

禽流感病毒 H5N1 亚型 HA 基因表达及其产物的应用

郑其升¹, 毕志香², 曹瑞兵¹, 周斌¹, 李鹏¹, 陈溥言^{1**}

(1.南京农业大学农业部动物疫病诊断与免疫重点开放实验室, 江苏南京 210095, 山东畜牧兽医职业技术学院, 山东潍坊 262100)

Correcting a Mutant HA Gene of the Avian Influenza Virus (AIV) H5N1

Subtype by SOE and the High Expression of the Corrected Gene

in *E.coli* and It's Application

ZHENG Qi-sheng¹, BI Zhi-xiang², CAO Rui-bing¹, ZHOU Bin¹, LI Peng¹, CHEN Pu-yan^{1**}

(1.Key Laboratory of Animal Disease Diagnosis and Immunology, Nanjing Agricultural University, Nanjing 210095, China; 2. Shandong Animal Science and Veterinary Vocational College, Weifang 262100, China)

Abstract: Using a pair of specific primers designed according to the relevant nucleotide sequence from GenBank (Accession number: DQ023145), the HA gene of AIV H5N1 subtype with the signal peptide sequence was obtained by PCR from the recombinant plasmid pUC-HA, which contains the full length of HA gene. Sequence analysis showed that a single base, an A, was replaced by aT to generate a stop codon (TAA) at position 967 of HA gene. Splicing by overlap extension (SOE) method was applied to correct this mutation with two overlapped mutation primers P3 and P4, and then the correct HA gene was inserted into the expression vector pET-32a (+) to generate the recombinant plasmid pET-HA-2. The target gene was successfully expressed in the host cell *E.coli* BL21(DE3) in inclusion bodies when induced with 1.0 mmol/L IPTG. Western-blot analysis proved that the recombinant protein had good immunoreactivity to positive serum of H5 subtype AIV. With this recombinant HA protein, an indirect ELISA method (iHA-ELISA) to detect antibodies of H5 subtype AIV was established. Interestingly, this iHA-ELISA could distinguish H5 positive serum from that of H7 and H9 subtypes. This results provide baseline for the investigating new vaccine and the development of new method to detect AIV.

Keywords: Avian Influenza Virus (AIV) H₅N₁ subtype; HA gene; Sited mutation; Expression

摘要: 根据 GenBank 公布的禽流感病毒 H5N1 亚型血凝素基因 (HA) (GenBank: DQ023145) 序列设计一对引物 P1、P2, 以重组质粒 pUC-HA 为模板扩增去除信号肽的 HA 成熟蛋白。PCR 产物克隆入 pMD18-T 载体, 经测序发现在 967 位 A 突变为 T, 形成一个终止密码子 TAA。在突变位点附近设计两条有 21 个碱基配对的突变引物 P3、P4, 采用重叠延伸剪切法 (SOE) 用 A 定点替换 T 碱基, 然后将正确的基因片段定向插入到表达载体 pET-32a (+) 中, 诱导表达获得正确的表达产物。Western-blot 分析表明, 表达的重组蛋白能与经 BL21(DE3) 大肠杆菌菌体裂解液处理的 H5 亚型禽流感病毒阳性抗血清发生特异性反应。利用纯化的重组 HA 蛋白初步建立了检测 H5 亚型禽流感病毒抗体的间接 ELISA 方法, 该方法可以代替传统的血凝与血凝抑制方法用于区分禽流感病毒的血清亚型。本研究为禽流感病毒亚单位疫苗及新型诊断试剂盒的研究奠定了基础。

关键词: H5N1 亚型禽流感病毒、HA 基因、定点突变、表达

中图分类号: S852.65

文献标志码: A

文章编号: 1003-5125(2006)06-0560-05

收稿日期: 2006-04-28, 修回日期: 2006-09-06

作者简介: 郑其升 (1979-) 男, 山东省籍, 在读博士研究生

** 通讯作者: 陈溥言 (1942-) 男, 江苏南京籍, 教授, 博士生导师, 从事动物分子病毒学及免疫学方面的研究。

Corresponding author. Tel: 025-84396028, E-mail: aid@njau.edu.cn

禽流感(Avian Influenza, A I) 是由 A 型流感病毒引起的一种禽类疾病综合征, 严重危害畜牧业发展和人类健康, 被国际兽疫局确定为 A 类烈性传染病, 并被列入国际生物武器公约动物传染病名单^[1,2]。目前用于检测鸡体内禽流感病毒抗体水平的主要方法有血凝与血凝抑制、琼脂扩散试验以及 ELISA 方法等^[3,4], 但是这些方法所采用的抗原大都来自于经纯化、浓缩的完整的病毒, 获得该抗原存在的问题是: 完整病毒不易生产、纯化、成本较高, 且存在感染人和向环境中散毒的潜在危险, 在应用中存在局限性^[5]。为了研究重组 HA 蛋白作为 ELISA 诊断抗原的可行性, 我们用常规方法构建了 H5N1 亚型禽流感病毒 HA 的重组质粒, 但测序结果显示在扩增产物的 967 为发生终止突变, 于是采用重叠延伸剪切法, 获得了正确的 HA 基因片段。矫正后的 HA 基因能正确表达, 表达产物能够与 H5N1 亚型 AIV 阳性血清反应。利用纯化的表达产物初步建立了可用于检测 H5 亚型 AIV 抗体以及用于区分 AIV 血清亚型的间接 ELISA 方法。

1 材料与方 法

1.1 材 料

重组质粒 pUC-HA 为本室自行构建, 该质粒系将编码 AIV 完整的血凝素基因克隆到 pMD18-T 载体中; 大肠杆菌 DH5 α 、BL21、原核表达载体 pET-32a (+) 为本组保存; H5、H7、H9 亚型 AIV 阳性血清由哈尔滨兽医研究所研制, 辣根过氧化物酶标记的兔抗鸡 IgY 抗体购自 promaga 公司; DAB 显色试剂盒购自南京生工生物工程有限公司; His•Bind[®] Ni²⁺-NTA Purification Kit 为 Novagen 公司产品; 限制性内切酶 BamH I、Hind III 和 T₄ DNA 连接酶、Probest TaqDNA 聚合酶、LA Taq DNA 聚合酶等工具酶以及 pMD18-T 载体均购自大连宝生物工程有限公司; 其余试剂均为分析纯。

1.2 引物设计

P1、P2 是参照 GenBank 公布的 H5N1 亚型 AIV HA 基因 (登录号: DQ023145) 的核苷酸序列, 自行设计的一对引物, 覆盖了除信号肽基因外的全长 HA 基因, 在引物的 5' 端加入了 BamH I 和 Hind III 酶切位点(划线部位); 引物 P3、P4 是根据质粒的测序结果, 针对突变位点设计的一对突变引物, 将突变为 T 的碱基改为 A (黑色斜体表示), 两条突变引物 5' 端有 21 个碱基相互配对。引物序列如下, 均由大连宝生物生物工程公司合成。

P1: 5'-GAGGATCCATGGAGAGAATAGTGC-3'

P2: 5'-TAAAGCTTGGCAATGCAAATTCTGCAT-3'

P3: 5'-TGATTTACATATTTGGGGCATTCCC-3'

P4: 5'-TGCCCCAAATATGTGAAATCAAACAGA-3'

1.3 禽流感病毒 H5N1 亚型 HA 基因重组质粒的构建

利用引物 P1、P2, 以重组质粒 pUC-HA 为模板进行 PCR 扩增, 得到预期大小的产物。将其克隆到 pMD18-T 载体中, 连接产物转化后提取质粒用 BamH I、Hind III 双酶切鉴定。阳性克隆送交大连宝生物工程有限公司进行序列测定, 结果显示扩增产物的 967 位碱基由 A 突变为 T, 形成一个终止密码子 (TAA)。

1.4 利用 SOE 法定点突变获得目的基因

以上述测序的重组 pMD-HA 质粒为模板, 分别以引物 P1、P3 和 P2、P4 进行 PCR 扩增, 95℃ 预变性 5min 后, 循环条件均为 94℃ 1min, 55.5℃ 1min, 72℃ 1min, 30 个循环, PCR 产物经 1% 琼脂糖电泳鉴定后, 用胶回收试剂盒分别回收 980bp 和 764bp 的目的片段。再以上述两回收产物为模板, 以 P1、P4 为上下游引物, 进行 PCR 扩增, 扩增条件为 95℃ 预变性 5min, 然后 94℃ 1min, 57℃ 1min, 72℃ 2min, 30 个循环。所得产物即为矫正后 HA 基因, 命名为 HA-2。用胶回收试剂盒回收 HA-2 片段, 克隆入 pMD18-T 载体, 连接产物转化感受态大肠杆菌 DH5 α , 挑取单个菌落培养后, 碱裂解法提取质粒用 BamH I、Hind III 酶切鉴定, 阳性克隆命名为 pMD-HA-2, 送交大连宝生物公司进行序列测定。

1.5 表达质粒的构建与鉴定

从 pMD-HA-2 中用 BamH I、Hind III 酶切获得 HA-2 片段, 克隆入 pET-32a(+) BamH I -Hind III 位点之间。转化连接产物, 挑取单个菌落, 碱裂解法提取质粒, 用 BamH I、Hind III 双酶切鉴定, 阳性克隆命名为 pET-HA-2。

1.6 重组质粒的诱导表达

将已构建的含 pET-HA-2 的 BL21 菌液按 1:100 的比例加入含有 Amp (50 μ g/mL) 的 LB 液体培养基中, 37℃ 振荡培养 2 h 左右至 OD 值 0.4-0.6, 加入 IPTG 至终浓度 1.0 mmol/L, 转移至 30℃ 继续振荡培养 3-4h, 取出 1mL 菌液, 12 000r/min 离心 30s, 弃上清, 沉淀重悬于 100 μ L 1 \times SDS-PAGE 凝胶电泳上样缓冲液中, 100℃ 变性 5min, 进行 SDS-PAGE 电泳。

1.7 表达产物的纯化及 Western-blot 分析

重组蛋白的纯化按照 His•Bind[®] Ni²⁺-NTA Purification Kit 说明书进行; Western-blot 分析以纯

化的重组 HA 蛋白为抗原,分别以鸡抗 H5 亚型 AIV 阳性血清与辣根过氧化物酶标记的兔抗鸡 IgY 为一抗和二抗,按文献^[6]介绍方法进行。

1.8 iHA-ELISA 检测方法的初步建立

根据文献^[8]介绍方法进行间接 ELISA 方阵滴定,确定抗原最佳包被量与抗体的最适稀释度。将纯化的重组 HA 蛋白从 1:10 开始倍比稀释后包被聚苯乙烯微量反应板, H5 亚型 AIV 阳性血清从 1:20 开始倍比稀释,同时设置 SPF 鸡血清对照和空白对照,按 ELISA 程序进行方阵滴定,选择 OD_{490} 值接近 1.0 的孔计算抗原的最佳包被量与抗体的最适稀释度。

1.9 iHA-ELISA 方法的特异性试验

根据方阵滴定的结果,将纯化的重组蛋白用抗原包被液稀释到 $30.5\mu\text{g}/\text{mL}$,将 H5 亚型、H7 亚型、H9 亚型 AIV 阳性血清和 SPF 鸡血清做 1:20 开始做倍比稀释,同时设空白对照,按常规方法做间接 ELISA,OPD 显色,重复 3 次,取平均值比较结果。

1.10 抗原保存期及 iHA-ELISA 试验重复性的鉴定

将制备重组 HA 抗原的存放于 4°C ,每隔 1 月取出与 H5 亚型 AIV 阳性血清做间接 ELISA 试验,以确定 HA 抗原的保存期;用同一批抗原对同一份 H5 亚型 AIV 阳性血清检测 3 次,以鉴定间接 ELISA 试验的批内重复性,利用不同批次制备的抗原对同一份阳性血清检测 3 次,比较试验结果,以鉴定 iHA-ELISA 试验的批间重复性。

2 结果

2.1 采用 SOE 法的 PCR 扩增与克隆结果

首轮 PCR 扩增得到大小分别为 980bp (P1、P3) 和 764bp (P2、P4) 的特异性片段,第二轮 PCR 得到预期大小 1723bp (P1、P4) 的目的基因(图 1);目的基因克隆入 pMD18-T 载体后,经 *Bam*H I、*Hind*III 双酶切鉴定,得到矫正后的重组质粒,命名为 pMD-HA-2,送交大连宝生物工程有限公司进行序列测定。

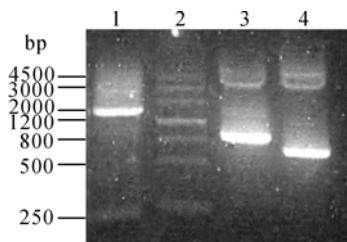


图 1 PCR 产物电泳鉴定结果

Fig.1 Identification of the PCR product

1, The amplified 1723 bp fragment by P1 and P4; 2, DNA L marker; 3, The amplified 980 bp upstream fragment; 4, The amplified 764 bp downstream fragment.

2.2 矫正后 HA 基因序列分析

应用分析软件 DNASTar 对矫正后测序结果进行分析,结果显示 967 位的碱基由 T 恢复为 A。矫正后的序列与 GenBank 中发表的禽流感病毒 H5N1 亚型 HA 基因 (Genbank: DQ023145) 核苷酸序列同源率为 99%,氨基酸同源率为 100%(数据未显示)。

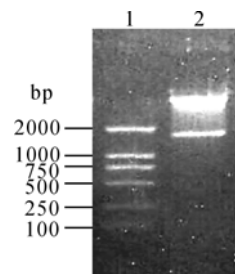


图 2 重组质粒 pET-HA-2 鉴定

Fig.2 Identification of recombinant plasmid pET-HA-2
1, DNA marker; 2, Recombinant plasmid pET-HA-2 digested by *Bam*H I and *Hind*III.

2.3 重组表达质粒 pET-HA-2 的鉴定

从 pMD-HA-2 中用 *Bam*H I、*Hind*III 酶切获得矫正后的 HA 片段,克隆入 pET-32a (+),用 *Bam*H I、*Hind* III 双酶切鉴定,阳性克隆命名为 pET-HA-2,如图 2 所示,酶切产物电泳后出现一大一小两个片段,其中小片段与目的基因片段大小一致,表明重组质粒已构建成功。

2.4 重组蛋白的诱导表达结果

pET-HA-2/BL21 经诱导后,可以发现在约 70kDa 处有一特异的重组蛋白质条带和预期结果一致,如图 3,而空载体对照 pET-32 (a)+/BL21 在相应部位没有明显的蛋白质条带。

2.5 重组蛋白的 Western-blot 分析

对表达产物进行 Western-blot 分析,结果与 H5N1 亚型 AIV 阳性血清呈现阳性反应(图 4),且无非特异性条带出现,证明表达产物抗原性较好。

2.6 iHA-ELISA 方阵滴定结果

根据 iHA-ELISA 方阵滴定的结果,将抗原的最适包被浓度定为 $30.5\mu\text{g}/\text{mL}$ 、血清最适稀释度为 1:80,阳性样品的判定标准定为: $OD_{\text{待检血清}} > 0.5$,且 $OD_{\text{待检血清}}/OD_{\text{阴性血清}} > 2.0$ 。

2.7 iHA-ELISA 特异性试验结果

利用 iHA-ELISA 检测 H5、H7、H9 亚型禽流感病毒阳性血清,同时设置 SPF 鸡血清对照与空白对照,结果(表 2)显示,重组蛋白抗原不但可以明显的区分 H5 亚型 AIV 阳性血清和 SPF 鸡血清,而且可以区分 H5 亚型 AIV 阳性血清与 H7、H9 亚

型 AIV 的阳性血清。H5 亚型 AIV 阳性血清与 SPF 鸡血清的 OD₄₉₀ 值之比远大于 2.0, 而其余两个亚型表明此重组抗原不仅可以检测鸡血清中 H5 亚型 AIV 抗体水平的高低, 而且可以作为 AIV 诊断区分亚型的抗原。

2.8 重复性试验和保质期试验结果

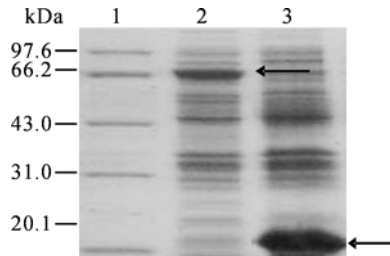


图3 SDS-PAGE 电泳分析表达产物

Fig.3 SDS-PAGE analysis for the expression products
1. Protein marker; 2. pET-HA-2 /BL21 induced with IPTG; 3. pET-32a (+)/BL21 induced with IPTG.

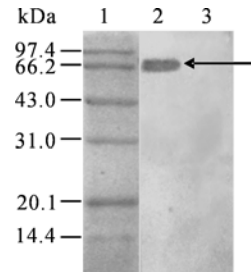


图4 表达产物的免疫印迹分析

Fig.4 Analysis of the expressed product by Western-blot
1. Protein marker; 2. pET-HA-2 fusion protein; 3. pET-32a (+).

表1 间接 ELISA 方阵滴定结果

Table 1 Result of the indirect ELISA checkboard titration

	1	2	3	4	5	6	7	8	SD
A	1.896	1.761	1.638	1.555	1.390	1.277	1.181	1.125	1:20
B	1.771	1.329	1.321	1.296	1.462	1.675	1.504	1.572	1:40
C	1.523	1.497	1.312	1.202	1.127	1.089	1.009	0.812	1:80
D	1.127	1.253	1.317	1.159	1.053	0.896	0.833	0.555	1:160
E	0.886	0.770	0.552	0.335	0.262	0.164	0.147	0.110	1:320
F	0.202	0.146	0.151	0.139	0.118	0.087	0.081	0.074	1:640
G	0.111	0.101	0.102	0.144	0.086	0.081	0.072	0.067	1:1280
H	0.100	0.087	0.088	0.092	0.069	0.072	0.053	0.012	1:2560
I	0.083	0.057							
AD	1:10	1:20	1:40	1:80	1:160	1:320	1:640	1:1280	

Note: The plate holes from A₁ to H₈ are positive phalanx titrimetry, I₁ is negative contrast, I₂ is blank contrast; AD and SD indicate the diluting measure of the antigen and serum respectively

表2 重组蛋白与常见亚型禽流感病毒阳性血清反应的 ELISA 结果

Table2 Result for the recombinant protein reacts with positive serum of other subtype AIV

SD	1:20	1:40	1:80	1:160	1:320	1:640	1:1280	1:2560
A	1.477	1.497	1.402	1.371	1.312	1.199	0.928	0.812
B	0.112	0.095	0.086	0.103	0.123	0.116	0.086	0.075
C	0.110	0.097	0.088	0.109	0.116	0.098	0.086	0.079
D	0.087	0.067	0.067	0.058	0.059	0.058	0.058	0.053
E	0.054							

Note: The plate holes from A to C are H9, H5 and H7 subtype positive serum of AIV diluted from 1:20 to 1:2560; hole D is negative control; hole E is blank contrast; SD indicates the diluting measure of the serum

3 讨论

本研究采用SOE法进行PCR扩增, 成功地获得了正确基因。较之重新进行RT-PCR克隆H5N1 AIV HA基因, SOE法更加简便、快速、安全, 且不需要昂贵的反转录试剂, 是一种切实可行的方法^[7]。将获得的重组菌株进行诱导表达, 得到预期大小的蛋白条带。采用超声波破碎菌体, 尿素溶解包涵体并通过Ni²⁺ 亲和层析等方法, 得到了纯度较高的重组HA蛋白。

(H7、H9) 的阳性血清与 SPF 鸡血清 OD₄₉₀ 值之比小于 2.0。

批内重复试验表明两次检测的结果基本一致, 说明重组HA蛋白具有较好的稳定性, 批间重复试验结果证明HA抗原的制备工艺是稳定的。制备的两批重组HA蛋白抗原在4℃下至少可保存6个月。

研究表明, HA大约有550个氨基酸, 是病毒表面主要糖蛋白之一, 以三聚体形式存在于囊膜表面, 在病毒吸附、穿膜以及决定病毒的宿主特异性和致病力方面均起着相当关键的作用, HA是AIV诱生保护性免疫的主要抗原, 它不仅可以诱导特异性中和抗体的产生, 而且还可以刺激机体产生细胞毒性T淋巴细胞(CTL) 反应^[8]。所以, 用重组AIV HA蛋白检测到的抗体能代表保护性抗体水平的高低。

重组HA蛋白以包涵体的形式表达, 包涵体主要由重组蛋白构成, 这给目的蛋白纯化提供了方

便。本试验获得的重组蛋白主要用于抗体水平的检测,因此,重组蛋白与H5型AIV抗血清的反应能力好坏就成为重组蛋白是否具有应用前景的重要依据。在Western-blot中,重组蛋白经过SDS-PAGE,再经电转移转印到NC膜上后,已经处于变性状态,仍然具有与H5亚型AIV抗血清反应的能力,这表明该重组蛋白表现了很强的反应原性,为建立以重组HA蛋白为抗原的间接ELISA方法奠定了基础。

目前在禽流感的诊断中,主要利用HA/HI方法来区分AIV血清亚型。这种传统的检测方法多为全病毒操作,存在感染人和散毒的危险,而且禽流感为国家规定的A类传染病,这给病毒的增殖带来了困难,而且全病毒抗原的制备过程繁琐,缺少标准化。本研究利用重组HA蛋白作为抗原建立的可以区分AIV血清亚型的iHA-ELISA方法与HA/HI相比具有生物安全性高、便于推广的优点。此外,ELISA 检测法比较灵敏,而且结果也较为可靠。因此,利用基因工程方法表达的重组HA 蛋白作为诊断抗原建立的间接ELISA 方法可望代替HA/HI方法用于AIV 的保护性抗体水平检测及血清亚型的鉴定。

References

- [1] Gan M H (甘孟侯). Avian Influenza (禽流感) [M]. Beijing: China Agricultural Press, 2002.
- [2] Jiang Y P, Zhang H B, Li C J (姜永萍, 张洪波, 李呈军) *et al.* Increased expression and immunogenicity of optimized H5 subtype avian influenza HA gene containing chicken basic codons [J]. Immunol J (免疫学杂志), 2005, 21(9): 377-381.
- [3] Xue J S (薛景山). Laboratory diagnostic methods for Avian Influenza [J]. Chin J Vete Sci Technol (中国兽医科技), 1998, 28 (9): 41-42.
- [4] Zhou E M, Chan M, Heckert R G. Evaluation of a competitive ELISA for detection of antibodies against avian influenza virus nucleoprotein [J]. Avian Dis, 1998, 42: 17-522.
- [5] Zheng Q S, Liu H L, Zhang X Y (郑其升, 刘华雷, 张晓勇) *et al.* Prokaryotic Expression and the Establishment of a Putative Indirect ELISA Assay for the HA Gene of Avian Influenza Virus H9N2 subtype [J]. Virologica Sinica (中国病毒学), 2005, 20 (3): 293-297.
- [6] Jin D Y, Meng L F (金冬雁, 孟黎枫), Molecular cloning: A laboratory Manual (分子克隆—实验指南) [M] 2nd ed, Beijing: Science Press, 1993. (in China)
- [7] Li C H, Li X R, Wei X F (李春华, 李祥瑞, 魏晓峰) *et al.* Mutant site correction of bovine IL-2 cDNA by SOE and the biological activity of its expressed product of bovine IL-2 cDNA [J]. J Nanjing Agric Univ (南京农业大学学报), 2003, 26 (4) : 86-89.
- [8] Suarez D L, Schutz-Cherry S. Immunology of influenza virus: a review [J]. Developmental and Comparative Immunology, 2000, 24: 269-283.

《中国病毒学(英文版)》征订启事

《中国病毒学》是由中国科学院武汉病毒研究所和中国微生物学会共同主办,科学出版社出版的学术期刊。办刊宗旨是:面向国民经济建设,加强国内外的学术交流,促进我国病毒科学研究事业的发展。其中文版为国内生物学核心期刊,被国内外多家文摘刊物和数据库收录。本刊主要报道病毒学领域国内科研工作进展及国际最新科技动态。刊登内容:昆虫病毒、医学病毒、动物病毒、植物病毒、噬菌体和亚病毒方面的理论和应用研究成果,栏目有:研究报告、综述、简报、动态、及新技术方法和新产品的介绍。读者对象为从事病毒学等相关领域的教学、科研、应用开发人员。

经国家新闻出版署批准,《中国病毒学》2007年出版语种变更为英文,外文刊名仍为《Virologica Sinica》双月刊,全年6期。刊号:ISSN1003-5125, CN 42-1760/Q。国内邮发代号:38-351。国内定价:20元/期,120元/年,国外定价:10.0 US\$/issue, 60.0 US\$/year。欢迎读者订阅。

编辑部地址:430071

湖北省武汉市武昌小洪山中区44号

中国科学院武汉病毒研究所

《中国病毒学》编辑部

E-mail: bjb@wh.iov.cn

http://www.virol.cn