维普资讯 http://www.cqvip.com

第14卷第2期 中国病毒学 Vol.14 No.2
1999年6月 VIROLOGICA SINICA Jun. 1999

(16)

181-184

R373

# 汉滩病毒S片段基因编码区在Vero-$E_6$细胞中的表达

张梦华* 王航雁 杨为松 黄长形 李光玉 汪 毅 白雪帆

(第四军医大学唐都医院传染科,西安 710038)

关键词 汉滩病毒,基因表达,S片段编码区

汉滩病毒属于布尼亚病毒科汉坦病毒属,主要引起人类肾综合征出血热[1]。我国是肾综合征出血热发生和流行的主要疫区,该病起病急、病死率高,流行范围广,因此寻找安全有效、低廉的疫苗是控制本病流行和发生的关键。基因免疫是近年来微生物学和免疫学研究的新热点[2],也是达到上述目的的一个新途径。它将某病原体的抗原基因插入到真核表达载体中,构成含有病原体抗原基因的重组质粒,再用该质粒免疫动物。由于基因免疫具有同时激发机体的体液免疫和细胞免疫的特点,而且操作简单,成本低廉,因此探索基因免疫预防肾综合征出血热具有现实意义。我们将汉滩病毒S片段编码区基因克隆至真核表达载体质粒pVR1012的多克隆位点上,构建了$pVRS_{22}$重组表达质粒,并进行了体外非洲绿猴肾细胞Vero-$E_6$的瞬时转染和表达,为汉滩病毒S基因的动物免疫奠定了基础。现将结果报告如下。

## 1 材料和方法

### 1.1 材料

1.1.1 质粒及宿主菌 质粒$pBVS_{22}$为含汉滩病毒(76/118)S片段编码区基因的质粒,由本室黄长形博士[3]构建;质粒pVR1012为真核表达载体质粒,由美国Vical公司惠赠;宿主菌$TG_1$,由本室保存。

1.1.2 细胞 Vero-$E_6$细胞为本室保存。

1.1.3 特异性抗核蛋白单克隆抗体及荧光抗体 购自中国预防医学科学院病毒学研究所出血热室。荧光抗体羊抗鼠IgG抗体购自华美公司。

1.1.4 试剂 各种分子克隆工具酶、连接酶购自宝灵曼公司、Promega公司及华美公司,Lipofectamine转染试剂盒为Gibco产品。

### 1.2 方法

1.2.1 含有汉滩病毒S片段编码区基因真核表达质粒的构建 用EcoR Ⅰ酶切含S片段编码区基因的$pBVS_{22}$质粒,线性化后,Klenow酶补平,再用Sal Ⅰ酶消化,形成大小为2 365 bp和1 300 bp的两个片段,低融点琼脂糖回收小片段,此即为S片段编码区基因。同样用Pst Ⅰ酶切真核表达载体质粒pVR1012,线性化后,Klenow酶补平,再用Sal Ⅰ酶切,低融点琼脂糖回收酶连接产物转化TG1钙化菌,挑取转化克隆,用BamH Ⅰ、Hind Ⅲ、Pvu Ⅱ单酶切,Pst Ⅰ/Sal Ⅰ双酶切鉴定,获得阳性克隆,所得到的表达质粒命名为$pVRS_{22}$,见图1。

收稿日期:1998-04-15,修回日期:1998-11-16

* 现在地址:卫生部艾滋病预防与控制中心临床病毒室,北京 100050

维普资讯 http://www.cqvip.com



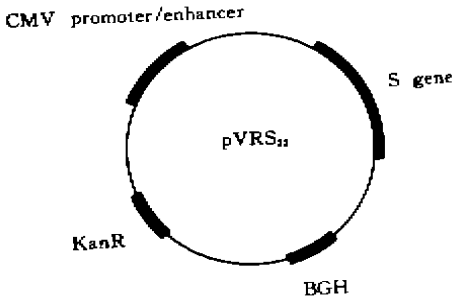


图1 $pVRS_{22}$质粒构建图

Fig.1 Construction of the $pVRS_{22}$ expression plasmid

1.2.2 重组质粒$pVRS_{22}$的体外转染试验 用含1%小牛血清(杭州四季青产品)的MEM培养基,在37℃,5% $CO_2$的条件下培养Vero-$E_6$细胞。转染采用Lipofectamine介导的方法,参照产品说明书及文献[4]进行,分别用重组质粒$pVRS_{22}$和空白载体质粒pVR1012进行转染,转染4~5 h后,弃转染液,代之以10%小牛血清的MEM,继续培养,待转染后72 h,用汉滩病毒核蛋白单克隆抗体进行间接免疫荧光染色,以确定转染细胞中核蛋白的瞬时表达情况。

## 2 结果

**2.1 重组表达质粒$pVRS_{22}$的构建** 汉滩病毒S片段编码区基因被正向插入到pVR1012真核表达载体的多克隆位点中,形成了一个约6 200 bp的重组质粒,经琼脂糖凝胶电泳及酶切产物电泳分析与预期结果完全相同。

**2.2 体外Vero-$E_6$细胞瞬时转染的结果** 转染后72 h,用汉滩病毒核蛋白特异性单克隆抗体,对转染的Vero-$E_6$细胞进行间接免疫荧光染色,可见个别细胞中观察到荧光颗粒,结果见图2。

**2.3 汉滩病毒S基因编码核蛋白** 对汉滩病毒核蛋白免疫学研究表明,病毒核蛋白与保护性免疫有关[5,6]。用核蛋白免疫动物,尽管诱导产生的是非中和抗体,但被免疫动物对汉滩病毒的攻击却有部分保护作用。这种免疫保护作用主要是由其诱导产生的细胞免疫应答所承担。我们选择汉滩病毒S片段编码区基因作为目的基因,希望在今后汉滩病毒核蛋白基因免疫的研究方面提供一些依据,也为汉滩病毒核蛋白基因免疫动物奠定物质基础。pVR1012质粒是能在哺乳动物细胞中表达的巨细胞病毒载体,它含有CMVIE启动子和增强子,并含有牛生长激素基因(BGH),这样的结构最适合核蛋白基因在哺乳动物细胞中的表达[7]。我们应用基因重组技术,成功地构建了含有汉滩病毒S片段编码区基因的$pVRS_{22}$真核表达质粒,并用该质粒进行了Vero-$E_6$细胞的瞬时转染。Vero-$E_6$细胞是分离培养汉滩病毒最常用的细胞系,具有易于生长、营养要求不高等特点,用其作为转染的靶细胞,对今后研究汉滩病毒各种抗原在哺乳动物细胞中的表达及各毒力位点、抗原位点的分析具有一定的意义。

维普资讯 http://www.cqvip.com



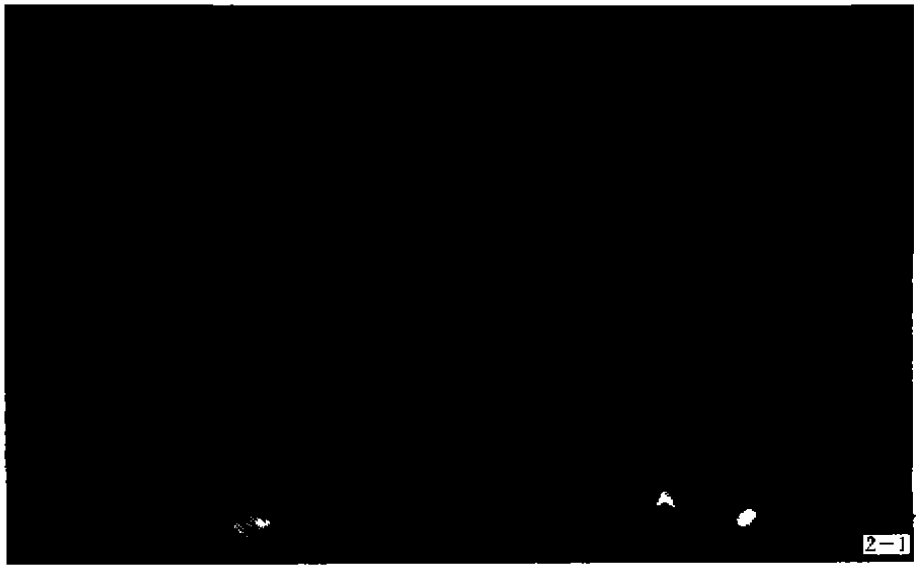


图 2-1　$pVRS_{22}$在 Vero $E_6$ 细胞中的瞬时表达(IFA 染色)

Fig 2-1　Expression of $pVRS_{22}$ in transiently transfected Vero-$E_6$ cells

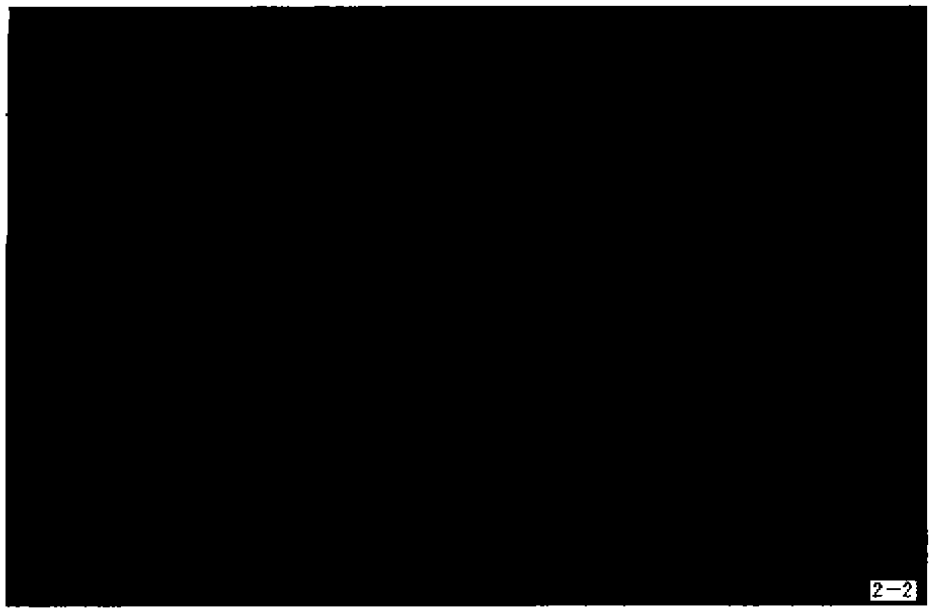


图 2-2　pVR1012 在 Vero-$E_6$ 细胞中的瞬时表达(IFA 染色)

Fig. 2-1　Expression of pVR1012 in transiently transfected Vero-$E_6$ cells

维普资讯 http://www.cqvip.com



## 参 考 文 献


1 Lee H W, Lee P W, Johnson K M Isolation of the etiologic agent of Korean fever. J Infect Dis, 1978, 137:298～308

2 Tang DC, Michael DV, Stephen A *et al*. Genetic immunization is a simple method for eliciting an immune response. Nature, 1992, 356:152～153

3 黄长形,李盈盈,杨为松等. 肾综合征出血热核蛋白在大肠杆菌表达及其产物的初步应用. 中华传染病杂志, 1996, 14(1):28～31

4 姜泊,张亚历,田殿元. 分子生物学常用实验方法. 北京: 人民军医出版社. 1996, 157～158

5 Schmaljohn CS, Chu YK., Schmaljohn AL *et al*. Antigenic subunits of Hantaan virus expression by baculovirus and vaccinia virus recombinants. J Virol, 1990, 64:3162～3170

6 Asuda H, Tamura M, Kondo K *et al*. Cell mediated immunity to virus causing haemorrhagic fever with renal syndrome generation of cytotoxic T lymphocytes. J Gen Virol, 1988, 69:2179～2188

7 Ulmer JB, Donnelly JJ, Parker SE *et al* Heterologous protection against influenza by injection of DNA encoding a viral protein Science, 1993, 259:1745～1749


# Transient Expression of Hantaan Virus S segment Gene Coding region *in vitro* of Vero-$E_6$ cells


Zhang Menghua Wang Hangyan Yang Weisong Huang Changxing
Li Guangyu Wang Yi Bai Xuefan

(*Tangdu Hospital, The Fourth Military Medical University, Xi'an* 710038)



**Abstract** The coding region of S genome segment of Hantaan virus (76/118 strain) was inserted into the eukarytic expression plasmid pVR1012. The recombinant expression plasmid $pVRS_{22}$ was constructed. Vero-$E_6$ cells were transiently transfected *in vitro* with $pVRS_{22}$ plasmid. The transient expression of Hantaan virus nucleocapsid proteins in Vero-$E_6$ cells was detected by indirect immunofluorescence assay (IFA) with monoclonal antibody 5H5 against Hantaan virus.


**Key words** Hantaan virus, Gene expression, S segment, Coding region