

# 单纯疱疹病毒 1 型糖蛋白 G 表达载体的构建及鉴定

黄涛<sup>1</sup>, 严华<sup>2</sup>, 龚文波<sup>3</sup>, 林连成<sup>1</sup>

**摘要:** [目的] 构建 gG-1 强抗原决定簇集中区对应基因的重组原核表达载体, 并对其进行鉴定。[方法] 利用 DNASTAR 软件分析 gG-1 强抗原决定簇的集中区, PCR 扩增相应基因片段, 将其定向克隆至原核表达载体 pGEX-4T-1 中, 构建重组质粒 pGEX-4T-1/gG-1, 并对其进行双酶切和 DNA 测序鉴定。[结果] 成功构建了 pGEX-4T-1/gG-1 重组原核表达载体, 且目的基因片段与 GenBank 中已公布序列一致性较高, 阅读框架正确。[结论] pGEX-4T-1/gG-1 重组原核表达载体的成功构建, 为研制 HSV-1 型特异性基因工程诊断试剂奠定了基础。

**关键词:** 单纯疱疹病毒; 糖蛋白 G; 原核表达

**CONSTRUCTION AND IDENTIFICATION ON THE PROCARYOTIC EXPRESSION VECTOR OF GG-1** HUANG Tao, YAN Hua, GONG Wen-bo, et al. (Sai'er Biotechnology Limited Company, Shenzhen 518055, China)

**Abstract:** [Objective] To construct and identify the procaryotic expression vector of the powerful epitopes of gG-1. [Methods] The domains of the powerful epitopes were analyzed by DNASTAR and amplified by PCR, then the production was directly cloned into procaryotic expression vector pGEX-4T-1 for construction of pGEX-4T-1/gG-1, the recombinant plasmid was identified by restriction endonuclease and DNA sequencing. [Results] The recombinant plasmid was successfully constructed, the comparison of inserted fragment with that reported in GenBank revealed that the identification was very high and the inserted fragment was in proper order. [Conclusion] The successful construction of pGEX-4T-1/gG-1 lays a good foundation for the research of new type-specific serological detection of HSV-1.

**Key words:** Herpes simplex virus; Glycoprotein G; Procaryotic expression

单纯疱疹病毒 (herpes simplex virus, HSV) 属于疱疹病毒科  $\alpha$  疱疹病毒亚科的具有代表性的疱疹病毒, 是 TORCH 综合征的病原体之一。根据抗原性的差别分为 HSV-1 和 HSV-2 两种血清型。

在目前已发现并正式命名的 HSV 12 种<sup>[1]</sup>包膜糖蛋白中, 包膜糖蛋白 G (gG) 是 HSV-1 与 HSV-2 型间差异最大的一个糖蛋白, 是抗 HSV 体液免疫应答的主要靶位, 可诱导机体产生型特异性抗体反应<sup>[2]</sup>, 是 HSV 型特异性血清学检测的最佳抗原<sup>[3]</sup>。gG 作为型特异性抗原, 在血清学诊断及疫苗研制方面的应用前景已引起广泛关注<sup>[4]</sup>。本研究克隆了 HSV-1 强抗原决定簇较集中的 gG 基因片段, 构建并鉴定了其重组原核表达载体, 为研制 HSV-1 型特异性基因工程诊断试剂奠定了基础。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

HSV-1 病毒 SM44 株、大肠杆菌 DH5 $\alpha$ 、原核表达载体 pGEX-4T-1 均为本室保存。

限制性内切酶 EcoR I、Sal I、PrimeSTAR<sup>TM</sup> HS DNA Polymerase、250 bp DNA Ladder Marker、TaKaRa DNA Ligation Kit Ver 2.0 均为宝生物工程 (大连) 有限公司产品; UNIQ-10

柱式病毒 DNA 抽提试剂盒、UNIQ-10 柱式 PCR 产物纯化试剂盒、UNIQ-10 柱式质粒小量抽提试剂盒、UNIQ-10 柱式 DNA 胶回收试剂盒均为上海生工生物工程技术有限公司产品。

### 1.2 方法

1.2.1 DNA 提取 采用“UNIQ-10 柱式病毒 DNA 抽提试剂盒”从热灭活并浓缩的 HSV-1 病毒液中提取病毒 DNA。

1.2.2 抗原性预测及引物设计 根据 GenBank: AF120934.1 中已公布的 HSV-1 gG (gG-1) 基因序列, 用 DNASTAR 软件中的 Protean 程序对整个氨基酸序列抗原性相关指标进行分析。用 Oligo 软件在强抗原决定簇的集中区两端设计一对引物, 由上海生工生物工程技术有限公司合成。其中, 在上游引物中增加一个 EcoR I 酶切位点, 在下游引物中增加一个 Sal I 酶切位点。

1.2.3 PCR 扩增 按如下组分配制 PCR 反应液: 5 $\times$ PrimeSTAR<sup>TM</sup> Buffer (Mg<sup>2+</sup> plus) 10  $\mu$ l, dNTP Mixture (各 2.5 mmol/L) 4  $\mu$ l, 上游引物 (10  $\mu$ mol/L) 1  $\mu$ l, 下游引物 (10  $\mu$ mol/L) 1  $\mu$ l, HSV-1 病毒 DNA 模板 0.5  $\mu$ l, PrimeSTAR<sup>TM</sup> HS DNA Polymerase (2.5 U/ $\mu$ l) 0.5  $\mu$ l, 灭菌蒸馏水 33  $\mu$ l, 总体积 50  $\mu$ l。按如下反应条件进行 PCR 扩增: 98 $^{\circ}$ C 5 min; 98 $^{\circ}$ C 10 s, 60 $^{\circ}$ C 15 s, 72 $^{\circ}$ C 60 s, 30 个循环; 72 $^{\circ}$ C 延伸 10 min。

1.2.4 重组质粒的构建 将用“UNIQ-10 柱式 PCR 产物纯化试剂盒”纯化的 PCR 产物以及用“UNIQ-10 柱式质粒小量抽提试剂盒”提取的 pGEX-4T-1 载体质粒 DNA, 分别经 EcoR I 和 Sal I 双酶切, 并用“UNIQ-10 柱式 DNA 胶回收试剂盒”纯化回收双酶切产物, 然后用“TaKaRa DNA Ligation Kit Ver

作者简介: 黄涛 (1984-), 男, 硕士, 研究方向: 病毒分子生物学

作者单位: 1. 深圳市赛尔生物技术有限公司, 深圳, 518055; 2. 扬州大学医学院病原学与免疫学教研室; 3. 深圳市人民医院检验科

2.0”对两者进行连接，构建重组质粒 pGEX-4T-1/gG-1，转化大肠杆菌 DH5α 感受态细胞。

1.2.5 重组质粒的筛选 从 Amp<sup>+</sup> LB 转化平板上挑取单菌落，接种于 Amp<sup>+</sup> LB 培养液中，37℃振荡培养过夜。次日，取 1 μl 菌液作模板进行 PCR 扩增反应，以筛选含重组质粒的阳性菌。

1.2.6 重组质粒的鉴定

1.2.6.1 双酶切鉴定 用“UNIQ-10 柱式质粒小量抽提试剂盒”对筛选到的阳性菌提取质粒 DNA 后，用 EcoR I 和 Sal I 对提取的质粒 DNA 进行双酶切，以鉴定重组质粒。

1.2.6.2 测序鉴定 将筛选到的阳性菌，送上海生工生物工程

技术有限公司进行 DNA 测序，以鉴定重组质粒。

## 2 结果

### 2.1 抗原性预测

用 DNASTar 软件中的 Protean 程序对整个 gG-1 氨基酸序列抗原性相关指标 (β 转角、无规卷曲、极性、可塑性、亲水性、表面可能性、抗原指数) 进行分析，从分析结果 (图 1) 可见目的氨基酸序列 (虚线框内部分) 几乎涵盖了整个蛋白的所有强抗原决定簇，预测此序列有较好的抗原性。

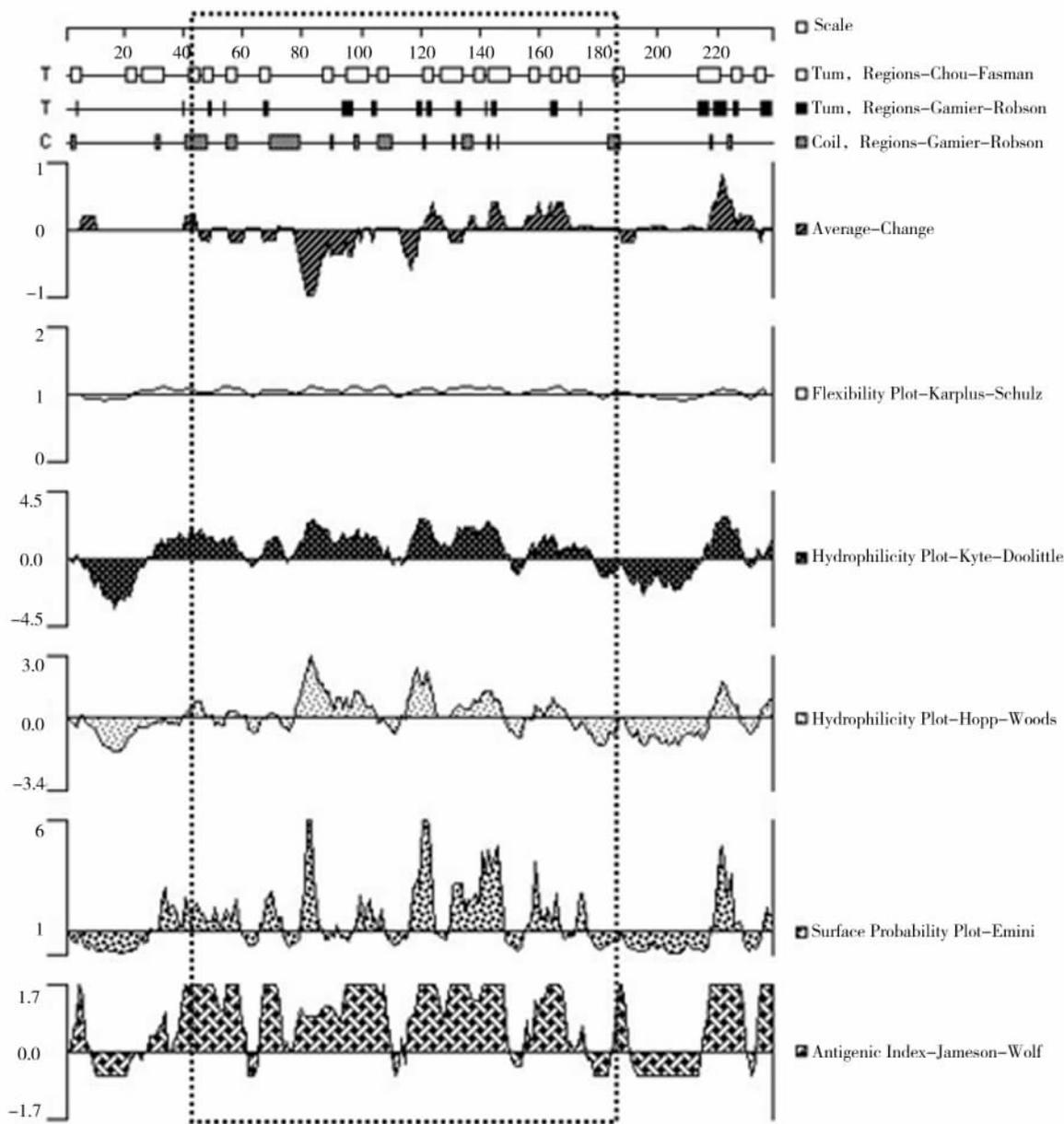


图 1 DNASTar 软件对 gG-1 氨基酸序列抗原性相关指标的分析

### 2.2 PCR 扩增

PCR 产物用 0.7% 琼脂糖凝胶电泳，结果显示在相对分子量约 400 bp 处有一条特异性扩增条带，与预期大小 (379 bp+15 bp) 基本相符。见图 2。

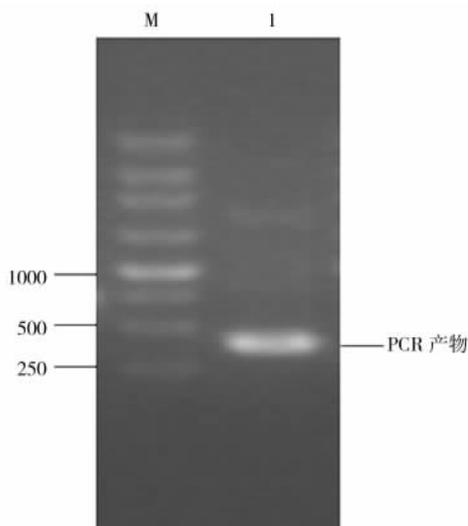
### 2.3 重组质粒的筛选

筛选在相对分子量 394 bp 附近可扩增出相应基因片段的

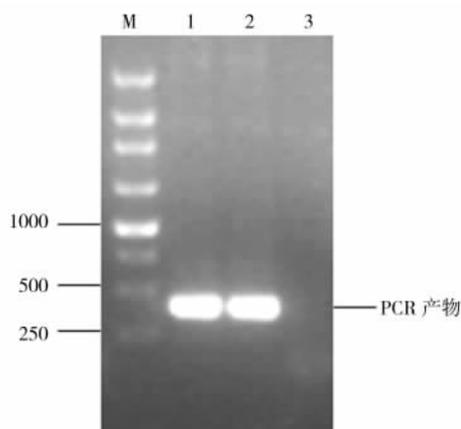
重组菌 (图 3)，确立为含 pGEX-4T-1/gG-1 重组质粒的阳性菌。

### 2.4 鉴定

2.4.1 双酶切鉴定 初步确立的阳性质粒，经 EcoR I 和 Sal I 双酶切后，可见约 4 900 bp 的载体片段和约 394 bp 的目的片段两条带 (图 4)，与理论片段大小相符。鉴定此菌确为含 pGEX-4T-1/gG-1 重组质粒的阳性菌。

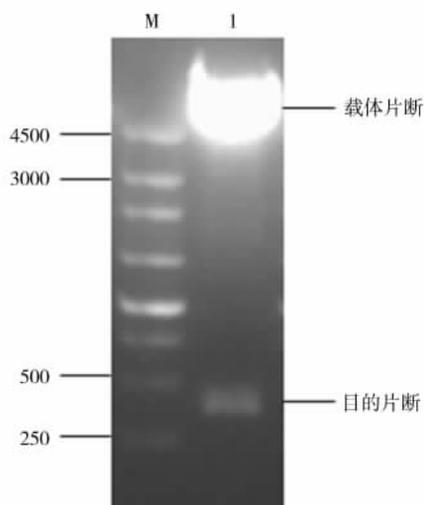


注：M：5  $\mu$ l 的 250 bp DNA Ladder Marker；1：2  $\mu$ l 的 PCR 扩增产物  
图 2 目的基因片段的 PCR 扩增



注：M：250 bp DNA Ladder Marker；1：用 PCR 扩增产物作模板的阳性对照；2：用含重组质粒的菌液作模板的试验组；3：用含载体质粒的菌液作模板的阴性对照

图 3 pGEX-4T-1/gG-1 重组质粒的 PCR 筛选



注：M：250 bp DNA Ladder Marker；1：重组质粒双酶切产物  
图 4 重组质粒的双酶切鉴定

2.4.2 测序鉴定 将鉴定含 pGEX-4T-1/gG-1 重组质粒的阳性菌送上海生工生物工程技术有限公司进行 DNA 测序，用 DNASTAR 软件中的 MegAlign 程序将测序结果（图 5）与 GenBank：AF120934.1 中已公布的 gG-1 基因序列进行比对分析，结果显示重组质粒的 DNA 序列与 GenBank：AF120934.1 基因序列的相应部分基本相符（吻合率为 96.1%），且阅读框架正确。

### 3 讨论

HSV 是广泛感染人类的一种病毒，无论是发展中国家还是发达国家，自然感染率都相当高（在中国感染率高达 80%~90%<sup>[5]</sup>）。鉴于 HSV 是导致胎儿先天畸形和死亡的 TORCH 病原体之一，感染后的临床症状又与带状疱疹、脓疱疹、手足口病类似，且约有 10% 的感染者无明显症状<sup>[5]</sup>，极易漏诊、误诊，因此临床上多借助实验室检测技术对血清中 HSV 抗体进行检测，以准确诊断 HSV 感染。

目前，国内检测 HSV 抗体的试剂盒，多以 HSV 病毒培养物粗提液为检测抗原，抗原的纯度和专一性直接影响检测的灵敏性和特异性，这是造成不同厂家（甚至同一厂家不同批次）检测试剂盒之间，结果存在差异的主要原因<sup>[6]</sup>。另外，由于 HSV 两型之间的核苷酸序列约有 83% 的同源性，某些蛋白氨基酸序列的同源性甚至高达 85%，两型之间不可避免地存在血清学交叉反应，因此根本无法做到准确的分型诊断<sup>[7]</sup>。国际上，虽已有几家大型生物公司（如 Focus、Trinity、Sigma 等）研制并生产了用型特异性基因工程抗原做检测抗原的分型诊断试剂盒，但进口试剂盒价格昂贵，限制了在国内基层医院的广泛应用。

gG 是 HSV 型特异性的糖蛋白，也是 HSV 体液免疫应答的主要靶位，是 HSV 型特异性血清学检测的最佳抗原<sup>[3]</sup>。美国疾病控制中心在 2002 年颁布的性传播疾病的防治方针中已推荐基于 gG-2 的型特异性血清学检测可用于诊断 HSV-2 的感染<sup>[8]</sup>，国外上市的 HSV 血清学分型诊断试剂盒也均是以 gG 为基础研制开发的。研究认为，使用多肽做抗原比使用完整的蛋白（gG、gD）作抗原有更好的灵敏性和特异性<sup>[9,10]</sup>。因此，本研究利用生物软件从全长的 gG-1 氨基酸序列中筛选出强抗原决定簇较集中的部分（其中包含了 gG-1 免疫优势氨基酸序列<sup>[11]</sup>），构建并鉴定了其重组原核表达载体，为进一步研制用相应的重组蛋白多肽代替传统全病毒作检测抗原的国产分型诊断试剂盒提供了依据。

### 参考文献：

[ 1 ] 黄涛, 严华. 单纯疱疹病毒包膜糖蛋白的结构及功能研究[J]. 微生物学免疫学进展, 2009, 37 (3): 59-62.  
[ 2 ] Liljeqvist JA, Svennerholm B, Bergstrom T. Conservation of type-specific B-cell epitopes of glycoprotein G in clinical herpes simplex virus type 2 isolates [J]. J Clin Microbiol, 2000, 38 (12): 4517-4522.  
[ 3 ] Liljeqvist JA, Trybala E, Svennerholm B, et al. Localization of type-specific epitopes of herpes simplex virus type 2 glycoprotein G recognized by human and mouse antibodies [J]. J Gen Virol, 1998, 79 (5): 1215-1224.  
[ 4 ] Grabowska AC, Jameson P, Laing S, et al. Identification of type specific domains within glycoprotein G of herpes simplex virus type 2 (HSV-2) recognized by the majority of patients infected with HSV-2, but not by those infected with HSV-1 [J]. J Gen Virol,

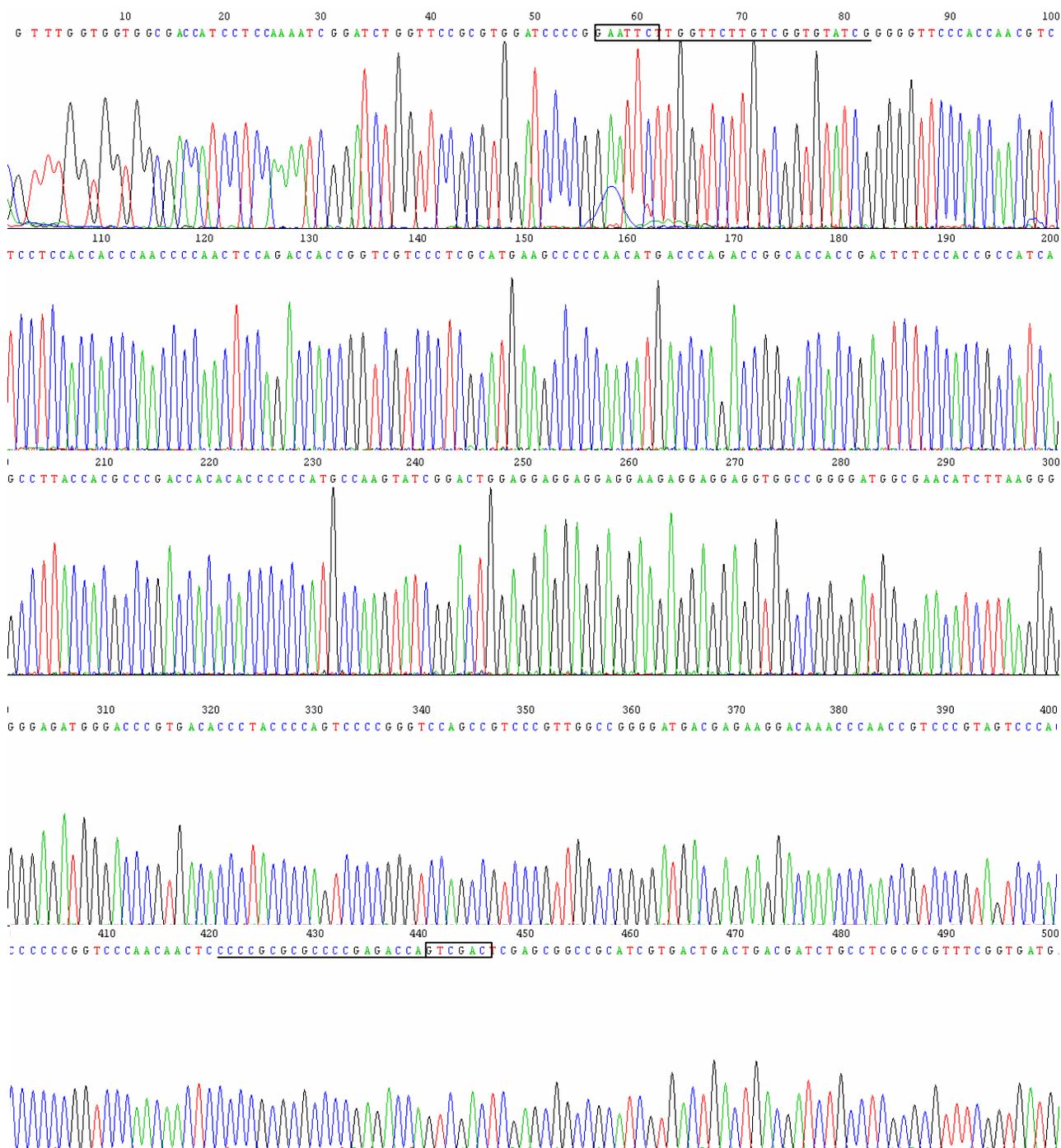


图 5 pGEX-4T-1/gG-1 重组质粒的 DNA 测序结果

1999, 80: 1789-1798.

[ 5 ] 赵玉坤. 医学微生物学[M]. 沈阳: 中国医科大学出版社, 2003. 78.

[ 6 ] Van-Dyck E, Buve A, Weiss HA, et al. Performance of commercially available enzyme immunoassays for detection of antibodies against herpes simplex virus type 2 in African populations [J]. J Clin Microbiol, 2004, 42 (7): 2961-2965.

[ 7 ] Us D. Herpes simplex virus vaccine studies: from past to present [J]. Mikrobiyol Bul, 2006, 40 (4): 413-433.

[ 8 ] Celum C, Levine R, Weaver M, et al. Genital herpes and human immunodeficiency virus: double trouble [J]. Bull World Health Organ, 2004, 82 (6): 447-453.

[ 9 ] Levi M, Ruden U, Carlberg H, et al. The use of peptides from

glycoproteins G-2 and D-1 for detecting herpes simplex virus type-2 and type-common antibodies [J]. J Clin Virol, 1999, 12 (3): 243-252.

[ 10 ] Oladejo DK, Klapper PE, Marsden HS. Peptide based enzyme-linked immunoassays for detection of anti-HSV-2 IgG in human sera [J]. J Virol Methods, 2000, 87 (1-2): 63-70.

[ 11 ] Tunback P, Liljeqvist JA, Lowhagen GB, et al. Glycoprotein G of herpes simplex virus type 1: identification of type-specific epitopes by human antibodies [J]. J Gen Virol, 2000, 81 (4): 1033-1040.

(收稿日期: 2010-01-08)