

人巨细胞病毒 pp150 蛋白片段与 MDBP 蛋白片段的融合表达及初步应用 Expression of Recombinant Human Cytomegalovirus Fusion Proteins pp150/MDBP Fragments and its Application

郭大东,高雪芹*,韩金祥,刘毅,张华宁

GUO Da-Dong, GAO Xue-Qin*, HAN Jin-Xiang, LIU Yi and ZHANG Hua-Ning

山东省医药生物技术研究中心,卫生部生物技术药物重点实验室,山东省现代医用药物与技术重点实验室 济南 250062

Shandong Medicinal Biotechnology Center, Key Laboratory for Biotech-drugs of the Ministry of Health, Key Laboratory for Modern Medicine and Technology of Shandong Province, Jinan 250062, China

摘 要 人巨细胞病毒(HCMV)感染是临床上常见的一种病毒性传播疾病,正常人群常无明显的临床症状,而对器官移植患者、免疫力低下及孕妇等人可产生严重的危害。以 HCMV AD169 病毒株基因为模板,经 PCR 扩增了编码 pp150 蛋白片段的 UL32 基因和编码 MDBP 蛋白片段的 UL57 基因,目的基因转入 pMD18-T 克隆载体后再经酶切与表达载体 pET-11a 连接构建出融合基因表达载体,然后转入大肠杆菌 BL21,重组大肠杆菌经诱导表达融合蛋白 pp150/MDBP。经 SDS-PAGE 分析,其相对分子量约为 27kD,表达量约占菌体蛋白的 17.45%,Western blot 鉴定为阳性,ELISA 及蛋白芯片检测表明融合蛋白具有良好的抗原性,经过初步应用表明其对血清 IgG 及 IgM 的检出率与全抗原相比一致,具有进一步开发应用的价值。

关键词 人巨细胞病毒,融合蛋白,原核表达,Western blot,蛋白芯片

中图分类号 Q78 文献标识码 A 文章编号 1000-3061(2006)06-0956-06

Abstract Human cytomegalovirus(HCMV) infection is an ubiquitous herpesvirus disease in human populations. It is rarely pathogenic to healthy adults, yet it may cause severe outcome to organ transplant recipients, the immunocompromised individuals and pregnant women. Using DNA from HCMV AD169 strain as template, the UL32 gene encoding pp150 protein fragment and the UL57 gene encoding MDBP protein fragment were amplified by PCR technique. After the construction of cloning vector pMD18-T-UL32, pMD18-T-UL57, pMD18-T-UL32/UL57 and expression vector pET-11a-UL32/UL57, the recombinant fusion proteins pp150/MDBP were induced with IPTG in BL21 host strain. The results showed that the relative molecular weight of recombinant fusion proteins pp150/MDBP is about 27kD, the product of fusion proteins takes 17.45% in the total proteins in host bacteria, the analytical result was positive to the fusion proteins pp150/MDBP via Western blot technique, while the purified recombinant fusion proteins have strong antigenicity detected by ELISA and protein chip compared with whole virus antigens from HCMV. It was demonstrated that when used for the detection of serum from the clinical patients it has the same detection rate compared with the whole virus antigen. It needs further research for application.

Key words Human cytomegalovirus, fusion protein, prokaryotic expression, Western blot, protein chip

Received: April 23, 2006; Accepted: August 19, 2006.

This work was supported by a grant from Key Project from Department of Science and Technology of Shandong Province(No.2004GG2202150).

* Corresponding author. Tel: 86-531-82919608; Fax: 86-531-82951586; E-mail: xueqingao666@163.com

山东省科技厅科技攻关计划资助项目(No.2004GG2202150)

人巨细胞病毒(HCMV)感染的特点是人群原发感染后多呈无症状的潜伏感染,但对机体免疫能力低下者,原发感染、病毒潜伏感染后的复发可引起活动性感染,并可引发严重的甚至是致死性的疾病。在器官移植、骨髓移植、免疫缺陷患者以及免疫抑制治疗的患者中,HCMV 感染是高发病率与致死率的重要原因^[1,2]。孕妇原发感染 HCMV 后容易导致胎儿畸形、低体重儿、新生儿小头畸形、耳聋、视力损伤、智力低下等^[3]。最近研究表明^[4-6],HCMV 感染与人类动脉粥样硬化甚至是冠心病的发生有重大关系。文献报道^[7-10],HCMV UL32 基因编码的磷蛋白 pp150 是急性感染的最佳血清学标志物之一。其中,pp150 的 495 至 691 氨基酸序列的蛋白结构部分是其主要的抗原表位。HCMV UL57 基因编码的蛋白,作为 HCMV IgM 抗体检测的主要抗原,是急性感染期重要的检测抗原之一^[11,12]。其中,该抗原中 545 至 601 的氨基酸部分(即 MDBP 蛋白)是抗原重要的组成部分。本研究采用 PCR 扩增编码 pp150 的 495 至 691 抗原决定簇片段的基因,并扩增了编码 MDBP 蛋白的基因,然后利用基因工程的方法,构建出包含 HCMV UL32 和 UL57 基因的融合基因表达载体,表达并纯化出融合蛋白,为其临床应用奠定了基础。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 菌株与载体:HCMV AD169 病毒株由安徽医科大学微生物学教研室王明丽教授惠赠;克隆质粒 pMD18-T 购自宝生物工程(大连)有限公司;表达质粒 pET-11a 购自 Invitrogen 公司,受体菌 *E. coli* DH5 α 、BL21(DE3)由山东省医药生物技术研究中心保存。

1.1.2 试剂:限制性核酸内切酶 *Nde* I、*Xho* I 和 *Bam* H I 以及 DNA DL2000 Marker 购自宝生物工程(大连)有限公司;T4 DNA 连接酶、X-gal、IPTG 购自 Promega 公司;病毒 DNA 快速提取试剂盒、DNA 凝胶回收试剂盒购自 OMEGA Bio-Tek 公司;胰蛋白胨和酵母提取物均为英国 OXOID 公司产品;一抗为 HCMV IgG 阳性血清(来源于山东省计划生育研究所)按 1:40 稀释;羊抗人 IgG-HRP、羊抗人 IgM-HRP 购自北京中杉金桥生物技术有限公司;HCMV 全抗原购自北京微生物研究所;氨基玻片、cy3-抗人 IgG,购自美国 SIGMA 公司。

1.1.3 仪器:PCR 扩增仪(PTC-200),美国 MJ

Research Inc 公司;PAC 300 型电泳仪,美国 BIO-RAD 公司;Centrifuge 5415D 高速离心机,德国 Eppendorf 公司;Milli-Q 纯水系统,美国 Millipore 公司;AlphaImagerTM 2200 型凝胶成像系统,美国 Alpha Innotech 公司;MOLECULAR DEVICES 酶标仪,美国 MOLECULAR DEVICES 公司;Cartisan Pixsys 5500 Robot 点样仪,Cartesian Technologies Irvine,CA 公司;ScanArray 4000, Packard Bioscience,美国 PE 公司。

1.2 方法

1.2.1 HCMV DNA 的提取:HCMV DNA 的提取照病毒 DNA 快速提取试剂盒说明书进行操作。

1.2.2 目的基因的扩增:

(1) HCMV UL32 基因的扩增:根据 GenBank 中 HCMV AD169 病毒株基因序列的报道,利用 DNA STAR 软件中 PrimerSelect 程序设计并合成了 1 对引物(上海博亚生物技术有限公司合成,下同),Primer1:5'-CAGCATATGCTCGTCTCCCCGACGCTGAC-3' 和下游引物 Primer 2:5'-CAACTCGAGAGACGCTGTTTGTGTACCCGC-3'。Primer1 和 Primer2 下划线部分分别为 *Nde* I 和 *Xho* I 的限制性内切酶位点,可扩增包含目的基因在内的 612bp DNA 片段。

PCR 反应体系(50 μ L):10 \times PCR buffer 5 μ L, MgCl₂ (25 mmol/L)3 μ L, dNTP(2.5mmol/L each)4 μ L, primer1 和 primer2 各 1 μ L, HCMV DNA 6 μ L, Taq DNA 聚合酶(5u/ μ L)0.25 μ L,灭菌 ddH₂O 29.25 μ L。PCR 反应条件:95 $^{\circ}$ C 3min,95 $^{\circ}$ C 30s,59.3 $^{\circ}$ C 40s,72 $^{\circ}$ C 55s,共进行 32 个循环,最后 72 $^{\circ}$ C 延伸 6min。扩增产物在 1.5% 琼脂糖凝胶上进行检测。

(2) HCMV UL57 基因的扩增:同法设计并合成了 HCMV UL57 基因的特异性上、下游引物 P3 和 P4。

上游引物 P3:

5'CAACTCGAGTTGGACGGC AAAGGTGAC 3'

下游引物 P4:

5'CGCGGATCCATTGAGCCG ATAGGTACGGT 3'

其中,P3 含有 *Xho* I 酶切位点及部分目的基因序列;P4 含有 *Bam* H I 的酶切位点、部分目的基因序列和 TAA 终止密码子,可扩增包含目的基因在内的 213bp DNA 片段。

PCR 反应体系同(1)。反应条件为:95 $^{\circ}$ C 3min,95 $^{\circ}$ C 30s,56 $^{\circ}$ C 40s,72 $^{\circ}$ C 45s,共进行 32 个循环,最后 72 $^{\circ}$ C 延伸 6min。扩增产物在 1.5% 琼脂糖凝胶上进行检测。

1.2.3 PCR 扩增产物的回收:照 DNA 凝胶回收试

试剂盒提供的方法进行操作。

1.2.4 pMD18-T 克隆载体的构建及鉴定 :目的基因 UL32、UL57 及融合基因 UL32/UL57 克隆载体的构建、转化及鉴定照文献 [13] 进行。

1.2.5 pET-11a 表达载体的构建及鉴定 :融合基因的 pET-11a 表达载体的构建、转化及鉴定同 1.2.4, 同时进行表达载体的基因序列测定(上海博亚生物技术有限公司)。

1.2.6 重组克隆的诱导表达 :将甘油保存的菌种用三段划线法接种于 LB 平板培养基中, 37℃ 过夜培养, 挑取单菌落接种于新鲜 LB 培养基中, 37℃ 过夜培养, 以此作为种子, 按 1% 的比例接种于 100mL 发酵培养基/500mL 摇瓶中, 于 37℃, 200r/min 振荡培养至菌体浓度达 A_{600nm} 0.6 ~ 0.8, 添加诱导剂 IPTG 至终浓度 0.5mmol/L, 诱导表达 4 h 后 10 000g、5min 离心收集菌体。

1.2.7 表达产物 SDS-PAGE 分析 :诱导表达产物的 SDS-PAGE 分析照文献 [13] 进行。

1.2.8 表达产物 Western blot 检测 :诱导表达产物经处理后行 15% SDS-PAGE 电泳, 常规方法进行 Western blot 检测。一抗为 HCMV IgG 阳性血清, 二抗为羊抗人 IgG-HRP, DAB 显色。

1.2.9 蛋白表达量的测定 :工程菌经 15% SDS-PAGE 分离后, 表达结果用 TOTAL LAB2.0 软件分析, 测定表达产物占菌体总蛋白的相对含量。

1.2.10 融合蛋白的纯化 :取诱导表达菌体超声破碎, 12 000r/min 离心 10min, 分别取上清和沉淀行 SDS-PAGE, 发现融合蛋白主要存在于上清中。取上清溶液经 DEAE-Sepharose FF 离子交换层析纯化, 接收各洗脱峰, 并用 SDS-PAGE 分析融合蛋白分布情况, 并用 Phenyl-Sepharose CL-4B 进一步纯化, 接收各洗脱峰, 用 SDS-PAGE 分析融合蛋白纯化程度。

1.2.11 融合蛋白的 ELISA 分析 :将纯化得到的融合蛋白按梯度稀释 10、2、0.4 及 0.2 μ g/mL, 与 HCMV 全抗原(按 1:150 稀释)及阴性对照一起包被酶标板(100 μ L/孔), 一抗为 HCMV IgG 阳性血清, 二抗为羊抗人 IgG-HRP, 以 TMB 为显色液, 按常规方法操作完毕后分别测定其 A_{450} 吸光度。

1.2.12 融合蛋白的蛋白芯片分析 :将融合蛋白抗原、阳性对照及阴性对照点于醛基玻片上, 经温育、封闭后, 以 HCMV IgG 阳性血清为一抗, 以 cy3-抗人 IgG 为二抗, 经温育、洗涤、离心后, 用激光聚焦扫描仪对蛋白芯片进行扫描, 并对结果进行分析处理。

1.2.13 融合蛋白抗原在血清学检测中的初步应

用 :用间接 ELISA 方法, 将纯化后的融合蛋白稀释后按 200 ng/孔包被酶标板, 按照 1.2.11 的方法, 一抗为临床收集的病人血清, 二抗为羊抗人 IgG-HRP、羊抗人 IgM-HRP。

2 结果

2.1 目的基因的 PCR 扩增

HCMV UL32 基因的 PCR 扩增产物长度为 609bp, 含目的基因 591bp(图 1A); HCMV UL57 基因的 PCR 扩增产物长度为 213bp, 含目的基因 192bp(图 1B)。

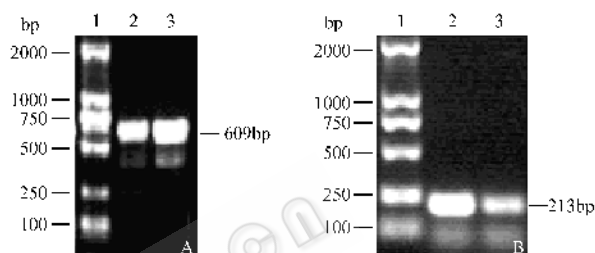


图 1 HCMVUL32 与 UL57 基因扩增电泳图谱

Fig. 1 PCR amplification of HCMV UL32 and UL 57 target genes
A. 1: DL2000 marker; 2, 3: amplified results of UL32; B. 1: DL2000 marker; 2, 3: amplified results of UL57.

2.2 克隆载体质粒的鉴定

分别构建了 HCMV UL32、UL57 及 UL32/UL57 融合基因的 pMD18-T 克隆载体, 用碱裂解法快速提取三种克隆质粒分别经 *Nde* I / *Xho* I、*Xho* I / *Bam* H I 以及 *Nde* I / *Bam* H I 双酶切后电泳均见 1 条带, 且大小与预测结果一致(图 2A ~ D)。

2.3 表达载体质粒的鉴定

构建的融合基因表达载体质粒经 *Nde* I / *Bam* H I 双酶切后经电泳分析(图 2D), 进一步经过基因测序, 证明表达载体克隆成功。

2.4 表达产物分析

工程菌诱导后经 SDS-PAGE 分析, 发现在 27kD 位置处有一明显蛋白条带(图 3A); Western blot 分析结果发现, 在 27kD 位置有单一条带出现, 证明工程菌经 IPTG 诱导表达后产生的蛋白的确为 pp150/MDBP 融合蛋白(图 3B)。

2.5 蛋白表达量的测定

目的蛋白经 SDS-PAGE 电泳分离后进行分析, 结果目的蛋白表达量占菌体总蛋白的 17.45%。

2.6 融合蛋白的纯化

工程菌经超声破碎后离心, 分别对沉淀与上清进行 SDS-PAGE 分析, 发现融合蛋白主要存在于上

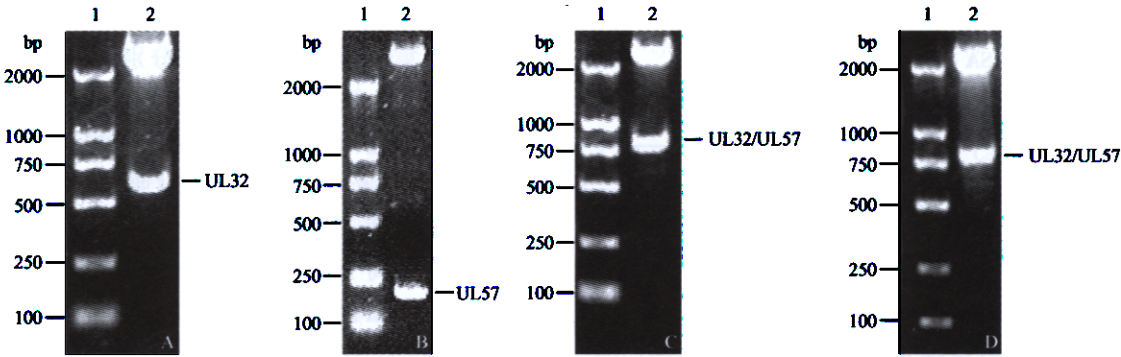


图 2 UL32、UL57 和 UL32/UL57 融合基因基因克隆质粒及融合基因表达质粒的酶切分析

Fig.2 Results of double endonucleases pMD18-T UL32, pMD18-T UL57 and pMD18-T UL32/UL57 and pET-11a-UL32/UL57

A. 1: DL2000 marker; 2: a 597bp fragment was obtained. B. 1: DL2000 marker; 2: a 201bp fragment was obtained. C. 1: DL2000 Marker; 2: an 801bp fragment was obtained. D. 1: DL2000 marker; 2: an 801bp fragment was obtained.

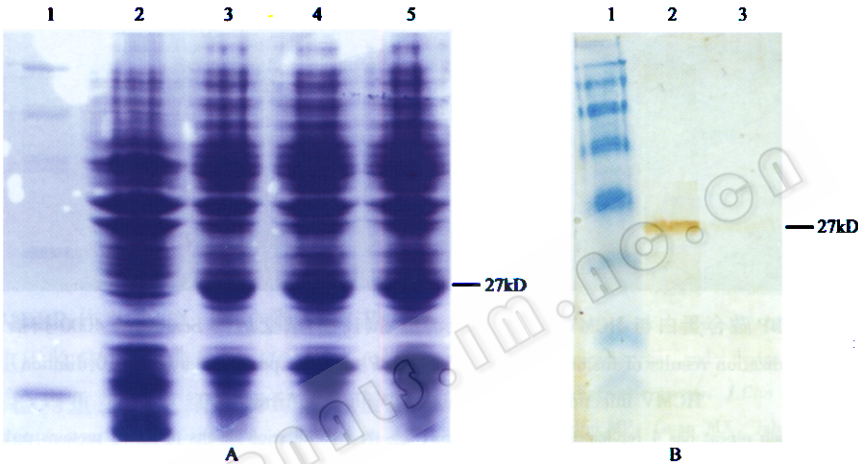


图 3 经 IPTG 诱导后重组融合蛋白 pp150/MDBP 的 SDS-PAGE 分析及免疫印迹分析

Fig.3 SDS-PAGE analysis of fusion protein pp150/MDBP induced by IPTG and immunoblot analysis

A: lane1 was marker; lane2 was without induction and lane 3 ~ 5 was induced for 3h, 4h, and 5h, respectively. B: immunoblot analysis of fusion protein pp150/MDBP expressed by pET11a-HCMV UL32/UL57 in BL21. 1: prestained protein marker: 298, 98, 64, 50, 36, 30, 16, 6, 4kD respectively; 2: induction by IPTG for 4h; 3: uninduced.

清溶液中;上清溶液分别经 DEAE-Sepharose FF 离子交换层析纯化及 Phenyl-sepharose CL-4B 进一步纯化,发现融合蛋白经纯化后纯度大于 95%(图 4)。

2.7 融合蛋白的免疫原性

2.7.1 ELISA 方法检测融合蛋白的免疫原性:纯化后的融合蛋白 pp150/MDBP 按梯度稀释后,与 HCMV 全抗原(1:150)及阴性对照一起包被酶标板,反应完毕后分别测定其 A_{450} 吸光度,结果见表 1。

以重组融合蛋白的蛋白浓度 $C(\mu\text{g}/\text{mL})$ 为自变量,以相应的 A_{450} 吸光度作为因变量,进行线性回归处理,得线性回归方程为:

$$A = 0.2362C + 1.9683, r = 0.9415$$

可见有良好的相关性。

2.7.2 蛋白芯片法检测融合蛋白的免疫原性:重组融合蛋白 pp150/MDBP 与阳性对照样品及阴性对照

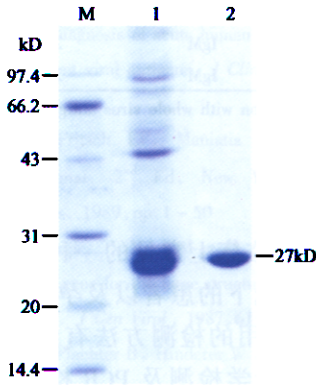


图 4 融合蛋白经 DEAE 和 Phenyl 纯化后的 SDS-PAGE 分析

Fig.4 SDS-PAGE analysis of fusion protein purified by DEAE and Phenyl Sepharose

1: fusion protein purified by DEAE Sepharose; 2: fusion protein purified by DEAE Sepharose and Phenyl Sepharose. It can be seen when purified with two steps, the purified efficiency was very high.

表 1 纯化后的融合蛋白 pp150/MDBP 的 ELISA 检测结果 (A_{450} , $n = 3$)

Table 1 ELISA results of purified fusion proteins pp150/MDBP (A_{450} , $n = 3$)

Control		Fusion protein pp150/MDBP($\mu\text{g/mL}$) ($\bar{X} \pm SD$)			
Negative	Whole antigen	10	2	0.4	0.2
0.068 \pm 0.002	3.515 \pm 0.103	4.233 \pm 0.119	2.977 \pm 0.085	2.028 \pm 0.051	1.612 \pm 0.136

样品的芯片检测扫描结果见图 5,证明融合蛋白具有良好的抗原性。

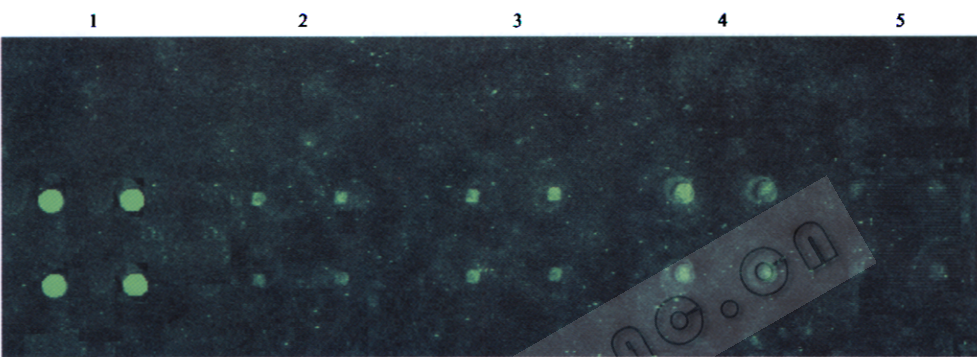


图 5 pp150/MDBP 融合蛋白与 HCMV IgG 阳性血清患者(1:10)杂交后的 ScanArray 4000 扫描结果

Fig. 5 Hybridization results of fusion protein pp150/MDBP with the positive serum(1:10 dilution) of HCMV infectious patient Scanning with ScanArray 4000

Each microarray has 3 repeats and each repeat has 4 replicates. 1: IgG control; 2~4: hybridization results of fusion proteins pp150/MDBP; 5: negative control.

表 2 纯化后的融合蛋白经间接 ELISA 方法检测血清样本结果

Table 2 Detection of serum by indirect ELISA with fusion protein

Origin of primary Antibody	Type of detection	Number of serum	Results detected by indirect ELISA			
			Positive	Negative	Positive rate	P value
Fusion protein	IgG	60	24	36	40%	0.225*
Whole virus antigen	IgG	71	31	40	43.67%	
Fusion protein	IgM	21	18	3	85.71%	0.000*
Whole virus antigen	IgM	21	1	20	4.76%	

* Represents comparison with whole virus antigen.

3 讨论

HCMV 感染是临床上常见的一种病毒性传播疾病,对于免疫能力低下的患者以及孕妇的危害很大。目前 HCMV 感染常用的检测方法有细胞培养技术、抗原血症检测、血清学检测及 PCR 检测等方法。在血清学检测方法中,其中血清学检测的敏感性与提供的抗原免疫原性的强弱有关。文献报道 pp150 蛋白与 HCMV 的其它结构蛋白相比,是一种免疫原性更强的蛋白,对 HCMV 抗体阳性的患者而言,用血清学方法检测时 pp150 蛋白更具有可靠性。Jahn

2.8 融合蛋白在血清学检测中的初步应用

对收集的临床血清标本,分别经商用试剂盒检测 HCMV IgG、IgM 为阳性后,再分别用融合蛋白及全病毒抗原经稀释后用 ELISA 法检测其 IgG、IgM 感染率,阳性判断标准为:阴性对照平均吸光度值 + 2SD,结果见表 2。结果表明,融合蛋白对 IgM 阳性检出率明显高于全抗原对 IgM 检出率($P = 0$);融合蛋白与全抗原相比,对临床患者血清 IgG 抗体的检出率相似($P = 0.225$),因此,可以使用基因重组融合蛋白替代全抗原进行血清学检测,从而克服病毒全抗原制备过程中的繁琐和高成本等缺陷。

等^[14]报道,pp150 蛋白的 3 个抗原决定簇分别位于 420-440、500-550 及 700-750 氨基酸残基之间;Vornhagen 等^[15]认为 pp150 蛋白的 495-691 氨基酸残基片段是鉴别个体感染的最适合的抗原,其中 594-643 氨基酸残基片段是主要的 IgG 抗原表位;HCMV UL57 基因编码的蛋白,作为 HCMV IgM 抗体检测的主要抗原,也是急性感染期重要的检测抗原之一。在此基础上,我们构建了 HCMV 的融合基因的原核表达载体。

构建的融合基因表达载体经 IPTG 诱导表达融合蛋白并经 DEAE-Sepharose FF 阴离子交换层析及

Phenyl-sepharose CL-4B 疏水层析两步纯化,得到了纯度大于 95% 的重组 HCMV 融合蛋白。该纯化条件为生产上常用的操作方法,操作步骤简单,无特殊仪器要求,融合蛋白纯化程度好,洗脱条件温和,回收率高,较适合大规模生产,此外表达的融合蛋白裂菌后以可溶性形式存在于上清中,无需破碎包涵体,也进一步简化了生产条件。

以纯化的融合蛋白作为抗原检测血清,发现其有良好的抗原性。ELISA 检测证实,以不同浓度的融合蛋白包被酶标板检测患者阳性血清时,融合蛋白浓度与其吸光度之间存在一定的相关性,证明可用纯化重组的融合蛋白作为抗原检测患者体内血清的抗体滴度。

蛋白质芯片技术是在芯片上固定好蛋白质分子如抗原或抗体,利用蛋白质与蛋白质之间的相互作用对蛋白质的生物学特性进行分析。蛋白质芯片技术具有快速、并行、自动化和高通量等特点,它可以同时对全基因组水平的上千种不同的蛋白质进行分析,是后基因组时代功能蛋白质组研究的重要手段。本研究利用基因工程手段纯化获得的人巨细胞病毒融合蛋白 pp150/MDBP 作为抗原,通过蛋白质芯片技术检测发现,使用临床上已确诊的 HCMV IgG 阳性血清作为抗体,检测重组人巨细胞病毒融合蛋白 pp150/MDBP,与阳性对照及阴性对照相比,可以完成正确的检测,说明基因重组人巨细胞病毒融合蛋白 pp150/MDBP 具有较好的抗原生物学特性,这也为其进一步扩大在临床上的应用奠定了良好的基础。

我们以表达纯化的融合蛋白抗原包被 ELISA 板,并且以病毒全抗原为对照对病人血清进行了检测,表明融合蛋白对血清的检出率优于全抗原,可以替代全抗原进行 ELISA 方法检测应用。

综上所述,我们运用基因工程的方法制备的 pp150/MDBP 融合蛋白,具有良好的抗原性,经过初步应用表明其抗原性优于全抗原,而且其制备过程具有安全、价廉、易规模化生产的优点,为进一步开发应用打下了基础。

REFERENCES (参考文献)

[1] Gaytant MA, Steegers EA, Semmekrot BA *et al.* Congenital cytomegalovirus infection: review of the epidemiology and outcome. *Obstet Gynecol Surv*, 2002, **57**(4): 245 - 256

[2] Boeckh MW, Leisenring SR, Riddell RA *et al.* Late cytomegalovirus disease and mortality in allogeneic hematopoietic stem cell transplant recipients: importance of viral load and T cell immunity. *Blood*, 2003, **101**: 407 - 414

[3] Bale JF, Miner L, Petheram SJ. Congenital cytomegalovirus infection. *Curr Treat Options Neurol*, 2002, **4**(3): 225 - 230

[4] Shen YH, Utama B, Wang J *et al.* Human cytomegalovirus causes endothelial injury through the ataxia telangiectasia mutant and p53 DNA damage signaling pathways. *Circ Res*, 2004, **94**(10): 1310 - 1317

[5] Reinhardt B, Minisini R, Mertens T. Opinion article: cytomegalovirus is a risk factor in atherogenesis. *Herpes*, 2002, **9**(1): 21 - 23

[6] Altannavch TS, Roubalova K, Broz J *et al.* Serological markers of chlamydia pneumoniae, cytomegalovirus and helicobacter pylori infection in diabetic and non-diabetic patients with unstable angina pectoris. *Cent Eur J Public Health*, 2003, **11**(2): 102 - 106

[7] Landini MP, Re MC, Mirolo G *et al.* Human immune response to cytomegalovirus structural polypeptides studied by immunoblotting. *J Med Virol*, 1985, **17**(4): 303 - 311

[8] Jahn G, Scholl BC, Traupe B *et al.* The two major structural phosphoprotein (pp65 and pp150) of human cytomegalovirus and their antigenic properties. *J Gen Virol*, 1987, **68**(Pt5): 1327 - 1337

[9] Greijer AE, VanDe Crommert JG, Stevens SC *et al.* Molecular fine-specificity analysis of antibody responses to human cytomegalovirus and design of novel synthetic-peptide-based serodiagnostic assays. *J Clin Microbiol*, 1999, **37**(1): 179 - 188

[10] Landini MP, Guan MX, Jahn G *et al.* Large-scale screening of human sera with cytomegalovirus recombinant antigens. *J Clin Microbiol*, 1990, **28**(6): 1375 - 1379

[11] Maine GT, Lazzarotto T, Chovan LE *et al.* The DNA-binding protein pUL57 of human cytomegalovirus: comparison of specific immunoglobulin M (IgM) reactivity with IgM reactivity to other major target antigens. *Clin Diagn Lab Immunol*, 1996, **3**(3): 358 - 360

[12] Vornhagen R, Hinderer W, Sonneborn HH *et al.* Immunoglobulin A-specific serodiagnosis of acute human cytomegalovirus infection by using recombinant viral antigens. *J Clin Microbiol*, 1996, **34**(4): 1020 - 1023

[13] Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. 2nd Ed, New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989, pp. 1 - 50

[14] Jahn G, Kouzarides T, Mach M *et al.* Map position and nucleotide sequence of the gene for the large structural phosphoprotein of human cytomegalovirus. *J Gen Virol*, 1987, **68**(5): 1358 - 1367

[15] Vornhagen R, Plachter B, Hinderer W *et al.* Early serodiagnosis of acute human cytomegalovirus infection by enzyme-linked immunosorbent assay using recombinant antigens. *J Clin Microbiol*, 1994, **32**(4): 981 - 986