

含有 IBV S1 基因的昆虫杆状病毒表达载体的构建^{*}

宋延华 刘福安

(华南农业大学动物医学系, 广州 510642)

摘要 以含有鸡传染性支气管炎病毒 Holte 株 S1 基因的重组质粒 pUC18-S1. Holte 和 pUC18-S¹. Holte 为材料, 分别构建了可表达 IBV S1 基因的昆虫杆状病毒转移载体质粒 pSXIVVI⁺X3-S1. Holte(含 IBV 先导序列)、pSXIVVI⁺X3/4-S1. Holte(IBV 先导序列作为融合短肽)、pAcGHL-C-S1. Holte (GST 和 6× His 作为融合伴侣)。

关键词 鸡传染性支气管炎病毒; S1 基因; 杆状病毒表达载体; 构建

中图分类号 S855.3

鸡传染性支气管炎(avian infectious bronchitis, IB)是鸡的一种急性、高度接触性传染病, 其病原传染性支气管炎病毒(infectious bronchitis virus, IBV)是冠状病毒科(Coronaviridae)的成员之一。IBV 血清型的多样性和变异株的不断产生往往使得传统的 IB 疫苗预防效果不够理想。S1 基因是 IBV 的主要免疫原基因(Cavanagh et al, 1984; 1986a; 1986b; Ignjatovic et al, 1994; Kant et al, 1992; Koch et al, 1990; Mockett et al, 1984)。采用核酸重组方法研制新型、高效、无毒的 IBV 基因工程疫苗是近年来 IB 研究中的一个重要方面。现在国外已经有人利用痘苗病毒表达完整的 S 蛋白, 此蛋白免疫老鼠所产生的抗体能识别 IBV S 蛋白抗原, 并能在鸡气管环培养试验中抑制 IBV 的感染(Tomley et al, 1987)。杆状病毒表达系统以其独特的优点倍受人们重视, 杆状病毒对人、畜安全、不污染环境。此外, 它还具有以下优点: 具有完备的翻译后加工修饰系统; 具有高效表达外源基因的能力; 外源基因在重组病毒中比较稳定; 可插入高达 100 kb 的外源基因; 有效表达剪接基因; 操作方便; 经济效益明显, 可大规模人工饲养寄主昆虫, 从而获得大量低成本高价值的外源基因表达产物。

本文以 IBV Holte 株 S1 基因为材料, 分别构建了 2 个能形成多角体和一个不形成多角体的重组杆状病毒表达载体, 为进一步开展 IBV S1 基因的表达和应用研究奠定了基础。

1 材料与方法

1.1 质粒和菌株

含 IBV Holte 株 S1 基因的重组质粒 pUC18-S1. Holte 和 pUC18-S¹. Holte 由华南农业大学动物医学系禽病研究室构建; 杆状病毒转移载体质粒 pSXIVVI⁺X3(不含起始密码 ATG)和 pSXIVVI⁺X3/4(含起始密码 ATG)由中山大学生命科学院提供(王珣章等, 1991); 转移载体质粒 pAcGHTL-C 为 PharMingen 公司产品。大肠杆菌 DH5 α 为转化受体菌。限制性内切酶及其它工具酶均为华美生物工程公司产品。

1.2 重组转移质粒的构建与鉴定

以 *EcoR* I、*Sal* I 分别酶切重组质粒 pUC18-S1.Holte、pUC18-S'1.Holte 和载体质粒 pSX-IVVI⁺X3、pSXIVVI⁺X3/4, 经低熔点琼脂糖挖块法 (Sambrook, 1989) 回收 S1.Holte、S'1.Holte 基因片段和 pSXIVVI⁺X3、pSXIVVI⁺X3/4 载体片断, 将 S1.Holte 与载体 pSXIVVI⁺X3 连接, S'1.Holte 与 pSXIVVI⁺X3/4 连接, 在 T4 DNA 连接酶催化下进行连接, 转化大肠杆菌 DH5 α 并在含有氨苄青霉素的 LB 平板上挑取白色菌落, 小量碱法提质粒。

重组质粒的鉴定: 取重组质粒用 *EcoR* I 或 *Sal* I 单酶切, 继而以 *EcoR* I + *Sal* I 双酶切, 观察插入片断大小是否与预期相符。再对重组质粒进行质粒 PCR 鉴定。

同时以 *EcoR* I 和 *Sac* I 双酶切 pSXIVVI⁺X3/4-S1.Holte 和 pAcGHLT-C, 按上述方法回收目的片段并进行连接、转化及重组质粒鉴定。

2 结果

2.1 重组转移载体质粒 pSXIVVI⁺X3-S1.Holte 和 pSXIVVI⁺X3/4-S1.Holte 的构建

质粒构建路线如图 1 所示。载体质粒 pUC18-S1.Holte 和 pUC18-S'1.Holte 经 *EcoR* I 和 *Sal* I 酶切后, 回收分别得到 S1.Holte 和 S'1.Holte, 将它们分别插入到 pSXIVVI⁺X3 和 pSXIVVI⁺X3/4 经 *EcoR* I 和 *Sal* I 切出的窗口中, 得到 2 个重组转移载体质粒: pSXIVVI⁺X3-S1.Holte (含先导序列) 和 pSXIVVI⁺X3/4-S1.Holte (先导序列作为融合短肽)。

对上述获得的重组质粒经 *EcoR* I 和 *Sal* I 双酶切后, 结果得到了与预期符合的片段 (图 2), 再对 pSXIVVI⁺X3-S1.Holte 和 pSXIVVI⁺X3/4-S1.Holte 分别进行质粒 PCR, 得到一条长为 1762 bp 的特异片段 (图 2), 证明 IBVS1 基因片段已正确插入到转移载体质粒 pSX-IVVI⁺X3 和 pSXIVVI⁺X3/4 中。

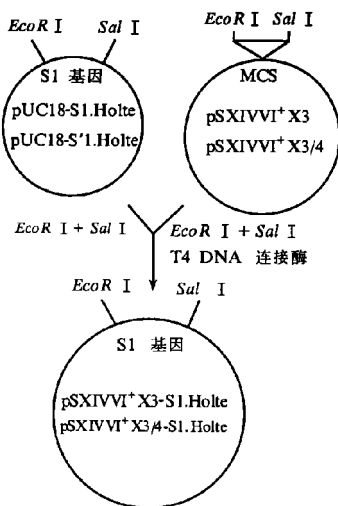
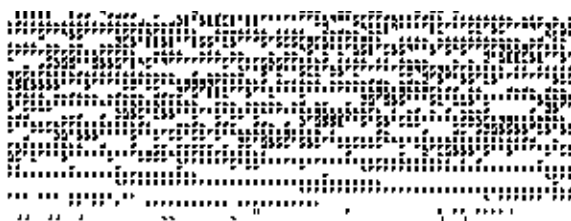


图1 重组转移质粒 pSXIVVI⁺X3-S1.Holte 和 pSXIVVI⁺X3/4-S1.Holte 的构建



A: λ DNA 经 *Hind* III 酶切产物 B: pSXIVVI⁺X3 经 *EcoR* I 酶切产物 C: pSXIVVI⁺X3-S1.Holte 经 *EcoR* I 酶切产物 D: pSXIVVI⁺X3-S1.Holte 经 *EcoR* I + *Sal* I 酶切产物 E: pSXIVVI⁺X3-S1.Holte 质粒 PCR 产物 F: pSXIVVI⁺X3/4-S1.Holte 经 *EcoR* I 酶切产物 G: pSXIVVI⁺X3/4-S1.Holte 经 *EcoR* I + *Sal* I 酶切产物 H: pSXIVVI⁺X3/4-S1.Holte 质粒 PCR 产物 I: λ DNA 经 *Hind* III + *EcoR* I 酶切产物

图2 重组转移质粒 pSXIVVI⁺X3-S1.Holte 和 pSXIVVI⁺X3/4-S1.Holte 的鉴定

2.2 重组转移载体质粒 pAcGHLT-C-S1.Holte 的构建与鉴定

质粒构建路线如图 3 所示, 重组质粒 pSXIVVI⁺X3/4-S1.Holte 经 *EcoR* I + *Sac* I 酶切得到含 S1 基因的片段, 将其插入 pAcGHLT-C 的 *EcoR* I + *Sac* I 酶切窗口上, 得到重组转移载体 pAcGHLT-C-S1.Holte. 用 *EcoR* I + *Sac* I 对 pAcGHLT-C-S1.Holte 进行酶切, 可切出一条长为 1 767 bp 的外源片段(图 4). 这表明 S1 基因已正确装入转移载体 pAcGHLT-C 上.

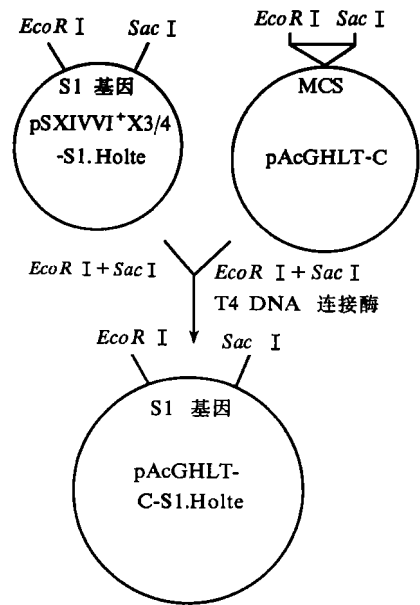
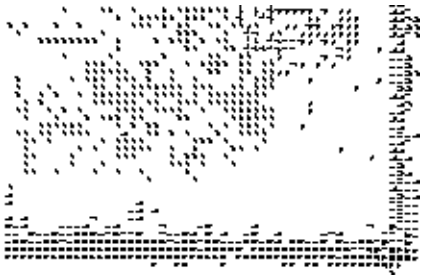


图 3 重组转移质粒 pAcGHLT-C-S1.Holte 的构建路线



A: λ DNA 经 *Hind* III 酶切产物; B: pAcGHLT-C 经 *EcoR* I 酶切产物; C: pAcGHLT-C-S1.Holte 经 *EcoR* I 酶切产物; D: pAcGHLT-C-S1.Holte 经 *EcoR* I + *Sac* I 酶切产物 E: 2 kb DNA 对照

图 4 重组转移质粒 pAcGHLT-C-S1.Holte 的酶切鉴定

3 讨论

将重组质粒 pUC18-S1.Holte、pUC18.S[']1-Holte 分别以 *EcoR* I 和 *Sal* I 酶切后, 再将目的片段 S1.Holte 和 S[']1.Holte 分别装入经同样酶切的 pSXIVVI⁺X3、pSXIVVI⁺X3/4 窗口中, 便可获得重组转移载体质粒 pSXIVVI⁺X3-S1.Holte 和 pSXIVVI⁺X3/4-S1.Holte. 在设计扩增 IBV S1 基因的引物时, 上游引物 Y₁/Y₁' 位于 IBV 基因组先导序列(leader sequence)中的保守区域(CTGAACAA)(Sutou et al, 1988), IBV S1 cDNA 含有 IBV 基因组的先导序列. 下游引物 Y₂ 则放在 S 蛋白裂解位点后、S₂ 前端, 因引物 Y₂ 内部不方便加翻译终止密码子, 所以考虑利用转移载体质粒 pSXIVVI⁺X3 和 pSXIVVI⁺X3/4 多克隆位点附近的多聚 A 信号(AATAAA)中的 TAA 作为终止密码子, 使 TAA 作为一个密码子与插入多克隆位点内的 S1 基因位于同一读码框即可实现. 重组转移载体质粒 pSXIVVI⁺X3-S1.Holte(含先导序列)中 S1 基因的实际读码长度为 1 689 bp, 编码 563 个氨基酸、相对分子质量约为 61 000 的多肽.

在重组质粒 pSXIVVI⁺X3/4-S1.Holte 中的 S1 基因情况则有所不同, 因载体带有自己的翻译起始密码子 ATG, 由此处开始翻译, 则 S1 基因前端的先导序列也将读码, 由载体上的 ATG 到 S1 上的 ATG 相距 78 bp, 因此 pSXIVVI⁺X3/4-S1.Holte 中 S1 基因的读码框的实际长度为 1 767 bp, 可编码含有 589 个氨基酸、相对分子质量约为 64 000 的多肽.

在构建重组转移载体 pAcGHLT-C-S1.Holte 过程中, 为使插入到 pAcGHLT-C 中的 S1 基因具备完整的读码框, 并使其带有多聚(A)转录终止识别信号, 利用前面所构建的重组质粒 pSXIVV I⁺X3/4-S1.Holte 作为中间质粒, pSXIVVI⁺X3/4 上的 *Sac* I 识别序列在多克隆位点下游, 中间隔多聚(A), 以 *Eco*R I 和 *Sac* I 酶切, 回收目的片段 S1 再将其装入到 pAcGHLT-C 的 *Eco*R I + *Sac* I 切口, 得到重组转移载体 pAcGHLT-C-S1.Holte.

参 考 文 献

- 王珣章, 谢伟东, 龙繁新, 等. 1991. 形成多角体的杆状病毒载体系统的建立. 病毒学报, 7(3): 253~261
- Cavanagh D, Darbyshire J H, Davis P, et al. 1984. Induction of humoral neutralizing and hemagglutination inhibiting antibody by the spike protein of avian infectious bronchitis virus. Avian Pathol, 13: 573~583
- Cavanagh D, Davis P J. 1986a. Coronavirus IBV: removal of spike glycopolyptide S1 by urea abolishes infectivity and hemagglutination but not attachment to cells. J Gen Virol, 67: 1 443~1 448
- Cavanagh D, Davis P J, Darby S J H, et al. 1986b. Coronavirus IBV: virus retaining spike glycopolyptide S2 but not S1 is unable to induce virus-neutralizing or hemagglutination-inhibiting antibody, or induced chicken tracheal protection. J Gen Virol, 67: 1 435~1 442
- Ignjatovic J, Galli L. 1994. The S1 glycoprotein but not the N or M protein of avian infectious bronchitis virus induces protection in vaccinated chickens. Arch Virol, 138: 117~134
- Kant A, Koch G, van Roozelaar D J, et al. 1992. Location of antigenic sites defined by neutralizing monoclonal antibodies on the S1 avian infectious bronchitis virus glycopolyptide. J Gen Virol, 73: 591~596
- Koch G, Hartog L, Kant A, et al. 1990. Antigenic domains on the peplomer protein of avian infectious bronchitis virus: correlation with biological functions. J Gen Virol, 71: 1 929~1 935
- Mockett A P A, Cavanagh D, Brown T D K. 1984. Monoclonal antibodies to the S1 spike and membrane proteins of avian infectious bronchitis coronavirus strain Massachusetts M41. J Gen Virol, 65: 2 281~2 286
- Sambrook J, Fritsch E F, Maniatis T. 1989. Molecular cloning A laboratory manual; Part Six. 2nd ed. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press 30~31
- Sutou S, Sato S, Okabe T, et al. 1988. Cloning and sequencing of genes encoding structural proteins of avian infectious bronchitis virus. Virology, 165: 589~595
- Tomley F M, Mockett A P A, Boursnell M E C, et al. 1987. Expression of the infectious bronchitis virus spike protein by recombinant vaccinia virus and induction of neutralizing antibodies in vaccinated mice. J Gen Virol, 68: 2 291~2 298

THE CONSTRUCTION OF BACULOVIRUS TRANSFER VECTOR CONTAINING THE S1 GENE OF AVIAN INFECTIOUS BRONCHITIS VIRUS

Song Yanhua Liu Fu'an

(Dept. Vet. Med., South China Agric. Univ., Guangzhou, 510642)

Abstract

The recombinant transfer plasmids pSXIVVI⁺X3-S1.Holte and pSXIVV I⁺X3/4-S1.Holte and pAcGHLT-C-S1.Holte were constructed by insertion of the cDNA of the S1 gene of avian infectious bronchitis virus (IBV) into transfer vector plasmids pSXIVVI⁺X3 and pSXIVV I⁺X3/4 and pAcGHLT-C.

Key words avian infectious bronchitis virus (IBV); S1 gene; baculovirus expression vector; construction
[责任编辑 柴 焰]