

禽副粘病毒-2 膜融合相关多肽基因的构建与表达 *

王晓佳¹⁾ 朱德兵²⁾ 张国中¹⁾ 柏亚铎¹⁾ 汪明^{1)**}

(¹⁾中国农业大学动物医学院, 北京 100094; ²⁾航天医学工程研究所, 北京 100094)

摘要 囊膜病毒与宿主细胞的膜融合是病毒入侵宿主细胞的第一步. 禽副粘病毒-2 (APMV-2) 囊膜表面糖蛋白有 2 种, 与宿主受体结合的血凝素神经氨酸酶 (HN) 及介导膜融合的融合糖蛋白 (F). HN 蛋白的茎部区域 (stalk region) 与球状头部区域 (globular head region), 以及 F 蛋白的 3 段七肽重复区域 (heptad repeat, HR) 都可能与膜融合直接相关, 将 5 段多肽进行基因的构建与表达研究. 根据已发表的禽副粘病毒-1 (APMV-1) 氨基酸序列, 应用 BLAST 程序进行同源性分析, 以确定 APMV-2 相应区域, 使用搭桥 PCR 或普通 PCR 方法构建基因, 分别克隆入表达载体 pGEX-6p-I 获得重组质粒, 阳性重组质粒转化入大肠杆菌 BL21 (DE₃), 表达后获得可溶性融合蛋白, 3C 蛋白酶酶切后的蛋白质混合物经 Glutathione-Sepharose 4B 亲和层析纯化, 最终获得可溶性、高纯度的 5 段多肽. 应用 LearnCoil-VMF 软件与 ExPASy 系列软件对蛋白质结构与功能进行预测与分析. 分子筛实验结果表明, F 蛋白的 HR1 与 HR2 可形成六聚体结构, 圆二色谱实验结果则表明, 六聚体蛋白富含 α 螺旋结构.

关键词 禽副粘病毒-2, 球状头部与茎部区域, 七肽重复区域, 搭桥 PCR

学科分类号 Q78

副粘病毒一般需要 2 种囊膜表面糖蛋白, 即与受体结合的血凝素神经氨酸酶 (HN) (或同工糖蛋白 H、G) 以及直接介导膜融合的融合蛋白 (F), 共同参与入侵宿主细胞的第一步——膜融合过程. 不同病毒的 F 蛋白对 HN 蛋白的依赖性有所不同^[1], 一些病毒如禽副粘病毒-1 (新城疫病毒) (APMV-1/NDV)、麻疹病毒 (MV) 和仙台病毒 (SeV), 需要 F 与 HN 蛋白共同介导膜融合, 即为 HN 严格依赖性病毒. 而另外一些病毒如呼吸道合胞体病毒 (RSV) 和猿副流感病毒 5 (SV5), F 蛋白单独也能引起细胞的融合, 即为非 HN 严格依赖性病毒. 国外近几年来对 HN 蛋白与 F 蛋白介导膜融合的作用机制进行了研究, 发现同其他囊膜病毒的融合蛋白一样, 副粘病毒的融合蛋白 (F) 在发挥膜融合作用时也发生一系列的构象变化, 七肽重复区 HR1 和 HR2 形成稳定的六聚体结构引发膜融合, 这在 APMV-1、MV、SeV、RSV 及 SV5 都已经得到证明^[2-6]. 此外, 研究还发现, 在 HN 严格依赖性病毒, 可通过 HN 与 F 蛋白结合而使 F 蛋白发生构象变化, 从而介导膜融合^[7-12], 但是 HN 与 F 蛋白的结合作用域或说是 HN 促膜融合区域的研究还处于初始阶段. 国外近几年来以 APMV-1 为研究对象, 用点突变结合细胞实验证明, HN 蛋白有两个促进膜融合作用域^[13,14] (这两个区域被证明与 HN 的受体结合作用域^[15]及神经氨酸酶活性作用域^[16]不重叠), 分别位于 HN 蛋白氨基端 (可形成 α 螺旋的

HR 区域即“茎部”区域 (stalk region, HNS)) 及其偏羧基端 β 折叠片区的几十个氨基酸区域 (即“球状头部”区域 (globular head region, HNH)). 有研究证明 APMV-1 HN 蛋白的 HNH 区域可与 F 蛋白 HR2 区域特异性结合^[17], 而 HNS 区域可能与 F 蛋白的 HR3 区域 (对分子折叠很重要, 有人称之为亮氨酸链区^[18]) 特异性结合^[19], 这提示 F 蛋白的 HR3 区域可能也与膜融合相关. 对人副流感病毒-2 (HPIV-2)、SeV 以及 SV5 的相关研究也在开展^[20,21]. 禽副粘病毒-2 (APMV-2) 是副粘病毒科 (*Paramyxovirinae*)、腮腺炎病毒属 (*Rubulavirus*) RNA 病毒^[22]. 关于 APMV-2 HN 蛋白与 F 蛋白相互作用介导膜融合机制的研究, 还没有任何文献报道. 本研究根据已发表相关文章中与病毒膜融合相关的 HR1、HR2、HR3、HNS、HNH 区域的氨基酸序列, 应用 BLAST 程序进行同源性分析, 以确定 APMV-2 相应区域, 对体外合成和纯化的多肽特性进行了研究.

*国家自然科学基金委员会海外青年学者合作研究基金资助项目 (30228025)

** 通讯联系人.

Tel: 010-62732840, E-mail: vetdean@cau.edu.cn

收稿日期: 2004-10-08, 接受日期: 2004-12-08

1 方 法

1.1 APMV-2 HR1、HR2、HR3、HNS、HNH 区域的确定

根据已发表文章中 APMV-1 各区域的氨基酸序列^[17-19], 应用 BLAST 程序, APMV-2 (Yucaipa 毒株) 确定为与 APMV-1 同源的区域. 即 F 蛋白 HR1 区域为氨基酸 119~172 位, HR2 区域为氨基酸 442~474 位, HR3 区域为氨基酸 247~278 位; HN 蛋白“茎部”区域 (HNS) 氨基酸 73~109 位, “球状头部”区域 (HNH) 为氨基酸 123~153 位.

1.2 引物设计

1.2.1 APMV-2 F 蛋白 HR1 与 HR2 区域. 根据所构建的 HR1、HR2 基因设计引物, 其中, 上游引物含 *Bam*H I 酶切位点 (下划线处), 下游引物含 *Xho* I 酶切位点 (下划线处), 且下游引物酶切位点前设终止密码子. 具体引物如下: HR1 区域引物上游为 ataggatccgccgccgtggctctcaat; HR1 区域引物下游为 gcgctcgagtccaaatatcatcattgataaa; HR2 区域引物上游为 gtcggatcctcgctggatataagcagt; HR2 区域引物下游为 tatctcgagtcagttcacagcgttcagcca.

1.2.2 APMV-2 F 蛋白 HR3 与 HN 蛋白 HNS 及 HNH 区域. 根据所构建的 HR3、HNS、HNH 基因设计引物, A~D 为引物, 其中, A、C 引物序列依次为与目的基因同向的部分片段, A 引物含 *Bam*H I 酶切位点 (下划线处), 而 B、D 引物依次为与目的基因互补的部分片段, 且依次与 A、C 引物有 15~18 bp 的搭桥区, D 引物含 *Xho* I 酶切位点 (下划线处), 且酶切位点前设终止密码子. 每条引物的长度须小于 60 bp, 所有引物与搭桥区的 G+C 含量须控制在 50%左右. 本方法可以用于体外小基因片段 (一般小于 500 bp) 的直接合成. 具体引物如下: HR3 区域引物为 A. gacggatccgaggtcaaccttattaccgccaatcgtt; B. ccggaactgcagattatcctgattcaagatcttaccgagc; C. aatctgcagttccgggtcataaccaacgatttggccggta; D. tcgctcgagtcaagtcacttcagacgcctcgggtaagatac. HNS 区域引物为 A. tatggatccctgaaagtcgccgtcaaccagatcaacgac; B. ttagcttccgctgcagatgaccagcttacagaaagaaatcaccaacg; C. tgcagcgaaggtcaagcgtcacaatcgaaacatgctgttgatctggtt; D. tcgctcgagtcacaagaagccgacttggtggtgatttcttctg. HNH 区域引物为 A. ataggatccgagcctggttctgttaatgaccggaa; B. gtatcgtgtcagcttgatcaaggtgatcatctcagg; C. agctgacagcgataccactgcatattccgggtcattaac; D. gacctcgagtcactggaattaagcctgcagatgcatca.

1.3 基因扩增

1.3.1 APMV-2 F 蛋白的 HR1 与 HR2 区域. 以 APMV-2 F 蛋白质粒 (赵继勋实验室所赠) 为模板进行普通 PCR 扩增. PCR 程序为: 94°C 5 min; 94°C 1 min, 55°C 1 min, 72°C 1 min, 28 个循环; 72°C 10 min.

1.3.2 APMV-2 F 蛋白的 HR3 以及 HN 蛋白的 HNS 与 HNH 区域.

第一轮 PCR 具体程序如下: 设计的 4 条引物以 50 mmol/L 的浓度分别溶于灭菌去离子水中, 使用时各取 4 μ l (引物互作模板). PCR 程序为: 94°C 5 min; 94°C 1 min, 55°C 1 min, 72°C 1 min, 28 个循环; 72°C 10 min.

第二轮 PCR 具体程序如下: 第一轮产物用 1/10 体积的 3 mol/L NaAC, 再加入总体积 3 倍冰冷的乙醇混合, -20°C 30 min, 12 000 r/min 10 min, 再用 75%乙醇洗涤, 自然干燥后溶于 10~20 μ l 的灭菌去离子水中. 取 1~2 μ l 作为 PCR 反应模板, 以 A 及 D 引物为第二轮反应的上、下游引物进行 PCR 扩增. PCR 程序为: 94°C 5 min; 94°C 1 min, 55°C 1.5 min, 72°C 1.5 min, 28 个循环; 72°C 5 min.

1.4 基因克隆

将所得 PCR 扩增产物用 *Bam*H I 和 *Xho* I 双酶切后分别克隆入 pGEX-6p- I 载体, 16°C 过夜后转化大肠杆菌 JM109 感受态细胞; 随机挑选转化菌单菌落接种液体培养基, 提取质粒进行 PCR 鉴定, 能够 PCR 扩增出与目的片段分子质量一致的质粒为候选阳性克隆, 对所得候选阳性质粒进行 DNA 测序.

1.5 融合蛋白表达与蛋白酶切后纯化

将经 DNA 测序鉴定正确的重组阳性质粒分别转化大肠杆菌 BL21 (DE3) 感受态细胞, 挑取单克隆接种含氨苄青霉素 (100 mg/L) 的适量液体培养基 (胰蛋白胨 10 g, 酵母提取物 5 g, 氯化钠 10 g, 水 1 000 ml), 37°C 振荡培养过夜作为种子液, 将种子液按 1:100 比例接种新鲜液体培养基, 37°C 振荡培养至 A_{590} 为 0.8~1.0 左右, 加诱导物 IPTG 至终浓度 1 mmol/L, 30°C 继续培养 4 h; 5 000 r/min 离心 15 min 收集菌体, 加适量 PBS 缓冲液 (140 mmol/L NaCl, 2.7 mmol/L KCl, 10 mmol/L Na_2HPO_4 , 1.8 mmol/L KH_2PO_4 , pH 7.3) 重悬菌体, 超声波裂解菌体, 加入终浓度为 1% 的 Triton X-100, 冰浴 30 min, 12 000 r/min, 4°C 离心 15 min, 取上清; 将上清通过经 PBS 平衡的 Glutathione-Sepharose 4B

亲和层析柱, 再用 PBS 洗涤亲和柱至少 10 个柱体积; 用至少 3 个柱体积的还原型谷胱甘肽溶液 (10 mmol/L 还原型谷胱甘肽, 50 mmol/L Tris-HCl pH 8.0) 洗脱, 收集洗脱液得到 GST 融合蛋白; 用截流分子质量为 5K 的超滤管浓缩后换成酶切缓冲液 (50 mmol/L Tris-HCl pH 7.0, 150 mmol/L NaCl, 1 mmol/L DTT, 1 mmol/L EDTA, pH 8.0), 加入过量的 GST-3C 蛋白酶, 4℃ 酶切 16 h; 浓缩后再换成 PBS 缓冲液, 用 Glutathione-Sepharose 4B 亲和层析除去酶切下的 GST 和 GST-3C, 即加入适量经 PBS 平衡的 Glutathione-Sepharose 4B 亲和填料, 轻轻震荡混匀, 中间不断震荡以防止填料沉淀; 室温作用 1 h 或稍长时间后, 500 g 离心 15 min, 轻轻吸取上清即纯化的目的蛋白 (HR1、HR2、HR3、HNS 或 HNH), 用 3K 超滤管浓缩至适当浓度, -80℃ 冻存备用 (几天内使用可存冰盒中放至 4℃ 冰箱). 蛋白质样品进行 15% SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳 (SDS-PAGE) 分析.

1.6 软件预测各蛋白质结构

1.6.1 应用 ExPASy 系列软件预测各蛋白质二级结构. 应用 ExPASy 服务器 (<http://www.expasy.ch/tools/>) 的 SOPMA、GOR4、nnPredict 与 HNN 方法预测蛋白质二级结构. 使用 DNASTAR 软件包中 Protean 程序提供的 Kyte-Doolittle 算法对蛋白质进行疏水性分析.

1.6.2 应用 LearnCoil-VMF 软件预测蛋白质 α 螺旋卷曲结构. 将囊膜糖蛋白的氨基酸一级序列输入 LearnCoil-VMF 软件 (<http://nightingale.lcs.mit.edu/cgi-bin/vmf/>), 包括 HN (GenBank Accession No. AF515836) 与 F 蛋白 (GenBank Accession No. D13977) 分别输入和共同输入、HN 与 F 上述部分片段的两两交叉输入, 以预测蛋白质相互形成 α 螺旋卷曲结构的趋势.

1.7 圆二色谱分析

经亲和层析纯化的等摩尔浓度的 HR1 与 HR2 混合蛋白, 用 3K 超滤浓缩管换成 PBS 缓冲液, 并将蛋白质浓度调整至 10 μmol/L. 用 Jasco J-715 分光光度计进行圆二色谱分析, 操作温度为 25℃, 光路为 0.1 cm, 记录波长范围为 195~235 nm.

1.8 凝胶过滤

经亲和层析纯化的等摩尔浓度的 HR1 和 HR2 混合蛋白进行 Hiload Superdex™ G75 (Pharmacia 公司) 分子筛层析, 操作系统为 Akta FPLC (Pharmacia 公司), 缓冲液为 20 mmol/L Tris-HCl, pH 8.0,

100 mmol/L NaCl, 并以 42 ku 和 10 ku 蛋白质标准作为对照.

2 结 果

2.1 构建正确的阳性重组质粒

经 PCR 扩增获得 HR1、HR2、HR3、HNS 与 HNH 基因 (图 1), 将基因克隆入 pGEX-6p- I 表达载体后, 将 PCR 鉴定正确的候选阳性质粒进行 DNA 测序, 获得构建正确的重组质粒.

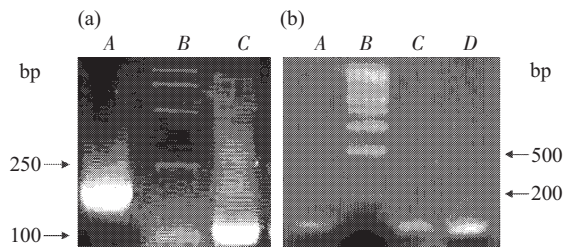


Fig.1 The PCR products of HR1, HR2, HR3, HNS and HNH genes

(a) A: HR1(162 bp); B: Marker(DL 2000); C: HR2(99 bp). (b) A: HNS (111 bp); B: Marker (200 bp DNA ladder); C: HR3(96 bp); D: HNH (93 bp).

2.2 可溶性表达的融合蛋白及其酶切后蛋白质

各多肽以 GST 融合的形式在大肠杆菌中高效表达, 并都是可溶性的. 经 GST 亲和层析纯化的 GST 融合蛋白分别用 GST-3C 蛋白酶酶切, 酶切下的 GST 与 GST-3C 蛋白酶使用 GST 亲和层析方法除去, 便得到了纯化的 HR1、HR2、HR3、HNS 与 HNH 多肽, 将融合蛋白及其酶切后蛋白质分别进行 SDS-PAGE 电泳分析(图 2), 结果证明各纯化蛋白质的纯度超过 90%. 此外, 电泳结果得出 HR1、HR2、HR3、HNS 与 HNH 多肽分子质量分别为: 6.4 ku、4.1 ku、4 ku、4.6 ku、3.5 ku, 而各

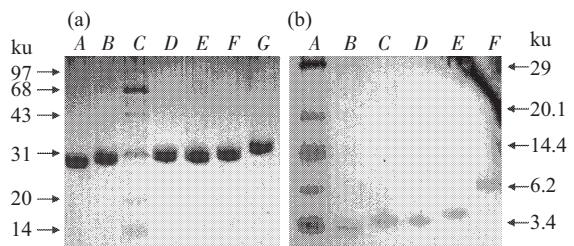


Fig. 2 SDS-PAGE analysis of the HR1, HR2, HR3, HNS and HNH proteins

(a) GST fusion proteins. A: GST; B: GST-HNH; C: marker (14, 20, 31, 43, 68, 97 ku); D: GST-HR2; E: GST-HR3; F: GST-HNS; G: GST-HR1. (b) Proteins after GST-3C cleavage. A: marker(3.4,6.2, 14, 20, 29 ku); B: HNH(3.5 ku); C: HR3 (4 ku); D:HR2(4.1 ku); E: HNS; F: HR1(6.4 ku).

多肽分子质量的 DNASTar 软件计算结果分别为: 6.42 ku、4.1 ku、3.92 ku、4.63 ku、3.54 ku, 即 SDS-PAGE 电泳结果与 DNASTar 软件计算结果相近. 蛋白质电泳结果见图 2.

2.3 软件预测的蛋白质结构

应用 ExPASy 系列软件预测各蛋白质二级结构结果统计如下: 其中, HR1 的 α 螺旋含量约 80%; HR2 的 α 螺旋含量约 62%; HR3 的 α 螺旋含量约 17%, β 延伸链含量约 40%; HNS 的 α 螺旋含量约 54%; HNH 的 β 延伸链含量约 40%. 使用 DNASTar 软件包中的 Protean 程序提供的 Kyte-Doolittle 算法进行蛋白质亲水及疏水性分析, 分析时平均氨基酸残基长度常数采用默认: Kyte-Doolittle 算法为 9 个残基. 预测结果表明, HR2 有较明显的亲水性趋势, HR3 有较明显的疏水性趋势, 而 HR1、HNS、HNH 则既含有亲水性区域又含有疏水性区域. 此外, 使用 LearnCoil-VMF 软件预测到的 HR1 与 HR2 序列与用 BLAST 程序选定的序列相同, 且 LearnCoil-VMF 软件预测到 F 蛋白的 HR1 与 HR2 可相互结合为 α 螺旋卷曲结构.

2.4 HR1 与 HR2 混合蛋白富含 α 螺旋结构

圆二色谱实验结果表明, 等摩尔浓度比的 HR1 与 HR2 混合蛋白于 208 nm 与 222 nm 处呈现负波峰, 且含量高于 80%, 即表明混合蛋白富含 α 螺旋结构. 圆二色谱实验结果见图 3, 其中横坐标为圆偏振光的波长, 纵坐标为不同波长条件下左旋与右旋圆偏振光的吸收差值.

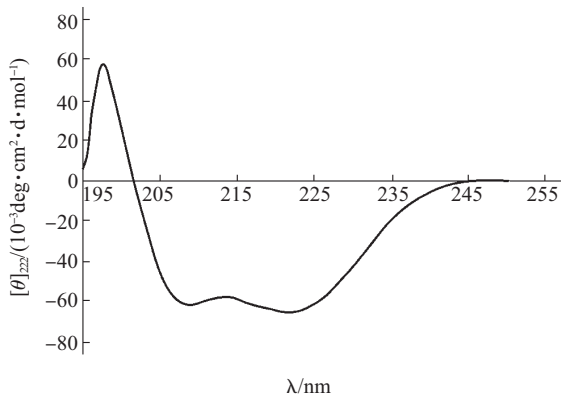


Fig.3 CD spectra of the mixed HR1 and HR2 proteins

The mixtures of HR1 and HR2 proteins gave a typical α -helix structure, with double minima at 208 nm and 222 nm.

2.5 HR1 与 HR2 混合蛋白形成的六聚体结构

分子筛实验结果表明, 等摩尔浓度比的 HR1

与 HR2 混合形成的单一峰蛋白质分子质量约为 31 ku. 由于 HR1 的分子质量约为 6.4 ku, HR2 的分子质量约为 4.1 ku, 而 HR1 与 HR2 是等摩尔比结合的, 故由此推算, 混合蛋白质可相互结合形成异源三聚体结构, 或称为六聚体结构 $[(6.4 \text{ ku} + 4.1 \text{ ku}) \times 3 = 31 \text{ ku}]$. 分子筛结果见图 4, 其中横坐标为洗脱下来的溶液体积, 纵坐标为 A_{280} 条件下的光吸收值.

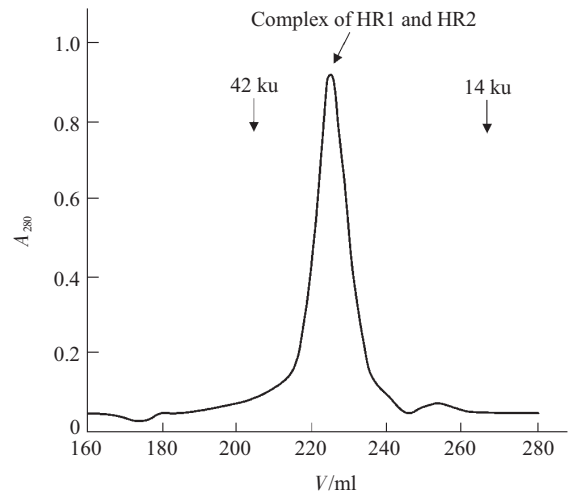


Fig.4 Gel-filtration analysis of the mixed HR1 and HR2 proteins

A clear peak was eluted between the eluted volumes corresponding to 42 and 14 ku standards, about 31 ku.

3 讨 论

国际上近年来逐渐开展了对 APMV-1 的病毒膜融合机制的研究, 但没有对其同病毒属 APMV-2 的相关报道. 国内赵继勋教授实验室已对该病毒的培养、增殖、致病性及主要功能基因的测序进行了研究. 本研究先采用搭桥 PCR 方法扩增了膜融合相关基因, 此方法不受模板的限制, 而且可以将稀有密码子替换成表达系偏爱密码子, 提高蛋白质表达效率, 用于碱基突变实验时也可以一步到位, 但这种方法只适合小片段核苷酸的体外合成. 随后将构建的基因分别克隆入表达载体获得了重组质粒, 阳性重组质粒转化大肠杆菌高效表达后获得可溶性融合蛋白, 经亲和和层析纯化的高纯度融合蛋白用过量的 3C 蛋白酶酶切后, 再经亲和和层析纯化最终获得了可溶性、高纯度的 HNS、HNH、HR1、HR2 与 HR3 蛋白. 研究中我们发现, 蛋白质表达过程中加 IPTG 诱导后在 30°C 继续培养 4 h, 是 GST 系统可溶性高效表达的最适合条件. 而多重复几次亲和和层析过程也可提高蛋白质纯度. 此外, 4°C 条件下酶切

蛋白质 16 h 效果最好, 如果蛋白质不够稳定, 室温条件下酶切 3 h 以上也可获得大部分目的蛋白。

20 世纪 90 年代研究者发现, 人免疫缺陷病毒 (HIV) 融合糖蛋白 (F) 的两段 HR 区域可相互结合形成富含 α 螺旋的六聚体结构, 其引发病毒与宿主之间的膜融合, 在此基础上逐渐形成了 HIV 膜融合机制假说^[23,24]。随后又证明, 包括副粘病毒在内的其他囊膜病毒的两段 HR 区域, 也可相互结合形成富含 α 螺旋的六聚体结构^[2-6]。本研究中的分子筛实验结果表明, HR1 与 HR2 多肽混合后形成六聚体结构, 圆二色谱实验结果则表明, 六聚体蛋白富含 α 螺旋结构。以上结果表明, APMV-2 与其他副粘病毒一样都可与 HIV 的膜融合机制归为一类。APMV-2 HR1 与 HR2 形成六聚体的三级结构研究正在进行中。

对猿副流感病毒 5(SV5)的研究结果表明, F 蛋白 HR1 及 HR3 区域的氨基酸对 HN 非依赖性融合活性是很重要的, 但 F 蛋白 HR1 及 HR3 与 HN 蛋白的结合域还未知^[8]。还有研究表明, 禽副粘病毒-1(新城疫病毒) (APMV-1/NDV) F 蛋白的 HR3 区域可能与 HN 蛋白的 HNS 区域相结合, 并且表明当 HR3 区发生突变的时候, 病毒可以不依赖 HN 蛋白而与宿主细胞发生膜融合^[9]。而 HN 严格依赖性病毒与 HN 非严格依赖性病毒的 HR3 氨基酸构成不同, 这可能是副粘病毒膜融合对 HN 依赖性不同的原因之一。此外, 研究表明, APMV-1 HN 蛋白的 HNH 区域可与 F 蛋白的 HR2 相互结合^[7]。我们将 F 蛋白与 HN 蛋白的 5 段多肽进行体外交叉结合实验, 除了发现 F 蛋白 HR1 与 HR2 可以结合以外, 也初步证明 APMV-2 F 蛋白的 HNH 区域也可以与 HR2 结合, 所形成的复合物蛋白的特性研究还在进行中。从 ExPASy 软件预测的结果来看, HNS 富含 α 螺旋而 HR3 区含 β 折叠结构, HNS 区域没有明显的疏水趋势而 HR3 多肽疏水区占其主要部分; HR2 多肽与 HNH 区域都富含 α 螺旋, HR2 多肽亲水区占其主要部分而 HNH 区域都没有明显的疏水趋势, 本研究中, 所有片段都不含形成二硫键的“半胱氨酸”, 所以蛋白质间稳定的相互作用更可能是靠氢键作用或疏水作用来维持。副粘病毒 F 蛋白与 HN 蛋白结合作用域的结构与功能研究少有报道, 本文的研究丰富了副粘病毒入侵宿主细胞机制的研究资料。

副粘病毒入侵宿主是个很复杂的过程, HN 蛋白的茎部区域 (HNS) 与球状头部区域 (HNH) 以及

F 蛋白的 HR 区域、HR-C 区^[25]、氨基端融合区^[26,27]、亮氨酸链区^[28]、胞外区^[29]等区域都与膜融合有关, 这些功能区都参与调节病毒入侵宿主细胞的膜融合过程, 需要进一步研究来阐明囊膜病毒膜融合机制的细节。

参考文献

- Bangai S, Labm R A. Quantitative measurement of paramyxovirus fusion: differences in requirements of glycoproteins between Simian virus 5 and Human parainfluenza virus 3 or Newcastle disease virus. *J Virol*, 1995, **69** (11): 6712~6719
- Zhu J, Gao G F, Tien P, *et al.* Design and analysis of post-fusion 6-helix bundle of heptad repeat regions from Newcastle disease virus F protein. *Protein Eng*, 2003, **16** (5): 373~379
- Zhu J, Ding Y, Gao G F, *et al.* Crystallization and preliminary X-ray crystallographic analysis of the trimer core from Measles virus fusion protein. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr*, 2003, **59**(3): 587~590
- Wang X J, Wang M, George F Gao. Biochemical, biophysical and preliminary X-ray crystallographic analyses of the fusion core of Sendai virus F protein. *Acta Crystallogr D*, 2004, **60** (9): 1632~1635
- Zhao X, Singh M, Kim P S, *et al.* Structural characterization of the Human respiratory syncytial virus fusion protein core. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2000, **97** (26): 14172~14177
- Kent A B, Dutch R E, Jardetzky T S, *et al.* Structural basis for paramyxovirus-mediated membrane fusion. *Mol Cell*, 1999, **3**(3): 309~319
- McGinnes L W, Gravel K, Morrison T G. Newcastle disease virus HN protein alters the conformation of the F protein at cell surfaces. *J Virol*, 2002, **76** (24):12622~12633
- Toru T, Garry L, Connaris L, *et al.* Role of the HN protein in the mechanism of paramyxovirus-cell membrane fusion. *J Virol*, 2002, **76** (24):13028~13033
- Matteo P, Matthew M, Olga G, *et al.* Triggering of Human parainfluenza virus 3 fusion protein by the HN protein: an HN mutation diminishes the rate of F activation and fusion. *J Virol*, 2003, **77** (6): 3647~3654
- Elizabeth A C, Anne M M, Elizabeth L, *et al.* Fusion deficiency induced by mutations at the dimmer interface in the NDV HN is due to a temperature-dependant defect in receptor binding. *J Virol*, 2003, **77** (12):6913~6922
- Samuel O, Shai Y. Participation of two fusion peptides in measles virus-induced membrane fusion: emerging similarity with other paramyxoviruses. *Biochemistry*, 2001, **40** (5):1340~1349
- Peisajovich S G, Shai Y. New insights into the mechanism of virus-induced membrane fusion. *Trends Biochem Sci*, 2002, **27**(4): 183~190
- Helen C, Toru T, Ruper R, *et al.* Probing the sialic acid binding site of the HN of NDV: identification of key amino acids involved in cell binding, catalysis, and fusion. *J Virol*, 2002, **76** (4):1816~1824
- Lin C, Peter M C, Leah J C, *et al.* Cloning, expression, and

- crystallization of the fusion protein of NDV. *Virology*, 2001, **290** (2): 290~299
- 15 Ronald M I, Gisela M F, Jennifer M S, *et al.* Structural and functional relationship between the receptor recognition and neuraminidase activities of the NDV HN protein: receptor recognition is dependent on neuraminidase activity. *J Virol*, 2001, **75** (4): 1918~1927
- 16 Sergel T, McGinnes L W, Morrison T G. The fusion promotion activity of NDV HN protein does not correlate with neuraminidase activity. *Virology*, 1993, **196** (2): 831~834
- 17 Kathryn A G, Trudy G M. Interacting domains of the HN and F protein of NDV. *J Virol*, 2003, **77** (20): 11040~11049
- 18 Tsurudome M, Ito M, Nishio M, *et al.* HN-independent fusion activity of Simian virus 5 fusion protein: difference in conformation between fusogenic and nonfusogenic F proteins on the call surface. *J Virol*, 2001, **75** (19): 8999~9009
- 19 Theresa A S, Lori W M, Trudy G M, *et al.* A single amino acid change in the NDV F protein alters the requirement for HN protein in fusion. *J Virol*, 2000, **74** (11): 5101~5107
- 20 Maurizio T, Claudia P, Cristina M, *et al.* Peptides derived from the heptad repeat region near the C-terminal of Sendai virus F bind the hemagglutinin-neuraminidase ectodomain. *FEBS Letters*, 2003, **536** (1~3): 56~60
- 21 Tanabayashi K, Compans R W. Function interaction of paramyxovirus glycoprotein: identification of a domain in Sendai virus HN which promotes cell fusion. *J Virol*, 1996, **70** (9): 6112~6118
- 22 Mao X, Kusagawa S, Tsurudome M, *et al.* Characterization of Bangor virus proteins by using monoclonal antibodies. *Avian Diseases*, 1996, **40** (1): 150~157
- 23 Eckert D M, Kim P S. Mechanisms of viral membrane fusion and its inhibition. *Annu Rev Biochem*, 2001, **70**: 777~810
- 24 王晓佳, 张卫红, 汪明, 等. 囊膜病毒膜融合的分子机制. *生物化学与生物物理进展*, 2004, **31** (6): 482~491
Wang X J, Zhang W H, Wang M, *et al.* *Prog Biochem Biophys*, 2004, **31** (6): 482~491
- 25 Plemper R K, Compans R W. Mutations in the putative HR-C region of the Measles virus F₂ glycoprotein modulate syncytium formation. *J Virol*, 2003, **77** (7): 4181~4190
- 26 Peisajovich S G, Epan R F, Shai Y, *et al.* Sendai virus N-terminal fusion peptide consists of two similar repeats, both of which contribute to membrane fusion. *Eur J Biochem*, 2002, **269** (17): 4342~4350
- 27 Peisajovich S G, Shai Y. Viral fusion proteins: multiple regions contribute to membrane fusion. *Biochim Biophys Acta*, 2003, **1614** (1): 122~129
- 28 Ghosh J K, Ovadia M, Shai Y, *et al.* A leucine zipper motif in the ectodomain of Sendai virus fusion protein assembles in solution and in membranes and specifically binds biologically-active peptides and the virus. *Biochemistry*, 1997, **36** (49): 15451~15462
- 29 Tong S. Regulation of fusion activity by the cytoplasmic domain of paramyxovirus F protein. *Virology*, 2002, **301** (2): 322~333

Construction and Expression of Correlative Genes With Membrane Fusion of Avian Paramyxovirus-2*

WANG Xiao-Jia¹⁾, ZHU De-Bing²⁾, ZHANG Guo-Zhong¹⁾, BAI Ya-Duo¹⁾, WANG Ming^{1)**}

¹⁾College of Animal Medicine, China Agricultural University, Beijing 100094, China;

²⁾Institute of Space Medico-Engineering, Beijing 100094, China)

Abstract Membrane fusion between the virus envelope and host cells is the first step of the enveloped virus entry into the host cells. This process involves the interaction of viral envelope proteins and their cellular receptors (proteins or sialic acids), which leads to the conformational changes of the envelope proteins. Avian paramyxovirus-2 (APMV-2) has the hemagglutinin-neuraminidase (HN) glycoprotein in which there are the stalk and globular head regions, and the fusion (F) glycoprotein in which there are the heptad repeat 1 (HR1) and heptad repeat 2 (HR2) and heptad repeat 3 (HR3) regions. To construct and express the correlative genes with membrane fusion of APMV-2, the relative sequences basing on the published sequences of avian paramyxovirus-1 (APMV-1) and using BLAST bio-software were ensured, then constructed genes by PCR and cloned genes into the *Bam*H I -*Xho* I restriction sites of the GST fusion expression vector pGEX-6P-I, in which there is a rhinovirus 3C protease cleavage site for the fusion protein. *E. coli* strain BL21 (DE₃) was transformed with the recombinant GST fusion plasmids. The supernatants lysed by sonication and clarified by centrifugation were passed over Glutathione-Sepharose 4B column for purifying, respectively. The GST fusion proteins were then cleaved by GST-fusion rhinovirus 3C protease and then were purified by the affinity chromatography. The LearnCoil-VMF

and ExPASy bio-sofwares were used for predict and analysis the structure and function of five peptides. And the results of Gel-filtration and circular dichroism (CD) showed that the HR1 and HR2 form a six-helix structure.

Key words avian parmyxovirus-2(APMV-2), stalk and globular head regions, heptad repeat, bridging-PCR

*This work was supported by a grant from The National Natural Sciences Foundation of China (30228025).

**Corresponding author. WANG Ming. Tel: 86-10-62732840, E-mail: vetdean@cau.edu.cn;

Received: October 8, 2004 Accepted: December 8, 2004