

· 研究原著 ·

文章编号 1000-2790(2006)13-1217-03

单纯疱疹病毒 2 型糖蛋白 G 的基因扩增、克隆及其 B 细胞抗原表位分析

王茜, 曾抗, 孙乐栋, 周再高, 刘凤岩 (南方医科大学南方医院皮肤科, 广东广州 510515)

Gene cloning and B cell antigen epitope analysis of HSV-2 glycoprotein G

WANG Qian, ZENG Kang, SUN Le-Dong, ZHOU Zai-Gao, LIU Feng-Yan

Department of Dermatology, Nanfang Hospital, Southern Medical University, Guangzhou 510515, China

【Abstract】 AIM: To clone full-length glycoprotein G (gG-2) gene of herpes simplex virus type II (HSV-2) and make a forecast to B cell antigen epitope of gG-2. METHODS: The gG-2 gene of HSV-2 amplified by PCR was inserted into pGEM-T carrier, then transected into *E. coli* DH5 α cells for sequencing. Then, B cell antigen epitope was analyzed by Lasergene, Clustal X softwares. RESULTS: We have cloned full-length gG-2 gene of HSV-2. By making an analysis to B cell epitope of gG-2, we found that the homology in N-terminal of gG-1 and gG-2 genes of HSV was very low. B cell antigen epitope of gG-2 of HSV-2 showed a very high antigen index in "peculiarity domain". CONCLUSION: The successful cloning of full-length gG-2 of HSV-2 and a successful forecast to B cell epitope of gG-2 provide evidences and references for developing diagnostic kits for herpes virus infection and finding better target sites of HSV-2 vaccine.

【Keywords】 herpes simplex virus type II; glycoprotein G-2; genes cloning; epitope

【摘要】目的: 克隆单纯疱疹病毒 2 型(HSV-2)糖蛋白 G-2 (gG-2) 全长基因并对糖蛋白 G-2 进行 B 细胞抗原表位预测。方法: 用 PCR 法扩增 HSV-2 的 gG-2 基因, 连接到 pGEM-T 载体, 转化大肠杆菌 DH5 α 株后测序。利用 Lasergene, Clustal X 等软件进行 B 细胞抗原表位预测。结果: 完成单纯疱疹病毒 2 型(HSV-2)gG-2 全长基因克隆。通过 B 细胞抗原表位分析, 发现 HSV-1 的 gG-1 和 HSV-2 的 gG-2 氨基端的同源性很低。gG-2 蛋白在“独特区”存在抗原指数非常强的抗原表位。结论: 成功构建单纯疱疹病毒 2 型(HSV-2)gG-2 全长基因克隆, 为单纯疱疹病毒感染的诊断试剂的研发及抗单纯疱疹病毒疫苗研究寻找更好的靶位点提供研究材料和参考。

【关键词】 单纯疱疹病毒 2 型; 包膜糖蛋白 G-2; 基因克隆; 抗原表位

【中图分类号】 R392.7; R758.66 **【文献标识码】** A

收稿日期 2006-02-24; 接受日期 2006-03-20

通讯作者: 孙乐栋. Tel: (020)61641984 Email: sunledong126@126.com

作者简介: 王茜, 硕士生(导师曾抗). Tel: (020)61641984

Email: wangqian120@126.com

0 引言

单纯疱疹病毒(herpes simplex virus, HSV)是引起人类病毒性疾病中常见的病毒之一, 可分为 HSV-1 和 HSV-2 两种血清型。HSV-2 型主要感染外生殖器和躯干下部皮肤, 引起生殖器疱疹、新生儿疱疹。目前认为与生殖器恶性肿瘤相关, 并增加了 AIDS 的感染机会^[1]。HSV-2 病毒颗粒中至少有 11 种包膜糖蛋白, 其中 gG-2 为型特异性抗原^[2]。在单纯疱疹 2 型病毒诊断、分型和疫苗研究中起到重要作用。我们对 HSV-2 的 gG-2 基因进行克隆, 并利用生物信息学软件对 gG-2 基因进行 B 细胞抗原表位分析, 为 gG-2 蛋白作为诊断试剂和疫苗研究打下基础。

1 材料和方法

1.1 材料 HSV-2 病毒株由本课题组在广东地区单纯疱疹感染患者中分离培养并感染于 Vero 细胞中保存, Vero 细胞、DH5 α 细胞由本实验室保存。DNAzol-E, DNA 纯化试剂盒购自申能博彩公司, ExTaq 酶、dNTP 购自 TaKaRa 公司, pGEM-T 载体购自 Promega 公司。

1.2 方法

1.2.1 引物设计 根据 GenBank 提供的 HSV-2 病毒(Genbank access number: Z86009)基因组全序列, 利用 Lasergene-PrimerSelect 软件设计引物。上游的引物序列是 5'-AAGCTTACCTTGCCGCCCGCGTCA-3'; 下游的引物序列是 5'-GCGGCCGCTTATCGTGGA-CATTTGCTCG-3'。引物由上海博亚生物技术有限公司合成。

1.2.2 DNA 提取 采用 DNAzol-E 从 HSV-2 病毒 Vero 细胞培养上清中提取 DNA。

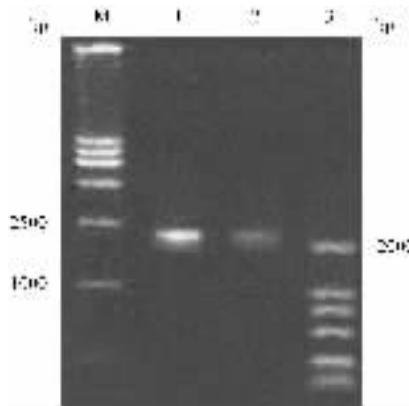
1.2.3 gG-2 基因的扩增 使用 TaKaRa 公司 ExTaq 酶进行 PCR。反应液包括 2.5 mmol 的 dNTPs 3 μ L, 10 \times PCR buffer 3 μ L, 上游引物 1 μ L, 下游引物 1 μ L, ExTaq 0.5 μ L, cDNA 模板 5 μ L, H₂O 16.5 μ L, 总体积 30 μ L。反应条件 94 $^{\circ}$ C 2 min, 94 $^{\circ}$ C 30 s, 55 $^{\circ}$ C 1 min, 72 $^{\circ}$ C 2 min, 30 个循环, 72 $^{\circ}$ C 8 min, 4 $^{\circ}$ C 保存。

1.2.4 基因克隆 使用申能博采公司 DNA 纯化试剂盒回收 PCR 产物, 将回收产物与 pGEM-T 载体连

接,4℃放置 12 h. 将重组载体转化 DH5α 感受态细胞,于氨苄青霉素抗性固体 LB 培养基上 37℃培养 16 h,利用 X-Gal 和 IPTG 筛选阳性重组克隆. 获得的阳性克隆菌扩大培养,提取质粒分别经 PCR 和双酶切初步鉴定,送 TaKaRa 公司测序. 利用 protean 软件对 HSV-2 病毒 gG-2 基因以及 HSV-1 病毒 gG-1 基因进行 B 细胞抗原表位分析,并比较这两型单纯疱疹病毒糖蛋白 G 之间的异同.

2 结果

2.1 HSV-2 病毒 gG-2 基因扩增结果 取确诊生殖器疱疹病毒感染者分泌物接种 Vero 细胞,约 6 d 发生病变后,取上清提取 DNA,用设计的引物进行 PCR,经 7 g/L 琼脂糖凝胶电泳可见一约 2191 bp 的片段,与 HSV-2 标准株的 gG-2 基因大小一致(图 1). 将上述 PCR 产物纯化回收后(图 1)与 pGEM-T 载体连接,转化 DH5α 感受态细胞,利用蓝白斑菌落筛选阳性重组克隆. 对阳性克隆扩大培养,提取质粒进行 PCR 和双酶切初步鉴定,PCR 产物的琼脂糖凝胶电泳条带大小约 2191 bp,阳性克隆质粒双酶切后电泳出现两条带,一条大小约 2191 bp,另一条大小位于 3000 bp(图 2)与预期结果完全一致.

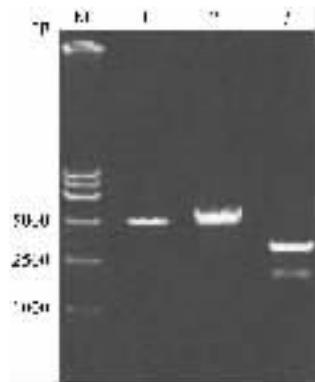


M: DNA Marker, DL15000 1 HSV-2 的 gG-2 基因 PCR 扩增产物 2 纯化的 gG-2 基因 3 DNA Marker DL2000.

图 1 扩增的 HSV-2 gG-2 基因的电泳

2.2 序列测定及 B 细胞抗原表位 鉴定后的阳性克隆进行序列分析发现,阳性克隆质粒中 gG-2 基因测序结果与 GenBank 中国际标准株序列同源性有 99.52%. 将基因序列翻译成氨基酸序列,根据序列分析结果,采用 Poly-Kyte-Doolittle 亲水性、Polt-Emini 表面可能性、Jameson-Wolf 抗原指数三参数综合预测方案预测,结果表明,HSV-2 病毒 gG-2 蛋白中存在 7 段抗原指数以及表面可能性强的肽段相对集中区域. 分别是 50 ~ 74, 134 ~ 160, 285 ~ 410, 437 ~ 482,

523 ~ 605, 615 ~ 637, 678 ~ 688, 其中 314 ~ 338, 352 ~ 367, 447 ~ 482, 527 ~ 544, 550 ~ 562, 570 ~ 578, 585 ~ 600, 615 ~ 625, 678 ~ 688 肽段为最有代表性的肽段(图 3, 4).



M: DNA Marker DL15000; 1 pGEM-T 载体 gG-2 基因重组质粒结果; 2 pGEM-T 载体 gG-2 基因重组质粒 HindIII 单酶切结果 3 pGEM-T 载体 gG-2 基因重组质粒 HindIII/Not I 双酶切结果.

图 2 HSV-2 gG-2 基因重组克隆的鉴定

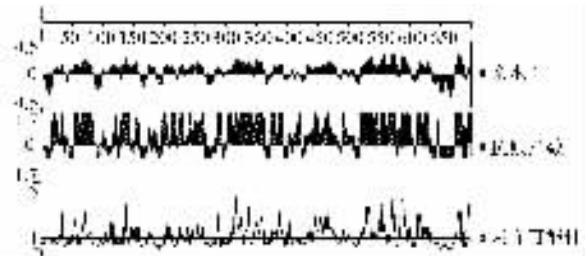


图 3 HSV-2 gG-2 蛋白 B 细胞表位分析

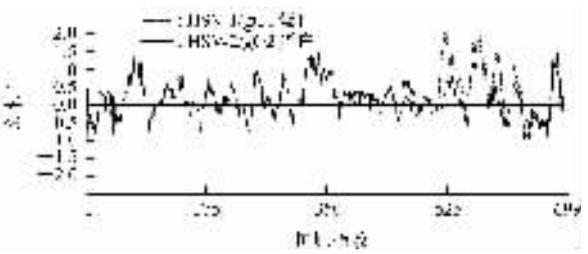


图 4 HSV-2 和 HSV-1 gG-2 蛋白 B 细胞表位比较分析

3 讨论

HSV-2 包膜糖蛋白 gG-2 由 US4 基因编码 699 个密码子,包括一个与 HSV-1 包膜糖蛋白 gG-1 基因高度同源的区域和一个“独特区”^[3]. 通过对 gG-1 蛋白和 gG-2 蛋白的比对以及 B 细胞抗原表位的预测我们发现 gG-1 和 gG-2 基因在“独特区”中的同源性非常低(图 4). gG-2 蛋白中存在 7 段抗原指数以及表面可能性强的肽段相对集中区域. 分别是 50 ~ 74, 134 ~ 160, 285 ~ 410, 437 ~ 482, 523 ~ 605, 615 ~ 637, 678 ~ 688, 其中 314 ~ 338, 352 ~ 367, 447 ~ 482, 527 ~ 544, 550 ~ 562, 570 ~ 578, 585 ~ 600,

615 ~ 625, 678 ~ 688 肽段为最有代表性的肽段。Grabowska 等^[4]利用噬菌体展示技术发现,两个位于 gG-2“独特区”内的免疫显位在氨基酸残基的 351 ~ 427, 525 ~ 587 内,并通过试验证明这两段氨基酸残基只与 HSV-2 型单纯疱疹病毒反应而不与 HSV-1 型单纯疱疹病毒反应。Ikoma 等^[5]利用杆状病毒表达系统表达 gG-2(281aa-594aa),检测 HSV-2 型感染患者血清特异性抗体,特异性和敏感性达到 95.5%。由此说明这两段区域的肽段适合用于临床抗体检测,尤其适合用于 HSV-2 分型诊断。Liljeqvist 等^[6]研究发现^[6], HSV-2 的 gG-2 基因序列抗原区域极少突变,即使出现了点突变也不会削弱 gG-2 的血清学活性。同时进一步证实 gG-2 基因可以作为型特异性抗原,同时指出 gG-2 基因的保守性是作为 HSV-2 特异疫苗成分的先决条件。

我们成功扩增和克隆了 HSV-2 型 gG-2 全长基因片段,并通过 B 细胞抗原表位预测出 gG-1 和 gG-2 蛋白的同源性区域在 gG-1 蛋白 157 ~ 239 肽段和 gG-2 蛋白 615 ~ 699 肽段,其同源性达到 70% 以上,是 HSV 病毒高度保守的区域。在 HSV-2 的 gG-2 蛋白的“独特区”存在 7 段抗原指数很强的氨基酸区段。本研究为单纯疱疹病毒 2 型感染的诊断试剂的研发,抗

单纯疱疹病毒疫苗研究寻找更好的靶位点提供参考。

【参考文献】

- [1] 孙乐栋,周再高,曾抗,等. 性乱人群中单纯疱疹 2 型病毒感染情况及丽珠威的疗效观察[J]. 第一军医大学学报, 2001, 21(10): 769.
- [2] 周建勋. 单纯疱疹病毒 II 型(HSV-2)包膜糖蛋白 G-2 相关研究进展[J]. 国外医学病毒学分册, 2004, 11(4): 123 - 126.
- [3] Gorander S, Svennerholm B, Liljeqvist JA, et al. Secreted portion of glycoprotein G of herpes simplex virus type 2 is a novel antigen for type-discriminating serology[J]. J Clin Microbiol, 2003, 41(8): 3681 - 3686.
- [4] Grabowska A, Jameson C, Laing P, et al. Identification of type specific domains within glycoprotein G of herpes simplex virus type 2 (HSV-2) recognized by the majority of patients infected with HSV-2, but not by those infected with HSV-1 [J]. Gen Virol, 1999, 80(7): 1789 - 1798.
- [5] Ikoma M, Liljeqvist J A, Groen J, et al. Use of a fragment of glycoprotein G-2 produced in the baculovirus expression system for detecting herpes simplex virus type-2 specific antibodies[J]. Clin Microbiol, 2002, 40(7): 2526 - 2532.
- [6] Liljeqvist JA, Syennerholm B, Bergstrom T, et al. T Conservation of type2 specific B2 cell epitopes of glycoprotein G in clinical herpes simplex virus type 2 isolates[J]. J Clin Microbiol, 2000, 38(12): 4517 - 4522.

编辑 袁天峰

· 经验交流 · 文章编号 1000-2790(2006)13-1219-01

超高频皮肤整形仪微创治疗皮肤良性肿瘤 1306 例

张勇,徐红霞,阎晓辉,薛艳斌,黄叶莉,曹朝霞,吴朝君 (海军总医院医学整形科,北京 100037)

【关键词】超高频,微创,皮肤,良性肿瘤
【中图分类号】R758.5 【文献标识码】B

1 临床资料 患者 1306(男 676,女 630)例,年龄 15 ~ 72 (38 ± 10)岁。其中皮脂腺囊肿 738 例,皮肤脂肪瘤 317 例,皮肤软纤维瘤 251 例。手术视野区常规消毒,浸润麻醉,将针直刺囊肿底部继续注入少许麻醉药物。选用柳叶刀状电极,在囊肿顶端中心处先作一直径约 3 mm 的 V 形小创面,当创面底部看到囊壁时,将囊壁点破,内容物排出后,用微血管钳进入直达囊肿底部,将囊壁从底部倒提出。术后囊腔内组织作轻微撕扯便于粘连闭合,然后用庆大霉素注射液冲洗,用干纱布加压包扎 3 d(每日换药)。术后 3 d 囊腔闭合,保持创面干燥,自行愈合。对直径 3 mm 以内的软纤维瘤可直接用柳叶刀状电极祛除,亦可将瘤体完整取出。结果皮肤良性肿瘤 1306 例中,痊愈 1273 例(97.5%),囊肿完全祛除,表皮恢复正常^[1],显效 27 例,经再次治疗后痊愈,效果满意。有效 6 例,

曾接受外科手术治疗后皮脂腺囊肿复发患者,经两次以上治疗,囊肿消失,但皮肤留有痕迹。

2 讨论 皮肤良性肿瘤一般多为囊肿,与皮下组织不粘连,一般无疼痛感,直径约 0.3 ~ 5 cm 之间^[2]。皮脂腺囊肿、皮肤脂肪瘤和皮肤软纤维瘤基本都是后天形成的。多见于面部前额、两侧面颊、耳前、颈后、背部、四肢躯干等全身皮肤。属于良性范围,但影响容貌美观,引起病损呈逐渐生长增大趋势,所以患者强烈要求诊治。传统治疗分为药物腐蚀和外科手术切开缝合法,术后的线状疤痕长度基本都大于囊肿原来的直径很多,且形状各异有增生性疤痕、有萎缩性疤痕,还有拆线后再次裂开时久不愈的。这些因缝合而不可避免的留下的疤痕,属于治疗的遗憾,影响患者的心情,满足不了患者的求美心愿。作者采用了超高频皮肤整形仪治疗时刀状电极将表皮逐层气化^[1-2],使开口边缘修整平整,囊腔与正常组织平滑、自然过度,术后皮肤不留疤痕这一优点,结合外科手术分离、剥脱等手法,以及内容物可顺应排出的特点,成功地实行了微创治疗,获得满意的效果。经长达 5 a 余的病例追踪观察,外观无明显痕迹,从而达到了病除貌美的治疗效果。超高频皮肤整形仪微创治疗各种皮肤良性肿瘤效果显著,方法简便,无特殊治疗护理要求,无任何副作用。

【参考文献】

- [1] 陈辉,赵新华,陈红艳. 超高频皮肤整形仪治疗脸部病变 826 例[J]. 中国美容医学, 2002, 11(1): 25 - 26.
- [2] 张勇,赵新华,叶莉,等. 超高频皮肤整形仪祛除眼部先天性黑色素巨痣疗效观察[J]. 中国美容医学, 2003, 12(6): 585 - 586.

收稿日期 2006-02-09; 接受日期 2006-03-10
作者简介 张勇,主管技师. Tel (010) 66958153 Email fenghs99@163.com

编辑 许昌泰