禽流感病毒 HA 部分基因的克隆及其表达

陈全姣，金梅林**，陈焕春

(华中农业大学动物医学院，武汉 430070)

The Cloning and Expressing of the Main Epitope of ha gene Fragement of Avian Influenza Virus

CHEN Quan-jiao, JIN Mei-lin**, CHEN Huan-chun

(*College of Animal Science and Veterinary medicine, Huazhong Agricultural University, Wuhan* 430070, *China*)

Abstract: The gene fragment of Avian influenza virus (AIV) was amplified by RT-PCR. The results of sequence analysis showed that high homology (97 %) exists among duck, goose and Human influenza virus in Hongkong AIV in 1997, indicating that there are close relationship among these *ha* genes. The *ha* gene are expressed efficiently in *E. Coli*.

Key words: Avian influenza virus; *ha* gene; Clone; Express

关键词：禽流感病毒；*ha* 基因；克隆；表达

中图分类号：S 831.7　　**文献标识码**：A　　**文章编号**：1003-5125(2005)01-0087-02

禽流感病毒(Avian influenza virus, AIV)是正粘病毒科流感病毒属的成员。AIV 核酸为单链线状分段 RNA，病毒表面囊膜上镶嵌着两种重要纤突，即血凝素(HA)和神经氨酸酶(NA)。HA 和 NA 与病毒的毒力、传染性密切相关。其中 *ha* 基因是最重要的免疫原性基因，它刺激机体所产生的抗体可中和病毒、抵抗感染，同时，由于 AIV 基因组中 *ha* 基因极易发生变异，故对 *ha* 基因的研究已成为目前研究 AIV 的热点。我们已成功克隆了禽流感 *ha* 基因的部分片断，并对其分子特性作了初步研究，现报告如下：

1 材料与方法

1.1 病毒、菌株与质粒

禽流感病毒由本室分离鉴定并保存；大肠杆菌 $DH_5\alpha$、BL21(DE3)，质粒 pET-28b 均为本室保存；限制性内切酶和工具酶，蛋白质分子量标准物为 MBI 公司产品；RNA-SOLV Reagent RNA Isolation Solvent 购自 OMEGA 公司；pMD18-T，One step RNA PCR kit(AMV)购自 TaKaRa 公司。

1.2 病毒 RNA 的提取及 RT-PCR 反应

RNA 的提取参照 OMEGA Bioteck RNA-SOLV Reagent 的说明进行。参照有关文献[4]设计并合成一对简并引物(引物由上海生工合成)。

P1: 5'-ACA CAT GCT CAG GAC ATA CT-3'

P2: 5'-CTC TGA TTT AGT GTT GAT GT-3'

1.3 重组表达质粒的构建

重组表达质粒的构建按常规方法，即将 *ha* 基因克隆入 pMD18-T 载体，经测序确证后将其连入 pET-28b 表达载体，从而构建重组原核表达质粒 pET-HA。

1.4 的蛋白的表达与检测

提取所构建的原核表达质粒，转化 BL21，按常规方法进行 IPTG 诱导表达，SDS-PAGE 电泳、Western blotting 检测表达产物。

2 结果与讨论

2.1 ha 基因的 PCR 扩增及核苷酸序列和氨基酸序列分析

RT-PCR结果扩增出一条546bp大小的DNA

收稿日期：2004-07-20，修回日期：2004-10-19

作者简介：陈全姣(1976-)，女，湖北省籍，硕士研究生，主要从事动物病毒研究。

** 通讯作者. 金梅林(1950-)，女，湖北省籍，教授，研究方向为动物传染病。

Corresponding auther. Tel: 027-87282608, E-mail: jm18328@hotmail.com

© 1995-2006 Tsinghua Tongfang Optical Disc Co., Ltd. All rights reserved.

片断,与预期设计相符。

通过序列测定,测得的 *ha* 基因核苷酸序列长度为526bp。与1997年人源流感病毒核苷酸序列、氨基酸序列同源性分别为96%、95%,具有相同的裂解位点[2],进一步警世禽流感对人类的威胁仍持续存在,也突出了加强监测和预警系统建设的重要性。而且亲源关系较近的病毒株有从无禽流感症状的鸭只中分离得到的[1,3,5],说明养禽业受禽流感侵袭的威胁较大。

2.2 重组表达质粒的酶切鉴定

用 *BamH*I、*Sal*I 酶切所得到的重组质粒,经1.0%琼脂糖凝胶电泳,EB染色后,于紫外灯下观察。所获得的重组质粒命名为pET-HA。见图1。

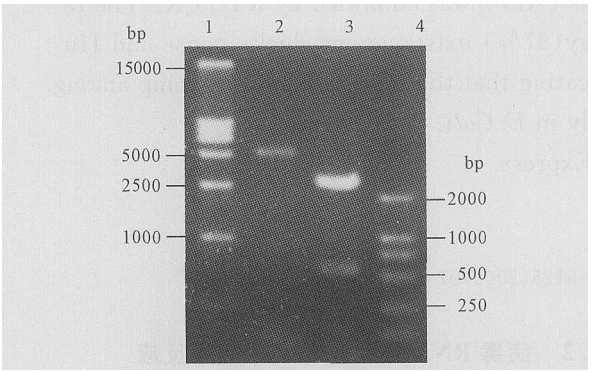

图1 重组pET-HA质粒的酶切鉴定

Fig. 1 Identification of pET-HA by digesting

1,DNA Marker; 2,pET-28b vector digested by *Sal* Iand *BamH* I; 3,pET-HA vector digested by *Sal* Iand *BamH* I; 4,DNA Marker.

2.3 ha基因在大肠杆菌中的表达

将重组质粒pET-HA转化表达宿主菌BL21(DE3),培养诱导,收集加入IPTG 1h、2h、3h、4h后的菌液,按常规方法处理后,经SDS-PAGE电泳分析,在30kDa处出现明显蛋白带,且重组蛋白表达量3h达到最高。见图2。

本试验尝试在大肠杆菌中表达 *ha* 全基因,但最终未能成功。据笔者了解,全基因的表达比较困难,而本试验 *ha* 部分基因的表达较为顺利,而且表达量很高。这可能与 *ha* 基因前端的信号肽序列有关。此次尝试也为表达禽流感 *ha* 基因提供了一定的基础。

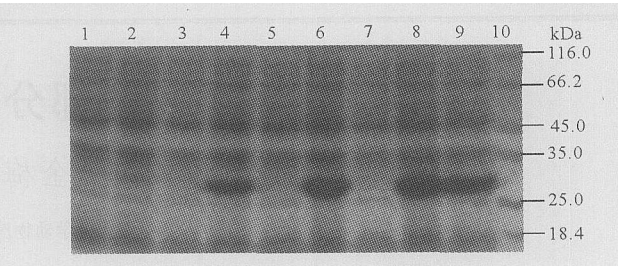

图2 SDS-PAGE的结果

Fig. 2 The result of SDS-PAGE

1/3/5/7, The expression product of pET-28b induced after 0h,1h, 2h and 3h; 2/4/6/8/9, The expression product of pET-HA induced after 0h,1h,2h and 3h;10, Protein standard.

参考文献

[1] Cauthen A N, Swayne D E, Schultz-Cherry S, *et al*. Continued circulation in China of highly pathogenic avian influenza viruses encoding the hemagglutinin gene associated with the 1997 H5N1 outbreak in poultry and humans[J]. J Virol, 2000, 74:6 592-6 599.

[2] Claas E C, Osterhaus A D, van Beek R, *et al*. Human influenza A H5N1 virus related to a highly pathogenic avian influenza virus[J]. Lancet, 1998, 351:472-477.

[3] Guan Y, Peiris M, Kong K F, *et al*. H5N1 Influenza Viruses Isolated from Geese in Southeastern China: Evidence for Genetic Reassortment and Interspecies Transmission to Ducks [J]. Virology, 2002, 292: 16-23.

[4] Lee M S, Chang P C, Shien J H, *et al*. Identification and subtyping of avian influenza viruses by reverse transcription-PCR [J]. J Virol Methods, 2001, 97: 13-22.

[5] Tumpey T M, Suarez D L, Perkins L E, *et al*. Characterization of a highly pathogenic H5N1 avian influenza A virus isolated from duck meat[J]. J Virol, 2002, 76:6 344-6 355.

© 1995-2006 Tsinghua Tongfang Optical Disc Co., Ltd. All rights reserved.