

# H5N1 亚型禽流感病毒核衣壳蛋白 (NP) 基因的进化及原核表达

邬成业<sup>1,2</sup>, 王爱萍<sup>2</sup>, 郝慧芳<sup>1</sup>, 史平玲<sup>2</sup>, 游雷鸣<sup>1</sup>, 李培培<sup>2</sup>, 张改平<sup>1</sup>

(1. 河南省农业科学院 农业部动物免疫学重点开放实验室 河南省动物免疫学重点实验室 河南 郑州 450002; 2. 郑州大学 生物工程系 河南 郑州 450001)

**摘要:** 参考 GenBank 上 H5N1 亚型禽流感病毒(AIV) 的核衣壳蛋白(NP) 基因序列设计引物,PCR 扩增 NP 基因, 对其进行序列分析并构建分子进化树。将克隆的 NP 基因插入原核表达载体 pET32a,在大肠杆菌中进行诱导表达, 对诱导表达的 NP 重组蛋白进行纯化、Western-Blot 鉴定及免疫原性分析。结果表明,克隆的 NP 基因与 GenBank 上发表的另外 2 个河南 AIV 毒株亲缘关系较近,诱导表达的 NP 重组蛋白主要以可溶性形式存在,分子量约为 70 kDa,并且能够与 H5 亚型 AIV 阳性血清发生特异性反应,具有良好的抗原性。

**关键词:** 禽流感病毒; H5 亚型; 核衣壳蛋白(NP); 原核表达

中图分类号: Q78 文献标识码: A 文章编号: 1000-7091(2010)03-0019-04

## Phylogenetic Analysis and Prokaryotic Expression of NP Gene from Subtype H5N1 of Avian Influenza Virus in *Escherichia coli*

WU Cheng-ye<sup>1,2</sup>, WANG Ai-ping<sup>2</sup>, HAO Hui-fang<sup>1</sup>, SHI Ping-ling<sup>2</sup>, YOU Lei-ming<sup>1</sup>,  
LI Pei-pei<sup>2</sup>, ZHANG Gai-ping<sup>1</sup>

(1. Key Laboratory of Animal Immunology of the Ministry of Agriculture, Henan Provincial Key Laboratory of Animal Immunology, Henan Academy of Agriculture Sciences, Zhengzhou 450002, China;  
2. Department of Bioengineering, Zhengzhou University, Zhengzhou 450001, China)

**Abstract:** The Nucleocapsid Protein (NP) gene of Avian influenza virus (AIV) subtype H5 was amplified by PCR according to the published sequence and its molecular evolution was analyzed. The coding sequence of NP was cloned into the prokaryotic vector of pET32a to express and obtain the recombinant protein in *E. coli*. The expressed NP was purified and identified with Western-Blot strategy, and its immunogenicity was further characterized with enzyme linked immunosorbent assay. The result suggested that the cloned NP was evolutionary more similar to others of Henan, and the fusion protein was successfully expressed and mainly existed as soluble bodies. Also, the protein could be specifically recognized by the serum against H5 subtype of AIV.

**Key words:** Avian influenza virus; Subtype H5; Nucleocapsid protein; Prokaryotic expression

禽流感(Avian influenza, AI)是由正粘病毒科 A 型流感病毒引起的全身性或呼吸系统的传染病,已被国际兽医局定为 A 类烈性传染病<sup>[1]</sup>。高致病性禽流感(Highly pathogenic avian influenza, HPAI)是由特定亚型的禽流感病毒引起的禽类高度致死性传染病。在禽类,高致病性禽流感主要由 A 型流感病

毒的 H5 和 H7 亚型引起<sup>[2]</sup>。近年来,禽流感病毒正在突破种间屏障引起人的感染<sup>[3]</sup>,除少数病例外,人禽流感主要由 H5N1 亚型感染所致。1997 年香港禽流感事件中, H5N1 亚型 HPAIV 直接感染造成 18 人发病, 6 人死亡<sup>[4]</sup>。

禽流感病毒(Avian influenza virus, AIV),直径 80~120 nm,呈球形或丝状体等多种形态<sup>[5]</sup>。根据

收稿日期: 2010-04-25

基金项目: 国家“973”计划专项(2005CB523200)

作者简介: 邬成业(1981-),男,河南信阳人,在读硕士,主要从事细胞生物学研究工作。

通讯作者: 张改平(1960-),男,河南内黄人,研究员,博士,博士生导师,中国工程院院士,主要从事病毒与分子免疫学研究。

AIV 囊膜表面的血凝素 (HA) 可分为 16 个 HA 亚型 根据神经氨酸酶 (NA) 又可将其分为 10 个亚型<sup>[5]</sup>。AIV 的 HA 和 NA 蛋白易变异,但其核衣壳蛋白 (NP) 却相对保守<sup>[6]</sup>,AIV 为单股负链 RNA 病毒,由 8 个独立的 RNA 节段组成<sup>[7,8]</sup>,编码 10 个基因,其中第 5 节段 RNA 编码的是禽流感病毒核衣壳蛋白 (NP)。NP 是分子量约为 60 kDa 的单体磷酸化的多肽,是构成核衣壳的主要成分,具有型特异性,其抗原性差异是流感病毒分型的依据之一。同时,NP 也是一种多功能蛋白质,在病毒基因组的转录和复制中及确定病毒的宿主特异性等方面发挥作用。它还能诱导机体的细胞免疫,对同型病毒有一定的交叉反应性,NP 基因的遗传变化可作为流感病毒分子进化和分类的基础<sup>[9]</sup>。本研究克隆了 NP 基因,并对原核表达的重组 NP 蛋白进行了抗原性分析,旨在为 AIV 抗原快速检测研究以及 NP 蛋白组分的亚单位疫苗的开发奠定基础。

## 1 材料和方法

### 1.1 材料

含禽流感病毒 (A/chicken/Henan/01/2004 (H5N1)) NP 基因的质粒 pMD19T-NP、感受态 *E. coli* JM109、*E. coli* Rosetta 和原核表达载体 pET32a 均由河南省动物免疫学重点实验室保存。T4 DNA 连接酶、限制性内切酶 *Hind* III、*Xho* I 以及 PCR 相关试剂盒购自大连宝生物工程有限公司,禽流感标准阳性血清购自哈尔滨兽医研究所。

### 1.2 方法

1.2.1 NP 基因表达引物设计 根据 H5N1 亚型禽流感病毒 NP 序列 (GeneBank: FJ784779),设计并合成了一对表达引物。上游引物: 5'-CTTAAGCTTATATG-GCGTCTCAGGGCACCAAC-3',下游引物: 5'-GT-GCTCGAGAATTGTCATACTCCTCTGCATTGTC-3'。上下游分别引入 *Hind* III *Xho* I 酶切位点(下画线)。

1.2.2 NP 基因的分子进化分析 将克隆有 H5N1 亚型禽流感病毒 NP 基因的 pMD19T-NP 载体,送至上海生工生物工程技术有限公司测序。将测序获得的 NP 基因全序列与 NCBI 核酸数据库上已登陆的不同地区的 10 个 H5N1 亚型禽流感病毒 NP 基因进行序列比对,并利用 MEGA3.1 软件采用 NJ 方法进行分子进化分析。

1.2.3 NP 基因重组表达质粒的构建 以重组质粒 T-NP 为模板,扩增 NP 基因片断,经 *Hind* III、*Xho* I 酶切后,装入同酶切的 pET32a 载体,构建成原核表达载体 pET32a-NP,然后转化大肠杆菌 *E. coli*

JM109,对克隆子进行菌落 PCR 鉴定。鉴定正确的阳性克隆子经扩大培养提取质粒后用 *Hind* III、*Xho* I 进一步进行酶切鉴定。

1.2.4 NP 基因诱导表达 重组质粒 pET32a-NP 转化大肠杆菌感受态细胞 *E. coli* Rosetta,构建可诱导表达 NP 基因的工程表达细菌。培养至对数生长期,加入 IPTG (0.5 mmol/L) 诱导 5 h 后,对诱导表达的 NP 重组蛋白进行 SDS-PAGE 分析。

1.2.5 重组 NP 蛋白的纯化和鉴定 在确定目的蛋白得到表达后,对表达蛋白进行可溶性分析。参照 Novageng 公司镍柱纯化操作说明对 NP 蛋白进行纯化,SDS-PAGE 电泳后,利用半干转膜仪转印至硝酸纤维素 (NC) 膜上,用抗 His 标签的单克隆抗体对重组 NP 蛋白进行 Western-Blot 鉴定。

1.2.6 重组 NP 蛋白的免疫原性分析 以纯化的 NP 重组蛋白为抗原包被酶标板,每个稀释度重复 3 孔,以禽流感标准阳性血清作一抗进行 ELISA 检测,以未做任何免疫的健康鸡的血清作为阴性对照。比较 OD<sub>450</sub> 值,以阳性血清 OD<sub>450</sub> 平均值  $\geq 2$  倍阴性血清 OD<sub>450</sub> 平均值,将其判定为阳性结果。

## 2 结果与分析

### 2.1 NP 基因的分子进化分析

对 11 条 H5N1 亚型禽流感病毒 NP 基因编码区序列进行了分子系统进化分析,结果见图 1。由图可见,H5N1 基因进化主要有 2 个大分枝。England CY015122、HongKong AF255744、Guangdong AF144303、Korea AF 156411 处于一个分枝,Henan FJ784779、Henan FJ784780、clone NP、South Kalimantan GQ122572、Viet Nam AY651499、Egypt CY041293 在同一分枝,克隆的 NP 基因(clone NP)与河南 H5N1 亚型 Henan FJ784779、Henan FJ784780 亲缘关系最近,可能有共同的祖先。

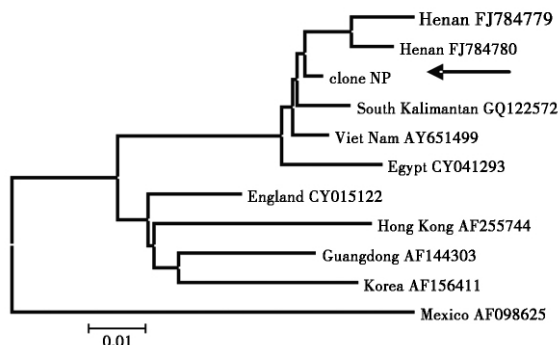
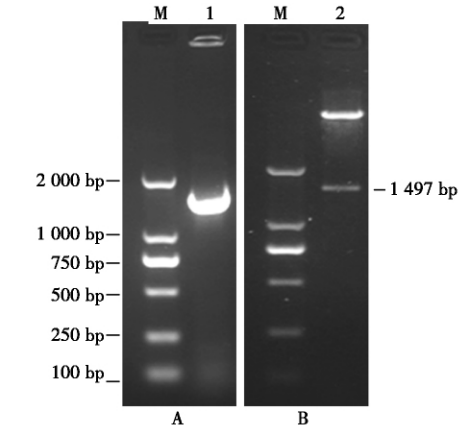


图 1 基于 NP 基因核苷酸序列的分子系统进化树

Fig. 1 A phylogenetic tree based on NP genes nucleotide sequences

2.2 pET32a-NP 重组表达质粒的鉴定结果

重组载体 pET32a-NP 的 PCR 鉴定结果显示,在 1 497 bp 处有清晰的 PCR 条带,与预期结果相符,结果见图 2-A。*Hind* III 和 *Xho* I 酶切图谱正确,结果见图 2-B。表明重组表达质粒 pET32a-NP 构建成功。



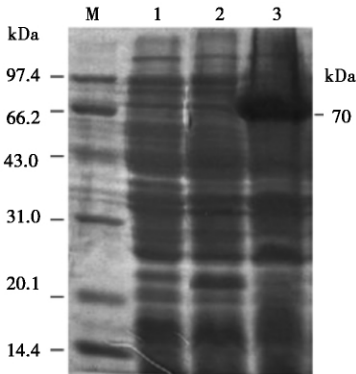
M. DNA Marker(2 000 bp) ; 1. *NP* 基因特异性片段;  
2. 重组质粒 *Hind* III、*Xho* I 酶切结果。  
M. DL2000 DNA Marker; 1. *NP* genes amplified by PCR;  
2. pET32a-NP with *Hind* III and *Xho* I .

图 2 重组表达质粒 pET32a-NP 的菌落  
PCR 分析及酶切结果

Fig. 2 Colony PCR analysis and identification of  
recombinant expression plasmid pET32a-NP

2.3 表达产物的电泳鉴定结果

将空菌、空载体及重组菌经 IPTG 诱导表达后 12% SDS-PAGE 电泳,结果见图 3。pET32a 表达的蛋白分子量约 70 kDa,与理论值相符,且表达蛋白以可溶性形式存在,经 alpha-Im ager 软件分析,表达量达到 40%。



M. 低分子量蛋白质 Marker; 1. 空菌 Rosetta;  
2. pET32a 空载体; 3. IPTG 诱导的 pET32a-NP。  
M. Low molecular weight protein Marker; 1. Control of Rosetta;  
2. Expressed product of normal pET32a; 3. pET32a-NP induced by IPTG.

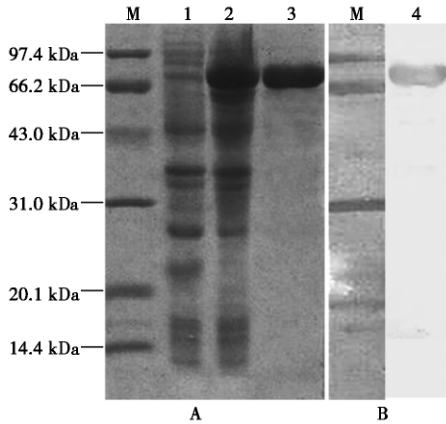
图 3 表达蛋白的 SDS-PAGE 电泳图谱

Fig. 3 SDS-PAGE detection of protein expressed in *E. coli*

2.4 NP 融合蛋白的纯化与 Western-Blot 鉴定

在测序证实重组质粒阅读框架(ORF)正确和无碱基突变的基础上,由原核表达载体 pET32a 表达的 NP 重组蛋白在其 N 端融合了多聚组氨酸

(6 × His) 标签,将 NP 融合蛋白经 Ni 亲和层析柱纯化获得高纯度 NP 重组蛋白,结果见图 4-A。以抗 His 标签的单抗为一抗,HRP 标记兔抗鸡 IgG 为二抗进行 Western-Blot 分析,结果显示,表达的 NP 重组蛋白带与抗 His 标签的单抗发生了特异性免疫反应, NP 重组蛋白大小约 70 kDa,与预期大小一致,结果见图 4-B。结合测序结果可知, NP 重组蛋白获得了正确表达。



M. 低分子量蛋白质 Marker; 1. 空载体对照菌 pET32a-Rosetta; 2. 未纯化的重组蛋白; 3. 纯化后的重组蛋白; 4. 重组蛋白的 Western-Blot。  
M. Low molecular weight protein Marker; 1. Expressed product of normal pET32a-Rosetta; 2. Expressed NP recombinant protein before purification; 3. Purified NP recombinant protein; 4. Western-Blot of recombinant protein after purification.

图 4 表达产物的纯化和 Western-Blot 检测

Fig. 4 Western-Blot analysis of the expressed protein

2.5 间接 ELISA 检测结果

以纯化的 NP 重组蛋白作为抗原包被酶标板,禽流感标准阳性血清为一抗进行 ELISA 检测,以 OD<sub>450</sub> 值 ≥ 阴性对照 OD<sub>450</sub> 值 2 倍以上判定为阳性,其中阳性值高于 0.5,阴性值低于 0.2,结果如图 5 所示。从图中可以看出,表达蛋白测定的标准阳性血清效价超过了 1:12 800,与标准阴性血清无交叉反应,说明表达的蛋白有很强的特异性。

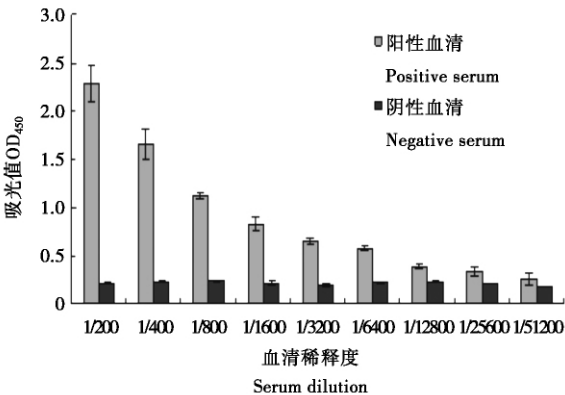


图 5 NP 重组蛋白的间接 ELISA 检测结果

Fig. 5 Results of indirect ELISA test of NP protein

### 3 讨论

AIV 的 NP 具有种群和型特异性, NP 在不同亚型流感病毒(包括 H5N1 亚型)间具有高度的保守性,是诱导细胞毒性 T 淋巴细胞(CTL)反应的主要抗原,至少含有 3 个独立的抗原位点,主要通过诱导细胞免疫反应来保护机体免受病毒攻击。用提纯的 NP 免疫动物能够使之产生抗感染能力,针对 NP 的单克隆抗体能抑制病毒 RNA 的体外转录。因此,高度保守的 NP 是研究通用流感疫苗的理想抗原。已有研究证明, NP 是 A 型流感病毒宿主特异性的决定因素之一,且 NP 被认为是病毒与宿主之间的接合蛋白或受体蛋白<sup>[10]</sup>。此外,在流感病毒复制过程中, NP 主要定位于细胞核内,降低了其免疫原性<sup>[11]</sup>。NP 蛋白 N 端和位于第 320~350 位氨基酸的核定位信号(NLS)在核定位中起关键作用,缺失和突变其 N 端或 NLS 可使 NP 主要表达在细胞质中,减少在细胞核中的分布。

本研究克隆得到一个包括完整的开放阅读框的 1 497 bp 大小的片段,序列比对结果表明,与 GenBank 登陆毒株 FJ784780 只有 4 bp 的不同。DNASTAR 软件分析显示,该蛋白有 498 个氨基酸,分子量 56.32 kDa,等电点 9.34。通过 SDS-PAGE 和 Western-Blot 试验,可以看到在 70 kDa 处有一条带,与预期的结果相符合,表明成功地在大肠杆菌 Rosetta 中表达了 NP 蛋白,另外,分子系统进化树也显示了 clone NP 与河南的另外 2 个毒株(FJ784780、FJ784779)在进化上具有相似性。

本试验在大肠杆菌 Rosetta 中表达了 NP 蛋白,并利用生物信息学方法分析了该蛋白的一些分子特征,纯化后的蛋白经 Western-Blot 和 ELISA 检测,结果表明该蛋白具有良好的免疫活性和较高的反应特异性,可作为抗原用来检测 NP 特异性抗体,这为研究 NP 的免疫原性、NP 抗原表位的筛选及含 NP 蛋白组分的亚单位疫苗的开发奠定了基础。

### 参考文献:

- [1] 傅生芳,独军政,常惠芸,等. 禽流感病毒的分子生物学研究进展[J]. 动物医学进展, 2005, 26(5): 22-24.
- [2] Alexander D J. A review of avian influenza in different bird species [J]. Veterinary Microbiology, 2000, 74: 3-13.
- [3] 袁建琴,高斌站. 一株 H9N2 型禽流感病毒全基因的序列分析[J]. 河南农业科学, 2007(6): 118-121.
- [4] Yuen K Y, Chan P K, Peiris M, et al. Clinical features and rapid viral diagnosis of human disease associated with avian influenza A H5N1 virus [J]. Lancet, 1998, 351: 467-471.
- [5] Pavoni E, Flego M, Dupuis M, et al. Selection, affinity maturation, and characterization of a human scFv antibody against CEA protein [J]. BMC Cancer, 2006, 6: 41-46.
- [6] Shibaguchi H, Kuroki M. Cloning and sequencing of variable region cDNA of a novel human monoclonal antibody to carcino-embryonic antigen, and generation of a single chain variable fragmented antibody [J]. Anticancer Res, 2004, 24: 3355-3360.
- [7] 张改平,李清州,郝慧芳,等. H5N1 亚型禽流感病毒神经氨酸酶基因的表达及纯化[J]. 华北农学报, 2008, 23(5): 107-110.
- [8] 李清州,郝慧芳,王丽,等. H5N1 亚型禽流感病毒血凝素(HA)基因的表达及纯化[J]. 河南农业科学, 2008(8): 127-129.
- [9] Pertmer T M, Oran A E, Moser J M, et al. DNA vaccines for influenza virus: differential effects of maternal antibody on immune responses to hemagglutinin and nucleoprotein [J]. J Virol, 2000, 74(17): 7787-7793.
- [10] 李斌,周晓巍. H5N1 型禽流感病毒核蛋白 C 端缺失削弱核蛋白间的相互作用[J]. 生物技术通讯, 2009, 20(1): 19-21.
- [11] Kodihalli S, Kobasa D L, Webster R G. Strategies for inducing protection against avian influenza A virus subtypes with DNA vaccines [J]. Vaccine, 2000, 18: 2592-2599.