文章编号: 1001-0580(2008)12-1495-03 中图分类号: R 373 文献标志码: A 【论 著】

巨细胞病毒 gp52 蛋白表达与应用

吴丽霞[1],赵玉红[1],陈咏君[1],郭晶[1],孙超[1],张小刚[2],于庭[3],李凤娣[4],杨丽荣[5]

摘 要: **目的** 构建表达巨细胞病毒(CMV) gp52 蛋白抗原的重组质粒及工程菌,获取纯化的 gp52 蛋白抗原。**方法** 采用 PCR 技术,克隆表达 CMV gp52 重组蛋白,利用产物建立 IgM 捕获 ELISA 方法鉴定其抗原性及实用性。**结果** 表达纯化的 gp52 蛋白纯度 > 95 %,经酶标记建立 IgM 捕获 ELISA 方法,检测 35 份抗巨细胞病毒 IgM 阳性血清和 35 份阴性血清,用酶标记 gp52 蛋白建立的捕获 ELISA 法阳性检出率 97.1 %,阴性检出率 100 %,与意大利 SORIN 公司试剂盒检测结果比较,差异无统计学意义($P > 0.05$);其中 1 份 CMV - IgM 阳性血清 1:16 稀释后仍能与抗原反应,表明 gp52 蛋白抗原表位有较好的抗原特异性。**结论** 高效表达纯化的 gp52 蛋白抗原性强,利用其建立的 IgM 捕获 ELISA 方法,可用于检测巨细胞病毒抗体。

关键词: 巨细胞病毒;gp52 蛋白;抗原;基因克隆

Cloning and application of CMV gp52 protein *WU Li-xia, ZHAO Yu-hong, CHEN Yong-jun, et al. Shenzhou Hospital of Shenyang Medcial College (Shenyang 110002, China)*

Abstract: **Objective** To construct the recombinant plasmid and engineering bacteria for expression of CMV gp52 protein and to use the expressed product for detection of CMV specific antibody. **Methods** Using PCR technology, recombinant CMV gp52 was cloned and expressed to establish IgM capture ELISA, and the product was detected for its antigenicity and practicality. **Results** Through expression and purification, the purity of gp52 was over 95 %. IgM capture ELISA established by gp52 - HRP was used to detect 35 CMV - positive serums and 35 CMV - negative serums, the positive detection rate was 97.1 % and negative detection rate was 100 % by capture ELISA with no significant difference compared with SORIN company's kit ($P > 0.05$). gp52 antigen can response to the one CMV - positive serum (1:16 dilution), so the gp52 had better antigenicity. **Conclusion** CMV gp52 protein efficiently expressed had specific antigenicity, and can be used for establishing IgM capture ELISA to detect cytomegalovirus antibodies.

Key words: cytomegalovirus; gp52 protein; antigen; gene cloning

巨细胞病毒(cytomegalovirus, CMV)属疱疹病毒β亚科,其感染在人群中广泛存在[1,2]。研究表明,妇女在妊娠初期感染 CMV 是引起胎儿宫内感染和发育缺损的重要原因,甚至认为其在致畸方面的作用比风疹病毒更为重要。CMV 也是器官移植失败和艾滋病患者并发感染死亡的主要原因,对非免疫缺陷者常导致长期隐形感染或出现非特异症状,甚至引起感染细胞的转化、畸变或癌变,同时也与多种肿瘤的发生相关,如宫颈癌、前列腺癌、结肠癌及下波济肉瘤[3,4]。建立 CMV 感染的早期检测方法,用于孕妇的检查及献血员筛选,对于优生优育及阻断 CMV 传播有重要意义。检测 CMV IgM 抗体仍是目前最常用的早期诊断方法,尤其 gp52 蛋白的 IgM 抗体,在 CMV 感染早期有较高的检出率。本文成功构建表达 gp52 蛋白工程菌,建立了表达 gp52 蛋白的纯化方法,获得了高纯度 gp52 蛋白,有较好的抗原特异性,可作为抗原检测巨细胞病毒抗体。

1 材料与方法

1.1 材料 (1)菌种、质粒与血清:大肠埃希菌 BL21、巨细胞病毒全基因(北京现代高达生物技术有限责任公司);pET - 28a 载体(华美生物技术有限公司)。经免疫印迹试验(WB)确定的 CMV 阳性与阴性血清(北京电力医院及辽宁省妇幼保健院)。(2)试剂:限制性内切酶 Xho I、EcoR I、T4 - DNA 连接酶、DNA 快速纯化试剂盒(北京 TaKaRa 公司);琼脂糖、IPTG、蛋白酶 K、蛋白质相对分子质量 marker(美国 Sigma 公司);其他试剂为进口或国产分析纯。

1.2 方法

1.2.1 目的基因选取和引物设计 通过计算机分析 CMV 全部氨基酸序列,筛选出强抗原表位,即从第 2 个氨基酸~第 273 个氨基酸,以其氨基酸所对应的核酸序列为目的基因设计 PCR 引物 P01 和 P02;引物由上海生工生物工程技术服务有限公司合成。引物序列如下:P01:5′- CGGGACTCGAGC-CGCAACGGTCTG - 3′,含 Xho Ⅰ酶切位点;P02:5′-CGAATTCTTACGTTACAGAATCCTCGCT - 3′,含 EcoRI 酶切位点和 TAA 终止密码。

1.2.2 CMV 目的基因纯化与扩增 取 0.5ml CMV 细胞培养上清液,加 50μl 蛋白酶 K(10mg/ml),混匀后至 50 ℃消化 4h,用酚/氯仿纯化,操作见文献[4]。以 CMV 基因组 DNA 为模板,进行扩增。PCR 反应体系:水 35.3 μl,模板 DNA1.5 μl,10 ×buffer 5.0 μl,dNTP 4.0 μl,上游引物 2.0 μl,下游引物 2.0 μl,Taqplus 0.2 μl(1U)。PCR 产物经琼脂糖凝胶电泳检测,并用 DNA 快速纯化试剂盒回收目的片段。

1.2.3 重组表达质粒构建 将纯化回收后的片段按常规的方法载入载体 pET - 28a,转化到大肠埃希菌感受态细胞中,碱裂解法抽提重组质粒,命名为 pET - 28a - gp52。经 XhoI 和 EcoR I 双酶切鉴定和 PCR 初步鉴定后测序,证实重组表达质粒构建成功。测序由北京赛百胜公司完成。

1.2.4 工程菌构建 将表达质粒 pET - 28a - gp52 转化大肠埃希菌 BL21 感受态细胞,铺 LB 琼脂平板(含 50 (g/ml 卡拉霉素),于 37 ℃培养过夜。然后挑单菌落于脂质双层(LB)液体培养基,37 ℃培养过夜。再按体积比 1 %的接种量接种于新鲜 LB 液体培养基,37 ℃培养至对数生长期,加 0.4

作者单位: 1. 沈阳医学院沈洲医院检验科,沈阳 110002; 2. 北京现代高达生物技术有限责任公司; 3. 吉林大学第二医院; 4. 沈阳市疾病预防控制中心; 5. 沈阳市大东区妇幼保健所
作者简介: 吴丽霞(1962 -),女,山东沂水人,主任技师,博士,研究方向:临床酶学与遗传性疾病分子遗传学研究及产前诊断研究等。

mmol/L 异丙基硫人β-D-半乳糖苷(IPTG)诱导 4 h。诱导菌体用 15%SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE)分析,表达 gp52 蛋白的菌株即为所需的工程菌株,用甘油冷冻保存。

1.2.5 工程菌裂解和 gp52 蛋白表达、纯化 将上述方法诱导培养工程菌 5000 r/min 离心 5 min,每克菌湿重加 3 ml 裂解缓冲液 (50 mmol/L Tris-HCl,1mmol/L 乙二胺四乙酸二钠盐(EDTA)100 mmol/L NaCl),超声波破碎菌体 10 min;温度 4 ℃,12 000 r/min离心 15 min,上清为可溶部分,沉淀为包涵体。用 2ml 包涵体溶解液[8 mmol/L 尿素、50 mmol/L 氯合三羟甲基氨基甲烷 Tris.Cl(pH8.0)]溶解包涵体。包涵体溶解液上清上样于阴离子交换柱(DEAE-52);用 20 mmol/L Tris.Cl/8mol/L 尿素(pH8.0)充分洗去未结合的蛋白,然后用 0.1～0.3 mmol/L NaCl 梯度洗脱,同时收集蛋白。透析脱盐后,再上 PEI 离子柱,用 0.1～0.5 mmol/L NaCl 梯度洗脱。洗脱峰蛋白液透析除盐复性,再经 DEAE-Sepharose FF 阴离子柱,依次用含 50,100,200,300,1 000mmol NaCl 的平衡液洗脱蛋白,收集洗脱峰蛋白,用 12%SDS-PAGE 检测重组蛋白的组分。

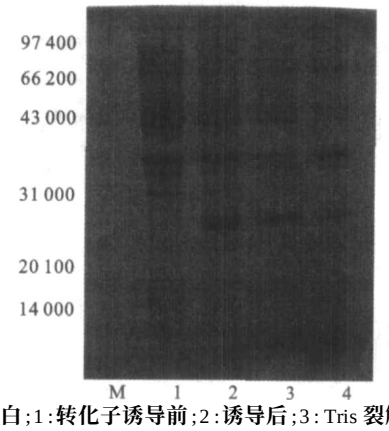
1.2.6 gp52 蛋白抗原 ELISA 法检测 用碳酸盐包被液稀释抗 IgM(链抗体,包被酶标板,4 ℃过夜;次日用封闭液封闭,4 ℃过夜;每孔加入 20μl 待检血清和 100μl 辣根过氧化物酶-巨细胞病毒(HRP-CMV)gp52 酶液(高碘酸钠还原法制备),37 ℃反应 60min;磷酸盐缓冲液-T(PBS-T)洗板 5 次,每孔加 A(过氧化氢)、B(过氧化氢尿素)显色液各 50μl,37 ℃显色 15min,每孔加 50μl 2mmol/L H_2SO_4 溶液终止反应,测定吸光度(A)值。

1.3 统计分析 采用 SPSS 11.0 软件进行统计分析。

2 结 果

2.1 重组产物 对有扩增产物的重组子质粒经 Xho Ⅰ和 EcoRI 双酶切、鉴定,其中有 3 个重组质粒的双酶切产物在 726 bp 位置可见一明亮条带,大小与预期结果一致,无其他杂带。鉴定这 3 个重组子为阳性重组子,从中选取 1 个送赛百胜公司测序。测序结果表明,该质粒上确实插入了目的基因,且插入方向正确,为表达质粒 pET-28a-gp52。

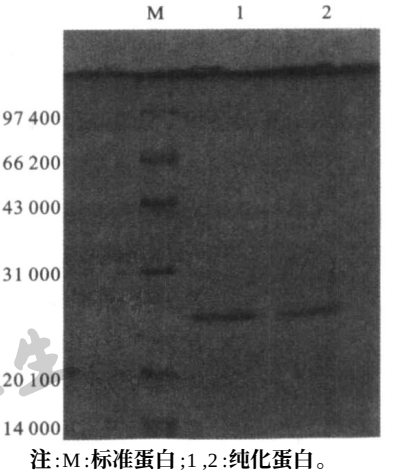
2.2 表达 CMV gp52 蛋白的 SDS-PAGE 检测(图 1) 取 1～4 号转化子,培养后经 IPTG 诱导 4 h,收集菌体进行 SDS-PAGE 检测。结果显示,2,3,4 号蛋白条带诱导后出现清晰的 gp52 蛋白带,相对分子质量与推测结果一致,并且 3,4 号转化子溶液经处理后蛋白含量较高。



注:M:标准蛋白;1:转化子诱导前;2:诱导后;3:Tris 裂解液溶解上清;4:尿素溶解上清液。

图 1 gp52 蛋白表达菌的 SDS-PAGE 检测结果

2.3 表达 gp52 蛋白抗原纯化(图 2) 经 DEAE-Sepharose FF 阴离子柱,在不同浓度 NaCl 洗脱下,收集峰值管进行 SDS-PAGE 分析(加样量 ≥10μg)。结果显示,凝胶经考马斯亮蓝染色和甲醇-冰乙酸脱色后,2 份平行加样样本均呈 1 条蛋白带;再将 3 批不同克隆纯化的 gp52 扫描分析,分别占总蛋白的比例为 96.2%,97.14%,95.8%,均有较高的纯度。



注:M:标准蛋白;1,2:纯化蛋白。

图 2 纯化 gp52 蛋白 SDS-PAGE 的分析结果

2.4 应用捕获 ELISA 法检测巨细胞病毒抗体 IgM 用酶标记 gp52 蛋白建立捕获 ELISA 法,与意大利 SORIN 公司 ELISA 试剂盒同时检测经 WB 法确定的 35 份抗巨细胞病毒 IgM 阳性血清和 35 份阴性血清。结果显示,35 份阳性血清,用酶标记 gp52 蛋白建立的捕获 ELISA 法检出阳性 34 份,阳性检出率 97.14%;SORIN 公司 ELISA 试剂盒检出阳性 33 份,阳性检出率 94.28%;35 份阴性血清 2 种方法阴性检出率均为 100%。2 种方法比较,差异均无统计学意义($P>0.05$)。选取其中 1 份抗巨细胞病毒 IgM 阳性血清,进行 1:1,1:2,1:4,1:8,1:16 梯度稀释。检测结果显示,抗巨细胞病毒 IgM 阳性血清 1:16 稀释后仍能与 gp52 蛋白抗原反应,表明 gp52 蛋白抗原表位有较好的抗原特异性。

3 讨 论

目前,巨细胞病毒感染诊断方法主要有脱落细胞及组织病理检查、病毒分离和抗原检测、分子杂交试验和血清学检查[3,5-9],这些方法多基于高特异性的抗原建立。我国用于抗体检测的巨细胞病毒蛋白抗原,多是巨细胞病毒分离提取的多种蛋白混合物或代谢产物,抗原特异性不强,批间差较大,易产生假阳性。利用基因工程制备巨细胞病毒特异性的抗原是制备优质抗原的有效途径,国外已克隆表达了多个重组巨细胞病毒抗原,并对其抗原性进行了鉴定[10]。本研究通过计算机软件分析 CMV 抗原表位及疏水区域,选定强抗原表位,利用基因工程技术在大肠埃希菌中进行了高效表达。高效表达的 gp52 蛋白抗原以包涵体形式存在,易于纯化,所获得的 gp52 蛋白抗原有较好的抗原特异性,可用作抗原检测巨细胞病毒抗体。将该蛋白抗原标记物用于检测试剂盒的制备,与市场上的同类试剂盒相比,具有特异性强、灵敏度高等优点,用于孕妇感染 CMV 的检测,对优生优育有重要意义。

参考文献

〔1〕 Maher KG,Rajiv K. Human cytomegalovirus:Clinical aspects,immune regulation,and emerging treatments[J]. Lancet Infect Dis,2004,12(4):725-738.

〔2〕 刘长飞,赵淑举,张义蛙,等. 孕妇 TORCH 感染血清流行病学

研究[J]. 中国公共卫生,2000,16(7):591 - 592.
〔3〕 Sia IG, Patel R. New strategies for prevention and therapy of cytomegalovirus infection and disease in solid organ transplant recipients[J]. Clin Microbiol,2000,13(1):83 - 121.
〔4〕 Revello MG, Gerna G. Diagnosis and management of human cytomegalovirus infection in the mother, fetus, and newborn infant [J]. Clin Microbiol,2002,15(45):680 - 715.
〔5〕 F 奥斯伯, R 布伦特. 精编分子生物学实验指南[M]. 2 版. 北京:科学出版社,1995:954 - 956.
〔6〕 李芬,张剑萍,任永惠,等. 孕妇围生期 HCMV 感染与婴儿先天性疾病关系[J]. 中国公共卫生,2006,22(10):1183 - 1184.
〔7〕 Boeckh M, Boivin G. Quantization of cytomegalovirus: methodological aspects and clinical applications[J]. Clin Microbiol,1998,11(3):533 - 554.
〔8〕 Landry ML, Cohen S, Huber K. Comparison of EDTA and acid citrate - dextrose collection tubes for detection of cytomegalovirus antigenicity and infectivity in leukocytes before and after storage [J]. Clin Microbiol,1997,35(1):305 - 306.
〔9〕 Alexander R, Lamb D, White D, et al. RETCIF: a rapid, sensitive method for detection of viruses, applicable for large numbers of clinical samples[J]. Virol Methods,2001,97(122):77 - 85.
〔10〕 Rosaa CL, Wanga Z, Laceya SF, et al. Characterization of host immunity to cytomegalovirus pp150 (UL32)[J]. Human Immunology,2005,66(2):116 - 126.

收稿日期: 2008-07-01 (孔繁学编校)

文章编号: 1001-0580(2008)12-1497-02 **中图分类号**: R 978.2 **文献标志码**: A **【实验研究】**

磺胺二甲嘧啶竞争抑制 ELISA 法检测*

王颖[1,2],刘阳[3],周立波[1,4],柳增善[1]

磺胺二甲嘧啶(Sulfamethazine, SM_2)作为一种广谱抗生素,普遍应用于医药(抗球虫药)、畜牧(作饲料添加剂以提高畜禽抗病力)以及水产养殖中(用于鱼、虾、蟹细菌性疾病),预防和治疗细菌感染性疾病[1]。短时间大剂量或长时间小剂量的作用可引起急性或慢性中毒;能够诱发人的甲状腺癌和影响机体泌尿系统、免疫系统,破坏肌肉和肾脏等组织,并具有三致作用[2],是国家农业部继克伦特罗后规定进出口检测必检项目之一。在残留药物检测的各种方法中,高效液相色谱(HPLC)及其联用技术成本昂贵,操作繁琐,放射性免疫检测技术则对机体有放射性损伤。酶联免疫吸附法(ELISA)因其兼顾灵敏度高和无放射性污染优点而被普及。为了探讨灵敏度更高,特异性更强和操作更简便易行的 ELISA 方法,制备具有独立知识产权的单克隆抗体,进行了本项研究。结果报告如下。

1 材料与方法

1.1 材料 (1)细胞株及实验动物:分泌抗 SM_2 抗体的杂交瘤细胞株 3D7,本课题组自行制备。10 周龄健康 BALB/c 小鼠(卫生部长春生物制品研究所)。(2)主要试剂及仪器:SM_2 标准品(中国兽医药品监察所);蛋白分子量标记物(Marker)和辣根过氧化物酶标记酶(HRP - IgG)(大连宝生物公司);N - 二羟乙基甘氨酸(BCA)蛋白试剂盒(Bradford Protein Assay Kit,美国 Piece 公司);其他所用试剂均为国产分析纯。倒置显微镜和 CO_2 培养箱(日本 Olympus 公司);酶联免疫检测仪(美国 Bio - Rad 公司);细胞培养瓶及可拆卸酶标板(丹麦 NUNC 公司)。

1.2 方法

1.2.1 SM_2 - 单抗的制备和标记 复苏能够稳定分泌抗 SM_2 单抗 4B12,腹腔注射石蜡致敏小鼠法制备腹水,正辛酸 - 硫酸铵法纯化腹水[3],BCA 蛋白试剂盒测定蛋白浓度,采用改良过碘酸钠法用辣根过氧化物酶标记制备 McAb - HRP[4],- 20 ℃保存备用。

1.2.2 检测抗原的制备 重氮化法制备检测碳酸二甲嘧啶色被抗原(SM_2 - OVA)。(1)重氮盐溶液称取 SM_2 原粉 280 mg,溶于 6 ml 的 1 mol/L HCl,置于 0～4 ℃冰浴,搅拌下逐滴加入 2 mol/L 的 $NaNO_2$。(2)称取 250 mg OVA 溶于 10 ml、pH 9.4 的 Na_2CO_3 - NaB_4O_7 缓冲溶液中,搅拌下加入重氮盐溶液,用 2 mol/L 的 NaOH 调 pH 值至 8～10,室温磁力搅拌反应 3 h 左右,反应物对 NH_4HCO_3 缓冲液透析 72 h,得 SM_2 - OVA,紫外扫描鉴定后冻干保存。

1.2.3 ELISA 酶标板均一性试验 分别用照过紫外线和未照过紫外线的 ELISA 板,进行间接 ELISA 检测,根据 SPSS 10.0 统计软件分析有无差异性。

1.2.4 SM_2 竞争抑制 ELISA 最佳工作条件确定 采用方阵法对包被抗原(SM_2 - OVA)、抗体适用浓度、反应介质、反应时间等工作条件进行优化。选择对抗原结合反应抑制率高,抗原抗体用量少的试验组合作为最佳工作条件。其中包被抗原按 1～0 μg/ml 倍比横向包被酶标板,腹水单抗从 8 000 × 开始倍比稀释,纵向加入酶标板,求得最佳条件。

1.2.5 SM_2 的 ELISA 检测标准工作曲线 标准 SM_2 溶液按 4 000～0 ng/ml 稀释,用竞争 ELISA 法检测获得不同浓度下的吸光度(A)$_{490}$值,以抑制率(P/N %)值为纵坐标,以 log(10 × SM_2 浓度)为横坐标绘制标准工作曲线。

1.2.6 样品模拟提取及回收 按文献[5]。用甲醇/水将 10 g 鸡肉组织(加入一定量 SM_2)匀浆,正乙烷脱脂,氯仿萃取,蒸发定容。用所建立的 2 种 ELISA 法检测,SM_2 含量计算按下式进行:SM_2 含量(ng/g) = C × L × X/W 式中:C 为根据酶标板上测得 A_{490} 后由标准曲线求得 log(10 × SM_2 浓度),再通过反对数求得的 SM_2 浓度(ng);L 为样品提取液体积(ml);X

*基金项目: 国家自然科学基金(30671762)
作者单位: 1. 吉林大学教育部人兽共患病重点实验室,长春 130062; 2. 黑龙江八一农垦大学食品学院; 3. 黑龙江省公安厅刑事技术总队; 4. 吉林出入境检验检疫局
作者简介: 王颖(1979 -),女,黑龙江大庆人,博士在读,主要从事食品安全学研究。
通讯作者: 柳增善