

H5N1 亚型禽流感病毒 *ns1* 基因修饰

张志珍, 赵丽纯, 李康生

(汕头大学医学院微生物学与免疫学教研室, 广东 汕头 515041)

[摘要] 目的: 对 H5N1 亚型禽流感病毒株 (A/Qa/ST/852/01) 的 *ns1* 基因进行修饰并构建 *ns1* 基因的真核表达载体。方法: 用 RT-PCR 方法扩增 A/Qa/ST/852/01 的 *ns1* 基因, 之后以扩增产物为模板, 采用多重 PCR 技术对 *ns1* 基因进行修饰, 将缺失的 15 个核苷酸片段插入 *ns1* 基因中, 并将其克隆到真核表达载体, 构建 pcDNA 3.1/*ns1* 重组质粒。结果: RT-PCR 产物测序显示, A/Qa/ST/852/01 *ns1* 基因开放阅读框全长 678 bp, 编码 225 个氨基酸。构建的重组质粒经酶切鉴定和序列测定与预期相一致。结论: 成功将缺失的 15 个核苷酸片段引入 A/Qa/ST/852/01 的 *ns1* 基因中, 重组质粒的构建为 NS1 蛋白功能研究奠定了基础。

[关键词] 禽流感病毒; *ns1* 基因; 修饰; 克隆

[中图分类号] R511

[文献标识码] A

[文章编号] 1007-4716(2005)02-0065-03

Modification of *ns1* Gene of H5N1 Avian Influenza Virus

ZHANG Zhi-zhen, ZHAO Li-chun, LI Kang-sheng

(Department of Microbiology and Immunology, Shantou University Medical College, Shantou 515041, China)

[Abstract] Objective: To modify the *ns1* gene of avian influenza virus H5N1 subtype (A/Qa/ST/852/01) and to construct the recombinant expression vector. Methods: The *ns1* gene of A/Qa/ST/852/01 was amplified by RT-PCR and a deletion of 15 nucleotides acid was inserted into *ns1* gene by multiply PCR, then cloned into expression vector pcDNA 3.1(+). Results: The sequence analysis demonstrated that the *ns1* gene of A/Qa/ST/852/01 contained one open reading frame of 678 bp, which encoded polypeptides of 225 amino acids. The recombinant plasmid of pcDNA 3.1/*ns1* was digested with restriction endonuclease and DNA sequence analysis. Conclusion: The deletion of 15 nucleotides acid is successfully inserted into the *ns1* gene of A/Qa/ST/852/01, and the construction of the eukaryotic expression vector provides a foundation for further studies on the function of NS1 protein.

[Key Words] avian influenza virus; *ns1* gene; modification; clone

1997 年在我国香港特区, 高致病性禽流感病毒 (AIV) ——A/Hong Kong/156/97 (A/HK/156/97) (H5N1) 感染 18 人, 其中 6 人死亡^[1], 这是世界上首次证实 AIV H5N1 感染人类。之后, 相继有 AIV H9N2^[2]、H7N7^[3] 亚型感染人类和 H5N1 再次感染人类的报道。2003 年底至今, H5N1 亚型再次在亚洲部分国家和地区肆虐^[4]。高致病性 A/HK/156/97 能抵抗机体的抗病毒反应, 尤其抑制 IFN- γ 及 TNF- α 介导的抗病毒反应与 AIV 的非结构 (nonstructural, NS) 蛋白 1 有关^[5]。NS1 蛋白能使 AIV 逃逸宿主的免疫防御在流感大流行中具有潜在的重要性^[6-9]。我们已测定了在华南地区分离的部分 H5N1 亚型 *ns1* 基因序列, 与 A/HK/156/97 的 *ns1* 序列比较后发现, 在 238~252 位存在 15 个核苷酸的缺失^[10], 这些缺失对 NS1 蛋白功能具有怎样的影响? 鉴于此, 我们选用 A/Quail/Shantou/852/01 (A/

Qa/ST/852/01) (H5N1) 作为研究材料, 采用多重 PCR 技术对其 *ns1* 基因进行修饰, 将缺失的 15 个核苷酸片段插入 A/Qa/ST/852/01 的 *ns1* 基因中, 构建 *ns1* 基因的真核表达载体, 为进一步研究 NS1 蛋白在流感流行中的作用奠定基础。

1 材料与方法

1.1 病毒、载体与菌株

A/Qa/ST/852/01 由本中心保存, 表达载体 pcDNA 3.1(+) 购于美国 Invitrogen 公司, 大肠杆菌 DH5 由本室保存。

收稿日期: 2005-01-24

基金项目: 中国博士后科学基金 (2003034460); 广东省教育厅
高校自然科学基金 (202038); 广东省自然科学基金 (04020239)

作者简介: 张志珍 (1967-), 女, 山西省万荣县人, 博士, 副教授, 主要从事流感病毒研究。

1.2 工具酶及其它试剂

病毒 RNA 提取试剂盒购自美国 Qiagen 公司, SuperScript 逆转录酶、DTT 购自美国 Invitrogen 公司, AmpliTaq Gold 酶、dNTP、MgCl₂ 购自德国 Roche 公司, 限制性内切酶 *EcoR*、*Xho* 及 T4 DNA 连接酶购自 New England Biolabs 公司, 质粒提取、凝胶回收试剂盒购自上海华舜生物工程公司, 其他试剂为国产分析纯。

1.3 病毒 RNA 的提取和纯化

将 A/Qa/ST/852/01 接种于 9~10 日龄鸡胚尿囊腔进行增殖, 取 140 μL 含流感病毒的鸡胚尿囊腔上清, 按 RNeasy RNA 提取试剂盒说明书提取和纯化病毒 RNA, 最后溶于 50 μL DEPC-H₂O 中。

1.4 *ns1* 基因 RT-PCR 扩增

引物序列、RT-PCR 循环参数见文献[10]。

1.5 *ns1* 基因缺失片段的 PCR 扩增

采用多重 PCR 方法将缺失的 15 个核苷酸引入, 设计合成 PCR 所需引物: P1: 5-**CGAATCCAC** CATGGATTCCAAC-3', P2: 5-**GCACTGAAGCGATA** GTCATTTA-3', P3: 5-**GACTATCGCTTCAGTGCCGG** CTF-3', P4: 5-**CCGCTCGAGTCAA**ACTTCTGAC-3'。其中斜体部分为限制性内切酶 *EcoR*、*Xho* 的酶切位点, 黑体部分为插入的缺失序列。以上述 RT-

PCR 扩增产物为模板, P1、P2 为引物, 进行第一轮 PCR 扩增; 再以 P3、P4 为引物, 进行第二轮 PCR 扩增。之后, 以第一、二轮的扩增产物为模板, P1、P4 为引物再次进行 PCR 反应。循环参数与文献[10]相同。

1.6 *ns1* 基因真核表达载体的构建

琼脂糖凝胶电泳回收上述多重 PCR 扩增产物, 经 *EcoR* 和 *Xho* 双酶切后, 与双酶切的 pcDNA 3.1(+)载体按 1:3 摩尔数进行连接, 构建 pcDNA 3.1/*ns1* 真核表达载体, 转化到 DH 5 宿主菌中, 双酶切和序列测定对重组质粒进行鉴定。

2 结果

2.1 *ns1* 基因的 RT-PCR 扩增及序列分析

以提取的 RNA 为模板进行 RT-PCR 扩增, 产物经质量分数 1.2% 琼脂糖凝胶电泳分析显示, 有特异性条带出现, 其大小与预期结果相符。扩增产物测序结果表明, 采用我们所设计的引物能特异地扩增出 AIV A/Qa/ST/852/01 的 *ns1* 基因序列。*ns1* 基因全长 865 bp, 包含一个完整的开放阅读框(ORF), *ns1* cDNA 长度 678 bp, 编码 225 个氨基酸, 核苷酸序列见图 1。



图 1 A/Qa/ST/852/01 与 A/HK/156/97 *ns1* 基因序列比较

Fig. 1 Comparison of nucleotide sequences of *ns1* gene between A/Qa/ST/852/01 and A/HK/156/97

1 A/HK/156/97 (H5N1) 2 A/Qa/ST/852/01 (H5N1)

2.2 *ns1* 基因序列与 A/HK/156/97 的比较分析

将测定的 *ns1* cDNA 核苷酸序列与 A/HK/156/97 (Genebank 登录序列号: AF036360) 的 *ns1* 序列进行比较分析, 发现 A/Qa/ST/852/01 *ns1* cDNA 除在第 238~252 位存在 15 个核苷酸的缺失外, 二者之间核苷酸序列的同源性为 95.0%, 推导的氨基酸序列的同源性也在 95.0% 以上(图 1)。

2.3 *ns1* 基因缺失片段的插入与克隆

采用多重 PCR 扩增后, 经琼脂糖凝胶电泳观察, 在约 713 bp 处出现单一条带, 大小与预计相符(图 2)。PCR 产物经 *EcoR* 和 *Xho* 双酶切后, 定向插入同样经双酶切的 pcDNA 3.1(+) 载体中, 获得重组质粒 pcDNA 3.1/*ns1*。*EcoR*、*Xho* 双酶切和 DNA 序列测定对重组质粒进行鉴定, 筛选出具有 *ns1* 基因正向插入的重组质粒, 酶切鉴定结果省略。

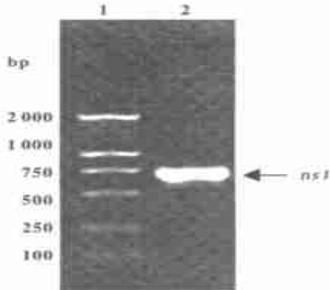


图 2 AIV *ns1* 基因修饰后的 PCR 分析

Fig. 2 PCR analysis of *ns1* gene of H5N1 influenza A virus
1 DL 2 000 marker 2 PCR product

3 讨论

甲型 AIV 属于正粘病毒科, 基因组由 8 个分节段的负链 RNA 组成。病毒 RNA 第 8 节段 *ns1* 基因由 890 个核苷酸组成, 包含一个完整 ORF, 编码两种蛋白质, 即 NS 蛋白 1 和 2。之所以命名为 NS1 蛋白, 是因为 NS 蛋白只在病毒感染的细胞中合成, 并没有被包装进病毒颗粒^[5]。在病毒感染早期即有 NS1 蛋白的大量表达, NS1 蛋白在病毒感染的细胞中含量丰富, 提示 NS1 蛋白在病毒复制及病毒早期抵抗机体的抗病毒免疫过程中具有重要作用^[11]。NS1 蛋白的分子长度从 202 个氨基酸残基 A/Fm/1/47 (H1N1) 到 237 个氨基酸残基 A/Udm/72 (H3N2)。反向遗传系统试验证实了 NS1 蛋白在保护流感病毒抵抗细胞 IFN 反应中的重要作用, 当缺乏 *ns1* 基因时, 重组病毒 A/PR8/34(delNS1) 仅能在细胞 IFN 反应缺陷时复制^[12,13]。目前, 对 NS1 蛋白

的研究主要集中在人流感病毒, AIV 很少涉及, 特别是对其缺失片段的功能研究。而 AIV 多次感染人的事件提醒我们, 必须重视对 AIV 的研究。

BLAST 分析表明, A/Qa/ST/852/01 *ns1* 基因的核苷酸序列与我们在 2000~2003 年间分离的 AIV H5N1 亚型 *ns1* 基因核苷酸序列的同源性在 99.0%~97.5% 之间, 推导的氨基酸序列的同源性在 99.1%~97.8% 之间。将 A/Qa/ST/852/01 的 *ns1* cDNA 核苷酸序列与 A/HK/156/97 进行比较, 发现其 *ns1* cDNA 在第 238~252 位明显存在 15 个核苷酸的缺失, 其推导的氨基酸序列在第 80~84 位存在 5 个氨基酸残基的缺失(即 TFA-S-V 肽段)。二者之间核苷酸序列的同源性为 95.0%, 推导的氨基酸序列的同源性也在 95.0% 以上。这些结果提示, 我们分离的病毒株已与 1997 年 H5N1 亚型有了明显变异, 且与近期其它地区分离的病毒株也存在差异。缺失的 15 个核苷酸处在 *ns1* 基因的功能活性区, 这种缺失是否与 NS1 蛋白逃避宿主的免疫防御有关? 所以, 我们采用多重 PCR 技术将缺失的片段插入 A/Qa/ST/852/01 中, 旨在对其缺失片段的功能进行研究。

本研究中, 我们选用 A/HK/156/97 作为对照株, 是因为该病毒株是首次感染人类的高致病性 AIV, 本身具有代表性。A/Qa/ST/852/01 的 *ns1* 基因 ORF 678 bp, 插入 15 bp 的缺失片段及增加限制性内切酶位点后, 其全长序列为 713 bp。*ns1* 基因的成功修饰及其真核表达载体的构建, 为我们研究缺失片段的功能和 NS1 蛋白在流感流行中的作用提供了基础, 同时也为采取有效措施预防世界性大流感提供有价值的理论资料。

参考文献:

- [1] Subbarao K, Klimov A, Kata J, et al. Characterization of an avian influenza virus(H5N1) isolated from a child with a fatal respiratory illness[J]. Science, 1998, 279(5 349): 393 - 396.
- [2] Lin YP, Shaw M, Gregory V, et al. Avian-to-human transmission of H9N2 subtype influenza A viruses: relationship between H9N2 and H5N1 human isolates[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2000, 97(17): 9 654 - 9 658.
- [3] Fouchier RA, Schneeberger PM, Rozendaal FW, et al. Avian influenza A virus(H7N7) associated with human conjunctivitis and a fatal case of acute respiratory distress syndrome[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2004, 101(5): 1 356 - 1 361.

(下转第 70 页)

射治疗相结合,在全身免疫功能增强的同时杀伤肿瘤局部细胞,达到双重抗肿瘤的效果。

本研究组构建了 *pEgr-P16* 表达载体,其转染食管癌细胞后,在不同大剂量照射后,可诱导细胞凋亡明显增强^[10]。我们先获得稳定表达 *pEgr-P16* 重组质粒的食管癌细胞系 EC9706-P16,然后分别予 0.075 Gy 和 2 Gy 照射,结果证实,0.075 Gy 也可显著诱导增强 EC9706-P16 细胞中 P16 表达,其表达量与 2 Gy 照射相接近。肿瘤细胞的杀伤作用是诱导细胞死亡或凋亡,通过检测细胞凋亡发现,0.075 Gy 组细胞凋亡率明显高于 0 Gy 组 ($P < 0.05$),但低于 2 Gy 组,荧光显微镜下观察,0.075 Gy 组细胞凋亡小体增多,而 2 Gy 组细胞凋亡小体和细胞碎片多于 0.075 Gy 组,说明 2 Gy 辐射对肿瘤细胞的杀伤作用比较强。

实验证明,0.075 Gy 辐射可同时诱导全身免疫功能增强和肿瘤局部基因-放射治疗杀伤肿瘤细胞。

参考文献:

- [1] 刘树铮. 辐射免疫学中的剂量效应关系[J]. 中华放射医学与防护杂志, 2002, 12: 385 - 388.
- [2] 龚守良, 吕喆, 刘淑春, 等. 低剂量辐射诱导胸腺细胞凋亡的适应性反应[J]. 中华放射医学与防护杂志, 2003, 23: 413 - 415.
- [3] Weichselbaum RR, Hallahan DE, Sukhatme VP, et al. Gene therapy targeted by ionizing radiation[J]. Int J Radiat Oncol Biol Phys, 1992, 24: 565 - 567.

- [4] 李修义, 李秀娟, 赫荣华, 等. 低剂量电离辐射对高剂量辐射致癌的影响[J]. 中华放射医学与防护杂志, 2003, 23: 411 - 413.
- [5] 李修义, 傅海青, 刘树铮. 低剂量全身照射增强荷瘤小鼠局部大剂量照射的抑瘤作用[J]. 白求恩医科大学学报, 1995, 21: 559 - 562.
- [6] Chon Hua, Tsai Morris, Xinmin Cao, et al. 5 flanking sequence and genomic structure of Egr-1, a murine mitogen inducible zinc finger encoding gene[J]. Nucl Acids Res, 1988, 16: 1 835 - 1 846.
- [7] Datta R, Taneja N, Sukhatme VP, et al. Reactive oxygen intermediates target CC(A/T)6GG sequences to mediate activation of the early growth response 1 transcription factor gene by ionizing radiation[J]. Proc Natl Acad Sci US, 1993, 90: 2 419 - 2 422.
- [8] Seung LP, Mauceri HJ, Beckett MA, et al. Genetic radiotherapy overcomes tumor resistance to cytotoxic agents[J]. Cancer Res, 1995, 55: 5 561 - 5 565.
- [9] Staba MJ, Mauceri HJ, Kufe DW, et al. Adenoviral TNF alpha gene therapy and radiation damage tumor vasculature in a human malignant glioma xenograft[J]. Gene Ther, 1998, 5: 293 - 296.
- [10] Wu Congmei, Huang Tianhua, Xie Qingdong, et al. Construction of *pEgr-P16* plasmid and its expression properties in esophageal squamous cell carcinoma induced by ionizing irradiation[J]. World J Gastroenterol, 2003, 12: 2 650 - 2 654.

(上接第 67 页)

- [4] Li KS, Guan Y, Wang J, et al. Genesis of a highly pathogenic and potentially pandemic H5N1 influenza virus in eastern Asia[J]. Nature, 2004, 430: 209 - 213.
- [5] Seo SH, Hoffmann E, Webster RG, et al. Lethal H5N1 influenza viruses escape host anti-viral cytokine responses[J]. Nat Med, 2002, 8(9): 950 - 954.
- [6] Salvatore M, Basler CF, Parisien JP, et al. Effects of influenza A virus NS1 protein on protein expression: the NS1 protein enhances translation and is not required for shutoff of host protein synthesis[J]. J Virol, 2002, 76(3): 1 206 - 1 212.
- [7] Wang XY, Basler CF, Williams RG, et al. Functional replacement of the carboxy-terminal two-thirds of the influenza A virus NS1 protein with short heterologous dimerization domains[J]. J Virol, 2002, 76(24): 12 951 - 12 962.
- [8] Geiss GK, Salvatore M, Tumpey TM, et al. Cellular transcriptional profiling in influenza A virus infected lung epithelial cells: The role of the nonstructural NS1 protein in the evasion of the host innate defense and its potential contribution to pandemic influenza[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2002, 99: 70 - 70.
- [9] Seo SH, Webster RG. Tumor necrosis factor alpha exerts powerful anti-influenza virus effects in lung epithelial cells[J]. J Virol, 2002, 76(3): 1 071 - 1 076.
- [10] 张志珍, 段炼, 李康生. 华南流感病毒 *ns1* 基因特性研究[J]. 生物化学与生物物理进展, 2004, 31(3): 237 - 243.
- [11] Lamb RA, Krug RM. Orthomyxoviridae: the viruses and their replication[M]. Knipe DM, Howley PM (Eds.), Fields Virology, fourth ed. Lippincott Williams & Wilkin, Philadelphia, 2001. 1 487 - 1 532.
- [12] Hatada E, Fukuda R, Saito S. Mutant influenza A virus with a defective NS1 protein cannot block the activation of PKR in infected cells[J]. J Virol, 1999, 73: 425 - 433.
- [13] Catchpole AP, Mingay LJ, Fodor E, et al. Alternative base pairs attenuate influenza A virus when introduced into the duplex region of the conserved viral RNA promoter of either the NS or the PA gene[J]. J Gen Virol, 2003, 84(3): 507 - 515.