

禽流感病毒 HA 基因在狂犬病毒中的表达

艾 军¹, 金晓芹¹, 孙京臣², 罗琴芳¹, 黄文科¹, 郭霄峰¹

(1 华南农业大学 兽医学院, 广东 广州 510642; 2 华南农业大学 动物科技学院, 广东 广州 510642)

摘要: 为了研究狂犬病毒作为载体表达外源基因的特性, 将禽流感病毒 HA 基因插入狂犬病毒全基因组 cDNA 感染性克隆 pHEP-3.0 G 基因与 L 基因的假基因位点, 再通过反向遗传技术, 获得了携带流感病毒 HA 基因的嵌合狂犬病毒 (HepFHA), 并进行了病毒传代与 HA 基因表达的研究。结果显示, 重组病毒经 BHK-21 细胞传代 10 次, 病毒表达稳定, 但各代次常规红细胞凝集试验均为阴性; Western-blotting 检测到病毒表达产物中存在部分 HA 蛋白的表达, 其相对分子质量为 39 540, 与 HA 裂解的 HA1 蛋白相对分子质量相吻合。

关键词: 狂犬病毒; 反向遗传技术; HA 基因

中图分类号: S852.6

文献标识码: A

文章编号: 1001-411X(2008)01-0081-03

Recombinant Rabies Virus Expressing Hemagglutinin of Avian Influenza Virus

AI Jun¹, JIN Xiao-qin¹, SUN Jing-chen², LUO Qin-fang¹, HUANG Wen-ke¹, GUO Xiao-feng¹

(1 College of Veterinary Medicine, South China Agricultural University, Guangzhou 510642, China;

2 College of Animal Science, South China Agricultural University, Guangzhou 510642, China)

Abstract: To study the characteristics of rabies virus as vector, hemagglutinin gene of avian influenza virus was inserted at the site of pseudogene between G and L genes and a chimeric virus, designated as HepFHA, was generated by the technique of reverse genetics. The virus HepFHA grew well in BHK-21 cells after passage for 10 times, but did not show hemagglutination. The foreign protein was analyzed by SDS-PAGE and Western-blotting, and the results indicated that the partial protein of hemagglutinin was expressed with relative molecular mass of 39 540, identical to that of HA1.

Key words: rabies virus; reverse genetic; HA gene

狂犬病病毒属于弹状病毒科狂犬病毒属, 病毒核酸为单股负链 RNA。病毒基因结构为 3'-N-P-M-G-L-5', 即核蛋白(N), 磷蛋白(P), 基质蛋白(M), 糖蛋白(G)和大转录蛋白(L), G-L 基因序列之间是一个伪基因^[1]。病毒表达蛋白质的水平随着基因组序列 3'到 5'的逐步转录而减弱。1994 年, Schnell 等^[2]利用反向遗传技术首次从 cDNA 获得了狂犬病毒的感染性克隆。其后多位学者利用反向遗传技术对狂犬病毒的分子生物学特性进行了深入的研究, 其中包括病毒基因突变与功能的关系研究, 基因重排与功能的关系研究, 病毒中基因缺失与病毒毒力的关系研究, 狂犬病毒表达外源基因的研究等。狂犬病毒作为载体表达外源基因的研究, 已经取得了一定的成果。研究显示, 以狂犬病毒为载体, 表达人类免疫

缺陷病毒 1 型 gag 蛋白的病毒能够作为理想疫苗株^[3]; 以狂犬病毒为载体, 增加狂犬病毒自身一个 G 基因表达的重组病毒, 与原病毒相比, 对鼠有很强的免疫原性, 但致病性降低^[4]。这些研究为新的疫苗株开发奠定了基础。血凝素 (hemagglutinin, HA) 糖蛋白是禽流感病毒最重要的表面抗原, 可刺激机体产生细胞和体液免疫。因此本研究将流感病毒 HA 基因在重组狂犬病毒上进行表达, 以探索以狂犬病毒为载体的新型基因工程疫苗。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 细胞和抗体 BHK-21 细胞、荧光素标记狂犬病毒抗 N 蛋白抗体购自武汉生物制品所。H5 亚

收稿日期: 2007-10-10

作者简介: 艾 军 (1977—), 男, 博士; 通讯作者: 郭霄峰 (1963—), 男, 教授, 博士, E-mail: xfguo@scau.edu.cn

基金项目: 广东省自然科学基金团队项目 (5200638); 国家自然科学基金 (30671565)

型禽流感病毒(AIV)阳性血清由哈尔滨兽医研究所研制;辣根过氧化物酶标记兔抗鸡 IgY 购于珠海百奥生物技术有限公司。

1.1.2 质粒和菌种 含流感病毒 H5N1 亚型 AIV A/Chicken/Guangdong/25/2000 株 HA 基因 ORF 框的质粒 p19THA, *E. coli* TOP10 和狂犬病毒弱毒株 HEP-Flury 由华南农业大学兽医学院微生物学教研室保存。

pH-N, pH-P, pH-L, pH-G 和 pHEP-3.0 (分别含有狂犬病毒 HEP-Flury 弱毒株 N、P、L、G 和全基因组)由日本国立传染病研究室 Dr. Morimoto 惠赠。

1.1.3 试剂 Plasmid Kit 和 Superfect Transfection Reagent 购自 Qiagen 公司; *Pst*I、*Bsi*W I 限制性内切酶、AMV 反转录酶等均购自大连 TaKaRa 公司。

1.2 方法

1.2.1 构建含 HA 基因的狂犬病毒全长基因组质粒 pHEP-3.0HA 含禽流感病毒 HA 基因的狂犬病毒全长基因组构建如图 1。设计 1 对引物, P1 5'-ATTCG-TACGATGGCTAGCAAAGG-3', P2 5'-GTTCTGCAGTCAGTT-GTACAGTTCAT-3', 在它们的 5' 端分别添加 *Pst*I 和 *Bsi*W I 酶切位点, 该引物用于从质粒 p19THA 中扩增禽流感病毒的 HA 基因。基因扩增后, 分别用 *Pst*I 和 *Bsi*W I 双酶切 pHEP-3.0 和 PCR 产物, 回收, 连接, 转化 TOP10 感受态, 筛选阳性质粒, 酶切、测序鉴定, 命名为 pHEP-3.0HA。

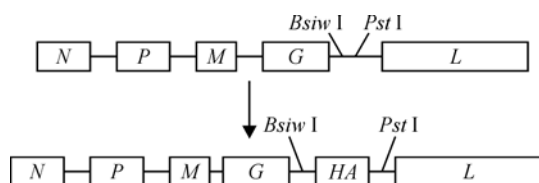


图1 含 HA 基因的狂犬病毒全长基因组质粒 pHEP-3.0HA 的构建

Fig. 1 Construction of the full-length genome plasmid pHEP-3.0HA

1.2.2 重组病毒(HepFHA)的拯救 HepFHA 病毒的拯救参考文献[5-6]的方法进行。

1.2.3 HepFHA 的传代 拯救的 HepFHA 原毒作 10 倍稀释, 接种于 BHK-21 细胞单层, 37 °C 吸附 1.5 h。弃去病毒液, 加入含有双抗的 DMEM 维持液, 继续培养 5 d。收集细胞和培养液, 冻融 3 次。以相同的方法传代 10 次。

1.2.4 HepFHA 的 RT-PCR 鉴定 HepFHA 原毒传至 3 代, 反复冻融细胞, 4 °C 4 000 r/min 离心 20 min, 收集病毒上清液, 提取病毒总 RNA。据 AIV A/Chicken/Guangdong/25/2 000 株(尚未公布)的 HA 基因序列和 HEP-Flury 株(基因序列号 AB085828), 自行设计 2 对引物 F1: 5'-GGGGCGATA-AACTCTAGTATGCCATTC-3'; F2: 5'-CCTTTGCAT-

TATCCCTAAGCTGT-3' 跨幅 537 bp, 鉴别 HA 基因。F3: 5'-GTCTGTACAGATTGAGCA-3'; F4: 5'-GAT-GAAATAAGAGTGAGG-3' 跨幅 425 bp, 鉴别狂犬病毒 N 基因。在 1.5 mL eppendorf 管中依次加入病毒总 RNA 10 μL, 5 × RT PCR buffer 4 μL, 下游引物 F2 (F4) 1 μL, dNTP 2 μL, AMV 反转录酶 1 μL, ddH₂O 2 μL, 42 °C 60 min。取逆转录产物 2 μL 作模板进行 PCR, 反应程序为: 94 °C 2 min, 94 °C 30 s, 51 °C 30 s, 72 °C 45 s, 30 个循环, 最后 72 °C 10 min。

1.2.5 HepFHA 病毒中 HA 蛋白表达的 Western-blotting 分析 病毒传至 10 代, 取少量病毒液, 加入等量 2 × 上样缓冲液, 煮沸 10 min, 12 000 r/min 离心 5 min, 上清液进行 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳。积层胶为 5%, 分离胶为 12%, 电压为 130 V, 电泳 1.5 h。电泳结束后立即进行电转移, 条件为 200 mA 电流, 电转结束后, 用 0.005 g/mL 脱脂奶粉封闭。一抗为哈尔滨兽医研究所提供抗 H5 的鸡血清, 100 倍稀释, 二抗为辣根过氧化物酶标记的兔抗鸡 IgY, 1000 倍稀释, 显色液显色。

2 结果

2.1 HepFHA 病毒的鉴定

取第 3 代病毒上清液进行 RT-PCR 鉴定, 成功扩增出与理论相符的目的条带, 如图 2。拯救的 HepFHA 病毒经 BHK-21 细胞传代 10 代, 荧光抗体染色, 病毒 10⁻⁶ 稀释的细胞培养孔内仍可见到大量散在的荧光斑点, 如图 3。

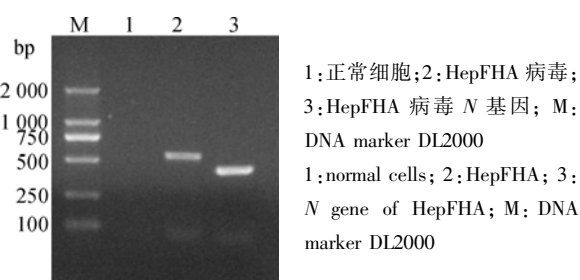


图2 HepFHA 病毒 RT-PCR 鉴定

Fig. 2 Identification of HepFHA by RT-PCR

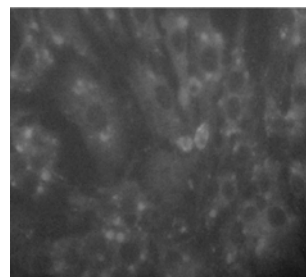


图3 HepFHA 病毒荧光抗体染色

Fig. 3 The identification of HepFHA virus by FITC-labeled anti-N antibody

2.3 HepFHA 病毒 HA 蛋白表达的检测

取传至 10 代的病毒上清液,进行 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳,Western-blotting 检测. 结果显示,在相对分子质量为 34 000~47 000 处有 1 条明显的表达条带,以距胶底端的距离为横坐标,标准蛋白质的相对分子质量为纵坐标,据相关性分析得出一线性回归方程: $y = 36.802x - 23.016$ ($r = 0.8738$),经计算,表达蛋白的相对分子质量为 39 540 左右,与 HA 裂解的 HA1 蛋白相对分子质量相吻合,而其他相对分子质量范围内未见表达条带出现,表明仅有 HA 的部分基因得到表达,检测结果如图 4、5.

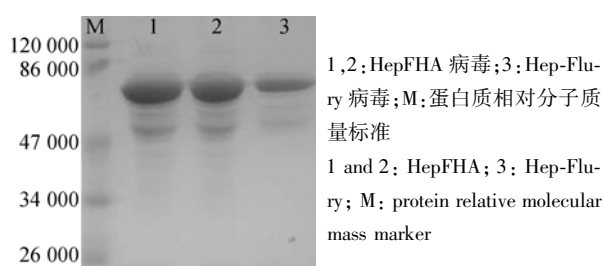


图 4 HepFHA 病毒 SDS-PAGE

Fig. 4 Detection of HepFHA HA protein by SDS-PAGE

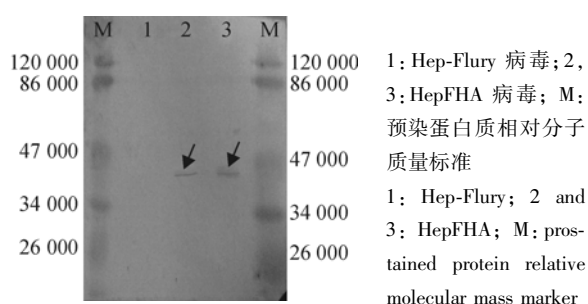


图 5 HepFHA 病毒 Western-blotting 检测

Fig. 5 Identification of HepFHA HA protein by Western-blotting

3 讨论

HepFHA 病毒经传代后,RT-PCR 和抗狂犬病毒 N 蛋白荧光抗体染色检测,表明本试验成功获得了携带流感病毒 HA 基因的重组狂犬病毒,且病毒经 BHK-21 细胞传代 10 代,表达稳定. 与华南农业大学兽医学院微生物学教研室先前的报道^[7]比较,外源基因的插入,并不影响 Hep-Flury 株病毒的拯救.

禽流感病毒 HA 是典型的 I 型糖蛋白,即羧基端在囊膜内氨基端在囊膜外,其一级结构含有信号肽(前导序列)、胞浆域、跨膜域、胞外域 4 个结构域,它的表达涉及到翻译后的糖基化、空间构象的形成及由内质网到高尔基体运送过程中的不断修饰,因此

表达比较困难^[8]. 本研究发现,重组的狂犬病毒在 BHK-21 细胞上传代 10 次,病毒液均未测到血凝价,Western-blotting 也仅检测到比 HA 小的表达蛋白. 该蛋白的相对分子质量与 HA 蛋白裂解后形成的 HA1 相对分子质量大小相当,据此推测禽流感病毒 HA 基因在狂犬病毒 Hep-Flury 株中仅 HA1 获得表达,其机理待进一步的研究.

以狂犬病毒为载体表达禽流感病毒 HA 基因,在狂犬病毒的研究中是新的尝试. 但与狂犬病毒同一科的水泡性口炎病毒,表达 HA 基因的研究却很深入^[9]. 动物试验表明,表达 HA 基因的水泡性口炎病毒能够完全保护流感病毒的攻击. 因此,我们的研究为研制以狂犬病毒为载体的重组病毒基因工程疫苗奠定了基础.

参考文献:

- [1] 殷震,刘景华. 动物病毒学[M]. 2 版. 北京:科学出版社,1997:777-809.
- [2] SCHNELL M J, MEBATSION T, CONZELMANN K K. Infectious rabies viruses from cloned cDNA[J]. EMBO J, 1994, 13:4195-4203.
- [3] McGETTIGAN J P, POMERANTZ R J, SILER C A, et al. Second-generation rabies virus-based vaccine vectors expressing human immunodeficiency virus type 1 gag have greatly reduced pathogenicity but are highly immunogenic[J]. J Virol, 2003, 77(1):237-244.
- [4] HOSOKAWA M J, ITO N, YAMADA K, et al. Characterization of recombinant rabies virus carrying double glycoprotein genes[J]. Microbiol Immunol, 2006, 50(3):187-196.
- [5] 郭霄峰, Fu Z F. 狂犬病毒糖蛋白基因的重排及病毒的拯救[J]. 华南农业大学学报, 2006, 27(1):104-106.
- [6] INOUE K I, SHOJI Y, KURANE I, et al. An improved method for recovering rabies virus from cloned cDNA[J]. Journal of Veterinary Methods, 2003, 107:229-236.
- [7] 艾军,林宝珍,郭霄峰. 从克隆的 cDNA 拯救狂犬病毒 HEP-Flury 株[J]. 动物医学进展, 2006, 27(2):99-100.
- [8] 张强哲,秦曦明,梁荣,等. 禽流感病毒 HA 基因真核表达质粒的构建与表达[J]. 生物化学与生物物理进展, 2003, 30(3):483-487.
- [9] ANJEANETTE R, EVELYNE K, ARCHIBALD S P, et al. Vaccination with a recombinant vesicular stomatitis virus expressing an influenza virus hemagglutinin provides complete protection from influenza virus challenge[J]. J Virol, 1998, 72(6):4704-4711.

【责任编辑 柴 焰】