维普资讯 http://www.cqvip.c

第19卷5期
2004年10月

中国病毒学
VIROLOGICA SINICA

19（5）：487-489
October 2004

犬瘟热病毒南京株H蛋白基因的克隆与表达

莫小见，郭爱珍，陆承平**

（南京农业大学 农业部动物疫病诊断与免疫重点实验室，江苏南京 210095）

Cloning and Expression of the H Protein Gene Fragment of Canine Distemper Virus Nanjing Strain

MO Xiao-jian, GUO Ai-zhen, LU Cheng-ping**

(Key Lab of Animal Diease Diagnostic and Immunology, Ministry of Agriculture, Nanjing Agriculture University, Nanjing 210095, China)

Abstract: One pair of primers was designed and synthesized based on the Haemagglutinin (H) protein gene Sequercein the Onderstepoort strain of *Canine distemper virus*(CDV). The templates were produced from the reverse transcription reaction, total RNA was isolated from the Vero cells infected with the Nanjing isolate of CDV (CDV NJ-15). The full-length H gene fragment was amplified by polymerase chain reaction (PCR). Digested with *Eco*R I and *Sal* I, a 1058bp fragment of the PCR product was cloned into the expression plasmid vector pET-28b (+).The recombinant was transformed into the Rosetta™ and induced to express by 1.0m mol/L IPTG at 37℃.The expression product was identified by SDS-PAGE and found to be 38kDa as expected and confirmed by Western blotting with CDV-Onderstepoort rabbit antiserum. The results revealed that the expressed fusion protein *in vitro* had the critical antigenitic epitopes of H gene of CDV.

Key words: *Canine distemper virus*; *H* gene; Clonging and Expression; Western blotting.

摘要：根据发表的犬瘟热病毒(CDV) 参考株 Ondetstepoort 的序列设计一对引物，以犬瘟热病毒南京株（CDV NJ-15)感染的Vero细胞总RNA为模板，RT-PCR扩增出1.9kb的全长H蛋白基因，双酶切该全长基因，得到1058bp片段，以正确的阅读框架定向克隆于pET-28b(+)中，然后将重组质粒转化宿主菌Rosetta™，在37℃1.0mmol/L IPTG诱导下获得良好表达。经SDS-PAGE鉴定，表达的融合蛋白质约38kDa，与预期值一致。免疫转印试验显示，该重组蛋白可被CDV Onderstepoort 兔抗血清识别，表明该重组蛋白具备部分抗原性。

关键词：犬瘟热病毒，H蛋白基因，克隆与表达，免疫转印

中图分类号：S852.65　　**文献标识码**：A　　**文章编号**：1003-5125(2004)05-0487-03

犬瘟热病毒（*Canine distemper virus*, CDV）以其高传染性和致死性成为危害特种养殖业发展的重要致病因子[1]，是引起犬以及其他食肉目动物犬瘟热的病原。同时，CDV脑炎又是研究人类脱髓鞘神经紊乱致病机理的重要动物模型[2,3]。

CDV与麻疹病毒、牛瘟病毒同为副粘病毒科麻疹病毒属的负链线性RNA病毒，基因组全长15690nt，由7个基因组成，分别编码N、P、M、F、H、L蛋白，F、H蛋白是产生中和抗体的重要抗原，在抗病毒免疫中占有重要地位。其中H蛋白是CDV感染细胞过程中侵袭宿主所必需的[4]，是CDV与细胞受体结合的蛋白，并决定着病毒感染的细胞嗜性[5]，在启动细胞融合上也起着重要的作用[6]。在免疫压力作用下，CDV抗原表位可能发生漂移，尤其是较大的H蛋白极易发生变异，从而引起CDV毒力的变化[7,8]。Camila及Nathalie等报道了关于H蛋白作为基因工程疫苗或核酸疫苗的备选基因的可能性，提示H蛋白可以用于CDV的预防控制[9,10]。

收稿日期：2004-03-29，修回日期：2004-05-19

作者简介：莫小见(1977-)，男，湖北襄阳人，硕士，主要从事病毒分子生物学研究。

** 通讯作者. Corresponding author. Tel: 025-84396517; E-mail:lucp@njau.edu.cn

维普资讯 http://www.cqvip.com

本研究将CDV南京株H蛋白基因的近全长片段进行克隆、表达，并进行免疫转印试验以期证实该重组蛋白是否保留了天然H蛋白的关键性抗原表位，为基因工程疫苗的设计和使用提供依据。

1 材料与方法

1.1 毒株、质粒与菌株

CDV NJ-15株由陈培富等从南京地区CDV临床病犬中分离鉴定[11]，本实验室保存。表达质粒pET-28b(+)由南京农业大学寄生虫教研室惠赠。宿主菌Rosetta™购自默克公司。

1.2 试剂

常规分子生物学试剂如RT-PCR试剂盒、各种酶类以及DNA连接系统等购自大连宝生物公司。凝胶回收试剂盒购自上海中科开瑞生物芯片科技股份有限公司。CDV Onderstepoort株兔抗血清由南京警犬研究所缪勤惠赠。

1.3 病毒扩增及总RNA的提取

CDV-NJ15毒株按0.1MOI量接种Vero细胞(德国吉森大学Baljer教授惠赠)，培养2～3d，待80%左右的细胞出现CPE时收获细胞及上清，冻融3次后，2 000r/min离心30min，去除细胞碎片，将上清液置于20%蔗糖溶液上，27 000r/min离心2h，取沉淀用适量PBS悬浮后冻存备用。参照RNAgents Total RNA Isolation System(Promega公司)的说明抽提总RNA，最后将核酸沉淀溶于适量DEPC处理过的双蒸水中。

1.4 RT-PCR

1.4.1 PCR引物设计：参照已发表的CDV基因序列[12]，利用Primer 5.0软件自行设计一对引物，两端分别添加*Bam*H I和*Sal* I酶切位点及保护性碱基，由上海中科开瑞生物芯片科技股份有限公司合成。

P_1:'AAAGGATCCGGCTCAGGTAGTCCAGCAATG3'

P_2: 'AGGGGTCGACCATTTCTCACCGCAGTTATC3'

1.4.2 反转录：模板RNA 4μL，DEPC-H_2O 7μL，上游引物 P_1 1μL（30pmol/μL），混匀后置于70℃5min，稍离心后冰上依次加入以下组分：5×Buffer 4μL，核酸酶抑制剂1μL，10mmol/L dNTPs 2μL，AMV逆转录酶2μL，42℃作用1h，70℃10min，置于冰上。

1.4.3 PCR扩增：cDNA模板5μL，上游引物 P_1 1μL，下游引物 P_2（30pmol/μL）1μL，10×PCR Buffer(Mg^{++} Plus)5μL，10 mmol/L dNTPs 3μL，Taq酶（1.25U/μL）1μL，补水至总体积50μL。PCR反应参数为：94℃3min，94℃50s、56℃1min、72℃2min，进行30个循环，最后72℃延伸10min。PCR产物经1%琼脂糖凝胶电泳确定其大小后回收。

1.5 重组质粒的克隆与鉴定

将回收的PCR产物用*Eco*R I和*Sal* I双酶切后回收，按常规方法连接pET-28b(+)，转化宿主菌Rosetta™，鉴定阳性的克隆送交上海中科开瑞生物芯片科技股份有限公司测序，以验证其阅读框架。

1.6 重组质粒在大肠杆菌中的诱导表达

纯化后的阳性克隆37℃1.0mmol/L IPTG诱导表达，SDS-PAGE分析表达产物。

1.7 免疫转印

按照半干转印法进行[13]。第一抗体为CDV Onderstepoort株兔抗血清，第二抗体为辣根过氧化物酶标记的羊抗兔IgG，以DAB显色。

2 结果

2.1 RT-PCR

经RT-PCR成功扩增出1.9kb H基因。

2.2 重组质粒的构建

将PCR产物与pET-28b(+)连接得到的阳性克隆命名为pET-28b-H_{ES}(图1)。测序结果表明其序列与已发表的CDV Onderstepoort株序列[12]同源性达99%，且阅读框正确。

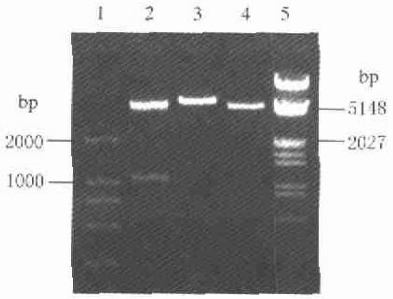

图1 重组质粒酶切鉴定结果

Fig. 1 Analysis of CDV H gene fragment inserted in pET-28b vector

Lane1, DNA Marker DL2000; 2, pET-28b-H_{ES} digested with *Eco*R I+*Sal* I(5.37kb+1.05kb); 3, pET-28b-H_{ES} digested with *Eco*R I(6.42kb); 4, pET-28b (+) digested with *Eco*R I(5.37kb); 5, λDNA *Hind* III/*Eco*R I Marker.

2.3 重组质粒的诱导表达

取重组菌裂解物进行SDS-PAGE。结果表明，重组菌在38kDa处出现一条特异蛋白条带（图2A）。

2.4 免疫转印

上述特异蛋白条带可被CDV Onderstepoort株兔抗血清识别，表明该重组蛋白具备天然H蛋白的部分抗原性（图2B）

维普资讯 http://www.cqvip.com

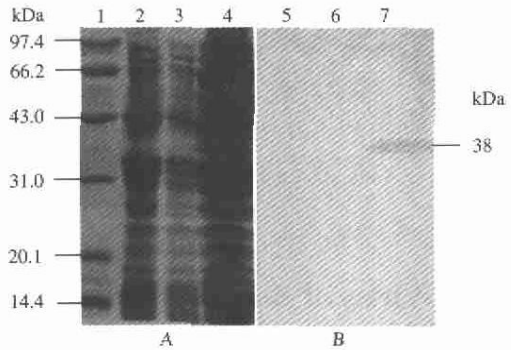

图 2 重组蛋白的检测

Fig2. Analysis of CDV H gene inserted in pET-28 b(+) vector

A: SDS-PAGE. B: Western blot. 1, Low Protein Molecular weight marker; 2,5, pET-28 b(+)induced by IPTG; 3/6, pET-28b-H_{ES} recombinant before induced; 4/7, pET-28b-H_{ES} recombinant induced by IPTG.

3 讨论

犬瘟热是危害犬等食肉目动物的高度传染性疾病。近年来，国内在 CDV 生态学、生物学特性鉴定、分离株的序列分析以及诊断方面进行了研究，而针对该病毒功能基因克隆表达方面的研究则仅见于 CDV 参考株的报道[11]。对于可能更具研究和使用价值的现场分离株的深入研究则未见报道。本研究采用 pET 系统成功表达了 CDV H 基因 3'端近全长的基因片段编码的蛋白，弥补了此前关于 CDV 南京分离株研究工作的空缺[14]。

表达性质粒载体 pET-28b(+)可以制备带有 His Tag™ 标签的融合蛋白，其理想插入片段约 1.0kb 左右，本实验拟克隆包含 H 基因全长序列的约 1.9kb 的片段，以获取完整的 H 抗原，但未能成功。这可能与以下因素有关：1)可能 CDV H 基因中含有太多大肠杆菌稀有密码子，具体如下：20 个 AGA，4 个 AGG，3 个 CGG，4 个 CGA，17 个 AUA，8 个 CUA，11 个 GGA，7 个 CCC，总计 74 个稀有密码子。2)可能外源基因太大，超过了原核表达系统所能承载的编码能力[15,16]。因此，本研究将 H 基因用限制性内切酶切成两段，并且换用更加适合表达含有大肠杆菌稀有密码子基因的宿主菌 Rosetta™，结果 3'端 1.05kb 的片段得到了良好的表达。但遗憾的是，5'端约 750bp 的片段在优化了诸多表达条件的情况下仍然未能表达，其原因尚有待探讨。

SDS-PAGE 和免疫转印试验表明，H 基因片段的重组融合蛋白约 38kDa,并且具备天然蛋白的关键性抗原表位。可见，虽然原核表达系统不能对表达产物进行糖基化、磷酸化等化学修饰作用，但是表达产物仍有可能作为抗原或用于制备单克隆抗体，是研究其免疫学功能或研制基因工程疫苗的侯选材料。

参考文献

[1] 陆承平. 兽医微生物学 [M]. 第三版. 北京：中国农业出版社. 2001, 525-527.

[2] Alldinger S, Wunschmann A, Baumgartner W, *et al.* Up-regulation of major histocompatibility complex class II antigen expression in the central nervous system of dogs with spontaneous canine distemper virus encephalitis [J]. Acta Neuropatol. 1996, 92:273-280.

[3] Alldinger S, Fonfara S Orvall C, *et al.* Characterization of a canine CD44-specific monoclonal antibody [J]. Vet Med. 1999, 46:19-32.

[4] Wild T F, Malvoisin E, Buckland R, *et al.* Measles virus: both haemagglutinin and fusion glycoproteins are required for fusion [J]. Gen Virol. 1991, 72:439-442.

[5] Stern L B, Greenberg M, Gershoni J M, *et al.* The haemagglutinin envelop protein of canine distemper virus (CDV) confers cell tropism as illustrated by CDV and measles virus complementation analysid [J]. Virology. 1995, 69(3):1661-1668.

[6] Lamb R. A Paramyxovirus fusion: a hypothesis for changes [J]. Virology. 1993, 197:1-11.

[7] Gemma T, Watari T, Akiyama K, *et al.* Epidemiological observation on recent outbreaks of distemper in Tokyo area [J]. Vet Med Sci. 1996, 58:547-550.

[8] Iwatsuki K, Miyashita N, Yoshida E, *et al.* Molecular and phylogenetic analyses of the haemagglutinin (H) proteins of field isolates of canine distemper virus fron naturally infected dogs [J]. Gen Virol. 1997, 78: 373-380.

[9] Camila P M. Protection of dogs against canine distemper by vaccination with a canarypox virus recombinant expressing canine distemper virus fusion and hemagglutinin glycoproteins [J]. AJVR. 1997, 58: 833-836.

[10] Narhalie S. Canine distemper virus DNA vaccination induces humoral and cellular immumity and protects against a lethal intracerebral challenge[J]. Virology. 1998, 8472-8476.

[11] 徐向明，崔治中，徐建生，等. 犬瘟热病毒 OP 株囊膜糖蛋白 H 基因的克隆与表达 [J]. 中国预防兽医学报. 2002, 24: 436-439.

[12] Sidhu M S, Husar W, Cook S D, *et al.* Canine distemper terminal an intergenic non-protein coding nucleotide sequences: completion of the entire CDV genome sequence [J]. Virology. 1993, 193: 66-72.

[13] 萨姆布鲁克 J，弗里奇 E F，曼尼阿蒂斯 T 著（金冬雁，等译）. 分子克隆实验指南[M]. 第二版. 北京：科学出版社. 1992: 860-862.

[14] 陈培富，郭爱珍，陆承平. 犬瘟热病毒南京分离株的生物学特性鉴定 [J]. 中国兽医学报. 2000, 20: 231-234.

[15] Alan H R, Barbara N L, Dzo-shan Chui, *et al.* Vectors for Selective expression of cloned DNAs by T_7 RNA Polymerase [J]. Gene. 1987, 56:125-135.

[16] 隋广超，胡美清. 影响大肠杆菌中外源基因表达的因素 [J]. 生物化学与生物物理进展. 1994, 21: 128-132.