禽流感病毒 M1 蛋白的表达及其免疫反应性分析 *

宋建领 ,王金萍 ,胡媛媛 ,张富强**

(云南省热带亚热带动物病毒病重点实验室 ,云南昆明 650224)

Expression of M1 protein of Avian Influenza Virus and Analysis of Its Immunoreactivity

SONG Jian-ling , WANG Jun-ping , HU Yuan-yuan , ZHANG Fu-qiang**

(*Yunnan Tropical and Subtropical Animal Virus Diseases Laboratory , Kunming* 650224 , *China*)

Abstract : A pair of primers were designed based on M1 gene sequence of known H5N1 Avian influenza virus. M1 gene was cloned from total RNA , extracted from tissue of H5N1 subtype virus inoculated embryo by reverse transcriptase - polymerase chain reaction using high proofreading polymerase (Pyobest™ DNA Polymerase) , and expressed using Invitrogen champion™ pET directional TOPO expression system. Recombinant protein containing polyhistidine (6xHis) tag in N-terminal about 29.8kDa in size ,wac obtained and purified. Its immunoreactivity was analyzed by Western blot , ELISA and blocking ELISA using MAb and positive serum. The results showed recombinant M1 protein can bind to MAb and positive serum with specificity , and this binding reactivity can be blocked by natural viral antigen. This indicates that the recombinant M1 protein possesses good immunoreactivity.

Key words : Avian influenza virus ; M1 protein ; Expression ; Immunoreactivity

摘要: 根据已发表的禽流感病毒 M1 基因序列设计合成 PCR 克隆引物 ,自接种 H5N1 亚型病毒的鸡胚组织中提取 RNA ,反转录后采用高可信度 DNA 聚合酶(Pyobest™ DNA Polymerase)经 PCR 扩增 M1 基因 ,采用 Invitrogen 定向表达系统(Champion™ pET directional TOPO expression system)进行克隆表达 ,纯化获得 N 末端携带多聚组氨酸标签的重组蛋白 ,分子量约 29.8 kDa。采用单克隆抗体和阳性血清经 ELISA、阻断 ELISA、免疫印迹分析重组蛋白的免疫反应性。结果发现 :重组 M1 蛋白能与单克隆抗体和阳性血清发生特异性结合 ,且此结合能被天然病毒抗原阻断。研究表明 :重组蛋白 M1 具有良好免疫反应性。

关键词 :禽流感病毒 ;M1 蛋白 ;表达 ;免疫反应性

中图分类号 :S855.3　　**文献标识码** :A　　**文章编号** :1003-5125(2005)05-0515-04

禽流感(Avian influenza ,AI or bird flu)是由 A 型流感病毒引起的一种禽类的感染和疾病综合征[1]。世界动物卫生组织(OIE)将其列为 A 类疫病[2] ,我国动物防疫法规定为一类动物传染病。1997 年、1999 年、2004 年中国香港、泰国、越南报道 H5N1、H9N2 亚型禽流感病毒 ,突破种间障碍直接感染人的病例[3] ,赋予禽流感全新的公共卫生意义。2004 年亚洲部分国家或地区暴发 H5N1 亚型禽流感 ,损失惨重。禽流感病毒属于正粘病毒科流感病毒属 A 型流感病毒成员。禽流感病毒基因组由 8 个分节段的单股负链 RNA 组成 ,编码 10 种病毒功能蛋白。病毒第 7 节段 RNA 转录过程中 ,经剪接、编辑合成两条不同的 mRNA ,指导翻译 M1 和 M2 基质蛋白。M1 由 252 个氨基酸残基组成 ,分子量约 26 KDa ,它是病毒的主要结构蛋白 ,占流感病毒蛋白总量的 30 %～40 %。该蛋白具有型特异性 ,其抗原性差异是流感病毒分型的依据之一[4]。M1还是一种多功能因子 ,在病毒复制中具有重要

收稿日期 :2005-03-28 ,修回日期 :2005-05-13
* 基金项目 :云南省科技攻关项目(2004NG-01) ;农业部 948 项目(2004-Z41)
作者简介 :宋建领(1974 -) ,男 ,在读硕士生 ,助理研究员 ,主要从事分子病毒学研究。
** 通迅作者. Corresponding Author. Tel : (0871) 5016575 , E-mail :zfq1968 @yahoo.com.cn

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

的调节功能[5],如控制病毒的转录和被感染细胞的胞核胞浆之间的物质运输[6]。本研究根据已发表的禽流感病毒M1基因序列设计合成PCR克隆引物,自接种H5N1亚型病毒的鸡胚组织中提取RNA,经RT-PCR克隆M1基因,应用定向表达系统(Champion™ pET directional TOPO expression system)进行克隆表达,并采用单克隆抗体和阳性血清对重组蛋白的免疫反应性进行了分析,为进一步评价其在疫病诊断及防制中的应用奠定基础。

1 材料与方法

1.1 病毒、质粒与菌种

禽流感云南地方分离毒株A/Chicken/Yunnan/K001/2004(H5N1),本实验室分离、鉴定、保存;原核表达质粒pET100/D-TOPO、大肠杆菌TOP10及BL21 Star™(DE3)感受态细胞购自Invitrogen公司。

1.2 主要试剂

定向表达试剂盒(Champion™ pET directional TOPO expression kit, K100-01)、辣根过氧化物酶(HRP)及碱性磷酸酶(AP/AKP)标记的抗多聚组氨酸(6xHis)抗体均购自Invitrogen公司;HRP或AP/AKP标记羊抗鼠IgG抗体购自北京中杉金桥生物技术有限公司;DL2000 DAN Marker、病毒RNA/DNA提取试剂盒(TaKaRa MiniBEST Viral DNA/RNA Extraction Kit Ver. 3.0)、高可信度DNA聚合酶(Pyobest™ DNA Polymerase)、反转录酶均购自TaKaRa公司;M1单克隆抗体购自上海复旦悦达生物技术有限公司。

1.3 引物设计与合成

根据已发表的A/Ck/YN/115/04毒株*M1*基因序列(GenBank登录号:AY651427),并考虑到不同分离毒株变异性,设计合成简并引物,上游引物M1F:5′CACCATGAGTCTTCTAACCGAGGTC-3′,下游引物M1R:5′CTACTTGAAYCGCTGCATYTG-3′,其中上游引物5端包含定向克隆序列CACC,其后紧接起始密码子ATG携带外源蛋白阅读框架,下游引物5端包含终止密码子互补序列CTA。用于克隆M1全基因,预期克隆基因大小763bp,编码M1蛋白的252个氨基酸。T7F、T7R引物参照试剂盒提供的序列。由宝生物工程(大连)有限公司合成。

1.4 RNA提取及M1基因的扩增

按试剂盒提供的操作手册,自接种A/Chicken/Yunnan/K001/2004(H5N1)毒株后24-36h存活或新近死亡的鸡胚组织样品中提取总RNA。采用随机引物经反转录制备cDNA,采用Pyobest™ DNA Polymerase经PCR扩增*M1*基因,产物经电泳定量,确定获得5-10ngDNA的稀释度。

1.5 重组质粒构建和鉴定

按试剂盒提供的手册进行克隆反应,取2μL反应物转化TOP10感受态细胞后,涂布Ampcilin抗性平板过夜,挑取孤立菌落,采用T7F、T7R和T7F、M1R引物经PCR鉴定阳性菌落。阳性菌落增殖培养后,提取质粒,采用T7F、T7R,T7F、M1R和M1F、T7R引物经PCR进行重组质粒鉴定。以T7F、T7R为测序引物,对克隆的*M1*基因进行测序。

1.6 表达条件的优化和产物的纯化

阳性重组M1质粒,经电泳定量确定获得5-10ng质粒DNA的稀释度,取1μL(5-10ng)转化BL21 Star™(DE3)感受态细胞,取不同IPTG浓度,不同诱导时间获得的重组菌裂解物,SDS-PAGE分离转膜后,采用抗多聚组氨酸抗体,经免疫印迹分析,确定获得最大表达量的IPTG浓度及诱导时间。在此条件大量培养后,以凝胶切割、蛋白洗脱方法纯化重组M1蛋白。

1.7 重组蛋白SDS-PAGE及免疫印迹分析

取重组菌诱导前、重组菌诱导后、纯化重组M1蛋白及空白菌,裂解后经SDS-PAGE分离,进行蛋白染色或转印,凝胶染色后,经凝胶扫描仪分析重组蛋白在细菌总蛋白中浓度,转印膜以M1单克隆抗体为检测抗体,AP/AKP标记羊抗鼠IgG抗体为交联剂,进行免疫印迹分析。

1.8 重组蛋白ELISA和阻断ELISA分析

重组蛋白直接包被或以鸡抗禽流感病毒阳性血清为包被抗体,以M1单克隆抗体为检测抗体,HRP标记羊抗鼠IgG抗体为交联剂,进行ELISA分析。以M1单克隆抗体为包被抗体,病毒抗原为竞争剂或阻断剂,HRP标记的抗多聚组氨酸单克隆抗体为检测抗体,进行阻断ELISA分析。

2 结果

2.1 M1基因的扩增及定量

RT-PCR产物经凝胶回收纯化后,经电泳检测和定量,获得大小为763bp单一基因片段,与预期结果吻合。PCR产物浓度60～80ng/μL。

2.2 重组质粒的构建、转化及鉴定

M1克隆反应物转化TOPO10感受态细胞,涂布Ampcilin抗性平板培养后获得54个独立菌落,随机选取6个菌落,PCR鉴定均为阳性。自阳性菌

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

落中选取 2 个增殖培养后,提取重组质粒,经 PCR 鉴定均为阳性,获得与预期大小一致的扩增产物(图 1)。序列分析结果表明:所克隆的 M1 基因序列(登录号:DQ055851)与A Y653194、A Y609315、A Y651427 同源性分别为:94.2 %,97.9 %,99.6 %。

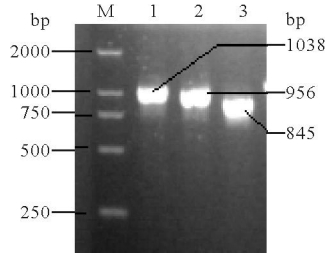

图 1 重组 M1 质粒的 PCR 鉴定

Fig. 1 Identification of Recombinant M1 plasmids by PCR

M, DL2000 DNA Marker; 1, T7F / T7R pair of primer; 2. , T7F / M1R pair of primer; 3, M1F / T7R pair of primer.

2.3 表达条件的优化和产物的纯化

不同 IPTG 浓度,不同诱导时间获得的重组菌裂解物,SDS-PAGE 分离、转膜后,采用抗多聚组氨酸抗体进行免疫印迹分析,结果发现:采用 1mmol/L IPTG 诱导 5h 后 M1 蛋白表大量最高。在此条件下,收集菌体 12 %SDS-PAGE 分离后,凝胶切割、蛋白洗脱纯化后,经免疫印迹检测,获得大小约为29.8 kDa 的重组 M1 蛋白带。

2.4 重组蛋白 SDS-PAGE 及免疫印迹性分析

重组菌诱导前、重组菌诱导后、纯化重组 M1 蛋白及空白菌经 SDS-PAGE 分离,进行蛋白染色后,经凝胶扫描仪分析得知重组 M1 蛋白约占细菌总蛋白的 30 %。蛋白转印后,免疫印迹分析结果表明:重组 M1 蛋白能被 M1 单克隆抗体特异性识别。M1 重组蛋白 SDS-PAGE 分析结果见图 2,免疫印迹分析结果见图 3。

2.5 ELISA 分析

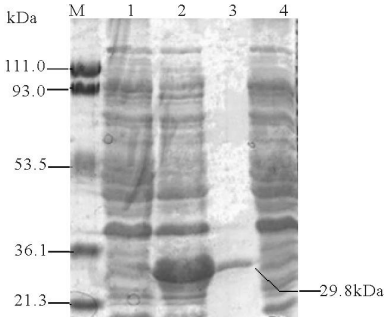

图 2 重组蛋白的 SDS-PAGE 分析

Fig. 2 Analysis of recombinant protein by SDS-PAGE

M, Prestainded protein molecular weight standards; 1, Cell lysate of recombinant bacteria un-induced with IPTG; 2, Cell lysate of recombinant bacteria induced with IPTG; 3, Purified recombinant M1 protein; 4, Cell lysate of blank *E. coli* BL21 Star TM(DE3).

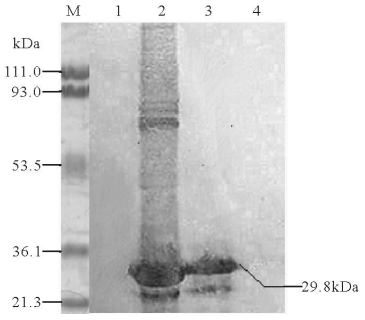

图 3 重组蛋白的免疫印迹分析

Fig. 3 Analysis of recombinant protein by western blot using monoclonal antibody

M, Prestainded protein molecular weight standards; 1, Cell lysate of recombinant bacteria un-induced with IPTG; 2, Cell lysate of recombinant bacteria induced with IPTG; 3, Purified recombinant M1 protein; 4, Cell lysate of blank *E. coli* BL21 Star TM(DE3).

将纯化的重组 M1 蛋白自 1∶40 至 1∶81 920 稀释后,包被 ELISA 板,同时以空白大肠埃希氏菌 BL21 Star™ (DE3) 裂解物为阴性对照,以 M1 单克隆抗体为检测抗体,进行 ELISA 分析。结果表明:重组 M1 蛋白能被单克隆抗体特异性识别,检测最高稀释度1∶20480(图4)。以禽流感阳性血清为

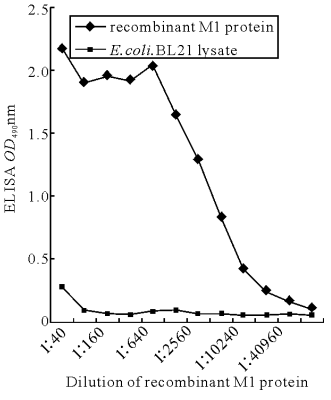

图 4 重组 M1 蛋白 ELISA 分析

Fig. 4 Analysis of recombinant M1 protein by ELSIA using Monoclonal antibody

包被抗体,将重组 M1 蛋白自 1∶10 至 1∶1 280 稀释后与鸡抗孵育,同上设阴性对照,以 M1 单克隆抗体为检测抗体进行 ELISA 分析,结果发现:重组 M1 蛋白能与禽流感阳性血清发生特异性结合,检测最高稀释度 1∶320(图 5)。

2.6 阻断 ELISA 分析

以 M1 单克隆抗体为包被抗体,将禽流感及新城疫病毒抗原自 1∶2 至 1∶256 稀释后与单克隆抗体孵育,再加已知滴定浓度的重组 M1 蛋白作用后,以 HRP 标记的抗多聚组氨酸抗体为检测抗体,进行阻断 ELISA 分析。研究发现:重组 M1 蛋白与单克隆抗体间的结合能被天然病毒抗原抑制或阻断,抑制率随病毒抗原浓度的降低而降低(图 6)。

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

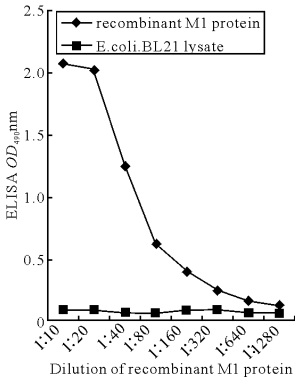

图5 重组M1蛋白ELISA分析(禽流感阳性血清)

Fig. 5 Analysis of recombinant M1 protein by ELISA using avian influenza positive serum

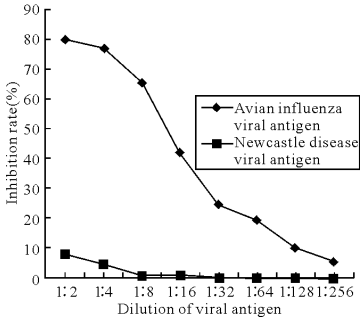

图6 重组M1蛋白阻断ELISA分析

Fig. 6 Analysis of recombinant M1 protein by blocking ELISA

3 讨论

禽流感病毒M1基因大小约759bp,编码252个氨基酸。文献[8]未对M1读码框架进行分析,将流感病毒第7节段RNA对应的全长dsDNA(1027bp)整个插入质粒,构建重组杆状病毒,表达重组M1蛋白的方法值得商榷。近几年国外对M1蛋白表位进行大量研究,采用蛋白酶水解,分析不同肽段对单抗的免疫反应性差异,分析发现M1蛋白近氨基端1/3区域与病毒类脂层结合,近羧基端2/3区域与核糖核蛋白结合。8-89、80-109、129-164位氨基酸区域至少各存在一个B细胞表位,89-141位氨基酸区域内至少存在2个B细胞表位,存在2个RNA结合位点[9],羧基端QAYQKRMGVQMQRFK多肽构成CD4+T细胞表位[10],58-66位(GILGFVFTL)氨基酸构成CD+8细胞毒性T细胞表位[11],63-70位(FVFTLTVPS)氨基酸构成CD+4T细胞表位[12]。

所表达的重组蛋白经凝胶洗脱纯化后,无需浓缩处理,1∶20 480稀释后仍能被单克隆抗体特异性检出,表明M1基因获得高效表达,便于大量制备M1蛋白。重组M1蛋白在ELISA和免疫印迹分析中,能与单克隆抗体和阳性血清发生特异性结合,且此结合能被天然病毒抗原特异性阻断,表明所获得的重组蛋白与天然病毒M1蛋白具有相同的免疫反应性。

本文使用的M1单克隆抗体,虽然来源H3N2亚型流感病毒,但也能检测H5N1、H9N2亚型流感,表明其可能针对流感病毒共有的特异性表位。本研究获得的重组蛋白,为禽流感病毒诊断方法的研究,尤其是未知亚型抗原、抗体检测技术的开发,奠定了基础,并且为进一步开展M1蛋白生物学功能及表位定位研究提供物质条件。

参考文献

[1] 甘孟侯. 中国禽病学[M]. 北京: 中国农业出版社, 1999. 66.

[2] List A and B Diseases of Mammals, Birds and Bees: Manual of Standards for Diagnostic Tests and Vaccines [M]. 5th Edition, Office International des Epizootites, 2004.

[3] Subbarao K, Klimov A, Katz J, *et al*. Characterization of an avian influenza A(H5N1) virus isolated from a child with a fatal respiratory illness[J]. Science, 1998, 293: 393-396.

[4] 殷 震,刘景华. 动物病毒学[M]. 第2版, 北京: 科学出版社, 1997,708-709.

[5] Helenius A. Unpacking the incoming influenza virus[J]. Cell, 1992, 69: 577-578.

[6] Watanabe K, Handa H, Mizumoto K, *et al*. Mechanism for inhibition of influenza virus RNA polymerase activity by matrix protein[J]. J Virol, 1996, 70: 241-247.

[7] 卢建红,邵卫星,韦栋平,等. 禽流感病毒感染的宿主免疫应答[J]. 动物医学进展, 2004, 25(5): 37-39.

[8] 王幼明,邓国华,于康震,等. 禽流感病毒GD/1/96株M基因在sf9昆虫细胞中的表达[J]. 中国兽医科技,2002,32(9):3-4.

[9] Ye Z P, Baylor N W, Wagner R R. Transcription-inhibition and RNA-binding domains of influenza A virus matrix protein mapped with anti-idiotypic antibodies and synthetic peptides [J]. J Virol. 1989, 63(9): 3586-3594.

[10] Adler S, Reay P, Roy P, *et al*. Induction of T cell response by bluetongue virus core-like particles expressing a T cell epitope of the M1 protein of influenza A virus[J]. Med Microbiol Immunol (Berl). 1998, 187(2): 91-96.

[11] Plotnicky H, Cyblat-Chanal D, Aubry J P, *et al*. The immunodominant influenza matrix T cell epitope recognized in human induces influenza protection in HLA-A2/K(b) transgenic mice[J]. Virology. 2003, 309(2): 320-329.

[12] Linnemann T, Jung G, Walden P. Detection and quantification of CD4(+) T cells with specificity for a new major histocompatibility complex class II-restricted influenza A virus matrix protein epitope in peripheral blood of influenza patients [J]. J Virol. 2000, 74(18): 8740-8743.

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