维普资讯 http://www.cqvip.com

论 著 文章编号:0253-3626(2007)10-1016-04

人偏肺病毒分离株蛋白质特性的初步探讨

黄 路,赵晓东,张 琴,赵 耀,丁 媛

(重庆医科大学附属儿童医院 P2 实验室,重庆 400014)

【摘 要】目的:初步明确人偏肺病毒(Human metapneumovirus ,hMPV)主要蛋白质的基本特性。方法:以纯化的 hMPV 重庆分离株 CHN05-01 灭活病毒为抗原,免疫家兔获得抗血清。用此抗血清为一抗通过免疫印迹法检测 hMPV 蛋白。用 NetNGlyc 1.0 Server、NetOGlyc 3.1 Server、NetPhos 2.0 Server 分析 hMPV A 型标准株 CAN97-83 氨基酸序列,预测 hMPV 蛋白氨基酸序列中可能的糖基化、磷酸化位点。结果:ELISA 检测显示所制备的抗血清与 hMPV 的蛋白反应效价达 1:500 以上,可有效识别 hMPV 蛋白。软件分析示 G 蛋白糖基化位点最多,而 P 蛋白磷酸化位点最多。以兔抗 hMPV 血清为一抗的免疫印迹法提示 CHN05-01 的 G 蛋白糖基化水平较一致,与 CAN99-80 和 CAN99-81 不同,其分子量介于 55 至 72ku 之间,约 68ku;F 蛋白 F1 亚单位分子量介于 40 至 55ku,约为 48ku。结论:初步明确了 hMPV 两个主要膜表面糖蛋白的分子量和糖化特点,为后续蛋白功能研究奠定了基础。

【关键词】偏肺病毒;F 蛋白;G 蛋白质;抗血清

【中国图书分类法分类号】R373.1 【文献标识码】A 【收稿日期】2007-02-02

Preliminary study on proteins of human metapneumovirus chinese isolate

HUANG Lu,et al

(*P2 lab,the Children's Hospital,Chongqing Medical Unitersity*)

【Abstract】*Objective*:Human metapneumovirus (hMPV),initially described in 2001,is an enveloped RNA virus of the genus Metapneumovirus,subfamily Pneumovirinae,family Paramyxoviridae. Here we sought to clarify basic features of human metapneumovirus proteins. *Methods*:Rabbits were immunized with inactivated virons of hMPV Chinese first isolate,CHN05-01, to yield anti-hMPV antiserum. Antiserum was used as primary antibody to detect hMPV proteins by Western blotting. NetNglyc1.0 server,NetOglyc 3.1server and the NetPhos 2.0 server were applied for predicting potential glycosylation and phosphorylation sites of proteins of prototype virus of type A,CAN97- 83. *Results*:The highest reactive titer of the antiserum with hMPV antigens reached 1:500 in ELISA. Potential glycosylation sites of G protein and phosphorylation sites of P protein were greatest among all hMPV proteins. G protein was shown a narrow band with molecular weight between 55 and 72kDa (approximately 68kDa),indicating its glycosylation level being consistent and remarkably different from that of CAN99-80 and CAN99-81. F1 subunit of fusion protein displayed molecular weight between 40 and 55kDa (approximately 48 kDa),which is consistent with previous reports. *Conclusion*:Basic features of two major membrane proteins of Chinese human metapneumovirus isolate were clarified, which will benefit future studies on protein funtion and pathogenesis of this virus.

【Key words】 Metapneumovirus;Fusion protein;Attachment protein;Antiserum

人偏肺病毒(Human metapneumovirus,hMPV)是 2001 年首度分离的呼吸道病毒病原,属副粘病毒科,肺病毒亚科,偏肺病毒属[1-3]。流行病学资料提示 hMPV 为儿科急性呼吸道感染较为常见的病毒病原,可导致各年龄组人群轻重不等的呼吸道感染尤其是儿童,并可致免疫功能不全者死亡[4-6]。hMPV 基因组 RNA 长约 13000nt,主要包含 8 个蛋白质基因[7],目前对上述蛋白的功能尚不清楚。为了解 hMPV 蛋白特性,我们采用 hMPV 中国第一株分离株 CHN05-01(属 A 型)免疫家兔制备抗 hMPV 抗血清,用免疫印迹法分析该株病毒膜表面主要糖蛋白的基本特性,并用软件辅助分析 hMPV 标准株各蛋白质的糖化和磷酸化特性。

作者介绍:黄 路(1981-),女,硕士,主要研究方向:临床免疫学。

基金项目:国家自然科学基金资助项目(30571976)。

1 材料和方法

维普资讯 http://www.cqvip.com

1.1 实验动物

新西兰大白兔 5 只,均为雄性,体重 1.5～2.0kg,购自重庆医科大学动物试验中心(生产许可证号:SCXK(渝)20050002)。

1.2 hMPV 的繁殖

接种病毒前 1 天将绿猴肾(Vero E6)细胞铺至 T75 培养瓶中,共 5 瓶。Vero E6 细胞培养基培养为:每 100ml 含 DMEM 88ml,胎牛血清 10ml,HEPES 缓冲盐(100×)1ml,抗生素 1ml。接种当天细胞约 70%～90%满,弃上清,用 PBS 清洗 2 次,每个培养瓶加入 1ml 病毒生长培养基和 50μl hMPV CHN05-01 病毒液,37℃吸附 1h,弃接种物后加入 12ml 病毒生长培养基(每 100ml 含 DMEM 94ml,胎牛血清 3ml,HEPES 缓冲盐(100×)1ml,抗生素 1ml,2.5%胰酶 1ml),培养至第 4 天 CPE 达 ++++ 时收获病毒,-80℃冻存。

1.3 hMPV 的纯化

采用 35%蔗糖梯度离心法。如上所述繁殖病毒,当 CPE 达 ++++ 时,收集含病毒细胞悬液,2℃、5000r/min(3024×g,BECKMAN Avanti J-25)离心 5min 后收集上清。将 20ml 35%蔗糖/HBSS 加入 50ml 无菌离心管中,再轻缓加入 15ml 含病毒上清,2℃、25000r/min(75000×g,BECKMAN Avanti J-25)过夜离心。次日弃上清,每管加入 1800μl MEM+200μl 病毒保存液(2mol/L $MgSO_4$ 和 1mol/L HEPES 以 1:1 配制),振荡混匀,分装并 -80℃冻存。

1.4 免疫原的制备及免疫

将纯化的 hMPV 病毒颗粒液用不含血清的 MEM 作 1:4,1:24,1:124 稀释。将纯化的病毒原液,3 种稀释液,和 MEM(阴性对照),分别与完全弗氏佐剂以 1:1 混合乳化成 A,B,C,D,E 乳剂,分别注射第 1 至第 5 只家兔。第 1 次注射家兔双足掌跖,分 3 点皮下注射,每只家兔每次注射乳剂 1ml。第 2 次加强免疫注射颈部皮下,第 3 次注射背部皮下,方法用量均同第 1 次。第 3 次加强免疫 1 周后,耳缘静脉取 200μl 血。用 ELISA 检测血清抗体效价,1 周后麻醉下颈静脉放血,分离血清,-20℃冻存。

1.5 抗体效价的酶联免疫吸附法(ELISA)检测

如前述方法用 hMPV CHN05-01 毒株感染他 Vero E6 细胞(T75),感染后 4 天至 CPE++++ 时用细胞刮刀收集所有细胞悬液,4℃离心去上清,细胞沉淀加入 1ml 0.5%NP-40 裂解后,13000r/min(16060×g Heraeus Labofuge 400)4℃离心 5min 去沉淀,分装上清,-80℃保存。再将此裂解液(1:100 稀释),包被 96 孔板。磷酸盐缓冲液(PBS)洗板,5%脱脂奶粉封闭。依次加入一抗(兔抗 hMPV 抗血清)37℃孵育 1h,二抗辣根过氧化物酶标记的羊抗兔 IgG 抗体孵育 1h。于 450nm 波长读取光密度值。以第 5 只兔血清作为阴性对照。

1.6 免疫印迹检测

裂解感染 hMPV 的 Vero E6 细胞、未感染 hMPV 的正常 Vero E6 细胞和 RSV 感染的人喉癌(HEP-2)细胞,裂解液经变性处理并十二烷基硫酸钠聚丙烯酰胺凝胶(SDS-PAGE)电泳后,电转至 PVDF 膜,膜与 1:1000 稀释的兔抗 hMPV 抗体共育 1h,二抗为辣根过氧化物酶标记的抗兔 IgG,加入化学发光底物并用图像分析仪曝光 5min 读取结果。

1.7 软件分析 hMPV 蛋白多肽分子量、糖基化位点和磷酸化位点

根据已知的 hMPV CAN97-83 的氨基酸序列应用 PeptideMass 计算其蛋白多肽分子量,NetNGlyc 1.0 Server 和 NetOGlyc 3.1 Server 神经网络预测氨基酸序列中 Asn-Xaa-Ser/Thr 三肽(天门冬酰胺-X 氨基酸—丝氨酸/苏氨酸三肽)可能性大于 50%的 N-连接糖基化和 O-GalNAc 连接糖基化位点。应用 The NetPhos 2.0 server 神经网络预测位于丝氨酸,苏氨酸,酪氨酸处可能性大于 50%磷酸化位点。

2 结 果

2.1 抗体效价的酶联免疫吸附测定法(ELISA)检测

纯化的 hMPV 病毒颗粒与佐剂乳化后,共免疫家兔 3 次。以 hMPV 裂解液为抗原包被进行 ELISA 测定。结果显示第一只家兔抗体效价最高,以阴性对照 OD 最高值 0.144 设为界点,即 OD>0.144 为阳性,100 倍稀释的血清平均 OD 值达 1.148,500 倍稀释的血清仍为阳性。

2.2 抗体特异性鉴定

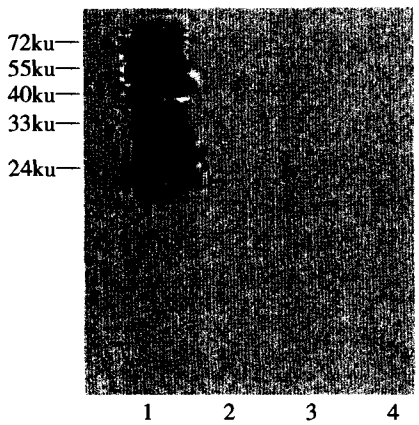
为进一步鉴定所制备抗体的特异性,采用 hMPV 感染的 Vero E6 细胞裂解液为抗原,进行 SDS-PAGE 电泳和免疫印迹检测。结果显示 1 号家兔抗血清可有效识别 hMPV 的抗原。免疫印迹至少清晰显示四条条带,分子量分别约为 68ku、48ku、38ku、27ku。家兔抗血清的反应效价达到 1:1000。作为阴性对照,用同一血清与未感染 hMPV 的正常 Vero E6 细胞的裂解液进行反应,未发现有相应条带出现;该抗血清亦不能识别 RSV 感染的 HEP-2 细胞裂解液抗原,提示我们所制备的抗血清可特异性识别 hMPV 抗原(图 1)。

2.3 软件分析 hMPV CAN97-83 蛋白多肽分子量、糖基化位点和磷酸化位点

以 hMPV A 型标准株 CAN97-83 氨基酸序列为对象,采用软件辅助分析其个蛋白糖基化和磷酸化情况。结果发现,G 蛋白可能性大于 50%的糖基化位点最多,共达 58 个,其中 O-连接糖基化位点 56 个,N-连接糖基化位点 2 个。同样作为膜表面糖蛋白的 F 蛋白潜在糖基化位点却明显少于 G 蛋白,仅为 4 个。L 蛋白可能性大于 50%磷酸化位点最多,

维普资讯 http://www.cqvip.com

为 98 个;P 蛋白蛋白核心分子量明显小于 L 蛋白,其可能的磷酸化位点却达 26 个,故其磷酸化水平可能最高(表 1)。



注:兔抗 hMPV 抗血清为一抗,1:抗原为感染 hMPV CHN 05-01 的 Vero E6 细胞;2:抗原为正常 Vero E6;3:抗原为感染 RSV 的 Hep-2 细胞;4:抗原为正常 Hep-2 细胞。分子量标记已标于左侧。

图 1 Western blot 检测 hMPV 蛋白

表 1 hMPV CAN97-83 蛋白多肽分子量、糖基化位点和磷酸化位点

蛋白(GenBank 氨基酸序列号)	蛋白多肽分子量(u)	预测的 N-连接糖基化位点(个)	预测的 O-GalNAc 连接糖基化位点(个)	预测的磷酸化位点(个)
F(YP 012608.1)	58440	3	1	28
G(YP 012612.1)	23653	2	56	36
SH(YP 012611.1)	20614	3	4	13
N(YP 012605.1)	43510	1	0	26
P(YP 012606.1)	32727	1	6	26
L(YP 012613.1)	230611	9	0	98
M(YP 012607.1)	27594	2	2	14
M2-1(YP 012609.1)	21220	2	0	9
M2-2(YP 012610.1)	8183	0	0	3

F:融合蛋白,G:主要吸附蛋白,SH:小疏水蛋白,N:核蛋白,P:磷蛋白,L:主要多聚酶亚单位,M:基质蛋白,M2-1:转录延伸因子,M2-2:RNA 合成调节因子

3 讨 论

目前已基本明确 hMPV 基因组含 8 个 RNA 转录单位,编码 9 个不同蛋白,分别是核衣壳蛋白(N)、磷酸化蛋白(P)、基质蛋白(M)、融合蛋白(F)、转录延伸因子(M2-1)、RNA 合成调节因子(M2-2)、小疏水蛋白(SH)、主要黏附蛋白(G)、和 RNA 聚合酶大亚单位(L)。从 3'至 5'端分别是 3'-N-P-M-F-M2-1-M2-2-SH-G-L-5'。其中 G、F 蛋白为膜表面糖蛋白,是肺炎病毒亚科所有成员均具有的膜蛋白分子,表达于被感染细胞或病毒颗粒表面,介导病毒粘附并感染靶细胞。作为膜蛋白成分,G、F 蛋白与机体的免疫系统接触频繁,在致病机制中扮演重要角色。G、F 蛋白诱导机体产生的中和抗体也是机体最为重要的预防感染途径。N 蛋白则主要诱导机体特异性细胞免疫应答,对机体最终清除病毒至关重要。hMPV 是迄今为止发现的唯一一个以人为宿主的偏肺病毒属成员,其蛋白分子量、糖化和磷酸化水平均不清楚,故采用免疫动物血清行免疫印迹检测和计算机辅助分析方法,探讨 hMPV 主要蛋白的基本特性及其是否与 RSV 蛋白存在交叉抗原性。

目前所分离的 hMPV 根据基因序列同源程度,分为 A、B 两个遗传型,分别以加拿大分离株 CAN97-83 和 CAN98-75 为代表[7,8]。通过核苷酸序列及推导的氨基酸序列分析:两代表株全基因组同源性分别为 80%和 90%[7];其 F 蛋白高度保守[9],序列同源性为分别为 95%和 95.3%[8];而 G 蛋白在 A、B 型间却表现出高度多样性。

本实验所选用的 hMPV 中国分离株 CHN05-01 为我们首先在中国大陆分离获得的 hMPV 流行株,经序列分析和遗传发生分析,CHN05-01 与 A、B 两型标准株 CAN97-83 和 CAN98-75 F 基因部分片断氨基酸序列同源性分别为 100%和 95.3%,因而被证实为 A 型 hMPV (Genbank 收录号为 DQ336142.1 GI:85070129)。用蔗糖梯度离心法纯化的病毒颗粒免疫家兔获得的抗血清可有效检测 hMPV 蛋白,反应效价可达 1:1000,免疫印迹清楚显示了四条带,分别位于 24~33ku、33~40ku、40~55ku、55~72ku,分子量约为 68ku、48ku、38ku、27ku 左右。该抗血清并不识别模拟感染的 Vero-E6 细胞抗原,亦未与 RSV 感染的 HEP-2 细胞抗原反应,证实其为 hMPV 特异性免疫血清,抗血清的获得为 hMPV 的免疫学检测和今后的蛋白功能研究奠定了基础。

我们将 hMPV A 型标准株全长 F 基因序列克隆如杆状病毒载体并在昆虫细胞 sf-9 中成功表达

维普资讯 http://www.cqvip.com

前体蛋白 F0,其分子量约为 68ku(资料未显示)。同副粘病毒科其他成员 (如 RSV、禽偏肺病毒等)类似,hMPV F0 蛋白被外源性蛋白酶消化为 F1 和 F2 两亚单位,其中 F1 亚单位 N 端为融合活性位点,介导病毒入胞及繁殖。此前他人报道 hMPV 荷兰分离株 F1 亚单位分子量约 45ku 左右[11],本研究发约 48ku 存在明显条带,由于我们的病毒培养系统中含有胰酶,因而推测其可能就是 CHN05-01 分离株的 F1 亚单位。

计算机辅助分析发现 G 蛋白蛋白核心分子量约为 23ku,且有多达 58 个可能的糖基化位点。结合副粘病毒科的其它成员 G 蛋白往往为高糖化蛋白,hMPV G 蛋白的分子量亦可能远远超出其蛋白核心的分子量,为其分子量最大的蛋白成分,因而我们推测图 1 中分子量约 68ku 的条带可能为 G 蛋白条带。此前他人用杆状病毒表达的 CAN99-80 和 CAN99-81 G 蛋白在免疫印迹检测时均为一拖尾条带,提示 hMPV G 蛋白与 RSV G 蛋白类似,不同毒株间甚至同一毒株的 G 蛋白糖化水平可能明显不同[10]。有趣的是我们检测到的可能 G 蛋白条带则较窄,无明显拖尾现象,提示 CHN05-01 G 蛋白糖化和水平相对一致。

N、P 和 M 蛋白糖化水平均应较低。N 蛋白蛋白核心分子量约为 43.5ku,仅有 1 个可能的糖基化位点和 26 个磷酸化位点;P 蛋白蛋白核心分子量约为 32.7ku, 有 6 和 26 个位点可能的糖基化和磷酸化。结合 Western blot 检测结果, 推测 33~55ku 间的条带中可能包括 N 蛋白和 P 蛋白。

本实验初步明确了 hMPV 两个主要表面糖蛋白的分子量和糖化程度,为单克隆抗体的制备和后续蛋白功能研究奠定了基础。

(作者现单位:江西省儿童医院)

参 考 文 献

[1] Van Den Hoogen BG,De Jong JC,Groen J,et al. A newly discovered human pneumovirus isolated from young children with respiratory tract disease[J]. Nat Med,2001;7:719-724.

[2] Van Den Hoogen BG,Osterhaus DM,Fouchier RA,et al. Clinical impact and diagnosis of human metapneumovirus infection[J]. Pediatr Infect Dis J,2004;23:S25-S32.

[3] Van Den Hoogen BG,Bestebroer TM,Osterhaus AD,et al. Analysis of the genomic sequence of a human metapneumovirus[J]. Virology,2002;295:119-132.

[4] Crowe,James E,Jr MD,et al. Human Metapneumovirus as a Major Cause of Human Respiratory Tract Disease[J]. Pediatr Infect Dis J,2004;23(11):S215-S221.

[5] Falsey AR,Erdman D,Anderson LJ,et al. Human metapneumovirus infections in young and elderly adults[J]. J Infect Dis,2003;187:785-790.

[6] Van Den Hoogen BG,Van Doornum GJ,Fockens JC,et al. Prevalence and clinical symptoms of human metapneumovirus infection in hospitalized patients[J]. J Infect Dis,2003;188:1571-1577.

[7] Biacchesi S,Skiadopoulos MH, Boivin G,et al. Genetic diversity between human metapneumovirus subgroups[J]. Virology,2003;315:1-9.

[8] Skiadopoulos MH,Biacchesi S,Buchholz UJ,et al. The two major human metapneumovirus genetic lineages are highly related antigenically, and the fusion (F) protein is a major contributor to this antigenic relatedness[J]. J Virol,2004;78:6927-6937.

[9] Galiano M,Trento A,Ver L,et al. Genetic heterogeneity of G and F protein genes from Argentinean human metapneumovirus strains[J]. J Med Virol,2006;78(5):631-637.

[10] Bastien N,Liu L,Ward D,et al. Genetic variability of the G glycoprotein gene of human metapneumovirus[J]. J Clin Microbiol,2004;42:3532-3537.

[11] Jeanne H. Schickli,Jasmine Kaur,Nancy Ulbrandt,et al. An S101P Substitution in the Putative Cleavage Motif of the Human Metapneumovirus Fusion Protein Is a Major Determinant for Trypsin-Independent Growth in Vero Cells and Does Not Alter Tissue Tropism in Hamsters[J]. J Virol,2005;79(16):10678-10689.