

中国 HTLV-*env* 基因的克隆及 + 型嵌合基因的原核表达与抗原活性检测

张军¹, 王颖彬¹, 徐颖潇¹, 逢淑强¹, 张国忠², 杨海杰¹, 夏宁邵¹

(1. 厦门大学 细胞生物学与肿瘤细胞工程教育部重点实验室, 厦门 361005;

2. 福建省莆田市中心血站, 福建 莆田 351100)

摘要:为尽快研制出国产 HTLV 抗体诊断试剂, 首先从福建 HTLV 流行区 1 名 HTLV 感染者外周血细胞中克隆出 HTLV- 的全长膜基因 (*env*), 继而结合文献报道、PSA 软件的亲疏水性分析和 EPI 软件的 B 细胞表位分析数据, 选择了 gp46 中段开始延伸至 gp21 N 端 212 个氨基酸(aa185 ~ aa396)的基因, 并在 3 端通过 (GlySer)₂ 与人工合成的 HTLV- 型的型特异性表位区基因嵌合, 插入原核表达载体 pRSET, 在 *E. coli* 中得到了高效表达, 目的蛋白产量约占菌体总蛋白的 30%。通过 Triton X100 洗涤, 低浓度尿素逐步变性处理, 8mol/L 尿素溶解后纯度在 75% 左右, 经电泳洗脱纯化, 最终纯度可达 95% 左右, 纯蛋白得率约 40%。经 Western blotting 检测, 该蛋白对 4 份 HTLV- 型和 2 份 HTLV- 型血清均有较强反应, 而对 4 份阴性血清无反应, 从而有可能用于研制 HTLV 抗体诊断试剂盒。

关键词:人类 T 淋巴细胞白血病病毒; 膜基因; 原核表达; 抗原

中图分类号: Q781 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000 - 8721(2001)01 - 0038 - 05

人类 T 淋巴细胞白血病病毒 (HTLV) 是最早发现的人类致瘤逆转录病毒, 可分为 型和 型。HTLV- 与成人 T 细胞性白血病 (ATL) 和 HTLV- 相关脊髓病或热带痉挛截瘫 (HAM/ TSP) 直接相关, HTLV- 也被认为与白血病的发生有关。输血是目前 HTLV 家庭外水平传播的最主要途径。日本、美国和欧洲多国在 80 年代陆续发现了多例输血导致的 HTLV 感染及随后发生的 TSP/ HAM 病例, 从而促使日本、美国、澳大利亚、法国及其他许多国家和地区均相继将 HTLV 感染列为献血员必检项目。我国曾毅等早在 1985 年就已在国内发现了 HTLV 感染者^[1], 随后, 在福建、广东等地又陆续发现了几个 HTLV 流行区^[2,3], 国内其他多个地区也陆续发现了 HTLV 的散在流行。另外, 黑龙江省的抽样调查中发现采浆人群中 HTLV 感染率明显高于普通人群^[4], 河南省也曾发现一例疑似受血导致的 HTLV 感染^[5], 福建省福清市医院发现住院血液病人中 HTLV 阳性率高达 11.9%^[6]。因此, 是否应在我国开展献血员中 HTLV 感染的筛查已成为一个迫切需要认真考虑的问题。既往我国国内仅有间

接免疫荧光法 (IFA) 试剂供应, 该法由于操作相对复杂, 尤其是结果的判断需要昂贵的荧光显微镜, 而且受主观因素影响大, 因此难以作为筛选试剂。而进口的 ELISA 试剂或明胶微粒凝集法 (GPA) 试剂又价格昂贵。这从客观上阻碍了我国 HTLV 相关研究的进行及筛检策略的实施。为尽快研制出国产 HTLV 抗体 ELISA 诊断试剂, 本研究首先从福建 HTLV 流行区 1 名 HTLV 感染者外周血淋巴细胞中克隆出 HTLV-I 的全长膜基因 (*env*), 进而选出其中的高免疫活性区段, 与一段人工合成的 HTLV-*env* 区的高免疫活性区段嵌合后, 在大肠杆菌中进行了表达、纯化及免疫学活性检测。

材料与方法

- 1 样品的采集及处理** 1 例 HTLV- 抗体阳性者 (编号为 S15) 来自福建省莆田市, 女性, 为本地长期居民, 无出国史, 无受血史, 无已知的 HTLV 相关疾病症状。采集静脉血 5ml, 肝素抗凝, 用淋巴细胞分离液分离外周血淋巴细胞。
- 2 核酸提取** 以 TaKaRa 公司的 Dr. GenTE™ 基因组 DNA 抽提试剂盒提取核酸, 严格按试剂盒操作手册进行, 所得 DNA 溶于 500μl 去离子水中, - 20 冷冻保存。
- 3 PCR 扩增** 参照 HTLV- 型 HI 1PROP 株序列 (GenBank 登记号: M33896) 设计引物 (表 1), 扩增 HTLV- 的 *env* 基因。(1) *env* gp46 片段的扩增: 以 F1/ R1 为外侧扩增

收稿日期: 2000 - 05 - 22; 修回日期: 2000 - 07 - 18

基金项目: 教育部重点科技项目 (99179)

作者简介: 张军 (1972 -), 男, 硕士, 助理研究员, 研究病毒分子生物学与基因工程。

引物,进行第一次 PCR 反应,反应条件是 94 预变性 10min,94 50s,52 50s,72 90s,25 个循环,72 后延伸 10min。取 0.5 μ l 第一次 PCR 产物,用 F2/R2 作为内侧引物进行第二次 PCR 反应,反应条件是 94 预变性 5min,94 50s,55 50s,72 90s,25 个循环,72 后延伸 10min。

(2) *env* gp21 基因片段的半巢式扩增:以 F2/R3 为外侧扩增引物,进行第一次 PCR 反应,反应条件是 94 预变性 10min,94 50s,50 60s,72 120s,25 个循环,72 后延伸 10min。取 0.5 μ l 第一次 PCR 产物为模板,用 F3/R3 作为内侧引物进行第二次 PCR 反应,反应条件是 94 预变性 5min,94 50s,55 60s,72 100s,25 个循环,72 后延伸 10min。

表 1 PCR 引物

Table 1 The primers for PCR

Primer	Sequence (5' - 3')	Location on genome
F1	A GCCGCCA GTGGAAAGGACCA	5 031 - 5 051
R1	CCTCGTCTGTCTGGGACGATAC	6 344 - 6 321
F2	ATGGGTAA GTTCTCGCCAC	5 203 - 5 222
R2	GGA GACAAGCCA GGCCGC	6 168 - 6 151
F3	CTATACTCTCCAACGTCTC	5 920 - 5 939
R3	AGCGCATGTGGTTGCAAT	6 702 - 6 684

4 PCR 产物纯化、克隆及测序 第二次 PCR 产物经 1.2% 琼脂糖凝胶电泳分离,对照 Marker 无误后,切下特异扩增带,用胶回收试剂盒(上海华舜公司)回收纯化扩增产物,克隆入 pMD18-T 载体 (TaKaRa 公司),分别构成质粒 pMDgp46 和质粒 pMDgp21,转化大肠杆菌 DH5 株。由上海博亚生物公司进行双向序列测定。

5 完整 HTLV-*env* 基因的拼接 利用 F2/R2 扩增片段 3 端与 F3/R3 扩增片段 5 端重叠部分的 *Kpn* 位点,以及 pMD18-T 载体上的 *Xba* 位点,以 *Kpn* / *Xba* 双酶切切出 F3/R3 的 3 端部分片段,插入 pMDgp46 片段的同样位点中,得到质粒 pMDgp68,携带完整 HTLV-*env* 基因, (Genbank 登记号:AF226595)(图 1)。

6 HTLV(1+2) *env* 区嵌合原核表达质粒的设计与构建 利用 Protein Sequence Analysis(PSA)软件的亲疏水性分析及 EPI 软件的 B 细胞表位分析,结合文献报道和经验推测,选择了 HTLV- 的 *env* 区中段 212 个氨基酸(包括 gp46 的 C 端和 gp21 的 N 端)的区段(aa185 ~ aa396),合成 5 端带 *Pst* 位点的正向引物 HT1F (5'-AACTGACGCTCCACCGCCCTCCT-3')和 5 端带 *Eco*RI 位点的反向引物 HT1R (5'-AAGAA TTCTAA TGCTTTGCATAA TCC-3'),以 pM-Denv 为模板,PCR 扩增出目的片段(PCR 条件:94 预变性 5min,94 变性 50s,58 复性 50s,72 延伸 50s,15 个循环后 72 后延伸 10min),用胶回收试剂盒(上海华舜生物公司)回收产物, *Pst* 、*Eco*RI 酶切回收片段及原核表达质粒 pRSET-A (Invitrogene 公司),连接,转化大肠杆菌 *E. coli* JM101 株,鉴定正确,获得质粒 pZX。综合文献报道,从

HTLV-*env* 区中选择了一段 26 个氨基酸的型特异性区段(aa185 ~ aa210),合成两条引物,正向引物 HT2F (5'-AA GAA TTC GGC TCC GGC TCC TTG GTC CAT GAC TCC GAC CTT GAA CAT GTC CTA ACC CCC TCC ACG TCC-3')的 5 端带 *Eco*RI 位点以及 (GlySer)₂ 连接肽,反向引物 HT2R (5'-AAAA GCT TTA GAT AAA TTT GAG TAT TTT GGT CGT CCT GGA CGT GGA GGG GGT TAG GAC-3')的 5 端带 *Hind* III 位点及终止密码子,进行 PCR 合成(94 变性 30s,58 复性 30s,72 延伸 30s,10 个循环后 72 后延伸 5min),用胶回收试剂盒(上海华舜生物公司)回收产物, *Eco*RI、*Hind* III 酶切回收片段及质粒 pZX,连接,转化 *E. coli* JM101 株,鉴定正确,获得表达 HTLV(+) *env* 区嵌合基因 (*env* 166)的原核表达质粒 pENV166,表达区域全长 285 个氨基酸,约 31kD(图 1)。

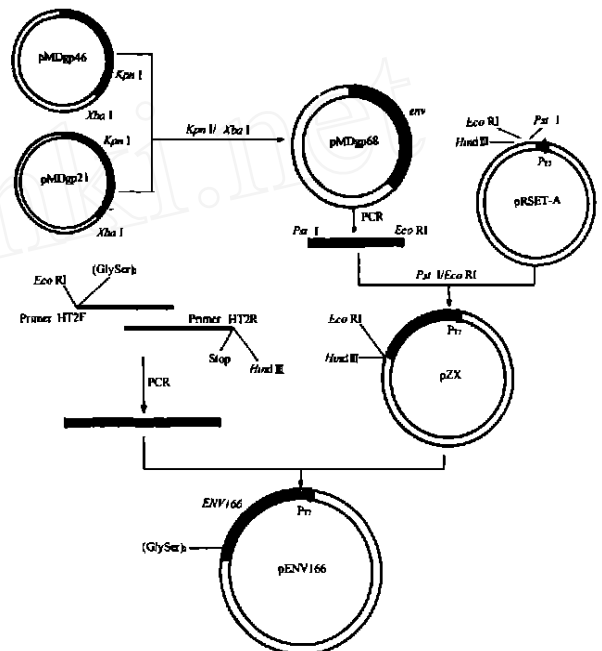


图 1 表达质粒 pENV166 的构建

Figure 1 The construction of expression plasmid pENV166

7 重组蛋白 ENV166 的表达 质粒 pENV166 转化 *E. coli* BL21(DE3) 株(本实验室保存),挑单菌落入 6ml Ap⁺ LB 培养基中,37 振荡(260r/min)培养 10h,按 1:50 比例扩种至 300ml Ap⁺ LB 中,37 振荡(260r/min)培养至 OD₆₀₀ 0.6 ~ 0.8,加 IPTG(Pharmacia 公司)至终浓度 0.1mmol/L,37 振荡(260r/min)开盖培养 4h。

8 重组蛋白 ENV166 的纯化 重组蛋白先采用包涵体洗涤液和 Triton-X100 洗涤,再经过低浓度尿素的逐步变性处理,然后以 8mol/L 尿素充分使包涵体变性溶解,最后再以电泳洗脱法进一步纯化,参见文献^[7]。

9 重组蛋白 ENV166 的 Western blotting 检测 以经 Western blotting 证实的 4 份 HTLV- 阳性血清、2 份 HTLV- 阳性血清和 4 份 HTLV 阴性血清,做 1:100 稀释后按文献进行 Western blotting 检测^[7]。

10 主要工具酶和试剂 实验用各种限制性内切酶、Taq DNA 聚合酶、T4 DNA 连接酶等均购自大连宝生物公司。引物由上海基康公司合成。

结 果

1 HTLV-1 env 基因的克隆及拼接

从福建沿海 HTLV 流行区 1 例 HTLV 感染者淋巴细胞中提取染色体 DNA,以巢式及半巢式 PCR 扩增 HTLV 的 *gp46* 基因和 *gp21* 基因,结果如图 2。泳道 2 在 966bp 处有一条清晰的带,泳道 3 在 783bp 处有一条清晰的带,与预期结果相同。回收 PCR 产物,克隆入 T 载体,测序后证实分别包含 HTLV-1 型 env 区 *gp46* 和 *gp21* 的全编码区。利用两片段重叠部分的一个 *Kpn* 位点和载体上的 *Xba* 位点,拼接出完整 HTLV-*env* 基因(图 1)。(GenBank 登记号:AF226595)

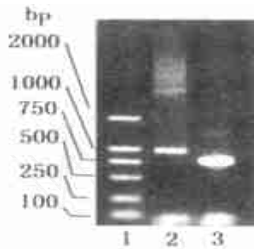


图 2 PCR 扩增的 *env* 基因片段

Figure 2 The *env* gene fragments amplified by PCR
Lane 1. DNA marker DL 2,000 (TaKaRa); Lane 2. *env gp46* gene fragment; Lane 3. *env gp21* gene fragment.

2 HTLV(1+2)env 区嵌合原核表达质粒的构建

对 *env* 基因编码蛋白进行亲疏水性分析,结合文献报道和经验推测,选择了 HTLV- 的 *env* 区中段 212 个氨基酸(包括 *gp46* 的 C 端和 *gp21* 的 N 端)的区段(185aa~396aa),同时从 HTLV-*env* 区中选择了一段 26 个氨基酸的型特异性区段(185aa~210aa),以 (GlySer)₂ 连接,获得表达 HTLV(+) *env* 区嵌合基因 (*env166*) 的原核表达质粒 pENV166,表达区域全长 285 个氨基酸,约 31kD(图 1)。

3 重组蛋白 ENV166 的表达与纯化

带有 HTLV(+)*env* 区嵌合基因的表达质粒 pENV166 在 *E. coli*BL21 株中,以常规 IPTG 诱导法表达,产物以 SDS-PAGE 电泳,见在 31kD 左右有一明显带,与预计相符。产量约占菌体总蛋白的 30%左右,重组蛋白主要以包涵体形式存在,经过低浓度尿素的逐步变性处理,然后以 8mol/L 尿素充

分使包涵体变性溶解,纯度可达 75%左右,最后再以电泳洗脱法进一步纯化,纯度在 95%以上,最终纯蛋白的得率在 40%左右(图 3)。

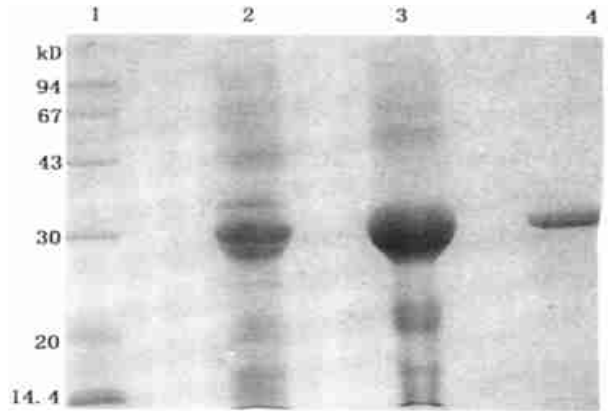


图 3 ENV166 的表达与纯化

Figure 3 The expression and purification of recombinant protein ENV166

Lane 1. Protein molecular weight standard; Lane 2. ENV166-expressed *E. coli* bacterium protein; Lane 3. Solution in 8mol/L urea; Lane 4. After electrophoresis elution.

3 重组蛋白 ENV166 的 Western blotting 检测

以 1 份 HTLV- 型阳性血清对重组蛋白 ENV166 进行 Western blotting 分析,结果纯化前、后的重组蛋白对 HTLV- 血清均有较强的反应(图 4),纯化过程未导致对 ENV166 的免疫活性的明显下降。

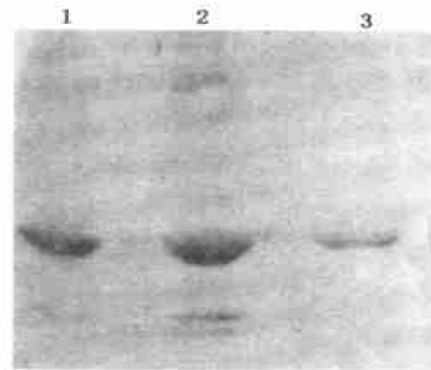


图 4 重组蛋白 ENV166 的 Western blotting 检测

Figure 4 The Western blotting results of recombinant protein ENV166

Lane 1. ENV166-expressed *E. coli* bacterium protein; Lane 2. Solution in 8 mol/L urea; Lane 3. After electrophoresis elution.

4 重组蛋白 ENV166 对多份 HTLV- / 血清的检测结果

将纯化后的 ENV166 转移至硝酸纤维素膜上,裁成条状,分别对 4 份 HTLV- 抗体阳性血清、2 份 HTLV- 抗体阳性血清和 4 份任意阴性血清进

行检测,结果 HTLV-*env* 型抗体阳性血清均出现清晰条带,位置与预期相符,而阴性血清均未见反应条带(图 5)。

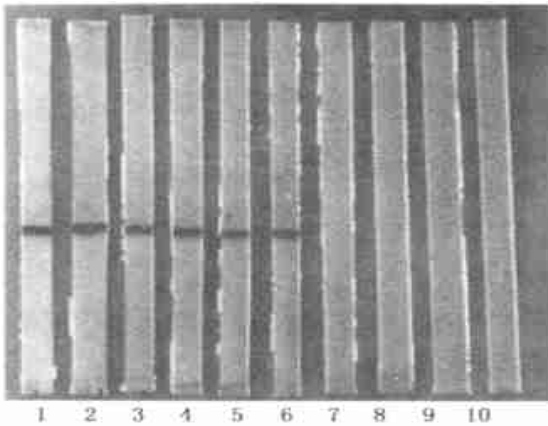


图 5 重组蛋白 ENV166 对多份 HTLV-*env* 血清的 Western blotting 检测结果

Figure 5 The Western blotting results of some HTLV-*env* positive or negative sera using recombinant protein ENV166 as membrane-binding antigen

Lane1-4. HTLV-*env* positive sera; Lane5,6. HTLV-*env* positive sera; Lane7-10. HTLV negative sera.

讨 论

HTLV 是二倍体单链 RNA 逆转录病毒,基因组大小 9kb 左右,从 5 至 3 方向,分别为 *gag*、*pro*、*plo*、*env* 和 *pX* 基因,分别编码核心蛋白、蛋白酶、逆转录酶、外膜蛋白和调节蛋白。人体抗体识别的主要抗原表位在核心蛋白和外膜蛋白上,调节蛋白 Tax 和 Rex 上也存在一些表位^[8]。由于核心蛋白上的表位多与宿主细胞的某些蛋白存在交叉反应^[9],而 Tax 和 Rex 的抗体出现的比率相对较低^[10],均不适于作为抗体诊断试剂的主要抗原原料,因此本研究选用外膜蛋白基因进行表达。在人体内,*env* 基因产物糖基化后为 gp61 ~ gp68 前体蛋白,经细胞蛋白酶酶切后产生一个外膜蛋白 gp46 和一个跨膜蛋白 gp21。外膜蛋白的 B 细胞表位集中于 gp46 的 C 端和 gp21 的 N 端,型特异性表位也存在于 gp46 的 C 端。因此我们在克隆出 *env* 全长基因后,结合 PSA 软件的亲疏水性分析和 EPI 软件的 B 细胞表

位分析数据,选择了 gp46 中段开始延伸至 gp21 的 N 端的 212 个氨基酸(aa185 ~ aa396)的基因,并在 3 端通过 (GlySer)₂ 与人工合成的 HTLV-*env* 型特异性表位区基因嵌合,插入原核表达载体 pRSET,在 *E. coli* 中得到了高效表达,目的蛋白产量约占菌体总蛋白的 30%。通过 Triton-X100 洗涤,低浓度尿素逐步变性处理,8mol/L 尿素溶解后纯度在 75% 左右;经电泳洗脱纯化,最终纯度可达 95% 左右,纯蛋白得率约 40%。经 Western blotting 检测,该蛋白对 HTLV-*env* 型和 HTLV-*env* 型血清均有较强反应,从而有可能可用于 HTLV 抗体诊断试剂盒的研制。

参考文献:

- [1] 曾毅,蓝祥英,王必常,等.成人 T 细胞白血病病毒抗体的血清流行病学调查[J].病毒学报,1985,1:344 - 348.
- [2] 吕联煌,叶榆生,黄淑华,等.福建沿海地区人类 T 淋巴细胞白血病病毒小流行区的发现[J].中华血液学杂志,1989,10:225 - 228.
- [3] 杨棉华,陈国敏,余秀葵,等.广东省人群中人嗜 T 细胞病毒型感染的血清流行病学调查及其与人类疾病的关系[J].中华实验与临床病毒学杂志,1997,11:56 - 58.
- [4] 白立石,高飞,黄秉诚,等.黑龙江省四市、县单采浆人群 HIV 及 HTLV-1 感染状况初步调查[J].中国性病艾滋病防治,1997,3(6):25.
- [5] 闫均炎,魏予凤,马仁安,等.老年人 T 淋巴细胞白血病病毒抗体普查分析[J].中国卫生检验杂志,1998,8:300 - 301.
- [6] 董德华,陈武,陈国敏,等.血液病患者感染人类 T 细胞白血病病毒的状况[J].中华微生物学和免疫学杂志,1997,17(2):101.
- [7] Ausubel F, Brent R, Kingston R, 等.精编分子生物学实验指南[M].科学出版社,北京,1998.
- [8] Smith M, Greene W. Molecular biology of the type I human T-cell leukemia virus (HTLV-D) and adult T-cell leukemia[J]. J Clin Invest, 1991,87:761 - 766.
- [9] Lal R, Rudolph D, Coligan J, et al. Failure to detect evidence of human T lymphotropic virus type-*env* and type-*env* in blood donors with isolated gag antibodies to HTLV-*env* / [J]. Blood, 1992, 80: 544 - 550.
- [10] Lal R, Coligan J, Giam C, et al. Differential immune responsiveness to the immunodominant epitopes of regulatory proteins (tax and rex) in human T-cell lymphotropic virus type-*env* associated myelopathy [J]. J Infect Dis, 1994, 169: 496 - 503.

Cloning of a Chinese Human T-lymphotropic Virus Type α *env* Gene and the Prokaryotic Expression and Immuno-activity Detection of the Type α + Chimeric Gene

ZHANG Jun^{1*}, WANG Ying-bing¹, XU Ying-xiao¹, PANG Shu-qian¹,
ZHANG Guo-zhong², YANG Hai-jie¹, XIA Ning-shao¹

(1. The Key Laboratory of Ministry of Education for Cell Biology and Tumor Cell Engineering, Xiamen University, Xiamen 361005, China; 2. The Central Blood Bank, Putian, Fujian 351100, China)

Abstract : For development of an antibody detection reagent for human T-lymphotropic virus (HTLV), a full-length envelope (*env*) gene of HTLV type α (HTLV-I) was cloned from peripheral blood cells of a HTLV-infected individual in a HTLV endemic region of Fujian, and then a gene fragment of 212 amino acid length from the midpiece of gp46 extending to the N-terminal of gp21 was selected as well as a type specific epitope region of HTLV type α *env* gene to construct a HTLV α + chimeric gene. This chimeric fragment was inserted into prokaryotic expression vector pRSET and expressed in *E. coli*. The yield of the target recombinant protein was about 30%. The final purity is about 95% after electrophoresis elution purification. Detected by Western blotting, this recombinant protein showed strong reaction with four HTLV- α positive sera as well as two HTLV- β positive sera, and had no response to four HTLV negative sera. Thus, this recombinant antigen can be used to develop a diagnostic reagent for HTLV antibody detection.

Key words : Human T-lymphotropic virus; *env* gene; prokaryotic expression; antigen

* Corresponding author: ZHANG Jun. E-mail: zhangj@jingxian.xmu.edu.cn