

研究报告

人巨细胞病毒 M 抗原表位保守氨基酸突变的分析

王本旭², 刘展³, 刘玉¹, 沈倍奋¹, 柳川¹, 邵宁生¹

1 军事医学科学院基础医学研究所, 北京 100850

2 北京军区疾病预防控制中心, 北京 100042

3 北京市怀柔区妇幼保健院, 北京 101400

摘要: 为确定人巨细胞病毒 M 抗原表位 MAD 的关键氨基酸残基, 以 MAD 多肽序列为基础, 分别将保守氨基酸残基单一突变为甘氨酸残基, 构建各自突变体, 然后与人源 Fc 的 N 端融合, 通过原核表达载体 pET32-Fc 表达融合蛋白 MAD-Fc, 经 protein A 柱亲和纯化得到各突变体纯品。通过 ELISA 及 Western blotting 方法验证各突变体特异结合羊抗 HCMV 多抗间的差异, 从而确定表位关键氨基酸残基。结果显示, 将 MAD 中的谷氨酰胺残基单突变为甘氨酸残基后, MAD_{Q-G} 结合羊抗 HCMV 多抗活性大大降低, 差异显著; 而其他氨基酸残基单突变时, 对 MAD 活性影响程度很小。由此得出结论: MAD 结合羊抗 HCMV 多抗的活性与谷氨酰胺残基有关。

关键词: 人巨细胞病毒, 抗原表位, 突变

Conserved Amino-acid Residue Mutations in Epitope of Human Cytomegalovirus Antigen M

Benxu Wang², Zhan Liu³, Yu Liu¹, Beifen Shen¹, Chuan Liu¹, and Ningsheng Shao¹

1 Institute of Basic Medical Sciences, Academy of Military Medical Sciences, Beijing 100850, China

2 Center of Disease Control and Prevention, Beijing Command, Beijing 100042, China

3 Huairou Maternal and Child Health Hospital, Beijing 101400, China

Abstract: We identified the critical amino-acid residues in antigen M determinant(MAD) epitope of human cytomegalovirus protein M. On the basis of the peptide sequence of MAD, some conservative residues were mutated into the glycine residue. Then the gene fragment of mutants linked to amino terminal of Fc were cloned into the plasmid pET32-Fc and expressed by fusion with Fc. After purified by protein A affinity chromatography, the activity of mutants binding the goat polyclonal antibodies against human cytomegalovirus(HCMV) were detected by ELISA and Western blotting. Our results showed that when glutamine residue was mutated into glycine residue, the activity of MAD_{Q-G} binding the goat polyclonal antibodies against HCMV was reduced apparently. Other mutants did not have the same characteristics. The activity of MAD was closely related to the conformation of glutamine residue.

Keywords: human cytomegalovirus(HCMV), epitope, mutant

Received: November 14, 2007; **Accepted:** January 17, 2008

Supported by: the National Natural Science Foundation of China(No. 30471556).

Corresponding author: Ningsheng Shao. Tel: +86-10-66932313; E-mail: shaons@yahoo.com

Chuan Liu. E-mail: liuchuan777@hotmail.com

国家自然科学基金(No. 30471556)资助。

人巨细胞病毒(Human cytomegalovirus, HCMV)是一类在自然界普遍存在的具有严格种属特异性的病毒,属 β 疱疹病毒亚科,又称为人类疱疹病毒 5 型。在正常的人群中, HCMV 感染呈现隐性感染,不表现临床症状;而在免疫状态低下者,包括艾滋病、放射性损伤、器官移植和恶性肿瘤等患者中,感染 HCMV 后常常引起严重的临床症状,甚至出现高死亡率;怀孕期间的孕妇感染 HCMV 可以通过胎盘垂直传播感染胎儿,造成严重的后遗症。因此国内外对于 HCMV 研究报道较多,尤其对于 HCMV 膜蛋白 B 和 H 的研究报道。到目前为止,膜蛋白 B 中和性抗原表位已经基本搞清楚,分别为 AD1:552~630aa, AD2: 50~54aa(site I)和 67~86aa(site II), AD3: 798~805aa^[1,2];膜蛋白 H 具有三个中和性抗原表位^[3],但具有株特异性,在人的血清中能够分别检测这些抗原表位的存在。相对于膜蛋白 B 和 H 来说,膜蛋白 M 的研究较少,只是近一段时间才证明抗膜蛋白 M 的中和性抗体也能够阻止病毒的侵袭^[4,5],说明在 HCMV 病毒的感染过程中,膜蛋白 M 具有一定的中和作用。

在以前的实验中,我们以山羊抗 HCMV 多抗为靶标,通过噬菌体随机 12 肽库筛选技术,得到 HCMV M 抗原表位 MAD,抗 MAD 多抗能够特异识别 HCMV 膜蛋白 M 第 31~37 aa^[6]。抗原表位中存在一些特殊的化学基团,这些化学基团的构象决定了抗原表位的特异性及活性。为了确定影响 MAD 特异结合羊抗 HCMV 多抗活性的关键氨基酸残基,本研究中我们通过人工定点突变的方法,将 MAD 中保守氨基酸残基分别突变为甘氨酸残基,观察各突变体结合羊抗 HCMV 多抗活性的改变,从而确定关键氨基酸残基的位置。

1 材料和方法

1.1 材料

质粒 pET28-Fc(军事医学科学院常宏博士馈赠); pET32(军事医学科学院徐若男博士馈赠);感受态细菌 BL21(DE3): F⁻ompT hsaS_B(r_B⁻M_B⁻)gal dcm(DE3), BL21(DE3)pLysS: F⁻ompT hsaS_B(r_B⁻M_B⁻)gal dcm(DE3) pLysS Cam^r均为本室保存;质粒提取试剂盒、切胶回收试剂盒均为 Promega 产品;限制性内切酶(Nco I, BamH I, EcoR I)为 TaKaRa 产品;T4 DNA 连

接酶为 NEB 产品;羊抗 HCMV 多抗(B65275G)为 Biodesign 产品;兔抗羊 HRP-IgG, TMD 购自中同生物工程公司;Protein A 填料为本元正阳产品。

1.2 实验方法

1.2.1 MAD 基因互补片断的合成与退火

用无菌水将合成的正负链分别溶解配成 100 pmol/mL,各取 5 μ L,加入 5 μ L 退火 10 \times Buffer (10 mmol/L Tris, pH 8.0, 50 mmol/L NaCl, 1 mmol/L EDTA),然后用无菌水加至 50 μ L, 95 $^{\circ}$ C 热变性 5 min,然后使其缓慢恢复至室温。

1.2.2 化学感受态细胞的制备、质粒的连接、转化、提取、限制性酶切、酶切产物切胶回收、细菌克隆鉴定

参见《分子克隆实验指南》第二版。

1.2.3 载体构建

Nco I 和 BamH I 分别双切 MAD 及其各突变体和载体 pET28-Fc,通过连接酶将 MAD 及其各突变体基因与载体相连。Nco I 和 EcoR I 切割重组后的质粒 pET28-Fc,回收小片段,再与同样双酶切割后的质粒 pET32a 连接,通过 Nde I 酶切和测序鉴定细菌克隆。

1.2.4 蛋白表达条件的探讨

挑取单克隆菌落于 LB(Amp⁺, 100 μ g/mL)培养基中培养过夜,次日按 1:100 转接新的 LB(Amp⁺, 100 μ g/mL)培养基中,37 $^{\circ}$ C 培养至 OD₆₀₀ \approx 0.5,加入 IPTG 至终浓度 0.01 mmol/L, 20 $^{\circ}$ C 诱导 20 h,离心收集菌体,加入 PBS 超声破碎菌体,低温离心取上清,12% SDS-PAGE 电泳鉴定。

1.2.5 蛋白质的纯化

载体构建过程中 MAD 主要通过 Linker(Gly-Gly-Gly-Gly-Ser)与 Fc N 端连接,所以通过 Protein A 亲和纯化融合蛋白。

1.2.6 MAD 及其各突变体活性的检测

ELISA 方法检测 MAD 及其各突变体特异结合多抗 B65275G 的活性。包被 MAD 及其各突变体,1 μ g/孔,4 $^{\circ}$ C 包被过夜;200 μ L/孔加入 3% BSA, 37 $^{\circ}$ C 封闭 1 h;倒掉封闭液,加入稀释后的多抗 B65275G (1:500),每孔 100 μ L/孔,37 $^{\circ}$ C 孵育 1 h;PBST (0.5% Tween-20)洗涤;加入 HRP 标记兔抗山羊二抗 (1:5000 倍稀释),100 μ L/孔,室温孵育 40 min;PBST (0.5% Tween-20)洗涤;加入 TMD,100 μ L/孔,10 min;加入终止液(1 mol/L H₂SO₄) 50 μ L/孔;测 OD₄₅₀ 值。

1.2.7 Western blotting 方法验证MAD 及其各突变体特异结合多抗 B65275G 活性

操作方法见《分子克隆》第二版。MAD 及其各突变体 SDS-PAGE 电泳上样量均为 2 μg。

1.2.8 突变体竞争 MAD 结合多抗 B65275G 的 ELISA 实验

包被 MAD, 1 μg/孔, 4°C 包被过夜; 200 μL/孔加入 3% BSA, 37°C 封闭 1 h; 甩掉封闭液, 分别加入 1:500 稀释的多抗 B65275G 与 0.1、0.5、1.0、5.0、10.0 μg 的突变体, 每孔 100 μL/孔, 37°C 孵育 1 h; 其他步骤见 1.2.6。

表 1 MAD 及其各突变体基因片段序列
Table 1 Gene sequences of MAD and its mutants

Mutants	Sequences of gene
MAD	5'- <u>CATGGGCAAGCTTAGTCTGAGTCAGGTTCCGCGTCTTCGCATGGCGGCGGCG</u> -3' 3'- <u>CCGTTCGAATCAGACTCAGTCCAAGGCGGCAGAAGCGTACCGCCGCCGCTAG</u> -5'
2LAG	5'- <u>CATGGGCAAGGCGAGTCTGAGTCAGGTTCCGCGTCTTCGCATGGCGGCGGCG</u> -3' 3'- <u>CCGTTCCCGTCAGACTCAGTCCAAGGCGGCAGAAGCGTACCGCCGCCGCTAG</u> -5'
4LAG	5'- <u>CATGGGCAAGCTTAGTGGCAGTCAGGTTCCGCGTCTTCGCATGGCGGCGGCG</u> -3' 3'- <u>CCGTTCGAATCACCCTCAGTCCAAGGCGGCAGAAGCGTACCGCCGCCGCTAG</u> -5'
5SΔG	5'- <u>CATGGGCAAGCTTAGTCTGGGCCAGGTTCCGCGTCTTCGCATGGCGGCGGCG</u> -3' 3'- <u>CCGTTCGAATCAGACCCGGTCCAAGGCGGCAGAAGCGTACCGCCGCCGCTAG</u> -5'
6QΔG	5'- <u>CATGGGCAAGCTTAGTCTGAGTGGCGTTCGCGTCTTCGCATGGCGGCGGCG</u> -3' 3'- <u>CCGTTCGAATCAGACTCACC GCAAGGCGGCAGAAGCGTACCGCCGCCGCTAG</u> -5'

Note: sequences of *Nco* I and *Bam* H I were marked with underline and italic; linker sequence were marked with italic only

2.2 pET32-MAD-Fc 载体的构建

pET32-MAD-Fc 融合表达载体的构建是以 pET28-Fc 为基本框架, Fc 基因片段位于 *Bam*H I 和 *Eco*R I 之间。将退火后的 MAD 及其各突变体的基因序列插入到 pET28-Fc 载体的 *Nco* I 和 *Bam*H I 酶切位点之间。由于在原载体的 *Nco* I 和 *Bam*H I 之间存在 *Nde* I 酶切位点, 所以利用 *Nde* I 进行重组克隆的单酶切鉴定, 将酶切鉴定阳性克隆进行测序(图 1)。由于 MAD-Fc 在 pET28 载体中诱导表达时几乎完全不可溶, 所以用 *Nco* I 和 *Eco*R I 双酶切 pET28-MAD-Fc 克隆, 将酶切后的 MAD-Fc 片段再插入到 pET32(a)表达载体中, 使 MAD-Fc 偶联到二硫环蛋白(TrxA)羧基端, Fc 片段在二硫环蛋白的作用下正确折叠, 促进 MAD-Fc 的可溶性表达。

2.3 MAD-Fc 融合蛋白诱导表达及纯化

将鉴定正确的重组质粒接种于 LB(Amp⁺, 100 μg/mL)培养基中, 加入 IPTG 至终浓度 0.01 mmol/L, 20°C 诱导 20 h, 可溶性的重组蛋白达到 40%左右。经过 Protein A 亲和纯化获得 TrxA-MAD-Fc 融合蛋白。经

2 实验结果

2.1 MAD 氨基酸突变位置的确定

根据 MAD 和膜蛋白 M 序列, 其保守性氨基酸为第 4 位亮氨酸(Leu, L)、第 5 位丝氨酸(Ser, S)和第 6 位谷氨酰胺(Gln, Q), 而第 2 位的亮氨酸和第 8 位的脯氨酸(Pro, P)是半保守性氨基酸残基, 因此选定第 2、4、5、6 位的氨基酸残基突变为甘氨酸(Gly, G), 分别命名为 2LAG、4LAG、5SΔG、6QΔG。氨基酸突变位点见表 1。

过肠激酶酶切, 去除二硫环蛋白, 再一次经过 Protein A 纯化获得了高纯度的 MAD 及其各突变体与 Fc 的融合蛋白。结果见图 2。

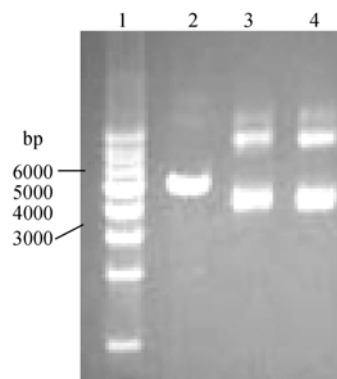


图 1 *Eco*R I 和 *Nde* I 酶切质粒 pET28-MAD-Fc 鉴定结果

Fig. 1 Result of pET28-MAD-Fc plasmid digested by *Eco*R I and *Nde* I

1: 1 kb DNA ladder; 2: plasmid digested by *Eco*R I; 3: plasmid digested by *Nde* I; 4: control plasmid

2.4 MAD 及其各突变体活性的检测

将纯化后 MAD 及其各突变体融合蛋白包被微孔板, ELISA 方法检测特异结合多抗 B65275G 活性。

结果发现第 6 位谷氨酰胺残基突变为甘氨酸后, MAD_{Q→G} 结合 HCMV 多抗活性明显降低, 基本与阴性对照(Fc 片段)持平。其他氨基酸残基突变为甘氨酸后, 突变体结合多抗 B65275G 的活性没有明显的改变。可见单个氨基酸突变时第 6 位的谷氨酰胺残基对 MAD 的活性起着至关重要的作用。结果见图 3。

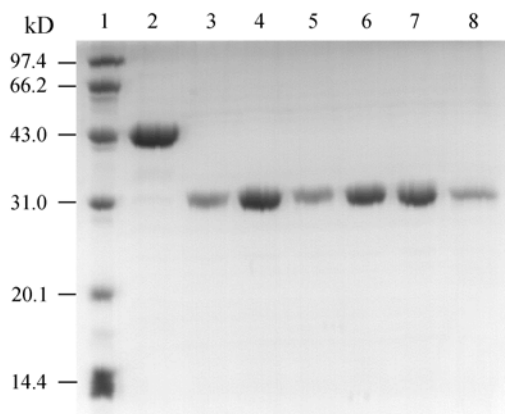


图 2 肠激酶酶切融合蛋白 SDS-PAGE 图谱
Fig. 2 SDS-PAGE map of fussion proteins digested enterokinase

1: marker; 2: TrxA-MAD-Fc; 3: MAD-Fc; 4: 2LΔG-Fc; 5: 4LΔG-Fc; 6: 5SΔG-Fc; 7: 6QΔG-Fc; 8: NP-Fc

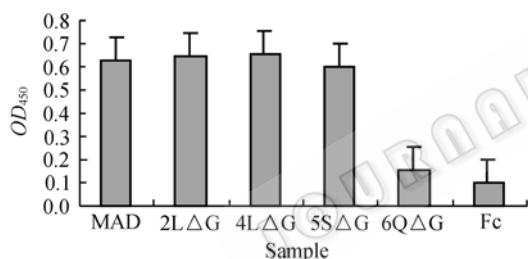


图 3 MAD 及其突变体特异结合多抗 B65275G 的 ELISA 结果

Fig. 3 ELISA results of MAD and its mutants binding goat polyclonal antibody B65275G

2.5 MAD 及其各突变体活性 Western Blotting 验证

Western blotting 检测结果显示 MAD 第 2 位和第 4 位的亮氨酸残基以及第 5 位丝氨酸残基突变后, 活性基本没有丧失; 而第 6 位的谷氨酰胺残基突变为甘氨酸残基后, MAD 活性丧失了 90% 以上(图 4)。



图 4 MAD 及其突变体特异结合多抗 B65275G 的 Western blotting 结果

Fig. 4 Activity of MAD and its mutants binding goat polyclonal antibody B65275G assayed by Western blotting

2.6 突变体竞争 MAD 结合多抗 B65275G 活性

竞争 ELISA 结果显示, 随着 2LΔG、4LΔG 和 5SΔG 各突变体量的增加, MAD 结合多抗 B65275G 的能力呈明显下降的趋势, 当突变体增加至 1 μg 时, MAD 结合多抗 B65275G 的能力达到最低值。而 6QΔG 突变体竞争 MAD 结合多抗 B65275G 的能力较弱, 随着 6QΔG 突变体量的增加, MAD 结合多抗 B65275G 的变化不明显。结果见图 5。

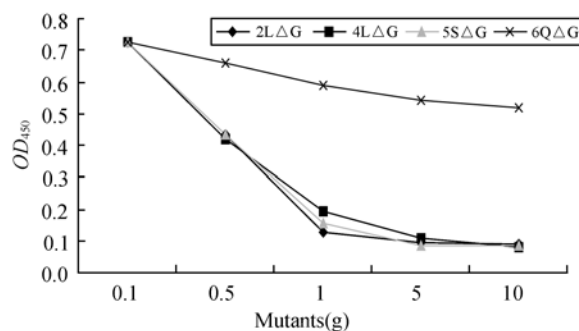


图 5 突变体竞争 MAD 结合多抗 B65275G 的 ELISA 结果

Fig. 5 Activity of MAD and its mutants binding goat polyclonal antibody B65275G assayed by competitive ELISA

3 讨论

抗原表位是 TCR/BCR 及抗体特异结合的基本单位。抗原表位中存在一些特殊的化学基团, 这些化学基团的构象决定了抗原表位的特异性和活性。实验中我们将 MAD 表位的几个保守性的氨基酸残基分别突变为甘氨酸残基, 发现将第六位的谷氨酰胺残基突变为甘氨酸残基时, MAD_{Q→G} 特异结合多抗 B65275G 的活性明显降低, 而其他突变体的活性变化不大。Western blotting 实验结果也证实 MAD 突变体存在这种现象。说明单个氨基酸残基突变时, 谷氨酰胺残基构象影响着 MAD 结合抗体的活性。若两个或多个氨基酸同时进行人工突变, 结果是否与单突变结果一致需要进一步的实验证实。

初步预测比较 MAD 与各突变体二级结构发现, MAD、MAD_{2L→G}、MAD_{4L→G} 以及 MAD_{5S→G} 的 N 端区结构主要是无规则卷曲(Coil), 而 MAD_{6Q→G} 的 N 端区出现了片层结构(Strand)(MAD 及其突变体的二级结构比较图略)。说明第六位谷氨酰胺残基对于维持 MAD 多肽的二级结构至关重要, 谷氨酰胺残基的突变导致了 MAD 多肽结构的改变, 从而改变了 MAD 与抗体之间的亲和力, 影响了 MAD 的活性。

Susan M^[7]实验小组获得 HCMV 膜糖蛋白 M 后通过软件预测, M 抗原可能存在八个跨膜区。我们实验中获得的 MAD 表位正好位于第二个胞外区内。Michael Mach^[8]实验小组进一步证实膜蛋白 M 与膜蛋白 N 的结合是通过 M 蛋白第 44 位半胱氨酸与 N 蛋白的第 90 位半胱氨酸之间的二硫键而实现的, 而 M 蛋白的第 44 位半胱氨酸残基正好位于 MAD 后面的序列中, 也位于第二个胞外区内。可以推测谷氨酰胺残基的突变可能会导致 M 蛋白第二个胞外区结构的改变, 至使 M 蛋白的整个结构发生改变, 其活性也随之发生变化, 这需要进一步的实验证实。

MAD 表位定点突变的研究对于设计特异性强、亲和力高的表位序列有着重要的指导意义, 为下一步 HCMV 疫苗的研究打下了重要的基础。


REFERENCES

[1] Andrea Speckner, Barbara Kropff, Susanne Knor, *et al.* The antigenic domain 1 of human ytomegalovirus glycoprotein B contains an intramolecular disulphide bond. *Journal of General Virology*, 2000, **81**: 2659–2663.
 [2] Norbert Kntess, Michael Mach, Jaydie Fay, *et al.* Distribution of linear antigenic sites on glycoprotein gp55

of human cytomegalovirus. *Journal of Virology*, 1991, **65**(1): 138–146.
 [3] Jill A Simpson, Jasmine C Chow, Jeanne Baker. Neutralizing monoclonal antibodies that distinguish three antigenic sites on human cytomegalovirus glycoprotein H have conformationally distinct binding sites. *Journal of Virology*, 1993, **67**(1): 489–496.
 [4] Masako Shimamura, Michael Mach, William J Britt. Human cytomegalovirus infection elicits a glycoprotein M(gM)/gN-specific virus-neutralizing antibody response. *Journal of Virology*, 2006, **80**(9): 4591–4600.
 [5] Shen Siyuan, Wang Shixia, Britt J William, *et al.* DNA vaccines expressing glycoprotein complex II antigens gM and gN elicited neutralizing antibodies against multiple human cytomegalovirus (HCMV) isolates. *Vaccine*, 2007, **25**: 3319–3327.
 [6] Wang BX. Screening and application of epitope in glycoprotein M of human cytomegalovirus. Doctoral Dissertation. 王本旭. 人巨细胞病毒糖蛋白 M 抗原表位筛选与应用研究. 博士论文.
 [7] Susan M Varnum, Daniel N Streblov, Mattew E Monroe. Identification of proteins in human cytomegalovirus (HCMV) particles: the HCMV proteome. *Journal of Virology*, 2004, **78**(20): 10960–10966.
 [8] Michael Mach, Barbara Kropff, Magdalena Kryzaniak, *et al.* Complex formation by glycoproteins M and N of human cytomegalovirus: structural and functional aspects. *Journal of Virology*, 2005, **79**(4): 2160–2170.



爱思唯尔生物医学工程专业图书推荐

	<p>Introduction to Biomedical Engineering, 2nd Edition By Enderle <i>et al</i> Product Type: Hardcover Price: \$97.95 Subject Area: Engineering / Electronics - Biomedical Engineering Since publication in 1999, the first edition of <i>Introduction to Biomedical Engineering</i> has dominated the market of biomedical engineering texts. Under the direction of John Enderle, Susan Blanchard and Joe Bronzino, leaders in the field will contribute chapters on the most relevant subjects for BME students. These chapters will coincide with courses offered in all biomedical engineering programs so that it can be used at different levels for a variety of courses of this evolving field. Both Enderle and Blanchard are on the Accreditation Board for Engineering and Technology (ABET), the body that sets the standard for US-based engineering programs. These standards will be used as a guideline for examples and pedagogy.</p>
<p>ISBN: 0122386620 ISBN-13: 9780122386626 Publication Date: 04/06/2005</p>	<p>Circuits, Signals, and Systems for Bioengineers A MATLAB-Based Introduction By Semmlow Price: \$103.00 Subject Area: Engineering / Electronics - Biomedical Engineering This book guides the reader through the electrical engineering principles that can be applied to biological systems and are therefore important to biomedical studies. The basic engineering concepts that underlie biomedical systems, medical devices, biocontrol, and biosignal analysis are explained in detail. This textbook is perfect for the one-semester bioengineering course usually offered in conjunction with a laboratory on signals and measurements which presents the fundamentals of systems and signal analysis. The target course occupies a pivotal position in the bioengineering curriculum and will play a critical role in the future development of bioengineering students. There are extensive questions and problems that are available through a companion site to enhance the learning experience.</p>
<p>ISBN: 0120884933 ISBN-13: 9780120884933 Publication Date: 03/07/2005</p>	

以上为爱思唯尔经典生物医学工程图书信息, 如果您对您的研究工作有所帮助, 请向所在图书馆推荐。谢谢!