

## 昆虫细胞表达基因VII NDVHN 基因的免疫效力研究

王善辉<sup>1</sup>, 薛忠<sup>1</sup>, 汪鹏旭<sup>1</sup>, 李云龙<sup>1</sup>, 成子强<sup>2\*</sup>

(1. 徐州生物工程职业技术学院动物工程系, 徐州 221006; 2. 山东农业大学动物科技学院, 泰安 271018)

**摘要:** 利用杆状病毒表达系统对VII NDV HN 基因进行表达研究。RT-PCR 扩增 HN 基因, 将其克隆到 pFastBacHTA 载体中, 阳性重组质粒转化 DH10Bac 感受态细胞, PCR 鉴定获得阳性克隆, 碱裂解法提取阳性质粒, 转染 Sf9 昆虫细胞, 获得含 HN 基因的重组杆状病毒质粒, 重组病毒感染 Sf9 细胞 72 h 后, 进行 SDS-PAGE 电泳、间接免疫荧光和 Western-blot 试验。免疫 SPF 鸡, 间接 ELISA 测定抗体滴度, 攻毒保护试验检测重组 HN 蛋白保护性。结果显示, 目的蛋白 HN 在昆虫细胞中有特异性表达, 该蛋白诱导了高滴度的 NDV 特异性抗体, 具有良好的免疫原性; 强毒攻击保护率达到 75%, 与 La sota 疫苗组保护率接近, 均明显高于阴性对照组。上述结果为 NDV 新型亚单位疫苗奠定了基础。

**关键词:** 新城疫病毒; HN 蛋白; 重组杆状病毒; 昆虫细胞; 免疫效力

中图分类号: S855.3

文献标识码: A

文章编号: 1672-352X (2016)01-0021-05

### Expressions of protein HN of Newcastle disease virus in recombinant baculovirus and its antigenicity analysis

WANG Shanhui<sup>1</sup>, XUE Zhong<sup>1</sup>, WANG Pengxu<sup>1</sup>, LI Yunlong<sup>1</sup>, CHENG Ziqiang<sup>2</sup>

(1. Animal Engineering Department, Xuzhou Vocational College of Bioengineering, Xuzhou 221006;

2. College of Animal Science and Veterinary Medicine, Shandong Agricultural University, Tai'an 271018)

**Abstract:** The expression of *F* gene of Newcastle disease virus (NDV) was analyzed using the baculovirus expression system. *HN* segments were amplified using RT-PCR and cloned into pFast BacHT A plasmid. The recombinant plasmid was transformed into DH10Bac competent cells to get the positive recombinant bacmid. The expression of the target gene was detected after 72 h post transfection of Sf9 cell with recombinant bacmid. Serum antibody titer of immunized SPF chickens and the protective properties were determined. The indirect immunofluorescence assay (IFA) and western-blot test showed that the *HN* gene expressed in Sf9 cells infected with the recombinant baculovirus. The ELISA results showed that the expressed protein could induce high titer specific antibody against NDV. The protection rate of JSXZ NDV strong virulent strains was 75%, and the protective rate in the La Sota vaccine group was significantly higher than that in the negative control group. These results would lay a foundation for the further study on Newcastle disease virus subunit vaccine.

**Key words:** Newcastle disease virus; HN protein; recombinant baculovirus; insect cell; immunity effect

新城疫是由新城疫病毒(Newcastle disease virus, NDV)引起鸡/鸽或其他禽类的一种高度接触性传染病, 是危害我国养禽业生产的最严重疾病之一<sup>[1-2]</sup>。随着预防接种的普及, 典型 ND 的毁灭性大

流行已基本被控制, 但世界各地仍不断有 ND 的暴发或小规模流行, 严重削弱毒疫苗最为常用, 但由于 NDV 毒株众多, 毒力差别较大<sup>[3-4]</sup>, 导致近年来在 ND 疫苗应用中经常出现抗体效价高却不能保护

收稿日期: 2015-08-17

基金项目: 徐州市科技项目(XM13B120)和山东省家禽产业体系岗位专家项目(SDAIT-13-011-04)共同资助。

作者简介: 王善辉, 博士。

\* 通信作者: 成子强, 博士, 教授, 博士生导师。E-mail: czqsd@126.com

强毒攻击。

NDV 基因组长度为 15~186 nt, 编码 6 种结构蛋白, 在基因上的排列顺序是 3'-NP-M-F-HN-L-5'<sup>[5-6]</sup>。其中 HN 长度约 570 个氨基酸, 位于 NDV 囊膜表面, 在病毒侵染过程中起着受体识别和介导病毒吸附细胞的作用<sup>[7]</sup>, 是决定病毒毒力的重要因素。HN 是诱导动物产生免疫保护的主要抗原蛋白, 针对该蛋白的单克隆抗体(MAb)可以通过阻断病毒颗粒吸附细胞上的唾液酸受体, 从而中和 NDV 的感染<sup>[8]</sup>。

新型杆状病毒表达系统 Bac-To-Bac 是目前比较成熟的真核表达系统, 利用该系统构建的重组 Bacmid 在大肠杆菌中以低拷贝复制, 重组 Bacmid 转染昆虫细胞不需要蚀斑纯化就可得到 100% 的阳性重组病毒, 而且表达的外源蛋白能够进行糖基化等修饰, 具有天然蛋白的生物学活性<sup>[9-11]</sup>。本试验利用杆状病毒表达系统对 NDV JSXZ 株的 HN 蛋白进行表达研究, 将 F 基因克隆到 pFastBacHT A 载体, 在体外进行表达、鉴定和纯化, 并将纯化的 HN 蛋白添加佐剂免疫 SPF 鸡, 通过 ELISA 试验检测抗体滴度。以期为 NDV 亚单位疫苗研究寻找一种新的有效方法。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

**1.1.1 载体和试剂** pFast Bac HT A 质粒载体和脂质体转染试剂盒, 均为 Invitrogen 公司产品; 各种常规酶、高保真酶、低分子量蛋白 marker、DNA marker 均购自宝生物工程(大连)有限公司。

**1.1.2 细胞** Sf9 昆虫细胞系, DH5A 和 DH10Bac 感受态 *E.coli* 菌种由徐州生物工程职业技术学院分子生物学实验室保存。

### 1.2 方法

**1.2.1 引物设计** 利用 DNAMAN 软件设计扩增 HN 基因特异性上、下游引物, 上游引物 HN-1 序列为 5'-ATTGAATTCATGGACCGCGCGGTTAAC-3', 引入 *EcoR* I 酶切位点; 下游引物 HN-2 序列为 5'-ACGGGTACCGCTTAAACTCTATCATCC-3', 引入 *Kpn* I 酶切位点。

**1.2.2 F 基因的扩增克隆及鉴定** 按 TaKaRa-MiniBEST viral RNAPDNA Extraction Kit Ver.3.0 说明书操作总提新城疫病毒 RNA。经反转录后, 取 cDNA 1  $\mu$ L 为模板, 用特异性引物 F1 和 F2 RCR 扩增 F 片段。胶回收纯化 PCR 产物, 并取 2  $\mu$ L 胶回收产

物作核酸电泳鉴定。

**1.2.3 F 基因的杆状病毒转移载体构建** 用 *EcoR*I 和 *Kpn* I 对序列正确的 F 基因 PCR 胶回收产物和杆状病毒转移载体 pFastBacHT A 进行双酶切并回收, 按分子克隆方法连接、转化。少量提取质粒, 利用菌落 PCR 和双酶切方法筛选、鉴定阳性克隆。

**1.2.4 转座及重组质粒的鉴定** 用 PCR 和酶切鉴定正确的阳性质粒转化 DH10Bac 感受态细胞, 碱裂解法提取重组质粒。用 M13 通用引物进行 PCR 扩增, 鉴定重组质粒。取 PCR 产物电泳, 通过 PCR 产物大小来确定阳性的质粒命名为 HN-Bacmid。

**1.2.5 转染及重组病毒的鉴定** 取纯化的阳性重组质粒 HN-Bacmid, 利用脂质体 Lipofectamine TM 2000 转染 Sf9 昆虫细胞, 提取病毒 DNA。PCR 鉴定为阳性的重组病毒低剂量感染 Sf9 昆虫细胞, 经 2 代扩大培养后收获培养上清液, 即获得了重组杆状病毒 HN-BV, 4℃避光保存。

**1.2.6 重组蛋白的表达、纯化与检测** (1) 重组蛋白 SDS-PAGE 分析。将感染病毒细胞及未接种病毒细胞参照参考文献[12]介绍的方法处理后, 进行 SDS-PAGE 分析。

(2) 间接免疫荧光法检测(IFA)。按照参考文献[12]介绍的方法进行, 一抗为鼠抗鸡新城疫病毒阳性血清, 二抗为 1:2000 倍稀释的 FITC 标记的羊抗鼠抗体。同时设未接种病毒的 Sf9 细胞为阴性对照。

(3) Western-blot 检测。参考文献[13]介绍的方法进行, 一抗为鼠抗鸡新城疫病毒阳性血清, 二抗为 1:2 000 倍稀释的辣根过氧化物酶(HRP)标记的羊抗鼠 IgG。

**1.2.7 动物免疫** 将 7 日龄 SPF 健康雏鸡 60 只随机分为 3 组, 每组 20 只。HN+弗氏完全佐剂组雏鸡胸部及腿部四点肌肉注射 0.1  $\mu$ g mL<sup>-1</sup> 的重组蛋白; La sota 活疫苗组滴鼻、点眼免疫, 阴性对照组胸部及腿部四点肌肉注射 PBS。分别在 7 日龄进行第 1 次免疫、21 日龄进行第 2 次免疫, 然后分别于 7、21 和 35 日龄采血, 分离血清 -20℃保存, 用间接血凝试验测新城疫抗体效价。

**1.2.8 攻毒保护试验** 上述 35 日龄所有免疫雏鸡用 NDV JSXZ 株进行攻毒, 滴鼻、点眼接种, 100  $\mu$ L 只<sup>-1</sup>, 按组隔离饲养, 逐日详细观察至攻毒后 7 d, 统计发病数和死亡数, 计算免疫保护率。

## 2 结果与分析

### 2.1 NDVHN 基因的扩增

以 RT-PCR 产物 cDNA 为模板扩增 NDVHN 基因, 用 1% 琼脂糖凝胶电泳, 得到 1 条 1716 bp 的 DNA 目的片段, 大小与预期片段的大小一致(图 1)。

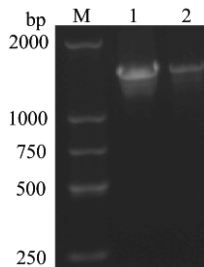
### 2.2 重组质粒的鉴定

质粒 PCR 产物片段长约 1716 bp, 与预期 PCR 产物一致。阳性质粒序列测定结果与原 HN

基因序列完全一致。双酶切载体和目的片段位置也与预期一致(图 2)。

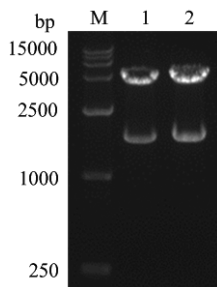
### 2.3 重组转座阳性质粒 PCR 的鉴定

用通用引物 M13 对重组质粒进行 PCR 鉴定, 阳性质粒约为 4146 bp (图 3)。



M: DL2 000 DNA 分子标准; 1-2: HN 基因 PCR 产物  
M: DNA Marker DL2 000; 1-2: PCR product of HN fragment  
图 1 NDVHN 基因 PCR 扩增产物

Figure 1 Identification of the NDV fragment HN by PCR



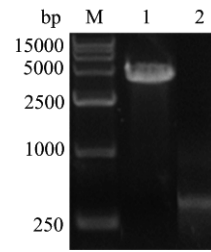
M: DL15000 DNA 分子标准; 1-2: 质粒 HN-pFast HTA 的 *Eco*R I 和 *Kpn* I 酶切产物  
M: DNA Marker DL15000; 1-2: Restriction analysis of HN-pFastBacHTA plasmid

图 2 HN-pFast HTA 的酶切鉴定

Figure 2 Identification of transfer vector of HN-pFast HTA

### 2.4 转染后的细胞病变

用 HN-1 和 HN-2 引物, 扩增病毒基因组 DNA, 得到特异的约 1716 bp 的 PCR 产物(图 4), 表明 HN 基因已经重组到杆状病毒中。



M: DL15 000 DNA 分子标准; 1-2: PCR 鉴定 HN-Bacmid 产物; 3: 未重组质粒 PCR 产物

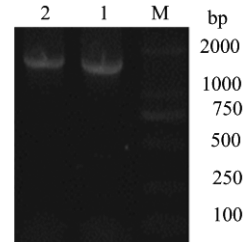
M: DNA Marker DL15 000; 1-2: Identification of PCR HN-Bacmid products; 3: PCR of non-recombinant plasmid

图 3 重组穿梭载体 F-Bacmid 的 PCR 鉴定

Figure 3 Identification of recombinant vector HN-Bacmid by PCR

### 2.5 重组病毒的鉴定

转染 24 h 后, 可观察到细胞停止生长, 细胞直径变大, 细胞核增大且充满细胞浆, 随着转染时间延长, 细胞边缘模糊, 72 h 后细胞逐渐破碎(图 5)。

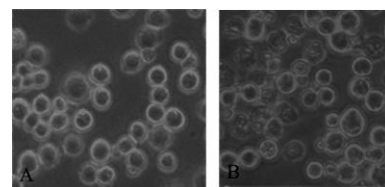


M: DL2 000 DNA 分子标准; 1-2: PCR 鉴定 HN-BV 重组病毒

M: DNA Marker DL15 000; 1-2: Recombinant HN-bacmid virus PCR product

图 4 PCR 鉴定 HN-BV 重组病毒 DNA

Figure 4 Identification of recombinant HN-BV by PCR

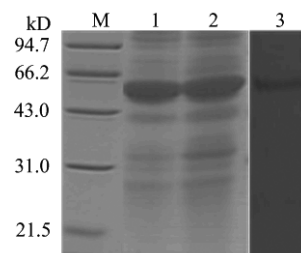


A: 正常 Sf9 昆虫细胞对照; B: HN-BV 感染的 Sf9 昆虫细胞

A: Normal Sf9 insect cell control; B: HN-BV infected Sf9 insect cells

图 5 重组杆状病毒 HN-BV 感染 Sf9 昆虫细胞

Figure 5 Sf9 cells infected by the recombinant baculovirus HN-BV



M: 蛋白分子量标准; 1-2: 重组杆状病毒感染的细胞裂解产物; 3: Western blot 检测表达产物

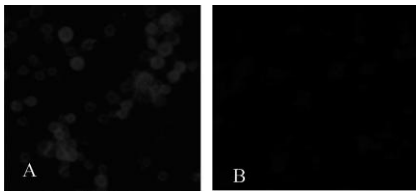
M: protein maker; 1-2: Split product of cells infected with recombinant baculovirus; 3: Western blot analysis of expression product

图 6 表达产物的 SDS-PAGE 及 Western-blot 分析结果  
Figure 6 SDE-PAGE and Western blot analysis of expression product

## 2.6 重组蛋白的表达与检测

### 2.6.1 重组蛋白 SDS-PAGE 及 Western-blot 试验

重组病毒 HN-Bacmid 感染的细胞裂解物 12.5% 分离胶进行 SDS-PAGE, 结果在 Mr 60000 左右可见明显的表达产物, 与预期产物的大小一致。Western-blot 试验结果表明, 重组病毒表达蛋白中有特异性条带出现(图 6)。



A: HN BV infected Sf9 cells; B: Non-infected Sf9 cells

图 7 荧光显微镜下检测到表达蛋白的细胞

Figure 7 Identification of the HN protein expression by IFA

**2.6.2 间接免疫荧光法检测** 以鼠抗鸡新城疫病毒阳性血清为一抗, 1:2000 倍稀释的 FITC 标记的羊抗鼠抗体为二抗, 通过 IFA 试验检测重组 HN 蛋白的表达经检测, 重组病毒表达蛋白有绿色荧光产生(图 7)。

### 2.7 ELISA 检测抗体滴度

用纯化的重组 HN 蛋白包被酶联板进行抗体检测, 结果阴性血清均无反应, 证明了该蛋白的特异性; 重组 HN 蛋白组可诱导鸡产生特异性抗 NDV 抗体, 初免后 14 d 及二免后 14 d 血清抗体检测结果分别显示, NDV 活疫苗(Lasota)组、重组 HN 蛋白免疫组与阴性对照组相比差异极显著, 见表 1。

### 2.8 攻毒保护试验

重组 HN 蛋白免疫组的强毒攻击保护率达到 75%, La sota 疫苗组的攻击保护率为 80%, 均明显高于阴性对照组的 5%, 见表 2。

表 1 各组血清抗体效价检测值

Table 1 Detection values of serum antibody titer in groups

组别 Group	免疫前 Before immunity	初免后 14 d 14 days after primary immunity	二免后 14 d 14 days after secondary immunity
PBS	<1:2	<1:2	<1:2
La sota 疫苗 La sota vaccine	<1:2	1:16~1:32*	1:32~1:64*
HN+弗氏完全佐剂 HN plus FCA	<1:2	1:16~1:32*	1:32~1:64*

注: \* La sota 疫苗组、HN+弗氏完全佐剂组与 PBS 组比较有显著差异( $P < 0.05$ )。下同。

Note: \* means the differences between La sota, HN + FCA and PBS groups are significant different at the 0.05 level. The same below.

表 2 各组攻毒保护试验结果

Table 2 Protest test result of groups

项目 Item	组别 Group			
	PBS	La sota 疫苗 La sota vaccine	HN+弗氏完全佐剂 HN plus FCA	
发病率 Incidence	20/20	18/20	19/20	
死亡率 Mortality	19/20	4/20	5/20	
存活保护率/% Survival rate	5	80*	75*	

## 3 讨论

尽管 NDV 只有一个血清型, 但其包多个基因型, 其中基因 VII 型为国内流行的优势基因型<sup>[14]</sup>。研究表明 NDV 强毒株在高 HI 抗体水平下, 鸡群仍有 ND 的发生, 这可能是在免疫压力的条件下强毒株的抗原性发生了变异, 造成了免疫失败, 而且目前新城疫的临床表现形式出现了非典型性, 感染范围出现扩大趋势, 这些都要求研制出高效的疫苗<sup>[15-16]</sup>。

杆状病毒具有高度的种属特异性, 对脊椎动物

无感染性, 其表达的产物具有较高生物安全性<sup>[17]</sup>。序列对比研究发现, NDV JSXZ 株为我国流行的优势基因 VII 型<sup>[18]</sup>, 与目前常用的预防 ND 的 LaSota 和 Clone30 弱毒疫苗的基因型差别较大。针对基因 VII 型 NDV 在我国广泛流行并结合目前 VII 型强毒为多宿主共同感染的现状, 为解决 NDV 抗原变异导致的免疫失败问题, 本研究利用杆状病毒表达系统构建了表达基因 VII 型 NDV JSXZ 株 HN 基因的重组杆状病毒, 成功地表达了 NDV HN 蛋白, 所表达的蛋白相对分子质量约为 60 kD。Western-blot 试验及

间接免疫荧光试验结果表明, 利用杆状病毒表达系统能够正确地表达 NDV HN 蛋白。将表达的 HN 蛋白免疫动物, ELISA 检测抗体滴度结果显示, 阴性血清均无反应, 证明了该重组 HN 蛋白的特异性; 重组 HN 蛋白组可诱导鸡产生特异性抗 NDV 抗体, 初免后 14 d 及二免后 14 d 血清抗体检测结果分别显示, NDV 活疫苗(Lasota)组、重组 HN 蛋白免疫组与阴性对照组相比差异极显著。攻毒保护试验结果显示, 重组 HN 蛋白免疫组的强毒攻击保护率达到 75%, 与 La sota 疫苗组的保护率(80%)接近, 明显高于阴性对照组的 5%。以上结果表明, 本研究表达的重组 NDV HN 蛋白具有良好的免疫原性及保护性, 为 NDV 新型亚单位疫苗的研究奠定基础。

### 参考文献:

- [1] 甘孟侯. 中国禽病学[M]. 北京:中国农业出版社, 1997: 1-10.
- [2] 胡思科, 席瑞珍, 任涛, 等. 4 株新城疫病毒 F 蛋白和 HN 蛋白的计算机建模与表面抗原分析[J]. 华南农业大学学报, 2013, 34(1): 87-92.
- [3] SAIF Y M. 禽病学[M]. 苏敬良, 高福, 索勋, 译. 11 版. 北京: 中国农业出版社, 2005: 5-9.
- [4] LIU X F, WAN H Q, NI X X, et al. Pathotypical and genotypical characterization of strains of Newcastle disease virus isolated from outbreaks in chicken and goose in some regions of China during 1985-2001[J]. Arch Virol, 2003, 148(7): 1387-1403.
- [5] 刘开春, 孟春春, 陈素娟, 等. 两株不同宿主来源的基因 VII 型新城疫病毒的生物学特性比较及全基因组序列分析[J]. 中国预防兽医学报, 2015, 37(5): 89-92.
- [6] PALDURAI A, KUMAR S, NAYAK B, et al. Complete genome sequence of highly virulent neurotropic Newcastle disease virus strain Texas GB[J]. Virus Genes, 2010, 41(1): 67-72.
- [7] COREY E A, MIRZA A M, LEVANDOWSKY E, et al. Fusion deficiency induced by mutations at the dimer interface in the Newcastle disease virus hemagglutinin- neuraminidase is due to a temperature-dependent defect in receptor binding[J]. J Virol, 2003, 77(12): 6913-6922.
- [8] 王斌, 刘培欣, 李涛, 等. 抗新城疫病毒 HN 蛋白单链抗体的原核表达及其功能鉴定[J]. 中国预防兽医学报, 2014, 36(5): 383-386.
- [9] FUTATSUMORI-SUGAI M, TSUMOTO K. Signal peptide for improving recombinant protein secretion in the baculovirus expression vector system[J]. Biochem, 2010, 391(1): 931-935.
- [10] KATHY H, SOMEET N, SOWMYA P, et al. False positive reactivity of recombinant, diagnostic, glycoproteins produced in High Five insect cell: Effect of glycosylation[J]. Immunol Methods, 2008, 330(1/2): 130-136.
- [11] 王桂军, 秦爱建, 邵红霞, 等. 新城疫病毒 F 蛋白在昆虫细胞中的表达及其融细胞作用[J]. 中国病毒学, 2006, 21(6): 571-574.
- [12] 徐鹏卫, 郭建强, 姚立红, 等. 共表达甲型流感病毒 M1 和 HA 抗原的重组杆状病毒的构建[J]. 病毒学报, 2012, 28(3): 231-235.
- [13] 隋修锬, 金红岩, 李文超, 等. 小反刍兽疫病毒 H 基因在杆状病毒中的表达及其免疫原性研究[J]. 畜牧兽医学报, 2014, 45(6): 974-980.
- [14] 孙敏华, 董嘉文, 李林林, 等. 一株基因 VII b 亚型新城疫病毒 F 和 HN 基因的序列分析[J]. 中国预防兽医学报, 2013, 35(1): 74-76.
- [15] 刘佳佳, 严专强, 刘迪, 等. 新城疫病毒广东基因 VII 型分离株的分离鉴定及 F 基因克隆与序列分析[J]. 动物医学进展, 2013, 34(10): 50-53.
- [16] 金宁一, 鲁会军, 金扩世. 新城疫病毒变异进化与跨种感染[J]. 中国家禽, 2010, 32(7): 1-5.
- [17] 查云峰, 徐兴然, 肖昌, 等. 猪瘟病毒 E2 基因在昆虫细胞中的分泌表达及活性检测[J]. 畜牧兽医学报, 2005, 36(10): 1100-1105.
- [18] 王善辉, 谢金文, 王文秀, 等. NDV 江苏分离株 F 基因的克隆与序列分析[J]. 中国动物检疫, 2014, 31(3): 64-67.