

HSV-1 重组糖蛋白 G 的表达、纯化及活性鉴定

周蓓¹, 黄涛², 林连成³

(1.广东医学院附属南山医院中心实验室, 广东 深圳 518052; 2.深圳市赛芯生物技术研究所; 3.深圳市赛尔生物技术有限公司)

摘要:目的 对构建的 pGEX-4T-1/gG-1 重组质粒进行诱导表达, 并纯化、鉴定表达的目的蛋白。方法 用最佳诱导条件对重组质粒进行诱导表达, 表达产物经 SDS-PAGE 电泳检测验证后, 对存在于超声离心后上清液中的融合蛋白用亲和层析技术进行纯化, 并用 ELISA 间接法对纯化的 GST/gG-1 融合蛋白进行灵敏性和特异性等生物活性的初步鉴定。结果 目的蛋白经诱导后表达于上清中, 初步鉴定纯化的目的蛋白保留了天然蛋白原有的生物活性。结论 GST/gG-1 融合蛋白的获得, 为研制以重组蛋白代替传统的全病毒作为检测抗原的新型 HSV-1 型特异性免疫学检测试剂盒奠定了基础。

关键词:单纯疱疹病毒; 糖蛋白 G; 表达; 纯化; 鉴定

中图分类号: R752.1 文献标志码: A 文章编号: 1003-8507(2012)05-1207-03

Expression construction and identification of procaryotic vector of gG-1

ZHOU Bei*, HUANG Tao, LIN Lian-cheng.

*Central Laboratory, Nanshan Hospital of Guangdong Medical College, Shenzhen, Guangdong 518052, China

Abstract: **OBJECTIVE** To induce the pGEX-4T-1/gG-1, and then purify and identify the expressed Protein. **METHODS** The recombinant plasmid was induced with the optimum condition, and then the expressed production was identified by SDS-PAGE. The recombinant strain was lysed by ultrasonic wave and harvested by centrifugation. Then the supernatant was purified by affinity chromatography, and the sensitivity and specificity of GST/gG-1 protein was initiatorly identified by indirect ELISA. **RESULTS** The interested protein was in the supernatant, and it remained the biological activity of native protein. **CONCLUSION** The successful expression of GST/gG-1 protein lays a good foundation for the research of new type-specific serological detection of HSV-1.

Key words: Herpes simplex virus; Glycoprotein G; Expression; Purification; Identification

单纯疱疹病毒 (herpes simplex virus, HSV) 属于疱疹病毒科 α 疱疹病毒亚科, 是 TORCH 综合症的病原体之一。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^[1]包膜糖蛋白中, 糖蛋白 G (glycoprotein 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^[2], 是 HSV 型特异性免疫学检测的最佳抗原^[3]。gG 作为型特异性抗原, 在免疫学检测及疫苗研制方面的应用前景已引起广泛关注^[4-7]。本研究, 对本室之前构建并鉴定的 pGEX-4T-1/gG-1 重组质粒, 进行了目的蛋白的诱导表达, 并进行了亲和纯化和初步活性鉴定, 为下一步研制 HSV-1 型特异性免疫学检测试剂盒奠定了基础。

1 材料与方 法

1.1 材 料

含 pGEX-4T-1 载体质粒的基因工程菌 BL₂₁ (DE₃) 由本室保存; 含 pGEX-4T-1/gG-1 重组质粒的基因工程菌 BL₂₁ (DE₃) 由本室构建并保存; 蛋白质分子量标准 (宽) 购自宝生物工

程 (大连) 有限公司; “High-Affinity GST Resin (L00207)” 试剂盒购自 GenScript 公司; Mouse anti-human IgG/HRP 购自 Sigma 公司; 8 份标准血清 (HSV-1 \oplus & HSV-2 \ominus 、HSV-1 \ominus & HSV-2 \ominus 、HSV-1 \oplus & HSV-2 \oplus 、HSV-1 \ominus & HSV-2 \oplus 各 2 份) 均购自 Trinity 公司。

1.2 方 法

1.2.1 重组质粒的诱导表达 分别将转化有 pGEX-4T-1/gG-1 重组质粒和 pGEX-4T-1 载体质粒的大肠杆菌 BL₂₁ (DE₃), 以确立的最佳诱导条件 (A_{600} =0.5~0.7、IPTG 终浓度为 1 mmol/L、37 $^{\circ}$ C 诱导培养 4 h) 进行目的蛋白的诱导表达, 产物经 12% SDS-PAGE 电泳, 观察蛋白表达情况。

1.2.2 表达产物的存在形式 将诱导后的菌液以冰浴超声波法^[8]进行细菌破碎, 超声离心后上清和沉淀分别进行 SDS-PAGE 电泳, 确立目的蛋白的表达形式。

1.2.3 表达产物的纯化 在证实目的蛋白均以可溶性形式表达后, 以 GenScript 公司的 “High-Affinity GST Resin (L00207)” 试剂盒, 用亲和层析技术^[9], 对存在于上清中的目的蛋白进行纯化。

1.2.4 重组蛋白的活性鉴定 分别用纯化的 GST/gG-1 融合蛋白和 GST 蛋白作包被抗原, 以预先确立的最佳反应模式 (蛋白包被浓度为 30 ng/孔、Mouse anti-human IgG/HRP 的使用浓度为 1:10 000), 用 ELISA 间接法对 8 份标准血清进行检测, 初步分析重组蛋白的生物活性。

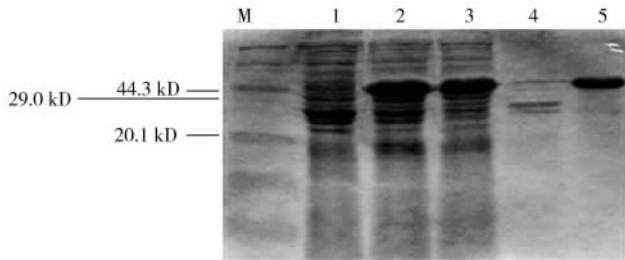
作者简介: 周蓓 (1963-), 女, 药理学学士, 主任药师, 研究方向: 临床药学及分子生物学

通讯作者: 黄涛, 硕士, 研究方向: 病毒分子生物, E-mail: taoshengyijiu929@yahoo.com.cn

2 结果

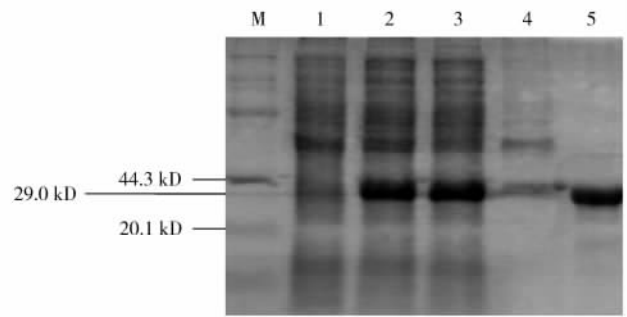
2.1 重组质粒的诱导表达及纯化

经 12% SDS-PAGE 电泳发现, 含 pGEX-4T-1/gG-1 重组质粒的 BL₂₁ (DE₃) 经诱导后表达相对分子质量约为 39 kD 的 GST/gG-1 融合蛋白 (图 1), 含 pGEX-4T-1 载体质粒的 BL₂₁ (DE₃) 经诱导后表达相对分子质量约为 26 kD 的 GST 蛋白 (图 2), 与预期结果相符; GST/gG-1 融合蛋白和 GST 蛋白均以可溶性蛋白形式存在于超声离心后的上清中 (图 1、图 2); GST/gG-1 融合蛋白和 GST 蛋白经亲和纯化后蛋白纯度极高, 几乎无杂蛋白存在 (图 1、图 2)。



注: M. 蛋白质分子量标准 (宽); 1. 未诱导的 pGEX-4T-1/gG-1 重组质粒; 2. 诱导的 pGEX-4T-1/gG-1 重组质粒; 3. 超声裂解诱导产物的离心上清; 4. 超声裂解诱导产物的离心沉淀; 5. 纯化后的 GST/gG-1 融合蛋白。

图 1 重组质粒表达、纯化的 SDS-PAGE 分析



注: M. 蛋白质分子量标准 (宽); 1. 未诱导的 pGEX-4T-1 载体质粒; 2. 诱导的 pGEX-4T-1 载体质粒; 3. 超声裂解诱导产物的离心上清; 4. 超声裂解诱导产物的离心沉淀; 5. 纯化后的 GST 蛋白。

图 2 载体质粒表达、纯化的 SDS-PAGE 分析

2.2 重组蛋白的活性鉴定

8 份标准血清以 1 : 100 稀释后, 用 ELISA 间接法检测, 结果显示 GST/gG-1 融合蛋白能将 4 份 HSV-1⊕ 标准血清 (HSV-1⊕ & HSV-2⊖、HSV-1⊕ & HSV-2⊕ 各 2 份) 全部检出, 且与 4 份 HSV-1⊖ 标准血清 (HSV-1⊖ & HSV-2⊖、HSV-1⊖ & HSV-2⊕ 各 2 份) 无非特异性反应 (表 1); 而 GST 蛋白与所有血清均无非特异性反应。见表 1。

表 1 ELISA 间接法对 8 份标准血清的检测

Table with 4 columns for antigen types and 2 sub-columns for each, showing positive (+) and negative (-) results for GST/gG-1 fusion protein and GST protein.

注: “⊕”表示阳性结果; “⊖”表示阴性结果。

3 讨论

外源蛋白表达系统, 按表达载体的不同, 分为原核表达系统和真核表达系统。原核表达系统的优点在于能够在较短时间内获得基因表达产物, 且产量较高, 成本较低; 缺点在于: ① 目的蛋白常以包涵体形式表达, 导致产物纯化困难。② 翻译后的加工修饰系统不完善, 使得表达的蛋白与天然蛋白的构象差距较大, 生物学活性较低。真核表达系统与原核表达系统相比, 虽然在翻译后的加工修饰方面有较大优势, 但是由于操作复杂、产量较低、成本较高, 却难以在实际生产中普及[10]。

pGEX-4T-1 质粒载体是一种带有 tac 启动子的原核表达载体, 可以高效地以融合蛋白的形式表达插入的外源基因。目的蛋白以与质粒载体本身编码的蛋白融合的形式表达, 具有以下优越性[11]:

- ① 克隆的外源真核基因在大肠杆菌内的有效翻译, 不仅取决于核糖体结合位点的存在与否, 而且同样也受到编码区起点的核苷酸序列的影响。这可能是由于链内碱基配对所形成的二级结构干扰了核糖体同其结合位点之间的接触, 而如果该区段完全是由天然的大肠杆菌序列构成, 这种情况就可能避免。
② 在融合蛋白的起始部位存在着大肠杆菌的多肽片段, 可使目的蛋白稳定, 免受寄主胞内酶的降解作用, 因而可以得到较高的产率。与此相反, 若是没有大肠杆菌的多肽片段, 外源蛋白质则往往会被寄主胞内酶所降解。
③ 融合蛋白中的大肠杆菌多肽片段, 有可能构成一种信

号肽指导大肠杆菌将融合蛋白分配到细胞的正确部位。如果这样的信号肽是由某种细胞蛋白衍生而来 (例如 ompA 或 malE 基因的产物), 那么重组的融合蛋白本身就可能输送到周围的培养基, 或是细胞内膜和外膜的周质间隙。

④ 融合蛋白中的大肠杆菌多肽片段, 使得我们能够使用亲和层析技术分离纯化融合蛋白质, 为实际生产中大量、简便、快速地获得高纯度的重组蛋白提供可能。

通过对纯化的 GST/gG-1 融合蛋白生物活性的初步鉴定, 发现重组蛋白可以特异性的与 HSV-1⊕ 标准血清发生反应, 而不与 HSV-1⊖ 标准血清发生非特异性反应, 初步说明虽然原核表达系统在蛋白表达后期缺乏糖基化、磷酸化等修饰过程, 但我们表达的重组蛋白却保留了 gG-1 天然蛋白相应的生物活性, 且融合蛋白中 GST 的存在对检测的灵敏性和特异性无影响 (GST 蛋白与所有标准血清均无非特异性反应)。GST/gG-1 融合蛋白的获得, 不仅对提高目前 HSV-1 免疫学检测的灵敏性和特异性具有重要实用价值, 同时对研制 HSV-1 基因工程疫苗也具有重要指导意义。接下来, 我们将加大标准血清样本量, 对重组蛋白进行更进一步的活性鉴定, 以期最终开发出以重组蛋白代替传统的全病毒作为检测抗原的新型 HSV-1 型特异性免疫学检测试剂盒。

参考文献

(下转第1213页)

表 1 不同性别和不同 HIV 诊断时间的 HIV/TB 合并率比较 (×10⁻²)

分组	HIV 感染者人数	HIV 合并结核数	合并感染率	χ ² 值	P 值
性别				1.55	0.213
男性	65	31	32.3		
女性	11	2	15.4		
HIV 诊断时间				76.365	0.000
短期	43	0	0.0		
中期	31	6	16.2		
长期	2	27	93.1		

表 2 不同 HIV 感染者诊断时间与 CD₄ 结果

分组	HIV 感染者人数 (例)	CD ₄ 细胞均数 ± 标准差 (个/mm ³)
短期	43	462.6 ± 95.9
中期	37	346.1 ± 104.9
长期	29	170.5 ± 69.0
合计	109	345.3 ± 148.9

在 109 例 HIV 感染者中, HIV 感染诊断时间最长 15 年, 最短 0.5 年, 平均 4.1 年; 其中合并肺结核共 33 例, 肺结核诊断时间最长 6 年, 最短 1 年, 平均 3.1 年。CD₄ 细胞均数与 HIV 感染诊断时间和肺结核诊断时间负相关, 见表 3。

表 3 CD₄ 细胞、HIV 诊断时间和结核诊断时间的相关分析

因素	CD ₄ 细胞均数 (个/mm ³)	HIV 感染诊断时间	肺结核诊断时间
CD ₄ 细胞均数	—	-0.801*	-0.786*
HIV 感染诊断时间	—	—	0.829*
肺结核诊断时间	—	—	—

3 讨论

我国是世界上结核病疫情严重的国家, 全国有 5 亿以上人口感染结核分枝杆菌 (MTB), 活动性结核病患者有 600 多万,

其中排菌的传染性肺结核为 200 万, 每年新发结核患者 113 万, 因结核病死亡者达 25 万^[1]。当前我国 HIV 感染状况同样不容乐观, 呈加速流行趋势, 在 31 个省市自治区全都发现了 HIV 感染者。

本研究结果表明, HIV 感染后, 病毒主要侵犯和破坏辅助性 T 淋巴细胞 (即 CD₄T 淋巴细胞), 使机体细胞免疫功能受损, 最后并发各种严重的机会性感染; 因此 HIV 感染的短、中、长期患者, CD₄ 细胞随着时间变长进行性下降。通过本文 29 例 HIV 感染长期 (6 年以上) 患者发现, CD₄ 细胞均数为 170.5 个/mm³ (CD₄ 细胞均数 < 200 个/mm³), 相比短、中期细胞均数明显下降, 因此 CD₄ 细胞均数可为 HIV 感染时间分期提供重要的临床参考。

本研究还发现, HIV 感染合并肺结核患者, CD₄ 细胞均数与 HIV 感染诊断时间、肺结核诊断时间负相关。说明不仅是 HIV 感染破坏辅助性 T 淋巴细胞, 肺结核感染也可能破坏淋巴细胞。张青和陈廷等研究结果表明, 肺结核患者的外周血 CD₄T 淋巴细胞均数低于健康组, 也证明了肺结核与 T 淋巴细胞有相关关系^[2,3]。原因是结核病患者免疫功能降低, CD₄T 淋巴细胞减少。而本研究结果表明 CD₄ 细胞均数与肺结核诊断时间呈负相关, 也证明了之前的研究结论。另外, 本研究中 CD₄T 淋巴细胞与 HIV 和肺结核感染高度相关也说明了 HIV 的感染时间越长, T 淋巴细胞数量减少越多, 免疫功能越低, 合并感染肺结核的可能性越大。

由该研究结论可知, CD₄ 细胞均数可为 HIV 感染时间分期提供重要的临床参考。另外, CD₄T 淋巴细胞均数与 HIV 感染诊断时间和合并肺结核诊断时间有密切的相关, 医疗机构及相关部门应考虑加大对 HIV 感染时间长的患者, 进行中常规筛查肺结核, 防止双重感染加重病情, 降低患者的病死率。

参考文献

[1] 马琦, 朱莉贞. 结核病 [M]. 北京: 人民卫生出版社, 2006. 33: 436.
 [2] 张青, 肖和平, 粟波. 肺结核患者外周血 CD₄CD₊ (25) ~ (high) T 细胞的临床意义初探 [J]. 中国防痨杂志, 2011, 33: 95-98.
 [3] 陈廷, 聂尚丹, 赵建磊, 等. 肺结核患者免疫功能状态的研究 [J]. 中国疾病控制杂志, 2011, 15: 381-383.

收稿日期: 2011-03-06

(上接第 1208 页)

[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]. 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]. 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]. Gen Virol, 1999, 80: 1789-1798.
 [5] 郑秀峰, 韩金祥. 单纯疱疹病毒研究现状 [J]. 中国麻风皮肤病杂

志, 2008, 24 (5): 370-373.
 [6] Parker JN, Pfister LA, Quenelle D, et al. Genetically engineered herpes simplex viruses that express IL-12 or GM-CSF as vaccine candidates [J]. Vaccine, 2006, 24 (10): 1644-1652.
 [7] 刘莉, 于爱莲. 单纯疱疹病毒 2 型疫苗的研究进展 [J]. 泰山医学院学报, 2009, 130 (110): 804-808.
 [8] 陆健. 蛋白质纯化技术及应用 [M]. 北京: 化学工业出版社, 2005. 12-15.
 [9] 吴乃虎. 基因工程原理 (下册) [M]. 北京: 科学出版社, 2001. 142-143.
 [10] 王正茂, 李琳, 管文燕, 等. 单纯疱疹病毒 I 型糖蛋白 D 胞外区的真核表达及生物学活性分析 [J]. 生物工程学报, 2010, 26 (5): 657-663.
 [11] 吴乃虎. 基因工程原理 (下册) [M]. 北京: 科学出版社, 2001. 142-143.

收稿日期: 2010-11-30