

人偏肺病毒 N 蛋白的原核表达及抗原活性的初步研究

刘爱玲¹, 陆学东², 王 琼², 贾 雪³ (1. 广东省深圳市宝安区龙华人民医院检验科 518109; 2. 广东医学院附属深圳福田人民医院检验医学部 518033; 3. 北京协和医院中心实验室 100032)

【摘要】 目的 构建人偏肺病毒(hMPV)N 蛋白(hMPV-N 蛋白)的原核表达载体, 研究其表达效果, 为临床抗体检测及预防提供基础资料。**方法** 根据 hMPV-N 基因的全序列设计引物, 扩增目的基因片段, 连接质粒载体 RSET-A, 转化大肠埃希菌 BL21, IPTG 诱导以 his 为标签的目的蛋白表达, 并用人血清进行检测。**结果** 重组质粒转化诱导后, 出现了与预期分子量相符的蛋白条带; 采用 Western blot 方法, 检测了 102 份呼吸道感染住院患儿血清标本中的抗 hMPV-N 蛋白 IgG 抗体, 阳性率为 53.9%。**结论** 成功获得了 hMPV-N 蛋白的表达, 为临床血清学检测奠定基础。

【关键词】 人偏肺病毒; N 蛋白; 原核表达; 免疫印迹

DOI:10.3969/j.issn.1672-9455.2013.08.016 文献标志码:A 文章编号:1672-9455(2013)08-0946-03

Analysis on prokaryotic expression and antigenicity of hMPV N protein LIU Ai-ling¹, LU Xue-dong², WANG Qiong², JIA Xue³ (1. Department of Clinical Laboratory, Longhua People's Hospital, Shenzhen, Guangdong 518109, China; 2. Department of Laboratory Medicine, Shenzhen Futian People's Hospital, Guangdong Medical College, Shenzhen, Guangdong 518033, China; 3. Central Laboratory of Peking Union Medical College Hospital, Beijing 100032, China)

【Abstract】 Objective To construct a prokaryotic expression plasmid containing hMPV N gene and analyze the effects, in order to provide basic information for detecting antibody and prevention in clinic. **Methods** The full length of N gene was amplified by RT-PCR and inserted into expression vector RSET-A. The recombinant expression plasmids were transferred into E. coli BL21, and induced with IPTG. **Results** The expected protein band was found by SDS-PAGE and Western-blot. The positive rate of 102 serum samples was 53.9%. **Conclusion** The hMPV N protein was expressed successfully, which will be helpful for serological testing.

【Key words】 hMPV; N protein; prokaryotic expression; Western-blot

人偏肺病毒(hMPV)是 2001 年荷兰学者 van den Hoogen 等^[1]在长达 20 年的研究中从呼吸道感染儿童鼻咽分泌物标本中分离鉴定出的一种新的呼吸道病原, 基因组序列分析和基因结构分析将该病毒归于副黏病毒科肺病毒亚科偏肺病毒属。其基因组 RNA 长约 13 000 个核苷酸(nt), 主要含有 8 个基因, 编码 9 个蛋白, 顺序为 3'-N-P-M-F-M2-S-H-G-L-5'。G 蛋白变异最大, 但它参与病毒与宿主细胞之间的吸附作用, 是主要的中和抗原, 可诱导保护性的特异性中和抗体^[2]。N 蛋白也可诱导机体细胞免疫应答, 发挥病毒清除作用。因此, 对 hMPV 这两种蛋白质表达的研究有助于深入了解其致病机制和进一步血清学诊断。

1 材料与方法

1.1 标本采集 收集 2009 年 1 月至 2010 年 10 月深圳市福田人民医院及汕头大学医学院第二附属医院儿科呼吸道感染住院患儿鼻咽抽吸物 1 137 例。患儿入院后 2 h 用一次性吸痰管吸取鼻咽抽吸物(NPA)2~3 mL 于病毒保护液中(100 U/mL 青霉素, 100 U/mL 链霉素, 2 000 U/mL 两性霉素 B), 置-80℃冰箱冻存储用。解冻后置螺旋振荡器振荡混匀, 13 400 r/min 离心 20 min, 取沉淀 200 μL 提取病毒核酸。另外, 采集患儿血清标本 102 份, 健康儿童血清标本 53 份。采样均获患儿家属签字同意。

1.2 试剂 Axygen 体液病毒 DNA/RNA 小量提取试剂盒; AxyPrep DNA 凝回收试剂盒(美国 Axygen 公司); One-step 逆转录-聚合酶链反应(RT-PCR)试剂盒(QIAGEN); 高保真

PCR 酶复合物; T4 DNA 连接酶(Fermentas 公司); TOP10、大肠埃希菌 BL21(DE3) (天根生物技术有限公司); RSETA 载体(厦门大学惠赠); 限制性核酸内切酶 BamH I 和 EcoR I (美国 Promega 公司); 抗 His 标签单抗(北京 Sinopcr 有限公司); 抗鼠 IgG-HRP (美国 Sigma 公司); 显色试剂盒(北京宜安泰医疗技术公司)。

1.3 引物设计 参考 GenBank 中 hMPV 基因序列及蛋白编码序列, 用 Primer5.0 引物设计软件辅助设计扩增编码基因全长的引物, 引物 5'端引入酶切位点, 分别以编码的蛋白命名 N。引物由上海生物工程公司合成。引物序列如下, NF: 5'-GCG GGA TCC GCG ATG TCT CTT CAA GGG ATT C-3', NR: 5'-CCG GAA TTC CGG CAG GGA ATG CAA TTT TGA CTT GT-3' 1 231 bp。

1.4 hMPV 核酸的提取 用 Axygen 体液病毒 DNA/RNA 小量提取试剂盒提取病毒核酸, 严格按照说明书操作, 核酸洗脱液在 65℃预热, 提高洗脱效率。

1.5 N 全基因片段扩增及纯化 选取筛查并确定为阳性的 hMPV 作为扩增模板, 反应体系按照试剂盒说明书配置, 反应条件: 50℃ 30 min; 95℃ 15 min; 94℃ 45 s, 55℃ 45 s, 72℃ 1 min, 40 个循环; 72℃ 10 min。将上一步反应液稀释 100 倍, 取 1 μL 作为模板, 加入 10×含有镁离子的高保真 PCR 缓冲液 2.5 μL, 10 mmol/L dNTP mix 0.5 μL, Primer-F 0.3 μL, Primer-R 0.3 μL, 高保真 PCR 酶复合物 0.2 μL, 无核酸酶的纯水 20.2 μL(冰上操作), 总体积 25 μL。反应程序: 94℃ 3 min;

94 ℃ 1 min, 57 ℃ 1 min, 72 ℃ 90 s, 30 个循环, 72 ℃ 延伸 10 min。按照 AxyPrep DNA 凝胶回收试剂盒说明书回收纯化目的 DNA。

1.6 目的 DNA 和质粒 DNA 的双酶切及连接 分别用 BamH I 和 EcoR I 在 37 ℃ 下酶切 3 h, 纯化后在 T4 DNA 连接酶的作用下 16 ℃, 连接过夜。

1.7 重组质粒的转化与筛选 将连接产物加入 TOP10 感受态细胞, 同时用质粒 DNA 分别作阴阳对照, 以质粒 DNA 加入 TOP10 细胞为阳性对照, 以 TOP10 细胞作阴性对照。冰浴 30 min, 热激 90 s, 冰浴 2 min。加入 LB 培养液 (不含 Amp) 300 μL, 37 ℃ 振荡培养 1 h, 平铺于含 100 μg/mL Amp 的 LB 培养板, 37 ℃ 倒置培养 12 h。挑取单克隆菌落于 3 mL 含 100 μg/mL Amp 的 LB 培养液, 37 ℃ 翻转培养, 检测 A_{600 nm} ≈ 1, 收菌, 提取质粒, 分别用双酶切和 PCR 筛选阳性重组子, 并送测序鉴定。

1.8 重组蛋白的表达 将鉴定为阳性的重组质粒加入大肠埃希菌 BL21(DE3), 挑取单克隆于 37 ℃ 振荡培养 3 h 左右, 测定 A_{600 nm} ≈ 0.6, 取出一半菌液于灭菌试管中, 按 1 : 1 000 的比例向试管加入 1 mol/L IPTG, 余下的一半不加 IPTG, 作为诱导菌的对照, 收菌。

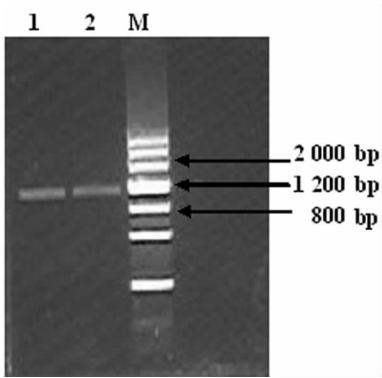
1.9 聚丙烯酰胺凝胶电泳检测 根据预期的蛋白分子量选择合适的分离胶与浓缩胶浓度, 进行 SDS-PAGE。

1.10 Western Blot 检测表达产物 诱导表达的菌体总蛋白经十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳, 转入 PVDF 膜, 3% 的脱脂奶封闭 2 h, 洗膜, 先后加入一抗、二抗, 最后显色 5 min。

1.11 人群中血清抗体的检测 分别检测小于 2 岁患儿血清标本 102 份及健康儿童血清 53 份, 后者样本来自汕头大学医学院第二附属医院儿保科。采用 Western blot 检测, 一抗用人血清, 二抗仍用羊抗鼠 IgG。

2 结 果

2.1 目的基因的扩增 N 蛋白基因的 PCR 扩增显示, 在预期大小的位置出现了明显的条带。见图 1。



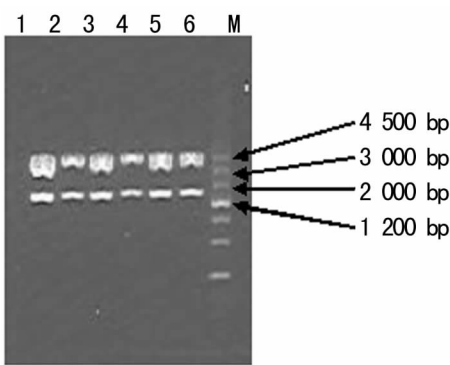
注: 1、2 为 N 蛋白基因扩增产物; M 为 DNA 相对分子质量标准; M 从下往上依次为 200、500、800、1 200、2 000、3 000、4 500 bp。

图 1 hMPV 目的基因扩增产物电泳图

2.2 重组质粒的酶切鉴定 目的基因与表达载体连接后, 用 BamH I 和 EcoR I 内切酶消化鉴定, 出现了目的基因与载体两条条带, 见图 2。

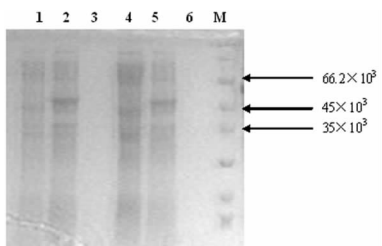
2.3 目的基因的诱导表达 筛选出的阳性重组质粒转入 BL21 感受态细胞, 挑去单克隆后经 SDS-PAGE, G、N 相对分子量大约为 23.6 × 10³、43 × 10³, 在相应处出现诱导条带, 同预

期结果一致, 见图 3。



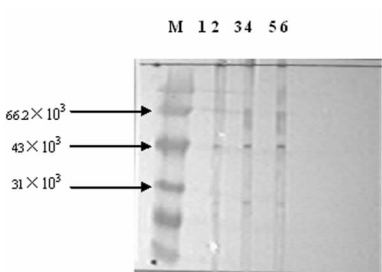
注: 1~6 为 N 基因重组质粒鉴定图; M 为 DNA 相对分子质量标准; M 从下往上依次为 200、500、800、1 200、2 000、3 000、4 500 bp。

图 2 重组质粒酶切电泳图



注: 2、5 是诱导株, 1、4 是未诱导株, 3、6 是空白对照, M 为 DNA 相对分子质量标准; M 从下往上依次是 14.4 × 10³、18.4 × 10³、25 × 10³、35 × 10³、45 × 10³、66.2 × 10³、116 × 10³。

图 3 蛋白表达产物电泳图



注: 2、4、6 是诱导蛋白 N, 1、3、5 是未诱导菌体蛋白, M 为 DNA 相对分子质量标准; 从下往上依次是 14.4 × 10³、20.1 × 10³、31 × 10³、43 × 10³、66.2 × 10³、97.4 × 10³。

图 4 Western blot 检测结果

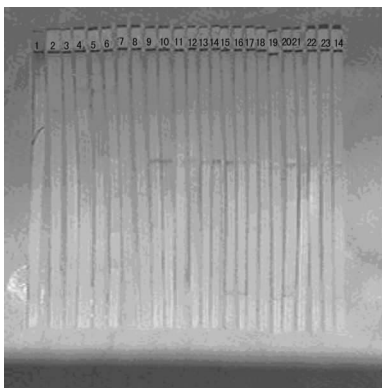


图 5 部分人群血清抗体检测结果

2.4 Western blot 检测 将重组菌体蛋白电转移至 PVDF 膜上, 依次加入鼠抗 His 标签单克隆抗体和羊抗鼠 IgG 二抗, 显

色后可看到与预期大小一致的条带,见图 4。

2.5 人群血清抗体检测 用原核表达的 hMPV-N 蛋白对小于 2 岁患儿血清标本及健康儿童血清 53 份进行 IgG 检测,结果见图 5;患儿血清阳性率为 53.9%(55/102),健康儿童的阳性率为 23.8%。

3 讨论

hMPV 生长缓慢,在宿主细胞复制十分困难,因此,要得到大量的目的蛋白,必须利用基因工程方法对目的蛋白进行表达。目前,大肠埃希菌的遗传背景及基因表达规律的研究较为清楚,并且有大量可供选择利用的克隆和高效表达的载体和宿主菌,因此大肠埃希菌表达系统是目前最常用的原核表达系统^[3]。外源基因在大肠埃希菌中的正确表达受多种因素的影响,载体的选择至关重要。本研究根据目的基因和候选载体的酶切位点及序列,将目的基因克隆入含有 T7 启动子带有 His 标签的融合表达载体 RSETA 中,并用 IPTG 诱导其表达。

基因变异对病毒在人群中的传播很重要,又给疫苗的研发带来了困难。hMPV 的 N 基因相对保守,而 G 蛋白基因变异较大,其结果是致核苷酸替换、插入和转录终止密码的改变^[4-6]。因此,作者选用 N 蛋白为靶基因,发现 N 蛋白的表达及 Western blot 检测比较稳定,为下一步实验改进打下基础。

文献报道儿童 5 岁时多数已经感染过 hMPV,大于 5 岁儿童的抗 hMPV IgG 抗体水平大于 90%。多数 hMPV 的感染发生在小于 5 岁的儿童,严重感染则发生在 2 岁以下儿童^[7-8]。利用本研究表达的 N 蛋白检测 2 岁以下儿童血清抗 hMPV IgG 抗体,结果显示阳性率为 53.9%,低于文献^[7-8]所测值,提示 2 岁以下儿童是易感人群,亦不排除抗体间交叉反应的存在。健康对照组为 23.8%,说明有部分感染者可能无临床症状或症状较轻。

综上所述,本研究利用原核表达系统成功获得了目的蛋白的表达,并初步应用于人群血清抗体检测,为今后的相关研究奠定了基础。

(上接第 945 页)

轻度增多,有可能误认为分化好的癌;部分乳腺增生症和导管内乳头状瘤伴上皮不典型增生的病例细胞具有一定的异形性,容易导致误诊。(3)诊断仅仅局限于细胞学表现,没有结合肿块大体特点、穿刺表现和临床病史。

3.3 FNAC 的诊断体会 (1)严格执行 FNAC“一体化”工作程序,针吸、制片、诊断均由专人独立完成^[8]。(2)详细询问病史,仔细触摸乳腺肿块及腋下,对高危患者要高度重视;观察乳房皮肤及乳头状况,认真触诊。(3)针吸时要注意体会针吸感觉,观察针吸物的性状,肿块大时可多方向穿刺,以获取不同部位足量的材料。(4)采集最佳针吸材料均匀涂片,避开坏死部位,血液或黏液多时应取灰白色颗粒状物涂片,弹击出针头内积存的抽吸材料尤其重要。(5)涂片厚薄应适当而均匀,减少人为的细胞变形,尽量要多涂片,以免遗漏掉有意义的细胞。(6)阅片要仔细观察和比较,严格掌握诊断标准,避免单纯依照上皮细胞分化进行诊断分级的片面性^[9]。(7)所有细胞学检查及时与组织活检对照、随访患者、与临床医生沟通,及时分析漏误诊原因,复阅细胞学涂片,总结经验,做好质量控制。

参考文献

[1] 任美英,王翠峰,徐军. 细针穿刺细胞学在乳腺肿块诊断中的应用[J]. 检验医学与临床,2011,08(7):849-850.

参考文献

[1] van den Hoogen BG,de Jong JC,Groen J,et al. A newly discovered human pneumovirus isolated from young children with respiratory tract disease[J]. Nat Med,2001,7(6):719-724.

[2] Gray GC,Capupano AW,Setterquist SF,et al. Human metapneumovirus,Peru[J]. Emerg Infect Dis,2006,12(2):347-350.

[3] Ito W,Kurosawa Y. Development of a prokaryotic expression vector that exploits dicistronic gene organization[J]. Gene,1992,118(1):87-91.

[4] van den Hoogen BG,Herfst S,Sprong L,et al. Antigenic and genetic variability of human metapneumoviruses[J]. Emerg Infect Dis,2004,10(4):658-666.

[5] Bastien N,Liu L,Ward D,et al. Genetic variability of the G glycoprotein gene of human metapneumovirus [J]. J Clin Microbiol,2004,42(8):3532-3537.

[6] Peret TC,Abed Y,Anderson LJ,et al. Sequence polymorphism of the predicted human metapneumovirus G glycoprotein[J]. J Gen Virol,2004,85(Pt 3):679-686.

[7] Esper F,Martinello RA,Boucher D,et al. A 1-year experience with human metapneumovirus in children aged <5 years[J]. J Infect Dis,2004,189(8):1388-1396.

[8] Aberle JH,Aberle SW,Redlberger-Fritz M,et al. Human metapneumovirus subgroup changes and seasonality during epidemics[J]. Pediatr Infect Dis J,2010,29(11):1016-1018.

(收稿日期:2012-11-18 修回日期:2012-12-28)

[2] 舒仪经,阚秀. 癌症早期诊断现代技术细针吸取细胞病理学[M]. 北京:人民卫生出版社,2000:146-220.

[3] 马正中,阚秀,刘树范,等. 诊断细胞病理学[M]. 郑州:河南科学技术出版社,2000:471.

[4] 王永才,钟寸获,王寰,等. 乳腺针吸细胞病理学对乳腺癌早期诊断研究应用[J]. 医学研究杂志,2007,36(2):85-87.

[5] 高志奇,刘锦程,付小伟,等. 乳腺实质性肿块针吸细胞学的诊断价值[J]. 现代肿瘤医学,2006,14(7):839-840.

[6] 孙新平,孙华,温鸿清. 细针吸取细胞学检查乳腺肿块 91 例临床分析[J]. 现代肿瘤医学,2006,14(4):415-416.

[7] Dutta SA,Chattopadhyaya A,Roy S. Evaluation of fine needle aspiration and imprint cytology in the early diagnosis of breast lesions with histopathological correlation [J]. J Indian Med Assoc,2001,99(8):421-423.

[8] 张春雨,闫云珍,赵鹏飞. 78 例乳腺肿块细针吸取细胞学检查分析[J]. 中国实验诊断学,2011,15(12):2101-2102.

[9] 余小蒙,王卫东,张长淮,等. 对乳腺肿物针吸细胞学诊断标准的探讨[J]. 中华病理学杂志,2002,31(1):26-28.

(收稿日期:2012-10-09 修回日期:2012-12-28)