



猕猴 B 病毒囊膜蛋白 gD 基因真核细胞 表达载体的构建及表达

王新¹, 易思萌^{1,2}, 刘慧芳^{1,2}, 马凯¹, 范君文², 马雨楠², 游颖², 孙兆增²

(1. 青岛农业大学, 青岛 266109; 2. 军事医学科学院实验动物中心, 北京 100071)

【摘要】 目的 构建猕猴 B 病毒囊膜蛋白 gD 的真核表达载体, 并且检测其在 293T 细胞内的表达情况。方法 首先通过基因合成手段获得含 B 病毒 gD 蛋白的基因片段, 在经由 *Pst* I 和 *Not* I 双酶切后连接到 pEGFP-N3 载体, 随后将构建的 pEGFP-N3-GD 重组质粒转染到人胚胎肾上皮细胞系 293T 细胞。再用 Western blot 检测所提蛋白其在细胞内的表达情况, 并用激光共聚焦分析其在细胞内的表达定位情况。结果 成功获得携带 gD 基因的阳性重组质粒 pEGFP-N3-GD, 且 pEGFP-N3-GD 重组质粒能在 293T 细胞的表面正常表达。结论 利用真核表达系统, 既能够在细胞表面产生 B 病毒 gD 蛋白的特异性重组抗原, 而且可用于 B 检测抗原的制备。

【关键词】 猕猴 B 病毒; gD 蛋白; 载体构建; 真核表达

【中图分类号】 R-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856(2015) 06-0028-04

doi: 10.3969/j.issn.1671.7856.2015.006.006

Construction of eukaryotic vector of monkey B virus glycoprotein D gene and the gD gene expression

WANG Xin¹, YI Si-meng^{1,2}, LIU Hui-fang^{1,2}, MA Kai², FAN Jun-wen², MA Yu-nan²,
YOU Ying², SUN Zhao-zeng²

(1. Qingdao Agriculture University, Qingdao 266109, China;

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

【Abstract】 Objective To establish an eukaryotic vector of monkey B virus glycoprotein D gene and analyze the expression of gD gene in human embryonic kidney 293T cells. **Method** First, the protein of monkey B virus glycoprotein D was obtained by gene synthesis. The gene fragments were digested with *Pst* I and *Not* I, and ligated to pEGPF-N3. Then, the recombinant plasmid pEGPF-N3-GD was transfected into 293T cells. The expression of gD protein in the cells was detected by Western blot, and the expression localization was investigated using laser scanning confocal microscopy.

Results The recombinant plasmid pEGPF-N3 carrying gD gene was successfully constructed, and normally expressed in the 293T cells. **Conclusions** Glycoprotein D of monkey B virus is expressed successfully in the 293T cells and the protein is located on the cell surface. It may be useful for the preparation of specific recombinant antigen to the glycoprotein D of monkey B virus on cell surface, and can be also used for preparation of antigen slide for detection of monkey B virus.

【Key words】 Monkey B virus; gD protein; Vector construction; Eukaryotic expressing

[基金项目] 国家自然科学基金项目(31272387); 十二五重大传染病专项(2011zx09201-031)。

[作者简介] 王新(1973-)男, 副教授, 研究方向: 中兽医学。

[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, E-mail: laxszz@aliyun.com。

猴 B 病毒,也叫猴疱疹病毒 I 型(cercopithecine herpesvirus I), α -疱疹病毒亚科,单纯疱疹病毒属。和它同一种属的还有会引起口腔溃疡的单纯疱疹病毒 1 型病毒(herpes simplex type 1, HSV-1)和人生殖器疱疹病毒 HSV-2^[1-3]。B 病毒主要自然宿主是猕猴等灵长类动物,感染率极高,它可使恒河猴引起一过性的疱疹样口炎,于 7~14 d 内自愈,但却能使人类等非自然宿主动物出现致死性的脑炎或上行性脑脊髓炎(死亡率超过 70%)^[1-3],正是由于其对人生命安全的高度威胁性,而被归于生物安全 4 级病原。在 B 病毒的快速检测方面,国内目前主要使用的检测抗原是 HSV-1 和 HSV-2,而国外主要使用的检测抗原是 SA8 和 HVP-2 等同源病毒^[3,4],虽然这些病毒抗原具有较高的安全性,但同样较高的抗原交叉性致使 B 病毒的检测误差可达 3%~10%。同样在 B 病毒的有效防治方面,受制于检测抗原的影响,对其防治办法的深入研究与防治效果的追踪反馈也相应的遇到了瓶颈。因此,找寻安全高效的特异性抗原对于研究猕猴 B 病毒的有效防治与快速诊断十分重要。

蛋白 gB、gC、gD 和 gG 等,均属于 B 病毒不同类型的囊膜蛋白,不同类型的囊膜蛋白在 B 病毒的复制传播中所起到的作用也各有不同。囊膜 gD 蛋白,它主要负责参与猕猴 B 病毒的吸附、膜融合和入侵;同时又与病毒的传播以及逃避机体免疫监视有着密切的关系。这些糖蛋白是猕猴 B 病毒检测的主要候选抗原,其中囊膜蛋白 gB,其敏感性最高(99%),但特异性最低。gG 重组蛋白的检测特异性最好(97.5%),但敏感性只有 80%^[5];而重组蛋白 gD 的检测敏感性较 gG 要高,且特异性较 gB 要好,因此,gD 重组蛋白是猕猴 B 病毒诊断的有效抗原。

本实验构建的重组真核细胞表达载体 pEGFP-N3-gD(含 gD 基因片段),并将其转染 293T 细胞,确认 gD 重组蛋白可在 293T 细胞的表达,为进一步研究 gD 蛋白对猕猴 B 病毒生物学功能的影响,以及将重组蛋白 gD 作为猕猴 B 病毒快速诊断用特异性抗原的研究提供相应的支持。

1 材料和方法

1.1 材料

猕猴 B 病毒 gD 胞外区基因序列由博迈德合成,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、2 \times Taqmix 购自北京博迈德生物公司。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 Abmart 公司。T4 连接酶、限制性内切酶 *Pst* I 和 *Not* I 等,来自 Takara 公司。山羊抗小鼠 IgG(辣根过氧化物酶标记),采购自中杉金桥公司。

1.2 方法

1.2.1 gD 基因合成:gD 为糖蛋白的一种,具有明显糖蛋白的特质,基因序列由胞外区、胞内区和跨膜区组成。根据其基因序列,合成基因片段,长度约为 1 304 bp,主要包括 gD 蛋白的胞外区域。并在基因的 5 端引入了 MHC I 类分子的信号肽序列和 *Pst* I 酶切位点,在基因 3 端引入 myc 标签序列和 *Not* I 酶切位点。设计完成后,由北京博迈德生物有限公司负责合成。

1.2.2 pEGFP-N3-gD 重组质粒的构建:用 *Pst* I 和 *Not* I 将之前测序筛选过的 gD 基因片段进行双酶切,所产生的基因回收产物利用与 T4 连接酶 pEGFP-N3 质粒相连接。将重组质粒转化到 DH5 α 感受态细胞,利用卡那抗性的平板进行选择培养,并进一步使用 PCR 的方法筛选出阳性克隆,最终选出的 PCR 阳性质粒再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:在 DMEM 培养基中(内含 10% 的胎牛血清)培养的 293T 细胞,并传代至 6 孔培养板。在培养箱(37 $^{\circ}$ C、5% CO₂)中培养到 70%~80% 时(在 6 孔板中),再用 Lipofectamine 2000 转染重组质粒。然后将这些细胞置于培养箱中培养 1 d 或 2 d 后,收集这些细胞进行接下来的实验。

1.2.4 Western blot 免疫印迹实验:用细胞核—胞浆—胞膜制备试剂盒来提取蛋白,吸取 40 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。用脱脂奶粉(浓度为 5%)来封闭 PVDF 膜,在两个小时以后加入 Myc 一抗(1:5 000);置于 4 $^{\circ}$ C 摇床上,孵育 12 h,充分洗涤后,再加入山羊抗鼠的二抗(1:8 000),在室温下培养 1 h,TBST 缓冲液洗涤 3 次,然后加入发光显色剂,再置于暗室用 X 光进行曝光、显影。利用 β -actin 蛋白作为对照。

1.2.5 细胞表达定位实验:转染后的 293T 细胞在继续培养 36 h 后,使用 4% 多聚甲醛进行固定,对细

胞的固定一般需要 15 min, 之后再用 0.3% Triton X-100 透化处理。以上处理完成后, 加入 10% BSA 封闭, 再用 myc 标签的一抗和 FITC 荧光的二抗孵育之后, 接着用浓度为 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的 RNase (1 ml/孔) 消化 RNA, 最后加入 PI, 600 μL 左右染色 10 min。再用适量的抗荧光猝灭封固液, 封片固定。之后利用德国蔡司公司生产的 Zeiss Ism 510 Meta 荧光共聚焦成像显微镜进行观察、拍照。

2 结果

2.1 基因合成结果分析

利用 PCR 法鉴定已合成 gD 基因, 试验结束后所得的结果显示, 目的片段的大小与预期结果相符, 目的片段大小为 1 000 ~ 2 000 bp 之间 (图 1), 而预期结果大小为 1 400 bp 左右。并且在测序后, 根据所得结果可知, 这段经 PCR 鉴定的 gD 基因与恒河猴 gD 基因的同源性可达 100%。

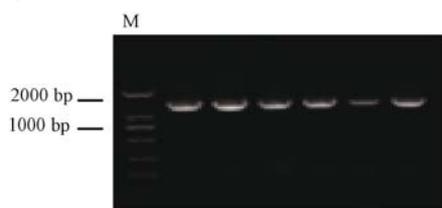


图 1 gD 基因片段的 PCR 扩增结果

Note. M: Marker 2000;

Fig. 1 PCR amplification results of gD protein

2.2 pEGFP-N3-gD 重组质粒的构建结果分析

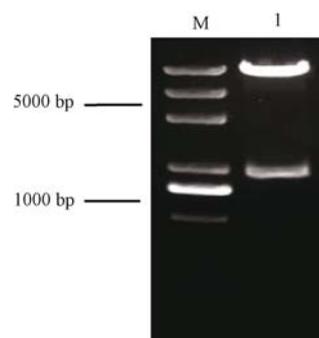
利用 T4 连接酶, 将已经合成的 gD 基因定向的连接到 pEGFP-N3 载体。利用 PCR 方法筛选阳性重组质粒。并利用双酶切法的方法进行鉴定。结果如图 2, 表明经双酶切后的阳性重组质粒 pEGFP-N3-gD, 分别在 5 000 bp 左右和 1 000 bp 左右切成两个片段, 由此可知 gD 成功克隆到 pEGFP-N3 载体上。

2.3 pEGFP-N3-gD 的 Western-Blot 鉴定

利用 Western-Blot 对 pEGFP-N3-gD 的表达情况进行鉴定。试验初预测 pEGFP-N3-gD 分子量为 45 kDa, 而由图 3 显示的实验结果分子量在 50 kDa 左右。说明 gD 重组蛋白可以在 293T 细胞内进行准确翻译, 并可能进行了一定的翻译后加工修饰。

2.4 pEGFP-N3-gD 在细胞内的定位表达

利用激光共聚焦显微镜观察 gD 基因在 293T 细胞的表达情况, 观察它们转染后的形态, 结果发现, (其重组蛋白) 能发出绿色荧光 (在经过 FITC 标

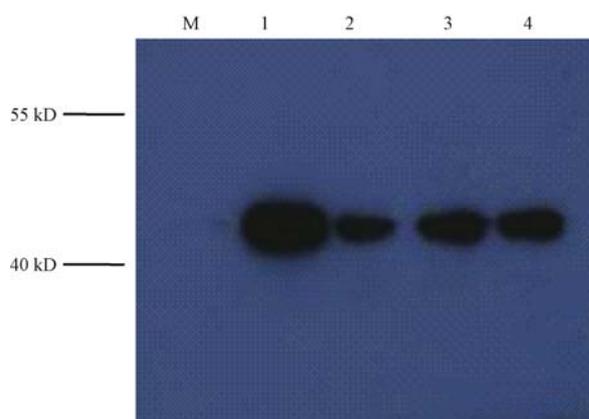


注: M: DNA 分子量标准; 1: 重组质粒 pEGFP-N3-GD 的 *Pst* I 和 *Not* I 双酶切结果

图 2 双酶切鉴定重组质粒 pEGFP-N3-GD

Note. M: DNA molecular standard; 1: The products of enzyme digestion with *Pst* I and *Not* I

Fig. 2 Enzyme digestion analysis of the recombinant plasmid pEGFP-N3-GD



注: M: 低水平蛋白; 1-4: pEGFP-N3-gD 基因的表达鉴定结果。

图 3 gD 基因表达的 western-blot 鉴定

Note. M: Low molecular weight protein marker; 1-4: Identification of the gD expression.

Fig. 3 Identification of the expression of gD protein by Western-blotting

记抗体染色), 但是, 由 PI 染色过的细胞核发出的荧光却为红色。由图 4 (见文后彩插 2) 可知, pEGFP-N3-gD 重组蛋白主要在细胞膜上进行表达, 可能是 MHC I 类分子 (附加在 gD 蛋白前端) 的信号肽引导 gD 蛋白在细胞膜上表达。

3 讨论

近年来, 关于猕猴 B 病毒 gD 囊膜蛋白在 B 病毒的诊断和防治方面的不断深入研究发现, gD 囊膜蛋白可以作为诱导机体产生免疫应答的主要靶点之一, 国外的研究者曾经以 B 病毒 gD 蛋白基因为基础设计 DNA 疫苗; 进一步的实验证实能诱导猴产

生免疫应答,并对 B 病毒有一定的中和保护作用^[6]。另外一个课题组的研究结果表明,将 gD 基因插入到痘苗病毒载体制成核酸疫苗,91% (10/11) 被免疫的兔子可抵抗病毒的攻击^[7]。国内学者肖镜等探索了利用 gB、gC 和 gD 重组蛋白以及 gD 的肽合成片段进行 B 病毒的检测^[8];张文韬等^[9]则对关于 B 病毒囊膜糖蛋白 gD 基因的克隆及原核表达进行了研究。

真核表达蛋白可进行翻译后加工,例如糖基化修饰等,并可正确折叠。利用真核系统产生的抗原,能够最大程度的模拟病毒蛋白,用于检测时的特异性和灵敏性更高。但真核表达系统的表达量低,获得重组抗原的数量较少。本实验利用真核表达系统成功表达了 gD 蛋白,并利用信号肽设法让蛋白在细胞的表面表达。蛋白在细胞的表面表达,拟不用纯化抗原,直接用细胞制备抗原片,用于病毒血清的检测。在下一步的实验中,会获得 gD 蛋白的稳定表达细胞株,直接用于病毒检测抗原片的制备,为新型猕猴 B 病毒检测方法的建立提供新的方法。

参考文献:

[1] 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.

- [2] Weigler BJ. Biology of B virus in macaque and human hosts: a review [J]. Clin Infect Dis, 1992, 14(2): 555 - 567.
- [3] Whitley RJ, Roizman. B Herpes simplex virus infections [J]. Lancet, 2001, 357(9267): 1513 - 1518.
- [4] Fujima A, Ochiai Y, Saito A, et al. Discrimination of antibody to herpes B virus from antibody to herpes simplex virus types 1 and 2 in human and macaque sera [J]. J Clin Microbiol, 2008, 46(1): 56 - 61.
- [5] Pereylygina L, Patrusheva I, Hombaiah S, et al. Production of herpes B virus recombinant glycoproteins and evaluation of their diagnostic potential. J Clin Microbiol, 2005, 43(2): 620 - 628.
- [6] Hirano M, Nakamura S, Mitsunaga F, et al. Efficacy of a B virus gD DNA vaccine for induction of humoral and cellular immune responses in Japanese macaques [J]. Vaccine, 2002, 20(19 - 20): 2523 - 2532.
- [7] Bennett AM, SlomkaMJ, Brown DWG, et al. Protection against herpes B virus infection in rabbits with a recombinant vaccinia virus expressing glycoprotein D [J]. J Medical Virol, 1999, 57: 47 - 56.
- [8] 肖镜,付瑞,贺争鸣,等. 猴 B 病毒 BVgD-多肽 ELISA 检测方法的建立 [J]. 实验动物科学, 2008, 25(2): 20 - 23.
- [9] 张文韬,董罡,袁菊芳,等. 猴 B 病毒囊膜糖蛋白 gD 的克隆表达及其诊断价值评价 [J]. 中国人兽共患病学报, 2012, 28(4): 363 - 366

[修回日期]2015-05-07