

文章编号:1008-7826(2009)03-0134-05

H5N1 亚型禽流感病毒 M2 的修饰表达及其免疫原性分析

张国广^{1,2}, 邹金美¹, 张辉煌², 董美², 陈亮²

(1. 漳州师范学院 生物科学与技术系, 福建 漳州 363000; 2. 厦门大学 生命科学学院, 福建 厦门 361005)

摘要: 禽流感的发生不仅会造成禽类的大量死亡, 而且也严重地威胁着人类健康, 接种疫苗是控制禽流感发生的主要措施之一. M2 基因的保守性使其成为基因工程亚单位疫苗的目标抗原. 本研究将 M2 基因的跨膜区删除后, 构建原核表达载体 pET32a- Δ M2, IPTG 诱导后, 收获的细菌总蛋白 SDS-PAGE 电泳结果表明修饰的 M2 基因在原核表达系统中得到高效表达, 表达蛋白以可溶性形式存在, Western 杂交和动物免疫结果表明重组蛋白具有抗原性和免疫原性. 本研究结果为利用 M2 重组蛋白开发具有交叉保护作用的禽流感疫苗奠定了基础.

关键词: 禽流感病毒; M2 基因; 抗原性

中图分类号: Q939.47; S852.65⁺9.5

文献标识码: A

Expression of Modified H5N1 Avian Influenza Virus M2 Gene and the Recombinant M2 Protein Immunogenicity Assay

ZHANG Guo-guang^{1,2}, ZOU Jin-mei¹, ZHANG Hui-huang², DONG Mei², CHEN Liang²

(1. (Department of Biological Science and Technology, Zhangzhou Normal University, Zhangzhou, Fujian 363000, China;
2. School of Life Sciences, Xiamen University, Zhangzhou, Fujian 363000, China)

Abstract: The present vaccination is one of main strategy for control of avian influenza virus that critically threatened human health. Recent investigations of subunit component vaccine focused on M2 gene because M2 gene possessed a highly structurally conserved property among influenza viral strain. In this study, the recombinants prokaryotic expression plasmid pET32a- Δ M2 harboring the deletion of the transmembrane segment of M2 gene was constructed. SDS-PAGE electrophoresis showed that modified M2 gene was highly expressed as fusion protein in a soluble form after genetic modified *E.coli* BL21(DE3) bacteria were induced with IPTG. The fusion protein of M2 possessed antigenicity and immunogenicity properties by Western Blotting analysis of fusion protein with standard antibody against M2(H5N1) and mouse vaccination of purified fusion protein respectively. The results laid a foundation of further study on the development of cross-protection avian influenza vaccine.

Key words: avian influenza virus; matrix2 gene; immunogenicity

1 引言

禽流感病毒 (Avian Influenza Virus, AIV) 属于正粘病毒科、流感病毒属、A 型流感病毒^[1]. 1997 年之前 AIV 只在禽类中发生和流行, 国际兽医局动物流行病组织和我国《家畜家禽防疫条例》都将禽流感列为 A 类烈性传染病. 1997 年香港 AIV (H5N1 亚型) 突破种间屏障, 直接感染人并导致 6 人死亡事件的发生^[2], 使得对该病毒的研究在公共卫生学上具有更大的意义.

AIV 是分节段的 RNA 病毒, 基因组由 8 条负链 RNA 所组成, 该病毒第 7 段 RNA 转录成的共线性 mRNA 分别编码基质蛋白 M1 和离子通道蛋白 M2^[3]. M2 蛋白分子质量较小, 约为 11 ku, 由 97 个氨基酸残基构成, 是构成禽流感病毒囊膜纤突的蛋白成分之一, 其 N 端 24 个氨基酸残基构成囊膜外区域, 19 个氨基酸残基为跨膜区, C 端 54 个氨基酸残基组成胞质尾位于病毒颗粒内部. 尽管 AIV 的血清型亚型很多, 病毒变异频繁,

收稿日期: 2008-12-19

基金项目: 福建省科技厅重点项目(2009N0051); 福建省教育厅 A 类科技项目(JA09168).

作者简介: 张国广(1973-), 男, 河南省遂平县人, 博士, 讲师. 通讯作者: 陈亮, 教授, 博导, E-mail: chenlg@xmu.edu.cn

但M1和M2蛋白的氨基酸序列高度保守^[4,5], 文献报道M2蛋白的N端24个氨基酸残基(膜外区)与一些大分子相连接^[6,7]或M2蛋白单独表达^[8,9]均能诱导机体产生M2蛋白特异性中和抗体. M2蛋白的抗体能够抑制禽流感病毒的复制, M2蛋白也能诱导机体的细胞免疫反应, 产生免疫保护, 并且这种保护具有较好的亚型间交叉保护能力^[6,9,10]. 鉴于M2蛋白对于研制禽流感病毒新型长效、广谱疫苗具有重要意义, 本研究报道了利用原核表达系统对一株分离自福建的鸡源H5N1亚型禽流感病毒M2基因进行修饰表达, 并对表达产物免疫原性进行分析的结果.

2 材料与方法

2.1 菌株、载体及试剂

pMD18-M(包含有H5N1亚型禽流感病毒完整的M1和M2基因), 大肠杆菌DH5 α , 表达菌株BL21(DE3), 原核表达载体pET32a(由本实验室保存). Pyrobest DNA聚合酶及内切酶等购自大连宝生物工程有有限公司, HisLinkTM蛋白纯化树脂购自Promega公司(产品编号: V8821), 兔抗H5N1-M2抗体购自北京博奥森生物(产品编号: bs-0344R), HRP标记的羊抗兔IgG购自华美生物, 其它所用试剂均为分析纯.

2.2 引物设计

参照已发表的H5N1亚型禽流感病毒M2基因全长序列, 设计合成4条引物:

P1: 5-GGCAAGCTTGCATGAGTCTTCTAACCGAGGTCGAAACGCCTACCAGAAACGA
ATGGGAG-3;

P2: 5-GGCCTCGAGTTACTCCAATTCTATGTTGAC-3;

P3: 5-GATAAATGCAAGGATCACTTGAATCGCTG-3;

P4: 5-CAAGTGATCCTTGCATTTATCGTCGCCTTA-3

引物P1和P2扩增完整的M2基因. 为克隆入原核表达载体pET32a, P1和P2两端分别设计了相应酶切位点. P1与P3配合扩增M2基因的膜外区, P2与P4配合扩增M2基因的胞内区, 其中P3和P4引物中有21个碱基互补.

2.3 M2基因的获得及缺失跨膜区的M2基因原核表达载体构建

用P1和P2从pMD18-M中扩增出M2全长基因, 用P1和P3引物从pMD18T-M质粒中扩增出M2基因膜外区, P2与P4扩增出膜内区. 将扩增出的膜外区和胞内区产物用10 g/L的琼脂糖凝胶电泳, 紫外灯下切出含特异目的片段的凝胶块, 凝胶回收试剂盒回收DNA片段, 将回收的膜外区和膜内区等比例混合作为模板, 以P1和P2为引物扩增出缺失跨膜区的M2基因, 将扩增出的缺失跨膜区的M2基因用HindIII和Xho I双酶切后凝胶回收, 然后与同样双酶切的pET32a载体连接, 连接产物热激转化DH5 α 感受态细胞、涂氨苄青霉素抗性平板, 将从抗性平板上挑取的白色克隆摇菌、提取质粒, 然后进行PCR和酶切鉴定, 鉴定为阳性的克隆送上海英骏生物公司测序, 测序正确的克隆命名为pET32a- Δ M2.

2.4 重组M2基因的诱导表达及蛋白纯化

将测序正确的pET32a- Δ M2质粒热激转化表达菌株BL21(DE3)中, 挑取阳性克隆, 再次经PCR和酶切鉴定后将构建好的表达菌株接种于氨苄青霉素抗性LB液体培养基中, 37 $^{\circ}$ C, 170 r/min振荡培养至OD₆₀₀=0.5~0.6, 加入IPTG至终浓度为0.8 mmol/L, 诱导M2基因表达, 同时设计不诱导对照. 诱导4 h后离心收获菌体, 用15% SDS-PAGE电泳检测蛋白表达情况.

将重组表达菌株接种于50 mL抗性LB液体培养基中培养, IPTG诱导4 h后收获菌体, 用5 mL PBS重悬, 超声波处理细胞重悬液至清亮, 4 $^{\circ}$ C, 12000 r/min离心10 min, 分别收获沉淀和上清液, SDS-PAGE

电泳检测表达蛋白的存在形式. 蛋白纯化按照 Promega 公司 HisLink 蛋白纯化树脂操作手册进行. 纯化蛋白定量采用 Bradford 法, 用购自上海生工生物公司的试剂盒(产品号: SK3031) 进行.

2.5 Western blotting 分析

将经过 IPTG 诱导表达蛋白和未诱导菌体蛋白进行 SDS-PAGE 电泳, 电泳结束后将蛋白电转移至尼龙膜, 分别以兔抗(H5N1) M2 抗体作为第一抗体, 以 HRP 偶联的羊抗兔 IgG 作为二抗进行 Western blotting 分析, 一抗和二抗分别用封闭液(溶解于 TBST 溶液的 5% 脱脂奶粉) 稀释, 具体操作步骤参考文献 11.

2.6 动物免疫及抗体效价检测

首次免疫将纯化的融合蛋白 Δ M2 与弗氏完全佐剂等体积混合, 采用皮下多点注射法免疫 5-6 周龄雌性 BALB/c 小鼠, 每只小鼠免疫纯化蛋白量为 50 μ g. 每隔 2 周加强一次, 连续加强 3 次, 加强免疫时纯化蛋白 50 μ g 与不完全弗氏佐剂均匀混合. 末次免疫后 1 周眼眶采血分离血清, 血清置于 -80 $^{\circ}$ C 保存备用. M2 特异性抗体检测采用 Dot-ELISA 法^[11], 抗体效价定为能发生阳性颜色反应的血清最大稀释倍数. 检测包被抗原采用提取的禽流感病毒 H5N1 型灭活疫苗的总蛋白, 蛋白制备方法参照文献 12.

3 结果与分析

3.1 缺失跨膜区的 M2 基因扩增及 pET32a- Δ M2 鉴定

引物对 P1 与 P3、P2 与 P4 分别扩增 M2 基因的膜外区和膜内区, 然后以 P1 和 P2 为引物, 凝胶回收的膜外区和胞内区为模板扩增出缺失了跨膜区的 M2 基因(见图 1a), M2 跨膜区缺失构建过程及缺失的氨基酸序列见图 2. 修饰的 M2 基因片段和 pET32a 双酶切后回收、连接、转化 DH5 α , 挑取阳性克隆, 阳性克隆 PCR 及双酶切鉴定结果见图 1b, PCR 产物大小及双酶切后产生的小片段大小与预期的缺失跨膜区的 M2 基因大小相符合, 测序验证后表明所得到的表达载体 pET32a- Δ M2 将 M2 基因的跨膜区删除(共缺失 72 bp, 缺失片段中包含 M2 跨膜区), 膜外区和膜内区连接后保持了正确的读码框架.

3.2 融合蛋白的表达及蛋白可溶性表达分析

含重组质粒 pET32a- Δ M2 的表达宿主菌 BL21(DE3) 经 0.8 mmol/L IPTG 诱导培养 4 h 后, 收获菌体, 诱导表达产物 SDS-PAGE 电泳结果见图 3, 与对照相比, 诱导的重组菌株裂解蛋白在约 28 ku 处出现表达的外源蛋白条带(图 3 箭头所指), 该蛋白分子质量大小与预期 Δ M2 基因和 pET32a 载体引导肽基因融合蛋白的分子质量一致, 表明缺失跨膜区的 M2 基因在大肠杆菌中得到了表达, 薄层扫描结果表明其表达量约占菌体总蛋白的 25%.

诱导表达的菌体细胞经超声波破碎菌体, 离心分离上清与沉淀后, SDS-PAGE 电泳结果表明上清中含有大量的目的蛋白, 沉淀中较少存在, 表达蛋白主要以可溶性形式存在. 用 Hislink 蛋白纯化树脂进行蛋白纯化效果

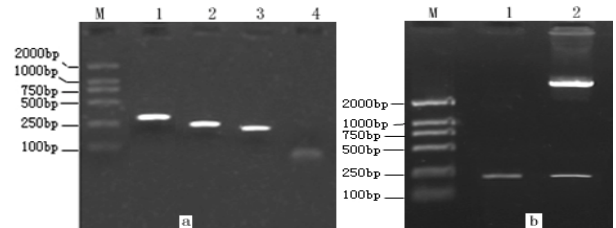


图 1 PCR 产物 (a) 及重组质粒 PCR 和酶切鉴定图 (b)
a: 1、M2 全长基因扩增产物, 2、缺失跨膜区的 M2 基因扩增产物, 3、膜内区的扩增片段, 4、膜外区的扩增片段;
b: 1、PCR 鉴定产物, 2、重组质粒 *Hind*III 和 *Xho*I 双酶切鉴定结果, M、Takara DL2000 DNA 分子质量标准

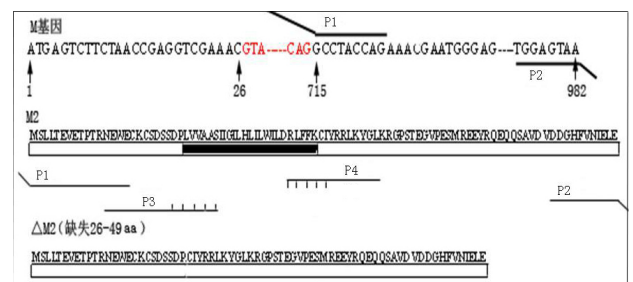


图 2 跨膜区缺失的 M2 基因构建示意图

M 基因中 1~26 位核苷酸, 715~982 位核苷酸为 M2 基因的外显子; M2 的全长氨基酸组成中 27~46 为该蛋白的跨膜序列, 缺失的跨膜区序列为 LVVAASIIIGI LHLILWILD RLFFK.

见图 3。

3.3 缺失跨膜区 M2 蛋白的免疫原性分析

用兔抗 H5N1 亚型禽流感病毒 M2 蛋白抗体作为一抗, 对转移至尼龙膜上的重组蛋白进行 Western 杂交分析结果见图 4, 在纯化蛋白和诱导表达菌体总蛋白泳道约 28 ku 处有一特异性杂交信号, 而未诱导表达的菌体总蛋白中没有相应的信号反应, 表明缺失跨膜区的 M2 基因在原核表达系统中正确表达, 表达出的缺失跨膜区的 M2 蛋白能与标准 M2 抗体特异性结合, 具有完整 M2 蛋白的抗原性。

3.4 抗血清中 M2 抗体效价分析

小鼠终免后 7 天眼眶采血并分离血清, 用提取的灭活 H5N1 病毒总蛋白包被尼龙膜, 应用 Dot-ELISA 方法进行 M2 特异性 IgG 效价检测, 结果本研究中表达的 M2 融合蛋白免疫小鼠后产生的抗 M2 蛋白抗体几何平均效价为 1:13000, 表明小鼠免疫融合蛋白后产生的血清能够与禽流感病毒总蛋白中的 M2 发生免疫反应, 该融合蛋白具有较好的免疫原性。

4 讨论

一直以来禽流感病毒基因工程亚单位疫苗研究的焦点都集中在病毒囊膜外壳的两个糖蛋白 HA 和 NA 上, 基于这两个蛋白研制的基因工程疫苗也在控制禽流感的发生中发挥了很大作用, 但这两个基因不断发生的基因漂移 (drift) 和基因转换 (shift) 也使得人们为了维持疫苗的保护效果, 耗费了大量的人力和财力来及时分离、鉴定当前流行株的基因结构, 预测可能发生的毒株突变, 且基于 HA 和 NA 研制的疫苗一般不具有亚型间交叉保护能力, 上述因素使不少研究人员对流感病毒囊膜上的第三个蛋白—M2 蛋白投入了研究, 与 HA 和 NA 基因相比, M (M1 和 M2) 基因是高度保守的^[4,5], 且 M2 基因在不同亚型之间同源性也相当高^[13]。尽管 M2 蛋白只是流感病毒粒子中的一个小蛋白, 病毒颗粒上的数量也较少, 但仍然能够在感染 A 型流感病毒的人和雪貂的血清中检测到 M2 蛋白特异性抗体^[14], 研究还发现针对 M2 蛋白的抗体可以抑制流感病毒在培养细胞和小鼠体内的复制^[15,16], 进一步的研究表明 M1 和 M2 蛋白能诱导机体的细胞免疫, 还具有一定的亚型间交叉保护能力^[6,9,10]。这些研究结果使人们认识到 M2 蛋白也是流感病毒的保护性抗原之一, 是具有交叉保护能力的“通用”流感疫苗研究的候选抗原。

在 A 型流感病毒中, M2 蛋白的翻译后修饰是非必需的^[17], 适合原核表达系统的翻译后无修饰的特点。但在基于 M2 的基因工程亚单位疫苗的研究中发现, M2 全长基因在原核和真核中表达, 产生的 M2 蛋白均定位到宿主细胞的细胞膜上, 并具有离子通道的活性, 能够改变细胞内的离子浓度和 pH 值, 从而对宿主细胞产生毒性, 因而在常用的表达系统中很难表达全长的 M2 基因^[18]。迄今在原核系统中表达的 M2 基因均将该基因的疏水跨膜区缺失后才能有效表达^[9,19], 而文献 9 和 19 中所采用的原核表达载体均为 Pharmacia 公司的 pGEX 系列载体, 为方便纯化及帮助表达, 该系列载体在多克隆位点前融合有谷胱甘肽 S-转移酶 (GST) 基因, 但 GST 自身较大 (26 ku), 且蛋白表达时要形成一定的构像, 一定程度上会屏蔽与其融合表达的蛋

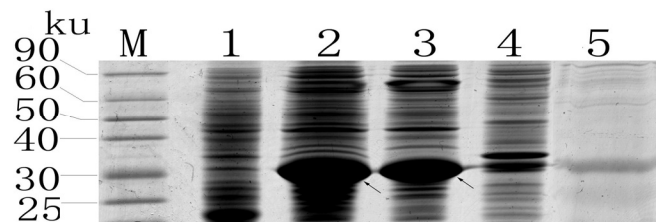


图 3 Δ M2 蛋白的原核表达和纯化

1、pET32a- Δ M2 载体 (已转化 BL21 (DE3) 菌株) 未加入 IPTG 诱导; 2、加入 IPTG 诱导 4 h 的全菌体总蛋白; 3、IPTG 诱导 4 h 的菌体经超声波处理后离心上清电泳结果; 4、超声波处理沉淀电泳结果; 5、纯化蛋白电泳结果; M、低分子量蛋白质量标准

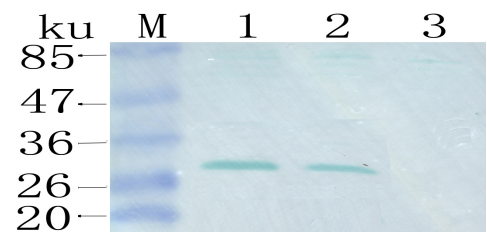


图 4 原核表达的 M2 蛋白的抗原性分析

1、纯化的 Δ M2 蛋白杂交信号; 2、IPTG 诱导表达 4 h 菌体总蛋白杂交信号; 3、阴性对照 (未诱导菌体总蛋白); M、预染蛋白分子量标准

白表位, 从而影响目的蛋白的免疫原性^[9]。在本研究中采用的原核表达载体为 Novagen 公司的 pET32a, 其多克隆位点前是一些多聚组氨酸标签, 在表达时一般不会形成特定的构像, 对目的蛋白的抗原性影响不大, 本研究利用 pET32a 载体将基因修饰后的 M2 在 BL21 (DE3) 原核细胞中进行了高效表达, 表达出的融合蛋白大量存在于超声波处理后的菌体上清中, 有利于利用亲和层析技术进行目的蛋白的纯化, 获得的缺失跨膜区的 M2 重组蛋白具有天然 M2 蛋白的免疫原性, 小鼠免疫血清能够识别禽流感病毒总蛋白中的 M2 蛋白。本研究的结果为利用 M2 重组蛋白开发具有交叉保护作用的禽流感疫苗奠定了基础。

参考文献:

- [1] 甘孟侯. 禽流感[M]. 北京: 中国农业出版社, 1999.
- [2] SUBBARAO K, KLIMOV A, KATZ J, et al. Characterization of an avian influenza A (H5N1) virus isolated from a child with a fatal respiratory illness[J]. *Science*, 1998, 279(16): 393-396.
- [3] RUIGROK R W H. Structure of Influenza A, B and C Virus in "Textbook of Influenza"[M]. London, Blackwell Science Ltd. 1998.
- [4] LAMB R A, LAI C J. Conservation of the influenza virus membrane protein (M1) amino acid sequence and an open reading frame of RNA segment 7 encoding a second protein (M2) in H1N1 and H3N2 strains[J]. *Virology*, 1981, 112 (2): 746-751.
- [5] ITO T, GORMAN O. T., KAWAOKA, Y., et al. Evolutionary analysis of the influenza A virus M gene with comparison of the M1 and M2 proteins[J]. *Journal of Virology*, 1991, 65: 5491-5498.
- [6] NEIRYNCK S, TOM D, XAVIER S, et al. A universal influenza a vaccine based on the extracellular domain of the M2 protein[J]. *Nature Medicine*, 1999, 5(10): 1157-1163
- [7] MOZDZANOWSKA K, FENG J, EID M, et al. Induction of influenza type A virus-specific resistant by immunization of mice with a synthetic multiple antigenic peptide vaccine that contains ectodomains of matrix protein 2[J]. *Vaccine*, 2003, 21(19-20): 2616-2626
- [8] SLEPUSHKIN V A, KATA J M, BLACK R A, et al. Protection of mice against influenza A virus challenge by vaccination with baculovirus-expressed M2 protein[J]. *Vaccine*, 1995, 13(15): 1399-1402.
- [9] FRACE A M, KLIMOV A I, THOMAS R, et al. Modified M2 proteins produce heterotypic immunity against influenza A virus[J]. *Vaccine*, 1999, 17: 2237-2244.
- [10] KENJI O, IHATA A, SETSUKO W, et al. Protective immunity against influenza A virus induced by immunization with DNA plasmid containing influenza M gene[J]. *Vaccine*, 2001, 19: 3681-3691.
- [11] SAMBROOK J, FRITSCH E F, MANJATID T. Molecular cloning[M]: A laboratory Manual. 2nd ed, New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989.
- [12] 史喜菊. 牛 IFN- α/γ 基因的克隆、表达及重组蛋白的应用研究[D]. 北京: 中国农业大学博士论文, 2004.
- [13] Wanli Liu, Hua Li, Ying-Hua Chen. N-terminus of M2 protein could induce antibodies with inhibitory activity against influenza virus replication [J]. *FEMS Immunology and Medical Microbiology*, 2003, 34: 141-6.
- [14] BLACK R A, ROTA P A, GORODKOVA N, et al. Antibody response of M2 protein of influenza A virus expressed in insect cells [J]. *Journal of General Virology*, 1993, 74: 1673-1677.
- [15] ZEBEDEE S L, LAMB R A. Influenza A virus M2 protein: monoclonal antibody restriction of virus growth and detection of M2 in virions[J]. *Journal of Virology*, 1988, 62: 2762-2772.
- [16] TREATOR J J, TIERNEY E L, ZEBEDEE S L, et al. Passively transferred monoclonal antibody to the M2 protein inhibits influenza A virus replication in mice[J]. *Journal of Virology*, 1990, 64: 1375-1377.
- [17] HOLSINGER L J, SHAUGHNESSY M A, MICKO A, et al. Analysis of the posttranslational modifications of the influenza virus M2 protein [J]. *Journal of Virology*, 1995, 69: 1219-1225.
- [18] BLACK R A, ROTA P A, GORODKOVA N, et al. Production of the M2 protein of influenza A virus in insect cells is enhanced in the presence of amantadine[J]. *Journal of General Virology*, 1993, 74: 1733-1737.
- [19] 李永清, 杨敬, 韦莉, 杨汉春. 禽流感病毒 M2 基因在原核系统中的表达及其抗原性分析[J]. *畜牧兽医学报*, 2005, 36(7): 739-743.

[责任编辑: 喻玉萍]