

N 端融合外源蛋白的兔出血症病毒衣壳蛋白自聚能力的研究

严维巍¹ 崔治中^{2*} 王永坤¹

(¹扬州大学畜牧兽医学院动物医学系 扬州 225009)

(²山东农业大学动物科技系 泰安 271018)

摘 要 将兔出血症病毒衣壳蛋白 VP60 基因插入杆状病毒转移载体 pBLUEBACHIS2-B 的 6 × HIS 表达标签下游,与线性化野生型杆状病毒基因组 DNA 共转染 Sf9 昆虫细胞,经蚀斑纯化后获克隆化重组杆状病毒 pBLUEBACHIS2B-VP60。以重组杆状病毒感染 Sf9 细胞,经 SDS-PAGE 和 Western blot 检测显示高效表达一分子量为 69kD 的重组蛋白,并且该蛋白可被兔抗 RHDV 高免血清识别。血凝试验表明,该重组蛋白可以凝集人“O”型红细胞,血凝价达 2¹⁶,同时,该血凝性可被抗 RHDV 的高免血清所抑制。经电镜观察,重组病毒表达的融合有 6 × HIS 表达标签的衣壳蛋白仍可在昆虫细胞内自聚成不包裹核酸的、与天然 RHDV 病毒粒子在物理形态上相似的病毒样颗粒(VLPs),并且该 VLPs 与兔抗 RHDV 高免血清作用后于电镜下可见凝集成团的现象,表明其与天然 RHDV 病毒粒子在抗原性上也极为相似。

关键词 兔出血症病毒 衣壳蛋白 VP60 基因 重组杆状病毒 表达 病毒样颗粒

中图分类号 Q78 文献标识码 A 文章编号 1001-6209(2005)01-0062-04

兔出血症病毒(*Rabbit haemorrhagic disease virus*, RHDV)是 20 世纪末期新发现的一种动物病毒,在国际病毒分类委员会(ICTV)2000 年的第七次报告中被列入了新成立的杯状病毒科(Caliciviridae)兔病毒属(*Lagovirus*)^[1],其病毒粒子呈球形,直径 35 ~ 40nm,20 面体对称,无囊膜,只拥有一个主要的结构蛋白——衣壳蛋白(VP60)。在对该病毒衣壳蛋白的研究中发现,在体外表达该衣壳蛋白时,在没有其他任何成分存在的条件下,可自然聚合成不包裹核酸的、与天然 RHDV 病毒粒子在物理形态上类似的病毒样颗粒(VLPs),我们前期的研究也同样证明了这点(待发表)。近年来,应用病毒样颗粒作为疫苗的抗原载体越来越受到广大科学家的重视。病毒样颗粒是一种模拟病毒的颗粒形态特点,将外源基因片段产物呈递到病毒颗粒表面而形成的嵌合颗粒,它与与病毒颗粒相同的外部形态,甚至还有某些病毒受体的天然配体,同时,还可将其他病原的特异性抗原等呈递在自己的表面,因而在病原体的疫苗研究中发挥着重要的作用。由于 VLPs 的空间结构,其常常可以诱导产生较灭活疫苗和可溶性多肽更为强烈的体液免疫应答,因为其表面是以非感染性的颗粒状态模拟天然抗原呈递过程来呈递糖蛋白抗原

的,而该法提呈引起的免疫应答优于溶解状态,故在保护作用中起重要作用的糖蛋白抗原引起的免疫应答可望更接近自然感染,这样,病毒样颗粒更有可能广泛用于疫苗的研制。不仅如此,VLPs 由于不包裹核酸,不能复制,因此也没有感染性,是一种安全的抗原载体^[2]。Nagesha 等^[3]研究发现无论是在 VP60 的 N 端去除 30 个氨基酸,还是将外源蛋白直接融合于 VP60 蛋白的 C 端下游,表达的 VP60 都能自聚成病毒样颗粒,但将外源蛋白直接融合于 VP60 的 N 端是否会干扰 VP60 蛋白自聚成病毒样颗粒国内外尚未见报道,本研究直接将 6 × HIS 的表达标签融合于 VP60 的 N 端以检测其能否自聚成病毒样颗粒,以期日后将 RHDV 的 VLPs 应用于疫苗抗原载体构建多联苗进行理论探索。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 质粒、菌株和抗体 含 RHDV WX84 株衣壳蛋白 VP60 基因重组质粒 pGEM-T-VP60 由本实验室构建^[4],灰翅夜蛾 *Spodoptera frugiperda* (clone Sf9) 昆虫细胞、杆状病毒表达转移质粒载体 pBLUEBACHIS2B 购自 Invitrogen 公司,RHDV WX84 分离株及其兔高

基金项目 国家自然科学基金(30400320)

* 通讯作者。Tel/Fax 86-538-8241560 E-mail: cuizz@sdau.edu.cn

作者简介 严维巍(1971-)男,江苏扬州人,副教授,博士,从事微生物学及免疫学研究。E-mail: yzuyww@yahoo.com

收稿日期 2004-02-05,修回日期 2004-05-17

免血清由扬州大学畜牧兽医学院预防兽医学教研室保存。

1.1.2 试剂 限制性内切酶购于 NEB 公司; T4 DNA 连接酶、IPTG、山羊抗兔 IgG AP 酶标抗体、NBT/BCIP 染色试剂盒等购于上海华美生物工程公司; 硝酸纤维素膜购于 Amersham 公司; Grace's 昆虫细胞培养基 (TNM-FH) Bluo-Gal 购自 Sigma 公司; 按说明书配制杆状病毒转染试剂盒购自 Invitrogen 公司; 胎牛血清购自 Hyclone 公司; 质粒纯化试剂盒购自 Roche 公司。

1.2 VP60 基因重组杆状病毒转移载体的构建

将 pGEM-T-VP60 重组质粒以 *Bgl* II 酶切后回收 VP60 基因, 并与经 *Bgl* II 酶切处理的转移质粒 pBLUEBACHIS2B 连接, 以氯化钙法转化大肠杆菌菌株 TOP10 F', 经限制性内切酶酶切鉴定筛选以正确方向插入的阳性重组转移载体 pBLUEBACHIS2B-VP60^[4]。

1.3 pBLUEBACHIS2B-VP60 重组质粒与杆状病毒的共转染

按照杆状病毒转染试剂盒说明书将纯化重组质粒与线性化野生型病毒基因组 DNA 共转染 Sf9 细胞以获取重组病毒, 并进行 3 轮蚀斑纯化后收获培养上清, 即为 P-1 代重组病毒。

1.4 重组病毒的 PCR 鉴定

按操作手册提取重组病毒的基因组 DNA 后, 对重组病毒进行 PCR 鉴定, PCR 鉴定采用操作手册提供的引物序列, 由 TaKaRa 公司合成。引物序列如下: P1 (Forward primer): 5'-TTTACTGTTTCGTAACAGTTTTG-3', P1 (Reverse primer): 5'-CAACAACGCA CAGAATCTAGC-3'。PCR 反应体系: 病毒 DNA 5 μ L, 10 \times buffer 5 μ L, 25mmol/L dNTPs 1 μ L, 上游和下游引物 (P1, P2) 各 1 μ L (均为 25 pmol/L), *Taq* DNA 聚合酶 0.5 μ L (1U), 去离子水 37.5 μ L。PCR 反应条件: 94 $^{\circ}$ C 2min, 94 $^{\circ}$ C 1min, 55 $^{\circ}$ C 2min, 72 $^{\circ}$ C 3min, 共进行 30 个循环, 72 $^{\circ}$ C 7min。反应结束后取 20 μ L PCR 扩增产物在 0.8% 琼脂糖凝胶上进行电泳, 观察结果。

1.5 高滴度重组病毒的增殖

将对数期生长的 Sf9 细胞接种于 25cm² 的培养瓶中, 向其中接种 20 μ L P-1 代病毒。27 $^{\circ}$ C 培养 5~10d 细胞完全裂解后收获病毒, 命名为 P-2 代。于 -70 $^{\circ}$ C 冰箱中贮存备用。

1.6 表达产物的 SDS-PAGE 和 Western blot 检测

以 P-3 代重组病毒液: 细胞培养液 = 1:50 的比例接种重组病毒于昆虫细胞培养方瓶中, 分别在

72h、96h、120h 和 140h 收集细胞。先收集培养上清液, 再用 PBS (pH7.2) 洗涤细胞两次后, 用 5mL PBS 将细胞完全吹下, 收集于无菌离心管中, 冻融 3 次后以超声波裂解, 2500r/min 于 4 $^{\circ}$ C 离心 15min, 吸取上清液, 于 -20 $^{\circ}$ C 贮存备用。将处理好的样品 (以野生型杆状病毒感染细胞和未感染病毒细胞为阴性对照) 分别取 20 μ L 与等体积 2 倍 SDS-PAGE 加样缓冲液混合, 96 $^{\circ}$ C 水浴作用 10min 后按常规方法电泳, 完毕后以考马斯亮兰 R-250 染色液固定并染色 3h, 此后以脱色液脱色至背景清晰。样品电泳后, 取下凝胶将其转印于 NC 膜上, 应用兔抗 RHDV 高免血清按常规方法进行 Western blot 反应^[5]。

1.7 重组病毒表达产物的血凝和血凝抑制试验

1.7.1 重组病毒表达产物的血凝试验: 试验采用人“O”型红细胞进行, 用前以 pH6.5 0.85% PBS 液洗涤, 洗涤后的红细胞以生理盐水制成 2% 悬液, 分别取 25 μ L 上述处理好的细胞裂解样品和培养上清于圆底微量血凝板中作 2 倍比稀释后, 加入等体积 2% 红细胞悬液, 振荡均匀, 置 25 $^{\circ}$ C 作用 30min 后观察结果。同时以非重组野生型病毒感染细胞处理上清为阴性对照, 以 RHD 病兔肝或脾组织 1:5 匀浆液上清为阳性对照。

1.7.2 重组病毒表达产物的血凝抑制试验: 根据 1.7.1 所测各表达产物 (包括病兔组织匀浆液上清对照) 的血凝价, 将其稀释成含 8 个 HA 单位的溶液。于微量血凝板第 1 孔中加入 0.025mL 血清, 然后以生理盐水倍比稀释至第 12 孔, 加入 0.025mL 内含 8 个 HA 单位的表达产物稀释液于每一孔中, 将血凝板置 25 $^{\circ}$ C 作用 45min, 每孔中加入 2% 浓度的人“O”型红细胞 0.025mL, 25 $^{\circ}$ C 静置 45min 后观察结果。

1.8 重组病毒表达产物的透射电镜观察

1.8.1 重组病毒表达产物的直接电镜观察: 将 1.6 处理好的重组病毒表达产物样品滴加于铜网 Formvar 膜上作用 5min, 以 pH6.4 2% 磷钨酸负染色 10min, 以 PHILIPS TECNAI12 型扫描电镜直接观察病毒。

1.8.2 重组病毒表达产物的免疫电镜观察: 将 100 μ L 1.6 处理好的待检样品与等量 RHDV 兔高免抗血清于 37 $^{\circ}$ C 作用 1h 后, 12000r/min 离心 30min, 弃上清, 沉淀以 50 μ L 去离子水重新悬浮, 取适量同 1.8.1 法进行负染电镜观察。

2 结果

2.1 pBLUEBACHIS2B-VP60 重组质粒的鉴定

对重组质粒 pBLUEBACHIS2B-VP60 酶切鉴定显

示,VP60 基因成功插入了 pBLUEBACHIS2B 转移载体质粒,且测序结果显示,其阅读框架也都正确。

2.2 重组病毒的 PCR 鉴定

因为鉴定引物 P1 和 P2 在转移载体 pBLUEBACHIS2B 上的跨度为 328bp,加上 WX 株 RHDV 的 VP60 蛋白基因约 1.7kb,所以重组病毒的 PCR 扩增产物大小应约为 2.0kb 左右。经过 3 轮蚀斑纯化后,提取重组病毒的核酸进行鉴定,得到了单一的目的条带,野生型病毒没有 800bp 左右条带出现。说明衣壳蛋白基因已经整合到杆状病毒基因组中,并且蚀斑纯化的结果较为理想。

2.3 重组蛋白的 SDS-PAGE 和 Western blot

结果显示,感染重组病毒 pBLUEBACHIS2B-VP60 的 Sf 9 昆虫细胞裂解液中较没有感染病毒和感染野生型病毒的 Sf 9 昆虫细胞分别多一明显的蛋白条带(分子量约为 69kD)。与预期的表达蛋白的分子量大约相符(图 1-A)。

将两种重组病毒感染昆虫细胞 120h 后的裂解产物,按 1.7 处理好样品后先进行 SDS-PAGE,之后将表达产物转移到硝酸纤维素膜上,应用兔抗 RHDV 多抗血清进行 Western blot 检测。硝酸纤维素膜上出现了一条 69kD 特异性条带(图 1-B),而没有重组病毒感染的细胞对照在相应位置则没有条带出现,说明重组蛋白不仅获得了成功表达,而且表达产物可以同 RHDV 抗体反应,重组蛋白和天然蛋白具有相似的免疫原性。

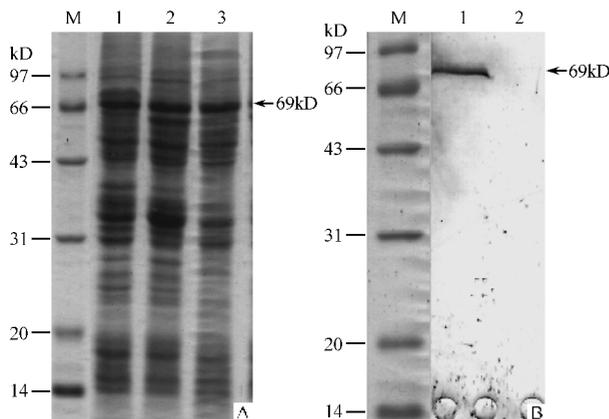


图 1 重组蛋白的 SDS-PAGE 和 Western blot 检测

Fig.1 SDS-PAGE analysis of VP60 expressed in Sf9 cells infected with recombinant baculoviruses

M. Molecular size markers; 1. Baculovirus pBLUEBACHIS2B-VP60 infected Sf9 cells; 2. Wild type baculovirus infected Sf9 cells; 3. Uninfected Sf9 cells.

2.4 重组病毒表达产物的血凝和血凝抑制试验

经检测,1.7 处理所得的待检样品皆具有明显的血凝性,可以凝集人“O”型红细胞,pBLUEBACHIS2B-VP60 重组病毒感染的 Sf 9 细胞裂解上清血凝价为 2^{16} ,同时,培养上清也具有血凝性,血凝价为 2^{13} ,表明细胞在培养后期裂解破碎,大量表达产物被释放进入培养基。此外,上述表达产物的血凝特性皆可被抗 RHDV 的高免血清所抑制,表明该表达产物与天然 RHDV 具有十分相似的生物学活性。

2.5 重组表达产物的直接电镜和免疫电镜观察

重组病毒 pBLUEBACHIS2B-VP60 感染 Sf 9 细胞裂解上清在电镜下可见有形态特征与天然 RHDV 相似的病毒样颗粒,大小约 40nm,无囊膜,周围排列有 RHDV 典型的呈辐射状排列的 10 个规律的突出物(图 2-A)。免疫电镜观察可见重组病毒表达形成的 RHDV 病毒样颗粒经抗天然 RHDV 抗体作用后能聚集成团,表明直接电镜观察所得的病毒粒子为表达的 VP60 蛋白自聚合而形成的 RHDV 病毒样颗粒(图 2-B)。

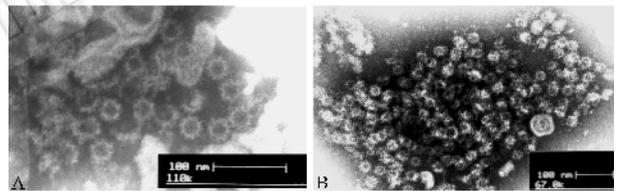


图 2 pBLUEBACHIS2B-VP60 重组病毒表达产物形成的 RHDV 病毒样颗粒(A:110000 \times ;B:67000 \times)

Fig.2 Electron micrograph(A) and immunoelectron micrograph(B) of RHDV VLPs from baculovirus pBLUEBACHIS2B-VP60 infected Sf9 cells (A:110000 \times ;B:67000 \times)

3 讨论

根据现有对嵌杯样病毒衣壳蛋白的结构分析发现,所有的嵌杯样病毒都只有一个分子量在 59 ~ 65kD 的唯一的衣壳蛋白。虽然这种情况在植物病毒中很普遍,但在动物病毒中,仅有一个结构蛋白即可构成病毒衣壳的却并不多见,到目前为止,仅在嵌杯样病毒和野田村病毒(Nodavirus)发现^[6]。有报道称,180 个拷贝的衣壳蛋白单位构成了 San Miguel 海狮病毒的衣壳蛋白^[6]。Norwalk 病毒在杆状病毒表达系统中发现表达的衣壳蛋白可自聚成病毒样颗粒(VLPs),这种病毒样颗粒在结构和抗原性上和天然病毒粒子十分相似^[7],这在免疫和诊断中十分有用。这点对某些嵌杯样病毒,如 Norwalk 病毒和

RHDV 尤为重要,因为他们至今不能在体外培养。

Nagesha 等^[3]详细研究了 RHDV VP60 在体外表达的情况。他们在杆状病毒中分 3 种方法表达了 VP60 蛋白,一种是表达完整的 VP60,一种是在 VP60 的 N 端去除 30 个氨基酸后取而代之以蓝舌病毒衣壳蛋白 VP7 上的一个特征性的 6 个氨基酸残基位点——Btag,还有一种是将该位点直接融合于 VP60 蛋白的 C 端下游。研究结果显示,这 3 种方法表达的 VP60 都能自聚成病毒样颗粒,但第二种方法表达形成的病毒样颗粒只有 27nm,不同于其他两种方法自聚成的与天然病毒粒子一样的 40nm,也就是说,去除 VP60 蛋白 N 端的 30 个氨基酸并不能阻止 VLPs 的形成,但却对 VLPs 的形态产生了重要影响。在曾经归入嵌杯样病毒的戊型肝炎病毒研究中有报道^[8],该病毒去除衣壳蛋白 N 端的 111 个氨基酸或 C 端的 50 个氨基酸后都不影响表达蛋白形成 VLPs。在本研究中,我们将 6 × HIS 的表达标签直接融合于 VP60 蛋白的 N 端,从直接的电镜观察以及病毒对人“O”型红细胞的凝集现象可看出,这不仅不影响 VLPs 的形成,而且对其形成的 VLPs 在空间构象上不存在任何影响;并且,Western blot 试验显示,形成的 VLPs 在抗原性上也没有改变。这说明在完整 RHDV VP60 蛋白的 N 端融合上一定长度的蛋白对该 VP60 蛋白的自聚现象也没有任何影响。到目前为止,在具有单衣壳蛋白的动物病毒中,这种在蛋白质两端能同时融合其它氨基酸序列的情况并不多,

并且,这种融合的氨基酸位点还不影响 VP60 蛋白自聚成病毒样颗粒,这便使 RHDV 的 VP60 蛋白成为一种理想的抗原载体,为我们在现有基础上开展研制兔病的用基因工程方法构建同时表达不同抗原蛋白的联苗奠定了重要的理论基础。

参 考 文 献

- [1] Green K Y, Ando T, Balayan M S, et al. Taxonomy of the caliciviruses. *J Infect Dis* 2000, 181 Suppl 2: S322 - S330.
- [2] Rob N, Polly R. Virus-like particle as immunogens. *Trends in Microbiology* 2003, 11(9): 438 - 444.
- [3] Nagesha H S, Wang L F, Hyatt A D. Virus-like particles of calicivirus as epitope carriers. *Arch Virol*, 1999, 144(12): 2429 - 2439.
- [4] 严维巍, 崔治中, 王永坤. 兔出血症病毒中国株衣壳蛋白基因的克隆和序列分析. *中国病毒学*, 2003, 18(2): 129 - 133.
- [5] Sambrook J, Fritsch E F, Maniatis T. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 2nd ed. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989.
- [6] Laurent S, Vautherot J F, Madelaine M F, et al. Recombinant rabbit hemorrhagic disease virus capsid protein expressed in baculovirus self-assembles into viruslike particles and induces protection. *J Virol*, 1994, 68(10): 6794 - 6798.
- [7] Jiang X, Wang M, Wang K, et al. Sequence and genomic organization of Norwalk virus. *Virology*, 1993, 195(1): 51 - 61.
- [8] Li T C, Yamakawa Y, Suzuki K, et al. Expression and self-assembly of empty virus-like particles of hepatitis E virus. *J Virol*, 1997, 71(10): 7207 - 7213.

Study on the self-assemble ability of expressed capsid protein of Rabbit haemorrhagic disease virus that fused with foreign epitope at the N-terminus

YAN Wei-wei¹ CUI Zhi-zhong^{2*} WANG Yong-kun¹

(¹ College of Veterinary Medicine, Yangzhou University, Yangzhou 225009, China)

(² College of Animal Science and Technology, Shandong Agricultural University, Tai'an 271018, China)

Abstract: The RHDV capsid protein (VP60) gene was first subcloned into the transfer plasmid pBLUEBACHIS2B located downstream of a 6 × HIS tag, then the recombinant transfer plasmid DNA were cotransfected Sf 9 cells with Bac-N-Blue DNA and purified for cloned recombinant baculovirus by plaque assay. The expression of fused-VP60 gene was analyzed by SDS-PAGE and Western blot. A specific 69 kD protein band was obtained. Observed under electron micrography, the recombinant baculovirus expressed VP60 protein assembled into viruslike particles which were morphologically and antigenically similar to native RHD virus but did not package RNA. The close-to-native conformation of the VLPs was also supported by the haemagglutination test, in which recombinant VLPs, like RHDV, agglutinated human blood type O erythrocytes.

Key words: Rabbit haemorrhagic disease virus, Capsid protein gene, Expression, Baculovirus, VLPs

Foundation item: Chinese National Natural Science Fund (30400320)

* Corresponding author. Tel/Fax: 86-538-8241560; E-mail: cuizz@sdau.edu.cn

Received date: 02-05-2004