

新城疫病毒 ZJ1 株 F 蛋白裂解位点突变对其融合活性的影响*

张艳梅 胡顺林 孙 庆 吴艳涛 刘秀梵**

(扬州大学 农业部畜禽传染病学重点开放实验室 扬州 225009)

摘要:新城疫病毒 ZJ1 毒株是近年来在我国水禽中流行并能引起水禽严重发病和死亡的强毒株,其 F 蛋白裂解位点有多个碱性氨基酸分布。将该毒株 F 蛋白裂解位点的 112、115 和 117 位碱性氨基酸突变成弱毒株特征的非碱性氨基酸,构建了重组表达质粒 pCI-FT。分别将突变前后的 F 蛋白与该毒株的 HN 蛋白在 COS-1 细胞共表达,表明突变前后的 F 蛋白均有融合活性;分别将突变前后的 F 蛋白与该毒株的 HN 蛋白在 CEF 细胞共表达,表明突变后 F 蛋白被裂解的活性大大降低。以上研究为下一步在全长 cDNA 克隆水平上对 F 蛋白裂解位点氨基酸序列进行相应突变,研究毒力相关因素以及构建毒力致弱疫苗株等奠定基础。

关键词:新城疫病毒, F 蛋白, 突变, 融合活性, 裂解活性

中图分类号: Q93 **文献标识码:** A **文章编号:** 0253-2654 (2006) 04-0069-05

Effect of Fusion Protein Cleavage Site Mutations of NDV ZJ1 Strain on Its Fusion Activity*

ZHANG Yan-Mei HU Shun-Lin SUN Qing WU Yan-Tao LIU Xiu-Fan**

(Infectious Disease Laboratory of Chinese Ministry of Agriculture, Yangzhou University, Yangzhou 225009)

Abstract: NDV strain ZJ1 strain, a highly virulent NDV strain, has been prevalent among the waterfowls in China mainland in the past years. Multi-basic amino acid sequence distribute in the protease cleavage site of F protein of this strain. Recombinant expressing plasmid pCI-FT, was generated by converting multi-basic amino acid sequence of 112, 115, 117 of the protease cleavage site of F₀ protein, to the non-basic amino acid sequence characteristic of avirulent NDV strain. The result from co-expression of mutant or parental F protein with homologous HN protein in COS-1 cells revealed that both mutant and parental F protein had fusion activity. The result from co-expression of mutant or parental F protein with homologous HN protein in CEF cells showed that the cleavage activity of mutant F protein was significantly reduced. The study built a foundation for mutagenesis of amino acid sequence of the protease cleavage site of F₀ protein at the full-length cDNA clone level, study on factors contributing to virulence and construction of candidate vaccine strain, and so on.

Key words: Newcastle disease virus, F protein, Mutation, Fusion activity, Cleavage activity

新城疫病毒 (Newcastle disease virus, NDV) 为单股负链不分节段的 RNA 病毒,目前其基因组全长为 15186nt 或 15192nt 两种,基因组结构模式为: 3'NP-P-M-F-HN-L 5',分别编码以下 6 种结构蛋白: 核衣壳蛋白 (NP)、磷蛋白 (P)、基质蛋白 (M)、融合蛋白 (F)、血凝素-神经氨酸酶蛋白 (HN) 和大蛋白 (L)。其中, F 和 HN 两种糖蛋白位于病毒表面,与病毒的毒力和致病性密切相关。研究表明^[1], F 蛋白裂解位点是

* “十五”国家科技攻关项目 (No. 2004BA519A44)

** 通讯作者 Tel: 86-514-7991416, Fax: 86-514-7323112, E-mail: xliu@mail.yzu.edu.cn

收稿日期: 2005-10-25, 修回日期: 2005-12-15

NDV 毒力的主要决定因素, 强毒株在该区域的序列一般由多个碱性氨基酸组成, 多种蛋白酶敏感, 可被机体很多组织器官的多种蛋白酶裂解, 导致全身性感染。而弱毒株则以非碱性氨基酸替代碱性氨基酸, 尤其在 112、115 和 117 位, 这种 F₀ 蛋白不易被裂解, 感染性很低或无感染性。同时 F 蛋白的融合活性需要 HN 蛋白的参与, 单独表达 F 蛋白, 融合过程极其有限或不能发生, 与 HN 蛋白共表达后, 融合作用显著增强^[2]。

本研究所选用的 NDV ZJ1 株是近年来在我国水禽中流行的并能引起水禽严重发病和死亡的强毒株, 我室已经完成了该毒株生物学特性鉴定^[3], 首次获得其基因组全序列^[4], 并通过将该毒株的全基因组 cDNA 克隆和分别表达病毒 NP、P 与 L 蛋白的辅助质粒共转染拯救出了感染性病毒^[5]。本研究将 F 蛋白裂解位点 112、115 和 117 位碱性氨基酸突变成非碱性氨基酸, 并鉴定了突变后其融合活性和裂解活性变化, 为下一步在全长 cDNA 克隆水平上对 F 蛋白的裂解位点进行相应突变, 开展毒力相关因素研究以及构建毒力致弱疫苗株等提供科学依据。

1 材料与方法

1.1 毒株和鸡胚

鹅源 NDV ZJ1 株由刘秀梵等分离和鉴定^[3]; SPF 鸡胚购自山东省家禽科学研究所。

1.2 质粒和菌株

真核表达载体 pCI-neo、pGEM-T easy Vector 购自 Promega 公司; 表达鹅源 NDV ZJ1 株 F 蛋白和 HN 蛋白的质粒 pCI-F 和 pCI-HN 由本实验室构建; 宿主菌 *E. coli* DH5 α 为本室保存。

1.3 主要试剂

AMV 反转录酶、高保真 DNA 聚合酶、T4 DNA 连接酶均购自 Promega 公司; *Sal* I、*Xba* I 等限制性内切酶购自上海生工生物工程技术有限公司; Agarose Gel DNA Extraction Kit 购自 Roche 公司; 转染试剂 (Lipofectin Reagent) 购自 Invitrogen 公司; Plasmid -ini Kit 为上海华舜公司产品; DMEM 细胞培养基和羊抗鸡荧光抗体购自美国 Sigma 公司; 抗 NDV 阳性血清由本实验室制备。

1.4 病毒增殖和病毒 RNA 提取

方法参考文献 [6]。

1.5 F 蛋白突变体表达载体 (pCI-FT) 的构建

设计 4 条引物, F1: ata tct aga gat ccc gac cgg cac att ca; F2: gag gga gac aag aac gcc tta tag gtg ctg tta ttg g; F3: aag gcg ttc ttg tct ccc tcc tcc aga cgt gga ca; F4: cgg gtc gat atc cac ctc tta tct gca ttc at。引物外带 *Sal* I 和 *Xba* I 酶切位点由斜体标注; 突变碱基由黑体标注。以上引物由大连宝生物工程有限公司合成。

通过 RT-PCR 方法, 用引物 F1 和 F2 扩增病毒基因组的 4,521 ~ 4,917nt 区域, 用引物 F3 和 F4 扩增 F 蛋白的 4,864 ~ 6,230nt 区域, 再用引物 F1 和 F4 将以上两个片段通过 overlap PCR 方法相连 (overlap 部分在上述引物中以下划线标注), 得到裂解位点发生 3 个氨基酸突变的 F 基因。PCR 产物经纯化回收后克隆于 pGEM-T easy Vector 进行扩增, 最后将目的片段亚克隆到经 *Sal* I 和 *Xba* I 酶切的真核表达载体 pCI-neo 中。重组质粒用酶切和 PCR 方法鉴定, 阳性克隆穿刺培养后送上海生工生物工程公司测序验证。突变模式见图 1。

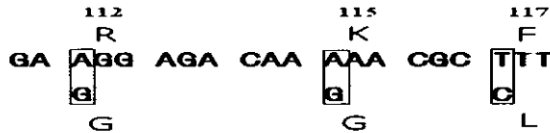


图 1 F 蛋白裂解位点突变模式图

1.6 F 蛋白突变体表达载体 (pCI-FT) 的表达鉴定

将 COS-1 细胞分装于 24 孔培养板上培养 20h, 使细胞密度达到 90% 左右, 用无血清无抗生素的 DMEM 培养基洗涤二遍, 吸弃上清, 转染 pCI-FT 质粒 (操作参见说明书)。48h 后用预冷甲醇固定细胞 10min, 加入抗 NDV 阳性血清, 37℃ 作用 1h, 用 PBS 洗涤 2 遍, 加入羊抗鸡荧光抗体, 37℃ 作用 1h, 用 PBS 洗 2 遍后放在倒置荧光显微镜下观察。设空载体转染组为阴性对照。

1.7 F 蛋白突变体融合活性的测定

将 COS-1 细胞分装于 24 孔培养板上培养 20h, 使细胞密度达到 90% 左右, 同上洗涤两遍后分别转染质粒 pCI-FT、pCI-F、pCI-HN、pCI-FT + pCI-HN、pCI-F + pCI-HN。3d 后吸弃培养上清, 对细胞进行瑞氏染色, 在显微镜下观察细胞形成合胞体的情况。设 ZJ1 毒株感染组为阳性对照, 空载体转染组为阴性对照。

1.8 F 蛋白突变体在 CEF 细胞被裂解情况

将 CEF 细胞分装于 24 孔培养板上培养 20h, 使细胞密度达到 90% 左右, 同上进行质粒转染、细胞染色和合胞体观察。设 ZJ1 毒株感染组为阳性对照, 空载体转染组为阴性对照。

2 结果与分析

2.1 F 蛋白突变体表达载体 (pCI-FT) 的构建与表达鉴定

F 蛋白突变体表达载体经酶切、质粒 PCR 和测序验证, 结果表明序列完全正确, 命名为 pCI-FT。F 蛋白突变体体外表达鉴定结果表明, 在倒置荧光显微镜下, 质粒 pCI-FT 转染组可以看到特异荧光 (图 2a), 阴性对照无特异荧光 (图 2b)。说明 pCI-FT 可在体外成功表达。

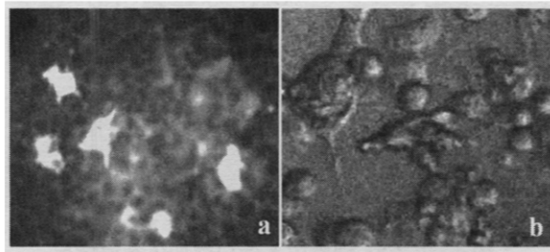


图 2 F 蛋白突变体 (pCI-FT) 的表达鉴定
a pCI-FT 转染细胞后得到了有效的表达, b 阴性对照

2.2 在 COS-1 细胞中 F 蛋白突变体的融合活性

质粒 pCI-F + pCI-HN、pCI-FT + pCI-HN、pCI-F、pCI-FT 分别转染 COS-1 细胞后, 对细胞进行瑞氏染色, 在倒置荧光显微镜下观察细胞形成合胞体情况。结果表明, pCI-F + pCI-HN (图 3A) 和 pCI-FT + pCI-HN (图 3B) 共转染组均能形成明显的合胞体;

pCI-F (图 3C) 和 pCI-FT 转染组 (图 3D) 无合胞体形成; 阳性对照形成明显合胞体 (图 3E); 阴性对照无合胞体形成 (图 3F)。

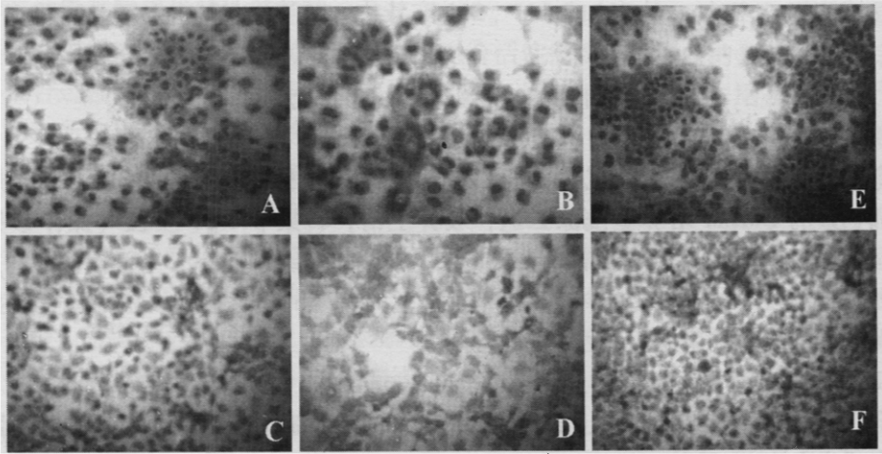


图 3 在 COS-1 细胞中 F 蛋白突变体的融合活性鉴定

A 转染 pCI-F 和 pCI-HN 的 COS-1 细胞, B 转染 pCI-FT 和 pCI-HN 的 COS-1 细胞, C 转染 pCI-F 的 COS-1 细胞, D 转染 pCI-FT 的 COS-1 细胞, E 感染 NDV ZJI 株的 COS-1 细胞, F 阴性对照

2.3 在 CEF 细胞中 F 蛋白突变体裂解情况

对用相同方法转染的 CEF 进行瑞氏染色, 结果发现: pCI-F + pCI-HN 共转染组形成明显的合胞体 (图 4A); pCI-FT + pCI-HN 共转染组不能形成明显的合胞体 (图 4B); pCI-F (图 3C) 和 pCI-FT 转染组 (图 3D) 无合胞体形成; 阳性对照 ZJI 株感染的 CEF 形成明显合胞体 (图 4E); 空载体质粒 DNA 转染组无合胞体形成 (图 4F)。

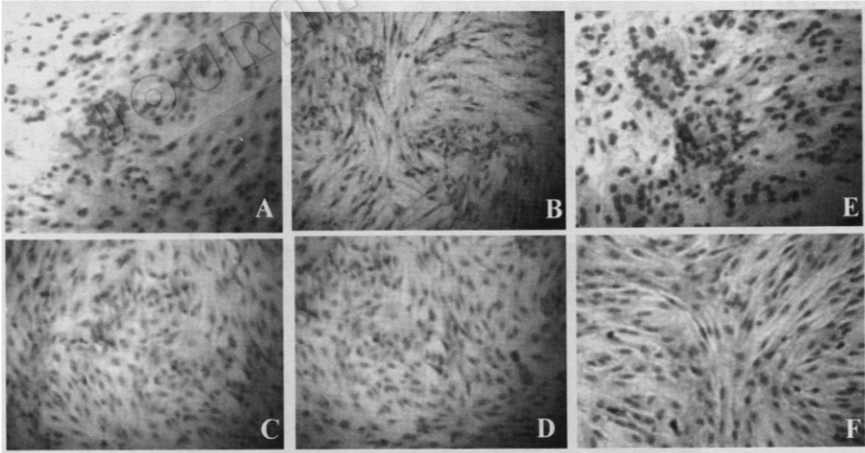


图 4 在 CEF 细胞中 F 蛋白突变体裂解情况

A 转染 pCI-F 和 pCI-HN 的 CEF 细胞, B 转染 pCI-FT 和 pCI-HN 的 CEF 细胞, C 转染 pCI-F 的 CEF 细胞, D 转染 pCI-FT 的 CEF 细胞, E 感染 NDV ZJI 株的 CEF 细胞, F 阴性对照

3 讨论

F 蛋白是 NDV 毒力和致病性的主要决定因素。在 NDV 的繁殖周期中, F 蛋白首先以无活性的 FO 前体形式生成, FO 前体只有被裂解成 F1 和 F2 两条多肽, 才能介导病毒和细胞膜发生融合。强毒株的裂解位点为多个碱性氨基酸连续排列, 可被机体很多

组织器官的多种蛋白酶裂解,因此可导致全身性感染。弱毒株在该区域碱性氨基酸则被中性氨基酸所代替,使相应序列成为 G/E¹¹²-K/R-Q-G/E¹¹⁵-R-L¹¹⁷,这种 F0 蛋白仅能被有限的组织或器官分泌的胰酶样酶裂解,感染性很低或无感染性^[1]。国外研究发现^[7-9],将 NDV 弱毒株 F 蛋白裂解位点的非碱性氨基酸突变成碱性氨基酸后,拯救出的病毒毒力均明显增强,进一步证明了 F 蛋白裂解位点的氨基酸序列与毒力和致病性的相关性。基于以上,本研究将鹅源 NDV ZJ1 强毒株 F 蛋白裂解位点的 112、115 和 117 位碱性氨基酸突变成非碱性氨基酸,在单个蛋白水平研究了该突变对 F 蛋白的裂解特性和融合活性的影响。

NDV 强毒和弱毒株均对肿瘤细胞有特异亲嗜性,能在 COS-1 细胞、Hep-2 细胞等肿瘤细胞有效复制^[10]。本研究在 COS-1 细胞上鉴定了 F 蛋白突变体的融合活性。结果表明,突变前后的 F 蛋白在与同源性的 HN 蛋白共表达时,均能形成明显的合胞体,证明 F 蛋白突变体被 COS-1 细胞提供的蛋白酶所裂解,且具有融合活性。CEF 细胞不同于 COS-1 细胞,仅能提供 NDV 强毒株 F 蛋白裂解所需要的酶而不能提供弱毒株 F 蛋白裂解所需要的酶,导致 NDV 弱毒株不能够在 CEF 细胞有效裂解和复制。因为裂解是融合以及感染发生的前提,所以在确定 F 蛋白突变体具有融合活性后,本研究在 CEF 细胞鉴定 F 蛋白突变体的裂解活性。结果表明,转染组 pCI-F + pCI-HN 能形成合胞体,但 pCI-FT + pCI-HN 以及其它转染组不能形成合胞体,提示我们 F 蛋白突变体不能被 CEF 细胞中的酶有效裂解,该突变造成 F 蛋白被裂解的能力明显降低。

要启动融合过程, F 蛋白需要经历两次构象变化,第 1 次是裂解,第 2 次是融合。研究表明^[11,12], F 蛋白的融合功能需要同源性的 HN 蛋白的共同参与。本研究中,无论在 COS-1 还是 CEF 细胞,单独表达 F 蛋白均不能引起合胞体形成,进一步证明 HN 蛋白对 F 蛋白的融合促进作用。

国外利用反向遗传学技术已经成功拯救了 NDV Clone-30 株、La Sota 株等鸡源弱毒株,并开展许多毒力相关因素的研究^[7,8],但迄今没有利用反向遗传学技术在病毒水平对速发性强毒株的毒力相关因素进行研究的报道。我们已经拯救出了鹅源 NDV ZJ1 强毒株,本研究对 F 蛋白裂解位点进行突变,并对 F 蛋白突变体的裂解及融合活性进行了研究,为下一步利用反向遗传技术对病毒全基因组进行相应突变,研究该毒株的毒力相关因素奠定基础,同时也为拯救出毒力减弱的疫苗候选株提供依据。

参考文献

- [1] 殷震,刘景华. 动物病毒学(第二版). 北京: 科学出版社, 1997. 743 ~ 748.
- [2] Baker K A, Dutch R E, Lamb R A, *et al.* Molecular Cell, 1999, 3: 309 ~ 319.
- [3] Liu X F, Wan H Q, Ni X X, *et al.* Archives of Virology, 2003, 148 (7): 1387 ~ 1403.
- [4] 黄勇, 万洪全, 刘红旗, 等. 病毒学报, 2003, 19 (4): 348 ~ 354.
- [5] 刘玉良, 张艳梅, 胡顺林, 等. 微生物学报, 2005, 45 (5): 780 ~ 783.
- [6] 吴艳涛, 刘秀梵, 张如宽, 等. 畜牧兽医学报, 1997, 28 (2): 176 ~ 180.
- [7] Peeters B P H, de Leeuw O, Koch G, *et al.* J Virol, 1999, 73: 5001 ~ 5009.
- [8] Leeuw O S, Hartog L, Koch G, *et al.* J Gen Virol, 2003, 84: 475 ~ 484.
- [9] Angela R O, Egbert M, Tsshome M, *et al.* J Gen Virol, 1999, 80: 2897 ~ 2995.
- [10] Reichard K W, Lorence R M, Cassino C J, *et al.* Proc Am Assoc Cancer Res, 1992, 33: 521 ~ 530.
- [11] McGinnes L, Sergei T, Ritter J, *et al.* Virology, 1989, 169: 273 ~ 282.
- [12] Baker K A, Dutch R E, Lamb R A, *et al.* Molecular Cell, 1999, 3: 309 ~ 319.