

微生物学报 *Acta Microbiologica Sinica*
49(3) 351-356; 4 March 2009
ISSN 0001-6209; CN 11-1995/Q
<http://journals.im.ac.cn/actamicrocn>

信号肽序列对禽流感病毒 H5N1 HA 蛋白 GFP 融合分子在真核细胞中表达的影响

苏艳¹, 张宝江¹, 申煜², 黄嘉骐¹

(¹ 新疆农业大学动物医学学院, 乌鲁木齐 830052)

(² 新疆普瑞纳公司, 乌鲁木齐 830002)

摘要 【目的】构建绿色荧光蛋白(GFP)与禽流感病毒(AIV) HA 基因的融合表达载体, 观察信号肽序列的有无及位置对 HA-GFP 在 293T 细胞中的表达影响。【方法】应用 PCR 方法从 H5N1 亚型 AIV 质粒 DNA 中扩增出完整的或除去信号肽序列的 HA 基因片段, PCR 产物经 Xho I 和 Sma I 双酶切后定向插入绿色荧光蛋白真核表达载体 pEGFP-C1 的不同位点, 将得到的重组体 M1, M2 和 M3 分别转化宿主菌 DH5 α , 经双酶切及 DNA 测序鉴定分析后, 采用脂质体转染法将 pEGFP-C1, M1, M2 和 M3 转染人胚肾细胞系 293T 细胞, 荧光显微镜下观察 HA-GFP 的表达, 流式细胞仪检测表达 HA 蛋白的细胞百分数。【结果】经酶切及测序鉴定成功构建了 HA-GFP 重组表达载体 M1, M2 和 M3, 荧光显微镜及流式细胞仪检测到重组质粒转染的 293T 细胞表达强的荧光蛋白, 信号肽的有无对 HA-GFP 融合蛋白在 293T 细胞中的表达有显著影响, 信号肽序列使 HA-GFP 融合蛋白在 293T 细胞中的表达减少, 而信号肽的位置对融合蛋白表达量的影响不显著。【结论】信号肽的有无对 HA-GFP 融合蛋白在细胞中的表达有显著影响。

关键词: 禽流感病毒 HA 蛋白, 绿色荧光蛋白, 融合分子, 真核表达, 信号肽序列

中图分类号: Q786 **文献标识码:** A **文章编号:** 0001-6209(2009)03-0351-06

高致病性禽流感病毒(HPAIV) H5N1 直接感染人的事实, 引起了对禽流感致病性分子机制的研究^[1-4]。禽流感病毒属正粘病毒科, 基因组分为 8 个片段, 是单股负义 RNA 病毒^[5]。AIV 的表面结构蛋白血凝素(HA)是病毒表面主要糖蛋白之一, 目前普遍认为 HA 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^[5-6]。HA 蛋白与宿主细胞相互作用机理的研究对揭示 AIV 感染与致病机理、疫苗研制、药物开发都有重要意义。

绿色荧光蛋白(GFP)是从维多利亚水母中克隆

得到的蛋白^[7], 在细菌、真菌、植物和动物细胞中表达时都能够发出绿色荧光, 没有种属特异性, 并且不干扰细胞的正常生长, 可活体表达, 较准确的定位蛋白, 随时监视蛋白的表达水平, 使其成为一种理想的荧光标记蛋白^[8-11]。其次因 GFP 基因分子量小, 易于与其它基因形成融合基因, 并且所获融合基因不影响自身和目的基因的空间构象和功能, 广泛应用于蛋白质体内定位的研究^[12]。本研究使用的增强型绿色荧光蛋白(EGFP)基因是在水母来源的野生型 GFP 基础上替换了影响荧光表达效率的基因合成的, 由于选用了哺乳动物偏爱的密码子, 可以显著

基金项目: 国家 973 项目 (2005CB523001)

作者简介: 苏艳 (1973-), 女, 籍贯, 陕西人, 博士, 讲师, 研究方向为分子生物学及微生物学。Tel: +86-991-8762701; E-mail: 2006au@163.com

收稿日期: 2008-09-28; 修回日期: 2008-12-14

提高其在动物细胞中的荧光效能。

信号肽是引导新合成肽链转移到内质网上的一段多肽,位于新合成肽链的N端,一般由15~30个氨基酸残基组成,含有6~15个带正电荷的非极性氨基酸。信号肽不仅能引导分泌蛋白或膜蛋白出胞,还能引导蛋白质在细胞内不同区域进行正确定位。本研究分别将国内AIV分离株A/chicken/Fujian/1042/2005(H5N1)HA的信号肽引入pEGFP-C1载体的绿色荧光蛋白N端和C端,构建带有AIV HA的信号肽和缺失信号肽的HA-GFP真核表达载体,并利用荧光显微镜和流式细胞仪检测HA-GFP融合蛋白在293T细胞中的表达,旨在探讨信号肽的有无和相对位置对重组蛋白表达的影响,从而为进一步研究HA的生物学功能提供参考和技术基础,并可为AIV的基因工程疫苗的研制提供一定的理论依据。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 载体、菌株与细胞 重组质粒pUC-HA为本实验室自行构建,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(*Escherichia coli*)DH5 α 为本组保存;绿色荧光蛋白

GFP真核表达载体pEGFP-C1购自Bio-Tech公司。293T细胞株为本实验室保存。

1.1.2 主要试剂和材料 限制性内切酶*Xho* I、*Nhe* I、*Hind* III、*Sma* I和T4 DNA连接酶、Probest *Taq* DNA聚合酶等工具酶以及pMD18-T载体、DNA Marker(λ EcoT14, λ DNA *Hind* III)均购自大连宝生物工程公司;蛋白Marker购自上海生物工程有限公司;其余试剂均为分析纯。DMEM培养基为Gibco公司产品。DNA片段纯化回收试剂盒及质粒抽提试剂盒购自QIAGEN公司;DMEM培养基、新生牛血清购自Gibco公司;DOTAP脂质体转染试剂盒购自Roche公司。

1.2 PCR扩增AIV HA基因

1.2.1 引物 引物P1、P2、P3、P4、P5和P6(表1)是参照GenBank公布的H5N1亚型AIV HA基因(A/Goose/Guangdong/1/96(H5N1)登录号:DQ023145)的核苷酸序列,自行设计的3对引物。P1和P2覆盖了全长HA基因,在引物的5'端加入了*Xho* I和*Sma* I酶切位点;P3和P4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*Xho* I和*Sma* I酶切位点;P5和P6覆盖了GFP基因及全长HA基因,在引物的5'端加入了*Nhe* I和*Sma* I酶切位点。3对引物由上海生物工程公司合成。

表1 所用引物及产物的大小

Table 1 Primers used in this study and length of PCR product

Recombinant name	Primer sequence (5'→3')	Length of PCR product/kb
pEGFP-HA(M1)	P1, CACGTCGCTCGAGCCACCATGGAGAGAATAGTGCTK (<i>Xho</i> I)	1.7
	P2, CACAGTTCCCGGTTAGATGCAAATTCGCACTG (<i>Sma</i> I)	
pEGFP-SP-HA(M2)	P3, CACGTCGCTCGAGCTGATCAGATTGCAATTGGT (<i>Xho</i> I)	1.7
	P4, CACAGTTCCCGGTTAGATGCAAATTCGCACTG (<i>Sma</i> I)	
SP-pEGFP-HA(M3)	P5, CCTCGCTAGCGCCACCATGGAGAGAATAGTGCTTCTTCTTGAATAGTCAGTCTTGTTAAAGTATGCTGAGCAAGGGCGAGGAG (<i>Nhe</i> I)	2.5
	P6, CACAGTTCCCGGTTAGATGCAAATTCGCACTG (<i>Sma</i> I)	

1.2.2 PCR反应条件 采用100 μ L体系,①P1/P2和P3/P4的反应条件:94 $^{\circ}$ C 5 min;94 $^{\circ}$ C 45 s,45 $^{\circ}$ C 45 s,72 $^{\circ}$ C 120 s,循环30次;72 $^{\circ}$ C 7 min。②P5/P6的反应条件:94 $^{\circ}$ C 5 min;94 $^{\circ}$ C 45 s,58 $^{\circ}$ C 45 s,72 $^{\circ}$ C 6 min,循环30次;72 $^{\circ}$ C 10 min。PCR产物经琼脂糖电泳后,采用DNA回收试剂盒回收、纯化DNA片段,操作按说明书进行。

1.3 重组体构建及鉴定

用限制性内切酶*Xho* I和*Sma* I双酶切

pEGFP-C1及纯化后的PCR扩增产物AIV HA基因片段,琼脂糖电泳并回收DNA。连接反应总体积20 μ L,目的基因与载体比为3:1,T4 DNA连接酶3 U,16 $^{\circ}$ C连接过夜后,转化感受态宿主菌DH5 α ,在含氨苄青霉素的LB平板37 $^{\circ}$ C过夜生长,然后随机挑取单菌落,培养扩增后提取质粒,用*Hind* III和*Nhe* I双酶切鉴定阳性克隆。对酶切鉴定的阳性重组体pEGFP-HA部分基因测序分析(上海生物工程有限公司),测序引物采用通用引物。

1.4 质粒的大量制备和纯化

100 mL 的三角烧瓶内加入含氨苄青霉素的 (0.1 × 10⁻³ g/mL) 的 LB 培养基 30 mL, 分别用含 pEGFP-HA 和 pEGFP-C1 质粒的细菌培养物 1 mL, 37 °C 摇菌过夜, 用试剂盒提取和纯化质粒。

1.5 细胞培养

37 °C 水浴复苏冻存的 293T 细胞, 用含 10% 胎牛血清和双抗的 DMEM 培养基, 置于 37 °C、5% CO₂ 的培养箱中培养 3 d 后传代, 当细胞稳定生长后传入 25 mm 培养盘中, 当细胞生长至 50% ~ 80% 融合后进行转染。

1.6 293T 细胞转染及表达

以 5 × 10⁴/mL 293T 细胞传代至培养皿, 待细胞长至 50% ~ 80% 融合时, 按 Roche 诊断公司的转染试剂说明方法转染。将 GFP 表达载体 pEGFP-C1 及重组质粒 M1、M2、M3 分别转染 293T 细胞, 取 0.5 mg 重组质粒稀释作为 A 液, 取 1.5 mL DOTAP 脂质体加入 5 mL 0.2 mol/L HEPES (pH 7.4), 混匀后作为 B 液, 然后将 A 液加至 B 液充分混匀, 室温放置 10 ~ 15 min, 加 90 mL 无血清 DMEM 培养基混匀, 将此混合液加至用无血清 DMEM 培养基轻洗过的培养有细胞的培养皿中, 4 h 后吸去质粒-脂质体混合物, 换上含 10% 血清 DMEM 培养基, 次日再换 1 次培养基。24 h 后每隔 12 h 置于荧光显微镜下观察拍照。每组重组质粒和细胞对照均作 3 个重复, 并作 3 次以上转染。

1.7 转染不同组合的 GFP-HA 融合蛋白在 293T 细胞中表达的流式细胞分析

转染重组质粒 M1、M2、M3 和 pEGFP-C1 后 48 h, 收集 293T 细胞 (每个样品 3 个重复), 用 PBS 洗 2 次。选取 1 × 10⁴ 个细胞进行流式细胞仪分析, 以未转染的 293T 细胞设定阳性区域。流式细胞仪检测绿色荧光细胞 (被感染的细胞) 的百分比 (取 3 次转染的平均值)。

2 结果

2.1 PCR 扩增 AIV-HA 基因片段

根据 AIV HA 基因 PCR 引物位置, PCR 扩增的 HA 基因片段加上两端内切酶位点序列理论上应为 1.7 kb (M1)、1.7 kb (M2)、2.5 kb (M3)。PCR 扩增产物进行 1% 琼脂糖电泳, 结果显示其基因片段大小与预计相符, 表明已获得 AIV HA 基因片段。

2.2 重组质粒的鉴定

重组质粒 M1、M2、M3 分别经 *Hind* III 与 *Nhe* I 双酶切后电泳, 分别见两条带, 一条约 3.9 kb, 另一条约 2.5 kb (HA-GFP), 与理论预计值相符, 空载体 pEGFP-C1 经相同双酶切分别见两条带, 一条约 3.9 kb, 另一条约 0.7 kb (GFP)。这表明已成功构建 pEGFP-C1 与 AIV HA 的重组表达载体 pEGFP-HA。对重组体 pEGFP-HA 中插入片段以及部分载体序列进行测序分析, 结果显示各连接位点以及阅读框架正确, 序列与已知序列完全相符。

2.3 HA-GFP 融合基因在 293T 细胞内的表达

用重组 DNA 转染 293T 细胞 24 h 后, 荧光显微镜下发现细胞带有绿色荧光。在不携带外源基因的空载体 pEGFP-C1 转染的对照组 293T 细胞中, 绿色荧光均匀分布于整个细胞中, 而用重组质粒 pEGFP-C1/HA 转染, 绿色荧光分布于细胞质内和胞膜上。荧光显微镜观察的结果显示, 无信号肽的重组质粒 M1 与带有信号肽的重组质粒 M2 和 M3 绿色荧光蛋白的表达水平有差别, 除去信号肽的重组质粒 M1 转染的 293T 细胞中呈绿色荧光的细胞多于带有信号肽的重组质粒 M2 和 M3 转染组中的绿色荧光细胞 (图 1)。

2.4 流式细胞仪检测重组蛋白的表达细胞百分比

用重组 DNA 转染 293T 细胞后 48 h, 流式细胞仪检测绿色荧光细胞百分比, 将未转染的细胞设为对照, 每个样品设 3 个重复, 对 293T 细胞的转染至少重复 3 次, GFP 表达细胞的百分比取 3 次转染的平均值。流式细胞仪检测的结果表明 (图 2): 除去信号肽的重组质粒 M1 转染的 293T 细胞表达 GFP 的细胞多于带有信号肽的重组质粒 M2 和 M3。对图 2 的统计分析结果显示, M1 与 M2、M3 之间差异显著 ($P < 0.05$) 表明信号肽的有无对 HA-GFP 融合蛋白的表达有明显影响。M2 和 M3 之间差异不显著, 说明信号肽位置对 GFP 融合蛋白的表达影响不显著。

3 讨论

禽流感病毒历来被认为是人类流感的最大基因库, 是人类流感病毒发生变异的新基因来源^[2, 19-20]。血凝素基因 (hemagglutinin, HA), 位于毒粒的囊膜上, 由同质的三聚体组成, 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, 是唯一能产生中和抗体的抗原, 诱导机体免疫

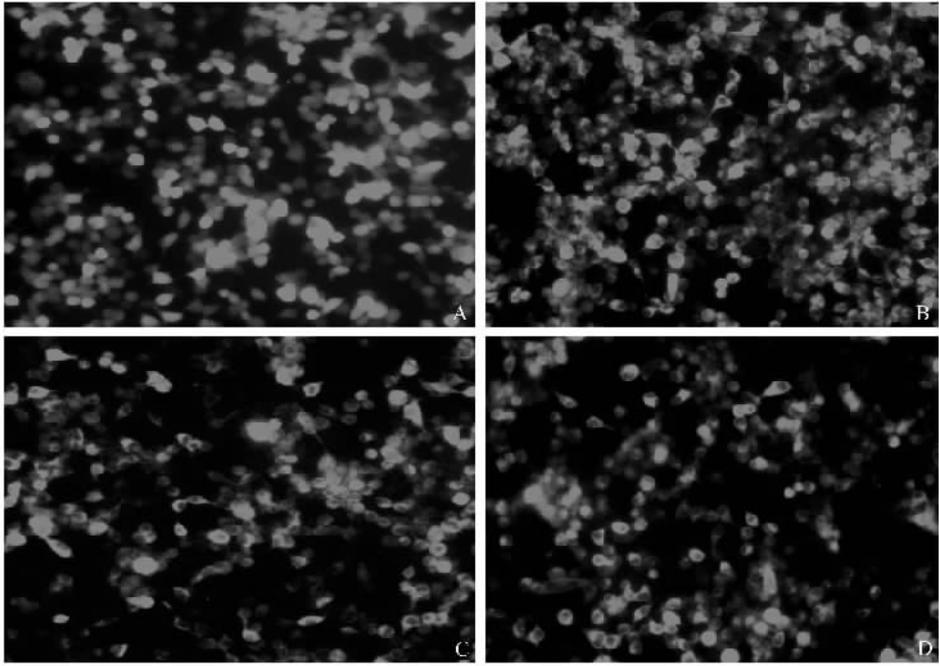


图1 不同组合的 HA-GFP 融合蛋白在 293T 细胞中的表达的荧光显微镜观察结果

Fig. 1 Expression of different GFP-HA fusion protein in 293T cells using fluorescent microscopy. A : Cells transfected by pEGFP-C1 (Fluorescent microscopy , 40 \times); B : Cells transfected by pEGFP-HA (M1 , fluorescent microscopy , 40 \times); C : Cells transfected by pEGFP-SP-HA (M2 , fluorescent microscopy , 40 \times); D : Cells transfected by SP-pEGFP-HA (M3 , fluorescent microscopy , 40 \times).

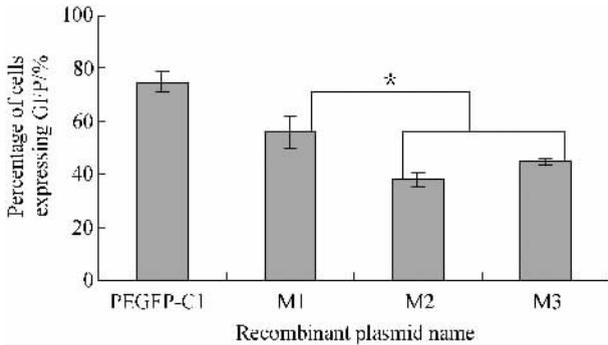


图2 不同组合的 GFP-HA 融合蛋白在 293T 细胞中的表达的流式细胞分析

Fig. 2 Fig. 2 Expression of different GFP-HA fusion protein in 293T cells using flow cytometric analysis. PEGFP-C1 : Cells transfected by pEGFP-C1 ; M1 : Cells transfected by pEGFP-HA (M1); M2 : Cells transfected by pEGFP-SP-HA (M2); M3 : Cells transfected by SP-pEGFP-HA (M3); * P < 0.05.

系统产生保护作用,是诱导机体产生保护性体液免疫反应的主要靶抗原。其主要功能还包括识别宿主细胞膜上的受体,介导毒粒囊膜和细胞囊膜的融合。而且它是变异最大的基因^[21],病毒的抗原性和致病性很大程度上取决于该基因的变异情况。HA 蛋白分子上个别关键氨基酸位点的突变,尤其是受体结合部位的氨基酸发生替换,就有可能造成毒粒致病

性和传播能力的改变。所以它在 AIV 中具有极重要的意义,是近年来禽流感工作者研究的热点。

HA 与易感细胞以及与相关蛋白的相互作用研究对于揭示 AIV 的致病机制和免疫机制、疫苗研制都具有重要价值。本试验将 HA 蛋白与 GFP 融合表达,不仅能通过 GFP 的绿色荧光直接检测 HA 在转染细胞中的表达情况,而且 GFP 还可以作为一种很好的示踪信号,在研究 HA 蛋白与宿主细胞、易感细胞结合特性中提供一种方便的检测手段。本研究将 AIV HA 基因插入到绿色荧光蛋白 GFP 真核表达载体 pEGFP-C1 中,构建了表达 GFP 与 HA 融合蛋白的 pEGFP-HA 重组体,将 GFP 质粒及 GFP-HA 重组体分别转染人胚肾细胞 293T,荧光显微镜下观察结果表明,对照 GFP 质粒及该重组体均能有效表达。在荧光显微镜下观察、比较发现 293T/ HA-GFP 细胞荧光强度弱于 293T/GFP 细胞,可能与 AIV HA 基因的插入影响了 GFP 载体表达能力或者 HA-GFP 分子较 GFP 分子大而导致 GFP 在细胞内浓度相对较低有关。

与 HA 和 EGFP 以非融合蛋白方式进行共转染相比,HA-EGFP 融合表达有较多优势。两者融合不仅便于对活细胞 HA 的表达进行多次原位直接观察

而无需进行染色等处理,而且从 EGFP 的荧光强度即能准确反映 HA 的表达水平;同时还可能进一步跟踪 HA 在体内的表达情况。这些都是共转染策略所不易做到的,因为 EGFP 与目标蛋白分开后,在细胞内表达水平通常不一致,两者的稳定性也存在差异,亚细胞定位更可能不同。因此,HA-EGFP 融合蛋白表达载体的成功构建,为进一步研究 HA 的生物学功能及其在 AIV 感染致病中的作用及机制等研究提供了有利条件。

信号肽的提出开辟了蛋白质的研究的新领域:蛋白质的空间属性,为下一步研究蛋白质的结构和功能奠定了一定的基础。在真核表达体系分泌性蛋白质的合成过程中,信号肽引导分泌性或膜蛋白质到达并且通过内质网经过修饰加工,该蛋白经高尔基体的囊泡运输被分泌至胞外或嵌于膜中。信号肽在外源蛋白质的表达中具有重要作用,选择合适的信号肽才能促进重组蛋白的表达^[16]。信号肽不仅能引导分泌蛋白或膜蛋白出胞,还能引导蛋白质在细胞内不同区域或不同细胞器进行正确定位。信号肽序列的合理选择及调整可为外源蛋白质的表达及免疫提供新的思路。以往的研究结果显示,猪繁殖与呼吸综合征病毒缺失 GP5 蛋白 N 端信号肽基因会影响 GP5 蛋白的抗原性^[17],从而影响其 DNA 免疫的体液免疫应答水平。此外还有研究认为信号肽和辅助性 T 细胞表位可增强乙肝病毒(HBV)核心抗原 DNA 疫苗诱导的免疫应答,能克服 HBV 慢性感染者抗原肽转运相关蛋白(TAP)依赖的 CTL 表位提呈缺陷对诱导 CTL 应答的不利影响^[22]。本研究的结果表明可通过去除信号肽序列增加蛋白在胞内的表达,因此我们推测该信号肽可能存在调控肽链降解的序列,从而在控制蛋白表达的量方面发挥一定的作用^[23]。

普遍认为 HA 蛋白是在禽流感病毒毒力的构成中起关键作用^[5],HA 序列存在信号肽和潜在的跨膜区,它被合成后进入内质网,并且与膜结合成为跨膜蛋白^[18]。本研究中我们分别将 AIV HA 的信号肽引入 pEGFP-C1 载体的绿色荧光蛋白的 N 端和 C 端,绿色荧光蛋白(green fluorescent protein, GFP)的羧基端连接到去除信号肽的 AIV HA 的氨基端,旨在探讨信号肽序列对 EGFP-HA 融合蛋白在 293T 细胞中的表达的影响。荧光显微镜下观察、比较发现 293T 细胞在被 pGFP-HA 瞬时转染后,仅经 36~72 h 已可

检出 GFP-HA 蛋白表达,融合分子的绿色荧光集中于膜表面和胞质区,研究的结果表明信号肽的有无对 HA-GFP 融合蛋白的表达有明显的影响,信号肽使表达融合蛋白的细胞数减少,除去信号肽表达 HA-GFP 融合蛋白的细胞数目增加,而信号肽的相对位置对融合蛋白表达的影响不显著。

参考文献

- [1] 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.
- [2] Webster RG. A molecular whodunit. *Science*, 2001, 293: 1773-1775.
- [3] Webby RJ, Webster RG. Are we ready for pandemic influenza? *Science*, 2003, 302: 1519-1522.
- [4] Hatta M, Cao P, Halfmann P, et al. Molecular basis for high virulence of Hong Kong H5N1 influenza A viruses. *Science* 2001, 293: 1840-1842.
- [5] 甘孟侯. 禽流感. 第二版. 北京: 农业出版社, 2002.
- [6] Suarez DL, Schutz-Cherry S. Immunology of influenza virus: a review. *Developmental and Comparative Immunology* 2000, 24: 269-283.
- [7] Prasher DC, Eckenrode VK, Ward WW, et al. Primary structure of the Aequorea Victoria green fluorescent protein. *Gene*, 1992, 111: 229-233.
- [8] Cormack BP, Valdivia R, Falkow S. FACS optimized mutants of the green fluorescent protein (GFP). *Gene*, 1996, 173(1): 332-338.
- [9] Tsien RY. The green fluorescent protein. *Annual Review of Biochemistry*, 1998, 67: 509-544.
- [10] 段小军, 杨柳, 周跃, 等. 不同荧光蛋白标记技术对骨髓基质干细胞体外增殖的影响. *中华创伤骨科杂志 (Chinese Journal of Orthopaedic Trauma)*, 2004, 6(7): 731-734.
- [11] Ehrhardt D. GFP technology for live cell imaging. *Current Opinion in Plant Biology* 2003, 6: 622-628.
- [12] Wei DY, Dai BB, Chen SS, et al. The expression of adenoviral mediated gfp reporter gene in tumor cells induced and regulated by irradiation. *生物化学与生物物理学报 (Acta Biochimica et Biophysica Sinica)*, 2001, 33(1): 123-127.
- [13] Yang TT, Cheng LZ, Kain SR. Optimized codon usage and chromophore mutations provide enhanced sensitivity with the green fluorescent protein. *Nucleic Acids Research*, 1996, 24: 4592-4593.

- [14] He ZM , Li HP , Li BJ. Applications of green fluorescent protein in life science research. *Heredity* ,1998 , 20 : 43 – 46.
- [15] Plautz JD , Day RN , Dailey GM. Green fluorescent protein and its derivatives as versatile markers for gene expression in living drosophila *Melanogaster* plant and mammalian cells. *Gene* ,1996 ,173 :83 – 87.
- [16] 张红 ,王健 ,李姣 等. 信号肽对鸡 Ig λ 轻链绿色荧光蛋白重组分子在 COS7 细胞上分泌表达的影响. 河南农业科学(*Journal of Henan Agricultural Sciences*) ,2008 , (2) 99 – 102.
- [17] 蒋文明 ,姜平 ,李玉峰. 猪繁殖与呼吸综合征病毒 GP5 蛋白 N 端信号肽对其 DNA 免疫应答的影响. 病毒学报(*Chinese Journal of Virology*) 2005 4(21) :478 – 480.
- [18] Skehel JJ , Wiley DC. Receptor binding and membrane fusion in virus entry : the influenza hemagglutinin. *Annual Review of Biochemistry* ,2000 69 :531 – 569.
- [19] Alexander DJ. Avian influenza viruses and human health. *Developmental Biology (Basel)* 2006 ,124 :77 – 84.
- [20] Lu Jia-hai , Zhang Ding-ming , Wang Guo Ling. Hight the significance of genetic evolution of H5N1 avian flu. *Chinese Medical Journal* ,2006 ,119(17) :1458 – 1464.
- [21] Webster RG. , Bean WJ , Gorman OT , et al. Evolution and ecology of influenza A viruses. *Microbiological Reviews* , 1992 56 :152 – 179.
- [22] 赵平 ,赵兰娟 ,曹洁. 信号肽和辅助性 T 细胞表位增强 HBV 核心抗原 DNA 疫苗诱导的免疫应答生物化学与生物物理学报(*Acta Biochimica et Biophysica Sinica*) , 2002 34(3) 341 – 346.
- [23] 王克夷. 肽链的翻译后加工 3. 蛋白质定位在细胞内的信号. 生命的化学(*Chemistry of Life*) ,1995 ,15(3) :1 – 4.

Effects of signal peptide sequence of hemagglutinin on the expression of green fluorescent protein and hemagglutinin fusion gene

Yan Su^{1*} , Baojiang Zhang¹ , Yu Shen² , Jiasi Huang¹

(¹ College of Animal Medicine , Xinjiang Agricultural University , Urumqi 830052 , China)

(² Company of Xinjiang Prina , Urumqi 830002 , China)

Abstract [**Objective**] Purified avian influenza virus (AIV) hemagglutinin (HA) gene fragment was inserted into green fluorescent protein(GFP) expression vector , pEGFP-C1 . The role of signal peptide in the HA-GFP expression in 293T cells was investigated by cutting the signal peptide or placing it in different locations of HA-GFP fusion gene . [**Methods**] The expression of GFP in 293T cells was examined directly with fluorescence microscope and flow cytometry analysis . [**Results**] After transfected with pEGFP-C1 , M1 , M2 and M3 plasmid , under fluorescent microscope the HA-GFP fusion protein was successfully expressed . Fluorescence was seen homogeneously distributed in the entire cell body of the cells transfected by the empty vector pEGFP-C1 , whereas signal peptide could obviously reduced the expression of GFP-HA compared with recombinant plasmid without signal peptide . In addition , we found that there was no significant effect of the location of signal peptide on the expression of HA-GFP fusion protein .

Keywords : avian influenza virus HA protein ; green fluorescent protein ; recombinant ; expression ; signal peptide

(本文责编 : 王晋芳)