

新城疫病毒 F 蛋白中两段七肽重复序列的克隆和表达

刘有放 于 明 王恩秀 田 波*

(中国科学院微生物研究所分子病毒学与生物工程研究室,北京 100080)

摘 要 从新城疫病毒(NDV)中国强毒株 F48E9 和弱毒株长春株 F 蛋白的 cDNA 中克隆出两段七肽重复序列(Heptad Repeat Region, HR1, HR2),将 HR1 和 HR2 分别插入表达载体 pGEX-6p-1,在大肠杆菌 BL21(DE3)中表达,将与载体中的 GST(Glutathione S-Transferase)融合表达的可溶性融合蛋白用 GST 亲和层析柱纯化。纯化的融合蛋白用蛋白酶切后,先用 GST 亲和层析柱除去 GST,再加热进一步纯化。纯化的 HR1 和 HR2 质谱分析其分子量,结果表明,强株的 HR1 和 HR2 的分子量分别为 7.103kD 和 6.301kD,弱株的 HR1 和 HR2 的分子量分别为 7.107kD 和 6.309kD,强弱株 HR1 和 HR2 的分子量都基本一致。本工作为研究 HR1、HR2 的结构以及它们在 NDV 与宿主细胞融合中的作用奠定了基础。

关键词 新城疫病毒 F 蛋白,七肽重复序列,质谱

中图分类号 Q786 **文献标识码** A **文章编号** 1000-3061(2001)06-0631-04

病毒与细胞间的融合是病毒进入并侵染宿主细胞的一个关键步骤,由副粘病毒介导的融合需要两个糖蛋白:融合蛋白(F)和血凝集素神经氨酸苷酶(HN)。HN 蛋白主要负责病毒粒子与细胞受体(神经氨酸)最初的结合(吸附)和破坏这种结合的相互拮抗作用,它作用于受体位点,使 F 蛋白发生病毒与细胞膜的融合。F 蛋白主要负责病毒囊膜与宿主细胞膜的融合,使病毒基因组能进入细胞内^[1]。F 蛋白中至少含有 3 段七肽重复序列(HR1, HR2, HR3),HR1 位于 F 蛋白的 C 端,HR2 与穿膜区的 N 端相邻^[2]。HR1 和 HR2 对融合作用都很重要,任何一个区域内的氨基酸突变都会降低融合活性^[3]。据报道,一些囊膜病毒的 HR1 和 HR2 可形成 HR1/HR2 异源三聚体,这种异源三聚体被认为是融合过程中最稳定的结构^[4]。

新城疫病毒(Newcastle Disease Virus, NDV)是对我国养鸡业威胁最大的一种传染病,它属副粘病毒科,为有囊膜的单链、负极性 RNA 病毒^[5]。Young 等人^[6]的研究表明 NDV 的 HR1 或 HR2 均可抑制 F 蛋白介导的融合过程,但两者等量混合后抑制作用大幅度降低,所以他们认为这可能是由于两段肽形成了复合物从而阻碍了两者对靶蛋白的作用。本文利用聚合酶链式反应(PCR)分别从强毒弱毒株的 F 蛋

白的 cDNA 克隆中扩增出 HR1 和 HR2 的序列,在大肠杆菌中表达,用 GST 亲和层析柱纯化,并通过质谱确定 HR1 和 HR2 的分子量,为研究 HR1、HR2 的结构和功能打下了基础。

1 材料及方法

1.1 基因、载体以及菌株

新城疫病毒强毒株(F48E9)的 F 蛋白的 cDNA 克隆由中国农科院哈尔滨兽医研究所曹殿军教授提供,新城疫病毒弱毒株(长春株)的 F 蛋白的 cDNA 克隆由军需大学病毒系金宁一教授提供。表达载体 pGEX-6p-1 由哈佛大学医学院提供。

根据 F 蛋白的 cDNA 全长序列设计了下列引物:

强株 HR1 5'引物:TAAGGATCCACAGCGCCGCGAGCTCTG

强株 HR1 3'引物:GTCGAATTCTCAGTCTAATTCCTGAGCTGT

强株 HR2 5'引物:GCCGGATCCTCAATACAAGATTCTCAAG

强株 HR2 3'引物:GTCGAATTCTCAGGTAATGAGAGCAGATGCTG

弱株 HR1 5'引物:AATGGATCCACAGCAGCCTCAGCTCTG

弱株 HR1 3'引物:GCCTAATTCCTGAGCTCTG

弱株 HR2 5'引物:GCCGGATCCTCAATATTAGATTCTCAG

弱株 HR2 3'引物:GCAGAATTCTCAGGTAATGAGAGCAGAGCTG

1.2 表达载体的构建

利用合成的特异引物分别以 F48E9 病毒株和长春病毒株的 F 蛋白的 cDNA 为模板扩增出 HR1 及

HR2 的序列。PCR 产物用 glass milk kit 回收,经 *Bam*HI/*Eco*RI 双酶切后,与用 *Bam*HI/*Eco*RI 双酶切的 pGEX-6p-1 16℃连接过夜,转化 DH5α 菌株,用合成的 PCR 引物做菌落 PCR 快速筛选克隆,所得克隆经酶切及 DNA 测序确证,得到的克隆分别称为 pGEX-vHR1, pGEX-vHR2, pGEX-aHR1, pGEX-aHR2 (第 1,2 个重组质粒由克隆强毒株基因所得,第 3,4 个重组质粒由克隆弱毒株基因所得)。

1.3 表达和纯化

重组质粒 pGEX-HR1 和 pGEX-HR2 分别转化到 BL21(DH3)中表达。表达条件:菌在 2 × YT 培养基中 37℃培养过夜,将过夜培养的菌以 2:100 的比例转接至新鲜预热的 2 × YT 培养基中,25℃培养至 OD_{600} 为 0.6 ~ 1.0,加终浓度为 0.1mmol/L IPTG 诱导 4h,收集菌体。菌体用磷酸缓冲液 (PBS, 140mmol/L NaCl, 2.7mmol/L KCl, 10mmol/L Na_2HPO_4 , 1.8mmol/L KH_2PO_4 , pH7.3) 重悬,在冰浴条件下超声破碎。加 20% Triton X-100 至终浓度为 1%,混匀后冰浴 30min, 12000r/min, 4℃离心 10min,取上清。收集上清,用 GST 亲和层析柱纯化可溶性蛋白,融合蛋白被 GST 洗脱缓冲液洗脱 (0.154g 还原型谷胱甘肽溶解在 50mL 50mmol/L Tris-HCl pH8.0 中)。将洗脱的融合蛋白换液于酶切缓冲液中 (50mmol/L Tris-HCl, pH7.0, 150mmol/L NaCl, 1mmol/L EDTA, 1mmol/L DTT)。融合蛋白被蛋白酶 precession (2μg 酶/100μg 融合蛋白) 酶切 4h,再用 GST 亲和层析柱除去被切下的 GST,最后 80℃加热 10min 得到纯化的蛋白^[4]。

1.4 质谱分析

纯化的蛋白用 20mmol/L Tris-HCl (pH7.5) 超滤换液并浓缩,然后进行质谱分析 (Bruker 公司 BILEX III 型飞行时间质谱 (MALDI-TOF))。取 1μL 样品溶液加在质谱仪的样品靶上,待溶液挥发后送入质谱仪进行质谱分析,加速电压为 19.5kV 反射器电压为 20kV,延时引出电压为 14.5 ~ 16.5kV,延迟时间为 50 ~ 200ns。累加 10 ~ 50 次单次扫描信号得到质谱图。

2 结果

2.1 HR1 和 HR2 序列的亚克隆

利用 PCR 方法从 F 蛋白的 cDNA 克隆中获得长度为 189bp (从基因的第 406 个碱基到第 594 个碱基) 的 HR1 序列和长度为 165bp (从基因的第 1345 个碱基到第 1509 个碱基) 的 HR2 序列。分别将强弱毒株的这两个片段克隆到 pGEX-6p-1 表达载体 (4.9kb) 中经酶切确证,获得含正确序列的 HR1 和

HR2 的克隆: pGEX-vHR1, pGEX-vHR2, pGEX-aHR1, pGEX-aHR2 (图 1)。由于小片段较小,在琼脂糖胶中用 EB 染色不容易看清楚,故采用 PAGE 银染。

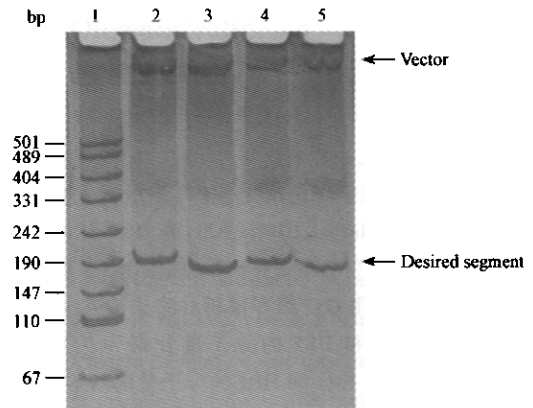


图 1 重组质粒酶切分析图

Fig.1 Restriction enzyme analysis of recombinant plasmids

1. DNA molecular weight marker; 2. pGEX-vHR1 digested by *Bam*HI and *Eco*RI; 3. pGEX-vHR2 digested by *Bam*HI and *Eco*RI;
4. pGEX-aHR1 digested by *Bam*HI and *Eco*RI;
5. pGEX-aHR2 digested by *Bam*III and *Eco*RI

2.2 HR1 和 HR2 的序列测定及分析

阳性克隆由宝生物工程有限公司进行全序列测定,结果显示,所克隆的区域与原 F 克隆的相应区域完全一致,没有任何突变位点。比较强弱株的 HR1 序列发现,在 415, 435, 438, 459, 477, 483, 489, 495, 501, 567, 576, 591 这 12 个位点上均有碱基差异 (图 2)。根据密码子推断的氨基酸序列中,仅第 139 (S-A), 145 (N-K), 192 (N-K) 位有 3 个氨基酸不同。比较强弱株的 HR2 序列发现,在 1351, 1352, 1362, 1369, 1371, 1377, 1383, 1384, 1398, 1422, 1435, 1455, 1458, 1464, 1482, 1489, 1494 这 17 个位点上均有碱基差异 (图 3), 但氨基酸序列的差异并不大, 仅在第 451 (L-Q), 457 (V-I), 479 (D-N), 486 (S-R), 497 (G-S) 位有氨基酸的不同。

2.3 HR1 融合蛋白和 HR2 融合蛋白的表达及纯化

将 pGEX-vHR1, pGEX-vHR2, pGEX-aHR1, pGEX-aHR2 分别转化到大肠杆菌 BL21 (DE3) 中表达,由于载体本身表达的 GST 的大小为 26kD,加上小肽后,所表达的 HR1 融合蛋白和 HR2 融合蛋白的分子量估计约为 33kD, 32kD。SDS-PAGE 结果显示所得融合蛋白与估计的大小相符。结果如图 4 所示。由于强弱毒株的 HR1 和 HR2 的大小基本一致,在电泳中亦无差别,故在此以 HR1 和 HR2 表示。

2.4 HR1 和 HR2 的纯化

融合蛋白酶切后,经 GST 亲和层析纯化与 80℃

```

vhr1 406 ACA GCA GCC TCA GCT CTG ATA CAA GCC AAC CAG AAT GCT GCC AAC ATC CTC
ahr1 406 ACA GCG GCC GCA GCT CTG ATA CAA GCC AAA CAA AAT GCT GCC AAC ATC CTC

CGG CTT AAA GAG AGC ATT GCT GCA ACT AAT GAA GCT GTA CAT GAA GTC ACT
CGA CTT AAA GAG AGC ATT GCC GCA ACC AAT GAG GCT GTG CAT GAG GTC ACT

GAC GGA TTA TCG CAA CTA GCA GTG GCA GTT GGG AAG ATG CAG CAG TTT GTT
GAC GGA TTA TCG CAA CTA GCA GTG GCA GTT GGG AAG ATG CAG CAG TTT GTT

AAT GAC CAG TTT AAT AAC ACA GCT CAG GAA TTG GAC 594
AAT GAC CAA TTT AAT AAA ACA GCT CAG GAA TTA GAC 594

```

图 2 HR1 的 DNA 序列

Fig.2 The DNA sequence of HR1

```

vhr2 1345 TCA ATA TTA GAT TCT CAG GTA ATA GTG ACA GGC AAT CTC AAT ATC TCA ACT
ahr2 1345 TCA ATA CAA GAT TCT CAA GTA ATA ATA ACA GGT AAT CTT GAT ATC TCA ACT

GAA CTT GGG AAT GTC AAC AAC TCG ATA AGT AAT GCT TTG GAT AAG TTA GAG
GAG CTT GGG AAT GTC AAC AAC TCG ATC AGT AAT GCT TTG AAT AAG TTA GAG

GAA AGC AAT AGC AAA CTT GAC AAA GTC AAT GTC AAG CTG ACC GGC ACG TCT
GAA AGC AAC AGA AAA CTA GAC AAA GTC AAT GTC AAA CTG ACC AGC ACA TCT

GCT CTC ATT ACC 1509
GCT CTC ATT ACC 1509

```

图 3 HR2 的 DNA 序列

Fig.3 The DNA sequence of HR2

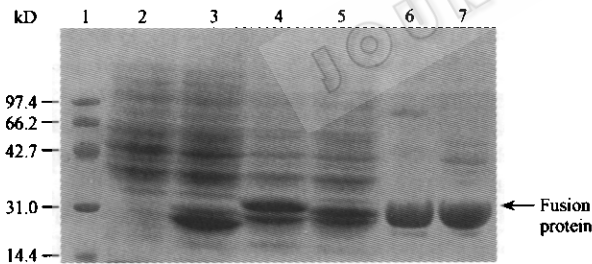
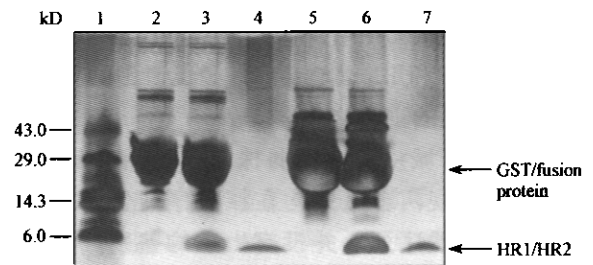


图 4 HR1 和 HR2 融合蛋白表达的 SDS-PAGE 考马斯亮蓝染色图

Fig.4 SDS-PAGE analysis of fusion protein expression of HR1 and HR2

1. MW marker; 2. Host protein before induction; 3. Host protein after induction; 4. Fusion protein of HR1; 5. Fusion protein of HR2; 6. Semi-purified fusion protein HR1; 7. Semi-purified fusion protein HR2

加热纯化, 所得 HR1 和 HR2 在银染条件下均为一条带, 且蛋白条带分子量位置正确(图 5)。HR1、HR2 的分子量较小, 普通的 SDS-PAGE 无法显示其条带, 故根据文献[7], 用适用于分辨小分子量蛋白的 Tricine-SDS-PAGE 进行电泳, 由于 Tricine-SDS-PAGE 不能将较大分子量的蛋白分的很开, 因此, 融合蛋白和 GST 在胶上的位置差不多。

图 5 HR1 和 HR2 蛋白纯化 Tricine-SDS-PAGE 银染图
Fig.5 Tricine-SDS-PAGE analysis of purified HR1 and HR2

1. MW marker; 2. Purified fusion protein HR1; 3. Cleavage of Fusion HR1; 4. Purified HR1; 5. Purified fusion protein HR2; 6. Cleavage of fusion HR2; 7. Purified HR2

2.5 HR1 和 HR2 的质谱分析

质谱分析表明 HR1(图 6)的分子量为 7.103kD, HR2(图 7)的分子量为 6.301kD。质谱图显示主峰, 杂峰强度很小, 说明表达产物纯度很高。

3 讨论

新城疫(ND)是多年来对我国养鸡业威胁最大的一种病毒性传染病。病毒感染是一个复杂的病理过程, 与多种因素有关, 但病毒的表面结构起着决定

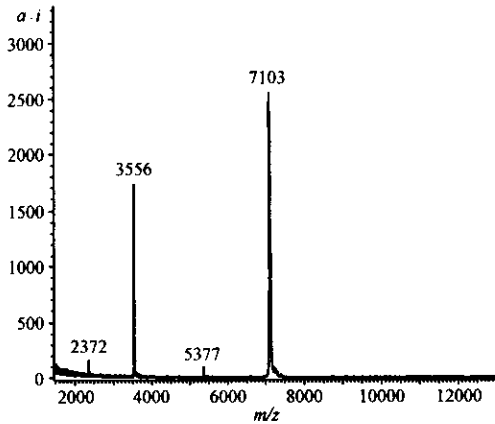


图 6 HR1 的质谱

Fig.6 Mass spectrometry analysis of HR1

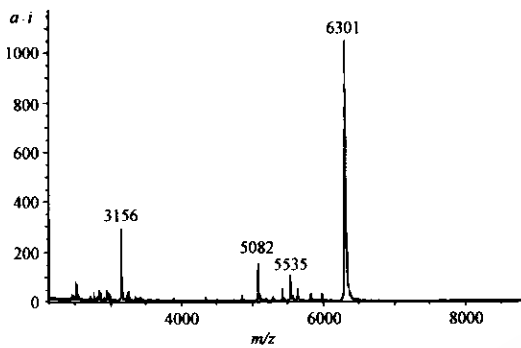


图 7 HR2 的质谱

Fig.7 Mass spectrometry analysis of HR2

性的作用^[1]。因此国内外研究者都将注意力集中在 NDV 的 F 蛋白和 HN 蛋白上,而 F 蛋白中的 HR1 和 HR2 又是研究的重点之一。

将我国新城疫病毒强弱株的 HR1 和 HR2 分别进行比较,发现两者虽然均在核酸序列上有较多差异,但在氨基酸序列上并没有太大的差别。进一步的比较须分析它们的二级结构和抑制融合的功能。

在表达融合蛋白时发现:诱导表达的温度为 37℃时,融合蛋白全部表达为包涵体;28℃时,部分为包涵体部分为可溶性蛋白;25℃时,全部为可溶性蛋白。因此,低温有利于可溶性蛋白的形成。

在纯化 HR1 融合蛋白(强弱株均如此)时发现,这种蛋白与 GS 亲和层析柱之间的亲和力比较强,需延长其在洗脱液中的浸泡时间至 4 h,且需用 6 倍柱的洗脱液洗脱,才能洗脱得比较彻底。

本文在大肠杆菌中表达了 HR1 和 HR2,并将二者纯化,这就为下一步分析它们的二级结构以及用 HR1 或 HR2 来抑制病毒侵染细胞打下基础^[7]。

REFERENCES(参考文献)

- [1] DING Chan(丁铲), YU Sheng-Qing(于圣青). Pathogenic molecular basis of Newcastle disease virus. *Chinese Journal of Virology*(病毒学报), 1993, 9(4): 397 ~ 400
- [2] Chambers P, Pringle C R and Easton A J. Heptad repeat sequences are located adjacent to hydrophobic regions in several types of virus fusion glycoproteins. *J. Gen. Virol.*, 1990, 71: 3075 ~ 3080
- [3] Sergel-German T, McQuain C and Morrison T. Mutations in the fusion peptide and heptad repeat regions of the Newcastle disease virus fusion protein block fusion. *J. Virol.*, 1994, 68: 7654 ~ 7658
- [4] Dutch R E, Leser G P, Lamb R A. Paramyxovirus Fusion Protein: Characterization of the Core Trimer, a Rod-Shaped Complex with Helices in Anti-Parallel Orientation. *Virology*, 1999, 254: 147 ~ 159
- [5] SHEN Yong-Zhou(沈咏舟), ZHENG Xin-Yong(郑新勇). Amino acid sequences of fusion protein and hemagglutinin-neuraminidase from Newcastle disease virus on its virulence. *Chemistry of Life*(生命的化学), 2000, 20(5): 220 ~ 222
- [6] Young J K, Li D, Abramowitz M C, Morrison T C. Interaction of Peptides with Sequences from the Newcastle Disease Virus Fusion Protein Heptad Repeat Regions. *Journal of Virology*, 1999, 73-7: 5945 ~ 5956
- [7] Schagger H, Von J G. Tricine-Sodium dodecylsulfate-polyacrylamide gel electrophoresis for the separation of protein in the range from 1 to 100kD. *Anal Biochem.* 1987, 166: 368 ~ 379
- [8] Yu M, Liu Y, Wang E, Tien P. Six-helix bundle assembly and characterization of heptad repeat regions from F protein of New Castle disease Virus. *Journal of General Virology*, 2001, (submitted)

Cloning and Expression of Heptad Repeat Regions of the Newcastle Disease Virus Fusion Protein

LIU You-Fang YU Ming WANG En-Xiu TIAN Bo*

(Institute of Microbiology, Chinese Academy of Science, Beijing 100080, China)

Abstract Two heptad repeat regions (HR1, HR2) from F clone of the virulent and avirulent NDV were cloned, expressed with vector pGEX-6p-1 in *E. coli* BL21 (DE3), and purified the fusion protein by Glutathione Sepharose 4B Column. After cleaved by precession protease, the desired protein was purified by Glutathione Sepharose 4B Column and high temperature. Purified HR1 and HR2 were analyzed by Mass spectrum, the result shows that the Molecular Weights of HR1 and HR2 of virulent NDV are 7103 and 6301, and the Molecular Weights of HR1 and HR2 of avirulent NDV is 7107 and 6309.

Key words newcastle disease viruses, fusion protein, heptad repeat region, mass spectrum

Received: May 16, 2001

* Corresponding author. Tel: 86-10-62554247; E-mail: tienpo@sun.im.ac.cn