

禽流感病毒 H5N1 血凝素基因和神经氨酸酶基因在大肠杆菌中的表达*

邹淑梅¹ 于在江¹ 张 焯¹ 辛 丽¹ 陈永坤¹ 唐启慧² 陈禹保³ 陈清轩² 舒跃龙^{1**}

(1 中国疾病预防控制中心病毒病预防控制所 北京 100052 2 北京标凯科技有限公司 北京 100094)

(3 北京中亚国瑞生物经济研究所 北京 102206)

摘要 目的:克隆、表达和鉴定禽流感病毒 H5N1 血凝素基因 (hemagglutinin, HA) 和神经氨酸酶基因 (neuraminidase, NA) 序列, 为制备抗体和基因工程疫苗打下基础。方法:在成功克隆禽流感病毒 H5N1 全长 HA、NA 基因并测序的基础上, 将部分基因序列克隆到表达载体 pET32a(+) 上, 全基因序列克隆到表达载体 pGEX4T-1 上, 构建了重组表达质粒 pET32a(+)/HA (49~1587bp)、pET32a(+)/NA (121~1141bp)、pGEX⁴T-1/HA、pGEX4T-1/NA, 转化大肠杆菌 BL21/rosetta, IPTG 诱导表达, 利用 Ni²⁺ 亲和层析柱和 GSTra P4B 亲和层析柱对重组蛋白进行纯化, 并用 Western blotting 和 ELISA 方法检测其抗原性。结果:重组蛋白在大肠杆菌中可以高效表达, SDS-PAGE 显示其相对分子质量与预计大小一致, 蛋白纯度占总蛋白的 90% 以上。ELISA 和 Western blotting 实验证实, 重组蛋白具有良好的抗原性。结论:成功克隆和表达了禽流感病毒 H5N1 HA、NA 基因序列, 为禽流感病毒 H5N1 诊断试剂和疫苗的开发等进一步的研究奠定了基础。

关键词 禽流感病毒 H5N1 血凝素 神经氨酸酶 克隆表达

中图分类号 Q786

禽流感 (avian influenza) 又名欧洲鸡瘟、真性鸡瘟, 是由正粘病毒科 A 型流感病毒引起的一种禽类感染和疾病综合征^[1]。我国《家畜家禽防疫条例》和世界动物卫生组织将该病规定为 A 类烈性传染病^[2]。其临床表现包括亚临床感染、中轻度的呼吸系统疾病、产蛋下降和严重的致死性疾病。高致病性禽流感 (HPA D) 是由特定亚型的禽流感病毒引起的禽类高度致死性传染病。禽类中, 高致病性禽流感主要由 A 型流感病毒的 H5 和 H7 亚型引起。近年来, 禽流感病毒正在突破种间屏障引起人类感染, 除少数病例外, 人患禽流感主要由 H5N1 亚型感染所致。1997 年香港禽流感事件中, H5N1 亚型 HPA V 直接感染造成 18 人发病, 6 人死亡^[3,4]。由 H5N1 亚型禽流感病毒 (avian influenza virus, A V) 引起的高致病性禽流感 (highly pathogenic

avian influenza, HPA D) 是近几年来在许多国家流行、给家禽养殖业带来巨大经济损失、而且威胁到人类的健康和安全的一种烈性传染病^[5]。因此, 有关 H5N1 生物学特性、致病机理、诊断和预防的研究日益受到卫生防疫人员的重视。

血凝素 (hemagglutinin, HA) 蛋白是流感病毒的主要表面糖蛋白, 占囊膜蛋白的 90%, 是诱导动物机体产生中和抗体的主要抗原, 具有亚型特异性, 同时可以诱导特异性抗体的产生, 还可以刺激机体产生细胞毒性 T 淋巴细胞 (CTL) 反应^[6,17]。

NA 基因编码的神经氨酸酶 (neuraminidase, NA) 蛋白是体液免疫的靶抗原, 可诱导机体产生特异性抗体, 抗体具有免疫保护作用^[7]。

本研究利用大肠杆菌表达系统成功表达了 H5N1 病毒 HA、NA 蛋白, 并对重组蛋白抗原性进行了初步评价, 为血清流行病学调查及诊断试剂的开发打下了良好的基础。

收稿日期: 2009-11-12 修回日期: 2009-12-26

* “十一五” 国家科技支撑计划 (2006BAD06A15) 资助项目

** 通讯作者, 电子信箱: yshu@vip.sina.com

1 材料与方法

1.1 材料

禽流感病毒株: A/Anhui/1/2005 (H5N1) 由中国疾病预防控制中心病毒所国家流感中心分离培养; 大肠杆菌 *E. coli* DH5、*E. coli* BL21、*E. coli* Rosetta、DNA marker 为北京标凯科技有限公司产品; pET32a (+) 和 pGEX4T-1 载体为 Novagen 公司产品、pMD20-T 载体、蛋白 marker 为 TaKaRa 公司产品; 限制性内切酶、T4 DNA 连接酶为 NEB 公司产品; DNA Polymerase、Reverse Transcriptase 为 TaKaRa 公司产品; DNA 凝胶回收试剂盒、质粒 DNA 小量抽提试剂盒、RNA 抽提试剂盒为北京标凯科技有限公司产品; Ni-NTA_{agarose} 为 Qiagen 公司产品; GSTra P4B 亲和层析柱为 GE 公司产品; 其他试剂为分析纯产品。

1.2 方法

1.2.1 禽流感病毒 H5N1 (安徽分离株) 全基因组提取以及 HA、NA 基因的克隆 病毒基因组的提取按病毒 RNA 提取试剂盒说明书进行操作。根据 GenBank 中禽流感病毒 H5N1 (安徽分离株) 基因序列, 设计出针对 H5N1 HA 和 NA 大片段的引物。以提取的病毒 RNA 为模板, 在逆转录酶的作用下逆转录 HA 和 NA 基因。操作步骤为: 模板与引物 70 °C 保温 10 min 后迅速在冰上急冷 3 min, 瞬离再加入已混合好的 buffer、dNTP Mixture、RNase Inhibitor、Reverse Transcriptase、RNase free 水, 42 °C 保温 1 h。再设计引物, 以逆转录出的 1st-Strand 为模板 PCR 扩增 DNA, 反应条件为: 95 °C 预变性 5 min, 93 °C 变性 30 s, 55 °C 退火 30 s, 72 °C 延伸 2 min, 30 个循环, 72 °C 延伸 10 min。PCR 结束后, 经 1% 琼脂糖凝胶电泳鉴定阳性的片段用 1% 琼脂糖凝胶电泳分离, 用胶回收试剂盒回收纯化后克隆至 pMD20-T 载体, 转化大肠杆菌感受态细胞 DH5, PCR 鉴定, 阳性质粒送北京标凯科技有限公司进行序列测定。

引物序列为: H5-up: 5'-GATCAGATTTGCA TTGGTT ACCAT; H5-down: 5'-TTAAA TGCAAATTC TGCA TTGT; N5-up: 5'-GGGAA TCAACACCAAGC; N5-down: 5'-CTAC TTG TCAA TGGTGA A TGCC。

1.2.2 HA、NA 蛋白抗原片段表达质粒的构建 (1) 重组表达质粒 pET32a (+) /HA (截短), pET32a (+) /NA (截短) 的构建: 根据 HA、NA 蛋白基因阳性重组质粒的测序结果, 设计引物 (pET-H5-up: 5'-GAGAGGATCGATCAGATTTGCA TTGGTTACCAT; pET-H5-down: 5'-

GAGAGCGGCCGCGTAA GTTCCTA TTGA TTCCAA TTTTAC T; pET-N5-up: 5'-GAGAGAA TTCGGGAA TCAACACCAAG C; pET-N5-down: 5'-GAGACTCGA GAGGTCTTA TGCAAT CT), 以禽流感病毒 H5N1 (安徽分离株) 蛋白基因阳性重组质粒 (pMD20-T-HA /NA) 为模板进行 PCR, 反应条件为 95 °C 预变性 5 min, 93 °C 变性 30 s, 55 °C 退火 30 s, 72 °C 延伸 2 min, 30 个循环, 72 °C 延伸 10 min。PCR 扩增出尾部截短 150 bp 两端带有酶切位点和保护碱基的 HA 和 NA 基因序列。经 1% 琼脂糖凝胶电泳分离, 胶回收纯化后双酶切, 与用同两种酶双酶切的 pET28a (+) 载体连接、转化大肠杆菌感受态细胞 DH5、挑单克隆扩大培养, PCR 鉴定出阳性克隆。重组质粒 pET32a (+) /HA (截短), pET32a (+) /NA (截短) PCR 阳性克隆送北京标凯科技有限公司测序。

(2) 重组表达质粒 pGEX4T-1 /HA, pGEX4T-1 /NA 的构建: 根据 HA 蛋白基因阳性重组质粒的测序结果, 设计引物 (GXT-H5-up: 5'-GAGAGGATCCGATCAGATTTGCA TTGGTTACCAT; GXT-H5-down: 5'-GAGACTCGAGT TAAA TGCAAATTC TGCA TTGT; GXT-N5-up: 5'-GAGAG AATTCGGGAA TCAACACCAAGC; GXT-N5-down: 5'-GAGACTCGA GCTACTTG TCAA TGGTGA A TGCC), 以禽流感病毒 H5N1 (安徽分离株) 蛋白基因阳性重组质粒 (pMD20-T-HA) 为模板进行 PCR, 反应条件为 95 °C 预变性 5 min, 93 °C 变性 30 s, 55 °C 退火 30 s, 72 °C 延伸 2 min, 30 个循环, 72 °C 延伸 10 min。PCR 扩增出全长 HA 基因序列。经 1% 琼脂糖凝胶电泳分离, 胶回收纯化后双酶切, 与用同两种酶双酶切的 pGEX4T-1 载体连接、转化大肠杆菌感受态细胞 DH5、挑单克隆扩大培养, PCR 鉴定出阳性克隆。重组质粒 pGEX4T-1 /HA, pGEX4T-1 /NA PCR 阳性克隆送北京标凯科技有限公司测序。

1.2.3 HA、NA 蛋白抗原片段的表达 阳性 pET28a (+) /HA (截短), pET28a (+) /NA (截短) 质粒转化 *E. coli* BL21 Star, 阳性 pGEX4T-1 /HA, pGEX4T-1 /NA 质粒转化 *E. coli* Rosetta, 挑单克隆, 接种入 5 ml 含相应抗生素的 LB 培养基中, 37 °C 250 r/min 振荡过夜。次日将 5 ml 培养液转接入 500 ml 含相应抗生素的 LB 培养基中, 37 °C 振荡培养至吸光度 $A_{600} = 0.6$ 时, 加入 IPTG 至终浓度 1 mmol/L, 诱导 3 h, 离心收集菌体, 并用 PBS 洗一次, -40 °C 冻融两次, 用 1/10 体积的 PBST (PBS, 0.5% Triton-X100, pH 7.4) 悬浮菌体, 加 EMSF 至终浓度为 1 mmol/L, 180 Hz 超声破碎细菌, 4 °C、12 000 r/min 离心 30 min, 分别收集沉淀和上清, SDS-PAGE 显示

蛋白位于沉淀中(也即包涵体表达)。

1.2.4 表达产物的纯化 (1) pET32a(+)/HA(截短)、pET32a(+)/NA(截短)重组质粒表达产物的纯化:用 Ni-NTA agarose 按 QAGEN 手册方法纯化包涵体, PBS 透析复性; (2) pGEX4T-1/NA 重组质粒表达产物的纯化:超声破碎后的沉淀溶于尿素中,用 PBS 梯度稀释使其复性,上 GSTra P4B 亲和层析柱,按 GE 手册方法纯化蛋白。

1.2.5 纯化产物免疫学活性的鉴定 (1) ELISA 检测:以梯度稀释的表达重组蛋白抗原铺板,梯度稀释的兔抗禽流感病毒 H5N1 血清作为一抗,HRP 标记的羊抗兔 IgG 为二抗,进行 ELISA 检测,并设空白对照和免疫前小鼠血清为阴性对照,待测样本 OD 值大于阴性对照 OD 值 2 倍以上为阳性。(2) Western blotting 印迹检测:以重组蛋白为抗原,兔抗禽流感病毒 H5N1 血清作为一抗,HRP 标记的羊抗兔 IgG 为二抗,进行 Western blotting 印迹检测,并设未诱导的 BL21/rosetta 为阴性对照。

2 结果

2.1 H5N1 病毒(安徽分离株)全基因组提取以及 HA、NA 基因的克隆

病毒 RNA 模板经逆转录及 PCR 扩增后,琼脂糖电泳显示得到一条 1700bp 和一条 1400bp 左右的条带(图 1),此条带与 T 载体连接转化后得到多个阳性克隆,测序结果分析,此两条基因序列是 H5N1 病毒的血凝素和神经氨酸酶基因。

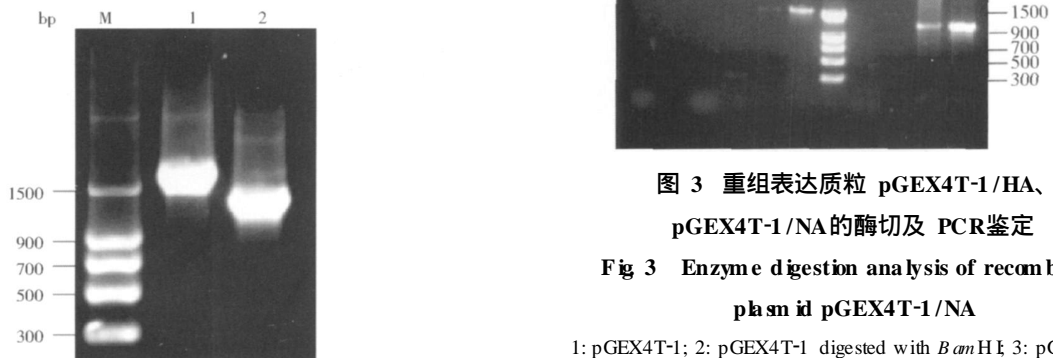


图 1 HA、NA 基因的 PCR 扩增图

Fig 1 PCR for HA and NA

M: DNA maker; 1: PCR for HA gene; 2: PCR for NA gene

2.2 HA、NA 蛋白抗原片段表达质粒的构建

PCR 产物经 1% 琼脂糖凝胶电泳分离,胶回收纯化后,上下游酶切位点双酶切,同时也用同样的酶处理

pET32a(+)载体和 pGEX4T-1 载体,连接,转化大肠杆菌 *E. coli* DH5_α, 小量抽提质粒后进行双酶切和 PCR 鉴定,电泳都显示出正确大小的条带(图 2 和图 3),测序结果也正确,表明目的基因已经成功克隆到 pET32a(+)载体和 pGEX4T-1 载体载体上。

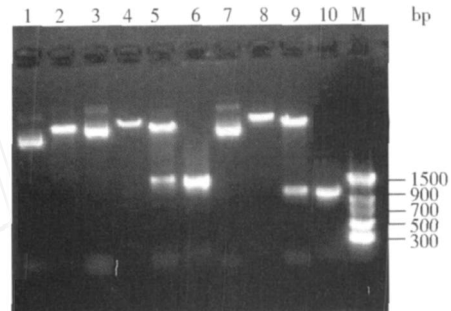


图 2 重组表达质粒 pET32a(+)/HA(截短)、pET32a(+)/NA(截短)的酶切及 PCR 鉴定

Fig 2 Enzyme digestion analysis of recombinant plasmid pET32a(+)/HA(cut)、pET32a(+)/NA(cut)

1: pET32a(+); 2: pET32a(+) digested with *Bam*H I; 3: pET32a(+)/HA(cut); 4: pET32a(+)/HA(cut) digested with *Bam*H I; 5: pET32a(+)/HA(cut) digested with *Bam*H I and *Nor*I; 6: PCR for HA(cut); 7: pET32a(+)/NA(cut); 8: pET32a(+)/(cut) digested with *Eco*R I; 9: pET32a(+)/NA(cut) digested with *Eco*R I and *Xho*I; 10: NA(cut)片段 PCR 产物; M: DNA maker

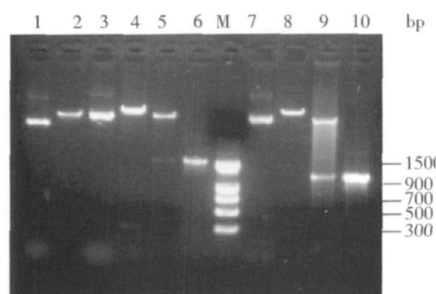


图 3 重组表达质粒 pGEX4T-1/HA、pGEX4T-1/NA 的酶切及 PCR 鉴定

Fig 3 Enzyme digestion analysis of recombinant plasmid pGEX4T-1/NA

1: pGEX4T-1; 2: pGEX4T-1 digested with *Bam*H I; 3: pGEX4T-1/HA; 4: pGEX4T-1/HA digested with *Bam*H I; 5: pGEX4T-1/HA digested with *Bam*H I and *Xho*I; 6: PCR for HA; 7: pGEX4T-1/NA; 8: pGEX4T-1/NA digested with *Eco*R I; 9: pGEX4T-1/NA digested with *Eco*R I and *Xho*I; 10: PCR for NA; M: DNA maker

2.3 HA、NA 蛋白抗原片段的表达

质粒转化表达菌 *E. coli* BL21/rosetta, 经 1mmol/L IPTG 诱导 3h 后, SDS-PAGE, 可见特异性表达带, 分子

量与预期大小相同。可溶性分析显示此蛋白为包涵体形式表达。

2.4 表达产物的纯化

2.4.1 pET32a(+)/HA(截短)、pET32a(+)/NA(截短)重组质粒表达产物的纯化 用 Ni-NTA agarose 亲和层析柱纯化包涵体,在 8mol/L 尿素 (pH 4.5) 洗脱时 Bradford 试剂有强烈的颜色变化,经 SDS-PAGE 检测,表明目的蛋白得到纯化,其中表达蛋白纯度占总蛋白的 90% 以上,浓度为约 3mg/ml (图 4 和图 5)。纯化后的蛋白经 PBS 透析复性后保存。

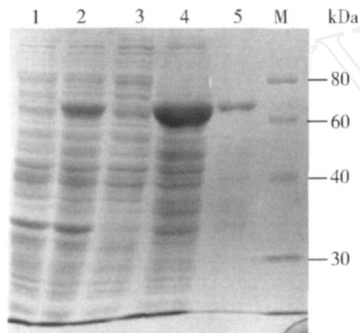


图 4 HA 重组蛋白的表达和纯化

Fig 4 Expression and purification of HA

M: Protein marker; 1: BL21 before IPTG induction; 2: BL21 after IPTG induction; 3: Ultrasonic supernatant after IPTG induction; 4: Crude extract of infusibility protein; 5: Purified recombinant protein

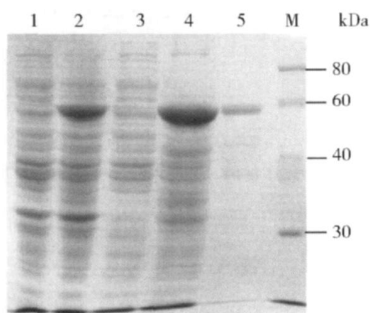


图 5 NA 重组蛋白的表达和纯化

Fig 5 Expression and purification of NA

M: Protein marker; 1: BL21 before IPTG induction; 2: BL21 after IPTG induction; 3: Ultrasonic supernatant after IPTG induction; 4: Crude extract of infusibility protein; 5: purified recombinant protein

2.4.2 pGEX4T-1/HA、pGEX4T-1/NA 重组质粒表达产物的纯化 超声破碎后的沉淀溶于尿素中,用 PBS 梯度稀释使其复性,上 GSTra P4B 亲和层析柱,在 10mmol/L 还原型谷胱甘肽洗脱时 Bradford 试剂有强烈的颜色变化,经 SDS-PAGE 检测,表明目的蛋白得到纯化,其中表

达蛋白纯度占总蛋白的 90% 以上,浓度为约 3mg/ml

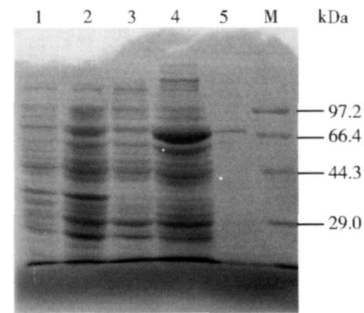


图 6 HA 重组蛋白的表达和纯化

Fig 6 Expression and purification of HA

M: Protein marker; 1: Rosetta before IPTG induction; 2: Rosetta after IPTG induction; 3: Ultrasonic supernatant after IPTG induction; 4: Crude extract of infusibility protein; 5: Purified recombinant protein

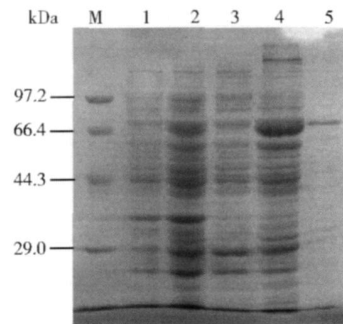


图 7 NA 重组蛋白的表达和纯化

Fig 7 Expression and purification of NA

M: Protein marker; 1: Rosetta before IPTG induction; 2: Rosetta after IPTG induction; 3: Ultrasonic supernatant after IPTG induction; 4: Crude extract of infusibility protein; 5: Purified recombinant protein

2.5 纯化产物免疫学活性的鉴定

2.5.1 ELISA 检测结果 重组蛋白与兔抗禽流感病毒 H5N1 血清有阳性反应 (数值略),提示表达的重组蛋白与病毒自身蛋白有相似的免疫原性。

2.5.2 Western blotting 结果 重组蛋白与兔抗禽流感病毒 H5N1 血清反应有特异性条带产生,分子量大小与预计一致 (图 8 和图 9)。

3 结论

禽流感病毒 (avian influenza virus, AIV) 属于正粘病毒科流感病毒属,其基因组为单股负链 RNA,含有大小不同的 8 个独立 RNA 片段,编码 10 种蛋白质^[8]。根据血凝素 (hemagglutinin, HA) 和神经氨酸酶 (neuraminidase, NA) 的不同可分为 15 个 HA 亚型,9 个

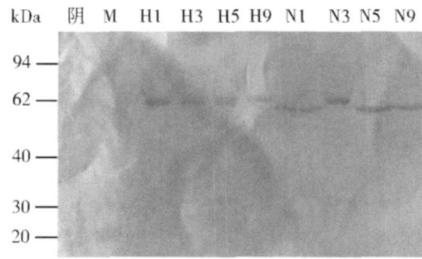


图 8 重组蛋白与抗禽流感病毒 H5N1 血清的 Western blotting 分析 (截短)

Fig 8 Western blotting analysis recombinant protein and avian influenza virus H5N1 monoclonal antibody (cut)

Negative control: BL21; M: Prestained protein marker, H5: Recombinant protein HA; N5: Recombinant protein NA

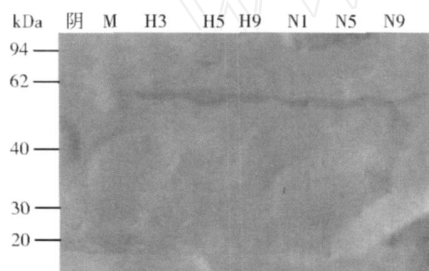


图 9 重组蛋白与抗禽流感病毒 H5N1 血清的 Western blotting 分析 (全长)

Fig 9 Western blotting analysis recombinant protein and avian influenza virus H5N1 monoclonal antibody (full length)

Negative control: Rosetta; M: Prestained protein marker, H5: Recombinant protein HA; N5: Recombinant protein NA

NA 亚型^[9-11]。编码 HA 的片段是 A/V 基因组中变异率最大的一个片段,不同亚型或同一亚型的不同毒株的 HA 序列均存在明显的差异。A/V 的毒力强弱主要体现在 HA 基因的变异,高致病力毒株通常由非致病力毒株的 HA 基因变异而来。研究表明该基因表达的蛋白是 A/V 诱导保护性免疫的主要抗原,它刺激机体所产生的抗体可中和病毒、抵抗感染。成熟的 HA 是由 548~552 个氨基酸残基构成的多肽链,在病毒的复制过程中,被细胞内蛋白酶切割为 HA1 和 HA2 2 个亚单位决定它能否感染细胞,而 HA 的抗原性主要集中于 HA1 上^[12-13]。NA 基因编码的神经氨酸酶 (neuraminidase, NA) 蛋白也是 A/V 的主要表面抗原之一,具有水解唾液酸的活性,当成熟的流感病毒经出芽的方式脱离宿主细胞之后,病毒表面的血凝素会经由唾液酸与宿主细胞膜保持联系,需要由神经氨酸酶将唾液酸水解,切断病毒与宿主细胞的最后联系。有利于子代病毒粒子

的成熟和释放。NA 的另一种作用是穿透呼吸道表面的黏膜,促进病毒在机体内的传播,与病毒的宿主嗜性及毒力有关。NA 是体液免疫的靶抗原,可诱导机体产生特异性抗体,抗体具有免疫保护作用,可抑制酶活性,抑制病毒从感染细胞释放,从而减少病毒的增殖^[14-15]。

禽流感病毒的流行范围遍及全球且目前尚无有效地预防措施,因此,禽病毒基因工程疫苗和快速诊断试剂的研制有着广阔的前景。近年来,随着血清学实验技术的发展,有几项技术常用于禽流感的监测和诊断,如用血凝抑制 (HI) 试验检测抗血凝素 (HA) 的抗体,用琼脂免疫扩散 (AGP) 试验检测抗核蛋白的抗体,其它还有病毒中和、补体结合、神经氨酸酶抑制和单辐射溶血等方法。国外已对检测禽流感抗体的 ELISA 方法进行了不少研究。我国对禽流感的研究起步较晚,虽然已先后建立了 AGP、HI 和 RTPCR 等检测技术,但其抗原来自于经纯化、浓缩的完整病毒,获得该抗原存在的问题是:完整病毒不易生产、纯化、成本较高^[16-17],且存在感染性和容易散毒,在应用中存在局限性^[18]。

本研究应用原核表达系统具有成本低,操作简单,生产周期短,适于大规模生产,并且表达的蛋白易于纯化等优点^[16]。利用基因工程手段将 HA、NA 基因的信号肽缺失掉,采用两种原核表达载体:pET32a(+)载体和 pGEX4T-1 载体表达缺失信号肽的 HA 和 NA 基因,结果表明:不同表达系统中蛋白表达水平相差大,pET32a(+) / BL21 中没有得到表达,pGEX4T-1 / rosetta 中获得较高表达,说明所选择的载体系统会影响蛋白基因的表达。pET32a(+) / BL21 体系不表达,推测可能是因为其尾部序列与头部序列会形成复杂的二级结构,阻碍蛋白翻译的起始,故决定分别切去头部和尾部约 150bp 序列试表达,因此基因为结构蛋白,一般 7 个氨基酸即可形成一个抗原决定簇,故切去头部或尾部小段片段不会影响免疫活性,结果截短头部还是未表达,截短尾部获得了高效表达,说明主要还是尾部序列影响表达。采用 pGEX4T-1 载体表达缺失信号肽的 HA 和 NA 基因,结果 HA 和 NA 都获得了高效表达。

免疫学鉴定确定所有表达成功的蛋白都具有较好的免疫反应性,后续试验将利用此重组蛋白进行单克隆抗体和免疫学快速检测试剂的研制,本工作为研制开发相关的诊断试剂和基因工程疫苗打下了基础。

致谢 感谢“人禽流感阻断技术研究课题组”全体人员对本文的贡献!

参考文献

- [1] Christensen J P, Dietz H H, Bisgaard M. Phenotypic and genotypic characters of isolates of *Pasteurella multocida* obtained from backyard poultry and from two outbreaks of avian cholera in avifauna in Denmark. *Avian Pathol*, 1998, 27 : 373-381.
- [2] Beman SM, Hirsh D C. Partial Characterization of Plasmids from *Pasteurella multocida* isolated from turkeys. *Antimicrobial Agents Chemotherapy*, 1978, 14 : 348-352.
- [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, 293 : 393-396.
- [4] Zhou N N, Shortridge K F, Claas E C J, et al. Rapid evolution of H5N1 influenza viruses in chicken in Hongkong. *J Virol*, 1999, 73 : 3366-3374.
- [5] Alexander D J. A review of avian influenza in different bird species. *Veterinary Microbiology*, 2000, 74 : 3-13.
- [6] 倪建强, 张春玲, 李海燕, 等. 猪流感病毒核蛋白基因的原核表达及其在诊断中的初步应用. *中国预防兽医学报*, 2004, 26 (1) : 18-21.
Ni J Q, Zhang C L, Li H Y, et al. *Chinese Journal of Preventive Medicine*, 2004, 26 (1) : 18-21.
- [7] 丛彦龙, 刘金华. 流感病毒血凝素在宿主特异性转变种的分子基础. *中国兽医学报*, 2008, 28 (6) : 737-742.
Cong Y L, Liu J H. *Chinese Journal of Veterinary Science*, 2008, 28 (6) : 737-742.
- [8] Webster R G, Bean W J, Gorman O T, et al. Evolution and ecology of influenza A viruses. *Microbiol Rev*, 1992, 56 : 152-179.
- [9] Alexander D J. A review of avian influenza in different bird species. *Veterinary Microbiology*, 2000, 74 : 3-13.
- [10] Pereira H G, Tumova B, Law V G. Animal influenza A virus. *World Health Organization*, 1965, 32 : 855-860.
- [11] 费东亮, 金宁一, 马鸣潇, 等. H5 亚型禽流感病毒 HA 基因在重组杆状病毒中的表达及检测. *中国兽医学报*, 2006, 26 (4) : 387-389.
Fei D L, Jin N Y, Ma M X, et al. *Chinese Journal of Veterinary Science*, 2006, 26 (4) : 387-389.
- * [12] 施源, 袁渭康, 陈敏恒. 不稳定的基因工程酵母生长动力学研究. *生物工程学报*, 1990, 6 (1) : 44-49.
Shi Y, Yuan W K, Chen M H. *Chinese Journal of Biotechnology*, 1990, 6 (1) : 44-49.
- [13] Claas E C, Osterhaus A D, Von Beek R, et al. Human influenza H5N1 virus related to a highly pathogenic avian influenza virus. *Lancet*, 1998, 35 (1) : 472-477.
- [14] Colman P M, Varghese J N, Laver W G. Structure of the catalytic and antigenic sites in influenza virus neuraminidase. *Nature*, 1983, 303 (5912) : 41-44.
- [15] 宋建领, 张富强, 王金萍, 等. H5N1 亚型禽流感病毒神经氨酸酶基因的克隆与表达. *中国病毒学*, 2006, 21 (1) : 43-46.
Song J L, Zhang F Q, Wang J P, et al. *Virologica Sinica*, 2006, 21 (1) : 43-46.
- [16] 郑其升, 刘华雷, 张晓勇, 等. H9N2 亚型 A/V HA 基因的原核表达及间接 ELISA 方法的建立. *中国病毒学*, 2005, 20 (3) : 293-297.
Zheng Q S, Liu H L, Zhang X Y, et al. *Virologica Sinica*, 2005, 20 (3) : 293-297.
- [17] 南文龙, 金宁一, 鲁会军, 等. H5N1 亚型禽流感病毒血凝素 Th 和 B 细胞表位预测及抗原性分析. *中国免疫学杂志*, 2009, 7 (25) : 630-637.
Nan W L, Jin N Y, Lu H J, et al. *Chinese Journal of Immunology*, 2009, 7 (25) : 630-637.
- [18] 钟晓琴. 感染人类的禽流感病毒 A (H5N1) 研究进展. *中华肺部疾病杂志*, 2009, 2 (1) : 63-75.
Zhong X Q. *Chinese Journal of Lung Disease*, 2009, 2 (1) : 63-75.

Expression of the Hemagglutinin and Neuraminidase Gene of Influenza A Virus H5N1 in *E. coli*

ZOU Shu-mei¹ YU Zai-jiang¹ ZHANG Ye¹ XN Li¹ CHEN Yong-kun¹ TANG Qi-hu² CHEN Yu-bao³
CHEN Qing-xuan² SHU Yue-long¹

(1 Institute for Viral Disease Control and Prevention, China National Influenza Center, Beijing 100052, China)

(2 Beijing Biokit Inc., Beijing 100094, China 3 Beijing Sinogreen Institute for Bioeconomy, Beijing 102206, China)

Abstract Objective: To clone, express and characterize the HA (hemagglutinin) and NA (neuraminidase, NA) protein of avian influenza virus H5N1. Methods: On the basis of successful clone the full length HA and NA

gene and sequence analysis of avian influenza virus H5N1, Ligated part of the gene into pET32a(+), full of the gene into pGEX4T-1. An expression vector pET32a(+)/HA (49 ~ 1587bp), pET32a(+)/NA (121 ~ 1141bp), pGEX4T-1/HA, pGEX4T-1/NA were constructed and expressed in *E. coli* BL21/rosetta induced by IPTG. recombinant protein was purified through Ni^{2+} and GSTrap 4B affinity chromatography column. Western blotting and ELISA were used to determine the antigenic of the recombinant protein. Results: The recombinant capsid gene can be overexpressed in *E. coli*. SDS-PAGE showed that the gene could express product as same as I might expect. The purity of the protein is greater than 90%. ELISA and Western blotting showed that the recombinant protein has good antigenic. Conclusion: The HA and NA protein of avian influenza virus H5N1 has been successful cloned and expressed, which could be useful for developing diagnose reagents or vaccine of H5N1.

Key words Avian influenza virus H5N1 Hemagglutinin Neuramidinase Clone and express

姜老师信箱

蛋白质研讨班学员问:

姜老师,您好!我们是蛋白质研讨班的学员,看到您使用 MAC 纯化抗体的结果很好,我们很感兴趣。我们尝试使用 MAC 来纯化筛出的一株 IgG1 单抗,可结果很不理想,主要是挂不住,咨询了介质厂家,问题仍未完全解决。请问能否拿我们的样品到您的实验室做一下 MAC? 谢谢!

姜老师答:

学员,你好!你们遇到的问题还是比较典型的。已经有学员到我这里做了 MAC,结果很令人满意。问题出在 MAC 柱子的平衡和再生上。MAC 作为金属螯合层析的介质,使用时要注意两点:(1)作为弱阳离子交换介质要充分的去质子化;(2)螯合基团要充分的络合金属离子。

具体操作流程如下:

1. 柱活化:新 MAC 柱 (或采用咪唑及氯化铵洗脱方式使用过的柱子运行过再生步骤后),用水 (4 个柱体积) 洗去保存液。
2. 使用 1M NaCl, 0.2M NaOH (4 个柱体积以上),接触时间不少于 10 分钟,中间可以停流 2 分钟,流出液 pH 不小于 11。(接触时间,即 residence time 很重要,这一步确保弱酸型基团都转变成钠型)
3. 使用 1M NaCl 洗至 pH9.0 以内。
4. 运行 4 个柱体积的 0.5M NaCl, 200mM NaAc, pH4.5, 洗至 pH 小于 4.7。
5. 运行 4 个柱体积的 0.5M NaCl, 100mM NaAc, 100mM NiCl_2 , pH4.5, 接触时间不大于 10 分钟。(charge 步骤,确保络合能力弱的位点“挂不上”镍离子)
6. 运行洗脱液: 0.5M NaCl, 100mM NaAc, pH4.5, 4 个柱体积。(洗去未结合或松散结合的镍离子)
7. 水洗 4 个柱体积。
8. 运行 0.5M NaCl, 150mM Na_2HPO_4 , 至 pH = 8。(提高柱子 pH 的能力比下一步的平衡液更强)
9. 运行 0.5M NaCl, 100mM (NaH_2PO_4 - Na_2HPO_4), pH8.0, 平衡柱子。(平衡在 pH8.0 比在 pH7.4 明显具有更高的动态载量)
10. 上样,样品不能有分子的络合金属离子成分,电导和 pH 要调整到跟平衡液一致。
11. 洗脱,可以采用 pH 梯度、咪唑梯度、氯化铵梯度等方式。其中 pH 梯度洗脱方式不需要每次都再生和活化,更经济、快速,是业界最常用的方法。
12. 柱再生,建议使用 0.5M NaCl, 0.2M HCl, 来去除金属离子及洗脱成分 (比使用 EDTA 要好的多),然后再从柱活化 (步骤 1) 开始。

祝实验顺利!