

微生物学报 *Acta Microbiologica Sinica*

54 (4) :455 - 462; 4 April 2014

ISSN 0001 - 6209; CN 11 - 1995/Q

http://journals.im.ac.cn/actamicrocn

doi: 10.13343/j.cnki.wsxb.2014.04.00?

以具有 WPRE 调控元件的杆状病毒为载体在鸡胚原代细胞中表达新城疫病毒 F 基因

高冬妮, 平文祥, 金丽颖, 沈万力, 宋刚, 唐晓艳, 安琦, 申燕, 葛菁萍*

微生物黑龙江省高校重点实验室, 黑龙江大学生命科学学院, 黑龙江 哈尔滨 150080

摘要:【目的】构建具有哺乳动物细胞特异性启动子和基因转录后调控元件的重组杆状病毒转移载体, 优化的重组杆状病毒可介导新城疫病毒 (Newcastle disease virus, NDV) F 基因在鸡原代骨骼肌细胞中进行高效表达。【方法】提取 NDV La Sota 株病毒 RNA 基因组, 用 RT-PCR 技术扩增 F 基因, 将其克隆到自主构建的具有转录后调控元件 (Woodchuck hepatitis virus post-transcriptional regulatory element, WPRE) 的杆状病毒转移载体的 CMV 启动子下游, 通过 Bac-to-Bac 系统获得 F 重组 Bacmid, 经转染 Sf9 昆虫细胞后获得 F 重组杆状病毒。重组病毒经扩增后以 50 个 MOI 感染鸡原代骨骼肌细胞, 接种 72 h 后裂解细胞收获蛋白。比较分析 WPRE 调控元件对蛋白表达水平的影响。【结果】经 Western blot 证实在鸡原代骨骼肌细胞中表达了 NDV F 蛋白, 分子量约 56 kDa, 与预测蛋白大小一致, 且能被 NDV 阳性血清所识别。添加 WPRE 转录后调控元件的重组杆状病毒介导 F 蛋白的表达效果与添加 10 mmol/L 丁酸盐法基本相同, 但对细胞几乎没有毒性。【结论】优化后的重组杆状病毒可以向鸡原代细胞中传递 NDV F 基因, 并在 CMV 的启动下表达具有反应原性的 F 蛋白, 添加的转录后调控元件 WPRE 可以增强杆状病毒介导外源基因在鸡原代细胞中的表达水平。本研究为研制 NDV 及其他重要禽类传染病的杆状病毒载体基因工程疫苗奠定了基础。

关键词:新城疫, F 基因, 杆状病毒, 鸡胚原代细胞, WPRE 调控元件

中图分类号: S852.65 **文献标识码:** A **文章编号:** 0001-6209 (2014) 04-0455-08

新城疫 (Newcastle disease, ND) 是由副黏病毒科的新城疫病毒 (Newcastle disease virus, NDV) 引起的一种烈性、高度接触性传染病^[1], 是危害我国畜牧业的 4 大 A 类疾病之一。新城疫 F 蛋白主要参与病毒穿入、细胞融合和溶血, 因此, F 蛋白是使病毒包膜与宿主细胞质膜融合的主要因子。F 蛋白还是诱导机体产生中和性抗体的主要病毒蛋白, 在

机体抗感染免疫中起着重要作用, 是当前抗病毒研究的一个重要靶点。

目前对新城疫的防治, 普遍使用的是驯化或灭活的病原体制备的病毒疫苗, 这些疫苗成本高、效价不稳定、具有一定毒性, 并且新城疫病毒经常出现新变种, 因而研制新型的基因工程疫苗具有重大意义。F 蛋白作为 NDV 的主要宿主保护性抗原, 已在沙门

基金项目:国家自然科学基金 (31270143); 黑龙江大学高层次人才 (创新团队) 支持计划 (Hdtd2010-17); 黑龙江省教育厅科学技术研究项目 (12511423); 黑龙江省高等学校科技创新团队 (农业微生物发酵技术)

* 通信作者。Tel: +86-451-86609016; E-mail: gejingping@126.com

作者简介:高冬妮 (1981-), 女, 黑龙江人, 博士研究生, 从事病毒分子生物学研究。E-mail: gaodongni1981@163.com

收稿日期:2013-07-24; **修回日期:**2013-12-15

氏菌、禽痘病毒、火鸡疱疹病毒、反转录病毒等活病毒载体中成功表达^[2-4],并证明重组疫苗对强毒攻击具有较好的免疫保护力,最高者达100%^[5]。但这些活病毒载体即使经过减毒修饰,对人类的安全仍具潜在的危险性,可能出现残余毒力诱发严重疾病和基因突变导致毒力返强的安全性问题。因此,F基因表达系统的选择对诱导中和抗体的产生和疫苗使用的安全性尤为重要。

杆状病毒在哺乳动物细胞中不复制,具有极高的生物安全性,已成为疫苗开发、基因治疗领域理想的转移载体^[6-7]。经过改造的杆状病毒可以介导外源基因在哺乳动物体内进行持久、高效的表达^[8]。但是,在具有一定活性的特异性启动子下,如何增加外源基因的表达量成为新的研究热点。启动子的强弱是影响基因表达的一个重要因素,不同启动子在不同细胞系的启动效率不同。另外,在杆状病毒表达载体中增加适当的调控元件也可有效提高外源基因的表达水平。在目的基因的3'端添加土拨鼠转录后调控元件(Wood chuck hepatitis virus post transcriptional regulatory element, WPRE)——位于病毒3'非编码区的RNA顺式作用元件,可增加杆状病毒介导的转基因表达水平^[9-11]。

本试验首先在自主构建的杆状病毒转移载体pFB/SD-PH中添加CMV启动子和基因转录后调控元件(WPRE),从而获得优化的杆状病毒表达载体pLM。通过RT-PCR法克隆到NDV Lasota株的F基因,将F基因亚克隆至pLM的CMV启动子下游。重组质粒pCMV-WPRE-F转化大肠杆菌(*Escherichia coli*) DH10Bac感受态细胞,提取重组Bacmid DNA后转染Sf9昆虫细胞,从而获得带有CMV-F表达盒的重组杆状病毒。重组病毒转染鸡原代骨骼肌细胞,利用SDS-PAGE和Western blot检测到抗原蛋白

F的表达。本试验证明了重组杆状病毒可以有效地将外源基因导入鸡原代细胞,并比较了WPRE调控元件下重组杆状病毒表达F蛋白的差异。本试验筛选出的具有WPRE调控元件的重组杆状病毒载体为进一步研制新城疫基因工程疫苗奠定了基础。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 菌株和细胞:新城疫病毒La Sota株购自内蒙古生物制品厂;*E. coli* DH5 α 、*E. coli* DH10Bac由本实验室保存;Sf9细胞由本实验室保存;鸡原代骨骼肌细胞由本实验室制备。

1.1.2 主要试剂和仪器:Cellfectin[®] Reagent、Sf900 II SFM培养基购自Invitrogen公司;DMEM培养基购自Hyclone公司;胎牛血清购自PAA公司;双抗溶液(青霉素、链霉素)购自GIBCO公司;Reverse Transcription System Kit、Agarose低熔点琼脂糖购自Promega公司;Taq DNA聚合酶、各种限制性内切酶、T4 DNA连接酶、胰蛋白酶、细胞裂解液、DNA Marker、蛋白Marker购自TaKaRa公司;DNA胶回收试剂盒购自华舜公司。PCR仪,购自Eppendorf GA Germany;Steri-Cyde371气套式二氧化碳培养箱,购自FORMA公司;BCM-1000A生物安全柜,购自苏州安泰空气技术有限公司。

1.1.3 质粒:pMD18-T Vector购自大连宝生物工程有限公司;pWHV8、pEGFP-C3质粒由楼庄伟教授惠赠;pFB/SD-PH为实验室保存质粒;pCMV-WPRE-F、pCMV-F为实验室自行构建质粒。

1.2 引物设计

以质粒和病毒基因组序列为模板,应用Gene runner软件设计引物,用于扩增各个目的片段(表1),所有引物均由Invitrogen公司合成。

表1. 本研究中使用的引物序列
Table1. primer sequences in this study

primer	sequence (5'→3')	restriction site
YL-1	ATATCGATATGGGCTCCAGACCTTCTACCAAGA	XhoI
YL-2	CGGGTCGACTCACATTTTGTAGTGGCTCTCATCTGATC	Sall
LM-6	TGCTCTAGATAGTTATTAATAAGTAATCAATTACGGGGTCATTAGTTC	Xba I
LM-7	GTGAATTCCGGAGCTCTGCTCGAGCGAGGCCTGATCTGACGGTTCCTAAACCAGCTCT	EcoRI-SacI-XhoI-StuI
LM-8	CGGAATTCACGCATCTTGTGCGAGCTTAATCAACCTCTGGATTACAAAATTTGTGA	EcoRI-SphI-Sall
LM-9	ATACGGTCCGTAAGATACATTGATGAGTTTGGACAAACCAC	Rsr II
LM-10a	CCGCCTCCCGCCTGTTTTAATCAGCCATACCACATTTGTAGAGGTTTTA	
LM-10b	TAAAACCTTACAAATGTGGTATGGCTGATTAACAGCGGGGAGGCCG	
M13-47	CGCCAGGTTTTCCAGTCACGAC	

1.3 F 基因的克隆

利用 TRIzol 法抽提 NDV La Sota 株病毒 RNA 基因组, 所有器皿和试剂均经 0.1% 的 DEPC 水溶液处理去除 RNase。参考 Reverse Transcription System Kit 说明书进行反转录, 生成 cDNA 第一链。参考 GenBank 上已发表的 NDV La Sota 株序列设计特异引物 YL-1 和 YL-2, 以 cDNA 第一链为模板, PCR 扩增约 1.7Kb 的 F 基因, 1% 琼脂糖电泳鉴定 PCR 产物。按华舜小量胶回收试剂盒说明书回收 PCR 产物, 与 pMD18-T 载体于 16°C 连接过夜, 转化 *E. coli* DH5 α 感受态细胞, 经蓝白斑筛选, 以碱裂解法小量制备质粒, 经限制性内切酶分析、质粒 PCR 鉴定以及核苷酸序列测定, 将阳性重组质粒命名为 pMD-F。

1.4 重组杆状病毒载体的获得

以质粒 pEGFP-C3、pWHV8、peGFP-C3 为模板, 以 LM-6 和 LM-7、LM-8 和 LM-10b、LM-10a 和 LM-9 为引物, PCR 扩增得到 610bp CMV 片段、650bp WPRE 片段、250bp pA 片段。以 LM-9 和 LM-8 为引物, WPRE 片段和 pA 片段进行融合 PCR 获得 soe2 片段。CMV 片段和 soe2 片段分别与 pMD18-T Vector 于 16°C 连接过夜, 转化 *E. coli* DH5 α 感受态

细胞, 经蓝白斑筛选, 以碱裂解法小量制备质粒, 并进行酶切和 PCR 鉴定, 将阳性重组质粒命名为 pT-CMV 和 pT-soe2。载体 pFB/SD-PH 和 pT-CMV 经 *Xba* I 和 *Eco*R I 酶切连接, 转化 *E. coli* DH5 α 感受态细胞后筛选质粒, 阳性质粒命名为 pFB/SD-PH-CMV。用 *Rsr* II 和 *Eco*R I 对载体 pFB/SD-PH-CMV 和 pT-soe2 进行双酶切, 酶切产物连接转化到 *E. coli* DH5 α 感受态细胞后筛选质粒, 阳性质粒命名为 pLM。

1.5 构建含 F 基因表达盒的重组转移载体

将阳性重组质粒 pMD-F 和 pLM 重组转移载体分别经 *Xho* I 和 *Sal* I 双酶切 (图 1), 利用 T4 DNA 连接酶将两者连接, 转化 *E. coli* DH5 α 感受态细胞, 挑取单菌落, 碱裂解法小量制备质粒, 经酶切和 PCR 鉴定筛选阳性重组子, 命名为 pCMV-WPRE-F。同时将 pMD-F 和 pFB/SD-PH-CMV 经双酶切连接, 获得重组子 pCMV-F 作为 WPRE 调控元件的对照。

1.6 构建 F 重组杆状病毒

重组质粒 pCMV-WPRE-F 和 pCMV-F 分别转化 *E. coli* DH10 Bac 感受态细胞, 经蓝白斑筛选, 碱裂解法提取 Bacmid DNA, 利用 M13 引物进行 PCR 鉴定, 重组 Bacmid 分别命名为 Bac-CMV-WPRE-F 和

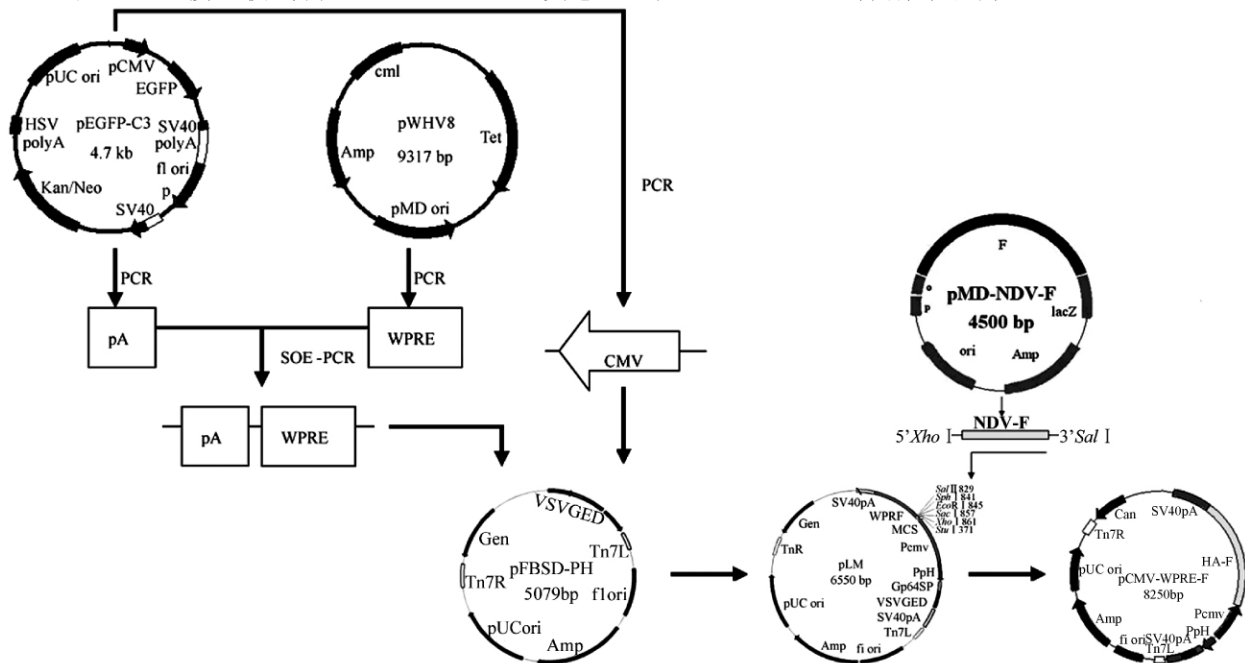


图 1. 含 F 基因表达盒转移载体的构建示意图

Figure 1. Scheme for construction of transfer plasmid vector.

Bac-CMV-F。按 Cellfectin © Reagent 转染试剂盒说明书将 1 μg 重组 Bacmid DNA 用脂质体转染试剂转染对数生长期的 Sf9 昆虫细胞,转染后至 Sf9 细胞出现感染迹象时,收获细胞培养上清,即 P1 代病毒储备,4℃ 避光保存备用。提取所获病毒 DNA,利用 YL-1 和 M13-47 特异引物对其进行 PCR 鉴定,获得含有 F 基因的重组杆状病毒。将重组杆状病毒反复感染对数生长期的 Sf9 昆虫细胞两次,获得高滴度的重组杆状病毒储备。采用空斑分析法测定病毒滴度,病毒滴度 (pfu/mL) = 每孔空斑数 × 稀释倍数 × 1/每孔病毒量 (mL)。P3 代重组杆状病毒的滴度分别为 3.0×10^8 pfu/mL (BV-CMV-WPRE-F) 和 2.8×10^8 pfu/mL (BV-CMV-F)。

1.7 F 重组杆状病毒在鸡原代细胞中的表达与检测

制备 13 日龄 SPF 鸡胚的骨骼肌细胞,以每孔 1×10^6 个细胞接种到六孔细胞培养板中。置于 37℃、5% CO₂ 培养箱培养至细胞铺满率达 80% 时,将 BV-CMV-WPRE-F 和 BV-CMV-F 重组杆状病毒,以 moi (Multiplicity of Infection, MOI) = 50 分别接种细胞,另外以 moi = 50 接种 BV-CMV-F 并添加终浓度为 10 mmol/L 的丁酸钠盐。病毒侵染细胞 2 h 后,弃去病毒液,每孔加入 3 ml 维持液 (DMEM 培养基加 2% 胎牛血清),置 37℃、5% CO₂ 培养箱培养 72 h,细胞裂解液裂解细胞后收获蛋白样品,进行 Western blot 检测。将电泳蛋白带转印至硝酸纤维素膜上, TBST 洗涤硝酸纤维素膜后,用含 5% 脱脂奶粉的 TBST 37℃ 封闭 2 h,加入 1:1000 稀释的 NDV 感染鸡抗血清于 4℃ 过夜杂交。TBST 洗涤 3 次后加入 1:2000 稀释的 AP-羊抗鸡二抗 37℃ 作用杂交 1 h。TBST 充分洗涤后,配制化学发光液显影,观察结果并使用 Multi Gauge 软件分析灰度值。

2 结果和分析

2.1 F 基因的克隆

2.1.1 RT-PCR: 以提取的病毒 RNA 基因组为模板反转录合成 cDNA,以 YL-1 和 YL-2 为引物,PCR 扩增获得大小约为 1700 bp 的 F 基因片段。

2.1.2 重组质粒的酶切、PCR 鉴定及序列测定: 重组质粒经 Xho I 和 Sal I 双酶切,琼脂糖凝胶电泳检测酶切产物,显示有一条 1.7 kb 的 F 基因片段和一条 2.8 kb 的 pMD18-T 载体片段。以重组质粒为模板,引物 YL-1 和 YL-2 进行 PCR 扩增,获得 1700 bp 的片段,说明插入片段为目的基因 F。序列分析表明目的基因的阅读框架长 1359 bp,编码 452 个氨基酸,并按正确的读码框架成功连接 (序列略)。

2.2 重组杆状病毒载体 pLM、pCMV-WPRE-F 和 pCMV-F 的鉴定

重组杆状病毒转移载体 pLM 经多克隆位点中的 Rsr II 和 EcoR I 双酶切后,0.8% 琼脂糖凝胶电泳鉴定,2 个条带分别符合 pFB/SD-PH-CMV (5.8 kb) 和片段 soe2 (850 bp) 的大小 (图 2-A)。pCMV-WPRE-F 和 pCMV-F 经 XbaI 和 EcoRI 双酶切后,pCMV-WPRE-F 获得 314 bp、589 bp、1350 bp、6001 bp 4 个条带 (图 2-B),pCMV-F 获得 314 bp、589 bp、1350 bp 和 5412 bp 4 个条带 (图 2-C),均与理论大小相符。

2.4 F 重组杆状病毒的筛选与鉴定

将经 PCR 鉴定筛选的重组 Bacmid-F DNA 转染 Sf9 昆虫细胞,120h 后细胞出现感染迹象。收取发生病变的细胞上清,提取病毒 DNA,以引物 YL-1 和 M13-47 进行 PCR 扩增,BV-CMV-WPRE-F 获得约为 3500 bp 的条带,BV-CMV-F 由于缺少 WPRE 调控元件 (598 bp),获得约为 2900 bp 的条带。2 支重组病毒均扩增出与目的大小相符的条带,表明获得了含有插入片段的阳性重组杆状病毒。

2.5 F 基因表达产物的 SDS-PAGE 和 Western blot 检测

将 F 重组杆状病毒侵染 SPF 鸡胚原代骨骼肌细胞,感染 3d 后裂解细胞收取蛋白,经 SDS-PAGE 检测,出现了约为 56 kDa 的蛋白条带,大小与预测的 F 蛋白大小一致 (图 3-A),表明 NDV F 基因在鸡原代骨骼肌细胞中进行了成功的表达。对上述表达产物进行 Western blot 检测,结果在约 56 kDa 处出现 1 条特异性反应条带 (图 3-B),证明目的蛋白 F 得以表达,且表达的蛋白具有反应原性。Western blot 结果经 Multi Gauge 软件分析,通过分析比较强度,

添加 WPRE 调控元件的重组杆状病毒 (BV-CMV-WPRE-F) 表达的 F 蛋白量明显高于未添加调控元件的重组杆状病毒 (BV-CMV-F)。另外, 在对照样

本 BV-CMV-F 中添加 10mmol/L 丁酸盐, 而含有 WPRE 调控元件的 BV-CMV-WPRE-F 不添加丁酸盐, 两者 F 蛋白的表达强度无明显差异 (图 3-C)。

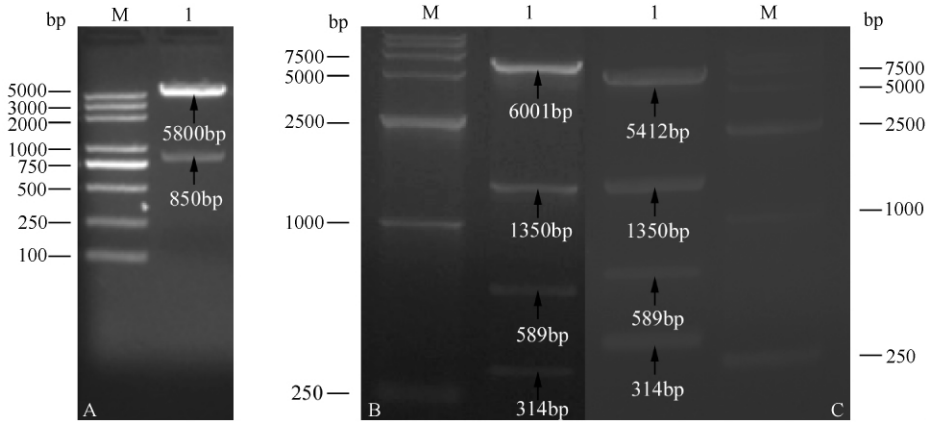


图 2. 重组杆状病毒载体酶切产物电泳图

Figure 2. The identification of recombinant baculovirus vector. M. DL15,000 DNA Marker; A: Lane1 is pLM digested with *EcoRI* and *Rsr II*; B: Lane1 is pCMV-WPRE-F digested with *XbaI* and *EcoRI*; C: Lane1 is pCMV-F digested with *XbaI* and *EcoRI*.

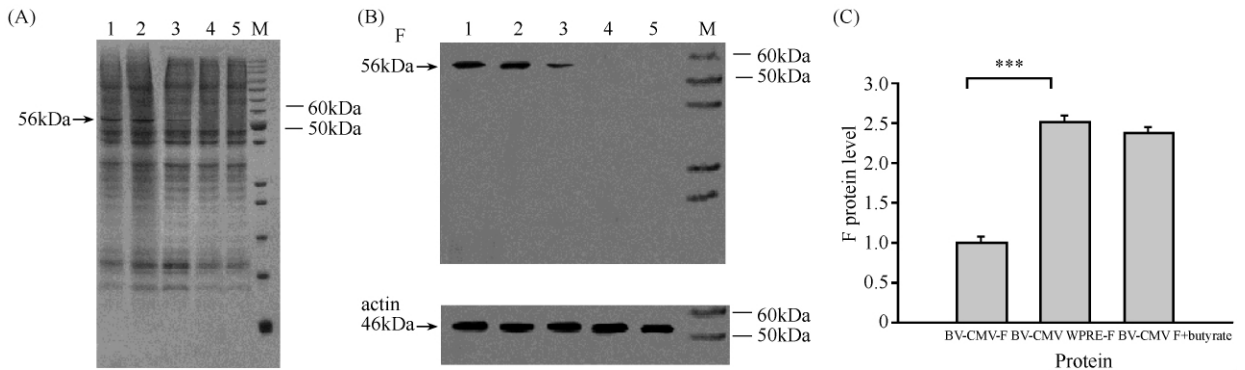


图 3. 重组杆状病毒表达 F 蛋白的 SDS-PAGE、Western blot 检测及蛋白强度

Figure 3. SDS-PAGE, Western blot and protein intensity of recombinant baculovirus expressed F protein. (A) and (B): Lane M is protein molecular weight marker; Lane1 is the expression result of BV-CMV-WPRE-F in MYO cell; Lane2 is the expression result of BV-CMV-F in MYO cell, adding 10mmol/L butyrate; Lane3 is the expression result of BV-CMV-F in MYO cell; Lane4 is empty baculovirus vector; Lane5 is control MYO cells. (C): The F protein expression level detected by western blot. Values are presented as the mean \pm SEM. (***) refers to $P < 0.001$

3 讨论

基因工程疫苗具有能在个体内持续表达抗原蛋白, 诱导机体产生针对多个抗原表位的免疫保护作用, 不像灭活疫苗影响 NDV 疫情的监测等优越性^[12], 因此受到国内外学者的瞩目。在畜禽中最常应用的重组痘苗病毒对人类安全具有潜在的危险

性, 可能造成重组病毒的扩散而危及人类健康。杆状病毒作为“非复制型”的基因转移载体能够介导外源基因在哺乳动物细胞、鸡原代细胞^[13]以及鱼细胞^[14]等非哺乳动物细胞中进行表达。与其他病毒载体相比, 杆状病毒在哺乳动物细胞中不复制、无细胞毒性, 且一段时间后病毒 DNA 降解, 减少发生副作用的可能性; 自然环境下杆状病毒的宿主为昆虫, 因此哺乳动物体内没有潜在的抗体和特异性 T 细

胞,可有效避免载体中和作用;其基因组巨大且具有良好的伸展性,可容纳 38kb 的外源片段;构建杆状病毒操作简单,易于获得高滴度的重组病毒。

但由于哺乳动物细胞不是杆状病毒的自然宿主,因此细胞嗜性不广泛、转导效率和转基因表达水平偏低、表达持续时间短暂等问题成为限制其进一步发展的瓶颈。就突破“瓶颈”而言,可从以下几个方面进行研究:哺乳动物细胞的类型、启动子的类型、基因表达调控元件的应用、添加化学助剂、病毒表面修饰以及改良转导技术。研究表明添加丁酸钠^[15]、曲古抑菌素 A^[15] 和丙戊酸^[16] 等组蛋白脱乙酰基酶抑制剂,可以显著提高杆状病毒介导的转基因表达效果,其机理是可以通过诱导组蛋白的超乙酰化来松弛染色质的结构^[17]。但是组蛋白脱乙酰基酶抑制剂在提高转基因表达水平的同时呈现出细胞毒性^[16]。所以转基因的高效表达大部分还是归因于启动子的强度以及基因表达调控元件^[18]。

启动子的强弱是影响基因表达的一个重要因素,各启动子在不同细胞系的启动效率不同。CMV 启动子是人巨细胞病毒立即早期启动子 (human cytomegalovirus immediate early promoter),在多种细胞中高水平表达报告基因和/或诱导强免疫应答,是真核表达载体公认的强启动子。研究还发现,一些细胞的启动子也可启动外源基因表达,如:人类泛素 C、U6、EF-1 α 、星形胶质细胞蛋白 (glial fibrillary acidic protein, GFAP) 组织特异性启动子,血小板衍生的生长因子 PDGF 启动子^[19],因此,选择合适的特异性启动子至关重要。本试验构建的带有 CMV-F 表达盒的重组杆状病毒在鸡原代骨骼肌细胞中成功表达 F 蛋白,说明 CMV 可有效启动重组病毒在非宿主的鸡原代细胞中表达。这与本实验小组报道的,CMV 启动子可以启动重组杆状病毒携带的 GFP 报告基因在鸡原代细胞中表达的结果一致^[13]。

基因表达调控元件 WPRE (Woodchuck hepatitis virus post-transcriptional regulatory element) 是位于病毒 3' 非编码区的 RNA 顺式作用元件,借助多个替代途径促进 RNA 的胞转基因高水平表达效果与添加丁酸盐法的效果相当,却不具有细胞毒性。在本试验中,根据前期试验结果证明丁酸盐终浓度达到

10mmol/L 时表达强度最高。因此对照样本 BV-CMV-F 中添加 10mmol/L 丁酸盐,而含有 WPRE 调控元件的 BV-CMV-WPRE-F 不添加丁酸盐。病毒感染 72h 后裂解细胞收获蛋白样品时,添加丁酸盐的对照样本细胞总数明显少于不添加丁酸盐的实验样本,Western blot 检测结果显示二者 F 蛋白的表达强度无明显差异。证明了基因水平添加 WPRE 元件对外源蛋白表达的增强作用与添加丁酸盐法基本相同,且 WPRE 元件不具有细胞毒性。

新城疫 F 蛋白与病毒穿入、细胞融合和溶血、病毒中和和抗体的诱导与识别等有关,因此 F 基因在机体抗感染免疫中起着重要作用,是研制基因工程疫苗主要利用的目标基因。本试验将 F 基因亚克隆到自主构建的杆状病毒转移载体 pLM 中,通过 Bac-to-Bac 系统筛选带有 CMV-F-WPRE 表达盒的重组杆状病毒,依靠杆状病毒感染鸡原代骨骼肌细胞的形式呈递 NDV F 抗原,表达了具有免疫原性的 F 蛋白,添加转录后调控元件 WPRE 的重组杆状病毒介导 F 蛋白的表达强度与添加丁酸盐法基本相同,可以增强外源基因在鸡胚原代细胞中的表达水平。重组杆状病毒研制的疫苗一方面可以自然感染的方式向机体呈递抗原基因,另一方面可以发挥与 DNA 疫苗相似的作用,将编码抗原蛋白的基因直接导入体内,不仅可以诱导持久的体液免疫,还可以诱生较强的细胞免疫应答,起到预防与治疗的双重作用。本试验利用杆状病毒作为基因转移载体,将 NDV F 抗原基因导入鸡原代骨骼肌细胞中,western blot 检测到较高水平的具有免疫原性的 F 抗原蛋白,为研制 NDV F 重组杆状病毒的基因工程疫苗奠定了坚实的基础。

参考文献

- [1] Wang X. Molecular biology of the Newcastle disease virus. *Animal Science & Veterinary Medicine*, 2001, 18 (3):28-30. (in Chinese)
王兴龙. 新城疫病毒分子生物学. 动物科学与动物医学, 2001, 18(3):28-30.
- [2] Taylor J, Edbauer C, Senelonger R, Bouquet JF, Norton E, Goebel S, Desmettre P, Paoletti E. Newcastle disease virus fusion protein expressed in a fowlpox virus

- recombinant confers protection in chickens. *Journal of Virology*, 1990, 64:1441-1450.
- [3] Pan Z, Jiao X, Zhang X, Zhang X, Huang J, Wan H, Liu X. DNA vaccine against Newcastle disease virus of Goose origin delivered by attenuated *Salmonella typhimurium* and its immunogenicity for mice. *Journal of Agricultural Biotechnology*, 2004, 12 (4): 412-415. (in Chinese)
潘志明, 焦新安, 张小荣, 张晓明, 黄金林, 万洪全, 刘秀梵. 运送鹅源新城疫病毒 DNA 疫苗的减毒沙门氏菌及其免疫原性. *农业生物技术学报*, 2004, 12 (4): 412-415.
- [4] Reddy SK, Sharma JM, Ahmad J, Reddy DN, McMillen JK, Cook SM, Wild MA, Schwartz RD. Protective efficacy of a recombinant herpesvirus of turkeys as an in ovo vaccine against Newcastle and Marek's diseases in specific-pathogen-free chickens. *Vaccine*, 1996, 14 (6): 469-477.
- [5] Wang Z, Wang Z, Chen P, Yang H. The recent advances on molecular biology of Newcastle disease virus. *Progress in Veterinary Medicine*, 2002, 2: 33-36. (in Chinese)
王忠田, 王泽霖, 陈溥言, 杨汉春. 新城疫病毒分子生物学最新研究进展. *动物医学进展*, 2002, 2: 33-36.
- [6] Hu YC. Baculovirus vectors for gene therapy. *Advance in Virus Research*, 2006, 68:287-320.
- [7] Kost TA, Condreay JP, Jarvis DL. Baculovirus as versatile vectors for protein expression in insect and mammalian cells. *Nature Biotechnology*, 2005, 23 (5): 567-575.
- [8] Hu YC. Baculoviral vectors for gene delivery: A Review. *Current Gene Therapy*, 2008, 8:54-65.
- [9] Mahonen AJ, Airene KJ, Purola S, Peltomaa E, Kaikkonen MU, Riekkinen MS, Heikura T, Roschier MM, Wirth T, Herttuala SY. Post-transcriptional regulatory element boosts baculovirus-mediated gene expression in vertebrate cells. *Biotechnology*, 2007, 131: 1-8.
- [10] Xu ZL, Mizuguchi H, Mayumi T, Hayakawa T. Woodchuck hepatitis virus post-transcriptional regulation element enhances transgene expression from adenovirus vectors. *Acta Biochimica and Biophysica*, 2003, 1621:266-271.
- [11] Liu X, Li K, Song J, Liang C, Wang X, Chen X. Efficient and stable gene expression in rabbit intervertebral disc cells transduced with a recombinant baculovirus vector. *Spine*, 2006, 31 (7): 732-735.
- [12] Wang XJ, Bai YD, Zhang GZ, Zhao JX, Wang M, Gao GF. Structure and function study of paramyxovirus fusion protein heptad repeat peptides. *Arch Biochem Biophys*, 2005, 436 (2): 316-322.
- [13] Ping WX, Ge JP, Li SX, Zhou H, Wang K, Feng YG, Lou ZW. Baculovirus-mediated gene expression in chicken primary cells. *Avian Diseases*, 2006, 50 (1): 59-63.
- [14] Leisy DJ, Lewis TD, Leong JA, Rohrmann GF. Transduction of cultured fish cells with recombinant baculovirus. *Journal of General Virology*, 2003, 84 (5): 1173-1178.
- [15] Condreay JP, Witherspoon SM, Clay WC, Kost TA. Transient and stable gene expression in mammalian cells transduced with a recombinant baculovirus vector. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1999, 96:127-132.
- [16] Hu YC, Tsai CT, Chang YJ, Huang JH. Enhancement and prolongation of baculovirus-mediated expression in mammalian cells: focuses on strategic infection and feeding. *Biotechnology Progress*, 2003, 19: 373-379.
- [17] Kramer OH, Gottlicher M, Heinzel T. Histone deacetylase as a therapeutic target. *Trends in Endocrinology and Metabolism*, 2001, 12:294-300.
- [18] Spenger A, Ernst W, Condreay JP, Kost TA, Grabherr R. Influence of promoter choice and trichostatin a treatment on expression of baculovirus delivered genes in mammalian cells. *Protein Expression and Purification*, 2004, 38: 17-23.
- [19] Wang CY, Li F, Yang Y, Guo HY, Wu CX, Wang S. Recombinant baculovirus containing the Diphtheria toxin a gene for malignant glioma therapy. *Cancer Research*, 2006, 66:5798-5806.

Construction of baculovirus vector with WPRE regulatory element to express Newcastle disease virus F gene in primary chicken embryo cells

Dongni Gao, Wenxiang Ping, Liying Jin, Wanli Shen, Gang Song, Xiaoyan Tang, Qi An, Yan Shen, Jingping Ge*

Key Laboratory of Microbiology, College of Life Science, Heilongjiang University, Harbin 150080, Heilongjiang Province, China

Abstract: [Objective] To construct the recombinant baculovirus with mammalian cell-specific promoter and woodchuck hepatitis virus post-transcriptional regulatory element (WPRE), to highly express Newcastle disease virus (NDV) F gene in the primary chicken embryo cells. [Method] We extracted total RNAs from NDV La Sota strain. Then the F gene was amplified by reverse transcription polymerase chain reaction. We constructed the baculoviral vector (pCMV-WPRE-F) with F gene fused with the WPRE near its 3' end, which expressed under the control of the CMV promoter. The F gene recombinant bacmid was obtained by Bac-to-Bac system and transfected into Sf9 insect cells to acquire F gene recombinant baculovirus. After amplification of recombinant baculovirus, the recombinant virus was transfected into chicken primary cells with 50 multiplicity of infection, and the proteins were harvested at 72 h after infection. The F protein expression levels mediated by WPRE regulatory element were analyzed. [Results] Western blot results show that the F gene was successfully expressed in chicken primary cells. The product was a 56 kDa protein and could be recognized by anti-NDV serum. The WPRE fusion significantly improved the F gene expression as 10 mmol/L butyrate did, but different to butyrate, the WPRE regulatory element was nontoxic to cells. [Conclusion] The optimized recombinant baculovirus could efficiently deliver NDV F gene into chicken primary cells and express the F antigen protein. In addition, the WPRE regulatory element could increase the expression levels of exogenous gene mediated by baculovirus in chicken primary cells. The research provides us a potential basis for the gene engineered vaccines of NDV and other avian infectious disease based on baculovirus vector.

Keywords: Newcastle disease, F gene, baculovirus, chicken primary cell, woodchuck hepatitis virus post-transcriptional regulatory element (WPRE)

(本文责编:王晋芳)

Supported by the National Natural Science Foundation of China (31270143), by the High-level Talents (innovation team) Projects of Heilongjiang University (Hdtd2010-17), by the Education Department of Heilongjiang Province Scientific Technology Research Project (12511423) and by the Scientific and Technological Innovation Team (Agricultural Microbe Fermentation Technology) of Colleges and Universities of Heilongjiang Province

* Corresponding author. Tel: +86-451-86609016; E-mail: gejingping@126.com

Received: 24 July 2013/ Revised: 15 December 2013