4 酶联免疫吸附试验(ELISA)

以融合蛋白 GST-NP 和 GST 分别作抗原, ELISA 检测 HFRS、森林脑炎和正常人血清的抗体 IgG。结果表明, 以 GST 作抗原, 其 OD 值都为阴性; 以融合蛋白 GST-NP 作抗原, HFRS 为阳性, 而森林脑炎和正常人都为阴性(表1)。

表1 融合蛋白 GST-NP 检测 HFRS、森林脑炎和正常人血清中 IgG

Table 1 Detection of anti-HV IgG in the sera of HFRS, TBE patients and normal sera by ELISA with antigen GST-NP

标本 Specimen	出血热 HFRS		森脑 TB		对照 NC	
	GST-NP	GST	GST-NP	GST	GST-NP	GST
1	1.18	0.00	0.40	0.29	0.17	0.00
2	1.18	0.00	0.43	0.32	0.14	0.03
3	1.18	0.01	0.46	0.30	0.15	0.03
4	1.13	0.00	0.42	0.33	0.24	0.00

我们选用 84 份 HFRS 病人血清和 10 份正常人血清, 以 GST-NP 做抗原进行 ELISA 检测抗汉坦病毒抗体 IgM 和 IgG, 同时以免疫荧光法(IFA)做对照。ELISA 检出结果与 IFA 检出结果完全符合(表2)。

3 讨论

汉坦病毒的 S 基因在汉坦病毒属中高度保守, 是体液免疫的主要识别抗原, 能刺激机体产生大量的抗体, 同时参与细胞介导的保护性免疫, 其编码产物核衣壳蛋白是用作 HFRS 诊断的理想抗原^[1]。

2.2 融合蛋白的表达

表达质粒 pGEX-3X/HTNS 转化 *E. coli* DH5 α , 工程菌经 IPTG 诱导后, 取 1 mL 表达菌体, 以及含 pGEX-3X 载体经 IPTG 诱导和未经诱导的菌体各 1 mL, 加入 100 μ L SDS 加样缓冲液煮沸 3 min, 离心后进行 SDS-PAGE。SDS-PAGE 显示, 工程菌在分子量 58 kD 处出现一条新增蛋白带 (GST-NP), 与预期的结果相符。经 IPTG 诱导的空载体菌则出现一条分子量为 26 kD 的 GST 蛋白带, 取菌体破碎离心后的沉淀和上清进行 SDS-PAGE 显示, 表达蛋白以可溶性蛋白和不可溶性蛋白两种形式存在, 但大部分以包涵体形式存在(图4)。

2.3 Western-blotting 测定表达产物的抗原性

诱导后的工程菌菌体出现一条带, 空

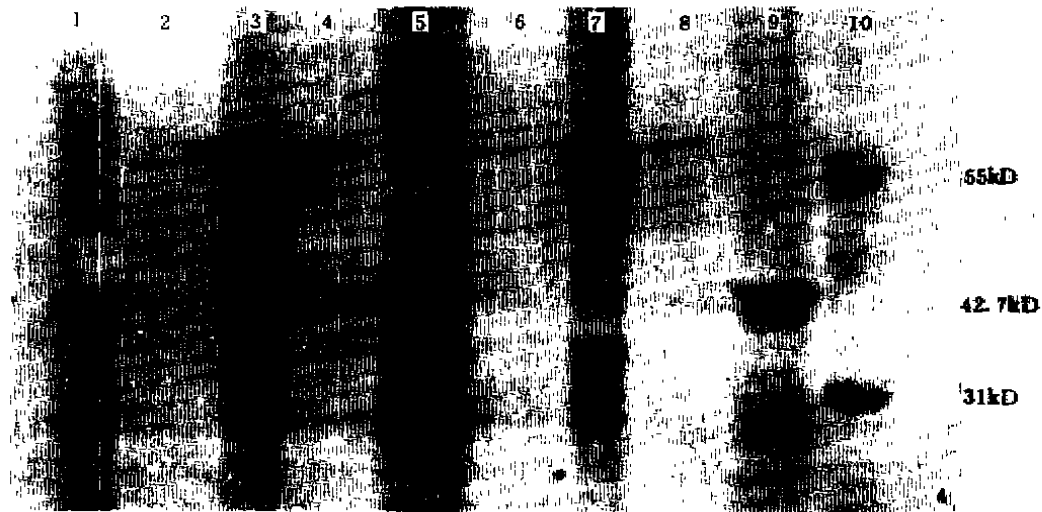


图 4 表达产物 GST-NP 融合蛋白 SDS-PAGE 电泳

Fig. 4 SDS-PAGE of fusion protein GST-NP

1. 9 DH5a-pellet 2. DH5a-supernatant 3-7 pGEX-3X/HTNS-pellet 4. 8. pGEX-3X/HTNS-supernatant
5. pGEX-3X-pellet 6. pGEX-3X-supernatant 10 protein markets



图 5 表达产物 GST-NP 融合蛋白 Western-blotting

Fig 5 Western-blotting of fusion protein GST-NP

1. 2. GST-NP 3. 4. GST

表 2 ELISA 检测 HFRS 病人血清 IgM 和 IgG

Table 2 Detection of anti-HV IgM and IgG in the sera of HFRS patients by ELISA with antigen GST-NP

OD	IgM		IgG	
	HFRS 对照	NC	HFRS 对照	NC
0.0~	0	1	16	6
0.1~	13	8	18	4
0.2~	25	1	25	0
0.8~	5		3	
1.0~	10		7	
1.2~	31		15	
合计 Total	84	10	84	10
阳性率 Positive rate	77.4%		57%	

汉坦病毒 H8205 株属于汉滩型(HTN)汉坦病毒, 其 NP 的亲水性结构图与标准株 76-118 株基本相似, 但 H8205NP 的 N 端有一个高度亲水性结构中心, 预测此区为 H8205NP 的主要抗原决定簇, 主要集中于 N 端的 33~42 位氨基酸(待发表)。SEO 型汉坦病毒 NP 的亲水性

结构图与 H8205 的相似,文献报道用 76-118NP 的全段或 N 端部分片段可同时用来检测 HTN 型和 SEO 型汉坦病毒,故推测 H8205 的 NP 可检测流行于中国的 HTN 型和 SEO 型汉坦病毒^[3]。我们的实验证实了这一点。H8205 株病毒与中国的绝大部分省市的 HFRS 病人血清发生强烈反应,且 H8205 株已显示比 76-118 更强的抗原性^[8,9]。H8205 株的 NP 和 76-118 株的 NP 的计算机分析,也发现 NP 预测的抗原性 H8205 比 76-118 强。所以我们选用 H8205 的 S 基因进行体外重组,于大肠杆菌中表达 NP。由于 H8205 株 NP 的主要抗原决定簇位于 N 端,我们选择 NP 的前 292 个氨基酸的编码序列进行体外表达,此段包含两个计算机预测的主要抗原决定簇。表达载体 pGEX-3X 是含 26 kD 谷胱甘肽转移酶(GST)的融合表达载体,我们把 NP 基因克隆于 pGEX-3X 的 EcoR I 酶切位点,与 GST 进行融合表达,融合蛋白质(GST-NP)的分子量为 58.2 kD。菌体的 SDS-PAGE 表明融合蛋白 GST-NP 为不可溶性表达,即以包涵体的形式存在。Western-blotting 染色表明表达产物有抗原性。Sephrose 6B 层析纯化后的融合蛋白 GST-NP 作抗原进行 ELISA 检测 HFRS 病人血清中的 IgG 和 IgM,结果表现很高的特异性和敏感性,说明表达产物可用来进行 HFRS 的血清学诊断,未纯化的融合蛋白 GST-NP 也可检出特异性抗汉坦病毒抗体,虽有一定的本底,但足以用作 ELISA 法对 HFRS 的临床诊断。在我们所检测的 84 份送检血清中,IgM 的阳性率高于 IgG 的阳性率,这可能与血清标本多数是在发病初期采集有关。

我们首先把 S 基因的全 NP 编码区序列插入表达载体 pBV220 的 P_LP_R 启动子下游,对影响原核表达系统的诸因素如温度、诱导时间、培养基的配方、菌量等进行了一系列的优化,但未见预期多肽的表达;把全 NP 编码区序列 BamHI 酶切片插入表达载体 pET-20b(+)和 pET-17xb 中进行融合表达,优化各种条件后,也未见表达;后来我们进一步缩短插入片段的长度,经 SDS-PAGE 还是检测不到特异多肽的表达。这一系列繁琐的探索表明病毒基因在原核系统中表达,病毒基因与原核表达载体存在的匹配关系非常重要,特定的病毒基因要在与特定的原核表达载体顺反调控基因匹配的情况下才能高效表达。

有生物活性的汉坦病毒 H8205NP 的体外表达成功,为汉坦病毒基因工程抗原的大量制备打下了基础,为汉坦病毒的临床诊断和流行病学调查提供了一种廉价、安全、可靠的抗原。至于 NP 上是否有中和抗原决定簇,有不同报道,H8205 株 NP 是否能刺激机体产生中和活性抗体有待进一步研究^[11]。

参 考 文 献

- 1 Zoller L, Yang S, Gott P *et al*. Use of recombinant nucleocapsid proteins of the hantaan and nephropathia epidemica serotypes of Hantaviruses as immunodiagnostic antigens. *Journal of Medical Virology*, 1993, 39:200~207
- 2 Feldmann H, Sanchez A, Morzunov S *et al*. Utilization of autopsy RNA for the synthesis of the nucleocapsid antigen of a newly recognized virus associated with hantavirus pulmonary syndrome. *Virus Research*, 1993, 30:351~367
- 3 Gott P, Zoller P, Yang S *et al*. Antigenicity of hantavirus nucleocapsid proteins expressed in *E. coli*. *Virus Research*, 1991, 19:1~16
- 4 Yang M, Rossi C, Schmaljohn CS. Expression of non-conserved regions of the S genome segments of three hantaviruses; evaluation of the expressed polypeptides for diagnosis of haemorrhagic fever with renal syndrome. *Journal of General Virology*, 1993, 74:1115~1124

- 5 Yoshimatsu K, Ankawa J, Kariwa H. Application of a recombinant baculovirus expressing hantavirus nucleocapsid protein as a diagnostic antigen in IFA test: cross reactivities among 3 serotypes of hantavirus which causes hemorrhagic fever with renal syndrome (HFRS). *J Vet Med Sci*, 1993, 55(6): 1047~1050
- 6 石晓宏, 杭长寿, 宋干. 汉坦病毒核壳蛋白(NP)在杆状病毒系统的表达及其免疫原性研究. *病毒学报* 1995, 11(2): 124~129
- 7 梁米芳, 李德新, 杭长寿. 汉坦病毒 S 基因在大肠杆菌中的表达及其初步应用. *中华实验和临床病毒学杂志*. 1993, 7(3): 225~228
- 8 李钟铎, 宋光昌, 李德荣等. 用 Vero E6 细胞从病人血中分离肾综合征出血热病毒的研究. *中华流行病学杂志*, 1983, 4(4): 198~201
- 9 李钟铎, 宋光昌, 蒋豫图. 用免疫荧光法对我国流行性出血热患者的血清学研究. *中华预防医学杂志*. 1982, 16(2): 48~52
- 10 Vapalahti O, Kallio-Kokko H, Salonen Eeva-Marjatta *et al.* Cloning and sequencing of puumala virus sotkamo strain S and M RNA segments: evidence for strain variation in hantaviruses and expression of the nucleocapsid protein. *Journal of General Virology*, 1992, 73: 829~838
- 11 Yoshimatsu K, Yoo YC, Yoshida R *et al.* Protective immunity of hantaan virus nucleocapsid and envelope protein studied using baculovirus-expressed proteins. *Arch Virol*, 1993, 130: 365~376

Expression of the S genome segment of Hantavirus H8205 and Application of the Expressed Polypeptide for Diagnosis of HFRS

Shen Changxian Li Zhongduo Yang Ruifu Zhu Qingyu

(Institute of Microbiology and Epidemiology, Beijing 100850)

Abstract The S genome segment encoding the nucleocapsid protein (truncated) of Hantavirus H8205 was amplified by PCR and cloned into the expression vector pGEX-3X and expressed in *E. coli*. SDS-PAGE showed that the expressed fusion protein (GST-NP) was mainly in the form of inclusion body. The expressed protein was used as diagnostic antigen in solid-phase enzyme immunoassay. The assay was used to detect IgG- and IgM- antibody in sera of HFRS patients originated from different geographic regions of China. The results revealed highly sensitive and specific. The successful expression and application of recombinant nucleocapsid protein of Hantavirus provides cheap, safe and sensitive antigen for the diagnosis of HFRS in China.

Key words Hantavirus, Recombinant nucleocapsid protein, Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA)