

减毒沙门氏菌为载体在 Vero 细胞中表达 传染性法氏囊病病毒多聚蛋白基因

李 龙^{1,2} 方维焕¹ 樊拥军² 许 健² 方 立¹ 李建荣¹ 于 涟^{1*}

(¹ 浙江大学动物预防医学研究所 杭州 310029; ² 浙江大学生物医学工程学系 杭州 310027)

摘 要 用长距离 RT-PCR 扩增了传染性法氏囊病病毒(infectious bursal disease virus, IBDV)ZJ2000 株多聚蛋白基因,定向克隆入真核表达载体 pCI,电转化 *dam*⁻ 和 *phoP*⁻ 双突变的减毒鼠伤寒沙门氏菌 ZJ111 株,并直接转染 Vero 细胞。RT-PCR 和间接免疫荧光试验可从 Vero 细胞中检测到阳性信号,SDS-PAGE 和 West-blotting 均可检测到 41kD 的蛋白条带。结果表明减毒沙门氏菌可将外源基因导入 Vero 细胞,并进行转录和表达,具有免疫反应性,为进一步研制减毒沙门氏菌为载体的 IBDV 口服 DNA 疫苗打下基础。

关键词 鸡传染性法氏囊病病毒,多聚蛋白,减毒沙门氏菌,基因疫苗载体

中图分类号 Q786 **文献标识码** A **文章编号** 1000-3061(2004)03-0437-04

传染性法氏囊病(Infectious bursal disease, IBD)是由传染性法氏囊病病毒(Infectious bursal disease virus, IBDV)引起的急性、高度接触性传染病。IBDV 主要侵害雏鸡的中枢免疫器官法氏囊,导致免疫抑制和免疫缺陷,同时造成其它疫苗的免疫失败,是目前危害世界养禽业的主要传染病之一^[1]。

免疫接种是 IBD 防治最为有效的手段。随着 IBDV 变异株和超强毒株的出现,IBDV 传统疫苗(弱毒苗和灭活苗)和亚单位疫苗已不能有效防治 IBD。近年来,针对 IBDV 结构蛋白基因设计的 DNA 疫苗受到了广泛关注。已有报道表明 IBDV 多聚蛋白基因 DNA 疫苗具有良好的免疫原性^[2-4]。但由于 DNA 疫苗的免疫途径通常为基因枪轰击或肌肉注射,较为烦琐且成本较高,因此如何寻求实用的禽类 DNA 疫苗的免疫途径,已成为其推广应用急需解决的问题之一。

沙门氏菌(*Salmonella typhimurium*, *S. typhimurium*)是一种较为常见的侵袭性胞内菌,可产生局部或全身感染的胞内病原体。DNA 腺嘌呤甲基化酶(*dam*)和转录激活因子(*phoP*)是控制沙门氏菌毒力的主要因子,*dam* 和 *phoP* 基因突变后可使沙门氏菌毒力显著下降,但不影响其繁殖和侵袭能力。国外学者已用减毒沙门氏菌载体,在真核细胞中成功表达了多种外源基因^[5-7],但利用减毒沙门氏菌递呈禽类 DNA 疫苗的研究刚刚起步。本试验以 *dam*⁻ 和 *phoP*⁻ 双突变的减毒鼠伤寒沙门氏菌 ZJ111 株为载体,构建了含有 IBDV 多聚蛋白基因真核表达质粒的重组菌 ZJ111/pCI-VP2/VP4/VP3,转染哺乳动物细胞,获得了具有免疫反应性的表达产物。

1 材料

1.1 毒株、菌株、载体、细胞株

传染性法氏囊病病毒 ZJ2000 株为本所从杭州某鸡场分离的强毒株;真核表达载体 pCI 购自 Promega 公司;*E. coli* DH5 α 菌株、Vero 细胞株由本所保存。*Salmonella typhimurium* (*S. typhimurium*) ZJ111 减毒株由 SL1344 强毒株突变而来,该菌株系 *dam*⁻ 和 *phoP*⁻ 双突变株,系本所与西班牙 Sevilla 大学分子遗传学系 Josep Casadesus 教授合作构建而成。

1.2 工具酶及试剂

Superscript II preamplification system、Trizol 试剂购自 Invitrogen 公司;限制性核酸内切酶、One Shot LA-PCR Mix、DNA Ligation Kit 均购自 TaKaRa 公司;HRP 标记的羊抗兔 IgG、FITC 标记羊抗兔 IgG 为北京鼎国生物技术发展中心产品;Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM)、胎牛血清(FCS)为 GIBCO 产品;庆大霉素购自 Sigma 公司。兔源 IBDV 抗血清为本所自制。其余试剂均为国产分析纯。

1.3 IBDV 多聚蛋白(VP2/VP4/VP3)基因 cDNA 的 RT-PCR 与真核表达载体的构建

根据已发表的 IBDV A 节段序列,设计一对 VP2/VP4/VP3 基因特异性引物,上游引物 P1 5' CGGAATTCATGACAAACCT-GCAAGATCAA 3',下划线为 *EcoR* I 酶切位点;下游引物 P2: 5' TAGGTACCTCACTCAAGGTCCTCATCAGAGAC 3',下划线为 *Kpn* I 酶切位点;用长距离 RT-PCR 一步扩增 VP2/VP4/VP3 基因 cDNA,方法按照本实验室已有报道进行^[8],PCR 参数为 94℃变性 15 s,59℃退火 30 s,68℃延伸 3 min,共 35 个循环。

收稿日期 2003-11-11,修回日期 2004-02-09。

基金项目 浙江省自然科学基金重大项目基金资助(No. ZA0105)。

* 通讯作者。 Tel 86-571-86971894; Fax 86-571-86971894; E-mail yulian@zju.edu.cn

© 中国科学院微生物研究所期刊联合编辑部 http://journals.im.ac.cn

目的片段定向克隆入 pCI 载体 ,PCR 和酶切鉴定 ,并测序证实 ,重组子命名为 pCI-VP2/VP4/VP3。

1.4 pCI-VP2/VP4/VP3 电转化沙门氏菌

pCI-VP2/VP4/VP3 高压(2.5kV、25μF , 200 ~ 400Ω)电转化沙门氏菌 ,抽提质粒 ,进行 PCR 鉴定 ,阳性质粒热击回转 *E. coli* DH5α ;抽提质粒 PCR 和酶切鉴定 ,将携带有 pCI-VP2/VP4/VP3 的重组沙门氏菌 ZJ111 命名为沙门氏菌 ZJ111/ pCI-VP2/VP4/VP3 ,同时将含有 pCI 空载体的沙门氏菌空白对照命名为 ZJ111/pCI。

1.5 重组沙门氏菌转染 Vero 细胞

6 孔细胞培养板接种 2 × 10⁵ 个 Vero 细胞 ,37℃、5% CO₂ 培养 18 ~ 24h ,至细胞融合度为 40% ~ 60%。将 ZJ111/pCI-VP2/VP4/VP3 和 ZJ111/pCI 分别感染细胞(20 : 1) ,30min 后用 PBS(pH7.4) 洗涤 3 次 ,用含 100mg/L 庆大霉素的 DMEM(5% FCS) 培养 2h ,再改用含 10mg/L 庆大霉素的 DMEM(5% FCS) 继续培养 72h ,观察细胞形态变化。用 0.25% 的胰酶消化 , 1500r/min 离心 5min ,收集细胞 ,以适量 PBS(pH7.4) 悬浮 ,用于检测。

1.6 RT-PCR 检测基因转录

Trizol 试剂抽提细胞总 RNA ,以 IBDV VP2/VP4/VP3 基因特异性引物 P1/P2 进行 RT-PCR 扩增目的片段。

1.7 间接免疫荧光试验法检测蛋白表达

按常规方法进行。ZJ111/ pCI-VP2/VP4/VP3 感染细胞后继续培养 72h ,以免抗 IBDV 血清为一抗 ,FITC 标记羊抗兔 IgG 为二抗 ,检测多聚蛋白表达情况。

1.8 SDS-PAGE 和 Western-blot 检测蛋白表达

Vero 细胞沉淀以适量 PBS 悬浮 ,沸水浴 10min ,6000r/min 离心 10min ,取上清进行 SDS-PAGE。以免抗 IBDV 血清为一抗 ,HRP 标记羊抗兔 IgG 为二抗 ,进行 Western-blot 检测。

2 结果

2.1 VP2/VP4/VP3 基因克隆与真核表达载体构建

长距离 RT-PCR 扩增到 3.0kb 的目的条带(图 1) ,经 *Eco*R I / *Kpn* I 双酶切直接克隆入真核表达载体 pCI , PCR 鉴定和酶切鉴定(图 2) ,取 3 个阳性克隆进行测序 ,结果表明 VP2/VP4/VP3 基因序列与已克隆的 IBDV ZJ2000 株 A 节段(GenBank 登录号 :AF321056)包含的多聚蛋白基因序列一致。

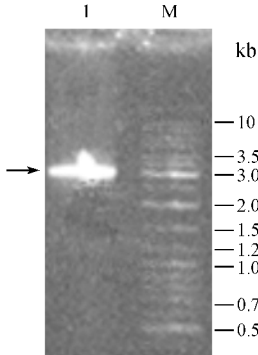


图 1 长距离 RT-PCR 扩增 IBDV 多聚蛋白基因
Fig.1 Polyprotein gene of IBDV(≈3.0kb , indicated by arrow) amplified by long RT-PCR
1 : long RT-PCR product of polyprotein gene ;
M : geneRuler DNA mix marker

2.2 含 pCI-VP2/VP4/VP3 的减毒沙门氏菌 ZJ111 重组子的鉴定

pCI-VP2/VP4/VP3 电转化减毒沙门氏菌后 ,抽提质粒 ,挑取 PCR 阳性克隆 ,再转化 *E. coli* DH5α 抽提质粒 ,进一步进行 PCR 和酶切鉴定。结果显示从 *E. coli* DH5α 中筛选到的 PCR 阳性克隆可被 pCI-VP2/VP4/VP3 上的一系列核酸内切酶所切割 ,并得到与预期相一致的目的条带(图略)。从而证明 pCI-VP2/VP4/VP3 已经成功转入减毒沙门氏菌 ZJ111 中。

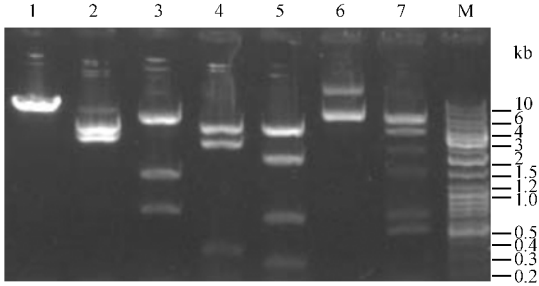


图 2 含有多聚蛋白基因的 pCI 重组质粒酶切鉴定
Fig.2 Identification of recombinant plasmid by restriction endonuclease digestion
1 : *Eco*R I ; 2 : *Eco*R I and *Kpn* I ; 3 : *Xho* I ; 4 : *Eco*R I and *Xba* I ; 5 : *Eco*R I and *Hind*III ; 6 : *Apa* I ; 7 : *Eco*R I and *Acc* I ;
M : geneRuler DNA mix marker

2.3 减毒沙门氏菌 ZJ111/pCI-VP2/VP4/VP3 的体外稳定性

Salmonella typhimurium ZJ111/pCI-VP2/VP4/VP3LB 平板划线传代至第 15 代 ,随机挑选 10 个细菌克隆 ,抽提质粒 ,进行 PCR 反应鉴定。结果显示 ,10 个克隆均出现与预期相一致的约 3.0kb 的 PCR 条带 ,随后进行的酶切鉴定结果与图 2 相同(图略) ,证明重组减毒沙门氏菌 ZJ111/pCI-VP2/VP4/VP3 能在体外稳定遗传。

2.4 重组沙门氏菌转染 Vero 细胞

重组减毒沙门氏菌 ZJ111/pCI-VP2/VP4/VP3 转染 Vero 细胞 24h 后 ,细胞形态即开始发生变化(图 3) ,细胞圆缩 ,颗粒物质增多 ,折光性增强 ,表明重组沙门氏菌已经侵入细胞中。转染重组减毒沙门氏菌 ZJ111/pCI 对照的 Vero 细胞出现类似的细胞形态变化。

2.5 RT-PCR 和间接免疫荧光试验

Trizol 试剂抽提 Vero 细胞总 RNA ,以引物 P1/P2 进行 RT-PCR ,可以扩增到一条 3.0kb 的明显条带 ,而对照组没有条带(图略) ,表明 VP2/VP4/VP3 基因在细胞中得到了正确转录。重组菌转染后 72h ,以 FITC 标记的二抗进行间接免疫荧光试验 ,荧光显微镜下可观察到大量黄绿色荧光 ,而对照组未见特异性荧光(图 4)。

2.6 SDS-PAGE 和 Western-blot 检测结果

SDS-PAGE 和 Western-blot 均在 41kD 处检测到蛋白条带(图 5) ,该分子量与成熟的 IBDV VP2 蛋白分子量一致 ,表明 VP2/VP4/VP3 基因在 Vero 细胞中得到了表达 ,表达产物具有免疫反应性。

3 讨论

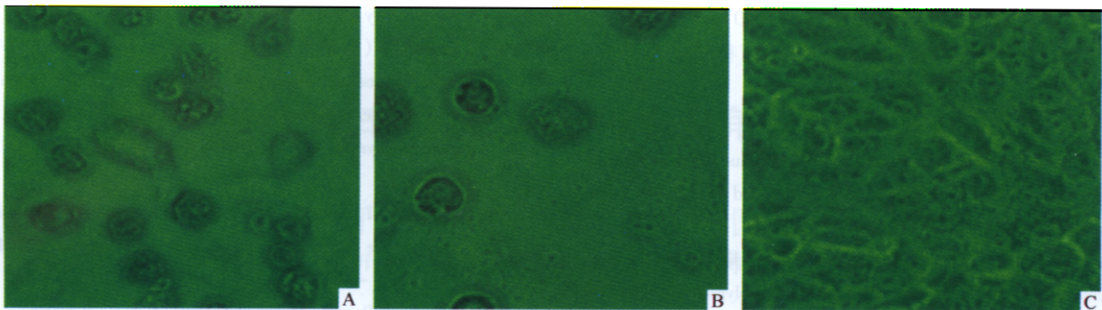


图 3 转染重组减毒沙门氏菌后,Vero 细胞的组织形态学变化

Fig.3 Detection of morphological change caused by recombinant *Salmonella typhimurium* in Vero cell(×200)

(A) Vero cells infected by *S. typhimurium* carrying pCI-VP2/VP4/VP3;(B) Vero cells infected by *S. typhimurium* carrying pCI;
(C) Normal Vero cell control

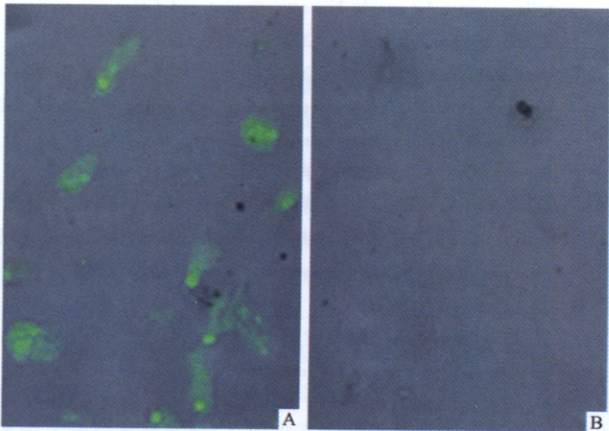


图 4 间接免疫荧光试验检测多聚蛋白基因在 Vero 细胞中的表达

Fig.4 Indirect-immunofluorescence assay analysis of polyprotein gene of IBDV expressed in Vero cells using *Salmonella typhimurium* as carrier

(A) The immunofluorescence of polyprotein gene of IBDV expressed in Vero cells, FITC labeled;(B) Negative control

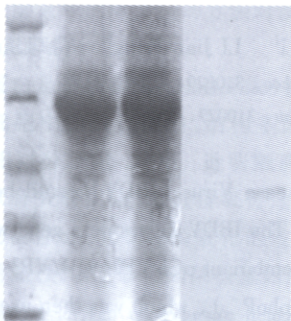


图 5 SDS-PAGE (A) and Western-blot(B)
检测多聚蛋白基因在 Vero 细胞中的表达

Fig.5 SDS-PAGE (A) and Western-blot(B) of polyprotein gene of IBDV expressed in Vero cells using *Salmonella typhimurium* as carrier at 72h after transfection

M: molecular weight marker; 1: SDS-PAGE detection of lysate of Vero cells transfected by *S. typhimurium* JZ111/pCI;
2: SDS-PAGE detection of lysate of Vero cells transfected by *S. typhimurium* JZ111/pCI-VP2/VP4/VP3; 3: Western-blotting detection of lysate of Vero cells transfected by *S. typhimurium* JZ111/pCI; 4: West-blotting detection of lysate of Vero cells transfected by *S. typhimurium* JZ111 /pCI-VP2/VP4/VP3

其基因组为双股双节段 RNA:A 节段和 B 节段。较短的 B 节段编码一个 RNA 依赖性的 RNA 聚合酶,较长的 A 节段上有大小两个开放性阅读框架(ORF),分别编码多聚蛋白 VP2/VP4/VP3(108kD)和非结构蛋白 VP5(15kD)。其中 VP2 位于病毒粒子的最外层,是 IBDV 的主要宿主保护性抗原,与病毒中和抗体的诱导有关;VP3 具有群特异性,但体外表达的 VP3 蛋白,不能诱导血清中和抗体;VP4 为非结构蛋白,是病毒的蛋白酶,可剪切多聚蛋白前体成 VP2 前体(45~50kD)、VP3(30~32kD)和 VP4(28kD),VP2 前体进一步加工成成熟的 VP2 蛋白(40~45kD)。

通过各种方法减毒的沙门氏菌,对人类和动物的致病力显著降低,但仍然保持良好的侵袭力,可有效携带外源真核表达质粒进入动物细胞内表达相应的蛋白^[9-13]。虽然沙门氏菌和大肠杆菌具有较为相近的遗传背景,但前者对外源质粒的转化效率比较低,只有高压电击法才能将质粒导入到细菌中,并且应用于大肠杆菌的质粒抽提方法并不能有效抽提沙门氏菌中的质粒。本实验中,高压电击法将外源重组载体 pCI-VP2/VP4/VP3 导入沙门氏菌后,抽提的质粒电泳条带并不典型,且无法得到清晰的酶切条带,但 PCR 法可筛选出阳性克隆。将 PCR 阳性质粒转化 *E. coli* DH5 α ,再抽提质粒进行酶切鉴定,可得到清晰的条带。这种新构建的重组菌在体外的传代中可有效保持质粒的稳定遗传,在体外传代至 15 代,未出现质粒丢失。

重组减毒沙门氏菌 JZ111/pCI-VP2/VP4/VP3 转染 Vero 细胞 24h 后,即出现了细胞病变效应(CPE),随后病变效应越来越明显,而 JZ111/pCI 转染组 CPE 虽然出现得比较早,但随后细胞病变的发展并没有 JZ111/pCI-VP2/VP4/VP3 转染组严重,提示多聚蛋白特别是 VP2 蛋白的表达加重了细胞病变,这可能与 VP2 可诱导细胞凋亡有关。SDS-PAGE 和 Western-blot 均可检测到 41kD 处的 VP2 条带,提示 VP2/VP4/VP3 基因在 Vero 细胞中得到了表达,并在 VP4 的作用下,进行了正确的体外剪切和加工,表达产物可与兔抗 IBDV 血清发生反应,具有免疫反应性,结果与卢觅佳等在家蚕中表达 IBDV 多聚蛋白基因的情况相似^[14]。VP2 的表达占绝对优势,而 VP3 和 VP4 的表达量似乎很低,SDS-PAGE 和 Western-blot 均无法检测到相应的阳性信号。

总之,本试验证明了减毒沙门氏菌可携带 IBDV VP2/VP4/VP3 基因进入哺乳动物细胞内表达出具有免疫反应性

的病毒蛋白。以减毒沙门氏菌为载体的 IBDV 口服 DNA 疫苗的免疫原性和对强毒攻击的保护力方面有待进一步研究。

REFERENCES (参考文献)

- [1] Hermann Müller, Md Rafiqul Islam, Rüdiger Raue. Research on infectious bursal disease—the past, the present and the future. *Veterinary Microbiology*, 2003, **97** (1 – 2): 153 – 165
- [2] Li JR(李建荣), Yu I(于涟), Huang YW(黄耀伟) *et al.* Study on immunogenicity of plasmid DNA encoding polyprotein(VP2/VP4/VP3) of infectious bursal disease virus formulated with ISCOM. *Chinese Journal of Virology* (病毒学报), 2001, **17** (4): 341 – 347
- [3] Yu I(于涟), Li JR(李建荣), Huang YW(黄耀伟) *et al.* Induction of protective immune response in chickens immunized with plasmid DNA encoding antigens of infectious bursa disease virus. *Scientia Agricultura Sinica* (中国农业科学), 2002, **35** (8): 995 – 100
- [4] Fordor I, Horvath E, Fodor N *et al.* Induction of protective immunity in chickens immunised with plasmid DNA encoding infectious bursal disease virus antigens. *Acta Vet Hung*, 1999, **47** (4): 481 – 492
- [5] Wang J, Michel V, Leclerc C *et al.* Immunogenicity of viral B-cell epitopes inserted into two surface loops of the *Escherichia coli* K12 LamB protein and expressed in an attenuated aroA strain of *Salmonella typhimurium*. *Vaccine*, 1999, **17** (1): 1 – 12
- [6] Al-Ramadi BK, Adeghate E, Mustafa N *et al.* Cytokine expression by attenuated intracellular bacteria regulates the immune response to infection : the *Salmonella* model. *Molecular Immunology*, 2002, **38** : 931 – 940
- [7] Weiss S. Transfer of eukaryotic expression plasmids to mammalian hosts by attenuated *Salmonella* sp. *International Journal of Medical*

Microbiology, 2003, **293** (1): 95 – 106

- [8] Huang YW(黄耀伟), Yu I(于涟), Ding HM(丁红梅) *et al.* Amplification and cloning by long RT-PCR of full-length genome of larger segment of chicken infectious bursal disease virus. *Acta Biochim Biophys Sin* (生物化学与生物物理学报), 2001, **33** (3): 355 – 359
- [9] Gentschev I, Dietrich G, Spreng S *et al.* Recombinant attenuated bacteria for the delivery of subunit vaccines. *Vaccine*, 2001, **19** (17 – 19): 2621 – 2628
- [10] Marcela F Pasetti, Myron M Levine, Marcelo B Szein. Animal models paving the way for clinical trials of attenuated *Salmonella enterica* serovar Typhi live oral vaccines and live vectors. *Vaccine*, 2003, **21** (5 – 6): 401 – 418
- [11] Helen S Garmory, Katherine A Brown, Richard W Titball. *Salmonella* vaccines for use in humans : present and future perspectives. *FEMS Microbiology Reviews*, 2002, **26** (4): 339 – 353
- [12] Fang WH(方维焕), Liang XY(梁雪芽). Expression of the Newcastle disease virus fusion glycoprotein in Vero cells using attenuated *Salmonella typhimurium* as transgenic carrier. *Acta Biochim Biophys Sin* (生物化学与生物物理学报), 2002, **34** (4): 488 – 493
- [13] Liang XY(梁雪芽), Fang WH(方维焕), Jiang LI(江玲丽). Safety, stability and immunogenicity of an oral DNA vaccine against Newcastle diseases. *Chinese Journal of Biotechnology* (生物工程学报), 2003, **19** (1): 24 – 29
- [14] Lu M(卢觅佳), Li JR(李建荣), Wang YK(王莹飞) *et al.* Expression of polyprotein of the infectious bursal disease virus in *Bombyx mori*. *Chinese Journal of Biotechnology* (生物工程学报), 2002, **18** (4): 472 – 476

Expression of the Infectious Bursal Disease Virus Polyprotein in Vero Cells Using Attenuated *Salmonella typhimurium* as Transgenic Carrier

LI Long^{1, 2} FANG Wei-Huan¹ FAN Yong-Jun² XU Jian² FANG Li¹ LI Jian-Rong¹ YU Lian^{1*}

¹(Institute of Preventive Veterinary Medicine, Zhejiang University, Hangzhou, 310029, China)

²(Department of Biomedical Engineering, Zhejiang University, Hangzhou, 310027, China)

Abstract To examine if polyprotein gene(VP2/VP4/VP3) of Infectious Bursal Disease Virus(IBDV) could be delivered into mammalian cells and expressed using attenuated *Salmonella typhimurium* as vector. The IBDV polyprotein gene was amplified by RT-PCR and inserted in to pCI, an eukaryotic expression plasmid. The resulting recombinant pCI-VP2/VP4/VP3 was transformed by electroporation into attenuated *Salmonella typhimurium* strain ZJ111(*dam*⁻ and *phoP*⁻), which was then use to transfect the Vero cells. Gene specific RT-PCR revealed that VP2/VP4/VP3 was transcribed into mRNA in the Vero cells. Indirect immunofluorescence assay, SDS-PAGE and Western-blot analysis showed that VP2/VP4/VP3 was expressed and the product was immuno-reactive with anti-IBDV serum. This work provides essential precondition for developing a new oral DNA vaccine against IBDV.

Key words infectious bursal disease virus, polyprotein, attenuated *Salmonella typhimurium*, DNA vaccine delivery vector

Received : 11-11-2003

This work was supported by Grant from key Project of Zhejiang Provincial Natural Science Foundation(No. ZA0105).

* Corresponding author. Tel : 86-571-86971894 ; Fax : 86-571-86971894 ; E-mail : yulian@zju.edu.cn http://journals.im.ac.cn