

重组犬瘟热病毒 F-H 融合基因乳酸菌的构建及表达

苏凤艳¹, 李哲¹, 李艳芝², 王春风³, 曾范利¹

(1. 吉林农业大学中药材学院 吉林 长春 130118; 2. 吉林省伊通满族自治县畜牧工作总站 吉林 伊通 130700;

3. 吉林省动物微生态制剂工程研究中心 吉林 长春 130118)

[收稿日期] 2016-07-29 [文献标识码] A [文章编号] 1002-1280 (2016) 09-0015-07 [中图分类号] S852.6

[摘要] 为了构建重组犬瘟热病毒(CDV) F-H 融合基因工程乳酸菌, 采用重叠延伸 PCR(SOE-PCR) 技术扩增 CDV F-H 融合基因。将 F-H 融合基因亚克隆至穿梭载体 pSIP409 多克隆位点上, 构建 pSIP-F-H 表达重组子, 并电转化至植物乳杆菌 NC8 感受态细胞中。利用 SDS-PAGE 和 Western blotting 检测 F-H 融合蛋白的表达情况。结果表明, 成功地扩增了 CDV F-H 融合基因, 构建了 pSIP-F-H 重组表达质粒, 并电转化至乳酸杆菌感受态细胞中。SDS-PAGE 和 Western blotting 检测表明, 重组乳酸杆菌表达了分子量约为 62.96 ku 的 F-H 融合蛋白, 且该蛋白能与 CDV 阳性抗体反应, 具有反应原性。

[关键词] 犬瘟热病毒; F-H 融合基因; 乳酸杆菌; 表达

Construction and Expression of Recombinant *Lactobacillus* Containing F-H Fusion Gene of Canine Distemper Virus from Mink

SU Feng-yan¹, LI Zhe¹, LI Yan-zhi², WANG Cun-feng³, ZENG Fan-li¹

(1. College of Chinese Medicinal Materials, Jilin Agricultural University, Changcun130118, China;

2. Animal Husbandry Work Station of Ytong Manzhou Autonomous County in Jilin Province, Jinlin, Ytong 130700, China;

3. Research Center of Animal Probiotics Engineering in Jilin Province, Changcun130118, China)

Abstract: In order to construct *Lactobacillus* containing a F-H fusion gene of canine distemper virus (CDV), the F-H fusion gene was amplified by gene splicing by overlap extension PCR (SOE-PCR). The F-H fusion gene was sub-cloned into shuttle carrier pSIP409 to construct a recombinant plasmid (named as pSIP-F-H). Then the recombinant plasmid pSIP-F-H was elec-transformed into *Lactobacillus plantarum* competence cells. SDS-PAGE and Western-blot were used to detect the expression of F-H fusion protein. In results, the F-H fusion gene of CDV was amplified successfully. The recombinant plasmid pSIP-F-H was constructed and elc-transformed into *Lactobacillus plantarum* competence cells successfully. Results of SDS-PAGE and Western-blot showed that recombinant *Lactobacillus* expressed a fusion protein (nearly 62.96 ku in size) and the protein

基金项目: 吉林省重点科技攻关项目(20130206039NY)

作者简介: 苏凤艳, 博士, 教授, 从事经济动物疾病防治方面研究。E-mail: sufy110@163.com

can react with CDV positive antibody.

Key words: canine distemper virus; F - H fusion gene; *Lactobacillus*; expression

犬瘟热系由副粘病毒科麻疹病毒属的犬瘟热病毒(Canine distemper virus, CDV)引起的高度接触性传染病^[1]。自1809年发现CDV以来,该病已给经济动物养殖业、养犬业、野生动物保护业、动物园观赏业造成了巨大的损失^[2]。且随着CDV的变异、动物对流行病因素的适应,CDV易感宿主范围有扩大的趋势,流行趋势由散在发生趋势向群发趋势发展,临床症状也越来越复杂,其危害也越来越大,单纯依靠传统疫苗免疫不能彻底防制犬瘟热的流行与发生^[3],有必要研制新型的基因工程疫苗来防控疾病的暴发。

CDV由基质蛋白(M)、核衣壳蛋白(NP)、磷蛋白(P)、血凝蛋白(H)、融合蛋白(F)和大蛋白(L)6种结构蛋白组成^[4],其中H和F两种糖蛋白组成病毒囊膜表面纤突,CDV通过H蛋白吸附到细胞表面的受体上,起细胞趋向作用,而F蛋白介导病毒与感染细胞、感染细胞与非感染细胞间融合,使病毒具有在宿主体内扩散的能力,是感染性病毒粒子进入宿主细胞所必需的,且可能介导病毒感染^[5]。具有中和作用的抗H蛋白抗体和抑制细胞融合的抗F蛋白抗体,在抗CDV感染的机制中发挥重要作用,是机体的主要保护性抗原,是目前制备CDV亚单位疫苗或合成疫苗的首选抗原^[6-7]。因此,本研究以穿梭载体pSIP409为工具,构建可表达CDV F-H基因的重组基因工程乳酸菌,为进一步研究基因重组乳酸杆菌的免疫效果及免疫保护作用奠定基础。

1 材料与方法

1.1 菌株和载体 大肠杆菌乳酸菌穿梭质粒载体pSIP409和植物乳杆菌NC8由印度卡马拉杰大学Anbazhagan. K高级研究员惠赠,吉林农业大学王春风教授保存。菌株*E. coli* BL21和DH5 α 由吉林农业大学经济动物实验室保存。pMD-18T-CDVF和pMD-18T-CDVH重组克隆质粒由本研究室构建。

1.2 工具酶和主要试剂 DNA Marker、*EcoR* I、*Hand* III、T4 DNA连接酶、PCR试剂盒均为TaKaRa公司产品;DNA凝胶回收试剂盒为杭州维特洁生化技术有限公司产品;蛋白质分子量标准为上海生物化学研究所产品。兔抗犬瘟热阳性血清由中国农科院左家特产研究所惠赠;HRP标记的山羊抗兔IgG为北京鼎国生物技术有限公司产品。PVDF转移膜为Gelman公司产品。

1.3 引物的设计与合成 为了扩增CDV的F-H融合基因,共设计了2对4条引物。根据犬瘟热病毒F和H基因设计特异性引物P1和P2、P3和P4。引物P1引入*EcoR*I酶切位点,引物P2引入一段由高亲水性氨基酸(Gly-Pro-Gly-Pro-Gly)编码基因GCCCGGACCCGGACC组成的linker;引物P3引入与P2互补的linker,引物P4引入*Hind* III酶切位点。引物由上海生工生物工程技术有限公司合成。

F-Linker上游引物P1: ATTAGAATTC CT-TAGGTATTATACTGAGT

F-Linker下游引物P2: GCCCGGACCCGGAC-CAGAGCGCCTAACCGTCTGAA

Linker-H上游引物P3: GGTCCGGGTC-CGGGCACACCTATGGATCATGTTGAG

Linker-H下游引物P4: CATTAAAGCTTTTA-ACGGTTACATGAGA

1.4 犬瘟热病毒H基因、F基因和F-H融合基因的扩增与纯化 分别以克隆质粒pMD18T-CDVF和pMD18T-CDVH质粒为模板,PCR扩增用于构建乳酸菌表达载体的F和H基因片段。

F-Linker反应体系:模板1 μ L,上游引物0.5 μ L,下游引物0.5 μ L,2 \times Master Mix 12.5 μ L, ddH₂O 10.5 μ L,总体积25 μ L。反应条件:94 $^{\circ}$ C预变性4 min,94 $^{\circ}$ C热变性30 s,50 $^{\circ}$ C退火30 s,72 $^{\circ}$ C延伸60 s,共35个循环,最后72 $^{\circ}$ C延伸10 min。

Linker-H反应体系:模板1 μ L,上游引物

0.5 μL , 下游引物 0.5 μL , $2 \times \text{Master Mix}$ 12.5 μL , ddH₂O 10.5 μL , 总体系 25 μL 。反应条件: 94 $^{\circ}\text{C}$ 预变性 4 min, 94 $^{\circ}\text{C}$ 热变性 30 s, 58.2 $^{\circ}\text{C}$ 退火 30 s, 72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 60 s, 共 35 个循环, 最后 72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 10 min。

F-H 融合基因 PCR 反应体系: F-Linker 回收产物 0.4 μL , Linker-H 回收产物 0.6 μL , F-Linker 上游引物 P1 0.5 μL , Linker-H 下游引物 P4 0.5 μL , $2 \times \text{Master Mix}$ 12.5 μL , dd H₂O 10.5 μL , 总体积 25 μL 。PCR 反应条件: 94 $^{\circ}\text{C}$ 预变性 5 min; 94 $^{\circ}\text{C}$ 变性 1 min, 50 $^{\circ}\text{C}$ 退火 1 min, 72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 1.5 min, 35 个循环; 72 $^{\circ}\text{C}$ 再延伸 10 min, 4 $^{\circ}\text{C}$ 保存。

扩增产物经 1% 琼脂糖凝胶电泳鉴定, 对扩增产物采用 DNA 片段纯化试剂盒纯化。

1.5 克隆载体 pMD18-F-H 重组克隆质粒的构建 将纯化的 F-H 融合基因与 pMD-18T Simple Vector 进行连接, 构建重组克隆质粒 pMD18-F-H。并将重组质粒转化 DH 5 α , 涂布于含 Amp 的 LB 固体培养基中进行筛选, 将阳性菌株用小量质粒抽提试剂盒抽提质粒, 进行 PCR 和酶切重组质粒的鉴定。

1.6 乳酸菌表达载体 pSIP-F-H 的构建与鉴定 将重组克隆质粒 pMD18-F-H 和乳酸菌表达载体 pSIP-409 分别以 *EcoR* I 和 *Hind* III 双酶切, 利用凝胶回收纯化试剂盒分别回收 F-H 基因和 pSIP-409 片段, 以 T4 DNA 连接酶于 16 $^{\circ}\text{C}$ 连接过夜, 次日转化至感受态细胞中。

挑取含 em 200 mg/mL LB 平板上 8 ~ 12 h 内生长的疑似阳性菌落, 分别接种于含 em 的 LB 液体培养基中, 37 $^{\circ}\text{C}$, 180 ~ 200 rpm 摇床过夜培养, 提取质粒, 进行 PCR 和双酶切鉴定。

1.7 植物乳杆菌 NC8 的电转化 取 5 μL 重组质粒 pSIP-F-H 加入 200 μL 乳酸菌感受态细胞中, 轻轻混匀, 移入预冷的电击杯中冰上静止 5 min, 调节电转化仪电压为 2.0 kV 和 6 ms, 进行电击。电转化结束后, 取出电击杯冰上静止 5 min, 将转化物移至 800 μL 的 MRS 液体培养基(含 0.5 mol/L 蔗糖)中, 30 $^{\circ}\text{C}$ 静止厌氧培养 3 h。取 150 μL 菌液涂布于 MRS 固体培养基(含

em 200 mg/mL), 30 $^{\circ}\text{C}$ 静止厌氧培养 24 - 36 h。挑选生长良好的单菌落, 接种于 5 mL MRS 液体培养基(含 em 200 mg/mL)中, 30 $^{\circ}\text{C}$ 静止厌氧培养过夜, 乘胜小量质粒提取试剂盒提取乳酸菌质粒, 并进行 PCR 和双酶切鉴定, 阳性质粒由上海生工生物工程技术有限公司测序。

1.8 CDV F-H 蛋白的表达检测

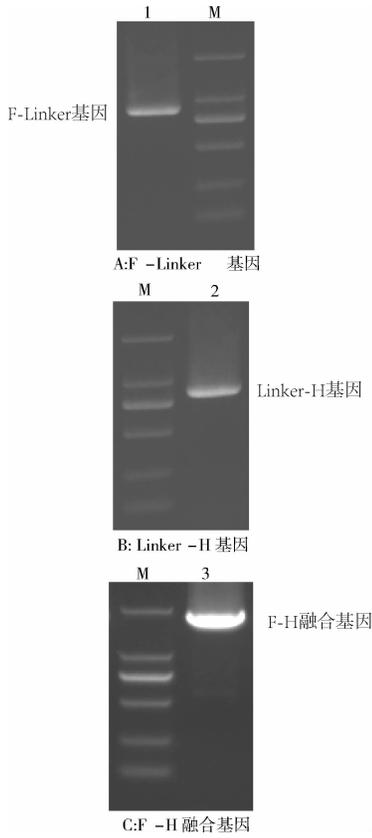
1.8.1 重组乳酸菌 SDS-PAGE 检测 将重组乳酸菌接种于 MRS 液体培养基(含 em 200 mg/mL)中, 30 $^{\circ}\text{C}$ 静止厌氧培养至 OD₆₀₀ 约等于 0.3 时, 添加诱导肽 SppIP 进行诱导培养, 于诱导前、诱导后 3 和 6 h 取菌液超声裂解进行 SDS-PAGE 检测。同法处理空载体 pSIP-409 乳酸菌培养作为对照。

1.8.2 重组乳酸菌的 Western blot 分析 经 SDS-PAGE 电泳后的表达产物电转移至 PVDF 膜后, 取出 PVDF 膜置于封闭液中, 37 $^{\circ}\text{C}$ 封闭 1 h。封闭结束后, 以洗涤缓冲液洗涤 PVDF 膜 3 次, 每次 3 min。加入犬瘟热多克隆抗血清, 37 $^{\circ}\text{C}$ 感作 1 h, 以洗涤缓冲液洗涤 PVDF 膜 5 次, 每次 3 min。加入 HRP 标记的羊抗兔 IgG 二抗, 37 $^{\circ}\text{C}$ 感作 1 h, 以洗涤缓冲液洗涤 PVDF 膜 5 次, 每次 3 min。加入新配制的 DAB 显色液, 37 $^{\circ}\text{C}$ 避光显色。

3 结果

3.1 F-Linker、Linker-H 和 F-H 融合基因的扩增结果 以克隆质粒 pMD18T-CDVF 和 pMD18T-CDVH 质粒为模板, 分别扩增得到了约 860 bp 的 F-Linker 基因(图 1A)、约 850 bp 的 Linker-H 基因(图 1B)、约 1700 bp 的 F-H 融合基因(图 1C), 与预期扩增的基因大小一致。

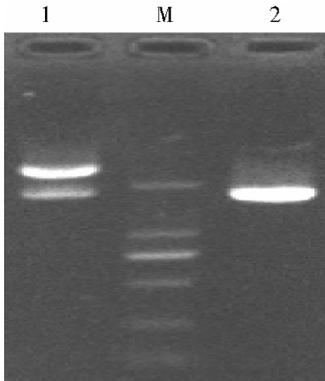
3.2 重组克隆质粒 pMD18-F-H 的 PCR 和酶切鉴定结果 以重组质粒 pMD18-F-H 为模板, 进行 PCR 扩增, 得到了约 1700 bp 的基因片段, 与预期大小相符(图 2)。经 *EcoR* I 和 *Hind* III 双酶切鉴定, 得到了约 2700 bp 的 pMD18-T 线性片段和大小约为 1700 bp 的目的片段, 结果表明, 该融合基因已经连接到克隆质粒 pMD-18T Simple vector 上(图 2)。



M. DNA 标准 DL 2000

(自上而下:2000,1000,750,500,250,100 bp)

图1 F-Linker、Linker-H和F-H融合基因的扩增结果



M. DNA 标准 DL 2 000

(自上而下:2000,1000,750,500,250,100 bp)

- 1. pMD18 - F - H EcoR I 和 Hind III 双酶切鉴定
- 2. pMD18 - F - H PCR 鉴定

图2 重组克隆质粒的鉴定结果

3.3 重组乳酸菌表达质粒 pSIP - F - H 和 pSIP - IL - F - H 的鉴定结果 以重组乳酸菌表达质粒

pSIP - F - H 为模板,进行 PCR 扩增,得到了约 1700 bp 的基因片段(图 3A),与预期大小相符。经 *EcoR* I 和 *Hind* III 双酶切鉴定,得到了 pSIP409 线性片段和大小约为 1700 bp 的目的片段(图 3B),初步表明,融合基因已经连接到乳酸菌表达载体 pSIP409 上。阳性重组乳酸菌表达质粒 pSIP - F - H 送往上海生工生物工程技术有限公司进行测序,结果与水貂源 CDV F - H 基因序列比对结果完全一致,没有出现缺失、移位、错配及突变现象,证实成功地构建了重组乳酸菌表达质粒 pSIP - F - H。

3.4 重组融合表达载体在大肠杆菌诱导表达结果

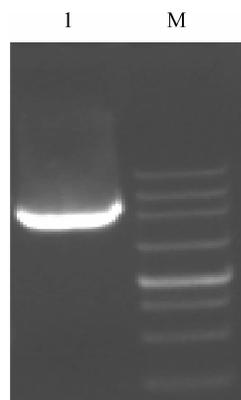
在 *E. coli* BL21 (DE3) 中,重组表达质粒 pSIP - F - H 由 SppIP 诱导表达,经 SDS - PAGE 电泳分析显示,重组表达质粒在 *E. coli* BL21 中出现表达产物,表达的融合蛋白大小约为 62.96 ku(图 4A),与预测大小相符。

为了进一步鉴定表达产物,将表达的蛋白质经 SDS - PAGE 后,电转移至 PVDF 膜上,以犬瘟热多克隆抗体为一抗,HRP 标记的山羊抗兔 IgG 为二抗,联苯胺 (DAB) 为底物,进行 western - blot 分析,在 62.96 ku(图 4B)处分别有一条明显的蛋白印迹带,表明经大肠杆菌表达后,表达产物依然具有与 CDV 抗血清结合的免疫反应性。

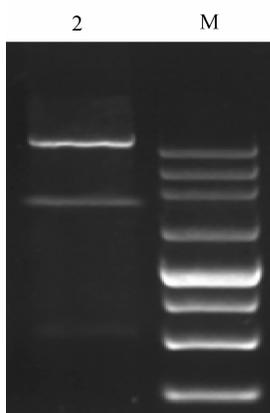
3.5 重组融合表达载体在乳酸菌中诱导表达结果

重组表达质粒 pSIP - F - H 在乳酸菌 NC8 中经 SppIP 诱导后,经 SDS - PAGE 电泳分析显示,重组表达质粒在乳酸菌中出现表达产物,表达的融合蛋白约为 62.96 ku(图 5A),与预测大小相符。

为了进一步鉴定表达产物,表达的蛋白质经 SDS - PAGE 后,电转移至 PVDF 膜上,以犬瘟热多克隆抗体为一抗,HRP 标记的山羊抗兔 IgG 为二抗,联苯胺 (DAB) 为底物,进行 western - blot 分析,在 62.96 ku(图 5B)处有一条明显的蛋白印迹带,表明经乳酸杆菌表达后,表达产物依然具有与 CDV 抗血清结合的免疫反应性。



A:PCR鉴定



B:双酶切鉴定

M. 250bp DNA Ladder Marker

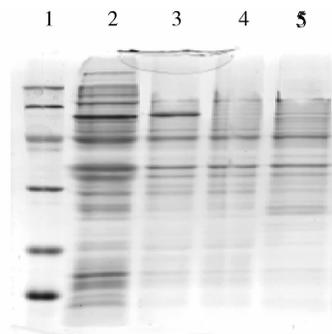
(自下而上:250、500、750、

1000、1500、2250、3000、4500 bp)

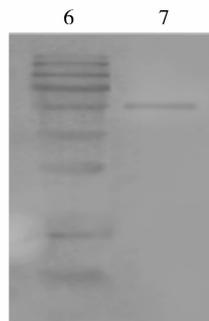
1. pSIP-F-H PCR 鉴定

2. pSIP-F-H EcoRI和HindIII双酶切鉴定

图3 重组乳酸菌表达质粒的鉴定



A:pSIP-F-H表达产物的SDS-PAGE分析



B:pSIP-F-H表达产物的Western-blot分析

1. 蛋白质分子量标准(97.4、66.2、43.0、31.0、20.1、14.4)；
- 2,3. pSIP-F-H在大肠杆菌BL21中表达产物；
4. 空载体pSIP-409在大肠杆菌BL21中诱导前产物；
5. 空载体pSIP-409在大肠杆菌BL21中诱导后产物；
6. 蛋白质分子量标准(180、135、100、75、63、48、35、25、17)；
7. pSIP-F-H在大肠杆菌BL21中表达产物

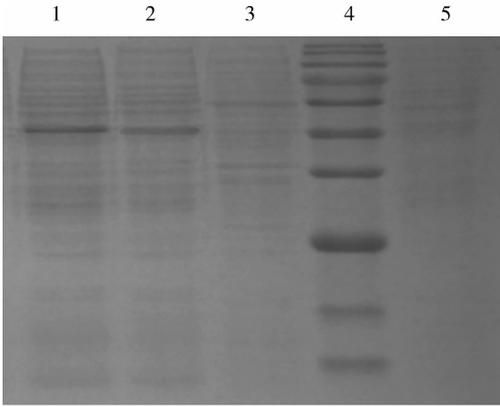
图4 大肠杆菌表达产物的鉴定

发生与流行。

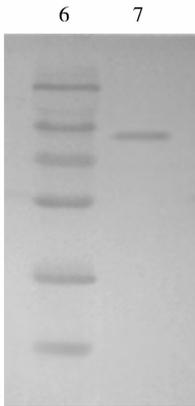
乳酸菌作为机体胃肠道菌群中的益生菌,可调节胃肠道常菌群,保持胃肠道内微生态平衡,增强机体的免疫力,且菌体本身含有的多种成分亦有强大的益生功能^[13],不产生内毒素,菌体表达的外源蛋白不需要纯化即可与菌体一起服用,是目前较理想的转化或表达系统^[14-15]。目前乳酸菌作为递呈肽类、低聚糖和核酸等生物分子载体的研究日益成熟,乳酸菌已成为运载功能分子的重要工具,在介导消化道局部免疫,进而影响全身免疫具有重要作用^[16]。胡静涛等^[17]构建了重组鹅源新城疫病毒(NDV)HN基因乳酸杆菌,SDS-PAGE和Western-blot检测结果表明,构建的HN基因重组乳酸菌可表达与HN蛋白大小相符的条带,而且该表达蛋白可与NDV阳

4 讨论

随着毛皮动物养殖业的不断扩大,集约化、密集程度越来越高,犬瘟热成为严重威胁毛皮动物养殖业的疾病之一。尽管我国在毛皮动物犬瘟热的诊断和防制上也做了大量的卓有成效的工作,研制成功了犬瘟热弱毒疫苗和灭活苗,在全国范围内大面积推广,并取得了明显的经济效益。但是,在实际生产中,犬瘟热仍时有暴发^[8-10],尤其近几年来,国内许多地区频频出现免疫毛皮动物爆发犬瘟热的报道^[11-12]。由于毛皮动物犬瘟热发病日趋严重,生产上迫切需要有效的防治技术,急需开展深入研究并研制高效的防制技术,有效控制犬瘟热的



A: pSIP-F-H表达产物的SDS-PAGE分析



B: pSIP-F-H表达产物的SDS-PAGE分析

- 1, 2. pSIP-F-H在乳酸杆菌NC8中表达产物;
3. 空载体pSIP-409在乳酸杆菌NC8中诱导前的产物;
4. 蛋白质分子量标准(180、135、100、75、63、48、35、25、17);
5. 空载体pSIP-409在乳酸杆菌NC8中诱导后的产物;
6. 蛋白质分子量标准(97.4、66.2、43.0、31.0、20.1、14.4);
7. pSIP-F-H在乳酸杆菌NC8中表达产物

图6 乳酸杆菌表达产物的鉴定

性抗体发生反应,具有反应原性。苏君鸿等^[18]以乳酸杆菌为载体构建了猪传染性胃肠炎病毒S基因A、D抗原位点DNA疫苗,具有益生性与免疫预防的双重功效。本研究以CDV的H基因和F基因为研究对象,采用SEQ-PCR技术扩增CDV的F-H融合基因,成功构建了CDV F-H基因的重组质粒pSIP-F-H,电击转入乳酸杆菌NC8中构建重组乳酸工程菌,SDS-PAGE和Western-blot分析结果证实,该重组菌能够表达CDV的F-H融合蛋白,且该表达蛋白可与CDV的多克隆抗体反应,具有免疫原性,这一研究结论与胡静涛、苏群鸿等研究结果一致,即重组乳

酸工程菌可作为候选疫苗进一步开发利用。

本研究将疫苗的免疫预防作用与乳酸杆菌的益生作用有机结合起来,将水貂源犬瘟热病毒F基因与H基因融合在一起,构建了含有F基因和H基因的重组乳酸工程菌,为以乳酸杆菌为载体的新型疫苗系统的研发以及动物疾病的预防提供新的思路。

参考文献:

- [1] 夏威柱. 养犬大全[M]. 吉林:吉林人民出版社,1993:549-553.
- [2] 刘继红. 犬瘟热病毒的研究进展[J]. 检验检疫科学,2007,17(1-2):144-149.
- [3] 陈秀. 犬瘟热流行病学调查与防控措施[J]. 中国畜牧兽医,2012,39(12):169-172.
- [4] Sidhu M S, Husar W, Cook S D, et al. Canine distemper terminal and intergenic non-protein coding nucleotide sequence: completion of the entire CDV genome sequence[J]. Virology, 1993, 193(1):66-72.
- [5] Wild T F, Fayolle I, Beauverger P, et al. Measles virus fusion: role of the cysteine-rich region of the fusion glycoprotein[J]. J Virol, 1994, 68(11):7546-7548.
- [6] Hirayama N, Senda M, Nakashima N, et al. Protective effects of monoclonal antibodies against lethal canine distemper virus infection in mice[J]. J Gen Virol, 1991, 72(11):2827-2830.
- [7] Obeid O E, Partrudus C D, Howard C R, et al. Protection against morbillivirus-induced encephalitis by immunization with a rational designed synthetic peptide vaccine containing B- and T-cell epitopes from the fusion protein of measles virus[J]. J Gen Virol, 1995, 69(3):1420-1428.
- [8] 王聪, 郇政敏, 张荧, 等. 水貂犬瘟热流行病学调查[J]. 中国畜牧兽医, 2013, 40(4):198-201.
- [9] 杨丽, 徐广贤, 段相国, 等. 犬瘟热病毒的分离与鉴定[J]. 中国兽医科学, 2016, 46(2):228-231.
- [10] 孙彦刚, 赵建军, 史宁, 等. 狐源犬瘟热病毒的分离鉴定及H基因遗传变异分析[J]. 中国预防兽医学报, 2016, 38(3):206-210.
- [11] 王琦, 张永光. 犬瘟热免疫失败原因与对策[J]. 新农业, 2015(11):52-53.
- [12] 刘秉玺, 张彦双. 浅谈狐犬瘟热免疫失败原因及相应防控措施[J]. 吉林畜牧兽医, 2015(1):59-60.

- [13] 黄皓,胡珊,梁卫驱,等. 乳酸菌微胶囊制剂的功能性与稳定性研究[J]. 中国食品添加剂,2016(4):90-93.
- [14] 蔡若鹏,杨桂连,王春风. 口服重组乳酸菌的药用研究与应用[J]. 中国药学杂志,2014,49(22):1973-1977.
- [15] 任大勇,李昌,秦艳青,等. 乳酸菌益生功能及作用机制研究进展[J]. 中国兽药杂志,2011,45(2):47-50.
- [16] 刘晓锐,张晓红,吴洁. 乳酸乳球菌在疫苗递呈载体中的应用[J]. 药物生产技术,2014,21(1):75-80.
- [17] 胡静涛,郭衍冰,杨文涛,等. 重组鹅源新城疫病毒 HN 基因乳酸菌的构建[J]. 中国兽医科学,2015,45(12):1242-1246.
- [18] 苏君鸿,李云岗,陈树林,等. 以乳酸杆菌为载体的猪传染性胃肠炎病毒 S 基因 A、D 抗原位点 DNA 疫苗的构建[J]. 动物医学进展,2009,30(8):19-23.

(编辑:陈希)