

doi: 10.3969/j.issn.1008-0589.202309005

A型流感病毒PB2蛋白帽子结合结构域的原核表达与鉴定

林维鹏, 崔鹏飞, 王思文, 邓国华, 陈化兰*

(中国农业科学院哈尔滨兽医研究所 动物疫病防控全国重点实验室/农业农村部动物流感重点开放实验室, 黑龙江 哈尔滨 150069)

摘要: A型流感病毒是一种重要的人畜共患病病原, 严重威胁全球公共卫生安全。PB2蛋白的帽子结合结构域(CBD)在流感病毒的转录过程中发挥重要功能, 是抗流感病毒药物的重要靶点之一。为获得高纯度原核表达的A型流感病毒的CBD蛋白, 本研究利用同源重组策略将8×His标签与一株H5N1亚型高致病性禽流感病毒的CBD区基因序列克隆至原核表达载体pET28a中, 构建重组质粒pET28a-8×His-CBD, 经PCR及测序鉴定正确后转化大肠杆菌BL21(DE3)感受态细胞, 经不同浓度IPTG诱导不同时间后, 经SDS-PAGE检测蛋白表达后使用镍柱纯化。结果显示, 菌体裂解上清中在21 ku处可见目的条带, 与8×His-CBD蛋白预期大小符合, 且以0.5 mmol/L IPTG于37 °C诱导6 h时蛋白表达量最高, 镍柱纯化后可获得纯度大于95%的8×His-CBD蛋白。为确定该蛋白是否具有生物学活性, 本研究以帽子结构类似物m⁷GTP对其进行等温滴定量热试验, 结果显示8×His-CBD蛋白和m⁷GTP结合时存在明显热峰, 表明8×His-CBD蛋白具有生物学活性; 经计算, 其K_d值为 $1.71 \times 10^{-5} (\pm 2.92 \times 10^{-6})$ mol/L。本研究结果对流感病毒的基础研究和抗流感病毒药物的研发具有借鉴意义。

关键词: A型流感病毒; PB2蛋白; 帽子结合结构域; 原核表达; 纯化

中图分类号: S852.65

文献标识码: A

文章编号: 1008-0589(2024)02-0107-06

Prokaryotic expression and characterization of PB2 cap-binding domain of influenza A virus

LIN Wei-peng, CUI Peng-fei, WANG Si-wen, DENG Guo-hua, CHEN Hua-lan*

(Influenza Laboratory of the Ministry of Agricultural and Rural Affairs, State Key Laboratory for Animal Disease Control and Prevention, Harbin Veterinary Research Institute, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Harbin 150069, China)

Abstract: As a major zoonotic pathogen, influenza A virus (IAV) poses serious threats to global public health security. The cap-binding domain (CBD) of PB2 protein plays an important role in IAV transcription process, and is therefore one of the important targets for anti-influenza drugs. To obtain high-purity CBD protein by prokaryotic expression system, the CBD gene sequence of a highly pathogenic IAV H5N1 and an 8×His tag were constructed into the prokaryotic expression vector pET28a by homologous recombination strategy. The constructed recombinant plasmid pET28a-8×His-CBD was identified by PCR and sequencing, and then transformed into *Escherichia coli* receptor cells BL21 (DE3). The expression of CBD protein was detected by SDS-PAGE after induction with different concentrations of IPTG for different hours, and then purified by Ni-NTA. The results showed that a distinct band at 21ku was visible in the cell lysate supernatant of the bacterium, which was consistent with the expected size of 8×His-CBD protein. The highest expression of the protein was obtained under the condition of 0.5mmol/L IPTG, cultured for 6 hours at 37°C, and the purity of the 8×His-CBD protein was more than 95% after Ni-NTA purification. To

*Corresponding author

收稿日期: 2023-09-08

基金项目: 十四五国家重点研发计划(2021YFD1800200)

作者简介: 林维鹏(1995-), 男, 山东济南人, 硕士研究生, 主要从事高致病性禽流感病毒的致病机制研究。

* 通信作者: E-mail: chenhualan@caas.cn

determine whether the 8×His-CBD protein in this study was biologically active, it was subjected to an isothermal titration calorimetry (ITC) assay with m⁷GTP, the cap structure analogue. Apparent thermal peaks were observed when the two were combined, indicating that the 8×His-CBD protein was biologically active, and the K_d value was calculated to be 1.71×10^{-5} ($\pm 2.92 \times 10^{-6}$) mol/L. In this study, the recombinant plasmid pET28a-8×His-CBD was correctly constructed, and the optimal induction conditions were determined. The high-purity 8×His-CBD protein was obtained with biological activity. This study could have reference significance for the basic research of influenza virus and for the development of anti-influenza virus drugs.

Key words: influenza A virus; PB2 protein; cap-binding domain; prokaryotic expression; purification

流感病毒属于正黏病毒科流感病毒属, 可分为A、B、C、D 4型。其中A型流感病毒(Influenza A virus, IAV)宿主范围广、危害极大, 常引发季节性流行, 并导致4次全球流感大流行, 包括1918年西班牙大流行、1957年亚洲大流行、1968年香港大流行和2009年甲型H1N1流感大流行^[1]; 而H5N1亚型高致病性禽流感病毒(Highly pathogenic avian influenza virus, HPAIV)不仅对全球养殖业造成严重经济损失^[2], 还可以跨越种间屏障直接感染人, 甚至引起患者死亡。2003年~2022年的20年间, WHO已报道了870例人感染H5N1亚型禽流感病毒(AIV)病例, 其中死亡457例。

IAV的RNA聚合酶(RNA dependent RNA polymerase, RdRP)是由PB2蛋白、PB1蛋白和PA蛋白组成的异源三聚体, 负责病毒基因组的转录和复制。IAV的转录必须依赖引物起始, 但其自身不能合成起始引物, 而是通过一种称为“帽子抢夺”的机制夺取宿主细胞mRNA前体(pre-mRNA)的5'端部分结构, 作为引物起始合成病毒mRNA^[3]。在这一过程中, PB2蛋白识别并结合pre-mRNA的5'端帽子结构, 随后PA蛋白发挥内切酶活性, 在5'帽子结构下游nt10~nt15处切断pre-mRNA, 最终由PB1蛋白作为核心亚基合成病毒mRNA^[4-5]。其中主要通过PB2蛋白上的帽子结合结构域(Cap-binding domain, CBD)识别并结合pre-mRNA, 该结构域位于PB2蛋白的aa318~aa483^[6], 对于流感病毒帽子结构依赖的转录过程至关重要, 可被部分化合物竞争性结合而导致流感病毒生命周期受损, 因此作为抗流感病毒药物研发的理想靶点而备受关注。

原核表达系统操作简单、蛋白表达迅速且产量高, 具有巨大优势。固定金属离子亲和层析法(Immobilized metal ion affinity chromatography, IMAC)是蛋白纯化的常用方法, 通过固相化的金属离子与蛋

白质表面的特殊氨基酸相互作用从而实现蛋白质的亲和纯化, 如蛋白质中组氨酸(His)残基的咪唑基团可以与Ni²⁺、Co²⁺等金属离子形成配位键而结合^[7]。多聚组氨酸亲和标签(His tag)具有富集纯化效率高、价格低廉等优势, 该标签尺寸和电荷相对较小, 对蛋白功能的影响很小; 此外, 含有His tag的融合蛋白可在温和条件下被洗脱, 从而保持其生物学活性^[7], 因此His tag是蛋白纯化的常用标签。基于以上优势, 使用原核表达系统表达His tag与目的蛋白的融合蛋白, 通过固相化Ni²⁺富集后使用高浓度咪唑缓冲液洗脱, 是目前获得纯化蛋白的常用策略。

本研究将一株H5N1亚型HPAIV PB2蛋白的CBD区与8×His tag融合表达于pET28a质粒, 表达8×His-CBD蛋白, 并优化表达条件, 利用镍柱纯化获得了高纯度的8×His-CBD蛋白, 为流感病毒的基础研究和抗流感病毒药物研发提供物质基础。

1 材料与方法

1.1 主要实验材料 本研究中所使用的H5N1亚型HPAIV A/Chicken/Liaoning/SD035/2018 (H5N1)株(简称LN35株)由国家禽流感参考实验室分离、鉴定并保存。原核表达载体pET28a由本实验室保存。病毒RNA提取试剂盒及胶回收纯化试剂盒购自天根生化科技(北京)有限公司; 反转录酶M-MLV购自Promega公司; 高保真DNA聚合酶PrimerSTAR Max及DL2000 DNA Marker购自TaKaRa公司; Dpn I酶购自NEB公司; 同源重组试剂盒及大肠杆菌BL21(DE3)感受态细胞购自南京诺唯赞生物科技股份有限公司; F-DH5α快速感受态细胞购自上海唯地生物技术有限公司; IPTG购自Biosharp公司; 硫酸卡那霉素、溶菌酶和咪唑购自北京索莱宝科技有限公司; Quick Blue快速染胶液购自北京博奥龙免疫技术有限公司;

Protease Inhibitor Cocktail购自APEXBio; High Affinity Ni-charged Resin FF (Ni-NTA)购自金斯瑞生物科技股份有限公司; 6×His tag鼠源单克隆抗体(MAb)购自Proteintech公司; IAV PB2蛋白兔源多克隆抗体(PAb)由本实验室制备; Dylight 680标记的山羊抗鼠IgG和Dylight 800标记的山羊抗兔IgG购自Immuno-way公司; 10 ku超滤管购自杭州科百特过滤器材有限公司; PD-10脱盐层析柱购自Cytiva公司; 蛋白Marker及BCA蛋白定量试剂盒购自Thermo Scientific公司; 宿主细胞帽子结构类似物7-甲基鸟苷5'-三磷酸(7-methylguanosine 5'-triphosphate, m⁷GTP)购自Sigma公司。

1.2 引物的设计与合成 依据LN35株PB2基因及pET28a载体序列, 利用Primer Premier 5设计引物。其中引物12bp-R用于RNA反转录; 引物CBD-F1/R1用于扩增CBD及引入凝血酶酶切位点; 引物CBD-F2/R2为同源重组引物, 其5'端(加粗部分)与pET28a序列同源, 该对引物用于扩增带有8×His tag(有下划线部分)的CBD区; 引物pET28a-VF/VR用于pET28a载体的线性化扩增; 引物T7/T7-terminal为pET28a质粒的通用测序引物(表1)。上述引物均由吉林省库美生物科技有限公司合成。

表1 本研究所使用的引物
Table 1 Primers used in this study

| 引物名称 Primers | 引物序列(5'-3') Primer sequences (5'-3') |
|-----------------|--|
| 12bp-R | AGCRAAAGCAGG |
| CBD-F1 | AGCAGCGGCCTGGTGCCGCGCGCAGCCATAGGA TCAGTTCATCCTTCAG |
| CBD-R1 | TCACATTTACTAACTCTTACTCCTCTC |
| CBD-F2 | AGATATACCATGGCAGCAGCCATCATCATCA TCATCATCACAGCAGCGCCTGGTG |
| CBD-R2 | CAAGCTTGTGACGAGCTCGAATTCACATTTT ACTAACTCTTACTCCTCTC |
| pET28a-VF | GAATTCGAGCTCCGTCGACAAGCT |
| pET28a-VR | GCTGCTGCCCATGGTATATCTCCTTCT |
| T7 | TAATACGACTCACTATAGGG |
| T7-terminal | GCTAGTTATTGCTCAGCGG |

注: 斜体部分为LN35-CBD序列; 加粗部分为LN35-CBD与pET28a同源序列; 下划线为8×His tag序列。

Note: Italicized sequences are homologous to LN35-CBD; Bolded sequences are homologous arms of LN35-CBD and pET28a; Underlined sequence is 8×His tag.

1.3 重组表达载体的构建与鉴定 利用病毒RNA提取试剂盒提取鸡胚尿囊液中的LN35株RNA, 利用反转录酶M-MLV将其反转录为cDNA, 反转录引物为通用引物12bp-R。

为了扩增PB2的CBD片段并去除pET28a质粒中固有的T7 tag, 同时保留凝血酶酶切位点, 以方便后续去除融合蛋白上的His tag, 以LN35株的cDNA为模板, 以CBD-F1/R1为引物, 利用PrimerSTAR Max进行PCR扩增, 反应程序: 98 °C 2 min; 98 °C 10 s、55 °C 15 s、72 °C 40 s, 共30个循环; 72 °C 2 min; CBD的PCR产物胶回收纯化后作为模板, 以CBD-F2/R2为引物, 进行第二次PCR扩增, 获得引入8×His tag和同源臂的CBD片段, 命名为8×His-CBD片段。同时以pET28a质粒为模板, 以pET28a-VF/VR为引物, 经PCR扩增获得线性化载体。线性化载体胶回收后利用Dpn I 37 °C酶切2 h后使用胶回收纯化试剂盒纯化, 以去除环状质粒模板。将8×His-CBD片段与线性化的pET28a载体于37 °C同源重组30 min后, 将产物转化F-DH5α感受态细胞, 涂布于硫酸卡那霉素抗性的LB平板, 37 °C培养12 h, 挑取单克隆菌落于卡那抗性LB液体培养基中继续培养12 h后, 提取重组质粒经PCR及测序鉴定, 将鉴定正确的重组质粒命名为pET28a-8×His-CBD。

1.4 重组蛋白的表达与鉴定 将pET28a质粒和pET28a-8×His-CBD重组质粒分别转化BL21 (DE3)感受态细胞, 获得pET28a/BL21和pET28a-8×His-CBD/BL21重组菌, 挑取单克隆菌落于5 mL卡那抗性LB液体培养基中, 37 °C 220 r/min培养至OD_{600nm}值为0.6~0.8时, 以终浓度为1 mmol/L的IPTG于37 °C 180 r/min诱导4 h后收集菌体, PBS洗涤沉淀2~3次后以500 μL PBS重悬, 超声破碎菌体, 直至溶液清亮。分别收集沉淀和上清, 菌体沉淀以500 μL PBS重悬。样品与5×loading buffer混匀煮沸10 min后经12% SDS-PAGE检测重组蛋白的表达; 分别以6×His tag鼠源MAb (1:5 000)和IAV PB2蛋白兔源PAb (1:500)为一抗, 以Dylight 680标记的山羊抗鼠IgG和Dylight 800标记的山羊抗兔IgG(1:10 000)为二抗, 通过western blot鉴定该蛋白的反应原性, 将表达的重组蛋白命名为8×His-CBD。

1.5 8×His-CBD蛋白表达条件的优化、纯化及SDS-PAGE检测 取5 mL待诱导pET28a-8×His-CBD/BL21重组菌液, 分别以终浓度为0、0.1 mmol/L、0.25 mmol/L、0.5 mmol/L、0.75 mmol/L、1.0 mmol/L及1.5 mmol/L的IPTG于37 °C、180 r/min诱导4 h后收集菌体, 同1.4样品处理后经12% SDS-PAGE凝胶电泳, Quick Blue快速染胶液染色2 h后使用近红外荧

光扫描成像系统(Odyssey CLx)扫描,采用Image J软件通过目的蛋白条带与总体蛋白条带灰度百分比进行蛋白表达率分析^[8]。随后,以0.5 mmol/L IPTG分别对5 mL OD_{600nm}为0.6~0.8的菌液于37 °C、180 r/min分别诱导0、2 h、4 h、6 h、8 h、12 h、18 h和24 h后以同样的方法检测并分析蛋白的表达量。

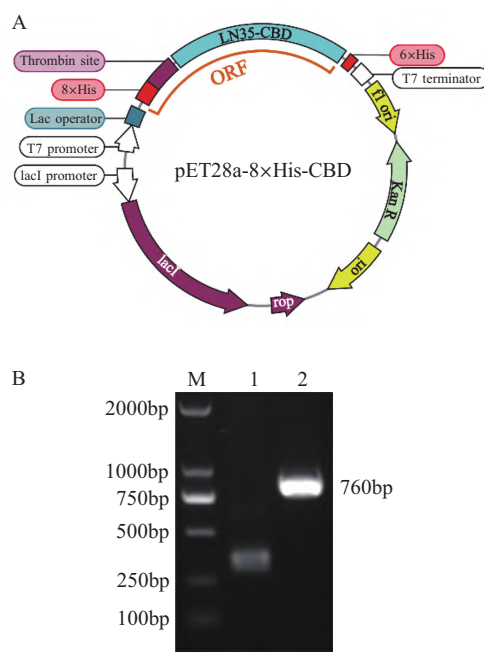
将100 mL pET28a-8×His-CBD/BL21重组菌液以终浓度为0.5 mmol/L的IPTG于37 °C 180 r/min诱导6 h后收集并洗涤菌体,加入10 mL Binding buffer (500 mmol/L NaCl、20 mmol/L Tris-HCl、1 mg/mL溶菌酶、1×Protease Inhibitor Cocktail, pH7.9),室温裂解30 min后,冰浴超声破碎10 min。4 °C、12 000 g离心10 min,裂解上清经0.45 μm滤膜过滤后用于纯化。将1 mL Ni-NTA填料以Binding buffer润洗4个柱体积后与裂解上清混匀,4 °C结合60 min后使用150 mmol/L咪唑充分洗去非特异性结合蛋白,随后采用400 mmol/L咪唑洗脱目的蛋白,经SDS-PAGE检测蛋白后,采用Image J软件分析纯化蛋白的纯度。

1.6 8×His-CBD蛋白的生物学活性检测 利用等温滴定量热(Isothermal titration calorimetry, ITC)试验检测8×His-CBD蛋白的生物学活性。使用10 ku超滤管浓缩纯化的8×His-CBD蛋白,通过PD-10脱盐层析柱将蛋白buffer置换为ITC buffer (150 mmol/L NaCl、10 mmol/L HEPES, pH7.4)后,采用BCA蛋白定量试剂盒测定并计算8×His-CBD蛋白的摩尔浓度,使用ITC buffer将m⁷GTP调整至该蛋白浓度的10倍备用^[9]。利用Affinity ITC仪器进行ITC实验,上述溶液于20 °C平衡并脱气后,取300 μL 8×His-CBD蛋白溶液加入样品池作为滴定底物(对照组使用ITC buffer稀释的相同摩尔浓度的BSA蛋白),第一次m⁷GTP滴定体积为0.5 μL/次,其余34次滴定体积为2 μL/次,仪器搅拌速率为150 r/min。采用NanoAnalyze Data Analysis软件(Version 3.11.0),依据8×His-CBD蛋白与m⁷GTP的结合热峰,对8×His-CBD蛋白的生物学活性进行评估。

2 结果

2.1 pET28a-8×His-CBD重组表达载体的构建与鉴定 有研究报道适当延长标签中的His残基数量可提高蛋白的纯度^[10]。本研究将8×His tag融合于CBD蛋白N端,并在两者之间插入凝血酶酶切位点,以便

后续切除His tag;采用同源重组策略将扩增的融合片段8×His-CBD克隆至pET28a原核表达载体中,构建重组质粒pET28a-8×His-CBD(图1A),并采用PCR和测序鉴定。结果显示,以T7/T7-terminal为引物对pET28a-8×His-CBD进行PCR扩增,获得一条760 bp左右的单一目的条带(图1B),与预期符合。对该扩增产物测序,结果与目的基因序列一致,表明正确构建了重组质粒pET28a-8×His-CBD。

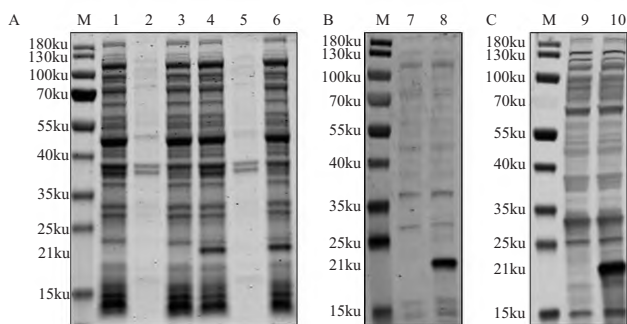


M: DL2000 DNA Marker; 1: pET28a; 2: pET28a-8×His-CBD

图1 pET28a-8×His-CBD质粒构建的模式图(A)及PCR鉴定结果(B)

Fig. 1 Schema (A) and PCR amplification result (B) of pET28a-8×His-CBD

2.2 8×His-CBD蛋白的表达与鉴定 pET28a-8×His-CBD/BL21菌液培养至OD_{600nm}为0.6~0.8时,将5 mL菌液以终浓度为1 mmol/L IPTG诱导后收集菌体超声破碎,SDS-PAGE分别检测上清与沉淀中蛋白的表达情况。结果显示,在21 ku处出现条带,与8×His-CBD蛋白预期大小相符,而空载体转化诱导菌中无该条带;且该蛋白主要在上清中表达,包涵体中未检测到该蛋白条带(图2A)。同时,分别利用6×His tag MAb和IAV PB2蛋白PAb为一抗进行western blot检测8×His-CBD蛋白的反应原性,结果显示,与对照组相比,诱导组在21 ku处均能检测到特异性条带(图2B、2C)。以上结果表明8×His-CBD蛋白以可溶性正确表达,且具有反应原性。

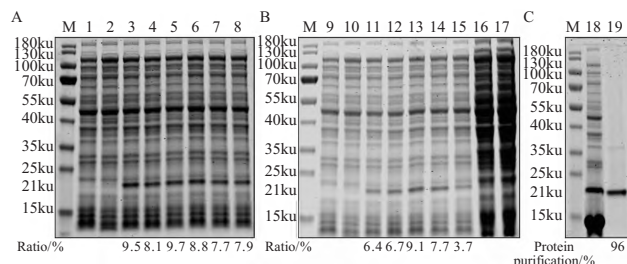


M: Protein Marker; 1-6: Lysate, precipitation, and supernatant of pET28a/BL21 and pET28a-8xHis-CBD/BL21; 7, 9: Supernatant of pET28a/BL21; 8, 10: Supernatant of pET28a-8xHis-CBD/BL21

图2 8xHis-CBD蛋白诱导表达的SDS-PAGE检测(A)、以6xHis tag MAb (B)及PB2蛋白pAb (C)为一抗的western blot检测结果
Fig. 2 Expression analysis of 8xHis-CBD with SDS-PAGE (A), western blot with monoclonal antibody to 6xHis tag (B), and with polyclonal antibody to PB2 protein (C) as primary antibody

2.3 8xHis-CBD蛋白诱导表达条件的优化与蛋白纯化的SDS-PAGE检测 为进一步筛选8xHis-CBD蛋白的最佳IPTG诱导浓度, 本研究分别以终浓度为0、0.1 mmol/L、0.25 mmol/L、0.5 mmol/L、0.75 mmol/L、1.0 mmol/L及1.5 mmol/L的IPTG对5 mL OD_{600nm} 0.6~0.8菌液诱导后, 菌体裂解并超声后的上清经12% SDS-PAGE凝胶电泳、染色、扫描成像后采用Image J软件分析8xHis-CBD蛋白表达情况。结果显示, 该蛋白表达率介于7.7%~9.7%, 当IPTG浓度为0.5 mmol/L时, 目的蛋白的表达率最高(图3A)。为确定最佳诱导时间, 以0.5 mmol/L IPTG对5 mL OD_{600nm}为0.6~0.8的菌液分别诱导0、2 h、4 h、6 h、8 h、12 h、18 h和24 h后裂解并超声菌液后采用SDS-PAGE分析目的蛋白表达率。结果显示, 随着诱导时间的延长, 8xHis-CBD蛋白表达率逐步升高, 并在6 h时达到最大; 但当进一步延长诱导时间时, 目的蛋白的表达率逐渐降低(图3B), 因此最佳诱导时间为6 h。综合以上结果, 37 °C、0.5 mmol/L IPTG 诱导6 h可获得8xHis-CBD蛋白的最佳诱导表达效果。

将pET28a-8xHis-CBD/BL21重组菌液以终浓度为0.5 mmol/L的IPTG于37 °C、180 r/min诱导6 h后超声, 裂解上清与Ni-NTA于4 °C充分结合后以150 mmol/L咪唑充分洗脱非特异性结合蛋白, 再以400 mmol/L咪唑洗脱8xHis-CBD蛋白, 并使用SDS-PAGE检测8xHis-CBD蛋白的纯化情况。结果显示, 本研究纯化的8xHis-CBD蛋白纯度大于95% (图3C)。



M: Protein Marker; 1-8: Supernatant of induced pET28a/BL21, and induced pET28a-8xHis-CBD/BL21 at an IPTG concentration of 0, 0.1 mmol/L, 0.25 mmol/L, 0.5 mmol/L, 0.75 mmol/L, 1.0 mmol/L, and 1.5 mmol/L, respectively; 9-17: Supernatant of induced pET28a/BL21, and induced pET28a-8xHis-CBD/BL21 for 0, 2 h, 4 h, 6 h, 8 h, 12 h, 18 h, and 24 h, respectively; 18-19: Unpurified and purified 8xHis-CBD protein

图3 8xHis-CBD蛋白的IPTG浓度(A)和诱导时间(B)的优化及纯化(C)结果

Fig. 3 Optimization of IPTG concentration (A) and induction time (B) for 8xHis-CBD, and its purification (C)

2.4 8xHis-CBD蛋白的生物活性检测 CBD蛋白最主要的功能是结合宿主细胞pre-mRNA的帽子结构, 因此通过分析ITC试验中CBD蛋白与该帽子结构类似物m⁷GTP的结合热峰可以判断纯化的8xHis-CBD蛋白是否具有生物学活性。本研究使用m⁷GTP在20 °C条件下分别滴定了BSA蛋白和8xHis-CBD蛋白。结果显示, m⁷GTP滴定BSA蛋白时, 仅可见稀释热而无明显结合热峰(图4A), 即BSA蛋白不能与m⁷GTP结合; 而m⁷GTP滴定8xHis-CBD蛋白时可见明显热峰, 经计算其K_d值为1.71×10⁻⁵(±2.92×10⁻⁶)mol/L(图4B), 表明本研究纯化的8xHis-CBD蛋白具有生物学活性。

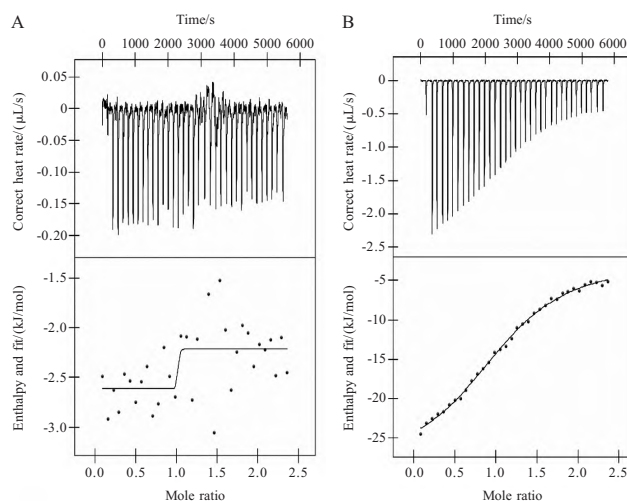


图4 BSA蛋白(A)及8xHis-CBD蛋白(B)与m⁷GTP的ITC结果
Fig. 4 ITC results of BSA (A) and 8xHis-CBD (B) with m⁷GTP

3 讨论

PB2蛋白的CBD区对流感病毒的生命周期及致病性存在重要作用。Guilligay等解析了IAV的CBD结构,并鉴定出CBD蛋白与m⁷GTP相互作用的14个氨基酸残基,其中E³⁶¹与帽子结构鸟嘌呤的N1、N2均存在氢键,而K³⁷⁶通过与鸟嘌呤O6相互作用参与碱基的识别,因此是两个最重要的位点;E³⁶¹A及K³⁷⁶A突变均能使CBD失去与m⁷GTP结合的能力^[6]。Liu等也报道了K³³⁹T突变能够降低CBD对m⁷GTP的亲和力,从而降低IAV的复制水平^[9]。CBD上存在一个明显暴露的424-loop,其序列在A型及B型流感病毒中均相对保守,研究表明该结构对CBD与帽子结构的亲和力影响不大,但其完整性对于流感病毒的转录至关重要^[6]。此外,有研究报道宿主因子ANP32A蛋白与IAV PB2蛋白的相互作用依赖PB2蛋白的aa307~aa534残基,其中CBD中的G⁴⁵⁰和Q⁴⁴⁷是两者互作的必要条件^[11]。

流感病毒变异迅速,单纯依靠疫苗往往不能满足防疫要求。抗流感病毒药物在流感的治疗中发挥着不可替代的作用。目前已有3种抗流感病毒药物被批准:针对M2蛋白的离子通道抑制剂、针对NA蛋白的神经氨酸酶抑制剂和针对RdRP的抑制剂^[12],但由于流感病毒跨物种传播、频繁的变异以及长期的药物选择压力,许多抗流感病毒药物已失效:如M2蛋白获得S³¹N等突变后,会导致金刚烷胺等M2质子通道抑制剂类药物失效^[13],美国疾病预防控制中心已不再建议使用该类药物;NA蛋白抑制剂的耐药问题也一直困扰着其临床应用^[12]。针对IAV CBD区的帽子结构结合靶点设计新型药物已成为一种抗流感病毒的新策略。Clark等于2014年报道的pimodivir(又名VX-787)即是基于这种思路研发的CBD蛋白抑制剂,该化合物可以竞争性占据CBD区帽子结构的结合位点进而抑制流感病毒的转录^[14]。VX-787在小鼠模型中预防和治疗流感的效果显著,尽管由于III期临床试验结果不理想,其开发工作已经停止^[11,15],但鉴于CBD蛋白在流感病毒生命周期中的独特功能,仍然不失为抗流感病毒药物设计的理想靶点之一。目前也不断有针对CBD蛋白的新药被开发出来,如Roch和Boyd等分别于2015年和2016年报道了VX-787类似物^[16-17],而纯化获得高纯度的CBD是开发这些化合物效力的基础。

使用His tag纯化蛋白的一个问题是非标记内源性蛋白质的非特异性结合。虽然组氨酸出现的频率相对较低,但部分菌体蛋白含有两个或多个相邻的His残基,本研究的western blot试验结果也证实了细菌裂解上清中存在能被6×His tag抗体识别的菌体蛋白,这些蛋白质可能对IMAC基质有较强亲和力,导致蛋白产物的污染^[7]。适当延长标签中His残基数量可提高蛋白的纯度,因为更加严格的洗脱条件在一定程度上去除了非特异性结合的内源蛋白^[10]。

本研究将经典原核表达系统中的6×His延长为8×His,获得了纯度大于95%的CBD蛋白,并通过ITC试验证实纯化的8×His-CBD蛋白具有生物学活性,对流感病毒的致病机制研究及抗流感病毒药物的研发具有一定的借鉴意义。

参考文献:

- [1] LI CHENG-JUN, CHEN HUA-LAN. Enhancement of influenza virus transmission by gene reassortment [J]. *Curr Top Microbiol Immunol*, 2014, 385: 185-204.
- [2] CUI PENG-FEI, SHI JIAN-ZHONG, WANG CONG-CONG, et al. Global dissemination of H5N1 influenza viruses bearing the clade 2.3.4.4b HA gene and biologic analysis of the ones detected in China [J]. *Emerg Microbes Infect*, 2022, 11(1): 1693-1704.
- [3] ENGELHARDT O G, SMITH M, FODOR E. Association of the influenza A virus RNA-dependent RNA polymerase with cellular RNA polymerase II [J]. *J Virol*, 2005, 79(9): 5812-5818.
- [4] JIANG LI, CHEN HUA-LAN, LI CHENG-JUN. Advances in deciphering the interactions between viral proteins of influenza A virus and host cellular proteins [J]. *Cell Insight*, 2023, 2(2): 100079.
- [5] 葛叶, 邓国华, 李雪平, 等. 流感病毒聚合酶PB1-1蛋白的表达与单克隆抗体的制备[J]. *中国预防兽医学报*, 2009, 31(9): 726-729.
- [6] GUILLIGAY D, TARENDEAU F, RESA-INFANTE P, et al. The structural basis for cap binding by influenza virus polymerase subunit PB2 [J]. *Nat Struct Mol Biol*, 2008, 15(5): 500-506.
- [7] BORNHORST J A, FALKE J J. Purification of proteins using polyhistidine affinity tags [J]. *Methods Enzymol*, 2000, 326: 245-254.
- [8] 戚百川, 杨金钱, 丁文文, 等. 副猪嗜血杆菌主要免疫原性抗原的克隆表达及其反应原性的对比分析[J]. *中国预防兽医学报*, 2021, 43(8): 880-884.

(下转第139页)

- ty [J]. Infect Immun, 2001, 69(8): 4938-4943.
- [37] GAILLOT O, PELLEGRINI E, BREGENHOLT S, et al. The ClpP serine protease is essential for the intracellular parasitism and virulence of *Listeria monocytogenes* [J]. Mol Microbiol, 2000, 35(6): 1286-1294.
- [38] JAMET A, KISS E, BATUT J, et al. The katA catalase gene is regulated by OxyR in both free-living and symbiotic *Sinorhizobium meliloti* [J]. J Bacteriol, 2005, 187(1): 376-381.
- [39] JAYAKAR H R, PARVATHAREDDY J, FITZPATRICK E A, et al. A galU mutant of *Francisella tularensis* is attenuated for virulence in a murine pulmonary model of tularemia [J]. BMC Microbiol, 2011, 11: 179.
- [40] NIOU YI-KAI, WU WAN-LING, LIN LING-CHUN, et al. Role of gale on biofilm formation by *Thermus* spp [J]. Biochem Biophys Res Commun, 2009, 390(2): 313-318.
- [41] 李静怡, 徐成刚, 冯赛祥, 等. galU和galE基因敲除对副猪嗜血杆菌脂寡糖分子质量的影响[J]. 动物医学进展, 2013, 34(11): 66-68.
- [42] 束晓梅, 蔡方成. galE基因敲除后空肠弯曲菌变异株脂寡糖结构的改变[J]. 中国免疫学杂志, 2004, (5): 300-302.
- [43] HALLGREN A, SAEEDI B, NILSSON M, et al. Genetic relatedness among *Enterococcus faecalis* with transposon-mediated high-level gentamicin resistance in Swedish intensive care units [J]. Antimicrob Agents Chemother, 2003, 52: 162-167.
- [44] 王蓉, 陈端. *aac(6)-Ie-aph(2)-Ia*基因及其转座子与HLGR肠球菌的相关性研究进展[J]. 微生物学免疫学进展, 2007, (4): 75-77.
- [45] 芮萍, 马增军, 陈翠珍, 等. 猪源链球菌对大环内酯类主要耐药基因的检测[J]. 中国兽医学报, 2011, 31(6): 838-842.
- [46] 李娜, 靳书刚, 李喜旺, 等. 牛源大肠杆菌四环素类抗生素耐药相关基因的筛选及鉴定[J]. 中国预防兽医学报, 2021, 43(4): 440-443.
- [47] YANG QIN, ZHU YAO, SCHWARZ S, et al. A novel plasmid from *Aerococcus urinaeequi* of porcine origin co-harboring the tetracycline resistance genes tet(58) and tet(61) [J]. Vet Microbiol, 2021, 257: 109065.

(本文编辑: 李 爽; 英文编辑: 于中业)

(上接第 112 页)

- [9] LIU YONG, QIN KUN, MENG GENG, et al. Structural and functional characterization of K339T substitution identified in the PB2 subunit cap-binding pocket of influenza A virus [J]. J Biol Chem, 2013, 288(16): 11013-11023.
- [10] GRISSHAMMER R, TUCKER J. Quantitative evaluation of neurotensin receptor purification by immobilized metal affinity chromatography [J]. Protein Expr Purif, 1997, 11(1): 53-60.
- [11] WEI XIU-LI, LIU ZHI-XIN, WANG JING-JIE, et al. The interaction of cellular protein ANP32A with influenza A virus polymerase component PB2 promotes vRNA synthesis [J]. Arch Virol, 2019, 164(3): 787-798.
- [12] HOU LING-XIN, ZHANG YING, JU HAN, et al. Contemporary medicinal chemistry strategies for the discovery and optimization of influenza inhibitors targeting vRNP constituent proteins [J]. Acta Pharm Sin B, 2022, 12(4): 1805-1824.
- [13] KROL E, RYCHLOWSKA M, SZEWCZYK B. Antivirals--current trends in fighting influenza [J]. Acta Biochim Pol, 2014, 61(3): 495-504.
- [14] CLARK M P, LEDEBOER M W, DAVIES I, et al. Discovery of a novel, first-in-class, orally bioavailable azaindole inhibitor (VX-787) of influenza PB2 [J]. J Med Chem, 2014, 57(15): 6668-6678.
- [15] ZHANG JIAN-TAO, HU YAN-MEI, MUSHARRAFIEH R, et al. Focusing on the influenza virus polymerase complex: Recent progress in drug discovery and assay development [J]. Curr Med Chem, 2019, 26(13): 2243-2263.
- [16] ROCH F F, HINTERKORNER G, MENKE J, et al. An RNA hybridization assay for screening influenza A virus polymerase inhibitors using the entire ribonucleoprotein complex [J]. Assay Drug Dev Technol, 2015, 13(8): 488-506.
- [17] BOYD M J, BANDARAGE U K, BENNETT H, et al. Isosteric replacements of the carboxylic acid of drug candidate VX-787: Effect of charge on antiviral potency and kinase activity of azaindole-based influenza PB2 inhibitors [J]. Bioorg Med Chem Lett, 2015, 25(9): 1990-1994.

(本文编辑: 李 爽; 英文编辑: 李 芳)