

甲型流感病毒核蛋白基因的克隆表达及纯化

房师松 程小雯 刘涛 刘建军 赵树进 周丽

【摘要】 目的 将甲型流感病毒核蛋白(NP)基因克隆到原核表达载体进行可溶性融合表达,制备纯化的病毒核蛋白,为制备甲型流感病毒单克隆抗体提供材料。**方法** 提取甲型流感病毒 RNA,设计引物,RT-PCR 扩增 NP 基因,利用基因工程的手段,将甲型流感病毒的 NP 基因在大肠埃希菌中进行融合表达,并将表达产物进行亲和层析。**结果** 成功构建了甲型流感病毒 NP 基因原核表达载体,经亲和层析制备了较高纯度的目的表达产物。**结论** 通过合理控制发酵时间、生长温度和诱导物浓度,制备了较为理想的可溶性甲型流感病毒核蛋白。

【关键词】 流感病毒 A 型; 核蛋白类; 克隆细胞

Clone expression and purification of influenza A virus nucleoprotein gene FANG Shi-song*, CHENG Xiao-wen, LIU Tao, LIU Jian-jun, ZHAO Shu-jin, ZHOU Li. Department of Food and Bioengineering, South China University of Technology, Guangzhou 510642, China

【Abstract】 Objective To clone the influenza A virus NP gene into expression vector and to purify the target protein, which was used to study the preparation of monoclonal antibody. **Methods** The RNA of influenza A virus was extracted and primers were designed according the NP gene sequence, then the NP gene of influenza A virus was expressed in *E. coli* DH5 α and the NP protein was purified by affinity chromatography. **Results** The recombinant expression vector-pGEX-4T-2-NP was successfully constructed and relatively pure target protein was obtained. **Conclusion** Through reasonably controlling the fermentation time, growth temperature and induction concentration, satisfactory soluble target product was obtained.

【Key words】 Influenza virus A; Nucleoproteins; Clone cells

甲型流感病毒是人类、鸟类和低等哺乳类动物产生严重疾病的病原。20 世纪人类流感曾发生过 3 次瘟疫性的全球大流行。特别是 1997 年“中国香港禽流感”事件的发生,更引起了国际科技界的极大关注。甲型流感病毒是 8 节段的负链单股 RNA 病毒,共编码 10 个多肽,其中节段 5 编码核衣壳蛋白,核蛋白(NP)具有型特异性。甲型流感病毒 NP 基因全长 1 497 bp,编码 498 个氨基酸多肽,NP 相对分子质量约为 55 000。

有效的流感监测对流感的预防及控制有重要意义。其中,建立快速诊断技术是流感监测中的关键。本研究利用基因工程技术,将 NP 基因在原核细胞中进行了克隆表达以及产物的纯化,为自主研制甲型流感免疫渗漏试剂盒奠定了基础。

1 材料和方法

1.1 材料与试剂 受体菌 DH5 α 由深圳市医学病原微生物参比重点实验室保存;表达质粒 pGEX-4T-2 及 GST 蛋白纯化试剂盒购自瑞典 Pharmacia 公司;病毒 RNA 抽提试剂盒、逆转录试剂盒购自基因工程公司;DNA Gel Extraction Kit、Plasmid DNA Extraction Kit 购自美国 Invitrogen 公司;培养基为 LB 培养基和 2 \times YT 培养基;所有酶均购自上海生工生物工程有限公司。

1.2 方法

1.2.1 流感病毒 RNA 的抽提:收集甲型流感病毒阳性 MDCK 细胞培养液,23 000 r/min 4 $^{\circ}$ C 离心 1 h,然后按病毒 RNA 抽提试剂盒说明书进行操作。整个过程注意污染和 RNA 酶影响。

1.2.2 流感病毒 RNA RT-PCR 反应:基本按试剂盒说明书进行操作并略加改进。反应体系包括:Buffer 2.5 μ l, MgCl₂ 5 μ l, dNTP (100 mmol/L) 2.5 μ l, RNase 抑制剂 0.5 μ l, 逆转录酶 0.5 μ l, Taq 酶 0.5 μ l, 引物

作者单位:510642 广州,华南理工大学食品与生物工程学院(房师松:现在深圳市疾病预防控制中心微生物检验科工作);深圳市疾病预防控制中心微生物检验科(程小雯、刘涛、刘建军、周丽);广州军区广州总医院药学部(赵树进)

1 (30 pmol/L)、2 (30 pmol/L) 各 0.5 μ l, RNA 模板 8 μ l, ddH₂O 4.5 μ l。反应条件为 50 $^{\circ}$ C 30 min, 4 $^{\circ}$ C 2 min, 94 $^{\circ}$ C 30 s, 60 $^{\circ}$ C 30 s, 72 $^{\circ}$ C 3 min, 40 个循环; 72 $^{\circ}$ C 10 min; 4 $^{\circ}$ C 至实验结束。

1.2.3 NP 基因 RT-PCR 产物割胶回收: 取 100 μ l PCR 产物进行 1% 琼脂糖电泳, 紫外透射仪下切割目的条带(约 1 500 bp)至一新离心管中, 用 DNA Gel Extraction Kit 进行回收。

1.2.4 NP 基因回收产物酶切: 取大约 0.6 μ g 回收产物进行 *EcoR* I 酶切, 37 $^{\circ}$ C 反应 4 h。用 DNA Gel Extraction Kit 进行回收纯化。然后再进行 *Xho* I 酶切, 37 $^{\circ}$ C 反应 4 h。最终酶切产物用 DNA Gel Extraction Kit 进行回收纯化, -20 $^{\circ}$ C 保存备用。

1.2.5 表达载体 pGEX-4T-2 转化受体菌 DH5 α : 挑取 LB 培养基平板上一单菌落, 至 3 ml LB 培养基中, 37 $^{\circ}$ C 240 r/min 培养过夜。取 20 μ l 新培养的菌液重新接种于 3 ml LB 培养基中, 相同培养条件培养约 4 h, 然后用 CaCl₂ 法制备感受态细胞。取 1 μ l 质粒载体 pGEX-4T-2 DNA 转化感受态细胞, 于培养箱中 37 $^{\circ}$ C 培养过夜。

1.2.6 质粒载体 pGEX-4T-2 DNA 的抽提与酶切: 取新培养的菌体培养液, 用德国 Qiagen 公司 Plasmid DNA Extraction Kit 抽提质粒 DNA。然后分别用 *EcoR* I 和 *Xho* I 酶切。产物保存于 -20 $^{\circ}$ C 备用。

1.2.7 融合表达载体 pGEX-4T-2-NP 的构建: 取 NP 基因双酶切产物与质粒载体 pGEX-4T-2 DNA (二者量浓度之比为 2:1) 用 T4 连接酶在 16 $^{\circ}$ C 反应 10 h。新连接构建的融合表达载体为 pGEX-4T-2-NP。

1.2.8 融合表达载体转化宿主菌及筛选鉴定: 用 CaCl₂ 法制备感受态细胞, 用 1 μ l 融合表达载体 pGEX-4T-2-NP 转化感受态细胞。然后均匀涂布 Amp 筛选 LB 固体培养基, 37 $^{\circ}$ C 培养过夜。挑取单菌落接种于含 Amp 的液体 LB 培养基中培养 10 h。抽提质粒 DNA, 分别用引物 1 和 2 做 PCR 以及 *EcoR* I、*Xho* I 双酶切鉴定分析。

1.2.9 NP 基因序列测定: 提取 PCR 鉴定阳性菌落 DNA, 分别用 pGEX 载体通用测序引物在上海生工生物工程公司进行双向测序。

1.2.10 NP 融合蛋白的诱导表达: 取结果阳性的菌落接种于 4 ml Amp 筛选 LB 培养基中, 240 r/min 37 $^{\circ}$ C 培养 4 h, 然后加入终浓度为 0.4 mmol/L 的 IPTG (100 mmol/L), 32 $^{\circ}$ C 继续培养 2 h。离心收集菌体, 按每毫升菌液加入 50 μ l PBS 的比例重悬菌体沉

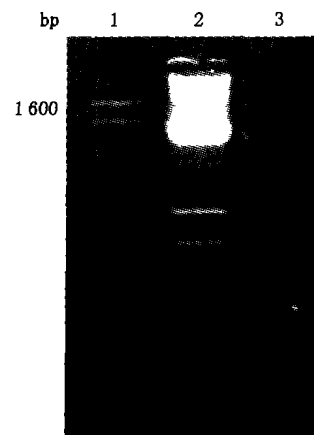
淀, 加入溶菌酶室温反应 20 min, 然后反复冻溶 5~6 次, 直至菌体悬浮液澄清为止。13 000 r/min 离心 10 min, 小心吸取上清, 即为 NP 融合蛋白混合液。将上清进行 10% SDS-PAGE 分析融合蛋白诱导表达情况。

1.2.11 NP 融合蛋白的亲层析纯化: 取新鲜培养的 NP 重组菌液, 按 1:100 的比例接种到 1×10^3 ml, 2 \times YT 培养基中, 按 1.2.10 诱导表达方法进行诱导并收集菌体裂解上清液。将上清液用直径 0.45 μ m 的微孔滤膜过滤, 过滤液上 GST 融合蛋白亲和层析柱纯化 NP 融合蛋白。

1.2.12 NP 融合蛋白的 ELISA 鉴定: 将纯化的 NP 融合蛋白包被 96 孔板, 用间接法进行 ELISA 鉴定。

2 结果

2.1 流感病毒 RNA NP 基因 RT-PCR 甲型流感病毒 NP 基因全序列总长度为 1 497 bp, 根据该序列设计并合成上、下游 RT-PCR 引物 P1、P2, 并在引物 5' 端设计了 *EcoR* I 和 *Xho* I 酶识别位点。引物序列如下: P1: 5'-GCGGAATTCCCATGGCGTCCCAAGGCACCAAACGG-3'; P2: 5'-GCGCTCGAGTTTAATTGTCGTACTCTTCTGC-3'。RT-PCR 反应结束后, 产物进行 1.5% 琼脂糖凝胶电泳(图 1), 所扩增主带位置在相对分子质量 1 500 bp 左右, 说明已成功扩增了 NP 基因。



1: 相对分子质量标准; 2: 甲型流感 RNA RT-PCR; 3: 空白对照

图 1 NP 基因 RT-PCR 结果

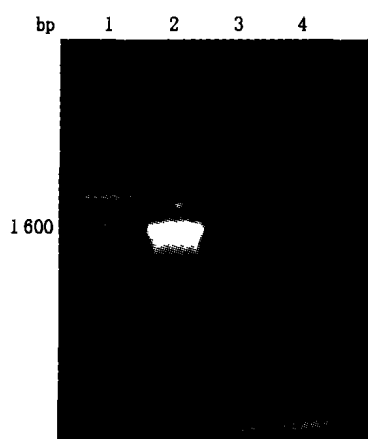
1: PCR Marker; 2: RT-PCR of influenza virus type A; 3: blank control

Fig. 1 RT-PCR results of NP gene

2.2 融合表达载体 pGEX-4T-2-NP 的鉴定分析

将表达质粒载体 pGEX-4T-2 与 NP 基因逆转录产物分别经 *EcoR* I 和 *Xho* I 酶切后, 用 T4 连接酶构建融合表达载体。融合表达载体转化宿主菌 DH5 α , 培

养抽提质粒 DNA。用 P1、P2 对融合表达载体 DNA 进行 PCR(图 2), 扩增出了目的条带, 初步说明成功构建了融合表达载体。将融合表达载体 DNA 进行 *EcoR* I 和 *Xho* I 酶切分析(图 3), 结果表明 NP 基因已经与载体 pGEX-4T-2 连接。为了进一步验证融合表达载体 NP 基因的准确性, 特别是表达调控元件读码的准确性, 将融合表达载体 pGEX-4T-2-NP 进行测序, 结果与设计完全吻合, 没有任何移码错误。表明已成功构建了融合表达载体, 筛选到了阳性克隆菌株。

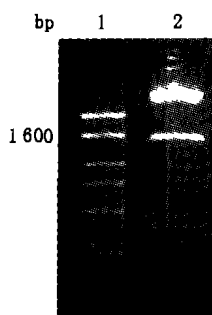


1: 相对分子质量标准; 2: 融合表达载体 DNA PCR;
3: 阴性对照 PCR; 4: 空白对照

图 2 融合表达载体 DNA PCR 结果

1: PCR Marker; 2: PCR products of recombinant vector;
3: negative control; 4: blank control

Fig. 2 The PCR result of recombinant vector DNA



1: 相对分子质量标准; 2: 双酶切产物

图 3 融合表达载体 DNA 酶切结果

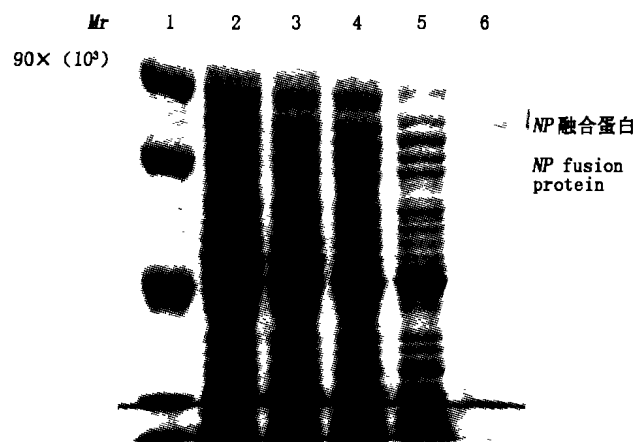
1: DNA marker; 2: product of double enzymatic restriction digestion

Fig. 3 The enzymatic restriction digestion

result of recombinant expression vector

2.3 NP 融合蛋白的诱导表达 取新鲜菌液按 1:100 比例接种 $2 \times$ YT 培养基培养 4 h, 经 IPTG 诱导并继续培养 1.5 h。用反复冻溶法提取融合表达的 NP, SDS-PAGE 进行鉴定, 其结果见图 4。经诱导后融合表达载体表达有相对分子质量大约在 81 000 的条带, 经亲和层析, 得到了单一条带, 相对分子质量

与理论值相符。表明融合表达载体诱导产生了 NP 融合蛋白。



1: 蛋白相对分子质量标准; 2: 阴性对照未诱导产物;

3: 阴性对照诱导产物; 4: 阳性未诱导产物;

5: 阳性诱导产物; 6: 亲和层析产物

图 4 NP 蛋白诱导表达 SDS-PAGE

1: the protein marker; 2: not induced product of negative control;

3: induced product of negative control;

4: not induced product of positive control;

5: induced product of positive control

6: the products were purified by affinity chromatography

Fig. 4 The SDS-PAGE map of induced NP protein

2.4 NP ELISA 分析 将纯化的 NP 抗原进行 10 倍稀释, 用 ELISA 方法对 NP 抗原进行滴度测定。所采用的相应抗体为甲型流感病毒鼠源单克隆抗体和酶标羊抗鼠二抗。结果表明将纯化的 NP 进行 10^{-9} 稀释后, 其吸光度 ($A_{450\text{nm}}$ 值) 可以达到 0.153, 结果为阳性, 说明纯化效果比较理想, NP 滴度较高。

3 讨论

在原核细胞表达外源基因, 尤其是以大肠埃希菌为宿主菌高效表达外源基因时, 表达蛋白常在细胞内形成包涵体。包涵体的形成有利于防止蛋白酶对表达蛋白的降解, 并且非常有利于分离表达产物。但包涵体形成后, 表达蛋白不具有物理活性, 另外, 负责水解起始密码子的甲硫氨酸的水解酶, 不能对所有的表达蛋白都起作用, 这往往造成所表达的蛋白为非生物体内的天然蛋白。在本研究中, 要尽量不使外源 NP 基因在大肠埃希菌中形成包涵体; 另一方面, 又要使表达的外源蛋白有一定的含量和比较高的稳定性。为了解决这一问题, 采用融合蛋白表达的方法, 使 NP 基因与载体上的 GST 基因融合表达。含原核细胞多肽的融合蛋白是避免细菌蛋白酶降解的最好措施。为了提高表达水平但不形成包

涵体,采用诱导表达,使细菌的生长与外源基因的表达分开。但是诱导物的诱导浓度必须合理控制,另外,细菌诱导前的生长条件与外源基因诱导表达后的生长条件也需要合理控制。在本研究中,我们用 0.4 mmol/L 的 IPTG 诱导,诱导前细菌生长条件为 37℃ 4 h,诱导后为 30℃ 1.5 h,取得了较为理想的效果。

有效的流感监测对流感的预防与控制有重要意义,其中建立快速诊断技术是流感监测中的关键。国外 Joseph、Chomel 等^[1,2]于 1991-1992 年报道用一种新的酶免疫膜实验(Directigen Flu-A test)能快速诊断甲型流感。Church^[3]、Matsumoto^[4]、Morley^[5]等均有快速检测甲型流感病毒试剂盒的报道。国内陶三菊等^[6]1994 年报道应用法国提供的 Directigen Flu-A 诊断试剂盒能快速诊断甲型流感。上述检测试剂盒有显著的缺点,其价格昂贵,易出现是非不明的弱反

应,同时敏感性不够高,在我国至今还未见有这方面的应用。

参 考 文 献

- 1 Joseph LW. Comparison of directigen Flu-A with viral isolation and identification of influenza A virus. *J Clin Microbiol*, 1991,29:479.
- 2 Chomel JJ, Remilleux MF, Machand P, et al. Rapid diagnosis of influenza A. Comparison with ELISA immunocapture and culture. *J Virol Methods*, 1992,37:337-343.
- 3 Church DL. Clinical and economic evaluation of rapid influenza a virus testing in nursing homes in Calgary. *Clin Infect Dis*, 2002,34:790-795.
- 4 Matsumoto T. Rapid diagnosis of infectious diseases at the site of outpatient clinics. *Rinsho Byori*, 2002,50:468-473.
- 5 Morley PS, Bogdan JR, Townsend HG, et al. Evaluation of directigen flu aassay for detection of influenza antigen in nasal secretions of horses. *Equine Vet J*, 1995,27:131-134.
- 6 陶三菊,王焕琴,刘玉华,等.应用 Directigen Flu-A 快速诊断甲型流感. *中华实验和临床病毒学杂志*, 1994,8:377-378.

(收稿日期:2004-05-28)

·论著摘要·

定喘汤及宣降清分解剂对 RSV 感染 Hela 细胞的实验研究

王雪峰 吴振起 崔振泽

呼吸道合胞病毒(RSV)是婴幼儿下呼吸道感染的主要病原体,我院儿科采用定喘汤加减治疗 RSV 感染,取得了好的疗效。为探讨定喘汤的作用机理,我们进行了定喘汤及宣、降、清分解剂在 Hela 细胞上抗 RSV 的实验研究,现报道如下。

材料和方法:药物组成:定喘汤:麻黄、黄芩、白果、半夏等;宣法:麻黄;降法:白果、半夏等;清法:黄芩、甘草等。宣+降:麻黄、半夏等;宣+清:麻黄、黄芩等;降+清:白果、黄芩等。制成含生药 0.5 g/ml 药液,备用。

将 RSV 接种于 Hela 细胞上,待细胞出现病变达 70% 左右时收获病毒;测定半数感染量(TCID₅₀)为 4.26 × 10⁵,体外感染细胞浓度为 100 TCID₅₀。将定喘汤及其分解剂稀释后,接种于 Hela 细胞中,动态观察结果,记录由药物产生的细胞病变效应,计算药物的半数中毒浓度(TD₅₀)和最大无毒浓度(TD₀)。药物抗 RSV 实验:A 组:先用 RSV 感染 Hela 细胞,再加不同倍比稀释的药物;B 组:先加不同倍比稀释的药物,再加 RSV 液;C 组:RSV 液与不同倍比稀释的药物等量混合后,感染 Hela 细胞。连续观察细胞病变,按 Reed-Muench 法计算药物的半数有效量(IC₅₀)、治疗指数 TI(TD₅₀/IC₅₀)。

结果:定喘汤及其分解剂在 1:8 稀释浓度的 Hela 细胞多

数坏死脱落,出现毒性作用,而 1:64 及以上各稀释度药物的 Hela 细胞则无毒性作用。定喘汤浓度在 1:16 时,即 32 mg/ml, Hela 细胞出现轻度中毒表现,毒性轻重次序是清、宣+清、降、降+清、宣、宣+降。A 组,各组均产生了不同程度细胞病变;B 组,定喘汤、清法、宣+清法抗病毒作用明显;C 组,宣法的作用明显。TI 值高低次序是清、宣+清、定喘汤、宣、降、降+清、宣+降。

讨论:定喘汤是治疗痰热内蕴哮喘咳嗽的有效方法。通过观察药物对 Hela 细胞的影响,发现降法、降+宣、降+清组 TI 值较小,说明“降法”组安全范围较窄,有毒成分较多。定喘汤, TI 值好于上法,用药合理。药物抗 RSV 实验中, A 组定喘汤、宣法、清法、宣+清组均有作用,提示麻黄、黄芩、桑白皮、甘草有抑制细胞内 RSV 增殖的作用,或抑制了病毒复制的某一环节;降法、宣+降、降+清组产生了完全细胞病变,可能病毒进入细胞后,药物已不再起作用。B 组定喘汤、清法、宣+清组能较好地抑制 Hela 细胞的融合病变,预防 RSV 感染细胞,其作用机制可能是药物作用于细胞而使细胞呈抗病毒状态;C 组宣法产生了不完全细胞病变,其他组作用不明显,说明麻黄对 RSV 具有直接灭活作用。定喘汤体外抑制 RSV,主要通过宣法、清法起作用,且预防细胞感染作用要好于对病毒的直接灭活作用。其作用机制需进一步探讨。

(收稿日期:2005-02-15)

基金项目:国家中医药管理局 2000-J-Z(PMQB)

作者单位:110032 辽宁中医学院附属医院儿科(王雪峰、吴振起);大连市儿童医院(崔振泽)