

双表达 H9N2 禽流感病毒 HA 基因的 假型重组杆状病毒系统的构建

林文耀[†], 樊惠英[†], 程晓亮, 陈筱薇, 叶煜, 廖明
(农业部动物疫病防控重点实验室, 华南农业大学 兽医学院, 广东 广州 510642)

摘要:以含有 H9N2 禽流感病毒 HA 基因的重组质粒 pMD18-H9HA 为模板, 扩增 HA 基因, 将其亚克隆入杆状病毒表面展示质粒 pBACsurf-1 中, 再次将含有 H9HA 及 gp64 的基因片段克隆到质粒 pcDNA3.1(+), 获得重组质粒 pcDNA-H9-HA. 然后将含有 CMV 启动子、H9HA 及 gp64 的基因片段克隆到杆状病毒转移质粒 pFastBac-G, 得到重组质粒 pFastBac-G-H9-HA. 将该重组质粒转化到 DH10Bac 感受态细胞中, 得到重组穿梭载体 Bacmid-G-H9-HA. 利用脂质体转染 Sf9 昆虫细胞, 获得重组杆状病毒 BV-Dual-H9-HA. 间接免疫荧光实验表明, 该重组杆状病毒可以转导哺乳动物细胞并表达 HA 蛋白. 免疫电镜观察结果表明, HA 蛋白可以在该重组杆状病毒表面展示.

关键词:禽流感病毒; H9N2 亚型; 双表达; HA 基因; 重组假型杆状病毒

中图分类号: S852.65

文献标识码: A

文章编号: 1001-411X(2011)02-0080-05

Construction of A Pseudotype Baculovirus Dual Expression System-Based Avian Influenza H9N2 Virus HA Gene

LIN Wen-yao[†], FAN Hui-ying[†], CHEN Xiao-liang, CHEN Xiao-wei, YE Yu, LIAO Ming
(Key Laboratory for Prevention and Control of Animal Diseases of the Ministry of Agriculture,
College of Veterinary Medicine, South China Agricultural University, Guangzhou 510642, China)

Abstract: HA gene of avian influenza H9N2 virus amplified by PCR from the recombinant plasmid pMD18-HA was sub-cloned into pBACsurf-1. The fusion gene containing HA and gp64 was inserted into pcDNA3.1(+) to construct the recombinant plasmid pcDNA-H9-HA. A fragment of the CMV promoter-H9HA-gp64 fusion gene cassette was excised from pcDNA-H9-HA and inserted into the baculovirus transfer vector pFastBac-G to construct the recombinant plasmid pFastBac-G-H9-HA. The plasmid was transformed into *Escherichia coli* DH10Bac competent cells to obtain recombinant shuttle vector Bacmid-G-H9-HA. The recombinant baculovirus BV-Dual-H9-HA was generated in Sf9 cells by cotransfection of the recombinant shuttle vector Bacmid-G-H9-HA with LipofectamineTM 2000. Indirect immunofluorescent assay demonstrated that BV-Dual-H9-HA efficiently transduced the mammalian cells *in vitro* and HA gene was successfully expressed. Immunoelectron microscopy showed that HA protein was surface-displayed on the BV-Dual-H9-HA virus.

Key words: avian influenza virus; H9N2 subtype; dual expression; HA gene; pseudotype baculovirus

收稿日期: 2010-10-28

作者简介: 林文耀(1985—), 男, 硕士研究生; 樊惠英(1977—), 女, 副教授, 博士; [†]: 对本文贡献相同; 通信作者: 廖明(1968—), 男, 教授, 博士, E-mail: mliao@scau.edu.cn

基金项目: 国家自然科学基金青年基金(30800826); 广东省博士启动基金(8451064201001131); 农业微生物学重点实验室开发课题(20090010); 华南农业大学校长基金(5500-K08240)

自 1994 年陈伯伦等^[1]国内首次分离到 H9N2 亚型禽流感病毒 (Avian influenza virus, AIV) 以来, 全国各地先后有从发病禽分离到 H9N2 亚型 AIV 的报导^[2-3], H9N2 目前已经成为严重危害我国养禽业的重要传染病之一. AIV 基因组是含有 8 个片段的单股 RNA, 分别编码 10 个蛋白, 即 PB2、PB1、PA、HA、NP、NA、M1、M2、NS1 和 NS2 蛋白. 其中, 血凝素 (Hemagglutinin, HA) 是流感病毒颗粒表面的一种糖蛋白, 具有凝集红细胞的能力, 它可以识别靶细胞受体并与之结合, 在病毒吸附和膜融合过程中起着重要作用, HA 能诱导保护性中和抗体的产生, 并能不同程度地抵抗流感病毒的攻击, 是流感疫苗的重要组成部分^[4-5].

随着生物技术的发展, 杆状病毒表达系统已经成为一种操作简便、安全有效和应用广泛的真核表达系统^[6]. 近年来研究发现杆状病毒可以刺激机体的天然免疫系统, 而其介导的外源基因在体内表达又可刺激机体产生特异性免疫反应, 这些为开发杆状病毒作为疫苗的载体提供了理论基础^[7-8]. 目前, 杆状病毒表达载体的应用主要有两种表达形式^[9]. 一种携带有哺乳动物启动子, 能转导哺乳动物细胞的杆状病毒, 通常称作 BacMan 病毒. 另一种是表面展示重组蛋白的杆状病毒. 杆状病毒的囊膜糖蛋白 gp64 N 端为信号肽序列, 近 C 端为跨膜结构域, 外源蛋白在信号肽的 C 端与 gp64 的 N 端之间发生融合. 融合蛋白经过真核细胞内质网加工后, 信号肽被切除, 形成的 N 端融合蛋白可稳定地展示于杆状病毒的表面. 据此, 本研究通过修饰外源基因, 双基因表达盒的构建等方法进一步改造杆状病毒载体, 将其构建为一种新型的杆状病毒双表达载体, 构建表面展示 H9N2 亚型禽流感病毒 HA 蛋白的重组杆状病毒疫苗, 为禽流感候选疫苗的研究提供新的思路.

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 毒株与细胞 H9N2 毒株由华南农业大学农业部动物疫病防控重点实验室分离并保存. Sf9 昆虫细胞为 GIBCO BRL 公司产品.

1.1.2 菌种与质粒 pFastBacTM Dual, pcDNA3.1 (+) 质粒为 GIBCO BRL 公司产品, pBACsurf-1 转移质粒为 Novagen 公司产品. pMD18-H9HA 质粒由华南农业大学农业部动物疫病防控重点实验室孔文宝老师惠赠, pFastBac-G 由华南农业大学农业部动物

疫病防控重点实验室硕士研究生程晓亮构建, 大肠杆菌 DH5 α 、DH10Bac 菌株由华南农业大学农业部动物疫病防控重点实验室保存.

1.1.3 主要试剂 T4 DNA 连接酶和各种限制性内切酶等工具酶均为大连宝生物公司产品, pfu 高保真酶为 Stratagene 公司的产品. DNA 凝胶纯化试剂盒为 Promega 公司产品. 质粒抽提试剂盒为天根生化科技 (北京) 有限公司产品. 昆虫细胞培养基 (Grace's) 和 LipofectamineTM2000 转染试剂为美国 Invitrogen 公司产品. 鼠抗流感病毒 H9 亚型 HA 抗体由华南农业大学农业部动物疫病防控重点实验室硕士研究生李芳提供. 5 nm 胶体金标记的抗鼠 IgG 为 Sigma 公司产品, FITC 标记的羊抗鼠 IgG 为中杉金桥公司产品.

1.2 方法

1.2.1 重组质粒 pBACsurf-1-H9N2-HA 的构建 根据 H9N2 株序列设计合成 1 对扩增 HA 基因的引物 P1/P2, 上下游引物引入相同的酶切位点 *Xma* I. 引物序列如下 (下划线为酶切位点), 由 Invitrogen 公司合成.

P1: 5'-ATACCCGGGTGCACCACCACCACCAC-CACATGGATCATATTTGCATTGGTTA-3';

P2: 5'-ATACCCGGGGTATTTGGTATGTTTCCTAT-TGATTCC-3'.

扩增片段为 1 518 bp, 扩增的片段不含有 HA 基因的信号肽 (SP)、跨膜区 (TM) 和胞质区 (CTD). 将 PCR 产物回收并用 *Xma* I 单酶切, 并将其克隆到同样用 *Xma* I 酶切的表面展示载体 pBACsurf-1, 获得重组质粒 pBACsurf-1-H9N2-HA.

1.2.2 重组质粒 pcDNA-H9-HA 的构建 以获得的重组质粒 pBACsurf-1-H9N2-HA 为模板, 利用引物 P3 和 P4 扩增 pBACsurf-1-H9N2-HA 的 gp64 signal sequence + H9HA ectodomain + gp64 mature domain 区域, 上游引物引入 *Nhe*I, 下游引物引入 *Hind* III 酶切位点. 引物序列如下 (下划线为酶切位点):

P3: 5'-ATAGCTAGCATGCTAAGCGCTATTGTTT-TATATGTG-3';

P4: 5'-CGATAAGCTTTTAATATTGTCTATTACG-GTTTCTAATC-3'.

扩增片段为 3 102 bp. 将 PCR 产物回收并用 *Nhe* I 和 *Hind* III 双酶切后, 将其克隆到同样用 *Nhe* I 和 *Hind* III 双酶切的载体 pcDNA3.1 (+), 构建重组质粒 pcDNA-H9-HA.

1.2.3 重组转移质粒 pFastBac-G-H9-HA 的构建 以

获得的重组质粒 pcDNA-H9-HA 为模板,利用引物 P5 和 P6,扩增 pcDNA-H9-HA 的 CMV Promoter + gp64 signal sequence + H9HA 区域,上游引物引入 *Sal* I,下游引物引入 *Hind* III 酶切位点.引物序列如下(下划线为酶切位点):

P5: 5'-GCAGTCGACGTTGACATTGATTATTGAC-TAGTTATTA-3';

P6: 5'-TGCAAGCTTTTAATATTGTCTATTACG-GTTTCTAATC-3'.

扩增片段为 3 771 bp. 将 PCR 产物回收并用 *Sal* I 和 *Hind* III 双酶切后,将其克隆到同样用 *Sal* I 和 *Hind* III 双酶切后的载体 pFastBac-G,构建重组转座质粒 pFastBac-G-H9-HA (图 1).

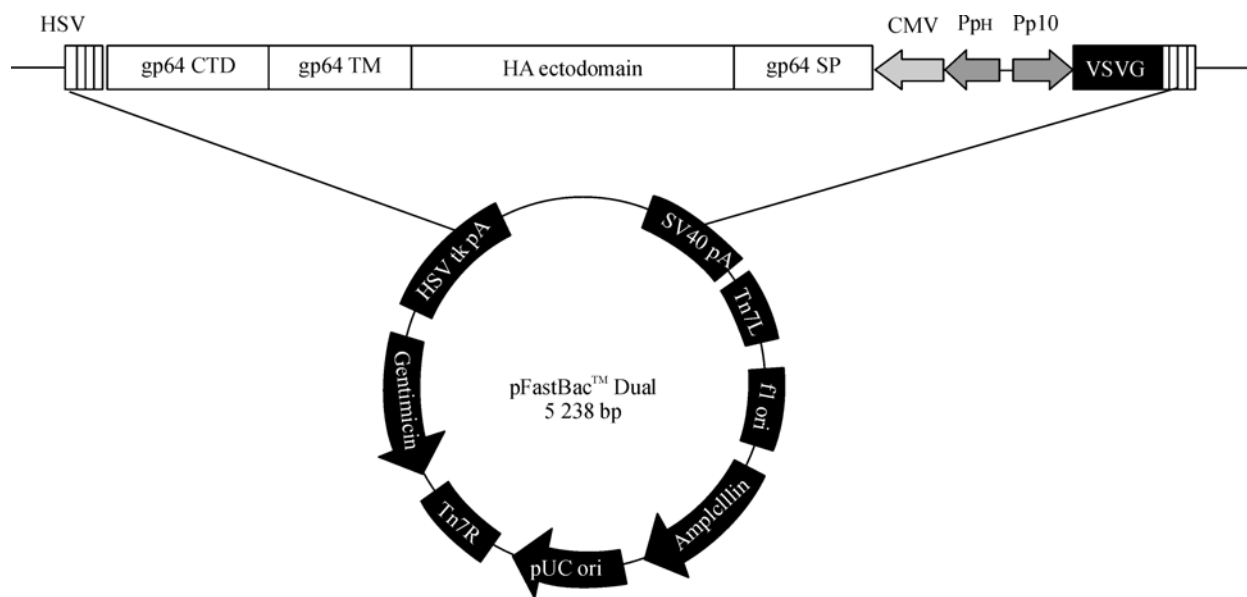


图 1 重组转座质粒 pFastBac-G-H9-HA

Fig. 1 Construction of recombinant donor plasmid pFastBac-G-H9-HA

1.2.4 重组穿梭载体 Bacmid-G-H9-HA 的获得 取 2~5 μL 重组质粒 pFastBac-G-H9-HA 与 100 μL DH10Bac 大肠杆菌感受态细胞混合,冰浴 30 min 后,于 42 $^{\circ}\text{C}$ 45 s 水浴进行热激,然后冰浴 2 min,加入 900 μL LB 液体培养基(高盐),37 $^{\circ}\text{C}$ 振荡培养 4 h,按 10^{-1} 、 10^{-2} 、 10^{-3} 稀释细胞后,各取 100 μL 涂布于三抗高盐 LB 平板(Kan、Gen 和 Tet),37 $^{\circ}\text{C}$ 培养 24~48 h,通过蓝白斑筛选、纯化阳性菌落.

1.2.5 重组杆状病毒 BV-G-H9-HA 的获得 提取纯化 Bacmid-G-H9-HA,利用脂质体 Lipofectamine™ 2000 转染 Sf9 昆虫细胞,于 28 $^{\circ}\text{C}$ 培养,待出现细胞病变后,收集培养物上清液即获得了重组杆状病毒 BV-G-H9-HA.

1.2.6 重组杆状病毒 BV-G-H9-HA 转导哺乳动物细胞 转染前 1 d,将形态良好、生长旺盛的 BHK-21 细胞以 1×10^5 个/孔的量接种到 6 孔板中,于 37 $^{\circ}\text{C}$ 培养,待细胞长至单层,去除培养基,用含钙、镁离子的 PBS 洗细胞,将重组杆状病毒与 PBS 按照 1:4 的比例混和后(总体积为 1 mL),将此病毒感染液加入

到 BHK-21 细胞中,室温转导 6 h,弃去感染液,并用 PBS 洗 1 遍,加入 2 mL 新鲜培养基,于 37 $^{\circ}\text{C}$ 继续培养 72 h 后,用 PBS 洗涤,甲醇固定细胞后,以鼠抗流感病毒 H9 亚型 HA 抗体为一抗,FITC 标记的羊抗鼠 IgG 为二抗,进行间接免疫荧光试验.

1.2.7 重组杆状病毒 BV-G-H9-HA 的免疫电镜分析 重组杆状病毒的纯化用蔗糖密度梯度超速离心法,具体参考文献[10]的方法进行.纯化病毒的免疫电镜分析按照参考文献[10]的方法进行,一抗为鼠抗流感病毒 H9 亚型 HA 抗体(1:50),二抗为 5 nm 胶体金标记的抗鼠 IgG(1:50).

2 结果

2.1 重组质粒 pBACsurf-1-H9N2-HA 的构建

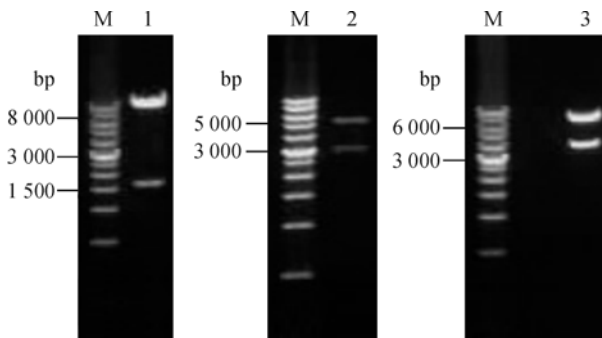
对重组质粒 pBACsurf-1-H9N2-HA 进行 *Bgl* II 和 *Xho* I 双酶切鉴定,双酶切后产生大小约为 9 500 和 1 500 bp 的 2 个片段,与预期大小一致(图 2).在此基础上,进一步对 pBACsurf-1-H9N2-HA 进行测序,证实无碱基突变.

2.2 重组质粒 pcDNA-H9-HA 的构建

对重组质粒 pcDNA-H9-HA 进行 *Nhe*I 和 *Hind* III 双酶切鉴定,双酶切后产生大小为 5 400 和 3 100 bp 的 2 个片段,与预期大小一致(图 2)。在此基础上,进一步对 pcDNA-H9-HA 进行测序,证实无碱基突变。

2.3 重组转移质粒 pFastBac-G-H9-HA 的构建

对重组质粒 pFastBac-G-H9-HA 进行 *Sal*I 和 *Hind* III 双酶切鉴定,双酶切后产生大小为 5 400 和 3 800 bp 的 2 个片段,与预期大小一致(图 2)。在此基础上,进一步对 pcDNA-H9-HA 进行测序,证实无碱基突变。



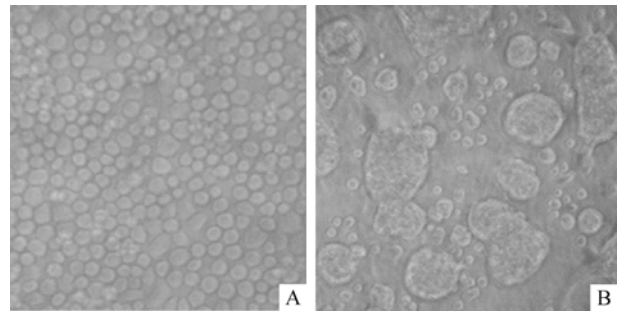
M: DNA marker DL12000; 1: 重组质粒 pBACsurf-1-H9N2-HA 的 *Bgl* II 和 *Xho* I 的双酶切产物; 2: pcDNA-H9-HA 的 *Nhe* I 和 *Hind* III 的双酶切产物; 3: pFastBac-G-H9-HA 的 *Sal* I 和 *Hind* III 的双酶切产物。

图 2 重组质粒 pBACsurf-1-H9N2-HA, pcDNA-H9-HA, pFastBac-G-H9-HA 的酶切鉴定

Fig. 2 Identification of transfer vector pBACsurf-1-H9N2-HA, pcDNA-H9-HA and pFastBac-G-H9-HA

2.4 重组杆状病毒 BV-G-H9-HA 的获得

利用脂质体转染法,将提取的重组穿梭载体 Bacmid-G-H9-HA 转染 Sf9 昆虫细胞,于 28 ℃ 培养,待 2~3 d 后出现细胞病变,主要表现为细胞变大、变圆、膨胀、折光率增强等。此外,由于本研究所用的杆状病毒转移载体中引入了水泡性口炎病毒 VSV-G 蛋白,因此,除了细胞病变,还可以观察到细胞间的融合现象(图 3)。



A: 正常 Sf9 昆虫细胞对照(200 ×); B: BV-G-H9-HA 感染的 Sf9 昆虫细胞(200 ×)。

图 3 重组杆状病毒 BV-G-H9-HA 感染 Sf9 昆虫细胞

Fig. 3 Sf9 cells infected by the recombinant baculovirus BV-G-H9-HA

2.5 重组杆状病毒 BV-G-H9-HA 转导哺乳动物细胞

重组杆状病毒转导 BHK-21 细胞 60 h 后,进行间接免疫荧光试验。结果表明,重组杆状病毒 BV-G-H9-HA 转导的 BHK-21 细胞能产生特异性免疫荧光,而杆状病毒野毒转导的 BHK-21 细胞未见任何特异荧光,表明重组杆状病毒能够高效转导 BHK-21 细胞,并在其转导细胞中表达 HA 蛋白(图 4)。



A: 转导 BV-G-H9-HA 的 BHK-21 细胞(200 ×); B: 转导杆状病毒野毒的 BHK-21 细胞(200 ×); C: 正常 BHK-21 细胞(对照,200 ×)。

图 4 BV-G-H9-HA 转导 BHK-21 细胞的间接免疫荧光试验

Fig. 4 Indirect immunofluorescent assay of BHK-21 cells transduction with BV-G-H9-HA by IFA

2.6 重组杆状病毒 BV-G-H9-HA 的免疫电镜分析

免疫电镜分析结果显示,金标颗粒结合到重组杆状病毒的囊膜上,而阴性重组杆状病毒对照组没

有金标颗粒结合到病毒的囊膜上(图 5),说明在重组杆状病毒囊膜上表达了 HA 蛋白。

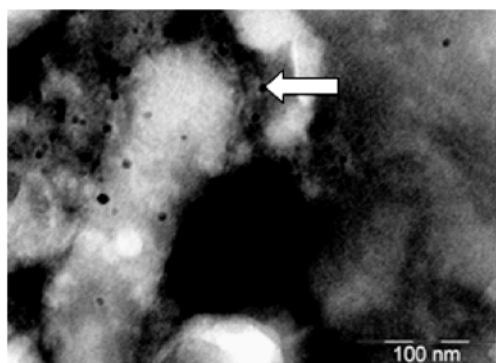


图5 HA蛋白在重组杆状病毒 BV-G-H9-HA 囊膜表面展示的免疫电镜分析

Fig.5 Immunoelectron microscopic analysis of HA protein, displayed on recombinant baculovirus envelope

3 讨论

近年来, DNA 重组技术的发展和运用使得疫苗方面的研究正逐渐从传统的疫苗向基因工程疫苗过渡, 特别是以病毒和细菌为活载体的疫苗的研制, 已经成为国内外学者研究的一大热点. 杆状病毒是一类大型的杆状包膜病毒, 具有环状双链 DNA 基因组, 基因组大小为 80 ~ 180 kb. 现有研究表明杆状病毒可作为一种新型的基因工程载体之一, 并以其独到的优越性越来越引起人们的关注, 以它作为载体所开展的基因工程疫苗方面的研究彰显了其广泛的应用前景^[11-12].

目前, 杆状病毒作为禽流感疫苗载体的研究主要用于以下 2 种表达系统. 一种是杆状病毒表面展示系统. Prabakaran 等^[13]用表面展示禽流感病毒 H5N1 血凝素 HA 的杆状病毒, 以重组霍乱毒素 B 亚单位为佐剂免疫 BALB/c 小鼠, 结果表明该疫苗能保护小鼠抵抗 10 MLD₅₀ H5N1 的攻击. 另一种是携带有哺乳动物启动子, 能转导哺乳动物细胞的杆状病毒. Wu 等^[14]构建携带有巨细胞病毒极早期启动子 (cytomegalovirus immediate early promoter, CMV-IE), 表达禽流感病毒 H5N1 血凝素 HA 的假型杆状病毒可以保护小鼠抵抗 50 MLD₅₀ H5N1 的攻击. 本研究结合了以上 2 种表达系统的优点, 构建了一种杆状病毒的双表达系统, 即在杆状病毒表面展示禽流感病毒 H9N2 血凝素 HA, 待杆状病毒转导哺乳动物细胞后, 在 CMV-IE 启动子的帮助下, 再一次表达 HA 蛋白. 这种假型重组杆状病毒系统既具备能诱导体液免疫应答及细胞免疫应答的全病毒灭活疫苗的优势, 又具备亚单位疫苗的安全性. 因此该类表面展示疫苗的研制与应用将为禽流感候选疫苗的研究提供新的思路.

研究证实水泡性口炎病毒 VSV-G 蛋白能消除杆状病毒的补体敏感性, 提高杆状病毒的转导及目的基因的表达效率. VSV-G 蛋白是一种穿膜糖蛋白, 它能利用其膜融合的活性介导病毒基因组从哺乳动物细胞内吞体中逃出. Barsoum 等^[15]将 VSV-G 蛋白基因插入 AcMNPV 基因组构建成一个假型病毒, 试验证明 VSV-G 蛋白的存在提高了假型杆状病毒在某些细胞系中的转导效率. Pieroni 等^[16]人研究证明直接注射到鼠四头肌的 VSV-G 假型杆状病毒有一部分不被补体系统中中和, 在 DBAP2J 鼠中转基因持续表达了 178 d, 在 BALB/c 鼠和 C57BL/6 鼠中表达持续了 35 d. 此外, 引入 VSV-G 蛋白, 除了能够逃避补体的灭活之外, 它还能介导细胞间的融合, 因此在本研究并没有通过间接免疫荧光或者 Western-blot 试验去证实 VSV-G 蛋白的表达, 而是通过观察细胞间表型的改变, 细胞间的融合现象来证实 VSV-G 蛋白的表达. 因此, 本研究也利用水泡性口炎病毒 VSV-G 蛋白修饰的杆状病毒转移载体 pFastBac-G-H9-HA, 成功构建了能在哺乳动物细胞中表达 H9N2 HA 蛋白的重组假型杆状病毒. 本课题组下一步的研究工作将通过小鼠的免疫试验, 对该流感新型疫苗进行免疫效果的分析 and 评价, 一方面将有助于阐明修饰后的杆状病毒在病毒性疫苗研究中的研发价值, 另一方面将为流感候选疫苗的研究开拓新的途径, 具有重要的理论意义和潜在应用价值.

参考文献:

- [1] 陈伯伦, 张泽纪, 陈伟斌. 禽流感研究: I: 鸡 A 型禽流感病毒的分离与血清学鉴定[J]. 中国兽医杂志, 1994, 20 (11): 4-6.
- [2] 张泉鹏, 李作生, 张富强, 等. 2006 ~ 2007 年云南流行 H9N2 禽流感病毒血凝素全基因序列分析[J]. 中国兽医学报, 2009, 29 (3): 299-303.
- [3] 齐岩, 袁润余, 张贺楠, 等. H9N2 亚型禽流感病毒广东分离株的全基因克隆及序列分析[J]. 病毒学报, 2010, 26 (3): 1-7.
- [4] CHEN Ming-wei, CHENG T J R, HUANG Yao-xing, et al. A consensus-hemagglutinin-based DNA vaccine that protects mice against divergent H5N1 influenza viruses[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2008, 105 (36): 13538-13543.
- [5] ZHENG Li-yun, WANG Fu-yan, YANG Zhong-dong, et al. A single immunization with HA DNA vaccine by electroporation induces early protection against H5N1 avian influenza virus challenge in mice[J]. BMC Infect Dis, 2009, 9: 17.
- [6] HOFMANN C, SANDIG V, JENNINGS G, et al. Efficient gene transfer into human hepatocytes by baculovirus vectors[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 1995, 92 (22): 10099-10103.

(下转第 92 页)