

表面展示鸡传染性支气管炎病毒 M41 株 S1 蛋白的重组假型杆状病毒的构建

陈筱薇^{1†}, 樊惠英^{1†}, 林文耀¹, 程晓亮¹, 叶昱¹, 陈春丽^{1,2}, 廖明¹

(1 华南农业大学 兽医学院, 农业部动物疫病防控重点实验室, 广东 广州 510642;

2 四川农业大学 动物医学院, 四川 雅安 625000)

摘要:以鸡传染性支气管炎病毒 M41 毒株基因序列为模板, 利用 PCR 方法扩增膜定位信号缺失的 S1 基因(dS1), 将其亚克隆入杆状病毒表面展示质粒 pBACsurf-1 中, 再次将 S1 及 gp64 的基因片段克隆到杆状病毒转移质粒 pFastBacTMDual, 得到重组质粒 pFastBac-gp64-dS1. 将该重组质粒转化到 DH10Bac 感受态细胞中, 获得重组穿梭载体 Bacmid-gp64-dS1, 提取重组 Bacmid 质粒, 以 PCR 验证其正确性. 将阳性重组 Bacmid 质粒利用脂质体转染 Sf9 昆虫细胞, 获得重组杆状病毒 BV-dS1. 间接免疫荧光试验表明, 该重组杆状病毒可以 Sf9 昆虫细胞膜表达鸡传染性支气管炎病毒 S1 蛋白.

关键词:鸡传染性支气管炎病毒; M41; 表面展示; S1 蛋白; 重组杆状病毒

中图分类号: S852.65

文献标志码: A

文章编号: 1001-411X(2012)03-0398-05

Construction of a Recombinant Baculovirus Surface Displaying S1 Protein of M41 Strain of Infectious Bronchitis Virus

CHEN Xiao-wei^{1†}, FAN Hui-ying^{1†}, LIN Wen-yao¹, CHENG Xiao-liang¹,

YE Yu¹, CHEN Chun-li^{1,2}, LIAO Ming¹

(1 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;

2 College of Veterinary Medicine, Sichuan Agricultural University, Yaan 625000, China)

Abstract: The S1 (Spike) protein gene without membrane localization signal of infectious bronchitis virus (dS1) was amplified from infectious bronchitis virus (M41) by PCR and sub-cloned into pBACsurf-1. The fusion gene containing S1 and gp64 was then inserted into baculovirus transfer vector pFastBacTMDual to construct the recombinant plasmid pFastBac-gp64-dS1. Then, the plasmid was transformed into *Escherichia coli* DH10Bac competent cells to obtain the recombinant shuttle vector Bacmid-gp64-dS1. Extracted Bacmid-gp64-dS1 was transfected into Sf9 cells to produce the recombinant baculovirus BV-dS1 by using LipofectamineTM 2000. Indirect immunofluorescent assay indicated that the recombinant baculovirus BV-dS1 could express S1 protein on infected Sf9 cell membrane.

Key words: infectious bronchitis virus; M41; surface display; S1 protein; recombinant baculovirus

鸡传染性支气管炎 (Infectious bronchitis, IB) 是由传染性支气管炎病毒 (Infectious bronchitis virus,

收稿日期: 2011-08-26

作者简介: 陈筱薇 (1985—), 女, 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)

IBV)引起鸡的一种急性、高度接触性呼吸道传染病。本病于1931年在美国首次发现。在我国,邝荣禄于1972年在广东首次发现后,北京、上海等地相继有报道,目前已成为养鸡业中危害最大的传染病之一。IBV基因组编码N、M、E和S4种蛋白。其中S蛋白由S1和S2两种糖多肽构成,S1蛋白是IBV最重要的保护性抗原,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I特异的细胞毒性T淋巴细胞(Cytotoxic T Lymphocyte, CTL)的免疫应答反应,关于IBV基因工程疫苗的研究,基本集中在S1基因上^[1-4]。在杆状病毒表面展示系统中用于和外源蛋白发生融合的囊膜糖蛋白gp64,是出芽型病毒(Budded virus, BV)特有的结构蛋白,由N末端信号肽和成熟蛋白(跨膜区TM和胞质区CTD)组成^[5],介导病毒和昆虫细胞的融合及侵染过程。gp64被开发成杆状病毒表面展示系统来展示不同的目的蛋白,外源基因片段插入到病毒囊膜蛋白的信号肽与成熟蛋白之间,表达加工时信号肽被切除,形成的N端融合蛋白借助杆状病毒稳定地表达并展示于感染细胞或病毒粒子的表面,筛选得到表达有目的蛋白的重组杆状病毒。目前,杆状病毒表面展示系统已经被开发用于进行基因工程亚单位疫苗的研制^[6-7]。据此,本研究通过修饰外源基因,构建表面展示传染性支气管炎病毒M41株S1蛋白的重组杆状病毒,为传染性支气管炎病毒基因工程疫苗的研究提供新的选择。

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 pFsatbacTM Dual为GIBCO BRL公司产品,pBACsurf-1为美国Novagen公司产品。大肠埃希菌DH5a、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 ExTM Taq DNA多聚酶、dNTP,为大连宝生物工程公司产品,T4DNA连接酶和各种限制性内切酶等工具酶均为NEB(NEW ENGLAND BioLabs)公司产品。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LipofectamineTM 2000转染试剂为美国Invitrogen公司产品。胎牛血清为奥地利PAA公司产品,抗IBV M41 S1的单克隆小鼠腹水为上海艾比玛生物医药有限公司产品,

FITC标记山羊抗小鼠IgG为Sigma公司产品。

1.2 方法

1.2.1 重组质粒 pBACsurf-dS1 的构建 根据M41株序列设计合成1对扩增S1基因的引物PS1、PS2,上下游引物引入相同的酶切位点 Xma I 引物序列如下,由Invitrogen公司合成。

PS1: 5'-ATACCCGGGcgATGCACCACCACCAC-CACCACGCTTTGTATGACAGTAGTTCTTACG-3' [下划线部分为保护性碱基;斜体字部分为限制性内切酶 Xma I 的识别位点;考虑到移码突变,加入2个碱基保证读码框正确(小写);ATG起始密码子];

PS2: 5'-ATACCCGGGcTGTTCATTACTGATTT-TAATGTA-3' [下划线部分为保护性碱基;斜体字部分为限制性内切酶 Xma I 的识别位点;考虑到移码突变,加入1个碱基保证读码框正确(小写)]。

扩增片段为1542 bp,扩增的片段不含有S1基因的信号肽(SP)。回收PCR产物并用 Xma I 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-dS1。

1.2.2 重组转移质粒 pFastBac-gp64-dS1 的构建 以获得的重组质粒 pBACsurf-dS1 中 gp4ss-dS1-gp64m 序列,分别在上、下游引物的5'端引入限制性内切酶 EcoR I、Xba I,利用PCR方法扩增 gp4ss-his-qS1-gp64m 基因。

上游引物(pBs): 5'-GCGGAATTCATGCTA-AGCGCTATTGTTTTATATGT-3' (下划线部分为保护性碱基;斜体字部分为限制性内切酶 EcoR I 的识别位点;ATG为起始密码子);

下游引物(pBa): 5'-GCGTCTAGATTATTGTC-TATTACGGTTTCTAATCATACA-3' (下划线部分为保护性碱基;斜体字部分为限制性内切酶 Xba I 的识别位点;TAA为终止密码子)。

扩增片段为3129 bp。将PCR产物回收并用 EcoR I、Xba I 双酶切后,将其克隆到同样用 EcoR I、Xba I 双酶切后的载体 pFsatbacTM Dual,构建重组转座质粒 pFastBac-gp64-dS1 (图1)。

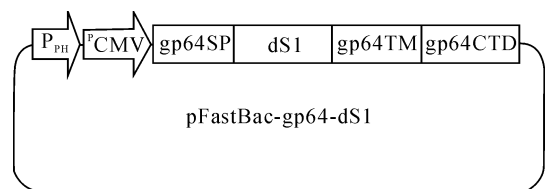


图1 重组转座质粒 pFastBac-gp64-dS1

Fig. 1 Construction of recombinant donor plasmid pFastBac-gp64-dS1

1.2.3 重组穿梭载体 Bacmid-gp64-dS1 的获得 取

2 ~ 5 μL 重组质粒 pFastBac-gp64-dS1 与 100 μL DH10Bac 大肠埃希菌感受态细胞混合,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、纯化白色阳性菌落,提取重组 Bacmid 质粒,以 M13 上下游引物进行 PCR 鉴定。

1.2.4 重组杆状病毒 BV-dS1 的获得 提取纯化 Bacmid-gp64-dS1,利用脂质体 LipofectamineTM 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-dS1。

1.2.5 重组杆状病毒 BV-dS1 感染 Sf9 昆虫细胞 细胞转染前 1 d,将形态良好、生长旺盛的 Sf9 昆虫细胞以 1×10^5 孔⁻¹ 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,将 10 μL 重组杆状病毒与 1 mL 昆虫细胞 Grace's 培养液混和后,将此病毒感染液加入到 Sf9 昆虫细胞中,28 $^{\circ}\text{C}$ 培养 2 h 后,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 60 h 后,用 PBS 洗涤,甲醇固定细胞后,以鼠抗 M41 株 S1 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。

2 结果

2.1 重组质粒 pBACsurf-dS1 的构建

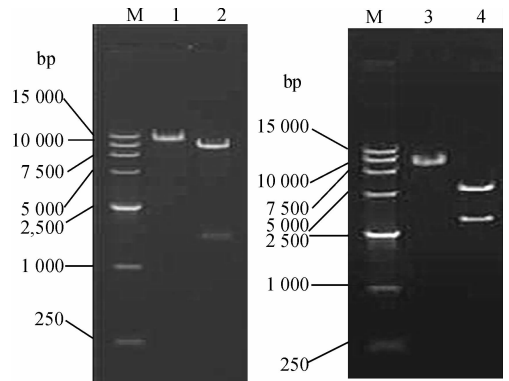
对重组质粒 pBACsurf-dS1 进行 *Xma* I 酶切鉴定,酶切后产生大小约为 9 400 和 1 500 bp 的 2 个片段,与预期大小一致(图 2)。在此基础上,进一步对 pBACsurf-dS1 进行测序,证实无碱基突变。

2.2 重组转移质粒 pFastBac-gp64-dS1 的构建

对重组质粒 pFastBac-gp64-dS1 进行 *Eco*R I、*Xba* I 双酶切鉴定,双酶切后产生大小约为 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 pFastBac-gp64-dS1 进行测序,证实无碱基突变。

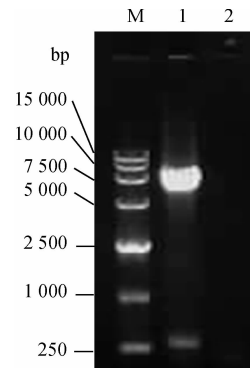
2.3 重组穿梭载体 Bacmid-gp64-dS1 的 PCR 鉴定

将重组转移质粒 pFastBac-gp64-dS1 转化 DH10Bac 感受态后,在含有三抗、IPTG 和 X-gal 平板上进行筛选,待出现蓝白斑落后,挑选白色菌落,提取质粒用 M13 上下游引物进行 PCR 鉴定,PCR 产物经 0.01 g/mL 的琼脂糖凝胶电泳后,在 5 400 bp 处可见特异性条带,证明 gp4_{ss}-his-qS1-gp64m 基因与 Bacmid 已经成功地发生了特异性位点转座(图 3)。



M:DNA marker DLI5000;1:重组质粒 pBACsurf-dS1 的 *Kpn* I 的单酶切产物;2:重组质粒 pBACsurf-dS1 的 *Xma* I 的酶切产物;3:pFastBac-gp64-dS1 的 *Eco*R I 的单酶切产物;4:pFastBac-gp64-dS1 的 *Eco*R I、*Xba* I 的双酶切产物。

图 2 重组质粒 pBACsurf-dS1、pFastBac-gp64-dS1 的酶切鉴定
Fig. 2 Identification of transfer vector pBACsurf-dS1 and pFastBac-gp64-dS1

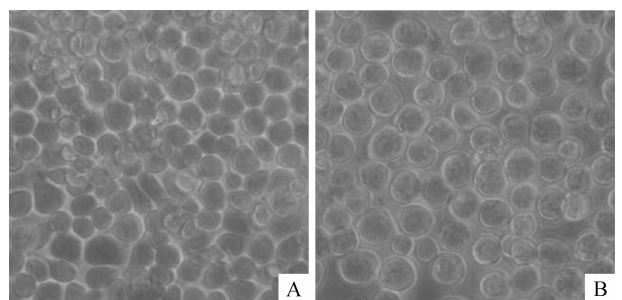


M:DNA marker DLI5000;1:重组穿梭载体 Bacmid-gp64-dS1 的 PCR 扩增产物;2:以 ddH₂O 为模板的 PCR 对照。

图 3 重组穿梭载体 Bacmid-gp64-dS1 的 PCR 鉴定
Fig3 Identification of recombinant vector Bacmid-gp64-dS1 by PCR

2.4 重组杆状病毒 BV-dS1 的获得

利用脂质体转染法,将提取的重组穿梭载体 Bacmid-gp64-dS1 转染 Sf9 昆虫细胞,于 28 $^{\circ}\text{C}$ 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(图 4)。



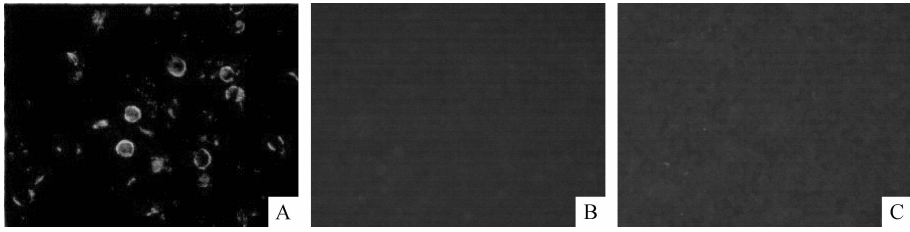
A: 正常 Sf9 昆虫细胞对照(200 \times);B: BV-dS1 感染的 Sf9 昆虫细胞(200 \times)。

图 4 重组杆状病毒 BV-dS1 感染 Sf9 昆虫细胞
Fig. 4 Sf9 cells infected by the recombinant baculovirus BV-dS1

2.5 重组杆状病毒 BV-dS1 的鉴定

重组杆状病毒感染 Sf9 昆虫细胞后,进行间接免疫荧光试验.结果表明,重组杆状病毒 BV-dS1 毒感染 Sf9 昆虫细胞细胞膜上能产生特异性免疫荧光,而

杆状病毒野毒毒感染 Sf9 昆虫细胞未见任何特异荧光,表明重组杆状病毒能够在其感染的细胞表面表达 S1 蛋白(图 5).



A: 感染 BV-dS1 的 Sf9 昆虫细胞(40 ×);B: 感染杆状病毒野毒的 Sf9 昆虫细胞(40 ×);C: 正常的 Sf9 昆虫细胞(对照,40 ×).

图 5 BV-dS1 感染 Sf9 昆虫细胞的间接免疫荧光试验

Fig. 5 Indirect immunofluorescent assay of Sf9 cells infected with BV-dS1 by IFA

3 讨论

S 蛋白是 IBV 最重要的保护性抗原,其作用表现为刺激机体产生中和抗体,在病毒吸附细胞过程中发挥作用,在血清学分类上起决定性作用. S 蛋白上存在 8 个抗原决定簇,其中 S1 上有 6 个,是重要的免疫原基因. S1 蛋白在 IBV 最外层形成蘑菇状的突起,膜定位信号为 N 端第 1~18 位氨基酸, S1 蛋白近 N 端第 37~81 位,第 117~160 位,第 269~298 位氨基酸构成了 S1 蛋白的抗原决定簇^[8-9],该定位区域缺失不会影响 S1 蛋白的免疫原性.

杆状病毒是昆虫专一性的病原病毒,是目前为止发现最早、研究最多且实用意义很大的昆虫病毒,可作为一种新型的基因工程载体之一,具有目的基因容量大、蛋白表达效率高、翻译后修饰系统、操作简单等特点,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^[10-12].

杆状病毒载体目前的主要应用包括做为外源基因的转移载体及表面展示外源基因的载体等. 作为外源基因的转移载体,杆状病毒将外源基因转入动物细胞,使外源基因在其中瞬时高效表达^[13-14]. 因此,杆状病毒作为基因转移载体,对于表达一些结构复杂的蛋白或同时表达多个基因,甚至携带整个病毒基因组,都体现了其他基因转移载体难以比拟的优势. 但是,杆状病毒不能在动物细胞内复制,因此其在动物细胞中的表达持续时间较短,所需的病毒量大,疗效有限. 杆状病毒作为表面展示外源基因的载体,将外源蛋白或多肽与杆状病毒的囊膜糖蛋白融合,使之在感染细胞的表面或病毒粒子的囊膜上获得有效的展示. 杆状病毒表面展示系统除了具有杆状病毒载体的一般优点外,与亚单位疫苗比较,表

达的蛋白在病毒表面,理论上能很好地刺激细胞免疫;而且使用纯化的杆状病毒可以减少佐剂生物用量,因为杆状病毒本身就可以作为佐剂刺激机体反应. 目前,多种大分子的复杂真核蛋白已经在杆状病毒表面展示系统表达展示,在展示病毒蛋白方面,如 SARS 冠状病毒表面 S 蛋白、柏格(氏)鼠疟原虫环孢子蛋白,口蹄疫病毒 A 位点都被展示到杆状病毒粒子表面,免疫动物均能获得理想的免疫原性^[15-17]. 另外,用杆状病毒表面展示系统生产目的蛋白,纯化过程特别简单,只需要超速离心得到重组杆状病毒即可同时获得目的蛋白,纯化费用低、操作简单、可以规模化生产,解决了目的蛋白纯化代价昂贵、程序复杂的现状^[18].

本研究获得重组转移质粒 pFastBac-gp64-dS1 后,再通过细菌内同源重组将转移载体上的外源基因整合到穿梭质粒 bacmid 中,获得重组质粒后转染 Sf9 细胞拯救出重组杆状病毒,然后对重组杆状病毒在实验室条件进行稳定性试验,通过对重组杆状病毒的鉴定,证明了重组杆状病毒 BV-dS1 的构建成功.

本研究构建了能表面展示鸡传染性支气管炎病毒 S1 蛋白的重组假性杆状病毒,为研制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的鸡传染性支气管炎的新型疫苗,提供一个可供选择的新策略.

参考文献:

- [1] IGNJATOVIC J, GALLI L. Immune responses to structural proteins of avian infectious bronchitis virus[J]. Avian Pathol, 1995, 24(2): 313-332.
- [2] SEO H S, WANG L, SMITH R, et al. The carboxyl-terminal 120-residue polypeptide of infectious bronchitis virus

- nucleocapsid induces cytotoxic T lymphocytes and protects chickens from acute infection[J]. *J Virol*, 1997, 71(10): 7889-7894.
- [3] CLLISSON E W, PEI Jian-wu, DZIELAWA J, et al. Cytotoxic T lymphocytes are critical in the control of infectious bronchitis virus in poultry[J]. *Dev Comp Immunol*, 2000, 24(2/3): 187-200.
- [4] 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.
- [5] MARKOVIC I, PULYAEVA H, SOKOLOFF A. Membrane fusion mediated by baculovirus gp64 involves assembly of stable gp64 trimers into multiprotein aggregates[J]. *J Cell Biol*, 1998, 143(5): 1155-1166.
- [6] YANG Ding-gang, CHUNG Yao-chi, LAI Yiu-kay, et al. Avian influenza virus hemagglutinin display on baculovirus envelope: cytoplasmic domain affects virus properties and vaccine potential[J]. *Mol Ther*, 2007, 15(5): 989-996.
- [7] XU Xin-gang, TANG De-wen, CHIOU Ming-tong, et al. Baculovirus surface display of NS3 nonstructural protein of classical swine fever virus[J]. *J Virol Methods*, 2009, 159(2): 259-264.
- [8] GELB J, Jr, KEELER C L, Jr, NIX W A, et al. Antigenic1 and S-1 genomic characterization of the delaware variant serotype of infectious bronchitis virus[J]. *Avian Dis*, 1997, 41(3): 661-669.
- [9] GELB J, WEISMAN Y, LADMAN B S, et al. S1 gene characteristics and efficacy of vaccination against infectious bronchitis virus field isolates from the United States and Israel (1996 to 2000)[J]. *Avian Pathol*, 2005, 34(3): 194-203.
- [10] FAN Hui-ying, PAN Yong-fei, FANG Liu-rong, et al. Construction and immunogenicity of recombinant pseudo-type baculovirus expressing the capsid protein of porcine circovirus type 2 in mice[J]. *J Virol Methods*, 2008, 150(1/2): 21-26.
- [11] HU Yu-chen, YAO Kun, WU Tong-yuan, et al. Baculovirus as an expression and/or delivery vehicle for vaccine antigens[J]. *Expert Rev Vaccines*, 2008, 7(3): 363-371.
- [12] HUANG Hai-nan, XIAO Shao-bo, QIN Jun-ling, et al. Construction and immunogenicity of a recombinant pseudo-type baculovirus expressing the glycoprotein of rabies virus in mice[J]. *Arch Virol*, 2011, 156(5): 753-758.
- [13] HOFMANN C, SANDIG V, JENNINGS G, et al. Efficient gene transfer into human hepatocytes by baculovirus vectors[J]. *Proc Natl Acad Sci*, 1995, 92(22): 10099-10103.
- [14] 罗琼, 樊惠英, 罗开健, 等. 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[J]. *华南农业大学学报*, 2010, 31(2): 104-107.
- [15] FENG Qian, LIU Ying-ying, QU Xiu-xia, et al. Baculovirus surface display of SARS coronavirus (SARS-CoV) spike protein and immunogenicity of the displayed protein in mice models[J]. *DNA Cell Biol*, 2006, 25(12): 668-673.
- [16] TAMI C, PERALTA A, BARBIERI R, et al. Immunological properties of FMDV- gp64 fusion proteins expressed on SF9 cell and baculovirus surfaces[J]. *Vaccine*, 2004, 22(6): 840-845.
- [17] YOSHIDA S, KAWASAKI M, HARIGUCHI N, et al. A baculovirus dual expression system-based malaria vaccine induces strong protection against *Plasmodium berghei* sporozoite challenge in mice[J]. *Infect Immun*, 2009, 77(5): 1782-1789.
- [18] 许信刚, 童德文, 刘宏仁. 猪瘟病毒囊膜蛋白在杆状病毒表面的展示及展示蛋白的免疫原性试验[J]. *西北农林科技大学学报*, 2009, 37(12): 73-79.

【责任编辑 柴 焰】