DOI:10.16016/j.1000-5404.2002.06.037

论著

文章编号:1000-5404(2002)06-0716-03

人巨细胞病毒重组基因表达质粒的构建

郑育声,谢琪璇,潘善培,芦春斌,肖銮娟 (暨南大学生殖免疫研究中心,广州 510632)

提 要:目的 用基因工程技术克隆人巨细胞病毒(Human cytomegalovirus, HCMV)中抗原性较强的蛋白片段—gp52C末端和pp150C末端的DNA序列,插入pPIC9K质粒,构建适于酵母表达系统的重组表达质粒。方法 根据人巨细胞病毒糖蛋白gp52和磷酸蛋白pp150C末端的cDNA序列,设计出2对引物。利用PCR的方法,以病毒培养液上清为模板,进行二轮PCR扩增,把两个目的基因串联在一起,将所得的DNA片段经 *EcoR*Ⅰ和 *Not*Ⅰ双酶切后用T_4连接酶与pPIC9K质粒进行连接,然后导入大肠杆菌DH5α,筛选出阳性转化子,并用PCR和双酶切鉴定阳性重组子。结果 从人巨细胞病毒培养液上清中扩增出目的基因,PCR反应和双酶切鉴定结果与预期相符。结论 重组表达质粒成功地克隆了目的基因片段。

关键词:人巨细胞病毒;重组PCR;质粒pPIC9K
中图法分类号:R373.9;R394.2 文献标识码:A

Construction of expression vector for human cytomegalovirus recombinant gene

ZHENG Yu-sheng, XIE Qi-xuan, PAN Shan-pei, LU Chun-bing, XIAO Luan-juan (Research Center of Reproduction Immunity, Jinan University, Guangzhou 510632, China)

Abstract: Objective To construct a recombinant plasmid for expressing recombinant peptides of human cytomegalovirus (HCMV) in Yeast Pichia Pastoris expression system. Methods Two pairs of primers were designed based on the DNA fragments of c-terminal of gp52 and pp150 of HCMV since the product peptides of these 2 fragments showing strong antigenicity. The 2 fragments were obtained in series by over lapping PCR with HCMV culture as template, PCR amplification and digestion with *EcoR*Ⅰ and *Not*Ⅰ. The DNA fragment was linked to plasmid pPIC9K with T4 DNA ligase, and the recombinant product was transformed into competent E. coli DH5α. Positive clone was screened and identified with PCR and EcoRⅠ and NotⅠ digestion. Results The target genes were amplified from human cytomegalovirus culture, and proved to be consistent with the objective sequences. Conclusion The recombinant plasmid containing c-terminal gp52 and pp150 genes of HCMV is constructed in success.

Key words: human cytomegalvirus; recombinant PCR; plasmid pPIC9K

人巨细胞病毒(Human cytomegalovirus, HCMV)是一个广泛传播的人类致病原,可通过唾液、尿或泌乳自然传播,还可通过性接触,输血和器官移植传播[1]。它主要引起人类的亚临床感染,但对于免疫抑制的个体和接受肿瘤治疗的病人等,HCMV感染可诱发许多疾病,导致严重的后果甚至危及生命。在孕期感染原发性HCMV的胎儿及新生儿中,80%可导致智力低下、畸形和死亡[2],因此,克隆并表达HCMV的特异抗原片段,对于开发HCMV疫苗或制备灵敏、特异的诊断试剂盒有着重要的意义。

本研究选用HCMV中抗原性较强的两个肽段(gp52的第202~433位氨基酸和pp150的第1 006~1 048位氨基酸)对应的基因序列作为目的基因片段,导入pPIC9K质粒,构建能在酵母表达系统中表达的重组质粒。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 菌种和质粒 大肠杆菌DH5α菌株,pPIC9K载体质粒为本实验室保存。

1.1.2 人巨细胞病毒培养上清为本实验室制备。

1.1.3 分子生物学试剂 各种工具酶均购自大连宝生物公司。PBR322DNA/MvaⅠMarker为上海Sangon公司产品。λDNA/HindⅢ为华美生物公司产品。DGL2000Marker为北京鼎国公司产品。PCR凝胶回收试剂盒购自美国Omege Bio-Tek公司,其他常规化学试剂为分析纯产品。引物由上海Sangon公司合成。

1.2 方法

1.2.1 HCMV模板的制备 HCMV病毒培养液上清经PEG6000沉淀,煮沸处理后备用。

1.2.2 PCR引物的设计合成 根据HCMV目的肽段的cDNA序列设计PCR引物。

正向引物(p1):5′-CTGGAATTCACAGCCAATAACCGCG-3′;

反向引物(p2):5′-CTCTTCTGGGGCGACGATAGGCCGCACTTTTGCTTCTTGGTG-3′;

正向引物(p3):5′-CACCAAGAAGCAAAAGTGCGGCCTATCGTCGCCCCAGAAGAG-3′;

反向引物(p4):5′-ATGCGGCCGCTTCCTCCGTGTTCTTAATCTTCTCG-3′。

引物p1,p2用于扩增gp52第606~1 299位核苷酸;引物p3,p4用于扩增pp150第3 018~3 144位核苷酸。引物p2和p3反向互补。且引物p2的5′端与pp150C末端基因片段的5′端有同源区;引物p3的5′端与gp52C末端基因片段的3′端有同源区。引物p1和p4分别带有 *EcoR*Ⅰ和 *Not*Ⅰ的酶切位点(下划线部分)。

第一轮PCR扩增:①反应物组成:1μl 10 pmol/μl p1,1μl 10 pmol/μl p2,5μl HCMV病毒液。反应条件:94 ℃ 1 min,43 ℃

基金项目:深圳市科技计划科研课题资助项目
作者简介:郑育声(1977-),女,海南省琼海县人,硕士研究生,主要从事基因工程与疫苗方面的研究。电话:(020)85220235
收稿日期:2002-01-04;修回日期:2002-03-20

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

30 s, 72 ℃ 1 min, 29 个循环; 最后, 72 ℃延伸 8 min。扩增出带有 *EcoR* Ⅰ 酶切位点的 gp52C 末端基因序列(719 bp)。②反应物组成: 1 μl 10 pmol/μl p3, 1 μl 10 pmol/μl p4, 其余组成同上。反应条件: 94 ℃ 1 min, 52 ℃ 30 s, 72 ℃ 1 min, 29 个循环; 最后 72 ℃延伸 8 min。扩增出带有 *Not* Ⅰ 酶切位点的 pp150C 末端基因序列(161 bp)。gp52C 末端基因序列和 pp150C 末端基因序列的 3′末端反向互补。

第二轮 PCR 扩增: 反应物组成: 2 μl 10 pmol/μl p1, 2 μl 10 pmol/μl p4, 第一轮 PCR 两种扩增产物各 2 μl。反应条件: 95 ℃ 3 min(预变性), 94 ℃ 1 min, 43 ℃ 30 s, 72 ℃ 1 min, 29 个循环; 最后, 72 ℃延伸 8 min。扩增出 gp52C 末端基因序列与 pp150C 末端基因序列串联的目的基因片段, 两端带有 *EcoR* Ⅰ 与 *Not* Ⅰ 酶切位点(838 bp)。

1.2.3　重组子的构建　　载体的抽提, 核酸的酶切、连接、电泳, 质粒的纯化、转化等一般分子克隆方法均参照文献[3]。

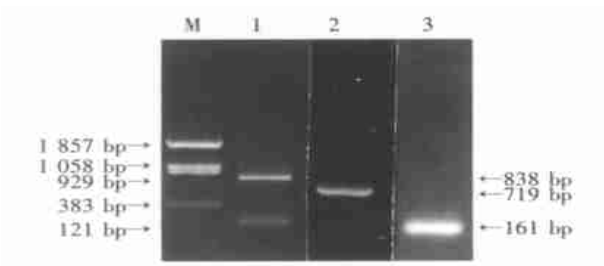
1.2.4　重组子的筛选和鉴定　　抽提重组质粒 DNA, 用 *EcoR* Ⅰ 与 *Not* Ⅰ 两种酶同时酶切, 琼脂糖凝胶电泳检测结果。

此外, 以重组质粒为模板, 用质粒 pPIC9K 的特征引物: α-factor和 3′AOX, 以及自行设计的引物 p1 和 p4 分别进行 PCR 扩增, 琼脂糖凝胶电泳鉴定结果。

2　结果

2.1　PCR 扩增结果

取 PCR 产物 5.0 μl 用 1%琼脂糖电泳检测, 结果显示: 两轮 PCR 扩增产物均为一条特异的 DNA 片段, 大小分别为 719, 161, 838 bp, 与设计的相符。初步证实 PCR 产物为目的基因片段, 见图 1。



M: PBR322 DNA/Mva Ⅰ marker; 22; 1: Recombinant DNA (838 bp); 2: gp52 CTP DNA (719 bp); 3: pp150 CTP DNA (161 bp)

图 1　PCR 扩增产物

Fig 1　PCR products

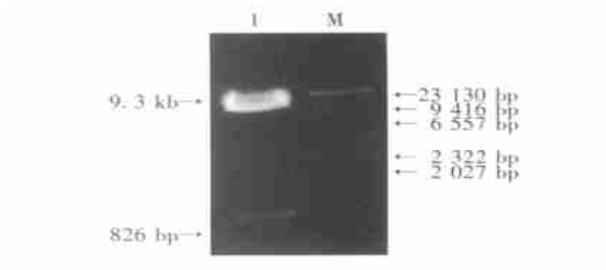
2.2　双酶切后(体外连接前)载体与目的 DNA 的电泳结果

双酶切后载体与目的 DNA 都呈现单一条带, 分子量分别对应于 Marker 9.3 kb 和 826 bp 相应的位置。

2.3　重组质粒的筛选和鉴定结果

pPIC9K 载体与 PCR 扩增产物经 *EcoR*Ⅰ 与 *Not*Ⅰ 双酶切, 纯化后 T_4 连接酶连接, 连接液转化大肠杆菌 DH5α, 涂布于含氨卞青霉素(AMP)的 LB 板上, 过夜培养, 次日观察到平板上菌落均匀分布。

挑取单菌落, 抽提质粒 DNA 进行双酶切。重组质粒经 *EcoR*Ⅰ 与 *Not*Ⅰ 双酶切后, 产生 9.3 kb 载体和 826 bp 外源片段两个产物。它们都对应λDNA/HindⅢ Marker 的相应位置, 见图 2。该结果说明了目的 DNA 片段已插入载体中。



M: λDNA/*Hind* Ⅲ marker; 1: Recombinant after restriction analysis (9.3 kb and 826 bp)

图 2　重组子双酶切电泳图

Fig 2　Electrophoresis of the recombinant after restriction analysis

为进一步鉴定重组质粒, 分别用质粒 pPIC9K 上的α-factor, 3′AOX 引物和 p1, p4 引物进行 PCR 扩增, 其产物在琼脂糖凝胶电泳中均出现单一的 DNA 条带。该结果进一步表明 DNA 已插入载体, 并且方向正确, 见图 3。由于α-factor 引物和 3′AOX 引物是载体的特征引物, 扩增出的产物含载体部分序列, 故分子量较 p1, p4 扩增产物的分子量稍大(约多 170 bp)。



M: DNA marker DGL2000; 1: With p1 and p4 as primers (838 bp); 2: α-factor and 3′ AOX as primers (1 008 bp)

图 3　α-factor, 3′AOX 引物和 p1, p4 引物 PCR 扩增产物比较

Fig 3　Comparison of the PCR products with α-factor and 3′ AOX as primers or with self-designed p1 and p4 as primers

3　讨论

快速、准确的病毒感染诊断对于 HCMV 相关疾病的诊断和治疗非常重要, 尤其对于孕妇和献血员的检测有着重要意义。HCMV 的诊断有不同的方法, 直接的方法有: 病毒培养、病毒基因组的验证、聚合酶链反应(PCR)技术、基因组探针。间接的检测方法是建立在血清学诊断的基础上。主要有利用单克隆抗体检测 HCMV 早期抗原和人工重组病毒抗原检测 HCMV 感染后机体出现的 IgG 和 IgM 抗体[4]。目前, 抗体的检测常采用的血清学方法是酶联免疫吸附试验(ELISA)。但当一份血清样品采用不同的 ELISA 试剂盒检测时常常出现不同的结果[5]。这主要是由于目前 ELISA 试剂盒所用的抗原均来源于病毒的细胞培养物, 即全病毒。研究发现, 只有有限的几种 HCMV 蛋白能与临床感染不同阶段的阳性血清反应, 为 HCMV 血清学诊断所必需。由于许多 HCMV 抗原成分与其它疱疹病毒中的

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.cnki.net

相应成分具有很强的同源性，造成结果的特异性，敏感性和稳定性差别很大[6]。因此，应用具有较强抗原性且与其它病毒没有同源性的 HCMV 蛋白或多肽作为抗原，替代全病毒抗原，是提高 HCMV 感染诊断的敏感性和特异性的有效途径。

对 HCMV 感染引起体液免疫反应研究证明，HCMVgp52 蛋白具有很强的抗原性，能被大多数 HCMV 阳性血清识别。用软件对蛋白氨基酸序列分析结果显示，该蛋白内有 3 个强抗原决定簇，分别位于第 167～172 位氨基酸，337～343 位氨基酸和 410～417 位氨基酸[7]，李长贵等[8]用计算机序列分析其抗原性主要集中在羧基末端约 200 个氨基酸，同时这一段蛋白与其它疱疹病毒的同源性小，闫梅英等[9]进一步研究证明，在 HCMV 感染引起的体液免疫反应中，p52 蛋白的 279～433 氨基酸是结合 IgM 的抗原决定簇，能特异性地识别 IgM 抗体，阳性反应率约为 90%[10]。Spaete 等[11]证实在病毒颗粒中，结构蛋白 UL32(pp150)是具有最强免疫原性的蛋白。尽管原发性 HCMV 感染早期和血清阴性个体对 UL32 的抗体反应相当低，甚至几乎没有，但 100% 血清阳性个体能检测到这种蛋白产生的高抗体滴度，而且它能引起 IgG 的 4 种亚型，在其它多肽引起的抗体都已消失以后这种免疫反应仍持续几年。Vornagen[12] 及 Landini[13] 等研究证实：HCMV 主要结构蛋白 pp150 的羧基末端部分是 HCMV-IgM 的重要结合表位，敏感性可达 80%以上，在进一步研究中，发现 UL32 羧基末端 38 个氨基酸重叠肽段是 IgM 结合反应的重要区域，因而在监测 HCMV 原发及急性期感染中有极为重要的作用。

根据上述资料，把 gp52C 末端和 pp150C 末端这两段抗原性较强的片段用基因工程技术连接在一起，克隆并进行表达，将能够加强抗体检测的特异性和敏感性，其产物可望用于发展新一代 HCMV 诊断试剂。本研究设计了 2 对引物，第一对扩增 gp52 第 606～1 299 位核苷酸(即 C 末端第 202～433 位氨基酸，含两个强抗原决定簇)。第二对扩增 pp150 第 3 018～3 144 位核苷酸(即 C 末端第 1 006～1 048 位氨基酸)，将两段目的基因片段通过重组 PCR 方法串联起来，并连接到载体上，构建成重组表达质粒，为进一步表达该嵌合肽蛋白建立了前提。

参考文献：

[1] Greijer A E, Crommert J G, Stevens S C, *et al*. Molecular fine-specificity analysis of antibody responses to human cytomegalovirus and design of novel synthetic-peptide-base serodiagnostic assays[J]. J Clin Microbiol, 1999, 37(1): 179－188.

[2] Middeldorp J M, Jongsma J, Haar A T, *et al*. Detection of immunoglobulin M and G antibodies against cytomegalovirus early and late antigens by enzyme-linked immunosorbent assay[J]. J Clin, Microbiol, 1984, 20(4): 763－771.

[3] Sambrook J, Fritsch E F, Maniatis T. Molecular cloning[M]. New York: Cold Spring Harbor Laboratory, 1989. 125－127.

[4] Landini M P, Guan M X, Jahn G, *et al*. Large-scale screening of human sera with cytomegalovirus recombinant antigens[J]. J Clin Microbiol, 1990, 28(6): 1 375－1 379.

[5] Werb B, Prosser F, Munlwitz A, *et al*. Serological diagnosis of cytomegalovirus infection: comparasion of 8 enzyme immunoassays for the detection of HCMV-specific IgM antibody[J]. Clin Diagn Virol, 1994, 2(1): 245－251.

[6] Chee M S, Bankier S, Beck R, *et al*. Analysis of the protein-coding content of the sequence of human cytomegalovirus strain AD169[J]. Curr Top Microbiol Immunol. 1990, 154(4): 125－169.

[7] 李越希，汪兴太，陶开华，等. 人巨细胞病毒 gp52 蛋白基因片段的克隆及表达[J]. 中国生物制品学杂志，2000，13(1)：9－12.

[8] 李长贵，沈月雷，周铁群，等. 人巨细胞病毒糖蛋白 gp52 的原核表达及初步应用[J]. 中华医学检验杂志，1997，20(4)：205－208.

[9] 闫梅英，葛银林，苏冬梅，等. 人巨细胞病毒 p52 蛋白基因的克隆及表达[J]. 青岛医学院学报，1998，34(4)：237－239.

[10] Jahn G, Kouzaridas T, Mach M, *et al*. Map position and nucleotide sequence of the gene for the large structural phosphoprotein of human cytomegalovirus[J]. J Virol, 1987, 61(5): 1 358－1 362.

[11] Spaete R R, Gehrz R, Landini M P, *et al*. Human cytomegalovirus structural proteins[J]. J Gen Virol, 1994, 75(3): 3 287－3 308.

[12] Vornagen R, Plachter B, Hinderer W, *et al*. Early serodiagnosis of acute human cytomegalovirus infection by enzyme-linked immunosorbent assay using recombinant antigens[J]. J Clin Microbiol, 1994, 32(4): 981－986.

[13] Landini M P, Lazzarotto T, Ripalti A, *et al*. Antibody response to recombinant Lamda gt11 fusion protein in cytomegalovirus infection[J]. J Clin Microbiol, 1989, 27(10): 2 324－2 327.

(编辑　冷怀明)

个案与短篇

文章编号：1000-5404(2002)06-0718-01

67 例急诊腹部 CT 扫描质量分析

Quality analysis of abdominal CT scanning in 67 emergency cases

谢　兵，王　健，岳旭光　(第三军医大学附属西南医院放射科，重庆 400038)

为了提高急诊病人 CT 检查的影像质量，我们分析了一个季度的所有急诊腹部 CT 片。将总结所得到的材料按年龄、病因、影像质量等分类统计分析。从中可以得知中老年人呼吸伪影是影响影像质量的最主要因素。

作者简介：谢　兵(1966－)，男，四川省乐山市人，主管技师，主要从事数字减影血管造影及 CT、MR 等放射技术的研究。电话：(023)68754426

收稿日期：2002-03-11；修回日期：2002-05-09

(下转 721 页)

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net