

王安平, 朱善元, 王永娟, 等. 鸭源新城疫病毒 NP 基因在昆虫细胞中的表达及抗原性检测[J]. 江苏农业学报, 2015, 31(6): 1384-1388.

doi: 10.3969/j.issn.1000-4440.2015.06.029

鸭源新城疫病毒 NP 基因在昆虫细胞中的表达及抗原性检测

王安平, 朱善元, 王永娟, 吴 双, 左伟勇, 洪伟鸣

(江苏农牧科技职业学院江苏省兽用生物制药高技术研究重点实验室, 江苏 泰州 225300)

摘要: 为在昆虫细胞中表达鸭源新城疫病毒 NP 蛋白质, 首先根据鸭源新城疫病毒 NP 基因序列设计引物, 扩增出 NP 基因, 将其克隆至杆状病毒表达载体 pFastBac1, 获得重组转移载体 pFastBac-NP, 将其转化到 DH10Bac 感受态细胞中, 经抗性和蓝白斑筛选, 获得重组穿梭质粒 rBacmid-NP, 在脂质体的介导下转染昆虫细胞 Sf9, 获得重组杆状病毒 NP 蛋白质。Western blot、间接免疫荧光试验结果均显示表达的重组蛋白质能够与全病毒阳性血清发生特异性反应, 具有良好的反应原性。以上结果说明鸭源新城疫病毒 NP 蛋白质在昆虫细胞中获得了成功表达。

关键词: 鸭源新城疫病毒; NP 基因; 昆虫细胞; 表达

中图分类号: S834 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-4440(2015)06-1384-05

Expression and antigenicity of NP gene of duck Newcastle disease virus (NDV) in insect cells

WANG An-ping, ZHU Shan-yuan, WANG Yong-juan, WU Shuang, ZUO Wei-yong, HONG Wei-ming

(*Jiangsu Provincial Key Laboratory of Veterinary Bio-pharmaceutical High-tech Research, Jiangsu Agri-animal Husbandry Vocational College, Taizhou 225300, China*)

Abstract: To express the NP gene of duck NDV (Newcastle disease virus) in insect cells, one pair of specific primers were designed for the amplification of NP gene by PCR, and the amplified fragment was cloned into baculovirus expression vector pFastBac1. The recombinant vector pFastBac-NP was transformed into DH10Bac *Escherichia coli*, and the positive recombinant bacmid rBacmid-NP was screened according to the resistance and the blue-white plaque screening. The NP protein was acquired through the transfection of rBacmid-NP into Sf9 insect cells by liposome. The results of Western blot and indirect immunofluorescence showed that the recombinant proteins could be recognized by positive serum, indicating that the protein had good reactiongenicity. These results suggested that the NP proteins of duck NDV had been successfully

expressed in insect cells.

Key words: duck Newcastle disease virus; NP gene; insect cell; expression

收稿日期: 2015-03-27

基金项目: 国家自然科学基金项目(31302096); 江苏省农业科技支撑计划项目(BE2013415); 江苏省“六大人才高峰”项目(NY-009)

作者简介: 王安平(1980-), 女, 江苏泰州人, 博士, 副教授, 主要从事兽用生物制药的研究。(Tel) 15189910087; (E-mail) wap4017@163.com

通讯作者: 朱善元, (Tel) 13775665658

新城疫病毒(NDV)是副粘病毒科副粘病毒亚科禽腮腺炎病毒属的成员, 能导致禽类严重的呼吸系统和神经系统疾病, 主要特征是呼吸困难、高

热、下痢、神经机能紊乱以及黏膜和浆膜出血。以前认为新城疫病毒不会引起水禽致病,自从 1997 年,王永坤等^[1]报道了从病鹅体内分离到了 NDV 强毒株,从而打破 NDV 对水禽不致病之说。近年来,鸭、鹅等水禽感染 NDV 并发病的病例越来越多,也越来越严重,给中国水禽养殖业带来了很大的损失^[2-4]。

新城疫病毒是单股负链,不分节段的 RNA 病毒,基因组编码 6 种结构蛋白质,分别为核衣壳蛋白质(NP)、磷酸化蛋白质(P)、膜蛋白质(M)、融合蛋白质(F)、血凝素-神经氨酸酶蛋白质(HN)和大分子蛋白质(L)^[5-6]。NP 蛋白质是 NDV 核衣壳的主要蛋白质成分,其 N 端结合 RNA,高度保守,C 端含有磷酸化位点和抗原决定簇位点。本研究利用 Bac-to-Bac 杆状病毒系统,构建含鸭新城疫病毒 NP 基因的重组杆状病毒,并在昆虫细胞中表达重组 NP 蛋白质,为鸭新城疫病毒病的基础研究奠定基础。

1 材料与方法

1.1 毒株、菌株和载体

鸭源新城疫病毒、鸭新城疫阳性血清由福建省农业科学院惠赠;Sf9 细胞、大肠杆菌 DH5 α 感受态细胞由江苏省兽用生物制药高技术研究重点实验室保存;杆状病毒 Bac-to-Bac 表达系统(包括转座质粒 pFastBac1、*E. coli* DH10Bac 受体菌)购自 Invitrogen 公司。

1.2 工具酶和试剂

pfu DNA Polymerase、限制性内切酶 *EcoR* I、*Pst* I 及 T4 DNA 连接酶购自 Fermentas 公司,Wizard DNA Clean-up System 购自美国 Promega 公司,昆虫细胞培养基 Sf-900II SFM (Serum free medium) 购自 GBICO 公司,转染试剂 Cellfectin II Reagent 购自 Invitrogen 公司,HRP 标记的羊抗鸭 IgG、荧光素标记的羊抗鸭 IgG 均购自美国 KPL 公司,其他试剂均为国产分析纯级。

1.3 引物的设计与合成

参考 GenBank 中登录的鸭新城疫病毒 NP 基因序列设计 1 对引物,为了便于基因的克隆及表达载体构建等后继工作,在 NP 基因引物的上、下游 5' 端分别添加了 *EcoR* I 和 *Pst* I 酶切位点。通用引物 M13F/M13R 参照 Bac-to-Bac 杆状病毒表达系统设计,引物均由上海英潍捷基生物技术有限公司合成。NP 基因

引物序列为: P1: 5'-GCGGAATTCACCATGTCGTCTGTTTTCGACGA-3' (下划线为 *EcoR* I 酶切位点), P2: 5'-TA~~ACTCGAGT~~CAGTACCCCCAGTCAGTGTG-3' (下划线为 *Pst* I 酶切位点)。通用引物序列为: P1: 5'-GTTTTC~~CC~~CAGTCACGAC-3', P2: 5'-CAGGAAACAGC-TATGAC-3'。

1.4 病毒的扩增与总 RNA 的提取

取 10 倍稀释的原代病毒 0.2 ml 接种于 10 日龄 SPF 鸡胚尿囊腔,于 37 °C 孵化箱孵化。选择 24~72 h 内死亡的鸡胚,置于 4 °C 过夜,收集尿囊液。按 Trizol 法抽提尿囊液总 RNA,操作参照说明书。

1.5 NP 基因的扩增

根据 Invitrogen 公司的 RT-PCR 试剂盒操作说明进行操作,反应程序设定为: 25 °C 10 min, 42 °C 90 min, 70 °C 10 min。PCR 反应条件为: 95 °C 预变性 3 min; 95 °C 30 s, 54 °C 30 s, 72 °C 1 min, 30 个循环; 72 °C 10 min。PCR 产物经 0.8% 琼脂糖凝胶电泳分析。

1.6 重组转座载体 pFastBac-NP 的构建

回收的 NP 基因经 *EcoR* I、*Pst* I 酶切后,与经同样酶切的 pFastBac1 连接,在含 100 μ g/ml 氨苄青霉素的 LB 琼脂平板上 37 °C 培养过夜后,挑取单菌落,提取质粒电泳筛选,并进行酶切鉴定。酶切鉴定正确后送由上海英潍捷基生物技术有限公司测序,鉴定正确的克隆命名为 pFastBac-NP。

1.7 重组杆状病毒穿梭载体的构建

参考 Invitrogen 公司的 Bac-to-Bac Baculovirus Expression System 使用说明,将阳性重组质粒 pFastBac-NP 转化 DH10Bac 感受态细胞,用含四环素 (10 μ g/ml)、卡那霉素 (50 μ g/ml)、庆大霉素 (7 μ g/ml)、IPTG (40 μ g/ml)、X-gal (100 μ g/ml) 的 LB 琼脂平板筛选阳性菌落,挑取白色菌落,提取质粒,用通用引物 M13F/M13R 进行 PCR 鉴定,扩增条件如下: 95 °C 预变性 3 min; 95 °C 变性 30 s, 55 °C 退火 30 s, 72 °C 延伸 2 min, 30 个循环; 72 °C 延伸 10 min。产物用 0.8% 琼脂糖凝胶电泳检测,获得的阳性重组转座子命名为 rBacmid-NP。

1.8 重组杆状病毒 rBac-NP 的制备

将 rBacmid-NP 参照 Cellfectin II Reagent 转染试剂说明书转染处于对数生长期的 Sf9 昆虫细胞。转染后每 12 h 观察细胞生长状态,直至细胞出现明

显的病变,72 h 后收集培养基上清液,500 *g* 离心 5 min,将上清液转移至新的无菌管中,此即为 P1 代重组杆状病毒 rBac-*NP*,4 °C 保存备用。

1.9 Western blot 分析

将 P1 代 rBac-*NP* 按感染复数 (*MOI*) 为 0.1 感染对数生长期 Sf9 细胞,直至细胞出现明显病变(感染后约 48~72 h),收集上清液即为 P2 代重组病毒,按此方法将病毒传至 P3 代。将 P3 代 rBac-*NP* 分别按 *MOI* 为 1、5、10 接种 24 孔板中 Sf9 细胞,分别在感染后 24 h、48 h、72 h 收集细胞沉淀,PBS 洗涤 1 次后,于沉淀中加入 100 μ l 1 \times Loading buffer 煮沸 3 min 后,取 15 μ l 进行 SDS-PAGE 分析,以未接种病毒的细胞沉淀作为阴性对照。样品电泳结束后转印 PVDF 膜,以全病毒鸭抗血清作为一抗,以 HRP 标记的羊抗鸭 IgG 作为二抗,按常规方法进行 Western blot。

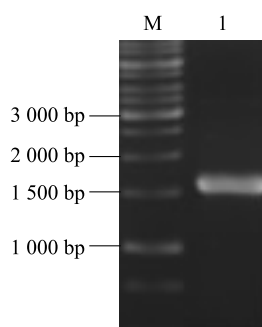
1.10 间接免疫荧光试验

将 P3 代 rBac-*NP* 分别按 *MOI* 为 1、5、10 接种 24 孔板中 Sf9 细胞,在感染后 48 h 弃去上清液,PBS 洗涤 2 次后,常规程序进行细胞免疫荧光,以全病毒鸭抗血清为一抗,以荧光素标记的羊抗鸭 IgG 为二抗。同时以未接种病毒的细胞作为阴性对照。

2 结果与分析

2.1 *NP* 基因的扩增

NP 基因 PCR 产物经 0.8% 的琼脂糖凝胶电泳,可见大约 1 500 bp 的条带(图 1),与预期结果相符。



M:DNA 分子质量标准;1:*NP* 基因的 PCR 扩增产物。

图 1 目的基因的 PCR 扩增结果

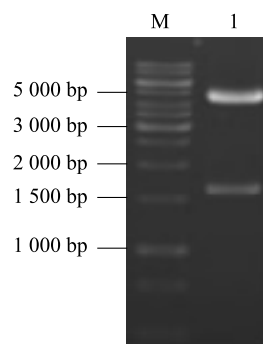
Fig.1 Amplification of target genes by PCR

2.2 重组转座载体 pFastBac-*NP* 的构建与鉴定

疑似重组质粒经 *EcoR* I 和 *Pst* I 双酶切后出现约 1 600 bp 和 4 800 bp 两条带(图 2),与预期相符,且 DNA 测序证明 *NP* 基因克隆正确且无突变。

2.3 重组杆状病毒穿梭载体的鉴定

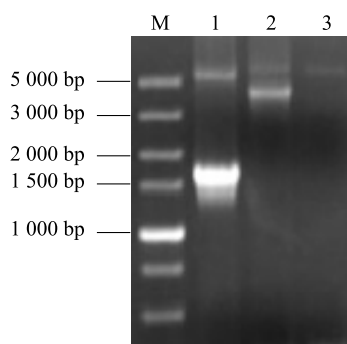
以提取的疑似含有 *NP* 基因的重组杆粒 DNA 为模板,分别以 NPP1/NPP2、M13P1/M13P2 为引物进行 PCR 鉴定,产物经 0.8% 琼脂糖凝胶电泳后分别在约 1 600 bp 和 4 800 bp 处可见特异性条带,与预期片段大小相符(图 3),而空载体对照组未出现特异条带,表明 *NP* 基因转座成功,获得的重组杆粒正确。



M:DNA 分子质量标准;1:pFastBac-*NP* 的 *EcoR* I+*Pst* I 酶切鉴定。

图 2 重组质粒 pFastBac-*NP* 的酶切鉴定

Fig.2 Identification of recombinant plasmid by restriction endonucleases digestion



M:DNA 分子质量标准;1:利用 NPP1/NPP2 引物的 rBacmid-*NP* PCR 扩增产物;2:利用 M13P1/M13P2 引物的 rBacmid-*NP* PCR 扩增产物;3:空载体对照。

图 3 重组转座子的 PCR 鉴定

Fig.3 Identification of recombinant plasmid by PCR

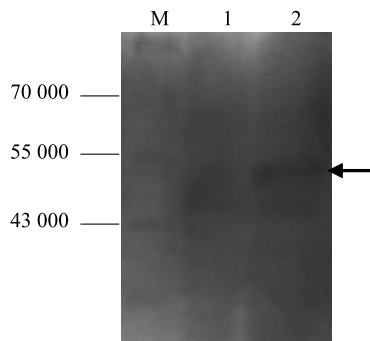
2.4 重组杆状病毒的收获及感染细胞的病变

rBacmid-*NP* 转染对数生长期昆虫细胞 Sf9,

5 d后可见细胞变大,细胞生长停止,细胞内出现颗粒,有些细胞肿大而破碎等明显的细胞病变现象,而未转染组的细胞未出现此现象。

2.5 F 基因在昆虫细胞中的表达

2.5.1 Western blot 鉴定 P_3 代 rBac-NP 感染 24 孔板中对数生长期的 Sf9 细胞,细胞沉淀经 SDS-PAGE 电泳后,采用鸭抗全病毒血清为一抗进行 Western blot 检测,结果在约 53 000 处出现特异条带(图 4),分子量与目的蛋白质相同,而正常 Sf9 细胞未出现相应条带,说明重组蛋白质在昆虫细胞中获得了成功表达,且具备良好的反应原性。



M:Marker;1:正常 Sf9 细胞裂解液;2:感染重组病毒细胞裂解液。箭头表示 NP 蛋白质大小位置。

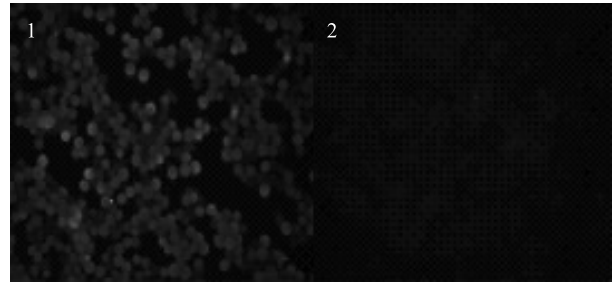
图 4 重组蛋白质的 Western blot 鉴定

Fig.4 Western blot identification of recombinant protein

2.5.2 间接免疫荧光试验 P_3 代 rBac-NP 感染 24 孔板中对数生长期的 Sf9 细胞,以鸭抗全病毒血清为一抗进行间接免疫荧光分析,结果显示在感染 rBac-NP 的 Sf9 细胞中观察到了特异性荧光,而在对照孔细胞中未出现荧光(图 5)。

3 讨论

自 1997 年以来在江苏、山东等地相继报道了鹅副粘病毒病以后,鸭源 NDV 也相继从发病鸭群中分离到,近些年鸭、鹅等水禽感染 NDV 并发病的病例越来越多,给中国的水禽养殖业带来了较大的损失。目前,疫苗接种仍然是预防和控制该病的主要手段和方法。NP 蛋白质是 NDV 的核衣壳蛋白质,与病毒基因组 RNA 结合形成螺旋堆成的卷曲状结构^[7]。不同毒株间 NP 基因的保守性很高,NP 蛋白质在病毒粒子中是最丰富的蛋白



1:感染重组病毒细胞;2:正常 Sf9 细胞。

图 5 重组蛋白质的间接免疫荧光试验

Fig.5 Indirect immunofluorescence detection of recombinant protein

质,具有天然的免疫原性,但不具有免疫保护作用,常用于监测疫苗接种程序和新城疫诊断中^[8]。本试验利用鸭源新城疫病毒福建强毒株为研究对象,利用分子克隆技术克隆出 NP 基因片段,将其克隆入 Bac-to-Bac 杆状病毒载体中并且获得了成功表达。

Bac-to-Bac 杆状病毒表达系统是一种比较成熟的真核表达系统,具有阳性重组率高、操作简便、成本低等优点,尤其是该系统可以获得大量的、免疫原性较好的、与天然蛋白质功能相似的可溶性重组蛋白质,因此被广泛应用于药物开发、重要药用蛋白质及疫苗研究等多个领域^[9-11]。

本研究利用 Bac-to-Bac 杆状病毒表达系统在昆虫细胞中表达鸭源新城疫病毒 NP 基因。首先将 NP 基因克隆入杆状病毒转移载体 pFastBac1 中,转化感受态细胞 DH10Bac,经抗性基因和蓝白斑筛选随机挑取白色菌落,分别以 NP 基因上、下游引物和 M13 上、下游引物进行 PCR 鉴定,以蓝色菌落为阴性对照,结果证实白色菌落为重组成功的阳性转座子。提取其 DNA,脂质体介导下转染 Sf9 昆虫细胞,72 h 后细胞出现典型病变。Western blot 分析重组蛋白质表达产物,有一条约 53 000 的特异性条带,与理论值相符,且重组蛋白质与鸭抗全病毒血清也呈现了良好的反应原性,说明本系统表达的重组 NP 蛋白质可用于鸭源新城疫病毒的诊断和检测。

参考文献:

- [1] 王永坤,田慧芳,周继宏,等. 鹅副粘病毒病的研究[J]. 中国家

- 禽, 1998, 20(4): 3-5.
- [2] 李世江, 赵忠民, 刘红娟, 等. 鸭副粘病毒病的诊治[J]. 中国动物保健, 2003, 53(7): 51.
- [3] 何永强, 洪健, 吴旧生, 等. 致麻鸭产蛋下降的副粘病毒的分离和鉴定[J]. 中国兽医学报, 2005, 25(3): 238-240.
- [4] 张耀成, 朱汉华. 鸭副粘病毒与鸭疫里默氏杆菌混合感染的诊治[J]. 禽病防制, 2005, 22(5): 28.
- [5] 于洋, 封振, 何孔旺, 等. 新城疫病毒毒力分子机制研究进展[J]. 江苏农业学报, 2013, 29(2): 435-439.
- [6] 吴双, 王永娟, 左伟勇, 等. 新城疫病毒 LaSota 疫苗株的准种遗传变异分析[J]. 江苏农业科学, 2014, 42(3): 161-163.
- [7] KHO C L, TAN W, YUSOFF K. Production of the nucleocapsid protein of newcastle disease virus in *Escherichia coli* and its assembly of into ring-like and nucleocapsid-like particles[J]. Journal of Microbiology, 2001, 39(4): 293-299.
- [8] MAKAY A M, KRELL P J, NAGY E. Antibody detection-based differential elisa for NDV-infected or vaccinated chickens versus NDV HN-subunit vaccinated chickens [J]. Veterinary Microbiology, 1999, 66(3): 209-222.
- [9] HU Y C. Baculovirus as a highly efficient expression vector in insect and mammalian cells[J]. Acta Pharmacol Sin, 2005, 26(4): 405-416.
- [10] MARANGA L, CRUZ P E, AUNINS J G, et al. Production of core and virus-like particles with baculovirus infected insect cells [J]. Adv Biochem Eng Biotechnol, 2002, 74: 183-206.
- [11] ZHANG T, XU Y, QIAO L, et al. Trivalent human papillomavirus (HPV) VLP vaccine covering HPV type 58 can elicit high level of humoral immunity but also induce immune interference among component types[J]. Vaccine, 2010, 28(19): 3479-3487.

(责任编辑: 袁伟)