

表达 H5N1 亚型禽流感病毒 HA 蛋白的重组鼠白血病毒的特性 Characterization of Murine Leukemia Virus Recombinants that Express H5N1 Subtype Avian Influenza Virus Hemagglutinin Glycoproteins

刘华雷¹, Rong Li-Jun², 周 斌¹, 魏建超¹, 郑其升¹, 陈溥言^{1*}

LIU Hua-Lei¹, RONG Li-Jun², ZHOU Bin¹, WEI Jian-Chao¹, ZHENG Qi-Sheng¹ and CHEN Pu-Yan^{1*}

1. 南京农业大学 农业部动物疫病诊断与免疫重点开放实验室, 南京 210095

1. Key Lab of Animal Diseases Diagnostic and Immunology, Ministry of Agriculture, Nanjing Agricultural University, Nanjing 210095, China

2. College of Medicine, University of Illinois at Chicago, Chicago, Illinois 60612, USA

摘 要 通过反转录-聚合酶链式反应(RT-PCR)扩增了 H5N1 亚型鹅源禽流感病毒(AIV)完整的血凝素(HA)基因并进行了克隆与鉴定。序列测定结果已经登陆 GenBank, 登陆号为 AY639405。序列分析表明所扩增的 HA 基因开放性阅读框架(ORF)由 1707 个核苷酸组成, 共编码 568 个氨基酸, 裂解位点的氨基酸组成为 RKKR↓GLF, 含连续的碱性氨基酸, 具有高致病性 AIV HA 基因裂解位点的特征。构建了含 HA 基因的真核表达载体 pcDNA-HA, 通过与鼠白血病毒(MuLV)假病毒构建体系的两种质粒 pHIT60 和 pHIT111 共转染人胚肾细胞 293T, 48h 后收集假病毒上清, 超离后通过 Western-blot 证明 HA 蛋白能够在假病毒颗粒表面表达, 表明 HA 能够整合到此病毒粒子表面。通过感染 293T、COS-7 和 NIH3T3 三种不同的靶细胞, 证实所构建的假病毒粒子具有感染性和泛嗜性。本研究成功构建了具有感染性的 MuLV-HA 假病毒体系, 为研究鹅源禽流感病毒侵入细胞的机理及其组织嗜性的变异提供一种新方法。

关键词 鼠白血病毒, 禽流感病毒, H5N1 亚型, 血凝素基因, 假病毒

中图分类号 Q786 文献标识码 A 文章编号 1000-3061(2005)01-0047-05

Abstract One highly pathogenic strain of avian influenza virus (AIV) was isolated from goose in China recently, designated as F-3. In order to study the viral entry mechanisms, the hemagglutinin(HA) gene of H5N1 subtype AIV isolate was amplified by RT-PCR, and then cloned into pGEM[®]-T vector and sequenced. The sequencing result has logging in GenBank, the accession number was AY639405. The HA gene of F-3 had a complete open reading frame (ORF) and composed of 1707 nucleotides, coding for 568 amino acids. The deduced amino acid sequence at the cleavage site of the HA protein was RKKR↓GLF, matched to the characteristic of virulent avian influenza strain. The HA gene were subcloned into pcDNA3, so the plasmid pcDNA-HA can express the HA glycoprotein. Co-transfected pcDNA-HA, pHIT60(include Murine Leukemia Virus structural genes, namely gag and pol) and pHIT111(retroviral vector genome, containing LacZ as a reporter) into 293T cells. The retroviral supernatant were harvested 48 hours post-transfection, filtered through 0.45μmol/L filter. The supernatant were used to analysis the characteristic of the pseudotyping virions by Western blotting and infection test. Western blotting revealed the HA glycoproteins can be expressed on the virions, indicated the glycoproteins were incorporated onto the retroviral virions. Infection test were performed on 293T, NIH3T3 and COS-7, all the three kinds of cells infected were lacZ positive, indicating viral entry, and revealed the pseudotype virions of MuLV-HA were infectious. So the pseudotype system of MuLV particles with AIV Hemagglutinin proteins

Received: June 8, 2004; Accepted: August 12, 2004.

* Corresponding author. Tel: 86-25-84396028; E-mail: aid@njau.edu.cn

were set up and it can be used to study the entry of avian influenza virus isolated from goose in China.

Key words Murine Leukemia Virus, avian influenza virus, H5N1 subtype, hemagglutinin gene, pseudotype

禽流感(Avian Influenza, AI)是严重危害畜牧业及公共卫生环境的一种传染性疾病。其病原为禽流感病毒,属正粘病毒科,为分节段单股负义RNA病毒^[1]。根据其对易感鸡致病性强弱,可将禽流感病毒分为高致病性AIV(如H5N1等)和低致病性AIV(如H9N2等)。高致病性AIV(HPAIV)感染禽类所导致的禽流感对养禽业具有毁灭性的打击,故被世界动物卫生组织(OIE)规定为A类疾病,被我国农业部列为I类传染病,并被列入国际生物武器公约动物类传染病范围。根据A型流感病毒表面糖蛋白血凝素(H)和神经氨酸苷酶(N)的抗原关系可将其进一步分为不同的亚型^[1,2]。香港于1997年报道了全球首例禽流感病毒能够感染一个3岁男童,至年底,香港H5N1型禽流感病毒感染共导致18人发病,其中6人死亡,从病人分离到H5N1病毒与当地家禽(鸡)分离到的H5N1病毒进行比较,发现两者都属于H5N1禽流感病毒基因,8个RNA节段与禽流感病毒相同,而未发现人类流感基因。这是世界上首次证实H5N1亚型禽流感病毒能够感染人,而且具有较高的致死率^[3]。最近禽流感突然袭击了亚太地区,10个国家及地区受影响(越南、印尼、柬埔寨、泰国、韩国、日本、台湾、巴基斯坦和中国),并造成了巨大的损失,在越南和泰国还发生了禽流感感染人的事件^[2,4]。我国最早报道发生禽流感是在2004年1月23日广西隆安县,证实为H5N1亚型高致病性禽流感,此后内地确诊禽流感的地区涉及16个省份^[4]。过去教科书和资料记载普遍认为水禽仅为流感病毒的携带者而不发病,然而近年来水禽感染高致病性禽流感病毒发病、死亡的事实打破了人们对于水禽流感的认识^[1]。因此,开展对H5N1亚型禽流感病毒的研究,从分子水平掌握禽流感病毒H5N1亚型的流行规律和致病机理,不仅在病毒学、兽医学等学科上有重要的学术意义,而且在公共卫生等方面也具有重大的社会意义。本研究通过扩增高致病性鹅源H5N1亚型禽流感病毒的血凝素(HA)基因,构建具有感染性的MuLV-HA假病毒体系,为研究这种高致病性禽流感病毒侵入细胞的机理奠定了基础。

假病毒是指一种反转录病毒能够整合另外一种不同种类病毒的囊膜糖蛋白,从而形成的具有外源性病毒的囊膜,而基因组保持着反转录病毒本身基

因组特性的病毒^[5]。假病毒技术在研究受体方面的应用主要是基于两点:即一种有囊膜的病毒其侵入细胞仅仅是由其囊膜蛋白所决定的,其次,一种病毒的囊膜能够整合到另外一种病毒颗粒的表面。其优点在于:安全性好,病毒的基因容易操作,可用于筛选病毒的受体,还可以快速筛选抑制病毒侵入的抑制剂。缺陷在于一些囊膜蛋白不能被有效地整合到异源病毒颗粒表面,而且,由于所形成的假病毒是复制缺陷型,只能在宿主细胞中进行单个循环的感染,因此对于小的缺陷不容易检测^[6]。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 病毒:禽流感病毒(A/Goose/China/F3/2004(H5N1))由本实验室分离保存,缩写为F3,经国家流感中心鉴定为H5N1亚型。

1.1.2 主要试剂及工具酶:MuLV假病毒构建体系的两种质粒pHIT60(主要包括MuLV的gag和pol结构基因)和pHIT111(为MuLV的基因组,还含有LacZ报告基因)、表达SV40大T抗原的人胚肾细胞293T均由美国UIC荣立军教授惠赠,真核表达质粒pcDNA3、鼠成纤维细胞NIH3T3、COS-7细胞由本实验室保存。禽白血病病毒反转录酶(AMV)、TaqDNA聚合酶、pGEM[®]-T vector和LacZ检测试剂盒 β -Galactosidase Enzyme Assay System等购自Promega公司。PCR产物回收试剂盒QIAquick Gel Extraction Kit购自QIAGEN公司,Taq DNA聚合酶、限制酶HindⅢ和BamHⅠ等购自TaKaRa公司。DMEM培养基为Gibco公司产品。羊抗鸡酶标二抗、Polybrene为Sigma公司产品。

1.2 方法

1.2.1 AIV HA基因的扩增:参照GenBank中发表的序列,在HA基因起始密码子ATG和终止密码子TAA分别设计一对引物(P₁:5'-CAAAGCTTATG-GAGAGAATAGTGC-3'和P₂:5'-TAGGATCCTTAAAT-GCAAATTCTG-3',在引物的两端分别引入了HindⅢ和BamHⅠ酶切位点)。引物由大连宝生物工程有限公司合成。参照Promega公司的RNAgents[®] Total RNA Isolation System的说明书提取病毒RNA后进行反转录和PCR反应。其中PCR反应条件参数:

95℃预变性 2min; 94℃变性 1min、54℃退火 1min、72℃延伸 3min, 进行 30 个循环; 最后 72℃延伸 10min。取 PCR 产物 10μL, 0.8% 琼脂糖凝胶电泳, 鉴定所扩增片段的大小。

1.2.2 HA 基因的克隆与序列测定:将 PCR 产物回收纯化后, 按 pGEM®-T 载体操作手册进行连接和转化。常规方法提取质粒, 用 *Hind*Ⅲ 和 *Bam*HⅠ 进行双酶切鉴定重组质粒。将经酶切鉴定为阳性的重组质粒进行序列测定。序列测定由大连宝生物工程有限公司完成。

1.2.3 HA 基因真核表达载体 pcDNA-HA 的构建:用 *Hind*Ⅲ 和 *Bam*HⅠ 进行双酶切 pGEM-HA 和载体 pcDNA3, 分别切胶回收目的片段, 按照常规方法进行连接、转化, 挑取重组质粒进行双酶切鉴定。

1.2.4 假病毒获得:取质粒 pHIT60、pHIT111 和 pcDNA-HA 各 10μg 采用磷酸钙方法共转染人胚肾细胞 293T 细胞, 用 pHIT60 和 pHIT111 两种质粒共转染作为阴性对照。转染 48h 后, 取转染细胞培养上清, 3000r/min 低速离心 5min 去除细胞碎片, 0.45μm 滤膜过滤, -80℃冻存备用。

1.2.5 HA 在 MuLV-HA 假病毒颗粒表面的表达:取处理过的假病毒上清, 20% 蔗糖垫底 22000r/min 超速离心 2h, 用 PBS 悬浮沉淀后加等量的 2 倍裂解缓冲液煮沸裂解 5min, 用 H5 多抗和羊抗鸡酶标二抗进行 Western-blot, 检测 HA 在假病毒颗粒表面的表达。

1.2.6 HA-MuLV 假病毒感染性测定:感染前 24h 在 6 孔板上分别接种 293T、NIH3T3、COS-7 三种细胞, 感染时每孔取 1mL 处理过的假病毒上清, 加入 Polybrene(终浓度为 8μg/mL), 吸附 2h 后加入含 10% 血清的 DMEM 完全培养基, 16h 后换新鲜完全培养基, 48h 后每孔加入 200μL 报告基因裂解缓冲液(RLB)室温充分裂解细胞, 按照 Promega 公司 Lac Z 检测试剂盒说明书进行 Lac Z 基因表达的检测。

2 结 果

2.1 AIV HA 基因的 RT-PCR 扩增与克隆

对 F-3 分离株经病毒增殖、纯化后, 提取 RNA 模板, 应用引物 P₁、P₂ 进行 RT-PCR 扩增其 HA 基因, 结果出现 1.7kb 左右的特异性条带, 与预期设计的扩增片段大小相符(见图 1)。PCR 产物纯化后按照常规方法与 pGEM®-T 载体进行连接、转化, 经 *Bam*HⅠ 和 *Hind*Ⅲ 双酶切鉴定重组质粒, 取阳性重组质粒进行序列测定。序列测定结果已经登陆 GenBank, 登陆号为 AY639405。所扩增的 HA 基因长

度为 1707 核苷酸, 包括自起始密码子 ATG 到终止密码子 TAA 完整的阅读框, 共编码 568 个氨基酸, 其中信号肽为 16aa, HA₁ 329aa, HA₂ 223aa。裂解位点的氨基酸组成为 RKKR ↓ GLF, 含连续的碱性氨基酸, 具有高致病性 AIV HA 基因裂解位点的序列特征。

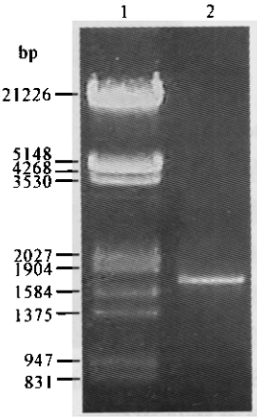


图 1 PCR 产物电泳图

Fig.1 Gel electrophoresis of PCR product
1:λDNA/ *Eco*RⅠ + *Hind*Ⅲ; 2:PCR product.

2.2 pcDNA3-HA 表达载体的构建

分别用 *Hind*Ⅲ 和 *Bam*HⅠ 进行双酶切 pcDNA3 和 pGEM-HA, 分别回收目的片段, 按照常规方法进行连接、转化, 挑取重组质粒进行 *Hind*Ⅲ 和 *Bam*HⅠ 双酶切鉴定, 结果出现 1.7kb 和 5.4kb 左右的条带, 分别与 HA 基因和 pcDNA3 载体大小相符, 说明获得了阳性重组质粒, 命名为 pcDNA3-HA(见图 2)。

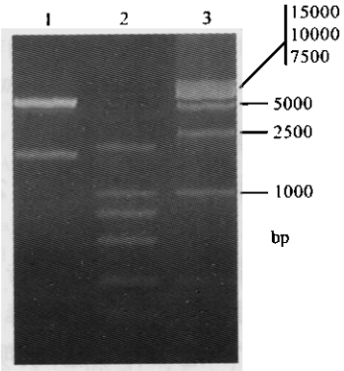


图 2 重组质粒 pcDNA-HA 酶切鉴定

Fig.2 Identify of recombinant plasmid pcDNA-HA
1:pcDNA-HA *Hind*Ⅲ and *Bam*HⅠ digest; 2:DL2000; 3:DL15000.

2.3 HA 在 MuLV-HA 假病毒颗粒表面的表达

将质粒 pHIT60、pHIT111 和 pcDNA-HA 共转染 293T 细胞 48h 后, 取假病毒上清, 低速离心去除大的细胞碎片, 然后以 20% 蔗糖垫底进行超速离心, 用 PBS 悬浮沉淀。裂解病毒沉淀, 用 H5 多抗和羊抗鸡酶标二抗进行 SDS-PAGE(图 3)和 Western-blot

(图 4), 结果具有特异性的三条带, 大小分别为 75kD、36kD 和 27kD, 分别与 HA 蛋白的前体蛋白 HA0、裂解后形成的 HA1 和 HA2 大小相符, 说明 HA 在假病毒颗粒表面得到了表达。

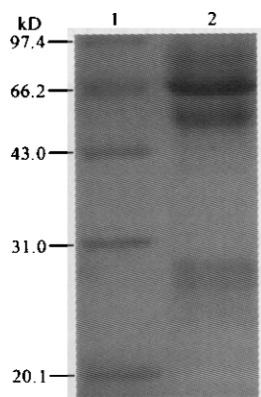


图 3 SDS-PAGE 分析 MuLV-HA 假病毒

Fig. 3 Analysis of MuLV-HA pseudotyping by SDS-PAGE

1: MW marker; 2: MuLV-HA pseudotyping.

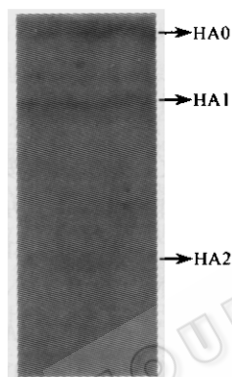


图 4 免疫印迹分析 MuLV-HA 假病毒

Fig. 4 Analysis of MuLV-HA pseudotyping by Western-blot

2.4 HA-MuLV 假病毒感染性测定

取处理过的假病毒上清, 分别感染 293T、COS-7 和 NIH3T3 三种细胞, 按照 Promega 公司 Lac Z 检测试剂盒说明书进行裂解细胞, 检测报告基因 Lac Z 的表达。结果证明 MuLV-HA 假病毒均能感染 293T、COS-7 和 NIH3T3 这三种细胞, 表明所构建的假病毒具有感染性, 而且具有泛嗜性(见图 5)。

3 讨论

对于构建一个假病毒体系来说, 有两点是至关重要的: 首先, 所插入的目的外源蛋白必须能够在所形成的假病毒颗粒表面得到表达; 其次, 所形成的假病毒必须具有感染性。否则, 所构建的体系便失去了研究意义。并不是所有的 gag 和 env 蛋白相互作用形成具有有效的假病毒颗粒, 而且, 对于同一种病

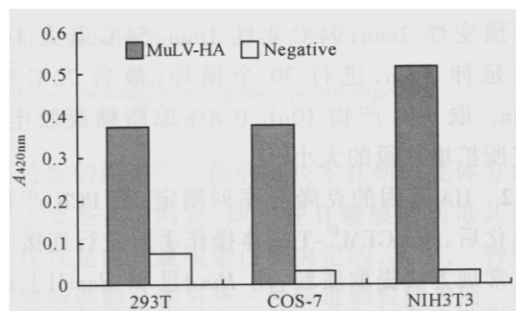


图 5 假病毒感染性测定结果

Fig. 5 Infection test of the pseudotype virus

毒的不同毒株其糖蛋白也具有不同的形成具有感染性的假病毒颗粒的能力。目前最常用的假病毒构建体系为 MuLV 基础上构建的反转录病毒的载体和包装组分。对于 MuLV 系统来说, 主要由 3 个质粒组成, 分别为 MuLV 基因组质粒(包括包装信号、标记基因 LacZ)、MuLV 结构蛋白表达质粒(gag, pol)和外源囊膜表达质粒。在本研究中所采用的质粒 pHIT60 主要包括 MuLV 的结构蛋白基因, 即编码核心蛋白的 gag 基因和编码聚合酶的 pol 基因, 带有 CMV 启动子, 含 SV40 的复制子, pHIT111 主要包括 MuLV 的包装信号 ψ 、3' 长末端重复序列 3'-LTR、CMV 启动子和 SV40 的复制子以及标记基因 Lac Z。由于 pHIT60、pHIT111 和 pcDNA3 所构建的真核表达载体都具有 CMV 启动子和 SV40 复制子, 而 293T 细胞带有 SV40 大 T 抗原, 能够增加包含 SV40 复制子质粒的拷贝数, 所以当这三种质粒转染到 293T 细胞时会大大增加其基因的表达水平。对于 MuLV 的两种包装组分, 即 gag-pol 和 env 蛋白, 由于是放在两个单独的表达质粒上, 减少了辅助病毒产生的可能性^[7]。当将三种质粒 pHIT60, pHIT111 和外源囊膜表达质粒共转染 293T 细胞时, 上清当中就会产生病毒样颗粒, 这些复制缺陷型病毒颗粒应当可以感染许多种细胞类型。当用假病毒上清去感染不同的靶细胞, 如果感染后的细胞能够检测到 Lac Z 基因的表达, 则表示病毒能够进入。

尽管决定病毒毒力的因素是多方面的, 但普遍认为血凝素基因(HA)在病毒毒力的构成中起关键作用^[1]。HA 基因在一定程度上可决定 AIV 感染的宿主特异性, 也就是由受体结合位点的氨基酸组成所决定^[8]。因此, 对 HA 序列的研究具有较实际的意义。HA 的前体蛋白 HA0 需经过一系列的加工处理过程才能形成具有生物活性的 HA 蛋白, 其中包括 N 端信号肽的切除及 HA1 和 HA2 的产生。HA 裂解成 HA1 和 HA2 是 AIV 能否感染细胞的先决条

件。HA1 与宿主细胞受体结合、HA2 参与病毒和细胞膜融合。未经裂解的 HA0 能识别红细胞表面的受体,也能识别宿主细胞表面的受体,但不能与宿主细胞膜发生融合,故不具有感染性。因此,HA 对细胞蛋白酶的易感性及这些酶在宿主组织细胞内的分布是病毒泛嗜性的决定因素^[8]。而 HA 对细胞蛋白酶的易感性是由 HA 的一级结构和空间结构决定的,HA 裂解位点的氨基酸序列可能是决定 AIV 毒力的关键因素^[9,10]。

通过对我国从水禽分离到的一株 H5N1 亚型 AIV 血凝素基因的克隆与序列分析,表明其 HA 基因共有 1707 个核苷酸,包含了 HA 基因完整的编码区,共编码 568 个氨基酸,其中前 16 个氨基酸为信号肽序列,主要是由疏水性氨基酸组成,其功能主要是使得蛋白质能被定向转运,在成熟的 HA 蛋白中并不包括信号肽。成熟的 HA1 蛋白有 329 个氨基酸,HA2 有 223 个氨基酸,其 N 段的 14 个氨基酸构成了 HA 蛋白的融合肽。在 HA2 的 185 到 212 位氨基酸为 HA 蛋白的非极性跨膜区,由疏水性氨基酸残基组成。最后 10 个氨基酸是 HA 蛋白的亲水性胞浆域,主要由亲水性氨基酸组成,它们高度保守。本分离株是 HA 蛋白裂解位点的氨基酸组成为 RKKR↓GLF,含有连续的碱性氨基酸,具有高致病性 AIV HA 基因裂解位点的序列特征,符合高致病力毒株的分子特征。因此,从分子水平说明,此分离株为高致病力毒株,这与其在临床上所产生的高致病性结果是一致的。在教科书和一般研究文献中,水禽一直被认为是 AIV 的传播和携带者,而且野生水禽的迁徙被认为是大范围传播 AIV 的条件,D.J. Alexander 通过研究不同时期不同地理区域的 AIV 的发病规律验证了这一点^[11]。1996 年以前的一百年的时间内 AIV 虽一直流行于水禽中,鲜有引起发病的报道。我国最近的 AIV 爆发却屡屡引起水禽的大批死亡,以患病水禽全身器官和组织严重出血为特征^[12]。以前认为,由于种间障碍 AIV 不会直接感染人,是先传染给中间宿主——猪,病毒在中间宿主猪体内适应后,方可感染人。然而,1997 年 4 月,我国香港 3 个鸡场暴发 H5N1 型禽流感,随后在 1 名 3 岁男童的气管分泌物中分离出 1 株 H5N1,截止 1998 年 2 月,确诊共有 18 人感染 H5N1 并发病,其中 6 人死亡。经过对期间分离的毒株 8 个基因片段的序列分析,并分别与人源和禽源流感病毒进行比较,发现与该病毒 8 个基因片段同源率最高的毒株均为 AIV,未发现任何曾经在中间宿主中与人流感

病毒发生重排的证据,由此分析该病毒来源于禽类。2003 年 2 月我国香港再次发生 H5N1 直接感染人事件(感染 2 例,1 例死亡)。最近禽流感突然袭击了亚太地区,10 个国家及地区受影响并造成了巨大的损失,并且在越南和泰国也发现了禽流感感染人的事件,更突出地显示了禽流感特别是高致病性禽流感的公共卫生学意义。

本研究在国内首次成功构建了禽流感病毒的 MuLV 假病毒体系。经过 Western-blot 发现 HA 在形成的假病毒颗粒表面得到了表达。通过感染性实验发现,其形成的假病毒具有感染性,能够感染 293T、COS-7 和 NIH3T3 等多种细胞,说明在这些细胞表面均有禽流感病毒 HA 蛋白的受体,表明其具有泛嗜性。经过 Western-blot 和感染性试验证明我们已经成功构建了鹅源禽流感病毒的 MuLV 假病毒体系,为研究水禽源禽流感病毒侵入细胞的机理提供了一个手段,为研究其在受体特性和组织嗜性上的变异提供了一个技术平台。

REFERENCES(参考文献)

- [1] Gan MH(甘孟侯). Avian influenza(Second Edition), Beijing: Chinese agriculture press, 2002
- [2] Lu HZ(卢洪洲), Pan XZ(潘孝彰). Development of avian influenza. *Chin J Infect Dis* (中华传染病杂志), 2004, 22(1): 63 - 65
- [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, 279: 393 - 396
- [4] Guo JS(郭建顺), Jin NY(金宁一). Highly pathogenic avian influenza and communal hygienics. *Chin J Biologicals* (中国生物制品学杂志), 2004, 17(2): 126 - 128
- [5] John A. G. Briggs, Thomas Wilk, Stephen D. Fuller. Do lipid rafts mediate virus assembly and pseudotyping? *Journal of General Virology*, 2003, 84: 757 - 768
- [6] David Avram Sanders. No false start for novel pseudotyped vectors. *Current Opinion in Biotechnology*, 2002, 13: 437 - 442
- [7] Soneoka Y, Cannon PM, Ramsdale EE *et al*. A transient three-plasmid expression system for the production of high titer retroviral vectors. *Nucleic Acids Research*, 1995, 23: 628 - 633
- [8] David A. Steinbauer. Role of Hemagglutinin Cleavage for the Pathogenicity of Influenza Virus. *Virology*, 1999, 258: 1 - 20
- [9] Weis W, Brown JH, Cusack S *et al*. Structure of the influenza virus haemagglutinin complexed with its receptor, sialic acid. *Nature*, 1988, 333: 426 - 431
- [10] Senne DA. Survey of the hemagglutinin(HA) cleavage site sequence of H5 and H7 avian influenza viruses: amino acid sequence at the HA cleavage site as a marker of pathogenicity potential. *Avian Diseases*, 1996, 40: 425 - 437
- [11] Dennis J. Alexander. A review of avian influenza in different bird species. *Veterinary Microbiology*, 2000, 74: 3 - 13
- [12] Wang YK(王永坤). Research and Prevention of avian influenza outbreaks in waterfowl. *China animal health* (中国动物保健), 2004, 3: 12 - 14