

# H5N1 亚型禽流感病毒神经氨酸酶基因的克隆与表达\*

宋建领, 张富强\*\*, 王金萍, 胡媛媛

(云南省热带亚热带动物病毒病重点实验室, 云南昆明 650224)

## Cloning and Expression of Neuraminidase Gene of H5N1

### Subtype Avian Influenza Virus

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

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

**Abstract :** A pair of clone primers were designed and synthesized based on neuraminidase(NA) gene sequences of known Avian influenza virus H5N1 subtypes. NA gene were amplified from total RNA, which had been extracted from allantoic fluid 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. 53.8kDa recombinant NA fusion with polyhistidine (6xHis) tag in N-terminal was expressed and purified. Its immunoreactivity and immunogenicity had been analyzed. The results showed the recombinant NA could not only bind to antiserum against H5N1 subtype virus with specificity but also elicit specific antibody in immunizing animal, and possessed good antigenicity.

**Key words:** Avian influenza virus; H5N1 subtype; Neuraminidase; Expression

**摘要 :** 根据已知 H5N1 亚型禽流感病毒神经氨酸酶基因 (na) 序列设计、合成克隆引物。自 H5N1 亚型病毒感染的鸡胚尿囊液中提取总 RNA, 反转录后采用高可信用度 DNA 聚合酶 (Pyobest™ DNA Polymerase) 扩增 na 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神经氨酸酶, 分子量约 53.8kDa。分析重组 NA 的免疫反应性和免疫原性, 结果表明: 重组 NA 能与 H5N1 亚型病毒抗血清发生特异性结合, 且其免疫动物后能诱导机体产生特异性抗体, 具有良好的抗原性。

**关键词:** 禽流感病毒; H5N1 亚型; 神经氨酸酶; 表达

中图分类号: S855.3

文献标识码: A

文章编号: 1003-5153(2006)01-0038-05

禽流感 (Avian influenza, AI or bird flu) 又名欧洲鸡瘟、真性鸡瘟, 是由 A 型流感病毒引起的一种禽类感染和疾病综合征<sup>[1]</sup>。1997、1999、2004-2005 年中国香港、泰国、越南暴发 H5N1、H9N2 亚型禽流感, 并存在病毒突破种间屏障感染人的病例<sup>[2]</sup>, 赋予禽流感全新的公共卫生意义。2004-2005 年东南亚暴发 H5N1 亚型禽流感, 截止到 2005 年 7 月 6 日, 确诊人感染病例 108 例, 死亡 54 例, 扑杀家禽 1.4 亿羽, 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, 病毒基因组由单股、负链、8 节段 RNA 组成, 编码 10 个基因, 其中第 4、第 6

节段 RNA 分别编码血凝素 (HA) 神经氨酸酶 (NA), 其抗原性差异, 确定病毒亚型的划分, 目前已知 HA 共有 16 种亚型 (H1-H16) \ NA 共有 9 种亚型 (N1-N9) <sup>[3]</sup>。NA 是 A 型流感病毒主要表面抗原之一, 具有糖苷外切酶活性, 可水解细胞表面受体特异性糖蛋白末端的 N-乙酰基神经氨酸。病毒在细胞表面成熟时, NA 可移去细胞膜出芽点上的神经氨酸, 有利于子代病毒粒子的成熟和释放。NA 的另一种作用是穿透呼吸道表面的粘膜, 促进病毒在机体内的传播, 与病毒的宿主嗜性及毒力有关。NA 具有免疫原性, 其诱导产生的抗体可抑制酶活性, 并具有免疫保护作用<sup>[4]</sup>。

收稿日期: 2005-08-09, 修回日期: 2005-10-08

\* 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, 山东省单县籍, 硕士生, 助理研究员, 主要从事分子病毒学研究。

\*\* 通讯作者: Corresponding author. Tel: 0871-5016575, E-mail: zfq1968@yahoo.com.cn

国内有采用禽巴斯德毕赤酵母系统表达 A/Goose/Guangdong/1/96 (H5N1) 毒株 *na* 基因<sup>[5]</sup>, 采用杆状病毒表达 A/Swine/Inner Mongolia/547/01(H3N2) 毒株 *na* 基因的报道<sup>[6]</sup>, 但未见对 2004 年 H5N1 亚型流行毒株 *na* 基因的研究。本文对 A/Chicken/Yunnan/K001/2004 (H5N1) 毒株 *na* 基因进行克隆表达, 并对表达产物的抗原性进行了分析, 以期获得高纯度重组抗原, 用于筛选 N1 亚型特异性单克隆抗体。

## 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), A/Chicken/Yunnan/K017/2002 (H9N2), 本实验室分离、鉴定、保存; 原核表达质粒 pET100/D-TOPO、大肠埃希氏菌 TOP10 及 BL21 Star<sup>TM</sup> (DE3) 购自 Invitrogen 公司。

### 1.2 主要试剂与材料

定向表达试剂盒 (Champion<sup>TM</sup> pET directional TOPO expression kit, K100-01) 碱性磷酸酶 (AP) 标记的抗多聚组氨酸 (6xHis) 抗体购自 Invitrogen 公司; 辣根过氧化物酶 (HRP) 及 AP 标记兔抗羊 IgG 二抗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<sup>TM</sup> DNA Polymerase) 反转录酶购自 TaKaRa 公司; BCIP/NBT 底物购自上海华舜生物工程有限公司; OPD 底物购自 SIGMA 公司; 高亲和性 96 孔酶标板购自 Costar 公司。

### 1.3 H5N1、H9N2 亚型病毒抗血清

H5N1、H9N2 亚型病毒灭活后, 经蔗糖梯度离心纯化, 制备油佐剂免疫接种物, 免疫山羊制备抗血清, 当血清血凝抑制效价达  $2^{11}$ - $2^{12}$  时, 采血分离血清, 与空白大肠埃希氏菌感作吸附非特异性抗体, 并经冷乙醇沉淀法纯化、浓缩, 按常规滴定血凝抑制效价<sup>[7]</sup>。

### 1.4 引物设计与合成

根据已发表的 A/Ck/YN/115/2004 毒株 *na* 基因序列 (GenBank: AY651482), 设计合成引物, 上游引物 N1F: 5'-CACCATGAATCCAAATAAGAAGA-3', 下游引物 N1R: 5'-CTACTTGTC AATGGTGAATGG-3', 其中 N1F 5' 端包含定向克隆序列 CACC, 其后紧接起始密码子 ATG 携带的 NA 阅读框架, N1R 5' 端包含终止密码子互补序列 CTA。预期扩增的 *na* 基因大小为 1354bp, 编码 449 个氨基酸。T7F、T7R 引物参照试剂手册提供的序列。引物由

宝生物工程 (大连) 有限公司合成。

### 1.5 RNA 提取及 *na* 基因的扩增

采用病毒 RNA/DNA 提取试剂盒, 按操作手册自 H5N1 亚型毒株接种鸡胚收集的尿囊液中提取总 RNA。采用随机引物经反转录制备 cDNA, 采用 Pyobest<sup>TM</sup> DNA Polymerase 经 PCR 扩增 *na* 基因, *na* 基因经凝胶回收纯化、电泳定量, 确定获得 5-10 ng/ $\mu$ L DNA 的稀释度。

### 1.6 重组质粒构建和鉴定

采用定向表达试剂盒, 按操作手册将 *na* 基因克隆至 pET100/D-TOPO 质粒, 构建重组质粒。取 2  $\mu$ L 克隆反应物转化 TOP10 感受态细胞后, 涂布 Ampicilin 抗性平板过夜培养后, 挑取孤立菌落, 采用 T7F、T7R 和 T7F、N1R 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、N1R 和 N1F、T7R 引物经 PCR 鉴定重组质粒。以 T7F、T7R 为测序引物, 对所克隆的 *na* 基因进行测序。

### 1.7 表达条件优化及产物纯化

获得的阳性重组质粒, 经电泳定量确定获得 5-10 ng/ $\mu$ L 质粒 DNA 的稀释度, 取 1  $\mu$ L 转化 BL21 Star<sup>TM</sup> (DE3) 感受态细胞, 取不同 IPTG 浓度, 不同诱导时间获得的重组菌菌体裂解物, 经 SDS-PAGE 分离, 蛋白转印后, 采用抗多聚组氨酸抗体进行免疫印迹分析, 确定获得最大表达量的 IPTG 浓度及诱导时间, 并在此条件下扩大培养后, 采用凝胶切割方法纯化重组 NA。

### 1.8 重组 NA SDS-PAGE 及免疫印迹分析

取重组菌诱导前、重组菌诱导后及空白大肠埃希氏菌裂解液和纯化的重组 NA, 经 SDS-PAGE 分离, 进行蛋白染色及蛋白转印。转印膜以 H5N1 亚型病毒抗血清为检测抗体, AP 标记兔抗羊 IgG 二抗为交联剂, BCIP/NBT 为底物, 进行免疫印迹分析。

### 1.9 重组 NA ELISA 分析

重组 NA 及相同蛋白浓度的空白大肠埃希氏菌裂解液 (阴性对照), 自 1:20 倍比稀释至 1:5120, 包被 ELISA 板, 以 H5N1、H9N2 亚型病毒抗血清为检测抗体, HRP 标记兔抗羊 IgG 二抗为交联剂, OPD 为底物, 进行 ELISA 分析。

### 1.10 重组 NA 免疫原性分析

将重组 NA 经紫外定量后, 制备油佐剂免疫接种物, 免疫 6 只 BALB/c 小鼠, 初免和加强免疫剂量约为 0.8~1.2  $\mu$ g 纯化的重组 NA, 初免后的 28d、42d、49d 进行三次加强免疫, 于第 56d 采血分离血清, 采用灭活的 H5N1、H9N2 及新城疫病毒为包被

抗原, 经 ELISA 分析重组 NA 的免疫原性。

## 2 结果

### 2.1 H5N1、H9N2 亚型病毒抗血清

灭活病毒免疫动物血清经空白大肠杆菌菌体吸附、冷乙醇沉淀法纯化, 获得 H5N1、H9N2 亚型病毒抗血清, 血凝抑制效价分别为  $2^{12}$ 、 $2^{13}$ , 血凝抑制抗体不存在交叉反应。

### 2.2 na 基因扩增及定量

RT-PCR 产物经凝胶回收纯化后, 电泳检测、定量, 获得大小为 1354bp 的 na 基因片段, 与预期结果吻合, 产物浓度 80-100 ng/ $\mu$ L。

### 2.3 重组质粒构建、转化及鉴定

重组质粒转化 TOPO10 感受态细胞, 经 PCR 鉴定, 选取阳性菌落增殖培养后, 提取重组质粒。测序结果表明: na 基因在重组质粒中的克隆方向、插入位点、阅读框架无误; 其氨基酸序列与 AY651445、AF144304、AY609314、AY651476、AY651482 同源性分别为: 96.0%、97.1%、97.4%、97.8%、98.4%。与 A/Goose/Guangdong/1/96 (H5N1) (AF144304) 毒株比较, 49~68 位存在 20 个氨基酸缺失, 与当前东南亚流行的优势基因型 Z 的毒株测序结果一致。

### 2.4 表达条件优化及产物的纯化

不同诱导条件下获得的菌体裂解物免疫印迹分析结果表明: 采用 0.75mmol/L IPTG 诱导 4h 后, 重组 NA 表达量最高。免疫印迹分析纯化重组 NA, 获得大小约 53.8kDa 的蛋白带。

### 2.5 重组 NA SDS-PAGE 及免疫印迹分析

样品经 SDS-PAGE 分离, 蛋白染色后, 凝胶扫描仪分析得知重组 NA 约占细菌总蛋白的 17% (图 1)。蛋白转印后免疫印迹分析结果表明: 重组 N1 蛋白能被 H5N1 亚型病毒抗血清特异性识别 (图 2)。

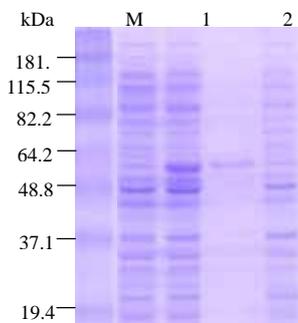


图 1 重组 NA 的 SDS-PAGE 分析

Fig. 1 Analysis of recombinant NA by SDS-PAGE

M, Prestained 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 NA; 4, Cell lysate of blank *E. coli* BL21 StarTM(DE3).

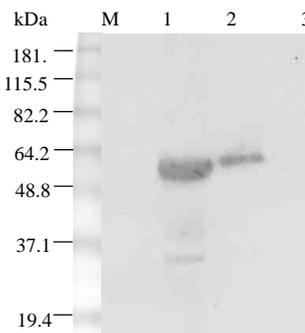


图 2 重组 NA 的免疫印迹分析

Fig.2 Analysis of recombinant NA by western blot

M, Prestained 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 NA; 4, Cell lysate of blank *E. coli* BL21 StarTM(DE3).

### 2.6 重组 NA ELISA 分析

重组 NA 及空白菌体裂解液 ELISA 分析结果表明: 重组 NA 能与 H5N1 亚型病毒抗血清发生特异性结合, 检测最高稀释度 1:2560, 而与 H9N2 亚型病毒抗血清无交叉反应 (图 3)。

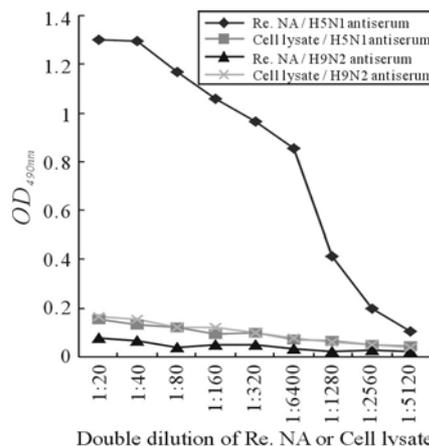


图 3 重组 NA 的 ELISA 分析

Fig. 3 Analysis of recombinant NA by ELISA

1, Re. NA/H5N1 antiserum, recombinant NA detected using antiserum against H5N1 subtype virus; 2, Cell lysate/H5N1 antiserum, blank *E. coli* cell lysate detected using antiserum against H5N1 subtype virus; 3, Re. NA/H9N2 antiserum, recombinant NA detected using antiserum against H9N2 subtype virus; 4, Cell lysate/H9N2 antiserum, blank *E. coli* cell lysate detected using antiserum against H9N2 subtype virus.

### 2.7 重组 NA 免疫原性分析

重组 NA 免疫小鼠获得的抗血清, 能与 H5N1 亚型病毒发生特异性结合, 与 H9N2 亚型和新城疫病毒检测结果比较, ELISA OD 值存在 2 倍或 2 倍以上差异, 表明重组 NA 保留或部分保留神经氨酸酶天然免疫原性。

## 3 讨论

神经氨酸酶 (NA) 是镶嵌在 A 型流感病毒双层类脂膜上的表面糖蛋白之一, 具有糖苷外切酶活性, 介导病毒对敏感细胞的侵染及协助子代病毒粒子的成熟和释放, 与病毒的宿主嗜性及毒力有关。NA 还作为一种重要的病毒表面抗原, 具有免疫原性, 其诱导产生的抗体虽然不能完全抵御强毒攻击, 但可降低机体内的病毒复制水平, 减轻临床症状<sup>[1, 4]</sup>。研究表明: 2004-2005 年东南亚流行的 H5N1 亚型禽流感病毒优势基因型为 2002 年出现的 Z 基因型, 该基因型病毒 NA 分子茎区相对源病毒 A/Goose/Guangdong/1/96(H5N1), 存在 20 个氨基酸 (49-68 位) 的缺失, 与 1997 年香港流行毒株 NA 19 个氨基酸缺失部位 (54-72 位) 不同, 但有重叠<sup>[8, 9]</sup>。2004 年云南禽流感流行毒株 A/Chicken/Yunnan/ K001/2004 (H5N1) 属于 Z 基因型, NA 也存在 20 个氨基酸 (49-68 位) 的缺失, 与 2004 年湖南、广东等国内毒株同源性 97.4% ~ 98.4%, 但与越南人体分离毒株 NA 氨基酸序列同源性 96%, 存在显著差异。目前已有克隆表达 A/Goose/Guangdong/1/96 (H5N1)、A/Swine/Inner Mongolia/547/01(H3N2) 毒株 na 基因的报道<sup>[5, 6]</sup>, 但未见对 2004 年 H5N1 亚型流行毒株 na 基因的克隆表达研究。

NA 属于糖蛋白, 其免疫原性和酶活性依赖蛋白翻译后的糖基化或部分糖基化修饰, 本研究获得的重组 NA 原核表达产物, 能与 H5N1 亚型病毒抗血清发生特异性结合, 而与 H9N2 亚型病毒抗血清无交叉反应, 且免疫动物后能诱导机体产生 H5N1 亚型特异抗体, 提示未糖基化的重组 NA, 仍具有与天然病毒 NA 相似的免疫反应性, 并保留或部分保留了天然病毒 NA 的免疫原性。猪瘟病毒囊膜结构糖蛋白 E2 研究中也发现了类似的免疫学特性<sup>[10-11]</sup>。进而考虑到原核表达系统具有简便、快速、表达量高的优点, NA 原核表达产物作为 H5N1 亚型特异性诊断抗原是可行的。

获得高纯度的重组 NA, 为禽流感病毒 N1 亚型多克隆抗体及单克隆抗体的研制, 提供了特异性的筛选抗原。为 N1 亚型特异性抗原、抗体快速诊断方法的研究, 尤其是 N1 亚型特异性抗原捕捉 ELISA 检测技术的开发, 奠定了基础。同时为进一步开展

禽流感病毒神经氨酸酶结构与功能研究及表位定位分析提供了物质条件。

## References

- [1] Gan M H (甘孟侯). Poultry Diseases in China(中国禽病学) [M]. Beijing: China Agriculture Press, 1999, 66.
- [2] 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.
- [3] List A and B Diseases of Mammals, Birds and Bees: Manual of Standards for Diagnostic Tests and Vaccines [M]. 5th ed. Office International des Epizooties, 2004.
- [4] Yin Z, Liu J H (殷震, 刘景华). Animal Virology (动物病毒学) [M]. 2nd ed. Beijing: Science Press, 1997, 711-713.
- [5] Ran D L, Shi J Z, Meng Q W (冉多量, 施建忠, 孟庆文). Expression of avian influenza virus NA gene of Pichia pastoris [J]. Chinese Journal of Veterinary Science and Technology (中国兽医科技), 2004, 34(6): 52-55.
- [6] Zhao P, Li H Y, Yang H L (赵朴, 李海燕, 杨焕良), *et al.* Cloning and expressing in the baculovirus expression system of NA gene of A/Swine/InnerMongia/547/01 isolate [J]. Chinese Journal of Preventive Veterinary Medicine (中国预防兽医学报), 2005, 27(1): 1-4.
- [7] Wang C Q (王重庆). Basic Molecular Immunology (分子免疫学基础) [M]. Beijing: Beijing University Press, 1997, 223-225. (in Chinese)
- [8] Chen H, Deng G, Li A, *et al.* The evolution of H5N1 influenza viruses in ducks in southern China[J]. Proc Nat Acad Sci USA, 2004, 101(28): 10452-10457.
- [9] Li K S, Guan Y, Wang J, *et al.* Genesis of a highly pathogenic and potentially pandemic H5N1 influenza virus in eastern Asia[J]. Nature, 2004, 430: 209-212.
- [10] Zhang F Q, Li Z H, Zhang N Z (张富强, 李志化, 张念祖). Antigenicity analysis of subdomain A1 of glycoprotein E2 of classical swine fever virus[J]. Chin J Veter Sci Technol (中国兽医科技), 2004, 34(10): 9-14.
- [11] Zhang F Q, Li Z H, Zhang N Z (张富强, 李志化, 张念祖). Expression of antigenic subdomain A1 of glycoprotein E2 of classical swine fever virus[J]. Chin J Veter med (中国兽医杂志), 2005, 41(6): 3-6.