

H1N1亚型猪流感病毒广东株HA基因的原核表达

周庆丰, 马静云, 曹永长, 谢青梅, 杜礼琴, 毕英佐

(华南农业大学 动物科学学院, 广东 广州 510642)

摘要:为了研制猪流感检测试剂和流感亚型特异性单抗筛选所需的重组抗原,本研究克隆和原核表达了H1N1亚型猪流感病毒的血凝素(hemagglutinin, HA)基因. 首先采用RT-PCR方法扩增了H1N1亚型猪流感病毒(SIV)广东株的HA基因. 测序结果表明,扩增的SIV HA基因cDNA长度为1 701个核苷酸,共编码566个氨基酸. BLAST分析表明, H1N1亚型SIV广东株HA基因核苷酸序列与GenBank中已发表的中国香港特别行政区、中国大陆、美国分离的经典H1N1亚型毒株相近,核苷酸序列同源性在89%以上. 然后将HA基因的cDNA片段亚克隆至pET32a(+)表达载体中,构建重组质粒pET32a-H1,转化大肠杆菌BL21(DE3)并进行诱导表达. SDS-PAGE和凝胶扫描分析表明,HA基因在大肠杆菌中获得了高效表达,重组融合蛋白的表达量占菌体总蛋白的25.2%. 经免疫印迹证实重组蛋白可以被SIV特异性抗体所识别.

关键词:猪流感病毒; HA基因; 克隆; 原核表达

中图分类号:S852.65

文献标识码:A

文章编号:1001-411X(2007)01-0105-04

Prokaryotic Expression of the HA Gene of Swine Influenza Virus H1N1 Subtype

ZHOU Qing-feng, MA Jing-yun, CAO Yong-chang, XIE Qing-mei, DU Li-qin, BI Ying-zuo

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

Abstract: To obtain a recombinant influenza antigen, the HA gene of H1N1 subtype swine influenza virus (SIV) isolated from Guangdong Province was successfully amplified by RT-PCR and the sequence has been submitted in GenBank. The result showed that the HA gene of this SIV isolate is most closely related to that of SIV strains isolated in China mainland, Hongkong and the United States (with homology rate more than 89%). The PCR product was then cloned into pET-32a(+) to generate a prokaryotic recombinant plasmid pET32a-H1. After induced with IPTG, the HA gene was successfully expressed in the *E. coli* BL21 (DE3). The highest expression content of the target protein added up to 25.2% of the total bacterial protein. Western-blotting analysis revealed that the recombinant protein could be recognized by H1N1 subtype SIV positive serum.

Key words: H1N1 subtype swine influenza virus (SIV); HA gene; cloning; prokaryotic expression

猪流感(swine influenza, SI)是由A型流感病毒引起的猪的一种急性、传染性呼吸道疾病. 其特征为突发,咳嗽,呼吸困难,发热,衰竭及迅速康复. 猪流感不仅影响猪的生长和成活率,造成巨大的经济损失,而且还具有重要的公共卫生意义. 1918年世界上首次报道猪流感,但直到1930年,Shope才鉴定了猪流感病毒(swine influenza virus, SIV)^[1]. 猪

流感流行的报道见于世界许多国家和地区,已发现的猪流感病毒包括H1N1、H1N2、H1N7、H3N2、H3N6、H4N6、H9N2等7种亚型,但以经典H1N1、类禽H1N1和类人H3N2亚型毒株为主^[2-4]. 猪H1N1亚型流感病毒是国内外广泛传播和流行的SIV毒株,多个国家都分离到相应病原. 中国1991年首次从猪群中分离到H1N1亚型SIV,并分析和研究了

收稿日期:2006-10-08

作者简介:周庆丰(1974—)男,博士研究生;通讯作者:毕英佐(1944—),男,研究员, E-mail: yzbi@scau.edu.cn

基金项目:广东省科技计划项目(2004A2090102)

其血凝素(HA)基因的核苷酸全序列^[5]. HA基因易发生变异,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意义. 猪流感的监测和诊断,常用的有病毒分离鉴定和血清学检测特异性的抗体. 血清学方法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,而且存在散毒的危险,在应用中存在局限性. 对于制备流感病毒亚型特异性的单克隆抗体,用全病毒等复杂抗原来筛选特异性的单克隆抗体存在一定的难度,如果用一种具有良好免疫原性的重组蛋白来筛选单克隆抗体,就相对简单得多. 本研究采用RT-PCR技术扩增了H1N1亚型猪流感病毒完整的HA基因,利用基因工程的方法对其进行了原核表达,并对其免疫反应原性进行了研究,为我国猪流感分子流行病学的研究以及新型诊断试剂的研制奠定了基础.

1 材料与方法

1.1 病毒

SIV 广东分离株 A/Swine/Guangdong/2/01 (H1N1),由华南农业大学家禽研究室分离^[6],北京国家流感中心鉴定.

1.2 引物、载体和细菌

RT-PCR引物参照GenBank收录的SIV毒株H1亚型HA基因cDNA序列设计,由上海博亚生物工程有限公司合成. 引物的核苷酸序列为:上游引物(P1):5'-AAAACAACCAAAATGAAGGCAA-3',下游引物(P2):5'-TCAGATGCATATTCTGCACT-3'. 2条引物的理论跨幅约为1.7 kb,包括整个HA基因. 大肠杆菌表达载体克隆所用上游引物(P3):5'-ATCGATCCGACACAATATGTATA-3',下游引物(P4):5'-ATGTCGACGATGCATATTCTGCACT-3'分别含有限制性内切酶BamH I和Sal I位点,2条引物的理论跨幅包括去掉N端17个氨基酸信号肽编码序列的HA基因. 克隆所用载体pMD18-T购自大连宝生物工程有限公司,大肠杆菌DH5 α 、BL21(DE3)和原核表达载体pET32a(+)由华南农业大学家禽研究室保存.

1.3 工具酶与常用试剂

AMV反转录酶、RNA酶抑制剂、Ex Taq DNA聚合酶、dNTPs、IPTG、DNA marker和限制性内切酶BamH I、Sal 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以及质粒提取试剂盒购自Omega公司;6 $\times$ His蛋白质纯化树脂Ni-

NTA购自QIAGEN公司;鼠抗SIV H1N1高免血清为华南农业大学家禽研究室制备和保存;预染色蛋白质相对分子质量标准为New England Biolabs产品;其他试剂均为国产分析纯.

1.4 病毒RNA抽提和HA基因的RT-PCR

按TRIzol Reagent RNA抽提试剂盒说明书进行,所用器皿和试剂经DEPC水处理. RT-PCR参照文献^[7]操作. PCR扩增程序为:94 $^{\circ}\text{C}$ 40 s, 54 $^{\circ}\text{C}$ 40 s, 72 $^{\circ}\text{C}$ 2 min, 30个循环后, 72 $^{\circ}\text{C}$ 10 min. 扩增产物经0.01 g/mL琼脂糖凝胶电泳鉴定.

1.5 目的DNA的克隆与测序

琼脂糖凝胶电泳纯化PCR产物,并克隆至pMD18-T载体,PCR法筛选阳性克隆,送上海博亚生物工程有限公司进行序列测定,并将测序结果提交到GenBank. 用DNASTAR软件分析其推导的氨基酸序列,并与GenBank中已发表的同亚型SIV HA基因核苷酸序列进行同源性比较.

1.6 重组表达载体pET32a-H1的构建

按质粒提取试剂盒说明书的方法制备质粒pET32a(+),利用引物对P3/P4 PCR扩增去掉信号肽的HA基因,将HA基因PCR产物提纯后用BamH I、Sal I酶切,酶切产物回收后与经同样酶切回收的质粒pET32a(+)用T4连接酶进行连接,连接产物转化感受态细胞DH5 α ,用Amp筛选阳性菌落,经PCR、酶切方法对重组质粒进行鉴定. 重组质粒命名为pET32a-H1,HA基因和载体的硫氧还蛋白基因构成一融合表达阅读框.

1.7 目的基因在大肠杆菌中的表达

用质粒提取试剂盒从含重组质粒pET32a-H1的大肠杆菌DH5 α 中抽提质粒pET32a-H1,转化受体菌BL21(DE3)得到表达工程菌,挑取单个菌落接种于3 mL含Amp(100 mg/L)的LB培养基,37 $^{\circ}\text{C}$ 过夜培养,次日按1:100比例扩大培养,待细菌培养到 $D_{600\text{nm}}$ 值达0.6左右加入终浓度为1 mmol/L的IPTG进行诱导表达,4 h后收获菌体,取样进行12%的SDS-PAGE并以薄层扫描确定表达的目的蛋白占菌体蛋白的百分比.

1.8 表达蛋白的Western-blotting鉴定

Western-blotting参照文献^[7]的方法进行.

2 结果

2.1 目的基因的RT-PCR扩增

对H1亚型的SIV 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出现特异性条带(图1),与预期的大小相符,初步表明用RT-PCR方法成功扩增了

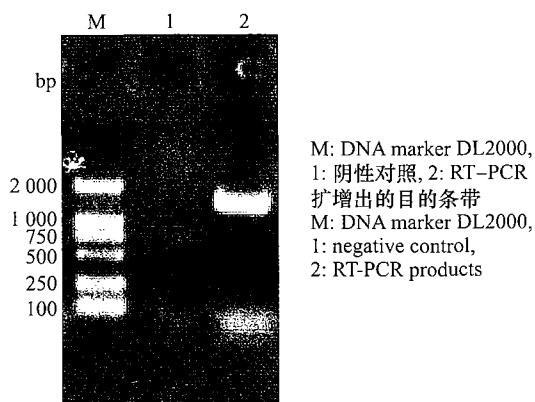


图1 血凝素基因 HA 的 RT-PCR 扩增

Fig. 1 RT-PCR amplification of hemagglutinin gene (HA)

SIV HA 基因.

2.2 HA 基因的克隆与测序

将 RT-PCR 产物纯化后, 克隆入 pMD18-T 载体, 转化大肠杆菌 DH5 α , 经含 Amp 的 LB 平板筛选出阳性克隆后, 对重组质粒进行序列测定. 测序结果表明, 克隆的 H1 亚型 HA 基因 cDNA 全长 1 701 bp, 包含 1 个完整阅读框, 编码 566 个氨基酸, 其中 N 端 17 个氨基酸为信号肽. 将本研究克隆测序得到的 H1 亚型 HA 基因序列提交到 GenBank, GenBank 登录号为 DQ058215.

2.3 目的基因序列分析

将所测定的 SIV HA 基因序列通过 BLAST 程序与 GenBank 中收录的核苷酸序列进行比较. 结果表明, 与广东分离株 HA 基因同源性最高的前 90 个序列均为 SIV H1 亚型的 HA 基因, 且多为美国和香港毒株基因, 核苷酸同源性在 89% 以上. 其中与广东分离株 A/swine/Guangdong/711/2001 (H1N1) 同源性最高, 核苷酸序列同源性为 98%, 与美国毒株 A/WI/4755/94、A/WI/4754/94、A/Swine/Indiana/1726/88、A/MD/12/91 (H1N1) 等的核苷酸同源性约为 94% ~ 95%.

2.4 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 pET32a, 转化大肠杆菌 DH5 α . PCR 鉴定得到阳性克隆, 抽提阳性重组质粒 pET32a-H1. 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 pET32a-H1 已构建成功 (图 2).

2.5 融合蛋白在大肠杆菌中的诱导表达

含重组质粒 pET32a-H1 的 BL21 (DE3) 用 IPTG 诱导表达 4 h 后, SDS-PAGE 结果显示 (图 3), 与诱导前相比, 在相对分子质量约 81 000 处出现明显的表达蛋白条带, 与预期一致. 凝胶扫描分析结果表明, 最佳表达状态时融合蛋白的表达量占菌体

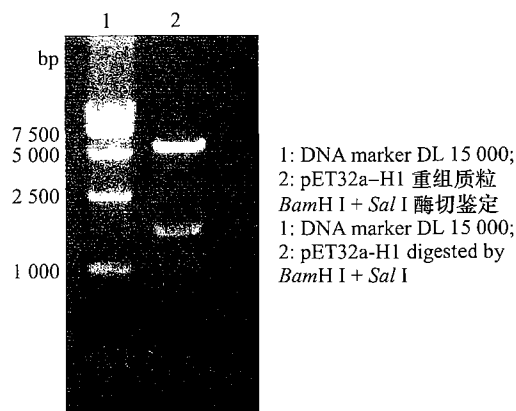
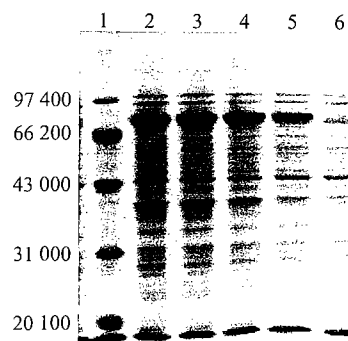


图2 双酶切鉴定重组质粒

Fig. 2 Identification of recombinant plasmids by digestion of restriction endonuclease



1: 蛋白质相对分子质量标准; 2~6: 分别为 IPTG 诱导 4、3、2、1 和 0 h 的细菌裂解产物

1: protein relative molecular mass marker; 2~6: BL21 (DE3) cell lysate after IPTG induction for 4, 3, 2, 1, 0 h respectively

图3 融合蛋白 Trx-H1 的 SDS-PAGE 分析

Fig. 3 Analysis of the expressed fusion protein Trx-H1 by SDS-PAGE

总蛋白的 25.2%.

2.6 表达产物的 Western-blotting 鉴定

用猪流感阳性血清对表达的 H1 亚型 SIV HA 融合蛋白进行了蛋白质免疫印迹检测. Western-blotting 结果显示, 出现了 1 条特异性反应条带, 其相对分子质量大小与融合蛋白的大小一致, 说明融合蛋白具有良好的反应原性 (图 4).

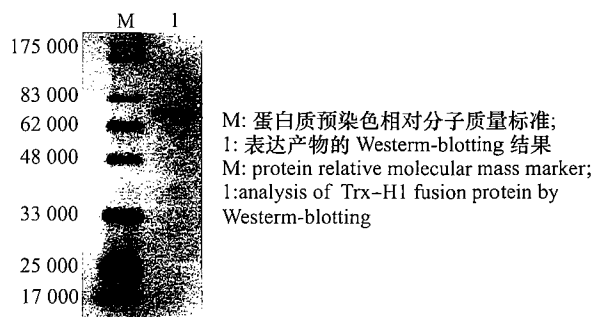


图4 表达产物的免疫印迹分析

Fig. 4 Analysis of the expressed product by Western-blotting

3 讨论

A型流感病毒囊膜上有3种突起的膜蛋白,即血凝素、神经氨酸酶和离子通道蛋白M2,根据病毒囊膜表面HA和神经氨酸酶(neuraminidase, NA)的差别,A型流感病毒又进一步分为不同的亚型,迄今禽流感病毒已发现有16种亚型的血凝素和9种亚型的神经氨酸酶^[8]. HA是流感病毒的一种最主要的囊膜糖蛋白之一,也是宿主免疫系统最主要的靶抗原. 流感病毒HA由RNA片段4编码,具有凝集多种动物红细胞的性质. 流感病毒HA主要有3个功能:(1)在感染之前与宿主细胞表面病毒特异性受体结合;(2)介导病毒囊膜与核内体膜的融合;(3)刺激机体产生中和抗体,产生免疫保护作用.

HA是典型的I型膜蛋白,其一级结构含有4个结构域:信号肽、胞浆域、跨膜域和胞外域. HA以同源三聚体的形式镶嵌在病毒囊膜上,每个单体糖蛋白由2个经二硫键连接的蛋白亚单位组成,它们来自于一条HA0前体肽链,经蛋白水解酶的切割而形成,分别命名为HA1和HA2,2个亚基之间以二硫键形成一个单体. HA1负责病毒与宿主细胞表面唾液酸受体的结合. 病毒吸附完成以后,病毒粒子通过宿主细胞的内吞作用进入细胞. 在内体的酸性环境中,HA2的疏水性融合多肽转移到膜的靶位上,从而介导内体膜与病毒囊膜的融合^[9]. HA是流感病毒最主要的表面抗原,它能够诱导机体产生相应的中和抗体以中和病毒的感染,流感病毒的流行与HA的变异关系极为密切^[10]. 因此,HA的研究对病毒的防制和诊断具有重要意义.

许多亚型的HA基因已经在多种系统中得到成功表达,如大肠杆菌、杆状病毒、酵母、植物和哺乳动物细胞等表达系统^[11-14]. 每种表达系统都有各自的优缺点,大肠杆菌表达系统虽然不能进行加工后的修饰,但是如果能够高效表达一种外源基因,就是一种十分简单而且廉价的重组蛋白获得途径. 大肠杆菌不能识别和加工真核基因的信号肽片段,故我们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pET32a(+)成功地表达了SIV H1亚型的HA基因,表达产量占菌体蛋白的25.2%,为进一步利用重组蛋白研制检测SIV H1特异性抗体的血清学方法,以及研制针对SIV H1亚型的单克隆抗体提供了基础. Western-blotting检测结果表明,表达的HA融合蛋白能够与H1亚型SIV阳性血清发生特异性的反应,具有很好的反应原性,为建立

H1亚型SIV的特异性检测方法奠定了基础.

参考文献:

- [1] 斯特劳B E,阿莱尔S D,蒙加林W L. 猪病学[M]. 赵德明,张中秋,等译. 8版. 北京:中国农业大学出版社,2000:287-300.
- [2] ITO T, COUCEIRO J N, KELM S, et al. Molecular basis for the generation in pigs of influenza A viruses with pandemic potential[J]. J Virol, 1998,72(9):7367-7373.
- [3] KIDA H, SHORTRIDGE K F, WEBSTER R G. Origin of the hemagglutinin gene of H3N2 influenza viruses from pigs in China[J]. Virology, 1988,162(1):160-166.
- [4] OLSEN C W, CAREY S, HINSHAW L, et al. Virologic and serologic surveillance for human, swine and avian influenza virus infections among pigs in the north-central United States[J]. Arch Virol, 2000,145(7):1399-1419.
- [5] 郭元吉,WEBSTER R G. 猪型流感病毒血凝素的核苷酸全序列分析[J]. 中华实验和临床病毒学杂志, 1995, 9(1):11-14.
- [6] 王连想,毕英佐,曹永长. 6株猪流感病毒分离株HA部分基因的克隆和序列分析[J]. 中国兽医学报, 2003,5(23):438-441.
- [7] SAMBROOK J, FRITSCH E F, MANIATIS T. 分子克隆实验指南. 金冬雁,黎孟枫,等译. 2版. 北京:科学出版社,1996:888-897.
- [8] FOUCHIER R A, MUNSTER V, WALLENSTEN A, et al. Characterization of a novel influenza A virus hemagglutinin subtype (H16) obtained from black-headed gulls[J]. J Virol, 2005,79(5):2814-2822.
- [9] VARECKOVA E, MUCHA V, WHARTON S A, et al. Inhibition of fusion activity of influenza A haemagglutinin mediated by HA2-specific monoclonal antibodies[J]. Arch Virol, 2003, 148(3):469-486.
- [10] CATON A J, BROWNLEE C G, YEWDELL J W, et al. The antigenic structure of the influenza virus A/PR/8/34 hemagglutinin (H1 subtype)[J]. Cell, 1982,31(2 Pt 1):417-427.
- [11] TRIPATHY D N, SCHNITZLEIN W M. Expression of avian influenza virus hemagglutinin by recombinant fowlpox virus[J]. Avian Dis, 1991,35(1):186-191.
- [12] KURODA K, GRONER A, FRESE K, et al. Synthesis of biologically active influenza virus hemagglutinin in insect larvae[J]. J Virol, 1989,63(4):1677-1685.
- [13] 宋长征, HUGH SMASON. 禽流感病毒血凝素疫苗在转基因马铃薯中的表达[J]. 生物技术, 2001,11(5):3-4.
- [14] SAELENS X, VANLANDSCHOOT P, MARTINET W, et al. Protection of mice against a lethal influenza virus challenge after immunization with yeast-derived secreted influenza virus hemagglutinin[J]. Eur J Biochem, 1999,260(1):166-175.

【责任编辑 柴 焰】