

麻鸡新城疫病毒 SX-1 株 *F* 和 *HN* 基因在真核细胞中共表达研究

李红丽 詹丽娥 张伟业 唐娟 陆冰洋 王彩先

(山西省农业科学院 畜牧兽医研究所 山西 太原 030032)

摘要: 以山西省农业科学院畜牧兽医研究所预防兽医研究室克隆的 pG-*F* 和 pG-*HN* 质粒为模板,PCR 扩增麻鸡新城疫病毒 SX-1 株 *F* 基因和 *HN* 基因,并以由 15 个柔性氨基酸构成的柔性短肽作为 Linker 将 *F* 及 *HN* 基因片段体外连接,插入 pCI-neo 真核表达载体,构建麻鸡新城疫病毒 SX-1 株 *F* 基因和 *HN* 基因共表达载体 pCI-*F-HN*,并在 Vero 细胞中转染表达,进行间接免疫荧光检测。结果显示,麻鸡新城疫病毒 SX-1 株 *F-HN* 组合基因在 Vero 细胞中得到较高水平的表达,在荧光显微镜下能够观察到较强的荧光,说明 *F-HN* 组合蛋白具有良好的反应原性。为下一步研究高效亚单位基因工程苗奠定基础。

关键词: 麻鸡新城疫病毒; SX-1 株; *F-HN* 基因; 共表达

中图分类号: S831; Q782 文献标识码: A 文章编号: 1000-7091(2011)03-0047-04

The Spotted Chicken Newcastle Disease Virus Strain SX-1 of *F* Gene and *HN* Gene Co-Express in Eukaryotic Cell

LI Hong-li, ZHAN Li-e, ZHANG Wei-ye, TANG Juan, LU Bing-yang, WANG Cai-xian

(Institute of Animal Husbandry and Veterinary, Shanxi Academy of Agriculture Sciences, Taiyuan 030032, China)

Abstract: Based on The pG-*F* and pG-*HN* cloning plasmid templated in our lab, Newcastle disease virus strain SX-1 sequences of *F* gene and *HN* gene isolated from spotted chicken were PCR amplified, 15 amino acids as flexible short peptide Linker connected *F* and *HN* genetic fragments in vitro was inserted into pCI-neo eukaryotic expression vector to construct the co-expression vector pCI-*F-HN* of Newcastle disease virus strain SX-1 sequences of *F* gene and *HN* gene and transfected in Vero cells, and carried on expression of indirect immune fluorescence detection. The results showed that virus SX-1 strain *F-HN* combination of genes in Vero cells had high level expression and in fluorescence microscopy strong fluorescence signal could be observed, which suggested that *F-HN* combination protein had good reactionogenicity. It provides for further research efficient subunits genetic engineering vaccine in foundation.

Key words: Spotted chicken newcastle disease virus; Strain SX-1 sequences; *F-HN* gene; Co-expression

新城疫是由副黏病毒科的单股负链 RNA 病毒引起的一种高度接触性传染病,被 OIE 列为对动物危害最大的 A 类传染病之一。其症状是高热、呼吸困难、下痢和出现神经症状,是以消化道黏膜出血为典型症状的急性传染病^[1]。该病的发病率和死亡率高达 90% 以上,常呈毁灭性流行,因此给养禽业造成了巨大的经济损失。NDV 基因组全长达 15 186 bp,共编码 6 个蛋白,其中 F 蛋白负责病毒穿入细胞,产生细胞融合和溶血作用;HN 蛋白负责

把病毒吸附到细胞受体和破坏细胞受体。F 蛋白和 HN 蛋白与病毒的致病性有关,具有良好的免疫原性,是 NDV 主要的保护性抗原。

本试验克隆了麻鸡新城疫病毒 SX-1 株 *F* 和 *HN* 基因,通过一个柔性短肽 (Gly₄Ser)₃ 将两个基因同时连接到 pCI-neo 哺乳动物细胞表达载体中,并在 Vero 细胞中成功共表达,为研究新城疫病毒的新一代亚单位疫苗打下理论基础,同时为病毒对宿主细胞融合功能的研究做好铺垫。

收稿日期: 2011-03-17

基金项目: 山西省自然科学基金资助项目 (2008011072)

作者简介: 李红丽 (1972-),女,山西翼城人,助理研究员,主要从事动物传染病研究工作。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 质粒及菌种 $pG-F$ 、 $pG-HN$ 质粒由山西省农业科学院畜牧兽医研究所预防兽医研究室构建; DH5 α 感受态由山西省农业科学院畜牧兽医研究所预防兽医研究室制备保存; 表达载体 pCI-neo 为 Promega 公司产品; 非洲绿猴肾细胞 (Vero 细胞) 由山西省农业科学院畜牧兽医研究所预防兽医研究室保存。

1.1.2 酶及试剂 DNA Markers (DL 2 000, DL 15 000)、各种限制性核酸内切酶为 TaKaRa 公司产品; T4 DNA Ligase 为 Promega 公司产品; Lipofectamine TM2000 购于 Invitrogen 公司; DMEM 为 GIBCO BRL 公司产品; G418 为 GENETICIN 公司产品; 一抗为鼠抗麻鸡新城疫病毒阳性血清, 由山西省农业科学院畜牧兽医研究所预防兽医研究室自制; 二抗为辣根酶标记山羊抗小鼠抗体, 购自北京中杉金桥生物技术有限公司。

1.2 方法

1.2.1 F 基因和 HN 基因的扩增^[2-4] 参考 GeneBank 收录的 NDV F 基因、 HN 基因核苷酸序列, 设计并合成了 2 对用以扩增麻鸡新城疫病毒 SX-1 株 F 基因和 HN 基因特异性的引物。

$F_{\text{上}}$: 5'-TTAGAAATTCATGGGCTCCAAACCTTCT-3' (含有 $EcoR$ I 酶切位点);

$F_{\text{下}}$: 5'-AATACGCGTT GCTCTTGTAGTGGCTC-3' (含有 Mlu I 酶切位点);

$HN_{\text{上}}$: 5'-TAAACGCGTggcgggcgggctcaggcgggcg-gcggtcaggcgggcggtctcaATGACCGCGCGGTTAA-CAGA-3' (含有 Mlu I 酶切位点);

$HN_{\text{下}}$: 5'-GACGTCGACTTAACTCTATCATCCT-TGAG-3' (含有 Sal I 酶切位点);

其中, 下划线为酶切位点, 斜体为保护碱基, 黑体小写部分为柔性短肽序列; 引物 $F_{\text{下}}$ 去除终止密码子 TGA。

分别以 $pG-F$ 、 $pG-HN$ 质粒为模板进行 PCR 扩增。PCR 采用 50 μL 反应体系, 其组分为: DEPC 水 34 μL , $10 \times \text{LA PCR Buffer}$ (Plus Mg^{2+}) 5 μL , dNTP Mixture (2.5 mmol/L) 3 μL , 上、下游引物 (10 pmol/ μL) 各 2 μL , 质粒模板 3 μL , LA Taq 酶 (1 U/ μL) 1 μL 。PCR 循环条件为: 97 $^{\circ}\text{C}$ 预变性 3 min; 95 $^{\circ}\text{C}$ 变性 40 s, 55 $^{\circ}\text{C}$ 退火 40 s, 72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 2 min, 30 个循环; 72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 10 min。以 1% 的琼脂糖凝胶

电泳鉴定核酸条带位置。

1.2.2 重组质粒 pCI- F 的构建 用 $EcoR$ I 和 Mlu I 两个核酸限制性内切酶消化 F 基因的 PCR 产物, 对表达载体 pCI-neo 进行酶切消化, 回收酶切产物, 将消化后的 F 片段和 pCI-neo 作连接反应。连接体系为 10 μL : F 基因片段 6 μL , pCI-neo 2 μL , $10 \times \text{T4 DNA Ligase Buffer}$ 1 μL , T4 DNA Ligase 1 μL 。16 $^{\circ}\text{C}$ 连接过夜。取连接产物转化大肠杆菌 DH5 α , 按 BioFlux 质粒小量提取试剂盒提取重组质粒 pCI- F 。

1.2.3 重组质粒 pCI- $F-HN$ 的构建^[5] 用 Sal I 和 Mlu I 两个核酸限制性内切酶消化 HN 基因的 PCR 产物, 对重组质粒 pCI- F 进行酶切消化, 回收酶切产物。将消化后的 HN 片段和 pCI- F 作连接反应。连接体系为 10 μL : HN 基因片段 6 μL , pCI- F 2 μL , $10 \times \text{T4 DNA Ligase Buffer}$ 1 μL , T4 DNA Ligase 1 μL 。16 $^{\circ}\text{C}$ 连接过夜。取连接产物转化大肠杆菌 DH5 α , 按 Bioflux 质粒小量提取试剂盒提取重组质粒 pCI- $F-HN$ 。

1.2.4 重组质粒的酶切鉴定 获得的重组质粒经相应的限制性核酸内切酶以 3 种方式进行酶切鉴定。将酶切产物在 1% 琼脂糖凝胶中电泳, 鉴定酶切结果。

1.2.5 序列测定 将构建好的阳性重组质粒 pCI- $F-HN$ 送上海生物工程有限公司进行序列测定。

1.2.6 细胞转染 按照 Lipofectamine^{TM2000} 产品说明书进行细胞转染, 将质粒-Lipofectamine 混合物加入每孔含 Vero 细胞的 DMEM 中混匀, 于 37 $^{\circ}\text{C}$ 5% CO_2 孵育培养 6 h, 吸弃转染液, 加入含有 10% FBS 的 DMEM 培养液 2 mL, 继续孵育 48 h, 然后以 G418 300 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 筛选 4 周, 作为靶细胞, 同时设空载体质粒为对照组。收集阳性细胞和正常细胞用于间接免疫荧光检测。

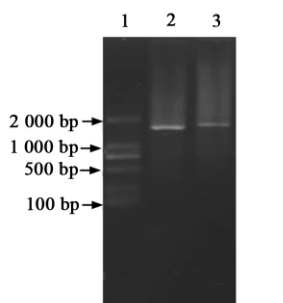
1.2.7 间接免疫荧光试验 待阳性细胞长成单层时, 用 80% 冷丙酮固定 30 min, pH 值为 7.4 的 PBST 洗涤 4 次 (每次 4 min); 加入小鼠高免血清, 37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 1 h, PBST 洗涤 4 次 (每次 5 min); 加入 FITC 标记的羊抗鼠二抗, 37 $^{\circ}\text{C}$ 感作 1.5 h, PBST 洗涤 4 次 (每次 5 min); 加入 50 μL 90% 甘油缓冲液, 吸弃甘油缓冲液, 荧光显微镜下观察结果。

2 结果与分析

2.1 PCR 扩增结果

以 $F_{\text{上}}$ 和 $F_{\text{下}}$ 引物扩增出约 1.66 kb 的核酸条带, 与预计大小相符; 以 $HN_{\text{上}}$ 和 $HN_{\text{下}}$ 扩增出约 1.75

kb 的核酸核酸条带,与预计大小相符(图 1)。



1. DL2000; 2. *F* 基因; 3. *HN* 基因。

1. DL 2 000; 2. *F* gene; 3. *HN* gene.

图 1 *F* 基因及 *HN* 基因 PCR 结果

Fig. 1 The PCR results of *F* gene and *HN* gene

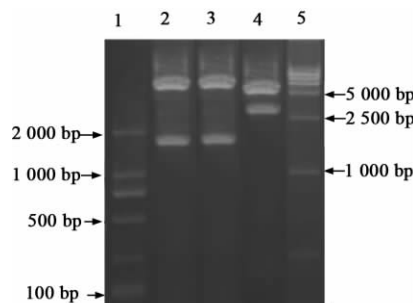
2.2 pCI-*F-HN* 酶切鉴定结果

重组质粒 pCI-*F-HN* 经 *EcoR* I、*Mlu* I 双酶切切出 *F* 基因片段(约 1.66 kb)和线性 pCI-*HN* 质粒(约 7.2 kb);重组质粒 pCI-*F-HN* 经 *Mlu* I、*Sal* I 双酶切切出 *HN* 基因片段(约 1.75 kb)和线性 pCI-*F* 质粒(约 7.2 kb);重组质粒 pCI-*F-HN* 经 *EcoR* I、*Sal* I 双酶切切出 *F-HN* 基因片段(约 3.4 kb)和线性 pCI-neo 质粒(约 5.5 kb),各基因片段与预计大小相符(图 2)。

2.3 序列测定结果

酶切鉴定后的阳性重组质粒 pCI-*F-HN* 经上海生物工程技术有限公司测序。核酸序列以与基因组序列互补 5'→3'方向的 cDNA 表示 *F+HN* 基因核苷酸全长 3 426 bp,包括 *F* 基因、*HN* 基因以及连接短肽

共编码 1 141 个氨基酸,与麻鸡新城疫病毒 SX-1 株所测得的 *F/HN* 基因核苷酸序列一致。



1. DL 2 000; 2. pCI-*HN* + *F*(*EcoR* I + *Mlu* I);

3. pCI-*F* + *HN*(*Mlu* I + *Sal* I);

4. pCI-neo + *F-HN*(*EcoR* I + *Sal* I); 5. DL 15 000.

图 2 重组质粒 pCI-*F-HN* 酶切鉴定

Fig. 2 Restriction analysis and PCR of recombinant plasmid pCI-*F-HN*

2.4 重组质粒 pCI-*F-HN* 转染 Vero 细胞

将重组质粒转染 Vero 细胞 48 h,细胞形态开始发生变化,部分细胞圆缩脱落,颗粒物质增多,折光性增强,表明重组质粒已转入细胞中,正常细胞无类似细胞形态变化。转染细胞经 G418 筛选 28 d 后,收集阳性细胞进行间接免疫荧光试验,经空载体 pCI-neo 转染细胞和正常细胞对照在荧光显微镜下未见到绿色荧光,呈阴性。经重组质粒 pCI-*F-HN* 转染的 Vero 细胞膜表面在荧光显微镜下可见强烈的绿色荧光,几乎所有的细胞均呈阳性,持续 72 h 荧光强度不减小(图 3)。

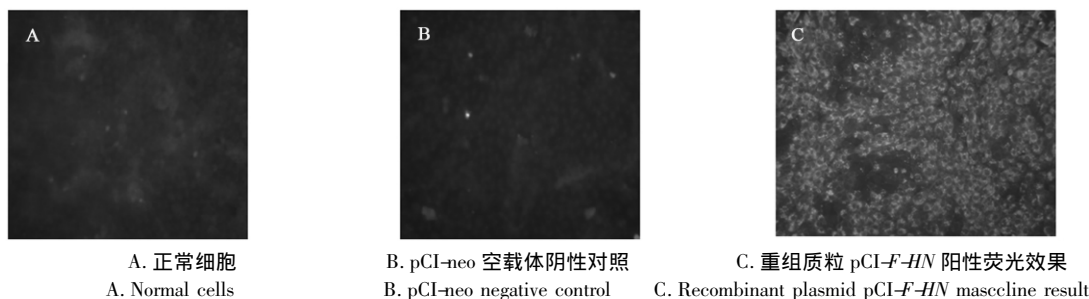


图 3 重组质粒 pCI-*F-HN* 在 Vero 细胞中表达产物免疫荧光结果(100 ×)

Fig. 3 Immunofluorescence of expression product of recombinant plasmid pCI-*F-HN* in Vero cells(100 ×)

3 讨论

本研究应用的 pCI-neo 真核表达载体是 Promega 公司的产品,长 5 472 bp,含有 Amp 抗性基因,携带有泛宿主性的人巨细胞病毒(CMV)早期快速增强子/启动子、肉瘤病毒(SV40)早期启动子/增强子和晚期多腺苷酸化信号^[6-8],以保证插入的 DNA 序列在多种动物细胞系中高效瞬时或稳定表达;pCI-neo 载体还携带有新霉素(neo)磷酸转移酶基因作为 G418 筛选标记,可用于哺乳类细胞的瞬时或

稳定表达。SV40 晚期多腺苷酸化信号通过 RNA 聚合酶 II 来终止转录,同时在 RNA 转录产物的 3' 端产生大约 200 ~ 250 个腺苷残基。多腺苷酸化能够增强 RNA 的稳定性和转录,pCI-neo 多克隆位点下游的 SV40 晚期多腺苷酸化信号比 SV40 早期多腺苷酸化信号更能提高 RNA 的稳定性^[9]。目前,国内外学者已用 pCI-neo 载体表达了多种外源基因,因此,本试验采用该真核表达载体构建 pCI-*F-HN*,为今后研制基因工程苗奠定基础。

在构建 pCI-*F-HN* 时,我们在引物中设计了包

含编码 15 个低疏水性及低电荷效应的氨基酸序列 (Gly-Gly-Gly-Gly-Ser) 3 作为接头,甘氨酸结构简单,易于折叠,对结构蛋白的空间构象影响小,从而使表达的结构蛋白空间构象与天然产物相近,以保持其生物学活性^[10,11]。通过连接短肽将 *F* 基因的 3'-C 端与 *HN* 基因的 5'-N 端相连形成一个组合蛋白,使其同时具有 *F* 蛋白和 *HN* 蛋白的抗原表位及免疫活性。

本试验成功将 *F* 基因和 *HN* 基因同时插入到真核表达载体 pCI-neo 的 T7RNA 聚合酶启动子下游,构建了真核表达载体 pCI-*F-HN*,经酶切鉴定及测序鉴定正确,并在脂质体介导下,将重组质粒 pCI-*F-HN* 转染 Vero 细胞,6418(300 µg/mL) 筛选 4 周后,经间接免疫荧光试验进行表达产物检测,表明真核重组质粒 pCI-*F-HN* 成功在 Vero 细胞中得到表达,通过间接免疫荧光试验观察到细胞膜表面发出强烈的绿色荧光,所构建的真核表达载体可以在体外进行表达。关于该重组质粒的免疫原性的优劣还有待进一步说明。

病毒包膜与靶细胞膜发生融合是副黏病毒感染并进入宿主细胞的一个关键步骤。这一过程需由病毒包膜的两种糖蛋白来完成,一种是血凝素-神经氨酸酶(*HN*),另一种是融合蛋白(*F*)。若被感染细胞的表面也有 *F* 蛋白和 *HN* 蛋白的表达,同样可使细胞与细胞之间发生膜融合。*HN* 蛋白主要负责病毒粒子与细胞受体(神经氨酸)最初的结合(吸附)和破坏这种结合的相互拮抗作用,它作用于受体位点以后,会诱导 *F* 蛋白与细胞膜发生融合。*F* 蛋白主要负责病毒包膜与宿主细胞膜的融合,使病毒基因组进入细胞内。然而,*F* 蛋白单独表达时并不能完成这一融合过程,需要和同源性 *HN* 蛋白共表达时才能显示出细胞融合活性,和异源性 *HN* 蛋白共表达时不能引起细胞融合^[12-14]。*F* 和 *HN* 的相互作用具有极强的特异性,这种特异性提示 *F* 与同源 *HN* 之间存在着相互联系的特异性区域,使得相互之间能够进行信息的传递。这将为下一步研究病毒基因组的融合功能,以及 *F* 蛋白的具体融合位点的确定打下基础。

参考文献:

- [1] 李爱英. 肉鸡非典型新城疫的发生与防治[J]. 山西农业科学, 2009, 37(2): 95-96.
- [2] 王学理, 武迎红, 丁壮, 等. 鹅源禽副黏病毒 NA-1 株生物学特性的研究[J]. 吉林农业大学学报, 2006, 28(1): 73-97.
- [3] 符芳, 姜北宇, 张莉, 等. 新城疫病毒 *LaSota F* 基因克隆及原核表达[J]. 华北农学报, 2006, 21(3): 117-120.
- [4] 张丽青, 王爱华, 张秀珊, 等. 新城疫病毒河北分离株 *F* 基因的克隆及序列分析[J]. 华北农学报, 2008, 23(4): 19-22.
- [5] 王学理, 丁壮, 左玉柱, 等. 鹅副黏病毒 NA-1 分离株 *HN* 蛋白基因的克隆与序列分析[J]. 中国预防兽医学报, 2005, 27(1): 18-21.
- [6] 王会中, 付秋霞, 高明, 等. 小鼠脂联素与绿色荧光蛋白融合基因表达载体的构建及在 COS-7 细胞中的表达[J]. 生物技术通讯, 2005, 16(5): 492-495.
- [7] 由振强, 于连, 翁继锋, 等. 鸡白细胞介素 2 真核表达质粒的构建、表达及对 AIV 疫苗免疫增强作用研究[J]. 浙江农业学报, 2005, 17(6): 350-353.
- [8] 王福祥, 孙永涛, 孙永年, 等. 中国株 HIV-1 *gag* 基因核酸疫苗免疫小鼠的实验研究[J]. 解放军医学杂志, 2004, 29(5): 430-432.
- [9] HS 态 ase D J, Romero C H. Partial protection against infectious bursal disease virus through DNA mediated vaccination with the VP2 capsid protein and chicken IL-2 genes [J]. Vaccine, 2004, 22(9): 1249-1259.
- [10] Zhang Zuiwei, Heng Zhengchang. Randomized Terminal Linker-dependent PCR: A Versatile and Sensitive Method for Detection of DNA Damage [J]. Biomedical and Environmental Science, 2002, 15: 203-208.
- [11] 戴勇, 徐卓佳, 李体远. EPO-Linker-EGFP 融合蛋白的设计和生物活性预测[J]. 广东医学, 2004, 25(11): 1247-1248.
- [12] Lamb R A. Paramyxovirus fusion: A hypothesis for changes [J]. Virology, 1993, 197: 1-11.
- [13] Stone-hulslander J, Morrison T G. Detection of an interaction *HN* and *F* proteins in Newcastle disease virus-infected cells [J]. J Virol, 1997, 71: 6287-6295.
- [14] 程宝艳, 余为一, 彭明义, 等. 鸡新城疫病毒 *F* 基因部分片段克隆表达及其抗体制备[J]. 安徽农业科学, 2008, 29: 86-88.