

# 人巨细胞病毒潜伏相关 IL-10 基因克隆及体外表达

郑晓群<sup>1</sup> 冯晶晶<sup>2</sup> 曾智<sup>2</sup> 姜招娣<sup>2</sup> 季敬璋<sup>2</sup> 李祥<sup>2</sup> 吕建新<sup>2\*</sup>

(<sup>1</sup>温州医学院附属第二医院实验诊断中心, 温州 325027;

<sup>2</sup>温州医学院, 浙江省医学遗传学重点实验室, 温州 325035)

**摘要** 为了研究人巨细胞病毒潜伏相关白细胞介素-10(LA-cmvIL-10)及巨细胞病毒编码的白细胞介素-10(cmvIL-10)在病毒感染中的作用, 构建了 *cmvIL-10* 基因和 *LA-cmvIL-10* 基因的原核及真核表达体系。从患儿尿液标本中提取病毒 DNA, 应用重叠延伸 PCR 扩增 *cmvIL-10* 基因和 *LA-cmvIL-10* 基因外显子, 产物克隆至原核表达载体 pMal-c2x 和真核表达载体 pCDNA3.1 上, 测序显示扩增的 *cmvIL-10* 基因和 *LA-cmvIL-10* 基因外显子包含了完整的编码区; 重组的原核表达质粒 pMal-c2x-cmvIL-10 和 pMal-c2x-LAcmvIL-10 转化受体菌 *E.coli* BL21(DE3), 经异丙基-β-D- 硫代半乳糖苷(IPTG)诱导, 在受体菌内表达目的蛋白。将表达产物免疫家兔, 获得特异性抗血清。真核表达载体 pCDNA3.1-cmvIL-10 和 pCDNA3.1-LAcmvIL-10 转染 Hela 细胞, 经 Western blot 鉴定与设计相符。

**关键词** 人巨细胞病毒; 潜伏; 白细胞介素-10; 克隆; 体外表达

人巨细胞病毒(human cytomegalovirus, HCMV)是一类在自然界普遍存在但又具有严格种属特异性的病毒。HCMV 是疱疹病毒 β 亚科中基因组最大的 DNA 病毒, 所编码的蛋白质超过 227 种。人群中 HCMV 感染非常普遍, 在发达国家人群感染率为 40%~60%, 而在发展中国家几乎达到 100%<sup>[1]</sup>。由于 HCMV 具有潜伏-激活感染的生物学特性, 其潜伏的确切机制不明<sup>[2-4]</sup>。

研究表明<sup>[5-7]</sup>, HCMV 病毒基因组中存在与人类 IL-10(Interleukin-10)序列同源性的区域, 编码 IL-10 同源类似物, 即巨细胞病毒编码的 IL-10(cmvIL-10)模拟分子; 同时, *cmvIL-10* 模拟分子的转录物存在另一个剪接体, 即 HCMV 潜伏相关白细胞介素-10(latency associated *cmvIL-10*, LA-cmvIL-10)。LA-cmvIL-10 与 *cmvIL-10* N 端前 127 个氨基酸高度同源, 但缺少 C 端的外显子 3, 在功能及分子结构上存在一定差异。因此, 研究 *cmvIL-10* 和 *LA-cmvIL-10* 基因的结构与功能对于进一步了解 HCMV 的致病机制是不可或缺的。为此, 本文克隆并构建了 *cmvIL-10* 基因和 *LA-cmvIL-10* 基因的体外表达载体, 并利用构建的原核表达载体转化大肠杆菌, 经诱导表达和亲和层析纯化, 获得目的蛋白, 制备了其效价较高的多克隆抗血清; 同时利用真核表达载体 pCDNA3.1-cmvIL-10 和 pCDNA3.1-LAcmvIL-10 转染 Hela 细胞, 经 Western blot 鉴定与设计相符, 为更深入的研究打下了坚

实的基础。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

PCR 反应试剂盒、DNA marker、DNA 回收纯化试剂盒、pMD18-T simple 载体和蛋白质 Marker 均购自宝生物工程(大连)有限公司; 羊抗兔 HRP-IgG 抗体、DAB 显色试剂盒购自碧云天生物公司; 限制性核酸内切酶、PCR 引物由上海生物工程有限公司合成; 蛋白质预染 Marker 购自 Fermentas 公司; Lipofectamine 2000 购自 Invitrogen 公司; 其余试剂均为国产分析纯。pMal-c2x 载体、pCDNA3.1 载体和大肠杆菌 BL21(DE3)均为我室保存; Hela 细胞株为本室保存, 购自中国中科院上海细胞库; 日本大耳兔由本校实验动物中心提供。

### 1.2 方法

**1.2.1 HCMV 基因组 DNA 提取** 收集 HCMV 感染患儿尿液标本 10 ml, 3 000 r/min 离心 10 min, 收集沉淀, 加细胞裂解液 200 μl, 加蛋白酶 K 2 μl, 置于 55 °C 水浴中消化 3 h。将消化后的标本降至室温, 加

收稿日期: 2009-10-19 接受日期: 2010-05-21

浙江省教育厅科研基金(No.Y200805034)和温州市对外合作交流科技计划(No.H20090077)资助项目

\* 通讯作者。Tel: 0577-86689805, Email: jxlu313@gmail.com

入 70  $\mu$ l 醋酸钾溶液(冰冷), 剧烈振荡 20 s 使其充分混和, 4  $^{\circ}$ C 12 000 r/min 离心 5 min, 将上清液转移到加有 300  $\mu$ l 异丙醇的 EP 管中, -20  $^{\circ}$ C 放置 1 h, 室温 12 000 r/min 离心 10 min, 吸去上清, 收集 DNA 沉淀, 加入 70% 的乙醇 200  $\mu$ l 洗涤 2 次, 室温下离心, 吸去上清液, 空气中干燥 DNA 沉淀, 将 DNA 沉淀溶解于 10  $\mu$ l TE 缓冲液中, -20  $^{\circ}$ C 保存备用。

**1.2.2 *cmvIL-10* 基因的 PCR 扩增和克隆载体的构建及序列测定** 参照文献<sup>[8]</sup>中的引物序列合成引物 P1/P2(引物序列见表 1, 下同)。将提取的 HCMV 基因组 DNA 进行 PCR 反应扩增 *cmvIL-10* 基因, 扩增片段为 683 bp, 含有 3 个外显子和 2 个内含子。参照 GenBank 发表的 *cmvIL-10* 基因序列(AF182315)和表达载体 pMal-c2x 的酶切位点, 利用 Primer 5.0 软件设计带有 *EcoRI* 和 *HindIII* 双酶切位点的 PCR 引物扩增 3 个外显子, 引物分别为: P3(*cmvF1*, 下划线为 *EcoRI* 位点)/P4(*cmvR1*)扩增片段长度为 180 bp; P5(*cmvF2*)/P6(*cmvR2*)扩增片段长度为 201 bp; P7(*cmvF3*)/P8(*cmvR3*, 下划线为 *Hind III*位点)扩增片段长度为 147 bp; 用重叠延伸 PCR(图 1)将 3 段外显子连接起来, 扩增 *cmvIL-10* 基因的完整 cDNA 片段, 此片段长度为 528 bp。将上述扩增的 *cmvIL-10* 基因连接 pMD18-T simple vector, 连接产物转化 *E.coli* DH5 $\alpha$ , 在氨基青霉素平板上筛选转化菌, 重组子 pMD18-T-*cmvIL-10* 经 *EcoRI/HindIII* 双酶切鉴定后送上海生工生物工程公司测序。

**1.2.3 *LA-cmvIL-10* 基因 PCR 扩增和克隆载体的构**

**建及序列测定** 参照文献<sup>[9]</sup>中 *LA-cmvIL-10* 基因序列设计特异性引物 P9(下划线为 *EcoRI* 位点)/P10(下划线为 *HindIII* 位点, 斜体为表达的内含子部分), 从 pMD18-T-*cmvIL-10* 质粒中扩增 *LA-cmvIL-10*, 其扩增片段长度为 420 bp; 将上述的 *LA-cmvIL-10* 连接 pMD18-T simple vector, 转化受体菌, 双酶切鉴定后测序, 方法同 1.2.2。

**1.2.4 原核重组子 pMal-c2x-*cmvIL-10* 与 pMal-c2x-LAc*cmvIL-10* 表达载体的构建和鉴定** 以 *EcoRI/HindIII* 双酶切 pMD18-T-*cmvIL-10* 与 pMD18-T-LAc*cmvIL-10*, 分别将 528 bp 和 420 bp 的酶切片段克隆至 pMal-c2x 的 *EcoRI/HindIII* 位点, 转化感受态受体菌 *E.coli* DH5 $\alpha$  并酶切鉴定, 将此重组质粒命名为 pMal-c2x-*cmvIL-10* 和 pMal-c2x-LAc*cmvIL-10*。

**1.2.5 真核重组子 pCDNA3.1-*cmvIL-10* 与 pCDNA3.1-LAc*cmvIL-10* 表达载体的构建和鉴定** 根据载体 pCDNA3.1, 利用 Primer 5.0 软件设计带有 *HindIII*、*EcoRI* 两酶切位点和 His 标签的 PCR 引物 P11(下划线为 His 标签, 斜体为 *HindIII* 位点)/P12(斜体为 *EcoRI* 位点), P13(下划线为 His 标签, 斜体为 *HindIII* 位点)/P14(斜体为 *EcoRI* 位点), 分别以质粒 pMal-c2x-*cmvIL-10* 与 pMal-c2x-LAc*cmvIL-10* 为模板, P11, P12 和 P13, P14 引物分别扩增带有 *HindIII*, *EcoRI* 双酶切位点和 His 标签的 *cmvIL-10* 与 *LA-cmvIL-10* 基因, 连接 pMD18-T Simple vector, 转化感受态受体菌 *E.coli* DH5 $\alpha$ , 双酶切鉴定后测序, 方法同上。以 *HindIII/EcoRI* 双酶切质粒 pMD18-T-*cmvIL-10* 与 pMD18-T-LAc*cmvIL-10*,

Table 1 Primer sequences

Primer	Sequences(5'-3')	Products(bp)
P1	5'-GAT GGA TCC ATG CTG TCG GTG ATG GTC-3'	683
P2	5'-CTC GAA TTC CTT TCT CGA GTG CAG AT-3'	
P3( <i>cmvF1</i> )	5'-GGG <u>GAA TTC</u> ATG CTG TCG GTG ATG GTC T-3'	180
P4( <i>cmvR1</i> )	5'-CAA CGT AGG TTT TAC TCG ATG AAA G-3'	
P5( <i>cmvF2</i> )	5'-GTA AAA CCT ACG TTG CAA CGT GAG GAC TAC TCC-3'	201
P6( <i>cmvR2</i> )	5'-ACA TTG CCG CAT GTC TTT G-3'	
P7( <i>cmvF3</i> )	5'-GAC ATG CGG CAA TGT CCT CTG TTA GGT TGC GGA G-3'	147
P8( <i>cmvR3</i> )	5'-GGG <u>AAG CTT</u> CTA CTT TCT GAG TGC AGA TA CTC-3'	
P9	5'-GGG <u>GAA TTC</u> ATG CTG TCG GTG ATG GTC T-3'	420
P10	5'-GGG <u>AAG CTT TTA CCT CTG CGC GGA CAG CGC C</u> GC CAC AGA GAC ACT TAC GCA TTG CCG CAT GTC TTT-3'	
P11	5'-GGG <u>AAG CTT</u> GCC ACC ATG GCC <u>CAT CAT CAT CAT</u> <u>CAT CAC</u> ATG CTG TCG GTG ATG GTC T-3'	528
P12	5'-GGG <u>GAA TTC</u> CTA CTT TCT CGA GTG CAG ATA CTC -3'	
P13	5'-GGG <u>AAG CTT</u> GCC ACC ATG GCC <u>CAT CAT CAT CA</u> <u>T CAT CAC</u> ATG CTG TCG GTG ATG GTC T -3'	420
P14	5'-GGG <u>GAA TTC</u> TTA CCT CTG CGC GGA CAG C-3'	

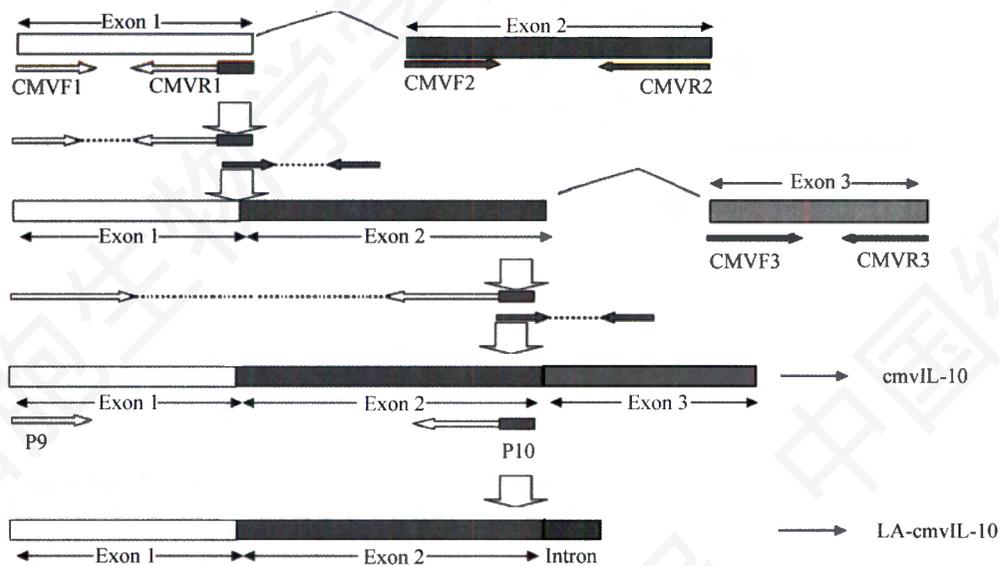


Fig.1 Overlap extension PCR for amplifying LA-cmvIL-10 gene and cmvIL-10 gene

分别将 528 bp 和 420 bp 的酶切片段克隆至 pCDNA3.1 载体的 *HindIII/EcoRI* 位点, 转化感受态受体菌 *E. coli* DH5 $\alpha$  并酶切鉴定, 将此重组质粒命名为 pCDNA3.1-cmvIL-10 和 pCDNA3.1-LAcmvIL-10。

1.2.6 *cmvIL-10* 与 LA-cmvIL-10 基因重组菌的诱导表达及纯化 将鉴定无误的重组表达质粒 pMal-c2x-cmvIL-10 与 pMal-c2x-LAcmvIL-10 分别转化到感受态受体菌 *E. coli* BL21 (DE3) 中, 以含有氨苄青霉素的 LB 琼脂平板筛选, 37 °C 培养过夜, 挑取单菌落增殖后提取质粒并酶切鉴定。经 IPTG 诱导, 表达目的蛋白。表达条件优化: 分别采用不同的 IPTG 浓度 (0.05 mmol/L, 0.1 mmol/L, 0.5 mmol/L, 1 mmol/L)、不同温度 (20 °C, 25 °C, 30 °C, 37 °C) 和不同时间 (1 h, 3 h, 4 h, 5 h, 6 h) 进行诱导表达, 超声裂解细菌提取蛋白质, 进行 SDS-PAGE 电泳, 比较不同条件下融合蛋白表达情况, 以选择最佳的诱导条件, 并利用 Amylose-resin 亲和层析柱对含 MBP 标签的蛋白进行纯化。

1.2.7 *cmvIL-10* 与 LA-cmvIL-10 多克隆抗体的制备和鉴定 免疫前采集阴性对照血清, 初次免疫将割胶纯化后的可溶性粗抗原与等体积完全福氏佐剂充分混匀, 皮下多点免疫日本大耳兔 (1 mg/只), 隔 2 w 进行 1 次加强免疫, 等量抗原与不完全福氏佐剂等体积混匀, 同样皮下多点免疫, 免疫 3 次, 最后一次免疫后一周心脏采血收集抗血清, 采用饱和硫酸铵提纯抗体, Western blot 鉴定制备的抗体, 并测定抗体效价。

1.2.8 *cmvIL-10* 与 LA-cmvIL-10 基因的转染表达及 Western blot 鉴定 利用 Lipofectamine 2000 脂质体

转染试剂, 分别将 pCDNA3.1-cmvIL-10 与 pCDNA3.1-LAcmvIL-10 重组质粒转染至 HeLa 细胞 (具体操作见说明书)。转染 48 h 后, 应用裂解液提取蛋白质, 以 15% SDS 进行聚丙烯酰胺凝胶电泳, 转膜后加入 (1:1 000) 的抗 His 单抗 4 °C 过夜, 洗膜后加 (1:1 000) 的 HRP-羊抗鼠 IgG 于室温温育 1 h, 再次洗膜后以 DAB 试剂盒进行显色。

## 2 结果

### 2.1 *cmvIL-10* 与 LA-cmvIL-10 基因的 PCR 扩增及克隆载体的构建及鉴定

以 *cmvIL-10* 基因组 DNA 为模板, P3/P4、P5/P6 和 P7/P8 为引物, 经 PCR 分别扩增出 180 bp、201 bp 和 147 bp 的外显子片段; 应用重叠延伸 PCR 连接 3 个外显子扩增出 528 bp 片段 (图 2)。重组子 pMD18-T-cmvIL-10 (以 *EcoRI/HindIII* 双酶切后得到大小约 2.7 Kb 的载体片段和 528 bp 的 *cmvIL-10* 基因 cDNA 片段) 进一步测序结果显示与 AD169 病毒株 *cmvIL-10* 序列一致。以 pMD18-T-cmvIL-10 质粒为模板, P9 和 P10 为引物, 经 PCR 扩增出 420 bp 片段 (图 2)。重组子 pMD18-T-LAcmvIL-10 (以 *EcoRI/HindIII* 双酶切后得到大小约 2.7 Kb 的载体片段和约 420 bp 的 LA-cmvIL-10 基因 cDNA 片段) 进一步测序结果显示与 AD169 病毒株 LA-cmvIL-10 序列一致。

### 2.2 pMal-c2x-cmvIL-10 与 pMal-c2x-LAcmvIL-10 重组表达载体的构建与鉴定

重组质粒 pMal-c2x-cmvIL-10 与 pMal-c2x-

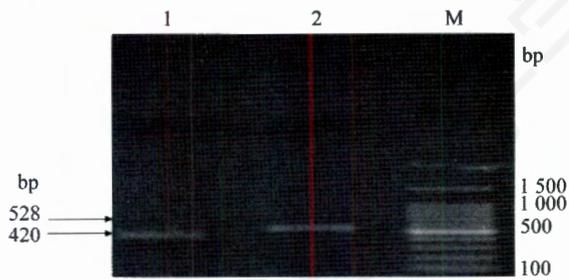


Fig.2 *cmvIL-10* and *LA-cmvIL-10* amplified by PCR

1: *LA-cmvIL-10* gene; 2: *cmvIL-10* gene; M: 100bp DNA molecular weight standard.

*LAcmvIL-10* 分别经 *EcoRI/HindIII* 双酶切, 电泳显示约在 528 bp, 420 bp 和 6.7 Kb 处呈现明显条带(图 3), 提示 *cmvIL-10* 和 *LA-cmvIL-10* 基因被克隆入 *pMal-c2x* 中, 质粒 PCR 扩增得到与预期大小(528 bp 和 420 bp)相符的片段, 表明 *pMal-c2x-cmvIL-10* 和 *pMal-c2x-LAcmvIL-10* 表达载体构建成功。

### 2.3 *pCDNA3.1-cmvIL-10* 与 *pCDNA3.1-LAcmvIL-10* 重组表达载体的构建与鉴定

重组质粒 *pMD18-T-cmvIL-10* 与 *pMD18-T-LAcmvIL-10*、*pCDNA3.1-cmvIL-10* 与 *pCDNA3.1-LAcmvIL-10* 分别经 *HindIII/EcoRI* 双酶切, 电泳显示在约 528 bp 和 420 bp 处呈现两条明显条带(图 4), 提示 *cmvIL-10* 与 *LA-cmvIL-10* 基因被克隆入 *pCDNA3.1* 载体中, 表明 *pCDNA3.1-cmvIL-10* 与 *pCDNA3.1-LAcmvIL-10* 真核表达载体构建成功。

### 2.4 *cmvIL-10* 与 *LA-cmvIL-10* 基因克隆测序的比对结果

*cmvIL-10* 与 *LA-cmvIL-10* 基因克隆测序的完整 cDNA 序列经 BLAST 比对, 结果显示与在 GenBank 已发表的 AD169 病毒株 *cmvIL-10* 和 *LA-cmvIL-10* 基因序列基本相同, 达到 99%~100% 的相似度。*cmvIL-10* 基因和 *LA-cmvIL-10* 基因在 GenBank 的编号分别为 AF182315 和 X17403。

### 2.5 重组子 *pMal-c2x-cmvIL-10* 与 *pMal-c2x-LAcmvIL-10* 的诱导表达及纯化

分别用 0.05 mmol/L, 0.1 mmol/L, 0.5 mmol/L, 1.0 mmol/L IPTG 诱导重组蛋白的表达, 并用 SDS-PAGE 分析; 分别在 20 °C, 25 °C, 30 °C, 37 °C 用同样浓度 IPTG 诱导表达; 分别诱导 1 h, 3 h, 4 h, 5 h, 6 h。表达产物经 SDS-PAGE 电泳分析, 结果显示 0.5 mmol/L IPTG 在 37 °C 诱导 3 h 以上能有效地促进重组蛋白的表达, *pMal-c2x* 的 MBP 标签大小约为 42.4 kDa,

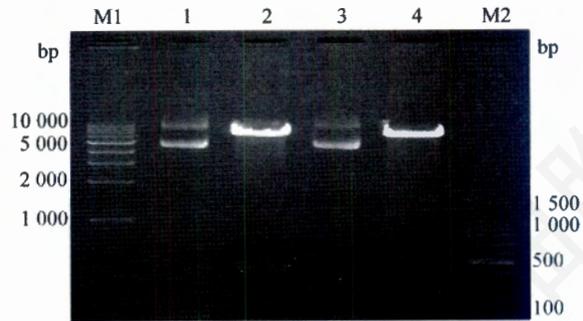


Fig.3 Identification of recombinant plasmid *pMal-c2x-cmvIL-10* and *pMal-c2x-LAcmvIL-10*

1: *pMal-c2x-LAcmvIL-10* plasmid; 2: *pMal-c2x-LAcmvIL-10* digested by *EcoRI* and *HindIII*; 3: *pMal-c2x-cmvIL-10* plasmid; 4: *pMal-c2x-cmvIL-10* digested by *EcoRI* and *HindIII*; M1: 1Kb DNA molecular weight standard; M2: 100bp DNA molecular weight standard.

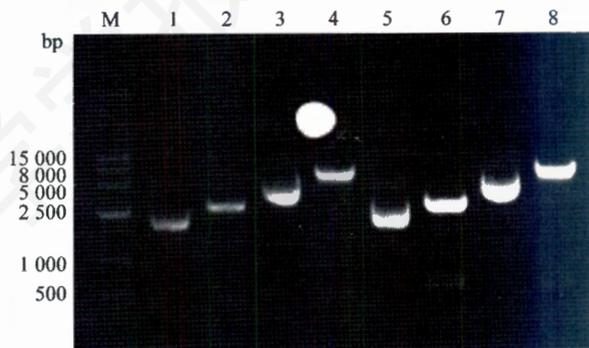


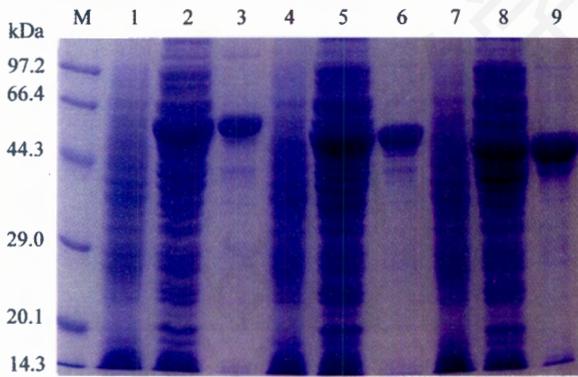
Fig.4 Identification of recombinant plasmid *pCDNA3.1-cmvIL-10* and *pCDNA3.1-LAcmvIL-10*

1: *pMD18-T-LAcmvIL-10* plasmid; 2: *pMD18-T-LAcmvIL-10* digested by *HindIII* and *EcoRI*; 3: *pCDNA3.1-LAcmvIL-10* plasmid; 4: *pCDNA3.1-LAcmvIL-10* digested by *HindIII* and *EcoRI*; 5: *pMD18-T-cmvIL-10* plasmid; 6: *pMD18-T-cmvIL-10* digested by *HindIII* and *EcoRI*; 7: *pCDNA3.1-cmvIL-10* plasmid; 8: *pCDNA3.1-cmvIL-10* digested by *HindIII* and *EcoRI*; M: wide range DNA marker(500~15 000).

*cmvIL-10* 与 *LA-cmvIL-10* 的大小约为 20.1 kDa 和 15.9 kDa, 加上 MBP 标签的大小, 结果与预期吻合。重组菌经超声(600 w, 3 s, 10 s, 18 次)裂解后, 12 000 r/min 离心 10 分钟, SDS-PAGE 分析, 产物主要存在于菌体超声破碎物离心后的上清和沉淀中, 利用 Amylose-resin 亲和层析柱对含 MBP 标签的蛋白进行纯化(图 5)。

### 2.6 *cmvIL-10* 与 *LA-cmvIL-10* 多克隆抗体的鉴定

将上述纯化的 2 种重组蛋白分别进行 SDS-PAGE 电泳并转至 PVDF 膜上, 以免疫前血清作阴性对照, 分别加入 *cmvIL-10* 和 *LA-cmvIL-10* 多克隆抗体(抗体稀释滴度为 1:500, 1:1 000, 1:2 000, 1:3 000),



**Fig.5 12%SDS-PAGE analysis of the purified recombinant protein**

M: protein marker; 1: pMal-c2x-cmvIL-10 before induction; 2: the protein expression of pMal-c2x-cmvIL-10 after induction; 3: purified pMal-c2x-cmvIL-10; 4: pMal-c2x-LAcmvIL-10 before induction; 5: the protein expression of pMal-c2x-LAcmvIL-10 after induction; 6: purified pMal-c2x-LAcmvIL-10; 7: pMal-c2x before induction; 8: the protein expression of pMal-c2x after induction; 9: purified pMal-c2x.

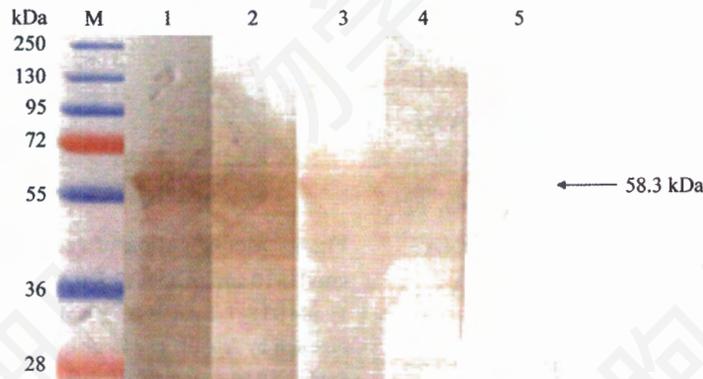
4 °C 过夜, 洗膜后加 1:1 000 稀释的 HRP-羊抗兔 IgG 于室温温育 1 h, 再次洗膜后以 DAB 试剂盒进行显色。结果在相对分子量约 62.5 kDa 和 58.3 kDa 处分别呈现特异性的结合条带, 表明所制备的抗体具有较好的抗体活性, 可与抗原特异性结合。图 6 为 LA-cmvIL-10 多克隆抗体的 Western blot 鉴定图。

### 2.7 *cmvIL-10* 与 *LA-cmvIL-10* 基因转染表达的 Western blot 鉴定结果

免疫印迹结果显示, 转染了 pCDNA3.1-cmvIL-10 与 pCDNA3.1-LAcmvIL-10 的 HeLa 细胞 48 h 后的蛋白质提取物分别在大约 20.1 kDa 和 15.9 kDa 处有两条特异性蛋白条带, 而未转染质粒的 HeLa 细胞蛋白提取物无此条带, 证明 *cmvIL-10* 与 *LA-cmvIL-10* 基因已成功转染入 HeLa 细胞并产生表达(图 7)。

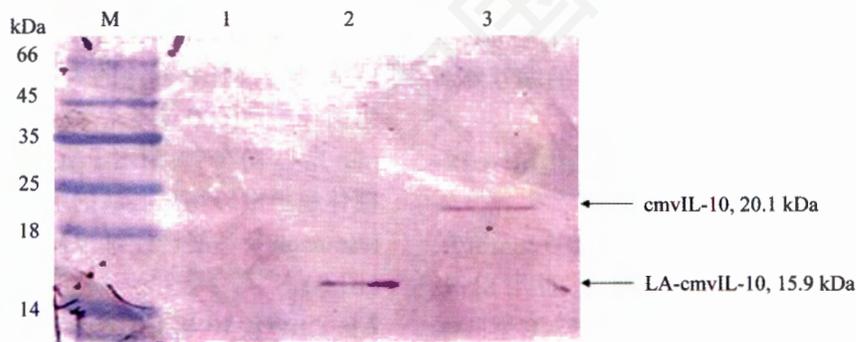
## 3 讨论

病毒在与人类共同进化的过程中演绎出大量的



**Fig.6 Western blot analysis of LA-cmvIL-10 polyclonal antibody**

M: prestained protein molecular weight marker; 1,2,3,4: LA-cmvIL-10 antibody dilutions was 1:500,1:1 000,1:2 000 and 1:3 000; 5: control.



**Fig.7 Western blot analysis of expression products**

M: prestained protein molecular weight marker; 1: proteins extracted from non-transfected HeLa cells; 2: proteins extracted from HeLa cells transfected with *LA-cmvIL-10* gene; 3: proteins extracted from HeLa cells transfected with *cmvIL-10* gene.

基因编码产物, 介导病毒所感染宿主的多项生命活动, 其目的在于帮助病毒逃避宿主的免疫攻击, 为病毒在宿主细胞中繁殖及复制创造有利的微环境。这些病毒在进化过程中, 由病毒基因编码的产物具有多种生物学活性, 且在结构与功能上与宿主的细胞因子相似, 被称为病毒编码的细胞因子的模拟分子。研究表明<sup>[6]</sup>, 这些模拟分子的作用机制主要涉及封闭或干扰宿主细胞的免疫防御体系和调节正常细胞的生长代谢途径。

HCMV 侵入宿主后, 机体形成多种独立机制逃避免疫系统的追剿。若宿主细胞不能清除这部分病毒, HCMV 便潜伏在宿主体内或呈低度增殖。迄今为止, 虽然对 HCMV 潜伏-激活感染的特性进行了相关研究, 但 HCMV 感染后的潜伏机制仍不十分明确。既往研究显示 *cmvIL-10* 与 IL-10 受体相互作用可能是病毒实现免疫逃避的重要策略。*cmvIL-10* 模拟分子可通过细胞表面 IL-10 受体起作用, 具有 IL-10 的许多功能, 如抑制细胞因子的合成, 干扰细胞表面 MHC 的表达和调节细胞介导的细胞毒性反应等<sup>[9]</sup>。*LA-cmvIL-10* 是 *cmvIL-10* 转录物的交替剪接导致的一个潜伏相关的转录子。*LA-cmvIL-10* 虽然保留了一些 *cmvIL-10* 的免疫抑制功能, 但由于 *LA-cmvIL-10* 并没有作用于细胞表面的 IL-10 受体, 因此在免疫抑制功能上与 *cmvIL-10* 有所不同: 如 *LA-cmvIL-10* 没有触发 *stat3* 的磷酸化; *LA-cmvIL-10* 没有抑制共刺激分子 CD40、CD80、CD86 的表达和树突状细胞上 CD83 标记物的成熟; 也没有抑制炎症细胞因子 IL-1 $\alpha$ 、IL-1 $\beta$ 、IL-6 和 TNF- $\alpha$  的表达等<sup>[9-11]</sup>。

研究表明<sup>[6-9]</sup>, *cmvIL-10* 与人 IL-10 有 27% 同源性, 为非连续性片段, 位于 HCMV 病毒 *UL111A* 基因附近, 有 2 个内含子, 而 *LA-cmvIL-10* 只有 1 个内含子。因此, 本课题采用重叠延伸 PCR 的方法: *cmvIL-10* 为双剪接, 含有三个外显子, 首先利用三对引物 P3/P4、P5/P6 和 P7/P8 分别扩增三个外显子片段, 由于 P4 与 P5, P6 与 P7 的 5' 端部分碱基互补, 当两个外显子片段混合后进行 PCR 扩增时两个片段的 3' 端就会有部分碱基互补, 利用重叠延伸法就可以将 *cmvIL-10* 的 3 个外显子连接起来, 得到 *cmvIL-10* 的完整 cDNA。同时 *LA-cmvIL-10* 为单剪接, 其第一个内含子被剪接, 而第二个内含子部分表达。因此我们将该表达内含子放在其下游引物 P10 上, 扩增 *LA-cmvIL-10*。克隆测序结果经 BLAST 软件分析显示, 本实验所得到的 *cmvIL-10* 和 *LA-cmvIL-10* 与已发表的 *cmvIL-10* 和 *LA-cmvIL-10* 基因序列同源性达到 99%, 同时初步确

定为 HCMV AD169 病毒株, 对于 *cmvIL-10* 和 *LA-cmvIL-10* 的研究具有较好的代表性。

本研究中, 我们分别将 *cmvIL-10* 与 *LA-cmvIL-10* 基因克隆至原核表达载体 pMal-c2x, 构建了重组质粒 pMal-c2x-*cmvIL-10* 与 pMal-c2x-*LA-cmvIL-10*。*cmvIL-10* 转录物编码一个同源于人类 IL-10 的 175 个氨基酸的蛋白质, 大小约为 20.1 kDa; 而 *LA-cmvIL-10* 编码一个同源于人类 IL-10 的 139 个氨基酸的蛋白质, 大小约为 15.9 kDa。SDS-PAGE 分析结果显示与预期相符。用纯化的 *cmvIL-10* 和 *LA-cmvIL-10* 蛋白免疫家兔, 制备抗血清, 所得抗血清经 Western blot 鉴定其抗体的效价及特异性。同时将 *cmvIL-10* 和 *LA-cmvIL-10* 基因定向克隆至真核表达载体 pCDNA3.1, 构建了重组质粒 pCDNA3.1-*cmvIL-10* 和 pCDNA3.1-*LA-cmvIL-10* 真核表达载体, 转染 Hela 细胞经 Western blot 鉴定与设计相符。

总之, *cmvIL-10* 与 *LA-cmvIL-10* 基因对于 HCMV 感染的潜伏及激活有着非常重要的作用, 我们成功的对 *cmvIL-10* 与 *LA-cmvIL-10* 基因进行了克隆及体外表达, 并且制备了高效价且特异的多克隆抗血清, 可以作为一种有效检测 *cmvIL-10* 与 *LA-cmvIL-10* 分子的工具。进一步对 *cmvIL-10* 与 *LA-cmvIL-10* 进行研究, 可为 HCMV 病毒学和生物学的研究奠定基础。

#### 参考文献(References)

- 1 Shibata Y, Kitajima M, Kawada J, Sugaya N, Nishikawa K, Morishima T, et al. Association of cytomegalovirus with infantile hepatitis. *Microbiol Immunol* 2005; 49(8): 771-7.
- 2 Gandhi MK, Khanna R. Human cytomegalovirus: clinical aspects, immune regulation, and emerging treatments. *Lancet Infect Dis* 2004; 4(12): 725-38.
- 3 Sinclair J, Sissons P. Latency and reactivation of human cytomegalovirus. *J General Virol* 2006; 87(7): 1763-79.
- 4 Reeves M, Sinclair J. Aspects of human cytomegalovirus latency and reactivation. *Curr Top Microbiol Immunol* 2008; 325: 297-313.
- 5 Jenkins C, Abendroth A, Slobedman B. A novel viral transcript with homology to human interleukin-10 is expressed during latent human cytomegalovirus infection. *J Virol* 2004; 78(3): 1440-7.
- 6 Jenkins C, Garcia W, Abendroth A, Slobedman B. Expression of a human cytomegalovirus latency-associated homolog of interleukin-10 during the productive phase of infection. *Virology* 2008; 370(2): 285-94.
- 7 Spence JV, Lockridge KM, Barry PA, Lin G, Tsang M, Penfold ME, et al. Potent immunosuppressive activities of cytomegalovirus-encoded interleukin-10. *J Virol* 2002; 76(3):1285-92.
- 8 Lin YL, Chang PC, Wang Y, Li M. Identification of novel viral interleukin-10 isoforms of human cytomegalovirus

- AD169. *Virus Res* 2008; 131(2): 213-23.
- 9 Spencer JV, Cadaoas J, Castillo PR, Saini V, Slobedman B. Stimulation of B lymphocytes by *cmvIL-10* but not *LAcmvIL-10*. *Virology* 2008; 374 (1): 164-9.
- 10 Chang WL, Baumgarth N, Yu D, Barry PA. Human cytomegalovirus-encoded interleukin-10 homolog inhibits maturation of dendritic cells and alters their functionality. *J Virol* 2004; 78 (16): 8720-31.
- 11 Gredmark S, Soderberg NC. Human cytomegalovirus inhibits differentiation of monocytes into dendritic cells with the consequence of depressed immunological functions. *J Virol* 2003; 77(20): 10943-56.

## Cloning and Vitro Expression of Human Cytomegalovirus Latency Associated IL-10 Gene

Xiao-Qun Zheng<sup>1</sup>, Jing-Jing Feng<sup>2</sup>, Zhi Zeng<sup>2</sup>, Zhao-Chang Jiang<sup>2</sup>, Jing-Zhang Ji<sup>2</sup>, Xiang Li<sup>2</sup>, Jian-Xin Lü<sup>1,2\*</sup>

<sup>1</sup>Laboratory Diagnosis Center, the Second Affiliated Hospital of Wenzhou Medical College, Wenzhou 325027, China;

<sup>2</sup>Zhejiang Provincial Key Laboratory of Medical Genetics, Wenzhou Medical College, Wenzhou 325035, China)

**Abstract** To provide data and material for the future study on the pathogenic mechanism of human cytomegalovirus latency associated IL-10 (LA-*cmvIL-10*) and IL-10 encoded by human cytomegalovirus (*cmvIL-10*) in the viral infection, we constructed prokaryotic expression vector and eukaryotic expression vector about human cytomegalovirus IL-10 (*cmvIL-10*) and LA-*cmvIL-10* gene. We extracted virus DNA from the positive urine specimens of the patients, overlap extension PCR was applied to amplify the exon of *cmvIL-10* and LA-*cmvIL-10* gene. PCR products were cloned into the pMal-c2x vector and the pCDNA3.1 vector. The exons of *cmvIL-10* and LA-*cmvIL-10* gene amplified contain the complete coding region by DNA sequencing. The prokaryotic recombinant expression vector pMal-c2x-*cmvIL-10* and pMal-c2x-*cmvIL-10* had been transformed into *E. coli* BL21 (DE3). By isopropyl- $\beta$ -D-thiogalactoside (IPTG) induction, our protein was expressed in receptor strain. The purified recombinant protein was used to immune rabbit for preparing polyclonal antibody with specificity. The eukaryotic expression vectors pCDNA3.1-*cmvIL-10* and pCDNA3.1-LA-*cmvIL-10* were transfected to Hela cell lines. The products identified by Western blot was consistent with our original design.

**Key words** human cytomegalovirus; latency; interleukin-10; cloning; vitro expression

Received: October 19, 2009 Accepted: May 21, 2010

This work was supported by Education Bureau of Zhejiang Province (No.Y200805034) and the Science and Technology Bureau of Wenzhou (No.H20090077)

\*Corresponding author. Tel: 86-577-86689805, E-mail: jxlu313@gmail.com