

肾综合征出血热病毒 R22 株核蛋白基因的克隆、R_{692.04} 序列分析及其表达 R₃₉₂₋₃₃

姚智慧 董关木[✓] 俞永新

(中国药品生物制品检定所, 北京 100050)

摘要 为研究肾综合征出血热病毒疫苗候选株 R22 核蛋白的结构与特性, 应用逆转录 PCR 扩增了 R22 编码区基因, 并将扩增产物克隆于 pET-3a 表达质粒, 测得 R22 株 S 片段编码区序列为 1 290 个核苷酸。比较分析表明与 Seoul 型同源性高达 96.2%, 而与 Hantaan 型同源性仅为 71.0%, 与用血清学分型的结果一致。将克隆的 pET-R22NP 转化到 BL21 后, IPTG 诱导得到较高效的表达, 产物纯化后进行 Western blot 分析, 结果表达的 NP 仅与 NP 蛋白特异的单克隆抗体 A35 和 3D9 反应, 而与 G2 蛋白特异的 3D8 不反应。表达的产物为汉坦病毒的诊断提供了特异性抗原。

关键词 肾综合征出血热病毒, 核蛋白, 基因克隆, 序列分析, 表达, MFRSV

肾综合征出血热是由布尼亚病毒科汉坦病毒属引起的、临幊上以发热、出血及肾损害为基夲特征的一类疾病^[1]。汉坦病毒具有单股负链 RNA 组, 分 L、M、S 3 个片段, 分别编码病毒的多聚酶, 包膜蛋白和核蛋白^[2~5]。研究表明, 3 个蛋白中以 NP 含量为高, 免疫原性强^[6~8]。为研究 NP 蛋白的结构与特性, 应用带有 T7 噬菌体启动子的 pET-3a 表达质粒对我国疫苗候选株 R22 株的 S 基因进行克隆、测序分析, 并在大肠杆菌中获得较高效的表达。

1 材料和方法

1.1 菌种和质粒 pET-3a 质粒和 BL21 宿主菌均为 Stratagene 公司产品。

1.2 Vero-E6 细胞 来自 ATCC, 由我室传代保存。病毒在 Vero-E6 细胞上感染 7~10 d 左右收获, 滴度大于 10⁷ PFU/mL。

1.3 R22 痘株 从河南省新安县疫区褐家鼠组织分离^[9], Vero-E6 细胞传代, -70 ℃ 保存。该毒株经交叉中和试验^[10]和交叉保护力试验^[11]表明具有较广谱的抗原特性。

1.4 RNA 提取 应用热酚异硫氰酸胍法, 参见文献[12]。

1.5 引物的设计与合成 参照肾综合征出血热标准株 76-118 的序列^[3], 设计带有 EcoR I 和 Bgl II 酶切位点的引物 3 条, 在 ABI 的 DNA 合成仪上合成, 用异丁醇提取纯化。

P1: TAGTAGTAGACTCCCTA (1~17)

P2: CCAGATCTATGGCAACTATGGAG (37~51)

P3: GGAATTCTTAGAGTTCAAAGG (1 326~1 312)

1.6 cDNA 合成及巢式 PCR 将提取的总 RNA 加 40 μg 的 AMV 逆转录酶和 1 μL 的随机引物, 42 ℃ 逆转录 2 h, 然后以 P1, P3 为引物, 92 ℃ 2 min, 42 ℃ 2 min, 72 ℃ 3 min, 1 个循环后, 92 ℃ 30 s, 42 ℃ 1 min, 72 ℃ 1 min,

* 收稿日期: 1998-11-13, 修回日期: 1999-04-16

30 个循环, 最后延伸 7 min。扩增的产物再以 P2, P3 为引物进行巢式 PCR, 条件同上。

1.7 扩增 DNA 的纯化、酶切及克隆 将扩增的产物在 0.8% Agarose 凝胶上电泳回收, 用 BIO 101 公司的 GeneClean II kit 纯化后, 再用 EcoRI 和 Bgl II 酶切消化并纯化; 同时将载体 pET-3a 用 EcoRI 和 BamHI 切割并纯化。用连接酶在 16 ℃ 连接 4 h 后转化到 BL21(DE3) 中, 在 LB 培养板上筛选克隆。

1.8 序列分析 将克隆正确的质粒纯化后, 应用 Pharmacia Biotech 的全自动序列分析仪进行测序, 并应用 DNASIS 软件进行辅助计算机分析。

1.9 核蛋白的表达和纯化 将克隆成功的 pET-R22 NP 转化到 BL21 后, 用 IPTG 进行诱导表达, 菌体用超声波处理后以硫酸铵沉淀, 并经 Phenyl Sepharose CL-4B 柱纯化, 最后用 50 mmol/L Tris-EDTA 透析, 而后进行 SDS-PAGE 和 Western-blot 分析。

1.10 ELISA 用每孔 100 ng 纯化的重组核蛋白包被 ELISA 板, 常规 ELISA 方法检测单克隆抗体的抗体水平, 同时用抗原夹心 ELISA 法对照比较。

2 结果

2.1 质粒的构建

表达载体的构建见图 1。

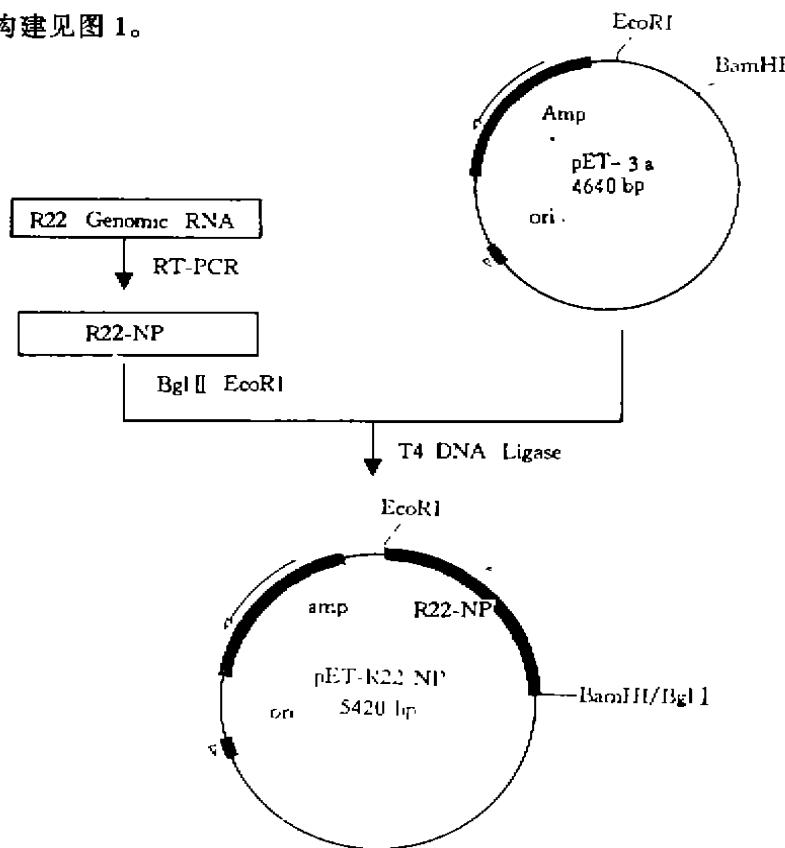


图 1 pET-NP 表达载体的构建图

Fig. 1 Construction of pET-NP expression vector

pET-sNP 经 EcoR I 酶切鉴定证明插入的为正确的约 1.3 kb 的 R22 NP 基因, 见图 2。

2.2 序列分析

克隆的 R22 株 S 片段编码区共测得 1 290 个核苷酸, 并由此得到推断的氨基酸序列(1~430), 见图 3、4。



图 2 PCR 扩增、克隆和酶切分析

Fig. 2 PCR amplification, cloning and restriction enzymes analysis

M. Molecular markers, 1 kb DNA ladder

A. PCR amplified 1.3 kb S segment cDNA

B. DNAs from pET-R22-NP digested with EcoR I and Bgl II, the upper band is the plasmid DNA, the lower band is inserted PCR amplified S segment cDNA

1 ATGGCAACTA TGGAGGAAT CCAGAGAGAA ATCAGTGCTC ACGAGGGCA GCTTGTGATA
 61 GCACGCCAGA AAGTCAGGA TGCAGAAAAG CAGTATGAAA AGGATCCTGA TGACTTCAAC
 121 AAGAGGGCAC TGCATGATCG GGAGAGTGTC GCAGCTCAA TACAATCAA AATTGATGAA
 181 TTGAAGGCCA AACTTGGCGA CAGGATTGCA GCAGGGAAAG ATATTGGCA AGACCGGGAT
 241 CCTACAGGGG TAGAGCCGGG TGATCATCTC AAAGAGAGAT CAGCACTAACG CTATGGGAAT
 301 ACACCTGGACC TGAATACTCT TGACATTGAT GAACCTACAG GACAGACAGC TGATTGGTTG
 361 ACCATAATTG TCTATCTGAC TTCATTGTCG GTCTGTGATCA TCTTAAAGGC ACTGTACATG
 421 TTAACAAACAA GAGGCAGGCA GACTTCAAAG GACAACAAAG GGATGAGGAT CAGATTCAAG
 481 GATGACAGCT CATATGAGGA TGTCAATGGA ATCAGAAAAC CCAAACATCT GTATGTGTC
 541 ATGCCAAACG CCCAATCCAG CATGANGGCT GANGAGATAA CAACCTGGAAAG ATTCCGCACT
 601 GCAGTATGTG GGCTATATCC TGCACAGATA AAGGCAAGGA ACATGGTGAG CCGCTGTGATG
 661 ACTGTAGTTG GGTGTTGGC ACTGGCAAAA GATTGGACAT CTAGAATTGA AGAATGGCTT
 721 GGTGCACCCCT GCAAGTTTAT GGCGGAATCT CCAATTGCTG GGAGTTTATC TGGGAATCCC
 781 GTGAATCGTA ACTATATCAG ACAGAGACAA GGTGCACTTG CAGGGATGGA GCCAAAGGAA
 841 TTTCAAGCCC TCAGGCAACA TGCAGGAGAT GCTGGGTGTA CACTGGTTGA GCATATTGAG
 901 TCACCATCAT CAATATGGGT GTTGTGCTGGG GCCCCGTGATA GGTGTCCACC AACATGTTG
 961 TTTGTGGAG GGATGGCTGA GTTAGGTGCC TTCTTTCTA TACTTCAGGA TATGAGGAAC
 1021 ACAATCATGG CTTCAAAAAC TGTGGGCACA GCTGATGAAA AGCTTCGAAA GAAATCATCA
 1081 TTCTATCAAT CATACTTCAG ACGCACACAA TCAATGGAA TACAACATGGA CCAGAGGATA
 1141 ATTGTATGTTT TTATGGTGC CTGGGGAAAG GAGGCAGTG GAAACTTCA TCTCGGTGAT
 1201 GACATGGACC CAGAGCTTCG TAGCTGGCT CAGATCCTGA TTGACCAGAA AGTAAAAGAA
 1261 ATCTCGAACCC AGGAACCTTT GAAACTCTAA

图 3 R22 株 S 片段编码区序列

Fig. 3 Nucleotide sequences of S segment code gene of R22 virus

将测得的核苷酸序列与汉坦病毒 HTN 型标准株 76-118 比较, 仅 71.0% 同源, 而与 SEO 型 SR-11 株同源率高达 96.2%。

```

1 MATMEEIQREISAHEGQLVIARQKVDAEKQYEKDPDDFN
41 KRALHDRESVAASIQSKIDELKRQLADRIAAGKNIGQDRD
81 PTGVEPGDHLKERSALS YGNTLDLNSLDIDEPTGQTADWL
121 TIIYVYLTSFVVLIIILKALYMLTTRGRQTSKDNKGMRIRFK
161 DDSSYEDVNGIRKPKHLYVSMPNAQSSMKAEE1TPGRFR
201 AVCGLYPAQIKARNMVSPVMSVVGFLALAKDWTSRIEEL
241 GAPCKFMAESPIAGSLSGNPVNRYIRQRQGALAGMEPKE
281 FQALRQHAKDAGCTLVEHIESPSSIWVFAGAPDRCPP
321 FVGGMAELGAFFSILQDMRNTIMASKTVGTADEKLRRKKSS
361 FYQS YLRRRTQSMGIQLDQRIIVMF MVAWGKEAVDNFHLD
401 DMDPELRSLAQILIDQKVKEISNQEPLKL Stop

```

图 4 依据核苷酸序列推导的 R22 S 片段氨基酸序列

Fig.4 The deduced amino acid sequences of R22 S segment depended upon nucleotide sequences

2.3 表达和纯化

以不同浓度的 IPTG 和不同温度进行诱导表达,结果表明,0.5 mmol/L IPTG、30 ℃ 培养表达效果较好。应用硫酸铵沉淀和 Phenyl Sepharose CL-4B 柱层析并用磷酸盐缓冲液洗柱,可从每升菌液中纯化到 9 mg 的 NP 蛋白。

2.4 表达的结构蛋白 SDS-PAGE 和 Western blot 分析

将不同纯化步骤的 NP 蛋白和培养的 R22 裂解蛋白进行 SDS-PAGE 分析,并应用 NP 蛋白特异的单克隆抗体 A35、3D9 和 G2 蛋白特异的单抗 3D8 进行免疫印迹分析,结果表达的 NP 仅与 A35 和 3D9 反应而不与 3D8 反应,而且大小与天然的 NP 相一致,见图 5。

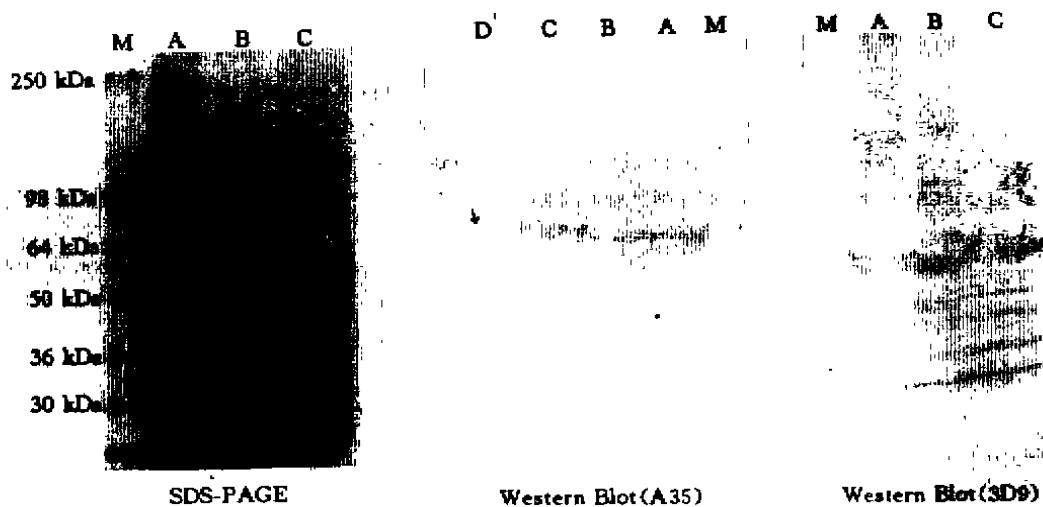


图 5 SDS-PAGE 和 Western blot 电泳图

Fig.5 Electrophoresis of SDS-PAGE and Western blot

- M. Molecular weight, SeeBlue™ Pre-Stained Standards
- A. Expression products, after sonication
- B. Expression products, after $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ deposited
- C. Expression products, after phenyl Sepharose CL-4B
- D. Hantavirus 76-118 on Vero cells lysis by 1% NP-40

2.5 ELISA 检测的结果

对 20 株核蛋白和 1 株 G2 单克隆抗体检测表明, 直接包被纯化重组核蛋白 ELISA 与传统的抗原夹心 ELISA 相比结果一致, 但敏感性高, 抗体水平平均高 2~4 倍。

3 讨论

本研究将我国正在研究的候选疫苗株 R22 的结构蛋白基因进行了序列分析, 阐明了该株核蛋白编码区的 1 290 个核苷酸 cDNA 的一级结构, 和已知标准毒株的序列分析比较表明, 与同型的 Seoul 型 SR-11 株同源性高达 96.2%, 而与 Hantaan 型 76-118 株同源仅为 71.0%。并由核苷酸序列得到了推断的氨基酸序列 1~429 及其等电点为 7.728。

将 pET-3a 载体克隆的 R₂₂ 结构蛋白基因插入大肠杆菌中, 并有效表达了 R22 的 NP 蛋白, 且能与特异性的单抗反应, 其分子量与天然的 NP 一致, 为我们研究病毒结构蛋白的功能提供了可能。虽然 NP 蛋白上没有中和位点, 抗 NP 的单抗亦不具备中和活性, 但 Schmaljohn 等报道用重组昆虫表达的 NP 免疫田鼠后, 可部分抵御汉坦病毒的攻击, 认为其免疫保护力由细胞免疫所介导^[13]。Yoshimatsu 用乳小鼠类似的研究也证明了这一点^[14]。因此认为 NP 在基因工程疫苗中占有重要地位, 我们所表达的 NP 将有可能作为基因工程疫苗的一种重要成分。同时用所表达的产物对不同位点的 20 株单抗良好的检测结果表明, 我们所表达的核蛋白可以作为对该病毒的诊断的一种优质价廉的特异性抗原。

参 考 文 献

- 1 Lee HW, Lee PW, Johnson KM. Isolation of the etiologic agent of Korea hemorrhagic fever. *J Infect Dis.* 1978, 137:298
- 2 Schmaljohn CS, Drylymple JM. Analysis of a new genus of *Bunyaviridae*. *Virology*, 1983, 131:482~491
- 3 Schmaljohn CS, Jennings GB, Hay J *et al.* Coding strategy of the S genome segment of Hantaan Virus. *Virology*, 1986, 155: 633~643
- 4 Schmaljohn CS, Schmaljohn AL, Drylymple JM. Hantaan virus M RNA: Coding strategy, nucleotide sequence and gene order. *Virology*, 1987, 151:31~39
- 5 Schmaljohn CS. Nucleotide sequence of the Hantaan virus L RNA segment. *Nucleic Acid Research*, 1990, 18:6278
- 6 Schmaljohn CS, Hasty SE, Harrison SA *et al.* Characterization of Hantaan virions, the prototype of hemorrhagic fever with renal syndrome. *The Journal of Infectious Disease*, 1983, 148:1005~1012
- 7 Schmaljohn CS, Hasty SE, Rossmussen L *et al.* Hantaan virus replication: Effects of monensin, tunicamycin and endoglycosidases on the structural glycoproteins. *Journal of General Virology*, 1986, 67:707~717
- 8 Zöller L, Scholz J, Stohwasser R *et al.* Immunoblot analysis of the serological response in Hantavirus infections. *Journal of Medical Virology*, 1989, 27:231~237
- 9 Song G, Heng CS, Liao HX *et al.* Antigenic difference between viral strains causing classical and mild types of epidemic hemorrhagic fever with renal syndrome in China. *J Infect Dis.* 1984, 150:889~894
- 10 俞永新, 安祺, 姚智慧等. 用空斑减少中和试验比较肾综合征出血热不同毒株的抗原性. 中华微生物和免疫学杂志, 1991, 11(3):162~164
- 11 何浩, 陈云华, 李永珍等. 肾综合征出血热病毒在金黄地鼠体内的交叉保护研究. 中华实验和临床病毒学杂志, 1990, 4(4):447~450
- 12 Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T. *Molecular cloning: A laboratory manual*. Second edition. Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989. 7:6~25

- 13 Schmaljohn CS, Yong kyu Chu, Schmaljohn Al et al. Antigenic subunits of hantaan virus expressed by baculovirus and vaccinia virus recombinants. *J Virol*, 1990, 64(7):3162~3170
- 14 Yoshimatsu K, Y-C Yoo, Yoshida R. Protective immunity of Hantaan virus nucleocapsid and envelope protein studies using baculovirus-expressed proteins. *Arch Virol*, 1993, 130:365~376

Cloning, Sequencing and Expressing of S Segment Coding Gene of Seoul Virus R22 Strain

Yao Zhihui Dong Guanmu Yu Yongxin

(National Institute for the Control of Pharmaceutical and Biological Products, Beijing 100050)

Abstract For studing the structure and characteristic of nucleoprotein (NP) of Seoul virus R22 strain, which is the seed virus of HFRS candidate vaccine, the NP gene coding region of the R22 S segment was amplified by RT-PCR and then cloned it into pET-3a expression plasmid. Sequence assay showed that the NP gene contains 1 290 nucleotides, which has homology of 96.2% with well known Seoul virus (SR-11) and 71.0% with Hantaan virus (76-118). These results coincide with previous serological testings. The cloned NP gene has been transformed into *E. coli* BL21 and it could give a high expression when induced by IPTG. Western blot and ELISA assay of the purified products showed that expressed NP only reacted with NP-specific MAbs A35 and 3D9, but not with G2-specific MAb 3D8. The expressed NP can be used as a specific antigen for clinical diagnosis.

Key words Seoul virus, Nucleoprotein(NP), Cloning, Sequencing, Expression