

HCMV 截短 UL83 基因真核表达重组体的构建、转染及其免疫效力研究

高荣保 李艳秋 王明丽*

(安徽医科大学基础医学院微生物学教研室 合肥 230032)

摘 要:为了构建人巨细胞病毒(HCMV)截短 UL83 基因真核表达重组体,实现其在 Hep-2 细胞中的稳定表达,研究该截短 UL83 基因真核表达重组体免疫效力,采用基因重组的方法,将 HCMV AD169 株截短 UL83 基因定向克隆到带有绿色荧光蛋白(GFP)作为报告基因的真核表达载体 pEGFP-C1 上,构建真核重组表达质粒 pEGFP-C1-UL83;脂质体转染至 Hep-2 细胞中,G418 筛选获得稳定表达 pp65 细胞表达系。经基因测序显示,重组体中截短 UL83 基因完全正确,RT-PCR 和 Western blot 检测证实其在 Hep-2 细胞中稳定表达。用该重组体和其表达产物在 HCMV 先天性感染小鼠模型上进行免疫保护试验显示,母鼠血清可检测到特异性抗 HCMV pp65 抗体,效价为 1:2.51 ~ 1:50.79;子鼠脑组织内未分离出病毒,亦未检测出病毒 pp65 蛋白抗原表达。初步结果表明,pEGFP-C1-UL83 具有较好的免疫原性,可作为 DNA 疫苗刺激机体产生有效抗体,并具有阻止病毒垂直传播的保护性作用。

关键词: HCMV 截短 UL83 基因;绿色荧光蛋白;转染;Hep-2 细胞;DNA 疫苗

中图分类号:Q78 文献标识码:A 文章编号:0001-6209(2006)03-0451-06

人巨细胞病毒(Human cytomegalovirus, HCMV)是一种 β 亚科疱疹病毒,其在人群中感染非常普遍,且绝大多数为潜伏感染。该种感染状态对健康个体在正常情况下并没有明显危害,而对于免疫功能不全或低下的个体,如心脏或肾脏移植以及 AIDS 患者,感染的病毒会形成严重危害,可引起较高的致病率和致死率。此外, HCMV 能垂直传播给胎儿,造成胎儿先天性感染、流产或死胎。是胎儿先天性感染的主要病原体之一。可导致胎儿畸形、流产、早产及迟发性中枢神经系统缺陷等。表现为小头畸形、脑瘫和癫痫^[1]。但是,到目前为止,对于 HCMV 感染的分子机制尚不清楚,且无有效的疫苗。

HCMV UL83 基因编码一种分子量为 65kDa 的被膜磷蛋白(phosphoprotein 65, pp65),该蛋白是病毒被膜蛋白中最主要的一种,占被膜蛋白致密颗粒的 95%,占整个病毒蛋白的 15%。pp65 在病毒的复制早期就出现快速的核转移^[2],提示其与病毒的侵入和复制启动有关。应用免疫组化方法还发现在整个感染周期中, HCMV pp65 在感染细胞中持续表达。另外,越来越多的研究表明, HCMV pp65 不仅是 HCMV 病毒血症的主要抗原,而且是 HCMV 特异性细胞毒性 T 细胞(Cytotoxic T lymphocytes, CTL)的主要靶蛋白^[3]。Beninga 等^[4]对 14 种 HCMV 蛋白与 Th

细胞的反应进行了比较,发现在所有的供者中, HCMV pp65 均能诱导明显的特异性 T 细胞增殖反应,而其它蛋白(如 IE1、IE2 和 UL69)仅能诱导单个或少数 T 细胞系反应,且反应程度远不及 HCMV pp65。Weekes 等^[5]研究发现 HCMV pp65 也是 T 记忆细胞的主要识别表位。因此,作为 CTL、Th 细胞及 T 记忆细胞的主要识别表位, HCMV pp65 在机体特异性的细胞免疫反应中起重要作用。

本研究利用基因重组和脂质体体外转染的方式,选择了包含有 pp65 大部分 B/T 淋巴细胞优势表位^[6,7]和 CTL^[8]优势表位,氨基酸区域为 138aa ~ 414aa,即表达基因位点为 412bp ~ 1242bp(共 831bp)的目的表达基因。旨在构建截短 UL83 基因真核表达重组体 pEGFP-C1-UL83 重组体,转染 Hep-2 细胞,建立稳定表达 pp65 细胞表达株,并在本室已经建立的 HCMV 先天性感染小鼠模型^[9]基础上进行重组体免疫效力研究。现将结果报告如下。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 细胞和病毒: Hep-2 细胞株购自中国科学院上海细胞所;人胚成纤维(HF)细胞株由本室制备^[9]; HCMV AD169 株由上海医科大学提供。

基金项目:安徽省科技厅“十五”生物医药重大科技专项(01303003);教育部科学技术研究重点项目(01052)

* 通讯作者。Tel/Fax 86-551-5123422; E-mail: wangmli@mail.hf.ah.cn

作者简介:高荣保(1977-),男,安徽繁昌人,硕士研究生,研究方向为临床分子病毒学。E-mail: rongbaogao@163.com

收稿日期:2005-10-09;接受日期:2005-10-28;修回日期:2005-11-17

1.1.2 质粒和菌种 :载体 pEGFP-C1 由中国协和医科大学寄生虫教研室惠赠, JM109 为本室保存。

1.1.3 试剂和仪器 :PMD simple vector 试剂盒购自 TaKaRa 公司, 其它分子生物学试剂分别购自 Promega、TaKaRa 和 Invitrogen life technologies 公司。抗 HCMV pp65 单克隆抗体购自 Novocastra Laboratories Ltd 辣根过氧化物酶标记的羊抗鼠 IgG 购自北京华美生物工程公司。AKTA-explorer 蛋白纯化仪为安玛西亚公司产品; 荧光显微镜和 Image Processing and Analysis System 为德国 Leica 公司产品。

1.1.4 实验动物 :SPF 级纯系 Balb/c 小鼠, 雌雄兼用, 6~8 周龄, 购自中国科学院上海实验动物中心, 饲养于屏蔽系统。

1.2 病毒基因组 DNA 提取

按照常规在 HF 细胞上进行 HCMV 的培养, 待细胞病变达“3+~4+”时, 进行反复冻融 3 次使细胞完全破裂, 病毒释放。常规柱式提取。

1.3 引物设计和 PCR 扩增目的基因

以 GenBank 中登录的 UL83 全长 cDNA 为模板, 用 primer5.0 软件进行引物设计, 上游: 5'-CCTCGAGAAACACCGACACCTGCCCG-3', 下游: 5'-GGAATTCCTCGGTGTTACGAGTTCT-3', 分别在上、下游引物中设定 *Xho* I 和 *Eco* R I 限制性酶切位点, 扩增长度为 845bp。引物由上海 Sangon 公司合成。

利用上述病毒基因组为模板、特异性引物和高保真 DNA 聚合酶, 分别加 1 μ L、5pmol、1U 在 25 μ L 体系中, 以 95 $^{\circ}$ C 1min、62 $^{\circ}$ C 30s 和 72 $^{\circ}$ C 1min 为反应条件进行 30 个循环 PCR。反应结束后, 在 PCR 反应液中加入普通 1U *Taq* 酶, 72 $^{\circ}$ C 2h 进行 PCR 产物 3' 端加“ A”, 以便于与克隆载体进行“ T-A” 连接。

1.4 克隆和表达载体的构建

按照 PMD simple vector 试剂盒进行克隆载体的构建和扩增。并进行 PCR、双酶切和基因测序鉴定。用 *Eco* R I 和 *Xho* I 分别对克隆载体和 pEGFP-C1 空质粒进行双酶切后, 进行割胶回收。采用 T4 DNA 连接酶在 16 $^{\circ}$ C 连接目的基因和经双酶切的空载体, 过夜后转化至 JM109 大肠杆菌感受态中, 并进行 PCR 和双酶切鉴定。

1.5 细胞培养和转染

Hep-2 细胞在 RPMI-1640(含 10% 小牛血清、100 μ g/mL 氨苄青霉素和 100 μ g/mL 庆大霉素) 营养培养液中常规培养(37 $^{\circ}$ C、5% CO₂) 贴壁生长。收集对数生长期的 Hep-2 细胞, 以 6 \times 10⁵/孔接种于 6 孔培养板, 待细胞生长至 90% 贴壁时换无血清 RPMI-

1640 培养液 2mL 备用。将表达重组体 pEGFP-C1-UL83 约 4 μ g 用 250 μ L 无血清无抗生素的 RPMI-1640 细胞培养液稀释, 加入用同样方法稀释的 5 μ L 脂质体 2000, 混匀, 室温放置 20min, 即可形成脂质体-重组体复合物, 并立即作用于 Hep-2 细胞^[10]。常规培养 6h 后换全培养液继续培养, 12h~48h 内进行瞬时表达分析, 48h 后更换含 200 μ g/mL G418 的选择性培养液筛选稳定表达的细胞株。稳定表达株仍以选择性培养液进行传代培养。

1.6 转染产物的纯化

大量收获稳定转染的 Hep-2 细胞培养物, 细胞裂解液作用后, 上 AKTA-explorer 蛋白纯化仪进行凝胶过滤层析纯化, 得到纯化的截短 UL83 基因表达产物 Tpp65, 用 Western blot 进行鉴定^[11]。

1.7 病毒效价测定

于 HCMV 感染后的第 1、2、3 和 4 周, 分别吸取培养上清, 冻存于 -70 $^{\circ}$ C 冰箱保存。按 Gibson^[12] 的 CPE 终点稀释法在 HF 细胞上滴定病毒 TCID₅₀。

1.8 动物免疫保护试验

SPF 级 Balb/c 小鼠随机分为 4 组, 每组 3 对。其中 A 组为 HCMV 感染组; B 组为 DNA 免疫组; C 组为联合免疫组; D 组为生理盐水对照组。前 3 组小鼠同时腹腔注射 HCMV 培养液 0.5mL/只(5.0 log TCID₅₀), D 组小鼠腹腔注射生理盐水 0.5mL/只。D 组小鼠在注射生理盐水前后不作任何处理, 其余 3 组小鼠在注射病毒 1 周前分别作如下处理: A 组, 经股四头肌多点注射 100 μ L 生理盐水; B、C 组经股四头肌多点注射 200 μ g pEGFP-C1-UL83。在小鼠感染 HCMV 当日, 按雌雄 1:1 进行分笼饲养, 逐日检查怀孕情况, B、C 组在孕 7d 均用 200g pEGFP-C1-UL83 同样方法加强免疫一次, B 组在孕 15d 用同样方法再加强一次, 而 C 组在孕 15d 用 50 μ L Tpp65 蛋白(1 μ g/ μ L) + 50 μ L 弗式完全佐剂(CFA) 加强免疫一次。待小鼠临产(妊娠 20d), 取母鼠眼眶血分离血清做抗体检测, 取胎鼠大脑做病毒分离和间接免疫荧光检测。

1.9 抗体效价测定

采用间接 ELISA 法。用 pp65 蛋白常规包板, 小鼠待检血清从 1:2 开始稀释, 直至 1:250 为止。待小鼠临产, 取母鼠眼眶血分离血清检测抗 HCMV pp65 特异性抗体, 取母鼠脑组织和剖腹取胎鼠脑组织作病毒分离。

1.10 病毒分离

常规无菌操作下取出母鼠胎鼠双侧大脑皮层, 用细胞维持液制备成 1 \times 10⁵/mL 脑细胞悬液, 低速

离心后,取上清直接接种至 HF 细胞,同时设置正常细胞对照。对出现 HCMV 特征 CPE 者,取培养上清做 PCR 检测 HCMV DNA。

1.11 间接免疫荧光检测

常规冰盘上操作,眼眶取血后引颈处死小鼠,取腹腔胎鼠大脑,选择一个较平整的切面,轻轻下压至预涂粘附剂的载玻片上,冷丙酮固定,常规方法进行间接免疫荧光反应。

1.12 统计学处理

用 SPSS 软件进行单因素方差分析,组间两两比较采用 q 检验。

2 结果

2.1 pEGFP-C1-UL83 表达载体的构建及验证

截短 UL83 基因 PCR 产物连接至 PMD-T simple vector 构建克隆载体,由于在 PCR 引物的 5' 端和 3' 端分别加有限制性酶切位点 *Eco*R I 和 *Xho* I,用这两种限制性内切酶进行双酶切,从克隆载体上酶切下目的基因后。定向克隆至 pEGFP-C1 相应的限制性酶切位点 *Eco*R I 和 *Xho* I 位置后,转化至 JM109 大肠杆菌中培养。在培养过夜的平板上挑单菌落做 PCR 验证,在 845bp 处有阳性 DNA 片段,并挑单菌落于含 $30\mu\text{g}/\text{mL}$ 卡那霉素的 LB 培养基中摇菌过夜提取质粒,用 *Eco*R I 和 *Xho* I 进行双酶切验证,得两条不同大小的 DNA 片段,其中小片段大小为 845bp,即目的基因。经验证正确后,用 ABI3700(联合基因)对插入目的基因进行测序,测序结果与 GenBank 中登录的基因完全一致。

2.2 转染表达重组体在 Hep-2 细胞中的表达筛选和鉴定

用脂质体包裹转染 pEGFP-C1-UL83 表达重组体于 Hep-2 细胞中后,继续培养细胞,并分别在 24h、36h、48h 和 72h 4 个时间点,在荧光显微镜下观察细胞中 GFP 的表达,并且使用 Image Processing and Analysis System (Leica Qwin) 进行灰度值分析表明,在 36h 左右表达量最高(图版 I-A-a)。说明截短 UL83 基因在 Hep-2 细胞中存在着瞬时表达效应。在转染 36h 后,用 $200\mu\text{g}/\text{mL}$ 浓度的 G418 进行稳定表达细胞筛选,2 周后可得到稳定表达细胞株(图版 I-A-b)。

2.3 RT-PCR、SDS-PAGE 和 Western blot 验证

在用 G418 筛选稳定表达转染细胞株 2 周后,收集细胞分别提取 RNA 和纯化蛋白进行 RT-PCR、SDS-PAGE 和 Western blot 检测,RT-PCR 在 845bp 处检测到目的基因,SDS-PAGE 显示,截短目的基因和

报告基因 EGFP(798bp)表达融合蛋白的大小位于接近 66kDa 处,与 HCMV 感染 HF 培养物阳性对照 pp65 位置相近,且 Western blot 也在相应位置处检测到阳性信号(图版 I-B)。证实截短 UL83 基因可以在细胞中稳定表达。

2.4 动物保护试验

2.4.1 抗体效价测定:A、B、C 3 组母鼠免疫前均为阴性,末次免疫后,A、B、C 3 组均有一定效价的抗体生成,其抗体平均效价分别为 1:2.51、1:12.69 和 1:50.79。统计学分析表明,各组间总的比较, $F = 80.80$ ($P < 0.01$)。组间两两比较,B、C 组的平均特异性抗体与 A 组比较差异均有显著性($P < 0.05$, $P < 0.01$),C 组特异性抗体平均效价高于 B 组,差异有显著性($P < 0.05$)。对照组 D 组抗体为阴性。说明 pEGFP-C1-UL83 重组体有一定的免疫原性,能刺激机体产生有效特异性中和抗体,且该作用在与其表达的目的蛋白 Tpp65 联合免疫时,免疫效果更理想。

2.4.2 病毒分离结果:A、B、C 3 组小鼠母鼠大脑皮质组织病毒分离以及 A 组胎鼠大脑皮质组织病毒分离在盲传后第 2 周均出现了典型的 HCMV CPE,表现为细胞明显肿胀、变圆,胞内出现颗粒状物,透明度明显降低,折旋光性增强,呈灶性病变,取细胞培养物进行 PCR、HCMV DNA(UL83)检测为阳性。B、C 组胎鼠和 D 组母鼠大脑皮质组织病毒分离未出现 CPE,与正常 HF 细胞无异,同时 HCMV 定性 PCR 检测为阴性。

2.4.3 间接免疫荧光结果:用抗 HCMV pp65 单克隆抗体间接免疫荧光检测各组胎鼠大脑皮质压印片中 pp65 的表达情况。A 组平均一个视野可见 4~5 个苹果绿色阳性细胞,位于胞核内;B 组平均一个视野可见 0~1 个苹果绿色阳性细胞;C 和 D 组未检测到阳性信号(图版 I-C)。

3 讨论

HCMV 基因组长达 230kb,编码 200 多种蛋白质。然而,关于这些蛋白质的功能,尤其在活动性和潜伏性感染中的作用,到目前为止,知之甚少。由于该病毒结构的复杂性,至今对于其确切的致病机理及机体对该病毒感染的保护性免疫反应仍不清楚。但越来越多的研究表明,HCMV pp65 在病毒感染及诱导机体免疫反应中起重要作用,并且参与病毒基因调节以及改变宿主细胞的代谢。

UL83 是一个全长 1686bp 且为高 GC 含量的基因,因此其全长基因通过重组表达的有效性和可行

性在一定程度上受到了限制,并且全长 UL83 基因存在激酶位点和核定位信号,可能容易发生基因整合。因而选择一个有效表达基因在研究开发 DNA 或蛋白疫苗中起着至关重要的作用。本研究选取的真核表达载体 pEGFP-C1,其自身携带 GFP 标签,可随时跟踪其目的蛋白的表达与否;选取的目的基因为删除主要核定位信号位(537-561aa)的 HCMV 截短 UL83 基因,其编码产物包含有大部分 B/T 淋巴细胞及 CTL 优势表位。因而 pEGFP-C1-UL83 重组体的成功构建,并成功实现该基因在真核细胞中的稳定表达。可能在如下一些方面为科研或应用提供基础(1)为进一步研究 pp65 和 HCMV 感染提供重要工具。尽管 HCMV pp65 在病毒感染中的作用仍不是十分清楚,但研究表明,该蛋白在感染后快速核转移提示其与病毒的侵入与复制启动有关^[13];此外,该基因在 HCMV 感染早期就开始表达,在晚期达到表达高峰,说明其是在病毒感染的早晚期均进行表达。这些结论说明 pp65 在病毒复制周期中可能起着重要的作用,并且可能与病毒的感染状态有关。因此,本研究中的表达重组体可能为进一步研究 pp65 在 HCMV 感染及其感染状态中的作用提供重要工具。(2)为 HCMV 感染的治疗研究提供一平台。病毒感染后的治疗一直为科学研究的所困扰,随着病毒学研究的不断深入,类似于 RNA 干扰的分子治疗技术广泛受到病毒学家的重视。pp65 蛋白的编码基因 UL83 是早晚期基因,研究表明 HCMV 立刻早期(IE)蛋白和八核苷酸序列(ATTTCCGGG_{at-51 site})的相互作用可能对 pp65 蛋白的表达很重要^[14],并且 pp65 蛋白在其羧基端有一个核靶向信号和靠近它附近的核定位信号。从这些结果我们可以认为,pp65 可能直接影响病毒对宿主细胞的感染能力。因而 pEGFP-C1-UL83 重组体的成功构建并在真核细胞中得到稳定表达,其将为应用 pp65 对 HCMV 感染的分子治疗的研究提供一平台。

目前为止仍未获得一种安全有效的 HCMV 疫苗,机体的自然免疫反应不能清除 HCMV。而针对 HCMV 的高感染率及其可垂直传播造成先天性感染的特性,研制一有效疫苗是必要的。已有的研究证明,结构成分有 95% 之多为 pp65 的 HCMV 致密体,在缺乏病毒基因表达的情况下,亦能有效的诱导针对 HCMV 的特异性细胞和体液免疫^[15],提示 pp65 具有较强的免疫原性,可诱导机体产生保护性抗病免疫反应。HCMV pp65 在机体内的免疫作用也为 HCMV 疫苗的研究提供了新的线索。本研究通

过 pEGFP-C1-UL83 动物免疫保护试验显示,pEGFP-C1-UL83 可作为 DNA 疫苗在体内产生有效抗体,并有阻止病毒垂直传播的保护性作用。因此,该研究可为 pp65 HCMV 疫苗的研发和应用提供重要基础。此外,由于 DNA/蛋白质联合免疫的方法在许多病毒疫苗中得到应用,并且研究认为 DNA 和蛋白质可以协同作用^[16]。本研究在动物免疫保护试验中,母鼠血清抗体检测和子鼠脑组织间接免疫荧光结果同时表明,pEGFP-C1-UL83 初始/蛋白质增强联合免疫效果要优于单一 pEGFP-C1-UL83 免疫效果。目前研究认为在蛋白质疫苗和 DNA 疫苗联合应用时,较理想的免疫方式为用 DNA 疫苗初次免疫,以蛋白质疫苗进行加强,可能免疫效果较好^[17]。本研究在选择 DNA 疫苗和蛋白质疫苗联合免疫时,先用 DNA 疫苗免疫两次,再用蛋白质疫苗以 CFA 为佐剂加强一次,获得较好效果。但是,多种疫苗形式联合应用较为复杂,接种顺序都会影响免疫应答的强弱,也会对应答的类型产生作用;不同的佐剂类型和混合比例,以及不同的抗原都可能会有所差异,因此须作进一步的深入研究。

参 考 文 献

- [1] Sweet C. The pathogenicity of cytomegalovirus. *FEMS Microbiol Rev*, 1999, **23**(4):457-482.
- [2] Schmolke S, Drescher P, Jahn G, *et al.* Nuclear targeting of the tegument protein pp65 (UL83) of human cytomegalovirus: an unusual bipartite nuclear localization signal functions together with other portions of the protein to mediate its efficient nuclear transport. *J Virol*, 1995, **69**:1071-1078.
- [3] Wills MR, Carmichael A, Mynard K, *et al.* The human cytotoxic T-lymphocyte (CTL) response to cytomegalovirus is dominated by structural protein pp65: frequency, specificity, and T-cell receptor usage of pp65-specific CTL. *J Virol*, 1996, **70**(11):7569-7579.
- [4] Beninga J, Kropff B, Mach M, *et al.* Comparative analysis of fourteen individual HCMV protein for helper T cell response. *J Gen Virol*, 1995, **76**:153-160.
- [5] Weekes MP, Wills MR, Mynard K, *et al.* The memory cytotoxic T-lymphocyte (CTL) response to human cytomegalovirus infection contains individual peptide-specific CTL clones that have undergone extensive expansion *in vivo*. *J Virol*, 1999, **73**(3):2099-2108.
- [6] Zal B, Booth J, Chadwick J, *et al.* Epitope mapping of mouse monoclonal antibodies to the ppUL83 lower matrix phosphoprotein of human cytomegalovirus. *J Medical Virol*, 1999, **57**:290-297.
- [7] Li PG, Bottone L, Ivaldi F, *et al.* Recognition of CMV pp65 protein antigen by human CD4 T-cell lines induced with an immunodominant peptide pool. *Hum Immunol*, 2004, **65**:537-543.

- [8] Paston SJ, Dodi IA, Madrigal JA. Progress made towards the development of a CMV peptide vaccine. *Humane Immunology*, 2004, **65**: 544 – 549.
- [9] 王明丽,唐久来,胡 闻,等.人巨细胞病毒先天性中枢神经系统感染小鼠模型的建立.动物学报 2000, **46**(2):167 – 174.
- [10] 李 昂,张晓实,王鸿鹤,等. Epstein-Barr 病毒 A73 基因在鼻咽癌组织中的表达及其细胞内定位研究. 癌症, 2003, **22**(6): 597 – 601.
- [11] 彭秀玲,袁汉英,谢 毅,等. 基因工程实验技术. 湖南: 湖南科学技术出版社, 1997: 256 – 261.
- [12] Gibson W. Structural and nonstructural proteins of strain Colburn cytomegalovirus. *Virology*, 1981, **111**(2): 516 – 537.
- [13] Sanchez V, Angeletti PC, Engler JA, et al. Localization of human cytomegalovirus structural proteins to the nuclear matrix of infected human fibroblasts. *J Virology*, 1998, **72**(4): 3321 – 3329.
- [14] Depto AS, Stenberg RM. Regulated expression of the human cytomegalovirus pp65 gene: Octamer sequence in the promoter is required for activation by viral gene products. *J Virology*, 1989, **63**(3): 1232 – 1238.
- [15] Pepperl S, Munster J, Mach M, et al. Dense bodies of human cytomegalovirus induce both humoral and cellular immune responses in the absence of viral gene expression. *J Virol*, 2000, **74**(13): 6132 – 6146.
- [16] Hanke T, Blanchard TJ, Schneider J, et al. Enhancement of MHC class I-restricted peptide-specific T cell induction by a DNA prime/MVA boost vaccination regime. *Vaccine*, 1998, **16**(5): 439 – 445.
- [17] Grange MP, Armand MA, Audoly G, et al. Induction of neutralizing antibodies against HTLV-I envelope proteins after combined genetic and protein immunizations in mice. *DNA Cell Biol*, 1997, **16**(12): 1439 – 1448.

Construction and transfection of eucaryotic expression recombinant vector containing truncated region of UL83 gene of human cytomegalovirus and it 's sheltered effect as DNA vaccine

GAO Rong-bao ,Li Yan-qiu ,WANG Ming-li*

(Department of Microbiology ,College of Basic Medicine ,Anhui Medical University ,Hefei 230032 ,China)

Abstract: To construct eucaryotic expression recombinant vector containing vivo truncated region of UL83 gene of human cytomegalovirus, realize its steady expression in Hep-2 cell, and study sheltered effect of the eucaryotic expression recombinant vector as DNA vaccine. A vivo truncated UL83 gene fragment encoding for truncated HCMV pp65 was obtained by PCR from human cytomegalovirus AD169 stock genome. By gene recombinant ways, the truncated UL83 gene fragment was cloned into eucaryotic expression vector pEGFP-C1 with reported gene coding GFP to construct recombinant vector pEGFP-C1-UL83. The recombinant vector pEGFP-C1-UL83 was tested by different methods including PCR, restriction digestion and gene sequencing. Test results showed the recombinant vector was constructed successfully. After pEGFP-C1-UL83 was transfected into Hep-2 cell by lipofectin mediation, expression of GFP and truncated pp65 fusion protein in Hep-2 cell was observed at different time points by fluorescence microscope. Results showed that quantity of fusion protein expression was the highest at 36h point. Then, Hep-2 cell was cultured selectively by RPMI-1640 containing G418 (200 μ g/mL) to obtain a new cell stock of expressing truncated UL83 Gene fragment steadily. RT-PCR and Western blot results showed the truncated fragment of UL83 gene could be expressed steadily in Hep-2 cell. The result showed a new cell stock of expressing Tpp65 was established. This cell stock could be useful in some HCMV research fields, for example, it could be a tool in study of pp65 and HCMV infection, and it could provide a platform for the research into the therapy of HCMV infection. Immune sheltered effect of pEGFP-C1-UL83 as DNA vaccine was studied in vivo of HCMV congenital infection mouse model. The mouse model was immunized solely by pEGFP-C1-UL83, and was immunized jointly by pEGFP-C1-UL83 and its expression product. When the mouse was pregnant and brought to bed, differential antibody of anti-HCMV pp65 was tested by indirect ELISA in mother mouse, the infectious virus was separated with the method of virus separation, and pp65 antigen was checked up by indirect immunofluorescence staining in fetal mouse. Results showed differential antibody of anti-HCMV pp65 was produced in mouse model. Titer of the antibody was from 1:2.51 to 1:50.79. Results of virus separation and pp65 checkup of fetal mouse brain tissue were negative. So the conclusion can be reached that pEGFP-C1-UL83 as DNA vaccine in vivo has sheltered effect which can prevent HCMV vertical transmission from mother mouse to her fetus.

Keywords: Human cytomegalovirus(HCMV); Truncated region of UL83 Gene ; Green fluorescence protein(GFP); Transfection ; Hep-2 cell ; DNA vaccine

Foundation item : Momentous Science and Technology Project Supported by Anhui Province Science and Technology Office(01303003) ; Important Science and Technology Project Supported by Education Department(01052)

* Corresponding author. Tel/Fax 86-551-5123422 ; E-mail : wangmlli@mail.hf.ah.cn

Received : 9 October 2005 / Accepted : 28 October 2005 / Revised : 17 November 2005 © 中国科学院微生物研究所期刊联合编辑部 http://journals.im.ac.cn