

# 禽流感病毒 H<sub>5</sub>N<sub>1</sub> 基因的克隆, 表达及转基因烟草的获得

陈亮, 肖平, 张军, 韩冬丽, 杜海莲, 夏宁邵

(厦门大学生物学系, 厦门 361005)

禽流感病毒 H<sub>5</sub>N<sub>1</sub> 为甲型禽流感病毒 (A/HongKong/156/97), 血凝素亚型为 H<sub>5</sub>, 神经氨酸酶亚型为 N<sub>1</sub>, 它是一种可以直接传染人体的禽流感病毒, 1997 年从一个因流感导致死亡的三岁小孩的气管组织中分离获得。由于人体缺乏针对它的免疫力, 人们担心其可能导致流感的大暴发, 曾在香港引起了社会的极大关注。本研究的主要目的: ①表达 H<sub>5</sub>N<sub>1</sub> 的基因片段, 进一步用于诊断和研制疫苗; ②利用植物表达 H<sub>5</sub>N<sub>1</sub> 的基因片段, 探索植物基因工程在预防病毒性流行病中的应用。

根据 H<sub>5</sub>N<sub>1</sub> cDNA 序列, 设计引物, FVF; 5' - CAGGTTGACACAATAATGG - 3'; 和 FVR; 5' - CCCGTAAGGGGCTACCA - 3'。以 H<sub>5</sub>N<sub>1</sub>Rt-PCR 产物 (由香港大学吴文翰教授馈赠) 为模板进行扩增。扩增片段 (约 800bp) 经回收, 补平后插入 pGEX-20T 的 SmaI 位点, 构建 pGEX-20T-H<sub>5</sub>N<sub>1</sub> 表达质粒, 并转化 E.coli BL21。但是, 可能因为合成引物的问题, 未能检测到 pGEX-20T-H<sub>5</sub>N<sub>1</sub> 的表达蛋白。利用 PCR 扩增片段上游约 200 bp 处 EcoRI 位点, 切下 pGEX-20T-H<sub>5</sub>N<sub>1</sub> 中部分 H<sub>5</sub>N<sub>1</sub> 片段, 插入 pGEX-5X-1 构建表达质粒 pGEX-5X-H<sub>5</sub>N<sub>1</sub>, 转化 E.coli BL21 后, 预期的约 40 kD 的蛋白获得了表

达。经过三代筛选出表达稳定且产量较高的工程菌株进行大量表达。表达蛋白主要以包含体形式存在。用国际流感中心提供的 4 株 H<sub>5</sub>N<sub>1</sub> 单克隆抗体进行 Western-blotting 分析, 结果呈阳性, 说明我们纯化的蛋白的确是 H<sub>5</sub>N<sub>1</sub> 基因所表达的蛋白, 并且具有免疫学活性。目前已将纯化的 H<sub>5</sub>N<sub>1</sub> 蛋白免疫小鼠。

从 pGEX-5X-H<sub>5</sub>N<sub>1</sub> 中用 EcoRI 切下 H<sub>5</sub>N<sub>1</sub> 片段插入到 CAMBIA1301 (含有 GUS 基因和潮霉素抗性基因, 由华中农业大学张启发教授馈赠。) 载体, 转化农杆菌 LBA4404。取珊西烟无菌苗叶片与农杆菌在 MS 基本培养基上, 26~28℃ 暗培养 2 d, 感染叶片经洗涤后转到 MS + KT2 mg/L + IAA 0.2mg/L + 羧苄青霉素 300 mg/L + 潮霉素 30 mg/L 培养基上, 26~28℃, 光照 12 d 进行培养, 约两周后可见叶片边缘长出小芽。经继代, 取 GUS 检测显阳性植株的中片抽提 DNA, 以质粒 pGEX-20T-H<sub>5</sub>N<sub>1</sub> 的 EcoRI 酶切片段探针, 进行斑点杂交, 在检测的烟草植株中 90% 呈阳性, 说明 H<sub>5</sub>N<sub>1</sub> 的基因片段已插入到了烟草基因组中, Southern-blotting 和表达蛋白的检测工作正在进行中, 另外转化百脉根和胡萝卜的工作也正在进行中。

## 牛泡沫病毒内部启动子的克隆、结构和功能分析

张莉, 乔文涛, 王金忠, 刘淑红, 耿运琪, 陈启民

(南开大学生命科学学院, 天津 300071)

牛泡沫病毒 (Bovine Foamy Virus, BFV) 基因组全长 12.0 kb, 除编码 gag, pol, env 3 个结

构基因外, 在 env 与 3' LTR 之间存在 2 个重叠的开放阅读框架 ORF-1, ORF-2。其中 ORF-