

汉滩病毒 S 基因及其 5' 端真核表达载体的构建及在细胞中的表达

潘蕾, 白雪帆, 黄长形, 李光玉, 陈红梅, 韦三华, 杨为松
(第四军医大学唐都医院传染科, 西安 710038)

Construction of HV S and 5' Terminal of S Gene Segment Eukaryotic Expression Vectors and Transfection into Vero Cells

PAN Lei, BAI Xue-fan, HUANG Chang-xing, LI Guang-yu, CHEN Hong-mei,
WEI San-hua, YANG Wei-song

(Department of Infectious Diseases, Tangdu Hospital, The 4th Military Medical University, Xi'an 710038, China)

Abstract: In order to provide some data for study of T cell epitope, HV S and 5' terminal of S gene segment were inserted into an eukaryotic expression vector pcDNA3.1/V5-His TOPO. The recombinant expression plasmids pcDNA3.1-S and pcDNA3.1-S-N were constructed. Vero cells were transfected in vitro with them. The transient expression of HV S and 5' terminal of S gene segment in vero cells was detected by indirect immunofluorescence assay (IFA).

Key words: Hantaan virus; S gene segment; Nucleocapsid protein

摘要: 体外研究汉滩病毒(HTNV)S 基因及其 5' 端表达的意义, 为核蛋白 T 细胞表位的研究奠定基础。设计 2 套引物, 用 PCR 方法从 PBV220-S22 原核质粒中扩增出 S 基因全读码框(37-1326bp)及 S 基因 5' 端(37-501bp), 用 TA 克隆将其克隆入 pcDNA3.1/V5-His-TOPO 载体中, 成功构建 pcDNA3.1-S 及 pcDNA3.1-S-N 真核表达载体, 并通过脂质体转染至 Vero 细胞中, 进行了瞬时表达。间接免疫荧光成功检测到 pcDNA3.1-S 及 pcDNA3.1-S-N 在 Vero 细胞中的表达。pcDNA3.1-S 及 pcDNA3.1-S-N 真核表达载体有较高的转染效率, 目的基因能在宿主细胞中表达, 有利于研究 HTNV-S 基因在 T 细胞表位研究中的意义。

关键词: 汉滩病毒; S 基因; 核蛋白

中图分类号: R373 文章标识码: A 文章编号: 1003-5125(2002)01-0047-04

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, 我国是肾综合征出血热发生和流行的主要疫区, 该病具有起病急、病死率高, 流行范围广等特点, 而目前其致病机理尚不完全清楚。核衣壳蛋白(Nucleocapsid Protein, NP)是汉坦病毒(hantaviruses, HV)的主要结构蛋白。已知 HV 约 45Kd~51Kd 的 NP 由 428~433 个氨基酸组成, 其 N 端约 100 个氨基酸大部分具有亲水性, 且能被患者血清及许多单克隆抗体所识别^[1-3]。虽然对 HV NP 氨基端蛋白的原核表达产物的抗原性及免疫原性已进行了许多研究, 并已用于出血热的诊

断, 但该抗原表位的精确一级结构及其基因定位迄今尚未完全明确。而研究 T 细胞表位的前提是首先要构造含病原体抗原基因片段的表达载体质粒。为了从真核水平探索汉滩病毒 S 基因表达的情况, 为下一步 T 细胞表位的研究做准备, 提供转染靶细胞的 S 基因片段。我们对 S 基因全读码框架及 S 基因 5' 端在 Vero 细胞中进行了真核表达。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 质粒 pcDNA3.1/V5-His-TOPO

收稿日期: 2001-06-21, 修回日期: 2001-07-27

作者简介: 潘蕾(1972-), 女, 浙江遂昌籍, 住院医师, 助教, 博士生, 从事汉坦病毒的分子生物学研究。

真核表达载体 pcDNA3.1/V5-His-TOPO 购自美国 INVITROGEN 公司,其结构示意图见图 1。

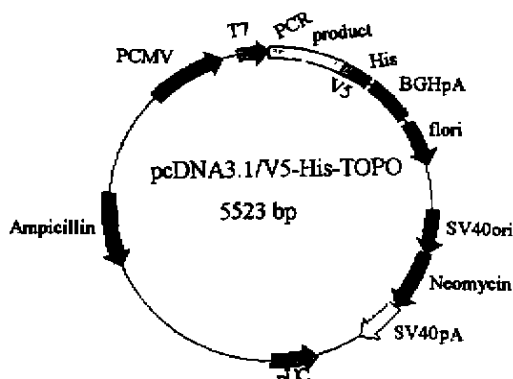


图1 质粒 pcDNA3.1/V5-His-TOPO 结构示意图

Fig. 1 Map of pcDNA3.1/V5-His-TOPO

1.1.2 引物设计与合成

根据 Schmaljohn CS 等^[4]发表的 HV 76-118 株 S 基因片段序列的资料,并参照 Morii M 等^[5]及 Arikawa J 等^[6]的文献,设计引物 Primer 76-1: 5'-GGG CTC GAG ATG GCA ACT ATG GAG GAA TTA CAG -3'; Primer 76-2: 5'-TTA GGT CCC TTT ATT ATC CTT GGT AGT -3'; Primer 76-4: 5'-GGG GAA TTC TTA GAG TTT CAA AGG CTC TTG GT-3'。由大连 Takara 生物工程公司合成。Primer 76-1 5' 端含 CTCGAG *Xho*I 酶切位点, Primer 76-4 5' 端含 GAATTC *Eco*RI 酶切位点。

1.2 方法

1.2.1 目的基因的制备

模板质粒 PBV220-S22(含 HTNV S 基因全读码框),由我室黄长形博士构建。以其为模板,以引物 76-1 和 76-4 扩增 S 基因全读码框(37-1 326bp), PCR 反应体系为取质粒 PBV220-S22 0.5 μ L 作为 PCR 扩增的模板,再加入 2.5mmol/L dNTP 2 μ L, Taq 酶 1.5U, 10 \times Buffer 2 μ L, 引物 76-1 和 76-4 各 10pmol, 补加去离子水至总体积 20 μ L。待 PCR 仪(PE 2400 型)温度升至约 60 $^{\circ}$ C 时进入 PCR 循环,其参数为 96 $^{\circ}$ C 变性 5min, 96 $^{\circ}$ C 45s, 68 $^{\circ}$ C 60s, 72 $^{\circ}$ C 90s, 共循环 35 次后, 72 $^{\circ}$ C 延伸 10min。以引物 76-1 和 76-2 扩增 S 基因 5' 端(37-501bp), PCR 反应体系同上。循环参数为 96 $^{\circ}$ C 变性 5min, 96 $^{\circ}$ C 30s, 62 $^{\circ}$ C 45s, 72 $^{\circ}$ C 45s, 共循环 35 次后, 72 $^{\circ}$ C 延伸 10min。PCR 产物用 Promega 公司 PCR 产物回收试剂盒回收纯化。

1.2.2 目的基因和载体的连接、转化

用 Invitrogen 公司的 pcDNA3.1/V5-His-TOPO TA cloning Kit 连接、转化。目的基因和载体在 TOPO 酶的作用下,室温连接 5min,取 2 μ L 连接产物转化感受态细菌,在 Amp 抗性培养板中 37 $^{\circ}$ C 温育过夜。

1.2.3 重组质粒的鉴定

采用双位点单酶(Promega)切鉴定。酶切鉴定得到的阳性克隆,送 Takara 公司进行核苷酸序列测定,用生物软件 pcgene 分析汇总结果。

1.2.4 重组质粒转染 Vero 细胞

采用脂质体介导的方法。将无菌盖玻片放入 6 孔板中,传 Vero 细胞入 6 孔板,长满至 90% - 95% 时,更换为 2.5mL 无血清和抗生素的 DMEM 培养液。5 μ g 重组质粒和 15 μ L 脂质体(Gibco)加入 500 μ L 无血清和抗生素的 DMEM 中,室温混合 30min。缓慢加入到 6 孔板中,37 $^{\circ}$ C 5% CO₂ 孵育 6h 后,更换为有血清和抗生素的 DMEM,48h 后,拿出盖玻片,冷丙酮固定 15min,吹干。

1.2.5 重组质粒在宿主细胞中表达的检测

采用间接免疫荧光方法。在盖玻片上加 1:50 稀释的 HFRS 病人血清,37 $^{\circ}$ C 温育 1h。PBS 洗,吹干。再加 1:10 稀释的 FITC 标记的羊抗人 IgG(军事医学科学院),37 $^{\circ}$ C 温育 1h。PBS 洗,吹干。荧光显微镜下观察。

反复冻融裂解表达细胞,经饱和硫酸铵分级沉淀表达的核蛋白,过 Sepharose-4B 柱,收集蛋白峰,采用夹心 ELISA 检测表达蛋白。

2 结果

2.1 重组质粒 pcDNA3.1-S 及 pcDNA3.1-S-N 的构建

以引物 76-1、76-4 和 76-1、76-2 扩增出的 S 基因片段(1 308bp, 477bp 见图 2),分别克隆到 pcDNA3.1/V5-His-TOPO 载体中,转化大肠杆菌,在 Amp 抗性培养板中 37 $^{\circ}$ C 温育过夜,均可见散在的抗性克隆菌落生长。

2.2 重组质粒 pcDNA3.1-S 及 pcDNA3.1-S-N 的鉴定

用 *Hind* III 酶切 pcDNA3.1-S 得到 793bp 的预期片段。用 *Xho* I 酶切 pcDNA3.1-S-N 得到 511bp 的预期片段。见图 3。

酶切鉴定获得的阳性克隆,送 Takara 公司测序,与 76-118 株 S 基因序列比较,完全一致。表明

目的基因成功克隆入目的载体。

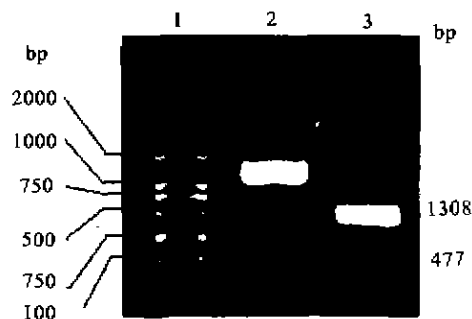


图 2 S 基因片段的扩增结果

1, DL-2000 DNA 参照; 2, 全 S 基因扩增结果; 3, S 基因 5' 端扩增结果。

Fig. 2 Amplification results of S gene fragments

1, DL-2000 DNA marker; 2, Amplification result of S gene segment; 3, Amplification result of 5' terminal of S gene segment.

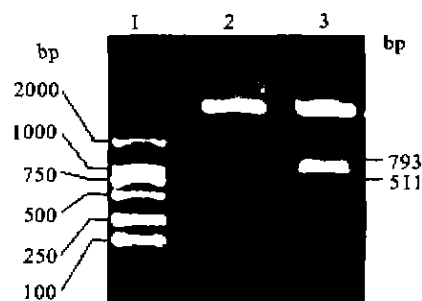


图 3 酶切鉴定结果

Fig. 3 Identification of recombinant plasmids with restriction enzymes
1, DL-2000 DNA marker; 2, Identification of pcDNA3.1-S-N with *Xho*I; 3, Identification of pcDNA3.1-S with *Hind*III.

2.3 重组质粒 pcDNA3.1-S 及 pcDNA3.1-S-N 在 Vero 细胞中的表达

间接免疫荧光 (IFA) 检测见彩版 II 图 4。以空载体转染的 Vero 细胞为阴性对照, 在检测重组质粒转染的 Vero 细胞中, 表达核蛋白及其氨基端的细胞胞浆内可见绿色荧光。

2.4 表达核蛋白的夹心 ELISA 检测结果见图 5

3 讨论

血清学研究早已发现, HV 核衣壳蛋白 (Nucleocapsid Protein, NP) 具有很强的抗原性和免疫原性, 患者对 NP 的抗体应答不仅出现得早, 而且滴度高。应用单克隆抗体进行的研究表明, 抗 NP 血清或单抗虽然没有中和活性, 但用 NP 免疫的动物仍可产

生一定的抗病毒免疫。此外还发现抗血清或单抗可与多种血清型病毒抗原产生交叉反应, 而 NP 抗原也可与汉坦病毒属内的多种血清型病毒的免疫血清产生交叉反应, 表明汉坦病毒 NP 具有共同的抗原决定簇。上述研究结果已为其后陆续发表的汉坦病毒属病毒 S 基因核苷酸序列的测定和比较所证实。

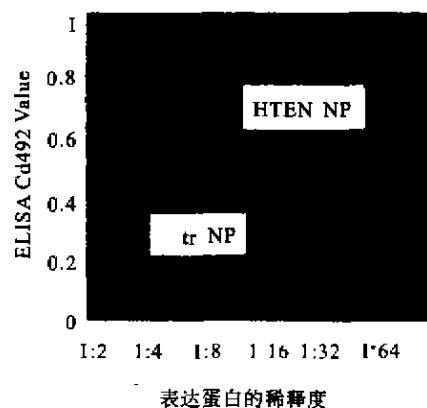


图 5 夹心 ELISA 检测纯化核蛋白结果

Fig. 5 Detection of purified NP by sandwich ELISA

核蛋白属内源性抗原, 它刺激机体的免疫系统主要引起由 CD8⁺ 介导的细胞免疫应答, 故汉滩病毒 T 细胞表位的研究主要是研究核蛋白上的 T 细胞表位。关于汉坦病毒属病毒 NP T 细胞表位的研究, 近年已有较多的报道。但对于急性 HFRS 病人感染的汉滩病毒 NP 的 T 细胞表位, 至今未有报道。

美国马萨诸塞大学医学中心与美国陆军传染病医学研究所^[7], 韩国的 Park J M 等^[8]及美国的 Ennis F A 和 Cruz J 等^[9]研究认为, 核蛋白上的线性表位主要存在于核蛋白氨基端, 线性表位中也可能存在着 T 细胞表位。

在汉坦病毒和 HFRS、HPS 的基础和防治研究中, 确定病毒抗原表位的结构和功能具有重要的意义, 一方面可以了解有关汉坦病毒免疫反应的众多信息, 为进一步阐明 HFRS 的发病机理和指导临床治疗奠定基础, 另一方面可用于指导诊断试剂的开发及疫苗的研制。总之, 目前有关汉坦病毒抗原表位的研究方兴未艾, 相信随着我们对于汉坦病毒结构和特性研究的不断深入, 汉坦病毒的致病机理和免疫应答特点将逐步阐明, HFRS 诊断试剂的开发及疫苗研究也将因此获益。

虽然对 HV NP 氨基端蛋白的原核表达产物的

抗原性及免疫原性已进行了许多研究,并已用于出血热的诊断,但该抗原表位的精确一级结构及其基因定位迄今尚未完全明确。我们设计了2套引物,用PCR方法从PBV220-S22原核质粒中扩增出S基因的目的片段,用TA克隆将其克隆入pcDNA3.1/V5-His-TOPO载体中,成功构建pcDNA3.1-S及pcDNA3.1-S-N真核表达载体,并通过脂质体转染至Vero细胞中,进行了瞬时表达。间接免疫荧光成功检测到pcDNA3.1-S及pcDNA3.1-S-N在Vero细胞中的高效表达。pcDNA3.1/V5-His-TOPO质粒是能在哺乳动物细胞中高效表达的真核载体,它含有CMV启动子,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。且其含有的V5和His便于表达蛋白的检测和纯化,并具有与目的基因连接迅速、高效的特点。Vero细胞作为分离培养汉滩病毒最广泛应用的细胞系,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意义。我们对S基因氨全读码框架及S基因氨基端进行了真核高效表达,以期为T细胞表位的研究奠定基础,提供转染靶细胞的S基因片段,为最终确定NP上的T细胞表位,提供一定的工具和资料。

参考文献

- [1] Gott P, Zoller L, Darai G, *et al.* A major antigenic domain of Hantaviruses is located on the aminoproximal site of the viral nucleocapsid protein[J]. *Virus Res*, 1997, 14:31-40.
- [2] Elgh F, Lundkvist A, Alexeyev O A, *et al.* A major antigenic domain for the human humoral response to Puumala virus nucleocapsid protein is located at the amino-terminus[J]. *J Virol Meths*, 1996, 59:161-172.
- [3] 白雪帆, 杨为松, 张文彬, 等。流行性出血热病人对三种病毒结构蛋白的抗体应答。中华传染病杂志[J], 1992, 10:187-191.
- [4] Schmaljohn C S, Jennings G B, Hay John, *et al.* Coding strategy of the S genome segment of hantaan virus[J]. *Virology*, 1986, 166:633-640.
- [5] Mori M, Yoshimatsu K, Arikawa J, *et al.* Antigenic characterization of Hantaan and seoul virus nucleocapsid proteins expressed by recombinant baculovirus: application of a truncated protein, lacking an antigenic region common to the two viruses, as a serotyping antigen[J]. *J Clin Microbiol*, 1998, 2514-2521.
- [6] Arikawa J, Lapenotiere H F, Iacono C L, *et al.* Coding properties of the S and the M genome segments of Sapporo rat virus: comparison to other causative agents of hemorrhagic fever with renal syndrome[J]. *Virology*, 1990, 176:114-125.
- [7] Van Epps H L, Schmaljohn C S, Ennis F A. Human memory cytotoxic T lymphocyte(CTL) responses to Hantaan virus infection: identification of virus-specified and cross-reactive CD8+ CTL epitopes on nucleocapsid protein[J]. *J Virology*, 1999, 73(7):5301-5308.
- [8] Park J M, Cho S Y, Hwang Y K, *et al.* Identification of H-2K(b)-restricted T cell epitopes within the nucleocapsid protein of Hantaan virus and establishment of cytotoxic T cell clones[J]. *J Med Virol*, 2000, 60(2):189-199.
- [9] Ennis F A, Cruz J, Spiropoulou C F, *et al.* Hantavirus pulmonary syndrome; CD8+ and CD4+ cytotoxic T lymphocytes to epitopes on Sin Nombre Virus nucleocapsid protein isolated during acute illness[J]. *Virology*, 1997, 238:380-390.