

新城疫病毒 F 基因真核表达载体的构建及瞬时表达

王 青¹,张彦明¹,王选年^{2,3},张改平³,胡建和²,杨苏珍³,赵 东³,邢广旭³,
徐彦召¹,赵光辉⁴,段艳华⁴

(1 西北农林科技大学 动物科技学院,陕西 杨凌 712100;2 河南科技学院 动物科学学院,河南 新乡 453003;
3 河南省农业科学院 河南省动物免疫学重点实验室,河南 郑州 450002;4 河南农业大学 牧医工程学院,河南 郑州 450002)

[摘 要] 应用 PCR 扩增出新城疫病毒 F 基因,将其克隆入 pGEM-T 载体,测序。然后将 NDV F 基因与高效的真核表达载体 pcDNA4/ HisMax 相连,构建 NDV F 基因重组真核表达质粒 pc4F,采用 Superfect 转染试剂将 pc4F 瞬时转染 COS-7 细胞,应用细胞免疫组化法检测其在细胞中的表达情况。结果表明,F 基因能够在 COS-7 细胞中成功表达。

[关键词] 新城疫病毒;F 基因;真核表达

[中图分类号] S858.31;S852.65+9.5

[文献标识码] A

[文章编号] 1671-9387(2007)10-006-05

Construction and transient expression of Newcastle disease virus F gene Eukaryotic vector in COS-7 cell line

WANG Qing¹,ZHANG Yan-ming¹,WANG Xuan-nian^{2,3},ZHANG Gai-ping³,
HU Jian-he³,Yang Su-zhen³,ZHAO Dong³,XIN G Guang-xu³,
XU Yan-zhao¹,ZHAO Guang-hui⁴,DUAN Yan-hua⁴

(1 College of Animal Sciences and Technology, Northwest A & F University, Yangling, Shaanxi 712100, China;2 College of Animal Sciences, He'nan Institute of Science and Technology, Xinxiang, He'nan 453003, China;3 He'nan Key Laboratory for Animal Immunology, He'nan Academy of Agricultural Sciences, Zhengzhou, He'nan 450002, China;4 Technologic College of Animal Husbandry and Veterinary Science, Henan Agriculture University, Zhengzhou, He'nan 450002, China)

Abstract : The F gene of NDV was amplified by PCR and cloned into pGEM-T Easy vector and sequenced. NDV F gene was,then,subcloned into high efficient eukaryotic vector pcDNA4/ HisMax. The recombinant plasmid pc4F was transfected into COS-7 cells by using superfect transfection reagent. The NDV F protein expression in COS-7 cells was detected by immunocytochemistry. The transient expression of NDV-F protein provided the foundation for stable expression in a cell line ,and for the future preparation of monoclonal antibodies that could be used to detect NDV and viral antigen variation. Results showed that F gene could be successflly experssed in COS-7 cells.

Key words : NDV ;F gene ;eukaryotic expression

新城疫是由新城疫病毒(Newcastle disease virus,NDV)引起的禽的一种急性、败血性传染病,对

养殖业危害严重。NDV 属于副黏病毒科,副黏病毒亚科,禽病毒属,是一种含有囊膜的负链 RNA 病

[收稿日期] 2006-10-20

[基金项目] 国家“863”计划项目(2003AA249031)

[作者简介] 王 青(1978-),女,河南社旗人,在读硕士,主要从事分子病原学与免疫学研究。E-mail:wangqing_201@eyou.com

[通讯作者] 张彦明(1956-),男,陕西南郑人,教授,博士生导师,主要从事分子病原学与免疫学研究。
E-mail:ylzhangym@sohu.com

毒^[1]。有研究表明,NDV 的 HN 和 F 蛋白是决定毒力、免疫原性的主要因素,其中 F 蛋白最为关键,其介导 NDV 与宿主细胞及宿主细胞间的融合,其氨基酸序列及裂解位点的差异决定了 NDV 毒力的强弱^[2]。由于 F 蛋白在 NDV 致病过程中有重要作用,所以已成为人们研究 ND 亚单位疫苗和基因疫苗的首选抗原^[3-4]。

相对于原核表达系统,真核表达系统有诸多优点,如用真核表达系统表达的外源蛋白具有良好的免疫原性,而且能够进行糖基化等修饰,具有天然蛋白的生物学活性^[5],免疫动物后能产生较高水平的特异性抗体,对强毒的攻击有很好的保护作用。目前,用真核表达系统表达 DNV *F* 基因的报道很少。为此,本研究以 NDV *F* 基因为目的基因,应用分子生物学技术,构建了 NDV *F* 基因真核表达载体,并将其在高效真核表达载体系统中进行了表达,以期作为 NDV 的检测及 F 蛋白的生物学功能和 ND 活病毒载体疫苗研究奠定良好的基础。

1 材料与方法

1.1 载体、菌株及工具酶

pGEM-T 载体购自 Promega 公司;pDNA4/HisMax 真核表达载体、含 *F* 基因的质粒及大肠杆菌 JM109 感受态细胞,由河南省农业科学院动物免疫学重点实验室保存;DH5 感受态细胞购自 Promega 公司;UltraPure PCR 纯化试剂盒、*Taq* DNA 聚合酶、T4 DNA 连接酶、核酸内切酶和 DNA Marker 购自宝生物工程(大连)有限公司;质粒 DNA 小量提取试剂盒购自北京赛百盛公司;其他试剂均为分析纯级。

1.2 NDV *F* 基因重组克隆质粒的构建

1.2.1 *F* 基因的 PCR 扩增 根据 GenBank 已发表的 *F* 基因序列(登录号为:AY50814)设计 1 对引物:上游引物 5'-ATTATGGGCCCCCAAATC-3';下游引物 5'-TTATCAGATTCTTGTA GTGGCCC-3'。引物由宝生物工程(大连)有限公司合成。

以含有 *F* 基因的质粒为模板,进行 PCR 扩增。PCR 反应体系为 50 μ L,其中含 *F* 基因的质粒 1 μ L,10 \times PCR 缓冲液 5 μ L,25 mmol/L Mg^{2+} 3 μ L,10 mmol/L dNTPs 4 μ L,上、下游引物各 2 μ L,超纯水 32.5 μ L,*Taq* DNA 聚合酶 0.5 μ L。PCR 循环参数为:94 预变性 4 min;94 变性 1 min,56 退火 1 min,72 延伸 1 min,30 个循环;最后 72 延伸 10 min。扩增完毕后,取 3 μ L 产物用 10 g/L

琼脂糖凝胶电泳,观察结果,然后参考 PCR 产物回收试剂盒说明书,回收纯化目的片断。

1.2.2 重组克隆质粒 pT-F 的构建与鉴定 参照载体试剂盒说明书,将上述 PCR 纯化产物与 pGEM-T 载体在 T4 连接酶及 Buffer 的作用下,4

连接过夜。将连接产物转化 *E. coli* JM109 感受态细胞,转化产物涂布于含 100 μ g/mL 氨苄青霉素的 LB 琼脂平板,37 培养过夜。挑取单个菌落接种于 3 mL 含 100 μ g/mL 氨苄青霉素的 LB 培养基上,37 摇床震荡培养 16 h。用质粒提取试剂盒提取重组克隆质粒,进行 PCR 鉴定。将 PCR 鉴定为阳性的重组质粒送宝生物工程(大连)有限公司测序,并将测试结果与 GenBank 中登录的 *F* 基因进行对比分析,同时保存菌种。质粒命名为 pT-F。

1.3 NDV *F* 基因重组真核表达质粒的构建

1.3.1 NDV *F* 基因的 PCR 扩增 根据 pT-F 质粒 *F* 基因的序列和 pcDNA4/His Max 载体多克隆位点的序列,设计 1 对包含 *Kpn* I 和 *Eco* RI 酶切位点的引物:上游引物 5'-ATTGGTACATGGGCCCAAATC-3' (斜体为 *Kpn* I 酶切位点);下游引物 5'-TTA GAATCCTCAGATTCTTGTA GTGGCCCTC-3' (斜体为 *Eco* RI 酶切位点)。引物由上海生工有限公司合成,预期扩增片段长度为 1 662 bp,合成后以无菌双蒸水稀释至 20 pmol/L,-20 保存备用。

以 pT-F 质粒为模板,用特异性引物扩增 NDV *F* 基因。PCR 反应体系为 50 μ L,其中 pT-F 质粒 1 μ L,10 \times LA buffer 5 μ L,25 mmol/L Mg^{2+} 3 μ L,10 mmol/L dNTPs 4 μ L,上、下游引物各 2 μ L,超纯水 32.5 μ L,LA DNA 聚合酶 0.5 μ L。PCR 循环参数为:95 预变性 3 min;94 变性 1 min,57 退火 1 min,72 延伸 1.5 min,30 个循环;最后 72 延伸 10 min。扩增结束后取出 3 μ L 产物进行 10 g/L 琼脂糖凝胶电泳,观察结果,并参考宝生物工程(大连)有限公司的 PCR 产物回收试剂盒说明书,纯化回收目的基因。

1.3.2 重组真核表达质粒 pc4F 的构建 将回收的 PCR 产物和真核表达载体 pcDNA4/His Max 分别进行 *Kpn* I 和 *Eco* RI 双酶切。酶切产物分别用宝生物工程(大连)有限公司的 DNA 凝胶回收试剂盒进行纯化回收,4 保存备用。取回收产物各 3 μ L,进行琼脂糖凝胶电泳鉴定。参照文献[6]构建重组真核表达质粒 pc4F。将酶切的目的基因与载体按 3:1(体积比)混合,在 T4 DNA 连接酶的作用下 16

连接过夜,将连接产物转化至 *E. coli* DH5 感受态细胞,在含有 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 氨苄青霉素的 LB 平板上筛选,挑选单个菌落摇菌培养过夜,提取质粒进行双酶切和 PCR 鉴定。

1.4 NDV *F* 基因重组真核表达质粒 pc4F 的表达

1.4.1 脂质体包被与转染 用 QIA GEN 超纯试剂盒提取重组质粒,将提取质粒在脂质体作用下转染 COS-7 细胞,步骤如下:(1)取 2 μg 阳性质粒 DNA,用 100 μL 不含血清的 DMEM 稀释,作为溶液 A;取 10 μL 脂质体用 100 μL 不含血清的 DMEM 稀释,作为溶液 B。(2)将溶液 A 和溶液 B 混合,轻轻摇匀,室温孵育 20 min。(3)用适量的不含血清的 DMEM 洗涤 COS-7 细胞。在上述 A 和 B 混合溶液中加入 800 μL 不含血清的 DMEM,轻轻摇匀,将混合液加到洗涤过的 COS-7 细胞培养孔中,覆盖细胞,在 37 的 CO_2 培养箱内培养 6 h。(4)将培养基换成含有体积分数 10% 小牛血清的 DMEM,继续培养,同时用转染 pcDNA 4/ His Max 载体的质粒作阴性对照。转染 36 h 后轻轻吸出培养基,细胞用冷甲醇固定 5 ~ 10 min,备用。

1.4.2 间接免疫染色检测 将固定好的细胞用 PBST 洗液洗 3 次。用体积分数 5% 的牛血清封闭(37 培养箱内作用 2 h)。弃去封闭液,用 PBST 洗液洗 3 次,每孔加入 100 μL NDV 阳性血清的稀释液,37 作用 45 min。取出后用 PBST 洗液洗 3 次,每孔加入 100 μL 兔抗鸡 HRP 二抗的稀释液,与结合到细胞表面的 NDV 阳性血清结合(37 作用 45 min)。取出后用 PBST 洗液洗 6 次,每孔加入 50

μL AEC 染料稀释液染色 5 ~ 10 min,吸出染色液,每孔加 100 μL 的 PBS,在倒置显微镜下观察结果。

2 结果与分析

2.1 NDV *F* 基因重组克隆质粒 p T-F 的构建结果

重组克隆质粒 PCR 扩增结果显示,在约 1 600 bp 处有一特异性条带(图 1),与预期长度一致。测序分析结果表明,构建的重组克隆质粒与参考序列的同源性达 98%。表明 NDV *F* 基因重组克隆质粒构建成功。

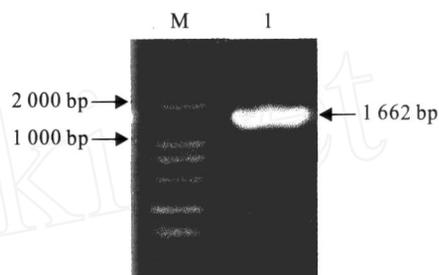


图 1 NDV *F* 基因重组克隆质粒 p T-F PCR 扩增鉴定结果
M. DL2 000 DNA 标准;1. 克隆载体的 PCR 产物

Fig. 1 PCR analysis of recombinant plasmid of NDV *F* gene
M. DL2 000 DNA Marker;1. PCR products of recombinant plasmid

2.2 NDV *F* 基因重组真核表达质粒 pc4F 的构建结果

pc4F 经 PCR 扩增,获得了 1 662 bp 的目的基因(图 2);经 *Kpn* I 和 *Eco* RI 双酶切鉴定,得到了 1 662 bp 的基因片段和 5.3 kb 的载体片段(图 3),表明 NDV *F* 基因重组真核表达质粒构建成功。

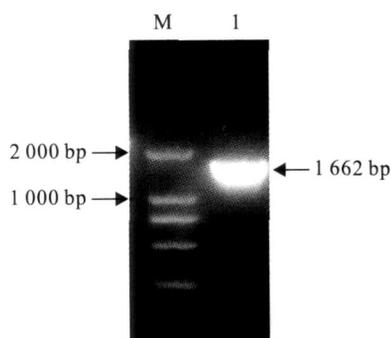


图 2 NDV *F* 基因重组真核表达质粒 pc4F 的 PCR 扩增鉴定结果

M. DL2 000 DNA 标准;1. 重组质粒的 PCR 产物;

Fig. 2 PCR analysis of recombinant plasmid of NDV *F* gene

1. PCR products of recombinant plasmid;

M. DL2 000 DNA Marker

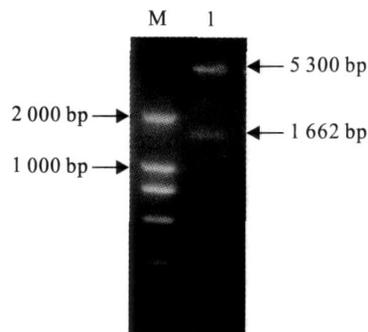


图 3 NDV *F* 基因重组真核表达质粒 pc4F 的酶切鉴定结果
M. DL2 000 DNA 标准;1. pc4F *Kpn* I + *Eco* RI 双酶切产物;

Fig. 3 Restriction analysis of recombinant plasmid of NDV *F* gene

1. *Kpn* I + *Eco* RI digestion of pc4F;M. DL2 000 DNA Marker

2.3 NDV F 基因的真核表达结果

结果显示,转染 pc4F 质粒的 COS-7 细胞被染成红色,呈阳性(图 4);而 pcDNA4/ HisMax 空载体

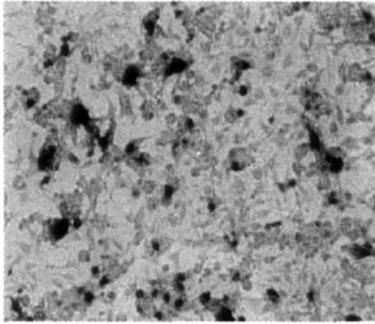


图 4 重组质粒 pc4F 转染 COS-7 细胞免疫组化染色结果

Fig. 4 Result of immunocytochemistry of recombinant plasmid pc4F transfected cells

转染的细胞没有颜色变化,呈阴性(图 5),表明 NDV F 基因在体外获得了成功表达。

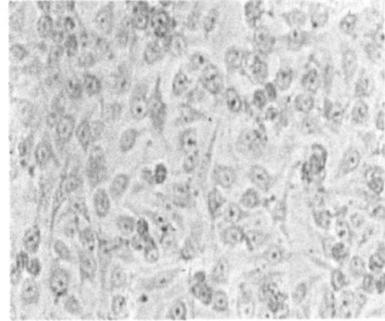


图 5 pcDNA4/ HisMax 载体转染 COS-7 细胞免疫组化染色结果

Fig. 5 Result of immunocytochemistry of pcDNA4/ HisMax vector transfected cells

3 讨 论

鸡新城疫是危害我国养鸡业的最重要的烈性传染病之一。目前,预防新城疫的主要方法是疫苗接种,所用疫苗主要有弱毒苗和灭活苗^[7]。虽然这 2 种疫苗具有很多优点,已在防止新城疫的发生上发挥了重要作用,但长期的防治实践表明,在疫苗株的选用上仍存在一些明显的不足,新城疫的预防仍未得到令人满意的结果。有研究表明,F 和 HN 基因是 NDV 的保护性抗原基因^[8]。F 蛋白是 NDV 感染细胞所必需的,它可以促进病毒囊膜与细胞膜的融合,从而使病毒穿入细胞浆脱去核衣壳进行复制。本试验成功构建了能表达 NDV F 蛋白的重组真核表达质粒,并将其在 COS-7 细胞中进行了表达,为进一步从分子水平上探索 NDV 的抗原性及毒力变异奠定了良好的基础。

近年来,在 ND 的诊断中出现了“非典型 ND”,使常规的检测方法不能满足生产实践的要求。传统的血清学方法尽管可以对 ND 作出诊断,但要作出进一步确诊及不同毒株的鉴别诊断仍有一定的局限性。目前,单克隆抗体在 ND 诊断方面的应用已经十分广泛,由于单克隆抗体具有针对单个抗原决定簇的特异性,这就为制备出仅针对某一毒株或某一型病毒的单克隆抗体提供了可能性。NDV 特异性抗体对快速获得毒株的性质具有重要意义^[9-12]。本研究成功实现了 NDV F 蛋白的瞬时表达,为该蛋白的稳定表达、单克隆抗体的制备与筛选及 NDV 快速检测方法的建立奠定了基础。此外,F 单抗和

NDV 其他几种结构蛋白单抗的结合,对于 NDV 不同毒株的抗原性差异、致病机理、流行病学等方面的研究将具有重要意义。

[参考文献]

- [1] 殷 震. 动物病毒学[M]. 北京:科学出版社,1997:736.
- [2] Sergel T A, Mcginnes L W, Marrison T G. A single amino acid change in the Newcastle disease virus fusion protein alters the requirement for HN protein in fusion[J]. J of Virol, 2000, 74: 5101-5107.
- [3] Sakaguchi M, Nakamura H, Sonoda K, et al. Protection of chickens from Newcastle disease by vaccination with a linear plasmid DNA expressing the F protein of Newcastle disease virus[J]. Vaccine, 1996, 14(8): 7472752.
- [4] 吴艳涛,彭大新,刘秀梵,等. 表达新城疫病毒 F48E8 株融合蛋白基因的重组鸡痘病毒及其免疫效力[J]. 生物工程学报, 2000, 16(5): 591-594.
- [5] Luckow V A, Lee S C, Barry G F, et al. Efficient generation infectious recombinant baculovirus by site-specific transposon-mediated insertion of foreign gene into baculovirus genome propagated in E. coli[J]. J Virol, 1993, 67: 4566-4579.
- [6] 萨姆布鲁克 J, 弗里奇 E F, 曼尼阿蒂斯 T, 等. 分子克隆实验指南[M]. 3 版. 黄培堂, 王嘉玺, 朱厚础, 等译. 北京: 科学技术出版社, 1999.
- [7] Elizabeth J, Kingston H G. Immunomodulators and delivery system for vaccination by mucosal routes[J]. Trends in Biotechnology, 2001, 19: 293-304.
- [8] Izumi Y, Yoko S. Enhancement of mucosal immune response against HIV-1 by DNA immunization[J]. Vaccine, 2001, 19: 2995-3003.
- [9] Nagai Y, Klenk H D. Activation of precursors to both glycoproteins of Newcastle disease virus by proteolytic cleavage[J]. Virology, 1977, 77: 125-134.

- [10] Collins M S, Strong I, Alexander D J. Evaluation of the molecular basis of pathogenicity of the variant Newcastle disease viruses termed "pigeon PMV-1 viruses"[J]. Archives of Virology, 1994, 134:403-411.
- [11] Li Z, Sergel T, Razvi E, et al. Effect of cleavage mutants on syncytium formation directed by the wild-type fusion protein of Newcastle disease virus[J]. Journal of Virology, 1998, 72: 3789-3795.
- [12] Peeters B P, Leeuw O S, Koch G, et al. Rescue of Newcastle disease virus from cloned cDNA: evidence that cleavability of the fusion protein is a major determinant for virulence[J]. Journal of Virology, 1999, 73:5001-5009.

(上接第 5 页)

[参考文献]

- [1] Saif Y M, Barnes H J, Glisson J R, et al. Disease of poultry [M]. 11th ed. Ames: Iowa State University Press, 2003:511-526.
- [2] 殷震, 刘景华. 动物病毒学[M]. 北京: 科学技术出版社, 1997.
- [3] Rosa C, Volker T, Stuart G S, et al. Reverse genetics system for the avian coronavirus infectious bronchitis virus[J]. Journal of virology, 2001, 75(24):12359-12369.
- [4] Lai M M, Cavanagh D. The molecular biology of coronaviruses [J]. Adv Virus Res, 1997(48):1-100.
- [5] Farsang A, Ros C, Lena H M, et al. Molecular epizootiology of infectious bronchitis virus in Sweden indicating the involvement of a accine strain[J]. Avian Pathology, 2002, 31, 229-236.
- [6] Cavanagh D. Coronavirus IBV glycopolypeptides: size of their polypeptide moieties and nature of their liga charides[J]. Journal of General Virology, 1983(64):1187-1191.
- [7] Freymuth F, Vabret A, Gouarin S, et al. Epidemiology of respiratory virus infections [J]. Allerg Immunol, 2001, 33(2): 662-669.
- [8] David F S, Bartholomew M S. Coronavirus proteins: structure and function of the oligosaccharides of the avian infectious bronchitis virus glycoproteins[J]. Journal of virology, 1982, 44(3):804-812.
- [9] 王晶钰. 鸡肾型传染性支气管炎病毒陕西分离株 N、M 和 S1 基因分子遗传变异研究[D]. 陕西杨凌: 西北农林科技大学, 2006.
- [10] 马学军. 精编分子生物学实验指南[M]. 4 版. 北京: 科学出版社, 2005:95-120.
- [11] Cavanagh D, Davis P J. Evolution of avian coronavirus IBV: senquence of the matrix glycoprotein gene and intergenic region of several serotypes[J]. J Gen Virol. , 1988, 69:621-629.
- [12] 潘杰彦, 陈德胜, 戴亚斌, 等. 传染性支气管炎病毒青岛腺胃分离株(SD/97/02)基质蛋白、5a、5b 蛋白基因的克隆和序列分析[J]. 中国兽医学报 2002, 22(2):108-110.
- [13] Saif L J. Coronavirus immunogens[J]. Vet Microbiol, 1993, 37(34):285-297.
- [14] 梁国栋. 最新分子生物学实验技术[M]. 北京: 科学出版社, 2001.