

· 论 著 ·

对嗜 T 淋巴细胞病毒 I 型重组 env 的研究

朱庆华, 王梅芬

摘要:目的 探讨人类嗜 T 淋巴细胞病毒(Human T-cell Lymphotropic Virus, HTLV)I 型重组 env 抗原的表达。方法 分析和选择 HTLV-I env 目的基因, 将目的基因片段分别克隆入原核表达载体 pQE80L, PCR 和酶切鉴定重组子, 诱导并亲和层析纯化表达重组 env 蛋白抗原, Western-blot 检测重组 env 蛋白抗原活性, ELISA 方法测试重组 env 蛋白抗原的特异性。结果 PCR 扩增和酶切筛选得到阳性重组子 pQE80L-env。SDS-PAGE 显示重组蛋白相对分子质量约为 25KDa, 与预期分子量相符。免疫印迹在约 25KDa 有一明显特异印迹条带。转染细胞培养 48h, SDS-PAGE 分析, 有相对分子质量约为 27KDa 目的重组蛋白表达, 与预期的融合蛋白大小相符。ELISA 检测到正常人、HIV 阳性和 HTLV-II 阳性的参考血清均为阴性, HTLV-I 阳性的参考血清为强阳性。结论 HTLV-I env 基因 5915nt-6545nt 区, 可以利用原核系统表达得到特异性 HTLV-I 重组抗原, 重组抗原无显著性差异, 有望成为检测试剂的抗原。

关键词: HTLV-I; 重组抗原; 原核表达载体; 表达

中图分类号: R373 文献标识码: A 文章编号: 1009-9727(2012)6-664-04

Study on the expression of recombinant antigen env in human T-cell lymphotropic virus type I. ZHU Qing-hua, WANG Mei-fen. (Department of Clinical Laboratory the First Affiliated Hospital of Zhengzhou University Zhengzhou 450052 Henan P. R. China)

Abstract: Objective To investigate the expression of recombinant antigen env in human T-cell lymphotropic virus type I. Methods The target gene of HTLV-I env were analyzed and selected, cloned into prokaryotic vector pQE80L and identified it through PCR and restriction methods. Then the expressed recombinant env protein antigen was induced and purified by affinity chromatography. Western-blot method was adapted to test the activity of the recombinant env antigen expressed by prokaryotic and ELISA method was adapted to test its specificity. Results The positive recombinants pQE80L-env was selected through PCR amplification and restriction. SDS-PAGE suggested the relative molecular mass of the recombinant protein was approximately 25KDa, which was in line with the expected molecular weight and Western-blot showed an obvious specific band at 25KDa. The transfected cells were cultured for 48h, then the corresponding SDS-PAGE indicated the relative molecular mass of the recombinant protein was approximately 27KDa, which coincided with the expected molecular weight and Western-blot revealed an obvious specific band at 27KDa. The reference sera of normal, HIV-positive and HTLV-II-positive people were all detected negative, while HTLV-I-positive people was strongly positive. Conclusion 5915-6545nt area of HTLV-I env gene can be cloned into prokaryotic and eukaryotic vector to express the specific recombinant antigen HTLV-I. There are no significant differences between the two antigens and it holds the potential to be used as test kits.

Key words: HTLV-I; Recombinant antigen; Prokaryotic vector; Expression

人类嗜 T 淋巴细胞病毒(Human T-cell Lymphotropic Virus, HTLV) 在病毒分类中归属于逆转录病毒科肿瘤病毒亚科哺乳类 C 型病毒^[1]。人类 T 淋巴细胞白血病病毒(HTLV)分为 I 型和 II 型, HTLV-I 可导致成人 T 细胞白血病、热带痉挛性麻痹症 /HTLV-I 相关的脊髓病等严重疾病^[2], 我国的 HTLV 人群感染率较低, 但是 HTLV 的流行状况值得关注。HTLV 主要通过输血、性接触、母婴等方式传播^[3], 因此, 在输血过程中, 对献血者进行 HTLV 的检测, 对保障输血安全有重要的意义。目前各国最常用的筛检试剂为酶联免疫吸附试验(ELISA)试剂, 蛋白印迹试验(WB)试剂。目前

国内使用的 HTLV- 筛检试剂 ELISA 和 WB 等均为国外进口试剂, 而制约国内 HTLV-I 筛检试剂开发的瓶颈是 HTLV-I 特异性抗原。因此, 本研究采用分子生物学技术, 利用原核表达载体表达 env 重组抗原, 为 HTLV-I 筛检试剂的开发奠定基础。

1 材料与方法

1.1 材料 克隆载体 pQE80L(Qiagen)、羊抗 HTLV-I gp2(Santa Cruz)、HTLV-I、HTLV-II 和 HIV 抗体阳性灭活参考血清, 10 份正常人血清, 由广州军区武汉总医院提供, NIH3T3 细胞株, 购自武汉大学典型物保藏中心(CCTCC)。env 引物的目的基因检测引物为 P1 5'

作者单位: 郑州大学第一附属医院检验科, 河南 郑州 450052

作者简介: 朱庆华(1966~), 男, 医学硕士, 副主任技师, 副教授, 研究方向: 医学检验。

TCTGTTCCATCCCCCTTCTTC3' P2 5' AAGAAGGAG TAGCGCGACAA 3' 由上海生物工程公司合成。

1.2 方法

1.2.1 目的基因与 pQE80L 重组 将目的基因与 pQE80L 载体连接,转化 DH5 α 随机挑取菌落,碱裂解法提取质粒,经 PCR 及 BamHI 和 PstI 双酶切重组体 pQE80L-env 进行鉴定,阳性重组子经上海生物工程公司进行序列测定。

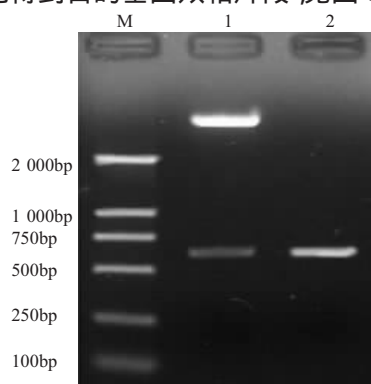
1.2.2 原核表达载体的诱导表达、纯化及 Western Blot 鉴定 采用 Promega 公司 Hislink™ 蛋白纯化试剂盒纯化重组 env 抗原蛋白。将纯化的蛋白进行 SDS-PAGE,转移至醋酸纤维素膜,以 10g/L BSA 室温封闭过夜后,用鼠抗人 env mcAb(1:1 000 稀释)室温孵育 3h, TBST 洗膜 3 次,10min/次,再以 HRP 标记的羊抗小鼠 IgG 抗体(1:1 000 稀释)室温孵育 3h, TBST 洗膜 3 次,用 DAB 显色液显色,观察结果。

1.2.3 ELISA 检测重组 env 抗原 原核表达纯化得到的 HTLV-I env 抗原蛋白经 ELISA 检测后,参照标准曲线确定 env 抗原含量。

1.3 统计学分析 计量数据均以均数 \pm 标准差($\bar{x}\pm s$)表示,采用 SPSS 软件,两组均数间的比较用 t 检验。 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 实验结果

2.1 目的基因双粘片段的制备 由上海旭冠生物有限公司合成目的基因 env、并插入 pUC57,即购得 pUC57-env。在目的基因的 5' 和 3' 端分别加上有 BamHI 和 PstI 酶切位点。用 BamHI 和 PstI 双酶切,可酶切下 630bp 的目的基因 env 片段,见图 1;经胶回收纯化得到目的基因双粘片段,见图 1。



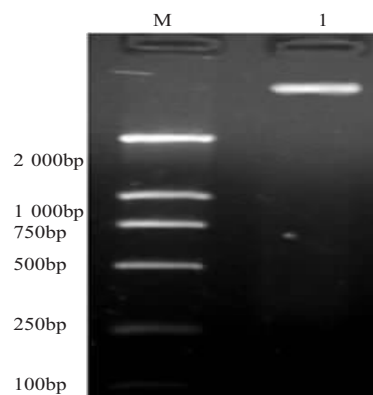
M:分子量 Marker;1: pUC57-env 质粒 BamHI 和 PstI 双酶切产物电泳结果;2:目的基因 env 片段胶回收纯化产物电泳结果

M:Molecular weight Marker; 1:Products after digestion of BamHI and PstI restriction enzyme; 2:Recycled and purified products of target gene env fragment

图 1 目的基因双粘片段制备琼脂糖凝胶电泳图

Fig 1 Agarose gel electrophoresis of the target gene double-stick fragment

2.2 线性双粘表达载体的制备 原核表达载体 pQE80L 的多克隆位点中含有 BamHI 和 PstI 酶切位点,用 BamHI 和 PstI 双酶切载体,经过电泳胶回收,得到约 4 800bp 的线性双粘原核表达载体 pQE80L,见图 2。



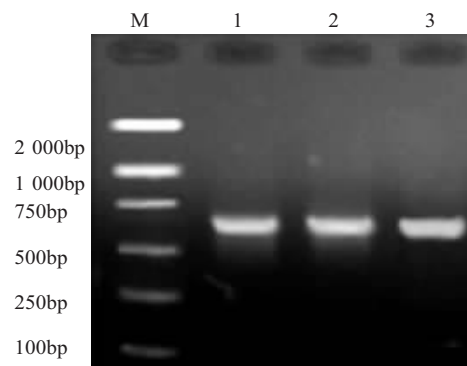
M:分子量 Marker;1:线性双粘原核表达载体 pQE80L 胶回收纯化产物电泳结果;

M: Molecular weight Marker; 1: Recycled and purified products of pQE80L;

图 2 线性双粘表达载体的制备琼脂糖凝胶电泳图

Fig 2 Agarose gel electrophoresis of linear double-stick expression vector

2.3 目的基因的克隆鉴定及测序结果 目的基因与载体重组后,转化 DH5 α ,挑取转化菌落进行 PCR 扩增,均得到 630bp 的 HTLV-I env 目的基因条带,说明鉴定菌均为阳性克隆,得到重组克隆 pQE80L-env,见图 3。BamHI 和 PstI 双酶切鉴定,可以得到 630bp 目的基因片段和约 4 800bp 的 pQE80L 载体片段,见图 4。得到的阳性重组子 pQE80L-env 进行序列测定,其插入片段与预期相符。



M:分子量 Marker;1-3:目的基因与 pQE80L 连接转化菌 PCR 扩增产物电泳结果。

M: Molecular weight Marker; 1-3: Transformed colonies with the target gene linked to pQE80L;

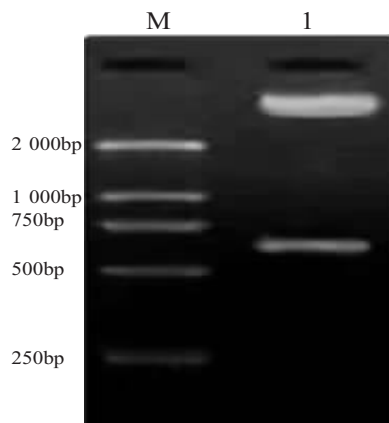
图 3 PCR 扩增鉴定重组克隆琼脂糖凝胶电泳图

Fig 3 Agarose gel electrophoresis of the recombinant clone through PCR

2.4 原核表达载体的诱导表达纯化和 Western blot 鉴定结果 含重组质粒 pQE80L-env 的大肠杆菌

DH5 α 以 IPTG 诱导后菌体蛋白裂解变性,以 120g/L SDS-PAGE 观察到一个相对分子量与理论值(25 000)相符的明显诱导表达条带,见图 5。Western Blot 鉴定诱导表达的菌体蛋白 25 000 处出现一条明显带,相对分子量与理论值相符合,而对照菌体未出现显色带,见图 6,表明该表达产物与 env mcAb 特异性结合,即重组表达 env 蛋白具有天然 env 的抗原特性。

2.5 ELISA 检测结果 利用原核表达纯化的重组 env 抗原包被 ELISA 板,对 10 例正常人参考血清检测,其吸光度均值为 0.068 标准差为 0.021。以均值+3 倍标准差为阴/阳性界值($0.068+3\times 0.021=0.131$)判断 3 例 HIV 阳性和 2 例 HTLV-II 阳性的参考血清均为阴性,而 2 例 HTLV-I 阳性均为阳性见表 1。

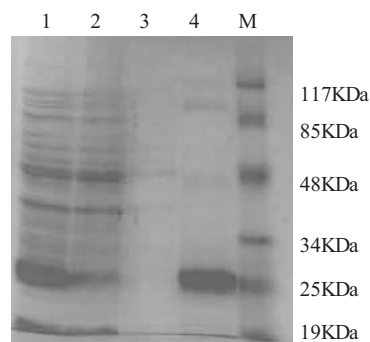


M: 分子量 Marker; 1: BamHI 和 PstI 双酶切重组子 pQE80L-env 产物电泳结果

M: Molecular weight Marker; 1: Recombinant pcDNA4/HisMax-A-env after digestion;

图 4 酶切鉴定重组子琼脂糖凝胶电泳图

Fig 4 Agarose gel electrophoresis of the recombinant after enzyme digestion

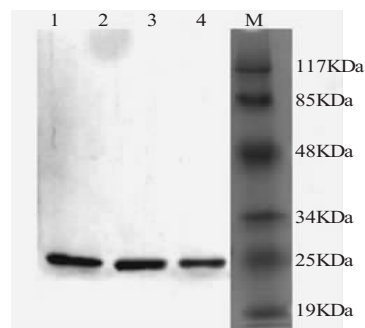


1 IPTG 诱导 6h 裂解产物 SDS-PAGE 结果 2 IPTG 诱导 4h 裂解产物 SDS-PAGE 结果 3 IPTG 诱导 2h 裂解产物 SDS-PAGE 结果 4: Hislink™ 蛋白纯化试剂盒纯化的蛋白 SDS-PAGE 结果 M: 蛋白分子量 Marker

1: Induced by IPTG for 6h and followed by pyrolysis; 2: Induced by IPTG for 4h and followed by pyrolysis; 3: Induced by IPTG for 2h and followed by pyrolysis; 4: Protein purified by Hislink™ protein purification kit; M: Protein molecular weight Marker

图 5 原核表达载体的 SDS-PAGE 结果

Fig 5 SDS-PAGE results of the prokaryotic expression vector



1-3 IPTG 诱导含有重组子 pQE80L-env 的 DH5 α 菌,裂解产物 SDS-PAGE 转膜后与羊抗 HTLV-I ggp21 多克隆抗体免疫印迹结果; M: 蛋白分子量 Marker

Marker 1-3: DH5 α containing recombinant pQE80L-env was induced by IPTG, then followed with pyrolysis. The resulting product was combined with goat antibody HTLV-I ggp21 after SDS-PAGE and then observed through western-blot; M: protein molecular weight Marker

图 6 原核表达载体的 Western-blot 结果

Fig 6 Western-blot results of prokaryotic expression vector

表 1 ELISA 检测结果

Table 1 Inspection result by ELISA method

编号 Items	血清类型 Serotype	吸光度值 A		结果判定(-/+) Determination of inspection results
		Absorbance Value A		
		原核表达抗原 Prokaryotic expression vector		
1	正常人 Normal	0.042	—	
2	正常人 Normal	0.076	—	
3	正常人 Normal	0.102	—	
4	正常人 Normal	0.055	—	
5	正常人 Normal	0.038	—	
6	正常人 Normal	0.073	—	
7	正常人 Normal	0.068	—	
8	正常人 Normal	0.051	—	
9	正常人 Normal	0.091	—	
10	正常人 Normal	0.084	—	
11	HIV 阳性 HIV Positive	0.048	—	
12	HIV 阳性 HIV Positive	0.061	—	
13	HIV 阳性 HIV Positive	0.052	—	
14	HTLV- II 阳性 HTLV- II Positive	0.067	—	
15	HTLV- II阳性 HTLV- II Positive	0.088	—	
16	HTLV- I阳性 HTLV- I Positive	1.433	+	
17	HTLV- I阳性 HTLV- I Positive	1.221	+	

3 讨论

人类嗜 T 淋巴细胞病毒(Human T-cell Lymphotropic Virus HTLV)属于逆转录病毒科肿瘤病毒亚科哺乳类 C 型病毒。根据其基因组及血清学反应分为两个型别人类嗜 T 细胞病毒 I 型(HTLV-I)和 II 型(HTLV-II),二者在基因结构上有较大的相似性;同时与 HIV 的基因结构也较为相似^[4]。因此,在检测性抗原选择和制备上存在困难,容易出现交叉反应,造成特异性问题。

其试剂抗原采用培养人 T 细胞系中的病毒裂解物作为抗原,其敏感性很高,但特异性较低。经过研究

探索 HTLV-I 特异性抗原有 gp46、gp21e、p24 和 p40 tax。近年来,应用基因重组技术合成了 HTLV-I 的外膜蛋白如 rgp46-I 和 rgp21-I 等,将这些重组蛋白应用于 ELISA 和 WB 技术,提高了 HTLV-I 抗体检测的敏感性和特异性。

HTLV-I env 基因是病毒外膜蛋白编码基因,主要编码的 gp46 蛋白和 gp21 蛋白。我们利用分子生物学软件和互联网上分子生物学工具,分析 gp46 蛋白和 gp21 蛋白疏水性、预测抗原决定簇丰富区、与 HTLV-II 和 HIV 的同源区和保守区。最后选定 HTLV-I env 基因 5915nt-6545nt 表达重组 env 抗原。王颖彬^[5]将一段 HTLV- 和 HTLV- env 区嵌合基因在大肠杆菌中表达,获得具有良好活性的重组抗原,建立了 ELISA 抗体检测方法。该抗原由于是 HTLV- 和 HTLV- env 区嵌合基因表达,因此是 HTLV- 和 HTLV- env 融合蛋白抗原;它是 HTLV- 和 HTLV- 的通用检测抗原。而我们设计建立的单纯检测 HTLV- 的抗原参考血清试验验证与 HTLV- 无交叉反应。

病毒抗原制备主要有两种方法^[6]:①病毒培养,病毒抗原蛋白分离纯化;②基因工程抗原的表达。病毒培养分离方法费时、费力成本高,目前采用的相对较少;基因工程抗原表达的方法使用广泛,表达抗原稳定、纯化方便、成本低。基因工程抗原的表达主要可分为原核与真核表达系统。原核表达系统(大肠杆菌表达系统)虽然不能对重组蛋白糖基化修饰,但因遗传背景清楚,易于操作,生产成本低,产量高等优点依然是重组蛋白生产的首选体系^[7-9]。在原核表中我们优化 IPTG 诱导表达的时间和温度,选择纯化 IPTG 诱导 4h 的产物,因为这时表达的重组可溶性蛋白最多。

本实验成功构建出 HTLV-I env 重组蛋白抗原的原核(pQE80L-env),表达纯化得到原核表达重组

env 抗原,Western-blot 证实其都具有良好 HTLV-I 抗原活性,参考血清 ELISA 试验验证与 HTLV-、HIV 无交叉反应。通过进一步的特异性和敏感性实验,有望为 HTLV-I 的抗体诊断提供重组抗原。

参考文献:

- [1] Gallo RC. History of the discoveries of the first human retroviruses: HTLV-I and HTLV-II[J]. *Oncogene* 2005 24(39): 5926-5930.
- [2] Karen VK, Kuan TJ. Human T-Cell leukemia virus type I 25 years of progress and challenges[J]. *J Biomed Sci* 2005 12: 7-11.
- [3] Feuer G, Green PL. Comparative biology of human T-cell lymphotropic virus type 1 (HTLV-I) and HTLV-II [J]. *Oncogene* 2005 24(39): 5996-6004.
- [4] Goncalves DU, Proietti FA, Barbosa-Stancioli EF et al. HTLV-I-associated myelopathy/tropical spastic paraparesis (HAM/TSP) inflammatory network[J]. *Inflamm Allergy Drug Targets* 2008 7(2): 98-107.
- [5] Shuh M, Beilke M. The human T-cell leukemia virus type 1 (HTLV-I) new insights into the clinical aspects and molecular pathogenesis of adult T-cell leukemia/lymphoma (ATLL) and tropical spastic paraparesis/HTLV-associated myelopathy (TSP/HAM) [J]. *Microsc Res Tech* 2005 Nov 68(3-4): 176-196.
- [6] Rafatpanah H, Farid R, Golanbar G et al. HTLV-I Infection: virus structure, immune response to the virus and genetic association studies in HTLV-I-infected individuals [J]. *Iran J Allergy Asthma Immunol* 2006 5(4): 153-166.
- [7] Grassmann R, Aboud M, Jeang KT. Molecular mechanisms of cellular transformation by HTLV-I Tax[J]. *Oncogene* 2005 24(39): 5976-5985.
- [8] Oliveira P, Castro NM, Carvalho EM. Urinary and sexual manifestations of patients infected by HTLV-I[J]. *Clinics* 2007 62(2): 191-6.
- [9] Casoli C, Pilotti E, Bertazzoni U. Molecular and cellular interactions of HIV-1/HTLV coinfection and impact on AIDS progression [J]. *AIDS Rev* 2007 9(3): 140-149.

收稿日期 2011-12-23 编辑:谢永慧

征订启事

《中国热带医学》杂志(*China Tropical Medicine*)是经国家科学技术部批准,由中华人民共和国卫生部主管,中华预防医学会和海南省疾病预防控制中心主办的国家级中华预防医学会系列杂志。月刊,大 16 开,128 页。本刊现为中国学术期刊综合评价数据库、中国生物医学文献数据库、万方数据库数字化期刊群、中国核心期刊(遴选)数据库、中国期刊全文数据库等国内数据库来源期刊,被 MEDLINE、CAB International、美国化学文摘社期刊等国际文献检索系统收录。2006、2008 和 2010 年被评为中国科技核心期刊,中国科技统计源期刊。

本刊主要报道寄生虫病、病毒、细菌性疾病、地方病、皮肤与性传播疾病、中毒、健康教育等热带病防治、研究成果、公共卫生和妇幼保健经验和基础医学研究,介绍国内外在热带病防治与研究中的新技术、新进展及发展趋势。本刊主要设述评、论著(包括:实验研究、现场研究、临床研究)、短篇论著、专家论坛、研究进展(综述)、经验交流等栏目。

基金项目或科研课题衍生论文优惠优先刊出,急用文稿可与编辑部联系在 1~2 月内刊出。

本刊编辑部