

48-52

维普资讯 http://www.cqvip.com

汉坦病毒陈株 S 基因编码区的克隆、序列分析及表达*

薛小平 徐志凯¹ 马文煜 闫岩 尹文
张芳琳 吴兴安 赵茜 白文涛

R 373-32

(第四军医大学微生物学教研室, 西安 710032)

摘要 从汉坦病毒陈株感染的 Vero-E6 细胞裂解液中提取病毒 RNA, 经逆转录 PCR 获得病毒 S 基因编码区约 1.3 kb cDNA 片段, 克隆该片段后进行核苷酸序列测定, 并与汉坦病毒 76-118 株进行同源性比较, 结果二者核苷酸序列同源性为 86%, 推导的氨基酸序列同源性为 97%。将该基因片段插入原核表达载体 pGEX-4T-1, 在大肠杆菌中获得高效表达。表达产物为 GST-NP 融合蛋白。SDS-PAGE 检测表达蛋白分子约 72 kD 左右。Western blotting 和 ELISA 试验结果表明, 表达产物可与多株抗汉坦病毒核蛋白的 McAb 发生反应, 其抗原表位及 McAb 反应谱与 76-118 株相比存在某些差异。

关键词 汉坦病毒, S 基因, 核苷酸序列分析, 基因表达

汉坦病毒 S 基因编码的核蛋白(NP)在该病毒三种结构蛋白中含量最高, 免疫原性最强的。在肾综合征出血热(HFRS)患者和灭活疫苗接种者体内抗 NP 抗体出现早、持续久, 用重组 NP 免疫动物虽未测到中和性抗体, 但对动物仍具有免疫保护作用^[2]。我国学者徐志凯、梁米芳等通过对 NP 的抗原性分析, 推测在 NP 上可能存在有中和性抗原位点^[2,3], 但尚缺乏基因水平的证据。我国是 HFRS 高发区, 先后从不同疫区、不同宿主动物及患者体内分离出多株病毒, 加强对我国各疫区流行株基因结构的研究, 通过基因序列的分析比较研究我国汉坦病毒的起源和变异, 无论对汉坦病毒基因结构和功能的研究, 还是 HFRS 的分子流行病学研究以及建立我国汉坦病毒基因库, 都具有重要意义。本研究旨在通过对从我国分离到的汉坦病毒陈株 S 基因的序列测定, 推导其氨基酸序列, 与国外已发表的汉坦病毒 S 基因作同源性比较, 以及对表达重组 NP 的抗原性分析, 为明确汉坦病毒核蛋白的抗原性质提供有用的证据。

1 材料和方法

1.1 病毒与细胞 Vero-E₆ 细胞由中国药品生物制品检定所引进, 汉坦病毒陈株由安徽省医科所倪大石主任惠赠, 为 I 型汉坦病毒^[4]。经本室连续乳鼠脑内传代增毒至 LD₅₀ 为 10⁻¹⁰。病毒以 100 TCID₅₀ 感染 Vero-E₆ 细胞, 维持培养至第八天, 免疫荧光检测达“卅~卅”, 供提取病毒 RNA 用。

1.2 单克隆抗体(McAb) 共选用 18 株抗汉坦病毒 McAb^[2] 和 1 株抗谷胱甘肽转移酶(GST) McAb。在抗汉坦病毒 McAb 中, 1A8、3G11、A35(由陈伯权教授惠赠)、H11(由唐家琪研究员惠赠)、3A9、1B3、8E8、2A11 为抗

收稿日期: 1998-03-09, 修回日期: 1998-07-17

* 本课题受国家自然科学基金(编号: 39570038)和军队杰出人才基金资助

汉坦病毒 NP 组特异性 McAb:5H5、7D12、7C11、7D1 为抗汉滩病毒 NP 型特异性 McAb;3G1 为抗汉滩病毒 NP/G2 双特异性 McAb;13E2、24F12 为抗汉城病毒 NP 型特异性 McAb;8G2、8G3、8F8 为抗汉滩病毒 GP McAb;3C11 为抗 GST McAb。均为本室制备^[5,6]。

1.3 汉坦病毒陈株 S 基因编码区 cDNA 的获得 以异硫氰酸胍一步法从感染细胞裂解液中提取的总 RNA 为模板,加入逆转录引物(5'-TAG TAG TAG CAC CCG-3'),按 Promega 公司逆转录 Kit 说明操作合成 cDNA 第一链,以此为一模板加入 PCR 引物扩增目的基因,实验中先后使用了 3 条 PCR 引物:HS₁:GC GAA TTC ATG GCA ACT ATG GAG GAA TTA-3';HS₂:5'-GC GTC GAC TTA GAG TTT CAA AGG AGG CTC TTG GTT-3';HS₃:5'-GC GAA TTC CCT GGA GAC CAT CTG AAA GAG-3'。引物 HS₁ 和 HS₂ 含 EcoRI 酶切位点,HS₃ 含 SalI 酶切位点。

1.4 PCR 产物的克隆及鉴定 PCR 产物回收纯化后用 EcoRI、SalI 双酶切,克隆入表达质粒 pGEX-4T-1 的相应位点,阳性重组子命名为 pGEX-ChenS 1.3 用 EcoRI、XhoI 从该质粒上切下 1.3 kb 片段,亚克隆入测序质粒 pGEM-7zf(+)的相应位点,阳性重组子命名为 pGEM-Chen 1.3。连接、转化阳性克隆的筛选及鉴定均按文献[5]进行。

1.5 核苷酸序列分析 用魔力柱法提取重组测序质粒 pGEM-ChenS 1.3,用全自动荧光 DNA 序列分析仪,从正反两个方面测序。

1.6 汉坦病毒陈株 S 基因在大肠杆菌中的表达 将含质粒 pGEX-ChenS 1.3 的菌种接种在 5 mL 2 × YT 管中(含 1% Amp,下同),37℃ 振荡培养过夜,以 1:100 转种 100 mL 2 × YT 继续培养 2 h,加入 0.1 mmol/L IPTG 250 μL 诱导 4 h。收集菌体,重悬于 5 mL GET(0.3 mmol/L 蔗糖,25 mmol/L EDTA 25 mmol/L Tris, HCl pH8.0),加入终浓度 2% (W/V)溶菌酶,室温作用 30 min,冻融 3 次后,超声粉碎,低速离心取上清进行分析鉴定。

1.7 表达产物的分析鉴定 SDS-PAGE、Western blotting 及 ELISA 参照文献[2]进行。

2 结果

2.1 逆转录 PCR 结果 以 cDNA 第一链为模板,用引物 HS₁ 和 HS₂ 组配 PCR 扩增得到约 1.3 kb 片段。

2.2 S 基因编码区的序析分析及同源性比较 随机挑取 2 个 pGEM-ChenS 1.3 阳性重组克隆,提取质粒,从正反两个方向测序,分别读出 360 bp(37~397)和 380 bp(900~1326)的碱基。根据测序结果合成引物 HS₃,引物 HS₃ 和 HS₂ 组配以重组质粒为模板 PCR 扩增出约 1 000 bp 片段,用 EcoRI + ClaI(位于 909 bp 处)双酶切后获得约 600 bp 片段,重新插入 pGEM-7zf(+)的相应位点。挑取阳性重组克隆,用同上的方法测序,两个方向分别读出 650 bp 和 580 bp。综合两次测序的结果,读出汉坦病毒陈株 S 基因编码区的全序列,全长 1 290 bp,编码 430 个氨基酸。将所测序列输入计算机与 76-118 株 S 基因做同源性比较。结果二者核苷酸序列同源率为 86%,推导的氨基酸序列同源率为 97%。抗原性分析显示,二者均有 5 个抗原表位,区别在于第 5 个抗原位点陈株位于 297 位为赖氨酸(K),76-118 株位于 280 位为谷氨酸(E)。测序及同源性比较结果见图 1。

2.3 重组表达质粒的鉴定 同批挑取 10 个单菌落,其中阳性克隆 8 个,根据测序结果进行酶切鉴定。用 EcoRI + SalI, EcoRI + HapI, SalI + HapI, EcoRI + HindIII 和 BamHI 酶切后,分别获得约 1.3 kb、0.7 kb、0.5 kb、1.2 kb 和 1.1 kb 片段,均与预期大小相符,结果见图 2。

2.4 表达产物的鉴定 SDS-PAGE 显示表达产物分子量约 72 kD,薄层层析扫描显示表达蛋

表 1 三种 NP 的 McAb 反应谱

Table 1 Reactivities of rNP to anti-HTNV McAb

McAb	血清型/特异性 ^a Serum type/Specificity	陈株 rNP Strain Chen rNP	76-118 株 rNP Strain 76-118 rNP	天然 NP Authentic NP
1A8	I/G	+	+	+
3A9	I/G	+	+	+
8E8	I/G	+	+	+
** A35	I/G	+	+	+
3G11	I/G	+	+	+
** 1B3	I/G	-	+	+
5H5	I/T	+	+	+
7D ₁	I/T	-	+	+
7C ₁₁	I/T	-	+	+
7G ₁₁	I/G	-	+	+
7D ₁₂	I/T	-	+	+
H ₁₁	I/T	+	+	+
2A ₁₁	I/T	+	+	ND
** 8G ₂	I/T	-	-	-
** 8G ₃	I/T	-	-	-
** 8F ₈	I/T	-	-	-
** 3G ₁	I/T	+	+	+
13E ₂	II/T	-	-	-
24E ₁₂	II/T	-	-	-
3C11	anti-GST	+	+	ND

G: 组特异性 T: 型特异性 * * 为中和性 McAb

G: Group specificity T: Typespecificity * * Neutralizing McAb

3 讨论

1986 年 Schmal Jhon 等首先以汉坦病毒 76-118 株(为该病毒原型株)M、S 片段进行了全序列克隆和分析。此后,国外学者在这方面做了大量工作,迄今为止,汉坦病毒 I、II、III、IV 型毒株 3 个基因片段的核苷酸序列及推导的氨基酸序列均已发表^[6]。研究分析表明同型病毒间核苷酸序列具有较高的同源性,其中 S 基因的同源性又高于 M 基因。汉坦病毒陈株和 76-118 株同为 I 型病毒,前者分离自安徽省一 HFRS 患者,后者分离自韩国疫区的黑线姬鼠,将二株病毒 S 基因编码区进行同源性比较,结果两者的核苷酸序列同源性为 86%,推导的氨基酸序列同源性为 97%。限制性酶切位点分析结果与文献报道的结果^[7]基本一致。表明不同疫区和来源的病毒株间 S 基因的变化相对稳定。但是核苷酸序列和氨基酸序列上较高的同源性并不表明不同毒株间在蛋白结构(如抗原表位等)和其他生物学性质(如血凝活性、细胞融合、对小鼠的致死力等)上没有区别。本研究通过对陈株重组 NP 的抗原性分析发现,与 76-118 株相比,二者虽都具有 5 个潜在的抗原表位,其中第 5 个抗原表位在 76-118 株上位于第 280 位为谷氨酸,而陈株则位于 279 位为赖氨酸。用一组位点特异的 McAb 对陈株重组 NP 进行抗原位点分析,结果表明它的 McAb 反应谱与天然 NP 和 76-118 株重组 NP 的 McAb 反应谱相比^[2,8],存在着一些差异,这种差异主要表现在对某些型特异性 McAb 的反应上。Tamara 通

过对一株汉坦病毒弱毒株和一株强毒株核苷酸序列分析比较发现,仅仅是由于强毒株糖蛋白第1124位的丝氨酸在弱毒株上被置换为甘氨酸,后者就失去了细胞融合、CTL活性和对乳鼠的致死力等生物学性状。这些都说明汉坦病毒核苷酸序列中的某些关键部位的微小变异即可引起表型的改变。因此加强对我国各疫区流行株的基因结构的研究,建立我国的汉坦病毒基因库,无论对汉坦病毒的结构与功能研究还是对HFRS分子流行病学研究都具有重要意义。

此外,使用McAb进行抗原位点分析中还发现,陈株重组NP与两株具有中和活性的McAb呈阳性反应,进一步揭示在汉坦病毒NP上似乎存在有中和性McAb的靶抗原,这种抗原的性质和基因定位需做更深入的研究。

参 考 文 献

- 1 Yoshimatsu K, Y-C Yoo, Yoshida R. Protective immunity of Hantaan virus nucleocapsid and envelope protein studied using baculovirus-expressed protein. *Ach Virol*, 1993, 130:365-376
- 2 徐志凯,王海涛,肖毅等.肾综合征出血热病毒50 kD结构蛋白的抗原位点分析.单克隆抗体通讯,1992,2:30-34
- 3 梁米芳,宋干,杭长寿等.流行性出血热病毒单克隆抗体的特性鉴定及其对病毒结构蛋白作用的初步研究.病毒学报,1989,3:217-223
- 4 王海涛,徐志凯,肖毅等.单克隆抗体用于肾综合征出血热病毒的型别鉴定.中华流行病学杂志,1992,13(特):243-245
- 5 Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T. *Molecular cloning*. Second ed. USA: Cold Spring Harbor Laboratory, 1989, 1:53-1.59
- 6 Antic D, Yong Kang C, Bpik K *et al*. Comparison of the deduced gene products of the L, M and S genome segments of Hantavirus. *Virus Res*, 1992, 24:35-46
- 7 Mifang L, Pexun L, Shu Yuan X *et al*. Antigenic and molecular characterization of Hantavirus isolates from China. *Virus Res*, 1994, 31:219-233
- 8 尹文,徐志凯,闫岩等.汉坦病毒S基因分段表达及其表达产物的鉴定.细胞免疫与分子免疫学杂志,1998,1:44-46

Cloning, Sequencing and Expression of S Gene Encoding Region of Hantaan Virus Strain Chen

Xue Xiaoping Xu Zhikai Ma Wenyu *et al*.

(Dept. Microbiology, The Fourth Military Medical University, Xi'an 710032)

Abstract RNA of Hantaan virus (HNTV) strain Chen isolated from China was extracted from lysate of Vero-E₆ cell infected by the virus. With the RNA as template, 1.3kb cDNA fragment containing the region encoding nucleocapsid protein (NP) was obtained by reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR). This fragment was cloned into pGEM-7zf(+) plasmid and sequenced. Homology comparison showed that the homology of the nucleotide and amino acid sequences between strain Chen and strain 76-118 was 86% and 97%, respectively. The RT-PCR product was cloned into pGEX-4T-1 vector and was efficiently expressed in *E. coli*. The expressed product is NP-GST fusion protein with molecular weight about 70 kD in SDS-PAGE. Its antigenic epitope was recognized by Western-blotting and ELISA using the McAbs. The results showed that there were some differences on antigenic epitopes between strain Chen and strain 76-118.

Key words Hantaan virus, S gene, Nucleotide sequencing, Expression