H5N1 亚型禽流感病毒 *NA* 基因在 Sf9 昆虫细胞中的表达

张晓东[1],陶 玲[2],王汉中[2],格日勒图[1]

(1 内蒙古农业大学 动物科学与医学学院,内蒙古 呼和浩特 010018;2 中国科学院武汉病毒研究所 人畜共患病实验室,湖北 武汉 430071)

[摘 要] 【目的】在 Sf9 昆虫细胞中表达 H5N1 亚型禽流感病毒(Avian influenza virus,AIV)神经氨酸酶(NA)基因。【方法】用 PCR 方法克隆 H5N1 亚型 AIV *NA* 基因,定点插入到转移载体 pFastBacHTb 中,构建重组转移载体 pFastBacHTb-NA。将其转化到含有 AcBacmid 和 helper 质粒的 *E. coli* DH10B 感受态细胞中,与 AcBacmid 重组,获得 rAcBacmid-NA。提取重组的 Bacmid,转染处于对数生长期的昆虫 Sf9 细胞,获得重组杆状病毒 vAc-NA。将 vAc-NA 重新感染处于对数生长期的昆虫 Sf9 细胞,3～5 d 后收集被感染细胞。取转染细胞、感染细胞、破碎感染细胞上清和破碎感染细胞沉淀进行 SDS-PAGE 和 Western-blotting 分析。【结果】通过 PCR 成功地克隆了 1 352 bp 的 H5N1 亚型 AIV 不含信号肽序列的 *NA* 基因;pFastBacHTb-NA 和 rAcBacmid-NA 构建成功。AIV *NA* 基因在昆虫 Sf9 细胞内得到有效表达,表达产物分子质量约为 52 ku,且具有免疫原性。【结论】H5N1 亚型 AIV *NA* 基因在昆虫 Sf9 细胞中表达成功。

[关键词] H5N1 亚型禽流感病毒;神经氨酸酶;杆状病毒载体;真核表达

[中图分类号] S852.65^{+}9.5 [文献标识码] A [文章编号] 1671-9387(2009)07-0028-05

Expression of influenza virus subtype H5N1 neuraminidase gene in Sf9 insect cells

ZHANG Xiao-dong[1], TAO Ling[2], WANG Han-zhong[2], GER Le-tu

(1. *College of Animal Science and Veterinary Medicine, Inner Mongolia Agricultural University, Hohhot, Inner Mongolia* 010018, *China*; 2. *Wuhan Institute of Virology, Chinese Academy of Science, Wuhan, Hubei* 430071, *China*)

Abstract: 【Objective】 The research studied influenza virus subtype H5N1 neuraminidase(*NA*) gene expressed in Sf9 insect cells. 【Method】 NA, the neuraminidase (*NA*) gene of H5N1 subtype avian influenza virus (AIV), was successfully amplified by polymerase chain reaction (PCR). The gene was inserted into plasmid pFastBacHTb to obtain recombinant transfer vector pFastBacHTb-H5N1-NA. pFastBacHTb-H5N1-NA was transformed into DH10B cells carrying both AcBacmid and helper plasmid. Recombinant bacmid rAcBacmid-H5N1-NA with the insertion of *NA* gene was obtained by specific transposition between pFastBacHTb-H5N1-NA and AcMNPV bacmid. Recombinant virus vAc-H5N1-NA was obtained by transfecting rAcBacmid-H5N1-NA into Sf9 insect cells. Supernatant containing vAc-H5N1-NA was collected and Sf9 cells were infected by vAc-H5N1-NA. Cells collected 3－5 days after transfection and infection were broken by the sonicator. Then the supernatant and the sediment were detected by SDS-PAGE and Western-blotting. 【Result】 NA, the neuraminidase (*NA*) gene of H5N1 subtype avian influenza virus

* [收稿日期] 2008-10-17
[作者简介] 张晓东(1982－),男,陕西岐山人,在读硕士,主要从事兽医微生物与免疫学研究。E-mail:zxd_welcome@163.com
[通信作者] 格日勒图(1972－),男,内蒙古呼和浩特人,副教授,博士,主要从事兽医微生物与免疫学研究。E-mail:geriletunjan@yahoo.com.cn

(AIV), was successfully amplified by PCR, which was 1 352 bp. Recombinant transfer vector pFastBacHTb-H5N1-NA was reconstructed and recombinant rAcBacmid-NA was obtained. NA protein NA was highly expressed in Sf9 insect cells with the approximate molecular weight 52 ku, and with immunogenicity. 【Conclusion】 Influenza virus subtype H5N1 neuraminidase gene(*NA*) was expressed in Sf9 insect cells successfully.

Key words: H5N1 subtype avian influenza virus; neuraminidase; baculovirus vector; eukaryotic expression

禽流感(Avian influenza, AI)是由禽流感病毒(Avian influenza virus, AIV)引起的一种高度接触性传染病,1878 年 AI 首次发生于意大利,现已几乎遍布全世界[1],尤其是近几年暴发的 H5N1 亚型高致病性禽流感(Highly pathogenic avian influenza, HPAI),不仅引起禽类大面积发病和死亡,也对人类健康构成了威胁[2]。

AIV 在一定选择压力作用下变异迅速,并造成不同血清型毒株间缺乏交叉保护性[3]。目前,AIV 存在 16 个血凝素(HA) 亚型和 9 个神经氨酸酶(NA)亚型。HA 和 NA 是 AIV 的 2 种表面蛋白,其中 NA 是病毒囊膜纤突成员之一,属Ⅱ类糖蛋白,以同源 4 聚体的形式存在,变异较活跃,具有亚型特异性;NA 的作用是水解细胞表面的特异性糖蛋白末端的 N-己酰基神经氨酸,避免病毒粒子的聚集,以利于病毒释放,对病毒在感染细胞周围的扩散能力有很大影响[4]。研究证实,NA 活性正常是 AIV 生长必不可少的条件,NA 活性部位的任何畸变都会使其活性降低。通过阻断 NA 可使 AIV 颗粒聚集在一起,黏着于细胞表面而不能感染其他细胞。NA 的活性可被特异性的抑制物或抗体所抑制,导致 AIV 丧失吸附、融合、复制装配和出芽等能力,根据这一特点,国内外研究出许多抗流感药物。在未来的流感治疗中,AIV NA 抑制剂将占主要地位。关于 AIV NA 抑制剂潜在的抗药性还需进一步研究[5]。

本研究对 1 株猪源高致病性 AIV 毒株 *NA* 基因片段进行了克隆,构建了能够表达 H5N1 亚型 AIV *NA* 基因的重组杆状病毒载体,并将其在昆虫 Sf9 细胞中进行表达,以期为进一步研究高致病性禽流感毒株 NA 蛋白的功能,以及新型流感疫苗的研制奠定基础。

1　材料与方法

1.1　菌种及细胞

含有猪源高致病性 AIV *NA* 基因的 pGEM-T-NA 重组质粒,由中国科学院武汉病毒研究所李天宪研究员构建;杆状病毒转移载体(pFastBacHTb)、*E. coli* DH5α 和 DH10B 菌种及昆虫 Sf9 细胞均由中国科学院武汉病毒研究所人畜共患病实验室保存。

1.2　试　剂

KOD-Plus 高保真 *Taq* 酶为日本 TOYOBO 公司产品;限制性内切酶购自 Taraka 公司;质粒提取试剂盒和 DNA 胶回收试剂盒购自美国 Omega 公司;Cellfectin 转染试剂、Grace 培养基、胎牛血清(FCS)购自美国 Invitroge 公司;AP 标记山羊抗小鼠 IgG 购自美国 Merk 公司。抗 NA 高免血清,由中国科学院武汉病毒研究所人畜共患病实验室制备并保存。

1.3　引物设计与合成

参考 GenBank 上公开发表的 *NA* 基因序列(GenBank 登录号:ABK00127),设计 1 对特异性引物,上游引物 NA-F:5′-GGCGAATTCCCACCATGATATGGGTTAGTCATTCAA-3′(下划线部分为 *Eco*R Ⅰ 酶切位点);下游引物 NA-R:5′-GAAGCGGCCGCCTACTTGTCAATGGTGAATGGCAA-3′(下划线部分为 *Not* Ⅰ 酶切位点)。引物由 Invitrogen 公司合成。参考 Invitrogen 公司的 Bac-to-Bac 杆状病毒表达系统说明,设计 Bacmid 上、下游引物,上游引物 M13-F:5′-CCCAGTCACGACGTTGTAAAACG-3′;下游引物 M13-R:5′-AGCGGATAACAATTTCACACAGG-3′。

1.4　重组杆状病毒转移载体的构建

1.4.1　AIV *NA* 基因的 PCR 扩增　以 pGEM-T-NA 质粒为模板,扩增不含信号肽序列的 *NA* 基因,PCR 反应体系为:去离子水 35 μL,10×KOD buffer 5 μL,2 nmol/L dNTP 4 μL,$MgSO_4$ 2 μL,上、下游引物各 1 μL,KOD-puls 1 μL,模板 pGEM-T easy-NA 质粒 1 μL。PCR 反应程序为:95 ℃ 5 min;95 ℃ 30 s,53 ℃ 30 s,68 ℃ 1 min,重复 30 个循环;68 ℃ 10 min,4 ℃ 保温 10 min。取 PCR 产物,用 100 g/L 琼脂糖凝胶电泳,回收目的片段。对回收

的目的片段进行PCR反应,在其末端加上腺嘌呤核苷酸,与pGEM-T Easy-vector连接,转化DH5α感受态细胞,经蓝白斑筛选,挑取多个白斑,提取质粒。将提取的质粒用*Eco*RⅠ和*Not*Ⅰ双酶切后,进行琼脂糖凝胶电泳鉴定,选取酶切结果与预期结果一致的目的片段,送交Invitrogen公司测序。

1.4.2 pFastBacHTb-NA的构建 经过测序确认,在完整阅读框中无突变位点,该重组质粒命名为pGEM-T-NA。取pGEM-T-NA,用*Eco*RⅠ和*Not*Ⅰ双酶切,获得的目的片段插入经同样酶切处理的pFastBacHTb载体中,构建重杆状病毒转移载体pFastBacHTb-NA[6-7],并进行*Eco*RⅠ和*Not*Ⅰ双酶切鉴定。按照Invitrogen公司的Bac-to-Bac杆状病毒表达系统说明,将双酶切鉴定正确的pFastBacHTb-NA转化到含有AcBacmid和helper质粒的DH10B感受态细胞中。转化的DH10B细胞经X-gal、IPTG筛选后,挑取单克隆,提取Bacmid,用*NA*基因的上游引物NA-F和Bacmid的下游引物M13-R进行PCR鉴定,阳性Bacmid命名为重组rAcBacmid-NA[8]。

1.5 重组病毒vAc-NA的构建

按照Invitrogen公司转染试剂盒说明,将鉴定为阳性的rAcBacmid-NA转染处于对数生长期的昆虫Sf9细胞。5 d后出现明显细胞病变时,收集上清液作为第1代重组病毒(vAc-NA 1G),同时收取转染细胞保存备用。将第1代病毒以低感染复数(100 μL稀释至3 mL)传代,感染处于对数生长期的Sf9细胞,3 d后出现明显细胞病变时,收集上清液作为第2代重组病毒(vAc-NA 2G),同时收集感染细胞备用[9-10]。

1.6 rbv-NA融合蛋白的SDS-PAGE分析与Western-blotting检测

1.6.1 SDS-PAGE分析 将1.5节所收集的转染细胞和感染细胞用PBS洗涤3次后,用适量PBS重悬。感染细胞经超声波破碎后,4 ℃、12 000 *g*离心10 min,分别收集上清液和沉淀,将沉淀重悬于PBS中回复原体积[11-12]。分别取20 μL转染细胞、感染细胞、破碎感染细胞上清和破碎感染细胞沉淀以及对照样品(正常培养的Sf9细胞),进行10 g/L SDS-PAGE电泳,记录结果并进行分析。

1.6.2 Western-blotting检测 取上述样品,经过SDS-PAGE凝胶电泳后,用半干转印膜的方法将凝胶上的蛋白质样品转移至硝酸纤维膜上,将膜取下在含5 g/L BSA的TBS(pH7.2)中室温封闭1 h,用TBS洗膜1次,与第1抗体(抗NA抗体Mouse anti-N1)于37 ℃下作用1 h,用TBS洗膜3次;再与第2抗体(AP标记的羊抗鼠IgG)于37 ℃下作用1 h,用TBS洗膜3次,然后进行显色并记录结果。

2 结果与分析

2.1 AIV *NA*基因的PCR扩增

从质粒pGEM-T-NA中用PCR方法扩增获得了*NA*目的基因(不含信号肽序列),长度为1 352 bp(图1)。

2.2 重组杆状病毒转移载体pFastBacHTb-NA的构建

pFastBac1-NA经*Eco*RⅠ和*Not*Ⅰ双酶切,获得了4 821和1 332 bp的片段;经*Bam*HⅠ酶切,获得了5 101和1 052 bp片段;经*Xho*Ⅰ酶切,获得了5 225和928 bp的片段(图2)。

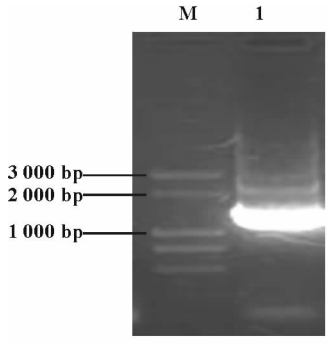

图1 AIV *NA*基因的PCR扩增结果

M. DL3000 DNA Marker;1. AIV *NA*基因PCR产物

Fig. 1 AIV NA Gene by PCR

M. DL3000 DNA Marker;1. AIV *NA* by PCR

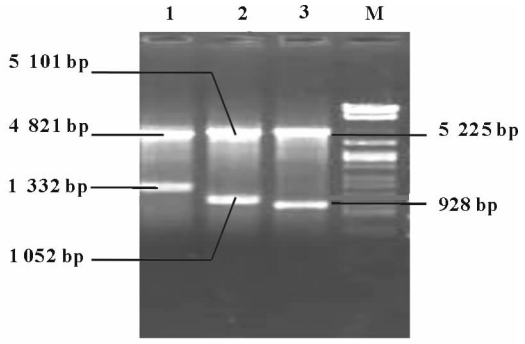

图2 pFastBacHTb-NA的酶切鉴定

1. *Eco*RⅠ和*Not*Ⅰ双酶切产物;2. *Bam*HⅠ酶切产物;3. *Xho*Ⅰ酶切产物;M. λEcoT14 DNA Marker

Fig. 2 pFastBacHTb-NA digest by different enzymes

1. *Eco*RⅠ+*Not*Ⅰ digest;2. *Bam*HⅠ digest;3. *Xho*Ⅰ digest;M. λEcoT14 DNA Marker

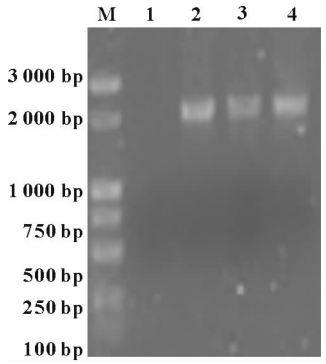

图 3　重组子 rAcBacmid-NA 的 PCR 鉴定结果

M. DL3000 Marker；1. AcBac 阴性对照；2～4. 不同克隆提取的 rAcBacHTb-NA

Fig. 3　PCR detection of different clones of rAcBacmid-NA

M. DL3000 Marker；1. Negative control；2－4. Different clones of AcBacHTb-NA

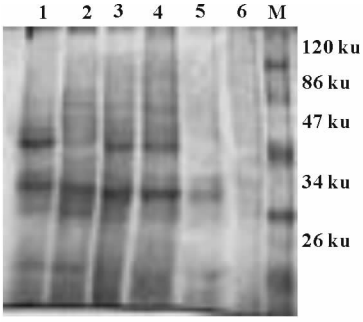

图 4　rbv-NA 融合蛋白的 SDS-PAGE 分析

1. 感染 rAcBacHTb-NA 的 Sf9 细胞破碎沉淀；2. rAcBacHTb-NA 感染的 Sf9 细胞破碎上清；3. 转染 rAcBacHTb-NA 的 Sf9 细胞；4. 感染 rAcBacHTb-NA 的 Sf9 细胞；5. 空载体 rAcBacHTb 感染的 Sf9 细胞；6. Sf9 细胞阴性对照；M. 蛋白 Marker SM＃0441

Fig. 4　SDS-PAGE analysis of rbv-NA fusion protein

1. Hepellets of Sf9 infected by rAcBacHTb-NA；2. The supernatant of Sf9 infected by rAcBacHTb-NA；3. Sf9 infected by rAcBac HTb-NA；4. Sf9 transfected with rAcBacHTb-NA；5. Sf9 infected by rAcBacHTb；6. Sf9 Negative control；M. protein prestained marker SM＃0441

3　讨　论

有研究表明，水禽感染 AIV 后可不表现任何症状，是 AIV 的天然储存库；猪可作为 AIV 和其他 A 型流感病毒的“中间宿主”，成为新型流感病毒亚型产生和传播的重要媒介[13]。本试验成功克隆了 1 株猪源 AIV 的 *NA* 基因，将获得的 *NA* 基因插入到杆状病毒转移载体 pFastBacHTb 中，获得重组转移载体 pFastBacHTb-NA，通过转座作用成功构建了重组转座子 rAcBacmid-NA，并对 rbv-NA 融合蛋白

2.3　重组子 rAcBacmid-NA 的 PCR 鉴定

对重组子 rAcBacmid-NA 进行 PCR 鉴定，产物长度为 1.94 kb（图 3），与预期结果一致，表明重组子 rAcBacmid-NA 构建成功。

2.4　rbv-NA 融合蛋白的 SDS-PAGE 分析

H5N1 亚型禽流感病毒 *NA* 基因 rbv-NA 融合蛋白经 SDS-PAGE 电泳分析，其分子质量为 52 ku（图 4），与理论值相符，表明 H5N1 亚型禽流感病毒 *NA* 基因已在昆虫 Sf9 细胞中获得成功表达。

2.5　rbv-NA 融合蛋白的 Western-blotting 检测

免疫印迹反应结果发现，3，4，6 泳道均在分子质量为 52 ku 处出现了特异性反应条带（图 5），而 1，2，5 泳道在相应位置处均未出现特异性条带。表明 H5N1 亚型禽流感病毒 *NA* 基因在杆状病毒中表达成功，且表达产物具有免疫原性。

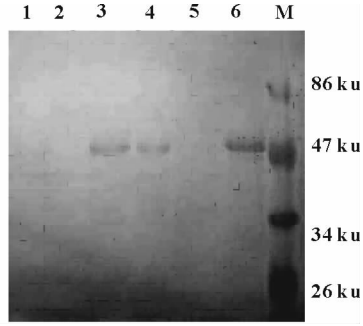

图 5　rbv-NA 融合蛋白的 Western-blotting 检测

1. Sf9 细胞阴性对照；2. 感染空载体 rAcBacHTb 的 Sf9 细胞；3. 转染 rAcBacHTb-NA 的 Sf9 细胞；4. 感染 rAcBacHTb-NA 的 Sf9 细胞；5. 感染 rAcBacHTb-NA 的 Sf9 细胞破碎上清液；6. 感染 rAcBacHTb-NA 的 Sf9 细胞破碎沉淀；M. 蛋白质 Marker SM＃0441

Fig. 5　Western-blotting detection of rbv-NA fusion protein

1. Sf9 Negative control；2. Sf9 infected by rAcBacHTb；3. Sf9 transfected with rAcBacHTb-NA；4. Sf9 infected by rAcBacHTb-NA；5. The supernatants of sf9 infected by rAcBacHTb-NA；6. The sediments of sf9 infected by rAcBacHTb-NA；M. Protein prestained marker SM＃0441

进行 SDS-PAGE 分析和 Western-blotting 检测。

昆虫细胞/杆状病毒系统已经成为真核外源基因表达的最常用工具之一，因为杆状病毒表达系统有以下方面的优点[14-15]：(1) 杆状病毒表达系统的启动子是多角体启动子，在病毒感染后期有很强的启动外源蛋白表达能力；(2)杆状病毒表达系统具有蛋白质修饰功能，从而保证了外源蛋白质的生物活性；(3) 杆状病毒是无脊椎动物病毒，对人、畜无害；(4) 可以表达多价蛋白。本试验通过昆虫细胞/杆状病毒表达系统，将 1 株猪源 H5N1 亚型 AIV *NA*

基因在昆虫Sf9细胞中成功表达。

在本试验中,rbv-NA融合蛋白的SDS-PAGE分析结果显示,1,3和4泳道在52 ku处出现了条带,表明H5N1亚型禽流感病毒*NA*基因已在昆虫Sf9细胞中获得成功表达。rbv-NA融合蛋白的Western-blotting检测结果显示,3,4和6泳道在52 ku处出现了特异性条带,而对照组1,2和5泳道在该处均未出现特异性条带,表明rbv-NA融合蛋白具有免疫原性。本试验中,感染Sf9细胞破碎上清液中未检测到特异性条带,这可能是由于禽流感病毒NA蛋白属于Ⅱ类糖蛋白(即跨膜蛋白),其疏水性较强[16],可溶性较差所致,但确切原因有待于进一步研究。本试验实现了H5N1亚型禽流感病毒*NA*基因在昆虫细胞/杆状病毒系统中的有效表达,为进一步研究高致病性AIV毒株NA蛋白的功能奠定了基础。

[参考文献]

[1] 张晓雾,刘 明,刘春国,等. H5N1亚型禽流感病毒*HA*基因在昆虫细胞中的表达及其生物活性鉴定[J]. 中国生物工程杂志,2007,27(3):422-426.
Zhang X J,Liu M,Liu C G,et al. The *HA* Gene of H5N1 Avian influenza virus expressed in insect cells and its biological activity [J]. China biotechnology,2007,27(3):422-426. (in Chinese)

[2] 王全英,乔传玲,张洪波,等. H5N1亚型禽流感病毒NA基因在重组禽痘病毒中的表达及其产物的免疫原性[J]. 中国兽医科学,2007,37(4):312-315.
Wang Q Y,Qiao C L,Zhang H B,et al. Expression of NA gene of H5N1 subtype avian influenza virus in recombinant fowlpox virus and analysis of immunogenicity of its product [J]. Veterinary Science in China,2007,37(4):312-315. (in Chinese)

[3] Bridges C B, Lim W, Hu-Primmer J,et al. Risk of influenza A (H5N1) infection among poultry workers,Hong Kong [J]. Infect Dis,2002,185:1005-1010.

[4] 甘孟侯. 禽流感[M]. 2版. 北京:中国农业大学出版社,2002:216-217.
Gan M H. Avian influenza [M]. 2nd ed. Beijing:China Agriculture University Press,2002:216-217. (in Chinese)

[5] 王全英,乔传玲,申之义,等. 禽流感病毒神经氨酸酶的结构及其生物学功能[J]. 动物医学进展,2005,26(12):40-43.
Wang Q Y,Qiao C L,Shen Z Y,et al. The structure and biology function of avian influenza virus neuraminidase [J]. Progress in Veterinary Medicine,2005,26(12):40-43. (in Chinese)

[6] 刘春国,刘 明,张 云,等. H5N1亚型禽流感病毒*NS*基因在昆虫细胞中的表达[J]. 中国生物工程杂志,2006,26(6):40-44.
Liu C G,Liu M,Zhang Y,et al. The *NS* gene of H5N avian influenza virus(AIV) expressed in insect cells [J]. China Biotechnology,2006,26(6):40-44. (in Chinese)

[7] 刘 波,薛仁宇,曹广力,等. H5N1亚型禽流感病毒*NS1*基因在大肠杆菌和昆虫细胞中的表达[J]. 中国人兽共患病学报,2007,23(11):1067-1070.
Liu B,Xue R Y,Cao G L,et al. Expression of the NS1 gene of H5N1 avian influenza virus in *E. coli* and insect cells [J]. Chinese Journal of Zoonoses,2007,23(11):1067-1070. (in Chinese)

[8] Yu C H ,Yu L L ,Wen T J,et al. Dual expression of the HA protein of H5N2 avian influenza virus in a baculovirus system [J]. Journal of Virological Methods,2006,135:43-48.

[9] 宋建领,张富强,王金萍,等. H5N1亚型禽流感病毒神经氨酸酶基因的克隆与表达[J]. 中国病毒学,2006(21):43-46.
Sun J L, Zhang F Q,Wang J P,et al. Cloning and expression of neuraminidase gene of H5N1 subtype avian influenza virus [J]. Virologica Sinica,2006(21):43-46. (in Chinese)

[10] Apisarnthanarak A,Kitphati R,Thongphubeth K,et al. Atypical avian influenza (H5N1) [J]. Emerg Infect Dis,2004,10:1321-1324.

[11] 黎玉梅,邓国华,熊 蕊,等. H5N1亚型禽流感病毒神经氨酸酶基因的表达及纯化[J]. 中国兽医科学,2007,37(9):783-786.
Li Y M,Deng G H,Xiong R,et al. Expression of NA gene of avian influenza virus subtype H5N1 in *Escherichia coli* and purification of the expressed product [J]. Veterinary Science in China,2007,37(9):783-786. (in Chinese)

[12] Manuel J T C. Stochastic simulation of protein expression in the baculovirus/insect cells system [J]. Computers and Chemical Engineering,2008,32:68-77.

[13] 刘贵忠,秦 刚. H5N1的结构与致病机制[J]. 菏泽学院学报,2006,28(2):69-72.
Liu G Z,Qin G. The Structure of H5N1 and its pathogenic mechanism [J]. Journal of Heze University,2006,28(2):69-72. (in Chinese)

[14] Tanaka K,Tsuzuki S,Matsumoto H,et al. Expression of Cotesia kariyai polydnavirus genes in Sf9 cells [J]. Journal of Insect Physiology,2003,49:433-440.

[15] Li L,Joshua S,Tauseef R B,et al. Enhanced protein expression in the baculovirus/insect cell system using engineered SUMO fusions [J]. Protein Expression and Purification,2008,16:167-174.

[16] 王振国,金宁一,郑 敏,等. H5N1亚型禽流感病毒神经氨酸酶基因的克隆及序列分析[J]. 吉林农业大学学报, 2004, 26(2):213-216.
Wang Z G,Jin N Y,Zheng M,et al. Cloning and sequencing of neuraminidase gene of an AIV isolate(H5N1) [J]. Journal of Jilin Agricultural University,2004,26(2):213-216. (in Chinese)