

猕猴 B 病毒 gB 蛋白胞外区基因片段的合成和真核表达

刘慧芳^{1,2}, 孙书芳³, 曾 林¹, 易思萌^{1,2}, 游 颖¹, 马雨楠¹, 范君文¹, 孙兆增¹, 王 新²

(1. 军事医学科学院实验动物中心, 北京 100071; 2. 青岛农业大学, 山东 青岛 266109;
3. 山东省青岛市中心血站, 山东 青岛 266071)

【摘要】 目的 获得猕猴 B 病毒 gB 蛋白胞外区基因, 并分析其表达特性。**方法** 利用基因合成的方法合成 B 病毒 gB 蛋白胞外区的基因片段, 经 *Bam*H I 和 *Not* I 双酶切后连接到 pEGFP-N3 载体。将构建的 pEGFP-N3-GB_合 重组质粒转染到 293 细胞。提取蛋白用 Western blot 检测其在细胞内的表达情况, 并利用激光共聚焦分析在细胞内的表达定位。**结果** pEGFP-N3-GB_合 重组质粒能在 293 细胞内正常表达, 并且在细胞膜上表达。**结论** 利用真核表达系统, 可以产生 B 病毒 gB 蛋白的特异性抗原重组蛋白, 且在细胞膜上表达。

【关键词】 猕猴 B 病毒; gB 蛋白; 合成; 真核表达

【中图分类号】 R332 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856(2014) 11-0006-04

doi: 10.3969/j.issn.1671.7856.2014.011.002

Synthesis and eukaryotic expressing of the gene encoding extracellular domains of gB protein B virus

LIU Hui-fang^{1,2}, SUN Shu-fang³, ZENG Lin¹, YI Si-meng², YOU Ying¹, MA Yu-nan¹,
FAN Jun-wen¹, SUN Zhao-zeng¹, WANG Xin²

(1. Laboratory Animal Center of the Academy of Military Medical Science, Beijing 100071, China;
2. Qingdao Agriculture University, Shandong Qingdao 266109, China;
3. Qingdao Blood Bank, Shandong Qingdao 266071, China)

【Abstract】 Objective To get the gene encoding extracellular domains of gB protein of B virus and analyze its expression in the eukaryocyte cell. **Methods** synthesizing gene fragment encoding extracellular domains of gB protein of B virus was by using synthesis gene, then digested with the restriction endonucleases *Bam*H I and *Not* I and inserted into eukaryotic expressing vector pEGFP-N3. pEGFP-N3-GB_合 was transfected into 293 cells. After protein extraction, the expression of gene was detected by western blotting, and the cellular localization of the gene was analyzed by immunofluorescence and laser scanning confocal microscopy. **Results** pEGFP-N3-GB_合 were expressed in 293 cells and on the cell membrane. **Conclusion** eukaryotic expressing system can produce specific antigen recombination protein of B virus gB protein and express on the cell membrane.

【Key words】 B virus; gB protein; Synthesis; Eukaryotic expressing

猕猴 B 病毒又称为猴疱疹病毒 I 型 (cercopithecine herpesvirus I), 是目前发现的唯一可以感染人的动物源性疱疹病毒。感染猕猴 B 病毒的猴终生携带病原, 并不定期的向外排毒传染性

[基金项目] 国家科技支撑计划(2011BAI15B03); 十二五重大传染病专项(2011ZX09201-031)。

[作者简介] 刘慧芳(1989-), 女, 硕士, 研究方向: 中兽医学, E-mail: 374278946@qq.com。

[通讯作者] 孙兆增(1977-), 男, 副研究员, 研究方向: 实验动物分子微生物学。王新(1973-), 男, 副教授, 研究方向: 中兽医学。

较强。当病毒侵入人神经系统,治疗基本失去意义^[1-4]。检测 B 病毒的传统方法是病毒的分离培养及血清学实验。由于 B 病毒操作的危险性、分离培养耗时较长、实验条件要求较高,因此仅仅局限在少数实验室进行。以 B 病毒作检测抗原,由于它与人的单纯疱疹病毒 I 型(HSV-1)和人的单纯疱疹病毒 II 型(HSV-2)病毒具有较强的抗原交叉性,而难以保证检测的准确性^[5]。找到 B 病毒特异性抗原是对 B 病毒准确诊断的关键所在。

一般用猴子和人血清中的 IgG 来作为 B 病毒的诊断蛋白,在评估诊断效果时,对囊膜蛋白 gB, gC, gD, gE, 进行比较发现 gB 囊膜蛋白的灵敏性和特异性都达到 100%^[6]。故本实验对 gB 囊膜蛋白基因序列进行了合成。B 病毒囊膜蛋白 gB 包括信号肽、胞外区、跨膜区、胞内区 4 个部分。猕猴 B 病毒囊膜蛋白蛋白的胞外区部分比胞内区和跨膜区有更好的免疫原性和反应原性,是刺激机体产生抗体的有效抗原成分^[7],故本实验采用基因合成的方法合成胞外区部分基因序列,以便获得重组抗原。为了新生蛋白在位于 N 端的信号肽的指引下到达细胞膜表面表达^[8],在 gB 蛋白的胞外区部分序列前加入 MHC 分子的 *Mamu-B*007:03* 基因序列。在合成的序列中也加入了 Myc 标签的基因序列,以便于检测 gB 蛋白的胞外区表达情况。

1 材料和方法

1.1 材料

猕猴 B 病毒合成基因(军事医学科学院实验动物中心提供),DH5 α 感受态细胞、质粒回收试剂盒、胶回收试剂盒、DNA Marker 2000、DNA Marker 10000、2xTaqmix 购自北京博迈德生物公司。T4 连接酶、限制性内切酶 *Bam*H I 和 *Not* I 等,购自 NEB 公司。转染试剂 Lipofectamine 2000 购自 Invitrogen 公司。细胞培养试剂购自 Hyclone 公司。Myc 标签一抗购自 AB-mart 公司。辣根过氧化物酶标记的山羊抗小鼠 IgG,购自中杉金桥公司。

1.2 方法

1.2.1 gB 基因合成

从 GenBank 上获得 B 病毒的 gB 蛋白胞外区序列,在序列前加入 MHC 分子的一段序列,使 gB 蛋白序列在细胞膜表面表达,然后加入信号肽序列引导该序列的表达。在序列两端加入 *Bam*HI 和 *Not*I 酶切位点。合成序列总长度为 1762 bp,命名为 gB_合。然后

根据 gB_合 基因的碱基序列,设计猕猴 gB_合 基因的鉴定引物,上游引物 5' - ggccctcgttcgcttctctc-3',下游引物 5' - cagcttgccgggctcgttccacag-3',扩增片段为 494 bp,以上均由北京博迈德生物有限公司合成。由于绿色荧光蛋白可能会对新构建的融合蛋白有影响,因此首先利用基因工程的方法将载体中的绿色荧光蛋白基因去掉。

1.2.2 pEGFP-N3-gB_合 重组质粒的构建

将合成的 gB 基因提取质粒,用 *Bam*H I 和 *Not* I 进行双酶切,对于 pEGFP-N3 质粒进行相同的酶切,然后用 T4 连接酶进行连接,连接产物转化于 DH5 α 感受态细胞,用 PCR 的方法选出阳性克隆,对于 PCR 阳性的质粒,利用酶切的方法进一步鉴定。

1.2.3 细胞培养和重组质粒的转染

用含有 10% 胎牛血清的 DMEM 于 37℃ 5% CO₂ 培养箱培养 293 细胞,传代于 6 孔板。当 6 孔板的密度在对数期且密度在 70%,用 Lipofectamine 2000 转染重组质粒。转染后的细胞于 37℃ 5% CO₂ 培养箱培养 24 ~ 48 h,收集细胞做以下实验。

1.2.4 Western blot 免疫印迹实验

根据普利莱基因公司的细胞核-胞浆-胞膜制备试剂盒提取蛋白。取 50 μ L 总蛋白进行 10% SDS-PAGE 蛋白电泳,然后转移到 PVDF 膜上进行 Western-blot 检测。对 PVDF 膜用 5% 脱脂奶粉封闭 2 h,加入 Myc 一抗 4℃ 摇床孵育 12 h,清洗后加入山羊抗鼠的二抗,室温孵育 2 h,用 TBST 缓冲液清洗 3 次后加入发光剂显色于暗室进行 X-光片曝光、显影。

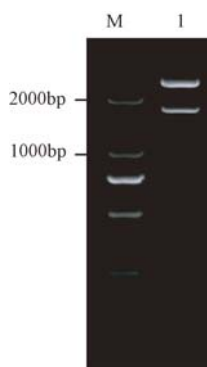
1.2.5 细胞表达定位实验

连续培养 24 h 后,利用 4% 多聚甲醛固定 15 min 对细胞进行固定,0.3% Triton X-100 透化处理。加入 10% 的 BSA 封闭后再孵育 myc 标签一抗, FITC (fluorescein isothiocyanate isomer I, 异硫氰酸荧光素) 荧光二抗。接着用浓度为 1 μ g/mL 的 Rase (1 mL/孔) 消化 RNA 然后加入 PI, 600 μ L 染色 10 min。然后加入抗荧光猝灭封固液,固定封片,最后利用共聚焦显微镜,观察、拍照。

2 结果

2.1 基因合成结果分析

利用 *Bam*H I 和 *Not* I 对 gB_合 基因进行酶切鉴定,得到目的片段(图 1)。基因片段大小在 1000 bp ~ 2000 bp 之间,与预期结果 1762 bp 基本相符。



注: M: 2000 DNA marker; 1: 重组质粒 PMD18-T-gB_合的 *BamH I* 和 *Not I* 双酶切结果。

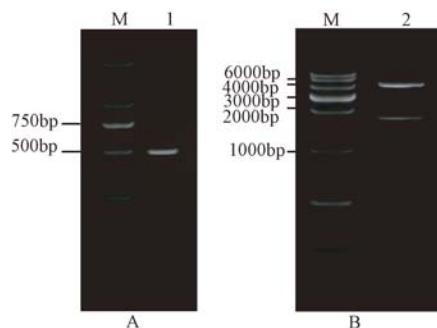
图 1 重组质粒 PMD18-T-gB_合 双酶切鉴定

Note: M: 2000 DNA marker; 1: the product of recombinant plasmid PMD18-T-gB_合 digestion with *BamH I* and *Not I*.

Fig. 1 Enzyme digestion analyses of the recombinant plasmid PMD18-T-gB_合

2.2 pEGFP-N3-gB_合 重组质粒的构建结果分析

将 gB_合 从基因合成的质粒上切下, 利用 T4 连接酶将片段定向连接到 pEGFP-N3 载体。将连接后产物转化到 DH5 α 感受态细胞, 用 PCR 的方法选出阳性克隆, 对于 PCR 阳性的质粒, 利用酶切的方法进一步鉴定(图 2)。



注: A(PCR) M: DNA 分子量标准; 1 重组质粒 pEGFP-N3-gB_合 的 PCR 鉴定结果;

B(酶切) M: DNA 分子量标准; 2 重组质粒 pEGFP-N3-gB_合 的 *BamH I* 和 *Not I* 双酶切结果。

图 2 重组质粒 pEGFP-N3-gB_合 PCR、双酶切鉴定

Note: A(PCR) M: DNA molecular standard;

1: the PCR product of recombinant plasmid pEGFP-N3-gB_合;

B(digestion) M DNA molecular standard;

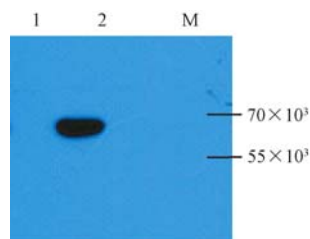
2: the product of enzyme digestion with *BamH I* and *Not I*.

Fig. 2 Enzyme digestion analyses of the recombinant plasmid pEGFP-N3-gB_合

2.3 pEGFP-N3-gB_合 的 Western-Blot 鉴定

利用 Western-Blot 对 pEGFP-N3-gB_合 的表达情况进行鉴定。蛋白分子量大小预测为 65.2×10^3 ,

Western-Blot 结果显示目的蛋白分子量大小接近 70×10^3 (图 3), 与预期结果 65.2×10^3 基本相符。



注: 1. 质粒 pEGFP-N3 对照; 2. 重组质粒 pEGFP-N3-gB_合 的蛋白表达, M, 低分子量蛋白质标准。

图 3 重组质粒 pEGFP-N3-gB_合 的 western-blot 分析

Note: 1. pEGFP-N3 plasmid control; 2. protein express of recombinant pEGFP-N3-gB_合 plasmid.

Fig. 3 Western-blot analysis of the recombinant plasmid pEGFP-N3-gB_合

2.4 pEGFP-N3-gB_合 在细胞内的定位表达

对含有 Myc 标签的 pEGFP-N3-gB_合 重组质粒转染到 293 细胞, 在激光共聚焦显微镜下观察发现 myc 标记的蛋白发出明亮的绿色荧光, 细胞核为红色球形(图 4, 彩插 2)。进一步观察重组蛋白在细胞内的定位情况进行研究发现, 重组蛋白在细胞膜上表达, 这与预期加入 MHC 分子引导序列在细胞膜上的表达相一致。

3 讨论

随着对猕猴 B 病毒结构的研究不断深入, 特别是猕猴 B 病毒的全基因组测序的完成, 囊膜糖蛋白(glycoprotein)逐渐成为猕猴 B 病毒诊断和防治研究的主要靶点。国内已利用基因工程技术产生猕猴 B 病毒囊膜重组蛋白, 隋丽华等^[9]利用原核表达系统产生 gB 蛋白特异性表位重组抗原, 严翔等^[10]用杆状病毒作为表达载体构建了 gB 合成基因的杆状病毒质粒。段博芳等^[11]用猕猴 B 病毒 gB 基因在昆虫细胞中表达, 以上证实重组蛋白具有较好的抗原性。

为了进一步观察 gB 重组蛋白的在细胞内的表达情况, 本实验合成 gB 胞外区基因, 构建了 pEGFP-N3-gB_合 重组质粒, 在真核细胞中进行表达并观察在细胞内的定位情况。结果显示, pEGFP-N3-gB_合 重组质粒在细胞内高效表达, 利用亚细胞定位技术证明了 gB 蛋白的胞外区基因序列能在细胞膜表面高效表达重组蛋白, 为获得猕猴 B 病毒灵敏性和特异性较好的重组蛋白提供好的方法, 为下一步检测试

剂盒的制备奠定的基础。

参考文献:

- [1] 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
- [2] Weigler B J. Biology of virus in macaque and human hosts a review [J]. Clin Infect Dis, 1992,14: 555-567.
- [3] 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.
- [4] 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.
- [5] 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.
- [6] Pereyagina L, Patrusheva I, Hombaiah S, *et al.* Production of herpes B virus recombinant glycoproteins and evaluation of their diagnostic potential[J]. Journal of clinical microbiology, 2005, 43(2): 620-628.
- [7] 张小飞,叶华虎,赵彦斌,等. 猴 B 病毒囊膜蛋白 gB 特异性抗原表位的筛选与表达鉴定[J]. 中国比较医学杂志, 2010(10): 10-14.
- [8] 彭佳师,龚继明. 信号肽与蛋白质的分选转运[J]. 植物生理学报,2011,47(1):9-17.
- [9] 隋丽华,刘一,赵彦斌,等. 猕猴 B 病毒 gB 蛋白特异性抗原表位的合成和表达[J]. 中国比较医学杂志,2013(3):4-7.
- [10] 严翔,曹玉华,刘慧芳,等. 猕猴 B 病毒 gB 和 gC 合成基因重组杆状病毒质粒的构建[J]. 实验动物科学,2013, 30(6).
- [11] 段博芳,王琼,锻纲,等. 猴 B 病毒 gB 基因在昆虫细胞中的表达[J]. 中国人兽共患病学报,2012,28(7):674-678.

[修回日期]2014-10-22