

**A 型流感病毒蛋白与宿主蛋白  
相互作用研究**

**The study of interaction between Influenza  
A virus protein and host protein**

学科专业：食品科学与工程  
研究生：刘永飞  
指导教师：黄金海 副教授  
              韩雪清 研究员

天津大学化工学院  
二零一二年十二月

## 独创性声明

本人声明所提交的学位论文是本人在导师指导下进行的研究工作和取得的研究成果，除了文中特别加以标注和致谢之处外，论文中不包含其他人已经发表或撰写过的研究成果，也不包含为获得 天津大学 或其他教育机构的学位或证书而使用过的材料。与我一同工作的同志对本研究所做的任何贡献均已在论文中作了明确的说明并表示了谢意。

学位论文作者签名：

签字日期：

年 月 日

## 学位论文版权使用授权书

本学位论文作者完全了解 天津大学 有关保留、使用学位论文的规定。特授权 天津大学 可以将学位论文的全部或部分内容编入有关数据库进行检索，并采用影印、缩印或扫描等复制手段保存、汇编以供查阅和借阅。同意学校向国家有关部门或机构送交论文的复印件和磁盘。

（保密的学位论文在解密后适用本授权说明）

学位论文作者签名：

导师签名：

签字日期： 年 月 日

签字日期： 年 月 日

## 摘要

A 型流感病毒属于正粘病毒科，由 8 股负链 RNA 构成，按照核蛋白和基质蛋白的不同进行分型。NS1 蛋白是由第 8 节段 RNA 编码，该蛋白在抑制宿主蛋白合成，诱导宿主细胞凋亡及促进病毒的合成和增殖等方面均有重要功能。

本研究以 1918 A 型流感病毒 NS1 蛋白为研究对象，通过全基因合成方法获得 NS1 蛋白的全序列，将 NS1 蛋白连接到 pET28 原核表达载体上，通过条件优化后确定的最佳诱导参数为：IPTG 终浓度 0.1mM，温度 28℃，诱导时间 6h。采用镍螯合层析法纯化获得可溶性 His-NS1 重组蛋白后免疫小鼠制备多抗。经 ELISA 检测，多抗的效价为  $1:1.6 \times 10^5$ 。

构建了 pCTAP-NS1 真核表达载体，用脂质体 2000 瞬时转染 HEK 细胞，转染 48h 后 Western Blot 能够检测到 NS1 蛋白。用 G418 筛选稳定表达 NS1 蛋白的细胞株，筛选 40 天后运用 RT-PCR 检测到 NS1 mRNA 的存在，Western Blot 表明 NS1 蛋白已经大量表达，说明已经成功筛选到稳定表达 NS1 蛋白的 HEK 细胞株。

应用 TAP 串联亲和纯化技术纯化 TAP-NS1 重组蛋白复合物，定量后上样 100 $\mu$ g 进行双向电泳，并通过质谱分析确定蛋白序列。在质谱分析的所有蛋白中，由于 HSP70 与 NS1 均在细胞凋亡中具有重要作用，因此两者有可能存在相互作用。

同时表达并纯化了带有 GST 标签的 NS1 蛋白及其两个结构域：RBD 和 ED 共三种蛋白，运用 GST Pull Down 技术在体外验证了 HSP70 蛋白与 NS1 存在相互作用，并发现 HSP70 与 RBD 和 ED 结构域都具有结合位点。将 GFP-NS1 质粒转染 A549 细胞后运用荧光显微镜观察 HSP70 与 NS1 的定位，发现两者在细胞浆中发生共聚焦，说明 HSP70 与 NS1 在体内也存在相互作用。因此，本研究初步确定了 HSP70 与 NS1 之间的相互作用，为进一步研究 NS1 蛋白对宿主细胞的调控机制奠定的基础。

**关键词：** 流感病毒；NS1 蛋白；HSP70；相互作用

# ABSTRACT

Influenza A viruses are enveloped viruses within the family Orthomyxoviridae. They contain a single-stranded, negative sense, segmented RNA genome which consists of eight segments of viral RNA (vRNA). NS1 protein is encoded on a collinear mRNA derived from vRNA segment eight. It is a multiple-function protein that plays a significant role in the restraining the synthesis of host proteins, and also has impact on the cell apoptosis and regulation of viral pathogenicity and virulence.

In this study, we synthesized the NS1 gene of 1918 influenza A virus and cloned it into prokaryotic expression vector pET28a. The soluble recombinant proteins His-NS1 was expressed in *E.coli* BL21 (DE3) under the optimal condition. The NS1 protein was purified by nickel chelate affinity chromatography method and then was injected into immune mouse to prepare the polyclonal antibody. ELISA assay were used to analysis the titer of the serum. The results showed that the titer of antiserum was 1:  $1.6 \times 10^5$ .

pCTAP-NS1 was constructed and was transfected in HEK cells by Lipofectamine 2000. The expression level of NS1 was then determined by Western Blot assay at 48h posttransfection. Furthermore, HEK cells were transfected with pCTAP-NS1, and anti-G418 cell clones were screened using G418. The results showed that HEK cell clones expressing NS1 were obtained by G418 pressure selection after continuous passage for 40 days by using RT-PCR and Western Blot analysis.

Tandem affinity purification was used in our study to purify cellular interactors of NS1 protein, one of which was identified as HSP70 by two-dimensional electrophoresis and mass spectrum. The interaction between HSP70 and NS1 was further conformed by GST Pull Down assay and confocal immunofluorescence. GST-RBD (RNA Binding Domain), GST-ED (Effect Domain) and GST-NS1 were purified to search for the interaction interface. Results of GST Pull Down indicated that HSP70 interacted with NS1 both in RNA Binding Domain and Effect Domain. Confocal immunofluorescence assay also demonstrated that they were well co-located in the cytoplasm. Summing up the above, our study preliminary indicated that HSP70

interacted with NS1 in the cytoplasm and made a foundation for NS1 protein function research in cell cycle regulation and induction of apoptosis.

**KEY WORDS:** Influenza A virus; NS1 protein; HSP70 protein; Interaction

# 目 录

第一章 文献综述.....	1
1.1 流感病毒综述.....	1
1.1.1 流感病毒概述.....	1
1.1.2 流感病毒的复制.....	1
1.1.3 流感病毒的进化方式.....	2
1.1.4 流感病毒常用的检测方法.....	3
1.1.5 流感病毒的结构.....	5
1.1.6 非结构蛋白 NS1.....	6
1.2 HSP70 蛋白.....	9
1.2.1 HSP70 的结构及其基因定位.....	10
1.2.2 HSP70 的生物学功能.....	11
1.3 蛋白质相互作用的研究方法.....	12
1.3.1 酵母双杂交.....	12
1.3.2 GST Pull Down.....	12
1.3.3 免疫荧光共定位.....	13
1.3.4 免疫共沉淀.....	13
1.4 研究的目的和意义.....	14
第二章 流感病毒 NS1 蛋白多抗的制备.....	15
2.1 实验材料.....	15
2.1.1 载体及菌株.....	15
2.1.2 主要试剂.....	15
2.2 试验方法.....	17
2.2.1 pET-NS1 载体的构建.....	17
2.2.2 凝胶回收 PCR 产物.....	17
2.2.3 pET28 和目的片段双酶切.....	17
2.2.4 柱式回收酶切产物.....	18
2.2.5 构建连接体系.....	18
2.2.6 连接产物转化到大肠杆菌 Trans5 $\alpha$ .....	18
2.2.7 阳性菌质粒提取.....	18
2.2.8 双酶切验证重组质粒.....	19
2.2.9 将重组质粒转化到大肠杆菌 BL21 (DE3).....	19

2.2.10	重组质粒的诱导表达 .....	19
2.2.11	纯化目的蛋白 .....	19
2.2.12	用抗原免疫小鼠 .....	19
2.2.13	ELISA 检测抗体滴度 .....	20
2.3	试验结果 .....	20
2.3.1	pET-NS1 载体的构建 .....	20
2.3.2	重组菌的诱导表达及纯化 .....	21
2.3.3	ELISA 检测多抗的效价 .....	22
2.4	讨论 .....	23
2.4.1	pET-NS1 重组蛋白的表达及纯化 .....	23
2.4.2	多抗的制备 .....	23
2.5	小结 .....	24
第三章	流感病毒 NS1 蛋白与 HSP70 相互作用的研究 .....	25
3.1	细胞和载体 .....	25
3.2	主要试剂 .....	25
3.3	试验方法 .....	27
3.3.1	构建 TAP-NS1 载体 .....	27
3.3.2	提取转染用质粒 .....	27
3.3.3	TAP-NS1 质粒转染 HEK 细胞 .....	27
3.3.4	Western Blot 检测 TAP-NS1 蛋白的表达 .....	28
3.3.5	G418 筛选 HEK 细胞稳定表达 NS1 蛋白细胞株 .....	28
3.3.6	纯化 NS1 重组蛋白 .....	28
3.3.7	双向电泳 .....	30
3.3.8	质谱分析 .....	30
3.3.9	GST Pull Down .....	31
3.3.10	免疫荧光共定位 .....	32
3.4	试验结果 .....	32
3.4.1	TAP-NS1 载体的构建 .....	32
3.4.2	真核表达载体 TAP-NS1 转染 HEK 细胞及 G418 筛选结果 .....	33
3.4.3	G418 筛选 HEK 细胞稳定表达 NS1 蛋白细胞株 .....	33
3.4.4	TAP-NS1 蛋白纯化 .....	34
3.4.5	双向电泳结果 .....	34
3.4.6	GST Pull Down 试验结果 .....	35
3.4.7	免疫荧光共定位 .....	36

3.5 讨论 .....	37
3.5.1 双向电泳试验结果 .....	37
3.5.2 NS1 蛋白与 HSP70 蛋白的相互作用 .....	38
3.6 小结 .....	39
第四章 结论 .....	40
参考文献 .....	41
附录一：主要化学试剂 .....	47
附录二：主要仪器 .....	48
发表论文和参加科研情况说明 .....	49
致 谢 .....	50



## 第一章 文献综述

### 1.1 流感病毒综述

#### 1.1.1 流感病毒概述

流感病毒 (Influenza virus) 是一种全球范围分布的人畜共患病, 全世界每年由于流感发病致死的人数高居所有传染病之首。流感病毒属于正粘病毒科, 负链由 8 个节段构成, 根据其核蛋白 (nucleoprotein, NP) 和基质蛋白 (matrix protein, MP) 的不同分为甲型、乙型和丙型流感病毒, 且三种类型的流感病毒均具有较强的感染性<sup>[1]</sup>。流感病毒不仅对人类具有重大威胁, 对其他禽类, 家畜也具有高致病性和高致死性<sup>[2]</sup>。报道显示已经在猪、马、猫、狗、鸡、鸭、鹅、人及海洋生物如海豹、鲸鱼等中发现了流感病毒<sup>[3]</sup>。在所有的感染宿主中, 禽类和鸟类被认为是主要的自然宿主和基因库, 目前已报道的所有甲型流感病毒的亚型都能在禽类和鸟类中发现。“混合器”理论认为, 禽类、鸟类、人和其他家畜的流感病毒都可以传染给猪, 并且猪充当了一个“混合器”的作用, 不同型的流感病毒经过猪的传染后常发生基因片段的交换重组而形成新的毒株<sup>[4]</sup>。甲型流感病毒通常是通过“基因突变”和“基因重排”来进行变异和进化, 通过“混合器”以后, 流感病毒的毒力、抗原表位等都会发生新的变化。在流感病毒的结构蛋白中, 血凝素抗原 (HA) 是其主要抗原表位, 通常新型流感病毒的爆发和蔓延都与 HA 蛋白发生变化相关。20 世纪全球共经历了三次影响范围比较广的流感病毒的传染, 其中包括: 1918 年西班牙流感、1957 年亚洲流感和 1968 年香港流感<sup>[3]</sup>。进入 21 世纪以来最著名的就是 2009 年全球爆发的 H1N1 甲型流感病毒。2009 年甲型流感病毒首先在美国爆发后迅速延伸到墨西哥等地, 并在短短几个月内席卷全球, 扰乱了全世界的正常秩序, 并对全球造成了巨大的经济损失和人员伤亡。2010 年 10 月, WTO 宣布在澳大利亚又发现了变异甲型 H1N1 流感病毒<sup>[5]</sup>。因此, 弄清楚甲型流感病毒进入宿主细胞以后的致病机理并采取有效的预防措施刻不容缓。

#### 1.1.2 流感病毒的复制

流感病毒的 HA 蛋白以突起的形式与宿主细胞表面的多糖受体结合, 病毒与细胞表面接触后以内吞的方式进入细胞内部。当体内的 pH 值达到 5.0 或者更低

时, HA2 蛋白的空间构象发生改变并激活融合通路需要的各种酶, 此时病毒表面囊膜和细胞膜融合, 病毒的核衣壳就释放到细胞质中<sup>[6]</sup>。病毒的 RNA 进一步到达宿主细胞的细胞核, 并在核内完成病毒基因组的复制和转录。病毒以 RNA 为模板, 在 RNA 聚合酶的催化下, 以宿主细胞的 mRNA 5'帽子结构转录得到 mRNA。在此过程中, PB1 蛋白负责延伸 mRNA 链, PB2 负责切割宿主细胞的帽子结构作为扩增的引物。病毒 RNA 5'端的连续的 U 序列转录得到连续的“ A 尾巴”后, 转录结束, 病毒的 RNA 聚合酶从 RNA 上脱离下来, mRNA 随后进行翻译。mRNA 在信号肽的引导下从细胞核转至细胞质, 并在细胞质中翻译病毒自身的结构蛋白和其他非结构蛋白。合成的蛋白进行一些修饰后会变成成熟的蛋白, 随后与核衣壳重新组装, 并从细胞膜释放, 形成新的病毒。

### 1.1.3 流感病毒的进化方式

流感病毒的进化分为三种方式: 抗原漂移、基因重配和宿主适应性进化等。其中人和禽类流感病毒以抗原漂移、宿主适应性为主, 猪在流感病毒进化过程中充当了“混合器”的作用, 因此猪流感病毒则以基因重配为主。

#### 1.1.3.1 抗原漂移

流感病毒在复制增殖的过程中是以 RNA 为模板, 以 RNA 聚合酶扩增新的 RNA 链。由于 RNA 缺乏 3'-5'的校正功能, 因此流感病毒复制时非常容易发生点突变。在所有蛋白中, HA 和 NA 的突变率最高, 因此以 HA 和 NA 蛋白对流感病毒进行分型。流感病毒点突变的意义在于它能逃脱宿主细胞的免疫压力, 有时候点突变积累的过多, 就会形成新的抗原, 使原来的抗体不能有效的识别抗原表位, 这就是抗原漂移<sup>[7-8]</sup>。研究表明, 近几年发现的 H5N1 和 H9N2 发生的抗原漂移现象十分明显, 这可能与长期使用疫苗增加病毒的抗免疫压力有关<sup>[9]</sup>。

#### 1.1.3.2 基因重配

基因重配现象一般常在猪体内出现。当不同来源或不同亚型的流感病毒同时感染同一宿主时, 病毒的基因组有可能会重新组合, 进而形成新的毒株, 这就是基因重配<sup>[10-12]</sup>。严格来说, 抗原漂移也是基因重组的一种特例, 当 HA 和 NA 蛋白发生新的基因重配时, 往往会出现抗原漂移的现象。近一些年在猪体内分离到了多种重配流感病毒, 包括 H1N2、H3N1、H3N2 等。这些重配株与母源相比, 在宿主范围、致病性和进化速度方面都有较大差异。

### 1.1.3.3 宿主适应性进化

当宿主细胞与流感病毒经过长期的相互适应, 流感病毒就会变异出一些与宿主细胞的免疫系统对抗的机制, 会逐渐的进化为具有宿主特异性的不同的毒株, 这本身就是流感病毒进化的过程, 也叫做宿主范围抑制性, 即一种宿主的流感病毒一般不会侵染其他的动物。不过现在也发现人与禽类之间的流感病毒的相互传染, 当流感病毒进入新的宿主细胞后还会继续发生宿主适应性进化, 通过这种方式来加快其在宿主细胞体内的适应性。

### 1.1.4 流感病毒常用的检测方法

我国是流感高发区, 流感病毒在我国呈季节性流行, 并且影响范围广, 有时甚至会威胁人类的生命, 因此建立一套完整、快速、准确、方便的诊断流感病毒的方法, 对于我国及时发现、正确治疗、有效控制流感病毒的扩散都具有重要的意义。常用的检测方法有如下几项:

#### 1.1.4.1 核酸检测方法

(1) PCR 方法。聚合酶链式反应 (PCR) 具有灵敏, 特异、快速等优点, 可以从基因水平上对流感病毒进行鉴定, 从得到样本到获得结果一般不会超过 1 天。这种方法不用从宿主中分离病毒, 只需提取组织或细胞 RNA 即可进行检测。常用的方法包括 RT-PCR, 荧光定量 PCR, 巢式 PCR, 多重 PCR, PCR-RFLP 和 RRT-PCR 等<sup>[13]</sup>。Michael 等人建立了一种多重 RT-PCR 酶杂交检测方法, 该方法可以区分 A 行流感病毒的各个亚型, 同时还可以检测甲型 H1N1 流感病毒。此方法与血清学实验结果相比较符合率为 100%。

(2) 荧光定量 PCR 方法。荧光定量 PCR 因其具有的高灵敏度、操作简单等优点, 正在逐渐取代常规 RT-PCR 成为主流的核酸检测技术<sup>[14-16]</sup>。荧光定量 RT-PCR 根据原理不同主要分为非特异结合的染料和特异性结合的探针, 通过收集到的荧光信号来反应核酸量的多少。常用染料为 SYBR Green 能够结合 DNA 双链的小沟中, 并通过融解曲线分析扩增产物是否特异。马丽<sup>[17]</sup>等人建立了 SYBR Green 荧光定量 RT-PCR 方法检测 H5 亚型流感病毒, 实验结果显示特异性良好, 可应用于临床检测。荧光探针则是由一段寡核苷酸引物组成, 在探针的两端分别标记一个发光集团和一个淬灭集团, 当两者距离很近的时候, 发光集团的荧光被淬灭, 而随着 PCR 的进行, 发光集团由于远离淬灭集团而发出荧光, 荧光的强弱跟模板量成正相关。常用探针包括 Taqman, 分子信标, 杂交探针等。2009 年甲型 H1N1 流感病毒爆发以后, WHO 推荐使用 Sitha 等人建立的荧光定

量 RT-PCR 方法, 该方法使反转录和 PCR 在同一个反应体系内完成, 并且能够检测出 A 型、B 型及副流感病毒 1 型、2 型、3 型和 4 型。Eric T B、Lisa A J、Zong M、Susanna K P L<sup>[18-23]</sup>等人均对此方法有所报道, 并且效果良好。

(3) 环介导等温扩增方法。环介导等温扩增技术是一项高灵敏度、反应快速的检测病毒的核酸扩增技术, 这项技术首先由日本学者 Notomi 提出<sup>[24]</sup>, 并逐渐在病毒检测方面得到广泛应用。该技术通过设计 2 对引物能够识别 DNA 的 6 个区域, DNA 聚合酶具有链置换性, 在反应时反转录、退火和扩增都可连续进行, 大大降低了反应所需时间, 并且反应结束后还可以用肉眼看到管底部的沉淀, 利于观察结果<sup>[25]</sup>。运用 LAMP 技术可以检测到  $10^{-3}$  pfu 的 H5N1 亚型, 并且与血清学方法的结果一致率为 100%<sup>[26]</sup>。

(4) 基因芯片。基因芯片技术分为固相芯片和液相芯片技术。芯片技术以荧光编码微球为基础, 微球表面带有大量的活性基团, 可与核酸探针、抗原、抗体等分子偶联。微球在生成过程中带上红色和橙色两种荧光染料, 两种染料分别有 10 个区分的不同配比赋予了微球 100 种不同的颜色, 产生了 100 种不同光谱学指纹的微球体, 每种微球特异性的偶联针对目的 DNA 序列的寡核苷酸探针, 就可以标记 100 种不同的探针分子。Qing 等人针对 2009 年爆发的甲型 H1N1 建立了基因芯片的检测方法, 可以鉴别 H1N1、H3N2、H5N1<sup>[27]</sup>。

#### 1.1.4.2 免疫学检测方法

流感病毒免疫学的检测方法一般是依赖抗原-抗体反应, 作为备选抗原的蛋白包括: 血凝素、核蛋白、神经氨酸酶蛋白和膜蛋白 M2e<sup>[28]</sup>, 另外也可以检测血清中是否存在流感病毒的抗体, 但是这类方法的缺点在于必须等宿主细胞内产生抗体后才可以检测, 不利于流感病毒的预防 and 有效控制。常用的免疫学检测方法如下:

(1) 琼脂凝胶扩散实验。琼扩实验利用抗原和抗体在凝胶中扩散后相结合而产生沉淀线来检测抗原或抗体。这类实验一般需要的抗原或者抗体的量比较大, 而且灵敏度和特异性均不理想。

(2) 免疫荧光法。免疫荧光法是目前检测抗原的常用方法。其原理为把荧光素标记在抗原或抗体上以检测抗体或者抗原, 如果抗原-抗体结合, 那么可以用显微镜观察到荧光。免疫荧光分为直接免疫荧光和间接免疫荧光。直接法就是在抗原的单抗上标记荧光素检测抗原, 这种方法对样品处理的要求比较高, 否则会出现假阳性和假阴性。间接法是用抗体结合抗原后, 再用二抗结合一抗, 二抗上会标记荧光集团, 从而能够检测到抗原。间接法由于有两层级联放大的作用,

因此灵敏性要比直接法高。间接法对标本也有一定的要求，一般取鼻洗液、痰、唾沫等作为受检样本<sup>[29]</sup>。

### 1.1.5 流感病毒的结构

A 型流感病毒基因组一共由 10 个蛋白组成，其中主要包括结构蛋白 HA、NA、NP、M、P 和 2 个为非结构蛋白 NS1、NS2，下面对一些主要蛋白的功能进行介绍。

#### 1.1.5.1 血凝素蛋白 (HA)

HA 蛋白位于甲型流感病毒表面，是其主要的表面抗原之一。HA 全长约为 1691bp，由两部分组成：HA1 和 HA2，大小分别为 978bp 和 669bp，两个蛋白之间由一个精氨酸以共价键连接。HA2 蛋白位于 HA 蛋白的顶部，更接近于流感病毒的表层，因此相对于 HA1 具有更强的免疫压力。最近的研究表明禽类流感病毒的 HA1 具有 4 个保守的糖基化位点，2009 年 H1N1 流感病毒在 HA1 蛋白上多出糖基化位点，因此推测 2009 甲型流感病毒在糖基化位点上具有更大的进化空间<sup>[30-31]</sup>，另外，2009 甲型流感病毒的糖基化结合位点保守性较差，在不同的宿主间差异较大，而同一个物种间比较保守<sup>[32]</sup>。这有可能与 2009 甲型流感病毒的感染机制有关。

#### 1.1.5.2 核蛋白 (NP)

核蛋白由 498 个氨基酸组成，是甲型流感病毒核衣壳主要组成部分，核蛋白在甲型流感病毒不同亚型之间也比较保守，它是流感病毒归类的主要依据。Reid 等人的研究发现在核蛋白中存在 6 个具有宿主特异性的位点<sup>[33]</sup>。NP 蛋白可以与 RNA 酶结合并在宿主细胞胞浆和细胞核之间穿梭，在病毒的增殖过程中发挥重要作用。与已知 H1N1 流感病毒相比较，2009 甲型 H1N1 流感病毒的核蛋白在 313 位由苯丙氨酸变为了缬氨酸，这有可能是流感病毒在增殖过程中与宿主细胞的相互影响的结果。

#### 1.1.5.3 基质蛋白 (M)

基质蛋白由 M1 和 M2 两个蛋白组成，M1 由 252 个氨基酸组成，是病毒囊膜的主要组成部分。基质蛋白没有糖基化位点，具有多种生物学功能，包括调控病毒的复制，组装和细胞核与细胞胞浆之间物质运输等<sup>[34]</sup>。M2 蛋白是一个跨膜蛋白，分为胞外区、跨膜区和胞内区。M2 蛋白的胞外区有四个位点具有宿主特异性，其中 2009 年甲型 H1N1 流感病毒兼具禽类和哺乳动物的特点，推测可

能是由于“混合器”的作用，导致病毒的基因重组而产生。Malik peiris J S 等人发现，2009 年甲型 H1N1 流感病毒的 M2 基因具有对金刚烷产生耐药性的基因特征<sup>[35]</sup>。

#### 1.1.5.4 聚合酶 (P)

聚合酶由 3 种蛋白组成，分别为 PB1、PB2 和 PA。PB1 和 PB2 为碱性蛋白，PA 为酸性蛋白。这三个蛋白均在宿主细胞质内合成，随后转运至细胞核，在核内指导合成病毒基因组 RNA。每个病毒中大约有 40~50 套的聚合酶，但是并不所有的都用于基因的合成，只有少量必需的酶才参与其中<sup>[36]</sup>。催化时，PB1 负责 cRNA、vRNA 的合成和 RNA 链的延伸，PB2 负责识别和切割宿主 mRNA 5' 帽状结构引物的作用，有报道显示 PA 有可能有聚合酶活性并发挥激酶或解旋酶的作用<sup>[37]</sup>。

#### 1.1.5.5 神经氨酸酶 (NA)

RNA 的第 6 个片段编码膜蛋白神经氨酸 (NA)。它是一种糖蛋白，是甲型流感病毒的主要表面抗原，它以四聚体的结构在病毒囊膜上构成刺突，但是数量不如 HA 多。NA 蛋白全长 469 个氨基酸，NA 分子跨越磷脂双分子层，C 端暴露在囊膜外。NA 蛋白结构上由三部分组成：前面为信号肽和锚定区；中间部分为茎区，约为 50 个氨基酸残基；最后 C 端为头区，是酶的催化位点，也是抗原的表达位点。NA 分子在病毒穿过呼吸道及抗原漂移和抗原转换过程中都是必不可少的。

#### 1.1.5.6 非结构蛋白 (NS)

NS1 蛋白是流感病毒非结构蛋白中一个具有重要功能的蛋白。A 型流感病毒的致病性和变异进化与很多因素相关，但是 NS1 无疑是一个重要的影响因素。NS1 是一个具有多种重要功能的蛋白，它能够参与病毒蛋白与宿主蛋白、宿主 RNA 的相互作用。NS1 具有两个结构域：RBD 和 ED，NS1 正是因为这两个结构域才实现了病毒在宿主体内的安全增殖和感染。下面就 NS1 蛋白的具体结构和功能做进一步的阐述。

### 1.1.6 非结构蛋白 NS1

A 型流感病毒 NS1 蛋白是由病毒基因组片段 8 编码，对于病毒的复制和传播具有重要的功能。NS1 蛋白全长由 202~237 个氨基酸，分子量约为 26kD，各亚型病毒的 NS1 蛋白的大小不尽相同，其区别在于在 C 末端多出或少 1~10 个

氨基酸。NS1 蛋白仅存在于感染的细胞内，而在病毒粒子中是不存在的。在感染的早期 NS1 蛋白主要聚集在宿主细胞核内，而在感染晚期在细胞质内也能检测到 NS1 蛋白的存在。NS1 蛋白从结构上可分为两个重要的功能区：1~73 氨基酸为 RNA 结合结构域，74 至末位氨基酸为效应结构域<sup>[38]</sup>。NS1 蛋白通过这两个区域相互分工配合，通过多种途径躲避宿主细胞的防御系统并实现病毒的快速增殖和感染。

#### 1.1.6.1 NS1 蛋白的结构

RNA 结合结构域 (RNA binding domain, RBD)：RBD 的核心区位于 19~41 位氨基酸，其中 38 和 41 位氨基酸对 RBD 与 dsRNA 的结合具有重要作用<sup>[39]</sup>。NS1 的 RNA 结构域能够只能结合规范的 A 型双链 RNA，而 B 型和 A/B 型的 dsRNA-DNA 杂合子则不能结合。晶体 X-射线衍射图显示其结构为对称的同源二聚体，每个单体由 3 个  $\alpha$  螺旋组成。RBD 的核心区处于 19~38 位，RBD 只有形成二聚体后才可以与 dsRNA 结合。通过定点突变技术研究表明 R38 和 K41 氨基酸残基在 RBD 与 dsRNA 结合的过程中发挥重要作用。

效应区由 3 个  $\alpha$  螺旋和 7 个  $\beta$  折叠组成。晶体衍射表明效应区也以二聚体形式存在，二聚体由每个单体的一个  $\beta$  折叠以侧面相连形成凹槽结构。每个单体的第二个  $\alpha$  螺旋基部有一段以第 186 为氨基酸为中心的 -Gly-Leu-Glu-Trp-Asn-氨基酸序列，该序列是 NS1 蛋白与剪切和多聚腺苷酸化作用特定因子 (cleavage and poly adenylatn specificity factor, CPSF) 亚单位的结合位点。第 92 位氨基酸和第 80~84 位氨基酸与病毒的致病性具有密切联系<sup>[40-41]</sup>。NS1 蛋白的 223~237 位氨基酸是聚腺苷酸结合蛋白 (poly(A)-binding protein, PABII 蛋白) 的结合位点。另外，NS1 蛋白有两个核定位信号区 (NLS)，位于第 34~38 位和第 219~237 位氨基酸，通过这两个区域 NS1 蛋白能够准确的进入细胞核<sup>[42]</sup>。

#### 1.1.6.2 NS1 蛋白的功能

当病毒进入宿主细胞以后，病毒和宿主细胞两者之间的战争就开始进行。宿主细胞会启动一系列的防御体系通过抑制病毒蛋白的合成或降解病毒蛋白来抵御病毒的入侵，而病毒蛋白则会通过与病毒 dsRNA 结合等手段来逃避宿主蛋白的监控，另外许多病毒蛋白都对宿主细胞的免疫信号通路具有拮抗作用，以利于病毒在宿主细胞内的增殖和再感染。NS1 蛋白的功能是由其两个结构域：RNA 结合区和效应区完成的。

(1)RNA 结合区。当流感病毒进入宿主细胞以后,病毒复制会产生 dsRNA, dsRNA 是病毒复制增殖的主要信号,这时宿主细胞首先启动第一道防御系统——产生大量的干扰素 IFN- $\alpha$ /  $\beta$  和 IFN- $\gamma$ 。NS1 蛋白通过 RBD 区结合病毒自身的 dsRNA 进而阻止 dsRNA 激活合成 IFN- $\alpha$ /  $\beta$  所必须的多种调节因子,包括 IRF-3, IRF-7, AP-1 和 NF- $\kappa$ B 等。IRF-3 和 IRF-7 可以由 dsRNA 激活,也可以由 PKR 激活。IRF-3 和 IRF-7 激活后可参与形成转录复合物,同时 IFN- $\alpha$ /  $\beta$  刺激反应元件进一步参与启动 IFN- $\alpha$ /  $\beta$  基因的转录<sup>[43]</sup>。Hu 等人利用 NS1 缺陷型毒株和野生型毒株同时感染宿主细胞后研究细胞的裂解产物发现,野生型毒株的 PKR 的磷酸化程度要远远高于 NS1 缺陷型毒株,这表明 NS1 蛋白可以阻止 PKR 的活化过程<sup>[44]</sup>。同时由于 NS1 蛋白的 RBD 区域与 dsRNA 结合,导致 PKR 由于其结合的 dsRNA 脱落而失活<sup>[45-46]</sup>,从而阻止了 PKR 的磷酸化,进而导致蛋白的表达受阻<sup>[47]</sup>。

RBD 区域对 U6 snRNA 在宿主细胞 mRNA 剪切过程中是一个核心的 snRNA, mRNA 剪切时需要 U2-U6 RNA 复合物的共同参与。NS1 蛋白通过 RBD 与 U6 snRNA 3'端竞争性结合,导致 mRNA 和剪切受阻,从而抑制宿主细胞的增殖过程。其机制可能是 U6 snRNA 的茎环结构会形成类似 dsRNA 的空间构象,从而与 NS1 的 RBD 结构域结合。

病毒在宿主细胞内复制产生的 dsRNA 可以活化 JNK (Jun N-terminal Kinase),活化的 JNK 可以上调转录因子 AP-1,磷酸化的 AP-1 会形成异源二聚体。宿主细胞在正常情况下体内的 NF- $\kappa$ B 会与抑制物 I $\kappa$ B 结合形成复合体滞留于细胞质内。dsRNA 可以通过磷酸化 I $\kappa$ B 使其降解,激活的 NF- $\kappa$ B 进入细胞核后会与 AP-1 异源二聚体共同启动 IFN- $\alpha$ /  $\beta$  基因的转录。当病毒入侵宿主细胞后,病毒的 NS1 蛋白通过 RBD 区域结合 dsRNA 后抑制 JNK 的活化,从而下调 AP-1 依赖性基因的表达,导致 dsRNA 激活抗病毒的通路阻断,INF- $\alpha$ /  $\beta$  表达所必须的多种调节因子无法正常转录。这不仅使宿主细胞不能正常的激活 INF- $\alpha$ /  $\beta$ ,也会抑制 INF- $\alpha$ /  $\beta$  和 dsRNA 介导的下游抗病毒通路。

细胞内产生 IFN- $\beta$  后会激活免疫系统的其他通路,转录并翻译抗病毒蛋白,其中研究的比较清楚的是 protein kinase 和 2'-5' OAS。病毒复制时会产生一系列 2'-5'寡腺苷酸,从而激活 2'-5' A 依赖性的 RNase L。NS1 蛋白与 dsRNA 结合后 2'-5' OAS 系统不能有效的活化,protein kinase 和 2'-5' OAS 也不能正常的生成。PKR 激活蛋白 (PACT) 可以由病毒 dsRNA 激活并活化 PKR。NS1 蛋白除了上述途径抑制 PKR (protein kinase) 外,还可以通过与 PACT 结合而导致 PKR 不能有效的活化。因此,即使通过点突变技术使 NS1 蛋白的 RBD 失去 dsRNA 结合活性时,它仍可以通过与 PACT 结合而拮抗 PKR 的抗病毒通路。



RBD 区域可以与游离的 RNA 结合,使 RNA 因被隔离而不能有效的刺激 RIG-I, RIG-I 的病毒感染的传感器效果急剧下降<sup>[48]</sup>。Guo 等研究发现,在感染 IAV 的人肺上皮细胞中 RIG-I 是诱导产生 IFN- $\beta$  所必需的<sup>[49]</sup>。通过 RNA 干扰抑制 RIG-I 的表达后,IFN- $\beta$  的表达量也大量降低。

(2) 效应区。研究发现 CPSF (cleavage and polyadenylation specific factor) 与 IFN- $\alpha/\beta$  非依赖性细胞抗病毒蛋白 mRNA 的合成有关,其中 CPSF 的一个 30kD 的亚单位是一个重要的亚基,它可以与宿主细胞 mRNA 前体上的 AAUAAA 保守序列特异性结合,然后在其他 5 种细胞剪切因子的参与下对 mRNA 前体进行剪切。当病毒感染细胞后,NS1 蛋白效应区以 186 位氨基酸为中心的 -Gly-Leu-Glu-Trp-Asn-氨基酸残基可以与 30kD 亚基特异性结合,从而抑制 mRNA 前体的剪切和聚腺苷酸化。Diana L 等人的研究表明,当 NS1 与 30kD 的 CPSF 亚基结合后会直接抑制 IFN- $\alpha/\beta$  蛋白的 mRNA 出现的早晚和合成的数量。当 NS1 的第 186 位氨基酸突变后,宿主细胞被感染后仍可产生大量的 IFN- $\alpha/\beta$ ,病毒数量也大大降低。在宿主细胞中也有少量的 IFN- $\beta$  mRNA 转录并表达,说明除了 NS1 蛋白结合 30kD CPSF 外还有其他的调控途径。

## 1.2 HSP70 蛋白

细胞和组织对热休克等刺激会产生相应的反应,其结果会导致一些蛋白质的产生或合成增加,这些蛋白质即热休克蛋白(Heat Shock Protein, HSP)。热休克蛋白是一组在生物进化过程中高度保守的蛋白质分子家族。该家族成员根据分子量大小可分为 HSP100、HSP90、HSP70、HSP60、HSP28 等几大类<sup>[50]</sup>。

研究表明,热休克蛋白除了因热休克刺激而产生以外,还有很多因素(如重金属、亚砷酸钠、氨基酸类似物、氧化性损伤等)都可以诱导它们产生,因此热休克蛋白又称为应激蛋白质(stress protein)<sup>[51]</sup>。HSP70 是分子量在 70kD 左右的热休克蛋白,是热休克蛋白家族中最重要的一员,被称为主要热休克蛋白,它们由 HSP70 基因家族编码。

HSP70 家族是成员最多、最为重要的 HSP 蛋白。HSP70 作为蛋白成熟过程中的分子伴侣,参与细胞周期调节、DNA 损伤修复及细胞凋亡,在配子及胚胎的发育、机体衰老的过程中具有重要的生理功能。HSP70 可通过 CD14 依赖性通路刺激细胞因子的产生,表明 HSP70 具有细胞因子作用。HSP70 能刺激 PBM 体外扩增  $\gamma\delta$ T 细胞,并诱导其表达高水平的 IFN- $\gamma$ 、IL-2、TNF、IL-8 等细胞因子,显示 HSP70 具有抗肿瘤力。通常机体细胞在环境中不利因素的作用下都能发生

应激反应和 HSP70 的表达。因此, 可将 HSPs 尤其是 HSP 的表达作为一个潜在性的环境应激和毒性的量化指标<sup>[52]</sup>。

## 1.2.1 HSP70 的结构及其基因定位

### 1.2.1.1 HSP70 的类型及特点

HSP70 为热休克蛋白家族中最为重要的一族, 有 20 余个成员, 进化上高度保守, 比较各种不同的 HSP70 的氨基酸序列发现, 其 N 端 2/3 部分较 C 端 1/3 部分保守得多。HSP70 在所有生物细胞中都有表达, 在大多数生物中, HSP70 含量丰富, 如 Dnak 为大肠杆菌的生长所必需。真核生物有多种 HSP70 相关蛋白, 按照其表达情况将 HSP70 分为构成型和诱导型, 构成型 HSP70 又可分为两种, 分别位于内质网和线粒体内<sup>[53]</sup>。原核生物和真核生物的 HSP70 有 40%~60% 的同源性, 而不同来源的真核生物其同源性为 60%~78%。

### 1.2.1.2 HSP70 蛋白的结构

HSP70 蛋白由两部分组成, 即 ATP 酶区(AT-Pase domain)和底物识别区或叫多肽结合区(pep-tide-binding domain)。

(1) ATP 酶区。通过 X 光衍射晶体分析法对 HSP70 的 ATP 酶区的晶体构象进行分析, 发现 HSP70 的 ATP 酶区在结构上与己糖磷酸激酶和肌动蛋白的 ATP 酶区有着高度的同源性。HSP70 的 ATP 酶活性区是位于 HSP70 蛋白的氨基端的 385 个氨基酸残基, 分离这一约 44kD 的氨基端片段, 可以得到一个非多肽依赖性的 ATP 酶。多肽与 HSP70 分子结合和释放是一个依赖 ATP 的过程。

(2) 多肽结合区。HSP70 蛋白的多肽结合区是羧基端的约 27kD 的氨基酸片段, 能与主要组织相容性复合物(major histocompatibility complex, MHC)抗原结合<sup>[54]</sup>。MHC 抗原有广泛的组织分布, 并负责区分体细胞和入侵细胞。

### 1.2.1.3 HSP70 的基因定位

HSP70 家族是一个多基因、多结构、多功能的家族。研究者已通过体细胞分析将人类的 HSP70 家族的部分基因定位于第 1、5、6(在 MHC 基因位点内)、9、14 和 21 号等染色体上。目前已发现的 HSP70 家族的基因有: HSP70-1(也称 HSPA1)、HSP70-2、HSP70-Hom、HSP70B(也称 HSPA6)、HSP70B'(也称 HSPA7)、HSC70、GRP78 (Bip)、PBP74、SIC1H 等<sup>[55]</sup>。

### 1.2.2 HSP70 的生物学功能

(1) HSP70 是一种非特异性的细胞保护蛋白,是目前发现的主要分子伴侣蛋白之一,可维持细胞蛋白自稳,提高细胞对应激原的耐受性,使细胞维持正常的生理功能<sup>[56]</sup>。HSP70 分布广泛,参与许多细胞的正常生理过程,直接参与蛋白质从初生链合成到多亚基复合体折叠、装配的整个生物合成,并参与蛋白质向内质网的易位、参与分解错装的蛋白等,并与新生肽和多肽链中错配的部分结合,对调节蛋白内环境的稳定具有重要作用。

(2) HSP70 不仅能帮助线粒体和内质网中新输入蛋白质的折叠,而且参与蛋白质的移位过程。实验证明 HSP70 用一种类似于棘轮的分子机制促进蛋白质移位<sup>[57]</sup>。多肽链在跨膜运输前通常处于松弛构象状态,当多肽的前导链通过蛋白质通道(proteinaceous channel)而进入线粒体内腔时,基质中的 HSP70 立即与多肽上适当片段结合,防止其后退滑回细胞质。随着多肽链向线粒体内腔的进一步伸入,有更多的 HSP70 与之结合,进而拖拽前导链促进整个蛋白质进入线粒体。

(3) HSP70 的高表达可以对热诱导的细胞凋亡起到抑制作用。Mosser<sup>[58]</sup>研究证实,将 HSP 基因转染 T 细胞性白血病细胞株 PEER,制成正常时呈现结构性高表达的细胞和仅在四环素刺激时表达的细胞,与对照组比较,DNA 碎片减少了 1/4。Chant 等<sup>[59]</sup>研究证实,初患急性白血病患者及处在治疗中的已经患病一段时间或复发患者的髓样细胞对细胞凋亡敏感性的差异显著。细胞培养液在不加血清或外源性生长因子的条件下,孵育 48 h,IP 染色,用流式细胞计数法分析,凋亡细胞的百分比从 3%到 99%不等,这与 HSP70 的量呈负相关,而与 HSP90 的表达无关。已经证明 HSP70 能通过与 Bcl-2 家族抗凋亡相同的机制抑制细胞凋亡<sup>[60]</sup>。

(4) 细胞周期中也存在 HSPs 的合成及其在细胞中的分布以及应激诱导的 HSP70 蛋白之间的相互作用的调控。已经证明,热诱导的 HSP70 的表达与 P21(一种细胞周期素依赖性抑制蛋白)的表达有关,继而导致细胞停留在非 p53 依赖性的 G1 期,说明 HSP70 可能和调节细胞周期的其它蛋白之间发生作用,为细胞免受热和化学致畸剂的损害提供保护。

(5) HSP70 能被天然免疫系统细胞所识别,由此引出了 HSP70 具有另一个独有的特性的假设。很多独立的研究小组都报道了 HSP70 通过与细菌脂多糖(LPS)相同的路径刺激和活化天然免疫细胞<sup>[61]</sup>。

(6) 衰老的最大特征是机体对各种应激的反应减弱。在应激状态下,HSP70 的表达及其细胞保护作用与细胞的生理状态有关。HSP70 对 JNK 信号通路的抑制作用对衰老有一定意义。

### 1.3 蛋白质相互作用的研究方法

随着人类基因组大规模测序工作的基本完成,生物学上又进入了另一个新的纪元-功能基因组时代。功能基因组的任务就是探索并发现基因组中一些重要蛋白的功能。生物体内重要的生理过程都有相应的蛋白质参与,如:基因复制和转录,蛋白质的合成、加工、修饰和定位,相关信号通路的激活和拮抗等都必须有相应的蛋白质的调控。因此,弄清生物体内蛋白质和 DNA,蛋白质之间的相互作用对于揭示生物生命过程具有重要的意义。目前常用的研究蛋白质相互作用的方法有:双向电泳技术,酵母双杂交,免疫荧光共定位,免疫共沉淀和 GST Pull Down 等。

#### 1.3.1 酵母双杂交

酵母双杂交技术是一项发现和研究胞内蛋白质之间相互作用的技术,并且在多个领域得到了广泛应用。酵母双杂交以酵母为研究工具探寻真核细胞体内的互作蛋白,即使瞬时的,微弱的相互作用也可以检测的到,具有非常高的灵敏性。酵母双杂交系统巧妙的利用了真核生物转录调控因子的组件式结构(modular)特征,因为这些蛋白常由两个或更多的独立结构域组成,包括 DNA 结合区(binding domain, BD)和转录激活结构域(activationg domain, AD),这两个结构域是转录激活因子发挥功能所必需的。单独的 DNA 结合区可以和特定的基因启动区结合,但是不能激活基因转录。AD 则是通过与转录机构(transcription machinery)中的其他成分之间的结合作用启动上游激活序列(upstream activating sequence, UAS)的下游的基因转录。BD 和 AD 的单独存在都不能正确的激活转录系统,只有两者在空间上接近的时候才可以激活下游的报告基因的转录。在酵母双杂交试验中,首先将编码诱饵蛋白的基因插入带有酵母转录调控因子(BD)的表达载体中,将疑似互作蛋白插入带有编码转录激活结构域(AD)的表达载体中,同时将两个质粒转入基因修饰过的酵母细胞内。这种酵母细胞既不能产生 GAL4,也不能合成 HIS, TRP, LEU 和 ADE 四种氨基酸。如果两个蛋白存在相互作用时,功能重建的反式作用因子能够使酵母表达报告基因 LACZ、MEL1、HIS 和 ADE,因此会在缺失四种氨基酸的选择培养基上通过功能互补和显色反应筛选到阳性菌。另外还可通过基因修饰或缺失等方法来确定蛋白质之间互作的作用位点。

#### 1.3.2 GST Pull Down

细菌表达的谷胱甘肽 S-转移酶 (GST) 重组蛋白被用于直接测定蛋白质之间的相互作用。GST Pull Down 重组蛋白沉降技术利用了 GST 和谷胱甘肽偶联球珠 (Beads) 之间的亲和力, 来验证诱饵蛋白 (bait) 和捕获蛋白 (candidate) 之间的相互作用。GST Pull Down 的实验原理如下: 首先将诱饵蛋白与 GST 融合表达并纯化, 并平行制备细胞裂解液 (可以进行标记), 然后将标记的裂解物、谷胱甘肽琼脂糖微球和重组蛋白混合孵育适当时间后, 离心沉淀, GST 重组蛋白和任何与其有互作的蛋白都将被收集, 获得的混合物洗涤用 SDS-PAGE 分离后可进行下一步的验证。常用的验证方法包括: 蛋白质染色, 放射自显影或者 Western Blot 检测等。诱饵蛋白和捕获蛋白均可通过细胞裂解物、纯化的蛋白、表达系统以及体外转录翻译系统等方法获得。此方法简单易行, 操作方便。

如果实验目的是用来确定一种诱饵蛋白与未知蛋白的相互作用时, 未知蛋白的浓度则可能成为实验成败的关键。未知蛋白必须有足够的量以使这种相互作用力通过现有的生化方法能够检测到。如果实验是为了验证诱饵蛋白与确定的另一种蛋白之间是否存在相互作用, 那么实验最重要的就是能否得到靶蛋白的抗体。常用的抗体有两种: 蛋白本身抗体, 或者使用蛋白融合表达的标签抗体进行验证试验。如果抗体的制备比较困难, 则可以利用 35S 标记的体外翻译蛋白或者靶蛋白用表位做标签, 必要时可以将编码靶蛋白的质粒转染细胞。

### 1.3.3 免疫荧光共定位

免疫荧光共定位是一种利用“抗原-抗体”结合时加入发光集团进而能观察到蛋白在细胞内部定位的技术, 这种技术的原理如下: 将诱饵蛋白和捕获蛋白同时转染细胞 (如果诱饵蛋白和捕获蛋白的丰度比较高则也可以不转染或者只转染一个蛋白) 并分别加入对应的一抗和二抗充分孵育, 二抗上标记有荧光集团, 运用荧光显微镜调节不同的波长就能看到不同频率的光并进行共定位, 如果两者在空间结构上重合或者接近, 则这两个蛋白有可能存在相互作用。由于有些蛋白的抗体的获得比较困难, 所以实验中经常采用融合表达并加入标签抗体的策略。值得一提的是, 免疫荧光共定位只能够说明两个蛋白都在细胞内表达, 并且在同样的细胞内位置, 不能够用于证明两个蛋白之间的相互作用, 更不可能用于证明蛋白之间的共价结合, 它只是提供了两个蛋白存在直接或者间接相互作用的一个佐证。

### 1.3.4 免疫共沉淀

免疫共沉淀是运用“抗原-抗体”之间的结合力来实现蛋白质之间相互作用的验证。当细胞在非变性条件或者使用比较温和的裂解方法时，细胞内的蛋白质-蛋白质之间的相互作用有可能被保留下来。因此，免疫共沉淀是一种可以检测细胞内蛋白互作的方法。基本原理如下：proteinA resin 能够非特异性的结合靶蛋白的抗体，如果用靶蛋白的抗体结合靶蛋白后，那么在体内与靶蛋白互作的蛋白则能够同时被 proteinA resin 沉淀下来，这就是基于两个蛋白之间的生理性相互作用的免疫共沉淀。这种方法最长常用于检测诱饵蛋白与靶蛋白的体内相互作用。

免疫共沉淀技术也是基于已经初步确定两种蛋白之间具有相互作用。在此之前可以用酵母双杂交技术进行高通量的筛选，然后通过免疫共沉淀进行验证。如果细胞的内源蛋白的丰度比较低时，可以通过将编码两种蛋白的质粒共转染细胞来增加蛋白的量。这样操作能够提高免疫共沉淀检测的灵敏度，但是缺点是由于两种蛋白不是在天然状态下的真实反映，过表达有可能促使蛋白之间非生理性的相互作用。

免疫共沉淀技术还存在一些缺点，如操作繁琐，成本高，并且需要大量培养细胞，另外它不能用于些检测构成巨大的，不溶性的大分子结构的蛋白质-蛋白质之间的相互作用。

## 1.4 研究的目的和意义

A 型流感的每一次大范围流行，都会引起动物和人集中发病甚至死亡。由于猪、马和禽类都是流感病毒的宿主，因此对世界的食品安全产生重大安全隐患，已成为当今世界重点关注的重大公共卫生问题。已有的报道对于 NS1 蛋白在调控细胞凋亡方面的功能存在不同的结论，并且不同型的流感病毒在致病性和致死性上差异较大。因此，本研究以具有高致死性的 1918 A 型流感病毒 H1N1 亚型 NS1 蛋白为研究对象，欲通过采用串联亲和纯化的策略获得可信的与 NS1 蛋白互作的细胞因子，并在流感病毒的调控细胞凋亡、致死率等发面进行新的探索。

## 第二章 流感病毒 NS1 蛋白多抗的制备

当流感病毒入侵宿主细胞后，宿主细胞会通过多种防御体系来抑制或降解病毒蛋白的合成，而流感病毒的 NS1 蛋白则会通过与病毒 dsRNA 结合的方式来逃避宿主免疫系统的监控。此外，NS1 蛋白对宿主细胞的免疫系统还具有拮抗作用，因此，必须制备能够准确检测 NS1 蛋白的抗体实时监控 NS1 蛋白的表达情况。本章拟将 NS1 基因连接到 pET28 原核表达载体上，转入大肠杆菌后诱导表达，将目的蛋白纯化后免疫小鼠，制备 NS1 蛋白的多抗并用 ELISA 方法检测抗体的效价。

### 2.1 实验材料

#### 2.1.1 载体及菌株

pEASY-T1 载体，大肠杆菌 DH5 $\alpha$  感受态细胞，大肠杆菌 BL21 (DE3) 感受态细胞购于全世金公司，pET28 ( $\alpha^+$ ) 载体为本实验室保存。

#### 2.1.2 主要试剂

T-NS1 全基因序列由上海生工公司合成。引物由英俊公司合成，测序由上海生工公司完成；Ex Taq 酶，dNTP，DNA 连接酶购自于 TaKaRa 公司，质粒提取试剂盒，胶回收试剂盒购自于 OMEGA 公司；限制性内切酶 *Bam*HI、*Eco*RI 购自于 NEB 公司，Amp、Kana 抗生素购自于上海生工公司。His 标签纯化试剂盒购自 GE 公司。QuickAntibody 免疫佐剂购自北京康碧泉公司。

其他试剂配方如下：

Ampicillin (100mg/mL)：将 10g 氨苄粉末溶于 100mL 超纯水中，充分混匀溶解后用 0.22 $\mu$ m 滤器过滤除菌，分装后于-20 $^{\circ}$ C 保存。

Kanamycin (100mg/mL)：将 10g 卡纳粉末溶于 100 mL 超纯水中，充分混匀溶解后用 0.22 $\mu$ m 滤器过滤除菌，分装后于-20 $^{\circ}$ C 保存。

IPTG (1mol/mL)：将 48mg IPTG 溶于 100 mL 超纯水中，充分混匀溶解后用 0.22 $\mu$ m 滤器过滤除菌，分装后于-20 $^{\circ}$ C 保存。

X-Gal (20 mg/mL) : 将 2g X-gal 溶于 90 mL 超纯水中, 加入 DMF 后定容至 100mL, 充分混匀溶解后用 0.22 $\mu$ m 滤器过滤除菌, 分装后于-20 $^{\circ}$ C 保存。

LB 液体培养基: 称取胰蛋白胨 10 g, 酵母提取物 5 g, NaCl 10 g, 溶于 900mL 超纯水中, 磁力搅拌器充分溶解混匀后, 定容至 1 L, 121 $^{\circ}$ C, 20min 高压灭菌后, 于 4 $^{\circ}$ C 保存。

LB(K<sup>+</sup>)液体培养基: 将高压灭菌后的 LB 培养基冷却至室温, 加入 Kanamycin 至终浓度为 50 $\mu$ g/mL, 4 $^{\circ}$ C 储存备用。

LB(K<sup>+</sup>)固体培养基: 称取胰蛋白胨 10 g, 酵母提取物 5 g, NaCl 10 g, 琼脂粉 15g, 溶于 900mL 超纯水中, 磁力搅拌器充分溶解混匀后, 定容至 1 L, 121 $^{\circ}$ C, 20min 高压灭菌后, 室温冷却至 50-60 $^{\circ}$ C, 加入 Kanamycin 至终浓度为 50 $\mu$ g/mL, 立即倒入培养皿中, 冷却后用封口膜封口后于 4 $^{\circ}$ C 保存。

50 $\times$ TAE Buffer (pH 8.5) : 称取 Tris base 242 g; 冰醋酸 57.1 mL; Na<sub>2</sub>EDTA  $\cdot$  2H<sub>2</sub>O 37.2 g, 加入 900 mL 去离子水, 磁力搅拌器充分溶解混匀后调节 pH 为 8.5, 定容至 1L 后, 室温下保存。

1.5 mol/L Tris-Cl (pH 8.8): 称取 Tris base 181.7 g 溶于 800 mL 去离子水, 用浓盐酸调 pH 至 8.8, 定容到 1 L。

1mol/L Tris-Cl (pH 6.8): 称取 Tris base 121.1 g, 溶于 800 mL 去离子水, 用浓盐酸调 pH 至 6.8, 定容到 1 L。

10% (W/V) SDS: 称取 SDS 10g 溶于 80 mL 去离子水, 加热至 68  $^{\circ}$ C 溶解, 定容到 100 mL。

10% (W/V) 过硫酸铵 (APS): 称取过硫酸铵粉末 1 g, 溶于 10 mL 去离子水中, 待溶解后分装于 1mL EP 管中于-20 $^{\circ}$ C 储存备用。

5 $\times$ SDS PAGE Loading Buffer: 量取 1mol/L Tris-Cl (pH 6.8) 1.25 mL、SDS 0.5g、溴酚蓝 25 mg、甘油 2.5 mL, 加入去离子水溶解后定容至 5 mL, 500  $\mu$ L 分装后于室温保存, 使用前将 25  $\mu$ L 的  $\beta$ -巯基乙醇加入至每小份中。

1 $\times$ PBS (pH 7.4): 称取 NaCl 8 g、KCl 0.2g、Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> $\cdot$ 12H<sub>2</sub>O 3.58g、KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0.27g, 溶于 1000 mL 去离子水中, 高压灭菌后室温保存。

His 镍柱纯化 Bind Buffer: 称取 3.12g NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 116g NaCl, 2.04g 咪唑, 加入 900mL 去离子水, 磁力搅拌器充分溶解混匀后调节 pH 为 7.4, 定容至 1L。使用前加入 10mM  $\beta$ -ME, 1% Triton-X100。

His 镍柱纯化 Wash Buffer: 称取 3.12g NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 116g NaCl, 6.8g 咪唑。加入 900mL 去离子水, 磁力搅拌器充分溶解混匀后调节 pH 为 7.4, 定容至 1L。

His 镍柱纯化 Elute Buffer: 称取 3.12g NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 29g NaCl, 34g 咪唑。加入 900mL 去离子水, 磁力搅拌器充分溶解混匀后调节 pH 为 7.4, 定容至 1L。



50mM 碳酸盐包被缓冲液：称取  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  0.15g,  $\text{NaHCO}_3$  0.293g, 蒸馏水稀释至 100mL。

## 2.2 试验方法

### 2.2.1 pET-NS1 载体的构建

根据 GenBank (Accession No.AF333238.1) 中报道的序列合成 NS1 全基因, 并合成一对表达引物:

pET-NS1-LF: 5'-CGC GGATCC ATGGATTCCAACACTGTGTCAAGC-3'

pET-NS1-LR: 5'-CCG CTCGAG TCAAACCTTCTGACTTAATTGTTCT-3'

(斜体加粗部分为 *Bam*HI 和 *Eco*R I 酶切位点, 下划线部分为保护碱基)

以 pET-NS1-LF 和 pET-NS1-LR 为引物, 以合成的全序列为模板进行 PCR。PCR 反应体系为: 上游引物 (20 $\mu$ M) 2 $\mu$ L, 下游引物 (20 $\mu$ M) 2 $\mu$ L, dNTP 2 $\mu$ L, 10 $\times$ ExTaq Buffer 5 $\mu$ L, 全基因模板 1 $\mu$ L, Ex Taq 酶 1 $\mu$ L, ddH<sub>2</sub>O 37 $\mu$ L。

PCR 反应程序为: 95  $^{\circ}$ C, 5 min; 94  $^{\circ}$ C, 30 s, 55  $^{\circ}$ C, 30 s, 72 $^{\circ}$ C 45s; 30 个循环, 72  $^{\circ}$ C 10 min。

将 PCR 产物用 1% 琼脂糖凝胶电泳鉴定和回收。

### 2.2.2 凝胶回收 PCR 产物

按照 OMEGA 公司的胶回收试剂盒的说明进行操作。把切好的凝胶称重, 按照 1:1 (W/V) 的量加入溶胶液, 55 $^{\circ}$ C 水浴锅中孵育 10min, 直至凝胶全部溶解。回收柱事先用 200 $\mu$ L Buffer GPS 平衡。待溶解的溶胶液降至室温后加入回收柱中静置 2min。12000g 离心 1min, 弃掉收集管中的滤液。加入 300 $\mu$ L 溶胶液, 12000g 离心 1min, 弃掉收集管中的滤液。加入 700 $\mu$ L Wash Buffer, 12000g 离心 1min, 弃掉收集管中的滤液。重复上述操作再次洗涤。弃掉收集管中的滤液, 14000g 离心 2min 除去回收柱的液体。将回收柱置于一个新的 EP 管中, 加入 40 $\mu$ L ddH<sub>2</sub>O, 室温静置 2min, 10000g 离心 1min。重复上述操作再次洗脱。利用 Nanodrop-1000 分光光度计测定回收产物的浓度。

### 2.2.3 pET28 和目的片段双酶切

分别对 pET28 载体和目的片段进行双酶切, 体系如下: 10 $\times$ 酶切 Buffer 10 $\mu$ L, DNA 4 $\mu$ g, 100 $\times$ BSA 1 $\mu$ L, *Bam*HI 2 $\mu$ L, *Eco*R I 2 $\mu$ L, ddH<sub>2</sub>O 补至 100 $\mu$ L。

### 2.2.4 柱式回收酶切产物

按照 OMEGA 公司的胶回收试剂盒的说明进行操作。向酶切体系中加入 500 $\mu$ L Buffer CP, 充分混匀后室温下静置 2min。回收柱事先用 200 $\mu$ L GPS Buffer 平衡。将上述溶液加入回收柱中 12000g 离心 1min, 弃掉收集管中的滤液。加入 700 $\mu$ L Wash Buffer, 12000g 离心 1min, 弃掉收集管中的滤液。重复上述操作再次洗涤。弃掉收集管中的滤液, 14000g 离心 2min 除去回收柱的液体。将回收柱置于一个新的 EP 管中, 加入 40 $\mu$ L ddH<sub>2</sub>O, 室温静置 2min, 10000g 离心 1min。重复上述操作再次洗脱。利用 Nanodrop-1000 分光光度计测定回收产物的浓度。

### 2.2.5 构建连接体系

按照 Takara 公司的连接酶的说明进行连接: pET28 50ng, 目的片段 20ng, Solution I 5 $\mu$ L, ddH<sub>2</sub>O 补足 10 $\mu$ L。16 $^{\circ}$ C 连接过夜。

### 2.2.6 连接产物转化到大肠杆菌 Trans5 $\alpha$

将大肠杆菌 Trans 5 $\alpha$  细胞在冰上融化, 将 10 $\mu$ L 连接体系加入感受态细胞中, 用手指轻弹混匀, 在冰上静置 20min。42 $^{\circ}$ C 热激 1min, 然后快速将管转移到冰浴中 2min, 该过程不要摇动离心管。向离心管中加入 700 $\mu$ L LB 阴性培养基, 混匀后置于 37 $^{\circ}$ C, 200r/min 培养 1h。将复苏的感受态细胞平铺到 LB(K<sup>+</sup>) 固体培养基上, 于 37 $^{\circ}$ C 培养箱中过夜培养。

### 2.2.7 阳性菌质粒提取

待 LB(K<sup>+</sup>) 培养基上长出菌后挑取单菌落, 用 10 $\mu$ L ddH<sub>2</sub>O 中充分混匀, 以 3 $\mu$ L 为模板, 进行菌液 PCR, 挑选阳性菌于 5mL LB(A<sup>+</sup>) 培养基中 37 $^{\circ}$ C, 200r/min 培养 10~14h 后, 按照 OMEGA 公司质粒提取试剂盒的说明提取质粒。将 5mL 菌液 10000g, 1min 离心收集在 1.5mL EP 管中, 加入 250 $\mu$ L SolutionI, 在涡旋震荡仪上充分混匀。加入 250 $\mu$ L SolutionII, 轻微混匀后室温静置 2min。加入 350 $\mu$ L SolutionIII 迅速混匀后 4 $^{\circ}$ C, 14000g 离心 10min。回收柱在使用前用 200 $\mu$ L Buffer GPS 平衡。将离心后的上清加入离心管柱中 10000g 离心 1min。加入 500 $\mu$ L Buffer HB 10000g 离心 1min。加入 700 $\mu$ L Wash Buffer 10000g 离心 1min。重复上述操作。收集管柱 14000g 离心 2min 出去残留液体。加入 40 $\mu$ L ddH<sub>2</sub>O, 室温静置 2min, 10000g 离心 1min。重复上述操作再次洗脱。利用 Nanodrop-1000 分光光度计测定回收产物的浓度。

### 2.2.8 双酶切验证重组质粒

酶切体系参考 2.2.3。将酶切鉴定为阳性的质粒进行测序。

### 2.2.9 将重组质粒转化到大肠杆菌 BL21 (DE3)

转化过程参考 2.2.6。

### 2.2.10 重组质粒的诱导表达

挑取单克隆后加入 LB(K<sup>+</sup>)培养基中于 37℃, 200r/min 培养, 待 OD 值达到 0.6~0.8 时加入 IPTG 至终浓度为 0.1mM 进行诱导表达, 对诱导时间进行优化, 分别在诱导后 1h, 2h, 4h, 6h, 8h 后跑 SDS-PAGE 电泳; 确定最佳诱导条件后培养 10mL 菌液离心后加入 100 $\mu$ L PBS 混匀进行超声裂解。裂解条件为 5s on, 5s off, 共超声 10min。4℃ 14000g 离心 10min, 将上清转至新的 1.5ml EP 管中加入 33 $\mu$ L 4 $\times$  Loading Buffer, 向沉淀中加入 133 $\mu$ L 1 $\times$  Loading Buffer, 100℃煮沸 5min, 10000g 离心 1min。取 10 $\mu$ L 上样进行 SDS-PAGE 电泳。

### 2.2.11 纯化目的蛋白

按 1:500 放大培养 200mL 菌液, 200r/min, 37℃培养至 OD 值为 0.6~0.8 时按最佳诱导条件加入 IPTG 进行诱导。诱导完毕后离心, 加入 15mL Bind Buffer 充分混匀, PMSF 和 DTT 现用现加。超声 30min, 超声条件为 5s on, 5s off。4℃ 14000g 离心 30min。将上清用 0.22 $\mu$ m 滤器过滤后加入已平衡的 His 纯化树脂, 4℃缓慢摇晃结合 1h。把混合液通过滤柱, 加入 5mL Wash Buffer, 重复洗涤 3~4 次, 加入 500 $\mu$ L Elute Buffer 洗脱蛋白, 再加入 1000 $\mu$ L Elute Buffer 洗脱蛋白。收集少量 Bind Buffer, Wash Buffer 和 Elute Buffer 进行 SDS-PAGE 分析。

### 2.2.12 用抗原免疫小鼠

佐剂使用前充分混匀。用 PBS 将抗原稀释到 0.3 $\mu$ g/ $\mu$ L, 吸取 50 $\mu$ L (抗原蛋白量约 15 $\mu$ g) 与佐剂按体积比 1:1 迅速混匀。将 100 $\mu$ L 液体通过后腿小腿肌肉注射小鼠。第 14 天按照同样的方法加强免疫一针。第 21 天对小鼠进行眼球取血。取血后在 37℃下让血液凝固 2h 后置于 4℃冰箱过夜。当血清自然析出后, 4℃, 3000r/min 离心 10min。将上层血清转移至一新的 EP 管, 分装成小份, 一份取出后进行 ELISA 检测滴度。其余 -80℃储藏。

### 2.2.13 ELISA 检测抗体滴度

用 50mM 的碳酸盐包被缓冲液 (pH 9.6) 溶解抗原, 使抗原浓度为 15 $\mu$ g/mL。按照 100 $\mu$ L/孔加入 96 孔板中, 4 $^{\circ}$ C 冰箱过夜包被。弃掉包被液, 用 TBST 洗涤液洗涤 3 次, 然后按照 150 $\mu$ L/孔加入 1% BSA 于 37 $^{\circ}$ C 封闭 1h。TBST 洗涤 3 次, 将血清依次稀释 1 $\times 10^4$ , 2 $\times 10^4$ , 4 $\times 10^4$ , 8 $\times 10^4$ , 10 $^5$ , 1.6 $\times 10^5$ , 3.2 $\times 10^5$  倍, 每孔加入 100 $\mu$ L 不同倍比稀释的血清, 每个稀释度同时做 3 个重复, 同时设置阴性对照, 37 $^{\circ}$ C 孵育 2h。TBST 洗涤 5 次, 加入 100 $\mu$ L HRP 标记二抗, 37 $^{\circ}$ C 孵育 1h。TBST 洗涤 5 次, 加入 TMB 显色, 37 $^{\circ}$ C 孵育 10min。酶标仪读取 OD<sub>405nm</sub> 吸收值。

## 2.3 试验结果

### 2.3.1 pET-NS1 载体的构建

以 NS1 全基因为模板, 扩增的产物经 1% 琼脂糖凝胶电泳后结果显示大小为 693bp (如图 2-1), 与预期的结果一致, 经胶回收后与 pET28 载体同时双酶切后按照 2.2.3 中的体系连接后转化, 挑取单菌落, 接种到 LB(K<sup>+</sup>) 液体培养基中, 37 $^{\circ}$ C 培养 5h 后, 菌液 PCR 挑选阳性菌, 并放大培养后提取质粒, 用 *Bam*H I 和 *Eco*R I 对质粒进行双酶切后发现两条目的条带, 分别为 693bp 和 5369bp (如图 2-2), 证明 pET-NS1 已经成功构建。将双酶切鉴定的质粒送至生工公司测序, 结果显示与 NS1 具有 100% 同源性, 可以进行后续的实验。

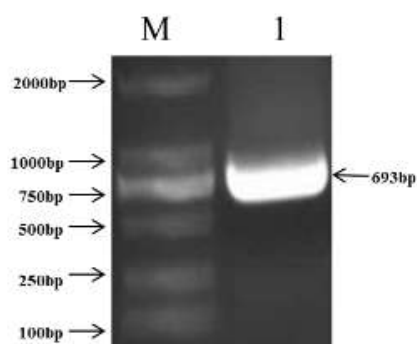


图 2-1. NS1 基因 PCR 扩增结果

Fig.2-1 The amplification of NS1 gene by PCR

注: M, DL2000 Marker; 1, NS1 基因扩增结果

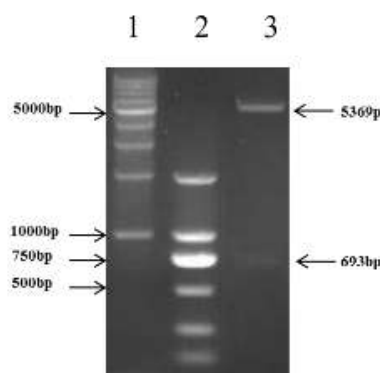


图 2-2. 重组质粒 pET-NS1 双酶切鉴定结果

Fig.2-2 The identification of recombinant vector pET-NS1 by restriction enzymes

注：1, 1kbp ladder Maker; 2, DL2000 Marker; 3, pET-NS1 双酶切结果

### 2.3.2 重组菌的诱导表达及纯化

将重组质粒转入大肠杆菌 BL21 (DE3) 后, 设置诱导时间的梯度, 摸索出最佳诱导时间, 结果如图 2-3 所示, pET-NS1 蛋白在 4h 时表达量达到最高, 并且差别比较小, 因此, 最佳诱导时间为 4h。在最佳诱导条件下诱导 5mL 菌液后离心, 弃掉上层培养基, 加入 PBS 后涡旋混匀, 超声 5min 后离心进行蛋白的可溶性分析, 分析结果如图 2-4 所示, 重组蛋白既有可溶性成分也有包涵体, 并且主要为包涵体。我们采取了收集上清液进行纯化得到可溶性蛋白的策略, 并且成功的纯化出了可溶性蛋白。

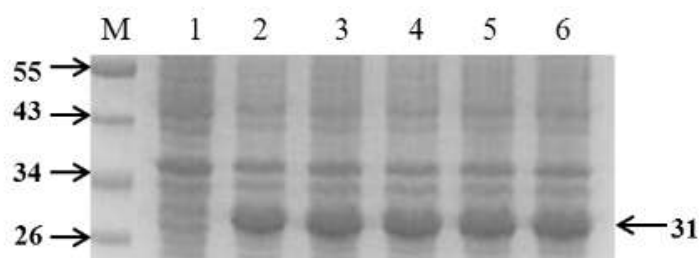


图 2-3. pET-NS1 重组菌诱导时间的优化结果

Fig.2-3 SDS-PAGE analysis of pET-NS1 fusion Protein

注：M, Maker; 1, 未诱导菌; 2-6 分别为诱导 1h, 2h, 4h, 6h 和 8h 后重组蛋白表达情况

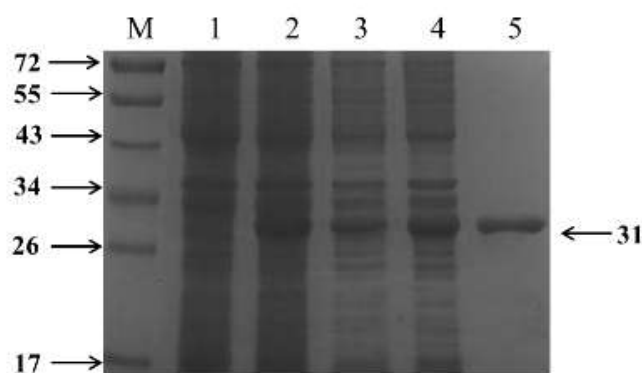


图 2-4. 重组蛋白的可溶性分析

Fig.2-4 Analysis of expressed products by SDS-PAGE and the solubility of the products;

注: M, Marker; 1, 未诱导菌; 2, 诱导全菌; 3, 上清裂解液; 4, 沉淀; 5, 纯化蛋白

### 2.3.3 ELISA 检测多抗的效价

将纯化的 pET-NS1 重组蛋白用 BCA 法进行定量,并用 PBS 稀释至浓度约为 0.5mg/mL,按照 QuickAntibody 的说明书操作免疫小鼠后眼球取血测定小鼠血清的效价,同一只小鼠的血清重复三次,用相同体积的 PBS 免疫的小鼠血清作为阴性对照,用 His 单抗作为阳性对照,结果如图 2-5 所示,小鼠的血清的效价可达到  $1:1.6 \times 10^5$ ,说明已经成功的制备了 pET-NS1 重组蛋白的多抗。

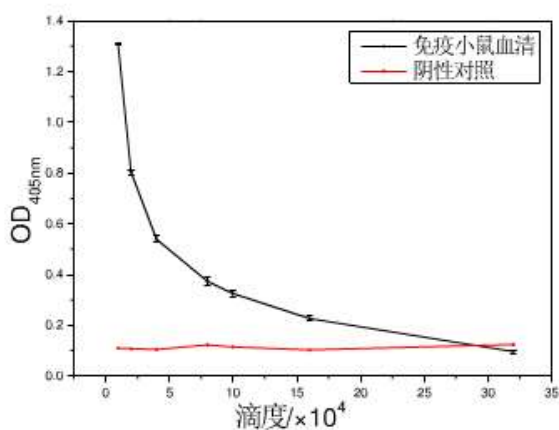


图 2-5. ELISA 检测多抗的效价

Fig.2-5 ELISA analysis for the titer of serum

## 2.4 讨论

### 2.4.1 pET-NS1 重组蛋白的表达及纯化

为了获得大量的 NS1 蛋白作为抗原免疫小鼠制备多抗,需选择重组蛋白表达能力比较强的载体,而 pET 系统是在大肠杆菌中表达重组蛋白功能非常强大的载体系统,目的基因被克隆到 pET 载体上,受噬菌体 T7 强转录及翻译的信号控制,表达由宿主细胞的 T7 RNA 聚合酶诱导,并且在充分诱导时,几乎所有的细胞都用于表达目的蛋白,诱导表达 2~6h 后,目的蛋白几乎可以占到细胞总蛋白的 50%以上。如果由于表达速度过快而形成包涵体的话,还可以通过降低 IPTG 的浓度来进行调节。因此,我们选择 pET 系列载体 pET28 进行原核表达。pET28 在 N 端和 C 端都有 His 标签,有利于纯化目的蛋白和除去杂蛋白。

温度、IPTG 浓度和时间都是影响蛋白表达量和可溶性的重要因素,本实验中分别采用 37℃ 和 28℃ 诱导,发现表达的可溶性蛋白的差异不大,同时 IPTG 浓度和时间对蛋白的表达量影响也比较小,这说明 pET28 载体的 T7 启动子具有强大的表达能力,IPTG 浓度降至 0.1mM,诱导 2h 后就可以得到大量的蛋白,达到制备多抗的要求。

蛋白纯化采用了镍柱亲和层析的方法,首次纯化后发现 3~4 条杂蛋白条带,于是通过反复多次洗涤、加入与基质兼容性试剂等方法去除了大部分的杂蛋白,保证了重组蛋白的纯度达 95%以上。出现杂蛋白时首先采取了用 Wash Buffer 反复多次洗涤,同时提高咪唑浓度至 100mM,这样可以洗掉结合能力比较差的杂蛋白,但是仍有一些蛋白由于与目的蛋白相互结合而不能采取提高咪唑浓度的方法除去。于是向 Wash Buffer 中加入了  $\beta$ -巯基乙醇(终浓度为 10mM),NaCl(终浓度为 2M),Triton X-100(终浓度为 1%)进行洗涤, $\beta$ -巯基乙醇可以防止分子间形成二硫键,高浓度的 NaCl 会防止离子间形成相互作用,Triton X-100 是一种洗涤剂,可以将杂蛋白和核酸除去。采取这样的 Wash Buffer 洗涤后发现得到了纯度很高的重组蛋白。

### 2.4.2 多抗的制备

制备多抗时,需要考虑两个因素,抗原的制备和免疫佐剂的选择。

首先,制备多抗时对抗原的纯度要求比较高,SDS-PAGE 的结果中不能有明显的杂蛋白,并且洗脱的蛋白中不能含有 Triton-X100, Tween-20 等去污剂,因为实验用动物(小鼠、兔子)对去污剂是非常敏感的,即使浓度非常低去污剂也有可能引起实验动物的死亡。另外,重组蛋白的标签也是应该考虑的一个重要

因素。如果重组蛋白中含有 GST 标签，一般要用凝血酶或者肠激酶将 GST 标签切除，否则制备的抗体会含有抗 GST 蛋白的杂质。如果重组蛋白使用 His 标签，并且目的蛋白要比 His 标签大很多，则可以将重组蛋白直接免疫动物而不用切除 His 标签。

免疫佐剂是在免疫动物时与抗原一起混合后注入体内试剂，它有两方面的作用，一是刺激机体引起免疫反应，二是可以将抗原包被延缓释放，起到多次免疫的效果。常用的弗氏佐剂在操作上存在一些不足，如在使用前需要与抗原进行完全乳化，并且在操作时不慎误入眼睛可能会造成失明。本次研究采取了一款国产试剂 antibody，此佐剂不含蛋白质成分，无需乳化抗原，同时免疫周期短，只需 3 周即可制备出效价达到  $1:1.6 \times 10^5$  的多抗。

## 2.5 小结

构建了 pET-NS1 载体，蛋白原核表达并纯化后制得多抗，经 ELISA 检测抗体效价可达  $1:1.6 \times 10^5$ ，可以用制备的抗体检测 NS1 蛋白的表达情况。



## 第三章 流感病毒 NS1 蛋白与 HSP70 相互作用的研究

NS1 蛋白介导的细胞凋亡可能部分的依赖于 NS1 蛋白对 IFN 的抑制作用。NS1 蛋白与 dsRNA、PKR 和 OAS/RNase L 等相互作用引起的抑制作用, 可能导致流感病毒诱导的细胞凋亡下调。为了进一步研究流感病毒 NS1 的作用, 本章将重组质粒 pCTAP-NS1 转染进入 HEK 细胞, 表达 NS1 蛋白后利用 TAP 串联亲和纯化技术纯化 NS1 蛋白复合物, 利用双向电泳和质谱分析技术寻找与 NS1 蛋白互作的蛋白, 并利用免疫荧光共定位和 GST Pull Down 技术进行进一步的验证。

### 3.1 细胞和载体

pGEX-4T-1 载体、HEK 细胞、A549 细胞由本实验室保存; pCTAP 载体购自 Agilent 公司; 大肠杆菌 DH5 $\alpha$ , 大肠杆菌 BL21(DE3)购自全世金公司。

### 3.2 主要试剂

DMEM 培养基, 无血清 opti-MEM 培养基, Penicillin Streptomycin Solution, 猪胰蛋白酶购自 Hyclone 公司, 胎牛血清, Lipofectamine 2000 购自 invitrogen 公司。ECL 化学显色剂购自 Thermo 公司。RNA 提取试剂盒购自 OMEGA 公司, 反转录试剂盒购自 Takara 公司。谷胱甘肽 Sepharose 4B 购自于 GE Healthcare 公司, HSP70 抗体、山羊抗鼠 HRP 标记二抗、罗丹明标记山羊抗小鼠 IgG 购自中杉金桥公司。4%多聚甲醛购自索来宝公司。DAPI 核酸染料购自西安沃尔森生物技术有限公司。质谱分析由北京华大公司完成。

Trans Buffer: 称取 Tris Base 5.8g、甘氨酸 2.9g、SDS 0.37g, 加入约 600 mL 去离子水中, 充分搅拌溶解。加入去离子水定容至 800mL 后, 加入 200mL 甲醇。

TBS: 称取 Tris Base 2.42g、NaCl 8g, 加入约 800mL 去离子水, 充分搅拌溶解后调 pH 值为 7.6, 定容至 1L。

TBST: 称取 Tris Base 2.42g、NaCl 8g, 加入约 800mL 去离子水, 加入 0.2% (V/V) Tween-20, 充分搅拌溶解后调 pH 值为 7.6, 定容至 1L。

一抗稀释液：称取 2g BSA，溶于 30mL TBS 中，充分溶解后定容至 40mL。4℃ 储存备用。

1mol/L DTT 储液：将 3.09 g DTT 溶解于 20mL 0.01mol/L 的乙酸钠溶液（pH 5.2）中，过滤除菌。

1% 溴酚蓝储液：称取 1g 溴酚蓝定容于 100mL 无水乙醇中，充分混匀后密封分装于阴凉干燥处保存。

等电聚焦水化液：称取尿素 2.1021g，硫脲 0.7612g，CHAPS 0.1g，溶于 4mL 去离子水中，待完全溶解后，补充至 5mL。使用时加入 IPG Buffer 25μL，1% 溴酚蓝储液 10μL，1mol/L DTT 储液至终浓度为 18mM。

SDS 平衡缓冲液：称取尿素 10.8g，60% 甘油 18.3g，SDS 0.6g，溶解于 20mL 去离子水中，待充分溶解后，加入 1.5M Tris-HCl（pH 8.8）储液 1.5mL，定容至 30mL。使用时加入 1% 溴酚蓝储液 60μL，碘乙酰胺 0.75g 和 DTT 0.3g。

10× 电泳缓冲液：称取 Tris 碱 30.285g，甘氨酸 144.1344g，SDS 1g，双蒸水定容至 1L。

0.5% 低熔点琼脂糖溶液：将 50mg 低熔点琼脂糖溶解于 10mL 1× 电泳缓冲液中，加热使其完全溶解。

SDS 储备平衡缓冲液：称取尿素 72.1g，SDS 粉末 4.0g，溶解于 100mL 去离子水中，加入 69mL 甘油及 10mL Tris-HCl（pH 8.8）缓冲液。滴加 1% 溴酚蓝储备溶液 400μL，充分混匀后加去离子水定容至 200mL。

固定液：无水乙醇 200mL，乙酸 50mL，用超纯水定容至 500mL。

敏化液：称取  $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$  1.5688g，无水乙酸钠 34g，300mL 超纯水充分溶解，加入 150mL 无水乙醇后定容至 500mL。

硝酸银染液：称取  $\text{AgNO}_3$  1.25g，用超纯水定容至 500mL。

显影液：称取无水  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  12.5g，用超纯水定容至 500mL。使用时加入 37% 甲醛 0.1mL。

终止液：称取  $\text{EDTA-Na}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  7.3g，用超纯水定容至 500mL。

GST Lysis Buffer: 150 mM NaCl, 1% Triton, 1 mM PMSF, 5 mM DTT, 1 mM EDTA 的 PBS。

GST Elute Buffer: 10~20 mM reduced glutathione, 5 mM DTT, 0.1% TritonX-100, 0.2 mM PMSF 的 PBS。

RIPA Lysis Buffer: 50mM Tris-HCl, 150mM NaCl, 2mM EDTA, 1% NP-40, 0.5% DOC, 0.1% SDS。调节溶液的 pH 值为 7.6。

### 3.3 试验方法

#### 3.3.1 构建 TAP-NS1 载体

根据 NS1 的碱基序列, 设计并合成一对表达引物:

TAP-NS1-LF: 5'-GGC *GAATTC* CATATGGATTCCAACACTGTGTCAAGCT-3'

TAP-NS1-LR: 5'-CGC *GGATCC* TCAAACCTTCTGACTTAATTGTTCTC-3'

(其中斜体加粗部分为 *Bam*H I 和 *Eco*R I 酶切位点, 下划线部分为保护碱基), 并按照第二章中的试验方法构建 TAP-NS1。将构建的载体进行双酶切验证。

#### 3.3.2 提取转染用质粒

按照 Qiagen 公司的中提质粒试剂盒操作。将双酶切验证为阳性的重组菌液按照 1:500~1000 的比例 37°C 放大培养 12~16h。6000r/min 离心 10min 将菌收集到 50mL 离心管中, 加入 4mL Buffer 1 重悬细胞。加入 Buffer 2 充分颠倒 4~6 次。加入 4mL 预冷的 Buffer 3 后立即混匀, 冰上放置 15min。4°C 20000g 离心 30min, 将上清转至新管。上清再次 4°C 20000g 离心 30min。将离心后的上清加入回收柱中, 加入 10mL Buffer QC 洗涤, 重复洗涤 1 次。加入 5mL Buffer QF, 收集洗出液。加入 3.5mL 异丙醇充分混匀, 15000g, 4°C 离心 30min, 弃上清。加入 2mL 70%乙醇洗涤沉淀, 15000g, 4°C 离心 10min, 小心倒掉上清。置于超净台中 5~10min, 用 50~60°C 的超纯水溶解质粒。

#### 3.3.3 TAP-NS1 质粒转染 HEK 细胞

转染前 24h, 将 HEK 细胞传至 6cm 细胞培养皿中, 使传代后每个培养皿中的细胞数为  $1\sim 3\times 10^5$  个。细胞培养至融合度约为 90%即可进行转染。转染按照 Lipofectamine 2000 说明书操作。取 2 个 1.5ml EP 管, 向其中一个加入 50 $\mu$ L Opti-MEM 和 2 $\mu$ g TAP-NS1 质粒, 轻轻吹吸混匀。另一个加入 50 $\mu$ L Opti-MEM 和 5 $\mu$ L Lipofectamine 2000, 轻轻吹吸混匀, 室温下静置 5min。将转染试剂和质粒混合, 轻轻吹吸混匀, 室温下静置 20min。同时将待转染细胞换为无双抗的 DMEM 培养基, 将混合物滴加在培养皿中, 8 字法轻柔混匀待 4~6h 后换为正常培养液。3~5 小时后换为正常培养基。37°C 培养 48h 后, 弃掉培养基, 吸掉残留的培养基后用 PBS 洗涤 1 次, 加入 150 $\mu$ L  $1.1\times$  Loading Buffer, 用细胞刮将细胞刮至新的 1.5mL EP 管中, 95°C 煮沸 5min 后进行 Western Blot 检测。

### 3.3.4 Western Blot 检测 TAP-NS1 蛋白的表达

PVDF 膜在使用前先用甲醇浸泡 5s, 然后按照“滤纸-胶-膜-滤纸”的顺序用夹子加紧, 采用湿转系统 100V 转 1h。取出膜放入 Western Blot 封闭液中, 37℃, 70r/min 1h。加入按照 1:1000 稀释的一抗中, 室温 70 r/min 1h, TBST 快速洗 3 次, 然后 5min/次共洗 3 次。加入 1:80000 稀释的二抗, 室温 70 r/min 1h, TBST 快速洗 3 次, 然后 5min/次共洗 3 次, 最后用 TBS 洗一次。取 ECL 显色液 A, B 各 50 $\mu$ L 加入 1.5mL EP 管中混匀, 滴至 PVDF 膜上, 反应 1~2min 后放入 X-射线曝光暗匣中, 立即进入暗室。将光片放入暗匣中, 待充分曝光后取出放入显影液中 1min, 用清水冲洗干净后放入定影液中 2min, 自然风干后观察结果。

### 3.3.5 G418 筛选 HEK 细胞稳定表达 NS1 蛋白细胞株

将 TAP-NS1 质粒转染 HEK 细胞 24 小时以后, 将细胞按照 1:4 的比例传代, 待细胞贴壁后, 更换含有 500 $\mu$ g/mL G418 的 DMEM 完全培养基。24 小时后细胞出现大量死亡, 用 PBS 洗 3 遍, 继续加入 500 $\mu$ g/mL G418 的完全培养基, 以后 2~3 天更换一次含有 G418 培养基。5~6 个星期以后, 收集细胞提取 RNA, RT-PCR 验证 NS1 基因是否已经整合到 HEK 细胞基因组中, 反转录过程按照说明书要求操作, 以 Oligo dT 为引物反转录, 得到的 cDNA 以 NS1 特异性引物 PCR。同时 Western Blot 检测 TAP-NS1 蛋白的表达情况。

### 3.3.6 纯化 NS1 重组蛋白

由于重组蛋白在 N 端依次带有两种亲和蛋白标签链酶亲和素结合缩氨酸 (SBP) 和钙调蛋白结合缩氨酸 (CBP), 因此根据载体的特点, 可以进行两次串联亲和纯化。重组蛋白示意图如下:

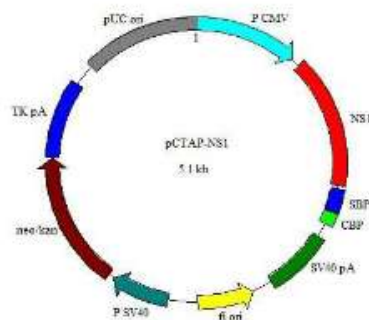


图 3-1. TAP-NS1 质粒图谱

Fig.3-1 Circular maps of TAP-NS1 vector

纯化原理如下:

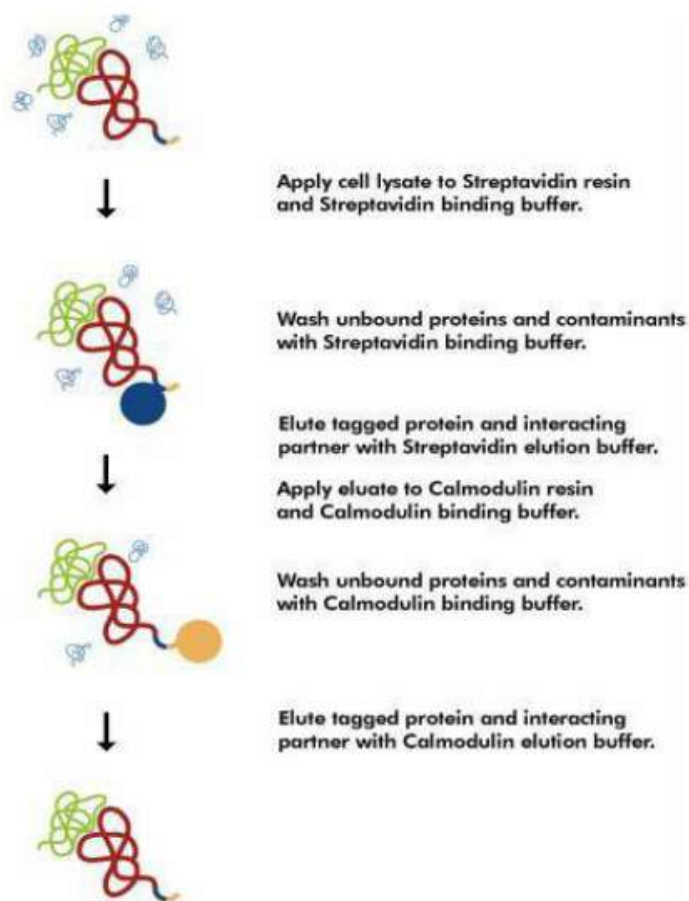


图 3-2. 利用 SBP 和 CBP 两步法纯化重组蛋白示意图

Fig.3-2 Tandem affinity purification of the tagged protein of interest and interacting protein using streptavidin resin(SBP) followed by calmodulin resin(CBP)

按照安捷伦公司 InterPlay Mammalian TAP System 试剂盒的说明操作。按照前面摸索的最佳转染条件收集 30 盘 HEK 细胞 (约为  $1 \times 10^8$  个细胞), 加入 10mL Lysis Buffer 充分混匀后, 放入  $-80^{\circ}\text{C}$  20min, 取出冰上解冻, 反复冻融 3 次。16000g 离心 10min, 将上清转至新的离心管中。取少量样品留作 Western Blot 分析。向上清中加入  $40\mu\text{L}$  0.5M EDTA 和  $7\mu\text{L}$  14.4M  $\beta$ -ME。吸取  $500\mu\text{L}$  50%链酶亲和素结合缩氨酸 (SBP) 树脂, 用 1mL/次 SBB 洗涤 2 次后  $4^{\circ}\text{C}$  1500g 离心 5min。将 SBP 树脂加入上清液中,  $4^{\circ}\text{C}$  缓慢结合 2h。1500g 离心 5min 弃掉上清, 少量留作后续的 Western Blot 分析。向 SBP 树脂中加入 1mL SEB 溶解重组蛋白,  $4^{\circ}\text{C}$  缓慢洗脱 1h,  $4^{\circ}\text{C}$  1500g 离心 5min。将上清转至新离心管中, 少量留样做后续 Western Blot 分析。向上清中加入 4mL CBB 和  $20\mu\text{L}$  链酶亲和素上清补充液 (Streptavidin supernatant supplement)。吸取  $250\mu\text{L}$  50% 钙调素 (CBP) 树脂,

用 1mL/次 CBB 洗涤 2 次后 4℃ 1500g 离心 5min。将 CBP 树脂加入上清中, 4℃ 缓慢结合 2h。1500g 离心 5min, 弃掉上清, 少量留作后续 Western Blot 分析。向 CBP 树脂中加入 200 $\mu$ L CEB, 4℃ 缓慢结合 2h 洗脱蛋白。4℃ 1500g 离心 5min, 上期转至新 EP 管中留作后续试验, 少量留样作后续 Western Blot 分析。

### 3.3.7 双向电泳

采用水化上样的方法上样, 将样品溶液溶解在水化溶液中, 小心加入胶条槽中。胶条槽在室温下平衡 30min 后, 用镊子小心的从酸性端剥去 IPG 胶条的保护膜, 胶面朝下, 从酸性端缓缓将胶条重新放入胶条槽中, 使胶条完全浸入水化溶液, 前后小心滑动, 排出水化液中的气泡。从胶条酸性端加入 2mL 覆盖油防止水化溶液蒸发。将胶条槽放入已经调平的 Ettan IPGphor 3 仪器中, 采用被动水化的方式, 等电聚焦程序为 50V, 4h; 500V, 1h; 1000V, 1h; 4000V, 1h; 4000V, 40000vhr; 500V, 1h。

等电聚焦电泳结束后要对 IPG 胶条进行凝胶平衡。将 IPG 胶条放入平衡试管中, 使支持膜贴着管壁。准备适当体积的 SDS 储备平衡缓冲液平分为 2 份, 一份中加入 DTT 至终浓度为 10mg/mL, 另一份中加入碘乙酸铵至终浓度为 25mg/mL。加入适当体积的含有 DTT 的 SDS 储备平衡缓冲液, 用封口膜封好试管, 放在摇床上缓慢平衡 15min。倒出上一步的缓冲液, 加入适当体积的添加碘乙酸铵的 SDS 储备平衡缓冲液, 用封口膜封好试管, 放在摇床上缓慢平衡 15min。

在平衡的同时将配制好的 1 $\times$ SDS 电泳缓冲液加入第二向电泳槽中。平衡好的 IPG 胶条小心的置于 SDS 胶面上, 并轻压使 IPG 胶条和 SDS 胶面充分结合, 加入 2mL 低熔点琼脂糖使 IPG 胶条和 SDS 胶能够融为一体。调节温度为 12℃, 电压为 80V, 电泳 2h。

将电泳完毕的胶小心转移到搪瓷盘中, 加入固定液使其浸没胶体, 放在摇床上缓慢固定 30min。倒出固定液, 加入敏化液, 缓慢摇动 30min。用去离子水洗涤胶体 3 次, 每次 5min。加入银染液, 缓慢摇动 20min。用去离子水洗涤胶体 3 次, 每次 5min。加入显影液, 缓慢摇动 10min; 换上终止液, 缓慢摇动 10min; 最后用去离子水洗涤 3 次, 每次 5min。

### 3.3.8 质谱分析

将双向电泳胶上的蛋白点送与北京华大公司全谱扫描根据分子质量和串联 MS 确定样品中氨基酸序列。

### 3.3.9 GST Pull Down

#### 3.3.9.1 pGEX-NS1, pGEX- NS1-N, pGEX- NS1-C 原核表达载体的构建

设计表达引物如下:

pGEX-NS1-LF: 5'-CGC **GGATCC** ATGGATTCCAACACTGTGTCAAGC-3'

pGEX-NS1-LR: 5'-CCG **GAATTC** TCATCAAACCTTCTGACTTAATTGTT-3'

pGEX-N-LF: 5'-CGC **GGATCC** ATGGATTCCAACACTGTGTCAAGC-3'

pGEX-N-LR: 5'-CCG **GAATTC** TCAGGCAATGGTCATTTTAAGTGCC-3'

pGEX-C-LF: 5'-CGC **GGATCC** TCTGTACCTGCTTCGCGCTACCTA-3'

pGEX-C-LR: 5'-CCG **GAATTC** TCATCAAACCTTCTGACTTAATTGTT-3'

以 pET-NS1 质粒为模板, 上面三对引物分别 PCR, 胶回收、连接、转化、挑选阳性菌、质粒提取参考第二章内容。

#### 3.3.9.2 pGEX-NS1, pGEX- NS1-N, pGEX- NS1-C 蛋白的表达和纯化

将测序后没有突变的阳性菌转化到大肠杆菌 BL21 (DE3) 中, 挑取单克隆至 1mL LB(A<sup>+</sup>)液体培养基中, 37°C, 250r/min 培养 5h 后, 按照 1:200 的比例放大至 100mL LB(A<sup>+</sup>)液体培养基中, 培养至 OD 值为 0.6~0.8 时, 加入 100μL 1mol/L IPTG, 16°C, 150r/min 过夜诱导蛋白表达。

离心收集细菌后, 加入 20mL GST Lysis Buffer, 冰上超声破碎, 程序为 5s on, 5s off, 共超声 1h。将超声裂解液于 4°C, 10000g 离心 30min, 取上清加入 1mL 已经平衡好的 Sepharose 4B 基质中, 在垂直混匀仪上混匀 1h, 4°C 离心, 小心弃掉上清, 加入遇冷的 PBS 5mL 洗涤 5min, 共洗 3 次。将洗好的 Sepharose 4B 基质分别放入三个 2mL 离心管中, 标记为 NS1-Full, NS1-N 和 NS1-C, 取少量 Sepharose 4B 基质加入 1×Loading Buffer, 95°C, 5~10min 后, 跑胶验证蛋白表达情况。同时表达 GST 标签蛋白。

#### 3.3.9.3 GST Pull Down

当 A549 细胞在 10cm 培养皿中生长到 90~95% 时, 收集 3 盘细胞, 用遇冷的 PBS 洗 3 次, 每盘加入 1mL 遇冷的 RIPA Lysis Buffer 用细胞刮刀轻轻将细胞刮下, 1mL RIPA 使用时加入 100μL cocktail 蛋白酶抑制剂。4°C 垂直混匀仪中混匀 10min 使细胞裂解。4°C, 12000r/min 离心 10min, 收集上清至新的 EP 管, 4°C, 12000 r/min 离心 5min, 收集上清至一个新的 15mL 离心管。

利用 GST 蛋白对细胞裂解液做预处理, 具体方法如下: 将纯化的含有 GST 蛋白的 Sepharose 4B 基质加入细胞裂解液上清中, 4°C 垂直混匀仪中混匀 2h, 除去细胞裂解液中与 Sepharose 4B 基质和 GST 蛋白结合的成分。

将经过预处理的细胞裂解液平均加入结合 NS1-Full, NS1-N 和 NS1-C 的 Sepharose 4B 基质中, 4℃垂直混匀仪中混匀 2h。500g, 4℃离心 3min, 小心弃掉上清, 用遇冷的 PBS 洗涤基质 3 次。在基质中加入 30 $\mu$ L 4 $\times$  Loading Buffer, 95℃加热 5~10 分钟。取 10 $\mu$ L 样品进行 Western Blot, 一抗为 HSP 抗体 1:200 稀释, 二抗为山羊抗鼠 1:5000 稀释, 检测 HSP 蛋白。同时以 GST 蛋白为阴性对照组。

### 3.3.10 免疫荧光共定位

转染前一天, 将 A549 细胞传代至 6 孔板培养皿中爬片培养, 使每个培养皿中细胞数约为 3~6 $\times 10^4$  个。第二天当细胞融合度约为 40%时, 使用 Lipofectamine 2000 进行转染, 具体步骤参见第二章内容。转染时质粒和 Lipofectamine 2000 用量分别为 0.8 $\mu$ g 和 2 $\mu$ L。24h 后, 弃掉培养基, PBS 小心清洗 3 次, 加入 4%多聚甲醛在室温下固定细胞 10min, PBS 洗 3 次后, 加入含 0.5% Triton-X100 的 PBS, 室温下 10min 对细胞表面打孔。PBS 洗 3 次, 加入马血清室温下封闭 1h。加入用马血清 1:50 稀释的 HSP 一抗 100 $\mu$ L, 使一抗完全覆盖住盖玻片。避光 4℃过夜孵育。PBS 洗 3 次。加入马血清 1:1000 稀释的罗丹明标记山羊抗小鼠 IgG 二抗, 避光孵育 1h。PBS 洗 3 次, 将盖玻片捞出放入 1:1000 稀释的 DAPI 核酸染料中 1min, 取出盖玻片, PBS 洗 3 次。取出盖玻片, 小心将液体吸干, 加 10 $\mu$ L 防淬灭剂, 将有细胞的一面盖在载玻片上, 滴上香柏油, 使用荧光显微镜 100 倍镜观察结果。

## 3.4 试验结果

### 3.4.1 TAP-NS1 载体的构建

利用 *Bam*H I 和 *Eco*R I 内切酶对 pET-NS1 和 pCTAP 进行双酶切, 分别回收 NS1 基因和 TAP 载体粘性末端片段, 16℃连接过夜后转化大肠杆菌 DH5 $\alpha$ , 挑取单克隆菌落过夜摇菌后提质粒, 并对质粒进行双酶切, 实验结果如图 3-3, 结果与预期一致, 出现了大小为 693bp 的 NS1 基因。将重组载体测序, 结果与 pET-NS1 中的 NS1 基因具有 100%同源性, 说明已经成功的构建了 TAP-NS1 真核表达载体。



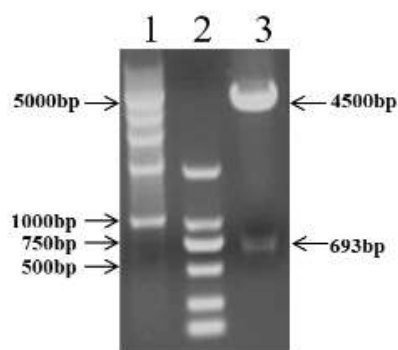


图 3-3. 重组质粒 TAP-NS1 双酶切鉴定结果

Fig.3-3 The identification of recombinant vector TAP-NS1 by restriction enzymes.

注：1, 1kb Ladder Maker; 2, DL2000 Marker; 3, TAP-NS1 双酶切结果

### 3.4.2 真核表达载体 TAP-NS1 转染 HEK 细胞及 G418 筛选结果

将 TAP-NS1 转染 HEK 细胞 48h 后，Western Blot 检测蛋白表达情况，结果见下图，TAP-NS1 蛋白大小约为 35kD，Western Blot 结果显示在 35kD 左右出现目的条带，表明 TAP-NS1 载体在 HEK 细胞内成功表达。

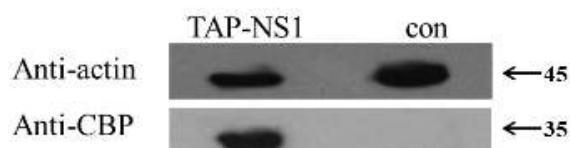


图 3-4. TAP-NS1 转染 HEK 细胞后 Western Blot 检测蛋白表达情况

Fig.3-4 Western Blot analysis of transfection of TAP-NS1

注：anti-actin 为使用  $\beta$ -actin 抗体作为一抗的 WB 结果，anti-CBP 为使用 TAP 抗体作为一抗的 WB 结果。con 为阴性对照。

### 3.4.3 G418 筛选 HEK 细胞稳定表达 NS1 蛋白细胞株

在筛选 40 天后提取 HEK 细胞的总 RNA，RT-PCR 结果如图 3-5 显示，在 693bp 出现特异性条带，初步表明这个细胞株中有外源 NS1 mRNA 的存在，Western Blot 结果如图 3-6 所示，表明 NS1 蛋白已经得到大量表达。

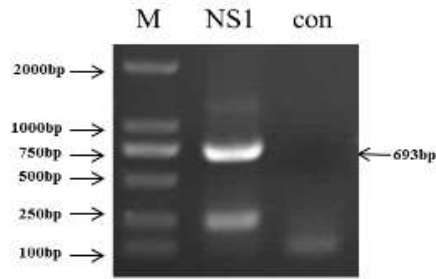


图 3-5. G418 筛选株 RT-PCR 结果

Fig.3-5 RT-PCR analysis of G418 screen cell line

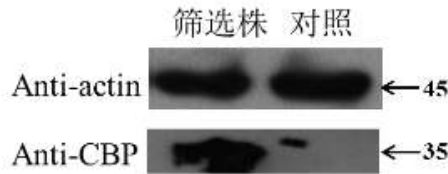


图 3-6. G418 筛选株 Western Blot 结果

Fig.3-6 Western Blot analysis of G418 screen cell line

### 3.4.4 TAP-NS1 蛋白纯化

在纯化过程中,收集用 SEB (Streptavidin Elute Buffer)洗脱后的 Bead1、SEB、CEB (Calmodulin Elute Buffer)洗脱后的 Beads2、CEB 进行 Western Blot 追踪在纯化过程中 TAP-NS1 的表达情况。Western Blot 结果如下图所示: Beads1 和 Beads2 几乎没有条带,这说明洗脱的比较干净。SEB、CEB 出现目的条带,说明第一步、第二步纯化过程都得到了 TAP-NS1 蛋白。纯化的蛋白进行双向电泳,寻找与 NS1 蛋白相互作用的蛋白。

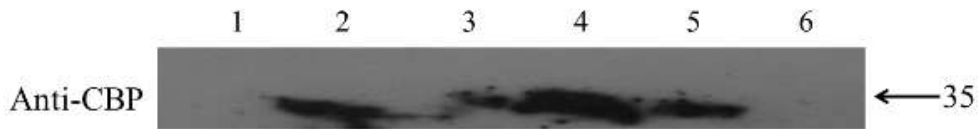


图 3-7. NS1 蛋白纯化结果 Western Blot 分析

Fig.3-7 Western Blot analysis of purified recombination protein

注: Lane1: Beads1. Lane2: SEB. Lane3: Beads2. Lane4: CEB.

Lane5:阳性对照. Lane6: 阴性对照

### 3.4.5 双向电泳结果

IPG 胶条使用线性胶条, pH 值范围为 3~10, 双向电泳采用银染后, 实验结果如图 3-8。图中发现, 大部分的蛋白均聚集在 pH 为 6~8 左右, 即中性蛋白。软件扫描后, 找到可以进行质谱分析的“蛋白点”, 软件分析结果如图所示。将扫描到的含量比较高的点用质谱检测其蛋白序列, 发现以下宿主蛋白: Protein kinase C, zyxin, immunoglobulin heavy chain variable region, Dynamin, Heat shock protein70, Mutl protein Homolog 1 Isoform 1 等。其中, Protein kinase C 等已经报道, 其他未见报道。

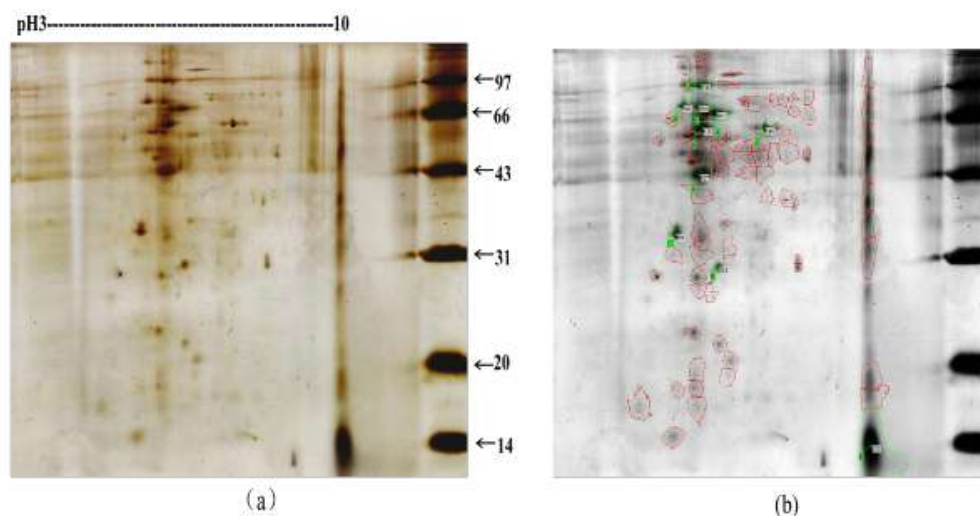


图 3-8. 双向电泳结果

Fig.3-8 the result of two-dimensional electrophoresis

注: (a)图为双向电泳银染结果; (b)图为 ImageMaster 2D Platinum 6.0 软件扫描结果

### 3.4.6 GST Pull Down 试验结果

利用三对引物 PCR 后胶回收, 连接 pGEX-4T-1 载体后, 挑取单菌落提取质粒进行双酶切验证, 实验结果如图 3-9。三个质粒都能双酶切出目的条带, 说明载体已经构建成功。将构建的质粒转化入大肠杆菌 BL21 (DE3) 中, 挑取单菌落至 100 mL LB(A<sup>+</sup>)液体培养基中放大培养, 到 OD 值为 0.6~0.8 时, 加入 IPTG 诱导表达, 四个蛋白的表达情况如图 3-10 所示。将预处理完的细胞裂解液平均分为四份, 分别与已经结合 GST-NS1, GST-NS1-N, GST-NS1-C 和 GST 蛋白的基质混匀后, 吸取 50 $\mu$ L Sepharose 4B 加入 18 $\mu$ L 4 $\times$  Loading Buffer 后 Western Blot 检测 HSP70, 一抗为 1:200 稀释的 HSP 单抗, 二抗为 1:5000 稀释的辣根过氧化物酶标记的羊抗鼠抗体, 实验结果如图 3-10 所示, pGEX-NS1-N, pGEX-NS1-C

和 pGEX-NS1 重组蛋白均出现目的条带，GST 阴性没有出现条带，初步说明 HSP70 蛋白与 NS1 蛋白存在相互作用。

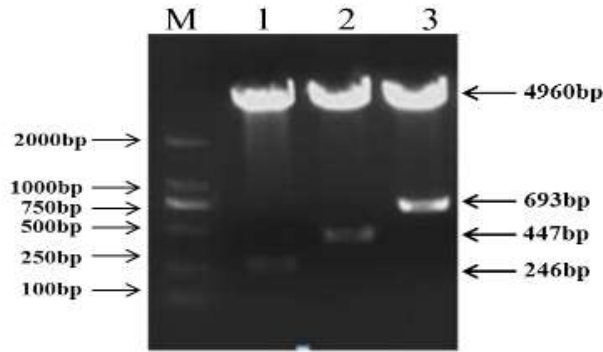


图 3-9. pGEX-NS1-N, pGEX-NS1-C 和 pGEX-NS1-Full 载体双酶切结果  
Fig.3-9 The identification of recombinant vector pGEX-NS1-N, pGEX-NS1-C and pGEX-NS1-Full by restriction enzymes

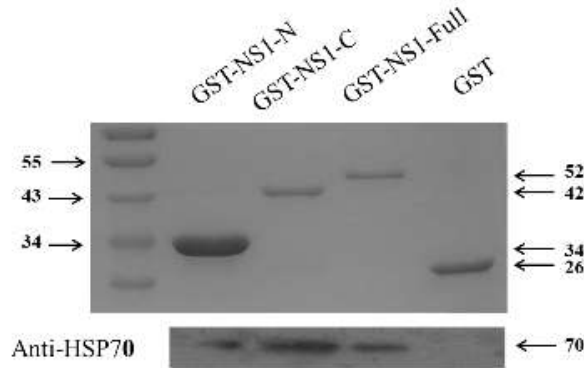


图 3-10. GST-NS1-N, GST-NS1-C, GST-NS1-Full 和 GST 蛋白纯化结果及对应的 GST Pull Down 结果

Fig.3-10 the SDS-PAGE analysis of purification of the recombination protein and the verification of the interaction of NS1 and HSP70 by GST Pull Down

### 3.4.7 免疫荧光共定位

免疫荧光共定位实验结果如图 3-11 所示：对照组中，红色荧光为 Tritc 标记二抗的荧光，蓝色荧光为细胞核。当转染 GFP-NS1 时，发现在细胞浆内红色荧光和绿色荧光相互重叠，出现黄色光，说明 GFP-NS1 和 HSP70 在细胞浆中发生共定位。免疫荧光共定位为 NS1 和 HSP70 两者之间的相互作用提供了进一步的支持。

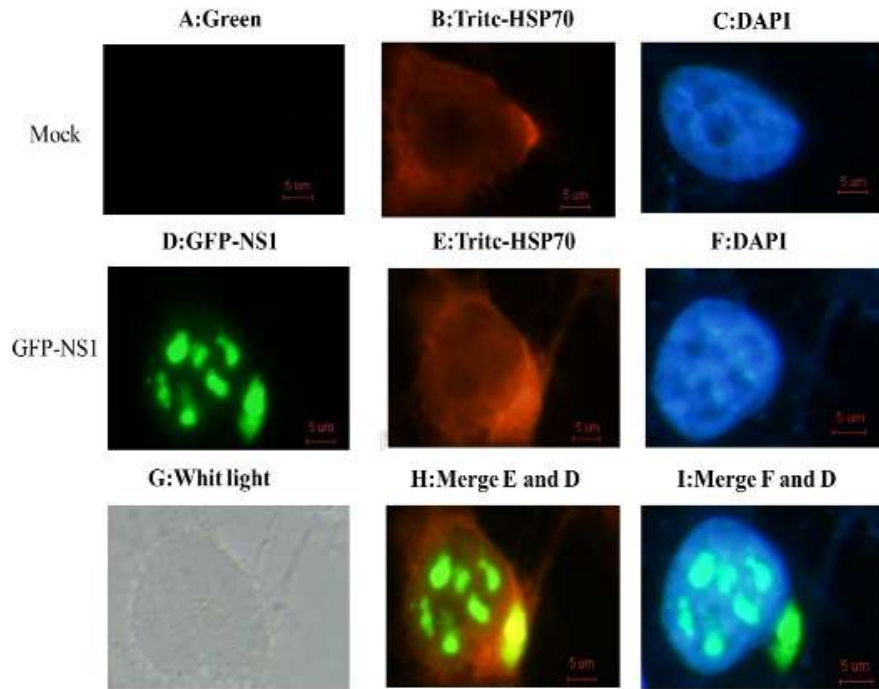


图 3-11. GFP-NS1 和 HSP70 的免疫共定位结果

Fig.3-11 the results of confocal immunofluorescence for GFP-NS1 and HSP70

注：绿色为荧光显微镜下 GFP 融合蛋白，红色为荧光显微镜下 HSP70，蓝色为荧光显微镜下细胞核。A,B,C 图为未转染 GFP-NS1 的 A549 细胞。D,E,F,G 图为转染 GFP-NS1 后的 A549 细胞。H 为 E 图和 D 图叠加的结果。I 图为 F 图和 D 图叠加的结果。

### 3.5 讨论

#### 3.5.1 双向电泳试验结果

在本研究中通过双向电泳技术成功的分离出了若干清晰并且无拖尾的蛋白点，满足质谱分析的要求，经质谱分析后发现为 HSP70、PRK 等蛋白，但是电泳图也存在一些缺陷，包括以下几个方面：

首先，在 43kD 以上出现明显的水平条纹，可能是由以下原因导致：去污剂、尿素、DTT 的浓度过低，导致蛋白不能完全变性，在等电聚焦时导致拖尾；被动扩散时间过短，可以将聚焦时间增长至 5~10 倍；核酸由于带有电荷，所以核酸的存在也会妨碍蛋白进入第一向胶条并影响其在胶内的迁移。

其次,在碱性端出现严重的纵向拖尾。可能由以下的原因导致:碱性端的蛋白的含量过高导致拖尾;第二向电泳的电极缓冲液的 pH 值在跑胶过程中不断的变化,电极缓冲液附近的 pH 的微小偏差都有可能碱性蛋白的拖尾或者沉淀。

第三,蛋白斑点少于实际的斑点。通过质谱分析我们发现,胶图上没有出现 NS1 蛋白,NS1 蛋白斑点的缺失可能是由以下情况造成的:上样浓度高但是 NS1 蛋白溶解不充分,不能完成等电聚焦过程,造成在图上没有出现 NS1 蛋白点;NS1 蛋白可溶于裂解液,但是在等电聚焦过程中蛋白质构型和电荷状态的改变可能造成蛋白的沉淀,导致蛋白斑点缺失。样品中盐离子浓度过高,导致没有达到预期电压,没有完全聚焦,导致 NS1 蛋白弥散,未出现蛋白斑点。

### 3.5.2 NS1 蛋白与 HSP70 蛋白的相互作用

NS1 蛋白与多种宿主蛋白存在相互作用,已经报道的与 NS1 蛋白相互作用的蛋白包括:RIG-1, PKR, PACT, PABPII, CPSF30, eIF4GI, Nucleolin, PDZ, PARP10, p85 $\beta$ , p15, NXF1 和 importin- $\alpha$  等。本研究中质谱分析的结果中存在 PKR 等已有报道的蛋白,而 HSP70 与 NS1 之间是否存在相互作用则未有报道。

有报道表明,HSP70 的高表达对各种因素诱导的细胞凋亡有抑制作用<sup>[62]</sup>。HSP70 抗细胞凋亡的作用机制可能与其抑制应激活化蛋白激酶(SAPK; JNK)的活性有关,谭红梅等人发现细胞凋亡对 JNK 的依赖性与 HSP70 的抗细胞凋亡作用有明显的相关性。细胞内 HSP70 的表达可以通过阻断信号通路,抑制应激诱导的 JNK 活化,从而抑制细胞凋亡。另外,也有报道 HSP70 的抗细胞凋亡作用与抑制半胱氨酸蛋白酶(caspase)活性和抑制促凋亡基因的表达也有密切关系。Mosser 等人的研究表明,HSP70 通过抑制 caspases-3 的活性实现了抗细胞凋亡的作用<sup>[63]</sup>。

NS1 蛋白在宿主细胞中发挥作用时同样与 JNK 和 caspases 家族蛋白存在相互作用。Ludwig S 等人根据试验结果推测 NS1 蛋白通过 RBD 结构域与 dsRNA 结合可以抑制 dsRNA 介导的 JNK 活化,即 NS1 蛋白抑制 dsRNA 活化 JNK,下调 AP-1 依赖性基因的表达<sup>[64]</sup>。Stasakova 等人发现,NS1 蛋白的 RBD 结构域能够通过抑制 Caspase-1 的活性而组织细胞发生凋亡<sup>[65]</sup>。此外,NS1 蛋白还可以与 P85  $\beta$  亚单位结合,从而阻止 Caspase-9 和 GSK-3 $\beta$  的激活,进而抑制宿主细胞的凋亡。

通过分析我们发现,NS1 和 HSP70 对细胞凋亡的调控都是直接或者间接的影响 JNK 或者 Caspase 家族成员的作用而实现的,因此,我们推测 NS1 蛋白与 HSP70 蛋白有可能在调控细胞凋亡时由于协同作用而存在相互作用。正是基于以上原

因，我们选择 HSP70 蛋白作为 NS1 的备选互作蛋白进行研究，并通过 GST Pull Down 和免疫荧光共定位技术初步确定了二者之间的相互作用。

另外，本研究的实验结果不能排除 NS1 和 HSP70 之间存在间接相互作用而非直接相互作用，即两者由于和一个或多个蛋白同时存在相互作用而导致以蛋白复合物的形式结合在一起。因此，HSP70 与 NS1 蛋白之间的相互作用还需要酵母双杂交或者免疫共沉淀等其他方法进一步的验证。

### 3.6 小结

成功构建 pCTAP-NS1 载体，并且筛选出稳定表达 NS1 蛋白的 HEK 细胞株。经双向电泳发现 NS1 的备选互作蛋白 HSP70，并且经 GST Pull Down 实验和免疫荧光共定位初步确定了二者的相互作用。GST Pull Down 实验表明 NS1 蛋白的 RBD 区域和 ED 区域都与 HSP70 具有互作，免疫荧光共定位实验表明 NS1 蛋白在细胞浆与 HSP70 存在相互作用。

## 第四章 结论

1. 构建了 pCTAP-NS1 载体, 获得了带有双标记标签的、稳定表达 NS1 蛋白的 HEK293 细胞系;
2. 通过串联亲和层析的方法纯化出 NS1 蛋白复合物, 采取双向电泳和质谱分析结合的方法发现了疑似互作蛋白 HSP70。
3. 通过 GST Pull Down 和免疫荧光共定位实验, 发现 HSP70 与 NS1 在细胞浆中存在相互作用, 并且 HSP70 与 NS1 的 RBD 和 ED 结构域都具有结合位点。



## 参考文献

- [1] Webster R G, Bean W J, Gorman O T, et al, Evolution and ecology of influenza A viruses, *Microbiology Reviews*, 1992, 56(1): 152~179
- [2] 陆慧君, 贺文琦, 邓旭明等, 流感的实验室诊断方法, *动物医学进展*, 2005, 26(5): 105~109
- [3] Perice J S, de J, Guan Y, Avian influenza virus (H5N1): a threat to human health, *Clinical Microbiology Reviews*, 2007, 20(2): 243~267
- [4] Reid A H, Fanning T G, Janczewski T A, et al, Novel origin of the 1918 pandemic influenza virus nucleoprotein gene, *Journal of Virology*, 2004, 78(22): 12462~12470
- [5] Fatimah S, Jain S, Finelli L, et al, Emergence of a Novel Swine-Origin Influenza A (H1N1) Virus in Humans, *New England Journal of Medicine*, 2009, 360(25): 2605~2615
- [6] Barman S, Adhikary L, Chakrabarti A K, et al, Role of transmembrane domain and cytoplasmic tail amino acid sequences of influenza A virus neuraminidase in raft association and virus budding, *Journal of Virology*, 2004, 78: 5258~5269
- [7] Seo SH, Hoffmann E, Webster RG, The NS1 gene of H5N influenza viruses circumvents the host anti-viral cytokine responses, *Virus Research*, 2004, 103(12): 107~113
- [8] Peiris JS, de J, Guan Y, Avian influenza virus (H5N1): a threat to human health, *Clinical Microbiology Reviews*, 2007, 20(2): 243~267
- [9] Olsen CW, The emergence of novel swine influenza viruses in North America, *Virus Research*, 2002, 85(2): 199~210
- [10] Rikinori M, Yuichi H, Toshikatsu S, et al, Influenza A virus non-structural protein (NS1) interacts with cellular multifunctional protein nucleolin during infection, *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 2007, 362: 880~885
- [11] Pratt W, The role of the HSP90-based chaperone system in signal transduction by nuclear receptors and receptors signaling via MAP kinase, *Pharmacol Toxicol*, 1997, 37: 297~326

- [12] Pratt W, The HSP90-based chaperone system: involvement in signal transduction from a variety of hormone and growth factor receptors, *Experimental Biology and Medicine*, 1998, 217: 420~434
- [13] 王秀荣, 刘丽玲, 熊永忠, 禽流感病毒几种 RT-PCR 诊断技术, *动物医学进展*, 2004, 25(4): 53~55
- [14] Smith A B, Mock V, Melear R, et al, Rapid detection of influenza A and B viruses in clinical specimens by light cycler real-time RT-PCR, *Journal of Clinical virology*, 2003, 28: 51~58
- [15] Chen W, He B, Li C, et al, Real-time RT-PCR for H5N1 avian influenza A virus detection, *Journal of Medical Microbiology*, 2007, 56: 603~607
- [16] Trani L, Bedini B, Donatelli I, et al, A sensitive one-step real-time PCR for detection of avian influenza using a MGB probe and an internal positive control, *BMC Infection Discovery*, 2006, 6: 87
- [17] 马丽, 汤承, 李明义等, SYBR Green I 定量 RT-PCR 快速检测 H5 亚型禽流感病毒方法的建立, *中国家禽*, 2008, 30(20): 18~21
- [18] Peacey M, Hall R J, Bocacao J, et al, Diagnostic assay recommended by the World Health Organization for swine origin influenza A (H1N1) virus cross-reacts with H5N1 influenza virus, *Journal of Clinical Microbiology*, 2009, 47: 3789~3790
- [19] Hall R J, Peacey M, Bocacao J, et al, Rapid method to support diagnosis of swine origin influenza virus infection by sequencing of real-time PCR amplicons from diagnostic assay *Journal of Clinical Microbiology*, 2009, 47: 3053~3054
- [20] Michael E B, Eric T B, Nate L, et al, Rapid semi-automated subtyping of influenza virus species during the 2009 swine origin influenza A H1N1 virus epidemic in Milwaukee, Wisconsin, *Journal of Clinical Microbiology*, 2009, 47: 2779~2786
- [21] Eric T B, Lisa A J, Sue C K, et al, Development of a rapid-automated influenza A, influenza B, and respiratory syncytia virus A/B multiplex real-time RT-PCR assay and its use during the 2009 H1N1 swine-origin influenza virus epidemic in Milwaukee, Wisconsin, *Journal of Molecular Diagnostics*, 2010, 12: 74~81
- [22] Ruixue W, Zong Mei S, Jeffery K T, et al, Detection of novel (swine origin) H1N1 influenza a virus by quantitative real-time RT-PCR, *Journal of Clinical Microbiology*, 2009, 47: 2675~2677
- [23] Susanna K P L, Kwok-Hung C, Cyril C Y Y, et al, Confirmation of the first Hong Kong case of human infection by novel swine origin influenza A (H1N1) virus

- diagnosed using ultra-rapid real-time reverse transcriptase PCR, *Journal of Clinical Microbiology*, 2009, 47: 2344~2346
- [24] Notomita T, Okayama H, Masubuchi H, et al, Loop-mediated isothermal amplification of DNA, *Nucleic Acids Research*, 2000, 28(12): 63~65
- [25] Mori Y, Nagamine K, Tomita N, et al, Detection of loop-mediated isothermal amplification reaction by turbidity derived from magnesium pyrophosphate formation, *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 2001, 289: 150~154
- [26] Imai M, Ninomiya A, Minekawa H, et al, Development of H5-RT-LAMP (loop-mediated isothermal amplification) system for rapid diagnosis of H5 avian influenza virus infection, *Vaccine*, 2006, 24(44): 6679~6682
- [27] Qing L, Xing-Quan Z, Sergei L K P, et al, Detection in 2009 of the swine origin influenza A (H1N1) virus by a subtyping microarray, *Journal of Clinical Microbiology*, 2009, 47: 3060~3061
- [28] Ebrahimi M, Tebianian M, Toghyani H, et al, Cloning expression and purification of the influenza A(H9N2) virus M2e antigen and truncated Mycobacterium tuberculosis HSP70 as a fusion protein in *Pichia pastoris*, *Protein Expression and Purification*, 2010, 70: 7~12
- [29] Kaiser L, Briones M S, Hayden F G, Performance of virus isolation to detect influenza A virus in experimental human infection, *Journal of Clinical Virology*, 1999, 14(3): 191~197
- [30] Qi X, Pang B, Lu C P, Genetic characterization of H1N1 swine influenza A viruses isolated in eastern China, *Virus Genes*, 2009, 39: 193~199
- [31] 祁贤, 汤奋扬, 新甲型 H1N1(2009)流感病毒的早期分子特征, *微生物学报*, 2010, 50(1): 81~90
- [32] Garten R J, Davis C T, Russell C A, et al, Antigenic and Genetic Characteristics of Swine-Origin 2009 A (H1N1) Influenza Viruses Circulating in Humans, *Science*, 2009, 325(5937): 197~201
- [33] 冯润, 孙坚, 何士勤, A 型流感病毒 NP 蛋白研究进展及流感的中药治疗, *江西医药*, 2009, 44 (3): 285~287
- [34] Zhao L, Xu L, Zhou X, et al, Interaction of influenza virus NS1 protein with growth arrest-specific protein 8, *Journal of Virology*, 2009, 6(1): 218

- [35] Malik Peiris J S, Leo L M Poon, Yi Guan, Emergence of a novel swine-origin influenza A virus (S-OIV) (H1N1) in humans, *Journal of Clinical Virology*, 2009, 45:169~173
- [36] Steel J, Lowen A C, Mubareka S, et al, Transmission of influenza virus in a mammalian host is increased by PB2 amino acids 627K or 627E /701N, *PLOS One*, 2009, 5(1):249~252
- [37] Li O T, Chan M C, Leung C S, et al, Full factorial analysis of mammalian and avian influenza polymerase subunits suggests a role of an efficient polymerase for virus adaptation, *PLOS One*, 2009, 4(1):56~58
- [38] Bornholdt Z A, Prasad B V, X-ray structure of influenza virus NS1 effector domain C, *Nature Structure and Molecular Biology*, 2006, 13(6):559~560
- [39] 史一博, 孙建和, A型流感病毒 NS1 蛋白抑制 IFN 抗病毒作用的机制, *中国人兽共患病学报*, 2007, 23(10): 1030~1034
- [40] Ludwig S, Wang X, Ehrhardt C, et al, The influenza A virus NS1 protein inhibits activation of Jun N-terminal kinase and AP-1 transcription factors, *Journal of Virology*, 2002, 76:11166~11171
- [41] Born holdt ZA, Prasad BV, X-ray structure of influenza virus NS1 effector domain C, *Nature Structure Molecular Biology*, 2006, 13(6):559~560
- [42] Falcon AM, Marion RM, Zurcher T, et al, Defective RNA replication and late gene expression in temperature sensitive influenza viruses expressing deleted forms of the NS1 protein C, *Journal of Virology*, 2004, 78 (8):3880~3888
- [43] Noah DL, Twu KY, Krug RM, Cellular antiviral response against influenza A posttranscriptional level by the viral NS1 protein binding to a cellular protein required for the 3' end processing of cellular premRNAs, *Virology*, 2003, 307(2):386~395
- [44] Hu Y, Conway TW, Aminopurine inhibits the double stranded RNA-dependent protein kinase in vitro, *Journal of Interferon Research*, 1993, 13:323
- [45] Lu YM, Wambach MG, Katze M, et al, Binding of the influenza virus NS1 protein to double-stranded RNA inhibits the activation of the protein kinase that phosphorylates the eIF-2 translation initiation factor, *Virology*, 1995, 214~222
- [46] Tan SL, Katze M, Biochemical and genetic evidence for complex formation between the influenza A virus NS1 protein and the interferon induced PKR protein kinase, *Journal of Interferon Cytokine Research*, 1998, 18:757

- [47] Abraham NDF, Stojd PI, Duncan N, et al, Characterization of transgenic mice with targeted disruption of the catalytic domain of the double-stranded RNA-dependent protein kinase, *Journal of Biology Chemistry*, 1999, 274: 5953~5962
- [48] Mibayashi M, Martinez-Sobrido L, Loo YM, et al, Inhibition of retinoic acid-inducible gene I-mediated induction of beta interferon by the NS1 protein of influenza A virus, *Journal of viology*, 2007, 1(2): 514~524
- [49] Guo Z, Chen LM, Zeng H, et al, NS1 Protein of influenza A virus inhibits the function of intra cytoplasmic pathogen sensor, *American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology*, 2006, 10: 19
- [50] Feige U, Polla NS, Heat shock protein: the HSP70 family, *Experientia*, 1994(50): 979~986
- [51] Fuller KJ, Issels RD, Slosman DO, et al, Cancer and the Heat Shock Response, *European Journal of Cancer*, 1994, 30 (12): 1884~1891
- [52] Morimoto RI, *Stress Protein in biology and Medicine*, Cold Spring Harbor: CSHL Press, 1990: 1~36
- [53] Ishii T, Udono H, Yamano T, et al, Isolation of MHC class T-restricted tumor antigen peptide and its precursors associated with heat shock proteins HSP70, hsp90, and gp96, *Immunology*, 1999, 162: 1303~1309
- [54] Castelli C, Ciupilu am, Rinif, et al, Human heat shock protein 70 peptide complexes specifically activate antimetastoma T cells, *Cancer Research*, 2001, 61(1): 222~227
- [55] Mosser D, The chaperone function of HSP70 is required for protection against stress-induced apoptosis, *Molecular and Cellular Biology*, 2000, 20(19): 7146~7159
- [56] Moroi Y, Mayhew M, Trcka J, et al, Induction of cellular immunity by immunization with novel hybrid peptides complexed to heat shock protein 70, *Proceeding of the National Academy of Science of the United States of America*, 2000, 97(7): 3485~3490
- [57] Mosser D, Role of the human heat shock protein HSP70 in protection against stress induced apoptosis, *Molecular and Cellular Biology*, 1997, 17(9): 5317~5327
- [58] Chant ID, Heat shock protein chaperoning life and death, *Cell Stress Chaperones*, 1996, 93(4): 898~902
- [59] Gabai VL, Role of HSP70 in regulation of stress kinase JNK: implications in apoptosis and aging, *FEBS Letters*, 1998, 438(1): 1~4

- [60] Ohtsubo T, Park H J, Lyons JC, et al, Effect of acidic environment and p53 on apoptosis induction by hyperthermia, *Internal Journal of Hyperthermia*, 2000, 16(6):481~491
- [61] Ravagnan L, Gurbuxani S, Susin S A, et al, Heat shock protein 70 antagonizes apoptosis inducing factor, *Natural Cell Biology*, 2001, 3(9):839~841
- [62] Kim Y M, Watkins S C, Billiar T R, et al, Nitric oxide protects cultured rat hepatocytes from tumor necrosis factor- $\alpha$ -induced apoptosis by inducing heat shock protein 70 expression, *Journal of Biology Chemistry*, 1997, 272(2): 1402~1411
- [63] Mosser D D, Caron A W, Bourget L, et al, The chaperone function of HSP70 is required for protection against stress-induced apoptosis, *Journal of Molecular Cell Biology*, 1997, 17(9):5317~5327
- [64] Ludwig S, Wang X, Ehrhardt C, et al, The influenza A virus NS1 protein inhibits activation of Jun N-terminal kinase and AP-1 transcription factors, *Journal of virology*, 2002, 76(21):11166~11171
- [65] Stasakova J, Ferko B, Kittel C, et al, Influenza A mutant viruses with altered NS1 protein function provoke caspase-1 activation in primary human macrophages, resulting in fast apoptosis and release of high levels of interleukins  $1\beta$  and 18, *Journal of gene of virology*, 2005, 86(1):185~195

## 附录一：主要化学试剂

药品名称	生产厂家
NP-40	Sigma
APS	Sigma
Trixon-100	Sigma
Tween-20	Sigma
凝血酶	Sigma
$\beta$ -巯基乙醇	Sigma
SDS	北京鼎国昌盛生物技术有限责任公司
甘氨酸	北京鼎国昌盛生物技术有限责任公司
30%丙烯酰胺	北京索莱宝公司
琼脂糖	北京索莱宝公司
蛋白胨	OXOID
酵母提取物	OXOID
琼脂糖	OXOID
磷酸氢二钠	北京化工厂
磷酸二氢钾	北京化工厂
氯化钠	北京化工厂
盐酸	北京化工厂
硫酸	北京化工厂
甘油	北京化工厂
无水乙醇	北京化工厂
异丙醇	北京化工厂
异戊醇	北京化工厂
甲醇	北京化工厂
Western Blot 封闭液	天根生化科技(北京)有限公司
TMB	天根生化科技(北京)有限公司
DAB	天根生化科技(北京)有限公司
溴酚蓝	北京鼎国昌盛生物技术有限责任公司
Sybr green I	北京鼎国昌盛生物技术有限责任公司
DL2000	Takara
1kbp DNA Ladder Marker	Takara
显影粉	天津市世纪奥博商贸有限公司
酸性定影粉	天津市世纪奥博商贸有限公司

## 附录二：主要仪器

仪器名称	型号	公司
电子天平	ML503	梅特勒-托利多
实验室 pH 计	EL20	梅特勒-托利多
样品储存冰箱	BCD-226ST C	Haier
-80℃冰箱	DW-40L262	Thermo
超净台	VS-840-K-U	苏净安泰
控温金属浴	H203-75C	GINGKO
磁力搅拌器	RH-KT/C	IKA
离心机	TDL-5-A	Thermo
二氧化碳培养箱	3111	Thermo
冷冻离心机	5417R	eppendorf
酶标仪	354	Thermo
PCR 仪	Mastercycler gradient	eppendorf
PFDV 膜转印仪	SEMI-DRY TRANSFER CELL	Bio-rad
倒置显微镜	090-135.001	Leica
蛋白电泳仪	mini pro/PowerPac HC	Bio-rad
高温灭菌锅	MLS-3780	三洋



## 发表论文和参加科研情况说明

### 发表或已接收的论文:

- [1] 刘永飞,黄金海,梁智选等. 荧光定量PCR技术检测PRRS变异病毒的研究[J].畜牧兽医科技信息,2011,8:38~40
- [2] 刘永飞,李志辉,韩雪清等. A型流感病毒NS1蛋白对细胞生长调控的影响[J].中国兽医科学.(已接收)

### 参与的科研项目:

- [1] 中国检验检疫科学研究院基本科研业务费专项资金资助项目(2011JK004):2009和1918甲型流感NS1相互作用蛋白的差异比较研究

---

## 致 谢

## 致 谢

本论文是在我的硕士导师黄金海教授和中国检验检疫科学研究院研究员韩雪清老师的悉心教导下完成的。黄金海老师严谨的治学态度，幽默的教学风格，开放启发式的教学思路以及开阔的专业视野都使我受益匪浅，给我留下了深刻的印象，在此论文完成之际衷心感谢黄老师在我的硕士期间对我的关心指导和教育。韩雪清老师在我在中国检验检疫科学研究院实习期间给予了大力支持，她在生活中无微不至的关怀以及在科研上循序善诱的启发是我顺利完成硕士论文的有力保障。

衷心感谢食品专业周志江老师、寇晓红老师、薛照辉老师、肖华志老师、韩晔老师、周凤娟老师和王占忠老师在我本科和硕士期间对我的悉心照料。感谢本实验室付俊淑、徐丹丹和曾琳姣师姐，刘鹏翀、孙盈和李霞同学，感谢李艺、夏乙禾和刘萌萌师妹等人在我试验期间对于我的指导和帮助。

感谢中国检验检疫科学研究院李志辉博士、李霆博士在我试验阶段对我的指导和帮助。感谢张永宁博士、吕继洲博士、冯春燕博士、王慧煜博士，王彩霞、邓启飞、朱振营、于宁师姐在我平时的生活中对我的鼓励和帮助。感谢程涛、王晓环、张丽、李晓菲、袁向芬、朱向博、李波、王飞、张晓娜等同学对我在学习和生活上的帮助，感谢他们使我的研究生期间的生活变得丰富多彩。

衷心感谢食品专业 2010 级硕士全体同学，同时祝福他们的明天更美好。

衷心感谢我的家人，感谢他们对我提供无私的奉献，他们是我坚强的后盾，让我能够安心的完成硕士期间的学习，是他们让我能够勇于面对并克服困难。

最后，再次诚挚地感谢所有关心、帮助和支持我工作的领导、老师及朋友们，谢谢！