

表达鹅细小病毒 VP3 基因重组腺病毒的构建与鉴定

陈海迪, 高旭*, 张颖, 许应天, 张立媛, 于清洋, 鲁承 (延边大学农学院动物医学系, 吉林延吉 133002)

摘要 [目的] 构建表达鹅细小病毒(GPV)VP3 基因的重组腺病毒, 为机体免疫试验和免疫效果评价奠定基础。[方法] 以重组质粒 pcDNA-VP3 为模板, 以 GPV-VP3 为目的基因, 构建 GPV-VP3 重组腺病毒载体, 通过转染获得能稳定表达 GPV-VP3 基因的重组腺病毒, 通过 IFA 和 Western-blot 检测 GPV-VP3 基因的表达情况。[结果] 扩增到的 GPV-VP3 基因全长为 1 605 bp, 线性化的重组腺病毒穿梭质粒 pCR259-VP3 能在 QBI-HEK293 细胞中瞬时表达 GPV-VP3 基因, 表达蛋白的分子量约为 60 Ku。[结论] 该重组腺病毒的构建将为 GPV 新型疫苗研发和后期体内试验奠定基础。

关键词 鹅细小病毒; VP3 基因; 重组腺病毒; 真核表达

中图分类号 S852.65*7 **文献标识码** A **文章编号** 0517-6611(2014)33-11751-04

Construction and Identification of Recombinant Adenovirus Expressing VP3 Gene of Goose Parvovirus

CHEN Hai-di, GAO Xu, ZHANG Ying et al (Department of Veterinary Medicine, Agricultural College of Yanbian University, Yanji, Jilin 133002)

Abstract [Objective] The research aimed to construct recombinant adenovirus expressing VP3 gene of goose parvovirus and lay the foundation for making the immunity test and evaluating the immune effects. [Method] Taking recombinant plasmid pcDNA-VP3 as the template, using GPV-VP3 as target gene, the recombinant adenovirus vector of GPV-VP3 was constructed. The recombinant adenovirus that could stably express VP3 gene of goose parvovirus was obtained by transfection. The expression situations of GPV-VP3 were detected by IFA and Western-blot detection. [Result] The complete sequence of amplified GPV-VP3 gene was 1 605 bp. pCR259-VP3 plasmid could transiently express in QBI-HEK293 cells. And the molecular weight of recombinant protein was about 60 Ku. [Conclusion] The construction of recombinant adenovirus laid a foundation for the research and development of a new vaccine of GPV and its experiment in vivo.

Key words Goose parvovirus; VP3 gene; Recombinant adenovirus; Eukaryotic expression

鹅细小病毒病(Goose parvovirus, GP)是由鹅细小病毒(Goose parvovirus, GPV)引起的一种雏鹅和雏番鸭最急性、急性、亚急性及高度接触性传染病^[1]。该病主要侵害雏鹅,病程短,雏鹅发病后多在 1 d 左右死亡,根本来不及治疗,死亡率高,给养鹅业带来了巨大的经济损失^[2]。防治鹅细小病毒病,接种有效的疫苗是关键。目前,养鹅业大多采用传统疫苗,但存在散毒和灭活不彻底等潜在危险,而基因工程疫苗弥补了传统疫苗的不足。在众多基因工程疫苗中,由于活载体疫苗能够刺激机体产生持久的体液免疫,可长期抵御外来病原体的侵袭,已成为当今新型疫苗研究的热点。在活载体疫苗中,腺病毒活载体疫苗因其安全性高、毒性小、宿主范围广等特点而受到了广大科研人员的关注,相关腺病毒活载体疫苗已进入临床试验或商品化,并取得了很好的免疫保护效果和经济效益^[3]。目前,尚未见到有关 GPV 重组腺病毒载体疫苗的报道。在 GPV 3 个结构基因中,VP3 基因编码的衣壳蛋白可以诱导机体产生中和抗体,使其成为预防 GP 基因工程疫苗研究的首选靶基因。因此,笔者以改造的腺病毒为载体,以 GPV-VP3 为目的基因,构建 GPV-VP3 重组腺病毒载体,通过转染获得能稳定表达 GPV-VP3 基因的重组腺病毒,为下一步机体免疫试验和免疫效果评价奠定基础。

1 材料与方 法

1.1 细胞和菌株 重组质粒 pcDNA-VP3 由延边大学动物医学系预防兽医实验室构建保存; *E. coli* JM109 和 DH5 α 感受态细胞购自索莱宝生物科技有限公司; QBI-HEK293 细胞和

腺病毒穿梭载体 pCR259 由日本带广畜产大学原虫病中心玄学南教授惠赠。

1.2 主要试剂 FITC 标记及 HRP 标记的羊抗兔 IgG, 购自 Sigma 公司。 *Ex Taq* DNA 聚合酶、T4 DNA 连接酶、各种限制性内切酶、pMD19-T Simple Vector 及 DNA 凝胶回收试剂盒、质粒提取试剂盒等均购自 TaKaRa 公司; Trizol 试剂、Lipofectamine 2000 转染试剂盒购自 invitrogen 公司; 其他常规生化试剂均为分析纯。

1.3 引物的设计与合成 根据 GenBank 中登录的 GPV-VP3 基因序列(AY524421), 应用 Oligo 6.0 软件设计合成了 1 对特异引物, 上游 P1: 5'-CTCGAGATGGCAGAGGGAGGAG-3' (*Xho* I), 下游 P2: 5'-CGGTCCACTTACAGATTTTGAGTTAG-3' (*Sal* I), 由上海英骏生物技术有限公司合成。

1.4 GPV-VP3 基因的克隆与鉴定 以重组质粒 pcDNA-VP3 为模板, 以 P1 与 P2 为引物, PCR 反应体系为 50 μ l。PCR 反应条件: 94 $^{\circ}$ C 预变性 5 min; 94 $^{\circ}$ C 变性 1 min, 55.5 $^{\circ}$ C 退火 1 min, 72 $^{\circ}$ C 延伸 100 s, 30 个循环; 最后 72 $^{\circ}$ C 再延伸 10 min。PCR 产物克隆至 pMD19-T Simple Vector, 构建质粒 pMD19T-VP3。将 PCR 和酶切鉴定均为阳性的质粒送往上海英骏生物技术公司测序。

1.5 重组腺病毒穿梭质粒 pCR259-VP3 的构建与鉴定 利用限制性内切酶 *Sal* I 和 *Xho* I 双酶切阳性克隆质粒 pMD19T-VP3 与腺病毒穿梭载体 pCR259, 各回收目的片段 4 $^{\circ}$ C 连接过夜, 将连接产物转化至 DH5 α 感受态细胞中, 筛选出阳性克隆产物接种于 Amp/LB, 220 r/min, 37 $^{\circ}$ C 过夜培养。将 PCR 和酶切鉴定均为阳性的质粒(pCR259-VP3)送往上海英骏生物技术公司测序。

1.6 重组腺病毒 rAd-VP3 的制备 经 Lipofectamine 2000

基金项目 吉林省自然科学基金项目(201215230)。

作者简介 陈海迪(1988-), 女, 吉林长春人, 硕士研究生, 研究方向: 动物传染病分子生物学与免疫学。* 通讯作者, 副教授, 博士, 从事动物传染病分子生物学与免疫学研究。

收稿日期 2014-10-15

介导,将测序正确的质粒 pCR259-VP3 转染到 QBI-HEK293 细胞,37 ℃、5% CO₂ 培养箱中培养 5 h,加入 1.5 ml 含 8% 血清的 DMEM 完全培养液过夜培养,此后在第 1 天和第 5 天更换含 3% 血清的 DMEM 完全培养液,经过 7~10 d 培养至出现细胞病变后收获病毒,即为原代重组腺病毒 rAd-VP3,记为 f₀ 代。

1.7 rAd-VP3 的 RT-PCR 鉴定 将 f₀ 代重组腺病毒 rAd-VP3 连续传代,收集第 f₀、f₂、f₆、f₁₀、f₁₂ 代病毒,应用 Trizol 试剂提取总 RNA,以 Oligo(dT) 为随机引物合成 cDNA,利用 P1、P2 引物进行 RT-PCR 鉴定。

1.8 IFA 检测表达产物 将收集的 f₀ 代重组腺病毒 rAd-VP3 接种于 24 孔细胞培养板培养的 QBI-HEK293 细胞,以野生型腺病毒感染 QBI-HEK293 细胞为对照,继续培养 48 h 后,用预冷的丙酮固定 10 min,以自制的兔抗 GPV-VP3 蛋白多克隆抗体为一抗,以 FITC 标记的羊抗兔 IgG 为二抗,在荧光显微镜下观察结果。

1.9 Western blot 检测表达产物 将收集的 f₀ 代重组腺病毒 rAd-VP3 接种于 6 孔细胞培养板培养的 QBI-HEK293 细胞,以野生型腺病毒感染 QBI-HEK293 细胞为对照,继续培养 48 h,经 -20 ℃ 反复冻融 3 次后,进行 Western blot 检测,以自制的兔抗 GPV-VP3 蛋白多克隆抗体为一抗,以 HRP 标记的羊抗兔 IgG 为二抗,DAB 显色后观察结果。

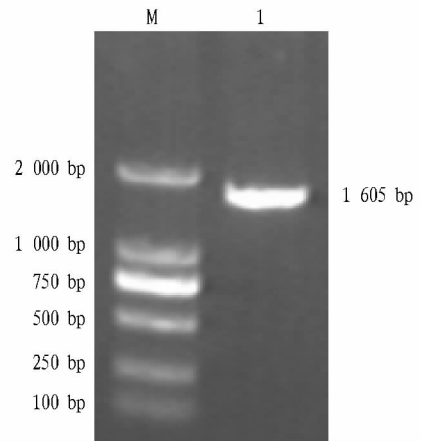
1.10 重组腺病毒 rAd-VP3 TCID₅₀ 的测定 将 QBI-HEK293 细胞接种于 96 孔细胞培养板,当细胞生长丰度达 70%~80% 时,将 10 倍比稀释的 F₀ 代重组腺病毒 rAd-VP3 (共 8 个稀释度:10⁻¹⁰~10⁻³) 接种到 96 板中,每个稀释度接种 6 个孔(100 μl/孔),并设置正常细胞对照组,细胞培养板置于 37 ℃、CO₂ 培养箱继续培养,每天观察并记录病变情况,观察 6 d,通过 Reed-Muench 法计算重组病毒的 TCID₅₀。

2 结果与分析

2.1 目的基因的扩增及克隆 从图 1 可以看出,经 PCR 扩增的 GPV-VP3 基因长度为 1 605 bp,与预期大小相符,且测序结果正确。构建的质粒 pMD19T-VP3 经 Sal I 和 Xho I 双酶切后,出现大小约为 2 700 bp 和 1 605 bp 的 2 个片段(图 2),结合测序结果,证明已成功构建 pMD19-VP3 质粒。

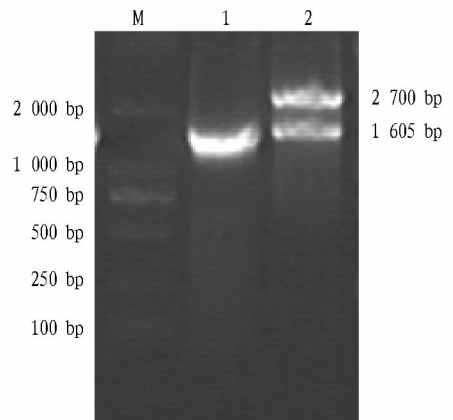
2.2 重组腺病毒穿梭质粒 pCR259-VP3 的鉴定 限制性内切酶 Sal I 和 Xho I 双酶切阳性克隆质粒 pMD19-VP3 与腺病毒穿梭载体 pCR259,将纯化后的目的片段插入到腺病毒穿梭载体 pCR259 中,经 PCR 扩增出大小为 1 605 bp 的片段,与预期大小相符。将其质粒酶切后出现大小分别约为 4 488 bp 和 1 605 bp 的片段(图 3)。将质粒送往北京英骏生物技术公司测序后证实,已成功构建了重组腺病毒穿梭质粒 pCR259-VP3。

2.3 重组腺病毒 rAd-VP3 的制备及毒价测定 利用大量质粒提取试剂盒提取质粒,经过 Pac I 线性化酶切、无水乙醇沉淀后,由 Lipofecta mine2000 介导转染至 QBI-HEK293 细胞中,第 8 天开始细胞出现皱缩变圆、呈葡萄串状、逐渐脱落等细胞病变(图 4),收获病毒,即为 f₀ 代重组腺病毒 rAd-VP3。



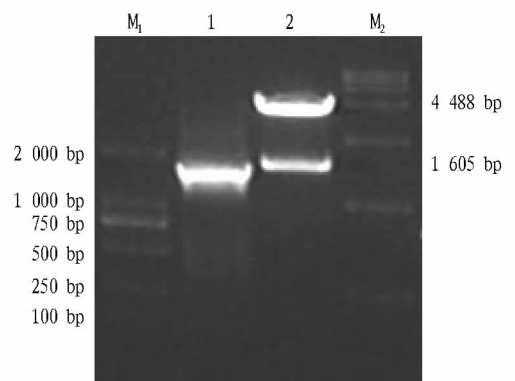
注: M: DL2 000 DNA Marker; 1: GPV-VP3 基因 PCR 产物。

图 1 GPV-VP3 基因的 PCR 扩增



注: M: DL2000 DNA Marker; 1: GPV-VP3 基因 PCR 鉴定结果; 2. 质粒 pMD19T-VP3 的 Xho I、Sal I 双酶切鉴定结果。

图 2 重组质粒 pMD19-VP3 的鉴定

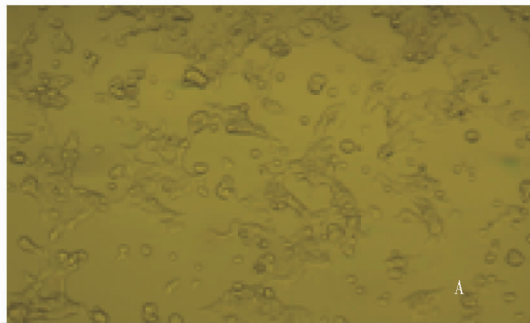


注: M₁: DL2 000 DNA Marker; M₂: DL15 000 DNA Marker; 1: GPV-VP3 基因的 PCR 结果; 2: 重组质粒 pCR259-VP3 的 Xho I、Sal I 双酶切结果。

图 3 重组质粒 pCR259-VP3 的鉴定

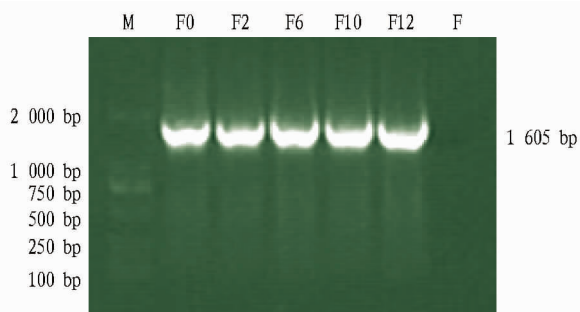
收获的 f₀ 代重组腺病毒 rAd-VP3 盲传至 F₆ 代,经 Reed-Meunch 方法计算 rAd-VP3 病毒滴度为 10^{9.15} TCID₅₀/ml。

2.4 rAd-VP3 的 RT-PCR 鉴定 感染 rAd-VP3 的 QBI-HEK293 细胞,经 RT-PCR 扩增,f₀、f₂、f₆、f₁₀、f₁₂ 代均可见 1 605 bp 特异目的条带,而空白对照组无特异条带(图 5),表明 rAd-VP3 能稳定转录。



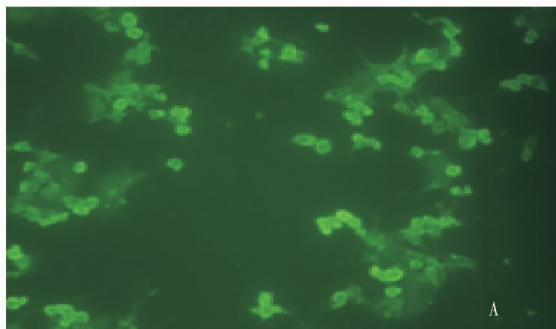
注:A. 重组腺病毒 rAd - VP3 导致 QBI - HEK293 细胞出现病变;B. 正常 QBI-HEK293 细胞对照。

图 4 QBI-HEK 293 细胞的病变



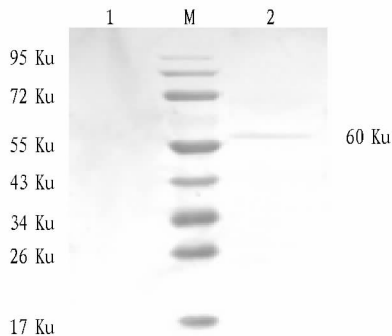
注:M. DL2 000 DNA Marker; F₀、F₂、F₆、F₁₀、F₁₂: RT-PCR 扩增 GPV - VP3 基因转录结果;F:空白对照。

图 5 重组腺病毒 rAd-VP3 感染的 QBI-HEK 293 细胞的 RT-PCR 鉴定



注:A. rAd-VP3 在 QBI-HEK293 细胞中表达 GPV - VP3 蛋白;B. 空白对照。

图 6 IFA 检测重组 VP3 蛋白在 QBI - HEK 293 细胞中的表达



注:M. 蛋白质标准 Marker; 1. 空白对照; 2. rAd-VP3 在 QBI-HEK293 细胞中表达 GPV-VP3 蛋白。

图 7 Western blot 检测重组 VP3 蛋白在 QBI-HEK293 细胞中的表达

2.5 IFA 检测重组 VP3 蛋白在 QBI-HEK 293 细胞中的表达 经 IFA 检测,在荧光显微镜下,接种 f₀ 代重组原病毒 rAd-VP3 的视野下有特异绿色荧光出现,而空白对照组的视野下没有绿色荧光(图 6),说明 f₀ 代重组原病毒 rAd-VP3 能在 QBI-HEK293 细胞中表达 GPV-VP3 蛋白。

2.6 Western blot 分析 经 Western blot 检测,在 f₀ 代重组原病毒 rAd-VP3 感染的 QBI-HEK293 细胞裂解物中检测到分子量为 60 Ku 的特异性条带(图 7),而空白对照组未见条带。结果表明,f₀ 代重组原病毒 rAd-VP3 能在 QBI-HEK293 细胞中表达 GPV-VP3 蛋白。

3 讨论

目前,随着市场对鹅绒需求量的提升,养鹅业得到了迅

猛发展。但是,随着集约化和规模化养殖的发展以及流通速度加快,使鹅细小病毒病在我国不同地区出现暴发和流行,表现为大批雏鹅突然死亡,有的病死率高达 100%^[4]。由于该病主要发生于雏鹅群体,病程短,传播速度快,死亡率高,使鹅细小病毒病成为危害我国养鹅业健康发展的最重要传染病之一,给养鹅业造成了巨大的经济损失^[4-5]。近些年,由于地域的优势,延边地区向韩国和日本的鹅绒出口量在稳步上升,该地区对鹅绒的需求量也在上升,这就催生了养鹅业的快速发展,但随着鹅细小病毒病的发生和流行,严重制约了该地区养鹅业的健康发展,应该研制出一种安全、有效的疫苗进行免疫接种,遏制鹅细小病毒病的传播和蔓延。

从 20 世纪 70 年代中期开始,分子生物学技术迅速发展,使从事疫苗研究的科学家得以从分子水平对病原体的基

因进行克隆和表达,用重组 DNA 技术研制的新型基因工程疫苗除了能保证其同传统疫苗具有同样的免疫原性外,最大的优越性是安全性高和经济效益好,避免了传统疫苗毒力返强、灭活不彻底等潜在危险,同时也具有易于区分免疫和自然感染的优点。在鹅细小病毒病结构蛋白(VP1、VP2、VP3)中,衣壳蛋白 VP3 是病毒的主要结构蛋白,约占总衣壳蛋白含量的 80%,且暴露于病毒粒子表面,是病毒刺激机体产生保护性中和抗体的重要抗原蛋白,所以 VP3 基因是研制基因工程疫苗的首选基因^[6]。车茜等^[7]通过基因枪轰击,将 VP3 基因疫苗(pcDNAGPV-VP3)接种免疫雏鹅,所诱导细胞免疫和体液免疫的能力明显强于弱毒疫苗。许洪洁等^[8]将真核表达质粒(pVAXI-GPV-VP3)免疫小鼠,发现真核表达载体疫苗可诱导小鼠产生明显的体液免疫,但细胞免疫水平不显著。卢菲等^[9]对 GPV-VP3 基因疫苗与弱毒疫苗进行了比较研究,对于 GPV-VP3 基因疫苗的免疫效力有不同的评价结果。高旭等^[10]构建了包含 GPV-VP3 基因的 VP2 基因工程亚单位疫苗,免疫实验动物后可产生较高的抗体水平,短期免疫效果明显,但不能持久产生抗体,不能诱导持久的体液免疫和细胞免疫水平,这是不能回避的关键问题。活载体疫苗解决了此难题,活病毒载体不仅失去了致病性,而且还能在免疫机体内持续表达外源保护性抗原基因,兼有灭活疫苗和活疫苗的优点。在诸多的活病毒载体中,经过改造后的腺病毒安全性高、毒性低、宿主范围广,能同时诱导机体产生 B 细胞免疫和 T 细胞免疫反应,已成为目前最有应用前景的疫苗载体之一,被广泛应用于各种预防性或治疗性疫苗的研发,如 HIV、流感、乙肝、狂犬病等疾病的腺病毒载体疫苗,并取得了可喜的效果^[3]。但关于腺病毒载体用于鹅细小病毒方面的研究尚未见报道,所以这方面的研究与开发将有很大的空间和前景。

该研究以前期分离的 YBLJ 株 GPV 强毒^[11]为毒种,克

(上接第 11750 页)

机制、民间的利用情况等等的调出与研究,不断积累资源本底资料,并将各种资料综合整理,构建有地方特色的资源数据库系统,有利于地方政府科学制定地方生物多样性的保护和可持续利用方面政策、规划提供科学依据和有价值信息,同时为有关职能部门、企业有针对性地合理开发利用和保护野生资源植物提供依据。

3.2.3 积极开展应用性研究,为资源植物的开发利用构建服务平台。野生资源植物是难得的种质资源,在优先保护好资源的前提下,有计划、分层次、有重点地开展这些资源的应用性研究,既可不断提升资源管理的层次,促进生物多样性的有效保护,又有利于人们对资源本身及其利用价值更全面的认识,使资源种质优势转化为地方的经济优势、特色优势。因此,积极开展文山州分布檀香科野生植物资源优良种质资源筛选、培育、引种驯化、示范栽培、组织培养、花药培养、有效成分的提取等方面的应用性研究,有利于发掘野生植物资

源能产生中和抗体的 VP3 基因,所构建的腺病毒载体疫苗具有显著的地域性和针对性,对预防延边地区鹅细小病毒病发生和净化鹅细小病毒将具有重要意义。经试验发现,虽然 GPV-VP3 基因较长(1 605 bp),但在 Lipofecta mine2000 的介导下线性化的重组腺病毒穿梭质粒 pCR259-VP3 能在 QBI-HEK293 细胞中瞬时表达 GPV-VP3 蛋白,通过 IFA 和 Western blot 检测,蛋白表达量较高,再次证实 GPV-VP3 腺病毒载体疫苗研制的可行性,随着下一步体内免疫试验的开展,将验证该活载体疫苗的免疫效力和免疫机制,为 GPV 新型疫苗研发以及探讨腺病毒载体应用于鹅细小病毒病预防的前景奠定基础,进一步促进养鹅业的健康发展。

参考文献

- [1] 方定一,王永坤,郑玉美,等.小鹅瘟病原体及其特异性防治的研究[J].中国农业科学,1981(1):1-8.
- [2] 张颖,鲁承,赵文婧,等.鹅细小病毒 YBLJ 株 VP3 基因的真核表达[J].动物医学进展,2012,33(12):23-25.
- [3] 杨勇,周东明.腺病毒载体疫苗的临床研究进展[J].生命的化学,2014,34(1):46-51.
- [4] 马磊,董浩,蒋运博,等.鹅细小病毒研究进展[J].中国畜牧兽医,2011,38(6):165-168.
- [5] YIN X,ZANG S,GAO Y,et al. Characterization of monoclonal antibodies against waterfowl parvoviruses VP3 protein [J]. Virol J,2012,9(1):288-294.
- [6] YU T F,MA B,GAO M C,et al. Localization of linear B-cell epitopes on goose parvovirus structural protein [J]. Vet Immunol Immunopathol,2012,15(1/2):522-526.
- [7] 车茜.小鹅瘟病毒 VP3 基因疫苗诱导雏鹅细胞免疫和体液免疫的研究[D].雅安:四川农业大学,2007.
- [8] 许洪洁,张鑫,夏铭琦,等.小鹅瘟病毒 VP3 基因真核表达质粒在小鼠中的免疫效果[J].中国兽药杂志,2008,42(1):5-8.
- [9] 卢菲,程安春,汪铭书,等.鹅细小病毒 VP3 基因疫苗与弱毒疫苗诱导小鼠免疫应答的比较[J].中国兽医科学,2008,38(7):576-581.
- [10] 高旭,张颖,鲁承,等.鹅细小病毒 VP2 基因工程亚单位疫苗的免疫试验[J].吉林农业,2012,263(1):171.
- [11] 高旭,张颖,鲁承.鹅细小病毒强毒 YBLJ 株的分离鉴定与 VP3 基因的进化分析[J].中国预防兽医学报,2011,33(12):924-926.

源在经济、生态及科学研究等方面的价值,推动地方特色产业发展,实现资源的可持续利用。

参考文献

- [1] 中国科学院中国植物志编委会.中国植物志,第 24 卷[M].北京:科学出版社,1988:53,61.
- [2] 中国科学院昆明植物所.云南植物志,第 4 卷[M].北京:科学出版社,2009:286.
- [3] 云南省药物研究所.云南天然药物图鉴 第 2 卷[M].昆明:云南科技出版社,2004:13.
- [4] 云南省药物研究所.云南天然药物图鉴 第五卷[M].昆明:云南科技出版社,2009:274.
- [5] 路锋,赵稳操,贾艳星,等.百蕊草属药学研究概况[J].安徽农业科学,2011,39(31):19091-19092.
- [6] 钟方丽,王晓林,纪萍萍,等.百蕊草中总黄酮的提取工艺研究[J].吉林化工学院学报,2008,25(4):5.
- [7] 云南省药物研究所.云南天然药物图鉴第四卷[M].昆明:云南科技出版社,2007:158.
- [8] 林盛秋.广西几种新油源[J].中国油脂,1982(3):81.
- [9] 夏念和.中国檀香科植物订正[J].植物分类学报,1992,30(5):471-472.