

# A 组轮状病毒 G4 型地方株 VP7 基因 在杆状病毒系统中的表达\*

何湘君 钱 渊 刘 军 李国华 靖 宇

(首都儿科研究所北京市感染与免疫中心实验室 北京 100020)

**关键词** 轮状病毒, VP7, 杆状病毒载体, 蛋白表达

**分类号** R373.2 **文献标识码** A **文章编号** 0001-6209(1999)02-0168-70

A 组轮状病毒是导致婴幼儿重症腹泻的最主要病毒病原, 位于病毒外壳上的 VP4 和 VP7 蛋白具有中和抗原活性, 与病毒的毒力及免疫保护性有关。VP7 是外壳上的主要糖蛋白, 根据其抗原性的不同, 可将 A 组轮状病毒划分出不同的血清型(G1~G14)<sup>[1]</sup>, 而对疫苗的研究证明不同血清型之间的交叉保护作用甚微。因此, 各国科学家均投入大量精力研究 VP7 基因及其编码蛋白的结构与功能。鉴于杆状病毒对外源基因的高效表达, 及其在昆虫细胞中表达外源基因时的翻译后处理与哺乳动物细胞相似, 我们选择了杆状病毒-昆虫细胞表达系统对我国 A 组轮状病毒的 G4 型 VP7 基因进行了表达。

## 1 材料和方法

### 1.1 主要实验材料

限制性内切酶及其它工具酶购自美国 GIBCO BRL 公司, 转移质粒 pBacPAK8、Bsu361 酶切后的 BacPAK6 病毒 DNA 和转染试剂为 Clontech 公司产品, 杆状病毒野毒株 AcMNPV、昆虫细胞 sf9 由卫生部北京生物制品研究所张鹏飞研究员赠送, 病毒和细胞的培养采用 GIBCO BRL 公司生产的 IPL41 培养基, G4 型轮状病毒标准株 ST3 和豚鼠抗 ST3 血清由美国 NIH Dr. Hoshino 赠送。硝酸纤维素膜和尼龙膜购自 Schleicher & Schuell 公司, DIG 标记和检测试剂盒购于 Beoringher Mannheim 公司, DNA 纯化柱为 QIAGEN 公司产品, 轮状病毒地方流行株 CR117 为北京 1994 年流行季节首都儿科研究所附属儿童医院腹泻病人标本, 经套式 PCR 鉴定为 G4 型轮状病毒。具体方法见文献[2]。

### 1.2 VP7 基因的克隆和测序

将病人标本 CR117 用 1% SDS 处理、酚/氯仿抽提, 再经羟基磷灰石处理后进行 RT-PCR 扩增, 得到的 PCR 产物以平端克隆至 pTZ18。用 DIG 标记的 G4 型 VP7 PCR 产物作为探针, 以菌落原位杂交法<sup>[3]</sup>筛选重组 pTZ18-CR117, 然后用双脱氧末端终止法<sup>[3]</sup>对插入的 VP7 基因进行核苷酸序列测定。将克隆至 pTZ18 的 VP7 基因用 BamHI + EcoRI 酶切后定向亚克隆至转移质粒 pBacPAK8 中。采用 QIAGEN 公司的 DNA 纯化术制备纯净 pBacPAK8-CR117 DNA。

### 1.3 转染 Sf9 细胞制备重组病毒

将纯化的重组质粒 pBacPAK8-CR117 和线性杆状病毒 DNA BacPAK6 按公司提供的方法共转染 sf9 细胞, 培养 5d 后, 收获培养上清。

### 1.4 重组病毒的筛选及鉴定

采用空斑法筛选并纯化重组病毒。用 DIG 标记的 G4 型 VP7 PCR 产物作为探针, 与重组病毒感染细胞的 DNA 提取物进行杂交, 以鉴定重组病毒。探针的标记和杂交后的检测按试剂盒说明进行。

\* 本项目由国家自然科学基金(No. 39570036)、卫生部科研基金(No. 94-1-289)和北京市自然科学基金(No. 7951002)资助

收稿日期: 1997-11-20, 修回日期: 1998-04-21

### 1.5 SDS-PAGE 和 Western blot

将重组病毒以 10pfu/cell 感染 sf9, 3d 后收获细胞。细胞裂解物经 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳后, 在 240mA 恒流条件下转移 1h 至硝酸纤维素膜。用 5% 的脱脂奶封闭 1h 后分别与 ST3 豚鼠免疫血清和辣根过氧化物酶标记的羊抗豚鼠免疫血清孵育, DAB 显色。

## 2 结果和讨论

### 2.1 重组转移质粒的鉴定

用菌落原位杂交法和酶切鉴定筛选出正确插入的 pTZ18-CR117 后, 对插入片段进行了序列测定。比较 CR117 与 ST3 的氨基酸序列, 两者的同源率为 96.9%, CR117 VP7 的氨基酸序列见李国华待发表资料。将此 VP7 基因定向亚克隆至转移质粒 pBacPAK8 中, 得到重组转移质粒 pBacPAK8-CR117。

### 2.2 重组病毒的筛选鉴定及扩增

用空斑法筛选转染上清中的重组病毒克隆。共挑取 30 个空斑, 经 DIG 标记的 VP7 探针杂交鉴定, 100% 阳性, 而 AcMNPV 感染的细胞对照为阴性。取一个杂交鉴定阳性的克隆进行两次空斑纯化后繁殖 2~3 代, 此时病毒量达  $2 \times 10^7$  pfu/mL。

### 2.3 重组病毒表达产物的检测

重组病毒表达产物经 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳后, 用 ST3 豚鼠免疫血清进行 Western-blot 检测可见三条着色条带, 见图 1。经 BIO-RAD GS-700 密度扫描仪分析, 三条带的分子量分别为 38.5kD、34kD 和 32kD, 其中 38.5kD 的蛋白条带着色明显弱于其它两条带, 上清中也有少量表达产物。在 AcMNPV 感染的细胞对照上未见任何条带。观察不同培养天数的表达产量发现第 3d 收获时产量最高。

### 2.5 讨论

轮状病毒 VP7 基因含 2 个处于同一读码框架的起始密码, 每一个起始密码后均有一段可作为信号序列的疏水氨基酸, 提示它是双顺反子<sup>[1]</sup>。Chan 等<sup>[4]</sup>报道在体外翻译系统中表达 SA11 的第 9 基因时, 发现 2 条分子量分别为 35.3 和 37kD 的非糖基化蛋白质条带, 推测 VP7 的 2 个顺反子表达的蛋白质中, 一条蛋白的信号序列是可切除的, 而另一条蛋白的信号序列是不可切除的, 因而产生了不同分子量的蛋白。我们在昆虫细胞中表达全长 VP7 基因时发现三条分子量不同、与 ST3 免疫血清呈特异反应的蛋白质条带, 感染细胞培养上清中有一条 VP7 蛋白带。而 Emslie 等<sup>[5]</sup>在原核系统中表达 SA11 株 VP7 时去除了 H1 和 H2 信号序列也得到了三条分子量不同的 VP7, 上清中同样也只有一条 VP7 蛋白带, 提示 VP7 经修饰而成熟并分泌到细胞外。VP7 在细胞内表达成熟前为什么具有不同的分子大小、它是如何被修饰的、这些蛋白质各起什么作用还有待进一步研究。

轮状病毒 VP7、VP4 和 VP6 基因在昆虫细胞中同时表达, 可自动形成病毒样颗粒, 使衣壳蛋白恢复天然构象, 增强免疫原性。猴轮状病毒和牛轮状病毒 VP6、VP7 已在杆状病毒系统成功表达, 并被包装成病毒样颗粒<sup>[6~8]</sup>, 而人轮状病毒衣壳蛋白的表达还未见报道。本研究对我国地方株轮状病毒 VP7 的表达成功将有助于对 VP7 结构和功能的进一步研究, 也为今后制备病毒样颗粒并进行亚单位疫苗的研制奠定了基础。

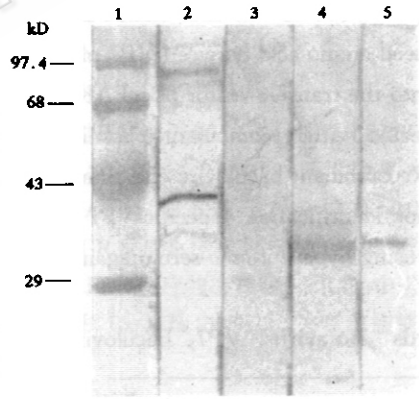


图 1 CR117 VP7 重组杆状病毒表达产物的 Western blot 分析

1. 标准蛋白; 2. ST3 感染的 MA104 细胞裂解物;
3. AcMNPV 感染的 sf9 细胞裂解物; 4. VP7 重组病毒感染的 sf9 细胞裂解物; 5. VP7 重组病毒感染的 sf9 细胞培养上清。

## 参 考 文 献

- [1] Kapikian A Z, Chanock R M. rotavirus. In: Fields B N *et al.* (ed). *Virology*, 3rd ed. Philadelphia, Lippincott-Raven Publishers, 1996, 1657~1708
- [2] 熊朝晖, 钱 渊, 袁丽娟等. 中华微生物和免疫学杂志, 1995, 15(2):105~109
- [3] Sambrook J, Fritsch E F, Maniatis T. *Molecular Cloning*, 2nd ed. New York; Cold Spring Harbor Lab. 1989
- [4] Chan W K, Penaranda M E, Crawford S E *et al.* *Virology*, 1986, 151:243~252
- [5] Ermslie K R, Miller J M, Slade M B *et al.* *J Virol* 1995, 69:1747~1754
- [6] Redmond M J, Ijaz M K, Parker M D *et al.* *Vaccine* 1993, 11:273~281.
- [7] Crawford S E, Labbe M, Cohen J *et al.* *J Virol*, 1994, 68:5945~5952
- [8] Sabara M, Parker M, Aha P *et al.* *J Virol*, 1991, 65:6994~6997

## EXPRESSION OF VP7 FROM A GROUP A ROTAVIRUS G4 FIELD STRAIN IN BACULOVIRUS SYSTEM

He Xiangjun Qian Yuan Liu Jun Li guohua Jing Yu

(Beijing Municipal laboratory of infection and immunity Capital Institute of Pediatrics, Beijing 100020)

**Abstract** The full length of G4 type VP7 cDNA was amplified by reverse transcription and polymerase chain reaction (RT-PCR) from a group A rotavirus field strain CR117 circulated in Beijing. The amplified cDNA was first cloned into pTZ18. Sequence analysis showed 96.9% homology of the deduced amino acid between VP7 of CR117 and ST3. Then the VP7 cDNA of CR117 was subcloned into the transfer vector pBacPAK8 downstream of the polyhedrin promoter. Insect cells were cotransfected with recombinant plasmid pBacPAK8-CR117 and Bsu36I-digested BacPAK6 viral DNA. Recombinant baculovirus containing CR117 VP7 gene was obtained by plaque screen and hybridization identification. Specific VP7 with three different molecular weight was detected by Western blot using hyperimmune serum against Rotavirus strain ST3 (G4 type) when expressed in insect cells.

**Key words** Rotavirus, VP7, Baculovirus, Protein expression