DOI:10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2014.06.012

HCMV 重组嵌合抗原表达质粒构建及免疫反应的初步鉴定

曾宪聪[1],汪小五[1],陈 伟[1],王林定[1,2]

摘要 **目的** 选用人巨细胞病毒(HCMV)抗原性强且亲水性较高片段构建融合抗原表达质粒,诱导其表达,纯化目的蛋白;并初步鉴定其免疫反应性。**方法** 通过 Protean 软件分析了 HCMV UL32、UL44、UL83 序列,设计合理引物;各基因片段用 Overlap 方法连接,并引入 Bgl Ⅱ、BamH Ⅰ 酶切位点,使之可通过酶切与质粒 pQE-80L 连接。重组质粒转化入感受态 BL21(DE3)菌株,经 PCR、酶切鉴定目的基因后再诱导、表达、纯化,获得目的蛋白,采用 Western blot 法检测免疫反应性。**结果** 诱导后的重组菌 pQE80-L-UL32-UL44-UL83 经十二烷基硫酸钠 - 聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE)证实蛋白表达在包涵体。纯化后获得大小约为 52 ku 的目的蛋白,采用 Western blot 法检测证实重组嵌合抗原能与 HCMV 阳性血清有反应。**结论** 构建了重组嵌合抗原表达质粒,并诱导、表达、纯化获得目的蛋白。Western blot 法鉴定嵌合抗原是 HCMV 特异性抗原且有免疫反应性。

关键词 人巨细胞病毒;重组融合抗原;免疫反应性
中图分类号 R 373.4
文献标志码 A **文章编号** 1000 - 1492(2014)06 - 0752 - 05

人巨细胞病毒(human cytomegalovirus,HCMV)又称为人疱疹病毒 5 型,属 β-疱疹病毒亚科,HCMV 感染极为普遍,在育龄期妇女中感染率可达 95% 以上[1-2]。此外,HCMV 感染可通过胎盘侵袭胎儿引起先天性感染,少数造成早产、死产或生后死亡[3]。母婴感染 HCMV 的快速诊断对于决定是否保留胎儿,及采取何种干预措施非常重要。目前国内外已有多家实验室及试剂生产厂家研制生产 HCMV IgM 抗体检测试剂盒,由于缺乏灵敏度强和特异性高的抗原以及生产条件和标准各异[4],因此该实验进一步研究 HCMV 相关基因为实验室诊断与应用提供支持,提高我国孕妇早期 HCMV 感染的检出率。

2014 - 01 - 15 接收

基金项目:国家自然科学基金(编号:81271837);安徽省教育厅自然科学基金(编号:KJ2012A161);安徽医科大学博士科研经费资助项目(编号:XJ200914)

作者单位:安徽医科大学[1]微生物学教研室、[2]病原与免疫学实验室,合肥 230032

作者简介:曾宪聪,女,硕士研究生;
王林定,男,教授,硕士生导师,责任作者,E-mail:wanglinding@ahmu.edu.cn

1 材料与方法

1.1 材料来源 pQE-80L、菌株 BL21(DE3)由本实验室保存。

1.2 主要试剂 Pst Ⅰ、Bgl Ⅱ、BamH Ⅰ、Sal Ⅰ 购自日本 TaKaRa 公司;PVDF 膜购自上海生物工程有限公司;Ni^{2+}-NTA 亲和层析柱购自美国 GE 公司;50 ml 亲和层析预装柱购自上海生物工程有限公司;HRP 标记山羊抗人 IgG 购自北京中杉金桥生物技术有限公司;ECL 化学发光试剂盒购自瑞士 Thermo 公司。

1.3 重组表达质粒的构建

1.3.1 HCMV 抗原片段引物设计 利用 Protean 软件分析了 UL32[5-6]、UL44[7]、UL83[8-9]、氨基酸序列,抗原性强且亲水性好的片段。分析了 UL32、UL44、UL83 氨基酸序列。选择 UL32A(372aa ~ 442aa,213 bp)UL32B(522aa ~ 552aa,93 bp)、UL32C(705aa ~ 727aa,69 bp);UL44 选择 2 个片段,分别为 UL44A(1aa ~ 40aa,120 bp、)UL44B(403aa ~ 421aa,57 bp);UL83 选择 3 个片段,分别为 UL83A(169aa ~ 271aa,309 bp)、UL83B(361aa ~ 478aa,354 bp)、UL83C(535aa ~ 561aa,81 bp)。选取在蛋白质 N 端和 C 端之间的区域,Jameson-wolf 抗原决定簇选正分高处;Kyte-Doolittle 预测亲水性强的区域。最后将选择好的氨基酸序列连成一条完整序列,预测重组蛋白在大肠杆菌中表达的可溶性。预测网址:http://biotech.ou.edu/。然后根据选定基因段序列,设计合理引物。各基因的片段用 Overlap PCR 方法连接,引入 Pst Ⅰ、Bgl Ⅱ、BamH Ⅰ 酶切位点,Overlap PCR 引物设计,在引物 A2 的 3′端加入了 B 基因 5′端的序列,在引物 B1 的 5′端加入了 20 个 A 基因 3′端序列。由于需要构建到 pQE-80L 的质粒中,故在每个融合基因的两端加入酶切位点,在引物 B2 的 3′端加入 BamH Ⅰ 的酶切位点,引物 A1 的 5′端加入 Bgl Ⅱ 与 Sal Ⅰ 酶切位点,便于引入新的基因片段。见表 1。

1.3.2 含目的基因的克隆载体和表达载体的构建 PCR 产物胶回收,按 DNA 回收试剂盒说明进行操作。回收的 PCR 产物与 pQE-80L 载体进行双酶

表1 重组质粒引物

引物名称	序列(5′→3′)
UL32A1	TTTGGATCCGAAAAGCGTCGCGAGCGGCAGAAACGGG
UL32A2	AAAAGATCCCCTCTGGTCTCGATGTTTTTCTCGTCATCAT
UL32 B1	ATGATGACGAGAAAAACATCGAGACCAGAGGGGATCTTTT
UL32B2	GACCGGTGACTCTGCAGTTTGCGTGTCGGTGAAACGCGGATCTTG
UL32C1	CAAGATCCGCGTTTCACCGACACGCAAACTGCAGAGTCACCGGTC
UL32C2	TTTGTCGACTTAAGATCTGACGGAGCCGGTGTCCGAGGAG
UL44A1	TTTGGATCCATGGATCGCAAGACGCGCCTCTCG
UL44A2	GTCGTTGAAGTAATTGCCAACCGTGGTGTTCTCCT
UL44B1	AGGAGAACACCACGGTTGGCAATTACTTCAACGAC
UL44B2	TTTGTCGACTTAAGATCTGAACGTTACAGAATCCTCG
UL83A1	TTTGGATCCACGCGTCAGCAGAACCAGTGGAAAGAG
UL83A2	GGTGCTCGCTGTACTGAGGGCCGTTGCGCTCGTGGG
UL83B1	CCCACGAGCGCAACGGCCCTCAGTACAGCGAGCACC
UL83B2	GGCGACGTTTGGGTTGCGCATTGTGGATTTCGTTGTC
UL83C1	GACAACGAAATCCACAATGCGCAACCCAAACGTCGCC
UL83C2	TTTGTCGACTTAAGATCTACCTCGGTGCTTTTTGGGCGTCGAG

切,酶切后的产物转化至Top10感受态细胞,挑取过夜培养的单菌落,接种于5 ml含Amp的LB培养基的试管中,37 ℃培养过夜,提取质粒,(按质粒提取试剂盒的说明书操作)。质粒经PCR(PCR反应体系:94 ℃变性3 min;94 ℃ 30 s;55 ℃ 30 s;72 ℃ 1 min;循环35次,72 ℃延伸10 min)。1%琼脂糖凝胶电泳鉴定PCR产物和酶切产物。质粒和酶切产物送至上海生物工程有限公司进行序列测定。

1.3.3 重组质粒pQE-80L-UL32-UL44-UL83转化 将pQE80-L重组质粒转化入BL21(DE3)中,冰浴30 min,42 ℃水浴中热击60 s,冰浴5 min。加入600 μl LB培养基,于37 ℃、200 r/min摇床培养45 min后,离心后将菌液均匀涂布在含Amp抗生素的LB固体培养基上,37 ℃ 倒置培养过夜。

1.3.4 目的蛋白的诱导、表达与纯化 挑取转化了含有目的片段的pQE-80L重组质粒的BL21(DE3)单菌落,接种到3 ml含Amp的LB液体培养基中,37 ℃恒温摇床200 r/min培养过夜后,按1∶50转种2~4 h(OD_{600}达0.5左右)取1 ml做诱导前对照,按1∶1 000加入诱导剂(IPTG)终浓度为1 mmol/L,次日取5 ml复苏后的菌液转种到500 ml含Amp的LB液体培养基中,37 ℃摇床培养过夜。样品加入终浓度1 mmol/L的IPTG。培养6、8 h各取1 ml培养物作为诱导后样品4 000 r/min离心10 min收集剩余菌体。两次取样用于SDS-PAGE电泳分析诱导情况。

含重组菌的LB培养液(500 ml)7 000 r/min离心30 min用裂解缓冲液(非变性)悬浮沉淀的菌体。加入终浓度为1 mg/ml溶菌酶及终浓度为1 mmol/ml蛋白酶抑制剂PMSF,冰上放置30 min。超声波破碎仪破碎菌体8 000 r/min离心30 min,过滤收集上清液即为上清粗蛋白(目的为防止有杂质堵住柱头避免柱流速度过慢)。沉淀加含8 mol/L尿素的变性裂解缓冲液50 ml室温溶解8 000 r/min离心30 min后取上清液过滤后即为包涵体粗蛋白。分别取少量上清液和包涵体样品电泳确定目的蛋白的表达部位。

Ni-NTA填料的预处理:用10倍柱体积的ddH_2O清洗Ni^{2+}亲和层析柱,用10倍的裂解缓冲液平衡柱子后,将已预处理好的Ni-NTA悬浮液混匀填装柱子,柱体积达到约1.5 ml。将上清液或包涵体蛋白质样品反复上柱2~3次。依次用5倍柱体积的裂解缓冲液(pH 8.0);5倍柱体积的洗涤缓冲液(pH 6.3)过柱,洗脱杂蛋白;用5倍柱体积的洗脱缓冲液(pH 5.9)将吸附在Ni柱中的目的蛋白洗脱,控制流速0.5 ml/min左右分管收集洗脱样品。纯化蛋白经SDS-PAGE电泳鉴定。

1.3.5 Western blot法检测目的蛋白免疫原性 蛋白样品,经SDS-PAGE分离后转移至PVDF膜上,Western blot按照(分子克隆)所述方法,所用一抗(1∶100)为HCMV确诊患者阳性血清和普通人群正常血清各一份。而二抗HRP标记山羊抗人IgG抗体(1∶15 000)加入化学发光剂,曝光,拍照。

2 结果

2.1 重组融合抗原表达质粒PCR鉴定 获得的重组质粒pQE80-L-UL32-UL44-UL83,经PCR扩增鉴定,PCR产物经1%琼脂糖凝胶电泳扩增出约1 356 bp大小的相应基因片段。证明该融合抗原表达质粒均已构建成功,送样至上海生物工程有限公司进行序列测定,序列比对正确。见图1A。

2.2 重组融合抗原表达质粒酶切鉴定 挑取重组质粒pQE80-L-UL32-UL44-UL83,用BamHⅠ,SalⅠ做双酶切后经1%琼脂糖凝胶电泳验证,电泳出现1 356 bp大小的条带,证明PQE-80L表达载体质粒构建成功。酶切有目的条带的重组质粒送上海生物工程有限公公司进行测序,测序结果正确。见图1B。

2.3 HCMV重组融合抗原蛋白诱导表达与纯化 将HCMV重组融合抗原质粒转化入大肠杆菌BL21(DE3)受体菌中,ITPG诱导后,重组蛋白成功表达

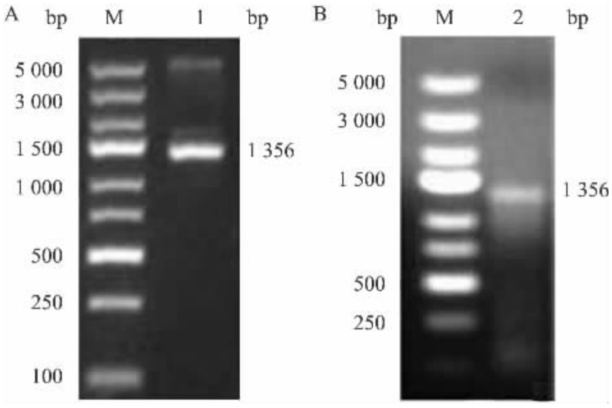

图 1 pQE80-L-UL32-UL44-UL8 目的基因 PCR 扩增和重组质粒双酶切鉴定

A: HCMV 重组融合抗原表达质粒 pQE80-L-UL32-UL44-UL83 质粒酶切电泳图; B: HCMV 重组融合抗原表达质粒 pQE80-L-UL32-UL44-UL83 PCR 产物电泳图; M: Marker; 1: 重组 pQE80-L-UL32-UL44-UL83 质粒双酶切; 2: PCR 产物

于大肠杆菌中,并经 SDS-PAGE 电泳分析诱导情况,电泳显示重组蛋白以包涵体形式表达。包涵体粗蛋白经过 Ni 亲和层析纯化,见图 2,含 pQE80-L-UL32-UL44-UL83 /BL21 (DE3) 表达含大小约为 52 ku 的蛋白,SDS-PAGE 电泳 6 ~ 7 泳道显示约在 50 ku 处有条带,与预期目的蛋白大小相一致; 但在约 70 ku 的位置也出现了一条带,考虑其为蛋白特异性条带。

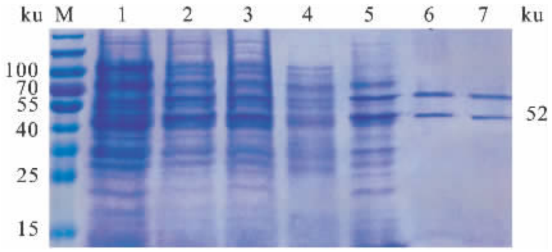

图 2 HCMV 重组嵌合抗原蛋白 pQE80-L-UL32-UL44-UL83 /BL21 (DE3) 的诱导表达与纯化

M: Marker; 1: 重组菌诱导前; 2 ~ 3: 重组菌诱导后 6、8 h; 4: 重组菌破碎后上清液; 5: 重组菌破碎后包涵体; 6 ~ 7: 重组菌体 Ni^{2+}-NTA 柱纯化

2.4 Western blot 法鉴定免疫反应性 纯化了的目的蛋白经 SDS-PAGE 电泳之后,转至硝酸纤维素膜上,进行 Western blot 鉴定,诱导前后与纯化后的结果。见图 3。通过 ELISA 筛查出阳性和阴性血清各一份作为一抗; 诱导的菌体蛋白中没有和 HCMV 阳性血清反应的条带,但是有一些非特异性的条带,发现在诱导后和目的蛋白纯化后的样品在预期分子量处出现了特异性的条带,这和上图诱导纯化后条

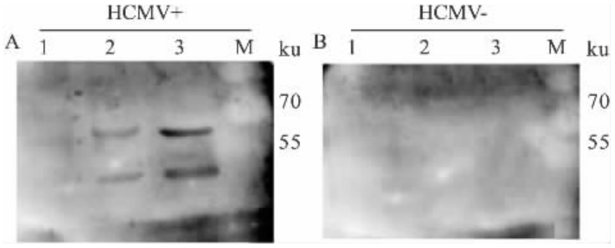

图 3 Western blot 法分析重组融合抗原蛋白 pQE80-L-UL32-UL44-UL83

A: HCMV 阳性血清反应; B: HCMV 阴性血清反应; M: Marker; 1: 诱导前样品; 2: 诱导后样品; 3: Ni^{2+}-NTA 纯化后蛋白样品 Western blot HCMV + 是与阳性血清作为一抗有反应,HCMV - 是与阴性血清作为一抗均没有反应

带相符,而且反应性很强。初步证实此重组融合抗原是 HCMV 的特异性抗原; 具有免疫反应性。

3 讨论

本实验分析了 HCMV UL32、UL44、UL83 蛋白抗原性强且亲水性高的氨基酸片段,分别编码抗原 p150、p52、pp65 具有很好的抗原性; 有文献[10-11] 报道多种巨细胞病毒抗原组合可以获得比单一重组抗原更好的结果,国内方毅 等[11] 报道用重组嵌合抗原 gp52 和 PP150 的抗原性做了检测分析,阳性率也达到了 92%。国内孙鹏 等[12] 报道了 p150、p52、pp65 的灵敏度/特异性分别是 70% /100% 、80% /100% 、73.3% /100% ,Landini et al [13] 对 UL44、UL80a 单一片段的重组抗原和多功能重组抗原做了比较,证明多种巨细胞抗原重组阳性检出率(98%) 明显高于单片段重组抗原阳检率(72%) 。从结果可知重组单片段优势抗原可以克服全病毒假阳性反应,但是阳性检出率较低; 用重组巨细胞病毒融合抗原可获得比单一片段重组抗原更好的结果。综上文献报道都充分证实了选用多个基因片段构建的重组嵌合抗原检测 HCMV 可以大大提高感染检出率,检测早期活动性的感染,其实际价值远远大于单片段的检测[13] 。因此笔者通过将 HCMV 各基因相应氨基酸序列相融合,通过与 pQE80-L 质粒连接,构建重组表达质粒,再通过不断酶切连接的方法,成功构建 HCMV 重组融合抗原表达质粒 pQE80-L-UL32-UL44-UL83; 其酶切后大小如图 1 所示为 1 356 bp,且序列测序比对正确。重组质粒导入大肠杆菌 BL21(DE3) 后,可成功表达,经 SDS-PAGE 分离及 Western blot 验证,确证其为目的蛋白。重组菌在终浓度为 1 mmol/L IPTG 成功诱导 6 ~ 8 h 后,收集

并破碎菌体,经确认其表达是在包涵体中。通过 Ni^{2+}-NTA 进行初步纯化,含 His-Tag 的蛋白可被洗脱。但由于重组融合抗原蛋白较大,容易出现比目的蛋白较大的条带;如图 2 结果显示在分子量(Marker) 50 ku 处有目的条带出现,但是约在 70 ku 显示有一条条带,在图 3 的 Western blot 鉴定中得到证实考虑为重组融合抗原的特异性条带;与血清结合反应也证实了该重组嵌合抗原其具有很好免疫反应性和特异性。

由于 HCMV 目前诊断没有统一的标准及其标准的诊断试剂盒。有报道[14]表明间接 ELISA 的抗 HCMV-IgM 阴性并不能排除 HCMV 感染的可能性。设计这种重组质粒,可以在后续试验中进行比较重组蛋白的特异性及灵敏度。提高孕妇 HCMV 早期感染检出率;提高优生优育,及其他相关疾病的发生;开发 HCMV 早期诊断的快速、灵敏的诊断试剂盒,就显得更有意义。

参考文献

[1] 饶美兰,郑 瑛,张畅斌. 孕妇巨细胞病毒感染及其母婴垂直传播[J]. 中国生育健康杂志,2008,19(2):95-8.

[2] Odeberg J,Wolmer N,Falci S,et al. Late human cytomegalovirus (HCMV) proteins inhibit differentiation of human neural precursor cells into astrocytes[J]. J Neurosci Res,2007,85(3):583-93.

[3] Neirukh T,Qaisi A,Saleh N,et al. Seroprevalence of Cytomegalovirus among pregnant women and hospitalized children in Palestine[J]. BMC Infect Dis,2013,13(1):528.

[4] 范行良,英志芳. 人巨细胞病毒 IgM 抗体国家参考品的研制[J]. 微生物学免疫学展,2012,40(3):30-2.

[5] Sampaio K L,Cavignac Y,Stierhof Y D,et al. Human cytomegalovirus labeled with green fluorescent protein for live analysis of intracellular particle movements[J]. J Virol,2005,79(5):2754-67.

[6] Ma Y,Gao S,Wang L,et al. Analysis and mapping of a 3′coterminal transcription unit derived from humancytomegalovirus open reading frames UL30-UL32[J]. Virol J,2013,(10):65.

[7] Beqaj S H,Lerner A M,Fitzgerald J T,et al. Immunoassay with cytomegalovirus early antigens from gene products p52 and CM2 (UL44 and UL57) detects active infection in patients with chronic fatigue syndrome[J]. J Clin Pathol,2008,61(5):623-6.

[8] 白 剑,肖 漓,石炳毅,等. 器官移植术后人巨细胞病毒感染的实验室诊断研究进展[J]. 中国误诊学杂志,2008,8(12):2791-3.

[9] 杨美芳,高海女,范 骏,等. pp65 抗原血症监测异基因造血干细胞移植受体 CMV 的感染[J]. 中华微生物学和免疫学杂志,2006,26(11):993.

[10] Bernard W,Annemarie B,Holger R,et al. Human cytomegalovirus infection: diagnostic potential of recombinant anigens for cytomegalovirus antibody detection[J]. J Virol Methods,2001,96(2):157-70.

[11] 方 毅,司炳银,祝庆余,等. 巨细胞病毒 ppl50 和 gp52 融合基因的克隆表达及重组蛋白的抗原性研究[J]. 中华检验医学杂志,2006,29(4):365-6.

[12] 孙 鹏,孙兴宝,胡 鹏,等. 重组人巨细胞病毒(HCMV)优势表位嵌合抗原的构建表达以及捕获法检测 IgM 抗体[J]. 遗传,2007,29(11):1351-6.

[13] Landini M P,Lazzarotto T,Maine G T,et al. Recombinantmono and polyantigens to detect cytomegalovirus specific immunoglobulin M in human sera by enzyme immunoassay[J]. J Clin Microbiol,1995,33(10):2535-42.

[14] 张新萍,李 沛. 酶联捕获法检测抗人巨细胞病毒-IgM 抗体的实验分析[J]. 中华实验和临床病毒学杂志,2003,17(3):285.

Construction of HCMV recombination multi-epitope antigen expression vector and preliminary identification of immunogenicity

Zeng Xiancong,Wang Xiaowu,Chen Wei,et al

(*Dept of Microbiology*,*Anhui Medical University*,*Hefei* 230032)

Abstract ***Objective*** To construct fusion antigen expression plasmid by choosing strong antigenicity and higher hydrophilic segments of HCMV gene,we induce expression,purify target protein and preliminarily identify immunogenicity of HCMV in order to develop fast and sensitive diagnostic kits research laboratory diagnosis. ***Methods*** in future. Methods Sequences of HCMV UL-32,UL-44,UL-83,were analyzed by software of Protean to design reasonable primers. Each gene fragment was linked by using Overlap method at the same time Pst Ⅰ,Bgl Ⅱ,BamH Ⅰ sites were introduced to make it connected to plasmid pQE80-L by enzyme digestion,then the recombinant plasmid was transformed into BL21. Target gene identified by PCR and digestion was induced to express the protein. The protein was purified and its immunoreactivity was assayed by Western blot. ***Results*** After inducing,recombinant bacteria,pQE80-L-UL32-UL44-UL83,had a fusion of 52 ku protein by SDS-PAGE electrophoresis. Recombinant

天麻素预处理减轻大鼠心肌缺血再灌注损伤的可能机制

位　凯，王　飞，张　瑾，李　珍，沈　兵，王烈成，孔德虎，胡金兰

摘要　**目的**　探讨天麻素预处理减轻大鼠心肌缺血再灌注损伤(MIRI)作用的可能机制。**方法**　健康 SD 大鼠 60 只，随机分为假手术组，MIRI 组，天麻素低、中、高剂量组(0.1、0.2、0.4 g/kg)，采用结扎大鼠左冠状动脉前降支 30 min，再灌注 120 min 的方法制备 MIRI 模型，分别测定血清及心肌组织中肿瘤坏死因子-α(TNF-α)和白介素-6(IL-6)的变化以及心肌组织中肌浆网 Ca^{2+} - ATP 酶(SERCA)的变化。**结果**　0.2、0.4 g/kg 天麻素预处理后，血清及心肌组织中 TNF-α 和 IL-6 的含量均降低($P<0.05$)，心肌组织中 SERCA 的含量均升高($P<0.01$)。**结论**　天麻素预处理减轻大鼠 MIRI 的机制可能与减少炎症因子 TNF-α 和 IL-6 的释放以及增加 SERCA 含量有关。

关键词　天麻素；缺血再灌注损伤；肿瘤坏死因子；白介素-6；心肌肌浆网 Ca^{2+}-ATP 酶
中图分类号　R 33-33；R 932
文献标志码　A　**文章编号**　1000 - 1492(2014)06 - 0756 - 04

心肌缺血再灌注损伤(myocardial ischemia reperfusion injury，MIRI)其病理机制主要与氧自由基过多、钙超载、炎症反应、细胞凋亡等有关[1]。天麻是一种具有多种功效的中药，天麻素(4-羟甲基苯甲醇-β-D 吡喃葡萄糖甙)是其活性最高的有效单体，具有改善神经系统血供、镇静、催眠和抗惊厥的作用[2]，还具有降低外周血管阻力和血压的作用[3-4]。该课题组前期研究[5]显示天麻素预处理能明显减轻大鼠 MIRI，可能与减轻 MIRI 时的炎症细胞浸润有关，在炎症反应中肿瘤坏死因子-α(tumor necrosis factor-α，TNF-α)和白介素-6(interleukin-6，IL-6)起主要作用，因此该实验在原有实验的基础上，从炎症因子变化的角度进一步探讨天麻素预处理减轻大鼠 MIRI 作用的可能机制。前期研究[5]还表明天麻素可能会抑制 Ca^{2+} 超载，这种作用是否与肌浆网 Ca^{2+} - ATP 酶(sarcoplasmic reticulum Ca^{2+} - ATPase，SERCA)有关，也是本研究要解决的问题。

2014 - 01 - 05 接收
基金项目：国家自然科学基金(编号：30900420)；安徽省杰出青年基金资助(编号：1108085J11)；校级优秀青年教师后备人选基金资助(编号：2009A208)
作者单位：安徽医科大学基础医学院生理教研室，合肥　230032
作者简介：位　凯，女，硕士研究生；
胡金兰，女，副教授，硕士生导师，责任作者，E-mail：hj-lan1872@163.com

1　材料与方法

1.1　实验动物与分组　60 只健康成年 SPF 级 SD 大鼠(安徽省实验动物中心)，雌雄不拘，体重(230 ± 10) g，随机分为假手术组，MIRI 组，0.1、0.2 和 0.4 g/kg 天麻素组。

1.2　主要试剂及仪器　天麻素(批号：2010081，纯度：99.2%，江苏宝泽堂医药科技有限公司)；TNF-α、IL-6、SERCA 检测试剂盒(上海森雄科技实业有限公司)；其他试剂均为分析纯；BL-420E 生物信号采集分析系统、动物呼吸机(成都泰盟科技有限公司)；SpectraMax190 酶标仪(Molecular Devices 公司)。

1.3　实验方法

1.3.1　大鼠 MIRI 模型制备　于每日上午 9：00 对各组大鼠灌胃给药：假手术组与 MIRI 组均给予生理盐水灌胃，天麻素组分别给予 0.1、0.2 和 0.4 g/kg 的天麻素灌胃，连续 7 d。于第 7 天灌胃后建立大鼠 MIRI 模型：用 10% 水合氯醛以 3 ml/kg 的剂量腹腔注射麻醉，做气管插管，连接呼吸机(呼吸频率 60 次/min，潮气量 11 ml/次，呼 - 吸之比为 1：2)。四肢皮下连接电极，标Ⅱ导联接 BL-420E 生物信号采集分析系统连续记录心电图。在左侧第 3 ~ 4 肋间隙之间钝性分离肌肉，暴露心脏，在左心耳下缘处以冠状静脉主干为标志，用 5-0 号带针无创缝合线进针，向肺动脉圆锥方向出针，连同直径 2 mm 塑料管一起打活结结扎左冠状动脉前降支，缺血成功的

chimeric antigen could react to HCMV positive serum through Western blot. ***Conclusion***　The recombinant fusion antigen expression plasmid is constructed to obtain target protein. Multi-epitope antigen is confirmed to be the specific antigen for HCHV and has immunity by Western blot.

Key words　HCMV；fusion antigen；immune reactivity