

犬瘟热病毒核衣壳蛋白基因免疫小鼠诱导抗体的研究

李晓叶^{1,2}, 刘颖¹, 艾纯旭¹, 袁宝², 文力正², 陈承祯², 陈健², 任文陟²

(¹吉林大学畜牧兽医学院, 长春 130062;

²吉林大学实验动物中心, 长春 130062)

摘要:将犬瘟热病毒(Canine distemper virus, CDV)核衣壳蛋白基因(Nucleocapsid protein, N)的N蛋白基因克隆到pMD-18T载体,经酶切分析测序获得阳性重组质粒。采用EcoR I和Kpn I双酶切后定向克隆进真核表达载体pcDNA中,电泳测序筛选阳性克隆pcDNA-N,转染COS-7细胞,IFA验证结果显示转染的COS-7细胞胞浆中表达了CDV的N蛋白。与弗氏佐剂乳化完全后将重组质粒pcDNA-N腹腔注射8周龄BABL/c小鼠,同时设pcDNA原载体做阴性对照,2周为间隔共免疫3次,三免两周后采血,ELISA检测效价。结果显示:pcDNA-N试验组抗体滴度为 $10^{1.62\pm 0.164}$,对照组为 $10^{0.52\pm 0.56}$ 。表明犬瘟热病毒核衣壳蛋白基因免疫小鼠可诱导机体产生特异性体液免疫。

关键词:犬瘟热病毒;真核表达;基因免疫

中图分类号:S823.9+2

文献标志码:A

论文编号:2010-2792

Antibody Response in Mice Induced by CDV Nucleocapsid Protein Gene

Li Xiaoye^{1,2}, Liu Ying¹, Ai Chunxu¹, Yuan Bao², Wen Lizheng², Chen Chengzhen², Chen Jian², Ren Wenzhi²

(¹The College of Animal Husbandry and Veterinary Medicine Jilin University, Changchun 130062;

²Laboratory Animal Center, Jilin University, Changchun 130062)

Abstract: The CDV nucleocapsid protein gene was cloned into pMD-18T vector, restriction analysis was positive for plasmid DNA sequencing. The pMD-18T-N was digested by EcoR I and Kpn I and cloned into the eukaryotic expression vector pcDNA, the positive clones pcDNA-N was screening by electrophoresis sequencing, then transfected COS-7 cells and verified with the IFA. Intraperitoneal injection of 8-week-old BABL/c mice after the plasmid pcDNA-N emulsified with Freund's adjuvant. At same time the original vector as negative control pcDNA. A total of three inoculations were performed at once every two weeks. Two weeks after the last injection, blood samples were collected to separate serum. Results of ELISA show that titer stimulated by pcDNA-N was $10^{1.62\pm 0.164}$. While the control group's titer was $10^{0.52\pm 0.56}$, could not be detected CDV antibody. These experiments provided primary data for in vivo research of dogs.

Key words: canine distemper virus; eukaryotic expression; gene immunization

0 引言

犬瘟热病毒(CDV)属于副粘病毒科(Paramyxoviridae)麻疹病毒属(Morbillivirus),可引起犬科、猫科、鼬科、灵猫科及部分浣熊科动物的一种急性、高度接触性传染病,对养犬业、毛皮动物养殖业和野生动物保护业产生极大的危害,病死率可达80%,雪

貂致死率高达100%^[1]。随着生态环境的改变,CDV的自然宿主已经扩展到了食肉目所有8个科,甚至人也有CDV感染病例。近年来,该病的预防主要依赖于接种弱毒疫苗,尽管取得了显著的成效,但对动物机体具有一定程度的免疫抑制和损伤神经系统的潜在危害^[2-3]。

基金项目:吉林省科技平台建设项目“吉林省实验动物质量检测中心平台建设”(20071138)。

第一作者简介:李晓叶,女,1987年出生,山西怀仁人,吉林大学实验动物中心研究生,主要研究方向:实验动物质量检测。通信地址:130062 长春市西安大路5333号,吉林大学实验动物中心, Tel: 0431-87836536, E-mail: yuanbao1982@163.com。

通讯作者:任文陟,男,1964年出生,吉林白城人,吉林大学实验动物中心副主任,硕士导师,在读博士,主要研究方向:实验动物质量检测。通信地址:130062 长春市西安大路5333号,吉林大学实验动物中心, Tel: 0431-87836536, E-mail: rwz1964@163.com。

收稿日期:2010-09-26, **修回日期:**2010-10-29。

传统疫苗是用完全病毒制备而成,故不可避免有一些与特异性免疫无关的成分存在,可能引起局部或全身不良反应,弱毒苗还存在着潜在的人为散毒和毒力返祖的危险,这使得传统疫苗的应用受到了一定的限制。目前,国外学者对CDV基因工程疫苗的研究已取得了一定的进展,其与传统疫苗相比更具有安全性^[4-6],而国内报道^[7,8]尚少。基因疫苗,亦称核酸疫苗、裸DNA疫苗,是20世纪90年代兴起的一项技术,该疫苗是将编码某种抗原蛋白的基因真核表达后直接接种动物,使带有目的基因的表达载体通过宿主的转录系统表达抗原蛋白,诱导机体产生针对该抗原的免疫应答,以达到预防和治疗的目的^[9-11]。基因免疫能全方位地调动机体的免疫系统,模拟病毒自然感染的过程,诱导机体产生保护性抗原的特异性体液和细胞免疫应答,既具有弱毒苗的高效性又具有灭活苗的安全性^[12]。

此研究中构建了含有CDV核衣壳蛋白(N)重组质粒,转染后稳定表达,并在小鼠体内初步探讨其免疫应答,从而为CDV的预防拓宽思路。

1 材料与方法

1.1 病毒

毒株CDV/R/20-8由吉林省五星动物保健药厂提供,按1%接种Vero细胞,约80%左右出现CPE时收获,-20℃冻融3次后去除细胞碎片,22000 r/min超离后取沉淀用PBS悬浮,冻存备用。

1.2 菌株及质粒

大肠杆菌JM109菌种由实验室保存;pMD-18T载体、pcDNA载体购自Promega公司。转染所用的细胞为COS-7细胞(SV40转化的非洲绿猴肾细胞),购自中科院上海细胞所。

1.3 试剂

RNA PCR Kit (AMV) Ver.3.0 反转录试剂盒(TaKaRa); Viral RNA Kit(OMEGA); T₄DNA连接酶、EX Taq聚合酶、dNTP混合物、IPTG、X-Gal、λ-EcoT14 I marker、DNA凝胶回收试剂盒和转染试剂盒(Lipofectamine™2000)均购于宝生物工程(大连)有限公司;质粒大量抽提试剂盒(E.Z.N.A.® HP Plasmid Midi Kit);其他试剂均为进口或国产分析纯。

1.4 实验动物

BALB/c小鼠购于吉林大学白求恩医学院。

1.5 病毒基因的扩增及克隆

RNA提取参照Viral RNA Kit(OMEGA)试剂盒的说明进行。

1.5.1 引物的设计及合成 根据GenBank中登录的

CDV全基因组中N基因序列(序列号:AF014953.1)设计1对引物。

S1: 5' -TGAATTCGGGGAGCAATAAGAGGAAT A-3';

S2: 5' -ANNGAATTCNNCCAAGATAACCATGTACG-3';

引物中含有EcoR I、Kpn I酶切位点,由上海生物工程公司合成。

1.5.2 RT-PCR 取上述提取的RNA,参照TaKaRa RNA PCR Kit(AMV)Ver.3.0说明书进行cDNA的合成。

PCR反应体系:6.5 μL灭菌二蒸水,5 μL 10×PCR Buffer,4 μL 2.5 mmol/L dNTPMix,1 μL 10 μmol/L上下游引物,2 μL cDNA模板,0.5 μL 5 U/μL Taq DNA Polymerase。反应条件为:95℃ 4 min;94℃ 30 s,59℃ 30 s,72℃ 40 s,35个循环;72℃ 10 min。

PCR产物的回收纯化具体操作按照回收试剂盒(Axygen)说明书进行,目的片段连接到pMD-18T载体上,16℃过夜连接。连接反应体系:pMD-18T载体0.5 μL;插入目的片段4.5 μL;连接混合物5 μL;总体积10 μL。

1.6 N蛋白基因的克隆与鉴定

将连接产物加入冰上冻融的感受态中,冰浴45 min。42℃热激2 min,转入冰中,冰浴5 min。加入890 μL LB培养基,120 r/min,振荡30 min。涂200 μL于LB固体培养基上,37℃培养12 h。从LB固体培养基上挑取单个生长菌落,接种于5 mL带有Amp抗性的LB液体培养基中,37℃下振荡12 h。用上述的菌液做模板,做菌液PCR鉴定。50 μL体系:38 μL灭菌二蒸水,5 μL 10×PCR Buffer,4 μL 2.5 mmol/L dNTPMix,1 μL 10 μmol/L上下游引物,0.5 μL菌液模板,0.5 μL 5 U/μL Taq DNA Polymerase。阳性克隆经琼脂糖电泳检测并测序鉴定。

1.7 亚克隆及转染

将克隆进pMD-18T的目的基因用EcoR I和Kpn I双酶切后回收纯化,按回收试剂盒(Axygen)说明书进行,真核表达载体pcDNA按常规方法连接转化,限制性内切酶酶切分析筛选阳性克隆pcDNA-N。

按转染试剂盒Lipofectamine™2000的说明书进行,同时设pcDNA原载体转染的阴性对照。间接免疫荧光试验(IFA)验证,一抗为在大肠杆菌中表达的CDV重组N基因产物免疫小鼠制备的血清;二抗为FITC标记的羊抗鼠IgG,常规方法进行试验,反应结束后倒置荧光显微镜下观察记录。重组质粒的扩增、纯化按E.

Z.N.A.® HP Plasmid Midi Kit 说明书进行。

1.8 DNA 免疫

将 20 只 8 周龄 BALB/c 母鼠分成 2 组 (pcDNA-N 注射组及原载体 pcDNA 注射组), 采用腹腔注射, 每只小鼠注射 100 μg 质粒 DNA 和 100 μL 弗氏佐剂 (1:1) 的完全乳化液。两周为间隔共免疫 3 次, 三免后 2 周采血分离血清。

1.9 ELISA 检测血清中抗 N 抗体效价

反应条件参照文献进行^[13], 终止反应后测定 OD₄₉₀

值, 效价以 P/N≥2.0 时血清最大稀释倍数计算。

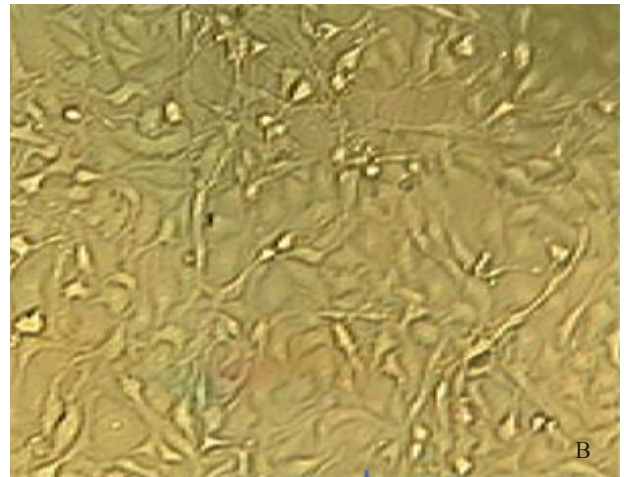
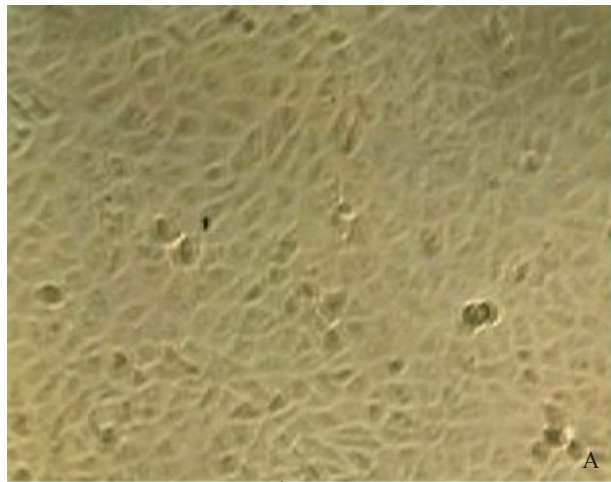
2 结果与分析

2.1 病毒增殖结果

Vero 细胞长满单层传代后, 同步接入 CDV, 37℃ 5% 浓度 CO₂ 培养箱中培养 3~4 天即出现细胞病变。病变主要表现为折光性增强, 细胞拉网, 凝集, 脱落。结果见图 1。

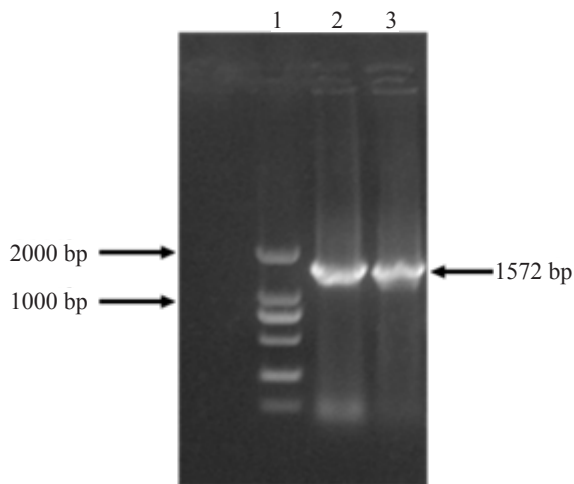
2.2 N 基因 RT-PCR 扩增产物鉴定结果

根据已知的 CDV N 基因序列, 设计引物进行



A: Normal Vero cell ; B: CPE cell

图 1 CDV 在 Vero 细胞产生的 CPE (10×10)



1: DL2000 Marker 2、3: PCR results of sample

图 2 N 基因 RT-PCR 鉴定结果

RT-PCR 扩增, 结果扩增的片段大小与预期相符 (预期为 1572 bp, 图 2)。

2.3 N 蛋白基因的克隆及测序鉴定结果

将上述经 PCR 鉴定的菌液送上海生工生物技术有限公司进行双向测序, 以确保序列的准确性。测序结果表明, 获得的 1572 bp 序列。同时将获的序列与

(AF014953.1) 进行比对, 结果发现同源性为 99.1%, 说明克隆成功。

2.4 重组质粒 pcDNA-N 在 COS-7 细胞中的表达

重组质粒 pcDNA-N 纯化后, 转染 COS-7 细胞, 48 h 后用丙酮/乙醇 (3:2) 固定, IFA 验证其表达。从图 3 可知, pcDNA-N 阳性细胞胞浆内呈现特异性荧光 (图 3A), 而空质粒阴性对照细胞中无特异性荧光 (图 3B)。表明重组质粒在体外系统中可以表达。

2.5 重组质粒在小鼠体内诱发的抗体 ELISA 检测结果

20 只 8 周龄 BALB/c 雌鼠分别腹腔注射 pcDNA-N 和 pcDNA 空载体 DNA, 三免后 2 周采血分离血清, ELISA 检测其特异抗体 (图 4)。由图 4 可知, pcDNA-N DNA 免疫能产生抗体效价达 10^{1.62±0.164}, 而原载体 DNA 阴性对照组只检测出 10^{0.52±0.56} 抗体效价, 该效价可看作非特异性背景反应。

3 讨论

犬瘟热是由犬瘟热病毒引起的一种高度接触性传染病, 危害犬及其它食肉目动物, 病毒的蛋白主要有核衣蛋白 (N)、磷蛋白 (P)、基质膜蛋白 (M)、融合蛋白 (F)、附着蛋白 (H), 其中 N 蛋白是病毒结构中含量最多的结



A: Detection of plasmid pcDNA-N by IFA B: Negative control

图3 IFA检测pcDNA-N转染的COS-7细胞中CDV N基因的表达(200×)

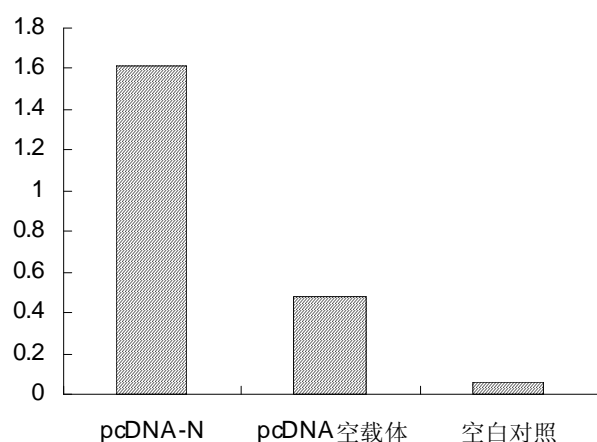


图4 pcDNA-N和pcDNA原载体基因免疫BALB/c小鼠后ELISA检测CDV抗体效价

构蛋白,在病毒装配、转录和复制过程中起调控作用。它是保守性最强的免疫原性蛋白,其在病毒感染时可引起强烈的抗体反应^[14]。此外,N蛋白上含有T细胞表位,在细胞免疫方面发挥着重要作用。CDV的毒力与N蛋白密切相关,且在中枢神经系统的持续性感染中具有重要作用^[15,16]。N蛋白是CDV中保守性最强的免疫原性蛋白,不含糖基化位点,因此,以CDV/R/20-8株为素材,将病毒核衣壳N蛋白基因插入真核表达载体pcDNA3.1中,构建了重组质粒pcDNA-N,为进一步研发针对CDV的DNA疫苗做了初步尝试。

重组的真核载体pcDNA-N,体外转染试验验证其表达,重组质粒扩增培养并纯化,与弗氏佐剂完全乳化后腹腔注射BALB/c小鼠,结果显示诱发了较高水平的ELISA抗体,抗体效价可达 $10^{1.62 \pm 0.164}$ 。这与Sixt报道结果相一致^[6],其构建的pVIJ-F和pVIJ-H重组质粒采用基因枪和肌肉注射两种方法免疫小鼠,诱导机体产生了免疫应答。徐向明^[10]报道过将囊膜糖蛋白基因F和H克隆并真核表达,以PEI为佐剂通过肌肉注射诱导机体产生免疫应答,在本实验免疫过程中也探索过

其他途径的接种方法,结果并不理想,免疫佐剂的筛选还有待进一步实验确定。实验结果表明,构建的重组质粒pcDNA-N在小鼠体内可以表达,并具有生物学活性,这为进一步在犬体内的试验打下了基础。

参考文献

- [1] 殷震,刘景华.动物病毒学(2版)[M].北京:科学出版社,1997:756-757.
- [2] Chappuis G. Control of canine distemper[J].Vet Microbiol,1995,44(2-4):351-358.
- [3] Pardo M C, Bauman J E, Mackowiak M. Protection of dogs against canine distemper by vaccination with a canarypox virus recombinant expressing canine distemper virus fusion and hemagglutinin glycoproteins[J]. Am J Vet Res,1997,58(8):833-836.
- [4] Kerdiles Y M, Cherif B, Marie J C, et al. Immunomodulatory properties of morbillivirus nucleoproteins[J]. Viral Immunol,2006,19(2):324-334.
- [5] Rubin D J, Levin R M. Neurologic complications of Paget disease of bone[J]. Endocr Pract,2009,15(2):158-166.
- [6] Jensen T H, Nielsen L, Aasted B, et al. Early life DNA vaccination with the H gene of Canine distemper virus induces robust protection against distemper[J]. Vaccine,2009,27(38):5178-5183.
- [7] 简中友,贾赞,王全凯,等.犬瘟热病毒核衣壳蛋白N基因的真核表达及鉴定[J].中国农学通报,2008(4):8-12.
- [8] 张莉,华育平,曾祥伟,等.貉貉源犬瘟热病毒融合蛋白基因的同源性分析[J].东北林业大学学报,2008(3):70-72.
- [9] Plattet P, Rivals J P, Zuber B, et al. The fusion protein of wild-type canine distemper virus is a major determinant of persistent infection [J]. Virology,2005,337(2):312-326.
- [10] Fischer L, Tronel J P, Minke J, et al. Vaccination of puppies with a lipid-formulated plasmid vaccine protects against a severe canine distemper virus challenge[J]. Vaccine,2003,21(11-12):1099-1102.
- [11] Wang L, Guo F, Wei S, et al. Neonatal intramuscular injection of plasmid DNA encoding GLP-1 reduces serum insulin level and modifies skeletal muscle myosin heavy chain composition in adult rats[J]. Physiol Res, 2010,59(4):571-579.
- [12] 薛春林,冯达干,曹少先,等.生长抑素主动和被动免疫及基因免疫研究进展[J].中国农学通报,2006(8):9-13.

- [13] 袁宝,王琛,任文陟,等.犬瘟热病毒核蛋白基因的原核表达及其间接ELISA检测方法的建立[J]. 中国兽医学报,2008(7):775-778.
- [14] Kibirev I, Drobkov B I, Marakulin I V. [Problems and prospects of gene therapeutics and DNA, vaccines development and application] [J]. Patol Fiziol Eksp Ter,2010(1):35-40.
- [15] Jensen T H, Nielsen L, Aasted B, et al. Early life DNA vaccination with the H gene of Canine distemper virus induces robust protection against distemper[J]. Vaccine, 2009,27(38):5178-5183.
- [16] Fukumoto S, Tamaki Y, Igarashi I, et al. Immunogenicity and growth inhibitory efficacy of the prime-boost immunization regime with DNA followed by recombinant vaccinia virus carrying the P29 gene of Babesia gibsoni in dogs[J]. Exp Parasitol,2009,123(4): 296-301.