维普资讯 http://www.cqvip.com

第15卷第3期 中国病毒学 Vol.15 No.3
2000年9月 VIROLOGICA SINICA Sep. 2000

220-225 R373 Q786

汉滩病毒核蛋白的分段表达及抗原表位分析*

薛小平，徐志凯，马文煜，尹文，张芳琳，闫岩，吴兴安，白文涛

（第四军医大学微生物教研室，西安 710032）

摘要：在大肠杆菌中对汉滩病毒S基因4种不同长度片段的重组表达质粒进行诱导表达。结果表明表达的4种GST-NP融合蛋白均以不溶性包含体形式存在于菌体细胞内，表达量分别占菌体蛋白总量的29－36%，分子量分别约为72 kD、66 kD、54 kD和44 kD。Western blot显示54 kD和72 kD融合蛋白用酶标抗汉滩病毒NP McAb 1A8和抗GST McAb 3C11染色呈阳性反应。66 kD和44 kD融合蛋白仅与酶标3C11呈阳性反应。用凝血酶切去GST，获得4种汉滩病毒重组核蛋白(rNP)，分子量分别约为44 kD、40 kD、26 kD和16 kD。用19株McAb对表达产物做抗原位点分析，结果完整的rNP可与19株McAb中的13株反应，McAb反应谱与天然NP相同；S1.1 kb表达产物(N-端1-37和C端402-429位aa缺失)和S 0.5 kb表达产物(N-端1-274位aa缺失)与19株McAb均不发生反应；S0.7 kb表达产物(C-端275-429位aa缺失)可与5株组特异性McAb反应。表明汉坦病毒核蛋白上的抗原位点主要存在于N-端1-37位aa区段内。

关键词：汉滩病毒；抗原表位；核蛋白

中图分类号：Q786.R373 **文献标识码**：A **文章编号**：1003－5125(2000)03－0220－06

迄今为止的研究表明，绝大多数有囊膜病毒的中和性抗原位点均定位于病毒的囊膜(糖)蛋白上，而在病毒核蛋白上(NP)上则没有中和抗原位点存在。汉坦病毒为有囊膜的RNA病毒，其中和抗原位点主要存在于囊膜糖蛋白G2和G1上。但有研究表明，在汉坦病毒的NP上也有可能有中和性抗原位点存在[1~2]。研究和确定汉坦病毒的抗原特性，将有助于汉滩病毒感染与免疫机制的阐明以及亚单位疫苗的研制，而且有可能丰富人类对有囊膜病毒的中和性抗原位点的分布及基因定位方面的知识。本研究利用DNA重组技术将汉滩病毒S基因编码区全序列或分段克隆入原核表达载体，在大肠杆菌中进行表达，分离纯化表达产物，用抗汉坦病毒单克隆抗体(McAb)做抗原表位分析。

1 材料与方法

1.1 实验材料

1.1.1 菌种与质粒 *E. coli* JM109，pUC18质粒，pGEX-4T系列质粒，均购自Pharmacia公司。pGS质粒：含汉滩病毒76/118株S基因全长片段，由Schmaljohn构建[3]，本校病理学教研室杨守京博士惠赠。质粒pGEX-HanS 1.3，pGEX-HanS1.1，pGEX-HanS 0.7分别含汉滩病毒76/118株S基因编码区全序列或部分片段，由本室尹文硕士构建[4]。

收稿日期：1999－04－19，修回日期：1999－06－14

* 基金项目：国家自然科学基金资助项目(39570038)；军队杰出青年基金资助项目

作者简介：薛小平(1951年－)，男，陕西人，教授，博士，主要从事出血热病毒结构与功能的研究

维普资讯 http://www.cqvip.com

1.1.2　分子生物学试剂　各种限制性内切酶、T4DNA 连接酶、Taq DNA 聚合酶、碱性磷酸酶等;PCR 产物纯化 Kit:Wizard PCR purification system; DNA 纯化 Kit: Wizard DNA cleanup system 分别购自 Promega 公司或 Sangon 公司。

1.1.3　PCR 引物　参照文献[5]设计,引物 1(HS1):5′-GC GAA TTC ATG GCA ACT ATG GAG GAA TTA-3′;引物 2(HS2):5′-GCGTC GAC TTA GAG TTT CAAAGG CTC TTG GTT-3′,由 Sangon 公司合成。

1.1.4　(McAb)　1A8、3G11、A35、H11、3A9、1B3、8E8、2A11 为抗汉坦病毒 NP 组特异性 McAb;5H5、7D12、7C11、7D1 为抗汉滩病毒 NP 型特异性 McAb;3G1 为抗汉滩病毒 NP/G2 双特异性 McAb;13E2、24F12 为抗汉城病毒 NP 型特异性 McAb;8G2、8G3、8G8 为抗汉滩病毒糖蛋白 McAb;3C11 为抗谷胱苷肽转移酶(GST) McAb。以上 McAb 中,除 A35 由陈伯权教授惠赠[6],H11 由唐家琪研究员惠赠[7]外,其余均由本室制备。

1.2　实验方法

1.2.1　含汉滩 S 基因 0.5 kb 片段重组表达质粒的构建　以质粒 pGS 为模板,用引物 HS1 和 HS2 组配扩增 S 基因编码区 1.3 kb 片段,PCR 产物经 *Eco*R I 和 *Sal* I 双酶切后克隆入经同样酶切的 pUC18 质粒,用 *Hind*Ⅲ 和 *Sal* I 从重组质粒 pUC18-S 0.5 切下 0.5 kb 片段,亚克隆到质粒 Bluscript/sk 的相应位点,构建重组质粒 Blu-S 0.5,最后用 *Eco*R I 和 *Sat* I 从该重组质粒上,切取 0.5 kb S 基因片段克隆入表达载体 pGEX-4T1 的相应位点。载体和 DNA 片段的酶切、回收、连接、转化、及阳性克隆的酶切鉴定均按分子克隆手册进行。

1.2.2　重组质粒的诱导表达　4 种 pGEX-HanS 重组质粒的诱导表达均按分子克隆手册[8]进行。

1.2.3　表达产物的纯化　取 100 mL 诱导表达菌液,按文献[9]进行产物纯化。

1.2.4　重组 NP 或 NP 片段的亲和层析　按 Pharmacia 公司 GSH-Sepharose4B 产品说明操作。

1.2.5　表达产物的检测　取丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE)采用不连续系统;薄层层折扫描仪测定表达产物的相对含量。Western blot 按常规进行。

1.2.6　表达产物的抗原性分析　双 McAb ELISA 夹心法。

2　实验结果

2.1　含 S 基因 0.5 kb 片段重组表达质粒的构建和酶切鉴定

按方法 2.1 所述流程构建了含 S 基因 0.5 kb 片段的重组 GST 融合蛋白表达质粒 pGEX-HanS 0.5。重组表达质粒的酶切鉴定结果见(图 1)。

2.2　汉滩病毒 76/118 株 NP 抗原位点的计算机分析结果

根据汉滩病毒 76/118 株 S 基因编码区的核苷酸序列推导出相应的氨基酸序列,通过计算机分析,发现在 76/118 株 NP 上具有 5 个潜在的抗原位点,即 32 位酪氨酸(Y)、79 位谷氨酰胺(Q)、149 位苏氨酸(T)、280 位谷氨酸(E)、355 位亮氨酸(L)。本实验中所构建和选用的重组表达质粒,其表达产物分别携带或交叉携带上述 5 个抗原位点。结果见表 1。

表 1　表达产物检测分析结果

Table 1　Identification of expressing products

基因片段 Gene fragment	核酸位置 *locus of* nucleotide	抗原位点* Antigenic epitope	GST-NP 分子量 *Molecular weight* of GST-NP	rNP 分子量 *Molecular weitht* of rNP
S1.3	37-1327	YQTEL	72 kD	44 kD
S1.1	137-1240	-QTEL	66 kD	40 kD
S 0.7	37-765	YQT--	54 kD	26 kD
S 0.5	768-1327	---EL	43 kD	16 kD

* 计算机分析结果

The results of analysis by computer

维普资讯 http://www.cqvip.com

2.3 GST-NT 融合蛋白的诱导表达和表达产物的 SDS-PAGE 鉴定

含四种不同表达质粒的大肠菌株经 IPTG 诱导后与未诱导的细菌培养物和含空载体的菌株对照，SDS-PAGE 检测结果显示(图2)，空载体菌在约26 kD 处有一条浓染蛋白带，为可溶性 GST。pGEX-HanS1.3 在 7.2 kD 处，pGEX-HanS1.1 在 66 kD 处，pGEX-HanS 0.7 在 54 kD 处，pGEX-HanS 0.5 在 43 kD 处分别出现一条浓染蛋白带。薄层层析扫描显示融合蛋白的表达量分别占菌体总蛋白的 35%、36%、29%和 34%。上述 4 种表达产物分别命名为 S1.3 重组融合 NP(1.3GS-NP)，S1.1 重组融合 NP(1.1GST-NP)、S 0.7 重组融合 NP(0.7GST-NP)和 0.5重组融合 NP(0.5GST-NP)。

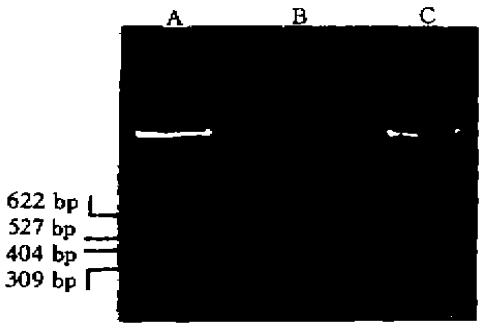

图1 质粒 PGEX-Han 0.5 鉴定结果

Fig.1 Identification of plasmid PGEX-Han 0.5

A: *Eco*R I + *Sal* I B: pBR322/MSP C: *Eco*R I + *Xho* I

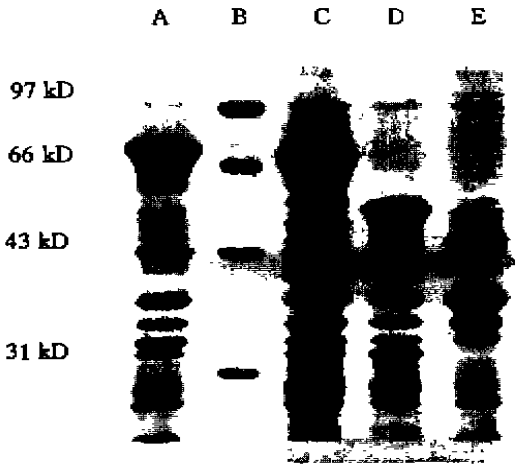

图2 四种表达产物的 SDS-PAGE 结果

Fig.2 SDS-PAGE of the four expressing products

A: GST-1.3NP B: Protein Marker C: GST-1.1NP

D: GST-0.7NP E: GST-0.5NP

2.4 凝血酶对四种 GST-NP 融合蛋白的酶切结果

四种重组融合蛋白表达质粒经 IPTG 诱导后，检测证实表达产物均以不溶性包含体形式存在于菌体细胞内，取菌体裂解后的沉淀提取包含体，随后做变性和复性处理，提取复性后的表达蛋白做活性检测，再用凝血酶消化，切除 GST，取酶解产物做 SDS-PAGE，结果 72 kD 融合蛋白酶解后分为 44 kD 和 26 kD 两个组分，66 kD 融合蛋白分成 40 kD 和 26 kD 两个组分，43 kD 融合蛋白分成 16 kD 和 26 kD 两个组分，而 54 kD 融合蛋白酶解后仅见 26 kD 一条染色带。

2.5 Western-blot 结果

以抗汉坦病毒组特异性 McAb1A8 对四种表达产物(融合蛋白)做 Western blot，其中仅 1.3GST-NP 和 0.7GST-NP 呈阳性反应，以抗 GST McAb 3C11 检测，上述四种表达产物均为阳性。

2.6 GST-NP 融合蛋白的抗原性分析结果

采用 19 株抗汉滩病毒 McAb 对四种重组融合蛋白进行分析的结果表明，1.3GST-NP 可

维普资讯 http://www.cqvip.com

与 8 株抗汉坦病毒 NP 组特异性 McAb、4 株抗汉滩病毒型特异性 McAb 和 1 株抗 NP/G2 双特异性 McAb 反应。0.7GST-NP 可与其中的 5 株抗汉滩病毒组特异性 McAb 反应。1.1GST-NP 和 0.5GST-NP 与 19 株 McAb 均不发生反应。

表 2　McAb 对 GST-NP 融合蛋白的抗原性分析结果

Table 2　Analysis of antigenicity of GST-NP by McAb

McAb	特异性* specificity	位点** epitope	天然 NP authentic NP	1.3GST-NP	1.1GST-NP	0.7GST-NP	0.5GST-NP
1A8	G	a	+	+	—	+	—
3G11	G	a	+	+	−	+	−
#A35	G	b	+	+	−	+	−
8E8	G	d	+	+	−	+	−
3A9	G	g	+	+	−	+	−
7G11	G	c	+	+	−	−	−
H11	G	f	+	+	−	−	−
#1B3	G	h	+	+	−	−	−
2A11	I	ND	ND	ND	−	−	−
5H5	I	i	+	+	−	−	−
7D1	I	i	+	+	−	−	−
7C11	I	i	+	+	−	−	−
7D12	I	k	+	+	−	−	−
*3G1	I	j	+	+	−	−	−
13E2	II	ND	−	−	−	−	−
24F12	II	ND	−	−	−	−	−
#8G2	I	ND	−	−	−	−	−
#8G3	I	ND	−	−	−	−	−
#8F8	I	ND	−	−	−	−	−

*G:组特异性　I:汉滩型　II:汉城型　**引自文献[2]　#中和性抗体

*G:Group specifity　I:HTN　II:SEO　**reference[2]　#Neutralizing antibodeis

3　讨论

徐志凯[2]等在应用一组位点特异的抗汉坦病毒 McAb 以 ELISA 阻断实验对纯化的天然汉滩病毒 NP 做抗原位点分析中发现,汉滩病毒 NP 上至少有 12 个抗原位点。其中 7 个组特异性和 1 个亚组特异性抗原位点至少分布在 2 个区域内,其他抗原位点则可能重叠于上述 2 个区域内。这些抗原位点的重叠有些表现在一级结构上,有些则表现在空间结构上。计算机多肽分析结果显示,在汉滩病毒陈株 NP 上有 5 个抗原表位,与 McAb 分析结果有较大差异。推测其原因(1)计算机分析所得到的仅为病毒 NP 上的线性抗原表位,而 McAb 不仅可以识别 NP 上的线性抗原表位,也可识别空间构象性表位;(2)McAb 做抗原位点分析具有更高的敏感性,FacK 等[10]在利用抗汉坦病毒 G2 和 NP McAb 从噬菌体随机肽库淘筛病毒抗原表位时发现,特异性 McAb 可识别由 4-5 个氨基酸残基构成的抗原表位。

本实验用 19 株汉坦病毒 McAb 对表达产物 rNP 做抗原性分析,结果显示 72 kD 融合蛋白可与其中的 13 株 McAb 发生反应,McAb 反应谱与天然 NP 完全相同;羧基端(aa275-429)区段缺失的 54 kD 融合蛋白(约为完整 NP 的 54%)仅与 5 株 McAb 反应。这 5 株 McAb 分别针

维普资讯 http://www.cqvip.com

对a、b、d、g4个抗原位点。而氨基端(aa1-37)区段和羧基端(aa402-429)区段缺失的66 kD融合蛋白(约为完整NP的84%)和氨基端(aa1-274)区段缺失的43 kD融合蛋白(约为完整NP的38%)与19株抗汉坦病毒McAb均不发生反应。从上述实验结果中,可归纳出以下几点看法:(1)汉滩病毒NP上的抗原表位主要存在于其N-端的aa 1-37的区段内(该区段包含32位酪氨酸抗原位点),而且该区段对于保持汉滩病毒NP的抗原活性有重要作用。66 kD融合蛋白和43 kD融合蛋白与多株McAb不发生反应,可能与这两种表达产物N-端该区段的缺失有关。(2)由于该区段的缺失可能会影响NP的正确折叠,结果不仅破坏了构象性抗原表位的空间构型,而且使线性抗原表位不能充分暴露。(3)54 kD融合蛋白由于缺失C-端154个氨基酸残基的区段,仅能与5株组特异性McAb反应,似乎表明组特异性McAb和型特异性McAb的靶抗原在汉滩病毒NP上的分布具有一定的区域性,也可能与NP的蛋白折叠及抗原的结构依赖性有关,还需进一步实验证实。(4)完整的重组NP可与3株具有中和活性的McAb反应(其中1株McAb的中和活性较低),表明在该NP上至少存在着2个中和抗原位点,其中1个位于该蛋白的氨基端。

参 考 文 献

[1] 徐志凯,汪美先,姜绍谆,等.用McAb对肾综合征出血热50 kD蛋白的分析[J].病毒学报,1988,4:113

[2] 徐志凯,王海涛,肖毅,等.肾综合征出血热病毒50 kD结构蛋白的抗原位点分析[J].单克隆抗体通讯,1992,8(2):30

[3] Schmaljohhn CS, Jernings G, Hay *et al*. Codng strategy of the S genome segment of Hantann virus [J]. Virology, 1986, 155:633

[4] 尹文,徐志凯,闫岩,等.汉坦病毒S基因的分段表达及其表达产物的鉴定[J].细胞与分子免疫学杂志,1998,1:23

[5] Mifang L, Dexin L, Shu yan X *et al*. Antigenic and molecular characterization of Hantavirus isolates from China virus [J]. Virus Research, 1994, 31:219

[6] 陈伯权,倪大石,沈宏开,等.广谱肾综合征出血热病毒单克隆抗体A35的生物学性状[J].病毒学报,1987,3(3):296

[7] 唐家琪,陈竟芳,张炳根,等.肾综合征出血热病毒单克隆抗体的制备及其特性鉴定[J].中华微生物和免疫学杂志,1987,7(4):237

[8] 萨姆布鲁克J,弗里奇EF,曼尼阿蒂斯T著.金冬雁等译.分子克隆实验指南[M],第二版,北京:科学出版社,1992

[9] Sigimoto S, yokoo Y. Purification of recombinant salmon growth hormone expressed is *Escherichia coli* [J]. Biotechno. Lett, 1991, 13:289

[10] Fack F, Hungle-Durr B, Sung D, *et al*. Epitope mapping by phage display random gene fragment libraries. Expression of various truncated fragments of S gene of HTNV strain 76-118 and analysis of antigenic epitope [J]. J. Immunol. Methe. 1997, 206(102):43

维普资讯 http://www.cqvip.com

Expression of Truncated HTNV Nucleoprotein and Analysis of Antigenic epitope

XUE Xiao-ping, XU Zhi-kai, MA Wen-yu *et al*

(*Dept. of Microbiology, Fourth Military Medical University, Xi'an 710032, China*)

Abstract: The expressing vector carring various truncated fragments of S gene of HTNV strain 76-118 was constructed and the vector efficienly expressed in *E. coli*. The result demonstrated that the GST-NP fusion proteins exist in the form of inclusion bodies in *E. coli*, the expressing amount accounted for 29-36% of the total proteins, and the molecular weights were 72 kD, 66 kD, 54 kD and 44 kD, respectively. Western blot showed that all of the four fusion proteins were positive stained with HPR-labeled anti-GST McAb 3C11, but only the 72 kD and 54 kD fusion proteins were positive stained with HRP-labeled anti-NP McAb 1A8. Four recombinant NP (rNP), which molecular weights were 44 kD, 40 kD, 26 kD and 16 kD respectively, were obtained by removing GST from purified GST-NP fusion proteins with thrombin. Mapping of antigenic epitope was done by 19 strains McAb. The result showed that 72 kD fusion protein could react with 13 strains McAb, which was same as authentic NP of HTNV. The truncated fusion protein (deleting aa 1-37 at N-teminal and aa 402-429 at c-terminal) expressed by S1.1 kb fragment and S 0.5 kb fragment (deleting aa 1-274 at N-terminal) did not react with all 19 strains McAb. The truncated fusion protein (deleting aa 275-429 at c-terminal) expressed by S 0.7 kb fragment reacted with 5 strains of group-specific McAb, which suggested that antigenic epitopes on NP of HTNV were located in the N-terminal of NP and distribution of group-specific and type-specific antigenic epitope showed some regional.

Key words: Hantaan virus; Nucleocapsid protein; Mapping epitope