

鸡传染性喉气管炎病毒 gB 基因的克隆及其在耻垢分枝杆菌中的表达

郑海洲¹ 杨 虹² 柏佳宁¹ 赵宝华^{1*}

(¹河北师范大学生命科学学院 石家庄 050016)

(²河北经贸大学生物工程系 石家庄 050061)

摘 要 以 ILTV 基因组为模板,利用 PCR 特异扩增出 gB 基因,定向克隆到中间质粒载体 pY- α ,构建了中间质粒 pY- α -gB。然后以中间质粒 pY- α -gB 为模板,扩增出含有人结核分枝杆菌启动子 hsp70 基因和堪萨斯分枝杆菌 α 信号肽基因的 hsp- α -gB 片段,回收补平后与穿梭表达载体 pRR3 平端连接,从而构建大肠杆菌-分枝杆菌穿梭表达质粒 pR- α -gB。再将其电转化至耻垢分枝杆菌 *M. smegmatis* mc² 155,ELISA 检测表明重组菌株 *M. smegmatis* mc² 155 (pR- α -gB) 的表达产物具有很好的反应原性。Western blot 检测说明 gB 基因在分枝杆菌中获得了表达并具有良好的免疫原性。鸡胚中和试验结果表明该重组菌株可以中和 1 个剂量 EID₅₀ 的 ILTV 强毒,能够保护 SPF 鸡胚抵抗强毒攻击。

关键词 聚合酶链式反应,克隆,表达,穿梭表达载体

中图分类号:Q939 文献标识码:A 文章编号:1001-6209(2004)06-0830-04

卡介苗(*Bacillus calmette-guerin*, BCG)是牛型分枝杆菌的减毒株,也是一种活的减毒性结核菌苗,具有低毒性、免疫力持久和对热稳定等特点,在全世界已经广泛用于预防结核病。目前,国内外科学家正致力于将 BCG 发展成为一种重组多价活疫苗,使它成为一种能携带多种外源免疫保护抗原的疫苗载体,不仅能预防结核病,同时也能预防其他感染性疾病,甚至具有抗肿瘤的活性^[1]。但是 BCG 生长缓慢,需 18 h 增殖一代,培养时间长,影响了人们对它的深入了解。耻垢分枝杆菌(*Mycobacterium smegmatis*)是一种生长相对较快、电转化效率较高的突变株,它是同 BCG 一样,也是一种非致病菌和强的细胞免疫佐剂,已经成为一种疫苗载体。

鸡传染性喉气管炎(ILT)是由传染性喉气管炎病毒(ILTV)引起的鸡的一种急性上呼吸道传染病,该病能导致鸡的死亡和产蛋率下降,是危害养禽业的重要疫病之一^[2]。ILT 发病与传播的明显特征是潜伏感染和毒力返强,在应激状态下激活并向体外排毒,引起复发。此病分布于世界各地,在我国的一些地区呈地方性流行。目前用于防制本病的弱毒疫苗普遍存在着毒力偏强、易于造成潜伏感染和病毒返祖等缺点,很难从根本上控制此病^[3],因此急需研制一种安全有效的新型疫苗。本研究构建的大肠杆菌-分枝杆菌穿梭表达质粒 pR- α -gB,拟在分枝杆菌表达 ILTV gB 蛋白基因,这样的活载体疫苗既能发挥卡介苗本身较强的细胞免疫佐剂作用,又能使表达的鸡传染性喉气管炎病毒 gB 蛋白发挥免疫保护作用,达到更好地预防鸡传染性喉气管炎的目的。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 菌株和质粒 病毒 ILTV 由本室在河北省某鸡场分离,经鉴定后暂定名为 HeB01,大肠杆菌(*Escherichia coli*) JM109 由本室保存,中间质粒 pY- α 、耻垢分枝杆菌 *M. smegmatis* mc² 155 由大连大学许崇波博士惠赠。

1.1.2 酶和试剂 λ -EcoT14 I digest Marker, dNTP, *Taq* DNA 聚合酶, T4 DNA 连接酶,限制性内切酶等购自 TaKaRa 公司,引物由 TaKaRa 公司合成, DNA 快速纯化/回收试剂盒购自北京鼎国生物技术有限责任公司,辣根过氧化物酶标记兔抗鸡 IgG 购自长春宝泰克生物科技公司。

1.1.3 实验动物和疫苗 SPF 鸡、SPF 鸡胚和鸡传染性喉气管炎活疫苗(SPF)由辽宁省益康生物制品厂提供。

1.2 ILTV gB 基因的扩增

以 ILTV 基因组为模板,引物 P1、P2 分别含有 *Nhe* I 酶切位点与 *Eco*R I 酶切位点。P1: 5'-CGGCTAGCATGGCTAGCTT-GAAAATGC-3', P2: 5'-GCGAATTCCTTATTCGCTTCGCTTTC-3'。扩增反应体系: P1, P2(均为 1.2mmol/L)各 1 μ L, 模板(1.4mmol/L)1 μ L, 10 \times Buffer 5 μ L, dNTP(25mmol/L)4 μ L, *LA Taq*(3U/L) 1 μ L, ddH₂O 37 μ L。反应条件: 94 $^{\circ}$ C 5min; 94 $^{\circ}$ C 1min 46 $^{\circ}$ C 1min 72 $^{\circ}$ C 2.5min 30个循环; 72 $^{\circ}$ C 10min。

1.3 重组中间质粒 pY- α -gB 的构建

参照文献[4]的方法进行。

1.4 hsp- α -gB 片段的扩增和序列分析

以重组质粒 pY- α -gB 为模板,引物 P3、P4 都含有 *Eco*RI 酶

基金项目 河北省自然科学基金资助项目(2004000154)

* 通讯作者: Tel 86-311-6268473; E-mail: zhaobaohua86178@sohu.com

作者简介: 郑海洲(1971-),男,河北省枣强县人,硕士研究生,主要研究方向为分子细菌学。E-mail: zhenghaizhou@eyou.com

收稿日期 2004-02-19, 修回日期 2004-04-18

切位点 ,P3 : 5'- CTGAATTCGAATTCGACCCGCACG-3' ,P4 : 5'- GCGAATTCCTATTCTCTTCGCTTTC-3'。反应体系 :模板 1 μ L , P3 1 μ L ,P4 1 μ L , 10 \times Buffer 5 μ L ,dNTP 4 μ L , LA Taq 1 μ L ,ddH₂O 37 μ L。反应条件 :94 $^{\circ}$ C 5min ;94 $^{\circ}$ C 1 min ,46 $^{\circ}$ C 1 min ,72 $^{\circ}$ C 3min 30 个循环 ;72 $^{\circ}$ C 10 min。回收 hsp- α -gB 片段与 pGEM-T vector 连接、转化、筛选重组子进行酶切鉴定和序列分析。

1.5 重组穿梭表达质粒 pR- α -gB 的构建

参照文献 [4] ,将回收的 hsp- α -gB 片段用限制性内切酶 *Eco*R I 消化 ,再经过补平、回收、*Sac* I 消化和去磷酸化等 ,与 pRR3 质粒连接 ,构建重组表达质粒 pR- α -gB。由于穿梭质粒载体 pRR3 为 Amp 和 Kan 双抗性 ,经限制性内切酶 *Sca* I 位点插入外源基因后破坏 Amp 抗性。所以筛选出 Kan 阳性菌落后 ,再用 Amp 筛选 ,Kan 阳性菌落而 Amp 为阴性者即为所需克隆。

1.6 耻垢分枝杆菌的培养和电穿孔转化

实验方法参照 [5] ,用苏通培养基 37 $^{\circ}$ C 培养耻垢分枝杆菌至对数生长期制备感受态细胞用于电转化。电转化条件 :电压 2.5kV ,电流 25mA ,电阻 200 Ω 。涂于含 25 μ g/mL 卡那霉素的苏通培养基平板上 ,37 $^{\circ}$ C 培养 3 ~ 4d 后筛选转化子。

1.7 表达产物 gB 糖蛋白的免疫学检测

参照文献 [4] ,用抗 ILTV 的鸡多克隆血清进行 ELISA 和 Western blot 分析。

1.8 重组菌株的鸡胚中和试验

参照文献 [6] ,将北京株 ILTV 病毒原液稀释至 1 个 EID₅₀ 单位 ,分装到 3 列无菌试管中 ,第 1 列加等量活疫苗免疫 SPF 鸡的血清 (阳性对照组) ,第 2 列加待检血清 (试验组) ,第 3 列加等量生理盐水免疫 SPF 鸡的血清 (阴性对照组) ,混合后 37 $^{\circ}$ C 放置 1 h ,各接种 11 日龄 SPF 鸡胚 10 枚 ,每胚绒毛尿囊膜接种 0.2 ml ,培养 5 d 解剖观察病变 ,鸡胚绒毛尿囊膜呈明显增厚 ,灰白色病斑 ,判为感染。

2 结果和分析

2.1 中间载体 pY-a 的酶切鉴定

重组质粒 pY- α 经 *Eco*R I 和 *Nco* I 酶切后得到约 150bp 片段 ,表明含有人结核分枝杆菌 HSP70 启动子基因核苷酸序列 ,经 *Nco* I 和 *Xba* I 酶切后得到约 130bp 片段 ,表明含有堪萨斯分枝杆菌 α 信号肽基因核苷酸序列。

2.2 ILTV gB 基因的 PCR 扩增和同源性分析

以 ILTV 基因组为模板 ,PCR 特异扩增出 gB 基因 ,琼脂糖凝胶电泳在 2.62kb 处可见一条清晰的 DNA 亮带 ,与预期大小一致。回收 PCR 扩增产物克隆到 pGEM-T vector 中 ,筛选出阳性重组子 pGEM-T-gB 进行序列测定 ,结果表明该片段为完整阅读框 (长度 2622bp) ,编码 873 个氨基酸 ,在 Gen-Bank 中申请的 gB 基因接受号为 AY427858。该基因与英国 Thorne V882 毒株、美国的 ILTV 632 毒株、澳大利亚 SA 2 毒株 gB 基因的核苷酸同源性分别为 98.9%、97.6% 和 98.4% ,氨基酸同源性分别为 99.8%、98.7% 和 98.5% ,表明 gB 基因是非常保守的。

2.3 重组中间质粒 pY- α -gB 的构建

回收 PCR 扩增的 gB 基因片段补平 ,用 *Nhe* I 单酶切后再回收 gB 基因片段 ,将其与经 *Xba* I 和 *Hinc* II 双切的 pY- α 载体连接、转化 ,提取质粒进行酶切鉴定 ,*Eco*R I 单酶切成单条带 ,*Nco* I 与 *Pst* I 均切下 1300bp 左右片段 ,表明获得了阳性重组质粒 pY- α -gB。

2.4 hsp- α -gB 目的片段的扩增和测序

以重组质粒 pY- α -gB 做模板 ,采用 PCR 扩增出 hsp- α -gB 基因片段 ,电泳后可见一约 2.9kb 的 DNA 条带 (图 1) ,与实验设计相符。回收扩增出的 hsp- α -gB 片段 ,将其与 pGEM-T vector 连接 ,得到重组质粒 pGEM-T-hsp- α -gB ,用 *Hind* III 切下 750bp 左右片段。重组质粒 pY- α -gB 的测序结果表明 hsp- α -gB 片段依次含有人结核分枝杆菌启动子 hsp70 基因、堪萨斯分枝杆菌 α 信号肽基因核苷酸序列和鸡传染性喉气管炎病毒的主要保护抗原 gB 基因核苷酸序列。

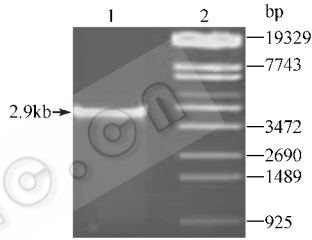


图 1 hsp- α -gB 目的片段的电泳图谱

Fig.1 Electrophoresis of PCR product of hsp- α -gB gene
1. hsp- α -gB gene (2.9kb) ; 2. λ -Eco T14 I digest marker.

2.5 间接 ELISA 检测表达产物与抗体的特异性反应

将诱导培养的重组分枝杆菌 *M. smegmatis* mc² 155 (pR- α -gB) 做包被抗原 ,同时做阳性对照和阴性对照 ,阳性对照是病毒 (ILTV 北京株) ,阴性对照为含空质粒 pRR3 的耻垢分枝杆菌 ,进行 ELISA 检测表达产物的抗原性 ,说明 gB 基因在分枝杆菌表达的重组蛋白具有很好的反应原性。

2.6 重组分枝杆菌表达产物的 Western blot 检测

用鸡传染性喉气管炎活疫苗制备高免血清做一抗 ,重组分枝杆菌 *M. smegmatis* mc² 155 (pR- α -gB) 表达产物与相应抗体进行 Western blot 分析 ,可以发现阴性对照菌体 *M. smegmatis* mc² (pRR3) 在 98kD 处未见有明显显色条带 ,而重组菌体在 98kD 处有明显特异性显色条带 (图 2) ,说明 gB 基因在分枝杆菌中获得了表达并具有良好的免疫原性。

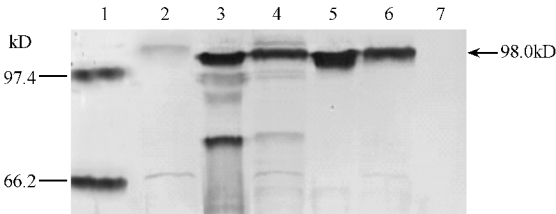


图 2 表达产物的 Western blot 分析

Fig.2 Analysis of expressed productins with Western blot
1. Low molecular weight protein markers ; 2. Control of pRR3 with SDS-PAGE ; 3 4. gB barboring pR- α -gB with SDS-PAGE ; 5 6. gB barboring pR- α -gB with Western blot ; 7. Control of pRR3 with Western blot
© 中国科学院微生物研究所期刊联合编辑部 http://journals.im.ac.cn

2.11 重组菌株的鸡胚中和试验结果

采用固定血清稀释病毒法检测重组菌株 *M. smegmatis* *mc*² 155(pR- α -gB)的保护效果 ,同时做阳性对照和阴性对照 (表 1)。结果表明用活疫苗免疫 SPF 鸡的血清能够完全中和

ILTV 接种的 10 枚鸡胚都没产生病变 ;用生理盐水免疫 SPF 鸡的血清不能将 ILTV 病毒中和 ,接种的 10 枚鸡胚全部产生病变 ,实验组仅 1 枚鸡胚产生病变。

表 1 重组菌株的鸡胚中和试验

Table 1 The neutralition of SPF chick embryo assay for the recombinant bacteria strain

Groups	Number of chick embryos	Observational time /d	Attacked embryos number/ suvived embryos number
Sera of vaccination with active vaccine	10	10	0/10
Sera of vaccination with normal saline	10	10	10/10
Sera of vaccination with recombinant bacteria strain	10	10	1/10

3 讨论

鸡传染性喉气管炎(ILT)是由 ILTV 引起一种鸡的急性上呼吸道感染病 ,是危害养禽业的重要疫病之一。ILTV 属于 α 疱疹病毒亚科成员 ,具有潜伏感染的特性。目前用于防制本病的弱毒疫苗存在毒力偏强、易于返祖、潜伏感染等不足。有可能会造成病毒的终生潜伏 ,偶尔活化和散毒 ,从而使 ILT 的完全控制成为养禽业的一大难题。因此 ,研究安全有效的基因工程疫苗是预防 ILT 的发展趋势。ILTV 的 gB 基因编码 205kD 的糖蛋白 ,糖蛋白 gB 能诱导体液免疫和细胞免疫 ,由 ILTV 糖蛋白 gB 制备的亚单位疫苗能保护鸡 100% 抵抗临床发病和 83% 抑制强毒复制 ,是该病毒的主要保护性抗原基因。因此研制 ILTV 的基因工程疫苗具有广阔的市场前景和应用价值。

分枝杆菌作为疫苗载体有一定的优势 ,如 :生产工艺简单、不需纯化及后期处理 ,性能稳定易保存 ;同时它还是一种很好的免疫佐剂。外源基因在分枝杆菌中的有效表达是基因工程分枝杆菌多价疫苗发挥作用的基础。Stover 等^[7]发现破伤风毒素 (α Tox C)在 BCG 中的表达量低 ,不能激发机体产生免疫保护反应 ,可见提高外源基因在分枝杆菌的表达效率是制约分枝杆菌的因素之一。我们用人结核分枝杆菌 HSP70 启动子来控制 ILTV gB 基因在分枝杆菌中的表达 ,HSP70 启动子在加热或过氧化物等应激条件下被活化 ,属于高效启动子 ,增加载体在分枝杆菌中的稳定性 ,减少外源蛋白表达对宿主细胞生长产生的影响以及减少宿主细胞蛋白酶对所表达蛋白的降解作用 ,使得通过穿梭载体表达外源基因更方便和容易。程继忠等^[8]利用 HSP70 启动子在耻垢分枝杆菌表达了日本血吸虫 26kD 抗原(Sj26GST)基因 ,程继忠等^[9]还利用 HSP70 启动子在 BCG 中表达了日本血吸虫中国大陆株谷胱甘肽 S-转移酶(GST)抗原基因。我们还用堪萨斯分枝杆菌 α 抗原信号肽来引导外源基因的分泌表达 ,从而有利于抗原递呈细胞的吞噬与处理 ,更有效地刺激机体产生针对外来抗原的保护性免疫反应。

本研究构建的重组菌株 *M. smegmatis* *mc*² 155(pR- α -gB)

在安全性方面比弱毒疫苗优越 ,不形成潜伏感染 ,不会散毒。因此本实验研究的工程菌 *M. smegmatis* *mc*² 155(pR- α -gB)将有望取代现用的 ILTV 弱毒疫苗 ,从而改变 ILT 防制现状。

参 考 文 献

[1] Fu jim oto T , O 'Donnell M A. Bacillus Calmette-Guerin plus interleukin-2 and/or granulocyte/macrophage-colony-stimulating factor enhances immunocompetent cell production of interferon- γ , which inhibits B16F10 melanoma cell growth *in vitro* . *Cancer Immunol Immunother* ,1996 ,**42** :280.

[2] Calnel B M. Laryngotracheitis. Disease of Poultry. 10th ed , Ames , Iowa , USA : Iowa State University press ,1997.

[3] 张绍杰 ,倪健强 ,孟松树 ,等. 鸡传染性喉气管炎病毒(ILTV)王岗株糖蛋白 gB 基因在重组杆状病毒的表达. 中国预防兽医学报 2001 **23**(5) 321 - 324.

[4] Sambrook J , Fritsch E F , Maniatis T. 分子克隆实验指南. 金冬雁 ,黎孟枫 ,等译. 第二版. 北京 :科学出版社 ,1993.

[5] Cirillo J D , Weisbrod T R , Jacobs W R. Efficient electro-transformation of mycobacterium smegmatis. BioRad Laboratories.

[6] 中华人民共和国农业部兽用生物制品规程委员会编. 中华人民共和国兽用生物制品规程. 北京 :化学工业出版社 ,2000.

[7] Stover C K , Bansak G P , Hanson M S. Towards a strategy based on our understanding of BCG failure. *Vaccine* ,2002 **21** :7 - 14.

[8] 程继忠 ,皇甫永穆 ,海 涛 ,等. HSP70 基因上游调控序列对 GST 基因在耻垢分枝杆菌中表达效率的影响. 微生物学报 ,1999 ,**39**(2) :100 - 107.

[9] 程继忠 ,郑 波 ,海 涛 ,等. 大肠杆菌-分枝杆菌穿梭表达质粒 pBCG2100 的构建及应用. 生物工程学报 ,1999 ,**15**(2) :225 - 229.

Cloning and Expression of gB Gene of Infectious Laryngotracheitis Virus in *M. Smegmatis*

ZHENG Hai-Zhou¹ YANG Hong² BAI Jia-Ning¹ ZHAO Bao-Hua^{1*}
(¹ College of Life Science , Hebei Normal University , Shijiazhuang 050016 ,China)
(² Biotechnology Department , Hebei Economic and Trade University , Shijiazhuang 050016 ,China)

Abstract : Firstly , the complete gB gene of a domestic isolation stain were amplified by PCR , and the 2.6 kb gene fragment was obtained. Then the recombinant plasmid pY-α-gB was constructed by cloning PCR product into pY-α vector , and the shuttle expression plasmid pR-α-gB was constructed by cloning the hsp-α-gB gene into the downstream sequences of pRR3 vector. The recombinant plasmid was identified by restriction enzyme digestion and the sequence analysis , which was electrophoreted into *M. smegmatis* mc2 155. At last , the expressed gB proteins were successfully detected by ELISA and Western blot , which seems to be immunogenic crucially. The recombinant bacterial stain *M. smegmatis* mc² 155(pR-α-gB)could protect SPF chick embryo from one lethal dose of ILTV.

Key words : Polymerase chain reaction , Cloning , Expression , The shuttle expression vector

Foundation item : Natural Science Foundation of Hebei Province(2004000154)
* Corresponding author. Tel :86-311-6268473 ; E-mail :zhaobaohua86178@sohu.com
Received date :02-19-2004

2003 ~ 2004 年《微生物学报》审稿专家名单
按姓名汉语拼音排序

以下专家在 2003 年(全年)和 2004 年(部分)为本刊审阅过稿件 ,在此谨向您表示衷心地感谢 ! 为编辑部审阅稿件给专家们增加了额外的工作量 ,但是本着对作者、读者和期刊负责的原则 ,审稿又是一件非常重要的事情。为了扩大学术影响、促进微生物学科的发展 ,同时也为了提高《微生物学报》的质量 ,本刊编辑部希望您今后能够继续给予支持。

白逢彦	鲍时翔	蔡文启	蔡永峰	曹竹安	陈冠军	陈洪章	陈剑平	陈民钧	陈润生	陈三凤	陈文新	程光胜
程元荣	储 炬	丁 鉴	丁久元	丁明孝	丁清泉	东秀珠	董志扬	方 勤	方维焕	冯德荣	高培基	高 松
葛 诚	耿运琪	弓明钦	龚建华	龚祖坝	郭三堆	郭志儒	何朝族	何秀良	何忠效	赫荣乔	洪 健	胡丰林
胡福泉	胡学智	胡远扬	还连栋	黄 力	黄大昉	黄年来	黄秀梨	黄耀煌	黄耀玉	吉鑫松	焦瑞身	焦新安
江 宁	姜道宏	姜文侠	蒋立科	荆玉祥	阚 飙	柯家骏	孔宪刚	雷肇祖	黎高翔	李 元	李电东	李卓棣
李季伦	李琦涵	李若瑜	李士东	李永泉	李育阳	李越中	李祖义	梁 龙	梁宗琦	廖延雄	林 敏	刘华珍
刘会洲	刘如林	刘双江	刘湘涛	刘杏忠	刘秀梵	刘志敏	刘志培	娄无忌	陆 健	陆承平	陆德如	吕国忠
罗信昌	马德钦	马清钧	马贤凯	马延和	闵 航	倪汉文	潘兹书	钱世钧	钱新民	邱并生	曲音波	茹炳根
阮继生	邵宗泽	沈 萍	盛 军	施巧琴	苏国富	孙 明	孙君社	孙万儒	孙忠富	谭华荣	唐 宏	唐国敏
唐亚林	陶天申	田杰生	王 东	王敖全	王惠莲	王慧敏	王金生	王守一	王锡锋	王修垣	王以光	王用楫
王有智	王在时	王正祥	文华安	吴 润	吴加全	吴克刚	吴庆余	夏春谷	夏桂先	向 华	肖 天	谢 红
刑建民	徐 冲	徐冠珠	徐建国	许建和	严 杰	杨海花	杨汉春	杨怀文	杨建民	杨 婉	杨苏声	杨希才
杨秀山	杨蕴刘	姚 斌	于嘉林	喻子牛	袁 生	袁勤生	袁正宏	袁志明	袁中一	张 杰	张 正	张博润
张楚瑜	张惠展	张建中	张曼夫	张小青	张渝英	张兆山	章克昌	赵立平	赵乃昕	赵小凡	郑天凌	周俊初
周培瑾	周雪平	周宇光	朱 军	朱 祯	朱宝泉	朱关福	朱厚础	朱庆裴	朱圣庭	朱伟云	朱玉贤	诸葛健
庄文颖	庄玉辉											