

禽流感病毒 M1 蛋白的表达及其免疫反应性分析*

宋建领,王金萍,胡媛媛,张富强**

(云南省热带亚热带动物病毒病重点实验室,云南昆明 650224)

Expression of M1 protein of Avian Influenza Virus and Analysis of Its Immunoreactivity

SONG Jian-ling, WANG Jun-ping, HU Yuan-yuan, ZHANG Fu-qiang**

(Yunnan Tropical and Subtropical Animal Virus Diseases Laboratory, Kunming 650224, China)

Abstract : A pair of primers were designed based on M1 gene sequence of known H5N1 Avian influenza virus. M1 gene was cloned from total RNA, extracted from tissue of H5N1 subtype virus inoculated embryo by reverse transcriptase - polymerase chain reaction using high proofreading polymerase (Pyobest™ DNA Polymerase), and expressed using Invitrogen champion™ pET directional TOPO expression system. Recombinant protein containing polyhistidine (6xHis) tag in N-terminal about 29.8kDa in size, was obtained and purified. Its immunoreactivity was analyzed by Western blot, ELISA and blocking ELISA using MAbs and positive serum. The results showed recombinant M1 protein can bind to MAbs and positive serum with specificity, and this binding reactivity can be blocked by natural viral antigen. This indicates that the recombinant M1 protein possesses good immunoreactivity.

Key words : Avian influenza virus; M1 protein; Expression; Immunoreactivity

摘要: 根据已发表的禽流感病毒 M1 基因序列设计合成 PCR 克隆引物,自接种 H5N1 亚型病毒的鸡胚组织中提取 RNA,反转录后采用高可信度 DNA 聚合酶(Pyobest™ DNA Polymerase)经 PCR 扩增 M1 基因,采用 Invitrogen 定向表达系统(Champion™ pET directional TOPO expression system)进行克隆表达,纯化获得 N 末端携带多聚组氨酸标签的重组蛋白,分子量约 29.8 kDa。采用单克隆抗体和阳性血清经 ELISA、阻断 ELISA、免疫印迹分析重组蛋白的免疫反应性。结果发现:重组 M1 蛋白能与单克隆抗体和阳性血清发生特异性结合,且此结合能被天然病毒抗原阻断。研究表明:重组蛋白 M1 具有良好免疫反应性。

关键词: 禽流感病毒;M1 蛋白;表达;免疫反应性

中图分类号:S855.3 文献标识码:A 文章编号:1003-5125(2005)05-0515-04

禽流感(Avian influenza, AI or bird flu)是由 A 型流感病毒引起的一种禽类的感染和疾病综合征^[1]。世界动物卫生组织(OIE)将其列为 A 类疫病^[2],我国动物防疫法规定为一类动物传染病。1997 年、1999 年、2004 年中国香港、泰国、越南报道 H5N1、H9N2 亚型禽流感病毒,突破种间障碍直接感染人的病例^[3],赋予禽流感全新的公共卫生意义。2004 年亚洲部分国家或地区暴发 H5N1 亚型禽流感,损失惨重。禽流感病毒属于正粘病毒科流感病

病毒属 A 型流感病毒成员。禽流感病毒基因组由 8 个分节段的单股负链 RNA 组成,编码 10 种病毒功能蛋白。病毒第 7 节段 RNA 转录过程中,经剪接、编辑合成两条不同的 mRNA,指导翻译 M1 和 M2 基质蛋白。M1 由 252 个氨基酸残基组成,分子量约 26 kDa,它是病毒的主要结构蛋白,占流感病毒蛋白总量的 30%~40%。该蛋白具有型特异性,其抗原性差异是流感病毒分型的依据之一^[4]。M1 还是一种多功能因子,在病毒复制中具有重要

收稿日期:2005-03-28,修回日期:2005-05-13

* 基金项目:云南省科技攻关项目(2004NG01);农业部 948 项目(2004-Z41)

作者简介:宋建领(1974-),男,在读硕士生,助理研究员,主要从事分子病毒学研究。

** 通讯作者. Corresponding Author. Tel: (0871) 5016575, E-mail: zfq1968@yahoo.com.cn

的调节功能^[5],如控制病毒的转录和被感染细胞的胞核胞浆之间的物质运输^[6]。本研究根据已发表的禽流感病毒 M1 基因序列设计合成 PCR 克隆引物,自接种 H5N1 亚型病毒的鸡胚组织中提取 RNA,经 RT-PCR 克隆 M1 基因,应用定向表达系统 (Champion™ pET directional TOPO expression system) 进行克隆表达,并采用单克隆抗体和阳性血清对重组蛋白的免疫反应性进行了分析,为进一步评价其在疫病诊断及防制中的应用奠定基础。

1 材料与方 法

1.1 病毒、质粒与菌种

禽流感云南地方分离毒株 A/Chicken/ Yunnan/ K001/ 2004 (H5N1), 本实验室分离、鉴定、保存;原核表达质粒 pET100/D-TOPO、大肠杆菌 TOP10 及 BL21 Star™ (DE3) 感受态细胞购自 Invitrogen 公司。

1.2 主要试剂

定向表达试剂盒 (Champion™ pET directional TOPO expression kit, K100-01)、辣根过氧化物酶 (HRP) 及碱性磷酸酶 (AP/ A KP) 标记的抗多聚组氨酸 (6xHis) 抗体均购自 Invitrogen 公司;HRP 或 AP/ A KP 标记羊抗鼠 IgG 抗体购自北京中杉金桥生物技术有限公司;DL2000 DAN Marker、病毒 RNA/ DNA 提取试剂盒 (TaKaRa MiniBEST Viral DNA/ RNA Extraction Kit Ver. 3. 0)、高可信度 DNA 聚合酶 (Pyobest™ DNA Polymerase)、反转录酶均购自 TaKaRa 公司;M1 单克隆抗体购自上海复旦悦达生物技术有限公司。

1.3 引物设计与合成

根据已发表的 A/ Ck/ YN/ 115/ 04 毒株 M1 基因序列 (GenBank 登录号:A Y651427), 并考虑到不同分离毒株变异性,设计合成简并引物,上游引物 M1F: 5'-CACC A TGA GTCTTCTA ACCG A GGTC-3', 下游引物 M1R: 5'-CTACTTGAA YCGCTGC ATYTG-3', 其中上游引物 5 端包含定向克隆序列 CACC, 其后紧接起始密码子 ATG 携带外源蛋白阅读框架, 下游引物 5 端包含终止密码子互补序列 CTA。用于克隆 M1 全基因, 预期克隆基因大小 763bp, 编码 M1 蛋白的 252 个氨基酸。T7F、T7R 引物参照试剂盒提供的序列。由宝生物工程 (大连) 有限公司合成。

1.4 RNA 提取及 M1 基因的扩增

按试剂盒提供的操作手册, 自接种 A/ Chicken/ Yunnan/ K001/ 2004 (H5N1) 毒株后 24-36h 存活或

新近死亡的鸡胚组织样品中提取总 RNA。采用随机引物经反转录制备 cDNA, 采用 Pyobest™ DNA Polymerase 经 PCR 扩增 M1 基因, 产物经电泳定量, 确定获得 5-10ngDNA 的稀释度。

1.5 重组质粒构建和鉴定

按试剂盒提供的手册进行克隆反应, 取 2μL 反应物转化 TOP10 感受态细胞后, 涂布 Ampicilin 抗性平板过夜, 挑取孤立菌落, 采用 T7F、T7R 和 T7F、M1R 引物经 PCR 鉴定阳性菌落。阳性菌落增殖培养后, 提取质粒, 采用 T7F、T7R、T7F、M1R 和 M1F、T7R 引物经 PCR 进行重组质粒鉴定。以 T7F、T7R 为测序引物, 对克隆的 M1 基因进行测序。

1.6 表达条件的优化和产物的纯化

阳性重组 M1 质粒, 经电泳定量确定获得 5-10ng 质粒 DNA 的稀释度, 取 1μL (5-10ng) 转化 BL21 Star™ (DE3) 感受态细胞, 取不同 IPTG 浓度, 不同诱导时间获得的重组菌裂解物, SDS-PAGE 分离转膜后, 采用抗多聚组氨酸抗体, 经免疫印迹分析, 确定获得最大表达量的 IPTG 浓度及诱导时间。在此条件大量培养后, 以凝胶切割、蛋白洗脱方法纯化重组 M1 蛋白。

1.7 重组蛋白 SDS-PAGE 及免疫印迹分析

取重组菌诱导前、重组菌诱导后、纯化重组 M1 蛋白及空白菌, 裂解后经 SDS-PAGE 分离, 进行蛋白染色或转印, 凝胶染色后, 经凝胶扫描仪分析重组蛋白在细菌总蛋白中浓度, 转印膜以 M1 单克隆抗体为检测抗体, AP/ A KP 标记羊抗鼠 IgG 抗体为交联剂, 进行免疫印迹分析。

1.8 重组蛋白 ELISA 和阻断 ELISA 分析

重组蛋白直接包被或以鸡抗禽流感病毒阳性血清为包被抗体, 以 M1 单克隆抗体为检测抗体, HRP 标记羊抗鼠 IgG 抗体为交联剂, 进行 ELISA 分析。以 M1 单克隆抗体为包被抗体, 病毒抗原为竞争剂或阻断剂, HRP 标记的抗多聚组氨酸单克隆抗体为检测抗体, 进行阻断 ELISA 分析。

2 结 果

2.1 M1 基因的扩增及定量

RT-PCR 产物经凝胶回收纯化后, 经电泳检测和定量, 获得大小为 763bp 单一基因片段, 与预期结果吻合。PCR 产物浓度 60~80ng/μL。

2.2 重组质粒的构建、转化及鉴定

M1 克隆反应物转化 TOP10 感受态细胞, 涂布 Ampicilin 抗性平板培养后获得 54 个独立菌落, 随机选取 6 个菌落, PCR 鉴定均为阳性。自阳性菌

落中选取 2 个增殖培养后,提取重组质粒,经 PCR 鉴定均为阳性,获得与预期大小一致的扩增产物(图 1)。序列分析结果表明:所克隆的 M1 基因序列(登录号:DQ055851)与 A Y653194、A Y609315、A Y651427 同源性分别为:94.2%、97.9%、99.6%。

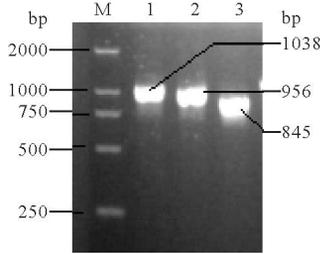


图 1 重组 M1 质粒的 PCR 鉴定

Fig. 1 Identification of Recombinant M1 plasmids by PCR M, DL2000 DNA Marker; 1, T7F/ T7R pair of primer; 2, T7F/ M1R pair of primer; 3, M1F/ T7R pair of primer.

2.3 表达条件的优化和产物的纯化

不同 IPTG 浓度,不同诱导时间获得的重组菌裂解物,SDS-PAGE 分离、转膜后,采用抗多聚组氨酸抗体进行免疫印迹分析,结果发现:采用 1mmol/L IPTG 诱导 5h 后 M1 蛋白表达量最高。在此条件下,收集菌体 12% SDS-PAGE 分离后,凝胶切割、蛋白洗脱纯化后,经免疫印迹检测,获得大小约为 29.8 kDa 的重组 M1 蛋白带。

2.4 重组蛋白 SDS-PAGE 及免疫印迹性分析

重组菌诱导前、重组菌诱导后、纯化重组 M1 蛋白及空白菌经 SDS-PAGE 分离,进行蛋白染色后,经凝胶扫描仪分析得知重组 M1 蛋白约占细菌总蛋白的 30%。蛋白转印后,免疫印迹分析结果表明:重组 M1 蛋白能被 M1 单克隆抗体特异性识别。M1 重组蛋白 SDS-PAGE 分析结果见图 2,免疫印迹分析结果见图 3。

2.5 ELISA 分析

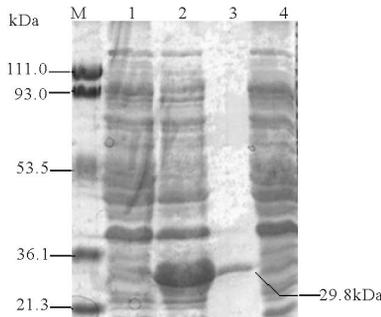


图 2 重组蛋白的 SDS-PAGE 分析

Fig. 2 Analysis of recombinant protein by SDS-PAGE M, Prestained protein molecular weight standards; 1, Cell lysate of recombinant bacteria un-induced with IPTG; 2, Cell lysate of recombinant bacteria induced with IPTG; 3, Purified recombinant M1 protein; 4, Cell lysate of blank *E. coli* BL21 StarTM(DE3).

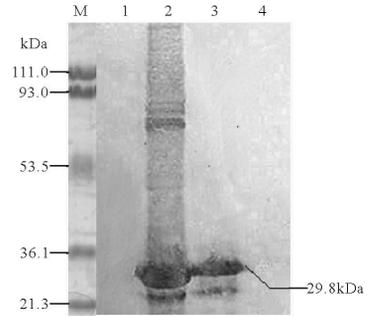


图 3 重组蛋白的免疫印迹分析

Fig. 3 Analysis of recombinant protein by western blot using monoclonal antibody

M, Prestained protein molecular weight standards; 1, Cell lysate of recombinant bacteria un-induced with IPTG; 2, Cell lysate of recombinant bacteria induced with IPTG; 3, Purified recombinant M1 protein; 4, Cell lysate of blank *E. coli* BL21 StarTM(DE3).

将纯化的重组 M1 蛋白自 1 40 至 1 81 920 稀释后,包被 ELISA 板,同时以空白大肠埃希氏菌 BL21 Star™ (DE3) 裂解物为阴性对照,以 M1 单克隆抗体为检测抗体,进行 ELISA 分析。结果表明:重组 M1 蛋白能被单克隆抗体特异性识别,检测最高稀释度 1 20480 (图 4)。以禽流感阳性血清为

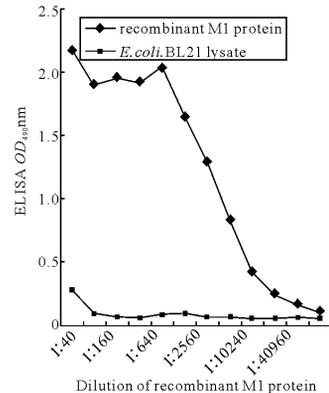


图 4 重组 M1 蛋白 ELISA 分析

Fig. 4 Analysis of recombinant M1 protein by ELISA using Monoclonal antibody

包被抗体,将重组 M1 蛋白自 1 10 至 1 1 280 稀释后与鸡抗孵育,同上设阴性对照,以 M1 单克隆抗体为检测抗体进行 ELISA 分析,结果发现:重组 M1 蛋白能与禽流感阳性血清发生特异性结合,检测最高稀释度 1 320 (图 5)。

2.6 阻断 ELISA 分析

以 M1 单克隆抗体为包被抗体,将禽流感及新城疫病毒抗原自 1 2 至 1 256 稀释后与单克隆抗体孵育,再加已知滴定浓度的重组 M1 蛋白作用后,以 HRP 标记的抗多聚组氨酸抗体为检测抗体,进行阻断 ELISA 分析。研究发现:重组 M1 蛋白与单克隆抗体间的结合能被天然病毒抗原抑制或阻断,抑制率随病毒抗原浓度的降低而降低 (图 6)。

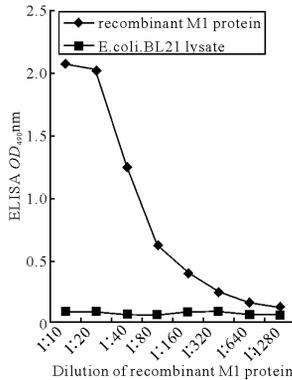


图5 重组 M1 蛋白 ELISA 分析(禽流感阳性血清)

Fig. 5 Analysis of recombinant M1 protein by ELISA using avian influenza positive serum

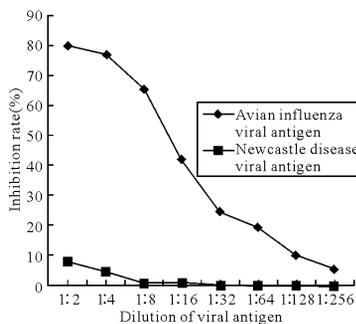


图6 重组 M1 蛋白阻断 ELISA 分析

Fig. 6 Analysis of recombinant M1 protein by blocking ELISA

3 讨论

禽流感病毒 M1 基因大小约 759bp, 编码 252 个氨基酸。文献^[8]未对 M1 读码框架进行分析, 将流感病毒第 7 节段 RNA 对应的全长 dsDNA (1027bp) 整个插入质粒, 构建重组杆状病毒, 表达重组 M1 蛋白的方法值得商榷。近几年国外对 M1 蛋白表位进行大量研究, 采用蛋白酶水解, 分析不同肽段对单抗的免疫反应性差异, 分析发现 M1 蛋白近氨基端 1/3 区域与病毒类脂层结合, 近羧基端 2/3 区域与核糖核蛋白结合。8-89、80-109、129-164 位氨基酸区域至少各存在一个 B 细胞表位, 89-141 位氨基酸区域内至少存在 2 个 B 细胞表位, 存在 2 个 RNA 结合位点^[9], 羧基端 QA YQ KRM GVQM QR-FK 多肽构成 CD4 + T 细胞表位^[10], 58-66 位 (GIL-GFVFTL) 氨基酸构成 CD + 8 细胞毒性 T 细胞表位^[11], 63-70 位 (FVFTL TVPS) 氨基酸构成 CD + 4 T 细胞表位^[12]。

所表达的重组蛋白经凝胶洗脱纯化后, 无需浓缩处理, 1:20 480 稀释后仍能被单克隆抗体特异

性检出, 表明 M1 基因获得高效表达, 便于大量制备 M1 蛋白。重组 M1 蛋白在 ELISA 和免疫印迹分析中, 能与单克隆抗体和阳性血清发生特异性结合, 且此结合能被天然病毒抗原特异性阻断, 表明所获得的重组蛋白与天然病毒 M1 蛋白具有相同的免疫反应性。

本文使用的 M1 单克隆抗体, 虽然来源 H3N2 亚型流感病毒, 但也能检测 H5N1、H9N2 亚型流感, 表明其可能针对流感病毒共有的特异性表位。本研究获得的重组蛋白, 为禽流感病毒诊断方法的研究, 尤其是未知亚型抗原、抗体检测技术的开发, 奠定了基础, 并且为进一步开展 M1 蛋白生物学功能及表位定位研究提供物质条件。

参考文献

- [1] 甘孟侯. 中国禽病学[M]. 北京: 中国农业出版社, 1999. 66.
- [2] List A and B Diseases of Mammals, Birds and Bees: Manual of Standards for Diagnostic Tests and Vaccines [M]. 5th Edition, Office International des Epizootites, 2004.
- [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[J]. Science, 1998, 293: 393-396.
- [4] 殷震, 刘景华. 动物病毒学[M]. 第2版, 北京: 科学出版社, 1997, 708-709.
- [5] Helenius A. Unpacking the incoming influenza virus[J]. Cell, 1992, 69: 577-578.
- [6] Watanabe K, Handa H, Mizumoto K, et al. Mechanism for inhibition of influenza virus RNA polymerase activity by matrix protein[J]. J Virol, 1996, 70: 241-247.
- [7] 卢建红, 邵卫星, 韦栋平, 等. 禽流感病毒感染的宿主免疫应答[J]. 动物医学进展, 2004, 25(5): 37-39.
- [8] 王幼明, 邓国华, 于康震, 等. 禽流感病毒 GD/1/96 株 M 基因在 sf9 昆虫细胞中的表达[J]. 中国兽医科技, 2002, 32(9): 3-4.
- [9] Ye Z P, Baylor N W, Wagner R R. Transcription-inhibition and RNA-binding domains of influenza A virus matrix protein mapped with anti-idiotypic antibodies and synthetic peptides[J]. J Virol. 1989, 63(9): 3586-3594.
- [10] Adler S, Reay P, Roy P, et al. Induction of T cell response by bluetongue virus core-like particles expressing a T cell epitope of the M1 protein of influenza A virus[J]. Med Microbiol Immunol (Berl). 1998, 187(2): 91-96.
- [11] Plotnicky H, Cyblat-Chanal D, Aubry J P, et al. The immunodominant influenza matrix T cell epitope recognized in human induces influenza protection in HLA-A2/ K(b) transgenic mice[J]. Virology. 2003, 309(2): 320-329.
- [12] Linnemann T, Jung G, Walden P. Detection and quantification of CD4(+) T cells with specificity for a new major histocompatibility complex class II restricted influenza A virus matrix protein epitope in peripheral blood of influenza patients[J]. J Virol. 2000, 74(18): 8740-8743.