

禽流感病毒 H5N1 血凝素蛋白的重组牛痘病毒表达

谌 资¹, 郑煜煌¹, Yipu Lin²

(1 中南大学湘雅二医院, 湖南 长沙 410011; 2 WHO Influenza Collaborating Centre, National Institute for Medical Research, NW7 1AA, London, UK)

[摘要] 目的 研究 H5 I151F 和 H5 I151F + A134V + E186D 两种氨基酸变异对血凝素蛋白(HA) 与人受体结合的影响, 并获得该 HA。方法 构建载体 pRB21', 共感染/转染 vp37⁻ 牛痘病毒 vRB12 和 pRB21', 基因同源重组牛痘病毒表达 HA, Western 免疫印迹法鉴定。结果 获得了克隆有 H5 HA 全长基因片段的载体 pRB21', 构建了 2 种重组牛痘病毒 re-VV H5 I151F 和 re-VV H5 I151F + A134V + E186D, 且能在被感染细胞膜表达这两种 HA。结论 首次通过构建重组牛痘病毒成功表达了禽流感病毒 H5N1 的 H5 HA, 为进一步研究禽流感病毒人传人的可能性奠定了基础。

[关键词] 禽流感病毒; H5N1 亚型; 血凝素蛋白; 重组牛痘病毒; 传染病

[中图分类号] R511.7 Q754 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1671-9638(2009)03-0150-05

Avian influenza virus H5N1 hemagglutinin proteins expressed by recombinant vaccinia viruses

CHEN Zi¹, ZHENG Yu-huang¹, Yipu Lin² (1 The Second Xiangya Hospital, Central South University, Changsha 410011, China; 2 WHO Influenza Collaborating Centre, National Institute for Medical Research, NW7 1AA, London, UK)

[Abstract] **Objective** To require hemagglutinin (HA) proteins for the study on the relationships between two kinds of amino acid alterations (H5 I151F, H5 I151F + A134V + E186D) and human receptor binding characteristics. **Methods** Vector pRB21' was constructed, vp37⁻ vaccinia virus vRB12 and pRB21' were co-infected and transfected. Recombinant vaccinia viruses (re-VV) were generated through homologous recombination, expressing HA proteins, which were identified with Western Blotting. **Results** The vector pRB21' within full length of H5 HA segments were obtained. Two kinds of HA proteins (re-VV H5 I151F, re-VV H5 I151F + A134V + E186D) were expressed by recombinant vaccinia viruses. **Conclusion** For the first time recombinant vaccinia viruses were generated to express hemagglutinin of the avian influenza virus subtype H5N1, which pave the way for further studying the possibilities of human to human transmission caused by avian influenza viruses.

[Key words] avian influenza viruses; subtype H5N1; hemagglutinin; recombinant vaccinia viruses; infectious diseases

[Chin Infect Control, 2009, 8(3): 150-154]

禽流感病毒表面的血凝素与宿主细胞受体结合的特异性为其感染人树立了一道屏障。但是 H5N1 已经跨越了宿主屏障, 从家禽直接感染人。截至 2009 年 4 月 8 日, 已经在 15 个国家确诊了 417 例人患禽流感 H5N1 病例, 死亡 257 例, 病死率高达 61.63%^[1]。血凝素蛋白(HA)的氨基酸变异如何影响与受体结合, 一直是流感病毒的研究热点。

HA 受体为宿主细胞表面糖蛋白和糖脂末端的唾液酸(Sialic Acid, SA)。SA 主要以 α -2,3 和 α -2,6 两种形式与半乳糖(Galactose, Gal)结合。禽流感病毒主要与前者结合, 故被称为禽受体; 人流感病毒主要与后者结合, 故被称为人受体^[2]。Menno de Jong 发现 H5N1 也发生了受体结合特性的变化, 使禽流感病毒能感染人; 他们通过基因测序比对发现 HA

[收稿日期] 2009-04-15

[作者简介] 谌资(1980-), 女(汉族), 湖南省安化县人, 中英联合培养博士研究生, 主要从事流感病毒学研究。

[通讯作者] 郑煜煌 E-mail: yhz2006@yahoo.com.cn

发生了 3 种突变: I151F、A134V 和 E186D (注: 此文中有关 H5N1 HA 编号均基于 H5 氨基酸序列, 其他则为 H3 序列编号)。实验提示, 这 3 个位点突变对于禽流感病毒 H5N1 打破宿主屏障, 由感染家禽到感染人起着重要作用。为了从 HA 晶体结构水平阐述这些位于或临近 HA 受体结合部位的氨基酸变异对 HA 受体结合功能的影响如何, 以及是否能够验证其中某个或某些氨基酸变异是 H5N1 禽流感病毒获得特异性结合人受体的关键所在, 我们必须获得高度纯化且足量的 HA。

1 材料与方法

1.1 材料 本研究中所使用的病毒株均为反向遗传学流感病毒, HA 基因均源于病毒株 VN1194 [A/Vietnam/1194/04 (H5N1)], 且经过基因改造去除了 HA 多碱性氨基酸裂解部位 (Polybasic Cleavage Site), 从而能够在二级生物安全 (Biological Safety Level-2, BSL-2) 实验室操作; 其他 7 个基因 (PB2、PB1、PA、NP、NA、M、NS) 均来自于病毒株 PR8 [A/Puerto Rico/8/34 (H1N1)], 均受赠于 Dr Yipu Lin (WHO Influenza Collaborating Centre, NIMR, UK)。vp37⁻ 牛痘病毒——vRB12 由 Dr Barry Ely (Parasitology, NIMR, UK) 惠赠。表达人乳头瘤样病毒 (HPV) E4 蛋白的重组牛痘病毒 (re-VV) 由 Dr Kenneth Raj (Virology, NIMR, UK) 惠赠。含有 H5 I151F 全段基因的质粒 pHW2000 由 Dr Yipu Lin (WHO Influenza Collaborating Centre, NIMR, UK) 惠赠。感受态细胞为商业化 *E. coli* 来源的 XL10-Gold Ultracompetent 细胞 (美国 Stratagene 公司), BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing 试剂盒 (美国 Applied Biosystems 公司), 紫外分光光度仪 (型号 ND-1000, 美国 NanaDrop 公司)。

1.2 方法 分离纯化重组牛痘病毒的实验方法简单且阳性率高, 不需要特殊的细胞系、试剂或特殊的染色方法, 只需要通过普通的蚀斑形成试验就可以达到目的^[3]。本研究使用的 vRB12 和空载体 pRB21 即为满足以上要求的牛痘病毒突变株 (vp37⁻ 牛痘病毒) 和载体质粒。

1.2.1 载体 pRB21' 的构建 将 H5 I151F 基因片段克隆到空载体 pRB21 中, 克隆引物 Hind III Forward: 5' - TATAAGCTTAGCAAAAGCAGGGG - 3'; BamH I Reverse: 5' - ATAGGATCCAGTAGAAACAAGGGTGT TTTT - 3'。下划线部分

为 Hind III 和 BamH I 酶切识别序列, 下划线之后的部分为扩增病毒 HA 基因片段的特异性序列。用 Taq DNA 聚合酶和有保真翻译功能的 Tgo DNA 多聚酶 (Expand High Fidelity PCR System Kit, 罗氏公司) 扩增 HA 基因片段。聚合酶链反应 (PCR) 产物经 GFX PCR DNA Purification Kit (GE Healthcare) 柱式纯化, NanoDrop 紫外分光光度仪定量检测。GFX 割胶法纯化 HA DNA 插入片段以及去磷酸化的线性 pRB21, 去掉各种酶和缓冲液中的离子。酶联反应后的质粒转染到 XL10-Gold Ultracompetent 细胞。用 QIAprep Miniprep 试剂盒 (Qiagen) 提取质粒。双酶切 (Hind III/BamH I) 鉴定阳性克隆 pRB21', 并进行基因测序, Staden 软件包汇编分析。

1.2.2 共感染/转染 vRB12 和 pRB21' 重组牛痘病毒 实验前新鲜分装的 CV-1 细胞在 6 孔板中接近长满, 分布均匀。5% FBS DMEM 培养液清洗细胞一遍, 以 MOI 为 2 的 vRB12 感染细胞, 37°C 二氧化碳 (CO₂) 培养箱中培育 1 h。将共约 240 μL 的 pRB21' - 脂质体混合物转移至 7 mL Bijou 管 (Sterilin) 中, 加入 3 mL Opti-MEM, 用移液器混合均匀。37°C 5% CO₂ 培养箱中培育 4 h, 真空泵吸尽接种液, 用 5% FBS DMEM 培养液清洗细胞 2 遍, 加入 3 mL/孔 5% FBS DMEM 培养液, 培养 2~3 d。每天观察 CPE, 与细胞对照相比, 24 h 内常可见到感染/转染成功的 CV-1 细胞的 CPE: 变圆变小。

1.2.3 重组牛痘病毒的蚀斑筛选 准备好新鲜分装的接近长满的 CV-1 细胞 6 孔板。轻刮细胞, 收集细胞混悬液, 反复冻融 3 次, 超声波震裂 5 min。用 PBS 溶液作 10 倍序贯稀释 (1 mL/管)。从 10⁻³ 开始, 将每毫升病毒稀释液逐滴分散地加入 6 孔板中培育 1~2 h。真空泵吸去 1 mL 接种的病毒液, 用不含血清的 VGM (Sigma) 将细胞清洗 2 次, 再将事先配好的营养琼脂混合液以 3 mL/孔的量沿孔壁加入到单层细胞上, 室温静置 30 min 后琼脂凝固, 置于 37°C 5% CO₂ 培养箱中培养 2 d。24~48 h 后即可在显微镜下或透过光线观察到蚀斑形成。

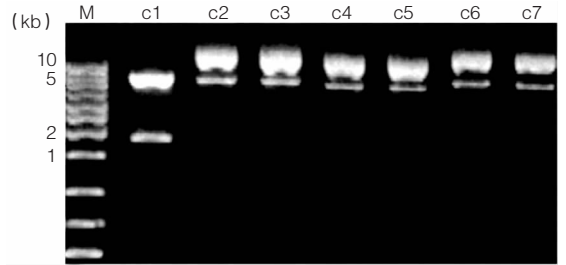
1.2.4 Western 免疫印迹法鉴定蚀斑 根据样本数量选择合适规格的预制胶 NuPAGE 4.2% Bis-Tris Gel, 在 2 块胶板所隔成的中间区域中加 200 mL 新鲜配制的 MES SDS Running Buffer, 中间区域的外周带加满每次跑胶后回收的 Running Buffer。为了判断抗体孵育蛋白检测结果, 每组实验加 20 μL 纯化的流感病毒阳性对照和细胞阴性对照。

150V 电压电泳 60 min(Bio-Rad 电泳仪)。通过转膜、封闭、一抗孵育、二抗孵育后,立即加入新鲜配制的 ECL Western 印迹检测试剂(GE Healthcare),被激活的化学发光被 LAS-3000 成像系统(Fuji film)检测到并成像。PVDF 膜经 0.1% 考马斯亮蓝染色显示蛋白条带。

2 结果

2.1 阳性克隆菌的双酶切(Hind III 和 BamH I)鉴定 酶联反应后,用超级感受态细胞 XL10-Gold Supercompetant Cells 转化质粒,振荡培养,以 Qia-gen 小剂量质粒提取试剂盒提取质粒,双酶切反应释放插入的 HA 片段(约 1.8 kb)及 pRB21 载体(约 4.5 kb),筛选阳性克隆菌。见图 1。

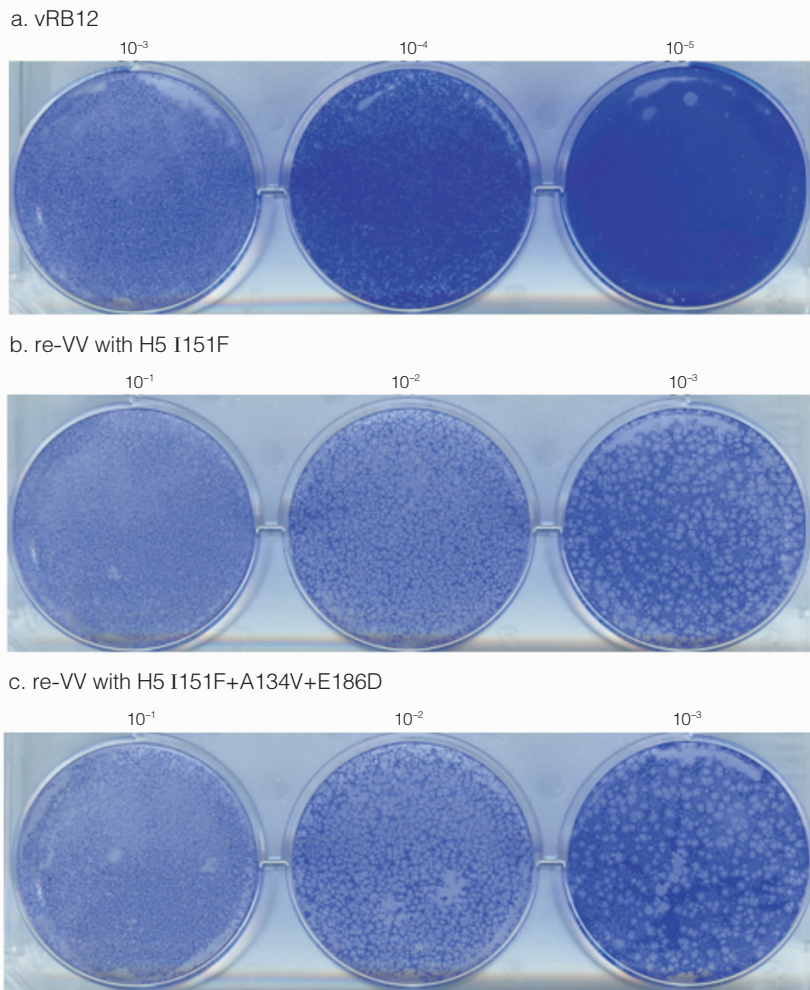
2.2 重组牛痘病毒(re-VV)的蚀斑筛选 vRB12 病毒难以形成蚀斑,或者要相对较长的时间(如 3~5 d)形成微小蚀斑;re-VV 能够在较短时间内(1~2 d)形成较大的蚀斑。见图 2。



c1~c7:挑取的 7 个克隆菌;c1 经双酶切后电泳显示 2 个条带: pRB21(约 4.5 kb)和 HA(约 1.8 kb),为阳性克隆;其余 6 个均为阴性

图 1 双酶切(Hind III 和 BamH I)鉴定阳性克隆

Figure 1 Identification of positive clone by Hind III/BamH I double digestion



a: vRB12 形成的微小蚀斑;b 与 c: 两种 re-VV 均形成较大蚀斑,有些地方有融合

图 2 vβ37 基因缺陷型牛痘病毒 vRB12 与重组牛痘病毒 re-VV H5 I151F 和 re-VV H5 I151F + A134V + E186D 形成的蚀斑比较
Figure 2 Plaque comparison between vβ37 defective vaccinia virus vRB12 and recombinant vaccinia viruses (re-VV) H5 I151F and H5 I151F + A134V + E186D

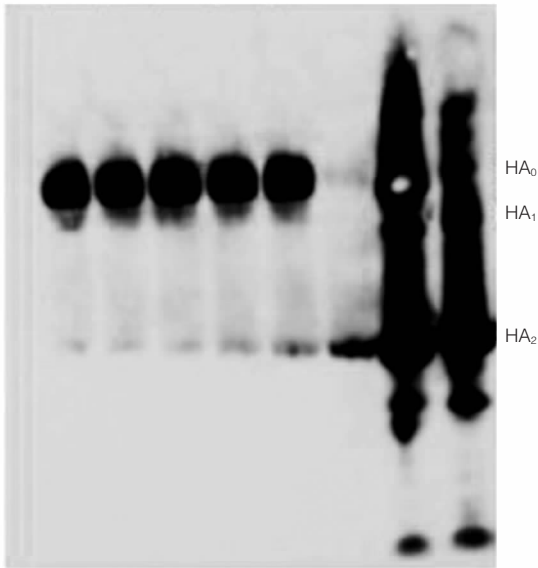
2.3 Western 印迹鉴定重组牛痘病毒表达的 H5 HAs 所用一抗为“雪貂抗 H5 HA/NA 高免血清”(由 Dr Patrick J Collins, NIMR, UK 提供) 1:500

稀释;二抗为“辣根过氧化酶标记的蛋白 A”(Bio-RaD), 1:1 000 稀释。

2.4 PVDF 膜考马斯亮蓝染色 见图 4。

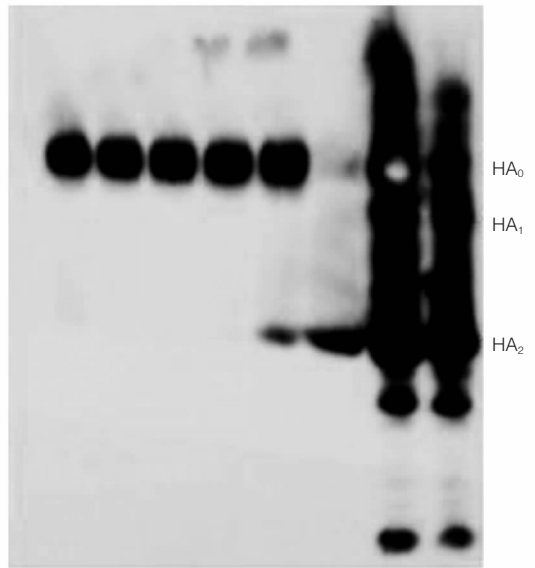
a. re-VV with H5 I151F

p1 p2 p3 p4 p5 - + +



b. re-VV with H5 I151F+A134V+E186D

p1 p2 p3 p4 p5 - + +

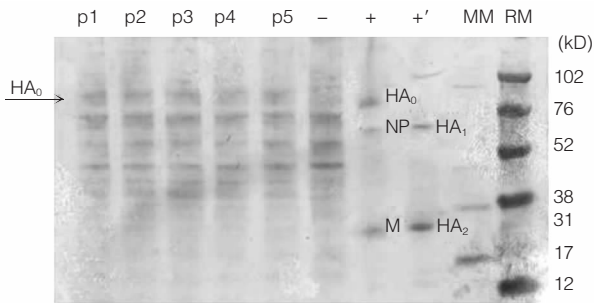


a: 从左至右, re-VV H5 I151F 的 5 个蚀斑 p1~p5 均为阳性;“-”设立细胞作为阴性对照;“+”用纯化的遗传学病毒 RG VN1194 E186D 作为阳性对照,第 1 个“+”显示与蚀斑印迹平齐的条带为非还原的 HA 前体 HA₀(80 kD),第 2 个“+”显示 HA₀ 经 β-巯基乙醇(β-Mercaptoethanol, 2BME)还原成 HA₁(55 kD)和 HA₂(25 kD);P1 等标本虽然也经 2BME 处理,但因为这些 HAs 是通过 re-VV 表达的,缺乏如 M2 离子通道等流感病毒蛋白协助 HA 发生翻译后修饰、裂解及构型改变,故不能被还原成 HA₁ 和 HA₂ 两个片段

b: 从左至右, re-VV H5 I151F + A134V + E186D 的 5 个蚀斑 p1~p5 均为阳性;“-”为阴性对照,感染 CV-1 细胞的是表达人乳头样瘤病毒(HPV)E4 蛋白的 re-VV;2 个阳性对照同 a

图 3 重组牛痘病毒所表达 HA 的 Western 印迹

Figure 3 Western blots of HA expressed by recombinant vaccinia viruses



图中的 p1~p5 同图 3 中 a,代表由 5 个 re-VV 形成的蚀斑样本,蓝色箭头所指为 HA₀ 蛋白,其余条带为杂质蛋白,如 CV-1 细胞蛋白及 re-VV 所表达的其他蛋白;“+”为未还原的病毒蛋白,从上至下 3 条带分别表示 HA₀、核蛋白(NP)和基质蛋白(M);“+”表示经 2BME 还原后的 HA₁、HA₂;“MM”代表 Magic Marker (20~220 kD, Invitrogen),“RM”代表“Rainbow Marker”(12~225 kD, GE Healthcare),上样 5 μL, SDS-PAGE 蛋白电泳后,从上至下条带颜色排列为“蓝、黄、紫、蓝、橙、绿、蓝、红”,代表不同的分子量大小,如图右侧标示

图 4 PVDF 膜的考马斯亮蓝染色蛋白印迹

Figure 4 Coomassie Brilliant Blue staining of protein blots in PVDF membrane

3 讨论

流感病毒与不同宿主细胞表面受体结合的匹配磨合,造成了 HA 的持续变异,主要发生在 HA 受体结合部位(Receptor Binding Site, RBS)及邻近氨基酸位点^[4]。禽流感病毒 H5N1 血凝素突变,使之对禽受体的亲和力下降并主要结合人受体,是 H5N1 能够感染人的分子基础^[5]。H5N1 亚型禽流感病毒不断感染哺乳动物及人类,使它的 HA RBS 发生与人受体结合的改变^[6]。

禽流感病毒 H5N1 还没有获得人流感病毒基因,缺乏有效的人群中传播能力^[7-8]。而且禽流感病毒 H5N1 与人流感病毒 H3N2 基因重组的反向遗传学病毒,并不能使这种病毒的传播能力得到增强^[9]。所以禽流感病毒 H5N1 可能另外需要发生某个或某些基因突变,才能使 H5 受体结合特点转

变成结合人受体 SA α 2、6Gal,从而具备成为大流行病毒株的先决条件^[10]。这一假设似乎顺理成章,而且除了上述本研究重点讨论的 3 个 H5 HA 氨基酸变异,Shinya 等^[11]还发现 VN1194 H5 Q192R 病毒突变株能够加强 H5 HA 与 SA α 2、6Gal 结合的能力,H5 S223N 却无此作用,而且 Q192R + S223N 变异株能够比单一 Q192R 结合 SA α 2、6Gal 的作用还要更强。因此,他们认为 H5 的 192 氨基酸位点可能是使 H5N1 受体结合特点转化的潜力位点。

A134V 和 E186D 是位于 H5 HA 受体结合部位的氨基酸,与唾液酸受体相互作用,关系密切。发生在这两个位置的氨基酸变异,可能直接影响 H5 HA 的受体结合特点,使 H5 HA 更倾向于结合人受体。151 位点位于 190-螺旋和 130-环之间,共同构成受体结合部位“口袋”的右缘,与唾液酸分子的位置相当邻近。而且从氨基酸分子结构来讲,异亮氨酸(Ile D)是一种非极性支链氨基酸,苯丙氨酸(Phe F)是一种非极性芳香氨基酸,两者的空间构象差异较大。在一个重要的位置换一种差别较大的氨基酸,可能对 HA 与受体结合产生比较明显的影响。

H5 A134V 和 H5 E186D 均通过反向遗传学方法重组流感病毒,并用传统鸡胚尿囊培育法获得。而 F151 不能在鸡胚中稳定表达,鸡胚传代后变成了 L151,故我们构建重组牛痘病毒,在被感染细胞膜表面表达这两种 HA;H5 I151F 和 H5 I151F + A134V + E186D。下一步,需要在细胞内大量扩增这两种重组牛痘病毒,并从细胞膜提纯 HA,最后通过 HA-人/禽受体模拟复合物晶体的 X 线衍射,从蛋白结构解析功能,即氨基酸变异对受体结合宿主特异性改变的影响。还可以用纯化的 HA 进行多聚糖微阵列分析(Glycan Microarray),比较这些有单个或多个氨基酸变异的 HA 对不同受体结合能力的大小。本实验为进一步研究禽流感病毒人传人的可能性奠定了理论基础。

[参 考 文 献]

- [1] WHO. Cumulative number of confirmed human cases of avian influenza A/(H5N1) reported to WHO [EB/OL]. [2009-04-08]. http://www.who.int/csr/disease/avian_influenza/country/cases_table_2009_04_08/en/index.html.
- [2] Matrosovich M N, Matrosovich T Y, Gray T, *et al.* Human and avian influenza viruses target different cell types in cultures of human airway epithelium [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2004, 101(13):4620-4624.
- [3] Blasco R, Moss B. Selection of recombinant vaccinia viruses on the basis of plaque formation [J]. *Gene*, 1995, 158(2): 157-162.
- [4] Skehel J J, Wiley D C. Receptor binding and membrane fusion in virus entry: The influenza hemagglutinin [J]. *Annu Rev Biochem*, 2000, 69: 521-569.
- [5] Stevens J, Blixt Ola, Tumpey T M, *et al.* Structure and receptor specificity of the hemagglutinin from an H5N1 influenza virus [J]. *Science*, 2006, 312(5772):404-410.
- [6] Stevens J, Blixt Ola, Chen L M, *et al.* Recent avian H5N1 viruses exhibit increased propensity for acquiring human receptor specificity [J]. *J Mol Biol*, 2008, 381(5):1382-1394.
- [7] Bridges C B, Lim W, Hu-Primmer J, *et al.* Risk of influenza A (H5N1) infection among poultry workers, Hong Kong, 1997-1998 [J]. *J Infect Dis*, 2002, 185(8):1005-1010.
- [8] Katz J M, Lim W, Bridges C B, *et al.* Antibody response in individuals infected with avian influenza A (H5N1) viruses and detection of anti-H5 antibody among household and social contacts [J]. *J Infect Dis*, 1999, 180(6):1763-1770.
- [9] Maines T R, Chen L M, Matsuoka Y, *et al.* Lack of transmission of H5N1 avian-human reassortant influenza viruses in a ferret model [J]. *Proc Natl Acad Sci*, 2006, 103(32): 12121-12126.
- [10] Matrosovich M, Tuzikov A, Bovin N, *et al.* Early alterations of the receptor-binding properties of H1, H2, and H3 avian influenza virus hemagglutinin after their introduction into mammals [J]. *J Virol*, 2000, 74 (18):8502-8512.
- [11] Yamada S, Suzuki Y, Suzuki T, *et al.* Haemagglutinin mutations responsible for the binding of H5N1 influenza A viruses to human-type receptors [J]. *Nature*, 2006, 444(7117):378-382.

中华临床医师杂志(电子版)征稿、征订

由中华人民共和国卫生部主管,中华医学会主办,中华医学电子音像出版社出版的中华临床医师杂志(电子版)ISSN 1674-0785 CN 11-9147/R 于 2007 年正式创刊,月刊,以光盘附纸质导读形式面向全国公开发刊,邮发代号:80-728。本刊为《万方数据——数字化期刊群》全文上网期刊,《中国核心期刊(遴选)数据库》《中文科技期刊数据库(全文版)》《中国学术期刊网络出版总库》收录期刊。

主要栏目:述评、专家笔谈、临床研究、实验研究、综述、临床经验、病例报告等。本刊特色栏目:(1)讲座(视频);(2)外科手术案例分析(视频);(3)影像及电生理诊断典型图像分析(动态图像)。欢迎投稿!

2009 年度,本刊将陆续刊出 24 个重点栏目,每期包含 5-10 个精品视频。同时,本刊特别邀请北大第一医院录制病例讨论系列视频。其内容详实,图像清晰,全部由临床一线名家主讲,是广大临床医师难得的学习资料。欢迎订阅!

投稿邮箱:北京市 100035-50 信箱 编辑部收 邮编 100035 电子邮件:Lcdoctor@163.com

电话:010-62219211 传真:010-62234701 网址:www.clinicmed.net