

# 人呼吸道合胞病毒 RNA 聚合酶复合体蛋白 N、P 的 表达鉴定\*

虞结梅, 何金生\*\*, 李栋梁, 杨兵, 袁媛

(安徽医科大学免疫学教研室, 安徽合肥 230032)

## Cloning and Expression of N and P of Human Respiratory Syncytial Virus RNA Polymerase Complex

YU Jie-mei, He Jin-sheng\*\*, LI Dong-liang, YANG Bing, YUAN Yuan

(Department of Immunology, Anh.ui Medical University, Hefei 230032, China)

**Abstract:** The *n* and *p* genes from subgroup A human respiratory syncytial virus (HRSV), were amplified by RT-PCR. The *n* product was cloned into pGEM-T easy vector and that of *p* into pcDNA3.1(+) vector and the two genes were subcloned into the eukaryotic expression vector pcDNA3.1(+). The resulting recombinant plasmids pcDNA3.1(+)/N and pcDNA3.1(+)/P were checked by restriction enzymes and DNA sequencing and were transfected into COS-7 cells with the aid of Lipofectamine 2000. Expression of N and P were detected by western blots at 72 hours post transfections. Expressed N and P in COS-7 cells was confirmed by western blot. The constructed expression vectors will be used for the further reverse genetics experimentations on HRSV.

**Key words:** Human respiratory syncytial virus(HRSV); Nucleocapsid protein; Phosphoprotein; Eukaryotic expression

**摘要:** 本研究根据编码 A 亚型人呼吸道合胞病毒 (Human Respiratory Syncytial Virus, HRSV) 核壳体蛋白 (Nucleocapsid protein, N) 和磷蛋白 (phosphoprotein, P) 的基因序列, 各设计一对特异性的引物, 应用 RT-PCR 技术, 从感染 HRSV 的 HEp-2 细胞中扩增获得 *n* 和 *p* 的基因片段, 克隆至真核表达载体 pcDNA3.1(+). 获得的重组质粒通过脂质体 Lipofectamine 2000 转染 COS-7 细胞, 72 h 后再用 Western blot 鉴定蛋白的表达。结果显示真核表达载体 pcDNA3.1(+)/N 和 pcDNA3.1(+)/P 的限制性内切酶分析结果与预期一致, 基因序列分析显示没有发生无义突变, 利用蛋白印记方法也检测到了 N 和 P 的特异性条带。于是我们认为成功构建了含有 HRSV N 和 P 编码基因的真核表达载体, 在真核细胞内能顺利表达。为进一步开展 HRSV 反向遗传学等研究奠定了基础。

**关键词:** 人呼吸道合胞病毒 (HRSV); 核壳体蛋白; 磷蛋白; 真核表达

中图分类号: R392

文献标识码: A

文章编号: 1003-5125(2006)03-0213-04

HRSV 是导致婴幼儿、老年人以及免疫力低下者下呼吸道严重感染的重要病原体, 而且研究表明, HRSV 与急性气管梗阻和慢性肺部感染也有一定的关系<sup>[1]</sup>, 但至今无有效的疫苗也无特异性的防治方法。HRSV 的基因组为长约 15 kb 的不分节段负链 RNA, 编码 11 种蛋白。N 是 HRSV 核壳体蛋白, 其

分子量为 43 kDa, 修饰后为 45 kDa, 与 HRSV 的基因组 RNA 和复制中间体 RNA 紧密结合形成具有 RNA 酶抗性的核壳体, 成为 RNA 基因组转录和复制的模板; 而 P 是 HRSV 磷酸化蛋白, 分子量为 33 kDa, 作为 HRSV RNA 依赖的 RNA 聚合酶复合体的组成成分, 在 HRSV 转录和复制酶体系中发挥关键

收稿日期: 2005-10-18, 修回日期: 2006-01-16

作者简介: 虞结梅 (1982-), 女, 研究生, 研究方向为 RNA 病毒反向遗传学

通讯作者: 何金生 (1964-), 男, 教授, 研究方向为病毒基因工程疫苗。Corresponding author. Tel: 0551-5161162, E-mail: he\_jinsheng@hotmail.com

作用, N、P、L 以及 M2-1、M2-2 共同组成 HRSV RNA 依赖的 RNA 聚合酶复合体<sup>[2,3]</sup>。本文旨在构建



克隆有 HRSV *n* *p* 基因的真核表达载体并检测其在真核细胞内的表达情况。为进一步研究 *N* 和 *P* 功能以及开展 HRSV 反向遗传学研究奠定基础。

## 1 材料与方法

### 1.1 实验材料

COS-7 细胞系、人喉癌 HEp-2 细胞系及菌株 *E. coli*. DH5 $\alpha$  和质粒 pcDNA II、pcDNA3.1(+) 为本室保种；HRSV 毒种(A 亚型 Long 株)由首都儿科研究所钱渊教授惠赠；T4 DNA 连接酶、质粒提取及纯化试剂盒、PCR 片段回收纯化试剂盒、Taq 和 PfuDNA 聚合酶购自 Promega 公司；逆转录试剂盒、脂质体转染试剂盒 Lipofectamine2000 购自 Invitrogen 公司，羊抗 HRSV 的多抗购自 Chemicon 公司，鼠抗羊-HRP 购自 Santa Cruz，蛋白 marker 为 MBI 公司产品，ECL 检测试剂盒购自 Pierce 公司，硝酸纤维素膜购自 Amersham 公司。

### 1.2 PCR 引物

根据 GenBank 中公布的 HRSV *n* 和 *p* 基因编码序列，各设计一对特异性引物 N<sub>U</sub>/N<sub>D</sub> 和 P<sub>U</sub>/P<sub>D</sub>。引物由上海博亚生物工程公司合成。

N<sub>U</sub>: nt1-nt24: -5' GCTAGCATGGCTCTTAGCAAA GTC-3' , N<sub>D</sub>: nt1155-nt1176: 5' -CTCGAGTCAAAG CTCTACATCATTATCT-3' , P<sub>U</sub>: nt1-nt21: 5' -GCT AGCATGGAAAAGTTTGCTCCTGAA-3' , P<sub>D</sub>: nt700 -nt725: 5' -CTCGAGTCAGAAATCTTCAAGTGAT-AGATCAT-3' 。

### 1.3 *N*、*P* 基因的获取与载体 pcDNA II、pcDNA

#### 3.1(+ )的处理

HRSV 接种 HEp-2 细胞，提取 RNA，以总 RNA 为模板，逆转录试剂盒中的 oligo(dT) 为引物按照说明书进行反转录。再以逆转录获得的 cDNA 为模板、*N* 和 *P* 基因的特异引物、对半量的 Taq DNA 聚合酶和 Pfu DNA 聚合酶进行两份常规 PCR 扩增。PCR 产物纯化按 Promega 公司试剂盒说明书进行。将载体 pcDNA II 用 *EcoR* V 线性化，pcDNA 3.1(+ )用 *Nhe* I 和 *Xho* I 消化，无水乙醇沉淀回收。

### 1.4 目的基因与载体的连接、转化及鉴定

*n* 基因与 pGEM-T easy、*p* 基因与线性化的 pc

DNA II 进行连接，转化 *E. coli* DH5 $\alpha$ ，通过蓝白筛选，选取疑似的阳性克隆，提取质粒后两者均用 *Xho* I 和 *Nhe* I 进行酶切鉴定。质粒命名为 pGEM-T/ *N* 和 pcDNA II/ *P*。上海博亚公司完成测序。测序正确后，用 *Xho* I、*Nhe* I 消化两种质粒以获得 *N* 和 *P* 基因，回收 *n* 和 *p*，再分别将 *n* 和 *p* 与经 *Xho* I 和 *Nhe* I 酶切处理的 pcDNA3.1(+ )载体进行连接，转化，小提质粒，用 *Xho* I 和 *Nhe* I 酶切鉴定。获得的重组体命名为 pcDNA3.1(+ )/*N* 和 pcDNA3.1(+ )/*P*。

### 1.5 转染

QIAGEN 公司中提试剂盒提取 pcDNA3.1(+ )/*N* 和 pcDNA3.1(+ )/*P* 质粒。DMEM 常规培养 COS-7 细胞，待细胞生长至 80%~90% 时用脂质体 Lipofectamine 2000 按说明书进行转染。

### 1.6 目的蛋白的检测

转染 72 h 后收集细胞于 10 mL 离心管，离心，在细胞中加入 100  $\mu$ L 细胞裂解液，制备样品的具体方法见参考文献<sup>[4]</sup>。用正常培养的 COS-7 细胞作为阴性对照，以 HRSV 感染的 HEp-2 细胞为阳性对照进行 SDS-PAGE 电泳，转膜，封闭，用羊抗 HRSV 多抗孵育 2 h，洗涤 3 次，再用鼠抗羊-HRP 孵育 1 h，洗涤 3 次，在暗室中按 ECL 试剂盒对 X 光片进行曝光。

## 2 结果

### 2.1 目的基因的克隆和鉴定

以总 RNA 逆转录的 cDNA 为模板，分别扩增获得 PCR 产物，分子量大约为 1176 bp 和 750 bp。用 *Nhe* I 和 *Xho* I 酶切鉴定 pGEM-T/ *N* 和 pcDNA II/ *P*，切下约 1176 bp/3.0 kb 和 750 bp/3.0 kb 两组片段，带型和分子量与预期值相符（图 1）。

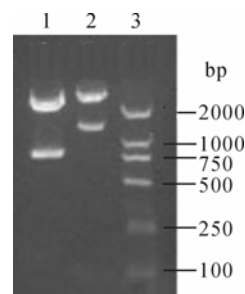


图 1 pGEM-T/*N* 和 pcDNA II/*P* 酶切鉴定

Fig.1 Identification of pGEM-T/*N* and pcDNA II/*P*

1. pcDNA II/*P* digested by *Xho* I and *Nhe* I; 2. pGEM-T/*N* digested by *Xho* I and *Nhe* I; 3. DL2000 marker

经核酸序列分析并与 GenBank 中收录的 HRSV N 和 P 基因进行碱基比较, N 有 3 个碱基发生突变, 进一步的氨基酸分析表明, 这三个突变均形成错义突变, 但未发现无义突变, 而 P 没有任何碱基发生突变。

*Xho* I 和 *Nhe* I 双酶切鉴定 pcDNA3.1(+)/N 和 pcDNA3.1(+)/P 质粒, 切下约 1176 bp/5.0 kb 和 750 bp/5.0 kb 两组片段, 带型和分子量与预期值相符

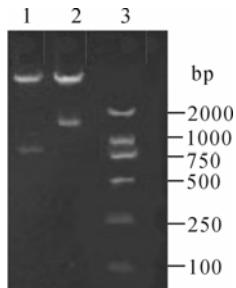


图 2 pcDNA3.1(+)/N 与 pcDNA3.1(+)/P 的酶切鉴定

Fig.2 Identification of pcDNA3.1(+)/N and pcDNA3.1(+)/P  
1. pcDNA3.1 (+)/P digested by *Xho* I and *Nhe* I; 2. pcDNA3.1 (+)/N digested by *Xho* I and *Nhe* I; 3. DL2000 marker

(图 2)。

## 2.2 Western blot 检测目的基因表达

用 pcDNA3.1(+)/N 和 pcDNA3.1(+)/P 分别转染 COS-7 细胞 72 h 后, 收获细胞, 行 SDS-PAGE、转膜, 用羊抗 HRSV 多克隆抗体进行 Western blot 以检测表达产物。第 4 泳道是 COS-7 的阴性对照, 没有观察到任何条带, 第 2 泳道为 HRSV 感染 HEp-2 细胞的 阳性对照, 出现 HRSV 的多个蛋白条带, 第 1、3 泳道为 pcDNA3.1(+)/P 和 pcDNA 3.1(+)/N 转染 COS-7 的实验组, 各观察到 1 条特异的蛋白条带, 根据电泳的位置, 其分子量分别约为 33 KDa 和 43 KDa, 与预期大小相一致, 同时在作为阳性对照的第 3 泳道中也发现与其分子量一致的蛋白条带 (图 3)。

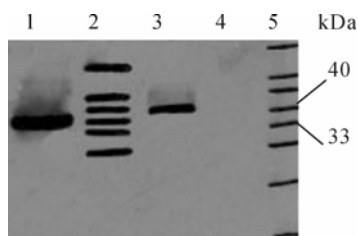


图 3 pcDNA3.1(+)/N 和 pcDNA3.1(+)/P 表达产物的分析

Fig. 3 Western blot analysis of HRSV N and P

1, COS-7 cells transfected by pcDNA3.1 (+)/P; 2, HEp-2 cell infected by HRSV (positive control); 3, COS-7 cells transfected by pcDNA3.1 (+)/N; 4, Normal COS-7 cells (negative control); 5, Protein marker.

## 3 讨论

HRSV 是世界范围内婴幼儿病毒性下呼吸道感染最主要的病毒病原, Morros 等于 1956 年首次从患普通感冒症状的黑猩猩鼻液中分离成功。HRSV 共表达 11 种蛋白质, 其中的 N、L 和 P 是 HRSV RNA 的转录和复制的必须成分, 与 HRSV RNA 转录进行性因子及转录终止抑制因子 M2-1 和复制/转录调节因子 M2-2 进一步组成依赖 RNA 的 RNA 聚合酶复合体, 可完成 HRSV RNA 合成的全过程<sup>[3,5]</sup>。

N 蛋白的主要功能是与病毒的 RNA 结合形成核壳体, 防止 RNA 被 RNA 酶降解, 但是这种结合是非特异性的, 如它可与细胞 RNA 结合, 也可形成核壳体样结构。只有通过与 HRSV 的 P 蛋白形成可溶性复合物才能阻止 N 蛋白与细胞 RNA 的这种非特异性结合。研究表明, N 蛋白与 RNA 的结合是由氨基端的 1-92 个氨基酸介导的, 而与 P 蛋白的结合则主要是通过其羧基端完成的<sup>[3, 6~9]</sup>。P 即高度磷酸化的蛋白, 由 241 个氨基酸组成, 分别在 116, 117, 119 以及 232 和 237 位的 Ser 上发生磷酸化<sup>[10]</sup>。根据近期有关 HRSV 以及副粘病毒的研究资料, 在 HRSV RNA 合成过程中, 推测 P 的功能主要为: 作为辅助因子稳定 L 同时引导聚合酶复合体与 N:RNA 模板结合; 作为 N 的伴侣蛋白可阻止 N 与细胞 RNAs 的非特异性结合, 使 N 与 HRSV RNA 特异性结合, 完成病毒基因组的衣壳化 (encapsidation) 过程<sup>[3, 5]</sup>。有研究发现, HRSV P 是激发细胞免疫应答的有效靶抗原, 可作为基因工程疫苗的候选抗原<sup>[11]</sup>。

## References

- [1] Chavez-Bueno S, Mejias A, Gomez A M, *et al.* Respiratory syncytial virus-induced acute and chronic airway disease is independent of genetic background: An experimental murine model [J]. *J Virol.* 2005, 2(1): 46.
- [2] Collins P L, Chanock R M, Murphy B R. Respiratory Syncytial Virus [A]. Knipe D M, Howley P M. (Eds) *Fidelds Virology [M]*. 4<sup>th</sup> ed, Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia. ISBN 0781718325. 2001, 1443-1485.
- [3] Castagne N, Barbier A, Bernard J, *et al.* Biochemical characterization of the respiratory syncytial virus P-P and P-N protein complexes and localization of the P protein oligomerization domain [J]. *J Gen Virol.* 2004, 85 (6): 1643-1653.
- [4] Suinters A, Fernandez de Mattos S, Stahl M, *et al.* FoxO3a

- transcriptional regulation of Bim controls apoptosis in paclitaxel-treated breast cancer cell lines [J]. *J Biol Chem*. 2003, 278(50): 49795-49805.
- [5] Lu B, Ma C H, Brazas R, *et al*. The major phosphorylation sites of the respiratory syncytial virus phosphoprotein are dispensable for virus replication in vitro [J]. *J Virol*. 2002, 76(21): 10776-10784.
- [6] Meric C, Spehner D, Mazarin V. Respiratory syncytial virus nucleocapsid protein (N) expressed in insect cells forms nucleocapsid-like structures [J]. *Virus Res*. 1994, 31 (2) : 187-201.
- [7] Murphy L B, Loney C, Murray J, *et al*. Investigations into the amino-terminal domain of the respiratory syncytial virus nucleocapsid protein reveal elements important for nucleocapsid formation and interaction with the phosphoprotein [J]. *Virology*. 2003, 307 (1) : 143-153.
- [8] Stokes H L, Easton A J, Marriott A C. Chimeric pneumovirus nucleocapsid (N) proteins allow identification of amino acids essential for the function of the respiratory syncytial virus N protein [J]. *J Gen Virol*, 2003, 84 (pt10) : 2679-2683.
- [9] Murray J, Loney C, Murphy L B, *et al*. Characterization of monoclonal antibodies raised against recombinant respiratory syncytial virus nucleocapsid (N) protein: identification of a region in the carboxy terminus of N involved in the interaction with P protein [J]. *Virol*, 2001, 289(2): 252-261.
- [10] Asenjo A, Rodriguez L, Villanueva N. Determination of phosphorylated residues from human respiratory syncytial virus P protein that are dynamically dephosphorylated by cellular phosphates: a possible role for serine 54 [J]. *J Gen Virol*, 2005, 86(Pt 4): 1109-1120.
- [11] Kumar M, Behera A K, Lockey R F, *et al*. Intranasal gene transfer by chitosan-DNA nanospheres protects BALB/c mice against acute respiratory syncytial virus infection [J]. *Hum Gene Ther*, 2002, 13 (12): 1415-1425.

## 《中国病毒学》英文版稿约

《中国病毒学》英文版 (*Virologica Sinica*) 是由中国科学院主管、中国科学院武汉病毒研究所和中国微生物学会共同主办、国内外公开发行的学术性双月刊。国际刊号仍为: ISSN 1003-5125, 国内刊号变更为 CN42-1760/Q。原《中国病毒学》中文版 (ISSN 1003-5125, CN 42-1295/Q) 为中国科学引文数据库和中国科技信息所《中国科技论文统计与分析》的统计源期刊, 同时加入了《中国学术期刊 (光盘版)》和“中国期刊网”、“中国科技信息网”, 被著名文摘 CA (化学文摘)、BA (生物学文摘) 等国内外 20 余种文摘刊物和数据库收录。主要刊载病毒学及各分支学科具有较高学术水平的原始研究论文, 以及病毒学研究的新技术、新方法, 酌登综合评论和研究简报。本刊热忱欢迎作者惠赐英文文稿。

### 1 来稿要求和注意事项

1.1 本刊今年 6 月开始接收英文稿件, 作者请登陆本刊网站: <http://www.virol.cn>。按照投稿指南撰写文稿、通过网站传递电子文稿, 国内作者需同时提供中文文题、作者、单位、摘要等信息以便审查。为避免提交失误, 请另将文稿的印刷稿和作者单位介绍信通过邮局寄送编辑部。

1.2 本刊已加入《中国学术期刊 (光盘版)》和“中国期刊网”、“中国科技信息网”。作者如不同意将文章编入光盘版和网上数据库, 请在投稿时声明, 否则视为同意。

1.3 本刊将通过电子邮件将评审和修改意见通知作者。作者应在 2 周内将修改后的电子稿件返回, 逾期寄回的作新收稿处理。本刊将按稿件的收稿日期排队逐期发表。

1.4 文稿经终审通过后, 编辑部将及时在网站公布, 请作者留意。不拟采用的稿件编辑部将通知作者, 稿件不退还, 请自留底稿。

### 2 英文版文章撰写格式

**Title:** 题名一般不要超过 25 个字, 凡获基金资助课题应在题名右上角标注“\*”。

**Authors:** 中文作者要用汉语拼音 (姓氏字母全部大写置后, 双名的前名首字母大写、后名全部小写, 两名中间加“-”符隔开, 姓名均不缩写。如: Da-ming WANG), 国外作者遵从所在国习俗。不同工作单位的作者应在作者右上角标注序号以示区别, 通讯 (责任) 作者右上角同时标注“\*\*”。如第一作者为在读学生, 应将导师注明为通讯作者。

**Affiliations:** 作者的工作单位序号 (应与作者标注序号相同)、全称、所在省市、邮编、国名。

**Abstract:** 摘要应简要介绍本文的目的意义、主要方法、结果及结论, 应有独立性和自含性, 一气呵成,

不分段, 不另列小标题, 不附图表, 不用非公知公用符号、略写语。

**Key words:** 3-5 词组, 词组间用“;”隔开, 单词首字母大写。

**CLC number (中图分类号):** Document code (文献标识码): Article ID (文章编号): (内容由本刊填写)

(下转第 272 页)