维普资讯 http://www.cqvip.com

第17卷 2期
2002年5月
中 国 病 毒 学
VIROLOGICA SINICA
17(2):189-192
May 2002

人巨细胞病毒PP71基因序列分析与表达*

张裕平,陈绳亮,陈立群,李天宪**
(中国科学院武汉病毒研究所,湖北 武汉 430071)

Sequencing and Expression of *PP71* Gene of Human Cytomegalor Virus

ZHANG Yu-ping, CHEN Sheng-liang, CHEN Li-qu, LI Tian-xian**
(*Wuhan Institute of Virology, Chinese Academy of Sciences, Wuhan* 430071, *China*)

Abstract: PP71 gene of the Human cytomegalor virur(HCMV AD-169) strain was amplified by PCR. After digestion by *Bam*H I and *Hin*d Ⅲ, the fragment was cloned into the high level expression vector pET28a. Recombinant plasmid pET28a-PP71 was transformed into *E. coli* BL21(DE3) and Induced by IPTG, high level protein was produced, and the target protein was 40% of all proteins. Purification recovery rate was high and up to 92.4% of the target protein before purification, which provides scientific basis on research of HCMV pathogenesis and diagnosis.

Key words: Human Cytomegalor Virus, *PP71* gene, Clone, Protein expression

关键词:人巨细胞病毒;*PP*71(UL82)基因;克隆;表达
中图分类号:R373 **文章标识码**:A **文章编号**:1003-5125(2002)02-0189-03

人巨细胞病毒(Human cytomegalo virus)在人群中存在非常普遍,大多数呈临床不显性或潜伏感染,孕妇HCMV复发感染或新的感染均可引起新生儿宫内或围产期感染,导致胎儿畸形、智力低下和发育迟缓等。人是HCMV的唯一宿主,病毒可通过人与人间的直接或间接接触传播。近年来对HCMV的致病机理的研究已日趋深入,已有多项研究证实,HCMV-*PP71*(*UL82*)基因是病毒抗原之一。亦有研究证实,HCMV-*PP71* 是(*UL82*)基因产物,可促进病毒后期的基因表达,提高病毒的复制能力。本实验对 *PP71*(*UL82*)基因进行了克隆、序列分析与表达,为深入研究 *PP71*(*UL82*)基因与HCMV致病机理之间的相互关系和作用提供了科学的试验依据。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 细胞及病毒 人巨细胞病毒(HCMV-AD_{169}),人胚肺细胞为本室保存。

1.1.2 质粒和菌种 表达载体pET28a、大肠杆菌BL21(DE3)由本所胡志红研究员惠赠。

1.1.3 酶及生化试剂 限制性内切酶、IPTG均为华美公司产品,Taq DNA polymerase、dNTPs为TAKARA公司产品,琼脂糖、低熔点琼脂糖为Gibcol公司产品,SDS、丙烯酰胺、N,N-亚甲基双丙烯酰胺、TEMED、过硫酸胺为Amresco公司产品,层析介质Sephadex G-75、λDNA/*Hin*d Ⅲ+*Eco*R I、Markers、低分子量蛋白标准为Sigma公司产品。

1.2 方法

1.2.1 参照文献[3]增殖人胚肺细胞及病毒,参照文献[4]提取病毒DNA。

1.2.2 引物设计及合成 引物由计算机Primer软件辅助设计[5],上海生物工程公司合成。

上游引物为 5′-GGGGGGATCCTAAGTGGAAGCGGTGCTGAT-3′

收稿日期:2001-09-28,修回日期:2001-11-14
* 基金项目:中国科学院非教育系统留学基金资助项目(B类)
作者简介:张裕平(1970—),男,湖北省籍,讲师,硕士生,主要从事病毒分子生物学的研究。
** 通讯作者:李天宪(1954—),女,浙江省籍,研究员,主要从事医学病毒研究。Correspondence author.

维普资讯 http://www.cqvip.com

下游引物为 5′-GGGAAGCTTAACAACACG-GTCTCGGTACT-3′

下划线部分分别为 *Bam*H I 和 *Hin*d Ⅲ内切酶位点。

1.2.3 目的基因扩增 PCR 扩增反应为每个循环 94℃变性 1min，55℃退火 1min，72℃延伸 2min，共 35 个循环，最后 72℃延伸 10min[7]。

1.2.4 PCR 产物回收、质粒的扩增、提取、PCR DNA 及质粒的内切酶酶切、连接、转化等参照文献[6]。

1.2.5 重组质粒的筛选、检测 选择卡那霉素的 LB 筛选平板上的单个菌落，利用加有卡那霉素的 LB 液体培养基 37℃培养过夜，提取重组质粒，双内切酶酶切和 PCR 检测。

1.2.6 *PP71* 基因序列测定 委托上海生物工程公司利用全自动测序仪测定。

1.2.7 *PP71* 在大肠杆菌中诱导表达[8] 含有 pET28a 和 pET28a-*PP71* 的 BL21(DE3)菌株，37℃震荡培养至吸光度 A_{600}为0.5，用浓度 0.5mmol/mL 的 IPTG 终诱导培养 4h，收集菌体，12% SDS-PAGE 电泳、考马斯亮蓝染色，利用核酸-蛋白测定仪测定表达蛋白的含量。

1.2.8 表达产物可溶性分析及蛋白纯化 取诱导好的菌体同细菌缓冲液裂解，室温放置 2h 后，12 000r/min离心 10min，取上清和沉淀做 SDS-PPAGE 电泳，确定蛋白的可溶性；沉淀用包涵体裂解缓冲液溶解，室温 2h，随后利用包涵体复性缓冲液复性过夜，离心取上清浓缩至1.5mL左右，利用亲和蛋白回收试剂盒纯化，SDS—PAGE 电脉检测纯度，同时利用核酸蛋白测定仪测定蛋白质浓度。

2 结果

2.1 HCMV *PP71* 基因 PCR 扩增

结果见图 1，0.8% 的琼脂糖凝胶检测结果显示：所扩增片段 1303bp，与国际基因库 *PP71* 基因大小一致，为目的基因片段。

2.2 重组质粒筛选及检测

利用限制性内切酶 *Bam*H I 和 *Hin*d Ⅲ酶切鉴定重组子pET28a-*PP71*，结果如图 2，重组质粒的酶切片段与目的基因片段大小一致，说明所筛选的重组质粒无误。

通过与国际基因库中基因序列分析比较，发现所克隆的 HCMV *PP71* 基因与基因库中的 HCMV *PP71* DNA 序列的同源性为 99.69%。

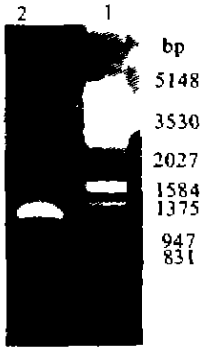

图 1 PCR 产物电泳图谱

泳道 1，PCR 产物；2，λ DNA/ *Hin* d Ⅲ + *Eco* R I Markers.

Fig.1 Agrose analysis of PCR product

Lane 1, PCR product; 2, λDNA/ *Hin* d Ⅲ + *Eco* R I Marker.

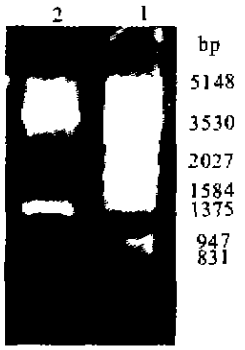

图 2 pET28a-*PP71* 酶切电泳图

泳道 1，Double digestion by *Bam* HI and *Hin* dⅢ；2，λDNA/ *Hin*d Ⅲ + *Eco*R I Marker

Fig 2 Digestion analysis of pET28a-*PP71*

Lane1, Double digestion by *Bam*H I and *Hin*d Ⅲ；2，λDNA/ *Hin*d Ⅲ + *Eco*R I Marker

2.3 目的基因 *PP71* 蛋白的诱导表达

诱导表达含有重组质粒 pET28a-*PP71* 的大扬杆菌 BL21(DE3)，SDS-PAGE 电泳检测到一分子量约 40kD 的蛋白条带(图 3)，而质粒载体中无此蛋白条带。测定表达蛋白量占菌体总蛋白量的 40%。

2.4 表达蛋白的纯化

纯化后菌体蛋白 SDS-PAGE 电泳结果见图 4，表达蛋白仅一种，未见杂蛋白。经核酸蛋白扫描仪扫描，其纯度为 96%。经核酸蛋白测定仪定量分

维普资讯 http://www.cqvip.com

析，纯化后蛋白量为纯化前蛋白量的92.4%。

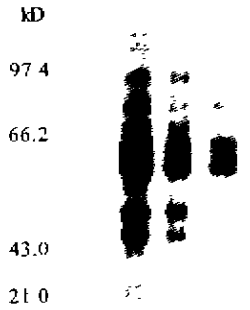

图3　表达产物的 SDS-PAGE 电泳图

泳道 1，蛋白分子量标准；2-3，pET28a-*PP71* 诱导表达蛋白；4，pET28a 诱导表达蛋白。

Fig.3　The SDS-PAGE pattern of expression product

Lane1, Marker; 2-3, Induce expression protein of pET28a-*PP71*; 4, Induce expression protein of pET28a.

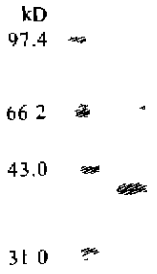

图4　表达蛋白纯化 SDS-PAGE 电泳图

泳道 1，蛋白分子量标准；2，纯化后蛋白。

Fig.4　The SDS-PAGE pattern of purification from expression protein

Lane1, Marker; 2, Protein after purification.

3　讨论

理论上目的蛋白的表达量可达总蛋白量的50%以上，而本实验中，目的蛋白的表达量不到50%，即使优化了表达条件，表达量仅有39%左右，究其原因，可能是该载体表达的目的蛋白以包涵体形式存在，目的蛋白裂解不完全而导致表达蛋白的含量偏低。所表达蛋白分子量为40kD，比理论值38.8kD稍大，估计是表达载体 pET28a 的与目的基因重组后，在不改变外源基因编码序列的基础上，载体自身带有的6个 His-tag 得到表达、连接到了外源蛋白 N 端或 C 端所致，亦有研究也曾报道过类似现象，可试用高效液相色谱法进行分子量测定。在蛋白质层析分离纯化过程中，采用尿素处理得到的蛋白纯化回收率高，为92.4%，其纯度及回收率高，洗脱条件温和，不破坏蛋白的生物活性。

据报道[12]对 HCMV-AD169 株完成了基因组的全部测序工作（EMBL 基因数据库录入号为 X17403）。HCMV-*PP71* 是 UL82 基因产物，分布在"上基质"，对 HCMV 的 IE1 和 IE2 基因表达有促进作用，同时促进病毒后期表达，提高病毒复制能力、加速病毒细胞—细胞间传播和空斑形成等作用。研究 HCMV-*PP71*（UL82）基因结构与功能，对探讨和阐明 HCMV 致病机理之间的相互关系和作用具有重要意义。本实验对 *PP71*（UL82）基因的克隆、序列分析与表达作出分析，可为深入研究 HCMV 的致病机理提供科学的试验依据。

参考文献

[1] 王朝晖 巨细胞病毒分子生物学研究进展[J]. 国外分子生物学分册，1994，9：151－154

[2] Schmitz, Deimling U, Flehmig B. Detection of IgM antibodies to CMV using an enzyme－labelled antigen[J]. Virology, 1980, 50: 59

[3] 黄楠祥主编. 医学病毒学基础及实验技术[M] 北京：科学出版社，1990，830－857，130－137.

[4] 张裕平、李天宪，张俊杰，等 三种疱疹科病毒 DNA 提取方法的建立[J]. 中华微生物学和免疫学杂志，2000，2：174

[5] 齐义鹏 基因及其操作原理[M] 武汉：武汉大学出版社，1998. 250－252

[6] （美）萨姆布鲁克，E F 弗里奇，T. 曼尼阿蒂斯著. 分子克隆实验指南（第二版）[M] 北京：科学出版社，1992 34－49

[7] 林万明 PCR 技术操作和应用指南[M]. 北京：人民军医出版社，1995. 5－91.

[8] Kim MN, Park CG, Hwang ES, *et al* Gene cloning of the humancytomegalo virus（HCMV）antigen reactive with the serum from a HCMV－infecrd patient[J]. J. Korean Med science 1994, 9(6): 476－481.

[9] Baldick J R, Andrew Marchini, Catherine E, *et al*. Human Cytomegalovirus Tegument Protein *PP71* Enthance the Infectivity of Viral DNA and Accelerates the Infections Cycle[J] Virol, 1997 4400－4408.

[10] Gabriele M Hensel, Hemmo H Meyer, Inga Buchmann, *et al* Intracellular localization and expression of the human cytomegalovirus matrix prospoprotein *PP71*（UL82）: evidence for its translocation into the nucleus. Gen Virol, 1996, 77: 3087－3097

[11] Elizabeth G, Homer, Angela Rinaldi, *et al*. Acativation of Herpesvirus gene expression by the human cytomegalovirus protein *PP71* virol. 1999 8512－8518

[12] 金 奇. 医学分子病毒学[M] 北京：科学出版社，2001. 763－783