晶体中的每个分子的 N(1) 与最近邻的另一个分子的硝基上 O(1) 形成分子间的氢键 $[N(1) \cdots O(1) = 0.299(1) \text{ nm}]$, (图略). 标题分子中的两个苯环平面间夹角为 $15.3 (\pm 0.9)^\circ$.

标题分子是一种新的有机非线性光学材料, 分子中存在着强的授受电子基团 $[NH=N-CH-, NO_2-]$, 同时分子间形成 $[N(1) \cdots O(1)]$ 氢键. 该分子微观结构特点导致了宏观上的非线性光学性能, 呈现出较强的倍频效应, 其晶体粉末的倍频强度约是 KDP 的 10 倍. 该晶体有可能成为小功率激光器的有希望的候选倍频材料. 有关大尺寸单晶生长和非线性光学性能的研究将另文发表.

参 考 文 献

- 1 Vidakovic P V, Coquillay M, Salin F. N-[4-nitrophenyl]-N-methylaminoacetonitrile: a new organic material for efficient second-harmonic generation in bulk and wave guide configurations. I. Growth, crystal structure, and characterization of organic crystal-cored fibers. J Opt Soc Am B, 1987, 4(6): 998~1012
- 2 Barzoukas M, Josse D, Fremaux P, et al. Quadratic nonlinear properties of N-[4-nitrophenyl]-L-Proline and of a newly engineered molecular compound N-[4-nitrophenyl]-N-methylaminoacetonitrile: a comparative study. J Opt Soc Am B, 1987, 4(6): 977~986
- 3 Katz H E, Schilling M L, Washington G E. Solution-phase dielectric characterization of the 4-amino-4'-dicyanovinylazobenzene nonlinear optical chromophore. J Opt Soc Am B, 1990, 7(3): 309~312

(1998-02-17 收稿, 1998-06-18 收修改稿)

控制麻疹病毒血凝集性的重要功能位点

李凌云 齐义鹏* 渡边伦子^④ 上田重晴^④

(武汉大学病毒研究所, 武汉 430072; ④大阪大学微生物病研究所, 大阪 565. * 联系人)

摘要 IMA•SMD 是经 B95a 细胞系培养纯化的 2 株麻疹病毒, 其血凝集性(Hemadsorption, HAD)呈阴性. 将其在 Vero 细胞系中培养数代后其血凝集性转变为阳性. 对在 2 种细胞中培养获得的病毒进行序列分析发现: 以上 2 株病毒 H 蛋白的第 546 位均由 Ser(HAD 阴性)突变为 Gly(HAD 阳性). 利用位点专一性诱变并在 COS 细胞中对 2 种 H 蛋白进行表达证实: 该突变导致血凝集性的改变; 进一步利用抗 CD46 的单克隆抗体证实: 该突变同时导致 H 蛋白与 CD46 受体结合功能的改变. 从而确定了第 546 位氨基酸是一个新的决定血凝集性及 H 蛋白与 CD46 受体结合的重要位点.

关键词 H 蛋白 CD46 受体 血凝集性 位点专一性诱变

人类是麻疹病毒(Measles virus, MV)唯一的天然宿主. 在病毒感染人类细胞的过程中, 首先是通过病毒跨膜糖蛋白——血凝素糖蛋白 H(Hemagglutinin glycoprotein)与细胞表面的 CD46 受体的结合开始的^[1]. 现已证实 CD46 是麻疹病毒的受体, 其 N 末端包含有 4 个短的共有重复序列(short consensus repeats, SCR)^[2], 其中 SCR₁•SCR₂ 是 H 蛋白的结合位点^[3].

由于某些灵长类动物(如非洲绿猴)红细胞表面存在 CD46 受体同源类似物^[4], 所以 H 蛋

白能与该同源类似物结合导致麻疹病毒可以凝集非洲绿猴红细胞(African green monkey red blood cells, AGM-RBC), 即H蛋白介导的血凝集性.

长期以来科学家一直利用猴肾细胞系如Vero细胞来分离纯化MV, 并经鸡胚细胞减毒培养来生产减毒疫苗^[5], 但纯化时间很长, 且方法困难. 1990年Kobune等人^[6]报道, 利用绒淋巴细胞系如B958细胞及其亚细胞系B95a可以非常容易地分离纯化病毒. 但经B95a细胞纯化的病毒却存在显著的表型差异: 前者血凝性呈阳性, 而后者血凝性呈阴性.

为了探明以上表型变化的分子水平原因, 将麻疹病毒株IMA•SMD在2种细胞中传代培养后所获得的2种类型病毒的H基因进行了序列分析比较; 利用位点专一性诱变并在COS细胞中分别表达诱变前后的H蛋白从而确定了导致血凝性表型变异的重要氨基酸位点; 最后利用抗CD46-SCR₁的单克隆抗体证实该位点的变异同时导致H蛋白与CD46受体的结合功能发生转变. 从而证实该氨基酸位点是导致血凝性表型及H蛋白与CD46结合功能转变的重要位点.

1 材料与方法

(1) 病毒、细胞及抗体. 经B95a细胞系培养纯化获得的IMA•SMD毒株, HAD呈阴性, 称为B95a型病毒(IMA/B•SMD/B). 将B95a型病毒分别在Vero细胞系中培养传代达18代以上获得的Vero型病毒(称为IMA/V18•SMD/V18), HAD则变为阳性. B95a细胞和Vero细胞均在MEM+5%FCS的培养液中生长, COS-7细胞在DMEM+10%FCS培养液中生长. 培养条件: 5%CO₂, 37℃. 以上病毒、细胞及抗体均由日本大阪大学微生物病研究所上田重晴教授提供.

(2) 逆转录PCR及序列分析. 从感染细胞中提取病毒RNA(ISOGENE KIT), 用重组禽类成髓细胞瘤病毒逆转录酶(RAV-2)逆转录获得cDNA. 利用一对特异性引物以逆转录PCR扩增H基因(5'AGGGTGCAAGATCATCCACA 3'; 5'CACTAGCGG GTATGCCTG 3'). PCR的条件: 95℃, 1 min → 55℃, 2 min → 72℃, 3 min. 30个循环. 循环结束后, 72℃继续延伸7 min以利用Taq酶非模板依赖的聚合活性, 在PCR产物的3'末端加上单个dA. 所得PCR产物直接克隆到pCR™ 载体(载体5'末端有单个dT残基)(TA cloning-kit). 将载体上的引物(T₇ Promoter; M₁₃ Reverse Primer)分别进行荧光标记, 运用单向不对称PCR技术和Sanger双脱氧链终止法原理^[7]进行序列分析. 每个PCR产物至少测定5个阳性重组子, 从而获得准确的共有序列(consensus sequence).

(3) 位点专一性诱变. 从B95a型病毒H基因的PCR产物中筛选具有共有序列的阳性重组子. 运用寡核苷酸介导的诱变技术(oligonucleotide-mediated mutagenesis)^[8]进行位点专一性诱变, 获得仅有单一点突变的H基因片段. 诱变产物经序列分析验证.

(4) 重组表达质粒的构建及电转染(electroporation). 将B95a型病毒的H基因和经位点专一性诱变产生的Vero型H基因分别克隆到表达载体PCD-SRα^[9]中. 经CsCl-EtBr梯度离心纯化的重组表达质粒DNA用电转染法转染COS-7细胞(转染条件: 200 V, 500μFD). 转染后24 h检测血凝性和H蛋白的表达.

(5) H蛋白表达的膜免疫荧光试验. 离心收集电转染24 h后的COS-7细胞, 加入人麻疹病毒抗体, 37℃, 30 min培养后PBS洗涤5次. 然后加入FITC(fluorescein isothiocyanate)偶联的抗人IgG, 冰上放置30 min后再次用PBS洗涤5次. 在荧光显微镜下观察.

(6) 血凝集性试验. 在电转染 24 h 后的 COS_7 细胞中加入 0.5% AGM-RBC 悬液, 37 °C 培养 1 h. 经 PBS 洗涤后观察血凝集性. 对照实验则用抗 CD46-SCR_I 的单克隆抗体 M75 对 AGM-RBC 预处理(37 °C, 1 h). 然后将 M75-AGM-RBC 加入转染后的 COS-7 细胞, 以相同条件进行血凝集性检测.

2 结果

2.1 两种类型病毒的 H 基因序列比较

利用逆转录 PCR 技术扩增全长 H 基因片段, 并直接克隆到 pCRTM ②载体中, 构建重组克隆质粒 pCRTM ②H(见图 1)(扩增产物长 1 939 bp, H 基因为 1 854 bp). 对扩增产物进行序列分析并由此推导出氨基酸序列. 将毒株 IMA/B·IMA/V18·SMD/B·SMD/V18 与标准毒株 Edmonston 的 H 蛋白序列进行对比, 其结果列于表 1.

图 1 重组克隆质粒 pCRTM ②H 和重组表达质粒 PCD-H 的构建

E —EcoR iv, H —Hind ②P —Pst iv, K —Kpn iv, B —BamH iv, X —Xho iv, 16S SJ —16S splice junction

从表 1 中可以看到: IMA 毒株在氨基酸第 14 位存在 Asp(HAD 阴性) → Asn(HAD 阳性) 的转变(相应核苷酸第 40 位存在 G → A 的突变). 另外 IMA·SMD 2 个毒株均在氨基酸第 546 位发生 Ser(HAD 阴性) → Gly(HAD 阳性) 的转变, 相应核苷酸第 1636 位存在 A → G 的突变.

表1 2种病毒在2种细胞中H蛋白序列的差异及与标准毒株的对照

氨基酸位置	相应的氨基酸				
	IMA/ B	IMA/ V	SMD/ B	SMD/ V	Edmonston
14	D	N	D	D	D
169	A	A	A	A	S
174	A	A	A	A	T
176	A	A	A	A	T
211	S	S	S	S	G
242	K	K	T	T	K
243	G	G	G	G	R
252	H	H	H	H	Y
276	F	F	F	F	L
279	S	S	S	S	P
284	F	F	F	F	L
296	F	F	F	F	L
302	R	R	R	R	G
416	N	N	N	N	D
448	Y	Y	H	H	H
481	N	N	N	N	Y
484	T	T	T	T	N
546	S	G	S	G	S
616	S	S	S	S	R

2.2 H蛋白第546位S[→]G的转变导致血凝集性表型由阴性向阳性的转变

分别从 IMA/B•SMD/B 的 H 基因 PCR 产物中各挑选了一个具有共有序列的阳性重组子 (这 2 个 H 基因第 1 636 位均为 A, 相应第 546 位氨基酸为 Ser), 并将它们分别克隆到表达载体 PCD-SR α 中去, 从而构建重组表达质粒 PCD-H (见图 1). 重组表达质粒分别转染 COS-7 细胞, 24 h 后经血凝性试验检测呈阴性 (见图 2(a)、(b)), 同时经免疫荧光检测证实 H 基因的表达正常.

另一方面, 对上述 H 基因进行位点专一性诱变得到单一点突变的 H 基因, 称为 IMA-H-mu. SMD-H-mu. 诱变结果经序列分析确认: IMA-H 和 IMA-H-mu•SMD-H 和 SMD-H-mu 的序列仅在第 1 636 位存在差异, 前者为 A, 后者为 G, 其他序列完全相同 (其中 IMA-H•IMA-H-mu 的第 40 位均为 A, 与 Vero 型 H 基因相同). 采用相同的方法将突变后的 H 基因也克隆到 PCD-SR α 表达载体中去, 并转染 COS-7 细胞, 24 h 后检测血凝性呈阳性 (见图 2(c)、(d)).

2.3 抗 CD46-SCR₁ 的单克隆抗体 M75 阻碍 H 蛋白对 AGM-RBC 的凝集作用

M75 是抗 CD46-SCR₁ 的单克隆抗体, 它直接封闭了 H 蛋白对 CD46 受体的结合位点——SCR₁, 阻碍了 H 蛋白与 CD46 的结合. 结果 2 已证实: 含 H-mu 基因的重组表达质粒转染 COS-7 细胞后血凝性表现为阳性, 即可以凝集 AGM-RBC. 利用 M75 对 AGM-RBC 进行预处理 1 h, 并证实 M75 抗体吸附于 AGM-RBC 的表面. 预处理后, 将 M75-AGM-RBC 悬液代替 AGM-RBC 加入转染后的 COS-7 细胞并以相同条件进行血凝试验. 其结果表明转染细胞不能凝集预处理过的 AGM-RBC, 即 M75 阻止了对 AGM-RBC 细胞的凝集作用, 血凝实验呈阴性 (见图 2(e)、(f)).

3 讨论

2 株经 B95a 细胞系分离纯化的麻疹病毒株 IMA/B•SMD/B 在 Vero 细胞系中传代培养后,

图2 诱变前后的H基因转染COS细胞后引起血凝集性改变

(a) IMA-H基因在COS细胞中表达后,不能凝集AGM-RBC,呈HAD阴性;(b) SMD-H基因在COS细胞中表达后,不能凝集AGM-RBC,呈HAD阴性;(c) IMA-H-mu基因在COS细胞中表达后,能凝集AGM-RBC,呈HAD阳性;(d) SMD-H-mu基因在COS细胞中表达后,能凝集AGM-RBC,呈HAD阳性;(e) IMA-H-mu基因在COS细胞中表达后,不能凝集M75+ AGM-RBC,呈HAD阴性;(f) SMD-H-mu基因在COS细胞中表达后,不能凝集M75+ AGM-RBC,呈HAD阴性

其血凝集性由阴性转变为阳性. 序列测定结果表明: 以上2种毒株均在H基因的第1636位存在A(HAD阴性)→G(HAD阳性)的突变,即H蛋白的546位发生了Ser→Gly的突变. 同时IMA毒株还在H蛋白第14位存在Asp→Asn的突变. 由于现已证实H蛋白的第35~58位是其跨膜部位^[10],所以第14位氨基酸位于H蛋白跨膜区的内侧. 由此推断第14位氨基酸的突变并不影响血凝集性,对于IMA毒株来说,可能仅仅是由于第546位氨基酸的突变才造成血凝性的改变.

为了确证第546位氨基酸改变所造成的H蛋白功能的变化,将来源于B95a细胞系病毒株的H基因进行了位点专一性诱变(即专一性的将H基因的第1636位的A突变为G,相应H蛋白的第546位由Ser突变为Gly),并在COS-7细胞中表达了含单点突变的H基因. 突变后的H蛋白能够凝集AGM-RBC,且这种凝集作用可以被M75抗体完全阻断,从而证实这种凝集作用是通过H蛋白与CD46相结合实现,即单点突变的H蛋白(氨基酸第546位为Gly)能够与CD46受体正常地结合,并因此导致凝集AGM-RBC.

另一方面,同时构建了含B95a型H基因的重组表达质粒(B95a型的H基因与单点突变的H基因序列仅有1个碱基的差异,即1636位是A,相应第546位氨基酸为Ser),转染COS-7细胞后表现为HAD阴性. 由于已经证实单点突变的H蛋白(氨基酸第546位为Gly)能够与

CD46受体结合导致血凝集性阳性,所以可以得到以下结论:H蛋白第546位Ser $\rightarrow$ Gly的突变直接影响H蛋白与CD46的结合,并导致对AGM-RBC凝集性的改变.因此根据研究结果:H蛋白第546位氨基酸是一个决定其与CD46结合及血凝性的重要位点,它的突变使得H蛋白不能与CD46受体结合,导致血凝集性的丧失.

1995年Hummel和Bellini^[11]报道认为H蛋白第451~505位是决定血凝集性的功能区域.Lecouturier等人^[12]的报道证实H蛋白第451位和481位在血凝集性及与CD46受体的结合中起重要作用.类似的报道^[13]亦证实以上2个位点的重要性.但是关于第546位氨基酸的重要性目前尚无报道.

在本文的研究工作中证实了第546位是继451位和481位氨基酸以外的另一个重要氨基酸位点,它的突变直接影响麻疹病毒的血凝集性,使得H蛋白不能与CD46受体结合.且第546位氨基酸是位于451~505位血凝集性功能区域以外的一个决定血凝集性的新的重要功能位点,由此H蛋白决定血凝集性的功能区域至少应扩展至第546位氨基酸.

参 考 文 献

- 1 Variorkrishnan G, Trescol-Biemot M C, Nanche D, et al. Glycosylphosphatidylinositol-anchored and transmembrane forms of CD46 display similar measles virus receptor properties. *J Virol*, 1994, 68: 7 891~ 7 899
- 2 Gerlier A, Schneider-Schaulies J, Liszewski M K, et al. Measles virus receptor properties are shared by several CD46 isoforms differing in extracellular regions and cytoplasmic tails. *J Gen Virol*, 1994, 75: 2 163~ 2 171
- 3 Manchester M, Valsamekis A, Kaufman R, et al. Measles virus and C3 binding sites are distinct on membrane cofactor protein (CD46). *Proc Natl Acad Sci USA*, 1995, 92: 2 303~ 2 307
- 4 Nanche D, Wild T F, Rabourdin-Combe C, et al. Human membrane cofactor protein (CD46) acts as a cellular receptor for measles virus. *J Virol*, 1993, 67: 6 025~ 6 032
- 5 Katz S L, Milovanovic M F, Enders J F. Propagation of measles virus in cultures of chick embryo cells. *Proc Soc Exp Biol Med*, 1958, 97: 23~ 29
- 6 Kobune F, Sakata H, Sugiura A. Mammalian epithelial cells as a sensitive host for isolation of measles virus. *J Virol*, 1990, 64: 700~ 705
- 7 Sanger F, Nicklen S, Coulson A R. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1977, 74: 5 463~ 5 467
- 8 Wild T F, Fayolle J, Beeuwerger P, et al. Measles virus fusion: role of the cysteine-rich region of the fusion glycoprotein. *J Gen Virol*, 1994, 68: 7 546~ 7 548
- 9 Takebe Y, Seiki M, Fujisawa J I, et al. SR α Promoter: An efficient and versatile mammalian cDNA expression system composed of simian virus 40 early promoter and the R-U₅ segment of human T-cell leukemia virus type 1 long terminal repeat. *Mol Cell Biol*, 1988, 8: 466~ 472
- 10 Gerald C, Buckland R, Barker R, et al. Measles virus hemagglutinin gene: cloning, complete nucleotide sequence analysis and expression in cos cells. *J Gen Virol*, 1986, 67: 2 695~ 2 703
- 11 Hummel K B, Bellini W J. Localization of monoclonal antibody epitopes and functional domains in the hemagglutinin protein of measles virus. *J Virol*, 1995, 69: 1 913~ 1 916
- 12 Lecouturier V, Fayolle J, Caballero M, et al. Identification of two amino acids in the hemagglutinin glycoprotein of measles virus (MV) that govern hemadsorption, Hela cell fusion, and CD46 downregulation. *J Virol*, 1996, 70: 4 200~ 4 204
- 13 Bartz R, Brinckmann U, Dunster L M, et al. Mapping amino acids of the measles virus hemagglutinin responsible for receptor (CD46) downregulation. *Virol*, 1996, 224: 334~ 337

(1998-04-23 收稿, 1997-07-24 收修改稿)