

# H5N1 和 H9N2 亚型禽流感病毒 HA 基因的原核表达

黄文科, 林宝珍, 罗琴芳, 牛学锋, 郭霄峰

(华南农业大学 兽医学院, 广东 广州 510642)

**摘要:**采用自行设计的引物,通过PCR的方法,分别从pMD-HA5和pMD-HA9中成功扩增出AIV 0025(H5N1)株和KMIII(H9N2)株的血凝素(hemagglutinin, HA)基因,然后分别亚克隆到pET-32a(+)、pET-28a(+ )表达载体中,构建并筛选出阳性重组子,分别标记为pET32-HA5、pET28-HA9。将阳性重组质粒转化进BL21(DE3)宿主菌中,通过改变IPTG浓度和诱导时间,使重组蛋白获得表达,并确定了最佳诱导条件为IPTG终浓度1.0 mmol/L、诱导时间4~5 h。经SDS-PAGE和Western-blotting分析表明,重组蛋白相对分子质量约为85 000和63 000,主要存在于包涵体中,具有良好的免疫学活性。

**关键词:**禽流感病毒; HA基因; 基因克隆; 原核表达

中图分类号:S852.6

文献标识码:A

文章编号:1001-411X(2008)02-0090-04

## Prokaryotic Expression of Hemagglutinin Genes of AIV H5 and H9 Subtypes

HUANG Wen-ke, LING Bao-zhen, LUO Qing-fang, NIU Xue-feng, GUO Xiao-feng

(College of Veterinary Medicine, South China Agricultural University, Guangzhou 510642, China)

**Abstract:** According to the known nucleic acid sequences of hemagglutinin(HA) genes of avian influenza virus(AIV) H5N1 and H9N2, two different pairs of primers were designed and applied to amplify the open reading frame of HA genes of AIV 0025(H5N1) and KMIII(H9N2) from recombinant plasmids pMD-HA5 and pMD-HA9, respectively. The PCR products were sub-cloned into prokaryotic expression plasmids pET-32a(+ ) and pET-28a(+ ). The positive recombinant plasmids, designated pET32-H5 and pET28-H9, were identified by PCR and digestion with restriction-endonuclease. And then the recombinant plasmids were transformed into BL21(DE3)pLysS. The results showed that the recombinant bacteria can express recombinant proteins after inducing with IPTG. The optimized IPTG mass concentration and inducing time were confirmed as 1.0 mmol/L and 4-5 h, respectively. After SDS-PAGE analysis, the expression proteins from recombinant H5 and H9 gene were 85 000 and 63 000, respectively. The results also suggested that the proteins were expressed as inclusion bodies in *E. coli* and had good immunogenicity.

**Key words:** avian influenza virus; HA gene; gene cloning; prokaryotic expression

禽流感病毒(avian influenza virus, AIV)属于正粘病毒科流感病毒属,基因组为分节段单股负链RNA,含有8个独立的RNA片段,编码10种蛋白质,其中第4片段为编码血凝素(HA)蛋白的HA基因。研究表明,HA是构成病毒囊膜纤突的主要成分之一,以三聚体形式存在于病毒囊膜表面,在病毒吸

附、穿膜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<sup>[1]</sup>。HA基因极易发生变异,具有亚型特异性,该基因表达的蛋白也是AIV诱导保护性免疫的主要抗原,它刺激机体所产生的抗体可中和病毒、抵抗感染<sup>[1-2]</sup>。目前对HA基因的研究已成为研究AIV的热点。许多学者在HA基因的克隆

收稿日期:2007-10-15

作者简介:黄文科(1980—),男,硕士; 通讯作者:郭霄峰(1963—),男,教授,博士,E-mail:xfguo@scau.edu.cn

基金项目:国家自然科学基金(30270987, 30440010);广东省自然科学基金(020996)

表达等研究上已进行了大量工作,并取得了理想的结果<sup>[3-5]</sup>。但是这些研究主要集中于HA部分基因(大多数为HA1基因)克隆表达上,就目前来说对HA基因克隆表达的研究工作还比较少,已有报道对其信号肽进行修整后获得了良好的表达效果<sup>[6-8]</sup>。为了研究HA基因(包括其原有信号肽)的克隆与表达,及往后相关工作的需要,根据以上众多学者已有的经验和基础,本试验对H5N1、H9N2亚型禽流感病毒HA基因进行了亚克隆和原核表达,获得了较好的表达效果,为更廉价、简便的方式获取大量的诊断用抗原和制备基因工程疫苗提供技术积累和尝试。

## 1 材料与方 法

### 1.1 质粒、菌株和血清

重组质粒pMD-HA5由罗琴芳博士构建,含有H5N1亚型0025株HA基因的完整开放阅读框(ORF)。重组质粒pMD-HA9由郭霄峰博士构建,含有H9N2亚型KMIII株HA基因的完整ORF。BL21(DE3)及原核表达载体pET-32a(+)、pET-28a(+ )为华南农业大学兽医学院微生物教研室保存。H5、H9亚型AIV阳性血清为哈尔滨兽医研究所产品。辣根过氧化物酶标记兔抗鸡IgY是珠海百奥生物技术有限公司产品。

### 1.2 试剂

质粒抽提试剂盒、凝胶回收试剂盒均为广州奇特科公司产品。Blend-Taq DNA聚合酶为上海生工生物工程技术服务有限公司产品。限制性内切酶为宝生物工程(大连)有限公司产品。DNA marker为北京天为时代科技有限公司产品。蛋白质预染marker为Fermentas公司产品。

### 1.3 PCR引物设计

根据罗琴芳博士所提供的H5N1亚型AIV 0025株HA基因的核苷酸序列设计了如下1对引物,上游引物P1:5'-CGGGATCCGAGAAAATAGTGC-3',去掉ATG,5'端含BamH I酶切位点及保护碱基;下游引物P2:5'-CCCAAGCTTTTATAGATGCAAATTC-3',保留终止子TAA,5'端含Hind III酶切位点及保护碱基;

根据郭霄峰博士所提供的H9N2亚型AIV KMI-II株HA基因的核苷酸序列设计了如下1对引物,上游引物P3:5'-CGGGATCCATGGAAACAATAGC-3',保留ATG,5'端含BamH I酶切位点及保护碱基;下游引物P4:5'-CCCAAGCTTTTATATACAAATGTTGC-3',保留终止子TAA,5'端含Hind III酶切位点及保护碱基。

### 1.4 原核表达载体的构建

参照萨姆布鲁克<sup>[9]</sup>和卢圣栋<sup>[10]</sup>的方法进行。以

质粒pMD-HA为模板,扩增出HA基因目的片段。PCR扩增条件为:94℃预变性8 min,然后再进行以下循环:94℃45 s,57.5℃45 s,72℃2 min,运行30个循环,最后72℃延伸8 min。在10 g/L琼脂糖凝胶中电泳,在紫外灯下观察结果。

用内切酶BamH I、Hind III对PCR扩增产物及pET空载体进行双酶切,纯化并回收酶切产物。按常规方法连接酶切产物并转化到DH5a感受态细胞中,利用氨苄霉素或卡那霉素抗性进行初筛选,再经过PCR、酶切、测序及阅读框验证等多方面鉴定后,筛选出阳性重组质粒pET32-HA5和pET28-HA9。最后将重组质粒转化到表达菌BL21(DE3)中进行表达。

### 1.5 表达条件的确定及表达产物的分析

参照谢海燕等<sup>[11]</sup>的方法进行。挑取经鉴定含有重组表达质粒的单菌落,接种于含相应抗菌素的LB液体培养基中,37℃振荡培养至 $D_{600\text{nm}}$ 达到0.4~0.5时(约为3 h)分别用终浓度为2.0、1.8、1.6、1.4、1.2、1.0、0.8、0.6、0.4 mmol/L的IPTG诱导表达4~5 h。取出诱导后的菌,12 000 r/min离心3 min,弃上清液,沉淀重悬于1×SDS-PAGE上样缓冲液中,80℃变性15 min,经离心后用上清液进行SDS-PAGE分析。在培养物中加入IPTG至最佳诱导浓度,在16、30、37℃振荡培养,诱导表达4~5 h,将表达产物处理后进行SDS-PAGE分析。最后确定IPTG的最佳浓度和最佳诱导时间。

### 1.6 目的蛋白的纯化

参照陈祖欢等<sup>[12]</sup>和康彬等<sup>[13]</sup>的方法进行。SDS-PAGE电泳后,染色确定目的带的位置,切下目的带,放入透析袋中,加入电泳缓冲液,电泳回收表达蛋白,并测定其含量。

### 1.7 表达产物Western-blotting分析

将重组子裂解物进行SDS-PAGE后,用“三明治”法转印至NC膜上,按常规方法<sup>[11]</sup>进行Western-blotting,一抗为H5和H9亚型AIV鸡阳性血清(1:100稀释);二抗为辣根过氧化物酶标记的兔抗鸡IgY(1:1 000稀释),用DAB显色。

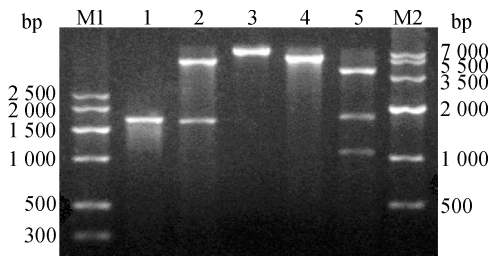
## 2 结 果

### 2.1 HA基因的扩增及重组质粒的鉴定

分别以质粒pMD-HA5和pMD-HA9为模板,用自行设计的引物进行PCR扩增,扩增产物经电泳后均得到1条特异的DNA电泳带,大小约为1 700 bp,而且特异性强,与试验设计相符,见图1和图2。表达载体pET-32a(+ )和pET-28a(+ )分别与HA基因连接,获得的重组质粒pET32-HA5和pET28-

HA9. 经特异引物 PCR 扩增, 可从 pET32-HA5 和 pET28-HA9 扩增出大小约为 1 700 bp 的目的条带, 而空白对照及背景对照均没有此条带出现。

重组质粒 pET32-HA5, 经 *Bam*H I、*Hind* III 双酶切后, 产生了预期的 2 条带, 一条带的大小与 pET-32a(+) 单酶切相近, 一条与 HA5 基因扩增产物大小相近; 经 *Bam*H I 单酶切后, 与 pET-32a(+) 单酶切比较, 电泳时明显滞后, 与预期结果相符; 经 *Bam*-H I、*Pst* I 双酶切后, 产生了预期的 3 条带, 大小分别为 4 561 bp、1 892 bp、1 147 bp, 与预期结果相符, 见图 1。



M1: DNA marker VII; 1: pET32-HA5 重组质粒 PCR 扩增; 2: pET32-HA5 重组质粒 *Bam*H I、*Hind* III 双酶切; 3: pET32-HA5 重组质粒 *Bam*H I 单酶切; 4: pET-32a(+) 质粒 *Bam*H I 单酶切; 5: pET32-HA5 重组质粒 *Bam*H I、*Pst* I 双酶切; M2: DNA marker IV

M1: DNA marker VII; 1: Amplification of HA gene from pET32-HA5; 2: Digestion of pET32-HA5 by *Bam*H I and *Hind* III; 3: Digestion of pET32-HA5 by *Bam*H I; 4: Digestion of pET32(+) by *Bam*H I; 5: Digestion of pET32-HA5 by *Bam*H I and *Pst* I; M2: DNA marker IV

图1 pET32-HA5 的酶切鉴定

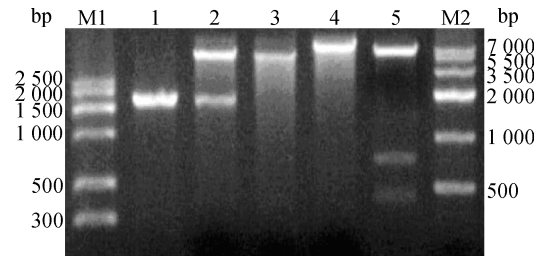
Fig. 1 Endonuclease digestion of pET32-HA5

重组质粒 pET28-HA9, 经 *Bam*H I、*Hind* III 双酶切后, 产生了预期的 2 条带, 一条带的大小与 pET-28a(+) 单酶切相近, 一条与 HA9 基因扩增产物大小相近; 经 *Bam*H I 单酶切后, 与 pET-28a(+) 单酶切比较, 电泳时明显滞后, 与预期结果相符; 经 *Bam*-H I、*Pst* I 双酶切后, 产生了预期的 3 条带, 大小分别为 5 846 bp、705 bp、418 bp, 与预期结果相符, 见图 2。

经 PCR、酶切等鉴定后, 均为阳性的 pET32-HA5 和 pET28-HA9 重组质粒送往上海英骏生物技术有限公司作正反方向测通。结果显示: HA5、HA9 基因均以正确的方式插入了表达载体中, 并没有打断 pET-32a(+) 和 pET-28a(+) 的阅读框架, 目的片段大小及插入方向正确, 证明成功构建 pET32-HA5 和 pET28-HA9 原核表达质粒。

## 2.2 表达产物的 SDS-PAGE 电泳鉴定

重组质粒 pET32-HA5 和 pET28-HA9 转化 BL21 (DE3), 获重组子 ET32-HA5 和 ET28-HA9。它们经



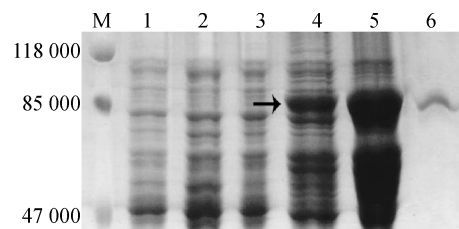
M1: DNA marker VII; 1: pET28-HA9 重组质粒 PCR 扩增; 2: pET28-HA9 重组质粒 *Bam*H I、*Hind* III 双酶切; 3: pET-28a(+) 质粒 *Bam*H I 单酶切; 4: pET28-HA9 重组质粒 *Bam*H I 单酶切; 5: pET28-HA9 重组质粒 *Bam*H I、*Pst* I 双酶切; M2: DNA marker IV

M1: DNA marker VII; 1: Amplification of HA gene from pET28-HA9; 2: Digestion of pET28-HA9 by *Bam*H I and *Hind* III; 3: Digestion of pET28(+) by *Bam*H I; 4: Digestion of pET28-HA9 by *Bam*H I; 5: Digestion of pET28-HA9 by *Bam*H I and *Pst* I; M2: DNA marker IV

图2 pET28-HA9 的酶切鉴定

Fig. 2 Endonuclease digestion of pET28-HA9

IPTG 诱导表达后, 在相对分子质量 85 000 (ET32-HA5)、63 000 (ET28-HA9) 处出现 1 条特异的目的蛋白带 (如图 3 和图 4 箭头所指), 与预期结果相符。而 BL21 宿主菌、空载体菌表达产物及未经 IPTG 诱导的重组子表达产物中均无这一特异带出现。



M: 蛋白质预染 marker; 1: BL21 宿主菌; 2: 含 pET-32a(+) 空载体的 BL21 表达菌; 3: 未经 IPTG 诱导的 ET32-HA5 重组子; 4: 经 IPTG 诱导的 ET32-HA5 重组子; 5: 经 IPTG 诱导的 ET32-HA5 重组子经超声波破碎菌后的沉淀; 6: 经 IPTG 诱导的 ET32-HA5 重组子的蛋白质纯化物

M: Pre-stained protein marker; 1: *E. coli* BL21 cell; 2: *E. coli* BL21 cell with pET-32a(+); 3: Recombinant ET32-HA5 un-induced with IPTG; 4: Recombinant ET32-HA5 induced with IPTG; 5: Pooled proteins of Recombinant ET32-HA5 induced with IPTG and treated by ultrasonic; 6: Purified proteins of recombinant ET32-HA5 induced IPTG

图3 ET32-HA5 SDS-PAGE 电泳结果

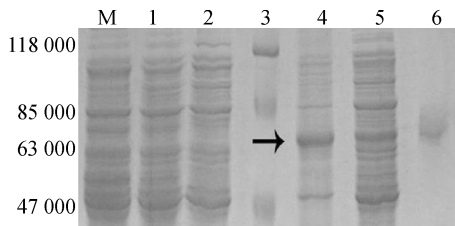
Fig. 3 SDS-PAGE analysis of ET32-HA5

## 2.3 表达条件的确定及表达产物的可溶性分析

经多浓度试验, IPTG 的最佳诱导终浓度为 1.0 mol/L、最佳诱导条件为 37 °C 诱导 4 ~ 5 h。SDS-PAGE 分析表明, 菌体经超声波破碎、离心后, 沉淀在 85 000 (ET32-HA5)、63 000 (ET28-HA9) 处出现 1 条明显的特异性蛋白条带, 表明表达产物大部分以包涵体形式存在, 见图 3 和图 4。

## 2.4 目的蛋白的纯化

目的蛋白经切胶、透析纯化后, 取少量进行 SDS-



M: 蛋白质预染 marker; 1: BL21 宿主菌; 2: 含 pET-28a (+) 空载体的 BL21 表达菌; 3: 未经 IPTG 诱导的 ET28-HA9 重组子; 4: 经 IPTG 诱导的 ET28-HA9 重组子经超声破菌后的沉淀; 5: 经 IPTG 诱导的 ET28-HA9 重组子; 6: 经 IPTG 诱导 ET28-HA9 重组子的蛋白质纯化物

M: Pre-stained protein marker; 1: *E. coli* BL21 cell; 2: *E. coli* BL21 cell with pET-32a (+); 3: Recombinant ET28-HA9 un-induced with IPTG; 4: Pooled proteins of Recombinant ET28-HA9 induced with IPTG and treated by ultrasonic; 5: Recombinant ET28-HA9 induced with IPTG; 6: Purified proteins of recombinant ET28-HA9 induced IPTG

图 4 ET28-HA9 SDS-PAGE 电泳结果

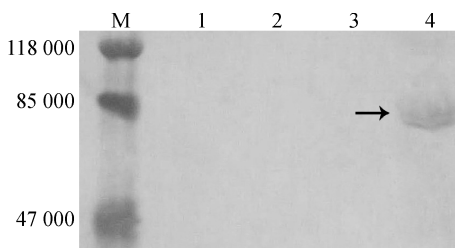
Fig. 4 SDS-PAGE analysis of ET28-HA9

PAGE. 虽然得到与目的蛋白大小一致的带(图 3、图 4 箭头所指),但是由于切胶透析纯化效果和目的蛋白经复性等缘故,得到的目的蛋白量比较少,而且相对弥散,见图 3 和图 4.

经测定,初步纯化的 HA5 重组蛋白为 2.948 mg/mL,初步纯化的 HA9 重组蛋白为 3.242 mg/mL.

### 2.5 表达产物的 Western-blotting 鉴定

ET32-HA5 重组子表达产物能特异地与 AIV H5 亚型阳性血清反应,在相对分子质量约 85 000 处出现着色条带,而空载体菌、ET28-HA9 重组子及未经 IPTG 诱导的 ET32-HA5 重组子表达产物均无这一着色条带,与预期结果相符,见图 5.



M: 蛋白质预染 marker; 1: 含 pET-32a (+) 空载体的 BL21 表达菌; 2: 经 IPTG 诱导的 ET28-HA9 重组子; 3: 未经 IPTG 诱导的 ET32-HA5 重组子; 4: 经 IPTG 诱导的 ET32-HA5 重组子

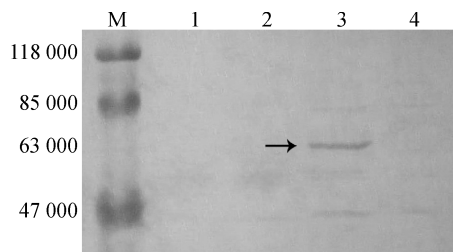
M: Pre-stained protein marker; 1: *E. coli* BL21 cell with pET-32a (+); 2: Recombinant ET28-HA9 un-induced with IPTG; 3: Recombinant ET32-HA5 induced with IPTG; 4: Recombinant ET28-HA9 induced with IPTG

图 5 HA5 蛋白 Western-blotting

Fig. 5 Western-blotting of purified HA5 protein

ET28-HA9 重组子表达产物能特异地与 AIV H9 亚型阳性血清反应,在相对分子质量约 63 000 处出现着色条带,而空载体菌、ET32-HA5 重组子及未经 IPTG 诱导的 ET28-HA9 重组子表达产物均无这一着

色条带,与预期结果相符,见图 6.



M: 蛋白质预染 marker; 1: 含 pET-28a (+) 空载体的 BL21 表达菌; 2: 经 IPTG 诱导的 ET32-HA5 重组子; 3: 经 IPTG 诱导的 ET28-HA9 重组子; 4: 未经 IPTG 诱导的 ET28-HA9 重组子

M: Pre-stained protein marker; 1: *E. coli* BL21 cell with pET-28 (+); 2: Recombinant ET32-HA5 un-induced with IPTG; 3: Recombinant ET28-HA9 induced with IPTG; 4: Recombinant ET28-HA9 induced with IPTG

图 6 HA9 蛋白 Western-blotting

Fig. 6 Western-blotting of purified HA9 protein

### 3 结论

本研究采用自行设计的引物,通过 PCR 的方法,分别从 pMD-HA5 和 pMD-HA9 中成功扩增出 AIV0025 (H5N1) 株和 KMIII (H9N2) 株的 HA 基因. 序列分析表明: H5N1 亚型 HA 基因由 1 707 个核苷酸组成,编码 568 个氨基酸; H9N2 亚型 HA 基因由 1 683 个核苷酸组成,编码 560 个氨基酸;成功构建了重组质粒 pET32-HA5、pET28-HA9;从重组子 ET32-HA5 和 ET28-HA9 成功表达 H5 和 H9 蛋白. 经 SDS-PAGE 分析表明: 相对分子质量分别为 85 000 和 63 000,与理论计算值一致.

本研究选用了融合表达(pET32-HA5)和非融合表达(pET28-HA9)2 种表达方式进行表达,尝试比较 2 种表达方式表达量的差异,结果表明:对 HA 全基因来说,两者表达量相当,均比较少(约为 10%),这可能与 HA 全基因相对分子质量较大有关. 经 Western-blotting 检测,证实重组蛋白具有良好的抗原活性,这就为 HA 重组蛋白多克隆抗体的制备提供了良好的基础.

在蛋白质的初步纯化过程中,为了提高蛋白质的回收率,本研究采用了蛋白质回收的快速 SDS-PAGE 电泳染色-脱色法,经试验证实该方法具有省时间、快速、显示蛋白清晰度高、稳定性强等特点,非常有利于蛋白质从凝胶中回收.

### 参考文献:

[1] 甘孟侯. 禽流感[M]. 北京:中国农业出版社,1995:15-62.