



## 研究报告

### Research Report

# H5N1 亚型 AIV HA 抗原表位的高效表达及其抗原活性分析

庞耀珊<sup>1</sup>, 谢丽基<sup>1</sup>, 邓显文<sup>1</sup>, 谢志勤<sup>1</sup>, 刘加波<sup>1</sup>, 谢体三<sup>2</sup>, 谢芝勋<sup>1</sup>

1 广西壮族自治区兽医研究所, 广西畜禽疫苗新技术重点实验室, 南宁, 530001;

2 南宁市蓝光生物技术有限公司, 南宁, 530007

✉ 通讯作者: xiezhixun@126.com 作者

医学检验检疫杂志, 2012年, 第1卷, 第2篇 doi:10.5376/jmiq.cn.2012.01.0002

收稿日期: 2012年04月26日

接受日期: 2012年07月18日

发表日期: 2012年07月20日

本文首次发表在《基因组学与应用生物学》(2012年第31卷第2期109-116页)上。现依据版权所有人授权的许可协议, 采用 Creative Commons Attribution License 对其进行授权, 再次发表与传播。只要对原作有恰当的引用, 版权所有人允许并同意第三方无条件的使用与传播。

建议最佳引用格式:

引用格式(中文):

庞耀珊等, 2012, H5N1 亚型 AIV HA 抗原表位的高效表达及其抗原活性分析, 医学检验检疫杂志(online) Vol.1 No.2 pp.7-14 (doi: 10.5376/jmiq.cn.2012.01.0002)

引用格式(英文):

Pang et al., 2012, High Level Expression and Antigenic Analysis of H5N1 AIV Hemagglutinin Epitopes, Yixue Jianyan Jianyi Zazhi (online) Vol.1 No.2 pp.7-14 (doi: 10.5376/jmiq.cn.2012.01.0002)

**摘要** 血凝素(hemagglutinin, HA)蛋白是禽流感病毒(avian influenza virus, AIV)的一个重要表面抗原蛋白, 在疾病诊断和防治上有重要意义。本研究为了探讨一种更为简便有效的 HA 重组蛋白表达途径, 利用生物信息学软件, 对 H5N1 亚型 AIV HA 基因编码的氨基酸序列进行分析, 在分析其在大肠杆菌中的密码子偏好性、稀有密码子分布情况及有关蛋白的抗原性等重要特性后, 构建了 HA 抗原表位重组表达质粒 pET-32a(+)-HA。经测试, 该重组质粒在 1 mmol/L IPTG 诱导剂作用下诱导过夜, 能在大肠杆菌 Rosetta-gami B (DE3)中高效表达, 并得到 48.1 kD 大小的目的重组表达蛋白。重组蛋白用 6×His-tagged protein 纯化试剂盒纯化后, 与福氏佐剂等量混合制备成抗原, 以 200 μg/鸡的剂量皮下注射 2 月龄 SPF 鸡 3 次, 采血分离血清。Western-Blot 试验结果表明, 该重组表达蛋白能分别与所制备的高免鸡血清及 H5N1 亚型 AIV 阳性血清发生特异性反应, 在硝酸纤维素膜上出现特异性杂交带。说明本试验研究的 HA 抗原重组表达蛋白具有良好的免疫原性和反应原性, 保留了 HA 蛋白的抗原活性, 提示该重组蛋白在 H5 亚型 AIV 的防治技术研究中具有重要的实际应用价值。

**关键词** 禽流感病毒(AIV); H5N1 亚型; 抗原表位; 表达

## High Level Expression and Antigenic Analysis of H5N1 AIV Hemagglutinin Epitopes

Pang Yaoshan<sup>1</sup>, Xie Liji<sup>1</sup>, Deng Xianwen<sup>1</sup>, Xie Zhiqin<sup>1</sup>, Liu Jiabo<sup>1</sup>, Xie Tisan<sup>2</sup>, Xie Zhixun<sup>1</sup>

1 Guangxi Veterinary Research Institute, Nanning, 530001;

2 Nanning Languang biotechnology Inc, Nanning, 530007

✉ Corresponding author, xiezhixun@126.com 作者

**Abstract** Hemagglutinin (HA) is an important surface antigen protein of avian influenza virus (AIV), and plays an important role in diagnosis, prevention and treatment of AIV. The purpose of this study is to develop an easier and more efficient way to express HA recombinant protein. The open reading frame (ORF) of H5N1 AIV HA gene was analyzed using bioinformatics software. Its codon bias to *Escherichia coli*, rare codon's contributions in the sequence and the antigenicity of HA protein were used to construct a recombinant expression plasmids of HA epitopes, pET-32a (+)-HA. When these recombinant plasmids were induced overnight with 1mmol/L IPTG solution, they could be highly expressed in *E. coli* Rosetta-gami B (DE3), and the desired recombinant proteins of 48.1kD could be got. After purified by 6×His-tagged protein purification kit, the recombinant proteins were mixed with equal amount of Freund's Adjuvant Complete/Incomplete to make the antigen. Then every seven days this antigen was hypodermically injected into two-month-old SPF chickens with a dose of 200 μg per chicken, totally three times. Serums were collected from chickens after last injection. Western-Blot results showed that the recombinant protein could hybridize with both the serum from the highly-immunized chicken and the serum from H5N1 AIV positive chicken. Specific bands were present on the nitrocellulose membrane. This indicates that the recombinant protein expressed by HA antigen gene segment has great immunogenicity and antigenicity and keeps the antigen activity of HA protein. This study suggests that the recombinant protein has practical value in the diagnosis, prevention and treatment of H5N1 AIV.

**Keywords** Avian influenza virus (AIV); H5N1 subtype; Epitope; Expression



禽流感病毒(AIV)是一种能引起禽类发生严重急性传染病的 A 型流感病毒, 其引起的禽流感被国际兽疫局(OIE)列为类 A 动物传染病。该病毒很容易发生变异, 至今已发现了 15 个血凝素(HA)和 9 个神经氨酸酶(NA)亚型。其中, H5N1 是一种高致病性亚型 AIV, 能引起禽类大规模死亡并给养殖业造成巨大的经济损失(Alexander, 1995; 2000)。有证据表明, H5N1 亚型 AIV 还能通过多种途径传播给人类及其它多种哺乳动物, 如: 猫、狗、猪、虎等, 导致其发病甚至死亡(Subbarao et al., 1998)。可见, H5N1 除了对养禽生产具有严重危害外, 对人畜生命安全也有严重威胁, 具有重要的公共卫生意义(Class et al., 1998; Olsen et al., 2006)。

AIV 基因组由 8 个独立的 RNA 组成, 共编码 10 种蛋白。其中, HA 蛋白是 AIV 的一个重要的表面抗原蛋白, 在病毒的吸附和穿膜、决定病毒致病力等方面起重要作用, 也是病毒刺激机体产生中和抗体的重要抗原(Suarez and Schultz-Cherry, 2000), 在疾病的诊断和防治技术的研究中有重要意义。有关 AIV HA 蛋白的研究报道很多(Stephenson et al., 2004; 刘华雷等, 2005; 李靖等, 2006; 郑其升等, 2006; 白霞等, 2008; 刘一尘等, 2009), 这些研究大部分是利用基因突变技术改造稀有密码子来实现目的基因的表达。密码子是 mRNA 链上决定一个氨基酸的相邻三个碱基, 与基因遗传信息表达调控密切相关。外源基因 mRNA 密码子组成决定着外源基因在宿主中表达丰度。密码子具有通用性, 不同的生物密码子基本相同, 但不同物种在基因表达过程中对密码子的使用却存在明显的偏好性。相关研究表明, 密码子的偏好性与宿主对外源基因的表达密切相关(Ikemura, 1985; Kanaya et al., 1999; Archetti, 2004; Gustafsson et al., 2004; 黄琦等, 2008)。密码子使用指数(codon adaptation index, CAI)、最佳密码子使用频率(frequency of optimal codons index, FOP)、密码子偏好性指数(codon bias index, CBI)是其中评定外源基因表达的三个常用的密码子指数。CAI 和 FOP 取值在 0~1 之间, 值越大, 密码子偏好性越大; 等于 1 时, 密码子偏好性达最大。而 CBI 取值 $\leq 1$ , 密码子偏好性随 CBI 值升高而增大, 当 CBI 值等于 1 时, 密码子偏好性达最大; 当 CBI 值为负数时, 表示最优密码子的使用次数少于平均使用次数。此外, 序列中稀有密码子的分布距离对外源基因的

完整表达也有重要影响。本研究通过对 H5N1 亚型 AIV HA 基因的生物信息学进行分析后, 选取一段抗原表位相对集中、稀有密码子分布有利于表达的区域, 研究构建了 HA 抗原表位重组表达质粒 pET-32a(+)-HA, 实现了该基因在大肠杆菌 Rosetta-gami B(DE3)中的高效表达。通过 Western-Blot 验证了表达蛋白保留了 HA 蛋白的免疫原性和反应原性, 为下一步研究开发相关的诊断和防治技术打下基础。

## 1 结果与分析

### 1.1 HA 完整 ORF 序列分析

H5N1 亚型 AIV 的 HA 完整 ORF 及抗原表位氨基酸序列和密码子分析结果见图 1 和表 1。如图 1 所示, ORF 基因编码的氨基酸序列全长为 567 aa, 蛋白质等电点为 6.54; 在 ORF 序列的共 567 个氨基酸密码子中, 使用频率 $\leq 1\%$ 的有 156 个, 使用频率 $\leq 0.28\%$ 的有 23 个, 部分稀有密码子相距很近, 甚至相邻并列出现。尤其是在第 341~343 位置并列出现的 3 个使用频率仅为 0.28%的稀有密码子 RRR。初步分析结果表明, HA ORF 基因密码子组成本身十分不利于该基因在大肠杆菌中的表达。图 1 阴影部分为 HA 抗原表位序列, 编码 244 aa, 蛋白质等电点为 8.29。该序列氨基酸密码子共 244 个, 其中,

```
1 mekIvllfaTislvksdhiCigyhannSTeqvdTImeknvtvThaqdIle
51 kTHngklCdLnGvkPlilkdCSvaGwllGnPmCdefinvPewSyIvekan
101 PandlCyPgnfndyeeLkHLLsEInhfekIqiiPkdSwSdheaSlgvSaa
151 CPyqGnSSffRuvvwlkkdnayPTIkksynntngedllvlwgiHhPnde
201 aeqTllyqnPttyiSigTSTLNgRlvPkIatRskIngqSgRidffwTilk
251 pndaiHfeSnGnfiaPeyaykivkkGdSTImkSeveygnCntRCgtpIga
301 InSSmPffHnIHPltiGeCPkyvkSnklvlatglnSPqRRRkRglfGa
351 IagfIeGGwqGuvdgwygyHHsneqgSgyaadkeStqkaIdGvtnkvnSi
401 idkmtqfeavCefnleRRlenInkkmedGfLdvwtynaellvlmene
451 RtLdfhdSnrnlydkvRqlkdnakelngCfefyHkCnneCmeSvRnG
501 tydypqySeeaRlkRseISGvkleSIGiyqIISiySTvaSSLvlaimmag
551 LSlwmCSngSlqCRiCi
```

图 1 H5N1 AIV HA 基因编码的氨基酸序列在大肠杆菌中的密码子使用情况表(临界值为 1%)

注: 图中所示的全长序列为 H5N1 AIV HA ORF 基因编码的氨基酸序列, 其中阴影部分为本研究所设计的 HA 抗原表位基因编码的氨基酸序列; 序列中使用频率 $\leq 1\%$ 的大肠杆菌稀有密码子用大写字母显示; 使用频率 $\leq 0.28\%$ 的大肠杆菌稀有密码子用带框的大写字母显示

Figure 1 codon frequency in H5N1 AIV HA amino acid sequence translated in *Escherichia coli* (critical frequency: 1%)

Note: The full length sequence is the amino acid sequence of H5N1 AIV HA ORF; The amino acid sequence encoded by HA epitope gene designed in this study is highlighted with shadow; The codons translated in *E. coli* whose frequency is  $\leq 1\%$  are in capital letters and those  $\leq 0.28\%$  are in capital letters with frame



表 1 HA 基因在大肠杆菌中表达的稀有密码子(临界值为 1%)分析

Table 1 Analysis of rare codons translated in *E. coli* from HA gene (critical frequency: 1%)

基因 Gene	氨基酸序列大小 Size of amino acid sequence	密码子总数 Codon number	使用频率≤1%的稀有密码子数 Codon number with frequency≤1%	使用频率≤0.28%的稀有密码子数 Codon number with frequency≤0.28%	A	B	C
HA ORF	567	567	156	23	0.175	0.377	-0.090
HA 抗原表位 HA antigenicity	244	244	70	9	0.177	0.374	-0.098

注: 大肠杆菌密码子使用频率越低, 外源基因越难以表达; A: 密码子使用指数(CAI); B: 最佳密码子使用频率(FOP); C: 密码子偏好性指数(CBI); A, B: CAI 和 FOP 取值均在 0~1 之间; 值越大, 密码子偏好性越大; 等于 1 时, 密码子偏好性达最大; C: 密码子偏好性随 CBI 值升高而增大; 当 CBI 值等于 1 时, 密码子偏好性达最大; 当 CBI 值为负数时, 表示最优密码子的使用次数少于平均使用次数

Note: Codon frequency corresponds to the expression of exotic gene; Less frequency means that the exotic gene difficultly translated in *Escherichia coli*; A: Codon adaptation index (CAI); B: Frequency of optimal codons index (FOP); C: Codon bias index (CBI); A, B: The range for the index of CAI and FOP is between 0~1; The increasing of CAI and FOP means that the codons tend to *Escherichia coli* bias; The codons would be adapted to the bias of *Escherichia coli* when the index reaches 1; C: The codon bias increase followed by the index of CBI; The codon would be adapted to the bias of *Escherichia coli* when the index reaches 1; The minus CBI means that the frequency of optimal codon is less than the average

使用频率≤1%的一共有 70 个, 使用频率≤0.28% 的有 9 个, 这些稀有密码子分布与 HA ORF 基因密码子相比, 相对有利于目的蛋白在大肠杆菌中的表达。尤其是避开了第 341~343 位置上的 3 个使用频率仅为 0.28%的稀有密码子 RRR, 有效降低了蛋白翻译提前终止的几率。

根据表 1 分析结果, 本研究中的 HA ORF 氨基酸密码子在大肠杆菌中表达的分别为 0.175、0.377、-0.090; HA 抗原表位基因在大肠杆菌中表达的 CAI、FOP、CBI 值分别为 0.177、0.374、-0.098。这些数值远低于大肠杆菌密码子的最佳偏好性指数 1, 说明大肠杆菌对这两个外源序列的密码子偏好性均很低, 属于较难表达的外源基因。

### 1.2 HA ORF 基因重组表达质粒的构建

对 pET-32a(+)-ORF 重组表达质粒转化菌进行 PCR 鉴定, 筛选能扩增出 1 704 bp 预期目的片段的转化菌(结果见图 2), 转化菌的质粒 DNA 测序结果经分析, 与 pMD18-T-ORF 质粒中的 H5N1 AIV 的 HA ORF 序列一致, 并与 NCBI (national center for biotechnology information)基因数据库中的 H5N1 AIV HA 基因高度同源, 结果见图 3。证明目的片段已插入载体, 成功构建了 HA ORF 基因重组表达质粒。

### 1.3 HA 抗原表位扩增及重组表达质粒构建

引物 P3 和 P4 对重组质粒 pMD18-T-ORF DNA 扩增所得到的 732 bp 目的片段, 经 1%琼脂糖凝胶电泳回收纯化后, 与线性化的 pET-32a(+)载体连接, 构建重组表达质粒 pET-32a(+)-HA, 转化大肠杆菌 Rosetta-gami B (DE3)。通过 PCR 扩增, 筛选能

扩增出 732 bp 预期目的片段的转化菌(结果见图 2)。转化菌的质粒 DNA 测序结果表明, 所插入的 732 bp 目的片段为质粒 pMD18-T-ORF 中的 HA ORF 基因的抗原表位序列(结果见图 3 中阴影部分)。证明成功构建了 HA 抗原表位基因重组表达质粒。

### 1.4 重组质粒的诱导表达

分别含有重组表达质粒的 pET-32a(+)-ORF 和 pET-32a(+)-HA 的大肠杆菌 Rosetta-gami B(DE3)菌株, 在不同浓度 IPTG 作用下诱导表达不同时间。表达产物经 SDS-PAGE 电泳分析, 结果发现, IPTG 浓度及诱导时间对 HA ORF 目的蛋白的表达量影响不明显。诱导表达菌体超声波沉淀物在约 85.4 kD (65 kD+20.4 kD)处出现少量与预期目的一致的表达产物堆积, 而上清及未诱导对照在该位置未发现目的表达产物出现。同样, 在 HA 抗原

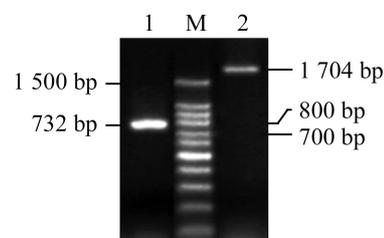


图 2 重组表达质粒阳性菌落 PCR 扩增结果图

注: 1: HA 抗原表位 PCR 扩增产物; 2: 100 bp DNA ladder marker; 3: HA ORF 基因 PCR 扩增产物

Figure 2 Results for the amplification of the clone contained recombinant expression vector

Note: 1: Amplified product for the HA epitopes; 2: 100 bp DNA ladder marker; 3: Amplified product for HA ORF



```
atggagaaaatagtgcttcttttgaacaacatcagccttgtaaaagcgatcatatgtgcattgggtatcatgcaataa
ctcgacagagcaggttgacacaataatggaaaagaacgttactgttacacatgcccaagacatactggaaaagacacaca
acgggaagctctgcgatctaaatggagtgaaagcctctgattttaaagattgtagttagcaggatggctcctcgaaac
ccaatgtgtgacgaattcatcaatgtgccagaatggtcttacatagtagagaaggccaatccagccaatgacctctgta
cccagggaatttcaacgattatgaagaattgaaacacctattgacaggataaacattttgagaaaaacagatcatcc
ccaaagattcttggctcagatcatgaagcctcattgggggtgagtgcgatgtccataccagggaaattcctcctcttc
agaaatgtggtatggcttatcaaaaaggacaatgcatacccaacaataaagaaaagctacaataataccaaccaagaaga
tctcttggtagcttgggggattcacctcctaagttagagcagagcagacaaggctctatcaaaaaccaaccacctata
tttccattgggacatcaaacactaaaccagagattggtacccaaaatagccactagatccaaaataaacgggcaagtggc
aggatagatttctcttgacaatttttaaaccgaatgatgcaatccacttcgagagtaatggaaatttcatgtctccaga
atatgcatacaaaatgtcaagaaaggagactcaacaattaagaaagtgaagtggaaatggtaactgcaacaccaggt
gtcagactccgatagggcgataaaccttagtatgccattccacaacatacacctctcaccatcgggaaatgtcccaa
tatgtgaaatcaaacaaatttagtcccttgcgactgggctcagaatagtcctcaaagagagagaagaagaaaagaggatt
gtttggagctatagcaggtttttagagggaggatggcagggaatggtagatggttggtatgggtaccaccacagcaatg
agcaggggagtggttagctgcagacaaagaatctactcaaaaggcaatagacggagtccaccaataaggtaactcgatc
attgacaaaatgaacactcagtttgaggccttaggaagggaatttaataacttagagaggagaatagagaatttgaacaa
gaagatggaagacggattccttagatgtctggacttataatgtgaacttctggttctcatggaaaatgagagaactctag
acttccatgactcaaatgtcaggaacctttacgacaaggctcagactacagcttaaggataatgcaaaagagctgggtaac
ggttgttctgagttctatcaaaaatgtaataatgaatgtatggaaagtgtgaagaaacggaaactatgactaccgcagta
ttcagaagaagcaagattaaaaagagaggaaaatagtgagtaaaaattggaatcaataggaatctacaaaactgtcaa
tttattcaacagtgggcaggtcccttagtactggcaatcatgatggctggtctatctttatggatgtgttccaacgggtcg
ttacagtgcagaatttgcatttaa
```

图3 pET-32a(+)重组质粒中插入的 HA 基因测序结果

注: 全长序列为插入到 pET-32a(+)-ORF 重组质粒的 HA ORF 基因的测序结果; 阴影部分为插入到 pET-32a(+)-HA 重组质粒的 HA 抗原表位基因测序结果

Figure 3 Sequencing of the HA gene inserted in recombinant plasmid pET-32a(+)

Note: The full length sequence is the sequencing result of HA ORF inserted in pET-32a(+)-ORF recombinant plasmid; The sequence highlighted with shadow is the sequencing result of HA epitopes inserted in pET-32a(+)-HA recombinant plasmid

表位基因的诱导表达中, IPTG 对目的蛋白表达量影响不大, 但明显与诱导时间长短有关。当诱导表达过夜时, 目的蛋白表达量最高。诱导表达菌体超声波沉淀物在约 48.1 kD (27.7 kD+20.4 kD)处出现大量与预期目的一致表达产物堆积, 而上清及未诱导对照在该位置未发现目的表达产物出现。图4和图5分别显示了 HA ORF 和 HA 抗原表位重组表达质粒在 1 mmol/L IPTG 诱导作用下, 表达不同时间后重组蛋白表达量的变化情况。

### 1.5 HA 抗原表位重组表达蛋白纯化

HA 抗原表位重组蛋白包涵体经 6×His-tagged protein 纯化试剂盒纯化后, 样品经 SDS-PAGE 电泳分析, 结果在约 48.1 kD 处出现预期的目的重组蛋白条带, 另外, 在低于该位置也有数条较明显的重组蛋白条带出现(结果图略)。

### 1.6 Western-Blot 试验

Western-Blot 试验结果显示, 转移到硝酸纤维素膜上的 HA 抗原表位重组表达纯化蛋白, 分别能与 HA 抗原表位重组蛋白的 SPF 鸡高免血清及 H5 亚型 AIV 标准阳性血清进行杂交显色, 在 48.1 kD 位置及低于该位置的多个地方出现明显的特异性

杂交带, 而未免疫 SPF 鸡血清对照在任何位置均无特异性杂交带出现(图6)。

## 2 讨论

H5N1 禽流感是近年来在亚洲地区发生的较大规模高致病性禽流感, 对禽类和人畜生命安全均造成了较大威胁。研究开发相关防治技术是有效防控该病的重要手段。本研究通过基因分析, 研究

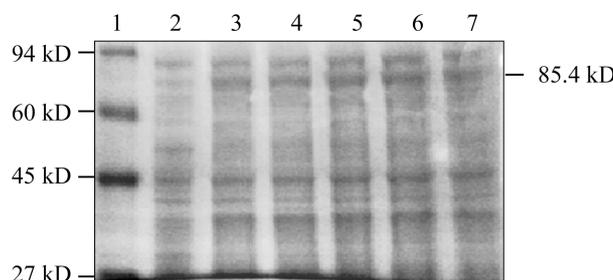


图4 诱导时间对 HA ORF 重组蛋白表达的影响(1 mmol/L IPTG)

注: 1: 蛋白质 Marker; 2: pET-32a(+)-ORF 未诱导对照; 3~7: 分别为 pET-32a(+)-ORF 诱导表达 2 h, 4 h, 6 h, 8 h 和过夜  
Figure 4 The affection of inducing time on the expression of HA ORF recombinant protein (1 mmol/L IPTG)

Note: 1: Protein marker; 2: pET-32a(+)-ORF non-induced control; 3~7: pET-32a(+)-ORF induced for 2 h, 4 h, 6 h, 8 h and overnight

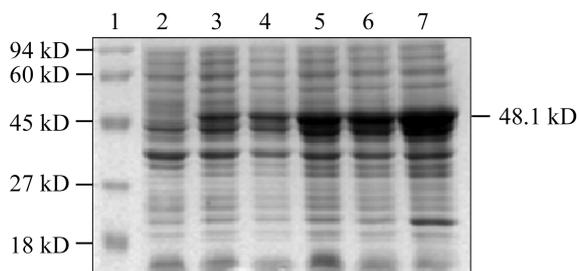


图5 诱导时间对 HA 抗原表位重组蛋白表达的影响(1 mmol/L IPTG)

注: 1: 预染蛋白质 markerIII; 2: pET-32a(+)-HA 未诱导对照; 3~7: 分别为 pET-32a(+)-HA 诱导 2 h, 4 h, 6 h, 8 h 和过夜

Figure 5 The affection of inducing time on the expression of HA antigenicity recombinant protein (1 mmol/L IPTG)

Note: 1: Protein markerIII; 2: pET-32a(+)-HA non-induced control; 3~7: pET-32a(+)-HA induced for 2 h, 4 h, 6 h, 8 h and overnight

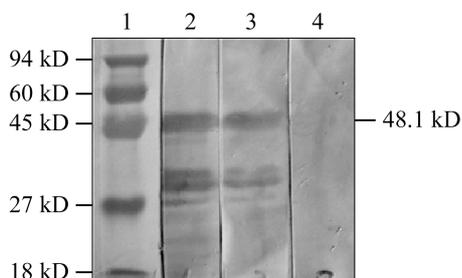


图6 HA 抗原表位重组蛋白 Western-Blot 试验

注: 1: 预染蛋白质 markerIII; 2: HA 抗原表位重组蛋白高免鸡血清; 3: H5 亚型 AIV 标准阳性血清; 4: SPF 鸡阴性血清对照

Figure 6 Western-Blot results for HA epitopes recombinant protein

Note: 1: Protein markerIII; 2: Immuned chicken serum with HA epitopes recombinant protein; 3: H5 subtype AIV positive serum; 4: Specific pathogen free chick serum control

构建了 H5N1 AIV 的 HA 抗原表位基因表达质粒, 成功地对 H5N1 AIV 的 HA 抗原表位进行了表达, 在对表达产物的抗原活性进行了研究后, 证明了该基因表达产物具有良好的免疫原性和反应原性, 为下一步研究开发 H5N1 AIV 相关诊断和防治技术奠定了基础。

大肠杆菌是基因工程技术中最常用的原核表达宿主菌, 其密码子偏好性影响着外源基因在其中的表达丰度。经分析, 本研究的 H5N1 亚型 AIV HA ORF 基因中大肠杆菌稀有密码子分布密集, 其与外源蛋白表达密切相关的 CAI、FOP 及 CBI 指数均远低于 1, 序列中有些稀有密码子的使用频率甚至  $\leq 0.28\%$ 。稀有密码子距离的远近与外源基因的表达有很大关系。距离越近, 影响就越大。特别是相邻并列的稀有密码子, 如图 1 HA ORF 序列中第 341~343 位使用频率仅为 0.28% 的 3 个相邻并

列的稀有密码子 RRR, 更是严重阻滞了 mRNA 信息的传递, 使蛋白翻译提前终止而最终影响目的蛋白的表达丰度(图 4)。解决稀有密码子对外源基因表达丰度的影响, 目前常用的方法是对基因进行突变。即利用同义密码子将原有的稀有密码子改造成偏好性较高的、利于表达的常用密码子。这种方法对于少量稀有密码子突变来说有一定意义(刘华雷等, 2005; 李靖等, 2006; 郑其升等, 2006; 白霞等, 2008; 刘一尘等, 2009)。但对大量稀有密码子进行改造则难度较大, 不但要耗费大量的人力、物力, 成倍增加成本, 操作也十分繁琐复杂。

本研究在不改变原有基因信息的前提下, 通过生物信息学软件分析, 选择了其中抗原表位集中, 稀有密码子之间距离相对较远的区域(如图 1 阴影部分)进行表达, 结果得到了较理想的表达效果(图 5)。通过对表达诱导剂 IPTG 的使用量和诱导时间的测试, 发现目的蛋白的表达量与表达时间的有关, 而与诱导剂的浓度无关。如图 5 所示, HA 抗原表位重组表达质粒在 1 mmol/L IPTG 诱导过夜后, 在 48.1 kD 处出现了相对丰厚的表达产物。说明外源基因氨基酸密码子组成是决定着外源基因表达的关键, 同时, 表达时间长短也对外源蛋白表达丰度有着重要影响。

图 6 Western-Blot 试验结果显示了 HA 抗原表位重组表达蛋白不但能与 H5 亚型 AIV 标准阳性血清起反应, 出现特异性的杂交反应带。同时, 利用该蛋白作为抗原免疫 SPF 鸡, 所采集的免疫鸡血清也能与重组蛋白发生杂交反应, 出现特异性杂交带。这些结果说明该重组蛋白具有良好的反应原性和免疫原性。由此可见, 本研究在生物信息学分析基础上所构建的 H5 亚型 AIV HA 抗原表位基因表达质粒, 在大肠杆菌 Rosetta-gami B (DE3) 菌株中所表达的重组蛋白保留了天然 HA 蛋白的抗原活性, 能作为 HA 蛋白的检测诊断试剂, 在 H5 亚型 AIV 的防治技术研究中有着重要的实际应用价值。

### 3 材料与方法

#### 3.1 供试材料

H5N1 亚型 AIV HA 完整 ORF 基因重组质粒 pMD18-T-ORF、大肠杆菌 Rosetta-gami B (DE3)、原核表达载体 pET-32a(+), 本实验室保存; 质粒 DNA 抽提试剂盒 TIANprep Mini Plasmid Kit, 购自天根生化科技(北京)有限公司; H5 亚型 AIV 阳



性血清, 购自哈尔滨维科生物技术开发公司; 辣根过氧化物酶标记的羊抗鸡 IgG 抗体为 promaga 公司产品; 6×His-tagged protein 重组蛋白纯化试剂盒, 购自德国 GIAGEN 公司; 限制性内切酶 *EcoR* I、*Taq* DNA 聚合酶等, 购自大连宝生物工程有限公司; CloneEZ<sup>®</sup> 重组克隆试剂盒, 购自南京金斯瑞生物科技有限公司; iBlot Gel Transfer Stacks 购自 invitrogen 公司; MyCycler thermal cycler (Serial No.: 580BR 5540) DNA 扩增仪, 购自 Bio-RAD 公司。

### 3.2 基因分析及引物设计

根据 H5N1 亚型 AIV HA 基因序列(GenBank 登录号: GQ290463)及本实验室保存的质粒 pMD18-

T-ORF 基因测序结果, 设计了一对扩增 HA ORF 全长基因的引物 P1 和 P2。同时, 利用在线工具 [http://molbiol.edu.ru/eng/scripts/01\\_11.html](http://molbiol.edu.ru/eng/scripts/01_11.html)、[http://cmgm.stanford.edu/WWW/www\\_predict.html](http://cmgm.stanford.edu/WWW/www_predict.html) 及 Anthe5.0 蛋白分析软件, 对 H5N1 亚型 AIV HA 基因编码的氨基酸、蛋白特性、在大肠杆菌中的偏好性及其稀有密码子分布情况等进行分析, 选择其中抗原位点分布相对集中, 亲水性较好, 并且稀有密码子分布相对有利于后期表达的区域, 设计一对对抗原表位区域的特异性引物 P3 和 P4。引物由中美泰和生物技术(北京)有限公司合成, 用 dH<sub>2</sub>O 稀释成 50 pmol/L 的工作浓度。引物信息具体见表 2。

表2 H5N1亚型AIV HA基因扩增引物信息

Table 2 Primers for HA gene of H5N1 AIV

目的基因	引物名称	引物寡核苷酸序列	扩增片段大小
Target gene	Primer name	Sequence of oligonucleotide primer	Size of products
HA ORF	P1	<u>ctgatatcggatccgctcatgagaaaatagtgcttc</u>	1 704 bp
HA ORF	P2	<u>tgtcgcaggagctcgtaaatacaaatctt gcattgt</u>	
HA抗原表位	P3	<u>atcgcgatccgaattcgagaaggccaatccag</u>	732 bp
HA antigenicity	P4	<u>tgcgcaggagctcgaattcctctctttgaggacta</u>	

注: 引物下划线部分与pET-32a(+)载体多克隆位点*EcoR* I 两端序列一致

Note: The underline parts in oligonucleotide primers sequence are matched to both shoulders of the multicloning side of *EcoR* I in pET-32a(+) vector

### 3.3 质粒 DNA 抽提

利用质粒 DNA 抽提试剂盒 TIANprep Mini Plasmid Kit, 按产品说明书提供的操作步骤对重组质粒 DNA 进行抽提。质粒 DNA 样品置-20℃保存备用。

### 3.4 目的基因扩增及电泳分析

目的基因扩增反应体系为 100 μL, 其中: 25 mmol/L MgCl<sub>2</sub> 10 μL, 10×PCR buffer 10 μL, 2.5 mmol/L dNTPs 2 μL, 5 units *Taq* DNA 聚合酶 1 μL, 50 pmol/L 的上游引物和下游引物各 1 μL, DNA 模板 1 μL, 用超纯水补足体积至 100 μL。DNA 扩增条件为: 94℃ 5 min; 94℃ 30 s, 50℃ 30 s, 72℃ 1 s, 35 个循环后, 72℃延伸 5 min。扩增结束后, 制备 1%琼脂糖凝胶, 取 10 μL 扩增产物在 100 V 电压下进行电泳。电泳结束后, 用溴化乙锭对凝胶进行染色, 最后在凝胶成像系统上对扩增产物进行分析并拍照。

### 3.5 ORF 基因重组表达质粒的构建

以抽提的 pMD18-T-ORF 重组质粒 DNA 为模

板, 按步骤 3.4 提供的方法, 利用引物 P1 和 P2 对 HA ORF 基因进行扩增, 并通过 1%琼脂糖凝胶电泳回收纯化 1 704 bp 的目的 PCR 产物。同时, 用 *EcoR* I 对 pET-32a(+)载体进行酶切并回收纯化酶切产物。利用 CloneEZ<sup>®</sup> 重组克隆试剂盒, 将纯化的 1 704 bp 的 PCR 产物与酶切后线性化的 pET-32a(+)载体连接, 转化大肠杆菌 Rosetta-gami B(DE3)。用引物 P1 和 P2 对插入的目的片段进行 PCR 扩增鉴定, 并对阳性菌落的质粒 DNA 进行测序, 筛选含目的片段并插入方向正确的质粒, 命名为 pET-32a(+)-ORF。阳性菌加 30%终浓度的甘油, -20℃保存备用。

### 3.6 HA 抗原表位基因扩增及重组表达质粒构建

以抽提的 pMD18-T-ORF 重组质粒 DNA 为模板, 按步骤 3.4 提供的方法, 利用引物 P3 和 P4 对 HA 抗原表位基因进行 PCR 扩增。扩增结束后, 通过 1%琼脂糖凝胶电泳回收纯化 732 bp 的目的 PCR 产物。同时, 用 *EcoR* I 对 pET-32a(+)载体进行酶切, 回收纯化酶切产物。利用 CloneEZ<sup>®</sup> 重组



克隆试剂盒, 将纯化的 732 bp PCR 扩增产物与酶切后线性化的 pET-32a(+)载体连接, 并将连接产物转化大肠杆菌 Rosetta-gami B(DE3)。挑选形成单菌落的转化菌, 用引物 P3 和 P4 进行 PCR 扩增, 对能扩增出预期目的片段的转化菌质粒 DNA 进行测序, 筛选含目的片段并插入方向正确的质粒, 命名为 pET-32a(+)-HA。阳性菌加 30%终浓度的甘油, -20℃保存备用。

### 3.7 重组蛋白的诱导表达

以 1%的接种量分别将含有重组表达质粒的 pET-32a(+)-ORF 和 pET-32a(+)-HA 菌株接种到含 Cam (34 µg/mL)、Kan (15 µg/mL)、Tet (12.5 µg/mL) 及 Amp (50 µg/mL)的 LB 液体培养基中, 37℃振荡培养至生长对数期, 当 OD600 读数在 0.4~0.6 之间时, 加入不同浓度的 IPTG (范围: 1~4 mmol/L)进行诱导表达, 时间由 0 h、2 h、4 h、6 h、8 h 至过夜。离心收获菌体, 并用适量 PBS 重悬,同时加入终浓度为 100 µg/mL 的溶菌酶, 在冰上进行超声裂解, 并用 SDS-PAGE 电泳分别对裂解物上清液与沉淀物进行检测。

### 3.8 HA 抗原表位重组表达蛋白纯化及高免血清制备

将含有重组表达质粒 pET-32a(+)-HA 的菌株接种到含相应浓度抗生素的 250 mL LB 培养基中, 按步骤 3.7 方法, 加入终浓度为 1 mmol/L 的 IPTG 进行诱导表达过夜。收获菌体, 用超声波裂解后收集包涵体沉淀。利用 6×His-tagged protein 重组蛋白包涵体纯化试剂盒对表达产物进行纯化。以 200 µg 纯化蛋白与等量的福氏佐剂混合制备成抗原, 免疫 2 月龄 SPF 鸡, 共 3 次。最后一次免疫后 7 d, 采血分离血清, -20℃备用。

### 3.9 Western-blot 试验

重组蛋白纯化后进行 SDS-PAGE 电泳,利用 iBlot Gel Transfer Stacks 转移试剂盒通过电转移将蛋白转印到硝酸纤维素膜上, 分别以 HA 抗原表位重组蛋白 SPF 鸡高免血清、H5 亚型 AIV 标准阳性血清及未免疫 SPF 鸡血清为一抗, 辣根过氧化物酶标记的羊抗鸡 IgG 为二抗进行 Western-Blot, 分析重组蛋白的免疫原性及反应原性。

### 作者贡献

在庞耀珊为本研究的主要执行人, 负责实验设计和大部分实验内容的操作、数据整理及撰写论文; 谢芝勋为本

论文的通讯作者, 负责论文的修改和审核; 谢丽基、邓显文、谢志勤、刘加波和谢体三五位作者为本研究的各项实验提供协助及建议。

### 致谢

感谢彭宜博士和范晴实习研究员对本研究的帮助; 感谢中美泰和生物技术(北京)有限公司的技术支持。

### 参考文献

- Alexander D.J., 1995, The epidemiology and control of avian influenza and Newcastle disease, *J. Comp. Pathol.*, 112(2): 105-126 [http://dx.doi.org/10.1016/S0021-9975\(05\)80054-4](http://dx.doi.org/10.1016/S0021-9975(05)80054-4)
- Alexander D.J., 2000, A review of avian influenza in different bird species, *Vet. Microbiol.*, 74(1-2): 3-13 [http://dx.doi.org/10.1016/S0378-1135\(00\)00160-7](http://dx.doi.org/10.1016/S0378-1135(00)00160-7)
- Archetti M., 2004, Selection on codon usage for error minimization at the protein level, *J. Mol. Evol.*, 59(3): 400-415 <http://dx.doi.org/10.1007/s00239-004-2634-7>
- Bai X., Li R.C., Yu X.L., Ding J., and Li M.X., 2008, Influences of site-directed mutagenesis of RNase activity from E<sup>ms</sup> gene of CSFV on expression in *Escherichia coli*, *Hunan Nongye Daxue Xuebao (Ziranhexue Ban) (Journal of Hunan Agricultural University (Natural Sciences))*, 34(5): 568-571 (白霞, 李润成, 余兴龙, 丁建, 黎满香, 2008, 猪瘟疫病毒 E<sup>ms</sup> 基因 RNase 酶活性位点的定点突变对其原核表达的影响, 湖南农业大学学报(自然科学版), 34(5): 568-571)
- Claas E.C., Osterhaus A.D., van Beek R., De Jong J.C., Rimmelzwaan G.F., Senne D.A., Krauss S., Shortridge K.F., and Webster R.G., 1998, Human influenza A H5N1 virus related to a highly pathogenic avian influenza virus, *Lancet*, 351(9101): 472-477 [http://dx.doi.org/10.1016/S0140-6736\(97\)11212-0](http://dx.doi.org/10.1016/S0140-6736(97)11212-0)
- Gustafsson C., Govindarajan S., and Minshull J., 2004, Codon bias and heterologous protein expression, *Trends in Biotechnology*, 22(7): 346-353 <http://dx.doi.org/10.1016/j.tibtech.2004.04.006>
- Huang Q., Xie Z.X., Pang Y.S., Tong G.X., Wen Y.L., Xie Z.Q., Deng X.W., Liu J.B., and Xie L.J., 2008, Expression and analysis of *apxIA* gene from *Actinobacillus pleuropneumoniae* in *Pichia pastoris*, *Xumu Yu Shouyi (Animal Husbandry & Veterinary Medicine)*, 40(4): 19-22 (黄琦, 谢芝勋, 庞耀珊, 童桂香, 文艳玲, 谢志勤, 邓显文, 刘加波, 谢丽基, 2008, 猪传染性胸膜肺炎放线杆菌 *apxIA* 基因在毕赤酵母中的表达与分析, 畜牧与兽医, 40(4): 19-22)
- Ikemura T., 1985, Codon usage and tRNA content in unicellular and multicellular organisms, *Mol. Biol. Evol.*, 2(1): 13-34
- Kanaya S., Yamada Y., Kudo Y., and Ikemura T., 1999, Studies



- of codon usage and tRNA genes of 18 unicellular organisms and quantification of *Bacillus subtilis* tRNAs: Gene expression level and species-specific diversity of codon usage based on multivariate analysis, *Gene*, 238(1): 143-155 [http://dx.doi.org/10.1016/S0378-1119\(99\)00225-5](http://dx.doi.org/10.1016/S0378-1119(99)00225-5)
- Li J., Liu B.H., Xia Y.K., Hu Y., Yang B.A., Yang Y.H., Qin E.D., and Zhu Q.Y., 2006, Site-directed mutations and prokaryotic expression of hemagglutinin gene of high pathogenic avian influenza virus, *Yixue Fenzi Shengwuxue Zazhi (Journal of Medical Molecular Biology)*, 3(1): 8-12 (李靖, 刘伯华, 夏玉坤, 户义, 杨保安, 杨银辉, 秦鄂德, 祝庆余, 2006, 高致病性禽流感病毒血凝素基因定点突变及其原核表达, *医学分子生物学杂志*, 3(1): 8-12)
- Liu H.L., Wei J.C., Zhou B., Cao R.B., and Chen P.Y., 2005, PCR site-directed mutagenesis of avian influenza virus hemagglutinin gene *in vitro* and expression in 293T cell, *Weishengwuxue Bao (Acta Microbiologica Sinica)*, 45(4): 614-616 (刘华雷, 魏建超, 周斌, 曹瑞兵, 陈溥言, 2005, 禽流感病毒血凝素基因突变体的构建及其在 293T 细胞中的表达, *微生物学报*, 45(4): 614-616)
- Liu Y.C., Zhang C.J., Cheng A.C., Cheng X.C., Wang M.S., Li Y.J., Wu T.C., and Yi M.L., 2009, Construction and expression of a site-specific mutant of chicken interleukin-18 gene in *Pichia pastoris*, *Zhongguo Shouyi Xuebao (Chinese Journal of Veterinary Science)*, 29(4): 502-506 (刘一尘, 张春杰, 程安春, 程相朝, 汪铭书, 李银聚, 吴庭才, 易明林, 2009, 鸡 IL-18 成熟蛋白基因变构体毕赤酵母表达载体的构建及表达, *中国兽医学报*, 29(4): 502-506)
- Olsen B., Munster V.J., Wallensten A., Waldenström J., Osterhaus A.D., and Fouchier R.A., 2006, Global patterns of influenza A virus in wild birds, *Science*, 312(5772): 384-388 <http://dx.doi.org/10.1126/science.1122438>
- Stephenson I., Nicholson K.G., Wood J.M., Zambon M.C., and Katz J.M., 2004, Confronting the avian influenza threat: vaccine development for a potential pandemic, *Lancet Infect. Dis.*, 4(8): 499-509 [http://dx.doi.org/10.1016/S1473-3099\(04\)01105-3](http://dx.doi.org/10.1016/S1473-3099(04)01105-3)
- Suarez D.L., and Schultz-Cherry S., 2000, Immunology of avian influenza virus: a review, *Dev. Comp. Immunol.*, 24(2-3): 269-283 [http://dx.doi.org/10.1016/S0145-305X\(99\)00078-6](http://dx.doi.org/10.1016/S0145-305X(99)00078-6)
- Subbarao K., Klimov A., Katz J., Regnery H., Lim W., Hall H., Perdue M., Swayne D., Bender C., Huang J., Hemphill M., Rowe T., Shaw M., Xu X.Y., Fukuda K., and Cox N., 1998, Characterization of an Avian Influenza A (H5N1) Virus Isolated from a child with a fatal respiratory illness, *Science*, 279(5349): 393-396 <http://dx.doi.org/10.1126/science.279.5349.393>
- Zheng Q.S., Bi Z.X., Cao R.B., Zhou B., Li P., and Chen P.Y., 2006, Correcting a mutant HA gene of the avian influenza virus (AIV) H5N1 subtype by SOE and the high expression of the corrected gene in *E. coli* and its application, *Zhongguo Bingduxue (Virologica Sinica)*, 21(6): 560-564 (郑其升, 毕志香, 曹瑞兵, 周斌, 李鹏, 陈溥言, 2006, 禽流感病毒 H5N1 亚型 HA 基因表达及其产物的应用, *中国病毒学*, 21(6): 560-564)