

嗜人类 T 淋巴细胞病毒 I 型核心蛋白 P24 基因的克隆与表达

张春涛 尹红章 李秀华 宋爱京 李德富(卫生部生物技术产品检定及标准化研究重点实验室,北京 100050)
夏宁邵 张 军(厦门大学,厦门 361004)

【摘要】 目的 从感染 HTLV-1 的中国患者外周血单核细胞(PBMCs)中扩增编码 HTLV-1 核心蛋白 P24 的 cDNA,并在大肠杆菌中进行表达。方法 提取感染者 PBMCs 基因组 DNA,应用巢式 PCR 方法扩增出 HTLV-1 核心蛋白 P24 的 cDNA 并测序,与 pGEX-20T 载体构建重组质粒,在大肠杆菌 BL21 中表达,采用 ELISA 和 Western blot 分析重组蛋白活性。结果 HTLV-1 核心蛋白 P24 基因序列高度保守,构建重组载体后,在大肠杆菌中表达的重组蛋白,经检测具有较强的抗原活性。结论 成功地表达了 HTLV-1 型病毒的核心蛋白 P24 基因,为国产诊断试剂和疫苗的研发打下了基础。

【关键词】 嗜人 T 淋巴细胞病毒 核心蛋白 基因表达

Cloning and Expression of Core Protein P24 Gene of Human T-cell Lymphotropic Virus Type 1

ZHANG Chuntao, YIN Hongzhang, LI Xiuhua et al (National Institute for the Control of Pharmaceutical and Biological Products, Beijing 100050)

【Abstract】 Objective To amplify the cDNA encoding core protein P24 from the PBMCs of a Chinese patient infected with human T-cell lymphotropic virus type 1 (HTLV-1) and express in *E. coli*. **Methods** Extract DNA from the patient, amplify p24 gene by nested-PCR and sequence, then clone into vector pGEX-20T and express in *E. coli*. The expressed product was identified by Western blot and detected for activity by ELISA. **Results** The sequence of p24 gene was highly conserved, and the p24 protein with good antigenicity was successfully expressed in *E. coli*. **Conclusion** The cloning and successful expression of core protein p24 gene lays a foundation of developing diagnostic kit and vaccine.

【Key words】 Human T-cell lymphotropic virus Core protein Gene cloning

嗜人类 T 淋巴细胞白血病病毒(HTLV)是最早发现并分离的逆转录病毒,它可引起成人 T 淋巴细胞白血病(adult T-cell leukemia/lymphoma ATL)和 HTLV-1 相关的脊髓病/热带痉挛截瘫(HTLV-1-associated myelopathy/tropical spastic paraparesis HAM/TSP)^[1]。我国也已发现该病毒的小流行^[2],其前病毒包括 9032 个碱基,具有典型的逆转录病毒结构。P24 是主要核心蛋白,HTLV-1 的感染者都产生针对 P24 的抗体。我们从福建莆田一名感染者的 PBMC 中扩增到 HTLV-1 P24 基因,在大肠杆菌中表达,并对表达产物进行分析。

材料与方 法

1. 标本来源

福建莆田地区一名确证的 HTLV-1 抗体阳性感染者的全血标本。

2. 菌株和质粒

pMD18-T 购自宝生物工程(大连)有限公司; pGEX-20T 由厦门大学夏宁邵教授惠赠; JM101、BL21 均为本室保存。

3. 引物的设计和合成

采用巢式 PCR 进行扩增,内侧引物分别加入 EcoR I 和 BamH I 酶切位点。引物序列如下:

外引物 F1(711~728): CGACAGCCCATCCTATAG

R1(2111~2129): GGTTAGGAAGGACTTGCCTG

内引物 F2(1194~1210): GGATCCCAGTCATG-CACCCACA

R2(1814~1835): GAATTCATAACACTTTG-GTTTTATCTTTG

4. HTLV-1 P24 基因的扩增

经 TaKaRa 试剂盒提取外周血单核细胞(PBMC)染色体为 PCR 反应的模板,引物 F1 和 R1 进行第 1

轮扩增,扩增条件为 94℃ 预变性 5min, 94℃ 5min, 94℃ 50s, 52℃ 50s, 72℃ 90s, 5 个循环, 然后按以下条件循环, 94℃ 50s, 55℃ 50s, 72℃ 90s, 30 个循环, 最后 72℃ 延伸 10min。以本轮 PCR 产物作为第 2 轮扩增的模板, 引物为 F2 和 R2, 扩增条件为 94℃ 50s, 56℃ 50s, 72℃ 90s, 30 个循环, 最后 72℃ 延伸 10min, 扩增产物与 pMD18-T 连接。经基康公司 ABI377 测序仪进行测序。

5. 重组质粒 pGEX-20T/p24 的构建

用 EcoR I 和 BamH I 双酶切 pMD18-T/p24, 回收目的片段, 与用同样酶切的 pGEX-20T 载体连接, 经酶切鉴定得到正确插入 HTLV-1 P24 基因的重组质粒 pGEX-20T/P24。

6. pGEX-20T/p24 在 *E. coli* 中表达

pGEX-20T/p24 转化 *E. coli* 菌株 BL21, 挑阳性克隆接种于 2ml 含氨苄抗性的培养基中, 37℃ 振荡培养过夜, 1:100 转接培养基, 培养至 $A_{600} = 0.6$ 时, 加入 IPTG 至终浓度为 1mmol/L, 25℃ 诱导表达 4h, 收集菌体, 超声破碎, 离心, 上清与沉淀分别进行 SDS-PAGE 电泳。

7. 表达产物的活性

采用 Western blot 和 ELISA, 按文献[3]操作。

8. 表达产物的纯化

在已经用 PBS 平衡好的 Glutathion Sepharose 4B 亲和层析柱加入菌体裂解上清, 用 10 倍柱体积的 PBS 洗涤 3 次, 加入洗脱液, 收集洗脱液。

9. 融合蛋白 GST-P24 中 GST 的切除

按试剂盒说明书进行操作。

结 果

1. HTLV-I P24 基因的体外扩增和鉴定

PCR 扩增出一大小约 650bp 的片段, 与设计相符。经 EcoR I 和 BamH I 酶切鉴定, 得到插入 HTLV-I P24 基因的重组质粒 pMD18-T/P24, 见图 1。酶切鉴定后测序, 证实扩增到的是 HTLV-I p24 基因。

2. 构建重组质粒的鉴定

用 BamH I 和 EcoR I 酶切 pMD-18T/p24 后与用同样双酶切的 pGEX-20T 连接, 转化, 经酶切鉴定, 得到阳性克隆 pGEX-20T/p24, 见图 2。

3. 重组质粒在 *E. coli* 中表达的检测

经 IPTG 诱导表达后, 将菌体裂解, 上清和沉淀进行 SDS-PAGE 电泳, 在相对分子质量为 50 000 处有一明显表达带, 而且上清中所占的比例较高, 表达蛋白为与 GST 融合的 GST-P24 融合蛋白, 表达蛋

白占菌体总蛋白的 33.8%, 见图 3。

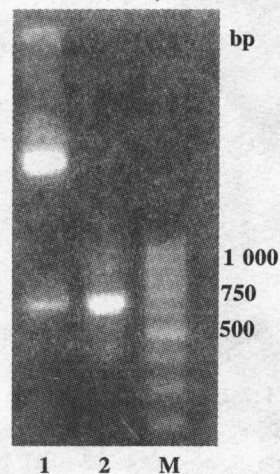


图 1 Nested-PCR 法扩增 HTLV-I P24 cDNA
Fig 1. Amplification of HTLV-I P24 by Nested-PCR
M, DNA marker; 1, pMD18-T/P24 digested with restriction endonuclease BamH I and EcoR I; 2, nested PCR products of HTLV-I P24.

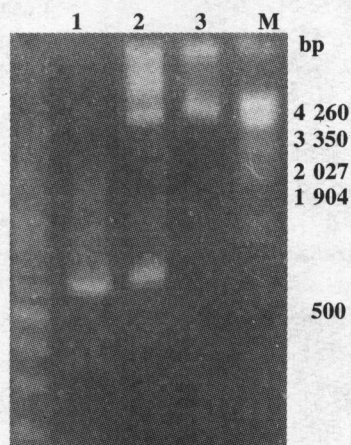


图 2 重组载体 pGEX-20T/p24 的酶切鉴定电泳图谱
Fig 2. Electrophoretic profile of recombinant vector pGEX-20T/p24 digested with restriction endonuclease
M, Lambda DNA/Hind III + EcoR I marker; 1, nested PCR products of HTLV-I p24; 2, constructed vector pGEX-20T/p24 digested with restriction endonuclease BamH I and EcoR I; 3, empty vector treated with BamH I.

4. 表达蛋白的纯度

表达蛋白经亲和层析纯化后, 可以看到一条单一清晰条带, 相对分子质量为 50 000, 凝胶扫描分析纯度达 94.27%, 见图 4。

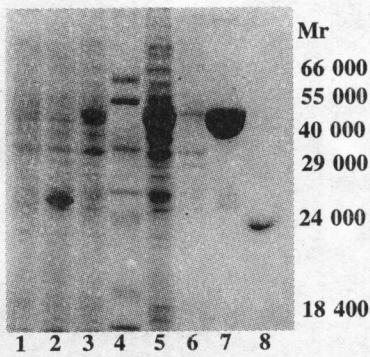


图 3 表达产物的 SDS-PAGE 电泳分析

Fig 3. SDS-PAGE profile of expressed product

1, empty BL21; 2, BL21 transformed with empty vector; 3, expression of pGEX-20T/p24 in BL21; 4, marker; 5, supernatant of BL21 lysate; 6, precipitate of BL21 lysate; 7, purified GST-p24 fusion protein; 8, p24.

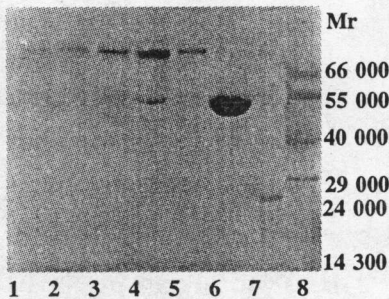


图 4 纯化的融合蛋白的 Western blot 结果

Fig 4. Western blotting of purified fusion protein

1, empty BL21; 2, BL21 transformed with empty vector; 3, expression of pGEX-20T/p24 in BL21; 4, supernatant of BL21 lysate; 5, precipitate of BL21 lysate; 6, purified GST-p24 fusion protein; 7, p24; 8, marker.

5. 表达产物活性鉴定

上清和沉淀纯化后经 Western blot 鉴定, 可以看到在相对分子质量 50 000 处的特异免疫印迹, 证实表达产物是 HTLV-I p24 蛋白, 见图 4。同时用表达的重组蛋白作为包被抗原, 检测 50 份正常人血清和 6 份经 Genelab 公司 Western blot 确证的 HTLV-1 抗体阳性血清, 根据 50 份正常人血清确定 Cut-off 值为 0.12, 6 份抗体阳性血清检测结果见表 1。

表 1 6 份确证的 HTLV-I 抗体阳性血清检测结果

Tab 1. Detection of 6 HTLV-1 antibody positive specimens using the expressed protein as coated antigen

Serum	1	2	3	4	5	6
A	0.379	0.667	1.666	1.309	1.306	0.511
S/CO	3.16	5.56	13.88	10.91	10.88	4.26

Cut-off = 0.12

讨 论

HTLV-I 型病毒是在人类中最早发现的一种逆转录病毒^[3], 血清流行病学调查显示主要流行于日本西南部, 加勒比海, 非洲西部。我国东南沿海如广东、福建及台湾也发现了 HTLV-I 的抗体阳性人群^[4,5]。本室 1998 年对福建献血员的调查结果显示该地区抗体阳性率为 0.1% 左右。目前, 国内对 HTLV-I 型病毒的研究大多集中于流行病学调查及临床, 对于我国 HTLV-I 型病毒基因组结构特点系统的研究报道较少。核心蛋白是病毒的主要组成部分之一, 有较好的抗原性, 相对较保守。我们的研究也说明, HTLV-I 型病毒的核心蛋白 p24 基因高度保守, 这可能由于 HTLV-I 型病毒的复制是通过感染细胞的克隆扩增, 而不是通过逆转录过程完成, 复制的拷贝数较少, 发生变异的机会也少, 同时也避免了逆转录过程导致复制错误的可能性。另一方面, 由于 HTLV-I 的病毒颗粒释放量少, 减弱了宿主免疫系统对它的选择压力, 因此基因较为保守, 有利于诊断试剂的研制和疫苗的开发。我们在大肠杆菌中成功地表达了核心蛋白 p24, 表达产物以可溶形式在菌体裂解上清中含量较大, 这为利用亲和层析纯化提供了可能。Western-blot 和 ELISA 都说明表达的蛋白能与 HTLV-I 阳性血清发生特异反应, 而与正常人血清不反应, 表明该蛋白有较好的抗原特异性, 可用于 HTLV-I 感染者的血清检测。对 HTLV-I 型病毒的系统研究将有利于预防和控制 HTLV-I 型病毒感染的发生。

参 考 文 献

- [1] Osame M. Advances in Adult T-cell Leukemia and HTLV-I earch. Tokyo, CRC Press, 1991, 57.
- [2] 曾毅. 成人 T 细胞白血病病毒抗体的血清流行病学调查. 病毒学报, 1985, 1: 344-348.
- [3] Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis, T. 分子克隆实验指南. 第 2 版. 金冬雁, 黎孟枫, 张德政, 等, 译. 北京: 科学出版社, 1998.
- [4] Poiesz BJ, Ruscetti FW, Gazdar AF, et al. Detection and isolation of type C retrovirus particles from fresh and cultured lymphocytes of a patient with cutaneous T-cell lymphoma. Proc Natl Acad Sci USA, 1980, 77 (12): 7415-7419.
- [5] 吕联煌, 叶榆生, 黄淑桦, 等. 福建地区人类 T 淋巴细胞白血病小流行区的发现. 中华血液学杂志, 1989, 10: 225.

(收稿日期: 2001-11-12)