

尼帕病毒融合蛋白、受体结合蛋白的表达及特异性高免血清制备

刘勇军^{1,2}, 肖 昌², 王贵平³, 宣 华³, 涂长春^{2*}

(¹ 吉林大学畜牧兽医学院 长春 130062)

(² 军事医学科学院军事兽医研究所 长春 130062)

(³ 广东省农业科学院兽医研究所 广州 510640)

摘 要 尼帕病毒膜融合蛋白 F 和受体结合蛋白 G 在病毒感染和诱导机体产生保护性免疫中起重要的作用。通过 PCR 扩增获得尼帕病毒 F1 和 G 基因片段(均去掉信号肽和跨膜区),克隆至原核表达载体 IPTG 诱导大肠杆菌表达目的蛋白, Western blot 表明重组 F1、G 蛋白与兔抗尼帕病毒血清具有良好的反应原性;同时将 F1 和 G 基因克隆至经改造过的杆状病毒表达载体,获得了含有目的基因的重组杆状病毒,接种 sf9 单层细胞,间接免疫荧光检测表明 F1、G 蛋白在杆状病毒中正确表达,并与抗尼帕病毒血清具有良好的反应原性。以纯化原核表达的 F1、G 蛋白免疫兔获得了抗 F1 和抗 G 重组蛋白的特异血清, Western blot 和间接免疫荧光检测表明所制备的血清具有特异性。试验所表达的抗原和制备的特异血清可用于尼帕病的诊断。

关键词 : 尼帕病毒(NiV) 融合蛋白 受体结合蛋白 重组杆状病毒 高免血清

中图分类号 : Q936 **文献标识码** : A **文章编号** : 1001-6209(2007)03-0465-06

尼帕病毒(Nipah Virus, NiV)是一种引起猪和人严重传染性脑炎和呼吸系统疾病的人畜共患病原体。与 1994 年在澳大利亚首次发现的亨德拉病毒(Hendra virus, HeV)一起同属于副粘病毒科亨尼帕病毒属成员(Henipavirus)^[1]。狐蝠科(Pteropid)的食果蝙蝠是 NiV 的自然宿主^[2],在向动物和人传播疫病过程中起到决定性作用,因此在病毒原产地和有类似动物分布的国家会受到病毒爆发流行的威胁。1998 年,马来西亚首次爆发尼帕病,导致 265 人感染 NiV,其中 105 人死亡^[3]。此后,2001 年尼帕病相继在孟加拉^[4,5]和印度^[6]流行,引起严重的人发病死亡。2003 ~ 2005 年孟加拉又连续 3 年流行该病^[4,5,7]。在柬埔寨和泰国所进行的病原生态学研究显示两国境内的蝙蝠群均存在一定比例的 NiV 抗体阳性率^[8~10]。虽然尼帕病在我国尚未出现,但是由于来自周边国家的疫情威胁以及我国东南沿海地区有与 NiV 原产地相似的生态环境和动物分布^[11],所以尼帕病对我国造成了明显的威胁。因此,建立必要的监测与诊断技术,构建预警与应急技术平台对防范尼帕病进入我国具有十分重要的现实意义。

NiV 基因组全长约 18.2kb,含有 6 个转录单位,

依次编码核蛋白(N)、磷蛋白(P)、基质蛋白(M)、融合蛋白(F)、受体结合蛋白(G)和大蛋白(L)等 6 个结构蛋白^[12],F 和 G 蛋白是病毒的两个表面糖蛋白。尼帕病毒蛋白在细胞内合成过程中,F 蛋白是以无活性的前体 F0 存在,在被宿主细胞蛋白酶降解为 F1、F2 两个片段后才能显现生物活性,且 F1 片段的 N 端有一个疏水区域是参与病毒囊膜与细胞膜融合的关键结构域^[13]。在病毒感染细胞的过程中,G 蛋白与 F1 和 F2 共同形成复合物,从而完成病毒对宿主细胞入侵^[14]。本研究分别利用原核和真核表达系统表达 NiV F1 蛋白和 G 蛋白,并成功制备了兔抗 NiV F1 和 G 蛋白的特异高免血清,为我国开展前瞻性尼帕病病原生态学和流行病学调查,防范该病在我国流行奠定了必要的技术基础。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 目的基因、阳性血清和表达系统:带有 NiV F 基因、G 基因的克隆质粒 pFBHa-NiVF、pFBHa-NiVG 以及兔抗 NiV 血清由澳大利亚动物健康实验室(AAHL)Linfa Wang 博士惠赠;兔阴性血清由本实验

基金项目 科技部重大动物疫病技术平台项目(2004BA519A48) 广东省科技计划重点项目(2004A20403001)

* 通讯作者。Tel 86-431-86985922 Fax 86-431-87960009 E-mail: changchun_tu@hotmail.com

作者简介 刘勇军(1978-)男,湖北人,硕士研究生,主要方向为分子病毒学。E-mail: lshiyao@gmail.com

收稿日期 2006-11-06 接受日期 2006-12-30 修回日期 2007-02-12

室采自健康的实验兔。Bac to Bac 杆状病毒载体表达系统、昆虫细胞 Sf9 购自 Invitrogen 公司,原核表达载体 pGEX-6P-1 购自 Amersham 公司。

1.1.2 主要试剂和仪器: 内切酶 *EcoR* I、*Sal* I、*Bam* H I、*Xho* I 和 IPTG 购自大连 TaKaRa 公司;弗氏完全佐剂、弗氏不完全佐剂、HRP 标记的羊抗兔 IgG、FITC 标记的羊抗兔 IgG 荧光抗体购自 Sigma 公司, Microncon YM-3 超滤管购自 Millipore 公司,免疫发光检测试剂盒 SuperSignal® West Pico Trial Kit 购自 Pierce 公司;PCR 仪为 ABI 的 GeneAmp PCR System 2400 荧光显微镜为 ZEISS 的 Axioskop 40。

1.2 NiV 病毒 F1、G 蛋白在大肠杆菌中的表达

1.2.1 NiV F1、G 基因原核表达载体的构建: 参照 GenBank 已发表的 NiV 全基因序列(登录号: AF212302),设计了扩增 F1、G 基因片段的上下游引物,其扩增产物不包括信号肽和跨膜区,上、下游引物分别加入下划线所示的酶切位点: NiV F1 FP: 5'-CCGAATTCATGGAGGCAATGAAGAATGCTGACAAC-3', NiV F1 RP: 5'-CCGTCGACTCACTCTTTGATATAGTCCTTAGACTGT-3'; NiV G FP: 5'-CCCAAGCTTATG GACAATCAGGCCGTGATCAAAGAT-3', NiV G RP: 5'-CCCCTCGAGTCACTCAACCAATGATATGCACC-3'。

以 pFBHa-NiVF、pFBHa-NiVG 为模板,PCR 分别扩增 F1、G 基因,产物用相应的酶进行双酶切后插入同样经双酶切的 pGEX-6P-1 质粒,重组质粒经 DNA 测序后分别命名为 pGEX6PNiVF1 和 pGEX6PNiVG。

1.2.2 NiV F1、G 蛋白在大肠杆菌中的表达、纯化及检测: 将表达质粒 pGEX6PNiVF1、pGEX6PNiVG 转化大肠杆菌(*Escherichia coli*) BL21(DE3),以质粒 pGEX-6P-1 转化的大肠杆菌 BL21(DE3)为对照, IPTG 诱导表达,按参考文献^[15]洗涤包含体,目的蛋白采用 SDS-PAGE(分离胶浓度为 10%)切胶法进行纯化,具体如下:从 SDS-PAGE 凝胶上切下目的条带,于匀浆器中使之匀浆化,加入浸提液(0.05mol/L Tris-HCl, 0.1mmol/L EDTA, 0.15 mol/L NaCl, 0.1% SDS, pH7.9),置于 4℃ 12h,其间振摇 3~4 次, 10000r/min 离心 20min,上清即为纯化的 F1、G 蛋白,分别命名为 GST-NiVF1、GST-NiVG。分别取纯化的蛋白进行 SDS-PAGE、Western blot 分析,以兔抗 NiV 血清(1:500)为一抗,HRP 标记的羊抗兔 IgG(1:10000)为二抗,SuperSignal® West Pico Trial Kit 化学

发光底物进行检测,显影、曝光并记录结果。

1.3 NiV 病毒 F1、G 蛋白在杆状病毒表达系统中的表达

1.3.1 重组杆状病毒穿梭质粒的构建: 对转移载体 pFastBac1 进行改造,在转移载体 pFastBac1 多克隆位点的 *Bam* H I 和 *EcoR* I 之间加入蜂素信号肽(Honeybee Melittin Secretion Signal peptide)基因^[16],在 *Sal* I 和 *Pst* I 之间加上多聚组氨酸标签,改造好的转移载体命名为 pFastBac-mels-His。

以 pFBHa-NiVF、pFBHa-NiVG 为模板,PCR 扩增 F1、G 基因,扩增 F1、G 基因的上游引物与 1.2 中的上游引物相同,而下游引物则为去掉终止密码子 TCA 的上述下游引物序列。将扩增得到的目的基因测序以后,克隆入 pFastBac-mels-His 转移载体,转化到大肠杆菌 DH10BAC 感受态细胞,按照杆状病毒表达系统手册提取重组 Bacmid。获得的重组穿梭质粒分别命名为 Bacmid NF1 和 Bacmid NG,同时提取不含有外源基因的 Bacmid 作为对照。

1.3.2 重组穿梭质粒转染 Sf9 细胞及重组杆状病毒的获取: Lipofectamine™ 转染法分别将重组 Bacmid NF1、Bacmid NG 以及不含有外源基因的 Bacmid 同时转染 Sf9 细胞。72h 细胞病变后收集细胞上清,得到重组杆状病毒原液,-80℃ 保存。扩大培养获得重组杆状病毒 rAcNPV-NF1、rAcNPV-NG 以及不含外源基因的野生型杆状病毒 AcNPV。

1.3.3 间接免疫荧光试验(Indirect immunofluorescent assay, IFA)检测 NiV F1、G 蛋白在杆状病毒表达系统中的表达: 将重组杆状病毒 rAcNPV-NF1、rAcNPV-NG 以一定的量感染 Sf9 细胞,同时以 AcNPV 感染的 Sf9 细胞和正常 Sf9 细胞作为对照。72h 后吸去细胞上清,冷丙酮固定,0.5% PBST 液洗涤后加入兔抗 NiV 血清(1:100)100μL, 37℃ 作用 1h,同前洗涤后加入 50μL(1:64)的 FITC 标记的羊抗兔 IgG 荧光抗体, 37℃ 作用 1h,同前洗涤后荧光显微镜下观察并记录结果。

1.4 兔抗 NiV F1、NiV G 高免血清的制备及特异性鉴定

1.4.1 兔抗 NiV F1、NiV G 高免血清的制备: 将纯化的 GST-NiVF1、GST-NiVG 蛋白以 500μg/只/次的剂量免疫约 2.5kg 的日本大耳白兔(购自长春生物制品所),首次免疫加以弗氏完全佐剂,间隔 14d 后以目的蛋白加以弗氏不完全佐剂进行第二次免疫,7d 后

以不加佐剂的蛋白进行第三次免疫,间隔 7d 后进行第四次免疫。最后一次免疫 3d 后取血并分离血清,以纯化的 GST-NiVF1、GST-NiVG 蛋白为包被抗原,按常规方法进行间接 ELISA 检测血清抗体效价。

1.4.2 抗血清特异性的检测：重组杆状病毒表达上清经超滤管浓缩 2.5 倍,浓缩产物进行 SDS-PAGE (分离胶浓度为 12%)后 Western blot 检测所制备的兔血清抗体与杆状病毒表达的重组蛋白之间的反应性,待检兔血清作 1:500 稀释,其余操作同 1.2.2。

以上述 1.3.3 的方法进行间接免疫荧光试验,检测所制备的免疫兔血清的反应性。

2 结果

2.1 NiV 病毒 F1、G 蛋白在大肠杆菌中的表达

通过 PCR 反应,成功地从 pFBHa-NiVF、pFBHa-NiVG 质粒分别扩增了 F1(1023bp)、G(1506bp)基因片段,基因序列测定表明扩增产物与参考毒株完全一致,且重组质粒经双酶切所得到的 DNA 条带也与预期相符,表明 NiV F1、G 基因已正确地插入原核表

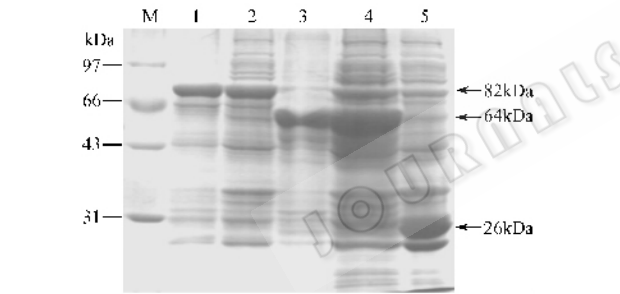


图 1 NiV F1、G 基因在大肠杆菌中表达分析

Fig.1 Expression of NiV F1 and G gene in *E. coli*, showing low molecular weight protein marker (M); Washed (1) and unwashed (2) inclusion body of GST-NiV G protein; Washed (3) and unwashed (4) inclusion body of GST-NiV F1 protein; blank GST protein as control (5).

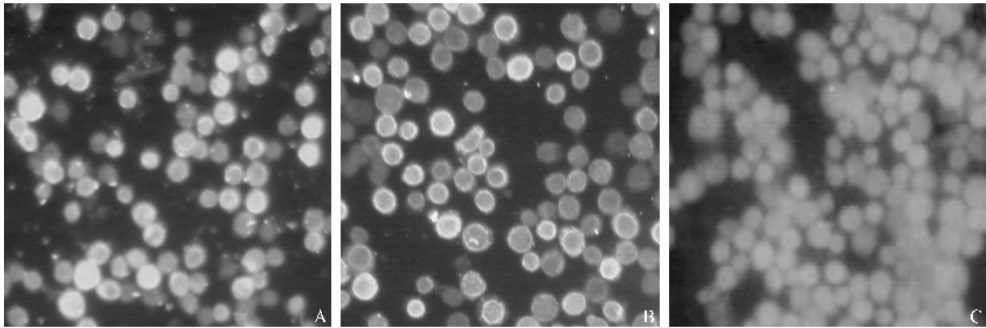


图 3 IFA 检测重组杆状病毒表达

Fig.3 IFA assay of the expression of recombinant baculovirus. A : s9 cells infected with rAcNPV-NiVF1 ; B : s9 cells infected with rAcNPV-NiVG ; C : negative control .

达质粒。IPTG 诱导表达和 SDS-PAGE 分析表明 NiV F1 和 G 分别与谷胱甘肽 S-转移酶(GST, 蛋白分子量为 26kDa)进行了融合表达,表达产物主要以包含体形式存在(图 1),融合表达的重组蛋白分子量分别为 63kDa(GST-NiV F1)、82kDa(GST-NiV G),大小与预计相符。

将纯化的 GST-NiVF1、GST-NiVG 蛋白经 SDS-PAGE 后,以兔抗 NiV 血清进行 Western blot,结果能观察到清晰的反应条带,说明原核表达的 NiV F1、G 蛋白能被兔抗 NiV 血清特异识别,具有较好的反应原性,可以用于 NiV 抗体的检测(图 2)。

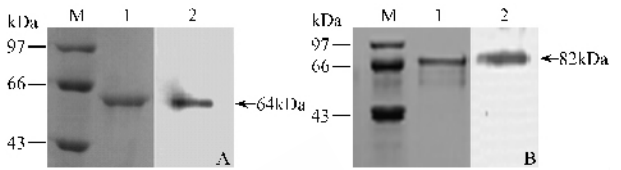


图 2 GST-NiV F1(A)和 GST-NiV G(B)重组蛋白的纯化及 Western blot 结果

Fig.2 Purification and Western blot of GST- NiV F1(A) and GST- NiV G(B). M. Low molecular weight protein marker ; 1. purified protein ; 2. detected in Western blot .

2.2 NiV 病毒 F1、G 蛋白在杆状病毒表达系统中的表达

重组杆状病毒 rAcNPV-NF1、rAcNPV-NG 感染正常的 Sf9 细胞,72h 后观察到细胞形态变大、单个细胞之间间隙明显等典型的细胞病变。间接免疫荧光实验结果表明(图 3),感染重组杆状病毒的细胞胞浆呈现亮绿色荧光,且产物定位于细胞质,而 AcNPV 感染的 Sf9 细胞和正常 Sf9 细胞对照均未见到荧光(AcNPV 感染的 Sf9 细胞荧光结果未显示),表明 2 种蛋白在杆状病毒系统中获得了正确表达。

2.3 兔抗 GST-NiV F1 ,GST-NiV G 血清特异性的检测

证明 NiV F1 和 G 在原核和真核成功表达后 ,为制备特异的 F1 和 G 抗体 ,以纯化的原核表达 F1 和 G 蛋白分别免疫家兔 ,成功制备了 2 种蛋白的高免特异血清。在点阵法确定 GST- NiV F1、GST-NiV G 蛋白的最佳包被量(分别为 0.26μg/孔和 0.30μg/孔)基础上 ,以 ELISA 测得 2 种特异血清效价均为 1:6400。

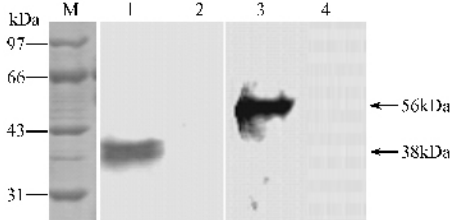


图 4 兔抗 GST-NiV F1 ,GST-NiV G 特异血清与重组杆状病毒感染 s9 细胞上清的 Western blot 检测结果

Fig.4 The figure showed the reactivity of anti-F1 antiserum with the supernatant of rAcNPV-NiVF1(1) and the reactivity of anti-G antiserum with the supernatant of rAcNPV-NiVG expressed (3) in Western blot. The lane 2 and lane 4 are negative controls , M is low molecular weight protein marker .

将重组杆状病毒表达的 NiV F1 和 G 蛋白 SDS-PAGE 后 ,Western blot 检测免疫血清的反应原性 ,以正常 S9 细胞上清作为对照 ,图 4 结果表明所制备的兔抗 2 种蛋白血清均能特异识别 2 种相应的蛋白 ,形成清晰的单一条带。

为了进一步验证免疫兔血清的反应性和特异性 ,以重组病毒 rAcNPV-NF1、rAcNPV-NG 和 AcNPV 分别感染 s9 细胞后进行了 IFA。图 5-A 结果显示兔抗 GST-NiV F1 高免血清只能与 rAcNPV-NF1 感染的单层细胞反应 ,在胞浆可见特异的亮绿色荧光 ,而不与 rAcNPV-NG(图 5-B)和 AcNPV(图 5-C)感染细胞反应。反之 ,图 5-B 显示兔抗 GST-NiV G 高免血清只能与 rAcNPV-NG 感染的单层细胞反应 ,在胞浆可见特异的亮绿色荧光 ,而不与 rAcNPV-NF1(图 5-A)和 AcNPV 感染细胞反应。在该试验中兔阴性血清不与各种状态下的细胞单层反应(结果未显示)。上述结果说明制备的兔高免血清具有蛋白特异性 ,均不出现交叉反应。

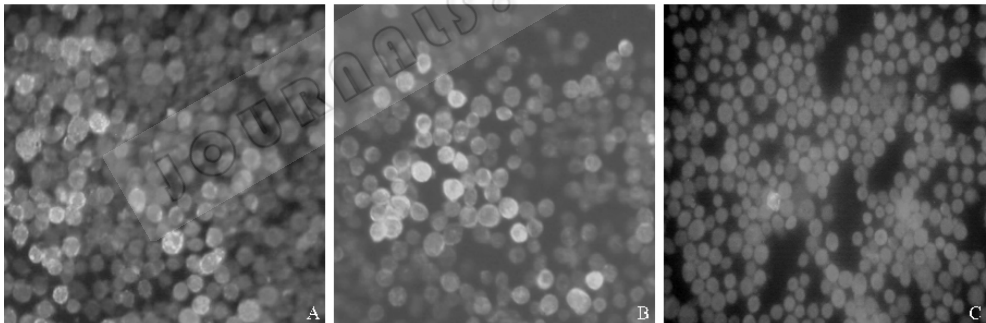


图 5 接种重组病毒的 S9 细胞单层与兔抗 GST- NiV F1 ,GST-NiV G 特异血清的 IFA 检测结果

Fig.5 IFA results of S9 cells infected with rAcNPV-NiVF1 and rAcNPV-NiVG using Rabbit GST-NiV F1 and anti-G sera.

A : Rabbit anti-NiV F1 serum ; B : Rabbit anti-G serum ; C : Negative rabbit serum .

3 讨论

本研究在最初的试验中 ,希望利用大肠杆菌表达 NiV 全长的 F 和 G 蛋白 ,均未能取得成功。推测目的蛋白的特性可能是影响蛋白表达的主要原因。目前有许多的资料表明 ,蛋白的疏水性过大 ,会导致目的蛋白在原核系统中无法表达 ,去掉这些疏水性区域将有利于蛋白在原核表达系统中的表达^[17,18] ,例如 Rodriguez 等^[19]利用 pET-3XC 在大肠杆菌中表达猪繁殖与呼吸综合症病毒(PRRSV)的 ORF5 时 ,缺失跨膜区比完整 ORF 的表达量高 20-30 倍。本试

验通过去掉 F1、G 蛋白的信号肽和跨膜区基因 ,在大肠杆菌中成功地表达这两种蛋白。

我们利用杆状病毒表达系统表达目的蛋白的过程中 ,在转移载体 pFastBac1 的多克隆位点(MCS)中插入了能被昆虫细胞识别的蜂素(melittin)信号肽 ,在昆虫细胞中实现了目的蛋白的分泌表达。蜂素信号肽由 25 个氨基酸组成 ,位于蜂素多肽 C 末端(residues 44-69)^[16] ,将蜂素信号肽基因置于目的基因 5'端进行融合表达后 ,重组多肽前体可以在蜂素信号肽的引导下 ,结合和插入内质网膜 ,使重组蛋白在内质网中得到正确的加工和修饰 ,细胞的信号酶

将信号肽切掉后,目的蛋白通过内质网膜转运,实现分泌表达^[20]。分泌表达可以使目的蛋白减少因胞内蛋白酶的降解而提高表达量,同时也有利于对目的蛋白的纯化。Tessier 等^[21]利用带有蜂素信号肽杆状病毒表达系统对木瓜蛋白酶前体蛋白(papain precursor)实现了高效表达。较之于同源重组的方法,Bac to Bac 杆状病毒表达系统通过转座子介导,含有目的基因的重组 Bacmid 转染 Sf9 细胞就可以得到重组杆状病毒,操作简单。因此,我们将 Bac to Bac 杆状病毒表达系统的转移载体质粒 pFast-Bac1 进行了改造,在多克隆位点 N 端插入蜂素信号肽基因,在 C 端插入多聚组氨酸,目的是使所表达的蛋白实现分泌表达的同时也有利于纯化。

通过 Western blot 和间接免疫荧光试验(IFA),证明通过原核和真核表达系统所表达的两种重组蛋白均能与兔抗 NiV 血清发生特异反应,提示这两种重组蛋白可以作为病毒血清抗体检测的备选抗原,为将来建立病毒血清抗体的检测方法打下了基础。

病毒血清中和试验是 NiV 病原学诊断的标准方法,NiV F、NiV G 均为病毒的囊膜糖蛋白,能诱导机体产生中和性抗体,本试验利用纯化的 GST-NiVF1、GST-NiVG 免疫家兔,制备了高效价的血清,通过 Western blot 和间接免疫荧光试验证明所制备的血清具有很好的特异性,因此本实验所制备的血清可用于建立病毒血清中和试验及间接免疫荧光试验。

参 考 文 献

[1] Wang LF, Harcourt BH, Yu M, *et al.* Molecular biology of Hendra and Nipah viruses. *Microbes Infect*, 2001, **3**(4): 279–287.

[2] Chua KB, Koh CL, Hooi PS, *et al.* Isolation of Nipah virus from Malaysian Island flying-foxes. *Microbes Infect*, 2002, **4**(2): 145–151.

[3] Chua KB, Bellini WJ, Rota PA, *et al.* Nipah virus: a recently emergent deadly paramyxovirus. *Science*, 2000, **288**(5470): 1432–1435.

[4] Anonymous. Outbreaks of viral encephalitis due to Nipah/Hendra-like virus, Western Bangladesh. *Health and Science Bulletin*, 2003, **1**(5): 1–6.

[5] Hsu VP, Hossain MJ, Parashar UD. Nipah Virus Encephalitis Reemergence, Bangladesh. *Emerg Infect Dis*, 2005, **10**(12): 2082–2087.

[6] Chadha MS. Nipah Virus-associated Encephalitis Outbreak, Siliguri, India. *Emerg Infect Dis*, 2006, **12**(2): 235–240.

[7] Anonymous. Nipah virus encephalitis outbreak over wide area of Western Bangladesh, 2004. *Health and Science Bulletin*, 2004, **2**(1): 7–11.

[8] Olson JG, Rupprecht C, Rollin PE, *et al.* Antibodies to Nipah-like virus in bats (*Pteropus lylei*) in Cambodia. *Emerg Infect Dis*, 2002, **8**(9): 987–988.

[9] Reynes JM, Couror D, Ong S, *et al.* Nipah virus in Lyle's flying foxes, Cambodia. *Emerg Infect Dis*, 2005, **11**(7): 1042–1047.

[10] Wacharapluesadee S, Lumlerdacha B, Boongird K, *et al.* Bat Nipah Virus, Thailand. *Emerg Infect Dis*, 2005, **11**(12): 1949–1951.

[11] 张荣祖. 中国动物地理. 北京: 科学出版社, 1999.

[12] Harcourt BH, Tamin A, Ksiazek TG, *et al.* Molecular Characterization of Nipah Virus, a Newly Emergent Paramyxovirus. *Virology*, 2000, **271**(2): 334–349.

[13] Lamb RA, Kolakofsky D. Paramyxoviridae: The viruses and their replication. In: Fields BN, Knipe DM, Howley PM, *et al.* Fields Virology. 3rd ed. Philadelphia: Lippincott-Raven Press, 1996.

[14] Tamin A, Harcourt BH, Ksiazek TG, *et al.* Functional properties of the fusion and attachment glycoproteins of Nipah virus. *Virology*, 2002, **296**(1): 190–200.

[15] Sambrook J, Russell DW. 分子克隆实验指南. 黄培堂, 王嘉玺, 译. 第3版. 北京: 科学出版社, 2002.

[16] Suchanek G, Kreil G, Hermanson MA. Amino acid sequence of honeybee prepro-melittin synthesized in vitro. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1978, **75**(2): 701–704.

[17] 丁家波, 崔治中, 韦平, 等. 马立克氏病病毒广西株 G2 囊膜糖蛋白 gl 基因的克隆和表达. 中国兽医学报, 2002, **21**(2): 109–112.

[18] 季朝能, 白晓阳, 盛小禹, 等. 信号肽去除的耐热碱性磷酸酯酶 FD-TAP 在大肠杆菌中的亚克隆和高表达. 生物工程学报, 2000, **16**(6): 690–693.

[19] Rodriguez MJ, Sarraesca J, Fominaya J, *et al.* Identification of an immunodominant epitope in the C terminus of glycoprotein 5 of porcine reproductive and respiratory syndrome virus. *J Gen Virol*, 2001, **82**(5): 995–999.

[20] Blobel G, Dobberstein B. Transfer of proteins across membranes. I. Presence of proteolytically processed and unprocessed nascent immunoglobulin light chains on membrane-bound ribosomes of murine myeloma. *J Cell Biol*, 1975, **67**(3): 835–851.

[21] Tessier DC, Thomas DY, Khouri HE, *et al.* Enhanced secretion from insect cells of a foreign protein fused to the honeybee melittin signal peptide. *Gene*, 1991, **98**(2): 177–183.

Expression of Nipah virus structural proteins F1 and G and preparation of hyperimmune antisera against two proteins

LIU Yong-jun^{1,2}, XIAO Chang², WANG Gui-ping³, XUAN Hua³, TU Chang-chun^{2*}

(¹ College of Animal Science and Veterinary Medicine, Jilin University, Changchun 130062, China.)

(² The Institute of Veterinary Sciences, The Academy of Military Medical Sciences, Changchun 130062, China)

(³ Institute of Veterinary Medicine, Guangdong Academy of Agricultural Sciences, Guangzhou 510640, China)

Abstract :The fusion protein (F) and attachment glycoprotein (G) of Nipah virus (NiV) are important for the virus to infect cells and induce protective immunity. In this study, the NiV F1 and G gene fragments without the sequences of signal peptide and transmembrane domain were amplified by PCR, then cloned into *E. coli* expression vector pGEX-6P-1 and modified baculovirus vector, respectively. After induction by IPTG, NiV F1 and G proteins were efficiently expressed in *E. coli* when analyzed by SDS-PAGE, both showing good reactivity with the rabbit antiserum anti-NiV serum in Western blot. The expression of NiV F1 and G in baculovirus system were also detected by indirect immunofluorescent assay (IFA) of fixed Sf9 cells monolayer infected with the recombinant baculoviruses expressing F1 and G. Furthermore the anti-F1 and anti-G hyperimmune sera were prepared by immunization of rabbits respectively with purified *E. coli*-expressed F1 and G proteins. Western blot and IFA as well as ELISA showed that antisera against both protein had high titers with good reactivity and specificity. The present study has provided a base for development of diagnostic reagents for detection of NiV infection.

Keywords : Nipah virus (NiV); fusion protein ; attachment glycoprotein ; hyperimmune serum

Foundation item : the Platform Project of MOST for the Control of Major Animal Infectious Disease (2004BA519A48); Scientific and Technological Project of Guangdong Province (2004A20403001)

* Corresponding author. Tel : 86-431-86985922 ; Fax : 86-431-87960009 ; E-mail : changchun_tu@hotmail.com

Received : 6 November 2006 / Accepted : 30 December 2006 / Revised : 12 February 2007

© 中国科学院微生物研究所期刊联合编辑部 <http://journals.im.ac.cn>