

猪细小病毒 VP₂ 蛋白在昆虫细胞中的表达及其特性^{*}

吕建强 陈焕春^{**} 赵俊龙 肖少波 王革非

(华中农业大学畜牧兽医学院动物病毒室 武汉 430070)

摘 要 将猪细小病毒(Porcine Parvovirus, PPV) *vp₂* 基因重组到杆状病毒 Bac-To-Bac 表达系统的 pFastBac 1 质粒中, 构建了 pFast-*vp₂* 质粒。在 DH₁₀ Bac 大肠杆菌中, pFast-*vp₂* 与改造过的苜蓿夜蛾核型多角体病毒(AcNPV)基因组(Bacmid)发生同源重组, 从而获得重组穿梭载体 Bacmid-*vp₂*。转染 Sf9 细胞得到重组病毒 AcNPV-*vp₂*。SDS-PAGE 和 Western-blotting 分析可见大小约为 64kD 的特异性带, 表明 AcNPV-*vp₂* 在 Sf9 细胞中成功地表达了 PPV VP₂ 蛋白。红细胞凝集试验和间接 ELISA 进一步证实, 表达的 VP₂ 蛋白具有与全病毒相同的血凝活性和相似的抗原性。电镜观察 VP₂ 蛋白的粗提物, 发现 VP₂ 蛋白可自行装配成许多病毒样粒子(VLPs)。

关键词: 猪细小病毒, VP₂ 蛋白, 昆虫细胞表达, 病毒样粒子

中图分类号: Q939.4 **文献标识码:** A **文章编号:** 1001-6209(2002)06-0675-05

猪细小病毒(Porcine Parvovirus, PPV)是引起猪繁殖障碍的主要病原之一, 导致母猪流产、死胎、木乃伊胎, 其中以胎儿木乃伊化为主, 成年猪不表现明显临床症状, 该病在世界范围内广泛流行, 造成了巨大的经济损失。大量研究发现, 疫苗免疫接种是防治该病的关键, 许多学者成功研制了相应的灭活疫苗和弱毒活疫苗。此外, Martinez 等还证实, 体外表达的 PPV VP₂ 蛋白具有良好的免疫原性, 免疫动物后可诱导产生保护性免疫反应, 与商品化疫苗的免疫效果相同^[1]。

PPV 属于自主型细小病毒, 能凝集多种动物的红细胞, 其基因组为线状单股负链 DNA, 大小约为 5kb, 共有两个开放阅读框架(Open Reading Frame, ORF), 一个编码结构蛋白(VP₁、VP₂), 另一个编码非结构蛋白(NS₁、NS₂ 和 NS₃)。在 *vp₁* 基因近 5' 端存在一个非编码区, *vp₂* 基于重叠于 *vp₁* 中, 两者具有同一个终止子, 编码的 VP₁ 和 VP₂ 蛋白分子量分别为 83kD 和 64kD, 而 VP₃ 蛋白则是 VP₂ 蛋白水解产生的^[2]。在 PPV 组织培养物中, 完整病毒粒子与不含 DNA 的空衣壳病毒粒子同时存在, 大小形态相同, 密度分别为 1.39g/cm³ 和 1.33g/cm³^[3]。Choi 等报道, PPV 空衣壳可影响病毒在传代细胞和猪体内的增殖。体内、外试验表明, 抑制作用依赖于空衣壳所占比例。当空衣壳与全病毒的比例超过 30:1 时, 接种的猪不表现临床症状, 但 DNA 杂交显示病毒存在的迹象^[4]。为了对 PPV 的结构蛋白进行深入研究, 我们采用杆状病毒 Bac-To-Bac 表达系统成功表达了 VP₂ 蛋白, 并对其特性进行研究, 为研究病毒形态发生及研制基因工程疫苗提供了理论依据。

^{*} 湖北省自然科学基金资助项目 ^{**} 联系作者

作者简介: 吕建强 (1975 -) 男, 内蒙古自治区临河市人, 华中农业大学畜牧兽医学院在读博士, 主要从事猪细小病毒的研究。

收稿日期: 2002-01-21 **修回日期:** 2002-06-04

1 材料和方法

1.1 载体和细胞

大肠杆菌 DH_{5α}, DH₁₀ Bac 菌株及 Sf9 细胞株均由本研究室保存, pFastBac I 载体为 Invitrogen 产品, 含有 PPV *vp₂* 全基因的 pMD18*vp₂* 质粒由本研究室构建。

1.2 试剂

限制性内切酶及工具酶均购自 TaKaRa 公司, Grace's 培养基、胎牛血清及转染介质脂体均购自 GIBCO BRL 公司, 辣根过氧化物酶标记的兔抗猪 IgG 抗体由本研究室制备。

1.3 重组杆状病毒(AcNPV-*vp₂*)的构建

用 *Pst* I 和 *Kpn* I 双酶切 pMD18*vp₂* 质粒, 回收 2.0kb 左右的目的片段, 连接到 pFastBac I 质粒的相应位点, 转化大肠杆菌 DH_{5α} 得到 pFast-*vp₂* 质粒, 酶切证实 *vp₂* 基因正向插入到了杆状病毒多角体启动子(*pPolh*)下游。再将其转化大肠杆菌 DH₁₀ Bac, 在三抗平皿上通过蓝白斑筛选阳性菌落, 获得重组杆状病毒穿梭载体 DNA(Bacmid-*vp₂*)。三次划线纯化后, 提取 Bacmid-*vp₂* DNA, 利用脂质体介导转染 Sf9 细胞, 发生细胞病变后, 收集重组杆状病毒(AcNPV-*vp₂*)。具体操作参照 Bac-To-Bac 杆状病毒表达系统操作手册。

1.4 VP₂ 蛋白的粗纯化

在刚长成单层的 Sf9 细胞上以 3 ~ 5 pfu/cell 的感染复数接种 AcNPV-*vp₂*, 3d 后收集病变细胞, 用 PBS 洗两次, 100 × g 15min 离心, 重悬于 50mmol/L NaHCO₃ (pH8.3) 中, 超声波裂解后, 24 000 × g 离心 15min, 上清液中含有表达的 VP₂ 蛋白。收集的上清中加入硫酸铵至终浓度 20%, 4℃ 搅拌过夜进行沉淀, 然后 20 000 × g 离心 10min, 沉淀重悬于 PBS 中, 透析、除盐即为 VP₂ 蛋白的粗提物。

1.5 SDA-PAGE 和 Western-blotting 检测

分别收集 AcNPV-*vp₂* 感染后 48h 和 72h 的病变细胞, PBS 洗三次, 参照文献 [5] 中的方法进行, 分离胶浓度为 12%。

1.6 红细胞凝集试验

参照文献 [6] 稍加改进, 使用 0.7% 豚鼠红细胞的 PBS 悬液。

1.7 间接酶联免疫吸附试验(ELISA)

利用粗纯化的 VP₂ 蛋白包被酶联板, 4℃ 过夜后置于 -20℃ 备用, 试验操作按常规。

1.8 电镜观察

将 VP₂ 蛋白的粗纯化物在 40% 的硫酸铵溶液中再沉淀, 10 000 × g 离心 10min, 取上清透析除盐后, 用聚乙二醇 6000 浓缩。然后负性染色, 利用 H7000 透射电子显微镜进行观察并照相。此外, 我们通过 20% ~ 60% 的蔗糖密度梯度离心进一步纯化 VP₂ 蛋白。

2 结果

2.1 构建重组杆状病毒 AcNPV-*vp₂*

pMD18*vp₂* 质粒中的 PPV *vp₂* 全基因带有自身的 *poly(A)*, 在定向克隆至 pFastBac I 载

体的 *Pst* I 和 *Kpn* I 位点之间 ,由于目的基因的第 581 个碱基处及 pFastBac I 载体插入位点下游均存在 *Hind*III 单一位点 ,酶切产生大小约为 1 450bp 及 5 300bp 的两条带 ,证实 *vp₂* 基因处于杆状病毒强的晚期启动子 pPolh 下游(图 1)。DH₁₀ Bac 大肠杆菌中含有携带 *LacZ* 基因的杆状病毒穿梭载体(Bacmid) ,在 X-gal 和 IPTG 存在下形成兰色菌落 ,当 pFast-*vp₂* 转化 DH₁₀ Bac 大肠杆菌后 ,通过将 *vp₂* 表达盒转入到 Bacmid 中 ,造成 *LacZ* 基因的插入失活而形成白色菌落 ,对阳性菌进行三次划线纯化。小量制备重组 Bacmid-*vp₂* DNA ,经脂质体介导直接转染 Sf9 细胞 ,发生细胞病变后收集上清液 ,从而获得重组杆状病毒(AcNPV-*vp₂*)。

2.2 表达蛋白 VP₂ 的鉴定

收集 AcNPV-*vp₂* 感染后 48h 和 72h 的病变细胞 ,经 SDS-PAGE 后 ,考马斯亮兰染色 ,在 lane 3 和 4 中均出现一条大小约为 64kD 的特异性蛋白质带 ,与 PPV VP₂ 蛋白分子量一致 ,而阴性对照 lane 1 和 2 中未出现 ,其中感染后 72h 的表达量明显高于感染后 48h 的(图 2-A)。按常规方法进行 Western-blotting 检测 ,在 lane 3、4 中出现特异性杂交带 ,其位于约 64kD 处 ,lane 2 中则没有出现杂交带(图 2-B)。

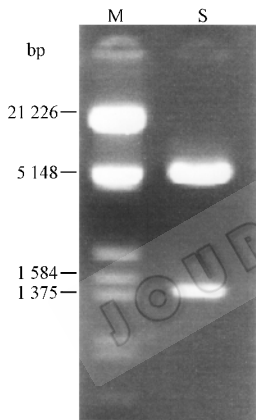


图 1 酶切鉴定 pFast-*vp₂* 质粒

Fig.1 Restriction analysis of the pFast-*vp₂*

M. λ DNA/*Eco*R I + *Hind*III ;

S. pFast-*vp₂*/*Hind*III .

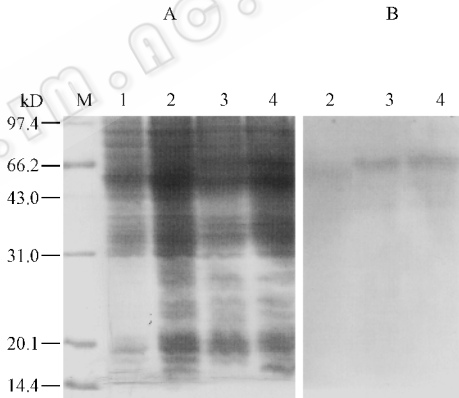


图 2 VP₂ 蛋白的 SDS-PAGE , Western-blotting 分析

Fig.2 Analysis of VP₂ protein by SDS-PAGE , Western-blotting

A. SDS-PAGE analysis of VP₂ protein ; B. Western-blotting analysis of VP₂ protein.

M. Protein marker ; lane 1. Product of AcNPV post-infection 48h ; lane 2. Product of AcNPV post-infection 72h ; lane 3. Product of AcNPV-*vp₂* post-infection 48h ; lane 4. Product of AcNPV-*vp₂* post-infection 72h.

2.3 红细胞凝集试验

将接种 AcNPV 和 AcNPV-*vp₂* 的病变 Sf9 细胞 ,于 -20℃ 反复冻融后进行血凝试验 ,发现表达的 PPV VP₂ 蛋白具有类似于全病毒的血凝活性 ,血凝价可达到 1:1024 ,与全病毒的血凝价相当 ,而 AcNPV 对照的血凝价低于 1:4。

2.4 酶联免疫吸附试验(ELISA)

利用表达的 PPV VP₂ 蛋白的粗提物包被酶标板 ,同时用 AcNPV 感染的 Sf9 细胞作为对照 ,以已知的猪细小病毒阳性血清作为一抗 ,兔抗猪 IgG 酶标抗体作为二抗进行检测。

结果显示,VP₂ 蛋白包被孔的 OD 值可达到 1.2,对照孔的 OD 值为 0.5,两者的差异达到显著水平。

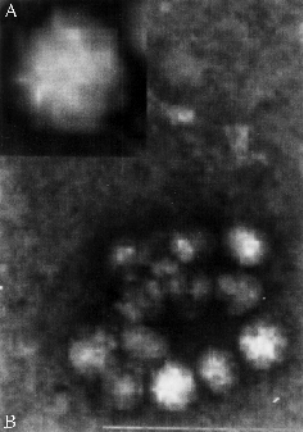


图 3 PPV 类病毒粒子的电镜图

Fig.3 Electron micrograph of VLPs

A.A single VLP was amplified by 750 000 × in the
Fig.B ;B. Many VLPs were amplified by 300 000 × ;
Scale bar represents 100nm.

2.5 电镜观察

对杆状病毒表达的 PPV VP₂ 蛋白进行纯化、负性染色后,在电子显微镜下可以看到许多病毒样粒子(Virus-Like Particle ,VLPs)存在,呈典型的二十面体,无囊膜,直径为 20nm 左右,其形态大小均与全病毒粒子的相近(图 3)。利用 MES75 型超速离心机进行蔗糖密度梯度离心,36 000r/min(160 000 × g) 2.5h,共出现三条蛋白质带,分别收集、脱糖后、电镜观察,在第二条蛋白质带中依然可以看到大量 VLPs,而且纯度有明显提高。

3 讨论

近年来,我们对猪细小病毒进行了大量研究,成功的建立了猪细小病毒乳胶凝集快速诊断试剂盒,同时获得了猪细小病毒中国株的全基因组序列。对 vp₂ 基因进行克隆测序,与 GenBank 中收录

的猪细小病毒 vp₂ 基因比较,发现同源性均达到 97.24% 以上。而且利用 vp₂ 基因构建了猪细小病毒 DNA 疫苗,动物试验证实其具有良好的免疫效果,尤其是可诱导高水平的细胞免疫。为了深入研究猪细小病毒 VP₂ 蛋白的功能,我们利用杆状病毒 Bac-To-Bac 表达系统成功的表达了 VP₂ 蛋白。

杆状病毒表达系统具有与动物细胞相似的转录、翻译及翻译后加工等功能,表达产生的外源蛋白基本保持原有的生物学活性,迄今已成功的用于表达多种病毒抗原,有些病毒结构蛋白可形成病毒样粒子(Virus-Like Particles ,VLPs)^[7-8]。Brown 等报道人细小病毒的 VP₂ 蛋白可以单独形成病毒空衣壳^[9]。在本研究中证实,体外表达的猪细小病毒 VP₂ 蛋白也可自行装配成病毒样粒子,电镜观察呈二十面立体对称结构,直径约为 20nm 左右,形态大小均与全病毒粒子相似。AcNPV-vp₂ 感染 sf9 细胞后,重组病毒大量存在于上清液中,尤其以感染后 48h 时的滴度最高,而表达的 VP₂ 蛋白则存在于细胞内,SDS-PAGE 显示感染后 72h 的表达量明显高于感染后 48h 的。Western-blotting 和 ELISA 结果表明,表达产生的 VP₂ 蛋白具有生物学活性,可以与抗猪细小病毒血清发生特异性反应。红细胞凝集试验发现,其具有与猪细小病毒相同的凝集豚鼠红细胞活性,凝集价与全病毒的相当,从而揭示猪细小病毒的凝集位点可能在 VP₂ 蛋白上。据报道,在猪细小病毒组织培养物中,空衣壳粒子在 CsCl 梯度中的密度为 1.33g/cm³,全病毒粒子的密度为 1.39g/cm³。这一试验结果揭示,PPV 空衣壳可能还包含 VP₁ 或 VP₃ 蛋白,但是其形成并不依赖于 VP₁ 蛋白、病毒 DNA 或 VP₃ 蛋白,可以由 VP₂ 蛋白单独形成,而且 VLPs 中的 VP₂ 蛋白不显示自我水解形成 VP₃ 的活性,进而揭示 VP₃ 蛋白的形成机制尚需深入研究。

在此之前, Sedlik 等证实携带外源多肽的杂合 PPV:VLP, 在不加佐剂的情况下, 可以诱导机体产生针对外源多肽的强烈 CD4⁺ 和 CD8⁺ T 细胞免疫反应, 其免疫水平比结合在乳胶微粒上产生的高 100 倍。进一步研究发现, 利用携带淋巴细胞脉络从脑炎病毒(LC-MV) CD8⁺ T 细胞多肽的 PPV:VLP, 免疫小鼠可激发抵抗 LCMV 攻击的免疫反应^[10~12]。由此可见, PPV VLPs 可以作为外源免疫原性多肽的细胞免疫载体, 具有安全高效的特点, 为研制多价基因工程疫苗提供了有力的工具, 具有诱人的应用前景。同时也为研究病毒形态发生及研制基因工程疫苗提供了理论依据。

参 考 文 献

- [1] Martinez C, Dalsgaard K. *Vaccine*, 1992, **10** :684 ~ 690.
- [2] Ranz A, Manclus J, Diaz E, *et al.* *J Gen Virol*, 1989, **70** :2541 ~ 2553.
- [3] Molitor T, Joo H, Collett M. *J Virol*, 1983, **45** :842 ~ 854.
- [4] Choi C, Molitor T, Joo H. *Arch Virol*, 1987, **96** :75 ~ 87.
- [5] 萨姆布鲁 I, 弗里奇 F 和曼尼阿蒂斯 (金冬雁等译). 分子克隆实验指南. 第二版. 北京: 科学出版社, 1993.
- [6] Joo H, Donaldson-Wood C, Johnson R. *J Aust Vet*, 1976, **52** :422 ~ 424.
- [7] Luckow V, Summers M. *Biotechnology*, 1988, **6** :47 ~ 55.
- [8] Urakawa T, Ferguson M, Minor P, *et al.* *J Gen Virol*, 1989, **70** :1453 ~ 1463.
- [9] Brown C, Vanlent J, Vlask J, *et al.* *J Virol*, 1991, **65** :2702 ~ 2706.
- [10] Sedlik C, Dadaglio G, Saron M, *et al.* *J Virol*, 2000, **74** (13) :5769 ~ 5775.
- [11] Sedlik C, Dridi A, Saron M, *et al.* *J Virol*, 1999, **73** (4) :2739 ~ 2744.
- [12] Sedlik C, Dadaglio G, Saron M, *et al.* *Proc Natl Acad Sci USA*, 1997, **94** :7503 ~ 7508.

The Expression of Porcine Parvovirus VP₂ Protein in Insect Cells and It ' s Character

Lü Jianqing Chen Huanchun* Zhao Junlong Xiao Shaobo Wang Gefei
(Animal Husband and Veterinary College, Huazhong Agricultural University, Wuhan 430070, China)

Abstract : *vp*₂ gene of PPV was cloned into pFastBac I plasmid of Bac-To-Bac expression system. Bacmid-*vp*₂ was obtained, through homologous recombination between pFast-*vp*₂ and bacmid which is genome modified of Autographa californica nuclear polyhedrosis virus(AcNPV). After transfection, recombinant virus(AcNPV-*vp*₂) was developed. The specific 64kD band was showed by analysis of SDS-PAGE and Western-blotting, which indicated that PPV VP₂ protein had expressed in insect sf9 cells. Moreover, VP₂ protein had identical haemagglutinating activity and similar antigenic activity with full PPV by haemagglutination assay and ELISA. It was noteworthy that many self-assembled virus-like particles(VLPs) were found in VP₂ crude by electron microscope.

Key words : Porcine parvovirus, VP₂ protein, Expression in insect cell, VLPs

* Corresponding author