

表达猫瘟热病毒 VP2 蛋白重组腺病毒的构建及其免疫原性研究*

杨松涛^{1,2}, 夏咸柱^{**}, 乔军¹, 常爽², 谢之景¹, 鞠会艳², 邹啸环¹

(1. 军事医学科学院军事兽医研究所, 吉林长春 130062; 2. 吉林大学农学部, 吉林长春 130062)

Construction and Immunogenicity of Recombinant Canine Adenovirus Type 2 of Feline Distemper Virus VP2

YANG Song-tao^{1,2}, XIA Xian-zhu^{**}, QIAO Jun¹, CHANG Shuang², XIE Zhi-jing¹,
JU Hui-yan², ZOU Xiao-huan¹

(1. Institute of Military Veterinary, Academy of Military Medical Sciences, Changchun 130062, China; 2. Division of Agricultural Sciences, Jilin University, Changchun 130062, China)

Abstract: In order to construct a recombinant canine adenovirus type 2 (CAV-2) of the VP2 of Feline distemper virus or *Feline panleukopenia virus* (FPV), the *vp2* gene fragment of FPV GT-2 strain was amplified by PCR and cloned into pVAX1 vector. The complete VP2 expression cassette was subcloned into the shuttle vector pVAX Δ E3 and then inserted into the pPoly2-CAV-2 backbone vector that contains the complete genome of CAV-2. Recombinant viral genome was linearized by *Cla*I/*Asc*I and transfected into MDCK cell. The recombinant CAV-2-VP2 was achieved through 4 passages in MDCK, which showed typical cytopathogenic effect (CPE). The expressed FPV VP-2 was detected in the infected MDCK cells of the recombinant CAV-2-VP-2 by using FPV polyclonal antibodies. The specific antibodies of VP-2 and CAV-2 were induced in cats by the recombinant CAV-2-VP-2. The results indicated that the recombinant CAV-2-VP-2 may have the potential to be used as a FPV vaccine strain.

Key words: Feline distemper virus; *Feline panleukopenia virus*; VP2; Recombinant canine adenovirus type 2

摘要:为构建能表达 FPV VP2 蛋白的重组犬 2 型腺病毒(CAV-2)载体。首先用 PCR 方法从 FPV GT-2 株细胞培养物中扩增出了 VP2 蛋白基因,将其克隆到真核表达质粒 pVAX1 中构建了含有 FPV *vp2* 基因的表达盒(CMV-VP2-PolyA),将该表达盒酶切后定向克隆到含有 CAV-2 E3 区的穿梭质粒 pVAX Δ E3 中,构建出 pVAX Δ E3VP2。用 *Sal*I + *Nru*I 双酶切 pVAX Δ E3VP2,回收含有目的基因表达盒部分,将其定向克隆入含有 CAV-2 全基因组的骨架质粒 pPoly2-CAV-2 中,构建了重组质粒 pCAV-2-FPV-VP2。*Cla*I + *Asc*I 酶切 pCAV-2-FPV-VP2 释放出重组基因组,以此转染 MDCK 细胞,获得了重组病毒 CAV-2-VP2。该重组病毒能使 MDCK 细胞产生腺病毒样细胞病变。Western blot 检测证实,该重组病毒能表达具有免疫学活性的 VP2 蛋白。该重组病毒可以有效地诱导免疫猫产生抗 FPV 和 CAV-2 抗体。本实验表明该重组病毒有可能成为一个 FPV 的疫苗株。

关键词: 猫瘟热病毒;猫泛白细胞减少症病毒;VP2 蛋白;重组腺病毒;免疫原性

中图分类号: S852.65 **文献标识码:** A **文章编号:** 1003-5125(2005)06-0637-05

猫瘟热病毒又称猫泛白细胞减少症病毒(*Feline panleukopenia virus*, FPV),是引起猫科动物

发生以高热、呕吐、白细胞减少和肠炎为主要特征传染病的病原^[1,2]。FPV在自然条件下可感染猫,也可

收稿日期:2005-06-27,修回日期:2005-08-12

* 基金项目:国家林业局野生动植物保护中心资助项目

作者简介:杨松涛(1961-),女,辽宁建昌籍,博士,研究方向为分子病毒学。Tel:86-431-6985518; E-mail: yst610223@yahoo.com.cn

** 通讯作者:夏咸柱(1939-),男,江苏建湖籍,中国工程院院士。Tel:86-431-6758799

Corresponding author. Tel:0431-6758799; E-mail: xia_xzh@yahoo.com.cn

感染虎、狮、豹和浣熊等珍稀野生动物^[3-5],给我国的野生动物保护业构成巨大的威胁。目前应用于FPV感染预防的疫苗主要有灭活苗和弱毒苗^[6-8]。FPV灭活苗在制备过程中其保护性抗原蛋白易发生变性,导致免疫效果不理想。弱毒疫苗虽然能有效地诱导机体的特异性免疫应答,但存在毒力返祖的潜在危险,用于野生动物不够安全。因此,有必要利用基因工程手段研制安全有效的新型疫苗用于野生动物FPV感染的免疫预防。在本试验中,我们以免疫原性良好的FPV GT-2株主要保护性抗原VP2蛋白基因作为目的基因,用犬2型腺病毒(*Canine adenovirus type 2*, CAV-2)感染性基因组克隆为载体,首次构建了能表达FPV VP2蛋白的重组CAV-2-VP2病毒。

1 材料与方 法

1.1 病毒、细胞和质粒

猫瘟热病毒FPV GT-2株和CAV-2 SY株毒种由本室分离和鉴定。MDCK细胞、*E. coli* JM109菌株、质粒pVAX1由本室保存。含有CAV-2全基因组的pPoly2-CAV-2质粒由本室构建。

1.2 主要试剂

T4连接酶购自Promega公司;T₃KaRa Ex Taq™、牛小肠碱性磷酸酶(CIAP)、pMD18-T、DNA Blunting kit和各种限制性内切酶均购自TaKaRa公司;Asc I和Cla I购自纽英伦生物技术公司;猫抗FPV多克隆抗体由本室制备,辣根过氧化物酶标记的兔抗猫IgG抗体购自Sigma公司。

1.3 FPV GT-2 vp2基因的扩增及pVAXVP2的构建

根据GenBank中FPV GT-2株vp2基因序列(GenBank登录号:AY955826),设计合成一对引物P1和P2,P1:5'-GGATCCCCAATGAGTGATGGAGCAGTTCAACCAGAC-3';P2:5'-CTCGAGCTAGGTGCTAGTTGATATGTAATAAAC-3',在引物5'端分别含有BamH I和Xho I位点。应用PCR方法从GT-2株细胞培养物中扩增出vp2基因,用BamH I+Xho I双酶切回收PCR产物,将其克隆入pVAX1载体中并进行酶切鉴定,选出鉴定正确的阳性克隆,命名为pVAXVP2。

1.4 穿梭质粒pVAXΔE3VP2的构建

用Sph I和Nde I对pVAXVP2双酶切,进行凝胶电泳回收含有VP2表达盒的目的片段,并对粘端进行补平;用Ssp I酶切pVAXE3,回收E3缺失的大片段并去磷酸化;将含有VP2表达盒目的片段克隆到pVAXE3的E3区缺失处,用限制性内切酶

酶切筛选出VP2表达盒方向与E3区转录方向一致的重组质粒pVAXΔE3VP2。

1.5 含FPV VP2表达盒CAV-2基因组重组质粒的构建

用Sal I+Nru I分别对pPoly2-CAV-2和pVAXΔE3VP2进行双酶切并进行琼脂糖凝胶电泳,回收目的片段,将含目的基因的VP2表达盒定向克隆入pPoly2-CAV-2载体,构建出含VP2表达盒重组CAV-2基因组的质粒pCAV-2-FPV-VP2,用Xba I、EcoR V、Nde I、Pst I、Bgl II和Hind III等限制性内切酶进行酶切鉴定。

1.6 重组CAV-2-vp2基因组转染MDCK细胞

用Cla I+Asc I对重组质粒pCAV-2-FPV-VP2进行双酶切,回收大片段。利用脂质体介导重组质粒pCAV-2-FPV-VP2及其线性化的大片段转染MDCK细胞。转染后的MDCK细胞按常规方法进行传代培养,每隔7d传代一次,出现CPE后,按常规方法进行病毒增殖。获得的重组病毒命名为CAV-2-VP2。

1.7 重组病毒CAV-2-VP2的形态学鉴定

取第5代重组病毒CAV-2-VP2单层接种一瓶10mL MDCK细胞,37℃培养,待80%细胞出现典型CPE时,取上清用0.5%磷钨酸负染,电镜观察;同时刮取CPE细胞,以戊二醛与锇酸双固定,用F812环氧树脂包埋、超薄切片、染色,电镜下进行超微结构观察。

1.8 CAV-2-VP2的分子生物学鉴定

根据CAV-2 Toronto A26/61株(GenBank登录号:U77082)E3序列设计一对特异性引物,P3:5'-GAGCATGGACCAGGTGGAGGTGAA-3';P4:5'-ATTTGCAGGTAGAGCTCTTCGTGT-3'。以提取的重组病毒CAV-2-vp2基因组DNA为模板,扩增含有VP2表达盒的核酸片段,用0.7%琼脂糖凝胶电泳。回收PCR产物,将其克隆到pMD18-T载体中进行测序。

1.9 CAV-2-VP2表达的VP2蛋白检测

刮取CPE细胞,加入100μL 2×SDS凝胶加样缓冲液,100℃水浴5min,进行SDS-PAGE电泳。电泳完毕后转膜,进行Western blot分析。一抗用猫抗FPV多克隆抗体,二抗用辣根过氧化物酶标记的兔抗猫IgG抗体。

1.10 CAV-2-VP2动物免疫试验

10只3个月龄的健康猫(其血清中抗FPV SN抗体效价小于1:2,抗CAV-2 HI抗体小于1:2)分为两组,每组5只。第一组(试验组)用重组病毒CAV-

2-VP2 免疫,第二组(对照组)用正常 CAV-2 免疫。每组均肌注 1×10^7 TCID₅₀/只,每间隔 10d 免疫 1 次,共免疫 3 次。在免疫前和第 3 次免疫后 2 周采血分离血清,56℃ 30 min 灭活;用微量中和试验测定免疫猫血清中抗 FPV SN 抗体效价^[1],用微量 HI 试验检测血清中抗 FPV 和 CAV-2 HI 抗体效价^[12,13]。

2 结果

2.1 FPV VP2 蛋白基因的扩增及重组质粒的鉴定

经 0.8% 琼脂糖凝胶电泳,FPV GT-2 株 *vp2* 基因 PCR 产物大小约为 1806 bp,与预期结果相符。重组质粒 pVAXVP2 用 *Bam*H I 和 *Xho* I 双酶切,可得到 3000bp 和 1806bp 两个片段;用 *Hind* III、*Eco*R V 和 *Pst* I 线性化可得到 4806bp 大小的核酸片段,与预期值完全一致(图 1)。用其特异性引物扩增,结果得到 1806bp 的目的基因片段。表明 pVAXVP2 质粒构建正确。

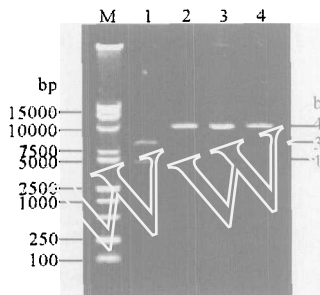


图 1 重组质粒 pVAXVP2 酶切鉴定结果

Fig. 1 Identification of pVAXVP2 by enzyme digestion
M, DL-15000+2000; 1, pVAXVP2/ *Xho* I + *Bam*H I; 2, pVAXVP2/ *Hind* III; 3, pVAXVP2/ *Eco*R V; 4, pVAXVP2/ *Pst* I.

2.2 重组质粒的酶切鉴定

重组质粒 pVAXΔE3VP2 和 pCAV-2-FPV-VP2 分别用不同的限制性内切酶酶切,结果均得到与预期大小一致的核酸片段,表明这两个重组质粒构建正确(图 2,3)。

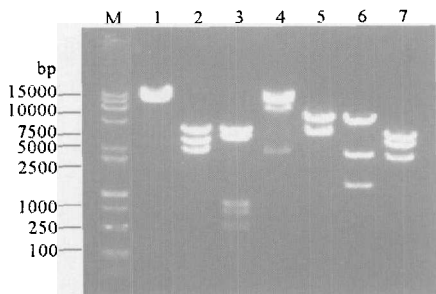


图 2 重组质粒 pVAXΔE3VP2 酶切鉴定结果

Fig. 2 Identification of pVAXΔE3 VP2 by enzyme digestion
M, DL-15000+2000; 1, pVAXΔE3 VP2/ *Eco*R I; 2, pVAXΔE3 VP2/ *Kpn*I; 3, pVAXΔE3 VP2/ *Bam*H I; 4, pVAXΔE3 VP2/ *Xho*I; 5, pVAXΔE3 VP2/ *Pst* I; 6, pVAXΔE3 VP2/ *Nru* I + *Sal* I; 7, pVAXΔE3 VP2/ *Xba* I.

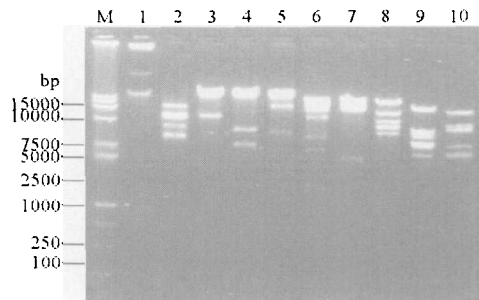


图 3 重组质粒 pCAV-2-FPV-VP2 酶切鉴定结果

Fig. 3 Identification of pCAV-2-FPV-VP2 by enzyme digestion

M, DL-15000+2000; 1, pCAV-2-FPV-VP2; 2, pCAV-2-FPV-VP2/ *Pst* I; 3, pCAV-2-FPV-VP2/ *Nru* I + *Sal* I; 4, pCAV-2-FPV-VP2/ *Bgl* II; 5, pCAV-2-FPV-VP2/ *Eco*R I; 6, pCAV-2-FPV-VP2/ *Xho* I; 7, pCAV-2-FPV-VP2/ *Bam*H I; 8, pCAV-2-FPV-VP2/ *Xba* I; 9, pCAV-2-FPV-VP2/ *Kpn* I; 10, pCAV-2-FPV-VP2/ *Sph* I.

2.3 重组病毒 CAV-2-VP2 基因组转染 MDCK 细胞

MDCK 细胞经过 1 次重组 DNA 转染后,盲传至第 4 代时出现细胞肿胀变圆、葡萄串样等典型的 CAV-2 样细胞病变(图 4),表明细胞培养物中可能含有重组病毒 CAV-2-VP2。

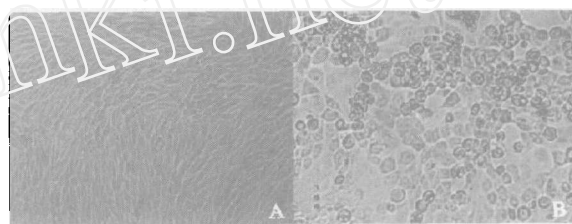


图 4 重组病毒在 MDCK 细胞产生的 CPE

Fig. 4 CPE was produced by recombinant virus in MDCK cells

A: Normal MDCK cell; B: CPE of recombinant virus CAV-2-VP2 in MDCK cells.

2.4 CAV-2-VP2 的鉴定

电镜负染检测,在病变细胞培养液上清中可观察到腺病毒样病毒粒子(图 5)。电镜超微结构观察,在其细胞核中可见呈排列整齐的腺病毒样粒子(图 6)。以提取重组病毒 CAV-2-*vp2* 基因组 DNA

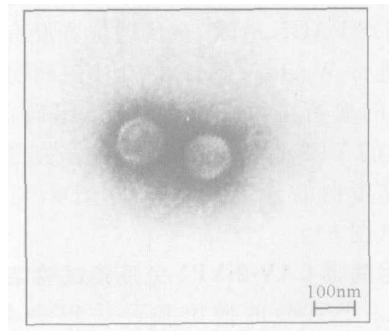


图 5 上清液中的腺病毒样颗粒

Fig. 5 Adenovirus-like in the supernatant of infected MDCK cells

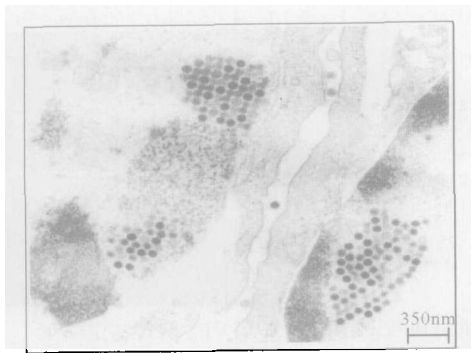


图 6 病变 MDCK 细胞超薄切片中的腺病毒样粒子
Fig. 6 Adenovirus-like in the ultrathin section of CPE MDCK cell

为模板,用 CAV-2 E3 特异性引物扩增出 3951bp 大小的片段,而正常 CAV-2 只能扩增出 1519bp 大小的片段;用 FPV VP2 特异性引物从重组病毒 DNA 中扩增出 1806bp *vp2* 基因片段,而正常的 CAV-2 扩增结果为阴性(图 7)。将从重组病毒 CAV-2-VP2 中扩增的片段纯化后进行测序,结果序列中包含 CAV-2 E3 区相关序列、pVAX1 相关序列和 FPV VP2 基因序列,表明所构建的重组病毒 CAV-2-VP2 完全正确。



图 7 重组病毒 CAV-2-VP2 的 PCR 鉴定结果
Fig. 7 Identification of recombinant virus by PCRs
M, Marker DL-15000+2000; 1, Recombinant CAV-2-VP2/ E3 primers; 2, Recombinant CAV-2-VP2 / VP2 primers; 3, Normal CAV-2/ E3 primers; 4, Normal CAV-2/VP2 primers.

2.5 重组病毒 CAV-2-VP2 表达 VP2 蛋白的检测

经 SDS-PAGE 电泳,在预期位置没有检测到蛋白带,但进行 Western blot 检测时在预期的位置出现了明显的血清学反应带,表明重组病毒 CAV-2-VP2 表达的 VP2 蛋白可被抗 FPV 多克隆抗体所识别,该表达蛋白的分子量约为 70 kDa,与预期的分子量相符(图 8)。

2.6 重组病毒 CAV-2-VP2 免疫猫试验结果

5 只 3 个月龄的健康猫经重组病毒 CAV-2-VP2 免疫 3 次后,血清中抗 FPV 和 CAV-2 HI 抗体效价分别为 1:788 和 1:6,抗 FPVSN 抗体效价

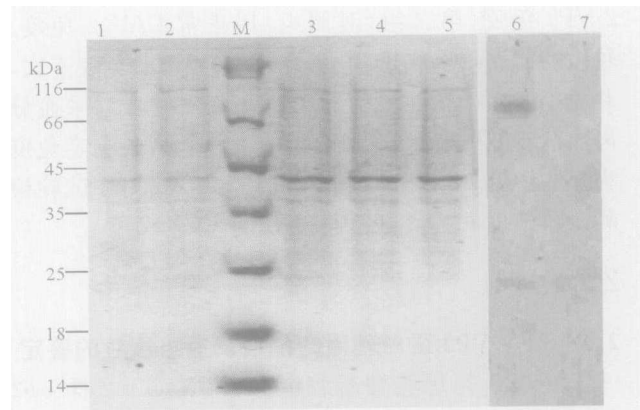


图 8 重组病毒 CAV-2-VP2 表达产物
Fig. 8 Analysis of expressed product by recombinant virus CAV-2-VP2

M, Protein molecular weight marker; 1, Normal MDCK cell; 2, MDCK cell infected by CAV-2; 3-5, The MDCK cells infected by recombinant virus CAV-2-VP2 of 5th, 10th and 15th passages, respectively; 6, Western blot analysis of CAV-2-VP2; 7, Negative control of CAV-2.

为 1:788;而对照组 5 只猫血清中抗 CAV-2 HI 抗体效价为 1:8,抗 FPV HI 和 SN 抗体效价均小于 1:2。

3 讨论

随着分子生物学技术地不断发展,动物病毒载体特别是腺病毒载体因具有基因组结构简单、分子背景清楚、容纳外源基因能力强和表达水平较高等优点而日益受到人们地关注,并成为研制安全、有效的新型活病毒载体疫苗的研究热点。腺病毒科可分为两个属,哺乳动物腺病毒属和禽类腺病毒属^[1,2]。CAV 属于腺病毒科哺乳动物腺病毒属成员,它包括犬 1 型腺病毒(CAV-1)和犬 2 型腺病毒(CAV-2)两个血清型。CAV-1 型可引起犬传染性肝炎和狐狸、熊的脑炎,而 CAV-2 型则引起犬的传染性喉气管炎和肠炎^[2,9]。CAV-2 弱毒与其它腺病毒载体相比有两个明显的优点,一是 CAV-2 可感染多种哺乳动物,以其构建载体研制的基因重组苗可在动物体内复制,免疫效果较好。二是作为载体的 CAV-2 对免疫动物来说本身具有一定的免疫原性,在其基因非必需区中插入某一种免疫原基因即为二价基因工程苗。现有的研究还发现,CAV-2 对 CAV-1 具有完全交叉保护能力,而且对免疫动物安全。1998 年,本实验室从沈阳等地送检的腹泻犬病料中分离得到了一株免疫原性良好的 CAV-2 SY 强毒,并在传代细胞上进行了驯化致弱。采用蚀斑克隆技术对致弱的 SY 毒株进行了纯化,从中筛选出一株产毒量高、免疫原性强、可作为 CAV 疫苗的候选毒株。动物

免疫试验表明,该候选毒株除肌肉和皮下注射能诱导免疫犬产生高效价的抗体外,通过口服途径也有较好的免疫效果。因此,在本试验中,我们使用了该弱毒株的全基因组感染性克隆作为原始的骨架质粒,为构建出具有自主知识产权的猫瘟热 VP2 基因重组腺病毒奠定了良好的基础。

FPV 衣壳由 VP1、VP2 和 VP3 3 种结构蛋白组成,其中 VP2 蛋白不但具有血凝活性,而且也是该病毒诱导机体产生中和抗体的主要保护性抗原^[4]。疫苗接种是控制 FPV 流行的有效途径之一。国外已有用貉痘病毒表达 FPV VP2 蛋白基因的研究报道^[10],并通过免疫试验证实其具有较好的免疫效果,但目前尚未见到用 CAV-2 作为载体表达 FPV VP2 的报道。在本试验中,我们采用了细菌内同源重组克隆 CAV-2 基因组-体外连接外源表达盒的方法进行了重组腺病毒的构建。首先我们选择了免疫原性良好的 GT-2 野毒株作为试验材料构建出含有目的基因的真核表达质粒 pVAXVP2,利用载体上的表达元件,将其克隆到含有 CAV-2 E3 区缺失的穿梭载体 pVAX Δ E3 中;运用穿梭载体与骨架载体上相同的酶切位点,将外源表达盒进一步克隆到骨架载体(含有 CAV-2 感染性全基因组)中^[11],得到含有外源表达盒的重组感染性 CAV-2 基因组,转染 MDCK 细胞后即可得到重组腺病毒 CAV-2-VP2。很显然,与传统的构建方法(真核细胞内同源重组或细菌内同源重组)相比,本试验的构建策略比以往的方法更简便和省时省力,因而具有更高的成功率。本实验室利用此法已成功获得了多株能表达含有外源基因的重组 CAV-2 病毒。

在本试验中,SDS-PAGE 检测没有发现目的蛋白带,可能与在真核细胞中表达的蛋白量较少有关。但 western blot 检测结果却表明,重组 VP2 蛋白进行了表达,表达产物能与猫抗 FPV 多克隆抗体发生血清学反应。动物免疫试验也表明,试验组猫经重组病毒 3 次免疫后,FPV 中和抗体滴度可达 1:512~1:1024,表明表达的 VP2 蛋白具有良好的免疫原性。由于我们选用的是外源的 CMV 启动子,与 CAV-2 自身携带

的晚期启动子相比有可能会影响目的蛋白的表达量,因此,我们下一步的研究目标是克隆 CAV-2 自身的启动子进一步提高目的蛋白的表达量,为重组病毒 CAV-2-VP2 的实用化奠定基础。

参考文献

- [1] 殷震,刘景华. 动物病毒学[M]. 2nd ed. 北京:科学出版社, 1997: 337-340;1155-1158.
- [2] 沈广,史计署,王林科. 经济动物群发病学[M]. 北京:北京农业大学出版社,1993. 113-116.
- [3] Kipar A, Kremendahl J, Jackson M L, *et al.* Comparative examination of cats with feline leukemia virus-associated enteritis and other relevant forms of feline enteritis[J]. *Vet Pathol*, 2001,38(4):359-371.
- [4] van Vuuren M, Steinel A, Goosen T, *et al.* Feline panleukopenia virus revisited; molecular characteristics and pathological lesions associated with three recent isolates[J]. *J S Afr Vet Assoc*, 2000, 71(3):140-143.
- [5] Ikegami T, Shirota K, Goto K, *et al.* Enterocolitis associated with dual infection by *Clostridium piliforme* and feline panleukopenia virus in three kittens[J]. *Vet Pathol*, 1999, 36(6): 613-615.
- [6] Chalmers W S, Tryggen U, Greenwood N M, *et al.* Efficacy of feline panleucopenia vaccine to prevent infection with an isolate of CPV2b obtained from a cat[J]. *Vet Microbiol*, 69(1-2): 41-45.
- [7] Norsworthy G D. Questions long-term immunity in cats[J]. *J Am Vet Med Assoc*, 1999,215(3):316-317.
- [8] Scott F W, Geissinger C M. Long-term immunity in cats vaccinated with an inactivated trivalent vaccine[J]. *Am J Vet Res*, 1999,60(5):652-658.
- [9] 夏咸柱. 养犬大全[M]. 长春:吉林人民出版社, 1993. 553-633.
- [10] Hu L, Esposito JJ, Scott FW. Raccoon poxvirus feline panleukopenia virus VP2 recombinant protects cats against FPV challenge[J]. *Virology*, 1996,218(1):248-252.
- [11] 张守峰,扈荣良,夏咸柱,等. 感染性犬 2 型腺病毒全基因组克隆及鉴定[J]. *中国兽医学报*, 2002,22:533-535.
- [12] 邱薇,夏咸柱,范泉水,等. 犬细小病毒血凝抑制抗体和抗体的关系[J]. *中国兽医科技*, 2000,30(10):3-4.
- [13] 范泉水,夏咸柱,邱薇,等. 犬传染性肝炎病毒的血凝抑制抗体和中和抗体的关系[J]. *动物医学进展*, 2002,23(1):64-66.