

· 研究原著 ·

文章编号 1000-2790(2007)15-1345-04

用 Gateway 技术克隆并表达汉滩病毒 G1 蛋白 ITAM 样基序

牟丹蕾, 姜泓, 王英鹏, 李光玉, 潘蕾, 李新红, 王临旭, 张岩, 黄长形, 白雪帆

(第四军医大学唐都医院全军感染病诊疗中心, 陕西 西安 710038)

Cloning and expressions of G1-ITAM-like sequences in Hantaan virus by gateway technology

MOU Dan-Lei, JIANG Hong, WANG Ying-Peng, LI Guang-Yu, PAN Lei, LI Xin-Hong, WANG Lin-Xu, ZHANG Yan, HUANG Chang-Xing, BAI Xue-Fan

Center for Diagnosis and Therapy of Infectious Diseases, Tangdu Hospital, Fourth Military Medical University, Xi'an 710038, China

【Abstract】 AIM: To clone and express wild-type G1-ITAM-like sequence-containing constructs and tyrosine-mutated G1-ITAM-like sequence constructs of Hantaan virus. **METHODS:** G1-ITAM-like sequence-encoding genes of Hantaan virus were amplified from cDNA of the virus strain 84FLi using RT-PCR. Mutagenesis of the ITAM-like sequence was obtained by artificial synthesis. The desired blunt-end PCR products were TOPO[®] cloned into a Gateway[®] entry vector named pENTR[™]/D-TOPO. The recombination reaction were performed using Gateway[®] LR Clonase[™] II enzyme mix to transfer the desired genes into the Gateway[®] destination vector pDEST[™]15. After three expression clones were generated, the recombinant proteins were expressed in BL21-AI[™] strain of *E. coli* under the induction of L-arabinose. The expressions of recombinant proteins were confirmed by Western Blot assay. **RESULTS:** The expression vectors, pDEST-ITAM-L (aa569-aa642), pDEST-ITAM (aa602-aa634) and pDEST-ITAM-YY-FF (Y615F, Y628F), were successfully constructed and highly effective expression of recombinant proteins in *E. coli* were measured by SDS-PAGE. Western Blot assay revealed that recombinant proteins were tagged by GST. **CONCLUSION:** Recombinant fusion proteins containing wild-type and tyrosine-mutated G1-ITAM-like sequences were obtained. This work lays a basis for the further study of the function of Hantaan virus G1-ITAM-like sequence.

【Keywords】 hantavirus; glycoproteins; immunoreceptor tyrosine-based activation motifs

收稿日期 2006-12-28; 接受日期 2007-03-05

基金项目 国家自然科学基金(30471540)

通讯作者: 白雪帆. Tel (029)84777452 Email xfbai@fmmu.edu.cn

作者简介: 牟丹蕾. 博士, 讲师, 主治医师. Tel (029)84777595

Email moudanlei@yahoo.com.cn

【摘要】目的: 克隆并表达汉滩病毒(HTNV)囊膜糖蛋白(G1)胞质区尾段 ITAM 样基序及其突变体. 方法: 采用 RT-PCR 方法扩增 HTNV G1 蛋白 ITAM 样基序及其中 2 个保守酪氨酸残基突变基序编码基因, 应用 Gateway 技术将目的基因克隆至 pDEST[™]15 表达载体, 在 BL21-AI 中经 L-阿拉伯糖诱导表达, 免疫印迹确证融合蛋白的表达. 结果: 成功地构建了 2 个含汉滩病毒 G1 胞质区尾段 ITAM 样基序编码序列表达载体 pDEST-ITAM-L, pDEST-ITAM 和 1 个含保守酪氨酸残基突变的 G1 ITAM 样基序编码序列表达载体 pDEST-ITAM-YY-FF (Y615F, Y628F), 并在大肠埃希杆菌中得到高效表达, 免疫印迹证实目的蛋白与 GST 融合表达. 结论: 获得了 3 种与谷胱甘肽-S-转移酶(GST)融合的 G1 ITAM 样基序及其突变基序的重组蛋白, 为进一步探讨 HTNV G1 蛋白 ITAM 样基序在 HFRS 免疫信号传递中的作用奠定了基础.

【关键词】 汉坦病毒; 囊膜糖蛋白类; 免疫受体酪氨酸活化基序

【中图分类号】R512.8

【文献标识码】A

0 引言

肾综合征出血热(HFRS)在我国广为流行, 严重危害人民的生命健康^[1]. 汉滩病毒(HTNV)引起的 HFRS 重危症多, 病死率高, 其发病机制尚未阐明. Geimonen 等^[2]的研究表明免疫受体酪氨酸酶活化基序(ITAM)—免疫受体活化性信号传递有关的一段以两个酪氨酸残基为中心的序列^[3]存在于 HPS 相关病毒囊膜糖蛋白 1(glycoprotein 1, G1)胞质区尾段, 具有免疫受体 ITAM 相似的功能. HFRS 相关 HV(HTNV, SEOV, DOBV)的 G1 胞质区存在 ITAM 样基序(ITAM-like sequences), 基本形式为 YxxLx9YxxT. HTNV 与 HPS 相关病毒同属于汉坦病毒(hantavirus, HV)属, 基因结构有较高的同源性. 我们以此为切入点, 克隆并表达 HTNV G1 蛋白 ITAM 样基序及其突变体, 获得 G1 ITAM 样基序及其突变基序的融合蛋白, 为进一步探讨 HTNV G1 蛋白 ITAM 样基序在 HFRS 免疫信号传递中的作用奠定基础.

1 材料和方法

1.1 材料 HTNV 84FLi 株由中国预防医学科学院病毒学研究所出血热及虫媒病毒研究室保存. Gate-

way[®]入门载体 pENTR[™]/D-TOPO, Gateway[®]原核表达载体 pDEST[™]15 及大肠埃希杆菌 BL21-AI[™]株(美国 Invitrogen 公司);主要的限制性内切酶(美国 Promega 公司), Pyrobest[™] DNA 多聚酶和 DNA 标准 DL-2000, DL-15 000(日本 TaKaRa 公司); SuperScript[™] II 逆转录酶和 Gateway[®] LR Clonase[™] II 酶混合物(美国 Invitrogen 公司);小鼠抗 GST mAb(美国 Chemicon 公司);细菌 GST 融合蛋白柱纯化试剂盒(美国 PIERCE 公司);总 RNA 提取试剂盒 TRIZOL[®] LS(美国 Gibco 公司);生物素标记的山羊抗小鼠 IgG, 链酶亲合素—过氧化物酶复合物, 二氨基联苯胺(DAB), 葡萄糖氧化酶及小量质粒抽提纯化试剂盒(美国 Sigma 公司);预染蛋白标准(美国纽英伦生物技术有限公司)。

1.2 方法

1.2.1 病毒 RNA 提取 以 0.01 ~ 0.1 感染复数(MOI)的 HTNV 疫苗生产株 84FLi 感染 Vero-E6 细胞,待间接免疫荧光法检测细胞质中特异性荧光达到卅 ~ 卅卅时收获病毒,参照 Trizol 试剂盒操作说明提取病毒感染细胞总 RNA。

1.2.2 引物设计与基因合成 参照 HTNV 国际标准毒株 76 ~ 118 株^[3],中国代表株 A9 株(GenBank 注册号:AF345636)及 84FLi 株(GenBank 注册号:AF035831)核苷酸序列,设计用于扩增 HTNV G1 胞质区尾段 aa569-aa642 和 aa602-aa634 编码序列(含 ITAM 样基序的编码基因)的 PCR 引物 FP1, RP1 和 FP2, RP2,由 TaKaRa 公司合成;同时合成一段突变 G1 ITAM 样基序中两个保守的酪氨酸残基(Y615F, Y628F)的 G1 胞质区尾段 aa602-aa634 的编码基因,连接入 pMD-18 中构建成克隆载体 pMD-ITAM-YY-FF。

1.2.3 RT-PCR 以提取病毒感染细胞的总 RNA 为模板,以 14 bp 随机引物和 RP1 为反转录引物,采用 SuperScript[™] II 逆转录酶按常规方法进行反转录;以合成的 cDNA 及 pMD-ITAM-YY-FF 为模板,分别以 FP1, RP1 和 FP2, RP2 为引物应用 Pyrobest[™] DNA 多聚酶进行扩增,退火温度分别为 55℃ 和 60℃。

1.2.4 应用 Gateway 技术构建载体及序列分析 新鲜 PCR 产物直接通过其上游引物 5'端的 CACC 序列被定向克隆至 pENTR[™]/D-TOPO 中,构建成 Gateway[®]入门载体 pENTR-ITAM-L, pENTR-ITAM 和 pENTR-ITAM-YY-FF。然后,应用 Gateway[®] LR Clonase[™] II 酶混合物通过 LR 重组反应将 Gateway[®]入门载体中目的基因转入 Gateway[®]终载体 pDEST[™]15 中,构建成表达载体 pDEST-ITAM-L, pDEST-ITAM 和

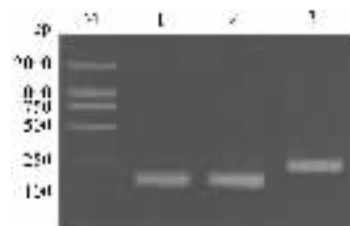
pDEST-ITAM-YY-FF。构建的载体用 PCR 和酶切初步鉴定,送交 TaKaRa 公司进行核苷酸序列测定,应用 DNASTar 生物软件对测序结果进行序列分析。

1.2.5 重组蛋白的表达和纯化 分别挑取转化入质粒 pDEST-ITAM-L, pDEST-ITAM 或 pDEST-ITAM-YY-FF 的大肠埃希杆菌 BL21-AI[™]株单菌落,接种于 LB(含羧苄青霉素 60 mg/L,四环素 20 mg/L)培养基中培养至 $A_{600\text{nm}} = \sim 0.8$,按 1:20 转种于新鲜的 LB(含羧苄青霉素 60 mg/L)培养基中,37℃ 快速震荡培养至 $A_{600\text{nm}} = \sim 0.4$,加 L-阿拉伯糖至终浓度为 5 mmol/L,加葡萄糖至终浓度为 56 mmol/L,继续震荡培养 5 h 至 $A_{600\text{nm}} = 2 \sim 3$,于诱导前及诱导后 1, 3, 5 h 时间点分别收集细菌样本 1 次,向细菌沉淀中加入裂解缓冲液,室温缓摇 10 min,液氮→42℃ 反复冻融细菌裂解液 5 次,离心后取上清进行 SDS-PAGE 鉴定。根据电泳鉴定结果,扩大培养,诱导表达后 5 h 收集细菌,按细菌 GST 融合蛋白柱纯化试剂盒说明书进行纯化,纯化后的蛋白经 SDS-PAGE 分析及透析复性后,分装保存于 -20℃。

1.2.6 Western Blot 检测 蛋白转印及抗体反应按常规进行,与小鼠抗 GST mAb,生物素标记的山羊抗小鼠 IgG 及链酶亲合素—过氧化物酶复合物结合,采用葡萄糖氧化酶-DAB-硫酸镍胺法显色。

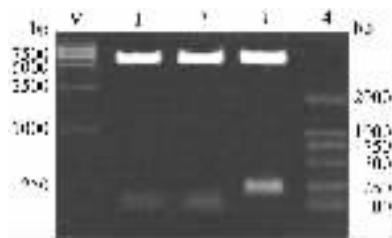
2 结果

2.1 G1 蛋白 ITAM 样基序及其突变体的克隆及序列分析 PCR 产物经琼脂糖凝胶电泳,分别在 245, 121 和 121 bp 位置出现特异性条带(图 1),同理论预期结果相符。应用 Gateway 技术将 PCR 产物克隆入 Gateway 终载体 pDEST[™]15 中,完成表达载体 pDEST-ITAM-L, pDEST-ITAM 和 pDEST-ITAM-YY-FF 的构建,经 PCR 及酶切初步鉴定,得到与预期结果相符的片段(图 2)。DNA 序列分析:与 76 ~ 118 株^[7]及中国株 A9 株、84FLi 株核苷酸序列比较,确证为 HTNV G1 蛋白胞质尾段 ITAM 样基序编码基因及其中 2 个酪氨酸残基突变基序编码基因。



M DL-2000 marker 1 G1-ITAM-YY-FF(aa602-aa634) PCR 产物 2 G1-ITAM(aa602-aa634) 3 G1-ITAM-I(aa569-aa642) PCR 产物。

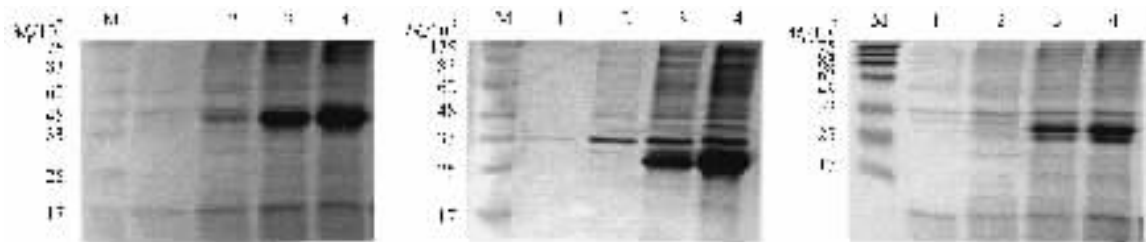
图 1 PCR 扩增 HTNV G1 蛋白 ITAM 样基序编码基因



M DL-15 000 marker 1 pDEST-ITAM/BamHI + KpnI 2 pDEST-ITAM-YY-FF/BamHI + KpnI 3 pDEST-ITAM-L/BamHI + KpnI 4 DL-2000 marker.

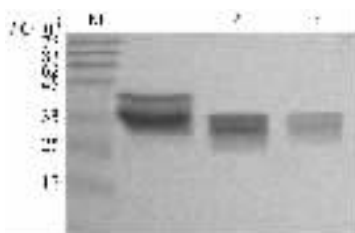
图2 重组质粒限制性内切酶分析

2.2 重组质粒在大肠杆菌中诱导表达及融合蛋白纯化 分别用已鉴定的3种表达载体 pDEST-ITAM-L,



A BL21-AI/ pDEST-ITAM-L B BL21-AI/ pDEST-ITAM-YY-FF C: BL21-AI/ pDEST-ITAM. M: marker 1: L-阿拉伯糖诱导前 2: L-阿拉伯糖诱导1 h后 3: L-阿拉伯糖诱导3 h后 4: L-阿拉伯糖诱导5 h后.

图3 SDS-PAGE 分析重组蛋白的表达



M: marker 1 GST-74G1 2 GST-G1-ITAM 3 GST-33G1.

图4 纯化的GST融合蛋白SDS-PAGE电泳结果

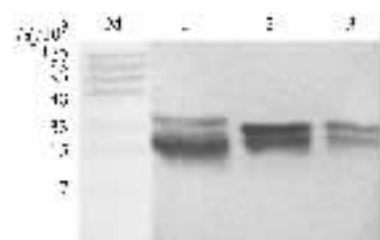
2.3 目的蛋白与 GST 融合表达 为确证重组蛋白, 应用抗 GST mAb 进行 Western Blot 鉴定. 结果显示, 经诱导表达的三种菌体蛋白在预期 M_r 处各出现一条与抗 GST mAb 发生反生的特异性蛋白表达带(图5), 而未经诱导的菌体蛋白在预期相对分子量处未见与抗 GST mAb 相互作用的蛋白条带. 表明, G1 蛋白 ITAM 样基序及其突变体与 GST 融合表达.

3 讨论

许多重要的免疫受体含有 ITAM, 一些病毒基因编码的蛋白也含有 ITAM, 在病毒的致病机制中发挥不容忽视的作用^[5-8]. 标准的 ITAM 基本形式为 YxxLx9YxxL/I, HFRS 相关 HV 的 G1 胞质区存在 ITAM 样基序, 第 2 个 YxxL 中的 Leu 631 转变为 Thr631 基

pDEST-ITAM 和 pDEST-ITAM-YY-FF 转化 BL21-AI™, 采用 L-阿拉伯糖诱导表达后, 经 SDS-PAGE 分析, 分别在相对分子质量约为 36, 30, 30 ku 处出现随诱导时间延长而渐次增强的蛋白表达带, 与理论计算的分子质量相符, 凝胶扫描分析表明, 表达量分别占菌体蛋白的 21.5%, 25.1% 和 19.7%. 诱导前及未诱导菌无此蛋白表达带, 这表明与 GST 融合的 G1 蛋白胞质尾段 ITAM 样基序及其突变体在 BL21-AI™ 中高效表达(图3). 诱导表达 5 h 的细菌经 GST 融合蛋白柱纯化试剂盒纯化后, 获得了 3 种较高纯度的融合蛋白(图4).

本形式为 YxxLx9YxxT, 两个保守的酪氨酸 Y615 和 Y628 位置完全相同. ITAM 基序中第二个 YxxL/I 中的 L/I 可以由其它若干氨基酸如脯氨酸(P)取代, 这种 ITAM 样基序仍具有标准 ITAM 的功能^[9]. ITAM 样基序可能在 HTNV 的致病机制特别是对人体免疫细胞和内皮细胞的作用和损伤中发挥了作用.



M: marker 1 GST-74G1 2 GST-G1-ITAM 3 GST-33G1.

图5 免疫印迹法鉴定重组蛋白

我们通过分析比较 HTNV 国际标准毒株 76 ~ 118 及中国代表株 A9, 疫苗候选株 84FLi 序列, 选取 G1 胞质区尾段高度保守的含 ITAM 样基序的 aa569-aa642 和 aa602-aa634 的编码基因进行克隆表达, 同时人工突变 aa602-aa634 中两个保守酪氨酸残基(Y615F, Y628F), 作为研究 ITAM 样基序功能的对照肽. 应用 RT-PCR 方法扩增 HTNV G1 蛋白 ITAM 样基序编码基因, 获得 HTNV G1 蛋白 ITAM 样基序及

其突变体的编码基因。

我们曾将 G1 蛋白 ITAM 样基序及其突变体编码基因克隆入原核表达载体 pRSET-A 中与 His 融合表达,虽得到了高效表达,但纯化后杂蛋白条带仍较多,经过反复优化条件,仍难以有效的解决。而采用 Gateway® 技术进行基因克隆,成功构建了 G1 蛋白 ITAM 样基序及其突变体表达载体 pDEST-ITAM-L, pDEST-ITAM 和 pDEST-ITAM-YY-FF,明显减少了杂蛋白对后期 G1 蛋白 ITAM 样基序功能研究的干扰。

对纯化产物进行 SDS-PAGE 及 Western Blot 分析时,发现在目的条带下有一条相对分子质量约为 26 ku 的蛋白条带,该蛋白既可以与固相化的还原型谷胱苷肽结合,又可以与抗 GST mAb 发生反生,其大小与 GST 蛋白一致,可能是未与目的蛋白融合的 GST 蛋白,也可能是融合蛋白降解后的 GST 蛋白。在进一步进行相关功能实验时有必要通过设立 GST 对照组,排除 GST 的干扰。

HTNV G1 蛋白 ITAM 样基序及其突变体在原核细胞中成功表达,为进一步研究 G1 蛋白 ITAM 样基序的功能、深入探讨该基序在 HTNV 感染后免疫应答的调节及血管内皮细胞损伤中的作用奠定了基础。

【参考文献】

[1] 王平忠,白雪帆,张颖,等. HFRS 患者汉滩病毒特异性 CTL 克隆靶细胞的建立及意义[J]. 第四军医大学学报, 2004, 25(7):

637 - 640.
[2] Geimonen E, LaMonica R, Springer K, et al. Hantavirus pulmonary syndrome-associated hantaviruses contain conserved and functional ITAM signaling elements [J]. Virology, 2003, 77(2): 1638 - 1643.
[3] 金伯泉. 细胞与分子免疫学[M]. 2 版. 北京: 科学技术出版社, 2001: 582 - 607.
[4] Schmaljohn CS, Schmaljohn AL, Dalrymple JM. Hantaan virus M RNA: Coding strategy, nucleotide sequence and gene order [J]. Virology, 1987, 157(1) 31 - 39.
[5] Xu XN, Laffert B, Screaton GR, et al. Induction of Fas ligand expression by HIV involves the interaction of Nef with the T cell receptor ζ chain [J]. Exp Med, 1999, 189(9): 1489 - 1496.
[6] Dehghani H, Brown CR, Plishka R, et al. The ITAM in Nef influences acute pathogenesis of AIDS-inducing Simian immunodeficiency viruses SIVsm and SIVagm without altering kinetics or extent of Viremia [J]. Virology, 2002, 76(9): 4379 - 4389.
[7] Morrison JA, Raab-Traub N. Roles of the ITAM and PY motifs of Epstein-Barr virus latent membrane protein 2A in the inhibition of epithelial cell differentiation and activation of {beta }-catenin signaling [J]. Virology, 2005, 79(4) 2375 - 2382.
[8] Katz E, Lareef MH, Rassa JC, et al. MMTV Env encodes an ITAM responsible for transformation of mammary epithelial cells in three-dimensional culture [J]. Exp Med, 2005, 201(3) #31 - 439.
[9] Lee H, Guo J, Li M, et al. Identification of an immunoreceptor tyrosine-based activation Motif of K1 transforming protein of Kaposi's Sarcoma-associated herpesvirus [J]. Mol Cell Biol, 1998, 18(9): 5219 - 5228.

编辑 杨湘华

· 经验交流 · 文章编号 1000-2790(2007)15-1348-01

氧氟沙星注射液致过敏反应 2 例报告

毛 纛 刘俊霞

(西北工业大学医院内科, 陕西 西安 710072)

【关键词】氧氟沙星 过敏反应

【中图分类号】R392.8 【文献标识码】B

1 临床资料 例 1, 女, 54 岁。因发热、流涕、咽痛 3 d 于 2006-08 就诊。查体 T 38.2℃, 咽充血, 双扁桃体不大, 心肺无异常。化验血常规: WBC 12.3 × 10⁹/L, N 88%。诊断上呼吸道感染。给与氧氟沙星(氧氟沙星葡萄糖注射液, 四川科伦药业股份有限公司生产, 批号 C060510) 0.2 g 静脉滴注 2 次/d。在第二瓶氧氟沙星治疗将结束时, 患者出现躯干以上肌肉震颤, 尤以头、颈、肩部震颤明显, 不能自控, 颈项僵硬。无头晕、头痛、恶心及呕吐。考虑药物不良反应, 立即停用氧氟沙星, 肌注非那根 25 mg, 上述震颤不能缓解, 给予口服安坦 0.2 g 3 次/d, 安定 2.5 mg 3 次/d。12 h 以后肌肉震颤逐渐缓解,

未再复发, 头颅 CT 扫描正常。

例 2 男 24 岁。因高热伴咽痛及全身不适 1 d 于 2007-02 就诊。查体 T 39.3℃, 咽充血, 双扁桃体 II 度肿大, 有脓性分泌物, 心肺无异常。诊断急性化脓性扁桃体炎。给与氧氟沙星 0.4 g 静脉滴注, 于治疗结束后约 2 h 患者突然出现四肢肌肉震颤。查心电图, 血电解质均正常, 考虑氧氟沙星不良反应所致, 肌注安定 10 mg, 静脉补充液体, 维生素 C 及 B₆, 并予利尿, 上述症状很快缓解。

2 讨论 氧氟沙星是氟喹诺酮类抗菌药物, 抗菌谱广, 抗菌作用强, 临床广泛用于临床治疗呼吸道、消化道及泌尿系统感染性疾病。临床常见的不良反应有消化道反应, 恶心、呕吐、腹痛等, 以及皮肤病变, 如荨麻疹样皮疹、皮肤发痒等。大多减慢滴速症状可减轻。近几年来, 氧氟沙星引起的神经系统不良反应日益增多, 临床主要表现为头痛、头晕、失眠、幻视、幻听及椎体外系症状, 如震颤、抽搐及小脑共济失调等症状, 较严重的可引起严重精神障碍。上述 2 例患者, 均无癫痫及精神病史, 可排除癫痫及精神病复发。均在治疗剂量范围内引起肌肉震颤、僵硬, 值得临床医师引起注意。用药前应详细询问过敏史, 严格掌握适应症和禁忌症。用药过程中注意观察患者病情变化, 并谨慎联合用药, 以避免和减少不良反应的发生。发生不良反应时及时停药, 及时对症处理。

编辑 黄良田

收稿日期 2007-04-26; 接受日期 2007-05-30

作者简介: 毛 纛, 主治医师. Tel (029) 88493838 Ext. 8210 Email:

zhongcw@nwpu.edu.cn