

H3N2 流感病毒非结构蛋白-1 真核表达载体的构建与表达及其对 293T 细胞增殖的影响

迟莹^{1,2}, 卞倩^{1*}, 李燕¹, 张文帅¹, 温恬¹, 焦永军¹

(¹江苏省疾病预防控制中心病原微生物研究所, 卫生部肠道病原微生物重点实验室, 江苏 南京 210009; ²南京医科大学江苏省现代病原生物学重点实验室, 江苏 南京 210029)

[摘要] 目的: 构建甲型 H3N2 流感病毒非结构蛋白-1(nonstructural-1, NS1) 真核表达载体并表达其编码蛋白; 探讨 NS1 对细胞增殖的影响。方法: 从江苏省甲型 H3N2 流感病毒毒株提取病毒 RNA, 采用 RT-PCR 技术扩增 NS1 全长基因, 将其克隆至 pMD18-T Simple Vector 中构建 pMD18-T/NS1 质粒, 双酶切 pMD18-T/NS1 与 pXJ40-HA 后, 构建真核表达载体 pXJ40-HA-NS1, 经酶切及测序鉴定后将质粒转染到 293T 细胞中, 通过免疫印迹法鉴定 NS1 蛋白的表达。3-(4,5-二甲基噻唑-2)-2,5-二苯基四氮唑溴盐[3-(4,5)-dimethylthiaziazolo(-z-y1)-3,5-di-phenyltetrazolium bromide, MTT]法检测 NS1 转染细胞后对细胞增殖的影响。结果: 经双酶切、测序鉴定证实 NS1 基因的真核表达载体构建成功; 免疫印迹法证实 NS1 蛋白的表达。MTT 法证实转染 NS1 质粒后对细胞增殖有抑制作用。结论: 成功克隆了 NS1 全长基因, 构建了其真核表达载体, 并初步验证了 NS1 蛋白过表达后能抑制细胞的增殖, 该表达载体的构建为后期建立稳定表达 NS1 的细胞模型和 NS1 蛋白对细胞增殖和凋亡作用机制的进一步研究提供了基础。

[关键词] H3N2 流感病毒; 非结构蛋白-1 基因; 克隆; 真核表达; 细胞增殖

[中图分类号] Q785

[文献标识码] A

[文章编号] 1007-4368(2012)01-040-05

Cloning and eukaryotic expression of non-structural protein-1 of a human influenza virus subtype H3N2 and the effect of non-structural protein-1 on proliferation of 293T cell

CHI Ying^{1,2}, BIAN Qian^{1*}, LI Yan¹, ZHANG Wen-shuai¹, WEN Tian¹, JIAO Yong-jun¹

(¹Institute of Pathogenic Microbiology, Jiangsu Provincial Center for Disease Prevention and Control, Key Laboratory of Enteric Pathogenic Microbiology of Health Ministry, Nanjing 210009; ²Key Laboratory of Pathogen Biology of Jiangsu Province, NJMU, Nanjing 210029, China)

[Abstract] **Objective:** To construct the full-length nonstructural-1 (NS1) gene of influenza A (H3N2) into a eukaryotic expression vector and express NS1 gene in mammalian cells, as well as to investigate the effects of NS1 on proliferation of 293T cells. **Methods:** The NS1 gene of influenza A (H3N2) was amplified by RT-PCR and cloned into pMD18-T simple vector to construct a plasmid, named pMD18-T/NS1. The pMD18-T/NS1 and the pXJ40-HA were double-digested, to yield the recombinant eukaryotic expression vector pXJ40-HA-NS1. The expression of the NS1 gene in transfected 293T cells was identified by Western blot. The effects of NS1 gene on cell proliferation were measured with 3-(4,5)-dimethylthiaziazolo(-z-y1)-3,5-di-phenyltetrazolium bromide (MTT) method. **Results:** The recombinant eukaryotic expression vector pXJ40-HA-NS1 was successfully constructed. The expression of NS1 protein was detected by Western blot. NS1 over-expression inhibited the proliferation of 293T cells. **Conclusion:** The full-length NS1 gene has been obtained and its recombinant eukaryotic expression vector has been successfully constructed. And we found that the proliferation was dramatically inhibited in 293T cells over-expressed with NS1 protein. The construction of eukaryotic expression plasmid of NS1 gene made it possible to set up the cell model expressing NS1 protein and further study the effects of NS1 protein on cell proliferation and apoptosis.

[Key words] influenza A (H3N2); nonstructural-1 gene; cloning; eukaryotic expression; cell proliferation

[Acta Univ Med Nanjing, 2012, 32(1): 040-044]

[基金项目] 江苏省现代病原重点实验室开放课题(XDBY1003); 江苏省自然科学基金资助项目(BK2009433); 江苏省卫生厅基金资助项目(Z200919); 第 39 批教育部留学回国人员科研启动基金

*通讯作者, E-mail: XiaoYing1225@163.com; bianqian@jscdc.cn

流行性感(流感)是至今无法完全加以控制的一种最常见的病毒性急性呼吸道传染病。流行性感(流感)属于正黏病毒科,分甲、乙、丙三个型别,能引起人致病的主要有甲、乙型,其中甲型流感病毒的致病力最强。根据血凝素(hemagglutinin, HA)和神经氨酸酶(neuraminidase, NA)抗原性的差异又可把甲型流感病毒(influenza virus A)分为不同的亚型。甲型流感在历史上曾多次引起大规模的世界性流行。早在 1988 年,美国就发现了甲型 H3N2 流感病毒,20 多年来,它多次在流感季节“袭击”全球,对人类健康和世界公共卫生安全已构成重大威胁,逐渐成为全球流感防控的重点病毒之一。H3N2 型流感病毒依然是 2010 年秋冬季监测到的流感病毒主要类型。只有深入了解 H3N2 流感病毒的致病机制才能真正做到对季节性流感疫情的有效防制。非结构蛋白-1(nonstructural-1, NS1)仅在流感病毒感染的细胞中大量表达,而在正常病毒粒子中不存在,同时经灭活疫苗免疫的动物也不会产生。已有研究表明,非结构蛋白及其抗体可以作为病毒感染的一个重要标记^[1]。上述特点使 NS1 蛋白在流感病毒的监测和抗病毒研究中有广阔的应用前景。本研究旨在通过对人甲型流感病毒 H3N2 亚型 NS1 基因真核表达载体的构建,以及 NS1 蛋白的表达,为其功能研究奠定基础。

1 材料与方

1.1 材料

1.1.1 试剂

PCR 试剂盒购自德国 Qiagen 公司。胶回收试剂盒购自美国 Omega 公司。*Taq* DNA 聚合酶、限制性内切酶 *Xho* I 及 *Bgl* II、DNA 连接酶试剂盒、pMD18-T Simple Vector 试剂盒、质粒纯化试剂盒、RNA 提取试剂盒均购自大连 TaKaRa 公司。Lipofectamine2000、Opti-MEM 购自美国 Invitrogen 公司。DMEM-1000 购自美国 Gibco 公司。Anti-HA antibody 购自英国 Abcam 公司。星形孢菌素(staurosporine, STS)、3-(4,5-二甲基噻唑)-2,5-二苯基四氮唑溴盐[3-(4,5)-dimethylthiazolium (-z-yl)-3,5-di-phenyltetrazolium bromide, MTT]及二甲基亚砷(DMSO)均购自美国 Sigma 公司。其他试剂均为国产分析纯。

1.1.2 病毒毒株、质粒及细胞

H3N2 流感病毒毒株为本实验室分离得到的 A/江苏下关/1305/2008。pXJ40-HA 质粒、大肠杆菌 *E.coli* TOP10 感受态细菌及 293T 细胞为江苏省疾

病预防控制中心病原微生物所保存。

1.2 方法

1.2.1 流感病毒总 RNA 的提取

参照试剂盒使用说明提取流感病毒总 RNA。

1.2.2 引物设计

根据 GenBank 中报道的甲型 H3N2 流感病毒(A/江苏下关/1305/2008)非结构蛋白 NS1 基因序列(NC_007370.1),设计上下游引物,由上海生工生物工程技术有限公司合成,序列如下:上游引物 5'-GTGCTCGAGATGGATTCCAACACTGTGTCA-3';下游引物 5'-CACAGATCTTCAAACCTTTTGACCTAGCTGT-3';引物序列下划线为 *Xho* I 和 *Bgl* II 的酶切位点。预期扩增产物为 NS1 全长基因,长度约为 660 bp。

1.2.3 RT-PCR 扩增甲型 H3N2 流感病毒 NS1 全长基因

以提取的流感病毒总 RNA 为模板扩增 NS1 全长基因,RT-PCR 体系参照试剂盒使用说明。RT-PCR 反应条件为:50 °C 30 min,95 °C 变性 15 min,然后 94 °C 30 s,58 °C 30 s,72 °C 30 s,34 个循环,最后 72 °C 延伸 30 min。1%琼脂糖凝胶电泳。

1.2.4 pMD18-T-NS1 质粒的构建

胶回收产物与 pMD18-T Simple Vector 连接,连接产物转化 *TOP10* 感受态细菌,涂板后挑选单个菌落培养扩增,提取质粒进行 PCR 及酶切鉴定,鉴定为阳性的重组质粒命名为 pMD18-T-NS1 质粒。

1.2.5 真核表达载体 pXJ40-HA-NS1 的构建

Xho I 和 *Bgl* II 分别双酶切 pMD18-T-NS1 与 pXJ40-HA 质粒,酶切产物 1%琼脂糖凝胶电泳,胶回收后连接酶切产物,连接产物转化 *TOP10* 感受态细菌,涂板后挑取单个菌落培养扩增,提取质粒进行 PCR 及酶切鉴定,鉴定为阳性的重组载体进行基因测序分析,测序正确的质粒命名为 pXJ40-HA-NS1。

1.2.6 真核表达载体 pXJ40-HA-NS1 转染 293T 细胞

将 293T 细胞常规培养于含 10%胎牛血清的 DMEM 中,于转染前 1 日收集细胞并接种于平板中,于 37 °C,5% CO₂ 培养 18~24 h,使平板中细胞汇合达 70%左右。将 pXJ40-HA-NS1 质粒转染细胞,步骤如下:在 50 ml 离心管中加入 200 μl 的 Opti-MEM 和 10 μl Lipofectamine-2000,后加入 10 μg 质粒 DNA,充分混匀,室温放置 30 min。用 Opti-MEM 清洗细胞后,加入以上混合物,37 °C 孵育 6 h;吸出混合物,以含 10% FBS 的 DMEM-1000 培养液替换。37 °C 孵育

24 h 后收集细胞。转染同时另设空载体转染对照和空白对照。

1.2.7 免疫印迹鉴定表达

SDS-PAGE 蛋白电泳后,用半干转移法将蛋白从凝胶转移到 PVDF 膜上,用 5% 的脱脂奶粉封闭。一抗为 1:500 兔抗 HA 多克隆抗体,二抗为 1:2 000 过氧化物酶标记的兔抗 IgG。用化学发光蛋白免疫印迹法(ECL)进行 Western Blot 显色分析。

1.2.8 MTT 法检测细胞增殖抑制状况

将 pXJ40-HA 空载体及 pXJ40-HA-NS1 重组质粒转染至 293T 细胞,24 h 后将未转染组、转染空载体组和转染 NS1 质粒组细胞分别按 2×10^4 个/孔接种于 96 孔板,每孔体积 150 μ l,37 $^{\circ}$ C,5%CO₂ 孵育 24 h 后加入 STS,终浓度为 0.025 μ mol/L,同时设立不加 STS 组为对照。培养 24 h 后,每孔加入 MTT 溶液 (5 mg/ml)20 μ l,37 $^{\circ}$ C,5%CO₂ 继续孵育 4 h,终止培养,小心吸去孔内培养上清,每孔加入 150 μ l 的 DMSO,振荡 10 min 后,选择 490 nm 波长,在酶联免疫检测仪上测定各孔的吸光度值,记录结果。同时用 Western blot 鉴定转染细胞中 NS1 的表达情况。

1.3 统计学方法

应用 SPSS13.0 统计分析软件进行数据统计处理,采用多因素方差分析, $P < 0.05$ 表示差异有统计学意义。

2 结果

2.1 甲型 H3N2 流感病毒 NS1 全长基因的鉴定

NS1 基因 PCR 扩增产物经 1.0% 琼脂糖凝胶电泳分析,在约 660 bp 处可见单一特异性条带,大小与 NS1 基因理论值一致(图 1)。

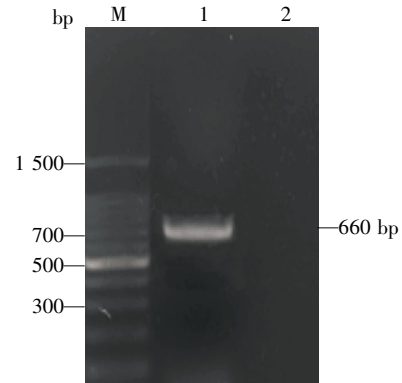
2.2 pMD18-T-NS1 质粒 PCR 及酶切鉴定

通过 T-A 连接原理将 PCR 产物与 pMD18-T Simple Vector 进行连接,产物 pMD18-T-NS1 转化感受态大肠杆菌 TOP10,挑 5 个单克隆进行 PCR 鉴定,结果 1 个为阴性,4 个为阳性(图 2)。取其中 1 个阳性克隆摇菌提取质粒,Xho I 和 Bgl II 双酶切。电泳鉴定双酶切有约 660 bp 左右的条带(图 3)。结果表明 NS1 基因片段正确克隆到载体 pMD18-T 上。

2.3 真核表达载体 pXJ40-HA-NS1 的 PCR 及酶切鉴定

从 pMD18-T-NS1 酶切回收 NS1 片段后与 pXJ40-HA 载体相连,将连接产物 pXJ40-HA-NS1 转化感受态大肠杆菌 TOP10。挑取 10 个单克隆进行

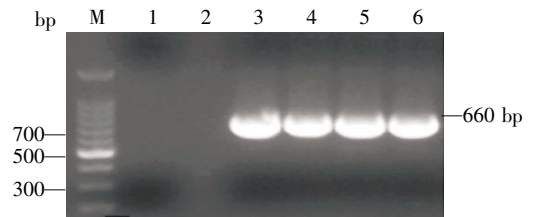
PCR 鉴定,结果 6 个为阳性,4 个为阴性(图 4)。取其中 1 个阳性克隆摇菌提取质粒用 Xho I 和 Bgl II 双酶切,电泳鉴定有约 660 bp 的目的条带(图 5)。将质粒送南京金斯瑞生物科技公司进行 DNA 测序,测序结果与 H3N2(A/江苏下关/1305/2008)中 NS1 基因序列完全一致。测序结果表明 NS1 基因序列正确克隆到载体 pXJ40-HA 上,质粒 pXJ40-HA-NS1 构建成功。



M:DNA Marker; 1:RT-PCR 产物; 2:阴性对照 (模板为水)。

图 1 RT-PCR 产物的琼脂糖电泳分析

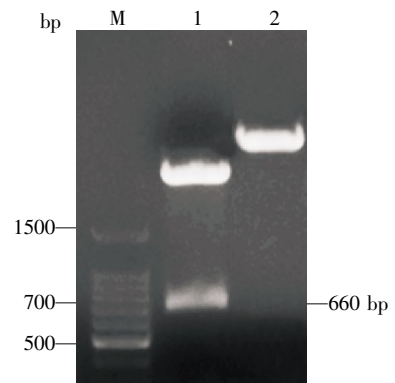
Figure 1 RT-PCR analysis of NS1 gene



M:DNA Marker; 1:阴性对照 (模板为 LB); 2~6:单克隆。

图 2 NS1 目的基因片段的 PCR 鉴定

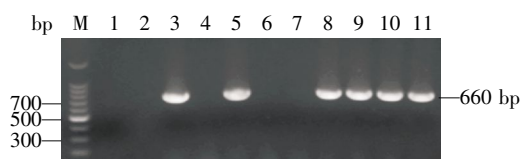
Figure 2 PCR analysis of NS1 gene



M:DNA Marker; 1:pMD18-T-NS1 双酶切; 2:pMD18-T-NS1 完整质粒。

图 3 质粒 pMD18-T-NS1 的双酶切鉴定

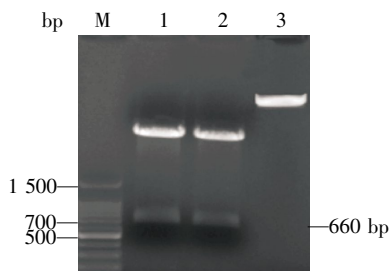
Figure 3 Double digestion analysis of pMD18-T-NS1 plasmid



M: DNA Marker; 1: 阴性对照 (模板为 LB); 2, 4, 6, 7: 阳性克隆; 3, 5, 8~11: 阳性克隆。

图 4 NS1 基因序列的 PCR 鉴定

Figure 4 PCR analysis of NS1 gene



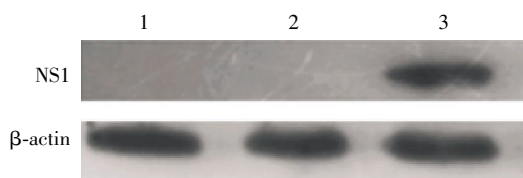
M: DNA Marker; 1, 2: pXJ40-HA-NS1 双酶切; 3: pXJ40-HA-NS1 完整质粒。

图 5 质粒 pXJ40-HA-NS1 的酶切鉴定

Figure 5 Double digestion analysis of pXJ40-HA-NS1 plasmid

2.4 Western Blot 鉴定转染结果

转染 pXJ40-HA-NS1 的 293T 细胞表达的重组蛋白可以被抗 HA 抗体所特异性识别, 其大小与预期相同(30 000), 同时空载体组与空白对照组无条带, 表明 NS1 在 293T 细胞中得到表达(图 6)。



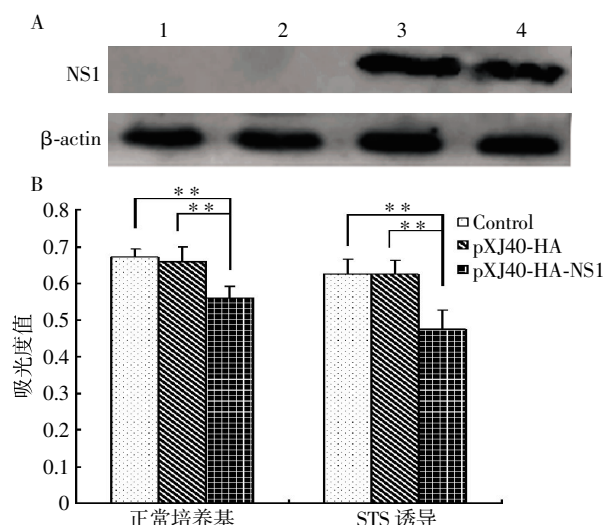
1: 未转染; 2: pXJ40-HA 空载体; 3: pXJ40-HA-NS1。

图 6 pXJ40-HA-NS1 在 293T 细胞中表达的 Western blot 分析

Figure 6 Western blot analysis of the expression product of pXJ40-HA-NS1 recombinant in 293T

2.5 MTT 法检测 pXJ40-HA-NS1 对细胞增殖的影响

MTT 法检测 H3N2-NS1 对细胞存活力的影响, 并进一步在凋亡诱导剂 STS 的作用下检测 H3N2-NS1 重组质粒的诱导细胞凋亡的作用。首先转染 293T 细胞, 运用 Western blot 验证了 pXJ40-HA-NS1 在 293T 细胞中的成功表达, 并且转染细胞在传代后也能稳定表达。MTT 检测结果显示无论在正常情况或者 STS 诱导的情况下, pXJ40-HA-NS1 转染组细胞的存活力明显低于空白细胞组 (Control 组) 及 pXJ40-HA 空载体组。统计学分析显示在不同处理下 NS1 组与 Control、Vector 组比较均有统计学意义 ($P < 0.01, n = 12$)。



A: Western blot 验证 MTT 试验中 pXJ40-HA-NS1 在 293T 细胞中的正常表达。1: 未转染; 2: pXJ40-HA 空载体; 3: pXJ40-HA-NS1 转染细胞第 1 代; 4: pXJ40-HA-NS1 转染细胞第 2 代。B: 不同处理情况下未转染 (control)、转染 pXJ40-HA 空载体及 pXJ40-HA-NS1 重组质粒对 293T 细胞存活力的影响 ($**P < 0.01, n = 12$)。

图 7 转染 pXJ40-HA-NS1 在正常情况及 STS 诱导下对 293T 细胞存活情况的影响

Figure 7 Effects of pXJ40-HA-NS1 on 293T cell viability under normal condition and STS induction

3 讨论

流感病毒的危害性极大, 全世界平均每年有 50~100 万人死于流感病毒感染。随着流感病毒表面的两种糖蛋白抗原——血凝素和神经氨酸酶不断进化, 流感病毒在人群中不断肆虐和流行。1968 年 7 月在香港首次分离到 H3N2 亚型流感病毒, 命名为 A/HongKong/68(H3N2)^[2], 其至今还是人群中流行的主要亚型。近几年, H3N2 亚型流感病毒在人群中引起了很高的致病率和死亡率, 使人们对 H3N2 亚型流感病毒的流行病学特征和致病机制更为关注^[3-5]。

甲型 H3N2 流感病毒属于正黏病毒科, 基因组由 8 个分节段的负链 RNA 组成, 编码 11 种蛋白^[6]。病毒 RNA 第 8 节段由 890 个核苷酸组成, 包含一个完整的 ORF, 在病毒复制时被翻译为一个共性 mRNA, 最终翻译为 NS1 和 NS2 两个非结构蛋白^[7]。NS1 蛋白只在病毒感染的细胞中合成, 并未被包装进病毒颗粒^[8]。在病毒感染早期即有大量 NS1 蛋白表达, 其在细胞浆合成后很快转移至核内, 并积聚在病毒感染早期的胞核内, 在感染后期则积聚于核仁中, 形成致密的晶体样包涵体, 提示 NS1 蛋白在病毒复制及早期抵抗机体的抗病毒免疫过程中具有重要作用^[9]。此外, NS1 蛋白是一个具有多种活性的调

控因子,在病毒的复制和毒力中发挥重要作用^[10]。研究提示,NS1 蛋白可诱导培养细胞的凋亡^[11-12],激活 Caspase 依赖的凋亡通路^[13-14],且 NS1 蛋白诱导的细胞凋亡具有干扰素依赖性^[15]。NS1 是除血凝素及神经氨酸酶蛋白之外的调节流感病毒致病力的重要基因。例如,用 A/HongKong/486/97(H5N1)的 NS 基因置换 H1N1 的 NS 基因后,重组 H1N1 对猪的致病能力大为提高^[16],NS1 的突变导致人禽流感病毒致病能力较其它人感染甲型流感病毒显著增强。可见,NS1 蛋白可能在破坏被感染细胞的过程中扮演着一个关键的角色,是决定流感病毒对感染细胞破坏力的重要因素。NS1 作为潜在的靶标和重要的毒力基因,已成为当前流感病毒研究中的热点。

活病毒致病机制的研究受干扰因素较多,机理较为复杂,本研究旨在以体外模型为主要研究手段探讨 NS1 蛋白的功能及其可能的致病机制。本研究用 RT-PCR 法获得甲型 H3N2 流感病毒非结构蛋白 NS1 全长基因序列,然后将其克隆到真核表达载体 pXJ40-HA 中,通过 PCR 扩增、酶切和序列测定证实重组质粒构建正确,并利用脂质体将重组质粒转染入 293T 细胞,通过免疫印迹法证实了细胞质中有特异性外源蛋白的表达,成功构建了 NS1 真核表达载体,模拟了 NS1 过表达模型,并初步验证了 H3N2-NS1 抑制细胞增殖的作用,为后期建立稳定表达 NS1 的细胞模型和进一步探讨 NS1 蛋白的功能和机制研究提供了材料和基础。

[参考文献]

- [1] 李建丽,张万坡,毕丁仁. A 型流感病毒 NS1 蛋白研究进展[J]. 微生物学报,2007,47(4):729-733
- [2] Cockburn WC, Delon PJ, Ferreira W, et al. Origin and progress of the 1968-69 Hong Kong influenza epidemic [J]. Bull World Health Organ, 1969, 41(3): 345-348
- [3] Bhat N, Wright JG, Broder KR, et al. Influenza-associated deaths among children in the United States, 2003-2004 [J]. N Engl J Med., 2005, 353(24): 2559-2567
- [4] Ghedin E, Sengamalay NA, Shumway M, et al. Large-scale sequencing of human influenza reveals the dynamic nature of viral genome evolution [J]. Nature, 2005, 437(7062): 1162-1166
- [5] Holmes EC, Ghedin E, Miller N, et al. Whole-genome analysis of human influenza A virus reveals multiple persistent lineages and reassortment among recent H3N2 viruses [J]. PLoS Biol, 2005, 3(9): 1579-1589
- [6] Parrish CR and Kawaoka Y. The origins of new pandemic viruses: The acquisition of new host ranges by canine parvovirus and influenza A viruses [J]. Annu Rev Microbiol 2005, 59: 553-586
- [7] Storch GA. Fields Virology [M]. 4th edition. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, 2001: 1487-1531
- [8] Seo SH, Hoffmann E, Webster RG, et al. Lethal H5N1 influenza viruses escape host anti-viral cytokine responses [J]. Nat Med, 2002, 8(9): 950-954
- [9] 史一博, 孙建和. A 型流感病毒 NS1 蛋白抑制 IFN 抗病毒作用的机制 [J]. 中国人兽共患病学报, 2007, 23(10): 1030-1032
- [10] Stacey SC, Naomi DS, Neumann G, et al. Influenza Virus NS1 protein induces apoptosis in cultured cells [J]. J Virol, 2001, 75(17): 7875-7881
- [11] Schultz-Cherry S, Hinshaw VS. Influenza virus neuraminidase activates latent transforming growth factor beta [J]. J Virol, 1996, 70(12): 8624-8629
- [12] Daidoji T, Koma T, Du A, et al. H5N1 avian influenza virus induces apoptotic cell death in mammalian airway epithelial cells [J]. J Virol, 2008, 82(22): 11294-11307
- [13] Lam WY, Tang JW, Yeung AC, et al. Avian influenza virus A/HK/483/97 (H5N1) NS1 protein induces apoptosis in human airway epithelial cells [J]. J Virol, 2008, 82(6): 2741-2751
- [14] 秦安, 蔡兵, 王彤, 等. 肝细胞肝癌中 survivin、caspase-3 和 NF- κ B 的表达及其相关性 [J]. 南京医科大学学报(自然科学版), 2009, 29(7): 953-957
- [15] Zhirmov OP, Konakova TE, Wolff T, et al. NS1 protein of influenza A virus down-regulates apoptosis [J]. J Virol, 2002, 76(4): 1617-1625
- [16] Seo SH, Hoffmann E, Webster RG, et al. The NS1 gene of H5N1 influenza viruses circumvents the host anti-viral cytokine responses [J]. Virus Research, 2004, 103(1-2): 107-113

[收稿日期] 2011-07-31