

犬瘟热病毒核衣壳蛋白 N 基因的真核表达及鉴定

简中友^{1,2}, 贾 赟², 王全凯¹, 徐立秋³, 吴 斌², 肇慧君², 李振荣²

¹吉林农业大学动物科技学院, 长春 130062; ²辽宁出入境检验检疫局, 大连 116001;

³沈阳农业大学畜牧兽医学院, 沈阳 110161)

摘要:根据 GenBank 发表的犬瘟热病毒 N 基因全序列, 设计合成了 1 对特异扩增 CDV N 基因的引物。以山东泰安分离的 CDV-FOX-TA 株细胞毒中提取病毒 RNA 来制模板, 利用 RT-PCR 扩增出了 1.6kb 的 N 基因, 将其克隆到 pIREShyg 载体上, 构建了 pIRES-N 真核表达载体。然后通过磷酸钙共沉淀法转染 CHO-K1 细胞, 通过潮霉素筛选得到阳性克隆, 间接免疫荧光实验 (IFA) 鉴定 N 基因在 CHO 细胞中的表达, 并用 RT-PCR 方法从转录水平证实 N 基因在 CHO-K1 细胞中的表达, 最终建立了 CHO/CDV-N 细胞株, 为犬瘟热病毒的血清学检测和基因疫苗的研制奠定了基础。

关键词:犬瘟热病毒; N 基因; 潮霉素; CHO-K1 细胞

中图分类号: S852.65 文献标识码: A

Eukaryotic Expression and Identification of Nucleocapsid Protein N Gene of Canine Distemper Virus

Jian Zhongyou^{1,2}, Jia Yun², Wang Quankai¹, Xu Liqiu³, Wu Bin², Zhao Huijun², Li Zhenrong²

¹College of Animal Technical, Jilin Agricultural University, Changchun 130118;

²Liaoning Entry-Exit Inspection and Quarantine Bureau, Dalian 116001;

³Department of Veterinary Medicine, Shenyang Agricultural University, Shenyang 110161)

Abstract: According to the published sequence of N gene of CDV, a pair of primers was designed and synthesized, which can amplify CDV N gene. N gene's cDNA fragment of about 1.6kb was obtained through RT-PCR from FOX TA strain of CDV, and was cloned into pIREShyg Vector Eukaryotic Expression Vector named as pIRES-N was constructed. pIRES-N was transfected into CHO-K1 cells with coprecipitation, and positive cells were screened with hygromycin selection. The N gene protein was expressed in the CHO cells proved by IFA. The N gene was transcribed as proved with RT-PCR. CHO/CDV-N cell strain was constructed, which provided evidence for research of CDV serumal detection and gene vaccine.

Key words: canine distemper virus, N gene, hygromycin, CHO-K1 cell

犬瘟热 (canine distemper, CD) 是由犬瘟热病毒 (canine distemper virus, CDV) 感染引起犬或其它食肉动物的一种急性、高传染性、致死性的疾病, 临床上以双相热、急性鼻卡他、结膜炎、严重的胃肠炎、白细胞减少及神经症状为特征。此病分布在世界各地, 各个季节均可发生, 虽然有犬瘟热弱毒疫苗可用于免疫预防, 但犬瘟热仍时有暴发, 是威胁犬和毛皮动物及其养殖业发展的主要疫病之一。

CDV 主要编码核衣壳蛋白 (N)、磷蛋白 (P)、基质膜蛋白 (M)、融合蛋白 (F)、血凝蛋白 (H) 和大蛋白 (L) 6 个结构蛋白^[1], 其中核蛋白在病毒装配、转录和复制过程中起调控作用, 并且能刺激机体产生强烈的抗体反应, 即使当抗 H 蛋白和 F 蛋白的特异性抗体检测不到时, 抗 N 蛋白的特异性抗体仍能被检出, 是主要的结构蛋白^[2]。并且核蛋白在结构和功能上有着高度保守的重要中间区 (160~407aa), 是保守性较强的免疫原

基金项目: 国家质检总局课题资助 (项目号: 2005IK047)。

第一作者简介: 简中友, 男, 1972 年出生, 河南人, 在读博士, 研究方向动物分子病毒学。通信地址: 116001 辽宁省大连市中山区人民路 81 号, 辽宁出入境检验检疫局动检处。Tel: 0411-82583548, E-mail: jxy750921@163.com。

收稿日期: 2008-03-04, 修回日期: 2008-03-14。

性蛋白,所以本试验选用 N 基因作为目标基因。

在本研究中成功地构建了含 CDV N 基因的真核表达载体并成功在体外表达,获得了一株稳定表达的细胞株,它可在一定程度上取代全病毒作为抗原的作用,以减少实验室活病毒的操作造成的散毒和污染,给 CDV 的研究带来很多方便,并为探索新的血清学早期诊断和基因免疫方法打下基础。

1 材料与方 法

1.1 试验时间、地点

本试验于 2007 年在辽宁出入境检验检疫局技术中心国家质检总局特种经济动物重点实验室进行。

1.2 试验材料

1.2.1 菌株、质粒、病毒 CDV-FOX-TA 株由山东农业大学临床兽医实验室分离、鉴定并惠赠;pIRESHyg 购自 Clontech 公司;宿主菌 DH5 α 由本实验室保存,CDV 阳性血清为本实验室保存,阴性血清为课题组分离的健康犬血清。

1.2.2 试剂和仪器 AMV 反转录酶、RNasin 购自 Promega 公司;PCR 试剂盒,分子量标准 DL-2000 和 DL-15000,蛋白酶 K 及试验用酶类、DNA 小量胶回收试剂盒均购自大连宝生物工程公司;HygromycinB 购自 Roche 公司;细胞基础培养基 F12 为 HyClone 公司产品;FITC 荧光标记的羊抗犬 IgG 购自 sigma 公司。PCR 仪为 ABI 公司生产的 System 9700 型。

2 试验方 法

2.1 引物设计与合成

根据 GENBANK 已发表的 CDV N 全基因序列,利用 Primer Premier 5.0 设计一对引物,并在上、下游引物 5' 端分别加上 BamH I 和 EcoRV 酶切位点(画线部分)。

P1: 5'-GCGGATTCAGGGTTCAGACCTACCAA
TATGG-3'

P2: 5'-AGGATATCGGTCTTGAATATTTAATT
GAGTAGCTC-3'

引物由大连宝生物工程公司合成。溶解于适量灭菌超纯水,浓度为 20pmol/ μ l,分装保存于 -20 $^{\circ}$ C 冰箱备用。

2.2 CDV 核酸的提取

取 200 μ l CDV-FOX-TA 细胞株的 MDCK 细胞培养物,加入 600 μ l 裂解液和 200 μ l 氯仿,剧烈震荡,充分混匀后,4 $^{\circ}$ C 12000r/min 离心 15min; 吸取上清 500 μ l 至另一离心管内,加入 500 μ l -20 $^{\circ}$ C 预冷的异丙醇,上下颠倒 5~6 次,混匀,4 $^{\circ}$ C 12000r/min 离心 15min,弃上清,加入 600 μ l -20 $^{\circ}$ C 预冷的 75%乙醇,上

下颠倒 5-6 次,混匀,4 $^{\circ}$ C 12000r/min 离心 10min,弃上清,在超净工作台内自然凉干,加入 20 μ l DEPC 水溶解 RNA 沉淀。

2.3 目的基因的 RT-PCR 扩增

取 CDV 核酸 10 μ l,加入 20pmol/L 上游引物 1.5 μ l,置 70 $^{\circ}$ C 水浴 5min,取出置冰上,随后加入 5 \times RT-buffer 2 μ l,10mmol/L dNTP 2 μ l,5U/ μ l AMV Reverse Transcriptase 1 μ l,40U/ μ l RNasin 0.5 μ l,补加 DEPC 水至总体积为 25 μ l。将反应体系置 42 $^{\circ}$ C 作用 1h,进行反转录,之后 70 $^{\circ}$ C 作用 15min 灭活 AMV,即可得到 cDNA。

PCR 反应体系:10 \times PCR-buffer 5 μ l,2.5mmol/L dNTP 8 μ l,20pmol/L 上、下游引物各 1 μ l,cDNA 5 μ l, Taq plus DNA polymerase 0.3 μ l,补加灭菌三蒸水至 50 μ l。PCR 反应参数:94 $^{\circ}$ C 预变性 40s,94 $^{\circ}$ C 变性 2min,55 $^{\circ}$ C 退火 50s,72 $^{\circ}$ C 延伸 120s,共进行 35 个循环,最后 72 $^{\circ}$ C 再延伸 10min。PCR 产物经 1%琼脂糖凝胶电泳检测确定其大小,胶回收试剂盒回收目的片段。

2.4 真核表达重组质粒 pIRES-N 的构建和鉴定

PCR 产物经回收并用 BamH I +EcoRV 双酶切后回收。pIRESHyg 载体先用 BstX I 单酶切补平回收,再用 BamH I 酶切回收。然后用 T4 DNA 连接酶对目的片段何线性载体进行连接反应。产物转化大肠杆菌 DH5 α 感受态细胞,氨苄抗性平皿长出菌落后挑单菌落摇菌小提质粒,得到重组表达载体 pIRES-N。利用 BamH I 对 pIRES-N 重组质粒进行单酶切鉴定,利用原设计引物其进行 PCR 扩增鉴定。并将 PCR 产物直接送去大连宝生物公司测序鉴定。

2.5 重组质粒 pIRES-N 的大量提取和纯化

挑取阳性克隆到含有 100ml LB 的 500ml 的三角瓶中,加入足量的氨苄青霉素,于 37 $^{\circ}$ C 剧烈振荡至对数晚期。于 12000r/min 离心 5min 收集菌体,用碱裂解法大量提取质粒,聚乙二醇沉淀法纯化质粒以备转染。所用所有操作均按《分子克隆》^[3]有关方法进行。

2.6 潮霉素在 CHO-K1 细胞上用量的测定

取生长旺盛的 CHO-K1 细胞,用 0.05%胰酶消化,接种到 24 孔细胞培养板上(接种量为 2 \times 10⁵ 个/孔)。配制含 Hygromycin B 浓度分别为 50 μ g/ml、100 μ g/ml、150 μ g/ml、200 μ g/ml、250 μ g/ml、300 μ g/ml 的 F12 细胞培养液(含 10%血清)。待 24 孔板上细胞贴壁后,换入不同浓度的药物培养基,48h 换一次液,以 7~10d 后选取孔内细胞全部死亡的抗生素浓度作为重组质粒转染 CHO-K1 进行筛选所用的药物筛选量。

2.7 重组质粒 pIRES-N 转染 CHO-K1 细胞及相应细胞株的筛选

转染前 24h, 0.05% 胰酶消化呈对数生长期的 CHO-K1 细胞, 每个 35mm 培养皿接入 5×10^4 个细胞, 加入 2ml 10% 培养液, 在 37℃, 5% CO₂ 浓度培养箱中培养过夜, 然后换上 1ml 10% 培养液, 将制备好的 CaCl₂-DNA-BES 缓冲盐溶液逐滴加入细胞培养皿中, 轻轻的晃动一下使充分混匀, 在 37℃, 5% CO₂ 浓度及一定湿度的培养箱中培养 12h 后, 吸出原培养液, 用无血清的培养液洗细胞 2 次, 加入 2ml 新鲜 10% 培养液, 在 37℃, 5% CO₂ 及保湿的培养箱中培养 24h, 用 0.05% 胰酶消化细胞, 重新接种到新的培养皿中, 待细胞贴壁后, 加入含有潮霉素的选择性培养基, 放到在 37℃, 5% CO₂ 浓度及一定湿度的培养箱中培养, 在 2~3W 内, 每隔 48h, 更换一次选择性培养基, 以除去死细胞, 使得抗性细胞集落得到进一步生长; 当空白对照 (未转染的 CHO-K1) 细胞全部死亡后, 所转染的细胞中依旧存活的细胞继续用药物培养, 直至长成单层, 即可初步筛选阳性表达细胞。

2.8 转染细胞株 N 基因表达产物的检测

2.8.1 间接免疫荧光 (IFA) 检测 筛选后的 CHO/CDV-N 细胞接种 96 孔板, 长成单层后, 每孔加上 50μl -20℃ 预冷的丙酮: 乙醇 (6:4) 固定液, 室温固定 10min。拍干, 用 PBS 洗涤 1 次, 拍干, 然后每个细胞孔加入 CDV 阳性血清 (1:20) 50μl, 37℃ 作用 1h; PBS

洗涤 3 次, 自然干燥, 然后每孔滴加 FITC 标记的羊抗犬荧光二抗 (1:200) 50μl, 37℃ 作用 45min, PBS 洗涤 3 次, 最后用 1:9 的磷酸甘油封底, 用荧光显微镜观察结果。同时设置细胞对照组。

2.8.2 细胞总 RNA 的提取及 RT-PCR 检测 取 500μl 细胞悬液, 向其中加入 800μl Trizol 细胞裂解液, 振荡混匀后, 置于室温下 10min, 然后向其中加入 200μl 氯仿, 混匀后于室温下静置 5min, 再于 12000r/min 4℃ 下离心 15min。吸取上清, 向其中加入 0.5 倍体积的异丙醇, 充分混匀后于室温下静置 15min, 随后在 12000r/min 4℃ 下离心 10min。排尽管内液体, 向管内加入 1ml 70% 乙醇, 混匀后, 10000r/min 4℃ 离心 5min。弃去液体, 待管壁稍干燥后加入 10μl DEPC 处理的超纯水溶解, 即得到病毒总 RNA。再按照 1.2.3 步骤来做 RT-PCR。PCR 产物经 0.8% 琼脂糖凝胶电泳检测。

3 结果

3.1 CDV N 基因的扩增、克隆和重组质粒 pIRES-N 的鉴定

采用 Trizol 法提取 CDV 的 RNA, 经 RT-PCR 法扩增得到的 PCR 产物经 1% 琼脂糖凝胶电泳观察, 大小为 1603bp, 与预期结果一致; pIRES-N 的 BamH I 和 EcoRV 双酶切鉴定 (图 1)。此结果表明, 目的基因已连接到 pIREShyg 载体中, 重组质粒 pIRES-N 已构建成功。将 PCR 产物送大连宝生物公司测序鉴定证明准确无误 (测序结果略)。

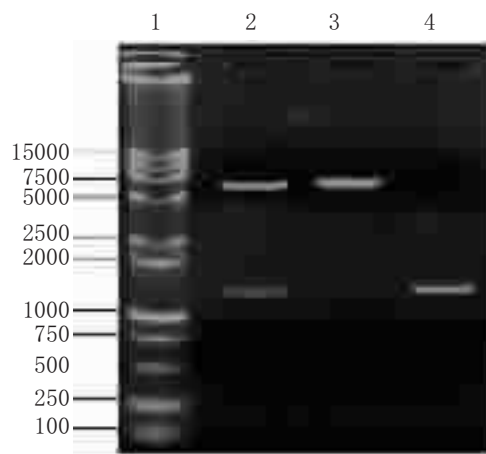


图 1 重组质粒 pIRES-N 的酶切鉴定分析

1: 分子量标准 DL-15000/DL-2000; 2: BamHI 和 EcoRV 双酶切 pIRES-N; 3: BamHI 单酶切 pIRES; 4: N 基因 RT-PCR 结果

3.2 潮霉素浓度定量

在有 CHO 的 24 孔板上, 分别加入含潮霉素 50μg/ml, 100μg/ml, 150μg/ml, 200μg/ml, 250μg/ml, 300μg/ml 的 10% 的 F12 营养液, 大约 7d, 结果为 150μg/ml, 200μg/ml, 250μg/ml, 300μg/ml 的选择性培养基中 CHO 已全部死亡, 而含 50μg/ml、100μg/ml 的

培养基中尚有存活的细胞。因此, 确定 150μg/ml 为选定的转染后筛选所用的参考药物浓度。

3.3 重组质粒转染 CHO-K1 细胞及阳性克隆的筛选

按照 2.7 的方法, 将 pIRES-N 及 pIREShyg 分别转染 CHO-K1 细胞, 同时设未转染的 CHO-K1 细胞空白对照。转染后, 先用不含药物的培养基进行培养, 24h

后加上潮霉素达到 200 μ g/ml 进行筛选, 刚刚加入潮霉素培养液的细胞, 3d 内, 细胞大量死亡, 随后的 1w 内, 活细胞数量很少。继续加药物筛选, 1w 后, 可见培养皿中长起零星的单个细胞或者细胞团, 呈纤维状; 而空白对照 CHO-K1 细胞全部死亡, 没有活细胞出现。在药物筛选下, 细胞越长越多, 最后可堆积成片。此时用胰酶消化后转移到新的培养板中, 细胞可均匀的生长。随着筛选时间的延长, 细胞形态开始改变, 由纤维状逐渐变圆。大约 2w 后, 可以得到初步筛选的细胞 CHO/CDV-N 和 CHO/hyg。

3.4 转染细胞株表达产物的鉴定

3.4.1 间接免疫荧光(IFA)试验检测转染细胞株的表达产物 将筛选出的阳性 CHO/CDV-N 细胞克隆和 CHO/hyg 及未转染的 CHO-K1 阴性细胞分别按照

2.8.1 的方法进行 IFA 试验, CHO/CDV-N 细胞组荧光显微镜下观察可见特异性荧光, 而 CHO/hyg 细胞和未经转染的 CHO-K1 细胞组则未见荧光(图 2)。此结果表明, VP2 基因在阳性转染细胞中得到了有效表达。

3.4.2 RT-PCR 检测转染细胞株的表达产物 将筛选出的阳性 CHO/CDV-N 细胞克隆和 CHO/hyg 及未转染的 CHO-K1 阴性细胞, 分别按照 2.3 的方法提取细胞总 RNA, 并按 1.2.4 方法进行 RT-PCR; 1%琼脂糖凝胶电泳鉴定, 结果显示: 对阳性 CHO/CDV-N 细胞克隆的 RT-PCR, 获得了约 1603bp 的特异条带, 而 CHO/hyg 及未转染的 CHO-K1 阴性细胞均未能扩增出相应的条带(图 3)。此结果也从转录水平证实了 CHO/CDV-N 细胞表达了 N 蛋白。

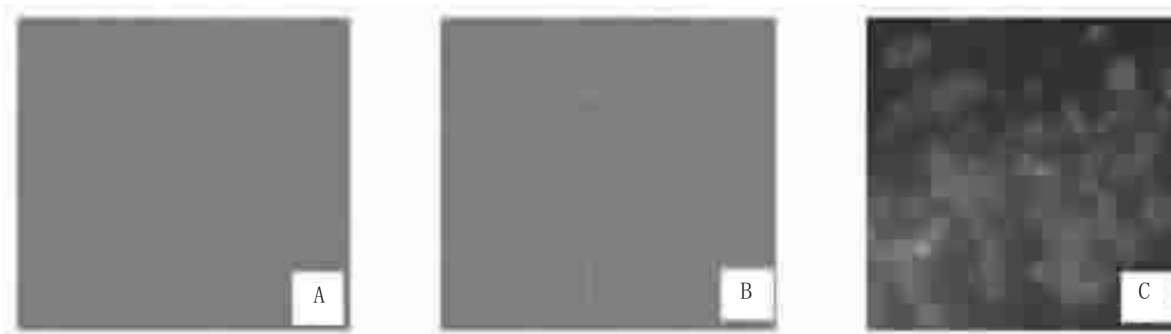


图 2 PIRES-N 转染 CHO-K1 细胞的间接免疫荧光分析(IFA, $\times 100$ 倍)
A: CHO-K1 细胞; B: pIRESHyg 转染 CHO-K1 细胞; C: pIRES-N 转染 CHO-K1 细胞

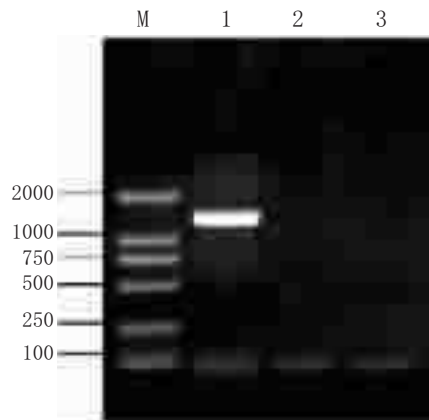


图 3 CHO/CDV-N 细胞基因组 RT-PCR 结果

M: DL-2000 分子量标准; 1: CHO/CDV-N 细胞的 RT-PCR; 2: CHO/hyg 细胞的 RT-PCR; 3: CHO 细胞的 RT-PCR

4 讨论

随着分子生物学的迅速发展, 表达载体的基因表达调控机理已经研究得比较清楚, 构建真核表达载体也已不在少数, 但在简化筛选和高效稳定表达的问题上并未得到很好的解决。本研究中选用了真核表达载体 pIRESHyg, 该载体上多克隆位点和筛选基因之间有一个内部核糖体进入位点(internal ribosome entry site,

IRES) 元件相连, 外源基因与筛选基因共同处在同一个启动子的控制下, 从而使得外源基因和筛选基因可同时转录, 在同一个转录体上翻译出不同的蛋白。其优点在于, 采用 IRES 元件代替内部启动子克服了启动子之间的相互影响, 而且由于核糖体既可以进入双顺反子 mRNA 的 5' 端启动翻译也可以在 IRES 的位置启动翻译, 因此, 对于抗生素的选择标记而言, 选择压

力是加在整个表达盒上的,在选择压力的作用下,在筛选基因得到表达的同时,目的基因也得到了表达,而且加大压力可获得目的基因的稳定高表达。因而,理论上只需要一步筛选,就可以得到目的克隆,大大简化了阳性克隆的筛选工作。

CDV 的核衣壳蛋白相对其他结构蛋白比较保守,并且在 CDV 的装配、转录和复制过程中起调控作用^[4,5],与 CDV 的毒力密切相关^[6],对 CDV 的繁殖生存具有重要意义。CDV N 蛋白如发生较大的变异则不利于 CDV 的繁殖和生存,研究发现即使 CDV N 基因序列发生变异,多数突变也是同义突变,不影响其氨基酸序列,相应生物学功能也不会发生改变。

本研究将 CDV N 基因克隆于真核表达载体 pIRESHyg 的 MCS 中,通过磷酸钙法转染 CHO 细胞,经潮霉素加压筛选,得到阳性克隆细胞,经间接免疫荧光鉴定,所有阳性克隆均表达了目的基因。经连续 2 个月的传代,CHO/CDV-N 细胞基因组的 RT-PCR 结果表明,N 基因已经整合到 CHO 细胞中并转录了相应的 mRNA。上述结果表明,建立的 CHO/CDV-N 细胞株具有比较好的表达稳定性。同时也说明,利用 IRES 元件连接外源基因和筛选基因,代替内部启动子,用同一个启动子同时控制 2 个基因表达的技术,是简化真核表

达系统阳性克隆筛选的一个好途径。利用获得的能稳定表达 CDV N 蛋白的 CHO/CDV-N 细胞株,可以在一定程度上取代 CDV 全病毒作为抗原的作用,为研究新的血清学诊断方法的建立和基因疫苗免疫方法的建立打下基础。

参考文献

- [1] 周洁,李昌文,张洪英,等.犬瘟热病毒 A 株核衣壳蛋白基因的克隆、表达及特性分析[J].中国预防兽医学报,2006,28(4):485-488.
- [2] Yoshida E,Iwatsuki K and Miyashita N.Molecular analysis of the nucleocapsid protein of recent isolates of canine distemper virus in Japan[J].Vet Microbiol,1998,59(2-3):237-244.
- [3] 萨姆布鲁克,等著.黄培堂,等译.分子克隆实验指南(第三版).北京:科学出版社,2002:38-40.
- [4] Switonski M,Szczerbal I,Nowacka.The dog genome map and its use in mammalian comparative genomics [J].Appl,Genet,2004,45:195-214.
- [5] Maes RK,Wise AG,Fitzgerald SD,et al.A canine distemper outbreak in Alaska: diagnosis and strain characterization using sequence analysis[J].Vet.Diagn.Invest.,2003,15(3):213-220.
- [6] Tongiorgi E,Armellini M,Giulianini PG,et al.Brain-derived neurotrophic factor mRNA and protein are targeted to discrete dendritic laminae by events that trigger epileptogenesis[J].Neurosci.,2004,24:6842-6852.