

新城疫病毒 HN 基因主要抗原位点区段的原核表达

罗晶璐, 齐岩, 任涛

(农业部养禽与禽病防治重点开放实验室, 华南农业大学 兽医学院, 广东 广州 510642)

摘要:利用生物软件对新城疫病毒 GD/GM/03/Ch 的血凝素神经氨酸酶(HN)蛋白进行抗原特性分析, 选定 169 ~ 267 位氨基酸、318 ~ 405 位氨基酸和 448 ~ 571 位氨基酸 3 个区域作为多肽表位候选区域. 用含新城疫病毒 HN 基因的重组质粒为模板, 设计引物通过 PCR 扩增获得 HNa、HNb 和 HNC 3 个抗原结构域基因片段, 分别经双酶切定向克隆到原核表达载体 pBT 上进行表达, 并构建了 pBT-HNa-b-c 串联重组质粒进行表达, 经过 SDS-PAGE 和 Western-blot 分析, 验证了表达产物具有反应原性.

关键词:新城疫病毒; HN 基因; 抗原位点; 原核表达

中图分类号: S852.659.5

文献标识码: A

文章编号: 1001-411X(2009)04-0090-04

Prokaryotic Expression of Antigen Sites of the Newcastle Disease Virus Hemagglutinin-Neuraminidase

LUO Jing-lu, QI Yan, REN Tao

(Key Laboratory of Poultry Feeding & Diseases Control of the Ministry of Agriculture College, Veterinary Medicine, South China Agricultural University, Guangzhou 510642, China)

Abstract: Antigenicity analysis of Newcastle disease virus (NDV) strain GD/GM/03/Ch hemagglutinin-neuraminidase (HN) protein was studied by using biological software, the selection of 169 – 267 AA, 318 – 405 AA and 448 – 571 AA as candidates for peptide epitopes was determined. The gene fragments HNa, HNb and HNC coding for the antigenic structural domains of the NDV HN amplified from the recombinant plasmid containing full length NDV HN gene by regular PCR with specific primers. The genes were respectively inserted into pBT vector after cleavage by corresponding enzymes. The recombinant plasmids pBT-HNa-b-c were also constructed to carry out the expression. It was found that all the expression products were recognized by NDV positive serum in Western-blot test.

Key words: newcastle disease virus; HN gene; antigen sites; prokaryotic expression

新城疫 (Newcastle disease, ND) 是由新城疫病毒 (Newcastle disease virus, NDV) 引起禽的一种高度接触性、急性败血性禽类传染病, 发病率和死亡率较高^[1]. 据国际病毒分类委员会 (ICTV) 报告将 NDV 列入副粘病毒亚科下的新属 *Avulavirus* 内, 基因组包含 6 个基因, 其结构为 3' NP-P-M-F-HN-L 5', 共编码 6 个主要蛋白^[2]. HN 糖蛋白在病毒脂质囊膜上形成纤

突, 具有血凝素和神经氨酸酶活性, 在病毒感染过程中识别细胞受体, 介导病毒吸附细胞膜, 促进 F 蛋白的融合作用, 并通过去除新合成的病毒核衣壳蛋白上的唾液酸, 对子代病毒粒子进行加工, HN 基因是决定 NDV 毒力、神经氨酸酶活性和血凝性等抗原性的关键基因^[3-5]. 目前我国 ND 防控工作主要依赖疫苗免疫, ND 疫苗从常规传统的灭活疫苗、弱毒活疫

收稿日期: 2009-02-24

作者简介: 罗晶璐 (1984—), 女, 硕士研究生; 通讯作者: 任涛 (1968—), 男, 教授, 博士, E-mail: rentao@scau.edu.cn

基金项目: 863 计划项目 (2006AA10A205); 教育部“长江学者和创新团队发展计划”创新团队项目 (IRT0723); 广东省自然科学基金 (5500-E08020); 广东省科技计划项目 (2007A020100006)

苗发展到今,已经在基因工程亚单位疫苗的研制上取得了较大进展.关于新城疫病毒亚单位疫苗的研究已早有报道:丁壮等^[6]制备的疫苗免疫鸡达到较高的保护率;Kapczynski^[7]也通过试验证实病毒亚单位成分具有良好的免疫保护效果.这些研究成果均表明,亚单位疫苗具有很好的应用前景.多肽疫苗具有安全、无毒、稳定等优点,并可进行精确定位;且其操作简易、灵活,可以将多种疾病的有效抗原肽组装到一起,制备成一个含有多种抗原肽的抗原,形成一种联合合成多肽疫苗.本试验根据新城疫病毒 HN 蛋白的抗原特性,分段表达 3 个抗原位点集中分布的区域,又将 3 段串联表达,构建了 4 个与抗原表位相关结构域基因片段的重组原核表达载体,并验证了表达产物的反应原性,为新城疫多肽疫苗的研制奠定了基础.

1 材料与方法

1.1 试验材料

1.1.1 毒株 NDV 分离株 GD/GM/03/Ch 为华南农业大学农业部养禽与禽病防治重点开放实验室分离保存.

1.1.2 菌株与质粒 感受态细胞 TG1 为北京鼎国生物技术有限责任公司产品,Rosetta 2(DE3)感受态细胞为 Novagen 公司产品,pBT 载体由华南农业大学农业部养禽与禽病防治重点开放实验室自行研制,阳性质粒 pGM 由华南农业大学农业部养禽与禽病防治重点开放实验室构建并保存.

1.1.3 主要工具酶及试剂 T4 DNA 连接酶、限制性内切酶 *Bam*H I、*Eco*R I、*Xho* I、*Hind* III、*Sac* I、预染及未预染的蛋白质质量标准均为 Fermentas 公司产品;硝酸纤维素膜为基因公司产品;DAB 显色试剂盒为展晨公司产品;NDV 高免血清由华南农业大学农业部养禽与禽病防治重点开放实验室保存;HRP 标记的羊抗鸡 IgG 为 KPL 公司产品,*His Tag* 纯化柱为 GE 公司产品;其他常规试剂均为国产分析纯试剂.

1.2 方法

1.2.1 GD/GM/03/Ch 株 HN 的抗原性分析 利用 Protean(DNAStar, V5.0.7)生物软件对 GD/GM/03/Ch 株 HN 的抗原性分析,根据 HN 亲水特性、表面可能性(可及性)以及抗原特性,并参照文献[8-9],选择了 3 个抗原表位集中区域,分别命名为 HNa、HNb、HNc 片段.

1.2.2 引物的设计与合成 详见表 1.

表 1 HNa、HNb、HNc 各片段的扩增引物

Tab. 1 Primer pairs for amplifying HNa、HNb、HNc segments

名称	酶切位点用酶	引物序列
pHNa-F	<i>Bam</i> H I	TATAA GGATCC GGTTCACCTCGG
pHNa-R	<i>Eco</i> R I	CCATC GAATTC GGGGGCAACTGACTTGT
pHNb-F	<i>Eco</i> R I	TCGTT GAATTC GGAGGGCTCAAACCCAAT
pHNb-R	<i>Sac</i> I	AATAT GAGCTC GAGGATTCTGCCTTCGG
pHNc-F	<i>Sac</i> I	TATCA GAGCTC ACTCGACCAGGTAGTGTC
pHNc-R	<i>Xho</i> I	GGCGC CTCGAG TAAACTCTATCATCCTT

其中 pHNa-F、pHNa-R 引物对用于扩增 169 ~ 267 位氨基酸区域(HNa 片段),pHNb-F、pHNb-R 引物对用于扩增 318 ~ 405 位氨基酸区域(HNb 片段),pHNc-F、pHNc-R 引物对用于扩增 448 ~ 571 位氨基酸区域(HNc 片段).引物送上海英骏生物有限公司合成.

1.2.3 HNa、HNb、HNc 各片段的扩增 将阳性质粒 pGM 进行 100 倍稀释后进行 PCR 扩增.PCR 反应程序:94 °C 预变性 3 min,一个循环;94 °C 30 s,53 °C 30 s,72 °C 30 s,进行 30 个循环;72 °C 后延伸 8 min.扩增完成之后,取 PCR 产物 3 μL 用 0.01 g/mL 琼脂糖凝胶电泳进行检测.

1.2.4 重组表达质粒的构建 用 *Bam*H I 和 *Eco*R I 双酶切 HNa 片段的 PCR 产物,*Eco*R I 和 *Sac* I 双酶切 HNb 片段的 PCR 产物,*Sac* I 和 *Xho* I 双酶切 HNc 片段的 PCR 产物,并用 *Bam*H I 和 *Eco*R I、*Eco*R I 和 *Sac* I、*Sac* I 和 *Xho* I 分别双酶切 pBT 载体,将各片段与相对应酶切的 pBT 载体用 T4 DNA 连接酶进行连接,连接产物转化 TG1 感受态细胞,抽提质粒,酶切,测序鉴定阳性重组质粒,将各阳性克隆分别命名为 pBT-HNa、pBT-HNb、pBT-HNc.再用分段酶切连接的方法将 a、b、c 3 个片段与 pBT 载体串联,转化,抽提质粒,酶切,测序鉴定出阳性重组质粒,命名为 pBT-HNa-b-c.

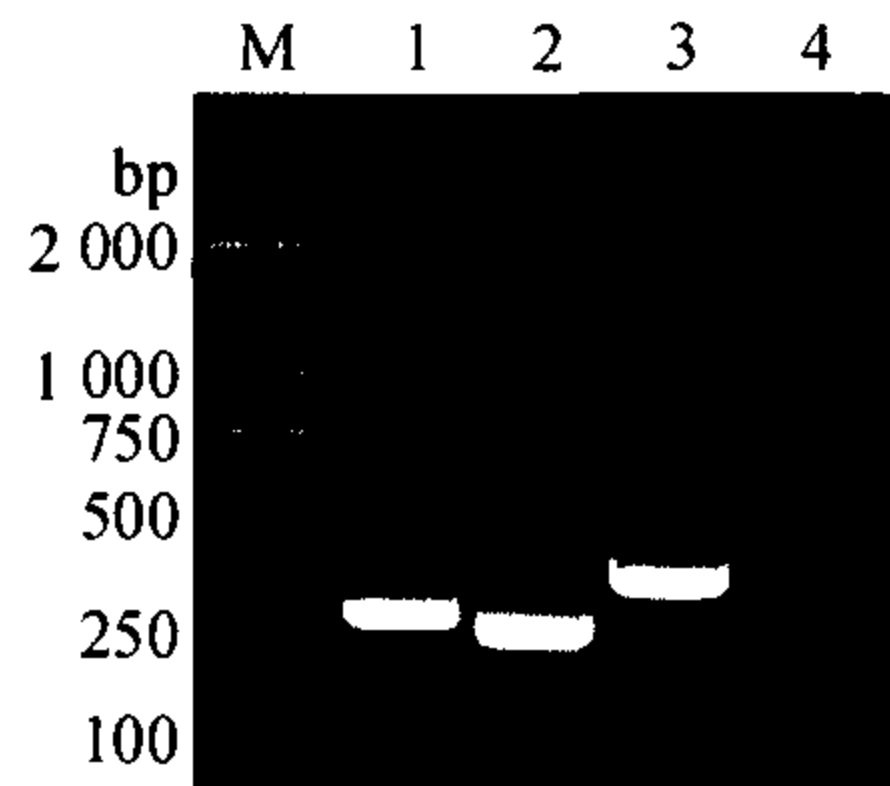
1.2.5 重组质粒在 Rosetta 2(DE3) 中的诱导表达 将 pBT-HNa、pBT-HNb、pBT-HNc、pBT-HNa-b-c 和 pBT 空载体分别转化至 Rosetta 2(DE3) 中,用 IPTG (终浓度为 0.5 mmol/L) 分别对各阳性菌和空载体对照菌进行诱导表达,诱导产物进行 SDS-PAGE 电泳分析.

1.2.6 各蛋白的纯化及反应原性检测 *His Tag* 纯化柱亲和层析纯化各蛋白;用 NDV 高免血清作一抗、HRP 标记的羊抗鸡 IgG 作二抗做免疫印迹,DAB 显色,检测各表达产物的反应原性.

2 结果与分析

2.1 HNa、HNb、HNc 各片段的扩增

以 pHNa-F、pHNa-R 引物扩增 HNa 片段, pHNb-F、pHNb-R 引物扩增 HNb 片段, pHNc-F、pHNc-R 引物扩增 HNc 片段, PCR 扩增后, 0.01 g/mL 琼脂糖凝胶电泳结果: HNa、HNb、HNc 产物分别与预期大小 298、264、375 bp 相符, 结果见图 1。



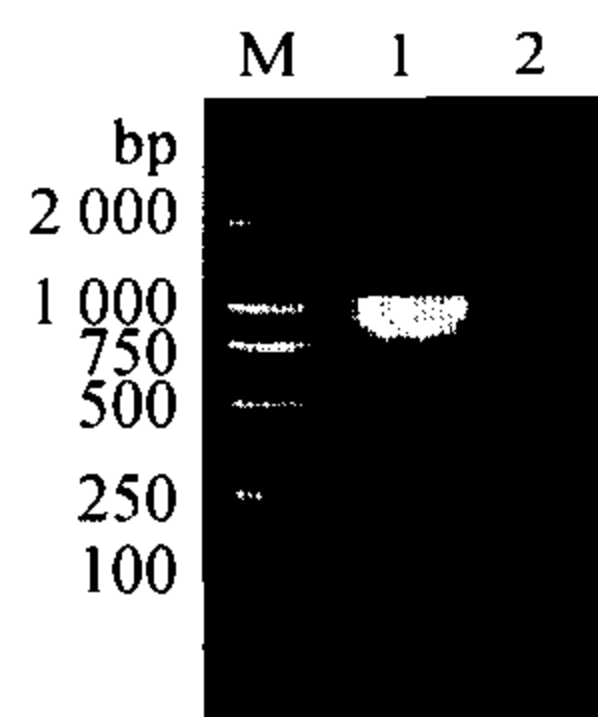
M: DNA Marker DL2000; 1: HNa 片段的 PCR 产物; 2: HNb 片段的 PCR 产物; 3: HNc 片段的 PCR 产物; 4: 空白水对照

图 1 HNa、HNb、HNc 片段的 PCR 产物电泳结果

Fig. 1 PCR results of HNa、HNb、HNc segments

2.2 重组表达质粒的构建

分别将 HNa、HNb、HNc 片段的酶切产物与相对应的 pBT 载体的酶切产物进行连接, 连接产物转化 TG1 感受态细胞, 抽提质粒进行酶切鉴定: pBT-HNa 经 *Bam*H I 和 *Eco*R I 双酶切产生 2 个条带, 大小分别符合 pBT 空载体片段 (约 5 600 bp) 和 HNa 片段 (298 bp); pBT-HNb 经 *Eco*R I 和 *Sac* I 双酶切产生 2 个条带, 大小分别符合 pBT 空载体片段 (约 5 600 bp) 和 HNb 片段 (264 bp); pBT-HNc 经 *Sac* I 和 *Xho* I 双酶切产生 2 个条带, 大小分别符合 pBT 空载体片段 (约 5 600 bp) 和 HNc 片段 (375 bp). pBT-HNa-b-c 是采用分段酶切连接的方法进行的, 3 段全连上并鉴定完后再用 pHNa-F/pHNc-R 引物进行 PCR 鉴定, 扩增产物大小与预期 (937 bp) 相符, 结果见图 2。



M: DNA Marker DL2000; 1: pBT-HNa-b-c 质粒 PCR 产物 (pHNa-F / pHNc-R); 2: 空白水对照

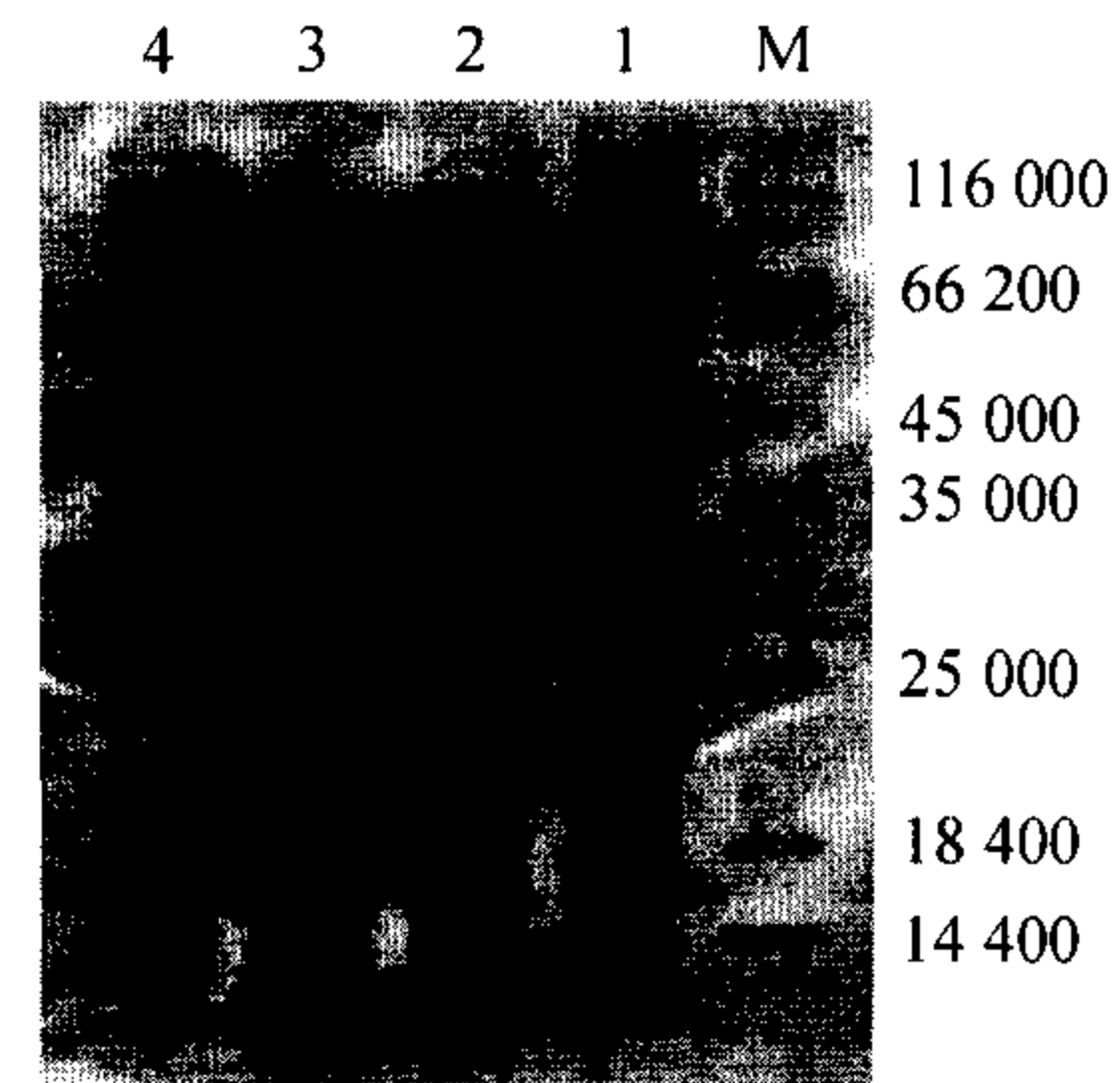
图 2 pBT-HNa-b-c 质粒 PCR 产物电泳结果

Fig. 2 PCR results of pBT-HNa-b-c

2.3 重组质粒在 Rosetta 2 (DE3) 中的诱导表达

收集诱导后 4 h 的阳性及阴性对照细菌, SDS-

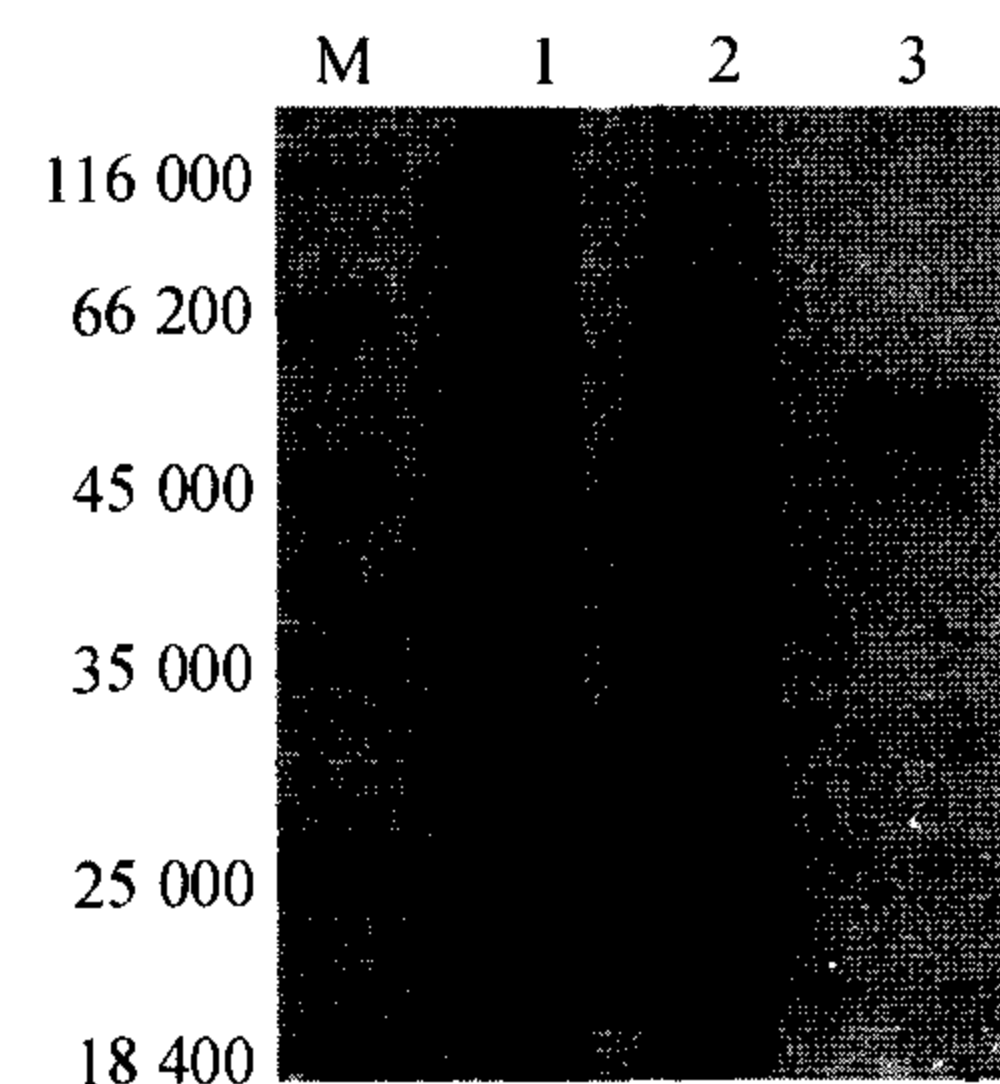
PAGE 分析中可见转化 pBT-HNa、pBT-HNb 和 pBT-HNc 重组质粒的诱导菌分别在蛋白相对分子质量约 30 000、32 000、31 000 附近有明显蛋白表达条带, 与生物软件 DNASTar 预测融合蛋白大小相符, 结果见图 3; 转化 pBT-HNa-b-c 重组质粒的诱导菌纯化后在蛋白相对分子质量约 55 000 附近有明显蛋白表达条带, 与生物软件 DNASTar 预测融合蛋白大小相符, 结果见图 4。



M: 蛋白质相对分子质量标准; 1: pBT 空载体诱导 4 h 阴性对照; 2: pBT-HNa 在 Rosetta 2 (DE3) 中诱导 4 h 菌; 3: pBT-HNb 在 Rosetta 2 (DE3) 中诱导 4 h 菌; 4: pBT-HNc 在 Rosetta 2 (DE3) 中诱导 4 h 菌

图 3 pBT-HNa、pBT-HNb、pBT-HNc 在 Rosetta 2 (DE3) 中表达的 SDS-PAGE 分析

Fig. 3 SDS-PAGE analysis of pBT-HNa、pBT-HNb、pBT-HNc expressed in Rosetta 2 (DE3)



M: 蛋白质相对分子质量标准; 1: pBT 空载体诱导 4 h 阴性对照; 2: pBT-HNa-b-c 在 Rosetta 2 (DE3) 中诱导 4 h 菌; 3: pBT-HNa-b-c 在 Rosetta 2 (DE3) 中诱导 4 h 纯化后菌

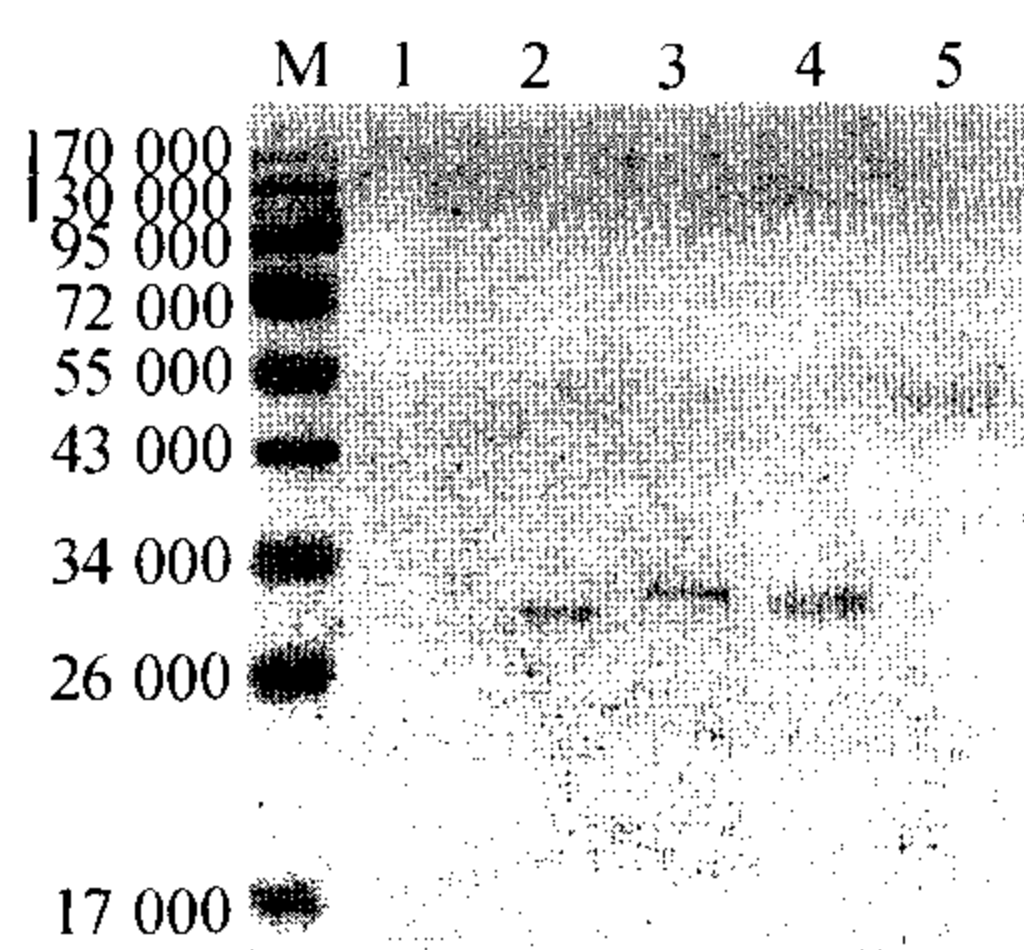
图 4 pBT-HNa-b-c 在 Rosetta 2 (DE3) 中表达及纯化产物的 SDS-PAGE 分析

Fig. 4 SDS-PAGE analysis of pBT-HNa-b-c expressed in Rosetta 2 (DE3) and the purified products

2.4 各蛋白的反应原性测定

经 Ni^{2+} 柱纯化的 HNa、HNb、HNc、HNa-b-c 蛋白, 以 NDV 高免血清作为一抗, HRP 标记的羊抗鸡 IgG 作为二抗进行 Western-blot 分析, 结果显示 pBT-HNa、pBT-HNb、pBT-HNc 和 pBT-HNa-b-c 在 Rosetta 2 (DE3) 中表达的产物均能同 NDV 抗血清发生特异

性的反应,结果见图5.



M: 预染蛋白相对分子质量标准;1: 诱导4 h 阴性对照菌;2: HNa 在 Rosetta 2(DE3) 中诱导4 h 菌;3: HNb 在 Rosetta 2(DE3) 中诱导4 h 菌;4: HNa 在 Rosetta 2(DE3) 中诱导4 h 菌;5: HNa-b-c 在 Rosetta 2(DE3) 中诱导4 h 菌

图5 HNa、HNb、HNc、HNa-b-c 蛋白的 Western-blot 分析

Fig. 5 Western-blot analysis of HNa, HNb, HNc, HNa-b-c

3 讨论与结论

据报道^[10], NDV HN 蛋白膜外区有12个完全保守的半胱氨酸(C)残基,分别位于172、186、196、238、247、251、344、455、461、465、531和542位氨基酸处.这些C残基对HN蛋白的成熟起着重要作用. Iorio等^[11]根据单抗对应的氨基酸序列,推测HN蛋白上可能有5个与受体结合有关的区域,即第193~201、345~351、494、513~521及569位氨基酸,其中第193~201位氨基酸同时具有受体结合及神经氨酸酶2种活性. Sheehan等^[12]经过比较发现,NDV HN蛋白存在一段保守序列171GCTRIPSF178,并且第175位氨基酸及其附近区域对于NA位点的完整性至关重要.本研究即根据之前大量研究论证结果,并综合软件分析结果,选定169~267位氨基酸、318~405位氨基酸和448~571位氨基酸3个区域作为多肽表位,这些表位涵盖了上述重要位点,因此具有较大意义.

本研究采用了华南农业大学农业部养禽与禽病防治重点开放实验室自行研制的pBT原核表达系统,方便蛋白的纯化和后续的分析.一般相对分子质量在10 000以上的抗原具有免疫原性,而小于4 000者一般无免疫原性,我们制备的多肽的相对分子质量大小约为10 000,从理论上讲免疫原性较差,因此将其构建到相对分子质量大小约为20 000的融合表达载体pBT上,以其增加多肽的免疫原性.本试验结果初步证明,所选的3个抗原结构域基因片段HNa、HNb、HNc及其串联片段HNa-b-c的蛋白表达量很高,且具有针对NDV阳性血清的免疫反应性,为进一步开展NDV多肽亚单位疫苗的研制做了前期准

备工作,而对于重组多肽是否可以有效地提供保护,以及免疫剂量的摸索、免疫佐剂的选择等将在以后的研究中进一步证明和完善.

参考文献:

- [1] SAIF Y M, BARNES H J, GLISSON J R, et al. Diseases of Poultry[M]. 11th ed. Iowa: Iowa State University Press, 2003.
- [2] MAYO M A. A summary of taxonomic changes recently approved by ICTV[J]. Arch Virol, 2002, 147(8): 1655-1656.
- [3] NIKURA M, MATSUURA Y, HATTORI M, et al. Characterization of HN glycoprotein of NDV expressed by a recombinant baculovirus[J]. Virus Res, 1991, 21: 31-43.
- [4] HUANG Zhu-hui, PANDA A, ELANKUMARAN S, et al. The hemagglutinin-neuraminidase protein of Newcastle disease virus determines tropism and virulence[J]. J Virol, 2004, 78(8): 4176-4184.
- [5] CONNARIS H, TAKIMOTO T, RUSSELL R, et al. Probing the sialic acid binding site of hemagglutinin-neuraminidase of newcastle disease virus: Identification of key amino acids involved in cell binding, catalysis and fusion[J]. J Virol, 2002, 76(4): 1816-1824.
- [6] 丁壮, 殷震. 新城疫病毒 HN 蛋白基因的克隆、序列分析、表达及其免疫原性研究[D]. 长春: 解放军军需大学动物科技学院, 2002.
- [7] KAPCZYNSKI D R, TUMPEY T M. Development of a virosome vaccine for Newcastle disease virus[J]. Avian Dis, 2003, 4(73): 578-587.
- [8] 王三虎, 李杰, 王选年, 等. 新城疫病毒 HN 蛋白结构及其生物学活性研究进展[J]. 安徽农业科学, 2006, 34(23): 6213-6214.
- [9] 何庆兰. 新城疫病毒基因组中 HN 基因的研究进展[J]. 浙江畜牧兽医, 2007(3): 11-12.
- [10] WMMGINNES L, GMORRISON T. The role of individual cysteine residues in the formation of the mature, antigenic HN protein of Newcastle disease virus[J]. Virology, 1994, 200: 470-483.
- [11] IORIO R M, GILCKMAN R L, RIEL A M, et al. Functional and neutralization profile of seven overlapping antigenic sites on the HN glycoprotein of newcastle disease virus: monoclonal antibodies to some sites prevent attachment[J]. Virus Research, 1989, 13: 245-262.
- [12] SHEEHAN J P, IORIO R M. A single amino acid substitution in the hemagglutinin-neuraminidase of newcastle disease virus results in both functions[J]. Virology, 1993, 189(2): 778-781.

【责任编辑 柴 焰】