

猕猴 B 病毒 gB 蛋白特异性抗原表位的合成和表达

隋丽华, 刘 一, 赵彦斌, 张小飞, 崔晓霞, 叶华虎, 白杰英,
许 琴, 孙兆增, 曾 林

(军事医学科学院实验动物中心, 北京 100071)

【摘要】 目的 获得可以用于 B 病毒检测的 gB 蛋白特异性表位重组抗原。方法 利用基因合成的方法, 合成包含 B 病毒 gB 蛋白主要特性抗原表位的基因, 通过定向克隆的方法, 将该基因克隆到原核表达载体 pET-22b 中, 构建了重组表达质粒。筛选出阳性重组质粒, 转化到 BL21 感受态细胞, 利用 IPTG 进行诱导表达。结果 成功的获得了 B 病毒 gB 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 gB 蛋白特异性表位重组抗原, 可以作为 B 病毒的检测抗原。

【关键词】 猕猴 B 病毒; gB 蛋白; 抗原表位; 合成与表达

【中图分类号】 R-332 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856(2013)03-0004-04

doi: 10.3969/j.issn.1671.7856.2013.003.002

Synthesis and expression of monkey B virus glycoprotein B specific antigen epitope

SUI Li-hua, LIU Yi, ZHAO Yan-bin, ZHANG Xiao-fei, CUI Xiao-xia,
YE Hua-hu, BAI Jie-ying, XU Qin, SUN Zhao-zeng, ZENG Lin

(Laboratory Animal Center of the Academy of Military Medical Sciences, Beijing 100071)

【Abstract】 Objective To get recombinant antigen including the antigen epitope of gB protein for the detection of B virus. **Methods** The gene fragment of the antigen epitope sequences of gB protein was synthesized and directly cloned into the pET-22b vector. The positive recombinant vector was transformed into BL21 competent cells and induced with IPTG. **Results** The synthesis gene fragment was expressed successfully in the Prokaryotic cells on the soluble form. **Conclusion** Prokaryotic expression system can produce soluble B virus gB protein antigen and can be used as the detection of B virus antigen

【Key words】 Macaque B virus; gB protein; Antigen epitope; Synthesis and Expression

猕猴 B 病毒 (Macaque B virus) 又猕猴疱疹病毒, 是人兽共患病毒。B 病毒在猴体内的存在比率随着年龄的增加, 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, 不仅严重影响

实验结果, 造成人力物力的极大浪费, 而且饲养人员与实验人员感染后死亡率及高, 幸存者也会留下神经后遗症^[3-8, 12-14]。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^[11]。

[基金项目] 十二五重大专项 (项目批准号: 2011ZXJ09201-031)。

[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] 孙兆增 (1977 -) 男, 博士, 副研究员, 研究方向: 实验动物分子微生物学。

B 病毒为Ⅳ级生物安全防护病原,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需在 3 级以上实验室完成,危险性高、分离培养耗时长,局限性大^[4]。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, HSV-2)病毒具有较强的抗原交叉性,目前多用人单纯疱疹病毒做抗原替代猕猴 B 病毒,但作为诊断试剂,要求灵敏度高、特异性强,才能更好地区别 B 病毒与其它疱疹病毒^[1,2,10]。目前,用于 B 病毒检测的重组抗原主要是其囊膜蛋白 gB、gC 和 gD。gC 蛋白作为重组抗原特异性最高,但检出率低于 gB。gD 的检出率和特异性都较差,gB 重组蛋白作为抗原,检出率最高,但作为囊膜蛋白,其抗原性强,分子量巨大,可溶性抗原生产困难。本研究利用 B 病毒高度保守的 gB 基因,通过构建 B 病毒 gB 基因原核表达载体,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^[8,9,15]。

1 材料和方法

1.1 主要试剂

高纯质粒小量快速提取试剂盒、凝胶回收试剂盒、T4 连接酶、*E. coli* DH5a、BL21(DE3) pLysS 菌株购自北京博迈德生物公司; 2 × Taq PCR Master Mix 购自上海捷瑞生物工程有限公司; Bam H I 和 Xho I 内切酶、pMD 18-T Vector 载体均为大连宝生物公司产品; IPTG 为 sigma 公司产品。

1.2 引物设计

为了将 gB 基因片段定向连接 pET-22b 载体,根据 NCBI 数据库上 gB 基因序列和载体的特异性位点,设计 1 对引物,上游引物: 5'-cgc gga tcc gca cag ctg gcc ctg gat gaa-3',下游引物: 5'-ccg ctg gag ttc ttc tgg tgc aac aac -3'。

1.3 基因合成

从 GenBank 上获得 B 病毒的 gB 蛋白序列,并将其与人的单纯疱疹病毒、带状疱疹病毒等的 gB 蛋白序列进行比较。选择 gB 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 597 bp,基因片段的两端酶切位点为 Ecol I 和 Nde I。基因片段由上海捷瑞生物工程有限公司合成,命名为 gB_合。

1.4 pET-22b 载体的构建

利用上述引物进行 PCR 扩增,引入 Bam H I 和 Xho I 酶切位点。将回收后的 gB 基因片段连接到 pMD 18-T Vector 载体。将连接后的产物转化 *E. coli*

DH5a 感受态细胞,利用 PCR 方法筛选出阳性质粒 pMD18-T Vector-gB_合; 将此阳性质粒用 Bam H I 和 Xho I 进行酶切,回收后的片段连接到 pET-22b 载体上,转化到 BL21(DE3) pLysS 感受态细胞。

1.5 合成基因的诱导表达

将 pET-22b-gB 转化 BL21(DE3) pLysS 感受态细胞,挑取单菌落在含氨苄抗性的 LB 液体培养基中 37℃ 培养至 OD 值为 0.6,加入终浓度为 0.3 mM 的 IPTG,室温诱导 4 h。取 50 μL 诱导后的菌液与等体积的 2 × 上样缓冲液混合,煮沸 5 min。样品上样量为 20 μL,利用 10% 的 SDS-PAGE 电泳,检测蛋白的表达情况。

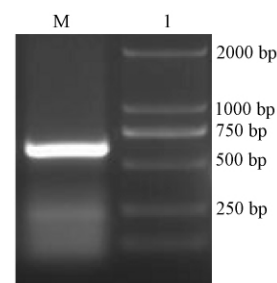
1.6 重组蛋白的纯化

1L LB 液体培养基中按 1% 接种过夜培养菌,37℃ 220 rpm 培养 3.5 h,加入 IPTG 的终浓度至 0.3 mM,室温 27.3℃ 诱导表达 4h。离心去上清,用每克 4 mL 的裂解缓冲液重悬,-20℃ 过夜。采用镍结合蛋白亲和层析柱纯化目的蛋白,用包含 20 mM 咪唑的冲洗缓冲液去除非特异结合的蛋白,含 250 mM 咪唑的洗脱缓冲液进行洗脱,收集纯化蛋白,进行 SDS-PAGE 电泳,样品上样量为 15 μL,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。利用 Western-blot 方法,检测重组蛋白与 B 病毒阳性血清的反应原性。

2 结果

2.1 基因合成结果分析

gB_合 基因重组质粒的 PCR 鉴定见图 1,扩增得到目的片段,其大小为 597bp,基因片断与预期结果基本相符。



注: M: DNA 分子量标准; 1: 重组质粒 p5X-gB_合 的 PCR 结果。

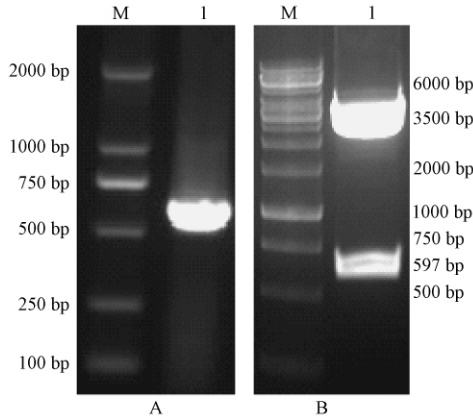
图 1 重组质粒 p5X-gB_合 PCR 鉴定

Note: M: DNA marker; Lane 1: The PCR results of the product of recombinant plasmid p5X-gB_合.

Fig. 1 PCR amplification of the recombinant plasmid P5X-gB

2.2 pMD 18-T Vector-gB_合 载体构建结果分析

将基因片段定向连接到 pMD 18-T Vector 载体。将连接后的产物转化 *E. coli* DH5a 感受态细胞,利用菌液 PCR 及双酶切筛选出阳性质粒 pMD 18-T Vector -gB_合,结果如图 2。



注: A (PCR 鉴定): M: DNA 分子量标准;
1: 重组质粒 pMD 18-T Vector -gB_合 PCR 鉴定结果
B(双酶切鉴定): M: DNA 分子量标准; 1: 重组质粒 pMD 18-T Vector-gB_合 的 BamH I 和 Xho I 双酶切结果。

图 2 重组质粒 pMD 18-T Vector-gB_合 PCR 及双酶切鉴定

Note: A (PCR identification): M: DNA marker;
Lane 1: The PCR results of the product of recombinant plasmid pMD 18-T Vector -gB_合 PCR.
B(Double Enzyme digestion identification): M: DNA marker;
Lane 1: the product of Enzyme digestion with BamH I 和 Xho I of recombinant plasmid pMD 18-T Vector-gB_合.

Fig.2 PCR and Enzyme digestion amplification of the recombinant plasmid pMD 18-T Vector-gB

2.3 pET-22b-gB_合载体的构建

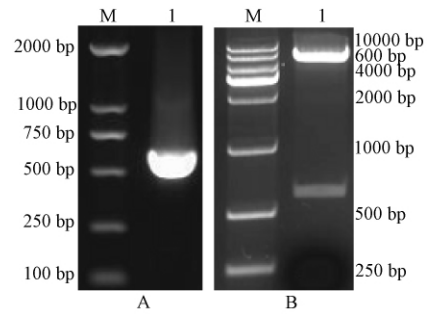
用双酶切方法将阳性基因质粒从重组质粒 pMD 18-T Vector-gB_合上分离后,胶回收鉴定,将阳性基因片段通过 T4 连接酶定向连接到 pET-22b 载体。转化到具有表达性的 BL(DE3) 21 感受态细胞上,经 PCR 和双酶切鉴定,成功建立 pET-22b-gB 重组质粒并大量扩增,结果如图 3。

2.4 合成基因的诱导表达

将 pET-22b-gB_合转化 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 4 在约 26 × 10³ 处出现目的蛋白条带,与预期重组蛋白的分子质量吻合。

2.5 重组蛋白的纯化

重组菌诱导表达后,柱层析纯化的蛋白经 SDS-PAGE 电泳,β-5 为 A₂₈₀ 不同吸光度值特异性洗脱目的条带,β、4 未出现目的条带,5 开始出现目的条带,吸光度值为 79,如图 5。

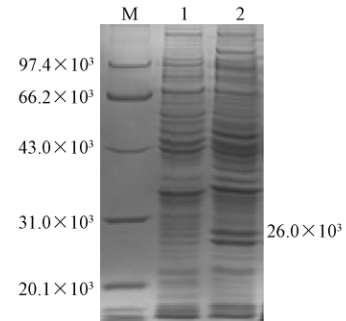


注: A (PCR 鉴定): M: DNA 分子量标准;
1: 重组质粒 pET-22b-gB PCR 鉴定结果
B(双酶切鉴定): M: DNA 分子量标准;
1: 重组质粒 pET-22b-gB 的 BamH I 和 Xho I 双酶切结果

图 3 重组质粒 pET-22b-gB PCR 及双酶切鉴定

Note: A (PCR identification): M: DNA marker; Lane 1: The PCR results of the product of recombinant plasmid pET-22b-gB PCR
B(Double Enzyme digestion identification): M: DNA marker; Lane 1: the product of Enzyme digestion with BamH I 和 Xho I of recombinant plasmid pET-22b-gB.

Fig.3 PCR and Enzyme digestion amplification of the recombinant plasmid pET-22b-gB



注: M: 蛋白分子量标准; 1: pET-22b 对照;
2: pET-22b-gB 诱导表达菌。

图 4 SDS-PAGE 检测重组蛋白表达

Note: M: protein molecular standard; 1: pET-22b plasmid control; 2: Induce products of pET-22b-gB.

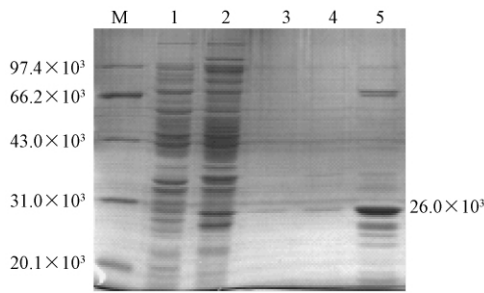
Fig.4 Detection of recombinant protein expression by SDS-PAGE

2.6 重组蛋白 Western blot 分析

纯化的目的蛋白,通过 Western-blot 分析,证实重组蛋白与 B 病毒阳性血清具有反应原性。如图 6。

3 讨论

病毒囊膜糖蛋白在病毒入侵宿主细胞的过程中作用显著。据 Pereylygina 等^[17]报道,用于 B 病毒诊断的糖蛋白 gB、gC、gD 敏感性分别为 100%、97.3%、88%。为了获得更灵敏、特异的 B 病毒检测方法,国内已有利用基因工程技术产生猴 BV 囊

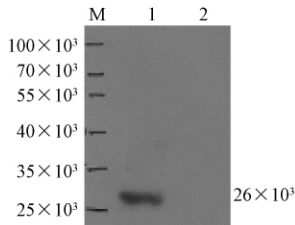


注: M: 蛋白分子质量标准; 1: pET-22b 质粒对照;
2: pET-22b-gB 诱导表达菌细胞破碎产物;
3-5: 特异性洗脱蛋白。

图 5 SDS-PAGE 检测重组蛋白表达、纯化

Note: M: protein molecular standard;
Lane 1: pET-22b plasmid control;
Lane 2: Induced products of pET-22b-gB;
Lane 3-5: specific elution protein.

Fig. 5 Detection of recombinant protein expression and Purification by SDS-PAGE



注: M: 蛋白分子质量标准; 1: pET-22b-gB
Western-blot 结果; 2: pET-22b 对照。

图 6 重组蛋白 Western-blot 分析

Note: M: protein molecular standard; Lane 1: products of
Western-blot of pET-22b-Gb; Lane 2: pET-22b plasmid control.

Fig. 6 Western blot analysis of pET-22-gB

膜重组蛋白,王琼等^[8]用杆状病毒作为表达载体表达了猴 BV gB 蛋白片段,段博芳等^[16]用猴 B 病毒 gB 基因在昆虫细胞中获得表达,肖镜等^[3]表达了猴 B 病毒 gD 蛋白片段,已证实重组蛋白具有较好的抗原性。

本试验选择猴 BV 的 gB 蛋白的抗原表位强、且与其它疱疹病毒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,采用 pET-22b 载体,通过原核表达系统,选择适于诱导表达的 IPTG 浓度、诱导温度及时间,避免产生包涵体,成功获得 pET-22b-gB 可溶性表达产物。通过镍结合蛋白亲和层析柱纯化,纯化过程相对简单,具有易于大量制备的优点,获得了纯度约为 85% 的目的蛋白,通过 Western-blot 证实, B 病毒 gB 基因重组蛋白具有较好的抗原性,为进一步取代全病毒作为抗原的 ELISA 方法奠定了基础。

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 anenzyme-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 -248.

[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] Weigler B J. Biology of virus in macaque and human hosts a review [J]. Clin Lect D is ,1992 ,14:555 -567.

[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] 王淑芬,李冠民,吴小闲,等.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] 王琼,吴志蕾,艾军,等.猴 B 病毒 gB 基因杆状病毒表达载体的构建[J].云南畜牧兽医 2010 ,(1) :4 -5.

[9] 吴春涛,李艳梅,唐少刚.牛疱疹病毒 I 型 gB 基因的原核表达及间接 ELISA 检测方法的建立[J].中国兽医科学 2010 ,40(12) :1259 -1264.

[10] 盘宝进.用 B 病毒 ELISA 和人单纯疱疹病毒 I 型酶免疫法检测食蟹猴血清中 B 病毒相关抗体的研究[J].广西畜牧兽医 ,2005 21(1) :10 -12.

[11] 王吉,卫礼,巩薇,等.2003 -2008 年我国实验猴 BV 抗体检测结果及抗体水平变化规律的分析[J].中国实验动物学报 ,2010 ,18(3) :268 -270.

[12] Huff JL ,Barry PA. B-virus (Cercopithecine herpesvirus 1) infection in humans and macaques: potential for zoonotic disease [J]. Emerg Infect Dis 2003 9(2) :246 -250.

[13] Focher F , Lossani A , Verri A , et al. Sensitivity of Mondey Bvirus (Cercopithecine herpesvirus 1) to antiviral drugs: role of thymidine kinase in antiviral activities of substrate analogs and acyclonucleosides [J]. Antimicrob Agents Chemother ,2007 ,51 (6) :2028 -2034.

[14] 饶国华,刘晓明,王海英,等.人工驯养条件下食蟹猴 B 病毒抗体水平变化规律研究 [J]. 中国比较医学杂志 ,2007 ,17 (1) :12 -14.

[15] 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.中国动物传染病学报 2009 ,17(2) :82 -86.

[16] 段博芳,王琼,段纲,等.猴 B 病毒 gB 基因在昆虫细胞中的表达.中国人兽共患病学报 2012 28(7) :674 -678.

[17] Ludmilapereylygina , Irina patru sheua , et al. Production of herpes of Bvirus recombinant glycoproteins and evaluation of their diagnostic potential [J]. J Clin Microbiol ,2005 ,43(2) :620 -628. DOI: 10.1128/JCM.43.2.620 -628.2005.

(修回日期)2012-09-25