

郑金, 陈滔, 陆吉虎, 等. 减蛋下降综合征病毒重组 *Knob-S* 基因在杆状病毒系统中的表达及其免疫原性鉴定[J]. 江苏农业学报, 2015, 31(3): 600-603.

doi:10.3969/j.issn.1000-4440.2015.03.022

## 减蛋下降综合征病毒重组 *Knob-S* 基因在杆状病毒系统中的表达及其免疫原性鉴定

郑金<sup>1</sup>, 陈滔<sup>1,2</sup>, 陆吉虎<sup>2</sup>, 高峰<sup>1,2</sup>, 侯继波<sup>2</sup>, 黎满香<sup>1</sup>, 唐应华<sup>2</sup>

(1. 湖南农业大学动物医学院, 湖南长沙 410128; 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)

**摘要:** 为以杆状病毒系统在 Sf9 细胞中表达含减蛋下降综合征病毒(EDSV)重组 Knob-S 蛋白质来制备亚单位疫苗, 采用 PCR 方法从鸭胚繁殖的 EDSV 尿囊液中扩增 Knob-S 基因, 并克隆到 pFastBac1 中, 经转化 DH10Bac 获得重组 rBac-Knob-S。将 rBac-Knob-S 转染 Sf9 细胞获得重组杆状病毒, 利用重组杆状病毒感染 Sf9 细胞表达重组蛋白质。重组 Knob-S 蛋白质经 Western blotting 和间接免疫荧光试验鉴定均为阳性。将重组 Knob-S 蛋白质制备成疫苗, 按 1 羽 0.3 ml (含 50  $\mu$ g 的重组病毒) 免疫 6 周龄非免疫海兰褐雏鸡, 在免疫后第 2 周可检测到血凝抑制抗体效价达 8.5 lg2, 在第 3 周达到高峰(9.5 lg2), 表明重组 Knob-S 蛋白质具有较好的免疫原性。

**关键词:** 减蛋下降综合征病毒; 重组 Knob-S; 真核表达; 杆状病毒表达系统

中图分类号: Q786 文献标识码: A 文章编号: 1000-4440(2015)03-0600-04

## Expression of *Knob-S* gene of egg drop syndrome virus in baculovirus system and its immunogenicity

ZHENG Jin<sup>1</sup>, CHEN Tao<sup>1,2</sup>, LU Ji-hu<sup>2</sup>, GAO Feng<sup>1,2</sup>, HOU Ji-bo<sup>2</sup>, LI Man-xiang<sup>1</sup>, TANG Ying-hua<sup>2</sup>

(1. College of Veterinary Medicine, Hunan Agricultural University, Changsha 410128, China; 2. Jiangsu Academy of Agricultural Sciences/National Research Center of Engineering and Technology for Veterinary Biologicals, Nanjing 210014, China)

**Abstract:** To develop egg drop syndrome virus subunit vaccine (EDSV) based on its recombinant Knob-S proteins expressed in Sf9 cell, the Knob-S gene of EDSV was amplified from allantoic fluids of duck embryos by PCR, and cloned into pFastBac-1 before transformation into DH10Bac to construct rBac-Knob-S bacmid. The recombinant Knob-S proteins were expressed in Sf9 cell by infection of the recombinant baculovirus derived from the transfection of the bacmids in Sf9 cell. The recombinant Knob-S proteins were identified by Western blotting and indirect immunofluorescence assay.

收稿日期: 2015-01-13

**基金项目:** 国家自然科学基金项目(31201904); 农业部公益性行业(农业)科研专项经费项目(201303046); 科技部国家高技术研究发展计划“863”课题(2011AA10A213); 江苏省农业科技自主创新基金项目[CX(14)5045]

**作者简介:** 郑金(1989-), 女, 湖南长沙人, 硕士研究生, 主要从事病原与分子生物学研究。(Tel) 18390990241; (E-mail) 296921762@qq.com

**通讯作者:** 黎满香, (E-mail) manxiangl@163.com; 唐应华, (E-mail) tyinghua@yhoo.com

of 6-week-old nonimmunized HY-Line brown chickens were inoculated with vaccines containing the recombinant Knob-S proteins. The serum antibody levels reached 8.5 lg2 2 week post-vaccination, and rose to the peak of 9.5 lg2 3 week post-vaccination determined by hemagglutinin inhibition test, indicating that recombinant Knob-S proteins had good immunogenicity for chickens.

**Key words:** egg drop syndrome virus; recombinant Knob-S; eukaryotic expression; baculovirus expression system

减蛋下降综合征(EDS)是由减蛋下降综合征病毒(EDS virus, EDSV)引起的以产蛋率下降为特征的传染病。本病的主要传播方式是垂直传播,也可通过呼吸道水平传播。所有年龄的鸡均可感染,但幼鸡感染后不表现任何临床症状,母鸡只是在产蛋高峰期表现明显<sup>[1]</sup>。EDSV 由 11 条大小不等的蛋白质组成,纤突蛋白质是 EDSV 的主要衣壳蛋白质,纤突蛋白质包括 3 个结构域,即 Tail、Shaft 和 Knob 区,Knob 区不但可识别宿主细胞受体而且能增强病毒的吸附能力<sup>[2]</sup>,Knob-S 蛋白质存在良好的免疫原性<sup>[3]</sup>。

本试验选用昆虫杆状病毒表达系统,对 EDSV 的 Knob-S 蛋白质进行真核表达、纯化,经 Western blotting 和间接免疫荧光分析,确定表达的蛋白质具有免疫原性,为研究 Knob-S 蛋白质的生物学活性及相关疫苗奠定基础。

## 1 材料与方法

### 1.1 质粒、菌株、细胞、试验动物

大肠杆菌 DH5 $\alpha$ 、pFastBac-1、转座用大肠杆菌宿主菌 DH10Bac、pMD18-T-Knob-S、草地贪夜蛾卵巢细胞(*Spodoptera frugiperda*)均由江苏省农业科学院保存。6 周龄非免海兰褐雏鸡,购自北京华都峪口禽业集团。

### 1.2 主要试剂

EDSV-76 由江苏省农业科学院国家兽用生物制品工程技术研究中心保存。*Bam*H I、*Hind* III 工具酶、*Ex* Taq DNA 聚合酶、IPTG、DNA marker DL2000、DL15000、蛋白质 Marker、X-gal、T4 DNA 连接酶、DNA 胶回收试剂盒和质粒小提试剂盒均购自宝生物工程(中国)有限公司,优级胎牛血清、Grace's 培养基、Sf-900 II SFM 培养液、Lipofectamine™ 2000 均购自 Invitrogen 公司, FITC 标记的羊抗鸡的抗体为 Promega 公司产品, DMEM 与 RPMI1640 培养基为 GIBCO 公司产品,细胞培养板为 Costar 公司产品,其余试剂均为进口或国产分析纯。

### 1.3 引物设计与合成

以 EDSV-76 疫苗株为模版,根据已发表的纤突蛋白质 Knob-S 氨基酸序列,利用 Primer Premier 5.0 生物软件设计 1 对引物,于上、下游引物分别引入 *Bam*H I、*Hind* III 酶切位点, F: 5'-GCGGGATCC CATGTTGACTTTGGCTTATGATTCAC-3', R: 5'-ATA-

AAGCTTCTACTGTGCTCCAACATATG-3', 下划线部分为酶切位点,扩增片段长为 708 bp,引物由南京金斯瑞生物科技有限公司合成。

### 1.4 Knob-S 基因的扩增、克隆

提取 pMD18-T-Knob-S 质粒,作为 PCR 扩增的模板,产物经 10 g/L 的琼脂糖凝胶电泳鉴定和切胶回收后连接到 pMD18-T 中,转化于 DH5 $\alpha$  感受态细胞,挑取白斑,提取质粒进行 PCR 和酶切鉴定。鉴定正确的质粒送上海美吉生物技术有限公司测序,测序正确的质粒命名为 p-Knob-S。

### 1.5 重组杆状病毒的构建

将重组质粒 p-Knob-S 和 pFastBac-1 质粒用 *Bam*H I 和 *Hind* III 双酶切,回收目的片段连接获得重组转座载体 pFast-Knob-S。将重组质粒 pFast-Knob-S 转化入 DH10Bac 感受态细胞,获得插入 Knob-S 基因的重组杆状病毒穿梭载体 rBac-Knob-S。3 次蓝白斑筛选纯化后,按 Bac-to-Bac 杆状病毒表达系统说明书中改良的碱裂解法提取重组 Bacmid 的 DNA,用 M13 上、下游通用引物进行 PCR 扩增,确定目的基因插入是否成功。将 rBac-Knob-S 在脂质体介导下转染 Sf9 细胞,感染 4~5 d 时,收集出现明显感染症状的细胞上清液,作为第 1 代重组病毒,传代 3 次后筛选到含有 Knob-S 基因的重组杆状病毒 rAcV-Knob-S 种子液。

### 1.6 重组杆状病毒滴度的测定

取 10 支 1.5 ml 灭菌 EP 管,每管中加入含有 2% FBS 的 Grace's 培养基 900  $\mu$ l,在第一管中加入 100  $\mu$ l 第 3 代病毒原液,倍比稀释至第 10 管,最高稀释度为  $1 \times 10^{-10}$ ,弃去已铺好的 96 孔细胞培养板内的培养液,用 Grace's 培养基清洗 1 遍,每列细胞板依次加入 100  $\mu$ l 所稀释的病毒滴度,最后两列为阴性对照,对照内加入 100  $\mu$ l 含有 2% FBS 的 Grace's 培养基,置于培养箱内,观察细胞状态并记录阳性孔中细胞病变情况,直到阴性细胞脱落老去,结果按 Karber 法计算。

### 1.7 Western blotting 和间接免疫荧光(IFA)检测重组 Knob-S 基因在 Sf9 细胞中的表达

收集 rBac-Knob-S 感染后 4~5 d 的病变细胞,用 PBS 洗涤 3 次后,再用 PBS 重悬,进行 Western blotting<sup>[4]</sup>。收集 rBac-Knob-S 感染后完全病变的细胞,同时以未感染的 Sf9 昆虫细胞和与空杆状病毒

感染的 Sf9 昆虫细胞为对照,固定后用鸡抗 EDSV 阳性血清和 FITC 标记的羊抗鸡二抗检测表达蛋白质,荧光显微镜下观察结果。

### 1.8 抗原的制备

重组杆状病毒调整到浓度为  $1 \text{ ml } 1 \times 10^{6.0} \text{ TCID}_{50}$  后,按每  $1 \text{ ml}$  病毒接种  $100 \text{ ml}$  的细胞(细胞密度约为  $1 \text{ ml } 1 \times 10^6$  个),共接种  $200 \text{ ml}$  细胞,接毒后  $96 \sim 120 \text{ h}$  收获细胞,PBS 洗 3 次, $10 \text{ ml}$  PBS 重悬(浓缩 20 倍),超声裂解, $4^\circ\text{C}$  以  $5000 \text{ r/min}$  离心  $10 \text{ min}$ ,弃掉沉淀。

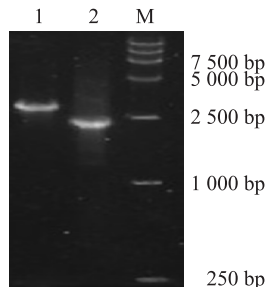
### 1.9 疫苗的制备及动物免疫

将重组蛋白质经初步离心纯化后与吐温混合制备水相,将此水相与油相按  $1:3$  (体积比)混合并充分乳化,制成油乳剂疫苗并于  $4^\circ\text{C}$  冰箱放置。将 30 只 6 周龄非免海兰褐雏鸡随机分成 3 组,每组 10 只,杆状病毒表达蛋白质各组每羽份免疫  $0.3 \text{ ml}$  (含  $50 \mu\text{g}$  的重组病毒)。免疫后第 2、3、4 和 5 周分别采血检测抗体效价。另设空 Bacmid 转染 Sf9 细胞对照组和不免疫空白对照组。免疫后第 2、3、4 和 5 周分别采血,以 EDS-76 病毒作为检测抗原,检测血清血凝抑制抗体(HI)效价。

## 2 结果

### 2.1 重组穿梭载体的构建及鉴定

分别以 rBac-Knob-S 和 rBac-pFast 为模板,用 M13 通用引物进行 PCR,扩增出的重组空载体大小为  $2430 \text{ bp}$ ,重组载体大小为  $3000 \text{ bp}$  左右,与预期结果相符(图 1)。



M: DL15000 Marker; 1: rBac-Knob-S PCR 扩增产物; 2: rBac-pFast 空载体 PCR 扩增产物。

图 1 重组 rBac-Knob-S PCR 鉴定

Fig. 1 Identification for the recombinant rBac-Knob-S with PCR

### 2.2 重组杆状病毒滴度的测定

用 Karber 法计算病毒滴度,结果表明,前 5 个病毒稀释度产生的细胞病变率为  $100\%$ ,  $10^{-6}$ 、 $10^{-7}$ 、 $10^{-8}$ 、 $10^{-9}$ 、 $10^{-10}$  稀释的病毒产生的细胞病变率分别为  $75.0\%$ 、 $37.5\%$ 、 $0$ 、 $0$  和  $0$ 。

根据细胞的病变率计算重组杆状病毒的病毒滴度,病毒滴度用组织培养半数感染量( $\text{TCID}_{50}$ )表示。

$$\lg \text{TCID}_{50} = L + d(S - 0.5)$$

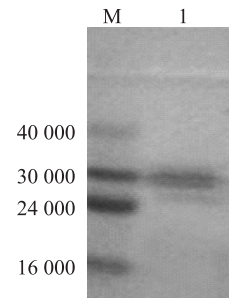
$L$ : 最低稀释度对数,为  $-1$ ;  $d$ : 稀释度对数之间的差值,为  $-1$ ;  $S$ : 阳性孔比率总和,为  $1+1+1+1+1+0.75+0.375+0=6.125$ 。

$$\lg \text{TCID}_{50} = -1 - 1 \times (6.125 - 0.500) = -6.625$$

即  $0.1 \text{ ml}$  重组杆状病毒的  $\text{TCID}_{50}$  为  $10^{-6.625}$ 。

### 2.3 重组蛋白质 Western blotting 鉴定

经 Western blotting 检测,重组杆状病毒表达产物转印反应后出现特异性蛋白质杂交带(图 2),表明利用杆状病毒在昆虫细胞 Sf9 内表达的重组蛋白质可与鸡阳性血清发生特异性免疫反应,从而证实具有生物学活性。



M: Marker; 1: rBac-Knob-S 表达产物。

图 2 重组杆状病毒表达蛋白质的 Western blotting 鉴定

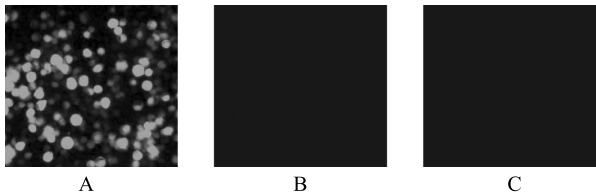
Fig. 2 Western blotting analysis of recombinant rBac-Knob-S

### 2.4 间接免疫荧光检测

经 IFA 检测, rBac-Knob-S 感染的 Sf9 细胞具有很强的特异性荧光(图 3A), 而健康 Sf9 细胞(图 3B)无荧光, 杆状病毒感染的 Sf9 细胞(图 3C)无荧光, 说明 Knob-S 基因得到表达, 并且表达产物位于细胞内。

### 2.5 血清中 HI 抗体的检测

重组 Knob-S 蛋白质免疫后第 2、3、4 和 5 周采血, 分离血清, HI 检测的抗体效价见表 1, 结果显示, 重组 Knob-S 蛋白免疫后第 2 周即可产生较高抗体, 阴性对照未检测到抗体。



A:rBac-*Knob-S* 感染的 Sf9 细胞;B:健康 Sf9 细胞;C:杆状病毒感染 Sf9 细胞。

图3 重组病毒的间接免疫荧光(IFA)检测

Fig.3 Identification of recombinant bacmid by indirect immunofluorescence assay

表1 抗 EDSV HI 抗体效价

Table 1 The hemagglutinin inhibition (HI) antibody titers against EDSV

组 别	第2周	第3周	第4周	第5周
重组 rBac- <i>Knob-S</i>	8.5lg2	9.5lg2	9.5lg2	9.1lg2
空 Bacmid 对照	0	0	0	0
空白非免疫对照	0	0	0	0

3 讨论

目前减蛋下降综合征病毒(EDSV)的疫苗是 EDSV 用鸭胚增殖,并灭活制备成油苗,用以预防 EDS-76,现阶段并无 SPF 鸭胚用于繁殖病毒,若灭活不完全,则有可能造成巨大的经济损失,存在很大的安全隐患。利用昆虫杆状病毒表达系统(BEVS)体外表达具有生物活性蛋白质国内外均有文献报道<sup>[5-10]</sup>,该系统具有对外源蛋白质加工后修饰的功能,容易从无血清培养上清液中纯化蛋白质,无内毒素污染等优点。该系统与大肠杆菌等原核表达的外源蛋白质相比能更好保持其免疫原性。

本试验以 AV-127 株基因组为模板,利用 PCR 方法扩增纤突蛋白质基因的 *Knob-S* 区,将其克隆到真核表达载体 pFastBac1 中,经双酶切证实重组质粒构建正确后构建穿梭载体 rBac-*Knob-S*,经三轮筛选后得到阳性菌落,提取病毒基因组转染 Sf9 细胞,在细胞中可见很强的亮绿色荧光,说明在 Sf9 细胞中高效表达了该蛋白质。病毒的滴度测定结果表明,重组 *Knob-S* 病毒感染 Sf9 细胞后,细胞出现病变死亡,说明融合表达的 *Knob-S* 蛋白质有细胞毒性。通过 Western blotting 检测,确定了 *Knob-S* 蛋白质的生物学活性,与预期结果相符,表明表达的蛋白

质具有与天然蛋白质相似的构象和相同抗原性。动物免疫试验结果表明,真核表达重组蛋白质的抗体效价较高,说明该真核表达蛋白质具有较好的免疫原性。

参考文献:

[1] W 卡尼尔 B. 禽病学[M]. 10 版. 北京: 中国农业大学出版社, 1999.

[2] TOMKO R P,JOHANSSON C B,TOTROV M,et al. Expression of the adenovirus receptor and its interaction with the fiber knob[J]. Experimental Cell Research,2000,255(1):47-55.

[3] FINGERUT E,GUTTER B,GALLILI G,et al. A subunit vaccine against the adenovirus egg-drop syndrome using part of its fiber protein[J]. Vaccine,2003,21(21):2761-2766.

[4] 陈 滔,唐应华,陆吉虎,等. 产蛋下降综合征病毒纤突蛋白 *Knob-S* 区原核表达及其活性分析[J]. 动物医学进展,2012,33(6):41-44.

[5] KOST T A,CONDREAY J P,JARVIS D L. Baculovirus as versatile vectors for protein expression in insect and mammalian cells [J]. Nature Biotechnology,2005,23(5):567-575.

[6] SHEN X,HU G,JIANG S,et al. Engineering and characterization of a baculovirus-expressed mouse/human chimeric antibody against transferrin receptor[J]. Protein Engineering Design and Selection, 2009,22(12):723-731.

[7] WANG Y,SUN Y,TIAN Z,et al. Protection of chickens against infectious bronchitis by a recombinant fowlpox virus co-expressing IBV-S1 and chicken IFN $\gamma$  [J]. Vaccine, 2009,27(50):7046-7052.

[8] NAGATA T,ISHIKAWA S,SHIMOKAWA E,et al. High level expression and purification of bioactive bovine interleukin-18 using a baculovirus system [J]. Veterinary Immunology and Immunopathology,2002,87(1):65-72.

[9] 唐应华,吴培培,宫玉珍,等. 肾型传染性支气管炎病毒的鉴定和结构蛋白的表达[J]. 中国兽医科学,2011,41(10):1034-1040.

[10] 李东卫,郭莹莹,刘在斯,等. 禽流感病毒 NS1 蛋白在杆状病毒表达系统中的表达[J]. 动物医学进展,2012,33(6):27-31.

(责任编辑:袁 伟)