



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 111534547 A

(43)申请公布日 2020.08.14

(21)申请号 202010426111.4

(22)申请日 2020.05.19

(71)申请人 扬州大学

地址 225009 江苏省扬州市大学南路88号

(72)发明人 叶建强 隆玉兰 秦爱建 张伟

王伟康 谢泉 张建军 李拓凡

万志敏 邵红霞

(74)专利代理机构 扬州苏中专利事务所(普通

合伙) 32222

代理人 沈志海

(51)Int.Cl.

C12N 15/866(2006.01)

C12N 15/70(2006.01)

权利要求书1页 说明书5页

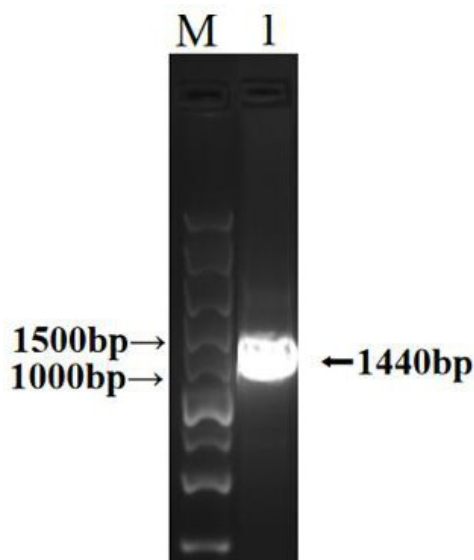
序列表1页 附图3页

(54)发明名称

一种表达血清4型禽腺病毒纤突蛋白F2的重组杆状病毒的构建方法

(57)摘要

本发明涉及一种表达血清4型禽腺病毒纤突蛋白F2的重组杆状病毒的构建方法,包括以下步骤:(1)构建FAdV-4-F2基因重组杆状病毒表达载体;(2)表达重组FAdV-4蛋白的杆状病毒包装和传代;(3)将携带有FAdV-4-F2基因的杆状病毒基因组转染进sf9细胞,27℃培养箱中培养5-7天,观察细胞病变情况;当细胞病变达到70%时收集细胞裂解液,离心去沉淀,作为种毒保存;进行病毒的传代,传至第3代时,作为种毒扩大培养。本发明利用杆状病毒表达系统构建了含F2基因的重组杆状病毒穿梭载体,将其转染Sf9细胞后获得重组杆状病毒rBA-F2,通过间接免疫荧光试验(IFA)和Western blot鉴定重组蛋白F2的表达。



1. 一种表达血清4型禽腺病毒纤突蛋白F2的重组杆状病毒的构建方法,其特征在于,包括以下步骤:

(1) 构建FAdV-4-F2基因重组杆状病毒表达载体;

设计F2基因扩增引物、pFastBacHTA线性化载体扩增引物,F2基因扩增引物扩增F2基因,pFastBacHTA线性化载体扩增引物扩增pFastBacHTA线性化载体,并连接转化至大肠杆菌DH5 α 感受态细胞,涂于加有Amp⁺的LB琼脂平板,过夜培养,利用菌落PCR鉴定阳性克隆,构建重组质粒pFastBacHTA-FAdV-4-F2;

F2基因扩增引物序列为:

上游引物: TTCAAAGGCCTACATGCTCCGGGCCCTAA;

下游引物: CTCTAGATTCTTACGGGAGGGAGGCC;

pFastBacHTA线性化载体扩增引物序列为:

上游引物: TAAGAATCTAGAGCCTGCAGTCTCGAG;

下游引物: CATGTAGGCCTTTGAATCCGCGCGCTTCG;

(2) 表达重组FAdV-4蛋白的杆状病毒包装和传代;

将构建成功的pFastBacHTA-FAdV-4-F2质粒转化进DH10Bac感受态细胞,利用蓝白斑筛选技术获得重组的阳性克隆;挑取单克隆,37 $^{\circ}$ C过夜扩大培养后,提取重组的带有F2基因的杆状病毒基因组,同时取不含目的片段的杆状病毒转移载体质粒作为阴性对照;利用pUC/M13 Forward和pUC/M13 Reverse引物,PCR扩增验证杆状病毒基因组;

(3) 将携带有FAdV-4-F2基因的杆状病毒基因组转染进sf9细胞,27 $^{\circ}$ C培养箱中培养5-7天,观察细胞病变情况;当细胞病变达到70%时收集细胞裂解液,离心去沉淀,作为种毒保存;进行病毒的传代,传至第3代时,作为种毒扩大培养。

一种表达血清4型禽腺病毒纤突蛋白F2的重组杆状病毒的构建方法

技术领域

[0001] 本发明涉及一种表达血清4型禽腺病毒纤突蛋白F2的重组杆状病毒的构建方法，属于生物技术领域。

背景技术

[0002] 禽腺病毒 (Fowl Adenovirus, FAdV) 属于腺病毒科禽腺病毒属，分为5个种 (A-E)，12个血清型。其中FAdV-4可通过接触水平传播及垂直传播，对雏鸡的致病力最强，致死率高，发病的宿主包括白羽肉鸡、肉种鸡、蛋鸡、黄羽鸡。临床表现为包涵体肝炎 (IBH)、心包积水肝炎综合征 (HHS)。随着我国养鸡业的迅速发展，禽腺病毒的爆发给家禽业造成了严重的经济损失。而F2蛋白是FAdV-4的衣壳蛋白之一，F2蛋白具备很好的抗原性，被认为与FAdV-4的组织嗜性有关，且能有效刺激机体产生中和抗体。由于目前尚无快速特异检测FAdV-4的血清学方法及商品化FAV-4疫苗。为减少FAdV-4给我国禽行业带来的损失，进一步研究建立诊断方法和生产FAdV-4亚单位疫苗及快速诊断试剂，本发明通过构建含FAdV-4-F2蛋白的重组杆状病毒载体，并利用杆状病毒表达系统在昆虫细胞中表达了F2蛋白，为建立及生产安全、可靠、适合推广的FAdV-4血清学检测方法和亚单位疫苗奠定了基础。

发明内容

[0003] 本发明的目的是提供一种表达血清4型禽腺病毒纤突蛋白F2的重组杆状病毒的构建方法。本发明的原理是通过扩增禽腺病毒血清4型的纤突蛋白F2全长片段，构建杆状病毒重组载体，转染Sf9细胞，获得能够表达纤突蛋白F2的杆状病毒。间接免疫荧光试验 (IFA) 和免疫印迹试验 (Western-blot) 结果显示，在Sf9细胞中扩增的含有F2蛋白的重组杆状病毒能够与鼠抗F2蛋白单克隆抗体发生特异性反应。

[0004] 本发明的目的是这样实现的，一种表达血清4型禽腺病毒纤突蛋白F2的重组杆状病毒的构建方法，其特征在于，包括以下步骤：

[0005] (1) 构建FAdV-4-F2基因重组杆状病毒表达载体；

[0006] 设计F2基因扩增引物、pFastBacHTA线性化载体扩增引物，F2基因扩增引物扩增F2基因，pFastBacHTA线性化载体扩增引物扩增pFastBacHTA线性化载体，并连接转化至大肠杆菌DH5 α 感受态细胞，涂于加有Amp⁺的LB琼脂平板，过夜培养，利用菌落PCR鉴定阳性克隆，构建重组质粒pFastBacHTA-FAdV-4-F2；

[0007] F2基因扩增引物序列为：

[0008] 上游引物：TTCAAAGGCCTACATGCTCCGGGCCCTAA；

[0009] 下游引物：CTCTAGATTCTTACGGGAGGGAGGCC；

[0010] pFastBacHTA线性化载体扩增引物序列为：

[0011] 上游引物：TAAGAATCTAGAGCCTGCAGTCTCGAG；

[0012] 下游引物：CATGTAGGCCTTTGAATTCGCGCGCTTCG；

[0013] (2) 表达重组FAdV-4蛋白的杆状病毒包装和传代；

[0014] 将构建成功的pFastBacHTA-FAdV-4-F2质粒转化进DH10Bac感受态细胞，利用蓝白斑筛选技术获得重组的阳性克隆；挑取单克隆，37℃过夜扩大培养后，提取重组的带有F2基因的杆状病毒基因组，同时取不含目的片段的杆状病毒转移载体质粒作为阴性对照；利用pUC/M13 Forward和pUC/M13 Reverse引物，PCR扩增验证杆状病毒基因组；

[0015] (3) 将携带有FAdV-4-F2基因的杆状病毒基因组转染进sf9细胞，27℃培养箱中培养5-7天，观察细胞病变情况；当细胞病变达到70%时收集细胞裂解液，离心去沉淀，作为种毒保存；进行病毒的传代，传至第3代时，作为种毒扩大培养。

[0016] 通过本发明，本发明的目的是通过以下技术方案实现的：

[0017] (1) 设计引物分别扩增血清4型禽腺病毒F2基因以及pFastBacHTA线性化载体，具体引物序列见表1，由苏州金唯智生物科技有限公司合成。

[0018] (2) 利用一步克隆法将F2基因克隆到pFastBacHTA载体上；

[0019] (3) 将上述步骤得到的质粒转化入DH10Bac感受态细胞中，制备重组穿梭质粒(rBa-F2)；

[0020] (4) 将rBa-F2转染入昆虫细胞，得到表达血清4型腺病毒F2基因的重组杆状病毒，表达重组蛋白。

[0021] (5) 通过Western-blot以及IFA方法对病毒表达的重组蛋白进行免疫反应性鉴定。

[0022] 本发明所述的血清4型禽腺病毒纤突蛋白F2利用该杆状病毒载体表达，且表达水平高，含有His标签，可以方便后期的纯化步骤，可以制备成禽腺病毒4型亚单位疫苗，也可以作为建立FAdV-4酶联免疫吸附试剂制备研发中的包被用抗原。

[0023] 发明原理描述：

[0024] 杆状病毒表达系统是利用体外重组技术，重新包装的携带外源基因F2的杆状病毒，感染Sf9细胞，使得重组杆状病毒在Sf9细胞中扩增，并且释放到细胞外面，存在于细胞上清中，后期可借助His标签蛋白，纯化外源蛋白。该系统表达的外源蛋白具有天然的构象，可通过蛋白纯化获得高纯度和高浓度蛋白，纯化的产物将有利于肌肉或者口服免疫。

[0025] 所以本发明选择F2作为表达对象，以期获得天然构象的F2蛋白，作为预防FAdV-4感染的候选疫苗和检测FAdV-4的抗体的抗原物质。

[0026] 与现有技术相比，本发明具有如下的有益技术效果：

[0027] (1) 基于昆虫杆状病毒表达系统优于原核表达系统的优点，表达外源蛋白时具有完备的翻译后加工修饰能力，在昆虫细胞上表达FAdV-4-F2蛋白，其具有天然构象，具有较好的模拟FAdV-4的免疫原作用；

[0028] (2) 利用杆状病毒表达系统制备的重组蛋白在Sf9昆虫细胞中的表达量高，易于纯化。

[0029] 本发明利用杆状病毒表达系统构建了含F2基因的重组杆状病毒穿梭载体，将其转染Sf9细胞后获得重组杆状病毒rBA-F2，通过间接免疫荧光试验(IFA)和Western blot鉴定重组蛋白F2的表达。本发明将提供一种表达血清4型禽腺病毒纤突蛋白F2的重组杆状病毒的构建方法，其在Sf9昆虫细胞中蛋白表达量高，易于纯化，所表达的蛋白具有天然的构象，其抗原性与天然病毒抗原性相似，可为进一步研制血清4型禽腺病毒基因工程亚单位疫苗提供候选抗原，同时也为深入研究FAdV-4致病机理提供基础试验材料。

附图说明

[0030] 图1为F2基因扩增图;其中:M为Super DNA Marker;1为F2扩增片段。

[0031] 图2为引物M13F和M13R检测目的基因在杆状病毒中的重组;其中:M:Super DNA Marker;泳道1:rBacmid-FAdV-4-F2;泳道2:rBacmid-HTA control;泳道3:rBacmid-DNA control。

[0032] 图3为重组蛋白的Western blot表达鉴定图;其中:M:Protein Marker;泳道1:感染rBacmid-FAdV-4-F2重组杆状病毒的Sf9细胞裂解产物;泳道2:rBacmid-HTA control;泳道3:Sf9 control。

[0033] 图4为重组杆状病毒rBacmid-FAdV-4-F2感染Sf9细胞间接免疫荧光检测。

具体实施方式

[0034] 下面结合附图和实施例对本发明作进一步说明:

[0035] 1材料

[0036] 1.1菌种、质粒、细胞

[0037] 血清4型禽腺病毒JH为本实验室分离鉴定。DH5 α 感受态细胞、DH10Bac感受态细胞、以及Sf9昆虫细胞、pFastBacHTA质粒均由本实验室保存

[0038] 1.2主要试剂

[0039] 抗F2蛋白的单克隆抗体由实验室保存;Phanta Super-Fidelity DNA聚合酶、Gene 1Kb Super Marker、2 \times Taq Master Mix以及ExnaseTMII连接酶购自南京诺唯赞公司;质粒小提试剂盒购自AxyPrep公司;凝胶回收DNA试剂盒购自QIAGEN公司;LipofectamineTM 3000转染试剂、FBS胎牛血清购自Gibco公司;羊抗鼠FITC标记的IgG购自SIGMA公司;Western-blot曝光液购自南京菲尔特生物技术公司;庆大霉素(GEN)、卡那霉素(Kan)、四环素(TET)、X-gal购自上海生工生物公司。

[0040] 1.3主要培养基

[0041] LB液体培养基、含Amp的LB液体培养基、含Amp的LB固体培养基、SOC培养基、选择性LB液体培养基、选择性LB固体培养基由本实验室自行配制。SF900培养基购自Gibco公司。

[0042] 1.4引物的设计和合成

[0043] 根据FAdV-4序列登录号碱基序列设计用于扩增出pFastBacHTA线性化载体与FAdV-4禽腺病毒F2蛋白基因片段的引物,具体引物序列见表1

[0044] 表1.PCR扩增线性化pFast-Bac-HTA及禽腺病毒F2基因引物

PCR 产物	引物序列 5' -3'
[0045] pFastBacHTA 线性化载体	上游引物:(SEQ ID NO.1) TAAGAATCTAGAGCCTGCAGTCTCGAG
	下游引物:(SEQ ID NO.2) CATGTAGGCCTTTGAATTCCGCGCGCTTCG
FAdV-4 病毒 F2 蛋白基因片段	上游引物:(SEQ ID NO.3) TTCAAAGGCCTACATGCTCCGGGCCCTAA
	下游引物:(SEQ ID NO.4) CTCTAGATTCTTACGGGAGGGAGGCC

[0046] 2.方法

[0047] 2.1目的基因的扩增

[0048] 首先制备禽腺病毒基因组,将血清4型禽腺病毒分离毒株病毒经细胞裂解液裂解,

随后用酚、氯仿、异戊醇进行病毒基因组抽提,最后用无水乙醇沉淀,溶于30 μ L灭菌超纯水,即得禽腺病毒基因组,置-20 $^{\circ}$ C备用。取1 μ L提取的血清4型禽腺病毒DNA作为模板进行纤突蛋白基因F2的PCR扩增,采用50 μ L的PCR体系。反应条件为:DNA模板1 μ L,5 \times Buffer 10 μ L,dNTP Mix 1 μ L,引物各2 μ L,高保真酶1 μ L,加入灭菌超纯水至50 μ L。反应程序为:95 $^{\circ}$ C预变性4min,95 $^{\circ}$ C变性30s,55 $^{\circ}$ C退火30s,72 $^{\circ}$ C延伸3min,共30个循环;72 $^{\circ}$ C延伸10min。同时以pFastBacHTA载体质粒为模板,PCR扩增线性化的pFastBacHTA载体。PCR反应体系、条件与程序与PCR扩增F2基因一致。PCR产物经1%琼脂糖凝胶进行电泳,电压为90V,电泳时间为45min;如图1所示,在1440bp处出现单一条带,证明获得所需的基因片段。

[0049] 2.2重组供体质粒pFastBacHTA-FAdV-4-F2的构建克隆载体与鉴定

[0050] 将步骤2.1扩增得到的目的片段与pFastBacHTA线性化于室温连接半小时后,将连接产物转化至DH5 α 感受态细胞后涂板,倒置平板于37 $^{\circ}$ C的恒温培养箱过夜培养,挑取单菌落进行PCR鉴定,PCR为阳性即得到了克隆载体pFastBacHTA-FAdV-4-F2,将PCR为阳性的菌液采用AxyGEN公司的小提质粒提取步骤提取阳性质粒进行保存。重组质粒进行测序鉴定正确后表明成功构建重组供体质粒pFastBacHTA-FAdV-4-F2。

[0051] 2.3重组杆状病毒穿梭质粒rBacmid-FAdV-4-F2的构建与鉴定

[0052] 将重组供体质粒转化入DH10Bac感受态细胞于SOC培养基,37 $^{\circ}$ C,225rpm震荡培养4h,用SOC培养基依次将培养物稀释三个浓度梯度,分别取200 μ L均匀涂布于含卡那霉素(50 μ g/mL)、四环素(10 μ g/mL)、庆大霉素(7 μ g/mL)、IPTG(100mM)和Bluo-gal的LA-Bac平板上,37 $^{\circ}$ C培养72h,直至菌落完全出现。进行蓝白斑筛选,挑选阳性白色克隆在新鲜LA-Bac选择性固体培养基上进行纯化,37 $^{\circ}$ C培养48h-72h;连续纯化3代,直到不再出现蓝色菌落,挑取单菌落,进行菌落PCR鉴定,获得鉴定正确的阳性菌。采用碱裂解法提取得到的阳性菌的重组质粒,使用M13F/M13R进行PCR鉴定,结果如图2所示,扩增产物为4440bp,证明目的基因已转座成功,重组质粒rBacmid-FAdV-4-F2构建成功。

[0053] 2.4重组质粒在昆虫细胞中的表达

[0054] 重组杆状质粒转染Sf9昆虫细胞,将SF900培养基、质粒DNA和LipofectamineTM 3000,轻轻吹打混匀,室温静置15min;将混合物加入至6孔板中长至80%-90%的细胞单层;于27 $^{\circ}$ C培养箱培养7d;收集培养上清液即为P1代重组杆状病毒rBacmid-FAdV-4-F2,将其作为种毒,传至第3代,收集培养上清液及细胞沉淀,对细胞沉淀进行Western-Blot分析其表达产物,出现特异性条带时,将对应的含重组杆状病毒的细胞上清液分装冻存于-80 $^{\circ}$ C作为种毒。

[0055] 2.5表达产物的鉴定

[0056] 1) Western-blot鉴定

[0057] 细胞经10000rpm/min离心5min,分别收集细胞沉淀和上清,随后在细胞沉淀中加入100 μ L细胞裂解液,混匀后立即冰浴裂解,30min后加入6 \times Buffer 20 μ L混匀后放置于恒温金属浴98 $^{\circ}$ C煮10min至无黏稠状;随即将样品经SDS-PAGE电泳分离后,用转印仪将蛋白转到NC硝酸纤维素膜上进行Western-Blot分析。转印有蛋白的NC膜用5%脱脂乳室温封闭2h,抗F2单抗1C9为一抗,用5%的脱脂乳稀释成1:1500,4 $^{\circ}$ C孵育过夜,次日用PBST洗膜3次,5min/次;洗后孵育二抗,二抗为商品化的羊抗鼠HRP标记的二抗,用5%的脱脂乳稀释成1:10000,常温孵育1h,用PBST洗膜,洗膜3次,5min/次;最后ECL发光液显色后,于化学发光成

像系统中拍照。如图3所示,在转染了rBacmid-FAdV-4-F1的Sf9细胞裂解物在蛋白质分子量在约70KDa处出现了F2特异性蛋白条带,而在转染pFAST-BacHTA载体的对照细胞和正常Sf9细胞中未出现特异性条带。

[0058] 2) 间接免疫荧光检测 (IFA)

[0059] 在48孔板上,将转染第3代重组病毒且维持培养2天的细胞用预冷的丙酮:乙醇(3:2)固定液固定,干燥后,以抗F2蛋白小鼠单抗为一抗,稀释度为1:1000,每孔200 μ L,37 $^{\circ}$ C作用45min;弃去一抗,用PBS清洗3遍,加入1:200稀释的羊抗鼠FITC标记的二抗200 μ L,37 $^{\circ}$ C作用45min,弃去二抗,用PBS清洗3遍后,置于倒置荧光显微镜观察并拍照。结果如图4所示,在转染了重组rBacmid-FAdV-4-F2的Sf9细胞中均可见特异性的亮绿色荧光,而转染rBacmid-HTA的野生型杆状病毒的对照细胞和正常Sf9细胞中未见特异性的亮绿色荧光。

[0060] Western blot以及IFA均证明该重组杆状病毒能够成功表达目的蛋白F2。

序列表

<110> 扬州大学

<120> 一种表达血清4型禽腺病毒纤突蛋白F2的重组杆状病毒的构建方法

<160> 4

<170> SIPOSequenceListing 1.0

<210> 1

<211> 27

<212> DNA

<213> 人工序列 (Artificial Sequence)

<400> 1

taagaatcta gagcctgcag tctcgag 27

<210> 2

<211> 30

<212> DNA

<213> 人工序列 (Artificial Sequence)

<400> 2

catgtaggcc tttgaattcc gcgcgcttcg 30

<210> 3

<211> 30

<212> DNA

<213> 人工序列 (Artificial Sequence)

<400> 3

ttcaaaggcc tacatgctcc gggcccctaa 30

<210> 4

<211> 26

<212> DNA

<213> 人工序列 (Artificial Sequence)

<400> 4

ctctagattc ttacgggagg gaggcc 26

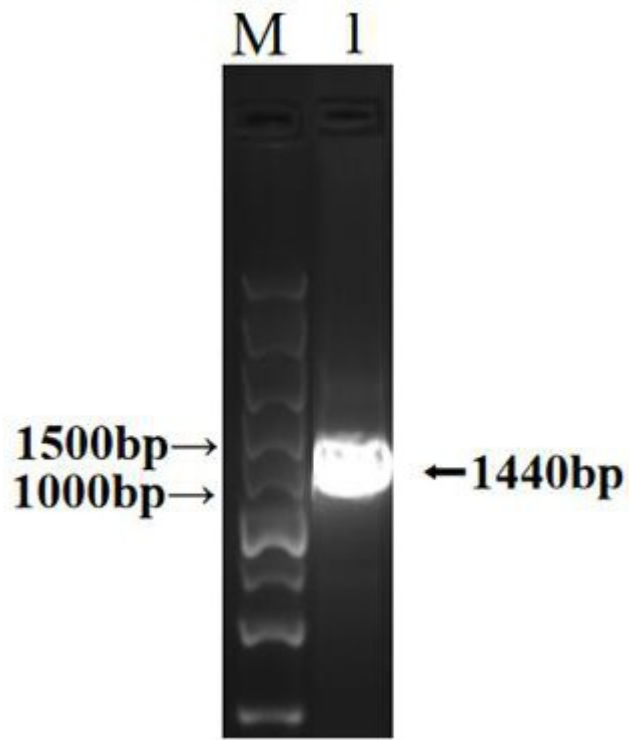


图1

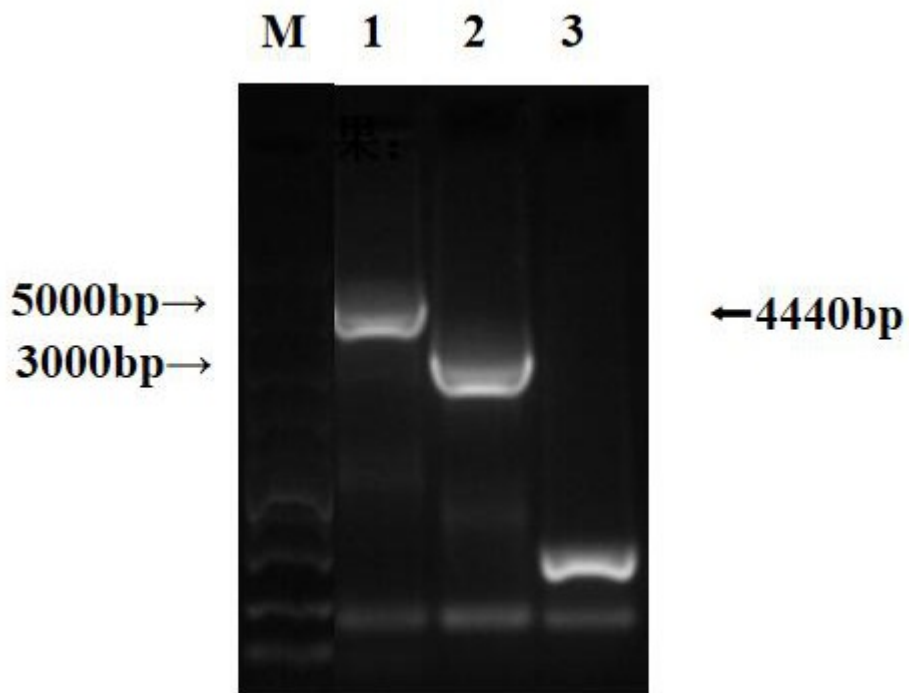


图2

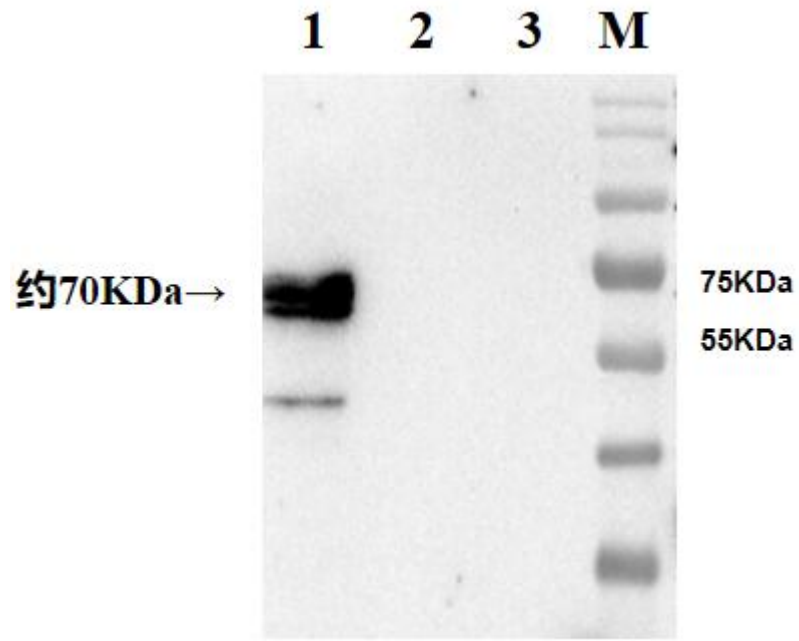


图3



图4