

卡波肉瘤相关疱疹病毒 ORFK12 蛋白初步研究

汪小五, 曾宪聪, 陈伟, 张莹, 吴悦, 杜爱能, 刘璐璐, 王林定

摘要 目的 研究卡波肉瘤相关疱疹病毒(KSHV) ORFK12 基因在大肠杆菌的表达及表达的蛋白在普通人群中检测 KSHV 的感染情况。方法 设计一对特异性引物,以 BCBL-1 细胞总 DNA 为模板,采用 PCR 方法扩增 KSHV ORFK12 基因。构建含目的基因的重组质粒命名为 PQE-80L-K12 和诱导蛋白表达。采用 ELISA 法和 Western blot 法筛查临床收集的血清标本中感染 KSHV 的情况。结果 异丙基- β -D-硫代吡喃半乳糖苷(IPTG)诱导后的 PQE-80L-K12 重组菌经十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE)显示有一个约 10 ku 的融合表达蛋白为 ORFK12 蛋白。采用 ELISA 法和 Western blot 法检测显示 ORFK12 蛋白能与 KSHV 阳性血清反应。结论 KSHV ORFK12 基因在大肠杆菌中表达,表达的 ORFK12 蛋白在实验室检测感染 KSHV 有一定的辅助作用。

关键词 卡波肉瘤相关疱疹病毒;ORFK12 基因;ORFK12 蛋白

中图分类号 R 373.4

文献标志码 A 文章编号 1000-1492(2014)05-0565-04

卡波肉瘤相关疱疹病毒(Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus, KSHV)是由美国哥伦比亚大学华裔病理学家 Chang 等于 1994 年对卡波肉瘤(Kaposi's sarcoma, KS)组织中特异 DNA 进行检测时发现的,是双链 DNA 病毒^[1-2]。经研究^[3]显示 KSHV 是 KS、原发渗液性淋巴瘤(primary effusion lymphoma, PEL)、多中心卡斯特慢病(multicentric Castleman disease, MCD)的病原体。K12 基因编码的蛋白被称为卡波济蛋白,它是 KSHV 感染潜伏期所特有的蛋白^[4],几乎在所有的 KS 纺锤样细胞和潜伏感染的原发渗液性淋巴瘤细胞中表达^[5]。笔者通过对 KSHV K12 基因进行基因扩增,诱导其表达,表达蛋白检测与血清的反应情况,为研究 KSHV 的致病机

制提供实验依据。

1 材料与方法

1.1 材料来源 细胞系 BCBL-1、表达载体 PQE-80L 质粒、宿主大肠杆菌 DH5a、BL21 (DE3) 为本实验室保存;pEASY-T1 simple cloning kit 购自北京全式金生物技术有限公司;Ni-NTA 购自美国 GE 公司。

1.2 工具酶和试剂 BamH I、Sal I 购自美国 Fermentas 公司;质粒小抽提取试剂盒购自美国 Axygen 有限公司;PVDF 膜购自美国 Bio-Rad 公司;辣根过氧化物酶(HRP)标记山羊抗人 IgG 抗体、碱性磷酸酶(ALP)标记的山羊抗人 IgG 购自武汉博士德生物工程有限公司。

1.3 重组 T 质粒的构建和重组质粒 PQE80-L-K12 的构建及表达与纯化

1.3.1 PCR 引物的设计与合成 参照 NCBI 上的 K12 序列设计引物如下,上游引物:5'-TTG-GATCCATGGATAGAGGCTTAACG-3';下游引物:5'-TTGTCGACTTAGTGCGCGCCCGTTGC-3' (下划线部分分别为 BamH I、Sal I 的酶切位点),以 BCBL-1 细胞总 DNA 为模板,按照设计好的 K12 序列的上、下游引物送至上海生工生物公司合成。PCR 反应条件:95 °C 变性 5 min,然后 94 °C 1 min,50 °C 30 s,72 °C 1 min 热循环 35 次,最后 72 °C 延伸 10 min。PCR 产物经 1% 琼脂糖凝胶电泳鉴定,大小正确,用胶回收试剂盒切胶回收 PCR 产物。

1.3.2 重组 T 质粒的构建 切胶回收的 PCR 产物 PCR-K12 与 pEASY-T1 载体用 T4 连接酶 16 °C 连接过夜,连接产物转化大肠杆菌 DH5a 感受态细胞,铺板于氨苄(Amp)抗性的 LB 培养基平板上(铺板前在 LB 培养基平板上均匀涂布 8 μ l 的 500 mmol/L IPTG 和 40 μ l 的 20 mg/ml 半乳糖苷酶(X-gal)混合液,用于蓝白斑筛选),置于 37 °C 恒温培养箱倒置培养过夜。次日挑取白斑单菌落转接于 3 ml 含 Amp 的 LB 培养基上 37 °C 恒温摇床 200 r/min 培养过夜后提取质粒,用 BamH I、Sal I 做双酶切鉴定。酶切正确的重组 T 质粒做基因测序进一步鉴定。

2013-11-25 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:安徽医科大学微生物学教研室,合肥 230032

作者简介:汪小五,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

1.3.3 重组质粒 PQE-80L-K12 的构建 PQE-80L 表达载体和测序正确重组 T 质粒用 BamH I、Sal I 同时做双酶切,回收双酶切后的 PQE-80L 的载体和目的基因 ORFK12 用 T4 连接酶连接。连接产物转化大肠杆菌 BL21 感受态细胞,其后的构建过程如构建重组 T 质粒过程一样,同样提取质粒做双酶切和测序鉴定。

1.3.4 目的蛋白诱导表达及表达蛋白纯化 经鉴定的重组 PQE-80L-K12 转化菌接种于 3 ml 含有 Amp 青霉素的 LB 液体培养基中,置于 37 °C 恒温摇床 200 r/min 培养过夜后。将过夜培养物取 60 μ l 转入 3 ml 含 Amp 青霉素的 LB 液体培养基中(转种比例 1:50),培养 3 h 后,取出 1 ml 培养物作为诱导前样品后,按 1:1 000 比例加入 IPTG 诱导剂,其终浓度为 1 mmol/L。37 °C、200 r/min 摇床继续培养 8 h,再取 1 ml 培养物作为诱导后的样品。诱导前样本和诱导后样本 SDS-PAGE 电泳分析蛋白表达情况,确认蛋白已表达后,次日扩大培养(500 ml LB 培养液)。

表达蛋白制备:收集扩大培养的表达菌体(500 ml LB 培养液)在 4 °C、7 000 r/min 离心 15 min,弃上清液,用 100 ml 裂解缓冲液(非变性)裂解沉淀,蛋白酶抑制剂 PMSF 至终浓度为 1 mmol/ml,加入溶菌酶至终浓度 1 mg/ml。冰上放置 40 min。用超声波细胞破碎仪破碎细胞,功率 300 W,超声 3 s 间隔 10 s,破碎 3 次。于 4 °C 以 8 000 r/min 离心 15 min 之后,用灭菌的移液枪将上清液移至 50 ml 的离心管里,再用 0.45 μ m 的滤膜过滤即为上清粗蛋白,留下的沉淀加 50 ml 变性的裂解缓冲液室温溶解,8 000 r/min 离心 15 min 后取上清液并且用 0.45 μ m 的滤膜过滤后即包涵体粗蛋白。10 μ l 的上清粗蛋白和 10 μ l 的包涵体粗蛋白样品经 SDS-PAGE 电泳确定目的蛋白的表达位置。

用 10 倍柱体积的超纯水清洗柱子,将已预处理好的 Ni-NTA 悬浮液混匀填充柱子,体积约 1.5 ml。将包涵体蛋白样品或者上清蛋白样品经过 Ni-NTA 柱进行纯化。依次用 5 倍柱体积的裂解缓冲液、5 倍柱体积的洗脱缓冲液过柱,洗脱杂蛋白。最后用 5 倍柱体积的洗脱液缓冲液洗脱吸附在 Ni 柱中的目的蛋白,分管收集样品。纯化的蛋白经 SDS-PAGE 电泳鉴定。

1.4 ELISA 法筛查临床血清标本 包被:上述纯化的含目的蛋白样品用 pH 9.6 的包被缓冲液稀释

到 1 ng/ μ l 将其作为抗原,在 96 孔酶标板中加入 50 μ l 4 °C 包被过夜;洗板:PBS-T 洗板 5 次;封闭:每孔加入 250 μ l 含 5% 脱脂奶粉和 1% 山羊血清的 PBS 溶液,37 °C 孵育 1 h;洗板:PBS-T 洗板 5 次;第一抗体结合:利用本实验室制备的 KSHV ORF65、ORF73 和 ORFK8.1 蛋白作为抗原从蚌埠地区普通人群血清中筛选的 KSHV 阳性、阴性血清(包括 32 份阳性和 32 份阴性)作为一抗,其血清按 1:100 比例稀释,每孔加入 50 μ l,37 °C 孵育 1 h;洗板:PBS-T 洗板 5 次;第二抗体结合:采用 AP 标记的山羊抗人的抗体作为二抗,按 1:2 000 比例每孔加入 50 μ l,37 °C 孵育 1 h;洗板:PBS-T 洗板 5 次;显色:以 p-NPP 作为显色剂,用显色缓冲液稀释到 1 mg/ml 后每孔加入 50 μ l,37 °C 孵育 15 min,加入 3 mol/L NaOH 溶液终止反应,用酶标仪测 405 nm 处的吸光度(optical density, OD)值。每份样本重复 3 次。分析纯化的目的蛋白与血清里的相应抗体的反应情况。结果判定:以阴性样品 OD 值平均值加上 5 倍标准差(standard deviation, STD)为 Cut-Off 值。样品 OD 值高于 Cut-Off 值则认为该血清与 ORFK12 基因表达的蛋白有反应。有反应的阳性血清和无反应的阴性血清用于 Western blot 实验进一步确认其与血清的反应情况。

1.5 Western blot 法鉴定 ORFK12 蛋白与血清的反应性 纯化了的蛋白经 SDS-PAGE 分离后转移至 PVDF 膜上,PVDF 膜放在封闭液中封闭 2 h,与 1:100 稀释的从以上利用 ELISA 法筛选出的 10 份有反应的阳性血清和无反应的阴性血清随机各取 3 份作为一抗,4 °C 孵育过夜。再与 HRP 标记的山羊抗人 IgG 抗体(1:20 000)室温孵育 1 h,将化学发光底物试剂加至 PVDF 膜上。把 X 线片覆盖在膜上压紧曝光,拍照观察结果。

2 结果

2.1 KSHV ORFK12 基因 PCR 扩增 PCR 扩增产物在 1% 琼脂糖凝胶上出现了约 183 bp 大小的条带,与预期的 183 bp 扩增片段大小一致。见图 1A。

2.2 重组 T 质粒酶切和测序鉴定 重组转化菌经 LB 液体培养基过夜培养后提取质粒。质粒用 BamH I、Sal I 做双酶切后经 1% 琼脂糖凝胶电泳,在琼脂糖凝胶上出现两条特异性条带,其中一条约为 5 100 bp,还有一条约为 183 bp,证明 KSHV ORFK12 基因已经与 T 载体连接成功。酶切有目的条

带的重组 T 质粒拿到公司进行测序,测序结果正确。见图 1B。

2.3 重组 PQE-80L-K12 质粒酶切和测序鉴定

提取重组质粒,同样用 BamH I、Sal I 做双酶切后经琼脂糖凝胶电泳验证,结果出现其中一条约为 5 000 bp,还有一条约为 183 bp,证明 KSHV ORFK12 基因已经 PQE-80L 表达载体连接成功。酶切有目的条带的重组质粒拿到公司进行测序,测序结果正确。见图 1C。

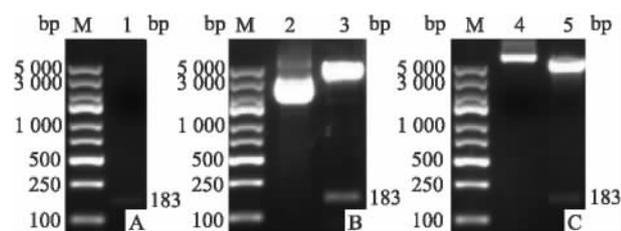


图 1 ORFK12 目的基因 PCR 扩增和重组质粒双酶切鉴定

A: ORFK12 基因 PCR 扩增图; B: 重组 T 质粒双酶切鉴定图; C: 重组 PQE-80L-K12 质粒双酶切鉴定图; M: Marker; 1: PCR 产物 183 bp; 2: 重组 T 质粒; 3: 重组 T 质粒双酶切; 4: 重组 PQE-80L-K12 质粒; 5: 重组 PQE-80L-K12 质粒双酶切

2.4 转化、诱导及纯化 含目的基因 KSHV ORFK12 基因的表达质粒转化到 BL21 受体菌中,经终浓度 1 mmol/L IPTG 诱导后,SDS-PAGE 电泳鉴定,重组蛋白以包涵体形式表达。包涵体经 0.45 μm 的滤膜滤过后的包涵体粗蛋白经过 Ni 亲和层析填料纯化后得到了约 10 ku 的蛋白,箭头处指的是表达的目的蛋白 ORFK12 蛋白。见图 2。

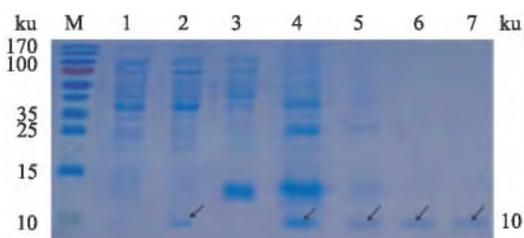


图 2 KSHV ORFK12 蛋白的表达与纯化

M: Marker; 1: 重组菌诱导前; 2: 重组菌诱导后 8 h; 3: 破碎后上清; 4: 破碎后包涵体; 5~7: Ni-NTA 填料纯化后包涵体蛋白

2.5 ELISA 法筛查临床血清情况 以纯化的蛋白作为抗原,采用 ELISA 法检测 64 份血清样本中 KSHV 感染情况的检测,结果发现 32 份阳性血清中有 10 份检测后 OD 值高于临界值 (Cut-Off 值为 0.705),32 份阴性血清经检测后 OD 值低于 Cut-Off

值。

2.6 Western blot 鉴定 ORFK12 蛋白与血清的反应性 纯化的蛋白经 SDS-PAGE 分离后转移至 PVDF 膜上,进行 Western blot 鉴定,纯化的蛋白与 KSHV 阳性血清有反应印迹,与 KSHV 阴性血清没有反应印迹,初步证明 KSHV ORFK12 基因表达蛋白与血清中相应抗体有反应性。见图 3。

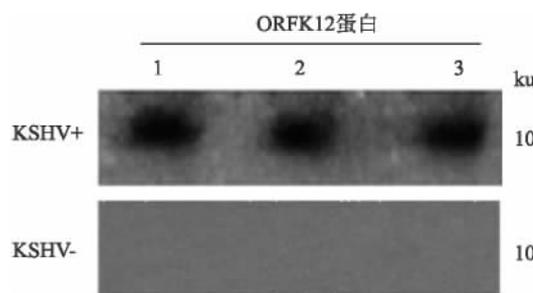


图 3 Western blot 检测 ORFK12 蛋白与 KSHV + 和 KSHV-血清

1~3: ORFK12 蛋白与临床感染 KSHV 的 3 份血清和未感染 KSHV 的 3 份血清

3 讨论

KSHV 又称人类疱疹病毒 8 型病毒,属于 γ 疱疹病毒亚科,是双链 DNA 病毒^[6]。KSHV 在部分非洲和欧洲尤其是意大利和南部地中海国家比较常见。目前我国对 KSHV 的研究才开始不久,有研究^[7]表明新疆地区经典型 KS 的发病率较高,而其他地区和民族的 KS 病例则比较罕见。KS 是一种在感染 AIDS 患者中常见的肿瘤,致病机制很复杂^[4]。KSHV 的研究已经有不少报道如 ORFK8.1 基因、ORFK73 基因^[1,8-10]。针对于 KSHV 编码的蛋白可以分为潜伏感染相关蛋白和裂解感染相关蛋白^[11]。

笔者通过 PCR 技术、ELISA 法和 Western blot 法^[1]构建含有目的基因的 T 载体和 PQE-80L 表达载体并检测了重组蛋白与血清抗体反应情况。利用 KSHV ORF65、ORF73 和 ORFK8.1 蛋白为抗原从蚌埠地区普通人群血清中筛查出阳性血清和阴性血清各 32 份。以 ORFK12 蛋白为抗原,用 ELISA 法筛查此 64 份血清,待测样品 OD 值高于 Cut-Off 值则判定为阳性,结果在 32 份经 KSHV ORF65、ORF73 和 ORFK8.1 蛋白为抗原筛查出的阳性血清中有 10 份的阳性血清 OD 值高于 Cut-Off 值即有反应,其中有 22 份没有反应,即用 ORFK12 基因表达的蛋白从普

通人群中筛选出 KSHV 阳性血清明显有漏检情况^[7],说明 ORFK12 蛋白为抗原 ELISA 法筛查普通人群 KSHV 感染的灵敏度低。而经 KSHV ORF65、ORF73 和 ORFK8.1 蛋白为抗原筛查出的 32 份阴性血清 OD 值都低于 Cut-Off 值,这说明 ORFK12 蛋白为抗原的 ELISA 法筛查普通人群感染 KSHV 特异性很强。ORFK12 蛋白虽然用于流行病学调查存在一定的局限性,不足以用于 KSHV 的检测,但可以作为辅助检查,因为其 ELISA 的特异性良好。ORFK12 基因编码的蛋白是潜伏期感染相关蛋白,有研究^[12]表明 ORFK12 基因是诱导肿瘤形成的基因,卡波齐蛋白在 90% 艾滋病患者的 KS 中都表达,KSHV K12 的表达对于 KS 发病具有较强的特异性。该研究通过验证 ORFK12 基因能够成功表达 ORFK12 蛋白,而且确定该蛋白与血清相应抗体有反应,为 KSHV 致病机制的研究提供了一定依据。

参考文献

- [1] Ouyang X X, Fu B, Li B, et al. Establishment of an ELISA to detect Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus using recombinant ORF73 [J]. *Virology*, 2010, 25(3): 168-76.
- [2] Fahad A S. Prevalence of human herpesvirus-8 (HHV-8) in untreated patients with early stage mycosis fungoides (A retrospective study) [J]. *Int J Health Sci (Qassim)*, 2010, 4(2): 128-38.
- [3] Wen K W, Damania B. Kaposi sarcoma-associated herpesvirus (KSHV): molecular biology and oncogenesis [J]. *Cancer Lett*, 2010, 289(2): 140-50.
- [4] Muralidhar S, Pumfery A M, Hassani M, et al. Identification of kaposin (open reading frame K12) as a human herpesvirus 8 (Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus) transforming gene [J]. *J Virol*, 1998, 72(6): 4980-8.
- [5] 南玉龙, 谭晓华, 杨磊. KSHV 潜伏和裂解感染机制的研究进展 [J]. *中国医学创新*, 2012, 9(3): 151-4.
- [6] Carratalà J, Montejo M, Pérez-Romero P. Infections caused by herpes viruses other than cytomegalovirus in solid organ transplant recipients [J]. *Enferm Infecc Microbiol Clin*, 2012, 30 Suppl 2: 63-9.
- [7] 张莹, 曾宪聪, 汪小五, 等. 安徽蚌埠地区卡波氏肉瘤相关疱疹病毒的血清阳性率研究 [J]. *安徽医科大学学报*, 2013, 48(5): 493-5.
- [8] Fu B, Li B, Ouyang X X, et al. Expression of Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus ORFK8.1 and its preliminary diagnostic application [J]. *Virology*, 2009, 24(3): 202-8.
- [9] Radu O, Pantanowitz L. Kaposi sarcoma [J]. *Archives of pathology & laboratory medicine*, 2013, 137(2): 289-94.
- [10] Wolz M M, Sciallis G F, Pittelkow M R. Human herpesviruses 6, 7, and 8 from a dermatologic perspective [J]. *Mayo Clinic Proc*, 2012, 87(10): 1004-14.
- [11] 周晓斐, 杨磊, 曾妍. 人类 8 型疱疹病毒的研究进展 [J]. *中国生物工程杂志*, 2007, 27(3): 110-4.
- [12] 唐桂霞, 卢春, 曾怡. 卡波济肉瘤相关疱疹病毒 K12 基因诱导裸鼠体内肿瘤的形成 [J]. *中华微生物学和免疫学杂志*, 2005, 25(6): 507-13.

Preliminary study of Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus ORFK12 protein

Wang Xiaowu, Zeng Xiancong, Chen Wei, et al

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

Abstract Objective To study the expression of ORFK12 gene of KSHV in *E. coli* and obtain KSHV seroprevalence in the general population in using the expressed protein. **Methods** A pair of primers was designed to amplify ORFK12 gene by PCR, using the total DNA of BCBL-1 cells as template. Recombinant plasmid with the target gene was named PQE-80L-K12 and induced to express. In this study, antibodies to one protein of KSHV (ORFK12) were tested by indirect ELISA and Western blot. **Results** After using IPTG to induce express, PQE-80L-K12 recombinant bacteria had a fusion of 10 Ku protein by SDS-PAGE electrophoresis. 10 specimens were tested. **Conclusion** It is preliminarily proved that KSHV ORFK12 gene can express in *E. coli*, and ORFK12 protein infection KSHV plays certain supplementary role in laboratory tests.

Key words Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus; ORFK12 gene; ORFK12 protein