

鸡贫血病毒 VP1 和 VP2 蛋白在家蚕中的联合表达

肖庆利 张志芳 何家禄*

(农业部家蚕生物技术重点开放实验室,中国农业科学院蚕业研究所,镇江 212018)

摘 要 将鸡贫血病毒 *vp1* 和 *vp2* 基因分别克隆入转移载体 pBacPAK8 中,获得重组转移质粒 pBac-*vp1* 和 pBac-*vp2*。以上两质粒分别与 *Cvn* I 酶切线性化的亲本病毒 Bm-BacPAK6 DNA 共感染家蚕细胞,通过蓝白斑筛选,纯化得到重组病毒 Bm-*vp1* 和 Bm-*vp2*。PCR 分析表明 *vp1* 和 *vp2* 基因已整合进杆状病毒基因组中。将 Bm-*vp1* 和 Bm-*vp2* 共感染 5 龄家蚕,通过表达产物免疫 SPF 鸡产生的抗血清与 CAV 感染的 MDCC-MSB1 细胞的间接荧光抗体分析,证明表达产物能诱导鸡产生相应的抗体,而且能够保护子代鸡免受 CAV 的攻击。该研究表明,表达 VP1 和 VP2 蛋白的重组家蚕杆状病毒(Recombinant BmNPV)是很有前途的 CAV 亚单位疫苗的生产系统。

关键词 鸡贫血病毒,VP1 和 VP2,重组杆状病毒,家蚕,基因表达

中图分类号 Q78 文献标识码 A 文章编号 1000-3061(2001)03-0283-05

鸡贫血病毒(Chicken anaemia virus,CAV)是呈世界范围分布的重要的家禽病原^[1],自 1979 年 Yuasa 等^[2]报道该病毒以来,许多国家和地区均相继证明了 CAV 的存在。CAV 的基因组是一条只有 2.3kb 的单股环状“ ω ”链 DNA^[3],只产生一个未经剪接的具有多顺反子特性的转录子,这个转录子中的 3 个互为部分重叠的不同开放阅读框(ORF)分别编码 3 个蛋白质,VP1,VP2 和 VP3。其中 VP1 分子量约有 51.6kD,是 CAV 主要衣壳蛋白。VP2 分子量约为 24kD,可与 VP1 相结合,参与病毒粒子的组装。VP3 为细胞凋亡因子,分子量 14kD。CAV 主要侵染鸡的造血组织和淋巴器官。雏鸡感染 CAV 后,由于红细胞前体和胸腺细胞遭到破坏呈现贫血和免疫缺陷的临床症状^[4]。在野外,单纯感染 CAV 几乎不引起典型的临床症状,但由于 CAV 的免疫抑制作用,感染鸡易并发或继发其它疾病,常造成某些疫苗的免疫失败。CAV 往往与马立克病,传染性法氏囊病等混合感染造成鸡群大批死亡,关于 CAV 可增强以上两病毒的致病性已有报道^[5,6]。CAV 的亚临床感染严重影响着养禽业的经济效益,然而至今仍没有理想的预防 CAV 感染的方法,因此研制 CAV 疫苗已显得极为重要。关于 VP1 和 VP2 的表达研究,国外报道在 Sf 细胞中单独表达的 VP1 和 VP2,与 CAV 特异

性中和抗体几乎没有反应,只有二者同时表达,才表现出保护性的免疫应答^[7]。本研究中,我们利用家蚕杆状病毒载体系统,在目前唯一可以大规模饲养的经济昆虫——家蚕体内成功地联合表达了 CAV 的 VP1 和 VP2 蛋白,为研制抗鸡 CAV 感染的基因工程亚单位疫苗提供了一条可行的途径。

1 材料和方法

1.1 材料

受体菌 *E. coli* TG1 为本实验室保存;含 CAV *vp1* 和 *vp2* 基因的质粒 pUC-*vp1*^[8],pUC-*vp2*^[9]由山东农业大学崔治中教授惠赠;转移质粒 pBacPAK8 和载体病毒 Bm-BacPAK6(修饰的 BmNPV)由中国科学院上海生物化学研究所吴祥甫教授提供;各种工具酶、培养基、胎牛血清、Lipofectin 均为 GIBCO BRL 公司产品;X-gal,兔抗鸡荧光抗体 FITC 购于 SIGMA 公司;家蚕 BmN 细胞和家蚕品种 JY1 为本实验室保存;MDCC-MSB1 细胞由江苏省家禽科学研究所张知良教授提供;各种寡核苷酸引物由上海生工生物工程公司合成。

1.2 方法

1.2.1 重组 *vp1/vp2* 转移载体的构建:参照文献 [10]将 *vp1* 和 *vp2* 基因的编码序列分别克隆进杆状

病毒转移载体 pBacPAK8 中。用 *EcoR* I 和 *Sma* I 分别从 pUC-*vp1* 和 pUC-*vp2* 中切下 *vp1* 和 *vp2* 基因经补平、连接等操作后分别克隆入 pBacPAK8 质粒中,最后获得重组转移载体 pBac-*vp1* 和 pBac-*vp2*。

1.2.2 构建和筛选重组 *vp1/vp2* 杆状病毒:参照 Summers 方法^[1]。Bm-BacPAK6 DNA 用 *Cmn* I 消化完全。线性化的 Bm-BacPAK6 DNA 1 μ g 与 2 μ g pBac-*vp1* 或 pBac-*vp2* 质粒在 Lipofectin 作用下共转染 BmN 贴壁细胞,二者在细胞内进行同源重组。27 $^{\circ}$ C 培养细胞 4~5d,收集共转染物上清作适当稀释后,感染 35mm 小 dish 中细胞 1h,铺上含 150 μ g/mL X-gal 的低融点琼脂糖,倒置培养 4~7d,进行蓝白斑筛选。挑取白斑于 96 孔板中细胞扩增病毒,重复筛选 2 轮最终获得重组病毒 Bm-*vp1*, Bm-*vp2*。

1.2.3 PCR 分析外源基因整合:游离病毒基因组 DNA 的提取方法如下:取病毒上清 150 μ L,加入 150 μ L 0.5mol/L 的 NaOH 后混匀,再加入 20 μ L 8mol/L 的 NH₄Ac,混匀后用等体积的酚和氯仿分别抽提 1 次,酒精沉淀后用 20 μ L TE 溶解 DNA。寡核苷酸引物为:P1 (phF. ID): 5'-ACTGTTTTGTAACAGTTTTGTAA-3', P2 (phR. ID): 5'-CGCTCTAACAT-ACCACCC-3', P3 (ph5' flanking sequence): 5'-CTACAATGGCGGGTTTTGG-3', P4 (*vp1* antisense): 5'-AGGTGGTGCCACCGTCCT-3', P5 (*vp2* antisense): 5'-CCAGGTTGCCCTCTCGG-3'。取上述病毒基因组 DNA 1 μ L 进行 PCR 扩增,反应条件:94 $^{\circ}$ C 变性 5min, 94 $^{\circ}$ C 1min, 55 $^{\circ}$ C 1min, 72 $^{\circ}$ C 1min, 30 个循环,最后 72 $^{\circ}$ C 延伸 5min。取 15 μ L 反应产物电泳分析。

1.2.4 家蚕接种和样品处理:将纯化的重组病毒 Bm-*vp1* 和 Bm-*vp2* 以 1:1 的病毒滴度比例混合后接种 5 龄蚕,每头注射约 10⁶ pfu 重组病毒。蚕发病后冰上收集血淋巴,加入 0.1% 苯基硫脲以防蚕血黑化。经 10 000r/min 离心 10min,除去细胞碎片,上清用作动物试验。分别用同样滴度的亲本病毒 Bm-BacPAK6 感染的蚕血和同龄健康蚕血作为阴性对照。

1.2.5 免疫荧光分析:将表达产物和对照血样进行以下试验:①1 日龄 SR2 黄羽肉鸡 15 只,免疫 30d 后采血分离血清,同时进行第二次免疫,30 d 后再分离血清,测定 CAV 阳性率;②32 日龄罗曼鸡 8 只,SR2 黄羽肉鸡 8 只,二次免疫后分离血清用间接荧光抗体的方法测其 CAV 的阳性率。对照的处理同上。

用 CAV 感染的 MDCC-MSB1 细胞作抗原,VP1 和 VP2 表达产物免疫的鸡血清作一抗按照文献^[12]进行间接荧光抗体反应。

1.2.6 动物保护试验:将表达产物免疫 SR2 黄羽肉鸡,取免疫后的一日龄子代鸡进行 CAV 攻毒,用 CAV 攻毒未免疫的子代鸡作对照,30 日后采血计算红细胞数。重复 3 次,每次 8 只。

2 结 果

2.1 含 *vp1/vp2* 基因的重组转移质粒的构建

重组转移载体结构如图 1 所示。转移载体 pBacPAK8 带有 AcNPV 多角体基因启动子。*vp1* 基因长约 1.4kb, *vp2* 基因大小约 0.65kb,二者约有 180bp 重叠的部分。将 *vp1* 和 *vp2* 基因由 *EcoR* I 和 *Sma* I 位点分别从原载体上切下,并以相同的位点克隆入 pBacPAK8 质粒中,获得中间质粒 pES-*vp1* 和 pES-*vp2*。因 *vp1* 和 *vp2* 基因与启动子间有一段较长的非编码序列,考虑到该序列对表达量的影响,故将 pES-*vp1* 用 *Xho* I 和 *EcoR* I 双酶切,去掉大部分非编码序列后再进行自身环化,获得重组转移载体 pBac-*vp1*。同样, pES-*vp2* 用 *Bam* H I 和 *EcoR* I 切掉非编码序列后得到重组转移载体 pBac-*vp2*。以上两重组质粒经酶切鉴定,大小和方向正确(酶切图谱略)。后来用 PCR 方法也分别从 pBac-*vp1* 和 pBac-*vp2* 中扩增出了 *vp1* 和 *vp2* 基因,见图 2。

2.2 重组杆状病毒的筛选和鉴定

将 *Cmn* I 酶切线性化的 Bm-BacPAK6(修饰的 BmNPV, LacZ 基因取代了多角体基因的位置并引入了两个 *Cmn* I 位点)病毒 DNA 与重组转移质粒 pBac-*vp1* 或 pBac-*vp2* 共转染 BmN 细胞,然后进行蓝白斑筛选,挑取白斑重复纯化获得重组杆状病毒 Bm-*vp1* 和 Bm-*vp2*。线性化的 Bm-BacPAK6 DNA 缺失了病毒复制的部分必需基因,只有通过转移载体进行体内同源重组才能复制成有感染力的病毒,大大提高了重组率^[13],降低了空斑筛选的难度。

为了鉴定获得的重组病毒,我们在多角体基因的两端合成了 2 个引物 P1 和 P2, P1 为 5' 端引物,位于多角体基因起始密码子 ATG 前约 40bp 处, P2 为 3' 端引物,在多角体基因终止密码子 TAA 后约 130bp 处,以上两引物分别从重组病毒 Bm-*vp1* 和 Bm-*vp2* 中扩增出了 1.6kb 和 0.8kb 左右的条带。为了进一步确定 *vp1* 和 *vp2* 基因已整合进杆状病毒中,设计了以下 3 个引物: P3 位于多角体基因 5' 上游侧翼区,距离起始密码约 1.3kb, P4 和 P5 分别为 *vp1* 和 *vp2* 基因的反向引物,二者均位于 ATG 后约 70bp 处,经 PCR 反应, P3、P4 及 P3、P5 两对引物均可扩增出约 1.4kb 的条带,如图 2 所示。

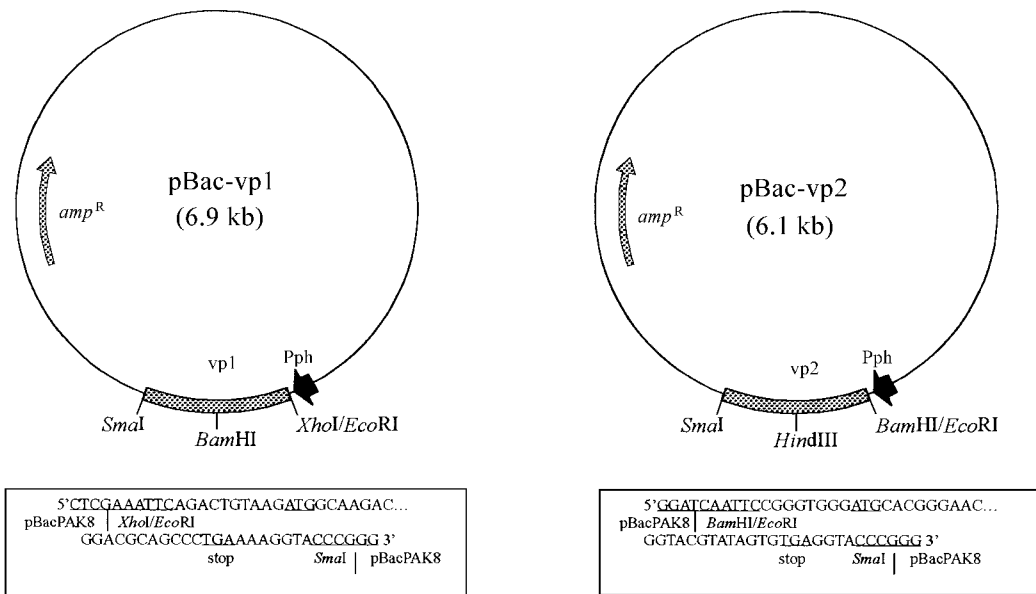


图1 转移质粒 pBac-vp1 和 pBac-vp2 的结构

Fig.1 Structure of transfer plasmids pBac-vp1 and pBac-vp2

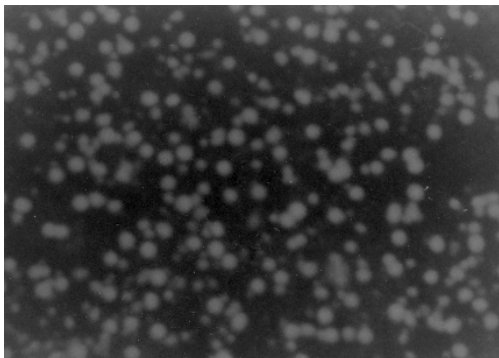


图2 重组病毒 Bm-vp1 和 Bm-vp2 的 PCR 结果

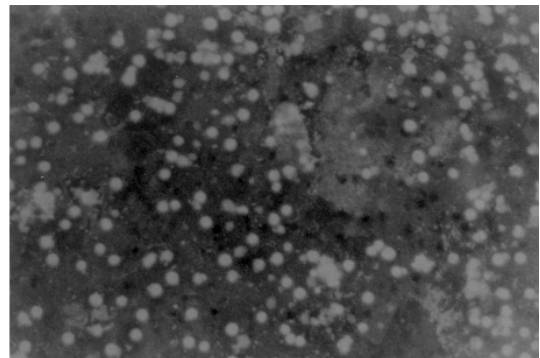
Fig.2 PCR results of recombinant baculoviruses

Bm-vp1 and Bm-vp2

1. λ DNA/*Hind*III
2. pBac-vp1 (P1 and P2)
3. pBac-vp2 (P1 and P2)
4. Bm-vp1 (P1 and P2)
5. Bm-vp2 (P1 and P2)
6. Bm-vp1 (P3 and P4)
7. Bm-vp2 (P3 and P5)
8. Bm-BacPAK8 (P3, P4 and P5)



A



B

图3 用 CAV 感染的 MDCC-MSB1 细胞在间接免疫荧光反应中显示家蚕中表达的 VP1 和 VP2

Fig.3 Indirect immunofluorescence staining of MDCC-MSB1 cells infected with CAV recognized by VP1 and VP2 co-expressed in silkworms

A. Negative control B. Antisera from inoculated chickens

2.3 免疫荧光反应显示在家蚕中表达的 CAV VP1 和 VP2 抗原

将 Bm-vp1 和 Bm-vp2 两种重组病毒在同一宿主家蚕体内进行表达,表达产物免疫 CAV 阴性的 SPF 鸡后,采血分离血清。以 CAV 感染的 MDCC-MSB1 细胞作抗原,VP1 和 VP2 高免血清作一抗,未免疫鸡血清作对照,荧光标记兔抗鸡 IgG (FITC) 作二抗进行间接免疫荧光染色,结果观察到试验区感染的细胞中存在明显的强荧光阳性细胞,符合率为 100%,而对照区则为阴性,如图 3 所示。试验结果也表明,用 IFA 可以对鸡体内是否存在 CAV 抗体作出可靠诊断。

2.4 表达产物对 CAV 感染鸡的保护性

表达产物免疫鸡后,其子代鸡再经 CAV 攻毒,

30d 后计算红细胞数,平均为 $3.54 \times 10^{12}/L$,而对照区只有 $1.93 \times 10^{12}/L$ (图 4)表明该重组产物能保护鸡抵抗 CAV 的攻击,是一种理想的疫苗分子。

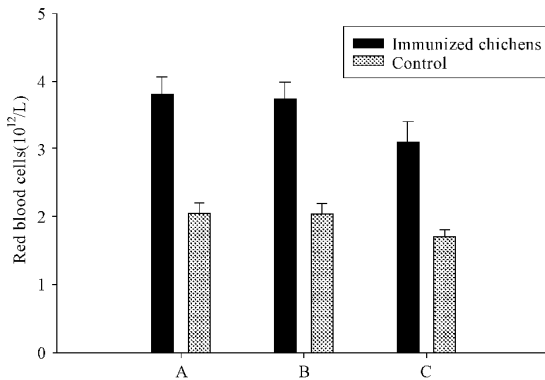


图 4 免疫后代子代鸡与天然子代鸡在 CAV 攻毒后红细胞数的比较

Fig. 4 Comparison of red blood cells of immunized and natural filial generation chickens attacked with CAV

3 讨 论

CAV 感染雏鸡可引起严重贫血、渗出性皮炎和死亡,特别是可引起免疫抑制而导致继发感染或二重感染,降低其它疫苗的免疫效果。野生型 CAV 虽然能在 MDCC-MSB1 细胞或鸡胚上增殖,但产生的病毒滴度很低,不能作为弱毒疫苗加以应用,加之 CAV 对各种理化因子的强抵抗力而很难将之全部灭活,在其它常规鸡胚苗的生产过程中,往往有活的 CAV 存在,引起严重的二次感染,因此,给常规疫苗的研制带来了很大困难。CAV 的感染已呈世界范围性,包括中国在内的许多国家鸡群中 CAV 的感染率都相当高,甚至认为在 SPF 鸡群也有 40% ~ 50% 表现出 CAV 抗体阳性,这可能是世界范围扩散的主要途径即通过污染的疫苗传播了 CAV。

由于 CAV 的基因组很小,整个基因组只有 2.3kb 左右,且只编码 3 个蛋白质,因此国内外一些学者正在探讨用基因工程的方法研制 CAV 亚单位疫苗。用大肠杆菌表达 CAV 蛋白,由于缺少有效的后加工过程,所以生产的蛋白质不能进行正确的组装。国外已有的报道,均是在昆虫 Sf 细胞中表达 CAV 蛋白^[7,14,15]。Noteborn 等通过免疫荧光反应显示重组病毒感染的 Sf9 细胞单独合成的 VP1 或 VP2 蛋白与 CAV 特异性的中和抗体反应很弱,而用含 vp1 和 vp2 基因的重组杆状病毒同时感染 Sf9 细胞,或用能共表达 VP1 和 VP2 的单一重组病毒感染 Sf9 细胞,则可与中和抗体有较强的反应。而且,免疫沉

淀分析表明 VP1 和 VP2 可进行直接的相互作用,意味着非结构蛋白 VP2 可能作为一种支架蛋白(Scaffold)在病毒粒子组装过程中起作用,二者的相互作用是产生 CAV 特异的中和抗原决定簇所必需的^[7]。

BmNPV-家蚕系统是近年来发展起来的在真核生物个体水平上高效表达外源基因的系统,家蚕饲养容易,生产成本低,且由于在血淋巴内存在蛋白酶抑制剂,表达产物稳定。因此,利用 BmNPV-家蚕系统生产 CAV 疫苗有着广阔的发展前景。本研究中,我们成功地在家蚕中联合表达了 VP1 和 VP2 蛋白,经 SDS-PAGE 凝胶电泳和 ELISA 并结合图像扫描分析,推算 VP1 和 VP2 的表达量分别为 300 ~ 400 μ g/mL 和 400 ~ 500 μ g/mL 血淋巴。对 CAV 感染鸡的保护试验显示,对照区在攻毒后红细胞数大大减少,仅为免疫后代子代鸡的一半左右,表明家蚕中表达的 VP1 和 VP2 对受 CAV 攻击的鸡具有很好的保护作用。今后考虑将 vp1 和 vp2 基因克隆入同一个杆状病毒表达载体中,处在不同强度的启动子下,通过控制两种蛋白的表达比例,获得最佳的装配效率和免疫效果。

REFERENCES (参考文献)

- [1] Menulty M S. Chicken anaemia agent: a review. *Avian Pathology*. 1991, **20**: 187 ~ 203
- [2] Yuasa N, Taniguchi T. Isolation and characterization of an agent including anaemia in chickens. *Avian Diseases*. 1979, **23**: 366 ~ 385
- [3] Gelderblom H, Kling S, Lurz R *et al*. Morphological characterization of chicken anaemia agent. *Journal of General Virology*. 1989, **71**: 819 ~ 823
- [4] Jeurissen S H M, Wagenaar F, Pol J M A *et al*. Chicken anaemia virus causes apoptosis of thymocytes after *in vivo* infection and of cell lines after *in vitro* infection. *Journal of Virology*. 1992, **66**: 7383 ~ 7388
- [5] De Boer G F, Jeurissen S H M, Roozelaar D J Van *et al*. Enhancing effects of chicken anaemia agent (CAA) on Marek's disease pathogenesis. In *Proceedings of the 38th Western Poultry Diseases Conference*, Tempe, Ariz. 1989, p. 28
- [6] Rosenberger J K, Cloud S S. The isolation and characterization of chicken anaemia agent (CAA) from broilers in the United States. *Avian Diseases*. 1989, **33**: 707 ~ 713
- [7] Noteborn M H M, Verschuuren C A J, Koch G *et al*. Simultaneous expression of recombinant baculovirus-encoded chicken anaemia virus (CAV) proteins VP1 and VP2 is required for formation of the CAV-specific neutralizing epitope. *Journal of General Virology*. 1998, **79**: 3073 ~ 3077
- [8] LIU Y I (刘岳龙), CUI Z X (崔治中), DUAN Y Y (段玉友). Amplifying by PCR and cloning capsid gene of chicken anaemia virus. *Journal of Jiangsu Agricultural College (江苏农学院学报)*, 1997, **18**(2): 49 ~ 52
- [9] CHEN W M (陈为民), CUI Z X (崔治中), DUAN Y Y (段玉友) *et al*. Amplification and cloning of the capsid vp2 gene of chicken anaemia virus by polymerase chain reaction. *Journal of Jiangsu Agricultural College (江苏农学院学报)*, 1998, **19**(2): 25 ~ 29

- [10] Sambrook J , Fritsch E F , Maniatis T. *Molecular Cloning : A Laboratory Manual*. 2nd ed , New York : Cold Spring Harbor Laboratory Press , 1989
- [11] Summers M D , Smith G E. *A Manual of Methods for Baculovirus Vectors and Insect Cell Culture Procedures*. Texas A & M University , 1986
- [12] Noteborn M H M , De Boer G F , Kant A *et al* . Expression of avian leukaemia virus env-gp85 in *Spodoptera frugiperda* cells by use of a baculovirus expression vector. *Journal of General Virology*. 1990 **71** : 2641 ~ 2648
- [13] Anthony H , Davies. Current methods for manipulating baculovirus. *Bio/Technology* , 1994 **12** : 47 ~ 50
- [14] Koch G , Roozelaar D J Van , Verschuieren C A J *et al* . Immunogenic and protective properties of chicken anaemia virus proteins expressed by baculovirus. *Vaccine*. 1995 **13** (8) : 763 ~ 770
- [15] Iwata N , Fujino M , Tuchiya K *et al* . Development of an enzyme-linked immunosorbent assay using recombinant chicken anaemia virus proteins expressed in a baculovirus vector system. *Journal of Veterinary Medical Science*. 1998 **60** (2) : 175 ~ 180

Simultaneous Expression of Chicken Anaemia Virus Proteins VP1 and VP2 in Silkworms

XIAO Qing-Li ZHANG Zhi-Fang HE Jia-Lu*

(Key Laboratory of Silkworm Biotechnology , Ministry of Agriculture , Sericultural Research Institute , Chinese Academy of Agricultural Sciences , Zhenjiang 212018 , China)

Abstract By cloning *vp1* and *vp2* genes of chicken anaemia virus into transfer vector pBacPAK8 , recombinant transfer plasmids pBac-*vp1* and pBac-*vp2* were obtained. Then BmN cells were co-transfected with linearized baculovirus Bm-BacPAK6 DNA and above two recombinant plasmids respectively , recombinant viruses Bm-*vp1* and Bm-*vp2* were constructed and used to co-infect silkworms to express recombinant proteins. The results indicated that recombinant VP1 and VP2 could induce the corresponding antibody in chickens using immunofluorescence assay and the expression products could protect filial generation from the attack of CAV. Recombinant BmNPV expressing VP1 and VP2 is , therefore , a great hopeful production system for a subunit vaccine against CAV infection.

Key words chicken anaemia virus , VP1 and VP2 , recombinant baculovirus , silkworm gene expression

Received September 15 2000

This work was supported by grants from the 863 High-Tech Program (102-11-02-06) and Scientific Commission Project of Jiangsu province (BE20000627).

* Corresponding author. Tel 86-511-5616659 ; Fax 86-511-5615044 ; E-mail 肖庆利@微生物研究所期刊联合编辑部 <http://journals.im.ac.cn>