

禽流感病毒 HA 基因真核表达质粒的构建与表达

张强哲²⁾ 秦曦明¹⁾ 梁 荣¹⁾ 邓明俊²⁾ 何宏轩¹⁾ 张彦明²⁾ 郑昌学¹⁾ 段明星^{1)*}

(¹⁾清华大学生物科学与技术系, 生物膜与膜生物工程国家重点实验室, 北京 100084;

²⁾西北农林科技大学动物科技学院, 杨凌 712100)

摘要 血凝素蛋白 (HA) 基因是禽流感病毒 (AIV) 重要的保护性抗原基因。为了研究 HA 基因疫苗, 用 PCR 扩增 H5 亚型 AIV HA 基因, 将其克隆到质粒 pcDNA4/HisMax 和 pRc/CMV 上得到真核表达质粒 pC4H5 和 pCMVH5。采用 TfxTM-20、Superfect 转染试剂和电转染法转染 HeLa 细胞, 转染后的 HeLa 细胞经蛋白质印迹和血凝试验检测 HA 蛋白及其活性。结果表明, Superfect 转染和电转染均能正确表达 HA 蛋白并具有生物学活性, 蛋白质印迹检测到 HA 和 HA 裂解的 HA1 和 HA2, 与 AIV 的 HA、HA1、HA2 蛋白的分子质量一致。从血凝试验结果看, Superfect 和电转染表达的 HA 均具有血凝活性, 而经 Superfect 转染的 pC4H5 的表达量是 pCMVH5 的 8 倍, 表明 pC4H5 是一高效的真核表达质粒。

关键词 禽流感病毒, HA 基因, 真核表达质粒, 表达, 生物活性

学科分类号 S852.659.5

禽流感 (avian influenza, AI) 是由 A 型流感病毒引起的禽类烈性传染病, 严重威胁世界各地的养禽业, 常常造成巨大的经济损失^[1], 尤其是 H5、H7 亚型引起的高致病力禽流感 (highly pathogenic avian influenza, HPAIV) 是养禽业的一种灾难性疾病^[2]。

血凝素蛋白 (hemagglutinin, HA) 在病毒入侵过程中起重要作用, 病毒与宿主细胞结合后, HA 诱导病毒囊膜与细胞膜结合, 使病毒粒子进入细胞。病毒要具有侵染性, 必须经过两个过程: a. 宿主蛋白酶将 HA 裂解为 HA1 和 HA2。b. 裂解后的 HA2 暴露出疏水区并与宿主细胞膜脂双层相互结合^[3]。禽流感病毒 HA 裂解为 HA1 和 HA2 是 AIV 致病的重要因素, 在病毒入侵细胞及决定病毒致病力方面起着关键作用。低致病力禽流感病毒 (low pathogenic avian influenza virus, LPAIV) 在 HA 裂解位点上只有一个碱性氨基酸——精氨酸^[4], 这种结构只能被存在于呼吸道和消化道内的精氨酸特异蛋白酶识别并裂解, 因此, LPAIV 感染一般只在呼吸道和消化道内局部繁殖。而 HPAIV 在 HA 裂解位点具有多个碱性氨基酸^[4], 可被机体大多数组织细胞内的蛋白酶识别并裂解, 具有广泛的嗜细胞性。HA 切割位点处多个碱性氨基酸的插入和 HA 上糖基化位点的丢失均能使 AIV 的致病性增高^[5]。

1997 年香港高致病性禽流感 H5N1 不经过中间宿主而直接由鸡传染给人, 导致 18 人感染, 6 人死亡^[6-8], 打破了传统认为的禽流感病毒需在中间宿主体内与人流感重组才能感染人的概念。这引起了

许多科学家的高度重视, 并正在努力寻找保护率更高, 更有效, 更便捷的方法, 以保护家禽和人类免受 HPAIV 的攻击^[9]。我们将对鸡具有高致病性的 HPAIV 鹅体分离株 A/GOOSE/GUANGDONG/1/96 (H5N1) 的 HA 基因构建到 QBI sp163 转录增强子和 CMV 启动子下, 在 HeLa 细胞中进行表达, 并检测到表达的 HA 蛋白, 为 H5 DNA 疫苗的后期工作打下了坚实的基础。

1 材料和方法

1.1 质粒和菌种

含 AIV H5 基因的质粒 PCH5 由哈尔滨兽医研究所于康震研究员惠赠; 载体 pcDNA4/HisMax 购自 Invitrogen 公司; pRc/CMV 质粒由 Chember 博士惠赠; *E. coli* DH5 α 由本室保存; HeLa 细胞由清华大学基因组研究所提供。

1.2 工具酶及主要试剂

DNA 限制性内切酶、T4 DNA 连接酶、TfxTM-20 reagent 购自 Promega 公司; Taq plus DNA 聚合酶、dNTP 购自上海生工公司; Superfect Transfection Reagent 购自 QIAGEN 公司; ECF Western blotting kit 为 Pharmacia 公司产品。

1.3 AIV H5 基因真核表达质粒的构建

1.3.1 AIV H5 基因的体外扩增: 根据 pcDNA4/HisMax 和 pRc/CMV 两个载体和 H5 基因序列分

* 通讯联系人。

Tel: 010-62773255, E-mail: duanmx@mail.tsinghua.edu.cn

收稿日期: 2002-11-20, 接受日期: 2002-12-16

别设计了两对引物 F1、R1 和 F2、R2, 扩增包括 H5 基因完整的开放阅读框架 (ORF) 共 1 707 bp. 两对引物及包含的酶切位点如下: F1 5' GC-GCGATATCCATGGAGAGAATAGTGCTTCT-T3' (*EcoR* V), R1 5' GGCCCTCGAGCTACAATCG-TGAACTCCATAAT3' (*Xho* I), F2 5' GCAAAAG-CTTCATGGAGAGAATAGTGCTTC3' (*Hind* III), R2 5' ATAGCGCGCTACAATCGTGAACTCCAT-AA3' (*BSSH* II).

引物由 TAKARA 公司 (大连分公司) 合成, PCR 反应条件为: 95℃ 预变性 5 min, 94℃ 1 min, 57℃ 1 min, 72℃ 2 min, 36 个循环后 72℃ 延伸 10 min.

1.3.2 AIV H5 基因的重组和鉴定: H5 基因的 PCR 扩增产物和 pCDNA4/HisMax 及 pRc/CMV 经双酶切处理后分别进行回收, 经 T4 DNA 连接酶连接后, 转化入 DH5 α 中经抗性筛选得到阳性重组子. 提取质粒对目的基因作限制性酶切鉴定和序列鉴定, 构建的真核表达质粒分别命名为 pC4H5 和 pCMVH5.

1.4 AIV H5 基因的体外表达

1.4.1 TfxTM-20 转染 HeLa 细胞: 按 TfxTM-20 试剂盒说明操作. 接种 5.5×10^5 个 HeLa 细胞于 60 mm 平板上, 待细胞达 80% 融合时, 将 TfxTM-20 与 pC4H5 和 pCMVH5 以 2:1 的电荷比混合转染 HeLa 细胞, 培养 48 h 后收集转染的 HeLa 细胞于冰预冷的 1.5 ml 离心管, 并作细胞计数. 一半用细胞裂解液 (400 mmol/L KCl, 10 mmol/L Na₂HPO₄, 1 mmol/L EDTA, 1 mmol/L DTT, 10% 甘油, 1 mmol/L PMSF, 0.5% NP-40) 裂解, 4℃ 12 000 g 离心 10 min, 回收上清, 另一半反复冻融裂解细胞, -20℃ 保存备用.

1.4.2 Superfect 转染 HeLa 细胞: 按照 Superfect transfect Reagent Kit 说明操作. 接种 $2 \times 10^5 \sim 8 \times 10^5$ 细胞于 60 mm 板中, 待细胞达 40%~80% 融合时, 将 pC4H5、pCMVH5 和 Superfect 试剂以质量与体积比为 1:5 的比例转染 HeLa 细胞, 37℃, 5% CO₂ 中培养 48 h 收获细胞. 一半用细胞裂解液裂解收获上清, 一半反复冻融细胞, -20℃ 保存备用.

1.4.3 电转染法体外转染 HeLa 细胞: 将培养好的 HeLa 细胞用 10% FCS PMEM 调至细胞密度 5×10^6 /ml, 取 700 μ l 加入 4 mm 电激杯内, 用

ECM830 电穿孔仪在电压 125 V, 波长为 99 ms, 波数为 2 个的条件下电击, 电击后置于 100 mm 板中培养, 待细胞贴壁后, 除去死亡细胞, 培养 48 h 收获细胞, 一半用细胞裂解液裂解, 收获上清, 一半反复冻融裂解细胞, -20℃ 保存备用.

1.5 H5 型血凝素的蛋白质印迹检测

SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳 (SDS-PAGE) 按照《分子克隆实验指南》方法进行, 积层胶为 5%, 分离胶为 15%, 积层胶电压为 130 V, 分离胶为 160 V. 上样量为 20 μ l (每孔约 4×10^5 个细胞), 设阳性对照, 阴性对照, 蛋白质低分子质量标准蛋白. 电泳结束后立即进行电转移, 条件为 30 V, 90 mA, 4℃ 过夜电转, 结束后用丽春红染色, 标出分子质量标准的位置. 用 5% 脱脂奶粉封闭, 一抗为哈尔滨兽医研究所提供抗 H5 的鸡血清, 800 倍稀释, 二抗为碱性磷酸酶标记的兔抗鸡的 IgG, 2 000 倍稀释; 底物为 ECF 试剂盒底物 (24 μ l/cm²), 在室温作用 10~20 min 用 STORM 在 Fluorescence mode Blue 450 nm 波长下扫描结果.

1.6 H5 型血凝素的活性检测

将上述细胞冻融裂解液 50 μ l (1×10^6 个) 依次作梯度稀释, 再分别加入 1% 鸡红细胞观察其血凝价.

2 结 果

2.1 AIV H5 基因真核表达载体的构建

用设计的两对引物经 PCR 扩增、酶切、连接、转化, 成功地将 1 707 bp 的 H5 全长基因亚克隆到 pCDNA4/HisMax 和 pRc/CMV 载体中, 得到 2 个含有 H5 基因的重组真核表达质粒 pC4H5 和 pCMVH5. pC4H5 经限制性内切酶 *EcoR* V 和 *Xho* I 双酶切, pCMVH5 经 *Hind* III 和 *BSSH* II 双酶切均获得 1.7 kb 的目的基因. pC4H5 和 pCMVH5 的序列由 TAKARA 公司 (大连分公司) 测定, 测序的序列经序列分析软件进行分析, 结果表明测序结果与设计结果完全一致, 均能找到包含 H5 基因完整的开放阅读框架, 表明两真核表达质粒构建成功. 酶切鉴定和测序结果图略.

2.2 pC4H5 和 pCMVH5 体外表达结果

用 Superfect 转染的 HeLa 细胞, 细胞裂解液经蛋白质印迹检测到 HA 及由 HA 裂解的 HA1 和 HA2, 和 AIV 的 HA、HA1、HA2 的分子质量一致 (图 1a), 电转染也检测到与 AIV 一致的 HA (图 1b), TfxTM-20 转染没有检测到 HA (图 1c).

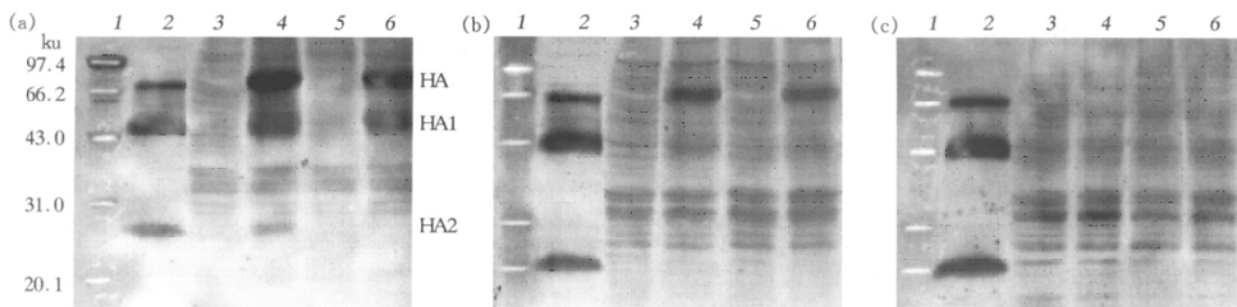


Fig. 1 Western blotting result of expressed HA of HeLa cell

(a) Superfect transfection method; (b) electroporation method; (c) TfxTM-20 transfection method. 1: protein molecular mass marker; 2: AIV HA control; 3: pcDNA4/HisMax; 4: pC4H5; 5: pRc/CMV; 6: pCMVH5.

2.3 HeLa 细胞表达的 HA 血凝实验结果

Superfect (SF) 转染和电转染 (EP) 表达的 HA 均检测到血凝价, 表达的 HA 能使鸡红细胞凝聚. 表明 HA 具有活性. TfxTM-20 转染 (Tfx) 的 HeLa 细胞和阴性对照 (plasmid) 检测不到血凝价. 具体结果见图 2.

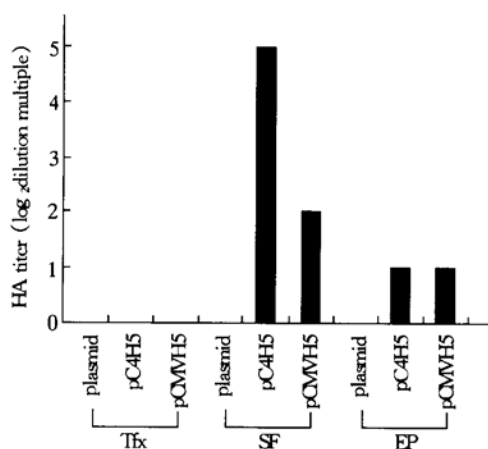


Fig. 2 Hemagglutination titer of expressed HA of three plasmids in HeLa cell by three transfection methods

由图 2 知 Superfect 转染效率最高, 电转染效率次之, TfxTM-20 转染效率最差, 检测不到血凝价. 在 Superfect 转染中 pC4H5 的表达量是 pCMVH5 的 8 倍, 而在电转染中 pC4H5 和 pCMVH5 的表达量基本相同.

3 讨 论

HA 是典型的 I 型糖蛋白, 即羧基端在囊膜内, 氨基端在囊膜外. 其一级结构含有信号肽 (前导序列)、胞浆域、跨膜域、胞外域 4 个结构域. 它的

表达涉及到翻译后糖基化的进行、空间构象的折叠及由内质网到高尔基体运送过程中的不断修饰, 因此表达比较困难. 从图 1 可看出 HeLa 细胞表达的 HA 与 AIV 自身的 HA 分子质量一致, 其中图 1a 第 4 泳道中部分 HA 裂解的 HA1 和 HA2 与 AIV 裂解的 HA1 和 HA2 也基本一致, 由图 2 可知 HeLa 细胞表达的 HA 与 AIV HA 相似能使鸡红细胞凝集, 具有血凝活性. 这些结果表明 AIV HA 基因能在 HeLa 细胞中正确表达, 因此我们后期的动物试验中 pC4H5 和 pCMVH5 取得了良好的保护率 (结果在另文报告). 图 2 中 Superfect 法转染的 HeLa 细胞, pC4H5 的表达量是 pCMVH5 的 8 倍, 原因可能是 pcDNA4/HisMax 上游含有 QBI sp163 转录增强子, 所以表达量明显高于不含增强子的 pRc/CMV 质粒. 比较图 1 中蛋白质印迹结果可知, 相同的上样量, Superfect 法表达的 HA 带浓度最大, 电转染次之, TfxTM-20 最差. 从图 2 也可以看出无论是 pC4H5 还是 pCMVH5 Superfect 法表达的 HA 血凝价最高, 电转染次之, TfxTM-20 最差. 因此我们认为 Superfect 转染法对 AIV HA 的表达是一种比较理想的转染方法.

Kodihalli 等^[10] 认为 A/HongKong/156/97 (H5N1) (HK/97) 和其他 AIV 相比明显的特点是 HA1 的 154 位氨基酸处的糖基化位点缺失. Matrosovich 等^[11] 研究发现 HA 糖基化位点的增加和 NA 氨基酸的缺失会降低 AIV 与细胞受体的亲和力和病毒的释放能力. HA1 和 HA2 裂解位点处多个碱性氨基酸的插入和糖基化位点的丢失均能使 HA 对蛋白酶切割的敏感性增强, 而使致病力提高^[5]. HPAIV A/GuangDong/1/96 (H5N1) (GD/96) 的 HA 基因与引起香港流感事件的 HPAIV A/

HongKong/156/97 (H5N1) (HK/97) 的 HA 基因核苷酸和氨基酸序列分别为 98% 和 98.2% 同源率, 6 个碱性潜在的糖基化位点和 2 个受体位点完全一致, HA1 和 HA2 裂解位点的 6 个碱性氨基酸序列 (RRRKRR) 也完全一致^[12, 13], GD/96 在 154 位也无糖基化位点, 因此我们选用 HPAIV GD/96 的 H5 基因作为 DNA 疫苗的外源基因, 以期望它具有更好的抗原性, 对 HPAIV 具有更高的保护率。

Goto 和 Kawaoka^[14] 研究发现, A/WSN/33 (H1N1) (WSN) 的 NA 对 HA 的裂解起到关键作用, 主要是因为 NA 羧基端 453 位是一个赖氨酸残基, 146 位又缺乏糖基化位点, 从而使 453 位的 lysine 易于聚集血纤维蛋白溶酶原 (plasminogen), 致使局部血纤维蛋白溶酶浓度升高, 将 HA 切割成 HA1 和 HA2, 增加了病毒的侵袭力。当 146 位具有糖链时, 寡糖链由于空间上的位置结构而阻碍 453 位 lysine 与 plasminogen 结合, 使病毒致病性减弱。因此我们下一步将继续构建 NA 基因的真核表达质粒与 HA 真核表达质粒联用, 或者构建融合表达质粒免疫动物来提高 DNA 疫苗的保护效果。

致谢 感谢湖南正虹科技发展股份有限公司对本研究给予的大力支持。

参 考 文 献

- 1 Crawford J, Wilkinson B, Vosnesensky A, *et al.* Baculovirus-derived hemagglutinin vaccines protect against lethal influenza infections by avian H5 and H7 subtypes. *Vaccine*, 1999, **17** (18): 2265~2274
- 2 Suarez D L, Schultz-Cherry S. Immunology of avian influenza virus: a review. *Developmental & Comparative Immunology*, 2000, **24** (2~3): 269~283
- 3 Garten W, Klenk H D. Understanding influenza virus pathogenicity. *Trends in Microbiology*, 1999, **7** (3): 99~100
- 4 Capua I, Margangon S. The avian influenza epidemic in Italy, 1999-2000: a review. *Avian Pathology*, 2000, **29** (3): 289~294
- 5 Vogel G. Sequence offers clues to deadly Flu. *Science*, 1998, **279** (5349): 324
- 6 Hatta M, Gao P, Halfmann P, *et al.* Molecular basis for high virulence of Hong Kong H5N1 Influenza A virus. *Science*, 2001, **293** (5536): 1840~1842
- 7 Gao P, Watanabe S, Ito T, *et al.* Biological heterogeneity, including systemic replications in Mice, of H5N1 Influenza A virus isolates from humans in Hong Kong. *J Virol*, 1999, **73** (4): 3184~3189
- 8 Ha Y, Stevens D J, Skehel J J, *et al.* X-ray structures of H5 avian and H9 swine influenza virus hemagglutinins bound to avian and human receptor analogs. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2001, **98** (20): 1181~1186
- 9 Kodihalli S, Kobasa D L, Webster R G. Strategies for inducing protection against avian influenza A virus subtypes with DNA vaccines. *Vaccine*, 2000, **18** (23): 2592~2599
- 10 Kodihalli S, Goto H, Kobasa D L, *et al.* DNA vaccine encoding hemagglutinin provides protective immunity against H5N1 influenza virus infection in mice. *J Virol*, 1999, **73** (3): 2094~2098
- 11 Matrosovich M, Zhou N, Kawaoka Y, *et al.* The surface glycoproteins of H5 influenza viruses isolated from humans, chickens, and wild aquatic birds have distinguishable properties. *J Virol*, 1999, **73** (2): 1146~1155
- 12 陈化兰, 于康震, 步志高. 一株鹅源高致病力禽流感病毒分离株血凝素基因的分析. *中国农业科学*, 1999, **32** (2): 87~92
- 13 Chen H L, Yu K Z, Bu Z G. *Scientia Agricultura Scientia*, 1999, **32** (2): 87~92
- 14 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. *Science*, 1998, **279** (5349): 393~396
- 15 Goto H, Kawaoka Y. A novel mechanisms for the acquisition of virulence by a human influenza A virus. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1998, **95** (17): 10224~10228

Construction and Expression of Avian Influenza Virus HA Gene Eukaryotic Vectors

ZHANG Qiang-Zhe²⁾, QIN Xi-Ming¹⁾, LIANG Rong¹⁾, DENG Ming-Jun²⁾,
HE Hong-Xuan¹⁾, ZHANG Yan-Ming²⁾, ZHENG Chang-Xue¹⁾, DUAN Ming-Xing^{1)*}

⁽¹⁾ State Key Laboratory of Biomembrane & Membrane Biotechnology, Department of Biological Sciences & Biotechnology,
Tsinghua University, Beijing 100084, China;

²⁾ College of Animal Science and Technology, Northwest Science and Technology University of Agriculture and Forest, Yangling 712100, China)

Abstract Hemagglutinin (HA) gene is an important gene of protective antigen of Avian Influenza Virus (AIV). In order to study HA gene vaccine, the H5 gene of AIV, amplified by PCR, was subcloned into eukaryotic expressing vectors pcDNA4/HisMax and pRc/CMV. The recombinant plasmids were transfected into HeLa cell by TfxTM-20 transfection reagent, Superfect transfection reagent and electroporation respectively. The

expressed HA was examined and identified by Western blotting and hemagglutination assay. The results showed that HA was expressed precisely in HeLa cells and had bioactivity. Three special bands (HA, HA1 and HA2) were found by Western blotting, which were identical to those of AIV. The quantity of expressed HA from pC4H5, transfected by superfect transfection reagent, was approximately 8 times as much as that from pCMVH5. These results suggest that pC4H5 is a highly efficient eukaryotic expressing vector.

Key words avian influenza virus, H5 gene, DNA vaccine, expression, bioactivity

* Corresponding author. Tel: 86-10-62773255, E-mail: duanmx@mail.tsinghua.edu.cn

Received: November 20, 2002 Accepted: December 16, 2002

一次成功的生物膜学术研讨会 ——第八次全国暨 2003 海内外生物膜学术研讨会

由中国生物物理学会、中国生物化学与分子生物学会、中国细胞生物学会、中国植物学会、国家自然科学基金委员会、生物大分子国家重点实验室、生物膜与膜工程国家重点实验室以及上海神经科学开放实验室等联合主办的“第八次全国暨 2003 海内外生物膜学术研讨会”于 2003 年 3 月 25~28 日在广西北海召开。这是每三年一届的全国生物膜学术讨论会。来自国内外高等院校、科研院所的 161 位代表参加了这次讨论会，规模超过以往任何一届。代表中有在国内外享有声誉的我国老一辈科学家，也有年富力强的中青年骨干，更令人振奋的是代表中半数以上为研究生，他们是我国生物膜研究的未来。与往届不同，这次研讨会还首次特邀了国外及中国港台地区在生物膜研究中较出色的海外学者做特邀报告。

研讨会就 A. 信号跨膜转导与细胞功能调控; B. 生物膜与细胞凋亡; C. 生物膜脂筏 (lipid raft) 和 Caveolae; D. 细胞内蛋白质的运送; E. 膜蛋白与蛋白质组学的研究; F. 膜脂与膜蛋白的相互作用; G. 转运体和离子通道; H. 生物膜研究在医、农中的应用; I. 生物膜与膜工程和药物开发等九个方面组织了 9 个特邀报告, 15 个专题报告, 墙报 24 份。从中可以看到, 我国生物膜研究水平整体上比上届有了较大的提高, 特别是在离子通道, 信号跨膜转导, 生物膜脂筏和细胞凋亡等国际热门领域投入较多, 研究成果

突出。但对膜蛋白三维结构、体现物理、化学、生物等多学科的交叉开展重大项目研究, 以及利用新的研究技术与手段等的探索有待进一步重视和加大投入的力度。总之, 这次研讨会, 内容非常丰富, 大会特邀报告、专题报告、研究生工作交流和专题座谈会等学术交流形式多样, 发言、提问踊跃, 讨论热烈, 学术交流紧凑活泼, 基本上反映了生物膜研究的国际前沿以及国内研究现状和最新研究进展。无论是多次还是初次参加生物膜会议的代表, 都觉得本次研讨会开得非常成功, 是一次高水平的学术研讨会。本次研讨会进一步明确在本世纪中我国生物膜研究的方向, 瞄准重点, 结合我国国情, 努力缩短与国际上的差距将会起到积极的推动和促进作用。研讨会期间, 还组织了“生物膜与蛋白质组学”和“生物膜研究在 21 世纪生命科学发展中的作用”的专题座谈会, 广泛地探讨了如何开展我国蛋白质组学研究, 膜蛋白与蛋白质组学的关系, 以及我国生物膜研究的问题和前景。为鼓励研究生进行学术交流, 本次研讨会还组织了研究生学术报告会和墙报展讲, 并从中评选出了一等奖二名, 二等奖五名, 颁发了荣誉证书和奖励, 收到了良好的效果。

这是一次成功的生物膜学术研讨会。相会老朋友, 结识新同行, 喜看中青年, 后继有人在。