

## 鸡传染性支气管炎病毒 S1 基因 在昆虫细胞中表达水平初探\*

宋延华 刘福安

(华南农业大学动物医学系, 广州 510642)

5852.65-

**摘要** 将含有鸡传染性支气管炎病毒 S1 基因 cDNA 的重组转移质粒 pSXIVVI<sup>+</sup>X3-S1. Holte 和 pSXIVVI<sup>+</sup>X3/4-S1. Holte 分别与粉纹夜蛾核型多角体病毒 TnNPV-SVI<sup>-</sup>G DNA (OCC<sup>-</sup>, gal<sup>+</sup>) 共转染草地夜蛾(Sf9)细胞, 经空斑纯化得到重组病毒 TnNPV-(X3)S1. Holte-OCC<sup>+</sup> 和 TnNPV-(X3/4)S1. Holte-OCC<sup>+</sup>。将重组毒株分别感染 Tn-5B1 细胞, 并进行 SDS-PAGE 与 Western-blot 检测。结果表明, TnNPV-(X3/4)S1. Holte-OCC<sup>+</sup> 在感染的细胞中高效表达了 S1 蛋白, SDS-PAGE 凝胶薄层色谱分析结果显示, 感染病毒后 72 h S1 蛋白的表达量占细胞内总蛋白量的 35.8%, 而 TnNPV-(X3)S1. Holte-OCC<sup>+</sup> 感染的细胞内检测不出 S1 蛋白。经分析认为这一差异主要来自 S1 基因翻译起始位点及其附近的周围环境。

**关键词** 传染性支气管炎病毒, S1 基因, 杆状病毒表达载体, 表达 ~~昆虫细胞~~ 鸡

鸡传染性支气管炎病毒(Infectious Bronchitis Virus, IBV)是冠状病毒科(Coronaviridae)的主要成员之一。IBV 的多血清型以及变异株的不断出现, 使传统的 IB 疫苗预防效果往往不够理想<sup>[1]</sup>。IBV 基因工程疫苗的研制是改进传统 IB 疫苗的一个重要方向。我们已经将 IBV 的主要免疫原基因 S1 克隆到形成多角体的杆状病毒表达载体并构建出两个表达质粒: pSXIVVI<sup>+</sup>X3-S1. Holte 和 pSXIVVI<sup>+</sup>X3/4-S1. Holte<sup>[2]</sup>, S1 基因在这两个质粒中的翻译起始位点及起始位点的周围环境不同<sup>[2]</sup>, 将影响 S1 基因的表达水平。我们以这一点为基础, 对它们在昆虫细胞中的表达情况进行了研究, 并初步探讨外源基因与 ATG 附近序列对翻译的影响。

### 1 材料与方法

#### 1.1 材料

含 IBV Holte 株 S1 基因的杆状病毒重组转移质粒 pSXIVVI<sup>+</sup>X3-S1. Holte(含先导序列)和 pSXIVVI<sup>+</sup>X3/4-S1. Holte(先导序列作为融合短肽)由华南农业大学动医系禽病研究室构建<sup>[2]</sup>。

草地夜蛾(*Spodoptera frugiperda*) Sf9、Tn-5B1 细胞以及含合成启动子和  $\beta$ -半乳糖苷酶基因的无包涵体粉纹夜蛾重组毒株 TnNPV-SVI<sup>-</sup>G 由中山大学生物防治国家重点实验室提供<sup>[3]</sup>, 细胞培养基为 TC-100 培养基(GIBCO 公司)补加 10% 小牛血清。

一抗为鸡抗 IBV Holte 株抗血清, 由本研究室制备; 二抗为抗鸡 IgG McAb-HRP, 由广东省农业科学院兽医研究所杜伟贤研究员惠赠。脂质体转染试剂(Lipofectin)为 GIBCO BRL 公司产品。

收稿日期: 1998-06-15, 修回日期: 1998-08-31

\* 国家教委高校博士点基金资助项目

## 1.2 方法

### 1.2.1 病毒 DNA 的提取和重组病毒的构建

病毒 DNA 的提取参照 Summers 等(1987)的方法<sup>[4]</sup>进行,共转染则按脂质体使用说明进行。重组毒株用 PCR 进行鉴定,使用扩增 IBV S1 基因的引物 Y<sub>1</sub>、Y<sub>2</sub>。

### 1.2.2 S1 基因在昆虫细胞中的表达与检测

1.2.2.1 样品制备 取对数生长的 Tn-5B1 细胞,用高滴度病毒原液(MOI 控制在 5~10 之间)吸附细胞 1 h,弃病毒液,加入新鲜的培养基,27℃ 下培养,在病毒感染后 72 h 收集细胞样品,供 SDS-PAGE 和 Western 印迹分析用。

1.2.2.2 SDS-PAGE 和 Western 免疫印迹 SDS-PAGE 分离胶的浓度为 8%,浓缩胶的浓度为 5%。Western 免疫印迹按 Sambrook 等(1989)的方法<sup>[5]</sup>。

## 2 结果

### 2.1 含 IBV Holte 株 S1 基因 cDNA 的重组杆状病毒的构建与鉴定

将高纯度的重组转移载体质粒 pSXIVVI<sup>+</sup>X3-S1.Holte 和 pSXIVVI<sup>+</sup>X3/4-S1.Holte 分别与亲本毒株 TnNPV-SV1<sup>-</sup>G DNA 共转染 Sf9 细胞。重组毒株具有产生多角体和 X-Gal 染色为白色两个标记,用这两标记,经多轮(3~5 次)空斑纯化,得到纯的重组毒株 TnNPV-(X3)S1.Holte-OCC<sup>+</sup> 和 TnNPV-(X3/4)S1.Holte-OCC<sup>-</sup>。

用扩增 S1 基因的引物 Y<sub>1</sub>、Y<sub>2</sub> 对重组毒株 TnNPV-(X3)S1.Holte-OCC<sup>+</sup>、TnNPV-(X3/4)S1.Holte-OCC<sup>+</sup> 的 DNA 进行 PCR 鉴定,电泳显示一条约为 1 760 bp 大小的特异带(图未显示),与 IBV Holte 株 S1 基因 cDNA 的大小完全符合<sup>[2]</sup>,而以亲本型病毒 DNA 的 PCR 扩增结果为阴性,证明 S1 基因 cDNA 片段已插入重组毒株基因组中。

### 2.2 S1 基因在昆虫细胞中的表达与检测

将两个重组毒株 TnNPV-(X3)S1.Holte-OCC<sup>+</sup> 和 TnNPV-(X3/4)S1.Holte-OCC<sup>+</sup> 分别感染 Tn-5B1 细胞后进行细胞内蛋白 SDS-PAGE 电泳和 Western 印迹分析(图 1、图 2)。结果显示,重组毒株 TnNPV-(X3)S1.Holte-OCC<sup>+</sup> 感染后细胞内检测不到 S1 蛋白,而重组毒株 TnNPV-(X3/4)S1.Holte-OCC<sup>+</sup> 感染的细胞中,S1 基因获得了高效表达,该蛋白的分子量约为 100 kD,与预期的完全糖基化后的产物大小基本一致,经 CS-930 双波长薄层扫描仪(日本产品)在波长为 590 nm 所进行的薄层色谱分析显示,病毒感染后 72 h, S1 蛋白表达量占细胞内总蛋白量的 35.8%。

为了确定 S1 基因的表达产物是否有部分为分泌性表达,本研究对重组病毒感染的细胞上清同时进行了 SDS-PAGE 电泳和 Western 印迹分析,结果显示阴性,从而表明 S1 基因的表达产物为非分泌性表达。

## 3 讨论

本实验结果表明,IBV Holte 株 S1 基因正确地插入到 TnNPV 基因组中构成两个重组毒株:TnNPV-(X3)S1.Holte-OCC<sup>+</sup>、TnNPV-(X3/4)S1.Holte-OCC<sup>+</sup>,后者使 S1 基因在昆虫细胞中获得了高效表达。1983 年 Cavanagh 等<sup>[6]</sup>确定 IBV M<sub>41</sub> 株的 S1 糖蛋白经糖基化后分子量约为 90 kD, M<sub>41</sub> 株的 S1 蛋白由 520~538 氨基酸个残基构成, S1 蛋白上的 N-糖基化位点有 17 个,未糖基化的分子量约为 56 kD,糖基化后分子量增加 34 kD 之多。而 IBV Holte 株 S1 蛋白

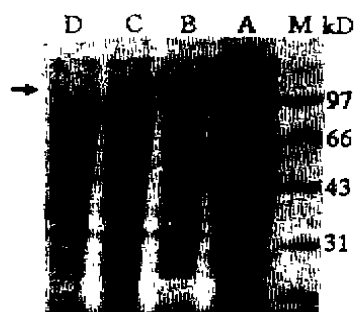


图 1 感染病毒的细胞总蛋白的 SDS-PAGE 分析

Fig. 1 SDS-PAGE analysis of the proteins from infected cells  
A: Tn-5B1 cells infected with TnNPV-SV1<sup>-</sup>G (parent); B: Tn-5B1 cells infected with TnNPV-(X3/4)S1<sub>Holte-OCC<sup>+</sup></sub> (recombinant); C: Tn-5B1 cells infected with TnNPV-(X3)S1<sub>Holte-OCC<sup>+</sup></sub> (recombinant); D: Tn-5B1 cells infected with TnNPV (wild type); M: Mid-range protein molecular weight markers; the arrow indicates the expressed product of the S1 gene.

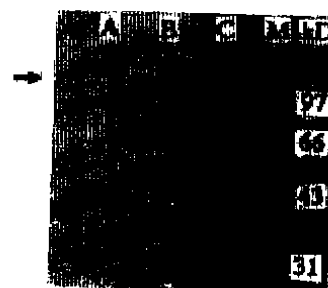


图 2 S1 蛋白的 Western-blot 检测

Fig. 2 Western-blot detection of the S1 glycoprotein expressed in Tn-5B1 cells  
A: Tn-5B1 cells infected with TnNPV-SV1<sup>-</sup>G; B: Tn-5B1 cells infected with TnNPV-(X3/4)S1<sub>Holte-OCC<sup>+</sup></sub>; C: Tn-5B1 cells infected with TnNPV-(X3)S1<sub>Holte-OCC<sup>+</sup></sub> (recombinant); M: Mid-range protein molecular weight markers; the arrow indicates the expressed product of the S1 gene.

上的 N-糖基化位点也有 17 个,完全糖基化后所增加的分子量应与 M<sub>41</sub> 的 S1 蛋白情况相似,即 64 kD 多肽加上 34 kD 的糖基化分子量,与 100 kD 相接近。本研究获得的 IBV Holte 株 S1 基因在昆虫细胞中的表达产物,与其完全糖基化后的理论预期值基本相符。

影响外源基因在杆状病毒表达载体系统中的表达量的因素是多方面的<sup>[7]</sup>。从本试验情况看,转移质粒 pSXIVVI<sup>+</sup>X3 不带有自己的 ATG, S1 基因 cDNA 插入后将使用基因本身的 ATG 作为起始密码子,但其 ATG-3 处为 G、+4 处为 A,不符合真核 mRNA 获得最佳表达量的要求<sup>[8-12]</sup>,使表达水平大受影响;另外,ATG 前的先导序列使得载体上的启动子与 S1 基因的起始密码子 ATG 相距较远(98 bp),也可能使表达水平受影响,这是 S1 基因没有表达或表达量甚低的两个主要因素。Western-blot 是检测表达产物一种较为灵敏的免疫学方法,对中等大小蛋白的检出下限为 1~5 ng<sup>[5]</sup>,当产物的表达量低于这一下限时,Western 是无法检出的。转移质粒 pSXIVVI<sup>+</sup>X3/4 带有自己的 ATG,ATG 附近的碱基已经过优化,-3 处为 A,+4 处是 G,符合外源基因获得最佳表达的要求。同时,IBVS1 基因上的先导序列作为融合短肽,对提高 S1 蛋白的表达量也可能具有重要作用,但这需要进一步研究证实。本研究用此系统表达 IBV Holte 株 S1 基因,获得了很高的表达量,为进一步研究和开发 IB 基因工程疫苗打下了基础。

**致 谢** 本研究主要在中山大学生物防治国家重点实验室完成的,感谢龙紫新教授、杨林博士以及其他师生所给予的真诚帮助。

## 参 考 文 献

- 1 卡尔尼卡主编,高福,刘文军主译.禽病学.第九版.北京:北京农业大学出版社,1991.407~418
- 2 宋延华,刘福安.含有鸡传染性支气管炎病毒 S1 基因的昆虫杆状病毒表达载体的构建.华南农业大学学报(已接受)
- 3 王珣章,谢伟东,龙策新等.形成多角体的杆状病毒载体系统的建立.病毒学报,1991,7(3):253~261
- 4 Summers M D, Smith G E. A manual of methods for baculovirus vectors and insect cell culture. Agricultural Experiment Station Bulletin and Texas A&M University Publishers Bulletin, 1987. No. 1555
- 5 Sambrook J, Fritsch E F, Maniatis T. Molecular cloning. 2nd ed. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press. 1989. 6. 30~6. 31
- 6 Cavanagh D. Coronavirus IBV glycopolypeptides: size of their polypeptide moieties and nature of their oligosaccharides. J Gen Virol, 1983, 64:1187~1191
- 7 O'Reilly D R, Miller L K, Luckow V A. Baculovirus expression vectors—A laboratory manual. New York: W H. Freeman and company. 1992:98~106
- 8 Kozak M. Comparison and analysis of sequence upstream from the translational start site in eukaryotic mRNAs. Nucleic Acids Res, 1984a, 12:857~872
- 9 Kozak M. Selection of initiation sites by eukaryotic ribosomes: effect of inserting AUG triplets upstream from the coding sequences for proepirinsulin. Nucleic Acids Res, 1984b, 12:3873~3893
- 10 Kozak M. Point mutations define a sequence flanking the AUG initiator codon that modulates translation by eukaryotic ribosomes. Cell, 1986, 44:283~292
- 11 Kozak M. An analysis of 5'-noncoding sequences from 699 vertebrate messenger RNAs. Nucleic Acids Res, 1987, 15:8125~8148
- 12 Kozak M. The scanning model for translation; An update. J cell Biol, 1989, 108(2): 229~241

## Preliminary Study on Expression Level of the S1 Gene of Avian Infectious Bronchitis Virus in a Baculovirus System

Song Yanhua     Liu Fuan

(Department of Veterinary Medicine, South China Agricultural University, Guangzhou 510642)

**Abstract** The recombinant transfer plasmids pSXIVVI<sup>+</sup>X3-S1.Holte and pSXIVVI<sup>+</sup>X3/4-S1.Holte containing S1 gene cDNA of avian infectious bronchitis virus and the parent virus (TnNPV-SVI<sup>-</sup>G) DNA were used to co-transfect *Spodotera frugiperda* (Sf) cells. The recombinant viruses TnNPV-(X3)S1.Holte-OCC<sup>+</sup> and TnNPV-(X3/4)S1.Holte-OCC<sup>+</sup>, which included the S1 gene and could form polyhedra, were plaque-purified. The expression products of S1 gene were detected by SDS-PAGE and Western blotting in Tn-5B1 cells infected with the recombinant viruses. The S1 protein with a molecular weight of 100 kD was expressed in the cells infected with TnNPV-(X3/4)S1.Holte-OCC<sup>+</sup> at high efficiency, the expression level in Tn-5B1 cells 72 h postinfection being 35.8% by SDS-PAGE gel thin-layer chromatography. No expression product was detected by SDS-PAGE and Western-blotting in Tn-5B1 cells infected with TnNPV-(X3)S1.Holte-OCC<sup>+</sup>. The expression level depends mainly upon the translational start site of the S1 gene and its flanking sequences.

**Key words** Avian infectious bronchitis virus (IBV), S1gene, Baculovirus expression vector, Expression