

· 实验研究 ·

汉坦病毒 N 蛋白的重组表达及其用于 IgM 直接捕捉 ELISA 的建立和应用

朱函坪 姚芊芊 徐芳 翁景清 谢荣辉 陆群英 朱智勇 严杰

【摘要】 目的 克隆并表达汉坦病毒(HV)Z10 株(HV-Z10)N 蛋白(NP)编码基因,建立基于辣根过氧化物酶(HRP)标记重组 NP(rNP)的 rNP-IgM 直接捕捉 ELISA,检测肾综合征出血热(HFRS)患者血清并评价其检测效果。方法 PCR 扩增 HV-Z10 株 NP 编码基因,基因工程方法构建 NP 编码基因原核表达系统 pET28a-Z10N-*E. coli* BL21DE3。SDS-PAGE 了解 rNP 表达情况,离子交换法和 Ni-NTA 亲和层析法提纯 rNP。Western blot 检测 rNP 的特异性免疫反应性。建立 HRP 标记 rNP-IgM 直接捕捉 ELISA 检测 HFRS 患者血清样品,并与常规 HV-IgM 间接捕捉 ELISA 进行比较。结果 pET28a-Z10N-*E. coli* BL21DE3 高效表达 rNP。提纯 rNP SDS-PAGE 显示单一蛋白条带,HV-IgG 能有效识别 rNP 并与之结合。94.73% (90/95) HFRS 患者血清样品 rNP-IgM 直接捕捉 ELISA 检测结果阳性,HV-IgM 间接捕捉 ELISA 阳性率为 92.63% (88/95)。两种 IgM 捕捉 ELISAs 检测的 HFRS 患者血清样品 A_{450} 值分布及对多份不同稀释度血清检测的 A_{450} 均值变化均相似。结论 成功构建了 HV-Z10 株 NP 编码基因高效原核表达系统。所建立的 rNP-IgM 直接捕捉 ELISA 可作为 HFRS 简便、安全、敏感、特异的血清学诊断新方法。

【关键词】 汉坦病毒; N 蛋白; 重组表达; IgM 捕捉 ELISA

Study on the recombinant expression of Hantaan virus protein N and the establishment and application of rNP-IgM direct capture ELISA ZHU Han-ping*, YAO Ping-ping, XU Fang, WENG Jing-qing, XIE Rong-hui, LU Qun-ying, ZHU Zhi-yong, YAN Jie. *Department of Medical Microbiology and Parasitology, College of Medicine, Zhejiang University, Hangzhou 310058, China
Corresponding author: YAN Jie, Email: med_bp@zju.edu.cn

【Abstract】 Objective To clone the gene encoding nucleocapsid protein (NP) of hantavirus strain Z10 (HV-Z10), to construct its prokaryotic expression system as well as to establish a rNP-IgM direct capture ELISA based on HRP-labeled recombinant NP (rNP), in order to detect serum samples of patients suffering from hemorrhagic fever with renal syndrome (HFRS) and to evaluate the effects of detection. **Methods** Gene encoding NP of strain HV-Z10 was amplified by PCR and then its prokaryotic expression system pET28a-Z10N-*E. coli* BL21DE3 was constructed, using routine genetic engineering method. SDS-PAGE was applied to measure the expression of rNP and ion-exchange plus Ni-NTA-affinity chromatography was performed to purify the recombinant product. Western blot assay was used to determine the specific immuno-reactivity of rNP while HRP-labeled rNP-IgM direct capture ELISA was established to detect the serum samples from 95 cases of confirmed HFRS patients. The detection effect was compared with that by routine HV-IgM indirect capture ELISA method. **Results** pET28a-Z10N-*E. coli* BL21DE3 was able to express rNP with high efficiency. The purified rNP only showed a single protein fragment in the gel after SDS-PAGE. HV-IgG could efficiently recognize rNP and hybridize with the recombinant protein. 94.73% (90/95) of HFRS patients' serum samples were positively confirmed by rNP-IgM direct capture ELISA, while a positive rate of 92.63% (88/95) in the same samples was confirmed by HV-IgM indirect capture ELISA. The distributions of A_{450} values of the serum samples detected by the two IgM capture ELISAs as well as the changes of the A_{450} mean values from several serum samples with different dilutions were similar. **Conclusion** We successfully constructed a high efficient prokaryotic expression system of NP encoding gene of hantavirus strain HV-Z10. The rNP-IgM direct capture ELISA that established in this study could be used as a new serological test for HFRS diagnosis because of its simplicity, safety, with high sensitivity and specificity.

【Key words】 Hantavirus; Nucleocapsid protein; Recombinant expression; IgM antibody; Capture enzyme-linked immunosorbent assay

基金项目:浙江省科技厅重点科研资助项目(2005C23014);浙江省医药卫生科学研究基金资助项目(2006B020)

作者单位:310058 杭州,浙江大学医学院病原生物学系(朱函坪、严杰);浙江省疾病预防控制中心(姚芊芊、徐芳、翁景清、谢荣辉、陆群英、朱智勇)

通讯作者:严杰, Email: med_bp@zju.edu.cn

汉坦病毒(HV)感染引起的肾综合征出血热(HFRS)是全世界流行的病毒性传染病^[1,2],我国流行最为严重^[3]。尽管RT-PCR可用于HFRS的早期诊断^[4,5],但急性期患者因HV体内持续时间短、滴度低而难以检出^[6],故检测特异性抗体仍是目前HFRS的主要确诊方法^[7],主要有基于病毒抗原的HV-IgM捕捉ELISA法,但该方法操作繁琐、费时。因此,建立快速简便、安全、高敏感性和特异性的HFRS血清学诊断新方法有其重要意义。

HV属布尼亚病毒科^[8,9],其基因组为负单链RNA,含大(L)、中(M)和小(S)3个基因片段。其中L和M基因片段分别编码多聚酶、糖蛋白(glycoprotein, GP)GP1和GP2;S基因片段编码N蛋白(nucleocapsid protein, NP)^[8,10]。NP能诱导机体产生HV特异性IgM抗体^[11,12],因而是HFRS血清学诊断的必需抗原。不少国外学者构建了不同表达系统表达NP,以作为HFRS的血清学诊断抗原^[13-15]。本研究中,我们从我国用于生产HFRS灭活疫苗的HV-Z10毒株基因组克隆了S基因编码区并构建了NP原核表达系统^[16],以提纯的重组NP(rNP)为抗原,建立IgM直接捕捉ELISA,检测了95份HFRS患者血清,并对其检测效果与HV为抗原的常规IgM捕捉ELISA法(HV-IgM间接捕捉ELISA法)进行了比较。

材料与方 法

1. 血清样品:经IFA检测HV-IgG抗体阳性的95份HFRS血清来自2004-2006年浙江省各医院就诊的HFRS患者。发热非HFRS患者血清40份,60份对照血清样品来自健康体检者,IFA检测HV IgG抗体阴性。

2. NP原核表达系统的构建及rNP表达:采用自行设计的引物用于扩增S基因蛋白编码区:上游5'-CAAAGCTT(Hind III)CAA TGG CAA CTA TGG-3',下游5'-CACTCGAG(Xho I)TTC AAA GGC TCT TG-3'。以pUCm-Z10S为模板,DNA聚合酶PrimeSTAR HS DNA Polymerase(TaKaRa)用于PCR扩增,反应条件:95℃预变性5 min,95℃45 s,55℃45 s,72℃60 s,共30个循环,72℃保温10 min。扩增产物经琼脂糖凝胶电泳检测后,目的扩增片段用琼脂糖凝胶DNA回收试剂盒(Agarose Gel DNA Purification Kit, Sangon)回收,用T-A克隆试剂盒(Sangon)连接于pUCm-T并转化入*E. coli*

DH5a。经蓝白筛选、限制性内切酶(Fermentas)分析后获得含有目的基因的重组质粒pUCm-Z10N,测序(Sangon)后与原基因进行比较。Hind III和Xho I分别双酶切质粒pUCm-Z10N和表达质粒pET28a(Invitrogen),回收S基因编码区序列片段和线性化pET28a并连接,转化入*E. coli* BL21DE3,PCR筛选出阳性克隆,该重组表达质粒命名为pET28a-Z10N。pET28a-Z10N转化入感受态*E. coli* BL21DE3,构建原核表达系统pET28a-Z10N-*E. coli* BL21DE3。从平板上挑取单菌落,接种于100 ml含100 μg/ml卡那霉素的LB培养基中,37℃旋转培养增菌。当培养液光密度 A_{600} 约为0.9时,加入终浓度为1 mmol/L的IPTG,诱导rNP表达。以含有pET28a载体的菌同时表达作为阴性对照。

3. rNP鉴定和纯化:采用ELISA了解不同诱导时间对表达量的影响。于诱导1、3、5、7、9、12和16 h,各取样10 ml,测 A_{600} 值,离心收集细菌,以0.1 A_{600} 加20 μl PBS悬浮细胞,300 W超声破碎100 s,12 000 r/min离心10 min后收集上清和沉淀,上清用20 mmol/L Tris-HCl缓冲液(pH值8.0)以1:1000稀释后,37℃包被凹孔板2 h,洗板后,加1:2000稀释的HRP标记兔抗HV免疫血清^[17],37℃反应0.5 h,再次洗板后加显示液显色,测 A_{450} 值。离心收集IPTG诱导12 h的菌体,300 W超声破碎100 s,12 000 r/min离心10 min取上清,经0.45 μm微孔滤膜除去细菌碎片,滤过液过HisTrap DEAE离子交换柱(Amersham),收集流出液再过HisTrap 6×His亲和层析柱(Amersham)提纯rNP。将HV-rNP表达前、表达后及纯化后样品SDS-PAGE后用半干转印法将表达产物转移至硝酸纤维素膜,用含1% BSA、NaCl 150 mmol/L、20 mmol/L Tris-HCl封闭液(pH值7.5)室温作用1.5 h,再用1:2000稀释的HRP标记兔抗HV IgG室温作用2 h,充分洗涤后加TMB显色液避光显色10 min。

4. HRP标记rNP:参考改进后的过碘酸钠标记法^[18]。即5 mg HRP(Sigma)加0.5 ml双蒸水及0.5 ml 60 mmol/L NaIO₄反应20 min,加0.5 ml 0.16 mol/L乙二醇反应50 min,加预冷的2倍体积乙醇沉淀标记蛋白,2000 r/min离心10 min,取沉淀用0.5 ml 0.01 mol/L碳酸盐溶液(pH值9.5)溶解,加等体积浓度为1 mg/ml rNP,4℃反应过夜,次日加终浓度为5 mg/ml的NaBH₄ 0.2 ml,4℃反应4 h,加

pH 值 7.8 等体积饱和硫酸铵沉淀已标记的 rNP, 沉淀溶于 0.01 mol/L PBS (pH 值 7.4) 中, 并在相同浓度 PBS 溶液中透析过夜, 以去除剩余的硫酸铵, 即为 HRP 标记的 rNP (HRP-rNP), 加 40% 甘油后 -20℃ 保存备用。

5. 抗人 IgM 抗体及 HRP-rNP 工作浓度的确定: 以不同稀释度的羊抗人 IgM 抗体 (Sigma) 为包被抗体、1:100 稀释的患者血清及阴性对照血清各 3 份、不同稀释度的 HRP-rNP, 用棋盘测定法确定 HRP-rNP 最佳工作浓度, 阳性血清对阴性血清的 P/N > 2 为最佳羊抗人 IgM 抗体及 HRP-rNP 的工作浓度。

6. 不同 IgM 捕捉 ELISAs 对血清样品检测: ① HV-IgM 间接捕捉 ELISA 见文献 [19]。即 1:2000 稀释的羊抗人 IgM 抗体为包被抗体, 4℃ 孵育 16 h, 洗涤后加入 1:100 稀释的 HFRS 患者待检血清, 37℃ 孵育 1 h, 洗涤后加入 1:100 稀释的 HV 抗原, 37℃ 孵育 1 h。洗涤后加入 1:600 稀释的 HRP 标记兔抗 HV IgG, 37℃ 孵育 1 h, 洗涤后加显色液 37℃ 反应 5 min, 加终止液中止反应, 测定 A₄₅₀ 值。② rNP-IgM 直接捕捉 ELISA: 1:2000 稀释的羊抗人 IgM 抗体为包被抗体, 4℃ 孵育 16 h, 洗涤后加 1:100 稀释的 HFRS 患者待检血清, 37℃ 孵育 1 h, 洗涤后加入 1:1000 稀释的 HRP-rNP, 37℃ 孵育 1 h, 此后检测步骤与 rNP-IgM 间接捕捉 ELISA 相同。患者血清 A₄₅₀ 值 ≥ 2.1 × 阴性血清 A₄₅₀ 均值, 判定为阳性, 否则为阴性。

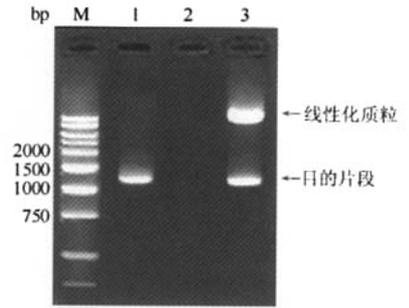
7. IgM 捕捉 ELISAs 检测效果比较: 用 rNP-IgM 直接或 HV-IgM 间接捕捉 ELISA 检测的 95 份 HFRS 患者血清样品, A₄₅₀ 值经 Excel 处理后形成点阵图, 以观察各样品检测值分布情况。另取 HFRS 患者血清和阴性对照血清各 3 份进行连续稀释, 观察 rNP-IgM 直接或 HV-IgM 间接捕捉 ELISA 检测值的变化情况。

结 果

1. S 基因编码区的扩增及其表达质粒的鉴定: S 基因编码区扩增及表达载体 pET28a-Z10N 酶切结果见图 1。测序结果表明, 克隆的 S 基因编码区与 pUCm-Z10S 中相应核苷酸序列同源性为 100%。

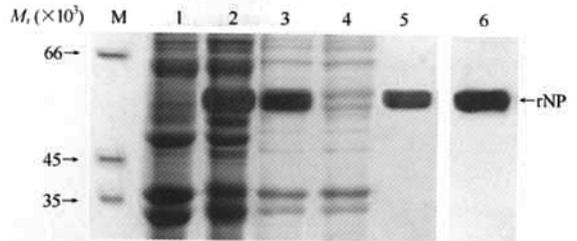
2. rNP 表达及提纯效果和免疫反应性: SDS-PAGE 和 Western blot 结果分别显示, 所构建的重

组表达系统 pET28a-Z10N-E. coli BL21DE3 能有效地表达目的重组蛋白 rNP, 主要存在于菌体超声裂解后离心收集的上清液中, 经提纯后可获得单一的 rNP 条带, rNP 能与 HFRS 患者 HV 抗体阳性血清发生免疫结合反应 (图 2)。根据 ELISA 结果, 1 mmol/L IPTG 诱导 12 h 和 16 h 时, rNP 表达量最高 (图 3)。



M: DNA 标准相对分子质量; 1: Z10 株 S 基因编码区扩增产物; 3: 重组表达质粒 pET28a-Z10N 酶切结果

图 1 汉坦病毒 HV-Z10 株 S 基因编码区扩增片段及其表达质粒核酸酶切结果



M: 蛋白标准相对分子质量; 1: 未诱导; 2: 诱导后; 3、4: 表达菌超声裂解后上清与沉淀; 5: 纯化的 rNP; 6: rNP Western blot 结果

图 2 rNP 表达和提纯效果及 Western blot 结果

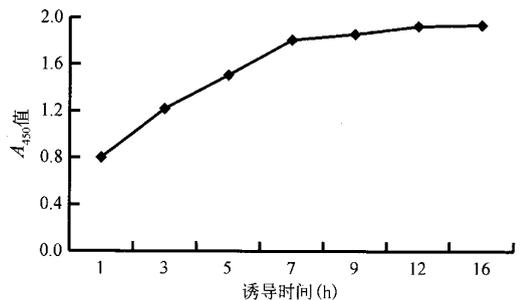
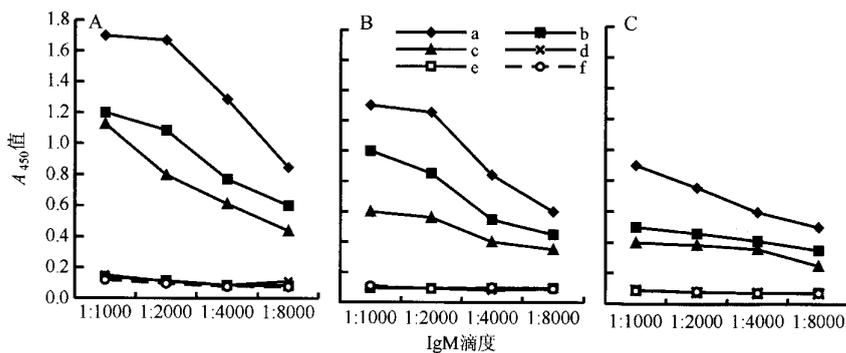


图 3 不同诱导时间对 rNP 表达量的影响

3. 抗人 IgM μ 链抗体和 HRP-rNP 最佳工作浓度: 抗人 IgM 抗体 1:2000 稀释、HRP-rNP 1:1000 稀释时, 其阳性血清对阴性血清 P/N > 2 (图 4)。



A~C:分别为 1:500, 1:1000 和 1:2000 稀释的 HRP-rNP; a~c:3 份汉坦病毒抗体阳性的患者血清; d~f:3 份汉坦病毒抗体阴性血清

图4 人 IgM 抗体和 HRP-rNP 最佳工作浓度

4. 不同 IgM 捕捉 ELISAs 检测 HFRS 血清标本: rNP-IgM 直接捕捉 ELISA 阴性对照血清 A_{450} 均值为 0.128, 故阳性判断标准值为 0.269; HV-IgM 间接捕捉 ELISA 阴性对照血清 A_{450} 均值为 0.110, 故阳性判断标准为 0.231。两种不同 IgM 捕捉 ELISA 法, 平行检测 HFRS 患者、发热非 HFRS 患者及健康人血清。95 份 HFRS 患者血清中, rNP-IgM 直接捕捉 ELISA 检出阳性率为 94.73% (90/95), HV-IgM 间接捕捉 ELISA 检出阳性率为 92.63% (88/95), 符合率为 97.78%。两种 IgM 捕捉 ELISAs 对发热非 HFRS 患者及健康人血清检测结果均为阴性。

5. 不同 IgM 捕捉 ELISAs 检测值的分布和变化: rNP-IgM 直接捕捉 ELISA 检测 95 份 HFRS 患者血清样品 A_{450} 值分布与 HV-IgM 间接捕捉 ELISA 相似, 但前法检测后 A_{450} 值较高的血清样品数略多于后者 (图 5)。rNP-IgM 直接捕捉 ELISA 与 HV-IgM 间接捕捉 ELISA 检测不同血清稀释度的 3 份 HFRS 患者 A_{450} 均值变化相似, 均随血清稀释度

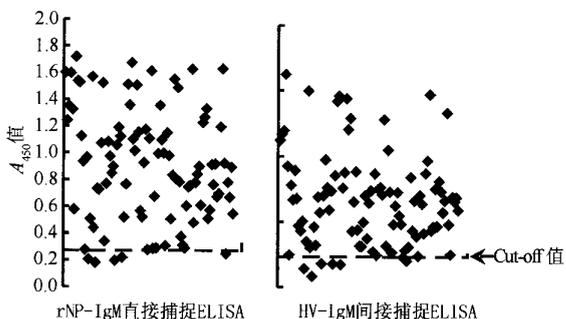


图5 不同 IgM 捕捉 ELISAs 检测 95 份 HFRS 患者血清样品 A_{450} 值的分布

增大而 A_{450} 均值有所下降, 但相同血清稀释度时, 前者 A_{450} 均值均略高于后者 (图 6)。

讨论

以 HV-Z10 株制成的 I 型 HFRS 疫苗投入实际应用已有 10 余年, 发现该株病毒抗原性较强且稳定^[17], 这是选择从 HV-Z10 株中克隆 S 基因编码区序列的依据。本研究扩增 S 基因编码区序列的模板为 pUCm-Z10S, 该重组质粒中全长 S 基因系从 HV-Z10 株基因组 RNA 中通过 RT-PCR 扩增、克隆并经测序证实。

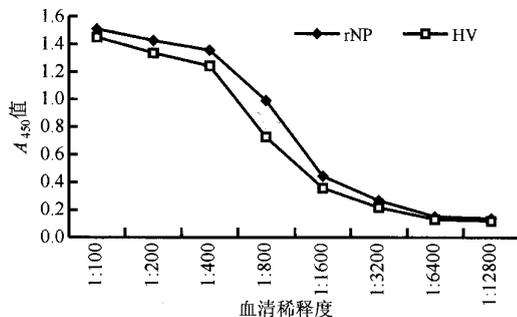


图6 rNP-IgM 或 HV-IgM 捕捉 ELISA 检测不同稀释度 HFRS 患者血清的 A_{450} 均值变化

我们采用基因工程技术, 成功地扩增、克隆了 HV-Z10 株 S 基因编码区序列并构建了原核表达系统。尽管扩增目的片段长达 1290 bp, 但测序结果证实, 所克隆的 S 基因编码区与原 S 基因相应区域的核苷酸序列同源性为 100%, 表明我们采用的 PCR 有较高的保真性。SDS-PAGE 结果表明, 若 IPTG 诱导约 12 h, 目的重组蛋白表达量较高, rNP 的高表达为后续实验及其进一步开发应用提供了有利条件。

有文献报道^[20], 大肠埃希菌表达的汉坦病毒普马拉型 rNP 与 β -半乳糖苷酶的融合蛋白, 不能被两株 HV 单抗所识别, 这可能是表达宿主细胞差异而导致该融合蛋白分子有不同的空间结构, 从而使 NP 某些抗原决定簇失去原有的作用。本研究中 Western blot 结果表明, HV-Z10 株 rNP 能与 HRP 标记兔抗 HV-Z10 株 IgG 发生很强的免疫结合反应, rNP 作为 IgM 直接捕捉 ELISA 抗原时, 也未发现

有漏检的阳性血清样品,这可能与 Western blot 中使用多克隆 IgG 抗体、以可溶性 rNP 为抗原、采用多种方法确保提取的 rNP 高纯度等因素有关。

本研究用 HRP 标记 rNP,建立了 rNP-IgM 直接捕捉 ELISA 检测新方法,并对部分 HFRS 患者血清进行了检测。目前 IgM 捕捉 ELISAs 通常采用间接法,并以血清 IgM ≥ 1:100 为阳性判断标准^[19],但目前尚无相应的商品化检测试剂盒。我们参照文献中基于 HV 抗原的 IgM 间接捕捉 ELISA^[19],用于对 rNP-IgM 直接捕捉 ELISA 检测效果进行比较。结果,两种 IgM 捕捉 ELISAs 法的符合率为 97.78%,阴性率为 100%,阳性率分别为 94.73% 和 92.63%,表明 rNP-IgM 直接捕捉 ELISA 与 HV-IgM 间接捕捉 ELISA 对 HFRS 患者血清样品具有相同的检测效果。

与 HV-IgM 间接捕捉 ELISA 比较,rNP-IgM 直接捕捉 ELISA 对不同血清稀释度的 HFRS 患者 A₄₅₀ 均值变化及 95 份 HFRS 患者血清样品 A₄₅₀ 值分布均与之相似,仅相同血清稀释度 A₄₅₀ 均值略高于 HV-IgM 间接捕捉 ELISA,A₄₅₀ 值较高的血清样品数也略多于 HV-IgM 间接捕捉 ELISA,显示了 rNP-IgM 直接捕捉 ELISA 检测的可靠性。此外,rNP-IgM 直接捕捉 ELISA 检测步骤较 HV-IgM 间接捕捉 ELISA 为少,也不需要培养活的病毒以获得抗原。因此,本研究中建立的 rNP-IgM 直接捕捉 ELISA 具有简便、安全、敏感、特异、可靠等优点,似可作为 HFRS 患者血清学诊断方法。

参 考 文 献

[1] Cosgriff TM. Mechanisms of disease in hantavirus infection: pathophysiology of hemorrhagic fever with renal syndrome. *Rev Infect Dis*,1991,13:97-107.

[2] Plyusnin A, Kruger DH, Lundkvist A. Hantavirus infections in Europe. *Adv Virus Res*,2001,57:105-136.

[3] Chen HX, Qiu FX, Dong BJ, et al. Epidemiological studies on hemorrhagic fever with renal syndrome in China. *J Infect Dis*, 1986,154:349-398.

[4] Ahn C, Cho JT, Lee JG, et al. Detection of Hantaan and Seoul viruses by reverse transcriptase-polymerase chain reaction (RT-PCR) and restriction fragment length polymorphism (RFLP) in renal syndrome patients with hemorrhagic fever. *Clin Nephrol*, 2000,53:79-89.

[5] Garin D, Peyrefitte C, Crance JM, et al. Highly sensitive TaqMan PCR detection of Puumala hantavirus. *Microbes Infect*,2001,3: 739-745.

[6] Hörling J, Lundkvist Å, Persson K, et al. Detection and subsequent sequencing of Puumala virus from human specimens by polymerase chain reaction. *J Clin Microbiol*,1995,33:277-282.

[7] Lee HW, G van der Groen. Hemorrhagic fever with renal syndrome. *Prog Med Virol*,1989,36:62-102.

[8] Schmaljohn CS, Hasty SE, Dalrymple JM, et al. Antigenic and genetic properties of viruses linked to hemorrhagic fever with renal syndrome. *Science*,1985,227:1041-1044.

[9] Lundkvist Å, Niklasson B. Hemorrhagic fever with renal syndrome and other hantavirus infections. *Rev Med Virol*,1994, 4:177-184.

[10] Elliott RM. Molecular biology of the Bunyaviridae. *J Gen Virol*, 1990,71:501-522.

[11] Zoller LG, Yang S, Gott P, et al. A novel capture enzyme-linked immunosorbent assay based on recombinant proteins for sensitive and specific diagnosis of hemorrhagic fever with renal syndrome. *J Clin Microbiol*,1993,31:1194-1199.

[12] Elgh FA, Lundkvist OA, Alexeyev G, et al. A major antigenic domain for the human humoral response to Puumala virus nucleocapsid protein is located at the amino-terminus. *J Virol Methods*,1996,59:161-172.

[13] Gott PL, Zoller S, Yang R, et al. Antigenicity of hantavirus nucleocapsid proteins expressed in *E. coli*. *Virus Res*,1991,19: 1-15.

[14] Schmaljohn CS, Chu YK, Schmaljohn AL, et al. Antigenic subunits of Hantaan virus expressed by baculovirus and vaccinia virus recombinants. *J Virol*,1990,64:3162-3170.

[15] Vapalahti O, Lundkvist A, Kallio-Kokko H, et al. Antigenic properties and diagnostic potential of Puumala virus nucleocapsid protein expressed in insect cells. *J Clin Microbiol*,1996,34:119-125.

[16] 朱智勇,傅桂明,翁景清,等. 自出血热病人分离到一株 EHF 病毒的特性. *浙江医学*,1984,6(6):1-3.

[17] 朱智勇,李岩金,陆群英,等. 双价肾综合征出血热沙鼠肾细胞灭活疫苗免疫效果观察. *中国媒介生物学及控制杂志*,1997,8 (5):377-380.

[18] 郭春祥,郭锡琼. 介绍一种简单、快速、高效的辣根过氧化物酶标记抗体的过碘酸钠法. *上海免疫学杂志*,1983,3 (2):97-100.

[19] Billecoq A, Coudrier D, Boue F, et al. Expression of the nucleoprotein of the Puumala virus from the recombinant semliki forest virus replicon: characterization and use as a potential diagnostic tool. *Clin Diagn Lab Immunol*,2003,10:658-663.

[20] Lundkvist Å, Björsten S, Niklasson B, et al. Mapping of B-cell determinants in the nucleocapsid protein of Puumala virus: definition of epitopes specific for acute immunoglobulin G recognition in humans. *Clin Diagn Lab Immunol*,1995,46(4): 293-303.

(收稿日期:2006-12-15)

(本文编辑:张林东)