

表达猪瘟病毒 E2 蛋白的 BacMam 病毒的构建及其免疫原性分析*

李 淼 王宇飞 王 煜 高 辉 李 娜 孙 元 梁冰冰 仇华吉**

(中国农业科学院哈尔滨兽医研究所, 兽医生物技术国家重点实验室猪传染病研究室, 哈尔滨 150001)

摘要 含具有哺乳动物细胞活性的启动子的重组杆状病毒(BacMam 病毒)可有效转导多种哺乳动物细胞, 并被广泛用于开发新型非复制型载体疫苗. 将水泡性口炎病毒 G 蛋白(VSV-G)基因插入多角体启动子下游, 得到经修饰的杆状病毒转移载体, 将对虾白斑综合症病毒(WSSV)ie1 启动子控制下的猪瘟病毒 E2 基因表达盒插入此载体中, 构建了 BacMam 病毒 BacMam/G-ie1-E2, 以其感染 Sf9 细胞和转导 HeLa 细胞, 通过间接免疫荧光试验和 Western blot 分析检测 E 蛋白的表达, 同时用 BacMam 病毒直接免疫小鼠, 用检测猪瘟病毒抗体的间接 ELISA 方法检测免疫小鼠血清抗体, 用基于 CFSE 和 WST-8 的淋巴细胞增殖试验评价其细胞免疫应答. 结果显示, BacMam/G-ie1-E2 能同时在昆虫细胞和哺乳动物细胞中高效表达 E2 蛋白, 免疫小鼠能诱导产生针对猪瘟病毒的特异性抗体, 免疫小鼠脾细胞经猪瘟病毒刺激后能诱导特异性的淋巴细胞增殖. 这表明, 由 BacMam 病毒介导的基因转移有望用于开发针对猪瘟病毒的非复制型载体疫苗.

关键词 猪瘟病毒, E2 蛋白, 重组杆状病毒, 免疫原性

学科分类号 Q786, S852

DOI: 10.3724/SP.J.1206.2008.00803

杆状病毒是一类宿主特异性的昆虫病毒, 目前被广泛用于在昆虫细胞中生产外源蛋白. 近年来, 研究者发现, 携带哺乳动物细胞启动子控制的表达盒的重组杆状病毒可将外源基因导入哺乳动物细胞内并在其中表达, 而不进行复制^[1], 因此, 杆状病毒可作为一种新型哺乳动物细胞基因转移载体. 能转导哺乳动物细胞的重组杆状病毒通常被称作 BacMam 病毒, 其中含有在哺乳动物细胞中具有活性的基因表达盒. BacMam 系统最大特点就是通过直接接种就可以实现在多种细胞内的基因转移. Aoki 等^[2]首次报道了用携带外源抗原基因的 BacMam 病毒接种小鼠可产生免疫应答. 随后, 又有研究者相继报道了用 BacMam 病毒通过肌肉内、鼻腔或者皮下注射接种实验动物后, 可诱导特异性免疫应答, 接种动物能抵抗病毒的攻击^[3~5]. 作为一种新型疫苗载体, BacMam 病毒具有很多独特的优点: 不能在哺乳动物细胞内复制; 对细胞基本上没有毒性; 操作简单、容易制备; 容许插入较大的外源 DNA 片段(可高达 38 kb); 生物安全性高. 因此, BacMam 病毒特别适于研制非复制型载体疫苗.

猪瘟(classical swine fever, CSF)是由猪瘟病毒(classical swine fever virus, CSFV)引起的猪的一种高度接触性传染病, 被世界动物卫生组织(OIE)列入 OIE 疾病名录(OIE Listed diseases), 为须申报的(notifiable)动物传染病. CSFV 为有囊膜的正链 RNA 病毒^[6], 基因组大小约为 12.3 kb, 仅含一个大的开放阅读框架(ORF), 编码的多聚蛋白经蛋白酶水解为 4 种结构蛋白(C、E^{ms}、E1 和 E2)及 8 种非结构蛋白^[7]. 其中 E2 囊膜糖蛋白是猪瘟病毒的主要结构蛋白, 是抗猪瘟病毒感染的主要保护性抗原, 因此, 猪瘟病毒 E2 蛋白是开发猪瘟新型疫苗、诊断试剂及研究猪瘟病毒致病机理的重要靶蛋白.

目前, 免疫接种仍是防治猪瘟的主要措施, 我国主要通过接种猪瘟兔化弱毒疫苗来控制猪瘟, 该疫苗具有良好的免疫效力, 但不能通过血清学方法

* 国家高技术研究发展计划(863)资助项目(2006AA10A204).

** 通讯联系人.

Tel: 0451-85935041, E-mail: huajiqu@hvri.ac.cn

收稿日期: 2009-01-23, 接受日期: 2009-03-17

对 CSFV 野毒感染猪和疫苗接种猪进行鉴别诊断. 该疫苗的广泛使用在控制猪瘟的同时影响了我国牲畜及其产品的贸易, 也不利于猪瘟的根除. 因此, 研制安全有效且能利用血清学方法对免疫猪和感染猪进行区分的新型猪瘟疫疫苗具有重要意义.

我们在之前的研究中利用 Bac-to-Bac 表达系统构建了含有对虾白斑综合症病毒(white spot syndrome virus, WSSV)ie1 启动子控制下的 EGFP 报告基因表达盒的重组杆状病毒 BacMam/ie1-EGFP, 证实报告基因在昆虫细胞及哺乳动物细胞中均能高效表达^[8]. 为了进一步验证这一新型哺乳动物细胞转移载体能否用于猪瘟疫疫苗的研制, 我们将多角体启动子调控下的水泡性口炎病毒 G 蛋白(vesicular stomatitis virus G, VSV-G)基因表达盒及 WSSV ie1 启动子调控下的猪瘟疫病毒 E2 基因表达盒共同插入杆状病毒穿梭载体 pFastBacHT B 中, 利用 Bac-to-Bac 表达系统获得重组杆状病毒 BacMam/G-ie1-E2, 转导哺乳动物细胞后能有效表达 E2 蛋白, 将其直接接种小鼠后可以诱导针对 CSFV 的特异性体液免疫和细胞免疫应答, 表明由 BacMam 病毒可以用来开发针对猪瘟疫病毒感染的非复制型载体疫苗.

1 材料与方法

1.1 菌株、细胞和病毒

杆状病毒转移载体质粒 pFastBacHT B 及感受态 DH10Bac™ 受体菌购自美国 Invitrogen 公司. Sf9 昆虫细胞株及 HeLa 细胞株由本实验室保存, 其中 Sf9 细胞用含有 10%胎牛血清和适量抗生素的 Grace's 培养基(Gibco BRL 公司)在 28℃ 培养箱中培养, HeLa 细胞用含有 10%胎牛血清和适量抗生素的 DMEM 培养基(Gibco BRL 公司)在 37℃、5% CO₂ 的培养箱中培养. 猪瘟疫病毒石门株和 SH-11 株(基因亚型 2.1 型)由本实验室分离保存; 重组腺病毒 rAdV-E2^[9]由本实验室构建; 针对猪瘟疫病毒 E2 蛋白一个构象表位的单克隆抗体 6E10^[10]和针对一个线性表位的单克隆抗体 HQ06^[11]由本实验室制备.

1.2 重组杆状病毒的获得

用引物 PVSUGS(5' CGG TCC GTA TGA AGT GCC TTT TGT AC 3')和 PVSUGR(5' GGA TCC GAC TTT TAT TTT ACT TTC CAA GTC GGT TC 3')通过 PCR 扩增 pVSV-G(Invitrogen 公司)得到 VSV-G 基因, 将其插入 pFastBacHT B 载体多角体启动子下游, 得到修饰过的杆状病毒转移载体.

用引物 PE2S(5' GCC GGA TCC ATG CGG CTA GCC TGC AAG GAA GAC TAC 3')和 PE2R(5' ATT GCG GCC GCC TAC ACA TCC AGG TCA AAC CAG TAT TGA TAC TC 3')通过 RT-PCR 扩增 CSFV SH-11 株基因组 RNA, 得到 E2 基因.

用 BamH I 将质粒 pUC-ie1 切下含 WSSV ie1 启动子的片段, 然后将含有 CSFV E2 基因的 BamH I -Not I 片段和含有 ie1 启动子的 BamH I -BamH I 片段插入到修饰后的载体上, 得到重组转移载体 pFB-G-ie1-E2. 用 BamH I 和 Not I 从质粒 pEGFP-N1(Invitrogen 公司)中切下含 EGFP 基因的片段, 以同样的方法构建重组转移载体 pFB-G-ie1-EGFP(图 1).

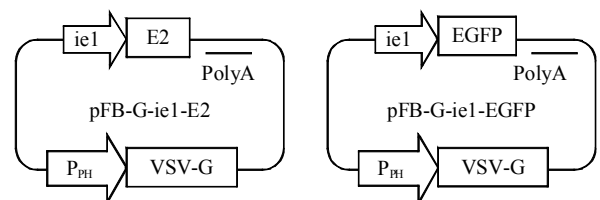


Fig. 1 Schematic representation of the recombinant transfer vectors

将获得的重组转移载体质粒转化大肠杆菌 DH10Bac™ 感受态细胞, 按照 Bac-to-Bac 杆状病毒表达系统(Invitrogen 公司)手册构建得到重组杆状病毒 BacMam/G-ie1-E2 和 BacMam/G-ie1-EGFP. 将获得的重组病毒在 Sf9 细胞上传代, 利用超速离心法纯化病毒^[3], 并用空斑试验测定重组病毒的滴度.

1.3 重组杆状病毒的鉴定

提取重组杆状病毒 DNA, 利用 M13 引物进行 PCR 鉴定. 分别用猪瘟疫病毒 E2 单抗 6E10 和 HQ06 进行间接免疫荧光试验及 Western blot 分析, 以检测目的基因的表达情况.

1.3.1 间接免疫荧光试验(IFA). 将 BacMam 病毒接种 Sf9 细胞, 72 h 后收集培养上清备用, 同时用灭菌的 PBS 洗细胞 2 次后, 收集细胞, 将其涂在载玻片上, 风干, 用冷丙酮固定 8~9 min, 加入抗 CSFV E2 的单克隆抗体 6E10, 置于湿盒中 37℃ 作用 45 min, 用 PBS 洗涤 3 次后, 加入 FITC 标记羊抗鼠 IgG(Sigma 公司), 置于湿盒中 37℃ 作用 45 min, 用 PBS 洗涤 3 次后, 风干, 滴加缓冲甘油, 置于倒置荧光显微镜(Nikon TE2000U, 日本)下观察.

1.3.2 Western blot 分析. 将感染的 Sf9 细胞用细胞裂解液裂解后, 收取上清, 进行 SDS-PAGE, 之后转印到硝酸纤维素膜上, 进行 Western blot 分

析, 一抗为抗 E2 蛋白的单克隆抗体 HQ06, 二抗为辣根过氧化物酶标记羊抗鼠 IgG(Sigma 公司).

1.4 重组杆状病毒对哺乳动物细胞的转导

将 HeLa 细胞用胰酶消化吹散后铺于 24 孔培养板, 每孔细胞数量约为 5×10^4 个, 37°C 培养 12 h 后, 以 100 MOI 重组杆状病毒按照优化的条件转导 HeLa 细胞^[12], 在室温条件下震荡孵育 8 h 后, 弃去病毒液, 以 PBS 洗涤细胞 1 次, 更换为含 10%胎牛血清的 DMEM 完全培养基, 48 h 后, 弃去培养液, 用 33%冷丙酮固定细胞 30 min, 加入 6E10 单抗于 37°C 孵育 1 h, 以 PBS 洗涤细胞 3 次后, 加入 FITC 标记的羊抗鼠 IgG 于 37°C 孵育 1 h, 以 PBS 洗涤细胞 3 次后, 置于倒置荧光显微镜下观察. 同时按上述方法进行 Western blot 分析.

1.5 小鼠免疫接种

选取 7 周龄的清洁级雌性 BALB/c 小鼠(由中国农业科学院哈尔滨兽医研究所实验动物中心提供), 随机分成 3 组, 每组 7 只, 通过空斑试验测定的重组病毒滴度, 以每只小鼠 1×10^9 PFU(蚀斑形成单位, plaque forming unit, PFU)的剂量经后腿部肌肉注射超速离心纯化后的重组杆状病毒 BacMam/G-ie1-E2, 以接种 1×10^9 PFU BacMam/G-ie1-EGFP 的小鼠作为阴性对照, 同时以接种 10^8 TCID₅₀(0.5 ml)重组腺病毒 rAdV-E2 的小鼠作为阳性对照^[9]. 初次免疫 4 周后, 分别以同等剂量进行加强免疫.

1.6 免疫小鼠血清抗体水平的检测

免疫后每周断尾采血, 分离血清, 按照已报道的文献, 利用间接 ELISA 方法测定抗体效价^[13]. 具体操作如下: 用包被液稀释纯化的重组 E2 蛋白^[14], 包被 96 孔微量滴定板, 每孔 200 ng(100 μl), 4°C 包被过夜; 用含有 0.05%吐温 20 的 PBS(pH 7.4) (PBST)洗涤 4 次, 以含 0.5%聚乙烯醇的 PBS 溶液 37°C 封闭 1 h; 用 PBST 洗涤 3 次, 每孔加入 1:40 稀释的待检血清 100 μl , 37°C 作用 2 h; 用 PBST 洗涤 3 次, 加入 1:5 000 稀释的辣根过氧化物酶标记的羊抗鼠 IgG, 37°C 作用 1 h; 用 PBST 洗涤 3 次, 每孔加入 100 μl TMB 显色液, 室温显色 10 min; 加入 100 μl 2 mol/L H_2SO_4 终止显色, 然后测定 A_{450} 值.

1.7 淋巴细胞增殖试验

按照下述步骤制备小鼠脾脏悬液, 加强免疫后 3 周将免疫小鼠脱颈处死, 置 75%乙醇中浸泡 5 min, 无菌采取脾脏, 置于加有 RPMI 1640 培养

液(Gibco BRL 公司)的平皿内, 用注射器针芯将脾脏在 200 目的筛网上研磨, 反复吹打后制备成单个细胞悬液. 用红细胞裂解液裂解红细胞后, 洗涤细胞 3 次, 将细胞用 RPMI 1640 培养液调整细胞浓度至 2×10^7 个/ml. 按已报道的文献^[15, 16], 用猪瘟疫病毒石门株作为刺激原, 采用基于 CFSE 染色的淋巴细胞增殖试验和 WST-8 方法(Cell Counting Kit-8, CCK-8, 日本同仁化学研究所)分析免疫小鼠的细胞免疫反应.

2 结 果

2.1 BacMam 病毒的构建及其在昆虫细胞中的表达

通过细菌内同源重组和细胞转染, 获得了含有 ie1 启动子控制的 E2 基因的重组杆状病毒 BacMam/G-ie1-E2, 将其在 Sf9 细胞上传代, 于 72 h 内细胞病变完全, 同时多角体启动子的调控下, 表面展示的 VSV-G 蛋白高效表达引起了细胞融合反应, 通过间接免疫荧光试验证实 VSV-G 蛋白得到表达(结果未显示)^[17]. 利用间接免疫荧光试验及 Western blot 均能检测到 E2 基因在感染细胞中的表达(图 2 和图 3).

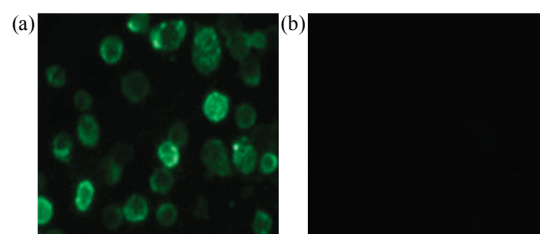


Fig. 2 Detection of the E2 protein expression in Sf9 cells infected with the recombinant baculovirus

(a) Sf9 cells infected with BacMam/G-ie1-E2. (b) Normal Sf9 cells as negative control.

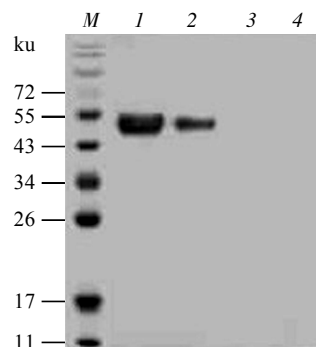


Fig. 3 Western blot analysis of E2 protein expression in infected Sf9 cells using anti-E2 monoclonal antibody

1: Baculovirus expressed recombinant E2 protein served as a positive control; 2: BacMam/G-ie1-E2 infected Sf9 cells; 3: BacMam/G-ie1-EGFP infected Sf9 cells; 4: Normal Sf9 cells as negative control. M: Prestained protein molecular mass marker(MBI).

2.2 BacMam 病毒在哺乳动物细胞中的基因转移

为了进一步验证 BacMam 病毒在体外的基因转移情况, 我们以感染复数 MOI=100 的 BacMam/G-ie1-E2 转导 HeLa 细胞, 利用间接免疫荧光试验和 Western blot 检测 E2 蛋白的表达情况. 结果显示, 重组杆状病毒 BacMam/G-ie1-E2 可有效进入哺乳动物细胞, 并高效表达 E2 蛋白(图 4 和图 5).

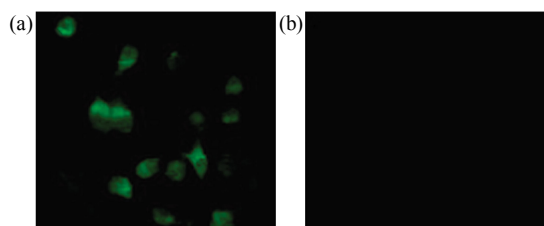


Fig. 4 Detection of the E2 protein expression in the recombinant baculovirus-transduced HeLa cells

(a) BacMam/G-ie1-E2 transduced HeLa cells. (b) Normal HeLa cells as negative control.

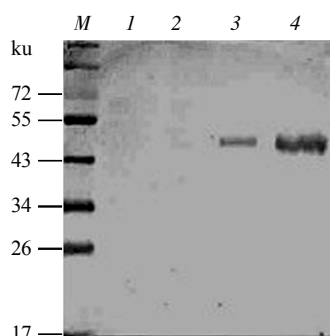


Fig. 5 Western blot analysis of E2 protein expression in transduced HeLa cells using anti-E2 monoclonal antibody

1: Normal HeLa cells as negative control; 2: Total cellular extracts from HeLa cells transduced with BacMam/G-ie1-EGFP; 3: Total cellular extracts from HeLa cells transduced with BacMam/G-ie1-E2; 4: Baculovirus expressed recombinant E2 protein served as positive control. M: Prestained protein molecular mass marker(MBI).

2.3 免疫小鼠的抗体产生情况

为了研究所构建的重组杆状病毒 BacMam/G-ie1-E2 能否在体内诱导针对 CSFV 的特异性体液免疫反应, 用间接 ELISA 检测免疫小鼠血清中的 E2 抗体水平. 结果显示, BacMam/G-ie1-E2 免疫的小鼠血清中 E2 抗体水平从第一次免疫后 1 周持续上升. 在第一次免疫 4 周后进行加强免疫, 抗体水平明显升高, 与重组腺病毒免疫组相比, BacMam/G-ie1-E2 免疫组抗体上升速度更快、幅度更高. 而试验过程中, 免疫 BacMam/G-ie1-EGFP 的阴性对照组小鼠的抗体水平始终低于临界值(即 $A_{450} < 0.35$)(图 6).

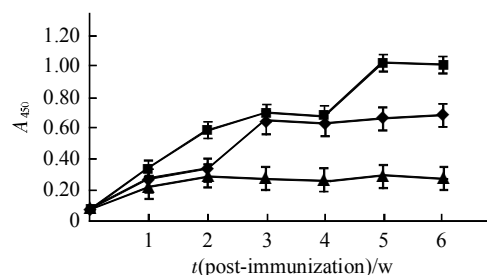


Fig. 6 Detection of serum antibody titers induced by the recombinant baculovirus in mice using indirect ELISA

◆—◆: rAdV-E2; ■—■: BacMam/G-ie1-E2; ▲—▲: BacMam/G-ie1-EGFP.

2.4 免疫小鼠的特异性淋巴细胞增殖水平

为了评价 BacMam 病毒免疫小鼠后所诱导的细胞免疫反应, 我们用 CFSE 染色方法, 评价了免疫小鼠 $CD8^+$ 和 $CD4^+$ T 细胞经特异性抗原(猪瘟病毒石门株)刺激后的增殖反应. 结果表明, 免疫 BacMam/G-ie1-E2 小鼠脾细胞经 CSFV 刺激后诱导了平均 4.07% 的 $CD8^+$ T 细胞和 4.06% 的 $CD4^+$ T 细胞增殖, 与阴性对照组比较, 淋巴细胞增殖水平极显著($P < 0.01$), 与重组腺病毒免疫组比较无显著差异(图 7).

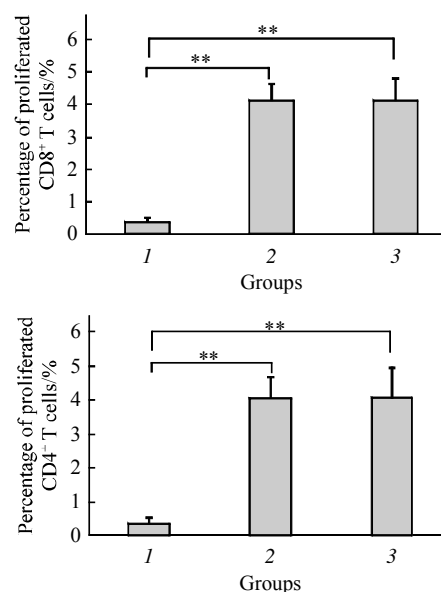


Fig. 7 The $CD8^+$ and $CD4^+$ T cells proliferation elicited by immunization with the recombinant baculovirus

1: BacMam/G-ie1-EGFP; 2: BacMam/G-ie1-E2; 3: rAdV-E2. ** $P < 0.01$.

免疫小鼠脾细胞经 CSFV 刺激后的增殖反应进一步用 WST-8 淋巴细胞增殖试验进行了分析. 结果显示, 与阴性对照组相比, BacMam/G-ie1-E2 免疫组脾细胞经 CSFV 刺激后表现出极显著水平的淋

巴细胞增殖($P < 0.01$), 与重组腺病毒免疫组比较无显著差异(图 8).

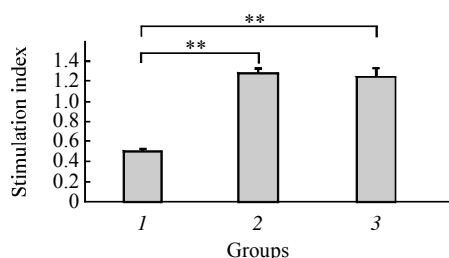


Fig. 8 The splenocyte proliferation responses elicited by immunization with the recombinant baculoviruses measured by WST-8 assay

1: BacMam/G-ie1-EGFP; 2: BacMam/G-ie1-E2; 3: rAdV-E2. ** $P < 0.01$.

3 讨 论

重组杆状病毒作为哺乳动物细胞的基因转移载体已经得到广泛应用. 近年来的研究表明, BacMam 病毒不但能够转导体外培养的哺乳动物细胞并介导外源基因的表达^[18, 19], 而且能在体内转导一些哺乳动物组织并介导目的基因的表达^[20, 21]. 随着 BacMam 病毒转导效率的提高^[22]、可转导细胞类型的增多以及病毒进入机制和体内基因转移研究的深入, 重组杆状病毒转移载体系统在基因治疗和研制开发新型非复制型载体疫苗方面的应用价值越来越受到人们的关注^[23~26]. 同时, 由于 BacMam 病毒表达系统制备成本低、表达量高、可以容载大片段外源基因而使多个基因共表达等特点, 使其在疫苗研制中显示出诱人的前景. 然而, 很多研究表明, BacMam 病毒在体内可被宿主血清中的补体所灭活^[27], 这很大程度上限制了其作为基因治疗和疫苗载体. 近年来有研究表明, VSV-G 蛋白可以通过自身的跨膜区和胞浆区整合并展示于杆状病毒表面, 经 VSV-G 修饰过的杆状病毒具有很强的抵抗补体灭活作用的能力^[28, 29], 将此修饰的杆状病毒注入小鼠体内, 可在其体内检测到转基因的表达^[30], 它还可以同时增加杆状病毒在体外^[31]和体内^[30]的转导效率, 显著扩展杆状病毒的细胞嗜性. 为了提高杆状病毒转导效率, 我们利用杆状病毒表面展示技术, 将 VSV-G 基因插入多角体启动子下游, 以此修饰过的杆状病毒作为载体, 构建了表达 CSFV E2 蛋白的 VSV-G 伪型 BacMam 病毒.

在利用 BacMam 病毒作为对哺乳动物细胞和动物体内的基因转移表达载体时, 采用一种具有较

高活性的启动子是十分必要的. 我们此前已经证实, WSSV 的 ie1 启动子是一种杆状病毒非依赖性、在昆虫细胞和哺乳动物细胞之间的新型穿梭启动子^[8]. 本研究中, 利用 ie1 启动子调控 CSFV E2 蛋白基因的表达, 结果显示, 构建的 BacMam 病毒在昆虫 Sf9 细胞和 HeLa 细胞中均能高效表达 E2 基因. 在转导试验中, 我们直接用 PBS 作为病毒稀释液, 在 25℃ 的室温环境下孵育, BacMam 病毒能有效转导 HeLa 细胞, 这与前人的研究结果是一致的^[3, 32]. 与 DMEM 相比, PBS 中不含有 NaHCO_3 , 而 NaHCO_3 可抑制杆状病毒的转导^[33], 这种方法省略了病毒的超速离心过程, 不但简单快速, 而且减少了离心过程导致病毒失活的可能.

为了进一步验证杆状病毒在动物体内的基因转移效力, 将构建的 BacMam 病毒作为免疫原直接接种小鼠, 并分别评价了其诱导的体液免疫及细胞免疫水平. 我们在之前的研究中已经证实, 将表达猪瘟疫病毒 E2 蛋白的重组腺病毒疫苗以 10^8 TCID₅₀ (1 ml) 的剂量接种家兔后, 其在兔体上显示了很好的免疫效力^[9], 因此在本研究中, 我们选择以 10^8 TCID₅₀ (0.5 ml) 的重组腺病毒免疫的小鼠作为阳性对照. 抗体检测结果显示, 经 BacMam/G-ie1-E2 免疫的小鼠, 初次免疫后抗体即持续上升, 加强免疫后抗体水平显著升高, 升高速度和幅度甚至高于重组腺病毒免疫小鼠. 细胞免疫在病毒性疾病的控制过程中具有非常重要的作用. 在病毒感染过程中, 完整功能的 CD8⁺ 细胞毒性 T 细胞 (CTL) 是控制病毒复制所必需的, 而 CD4⁺ T 细胞在保持这些 CD8⁺ T 细胞反应过程中发挥关键的作用^[34]. CD8⁺ T 细胞活化后形成效应性的杀伤细胞, 可以特异性地杀伤感染病毒的细胞. CD4⁺ T 细胞活化后的 Th 细胞可以大量分泌细胞因子, 加强抗体分泌或是细胞毒性 T 细胞的杀伤能力. 在机体抵御病毒感染的过程中, 抗体主要针对病毒颗粒, 而 T 细胞针对病毒感染的细胞. 因此, 细胞免疫水平的评价在评价疫苗的免疫效力方面具有相当重要的作用. 本研究通过用 WST-8 活细胞计数和 CFSE 荧光衰减两种方法, 检测疫苗诱导的抗原特异性淋巴细胞增殖能力, 评价了 BacMam 病毒诱导的细胞免疫应答水平, 结果显示, 与对照组相比, 经 CSFV 刺激后疫苗组小鼠的脾细胞出现了明显的增殖, 增殖水平与重组腺病毒免疫组的增殖水平相当.

总之, 我们的研究证实, 以修饰过的杆状病毒为载体构建的 BacMam 病毒可以有效介导

CSFV E2 蛋白的表达, 用 BacMam 病毒直接接种小鼠就能诱导产生 CSFV 特异性的体液免疫和细胞免疫应答. 这些结果显示, 由 BacMam 病毒介导的基因转移有望用于开发针对猪瘟的非复制型载体疫苗, 为下一步进行猪的免疫试验提供了有力依据.

参 考 文 献

- 1 Delaney W E 4th, Isom H C. Hepatitis B virus replication in human HepG2 cells mediated by hepatitis B virus recombinant baculovirus. *Hepatology*, 1998, **28**(4): 1134~1146
- 2 Aoki H, Sakoda Y, Jukuroki K, *et al.* Induction of antibodies in mice by a recombinant baculovirus expressing pseudorabies virus glycoprotein B in mammalian cells. *Vet Microbiol*, 1999, **68**(3~4): 197~207
- 3 Facciabene A, Aurisicchio L, Monica N L. Baculovirus vector elicit antigen specific immune response in mice. *J Virol*, 2004, **78**(16): 8663~8672
- 4 Abe T, Takahashi H, Hamazaki H, *et al.* Baculovirus induces an innate immune response and confers protection from lethal influenza virus infection in mice. *J Immunol*, 2003, **171**(3): 1133~1139
- 5 Gronowski A M, Hilbert D M, Sheehan K C, *et al.* Baculovirus stimulates antiviral effects in mammalian cells. *J Virol*, 2000, **73**(12): 9944~9951
- 6 Moennig V. Introduction to classical swine fever virus, disease and control policy. *Vet Microbiol*, 2000, **73**(2~3): 93~102
- 7 Lin M, Lin F, Mallory M, *et al.* Deletions of structural glycoprotein E2 of classical swine fever virus strain Alfort/187 resolve a linear epitope of monoclonal antibody WH303 and the minimal N-terminal domain essential for binding immunoglobulin G antibodies of a pig hyperimmune serum. *J Virol*, 2000, **74**(24): 11619~11625
- 8 Gao H, Wang Y, Li N, *et al.* Efficient gene delivery into mammalian cells mediated by a recombinant baculovirus containing a whispovirus iel promoter, a novel shuttle promoter between insect cells and mammalian cells. *J Biotechnol*, 2007, **131**(2): 138~143
- 9 孙元, 祁巧芬, 梁冰冰, 等. 表达猪瘟病毒 E2 蛋白的重组腺病毒的构建及其在兔体内的免疫原性分析. *生物工程学报*, 2008, **24**(10): 1734~1739
Sun Y, Qi Q F, Liang B B, *et al.* *Chin J Biotech*, 2008, **24**(10): 1734~1739
- 10 彭伍平. 利用噬菌体展示技术鉴定猪瘟病毒 E2 蛋白抗原表位: [学位论文]. 北京: 中国农业科学院研究生院, 2007
Peng W P. Epitope identification of classical swine fever virus E2 protein by phage display: [thesis]. Beijing: Chinese Academy of Agricultural Sciences, 2007
- 11 Peng W P, Hou Q, Xia Z H, *et al.* Identification of a conserved linear B-cell epitope at the N-terminus of the E2 glycoprotein of Classical swine fever virus by phage-displayed random peptide library. *Virus Res*, 2008, **135**(2): 267~272
- 12 Hsu C S, Ho Y C, Wang K C, *et al.* Investigation of optimal transduction conditions for baculovirus-mediated gene delivery into mammalian cells. *Biotech Bioeng*, 2004, **88**(1): 42~51
- 13 孙元, 夏照和, 梁冰冰, 等. 基于重组 E2 蛋白的猪瘟病毒抗体间接 ELISA 检测方法的建立. *中国兽医科学*, 2008, **38**(4): 315~319
Sun Y, Xia Z H, Liang B B, *et al.* *Vet Sci China*, 2008, **38**(4): 315~319
- 14 彭伍平, 夏照和, 侯强, 等. 猪瘟病毒石门强毒株和兔化弱毒疫苗株 E2 蛋白糖基化位点差异分析. *病毒学报*, 2007, **23**(5): 389~393
Peng W P, Xia Z H, Hou Q, *et al.* *Chin J Virol*, 2007, **23**(5): 389~393
- 15 Bird J J, Brown D R, Mullen A C, *et al.* Helper T cell differentiation is controlled by the cell cycle. *Immunity*, 1998, **9**(2): 229~237
- 16 Zhao H P, Sun J F, Li N, *et al.* Assessment of the cell-mediated immunity induced by alphavirus replicon-vectored DNA vaccines against classical swine fever in a mouse model. *Vet Immunol Immunopathol*, 2009, **129**(1~2): 57~65
- 17 Bailey M J, McLeod D A, Kang C Y, *et al.* Glycosylation is not required for the fusion activity of the G protein of vesicular stomatitis virus in insect cells. *Virology*, **169**(1989): 323~331
- 18 Boyce F M, Bucher N L. Baculovirus mediated gene transfer into mammalian cells. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1996, **93**(6): 2348~2352
- 19 Condreay J P, Witherspoon S, Clay W C, *et al.* Transient and stable gene expression in mammalian cells transduced with a recombinant baculovirus vector. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1999, **96**(1): 127~132
- 20 Airene K J, Hiltunen M O, Turunen M P, *et al.* Baculovirus-mediated periaortic gene transfer to rabbit carotid artery. *Gene Ther*, 2000, **7**(17): 1499~1504
- 21 Liu X, Li K, Song J, *et al.* Efficient and stable gene expression in rabbit intervertebral disc cells transduced with a recombinant baculovirus vector. *Spine*, 2006, **31**(7): 732~735
- 22 许辰煜, 程通, 卢五迅, 等. 杆状病毒对不同哺乳动物细胞基因转移及表达效率的研究. *生物工程学报*, 2004, **20**(1): 73~77
Xu C Y, Cheng T, Lu W X, *et al.* *Chin J Biotech*, 2004, **20**(1): 73~77
- 23 Ikononou L, Schneider Y J, Agathos S N. Insect cell culture for industrial production of recombinant proteins. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2003, **62**(1): 1~20
- 24 Ho Y, Lin P H, Liu C Y, *et al.* Assembly of human severe acute respiratory syndrome coronavirus-like particles. *Biochem Biophys Res Commun*, 2004, **318**(4): 833~838
- 25 Mortola E, Roy P. Efficient assembly and release of SARS coronavirus-like particle by a heterologous expression system. *FEBS Lett*, 2004, **576**(1~2): 174~178
- 26 Fan H, Pan Y, Fang L, *et al.* Construction and immunogenicity of recombinant pseudotype baculovirus expressing the capsid protein of porcine circovirus type 2 in mice. *J Virol Methods*, 2008, **150**(1~2): 21~26
- 27 Sandig V, Hofmann C, Steinert S, *et al.* Gene transfer into hepatocytes and human liver tissue by baculovirus vectors. *Hum*

- Gene Ther, 1996, **7**(16): 1937~1945
- 28 Kitagawa Y, Tani H, Kwang C, *et al.* Ligand-directed gene targeting to mammalian cells by pseudotype baculoviruses. *J Virol*, 2005, **79** (6): 3639~3652
- 29 Kaikkonen M U, Raty J K, Airene K J, *et al.* Truncated vesicular stomatitis virus G protein improves baculovirus transduction efficiency *in vitro* and *in vivo*. *Gene Ther*, 2006, **13**(4): 304~312
- 30 Tani H, Limn C K, Yap C C, *et al.* *In vitro* and *in vivo* gene delivery by recombinant baculoviruses. *J Virol*, 2003, **77**(18): 9799~9808
- 31 Barsoum J, Brown R, McKee M, *et al.* Efficient transduction of mammalian cells by a recombinant baculovirus having the vesicular stomatitis virus G glycoprotein. *Hum Gene Ther*, 1997, **8** (17): 2011~2018
- 32 Lu L Q, Ho Y F, Kwang J. Suppression of porcine arterivirus replication by baculovirus-delivered shRNA targeting nucleoprotein. *Biochem Biophys Res Commun*, 2006, **340**(4): 1178~1183
- 33 Shen H C, Lee H P, Lo W H, *et al.* Baculovirus mediated gene transfer is attenuated by sodium bicarbonate. *J Gene Med*, 2007, **9** (6): 470~478
- 34 Imami N, Hardy G, Pires A, *et al.* Detection and quantification of HIV-1 specific CD4 helper and CD8 cytotoxic cells: their role in HIV-1-infected individuals and vaccine recipients. *HIV Med*, 2001, **2**(3): 146~153

Generation of a Recombinant Baculovirus Expressing The E2 Protein of Classical Swine Fever Virus and Its Immunogenicity in a Mouse Model*

LI Miao, WANG Yu-Fei, WANG Yu, GAO Hui, LI Na, SUN Yuan, LIANG Bing-Bing, QIU Hua-Ji **

(Division of Swine Infectious Diseases, National Key Laboratory of Veterinary Biotechnology, Harbin Veterinary Research Institute, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Harbin 150001, China)

Abstract Baculovirus-mediated gene transfer into mammalian cells has been used to develop non-replicative vector vaccines against a number of diseases in several animal models. A baculovirus pseudotyped with the glycoprotein of vesicular stomatitis virus was used as vector to construct the recombinant baculovirus expressing classical swine fever virus (CSFV) E2 protein under the control of iel promoter from white spot syndrome virus. The E2 gene was shown to be efficiently expressed in both insect and mammalian cells. Intramuscular injection of mice with the recombinant baculovirus resulted in the production of high-level CSFV-specific antibodies. Specific lymphoproliferative responses to the CSFV stimulation were induced in the splenocytes of the immunized mice as demonstrated by CFSE staining assay and WST-8 assay. The results indicates that the pseudotyped baculovirus-delivered gene can be a potential non-replicative vaccine against CSFV infection.

Key words classical swine fever virus, E2 gene, recombinant baculoviruses, immunogenicity

DOI: 10.3724/SP.J.1206.2008.00803

*This work was supported by a grant from Hi-Tech Research and Development Program of China (2006AA10A204).

**Corresponding author.

Tel: 86-451-85935041, E-mail: huajiqiu@hvri.ac.cn

Received: January 23, 2009 Accepted: March 17, 2009