

伪狂犬病病毒鄂 A 株包膜糖蛋白 gD 基因的克隆与表达^{*}

陈新华¹ 杨 林¹ 洪文洲² 陈焕春² 陈曲侯³ 龙繁新¹ 王珣章¹

(¹ 中山大学生物防治国家重点实验室 生物医药中心 广州 510275)

(² 华中农业大学畜牧兽医学院 武汉 430070)(³ 华中师范大学昆虫学研究所 武汉 430079)

摘 要:克隆了伪狂犬病病毒鄂 A 株编码包膜糖蛋白 gD 的基因并进行了序列测定,与国外报道的 Rice 株相比,其核苷酸序列具有 98% 的同源性,推导氨基酸序列同源性为 97%。将此基因克隆于具有全期启动子盒的杆状病毒转移载体 pSX35A 中,构建成重组转移质粒 pSX35A-gD,与致死缺失型线性化苜蓿丫纹夜蛾核型多角体病毒(AcMNPV-OCC⁻)基因组 DNA 一起共转染粉纹夜蛾 Hi5 细胞,经同源重组,获得含 gD 基因的重组病毒 AcMNPV-OCC⁺-gD。重组病毒经空斑纯化后感染 Hi5 细胞进行表达分析,细胞裂解物的 SDS-PAGE 及 Western-Blotting 均显示分子量约 47kD 的 gD 蛋白得到了特异性表达,其表达量占细胞总蛋白的 6.2%,表达的 gD 蛋白具有免疫原性。

关键词:伪狂犬病病毒, gD 基因, 杆状病毒表达系统

中图分类号:Q 939.4 **文献标识码:**A **文章编号:**0001-6209 (2001) 03-0329-05

伪狂犬病是由伪狂犬病病毒(pseudorabies virus, PRV)引起的多种家畜及野生动物的急性传染病。该病对仔猪的致死率可高达 100%,成年猪可产生呼吸系统感染症、康复猪可潜伏感染、终生带毒等,给全球畜牧业尤其是养猪业造成了巨大的经济损失。疫苗接种是防治乃消灭伪狂犬病的重要手段,但目前常用的弱毒苗、灭活苗普遍存在散毒、毒力返强、潜伏感染等问题及不足^[1],因此,研制安全有效的 PRV 基因工程疫苗成为当前的研究热点之一。

PRV 属疱疹病毒科 α 病毒亚科,其基因组为线状双链 DNA,大小约 150kb, G + C 含量约为 72%,编码 70 ~ 100 种蛋白。截至目前,已对 PRV 编码的 11 种糖蛋白进行了基因定位及功能研究,其中 gC、gE、gG、gI、gM、gN 是病毒复制非必需的;gB、gD、gH、gK 等是病毒复制必需的。gD 蛋白位于 PRV 的囊膜上,参与病毒的吸附和穿透过程,同时也是一种重要的免疫原性蛋白,能诱导机体产生中和抗体,抵抗 PRV 强毒株对小鼠和猪的攻击^[2,3]。因此,gD 被认为是 PRV 亚单位疫苗的首选抗原蛋白。本文根据 PRV Rice 株 gD 基因的序列设计合成了一对引物^[4],以 PRV 鄂 A 株基因组 DNA 为模板,运用 PCR 技术扩增了完整的 gD 基因,并利用具全期启动子盒的杆状病毒表达载体 pSX35A 成功地在昆虫细胞中进行了表达,为下一步研制 PRV 基因工程亚单位疫苗打下了基础。

1 材料和方法

1.1 病毒株、细胞株、载体

致死缺失型线性化 AcMNPV-OCC⁻ 病毒 DNA 购自 PharMingen 公司;PRV-鄂 A 株为华

^{*} 本文获国家自然科学基金(3967055)和瑞典青年基金(IFS:B/2987-1)资助

作者简介:陈新华(1968-),男,湖北省黄陂县人,博士研究生,主要从事微生物及分子生物学研究。

收稿日期:2000-08-17,修回日期:2000-11-04

中农业大学动物病毒室分离的强毒株^[5];重组毒株 TnNPV-SVI⁻G 由本室构建保存。

PK-15 细胞由华中农业大学动物病毒室提供;粉纹夜蛾 Hi5 细胞由本室保存。

载体 pBluescript II KS⁻ 购于 STRATAGENE 公司;具全期启动子盒的杆状病毒转移载体 pSX35A 由本室构建保存。

1.2 工具酶与试剂

限制性内切酶, TaqDNA 聚合酶, T4DNA 连接酶, 细胞培养基, 脂质体, DNA 凝胶回收试剂盒, 印迹膜分别购自华美生物工程公司、大连宝生物工程公司、GIBCO-BRL、PRO-MEGA、QIAGEN 公司;猪抗 PRV 抗血清, HRP 标记鼠抗猪 IgG 抗体均由华中农业大学动物病毒室提供。

1.3 模板 DNA 的制备

病毒扩增与模板 DNA 的制备参照文献[1]进行。

1.4 引物设计与 PCR 扩增

参照 Erik 等人发表的 PRV Rice 株 gD 基因序列^[4], 设计合成了一对引物, 其核苷酸序列如下:

P1: 5' TTTGCATCCATGCTGCTCGCAGCGCTATTGGCG 3' 引入 *Bam*HI 位点;

P2: 5' TTTGAATTCCATCATCGACGCCGGTACTGCCGA 3' 引入 *Eco*RI 位点。

反应程序: 96℃ 预变性 3min, 然后按 95℃ 1min, 60℃ 1min, 72℃ 1.5min 进行 30 个循环, 最后 72℃ 延伸 10min。扩增产物经 0.8% 琼脂糖凝胶电泳检测, QIAGEN DNA 凝胶回收 Kit 回收目的 DNA。

1.5 测序质粒的构建与序列测定

PCR 回收产物经 *Bam*HI/*Eco*RI 双酶切后, 插入质粒 pBluescript II KS⁻ 的 *Bam*HI/*Eco*RI 切口, 构建得到测序质粒 pBluescript II KS⁻-gD。再利用 ABI 自动测序仪进行序列测定, 结果用 DNASIS 和 PROSIS 软件进行分析。

1.6 重组转移载体的构建

用 *Bam*HI/*Eco*RV 从 pBluescript II KS⁻-gD 切下 gD 基因, 将其插入转移载体 pSX35A 的 *Bgl*II, *Sma*I 位点之间, 构建成重组转移载体 pSX35A-gD。具体操作参照文献[6]。

1.7 重组杆状病毒的构建与纯化

采用脂质体介导法构建重组杆状病毒, 具体操作按 GIBCO-BRL 公司 CellFECTIN 产品说明书进行。重组病毒的空斑纯化参照文献[7]。

1.8 gD 基因的表达及检测

用重组病毒 AcNPV-OCC⁺-gD 感染粉纹夜蛾 Hi5 细胞, 27℃ 培养 72h 后, 收集细胞进行细胞总蛋白 SDS-PAGE, 然后用猪抗 PRV 抗血清进行 Western-blotting, 具体操作参照文献[6]略加修改。

2 结果

2.1 gD 基因的扩增与序列测定

以 PRV 鄂 A 株基因组 DNA 为模板, 运用 PCR 技术对 gD 基因进行了特异性扩增, 得到一条约 1240bp 的扩增片段, 与预计相符。对测序质粒 pBluescript II KS⁻-gD 进行序列测

定结果表明,扩增的 gD 基因长 1239bp,包括了完整的 gD 基因编码区序列。

2.2 重组转移载体 pSX35A-gD 的构建

重组转移载体 pSX35A-gD 的构建路线如图 1 所示,其中 pSX35A 多克隆位点上游依次为人工合成启动子 *Psyn*、经修饰的多角体基因启动子 *Pvix*、杆状病毒早期基因 *p35* 启动子 *Pp35*,由它们组成全期启动子盒,共同控制着外源基因的表达。在启动子盒的上游反向插

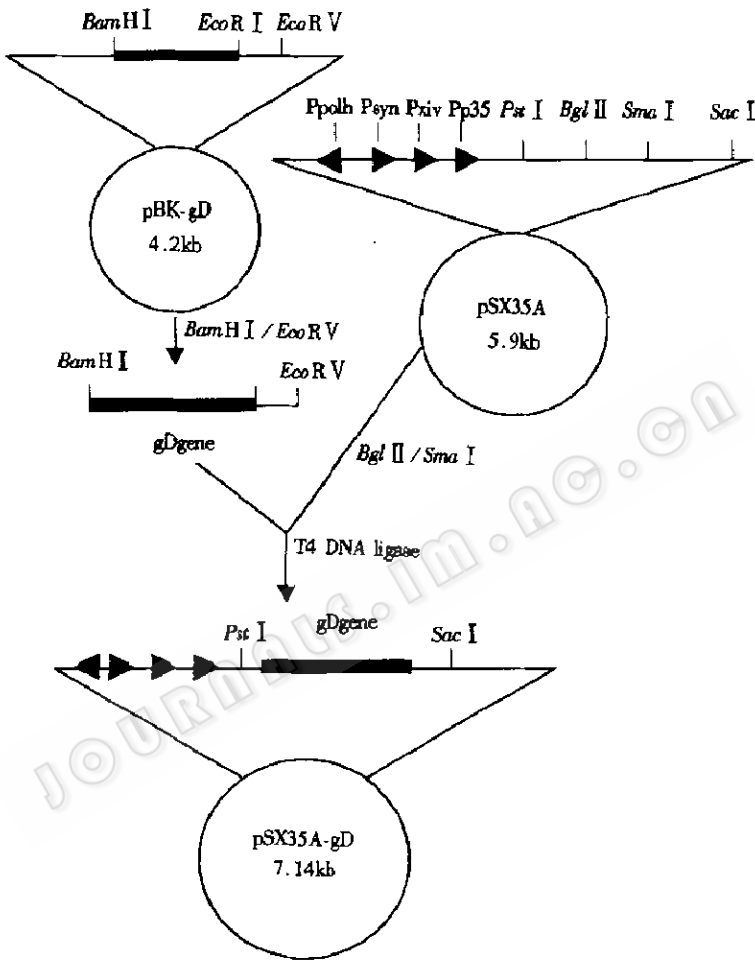


图 1 重组转移载体 pSX35A-gD 的构建

Fig.1 Construction of recombinant transfer vector pSX35A-gD

入了一个多角体基因表达盒,使得到的重组病毒能形成多角体。用 *Bam*HI/*Eco*RV 从 *p*Bluescript II *KS*⁻-gD 中切下 gD 基因,克隆于 pSX35A 的 *Bgl*II, *Sma*I 位点之间,得到重组转移载体 pSX35A-gD,经 *Pst*I/*Sac*I 酶切鉴定其插入的正确性,如图 2 所示。

2.3 重组病毒 AcNPV-OCC⁺-gD 的构建及纯化

将重组转移载体 pSX35A-gD 与致死缺失型线性化 AcMNPV-OCC⁻ DNA 经脂质体介导共转染 Hi5 细胞,96h 后细胞出现明显病变,核内有大量多角体产生,即收获共转染上清进行空斑纯化,经第一轮空斑筛选后、挑取数株表观性状为 OCC⁺,Blue⁻ 的重组毒株进行特异性 PCR 扩增,随机选取 PCR 产物符合预期大小的重组毒株进行表达情况分析。

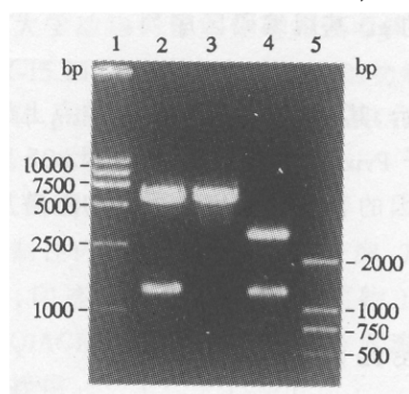


图 2 pSX35A-gD 的酶切鉴定

Fig.2 Characterization of pSX35A-gD by *Pst*I/*Sac*I digestion

1. DL-15000bp marker; 2. pSX35A-gD digested by *Pst*I/*Sac*I;
3. pSX35A digested by *Pst*I/*Sac*I; 4. pBluescript II KS⁻-gD digested by *Bam*HI/*Eco*RV; 5. DL-2000bp marker.

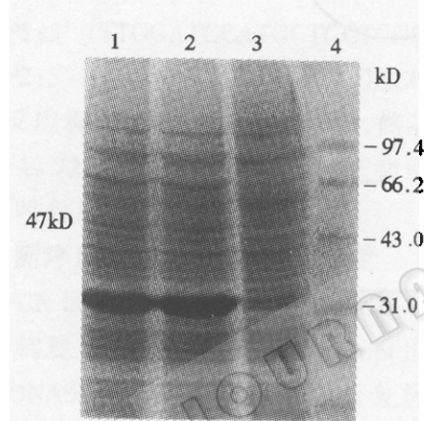


图 3 感染细胞总蛋白的 SDS-PAGE 分析

Fig.3 SDS-PAGE analysis of the total cellular proteins of Hi5 cells 72h postinfection

- 1, 2. Hi5 cells infected with AcMNPV-OCC⁺-gD;
3. Hi5 cells infected with TnNPV-SVI⁻ G;
4. Mid-range protein molecular weight marker.

2.4 gD 基因在 Hi5 细胞中的表达与检测

将 MOI 为 8 的重组病毒感染对数生长期的 Hi5 细胞, 27℃ 培养 72h 后, 收集细胞进行 SDS-PAGE, 结果显示感染了重组毒株的细胞特异地表达了分子量约 47kD 的蛋白, 如图 3。Western-blotting 结果表明该表达产物为预期的 gD 蛋白, 如图 4 所示。薄层凝胶扫描结果显示表达蛋白占细胞总蛋白量的 6.2%。而亲本毒株 TnNPV-SVI⁻ G 感染的 Hi5 细胞没有检测到 gD 的表达。

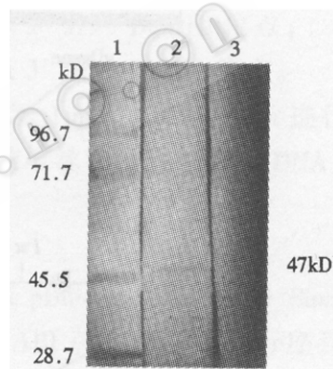


图 4 gD 蛋白的 Western-blotting 分析

Fig.4 Western-blotting analysis of glycoprotein gD expressed in Hi5

1. Protein molecular weight marker;
2. Hi5 cells infected with AcMNPV-OCC⁺-gD;
3. Hi5 cells infected with TnNPV-SVI⁻ G.

3 讨论

在目前已发现的 11 种 PRV 糖蛋白中, gD 是一种主要的免疫原性蛋白, 它不仅能诱导较强的体液免疫, 而且还能激发细胞免疫反应^[8]。因此, 以 gD 基因作为目标基因发展 PRV 基因工程亚单位疫苗和 DNA 疫苗, 具有令人鼓舞的应用前景。

本文运用 PCR 技术扩增并克隆了 PRV 鄂 A 株 gD 基因。序列测定结果表明, 所测 gD 基因长 1239bp (另文发表) 编码一个由 405 个氨基酸组成的多肽。利用具全期启动子盒的杆状病毒载体 pSX35A 在 Hi5 细胞中成功表达了 gD 基因。SDS-PAGE 及 Western-Blotting

结果表明,感染了重组病毒 AcMNPV-OCC⁺-gD 的 Hi5 细胞特异性地表达了 gD 蛋白,分子量约 47kD,与预计相符。表达的 gD 蛋白具有反应原性,其产量占细胞总蛋白的 6.2%。

本实验选用具全期启动子盒的杆状病毒载体 pSX35A,目的是将 gD 基因置于三个串联的早晚期启动子的控制下,使 gD 基因能够从感染早期开始持续表达,以提高其表达水平。同时,由于所得到的重组病毒可形成多角体,易于进行重组毒株的筛选与虫体感染。为利用昆虫进行大规模生产提供了一条有效途径。本文对我国 PRV 地方毒株鄂 A 株 gD 基因的克隆及其在昆虫细胞中的表达,为下一步开展与 gD 有关的基因免疫工作及研制 PRV 基因工程亚单位疫苗奠定了基础。

参 考 文 献

- [1] 白新盛,卢景良主编. 畜禽重大疫病生物技术防制研究. 北京:中国农业科技出版社,1998. 5.
- [2] Riviere M, Tartaglia J, Perkus M E, et al. *J Virol*, 1992, **66**:3424 ~ 34.
- [3] Eloit M, Fargeaud D L, Haridon R, et al. *Arch Virol*, 1988, **99**:45 ~ 56.
- [4] Erik A P, James G T, Marty A, et al. *J Virol*, 1986, **59**:216 ~ 223.
- [5] 陈焕春,方六荣,何启盖,等. 畜牧兽医学报,1998, **29**(2):156 ~ 161.
- [6] J 萨母布鲁克, E F 费里奇, T 曼尼阿蒂斯著. 金冬雁等译. 《分子克隆》实验指南. 第二版. 北京:科学出版社,1992.
- [7] Fraser M J. *J Tissue Methods*, 1982, **7**:43 ~ 45.
- [8] Haagmans B L, eugene M A. Van Rooij, Mark Dubelaar, et al. *Vaccine*, 1999, **17**:1264 ~ 1271.

CLONING AND EXPRESSION OF THE ENVELOPE GLYCOPROTEIN gD GENE OF PSEUDORABIES VIRUS EA STRAIN*

Chen Xinhua¹ Yang Lin¹ Hong Wenzhou² Chen Huanchun²

Chen Quhou³ Long Qingxin² Wang Xunzhang¹

(¹ State Key Lab for Biocontrol, Zhongshan University, Guangzhou 510275, China)

(² Veterinary College, Central-China Agricultural University, Wuhan 430070, China)

(³ Institute of Entomology, Central-China Normal University, Wuhan 430079, China)

Abstract: The envelope glycoprotein gD gene of pseudorabies virus Ea strain was cloned via PCR technique. Sequence analysis displayed 98% nucleotide sequence homology and 97% deduced amino acid sequence homology between our cloned gD gene and PRV Rice strain gD gene. The recombinant transfer plasmid pSX35A-gD was obtained by inserting D gene into the baculovirus transfer vector pSX35A with whole-phase promoter cassette, then transfected insect cell Hi5 with linearized AcMNPV-OCC⁻ virus DNA, and formed recombinant baculoviruses AcMNPV-OCC⁺-gD by homologous recombination in insect cell. Recombinant baculoviruses infected insect cell Hi5 after being purified by plaque assay. Both SDS-PAGE and Western-blotting showed glycoprotein gD with a molecular weight of about 47kD was expressed specifically, product was about 6.2% of total cellular protein, and expressed gD was of immunogenicity.

Key words: Pseudorabies virus, gD gene, Baculovirus expression system

* Project Granted by Chinese National Science fund (3967055)