文章编号:1000-5404(2009)06-0557-03

技术方法

登革2型病毒NS1-NS2a基因真核表达载体的构建及鉴定

陈 炜[1],王嘉丽[1],高 娜[2],田衍平[2],陈宗涛[1],徐小峰[1],张俊磊[1],刘丽梅[1],江 雯[1],安 静[3] ([1]第三军医大学基础医学部:[1]微生物学教研室,重庆市微生物工程实验室,[2]组织胚胎学教研室,重庆市神经科学研究所,重庆 400038;[3]首都医科大学基础医学院微生物学教研室,北京 100069)

摘 要:目的 构建登革2型病毒NS1-NS2a基因真核表达质粒。**方法** RT-PCR扩增NS1-NS2a基因片段后,将其克隆入真核表达载体pReceiver-M01a;通过PCR、酶切、测序和间接免疫荧光染色鉴定重组质粒。**结果** 经PCR扩增、酶切和测序验证,重组质粒构建正确,命名为pRe-NS1-NS2a;重组质粒转染Vero细胞后,间接免疫荧光染色显示细胞质中有登革2型病毒特异性蛋白的表达。**结论** 成功构建了真核表达质粒pRe-NS1-NS2a。

近年来,世界范围内的(包括我国南方)人类登革热(classical dengue fever, DF)和登革出血热/登革休克综合征(dengue hemorrhagic fever /dengue shock syndrome, DHF/DSS)流行、暴发更加频繁。据报道登革病毒每年感染约1亿人,其中DHF/DSS患者约50万人,病死率为5% ~10%,如未及时治疗,可上升至50%[1,2]。由此可见登革病毒感染已是严重的公共卫生问题,但至今尚无有效防治措施。

登革病毒的非结构蛋白中,NS1蛋白与病毒RNA的复制关系密切;在调节免疫过程中,也具有重要作用。因而认为NS1是一种颇有前途的保护性蛋白,可用于登革病毒的疫苗研究。而有研究证明,只有NS1与其下游的全长NS2a同时表达,才能产生天然的NS1蛋白,并可在小鼠体内诱导产生保护作用[3]。因此本实验构建了登革2型病毒NS1-NS2a基因真核表达质粒,为进一步研究其免疫原性及对登革病毒感染的保护作用奠定工作基础。

1 材料与方法

1.1 病毒株和细胞株

登革2型病毒(DV2,Tr1751株)分离自登革热患者(日本感染病研究所惠赠)。白纹伊蚊C6/36细胞株和Vero细胞株由本室保存。

基金项目:国家自然科学基金(30471552, 30640065, 30671853);北京市自然科学基金(5082004)
Supported by the the National Natural Science Foundation of China (30471552, 30640065,30671853) and Beijing Natural Science Foundation (5082004)

作者简介:陈 炜,女,上海市人,博士研究生,实验师,主要从事登革病毒致病机制方面的研究。电话:(023) 68752239; E-mail: chongqingchenwei@126.com
通信作者:安 静,E-mail: anjing60@yahoo.com.cn

收稿日期:2008-07-21;修回日期:2008-08-28

1.2 质粒和主要试剂

RT-PCR试剂为TaKaRa公司产品;真核表达载体pReceiver-M01a由美国陈锡林教授惠赠;限制性内切酶*Not* Ⅰ、NSPV均购自MBI公司;转染采用Invitrogen公司的Lipofectamine 2000脂质体转染试剂;小鼠抗DV2多克隆抗体由本室制备;羊抗小鼠IgG-FITC购自Sigma公司。

1.3 引物设计

根据DV2(Tr1751株)的基因序列设计引物,上游:5′-CGTTCGAATCATGAACTCACGTAGCACTT-3′,下游:5′-ATAGCGGCCGCCTACCTTTTCTTACTGGTTCTTG-3′,下划线分别为NSPV和*Not* Ⅰ酶切位点。扩增NS1-NS2a全长序列,并包括E蛋白末端的信号肽序列,位于整个基因组的2 337~4 131位,长1 794 bp。

1.4 RNA的制备、RT-PCR及克隆入载体pReceiver-M01a

病毒RNA逆转录及PCR按操作说明进行。病毒RNA逆转录参数如下:RNA提取物5 μl,加入上述设计的下游引物2 μl,70 ℃ 10 min后立即放置到冰上,10 min后在冰上依次加入5 × Buffer 4 μl, dNTPs 1 μl, RNA Inhibit 0.5 μl, 含0.1% DEPC的ddH_2O 6.5 μl, AMV 1 μl,反应体积为20 μl,轻轻混匀后42 ℃ 1 h,95 ℃ 5 min, -20 ℃保存备用。PCR反应参数如下:在反应体积中依次加入5 × PrimeSTARTM Buffer (Mg^{2+} plus) 10 μl,2.5 mmol/L dNTP Mixture 4 μl,25 pmol/μl的上游和下游引物各1 μl,cDNA模板1 μl,PrimeSTARTMHS DNA Polymerase 0.5 μl补加灭菌水至50 μl,混匀后置扩增仪上按95 ℃预变性5 min, 98 ℃ 10 s、58 ℃ 15 s、60 ℃ 2 min,反应30个循环后, 72 ℃延伸10 min。反应完毕, PCR产物在1%琼脂糖电泳上分析,并用胶回收产物试剂盒(博大泰克,北京)回收PCR产物, 经NSPV和*Not* Ⅰ双酶切,定向插入表达载体pReceiver-M01a的相应位点。该质粒命名为pRe-NS1-NS2a, 经PCR、NspV和*Not* Ⅰ双酶切及测序鉴定序列的正确性。

1.5 重组质粒pRe-NS1-NS2a瞬时转染实验及间接免疫荧光染色

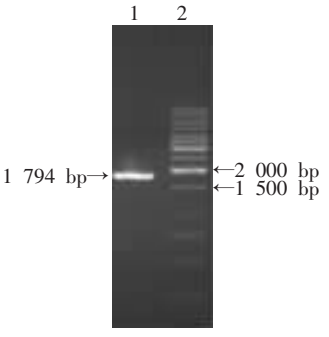
将所构建质粒pRe-NS1-NS2a瞬时转染Vero细胞,间接免疫荧光染色验证其表达情况。步骤如下:Vero细胞悬液接种于24孔板中的盖玻片上,混匀,37 ℃,5% CO_2,培养18~24 h,使

细胞融合率达到80%左右,将 pRe-NS1-NS2a 和 pReceiver-M01a 空质粒转染细胞,步骤如下:分别将 0.8 μg 质粒 DNA 和 2 μl Lipofectamine 2000 脂质体试剂稀释至 50 μl Opti-MEM 培养基,轻轻混匀,室温 5 min 后,将两管稀释液混合,轻轻混匀,室温静置 20 min,24 孔板中细胞用 PBS 洗涤 1 次,每孔加入以上混合物共 100 μl,37 ℃孵育 4 h;吸出混合物,以含 10% FCS 的 MEM 替换。37 ℃孵育 48 h,取出细胞爬片,PBS 漂洗 2~3 遍,4% 多聚甲醛固定,室温 20 min。PBS 漂洗后,0.2% Triton X-100/PBS 室温通透 5 min。PBS 漂洗后,加 1% BSA/PBS 室温对非特异性位点封闭 1 h 后加小鼠抗 DV2 多克隆抗体,4 ℃ 孵育过夜。PBS 漂洗 3~5 遍,加入 FITC 标记的羊抗小鼠 IgG,室温孵育1 h 后,漂洗、干燥后 40% 甘油封片,荧光显微镜下观察、拍照。

2 结果

2.1 NS1-NS2a 的 RT-PCR 扩增

从感染的 C6/36 细胞提取获得细胞总 RNA,其中即包括病毒 RNA。以此为模板,应用前述引物进行 RT-PCR, 将扩增产物用 1% 琼脂糖电泳可见分布于标准 1.5~2 kb 的特异条带,与预计长度 1 794 bp 相符(图 1)。

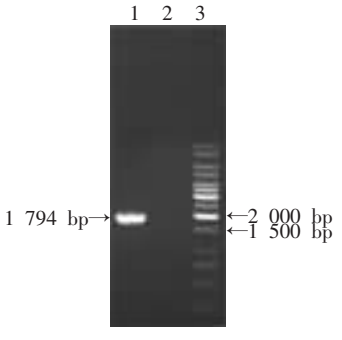


1: DV2 全长 NS1-NS2a 基因; 2:标准

图 1 RT-PCR 扩增 DV2 全长 NS1-NS2a 基因

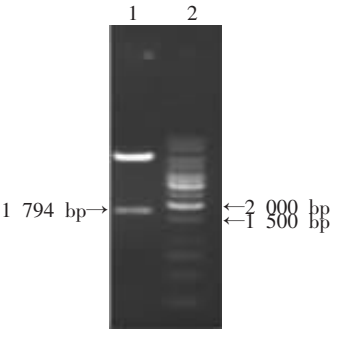
2.2 真核表达重组载体 pRe-NS1-NS2a 的构建及鉴定

将 NS1-NS2a 的 RT-PCR 扩增产物进行 NSP V 和 Not Ⅰ双酶切后克隆入载体 pReceiver-M01a。阳性克隆送英骏公司测序(中国上海),同时进一步对真核表达重组质粒进行双酶切和 PCR 鉴定。提取筛选到的阳性重组质粒 pRe-NS1-NS2a 用前述引物进行 PCR,可扩增出约 1 794 bp 目的基因片段,而空载体则不能(图 2)。阳性重组质粒经 NSP V 和 *Not* Ⅰ双酶切,切出与 PCR 产物大小一致的目的基因片段(1 794 bp,图 3)。



1:从阳性重组质粒 pRe-NS1-NS2a 中扩增出的目的基因片段;2:质粒 pReceiver-M01a 进行 PCR 扩增;3:标准

图 2 重组质粒 pRe-NS1-NS2a 的 PCR 鉴定

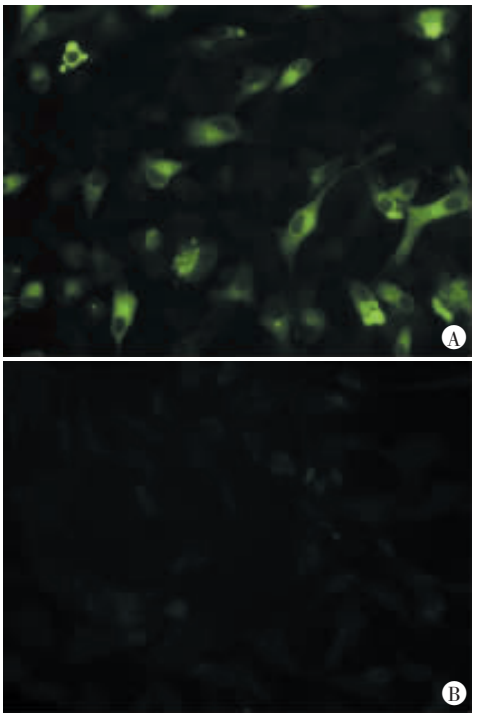


1:重组质粒 pRe-NS1-NS2a 经 *Not* Ⅰ和 NSP V 双酶切;2:标准

图 3 重组质粒 pRe-NS1-NS2a 的双酶切鉴定

2.3 真核表达重组质粒 pRe-NS1-NS2a 在 Vero 细胞中的表达

将 pRe-NS1-NS2a 和 pReceiver-M01a 空质粒采用脂质体的方法转染 Vero 细胞,转染后 48 h,用小鼠抗 DV2 多克隆抗体进行染色,可见转染 pRe-NS1-NS2a 质粒的 Vero 细胞胞质内有特异荧光, 转染率约为 40%(图 4),说明特异的外源蛋白可在细胞质内表达,质粒构建正确。



A:pRe-NS1-NS2a;B:pReceiver-M01a

图 4 间接免疫荧光染色检测 pRe-NS1-NS2a 在 Vero 细胞中的表达 (×400)

3 讨论

登革病毒的感染已是严重的公共卫生问题,但目前仍没有理想的疫苗问世。而核酸疫苗具有价廉、易于生产和更为安全的优点,因而成为病毒疫苗研究的重点。病毒核酸疫苗是将含病毒抗原蛋白基因的真核表达重组质粒直接注射到机体内,在体内表达具有正

常构象和转录后加工修饰的抗原，进而引发机体良好的体液免疫和细胞免疫[4]。

目前,在登革病毒的非结构蛋白中，NS1 的功能已经逐渐引起人们的重视。NS1 在病毒复制中可能有辅助病毒颗粒的装配和成熟的作用。近年来研究表明,应用 NS1 主动免疫或用抗 NS1 单克隆抗体被动免疫,均可保护小鼠免受致死剂量登革病毒的攻击[5,6]。Rothman 等[7] 用登革病毒型交叉性的鼠 $CD4^+$ 和 $CD8^+$ 的 T 细胞克隆可识别 NS1 和 NS2a 蛋白上的位点,NS1 蛋白能诱导机体产生特异性的 T 细胞反应。因而 NS1 被认为是一种保护性蛋白,可用于研制登革病毒的新疫苗。但是,有研究显示:只有 NS1 与其下游的全长 NS2a 同时表达,才能产生天然的 NS1 蛋白,进而发挥良好的保护作用。因此,本研究用 RT-PCR 法获得登革 2 型病毒 NS1-NS2a 基因片段，然后将其克隆到真核表达载体中,通经 PCR 扩增、酶切和序列测定证实重组质粒构建正确,并利用脂质体将重组质粒瞬时转染入 Vero 细胞,通过间接免疫荧光法检测到细胞质中有特异性外源蛋白的表达,成功构建了 NS1-NS2a 基因真核表达载体,为进一步研究其免疫原性及对登革病毒感染的保护作用奠定了基础。

关键词：登革 2 型病毒;NS1-NS2a 基因;真核表达
中图法分类号：Q782　　**文献标识码**：B

参考文献：

[1] Diamond M S, Edgil D, Roberts T G, *et al*. Infection of human cells by dengue virus is modulated by different cell types and viral strains [J]. J Virol, 2000, 74(17): 7814 – 7823.
[2] Rey F A. Dengue virus envelope glycoprotein structure: new insight into its interactions during viral entry [J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2003, 100(12): 6899 – 6901.
[3] Falgout B, Bray M, Schlesinger J J, *et al* . Immunization of mice with recombinant vaccinia virus expressing authentic dengue virus nonstructural protein NS1 protects against lethal dengue virus encephalitis[J]. J Virol, 1990, 64(9): 4356 – 4363.
[4] 高　娜,彭　涛,陈　炜,等. 日本脑炎病毒基因片段-GM-CSF 双顺反子表达载体的构建[J]. 第三军医大学学报, 2006, 28(10): 1019 – 1021.
[5] Schlesinger J J, Brandriss M W, Walsh E E. Protection of mice against dengue 2 virus encephalitis by immunization with the dengue 2 virus non-structural glycoprotein NS1[J]. J Gen Virol, 1987, 68(Pt 3): 852 – 857.
[6] Henchal E A, Henchal L S, Schlesinger J J. Synergistic interactions of anti-NS1 monoclonal antibodies protect passively immunized mice from lethal challenge with dengue 2 virus[J]. J Gen Virol, 1988, 69(Pt 8): 2101 – 2107.
[7] Rothman A L, Kurane I , Ennis F A, *et al*. Multiple specificities in the murine $CD4^+$ and $CD8^+$ T-cell response to dengue virus[J]. J Virol, 1996, 70(10): 6540 – 6546.

（编辑　栾　嘉）

（上接 554 页）

测定 288.8 μmol/L,类风湿因子 20.0 IU/ml,抗环瓜氨酸肽抗体 <5 IU,抗核提取物抗体示 ENA 阴性、ds-DNA 阴性。胸片、腹部 B 超、双手正斜位片、双眼裂隙灯检查未见异常。诊断:①鼻咽癌 T4N1M0;②干眼病。4 月 12 日,患者入我院治疗。4 月 12 – 17 日给予泪然眼液、盐酸萘甲唑啉眼液、盐酸左氧氟沙星眼液治疗,眼部症状无好转。4 月 14 日给予化疗,方案为第 1 ~ 4 天静脉注射顺铂 30 mg,第 1 ~ 5 天静脉注射 5-FU 500 mg 和放线菌素 D 0.3 mg。化疗后,眼部异物感消失,仍感干燥,结膜充血减轻;四肢小关节自发痛、压痛减轻;肿胀、紫绀无改变;右乳突下淋巴结缩小。4 月 21 至 6 月 25 日行鼻咽癌根治性放疗。放疗期间未进行其他治疗。放疗后,患者眼部症状消失,听力好转,双手肿胀、紫绀消失,四肢小关节自发痛消失,双手第 2 ~ 5 指指间关节轻压痛,其他关节无压痛。6 月 30 日第 2 次化疗。化疗后,患者手指间关节压痛消失。出院后随访,各症状无复发。2005 年 3 月,患者因上腹部不适,查腹部 B 超示,肝占位,考虑肝转移癌。当地医院腹部增强 CT 检查,考虑为肝转移癌,门静脉癌栓。同 4 月因“肝转移癌”至当地医院住院治疗。2005 年 5 月 24 日死亡。

2　讨论

现已报道的鼻咽癌副肿瘤综合征多表现为肥大性骨关节病、皮肌炎[3-5]。此病例早期在鼻咽癌原发灶直接引起的症状不明显时,副肿瘤综合征症状(结膜充血、四肢小关节疼痛、紫绀)就已明显,但因类似病例少见报道,易导致误诊、漏诊。因此,对持续时间长、疗效差且难以解释的不典型症状,应警惕副肿瘤综合征。这对肿瘤的早期发现、诊断具有重要意义。

关键词：鼻咽癌;副肿瘤综合征;鳞状细胞癌
中图法分类号：Q782　　**文献标识码**：B

参考文献：

[1] Mukherjee S, Diver M, Weston P J. Non islet cell tumor hypoglycaemia in a metastatic Leydig cell tumor[J]. Acta Oncol, 2005, 44(7): 761 – 763.
[2] Wong A K, Alfert M, Castrillon D H, *et al*. Excessive tumor-elaborated VEGF and its neutralization define a lethal paraneoplastic syndrome [J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2001, 98(13): 7481 – 7486.
[3] Biswal B M, Kareem A, Ahmed N M. Hypertrophic osteoarthropathy: an unusual manifestation in nasopharyngeal cancer[J]. Australas Radiol, 2001, 45(1): 71 – 73.
[4] Teo P, Tai T H, Choy D. Nasopharyngeal carcinoma with dermatomyositis[J]. Int J Radiat Oncol Biol Phys, 1989, 16(2): 471 – 474.
[5] Miyachi H, Akizuki M, Yamagata H, *et al*. Hypertrophic osteoarthropathy, cutaneous vasculitis, and mixed-type cryoglobulinemia in a patient with nasopharyngeal carcinoma[J]. Arthritis Rheum, 1987, 30(7): 825 – 829.

（编辑　栾　嘉）