

鸡源抗菌肽 Fowlicidin-2 在大肠杆菌中的 重组表达及其生物学活性鉴定

许文杉 冯兴军* 李晓冲 邢丽维 柳迪

(东北农业大学 动物科学技术学院 黑龙江 哈尔滨 150030)

摘要:【目的】对抗菌肽 Fowlicidin-2 基因进行克隆与表达, 并鉴定其生物学活性。【方法】根据抗菌肽 Fowlicidin-2 氨基酸序列, 依照大肠杆菌(*E. coli*)密码子的偏爱性, 人工设计合成其编码基因。与质粒 pET-32a 连接, 构建重组表达载体, 转化表达宿主菌 *E. coli* BL21(DE3), IPTG 诱导表达, 融合蛋白经溴化氰裂解后进行纯化, 测定重组抗菌肽的抑菌活性。【结果】Fowlicidin-2 融合蛋白以包涵体形式表达, 经溴化氰裂解后, 成功释放出 Fowlicidin-2, 获得的重组 Fowlicidin-2 对革兰氏阳性菌和革兰氏阴性菌均有明显的抑菌效果。【结论】实现了抗菌肽 Fowlicidin-2 的重组表达, 为抗菌肽的重组量化制备提供了理论基础与技术手段。

关键词: 抗菌肽, Fowlicidin-2, 融合表达, 抑菌活性

Recombinant expression of the chicken antimicrobial peptide fowlicidin-2 in *Escherichia coli* and identification of its biological activity

XU Wen-Shan FENG Xing-Jun* LI Xiao-Chong XING Li-Wei LIU Di

(College of Animal Science and Technology, Northeast Agricultural University,
Harbin, Heilongjiang 150030, China)

Abstract: [Objective] The study was to clone, express the gene of chicken antimicrobial pep-

基金项目: 国家自然科学基金项目(No. 30800794); 黑龙江省普通高等学校青年学术骨干支持计划项目(No. 1252G010); 哈尔滨市科技创新人才研究专项资金项目(No. 2012RFQXN022)

*通讯作者: ✉: fengxingjun2008@163.com

收稿日期: 2012-07-09; 接受日期: 2012-10-15

tide fowlicidin-2 and characterize its bioactivity. **[Methods]** The gene encoding fowlicidin-2 with the condon preference of *E. coli* was designed based on the amino acids of fowlicidin-2 and synthesized *in vitro*. The gene was ligated into the plasmid pET32a, and transformed into *E. coli* BL21(DE3). The transformant *E. coli* BL21(DE3) was induced by IPTG. Cyanogen bromide (CNBr) was used to cleave the inclusion body of fusion protein and molecular sieve chromatography was used to purify the released fowlicidin-2. Bioactivity of the recombinant fowlicidin-2 was tested. **[Results]** The fowlicidin-2 fusion protein was expressed as inclusion body. Fowlicidin-2 was effectively released after digestion of the fusion protein with CNBr. The recombinant fowlicidin-2 exhibited high antibacterial activity against the Gram-positive and Gram-negative bacteria. **[Conclusion]** Fowlicidin-2 was successfully expressed in *E. coli*. The study provides theoretical foundation and technical means for scale-up preparation of antimicrobial peptides by engineering method.

Keywords: Antimicrobial peptides, Fowlicidin-2, Fusion expression, Antibacterial activity

抗菌肽是生物体经诱导产生的具有抗菌活性的一类小分子多肽,已经在原核生物、高等真核生物中发现,是宿主先天性免疫的重要组成成分。抗菌肽具有抗菌谱广、抗菌活性高、不易产生耐药性、无免疫原性等特点,作为理想的抗生素替代品,正受到人们越来越多的重视。

目前,在鸡基因库中注册的抗菌肽包括 14 种 β -防御素,3 种 Cathelicidins 家族抗菌肽和 1 种肝脏表达的抗微菌肽(LEAP-2),其中 Cathelicidins 的研究主要集中在哺乳动物^[1],有关鸡的研究报道较少。鸡源抗菌肽 Fowlicidin-2 为 Cathelicidins 家族的成员之一。成熟的 Fowlicidin-2 不含有半胱氨酸残基,由 31 个氨基酸组成(LVQRGRFGRFLRKIRRFPRPKVTITIQGSARF),带有 10 个正电荷。其抗菌活性不受生理盐浓度的影响,甚至在高盐浓度下,仍然保持着良好的抗菌活性,对抗性菌株有很强的抑制作用,并且具有 LPS 中和活性^[2],显示了良好的应用前景。

本试验以鸡源抗菌肽 Fowlicidin-2 为研究对象,采用融合表达方式,利用带有 His-标签的硫氧还原蛋白(Trx)与 Fowlicidin-2 融合在大肠杆菌

中重组表达,并利用溴化氰在 70%甲酸的低 pH 条件下裂解释放出重组 Fowlicidin-2,检测其抑菌和溶血活性,为实现抗菌肽 Fowlicidin-2 的规模化廉价生产及进一步建立抗菌肽的重组表达关键技术平台提供技术支持与理论依据。

1 材料与amp;方法

1.1 菌株、载体及主要试剂

E. coli DH5 α 、*E. coli* BL21(DE3)、金黄色葡萄球菌 ATCC25923、大肠杆菌 ATCC25922、绿脓杆菌 ATCC27853 和质粒 pET-32a 为本实验室保存。

限制性内切酶 *Nco* I 和 *Eco*R I、T4 DNA 连接酶、dNTP、T4 多核苷酸激酶均购自大连宝生物工程有限公和 DNA 回收纯化试剂盒购自北京康为生物公司;其他试剂为国产分析纯;多核苷酸和引物合成与 DNA 测序由上海生工生物工程公司完成。

1.2 Fowlicidin-2 编码基因的合成

根据 *E. coli* 密码子偏爱性,利用 DNA Star 和 Primer Premier 5.0 软件设计了编码 Fowlicidin-2

的 31 个氨基酸的 DNA 序列。正反链分别分为两段多核苷酸合成, X₁ 和 X₂ 为正链, X₃ 和 X₄ 为反链, 其序列如下:

X₁: 5'-CATGGCTCTGGTTCAGCGTGGTCGT
TTCGGCCGTTTTCTGCGCAAATCCGTCGT-3';

X₂: 5'-TTTCGCCCGAAAGTTACCATTACTA
TCCAGGGTTCTGCTCGTTTCTAATAG-3';

X₃: 5'-AATTCTATTAGAAACGAGCAGAACC
CTGGATAGTAATGGTAACTTTCGGGCGAAA-3';

X₄: 5'-ACGACGGATTTTGCAGAAAACG
GCCGAAACGACCACGCTGAACCAGAGC-3'。

下划线部分为 Fowlicidin-2 的 31 个氨基酸的编码序列。为了便于将基因片段克隆到 pET-32a 的 *Nco* I 和 *Eco*R I 酶切位点之间, 在正反链的 5' 端分别加上两种酶的粘性末端 CATG 和 AATT, 其中 CATG 编码 Met, 为溴化氰的裂解位点, 同时加入终止密码子 TAATAG。多核苷酸片段 X₂、X₄ 的 5' 端经 T4 多核苷酸激酶磷酸化后, 65 °C 水浴 20 min 灭活多核苷酸激酶活性。将磷酸化的 X₂、X₄ 与 X₁、X₃ 等摩尔混合, 进行退火与连接: 95 °C 5 min, 自然降至 40 °C, 维持 2 h, 加入 10× 连接酶缓冲液 5 μL, T4 DNA 连接酶 0.2 μL, H₂O 补足 50 μL, 16 °C 连接过夜, DNA 凝胶回收试剂盒回收目的基因。

1.3 重组表达载体的构建

将目的基因与经 *Nco* I 和 *Eco*R I 双酶切的 pET-32a 载体连接, 转化 *E. coli* DH5α^[3], 转化菌液涂布于含 Amp (100 mg/L) 的 LB 平板上, 37 °C 培养 18 h, PCR 方法筛选阳性克隆(所用引物 F₁: 5'-CGTAACCACCACCCGCG-3', F₂: 5'-CTCAAAGCGGACGGGCGAT-3')。对 PCR 鉴定为阳性克隆的质粒进行核苷酸序列测定。获得的重组表达质粒命名为 pET32 a-F2。

1.4 融合蛋白的表达和纯化

将 pET32a-F2 转化 *E. coli* BL21(DE3), 重组转化子按 1% 接种量转接至含 Amp (100 mg/L) 的

液体 LB 培养基中, 37 °C 摇床振荡培养, 在最佳诱导条件下, 即 OD₆₀₀ 为 0.6 时, 加入 IPTG 至终浓度为 0.3 mmol/L, 诱导表达 4 h。离心收集菌体, 超声波破碎, 12 000 r/min 离心后, 分别取上清液和沉淀进行 15% SDS-PAGE 分析。

1.5 包涵体的洗涤、裂解及其抗菌肽纯化

2.5 mol/L 尿素洗涤包涵体融合蛋白沉淀, 加入 50 g/L 溴化氰与 70% 甲酸^[4-5], 30 °C 裂解 1 h, 取样进行尿素-Tricine-SDS-PAGE 检测。干燥裂解产物, PBS 溶解, Bradford 方法测定蛋白浓度^[6], 计算包涵体溶解率。用 AKTA explorer 蛋白纯化系统分子筛层析柱纯化目的抗菌肽。缓冲液: 0.5 mol/L Na₂HPO₄, 0.15 mol/L NaCl, pH 7.0, 流速 0.8 mL/min, 上样量 500 μL, 压力 1.8 MPa, 收集目的洗脱峰, Bradford 方法测定蛋白浓度。

1.6 重组抗菌肽的活性鉴定

1.6.1 K-B 纸片扩散法药敏试验^[7]: 取纯化浓缩的重组抗菌肽, 利用 Bradford 法测定浓度, 调整浓度为 1 g/L, 采用 K-B 纸片扩散法药敏试验测定活性: 过夜培养的指示菌金黄色葡萄球菌 ATCC25923 1% 接种于新鲜 LB 培养基中培养至对数生长期, 取菌液涂布 LB 平板。用打孔器制备直径为 6 mm 的滤纸片, 灭菌干燥, 滴加 50 μL 重组 Fowlicidin-2, 37 °C 培养 12 h 后观察抑菌效果, 以同体积的 PBS 作阴性对照。

1.6.2 Fowlicidin-2 的最小抑菌浓度(MIC)和最小杀菌浓度(MBC)的测定: 采用 Hancock^[8]改进的微量肉汤稀释法测定重组 Fowlicidin-2 对金黄色葡萄球菌 ATCC25923、大肠杆菌 ATCC25922、绿脓杆菌 ATCC27853 的最小抑菌浓度 MIC: 处于对数生长期(OD₆₀₀=0.4)的测试菌 1:1 000 倍稀释, 分别接种于 96 孔细胞培养板上, 每孔加入 90 μL。用 0.01% 乙酸(含 0.2% BSA)稀释得到不同浓度的 10 倍于测试浓度的多肽溶液: 1 280、

640、320、160、80、40、20、10、5、2.5 mg/L。各取 10 μ L 分别对应加入到 1-10 号培养孔中,混匀。11、12 孔分别设接种细菌而不加抗菌肽的阳性对照孔和只加 MHB 培养基的阴性对照孔。37 $^{\circ}$ C 培养 18 h, 酶标仪测定 OD_{600} , 将能完全抑制菌体生长的最低抗菌肽浓度确定为 MIC。将高于 MIC 的各孔培养物涂布与预先准备好的不含抗生素的 MH 琼脂平板上, 37 $^{\circ}$ C 培养 12 h, 无细菌生长的最低浓度即为最小杀菌浓度 MBC。

2 结果与分析

2.1 Fowlicidin-2 编码基因的设计与合成

通过 4 段多核苷酸片段的退火连接, 成功获得 Fowlicidin-2 编码基因片段, 大小为 106 bp (图 1)。

2.2 表达菌株的构建和筛选

利用 PCR 方法筛选阳性质粒, 如图 2 所示, 阳性对照, 即以含有质粒 pET32a 的菌落为模板的 PCR 产物为 690 bp 左右, 而重组质粒 pET32a-F2 扩增产物为 800 bp 左右, 说明重组质粒中已经接入目的片段。进一步测序验证, 结果显示读码框和碱基序列与设计完全相符, 说明得到目的重组质粒。

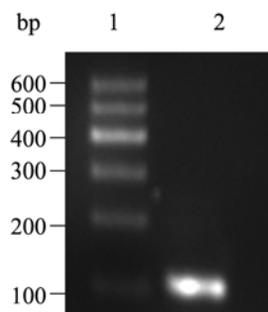


图 1 纯化合成的 Fowlicidin-2 编码基因

Fig. 1 The synthesized gene encoding fowlicidin-2 after purification

注: 1: DNA 分子量标准; 2: 纯化后的 Fowlicidin-2 基因。

Note: 1: DNA marker; 2: Fowlicidin-2 gene after purification.

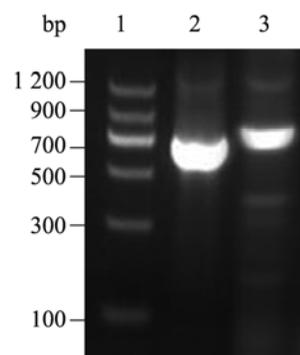


图 2 PCR 筛选阳性重组表达载体

Fig. 2 PCR screening of the recombinant expression plasmid

注: 1: DNA 分子量标准; 2: 以 pET32a 为模板的 PCR 扩增产物; 3: 以含有 pET32a-F2 菌落为模板的 PCR 扩增产物。

Note: 1: DNA marker; 2: PCR products of the plasmid of pET32a; 3: PCR products of the recombinant plasmid pET32a-F2.

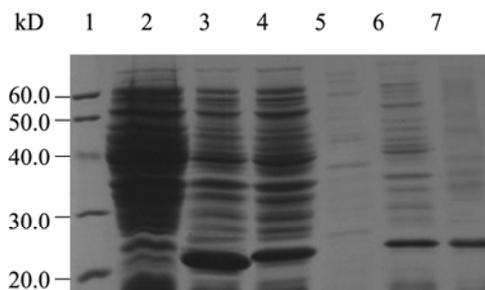


图 3 融合蛋白在 *E. coli* BL21(DE3) 中表达的 SDS-PAGE 分析

Fig. 3 SDS-PAGE analysis of fusion protein expressed in *E. coli* BL21(DE3)

注: 1: 蛋白质分子量标准; 2: 未诱导的 pET32a-F2 转化子表达产物; 3: pET32a 转化子的诱导表达; 4: IPTG 诱导的 pET32a-F2 转化子表达产物; 5: 上清; 6: 包涵体; 7: 2.5 mol/L 尿素洗涤后沉淀。

Note: 1: Protein molecular weight marker; 2: Total protein of *E. coli* BL21(DE3) containing pET32a-F2 without IPTG induction; 3: Total protein of *E. coli* BL21(DE3) containing pET32a after induction with IPTG; 4: Total protein of *E. coli* BL21(DE3) containing pET32a-F2 after induction with IPTG; 5: Supernatant products; 6: Inclusion bodies; 7: Inclusion bodies washed by 2.5 mol/L of urea.

2.3 融合蛋白的表达和纯化

如图 3 所示, 最佳诱导条件下诱导表达后, 在分子量约 20.6 kD 处出现一条明显的条带(泳道 4), 与目的蛋白大小一致。诱导菌体经超声波裂解后, 将上清和沉淀分别取样分析, 发现目的蛋白多数存在于沉淀中(泳道 6), 说明表达蛋白主要以包涵体形式存在。菌体裂解液沉淀经 2.5 mol/L 尿素洗涤后, 获得纯度较高的目的融合蛋白, 凝胶薄层扫描纯度在 50% 以上(泳道 7)。

2.4 融合蛋白的裂解

采用溴化氰裂解包涵体融合蛋白, 30 °C 作用 1 h 后, 包涵体沉淀 80% 以上溶解在裂解液中, 将裂解产物干燥后, 取样进行尿素-Tricine-SDS-PAGE 分析, 如图 4 所示, 作用 1 h 后溶解的包涵体融合蛋白全部已经裂解, 释放出分子量为 3.9 kD 的目的多肽, 平均每升培养基获得 51.7 mg 重组 Fowlicidin-2。

2.5 抗菌肽的纯化

包涵体裂解产物通过蛋白纯化系统 AKTA explorer 进行纯化, 在 16 min 时出现了目的蛋白峰(图 5), 收集洗脱峰。

收集洗脱峰得到纯化蛋白经冻干, 复溶。取样进行尿素-Tricine-SDS-PAGE (图 6), 结果产生约 3.9 kD 特异性的蛋白条带, 与预期蛋白大小一致。说明从诱导的菌体裂解液中得到目的重组抗菌肽。

2.6 重组 Fowlicidin-2 的抑菌活性

2.6.1 初步抗菌活性: 以对数生长中期的金黄色葡萄球菌(*S. aureus* ATCC25923)为指示菌, 用 K-B 纸片扩散法药敏试验测定纯化后的重组 Fowlicidin-2 的抗菌活性(图 7)。药敏纸片出现明

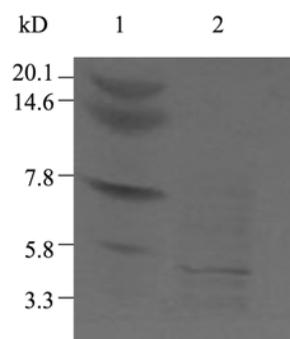


图 4 溴化氰裂解的融合蛋白

Fig. 4 Fusion protein cleaved by cyanogen bromide

注: 1: 蛋白质分子量标准; 2: 溴化氰裂解后的融合蛋白。

Note: 1: Protein molecular weight marker; 2: Products of fusion protein cleaved by cyanogen bromide.

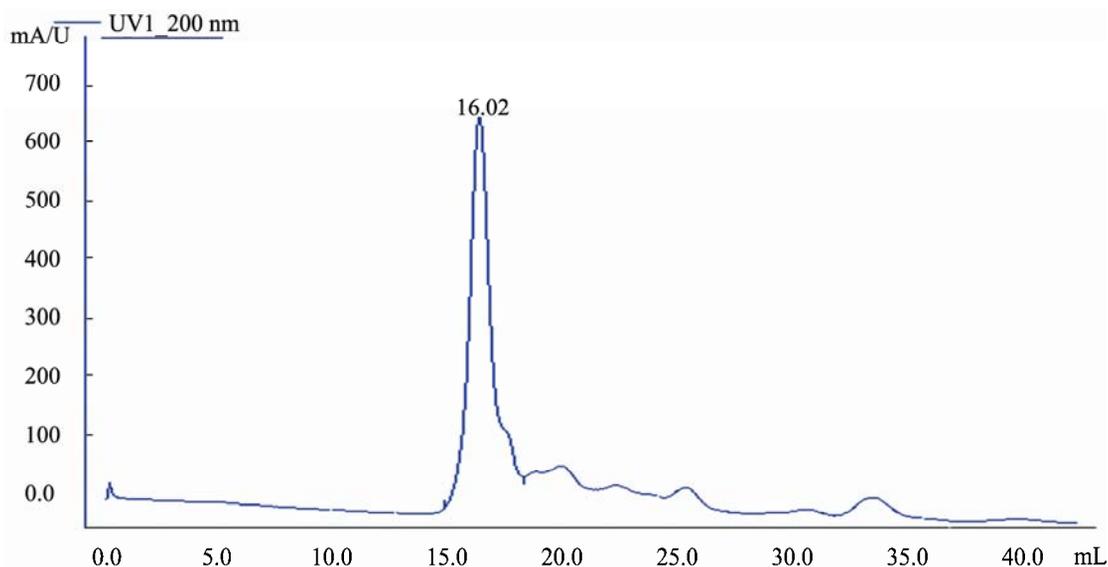


图 5 AKTA explorer 凝胶层析系统捕捉的洗脱峰

Fig. 5 AKTA explorer gel chromatography system of capture with peak

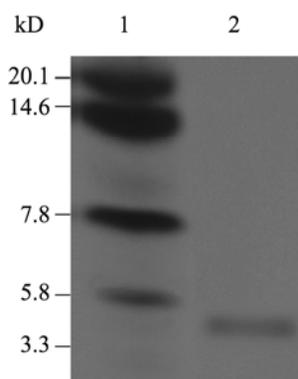


图6 纯化的重组抗菌肽 Fowlicidin-2

Fig. 6 The purified recombinant antimicrobial peptide fowlicidin-2

注: 1: 蛋白质分子量标准; 2: 纯化的目的产物。

Note: 1: Protein molecular weight marker; 2: Purified fowlicidin-2.

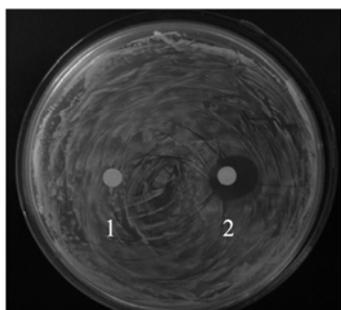


图7 重组 Fowlicidin-2 对 *S. aureus* ATCC25923 的抑菌圈

Fig. 7 Inhibition zone of fowlicidin-2 to *S. aureus* ATCC25923

注: 1: 对照; 2: 处理。

Note: 1: Control; 2: Treatment.

显的抑菌圈, 而阴性对照周围的细菌生长没有受到抑制, 表明得到了有抗菌活性的重组 Fowlicidin-2。

2.6.2 MIC和MBC: 测定重组 Fowlicidin-2 对金黄色葡萄球菌 ATCC25923、大肠杆菌 ATCC25922、绿脓杆菌 ATCC27853 的最小抑菌浓度(MIC)和最小杀菌浓度(MBC), 结果如表1所示, 表明重组的抗菌肽对革兰氏阳性菌和革兰氏阴性菌均有明显的抑制作用。

表1 重组抗菌肽对不同测试菌的 MIC 和 MBC
Table 1 MIC and MBC of the peptide in this study

测试菌 Tested bacteria	最小抑菌浓度 MIC (mg/L)	最小杀菌浓度 MBC (mg/L)
<i>S. aureus</i>	16	32
<i>E. coli</i>	8	32
<i>P. aeruginosa</i>	32	64

3 讨论

抗菌肽的来源问题是抗菌肽应用的最大限制瓶颈, 利用基因工程技术重组表达抗菌肽为实现抗菌肽的量化制备提供了有力手段。史春林^[9]在大肠杆菌中成功实现了 Fowlicidin-1 的融合表达, 不仅优化了表达条件, 且鉴定了样品的活性。和祯泉等^[10]与李荣荣等^[11]分别采用大肠杆菌融合表达系统和毕赤酵母表达系统成功表达了抗菌肽 Fowlicidin-3。目前, 关于 Fowlicidin-2 的研究很少。

本研究成功实现了 Fowlicidin-2 的原核表达, 重组子产生了一条大小为 20.6 kD 的特异性条带, 与预期蛋白大小一致。融合蛋白以不可溶的包涵体形式存在。包涵体的优点是不易被蛋白酶水解破坏, 在表达毒性蛋白时不影响宿主菌的生长, 杂蛋白含量较低等; 但只有采用有效的复性方法才能从包涵体中获得有生物活性的重组蛋白^[12], 然而复性却是一个非常复杂的过程。目前已经开发出多种能在靶蛋白和运载蛋白的连接处切割肽键的化学和酶学方法, 如 Xa 因子和肠激酶等, 但是许多酶的切割效率都很低, 其他蛋白酶的污染, 以及价格昂贵^[13]。化学法价格低廉, 效果明显, 操作简便。本研究在标签蛋白与抗菌肽之间引物溴化氰的裂解位点, 直接利用溴化氰在 70% 甲酸的低 pH 条件下去除标签蛋白, 不但省略了复杂耗时的包涵体复性过程, 极大的节省了成本, 而且成功释放了具有活性的

重组 Fowlicidin-2。

抗菌肽的巨大应用前景使其备受关注, 欧美国家研发的抗菌肽药物已经在医药范围内得到广泛的应用^[14]。Bommineni 等^[15]研究表明鸡 Cathelicidins 三种抗菌肽 Fowlicidin-1、2、3 对多重耐药性鼠伤寒沙门氏菌、克雷伯氏肺炎杆菌、绿脓杆菌、单核细胞增多性李氏杆菌和多重耐药性金黄色葡萄球菌具有很强的抑制活性, 其最小抑菌浓度在 0.4–2.0 mol/L。本研究利用 K-B 纸片扩散法药敏试验和微量肉汤稀释法测定重组 Fowlicidin-2 的抑菌活性及其溶血活性, 表明重组 Fowlicidin-2 对金黄色葡萄球菌 ATCC25923、大肠杆菌 ATCC25922 和绿脓杆菌 ATCC27853 为代表的革兰氏阳性菌和阴性菌均有很强的抑制作用, 这与 Xiao 等^[16]研究的化学合成 Fowlicidin-2 有同样高的抗菌活性。显示了 Fowlicidin-2 具有药物开发的潜在研究价值, 同时也为下一步研究其在动物体内的生物学活性提供理论基础。

参 考 文 献

- [1] Ramanathan B, Davis EG, Ross CR, et al. Cathelicidins: microbicidal activity, mechanisms of action, and roles in innate immunity[J]. *Microbes and Infection*, 2002, 4(3): 361–372.
- [2] Xiao YJ, Herrera AI, Bommineni YR, et al. The central kink region of fowlicidin-2, an α -helical host defense peptide, is critically involved in bacterial killing and endotoxin neutralization[J]. *Journal of Innate Immunity*, 2009, 1(3): 268–280.
- [3] 萨姆布鲁克 J, 拉塞尔 DW. 分子克隆实验指南[M]. 黄培堂, 等译. 第3版. 北京: 科学出版社, 2002: 96–99, 267, 1228–1232, 1245–1248.
- [4] Duetzel HS, Honek JF. CNBr/formic acid reactions of methionine- and trifluoromethionine-containing lambda lysozyme: probing chemical and positional reactivity and formylation side reactions by mass spectrometry[J]. *Journal of Protein Chemistry*, 1998, 17(4): 337–350.
- [5] 奥斯伯 F, 金斯顿 RE. 精编分子生物学实验指南[M]. 严子颖, 等译. 北京: 科学出版社, 1999: 644–645.
- [6] Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding[J]. *Analytical Biochemistry*, 1976, 72(1/2): 248–254.
- [7] Andrews JM. BSAC standardized disc susceptibility testing method[J]. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 2001, 48(S1): 43–57.
- [8] Hancock REW. Hancock laboratory: Methods[EB/OL]. <http://http://www.interchg.ubc.ca/both/MIC.htm>, 2001-11-27.
- [9] 史春林. 重组抗菌肽 Fowlicidin-1 的制备及其抑菌活性检测[D]. 哈尔滨: 东北农业大学硕士学位论文, 2008.
- [10] 和祯泉, 刘天健, 吕英军, 等. 抗菌肽 Folicidin-3 在大肠杆菌中融合表达及抑菌活性[J]. *扬州大学学报: 农业与生命科学版*, 2011, 32(4): 2–4.
- [11] 李荣荣, 和祯泉, 鲍恩东, 等. 鸡源抗菌肽 Folicidin-3 在毕赤酵母中的分泌表达及其生物学活性鉴定[J]. *中国农业科学*, 2010, 43(21): 4529–4535.
- [12] Hoffmann F, Van Den Heuvel J, Zidek N, et al. Minimizing inclusion body formation during recombinant protein production in *Escherichia coli* at bench and pilot plant scale[J]. *Enzyme and Microbial Technology*, 2004, 34(3/4): 235–241.
- [13] 王丽. PP-rhBMP-4m 的表达、纯化和活性[D]. 西安: 第四军医大学硕士学位论文, 2007.
- [14] Hiemstra PS, Fernie-King BA, McMichael J, et al. Antimicrobial peptides: mediators of innate immunity as templates for the development of novel anti-infective and immune therapeutics[J]. *Current Pharmaceutical Design*, 2004, 10(23): 2891–2905.

- [15] Bommineni YR, Dai HE, Gong YX, et al. Fowlicidin-3 is an α -helical cationic host defense peptide with potent antibacterial and lipopolysaccharide-neutralizing activities[J]. The FEBS Journal, 2007, 274(2): 418–428.
- [16] Xiao YJ, Cai YB, Bommineni YR, et al. Identification and functional characterization of three chicken cathelicidins with potent antimicrobial activity[J]. The Journal of Biological Chemistry, 2006, 281(5): 2858–2867.

科技信息摘录

《柳叶刀》和《科学》发表中国科学家禽流感病毒研究成果

5月1日和3日,国际著名学术期刊The Lancet(《柳叶刀》)和Science(《科学》)分别在线发表了中国科学院、中国疾病预防控制中心等单位科技人员关于H7N9病毒溯源和高致病性禽流感H5N1跨种间传播机制研究的两项重要成果。

近期,中国科学院微生物研究所研究团队在高致病性H5N1禽流感病毒跨种传播机制方面取得重大突破。该团队利用表面等离子共振技术研究H5N1病毒野生型和突变型HA蛋白分别与禽源和人源受体类似物的结合能力,证明突变型H5N1病毒有可能感染哺乳动物上呼吸道,并侵染肺部组织造成严重感染。之后,利用晶体学方法解析了高致病性禽流感H5N1病毒的野生型和突变型HA蛋白分别与禽源和人源受体类似物的复合物结构,揭示了突变型HA与人、禽受体结合的特点以及结构基础,发现关键的Q226L氨基酸突变决定了受体结合特性转换,并进一步阐明了这种转换机制,同时证明了该突变型HA的其他3个氨基酸突变也对病毒获得空气传播能力起重要作用。该研究是国际上首次在分子水平对重要氨基酸突变能够导致H5N1病毒在哺乳动物间获得空气传播能力这一重要现象进行解析,是禽流感跨种传播研究领域的重要突破。这一研究成果也将对H7N9流感病毒的系统研究提供重要的参考信息。相关研究成果发表在Science杂志上。

针对今年3月至4月初在我国上海、安徽等地区首次发现的人感染H7N9亚型禽流感病毒,中国科学院组织相关研究所开展联合攻关研究,在病毒溯源方面取得重要进展。研究人员发现造成这次暴发的H7N9禽流感病毒是一种新型的重配病毒,主要由4个不同来源的流感病毒重配而成。该研究成果对准确判断病毒来源、切断病毒重配与传播途径、有效控制病毒扩散、预判禽流感病毒暴发的潜在风险等具有重要意义。国际顶级医学期刊The Lancet发表了这项研究成果。

——摘自《中国生物技术信息网》2013/5/6
<http://www.biotech.org.cn/information/107297>