

梅 梅, 陆吉虎, 张雪花, 等. 高致病性血清 4 型禽腺病毒 *hexon* 基因在昆虫细胞中的表达及鉴定 [J]. 江苏农业学报, 2018, 34(4): 862-865.

doi: 10.3969/j.issn.1000-4440.2018.04.021

## 高致病性血清 4 型禽腺病毒 *hexon* 基因在昆虫细胞中的表达及鉴定

梅 梅<sup>1,2,3</sup>, 陆吉虎<sup>1,2,3</sup>, 张雪花<sup>1,2,3</sup>, 唐应华<sup>1,2,3</sup>, 侯继波<sup>1,2,3</sup>

(1.江苏省农业科学院动物免疫工程研究所, 江苏 南京 210014; 2.江苏省农业科学院国家兽用生物制品工程技术研究中心, 江苏 南京 210014; 3.江苏省动物重要疫病与人兽共患病防控协同创新中心, 江苏 扬州 225009)

**摘要:** 为获得杆状病毒表达的重组高致病性血清 4 型禽腺病毒 (Fowl adenovirus serotype 4, FAdV-4) 六邻体蛋白 (Hexon), 本研究通过 PCR 从高致病性血清 4 型禽腺病毒基因组中扩增到 *hexon* 基因, 克隆到杆状病毒转移载体 pFastBac-1, 获得重组转移质粒 pFastBac-*hexon*, 将其转化 DH10Bac 大肠杆菌并筛选, 获得重组杆状病毒穿梭质粒 rBacmid-*hexon*, 将重组杆状病毒穿梭质粒转染 Sf9 细胞, 获得重组杆状病毒 rBV-*hexon*。间接免疫荧光试验和免疫印迹试验结果显示, Sf9 细胞中的 Hexon 蛋白能够与血清 4 型禽腺病毒阳性血清发生特异性反应, 蛋白质分子量约 110 000, 表明 Hexon 蛋白在 Sf9 细胞中获得良好的表达。

**关键词:** 高致病性血清 4 型禽腺病毒; 六邻体蛋白; *hexon* 基因

**中图分类号:** S855.3 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-4440(2018)04-0862-04

## Expression and identification of high pathogenic fowl adenovirus serotype 4 *hexon* gene in insect cell

MEI Mei<sup>1,2,3</sup>, LU Ji-hu<sup>1,2,3</sup>, ZHANG Xue-hua<sup>1,2,3</sup>, TANG Ying-hua<sup>1,2,3</sup>, HOU Ji-bo<sup>1,2,3</sup>

(1. Institute of Veterinary Immunology and Engineering, Jiangsu Academy of Agricultural Sciences, Nanjing 210014, China; 2. National Research Center of Engineering and Technology for Veterinary Biologicals, Jiangsu Academy of Agricultural Sciences, Nanjing 210014, China; 3. Jiangsu Co-innovation Center for Prevention and Control of Important Animal Infectious Diseases and Zoonoses, Yangzhou 225009, China)

**Abstract:** To obtain the expression product of high pathogenic fowl adenovirus serotype 4 (FAdV-4) hexon protein, *hexon* gene was amplified from genome of high pathogenic fowl adenovirus serotype 4, and it was cloned into transfer vector pFastBac-1. The recombinant transfer plasmid pFastBac-*hexon* was generated, transformed into DH10Bac *Escherichia coli* and screened to obtain recombinant shuttle plasmid rBacmid-*hexon*. The rBacmid-*hexon* was transfected into Sf9 cell to produce recombinant virus rBV-*hexon*. The expression of hexon was identified by indirect immunofluorescence assay and western blot, the results showed the recombinant virus in Sf9 cell can be recognized specifically by polyclonal antibody against FAdV-4, and the molecular weight was about 110 000, these results indicated that the hexon protein was well expressed in Sf9 cell.

**Key words:** high pathogenic fowl adenovirus serotype 4 (FAdV-4); hexon protein; *hexon* gene

禽腺病毒 (FAdV) 属于腺病毒科禽腺病毒属,

主要分为 5 个种 (A~E), 12 个血清型<sup>[1]</sup>。禽腺病毒感染 1963 年首次在美国发生, 随后扩散至世界各地<sup>[2]</sup>。FAdV 感染一般引起亚临床症状, 而急性感染会引发肌胃糜烂、心包积液及包涵体肝炎等<sup>[3]</sup>。2013 年以来, 中国鸡群由 FAdV 引起的心包积液、包涵体肝炎临床病例逐渐增多<sup>[4-5]</sup>。2015 年以来,

收稿日期: 2018-01-08

作者简介: 梅 梅 (1982-), 女, 江苏东台人, 博士, 副研究员, 主要从事分子病毒学和免疫学研究。(E-mail) jacqui18@163.com

FAdV 感染鸡群在各国爆发,而发病鸡除 3~4 周龄的肉鸡外,10~20 周龄的蛋鸡也可被 FAdV 感染,而目前高致病性血清 4 型 FAdV 在鸡群流行广泛,给养鸡业造成了严重的经济损失<sup>[6-10]</sup>。

禽腺病毒(FAdV)是一种没有包膜的直径为 70~90 nm 的颗粒,由 252 个壳粒呈二十面体排列而成<sup>[11]</sup>。衣壳含有 240 个六邻体(Hexon)、12 个五邻体(Penton)和 12 根纤突(Fiber),Hexon 蛋白是 FAdV-4 主要表面结构蛋白,可诱导机体产生中和抗体,在病毒感染细胞过程中起着非常重要的作用。本研究利用 Bac-to-Bac 真核表达系统,克隆和表达了 FAdV-4 *hexon* 基因,为进一步研究 FAdV-4 致病性及疫苗抗原的研制提供基础材料。

## 1 材料与方法

### 1.1 病毒

高致病性血清 4 型禽腺病毒由本实验室分离、鉴定和保存。

### 1.2 试剂

*Taq* DNA 聚合酶、DNA marker、pMD-19 载体、T4 连接酶购自 TaRaKa 公司,小提质粒试剂盒、Agarose Gel DNA Extraction Kit、BAC 基因组提取试剂盒购自 Qiagen 公司,引物由金斯瑞公司合成。

### 1.3 病毒基因组 DNA 的提取

病毒基因组 DNA 的提取<sup>[12]</sup>,具体方法如下:向 200  $\mu$ l 病毒液中加入 400  $\mu$ l 消化液(100 mmol/L NaCl, 25 mmol/L EDTA, 10 mmol/L Tris-HCl pH 8.0, 0.5% SDS, 0.1 mg/ml 蛋白酶 K),在 37  $^{\circ}$ C 消化过夜,在上述消化产物中加入等体积的苯酚,充分混匀,12 000 r/min 离心 5 min,取上清液,加等体积的苯酚和氯仿,混匀,12 000 r/min 离心 5 min,取上清液,再用等量的氯仿抽提,12 000 r/min 离心 5 min,取上清液,加入 2 倍体积的无水乙醇于 -20  $^{\circ}$ C 沉淀 DNA,过夜,以 12 000 r/min 离心 10 min,将沉淀以 70% 乙醇洗涤 1 次,空气中自然干燥后悬浮于 50  $\mu$ l 灭菌 TE(pH 8.0)中, -20  $^{\circ}$ C 保存备用。

### 1.4 基因扩增

根据已发表的血清 4 型禽腺病毒基因组六邻体基因 *hexon* 碱基序列设计 1 对引物,扩增基因片段 2 890 bp。引物序列:Hex1: 5'-TATTGGATCCATGGCGGCCTCACGCCCCGACCTGA-3'; Hex2: 5'-TATTTTCGAA TTACACGGCGTTGCCTGTGGCGAAAGGCGTA-3'。

PCR 反应体系为 50  $\mu$ l: 10 $\times$ PCR buffer 5  $\mu$ l, MgCl<sub>2</sub> 2  $\mu$ l, dNTP 2  $\mu$ l, DNA 模板 1  $\mu$ l, 上、下游引物各 1  $\mu$ l, *Taq* 酶 1  $\mu$ l, 灭菌双蒸水 38  $\mu$ l。

PCR 反应条件为: 95  $^{\circ}$ C 预变性 5 min; 95  $^{\circ}$ C 60 s, 64  $^{\circ}$ C 60 s, 72  $^{\circ}$ C 90 s, 10 个循环; 95  $^{\circ}$ C 60 s, 62  $^{\circ}$ C 60 s, 72  $^{\circ}$ C 90 s, 10 个循环; 95  $^{\circ}$ C 60 s, 60  $^{\circ}$ C 60 s, 72  $^{\circ}$ C 90 s, 10 个循环, 72  $^{\circ}$ C 延伸 10 min。

### 1.5 构建重组杆状病毒转移质粒

将杆状病毒转移载体与 PCR 回收产物按 1:7 (摩尔比) 4  $^{\circ}$ C 连接过夜, 连接产物转化 DH5a 感受态, 37  $^{\circ}$ C 培养箱培养过夜, 挑取单克隆, 接种至液体 LB(Amp<sup>+</sup>) 培养基, 37  $^{\circ}$ C 培养 12~16 h, 酶切鉴定并测序。

### 1.6 构建重组杆状病毒穿梭质粒

将 5  $\mu$ g 重组转移质粒转化 DH10 Bac 感受态细胞, 37  $^{\circ}$ C 培养箱培养 24~48 h, 经蓝白斑筛选, 挑取白色单克隆划线培养 2~3 代, 接种液体 LB(含 Kan<sup>+</sup>、Gen<sup>+</sup>、Tet<sup>+</sup>) 培养基, 37  $^{\circ}$ C 培养 16~18 h, 同时用特异性上、下游引物(表 1) 和通用引物 M13 进行 PCR 鉴定。

### 1.7 转染

取 5~10  $\mu$ g 重组穿梭质粒转染昆虫细胞(Sf9), 转染后 27  $^{\circ}$ C 培养箱继续培养 120 h 或出现细胞病变, 收集细胞和上清液, 4  $^{\circ}$ C, 1 000 r/min 离心 5 min, 收获离心上清液, 4  $^{\circ}$ C 避光保存。

### 1.8 重组杆状病毒的鉴定

1.8.1 IFA 鉴定重组杆状病毒 重组杆状病毒感染 Sf9 细胞 96 h, 吸去细胞上清液, PBS 清洗细胞 1 遍, 4% 多聚甲醛室温固定细胞 30 min, 自然吹干后加入抗禽腺病毒多抗血清, 37  $^{\circ}$ C 作用 45 min, PBS 清洗 3 遍, 加入 FITC 标记的羊抗鸡荧光二抗, 37  $^{\circ}$ C 作用 45 min, PBS 清洗 4 遍, 倒置荧光显微镜观察结果。

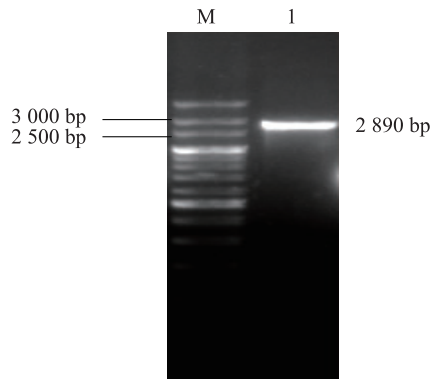
1.8.2 WB 鉴定重组杆状病毒 重组杆状病毒感染 Hifi 细胞 120 h, 1 000 r/min 离心 5 min, 收获细胞, SDS-PAGE 后, 5% 脱脂乳 4  $^{\circ}$ C 封闭过夜, 以抗禽腺病毒多抗血清为一抗, 37  $^{\circ}$ C 作用 1 h, TBST 清洗 3 遍, HRP 标记的羊抗鸡抗体, 37  $^{\circ}$ C 作用 1 h, TBST 清洗 3 遍, DAB 显色, 肉眼观察反应结果。

## 2 结果与分析

### 2.1 *hexon* 基因的扩增

PCR 产物经 1% 琼脂糖凝胶电泳后显示, 扩增

片段大小约 2 890 bp, 与预期大小相符(图 1), 将 PCR 片段命名为 hexon。



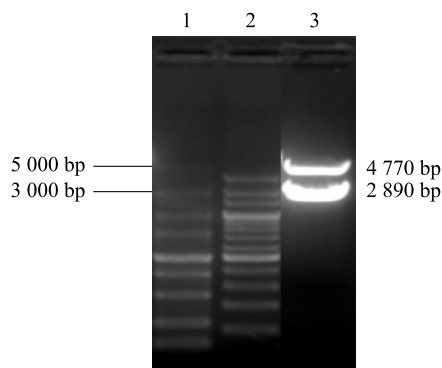
M: 200 bp DNA marker; 1: hexon 基因。

图 1 PCR 扩增血清 4 型禽腺病毒 hexon 基因

Fig.1 PCR results of fowl adenovirus serotype 4 hexon gene

## 2.2 重组转移质粒的鉴定

将重组转移质粒进行双酶切, 酶切产物经 1% 琼脂糖凝胶电泳后显示, 酶切后条带与预期大小相符(图 2), 说明重组转移质粒构建成功, 将测序结果正确的质粒命名为 pFastBac-hexon。



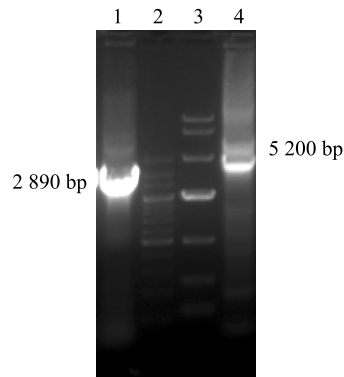
1: DL5000 DNA marker; 2: 200 bp DNA marker; 3: pFastBac-hexon 酶切。

图 2 酶切鉴定重组转移质粒 pFastBac-hexon

Fig.2 Identification of recombinant transfer plasmid pFastBac-hexon by digestion

## 2.3 重组穿梭质粒的鉴定

重组转移质粒转化 DH10 Bac 感受态细胞后, 挑取白色克隆传代培养, 利用 hexon 基因特异性引物和杆状病毒穿梭载体通用引物 M13 进行 PCR 鉴定。PCR 产物经 1% 琼脂糖凝胶电泳后显示, 基因片段与预期大小相符(图 3), 说明重组穿梭质粒构建成功, 命名为 rBacmid-hexon。



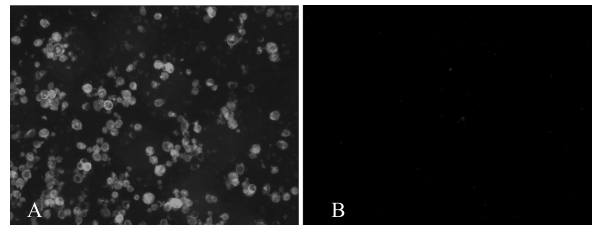
1: hexon 特异性上下游引物 PCR 扩增 hexon 基因片段; 2: 200 bp DNA marker; 3: DL10000 DNA marker; 4: 通用引物 M13 上下游引物 PCR 扩增片段。

图 3 PCR 鉴定重组穿梭质粒 rBacmid-hexon

Fig.3 Identification of rBacmid-hexon with PCR

## 2.4 IFA 鉴定重组杆状病毒

重组杆状病毒感染 Sf9 细胞 96 h, 吸去细胞上清液, PBS 清洗 3 次, 4% 多聚甲醛固定后分别与一抗、二抗作用, 结果(图 4)显示, 重组杆状病毒感染的 Sf9 细胞呈现亮绿色特异性荧光, 野生杆状病毒感染的细胞无特异性荧光, 说明血清 4 型禽腺病毒 hexon 基因在 Sf9 细胞中得到表达, 将重组杆状病毒命名为 rBV-hexon。



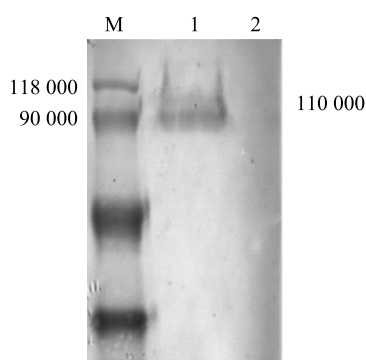
A: 重组病毒 rBV-hexon 感染的 Sf9 细胞; B: 野生杆状病毒感染的 Sf9 细胞。

图 4 间接免疫荧光试验 (IFA) 鉴定 hexon 基因在 Sf9 细胞中的表达

Fig.4 Identification of recombinant baculovirus rBV-hexon in Sf9 cells by indirect immunofluorescence assay (IFA)

## 2.5 Western blot 鉴定重组杆状病毒

重组杆状病毒感染 HIFI 细胞 120 h, 收获细胞及上清液, 经 SDS-PAGE 电泳后, 分别与一抗、二抗反应。结果(图 5)显示, 约 110 000 处出现 1 条特异性的蛋白质条带, 而阴性对照则未出现相应大小的条带, 且条带大小与 Hexon 蛋白大小相符, 说明血清 4 型禽腺病毒 Hexon 蛋白得到表达。



M:蛋白预染 marker;1:重组杆状病毒 rBV-*hexon* 感染的 Sf9 细胞裂解上清液;2:野生杆状病毒感染的 Sf9 细胞裂解上清液。

图5 Western blot 鉴定重组杆状病毒 rBV-*hexon*

Fig.5 Identification of recombinant baculovirus rBV-*hexon* by western blot

### 3 讨论

Hexon 蛋白是 FAdV-4 的主要表面结构蛋白,血清4型禽腺病毒的感染主要由六邻体蛋白和纤突蛋白介导,而六邻体蛋白带有主要的属和亚属特异性抗原决定簇和次要的种特异性抗原决定簇,能引发机体产生中和抗体。本研究通过杆状病毒表达系统构建并表达了1株高致病性血清4型禽腺病毒 *hexon* 基因,在 sf9 细胞中获得很好的表达,IFA 和 western blot 结果均表明,表达的重组病毒与抗 FAdV-4 多抗血清能发生特异性反应,且反应性良好,蛋白质分子量大小110 000左右,与 Hexon 蛋白大小相符。血清4型禽腺病毒感染面积广,危害严重,临床上尚未出现针对 FAdV-4 的有效疫苗<sup>[13]</sup>,本研究制备的重组高致病性血清4型禽腺病毒 Hexon 蛋白,可为进一步研制血清4型禽腺病毒基因工程亚单位疫苗提供候选抗原,同时也为深入研究 FAdV-4 致病机理提供基础试验材料。

#### 参考文献:

- [1] 殷 震,刘景华. 动物病毒学[M]. 2版. 北京:科学出版社,1997.
- [2] CALNEK B W, BARNES H J, BEARD C W. Diseases of poultry [M]. USA: Iowa State University Press, 1997: 721-738.
- [3] ZHANG T, JIN Q Y, DING P Y, et al. Molecular epidemiology of hydropericardium syndrome outbreak-associated serotype 4 fowl adenovirus isolates in central China [J]. Virology Journal, 2016, 13: 188.

- [4] LI H X, WANG J, QIU L Y, et al. Fowl adenovirus species C serotype 4 is attributed to the emergence of hepatitis-hydropericardium syndrome in chickens in China [J]. Infection Genetics and Evolution, 2016, 45: 230-241.
- [5] YE J Q, LIANG G C, ZHANG J J, et al. Outbreaks of serotype 4 fowl adenovirus with novel genotype, China [J]. Emerging Microbes & Infections, 2016, 5: 1-2.
- [6] EREGAE M E, DEWEY C E, MCEWEN S A, et al. Flock prevalence of exposure to avian adeno-associated virus, chicken anemia virus, fowl adenovirus, and infectious bursal disease virus among ontario broiler chicken flocks [J]. Avian Disease, 2014, 58(1): 71-77.
- [7] TORO H, GONZALEZ C, CERDA L, et al. Chicken anemia virus and fowl adenoviruses: association to induce the inclusion body hepatitis hydropericardium syndrome [J]. A Avian Disease, 2000, 44(1): 51-58.
- [8] LI P H, ZHENG P P, ZHANG T F, et al. Fowl adenovirus serotype 4: epidemiology, pathogenesis, diagnostic detection, and vaccine strategies [J]. Poultry Science, 2017, 96(5): 1-11.
- [9] NIU Y J, SUN W, ZHANG G H, et al. Hydropericardium syndrome outbreak caused by fowl adenovirus serotype 4 in China in 2015 [J]. Journal of General Virology, 2016, 97: 2684-2690.
- [10] CHEN H, DOU Y, ZHENG X, et al. Hydropericardium hepatitis syndrome emerged in cherry valley ducks in China [J]. Transboundary and Emerging Diseases, 2017, 64(4): 1262-1267.
- [11] SHAH M A, ULLAH R, MARCH M, et al. Overexpression and characterization of the 100K protein of Fowl adenovirus-4 as an antiviral target [J]. Virus Research, 2017, 28: 218-225.
- [12] 梅 梅, 陆吉虎, 张雪花, 等. 鸡血清4型禽腺病毒与 H9 亚型禽流感病毒、新城疫病毒混合感染的鉴定 [J]. 中国家禽, 2017, 39(22): 59-62.
- [13] 楚电峰, 刘文亭, 冯嫣芳, 等. 1 群禽腺病毒疫苗研究进展 [J]. 中国家禽, 2017, 39(12): 44-47.

(责任编辑:陈海霞)