

密码子优化的甲型 H1N1 流感病毒 HA/HA1 基因 真核载体的构建及初步表达

李捧花¹, 张晓光², 王晶钰¹, 马 晶², 张晓梅²

(1 西北农林科技大学 动物医学院, 陕西 杨凌 712100; 2 中国疾病预防控制中心 病毒病预防控制所肿瘤病毒室, 北京 100052)

【摘 要】 【目的】构建甲型流感病毒 H1N1 血凝素基因 HA/HA1 的真核表达载体, 并检测其在 BHK-21 细胞中的表达。【方法】按照人的偏爱密码子, 对 H1N1 流感病毒的 HA/HA1 基因进行优化改造, 以提高其表达量, 经全基因合成后插入到真核表达载体 pSNAV 中, 构建了真核表达质粒 pSNAV-Mod. HA 与 pSNAV-Mod. HA1; 质粒转染 BHK-21 细胞, G418 筛选后, 用免疫荧光及 Western blot 技术检测其表达情况。【结果】成功构建了血凝素基因 HA/HA1 的真核表达载体。经 G418 筛选得到单克隆, 免疫荧光技术和 Western blot 检测 10 代, 显示 Mod. HA 和 Mod. HA1 皆可在 BHK-21 细胞中稳定表达。【结论】成功构建的流感病毒 HA 和 HA1 真核表达载体, 可为今后开展多基因表达的基因工程疫苗及 H1N1 检测试剂奠定基础。

【关键词】 流感病毒; HA 基因; HA1 基因; 密码子优化; 真核表达

【中图分类号】 R373.1; Q786

【文献标识码】 A

【文章编号】 1671-9387(2010)11-0007-07

Construction and primary expression of eukaryotic expressing vectors of codon-optimized H1N1 influenza virus HA and HA1 gene

LI Peng-hua¹, ZHANG Xiao-guang², WANG Jing-yu¹, MA Jing²,
ZHANG Xiao-mei²

(1 College of Veterinary Medicine, Northwest A&F University, Yangling, Shaanxi 712100, China;

2 Department of Virus-Associated Tumors, National Institute for Viral Disease Control and Prevention,
Chinese Center for Disease Control and Prevention, Beijing 100052, China)

Abstract: 【Objective】The study was done to construct influenza A virus H1N1-Mod. HA and H1N1-Mod. HA1 eukaryotic expressing plasmids and test their expression in BHK-21 cells. 【Method】HA and HA1 DNA sequences of H1N1 influenza A virus were optimized in accordance with human codon preference so as to enhance its protein expression in eukaryotic expressing system. Synthetic HA and HA1 genes were inserted into the eukaryotic expressing vector pSNAV, which constructed Eukaryotic Expressing Plasmids of Mod. HA and Mod. HA1. Mod. HA and Mod. HA1 eukaryotic expressing plasmids were transfected into BHK-21 cells. G418 selection acquired monoclonal. Immunofluorescence assay and Western blot detected expression in BHK-21 cells. 【Result】It was confirmed that the construction of Mod. HA and Mod. HA1 eukaryotic expressing plasmids was made successfully. The 10 generations BHK-21 cells were tested with immunofluorescence and Western blot, which showed HA and HA1 were both stably and accu-

* [收稿日期] 2010-04-16

[基金项目] 国家“十一五”科技支撑计划项目(2006BAD06A15)

[作者简介] 李捧花(1984—), 女, 河南开封人, 在读硕士, 主要从事甲型流感病毒检测试剂与方法研究。
E-mail: penghuali0901@yahoo.com.cn

[通信作者] 张晓光(1975—), 男, 北京市人, 副研究员, 主要从事病毒学与流感病毒疫苗研究。E-mail: xgzhang01@163.com
王晶钰(1964—), 男, 陕西乾县人, 副教授, 博士, 硕士生导师, 主要从事预防兽医学研究。
E-mail: wjingyu2004@126.com

rately expressed in BHK-21 cells. 【Conclusion】 The experiment successfully constructed eukaryotic expressing plasmids for *Mod. HA* and *Mod. HA1*, which could provide a foundation for the further study on the development of genetic engineering vaccine and the tested reagent of H1N1 influenza.

Key words: influenza virus; *HA* gene; *HA1* gene; codon optimization; eukaryotic expression

2009-03-18 首先在墨西哥出现的甲型 H1N1 流感^[1], 随后蔓延至北美洲、欧洲、亚洲及南美洲。经美国疾病预防控制中心(CDC)鉴定, 致病源为发生基因重排且同时含人、禽、猪流感病毒核酸序列的新型 H1N1 甲型流感病毒^[2-3]。截止 2010-03-07, 根据世界卫生组织的疫情通报, 甲型 H1N1 流感导致全球至少 16 713 人死亡。鉴于甲型 H1N1 流感在全球迅速蔓延的趋势并出现人群之间的传播, 世界卫生组织不断提高流感大流行预警级别, 最严重时提高至 5 级(最高为 6 级)^[4]。

流感病毒是引起流行性感冒的病原体, 属正黏病毒科、流感病毒属, 是具有包膜和分节段的单股负链 RNA 病毒, 自外而内分为包膜、基质蛋白及核心 3 部分。根据病毒颗粒核蛋白、基质蛋白抗原及基因特性的不同, 分为甲(A)、乙(B)、丙(C)3 型。甲型流感常导致季节性流行, 并能引起世界性大流行。根据血凝素(Hemagglutinin, HA)和神经氨酸酶(Neuraminidase, NA)抗原性的不同, 可将甲型流感病毒分为 16 个 HA 亚型和 9 个 NA 亚型^[5]。

甲型流感病毒广泛存在于禽类和哺乳动物中, 是致人类和各种动物流感的主要病原, 在人类和动物间流行时可导致高发病率和高死亡率^[6]。流感病毒的分子结构和宿主界限有利于流感的复发和流行, 其表面糖蛋白的高度变异, 更是导致流感疫苗免疫效果下降的主要原因^[7]。核酸疫苗作为新一代疫苗, 由于其能够同时刺激机体产生体液免疫和细胞免疫, 易于操作, 经济有效, 目前已成为新型疫苗研究的热点^[8]。

HA 是流感病毒颗粒表面的一种糖蛋白, 具有凝集红细胞的能力, 在病毒吸附和膜融合过程中起着重要作用, 并能诱导保护性中和抗体的产生, 是流感疫苗的重要组成部分。*HA* 基因及其编码产物的抗原特性, 是划分甲型流感病毒亚型的主要依据之一, 也是型和亚型内新变种判断的主要依据。*HA* 由重链 *HA1* 和轻链 *HA2* 2 部分组成, 其中主要的抗原性保护位点均存在于 *HA1* 上^[9]。*HA1* 是与宿主细胞受体结合的部分, 决定宿主的特异性; *HA2* 具有融膜活性, 在病毒穿膜过程中起关键作用。

流感病毒血清型或亚型众多, 但不同血清型或

亚型间交叉反应性很低或无交叉反应性, 这给诊断带来了很大困难。为了克服常规诊断方法的不足, 进一步提高血清学诊断方法的安全性、精确性、准确性及可重复性, 依然是流感诊断研究的主要内容。用稳定细胞系表达的 *HA*、*HA1* 蛋白作为 H1N1 流感诊断的抗原, 既不存在病毒扩散等方面的危险, 而且制备过程比较简单; 同时表达的 *HA*、*HA1* 蛋白产物带有 6xHis 标签, 并且易于纯化。利用稳定细胞系表达的外源蛋白, 较原核表达系统有着不可比拟的优点, 其在真核细胞中能进行一系列复杂的蛋白翻译后修饰(如甲基化、磷酸化、N-糖基化等一系列翻译后加工修饰), 使表达的蛋白更接近于其天然蛋白的结构与功能。因此, 以稳定细胞系表达的外源蛋白作为诊断试剂和亚单位疫苗抗原, 具有较强的现实意义。本研究构建了 H1N1 血凝素基因 *HA* 和 *HA1* 的真核表达载体, 经 G418 筛选后, 检测其在 BHK-21 细胞中的表达, 以期为今后开展多基因表达的基因工程疫苗及 H1N1 检测试剂奠定基础。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 病毒株、质粒、菌株和细胞株 从 GenBank 中下载最新的 14 株 H1N1 甲型流感病毒 *HA* 核酸全序列, 这些序列是 2009-04 来自美国的 14 个序列(分布于美国不同的州); 真核表达质粒 pSNAV、BHK-21 细胞株、大肠杆菌 DH5 α , 由中国疾病预防控制中心病毒病预防控制所肿瘤病毒室保存。

1.1.2 工具酶、试剂和仪器 试验所用的 *EcoR* I、*Sal* I 内切酶以及预染蛋白 Marker 购自 NEB 公司; DNA Marker 和 T4 连接酶购自 TaKaRa 公司; DNA 凝胶回收试剂盒、质粒小量及大量提取试剂盒购自 Qiagen 公司; 转染试剂 FuGENE[®] HD 购自 Roche 公司; DMEM 细胞培养基、胎牛血清(FBS)与 100 U/mL 青霉素、100 μ g/mL 链霉素购自 GIBCO 公司; 抗 His 标签鼠单克隆抗体(一抗)购自北京康为世纪生物科技有限公司; DyLight[™] 800-Labeled Antibody To Rabbit IgG(H+L) 二抗购自华瑞康生物科技有限公司; FITC 标记的羊抗鼠 IgG 购自中杉金桥公司; 引物合成和核酸测序由英潍捷

基贸易有限公司完成,G418(一种氨基糖苷类抗生素)购自上海浩然生物技术有限公司。

1.1.3 H1N1-HA 全基因共有序列的获得与氨基酸序列分析 采用 Vector NTI 9.0.0 软件,对来自美国不同州的 14 个 H1N1-HA 核酸序列(FJ966082、FJ966952、FJ966960、FJ966971、FJ966974、FJ969511、FJ971076、FJ969521、FJ969523、FJ969535、FJ969540、FJ971076、FJ966959、FJ966982)进行比对分析,得到其共有序列。同时,对其相应的氨基酸序列(分别为 ACP41105、ACP41926、ACP41935、ACP41949、ACP41953、ACP44150、ACP52565-1、ACP44164、ACP44166、ACP44182、ACP44189、ACP52565、ACP41934、ACP41963)进行分析。

1.1.4 HA 基因密码子的优化 利用 BioEditor 软件,将上述得到的共有 H1N1-HA 基因序列(1 704 bp)翻译为氨基酸序列,根据网站(<http://www.kazusa.or.jp/codon>)提供的最新人密码子表,以人偏爱密码子将氨基酸序列反翻译为 DNA 序列,在上游引入 *EcoR* I 酶切位点和 Kozak 序列,在下游引入 6xHIS 标签和 *Sal* I 酶切位点,终止密码子改为哺乳动物偏爱的 TGA(原始序列中是 TAA);利用软件核查设计的序列,进行氨基酸比对和酶切位点检查,将最终序列送北京利嘉富诚生物技术有限公司合成并克隆到 PGEMT 载体中,记为 PGEMT-Mod. HA 与 PGEMT-Mod. HA1,送英潍捷基贸易有限公司测序验证。

1.2 真核表达质粒的构建与酶切鉴定及制备

用限制性内切酶 *EcoR* I 和 *Sal* I 分别双酶切质粒 PGEMT-Mod. HA、PGEMT-Mod. HA1 与 pSNAV,经胶回收、连接、转化后,小提 pSNAV-Mod. HA 质粒与 pSNAV-Mod. HA1 质粒,并对这 2 种质粒进行 *EcoR* I 和 *Sal* I 双酶切鉴定,将酶切鉴定正确的质粒,送英潍捷基贸易有限公司测序;由于转染所用的质粒质量与转染效率有密切关系,为此,在转染前用 Qiagen Maxi Plasmid Kit 大提试剂盒准备所需的 2 个质粒,即 pSNAV-Mod. HA 与 pSNAV-Mod. HA1,制备方法按照试剂盒的操作说明进行,制备过程中始终采取无菌操作。将制备好的质粒溶于无菌 TE 溶液中,用 Eppendorf Biophotometer 紫外分光光度计测定 260 nm 及 280 nm 的 OD 值,计算核酸纯度(要求 $OD_{260}/OD_{280} > 1.8$)及核酸含量,调整终质量浓度为 0.5 mg/mL,分装保存于 -20°C 备用。

1.3 BHK-21 细胞的培养

用含体积分数 10% FBS 及 100 U/mL 青霉素、100 $\mu\text{g/mL}$ 链霉素的 DMEM 培养基,常规培养及传代 BHK-21 细胞。

1.4 G418 最佳质量浓度的确定

进行 G418 筛选,首先需要做预试验确定其最佳质量浓度。将 BHK-21 细胞稀释为 1 000 个/ μL ,加入到含有 G418 培养基的 24 孔板中,每孔 100 μL 。各孔中 G418 的质量浓度分别为 0,100,200,300,400,500,600,700,800,900 和 1 000 $\mu\text{g/mL}$,培养 10~14 d,结果发现 $G418 \geq 800 \mu\text{g/mL}$ 时,孔中的细胞全部死亡,由此确定 G418 的质量浓度为 800 $\mu\text{g/mL}$ (以细胞全部死亡的最低质量浓度为基准)。

1.5 真核表达质粒的转染及单克隆的筛选和培养

以含体积分数 10%胎牛血清的 DMEM 培养基培养 BHK-21 细胞,接种到 24 孔板中(每孔 6.5×10^4 个细胞),各孔加 2 mL 培养基,37 $^{\circ}\text{C}$ 下在 CO_2 培养箱中培养 16~24 h,按照 FuGENE[®] HD 说明书,用 pSNAV-Mod. HA、pSNAV-Mod. HA1、空载体 pSNAV 分别转染 BHK-21 细胞(m (质粒, μg): V (转染试剂, μL)=1:3),24 h 后换含体积分数 2% FBS 的 DMEM 选择培养基(含 G418 800 $\mu\text{g/mL}$)培养,每 2~3 d 换液 1 次。待细胞大部分死亡时,换用含体积分数 10%FBS 的选择培养基培养 2~3 周,待培养皿中出现 0.5~1.0 mm 大小单个细胞集落时,将单个细胞集落挑出,接种到 48 孔板中,用含体积分数 10%FBS 的 DMEM 继续培养,待 48 孔板中的每个克隆细胞长满后,逐步转移到培养瓶中,扩大培养后即为克隆系细胞,分别记为 pSNAV-Mod. HA-BHK-21 和 pSNAV-Mod. HA1-BHK-21。

1.6 Mod. HA 与 Mod. HA1 基因在 BHK-21 细胞中的表达

1.6.1 间接免疫荧光检测 取部分上述扩大培养的克隆系细胞,同时用 GFP 质粒瞬时转染的 BHK-21 细胞作为阳性对照、空白 BHK-21 细胞作为阴性对照,用 PBS 重悬后,800 r/min 离心 5 min,再重复此方法 2 次,即用 PBS 洗 3 次细胞,之后滴片,用 4 $^{\circ}\text{C}$ 预冷的丙酮固定 30 min,再用 PBS 洗片 3 次(每次冲一下片即可);用抗 His 标签鼠单克隆抗体(1:20 倍稀释,稀释液为含体积分数 10%FBS 的 PBS)于 37 $^{\circ}\text{C}$ 湿盒中作用 1~2 h,PBS 洗 3 次,自来水洗 6 次;用 FITC 标记的羊抗鼠 IgG(1:40 倍稀释)于湿盒中作用 1 h,PBS 洗 3 次,自来水洗 6 次,

0.1%伊文氏蓝负染,以缓冲甘油(V(甘油):V(pH9.2 的 0.2 mol/L 碳酸盐缓冲液)=9:1)封片,荧光显微镜观察结果。

1.6.2 Western blot 检测 收获部分扩大培养的克隆系细胞,用 150 μ L 自配的细胞裂解液(含有 100 mmol/L 的 PMSF)重悬细胞,冰上作用 10 min,12 000 r/min、4 $^{\circ}$ C 离心 5 min,取上清加 3 $\times$ loading buffer 煮沸 10 min,用 120 g/L 的 SDS-PAGE 电泳。然后用半干法将蛋白转印到 NC 膜上,以含 20 g/L 脱脂奶的 PBS 于 4 $^{\circ}$ C 封闭过夜;以 1:500 稀释(稀释液为含 20 g/L 脱脂奶的 PBS)的抗 His 标

签鼠单克隆抗体室温作用 3 h 后,PBST 洗 4 次,每次 10 min;用 1:7 500 倍稀释(稀释液为 PBS)的 DyLightTM 800-Labeled Antibody To Rabbit IgG (H+L)二抗室温作用 1 h,PBST 洗 4 次,PBS 洗 2 次,最后用红外扫描仪观察结果,以未转染的 BHK-21 细胞为空白对照。

2 结果与分析

2.1 14 个最新 H1N1 毒株 HA 氨基酸序列的同源性
图 1 表明,14 个 H1N1 毒株 HA 氨基酸序列的同源性约为 98%,只有 6 个氨基酸位点不同。

	8	13	100	214	220	338
ACP41105	ILVVL	LYTFATA	VETPSS	NAD	IVV	..SSR.....RNI
ACP41949	ILVVL	LYTFATA	VETPSS	NAD	IVV	..SSR.....
ACP41926	ILVV	LYTFATA	VET	SS	NADAYV	..SSR.....RNI
ACP41935	ILVV	LYTFATA	VET	SS	NADAYV	..SSR.....RNI
ACP44150	ILVV	LYTFATA	VET	SS	NADAYV	..SSR.....RNI
ACP44164	YTFATA	VET	SS	NADAYV	..SSR	
ACP44182	YTFATA	VET	SS	NADAYV	..SSR	
ACP44166	ILVVL	LYTFATA	VET	SS	NADAYV	..SSR.....
ACP41934	ILVVL	LYTFATA	VET	SS	NADAYV	..SSR.....RNI
ACP41963	ILVVL	LYTFATA	VET	SS	NADAYV	..SSR.....RNI
ACP41953	ILVVL	LYTFATA	VETPSS	NADAYV	..SSR	
ACP52565	ILVVL	LYTFATA	VETPSS	NADAYV	..SSR	RNI
ACP44189	ILVVL	LYTFATA	VETPSS	NADAYV	..SSR	RNI
ACP52565-1	ILVVL	LYTFATA	VETPSS	NADAYV	..SSR	RNI

图 1 14 个 H1N1 甲型流感毒株 HA 氨基酸序列的比较
ACP 52565-1 为参照;框内表示有差异的位点

Fig. 1 Comparison of 14 influenza A influenza virus H1N1-HA amino acid sequences
ACP 52565-1 was a reference;The different loci was in the frame table

2.2 真核表达质粒的酶切鉴定

真核表达质粒 pSNAV-Mod. HA 与 pSNAV-Mod. HA1 经 *Eco*R I 和 *Sal* I 双酶切,分别得到

1 700 与 1 000 bp 左右的条带(图 2),与 HA 与 HA1 基因的长度相符,表明 Mod. HA 和 Mod. HA1 已正确插入 pSNAV 载体。

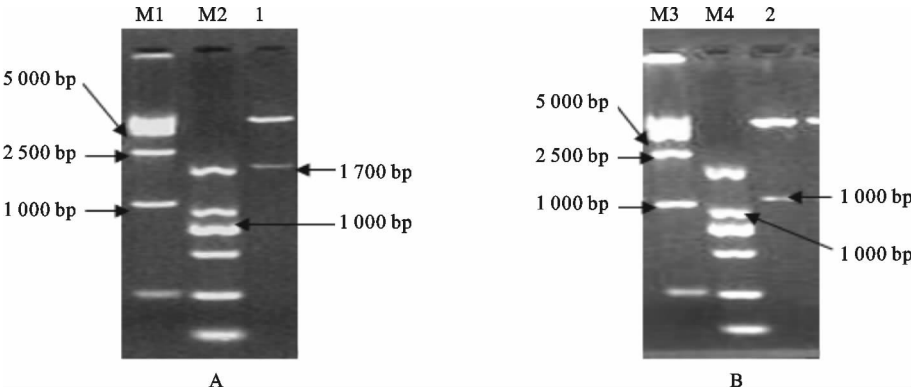


图 2 真核表达质粒 pSNAV-Mod. HA 和 pSNAV-Mod. HA1 的酶切鉴定
M1,M3. DNA Marker DL15000;M2,M4. DNA Marker DL2000;1. pSNAV-Mod. HA 经 *Eco*R I 和 *Sal* I 双酶切;
2. pSNAV-Mod. HA1 经 *Eco*R I 和 *Sal* I 双酶切

Fig. 2 Identification of plasmids pSNAV-Mod. HA and pSNAV-Mod. HA1 by restriction enzyme digestion
M1,M3. DNA Marker DL15000;M2,M4. DNA Marker DL2000;1. pSNAV-Mod. HA digested by *Eco*R I & *Sal* I ;
2. pSNAV-Mod. HA1 digested by *Eco*R I & *Sal* I

2.3 真核表达质粒序列的测定

将酶切鉴定正确的重组质粒 pSNAV-Mod. HA 与 pSNAV-Mod. HA1 的甘油菌送英潍捷基贸易有限公司测序,将测序结果与密码子优化过的 DNA 序列用 Vector NTI 9.0.0 软件进行比对分析,结果显示其完全一致,证实了所克隆片段的正确性。

2.4 稳定表达 H1N1-Mod. HA 与 H1N1-Mod. HA1 细胞系的建立

用 FuGENE® HD 转染试剂将 pSNAV- Mod. HA 和 pSNAV-Mod. HA1 质粒转入 BHK-21 细胞中,在 G418 存在的条件下,经 2~3 周分别筛选出 10 个单克隆,免疫荧光与 Western blot 检测发现均有蛋白表达,连续传 10 代后,最终分别筛选出 1 株

蛋白表达量较高的细胞单克隆,记为 pSNAV-Mod. HA-BHK-21 和 pSNAV-Mod. HA1-BHK-21 (图 3)。

2.5 Mod. HA 与 Mod. HA1 在 BHK-21 细胞中的表达

2.5.1 间接免疫荧光检测 免疫荧光检测结果(图 4)表明,BHK-21 细胞中有 Mod. HA 与 Mod. HA1 蛋白的表达,而且蛋白定位在细胞膜上,GFP 质粒瞬时转染的 BHK-21 细胞(阳性对照)有明显的荧光,没有转染的 BHK-21 细胞(阴性对照)没有检测到目的蛋白,表明 Mod. HA 与 Mod. HA1 蛋白均能在 BHK-21 细胞中正常表达。

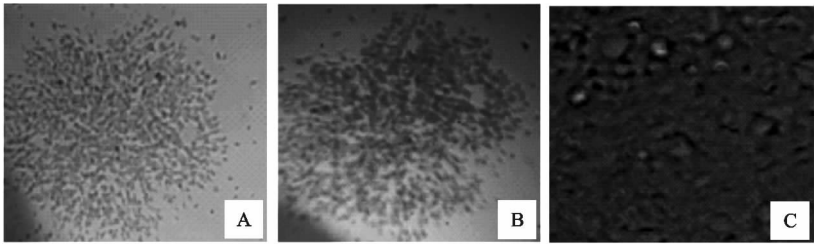


图 3 pSNAV-Mod. HA-BHK-21 和 pSNAV-Mod. HA1-BHK-21 的细胞单克隆
A. pSNAV-Mod. HA-BHK-21 细胞单克隆(200×); B. pSNAV-Mod. HA1-BHK-21 细胞单克隆(200×);
C. BHK-21 细胞:阴性对照(200×)

Fig. 3 The monoclonal of pSNAV-Mod. HA-BHK-21 and pSNAV-Mod. HA1-BHK-21
A. The monoclonal of pSNAV-Mod. HA-BHK-21 (200×); B. The monoclonal of pSNAV-Mod. HA1-BHK-21 (200×);
C. BHK-21 cells; Negative control (200×)

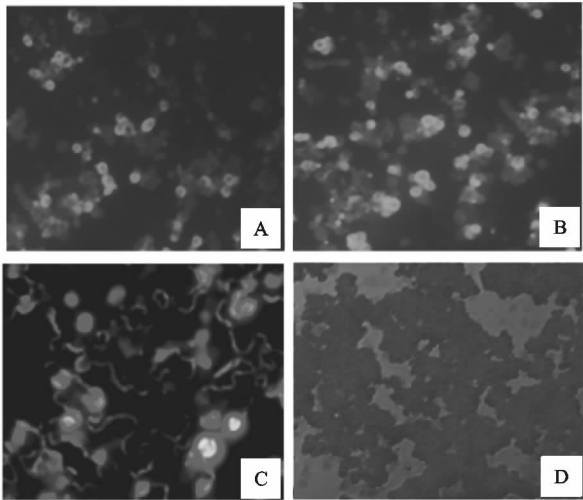


图 4 Mod. HA 与 Mod. HA1 在 BHK-21 细胞中表达的间接免疫荧光检测
A. Mod. HA 在 BHK-21 细胞中的表达(200×); B. Mod. HA1 在 BHK-21 细胞中的表达(200×);
C. GFP 在 BHK-21 细胞中的表达:阳性对照(200×); D. BHK-21 细胞:阴性对照(200×)

Fig. 4 Identification of Mod. HA and Mod. HA1 protein expressions in BHK-21 cells by immunofluorescence assay
A. Expression of Mod. HA protein in BHK-21 cells (200×); B. Expression of Mod. HA1 protein in BHK-21 cells (200×);
C. Expression of GFP in BHK-21 cells; Positive control cells (200×); D. BHK-21 cells; Negative control (200×)

2.5.2 Western blot 检测 Western blot 结果显示, Mod. HA 与 Mod. HA1 在 BHK-21 细胞中均有表达(图 5), 产物的分子质量分别约为 75 和 50 ku, 与 HA 和 HA1 的大小^[10]相符。

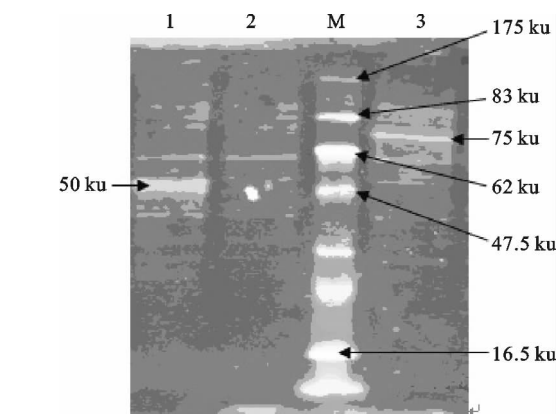


图 5 Mod. HA 与 Mod. HA1 在 BHK-21 细胞中表达的 Western blot 检测

1. Mod. HA1 蛋白;2. BHK-21 细胞:阴性对照;
3. Mod. HA 蛋白;M. 蛋白 Maker;16. 5~175 ku

Fig. 5 Identitication of Mod. HA and Mod. HA1 protein expressions in BHK-21cells by Western blot

1. Mod. HA1 protein;2. BHK-21 cells;Negative control BHK-21;
3. Mod. HA protein;M. Protein Marker;16. 5—175 ku

3 讨 论

本研究利用 BioEditor 软件将 14 个最新 H1N1 甲型流感毒株 HA 基因的共有序列(1 704 bp)翻译为氨基酸序列,根据网站(<http://www.kazusa.or.jp/codon/>)提供的最新人密码子表,按照人的偏爱密码子对 HA 基因的共有序列进行优化改造,并成功构建了 HA 和 HA1 基因的真核表达质粒 pSNAV-Mod. HA 与 pSNAV-Mod. HA1,将其在 BHK 细胞中表达,经间接免疫荧光及 Western blot 检测,结果表明,HA 与 HA1 蛋白均能在 BHK 细胞中正常表达。

甲型流感病毒 HA 蛋白是流感病毒基因组第 4 节段的编码产物,很容易变异,与流感的流行和发病密切相关。未经水解的 HA 蛋白称为 HA 前体(即 HA0),不具有感染性,不能使机体获得中和性抗体,可经宿主细胞蛋白酶水解为重链 HA1 和轻链 HA2 2 个片段,HA 只有被水解后才能使流感病毒获得感染性^[5,9]。另外,HA 是典型的 I 型膜糖蛋白,其一级结构含有信号肽、胞浆域、跨膜域、胞外域 4 个结构域。HA 分子翻译后的修饰及加工,如糖

基化、空间构象的折叠等都影响其表达。未糖基化的 HA 不能诱导机体产生保护性的中和抗体。本研究利用真核细胞表达 HA 与 HA1 蛋白,可以利用真核细胞的翻译后修饰系统,使 HA 蛋白获得正常的二硫键修饰和糖基化修饰,从而产生有生物学活性的 HA 蛋白。

近年来,通过密码子优化,很多蛋白在毕赤酵母^[11-12]、昆虫细胞^[13]、大肠杆菌^[14]及哺乳动物细胞^[15-16]中得到了不同程度的表达。然而密码子优化后 GC 含量过高,蛋白产量不太理想^[17]。本研究通过分析优化后的基因序列,适当调整了几个富含 G/C 的氨基酸密码子,从而降低了 GC 含量。

本试验结果显示,成功构建的真核表达质粒 pSNAV-Mod. HA 与 pSNAV-Mod. HA1,能够在真核细胞中正确表达。HA 是流感病毒最重要的保护性抗原,其水解后刺激机体产生的特异性中和抗体在抗流感病毒免疫中发挥着重要的作用。因此获得具有生物活性的 HA,是提高 DNA 疫苗抗原性和保护率的关键。本研究构建的 pSNAV-Mod. HA 与 pSNAV-Mod. HA1 真核表达载体中的 Mod. HA 及 Mod. HA1,只是 HA 及 HA1 基因的读码框,并非完整的流感病毒 RNA 节段,因此与普通流感病毒 RNA 节段发生重组与重配而产生具有感染性毒株的几率微乎其微。Mod. HA 及 Mod. HA1 真核表达载体的构建及表达,为今后开展多基因表达的基因工程疫苗及 H1N1 检测试剂奠定了基础。关于 DNA 疫苗的研究,已有较为成熟的例子,如美国 Vial 公司的流感 DNA 疫苗,目前已经进入了临床试验阶段^[18]。

[参考文献]

[1] No author listed. Swine influenza: how much of global threat [J]. Lancet, 2009, 373(9674): 1495.

[2] Kerr J R. Swine influenza [J]. J Clin Pathol, 2009, 62(7): 577-578.

[3] Neumann G, Noda T, Kawaoka Y, et al. Emergence and pandemic potential of swine-origin H1N1 influenza virus [J]. Nature, 2009, 459(7249): 931-939.

[4] 蔡 闯. 2009 年甲型 H1N1 流感研究近况 [J]. 中国急救医学, 2009, 29(6): 553-555.

Cai C. Study of 2009 influenza A (H1N1) virus epidemic [J]. Chinese Journal of Critical Care Medicine, 2009, 29(6): 553-555. (in Chinese)

[5] Mahy B W J, Meulen V T. Topley & Wilson microbiology and microbial infection. Volume 1; Virology [M]. 10th ed. London: Hodder Arnold, 2005.

[6] Potter C W. A history of influenza [J]. J Appl Microbol, 2001, 91:572-579.

[7] Cox N J, Subbarao K. Global epidemiology of influenza: Past and present [J]. Annu Rev Med, 2000, 51:407-421.

[8] McDonnell W, Askari F K. DNA vaccines [J]. N Engl J Med, 1996, 334(1):42-45.

[9] 邹丽芳,姚立红. 人 H5N1 流感病毒血凝素蛋白 DNA 疫苗的构建及其免疫原性研究 [J]. 病毒学报, 2007, 24(5):366-370.

Xun L F, Yao L H. Construction and immunogenicity study of DNA vaccine expressing human H5N1 influenza virus hemagglutinin [J]. Chinese Journal of Virology, 2007, 24(5): 366-370. (in Chinese)

[10] Wang K, Holtz K M, Anderson K, et al. Expression and purification of an influenza hemagglutinin-one step closer to a recombinant protein-based influenza vaccine [J]. Vaccine, 2006, 24(12):2176-2185.

[11] 张素芳,蔡梅红,陈博言,等. Magainin 和 cecA-mil 抗菌肽基因的密码子优化及在毕赤酵母中的高效表达 [J]. 中国生物工程杂志, 2004, 24(7):93-97.

Zhang S F, Cai M H, Chen P Y, et al. Codon optimization of antibacterial peptide magainin and CecA-mil gene and over-expression in *Pichia pastoris* [J]. China Biotechnology, 2004, 24(7):93-97. (in Chinese)

[12] Teng D, Fan Y, Yang Y L, et al. Codon optimization of bacillus licheniformis blucanase gene and its expression in *Pichia pastoris* [J]. Appl Microbiol Biotechnol, 2007, 74(5):1074-1083.

[13] 郭丽,周红莉,屈建国,等. 人诺如病毒衣壳蛋白的密码子优化及在昆虫细胞中的表达 [J]. 中国病毒学, 2006, 21(2):121-125.

Guo L, Zhou H L, Qu J G, et al. Codon optimization and expression of norovirus capsid proteins in insect cells [J]. Chinese Journal of Virology, 2006, 21(2):121-125. (in Chinese)

[14] Wu X, Jornvall H, Berndt K D, et al. Codon optimization reveals critical factors for high level expression of two rare codon genes in *Escherichia coli*: RNA stability and secondary structure but not tRNA abundance [J]. Biochem Biophys Res Commun, 2004, 313(1):89-96.

[15] Nguyen K L, Llano M, Akari H, et al. Codon optimization of the HIV-1 vpu and vif genes stabilizes their mRNA and allows for highly efficient rev-independent expression [J]. Virology, 2004, 319(2):163-175.

[16] 宋敬东,王健伟,王敏,等. 昆虫细胞偏爱密码子优化的 HPV16L1 基因在昆虫和哺乳细胞中的表达 [J]. 中国病原生物学杂志, 2007, 2(4):247-251.

Song J D, Wang J W, Wang M, et al. The optimization of human papillomavirus type 16L1 gene following the insect cell codon bias can achieve effective expression in both insect and mammalian cells [J]. Journal of Chinese Pathogenbiology, 2007, 2(4):247-251. (in Chinese)

[17] 左建民,周玲,王琦,等. EBV-LMP2 基因密码子优化对其蛋白表达及免疫效果的影响 [J]. 现代免疫学, 2004, 24(4):301-304.

Zuo J M, Zhou L, Wang Q, et al. The influence of gene codons optimization of LMP2 on the protein expression and immunogenic character [J]. Current Immunology, 2004, 24(4):301-304. (in Chinese)

[18] Vial. Influenza pandemic vaccine from Vial company [EB/OL]. (2008-01-03). <http://www.vical.com/products/infectiousdiseases/influenza.htm>.

欢迎订阅 2011 年《农产品加工》

《农产品加工》(旬刊)是国内惟一的专门服务于农产品加工业的专业媒体,被农业部农产品加工局指定为农产品加工业主流媒体,并与国家农产品加工技术研发中心等单位合办的专业性期刊。其商标被国家工商总局注册登记,并获著名商标称号,现已进入中国科技核心期刊行列,是新闻出版总署农家书屋重点推荐期刊。

《农产品加工》上旬出版《农产品加工》(邮发代号 22-121);中旬出版《农产品加工·创新版》(邮发代号 22-150);下旬出版《农产品加工·学刊》(邮发代号 22-19)。3 个版本单独发行,每册定价 8 元,全年 96 元,全国各地邮局均可订阅,逾期可直接向本刊广告发行部订阅。

电 话:0351-4606085,4606086,4606089(传真)

联系地址:山西省太原市双塔东街 124 号 闻汇商务大厦 B 座 2102 室

邮 编:030012; 网 址:www.ncpig.com

E-mail:ncpjg@163.com(综合刊), ncpjgsk@163.com(学刊), ncpjgkx@163.com(创新版)