

斑点叉尾鲴病毒囊膜蛋白 ORF6 在昆虫细胞中的表达

黄锋涛¹, 熊海林¹, 曹胜波², 熊传喜¹, 王敏¹,
王卫民¹, 吴兵¹, 刘玉林¹, 刘学芹^{1*}

(1. 华中农业大学水产学院农业动物遗传育种与繁殖教育部重点实验室, 湖北 武汉 430070;
2. 华中农业大学动物医学院, 湖北 武汉 430070)

摘要: 为构建基于杆状病毒表达系统的 CCV 新型亚单位疫苗, 将 CCV 的囊膜蛋白基因 ORF6 克隆至杆状病毒转座载体 pFastBacTM 1 质粒中, 并将阳性重组转座质粒转化进含穿梭载体 Bacmid 的感受态细胞 DH10Bac 中, 获得重组子 rBacmid-ORF6。在脂质体介导下将该重组子转染 sf9 昆虫细胞, 获得重组杆状病毒 AC-ORF6。AC-ORF6 感染的 sf9 昆虫细胞, 经超薄切片电镜观察, 可见重组杆状病毒呈多粒包埋, 经间接免疫荧光、Western-blotting 检测, CCV 的 ORF6 蛋白可以在感染了 AC-ORF6 的 sf9 细胞中表达。研究表明, 获得了插入 ORF6 基因的重组杆状病毒, 并且该基因可以在重组杆状病毒介导下在昆虫细胞中表达, 从而为基于 CCV ORF6 的杆状病毒亚单位疫苗研究奠定了基础。

关键词: 斑点叉尾鲴病毒; ORF6 蛋白; 杆状病毒; 昆虫细胞; 表达

中图分类号: Q 785; S 941.41

文献标识码: A

斑点叉尾鲴病毒 (channel catfish virus, CCV) 属于 α 疱疹病毒, 由 Ken 于 1971 年首次报道^[1], 是严重危害斑点叉尾鲴养殖的一种重要病原。该病毒主要感染斑点叉尾鲴 (*Ictalurus punctatus*) 鱼苗, 引起严重的急性出血性疾病, 并可导致 40% ~ 90% 的鱼苗死亡。虽然, 该病毒对成鱼的致病力较弱, 但成鱼仍可隐性感染, 并成为传染源^[2]。

我国于上世纪 80 年代从美国引进斑点叉尾鲴, 目前许多地区开展了斑点叉尾鲴的养殖, 并且规模在不断扩大^[3]。尽管我国目前尚无 CCV 的正式报道, 但近年来, 国内已有疑似疾病的大面积流行和发病^[4], 因此, 开展 CCV 疫苗研究, 对于该病的预防和控制具有重要意义。

杆状病毒表达系统是当今基因工程四大表达系统之一。其表达产物可进行翻译后加工, 其抗原性、免疫原性和功能等生物活性与天然蛋白相似, 在疫苗研制中具有良好前景。目前已有大量

的重组蛋白在昆虫细胞中得以表达, 并且验证具有很好的免疫原性, 许多产品已完成临床实验, 并很有可能通过美国 FDA 批准^[5]。

ORF6 是 CCV 的重要囊膜蛋白^[6], 具有较好的免疫原性, 是疫苗和诊断试剂研发的主要靶蛋白。本研究利用 Bac-to-Bac 杆状病毒表达系统, 在昆虫细胞中表达了 CCV ORF6 基因, 从而为基于 ORF6 基因的杆状病毒亚单位疫苗研制奠定基础。

1 材料与方法

1.1 材料

质粒、菌株及细胞 含 CCV ORF6 重组质粒 pGEM-TORF6 本实验室刘玉林博士构建; 载体质粒 pFastBacTM 1 及 DH10Bac 由华中农业大学肖少波博士赠送; 昆虫细胞 sf9 由中国科学院武汉病毒所王华林博士赠送; DH5 α 购自北京全式金生物技术有限公司。

收稿日期: 2010-03-03 修回日期: 2010-05-10

资助项目: 国家自然科学基金项目(30901118); 教育部新教师基金项目(20070504047); 湖北省自然科学基金项目(2008CBB099); 华中农业大学教师启动基金项目(2006XRC047)

通讯作者: 刘学芹, Tel: 027-87282676, E-mail: xueqinliu@mail.hzau.edu.cn

工具酶及化学试剂等 LA-Taq 酶、限制酶、T4 DNA 连接酶均购自大连宝生物工程有 限公司;HRP-DAB 底物显色试剂盒购自武汉博士 德生物工程有限公司;昆虫细胞培养基及脂质体 转染试剂,FITC 标记的羊抗兔荧光二抗购自美国 Invitrogen 公司;抗 CCV ORF6 蛋白的多抗血清由 本实验室制备。

1.2 重组转移载体 pFast-ORF6 的构建

用 *EcoR* I 和 *Xho* I 双酶切 pGEM-TORF6 质粒,将切下来的目的基因 CCV ORF6 连接到 pFastBac™ 1 质粒的相应位点,转化感受态 DH5 α 细胞得到重组质粒 pFast-ORF6,用 *EcoR* I 酶切 鉴定,将酶切鉴定正确的质粒,送至英骏生物技术 有限公司测序鉴定。

1.3 重组子 rBacmid-ORF6 的构建

用重组转移质粒 pFast-ORF6 转化感受态 DH10Bac 细胞,在含有卡那霉素、庆大霉素、四环素 三种抗性及 IPTG、X-gal 的平板上,通过蓝白斑筛选 重组子。将挑取的白色菌落,经含有相同抗生素的 液体 LB 培养基摇菌过夜,提取重组子 rBacmid- ORF6,用 Invitrogen 公司 Bac-to-Bac 表达系统操作 手册提供的通用引物 PUC/MI3 进行 PCR 鉴定,获 得正确的重组子,命名为 rBacmid-ORF6。

1.4 重组杆状病毒的制备

用碱法提取重组子 rBacmid-ORF6 DNA 及野 生型 bacmid DNA,按 Invitrogen 公司 Bac-to-Bac 表达系统操作手册,将 rBacmid-ORF6 DNA 与 bacmid DNA 分别在脂质体介导下转染对数生长 期的 sf9 昆虫细胞,经过三轮感染,获得高滴度重 组杆状病毒和野生型杆状病毒。

1.5 重组杆状病毒超薄切片电子显微镜观察

将重组杆状病毒感染 sf9 细胞 72 h 后,弃掉 培养液,加 2.5% 的戊二醛固定 15 min。将 sf9 细 胞刮集于 1.5 mL 的 EP 管中,2 000 r/min 离心 15 min,弃上清,将细胞沉淀送由中国科学院 武汉病毒研究所完成切片及电子显微镜操作。

1.6 间接免疫荧光分析目的蛋白的表达

重组杆状病毒感染 sf9 细胞 72 h 后,用 PBS 洗 3 次,100% 甲醇固定 15 min。PBS 洗 3 次后, 用含 1% 的 BSA 与 5% 羊血清于室温封闭 0.5 h 后,加入抗 CCV ORF6 兔多抗血清(1:50 稀释) 室温作用 2 h,PBS 洗 3 次,加 FITC 标记的羊抗兔 荧光二抗(1:250 稀释)室温作用 1 h,再经 PBS

洗 3 次,加 DAPI(1:500 稀释),PBS 洗 3 次,于倒 置荧光显微镜下观察。同时,设野生型杆状病毒 感染的 sf9 细胞作对照。

1.7 Western-blotting 鉴定表达的目的蛋白

用获得的重组杆状病毒和野生型杆状病毒,分 别接种于对数生长的 sf9 昆虫细胞,经 72 h 感染, 收集感染的 sf9 昆虫细胞,PBS 洗三次后加入裂解 液裂解细胞,经 SDS-PAGE 电泳后,转至硝酸纤维 薄膜,用含 5% 脱脂牛奶与 1% BSA 的 TBST 封闭 1 h 后,加入抗 CCV ORF6 兔多抗血清(1:50 稀释), 于室温摇床孵育 2 h,TBST 洗 3 次,每次 5 min,然 后加入 HRP 标记的羊抗兔 IgG(1:400 稀释),于室 温摇床孵育 1 h,后经 TBST 洗 3 次后,加入 DAB 显色,用成像系统进行拍照。

2 结果

2.1 重组转座载体 pFast-ORF6 的构建及酶切 鉴定

将 pGEM-TORF6 质粒用 *EcoR* I 和 *Xho* I 双酶 切后,得到约 420 bp 的目的片段 CCV ORF6。将该 片段连接到用相同内切酶酶切的 pFastBac™ 1 质 粒上,构建得到重组转移载体 pFast-ORF6。将 pFast-ORF6 载体经 *EcoR* I 单酶切后,切出约 5 200 bp 的片段,与预期的大小相符(图 1)。经测序通过 序列分析,进一步验证目的基因正确的插入到载体 中,并且 ORF6 基因序列无误。

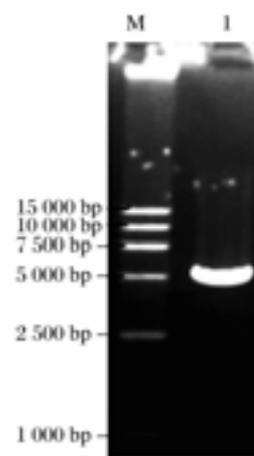


图 1 重组质粒 pFast-ORF6 的酶切鉴定

M:DL 15 000 Marker; 1:pFast-ORF6 载体 *EcoR* I 单酶切 产物。

Fig. 1 Identification of plasmid pFast-ORF6

M:DL 15 000 Marker; 1:pFast-ORF6 digested by *EcoR* I.

2.2 重组子 rBacmid-ORF6 DNA 的构建

用重组转移载体 pFast-ORF6 转化 DH10Bac 细胞,通过蓝白斑筛选得到重组子 rBacmid-ORF6。提取 rBacmid-ORF6 DNA,用通用引物 PUC/M13 扩增出了约 2 700 bb 的目的条带,以野生型杆状病毒 Bacmid DNA 作对照扩增出了 300 bp 的片段,与预期相符,表明 pFast-ORF6 载体与野生型 Bacmid 成功发生转座,将目的基因 CCV ORF6 正确的整合到了杆状病毒基因组上(图 2)。

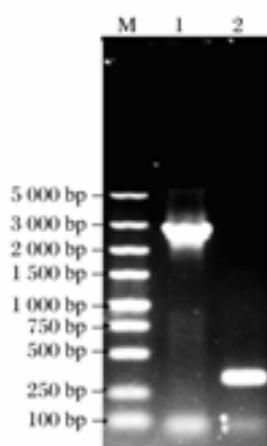


图 2 重组子 rBacmid-ORF6 DNA PCR 鉴定

M:DL5 000 Marker; 1:rBacmid-ORF6 PCR 产物; 2:野生型 Bacmid PCR 产物。

Fig. 2 Identification of rBacmid-ORF6 by PCR

M:DL5 000 Marker; 1:PCR amplification product of rBacmid-ORF6; 2:PCR amplification product of wild type bacmid.

2.3 重组杆状病毒的获得及鉴定

重组子 rBacmid-ORF6 DNA 通过脂质体介导转染 sf9 细胞,经 3 轮感染后,获得高滴度的重组杆状病毒,取 200 μ L 含重组杆状病毒的培养液,提取重组杆状病毒基因组,经通用引物 PUC/M13 扩增出了约 2 700 bp 的片段,证明正确获得了重组杆状病毒(图 3),将该病毒命名为 AC-ORF6。用获得的 AC-ORF6 感染 sf9 细胞 72 h 后,可以看到细胞有明显的病变(如图中箭头所示)。病变的细胞变圆变大,有许多细胞裂解(图 4)。

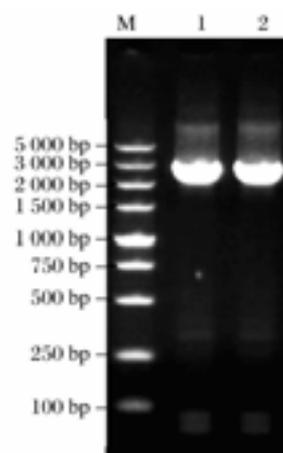


图 3 重组杆状病毒 AC-ORF6 的 PCR 鉴定

M:DL5 000 Marker; 1,2:AC-ORF6 PCR 产物。

Fig. 3 Identification of AC-ORF6 by PCR

M:DL5 000 Marker; 1,2:PCR amplification product of AC-ORF6.

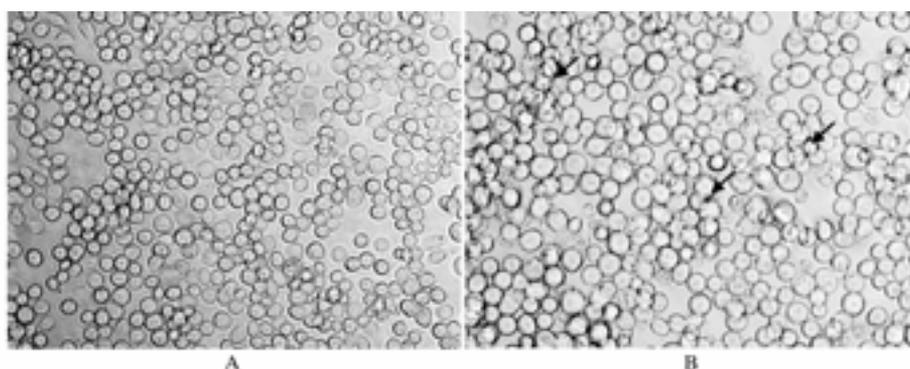


图 4 AC-ORF6 感染昆虫细胞后与正常细胞的对照(400 \times)

A:未被 AC-ORF6 感染的昆虫细胞; B:感染 AC-ORF6 72 h 后的昆虫细胞。

Fig. 4 Comparison of uninfected cells and infected cells by AC-ORF6 (400 \times)

A:Uninfected sf9 cells; B:Sf9 cells infected by AC-ORF6.

2.4 重组杆状病毒超薄切片观察

AC-ORF6 感染 sf9 细胞后,经超薄切片,电子显微镜观察。本研究所使用的杆状病毒表达载体

属于多粒包埋型,在感染的细胞核中复制。从图 5 中可以看到(如图中箭头所示),大量的杆状病毒在 sf9 细胞核中复制,并且每个囊膜包裹着多个病毒

粒子,说明成功地获得了大量的重组杆状病毒 AC-ORF6。

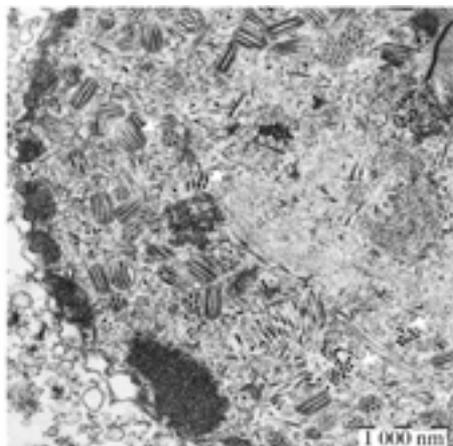


图5 AC-ORF6 感染 sf9 细胞电镜观察
Fig.5 Electron microscopic analysis of AC-ORF6 infection of sf9 cells

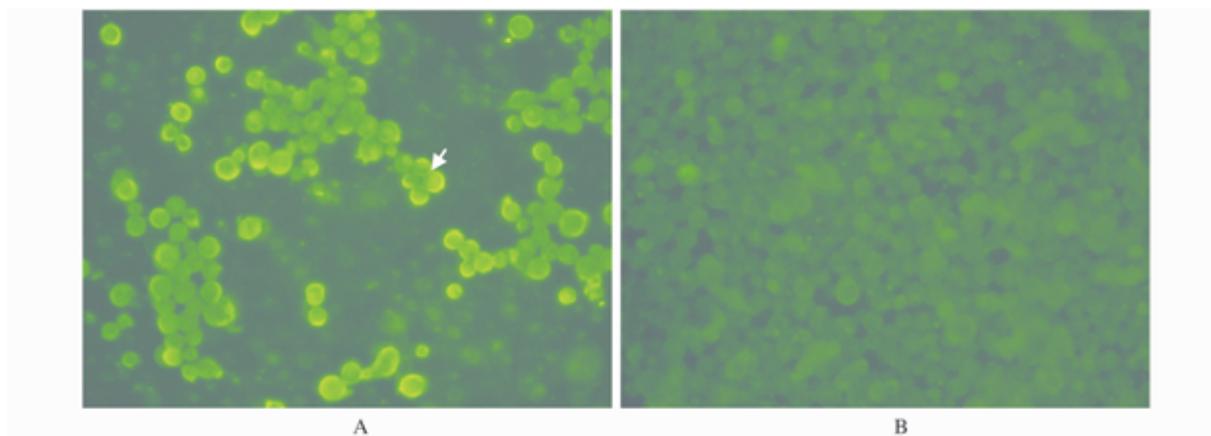


图6 间接免疫荧光检测 CCV ORF6 在昆虫细胞中的表达(400 ×)

A:感染 AC-ORF6 72 h 后的昆虫细胞; B:被野生型杆状病毒感染的昆虫细胞。

Fig.6 CCV ORF6 protein were detected by indirect immunofluorescence assay in sf9 cells(400 ×)

A: sf9 cells infected by AC-ORF6; B: sf9 cells infected by wild type baculovirus.

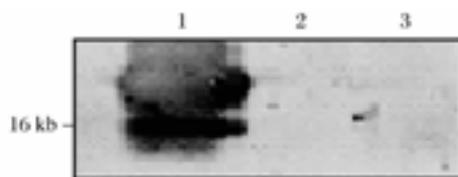


图7 Western-blotting 分析 CCV ORF6 在昆虫细胞中的表达

1: AC-ORF6 感染的昆虫细胞; 2: 野生杆状病毒感染的昆虫细胞; 3: 正常昆虫细胞。

Fig.7 Identification of CCV ORF6 protein by Western-blotting in sf9 cells

1: infected sf9 cells by AC-ORF6; 2: infected sf9 cells by wild type baculovirus; 3: uninfected sf9 cells.

2.5 表达产物的间接免疫荧光检测

用收集的第三代重组杆状病毒 AC-ORF6 感染 sf9 细胞 72 h 后,进行间接免疫荧光试验,同时以野生型杆状病毒(AcNPV)感染的 sf9 细胞作对照,结果显示,感染 AC-ORF6 的细胞呈现出强的绿色荧光(如图 6 中箭头所示),而感染野生型杆状病毒的细胞只有很弱背景荧光(图 6),说明 ORF6 基因在 sf9 细胞中得到了表达。

2.6 表达产物的 Western-blotting

收集经第三代重组杆状病毒 AC-ORF6 感染 72 h 后病变的细胞,经 SDS-PAGE 电泳后,转醋酸纤维薄膜,经 Western-blotting 分析,结果可以看到约 16 ku 处有一条带,略大于目的蛋白 14.6 ku 的理论值,而在野生型杆状病毒(AcNPV)感染的 sf9 细胞和正常 sf9 细胞作对照组,此处无特异性的带,证明目的蛋白成功的在昆虫细胞中得到表达(图 7)。

3 讨论

本研究利用杆状病毒表达系统成功构建了重组杆状病毒 AC-ORF6,并表达了 CCV ORF6 蛋白,通过电镜观察,可以看到杆状病毒呈多粒包埋,并且在细胞核中大量的复制。同时,通过间接免疫荧光和 Western-blotting 检测到了目的蛋白质。说明获得了重组杆状病毒,并且 CCV 的 ORF6 蛋白实现了在昆虫细胞中的表达。

在进行 Western-blotting 试验时,我们发现 ORF6 表达蛋白的实际大小约为 16 ku,比理论值 14.6 ku 略大,这可能是由于蛋白质糖基化造成的。

因为杆状病毒表达系统,可以对表达的蛋白同时进行 N-和 O-两种糖基化^[7]。同时,我们也发现利用该表达系统所表达的蛋白质含量并不高,以至于在 SDS-PAGE 电泳后的胶通过考马斯亮蓝染色并不能观察到明显的目的蛋白带。1998 年, Kucuktas 等^[8]利用杆状病毒表达系统表达 CCV ORF59 蛋白时,也发现目的蛋白质的表达量不高。我们推测这可能与 sF9 细胞密码子偏爱性有关,可以通过基因的密码子优化来提高表达产量^[9]。

斑点叉尾鮰适应范围广,易饲养,味道鲜美,是一种优良的养殖品种。为防治 CCV,国外早在上个世纪就有了关于 CCV 疫苗的研究。先后有 CCV 基因缺失疫苗、弱毒疫苗和 DNA 疫苗的研究报道^[6,10-11]。自上个世纪 80 年代我国首次引进斑点叉尾鮰以来,其养殖面积迅速扩大,并成为我国出口创汇的重要鱼类品种之一,但我国在 CCV 疫苗的研究尚处于起步阶段。尽管我国尚无 CCV 流行爆发的正式报道,但近年来已有 CCV 疑似疫情发生,并造成了巨大经济损失^[3-4],因此,研制 CCV 疫苗,对于保障斑点叉尾鮰的健康养殖迫在眉睫。

目前杆状病毒表达系统以独特的优点在哺乳动物疫苗研究中展示了十分广阔的应用前景。迄今为止,杆状病毒表达载体系统已应用到多种疫苗研究中,尤以病毒疫苗为多,包括针对乙脑病毒、猪瘟病毒、口蹄疫病毒、猪圆环病毒等多种病毒的疫苗,其中针对猪瘟病毒的亚单位疫苗已被批准进行商品化生产,针对猪圆环病毒二型的疫苗已通过加拿大食品监督部门评估^[12-15]。同样,近年来,人们也已把杆状病毒载体用于鱼类疫苗的研究。目前,已有报道利用杆状病毒载体表达的传染性造血器官坏死症病毒 (IHNV) 糖蛋白在浸泡条件下能够诱发极小鱼苗的保护性免疫反应^[16],罗卫等^[17]在 Sf9 细胞中成功的表达了病毒性神经坏死病毒 (VNNV) 的衣壳蛋白,其具有良好的免疫学活性。这些研究表明,利用杆状病毒表达系统研制鱼类疫苗将可能是鱼类疫苗创制的一个新领域。本研究利用杆状病毒表达系统成功的表达了 CCV ORF6 蛋白,从而为制备 CCV 新型疫苗奠定了基础。

参考文献:

- [1] Wolf K, Darlington R W. Channel catfish virus: a new herpesvirus of ictalurid fish[J]. J Virol, 1971, 8 (4): 525 - 533.
- [2] Gray W L, Williams R J, Jordan R L, et al. Detection of channel catfish virus DNA in latently infected catfish[J]. J Gen Virol, 1999, 80(7): 1817 - 1822.
- [3] 刘玉林,王敏,王卫民. 斑点叉尾鮰病毒性疾病综述[J]. 水利渔业, 2006, 26(6): 84 - 96.
- [4] 孟彦,肖汉兵,曾令兵. 斑点叉尾鮰病毒病研究概述[J]. 淡水渔业, 2007, 37(5): 72 - 75.
- [5] Hu Y C, Yao K, Wu T Y. Baculovirus as an expression and/or delivery vehicle for vaccine antigens[J]. Expert Rev Vaccines, 2008, 7(3): 363 - 371.
- [6] Nusbaum K E, Smith B F, DeInnocentes P, et al. Protective immunity induced by DNA vaccination of channel catfish with early and late transcripts of the channel catfish herpesvirus (IHV-1) [J]. Vet Immunol Immunopathol, 2002, 84 (3 - 4): 151 - 168.
- [7] 张鹏飞, Smith J, Marcus-Sekura C. 杆状病毒系统表达信号肽序列依赖糖基化的 EBVgp350 片段[J]. 中华微生物学和免疫学杂志, 1995, 15 (3): 210 - 213.
- [8] Kucuktas H, Brady Y J, Tuzun S. Cloning and expression of a putative glycoprotein gene of channel catfish virus using baculovirus expression system [J]. Dis Aquat Organ, 1998, 34(3): 231 - 237.
- [9] 宋敬东,王健伟,王敏,等. 昆虫细胞偏爱密码子优化的 HPV16L1 基因在昆虫和哺乳动物细胞中的表达[J]. 中国病原生物学杂志, 2007, 2 (4): 247 - 251.
- [10] Vanderheijden N, Alard P, Lecomte C, et al. The attenuated V60 strain of channel catfish virus possesses a deletion in ORF50 coding for a potentially secreted glycoprotein[J]. Virology, 1996, 218(2): 422 - 426.
- [11] Harbottle H, Plant K P, Thune R L. DNA vaccination against channel catfish virus results in minimal immune response and is not efficacious against challenge [J]. Journal of Aquatic Animal Health, 2005, 17(3): 251 - 262.
- [12] Li Y M, Ye J, Cao S B, et al. Immunization with pseudotype baculovirus expressing envelope protein of Japanese encephalitis virus elicits protective immunity in mice [J]. Journal of Gene Medicine, 2009, 11(1): 150 - 159.
- [13] Xu X G, Liu H J. Baculovirus surface display of E2 envelope glycoprotein of classical swine fever virus and immunogenicity of the displayed proteins in a mouse model [J]. Vaccine, 2008, 26 (43):
- [1] Wolf K, Darlington R W. Channel catfish virus: a new herpesvirus of ictalurid fish[J]. J Virol, 1971, 8

- 5455 – 5460.
- [14] Tami C, Peralta A, Barbieri R, *et al.* Immunological properties of FMDV-gP64 fusion proteins expressed on SF9 cell and baculovirus surfaces [J]. *Vaccine*, 2004, 23(6):840 – 845.
- [15] Yu-Chen H, Kun Y, Tzong-Yuan W. Baculovirus as an expression and/or delivery vehicle for vaccine antigens [J]. *Expert Review of Vaccines*, 2008, 7(3):363 – 371.
- [16] 袁野,王秀丽,郭设平. 鱼用基因工程疫苗载体的研究进展 [J]. *生物技术通报*, 2008, 5:31 – 34.
- [17] 罗卫,田飞炎,刘荭,等. 鱼类病毒性神经坏死病毒衣壳蛋白在昆虫细胞中的表达及其特性 [J]. *水产学报*, 2008, 32(4):651 – 656.

Expression of channel catfish virus ORF6 gene in insect cells

HUANG Feng-tao¹, XIONG Hai-lin¹, CAO Sheng-bo², XIONG Chuan-xi¹,
WANG Min¹, WANG Wei-min¹, WU Bing¹, LIU Yu-lin¹, LIU Xue-qin^{1*}

(1. Key Lab of Agricultural Animal Genetics, Breeding and Reproduction of Ministry of Education,
College of Fisheries, Huazhong Agricultural University, Wuhan 430070, China;
2. College of Veterinary Medicine, Huazhong Agricultural University, Wuhan 430070, China)

Abstract: Channel catfish virus (CCV) is a pathogen of channel catfish. This virus can cause severe hemorrhagic disease in young channel catfish and cause major losses to fish farmers. As no efficacious treatment exists, a vaccine against CCV is essential for prevention and control of this disease. Recently, the baculovirus was described as an attractive gene delivery vehicle and a potential vector for vaccine development. In order to express the membrane protein of the CCV ORF6 gene in insect cells, ORF6 gene was subcloned into baculovirus transfer vector (pFastBacTM1). The recombinant plasmid pFast-ORF6 was identified by restriction enzyme digestion and gene sequencing. DH10Bac containing baculovirus shuttle vector (bacmid) and helper vector was transformed with recombinant plasmid pFast-ORF6. The recombinant bacmid (rBacmid-ORF6) was identified by blue/white selection and PCR analysis. Then the rBacmid-ORF6 was transfected into sf9 cells with Cellfectin Reagent and recombinant baculovirus was obtained in sf9 cells, named AC-ORF6. AC-ORF6 was multiple-nucleopolyhedrovirus which was observed by electron microscopy in the ultra thin section of infected sf9 cells. After AC-ORF6 infection, the recombinant CCV ORF6 protein was characterized by indirect immunofluorescence assay and Western-blotting. The results showed that ORF6 protein was expressed in sf9 cells and had a molecular mass of 16 ku. This study will provide useful basis for the subunit CCV vaccine development in the future.

Key words: channel catfish virus; ORF6 protein; baculovirus; insect cells; expression

Corresponding author: LIU Xue-qin. E-mail: xueqinliu@mail.hzau.edu.cn