

H9N2禽流感病毒HA全长基因的高效可溶表达

及免疫原性研究

谢青梅, 李少璃, 陈丽, 周庆丰, 马静云, 毕英佐, 曹永长

(华南农业大学动物科学学院, 广东 广州 510642)

摘要: 采用 RT-PCR 方法扩增了 H9N2 亚型禽流感病毒 (AIV) 广东株的血凝素基因 HA. 将 HA 基因克隆到笔者所设计的原核表达载体 pMBX 上, 成功构建重组表达质粒 pMBX-HA. 将其转化到 E. coli BL-21 感受态细胞中表达, 经 SDS-PAGE 可检测到相对分子质量约为 96 200 的融合蛋白, 表达产物占菌体总蛋白的 29.5%. 经蛋白可溶性分析看出, 融合蛋白 90% 以上是以可溶形式表达的. Western-blot 证实, 可溶表达的融合蛋白与 H9N2 AIV 阳性血清具有良好的免疫反应性. 将可溶表达的融合蛋白用体积分数为 50% 的 Ni-NTA 树脂过柱纯化, 用融合蛋白作抗原, 通过 ELISA 方法, 能特异性地检测出禽流感阳性血清.

关键词: 禽流感病毒; HA 基因; 高效可溶表达; 免疫原性

中图分类号: S852.65 文献标识码: A 文章编号: 1001-411X(2006)03-0093-04

High Soluble Expression and Immunogenicity Assessment of

HA Protein of Avian Influenza Virus

XIE Qing-mei, LI Shao-li, CHEN Li, ZHOU Qing-feng, MA Jing-yun, BI Ying-zuo, CAO Yong-chang

(College of Animal Science, South China Agric. Univ., Guangzhou 510642, China)

Abstract: The HA gene of H9N2 subtype avian influenza virus (AIV) isolated from Guangdong Province was successfully amplified by RT-PCR. The HA fragment was inserted into plasmid pMBX to obtain recombinant plasmid in which HA gene was fused into. The pMBX-HA was transformed into E. coli BL-21 (DE3) to induce HA gene fusion expression with 1 mmol/L IPTG. The fusion protein band with relative molecular mass of 96 200 was detected on the SDS-PAGE gel, and the soluble expression products accounted for 29.5% of the total E. coli proteins. The soluble form of the expression products was up to 90% the fusion protein. The expression products specifically reacted with the antisera against H9N2 subtype avian influenza virus. The soluble expression products was purified by 50% () Ni-NTA affinity chromatography and used as an antigen, AIV antibody could be detected by ELISA method.

Key words: avian influenza virus; HA gene; high soluble expression; immunogenicity

禽流感 (avian influenza, AI) 由 A 型流感病毒引起的一种急性、传染性呼吸道疾病, 是现代化养禽业难以对付的重要禽类呼吸道传染病之一. 我国《中华人民共和国动物防疫法》和世界动物卫生组织 (OIE) 规定该病为 A 类烈性传染病^[1]. 1966 年首次在 Wisconsin 从火鸡体内分离到 H9N2 禽流感病

毒^[2]. H9N2 亚型禽流感病毒可广泛从野生和家养禽类中分离^[3-4], 在香港和大陆的猪及人体内也分离到此病毒^[5-6]. H9N2 亚型 AIV HA 基因的核苷酸易发生变异, 在分子流行病学调查、疫源的追踪、毒株型与亚型的分析、基因工程疫苗的研究方面具有重要的学术价值和现实意义. Li 等^[7]分析了 20 株

收稿日期: 2005-12-27

作者简介: 谢青梅 (1972-), 女, 讲师, 在职博士研究生; 通讯作者: 曹永长 (1965-), 男, 教授, 博士, E-mail: yccao@scau.edu.cn

基金项目: 广东省科技计划项目 (2004A2090102)

H9N2 亚型 AIV 的 HA、NA 基因之间的核苷酸的同源性后,首次报道了 H9N2 亚型 AIV 之间存在抗原变异性和遗传多样性. 由于 HA 蛋白本身比较大,郑其升等^[8]用原核表达载体表达 HA 蛋白都是包涵体,表达量低,可溶性也很低,且要通过包涵体的变性复性来进行纯化,这很可能改变表达蛋白的生物学活性. 禽流感监测和诊断,常用的有病毒分离鉴定和血清学检测特异性的抗体^{[1]181}. 检测用的抗原来自于经纯化浓缩处理的流感病毒,该病毒来源的抗原不仅制备工艺复杂和成本较高,且存在散毒的危险,在应用中存在局限性. 本研究采用 RT-PCR 技术扩增了 H9N2 亚型禽流感病毒完整的 HA 基因,并用新构建的高效可溶表达载体 pMBX,在大肠杆菌中高效可溶表达 HA 融合蛋白,突破了一般大肠杆菌表达载体以包涵体形式表达外源蛋白的瓶颈. 证实了新构建的 pMBX 载体具有高效可溶表达载体的特性,具有广泛的应用价值.

1 材料与方法

1.1 毒株、菌种和质粒

A/Chicken/Guangdong/7/2001 (H9N2) 毒株、*E. coli* BL-21 (DE3)、*E. coli* DH5 α 及质粒 pMBX,由华南农业大学动物科学学院基因工程实验室保存. 质粒 pMBX 由笔者构建.

1.2 主要试剂

AMV 反转录酶、RNA 酶抑制剂、ExTaq DNA 聚合酶、dNTPs、IPTG、DNA Marker 和限制性内切酶 *Eco*RI、*Xho*I 均购自大连宝生物工程有限公司;RNA 抽提试剂 TRIzol LS Reagent 为 Invitrogen 公司产品;DNA 片段凝胶快速回收试剂盒购自 Omega 公司;6 $\times$ His 蛋白质纯化树脂 Ni-NTA 购自 QIAGEN 公司;鸡的禽流感 H9N2 标准阳性血清由哈尔滨兽医研究所提供,鸡的待测血清由广东省兽医防疫站提供;其他试剂均为国产分析纯.

1.3 引物

参照 GenBank 中注册的 H9N2 亚型 AIV HA 基因序列(注册号 DQ464352)设计 1 对引物,即 HAup/HAdn. 跨幅 1 709 bp,包括 HA 全长基因. 在引物 5' 端加上 *Eco*RI 酶切位点,3' 端加上 *Xho*I 酶切位点用斜体表示. 引物序列如下:

HAup:5'-ATTGAATTCATGGAGCGCTTAGTG-3';

HAdn:5'-ATTCTCGAGAATGGCGATGGCACAA-TC-3'.

1.4 AIV HA 基因的 RT-PCR 扩增

参照 TRIzol LS Reagent 说明提取病毒 RNA,以 HAup/HAdn 为引物,在 AMV 反转录酶作用下合成

HA 基因的 cDNA,RT 产物直接用于 PCR 扩增 HA 基因的模板. 按常规方法扩增 HA 基因,反应条件为:94 $^{\circ}$ C 预变性 3 min;94 $^{\circ}$ C 变性 40 s,52 $^{\circ}$ C 退火 90 s,72 $^{\circ}$ C 延伸 90 s,循环 30 次,最后 72 $^{\circ}$ C 延伸 10 min. PCR 产物用 0.01 g/mL 琼脂糖凝胶电泳检测.

1.5 AIV HA 基因的克隆与鉴定

用 0.01 g/mL 琼脂糖凝胶电泳纯化 PCR 产物,用 Ex Taq 加 A 尾,加尾产物在 T4 DNA 连接酶作用下连接到 pGEM⁺-T Easy 载体,连接产物直接用于转化 *E. coli* DH5 α 感受态细胞. 用 PCR 筛选阳性 T-HA 重组质粒,同时送阳性菌液到上海博亚生物工程公司测序鉴定.

1.6 重组表达质粒的构建

以阳性 T-HA 重组质粒为模板按 1.4 的条件扩增、检测目的片段. 用 *Eco*RI、*Xho*I 消化的 HA 基因与消化的 pMBX 质粒连接,连接好的质粒转化 DH5 α 感受态细胞,转化子分别用 HAup/HAdn 引物进行 PCR 筛选.

1.7 重组质粒在大肠埃希氏菌中的可溶表达

用上述阳性重组质粒转化 *E. coli* BL-21 (DE3),加入 IPTG 至终浓度 1 mmol/L 诱导表达,分别于 37 $^{\circ}$ C 进行诱导,诱导后 1、2、3、4、5 h 取样检测表达产物,取表达量大的表达产物进行可溶性分析. 于冰浴中超声破碎细菌沉淀,在细菌沉淀中加入 500 μ L 的裂解缓冲液,超声时间 5 s,间隔时间 8 s,功率 400 W 破碎 20 次,4 $^{\circ}$ C 12 000 r/min 离心 10 min,取上清液和沉淀,在上清液和沉淀中加入 SDS-PAGE 上样缓冲液,使二者体积基本相等. 再取等量上清液和沉淀溶液进行 SDS-PAGE 电泳.

1.8 表达产物的纯化

按照 Qiagen 公司纯化树脂 Ni-NTA 说明书的方法进行操作.

1.9 HA 融合蛋白的 Western-blot 分析

按文献[9]方法进行表达产物的 SDS-PAGE 及 Western-blot 分析. 用 SDS-PAGE 检测目的蛋白的表达,浓缩胶质量分数为 5%,分离胶质量分数为 12%. Western-blot 所用一抗为 H9N2 亚型 AIV 阳性血清(用经超声波破碎的大肠杆菌吸附处理);二抗为辣根过氧化物酶标记的山羊抗小鼠 IgG, DAB 显色.

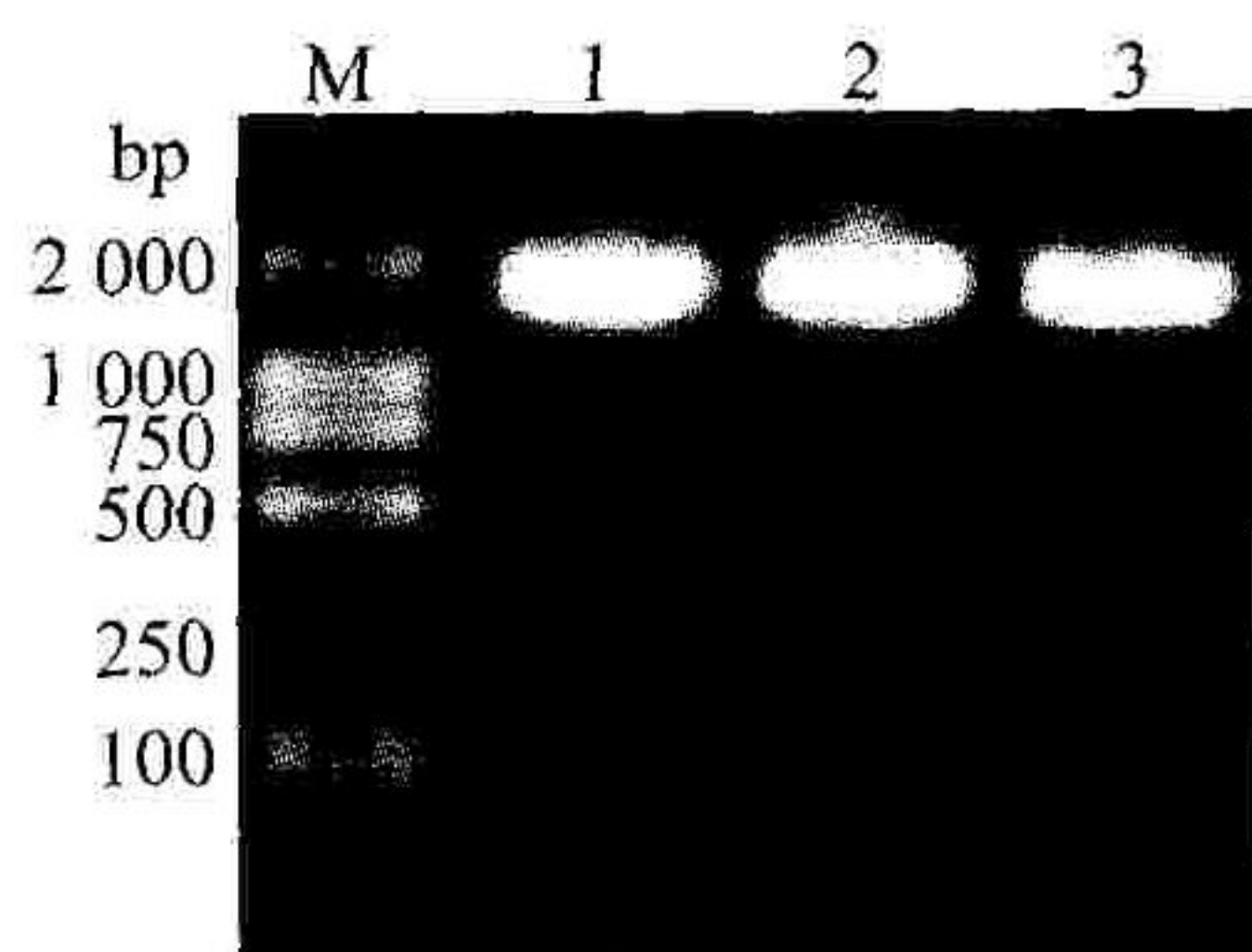
1.10 ELISA 检测

以不同浓度的纯化 HA 蛋白包被酶标板,并且用制备的阳性和阴性血清(用经超声波破碎的大肠杆菌吸附处理)倍比稀释后进行方阵滴定,探索最佳的抗原包被浓度和血清的最佳稀释度,并用最佳的抗原浓度包被酶标板,检测部分送检的血清.

2 结果

2.1 HA 基因的 RT-PCR 扩增

对 H9N2 亚型的 AIV HA 基因进行 RT-PCR 扩增,产物用 0.01 g/mL 琼脂糖凝胶电泳进行检测,研究发现在约 1 700 bp 出现特异性扩增带(图 1),与预期的大小相符,初步表明用 RT-PCR 方法成功扩增了 H9N2 亚型 AIV HA 基因。



M: DNA marker DL2000, 1~3: RT-PCR 扩增出的目的条带

M: DNA marker DL2000; 1-3: RT-PCR products

图 1 H9N2 亚型 AIV HA 基因的 RT-PCR 扩增产物电泳结果

Fig. 1 Electrophoretic analysis of RT-PCR amplification of H9N2 subtype AIV HA gene

2.2 HA 基因的 cDNA 的克隆及鉴定

AIV HA cDNA 的 RT-PCR 产物经纯化、加尾后,插入到 pGEM-T Easy 载体的外源基因插入位点,重组质粒转化 *E. coli* DH5 α ,以培养的菌液为模板进行 PCR 鉴定。阳性菌液经上海博亚生物工程公司测序,测序结果与 GenBank 中检索的 AIV HA 基因同源性达 95.3% 以上,而氨基酸同源性为 96.0% 以上。

2.3 重组表达质粒的鉴定

PCR 扩增的 HA 基因经过酶切后连接同样经过酶切的 pMXB,转化大肠杆菌 DH5 α 。PCR 鉴定得到阳性克隆,抽提质粒。重组表达质粒双酶切产物电泳后,得到一大一小 2 个片段,其中小片段与目的基因片段大小一致,表明重组质粒 pMXB-HA 已构建成功(图 2)。

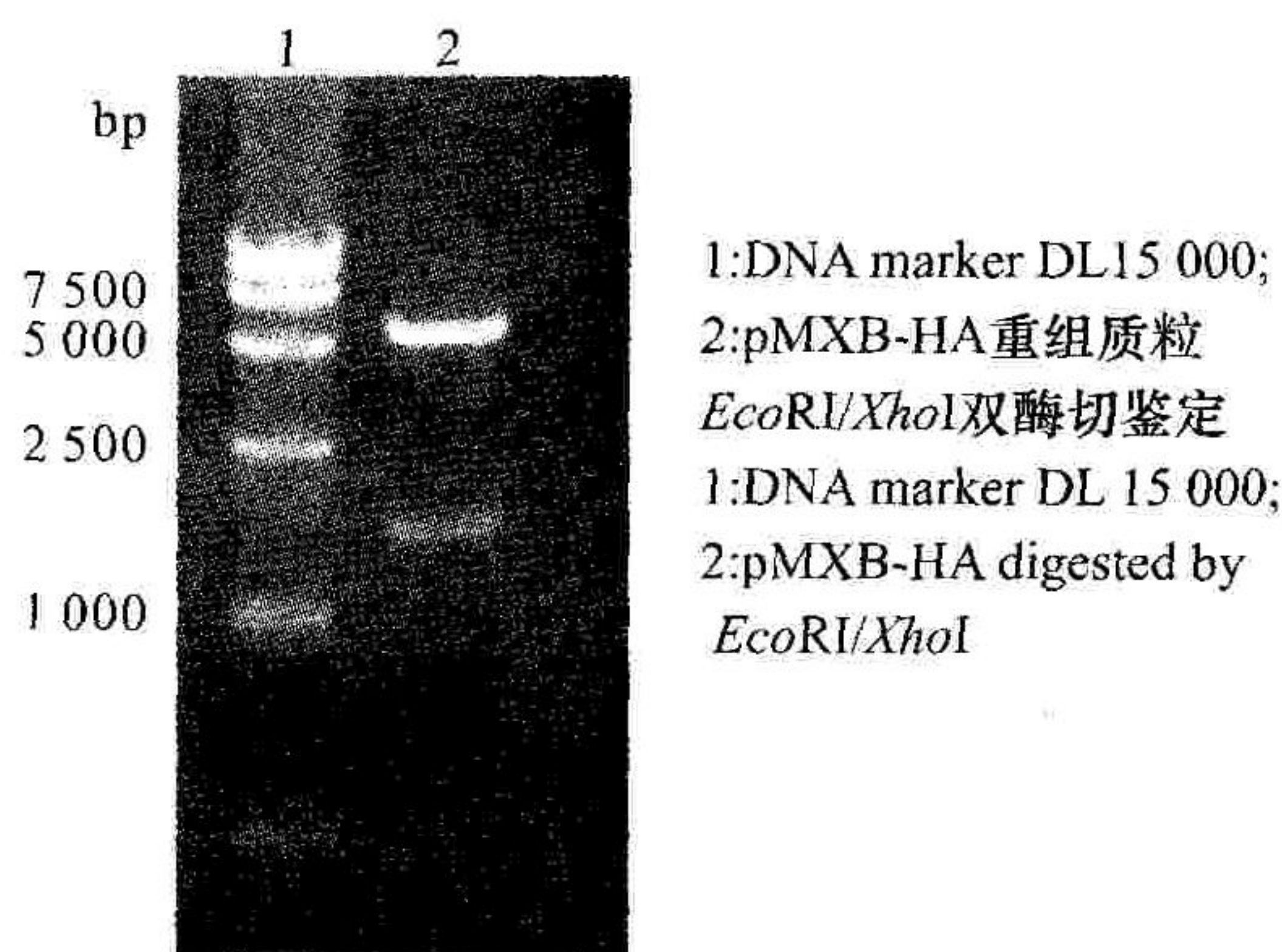
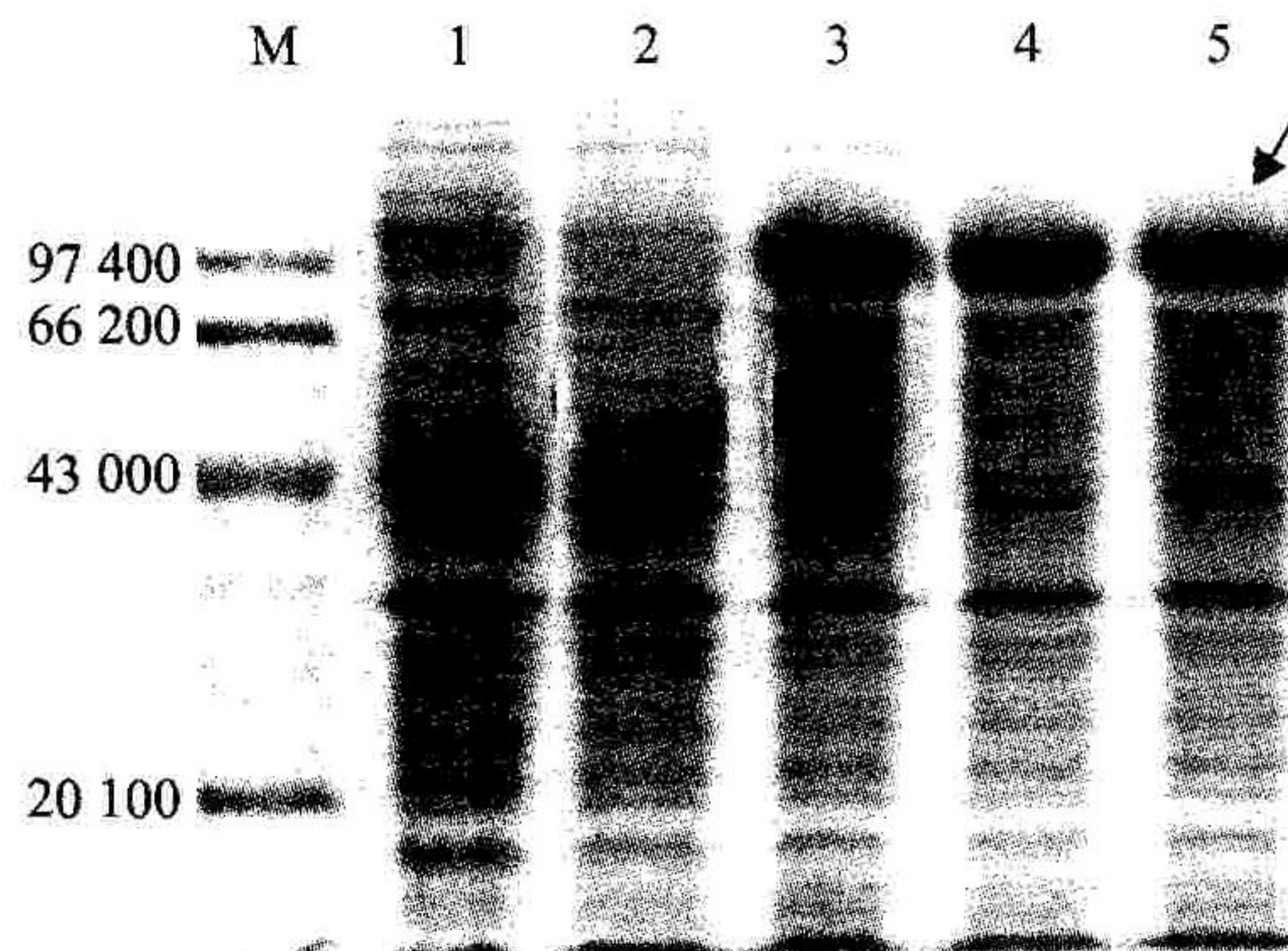


图 2 重组质粒的酶切鉴定

Fig. 2 Identification of recombinant plasmids by digestion with restriction endonucleases

2.4 HA 基因在大肠杆菌中的诱导表达

经酶切鉴定为阳性的重组质粒转化表达菌 BL-21 (DE3),在 LA 平板上挑取单个菌落培养,同样进行 PCR 鉴定,获得阳性的重组质粒表达菌。取菌液接种到 LA 液体培养基中,待细菌浓度达到 $D_{600\text{ nm}}$ 为 0.4~0.5 时加入 IPTG 并使其终浓度达 1 mmol/L,用 SDS-PAGE 检测表达产物(图 3),与诱导前相比,在相对分子质量约 96 200 处出现明显的诱导蛋白条带,相对分子质量大小与预期一致。薄层凝胶扫描分析,最佳表达状态时融合蛋白的表达量占菌体总蛋白的 29.5%。



M: 蛋白质相对分子质量标准;1:未加 IPTG 的细菌裂解产物;2~5:分别为 IPTG 诱导 0、3、4 和 5 h 的细菌裂解产物

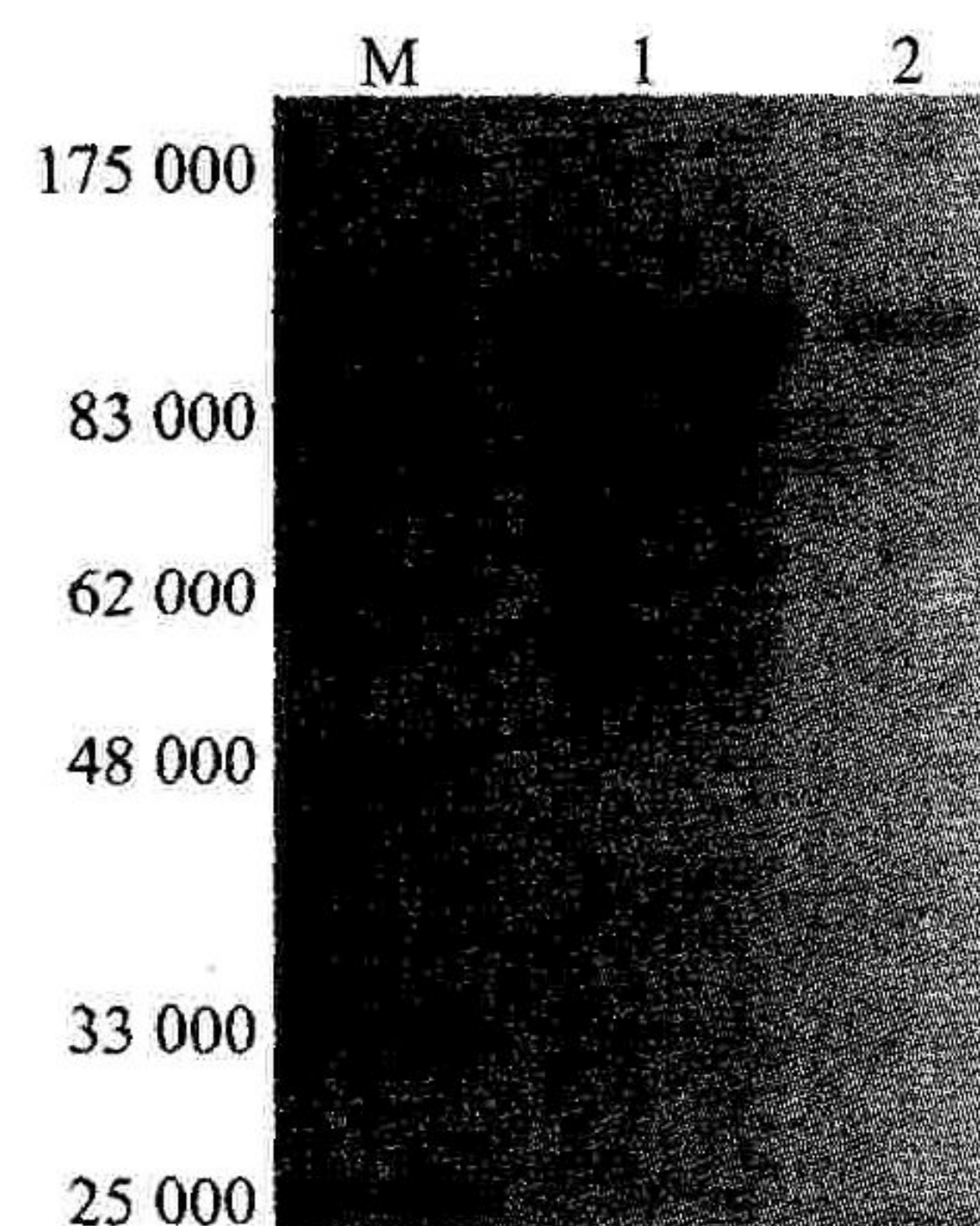
M: Relative molecular mass of protein marker; 1: BL-21 (DE3) cell lysis without IPTG; 2-5: BL-21 (DE3) cell lysis after IPTG induction for 0, 3, 4 and 5 h respectively

图 3 融合蛋白的 SDS-PAGE 分析

Fig. 3 SDS-PAGE analysis of the expressed fusion protein

2.5 表达产物的可溶性分析及 Western-blot 检测

经蛋白可溶性分析看出,融合蛋白 90% 以上是以可溶形式表达的(图 4)。经 SDS-PAGE 电泳,然后转移硝酸纤维素膜,用特异性的禽流感阳性血清对



M: 蛋白质相对分子质量标准;1: 细菌裂解物上清的 SDS-PAGE;2: 细菌裂解物沉淀的 SDS-PAGE;箭头所指为 HA 表达条带

M: relative molecular mass of protein marker; 1: SDS-PAGE of supernatant of HA protein lysis; 2: SDS-PAGE of sediment of HA protein lysis HA protein indicated by arrow

图 4 HA 基因表达产物细菌裂解物的 SDS-PAGE

Fig. 4 Solubility analysis of the expressed product

HA 融合蛋白进行 Western-blot 分析(图5)。在硝酸纤维素膜上具有一条活性带,大小与 SDS-PAGE 表达的蛋白大小一致,证实了用载体 pMBX 表达的融合蛋白 HA 具有免疫活性。

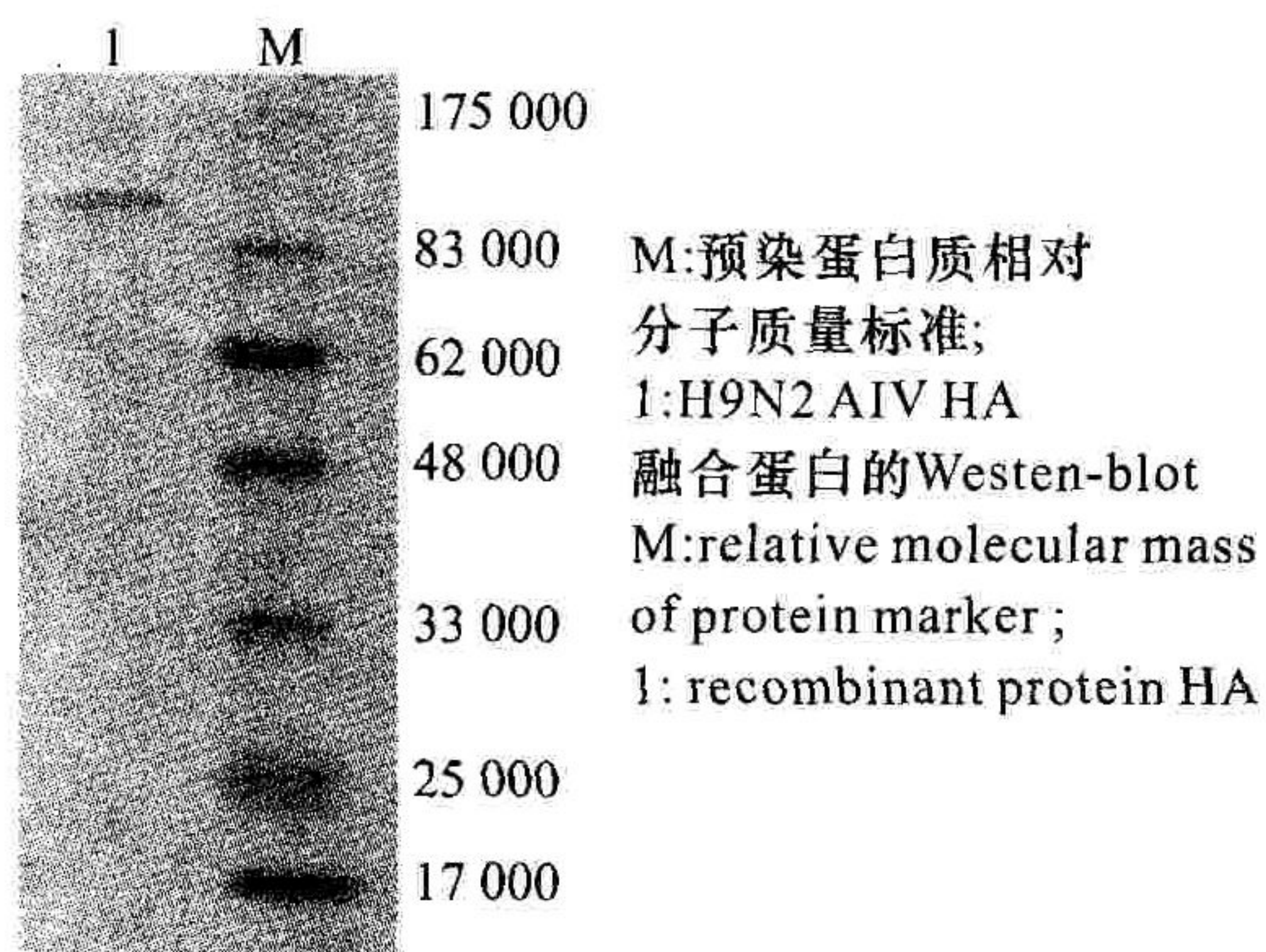


图5 HA 基因表达产物 Western-blot 分析

Fig. 5 Western-blot analysis of recombinant protein HA

2.6 ELISA 检测

用纯化树脂 50% (体积分数) Ni-NTA 过柱纯化的融合蛋白作抗原,用 H9N2 亚型 AIV HA 蛋白免疫小鼠制备获得 AIV H9N2 阳性血清,HI 效价达 2^{10} (获得的血清用经超声波破碎的大肠杆菌吸附处理)。将纯化的 HA 蛋白包被在酶标板上,进行 ELISA 反应,同时用没有免疫的小鼠血清作对照。结果表明纯化的 HA 融合蛋白能特异性地检测到阳性血清中 HA 抗体, P/N 值均大于 3.0。方阵滴定表明,最佳的抗原稀释浓度为 1:64,即 $12.5 \mu\text{g/mL}$;最佳的血清稀释度为 1:100。从待检 120 份血清中能检测出 90 份阳性血清,与 HI 试验结果符合率达 94.5%。

3 讨论

研究表明,H9N2 亚型 AIV HA 基因大约编码 550 个氨基酸,是病毒表面主要糖蛋白之一,以三聚体形式存在于囊膜表面,在病毒吸附、穿膜以及决定病毒的宿主特异性和致病力方面均起着相当关键的作用,HA 是 AIV 保护性免疫的主要抗原,它不仅可以诱导特异性中和抗体的产生,而且还可以刺激机体产生细胞毒性淋巴细胞(CTL)反应。所以,用重组 AIV HA 蛋白检测到的抗体代表了鸡体保护性抗体水平的高低。国内外已对检测禽流感抗体的 ELISA 方法进行了不少研究^[10],HA 蛋白的原核表达多以包涵体形式存在^[8],不利于蛋白的生物活性检测。不少学者尝试用真核表达系统表达 HA 蛋白,但蛋白的表达量不高,且表达过程远比原核表达繁琐^[11]。

本试验重组蛋白主要用于抗体水平的检测,因此,重组蛋白与 H9N2 亚型 AIV 抗血清的反应能力好坏就成为重组蛋白是否具有应用前景的重要依

据。大肠杆菌表达系统不能识别和加工真核基因的信号肽片段,故笔者选择了去掉信号肽的 HA 基因进行表达。本试验通过基因工程方法,利用表达载体 pMBX 成功地表达了 H9N2 亚型 AIV 的 HA 基因,表达产量占菌体蛋白的 29.5%,且大部分以可溶的形式表达,这给目的蛋白纯化提供了方便。为进一步利用重组蛋白研制检测 H9N2 亚型 AIV 特异性抗体的血清学方法,以及研制针对 H9N2 亚型 AIV HA 蛋白的单克隆抗体提供了基础。Western-blot 检测结果表明,表达的 HA 融合蛋白能够与 H9N2 亚型 AIV 阳性血清发生特异性的反应,具有很好的反应原性,为检测 H9N2 亚型 AIV 抗体的间接 ELISA 方法的建立奠定了基础。

参考文献:

- [1] 甘孟侯. 禽流感[M]. 北京:中国农业出版社,2002.
- [2] HOMME P J, EASTERDAY B C, ANDERSON D P. Avian influenza viruses infections: II. Experimental epizootiology of influenza A/Turkey/Wisconsin/1966 virus in turkeys[J]. Avian Dis, 1970,14:40-247.
- [3] ALEXANDER D J. A review of avian influenza in different bird species[J]. Vet Microbiol, 2000,74:3-13.
- [4] BANKS J, CAMERON K R, GREGORY V, et al. Phylogenetic analysis of influenza aviruses of H9 haemagglutinin subtype[J]. Avian Pathol, 2000,29:353-359.
- [5] PEIRIS M, YUEN K Y, CHAN K H, et al. Influenza A H9N2: aspects of laboratory diagnosis[J]. J Clin Microbiol, 1999,37:3 426-3 427.
- [6] GUAN Y, SHORTRIDGE K F, KRAUSS S, et al. Molecular characterization of H9N2 influenza viruses: were they the donors of the "internal" genes of H5N1 viruses in Hong Kong? [J]. Proc Natl Acad Virol USA, 1999,96(16): 9 363- 9 367.
- [7] LI Cheng-jun, TIAN Guo-bin, LI Yan-bing, et al. Antigenic and genetic analysis of the H9N2 avian influenza viruses isolated in China[J]. International Congress Series, 2004,1 263:762-765.
- [8] 郑其升,刘华雷,张晓勇,等. H9N2 亚型 AIV HA 基因的原核表达及间接 ELISA 方法的建立[J]. 中国病毒学, 2005,20(3):293-297.
- [9] SAMBROOK J, FRITSCH E F, MANIATIS T. 分子克隆实验指导[M]. 第2版. 金东雁,黎孟枫译. 北京:科学出版社,1996:880-898.
- [10] ZHOU E M, CHAN M, HECKERT R G. Evaluation of a competitive ELISA for detection of antibodies against avian influenza virus nucleoprotein [J]. Avian Disease, 1998,42:517-522.
- [11] 张强哲,秦曦明,梁荣,等. 禽流感病毒 HA 基因真核表达质粒的构建与表达[J]. 生物化学与生物物理进展,2003,30(3):483-487.

【责任编辑 柴 焰】