

· 研究原著 ·

文章编号: 1000-2790(2009)21-2289-04

呼吸道合胞病毒 F 蛋白基因片段原核表达和初步应用

芦 起¹, 申昆玲², 许文波³, 刘中华³, 朱 贞³, 毛乃颖³, 杨锡强¹, 余加林¹, 王家蓉¹, 王 颖¹(¹重庆儿童医院, 重庆 400014 ²北京儿童医院, 北京 100050 ³中国疾病预防控制中心, 病毒病预防控制所, 北京 100015)

Expression of RSV F protein fragment and its application

LU Qi, SHEN Kun-Ling, XU Wen-Bō, LIU Zhong-Hua, ZHU Zhen, MAO Nai-Ying, YANG Xi-Qiang, YU Jia-Lin, WANG Jia-Rong, WANG Ying

¹ Chongqing Children's Hospital, Chongqing 400014, China² Beijing Children's Hospital, Beijing 100050, China, ³ China

Center for Disease Control and Prevention, National Institute for Virology, Beijing 100015, China

【Abstract】 A M. To establish rapid sensitive specific cheap serological detection methods of human respiratory syncytial virus.

METHODS The viruses were isolated from nasopharyngeal secretions which collected from patient in Beijing Children's hospital. One fragment of F gene (F1-1, AA 137-363) was amplified by RT-PCR since this region contains the major neutralization sites. The PCR product was cloned into pMD18-T vector and was identified by PCR, then the target gene was subcloned into PET-32a expression vector and was identified by restriction analysis and sequencing. F1-1 was efficiently expressed in E. coli BL21 and purified by nickel HiTrap chelating metal affinity column. The serum levels of IgG antibodies to F antigen were measured in 91 serum samples of suspected RSV from Beijing Children's hospital using indirect ELISA against F1-1 proteins of HRSV. **RESULTS** The size of the RT-PCR product was 678 bp. The sequence of insert was correct after examined by restriction enzyme digestion and sequencing. Western Blotting indicated that the RSV F1-1 protein had specific antigenicity. No significant difference was found when compared our method with commercial detection kits. **CONCLUSION** The recombinant RSV F protein fragment offers an efficient way for serological diagnosis.

【Keywords】 human respiratory syncytial virus; fusion (F) gene; prokaryotic expression

【摘要】目的: 建立呼吸道合胞病毒快速、敏感、特异、廉价

收稿日期: 2009-03-15 接受日期: 2009-04-09

通讯作者: 许文波. Tel: (010) 63534352 Email: wenclun@public.bj.net.cn

作者简介: 芦 起, 博士, 主治医师. Tel: (023) 63631803 Email: qilu_q@163.com

的早期血清学检测方法。方法: 从北京儿童医院患者鼻咽分泌物分离的呼吸道合胞病毒中, 用 RT-PCR 的方法扩增出 RSV F 蛋白的 F1 区部分基因片段 F1-1 (AA137~363), 此区域包含 F 蛋白的主要中和抗原位点。将该基因片段克隆到 pMD18-T 载体, 将连接质粒经 PCR 鉴定, 证实插入目的片段。酶切后将该片段与 PET-32a 表达质粒连接, 用限制性内切酶酶切及序列测定, 证实插入片段的正确性。利用 PET-32a 表达质粒在大肠杆菌 BL21 表达正确的 RSV F1-1 蛋白。重组蛋白 N 端包含有 6 个连续的组氨酸标签, 通过镍离子金属螯合亲和层析纯化, 获得了高纯度的目的重组蛋白 RSV F1-1。然后将重组 RSV F1-1 包被建立间接 ELISA 法检测人血清中的 RSV F 蛋白 IgG 抗体。结果: RT-PCR 产物的片段大小为 678 bp 经酶切和测序鉴定后, 插入序列无误。Western Blot 分析显示: 重组蛋白具有较好的抗原性。用该蛋白建立的间接 ELISA 方法检测结果与进口 Euroimmun 和维润试剂盒检测结果比较, 差异无显著性。结论: F 蛋白基因片段的成功表达为进一步开发诊断试剂盒提供了实验依据。

【关键词】 人呼吸道合胞病毒; F 蛋白; 原核表达

【中图分类号】 R373.1

【文献标识码】 A

0 引言

人呼吸道合胞病毒 (human respiratory syncytial virus, HRSV) 是在婴幼儿、老年人以及免疫损害病人中引起严重下呼吸道感染的最重要病因^[1]。HRSV 的感染的显著特征是初次感染在体内产生的抗体不能提供永久保护, 在人的一生中可重复感染 HRSV。HRSV 的 F₂ 蛋白是激发机体产生保护性抗体最主要的病毒抗原。G 蛋白所诱导的中和抗体则具有型特异性, 而 F 蛋白所诱导的中和抗体可以同时抑制 A、B 两个亚型的病毒感染^[2]。F 蛋白最初翻译为 Mr 70 000 的无活性前体形式 F₀, F₀ 可被内源性的酪氨酸样蛋白酶切开生成 F₁ 和 F₂ 亚单位, 二者经二硫键连接构成 F 蛋白的生物活性形式^[3]。F 蛋白主要的抗原表位集中于 F₁ 区。在本实验中我们利用基因重组的方法, 表达了 HRSV 病毒 F 蛋白的 F₁ 区部分片段 (AA137~363), 此区域包含主要中和抗原位点^[4]。并初步建立了以 F 蛋白为基础的间接酶联免疫吸附试验法, 用于检测血清 RSV 病毒 IgG 抗体。F 蛋白基因片段的成功表达为进一步开发诊断试剂盒

和我国 RSV疫苗研制奠定基础。

1 材料和方法

1.1 材料 AMV反转录酶、Taq DNA polymerase、dNTP(Promega公司); T₄连接酶、限制性内切酶 BamH_I、HindIII、pMD18-T vector试剂盒等(大连宝生物公司); Ni-NTA Agarose(QIAGEN公司); 大肠杆菌 DH5 α 、BL21(天根公司)。血清来自北京儿童医院临床诊断呼吸道合胞病毒感染患者,共 91份;呼吸道合胞病毒从 2004年儿童医院患儿鼻咽分泌物中分离得到。

1.2 方法

1.2.1 RT-PCR 从 GenBank调出所有 F蛋白基因序列,通过序列比对在保守区设计上下游引物各 1条,上游 5'-GGATCCGGGGAAGTGAACAAAAT-3'带有 BamHI 酶切位点,下游 5'-AAGCTTCTAGAATATGTCACACGTTCAG-3'带有 HindIII酶切位点。使用 Trizol 方法提取病毒 RNA(方法见厂家操作手册)。RT-PCR 扩增目的片段:逆转录反应条件为 42 $^{\circ}$ C 45 min,95 $^{\circ}$ C 5 min,PCR反应的条件为 94 $^{\circ}$ C 10 min预变性,随后 94 $^{\circ}$ C 1 min,45 $^{\circ}$ C 1 min,72 $^{\circ}$ C 90 s,共 40个循环,最后 72 $^{\circ}$ C延伸 10 min。15 g/L琼脂糖凝胶电泳鉴定 PCR 产物。

1.2.2 重组表达载体的构建与鉴定 纯化的目的片段克隆到 pMD18-T Vector上, BamHI, HindIII进行双酶切鉴定,进一步序列测定,以确定序列以及读码框的正确性。双酶切回收目的基因片段,然后亚克隆到 PET-32a表达载体,小量提取表达质粒进行酶切(BamHI, HindIII)鉴定。

1.2.3 目的蛋白的诱导表达 将阳性克隆菌接种到含氨苄霉素(100 mg/L)的 LB培养基中,37 $^{\circ}$ C过夜震荡培养后,1:20比例接种到新鲜的 LB培养基中,加入终浓度为 1 mmol/L的 IPTG诱导表达 4 h收获菌体, SDS-PAGE电泳鉴定。

1.2.4 表达蛋白的纯化 细菌沉淀中加入裂解 Buffer A(100 mmol/L NaH₂PO₄, 10 mmol/L Tris,Cl₂ 6 mol/L盐酸胍, pH 8)裂解 2 h进一步超声粉碎(200~300 W), 10 s中间停 10 s,共 10次,全过程保持冰浴状态。4 $^{\circ}$ C, 8500 r/min离心 40 min转移到新离心管中,加入 1 mL用裂解 Buffer A平衡过的 Ni-NTA Agarose,室温结合 30 min,4 $^{\circ}$ C, 8500 r/min离心 10 min弃上清。用 Wash buffer C(100 mmol/L NaH₂PO₄, 10 mmol/L Tris,Cl₂ 8 mol/L Lurea, pH 6.3)洗 Ni柱 5遍。用 ELution buffer E(100 mmol/L NaH₂O₄, 10 mmol/L Tris,Cl₂ 8 mol/L Lurea, pH 4.2)洗脱目的融合蛋白。SDS-PAGE电泳鉴定纯化蛋白,纯

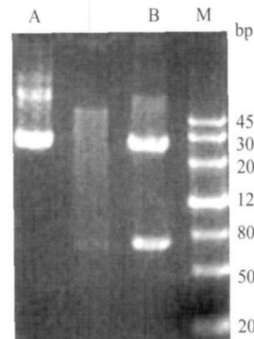
化的蛋白 -20 $^{\circ}$ C保存。

1.2.5 Western Blot 将目的蛋白电转至硝酸纤维素(NC)膜上,用含 50 g/L脱脂奶的 PBS封闭 4 $^{\circ}$ C过夜,NC膜, PBS洗膜 3次。以封闭液 1:20稀释阳性血清,与 NC膜于 37 $^{\circ}$ C共同孵育 2 h后,用 PBS洗膜。加入辣根过氧化物酶标记的山羊抗人 IgG酶, 37 $^{\circ}$ C孵育 1 h, PBS洗膜后 DAB显色。具体操作方法见文献[5]。

1.2.6 酶联免疫吸附试验(ELISA) 用 0.05 mol/L pH 9.6碳酸盐缓冲液(包被液)稀释纯化蛋白混合液 F1-1(1:1600稀释)。微孔板每孔加 100 μ L, 4 $^{\circ}$ C过夜。弃液体,每孔加入封闭液(含 100 mL/L小牛血清的 PBS)200 μ L, 37 $^{\circ}$ C封闭 2 h,洗液洗 4遍,拍干。每孔加入 1:200稀释的待检血清 100 μ L(稀释液为含 50 mL/L小牛血清和 0.5 mL/L吐温的 PBS), 37 $^{\circ}$ C孵育 30 min,洗液洗 4遍,拍干。每孔再加入 1:200稀释的辣根过氧化物酶标记的抗人 IgG 100 μ L, 37 $^{\circ}$ C孵育 30 min,洗液洗 4遍,拍干。加 TMB显色 10 min, 1 mol/L硫酸终止反应,于 450 nm测 A值。结果判定临界值(Cutoff值)以最佳工作条件检测 56份阴性血清样品,将 $\bar{x} \pm s$ 作为结果判定临界值(Cutoff值),故大于临界值 0.12为 RSV病毒抗体阳性,反之为阴性。

2 结果

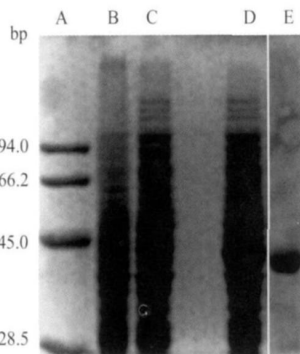
2.1 F蛋白基因片段的体外扩增及重组表达载体的构建 PCR产物经 15 g/L琼脂糖凝胶电泳鉴定,在 678 bp左右可见特异性扩增条带。将 RT-PCR扩增得到的 RSV病毒 F1-1目的基因纯化后,与 pMD18-T Vector连接,得到中间质粒,经双酶切凝胶回收目的片段,进一步和相同酶切的表达质粒 PET32a连接,命名为 PET32 F1-1。表达质粒经双酶切鉴定,得到 678 bp长度的目的基因片段。与预期大小一致(图 1)。序列测定结果表明插入序列与目的片段完全一致。



A: 重组表达质粒; B: 双酶切重组表达质粒(BamHI, HindIII); M: marker

图 1 重组表达质粒酶切鉴定结果(PET32 F1-1)

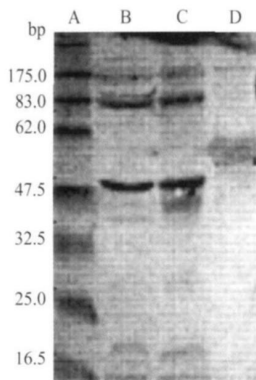
2.2 目的蛋白的诱导、表达与纯化 将表达质粒 PET32-F1-1 转化 E. coli BL21, 得到表达菌株, 经 IPTG 诱导表达后, 进行 SDS-PAGE 电泳和凝胶扫描分析, 显示表达的外源蛋白 F1-1 表达量约占全菌体蛋白量的 50% 左右. 菌体破碎离心后, 取上清和沉淀进行 SDS-PAGE 分析, 发现表达产物主要位于沉淀中, 通过变性复性, 利用 Ni-NAT Agarose 金属整合亲和层析柱纯化目的蛋白 (图 2). 所有初步纯化产物再进一步经凝胶过滤层析柱.



A: 标准蛋白 marker; B: PET32-BL21; C: PET32-F1-1-BL21 未经 IPTG 诱导; D: PET32-F1-1-BL21 经 IPTG 4 h 诱导; E: 纯化蛋白.

图 2 表达和纯化蛋白的 SDS-PAGE 检测结果

2.3 Western Blot 用诱导表达蛋白纯化后经 SDS-PAGE 电泳, 电转移到硝酸纤维素膜上, 进行 Western Blot 分析 (图 3). 结果在相应位置出现特异性抗原-抗体反应条带, 表明表达蛋白与其抗体有良好的反应原性.



A: 标准蛋白; B: PET32-BL21; C: PET32-F1-1-BL21 未经 IPTG 诱导; D: PET32-F1-1-BL21 经 IPTG 4 h 诱导.

图 3 表达蛋白的 Western Blot 检测结果

2.4 与其他检测 RSV 病毒抗体的试剂盒的比较 用 3 种试剂盒检测 RSV 血清 91 份, Euroimmun 的阳性率是 38.5%; 维润的阳性率是 39.5%; 本室的阳性率是 43.9%, 统计分析表明, 与欧盟试剂盒比较 $P > 0.05$ 与维润试剂盒比较, $P > 0.05$; 说明本实验室建

立的 ELISA 检测方法与 Euroimmun 和维润试剂盒相比, 检测结果差异无统计学意义. 本实验检测结果与 Euroimmun 试剂检测结果的符合率为 83.5%, 而与维润检测结果的符合率为 80.2%. 如果以维润试剂检测结果作为“金标准”, 则本实验室检测方法的敏感度和特异度分别为 83.3% 和 78.2%.

3 讨论

G 和 F 蛋白是 HRSV 仅有的两个保护性抗原^[6], 针对 G 蛋白或 F 蛋白的抗体能中和病毒的传染性, 在抵抗 HRSV 感染的保护性免疫反应中起重要的作用. 但 G 蛋白在 HRSV 各分离株中存在广泛的变异. 而 F 蛋白的基因变异很小, 亚型间 F 蛋白的抗原高度相关, 系数为 50%^[7]. 因此, 无论从诊断试剂研制还是从亚单位疫苗开发的角度, F 蛋白都比 G 蛋白具有优势.

本研究结果证实 HRSV 的 F 蛋白基因片段以融合蛋白形成得到了正确表达, 并具有较好的免疫反应性. 本研究建立了融合蛋白表达和纯化的流程. 该方法突出优点是流程短, 成本较低, 技术成熟, 可靠性高. 将克隆的外源性基因用融合蛋白表达系统, 则可将转录和翻译的起始由大肠杆菌序列所控制, 既保证了较强转录, 又保证了翻译的起始, 从而使克隆的外源性基因得到高效表达. HRSV F1-1 融合蛋白成功表达为进一步研制重组蛋白诊断试剂盒及开发基因工程疫苗奠定了基础. 此外, 也为研究 F 蛋白的结构功能提供了有利条件.

目前对 RSV 病毒的诊断方法有: 病毒分离培养、病毒核酸 RT-PCR 检测、中和试验、ELISA 法等. 病毒分离培养方法操作复杂, 实验较长; RT-PCR 方法操作不当容易产生假阳性结果, 易受外界因素的影响, 对 RT-PCR 阴性结果的病例也不能确诊未感染 RSV. 中和试验等检测周期较长, 一次检测样品数有限, 不利于大批量样品的快速检测^[8]. 而 ELISA 检测方法有较高的敏感性和特异性. 我们将大肠杆菌表达的融合蛋白包被 ELISA 板并与其他商品化试剂盒一起检测血清, 结果表明, 本室的 HRSV 病毒 IgG 抗体阳性率是 43.9%, 高于 Euroimmun 的 38.5% 和维润的 39.5%, 考虑可能为利用基因重组 F 蛋白作包被抗原时, 少量的大肠杆菌蛋白污染导致的检测试剂产生较高的本底, 甚至假阳性的结果, 但不排除 Euroimmun 维润采用的是国外的 HRSV 毒株很可能无法完全被本土毒株感染机体后诱导产生的抗体所中和. 本实验检测结果与 Euroimmun 和维润试剂检测结果的符合率均大于 80%, 其差异经统计检验无显著性, 但如以维润试剂作为“金标准”, 则本实验的敏感度和特

异度均低于 85%, 说明本实验还需进一步的改进. 本研究证明了 HRSV 病毒 F 蛋白片段具有很高的免疫原性可以代替 F 蛋白全长来建立免疫学诊断方法, 在 RSV 的人群抗体水平监测和实验室诊断方面具有潜在的应用价值.

【参考文献】

[1] Beljano Studzñska P, Pancer K. Respiratory syncytial virus: As an etiological agent of respiratory tract infection in children and adults [J]. Przegl Epidemiol. 2008, 62 (4) : 767-775.

[2] Arcuri HA, Apponi LH, Valentin SR, et al. Expression and purification of human respiratory syncytial virus recombinant fusion protein [J]. Protein Expr Purif. 2008, 62(2): 146-152.

[3] McDona ld TP, Sugruer J. The use of two dimensional SDS-PAGE to

analyze the glycan heterogeneity of the respiratory syncytial virus fusion protein [J]. Methods Mol Biol. 2007, 379: 97-108.

[4] I6 Pez JA, Bustos R, Zrve ll C, et al. Antigenic structure of human respiratory syncytial virus fusion glycoprotein [J]. J Virol. 1998, 72 (8) : 6922-6928.

[5] Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T, et al. 分子克隆实验指南 [M]. 3版. 北京: 科学出版社, 2005. 1713-1726.

[6] Mura ta Y. Respiratory syncytial virus infection in adults [J]. Curr Opin Pulm Med. 2008, 14 (3) : 235-240.

[7] Collins PL, Huang Y T, Wertz GW. Nucleotide sequence of the gene coding the fusion (F) glycoprotein of human respiratory syncytial virus [J]. Proc Natl Acad Sci USA. 1984, 81 (24) : 7683-7687.

[8] 刘菊, 唐安芬. 呼吸道合胞病毒 I G 酶联检测试剂盒的研制 [J]. 微生物学免疫学进展, 2005, 33 (1) : 15-18.

编辑 黄良田

· 经验交流 · 文章编号: 1000-2790(2009) 21-2292-01

封闭负压引流技术治疗慢性窦道的应用与护理

袁琰琴, 蒋立, 王线妮

(第四军医大学唐都医院整形烧伤科, 陕西 西安 710038)

【关键词】封闭负压引流; 窦道; 护理

【中图分类号】R642 【文献标识码】B

0 引言 窦道多为感染性伤口发展而成, 治愈难度较大, 传统处理方法采用窦道搔刮、换药、切除、带蒂肌皮瓣转移术等治疗, 具有治疗周期长、效果不佳、患者痛苦、医护人员工作量大的缺点. 我科采用封闭负压引流技术治疗此类患者 28 例, 取得了较好效果.

1 对象和方法

1.1 对象 本组 28(男 17, 女 11)例, 年龄 17~65(平均 36.1)岁. 窦道深度 2~9(平均 4.6)cm, 病程 1~15mo, 均因外伤后伤口感染或术后伤口感染形成窦道. 导致窦道原因: 开胸术后感染 16例, 腹部术后感染 6例, 乳房脓肿破溃 1例, 外伤后感染 5例. 以上病例采用封闭负压引流治疗前均有应用抗生素及外科换药治疗史. 使用一次性负压引流专用敷料、多聚乙醇明胶海绵(武汉维第斯医用科技有限公司)、生物半透性薄膜(3M 中国公司)、XH120 型可调式中心负压器(北京兴华仪器厂).

1.2 方法 ①彻底清创: 清除坏死组织、脓液、渗液, 先用 30 mL/L 双氧水注射器冲洗窦道, 再用生理盐水冲洗 3 遍. ②按创面形状剪裁海绵, 引流管带侧孔的一端插入海绵放入窦道, 引流管不能将窦道及空腔堵塞得太紧, 底部应稍留空隙, 引流管另一端与负压引流器相接. ③根据引流液及窦道闭合情况, 每次换药向外将负压吸引管拔出 1~2cm, 2~3d 换药 1 次. ④封闭: 清洁、擦干窦道周围皮肤, 在 VAC 敷料外覆盖生

物半透薄膜; ⑤接中心负压吸引, 24h 持续吸引; 负压为压值 -120 mmHg (-1 mmHg = 0.133 kPa).

2 结果 本组 28 例病例痊愈. 23 例患者经负压吸引治疗窦道变浅, 愈合时间 7~20(平均 16)d. 3 例封闭负压吸引治疗后创面清洁, 肉芽生长良好, 1 例行清创缝合术, 2 例行皮瓣移植术.

3 讨论 封闭负压引流技术维持有效的负压、保持引流通畅是关键, 应注意经常观察中心负压引流装置连接部位是否严密、有无漏气和堵塞、引流管有无扭转和折叠, 发现问题要及时处理. 若创面敷料隆起、创面潮湿且有液体聚集, 提示引流管堵塞或连接管压折, 应立即处理. 如有小血块堵塞管道时可用 9 g/L 生理盐水 10~20 mL 冲洗管道, 防止管道扭曲, 保持引流通畅. 注意观察并记录引流的量、性质, 换药时观察创面肉芽组织的生长情况. 我科对封闭负压引流促进创面愈合的进行了系列深入的临床和基础研究, 发现其机制主要是: 显著提高创面血流量, 促进坏死组织和细菌清除, 能加速创面肉芽组织生长和修复细胞增殖^[1]; 增加毛细血管流量, 促进毛细血管新生^[2]; 还能降低创面中基质免疫蛋白酶活性, 增加纤维连接蛋白含量^[3]. 封闭负压引流技术护理方便, 透明的粘贴薄膜利于对伤口或创面的观察. 通过我科 500 多例各类急慢性创面的治疗, 它能够显著加快感染腔隙的闭合和感染创面的愈合, 缩短住院时间, 使患者免除频繁换药之苦, 减轻医务人员换药工作量, 也使医疗费用得以降低. 而且这种治疗方法是一种纯物理方法, 完全避免了各种化学治疗(例如抗生素治疗)可能引致的副作用, 安全有效, 值得推广.

【参考文献】

[1] 许龙顺, 陈绍宗, 李学拥. 负压封闭治疗慢性创面的初步报告 [J]. 现代康复, 2001, 5 (7) : 39-40.

[2] 李靖, 陈绍宗, 李学拥, 等. 封闭负压引流技术对创面微循环流速和血管口径影响的实验研究 [J]. 现代康复, 2000, 4 (12) : 1848-1849.

[3] 李金清, 陈绍宗, 李学拥, 等. 封闭负压引流技术对加速慢性创面愈合的机制 [J]. 中国临床康复, 2002, 4 (6) : 520-521.

编辑 黄良田

收稿日期: 2009-09-01 接受日期: 2009-09-15

作者简介: 袁琰琴, 本科, 主管讲师, 护士长. T: (029) 8477738