

239-243

3016069 http://www.cqvip.com

甲型肝炎病毒细胞受体结合区氨基酸突变分析

韩剑秋¹ Jack T. Stapleton² Stapl, JT

¹(卫生部上海生物制品研究所,上海 200052)

²(Division of Infectious Diseases, Department of Internal Medicine,
The University of Iowa College of Medicine, Iowa City, IA 52242 U. S. A)

R373.21

A **摘要** 利用 PCR 引导的基因突变技术,对位于甲型肝炎病毒衣壳蛋白 VP₁ 上的细胞受体结合区进行氨基酸定点突变。结果发现当第 1143、1187、1202 和 1225 位氨基酸发生突变时,突变株病毒在细胞中的增殖动力学改变,病毒增殖量呈不同程度减少,提示这些位置上的氨基酸可能与细胞受体结合。若发生突变将影响病毒对敏感细胞的吸附和脱衣壳过程,使病毒感染力下降。

关键词 甲型肝炎病毒,受体,聚合酶链式反应,基因突变,细胞受体,氨基酸

甲型肝炎病毒(HAV)在细胞培养中增殖缓慢且不引起病变,因而有关其结构蛋白在感染细胞及复制过程中的作用所知甚少^[1]。对于小 RNA 病毒科中的 HAV,鼻病毒(HRV14)的 X 射线晶体衍射研究表明,这些病毒的每个衣壳蛋白的 VP₁ 上都有一个细胞受体结合区^[2]。

根据对 HRV14 的细胞受体结合区研究结果及其与 HAV 的氨基酸同源性比较^[3,4],我们选择了在 HAV 中可能有突变意义的第 1143、1187、1202 和 1225 位氨基酸进行了突变分析,发现突变株病毒在细胞中的增殖动力学改变,病毒增殖减少。推测上述氨基酸的突变可能改变了受体结合区的空间结构,影响了病毒与细胞受体的有效结合。深入研究 HAV 细胞受体结合区的结构与功能的关系,将有助于进一步揭示 HAV-细胞的相互作用,对于病毒疫苗株的筛选及抗病毒药物的设计都将起到积极的作用。

材料与方 法

1 细胞

BS-C-1 细胞系非洲绿猴肾传代细胞,由美国菌种毒种保存中心(ATCC)提供,使用代次为 54 代。

2 质粒

含 HAV 传染性 cDNA 全基因的质粒 pCH2 由 pGEM 质粒构建而成,由 Dr. Jack T. Stapleton 提供。

3 PCR 引导的基因突变

自 HAV cDNA 的上游至下游依次设计 a、c、b、d 4 个引物,a 与 d 引物分别设计在限制性内切酶 Bst E II 和 Sac I 的两侧;b 与 c 引物上分别设计有待突变的核苷酸序列。以 a 和 b 引物扩增在下游含突变基因的片段 AB;以 c 和 d 引物扩增在上游含相同突变基因的片段 CD。然后将 AB 与 CD 片段混合作为模版,再以 a 与 d 引物扩增一次,即得到两端为 Bst E II 和 Sac I 位点、中间含有突变基因的大片段 AD,经酶切后重组入 pCH2 质粒中,共构建了 4 个突变质粒,编号 m1 至 m4。

收稿日期:1996-11-13,修回日期:1997-03-03

4 序列分析

用 Sanger 双脱氧链终止法测定位于 BstE II 和 Sac I 之间的 DNA 序列,使用 Sequenase Version 2.0 (U. S. B) 试剂盒,方法参考使用说明书。

5 质粒 DNA 转染细胞

以氯化铯梯度离心方法纯化环状 pCH2 及 m1~m4 质粒 DNA,用脂质体法转染 BS-C-1 细胞,取 5 μg DNA 与 15 μL 脂质体 Lipofect AMINE (GIBCO. BRL),按产品使用说明书提供的方法进行转染。

6 HAV 的检测

经转染的细胞培养 30 d 后收获,经冻融¹²⁵I、超声处理,离心去除沉淀碎片,取上清按如下方法进行检测:

6.1 固相免疫法(RIA) 包被抗体和¹²⁵I 标记抗体均为甲肝恢复期病人 Chuley 的血浆,阳性对照抗原为 HAV 标准株 HM-175 株病毒,操作方法见参考文献[5]。

6.2 抗原捕获 PCR 法 以 Chuley 血浆包被 PCR 管、阳性对照抗原为 HM-175 株 HAV,方法见参考文献[6]。

7 HAV RNA 的 PCR 半定量方法

取以上待检上清,用 RNA 抽提试剂盒(RIK2.0 IBC)抽提 RNA(方法参考使用说明书),作倍比稀释后进行逆转录 PCR,根据 HAV RNA 的稀释终点标定起始 HAV RNA 量,用含等量 HAV RNA 的细胞抽提物感染正常 BS-C-1 细胞。

结 果

1 突变质粒构建及突变位点的 DNA 序列分析

PCR 引导的基因突变及质粒构建如图 1 所示。

突变质粒构建后,对位于 BstE II 和 Sac I 之间的约 1.8 kb 的 cDNA 进行序列分析,结果 m2、m3、m4 的序列正确,但 m1 除应有的突变外,还出现 3 个由 Taq 酶误配引入的意外突变,经校对受体结合区氨基酸序列,发现这 3 个意外突变均不在该受体结合区内(表 1)。

表 1 HAV 受体结合区氨基酸突变及序列分析

Table 1 Amino acid mutation and plasmid DNA sequencing of HAV cellular receptor binding region

突变株名称 Name of mutant	突变位置 Site	突变前氨基酸(密码子) Amino acid (code) before mutagenesis	突变后氨基酸(密码子) Amino acid (code) after mutagenesis
m1	1202	亮氨酸(TAA)	色氨酸(TGG)
	1067*	苏氨酸(ACC)	丙氨酸(GCC)
	1241*	谷氨酸(GAA)	赖氨酸(AAA)
	2205*	亮氨酸(TTA)	丝氨酸(TCA)
m2	1143	亮氨酸(CTG)	精氨酸(CGG)
m3	1187	丙氨酸(GCT)	组氨酸(CAT)
m4	1225	苏氨酸(ACA)	精氨酸(CGC)

* 不在受体结合区内的意外突变

* Non-predicted mutations outside the cellular receptor binding region

2 突变质粒转染 BS-C-1 细胞

以 5 μg m1~m4 及 pCH2 质粒同时转染 BS-C-1 细胞,培养 30 d 后以 RIA 法检测 HAV 抗

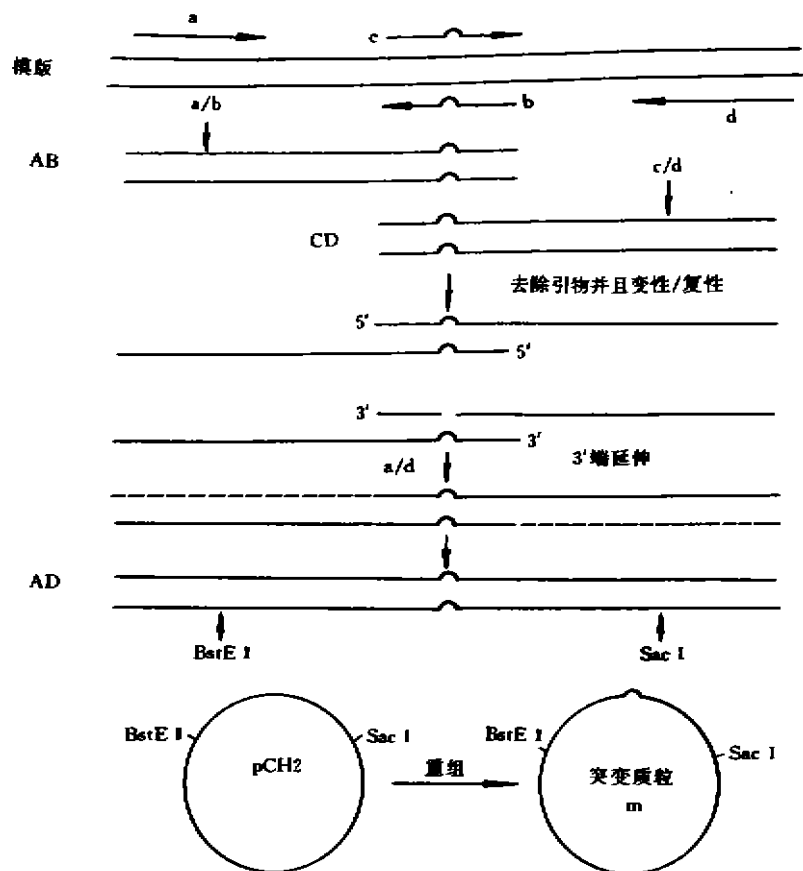


图 1 PCR 定点突变及突变质粒构建

Fig 1 Site directed PCR mutagenesis and the construction of mutant plasmid

原表达,结果显示突变株质粒及 HAV 原始质粒均能转染 BS-C-1 细胞并表达 HAV 抗原,但抗原表达量有所不同,以未经突变的 HAV 原始质粒表达的抗原量最高,m3 质粒次之(结果略)。

3 突变株 HAV 病毒在 BS-C-1 细胞中的增殖动力学

收获经转染 BS-C-1 细胞后表达的 HAV 标准株及突变株病毒,经 PCR 半定量法测定其 HAV RNA 含量后,以含等量 HAV RNA 拷贝数的细胞抽提物感染正常 BS-C-1 细胞。培养第 50 d 和 70 d 时,以抗原捕获 PCR 和 RIA 法测定 HAV 抗原,发现各突变株抗原量增长速度不一,但均明显低于标准株的抗原增长速度(见表 2)。

讨 论

根据 Colonna 等对 HRV14 表面细胞受体结合区的研究结果,我们对 HAV 该区域进行了氨基酸突变分析,发现 4 株突变株的 HAV 增殖均较原始标准株减少,与对 HRV14 的同类研究结果相似^[3],突变株病毒增殖的减少似乎与突变氨基酸在受体结合区中的位置有一定联系。突变位置越接近受体结合区(呈袋状结构)的“入口”,病毒增殖受影响越大,病毒增殖越少

(m4), 而突变位置越接近袋状结构的底部, 病毒增殖受影响越小, 病毒增殖在4株中越高(m1), 但仍比原始标准株明显减少。

表2 HAV突变株在BS-C-1细胞中的复制

Table 2 The replication of HAV mutant in BS-C-1 cell

标本 Sample	50 d		70 d		%HAV 增长 %HAV increment
	抗原捕获 PCR 法 Antigen-capture PCR	放免法 RIA	抗原捕获 PCR 法 Antigen-capture PCR	放免法 RIA	
m1	+	1.05	+	1.90	80.9
m2	+	1.07	+	1.21	13.1
m3	+	1.03	+	1.15	11.7
m4	+	1.19	+	1.27	6.7
pCH2	+	1.28	+	3.67	186.7
BS-C-1	-	1	-	1	0

表中数值为放免法 P/N 值 Data shown are RIA P/N value

推测 HAV 吸附细胞时, 细胞受体与病毒的受体结合区袋状结构结合, 然后导致病毒脱壳。这种病毒-细胞的结合特异性很强, 即使单一的氨基酸突变, 都可影响其有效结合, 影响病毒入侵进入细胞的效率。或许 HAV 的抗原决定簇也在这一细胞受体结合区内, 其氨基酸的突变并不直接影响病毒的复制, 而是影响了病毒与抗体的结合, 表现为病毒检出量的减少, 尚需进一步研究证实。

参 考 文 献

- 1 Lemon SM, Amphlett E, Sanger D. Protease digestion of hepatitis A virus - disparate effects on capsid proteins, antigenicity and infectivity. *J Virol.* 1991a, 65:5636~5640
- 2 Shepard DA, Heinz BA, Ruecker RR. WIN 52035-2 inhibits both attachment and eclipse of human rhinovirus 14. *J Virol.* 1993, 67:2245~2254
- 3 Colonna RJ, Condra JH, Mizutani S *et al.* Evidence for the direct involvement of the rhinovirus canyon in receptor binding. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1993, 85:5449~5453
- 4 Luo M, Rossmann MG, Palmberg AC. Prediction of three-dimensional models for foot-and-mouth disease virus and hepatitis A virus. *Virology.* 1988, 166:503~514
- 5 Stapleton JT, Frederick R, Meyer B. Hepatitis A virus attachment to culture cell lines. *J Infect Dis.* 1991, 164:1098~1103
- 6 Jansen RW, Siegl G, Lemon SM. Molecular epidemiology of human hepatitis A virus defined by an antigen-capture polymerase chain reaction method. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1990, 87:2867~2871

Assay of Amino Acid Mutagenesis in Hepatitis A Virus Cellular Receptor Binding Region

Han Jianqiu

(Shanghai Institute of Biological Products,

Ministry of Public Health, Shanghai 200052)

Jack T. Stapleton

(Division of Infectious Diseases, Department of Internal Medicine,

The University of Iowa College of Medicine, Iowa City, IA 52242 U. S. A.)

Point mutation was produced in the cellular receptor binding region of hepatitis A virus VP1 based on PCR directed mutagenesis. The results showed that the replication kinetics were changed when 1143, 1187, 1202 and 1225 amino acid were mutated respectively. HAV replication quantity decreased at a different range compared with prototype HAV strain. The results indicated that these amino acid may be involved in the binding of cellular receptor. The amino acid substitution may affect the attachment and the uncoating process of HAV to permissive cell, therefore the virus infection decreased.

Key words Hepatitis A Virus, Receptor, PCR, Mutagenesis