

H7N2 禽流感病毒 HA 的分离纯化及其糖链谱研究*

李学甜¹⁾ 孙 宇¹⁾ 杜亚蓉¹⁾ 王喜龙¹⁾ 张沛欣¹⁾

钟耀刚¹⁾ 马恬然¹⁾ 王秀荣²⁾ 李 铮^{1)**}

(¹⁾ 西北大学生命科学学院功能糖组学实验室, 西安 710069;

(²⁾ 中国农业科学院哈尔滨兽医研究所, 国家禽流感研究参考实验室, 哈尔滨 150001)

摘要 血凝素(HA)是位于流感病毒囊膜表面的一种 I 型跨膜糖蛋白, 是流感病毒结合宿主细胞表面受体, 介导病毒入胞的关键分子, 也是中和抗体以及疫苗研制的重要靶标. HA 表面糖基化与病毒毒力、感染宿主范围等密切相关, 且其表面糖链变化会影响其结构与功能. 然而目前关于流感病毒 HA 糖基化的研究主要集中在其糖基化位点上, 而对于 HA 上详细的糖链结构知之甚少. 本文应用禽流感病毒特异识别的唾液酸糖链 (SA α 2-3Gal) 受体, 制备特异的糖链磁性微粒复合物, 进而从 H7N2 禽流感病毒中分离纯化 HA, 并采用 SDS-PAGE 及质谱技术进行鉴定. 确定提取物系 HA 后, 进一步利用凝集素芯片联合质谱技术研究禽流感病毒 H7N2 的 HA 表面糖型, 结果显示 H7N2 禽流感病毒 HA 表面主要含有岩藻糖、半乳糖、N-乙酰半乳糖胺、甘露糖、N-乙酰葡萄糖胺等糖链结构, 共获得 16 个糖链结构较为准确的寡糖, 这些糖链可能与 HA 生物学功能相关. 本研究有助于揭示禽流感病毒感染宿主的糖链作用机制, 有助于设计制备针对 HA 相关的糖链疫苗.

关键词 禽流感病毒, 血凝素, 糖链谱, 凝集素芯片, 质谱

学科分类号 Q5

DOI: 10.16476/j.pibb.2015.0026

禽流感(avian influenza, AI)是由正黏病毒科甲型流感病毒引起的一种禽类急性或慢性呼吸道传染病, 起初只对部分禽类有危害, 现已威胁到很多哺乳类乃至人类的生命安全, 被国际兽医局(OIE)列为 A 类传染病, 引起了全世界的广泛关注. 由于禽流感病毒(avian influenza virus, AIV)基因组为单股负链分节段的 RNA 病毒, 且其 RNA 聚合酶缺乏有效的校正功能, AIV 经常发生变异^[1-2], 而宿主对禽流感病毒变异株往往缺乏相应免疫力, 导致病毒能够迅速传播, 从而引起流感大流行, 发病率和死亡率极高, 给人类带来极大的灾难和威胁^[3-4].

流感病毒感染宿主细胞是由其表面糖蛋白血凝素(hemagglutinin, HA)与宿主细胞表面上的糖链受体唾液酸(sialic acid, SA)共同介导的, 且流感病毒对糖链受体的识别具有特异性, 人流感病毒 HA 主要识别末端为唾液酸 α 2-6 半乳糖(galactose, Gal)(SA α 2-6Gal)的糖链受体, 其主要存在于人呼吸道上皮细胞表面, 而禽流感病毒 HA 主要识别末端为 SA α 2-3Gal 的糖链受体, 其广泛存在于禽肠

胃道的上皮细胞表面^[5-6]. HA 是构成流感病毒囊膜纤突的主要成分之一, 是病毒表面的重要抗原, 是众多疫苗和药物的重要作用靶点. 许多研究表明, 流感病毒 HA 在决定病毒宿主范围、识别结合宿主受体、穿膜侵入细胞以及刺激机体产生抗体等过程中都起着至关重要的作用^[7-10]. 作为识别受体的大分子, HA 既是一种糖结合蛋白, 也是一种糖基化蛋白, 由 3 个相同的亚基组装而成, 每个亚基含有 3~12 个 N-糖基化位点^[11-13]. 研究表明, HA 的糖基化对流感病毒感染宿主发挥着关键作用: 糖基化位点的增加或减少可以影响病毒对宿主的特异性^[14-17], 还可以改变病毒的毒力^[18-19], 在病毒免疫逃逸和进化方面也有重要作用^[20-21].

近年来, 糖芯片^[22]、植物凝集素组化^[23]和生物

* 科技部国际科技合作计划(2009DFA32730)资助项目.

** 通讯联系人.

Tel: 029-88304104, E-mail: zhengli@nwu.edu.cn

收稿日期: 2015-01-23, 接受日期: 2015-05-04

质谱^[24]等技术被广泛应用于流感病毒糖链受体的研究,发现了流感病毒糖链受体的精细结构及其在人体呼吸道的精确分布^[25]。然而目前人们对禽流感病毒 HA 上详细的糖链结构还知之甚少。在糖蛋白糖链结构解析方面,凝集素芯片技术^[26-27]以其简便、快速、高通量等优点,成为糖蛋白糖链图谱绘制和研究的强有力的工具。在 HA 分离纯化方面,一般采用红细胞吸附释放、密度梯度离心等方法,但是这些方法不是步骤繁琐就是纯度不高;近年来,也有根据 HA 糖基化的特性,利用固定化的凝集素提取流感病毒 HA 的技术,但特异性不强^[28]。本研究基于禽流感病毒特异性识别唾液酸糖链受体和本实验室建立的糖链磁性微粒复合物分离纯化糖结合蛋白质技术^[29-31],发展了一种快速分离纯化流感病毒 HA 的方法,并整合凝集素芯片和质谱技术对纯化的 HA 进行了糖链图谱分析。

1 材料与方法

1.1 主要试剂

环氧化磁性微粒为本实验室自制;4-羟基苯甲酰肼和二甲基甲酰胺(N,N-dimethylformamide, DMF)购自英国 Alfa Aesar 公司;唾液酸糖链 SA α 2-3Gal (α -NeuNAc- (2 $\rightarrow$ 3)- β -D-Gal- (1 $\rightarrow$ 4)-D-GlcNAc)、二硫苏糖醇(DL-dithiothreitol, DTT)、苯甲基磺酰氟(phenylmethanesulfonyl fluoride, PMSF)、二甲基亚砜(dimethyl sulfoxide, DMSO)、碘乙酰胺(iodoacetamide, IAM)均购自美国 Sigma 公司;ConA、LCA、GNA 等 37 种凝集素购自美国 Vector 公司;Cy3 荧光染料购自美国 Amersham 公司;Sephadex G-25 柱购自美国 GE Healthcare 公司;牛血清白蛋白(BSA)购自德国 Calbiochem 公司;PNGase F 酶购自美国 NEB 公司;Sephrose 4B 购自德国 Merck 公司。

1.2 禽流感病毒增殖和乙醚粗提

鸡胚培养禽流感病毒株 H7N2 (A/Chicken/Hebei/1/2002),并使用乙醚提取法对病毒液进行初步裂解提取。取 10 日龄 SPF 鸡胚,按绒毛尿囊腔途径接种 0.1~0.2 ml 病毒母液,37℃ 诱导培养 72 h 后收获病毒尿囊培养液,4℃ 2 000 r/min 离心 20 min,收集上清液,继续传 2~3 代。将等体积无水乙醚加入到收取的 H7N2 病毒尿囊培养液中,4℃ 震荡反应 5 h,使流感病毒囊膜裂解。反应结束后,4℃ 2 000 r/min 离心 20 min,静置片刻后弃去上层有机相,小心吸取下层病毒液,通风排醚至病

毒液中无乙醚气味为止,然后将病毒粗提液置于 -80℃ 保存备用^[32]。

1.3 SA α 2-3Gal-磁性微粒复合物的合成

取 3 mg 环氧化磁性微粒加入 2.0 ml 离心管中,磁性分离 3 min 后弃上清,DMF 清洗 3 次,加入以 DMF 配制的 500 μ l 40 mmol/L 4-羟基苯甲酰肼溶液,37℃、120 r/min 震荡反应 10 h,以使磁粒进行充分的羟基化修饰。反应结束后,磁性分离弃上清,加入偶联缓冲液(14 ml 0.2 mol/L 冰乙酸,86 ml 0.2 mol/L 乙酸钠, pH 5.4)清洗 3 次后,加入 190 μ l 偶联缓冲液与 10 μ l 15 mmol/L 唾液酸糖链 SA α 2-3Gal 溶液,37℃ 振荡反应 6 h 以使糖链偶联在羟基化磁粒上。反应结束后,磁性分离收集上清 b,再向 SA α 2-3Gal-磁性微粒复合物中加入 400 μ l 封闭液(2%乙醇胺,1% BSA, pH 8.8)25℃ 封闭 1 h,再用结合缓冲液(20 mmol/L Tris-HCl, 10 mmol/L CaCl₂, 0.5 mol/L NaCl, 6 mmol/L MnCl₂, pH 7.2)清洗,收集上清 c,SA α 2-3Gal-磁性微粒复合物置于结合缓冲液中 4℃ 保存备用。此外,硫酸-地衣酚法测定上样前的总糖量、上清 b 与 c 中糖量,用上样前的总糖量减去未结合到磁性微粒上的糖量,即可确定 SA α 2-3Gal-磁性微粒复合物上偶联的糖量。

1.4 HA 的分离纯化和鉴定

上述合成的 3mg SA α 2-3Gal-磁性微粒复合物在 200 μ l 结合缓冲液中与 200 μ l 病毒粗提液和 10 μ l 蛋白酶抑制剂 PMSF 混合,37℃ 缓慢震荡反应 1 h,以使禽流感病毒液中的 HA 充分与糖链磁性微粒复合物上的 SA α 2-3Gal 结合;反应结束后,用 400 μ l 清洗缓冲液(20 mmol/L Tris-HCl, 0.05% Tween20, 0.5 mol/L NaCl, pH 7.2)清洗 4~5 次,洗去非特异性吸附;然后加入 5 μ l PMSF 和 195 μ l 洗脱液(0.5% SDS),37℃ 振荡反应 1 h,对 SA α 2-3Gal-磁性微粒复合物上特异性结合的 HA 进行洗脱,洗脱结束后,磁性分离 3 min,收集上清液,-80℃ 保存备用。采用 SDS-PAGE 及 MALDI-TOF-MS 对 SA α 2-3Gal-磁性微粒复合物分离纯化的 HA 进行鉴定。本实验采用 3%的浓缩胶和 10%的分离胶进行 SDS-PAGE 并用硝酸银染色法显影^[29]。同时,将提取所得 HA 利用 10 ku 过滤装置 Amicon Ultra-0.5 进行离心除盐处理后冻干,用 50%的乙腈:CHCA 基质为 1:1 溶液 10 μ l 溶解后取 1 μ l 点样于靶板上真空抽干,337 nm 氮气激光下进行 MALDI-TOF-MS 鉴定。

1.5 凝集素芯片的制备及封闭

选用 1 g/L BSA 作为阴性质控, Cy3 荧光染料标记的 BSA 作为阳性 Marker, 与 ConA、SNA、DSA 等 37 种凝集素^[32]共同构成如图 3a 所示 12×10 的凝集素芯片矩阵, 其中每种探针重复点样 3 次, 每张玻片点制 3 个矩阵. 按矩阵设计顺序在 384 孔板中依次加入相对应的各凝集素点样液, 使用博奥晶芯 SmartArrayer 48 点样系统在环氧化片基上点制凝集素芯片. 点制好的芯片在室温且相对湿度为 50%~60% 的环境中孵育 6 h 后, 37℃ 真空干燥 3 h, 使凝集素固定于芯片上. 将制备好的凝集素芯片避光保存, 并置于 4℃ 干燥器备用. 使用前, 取 4℃ 保存的凝集素芯片置于 37℃ 下回温 30 min 后封闭, 封闭前先用 1×PBST (0.05% Tween-20, 1×PBS), 1×PBS (10 mmol/L 磷酸盐缓冲液, 0.15 mol/L NaCl, pH 7.4) 各清洗玻片 1 次, 每次 5 min, 离心甩干. 将片基置于芯片杂交盒中, 加入芯片封闭缓冲液 (2% BSA, 7.5% 甘氨酸, 1×PBST), 置于芯片杂交仪中缓慢旋转, 25℃ 封闭 1 h. 封闭结束后, 用 1×PBST, 1×PBS 各清洗玻片 2 次^[32-33].

1.6 凝集素芯片与 HA 的孵育及分析

对纯化出的 HA 采用 Bradford 法测定浓度后进行 Cy3 荧光标记: 将 5 μl DMSO 加入分装好的 Cy3 荧光染料中, 室温避光使其活化 30 min; 再加入 20 μg HA 以及 100 μl 0.1 mol/L Na₂CO₃ 溶液 (pH 9.3), 涡旋混匀, 室温避光标记 1~1.5 h; 加入 30 μl 4 mol/L 羟胺, 冰浴 10 min 终止荧光反应; 用 Sephadex G-25 柱分离纯化标记蛋白质并去除游离的 Cy3 荧光染料; 最后用微量核酸蛋白质分析仪 Nanophotometer 测定荧光标记后的 HA 浓度, 并置于 -20℃ 以下避光保存备用. 取 5 μg Cy3 标记后的 HA, 加入孵育缓冲液 (2% BSA, 7.5% 甘氨酸, 1×PBST, 20% 4 mol/L 羟胺), 混匀, 冰浴 1 h 后取 700 μl 均匀加载于盖玻片上, 盖上封闭后的凝集素芯片, 借助芯片杂交盒固定后于芯片杂交仪中缓慢旋转, 25℃ 孵育 3 h, 孵育结束后用 1×PBST, 1×PBS 各清洗 2 次, 每次 5 min, 最后离心甩干. 设定芯片扫描仪 Genepix 4000B 的扫描波长为 535 nm, 激光强度为 100%, 光电倍增管 PMT 为 70%, 对孵育后的凝集素芯片进行预扫描, 确定点样区后再精确扫描, 调节亮度与对比度, 保存最佳视觉效果图. 最后应用软件 GenePix 3.0 从扫描图像中获取各点荧光信号强度值和背景值等信息, Graphpad Prism 5 等统计学分析软件进行数据分析^[32-33].

1.7 HA 糖链的释放及纯化

取 2 mg 纯化出的 HA 分次加入到 10 ku 过滤装置 Amicon Ultra-0.5 中, 14 000 r/min 离心 15 min, 使样品浓缩至约 100 μl; 依次使用 8 mol/L 尿素, 10 mmol/L DTT 和 10 mmol/L IAM 对 HA 进行变性, 并换液至 40 mmol/L 的 NH₄HCO₃ 中; 将 10 ku 柱转移至新的收集管后, 按照每 1 mg 蛋白质样品使用 1 μl PNGaseF 酶的比例加入 PNGaseF 酶, 混匀, 37℃ 水浴酶解过夜; 酶解反应结束后, 12 000 r/min 离心 15 min, 再加入 100 μl 40 mmol/L NH₄HCO₃ 清洗 1 次, 收集含糖量的溶液于 1.5 ml 离心管中备用. 取 100 μl Sepharose 4B 至 1.5 ml 的离心管中, 加入 1 ml 甲醇: 水为 1:1 的溶液清洗 3 次; 再加入 1 ml 正丁醇: 甲醇: 水为 5:1:1 的溶液清洗 3 次; 向上述含糖链的收集液中加入 1 ml 正丁醇: 甲醇为 5:1 的溶液, 摇匀, 加入到清洗好的 Sepharose 4B 离心管中; 25℃, 180 r/min 震荡反应 45 min; 反应结束后, 9 000 r/min 离心 15 min, 收集上清于冷冻干燥仪中冻干, 即为分离纯化的糖链^[34].

1.8 MALDI-TOF-MS 解析糖链

应用 Bruker Daltonics 公司的 ultrafle Xtreme MALDI-TOF-MS 解析流感病毒 HA 的糖链. 将冻干糖链完全溶解于 50 μl 甲醇/水 (v/v) 为 1:1 的溶液中, 取此糖链溶液 1 μl 点样于靶板 MTP Anchorchip 384, 自然晾干后, 在此样品点加载 1 μl 以 20 g/L 50% 甲醇溶液溶解的 DHB 基质, 自然晾干; 设置质谱模式为反射、阳离子模式, 激发光源为 337 nm 氮气激光, 加速电压 20 kV, 分子质量检测范围为 1 000~5 000 u, 质谱仪校正外标选取标准肽校正混合物, 进行质谱检测. 检测时图谱采集来自于每个样品点上多个不同位置, 每个图谱连续扫描 1 500 次, 叠加全部图谱得到最后的糖链一级指纹图谱. 从一级图谱中选择质谱峰进行二级质谱分析, 以进一步分析糖链的组成和连键方式. 使用 Bruker 公司的 Flexcontrol 和 FlexAnalysis 软件进行质谱数据的采集和处理, 获得碎片的 m/z 数据及其对应糖链峰的强度值等信息, 同时使用软件 GlycoWorkbench (<http://code.google.com/p/glycoworkbench/>) 分析 m/z 数据并注释糖链^[34].

2 结 果

2.1 SAα2-3Gal-磁性微粒复合物上糖偶联量的测定

对环氧化磁性微粒进行羟基化修饰得到羟基化

磁性微粒, 羟基能和糖链的半缩醛基在酸性条件下反应, 从而将糖链共价偶联在其表面, 合成糖链磁性微粒复合物, 其可以特异识别糖结合蛋白质, 据此可应用糖链磁性微粒复合物分离纯化目标糖结合蛋白质^[29]. 因此, 选取禽流感病毒 HA 特异性结合的唾液酸糖链受体 SA α 2-3Gal, 将其偶联在羟基化磁性微粒上, 可合成用于分离纯化 HA 的 SA α 2-3Gal- 磁性微粒复合物. 采用硫酸-地衣酚法, 在 505 nm 下比色测定未结合至羟基化磁性微粒上的糖量和清洗下来的糖量, 偶联于羟基化磁性微粒表面的糖链 SA α 2-3Gal 的量为加入的总糖量减去未结合至磁性微粒上的糖量再减去清洗下来的糖量, 3 次平行实验, 计算出 1 mg 磁性微粒能偶联(14.61 $\pm$ 0.42) μ g SA α 2-3Gal 糖链.

2.2 SA α 2-3Gal-磁性微粒复合物的特异性

应用制备的 SA α 2-3Gal- 磁性微粒复合物对禽流感病毒 H7N2 HA 进行分离纯化, 并以甘露糖(mannose)磁性微粒复合物^[30]为阴性对照, 鸡胚尿囊液为阴性质控, 对提取的各组分进行 SDS-PAGE 鉴定, 结果如图 1 所示: 应用 SA α 2-3Gal- 磁性微粒复合物提取得到显示单一条带的蛋白质(泳道 7), 其分子质量在 58~80 ku 左右, 而甘露糖-磁性微粒复合物提取结果显示无蛋白质条带(泳道 8), 即连有甘露糖的磁性微粒无法从病毒液中提取到

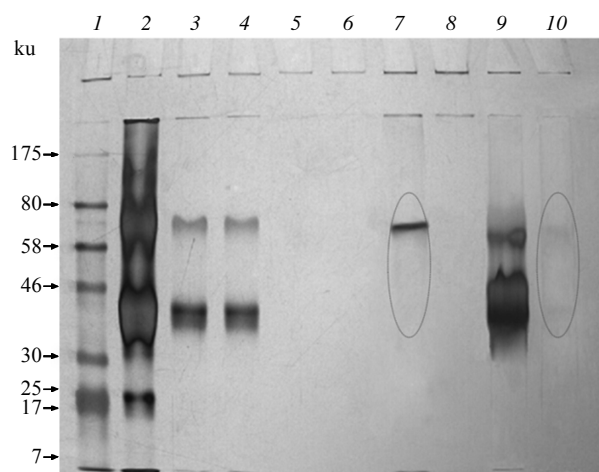


Fig. 1 Analysis of the purified components by SDS-PAGE

The purified proteins from H7N2 and allantoic fluid were subjected to 10% SDS-PAGE. Lane 1: Protein marker; Lane 2: The total protein of H7N2; Lane 3: Protein fractions not bound to SA α 2-3Gal; Lane 4: Protein fractions not bound to mannose; Lane 5, 6: Washing composition; Lane 7: Protein fraction bound to SA α 2-3Gal eluted by 0.5% SDS; Lane 8: Protein fraction bound to mannose eluted by 0.5% SDS; Lane 9: Allantoic fluid; Lane 10: Elution fractions from allantoic fluid.

HA, 说明本实验中 SA α 2-3Gal- 磁性微粒复合物分离提取禽流感 HA 具有特异性; 清洗之后组分内无残留蛋白质(泳道 5, 6), 说明应用 SA α 2-3Gal- 磁性微粒复合分离纯化 HA 的方法, 可以有效地去除病毒液中的杂质和其他非目标蛋白质, 进而纯化 HA; 最后洗脱得到单一蛋白质条带, 且 Bradford 法测得提纯的 HA 浓度为(0.432 $\pm$ 0.33) g/L; 从阴性质控鸡胚尿囊液中也可纯化出微量的蛋白质(泳道 10).

2.3 HA 的 MALDI-TOF-MS 鉴定

为获得精确的分子质量信息, 采用 MALDI-TOF-MS 进一步鉴定 SA α 2-3Gal- 磁性微粒复合物纯化得到的 HA, 得到肽指纹图谱如图 2. 应用 SA α 2-3Gal- 磁性微粒复合物分离纯化的 H7N2 禽流感病毒的蛋白质主峰在 73 ku 处, 接近于报道的禽流感病毒 HA 分子质量 76 ku^[19]. 此外, 还存在两个位于 68 ku 与 78 ku 左右的峰, 这些峰的产生可能是 HA 表面糖链的微不均一性造成的. HA 作为一种糖基化蛋白, 其去糖基化的 HA 分子质量约在 65 ku, 报道所述的 76 ku 是其糖基化修饰后的分子质量, 而糖链的修饰具有微观不均一性, 糖类分子的离子峰在 MALDI-TOF-MS 质谱图上往往表现为一簇峰. 因此血凝素分子质量可能因为糖基化修饰而产生微小差异, 故本实验提纯得到的分子质量为 73 ku 的蛋白质确系为 HA, 可用于后续实验.

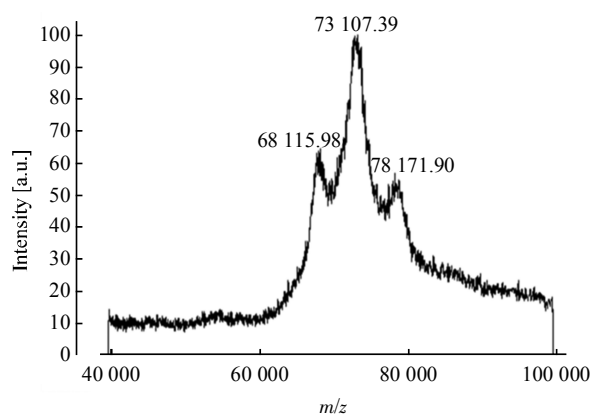


Fig. 2 Identification of the purified HA by MALDI-TOF-MS

The purified proteins from H7N2 was identified by MALDI-TOF-MS, and the results showed that its molecular mass was about 73 ku.

2.4 凝集素芯片分析 HA 表面糖链谱

荧光标记的 H7N2 HA 和纯化出的尿囊液蛋白

质分别与凝集素芯片孵育, 得到结果如图 3 所示, H7N2 HA 在芯片上显示出阳性信号的凝集素数量远远多于阴性尿囊液蛋白质的。用 GenePix 3.0 软件从扫描结果图中获取各凝集素与 HA 结合的信号强度值, 去除背景信号值, 以大于 2 倍背景值 SD 值为有效信号值, 对所有有效信号值分别进行中值归一化分析^[33, 35], 得出各个凝集素的相对荧光信号强度值(normalized fluorescent intensity, NFI)(表 1)。分析发现: a. PNA、MPL、VVA、EEL、DBA、ACA、BPL、RCA120、DSA、STL、AAL、LTL、HHL、LCA、ConA、NPA、PSA、PWM、UEA-I 和 GNA 等共有 20 种凝集素与 H7N2 HA 孵育后显示明显阳性信号(NFI > 0.020), 其中凝集素 LTL、ACA、ConA、STL、AAL、DSA 等 6 种凝集素显示相对较强信号(NFI > 0.040), 对应高表达糖链为: Fuc α 1-3(Gal β 1-4)GlcNAc、Gal β 1-3GalNAc α -Ser/Thr (T-antigen)、Man α 1-6 (Man α 1-3)Man、terminal

GlcNAc、 β -D-GlcNAc、(GlcNAc β 1-4) n 、Gal β 1-4GlcNAc、(GlcNAc) of N-glycan、oligosaccharide containing GlcNAc and MurNAc、Fuc α 1-6 GlcNAc (core fucose); b. 作为阴性质控, 分离出的阴性尿囊液蛋白质仅有 2 种凝集素, DSA 和 RCA120 显示阳性信号(NFI > 0.002), 对应高表达糖链为: β -D-GlcNAc、(GlcNAc β 1-4) n 、Gal β 1-4GlcNAc、 β -Gal 和 Gal β -1、4GlcNAc (type II); c. 与阴性尿囊液蛋白质孵育后显示阳性信号的凝集素, 与 H7N2 HA 孵育也呈明显阳性结果, 但其相对荧光信号值远远弱于 H7N2 HA 的结果, 提示 GlcNAc 和 Gal 糖链结构在鸡胚尿囊液中也少量存在; d. 由于 H7N2 HA 是由 SA α 2-3Gal- 磁性微粒复合物分离纯化, 提示这些高表达的 Fuc-(Gal)GlcNAc、Gal-GalNAc、Man α 1-6 (Man α 1-3)Man、terminal GlcNAc 等糖链结构可能与禽流感病毒 H7N2 HA 的生物学功能密切相关。

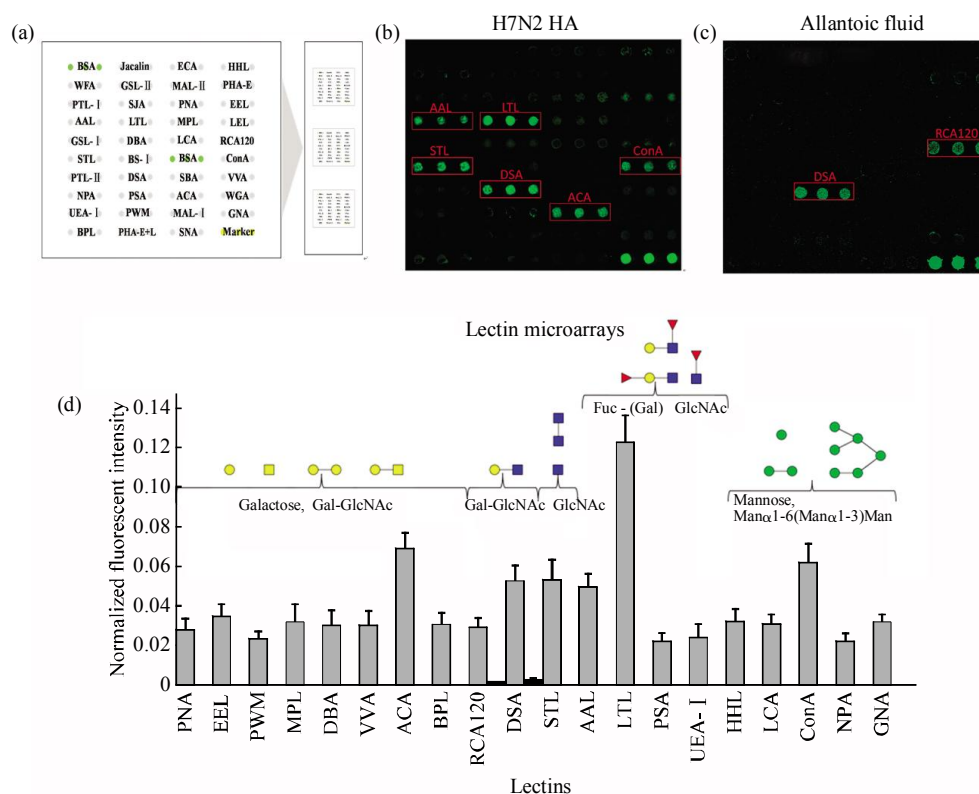


Fig. 3 Glycopatterns of H7N2 HA by lectin microarrays

(a) The layout of the lectin microarrays. Each lectin was spotted in triplicate per block, with triplicate blocks on one slide. Cy3-labeled BSA was spotted as a location marker and BSA as a negative control. (b) Fluorescence image of lectin microarrays incubated with Cy3-labeled H7N2 HA. 20 lectins showed significant positive signal, LTL, ACA, ConA, DSA, STL and AAL that were marked with red frames showed the stronger signals. (c) Fluorescence image of lectin microarrays incubated with allantoic Fluid. DSA, RCA120 that were marked with red frames showed the weaker signal. (d) Graphical representation of the array data from H7N2 HA mainly expressing galactose, Fuc-(Gal)GlcNAc, Gal-GlcNAc, mannose and allantoic fluid expressing galactose and Gal-GlcNAc. ■: H7N2 HA; ■: Allantoic fluid.

Table 1 Relative expression levels of glycan from H7N2 HA and allantoinic fluid

Lectin	Specificity	Normalized fluorescent intensity, NFI $\pm$ SD	
		H7N2 HA	Allantoic fluid
HHL	Non-substituted α -1, 6Man	0.032 $\pm$ 0.006	–
LTL	Fuc α 1-3(Gal β 1-4)GlcNAc, anti-H blood group specificity	0.124 $\pm$ 0.014	–
PNA	Gal β 1-3GalNAc α -Ser/Thr(T)	0.028 $\pm$ 0.006	–
EEL	Gal α 1-3(Fuc α 1-2)Gal (blood group B antigen)	0.035 $\pm$ 0.006	–
AAL	Fuc α 1-6 GlcNAc(core fucose), Fuc α 1-3(Gal β 1-4)GlcNAc	0.050 $\pm$ 0.007	–
MPL	Gal β 1-3GalNAc, GalNAc	0.032 $\pm$ 0.010	–
DBA	α GalNAc,Tn antigen, GalNAc α 1-3((Fuc α 1-2))Gal (blood group A antigen)	0.031 $\pm$ 0.008	–
LCA	α -D-Man, Fuc α -1, 6GlcNAc, α -D-Glc	0.031 $\pm$ 0.005	–
RCA120	β -Gal, Gal β -1, 4GlcNAc (type II), Gal β 1-3GlcNAc (type I)	0.029 $\pm$ 0.005	0.002 $\pm$ 0.001
STL	Trimers and tetramers of GlcNAc, core (GlcNAc) of N-glycan, oligosaccharide containing GlcNAc and MurNAc	0.053 $\pm$ 0.011	–
ConA	High-Mannose, Man α 1-6(Man α 1-3)Man, terminal GlcNAc	0.062 $\pm$ 0.010	–
DSA	β -D-GlcNAc, (GlcNAc β 1-4) _n , Gal β 1-4GlcNAc	0.053 $\pm$ 0.008	0.003 $\pm$ 0.001
VVA	Terminal GalNAc, GalNAc α -Ser/Thr(Tn), GalNAc α 1-3Gal	0.030 $\pm$ 0.007	–
NPA	High-Mannose, Man α 1-6Man	0.022 $\pm$ 0.004	–
PSA	Fucose α -1, 6GlcNAc(core fucose)	0.022 $\pm$ 0.005	–
ACA	Gal β 1-3GalNAc α -Ser/Thr(T-antigen)	0.069 $\pm$ 0.008	–
UEA-I	Fucose α 1-2Gal β 1-4Glc(NAc)	0.024 $\pm$ 0.007	–
PWM	Branched (LacNAc) _n	0.024 $\pm$ 0.004	–
GNA	Terminal α -1, 3 mannose	0.032 $\pm$ 0.004	–
BPL	Gal β 1-3GalNAc, Terminal GalNAc	0.031 $\pm$ 0.006	–

The data were the averaged NFI $\pm$ S.D. of three biological replicates; ‘–’ Declare no significant data.

2.5 质谱解析 HA 的表面糖链结构

为获得禽流感病毒 H7N2 HA 更准确的糖链结构信息, 应用 MALDI-TOF-MS 以及 MS/MS 技术解析 H7N2 HA 的糖链结构. 质谱时应用 Flexcontrol 和 FlexAnalysis 软件进行数据采集和处理, 获得 m/z 数据及其对应糖链峰的强度值等信息. 从 FlexAnalysis 软件中打开数据, 取信噪比大于 6, 且被至少三次鉴定到的质谱峰做后续分析. 将所得糖链的 m/z 和信号强度结果以 txt 格式导入至 Glycoworkbench 软件中进行分析. 选择糖链数据库 Carbbank 和 GlycomeDB, 依次优先选取来自

流感病毒、鸡胚、卵清蛋白质、鸡(禽类)的糖链结构对相应糖链峰进行注释, 最终得到的可能糖链结构如图 4 所示, 对 H7N2 HA 的糖链结构解析共获得 16 个糖链峰, 涉及的糖链结构可能有 mannose、galactose、Gal-GlcNAc、GalNAc-GlcNAc、fucose-GlcNAc 等, 而阴性尿囊液只显示 2 个糖链峰, 可能存在 mannose、Gal-GlcNAc 等糖链结构. 此外, 阴性尿囊液中糖链出峰位置 m/z 1663.6480 和 m/z 1866.7190 在 H7N2 HA 相应位置亦出峰, 但其强度远远低于 H7N2 HA, 这与凝集素芯片结果一致.

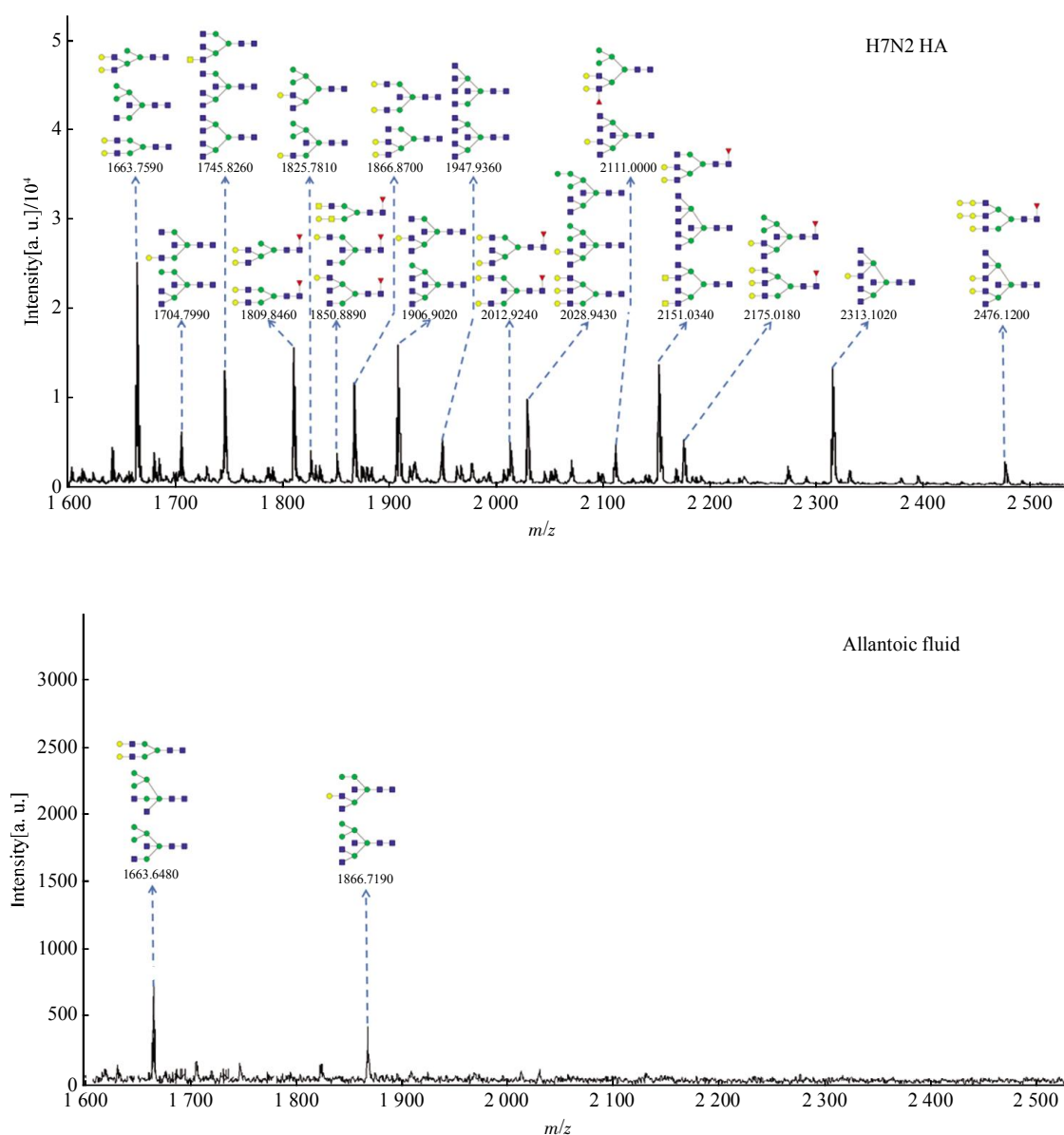


Fig. 4 Glycan structures of H7N2 HA and allantoic fluid according to MALDI-TOF-MS

●: Galactose; ●: Mannose; ■: GlcNAc; ■: GalNAc; ▲: Fucose.

2.6 二级质谱分析 HA 糖链的组成、分支及糖苷键连接方式

为了分析 HA 糖链的精细结构, 对一级质谱显示的糖链进一步碎片离子化. 经过串联二级质谱的检测和软件分析, 获得糖链峰的二级图谱和较为精确的糖链结构, 部分结果如图 5 所示. 糖链碎片大多是从糖苷键的位置断裂的(即 y^+ 和 b^+ 离子), 这可能是糖苷键断裂需要的能量相对穿环断裂需要的能量小, 如 m/z 1745.8260 的碎片 591.2008 和 m/z

1866.8700 的碎片 1663.5814. 同时也存在穿环断裂, 如 m/z 1866.8700 的碎片 711.2430 和 m/z 1906.9020 的碎片 1603.5603. 从 m/z 1745.8260 的碎片 753.2536 和 914.3223 可以推断该糖链含有分支结构. 由 m/z 1866.8700 的碎片 388.1214 可以推断该糖链结构中存在 Gal-GlcNAc 或 GlcNAc-mannose 连接的糖链结构, 进一步从后面的碎片可以推断其连接方式. 同样地, m/z 1906.9020 的二级碎片分析也为其糖链组成的分析提供了大量的信息.

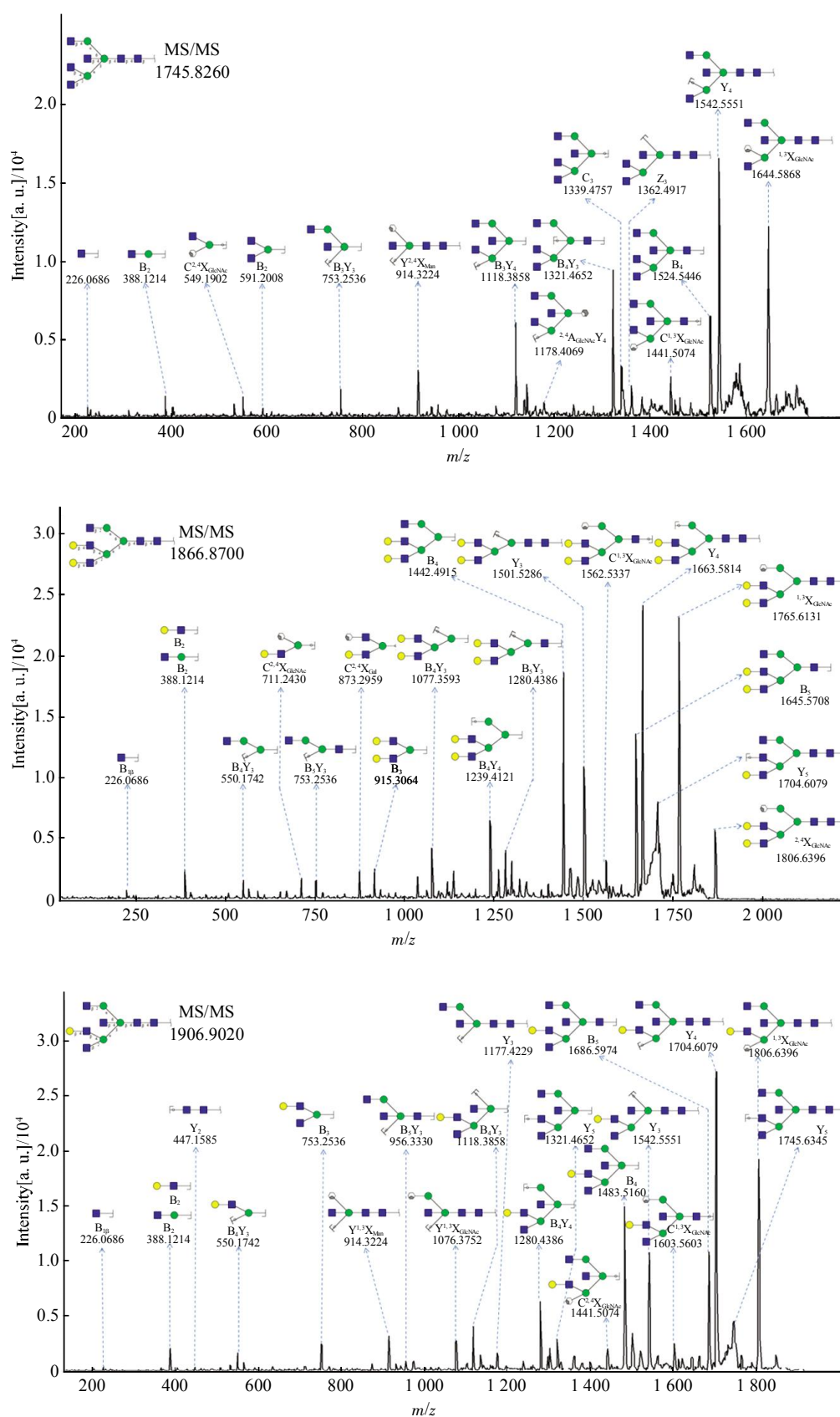


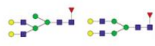
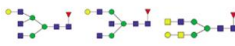
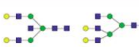
Fig. 5 Glycan structures according to MALDI-TOF-MS/MS

2.6 禽流感病毒 H7N2 HA 的糖链谱

凝集素芯片实验显示 HA 表面高表达 Fuc-(Gal) GlcNAc、Gal-GalNAc、Man α 1-6 (Man α 1-3)Man、terminal GlcNAc 等糖链结构, 质谱结果显示 HA 表

面至少存在 16 个糖链峰, 而二级质谱技术进一步绘制出各糖链峰的糖链组成, 综合所有实验结果, 得到 H7N2 HA 上较为精确的糖链结构, 如表 2.

Table 2 Probable glycan structure of H7N2 HA and allantoic fluid

No.	<i>m/z</i>	Glycan structure shown in mass	Glycan structure predicted with lectin microarrays and MS/MS
H7N2 HA			
1	1663.7590		
2	1704.7990		
3	1745.8260		
4	1809.8460		
5	1825.7810		
6	1850.8890		
7	1866.8700		
8	1906.9020		
9	1947.9360		
10	2012.9240		
11	2028.9430		
12	2111.0000		
13	2151.0340		
14	2175.0810		
15	2313.1020		
16	2476.1200		
Allantoic fluid			
1	1663.6480		
2	1866.7190		

3 讨 论

近年来, 禽流感病毒感染人的事件屡有发生, 从最早 1997 年的 H5N1, 到 2013 年流行的 H7N9, 死亡率之高, 俨然为人类敲响了警钟. 这种难以预测的局部流行和有可能引发全球大流行, 一直威胁着全社会. 甲型流感病毒表面 HA 与宿主细胞表面 SA α 2-3Gal 或 SA α 2-6Gal 糖链末端受体的结合, 是流感病毒侵染宿主、进而复制并继续传播的开始. HA 的糖基化不仅可以影响与受体的结合活性, 还能影响病毒毒力, 参与病毒的演化. 因此, HA 糖链在流感病毒生命周期和演化中发挥了重要作用, 准确掌握流感病毒宿主细胞表面糖链结构及结构变化带来的影响, 有助于理解糖链在流感病毒感染中的重要生物学功能, 发现关键糖基化位点, 有助于人们进一步加强对流感病毒的防控.

纯化流感病毒 HA 是研究流感病毒 HA 的基础环节, 本文发展了一种快速高效分离纯化流感病毒 HA 的方法, 其能从灭活裂解经鸡胚增殖的流感病毒或细胞培养的流感病毒液中快速分离纯化流感病毒 HA. 首先对环氧化磁性微粒进行羟基化修饰, 再利用羟醛缩合原理, 将禽流感病毒特异性识别的唾液酸化糖链 SA α 2-3Gal 偶联于羟基化磁性微粒表面, 合成 SA α 2-3Gal- 磁性微粒复合物, 然后将初步纯化后的裂解流感病毒液与其混合, HA 由于与唾液酸糖链结合而被吸附于 SA α 2-3Gal- 磁性微粒复合物上; 再对特异吸附 HA 的糖链微粒复合物进行清洗, 除去病毒液中的杂质和其他非特异结合的蛋白质; 最后从 SA α 2-3Gal- 磁性微粒复合物上洗脱得到纯度较高的 HA, 即可用于后续研究.

复杂样品中糖链结构解析一直是糖组学研究的难点之一, 凝集素由于其可特异性识别不同糖链结构并可以多价形式与特定糖链高亲和性结合的特性, 被广泛用于糖组学的研究. 凝集素芯片技术通过固定于芯片上的凝集素探针与样品中糖蛋白糖链特异性结合, 可以高通量地检测出样品中糖蛋白糖链结构和连接方式的变化, 是研究糖蛋白糖链结构变化最有效的分析工具之一. 凝集素芯片技术在快速检测某一类型的糖链结构以及对糖链连键的区分(如区分 2-3/6 唾液酸连键)等方面都具有很大的优势, 但是凝集素对糖链结构的识别并不是一一对应的关系, 不是一种凝集素识别一种糖链结构, 而是一种凝集素能够识别一类糖链结构, 因此对于糖链结构的解析而言, 凝集素得到的信息不够精确. 此

外, 凝集素芯片结果得到的一般为糖链的部分结构信息而非糖链结构的完整信息, 一般不容易判断该糖链结构存在于哪种聚糖中. 对糖链结构的解析也需要其他技术, 如质谱技术作为补充^[6]. 质谱技术可以通过较低能量的碰撞诱导解离得到非修饰的寡糖链和糖肽碎片, 从而获得糖链的组成和连键信息, 并能推测出可能的完整糖链结构. 凝集素芯片和质谱技术联用能得到较为准确的完整糖链结构.

应用 SA α 2-3Gal- 磁性微粒复合物从禽流感病毒 H7N2 中分离纯化得到的 HA, 凝集素芯片进一步分析, 发现 H7N2 HA 可引起 20 种凝集素显示明显阳性信号, 表明 H7N2 禽流感病毒血凝素的表面主要表达 Fuc α 1-3 (Gal β 1-4)GlcNAc、Gal β 1-3GalNAc α -Ser/Thr (T-antigen)、Man α 1-6 (Man α 1-3)Man、terminalGlcNAc、 β -D-GlcNAc、(GlcNAc β 1-4)n、Gal β 1-4GlcNAc、(GlcNAc) of N-glycan、oligosaccharide containing GlcNAc 和 MurNAc、Fuc α 1-6 GlcNAc (core fucose)、Fuc α 1-3 (Gal β 1-4)GlcNAc 等糖链结构; 再联合质谱技术解析 H7N2 HA 的糖链结构, 共获得 16 个糖链结构较为准确的寡糖. 这些糖链可能影响流感病毒识别宿主的特异性, 影响病毒的宿主范围和毒力, 并参与病毒的免疫逃逸等过程. 本文的研究有助于揭示禽流感病毒感染宿主的糖链作用机制, 有助于进一步理解和寻找流感病毒关键感染作用的糖基化位点, 有助于新型流感病毒疫苗及药物的设计以及发展新技术新方法, 可为流感病毒的监测和防治提供新的理论依据和技术支持.

参 考 文 献

- [1] Schulze I T. Effects of glycosylation on the properties and functions of influenza virus hemagglutinin. *J Infect Dis*, 1997, **176**(Suppl 1): S24-28
- [2] Stephenson I, Nicholson K G, Glück R, *et al.* Safety and antigenicity of whole virus and subunit influenza A/Hong Kong/1073/99 (H9N2) vaccine in healthy adults: phase I randomised trial. *Lancet*, 2003, **362**(9400): 1959-1966
- [3] Lupiani B, Reddy S M. The history of avian influenza. *Comp Immunol Microbiol Infect Dis*, 2009, **32**(4): 311-323
- [4] Medina R A, García-Sastre A. Influenza A viruses: new research developments. *Nat Rev Microbiol*, 2011, **9**(8): 590-603
- [5] Tate M D, Brooks A G, Reading P C. Receptor specificity of the influenza virus hemagglutinin modulates sensitivity to soluble collectins of the innate immune system and virulence in mice. *Virology*, 2011, **413**(1): 128-138
- [6] de Vries R P, Zhu X, McBride R, *et al.* Hemagglutinin receptor specificity and structural analyses of respiratory droplet-

- transmissible H5N1 viruses. *J Virol*, 2014, **88**(1): 768–773
- [7] Wilks S, de Graaf M, Smith D J, *et al.* A review of influenza haemagglutinin receptor binding as it relates to pandemic properties. *Vaccine*, 2012, **30**(29): 4369–4376
- [8] Skehel J J, Wiley D C. Receptor binding and membrane fusion in virus entry: the influenza hemagglutinin. *Annu Rev Biochem*, 2000, **69**(1): 531–569
- [9] Xu R, McBride R, Paulson J C, *et al.* Structure, receptor binding, and antigenicity of influenza virus hemagglutinins from the 1957 H2N2 pandemic. *J Virol*, 2010, **84**(4): 1715–1721
- [10] Zhirnov O P, Vorobjeva I V, Saphonova O A, *et al.* Structural and evolutionary characteristics of HA, NA, NS and M genes of clinical influenza A/H3N2 viruses passaged in human and canine cells. *J Clin Virol*, 2009, **45**(4): 322–333
- [11] Das S R, Puigbò P, Hensley S E, *et al.* Glycosylation focuses sequence variation in the Influenza A Virus H1 hemagglutinin globular domain. *PLoS Pathog*, 2010, **6**(11): e1001211
- [12] Chen W, Zhong Y, Qin Y, *et al.* The evolutionary pattern of glycosylation sites in influenza virus (H5N1) hemagglutinin and neuraminidase. *PLoS One*, 2012, **7**(11): e49224
- [13] Hillaire M L, van Eijk M, Nieuwkoop N J, *et al.* The number and position of N-linked glycosylation sites in the hemagglutinin determine differential recognition of seasonal and 2009 pandemic H1N1 influenza virus by porcine surfactant protein D. *Virus Res*, 2012, **169**(1): 301–305
- [14] Chen W, Sun S, Li Z. Two glycosylation sites in H5N1 influenza virus hemagglutinin that affect binding preference by computer-based analysis. *PLoS One*, 2012, **7**(6): e38794
- [15] Stevens J, Blixt O, Tumpey T M, *et al.* Structure and receptor specificity of the hemagglutinin from an H5N1 influenza virus. *Science*, 2006, **312**(5772): 404–410
- [16] 钟耀刚, 秦桢楠, 孙士生, 等. 流感病毒识别糖链受体分子机制的研究进展. *生物化学与生物物理进展*, 2012, **39**(7): 605–612
Zhong Y G, Qin Y N, Sun S S, *et al.* *Prog Biochem Biophys*, 2012, **39**(7): 605–612
- [17] Viswanathan K, Koh X, Chandrasekaran A, *et al.* Determinants of glycan receptor specificity of H2N2 influenza A virus hemagglutinin. *PLoS One*, 2010, **5**(10): e13768
- [18] Sun S, Wang Q, Zhao F, *et al.* Prediction of biological functions on glycosylation site migrations in human influenza H1N1 viruses. *PLoS One*, 2012, **7**(2): e32119
- [19] 孙士生, 王秦哲, 李 铮. 流感病毒糖蛋白糖链的作用和功能研究. *中国科学: 化学*, 2011, **41**(3): 424–432
Sun S S, Wang Q Z, Li Z. *Scientia Sinica Chimica*, 2011, **41**(3): 424–432
- [20] Arinaminpathy N, Grenfell B. Dynamics of glycoprotein charge in the evolutionary history of human influenza. *PLoS One*, 2010, **5**(12): e15674
- [21] Sun S, Wang Q, Zhao F, *et al.* Glycosylation site alteration in the evolution of influenza A (H1N1) viruses. *PLoS One*, 2011, **6**(7): e22844
- [22] Stevens J, Blixt O, Paulson J C, *et al.* Glycan microarray technologies: tools to survey host specificity of influenza viruses. *Nat Rev Microbiol*, 2006, **4**(11): 857–864
- [23] 张增峰, 樊晓晖, 李康生, 等. 人呼吸道禽流感病毒受体的分布趋势. *生物化学与生物物理进展*, 2008, **35**(12): 1387–1393
Zhang Z F, Fan X H, Li K S, *et al.* *Prog Biochem Biophys*, 2008, **35**(12): 1387–1393
- [24] Blake T A, Williams T L, Pirkle J L, *et al.* Targeted N-linked glycosylation analysis of H5N1 influenza hemagglutinin by selective sample preparation and liquid chromatography/tandem mass spectrometry. *Anal Chem*, 2009, **81**(8): 3109–3118
- [25] 杨 利, 张增峰, 樊晓晖, 等. 鸬鹚禽流感病毒和人流感病毒唾液酸受体分布特征. *中国人兽共患病杂志*, 2014, **30**(6): 545–550
Yang L, Zhang Z F, Fan X H, *et al.* *Chin J Zoonoses*, 2014, **30**(6): 545–550
- [26] 简 强, 于汉杰, 陈 超, 等. 凝集素芯片技术检测糖蛋白方法的建立及初步应用. *生物化学与生物物理进展*, 2009, **36**(2): 254–259
Jian Q, Yu H J, Chen C, *et al.* *Prog Biochem Biophys*, 2009, **36**(2): 254–259
- [27] Qin Y, Zhong Y, Dang L, *et al.* Alteration of protein glycosylation in human hepatic stellate cells activated with transforming growth factor- β 1. *Journal of Proteomics*, 2012, **75**(13): 4114–4123
- [28] Opitz L, Zimmermann A, Lehmann S, *et al.* Capture of cell culture-derived influenza virus by lectins: Strain independent, but host cell dependent. *J Virol Methods*, 2008, **154**(1–2): 61–68
- [29] Sun X, Yang G, Sun S. *et al.* The hydroxyl-functionalized magnetic particles for purification of glycan-binding proteins. *Curr Pharm Biotechnol*, 2009, **10**(8): 753–760
- [30] Yang G, Chu W, Zhang H, *et al.* Isolation and identification of mannose-binding proteins and estimation of their abundance in sera from Hepatocellular Carcinoma patients. *Proteomics*, 2013, **13**(5): 878–892
- [31] Yang G, Cui T, Chen Q, *et al.* Isolation and identification of native membrane glycoproteins from living cell by concanavalin A-magnetic particle conjugates. *Anal Biochem*, 2012, **421**(1): 339–341
- [32] Qin Y, Zhong Y, Zhu M, *et al.* Age- and sex-associated differences in the glycoproteins of human salivary glycoproteins and their roles against influenza A virus. *Journal of Proteome Research*, 2013, **12**(6): 2742–2754
- [33] Yu H, Zhu M, Qin Y, *et al.* Analysis of glycan-related genes expression and glycan profiles in mice with liver fibrosis. *Journal of Proteome Research*, 2012, **11**(11): 5277–5285
- [34] 杨刚龙, 马恬然, 李 铮. 基于超滤膜辅助的糖蛋白全 N-连接糖链的富集和质谱解析. *生物化学与生物物理进展*, 2014, **41**(4): 403–408
Yang G L, Ma T, Li Z. *Prog Biochem Biophys*, 2014, **41**(4): 403–408
- [35] Kuno A, Kato Y, Matsuda A, *et al.* Focused differential glycan analysis with the platform antibody-assisted lectin profiling for glycan-related biomarker verification. *Mol Cell Proteomics*, 2009, **8**(1): 99–108
- [36] 李 铮. 糖组学研究技术. 北京: 高等教育出版社. 2015
Li Z. *Technology for Glycomics Beijing*: Higher Education Press. 2015

Purification and Glycan Profile of Hemagglutinin From Avian Influenza A (H7N2) Virus*

LI Xue-Tian¹⁾, SUN Yu¹⁾, DU Ya-Rong¹⁾, WANG Xi-Long¹⁾, ZHANG Pei-Xin¹⁾,
ZHONG Yao-Gang¹⁾, MA Tian-Ran¹⁾, WANG Xiu-Rong²⁾, LI Zheng^{1)**}

¹⁾ *Laboratory for Functional Glycomics, College of Life Sciences, Northwest University, Xi'an 710069, China;*

²⁾ *National Key Laboratory of Veterinary Biotechnology, Harbin Veterinary Research Institute,
Chinese Academy of Agricultural Science, Harbin 150001, China)*

Abstract Hemagglutinin(HA)is a type I transmembrane glycoprotein which is located in the surface of the influenza virus envelope. It plays a pivotal role in binding with sialyloligosaccharides receptor on host cell surface and mediated viral entry into cells. It is also the important target of neutralizing antibodies and vaccine development. The glycosylation of HA is closely associated with viral virulence, host range and other infections. In addition, glycosylation and pattern alterations also affect the structural roles as well as diverse functional roles of HA in many specific biological process. However, little is known about the precise glycan structures on the surface of HA. In this study, we prepared a specific SA α 2-3Gal Magnetic Particle Conjugates, which was used to purify HA from avian influenza A (H7N2) virus. The isolated HA was identified by SDS-PAGE and MALDI-TOF-MS. Then, the glycan profile of HA was analyzed by the lectin microarrays and mass spectrometry. The results showed that the glycan structures such as fucose, galactose, N-acetylgalactosamine, mannose, and N-acetylglucosamine were expressed on the surface of HA and 16 glycans with the precise structure were acquired. These glycans may be associated with the biological functions of HA, and helps to reveal the glycan mechanism of avian influenza virus how to effect the host specificity, virulence and infectivity of the influenza virus, as well as design the vaccine based on glycan structures on the surface of HA.

Key words avian influenza virus, hemagglutinin, glycan profile, lectin microarrays, mass spectrometry

DOI: 10.16476/j.pibb.2015.0026

*This work was supported by a grant from The International S&T Cooperation Program (2009DFA32730) from the Chinese Ministry of Science and Technology.

**Corresponding author.

Tel: 86-29-88304104, E-mail: zhengli@nwu.edu.cn

Received: January 23, 2015 Accepted: May 4, 2015