

# 新城疫病毒 HN 蛋白和 F 蛋白 结构域共表达对细胞融合的影响

陈亚波, 陈雪燕, 徐程, 张桂芝, 方维焕

(浙江大学动物预防医学研究所, 浙江省动物预防医学重点实验室, 杭州 310029)

**摘要:** 将重组真核质粒 pcDNA3-HN、pcDNA3-HNa、pcDNA3-HNb、pcDNA3-F 和 pcDNA3-Fa(c) 脂质体介导转染 HeLa 细胞, 分别以新城疫病毒阳性血清和制备的相应多抗为一抗, 用 FITC 标记二抗进行间接免疫荧光试验, 均可以观察到荧光, 说明重组质粒能在 HeLa 细胞中表达具有免疫反应性的目的蛋白。将 pcDNA3-F 和 pcDNA3-Fa(c) 分别与 pcDNA3-HN、pcDNA3-HNa 和 pcDNA3-HNb 在脂质体介导下逐一共转染 HeLa 细胞。转染后 24 h, Fa(c) 片段与 HNa、HNb 共转染孔就观察到了细胞融合, 36 h 后每个共转染孔都观察到了细胞融合, 同时用间接免疫荧光法也检测到合胞体。单独转染孔均未观察到细胞融合。结果表明: 不同组合共转染对细胞融合都有一定促进, 其中 Fa(c) 片段与 HNa、HNb 共转染促融合更为明显, 可能与这三个片段较小、易表达且保留了融合所需的结构有关。

**关键词:** 兽医学; 新城疫病毒; 血凝素—神经氨酸酶; 融合蛋白; 细胞融合

**中图分类号:** S852.65 **文献标识码:** A **文章编号:** 1674-2850(2008)06-0283-6

## Cell fusion upon co-expression of structural domains of hemagglutinin-neuraminidase and fusion protein of newcastle disease virus

CHEN Yabo, CHEN Xueyan, XU Cheng, ZHANG Guizhi, FANG Weihuan

(*Institute of Preventive Veterinary Medicine, Zhejiang University and Provincial Key  
Laboratory of Preventive Veterinary Medicine, Hangzhou 310029*)

**Abstract:** Recombinant plasmids pcDNA3-HN, pcDNA3-HNa, pcDNA3-HNb, pcDNA3-F and pcDNA3-Fa(c) were transfected individually into HeLa cells. Indirect immunofluorescent assay revealed expression of the target proteins in HeLa cell monolayers using NDV positive serum and rabbit polyclonal antibodies. To evaluate the effects of co-expression on cell fusion of HN and F structural domains, pcDNA3-F or pcDNA3-Fa(c) were co-transfected with pcDNA3-HN, pcDNA3-HNa or pcDNA3-HNb respectively into HeLa cells. After culture for 24 h, cell fusion was observed in the wells co-transfected with pcDNA3-Fa(c) and pcDNA3-HNa, and also those containing pcDNA3-Fa(c) and pcDNA3-HNb. After 36 h, cell fusion wells of all co-transfected combinations were found and detectable by indirect immunofluorescent assay. However, cell fusion could not be observed in the wells with recombinant plasmid F or Fa(c) alone. These results indicate that co-expression of fragments of HN and F protein can promote cell fusion. We postulate that these fragments contained the structural domains required for cell fusion and were easier to be expressed than the full length proteins.

**Key words:** veterinary medicine; newcastle disease virus; hemagglutinin—neuraminidase; fusion protein; cell fusion

基金项目: 高等学校博士学科点专项科研基金 (20040335079)

作者简介: 陈亚波 (1979—), 女, 硕士研究生, 主要研究方向: 病原生物学

通信联系人: 方维焕, 教授, 主要研究方向: 分子微生物学与食品安全, E-mail: whfang@zju.edu.cn

## 0 引言

新城疫 (Newcastle disease, ND) 是危害养禽业最严重的急性传染病之一, 该病病原新城疫病毒 (Newcastle disease virus, NDV) 属于副粘病毒科腮腺炎病毒属, 是一种有囊膜的负链 RNA 病毒。其基因组为单股不分节 RNA, 全长 15 186 bp, 编码 6 种病毒结构蛋白, 顺序为 3'-NP-P-M-F-HN-L-5', 即核蛋白、磷蛋白、基质蛋白、融合蛋白、血凝素-神经氨酸酶以及聚合酶<sup>[1]</sup>。其中血凝素-神经氨酸酶 (hemagglutinin-neuraminidase glycoprotein, HN) 和融合蛋白 (fusion glycoprotein, F) 是 NDV 的致病基础和主要宿主保护性抗原。F 蛋白主要介导病毒囊膜与宿主细胞表面蛋白膜的融合<sup>[1~5]</sup>, 而 HN 蛋白具有血凝、神经氨酸酶 (NA) 和促融合活性<sup>[6~7]</sup>。

近年来, 许多学者通过对融合囊泡形成过程的研究发现, 许多副粘病毒包括 NDV 的 HN 蛋白除具有抗原性、NA 活性和 HA 活性外, 与 F 蛋白有协同作用<sup>[7]</sup>。IORIO 等<sup>[8]</sup>证实同源 F 蛋白与 HN 蛋白能相互作用而产生活性, 而异源 F 蛋白与 HN 蛋白不能相互作用产生融合活性, 并且既表达 HN 蛋白又表达 F 蛋白的感染细胞能够融合邻近的细胞形成多核细胞或者合胞体<sup>[9]</sup>。但目前国内还没有这两个蛋白结构域共表达对细胞融合影响方面的报道。本研究将包含 F 和 HN 不同抗原结构域的真核表达质粒转染入 HeLa 细胞, 观察细胞融合情况, 从而初步探讨不同结构域对细胞融合的影响, 并确定与细胞融合相关的结构域。

## 1 材料和方法

### 1.1 质粒、菌株和细胞系

真核表达载体 pcDNA3、大肠杆菌 (*Escherichia coli*) DH5 $\alpha$  菌株和 HeLa 细胞均由本实验室保存, 重组真核表达质粒 pcDNA3-F 由本实验室构建保存<sup>[10]</sup>。

### 1.2 主要试剂

DMEM 培养基和胎牛血清购自 GIBICO 公司; High Purity Plasmid Purification Systems 购自 Marligen 公司, 脂质体转染试剂 Lipofectamine<sup>TM</sup> 2000 购自 Invitrogen 公司; FITC 标记的兔抗鸡 IgG 购自 Progenia 公司, FITC 标记的山羊抗兔 IgG 购自鼎国生物工程公司; 新城疫阳性血清由中国科学院宋厚辉博士惠赠; *Bam*H I、*Hind* III 等限制性内切酶及 DNA Marker 购自大连宝生生物有限公司; dNTP、pfu Taq plus、DNA 琼脂糖胶回收试剂盒及 DNA 连接试剂盒等购自上海生工生物技术有限公司; 氨苄青霉素购自鼎国生物工程公司; 其余试剂均为进口或国产分析纯。

### 1.3 重组真核表达质粒的构建和鉴定

将重组原核表达质粒 pET32c-HNa 和 pET32c-HNb 经限制性酶 *Bam*H I 和 *Hind* III 双酶切后, 胶回收目的片段, 并克隆至真核表达载体 pcDNA3, 获得重组质粒分别为 pcDNA3-HNa 和 pcDNA3-HNb。同时重组原核表达质粒 pGEX-Fa(c) 经 *Bam*H I 和 *Not* I 双酶切后, 将 Fa(c) 克隆到 pcDNA3, 构建成真核表达质粒 pcDNA3-Fa(c)。重组质粒采用 PCR 和酶切鉴定。

### 1.4 脂质体介导重组质粒转染 HeLa 细胞

重组质粒经 High Purity Plasmid Purification Systems 纯化后, 再利用转染试剂 Lipofetamine<sup>TM</sup> 2 000 转染至 HeLa 细胞。将 HeLa 细胞接种于 96 孔细胞培养板中, 营养液为不含抗生素的 DMEM 培养液 (含 10% 胎牛血清), 37 $^{\circ}$ C、5%CO<sub>2</sub> 培养至 90%~95% 的细胞融合度后, 用 0.01 mol/L PBS (pH 7.4) 洗涤 2~3 次后, 加入质粒 DNA 和转染试剂, 再加入 50  $\mu$ L 不含血清和抗生素的 DMEM 培养液, 混合均匀, 并设 pcDNA3 空质粒对照和 pcDNA3-EGFP 阳性对照。37 $^{\circ}$ C、5%CO<sub>2</sub> 培养 4~6 h 后, 每孔再加入 100  $\mu$ L 含 10% 血清和抗生素的 DMEM, 继续培养 18~48 h, 并在不同时间观察细胞融合情况。

### 1.5 间接免疫荧光检测目的蛋白的表达

转染 18~48 h 后，吸去 96 孔细胞培养板中的培养基，用 0.01 mol/L PBS 洗涤 3 次，80% 预冷的丙酮在 -20 °C 中固定 30 min。0.01 mol/L PBS 洗涤 3 次后，加入相应适当稀释的一抗，每种组合都分别用新城疫阳性血清和制备的抗 Fa(c) 多抗检测，同时设阴性血清对照。37 °C 作用 1 h 后，0.01 mol/L PBS 洗涤 3 次，加入相应二抗，37 °C 作用 1 h 后，0.01 mol/L PBS 洗涤 3 次，倒置荧光显微镜观察拍照。

## 2 结果

### 2.1 重组真核表达质粒鉴定

重组质粒经 PCR 以及限制性内切酶 *BamH* I 和 *Hind* III 双酶切均可获得 HNa 和 HNb，表明这两种外源基因片段均已插入 pcDNA3 的 CMV 早期立即启动子的下游（如图 1、图 2 所示）。同时 PCR 和 *BamH* I、*Not* I 双酶切鉴定也证实了重组真核表达质粒 pcDNA3-Fa(c) 的成功构建。

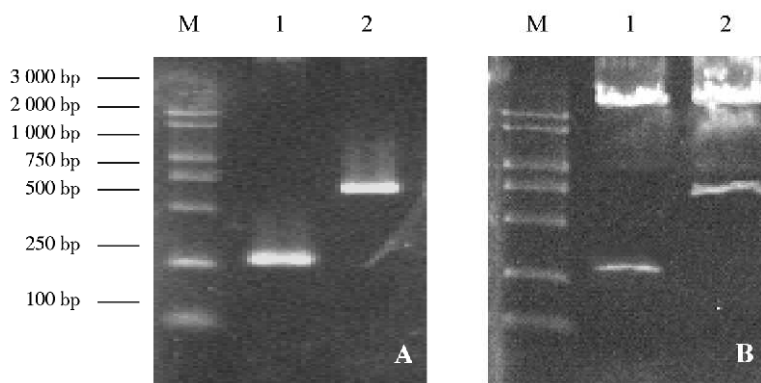


图 1 重组质粒 pcDNA3-HNa 和 pcDNA3-HNb 的 PCR (A) 和酶切鉴定 (B)  
Fig. 1 Identification of recombinant plasmids pcDNA3-HNa and pcDNA3-HNb by PCR (A) and enzyme digestion (B)  
M—DL 3 000 DNA Marker; 1—pcDNA3-HNa; 2—pcDNA3-HNb

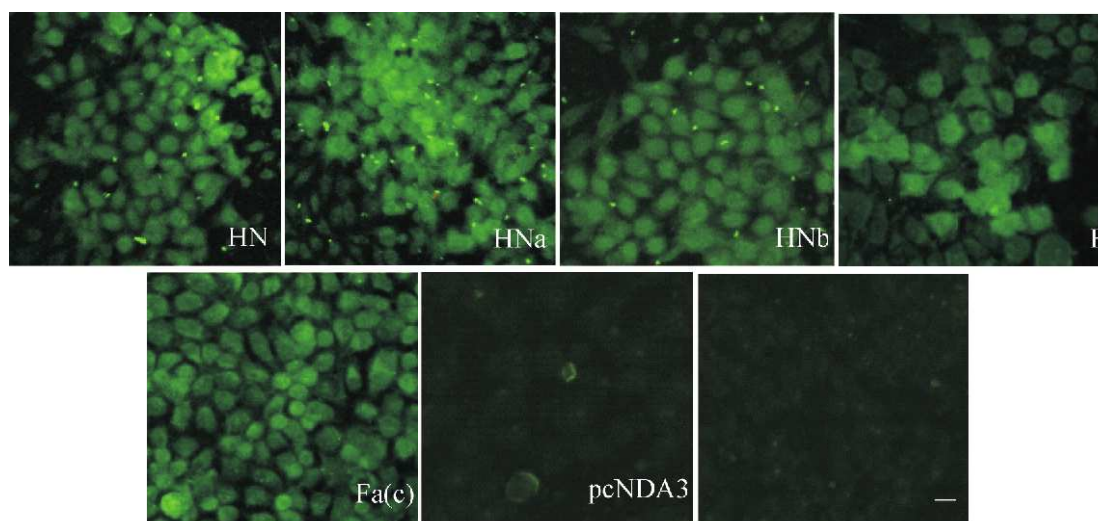


图 2 间接免疫荧光法检测外源蛋白基因在 HeLa 细胞中的表达（一抗为 NDV 阳性血清）  
Fig. 2 Detection of target proteins expressed in HeLa cells by indirect immunofluorescent assay (the 1<sup>st</sup> antibody is NDV positive serum)

## 2.2 间接免疫荧光检测目的蛋白在 HeLa 细胞中的表达

重组质粒转染 HeLa 细胞 20 h 后, pcDNA3-EGFP 转染孔就可观察到明显的荧光, 表明了转染体系的成功建立。以 NDV 阳性血清为一抗, FITC 标记的兔抗鸡 IgG 为二抗, pcDNA3-HN、pcDNA3-HNa、pcDNA3-HNb、pcDNA3-F 和 pcDNA3-Fa(c)转染孔均可观察到绿色荧光, 而 pcDNA3 对照孔和未转染孔都没有可见荧光 (如图 2 所示), 而抗 HNa、HNb 及 Fa(c)多抗也可检测到相应的荧光, 表明了外源蛋白均在 HeLa 细胞内得到了表达。

## 2.3 F 和 HN 蛋白片段对 HeLa 细胞融合的影响

如图 3、图 4 所示, 转染后 24 h, F、Fa(c)重组质粒单独转染孔没有观察到细胞融合, Fa(c)+HNa 及 Fa(c)+HNb 重组质粒转染孔可见明显的细胞融合, 其它转染孔只有少量的细胞融合。转染后 36 h, F、Fa(c)单独转染孔还是没有观察到细胞融合, Fa(c)+HNa 重组质粒转染孔细胞融合更加明显, 其它转染孔也有不同程度的细胞融合。

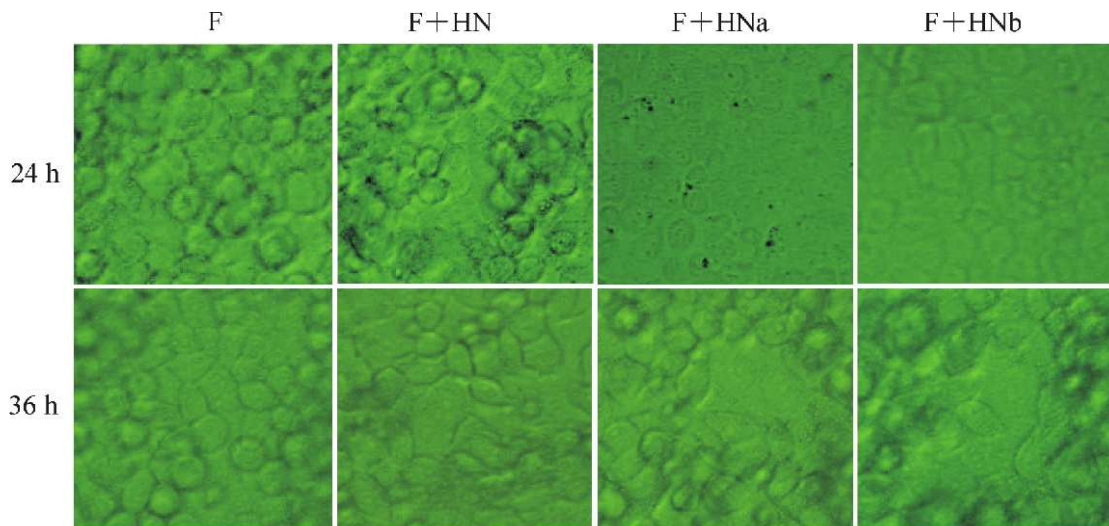


图 3 F 全长片段与 HN 不同片段重组质粒共转染后 HeLa 细胞的融合情况  
Fig. 3 Fusion of HeLa cells transfected with pcDNA3-F and HN, HNa or HNb

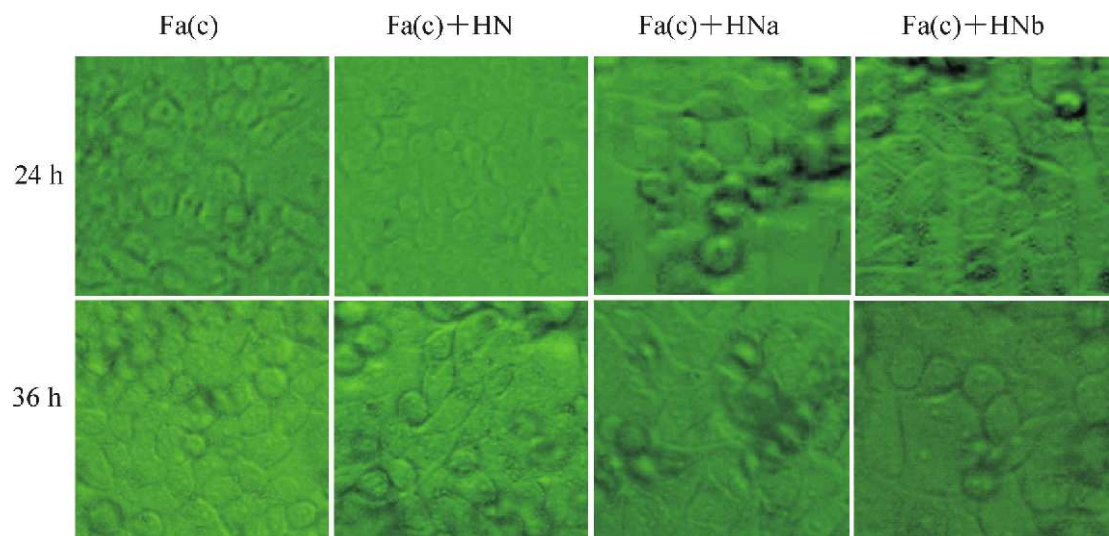


图 4 Fa(c)片段与 HN 各片段重组质粒共转染后 HeLa 细胞的融合情况  
Fig. 4 Fusion of HeLa cells transfected with pcDNA3-Fa(c) and HN, HNa or HNb

转染后 36 h, 以 NDV 阳性血清为一抗, 间接免疫荧光检测目的蛋白, 在合胞体中均能检测到目的蛋白的表达, 而抗 HNa、HNb 及 Fa(c)多抗作为一抗的结果也相似, 其中 Fa(c)+HNa 转染孔融合程度最高, 进一步说明共转染促进了细胞的融合 (如图 5、图 6 所示)。

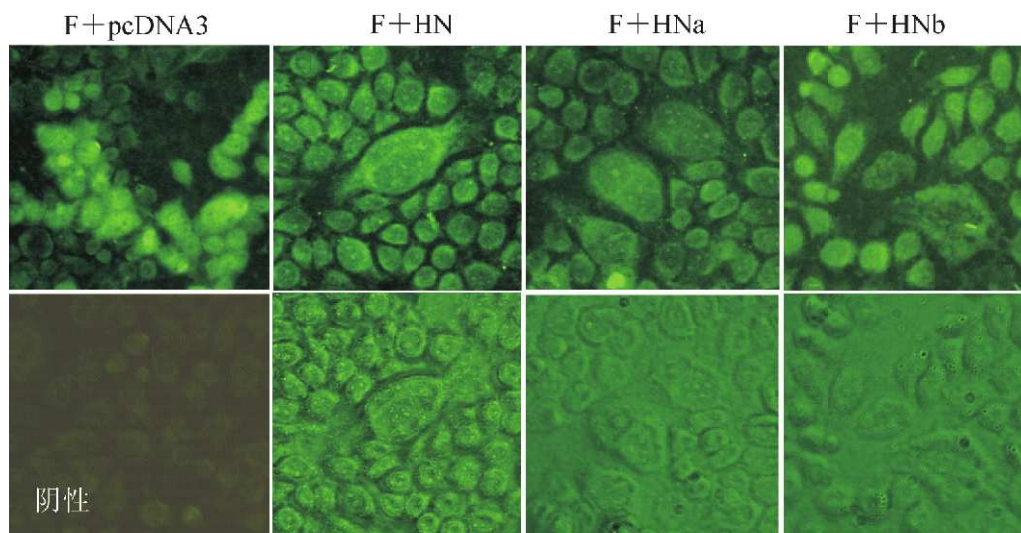


图 5 间接免疫荧光 (上排) 检测重组质粒共转染后 HeLa 细胞的融合 (一抗为 NDV 阳性血清) (下排除左下 1 外, 其余三幅为同一视野普通光学显微照片作为对照)

Fig. 5 Detection of cell fusion in HeLa cells by indirect immunofluorescent assay (top panels)(the 1<sup>st</sup> antibody is NDV positive serum)

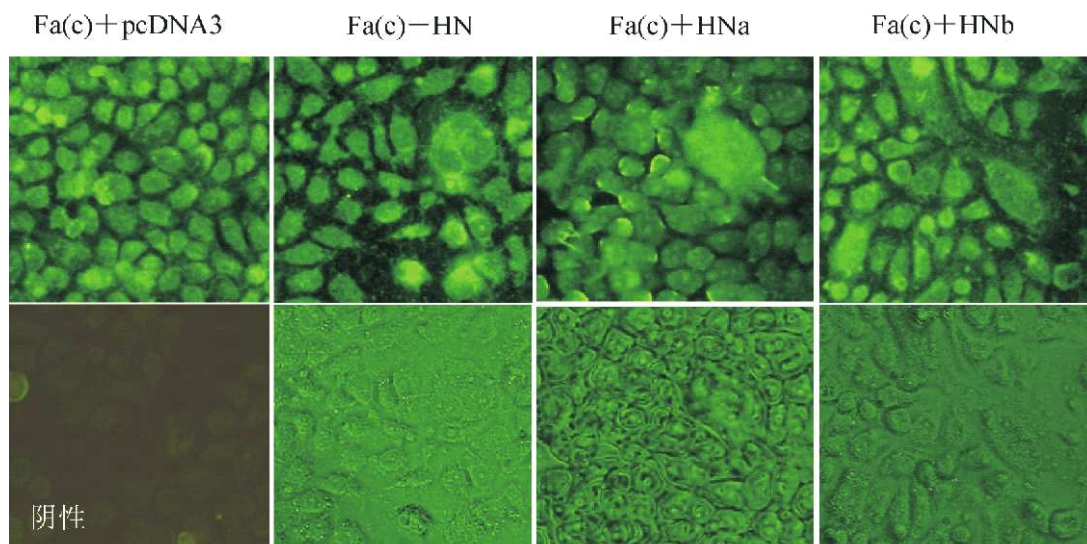


图 6 间接免疫荧光 (上排) 检测重组质粒共转染后 HeLa 细胞的融合 (一抗为 NDV 阳性血清) (下排除左下 1 外, 其余三幅为同一视野普通光学显微照片作为对照)

Fig. 6 Detection of cell fusion in HeLa cells by indirect immunofluorescent assay (top panels)(the 1<sup>st</sup> antibody is NDV positive serum)

### 3 讨论

新城疫病毒侵入宿主细胞需要 HN 蛋白和 F 蛋白的相互作用<sup>[9]</sup>。既表达 HN 蛋白又表达 F 蛋白的

感染细胞能够融合邻近的细胞形成多核细胞或者合胞体<sup>[9]</sup>。IORIO等<sup>[8]</sup>证实同源F蛋白与HN蛋白能相互作用、产生活性，LAMB等<sup>[11]</sup>认为HN蛋白与受体结合是为了激活F蛋白。

经超纯质粒试剂盒纯化的F全长、Fa(c)片段真核表达重组质粒分别与HN全长、HNa和HNb片段真核表达重组质粒在脂质体介导下逐对共转染HeLa细胞，同时设F全长、Fa(c)片段重组质粒单独转染对照，pcDNA3-EGFP阳性转染对照，pcDNA3空质粒转染对照以及阴性血清对照，观察不同组合共转染对细胞融合产生的影响。转染后24h，Fa(c)与HNa、HNb片段重组质粒共转染孔就观察到了细胞融合，36h后每个共转染孔都观察到了细胞融合，同时用间接免疫荧光的方法也检测到了细胞融合，说明不同组合共转染都在一定程度上促进了细胞的融合，其中Fa(c)与HNa或HNb片段重组质粒共转染促融合作用更为明显，可能与Fa(c)片段较小、易表达且保留了融合所需的结构有关。

以上结果表明，F与HN基因不同片段重组质粒组合共转染都可以促进细胞融合，说明所选几个片段表达的蛋白都有活性，且不同组合对融合的促进程度不同。用FITC标记的羊抗鸡IgG及羊抗兔IgG进行间接免疫荧光试验，可检测到特异性的黄绿色荧光和细胞融合，即合胞体。虽然观察到了细胞融合，但是融合效率不高，形成合胞体的细胞数量较少，最多只可见4~5个细胞融合在一起，这可能与选用的细胞系有很大关系，如果用COS-7或CHO细胞系结果可能会更好。本试验为进一步研究F蛋白与HN蛋白在细胞融合中的相互作用提供了一定基础，并为构建对细胞融合产生明显影响的F和HN基因片段嵌合基因重组质粒提供了一定的依据。

#### [参考文献] (References)

- [1] PEETERS B P, DE LEEUW O S, KOCH G. Rescue of Newcastle disease virus from cloned cDNA: evidence that cleavability of the fusion protein is a major determinant for virulence[J]. *J. Virol.*, 1999, 73(6): 5001~5009.
- [2] PEISAJOVICH S G, SAMUEL O, SHAI Y. Paramyxovirus F1 protein has two fusion peptides: implications for the mechanism of membrane fusion[J]. *J. Mol. Biol.*, 2000(296): 1353~1365.
- [3] LIN C, JEFFREY J G, JENNY M B. The structure of the fusion glycoprotein of newcastle disease virus suggests a novel paradigm for the molecular mechanism of membrane fusion[J]. *Structure*, 2001, 9(3): 255~266.
- [4] PEETERS B P, DE LEEUW O S, VERSTEGEN I, et al. Generation of a recombinant chimeric Newcastle disease virus vaccine that allows serological differentiation between vaccinated and infected animals[J]. *Vaccine*, 2001, 19(13): 1616~1627.
- [5] MORI H, TAWARA H, NAKAZAWA H, et al. Expression of the Newcastle disease virus (NDV) fusion glycoprotein and vaccination against NDV challenge with a recombinant baculovirus[J]. *Avian Dis.*, 1994, 38(4): 772~777.
- [6] IORIO R M, FIELD G M, SAUVRON J M, et al. Structural and functional relationship between the receptor recognition and neuraminidase activities of the newcastle disease virus hemagglutinin-neuraminidase protein: receptor recognition is dependent on neuraminidase activity[J]. *J. Virol.*, 2001, 75(4): 1918~1927.
- [7] DENG R, WANG Z, MIRZA A M, et al. Localization of a domain on the paramyxovirus attachment protein required for the promotion of cellular fusion by its homologous fusion protein spike[J]. *J. Virol.*, 1995, 209(2): 457~469.
- [8] IORIO R M, GLICKMAN R L, SHEEHAN J P. Inhibition of fusion by neutralizing monoclonal antibodies to the haemagglutinin neuraminidase glycoprotein of Newcastle disease virus[J]. *Journal of General Virology*, 1992, 73(5): 1167~1176.
- [9] LAMB R A, KOLAKOFSKY D. Paramyxoviridae: the viruses and their replication[J]. *Fields Virology*, 2001, 4(1): 1305~1340.
- [10] FANG W H, LIANG X Y. Expression of the Newcastle disease virus fusion glycoprotein in Vero cells using attenuated *Salmonella typhimurium* as transgenic carrier[J]. *Acta Biochimica et Biophysica Sinica*, 2002, 34(4): 488~493.
- [11] LAMB R A. Paramyxovirus fusion: a hypothesis of changes[J]. *Virology*, 1993(197): 1~11.