

网络出版时间: 2016-1-20 10:32:25 网络出版地址: <http://www.cnki.net/kcms/detail/34.1065.R.20160120.1032.002.html>

◇基础医学研究◇

VZV 糖蛋白 E 基因胞外域的原核表达及其兔抗血清的制备

伊兴旭¹ 陈敬贤² 甘霖² 王明丽²

摘要 目的 采用原核表达系统表达水痘-带状疱疹病毒(VZV)糖蛋白 E(gE)基因的胞外域,将纯化后的目的蛋白免疫新西兰家兔,制备该蛋白特异性抗血清。方法 构建原核表达质粒 gE-pET-32a(+),测序后将其转化至 *E. coli* BL21,以异丙基硫代 β -D-半乳糖苷(IPTG)诱导,获得 VZV gE 融合蛋白。采用 SDS-PAGE 电泳、Western blot 法鉴定其特异性,利用 Ni^{2+} -NTA 柱对 gE 蛋白进行纯化,复性后免疫新西兰家兔,获得兔抗 VZV gE 血清;采用间接免疫荧光、Western blot 法和 ELISA 法检测该血清的特异性和效价。结果 成功诱导表达出 VZV gE 融合蛋白,SDS-PAGE 鉴定提示其主要为包涵体表达,浓度约为 3.01 mg/ml。蛋白经 Ni^{2+} -NTA 柱纯化后,纯度约为 90%。Western blot 法显示,经变性、复性后的该融合蛋白有良好的免疫反应性。用该蛋白免疫新西兰家兔后获得兔抗 VZV gE 血清。ELISA 分析显示,该兔抗血清的效价为 1:6 400。结论 成功构建了高效表达 VZV gE 蛋白的原核表达系统,获得较高纯度的 gE 蛋白,可以作为 VZV 亚单位疫苗的候选抗原,制备了特异性及效价均较高的兔抗 VZV gE 多克隆抗体,为 VZV 感染的临床诊断及治疗提供了重要的实验工具。

关键词 水痘-带状疱疹病毒;原核表达;融合蛋白;兔抗血清

中图分类号 R 373.1; R 392.7

文献标志码 A 文章编号 1000-1492(2016)02-0151-05

水痘-带状疱疹病毒(varicella-zoster virus, VZV)即人类疱疹病毒 3 型,属于疱疹病毒 α 亚科,为 DNA 病毒。病毒主要通过呼吸道分泌物和密切接触传播,可引发两种不同临床症状的疾病,水痘和带状疱疹^[1-2]。VZV 糖蛋白 E(glycoprotein E, gE)是一种晚期结构蛋白,由 ORF68 基因编码,含有 623 个氨基酸(amino acid, AA),其 N 端为 544 AA 的亲

水胞外区, C 端是 17 AA 的跨膜疏水区和 62AA 的胞内区^[3-4]。在 VZV 颗粒的表面和宿主细胞的细胞膜和胞质内均含有大量的 gE,其在病毒的不同成熟阶段以不同的含糖多肽形式存在,是体液免疫和细胞免疫应答的重要靶点^[5-7]。该实验获得较高纯度的 gE 蛋白,可以作为 VZV 亚单位疫苗的候选抗原,获得了特异性及效价均较高的兔抗 VZV gE 多克隆抗体,为 VZV 的临床诊断和治疗提供了重要的实验工具。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 试剂和菌株 参考抗体:鼠抗 VZV gE 单克隆抗体(美国 Abcam 公司);异硫氰酸荧光素(fluorescein isothiocyanate, FITC)和辣根过氧化物酶(horseradish peroxidase, HRP)标记的羊抗鼠 IgG 抗体(北京中杉金桥生物技术有限公司);弗氏完全佐剂和弗氏不完全佐剂(美国 Sigma 公司);Alexa Fluor 488 标记的山羊抗兔 IgG(H+L)抗体(美国 Invitrogen 公司);*E. coli* BL21-pET-32a(+)菌株由本教研室保存(菌种库)。

1.1.2 细胞、病毒和新西兰家兔 人胚胎成纤维细胞(human embryo fibroblast, HF)为本教研室制备;Vero 细胞购自美国 ATCC 机构;VZV 临床分离株为安徽医科大学第一附属医院皮肤科带状疱疹患者的皮肤水疱液中分离,经间接免疫荧光染色排除其他疱疹病毒,并经 DNA 测序鉴定。HCMV(AD169 株)、HSV-1(F 株)、HSV-2(Sav 株)均为本教研室保存(病毒库)。新西兰家兔购自安徽医科大学实验动物中心。

1.1.3 引物 参照文献^[8]设计引物,上游引物(含 Hind III 酶切位点):5'-AGGCAGAAGCTTCCATGGG-GACAGTTAATAAACCTGT-3';下游引物(含 Xho I 酶切位点):5'-AATAATCTCGAGGGCATATCG-TAGAAGTGGTGACC-3',由上海生工生物技术服务有限公司合成。

1.2 方法

2015-11-17 接收

基金项目:国家自然科学基金(编号:30872253);安徽省科技厅科技攻关项目(编号:08010302179);校企合作实践教育基地(编号:2012sjjd014)

作者单位:¹安徽医科大学附属巢湖医院检验科,合肥 238000

²安徽医科大学微生物学教研室,合肥 230032

作者简介:伊兴旭,男,硕士;

王明丽,女,教授,硕士生导师,责任作者, E-mail: 1952987441@qq.com

1.2.1 重组质粒的构建 以 VZV 临床分离株的 DNA 为模板, PCR 扩增 VZV gE 基因胞外域(1 617bp), 反应条件为 94 °C 预变性 5 min; 94 °C 变性 50 s; 60 °C 退火 45 s; 72 °C 延伸 2 min; 共 35 个循环, 最后 72 °C 延伸 10 min。将 PCR 产物与 pET-32a (+) 载体分别用 Hind III、Xho I 进行酶切, 凝胶回收 DNA 以后, 由 T4 DNA 连接酶连接 gE 基因片段与 pET-32a (+) 载体(5 900 bp), 并转化至 *E. coli* BL21 感受态细胞, 涂 AMP 抗性 LB 板。挑取单个菌落, 扩增培养后提取质粒, 经酶切和测序鉴定。

1.2.2 融合蛋白的表达及鉴定 挑取单个重组表达菌落先于 LB/AMP 培养基中少量培养, 然后扩增培养, 当光密度(optical density, OD) 值约为 1.0 时, 加入 0.1% 的异丙基硫代 β -D-半乳糖苷(isopropyl β -D-Thiogalactoside, IPTG), 32 °C 诱导表达 5 h 后, 收集菌体, 按常规方法超声裂解。分别收集上清液和菌体沉淀, 通过 SDS-PAGE 电泳分析菌体上清液和沉淀中 gE 蛋白的表达情况, 应用 Western blot 对目的蛋白的特异性进行鉴定(设置空菌对照和空载体对照)。

1.2.3 融合蛋白的复性及纯化 以尿素终浓度为 1 mol/L 的包涵体洗涤液(20 mmol/L Tris-HCl, 100 mmol/L NaCl, 5 mmol/L EDTA, 1% Triton), 4 °C 洗涤超声裂解的菌体沉淀 3 次, 1 h/次。12 000 r/min 离心 15 min, 收集包涵体于 I 液(8 mol/L 尿素, 0.5 mol/L NaCl, 20 mmol/L 咪唑, 20 mol/L PBS) 中, 4 °C 磁力搅拌下低速溶解。3 000 r/min 离心 15 min, 收集上清液, 经 0.45 μ m 滤膜滤过后进行柱上复性和纯化: ① 样品上经 5 个柱床体积 I 液平衡的 Ni²⁺-NTA 柱; ② 用 II 液(20 mmol/L 咪唑, 0.5 mol/L NaCl, 20 mol/L PBS) 按线性梯度稀释尿素浓度至零, 进行蛋白柱上复性; ③ 以 500 mmol/L 的咪唑缓冲液线性梯度洗脱目的蛋白; ④ SDS-PAGE 分析蛋白纯度, Lowry 法测定蛋白浓度。

1.2.4 VZV gE 兔抗血清的制备 取体重约为 3 kg 的雄性新西兰家兔, 免疫前 3 d 耳缘静脉取血作为阴性对照。初次免疫时, 每只家兔颈部和皮下多点注射 2 ml 弗氏完全佐剂乳化的纯化抗原(蛋白浓度为 1.0 mg/ml)。第 3 周以弗氏不完全佐剂乳化的纯化抗原进行免疫, 方法同前。以后每隔 1 周均以耳缘静脉注射抗原纯品 1.0 mg, 此法免疫 3 次。免疫 5 次后, 耳缘静脉采血少许, 采用 ELISA 法分析其多克隆抗体效价。继后按常规方法心脏取血, 分离血清, 加入 50% 甘油分装, -80 °C 保存备用。

1.2.5 VZV gE 抗原制备的多克隆抗体效价测定 采用棋盘滴定确定的 gE 抗原的最佳包被浓度 1.0 μ g/ml 包被 ELISA 板, 以系列稀释的兔抗血清(1:200, 1:400, 1:800, 1:1 600, 1:3 200, 1:6 400, 1:12 800, 1:51 200) 作为一抗, 设置 3 个复孔, 阴性对照组(免疫前兔血清)和空白对照组。ELISA 法测定各组的 OD 值, 计算其 OD 的平均值(\bar{x}) 和标准差(s), OD 值 $< \bar{x} + 3s$ 判断为阴性; OD 值 $> \bar{x} + 3s$ 判断为阳性。

1.2.6 间接免疫荧光和 Western blot 法鉴定多克隆抗体的特异性 分别取 VZV 临床分离株、HCMV AD169 株感染实验室培养的单层 HF 细胞, 取 HSV-1(F 株)、HSV-2(Sav 株) 接种至单层 Vero 细胞, 进行细胞爬片处理, 置 37 °C、5% CO₂ 温箱培养。待出现特征性细胞病变效应(cytopathic effect, CPE) 后, 以 1:500 稀释的兔抗血清作为一抗, 1:4 000 稀释的 Alexa Fluor 488 标记山羊抗兔 IgG(H+L) 作为二抗, 采用间接免疫荧光法观察结果。

收集上述各病毒感染的细胞, 加入蛋白上样缓冲液沸水浴 5 min, SDS-PAGE 电泳分离目的蛋白, 并转移至 PVDF 膜上。用本研究制备的 VZV gE 家兔免疫血清(1:6 000) 作为一抗, HRP 标记的羊抗兔 IgG(1:5 000) 作为二抗, 检测免疫血清中 gE 多克隆抗体的特异性。

1.2.7 Protein A 亲和层析纯化兔抗 VZV gE 多克隆抗体 将兔抗血清, 依次用 50% 和 33% 浓度的饱和硫酸铵进行粗纯。然后用 PBS 缓冲液充分透析, 收集上清液, 经 Protein A 亲和层析柱纯化兔抗 VZV gE-IgG。Lowry 法测定蛋白浓度, 用 SDS-PAGE 分析抗体纯度。

1.3 统计学处理 采用 SPSS 18.0 软件进行分析, 定性数据以 % 表示, 定量数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 采用配对 *t* 检验。

2 结果

2.1 重组质粒的鉴定 琼脂糖凝胶电泳显示, PCR 扩增及双酶切均获得预期的 1 617 bp VZV gE 基因胞外域片段。见图 1。目的基因片段经测序后, 用 BLAST 法与 GenBank 数据库比对, 其序列与 VZV Dumas 标准株基因组 DNA 的 gE 基因相应序列符合率为 100%。

2.2 VZV gE 融合蛋白的表达及鉴定 SDS-PAGE 鉴定显示, 重组菌体的沉淀样品在约 73 ku 处出现清晰的特异性目的条带, 与预测的蛋白相对分子质

量一致,表明融合蛋白主要以包涵体形式存在。见图 2A。

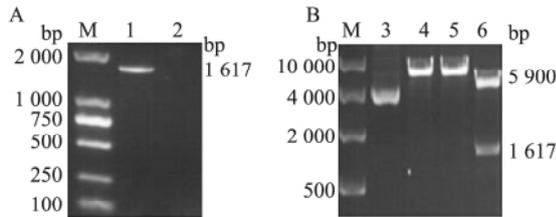


图 1 VZV gE 基因胞外域 PCR 扩增和 gE-pET-32a(+) 酶切鉴定
A: VZV gE 基因胞外域 PCR 扩增图; B: 重组质粒单、双酶切鉴定图; M: Marker; 1: 目的基因片段; 2: 阴性对照; 3: 重组质粒; 4: 重组质粒经 XhoI 酶切; 5: 重组质粒经 Hind III 酶切; 6: 重组质粒经双酶切

2.3 VZV gE 融合蛋白的复性、纯化及鉴定 取纯化后的融合蛋白进行 SDS-PAGE 鉴定,软件分析显示其纯度约为 90%,见图 2B。Lowry 法测定融合蛋白的浓度为 3.01 mg/ml。应用鼠抗 VZV gE 单克隆抗体进行 Western blot 鉴定,结果可见约 73 ku 的特异性目的条带。见图 2C。

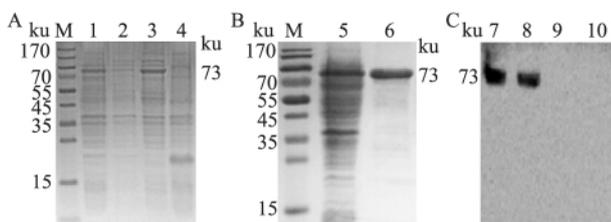


图 2 VZV gE 融合蛋白经 SDS-PAGE 和 Western blot 特异性鉴定
A: 融合蛋白的可溶性 SDS-PAGE 鉴定图; B: 纯化后的融合蛋白 SDS-PAGE 鉴定图; C: 融合蛋白的 Western blot 分析; M: Marker; 1: 重组菌体破碎前总蛋白; 2: 重组菌体破碎后上清液; 3: 重组菌体破碎后包涵体; 4: pET-32 空载体对照; 5: 纯化前 gE 融合蛋白; 6: 纯化后 gE 融合蛋白; 7: 纯化前 gE 融合蛋白; 8: 纯化后 gE 融合蛋白; 9: pET-32 空载体对照; 10: BL21 空菌对照

2.4 兔抗 VZV gE 多克隆抗体 ELISA 法效价检测结果 采用 ELISA 法检测,结果显示,免疫前兔阴性血清 OD 值为 (0.253 ± 0.037) ,当免疫后血清最大稀释度达 1 : 6 400 时,其 OD 值为 $0.382 > \bar{x} + 3S$ 采用配对 *t* 检验分析,与免疫前兔阴性血清组相比,差异有统计学意义 ($P < 0.01$),即多克隆抗体效价为 1 : 6 400。见图 3。

2.5 兔抗 VZV gE 多克隆抗体特异性鉴定 采用间接免疫荧光法和 Western blot 分析兔抗 VZV gE 多克隆抗体的特异性。结果显示 gE 蛋白免疫血清仅在感染 VZV 的 HF 细胞上呈现典型的绿色荧光,在其他疱疹病毒感染的细胞中都不出现荧光。见图

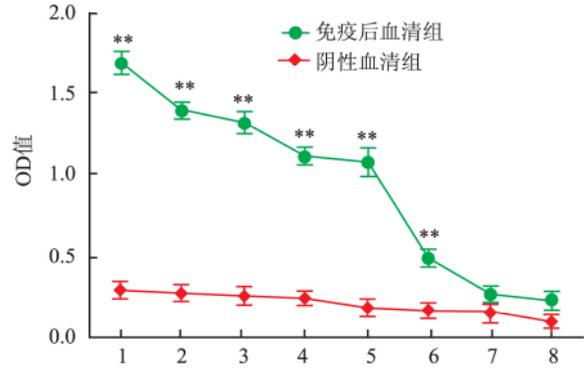


图 3 ELISA 法分析兔血清中 VZV gE 抗体效价

1: 血清 1 : 200 稀释度; 2: 血清 1 : 400 稀释度; 3: 血清 1 : 800 稀释度; 4: 血清 1 : 1 600 稀释度; 5: 血清 1 : 3 200 稀释度; 6: 血清 1 : 6 400 稀释度; 7: 血清 1 : 12 800 稀释度; 8: 血清 1 : 25 600 稀释度; 与阴性血清组比较: ** $P < 0.01$

4。感染了 VZV 的 HF 细胞蛋白所在的泳道,出现特异性目的条带,而其它疱疹病毒感染的细胞组均为阴性,表明所用 VZV gE 重组蛋白制备的兔抗 VZV gE 多抗具有较高的特异性。见图 5。

2.6 Protein A 亲和层析柱纯化兔抗 VZV gE 多克隆抗体 纯化的兔抗 VZV gE 多克隆抗体经 SDS-PAGE 鉴定,结果显示两条目的条带,分别为 IgG 抗体的轻链(25 ku)、重链(55 ku)。见图 6。Lowry 法测定抗体浓度为 5.51 mg/ml。

3 讨论

VZV 基因组为约 124 884 bp 的线性双链 DNA 分子,包含一个约 105 000 bp 的独特长片段(UL)和 5 400 bp 的独特短片段(US),被约为 6 800 bp 的末端和内部重复序列隔开。基因组共含有 72 个开放读码框,除了编码与病毒复制、转录、包装、释放等生物活性相关的蛋白分子以及与宿主细胞相互作用的蛋白以外,还编码 gB、gC、gE、gH、gI、gK、gL 和 gM 共 8 种病毒糖蛋白,这些糖蛋白在病毒的成熟与包装方面发挥着极为重要的作用^[9-10]。在处于恢复期的水痘和带状疱疹患者的血清中,VZV 抗体主要是针对 gB、gH 和 gE 病毒的糖蛋白,尤其是以 gE 为主要靶点诱导的体液免疫和细胞免疫,能够保护机体免受病毒攻击^[11-12]。

融合蛋白经原核表达系统表达时,往往因缺乏二硫键的形成、糖基化和磷酸化等加工、修饰过程,最后表达的蛋白会以无活性或活性较低的包涵体形式存在。本实验中获得的融合蛋白并不是完整的成熟蛋白,因此实验中首先对包涵体进行了变性和复

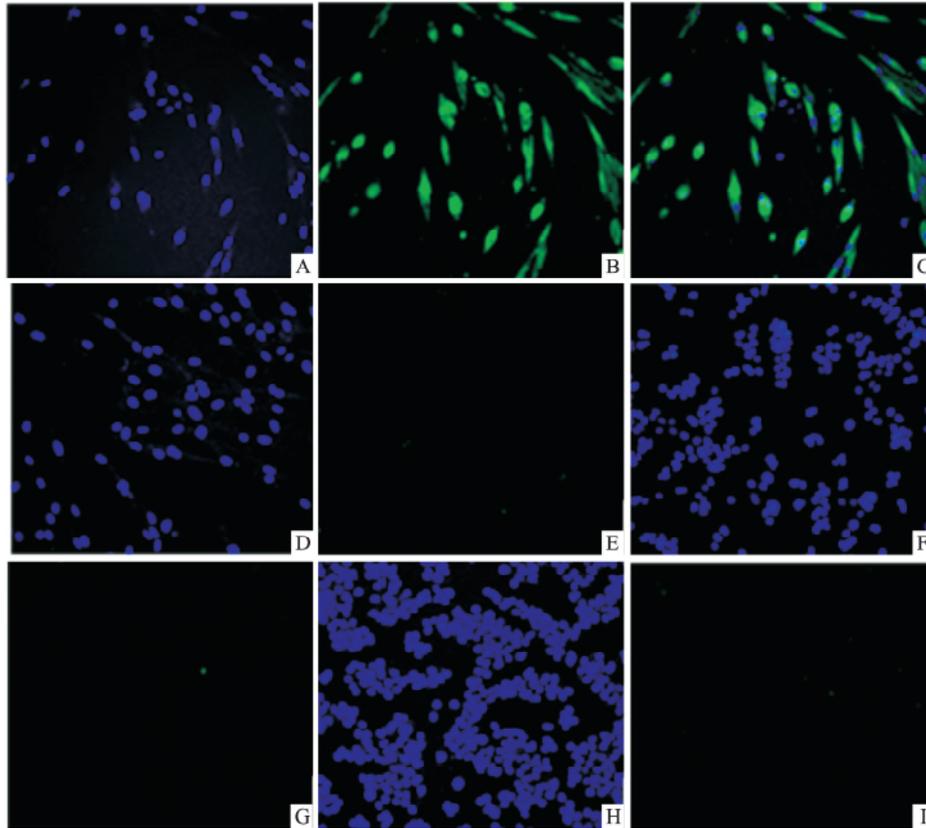


图4 间接免疫荧光鉴定多克隆抗体的特异性 ×400

A: DAPI 染色 VZV 感染的 HF 细胞核; B: VZV gE 膜荧光染色; C: 蓝绿荧光信号的叠加; D: DAPI 染色 HCMV 感染的 HF 细胞核; E: HCMV 荧光染色; F: DAPI 染色 HSV-1 感染 Vero 细胞核; G: HSV-1 荧光染色; H: DAPI 染色 HSV-2 感染 Vero 细胞核; I: HSV-2 荧光染色

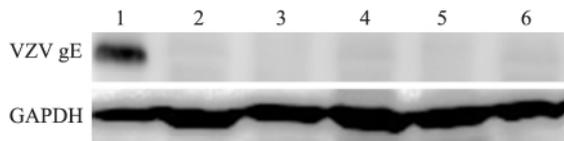


图5 Western blot 分析多克隆抗体的特异性

1: VZV 感染的 HF 细胞; 2: HCMV 感染的 HF 细胞; 3: HSV-1 感染的 Vero 细胞; 4: HSV-2 感染的 Vero 细胞; 5: 正常 HF 细胞; 6: 正常 Vero 细胞

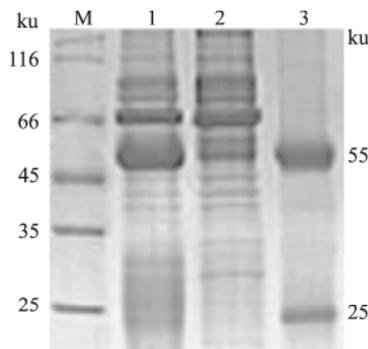


图6 Protein A 亲和层析柱纯化兔抗 VZV gE 的 IgG 抗体经 SDS-PAGE 鉴定

M: Marker; 1: 纯化前兔抗 VZV gE 的 IgG 抗体; 2: 纯化过程中的流穿液; 3: 纯化后兔抗 VZV gE 的 IgG 抗体

性处理,并通过镍柱对融合蛋白进行了亲和纯化。Western blot 表明经变性和复性后的融合蛋白具有较好的免疫反应性。研究^[13]表明,VZV gE 单克隆抗体可以介导抗体依赖的细胞毒性,在有外源性补体的情况下能中和病毒的感染性。本实验中以纯化的融合蛋白为抗原,免疫新西兰家兔制备了特异性和效价较高的多克隆抗体,其是否具有中和病毒效应,还有待进一步采用中和试验来验证。

本研究成功构建了高效表达 VZV gE 蛋白的原核表达系统,为今后构建 VZV gE 蛋白的真核表达系统奠定了基础。目前,国内尚无商品化的 VZV 抗体供应,而国外的 VZV 抗体价格昂贵。制备的兔抗 VZV gE 多克隆抗体有很高的特异性而且效价高,这不仅为进一步制备 VZV gE 单克隆抗体奠定了基础,也为 VZV 感染的临床治疗和病毒感染的早期诊断提供了重要的实验工具。

参考文献

[1] Gershon A A, Gershon M D, Breuer J, et al. Advances in the understanding of the pathogenesis and epidemiology of herpes zoster

- [J]. *J Clin Virol*, 2010, 48(Suppl 1): S2 - 7.
- [2] Fusco D, Krawitz P, LaRussa P, et al. VZV meningitis following varicella vaccine [J]. *J Clin Virol*, 2010, 48(4): 275 - 7.
- [3] Arvin A M, Oliver S, Reichelt M, et al. Analysis of the functions of glycoproteins E and I and their promoters during VZV replication *in vitro* and in skin and T-cell xenografts in the SCID mouse model of VZV pathogenesis [J]. *Curr Top Microbiol Immunol*, 2010, 342: 129 - 46.
- [4] 伊兴旭, 陈敬贤, 甘霖, 等. 水痘 - 带状疱疹病毒糖蛋白 E 胞外域基因的真核细胞稳定表达及其免疫反应性的初步研究 [J]. *安徽医科大学学报*, 2015, 50(3): 259 - 61.
- [5] Cole N L, Grose C. Membrane fusion mediated by herpesvirus glycoproteins: the paradigm of varicella-zoster virus [J]. *Rev Med Virol*, 2003, 13(4): 207 - 22.
- [6] Mo C, Lee J, Sommer M, et al. The requirement of varicella zoster virus glycoprotein E (gE) for viral replication and effects of glycoprotein I on gE in melanoma cells [J]. *Virology*, 2002, 304(2): 176 - 86.
- [7] Grahn A, Studahl M, Nilsson S, et al. Varicella-zoster virus (VZV) glycoprotein E is a serological antigen for detection of intrathecal antibodies to VZV in central nervous system infections, without cross-reaction to herpes simplex virus 1 [J]. *Clin Vaccine Immunol*, 2011, 18(8): 1336 - 42.
- [8] Thomsson E, Persson L, Grahn A, et al. Recombinant glycoprotein E produced in mammalian cells in large-scale as an antigen for varicella-zoster-virus serology [J]. *J Virol Methods*, 2011, 175(1): 53 - 9.
- [9] Rahaus M, Wolff M H. Analyses of the transcriptional pattern of glycoproteins E and I of Varicella-zoster virus and evidence for a monocistronic transcription [J]. *J Med Virol*, 2003, 70 (Suppl 1): S51 - 5.
- [10] Malavige G N, Jones L, Black A P, et al. Varicella zoster virus glycoprotein E-specific CD4⁺ T cells show evidence of recent activation and effector differentiation, consistent with frequent exposure to replicative cycle antigens in healthy immune donors [J]. *Clin Exp Immunol*, 2008, 152(3): 522 - 31.
- [11] Dendouga N, Fochesato M, Lockman L, et al. Cell-mediated immune responses to a varicella-zoster virus glycoprotein E vaccine using both a TLR agonist and QS21 in mice [J]. *Vaccine*, 2012, 30(20): 3126 - 35.
- [12] Wang Z H, Gershon M D, Lungu O, et al. Essential role played by the C-terminal domain of glycoprotein I in envelopment of varicella-zoster virus in the trans-Golgi network: interactions of glycoproteins with tegument [J]. *J Virol*, 2001, 75(1): 323 - 40.
- [13] 伊兴旭, 甘霖, 陈敬贤, 等. 水痘 - 带状疱疹病毒疫苗的评价与研究进展 [J]. *微生物与感染*, 2014, 9(4): 256 - 60.

Prokaryotic expression of varicella zoster virus glycoprotein E extracellular domain and preparation of antiserum

Yi Xingxu¹, Chen Jingxian², Gan Lin², et al

¹ *Chaohu Hospital of Anhui Medical University, Hefei 238000;*

² *Dept of Microbiology, Anhui Medical University, Hefei 230032)*

Abstract Objective Varicella-zoster virus (VZV) glycoprotein E (gE) extracellular domain was cloned and expressed in *E. coli*. New Zealand rabbit was immunized with the recombinant proteins to produce anti-VZV gE polyclonal antibody. **Methods** Prokaryotic expression plasmid gE-pET-32a(+), which contained the coding sequence for the extracellular domain of VZV gE. The authenticity of the insert was confirmed by DNA sequencing before it was transformed into *E. coli* BL21 strain. The fusion proteins were analyzed by Western blot and purified with Ni²⁺-NTA column. The New Zealand rabbit was immunized with the recombinant gE protein. Antibody titers were determined by ELISA. **Results** Using prokaryotic expression system, we were able to successfully induce the expression of VZV gE fusion proteins in *E. coli*. The fusion proteins reached 3.01 mg/ml in cell lysate and the purity was nearly 90%. The titer of the rabbit anti-VZV gE polyclonal antibody was 1 : 6 400. **Conclusion** The extracellular domain of VZV gE proteins are successfully expressed in *E. coli*, and could be a candidate for VZV vaccine. Highly specific polyclonal anti-VZV gE antibodies are obtained by immunization in New Zealand rabbit, which could be used to develop a method for VZV laboratory diagnosis.

Key words varicella-zoster virus; prokaryotic expression; fusion protein; polyclonal antibody