

伪狂犬病病毒鄂 A 株囊膜蛋白 gD 基因 在杆状病毒载体系统中的表达研究*

陈新华^{1)**} 杨 林¹⁾ 龙紫新^{1)***} 王珣章¹⁾ 陈曲侯²⁾ 洪文洲³⁾ 陈焕春³⁾

(¹⁾中山大学生物防治国家重点实验室, 广州 510275; ²⁾华中师范大学昆虫学研究所, 武汉 430079;

³⁾华中农业大学畜牧兽医学院, 武汉 430070)

摘要 克隆了伪狂犬病病毒鄂 A 株囊膜蛋白 gD 基因并进行了序列分析, 与国际标准毒株 Rice 株相比, 两者之间核苷酸序列同源性为 98%, 推导氨基酸序列同源性为 97%。利用杆状病毒 GST 融合载体系统对其进行了高效表达, SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳及蛋白质印迹均证明了表达产物为 71 ku 的 GST-gD 融合蛋白, 其产量占细胞不溶蛋白量的 20% 左右。以 GST-gD 融合蛋白作为抗原进行小鼠免疫保护实验, 结果表明表达的 GST-gD 融合蛋白具有较好的免疫原性, 不仅能诱导小鼠产生血清抗体 (1:128), 还能部分地保护小鼠免受伪狂犬病病毒 Su 强毒株的攻击。

关键词 伪狂犬病病毒, gD 基因, 杆状病毒表达系统, 免疫原性

学科分类号 Q78

伪狂犬病病毒 (pseudorabies virus, PRV) 是引起多种家畜及野生动物发生伪狂犬病的病原体。该疾病分布范围广泛, 危害严重, 对仔猪的致死率可高达 100%、成年猪可产生呼吸系统感染症、康复猪可潜伏感染、终生带毒等, 给全球养猪业造成了巨大的经济损失^[1]。因此, 研制安全有效的 PRV 基因工程疫苗, 加强对伪狂犬病的防治, 对于畜牧业尤其是养猪业的发展具有重要的意义。

PRV 属疱疹病毒科 α 亚科, 其基因组为线状 dsDNA, 大小约 150 kb, G+C 含量约为 72%, 编码 70~100 种病毒蛋白。截至目前, 已对 11 种 PRV 糖蛋白进行了基因定位及功能研究, 其中糖蛋白 gD 位于 PRV 的囊膜, 参与病毒吸附和穿透过程, 同时也是一种重要的免疫原性蛋白, 不仅能高效激活机体体液免疫, 还能诱导细胞免疫反应^[2]。大量研究表明, 以重组 gD 蛋白或包含 gD 基因的重组载体作为疫苗免疫小鼠或猪, 均能保护动物免受 PRV 强毒的攻击^[3~5]。gD 基因已成为发展 PRV 基因工程亚单位疫苗和 DNA 疫苗的理想目标基因。为此, 本文运用 PCR 技术克隆了我国 PRV 地方毒株鄂 A 株的 gD 基因。然后利用杆状病毒载体系统对其进行了高效表达, 以融合表达的 GST-gD 蛋白作为抗原进行动物试验, 结果表明表达的 GST-gD 融合蛋白具有免疫原性及保护效果, 为下一步研制 PRV 基因工程亚单位疫苗打下了基础。

1 材料和方法

1.1 材料

致死缺失型线性化 AcMNPV-OCC⁻ 基因组 DNA 购自 PharMingen 公司; PRV-鄂 A 株由华中农业大学动物病毒室提供^[6]; PRV-Su 株购自中国兽药监察研究所; 重组毒株 TnNPV-SVI⁻G 由本室构建保存^[7]; 粉纹夜蛾 Hi5 细胞由本室保存; 载体 pBluescript II KS⁻ 购于 STRATAGENE 公司; 杆状病毒 GST 融合载体 pAcGHLT-C 购自 PharMingen 公司。

限制性内切酶, TaqDNA 聚合酶, T4DNA 连接酶, 细胞培养基, 脂质体, DNA 凝胶回收试剂盒, 印迹膜等分别购自华美生物工程公司、大连宝生物工程公司、GIBCO-BRL、PROMEGA、QIAGEN 等公司; 猪抗 PRV 抗血清, 辣根过氧化物酶 (HRP) 标记鼠抗猪 IgG 抗体、包被有 PRV 抗原成分的酶标板均由华中农业大学动物病毒室提供; 羊抗鼠 HRP-IgG 购于华美生物工程公司; BALB/c 小鼠 (2 周龄雄鼠、体重 20 g 左右), 购

* 国家自然科学基金 (3967055) 和瑞典青年基金 (IFS: B/2987-1) 资助项目。

** 国家海洋局第三海洋研究所海洋生物工程重点实验室, 厦门 361005。

*** 通讯联系人。

Tel: 020-84113904, E-mail: ls45@zsu.edu.cn

收稿日期: 2001-09-13, 接受日期: 2001-10-18

于中山医科大学实验动物中心。

1.2 方法

1.2.1 引物设计与 PCR 扩增: 参照国外发表的 PRV Rice 株 gD 基因序列^[8], 设计合成了一对引物, 其核苷酸序列如下: P1: 5' TTTGGATCCATGCTGCTCGCAGCGCTATTGGCG 3' 引入 *Bam*HI 位点; P2: 5' TTTGAATTCCATCATCGACGCCGGTACTGCGGA 3' 引入 *Eco*RI 位点。

以 PRV 鄂 A 株基因组 DNA 为模板进行 PCR 扩增, 反应程序如下: 96 °C 预变性 3 min, 然后按 95 °C 1 min, 60 °C 1 min, 72 °C 1.5 min 进行 30 个循环, 最后 72 °C 延伸 10 min, 扩增产物经 0.8% 琼脂糖凝胶电泳检测, QIAGEN DNA 凝胶回收 Kit 回收目的 DNA。

1.2.2 测序质粒的构建与序列测定: PCR 回收产物经 *Bam*HI / *Eco*RI 双酶切后, 插入质粒 pBluescript II KS⁻ 的 *Bam*HI / *Eco*RI 切口, 构建得到测序质粒 pBluescript II KS⁻-gD, 再利用 ABI 自动测序仪进行序列测定, 结果用 DNASIS 和 PROSIS 软件进行分析。

1.2.3 重组转移载体 pAcGHLT-G-D 的构建: 用 *Sac*I / *Kpn*I 从 pBluescript II KS⁻-gD 切下 gD 基因, 将其插入转移载体 pAcGHLT-C 的 *Sac*I、*Kpn*I 位点之间, 构建成重组转移载体 pAcGHLT-G-gD, 具体操作参照文献 [9]。

1.2.4 重组杆状病毒的构建与纯化: 采用脂质体介导法转染 Hi5 细胞, 操作按 GIBCO-BRL 公司 CellFECTIN 产品说明书进行。重组病毒的空斑纯化参照文献 [10]。

1.2.5 GST-gD 基因的融合表达及检测: 用重组病毒 AcNPV-OCC⁺-gD 感染 Hi5 细胞, 27 °C 培养 72 h 后收集细胞, 裂解后进行 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳 (SDS-PAGE), 然后用猪抗 PRV 抗血清进行蛋白质印迹, 具体操作参照文献 [9] 略加修改。

1.2.6 GST-gD 融合蛋白的免疫保护试验: 收集重组病毒 AcNPV-OCC⁺-gD 感染细胞裂解物进行 SDS-PAGE, 切取含 GST-gD 蛋白的凝胶条带, 按 200 µg/只的剂量对小鼠进行肌肉注射, 共注射 10 只, 两周后加强一次, 于第二次注射后两周经尾静脉采血, 用包被 PRV 抗原成分的酶标板进行 ELISA 检测以确定抗血清的效价, 同时以不含

GST-gD 蛋白的凝胶注射小鼠作为对照。然后以 PRV-Su 强毒株按 2×10^5 PFU/只进行腹腔攻毒试验, 计算其保护效率。

2 结 果

2.1 gD 基因的 PCR 扩增与序列分析

以 PRV 鄂 A 株基因组 DNA 为模板, 运用 PCR 技术对 gD 基因进行了特异性扩增, 得到一条约 1 240 bp 的扩增片段, 与预计相符。PCR 产物经 *Bam*HI / *Eco*RI 酶切后, 插入 pBluescript II KS⁻ 的 *Bam*HI 和 *Eco*RI 位点之间, 经酶切鉴定后得到测序质粒 pBluescript II KS⁻-gD。序列测定结果表明, 我们扩增的 gD 基因长 1 215 bp, 包括了完整的 gD 基因编码区序列, 与国外报道的 PRV-Rice 株相比^[8], 核苷酸序列同源性的 98%, 两者存在 18 个核苷酸的差异, 推导氨基酸序列同源性为 97%, 有 12 个氨基酸发生了变异 (图 1)。

2.2 重组转移载体 pAcGHLT-G-gD 的构建

用 *Sac*I / *Kpn*I 从 pBluescript II KS⁻-gD 中切下 gD 基因, 克隆于载体 pAcGHLT-C 的 *Sac*I、*Kpn*I 位点之间得到重组转移载体 pAcGHLT-G-gD, 其中 gD 基因与 GST 编码序列串联后位于多角体基因启动子 (polyhedrin promoter) 控制下 (图 2), 经 *Sac*I / *Kpn*I 酶切鉴定其插入的正确性。

2.3 重组病毒 AcNPV-OCC⁻-GST-gD 的构建及纯化

将重组转移载体 pAcGHLT-G-gD 与致死缺失型线性化 AcMNPV-OCC⁻ 病毒 DNA 经脂质体介导共转染 Hi5 细胞, 96 h 后细胞出现被病毒感染的迹象, 随即收获共转染上清进行空斑纯化, 经第一轮空斑筛选后, 挑取数株表观性状为 OCC⁻, Blue⁻ 的重组毒株提取病毒基因组 DNA 进行 PCR 扩增, 随机选取 PCR 产物符合预期大小的重组毒株进行表达情况分析。

2.4 gD 基因在 Hi5 细胞中的融合表达与检测

将 MOI 为 8 的重组病毒感染对数生长期 Hi5 细胞, 27 °C 培养 72 h 后, 收集细胞进行 SDS-PAGE, 结果显示感染了重组病毒的细胞特异性地表达了分子质量约 71 ku 的蛋白, 与预期大小一致 (图 3)。蛋白质印迹结果表明该表达产物为预期的 GST-gD 融合蛋白 (图 4)。薄层凝胶扫描结果显示表达蛋白占细胞不溶蛋白量的 20% 左右。



Fig. 1 Homology comparison of the nucleotide (a) and deduced amino acid (b) sequences of gD gene between PRV Ea strain and Rice strain

R represents PRV Rice strain; E represents PRV Ea strain; the underlines represent homologous sequences.

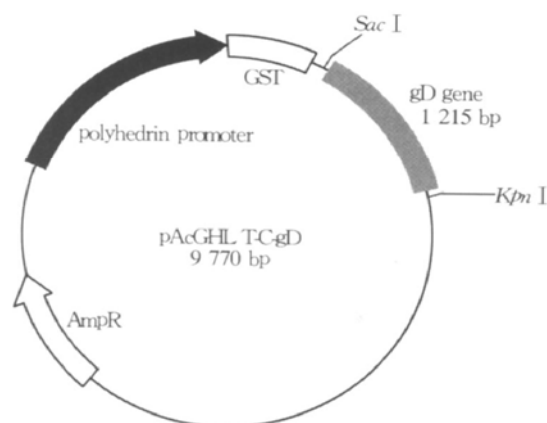


Fig. 2 Struction of recombinant transfer vector

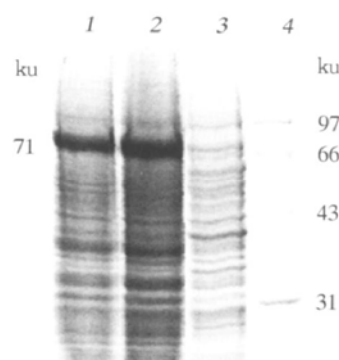


Fig. 3 SDS PAGE analysis of the total cellular proteins of Hi5 cells 72 h postinfection

1, 2: Hi5 cell infected with AcNPV-OCC⁻-GST-gD; 3: Hi5 cell infected with TnNPV-SVI⁻ G; 4: protein molecular mass marker.

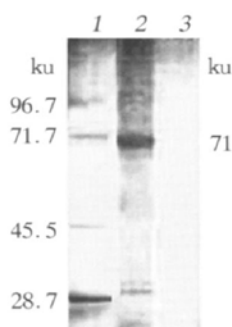


Fig. 4 Western blot analysis of gD expressed in Hi5 cells

1: Mid-range molecular mass protein marker; 2: Hi5 cells infected with AcNPV-OCC⁻-GST-gD; 3: Hi5 cells infected with TnNPV-SVI⁻G.

2.5 GST-gD 融合蛋白的免疫保护试验

以 GST-gD 融合蛋白免疫小鼠 2 次后, 从尾静脉采血进行 ELISA 检测, 结果免疫组小鼠血清抗体效价为 1: 128, 表明了 gD 融合蛋白能诱导小鼠产生一定水平的血清抗体. 以 PRV-Su 强毒株按 2×10^5 PFU/只进行攻毒试验, 结果免疫组小鼠得到了保护, 其保护率为 60% (6/10)、而对照组小鼠全部死亡.

3 讨 论

本文所克隆的 PRV 鄂 A 株 gD 基因长 1 215 bp, 编码一个由 404 个氨基酸组成的多肽, 与 PRV-Rice 株相比^[8], 存在 12 个氨基酸的变异, 且在第 278、279 位有两个氨基酸的增补突变 (Ser, Pro). 经计算机分析发现, 这些氨基酸的变化对酪氨酸激酶、cAMP、cGMP 依赖的蛋白激酶、蛋白激酶 C 等一些重要酶类的磷酸化位点没有影响, 对蛋白质的亲水性、疏水性以及二级结构均无明显的改变. 我们首先运用杆状病毒 pSX35A 载体系统对 gD 基因进行了非融合表达, 但表达水平较低, 其表达量仅占细胞总蛋白量 6.2%. 于是选用了杆状病毒 GST 融合载体系统, 在该系统中 gD 基因得到了高效表

达, 表达的 GST-gD 融合蛋白占细胞不溶蛋白量的 20% 左右, 因而对 GST-gD 融合蛋白免疫原性的评价显得尤为重要. 将 GST-gD 融合蛋白经 SDS-PAGE 分离后作为抗原进行小鼠免疫保护试验, 结果表明表达的 GST-gD 融合蛋白具有较好的免疫原性及保护效果. 我们以含 GST-gD 凝胶进行免疫试验, 主要是由于聚丙烯酰胺凝胶本身是良好的辅助佐剂, 且经 SDS-PAGE 后目的蛋白得到了初步的纯化, 有助于增强其免疫原性. 本文对我国 PRV 地方毒株鄂 A 株 gD 基因的克隆及其高效表达, 为下一步研制 PRV 基因工程亚单位疫苗创造了条件.

参 考 文 献

- 1 白新盛, 卢景良. 畜禽重大疫病生物技术防治研究. 北京: 中国农业科技出版社, 1998. 5
Bai X S, Lu J L. Study of Biocontrol Technique of Major Veterinary Disease. Beijing: Chinese Agricultural Science and Technology Press, 1998. 5
- 2 Haagsmans B L, van Rooij E M, Dubelaar M, *et al.* Vaccination of pigs against pseudorabies virus with plasmid DNA encoding glycoprotein D. Vaccine, 1999, **17** (9-10): 1264~1271
- 3 Riviere M, Tartaglia J, Perkus M E, *et al.* Protection of mice and swine from pseudorabies virus conferred by vaccinia virus-based recombinants. J Virol, 1992, **66** (6): 3424~3434
- 4 Hammond J M, Jansen E S, Morrissy C J, *et al.* Vaccination of pigs with a recombinant porcine adenovirus expressing the gD gene from pseudorabies virus. Vaccine, 2001, **19** (27): 3752~3758
- 5 Ho T Y, Hsiang C Y, Hsiang C H, *et al.* DNA vaccination induces a long-term antibody response and protective immunity against pseudorabies virus in mice. Arch Virol, 1998, **143** (1): 115~125
- 6 陈焕春, 方六荣, 何启盖, 等. 伪狂犬病病毒鄂 A 株的分离鉴定. 畜牧兽医学报, 1998, **29** (2): 156~161
Chen H C, Fang L R, He Q G, *et al.* Acta Veterinaria et Zootechnica Sinica, 1998, **29** (2): 156~161
- 7 王珣章, 谢伟东, 龙繁新, 等. 形成多角体的杆状病毒载体系统的建立. 病毒学报, 1991, **7** (3): 253~261
Wang X Z, Xie W D, Long Q X, *et al.* Chinese J Virol, 1991, **7** (3): 253~261
- 8 Petrovskis E A, Timmins J G, Armentrout M A, *et al.* DNA sequence of the pseudorabies virus gD, a glycoprotein without N-linked glycosylation. J Virol, 1986, **59** (2): 216~223
- 9 Sambrook J, Fritsch E F, Maniatis T. Molecular Cloning, A Laboratory Manual. 2nd. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989. 34~69
- 10 Fraser M J. Simplified agarose overlay plaque assay for insect cell lines and insect nuclear polyhedrosis viruses. J Tissue Methods, 1982, **7**: 43~45

Expression of the Envelope Glycoprotein D Gene of Pseudorabies Virus *Ea* Strain*

CHEN Xin-Hua^{1)**}, YANG Lin¹⁾, LONG Qi-Xin^{1)***}, WANG Xun-Zhang¹⁾,
CHEN Qu-Hou²⁾, HONG Wen-Zhou³⁾, CHEN Huan-Chun³⁾

(¹⁾ State Key Laboratory for Biocontrol, Zhongshan University, Guangzhou 510275, China;

²⁾ Institute of Entomology, Central-China Normal University, Wuhan 430079, China;

³⁾ Veterinary College, Central-China Agricultural University, Wuhan 430070, China)

Abstract The envelope glycoprotein D gene of pseudorabies virus *Ea* strain was cloned by PCR technique. Sequence analysis displayed 98% nucleotide sequence homology and 97% deduced amino acid sequence homology between the cloned gD gene and PRV Rice strain gD gene. Then gD gene was expressed highly in the baculovirus GST fusion vector system. Both SDS-PAGE and Western-blot verified that the expression product was GST-gD fusion protein with the molecular mass of 71 ku. Expressed GST-gD fusion protein accounted for about 20% of total cellular protein. The protective immune assay was performed in mice by using GST-gD fusion protein as antigen. The result showed that all mice immunized by GST-gD could produce a certain level of antibody against PRV gD (antibody titer: 1: 128), and the mice in immunized group could be partly protected against challenge infection of highly virulent PRV Su strain at 2×10^5 PFU per mice. A good foundation has been laid down for developing PRV genetically-engineered subunit vaccine.

Key words pseudorabies virus, gD gene, baculovirus expression system, immunogenicity

* This work was supported by grants from the National Nature Science Foundation of China (3967055) and Youth Fund of Sweden (IFS; B/2987-1).

** The Key Laboratory of Oceanic Biotechnology, Third Institute of Oceanography, State Oceanic Administration, Xiamen 361005, China.

*** Corresponding author. Tel: 86-20-84113904, E-mail: ls45@zsu.edu.cn

Received: September 13, 2001 Accepted: October 18, 2001