

禽流感 H5N1 型神经氨酸酶在细胞中的表达

丁爱军,任丽伟,傅德智,李碧春*

(扬州大学 动物科学与技术学院,江苏 扬州 225009)

摘要: 利用表达载体 pIRES-NA 研究 H5N1 型神经氨酸酶(neuraminidase, NA) 基因在 NIH-3T3 细胞中表达, 为今后转基因家禽的培育提供证据。通过构建重组表达载体转染细胞经 G418 筛选后,利用 PCR 方法检测 NA 基因在细胞基因组中整合,利用 RT-PCR 和 Western Blotting 的方法分别在 RNA 及蛋白质水平上检测 NA 基因在细胞中表达。结果表明细胞转染经筛选后,提取细胞基因组进行 PCR,能扩增出 NA 基因片段约 1.4 kb;同时 RT-PCR 能检测到 NA 基因 mRNA,Western Blotting 能检测到细胞表达约 55 ku NA 蛋白,构建重组载体能整合到 NIH-3T3 细胞基因组中,NA 基因能在细胞中表达。

关键词: H5N1; 神经氨酸酶; 表达

中图分类号: S858.32 文献标志码: A 文章编号: 1000-2286(2010)04-0673-04

Expression of Neuraminidase of H5N1 Subtype Avian Influenza Virus in NIH-3T3 Cells

DING Ai-jun, REN Li-wei, FU De-zhi, LI Bi-chun*

(College of Animal Science and Technology, Yangzhou University, Yangzhou 225009, China)

Abstract: The aim of this experiment was to study the expression of H5N1 subtype neuraminidase gene transferred to NIH-3T3 cells by constructing recombinant expression vector pIRES-NA in order to provide the proof of producing transfer-gene fowls further. After cells were transfected with pIRES-NA and sieved with G418, the PCR method was used to examine whether the pIRES-NA vector was integrated to the cell gene set or not; the methods of the RT-PCR and the Western Blotting were respectively used to examine the expression of NA gene in cells transcribed and translated to the protein. The result showed that after cell transfection and sieving, cell gene set was withdrawn and amplified NA gene (1.4 kb) by PCR; the RT-PCR could examine mRNA of NA gene in the cells; NA protein about 55 ku from the cells could be examined by Western blotting. As a conclusion, recombinant expression vector pIRES-NA could be integrated to the cell gene set and NA gene might be transcribed and translated to protein in the cells.

Key words: H5N1; neuraminidase; expression

禽流感是由禽流感病毒(avian influenza virus, AIV)引起的一种高度接触性传染病。禽流感(avian influenza, AI)在我国鸡群中出现的时间并不长,但给我国养禽业造成了巨大的经济损失。2010年全球暴发的甲型 H1N1 流感对人类和一些动物的健康构成了威胁,引起世界卫生组织(WHO)和世界各国密切关注。

收稿日期: 2010-04-19 修回日期: 2010-05-26

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(30871791)、“六大人才高峰”资助项目和江苏省高校自然科学重大基础研究资助项目(08KJA230001)

作者简介: 丁爱军(1975-),男,博士生,主要从事动物胚胎工程与遗传工程研究; * 通讯作者: 李碧春,博士,教授, E-mail: yubeli@yzu.edu.cn。

神经氨酸酶(neuramidinase, NA) 基因是 AIV 一种重要保护性抗原基因,其蛋白可作为体液免疫的靶抗原,可以诱导机体产生特异性抗体,抑制病毒从感染细胞中释放出来,从而减少病毒的增殖和感染其它细胞^[1]。NA 基因变异速度与另一种抗原基因血凝素基因(hemagglutinin, HA) 相比,则较慢^[2]。目前,关于 NA 基因克隆和表达的研究大多出自于兽医学和临床医学领域的学者,其研究着眼于抗禽流感亚单位疫苗和药物。由于复杂多变的病毒血清型,因此研究一种对所有亚型的禽流感病毒都有免疫保护作用的疫苗是极其困难的。这一问题促使研究者们从增强家禽机体自身抗病力,利用 NA 进行转基因培育抗病家禽品种的方向进行探索,为人们在抵抗病毒侵害的防御手段上拓宽了思路。本文将利用 NA 蛋白是否可以在动物细胞中表达,为今后转基因家禽的培育提供有力的证据。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 载体 pcDNA-NA 为本实验室(扬州大学动物科学与技术学院江苏省动物遗传育种与繁殖实验室)保种;pIRES(6.1 kb)由西安交通大学第一附属医院郝志明博士惠赠。

1.1.2 菌株、血清及细胞 DH5 α 大肠杆菌购自上海生工公司;H5N1 多抗血清由扬州大学兽医学院刘文博老师惠赠;NIH-3T3 细胞是由苏州大学医学部王明华教授惠赠。

1.1.3 主要仪器 超净台(SW-CJ 医用型);PCR 仪、电泳系统及核酸蛋白测定仪(Bio-Rad);凝胶成像系统(Syngene);CO₂ 培养箱(RCO3000T-5VBC);荧光倒置显微镜(Olympus);台式高速冷冻离心机、微量加样器(Eppendorf)等。

1.1.4 主要试剂 含糖的培养基 DMEM(Gibco-BRL);胎牛血清(杭州四季青产品);胰蛋白酶、聚乙烯亚胺(polyethylenimine, PEI)(Sigma);DNA Marker、蛋白 Marker 及反转录试剂盒(MBI Fermentas);Taq 酶、限制性内切酶等(TaKaRa 宝生物工程有限公司产品);小量质粒抽提试剂盒、凝胶回收试剂盒(均为 AXYGEN 产品);蛋白裂解液、HRP 羊抗鸡 IgG 购自北京博奥森生物公司等。

1.2 方法

1.2.1 真核表达载体 pIRES-NA 的构建 质粒 pIRES 和 pcDNA-NA 的提取参照质粒抽提试剂盒说明进行;分别用 *EcoR*I/*Xba*I 双酶切 pIRES 和 pcDNA-NA 质粒,凝胶回收试剂盒回收线性化 5.5 kb pIRES、1.4 kb NA 片段;T₄ DNA 连接酶的 10 μ L 连接体系进行连接;取 10 μ L 连接产物转化大肠杆菌 DH5 α 挑选阳性转化菌落,用 PCR 方法和 *EcoR*I/*Xba*I 双酶切方法鉴定重组 pIRES-NA 并进行测序(图 1)。

1.2.2 细胞转染 大量质粒提取按照分子克隆的方法进行并去内毒素^[3],OD 值在 1.8~1.9,并将其质量浓度调整为 1 μ g/ μ L。用聚乙烯亚胺(PEI)进行质粒包裹,质粒与 PEI 质量比为 1:2。当细胞密度

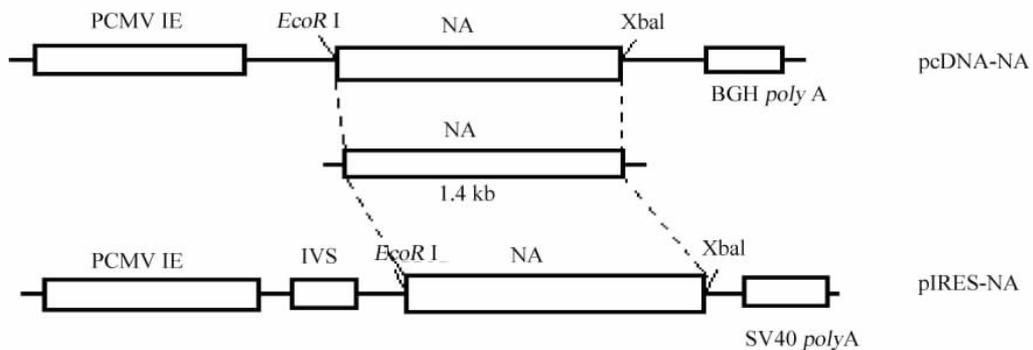


图 1 pIRES-NA 真核表达载体的构建

Fig. 1 Construction of expression plasmid pIRES-NA

达 70%~80% 进行转染,采用重复转染的方法。转染 48 h 后进行细胞筛选(C418 质量浓度为 700 μ g/mL),每 3 d 换液(含 20 g/L FBS)1 次,筛选 2 周后,筛选得到阳性细胞克隆及扩增培养。

1.2.3 DNA 提取及 PCR 扩增 收集筛选细胞用 SDS/蛋白酶 K 消化,酚/氯仿抽提的方法制备细胞的 DNA^[4]。根据 NA 基因的序列设计并合成引物,预计扩增片段长度为 1.41 kb 引物序列:

F: CCGCCGGAATTCATGAATCCAAATCAAAAG;
R: ATTTGCGGCCCTACTTGTCAATGGTGAAT。

PCR 反应条件如下: 变性温度 94 °C 5 min, 预变性 94 °C 50 s, 退火温度 60 °C 50 s, 延伸温度 72 °C 90 s, 30 个循环, 72 °C 10 min, 扩增产物用 10 g/L 琼脂糖凝胶电泳进行的分析。

1.2.4 RT-PCR 收集经筛选细胞, 按照 Trizol 的方法进行总 RNA 的提取, 测 OD 值在 1.9 ~ 2.0, 再按反转录试剂盒的方法进行操作, 分别用 NA 基因上、下游引物和内参 Bate-Actin 引物(F: ATATCGCT-GCGCTGGTCGT; R: AGGATGGCGTGAGGGAGAGC) 进行 PCR, PCR 产物用 10 g/L 琼脂糖凝胶进行电泳, 在凝胶成像系统下观察结果。

1.2.5 蛋白凝胶电泳及 Western-Blotting 分析 收集筛选细胞, 用蛋白裂解液裂解后取处理后的蛋白样品进行 SDS-PAGE 凝胶电泳, 电泳转印 PVDF 膜(80 mA, 150 min), 用 50 g/L BSA 封闭液、H5N1 多抗血清作为一抗(1:60) 和羊抗鸡 HRP IgG (1:1 000) 作为二抗在 4 °C 孵育 12 h, DAB 显色, 观察特异性条带。

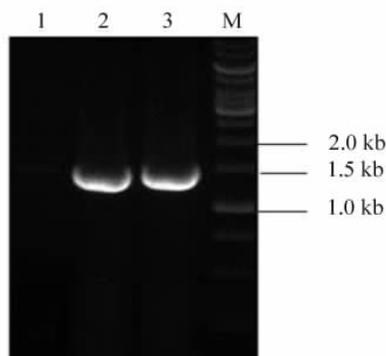
2 结果与分析

2.1 重组表达载体 pIRES-NA 鉴定

重组质粒 pIRES-NA 用引物经 PCR 得到 1 410 bp 扩增产物 NA(图 2), 经 *EcoR* I / *Xba* I 酶切呈 5.5 kb 左右和 1.4 kb 双带(图 3), 这与理论值相一致, 经上海生工测序证实 NA 基因已重组到 pIRES 载体上, 证实重组质粒构建正确。

2.2 DNA 目的片段鉴定

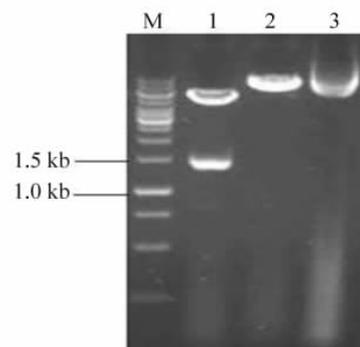
收集转染后经 G418 筛选并传代的细胞, 提取其基因组 DNA, 利用合成引物进行 PCR 扩增检测, 结果均能扩增出约 1.4 kb 的特异片段(图 4)。初步证明, 表达载体 pIRES-NA 已整合到细胞基因组中。



M. 1 kb Marker; 1. 阴性对照; 2. PCR 扩增 pIRES-NA; 3. PCR 扩增 pcDNA-NA。

图 2 NA 基因 PCR 扩增结果

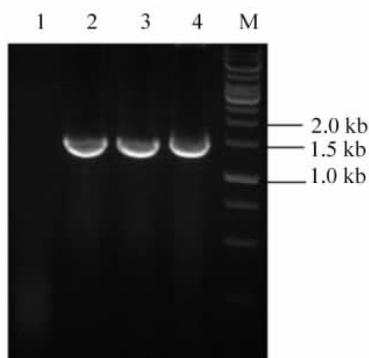
Fig. 2 The amplified results of NA gene by PCR



M. 1 kb Marker; 1. *EcoR* I/*Xba* I 酶切产物; 2. *EcoR* I 酶切产物; 3. 表达载体。

图 3 表达载体 pIRES-NA 酶切鉴定

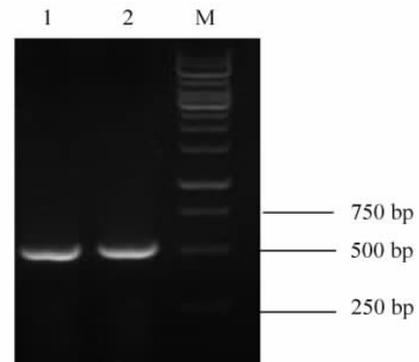
Fig. 3 Identification of expression plasmid pIRES-NA digestions



1. NIH-3T3 细胞总 RNA; 2. 转染细胞总 RNA; 3. 转染细胞基因组 DNA; 4. 阳性对照; M. 1 kb Marker。

图 4 转染细胞 DNA 和 RNA 中 NA 基因 PCR 扩增结果

Fig. 4 The amplified results of NA gene in total DNA and RNA of transfection cells by PCR



1. NIH-3T3 细胞总 RNA; 2. 转染细胞总 RNA; M. 1 kb Marker。

图 5 RT-PCR 检测细胞中 β -actin 基因

Fig. 5 β -actin gene detected by RT-PCR in NIH-3T3 cells

2.3 RT-PCR 鉴定

收集经筛选转染 pIRES-NA 重组载体的细胞, 提总 RNA, 经逆转录合成 cDNA 第一链, 以合成的 cDNA 为模板, 分别以 NA 引物、 β -actin 引物扩增。在电泳下可见转染 pIRES-NA 载体的细胞出现 1.4 kb 条带(NA 的表达, 图 4) 及 517 bp 条带(β -actin 内表达, 图 5); 而 NIH-3T3 细胞仅见 517 bp 条带(β -actin 内参照表达, 图 5)。

2.4 Western Blotting 鉴定细胞表达 NA 蛋白

将筛选细胞裂解取上清进行 120 g/L SDS-PAGE, Western Blotting 结果表明, pIRES-NA 载体转染筛选细胞裂解上清中约 55 ku 蛋白条带能与 H5N1 多抗特异结合, 与理论值相一致, PVDF 膜上出现的特异性条带是 pIRES-NA 载体表达的 NA 蛋白(图 6)。

3 讨论

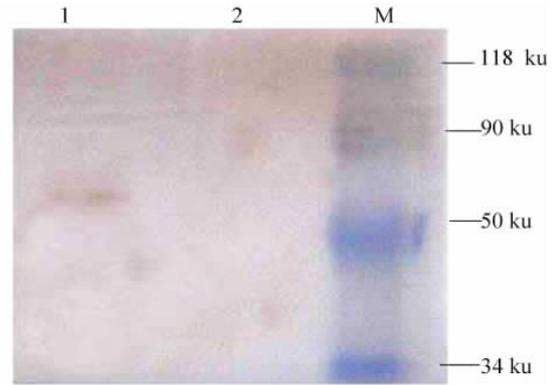
NA 型神经氨酸酶是位于病毒囊膜表面的一种糖蛋白, 呈蘑菇状, 以同源四聚体形式存在, 分膨大的头部和纤细的茎部两部分, 头部的顶端是 NA 酶活性的催化中心, 其具有糖苷外切酶活性, 可水解细胞表面受体特异性糖蛋白末端的 N-乙酰基神经氨酸。病毒在细胞表面成熟时, NA 可移去细胞膜出芽点上的神经氨酸, 有利于子代病毒粒子的成熟和释放。NA 的另一种作用是穿透呼吸道表面的粘膜, 促进病毒在机体内的传播, 与病毒的宿主嗜性及毒力有关。NA 具有免疫原性, 其诱导产生的抗体可抑制酶活性, 并具有免疫保护作用^[5]。

目前 NA 表达主要利用原核生物表达载体和病毒载体进行, 这两种表达都存在一些弱点, 如原核表达产生大量融合蛋白包涵体, 纯化难; 病毒载体表达量高但对实验设施要求高, 同时也有一定的危险性、感染谱窄等。利用真核表达载体表达 NA, 其蛋白接近于天然状态, 但真核表达载体表达效率低, 这主要可能受转染、表达载体元件等影响, 表达载体选择可能是提高基因表达效率的措施之一。

本实验利用 pIRES 构建重组表达载体 pIRES-NA, 在 NA 开放阅读框前多含 132 bp 插入序列(intervening sequence, IVS), IVS 序列虽不具有编码功能, 但增强 mRNA 的稳定性, 从而促进蛋白翻译。IVS 序列可能被认为序列能够通过自身的折叠或者结合其它蛋白质形成一种二级结构从而达到稳定初级转录本的作用, 间接增加了 mRNA 在核内的稳定性, 导致细胞质中积累更多的成熟 mRNA, 从而增强目的基因的表达效率^[6]。实验结果发现, 转染细胞经筛选后 pIRES-NA 载体能整合 NIH-3T3 细胞基因组中, 并通过 RT-PCR 检测到 NA 基因能转录成 mRNA, Western Blotting 检测到细胞能成功表达了 NA 蛋白, 而笔者曾构建 pcDNA-NA 载体, Western Blotting 未检测到 NA 蛋白表达。从而可以预示, IVS 序列能增加 NA 蛋白在细胞中表达量。Pavlova 等最初构建 pcDNA-NA 载体, 转染之后, 没有蛋白在 Western Blotting 分析中被特异性识别, 后来在开放阅读框上游插入 301 bp IVS 序列进行载体修饰, 由于修饰导致在 Western Blotting 分析中检测到 NA 蛋白^[7], 与本实验结果相一致。本实验利用真核表达载体重组 NA 基因研究其在细胞中蛋白表达, 为下一步动物免疫和抗流感动物育种提供有力的证据。

参考文献:

- [1] Webster R G, Reay P A, Laver W G. Protection against lethal influenza with neuraminidase [J]. Virology, 1988, 164: 230-237.
- [2] 王全英, 乔传玲, 张洪波, 等. H5N1 亚型禽流感病毒 NA 基因在重组禽流感病毒中的表达及其产物的免疫原性 [J]. 中国兽医科学, 2007, 37(04): 312-315.
- [3] 张泉, 袁燕, 袁维峰, 等. 动物用质粒 DNA 内毒素去除方法的建立及其质量检验 [J]. 中国兽医学报, 2009, 29(1): 63-66.
- [4] 刘元进. 分子生物学实验指导 [M]. 北京: 清华大学出版社, 2002: 50-52.
- [5] 殷震, 刘景华. 动物病毒学 [M]. 2 版. 北京: 科学出版社, 1997.
- [6] 丁红梅, 邵根宝, 徐根学. 内含子与基因表达调控 [J]. 畜牧与兽医, 2006(3): 50-53.
- [7] Sophia P Pavlova, Jutta Veits, Günther M Keil, et al. Protection of chickens against H5N1 highly pathogenic avian influenza virus infection by live vaccination with infectious laryngotracheitis virus recombinants expressing H5 hemagglutinin and N1 neuraminidase [J]. Vaccine, 2009, 27: 773-785.



1. 转染细胞蛋白; 2. NIH-3T3 细胞蛋白; M. 蛋白 Marker。

图 6 Western Blotting 鉴定转染细胞表达 NA 蛋白

Fig. 6 Western Blotting analysis of NA protein from NIH-3T3 cells after transfection