

H9N2 亚型禽流感病毒血凝素基因的克隆及原核表达

李春红¹, 董玉龙² (1. 河北北方学院动物医学系, 河北张家口 075131; 2. 河北北方学院理学院, 河北张家口 075131)

摘要 据 GenBank 收录的 H9N2 亚型禽流感病毒血凝素(HA)基因序列设计并合成引物, 以 H9N2 亚型禽流感病毒 RNA 为模板, 用 RT-PCR 方法扩增了预计约 1 700 bp 的 HA 基因, 将此扩增产物克隆进 pMD18-T 载体, 采用限制性酶切及序列测定鉴定阳性重组克隆子。结果表明 HA 基因长为 1 683 bp。基于 HA 信号肽在表达中的负作用, 研究通过基因工程手段缺失 HA 蛋白位于起始的信号肽的编码序列, 获得了缺失 HA 蛋白信号肽的 HA 基因, 将其亚克隆到 pGEX-KG 中, 与 GST 融合表达。SDS-PAGE 显示: 融合表达的蛋白分子量约为 90 kDa。

关键词 禽流感病毒; 血凝素基因; 原核表达

中图分类号 S188 **文献标识码** A **文章编号** 0517-6611(2009)18-08375-02

Clone and Prokaryotic Expression of Hemagglutinin Gene of H9N2 Avian Influenza Virus

LI Chun-hong et al (Department of Animal Medicine, Hebei Northern University, Zhangjiakou, Hebei 075131)

Abstract According to HA gene sequence of H9N2 avian influenza virus collected by GenBank, We designed and synthesized primers, 1 700 bp fragment was amplified from H9N2 AIV RNA by RT-PCR and cloned into the pMD18-T vector. Restrictive enzyme and sequence were used to determinate positive recombinant cloning. The results showed that HA gene consisted of 1 683 bp. Based on the negative function of signal peptide of HA gene in expression, we lacked the signal peptide of HA gene which lies in initial coding sequence through the genetic engineering means and obtained the HA gene which lacked signal peptide, then partial fragment of HA was subcloned into prokaryotic expression vector pGEX-KG, and was fusion expressed with GST. SDS-PAGE showed that protein molecular weight was about 90 kDa.

Key words Avian Influenza virus; Hemagglutinin (HA) gene; Prokaryotic expression

禽流感(AI)是由正黏病毒科 A 型流感病毒引起的一种禽类的感染或/和疾病综合症。H9 亚型禽流感最早报道于 1966 年^[1], 20 世纪 90 年代开始, H9 亚型 AIV 已在亚洲鸡群广泛流行^[2]。我国自 1994 年首次报道 H9N2 亚型禽流感以来^[3], 已经从不同地区的患病鸡群中分离到相同亚型的禽流感病毒(AIV)。从已有的报道分析, 禽流感病毒 H9N2 亚型已成为中国当前的主型。因此, 开展对 H9N2 亚型禽流感病毒的研究, 对养禽业和人类公共卫生都有重大意义。

禽流感病毒基因组分节段单股负链 RNA, 编码至少 10 种病毒蛋白, 其中血凝素基因为病毒最重要的表面抗原, 也是遗传性和抗原性的高变区。笔者根据 HA 蛋白的亚型特异性的特点, 进行了 HA 基因的克隆表达, 为建立快速、灵敏、准确的禽流感亚型诊断技术提供了行之有效的方法。

1 材料与方法

1.1 材料 H9N2 亚型禽流感病毒由河北北方学院动物医学系实验室分离并保存。E. coli DH5 α 、E. coli BL21 由该室保存提供。pMD18-T 载体购自宝生物工程公司; pGEX-KG 由该室保存并提供; OMEGA Biotek RNA-Solv Reagent、TaKaRa One step RNA PCR Kit (AMV)、Taq 聚合酶以及相关限制性内切酶均购自宝生物工程公司。UNIQ-10 柱式离心式 DNA 凝胶回收试剂盒购自上海生工生物工程公司; H9 AIV 标准阳性血清购于哈尔滨兽医研究所; 辣根过氧化物酶标记羊抗鸡 IgG 购于华美生物公司。

1.2 引物 据 GenBank 收录的 H9N2 亚型禽流感病毒 A/Chicken/Shandong/2/99 分离株血凝素基因序列设计并合成引物 HAP1、HAP2、HAP3、HAP4。其中 HAP1、HAP2 用于扩增从 ATG 到 TAA 一个完整阅读框架的 HA 基因, HAP3、HAP4 用于扩增缺失 HA 蛋白信号肽序列的 HA 基因。引物由上海生物工程公司合成, 其序列为: HAP1: 5'CGC GGA

TCC ATG GAA ACA ATA TCA CT, 引入 BamHI 的酶切位点; HAP2: 5'CGC GAG CTC TTA TAT ACA AAT GTT GC, 引入 SacI 的酶切位点; HAP3: 5'GCG GAT CCG ATA AAA TCT GCA TCG GC, 引入 BamHI 的酶切位点; HAP4: 5'CGG AAG CTT TTA TAT ACA AAT GTT GC, 引入 HindIII 的酶切位点。

1.3 HA 基因的 RT-PCR 扩增 模板: 病毒基因组(参照 OMEGA Biotek RNA-Solv Reagent 说明书提取 RNA); 引物: HAP1、HAP2; 模板: 病毒基因组 RNA, 按 TaKaRa One step RNA PCR Kit 说明书进行。

1.4 HA 基因的克隆及鉴定 按照 pMD18-T 载体试剂盒说明书进行: PCR 产物与载体连接, 转化 E. coli DH5 α , 常规方法小量提取质粒, BamHI + SacI 双酶切鉴定所需重组质粒进行测序, 阳性重组克隆子命名为 pMD-HA。

1.5 HA 基因的亚克隆及缺失修饰 引物: HAP3、HAP4; 模板: pMD-HA。常规 PCR 方法扩增缺失掉 HA 蛋白信号肽的 HA 基因。经 BamHI + HindIII 双酶切及序列测定的方法筛选阳性重组克隆子, 并命名为 pMD-HAM。

1.6 重组表达质粒的构建 BamHI + HindIII 双酶切 pMD-HAM 及 pGEX-KG, 回收 HAM 片段和 pGEX-KG, T₄DNA 连接酶 16 °C 连接过夜, 产物转化 E. coli DH5 α , BamHI + HindIII 双酶切鉴定, 获得所需阳性重组子命名为 pGEX-HAM。

1.7 目的蛋白的表达 将 pMD-HAM 转化 E. coli BL21 经含氨苄青霉素抗性的 LB 平板筛选单个菌落, 37 °C 扩大培养, 终浓度为 1.0 mmol/L 的 IPTG 诱导 3 h 收集菌体, 菌体裂解后, SDS-PAGE 胶分析目的蛋白的表达。

2 结果与分析

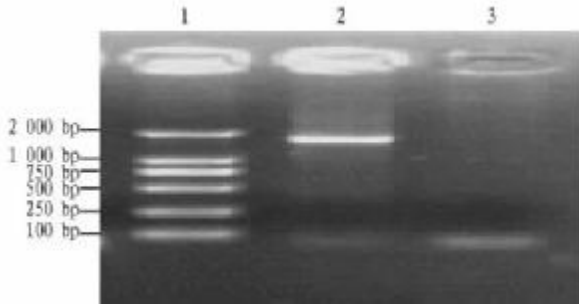
2.1 HA 基因的 RT-PCR 扩增 以病毒基因组为模板, 运用特异性引物 HAP1、HAP2 进行 One Step RT-PCR 扩增, 扩增产物经 0.8% 琼脂糖凝胶电泳分析表明: 扩增出一条约 1 700 bp 大小的特异性片段, 与预期的结果相符(图 1)。

2.2 HA 基因的克隆及鉴定 RT-PCR 产物回收后与

作者简介 李春红(1978-), 女, 河北唐山人, 在读硕士, 助教, 从事基础兽医学教学工作。

收稿日期 2009-03-17

pMD18-T 连接,转化 DH5 α 。BamHI + SacI 鉴定,获得了1 700



注: 1. DL2000 标准分子量;2. RT-PCR 产物;3. 阴性对照。

Note: 1. DL2000 standard molecular weight; 2. RT-PCR product; 3. Negative control.

图1 AIV RT-PCR 扩增 HA 结果

Fig.1 RT-PCR amplified HA results

和 2 700 bp 的 2 条带,与预期结果相符。核酸序列测定显示:HA 基因为 1 683 bp,涵盖了 HA 的完整阅读框架。

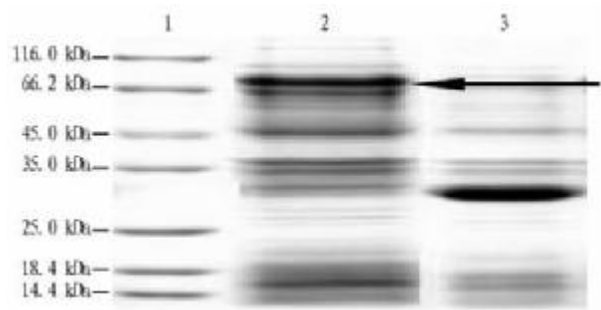
2.3 HA 基因的亚克隆及缺失修饰 以 pMD-HA 为模板,特异性引物 HAP3、HAP4,进行常规 PCR。扩增出一条约 1 600 bp 的特异性片段,与预期结果相符。PCR 扩增产物经回收纯化后与 pMD18-T 载体连接,转化 *E. coli* DH5 α ,经 BamHI + HindIII 双酶切对重组质粒进行鉴定,获得了 1 600 和 2 700 bp 左右的 2 条带,与预期结果相符。

2.4 重组原核表达质粒的构建 用 BamHI + HindIII 双酶切阳性重组子,获得了 1 600 和 5 000 bp 左右的 2 条带,说明缺失了 HA 蛋白信号肽的 HA 基因插入了原核表达载体 pGEX-KG 中相应的位置。

2.5 HA 基因的表达 将 pGEX-HAM 转化 *E. coli* BL21 挑取单个菌落扩大培养,菌体裂解后,SDS-PAGE 胶分析目的蛋白的表达。含 pGEX-HAM 的重组质粒的 *E. coli* BL21 在约 90 kDa 处有明显的表达带,是 HA 蛋白与 GST 蛋白融合表达的产物,HA 蛋白约 63 kDa,与 GST 的 26 kDa 融合后约为 90 kDa。而含 pGEX-KG 的 *E. coli* BL21 在约 26 kDa 有明显的表达带,是 GST 蛋白的分子量。以上结果说明目的基因获得了表达(图 2)。

3 讨论

血凝素基因(HA)是位于病毒囊膜表面的一种蛋白质,可以诱导机体产生中和抗体,为 AIV 中最重要的保护性抗原。HA 在病毒的吸附和穿膜过程、决定病毒的致病力以及宿主的特异性方面均起决定性作用。因此,对于血凝素基因的研究具有实际意义。



注:1. 蛋白质标准分子量;2. pGEX-HAM 诱导表达产物。

Note: 1. Protein standard molecular weight; 2. pGEX-HAM induced expression product.

图2 原核表达载体 pGEX-HAM 诱导表达产物的 SDS-PAGE 检测

Fig.2 SDS-PAGE analysis of the expressed products by prokaryotic expression vector of pGEX-HAM

本研究利用基因工程手段将 HA 基因的信号肽缺失掉,采用 pET-28a 载体和 pGEX-KG 载体表达缺失信号肽的 HA 基因,结果表明:pET-28a/BL21 中没有得到表达,pGEX-KG/BL21 中获得较高表达,说明所选择的载体系统会影响 HA 基因的表达,而且信号肽在表达中起到了负面作用。用表达的 HA 蛋白代替全病毒作为 ELISA 和 LAT 等免疫学检测的抗原,可以提高诊断的敏感性、特异性及抗原制备的生物安全性。另外,研究表明,HA 是 AIV 的主要保护性抗原,以 HA 研制的亚单位疫苗可对同一亚型不同毒株产生良好的免疫保护性^[4-6]。因此,该研究对 HA 基因的克隆表达为我国的禽流感病毒 HA 基因的结构与功能的研究、亚单位疫苗及基因疫苗的研究奠定了基础。

参考文献

- [1] HOMME P J, EASTERDAY B C. Response of pheasants, ducks and geese to influenza A-turkey-Wisconsin-1996 virns [J]. Avian Diseases, 1970, 14 (2): 285 - 290.
- [2] ALEXANDER D J. Proceeding of the fourth international symposium on avian influenza [M]. Athens, GA: United States Animal Health Association, 1997: 9 - 13.
- [3] 陈伯论,张泽纪,陈伟斌,等. 禽流感研究 I: 鸡 A 型禽流感病毒的分离与血清学初步鉴定 [J]. 中国兽医杂志, 1994, 22(10): 3 - 5.
- [4] TAYLOR J, WEINBERG R, KAWAKA Y, et al. Protective immunity against avian influenza induced by a fowlpox virus recombinant [J]. Vaccine, 1988, 6: 504 - 508.
- [5] TRIPATHY D N, SCHNITZLEIN W M. Expression of avian influenza virus haemagglutinin by recombinant fowlpox virus [J]. Avian Dis, 1991, 35: 186 - 191.
- [6] ROBERT R G, TAYLOR J, PEARSON J, et al. Immunity to Mexican H5N2 avian influenza virus induced by a fowlpox-H5 recombinant [J]. Avian Dis, 1996, 40: 461 - 465.