

非洲马瘟病毒 VP7 基因的克隆及其在昆虫细胞中的表达

李富祥¹, 杨仕标¹, 艾军², 周晓黎², 赵文华¹, 王金萍¹

(1. 云南省畜牧兽医科学院, 云南昆明 650224; 2. 云南出入境检验检疫局, 云南昆明 650228)

摘要: 为了获得具有天然活性的非洲马瘟病毒重组 VP7 蛋白, 制备针对非洲马瘟 VP7 蛋白的单克隆抗体及建立快速抗体检测方法, 本试验通过 PCR 扩增、胶回收纯化后经 *Xba* I 和 *Hind* III 特异性酶切, 将 VP7 基因克隆于昆虫杆状病毒表达载体 pFastBacHTB, 经 PCR、酶切、测序鉴定后, 成功构建了携带 VP7 基因的重组质粒 pFastBacHTB-AHSV-VP7。该重组质粒转化含有杆状病毒穿梭载体的 DH10Bac 感受态细胞, 经抗生素、PCR 筛选, 获得转座的杆粒 Bacmid-AHSV-VP7, 并在脂质体介导下转染 Sf9 昆虫细胞, 获得重组杆状病毒, 再感染 Sf9 昆虫细胞, 收获表达产物。表达产物经 Western blotting 分析表明, VP7 重组蛋白得到表达, 其分子质量大小约为 45 ku, 且具有良好的生物活性。

关键词: 非洲马瘟病毒; VP7 基因; 杆状病毒表达; 昆虫细胞

中图分类号: S879.1

文献标识码: A

文章编号: 1671-7236(2012)01-0028-04

非洲马瘟是由非洲马瘟病毒(African horse sickness virus, AHSV)引起的马属动物的一种急性或亚急性虫媒传染病, 库蠓是其主要传播媒介。该病在临床上以发热、皮下结缔组织与肺水肿及内脏出血为特征, 马对此病的易感性最高, 病死率高达 95%(Coetzer 等, 1994), 中国将其列为一类动物传染病。由于本病属于虫媒病, 其发生有明显的季节性和地域性, 多见于温热、潮湿季节, 常呈地方性流行或暴发流行。本病主要流行于非洲大陆中部热带地区, 并传播到南部非洲, 有时也传播到北部非洲。近东与中东、西班牙(Mellor 等, 1990)、葡萄牙(Jorge 等, 2001)等非洲以外的国家也曾流行。在非洲国家, 该病的防控主要以加强动物流动区划管理、接种多价弱毒疫苗和监测为主。

随着经济全球化的迅猛发展, 农畜产品贸易及流通也呈全球化发展, 外来动物疫病的防控问题已经受到了各国的高度关注。虽然中国目前没有非洲马瘟的发生, 但研究该病的诊断检测方法作为技术储备对该病的防控体系建设具有重要意义。非洲马瘟病毒属呼肠孤病毒科环状病毒属, 现已知有 9 个血清型, 各型之间没有交互免疫关系, 不同血清型病

毒的毒力强弱也不相同。本研究对 9 个血清型非洲马瘟病毒最为保守的 VP7 基因进行克隆和真核表达, 制备非洲马瘟病毒群特异性抗原 VP7 重组蛋白, 为建立一种以 VP7 重组蛋白为包被抗原的 ELISA 群特异性抗体检测方法奠定基础。

1 材料与方法

1.1 病毒、质粒和菌种 非洲马瘟血清 9 型灭活病毒(11/10/90)由西班牙马德里 Ingenasa 公司提供; pFastBacHTB 质粒、Top10 *E. coli* 和 DH10Bac 菌种为云南出入境检验检疫局技术中心保存。

1.2 主要试剂和仪器 病毒 RNA 提取试剂盒(RNAEZ Spin Column Virus RNA Isolation Kit)购自美国 BBI 公司; 质粒小量提取试剂盒、凝胶回收试剂盒购于 Axygen 公司; 一步法 RT-PCR 试剂盒、限制性内切酶 *Xba* I 和 *Hind* III、DNA Marker、T4 连接酶购于 TaKaRa 公司; Cellfectin 转染试剂盒购自 Invitrogen 公司; 胎牛血清、Grace's 细胞培养基购自 Gibco 公司; 非洲马瘟病毒血清 9 型阳性血清由西班牙马德里 Ingenasa 公司提供; 辣根过氧化物酶(HRP)标记山羊抗马 IgG 购自美国 KPL 公司; PCR 仪为 Eppendorf 公司产品。

1.3 引物设计与合成 根据 AHSV 血清 9 型病毒 VP7 基因序列设计了一对引物用于扩增和鉴定 VP7 基因, 上游引物 AH1: 5'-CCCTCTAGAATG-GACGCGATAGCAGCAAG-3'(斜体部分为保护性碱基, 下划线部分为 *Xba* I 核酸酶切位点), 下游引物 AH2: 5'-GGGAAGCTTCTAGTGGTAGGCTG-

收稿日期: 2011-06-21

作者简介: 李富祥(1979—), 男, 云南人, 助理研究员, 主要从事动物微生物及免疫学研究。

通信作者: 杨仕标。Tel: 0871-5016575; E-mail: yangsb3799@sinan.com

基金项目: 公益性行业(农业)科研专项(200903037)。

CTAGCAC-3' (斜体部分为保护性碱基, 下划线部分为 *Hind* III 核酸酶切位), 扩增片段长度为 1080 bp。参照 Bac-to-Bac 杆状病毒表达系统使用手册, 设计一对用于鉴定 DH10Bac 杆粒通用引物, M13 F: 5'-GTTTTCCTCCAGTCACGAC-3'; M13 R: 5'-CAGGAA-ACAGCTATGAC-3'。引物均由 Invitrogen 公司合成。

1.4 AHSV 核酸提取 取灭活的非洲马瘟血清 9 型病毒液 200 μ L, 按照病毒 RNA 提取试剂盒操作说明提取病毒 RNA, -20 $^{\circ}$ C 保存, 用于 VP7 基因的克隆。

1.5 VP7 基因的 TA 克隆 以提取的病毒 RNA 为模板, 以 AH1/AH2 为特异性引物, 进行 RT-PCR 一步法扩增 VP7 基因片段, 反应体系按宝生物公司一步法 RT-PCR 试剂盒操作说明配制, RT-PCR 反应条件为 50 $^{\circ}$ C 反转录 30 min; 94 $^{\circ}$ C 预变性 3 min; 94 $^{\circ}$ C 变性 30 s, 55 $^{\circ}$ C 退火 45 s, 72 $^{\circ}$ C 延伸 1 min, 30 个循环; 72 $^{\circ}$ C 延伸 10 min, 4 $^{\circ}$ C 保温。将扩增产物进行 1.0% 琼脂糖凝胶电泳, 紫外凝胶成像系统观察结果。将 PCR 产物进行胶回收, 纯化后进行 TA 克隆, 将 VP7 基因片段连接到 pMD19-T 载体上。通过 PCR 及测序鉴定获得重组质粒 pMD19-T-VP7。同时通过切胶回收对 PCR 产物进行纯化, -20 $^{\circ}$ C 保存, 用于重组质粒的构建。

1.6 重组质粒 pFastBacHTB-AHSV-VP7 的构建 将重组质粒 pMD19-T-VP7 通过限制性内切酶 *Xba* I 和 *Hind* III 双酶切后, 与用相同酶切处理的昆虫表达载体 pFastBacHTB 连接。连接产物转化 Top10 感受态细胞, 经过庆大霉素和氨苄青霉素培养基筛选, 提取质粒, 并对重组质粒进行 PCR 扩增、酶切和测序鉴定。

1.7 重组穿梭质粒 Bacmid-AHSV-VP7 的构建 将 VP7 阳性质粒 pFastBacHTB-AHSV-VP7 转化含有杆状病毒穿梭载体的 DH10Bac 感受态细胞, 通过卡那霉素、四环素和庆大霉素筛选, 获得重组穿梭质粒 Bacmid-AHSV-VP7, 提取杆粒, 分别用 M13 引物和 AH1/AH2 引物进行 PCR 鉴定。

1.8 重组穿梭质粒在昆虫细胞中的表达 按照 Invitrogen Bac-to-Bac Baculovirus Expression System 使用说明手册, 将重组穿梭质粒 Bacmid-AHSV-VP7 在脂质体介导下转染对数期生长的单层 Sf9 昆虫细胞。转染后 28 $^{\circ}$ C 培养 96 h, 收集细胞, 反复冻

融 3 次后 3000 r/min 离心 10 min, 取上清作为 F1 代病毒原种, -20 $^{\circ}$ C 保存备用。取少量 F1 代病毒液接种单层 Sf9 昆虫细胞, 28 $^{\circ}$ C 培养 96 h 后按同样方法收集上清即为 F2 代病毒, -20 $^{\circ}$ C 保存备用。再用 F2 代病毒液接种单层 Sf9 昆虫细胞, 用相同方法将病毒传代培养至 F4 代, 观察细胞生长情况。

1.9 表达产物的 Western blotting 鉴定 取第 4 代重组病毒培养物裂解液上清为表达产物样品, 以正常 Sf9 细胞上清为阴性对照, 用 12% 的分离胶进行 SDS-PAGE 电泳, 用半干电转移法将 PAGE 凝胶中的蛋白转移到硝酸纤维素膜上, 以非洲马瘟病毒血清 9 型阳性血清为一抗 (1:3000)、HRP 标记的羊抗马 IgG 为二抗 (1:3000), 按常规步骤进行 Western blotting, 对表达产物进行鉴定 (汪家政等, 2000)。

2 结果

2.1 pMD19-T-VP7 重组质粒的 PCR 鉴定 用 AH1/AH2 引物对重组质粒 pMD19-T-VP7 进行 PCR 扩增, 琼脂糖凝胶电泳表明重组质粒扩增得到分子质量约为 1000 bp 的条带 (图 1), 与理论分子质量 1080 bp 相符合, 阴性对照未扩增出任何片段, 证明 VP7 基因片段已正确连接到 pMD19-T 载体上。

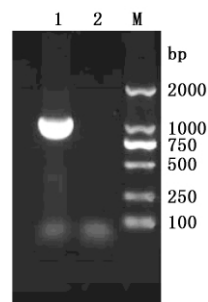


图 1 pMD19-T-VP7 重组质粒的 PCR 鉴定

注: 1, 重组质粒 pMD19-T-VP7 的 PCR 产物; 2, 质粒 pMD19-T 阴性对照; M, DL2000 DNA Marker。

2.2 重组质粒 pFastBacHTB-AHSV-VP7 的鉴定 重组质粒 pFastBacHTB-AHSV-VP7 用引物 AH1/AH2 进行 PCR 初步鉴定, 扩增得到分子质量约为 1000 bp 的产物 (图 2), 与理论值 1080 bp 相符合, 鉴定为 VP7 阳性质粒。再用酶切方法对重组质粒进行鉴定, 结果发现经 *Xba* I 和 *Hind* III 双酶切后得到的 2 个片段与理论值相符 (图 2), 鉴定为 VP7 阳性质粒。进一步对重组质粒进行测序鉴定, 测序结果证实已成功构建了昆虫杆状病毒表达质粒 pFastBacHTB-AHSV-VP7。

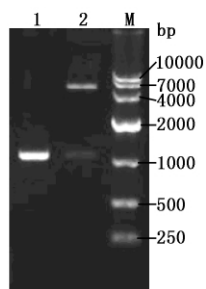
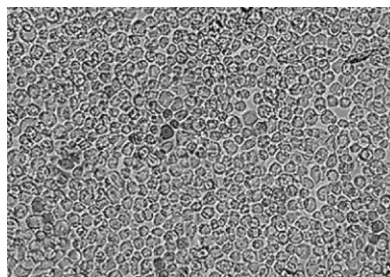


图2 重组质粒 pFastBacHTB-AHSV-VP7 的鉴定

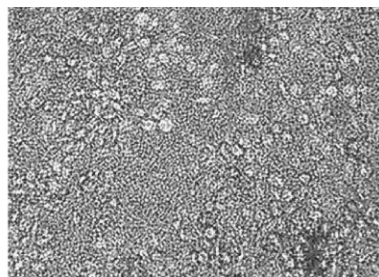
注:1,pFastBacHTB-AHSV-VP7 用引物 AH1/AH2 的 PCR 产物;2,pFastBacHTB-AHSV-VP7 的 *Xba* I 和 *Hind* III 双酶切产物;M,DL10000 DNA Marker。

2.3 重组杆粒 Bacmid-AHSV-VP7 的 PCR 鉴定

pFastBacHTB-AHSV-VP7 转入 DH10Bac 感受态细胞后,经庆大霉素、卡那霉素、四环素抗生素平皿筛选阳性质粒,提取其杆粒,用 M13 引物和 AH1/AH2 进行 PCR 鉴定,扩增产物分别约为 4000 和 1000 bp(图 3),与理论值相符。证明 VP7 基因片段已经成功转座到 Bacmid 载体上,重组杆粒 Bacmid-AHSV-VP7 构建成功。



A



B

图4 Bacmid-AHSV-VP7 杆粒在 Sf9 昆虫细胞上的细胞病变

注:A,正常 Sf9 细胞;B,转染 Bacmid-AHSV-VP7 杆粒传代至 F4 代时的 Sf9 细胞。

2.5 表达产物的 Western blotting 鉴定 将表达产物离心取沉淀适量,加入上样缓冲液煮沸 10 min,用 12% 的分离胶进行 SDS-PAGE,用半干电转移法将 PAGE 凝胶中的蛋白转移到硝酸纤维素膜上,以非洲猪瘟病毒血清 9 型阳性血清为一抗(1:3000)、HRP 标记的羊抗马 IgG 为二抗(1:3000),以 2% 胎牛血清为封闭液,按常规步骤进行 Western blotting。结果发现表达产物样品在蛋白质分子质量约 45 ku 的位置有一条明显的杂交条带,与理论值 46.2 ku 相符合,而正常的 Sf9 细胞对照没出现杂交条带(图 5),表明表达得到了特异性的重组蛋白。

3 讨论

非洲猪瘟在国际上作为一种重要的马属动物病毒性传染病,其诊断检测方法的建立在动物流动区划管理和外来动物疫病防控体系建设中具有十分

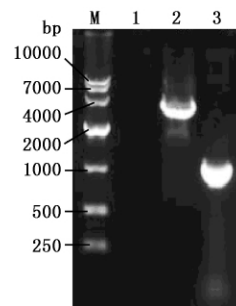


图3 重组杆粒 Bacmid-AHSV-VP7 的 PCR 鉴定

注:1,Bacmid 载体阴性对照;2,Bacmid-AHSV-VP7 用引物 M13F 和 M13R 的 PCR 产物;3,Bacmid-AHSV-VP7 用 AH1/AH2 引物的 PCR 产物;M,DL10000 DNA Marker。

2.4 重组蛋白在昆虫细胞中表达 提取转座杆粒

Bacmid-AHSV-VP7,在脂质体介导下转染对数期生长的单层 Sf9 昆虫细胞,28 °C 培养 96 h 后,倒置显微镜下观察细胞病变,结果发现转染 Bacmid-AHSV-VP7 的细胞传代培养至 F4 代时,细胞出现变圆、皱缩、大片状脱落等明显的细胞病变,而对照细胞无病变(图 4)。

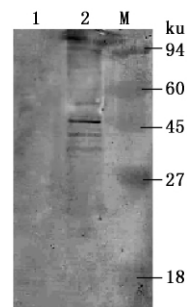


图5 表达产物的 Western blotting 分析

注:1,Sf9 昆虫细胞;2,表达产物离心后的细胞沉淀;M,预染蛋白质 Marker。

重要的价值,尤其是在中国动物进出口检验检疫中具有重要意义,已经成为国内外学者研究的一个焦点(Sonja 等,2005)。曾绍文等(2006)人工合成 VP7 基因,并在大肠杆菌中表达得到分子质量约为

54 ku 的 VP7 重组蛋白,但该蛋白以非分泌形式表达于大肠杆菌周质空间,使得其纯化方法较为困难。曹琛福等(2010)将血清 4 型 VP7 基因重组入杆状病毒,并感染昆虫细胞 Sf9,表达得到 VP7 重组蛋白,但其表达量较低;高志强等(2008)采用人工拼接的方式获得了非洲马瘟病毒含有绝大多数线性抗原表位的 VP7 编码基因片段,并在大肠杆菌中获得表达,由于其为原核表达使表达蛋白活性受到一定影响。赵文华等(2011)成功建立了检测非洲马瘟病毒群特异性 RT-PCR 检测方法,可检测非洲马瘟血清型 2、3、4、7、8 和 9 共 6 个血清型的非洲马瘟病毒。

与以往学者进行的非洲马瘟病毒克隆表达研究不同的是,本研究直接利用进口的非洲马瘟病毒血清 9 型灭活病毒,提取 RNA 作为模板进行 RT-PCR 扩增,获得 VP7 基因片段,避免了人工合成 VP7 基因可能产生的误差;并将其克隆到 Bacmid 载体上,成功构建了 Bacmid-AHSV-VP7 重组真核表达载体,并在昆虫细胞 Sf9 中进行真核表达;表达产物经 Western blotting 鉴定表明,表达产物样品在蛋白质分子质量约 45 ku 的位置有一条明显的杂交条带,与理论值 46.2 ku 相符合,而正常的 Sf9 细胞对照没出现杂交条带。结果表明,本研究表达得到了非洲马瘟病毒群特异性的 VP7 重组蛋白,但在 Western blotting 结果中出现了分子质量较 VP7 蛋白小的两条不明显的杂带,这是由于 Western blotting 是采用 AHSV 9 型多克隆抗体为一抗进行反应所致。本研究成功表达得到了 VP7 重组蛋白,为下一步 VP7 重组蛋白的纯化制备及非洲马瘟群特

异性间接 ELISA 诊断方法的建立奠定了物质基础。

参 考 文 献

- 1 汪家政,范明. 蛋白质技术手册[M]. 北京:科学出版社,2000, 166~183.
- 2 赵文华,杨仕标,王金萍,等. 非洲马瘟病毒群特异性 RT-PCR 检测方法研究[J]. 生物技术通报,2011(4):204~207.
- 3 高志强,张鹤晓,赖平安,等. 非洲马瘟病毒 VP7 基因拼接、表达及重组 ELISA 方法的建立与初步应用[J]. 畜牧兽医学报,2008, 39(11):1548~1553.
- 4 曹琛福,花群义,吕建强,等. 非洲马瘟病毒 VP7 基因在重组杆状病毒中的表达及抗原性检测[J]. 中国兽医科学,2010,8:793~796.
- 5 曾绍文,花群义,段纲,等. 非洲马瘟病毒 VP7 基因的克隆与表达[J]. 中国农学通报,2006,22(10):49~53.
- 6 Coetzer J, Erasmus B. African horse sickness virus infectious disease of livestock with special reference to Southern Africa[M]. Oxford University Press, Cape Town, 1994, 460~475.
- 7 Jorge L, Martinez-Torrecuadrada, Jan P M, et al. Definition of neutralizing sites on African horse sickness virus serotype 4 VP2 at the level of peptides[J]. Journal of General Virology, 2001, 82: 2415~2424.
- 8 Mellor P S, Boned J, Hamblin C, et al. Isolation of African horse sickness virus from vector insects made during the 1988 epizootic in Spain[J]. Epidemiol infect, 1990, 105(2):447~454.
- 9 OIE. Manual of diagnostic test and vaccines for terrestrial animals (mammals, birds and bee)[M]. OIE, 2008, 823~838.
- 10 Sonja M, Janusz T P. Preparation of recombinant African horse sickness virus VP7 antigen via a simple method and validation of a VP7-based indirect ELISA for the detection of group-specific IgG antibodies in horse sera[J]. Journal of Virological Methods, 2005, 125:55~65.

Cloning and Expression of VP7 Gene of African Horse Sickness Virus in Baculovirus Infected Insect Cells

LI Fu-xiang¹, YANG Shi-biao¹, AI Jun², ZHOU Xiao-li², ZHAO Wen-hua¹, WANG Jin-ping¹

(1. Yunnan Animal Science and Veterinary Institute, Kunming 650224, China;

2. Yunnan Entry-Exit Inspection and Quarantine Bureau, Kunming 650228, China)

Abstract: The VP7 gene fragment was cloned to the vector pFastBacHTB. The recombinant plasmid pFastBacHTB-AHSV-VP7 was constructed and was identified by PCR and enzyme digestion and sequenced. Then the plasmid pFastHTB-AHSV-VP7 was transformed into DH10Bac complement cells. It was identified by antibiotics and PCR, it showed the recombinant plasmid pFastBacHTB-AHSV-VP7 was constructed. On this basis, transposition bacmid DNA was extracted to transfect Sf9 insect cells. After transfected 96 hours, baculovirus was harvested. Then the Western blotting showed that the recombinant VP7 was expressed in insect cells. The recombinant VP7 protein had a good biological activity and was approximate 45 ku. It is a base to construct a ELISA kit to test AHSV antibody and to prepare monoclonal antibody.

Key words: African horse sickness virus(AHSV); VP7 gene; baculovirus expression; insect cells