

DOI: 10.3969/j.issn.1002-2694.2016.08.006

# 汉坦病毒 Hunan03 株 S 基因克隆、 表达及核蛋白免疫原性分析

蔡亮<sup>1,2</sup>, 张红<sup>1</sup>, 高立冬<sup>1</sup>, 刘建高<sup>1</sup>, 覃迪<sup>1</sup>, 何方玲<sup>1</sup>, 刘佳惠<sup>1</sup>, 邹义洲<sup>2</sup>, 李俊华<sup>1</sup>

**摘要:**目的 构建汉坦病毒 Hunan03 株核蛋白基因原核重组表达载体,在大肠杆菌中进行核蛋白表达,研究核蛋白的免疫性及免疫反应性。方法 设计特异性扩增汉坦病毒 Hunan03 株 S 基因完整开放阅读框(ORF)的引物,RT-PCR 扩增,产物克隆到 pGM-T 载体,转化感受态细胞 TOP10,应用蓝白斑筛选、酶切、PCR 鉴定,定向克隆到 pGEX-6p-2 原核表达载体,转化 *E. coli* BL21 Star<sup>TM</sup> (DE3),IPTG 诱导表达,SDS-PAGE、Western blot 对重组蛋白进行鉴定。应用 Glutathione Sepharose 4B 纯化柱纯化重组蛋白,免疫新西兰兔,建立间接 ELISA 法对核蛋白的免疫原性与免疫反应性进行评价。结果 PCR 扩增 S 基因 ORF 区域产物大小约 1 306 bp,重组载体 pGEX-6p-2-S 经双酶切、PCR、测序鉴定提示构建成功;在 37 °C, IPTG 浓度为 0.8 mmol/L 诱导 5 h 的条件下,表达出最高量的相对分子量约 74 kDa 的 GST-NP 融合蛋白。建立的间接 ELISA 法检测 GST-NP 融合蛋白免疫后的新西兰兔血清, IgM 抗体滴度达 1 : 8 000, IgG 抗体滴度达 1 : 16 000。结论 成功构建了高效表达的汉坦病毒 S 基因重组表达载体,获得了纯度较高具有较好的免疫原性与免疫反应性的核蛋白,为后续汉坦病毒单克隆抗体的制备奠定了基础。

**关键词:** 汉坦病毒; S 基因; 原核表达; 核蛋白免疫原性

中图分类号: 373

文献标识码: A

文章编号: 1002-2694(2016)08-0711-06

## Cloning and expression of hantavirus nucleoprotein gene of Hunan03 and its immunogenicity

CAI Liang<sup>1,2</sup>, ZHANG Hong<sup>1</sup>, GAO Li-dong<sup>1</sup>, LIU Jian-gao<sup>1</sup>, QIN Di<sup>1</sup>,  
HE Fang-ling<sup>1</sup>, LIU Jia-hui<sup>1</sup>, ZOU Yi-zhou<sup>2</sup>, LI Jun-hua<sup>1</sup>

(1. Hunan Provincial Center for Disease Control and Prevention,  
the Key Laboratory of Microbial Molecular Biology of Hunan Province, Changsha 410005, China;  
2. School of Basic Medical Science, Central South University, Changsha 410013, China)

**Abstract:** We cloned the hantavirus nucleoprotein gene and expressed it in *E. coli* for laboratory diagnosis. The whole open reading frame(ORF)of hantavirus Hunan03 strain S gene was amplified by RT-PCR after designing specific primers, and the PCR products was cloned into the pGM-T vector and transformed into competent cell of TOP10 and identified by the assay of blue-white spot screening, PCR and enzyme digestion. Then, we directed cloned the S gene into the prokaryotic expression vector of pGEX-6p-2 and the recombinant plasmid of pGEX-6p-2/S was transformed into the competent cell of *E. coli* BL21 Star<sup>TM</sup> (DE3) and induced by IPTG. We identified the expression product by SDS-PAGE and Western-blot. Results showed that the PCR product of S gene was about 1 306 bp. The recombinant plasmid of pGEX-6p-2/S was constructed successfully after being identified by PCR and double enzyme digestion. Under the condition of 37 °C and 0.8 mmol/L IPTG induction, the pGEX-6p-2/S has expressed a 74 kDa fusion GST-NP protein. The successful expression of the recombinant prokaryotic plasmid pGEX-6p-2/S will benefit to the laboratory diagnosis of hantavirus infection.

**Keywords:** hantavirus; nucleoprotein gene; prokaryotic expression; Nucleoprotein immunogenicity

湖南省科技厅科研基金(No. 2013TT2016)资助

通讯作者: 李俊华, Email: hncdc\_ljh@163.com

邹义洲, Email: 289034452@qq.com

作者单位: 1. 湖南省疾病预防控制中心, 湖南省微生物分子生物学  
重点实验室, 长沙 410005;

2. 中南大学基础医学院, 长沙 410013

Supported by the Project of the Scientific & Technological of  
Hunan province (No. 2013TT2016).

Corresponding authors: Li Jun-hua, Email: hncdc\_ljh@163.com;  
Zou Yi-zhou, Email: 289034452@qq.com

汉坦病毒(Hantavirus, HV)为分节段的单股负链RNA病毒,人和啮齿类动物均可被感染,其L、M、S基因分别编码依赖RNA的RNA聚合酶、包膜糖蛋白(G1、G2)及核衣壳蛋白(NP)<sup>[1]</sup>。NP又称核蛋白,由S基因编码,是病毒的主要结构蛋白,免疫原性极强,刺激机体可引起强烈的体液免疫和细胞免疫应答,产生的抗体滴度高、维持时间长,在抗病毒免疫中起重要作用,不同株、型的病毒NP氨基酸序列保守,常用作为HV感染后的诊断蛋白<sup>[2,3]</sup>。在前期研究中我们从黑线姬鼠肺组织中分离到了汉坦病毒Hunan03株(GenBank No. JN712306)<sup>[4]</sup>,对S基因分子特征及核蛋白二级结构进行了预测和分析<sup>[5,8]</sup>,在此基础上我们将S基因的ORF区域克隆到pGEX-6p-2原核表达载体,在大肠杆菌中进行了表达,利用动物实验对核蛋白的免疫原性与免疫反应性进行了初步研究,现将结果报道如下。

## 1 材料与方法

**1.1 质粒、菌株与试剂** 质粒pGEX-6P-2(GE Healthcare, USA), Glutathione Sepharose 4B蛋白纯化柱(GE Healthcare, USA), 抗GST McAb(Cell Signaling Technology Inc, USA), *E. coli*. BL21 Star<sup>TM</sup>(DE3)、JM109(TIANGEN, 北京), Trizol, One-step RT-PCR System with Platinum<sup>®</sup> Taq High Fidelity, Platinum<sup>®</sup> PCR Super Mix, TOPO<sup>®</sup> R TA Cloning<sup>®</sup> Kit(Invitrogen, USA), T4 DNA连接酶、*EcoR* I、*Xho* I限制性内切酶、1 000 bp DNA Marker、低分子量蛋白 Marker(Fermentas, Canada), 胶回收试剂盒、小量质粒提取试剂盒(Axygen, USA)。

**1.2 引物设计与合成** 根据前期研究上传至GenBank的汉坦病毒Hunan03株(GenBank No. JN712306)S基因编码区序列及质粒pGEX-6P-2多克隆位点,应用Primer Premier 6.0设计一对扩增S基因编码区全长的特异性引物,为了便于克隆与表达,在引物两端引入*EcoR* I和*Xho* I酶切位点及保护性碱基。上游引物pGEX-6P-2-F: 5'-TAGAATTCTGATGGCAACTATGGAGG-3'(5'端下划线部分为*EcoR* I酶切位点);下游引物pGEX-6P-2-R: 5'-CGCTCGAGTTATAGTTT-TAAAGGCTC-3'(5'端下划线部分为*Xho* I酶切位点),委托Invitrogen公司合成。

**1.3 RNA提取、cDNA合成及PCR产物纯化回收** Trizol法提取HV鼠肺组织Hunan03株阳性标

本总RNA,在引物pGEX-6P-2-F、pGEX-6P-2-R作用下,应用One-step RT-PCR System with Platinum<sup>®</sup> Taq High Fidelity试剂盒对S基因ORF区域进行一步法逆转录及扩增。扩增产物经1.0%琼脂糖凝胶电泳,应用Axygen胶回收试剂盒对产物进行纯化回收。

**1.4 TA克隆与鉴定** PCR产物纯化回收后,参照TOPO<sup>®</sup> TA Cloning Kit说明书按照PCR产物与T载体1:5的比例于22℃进行连接反应,取10 μL连接产物转化*E. coli*. TOP10,挑选阳性克隆抽提质粒,应用Platinum<sup>®</sup> PCR Super Mix试剂盒进行PCR鉴定,应用*EcoR* I、*Xho* I于37℃进行双酶切鉴定。

**1.5 重组质粒pGEX-6P-2/S的构建与鉴定** 鉴定后的TA克隆阳性质粒与pGEX-6P-2空质粒在37℃条件下同时进行*EcoR* I、*Xho* I双酶切、电泳、目的片段回收纯化。在1:3比例下应用T4 DNA连接酶于22℃连接反应10 min,取连接产物10 μL转化感受态细胞TOP10,涂布100 μg/mL氨苄青霉素的LB平板,37℃倒置培养过夜。挑选单克隆菌落,抽提质粒,取1 μL进行PCR鉴定。应用*EcoR* I、*Xho* I对重组质粒进行双酶切,PCR产物及酶切产物于1.0%琼脂糖凝胶电泳,对pGEX-6P-2/S重组质粒送Invitrogen公司进行序列测定。

**1.6 S基因的表达** 将pGEX-6P-2/S重组质粒转化工程菌*E. coli*. BL21 Star<sup>TM</sup>(DE3)感受态细胞,37℃培养24 h,挑单克隆菌落于含100 μg/mL氨苄青霉素的LB培养液中(2 mL)培养至OD值为0.6左右,加入不同浓度IPTG(0.2 mmol/L、0.4 mmol/L、0.6 mmol/L、0.8 mmol/L、1.0 mmol/L、1.2 mmol/L),37℃水浴诱导培养3~8 h,离心收集菌体。

**1.7 包涵体的溶解与复性** 收集的菌体经冰浴超声裂解,应用洗液I(60 mmol/L EDTA,4% Triton X-100,1.5 mol/L NaCl,pH7.0),洗液II(0.1 mol/L Tris-Cl,20 mmol/L EDTA,2 mol/L Urea,pH7.0)洗涤,收集上清和包涵体,12% SDS-PAGE电泳。包涵体应用溶解液(8 mol/L Urea,20 mmol/L Tris-Cl,1 mmol/L EDTA,6 mmol/L DTT,pH8.0)溶解过夜后装入含GST融合蛋白复性液(20 mmol/L Tris-Cl pH8.0,1 mmol/L EDTA pH8.0,0.9 mmol/L GSH,0.1 mmol/L GSSG)的透析袋中复性24 h。

**1.8 GST-NP重组蛋白纯化、Western blot** 将10 mL Glutathione Sepharose 4B加入GST蛋白纯化柱,PBS洗涤至柱平衡,以0.1 mL/min流速加入

10 mL 的复性蛋白,使蛋白充分吸附,PBS 洗涤层析柱至重新平衡,超纯水洗脱目的蛋白,具体操作参考 GST 蛋白纯化柱说明进行。洗脱的 GST-NP 融合蛋白经 12% SDS-PAGE 电泳分离,电转移至 PVDF 膜,以抗 GST McAb 为一抗、HRP 标记的羊抗鼠抗体为二抗,ECL 显影,Western blot 鉴定。

**1.9 GST-NP 重组蛋白浓度测定** 在核酸蛋白分析仪上,采用  $A_{280}$  紫外分光光度法,应用 BSA 蛋白浓度标准品绘制标准曲线,测定纯化后 GST-NP 浓度。

**1.10 动物实验制备抗 GST-NP 重组蛋白特异性抗体** 以鉴定的重组蛋白 GST-NP 为免疫原免疫新西兰兔(雄性,6 只,2.5~3.0 kg/只),初次免疫用纯化蛋白 200  $\mu\text{g}$  与等体积弗氏完全佐剂注射器搅拌混匀,皮内多点注射,15 d 后每隔 10 d 用纯化蛋白 100  $\mu\text{g}$  与等体积弗氏不完全佐剂混匀,加强免疫 3 次;同时用纯化蛋白的洗涤液和 GST 蛋白各免疫 2 只新西兰兔作对照;每次免疫前于耳缘静脉采血,末次免疫 10 d 后心脏采血,离心分离血清,保存于  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ 。

**1.11 免疫血清抗 GST-NP 重组蛋白抗体滴度测定** 用 0.05 mmol/L 碳酸盐缓冲液(pH9.6)稀释纯化的 GST-NP 重组蛋白至 1 mg/L,按每孔 100  $\mu\text{L}$  包被酶标板过夜,间接 ELISA 法检测 PBS 系列稀释的末次兔免疫血清,二抗为羊抗兔 IgG-HRP 和 IgM-HRP 100  $\mu\text{L}$ (1:1 000 稀释),TMB 显色,酶标仪测定  $A_{450}$  值,以对照组兔血清作阴性对照,待测样本  $A_{450}$  值/阴性对照  $A_{450}$  值  $\geq 2.1$ (P/N 值  $\geq 2.1$ ) 为阳性,阳性最高抗体稀释度为血清效价。

## 2 结 果

**2.1 S 基因的 PCR 扩增及 TA 克隆鉴定** Trizol 提取后的 RNA 经 pGEX-6P-2-F、pGEX-6P-2-R 引物进行一步法 RT-PCR 扩增 S 基因,1.0% 琼脂糖凝胶电泳显示扩增条带约 1 306 bp,与预期大小一致,提示扩增的 DNA 为目的片段。以抽提后的 TA 克隆质粒为模板,用 pGEX-6P-2-F、pGEX-6P-2-R 引物对 S 基因进行 PCR 扩增,产物经 1.0% 琼脂糖凝胶电泳,可见一约 1 306 bp 的目的条带(图 1),以构建好的 pUCm-T/S 经 *EcoR* I、*Xho* I 双酶切鉴定,酶切后的产物经 1.0% 琼脂糖凝胶电泳,可见一约 1 306 bp 的目的条带,与预期值一致。

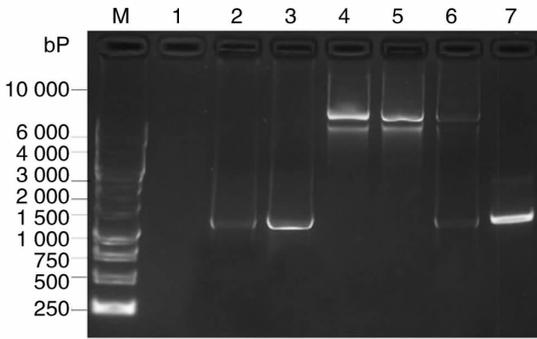
**2.2 pGEX-6P-2/S 的构建与鉴定** 以抽提后的质粒 pGEX-6P-2/S 为模板,以 pGEX-6P-2-F、pGEX-6P-2-R 为引物进行 PCR 扩增,可见一约 1 306 bp 的目的条带(图 1),与预期值一致。用限制性内切酶 *EcoR* I、*Xho* I 对重组质粒 pGEX-6P-2/S 进行双酶切,得到与目的基因(1 306 bp)及载体(4 985 bp)相同大小的 2 个片段(图 1)。挑取含插入片段 pGEX-6P-2/S 的阳性克隆,用小量质粒提取试剂盒提取质粒测序,结果表明 S 基因片段已经成功的插入 pGEX-6P-2 载体,且插入方向正确。

**2.3 测序结果分析** 核蛋白基因编码区以起始密码 ATG 开始,以终止密码子 TAA 结尾,ORF 长 1 290 个核苷酸残基,包括碱基 A423 个(32.79%),碱基 C244 个(18.91%),碱基 G325 个(25.19%),碱基 T298 个(23.10%),GC 含量为 44.11%,AT 含量为 55.89%,单链分子量约为 391.41 kDa,编码 429 个氨基酸(20 种),平均分子量为 48.13 kDa,含量最高的氨基酸为 Leu(亮氨酸),占总蛋白含量的 9.79%(42/429),含量最低的为 Cys(半胱氨酸)和 Trp(色氨酸),仅各占 1.17%(5/429)。

**2.4 pGEX-6P-2/S 的表达与鉴定** 含重组质粒 pGEX-6P-2/S 的 *E. coli* Star<sup>TM</sup> BL21(DE3) 菌株应用不同浓度 IPTG 进行诱导,SDS-PAGE 凝胶电泳图上均显示特异性条带,蛋白分子量与理论值一致,约为 74 kDa。菌株在 IPTG 终浓度 0.8 mmol/L、37  $^{\circ}\text{C}$  条件下诱导 5 h 条件下,表达量最大(图 2)。菌体经超声波破菌,包涵体经 8 mol/L 尿素溶解后过 GST 亲和层析柱,SDS-PAGE 凝胶电泳显示单一的目的蛋白条带,分子量与预期大小一致,约 74 kDa,融合蛋白主要存在于不溶性的包涵体中。

**2.5 NP 蛋白的纯化与 Western blot 鉴定**  $A_{280}$  紫外分光光度法测得蛋白浓度为 1.80 mg/mL。蛋白复性后经 GST 蛋白纯化柱纯化,SDS-PAGE 凝胶电泳显示蛋白分子量约 74 kDa(图 3);以抗 GST McAb 为一抗、HRP 标记的羊抗鼠 IgG 为二抗的 Western blot 在相应位置出现特异性条带。

**2.6 重组蛋白免疫原性** 重组蛋白免疫新西兰兔 4 次后,间接 ELISA 法检测血清中特异性 IgG 和 IgM 抗体显著升高,其效价分别达到 1:16 000 和 1:8 000 以上,血清阳性反应率为 6/6。同时阴性对照组兔免疫 4 次后,血清中未检出抗 GST-NP 特异性抗体。



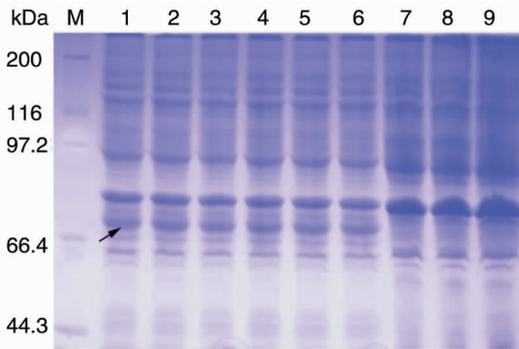
M: 1 kb DNA ladder; 1: PCR 阴性对照; 2: RT-PCR; 3: 重组质粒 pGEX-6P-2/S 为模板的 PCR 产物; 4: 空质粒 pGEX-6P-2; 5: 重组质粒 pGEX-6P-2/S; 6: 重组质粒 pGEX-6P-2/S 经 *EcoR* I、*Xho* I 双酶切; 7: 重组质粒 pUCm-T/S 经 *EcoR* I、*Xho* I 双酶切

M: 1kb DNA ladder; 1: PCR negative control; 2: RT-PCR; 3: PCR products of recombinant plasmid pGEX-6P-2/S; 4: Plasmid of pGEX-6P-2; 5: Recombinant plasmid of pGEX-6P-2/S; 6: Recombinant plasmid of pGEX-6P-2/S digested by *EcoR* I and *Xho* I; 7: Recombinant plasmid pUCm-T/S digested by *EcoR* I and *Xho* I

图 1 S 基因原核重组质粒 pGEX-6P-2/S 构建

(8 cm length gel, 1×TAE, 7V/cm, 45 min)

Fig. 1 Construction of the prokaryotic expression recombinant plasmid of pGEX-6P-2/S

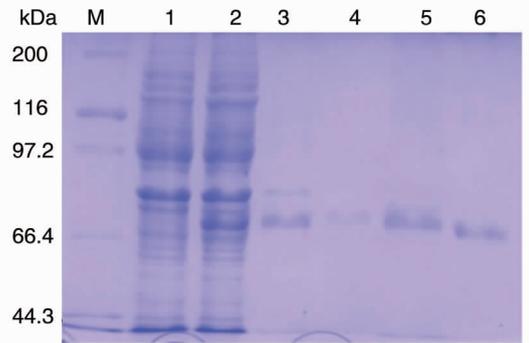


M: 蛋白 Marker; 1-6: 0.2 mmol/L, 0.4 mmol/L, 0.6 mmol/L, 0.8 mmol/L, 1.0 mmol/L, 1.2 mmol/L IPTG 诱导 pGEX-6P-2/S; 7: 空质粒 pGEX-6P-2; 8: 空菌 *E. coli* BL21 Star™ (DE3); 9: pGEX-6P-2/S 未经 IPTG 诱导

M: Protein Marker, 1-6: 0.2 mmol/L, 0.4 mmol/L, 0.6 mmol/L, 0.8 mmol/L, 1.0 mmol/L, 1.2 mmol/L IPTG induced pGEX-6P-2/S; 7: Plasmid of pGEX-6P-2; 8: *E. coli* BL21 Star™ (DE3), 9: pGEX-6P-2/S induced without IPTG

图 2 重组质粒 pGEX-6P-2/S 在大肠杆菌中的诱导表达 (12% SDS-PAGE)

Fig. 2 Recombinant plasmid pGEX-6P-2/S expressed in *E. coli*. BL21 Star™ (DE3)

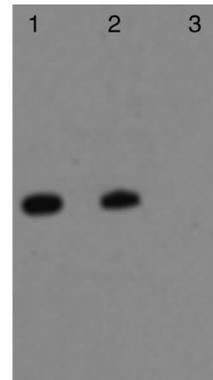


M: 蛋白 Marker; 1: pGEX-6P-2/S 未经 IPTG 诱导; 2: pGEX-6P-2/S 经 1.0 mmol/L IPTG 诱导; 3: 过 GST 蛋白纯化柱前; 4: 过 GST 蛋白纯化柱后; 5: 第一次洗脱液; 6: 第二次洗脱液

M: Protein Marker, 1: pGEX-6P-2/S induced without IPTG, 2: pGEX-6P-2/S induced with 1.0 mmol/L IPTG, 3: Induced products of pGEX-6P-2/S before purification, 4: Induced products of pGEX-6P-2/S after purification, 5: The first eluant, 6: The second eluant

图 3 Hunan03 株汉坦病毒核蛋白纯化效果分析 (12% SDS-PAGE)

Fig. 3 The purification of hantavirus nucleoprotein of Hunan03 (12% SDS-PAGE)



1: pGEX-6P-2/S 经 0.8 mmol/L IPTG 诱导表达产物; 2: 纯化后的 pGEX-6P-2/S 重组蛋白; 3: pGEX-6P-2/S 无 IPTG 诱导产物  
1: The expression product of recombinant plasmid of pGEX-6P-2/S with 0.8 mmol/L IPTG, 2: Purified recombinant pGEX-6P-2/S nucleoprotein, 3: The expression product of recombinant plasmid of pGEX-6P-2/S without IPTG

图 4 Hunan03 株汉坦病毒核蛋白免疫印迹分析

Fig. 4 Immunoblot analysis of hantavirus recombinant nucleoprotein of Hunan03

表 1 ELISA 法检测新西兰兔免疫血清中 GST-NP 特异性抗体滴度及阳性反应率

Tab. 1 Specificity antibody titer in New Zealand rabbit serum detected by ELISA and the positive rate analysis

分组 Groups	新西兰兔(只) No. of New Zealand rabbit	IgM 抗体滴度 Titer of IgM	IgG 抗体滴度 Titer of IgG	阳性率(%) Positive rate(%)
免疫组 Immune group	6	$\geq 1:8\ 000$	$\geq 1:16\ 000$	6/6(100%)
缓冲液对照组 Buffer solution control	2	—	—	0/2(0)
GST 对照组 GST control	2	—	—	0/2(0)

注:结果以待测标本平均  $A_{450}$  值/阴性对照  $A_{450}$  值  $\geq 2.1$  为阳性,以出现阳性反应的最高稀释度作为该血清的滴度。

Note: If the ratio of the absorbance value of the sample to the negative control at 450nm was  $\geq 2.1$ , the sample was considered as positive, and the highest serum dilution was the serum's titer.

### 3 讨 论

不同株、型的汉坦病毒核蛋白氨基酸序列相对保守,均携带有 T 细胞和 B 细胞抗原决定簇,能诱导机体产生特异性体液免疫应答和细胞免疫应答,可直接与体外转录病毒的 RNA 及被感染细胞的细胞器结合,起着调节病毒复制的作用<sup>[6]</sup>。以前汉坦病毒感染后的血清学诊断所用抗原常为病毒感染的组织细胞,其敏感性、特异性和可操作性不是十分理想,免疫印迹实验表明重组的完整核蛋白或截短的核蛋白均具有良好的免疫原性和免疫反应性,可替代天然抗原用于汉坦病毒感染的实验室诊断<sup>[7]</sup>。

前期研究表明 Hunan03 株来源于野生黑线姬鼠,属汉坦病毒 HTN 型, S 基因编码的核蛋白由 428~433 个氨基酸组成,相对分子量为 49~51 kDa,基因片段抗原位点呈非构象依赖性。在感染细胞内过量表达时由于肽链的合成速度过快且缺乏足够的时间和空间进行折叠和盘曲,可形成颗粒状包涵体<sup>[8]</sup>。本研究通过对汉坦病毒 S 基因的 ORF 区域进行克隆、测序和表达,获得了一分子量约 74 kDa 的 GST-NP 融合蛋白, SDS-PAGE 试验表明融合蛋白以包涵体形式存在于菌体中,由于包涵体组织结构稳定,实验中应用低浓度的表面活性剂十二烷基磺酸钠和低浓度的变性剂尿素等在低能量的超声波中除去了大部分杂质,采用含 Triton X-100、EDTA 的洗涤液洗涤包涵体,大部分杂蛋白得到了洗脱,用含 8 mol/L 尿素的溶解液对包涵体进行了较好的溶解。pGEX-6P-2 载体自身携带有分子量为 26 kDa 的在解毒过程中起重要作用的谷胱甘肽巯基转移酶(GST),具有增加外源基因的表达、提高表达蛋白的可溶性和易纯化的特点,我们应用 GST

琼脂糖凝胶纯化柱一步分离到了纯度较高的目的蛋白。

包涵体蛋白的复性是一个费时且效率较低的过程,经常会导致重组蛋白的损失,是基因工程研究领域的瓶颈。本研究经条件摸索后发现:采用缓慢透析法、氧化型和还原型谷胱甘肽相结合的方法对汉坦病毒核蛋白复性非常有效。即在 4℃ 条件下,用 8 mol/L Urea 溶液作为起始透析液,然后逐渐降低透析液的尿素浓度,由于尿素浓度下降连续缓慢,减少了复性过程中蛋白沉淀,提高复性蛋白回收率。研究中还发现核蛋白含有较多的二硫键,我们通过复性缓冲液中加入 2 mol/L 还原型谷胱甘肽 GSH 和 0.2 mol/L 氧化型谷胱甘肽 GSSG,能有效促进二硫键的形成,有利于汉坦病毒核蛋白恢复其天然的空间结构,从完全伸展的变性状态恢复到正常的折叠结构,最大程度地恢复了变性后重组蛋白的生物活性。

将 GST-NP 重组蛋白包被酶标板,以羊抗兔 IgG-HRP 和 IgM-HRP 为二抗,建立的间接 ELISA 法检测免疫 45 d 之后的兔血清, IgG 和 IgM 抗体其效价分别达到 1:16 000 和 1:8 000 以上,血清阳性反应率为 100%。说明重组蛋白 GST-NP 具有较好的免疫原性和免疫反应性,为后续汉坦病毒单克隆抗体的制备奠定了基础。

### 参考文献

- [1] Antic D, Kang CY, Spik K, et al. Comparison of the deduced gene products of the L, M and S genome segments of Hantaviruses[J]. Virus Res, 1992, 24(1): 35-46. DOI: 10.1016/0168-1702(92)90029-9
- [2] Elliott RM, Schmaljohn CS, CoHeu MS. Bunyaviridae genome

- structure and gene expression[J]. *Curr Top Microbiol Immunol*, 1991, 169: 91-141. DOI:10.1007/978-3-642-76018-1\_4
- [3] Li JL, Li DX. The research progress of hantavirus[J]. *Chinese J Exp Clin Virol*, 2005, 19(2):198-200. (in Chinese)  
李家亮, 李德新. 汉坦病毒病原学研究进展[J]. *中华实验和临床病毒学杂志*, 2005, 19(2):198-200.
- [4] Li JH, Cai L, Gao LD, et al. Epidemiologic and phylogenetic study on hemorrhagic fever with renal syndrome in Hunan province from 2007 to 2010[J]. *Chin PREV Med*, 2012, 10(10): 724-728. (in Chinese)  
李俊华, 蔡亮, 高立冬, 等. 2007—2010年湖南省肾综合征出血热监测及病毒种系进化分析[J]. *中国预防医学杂志*, 2012, 10(10):724-728.
- [5] Cai L, Zhang H, Gao LD, et al. Detection and genotyping of hantavirus M and S gene and its phylogenetic analysis[J]. *Chinese journal of Zoonoses*, 2012, 28(2):111-115. (in Chinese)  
蔡亮, 张红, 高立冬, 等. 汉坦病毒 M、S 基因分型及种系进化分析[J]. *中国人兽共患病学报*, 2012, 28(2):111-115.
- [6] Xue XP, Xu ZK, Ma WY, et al. Hantavirus nucleoprotein sectorial expression and the epitope analysis[J]. *Virologica Sinica*, 2000, 15(3):220-224. (in Chinese)  
薛小平, 徐志凯, 马文煜, 等. 汉滩病毒核蛋白的分段表达及抗原表位分析[J]. *中国病毒学*, 2000, 15(3):220-224.
- [7] Yao ZH, Dong GM. Hantavirus research progress[J]. *Chinese journal of Zoonoses*, 1999, 15(5):75-79. (in Chinese)  
姚智慧, 董关木. 汉坦病毒(Hantavirus)研究进展[J]. *中国人兽共患病杂志*, 1999, 15(5):75-79.
- [8] Cai L, Gao LD, Zhang H, et al. The characteristics of hantavirus Hunan03 strain S gene and the nucleoprotein structure prediction[J]. *Chin J Microbiol Immunol*, 2012, 32(8):725-729. (in Chinese)  
蔡亮, 高立冬, 张红, 等. 汉坦病毒 Hunan03 株 S 基因分子特征及核蛋白结构分析[J]. *中华微生物学和免疫学杂志*, 2012, 32(8):725-729.
- 收稿日期:2016-03-29;修回日期:2016-05-19
- 
- (上接第 695 页)
- [10] Wang KL, Zhang H, Jiang HH, et al. *In vitro* study on tetradrine as a synergist to fluconazole in murine model of vaginal candidiasis[J]. *Chin J Zoonoses*, 2007, 23(5): 474-478, 483. (in Chinese)  
王凯丽, 张宏, 姜红浩, 等. 汉防己甲素对氟康唑抗白念珠菌活性的增效作用的体内实验研究[J]. *中国人兽共患病学报*, 2007, 23(5):474-478, 483.
- [11] Zhang X, Guo H, Gao L, et al. Molecular mechanisms underlying the tetradrine-mediated reversal of the fluconazole resistance of *Candida albicans* [J]. *Pharm Biol*, 2013, 51(6): 749-752. DOI: 10.3109/13880209.2013.764537. Epub 2013 Mar 25.
- [12] Zhang XL, Zhang GH, Wang ZY, et al. Proteomic analysis reveals that Adh1p is involved in a synergistic fluconazole and tetradrine mechanism against *Candida albicans* [J]. *Pharmazie*, 2013, 68(12):951-954.
- [13] Shi JP, Zhang H, Zhang ZD, et al. Clinical investigation on the synergistic effect of tetradrine on the antifungal activity of fluconazole for vulvovaginal candidiasis [J]. *Chin J Zoonoses*, 2009, 25(11):1121-1123. (in Chinese)  
石建平, 张宏, 张志东, 等. 汉防己甲素对氟康唑外用治疗单纯性外阴阴道念珠菌病增效作用的临床研究[J]. *中国人兽共患病学报*, 2009, 25(11):1121-1123.
- [14] Shi J, Li S, Ma Z, et al. Acute and sub-chronic toxicity of tetradrine in intravenously exposed female BALB/c Mice [J]. *Chin J Integr Med*, DOI: 10.1007/s11655-015-2303-2. 2015, 10.29
- [15] He FQ, Qiu BY, Li TK, et al. Tetradrine suppresses amyloid- $\beta$ -induced inflammatory cytokines by inhibiting NF- $\kappa$ B pathway in murine BV2 microglial cells [J]. *Immunopharmacol*, 2011, 11(9): 1220-1225. DOI: 10.1016/j.intimp.2011.03.023. Epub 2011 Apr 13
- [16] Chen Y, Lai HS, Chiang BL, et al. Tetradrine attenuates dendritic cell-mediated alloimmune responses and prolongs graft survival in mice [J]. *Lanta Med*, 2010, 76(13): 1424-1430. DOI:10.1055/s-0029-1240909. Epub 2010 Feb 25.
- [17] Fatahinia M, Khosravi AR, Shokri H. Propolis efficacy on TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$  and IL2 cytokines production in old mice with and without systemic candidiasis [J]. *J Mycol Med*, 2012, 22(3): 237-242. DOI: 10.1016/j.mycmed.2012.05.004. Epub 2012 Aug 9
- [18] Shimonkevitz R, Bar-Or D, Harris L, et al. Granulocytes, including neutrophils, synthesize IL-10 after traumatic pancreatitis: case report [J]. *Trauma*, 2000, 48(1):165-168.
- [19] Hernández-Santos N and Gaffen SL. Th17 cells in immunity to *Candida albicans* [J]. *Cell Host Microbe*. 2012, 11(5): 425-435. DOI:10.1016/j.chom.2012.04.008.
- [20] Whibley N, MacCallum DM, Vickers MA, et al. Expansion of Foxp3+ T-cell populations by *Candida albicans* enhances both Th17-cell responses and fungal dissemination after intravenous challenge [J]. *Eur J Immunol*, 2014, 44(4): 1069-1083. DOI: 10.1002/eji.201343604. Epub 2014 Feb 13
- [21] Mottet C, Uhlig H H, Powrie F. Cutting edge: cure of colitis by CD4+ CD25+ regulatory T cells [J]. *Immunol*, 2003, 170: 3939-3943.
- [22] Zhou L, Lopes JE, Chong MM, et al. TGF- $\beta$ -induced Foxp3 inhibits T(H) 17 cell differentiation by antagonizing ROR $\gamma$  function [J]. *Nature*, 2008, 453(7192): 236-240. DOI:10.1038/nature06878. Epub 2008 Mar 26
- 收稿日期:2015-10-25;修回日期:2016-02-20