

含组氨酸标签的甲/乙型流感嵌合体假病毒颗粒的构建和表达

张瑾^{1*}, 薛晓宁², 徐翮飞¹, 朱可¹, 陈晓光¹, 张娟¹, 张齐¹, 林元¹

(1. 山东国际旅行卫生保健中心, 山东出入境检验检疫局, 青岛 266071;

2. 青岛机场出入境检验检疫局, 山东出入境检验检疫局, 青岛 266071)

摘要:为了获得内含甲/乙型流感病毒部分序列的病毒样颗粒, 本研究通过定点突变技术将6个组氨酸插入MS2噬菌体包膜蛋白的 β -发夹环结构中, 建立通用表达载体D-pET32a-CP-his。并采用聚合酶链反应扩增甲/乙型流感病毒cDNA的部分保守区域, 将两种病毒的嵌合体基因序列连接到表达载体, 转化BL21细胞。经诱导表达和镍柱亲和层析纯化, 获得了含有甲/乙型流感病毒部分序列的高浓度和纯度的病毒样颗粒。该病毒样颗粒在4℃和-20℃条件下可稳定保存。本研究构建带有组氨酸纯化标签假病毒的通用表达载体, 可以作为以后构建和制备耐RNase的mRNA标准品和质控品的平台; 构建的甲/乙型流感嵌合体假病毒可为实验室流感病毒的检测提供新的标准品及质控品。

关键词:流感病毒; MS2噬菌体; 镍离子亲和层析; 病毒样颗粒; RT-PCR

中图分类号: S852.65 文献标识码: A 文章编号: 1000-8721(2015)06-0629-05

DOI: 10.13242/j.cnki.bingduxuebao.002822

流行性感感冒病毒, 简称流感病毒, 是一种正黏病毒科单链RNA病毒。近年来流感病毒在世界范围内的流行引起了人们的高度重视, 例如2009年墨西哥暴发H1N1疫情和2013年中国出现的首次人感染H7N9流感病毒疫情, 由于其传染性强, 多传播途径, 易感人群广泛, 高致病性等特点, 严重威胁人类健康和生命安全, 影响社会稳定和经济发展, 引起世界卫生组织高度关注, 也成为我国公共卫生防控的焦点^[1]。我国各口岸检验检疫机构已将流感病毒的检测纳入到口岸传染病日常检测工作中, 而完善和提高实验室检测技术, 快速获得准确可靠检测结果是满足口岸检验检疫机构对传染病监测, 预防和控制的关键。

目前, 实时定量PCR方法是该类传染病快速检测最有效的方法, 也是我国检测实验室普遍使用的方法^[2-3]。但此类检测技术检测过程复杂, 检测结果容易受多种因素的影响, 如操作过程中的随机误差; 样本分离过程中残留试剂等均可能会影响PCR扩增的效率, 造成结果的偏差, 甚至假阴性的结果^[4-5]。因此, 要得到一个准确可靠的结果, 需要有严格的质

量控制措施, 即需要有特定的RNA病毒质控/标准品。目前大多试剂厂家生产的RNA病毒核酸扩增检测试剂盒仅提供质粒DNA或PCR扩增的短片段作为标准品, 不能控制在检测过程中的核酸纯化和逆转录环节, 因而迫切需要一种无生物毒害且能安全流通并具备RNA病毒特性的质控物质, 对RNA病毒从提取到RT-PCR检测进行全程监测。本研究目的是选择内标靶序列, 利用质粒构建和装甲RNA两种技术, 制备甲/乙型流感嵌合体假病毒, 作为流感病毒RT-PCR检测的标准品和质控品可用于监测RT-PCR反应的全过程。

材料与方法

1 材料 甲型流感H1N1, 乙型流感为本室保存样本; 去除蛋白标签的D-pET32a质粒, MS2噬菌体RNA由山东检验检疫局技术中心馈赠; 大肠杆菌DH-5 α 菌株, 高保真Taq酶, 一步法RT-PCR试剂盒, Minibest plasmid purification Kit质粒DNA小量纯化试剂盒, DNA胶回收试剂盒, Puc19-T载体连接试剂盒, 限制性内切酶Not I, Hind III, BamH I, T4 DNA连接酶购自大连宝生物(TaKaRa)公司; IPTG, X-gal, 氨苄, 琼脂和甘油均购自上海生工公司; QIAGEN Ni-NTA Fast Start Kit为Qiagen公司产品; 大肠杆菌BL21(DE3)菌株购自北京金生物技术有限公司; QuikChange[®] Site-Directed Mutagenesis Kit试剂盒为Stratagene公司产品; 甲/乙型流感病毒通用荧光RT-PCR检测试剂盒购自

收稿日期: 2015-03-25; 修回日期: 2015-06-03

基金项目: 山东出入境检验检疫局科研项目(SK201309)资助

作者简介: 张瑾(1977-), 女, 博士, 副研究员, 主要从事病毒检测和致病机理的研究, Tel: 0532-80887762, 15265270513, E-mail: zhjoohyn@hotmail.com

*通讯作者: 张瑾(1977-), 女, 博士, 副研究员, 主要从事病毒检测和致病机理的研究, Tel: 0532-80887762, 15265270513, E-mail: zhjoohyn@hotmail.com

上海之江生物技术公司;其它分析纯试剂均购自北京化学试剂公司。

2 甲/乙型流感基因片段扩增 对 GeneBank 上多种甲/乙型流感病毒株序列进行比对,选择病毒的特异性保守区域,采用 primer 5.0 软件设计引物,保证扩增的核酸序列适用于病毒的特异性检测。甲型流感扩增引物为:FluA-M2-F:5'-AAGCTTTTCTAAC CGAGGTCGAAACGTA-3',FluA-M2-R:5'-AAGCTTCGTCTACGCTGCAGTCCT-3';乙型流感扩增引物为:FluB-M1-F:5'-GCGGCCGCACAGAAGATGGAGAAGGCAAAG-3',FluB-M1-R:5'-GCGGCCGCTTTTGTGCTGTTGTTCCCAT-3'。反应条件如下:50℃ 30min,94℃ 2min,94℃ 30s,58℃ 30s,72℃ 30s,共 35 个循环。PCR 产物经 1.5% 琼脂糖电泳鉴定。

3 MS2 扩增及与 D-pET32a 连接 为扩增 MS2 噬菌体的外壳蛋白基因和成熟酶蛋白基因(CP 基因),设计引物对 MS-CP1 和 MS-CP2,并分别在 5' 端添加 BamH I 和 Hind III 酶切位点。采用一步法 RT-PCR,以 MS2 RNA 为模板扩增 CP 基因片段,回收片段和 D-pET32a 均用 BamH I 和 Hind III 双酶切后连接,转化 DH-5 α 菌株,获得假病毒表达载体 D-pET32a-CP。

4 组氨酸序列的插入 用 QuikChange[®] Site-Directed Mutagenesis Kit 试剂盒通过 PCR 扩增的方法在 D-pET32a-CP 载体的衣壳蛋白基因第 16 个密码子后插入编码 6 个组氨酸的 DNA 序列,成功得到带有组氨酸标签的假病毒表达载体 D-pET32a-CP-His。

5 表达载体 D-pET32a-CP-His-FluA/B 构建 D-pET32a-CP-His 载体与 FluA 片段用 Hind III 酶切后,连接转化 DH-5 α 菌株,获得的质粒测序鉴定。

对测序正确的 D-pET32a-CP-His-FluA 质粒与 FluB 片段分别用 Not I 酶切,连接转化 DH-5 α 菌株,获得的质粒测序鉴定,最终得到 D-pET32a-CP-His-FluA/B 质粒。

6 FluA/B 假病毒的诱导表达,纯化与鉴定 D-pET32a-CP-His-FluA/B 质粒转化 BL21 (DE3) 菌株,阳性克隆接入 3 ml 含 Amp(100 μ g/mL) 的 LB 液体培养基中,37℃ 振荡培养过夜;1:100 接种过夜培养液至 100 mL 含 LB 液体培养基中,37℃ 振荡培养 3 h 左右至 OD 值 0.6~0.8;在培养物中加入诱导剂 IPTG 至终浓度为 1.0 mmol/L,28℃ 继续振荡培养 16 h 后取出。用 Qiagen Ni-NTA Fast Start Kit 纯化假病毒,按照 Qiagen 相关操作手册所述方法进行。取 50 μ l 假病毒 Ni-NTA 纯化液,经 Qiagen RNA 提取试剂盒提取 RNA,取 2 μ l 用 RT-PCR 和 PCR 法分别检测提取物中的目标 RNA 和质粒 DNA 的含量。

7 假病毒稳定性研究 将纯化的病毒样颗粒溶液用含有 15% 甘油的缓冲液稀释到 10⁵ 拷贝/mL,每管 50 μ l 分装分别置于室温、4℃ 和 -20℃,放置 5d、10d、20d、30d、60d 和 90d,取样检测,观察其稳定性。另一管 600 μ L 病毒颗粒放置 -70℃ 和 37℃ 下反复冻融 10 次,检测其稳定性。

结 果

1 FluA/B 的 RT-PCR 扩增产物和测序

图 1 显示甲/乙型流感两种病毒的 PCR 扩增片段大小与预期相符,初步判定为本实验所需要扩增的目的核酸序列。PCR 产物经序列测定以及 NCBI BLAST 分析证实得到预期设计的目的基因片段。

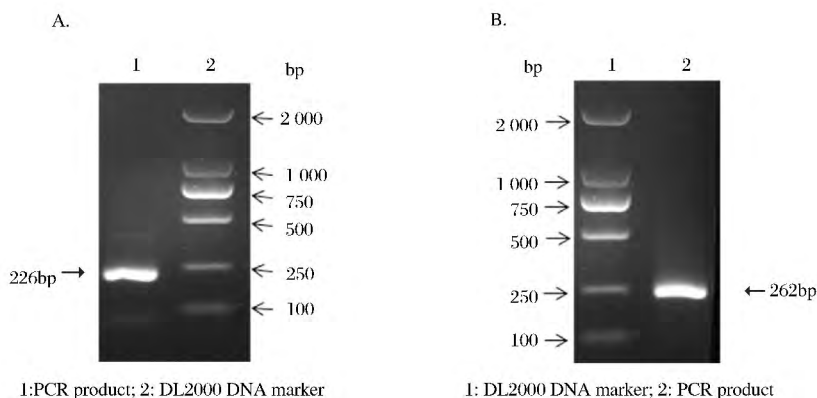
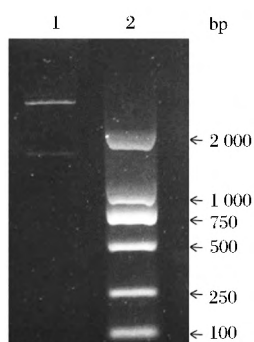


图 1 RT-PCR 扩增产物凝胶电泳图 A. FluA B. FluB

Figure 1 Agarose gel electrophoresis of the RT-PCR product of FluA/B. A. FluA, B. FluB

2 表达载体 D-pET32a-CP-His 的构建

采用一步法 RT-PCR,以 MS2 RNA 为模板扩增 CP 基因片段,回收片段和 D-pET32a 均用 *Bam*H I 和 *Hind* III 双酶切后连接,转化 DH-5 α 菌株,获得假病毒表达载体 D-pET32a-CP。经 *Bam*H I 和 *Hind* III 双酶切鉴定,电泳结果显示可以看到 1 800bp 左右的目的条带(图 2),测序证实 CP 基因已正确插入到 D-pET32a 载体上。再以质粒 D-pET32a-CP 为模板,用 QuikChange[®] Site-Directed Mutagenesis Kit 试剂盒通过 PCR 扩增的方法在 D-pET32a-CP 载体的衣壳蛋白基因第 16 个密码子后插入编码 6 个组氨酸的 DNA 序列,获得的质粒经测序表明 His 序列已正确插入到 CP 基因中。



1: Double enzymes digestion of D-pET32a-CP;
2: DL2000 DNA marker

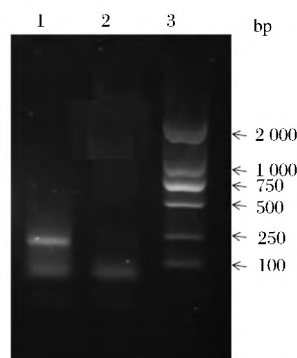
图 2 *Bam*H I 和 *Hind* III 双酶切 D-pET32a-CP 凝胶电泳图

Figure 2 Agarose gel electrophoresis of *Bam*H I and *Hind* III double digestion D-pET32a-CP

3 假病毒载体 D-pET32a-CP-His-FluA/B 的构建和表达

将扩增的 FluA 和 FluB 序列依次连接到 D-

pET32a-CP-His,得到假病毒表达载体 D-pET32a-CP-His-FluA/B。假病毒表达载体转化 BL21 (DE3)菌株经 IPTG 诱导表达后获得含有两种病毒 RNA 片段的假病毒, QIAGEN Ni-NTA Fast Start Kit 纯化假病毒。纯化后的假病毒颗粒用 Qiagen RNA 提取试剂盒提取 RNA,用 RT-PCR 扩增和 PCR 扩增检测。从结果可以看出,亲和层析法提纯的样本经 RNA 提取后可以很好的通过 RT-PCR 方法检测到,仅 PCR 扩增未检出,表明纯化后的样本中无 DNA 污染(图 3)。



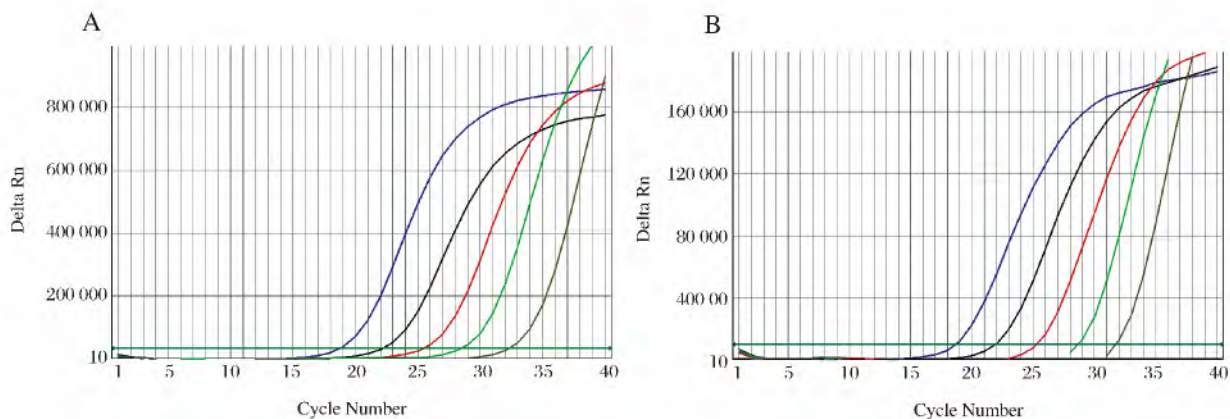
1: RT-PCR amplification; 2: PCR amplification;
3: DL2000 DNA marker

图 3 RT-PCR 和 PCR 方法扩增 FluA/B 嵌合体假病毒中 FluA 基因片段凝胶电泳图

Figure 3 Agarose gel electrophoresis of amplification FluA gene FluA/B AR by RT-PCR and PCR

4 FluA/B 假病毒作为标准品

将纯化的含有 FluA/B 片段的假病毒 10 倍梯度稀释作为定量标准品,线性标准品浓度从 10^7 拷贝/mL 到 10^3 拷贝/mL,扩增曲线见图 4。



A: Amplification of FluA; B: Amplification of FluB.

图 4 FluA/B 假病毒标准品 RT-PCR 扩增 A: FluA 扩增; B: FluB 扩增

Figure 4 Amplification of FluA/B AR standards

5 FluA/B 假病毒稳定性研究

不同温度下保存的稳定性检测结果表明,假病毒至少可以在 4℃和-20℃稳定保存 3 个月以上,在

室温条件下,2 个月后开始出现缓慢降解(图 5,A)。在-70℃和 37℃反复冻融 10 次,Ct 值未发生明显变化(图 5,B)。

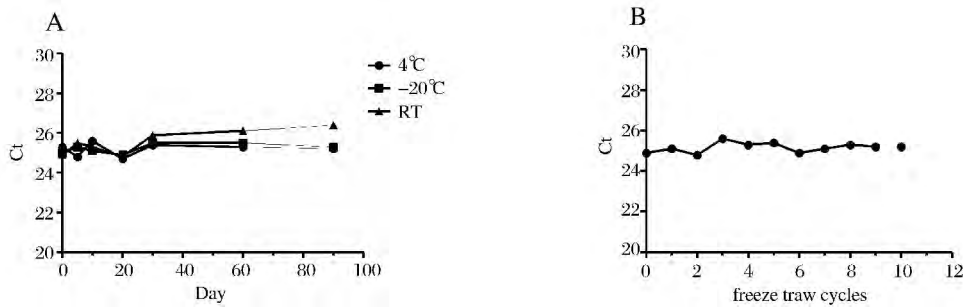


图 5 FluA/B 假病毒稳定性 A:不同保存温度下稳定性; B:反复冻融下稳定性

Figure 5 Stability of FluA/B AR.

讨 论

随着实时荧光 PCR 技术在病毒检测中的广泛应用,制备可以监测病毒核酸提取、逆转录和 PCR 扩增全程的理想质控品是保证检测结果准确可靠的必要因素。自 1997 年, DuBois 发布耐 RNase 的“盔甲 RNA”(armored RNA)技术的专利之后,越来越多运用装甲 RNA 的技术来制备质控品,装甲 RNA 技术是指由 MS2 噬菌体外壳蛋白包裹重组 RNA 的技术^[6-7],研究发现将 MS2 噬菌体的外壳蛋白等基因和外源性基因片段插入到原核表达载体中,这一载体能够将它们转录成 RNA,并利用载体上 MS2 外壳蛋白基因合成的外壳蛋白将重组 RNA 装配成球状的 RNA 蛋白复合物,即病毒样颗粒^[8-12]。

本实验将带有 His 标签的 MS2 衣壳蛋白基因(CP 基因)插入 pET32a 载体后,构建的假病毒通用载体,通过诱导表达能够形成带有 His 标签的 RNA-蛋白质复合物,可通过镍柱亲和层析纯化假病毒,这一纯化方式相比常规氯化铯超速离心纯化病毒样颗粒更简便高效,特异性高^[13],可以最大程度地减少大肠杆菌在裂解过程中大量释放的质粒 DNA 对病毒颗粒的污染,提高假病毒样本的纯度。本实验构建的这一假病毒通用载体可以作为构建和制备耐 RNase 的 mRNA 标准品和质控品的平台。

本研究通过序列分析,通过 RT-PCR 分别获得甲/乙型流感高保守区基因片段,并将这两个片段依次连接到假病毒通用载体上,诱导表达后获得甲/乙

型流感嵌合体假病毒颗粒。通过对表达产物的观察,大肠杆菌表达的甲/乙型流感嵌合体假病毒在纯化过程中,以可溶状态存在于裂解物的上清中,具有极高的可溶性,说明包膜蛋白在体内可以正确组装形成完整的病毒样颗粒。经镍柱亲和层析纯化的甲/乙型流感嵌合体假病毒,用商品化的甲/乙型流感核酸试剂盒经 RT-PCR 可同时检测出甲/乙型流感病毒,获得特异性扩增曲线,单纯 PCR 并无扩增,表明纯化颗粒中无质粒 DNA 污染。本实验通过后对甲/乙型流感嵌合体假病毒稳定性初步实验发现,该假病毒可以在-20℃或 4℃条件下稳定存在至少 3 个月以上,反复冻融对假病毒的稳定性影响不大。实验获得的甲/乙型流感嵌合体假病毒经梯度稀释后完全满足实验室流感病毒检测的要求,高纯度和高稳定的特性使其成为更加完善的流感病毒 RNA 检测的质控品/标准品。

参考文献:

- [1] Bao Y, Bolotov P, Dernovoy D, Kiryutin B, Zaslavsky L, Tatusova T, Ostell J, Lipman D. The influenza virus resource at the national center for biotechnology information [J]. *J Virol*, 2008, 82:596-601.
- [2] Smith A B, Mock V, Melear R, Colarusso P, Willis D E. Rapid detection of influenza A and B viruses in clinical specimens by LightCycler real-time RT-PCR [J]. *J Clin Virol*, 2003, 28:51-58.
- [3] World Health Organization. CDC protocol of real-time RT-PCR for swine influenza (H1N1) [R]. World Health Organization. http://www.who.int/csr/resources/publications/swineflu/CDCrealtimeRTPCRprotocol_20090428.pdf. Accessed on 8 May 2009.

- [4] Kim K, Park J, Chung Y, Cheon D, Lee I B, Lee S, Yoon J, Cho H, Song C, Lee K H. Use of internal standard RNA molecules for the RT-PCR amplification of the faeces-borne RNA viruses[J]. *J Virol Methods*, 2002,104(2) : 107-115.
- [5] Matthews J L, Chung M, Matyas R J. Persistent DNA contamination in competitive RT-PCR using cRNA internal standards: Identity, quantity, and control [J]. *Biotechniques*,2002,32(6) : 1412-1417.
- [6] Pasloske B L, Walkerpeach C R, Obermoeller R D, Winkler M, DuBois D B. Armored RNA technology for production of ribonuclease-resistant viral RNA controls and standards [J]. *J Clin Microbiol*, 1998,36(12):3590-3594.
- [7] WalkerPeach C R, Winkler M, DuBois D B, Pasloske B L. Ribonuclease-resistant RNA controls (Armored RNA) for reverse transcription-PCR, branched DNA, and genotyping assays for hepatitis C virus [J]. *Clin Chem*, 1999,45(12):2079-2085.
- [8] David S Peabody. The RNA binding site of bacteriophage MS2 coat protein [J]. *EMBO J*,1993,12(2):595-600.
- [9] Peabody DS. Role of the coat protein-RNA interaction in the life cycle of bacteriophage MS2 [J]. *Mol Gen Genet*,1997,254:358-364.
- [10] Karataylı E, Altunoğlu YÇ, Karataylı S C, Alagöz S G, Cınar K, Yalçın K, Idilman R, Yurdaydın C, Bozdayı A M. A one step real time PCR method for the quantification of hepatitis delta virus RNA using an external armored RNA standard and intrinsic internal control [J]. *J Clin Virol*, 2014, 60(1):11-15.
- [11] Shulman L M, Hindiyeh M, Muhsen K, Cohen D, Mendelson E, Sofer D. Evaluation of four different systems for extraction of RNA from stool suspensions using MS-2 coliphage as an exogenous control for RT-PCR inhibition [J/OL]. *PLoS One*, 2012, 7 (7): e39455.
- [12] Zhan S, Li J, Xu R, Wang L, Zhang K, Zhang R. Armored long RNA controls or standards for branched DNA assay for detection of human immunodeficiency virus type 1 [J]. *J Clin Microbiol*, 2009, 47(8):2571-2576.
- [13] 肖性龙, 余以刚, 翟建新, 李惠芳, 吴晖. 含组氨酸纯化标签的假病毒表达载体的构建与应用[J]. *中国生物化学与分子生物学报*, 2011, (07):687-692.

Construction and Expression of RNase-Resisting His-Tagged Virus-Like Particles Containing FluA/B mRNA

ZHANG Jin¹, XUE Xiaoning², XU Hefei¹, ZHU Ke¹, CHEN Xiaoguang¹,
ZHANG Juan¹, ZHANG Qi¹, LIN Yuan¹

(1. Shandong International Travel HealthCare Center, Shandong Entry-Exit Inspection and Quarantine Bureau, Qingdao 266071, China;

2. Qingdao Airport Entry-Exit Inspection and Quarantine Bureau,

Shandong Entry-Exit Inspection and Quarantine Bureau, Qingdao 266071 China)

Abstract: To prepare virus-like particles containing FluA/B mRNA as RNA standard and control in Influenza RNA detection, the genes coding the coat protein and maturase of *E. coli* bacteriophage MS2 were amplified and cloned into D-pET32a vector. Then we inserted 6 histidines to MS2 coat protein by QuikChange[®] Site-Directed Mutagenesis Kit to construct the universal expressing vector D-pET32a-CP-His. In addition, the partial gene fragments of FluA and FluB were cloned to the down-stream of expressing vector. The recombinant plasmid D-pET32a-CP-His-FluA/B was transformed to BL21 with induction by IPTG. The virus-like particles were purified by Ni⁺ chromatography. The virus-like particles can be detected by RT-PCR, but not PCR. They can be conserved stably for at least 3 months at both 4°C and -20°C. His-tagged virus-like particles are more stable and easier to purification. It can be used as RNA standard and control in Influenza virus RNA detection.

Key words: Influenza virus; Bacteriophage MS2; Ni⁺ chromatography, Virus-like particles; RT-PCR

* Corresponding author: ZHANG Jin, E-mail: zhjooohyn@hotmail.com