

表达鸡传染性支气管炎病毒 S1 蛋白的 重组假型杆状病毒的构建

罗琼[†], 樊惠英[†], 罗开健, 林文耀, 程晓亮, 任涛, 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:根据鸡传染性支气管炎病毒 M41 株的基因序列 (GenBank: AY851295.1), 设计特异性引物, 利用 RT-PCR 方法扩增其 S1 基因, 并将扩增产物克隆到杆状病毒转移质粒 pFast-VSV-G-CMV 中, 获得重组质粒 pFast-VSV-G-CMV-S1, 进一步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-CMV-S1, 再利用脂质体转染 sf9 昆虫细胞, 获得重组杆状病毒 Ac-V-S1. 间接免疫荧光试验表明, 该重组杆状病毒可以转导哺乳动物细胞并表达 S1 蛋白.

关键词:鸡传染性支气管炎; S1 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(2010)02-0104-04

Construction of a Pseudotype Baculovirus Expressing S1 Protein of Infectious Bronchitis Virus

LUO Qiong[†], FAN Hui-ying[†], LUO Kai-jian, LIN Wen-yao, CHENG Xiao-liang, REN Tao, 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: According to the sequence of infectious bronchitis M41 (GenBank: AY851295.1), the S1 gene was amplified with specific primers and cloned the amplicon into the baculovirus transfer vector pFast-VSV-G-CMV to construct the recombinant plasmid pFast-VSV-G-CMV-S1. Then, the plasmid was transformed into *Escherichia coli* DH10Bac competent cells to obtain the recombinant shuttle vector Bacmid-CMV-S1 after identifying the plasmid by digestion with restriction endonuclease and sequencing. Eventually, the recombinant Bacmid was transfected into sf9 cells to produce the recombinant baculovirus Ac-V-S1 using the LipofectamineTM2000. Indirect immunofluorescent assay demonstrated the Ac-V-S1 could efficiently transduce the mammalian cells *in vitro* and the S1 gene was expressed successfully.

Key words: infectious bronchitis; S1 gene; pseudotype baculovirus

鸡传染性支气管炎 (Infectious bronchitis, IB) 是由鸡传染性支气管炎病毒 (Infectious bronchitis virus, IBV) 引起的鸡的一种急性、高度接触性传染病, 是严重危害养禽业的重要传染病之一. IBV 的基因组为不分节段的单股正链 RNA, 长约 27.6 kb, 编码纤突糖蛋白 (S)、膜糖蛋白 (M)、核衣壳蛋白 (N) 和数量很少的小膜蛋白 (E) 等 4 种结构蛋白, 其中 S 蛋白由 S1 和 S2 2 个亚单位组成, 而 S1 蛋白是 IBV 最主要

收稿日期: 2009-10-30

作者简介: 罗琼 (1984—), 男, 硕士研究生; 樊惠英 (1977—), 女, 讲师, 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: “863” 计划项目 (2006AA10A205); 教育部新世纪优秀人才支持计划 (NCET-06-0752); 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)

的免疫原蛋白,它具有诱导产生病毒中和抗体、血凝抑制活性及血清特异性抗体的抗原表位^[1-2]. 杆状病毒属于昆虫病毒,动物体内缺乏预先存在的抗体. 杆状病毒载体除具备病毒载体的优势外,还具有低毒、安全、制备简单和易于得到高滴度的病毒粒子等优点^[3]. 同时,近年来人们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^[4-5]. 据此,本研究利用水泡性口炎病毒(Vesicular stomatitis virus, VSV)膜融合蛋白 G 修饰后的杆状病毒转移载体构建表达 S1 蛋白的重组杆状病毒,该修饰后的重组杆状病毒能够在哺乳动物细胞中表达 S1 蛋白,该重组杆状病毒的构建将为今后研制新型的 IBV 重组杆状病毒疫苗奠定基础.

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 毒株与细胞 IBV-M41 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 pFastBacI 质粒为 GIBCO BRL 公司产品. pFast-VSV-G-CMV 由农业微生物国家重点实验室肖少波副教授惠赠. 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. DNA 凝胶纯化试剂盒为上海生工生物工程公司产品. 质粒抽提试剂盒为 OMEGA 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. FITC 标记兔抗鸡荧光二抗为 Sigma 公司产品.

1.2 方法

1.2.1 引物的设计与 PCR 扩增 根据 IBV M41 株序列(GenBank:AY851295.1)设计合成 1 对扩增 S1 基因的引物 S1s/S1a,其 5' 端分别引入限制性内切酶 *Nhe* I 和 *Hind* III,预期扩增大小为 1 638 bp. 引物序列如下,由 Invitrogen 公司合成.

S1s:5' - GCCGCTAGCATGTTGGTAACACCTCTTT-TAC - 3';

S1a:5' - GTGAAGCTTTCAACGTCTAAAACGACGT-GTTCC - 3'.

扩增条件为 95 °C 预变性 2 min,循环参数为 94 °C 1 min,53 °C 1 min,72 °C 2 min,35 个循环后 72 °C 延伸

10 min,0.01 g/mL 的琼脂糖凝胶电泳鉴定 PCR 产物.

1.2.2 转移载体 pFast-VSV-G-CMV-S1 的构建 用 *Nhe* I 和 *Hind* III 双酶切回收后的 S1 基因的 PCR 产物克隆到同样用 *Nhe* I 和 *Hind* III 酶切的转移载体 pFast-VSV-G-CMV 中,构建重组质粒 pFast-VSV-G-CMV-S1.

1.2.3 重组穿梭载体(Bacmid-CMV-S1)的构建 取 2~5 μ L 重组质粒 pFast-VSV-G-CMV-S1 与 100 μ L DH10Bac 大肠杆菌感受态细胞混合,冰浴 30 min 后,于 42 °C 水浴进行热激 45 s,然后冰浴 2 min,加入 900 μ L LB 液体培养基(高盐),37 °C 振荡培养 4 h,按 10⁻¹、10⁻²、10⁻³ 稀释细胞后,各取 100 μ L 涂布于三抗高盐 LB 平板(Kan、Gen 和 Tet),37 °C 培养 24~48 h,通过蓝白斑筛选、纯化阳性菌落.

1.2.4 重组杆状病毒 Ac-V-S1 的获得 提取纯化 Bacmid-CMV-S1,利用脂质体 LipofectamineTM2000 转染 sf9 昆虫细胞,于 28 °C 培养,待出现细胞病变后,收集培养物上清即获得了重组杆状病毒 Ac-V-S1.

1.2.5 重组杆状病毒 Ac-V-S1 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 \times 10⁵ 个/孔的量接种到 6 孔板中,于 37 °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 按照体积 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 °C 继续培养 60 h 后,用 PBS 洗涤,甲醇固定细胞后,以 IBV 的标准阳性鸡血清为一抗,FITC 标记的兔抗鸡 IgG 为二抗,进行间接免疫荧光试验.

2 结果

2.1 IBV S1 基因的 PCR 扩增

按照常规方法提取 IBV M41 株的病毒 RNA,扩增 S1 基因,反应结束后,通过琼脂糖凝胶电泳,检测出扩增片段大小约为 1 611 bp,与预期大小相符(图 1).

2.2 转移载体 pFast-VSV-G-CMV-S1 的构建

回收 S1 基因的 PCR 产物,并用限制性内切酶 *Nhe*I 和 *Hind* III 双酶切,回收纯化后,将此 S1 基因亚克隆到用同样方法处理过的 pFast-VSV-G-CMV 载体,并转化 *Escherichia coli* DH5 α 感受态细胞,获得重组转移载体 pFast-VSV-G-CMV-S1,并用 *Nhe* I 和 *Hind* III 双酶切对重组转移载体进行鉴定,双酶切后产生大小为 1 611 bp 和 7 200 bp 的 2 个片段,与预期大小一致(图 1). 在此基础上,进一步对 pFast-VSV-G-CMV-S1 进行测序,证实无碱基突变.

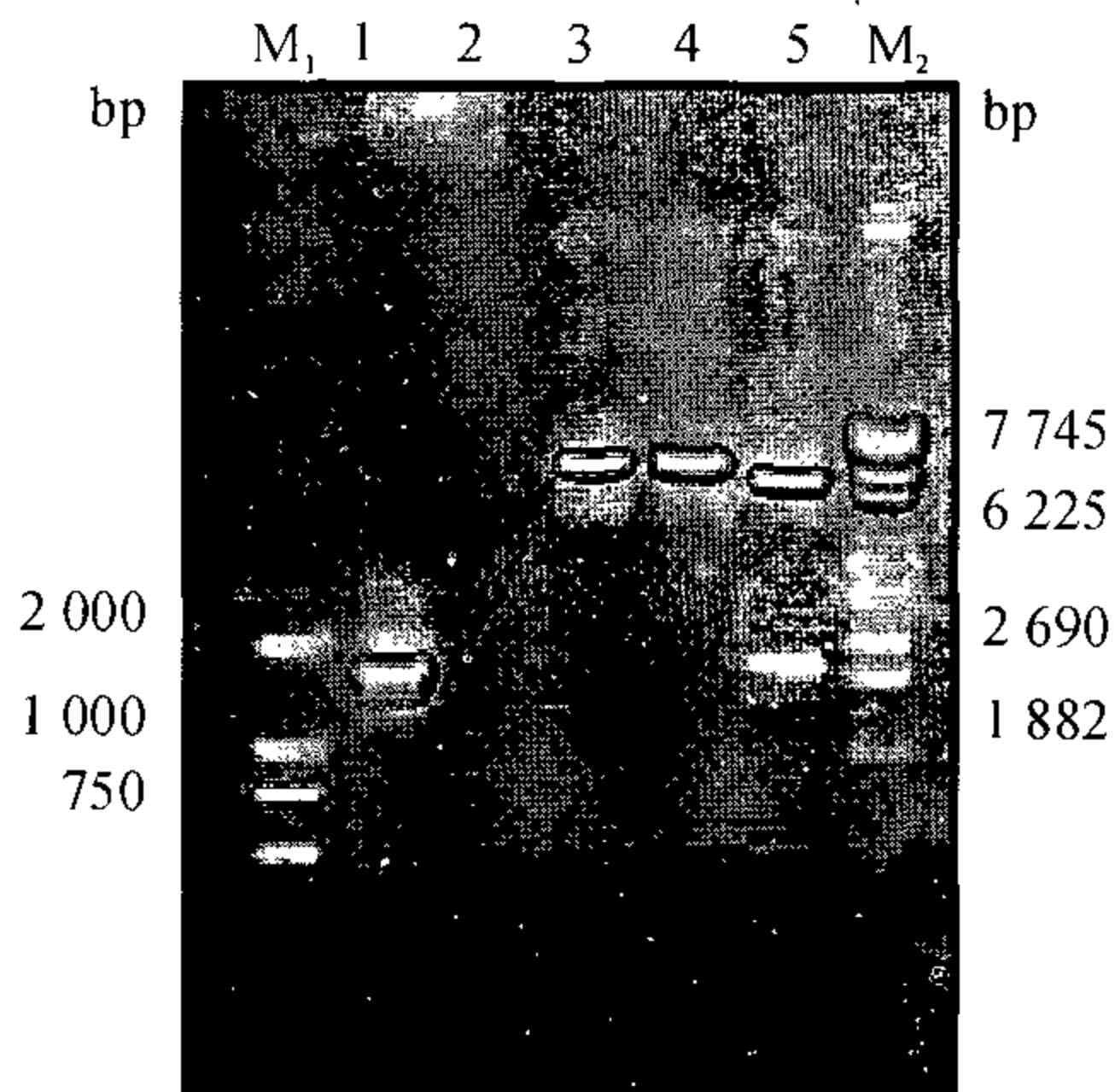


图1 RT-PCR 扩增 IBV S1 基因和重组转移载体 pFast-VSV-G-CMV-S1 的酶切鉴定
 M₁:DL2000 DNA Marker;M₂:λ - EcoT - 14 digest DNA Marker;1:PCR 扩增产物;2:阴性水对照;3:Hind III 单酶切 pFast-VSV-G-CMV-S1 产物;4:Nhe I 单酶切 pFast-VSV-G-CMV-S1 产物;5:Nhe I 和 Hind III 双酶切 pFast-VSV-G-CMV-S1 产物.

图1 RT-PCR 扩增 IBV S1 基因和重组转移载体 pFast-VSV-G-CMV-S1 的酶切鉴定

Fig.1 S1 gene of IBV amplified by RT-PCR and identification of recombinant transfer vector pFast-VSV-G-CMV-S1

2.3 重组杆状病毒 Ac-V-S1 的获得

利用脂质体转染法,将提取的重组杆状病毒穿梭载体基因组转染 sf9 昆虫细胞,于 28 °C 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2).

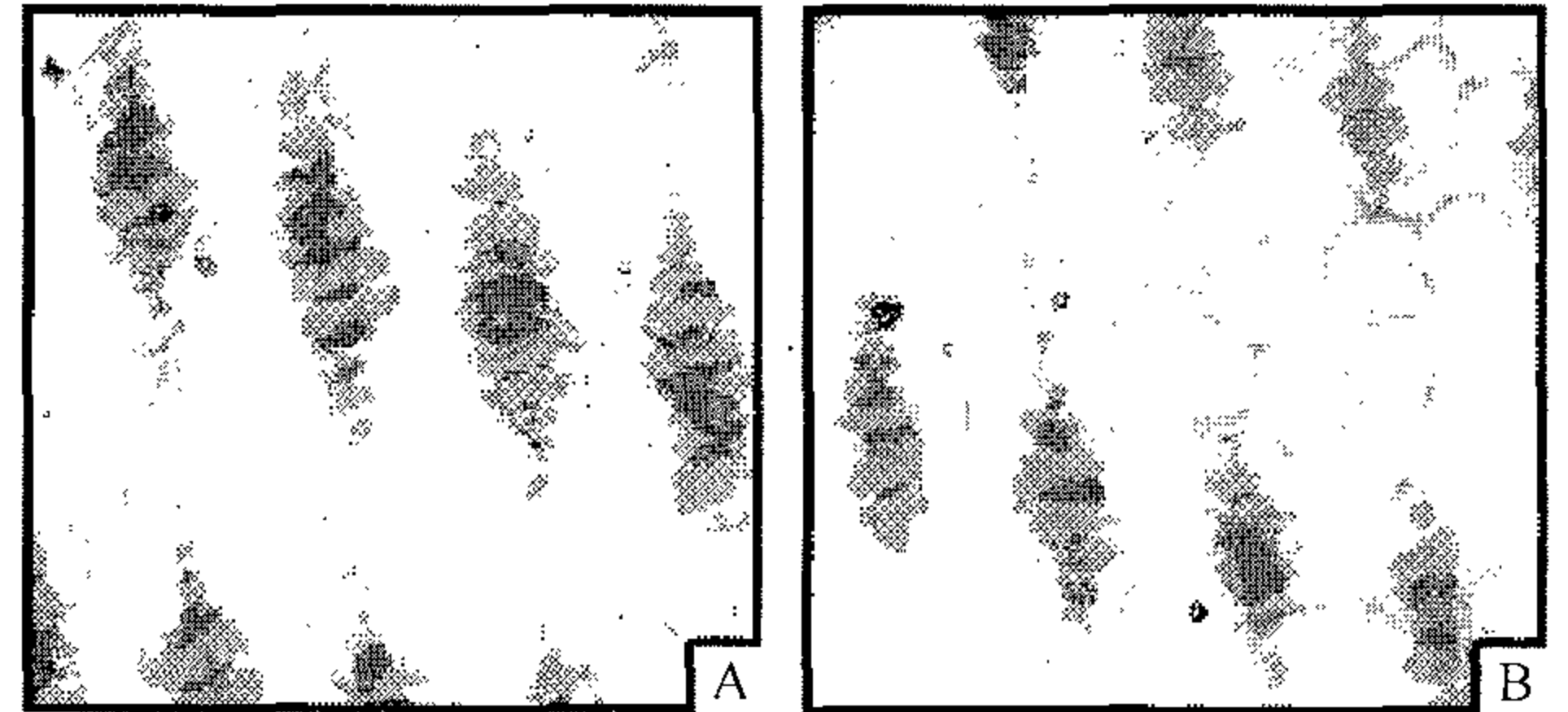


图2 重组杆状病毒 Ac-V-S1 感染 sf9 昆虫细胞
 A Ac-V-S1 感染的 sf9 昆虫细胞(×160);B 正常 sf9 昆虫细胞对照(×160)

图2 重组杆状病毒 Ac-V-S1 感染 sf9 昆虫细胞

Fig.2 sf9 cells infected by the recombinant baculovirus Ac-V-S1

2.4 重组杆状病毒 Ac-V-S1 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 Ac-V-S1 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 S1 蛋白(图3).

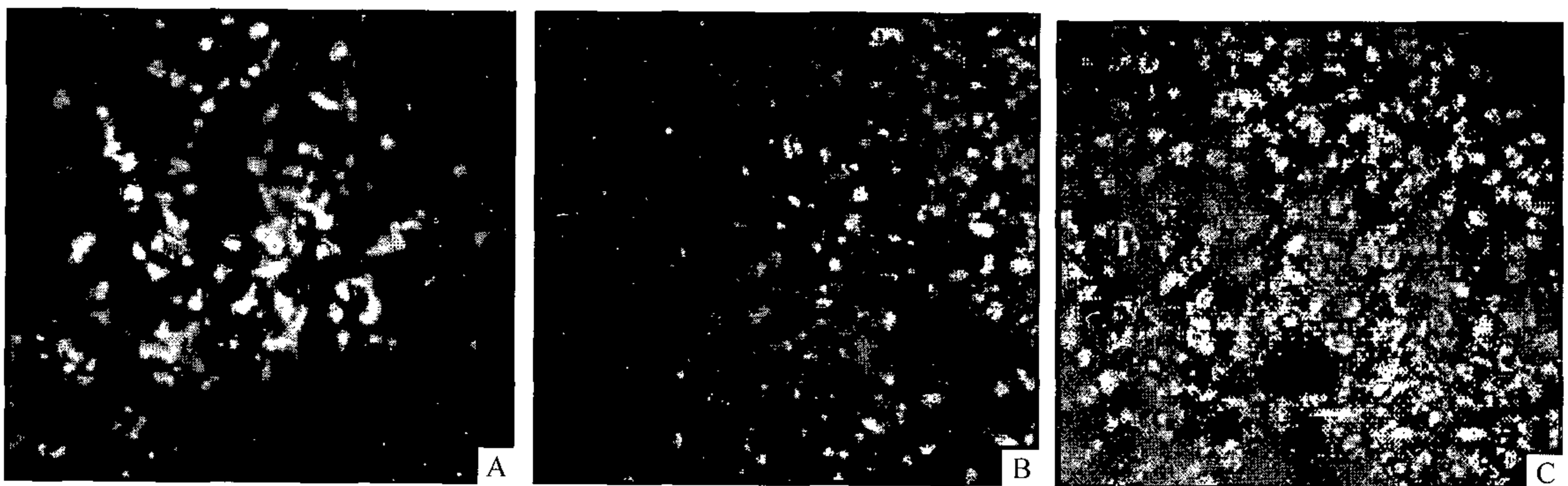


图3 Ac-V-S1 转导 BHK-21 细胞的间接免疫荧光试验
 A 转导 Ac-V-S1 的 BHK-21 细胞(×100);B 转导杆状病毒野毒的 BHK-21 细胞(×100);C 正常 BHK-21 细胞对照(×100)

图3 Ac-V-S1 转导 BHK-21 细胞的间接免疫荧光试验

Fig.3 Indirect immunofluorescent assay of BHK-21 cells transduced with Ac-V-S1 by IFA

3 讨论

S1 蛋白是 IBV 最重要的保护性抗原,它可诱导血凝抑制抗体和大部分病毒中和抗体的产生,还可以在鸡体内诱导 IBV 特异的细胞毒性 T 淋巴细胞(Cytotoxic T Lymphocyte, CTL)的免疫应答反应^[2];除此之外,S1 蛋白还决定病毒的组织嗜性,在病毒吸附细胞的过程中发挥重要作用,并在血清学分类中起决定作用^[6].因此,S1 基因是 IBV 基因工程疫苗研究的主要靶基因.近年来国内外许多学者利用大肠杆菌、酵母、马铃薯等多种表达系统成功表达了 S1

亚单位蛋白^[7-9],但各研究小组对其免疫效果的评价却不尽相同,田占成等^[10]用 IBV S1 基因构建了鸡痘病毒重组表达载体(rFPV-IBV)免疫组和弱毒疫苗免疫组的 SPF 鸡均获得 100% 保护,而陈洪岩等^[11]构建表达 S1 的真核表达质粒免疫鸡后有 40% 的鸡可耐过强毒的攻击.

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^[12-13].

研究证实杆状病毒用于疫苗开发的首要问题就是要首先消除杆状病毒的补体敏感性. 而水泡性口炎病毒 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^[14]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. Tani 等^[4]通过在 AcMNPV gp64 上重组 VSV-G 蛋白也获得了同样的效果. 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 pFast-VSV-G-CMV,成功构建了能在哺乳动物细胞中表达 IBV S1 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鸡的免疫试验,对该 IB 新型疫苗进行免疫效果的分析和评价,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 IBV 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] KWON H M, JACKWOOD M W. Molecular cloning and sequence comparison of the S1 glycoprotein of the Gray and JMK strains of avian infectious bronchitis virus[J]. *Virus Genes*, 1995, 9 (3): 219-229.
- [2] ELLEN W C, PEI J W, JENNIFER D, et al. Cytotoxic T lymphocytes are critical in the control of infectious bronchitis virus in poultry[J]. *Developmental and Comparative Immunology*, 2000(24): 187-200.
- [3] 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: 10099-10103.
- [4] TANI H, LIMN C K, YAP C C, et al. *In vitro* and *in vivo* gene delivery by recombinant baculoviruses[J]. *J Virol*, 2003, 77: 9799-9808.
- [5] GRABOWSKA A K, LIPINSKA A D, ROHDE J, et al. New baculovirus recombinants expressing pseudorabies virus (PRV) glycoproteins protect mice against lethal challenge infection[J]. *Vaccine*, 2009, 27(27): 3584-3591.
- [6] 石星明,王云峰,王玫,等. 传染性支气管炎重组鸡痘病毒免疫鸡对 LHLJ04X I 株病毒攻击的免疫保护作用[J]. *中国预防兽医学报*, 2008, 30(1): 47-52.
- [7] DAI Ya-bin, CHEN De-Sheng, DING Chan, et al. Construction of recombinant baculovirus expressing S1 glycoprotein of infectious bronchitis virus isolate JS/95/03[J]. *Chin J Virol*, 2003(19): 86-90.
- [8] HUANG Ya-dong, ZHENG Qing, LI Xiao-kun, et al. Cloning of spike protein S1 gene of avian infectious bronchitis virus H strain and its expression in *pichia pastoris* [J]. *Chin J Virol*, 2003(19): 144-148.
- [9] ZHOU, Ji-yong, CHENG Li-qin, ZHENG Xiao-jun, et al. Generation of the transgenic potato expressing full-length spike protein of infectious bronchitis virus[J]. *J Biotechnol*, 2004(111): 121-130.
- [10] 田占成,孙永科,王云峰,等. 表达鸡传染性支气管炎病毒 S1 基因重组鸡痘病毒对 SPF 鸡的免疫保护作用[J]. *畜牧兽医学报*, 2006, 37(6): 580-586.
- [11] 陈洪岩,江国托,杨奇伟,等. 鸡传染性支气管炎病毒 S1 基因免疫对鸡的保护作用[J]. *中国预防兽医学报*, 1999, 21(4): 250-253.
- [12] FAN Hui-ying, PAN Yong-fei, FANG Liu-rong, et al. Construction and immunogenicity of recombinant pseudotype baculovirus expressing the capsid protein of porcine circovirus type 2 in mice[J]. *J Virol Methods*, 2008, 150: 21-26.
- [13] WU Qun-feng, FANG Liu-rong, WU Xue-bao, et al. A pseudotype baculovirus-mediated vaccine confers protective immunity against lethal challenge with H5N1 avian influenza virus in mice and chickens[J]. *Mol Immunol*, 2009, 13: 2210-2217.
- [14] BARSOU M J, BROWN R, MCKEE M, et al. Efficient transduction of mammalian cells by a recombinant baculovirus having the vesicular stomatitis virus G glycoprotein[J]. *Hum Gene Ther*, 1997, 8(17): 2011-2018.

【责任编辑 柴 焰】