

# 猕猴 B 病毒 gC 蛋白特异性抗原表位的合成和表达

隋丽华, 孙兆增, 刘 一, 张小飞, 崔晓霞, 赵彦斌, 刘 冰, 许 琴, 曾 林

(军事医学科学院实验动物中心, 北京 100071)

**【摘要】** 目的 获得 B 病毒 gC 蛋白的特异性表位抗原。方法 利用长片段基因合成的方法, 合成 B 病毒 C 蛋白的特性抗原表位基因, 将该基因连接到 pMAL-5x 载体, 转化到 BL21 受体菌进行表达, 并纯化表达产物。结果 成功的获得了 B 病毒 gC 蛋白的特异性抗原蛋白, 该蛋白以可溶的形式表达。结论 利用原核表达系统, 可以产生 B 病毒 gC 蛋白的可溶性抗原, 可以作为 B 病毒的检测抗原。

**【关键词】** 猕猴 B 病毒; C 蛋白; 抗原表位; 合成与表达

**【中图分类号】** Q95-331; R332 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856(2012)07-0021-04

doi: 10.3969/j.issn.1671.7856.2012.007.006

## Synthesis and Expression of Monkey B Virus Glycoprotein C Specific Antigen Epitope

SUI Li-hua, SUN Zhao-zeng, LIU Yi, ZHANG Xiao-fei, CHUI Xiao-xia, ZHAO Yan-bin, LIU Bing, XU Qin, ZENG Lin  
(Laboratory Animal Center of the Academy of Military Medical Sciences, Beijing 100071, China)

**【Abstract】 Objective** To get specific antigen epitope of B virus gC protein. **Methods** Synthesis specific antigen epitope of B virus gC gene by using synthesis gene of Long fragment, cloned the gene into the pMAL-5x vector and transformed into E. coli BL21 to express and purify the expression product. **Results** We get the B virus gC protein specific antigen protein successfully, and the protein expression in soluble form. **Conclusion** Prokaryotic expression system can produce soluble B virus gC protein antigen and can be used as the detection of B virus antigen

**【Key words】** Macaque B Virus; gC protein; Antigen epitope; Synthesis and expression

猕猴 B 病毒(macaque B virus)是人兽共患病病毒,在自然宿主猕猴体内多呈潜伏感染,一般不表现临床症状。B 病毒在幼猴体内的存在比率约 10% 左右,随着年龄的增加,阳性率越来越高,在有些饲养场的老年猴群中,B 病毒的阳性率在 90% 左右。B 病毒阳性的猕猴,终生携带病原,传染性较强。因此,及时、准确的检测出 B 病毒,并控制其传播,对于猕猴的生产和人兽共患病的防控,具有重要意义。

猕猴 B 病毒属于疱疹病毒属,为生物安全 4 级病原,因此在研制猕猴 B 病毒的检测试剂时,用全病毒做抗原检测抗体的可行性较小,而它与人的单纯疱疹病毒 1 型(human simple herpes virus-1, HSV-1)和人的单纯疱疹病毒 2 型(human simple herpes virus-2)病毒具有较强的抗原交叉性,目前多用单纯疱疹病毒做抗原替代猕猴 B 病毒,但作为诊断试剂,不仅要求灵敏度高,而且要求具有良好的特异性,才能更好地区别 B 病毒与其它疱疹

**【基金项目】** 十二五重大专项“高致病病原动物模型研究”(2012ZX10004502)。

**【作者简介】** 隋丽华(1970 - )女,高级实验师,研究方向:实验动物微生物检测。

**【通讯作者】** 曾林(1965 - )研究员,研究方向:实验动物科学与管理。

病毒<sup>[1,2]</sup>。

用于 B 病毒检测的重组抗原主要是其囊膜蛋白 gB、gC 和 gD, gB 重组蛋白作为抗原, 检出率最高, 但特异性较差, gD 的检出率和特异性都较差。gC 蛋白作为重组抗原的检出率虽然低于 gB, 但特异性强, 其不仅参与病毒的吸附<sup>[8,9]</sup>, 还对病毒粒子的释放、病毒的毒力以及病毒粒子的稳定性有影响<sup>[10]</sup>。其作为猕猴 B 病毒诊断的候选抗原具有一定优势。因此, 本研究选择 B 病毒 gC 的特异性抗原表位区域, 采用长片段基因合成的方法合成这段基因, 并利用原核表达系统进行表达, 期望获得灵敏性和特异性较好的重组蛋白, 为猕猴 B 病毒检测试剂盒的研制奠定基础。

## 1 材料和方法

### 1.1 实验用菌株和质粒

pMAL-5x 载体, BL21 (DE3) plys 菌株为本室保存。

### 1.2 主要试剂

凝胶回收试剂盒和质粒提取试剂盒购自杭州 BioFlux 公司; LA-Taq、dNTP、Nde I 和 EcoR I 内切酶、ligase 均为大连宝生物公司产品; E. coli DH5 $\alpha$  感受态为北京博迈德公司产品。IPTG, X-Gal 为 sigma 公司产品。

### 1.3 基因合成

从 GenBank 上获得 B 病毒的 gC 蛋白序列, 并将其与人的单纯疱疹病毒、带状疱疹病毒等的 gC 蛋白序列进行比较。选择 gC 蛋白序列中, 抗原表位强, 但与其它疱疹蛋白同源性较低的序列, 进行合成, 合成序列的总长度为 468 bp, 基因片段的两端分别添加 Nde I 和 EcoR I 酶切位点。基因片段由上海捷瑞生物工程有限公司合成, 命名为 gC<sub>合</sub>。

### 1.4 pMAL-5x-gC<sub>合</sub>载体的构建

利用 Nde I 和 EcoR I 两种限制性内切酶将 gC<sub>合</sub> 从基因合成的质粒上切下, 利用 ligase 将片段定向连接到 pMAL-5x 载体。将连接后的产物转化 E. coli DH5a 感受态细胞, 利用 PCR 和酶切的方法筛选出阳性质粒 pMAL-5x-gC<sub>合</sub>。

### 1.5 合成基因的诱导表达

将 pMAL-5x-gC<sub>合</sub> 转化 BL21 (DE3) plys 感受态细胞, 挑取单菌落在含 10 mmol/L 葡萄糖的 LB 中 37℃ 培养至 OD 值为 0.6, 加入终浓度为 0.3 mmol/L 的 IPTG, 室温诱导 4 h。取 50 $\mu$ L 诱导后的菌液与

等体积的 2 倍上样缓冲液混合, 煮沸 10 min。样品上样量为 20 $\mu$ L, 利用 10% 的 SDS-PAGE 电泳, 检测蛋白的表达情况。

### 1.6 重组蛋白的纯化

1L 的培养基中培养细菌浓度为  $2 \times 10^8$  (OD 值约为 0.5), 加入 IPTG 的终浓度至 0.3 mmol/L, 室温 (25~30℃) 诱导表达 4 h。离心去上清, 用 25 mL 的上柱缓冲液重悬, -20℃ 过夜。冰浴中融化, 超声破碎, 离心, 保留上清, 采用麦芽糖结合蛋白亲和层析柱纯化目的蛋白, 用包含 10 mmol/L 麦芽糖的上柱缓冲液进行洗脱, 收集纯化蛋白, 进行 SDS-PAGE 电泳, 分离胶的浓度为 10%。利用考马斯亮蓝进行染色, 观察电泳结果, 并照相。

## 2 结果

### 2.1 基因合成结果分析

gC<sub>合</sub> 基因重组质粒的酶切鉴定见图 1, 基因片断与预期结果基本相符。

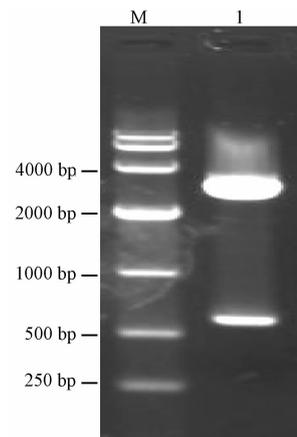


图 1 重组质粒 P5X-gC<sub>合</sub> 双酶切鉴定

Fig. 1 Enzyme digestion analyses of the recombinant plasmid P5X-gC<sub>合</sub>

注: M, DNA 分子量标准; 1, 重组质粒 P5X-gC<sub>合</sub> 的 Nde I 和 Eco I 双酶切结果

Note: M, DNA molecular standard; 1, the product of recombinant plasmid P5X-gC<sub>合</sub> digestion with Nde I and Eco I

### 2.2 pMAL-5x-gC<sub>合</sub>载体的构建结果分析

将 gC<sub>合</sub> 从基因合成的质粒上切下后, 利用 ligase 将片段定向连接到 pMAL-5x 载体。将连接后的产物转化 E. coli DH5a 感受态细胞 (如图 2), 利用 PCR 和酶切的方法筛选出阳性质粒 pMAL-5x-gC<sub>合</sub>, 结果如图 2。

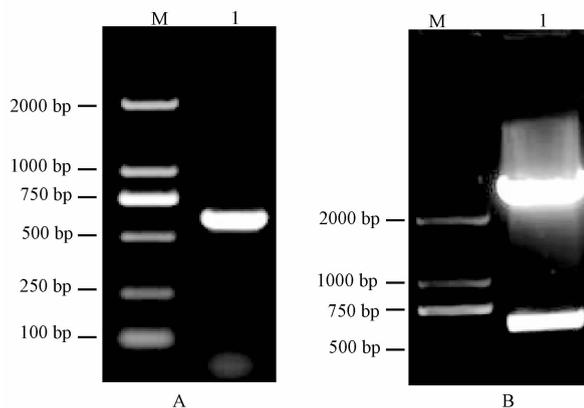


图 2 重组质粒 pMAL-5x-gC<sub>6</sub> PCR、双酶切鉴定

Fig. 2 Enzyme digestion analyses of the recombinant plasmid pMAL-5x-gC<sub>6</sub>

注:A(PCR):M,DNA 分子量标准、1,重组质粒 pMAL-5x-gC<sub>6</sub> 的 PCR 鉴定结果;B(酶切):M DNA 分子量标准、1,重组质粒 pMAL-5x-gC<sub>6</sub> 的 *Nde* I 和 *EcoR* I 双酶切结果

Note:A(PCR), M, DNA molecular standard; 1, the PCR product of recombinant plasmid pMAL-5x-gC<sub>6</sub>; B(digestion), M DNA molecular standard; 1 the product of Enzyme digestion with *Nde* I and *EcoR* I of pMAL-5x-gC<sub>6</sub>

### 2.3 合成基因的诱导表达

将 pMAL-5x-gC<sub>6</sub> 转化 BL21 (DE3) *plysS* 感受态细胞进行诱导表达,经 SDS-PAGE 电泳,检测蛋白的表达情况,如图 3,在约  $70 \times 10^3$  处出现蛋白条带,与预期重组蛋白的分子质量吻合。

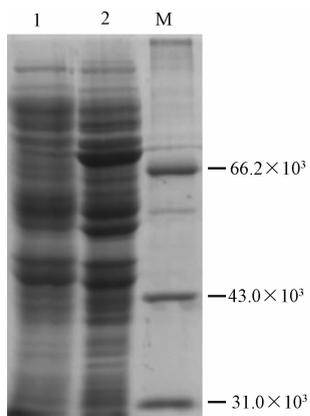


图 3 SDS-PAGE 检测重组蛋白表达

Fig. 3 Detection of recombinant protein expression by SDS-PAGE

注:M,蛋白分子质量标准;1,pMAL-5x 对照;2,pMAL-5x-gC<sub>6</sub> 诱导表达菌  
Note: M, protein molecular standard; 1, pMAL-5x plasmid control; 2, Induce products of pMAL-5x-gC<sub>6</sub>

### 2.4 重组蛋白的纯化

重组诱导后,柱层析纯化的蛋白经 SDS-PAGE

电泳,得到目的条带,可进一步用于 ELISA 试剂盒研制。

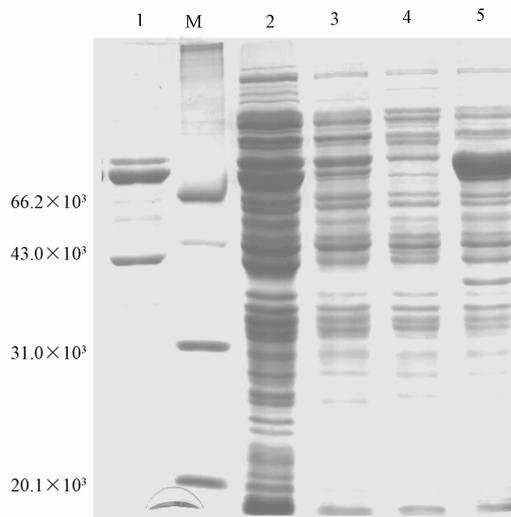


图 4 SDS-PAGE 检测重组蛋白表达、纯化

Fig. 4 Detection of recombinant protein expression and Purification by SDS-PAGE

注:M,蛋白分子质量标准;1,柱纯化产物;2, pMAL-5x-gC<sub>6</sub> 诱导表达菌细胞破碎产物;3,非特异洗脱;4, pMAL-5x 质粒对照;5, pMAL-5x-gC<sub>6</sub> 诱导表达菌

Note: M, protein molecular standard; 1, Purified products; 2, Induced products of pMAL-5x-gC<sub>6</sub>; 3, non-specific eluent; 4, pMAL-5x-gC<sub>6</sub> plasmid control; 5, Induce the expression products of pMAL-5x-gC<sub>6</sub>

### 3 讨论

猴感染 BV 后,急性期在口腔或皮肤有溃疡,并排毒,约 10 d 症状消失,抗体上升,此时病毒潜伏于面部和生殖道附近神经节,遇机体抵抗力下降可激活病毒。猴 BV 在排毒期可通过接触、抓伤、咬伤传染给人,发生脑炎,死亡率达 80%<sup>[3-7]</sup>,因此 B 病毒的检测和防控具有重要的意义。但由于猴 BV 属于生物安全 4 级病原,全病毒做为抗原检查猴 BV,最低需要生物 3 级实验室条件才能完成,所以,一般实验室均用人单纯疱疹病毒(HSV)作为诊断抗原,此种检测方法降低了安全隐患,但检测的准确性也随之降低。

为了减少非特异性检测结果,近年来,国内已有利用基因工程技术产生猴 BV 囊膜重组蛋白,肖镜<sup>[3]</sup>等表达了猴 BV gD 蛋白片段,王代平<sup>[4]</sup>等表达了猴 BV gC 蛋白片段,均证实重组蛋白具有良好的抗原性,但抗原的特异性和灵敏性有待进一步提高。本试验选择猴 BV 的 gC 蛋白的抗原表位强,但

与其它疱疹蛋白同源性较低的序列,进行合成,并对其密码子进行了优化。由该基因产生的重组蛋白,理论上抗原的特异性和灵敏性符合检测要求。

本试验利用原核表达系统对该合成基因进行了表达。原核系统表达的优点是重组蛋白产量大,但易产生包涵体,蛋白质的活性较低。因此我们选择了 pMAL-5x 这种表达质粒,这种重组质粒可以产生麦芽糖结合蛋白融合的重组蛋白,明显增强重组蛋白的可溶性。最终结果表明, gC<sub>合</sub> 基因是以可溶的形式表达,这为下一步的检测试剂盒的制备奠定了基础。

#### 参考文献:

- [ 1 ] Jennifer L H, Peter A B. B-virus(cercopithecine herpesvirus 1) infection in humans and macaques potential for zoonotic disease [J]. Emerg Infect Dis, 2003, 9(2):246 - 250.
- [ 2 ] Yamaoto H, Ohsawa K, Walz S E, et al. Validation of an enzyme-linked immunosorbent assay kit using herpesvirus papio2 (HVP2) antigen for detection of herpesvirus simiae (B virus) infection in rhesus monkeys [J]. Comp Med, 2005, 55(3):244 - 8.
- [ 3 ] 肖镜,付瑞,贺争鸣,等.猴 B 病毒 gD-多肽 ELISA 检测方法的建立[J]. 实验动物科学,2008,25(2):20 - 23.
- [ 4 ] 王代平,叶华虎,曾林,等.猴 B 病毒囊膜蛋白 gC 基因密码子优化及其在大肠埃希中的表达[J]. 动物医学进展,2011,32(5):1 - 4.
- [ 5 ] Xuan X, Kojima A, Murata T, et al. Analysis of canine herpes virus gB, gC and gD expressed by a recombinant vaccine virus [J]. Arch Virol,1997,142:1003 - 1010.
- [ 6 ] Besecher M I, Harden H E, Li G, et al. Discovery of herpes B virus-encoded micro RNAs [J]. Virology, 2009, 83(7):3413 - 3416.
- [ 7 ] 吴小闲. 医学实验动物监测手册 实验动物微生物学、寄生虫学监测分册 [M]. 北京:卫生部医学实验动物管理委员会,1992:69.
- [ 8 ] Li Y, van Drunen Little van den Hurk S, Babiuk L A, et al. Characterization of cell-binding properties of bovine herpesvirus 1 glycoproteins B, C, and D: identification of adual cell-binding function of Gb [J]. J Virol,1995,69:4558 - 4568.
- [ 9 ] Liang X, Babiuk L A, van Drunen Little van den Hurk S, et al. Bovine herpes virus 1 attachment to permissive cells is mediated by its major glycoproteins g I, g III and g IV [J]. J Virol,1991,65:1124 - 1132.
- [ 10 ] 练蓓,程安春,汪铭书. 疱疹病毒 gC 基因及其编码蛋白研究进展 [J]. 中国动物传染病学报,2009,17(2):82 - 86.

[ 修回日期 ]2012-07-05