

表达新城疫病毒 F48E8 株血凝素-神经氨酸酶的 重组鸡痘病毒的构建和鉴定*

刘伟忠 吴艳涛 姜 焱 张如宽 刘秀梵**

(扬州大学农学院动物医学系 扬州 225009)

摘 要 在克隆和鉴定新城疫病毒(NDV)F48E8 株血凝素-神经氨酸酶(HN)基因的基础上,应用分子克隆技术将 HN 基因导入鸡痘病毒插入载体 pFG1175-1 中启动子 P7.5 的下游,得到携带 NDV-HN 基因的质粒 pFGHN1175-1。将此质粒 pFGHN1175-1 以脂质体转染中国鸡痘病毒疫苗株 282E4 株感染 3~4h 的鸡胚成纤维细胞,采用蓝斑筛选方法纯化 3 次,得到稳定的重组鸡痘病毒。用 NDV-HN 基因特异性探针进行斑点杂交试验以及用 HN 基因特异性引物作 PCR 检测,表明 NDV-HN 基因已插入鸡痘病毒基因组中。以 NDV-HN 蛋白特异性单克隆抗体进行间接免疫荧光试验,证实重组鸡痘病毒在感染细胞中表达了 HN 糖蛋白,从而成功建立了表达新城疫病毒 F48E8 株血凝素-神经氨酸酶的重组鸡痘病毒。

关键词 重组鸡痘病毒,新城疫病毒 F48E8 株,血凝素-神经氨酸酶

分类号 S858.31

新城疫(Newcastle disease, ND)是鸡的一种高度接触性、烈性传染病。其病原新城疫病毒(Newcastle disease virus, NDV)是副粘病毒科副粘病毒属的代表种,为一种单股负链 RNA 病毒。构成病毒囊膜表面突起的两种结构糖蛋白—血凝素—神经氨酸酶(HN 蛋白)和融合(F)蛋白在 ND 发病过程中起着重要作用。HN 糖蛋白具有血凝素和神经氨酸酶两种活性,在 NDV 侵染过程中起着识别细胞受体的作用;F 糖蛋白则参与病毒的穿透、融合和溶血等作用。两者均是 NDV 的保护性抗原,具有良好的免疫原性,因此 HN 基因和 F 基因常被用作研制 ND 基因工程疫苗^[1,2]的目的基因。

ND 是危害我国养禽业的主要禽病之一。尽管我国目前已普遍开展以疫苗预防为主、综合性防制措施,但由于 NDV 强毒污染等原因常引起免疫失败,使 ND 仍时有发生。因此研制比 ND 常规疫苗免疫保护率更高、免疫保护期更长的新一代基因工程疫苗势在必行,而始于 80 年代后期现已发展相当成熟的重组禽痘病毒技术^[3,4]则为其提供了有效方法。

本研究在克隆和鉴定 NDV F48E8 株 HN 基因的基础上,构建了重组鸡痘病毒(Fowlpox virus, FPV)转移载体 pFGHN1175-1,应用脂质体介导转染的方法通过同源重

* 本研究受江苏省九五攻关项目、省自然科学基金和省教委自然科学基金资助。

** 联系作者

收稿日期:1997-05-04

组原理在国内首先建立并获得了可表达 NDVF48E8 株 HN 基因的重组 FPV, 为研制 ND 基因工程疫苗奠定了基础。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 病毒与鸡胚: FPV282E4 株来自中国兽药监察所。9~11 日龄 SPF 鸡胚来自扬州大学农学院实验动物组。鸡胚成纤维(CEF)细胞按常规方法制备。抗 NDVF48E8 株 HN 蛋白特异性单克隆抗体杂交瘤细胞株 10-1 由周维松等^[5]建株, 腹水单壳隆抗体按常规方法制备。

1.1.2 质粒与宿主菌: FPV 插入载体 pFG1175-1 由王志亮等^[6]构建。含 NDVF48E8 株 HN 基因(长约 1.93kb)的质粒 pGEMHN 由刘伟忠等^[7]构建。含覆盖 NDVF48E8 株部分 F 和 HN 基因片段(长约 926bp)的质粒 pFHN 由刘伟忠等构建, HN 基因特异性狄高辛探针由此制备。大肠杆菌宿主菌 TG1 购自 BM 公司。

1.1.3 其它试剂: 限制性内切酶 BamHI、HindIII、SalI、SmaI; T4 DNA 聚合酶; T4DNA 连接酶; 狄高辛 DNA 标记与检测试剂盒; X-gal; 蛋白酶 K; 胰 RNA 酶; ExpandTM 高保真 PCR 系统均购自 BM 公司。培养基 DMEM、F10、199 均购自 Sigma 公司。犊牛血清(FCS)自行制备。

1.2 方法

1.2.1 含 NDV-HN 基因的 FPV 转移载体的构建: 以 HindIII 和 SmaI 切割 pGEMHN, 回收长约为 1.93kb 的 NDV-HN 基因开放阅读框架(ORF); 以 SalI 切割 pFG1175-1, 经 T4DNA 聚合酶补平后再以 HindIII 切割, 回收长约为 9.7kb 的大片段; 两者于 16℃ 连接 20h, 将 NDV-HN 基因置于 pFG1175-1 中启动子 P7.5 的下游。转化大肠杆菌感受态细胞 TG1, 涂布含氨苄青霉素、X-gal 和 IPTG 的 LB 平板(AIX 平板), 37℃ 培养 14~16h。挑取蓝色菌落, 按文献[8]进行原位杂交筛选。对原位杂交呈阳性结果的菌落按文献[8]大规模抽提重组质粒, 并经 PEG8000 纯化, 以 HindIII 和 BamHI 作酶切分析。符合酶切分析、原位杂交呈阳性的重组质粒即为含 NDV-HN 基因的 FPV 转移载体, 命名为 pFGHN1175-1。

1.2.2 脂质体转染及含 NDV-HN 基因重组 FPV 的纯化: 在 50ml 方瓶中, 将 CEF 细胞培养至 70%~85% 成片, 以 0.1MOI 的 FPV282E4 株感染细胞, 37℃ 培养 3~4h。分别在两个离心管中用 HBS(20mmol/L Hepes, 150mmol/L NaCl, pH7.4) 分别稀释脂质体、质粒 pFGHN1175-1DNA 至 50 μ l, 使脂质体与重组质粒 DNA 的比例为 5:1, 将以上两管合为一管, 轻轻吹吸混匀, 室温静置作用 15~30min。用 3ml 无血清 DMEM 培养基洗细胞表面两次。加 3ml 无血清 DMEM 培养基至细胞表面, 将上述制备的 100 μ l 脂质体-DNA 复合物吹吸一次混匀后慢慢垂直滴入培养液, 缓缓转动培养瓶混匀, 37℃ 5%CO₂ 培养 6h。补充培养液, 使血清终浓度为 10%, 继续培养 18h。次日换含有 1%FCS 的维持液培养 48~72h。待细胞完全病变后收获病毒, -70℃ 反复冻融 3 次, 低速离心去细胞碎片, 上清即可能含重组 FPV。

将上述转染的病毒原液作 1:1000 倍稀释后感染培养于直径为 60mm 平皿内的次代 CEF 单层, 待病变明显后倒掉维持液, 每瓶加入含终浓度 200 μ g/ml X-gal 的营养琼脂

5ml, 凝固后翻转平皿, 37℃ 5%CO₂ 培养。待蓝斑出现后, 用吸管将带蓝斑的琼脂吸出, 转入 0.5ml 维持液中, -30℃ 冻融 3 次, 再感染次代 CEF 单层。重复上述步骤, 连续蚀斑纯化 3 次, 即可筛选出稳定的重组 FPV。

1.2.3 含 NDV-HN 基因重组 FPV 的鉴定: 按 [8] 提取重组 FPV、FPV282E4 株和 CEF 的基因组 DNA, 溶于适量 TE(10mmol/L Tris-Cl, 1mmol/L EDTA, pH8.0), -20℃ 保存。

斑点杂交试验检测重组 FPV: 取质粒 pFGHN1175-1、质粒 pFG1175-1、重组 FPV DNA、FPV282E4 株 DNA 和 CEF DNA, 经变性后点样于硝酸纤维素膜上, 经 80℃ 干烤固定、68℃ 预杂交和杂交后进行免疫检测。

PCR 检测重组 FPV: 根据已发表的 NDV-HN 基因核苷酸序列^[9,10] 设计并合成一对分别长为 28-mer 和 30-mer 的引物。P₁ 位于 HN 基因上游, 序列为 5'-CGAAGCTTCAGACCTCAGTCATGCG-3'; P₂ 位于 HN 基因下游, 序列为 5'-CCGGATCCAATCAAGTGACTATCGACAAGA-3'。预期 PCR 扩增片段长约为 1.93kb, 即 NDV-HN 基因。具体 PCR 扩增参数为: 98℃ 变性 5min; 94℃ 变性 30s, 50℃ 退火 1min, 72℃ 延伸 3min, 进行 10 个循环; 94℃ 变性 30s, 50℃ 退火 1min, 72℃ 延伸 3min, 并在每次延伸结束后自动加长延伸时间 10s, 进行 20 个循环; 72℃ 延伸 10min 后结束 PCR 反应。取 5μl PCR 扩增反应产物进行 1% 琼脂糖凝胶电泳分析。

间接免疫荧光试验检测重组 FPV 中 NDV-HN 基因的表达: 将纯化的重组 FPV 感染 24 孔培养板上的次代 CEF 单层, 72~96h 后去除培养液, 以 0.01mol/L pH7.4 PBS 洗一次; 以 -30℃ 冷甲醇固定 15min, 0.01mol/L pH7.4 PBS 洗 3 次; 加入工作浓度的抗 NDV-HN 蛋白腹水单克隆抗体, 37℃ 作用 1h, 以含 0.05% 吐温-20 的 PBS 洗 5 次, 每次 5min; 再加入工作浓度的羊抗鼠 IgG 荧光抗体作用 45min, 以含 0.05% 吐温-20 的 PBS 充分洗涤后, 在荧光显微镜下观察。同时以 FPV282E4 株感染的次代 CEF 单层作对照。

2 结果

2.1 构建含 NDV-HN 基因 FPV 转移载体

以 SalI 切割 FPV 插入载体 pFG1175-1, 末端补平后再以 HindIII 切一次, 电泳分离大片段, 然后与 HindIII + SmaI 切下的质粒 pGEMHN 上的 NDV-HN 基因 ORF 连接, 最终得到含 P7.5-HN 基因的质粒 pFGHN1175-1 (图 1)。经原位杂交筛选得到阳性克隆 4 个。大规模抽提并经 PEG8000 纯化重组质粒, 以 HindIII + BamHI 酶切分析, pFGHN1175-1 与 pGEMHN 均切出一条长约为 1.93kb 的条带 (图 2)。表明构建成功含 NDV-HN 基因的 FPV 转移载体 pFGHN1175-1。

2.2 脂质体转染及含 NDV-HN 基因重组 FPV 的纯化

当脂质体与质粒 pFGHN1175-1DNA 的比例为 5:1 时, 转染 FPV282E4 株感染 3~4h 的 CEF 可获得较高的转染效率, 在两个直径为 60mm 的平皿上共获得近 50 个重组病毒的蓝斑。连续蚀斑纯化 3 次后即得到稳定的呈现蓝色的重组 FPV。

2.3 斑点杂交试验和 PCR 检测重组 FPV

以 NDV-HN 基因特异性探针对质粒 pFGHN1175-1、质粒 pFG1175-1、重组 FPV DNA、FPV 282E4 株 DNA 和 CEF DNA 进行斑点杂交试验, 结果 pFGHN1175-1 和重组

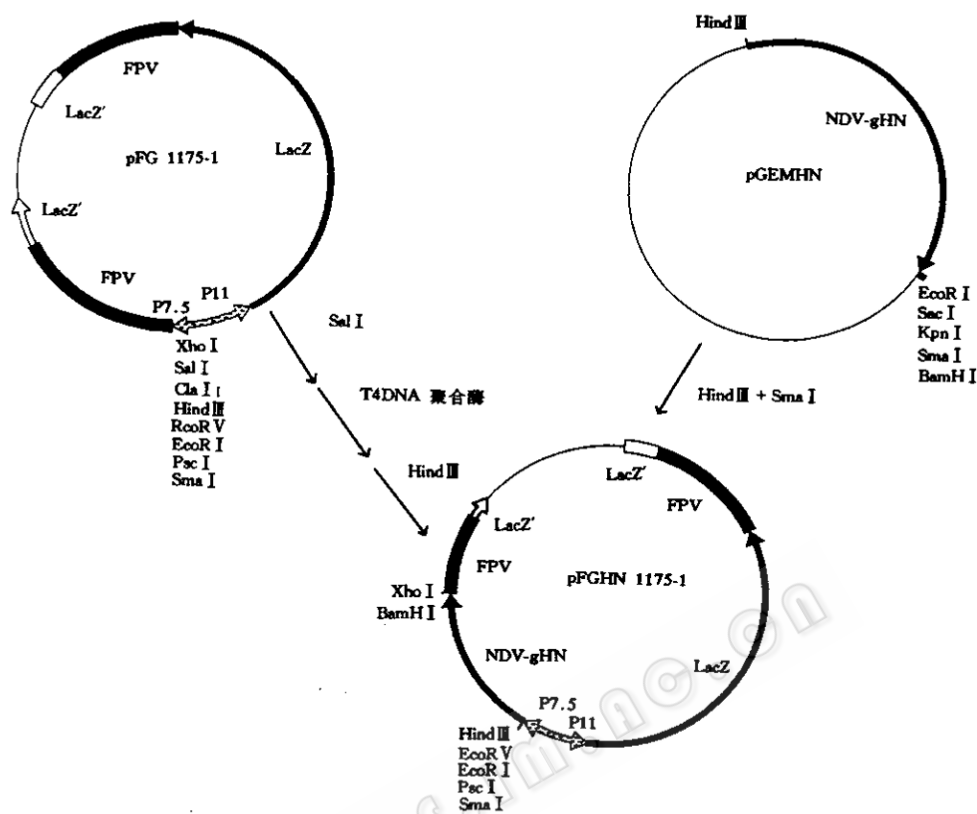


图1 含NDV-HN基因的FPV转移载体pFGHN1175-1的构建

Fig.1 Construction of pFGHN1175-1 containing the HN gene of NDV

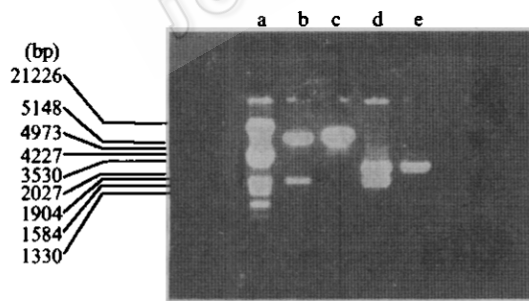


图2 FPV 转移载体 pFGHN1175-1的酶切电泳

Fig.2 Agarose gel electrophoresis of pFGHN1175-1
a. λ DNA/HindIII + EcoRI; b. pFGHN1175-1/HindIII + BamHI; c. pFG1175-1/HindIII; d. pGEMHN/HindIII + BamHI; e. pGEM-3Z(-)/HindIII + BamHI.

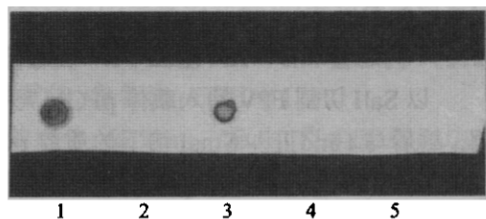


图3 斑点杂交试验检测重组 FPV

Fig.3 Identification of recombinant FPV by dot-blotting hybridization assay
1. pFGHN1175-1; 2. pFG1175-1; 3. DNA from CEF cells infected with recombinant FPV; 4. DNA from CEF cells infected with FPV strain 282E4; 5. DNA from uninfected CEF cells.

FPV DNA 呈现棕褐色的阳性斑点, 而 pFG1175-1、FPV282E4 株 DNA 和 CEF DNA 则为阴性 (图 3); 以提取的重组 FPV 基因组 DNA 为模板, 经 PCR 扩增和琼脂糖凝胶电泳, 在 1.93 kb

处呈现一明亮的条带(图 4)。表明 NDV-HN 基因已插入 FPV 基因组 DNA 中, 成功获得含 NDV-HN 基因的重组 FPV。

2.4 间接免疫荧光试验检测重组 FPV 中 NDV-HN 基因的表达

应用脂质体转染技术, 连续蚀斑纯化 3 次后, 最终获得可表达 NDV-HN 基因的重组 FPV。间接免疫荧光试验中可见重组 FPV 感染的 CEF 细胞中有明显的黄绿色荧光, 而 FPV282E4 株感染的 CEF 细胞中则未见荧光着色。

3 讨论

FPV 作为载体表达外源基因有其明显优点: 表达产物经转录后能被修饰, 如糖基化等, 使表达产物更接近于天然蛋白, 具有良好的免疫原性。它被广泛用于表达外源基因, 以研究基因产物特征, 并可以成为基因工程活载体疫苗。因此利用 DNA 重组技术建立表达 NDV 保护性抗原基因的重组 FPV 是研制 ND 基因工程疫苗的良好途径之一。

在构建含 NDV-HN 基因重组 FPV 转移载体 pFGHN1175-1 时, 为了提高连接效率并根据 FPV 插入载体 pFG1175-1 的多克隆位点, 作者采用了一端为粘端、一端为平端的连接方法。因为重组 FPV 转移载体 pFGHN1175-1 和 FPV 插入载体 pFG1175-1 经转化后在 AIX 平板上均呈蓝色菌落, 所以在鉴定重组 FPV 转移载体 pFGHN1175-1 时, 采用原位杂交方法筛选阳性克隆, 再经酶切分析证实。

影响脂质体转染效率的两个重要因素是脂质体与质粒 DNA 的比例和转染时间, 因此必须优化转染条件。在本研究中作者经预试验后确定以脂质体与质粒 pFGHN1175-1DNA 的比例为 5:1 和转染时间在 FPV282E4 株感染 CEF 细胞后 3~4h 的条件下获得了较高的转染效率, 在含 X-gal 营养琼脂的平皿中获得了多个呈现蓝色的重组病毒。

在本研究中作者应用斑点杂交和 PCR 两种方法证实了 NDV-HN 基因已重组进入 FPV 基因组 DNA 中, 并进一步应用间接免疫荧光试验证实了重组 FPV 在感染 CEF 细胞中表达了 NDV-HN 基因。PCR 检测所用引物为参照多株 NDV-HN 基因序列后所设计, 特异性良好。作者应用这对引物作 PCR 检测重组 FPV, 结果在约 1.93kb 处出现了预期的一条明亮条带, 在其后面尚有一条较弱条带应属非特异性扩增产物。由于 NDVF48E8 株 HN 基因是经 RT-PCR 扩增而得, 是否发生错配从而影响基因正确表达, 这是本研究所面临的一个关键性问题。作者在通过间接免疫荧光检测重组 FPV 中 NDV-HN 基因的表达时, 幸运地发现该基因在感染细胞中能充分表达, 说明前期工作 RT-PCR 扩增 NDV-HN 基因非常成功。

NDVF48E8 株是国内攻毒常用的标准强毒株, 其致病机理至今仍不很清楚, 因此克隆并表达其保护性抗原(F 和 HN)基因有助了解其致病特点。本研究利用同源重组原理, 通过脂质体介导质粒 pFGHN1175-1DNA 转染 CEF 细胞经蓝斑筛选后获得了可表达 NDVF48E8 株 HN 蛋白的重组 FPV, 为开展研制 ND 新一代基因工程疫苗的工作奠定了良好的基础。目前正在对 HN 基因的表达水平及重组病毒的免疫原性作深入研究, 另外

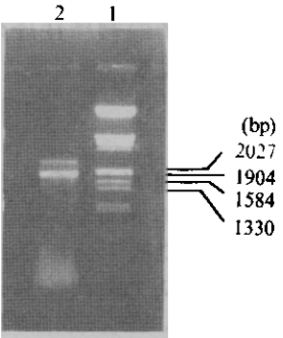


图 4 PCR 检测重组 FPV
Fig.4 Identification of recombinant FPV by PCR
1. λ DNA/HindIII+EcoRI;
2. PCR amplified product.

正在对该基因测序作序列分析以从分子水平了解病毒蛋白的结构与功能的关系,详细情况将另文发表。

参 考 文 献

- [1] Boursnell M E G, Green P F, Campbell J I A *et al.* *Journal of General Virology*, 1990, 71: 621~628.
- [2] Boursnell M E G, Green P F, Campbell J I A *et al.* *Virology*, 1990, 178: 297~300.
- [3] Boyle D B, Coupar E H. *Virus Research*, 1988, 10: 348~356.
- [4] Taylor J, Paoletti E. *Vaccine*, 1988, 6: 466~468.
- [5] 周维松, 刘秀梵. *病毒学报*, 1991, 7(1): 23~29.
- [6] 王志亮, 彭大新, 刘秀梵等. *病毒学报*, 1996, 12(1): 48~54.
- [7] 刘伟忠, 吴艳涛, 刘秀梵等. *中国兽医科技*, 1997, 6: 16~18.
- [8] Sambrook J, Fritsch E F, Maniatis T. *Molecular Cloning, A Laboratory Manual*. 2nd ed. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989.
- [9] Wermers C D, Henau S D, Neyt C *et al.* *Archives of Virology*, 1987, 97: 101~103.
- [10] Millar N S, Chambers P, Emmerson P T. *Journal of General Virology*, 1986, 67: 1917~1927.

CONSTRUCTION AND IDENTIFICATION OF RECOMBINANT FOWLPOX VIRUS FOR EXPRESSING HAEMAGGLUTININ-NEURAMINIDASE GLYCOPROTEIN OF NEWCASTLE DISEASE VIRUS STRAIN F48E8

Liu Weizhong Wu Yantao Jiang Yan Zhang Rukuan Liu Xiufan

(Department of Veterinary Medicine, Yangzhou University, Yangzhou 225009)

Abstract For the construction of transfer vector pFGHN1175-1, the gene encoding haemagglutinin-neuraminidase(HN) glycoprotein of newcastle disease virus(NDV) strain F48E8 was removed from plasmid pGEMHN, and inserted into the HindIII site of insertion vector pFG1175-1, downstream of P7.5 promotor. Chicken embryo fibroblast (CEF) cell cultures which had been infected with fowlpox virus (FPV) chinese vaccine strain 282E4 for 3~4 hours were transfected with pFGHN1175-1 plasmid DNA by liposomal transfection. Recombinant FPV with blue plaques were selected and purified 3 times in CEF cell cultures overlaid agarose containing X-gal. PCR analysis and DNA dot-blotting hybridization assay indicated that the HN gene had inserted into the FPV genomic DNA. The expression of the NDV HN gene in recombinant FPV was confirmed by indirect immunofluorescence assay with specific monoclonal antibody.

Key words Recombinant fowlpox virus, Newcastle disease virus strain F48E8, Haemagglutinin-neuraminidase glycoprotein