

小反刍兽疫病毒 Tibet 07 株 F 蛋白在昆虫细胞中的表达及其抗原性鉴定

赵文年^{1,2}, 王清华¹, 刘春菊¹, 王淑娟¹, 雷程红², 包静月¹, 王志亮¹

(1. 中国动物卫生与流行病学中心, 山东青岛 266032; 2. 新疆农业大学动物医学学院, 新疆乌鲁木齐 830000)

摘要:应用 Bac-to-Bac 杆状病毒表达系统表达小反刍兽疫病毒(pestes des petits ruminants virus, PPRV)西藏分离株 Tibet 07 的融合蛋白, 并对其抗原性进行鉴定。扩增 PPRV Tibet 07 株融合蛋白基因, 克隆至 pFastBac/CT-TOPO 载体中, 构建重组穿梭质粒 pFastBacCT-PPRV-F, 构建重组杆状病毒 Bacmid-PPRV-F, 转染 sf9 细胞, 获得重组杆状病毒。通过 SDS-PAGE 鉴定 F 蛋白的表达, 利用 Western blotting 和间接免疫荧光鉴定 F 蛋白的抗原性。表达的 F 蛋白在分子质量约 59 ku 处可见特异蛋白条带。重组杆状病毒 Bacmid-PPRV-F 感染的 sf9 细胞可与抗 PPRV 阳性血清发生特异性反应。使用 Bac-to-Bac 杆状病毒表达系统表达了 PPRV 西藏分离株 Tibet 07 的融合蛋白, 为进一步研究其生物学功能及研制小反刍兽疫的亚单位疫苗奠定了基础。

关键词:小反刍兽疫; F 蛋白; 杆状病毒表达系统

中图分类号: S852.65⁺9.5

文献标识码: A

文章编号: 1671-7236(2014)08-0029-05

小反刍兽疫(pestes des petits ruminants, PPR) 是山羊、绵羊和野生小反刍兽的一种急性病毒病, 以发热, 眼、鼻分泌物, 胃炎, 腹泻和肺炎为特征。PPR 是一种地方性流行疫病, 先后在非洲、中东和亚洲发生和流行(Dhar 等, 2002)。中国西藏阿里和那曲地区分别于 2007 年和 2008 年暴发 PPR(王志亮等,

2007), 2013 年 11 月~2014 年 1 月, 中国新疆暴发 PPR 疫情。通过扑杀、大规模免疫、检疫和移动控制、野生动物控制等综合防控措施, 上述疫情得到有效控制。

小反刍兽疫病毒(pestes des petits ruminants virus, PPRV)基因组为单股负链 RNA, 大小为 15948 个核苷酸, 基因组 3'末端为前导序列, 5'末端为尾随序列, 6 个基因排列顺序为 3'-N-P-M-F-H-L-5', 依次编码 6 个结构蛋白: 核衣壳蛋白(N)、磷蛋白(P)、基质蛋白(M)、融合蛋白(F)、血凝蛋白(H)和大蛋白(L), P 基因还编码 2 个非结构蛋白 C 和 V(Bailey 等, 2005)。F 基因总长度为 2411 个核苷酸, 开放阅读框长度为 1641 个核苷酸, 编码 546 个氨基酸, F 蛋白分子质量约为 59.1 ku(包静月等, 2010)。PPRV 的 F 蛋白属于 I 型膜糖蛋白, 对于介导

收稿日期: 2014-01-14

作者简介: 赵文年(1988—), 男, 新疆人, 硕士, 研究方向: 预防兽医学。

王清华(1979—), 女, 山东人, 硕士, 研究方向: 预防兽医学。

赵文年和王清华对本文具有同等贡献, 并列为一作者。

通信作者: 包静月。E-mail: baojingyue@cahec.cn

王志亮。E-mail: wangzhiliang@cahec.cn

基金项目: 国家自然科学基金项目(31272589); 公益性行业(农业)科研专项经费(201103008)。

Abstract: To maintain the native conformation and antigenicity of hemagglutinin (H) of canine distemper virus, the H gene which referred to HLJ2-07 strains was accurately amplified by RT-PCR and cloned into pFastBacTM HTA vector. The recombinant plasmid was successfully transformed into *E. coli* DH10BacTM competent cell and constructed shuttle vector, which was transfected into Sf9 cell to save baculovirus expressing destined protein. To determine the antigenicity of recombinant protein, Western blotting analysis was used to detect the interesting protein. Furthermore, the identification and characterization of B cell epitopes were predicted and analyzed by related software and online websites. The result demonstrated that the fusion protein generated by recombinant baculovirus was reacted with both anti-His tag monoclonal antibodies and canine distemper virus positive serum by Western blotting test, which showed that this protein had sufficient antigenicity. In addition, B cell epitopes were selected by between Swiss-model and online websites for consistent sequences to improve predictive accuracy, whereas the possible sites were 175 to 195, 240 to 250, 365 to 380, 480 to 508 and 526 to 555. These efforts served as a strong foundation for the development of diagnostic kits, the production of monoclonal antibodies and selection of protein epitopes.

Key words: canine distemper virus; hemagglutinin protein; baculovirus expression system; B cell epitopes

病毒和宿主细胞膜的融合至关重要 (Seth 等, 2001)。F 基因的最初翻译产物是 F 蛋白前体, 该蛋白前体在其 N 端信号肽的引导下进入内质网内腔, 在其中信号肽被细胞信号肽酶切除, 从而产生不成熟的 F0 前体, F0 前体在内质网中形成同源三聚体 (Plemper 等, 2001)。然后, F0 同源三聚体在高尔基体中发生糖基化, 并且裂解成相互间由二硫键连接的 F1 和 F2 亚基, 即以寡聚体形式存在的融合蛋白 (F 蛋白) (Bolt 等, 1998)。随后, 在 F 蛋白 F1 亚基 N 端融合肽的作用下, 病毒包膜和宿主细胞膜发生融合 (Morrison, 2003)。

本试验利用 Bac-to-Bac 杆状病毒表达系统, 表达 PPRV 西藏分离株 Tibet 07 的 F 蛋白, 为进一步研究其生物学特性、研制特异性单抗奠定试验基础。

1 材料与方法

1.1 菌株、质粒及细胞 大肠杆菌 DH10Bac、pFastBac/CT-TOPO 载体及昆虫传代细胞系 sf9 均购自 Invitrogen 公司; 大肠杆菌 DH5 α 购自宝生物工程(大连)有限公司; pGEM-T 载体购自 Promega 公司; PPRV Tibet 07 株 cDNA、PPRV 阳性血清均由中国动物卫生与流行病学中心外来病研究中心保存。

1.2 主要试剂 Sf-900 III SFM 培养基及 Foetac Bovine Serum 购自 Gibco 公司; 各种工具酶购自 NEB 公司; Thermo Scientific PageRuler Prestained Protein Ladder、DAB Substrate 均购自 Thermo 公司; Pent-HisTM Antibody、QIAprep Spin Miniprep Kit、QIAquick Gel Extraction Kit 均购自 QIAGEN 公司; Bac-to-Bac TOPO Cloning Kit、PCR Super-Mix、Cellfection II Reagent、ZyMAX Rabbit Anti-Mouse IgG (H+L)-HRP、Rabbit Anti-Goat IgG-FITC、Triton X-100、CFM-PBS 均购自 Invitrogen 公司; Genogure Plasmid Mid Kit、Expand High Fidelity^{Plus} PCR System 均购自 Roche 公司。

1.3 F 基因的 PCR 扩增及测序 通过 PCR 以 PPRV Tibet 07 毒株 cDNA 为模板扩增 F 基因, 引物序列为: 上游引物: 5'-CGCGGATCCATGACACGGGTTCGCAATCTT-3'; 下游引物: 5'-CCGCTCGAGCTACAGTGATCTCACGTACGACT-TTG-3', 下划线为酶切位点。使用 50 μ L 反应体系。PCR 反应程序为: 95 $^{\circ}$ C 预变性 5 min; 94 $^{\circ}$ C 变性 45 s, 60 $^{\circ}$ C 退火 45 s, 68 $^{\circ}$ C 延伸 2 min, 35 个循环; 68 $^{\circ}$ C 延伸 7 min。扩增片段胶回收纯化后连接 pGEM-T, 使用 T4 DNA 连接酶连接到 pGEM-T 载

体上, 转化 DH5 α 感受态细胞, 提质粒得到重组质粒 pGEM-PPRV-F, 双酶切鉴定阳性克隆, 并送上海生工生物工程技术有限公司测序。

1.4 重组穿梭质粒的构建 用 BamHI 和 XhoI 双酶切 pGEM-PPRV-F, 补平末端, 与 pFastBac/CT-TOPO 进行平末端连接, 连接产物转化感受态大肠杆菌 DH5 α , PCR 鉴定阳性克隆, 并送上海生工生物工程技术有限公司测序。测序正确的质粒命名为 pFastBacCT-PPRV-F。

1.5 Bacmid DNA 的获得 参考 Bac-to-Bac 杆状病毒表达系统 (Invitrogen 公司) 技术手册, 取测序正确的重组穿梭质粒 pFastBacCT-PPRV-F 转化 MAX Efficiency 感受态大肠杆菌 DH10Bac, 蓝白斑筛选阳性菌落, 使用 Genogure Plasmid Mid Kit 提取重组杆状病毒 DNA, 经 PCR 鉴定, 获得重组杆粒 Bacmid-PPRV-F。

1.6 sf9 细胞的培养及转染 用 Sf-900 III SFM 培养基培养 sf9 细胞, 利用转染试剂 Cellfection II Reagent 将重组杆粒 Bacmid-PPRV-F 转染至 sf9 细胞, 当细胞出现 CPE 时, 收集细胞, 1000 g 离心 5 min, 取上清, 即为第 1 (P1) 代重组杆状病毒。

1.7 杆状病毒的扩增 将培养 2~3 d 的 sf9 昆虫细胞分至 6 孔板上, 27 $^{\circ}$ C 吸附 1 h, P1 代重组杆状病毒以 0.1 MOI (P1 代病毒按 1:50 稀释加入 600 μ L) 感染 sf9 细胞 1 h, 补加 Sf-900 III SFM 培养基 1.4 mL, 27 $^{\circ}$ C 培养 72 h 后, 反复冻融 3 次, 1000 g 离心, 收获上清, 即 P2 代病毒, 测定病毒滴度。使用与 P2 代相同的扩增方法获得 P3 代病毒。

1.8 SDS-PAGE 和 Western blotting 检测目的蛋白的表达 将 P3 代重组杆状病毒以 MOI=0.05 感染悬浮培养的 sf9 细胞 (9×10^6 cell/孔), 27 $^{\circ}$ C 悬浮培养 72 h 后, 冻融裂解细胞, 离心取细胞裂解液, 加上样缓冲液沸水煮 5 min, 取样进行 12% SDS-PAGE 电泳分析。将电泳后在凝胶上分离的蛋白采样半干法转至硝酸纤维素膜, 用 5% 脱脂奶粉 4 $^{\circ}$ C 封闭过夜。表达的重组蛋白具有 1 个 His 标签, 所以以抗 His 单抗 (1:10000 稀释) 为一抗, 抗小鼠 HRP-IgG (1:10000 稀释) 为二抗, 进行 Western blotting 鉴定, 洗膜后用 DBA 显色。

1.9 间接免疫荧光试验 将 P3 代重组杆状病毒接种 sf9 细胞 72 h 后, 去培养液, PBS 洗 3 次, 加入 4% 多聚甲醛室温固定 30 min, 用 1% BSA-PBS 封闭 30 min。用抗 PPRV 阳性血清 (1:4000 稀释) 室温孵育 1 h, 加入 FITC 标记的兔抗山羊 IgG, 室温

孵育 1 h,用荧光显微镜进行观察。

2 结果与分析

2.1 F 基因的扩增和重组克隆质粒的鉴定 F 基因的扩增产物经 1% 琼脂糖凝胶电泳,可见约 1600 bp 的特异性片段,结果与预期相符,表明成功扩增了 PPRV Tibet 07 株的 F 基因。重组克隆质粒 pGEMT-PPRV-F 经 *Bam*H I / *Xho* I 双酶切,1% 琼脂糖凝胶电泳,可见约 1600 bp 的目的基因片段,结果与预期相符(图 1)。经测序发现序列与目的基因序列完全一致,表明成功构建了 pGEMT-PPRV-F 载体。

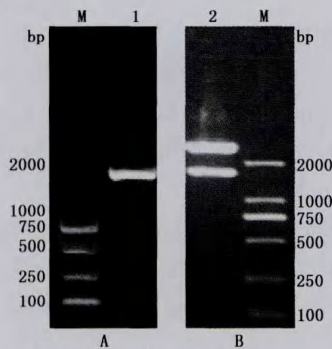


图 1 F 基因的 PCR 扩增(A)和重组克隆质粒 pGEMT-PPRV-F 的酶切鉴定(B)结果

注:M, DL2000 DNA Marker; 1, F 基因 PCR 产物; 2, 质粒 pFastBacCT-PPRV-F 的双酶切(*Bam*H I / *Xho* I)产物。

2.2 重组穿梭质粒的鉴定 重组穿梭质粒 pFast-BacCT-PPRV-F 用 F 基因扩增引物进行 PCR 扩增,可见约 1600 bp 的特异性片段(图 2),结果与预期相符,经测序,挑选方向正确且序列无突变的质粒,表明成功构建了 pFastBacCT-PPRV-F 载体。

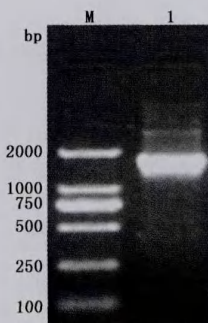


图 2 pFastBacCT-PPRV-F 的 PCR 鉴定

注:M, DL2000 DNA Marker; 1, 质粒 pFastBacCT-PPRV-F 的 PCR 产物。

2.3 重组杆粒的鉴定 重组杆粒 Bacmid-PPRV-F 用 F 基因扩增引物进行 PCR 扩增,可见约 1600 bp

的特异性片段(图 3),结果与预期相符,证明成功构建了重组杆粒 Bacmid-PPRV-F。

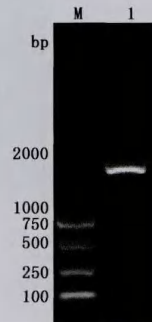


图 3 Bacmid-PPRV-F 的 PCR 鉴定

注:M, DL2000 DNA Marker; 1, 质粒 Bacmid-PPRV-F 的 PCR 产物。

2.4 融合蛋白的 SDS-PAGE 和 Western blotting 结果 用 MOI=0.05 的 P3 代重组杆状病毒感染 sf9 细胞,收获的细胞裂解液经 12% SDS-PAGE 分析,可见分子质量约为 59 ku 的特异蛋白条带(图 4A)。经 Western blotting 分析,在 59 ku 处有特异反应条带(图 4B)。证明在昆虫细胞中成功表达了 PPRV Tibet 07 株的 F 蛋白。

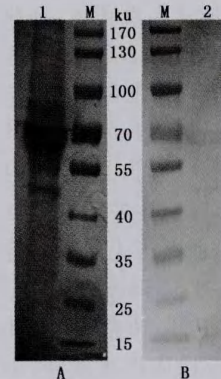


图 4 融合蛋白的 SDS-PAGE(A)和 Western blotting 检测(B)结果

注:1、2, F 蛋白; M, 预染蛋白质分子质量标准。

2.5 间接免疫荧光的结果 使用 P3 代重组杆状病毒感染 sf9 细胞,采用 PPRV 阳性血清做间接免疫荧光。由免疫荧光结果可知,表达 F 蛋白的细胞具有特异性荧光信号(图 5),表明在昆虫细胞中表达的目的蛋白具有抗原性,能与 PPRV 阳性血清发生特异性反应。

3 讨论

PPR最早于1942年发生于西非;1970~1972

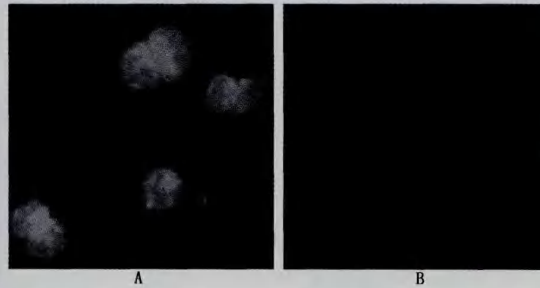


图5 感染杆状病毒的sf9昆虫细胞的间接免疫荧光结果

注:A,感染重组杆状病毒的昆虫细胞(40×);B,未感染病毒的昆虫细胞(20×)。

年间,PPR首次在东非国家苏丹发生;1983年传至阿拉伯半岛;1987年传至印度南部。在非洲,PPR流行于中部和北部非洲。在亚洲,PPR在中东、中亚和南部亚洲的大部分国家流行,对中国西南边境省份形成包围态势(Banyard等,2010)。2007年7月~2007年9月,中国西藏首次暴发PPR疫情(Wang等,2009)。该疫情涉及西藏阿里地区革吉县、日土县、扎达县和改则县4个县、10个乡镇、13个村,共出现20个疫点,羊发病6122只,死亡1888只(王乐元等,2011)。流行病学调查结果表明,2005年PPR可能就曾经传入与印度接壤的日土县热角村,但未被确诊。PPR可能从印度传入,在阿里境内缓慢向东扩散(Wang等,2009)。2008年西藏阿里地区革吉县文布当桑乡罗玛村发生野生岩羊PPR疫情,未见家畜发病(Bao等,2011)。2008年6月初,在那曲地区尼玛县双湖区嘎措乡发生PPR疫情。2010年5月,阿里地区日土县多玛乡乌江村斯亚点发生PPR疫情。此后,西藏再无新的疫情报道。2013年11月~2014年1月,新疆暴发PPR疫情,疫情确诊后,被迅速扑灭。PPR频频传入中国,对中国西南边境省份的养羊业构成严重威胁,中国迫切需要开展PPRV主要结构蛋白生物学特性研究。

F蛋白F1亚基上的2个七肽重复区(HRA和HRB)在副黏病毒膜融合过程中发挥至关重要的作用。在低pH或受体结合等条件触发后,HRA折叠形成对称的三聚卷曲螺旋(coiled coil)构象,引发融合肽插入细胞膜的靶位点,这就是所谓的前发夹中间体(Colman等,2003)。随后,HRB以相反方向结合在HRA相邻单体之间的凹槽里,与HRB相互作用形成3:3的六聚体构象的发夹结构,使跨膜结构域和融合肽处于并列位置(Matthews等,2000;Rahaman等,2003)。跨膜结构域是F蛋白病毒膜胞外结构域的锚,是形成融合小孔所必需的(Bisson-

nette等,2009)。HRB结构域中个别位点氨基酸的变异导致该核心构象的稳定性减弱(Doyle等,2006)。HRA和HRB来源的肽段能够抑制病毒的融合作用(Lambert等,1996)。研究发现HRA和HRB构成的六聚体是PPRV融合作用的核心复合体(Rahaman等,2003)。

本试验利用真核表达系统表达了中国西藏07株的F蛋白。此毒株为中国西藏流行株,而国内表达的PPRV F蛋白多为疫苗株(杨帆等,2009),非中国流行株。虽然PPRV的F蛋白较保守,但强弱毒株在生物学还是有一定差异,且杆状病毒表达系统表达的蛋白具有较好生物活性。所以,表达西藏07株的F蛋白对于进一步研制特异性单克隆抗体和研究其生物学特性具有重要意义。

杆状病毒表达系统利用杆状病毒作为载体,在昆虫细胞中表达外源蛋白,其表达产物为有生物活性的可溶性蛋白。该系统对外源基因克隆容量大,重组病毒易于筛选,具有完备的翻译后加工修饰系统,被广泛应用于外源基因的高效表达。

4 小结

本研究采用杆状病毒表达系统表达了PPRV西藏流行株F蛋白,得到的重组蛋白能与PPRV的阳性血清发生特异性的免疫反应,具有良好的抗原性,为研究F蛋白生物学特性、研制单抗奠定了基础。

参 考 文 献

- 1 王乐元,次真,吴国珍,等.中国西藏小反刍兽疫的发生状况与防控[J].畜牧兽医学报,2011,42(5):717~720.
- 2 王志亮,包静月,吴晓东,等.我国首例小反刍兽疫诊断报告[J].中国动物检疫,2007,24(8):24~26.
- 3 包静月,赵文姬,王志亮,等.我国西藏小反刍兽疫病毒野生株China/Tib/Gej/07-30基质蛋白和融合蛋白基因的分子特征分析[J].病毒学报,2010,26(4):305~314.
- 4 杨帆,窦永喜,朱学亮,等.小反刍兽疫病毒Nigeria75/1株F基因的克隆与原核表达[J].中国兽医科学,2009,39(6):503~509.

- 5 徐向明,张泉. 小反刍兽疫研究进展[J]. 中国畜牧兽医, 2009, 36(1): 113~116.
- 6 Bailey D, Banyard A, Dash P, et al. Full genome sequence of peste des petits ruminants virus, a member of the Morbillivirus genus[J]. Virus Res, 2005, 110 (1~2): 119~124.
- 7 Banyard A C, Parida S, Batten C, et al. Global distribution of peste des petits ruminants virus and prospects for improved diagnosis and control[J]. J Gen Virol, 2010, 91(Pt12): 2885~2897.
- 8 Bao J, Wang Z, Li L, et al. Detection and genetic characterization of peste des petits ruminants virus in free-living bharals (*Pseudois nayaur*) in Tibet, China[J]. Res Vet Sci, 2011, 90(2): 238~240.
- 9 Bissonnette M L, Donald J E, DeGrado W F, et al. Functional analysis of the transmembrane domain in paramyxovirus F protein-mediated membrane fusion[J]. J Mol Biol, 2009, 386 (1): 14~36.
- 10 Bolt G, Pedersen I R. The role of subtilisin-like proprotein convertases for cleavage of the measles virus fusion glycoprotein in different cell types[J]. Virology, 1998, 252(2): 387~398.
- 11 Colman P M, Lawrence M C. The structural biology of type I viral membrane fusion[J]. Nat Rev Mol Cell Biol, 2003, 4 (4): 309~319.
- 12 Dhar P, Sreenivasa B P, Barrett T, et al. Recent epidemiology of peste des petits ruminants virus (PPRV)[J]. Vet Microbiol, 2002, 88(2): 153~159.
- 13 Doyle J, Prussia A, White L K, et al. Two domains that control prefusion stability and transport competence of the measles virus fusion protein[J]. J Virol, 2006, 80(3): 1524~1536.
- 14 Lambert D M, Barney S, Lambert A L, et al. Peptides from conserved regions of paramyxovirus fusion (F) proteins are potent inhibitors of viral fusion[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 1996, 93(5): 2186~2191.
- 15 Matthews J M, Young T F, Tucker S P, et al. The core of the respiratory syncytial virus fusion protein is a trimeric coiled coil[J]. J Virol, 2000, 74(13): 5911~5920.
- 16 Morrison T G. Structure and function of a paramyxovirus fusion protein[J]. Biochim Biophys Acta, 2003, 1614(1): 73~84.
- 17 Plemper R K, Hammond A L, Cattaneo R. Measles virus envelope glycoproteins hetero-oligomerize in the endoplasmic reticulum[J]. J Biol Chem, 2001, 276(47): 44239~44246.
- 18 Rahaman A, Srinivasan N, Shamala N, et al. The fusion core complex of the peste des petits ruminants virus is a six-helix bundle assembly[J]. Biochemistry, 2003, 42(4): 922~931.
- 19 Seth S, Shaila M S. The fusion protein of peste des petits ruminants virus mediates biological fusion in the absence of hemagglutinin-neuraminidase protein [J]. Virology, 2001, 289 (1): 86~94.
- 20 Wang Z, Bao J, Wu X, et al. Peste des petits ruminants virus in Tibet, China[J]. Emerg Infect Dis, 2009, 15(2): 299~301.

Expression and Identification of F Protein of Peste Des Petits Ruminants Virus Strain Tibet 07 in Insect Cells

ZHAO Wen-nian^{1,2}, WANG Qing-hua¹, LIU Chun-ju¹, WANG Shu-juan¹,
LEI Cheng-hong², BAO Jing-yue¹, WANG Zhi-liang¹

(1. China Animal Health and Epidemiology Center, Qingdao 266032, China;

2. College of Veterinary Medicine, Xinjiang Agricultural University, Urumqi 830000, China)

Abstract: In order to obtain purified peste des petits ruminants virus F protein, the F gene of peste des petits ruminants virus strain Tibet 07 was cloned into transfer vector pFastBac/CT-TOPO, plasmid pFastBacCT-PPRV-F was then transformed into DH10Bac complement cells. The recombinant bacmid DNA was isolated and transfected into sf9 insect cells to express F protein. The expressed F protein was identified by using SDS-PAGE, Western blotting and indirect immunofluorescence assay. The recombinant F protein was successfully expressed in insect cells with a relative molecular of 59 ku. The sf9 cells infected by Bacmid-PPRV-F can reacted with positive serum of peste des petits ruminants. Using the Bac-to-Bac baculovirus expression system expressed the F protein of peste des petits ruminants virus strain Tibet 07. This work provides basis for development of rapid test for detection of peste des petits ruminants antibody.

Key words: peste des petits ruminants; F protein; baculovirus expression system

书 讯

2011年合订本(每册128元),并有少量2004、2005年合订本(每册70元),1999、2000、2001、2002、2003年合订本(每册40元)。如有订购者,请汇款到:100193 中国农业科学院北京畜牧兽医研究所《中国畜牧兽医》编辑部收。