

利用 Cre-loxP 自动敲除 H5 亚型禽流感病毒血凝素 重组鸡痘病毒中的报告基因

高月花¹, 王莉莉², 黄 兵², 宋敏训², 崔言顺^{1*}

(¹ 山东农业大学动物科技学院 泰安 271018)

(² 山东省农业科学院家禽研究所 济南 250023)

摘 要 研究去除重组鸡痘病毒中的报告基因, 构建一株只含目的基因的重组毒。将 H5 亚型 AIV 的 HA 基因作为靶基因, 两侧含 loxP 序列的 GFP 表达盒插入鸡痘病毒重组臂基因构建了转移质粒载体, 将其与脂质体混合转染 CEF 细胞, 获得了表达 H5 和 GFP 的鸡痘病毒重组体。通过二次转染, 利用 Cre 酶自动敲除重组病毒中的 GFP 基因, 最终获得了只含 H5 血凝素基因表达盒的重组鸡痘病毒。免疫荧光和病毒滴度测定结果表明, 经过连续传代后重组病毒仍然稳定复制并表达 H5 血凝素。用 10⁵ PFU 和 2 × 10⁵ PFU rFPV H5 免疫 SPF 鸡, 28d 后, 免疫组鸡抗体平均滴度(HI)分别达到 4log₂ 和 4.5log₂。结果表明, H5HA 基因重组病毒能刺激鸡群产生较高特异抗体。

关键词: 鸡痘病毒; 禽流感病毒; H5 血凝素; 重组; Cre-loxP

中图分类号: Q78, S852.65 文献标识码: A 文章编号: 0001-6209(2007)03-0537-03

禽流感(avian influenza, AI)是由正粘病毒科 A 型流感病毒引起的禽类的传染病, 高致病力禽流感病毒的感染可导致鸡群 75% ~ 100% 的死亡率^[1]。禽流感病毒(avian influenza virus, AIV)变异频繁, 血清亚型众多, 其中 H5 亚型危害严重, 而血凝素(HA)是主要免疫原, 已有表达 HA 的基因工程疫苗的研究报告, 但在以往构建的含 H5 血凝素基因的重组鸡痘病毒中往往含有 lacZ 等报告基因, 不符合商业疫苗生物安全的要求, 因此, 将重组体中的报告基因去除是构建重组毒非常重要的内容。

Cre 重组酶首先被发现于 P1 噬菌体, 编码 38kDa 蛋白, 它能识别 34bp 部分回文的 loxP 序列, 并通过分子间重组将相同方向的两个 loxP 序列间的核苷酸序列有效切除^[2]。Cre-loxP 位点依赖的重组发生在表达 Cre 重组酶的组织类型中, 导致靶基因被去除, 而其他组织或细胞中由于 Cre 表达, 靶基因仍然有功能^[3,4]。近年来国外的研究报告表明, 基于 Cre-loxP 系统的遗传操作还广泛应用于精细突变的引入、染色体大片的删除与重排以及时空上可调节的基因打靶等研究领域^[5]。实验首先构建以绿色荧光蛋白作为标记系统的鸡痘病毒通用载体, 用 Cre-loxP 系统自动去除重组病毒基因组中的 GFP 报告基因, 极大方便了目的基因重组鸡痘病毒的构建, 以达到重组毒符合基因工程疫苗种毒标准的目的。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 病毒及实验动物: 鸡痘病毒(Fowlpox, FPV)282E4 株,

SPF 鸡胚和 SPF 鸡由山东省农科院家禽研究所提供。

1.1.2 质粒与菌种: 质粒 pH308(含 AIV H5 HA)质粒 px03(含痘病毒的早晚期复合启动子的 GFP 表达盒) pCre(含 Cre 重组酶基因) 宿主菌 DH5α 均为山东省家禽研究所重点试验室保存。pMD18-T vector 购自宝生物工程(大连)有限公司。质粒 pHBP 由自己构建, 将 px04 质粒的 loxP-GFP-loxP 序列插入含鸡痘病毒非必需区片段的 pPC1 质粒中(质粒 px04、pPC1 均为山东省家禽研究所重点试验室保存)。

1.1.3 工具酶与试剂: Lipofectamine™ 2000 脂质体购自 Invitrogen 公司。DMEM 培养基为 GIBICO BRL 公司产品。胰酶为 SIGEMA 公司产品。FITC 标记羊抗鼠 IgG 为美国 SIGEMA 公司产品。鼠抗 H5 亚型 AIV 血凝素单克隆抗体为本室研制保存。其它试剂均为国产或进口分析纯。

1.2 重组毒的构建

根据 AIV 的血凝素神经氨酸酶基因设计引物, 正链引物(mx01)为 5'-CTCTGCTAGCGCCACCATGGAGAAAACAGTGCT-3', 负链引物(mx02)为 5'-GAACGGATCCATTTAAATGCAAA TTCTGCA-3'。扩增片段全长 1735bp。以 pH308 为模板进行 PCR。将扩增产物用 Nhe I/BamH I 双酶切, 连入 px03 的 Nhe I/BamH I 双酶切回收大片段, 即获得了含痘病毒复合启动子和 SV40 PolyA 尾的 HA 基因表达盒质粒 pAIH5。将 pAIH5 用 Mlu I/Vsp I 双酶切回收补平后, 连入 pHBP 的 Spe I 酶切位点, 转化细菌获得转移质粒载体 pPH5。

按碱裂解法提取质粒和聚乙二醇(PEG)沉淀法纯化 DNA。按脂质体说明书转染已感染 FPV 的 CEF 单层细胞。

基金项目: 山东省科技攻关项目(022020103)

* 通讯作者。Tel 86-538-8241103 E-mail yscui@sdau.edu.cn

作者简介: 高月花(1974-), 女, 山东日照人, 硕士研究生, 主要从事动物检疫与禽病防治研究。E-mail zwh143@163.com

其他作者: 李建亮¹

收稿日期: 2006-05-08 接受日期: 2006-05-25 修回日期: 2007-03-02

将有绿色荧光的蚀斑取出,梯度稀释后接种到新的 96 孔板细胞上,如此重复 5~6 次。将带有荧光的病毒液提取 DNA,通过 PCR 鉴定纯度。检测引物序列正链为 5'-CCGTTG TTGTTAGCGGGATTTA-3',负链为 5'-TCGATCGGGTGGATTCCA-3',扩增产物大小为 171bp。将获得的重组病毒命名为 rFPVGFPH5。

从 rFPVGFPH5 接种 CEF 细胞毒液中提取病毒 DNA,用 pCre 质粒按脂质体说明书在脂质体介导下转染已感染 rFPVGFPH5 的 CEF 单层细胞。通过梯度稀释筛选不含荧光的细胞毒,如此重复 3~4 次。将获得的重组病毒命名为 rFPVH5。

1.3 重组病毒的 PCR 鉴定

收集重组病毒感染的 CEF,SDS-蛋白酶 K 法提取基因组 DNA,用 HA 扩增引物(nx01/nx02)和禽痘病毒同源重组臂引物(pg3/pg4)进行 PCR。pg3 5'-TAGAACTCATACTCGTTACTG-3',pg4 5'-CGATGAAGATATGTCTATACAC-3'。扩增产物长度为 2350bp。

1.4 表达产物的测定

通过免疫荧光检测表达产物。在 96 孔板上制备 CEF 细胞,接种重组痘病毒 rFPVH5,设空白对照和 FPV 亲本毒接种细胞对照。在 37°C 5% 的 CO₂ 培养箱中培养 24~48h;弃去维持液,用 PBS 洗涤细胞;加入预冷的丙酮-乙醇(体积比 3:2)20min;用 PBS 洗 2 次,室温干燥后加入 100 μ L 鼠抗 AIV H5 血凝素单克隆抗体(0.08log₂ HI 滴度),在湿盒内 37°C 温育 30min;用 PBS 洗 3 次,在纸巾上倒置使细胞板变干,加入 5% BSA 封闭 1h;用 PBS 洗 1 次,加入 100 μ L FITC 标记羊抗鼠 IgG (1:10),在湿盒内 37°C 温育 30min;用 PBS 洗 3 次,干燥后加入 100 μ L 1% 甘油-PBS 溶液,于荧光显微镜下观察。

1.5 重组病毒的稳定性

将纯化的重组病毒和亲本毒分别以 100 倍稀释,接种量为 0.1mL/孔,在 96 孔 CEF 细胞板上连续传 6 代后,测定蚀斑大小、病毒滴度及检测重组病毒基因组中是否存在目的基因。

1.6 实验动物免疫及 HI 抗体检测

将 7 日龄 SPF 鸡随机分为 4 组,每组 10 只,实验组分别经翅下刺种接种 10⁵ PFU 和 2 \times 10⁵ PFU 的重组病毒疫苗,对照组接种灭菌生理盐水和禽痘病毒疫苗。分别于免疫后一周、二周、三周、四周测定 H5 血凝素的 HI 抗体。

2 结果

2.1 重组病毒的构建

将转移质粒载体 pPH5 转染感染鸡痘病毒的 CEF 细胞,在转染后 12h 即可见转染细胞呈特异性荧光着色。4d 后将细胞毒接种到 96 孔板,挑选带有绿色荧光的细胞毒,再次接种 CEF 细胞,这样连续在 CEF 细胞上传代克隆,经 PCR 鉴定获得纯化的重组病毒,命名为 rFPVGFPH5。经过二次转染,在 Cre 酶作用下,重组病毒基因组中的 GFP 基因被去除。rFPVH5 重组病毒的构建模式图见图 1 所示。PCR 扩增测序分析表明,rFPVH5 基因组中只含 AIVH5 血凝素基因序列。

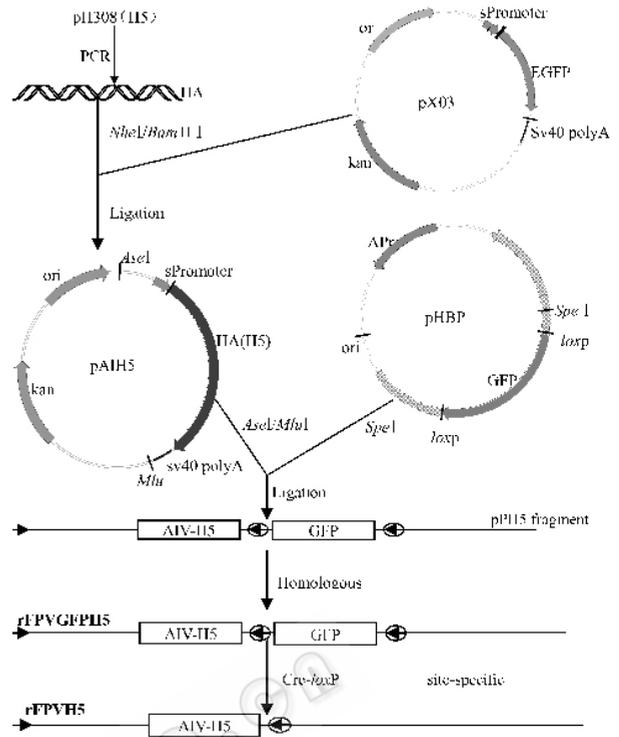


图 1 rFPVH5 重组病毒的构建模式图

Fig.1 Schematic of construction of rFPVH5 recombinant virus. All recombinations were carried out in transfected chicken embryo fibroblast. Viral genes are represented as line with an arrowhead denoting direction of transcription. Ellipse circles represent loxP sites with the enclosed arrow indicating relative orientation.

2.2 重组病毒 PCR 鉴定

PCR 产物有两条带,以 nx01/nx02 为引物的扩增条带为 1.7kb 左右;以同源重组臂引物(pg3/pg4)的扩增条带为 3.7kb,大小与预期值相符。这说明目的基因已成功插入。

2.3 表达产物的测定

荧光试验证实,感染了重组禽痘病毒的 CEF 呈特异性荧光着色(图 2)表明感染细胞表达了 HA,接种 FPV 亲本毒的细胞没有荧光着色。

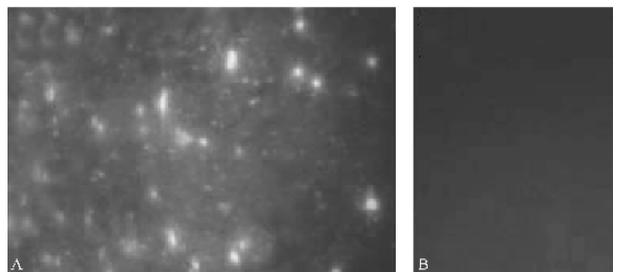


图 2 rFPVH5 感染 CEF 后 HA 表达情况(36h)

Fig.2 HA expressed by recombinant rFPVH5 virus in chicken embryo fibroblast cell(36h). A: rFPVH5; B: parent fowlpox virus.

2.4 重组病毒的稳定性

纯化的重组病毒和亲本毒在 96 孔 CEF 细胞板上连续传 6 代后,重组病毒的蚀斑直径平均为 880 μ m,病毒滴度为 5.0 \times 10⁶ PFU/mL,亲本毒蚀斑直径平均为 910 μ m,病毒滴度为

5.0×10^6 PFU/mL, 重组毒的复制效率与亲本毒一致。

2.5 HI 抗体检测结果

抗体检测结果表明(表 1)接种 10^5 PFU 和 2×10^5 PFU 的重组病毒疫苗的实验组都在 2 周后检测到较高滴度的 HI 抗体,接种 2×10^5 PFU 重组毒的实验组在免疫第三周抗体滴度达到了最高。

表 1 免疫鸡群 H5 血凝素 HI 抗体检测结果

Table 1 HI titration of Antibodies against subtype H5 hemagglutinin in chickens Group

Group	Antibodies titers (\log_2)				
	Before immunization	7 days PI	14 days PI	21 days PI	28 days PI
rFPV	0.5	0.75	4	4	3
$2 \times$ rFPV	1	1	4	4.5	3
FPV	0.5	0	0	0	0
Normal saline	0	0	0	0	0

3 讨论

痘病毒(包括鸡痘病毒)作为较成熟的重组病毒疫苗载体已成功应用于多种病原免疫原基因的表达^[6,7]。在以往重组病毒构建中,为了便于筛选和纯化,往往需要加入一个报告基因,这对最终的重组毒是不必要的,而且不符合疫苗生物安全的要求。本项研究的改进之处在于,利用 Cre 酶能够识别特定的 loxP 序列的特性,试验中构建了双 loxP 序列,并将 GFP 报告基因插入到两个 loxP 之间。试验表明构建好的表达 HA 和 GFP 的重组病毒通过 Cre 位点特异性重组,自动去除 GFP 报告基因,获得了只含有 HA 表达盒基因重组病毒。为了提高位点特异性重组效率,先用重组病毒吸附单层细胞,再将重组病毒基因组 DNA 与 Cre 重组酶质粒用脂质体包裹共转染,筛选 3 代后就获得了不含荧光信号的细胞毒。

已有的研究表明,与用全禽流感灭活疫苗免疫后的 HI 抗体水平相比,以 HA 基因为基础的重组禽流感病毒疫苗免疫鸡后,机体产生的 HI 抗体相对较低,但可对免疫鸡产生很强的保护力。Swayne 等^[7]利用表达 HA 基因的重组鸡痘病毒以 $10^{1.5}$ TCID₅₀、 $10^{2.0}$ TCID₅₀ 和 $10^{3.3}$ TCID₅₀ 的免疫剂量经皮下注射或翼部刺种免疫鸡,3 周后 HI 抗体阳性率分别为 0%、0%、20%,但可使 90%~100% 的免疫鸡抵抗 HPAIV 的致死性攻击。本实验用 10^5 PFU 和 2×10^5 PFU 重组鸡痘病毒 rFPVH5 翅下刺种免疫 8 日龄 SPF 鸡,3 周后 HI 抗体滴度分别为 4 和 4.5,抗体阳性率为 70%,这表明重组病毒能诱导较高水平 HI 抗体应答,提高免疫剂量可提高抗体水平,但差异不显著。虽然我们只进行了 HI 抗体检测试验,其免疫应答水平有待进一步研究,但仍预示了我们构建的重组鸡痘病毒具有广阔的应用前景。

参 考 文 献

- [1] 殷震. 动物病毒学. 第二版. 北京: 科学出版社, 1997.
- [2] Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T. 分子克隆实验指南. 黄培堂等译. 第三版. 北京: 科学出版社, 2002.
- [3] Ghosh K, Van Duyn GD. Cre-loxP biochemistry. *Methods*, 2002, **28**: 374-383.
- [4] Nagy A. Cre recombinase. The universal reagent for genome tailoring. *Genesis* 2000 **26**(2): 99-109.
- [5] Daniel M, Robert F. Engineering the mouse genome by site-specific recombination. *Current Opinion in Biotechnology*, 1999, **10**: 470-471.
- [6] Lee LE, Witter RL, Reddy SM, et al. Protection and synergism by recombinant fowl pox vaccines expressing multiple genes from Marek's disease virus. *Avian Dis* 2003 **47**(3): 549-558.
- [7] Swayne DE, Garcia M, Beck JR, et al. Protection against diverse highly pathogenic H5 avian influenza virus in chickens immunized with a recombinant fowlpox vaccine containing an H5 avian influenza hemagglutinin gene insert. *Vaccine* 2000, **18**: 1088-1095.

Self-excising reporter gene in recombinant Fowlpox virus expressing H5 hemagglutinin gene of influenza A virus using Cre-loxP system

GAO Yue-hua¹, WANG Li-li², HUANG Bing², SONG Min-xun², CUI Yan-shun^{1*}
⁽¹⁾ College of Animal Science & Veterinary Medicine of Shandong Agricultural University, Tai'an 271018, China)
⁽²⁾ Institute of Poultry Science, Shandong Academy of Agricultural Sciences, Ji'nan 250100, China)

Abstract Hemagglutinin gene of subtype H5 avian influenza virus was amplified by polymerase chain reaction to construct expression cassette containing FPV early, late promoter and SV40 polyA tail. Then delivery vector was constructed by subcloning hemagglutinin gene of subtype H5 and GFP gene into fowlpox virus recombinant arm. The delivery vector and Lipid were transfected into CEF cells preinfected with FPV 282E4 strain virus. Recombinant fowlpox virus expressing the green fluorescence protein and hemagglutinin gene was screened and plaques were purified in CEF cell. After a second cotransfection with Cre recombinase plasmid, a recombinant virus only including hemagglutinin gene was gained. The immunofluorescent assay and replication efficiency of virus proved the recombinant could replicate steadily and express subtype H5 hemagglutinin gene. Two groups of 8-day-old SPF chickens were vaccinated with rFPVH5 by the wing-web method at the dosage of 10^5 PFU and 2×10^5 PFU respectively. After 28 days, antibodies titer was tested by HI. The results showed that the recombinant fowlpox virus could activate high antibody response.

Keywords: Fowlpox virus; Avian influenza virus; subtype H5 hemagglutinin; recombination; Cre-loxP

Foundation item: Programe for Science and Technology Development of Shandong Province of China (022020103)

* Corresponding author. Tel: 86-538-8241103; E-mail: yscui@sdau.edu.cn

Other author: Li Jian-liang, College of Animal Science & Veterinary Medicine of Shandong Agricultural University

Received 8 May 2006/ Accepted 25 May 2006/ Revised 2 March 2007

© 中国科学院微生物研究所期刊联合编辑部 <http://journals.im.ac.cn>