

H7N9 亚型禽流感病毒非结构蛋白-1 真核表达载体的构建与表达

温恬,迟莹,张黎,张文帅,彭海燕,史智扬*

(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)

[摘要] **目的:** 构建甲型 H7N9 亚型禽流感病毒非结构蛋白 NS1 真核表达载体并转染 293T 细胞以表达其编码的蛋白。**方法:** 从南京分离株 H7N9 流感病毒[A/Nanjing/1/2013(H7N9)]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 载体中构建 pMD18-T-NS1 质粒,以 pMD18-T-NS1 质粒为模板扩增 NS1 基因。双酶切 NS1 基因 PCR 产物与 PXJ40-MYC 后,连接构建真核表达载体 PXJ40-MYC-NS1,经酶切及测序鉴定后将质粒转染到 293T 细胞中,通过 Western blot 鉴定 NS1 蛋白的表达。**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。Western blot 法可见 NS1 基因编码蛋白的成功表达。**结论:** 成功构建了 H7N9 非结构蛋白 NS1 真核表达载体,该表达载体的构建为后期建立稳定表达 NS1 蛋白的细胞模型和 NS1 蛋白功能研究奠定基础。

[关键词] H7N9 亚型禽流感病毒;NS1;真核表达;免疫印迹

[中图分类号] R373.1

[文献标志码] A

[文章编号] 1007-4368(2013)10-1339-05

doi:10.7655/NYDXBNS20131002

Cloning and eukaryotic expression of non-structural protein-1 of a human influenza virus subtype H7N9

Wen Tian, Chi Ying, Zhang Li, Zhang Wenshuai, Peng Haiyan, Shi Zhiyang*

(Key Laboratory of Enteric Pathogenic Microbiology, Ministry of Health, Institute of Pathogenic Microbiology, Jiangsu Provincial Center for Disease Prevention and Control, Nanjing 210009, China)

[Abstract] **Objective:** To construct the full-length NS1 gene of influenza A (H7N9) into an eukaryotic expression vector PXJ40-MYC, and study the expression of NS1 gene in transfected 293T cell. **Methods:** The NS1 gene of influenza A (H7N9) was amplified by RT-PCR and cloned into pMD18-T vector to construct a plasmid, named pMD18-T-NS1. The PCR product of pMD18-T-NS1 plasmid and the PXJ40-MYC were double digested using the same restrict enzymes, the recombinant eukaryotic expression vector PXJ40-MYC-NS1 was subsequently yielded. The expression of the NS1 gene in transfected 293T cells was tested by Western blot. **Results:** The recombinant eukaryotic expression vector PXJ40-MYC-NS1 was successfully constructed. The NS1 protein was finally expressed in 293T. **Conclusion:** The full-length NS1 gene was obtained as well as its recombinant eukaryotic expression plasmid was successfully constructed. The construction of eukaryotic expression plasmid of NS1 gene made it possible to further study the function of NS1 protein and the mechanism of diseases induced by influenza A virus.

[Key words] influenza A (H7N9); NS1; eukaryotic expression; Western blot

[Acta Univ Med Nanjing, 2013, 33(10): 1339-1343]

禽流感 (avian influenza, AI) 是由禽流感病毒 (avian influenza virus, AIV) 引起的一种禽类感染和 (或) 疾病综合征。根据 AIV 致病力的差异, 将其分为高致病性禽流感 (highly pathogenic avian influenza, HPAIV, 如 H5N1) 和低致病性禽流感 (low

pathogenic avian influenza, LPAIV, 如 H9N2)。世界动物卫生组织 (office of des international epizooties, OIE) 和我国均已将 HPAIV 列为 A 类传染病。近年来, 禽流感病毒正在突破种间屏障引起人类感染, 据文献记载, 偶然感染人类的禽流感病毒主要有 H7、H5N1 和 H9N2 亚型甲型流感病毒^[1-4]。近年来北美、欧洲等地都有 H7 亚型 (包括 H7N2、H7N3 和 H7N7 亚型) 感染人的报道。最近两次 H7 亚型病毒感染人

[基金项目] 国家科技重大专项 (2012ZX10004-210-004)

*通信作者 (Corresponding author), E-mail: jabpwt@hotmail.com

的报道是2006年英国养殖场工作人员感染H7N3和2007年在英国家禽类市场上由于禽带毒(H7N2)通过鸡流通导致4例人感染^[5]。但是这两次均未发现病毒能够在人与人之间传播。2013年3月下旬,上海和安徽两地首次报道人类感染甲型流感H7N9病毒(influenza A virus subtype H7N9)的病例,并陆续在中国长江三角洲一带城市出现,这是该病毒在全球首次感染人类^[6]。H7N9为新型重配病毒,其内部基因来自于H9N2禽流感病毒,是甲型流感中的一种,既往仅在禽间流行,未发现感染人的情况。2013年5月29日止,中国向世卫组织总共报告了131例人感染甲型H7N9禽流感病毒实验室确诊病例,包括31例死亡病例。该病毒对家禽感染呈低致病性,经基因交换后感染人体则呈高致病性,发病期短、重症率与病死率高,引起了全球的广泛关注。

NS1蛋白是甲型流感病毒唯一的非结构蛋白(nonstructural protein),由流感病毒基因组片段8编码,是一种RNA结合蛋白,在病毒的复制和毒力中发挥重要作用^[7]。NS1蛋白可与宿主细胞内的多种受体蛋白质结合^[8],诱导多种培养细胞的凋亡,激活Caspase依赖的凋亡通路,且NS1蛋白诱导的细胞凋亡具有干扰素(IFN)依赖性^[9]。目前关于NS1作用和参与流感病毒致病机制的研究较少,本研究构建了H7N9亚型禽流感病毒NS1真核表达载体,为后期建立稳定表达NS1的细胞模型和NS1蛋白功能研究奠定了基础。

1 材料与方法

1.1 材料

PCR试剂盒(Qiagen公司,德国)、胶回收试剂盒(Omega公司,美国);293T细胞、*E.coli* TOP10感受态细胞、PXJ40-MYC质粒和江苏H7N9亚型禽流感病毒毒株[A/Nanjing/1/2013(H7N9)]为本实验室保存;Taq DNA聚合酶、DNA连接酶试剂盒、pMD18-T Vector试剂盒、限制性内切酶试剂盒、质粒纯化试剂盒、RNA提取试剂盒(TaKaRa公司,大连);Lipofectamine2000、Opti-MEM、胎牛血清(Invitrogen公司,美国);DMEM-1000(Gibco公司,美国);MYC抗体(海门Beyotime公司);辣根过氧化物酶标记小鼠抗兔IgG(北京中杉金桥公司);PVDF膜(BIO-RAD公司,美国);DAB辣根过氧化物酶显色试剂盒(武汉博士德生物工程有限公司);其他试剂均为国产分析纯。

1.2 方法

1.2.1 RT-PCR扩增流感病毒H7N9亚型NS1全长基因

根据H7N9亚型禽流感病毒NS1基因序列设计引物NS1F1/NS1R1,用于扩增NS1基因,与T载体连接;引物NS1F2/NS1R2用于扩增NS1基因后构建真核表达载体。引物序列如下:NS1F1:5'-ATGGA-TTCCAATACTGTGTCAAG-3';NS1R1:5'-TTAAATA-AGCTGAAACGAGAAATTC-3';NS1F2:5'-CGGGAT-CCGATTCCAATACTGTGTC-3';NS1R2:5'-GGGGTA-CCCTACTTTGTAGAGAGTGG-3'。在NS1F2和NS1R2的5'端分别引入*Bam*H I和*Kpn* I酶切位点(下划线处),预期扩增NS1基因的大小为654 bp。以上引物由生工生物工程(上海)股份有限公司合成。参照试剂盒使用说明提取流感病毒总RNA。以反转录的cDNA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℃ 30 min,95℃变性15 min,然后94℃预变性3 min;94℃变性30 s,56℃退火30 s,72℃延伸60 s,循环30次,最后72℃延伸10 min。10 g/L琼脂糖凝胶电泳。

1.2.2 pMD18-T-NS1质粒的构建

PCR扩增产物用胶回收试剂盒回收后,用T4连接酶连接连入pMD18-T载体,连接产物转化Top10感受态细胞,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。

1.2.3 真核表达载体PXJ40-MYC-NS1的构建

以pMD18-T-NS1质粒为模板按上述条件用NS1F2/NS1R2引物扩增NS1基因。用*Bam*H I和*Kpn* I双酶切NS1基因PCR产物和真核表达载体PXJ40-MYC。酶切产物10 g/L琼脂糖凝胶电泳,胶回收后连接酶切产物,连接产物转化Top10感受态细胞,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-MYC-NS1。

1.2.4 真核表达载体PXJ40-MYC-NS1转染293T细胞

将293T细胞常规培养于含10%胎牛血清FBS的DMEM中,于转染前1 d收集细胞并接种于平板中,于37℃ 5% CO₂培养18~24 h,使平板中细胞汇合达50%~80%。将PXJ40-MYC-NS1质粒转染细胞,步骤如下:在EP管中加入400 μl的Opti-MEM和5 μl Lipofectamine2000,室温放置5 min后加入5 μg质粒DNA,充分混匀,室温静置30 min。加入5 ml含

1% FBS 的 DMEM-1000。用 Opti-MEM 清洗平板中细胞后,加入以上混合物,37℃孵育 6 h;吸出混合物,以含 10% FBS 的 DMEM-1000 替换。37℃孵育 24 h 后收细胞。转染同时另设空载体转染对照。

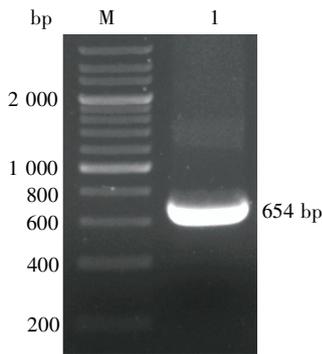
1.2.5 免疫印迹鉴定表达

SDS-PAGE 后,用半干转移仪将蛋白从凝胶转移到 PVDF 膜上,用 10 ml 50 g/L 的脱脂奶粉封闭。一抗为 1:100 兔抗 MYC 多克隆抗体,二抗为 1:5 000 用过氧化物酶标记的小鼠抗兔 IgG。DAB 显色分析。

2 结果

2.1 H7N9 亚型禽流感病毒非结构蛋白 NS1 全长基因的鉴定

以病毒 RNA 反转录产物为模板,用 NS1F1/NS1R1 引物,PCR 扩增 NS1 基因,经琼脂糖凝胶电泳,特异地扩增出了大小约 654 bp 的单一特异性条带,与预期的 NS1 片段大小相符(图 1)。



M:DNA Marker;1:RT-PCR 产物。

图 1 NS1 基因 RT-PCR 产物琼脂糖凝胶电泳分析

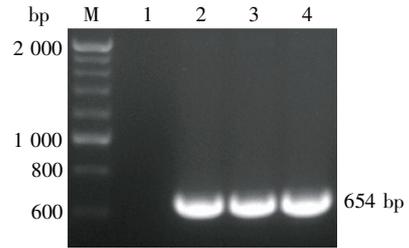
Figure1 RT-PCR analysis of NS1 gene

2.2 pMD18-T-NS1 质粒 PCR 及酶切鉴定

将连接产物 pMD18-T-NS1 转化大肠杆菌 Top10 感受态细胞,挑 3 个单克隆进行 PCR 鉴定,结果全为阳性(图 2)。取其中 1 个阳性克隆摇菌提取质粒,测序结果表明 NS1 基因片段正确克隆到载体 pMD18-T 上。

2.3 真核表达载体 PXJ40-MYC-NS1 的 PCR 及酶切鉴定

以质粒 pMD18-T-NS1 为模板,用 NS1F2/NS1R2 引物扩增 NS1 基因片段,通过 *Bam*H I 和 *Kpn* I 双酶切将 NS1 基因定向插入真核表达载体 PXJ40-MYC 中,将连接产物 PXJ40-MYC-NS1 转化大肠杆菌 Top10 感受态细胞。挑取 4 个单克隆进行 PCR 鉴定,结果全为阳性(图 3)。取其中 1 个阳性克隆摇菌提取质粒用 *Bam*H I 和 *Kpn* I 双酶切,电泳



M:DNA Marker;1:阴性对照(模板为水);2~4:单克隆。

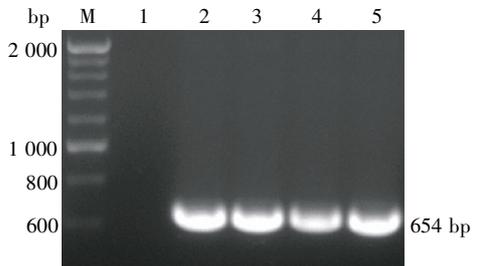
图 2 NS1 目的基因片段的 PCR 鉴定

Figure 2 PCR analysis of NS1 gene

鉴定有约 654 bp 目的条带(图 4)。将质粒送金斯瑞生物科技公司进行 DNA 测序,测序结果与 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-MYC 上,真核表达载体 PXJ40-MYC-NS1 构建成功。

2.4 Western blot 鉴定转染结果

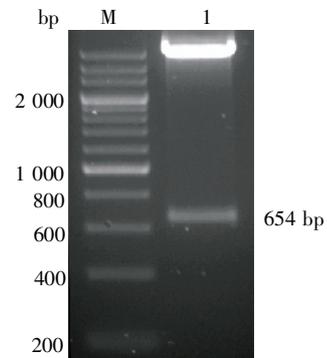
转染 PXJ40-MYC-NS1 的 293T 细胞表达的重组蛋白可以被抗 MYC 抗体特异性识别,其大小与预期相同,同时空载体组无条带,表明 NS1 在 293T 细胞中得到表达(图 5)。



M:DNA Marker;1:阴性对照(模板为水);2~5:单克隆。

图 3 NS1 基因序列的 PCR 鉴定

Figure 3 PCR analysis of NS1 gene



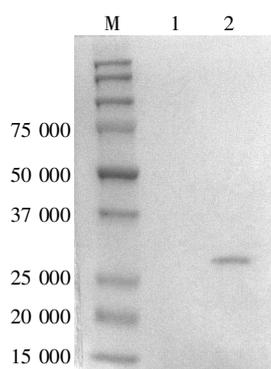
M:DNA Marker;1:PXJ40-MYC-NS1 双酶切。

图 4 质粒 PXJ40-MYC-NS1 的酶切鉴定

Figure 4 Double digestion analysis of PXJ40-MYC-NS1 plasmid

3 讨论

目前,甲型流感病毒的致病机制仍不甚清楚。流



M: Marker; 1: PXJ40-MYC 空载体; 2: PXJ40-MYC-NS1。

图5 Western blot 法检测 PXJ40-MYC-NS1 在 293T 细胞的表达

Figure 5 Western blot analysis of the expression product of PXJ40-MYC-NS1 recombinant in 293T

感病毒基因组的 NS 基因是其基因组中最小的基因片段,它转录成的线性 mRNA 共编码两种蛋白质,即 NS1 和 NS2 蛋白。早期的研究表明,这两种蛋白质仅存在于被流感病毒感染的细胞中,而在病毒粒子内不存在这两种蛋白成分,所以称为非结构蛋白。NS1 蛋白是病毒重要的毒力因子,它通过干扰宿主细胞信号转导和基因表达等途径拮抗宿主细胞的抗病毒免疫,它也是一个具有多种活性的调控因子,具有重要的调节活性。它在病毒侵染机体的过程中具有抑制固有免疫应答的作用。在宿主方面,NS1 蛋白通过抑制宿主细胞蛋白的合成、诱导细胞凋亡及拮抗干扰素的产生等方式调节机体的抗病毒反应。甲型流感病毒的 NS1 蛋白是一种 RNA 结合蛋白^[10],包括 2 个功能区,即 RNA 结合区(RNA binding district, RBD)和受体蛋白结合区^[11]。NS1 拮抗干扰素特性主要与它的双链 RNA (dsRNA) 结合区有关^[12]。2008 年,美国贝勒医学院的研究人员利用在越南禽流感爆发期间分离出的一个 H5N1 禽流感病毒毒株,确定了全长 NS1 蛋白的结构^[13]。该分子的 RNA 结合区域与非 H5N1 毒株的 RNA 结合区域相比有微妙的差别,而效应子区域则有较大改变。这两个区域以某种方式发生相互作用,形成小管,后者可能会隔离双链 RNA,从而让病毒躲过宿主的固有免疫反应。目前的研究认为,流感病毒的 NS1 蛋白通过 RBD 与胞浆中 dsRNA 分子相互作用,间接抑制 dsRNA 活化干扰素调节因子 3 (interferon regulatory factor 3, IRF-3)、核转录因子 κ B (nuclear factor kappa-B, NF- κ B) 和核内原癌基因/转录激活因子 2 (c-Jun/ATF2) 等多种转录因子,从而在转录水平抑制 IFN 基因 mRNA 的合成,延缓了宿主抗病毒状态的

建立^[14-15]。并且,NS1 蛋白对干扰素的拮抗作用可能与流感病毒的毒力有关,仅仅 NS1 基因的某一个位点的突变,就能改变流感病毒的毒力。Seo 等^[16]研究证实,在哺乳动物甲型流感病毒的研究中,第 92 位谷氨酸的存在与否是影响病毒毒力强弱的关键性因素。这段谷氨酸特征序列导致了抗病毒因子 IFN- α 和 IFN- γ 的下调,破坏细胞内的关键信号转导通道,从而增强了病毒的复制。这可能与高致病性禽流感病毒高致死率有关。

综上,流感病毒的 NS1 蛋白是一个关键致病因子,它通过多种机制包括双链 RNA 的结合和隔离来拮抗宿主的抗病毒反应。就其重要性来说,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。如果能阻断 NS1 蛋白质进入细胞后和细胞内受体结合,就有可能抑制高致病性禽流感病毒复制和限制病毒传播,大幅度降低高致病性禽流感病毒的致死率。本研究用 RT-PCR 法获得 H7N9 亚型禽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-MYC 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细胞质中有特异性外源蛋白的表达。NS1 基因真核表达载体的成功构建,为后期建立稳定表达 NS1 的细胞模型和进一步研究 NS1 蛋白与宿主细胞凋亡的关系,及对宿主细胞因子水平的影响提供了材料;甲型流感病毒 NS1 蛋白功能和致病性机制的研究不仅为揭示禽流感病毒感染人类的机制创造了条件,也为未来研制抗流感药物提供了线索。

[参考文献]

- [1] Peiris JS, de Jong MD, Guan Y. Avian influenza virus (H5N1): a threat to human health [J]. *Clin Microbiol Rev*, 2007, 20(2): 243-267
- [2] Jia N, de Vlas SJ, Liu YX, et al. Serological reports of human infections of H7 and H9 avian influenza viruses in northern China [J]. *J Clin Virol*, 2009, 44(3): 225-229
- [3] Hui DS. Review of clinical symptoms and spectrum in humans with influenza A/H5N1 infection [J]. *Respirology*, 2008, 13(Suppl 1): S10-13
- [4] Butt KM, Smith GJ, Chen H, et al. Human infection with an avian H9N2 influenza A virus in Hong Kong in 2003 [J]. *J Clin Microbiol*, 2005, 43(11): 5760-5767
- [5] Avian influenza A/(H7N2) outbreak in the United Kingdom [J]. *Euro Surveill*, 2007, 12(5): E070531.2
- [6] Li Q, Zhou L, Zhou M, et al. Epidemiology of the avian

- influenza A (H7N9) outbreak in China [J]. *N Engl J Med*, 2013, [Epub ahead of print]
- [7] Li Z, Jiang Y, Jiao P, et al. The NS1 gene contributes to the virulence of H5N1 avian influenza viruses [J]. *J Virol*, 2006, 80(22): 11115-11123
- [8] Hale BG, Randall RE, Ortin J, et al. The multifunctional NS1 protein of influenza A viruses [J]. *J Gen Virol*, 2008, 89(Pt 10): 2359-2376
- [9] Hayman A, Comely S, Lackenby A, et al. NS1 proteins of avian influenza A viruses can act as antagonists of the human alpha/beta interferon response [J]. *J Virol*, 2007, 81(5): 2318-2327
- [10] Schultz-Cherry S, Dybdahl-Sissoko N, Neumann G, et al. Influenza virus ns1 protein induces apoptosis in cultured cells [J]. *J Virol*, 2001, 75(17): 7875-7881
- [11] Bornholdt ZA, Prasad BV. X-ray structure of influenza virus NS1 effector domain [J]. *Nat Struct Mol Biol*, 2006, 13(6): 559-560
- [12] Falcón AM, Marión RM, Zürcher T, et al. Defective RNA replication and late gene expression in temperature-sensitive influenza viruses expressing deleted forms of the NS1 protein [J]. *J Virol*, 2004, 78(8): 3880-3888
- [13] Bornholdt ZA, Prasad BV. X-ray structure of NS1 from a highly pathogenic H5N1 influenza virus [J]. *Nature*, 2008, 456(7224): 985-988
- [14] Ludwig S, Wang XY, Ehrhardt C, et al. The influenza A virus NS1 protein inhibits activation of jun N-terminal kinase and AP-1 transcription factors [J]. *J Virol*, 2002, 76(21): 11166-11171
- [15] Talon J, Horvath CM, Polley R, et al. Activation of interferon regulatory factor 3 is inhibited by the influenza A virus NS1 protein [J]. *J Virol*, 2000, 74(17): 7989-7996
- [16] Seo SH, Hoffmann E, Webster RG. The NS1 gene of H5N1 influenza viruses circumvents the host anti-viral cytokine responses [J]. *Virus Res*, 2004, 103(1-2): 107-113

[收稿日期] 2013-06-28

热烈祝贺《南京医科大学(自然科学版)》在第三届中国学术期刊评价中被评为“RCCSE 中国核心学术期刊(A)”! 本次共有 6448 种中文学术期刊参与评价, 经过综合评价后得到期刊相应的等级, 共计 1939 种学术期刊进入核心期刊区。