

人疱疹病毒 7 型 pp85 重组表达及抗体制备

徐 建 姚 堑 窦 洁 许文嵘 尹全章 陈 云 周 锋

【摘要】 目的 制备人疱疹病毒 7 型 (HHV-7) pp85 蛋白及其抗体。方法 采用聚合酶链反应 (PCR) 方法自 HHV-7 型 YY5 分离株中扩增出 pp85 基因, 经测序后构建原核表达质粒 PGEX-6p-1 + pp85b。重组质粒转化大肠埃希菌 Rosetta, 诱导蛋白表达。应用酶切鉴定、十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳 (SDS-PAGE) 及蛋白质印迹法等方法确保基因片段的正确性及表达蛋白的特异性。表达的蛋白经亲和层析纯化后, 免疫动物制备多克隆抗体, 并通过免疫荧光法鉴定抗体的特异性。结果 成功地获得了高纯度的 pp85 融合蛋白, 纯度可达 90% 以上; 免疫动物后制备的多克隆抗体效价可达 1 102 400, 该抗体能特异识别 HHV-7 抗原, 而不与 HHV-6 反应。结论 获得高纯度的 HHV-7 pp85 融合蛋白及其高效价的抗体, 将进一步应用于临床检验。

【关键词】 人疱疹病毒 7 型; pp85; 基因表达; 病毒抗体

Cloning and expression of human herpesvirus 7 pp85 and corresponding antibody production

XU Jian, YAO Kun, DOU Jie, XU Weirong, YIN Quanzhang, CHEN Yun, ZHOU Feng (Department of Microbiology and Immunology, Nanjing Medical University, Nanjing 210029, China)

【Abstract】 Objective The goal of the current study was to express the pp85 gene of human herpesvirus 7 (HHV-7) and to prepare anti pp85 polyclonal antibodies. **Methods** The pp85 gene of HHV-7 was amplified using PCR and this amplified gene was cloned into a prokaryotic expression vector and named as PGEX-6P-1 + pp85b. The recombinant plasmid was then transformed into Escherichia coli Rosetta. The accuracy of the inserted gene and the specificity of the proteins were verified by restriction enzyme digestion, SDS-PAGE, and Western blot. The expressed pp85 fusion protein was then purified using affinity chromatography and was used to immunize rabbits in order to obtain the anti pp85 antibodies. The specificity of these antibodies was verified using immunofluorescence. **Results** The purity of the recombinant pp85 was above 90% and the titer of anti pp85 antibodies was 1 102 400. As an indication of the specificity of the antibodies produced, this polyclonal antibody was shown to react with HHV-7 infected cells but failed to react with human herpesvirus 6 (HHV-6) infected cells as shown by IFA. **Conclusion** In the current study we were able to obtain a highly purified form of the HHV-7 pp85 fusion protein and the corresponding high titer polyclonal antibodies were produced in rabbit.

【Key words】 Human herpesvirus 7; pp85; Gene expression; Viral antibodies

人疱疹病毒 7 型 (HHV-7) 是一种新型的嗜人淋巴细胞病毒, 属 -疱疹病毒亚科, 1990 年由 Frenkel 等^[1]从健康成人的外周血单个核细胞 (PBMC) 中首次分离。HHV-7 是引起婴幼儿急疹 (Exanthem Subitum) 的主要病原之一, 并与玫瑰糠疹 (Pityriasis Rosea) 和器官移植综合征相关^[2]。pp85 由 U14 基因所编码, 位于病毒的内膜层, 具有强免疫原性和特异性^[3,4]。本研究克隆并构建了 HHV-7 pp85 C 端 540 bp 编码基因的表达质粒, 在大肠埃希菌中表达, 获得纯化蛋白, 制备了多克隆抗体, 旨在为临床诊断和实验室研究提供工具。

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (NO. 30371345); 江苏省自然科学基金资助项目 (NO. BK2001115)

作者单位: 南京医科大学微生物与免疫学系, 南京 210029

通讯作者: 姚 堑, E-mail: yaokun@njmu.edu.cn

材料和方法

1. 毒株、细胞 南京市妇幼保健院提供肝素抗凝脐血, 淋巴细胞分离液分离人脐带血单个核细胞 (CBMC)。于 20% 新生牛血清 RPMI 1640, 含 PHA 50 μg/ml, 白细胞介素-2 (IL-2) 10 μg/ml, 青、链霉素分别为 100 U/ml 的条件下培养。第 3 天接种 HHV-7 自分离株 YY5。第 10 天病变明显时收获细胞, 抽提 DNA。

2. 质粒、菌株 原核表达质粒 pGEX-6p-1 和大肠埃希菌 DH5⁺、Rosetta 均为本室保存。

3. 主要试剂 限制性内切酶 BamH¹、Xba¹、Taq 酶、高保真酶 Pyrobest、DNA 连接酶均购自日本 Takara 公司, 质粒提取试剂盒、胶回收纯化试剂盒、CST 单克隆抗体为北京天为时代公司产品, Glutathione Sepharose 4B 亲和层析柱购自 Pharmacia

公司,二抗均购自武汉博士德公司,蛋白质印迹法显色剂购自 Cell Signaling 公司,佐剂购自美国 Sigma 公司,HHV-6 IgG 间接免疫荧光检测试剂盒购自德国欧蒙公司。

4. PCR 引物的设计与合成 根据 GenBank 中 U14 基因序列 , 辅助于计算机设计引物 , 分别命名为 P1a 、 P1b 。引物的上游序列 P1a 为 : 5' ctggatccggatt c t a a t t c t a t t 3' , 下游序列 P1b 为 : 5' ctccctcgagtttccgggtcttcgg 3' 。这对引物扩增的是原序列中的第 1 408 ~ 1 947 位核苷酸间的片段 , 并在上、下游分别加入 BamH 、 Xba I 的识别序列 (下划线标注) 和保护性碱基。引物合成由上海博亚公司完成。

5. pp85 基因的扩增 取病毒接种后 10 d 出现明显病变的 CBMC, 提取细胞总 DNA, 以此为模板, P1a、P1b 为引物, 高保真酶常规聚合酶链反应(PCR)扩增目的核酸片段。具体 PCR 条件为: 预变性 94 5 min; 然后 94 30 s, 50 45 s, 72 45 s, 热循环 30 次; 末次延伸 72 10 min。PCR 产物通过 1.5% 琼脂糖凝胶电泳鉴定。回收 PCR 产物, 送上海博亚公司测序。

6. pp85 基因重组原核表达质粒的构建 用 BamH 和 Xoh 双酶切纯化的 PCR 产物和质粒 PGEX-6p-1 ,酶切产物经琼脂糖电泳、回收并纯化 ,用 T4 DNA 连接酶 4 连接过夜 ,连接产物转化 DH5 感受态细胞。重组子采用菌落 PCR 法、双酶切及测序鉴定。重组质粒命名为 pGEX-6p-1 + pp85b。

7. 重组 pp85 基因的表达与纯化 将重组质粒 pGEX-6p-1 + pp85b 重新转化感受态细胞 Rosette , 挑取单个克隆接种 LB 肉汤 ,37 225 r/ min 振荡过夜。取过夜的菌液按 1 : 50 比例接种新鲜的 LB 肉汤 , 剧烈振荡 2 ~ 3 h, 待菌液浓度达 A_{600} 0.6 ~ 0.8 时 , 加入异丙基硫代- -D- 半乳糖苷 (IPTG) 至终浓度为 1 mmol/L , 继续剧烈振荡 , 于 5 h 后离心收集细菌沉淀 , 12 % 十二烷基硫酸钠 - 聚丙烯酰胺凝胶电泳 (SDS-PAGE) 鉴定目的蛋白的相对分子质量和表达产量。常规 Glutathione Sepharose 4B 亲和层析柱进行蛋白纯化。

8. pp85 基因产物的蛋白质印迹法鉴定 将上述蛋白电泳后的产物转移至 PVDF 膜上,以未诱导的重组蛋白作为阴性对照,以小鼠抗 GST 单克隆抗体为一抗, HRP 标记的羊抗鼠 IgG 为二抗,显色后对 X 光片曝光。

9. pp85 基因产物的多克隆抗体制备 取纯化

后的重组 pp85 蛋白免疫新西兰兔 :1 ml 蛋白溶液 (约 500 μ g) 与等量弗氏完全佐剂混匀 , 皮下注射。 4 周后 , 等量蛋白液与弗氏不完全佐剂混匀 , 肌内注射 , 加强免疫 2 次。 8 周后 , 心脏取血 , 分离抗血清。以纯化的重组 pp85 蛋白包板 (60 ng/ 孔) , 间接酶联免疫吸附试验 (ELISA) 测定多克隆抗体的效价。

10. 间接免疫荧光试验 将 HHV-7 感染的 SupT1 细胞悬液滴在玻片上，冷丙酮固定。以抗 pp85 的多克隆抗体为一抗，异硫氰酸荧光素(FITC)标记的羊抗兔 IgG 为二抗，免疫前兔血清为阴性对照，荧光显微镜观察。另取试剂盒中 HHV-6 感染细胞的抗原片，按欧蒙产品说明书检测抗 pp85 的多克隆抗体与 HHV-6 是否存在交叉反应。

结 果

1. pp85 基因的扩增和克隆 自 HHV-7 YY5 病毒株基因组中 PCR 扩增 pp85 基因 , 经琼脂糖凝胶电泳可见约 500 bp 的目的条带 , 与预期的 540 bp 条带大小相近 (图 1)。测序结果经 Blast 比对 , 与 Genebank 中 HHV7 标准株 RK 株的序列完全一致。

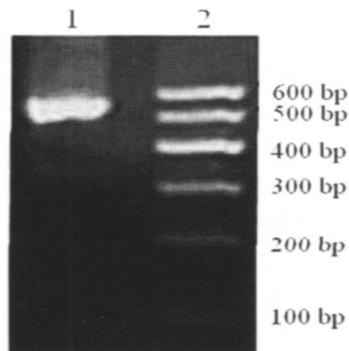


图 1 pp85 基因的 PCR 扩增

Fig 1. pp85 gene amplified by PCR

Lane 1 : Product of PCR ; Lane 2 : DNA Marker .

2. pp85 重组原核表达质粒的鉴定及表达 pp85 基因扩增产物经 BamH 和 Xoh 双酶切后克隆至原核表达载体,命名为 pGEX-6p-1 + pp85b。pGEX-6p-1 + pp85b 转化的 DH5 菌经扩增培养后提取质粒 DNA,经 BamH 和 Xoh 双酶切,酶切产物在琼脂糖凝胶上出现 2 条核酸条带,其中 1 条大小约为 5 kb,另 1 条大小约 500 bp;对照质粒 pGEX-6p-1 经相同酶切后只有 1 条 5 kb 左右条带,表明外源片段插入表达载体中(图 2)。重组转化菌经 IPTG 诱导后,在 48×10^3 处显示融合表达蛋白条带;空质粒

pGEX-6p-1 在该处无特异条带 ,在 26 kd 处有谷胱甘肽转移酶 (GST) 表达条带 ;而未诱导的重组 pGEX-6p-1 + pp85b 质粒在 48×10^3 处无特异性条带显示。为了获得 IPTG 诱导表达的最佳浓度和时间 ,试验选择终浓度为 0.2、0.4、0.6、0.8、1.0 mmol/L 的 IPTG ,并分别于诱导后 2、3、4、5、6 h 收集细菌沉淀 ,进行 SDS-PAGE 鉴定。结果表明 ,IPTG 在 0.2 ~ 1.0 mmol/L 的终浓度范围之内 ,表达量无明显差异。在 2、3、4、5、6 h 的诱导时间段内 ,融合蛋白的表达在 5h 达到最高 (图 3)。经过 Glutathione Sepharose 4B 柱亲和层析 ,得到了纯度高达 90 % 以上的重组蛋白 (图 4)。

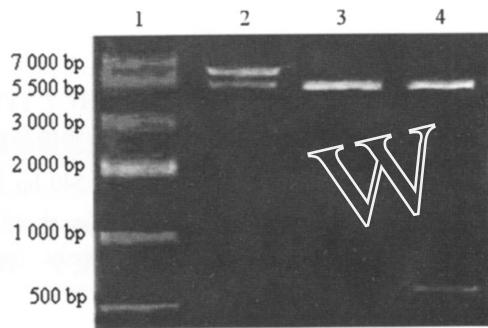


图 2 重组质粒 pGEX-6p-1 + pp85b 的双酶切鉴定

Fig. 2. Restriction enzyme analysis of recombinant plasmid pGEX-6p-1 + pp85b

Lane 1 : DNA Marker ; Lane 2 : Undigested recombinant plasmid pGEX-6p-1 + pp85b ;Lane 3 : Plasmid pGEX-6p-1 digested by BamH I and Xba I ;Lane 4 : Recombinant plasmid pGEX-6p-1 + pp85b digested by BamH I and Xba I .

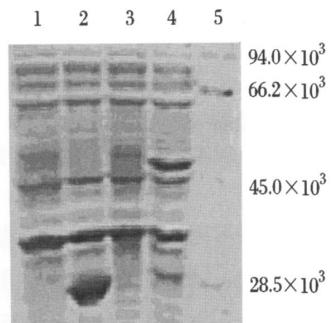


图 3 pp85 在大肠埃希菌中重组表达的 SDS-PAGE 分析

Fig. 3. SDS-PAGE of expressed pp85 from E. coli

Lane 1 : Rosetta alone ;Lane 2 : Rosetta transformed with pGEX-6p-1 , induced ; Lane 3 : Rosetta transformed with pGEX-6p-1 + pp85b , non-induced ;Lane 4 : Rosetta transformed with pGEX-6p-1 + pp85b , induced ;

Lane 5 : Protein molecular marker standards

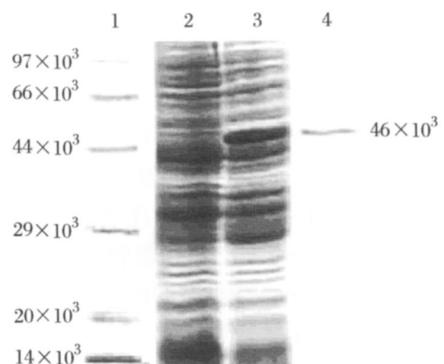


图 4 纯化的 pp85 蛋白 SDS-PAGE 分析

Fig. 4. SDS-PAGE of purified pp85 protein

Lane 1 : Protein molecular marker ;Lane 2 : Lysate proteins from non induced pGEX-6p-1 + pp85b transformed bacteria ;Lane 3 : Lysate proteins from induced pGEX-6p-1 + pp85b transformed bacteria ;Lane 4 : Purified pp85 protein.

3. pp85 基因表达产物的蛋白质印迹法鉴定

分别以未诱导的、诱导 5 h 的重组蛋白以及纯化后的蛋白进行 12 % SDS-PAGE 和蛋白质印迹法测定 ,结果可见诱导 5 h 的重组蛋白以及纯化后的重组蛋白均有明显的免疫印迹条带出现 ,而作为阴性对照的未诱导重组蛋白则无此条带 (图 5)。

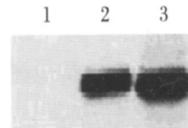


图 5 蛋白质印迹法鉴定重组蛋白 pp85

Fig. 5. Identification of recombinant pp85 protein by Western blot

Lane 1 : Negative control ;lane 2 : Recombinant pp85 ; lane 3 : Purified recombinant pp85.

4. pp85 重组蛋白诱导产生抗体的检测 利用上述重组表达的 pp85 蛋白免疫新西兰兔 ,采用间接 ELISA 测定抗血清效价高达 1 102 400 。间接免疫荧光试验结果显示抗 pp85 的多克隆抗体能特异性识别 HHV-7 ,而不与 HHV-6 反应 (图 6)。

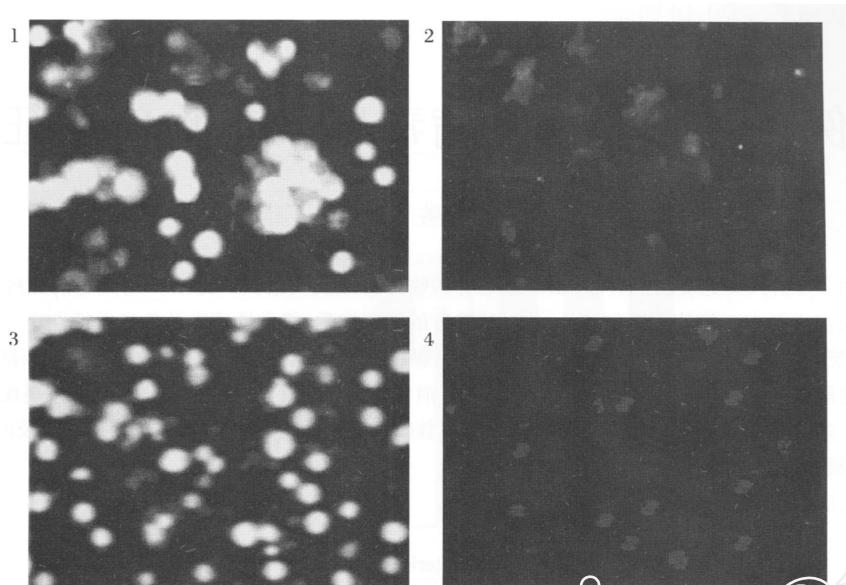


图 6 间接免疫荧光法鉴定抗 pp85 多克隆抗体的特异性 (10 ×40)

Fig 6. Identification of the specificity of anti-pp85 polyclonal antibodies by immunofluorescence (10 ×40)

1: HHV-7 infected ScpTl cells with anti-pp85 polyclonal antibodies; 2: HHV-7 infected ScpTl cells with normal rabbit serum; 3: HHV-6 infected cells with positive control serum; 4: HHV-6 infected cells with anti-pp85 polyclonal antibodies.

讨 论

HHV-7 是近年新发现的一种人类疱疹病毒,其普遍潜伏于人体中,建立持续感染。目前除婴幼儿急疹外,还未证实与其他疾病存在必然的联系。但 HHV-7 在慢性疲劳综合征、器官移植和免疫抑制患者体内有着较高的检出率,并与疾病发展过程存在一定的相关性。HHV-7 主要感染 CD4⁺ T 淋巴细胞,并以 CD4 分子作为入侵细胞的受体。值得一提的是,CD4 也是人类免疫缺陷病毒(HIV)侵入细胞的主要受体分子,而且 HHV-7 与 HIV 存在着相互拮抗的关系^[5,6]。因此 HHV-7 的研究有助于加深对 HIV 感染机制的理解,并有助于探索 HIV 感染防治的新途径^[7]。

HHV-7 与 HHV-6 同属 -疱疹病毒亚科,两者在 DNA 水平上约有 60 %的同源性,在蛋白质水平上约有 54.3 %同源性,并且具有相似的细胞嗜性、致病性和抗原表位^[8]。这些相似性增加了 HHV-7 感染诊断的困难。因此开发特异性强的诊断工具对 HHV-7 的基础和临床研究具有重要意义。

pp85 是 HHV-7 的内膜蛋白,具有很强的免疫原性和特异性,能特异地识别 HHV-7 感染者的血清,而不与 HHV-6 感染者的血清发生反应。由于 pp85 是病毒晚期基因编码的结构蛋白,它的检出还可以作为病毒裂解期复制的标志。pp85 的特异性单克

隆抗体 5E1 已被用于免疫组化和免疫电镜的方法检测抗原。Stefan 等^[9]对 HHV-7 与 HHV-6 U14 基因编码蛋白的序列分析表明,两者的 C 端存在较大的差异,并将 5E1 对应的抗原表位定位于 pp85 的第 484 与 502 位氨基酸之间的肽段。由于国内、外对 HHV-7 的研究较少,目前尚缺乏商品化的试剂供应临床检测及实验室研究。本研究表达了 HHV-7 C 端 179 个氨基酸的肽段(470~648 位氨基酸),纯化了蛋白,并将进一步建立血清学检测方法,用于临床诊断;另一方面,免疫动物制备了多克隆抗体,该多克隆抗体能特异地识别 HHV-7,且与 HHV-6 无交叉反应,为进一步研究 HHV-7 提供了工具。

参 考 文 献

1. Frenkel N, Schirmer EC, Wyatt LS, et al. Isolation of a new herpesvirus from CD4⁺ T cells. Proc Natl Acad Sci USA, 1990, 87:748~752
2. Karabulut AA, Kocak M, Yilmaz N, et al. Detection of human herpesvirus 7 in pityriasis rosea by nested PCR. Int J Dermatol, 2002, 41:563~567
3. Stefan A, Secchiero P, Baechi T, et al. The 85-kilodalton phosphoprotein(pp85) of human herpesvirus 7 is encoded by open reading frame U14 and localizes to a tegument substructure in virion particles. J Virol, 1997, 71:5758~5763

(下转第 110 页)

22. Burysek L , Pitha PM. Latently expressed human herpesvirus 8-encoded interferon regulatory factor 2 inhibits double stranded RNA-activated protein kinase. *J Virol* ,2001 ,75 :2345 ~ 2352
23. Lubyova B , Kellum MJ , Frisancho AJ , et al. Kaposi 's sarcoma-associated herpesvirus-encoded vIRF3 stimulates the transcriptional activity of cellular IRF3 and IRF7. *J Biol Chem* ,2004 ,279 :7643 ~ 7654
24. Seo T , Park J , Lim C , et al. Inhibition of nuclear factor kappaB activity by viral interferon regulatory factor 3 of Kaposi 's sarcoma-associated herpesvirus. *Oncogene* ,2004 ,23 :6146 ~ 6155
25. Andrejeva J , Young DF , Godbourn S , et al. Degradation of STAT1 and STAT2 by the V proteins of simian virus 5 and human parainfluenza virus Type 2 , respectively: consequences for virus replication in the presence of alpha/ beta and gamma interferons. *J Virol* ,2002 ,76 :2159 ~ 2167
26. Ulane CM , Rodriguez JJ , Parisien JP , et al. STAT3 ubiquitylation and degradation by mumps virus suppress cytokine and oncogene signaling. *J Virol* ,2003 ,77 :6385 ~ 6393
27. Gotoh B , Takeuchi K , Komatsu T , et al. The STAT2 activation process is a crucial target of sendai virus C protein for the blockade of alpha interferon signaling. *J Virol* ,2003 ,77 :3360 ~ 3370
28. Kato A , Kiyotani K , Kubota T , et al. Importance of the anti-interferon capacity of sendai virus C protein for pathogenicity in mice. *J Virol* ,2007 ,81 :3264 ~ 3271
29. Heim MH , Moradpour D , Blum HE. Expression of hepatitis C virus proteins inhibits signal transduction through the Jak-STAT pathway. *J Virol* ,1999 ,73 :8469 ~ 8475
30. Shaw ML , Sastre AG , Palese P , et al. Nipah virus V and W proteins have a common STAT1-binding domain yet inhibit STAT1 activation from the cytoplasmic and nuclear compartments. *Res J Virol* ,2004 ,78 :5633 ~ 5641
31. Palosaari H , Parisien JP , Rodriguez JJ , et al. STAT protein interference and suppression of cytokine signal transduction by measles virus V protein. *J Virol* ,2003 ,77 :7635 ~ 7644
32. Reid SP , Leung LW , Amy L , et al. Ebola Virus VP24 Binds Karyopherin 1 and Blocks STAT1 Nuclear Accumulation. *J Virol* ,2006 ,80 :5156 ~ 5167
33. Rodriguez JJ , Wang LF , Horvath CM. Hendra virus V protein inhibits interferon signaling by preventing STAT1 and STAT2 nuclear accumulation. *J Virol* ,2003 ,77 :11842 ~ 11845
34. Brzak K , Finke S , Conzelmann KK. Inhibition of interferon signaling by rabies virus phosphoprotein P: activation dependent binding of STAT1 and STAT2. *J Virol* ,2006 ,80 :2675 ~ 2683

(收稿日期:2007-05-25)

(上接第 91 页)

4. Tomasi LF , Fiorilli MP , Avitabile E , et al. Identification of an 85 kDa phosphoprotein as an immunodominant protein specific for human herpesvirus 7-infected cells . *J Gen Virol* ,1996 ,77 :511 ~ 518
5. Lisco A , Grivel JC , Biancotto A , et al. Viral interactions in human lymphoid tissue : human herpesvirus 7 suppresses the replication of CCR5-Tropic human immunodeficiency virus type 1 via CD4 modulation . *J Virol* ,2007 ,81 :708 ~ 717
6. Vermeire K , Zhang Y , Princen K , et al. CADA inhibits human immunodeficiency virus and human herpesvirus 7 replication by down modulation of the cellular CD4 receptor. *Virology* ,2002 ,302 :342 ~ 353
7. Yao K , Dou J , Xu J , et al. Isolation of Nanjing local strains of HHV-7 and their biological and immunological characteristics. *Cell Mol Immunol* ,2004 ,1 :367 ~ 372
8. Megaw AG , Rapaport D , Avidor B , et al. The DNA sequence of the RK strain of human herpesvirus 7. *Virology* ,1998 ,244 :119 ~ 132
9. Stefan A , De LM , Frascaroli G , et al. Development of recombinant diagnostic reagents based on pp85(U14) and p86 (U11) proteins to detect the human immune response to human herpesvirus 7 infection. *J Clin Microbiol* ,1999 ,37 :3980 ~ 3985

(收稿日期:2007-01-29)

更 正

本刊 2007 年 3 月第 1 期第 64 页《网上快讯》中的“ Tool 样 ” 应为“ Toll 样 ” , 特此更正。

本刊编辑部