

• 基础实验研究 •

人博卡病毒相关基因的克隆与表达

何涛君, 吴正林, 杨来智, 吴润香, 王 琼, 陆学东[△]

(广东医学院附属深圳福田医院检验科 518033)

摘要:目的 克隆临床标本中人博卡病毒相关功能基因,进而在原核表达体系中表达博卡病毒相关的蛋白。方法 采用分子生物学技术构建重组质粒 PGEX-20T-VP、PGEX-20T-NP 和 PGEX-20T-NS,分别对其进行 PCR、双酶切和测序鉴定,然后将已测序鉴定的包含 3 种重组质粒的工程菌,转化至大肠杆菌 BL21 菌中表达博卡病毒 VP、NP 和 NS 部分基因的相关蛋白。结果 成功的构建了人博卡病毒 3 种相关功能基因重组质粒,并在大肠杆菌中表达了 VP、NP 和 NS 部分基因的相关蛋白。结论 原核体系中表达出来的博卡病毒 VP、NP 和 NS 部分基因的相关蛋白将为下一步抗原纯化、单抗制备及博卡病毒检测奠定基础。

关键词:博卡病毒属; VP、NP 和 NS 部分基因; 相关蛋白

DOI:10.3969/j.issn.1673-4130.2011.20.029

文献标识码:A

文章编号:1673-4130(2011)20-2364-02

Human bocavirus associated gene cloning and expression

He Taojun, Wu Zhenglin, Yang Laizhi, Wu Runxiang, Wang Qiong, Lu Xuedong[△]

(Department of Clinical Laboratory, The Affiliated Shenzhen Futian Hospital of the Medical College of Guangdong, 518033, China)

Abstract: **Objective** To clone the genes associated with function researchment on human bocavirus, and to express the proteins about human bocavirus were in prokaryotic expressing system. **Methods** Recombinant plasmid PGEX-20T-VP, PGEX-20T-NP and PGEX-20T-NS were constructed by molecular biological methods, which were identified by PCR, restriction enzyme digestion and sequence analysis. Those three recombinant plasmids, identified by sequencing, were transformed into E. coli BL21 and expressed human bocavirus associated protein on VP, NP and NS partial gene. **Results** Three recombinant plasmids were constructed successfully, whereafter human bocavirus associated protein on VP, NP and NS partial gene were expressed. **Conclusion** These proteins being expressed in prokaryotic expressing system will set up the foundations for antigen purification, monoclonal antibody preparation and human bocavirus detection in next step.

Key words: bocavirus; VP, NP and NS partial gene; associated protein

博卡病毒是 2005 年瑞典学者 Allander 等^[1]采用随机 PCR 扩增,测序并结合生物信息学方法对儿童急性呼吸道感染样本进行大规模筛查而发现的一种新的细小病毒。由于该细小病毒的基因序列与牛(bovine)细小病毒和犬(canine)细小病毒序列相似,因此,被命名为人博卡病毒(bocavirus),源于 bovine 中的 bo 和 canine 中的 ca 字母的组合^[2]。该细小病毒被归类为细小病毒科,细小病毒亚科,博卡病毒属。博卡病毒基因组包含 4 个功能蛋白:NS(非结构蛋白)、VP1 和 VP2(均为衣壳蛋白)、NP(核蛋白)^[3]。本研究旨在通过基因克隆技术获得功能蛋白的相关部分基因,并在原核体系中表达相应的 NS、VP 和 NP 的部分蛋白,比较蛋白的功能活性,为进一步博卡病毒单抗的制备和临床的检测工作奠定基础。

1 材料与与方法

1.1 材料 Taq DNA 聚合酶, T4 连接酶,病毒 DNA 提取试剂盒购于美国 QiaGen 公司, BamH I、EcoR I 限制性内切酶购自大连 TaKaRa 生物工程公司; PGEX-20T 载体、BL21 菌种由厦门大学国家传染病诊断试剂与疫苗工程技术研究中心惠赠; DNA 标记 II 购自天根生物科技有限公司; 蛋白相对分子量 Marker 购自凯基生物科技发展有限公司。

1.2 方法

1.2.1 患者标本的采集与博卡病毒的筛查 患者的标本均来源于深圳市福田人民医院儿科和汕头大学医学院第二附属医院儿科 2010 年 3~7 月住院的支气管肺炎患儿鼻咽分泌物标本,于 -80 °C 条件下保存。采用病毒 DNA 提取试剂盒提取病

毒的 DNA,置于 -80 °C 条件下保存备用。根据博卡病毒基因的特点,设计特异性引物采用 PCR 扩增技术筛出患者标本的博卡病毒阳性株。上述工作本实验室均已顺利完成,本实验室检出并鉴定了广东地区首例人博卡病毒 GD-1。上述工作的顺利开展为下一步博卡病毒基因相关功能蛋白的研究奠定了良好的基础。

1.2.2 PCR 特异性扩增 NS、VP 和 NP 的部分基因 登录 GenBank 获得 NS、VP 和 NP 的部分基因,对照 PGEX-20T 载体上的多克隆酶切位点,引入 BamH I 和 EcoR I 酶切位点并加上保护性碱基,设计引物上游引物分别为 NS-F: TTT GGA TCC GAT CCT CTT CGC TTC TTC AAA A, NS-R: TTT GAA TTC TTA TAT TGT CTG AGT CAA GCG AAG TAA C; VP-F: TTT GGA TCC ATG TCT GAC ACT GAC ATT CAA GAC CA, VP-R: TTT GAA TTC TTA TGC CTG TGC TGG CTG CTG T; NP-F: TTT GGA TCC ATG AGC TCA GGG AGT ATG AAA GA, NP-R: TTT GAA TTC TTA TTA ATT GGA GGC ATC TGC TTC; PCR 特异性扩增出 3 种目的基因 NS、VP 和 NP,片段大小分别为 550、859、660 bp。3 个反应体系均采用 ddH₂O 32.75 μL, 10×缓冲液 5 μL, 10 mmol/L dNTPS 4 μL, 25 mmol/L MgCl₂ 4 μL, 上游引物(20 μmol/L) 1 μL, 下游引物(20 μmol/L) 1 μL, 模板 2 μL, TaKaRa Ex Taq(5 U/μL) 0.25 μL, 总体积 50 μL。混匀后短暂离心,先 94 °C 预变性 5 min 后,于 94 °C 30 s, 58 °C 45 s, 72 °C 1 min, 共循环 30 次,获得目的基因。

[△] 通讯作者, E-mail: luxuedong2004@163.com.

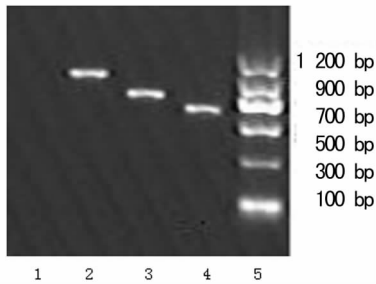
1.2.3 重组质粒构建 将扩增得到的 NS、VP 和 NP 目的基因和 PGEX-20T 质粒分别进行 *Bam* I 和 *Eco*R I 双酶切和连接反应,构建重组质粒。酶切体系(质粒和 PCR 产物共 10 μ L, *Bam*H I 和 *Eco*R I 酶各 1 μ L, K 缓冲液 2 μ L, ddH₂O 6 μ L, 共 20 μ L)37 $^{\circ}$ C 水浴 1 h, 65 $^{\circ}$ C 水浴 15 min 终止酶切反应。连接体系(ddH₂O 8.5 μ L, 10 \times 连接缓冲液 2.5 μ L, PCR 产物 6 μ L, PGEX-20T 2 μ L, T4 DNA 连接酶 1 μ L, 共 20 μ L)16 $^{\circ}$ C 连接过夜, 65 $^{\circ}$ C 水浴 15 min 终止连接反应。

1.2.4 重组质粒双酶切、PCR 及测序鉴定 分别对其进行 PCR、双酶切和送往上海生工生物工程有限公司测序鉴定。PCR 和双酶切反应的体系、条件同 1.2.3。

1.2.5 重组蛋白表达 SDS-PAGE 鉴定 将测序鉴定的工程菌转入大肠杆菌 BL21 中, 在 37 $^{\circ}$ C, 异丙基- β -D-硫代吡喃半乳糖苷(IPTG)浓度为 1.0 mmol/L, 诱导 3 h 后均表达了其目的蛋白。

2 结果

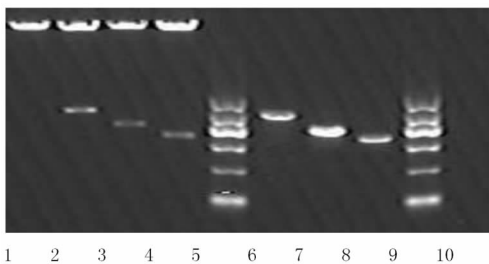
2.1 目的基因 NS、VP 和 NP 的扩增结果 目的基因 NS、VP 和 NP 基因(包括两端的酶切位点和保护性碱基)大小分别为 603、910、710 bp, 见图 1。



1: 阴性对照; 2: VP 部分基因; 3: NP 部分基因; 4: NS 部分基因; 5: DNA 标记 II。

图 1 PCR 产物 1% 琼脂糖电泳分析

2.2 重组质粒的双酶切及 PCR 鉴定结果 重组质粒 PGEX-20T-VP、PGEX-20T-NP、PGEX-20T-NS 的双酶切鉴定结果均能切出目的条带, PCR 鉴定结果均能特异性扩增出目的片段, 见图 2。



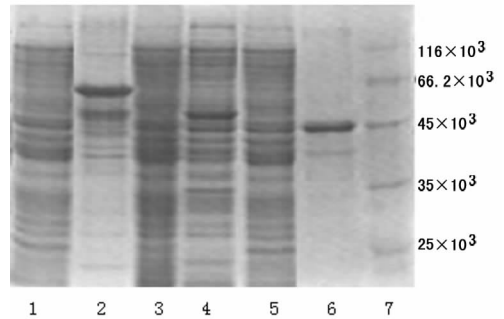
1: PGEX-20T 双酶切; 2: 重组质粒 PGEX-20T-VP 双酶切; 3: 重组质粒 PGEX-20T-NP 双酶切; 4: 重组质粒 PGEX-20T-NS 双酶切; 5、9: DNA 标记 II; 6: 重组质粒 PGEX-20T-VP PCR; 7: 重组质粒 PGEX-20T-NP PCR; 8: 重组质粒 PGEX-20T-NS PCR; 10: 阴性对照。

图 2 重组质粒的双酶切及 PCR 鉴定

2.3 测序鉴定 将 3 种重组质粒的测序结果与 GenBank 上登录的 BNP 序列, 在 NCBI 上做 BLAST 比对, 同源性 100%, 完全正确, 无碱基突变和读码框移位。

2.4 重组蛋白的表达的 SDS-PAGE 鉴定 将通过测序鉴定完全正确的 3 种重组质粒转入大肠杆菌 BL21 中, 在 37 $^{\circ}$ C, IPTG 浓度为 1.0 mmol/L, 诱导 3 h 表达了博卡病毒 VP、NP 和 NS 部

分基因相关蛋白约为 32 \times 10³、26 \times 10³、21 \times 10³, 加上 PGEX-20T 载体带的 GST 标签的融合蛋白 26 \times 10³, 最终表达融合蛋白的大小约为 58 \times 10³、52 \times 10³、47 \times 10³。见图 3。



1: 重组质粒 PGEX-20T-VP 未诱导; 2: 重组质粒 PGEX-20T-VP 诱导; 3: 重组质粒 PGEX-20T-NP 未诱导; 4: 重组质粒 PGEX-20T-NP 诱导; 5: 重组质粒 PGEX-20T-NS 未诱导; 6: 重组质粒 PGEX-20T-NS 诱导; 7: 蛋白相对分子质量标记。

图 3 博卡病毒 VP、NP 和 NS 相关重组蛋白的 10% SDS-PAGE 鉴定

3 讨论

呼吸道病毒感染病原学十分复杂, 目前, 报道在儿童急性呼吸道感染性疾病中, 病毒感染主要病原为呼吸道合胞病毒、人偏肺病毒、冠状病毒、流感病毒 A 型及腺病毒。还有一部分儿童的急性呼吸道感染, 虽然认为是由病毒感染引起, 但是其病原并未被阐明^[4]。博卡病毒是瑞典学者从儿童呼吸道感染样本中筛选到的一种新型细小病毒, 研究提示博卡病毒感染与呼吸道疾病相关, 博卡病毒可能是能致病者的第 2 种细小病毒^[5]。中国 Qu 等^[6], Naghipour 等^[7], 加拿大 Bastien 等^[8], 法国 Jacques 等^[9], 日本 Moriyama 等^[10] 的研究均表明博卡病毒与呼吸道感染相关^[6-10]。

Allander 等对当时发现的两株人博卡病毒进行全基因组测序, 基因组包含 4 个功能蛋白: NS(非结构蛋白)、VP1 和 VP2(均为衣壳蛋白)、NP(核蛋白)。

博卡病毒有两个主要开放读码框架(ORF) 和一个次要 ORF。两个主要 ORF 分别编码一个非结构蛋白(NS) 和两个核壳蛋白(VP1 和 VP2), 次要 ORF 编码产物的功能不详。到目前为止, 不同国家检出的 HBoV 核苷酸序列都表现出高度的一致性, 似乎表明博卡病毒是一种高度保守的病毒, 但有迹象表明 HBoV 的 NP 基因存在差异^[11]。

随着测序工作的顺利完成, 对博卡病毒的研究很快由病毒的筛选和基因组测序转向病毒蛋白组学等后基因组学的研究。因此, 开展对人类博卡病毒主要蛋白的抗原免疫原性研究将对研究 HBoV 具有十分重要的意义。通过生物信息学方法对 HBoV 基因组编码的 NS、NP 及 VP1、VP2 进行二级结构特性的预测性分析, 将有益于蛋白的表达、分离、纯化以及蛋白检测条件的选择^[12]。

本研究采用分子生物学技术体外扩增得到博卡病毒 NS、VP 和 NP 部分基因, 并在原核表达体系中表达 NS、VP 和 NP 部分基因相应的蛋白, 从而可以进一步纯化表达的蛋白, 为博卡病毒单抗制备抗原成分。成功建立博卡病毒蛋白水平的检测平台, 将实现博卡病毒的检测从基因水平向蛋白水平转变, 进而为开创具有自主知识产权的博卡病毒检测试剂盒奠定基础。这将有助于进一步推进人博卡病毒的研究向纵深发展。人博卡病毒对于全世界的科研人员来说, 既充满了机遇也充满了挑战^[13]。

流迅速冲掉染液, 室温干燥, 观察结果。

2 结 果

普通光学显微镜直接油镜观察: 变形杆菌菌体着色殷红, 鞭毛深红且粘连脱落较多, 菌体与鞭毛颜色对比深, 背景有块状染液沉淀(图 1)。改良后, 变形杆菌菌体着色深红, 鞭毛呈浅红, 背景淡红, 层次分明, 轮廓清晰。鞭毛粗细适合染色效果好, 见图 2。

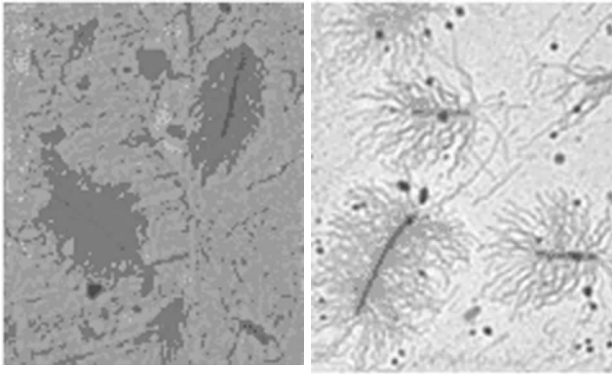


图 1 传统的鞭毛染色 图 2 改良后的鞭毛染色

3 讨 论

经过多次反复的试验, 染液配制的浓度及温度与染色时间, 都与染色的效果有密切的关系。(1) 染液的配制在传统的基础上, 其方法及用量都作了相应的调整, 减少了配制上的繁琐。不像传统的配制方法先将各种固体溶解成溶液^[7,10], 再将其溶液按一定的用量混合。而改良染液是首先将各种溶剂在用量上作了加减的调整, 再一次性加量溶解, 即可过滤, 增强了其中的亲和力, 减少了细菌的着色时间, 只需 30~40 s 即可。(2) 在染色的过程中, 改良染液的温度始终保持在 40~50 °C, 它直接影响标本片的质量, 温度偏低, 标本片上因染液结晶而出现许多染液沉渣, 而温度过高, 容易蒸发掉水分, 染液浓度偏高, 使标本没有层次之分。(3) 采用 50 °C 的恒温培养箱快速烘

干细菌标本, 可使鞭毛蛋白高热凝固, 不致过于膨大。快速流水冲掉标本染液, 既能保证鞭毛染色效果又能保持视野背景洁净。

综上所述, 改良方法染色方法简便、操作简单, 呈现结果时间短、效果良好。适用于微生物学实验教学和临床微生物学鉴定, 具有一定的推广价值。

参考文献

- [1] 谢文熙. 细菌鞭毛染色的效果和影响因素[J]. 检验医学与临床, 2010, 12(7): 1208.
- [2] Murray RGE, Doetsch RN, Robinow CF. Determinative and cytological light microscopy//Gerhardt P, Murray RGE, Wood WA, et al. Methods for general and molecular bacteriology[M]. Washington DC: American Society for Microbiology, 1994: 35-36.
- [3] Rhodes ME. The cytology of Pseudomonas spp. as revealed by a silverplating staining method[J]. J Gen Microbiol, 1958, 18(3): 639-648.
- [4] Kodaka H, Armfield AY, Lombard GL, et al. Practical procedure for demonstrating bacterial flagella[J]. J Clin Microbiol, 1982, 16(5): 948-952.
- [5] 潘运珍, 梁惠冰. 鞭毛镀银染色片的制作和体会[J]. 卫生职业教育, 2010, 28(4): 90.
- [6] 钱晓强, 张维萍. 载玻片清洁的新方法[J]. 医疗保健器具, 2008, 111(5): 66.
- [7] 于爱莲. 医学微生物学实验指导[M]. 北京: 人民卫生出版社, 2005: 59.
- [8] 吕锐. 细菌鞭毛染色法染色条件的探讨[J]. 青岛大学医学院学报, 2006, 42(1): 81.
- [9] 谭瑶, 赵清. K-B 纸片扩散法药敏试验[J]. 检验医学与临床, 2010, 7(20): 2290-2291.
- [10] 胡开辉. 微生物学实验[M]. 北京: 中国林业出版社, 2004: 30-31.

(收稿日期: 2011-03-09)

(上接第 2365 页)

参考文献

- [1] Allander T, Tammi MT, Eriksson M, et al. Cloning of a human parovirus by molecular screening of respiratory tract samples[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2005, 102(36): 12891-12896.
- [2] Kapoor A, Mehta N, Esper F, et al. Identification and characterization of a new bocavirus species in qorillas[J]. PLoS One, 2010, 5(7): 119-148.
- [3] Shirkoohi R, Endo R, Ishiguro N, et al. Antibodies against structural and nonstructural proteins of human bocavirus in human sera[J]. Clin Vaccine Immunol, 2010, 17(1): 190-193.
- [4] Song JR, Jin Y, Xie ZP, et al. Novel human bocavirus in children with acute respiratory tract infection[J]. Emerg Infect Dis, 2010, 16(2): 324-327.
- [5] Chow BD, Esper FP. The human bocavirus: a review and discussion of their role in infection[J]. Clin Lab Med, 2009, 29(4): 695-713.
- [6] Qu XW, Duan ZJ, Qi ZY, et al. Human bocavirus infection, People's Republic of China[J]. Emerg Infect Dis, 2007, 13(1): 165-168.
- [7] Naghipour M, Cuevas LE, Bakhshinejad T, et al. Human bocavirus in Iranian children with acute respiratory infections[J]. J Med

Virol, 2007, 79(5): 539-543.

- [8] Bastien N, Chui N, Joan L, et al. Detection of Human Bocavirus in Canadian children in a 1-year study[J]. J Clinical Microbiology, 2007, 45(2): 610-613.
- [9] Jacques J, Moret H, Renois F, et al. Human bocavirus quantitative DNA detection in French children hospitalized for acute bronchiolitis[J]. J Clin Virol, 2008, 43(2): 142-147.
- [10] Moriyama Y, Hamada H, Okada M, et al. Distinctive clinical features of human bocavirus in children younger than 2 years[J]. Eur J Pediatr, 2010, 169(9): 987-992.
- [11] Lindner J, Karalar L, Zehentmeier S, et al. Humoral immune response against human bocavirus VP2 virus-like particles[J]. Viral Immunol, 2008, 21(4): 443-449.
- [12] Zhao LQ, Qian Y, Ding YX, et al. The expression of the capsid protein VP2 from human bocavirus identified in Beijing and formation of virus-like particles (VLPS) in insect cells[J]. Bing Du Xue Bao, 2009, 25(5): 333-338.
- [13] Kapoor A, Slikas E, Simmonds P, et al. A newly identified bocavirus species in human stool[J]. J Infect Dis, 2009, 199(2): 196-200.

(收稿日期: 2011-08-09)