

犬瘟热病毒水貂分离株 F 基因真核表达载体的构建与表达

苏凤艳,宗春苗,王卓聪,丁庆东,王全凯

(吉林农业大学 中药材学院,吉林 长春 130118)

[摘 要] 为了构建犬瘟热病毒 F 基因真核表达载体,利用 RT-PCR 方法扩增出水貂源犬瘟热病毒分离株的 F 基因,将其克隆至 pMD-18T 载体上,用 *Bam*H 和 *Kpn* 进行双酶切,回收目的基因。将目的基因亚克隆至 pcDNA3.1(+)中,获得真核重组质粒 pcDNA3.1-CDVF。通过脂质体介导法将 pcDNA3.1-CDVF 转染至 BHK-21 细胞中,并利用间接免疫荧光试验和 RT-PCR 法检测 pcDNA3.1-CDVF 在 BHK-21 细胞中的表达情况。结果表明,真核重组表达质粒 pcDNA3.1-CDVF 构建成功,F 基因可在 BHK-21 细胞中表达。

[关键词] 水貂;犬瘟热病毒;F 基因;真核表达

[中图分类号] Q78

[文献标识码] A

[文章编号] 1671-9387(2007)08-0024-05

Construction and expression of eukaryotic expression plasmid for F gene of canine distemper virus Isolated from mink

SU Feng-yan, ZONG Chun-miao, WANG Zuo-chong, DING Qing-dong, WANG Quan-kai

(Chinese Medicinal Materials College, Jilin Agricultural University, Changchun, Jilin 130118, China)

Abstract : In order to construct eukaryotic expression plasmid for F gene of canine distemper virus, the F gene of CDV strain isolated from mink was amplified by reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR). The amplified fragments were cloned into pMD-18T simple vector. Objective gene was obtained by digesting the cloning plasmid with *Bam*H and *Kpn*, and the eukaryon recombinant expression plasmids was constructed by re-cloning the objective gene into pcDNA3.1 (+) vector. Eukaryon recombinant expression plasmid pcDNA3.1-CDVF was transfected into BHK-21 cell by using lipoplast mediate method and it was proved with indirect fluorescent antibody technique and RT-PCR detection that the objective gene was successfully expressed in BHK-21 cell. The results of the study provided fundamental information for the further study on the prevention of mink CD and new generation vaccine.

Key words : mink; canine distemper virus; F gene; eukaryotic expression

犬瘟热 (Canine distemper, CD) 系由副粘病毒科麻疹病毒属的犬瘟热病毒 (Canine distemper virus, CDV) 引起的急性、热性、高度接触性传染病^[1], 是当前对经济动物养殖、野生动物保护、观赏动物及养犬业危害较大的疫病之一。目前, 预防犬瘟热的方法主要是弱毒疫苗接种, 但是弱毒疫苗对不同种

属动物的安全性差异很大, 甚至可引起某些动物出现犬瘟热临床症状, 具有散毒的危险^[2-3]。特别是近年来, CDV 在不断发生变异, 不同地域来源的 CDV 的生物学特性存在差异, 说明 CDV 可能具有基因多样性^[4]。现已证明, 目前流行的野毒株与标准的 Covac、Rockborn、Onderstepoort 和 Lederle 等疫苗

†收稿日期] 2007-03-06

[基金项目] 苏凤艳 (1973 -), 女, 吉林集安人, 在读博士, 主要从事经济动物疾病研究。E-mail: sufuy110@sohu.com

[作者简介] 王全凯 (1958 -), 男, 吉林省长春市人, 教授, 博士生导师, 主要从事经济动物疾病研究。

株在抗原性、致细胞病变类型(CPE)和毒力等生物学特性方面存在部分差异^[5-7]。欧洲一些地区和日本等在已免疫过的犬中爆发过犬瘟热^[6,8-9]。因此,开发新型、安全、高效的抗犬瘟热疫苗,已成为控制该病的当务之急。

犬瘟热病毒是负链单股不分节的 RNA 病毒,主要由 6 种结构蛋白基因构成,分别编码核衣壳蛋白(Nucleocapsid protein, N 或 NP)、磷蛋白(Phospho protein, P)、膜蛋白(Matrix, M)、融合蛋白(Fusion protein, F)、血凝蛋白(Hemagglutinin protein, H 或 HA)、大蛋白(The large protein, L),其中 F 蛋白可介导病毒与感染细胞、感染细胞与非感染细胞间的融合,使病毒在宿主体内具有扩散的能力^[10],是犬瘟热病毒的主要保护性抗原之一,亦是近年来研制犬瘟热疫苗的首选抗原。本研究构建了表达水貂源犬瘟热病毒 F 基因的真核表达载体 pcDNA3.1-CDVF,并体外转染 BHK-21 细胞,用间接荧光抗体法和 RT-PCR 法检测了目的蛋白的表达情况,以期为新 CDV 疫苗的研制奠定基础。

1 材料与方法

1.1 试验材料

1.1.1 毒株、菌株与细胞 CDV 由吉林农业大学中药材学院经济动物基因工程实验室,用 Vero 传代细胞从 1 只临床疑似犬瘟热的病死水貂肝脏中分离获得,经系统的病毒学鉴定后保存^[11]; *E. coli* JM109 由吉林农业大学中药材学院经济动物基因工程实验室保存;Vero 细胞和 BHK-21 细胞由吉林大学和和平校区(原解放军军需大学)胡微博士惠赠。

1.1.2 载体 pMD-18T 载体为 TaKaRa 公司产品,pcDNA3.1(+)由清华大学庞海教授惠赠。

1.1.3 主要试剂 RNAGentsR Total RNA Isolation System Kit 为 Promega 公司产品,RT-PCR 试剂盒、*Bam*H I、*Kpn*I、核酸分子量标准和棱华-SofastTM基因转染试剂盒为 TaKaRa 公司产品,琼脂糖为 Spanish 公司产品,X-gal 为 Bebcos 公司产品,氨苄青霉素(Amp)、IPTG 为 Sigma 公司产品,DNA 凝胶回收纯化试剂盒、质粒 DNA 回收和纯化试剂盒为杭州维特洁生化技术有限公司产品,酵母浸出粉、胰蛋白胨为 Oxoid 公司产品,FITC 标记的山羊抗兔 IgG 为北京鼎国生物技术有限公司产品,兔抗 CDV 阳性血清由吉林省左家特产研究所赠送。

1.2 CDV F 基因的 RT-PCR 扩增

1.2.1 引物的设计与合成 根据 GenBank 中的

CDV Onderstepoort 株 F 基因序列(AF378705),设计 1 对扩增 CDV F 基因的 PCR 引物,上游引物:5'-GGGTACCTCCAACCTCAATGCTCAAG-3';下游引物:5'-CGGATCCA GAGCGCCTAACCGTCTC-3'。

上、下游引物 5'端分别引入 *Kpn*I 和 *Bam*H 酶切位点,预期扩增的基因片段长度为 1 067 bp。引物由上海生物工程公司合成。

1.2.2 CDV 的增殖及 RNA 的提取 弃去长满单层非洲绿猴肾细胞(Vero 细胞)的培养液,接种 CDV 水貂分离株,37℃感作 1 h 后,弃去病毒液。加入含体积分数 2%胎牛血清的 RPMI 1640 培养液,37℃

培养 72 h。按试剂盒说明提取总 CDV RNA,用无 RNase 去离子水溶解后,-20℃保存。

1.2.3 RT-PCR 扩增及产物的纯化 以犬瘟热病毒 RNA 为模板,对 F 基因进行扩增。RT 反应的总反应体系为 10 μL,其中 MgCl₂ 2 μL,10×RT 缓冲液 1 μL,ddH₂O 0.75 μL,dNTP 1 μL,RNase 抑制剂 0.25 μL,AMV 0.5 μL,下游引物 0.5 μL,模板 RNA 4 μL。反转录条件:42℃ 20 min,99℃ 5 min,5℃ 5 min。PCR 反应体系为 50 μL:5×PCR 缓冲液 10 μL,Ex TaqE 0.25 μL,上游引物 0.5 μL,ddH₂O 34.25 μL,RT 产物 5 μL。反应条件为:94℃ 预变性 2 min;94℃ 热变性 30 s;60℃ 退火 30 s;72℃ 延伸 1 min,共 35 个循环;最后 72℃ 延伸 10 min。扩增产物用 10 g/L 琼脂糖凝胶电泳鉴定,并以 DNA 凝胶回收纯化试剂盒进行纯化,操作方法按产品说明书进行。

1.3 克隆质粒 pMD-18T-CDVF 的构建与鉴定

纯化的 PCR 产物与 pMD-18T simple vector 于 16℃ 连接 8 h,构建重组质粒 pMD-18T-CDVF,连接产物转化 *E. coli* JM109。*E. coli* JM109 感受态的制备(CaCl₂法)和转化参考文献[12]进行。转化产物于 37℃ 220 r/min 培养 45 min,涂布于含有 X-Gal 和 IPTG 的 LB 琼脂平板(含 100 mg/L Amp)上,37℃ 培养过夜。通过异丙基-D-硫代半乳糖苷(IPTG)诱导和 X-Gal 显色进行初步筛选,挑取白色菌落,接种于含 60 μg/mL Amp 的液体培养基中,37℃ 振荡培养过夜。碱裂解法小量提取质粒,并对提取的质粒进行 *Kpn*I 和 *Bam*H 双酶切及 PCR 鉴定,选取阳性克隆送至大连宝生物公司测序。

1.4 真核表达质粒 pcDNA3.1-CDVF 的构建与重组子的筛选

以 *Kpn*I 和 *Bam*H 双酶切重组质粒 pMD-

18 T-CDVF 和 pcDNA3.1 (+) 为载体,切胶回收后,按照载体 插入片段 = 1 : 3 (体积比),取适量线性化载体 pcDNA3.1 和 CDV F 基因片段混匀,加入 T₄DNA 连接酶于连接反应体系中,16 ℃ 连接 8 h,构建真核表达质粒 pcDNA3.1-CDVF。连接产物转化 *E. coli* JM109 感受态细菌,将转化产物涂布于 LB 琼脂平板中。以碱裂解法小量提取质粒进行 *Kpn* 单酶切鉴定及 *Kpn*、*Bam*H 双酶切鉴定。

1.5 真核表达质粒 pcDNA3.1-CDVF 转染 BHK-21 细胞

参照梭华-Sofast™ 基因转染试剂说明书,通过脂质体介导法将 pcDNA3.1-CDVF 转染至 BHK-21 细胞中。具体过程为:将 BHK-21 细胞传至放有盖玻片的 6 孔细胞培养板中,待细胞生长至 80 % 左右汇合时,加入梭华-Sofast™/DNA 复合物,并轻轻摇动使其混合均匀,置于 37 ℃、体积分数 5 % CO₂ 培养箱中孵育 24 ~ 48 h。同时设 pcDNA3.1 (+) 转染 BHK-21 细胞对照组。

1.6 CDV F 基因在 BHK-21 细胞中的表达及鉴定

1.6.1 间接免疫荧光抗体检测 (IFA) 取出转染的细胞飞片,晾干后,用丙酮固定细胞 5 min, PBS 洗涤,加入兔抗 CDV 阳性血清,37 ℃ 感作 1 h, PBS 洗涤后加入 FITC 标记的山羊抗兔 IgG,37 ℃ 感作 1 h,于荧光显微镜下观察并照相。

1.6.2 RT-PCR 鉴定 收集转染细胞,提取总 RNA,进行 RT-PCR 鉴定。

2 结果与分析

2.1 CDV F 基因的获得

由图 1 可见,以病毒 RNA 为模板,应用作者所设计的引物扩增出了约 1 000 bp 的基因片段,与预期 DNA 片段大小基本相符。

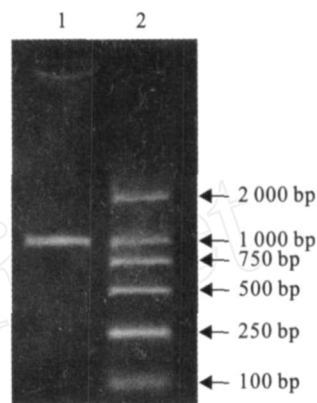


图 1 F 基因 RT-PCR 扩增的结果

1. CDV 分离株 F 基因的 RT-PCR 产物;2. DL2000 DNA 标样

Fig. 1 RT-PCR amplification result of F gene of CDV isolated strain

1. RT-PCR product of F gene of CDV isolated strain;
2. DNA Marker DL2000

2.2 重组质粒 pMD-18 T-CDVF 的鉴定

以 *Kpn* 和 *Bam*H 双酶切 pMD-18 T-CDVF,得到约 2 700 bp 的 pMD18-T 线性片段和约 1 000 bp 的插入片段(图 2)。

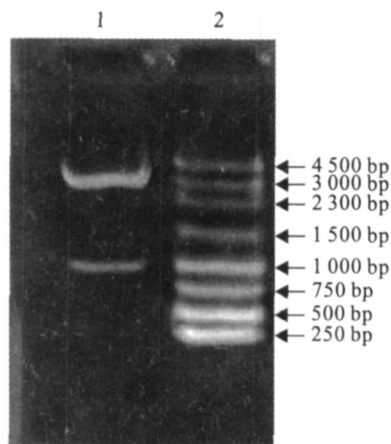


图 2 pMD-18 T-CDVF 的酶切鉴定结果

1. pMD-18 T-CDVF *Bam*H + *Kpn* 双酶切产物;
2. 250 bp DNA 标样

Fig. 2 Restriction endonucleases analysis of pMD-18 T-CDVF

1. pMD-18 T-CDVF digested by *Bam*H + *Kpn* ;
2. DNA Marker 250 bp DNA Ladder

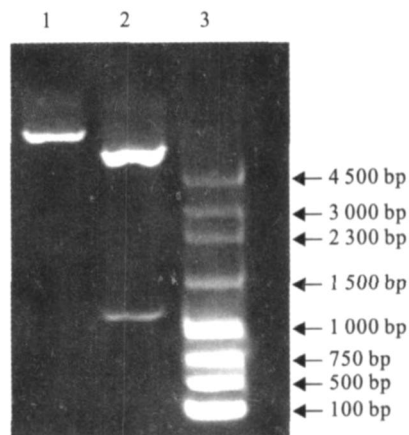


图 3 pcDNA3.1-CDVF 的酶切鉴定结果

1. pcDNA3.1-CDVF *Kpn* 单酶切产物;2. pcDNA3.1-CDVF *Bam*H + *Kpn* 双酶切产物;3. 250 bp DNA 标样

Fig. 3 Restriction endonucleases analysis of pcDNA3.1-CDVF

1. pcDNA3.1-CDVF digested by *Kpn* ;2. pcDNA3.1-CDVF digested by *Bam*H + *Kpn* ;3. DNA Marker 250 bp DNA Ladder

应用特异性引物,以重组质粒为模板进行 PCR 反应,亦扩增出约 1 000 bp 的目的片段,序列分析结果证实,该 DNA 片段大小为 1 067 bp,与 GenBank 中 01-2601 株、2544-Han95 株、5804P 株、25259 株、A75-17 株、DOGDK91C 株、ONP 株、PDV-2 株和 98-2646 株核苷酸序列的同源性分别为 95.4%,93.8%,93.9%,94.3%,94.5%,93.9%,97.3%,94.7 和 94.1%;推导的氨基酸序列的同源性分别为 97.4%,96.6%,97.7%,98.0%,97.4%,97.4%,97.2%,98.0%和 96.6%。

2.3 真核表达质粒 pcDNA3.1-CDVF 的鉴定

图 3 结果表明,pcDNA3.1-CDVF 经 *Kpn*、*Bam*H 双酶切后,得到约 5 400 bp 的 pcDNA3.1(+)线性片段和约 1 000 bp 的插入片段,以 *Kpn*

单酶切,可得到约 6 400 bp 的线性片段。

2.4 真核表达质粒 pcDNA3.1-CDVF 在转染的 BHK-21 细胞中的表达

2.4.1 间接荧光抗体检测 由图 4 可见,转染重组质粒 pcDNA3.1-CDVF 的 BHK-21 细胞出现特异性的亮绿色荧光,而转染 pcDNA3.1(+)空载体的 BHK-21 细胞则无特异性的亮绿色荧光出现。表明 CDV F 基因在 BHK-21 细胞中得到表达。

2.4.2 RT-PCR 鉴定结果 提取 pcDNA3.1-CDVF 转染细胞总 RNA 进行 RT-PCR 反应,扩增出了约 1 000 bp 的 DNA 片段,而空载体转染的 BHK-21 细胞和正常的 BHK-21 均未见目的条带,仅有引物二聚体条带出现(图 5)。

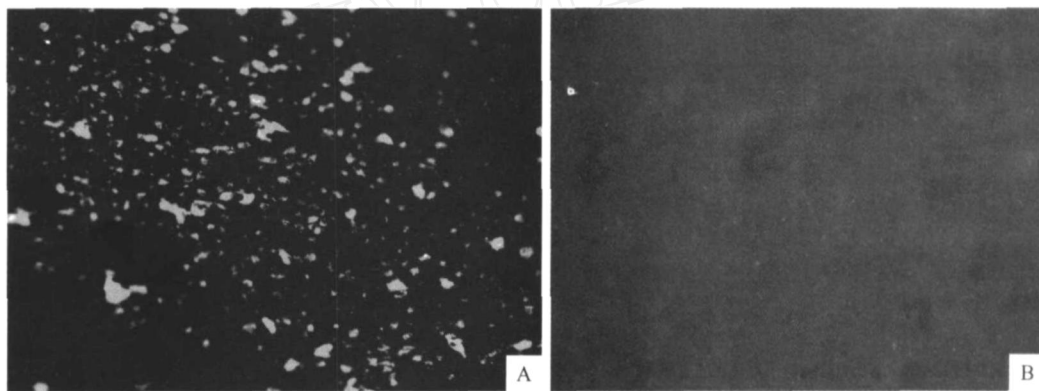


图 4 pcDNA3.1-CDVF 转染 BHK-21 细胞荧光抗体检测结果

A. 转染 pcDNA3.1-CDVF 的 BHK-21 细胞;B. 转染 pcDNA3.1(+) 的 BHK-21 细胞

Fig. 4 Results of fluorescence antibody assay for BHK-21 cell transfected with pcDNA3.1-CDVF

A. BHK-21 cells transfected with pcDNA3.1-CDVF;B. BHK-21 cells transfected with pcDNA3.1(+)

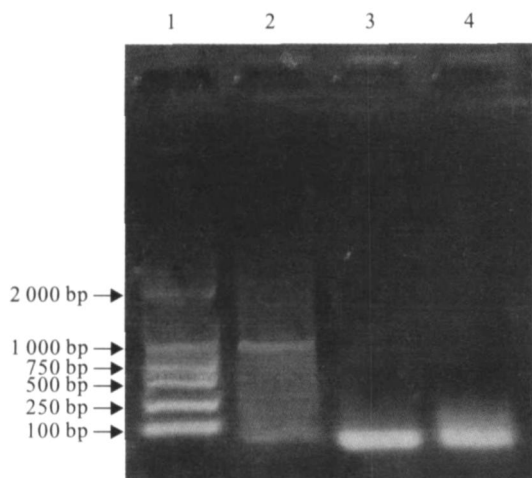


图 5 pcDNA3.1-CDVF 转染 BHK-21 细胞的 RT-PCR 鉴定结果

1. DL2000 DNA 标样;2. pcDNA3.1-CDVF 转染 BHK-21 细胞的 RT-PCR 产物;3. pcDNA3.1 转染 BHK-21 细胞的 RT-PCR 产物;4. 正常 BHK-21 细胞的 RT-PCR 产物

Fig. 5 RT-PCR identification results for BHK-21 cells transfected with pcDNA3.1-CDVF

1. DNA Marker DL2000;2. RT-PCR product of BHK-21 tranfected with pcDNA3.1-CDVF;3. RT-PCR product of BHK-21cell transfected with pcDNA3.1;4. RT-PCR product of normal BHK-21 cell;

3 讨 论

由于 CDV 呈世界性分布,自然感染宿主种类广

泛,且可在大量的不相关动物种类间交叉感染^[13],因此,消灭 CDV 几乎是不可能的,但可以利用疫苗通过主动免疫进行控制。目前,常用的犬瘟热疫苗

有 CDV 死毒苗、MV 疫苗、CDV 弱毒疫苗,但是 CDV 死毒苗和 MV 疫苗不能提供动物持久的保护力,而 CDV 弱毒疫苗的热稳定较差,接种后易受母源抗体的干扰,对某些免疫缺陷犬和野生动物不安全,且具有散毒的危险。多年来,在犬瘟热的控制方面,尽管采取了许多措施,但仍未能从根本上得以控制,近年来反而呈上升趋势,其根本原因是目前尚无安全有效的疫苗,所以人们已开始研制新型疫苗,如核酸苗、基因工程亚单位苗、重组病毒苗等^[14]。犬瘟热病毒 F 基因编码产生的融合蛋白,可诱导机体产生特异性免疫应答反应,是犬瘟热病毒的主要保护性抗原,亦是构建病毒亚单位疫苗或重组疫苗的主要蛋白之一。本研究成功地克隆了犬瘟热病毒的 F 蛋白基因,通过序列测定和 DNASTAR 分析发现,所克隆的 F 基因与 GenBank 中其他 CDV 毒株 F 基因核苷酸序列的同源性为 93.8%~97.3%,推导的氨基酸序列的同源性为 96.6%~98.0%。表明该基因在犬瘟热病毒中是相对保守的,这与其他学者的研究结论一致^[15]。采用脂质体介导法将真核表达质粒 pcDNA3.1-CDVF 转染至 BHK-21 细胞中,并进行间接免疫荧光抗体法和 RT-PCR 法检测,结果表明,犬瘟热病毒融合蛋白(F)基因在 BHK-21 细胞中得到了表达,表明 F 基因具有作为 DNA 疫苗预防 CD 的应用价值。在今后的研究工作中,可进一步以构建的真核重组质粒免疫实验动物,观察其在动物体内的免疫活性,从而为 CDV DNA 疫苗的研发奠定基础。

[参考文献]

- [1] 殷震,刘景华. 动物病毒学[M]. 2 版. 北京:科学出版社, 1997:671-703.
- [2] 陈武,陈洪汉,黄勉. 弱毒疫苗接种导致小熊猫犬瘟热病毒感染的诊断[J]. 黑龙江畜牧兽医, 2006(1):76-78.
- [3] 闫芳,夏咸柱,李德生,等. 犬瘟热减毒疫苗对小熊猫安全性与免疫原性研究[J]. 病毒学报, 2004, 20(3):275-278.
- [4] Bolt G, Jensen T D, Gottschalk E, et al. Genetic diversity of the attachment (H) protein gene of current field isolates of canine distemper virus[J]. J Gen Virol, 1997, 78:367-372.
- [5] Harder T C, Kenter M, Vos H, et al. Canine distemper virus from diseased large felids: biological properties and phylogenetic relationships[J]. J Gen Virol, 1996, 77(3):397-405.
- [6] Iwatsuki K, Miyashita N, Yoshida E, et al. Molecular and phylogenetic analyses of the haemagglutinin(H) proteins of field isolates of canine distemper virus from naturally infected dog[J]. J Gen Virol, 1997, 78:373-380.
- [7] 何洪彬,李金中,夏咸柱,等. 犬瘟热病毒小熊猫株附着蛋白基因的序列分析[J]. 中国预防兽医学报, 1999, 21(6):423-427.
- [8] Blixenkrone-Møller M, Svansson V, Have P, et al. Studies on manifestations of canine distemper virus infection in an urban dog population[J]. Vet Microbiol, 1993, 37:163-173.
- [9] Lan N T, Yamaguchi R, Inomata A, et al. Comparative analyses of canine distemper viral isolates from clinical cases of canine distemper in vaccinated dogs[J]. Vet Microbiol, 2006, 115(1-3):32-42.
- [10] Wild T F, Fayolle I, Beauverger P, et al. Measles virus fusion: role of the cysteine-rich region of the fusion glycoprotein[J]. J Virol, 1994, 68(11):7546-7548.
- [11] 苏凤艳,王卓聪,宗春苗,等. 水貂源犬瘟热病毒的分离鉴定[J]. 吉林农业大学学报, 2006, 28(6):674-677.
- [12] 萨姆布鲁克 J, 拉塞尔 W D. 分子克隆实验指南[M]. 3 版. 黄培堂,王嘉玺,朱厚础,等译. 北京:科学出版社, 2002:8.
- [13] Curlee J F. Cross-species vaccination in wild and exotic animals[J]. Adv Vet Med, 1999, 41:551-556.
- [14] Cherpillod P, Tipold A, Griotwenk M, et al. DNA vaccine encoding nucleocapsid and surface proteins of wild type canine distemper virus protects its natural host against distemper[J]. Vaccine, 2000, 18:2927-2936.
- [15] Messling V, Cattaneo R. Amino-terminal precursor sequence modulates canine distemper virus fusion protein function[J]. J Virol, 2002, 76:4172-4180.