

PRV 闽 A 株 gE 基因抗原编码区片段在昆虫细胞中的表达研究^{*}

敖敬群¹, 王瑾雯¹, 陈新华², 王~~耀~~章¹, 龙蔡新¹

(1. 中山大学生物防治国家重点实验室, 广东 广州 510275;

2. 国家海洋局海洋遗传资源重点实验室, 福建 厦门 361005)

摘 要: 伪狂犬病病毒 (PRV) 糖蛋白 E 是一种在伪狂犬病的根除计划中具有重要作用的糖蛋白。将伪狂犬病病毒闽 A 株 gE 基因抗原编码区片段克隆到杆状病毒 Bac-to-Bac 系统表达载体 pFastBacHTa 中, 获得的重组表达载体 pFastBacHTa-*FS* 转化大肠杆菌 DH10B_{AC} 感受态细胞后, 得到的重组 Bacmid DNA 在脂质体介导下转染粉蚊夜蛾 Hi5 细胞, 通过细胞内同源重组, 获得了含目的片段的重组病毒。此重组病毒感染 Hi5 细胞后 72 h, 细胞总蛋白的 SDS PAGE 与 Western-Blot 结果表明, gE 基因抗原编码区片段在 Hi5 细胞中得到了正确表达, 表达产物约 35 000, 占细胞总蛋白的 9.31%。溶解性分析显示该片段在 Hi5 细胞中为不可溶性表达。

关键词: 伪狂犬病病毒; gE 基因抗原编码区片段; 杆状病毒 Bac-to-Bac 表达系统; 基因表达

中图分类号: Q786; R392 **文献标识码:** A **文章编号:** 0529-6579 (2004) 05-0076-04

伪狂犬病病毒 (pseudorabies virus, PRV) 属于疱疹病毒科 α 亚科, 是引起猪、牛、羊等多种家畜及野生动物发生伪狂犬病 (pseudorabies, PR) 的病原体。伪狂犬病在世界许多国家包括我国广泛流行。近年来, 该病在我国的发病率呈现明显的上升趋势^[1]。PRV 编码的糖蛋白 E (glycoprotein E, gE) 因其独特的生物学特性在伪狂犬病的预防与监测过程中具有重要作用^[2, 3]。PRV 闽 A 株是我国分离最早、生物学特性研究得最为详尽的 PRV 毒株^[4], 其 gE⁻gI⁻/HK⁻ 3 基因缺失疫苗已研制成功并通过了国家科技部的成果鉴定^[5], 但还没有与之配套的血清学检测方法, 开展了 PRV 闽 A 株 gE 基因片段的重组表达工作, 并拟以重组表达产物为包被抗原建立 PRV gE ELISA 检测方法。杆状病毒表达系统是目前应用广泛的一种真核表达系统^[6], 其表达宿主昆虫细胞能够对表达产物进行翻译后修饰, 因而表达产物具有生物学活性好、抗原性强的优点。难以在实际应用中发挥作用。鉴于 gE 基因的抗原表位已很清楚—主要在其 N 端编码的第 52—238 位氨基酸区段内^[7, 8], 我们选择 PRV 闽 A 株 gE 基因抗原编码区片段在杆状病毒表达系统中进行了该片段的重组表达工作, 现将研究结果报道如下。

1 材料与方法

1.1 质粒与菌株

实验所用含 PRV 闽 A 株 gE 基因抗原编码区片

段的重组质粒由本实验室构建并保存; 杆状病毒 pFastBacHTa 表达载体与大肠杆菌 DH10B_{AC} 菌株为 GIBCO /BRL 公司产品。

1.2 细胞与病毒

粉蚊夜蛾 Hi5 细胞 (BT1 Tn 5B1-4) 由华中师范大学昆虫学研究所惠赠; 野生型苜蓿丫纹夜蛾核型多角体病毒 (AcMNPV) 由本实验室保存。

1.3 主要试剂

限制性内切酶、T₄ DNA 连接酶、DNA 相对分子质量 Marker 购自大连宝生物工程公司; 细胞培养用 Grace' s 基础培养基与胎牛血清、转染用 Cellfectin 等购自 GIBCO /BRL 公司; 凝胶回收试剂盒购自 QIAGEN 公司; 其余试剂均为进口或国产分析纯产品。

1.4 抗体

猪抗 PRV 抗血清、HRP 标记的鼠抗猪 IgG 第二抗体由华中农业大学畜牧兽医学院病毒室惠赠; anti-6 $\times$ His 第一抗体与碱性磷酸酶标记的羊抗鼠 IgG 第二抗体购自罗氏公司。

1.5 重组 Bacmid 的构建与鉴定

提取带有 PRV 闽 A 株 gE 基因抗原编码区片段的重组表达载体 pFastBacHTa-*FS* 的质粒 DNA, 转化大肠杆菌 DH10B_{AC} 感受态细胞, 转化液涂布 K⁺/A⁺/H⁺ 三抗平板, 48 h 后挑取平板上长出的白斑, 在三抗平板上再次划线确定其白色表型。按照

^{*} 收稿日期: 2003-12-10

基金项目: 国家“九五”科技攻关资助项目 (96-C01-04-03); 国家自然科学基金资助项目 (39600109)

作者简介: 敖敬群 (1975 年生), 女, 博士, 通讯联系人, 王~~耀~~章, E-mail: wxz@zsu.edu.cn

GIBCO /BRL 公司《Bac to Bac Baculovirus Expression System Instruction Manual》中方法提取重组 Bacmid DNA, 用 5'M13 primer 与 3'外源基因 primer 为引物进行 PCR 鉴定, 以证实转座过程是否正确。

1.6 重组病毒的获得

在 13 cm² 的细胞培养瓶中接种约 4×10⁵ 个 Hi5 细胞, 细胞活力大于 95%, 27 °C 贴壁 1 h 后, 按照 GIBCO 操作手册的方法用重组 Bacmid DNA 进行细胞转染。转染后 48 h, 转染细胞变圆变大, 细胞核膨胀, 呈现出明显的病变。转染后 72 h, 病变进一步加深, 初步说明转染成功。3 000 r/m 离心 10 min 收集培养上清, 即为第 1 代重组病毒液 *AcMNPV* /*BacFS*。此第 1 代重组病毒液 *AcMNPV* /*BacFS* 按 0.1 ~0.01 MOI 感染细胞扩增 1 次后, 收集培养上清 (第 2 代重组病毒液), 用于 gE 基因抗原编码区片段的表达。

1.7 gE 基因抗原编码区片段在 Hi5 细胞中的表达及表达产物的检测

挑选处于对数生长期、生长良好的 Hi5 细胞, 吸弃培养基, 按照 MOI=5 ~ 10 的剂量接种第 2 代重组病毒, 感染后 72 h 收集细胞加 1×SDS PAGE Loading Buffer 煮沸 5 min 后进行 SDS PAGE 分析。同时设置正常细胞与野生型 *AcMNPV* 感染细胞作为对照。用猪抗 PRV 抗血清及 anti 6×*His* 抗体进行 Western Blot 分析。转膜及 Western Blot 的操作参见文献 [9]。

1.8 表达产物的溶解性分析

病毒感染后 72 h, 收获细胞, 冰预冷 1×PBS 洗涤 2 次。按 1×10⁶ 个细胞/400 mL 的比例加入冰预冷昆虫细胞裂解液 (50 mmol/L Tris Cl pH 8.0, φ = 1% Triton X-100, 10 mmol/L EDTA, 50 mmol/L MgCl₂), 冰浴 30 min, 12 000 r/m 离心 10 min, 上清加等体积 2×SDS PAGE Loading Buffer, 沉淀加 1×SDS PAGE Loading Buffer 煮沸后, 用于 SDS PAGE 分析。或是按每 400 μ L 1×10⁶ 个细胞加入冰预冷 1×PBS 悬浮细胞沉淀后, 按 4 s 超声/8 s 间歇/200 W 的条件进行 30 个循环的超声处理, 超声后产物 12 000 r/m 离心 10 min, 上清与沉淀分别制样用于 SDS PAGE。

2 结 果

2.1 重组 Bacmid 的构建与鉴定

重组表达载体 pFastBacHTa FS 转化大肠杆菌 DH10B_{ac} 感受态细胞后, 长出的白色菌落经过再次表型鉴定确认为重组菌, 提取其 Bacmid DNA, 用 5'M13 primer 与 3'外源基因 primer 为引物进行 PCR,

结果 (图 1) 显示, PCR 产物比 *DL*-15 000 Marker 的 2 500 bp 略小, 与预期的 2 230 bp 基本一致, 说明重组 Bacmid 中含有目的基因序列的转座已成功发生, 可用于下一步的重组病毒构建。

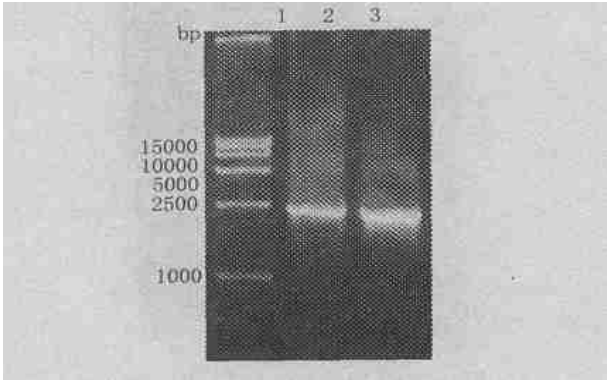


图 1 Bacmid DNA 的 PCR 鉴定

Fig. 1 Characterization of recombinant Bacmid DNA by PCR

1: *DL*-15 000 DNA 相对分子质量;
2, 3: PCR 扩增产物

2.2 gE 基因抗原编码区片段在 Hi5 细胞中的表达及表达产物的检测

Hi5 细胞按约 5 ~ 10 MOI 的剂量感染重组病毒 *AcMNPV* /*BacFS*, 感染 72 h 后的细胞总蛋白电泳显示: 与正常细胞及野生型病毒 *AcMNPV* 感染的 Hi5 细胞相比, 感染了重组病毒的 Hi5 细胞在约 35 000 处出现一条特异性表达带 (图 2)。gE 基因抗原编码区片段编码肽段的理论相对分子质量约为 20 000, 具 3 个潜在的 N 糖基化位点。考虑到翻译后 N-糖基化修饰过程, 35 000 的表观相对分子质量与理论相对分子质量基本相符。用猪抗 PRV 抗血清与之进行 Western Blot, 在与 PAGE 结果相应的 35 000 处出现一条明显的阳性反应带 (见图 3a), *AcMNPV* 感染后的 Hi5 细胞与正常的 Hi5 细胞总蛋白中没有此带出现。3 种 Hi5 细胞总蛋白中同时还有一些其他的蛋白带也可与 PRV 抗血清反应, 可能是抗血清与昆虫细胞所合成的部分蛋白质之间的交叉反应。利用 pFastBacHTa 载体自身编码的 6×*His* tag 用 anti 6×*His* 抗体与 Hi5 细胞总蛋白进行 Western Blot 做进一步验证, 结果仅 *AcMNPV* /*BacFS* 感染后的 Hi5 细胞总蛋白在与 35 000 处出现特异性反应带 (如图 3b)。以上结果说明, gE 基因抗原编码区片段在 Hi5 细胞中得到了正确表达。

2.3 表达产物的溶解性分析

细胞感染 72 h 后, 离心收获细胞, 经冰预冷 1×PBS 溶液洗涤, 裂解液裂解或是超声裂解后, 裂解上清与沉淀分别进行 SDS PAGE。结果显示, 无论是通过超声还是裂解液裂解处理, gE 基因抗原

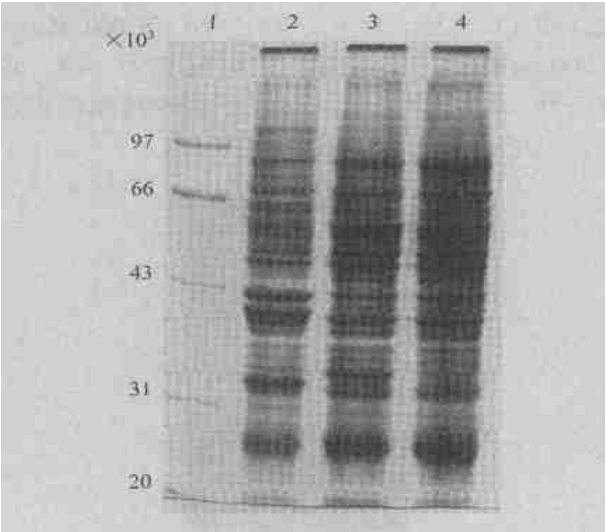


图 2 Hi5 细胞总蛋白的 SDS PAGE

Fig 2 SDS-PAGE of total cellular proteins of Hi5 cells

- 1: 蛋白相对分子质量标准;
- 2: *AcMNPV* 感染后的 Hi5 细胞总蛋白;
- 3: *AcMNPV/BacFS* 感染后的 Hi5 细胞总蛋白;
- 4: 正常 Hi5 细胞总蛋白

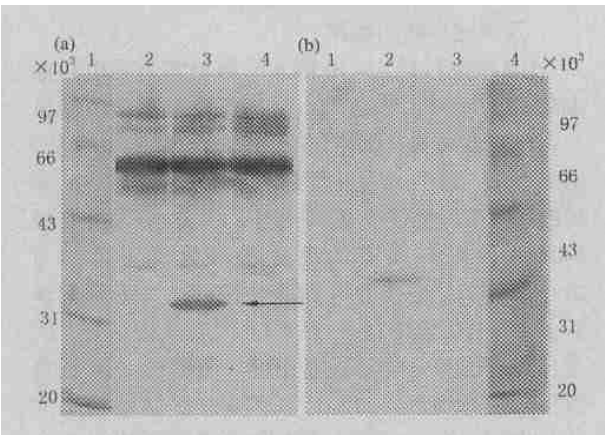


图 3 Hi5 细胞总蛋白的 Western-Blot

Fig 3 Western-Blot of total cellular proteins of Hi5 cells (a) with-PRV porcine serum as the first antibody (b) with anti-6X His antibody as the first antibody

- 1: 蛋白相对分子质量标准;
- 2: *AcMNPV* 感染后的 Hi5 细胞总蛋白;
- 3: 重组病毒 *AcMNPV/BacFS* 感染后的 Hi5 细胞总蛋白;
- 4: 正常 Hi5 细胞总蛋白

编码区片段的表达产物都位于沉淀中 (图 4), 说明该片段在 Hi5 细胞中为不可溶性表达。

3 讨 论

本文最初拟用带有 GP67 信号肽的表达载体 pAcGP67A 完成 gE 基因抗原编码区片段在昆虫细胞

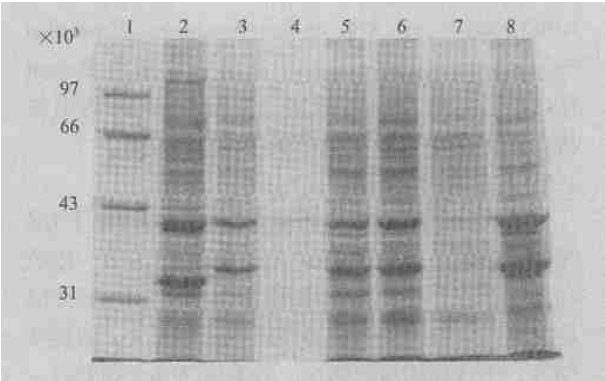


图 4 表达产物的溶解性分析

Fig 4 Solubility analysis of expression product

- 1: 蛋白相对分子质量标准;
- 2: *AcMNPV* 感染后的 Hi5 细胞总蛋白;
- 3, 6: *AcMNPV BacFS* 感染后的 Hi5 细胞总蛋白;
- 4, 5: *AcMNPV BacFS* 感染后的 Hi5 细胞的超声上清与沉淀;
- 7, 8: *AcMNPV BacFS* 感染后的 Hi5 细胞的裂解上清与裂解沉淀

中的分泌性表达, 所获得的重组病毒感染 Hi5 细胞后, 细胞病变明显, 但在培养基与细胞内均未能检测到表达产物的存在, 因此后期我们换用 Bac to-Bac 表达系统的 pFastBacHTa 表达载体, SDS PAGE 考马斯亮蓝染色即可检测到 gE 基因抗原编码区片段的表达, 表达产物占细胞总蛋白的 9.31%, 说明同一基因使用不同的表达载体在表达量上存在较大的差异, 当使用某种表达载体表达情况不理想时, 应尝试另一种载体或是根据需要更换表达系统。

一般认为, 真核表达系统相对于原核表达系统在外源基因表达方面的优势除了真核表达系统中表达产物能够进行正确的翻译后加工外, 表达产物多为可溶性状态, 便于下一步的纯化或活性检测等工作。但本实验中 gE 基因抗原编码区片段在 Bac to-Bac 系统中的表达产物却是不可溶的。采用多种细胞裂解液以及超声的方法均不能使表达产物成为可溶, 这对于后面的 ELISA 包被工作不利。外源基因在昆虫细胞中表达产物的不可溶可分为两种情况: 表达产物与细胞核内的某些成分紧密结合导致不溶。在细胞裂解液中加入 Mg^{2+} , 通常是 $MgCl_2$, 可使蛋白与这些成分分离; 表达产物自身之间通过非特异性疏水作用而形成的不可溶性聚集^[10]。本实验中 gE 基因抗原编码区片段表达产物的不可溶属于后一种。Ailor 等认为, 重组病毒感染昆虫细胞后, 接管细胞的合成机器, 关闭了宿主自身的蛋白合成, 有可能造成某些分泌辅助因子 (secretory

assisting factors) 的供应不足, 从而导致表达产物以不可溶状态存在^[11]。Hsp 70 家族的免疫球蛋白重链结合蛋白 (immunoglobulin heavy chain binding protein, BiP)、一种膜结合的分子伴侣—钙联接蛋白 (calnexin) 及其同源物钙视网膜蛋白 (calreticulin) 可以帮助蛋白质形成易于转位 (translocation) 的构象, 阻止蛋白间非特异性的疏水作用, 从而帮助外源基因的表达产物正确折叠, 并促进其细胞内运输。当含有这些基因的重组病毒与含有目的基因的重组病毒共感染昆虫细胞时, 目的基因表达产物的聚集大大降低, 产物的分泌和溶解性都要好于目的重组病毒的单独感染^[12-14]。考虑到本研究的应用价值, 本文未在这方面做进一步尝试, 而是选择换用别的表达系统。

参考文献:

[1] 李凯伦, 郑文波. 动物重点疫病防治技术[M]. 北京: 中国农业出版社, 2001.

[2] METTENLEITER T C. Aujeszky's disease (pseudorabies) virus: the virus and molecular pathogenesis state of the art, June 1999[J]. Vet Res, 2000, 31(1): 99—115.

[3] JACOBS L. Glycoprotein E of pseudorabies virus and homologous proteins in other alphaherpesvirinae[J]. Arch Virol, 1994, 137: 209—228.

[4] 白新盛, 卢景良. 畜禽重大疫病生物技术防制研究[M]. 北京: 中国农业科技出版社, 1998.

[5] 郭万柱, 徐志文, 王小玉, 等. 新型伪狂犬病病毒、基因缺失株的构建及生物学特性研究(初报)[J]. 四川农业大学学报, 2000, 18(1): 1—4.

[6] POSSEE R D. Baculoviruses as expression vectors[J]. Curr Opin Biotechnol, 1997, 8(5): 569—72.

[7] JACOBS L, MELOEN R H, GIELKENS A L, et al, Epitope analysis of glycoprotein I of pseudorabies virus[J]. J Gen Virol, 1990, 71(Pt 4): 881—887.

[8] MORENKOV O S, FODOR N, SOBKO Y A, et al. Immunological characterisation of glycoprotein E of Aujeszky's Disease virus[J]. Virus Res, 1997, 51: 65—79.

[9] SAMBROOK J, FRITSCH E F, MANIATIS T. Molecular cloning a laboratory manual[M]. 2nd. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989.

[10] ALNEMRI E S, LITWACK G. The steroid binding domain influences intracellular solubility of the baculovirus overexpressed glucocorticoid and mineralocorticoid receptors[J]. Biochemistry, 1993, 32 (20): 5387—5393.

[11] AILOR E, BETENBAUGH M J. Modifying secretion and post-translational processing in insect cells[J]. Curr Opin Biotechnol, 1999, 10(2): 142—145.

[12] AILOR E, BETENBAUGH M J. Overexpression of a cytosolic chaperone to improve solubility and secretion of a recombinant IgG protein in insect cells[J]. Biotechnol Bioeng, 1998, 58 (2—3): 196—203.

[13] HSU T A, WATSON S, EIDEN J J, et al. Rescue of immunoglobulins from insolubility is facilitated by PDI in the baculovirus expression system[J]. Protein Expr Purif, 1996, 7 (3): 281—288.

[14] VASSILAKOS A, COHEN-DOYLE M F, PETERSON P A, et al. The molecular chaperone calnexin facilitates folding and assembly of class I histocompatibility molecules[J]. EMBO J, 1996, 15(7): 1495—1506.

Studies on the Expression of Gene Fragment Encoding gE Epitope Area of Pseudorabies Virus Fa Strain in Insect Cells

AO Jing qun¹, WANG Jin wen¹, CHEN Xin hua², WANG Xun zhang¹, LONG Qing xin¹

(1. State Key Labaratory for Biocontrol, Sun Yat sen University, Guangzhou 510275, China;

2. Key Labarotory for Maine BioGentic Resources, State Oceanic Administration, Xiame 361005, China)

Abstract: Gene fragment encoding gE epitope area of pseudorabies virus Fa strain was inserted into the baculovirus expression vector pFastBacHTa, then the resulted recombinant expression plasmid pFastBacHTa FS was used to transform *E. coli* DH10B_{AC} competent cells and obtained recombinant Bacmid. Recombinant baculovirus AcMNPV / BacFS was constructed by transfecting Hi5 cells with recombinant Bacmid DNA. At 72 hours post infection with AcMNPV / BacFS, Hi5 cells were collected and subjected to SDS PAGE and Western-Blot analysis. The results showed that the expression product of gene fragment encoding PRV gE epitope area in Hi5 cells was about 35 000 and accounted for 9.31% of total cellular protein. Solubility analysis displayed that the expression product of gene fragment encoding PRV gE epitope area in Hi5 cells is insoluble.

Key words: pseudorabies virus; gene fragment encoding gE epitope area; baculovirus Bac to Bac expression system; gene expression