

犬瘟热病毒水貂株 H 与 F 蛋白基因原核表达 重组质粒的构建及表达

苏凤艳, 温铁峰, 宗颖, 王全凯

(吉林农业大学 中药材学院, 吉林 长春 130118)

摘要:将克隆质粒 pMD-18T-H 和 pMD-18T-F 分别进行双酶切, 获得纯化的 H 基因和 F 基因, 在 T₄ DNA 连接酶的作用下, 亚克隆到原核表达载体 pET28a(+) 上, 获得原核重组质粒 pET28a-H 和 pET28a-F. 将原核重组质粒转化大肠埃希菌 *Escherichia coli* Rosetta2 (DE3) 中进行表达, SDS-PAGE 结果显示 H 基因和 F 基因分别表达相对分子质量约为 31 400 和 38 200 的融合蛋白, Western-blot 检测结果显示, 表达蛋白均可与 CDV 标准阳性血清呈阳性反应, 表明原核表达的 CDV H 蛋白和 F 蛋白在反应原性上具有与天然 H 蛋白和 F 蛋白同样的特性, 可作为 CDV 诊断用抗原, 为 CDV 的免疫预防研究奠定基础.

关键词:犬瘟热病毒; H 基因; F 基因; 原核表达

中图分类号: S852.65

文献标志码: A

文章编号: 1001-411X(2012)03-0417-04

Construction and Expression of Protokaryon Expression Plasmid for H and F Genes of Canine Distemper Virus Isolated from Mink

SU Feng-yan, WEN Tie-feng, ZONG Ying, WANG Quan-kai

(College of Chinese Medicinal Materials, Jilin Agricultural University, Changchun 130118, China)

Abstract: H and F genes were obtained by digesting the cloning plasmid pMD-18T-H and pMD-18T-F respectively. The recombinant protokaryon expression plasmids pET28a-H and pET28a-F were constructed by sub-cloning the objective gene into pET28a(+) vector. Recombinant protokaryon expression plasmids pET28a-H and pET28a-F were transformed into *Escherichia coli* Rosetta2(DE3) cell. Target genes were successfully expressed by SDS-PAGE detection. The size of the recombinant fusion proteins was 31 400 (H) and 38 200 (F) respectively. The recombinant fusion proteins showed positive reaction to anti-CDV canine serum by Western-blot detection.

Key words: canine distemper virus; H gene; F gene; protokaryon expression

犬瘟热 (Canine distemper, CD) 系由副粘病毒科麻疹病毒属犬瘟热病毒 (Canine distemper virus, CDV) 引起的一种急性、热性、高度接触性传染病. 由于 CDV 呈世界性分布, 自然感染宿主种类广泛, 且可在大量不相关的动物种类间交叉感染, 因此, 消灭 CDV 几乎是不可能的^[1], 但可以利用疫苗进行人工主动免疫控制犬瘟热. 目前常用的犬瘟热疫苗有 CDV 灭活疫苗、MV 疫苗、CDV 弱毒疫苗, 但是 CDV

灭活疫苗和 MV 疫苗不能给动物提供持久的保护力, 而 CDV 弱毒疫苗的稳定性较差, 接种后易受母源抗体的干扰, 对某些免疫缺陷动物和野生动物不安全, 具有散毒的危险^[2-4]. 特别是近年来研究表明 CDV 在不断发生变异, 具有基因多样性^[5]. 现已证明, 目前流行的野毒株与标准的 Covac、OP 等疫苗株的抗原性、致细胞病变 (CPE) 类型、毒力等生物学特性方面存在部分差异^[2-3,6]. 欧洲和日本等地区均有

收稿日期: 2011-12-27

作者简介: 苏凤艳 (1973—), 女, 副教授, 博士, E-mail: sufy110@126.com

基金项目: 吉林省自然科学基金 (201115194); 吉林省教育厅项目 [2009 第 (66) 号]

已免疫过的犬再次爆发犬瘟热^[1,3,7]的现象. 所以研制新型、安全、高效的疫苗以及检测犬瘟热的特异性诊断试剂已成为控制水貂犬瘟热的研究热点^[8-9]. CDV 主要由6种结构蛋白构成, 其中附着蛋白或血凝蛋白(Attachment protein or Hemagglutinin protein, H)在吸附和侵入宿主细胞过程中起重要作用, 它介导融合蛋白(Fusion protein, F)与细胞发生融合反应, 而F蛋白可介导囊膜与细胞膜囊合^[10-11], 是感染性病毒粒子进入宿主细胞所必需的, 是犬瘟热病毒的主要保护性抗原. 因此, 本研究构建了水貂源犬瘟热病毒H和F蛋白基因原核表达质粒, 并在大肠埃希菌 *Escherichia coli* 中进行表达, 对其反应原性进行了研究, 为进一步研究其作为疫苗候选分子的可能性奠定基础.

1 材料与方法

1.1 毒株、菌株和质粒

CDV 由吉林农业大学经济动物基因工程实验室利用 Vero 传代细胞, 从1只临床疑似犬瘟热的病死水貂肝脏中分离获得, 经系统的病毒学鉴定后保存^[12]; 均 *E. coli* JM109 由吉林农业大学中药材学院经济动物基因工程实验室保存; pMD-18T 克隆载体和 pET28a(+) 原核表达载体为 TaKaRa 公司产品.

1.2 工具酶、试剂和抗体

*Bam*H I、*Kpn* I、*Xho* I、RT-PCR 试剂盒和核酸相对分子质量标准为 TaKaRa 公司产品; RNAgentsR-Total RNA Isolation System Kit 为 Promega 公司产品; IPTG 为 Sigma 公司产品; DNA 凝胶回收纯化试剂盒、质粒 DNA 回收和纯化试剂盒为杭州维特洁生化技术有限公司产品; PVDF 转移膜为 Geman 公司产品. 兔抗 CDV 阳性血清由吉林省左家特产研究所赠送.

1.3 引物的设计与合成

根据 GeneBank 中 Messling 等^[13]发表的 Onderstepoort 疫苗株(AF378705) H 基因序列和 F 基因序列, 利用 Gene runner 软件设计引物, 预期扩增的 H 基因和 F 基因片段长度分别为 843 和 1 067 bp. H 基因上游引物: 5'-CGGATCCAGGATAATGCAAGAGCC-3'; H 基因下游引物: 5'-GCTCGAGAAGCCAGTGTCAACTCAC-3'. F 基因上游引物: 5'-GGGTACCTCCAACCTCAATGCTCAAG-3'; F 基因下游引物: 5'-CGGATCCAGAGCGCCTAACCGTCTC-3'.

在 H 基因上、下游引物 5'端分别引入 *Bam*H I 和 *Xho* I 酶切位点. 在 F 基因上、下游引物 5'端分别引入 *Kpn* I 和 *Bam*H I 酶切位点. 引物由上海生物工程生物技术有限公司合成.

1.4 CDV 的增殖及 RNA 的提取

将长满单层的非洲绿猴肾(Vero)细胞培养液弃去, 接种 CDV 水貂分离株, 37 °C 感作 1 h 后, 弃去病毒液. 加入含体积分数为 2% 胎牛血清的 RPMI 1640 培养液, 37 °C 条件培养 72 h. 按试剂盒说明提取 CDV 总 RNA, -20 °C 条件保存.

1.5 CDV H 和 F 蛋白基因的扩增及纯化

以犬瘟热病毒 RNA 为模板, 对 H 和 F 基因进行扩增. RT 反应总反应体系为 10.00 μL: MgCl₂ 2.00 μL, 10 × RT 缓冲液 1.00 μL, ddH₂O 0.75 μL, dNTP 1.00 μL, RNase 抑制剂 0.25 μL, AMV 0.50 μL, 下游引物 0.50 μL, 模板 RNA 4.00 μL. 反转录条件: 42 °C 20 min, 99 °C 5 min, 5 °C 5 min. PCR 反应体系为 50.00 μL: 5 × PCR 缓冲液 10.00 μL, Ex *Taq* E 0.25 μL, 上游引物 0.50 μL, ddH₂O 34.25 μL, RT 产物 5.00 μL. 反应条件: 94 °C 预变性 2 min; 94 °C 热变性 30 s, 60 °C 退火 30 s, 72 °C 延伸 1 min, 共 35 个循环; 最后 72 °C 延伸 10 min. 扩增产物用 10 g/L 琼脂糖凝胶电泳鉴定, 并以 DNA 凝胶回收纯化试剂盒进行纯化.

1.6 重组克隆质粒 pMD-18T-H 和 pMD-18T-F 的构建与鉴定

纯化的 PCR 产物与 pMD-18T simple vector 于 16 °C 连接 8 h, 构建重组质粒 pMD-18T-F 和 pMD-18T-H, 连接产物转化 *E. coli* JM109. *E. coli* JM109 感受态的制备(CaCl₂法)和转化参照文献[9]进行. 通过 α-互补法挑取白色菌落, 接种于含 Amp 的液体培养基中, 37 °C 振荡培养过夜. 碱裂解法小量提取质粒, 并进行双酶切鉴定, 选取阳性克隆送至大连宝生物公司测序.

1.7 原核表达重组质粒 pET28a-H 和 pET28a-F 的构建与鉴定

以 *Bam*H I 和 *Xho* I 双酶切重组克隆质粒 pMD-18T-H 和 pET28a(+) 载体, 以 *Kpn* I 和 *Bam*H I 双酶切重组克隆质粒 pMD-18T-F 和 pET28a(+) 载体, 切胶回收后, 按照体积比(载体:插入片段=1:3)取适量线性化载体 pET28a(+) 和 CDV H 和 F 基因片段混匀, 加入 T₄ DNA 连接酶于连接反应体系中, 16 °C 连接 8 h, 构建原核表达质粒 pET28a-H 和 pET28a-F. 连接产物转化 *E. coli* DH5α 感受态细菌, 转化产物涂布于 LB 琼脂平板. 以碱裂解法小量提取质粒进行双酶切鉴定.

1.8 目的基因的诱导表达

将阳性原核表达质粒 pET28a-H 和 pET28a-F 转化至 *E. coli* Rosetta2(DE3) 宿主菌感受态细胞, 均匀涂于含 Kan 的 LB 琼脂平板上, 37 °C 条件培养过夜.

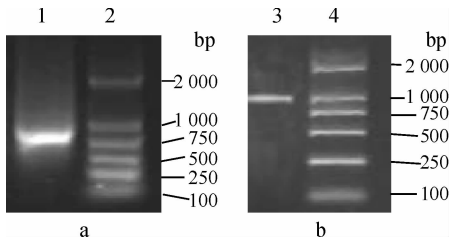
挑取单个转化菌落接种于 5 mL 含 Kan 的 LB 液

体培养基中,37 °C 200 r/min 培养过夜.取 2 mL 接种于 100 mL 含 Kan 的 LB 液体培养基中,37 °C 250 r/min 培养至 $D_{600\text{nm}}$ 为 0.6 ~ 0.8. 加 IPTG 至终浓度为 1 mmol/L 诱导表达,37 °C 250 r/min 振荡培养,分别于诱导前、诱导后 5 h、诱导后 10 h 收集菌液.以同样的方法诱导含空载体 pET28a (+) 的 *E. coli* Rosetta2 (DE3) 10 h 作对照.收集的菌液进行 SDS-PAGE 和 Western-blot 分析.

2 结果与分析

2.1 CDV H 和 F 蛋白基因的获得

利用所设计的引物,采用 RT-PCR 反应分别扩增出了 840 bp 左右的 CDV H 基因片段(图 1a)和 1 060 bp 左右的 CDV F 基因片段(图 1b),与预期 DNA 片段大小相符.



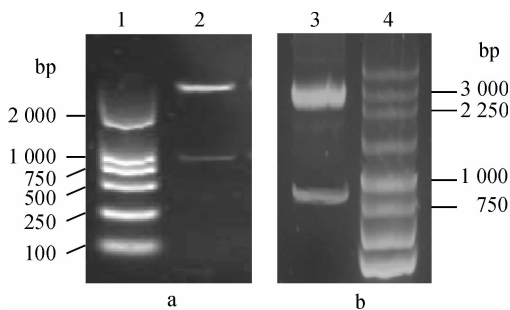
1:H 基因; 2,4:DNA marker DL2000; 3:F 基因.

图 1 分离株的 H 和 F 基因片段 RT-PCR 扩增结果

Fig. 1 RT-PCR products of H and F genes fragments from isolated strains

2.2 克隆质粒的酶切鉴定

以 *Kpn* I 和 *Bam*H I 限制性内切酶双酶切重组质粒 pMD-18T-F,得到约 2 700 bp 的 pMD18-T 线性片段和约 1 000 bp 的插入片段(图 2a).以 *Bam*H I 和 *Xho* I 限制性内切酶双酶切重组质粒 pMD-18T-H,得到约 2 700 bp 的 pMD18-T 线性片段和约 850 bp 的插入片段(图 2b).序列分析结果表明,成功地克隆了 CDV H 蛋白基因和 F 蛋白基因.



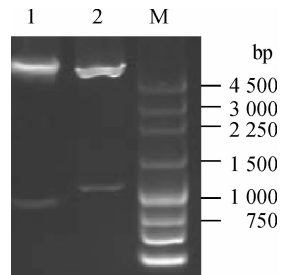
1:DNA marker DL2000; 2: *Kpn* I + *Bam*H I 酶切 pMD-18T-F; 3:*Bam*H I + *Xho* I 酶切 pMD-18T-H; 4:250 bp ladder DNA marker.

图 2 pMD-18T-F 和 pMD-18T-H 的酶切鉴定结果

Fig. 2 Restriction endonucleases analysis of pMD-18T-F and pMD-18T H

2.3 原核重组表达质粒 pET28a-H 和 pET28a-F 的酶切鉴定

对 pET28a-H 和 pET28a-F 质粒分别进行双酶切后,得到了约 5 400 bp 的 pET-28a (+) 的线性片段及约 850 和 1 000 bp 的插入片段(图 3).说明成功地构建了原核重组表达质粒 pET28a-H 和 pET28a-F.



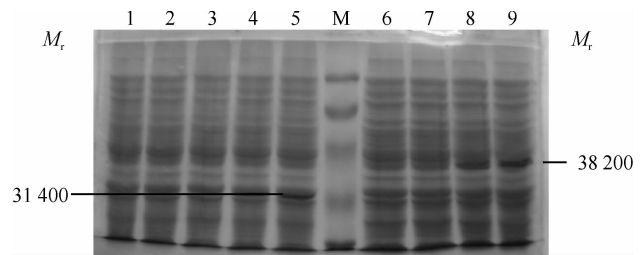
1:pET28a-H 的酶切产物; 2:pET28a-F 的酶切产物; M:250 bp ladder DNA marker.

图 3 原核重组表达质粒的酶切鉴定

Fig. 3 Analysis of recombinant prokaryotic expression plasmids by restriction enzyme cleavage

2.4 SDS-PAGE 分析

在 *E. coli* BL21 (DE3) 中,重组表达质粒 pET28a-H 和 pET28a-F 由 IPTG 诱导表达,经 SDS-PAGE 电泳分析,重组表达质粒在 *E. coli* BL21 中均表达融合蛋白,其相对分子质量分别约为 31 400 和 38 200,与预测大小相符(图 4).



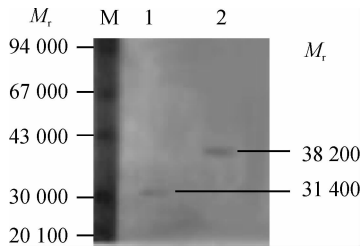
1: *E. coli* BL21 菌体裂解物; 2,6: IPTG 诱导前菌体裂解物; 3,7: IPTG 诱导后含空载体的菌体裂解物; 4,5: IPTG 诱导后 5、10 h 含 pET28a-H 的重组菌体裂解物; 8,9: IPTG 诱导后 5、10 h 含 pET28a-F 的重组菌体裂解物; M: 蛋白质相对分子质量标准(条带从上至下分别为 94 000、67 000、43 000、30 000、20 100).

图 4 重组表达质粒在 *Escherichia coli* BL21 中的表达

Fig. 4 Recombinant expression plasmids expressed in *E. coli* BL21

2.5 Western-blot 分析

表达产物经 SDS-PAGE 后,电转移至 PVDF 膜上,以犬瘟热多克隆抗体为一抗,HRP 标记的山羊抗兔 IgG 为二抗,联苯胺(DAB)为底物,进行蛋白印迹分析,结果如图 5,在相对分子质量为 31 400 和 38 200 处分别有 1 条明显的蛋白印迹带,表明 H 和 F 蛋白基因片段经原核表达后,表达产物具有与 CDV 抗血清结合的反应原性.



M: 蛋白质相对分子质量标准; 1: pET28a-H 在 DE3 中的表达产物;
2: pET28a-F 在 DE3 中的表达产物。

图5 表达产物的 Western-blot 分析

Fig.5 Western-blot analysis of expression products

3 讨论

犬瘟热在世界分布广泛,不仅影响动物养殖业的发展,而且给经济贸易带来了严重影响.因此,建立一种快速、准确的诊断方法及研制更为安全有效的疫苗迫在眉睫.

CDV 结构蛋白中,F 蛋白位于 CDV 囊膜上,呈纤突状,是 CDV 病毒感染细胞所必须的成分,是刺激机体产生中和抗体的重要抗原,F 蛋白诱导的免疫反应能阻止病毒感染,并且在有病毒增殖的情况下可抑制症状的发生.而且该蛋白基因相对比较保守^[14],在诊断上亦具有一定的价值,其抗体可用于 CDV 感染的诊断或流行病学调查.CDV 的 H 蛋白决定着病毒感染的趋向性和致细胞病变^[15],是决定融合效率的主要决定因子.

本试验以 CDV 的 H、F 蛋白基因为研究对象,采用 PET-28a 原核表达系统成功表达了 H 蛋白和 F 蛋白.Western-blot 检测结果显示,重组融合蛋白能够被 CDV 阳性血清识别,而与阴性血清无反应,表明重组融合蛋白具有良好的反应原性,可作为 CDV ELISA 检测法包被抗原.该结果为下一步研究 CDV 基因结构及其蛋白功能,以及利用所表达的蛋白研制基因工程亚单位疫苗等工作奠定了基础.

参考文献:

[1] LAN N T, YAMAGUCHI R, INOMATA A, et al. Comparative analyses of canine distemper viral isolates from clinical cases of canine distemper in vaccinated dogs[J]. *Vet Microbiol*, 2006, 115(1/2/3): 32-42.

[2] HARDER T C, KENTER M, VOS H, et al. Canine distemper virus from diseased large felids; Biological properties and phylogenetic relationships[J]. *J Gen Virol*, 1996, 77(3): 397-405.

[3] IWATSUKI K, MIYASHITA N, YOSHIDA E, et al. Molecular and phylogenetic analyses of the haemagglutinin (H) proteins of field isolates of canine distemper virus from naturally infected dogs[J]. *J Gen Virol*, 1997, 78(2): 373-380.

[4] BOLT G, JENSEN T D, GOTTSCHALCK E, et al. Genetic diversity of the attachment (H) protein gene of current filed isolates of canine distemper virus[J]. *J Gen Virol*, 1997, 78(2): 367-372.

[5] 苏凤艳, 宗春苗, 王卓聪, 等. 水貂株犬瘟热病毒 H 基因的遗传多样性分析[J]. *上海交通大学学报*, 2009, 28(6): 541-547.

[6] 何洪彬, 李金中, 夏咸柱, 等. 犬瘟热病毒小熊猫株附着蛋白基因的序列分析[J]. *中国预防兽医学报*, 1999, 21(6): 423-427.

[7] BLIXENKRONE-MØLLER M, SVANSSON V, HAVE P, et al. Studies on manifestations of canine distemper virus infection in an urban dog population[J]. *Vet Microbiol*, 1993, 37(1/2): 163-173.

[8] 苏凤艳, 宗春苗, 王卓聪, 等. 水貂株犬瘟热病毒 F 基因工程疫苗的免疫特性研究[J]. *上海交通大学学报*, 2010, 28(2): 102-106.

[9] BERGMAN J G, MUNIZ M, SUTTON D, et al. Comparative trial of the canine parvovirus, canine distemper virus and canine adenovirus type 2 fractions of two commercially available modified live vaccines[J]. *Vet Rec*, 2006, 159(22): 733-736.

[10] HORVACH C M, PATERSON R G, SHAUGNESSY M A, et al. Biological activity of paramyxovirus fusion proteins: Factors influencing formation of syncytia[J]. *J Virol*, 1992, 66(7): 4564-4569.

[11] WILD T F, FAYOLLE I, BEAUVERGER P, et al. Measles virus fusion: role of the cysteine-rich region of the fusion glycoprotein[J]. *J Virol*, 1994, 68(11): 7546-7548.

[12] 苏凤艳, 魏吉祥, 王卓聪, 等. 犬瘟热病毒水貂株的分离与鉴定[J]. *东北林业大学学报*, 2010, 38(2): 79-82.

[13] VON MESSLING V, ZIMMER G, HERRLER G, et al. The hemagglutinin of canine distemper virus determines tropism and cytopathogenicity[J]. *J Virol*, 2001, 75(14): 6418-6427.

[14] MERZ D C, SCHEID A, CHOPPIN P W. Importance of antibodies to the fusion glycoproteins of paramyxoviruses in the prevention of spread of infection[J]. *J Exp Med*, 1980, 151(2): 275-288.

[15] GILLESPIE J H, TIMONCY J F. 家畜传染病[M]. 胡祥璧等译. 7 版. 北京: 农业出版社, 1998: 770-784.