

北海道型汉坦病毒核蛋白基因的克隆表达及其免疫原性

姚文荣 邹洋 李明慧 张永振

【摘要】目的 构建北海道型汉坦病毒(HOKV)核蛋白(NP)基因的重组杆状病毒表达载体,在昆虫细胞中表达出具有免疫原性的抗原,用于HOKV的检测及诊断。**方法** 应用RT-PCR方法扩增HOKV Fusong-Cr-247株的NP基因,并将该基因片段克隆到PCR[®]2.1TA载体,转化到One Short™TOP10感受态细胞构建TA克隆载体,并与pFastBac™1转座质粒载体分别用Kpn I和Not I双酶切,用T4连接酶连接,构建pFast PUUV-S重组转座质粒,经双酶切、PCR扩增及插入序列方向鉴定后,转化到DH10Bac™*E.coli*感受态细胞,经三抗培养基筛选和PCR扩增鉴定后获得重组Bacmid质粒,将重组Bacmid质粒转染Sf9昆虫细胞制备重组杆状病毒毒液,并继续扩增重组杆状病毒,以第三代毒液感染Sf9昆虫细胞,96 h后收获细胞,用间接免疫荧光(IFA)、SDS-PAGE和Western blot对表达产物进行鉴定和分析。**结果** 实验应用Bac-to-Bac™杆状病毒表达系统,成功构建了含普马拉类汉坦病毒核蛋白基因的重组杆状病毒表达载体,并在昆虫细胞中获得表达。IFA结果显示,感染细胞的胞浆中有亮绿色荧光颗粒,SDS-PAGE和Western blot检测细胞表达产物的 $50 \times 10^3(M_r)$ 的蛋白条带,证实重组病毒感染昆虫细胞后表达了相应的重组核蛋白,与预计的结果相符。并能与抗汉坦病毒抗体结合。**结论** 成功表达具有HOKV免疫原性及反应性的重组核蛋白,为研制HOKV的诊断试剂奠定了基础。

【关键词】 汉坦病毒;北海道病毒;核蛋白;杆状病毒表达系统

Cloning and expression of the nucleoprotein gene of Puumala-like virus YAO Wen-rong, ZOU Yang, LI Ming-hui, ZHANG Yong-zhen. National Institute for Communicable Disease Control and Prevention, Chinese Center for Disease Control and Prevention, Beijing 102206, China
Corresponding author: ZHANG Yong-zhen, Email: yongzhenzhang@sohu.com

【Abstract】Objective In order to detect Hokkaido virus (HOKV), a recombinant baculovirus containing the nucleoprotein (NP) gene of HOKV was constructed, and then the NP was expressed in insect cell. **Methods** The NP gene was cloned into plasmid PCR[®]2.1TA vector and then was ligated into baculovirus donor plasmid pFastBac™1 after cutting by the restriction enzyme Kpn I and Not I. pFastBac™1 was subsequently transferred into the One Short™TOP10 competent cells and then into DH10Bac™*E.coli* competent cells, which contained the baculovirus shuttle vector (Bacmid) and the helper plasmid to generate a recombinant bacmid. **Results** The NP gene was successfully expressed in Sf9 insect cell. The expressed recombinant nucleoprotein had been identified in the Sf9 insect cell by indirect immunofluorescence assay, sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) and Western blot. The results showed that the recombinant nucleoprotein appeared a molecular weight of $50 \times 10^3 M_r$, and could reacted with anti-recombinant Puumala virus (PUUV) nucleocapsid monoclonal antibodies and polyclonal antibodies against hantavirus. **Conclusion** Our results indicated that the recombinant nucleoprotein was successfully expressed and having the immunogenicity and reactivity of natural nucleoprotein of HOKV.

【Key words】 Hantavirus; Hokkaido virus; Nucleoprotein; Baculovirus expression system

普马拉病毒(PUUV)属于布尼亚病毒科的汉坦病毒属(HV),广泛流行于欧洲及俄罗斯^[1]。在日本及韩国发现的PUUV类病毒分别命名为北海道病毒

(HOKV)和Muju病毒(MUJV)^[2-5]。2006年在我国吉林省抚松地区棕背鼠中发现HOKV^[6]。PUUV类病毒能引起临床症状较轻的肾综合征出血热(HFRS)^[7]。然而由于缺少特异性的诊断试剂,至今我国还未能明确是否存在由HOKV引起的HFRS临床病例。PUUV类病毒属于分节段的单股负链RNA病毒,由大(L)、中(M)、小(S)三个基因片段组成,分别编码RNA聚合酶、糖蛋白(Gn和Gc)以及核蛋白

DOI: 10.3760/cma.j.issn.0254-6450.2009.02.018

基金项目:国家“十五”科技攻关计划资助项目(2003BA712A08-02)

作者单位:102206 北京,中国疾病预防控制中心传染病预防控制所

姚文荣与邹洋同为第一作者

通信作者:张永振,Email:yongzhenzhang@sohu.com

(NP)。其中 S 基因编码的 NP 抗原性稳定,各毒株间的差异较小,常作为研制 PUUV 类病毒诊断试剂的首选蛋白,并且重组 NP 与天然 NP 在免疫原性和免疫反应性方面具有一致性^[8]。为此本研究将 HOKV Fusong-Cr-247 株的 NP 基因克隆到 pFastBacTM1 表达载体上,构建了重组杆状病毒表达载体,并在 Sf9 昆虫细胞中成功表达;现将结果报道如下。

材料与方法

1. 细胞和病毒: Sf9 昆虫细胞和 Grace's 细胞培养液购于 GIBCO-BRL 公司; HOKV Fusong-Cr-247 株的 S 基因克隆由本实验室保存^[6]。

2. 菌株和质粒: PCR[®]2.1TA 克隆载体、One ShotTMTOP10 感受态细胞,以及 Bac-to-BacTM 杆状病毒表达系统 (pFastBacTM1 转座质粒载体和 DH10BacTME.coli 感受态细胞) 购于 Invitrogen 公司。

3. 试剂和工具酶: 限制性内切酶 Not I、T4 DNA 连接酶、转染试剂 CellFECTIN、Bluo-Gal 和 S.N.A.P TM.MidiPrep Kit 购于 Invitrogen 公司; Taq DNA 聚合酶、AMV 反转录酶和限制性内切酶 Kpn I 购于 Promega 公司; Trizol 购于 GIBCO-BRL 公司; 兔抗汉城型汉坦病毒 (SEOV) 抗体由本研究室自制, 抗重组 PUUV 核蛋白单克隆抗体购自 American Research Products 公司, 荧光素标记的羊抗兔 IgG-HRP、羊抗鼠 IgG-HRP 购自美国 Sigma 公司; DNA Marker DL 2000、λ Hind II digest Marker、TaKaRa Agarose Gel DNA Purification Kit Ver.2.0 和 TaKaRa Mini BSET Plasmid Purification Kit Ver.2.0 购自宝生物公司。

4. Fusong-Cr-247 株 NP 基因重组杆状病毒的构建:

(1) Fusong-Cr-247 株病毒的扩增: 根据 PMD18T-Fusong-Cr-247 TA 克隆质粒中 HOKV HP 基因的核苷酸序列^[6], 设计带有 Not I 和 Kpn I 酶切位点的引物 PuY1 和 PuY2, 扩增 NP 基因的开放读码框。

(2) 重组转座质粒的构建: 分析酶切位点, 选用 Not I 和 Kpn I 限制性内切酶双酶切, 将 pFastBac HOKV-S 上的目的基因定向克隆到 pFastBacTM1 转座质粒载体, 连接产物转化 One ShotTMTOP10 感受态细胞, 涂布含有氨苄抗生素的 LB 平板, 37℃ 培养过夜。筛选阳性克隆, 少量提取质粒, 用特异性引物进行 PCR 扩增, 并经双酶切鉴定阳性重组转座质粒, 命名为 pFastBac HOKV-S。

(3) 重组穿梭质粒的构建: 将 pFastBac HOKV-S 转化 DH10BacTME.coli 感受态细胞, 涂布含有卡那霉素、庆大霉素、四环素、IPTG 和 Bluo-gal 的 LB 平板, 37℃ 培养 48 h。蓝白斑筛选单个阳性克隆菌落, 重新划线经卡那霉素、庆大霉素、四环素三重选择后确定阳性克隆, 挑取单个菌落 SOC 培养液 37℃ 培养过夜, 用 S.N.A.P TM.MidiPrep Kit 大量提取质粒, 扩增用的特异引物和 M13 Forward (-40) and M13 Reverse 引物分别进行 PCR 检测, 确定阳性穿梭质粒, 命名为 Bacmid HOKV-S。

5. 重组杆状病毒的获得及在 Sf9 昆虫细胞中的表达: 按照 Bac-to-Bac 表达系统说明书, 将 Bacmid HOKV-S 转染处于对数生长期、活度 > 98%、倍增时间 < 24 h 的 Sf9 细胞, 27℃ 培养 4~7 d 后, 收获第一代重组杆状病毒毒液。继续扩增重组杆状病毒, 采用空斑试验确定重组杆状病毒滴度。以第三代重组杆状病毒毒液感染 Sf9 昆虫细胞, 27℃ 培养 96 h。

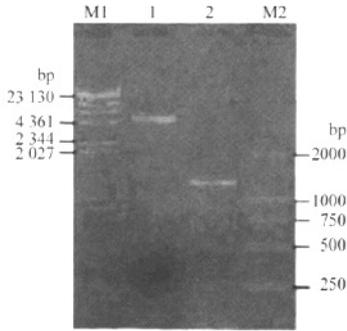
6. NP 基因表达产物的检测: 用间接免疫荧光方法 (IFA) 检测感染重组杆状病毒的细胞是否表达目的 HOKV NP^[9]。冷丙酮固定细胞刮片, 吹干, 加抗 PUUV 重组 NP 单克隆抗体, 37℃ 孵育 30 min, 洗涤后加荧光素标记的羊抗鼠 IgG 抗体, 37℃ 温育 30 min, 荧光显微镜下观察。用 SDS-PAGE 法检测表达抗原的分子量。以 Western blot 法检测表达抗原的特异性及免疫原性。将蛋白转移到硝酸纤维素膜上, 分别用抗 PUUV 重组 NP 单克隆抗体和兔抗 SEOV 血清为一抗, 羊抗鼠 IgG-HRP 和羊抗兔 IgG-HRP 为二抗。

结 果

1. Fusong-Cr-247 株病毒 TA 克隆质粒的基因扩增: 设计带有 Not I 和 Kpn I 酶切位点的引物, 以 PMD18T-HOKV-Fusong-Cr-247 菌液为模板, 进行核蛋白开放读码框的扩增。PCR 产物经 1% 凝胶电泳, 1300 bp 处有单一条带, 与理论值相符。

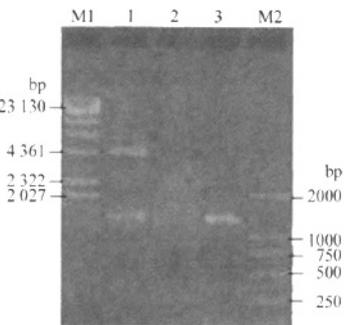
2. 重组转座质粒的构建: 用限制性内切酶 Not I 和 Kpn I 酶切目的基因和 pFastBacTM1 转座质粒载体 (图 1), T4 连接酶连接后, 转化 One ShotTMTOP10 感受态细胞获得重组转座质粒 pFastBac HOKV-S, PCR 扩增产物和双酶切鉴定结果如图 2。

3. 重组穿梭质粒的构建: 将 pFastBac HOKV-S 转化到 DH10BacTME.coli 感受态细胞, 卡那霉素、庆大霉素和四环素三重选择后挑选阳性穿梭质粒, 大量提取后进行 PCR 扩增, 结果见图 3。



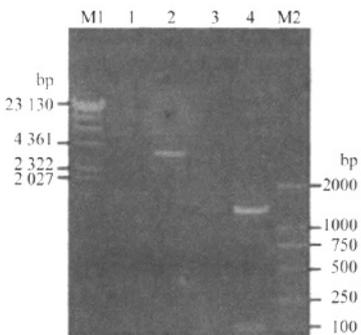
注: M1: λ Hind II digest Marker; M2: DL2000 Marker; 1: Kpn I and Not I 酶切 pFastBacTM1; 2: Kpn I and Not I 酶切 PMD18T-Fusong-Cr-247-NP

图1 PMD18T-Fusong-Cr-247-NP 鉴定和 pFastBacTM1 酶切结果



注: M1: λ Hind II digest Marker; M2: DL2000 Marker; 1: Kpn I and Not I 酶切质粒 pFastBac HOKV-S; 2: PCR 阴性对照; 3: PCR 鉴定结果

图2 重组质粒 pFastBac HOKV-S 的鉴定结果



注: M1: λ Hind II digest Marker; M2: DL2000 Marker; 1: 载体引物阴性对照; 2: 载体引物 PCR 扩增结果; 3: 特异引物 PuY1 和 PuY2 阴性对照; 4: 特异引物 PuY1 和 PuY2 PCR 扩增结果

图3 PCR 检测重组质粒 Bacmid HOKV-S

4. 重组杆状病毒表达 NP 的免疫荧光检测: 对感染重组杆状病毒的细胞进行间接免疫荧光检测, 荧光显微镜下观察, 感染细胞的胞浆内出现大量亮绿色荧光颗粒, 而正常细胞的胞浆内没有荧光颗粒 (图 4)。结果显示, 重组杆状病毒感染后可表达

HOKV NP。

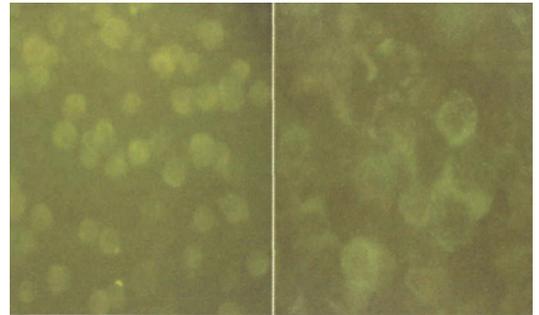
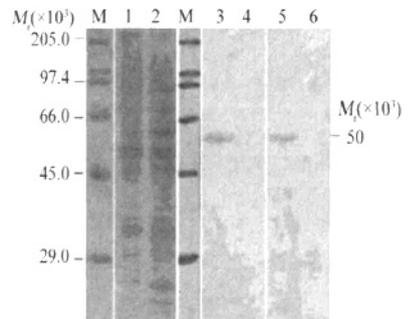


图4 Fusong-Cr-247-NP 基因在 Sf9 昆虫细胞中的表达

5. 重组核蛋白的鉴定: 收集正常 Sf9 昆虫细胞和感染重组杆状病毒的昆虫细胞, 裂解后进行 SDS-PAGE 电泳, 经考马斯亮兰 R-250 染色, 出现一条约 $50 \times 10^3 (M_r)$ 的蛋白条带, 与理论值相符合, 而正常细胞裂解液中未见此条带 (图 5)。将蛋白转移到硝酸纤维素膜上, 分别用抗 PUUV 重组 NP 单克隆抗体和兔抗 SEOV 血清为一抗, 羊抗鼠 IgG-HRP 和羊抗兔 IgG-HRP 为二抗, 进行 Western blot 检测。硝酸纤维素膜上在约 $50 \times 10^3 (M_r)$ 处出现特异的蛋白条带 (图 5)。



注: M: Protein Marker; 1: 正常 Sf9 昆虫细胞裂解后 SDS-PAGE 电泳结果; 2: 感染杆状病毒的 Sf9 昆虫细胞裂解后 SDS-PAGE 电泳结果; 3: 重组 NP 与抗 PUUV 重组 NP 单克隆抗体反应的 Western blot 结果; 4: 正常细胞蛋白与抗 PUUV 重组 NP 单克隆抗体反应的 Western blot 结果; 5: 重组 NP 与兔抗 SEOV 血清反应的 Western blot 结果; 6: 正常细胞蛋白与兔抗 SEOV 血清反应的 Western blot 结果

图5 重组 NP 的 SDS-PAGE 和 Western blot 鉴定

讨论

S 基因片段编码的 NP 是 HV 的主要组成部分^[5], HVNP 具有很强的抗原性, 存在 B 和 T 淋巴细胞的抗原表位, 能诱导细胞免疫和体液免疫应答^[9-11]。NP 是 HV 感染早期产生的主要抗原, 早期患者血清中抗体也主要是抗 NP 的抗体, 并且滴度很高^[9]。应用 NP 抗原或抗 NP 抗体是目前国际上进行 HV 血清

学检测及临床诊断最常用的方法。因此为了建立检测 HOKV 的有效方法,本研究选择 HOKV 的 S 基因作为目的基因进行表达。

细胞杆状病毒表达系统(BEVS)已成为当今基因工程领域四大表达系统之一,该系统具有产量高、后加工修饰系统完备及安全等优点,已广泛应用于外源基因的高效表达及对蛋白功能的研究^[12,13]。我们采用该表达系统已成功表达了狂犬病毒的 NP,用于狂犬病的诊断^[14,15]。尤其与大肠埃希菌等原核表达系统相比,能更好地保持病毒蛋白的免疫原性。本研究应用 RT-PCR 方法扩增了 HOKV 的 Fusong-Cr-247 株 NP 基因并以穿梭质粒法构建重组杆状病毒,在 Sf9 昆虫细胞中获得表达。用 IFA、SDS-PAGE 等方法进行检测,确定重组杆状病毒感染的昆虫细胞所表达的重组蛋白分子质量约为 50×10^3 (M),与预计的结果相符,且能与抗 PUUV 重组蛋白的抗体结合。因此表达的蛋白是 HOKV 的重组 NP。

已有的研究发现田鼠亚科啮齿动物携带的 HV 与鼠亚科啮齿动物携带的 HV 具有较大的遗传差异^[16],抗 PUUV 重组 NP 的单克隆抗体与 SEOV 有交叉反应性,但与汉滩型汉坦病毒(HTNV)几乎无反应性,在荧光显微镜下看不到特异的免疫荧光^[6]。研究发现抗 PUUV 重组 NP 单克隆抗体与 HOKV 抗原具有良好的反应性^[6]。为了鉴定表达的重组 NP 抗原具有天然 NP 的特异性、免疫原性及其反应性,我们采用抗 PUUV 重组 NP 单克隆抗体及抗 SEOV 抗体以免疫印迹法分析,表达的蛋白能与上述两种特异性抗体结合,与以前的研究结果一致^[6]。这进一步证明重组 NP 是 HOKV 的 NP,并且说明重组 NP 具有天然核蛋白的免疫原性及其反应性。HOKV 重组 NP 的成功表达为进一步制备抗 HOKV NP 抗体,研制诊断试剂奠定了基础。

全世界范围内至今已发现 22 个血清型或基因型的 HV,而且每一型均由一种或少数几种密切相关的啮齿类动物携带并传播^[5,16]。在欧洲,PUUV 的宿主是 *Myocles glareolus*^[3,16],我国与日本流行的 HOKV 的宿主是 *M. rufocanus*^[3,6]。尽管我国是世界上年报告 HFRS 病例最多的国家,然而至今仅证明存在由 HTNV 及 SEOV 引起的 HFRS 病例,还没有报道由其他型 HV 引起的 HFRS 病例^[17]。在我国黑龙江、吉林、辽宁以及内蒙古等省区的林区,棕背鼯及其密切相关的鼠种分布广泛^[18],而且长期以来这些省份 HFRS 流行严重^[17],因而这些地区的 HFRS 病例中很可能有由 HOKV 引起的病例。由于 HOKV 分离困

难,因此表达出 HOKV 的核蛋白,将有利于明确我国是否存在 HOKV 引起的 HFRS 病例,开展实验室相关研究,进一步了解 HOKV 的流行特点及其地理分布,提高 HFRS 的防治效果。

参 考 文 献

- [1] Brummer-Korvenkontio M, Vaehri A, Hovi T, et al. Nephropathia epidemica: detection of antigen in bank voles and serologic diagnosis of human infection. *J Infect Dis*, 1980, 141: 131-134.
- [2] Sironen T, Vaehri A, Plyusnin A. Molecular evolution of Puumala hantavirus. *J Virol*, 2001, 75: 11803-11810.
- [3] Kariwa H, Yoshimatsu K, Sawabe J, et al. Genetic diversities of hantaviruses among rodents in Hokkaido, Japan and Far East Russia. *Virus Res*, 1999, 59: 219-228.
- [4] Song KJ, Baek LJ, Moon S, et al. Muju virus, a novel hantavirus harboured by the arvicolid rodent *Myodes regulus* in Korea. *J Gen Virol*, 2007, 88: 3121-3129.
- [5] Nichol ST, Beaty BJ, Elliott RM, et al. Bunyaviridae//Fauquet CM, Mayo MA, Maniloff J, et al. *Virus Taxonomy. VIII th Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses*. Elsevier Academic Press, Amsterdam, 2005: 695-716.
- [6] Zhang YZ, Zou Y, Yan YZ, et al. Detection of phylogenetically distinct Puumala-like viruses from red-Grey vole *Clethrionomys rufocanus* in China. *J Med Virol*, 2007, 79: 1208-1218.
- [7] Schmaljohn C, Hjelle B. Hantaviruse — a global disease problem. *Emerg Infect Dis*, 1997, 3: 95-104.
- [8] Brus Sjölander K, Golovljova I, Plyusnin A, et al. Diagnostic potential of Puumala virus nucleocapsid protein expressed in *Drosophila melanogaster* cells. *J Clin Microbiol*, 2000, 38: 2324-2329.
- [9] Lundkvist A, Kallio-Kokko H, Sjölander KB, et al. Characterization of Puumala virus nucleocapsid protein: identification of B-cell epitopes and domains involved in protective immunity. *Virology*, 1996, 216: 397-406.
- [10] Plyusnin A, Horling J, Kanerva M, et al. Puumala hantavirus genome in patients with Nephropathia Epidemica: correlation of PCR positivity with HLA haplotype and link to viral sequences in local rodent. *J Clin Microbiol*, 1997, 35: 1090-1096.
- [11] Lundkvist A, Meisel H, Koletzki D, et al. Mapping of B-cell epitopes in the nucleocapsid protein of Puumala hantavirus. *Viral Immunol*, 2002, 15: 177-192.
- [12] 李卫国, 王厚伟, 牟志美, 等. 昆虫重组杆状病毒获得技术研究展望. *山东农业大学学报*, 2003, 34: 134-138.
- [13] 孙丽翠, 王雅梅, 闫豫东, 等. 人 VEGF 基因杆状病毒表达载体的构建及生物学活性鉴定. *首都医科大学学报*, 2006, 27: 623-626.
- [14] 姚文荣, 徐兰, 李明慧, 等. 狂犬病毒核蛋白的表达与鉴定. *中国人兽共患病学报*, 2008, 24(6): 514-517.
- [15] Yao WR, Pan GQ, Xiong CL, et al. Detection and genetic characterization of rabies virus from patients. *Virologica SINICA*, 2007, 22: 307-315.
- [16] Plyusnin A, Morzunov SP. Virus evolution and genetic diversity of hantavirus and their rodent hosts. *Curr Top Microbiol Immunol*, 2001, 256: 47-75.
- [17] 张永振, 肖东楼, 王玉, 等. 中国肾综合征出血热流行趋势及其防治对策. *中华流行病学杂志*, 2004, 25: 466-469.
- [18] 张荣祖. *中国哺乳动物分布*. 北京: 中国林业出版社, 1997: 227-233.

(收稿日期: 2008-07-08)

(本文编辑: 尹廉)