

# 重组杆状病毒表达尼帕病毒融合蛋白和受体结合蛋白的研究 Study of Fusion Protein and Attachment Glycoprotein of Nipah Virus Expressed in Recombinant Baculovirus

王喜军<sup>1</sup>, 胡 森<sup>1</sup>, 葛金英<sup>1,2</sup>, 王清华<sup>3</sup>, 秦立廷<sup>1,4</sup>, 步志高<sup>1\*</sup>

Wang Xi-Jun<sup>1</sup>, Hu Sen<sup>1</sup>, Ge Jin-Ying<sup>2</sup>, Wang Qing-Hua<sup>3</sup>, Qin Li-Ting<sup>4</sup> and Bu Zhi-Gao<sup>1\*</sup>

1 中国农业科学院哈尔滨兽医研究所兽医生物技术国家重点实验室, 哈尔滨 150001

2 南京农业大学动物医学院, 南京 210095

3 农业部青岛动物检疫所国家外来病诊断中心, 青岛 266032

4 山东农业大学动物科技学院, 泰安 271018

1 National Key Laboratory of Veterinary Biotechnology, Harbin Veterinary Research Institute, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Harbin 150001, China

2 College of Veterinary Medicine, Nanjing Agricultural University, Nanjing 210095, China

3 National Diagnostic Center for Exotic Animal Disease, National Animal Quarantine Institute of Ministry of Agriculture, Qingdao 266032, China

4 College of Animal Technique and Science, Shandong Agricultural University, Taian 271018, China

**摘要** 构建了表达尼帕病毒(Nipah virus, NiV)囊膜功能糖蛋白 F 和 G 的重组杆状病毒 rBac-NF、rBac-NG。Western-blot 证实大小分别为 61kD 和 66kD 的重组融合蛋白(rNF)和受体结合蛋白(rNG)分别在 rBac-NF、rBac-NG 感染的昆虫细胞中获得表达,并且 rNF 前体 FO 可在昆虫细胞内进一步有效裂解为 F1(~49kD)和 F2;采用兔抗 NiV 病毒高免血清间接免疫荧光检测重组杆状病毒表达 F 和 G 蛋白显示出良好的特异免疫反应原性。以 rBac-NF、rBac-NG 感染的昆虫细胞裂解液稀释后直接包被 ELISA 板,间接 ELISA 检测兔抗灭活 NiV 全病毒高免血清中的 F 和 G 蛋白特异性抗体,同样具有良好的敏感性和特异性;以 rBac-NF 和 rBac-NG 感染昆虫细胞培养物直接免疫 BALB/c 小鼠,可诱导显著的 NiV F 和 G 蛋白特异体液免疫反应,产生的特异抗体可有效中和 NiV 囊膜蛋白 F 和 G 介导的伪型 VSV 重组病毒侵入 NiV 易感宿主细胞的感染性。结果表明,杆状病毒表达重组 F 和 G 蛋白抗原具有替代 NiV 全病毒,作为安全、经济、敏感和特异的诊断抗原的潜力,并为重组病毒亚单位疫苗预防尼帕病毒性脑炎的探索研究奠定了基础。

**关键词** 尼帕病毒, 融合蛋白, 受体结合蛋白, 重组杆状病毒

中图分类号 Q786 文献标识码 A 文章编号 1000-3061(2006)03-0418-07

**Abstract** In this study, Recombinant baculoviruses rBac-NF and rBac-NG were generated for expressing F and G proteins Nipah virus (NiV). The expression of recombinant G (rNG) and F (rNF) protein in rBac-NF and rBac-NG infected cells were confirmed by western-blot. Both rNG and rNF showed sensitive and specific antigenic reaction to rabbit serum anti-Nipah virus in indirect immunofluorescence detection and indirect ELISA. Immunization with rBac-NF and rBac-NG infected insect cells elicited G and F protein specific antibody responses in mice. Furthermore, the G and F specific antibodies could neutralize the infectivity of the VSVΔG<sup>+</sup>F/G, the NiV F and G envelope glycoproteins pseudotyped recombinant Vesicular Stomatitis Virus expressing green fluorescence protein. The results demonstrated F and G protein expressed by the recombinant baculoviruses could be safe economic diagnostic antigens for the surveillance and monitoring of NiV and promising subunit vaccines for the prevention of NiV.

Received: October 8, 2005; Accepted: February 28, 2006.

This work was supported by grants from the Programs for Science and Technology Development of China (No. 2004BA519A19, 2005BA711A10) and the National Fundamental Research Programs of China (No. 2005CB523200).

\* Corresponding author. E-mail: zgb@hvri.ac.cn

国家“攻关”项目(No. 2004BA519A19, 2005BA711A10)和“973”项目(No. 2005CB523200)资助。

**Key words** Nipah virus, fusion protein, attachment glycoprotein, recombinant baculovirus

尼帕病毒性脑炎(Nipah virus encephalitis, NVE)是由尼帕病毒(Nipah virus, NiV)引起的烈性的人兽共患传染病。1998年9月底,马来半岛爆发了原因不明、以急性发热性脑炎和高死亡率为特征的疫情<sup>[1]</sup>。最初的病患者均与婆罗洲肯塔地区 Ipoh 市郊的养猪业密切相关,而这一地区的猪群也同时出现脑炎疫情。各种针对日本脑炎和猪瘟的防疫措施并未奏效。12月,疫情蔓延至森美兰州,其中包括位于尼帕村(nipah)附近该州最大的一个养猪场。1999年1月,新加坡报告了包括1例死亡在内的11例发热性脑炎病例,病患者均为处理过来自马来半岛疫区猪只的屠宰场工人。3月初,从尼帕村病患者的脑脊髓液中分离出一种新的副粘病毒,随后被确定为这场脑炎疫情的致病原,并被命名为尼帕病毒(Nipah virus, NiV)<sup>[2]</sup>。截至1999年12月,先后共确诊尼帕病毒性脑炎283例,死亡109例,死亡率38.5%<sup>[3]</sup>。

NiV为副粘病毒科(Paramyxoviridae)副粘病毒亚科(Paramyxovirinae)的成员,和亨德拉病毒(Hendra virus, HeV)共同组成Henipavirus属。HeV的自然宿主为Pteropus属的果蝠。1996年在Pteropid属的数种果蝠(fruit bats, 又名飞狐, flying-foxes)体内发现了HeV中和抗体<sup>[4]</sup>, 4年后病毒分离成功<sup>[5]</sup>, 正式确定果蝠为其自然宿主。由此推断, NiV自然宿主也有可能为果蝠。果然, 2000年对14种共324只野生果蝠的血清学调查结果表明, 有两种果蝠(岛飞狐和马来亚飞狐)体内存在有针对NiV的中和抗体<sup>[6]</sup>。2002年, 从直接收集果蝠新鲜尿液和唾液成功分离到NiV。可能成为NiV自然宿主的果蝠种类广泛分布于澳大利亚、太平洋西南群岛、西印度洋及东南亚地区<sup>[7]</sup>, 我国南方地区也有分布。2001年至2002年对果蝠血清学调查结果显示, 孟加拉国、印度北部和柬埔寨的果蝠体内存在抗NiV抗体。2004年初, 在孟加拉国有30人因食用果蝠啃食污染NiV的水果而导致感染发病, 其中死亡18人。

NiV的受体结合蛋白(G)与融合蛋白(F)是病毒的主要结构蛋白, 在病毒侵入宿主细胞的过程中共同作用介导细胞膜发生融合, 同时也是诱导中和抗体的主要免疫原。本研究分别构建了表达NiV F蛋白和G蛋白的重组杆状病毒, 其昆虫细胞表达产物与NiV全病毒免疫阳性血清具有良好、特异的免疫反应原性; 以重组病毒感染昆虫细胞培养物直接

免疫BALB/c小鼠, 可诱导显著的NiV G和F蛋白特异体液免疫反应, 产生的特异抗体可有效中和NiV囊膜蛋白F和G介导的伪型VSV重组病毒侵入NiV易感宿主细胞的感染性。从而表明, 杆状病毒表达重组F和G蛋白抗原具有替代NiV全病毒, 作为安全、经济、敏感和特异的诊断抗原的潜力, 并为重组病毒亚单位疫苗防制尼帕病毒性脑炎的探索研究奠定了基础。

## 1 材料与amp;方法

### 1.1 材料

NiV F基因cDNA克隆质粒pUC18-NiV-F(完整ORF cDNA插入*Sam*I酶切位点)、G基因cDNA克隆质粒pMD18-T-NiV-G(完整ORF cDNA插入*Eco*RV酶切位点)、质粒pFastBac1(Invitrogen); DH<sub>10B</sub>感受态细胞(Invitrogen); sf9昆虫细胞和VeroE6细胞系(细胞生长维持液分别为含10%胎牛血清Grace's培养基及DMEM)均为本实验室保存; 辣根过氧化物酶(HRP)标记羊抗鼠IgG购于Sigma; 辣根过氧化物酶(HRP)标记山羊抗兔IgG购于Southern Biotechnology Associates, Inc.; 荧光素(FITC)标记山羊抗兔IgG购于北京中杉金桥生物技术有限公司; 兔抗NiV病毒高免血清由澳大利亚动物健康实验室(CSIRO Livestock Industries, Australian Animal Health Laboratory)惠赠。BALB/c小鼠购自北京维通利华实验动物公司。VSVΔG<sup>-</sup>GFP为表达绿色荧光蛋白报告基因的重组水疱性口炎病毒(VSV), 其基因组缺失囊膜G蛋白, 通过外源瞬时表达获得VSV囊膜蛋白G, 因而具有感染、表达和复制能力, 但装配释放的子代病毒失去再感染能力。用于制备VSVΔG<sup>-</sup>GFP的重组型VSV基因组cDNA克隆质粒pVSVΔC<sup>-</sup>GFP、结构与转录功能蛋白辅助表达质粒pBS-G、pBS-L、pBS-N和pBS-P均由M. Witte博士提供, 表达T7聚合酶的重组痘病毒由B. Moss博士提供, 制备与滴定过程按文献进行<sup>[8,9]</sup>。滴定后的病毒液-70℃保存备用。

### 1.2 重组杆状病毒的构建

*Eco*RI和*Pst*I双酶切pUC18-NiV-F, *Sal*I和*Xba*I双酶切pMD18-T-NiV-G, 将编码NiV F和G蛋白基因cDNA分别克隆至pFastBac1, 构成pFastBac1-NF和pFastBac1-NG。分别将pFastBac1-NF和pFastBac1-NG转化至DH<sub>10B</sub>, PCR筛选阳性重组杆

状病毒基因组克隆 rBac-NF 和 rBac-NG。按文献制备阳性重组基因组克隆 DNA, 采用 Cellfectin<sup>R</sup> Reagent (Invitrogen) 转染 s19 细胞, 待细胞出现病变后, 按文献[10]进行重组病毒嗜斑纯化和病毒扩增, 蛋白酶 K-SDS-酚/氯仿抽提病毒基因组 DNA, M13-48f 和 M13-47r 为引物 PCR 验证 NiV F 和 G 基因分别在纯化病毒获得稳定重组, 重组病毒分别命名为 rBac-NF 和 rBac-NG。扩增病毒分别完成蚀斑形成单位 (pfu) 滴定后, 于 4℃ 保存备用。

### 1.3 间接免疫荧光

参见文献进行<sup>[10]</sup>。上述 rBac-NF 和 rBac-NG 种毒液按 1:10 体积比感染新鲜制备 s19 细胞, 至 CPE 达 90% 时, 收获细胞 PBS 洗涤重悬后滴于玻片上, 自然阴干后 95% 乙醇固定。分别以 1:20 倍稀释的兔抗灭活 NiV 全病毒高免血清和相应稀释倍数的非免疫兔阴性血清为一抗。PBST 洗涤后加入 1:50 倍稀释荧光素 (FITC) 标记的二抗, 作用 30min, PBST 洗涤后荧光显微镜 (Leica DMIRES2) 观察结果。

### 1.4 F 和 G 蛋白片段重组抗原免疫血清的制备

以 NiV-F-f(5'GTGTTCCAATTCATCGAGATCGGGT TCTG3') 和 NiV-F-r(5'GATGATGTCGACCGAGACCAT GGAG3') 为引物 PCR 扩增 F 基因 976~1479bp 片段 (515bp); 以 NiV-G-f(5'ACCGACGAATTCGCCAAGGTG TCCCTGAT3') 和 NiV-G-r(5'GAGGACGTCGACCTG GTGCTGTTGTA3') 为引物 PCR 扩增 G 基因 319~1002bp 片段 (684bp), 将 PCR 扩增目的片段 *EcoR* I 和 *Sal* I 限制酶切克隆于表达载体 pET-30a(+) *EcoR* I 和 *Sal* I 位点, 使 F、G 蛋白表达框架与 His 标签融合。转化 BL21, IPTG 诱导, SDS-PAGE 检测融合蛋白表达, Ni 化琼脂糖柱 (Pierce) 纯化。重组表达 F、G 片段蛋白分别表示为 F' 和 G', 作为抗原分别按每小鼠 10 $\mu$ g 剂量皮下注射免疫 (首免弗氏完全佐剂乳化, 二免、三免弗氏不完全佐剂乳化, 间隔时间 3 周), 三免后第 3 周采血分离重组抗原免疫血清, -20℃ 保存备用。

### 1.5 细胞裂解抗原液的制备

参照文献[9]进行。上述 rBac-NF 和 rBac-NG 种毒液按 1:10 体积比感染新鲜制备 s19 细胞, 72h 后 1000r/min 离心 10min 收获感染细胞, PBS 离心洗涤, 按原培养液 10% 体积加入 PBS 悬起细胞, 超声波加 2 次冻融裂解细胞, 离心后收获上清, 制备成细胞裂解抗原液。

### 1.6 SDS-PAGE 和 Western-blot

上述 rBac-NF 和 rBac-NG 感染 s19 细胞裂解抗原

液于 12% 的分离胶进行 SDS-PAGE 电泳, 并电转印至硝酸纤维素膜 (Nitrocellulose filter), 10% 脱脂乳 PBST (0.05% Tween20) 封闭过夜, PBST (0.05% Tween20) 洗涤, 1:100 倍 PBST 稀释鼠抗 NiV F' 或 G' 抗原蛋白免疫多克隆抗血清为一抗, 1:2500 倍 PBST 稀释辣根过氧化物酶 (HRP) 标记山羊抗鼠 IgG (Sigma) 为二抗, DAB 显色检测。

### 1.7 间接 ELISA 检测重组杆状病毒表达蛋白的反应原性

上述 rBac-NF 和 rBac-NG 感染 s19 细胞裂解抗原液, 分别以 NaHCO<sub>3</sub> (pH 9.6) 缓冲液 1:100 倍稀释, 按每孔 100 $\mu$ L 包被 96 孔 ELISA 板 (Nunc) 4℃ 过夜; 含 5% 脱脂乳的 PBST (0.05% Tween20) 封闭; 1:200 倍稀释兔抗灭活 NiV 全病毒高免血清为一抗, 另设相同稀释倍数非免疫兔血清为阴性对照; 1:4000 倍 PBST 稀释 HRP 标记山羊抗兔 IgG (Southern Biotechnology Associates, Inc.) 为二抗; PBST 洗涤, 底物 OPD 作用 25min, 2mol/L 硫酸终止反应后, 测定 OD<sub>490nm</sub> (Bio-Rad, Benchmark plus)。每个血清稀释度至少设 3 个平行孔, 取平均值计算 P/N 值。

### 1.8 小鼠免疫实验

以重组杆状病毒 rBac-NF 和 rBac-NG 感染 s19 细胞, 待 90% 细胞出现病变后, 用吸管吹打、分散细胞, 收集细胞悬液 (包括细胞培养上清), 作为免疫接种小鼠的重组亚单位抗原。分别免疫 8 只 6 周龄 BALB/c 小鼠; 每只小鼠腹腔接种 250 $\mu$ L, 肌注 100 $\mu$ L, 间隔 4 周后加强免疫, 二免 3 周后采血, 分离血清, -20℃ 保存备用。

### 1.9 间接 ELISA 检测重组杆状病毒表达蛋白的免疫原性

用 NaHCO<sub>3</sub> 包被液 (pH 9.6) 按 5 $\mu$ g/mL 浓度分别稀释上述原核表达、纯化 NiV F' 和 G' 蛋白, 按每孔 100 $\mu$ L 包被 96 孔 ELISA 板 (Nunc) 4℃ 过夜; 含 5% 脱脂乳的 PBST (0.05% Tween20) 封闭; 1:50 倍稀释的鼠抗 rNF 免疫血清和鼠抗 rNG 免疫血清为一抗, 另设相同稀释倍数的非免疫小鼠血清为阴性对照; 1:2500 倍稀释的 HRP 标记的山羊抗鼠 IgG (Sigma) 为二抗; PBST 洗涤, 底物 OPD 作用 25min, 2mol/L 硫酸终止反应后, 测定 OD<sub>490nm</sub> (Bio-Rad, Benchmark plus)。每个血清稀释度至少设 3 个平行孔, 取平均值计算 P/N 值。

### 1.10 中和试验

用于替代 NiV 感染性活病毒进行血清中和试验, 具有感染和非生产性复制能力并表达绿色荧光

蛋白报告基因的 NiV G 和 F 囊膜蛋白嵌合 (psudotyped) 重组病毒 VSVΔG<sup>+</sup> F/G 按文献制备并滴定<sup>[8,9]</sup>, 过程简述如下, 首先采用转染试剂 lipofectamine 2000 (Invitrogen), 分别以 2μg 表达 F 和 G 囊膜蛋白的表达质粒 pCAGG-NiV-G 和 pCAGG-NiV-F 转染生长过夜、密度为 90% 的 293T 细胞系, 5% CO<sub>2</sub> 37℃ 培养 24h, 再以 VSVΔG<sup>+</sup> GFP (MOI 约为 1) 感染 293T 细胞, 36h 后收获含伪型 (psudotype) 病毒 VSVΔG<sup>+</sup> F/G 的培养上清, 按文献于 Vero 细胞滴定感染单位 (IU), -70℃ 储存备用。血清中和试验基本参照文献进行<sup>[11]</sup>。VERO 细胞生长于 24 孔培养板过夜至 80% 密度备用。待检血清分别以完全 DMEM (10% FCS) 连续倍比稀释, 每稀释度体积为 25μL, 与含约 1 × 10<sup>4</sup> IU 的伪型病毒 VSVΔG<sup>+</sup> F/G 悬液混合, 37℃ 感作 1h 后感染 VERO 细胞 (MOI 约为 0.1 ~ 0.2), 5% CO<sub>2</sub> 37℃ 培养 24h 后置于荧光显微镜 (Leica DMIRES2) 下观察 GFP 表达阳性细胞情况。血清每稀释度设 3 个平行对照孔。

## 2 结果

### 2.1 表达 NiV F 和 G 蛋白重组杆状病毒 rBac-NF 和 rBa-NG 的构建与鉴定

为构建表达 NiV F 和 G 基因的重组杆状病毒, 首先将 NiV F 和 G 基因 (NF 和 NG) 亚克隆至 pFastBac1, 构建成穿梭质粒 pFastBac1-NF 和 pFastBac1-NG, 将二者分别转化至 DH<sub>10</sub>Bac, 经蓝白斑筛选获得转移质粒 rBacmid-NF 和 rBacmid-NG。进一步提取重组质粒 rBacmid-NF 和 rBacmid-NG 分别转染 sf9 细胞收获重组杆状病毒, 提取重组杆状病毒基因组核酸 DNA, 以 M13-48f 和 M13-47r 为引物 PCR 扩增出特异的 3.9kb 和 4.1kb 的产物, 表明 NiV F 和 G 基因分别在杆状病毒 rBac-NF 和 rBac-NG 中获得重组。

用 rBac-NF 感染 sf9 细胞裂解液进行 SDS-PAGE, 转膜后分别以鼠抗 F' 蛋白免疫血清为一抗, Western-blot 显示出特异的 61kD 和 49kD 检测蛋白, 大小与 F0 和 F1 预期值相符 (图 1)。用 rBac-NG 感染 sf9 细胞裂解液进行 SDS-PAGE, 转膜后分别以上鼠抗 G' 蛋白免疫血清为一抗, Western-blot 显示出特异的 66kD 检测蛋白, 大小与 G 蛋白预期值相符 (图 2)。结果说明 NiV F 和 G 基因在重组杆状病毒 rBac-NF 和 rBac-NG 感染的 sf9 细胞中获得表达, 并且 F0 可在昆虫细胞与哺乳动物一样被有效裂解。

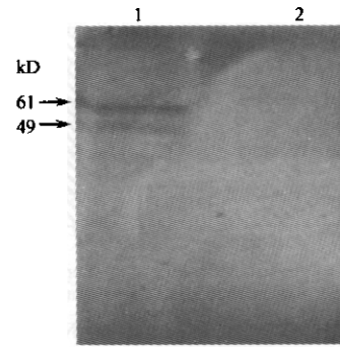


图 1 Western-blot 检测重组蛋白 rNF 在重组杆状病毒 rBac-NF 感染昆虫细胞中的表达

Fig. 1 Western-blot detecting expression of rNF in insect cells infected with rBac-NF

1: lysates of insect cells infected with rBac-NF; 2: lysates of insect cells infected with wild type Baculovirus.

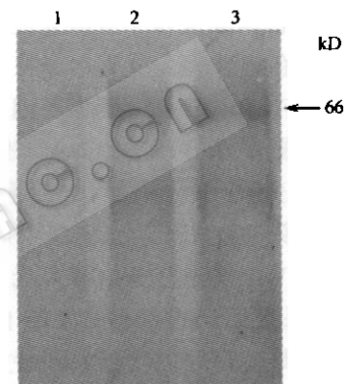


图 2 Western-blot 检测重组蛋白 rNG 在重组杆状病毒 rBac-NG 感染昆虫细胞中的表达

Fig. 2 Western-blot detecting expression of rNG in insect cells infected with rBac-NG

1: lysates of insect cells infected with wild type Baculovirus; 2,3: lysates of insect cells infected with rBac-NG.

### 2.2 rNF 和 rNG 为间接 ELISA 抗原检测兔抗灭活 NiV 全病毒高免血清特异抗体

为测试 rNF 和 rNG 作为间接 ELISA 包被抗原的免疫反应原性, 分别以 rBac-NF 和 rBac-NG 感染 sf9 细胞裂解抗原液包被 96 孔酶标板, 200 倍稀释兔抗 NiV 全病毒高免血清为被检一抗, 间接 ELISA 检测兔抗灭活 NiV 全病毒高免血清中抗 F 和 G 蛋白特异抗体。结果, rNF 和 rNG 作为包被抗原的 OD<sub>490nm</sub> 平均值分别为 0.181 和 0.281, 健康兔对照血清分别为 0.063 和 0.055, P/N 值分别为 2.9 和 5.1 (图 3)。

### 2.3 IFA 检测昆虫细胞表达重组 NiV F 和 G 蛋白的免疫反应原性

IFA 方法检测血清特异性抗体具有特异性强、快速简便的突出优点。为此, 分别以 rBac-NF 和 rBac-NG 感染 sf9 细胞, 至 CPE 达 90% 时收集细胞悬

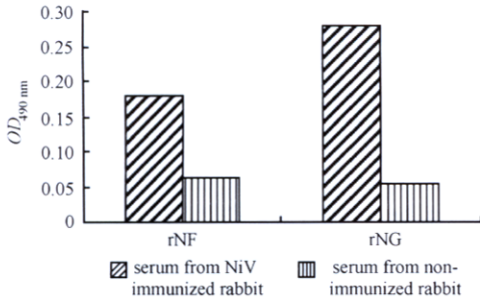


图3 重组杆状病毒表达的 rNF 和 rNG 为包被抗原, 间接 ELISA 检测兔抗灭活 NiV 全病毒高免血清中 F 和 G 蛋白特异抗体

Fig.3 Indirect ELISA detecting serum antibodies of NiV fusion and attachment glycoprotein in serum from rabbit immunized with inactivated NiV based on rNF and rNG as antigens

液制备涂片,再分别以 1:100 倍稀释兔抗灭活 NiV 全病毒高免血清和健康兔对照血清为被检一抗进行间接免疫荧光染色。结果兔抗灭活 NiV 全病毒高免血清检测 rBac-NF 和 rBac-NG 感染 sf9 细胞均显示强阳性荧光信号(图 4A 和 4B),而 1:100 倍稀释非免疫兔对照血清则荧光信号阴性(图 4C 和 4D);以野生型杆状病毒感染 sf9 细胞悬液制备涂片,1:100 倍稀释兔抗灭活 NiV 全病毒高免血清荧光信号也为阴性(图 4E)。结果表明表达 rNF 和 rNG 的昆虫细胞应用于 IFA 检测具有良好的敏感性和特异性。

2.4 F'和 G'蛋白为间接 ELISA 抗原检测免疫小鼠血清中 F 和 G 蛋白特异抗体

为测试重组杆状病毒表达蛋白 rNF 和 rNG 的免疫原性,分别用原核表达的重组蛋白 F'和 G'蛋白包被 ELISA 板,检测重组杆状病毒 rBac-NF 和 rBac-NG 感染 sf9 细胞悬液免疫小鼠血清中抗 F 和 G 蛋白特异抗体。F'蛋白为包被抗原,50 倍稀释 rNF 免疫血清为被检一抗的 OD<sub>490nm</sub> 平均值为 0.236,非免疫对照小鼠血清为 0.059,P/N 值为 4(图 5);G'蛋白为包被抗原,50 倍稀释 rNG 免疫血清为被检一抗的 OD<sub>490nm</sub> 平均值为 0.208,非免疫对照小鼠血清为

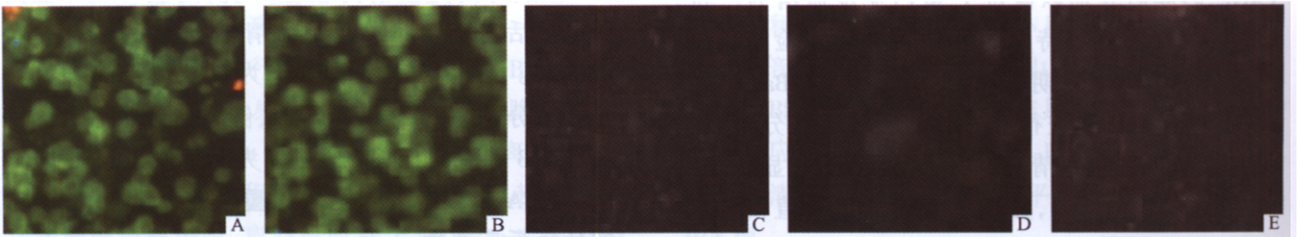


图4 rNF 和 rNG 为抗原间接免疫荧光检测兔抗灭活 NiV 全病毒高免血清中 F 和 G 蛋白特异抗体

Fig.4 IFA assay detecting serum antibodies of NiV fusion and attachment glycoprotein in serum from rabbit immunized with inactivated NiV based on rNF and rNG as antigens

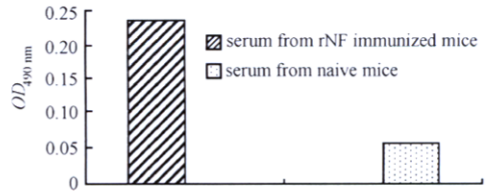


图5 原核表达蛋白 NiV F 蛋白片段 F'为包被抗原间接 ELISA 检测重组 rNF 免疫小鼠血清 F 蛋白特异抗体 Fig.5 Indirect ELISA detecting serum antibodies of NiV attachment glycoprotein in serum from mouse immunized with recombinant F protein based on F protein fragment F' as antigen

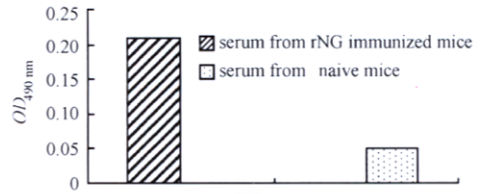


图6 原核表达 NiV G 蛋白片段 G'为包被抗原间接 ELISA 检测重组 rNG 免疫小鼠血清 G 蛋白特异抗体 Fig.6 Indirect ELISA detecting serum antibodies of NiV attachment glycoprotein in serum from mice immunized with recombinant G protein based on G protein fragment G' as antigen

0.052,P/N 值为 4(图 6)。

2.5 中和试验检测 rNF 和 rNG 免疫小鼠血清中特异性中和抗体

NiV 囊膜蛋白 F 和 G 介导伪型重组病毒 VSVΔG<sup>+</sup> F/G 侵入敏感宿主细胞的过程完全模拟了 NiV 本身感染、侵入宿主细胞的过程,因而 VSVΔG<sup>+</sup> F/G 可替代高度生物安全危险的天然 NiV 用于中和试验。试验结果表明,表达 F 和 G 蛋白的重组杆状病毒 rBac-NF 和 rBac-NG 感染 sf9 细胞悬液免疫小鼠可诱导显著的特异抗体反应,产生的抗体能有效中和 NiV 囊膜蛋白 F 和 G 介导的伪型 VSV 重组病毒侵入 NiV 易感宿主细胞的感染性。按病毒粒子感染率 80% 以上被抑制为判定标准,rNG 免疫小鼠血清、rNF 免疫小鼠血清和兔抗灭活 NiV 全病毒高免血清

有效阻断  $1 \times 10^4$  IU 的伪型病毒 VSV $\Delta$ G<sup>-</sup>F/G 感染性的稀释倍数分别为 128、64 和 32;野生型杆状病毒免疫小鼠血清及非免疫对照兔血清则完全不能阻断伪型病毒 VSV $\Delta$ G<sup>-</sup>F/G 的感染性(图 7)。

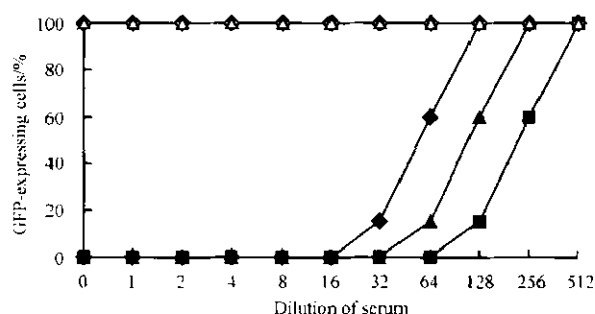


图 7 rNF 和 rNG 免疫鼠血清的中和抗体曲线

Fig.7 Neutralization curves of serum from mouse immunized with rNF and rNG

$1 \times 10^4$  IU VSV $\Delta$ G<sup>-</sup>F/G was added at each step of a serial twofold dilution of heat-inactivated immunized mouse serum (serum from rNF immunized mouse ( $\blacktriangle$ ) and serum from rNG immunized mouse ( $\blacksquare$ ) and serum from wild type baculovirus immunized mouse ( $\triangle$ ), 30 min at 56°C.) in triplicate wells. After incubation for 1 hour at 37°C, these mixtures containing  $1 \times 10^4$  IU VSV $\Delta$ G<sup>-</sup>F/G were added to the rinsed Vero E6 monolayers. Serum from inactivated NiV immunized rabbit ( $\blacklozenge$ ) and non-immunized rabbits ( $\diamond$ ) were included in each test as controls. The GFP-expressing cells were counted at 16 h post-infection (hpi) under a fluorescence microscope. The neutralizing titres were expressed as the reciprocal of the highest serum dilution that gave 80% reduce of the number of GFP-expressing cells.

### 3 讨论

本研究成功构建了表达 NiV F 和 G 蛋白的重组杆状病毒,感染昆虫细胞获得了高效表达。Western blot、间接免疫荧光和间接 ELISA 结果显示,昆虫细胞表达 rNF、rNG 与兔抗灭活 NiV 全病毒高免疫血清具有良好特异的免疫反应原性。昆虫细胞表达的 NiV 蛋白作为诊断抗原,不仅制备过程简化(只需加入 PBS 超声裂解重组病毒感染细胞即可),而且有利于保持重组抗原的天然构象,同时制备过程不受严格的生物安全条件限制,具有良好的敏感性和特异性及高度的安全性。进一步对免疫小鼠血清的 ELISA 和中和试验结果表明,重组杆状病毒 rBac-NF 和 rBac-NG 感染昆虫细胞培养物直接免疫 BALB/c 小鼠可诱导显著的 F 和 G 蛋白特异体液免疫反应及阻断 NiV 囊膜蛋白介导的伪型 VSV 重组病毒侵入 NiV 敏感宿主细胞的中和性抗体的形成。因而,重组杆状病毒表达的 NiV F 和 G 蛋白对尼帕病毒性脑炎流行病学研究、野生动物的血清学监测及新型

疫苗研制过程中保护性免疫原特异性免疫反应的评估,均具有重要意义。

副粘病毒的受体结合蛋白 G 或 HN 为 II 型膜糖蛋白,以四聚体形式存在;G 蛋白功能主要是与细胞表面的受体结合,无血凝素和神经氨酸酶(HN)活性。融合蛋白 F 为 I 型囊膜糖蛋白,负责诱导病毒囊膜和细胞膜发生融合。一般认为,受体结合蛋白必须与 F 蛋白共表达于细胞膜或病毒囊膜表面才能使 F 蛋白发生构象改变。目前直接证据表明新城疫病毒(Newcastle disease virus)<sup>[12]</sup>、人类副流感病毒(Human parainfluenza virus)<sup>[13]</sup>和麻疹病毒(Measles virus)<sup>[14]</sup>的 F 蛋白必须与 G 蛋白直接接触才能诱导膜融合。NiV F 和 G 蛋白缺少血凝素和神经氨酸酶活性,只有共同存在于细胞表面时才可引起膜融合。G 蛋白与宿主细胞膜特定受体的结合可能诱导 F 蛋白发生一系列构象变化,引起病毒囊膜与细胞膜或细胞膜与细胞膜之间发生融合,其结果是病毒的基因组进入细胞浆或细胞融合形成典型的合胞体。一般认为,融合蛋白 F 与不同种属副粘病毒成员的受体结合蛋白共表达不能形成融合活性,反之亦然。但有趣的是,NiV 的 F 和 HeV 的 G 共表达或 NiV 的 G 与 HeV 的 F 共表达却都可以形成细胞膜融合活性<sup>[15]</sup>。研究表明,NiV 囊膜蛋白 F 和 G 可介导 BSC-1(猴肾细胞)、U373、BHK 21 和猫的胚胎细胞发生高水平的细胞膜融合<sup>[15]</sup>。本研究表明,昆虫细胞表达 F 糖蛋白前体 F<sub>0</sub>。同样可被有效裂解为 F1 和 F2 亚单位;我们分别以本研究构建的重组杆状病毒 rBac-NF 和 rBac-NG 混合感染 NiV 敏感细胞 BHK 细胞系(M.O.I 均为 1),48h 后倒置显微镜下可观察到部分细胞形成合胞体融合现象(结果未报),从而提示昆虫细胞表达 NiV 的 F 和 G 糖蛋白,仍具有一定的生物学活性功能。

RNA 病毒囊膜糖蛋白对病毒与宿主细胞受体结合、侵入、融合(fusion)功能及中和抗体的诱导方面起决定性作用。VSV 和反转录病毒一样,具备和多种异源病毒囊膜蛋白形成伪型病毒(psudotype)的能力。通过负链 RNA 病毒的反向遗传操作技术,人工缺失 VSV 囊膜 G 糖蛋白,使其完全被异源病毒相应功能囊膜蛋白取代,装配于病毒粒子表面,形成的伪型 VSV 在受体结合功能、侵入机制及对中和抗体的敏感性特异性方面与囊膜蛋白供体病毒高度相似。利用这一特点,采用报告基因取代 VSV 或反转录病毒基因组囊膜蛋白基因,通过瞬时表达提供异源囊膜蛋白,形成的伪型病毒被许多研究者用来取

代一些生物安全高度危险或细胞病变观察难度较大 RNA 活病毒进行中和抗体检测、受体结合特性及抗原性或中和表位的研究<sup>[16,17]</sup>。我国目前尚未发现 NiV 存在,客观条件不允许引进或操作 NiV 活病毒,因此采用 GFP 报告基因取代基因组 G 蛋白基因的重组 VSV 系统,通过高水平的瞬时表达提供 NiV 功能囊膜蛋白 F 和 G,获得安全、稳定、高滴度、具备感染复制及 GFP 指示能力的 VSV 伪型病毒,取代 NiV 活病毒进行血清中和抗体检测,取得了良好的效果。

通过小动物模型的被动免疫保护试验证实,中和抗体可对 NiV 的致死性攻击形成免疫保护<sup>[18]</sup>。NiV 的 G 蛋白与 F 一样,是诱导中和抗体形成的主要结构蛋白。我们分别采用表达 NiV F 和 G 蛋白的重组杆状病毒感染昆虫细胞悬液免疫小鼠,所诱导的 F 和 G 蛋白特异血清抗体,可有效中和伪型病毒 VSVΔG<sup>+</sup>F/G 的感染性。rNG 诱导中和抗体滴度(1:128 以上)高于 rNF(1:64 以上),均高于兔抗灭活 NiV 全病毒高免血清中和抗体滴度(1:32 以上)。对麻疹病毒的研究表明,在动物体内 HN 蛋白诱导的中和抗体水平高于 F 蛋白诱导的中和抗体水平<sup>[19]</sup>,而我们对 NiV 两种保护性抗原 F 和 G 蛋白进行 DNA 免疫的比较研究也表明,G 蛋白诱导 ELISA 抗体及中和抗体的能力均高于 F 蛋白(结果另报)。杆状病毒具有一过性感染哺乳动物细胞的能力,表达特异免疫原的重组杆状病毒感染哺乳动物可有效诱导特异免疫反应的形成<sup>[20]</sup>。本研究采用重组杆状病毒感染昆虫细胞悬液直接免疫小鼠,除了昆虫细胞表达 rNF 和 rNG 作为抗原对小鼠形成免疫刺激,细胞悬液内存在具有感染性的重组杆状病毒同样可在小鼠体细胞内一过性表达 F 和 G 蛋白亚单位,进一步加强特异免疫反应的形成。目前尼帕病毒防制尚未有成熟的疫苗。表达 NiV 保护性抗原 F 和 G 蛋白重组杆状病毒为研发防制尼帕病毒性脑炎安全、高效的新型基因工程亚单位疫苗奠定了良好的理论和实验基础。

## REFERENCES(参考文献)

- [1] CDC. Update: Outbreak of Nipah virus—Malaysia and Singapore. *MMWR*, 1999, **48**(16): 335–337
- [2] Farrar JJ. Nipah virus encephalitis—Investigation of a new infection. *Lancet*, 1999, **354**: 1222–1223
- [3] Chua KB, Goh KJ, Wong KT *et al.* Fatal encephalitis due to Nipah virus among pig farmers in Malaysia. *Lancet*, 1999, **354**(9186): 1257–1259
- [4] Young PL, Halpin K, Selleck PW *et al.* Serologic evidence for the presence in Pteropus bats of a paramyxovirus related to equine morbillivirus. *Emerg Infect Dis*, 1996, **2**:239–240
- [5] Halpin K, Young PL, Field HE *et al.* Isolation of Hendra virus from pteropid bats: a natural reservoir of Hendra virus. *J Gen Virol*, 2000, **81**:1927–1932
- [6] Yob JM, Field H, Rashdi AM *et al.* Nipah virus infection in bats (Order Chiroptera) in Peninsular Malaysia. *Emerg Infect Dis*, 2001, **7**(3):439–441
- [7] Field H, Young P, Yob J M *et al.* The natural history of Hendra and Nipah viruses. *Microbes and infection*, 2001, **3**(4):307–314
- [8] Michael Garbutt, Ryan Liebscher, Victoria Wahl-Jensen *et al.* Properties of replication-Co-mpetent vesicular stomatitis virus vectors expressing glycoproteins of filoviruses and arenaviruses. *Journal of Virology*, 2004, **78**: 5458–5465
- [9] Ayato Takada, Clinton Robison, Hideo Goto *et al.* A system for functional analysis of Ebola virus glycoprotein. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1997, **94**: 14764–14769
- [10] Chan YP, Chua KB, Koh CL *et al.* Complete nucleotide sequences of Nipah virus isolates from Malaysia. *J Gen Virol*, 2001, **82**:2151–2155
- [11] Yin Z, Liu JH. *Animal Virology*. 2<sup>nd</sup> ed. Beijing: Sciences Press, 1997, pp. 336–340
- [12] Deng R, Wang Z, Mahon P J *et al.* Mutations in the Newcastle disease virus hemagglutinin-neuraminidase protein that interfere with its ability to interact with the homologous F protein in the promotion of fusion. *Virology*, 1999, **253**(1):43–54
- [13] Yao Q, Hu X, Compans RW. Association of the parainfluenza virus fusion and hemagglutinin-neuraminidase glycoproteins on cell surfaces. *Virology*, 1997, **71**: 650–656
- [14] Plemper RK, Hammond AL, Cattaneo R. Measles virus envelope glycoproteins hetero-oligomerize in the endoplasmic reticulum. *J Biol Chem*, 2001, **276**:44239–44246
- [15] Bossart KN, Wang LF, Flora M N *et al.* Membrane fusion tropism and heterotypic functional activities of the nipah virus and hendra virus envelope glycoproteins. *Journal of Virology*, 2002, **76**(22): 11186–11198
- [16] Nigel J Temperton, Paul K Chan, Graham Simmons *et al.* Longitudinally profiling neutralizing antibody response to SARS coronavirus with pseudotypes. *Emerging Infectious Diseases*, 2005, **11**(3):411–416
- [17] Heike Hofmann, Kim Hattermann, Andrea Marzi *et al.* S protein of severe acute respiratory Syndrome-associated coronavirus mediates entry into hepatoma Cell lines and is targeted by neutralizing antibodies in infected Patients. *Journal of Virology*, 2004, **78**(12):6134–6142
- [18] Guillaume V, Contamin H, Loth P *et al.* Nipah Virus: Vaccination and passive protection studies in a hamster model. *Journal of Virology*, 2004, **78**: 834–840
- [19] Griffin DE, Bellini WJ. Measles virus. In: Fields BN, Knipe DM and Howley PM ed. *Fields Virology*. 3<sup>rd</sup> ed. Philadelphia, PA: Lippincott-Raven, 1996, pp.1267–1312
- [20] Nico-dirk Vanlod, Elisabetta Fortunati, Erich Ehlert *et al.* Baculovirus infection of nondividing mammalian cells: Mechanisms of entry and nuclear transport of capsids. *Journal of Virology*, 2001, **75**(2):961–970