

禽流感病毒血凝素基因突变体的构建 及其在 293T 细胞中的表达

刘华雷 魏建超 周 斌 曹瑞兵 陈溥言*

(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 南京 210095)

摘 要 采用 PCR 定点突变技术,通过重叠延伸法 3 次 PCR 扩增,扩增片段上含有所需要的突变位点,最后将扩增片段克隆入 pcDNA3 载体中, DNA 测序表明在预期位点已经发生突变, HA 基因裂解位点的氨基酸组成为 RKKR ↓ GLF 突变为 RSSR ↓ GLF,通过磷酸钙共沉淀方法将 HA 基因突变体的重组质粒瞬时转染 293T 细胞,采用间接免疫荧光鉴定其表达情况。IFA 证实突变后的 HA 在细胞膜上获得了有效表达。HA 基因突变体的成功构建,为进一步研究该突变位点导致 AIV 进入细胞的发病机制和 HA 蛋白的结构和功能的关系奠定了基础。

关键词 血凝素基因 裂解位点 定点突变 间接免疫荧光

中图分类号: Q78 文献标识码: A 文章编号: 0001-6209(2005)04-0614-03

禽流感(Avian Influenza, AI)是严重危害畜牧业及公共卫生的一种传染性疾病。其病原为禽流感病毒,属正粘病毒科,为分节段单股负义 RNA 病毒^[1]。根据 A 型流感病毒表面糖蛋白血凝素(H)和神经氨酸苷酶(N)的抗原关系可将其进一步分为不同的亚型^[1,2]。根据其对待易感鸡致病性强弱,可将禽流感病毒分为高致病性 AIV(如 H5N1 等)和低致病性 AIV(如 H9N2 等)。自香港于 1997 年报道了全球首例禽流感病毒能够感染人,世界上已经证实 H5N1 亚型禽流感病毒能够感染人,而且具有较高的致死率^[3]。最近禽流感突然袭击了亚太地区,10 个国家及地区受影响并造成了巨大的损失,并且在越南和泰国也发现了禽流感感染人的事件^[2,4]。我国最早报道发生禽流感是在 2004 年 1 月 23 日广西隆安县,证实为 H5N1 亚型高致病性禽流感,此后内地确诊禽流感的地区涉及 16 个省份^[4]。因此,世界范围内人们都高度重视禽流感。

尽管决定病毒毒力的因素是多方面的,但普遍认为血凝素基因(HA)在病毒毒力的构成中起关键作用^[5]。血凝素是构成禽流感病毒囊膜纤突的主要成分之一,其裂解过程是感染细胞的先决条件,在病毒吸附与产生中和抗体方面有重要作用,且认为与毒力相关。HA 基因在一定程度上可决定 AIV 感染的宿主特异性,也就是由受体结合位点的氨基酸组成所决定。因此,对 HA 序列的研究具有较实际的意义。对 AIV 的 HA 序列的研究表明,其裂解位点的氨基酸序列是其致病力的分子基础^[6,7]。由此可见 HA 切割点碱性氨基酸序列能作为鉴定高致病力和潜在高致病力分离株的遗传标记。因此,我们对 H5 亚型禽流感病毒的裂解位点的氨基酸组成进行了突变,为研究其在病毒侵入细胞过程中的作用奠定了

基础。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 质粒和菌株 含有 H5N1 亚型禽流感病毒 HA 基因全长 cDNA 片段的重组质粒(pGEM-HA)为本室保存;大肠杆菌(*Escherichia coli*)DH5 α 为本室保存;293T 细胞由美国 UIC 荣立军教授惠赠。

1.1.2 主要试剂 限制性内切酶 *Hind* III 和 *Bam* H I、*Pyrobest* DNA Polymerase 和 T4 DNA 连接酶为 TaKaRa 公司。PCR 产物纯化试剂盒为上海博采生物科技有限公司产品。DMEM 培养基为 GIBICO BRL 公司产品。兔抗鸡 IgY 荧光标记二抗购自 Promega 公司,鸡抗 H5 亚型 AIV 标准血清为哈尔滨兽医研究所产品。

1.2 引物设计

按照引物设计原则,采用引物设计软件(Primer5.0),根据 H5 亚型禽流感病毒的 HA 基因序列(AY639405)和 H9 亚型禽流感病毒 HA 基因(AY364228)分别设计两对引物 P1 和 P3, P2 和 P4。P1: 5'-CA AAGCTT ATGGAGAGAATAGTGC-3' (含 *Hind* III 酶切位点); P2: 5'-TAGGATCCTTAAATGCAAATCTG-3' (含 *Bam* H I 酶切位点); P3: 5'-TAGTCCTCTGCTGGATCTTATCT3'; P4: 5'-GAGAATAAGATCCAGCAGAGGACTA3'。P3 和 P4 互补,且都带有突变位点,即在裂解位点引入两个氨基酸的突变:在 344 位的赖氨酸 K(AAA)突变为丝氨酸 S(AGC),第 345 位的赖氨酸 K(AAG)突变为丝氨酸 S(AGT)。引物由大连 TaKaRa 公司合成,用去离子水配制成 20 μ mol/L。

* 通讯作者。Tel 86-25-84396028 E-mail: laid@njau.edu.cn

作者简介 刘华雷(1977-)男,江苏丰县人,博士研究生,研究方向为动物病毒分子生物学和免疫学。现工作单位:农业部动物检疫所。

收稿日期 2004-12-20,修回日期 2005-04-08

1.3 目的基因的扩增

1.3.1 上游目的片段 T13 的扩增:反应体系: pGEM-HA 质粒模板 2.0 μ L (约 50ng), 10 \times Pyrobest Buffer 5 μ L, 10mmol/L dNTPs 4 μ L, 引物 P1、P3 (均为 20pmol/mL) 各 2 μ L, Pyrobest DNA Polymerase 0.5 μ L, 补充 dH₂O 至总体积为 50 μ L。反应条件: 95 $^{\circ}$ C 5min; 94 $^{\circ}$ C 1min, 56 $^{\circ}$ C 45s, 72 $^{\circ}$ C 90s, 30 个循环; 72 $^{\circ}$ C 10min。1.0% 琼脂糖凝胶电泳鉴定扩增目的片段大小。

1.3.2 下游目的片段 T24 的扩增:引物 P2、P4 采用相同的反应体系, 反应条件: 95 $^{\circ}$ C 5min, 94 $^{\circ}$ C 1min, 53 $^{\circ}$ C 45s, 72 $^{\circ}$ C 1min, 30 个循环, 72 $^{\circ}$ C 10min。1.0% 琼脂糖凝胶电泳鉴定扩增目的片段大小。

1.3.3 长片段 T1234 的扩增:将扩增产物 T13 和 T24 用 PCR 产物纯化试剂盒回收后作为模板继续进行下面反应, 目的是将片段 T13 和 T24 拼接成 T1234: T13 产物 3 μ L (约 25ng), T24 产物 3 μ L (约 25ng), 10 \times Pyrobest Buffer 5 μ L, 10mmol/L dNTPs 4 μ L, 引物 P1 2 μ L, 引物 P2 2 μ L, Pyrobest DNA Polymerase 0.5 μ L, 补充 dH₂O 至总体积为 50 μ L。扩增条件: 95 $^{\circ}$ C 5min; 94 $^{\circ}$ C 1min, 52 $^{\circ}$ C 45s, 72 $^{\circ}$ C 2min30s, 30 个循环; 72 $^{\circ}$ C 10min。扩增产物取名为 T1234。1.0% 琼脂糖凝胶电泳鉴定扩增目的片段大小。

1.4 含突变位点的 HA 真核表达载体的构建

用 *Hind* III 和 *Bam* H I 进行双酶切 T1234 和载体 pcDNA3, 分别切胶回收目的片段, 按照常规方法进行连接、转化, 挑取重组质粒进行双酶切鉴定^[8], 将含约 5400bp 和 1700bp 两条带的克隆定为阳性克隆, 命名为 pHAm。

1.5 DNA 测序鉴定

将鉴定为阳性的重组克隆送大连 TaKaRa 公司进行测序, 确认是否在裂解位点已经引入定点突变以及排除在反应过程中有随机产生新的突变。

1.6 突变体在 293T 细胞中的表达

采用磷酸钙共沉淀法将重组质粒转染 293T 细胞。293T 细胞在转染前 24h 以 2×10^6 接种于 10cm 培养皿, 转染前 1h 换液 (DMEM 培养液, 含 10% FBS)。在 5mL 灭菌塑料管中混合 50 μ L 2.5mol/L CaCl₂ 和 15 μ g 重组质粒 (OD_{260}/OD_{280} 在 1.8 左右), 用 0.1 \times TE (pH7.6) 将体积补充至 500 μ L, 然后与等体积 2 \times HEPES 混合室温静置 1min 后, 取混合物均匀、缓慢地加入培养皿细胞中。16h 后用 0.05% 胰酶消化, 分装 96 孔板 (2×10^4 细胞/孔), 48h 后用 IFA 检测其表达。同时, 以转染空载体 pcDNA3 的 293T 细胞做阴性对照。

1.7 间接免疫荧光检测

弃去培养液, 用 PBS 洗一遍, 加入 100 μ L 预冷的固定液 (95% 的乙醇和丙酮按 4:6 的比例混合) 室温固定细胞 5min; 加入用 PBS 做 1:200 稀释的鸡抗 H5 亚型 AIV 的血清, 湿盒中 37 $^{\circ}$ C 反应 30min, 用 PBS 充分洗涤 96 孔板然后加入用 PBS 做 1:2000 稀释的荧光标记兔抗鸡 IgY, 湿盒中 37 $^{\circ}$ C 反应 30min, 充分洗涤。加入 0.1mL 甘油 + PBS (9:1) 混合液, 在荧光显微镜下观察结果。

2 结果

2.1 上游片段 T13 和下游片段 T24 的扩增

以重组质粒 pGEM-HA 为模板, 用引物 P1 和 P3, P2 和 P4 分别扩增两个目的片段, 用凝胶电泳鉴定, 分别获得了部分序列互补的上游片段 T13 (大小约 1000bp) 和下游片段 T24 (大小约 700bp)。

2.2 突变 HA 基因 T1234 的扩增

以回收纯化的片段 T13 和 T24 为模板, 按 25ng 的量等比例加入, 用引物 P1 和 P4 扩增, 获得含有突变位点的全长 T1234 (大小约 1700bp)。

2.3 HA 基因突变的序列测定

对构建在 pcDNA3 载体内的突变型 HA 基因进行测序, 并与正常 H5 亚型的 HA 基因序列进行比较。序列测定结果表明, 在 344 位的密码子 AAA (赖氨酸 K) 突变为 AGC (丝氨酸 S), 第 345 位的 AAC (赖氨酸 K) 突变为 AGC (丝氨酸 S), 其余的序列与野生型 H5 基因完全相同, 说明成功引入了预期突变。同时对 HA 基因其它片段进行测序表明, 未发现随机突变的产生。

2.4 IFA 检测

重组质粒 pHAm 以磷酸钙共沉淀法转染 293T 细胞后 48h, 用 IFA 可检测到细胞膜上有特异性荧光, 表明突变后的重组质粒在 293T 细胞中得到正确表达, 且表达的蛋白具有抗原性 (图 1-A)。而正常未转染细胞无荧光出现 (图 1-B)。

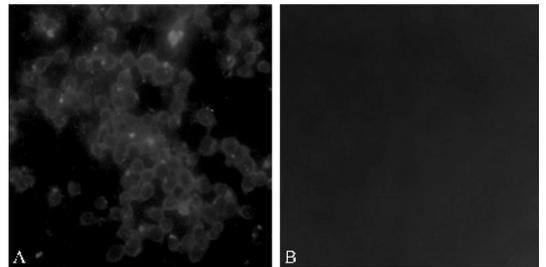


图 1 (A) 重组质粒转染 293T 细胞间接免疫荧光检测结果 (B) 空载体转染 293T 细胞对照

Fig. 1 (A) The result of IFA in transfected 293T cells (B) The result of IFA in 293T cell as control

3 讨论

基因体外定点突变技术是研究蛋白质结构和功能之间复杂关系的有力工具, 也是我们在实验室中改造或优化基因的常用手段。对某个已知基因的特定碱基进行定点突变、缺失或者插入, 可以改变对应的氨基酸序列和蛋白质结构, 对突变基因的表达产物进行研究有助于我们了解蛋白质结构与功能的关系, 探讨蛋白质的结构或结构域^[9, 10]。本实验在操作中, 为减少其它位点随机突变的可能性, 在第 2 次 PCR 扩增时采用纯化后的片段 T13、T24 作为模板, 优化复性与延伸温度。测序结果表明, 在预定位置引入了定点突变。

HA 是构成病毒囊膜纤突的主要成分之一, 是典型的 I

型糖蛋白,以三聚体形式存在于囊膜的表面^[1,5]。其一级结构有4个结构域,分别为信号肽(前导序列)、胞浆域、跨膜区和胞外域。HA在病毒吸附及穿膜过程中以及决定病毒致病力方面均起关键作用,它能否被裂解为HA1和HA2是病毒感染细胞的先决条件,也是决定病毒致病力高低的重要因素,病毒毒力的强弱与HA能否被裂解为HA1和HA2呈正相关^[6]。HA能否裂解为HA1和HA2关系到该病毒粒子致病力的强弱,而HA对蛋白酶裂解的敏感性直接影响到病毒的毒力。HPAIV在裂解位点处有多个碱性氨基酸(Arg, Lys),能为广泛存在的蛋白酶裂解而引起全身感染。高致病性H5或H7亚型HA切割位点处有一系列碱性氨基酸,存在于大多数真核细胞中的细胞内枯草溶菌素样切蛋白酶,可促进HA的切割活化作用^[7]。而特异性细胞蛋白酶识别、切割不同亚型HA糖蛋白的能力决定病毒在宿主中的传播。由于宿主的大多数细胞均有内切蛋白酶,因此,HA切割作用范围广,进而导致严重病变和高死亡率。非致病性毒株在HA裂解位点处只有一个精氨酸(Arg),使其对蛋白酶的敏感性较低,因此它只能在呼吸道和胃肠道中增殖,引起局部亚临床症状。

293T细胞是表达外源真核蛋白的最佳宿主之一,因为其转染效率高,所以应用较为广泛。我们通过保留突变HA基因的信号肽,转染293T细胞后用间接免疫荧光检测结果表明,转染重组载体后的293T细胞在细胞膜上可特异性地表达AIV突变后的HA基因,从而说明其可以在细胞中有效地表达,为进一步研究裂解位点对HA功能的影响打下基础。

PCR site-directed mutagenesis of avian influenza virus hemagglutinin gene *in vitro* and expression in 293T cell

LIU Hua-lei WEI Jian-chao ZHOU Bin CAO Rui-bing CHEN Pu-yan*

(Key Lab of Animal Diseases Diagnostic and Immunology, Ministry of Agriculture, Nanjing Agricultural University, Nanjing 210095, China)

Abstract: The site-directed mutagenesis of HA gene was made by using PCR, and mismatches were introduced into primers. Mutagenesis was performed in a three-step PCR. The amplified fragments from the second PCR which contained the mutation site were cloned into the pcDNA3 vector, named pHAm. The sequencing analysis showed that the mutation site was correct. The amino acid sequence at the cleavage site of the HA protein was from RKKR↓GLF to RSSR↓GLF. The recombinant plasmid pHAm was transiently transfected into 293T cells by the calcium phosphate precipitation method. Indirect immunofluorescent assay (IFA), confirmed expression of the HA protein on the cell membrane, the mutant HA gene was a promising candidate for further studies.

Key words: HA gene, Cleavage site, Site-Directed Mutagenesis, Indirect Immunofluorescent Assay (IFA)

参 考 文 献

- [1] 甘孟侯. 禽流感. 第二版. 北京: 中国农业出版社, 2002.
- [2] 卢洪洲, 潘孝彰. 禽流感研究动态. 中华传染病杂志, 2004, 22(1): 63-65.
- [3] 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: 393-396.
- [4] 郭建顺, 金宁一. 高致病性禽流感及其公共卫生学. 中国生物制品学杂志, 2004, 17(2): 126-128.
- [5] Steinhauer D A. Role of hemagglutinin cleavage for the pathogenicity of influenza virus. *Virology*, 1999, 258: 1-20.
- [6] Weis W, Brown J H, Cusack S, et al. Structure of the influenza virus haemagglutinin complexed with its receptor, sialic acid. *Nature*, 1988, 333: 426-431.
- [7] Steinhauer D A. Survey of the hemagglutinin (HA) cleavage site sequence of H5 and H7 avian influenza viruses: amino acid sequence at the HA cleavage site as a maker of pathogenicity potential. *Avian Diseases*, 1996, 40: 425-437.
- [8] Sambrook J, Russell D W. 分子克隆实验指南. 黄培堂, 等译. 第三版. 北京: 科学出版社, 2002: 27-29.
- [9] Kunkel T A. Rapid and efficient site-specific mutagenesis without phenotypic selection. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1985, 82(2): 488-492.
- [10] Steffan N, Henry D, Robert M, et al. Site-directed mutagenesis by overlap extension using the polymerase chain reaction. *Gene*, 1989, (77): 51-59.

* Corresponding author. Tel 86-25-84396028; E-mail: laid@njau.edu.cn

Received date: 12-20-2004