

谭 晖 胡 波 陈萌萌 等. 嵌合卵清蛋白-兔出血症 VP60 蛋白病毒样颗粒在杆状病毒表达系统中的表达及其鉴定[J]. 江苏农业学报 2013 29(2): 352-358.

doi: 10. 3969/j. issn. 1000-4440. 2013. 02. 021

嵌合卵清蛋白-兔出血症 VP60 蛋白病毒样颗粒在杆状病毒表达系统中的表达及其鉴定

谭 晖^{1,2}, 胡 波¹, 陈萌萌^{1,2}, 范志宇¹, 魏后军¹, 宋艳华¹, 王 芳¹

(1. 江苏省农业科学院兽医研究所 农业部兽用生物制品工程技术重点实验室 国家兽用生物制品工程技术研究中心 江苏南京 210014; 2. 南京农业大学动物医学院 江苏 南京 210095)

摘要: 利用卵清蛋白(OVA) 第 257 ~ 264 位氨基酸替换兔出血症病毒的主要结构蛋白质 VP60 不同位置处相应数量的氨基酸, 研究了氨基酸的替换对 VP60 蛋白表达及病毒样颗粒装配的影响。通过重叠延伸剪接术(SOE) 法, OVA T-细胞表位(257 ~ 264 位氨基酸) 分别取代 VP60 3 个区域(502 ~ 510 位氨基酸、411 ~ 417 位氨基酸、302 ~ 309 位氨基酸) , 得到 3 种重组嵌合 VP60 基因。利用杆状病毒表达系统, 得到 3 种重组穿梭载体 Bacmid, 分别命名为 Bacmid-V-1、Bacmid-V-2、Bacmid-V-3。将重组阳性质粒转染 Sf9 昆虫细胞, 得到 3 种重组病毒 rBac-v-1、rBac-v-2、rBac-v-3。3 组重组病毒感染 Sf9 细胞后表达的 3 种蛋白质分别命名为 Z1、Z2 和 Z3。经 RT-PCR、IFA、SDS-PAGE、Western blot 等方法鉴定后, 利用电镜观察此 3 种重组蛋白质病毒样颗粒的形成情况。3 种重组嵌合 VP60 蛋白在 Sf9 昆虫细胞中得到表达, 3 种重组嵌合蛋白质均可以形成与 VP60 蛋白类似的病毒样颗粒。

关键词: 兔出血症病毒(RHDV); VP60 蛋白; 卵清蛋白; Sf9 细胞; 病毒样颗粒(VLPs)

中图分类号: S858. 2912. 65 文献标识码: A 文章编号: 1000-4440(2013) 02-0352-07

Expression and identification of chimeric virus-like particles integrating ovalbumin and VP60 protein from rabbit hemorrhagic disease virus in baculovirus system

TAN Hui^{1, 2}, HU Bo¹, CHEN Meng-meng^{1, 2}, FAN Zhi-yu¹, WEI Hou-jun¹, SONG Yan-hua¹, WANG Fang¹
(*Institute of Veterinary Medicine, Jiangsu Academy of Agricultural Sciences/Key Laboratory of Veterinary Biological Engineering and Technology, Ministry of Agriculture/National Center for Engineering Research of Veterinary Bio-products, Nanjing 210014, China; 2. College of Veterinary Medicine, Nanjing Agricultural University, Nanjing 210095, China*)

Abstract: The amino acids 257 - 264 on OVA (ovalbumin) was used as a substitute for corresponding number of amino acids on different locations of VP60, the major structural protein of rabbit hemorrhagic disease virus, to study the effects of the substitution on the expression of VP60 and VLPs (virus-like particles) assembling. By splicing by overlap extension (SOE) method, three areas on VP60, amino acids 502 - 510, amino acids 411 - 417, and amino acids 302 - 309

were replaced by OVA T-cell epitope (OVA 257 - 264) to get three recombinant chimeric VP60 genes. Via the baculovirus expression system, three recombinant shuttle vector bacmids, named Bacmid-V-1, Bacmid-V-2 and Bacmid-V-3 were obtained. The positive recombinant plasmids were transfected into Sf9 insect cells to produce three kinds of recombinant viruses, rBac-v-1, rBac-v-2, rBac-v-3, and three kinds of proteins expressed in the recombi-

收稿日期: 2012-09-07

基金项目: 国家自然科学基金项目(31070140); 江苏省自主创新项目[CX(10) 214]

作者简介: 谭 晖(1988-), 女, 安徽宣城人, 硕士研究生, 研究方向为动物传染病诊断与免疫。(E-mail) tanhui210327@163. com

通讯作者: 王 芳, (Tel) 025-84390337; (E-mail) rwangfang@126. com

nant virus infected Sf 9 cells were named Z1 , Z2 , and Z3. After identification by RT-PCR , IFA , SDS-PAGE and Western blot , three recombinant proteins were observed under electron microscopy. All the three recombinant chimeric VP60 proteins were expressed in Sf 9 insect cells , and formed VLPs that similar to VP60.

Key words: rabbit hemorrhagic disease virus (RHDV) ; VP60 protein; ovalbumin; sf 9 cell; virus-like particle (VLP)

兔病毒性出血症(Rabbit hemorrhagic disease , RHD) 是由兔出血症病毒(Rabbit hemorrhagic disease virus ,RHDV) 引起的一种高度接触性传染病^[1] ,该病毒为嵌杯病毒科兔病毒属(*Lagovirus*) 成员^[2]。病毒粒子的衣壳由 32 个 5 ~ 6 nm 大小的壳粒构成 ,为一种分子量约 6.0×10^4 的主要结构蛋白质 VP60 多重拷贝所组成^[3-4]。研究证明 ,VP60 衣壳蛋白质在没有其他任何成分存在的条件下 ,在体外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)^[5-6]。兔瘟病毒 VLPs 具有很好的免疫原性 ,可以以胞吞或胞饮途径进入抗原递呈细胞分别诱导体液免疫应答和细胞免疫应答^[7]。卵清蛋白质(OVA) 第 257 ~ 264 位氨基酸(SIINFEKL) 为 CD8 + T 细胞表位 ,这个位点受 MHC-I 类分子限制 ,具有较强的免疫原性^[8] ,常用来诱导机体免疫应答。

法国学者 Laurent 等^[9] 指出 VP60 蛋白的 C 末端组成了病毒的外表面(P 区) ,而 N 末端构成了衣壳的内壳(S 区) 。江苏省农业科学院兽医研究所兔病与生物技术项目组(下文简称本实验室) 对不同来源的 RHDV 毒株进行同源比对 ,发现 RHDV 上存在一些高变区 ,这些高变区在不同 RHDV 毒株中基因序列有所不同 ,我们又对这些高变区的二级结构进行预测 ,发现一些位点位于 VP60 二级结构的连接区 ,不参与二级结构形成 ,为线性结构 ,如 502 ~ 510 位、411 ~ 417 位、302 ~ 309 位氨基酸。本研究分别将 VP60 以上 3 个区域替换为外源 OVA T-细胞表位 ,并在昆虫细胞中表达 ,为研究嵌合 VP60 蛋白的自聚能力及其免疫原性奠定基础。

1 材料与方法

1.1 种毒(病毒)、质粒、细胞和菌种

供体质粒 pFastBac1-VP60 由本实验室构建并保存; 大肠杆菌 DH10 Bac 由本实验室保存; Sf9 昆虫细胞由本实验室培养; 表达载体 pFastBac1 购自 Invitrogen 公司; pMD19-T Vector 购自 TaKaRa 公司;

大肠杆菌 DH5 α 感受态购买自北京全式金生物技术有限公司。

1.2 主要试剂和仪器

DNA Marker DL2000 及 DL15000 、限制性内切酶 *EcoR* I 、*Hind* III 、T4 DNA Ligase、凝胶回收纯化试剂盒等购自大连宝生物工程有限公司; PfxDNA 聚合酶、*Taq* 高保真酶、脂质体 LipofectamineTM2000 和 Grace 不完全培养液购自 invitrogen 公司; 胎牛血清购自 GIBCO 公司; 酶标兔抗小鼠 IgG (FITC-IgG) 购自北京鼎国昌盛生物技术有限公司; 柱式动物 RNAout 购自北京天恩泽基因科技有限公司; DAB 显色试剂盒购自武汉博士德生物工程有限公司; 小鼠抗 VP60 单抗 A3C 为本实验室保存; 人“O”型红细胞取自南京军区总医院。柱式质粒 DNAout 试剂盒、柱式动物 RNAout 购自北京天恩泽基因科技有限公司。病毒颗粒的电镜观察在东南大学医学院大型仪器平台的 H-7650 型透射电镜上操作完成。

1.3 引物设计

根据 GenBank 数据库 RHDV 皖阜株 VP60 基因序列(FJ794180) 和卵清蛋白质(OVA) 257 ~ 264aa 的碱基序列 ,用 Primer 5.0 软件设计引物(由 Invitrogen 公司合成)。上游引物 VP60-F: 5'-TTT-GAATTCATGGAGGGCAAAGCCCCGAC-3' (*EcoR* I); 下游引物 VP60-R: 5'-GCCAAGCTTTCAGACATA-AGAAAAGCC-3' (*Hind* III)。第 1 组引物: 引物 1 (VP60-502-R): 5'-GGATCCGAGTTTTTCAAAGTT-GATTATGGAGGATCCGTTGAGCGAAAGTCCAATTG-3'; 引物 2 (VP60-510-F): 5'-GGATCCTCCATAAT-CAACTTTGAAAACTCGGATCCCAGTTCTTCGTTTG GCAGTT-3'。第 2 组引物: 引物 3 (VP60-411-R): 5'-GGATCCGAGTTTTTCAAAGTTGATTATGGAGGAT CCGCCGGTTACCACGGCATAAA-3'; 引物 4 (VP60-417-F): 5'-GGATCCTCCATAATCAACTTTGAAAAAC TCGGATCCCTGTTTGTGATGGCCTCGGG-3'。第 3 组引物: 引物 5 (VP60-302-R): 5'-GGATCCGAGTTTTT CAAAGTTGATTATGGAGGATCCACTGCCTCTTCGAT

GGTCAA-3'; 引物 6 (VP60-309-F): 5'-GGATCCTC-CATAATCAACTTTGAAAACTCGGATCCACCAACG TGCTTCAGTTTTG-3'。

1.4 重叠区扩增基因拼接法 (SOE 法) 构建目的基因

以 SOE 法 (图 1) 构建第 1 组重组基因片段为例 融合基因构建方法如下: 首先利用引物 VP60-F 和引物 1 扩增出片段 1 (片段 1 为 VP60 第 1~502 位氨基酸的碱基, 末端引入 OVA T 细胞表位碱基)。然后, 利用引物 2 和 VP60-R 扩增片段 2 (片段 2 为前端引入 OVA T 细胞表位的碱基, 后为 VP60 第 510~579 位氨基酸的碱基)。两次 PCR 的产物经 1% 琼脂糖凝胶电泳后, 用 DNA 快速回收纯化试剂盒回收凝胶中的目的片段, 回收产物 10 倍稀释后作为第 3 次 PCR 的模板。第 3 次 PCR 反应体系 (SOE 反应): 10 × 高保真 PCR 缓冲液 5.0 μl, 2.5 mmol/L 的 dNTP 4.0 μl, PCR 1 和 2 回收产物 10 倍稀释后各 4.0 μl, *Taq* 高保真 DNA 聚合酶 0.2 μl, 50 mmol/L MgSO₄ 2.0 μl。94 °C 预变性 2 min; 94 °C 变性 30 s, 37 °C 退火 2 min, 68 °C 延伸 1 min, 15 个循环; 68 °C 延伸 5 min 结束反应。

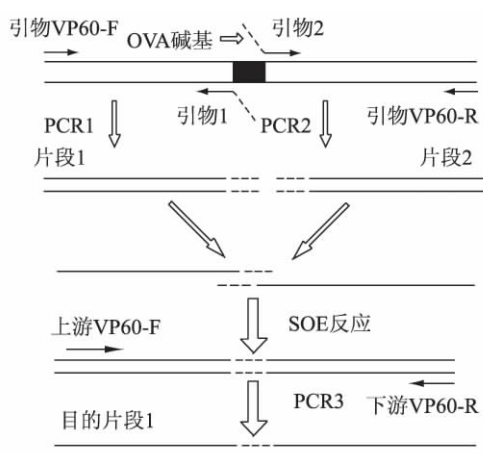


图 1 重叠区扩增基因拼接 (SOE) 法示意图

Fig. 1 Diagram of splicing by overlap extension (SOE) method

第 3 次 PCR 完成后, 向体系中添加上游引物 VP60-F 和下游引物 VP60-R 进行第 4 次 PCR 反应。PCR 条件为: 94 °C 预变性 2 min; 94 °C 变性 30 s, 53 °C 退火 30 s, 68 °C 延伸 2 min, 25 个循环; 68 °C 延伸 5 min 结束反应。电泳得到第一组重组基因片段。外源 OVA T 细胞表位取代 VP60 蛋白上相应位点 (图 2)。

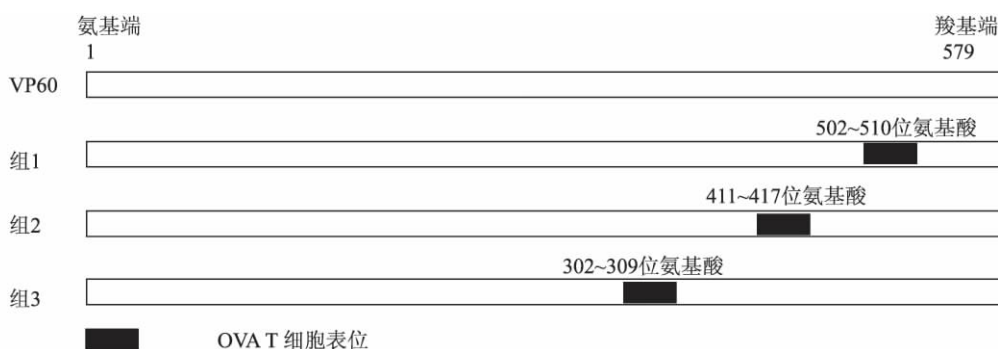


图 2 OVA T 细胞表位置换 VP60 氨基酸区域得到的 3 组重组蛋白质示意图

Fig. 2 Schematic diagram of the three recombinant proteins obtained by the OVA T cell epitopes replacing corresponding regions on VP60

PCR 产物经 1% 琼脂糖凝胶电泳后, 在紫外灯下切下含目的条带的琼脂糖块, 用 DNA 快速回收纯化试剂盒回收凝胶中的目的片段, 与 pMD19-T 载体 4 °C 过夜连接。连接后转化大肠杆菌 *E. coli* DH5 α 感受态细胞, 均匀涂布于事先 37 °C 预热的氨苄 LB 平板 (100 μg/ml) 上, 37 °C 过夜培养。挑单个菌落到 5 ml 氨苄 LB 中摇床过夜培养, 柱式质粒 DNAout 试剂盒提取重组质粒。得到的质粒 DNA 进行限制

性内切酶 *EcoR* I、*Hind* III 双酶切鉴定。酶切过后的溶液进行 1% 琼脂糖凝胶电泳, 紫外灯下切下含有目的条带的凝胶, 回收目的片段。

1.5 重组转移载体的构建与鉴定

用 T4 DNA 连接酶将含有粘性末端 (位点为 GAATTC *EcoR* I 酶切位点; AAGCTT *Hind* III 酶切位点) 的 pFastBac1 载体和回收的目的片段 4 °C 连接 12 h, 转化 DH5α 感受态细胞。37 °C 温箱过夜培

养挑单菌落摇床培养。用试剂盒提取质粒 DNA 进行双酶切鉴定,得到重组转移载体 pFast-V-1、pFast-V-2、pFast-V-3。将阳性克隆对应的菌液送 Invitrogen 公司测序。测序正确的阳性质粒转座新制备的 DH10 Bac 大肠杆菌感受态细胞,经蓝白斑筛选,获得重组质粒 Bacmid (Bacmid-V-1、Bacmid-V-2、Bacmid-V-3)。提取大片段质粒,以 M13 上下游引物进行 PCR 鉴定。PCR 循环条件为: 95 °C 预变性 5 min; 94 °C 变性 1 min, 55 °C 退火 1 min, 72 °C 延伸 2 min, 30 个循环; 72 °C 延伸 10 min。反应结束后取 10 μ l 产物经 0.8% 琼脂糖凝胶电泳分析。

1.6 重组穿梭质粒转染 Sf9 细胞

经 PCR 鉴定为阳性的重组质粒,以脂质体 Lipofectamine™2000 为共转染试剂,转染 Sf9 单层细胞。转染在 24 孔板上进行,转染后每 12 h 观察 1 次,直到细胞病变明显时,收集细胞及上清液,得到 3 种重组杆状病毒 rBac-v-1、rBac-v-2、rBac-v-3,以此作为重组杆状病毒原液 4 °C 保存。病毒原液按照 1: 50 的比例感染 Sf9 细胞,出现病变后,收集细胞和上清,此为第 2 代病毒液。依此方法得到第 7 代病毒液,此时病毒纯度较高。

1.7 RT-PCR 鉴定重组病毒

收集第 2 代感染重组病毒的 Sf9 细胞,按照柱式动物 RNAout 试剂盒说明书,提取杆状病毒 RNA,以目的基因上下游引物进行 RT-PCR。RT 反应条件为: 30 °C 反应 10 min, 42 °C 反应 30 min, 99 °C 反应 5 min, 5 °C 5 min。PCR 反应条件为: 95 °C 预变性 3 min; 94 °C 变性 1 min, 53 °C 退火 1 min, 72 °C 延伸 2 min, 30 个循环; 72 °C 延伸 10 min。反应结束后产物经 1% 琼脂糖凝胶电泳鉴定。

1.8 表达产物的鉴定

1.8.1 间接免疫荧光检测 (IFA) 于 24 孔细胞培养板上,将重组病毒接种对数生长期的 Sf9 细胞,培养至发生病变时,以本实验室制备的 RHDV 单抗 A3C 为一抗 (1: 40),采用间接免疫荧光法检测嵌合蛋白质的表达。

1.8.2 蛋白质电泳 (SDS-PAGE) 将重组杆状病毒液以 1: 100 的体积比感染 Sf9 细胞。5 d 后轻轻吹下病变细胞,连同培养液一起分装于 1.5 ml 离心管中, 3 000 r/min 离心 5 min, 分离细胞和上清,弃上清。用 PBS 重悬细胞,洗涤 3 次,加入 200 μ l PBS,反复冻融 3 次。加入 5 $\times$ 上样缓冲液,煮沸 5 min, 11 000 r/min

离心 2 min, 取上清 20 μ l 进行蛋白质电泳。

1.8.3 免疫印迹 (Western blot) 鉴定 采用半干转印法。同方法 1.8.2 将样品电泳后,取下凝胶,将其转印于 NC 膜上, 2 mA/cm² 转印 70 min。以 RHDV 单抗 A3C 为一抗 (1: 100), 羊抗兔 IgG-HRP 为二抗 (1: 2 000), 进行 Western blot 鉴定。

1.9 电镜观察

取第 7 代重组病毒 2 ml 接入 100 ml 密度为 1 ml 2×10^6 个的 Sf9 细胞悬浮液,培养 6 d。取 30 ml 培养液, 3 000 r/min 离心 5 min, 弃培养液。沉淀用 5 ml PBS 重悬, 12 000 r/min 离心 5 min, 弃上清。洗涤 3 次后,用 1 ml PBS 重悬沉淀。反复冻融 3 次, 12 000 r/min 离心 5 min, 取上清,用于电镜观察。

2 结果

2.1 重叠区扩增基因拼接法 (SOE 法) 获得目的基因及其鉴定

以本实验室保存的 pFastBac1-VP60 为模板,利用 primer5.0 设计退火温度,用设计的各组引物,各进行 4 次 PCR,产物经 1% 琼脂糖凝胶电泳,获得符合目标片段大小的条带。目的基因与 T 载体连接转化后,进行双酶切鉴定,经 1% 琼脂糖凝胶电泳检测,得到与预期片段大小一致的特异条带,成功构建 3 组克隆质粒。

2.2 重组表达载体的酶切鉴定

T/A 鉴定后,目的片段与真核表达载体 pFaster-Bac1 连接,转化 DH10 Bac 感受态细胞,提取质粒,进行双酶切鉴定。1% 琼脂糖凝胶电泳结果显示,得到与预期片段大小一致的特异条带,同时测序结果表明成功构建嵌合 VP60 重组质粒。

2.3 重组 Bacmid 鉴定

用 PCR 方法鉴定目的基因是否插入到 Bacmid 中。以 pUC/M13 上游引物和下游引物对重组质粒的扩增产物大小约为 3 000 bp,而以 pUC/M13 上、下游引物对未插入外源基因片段的空 Bacmid 质粒的扩增产物大小约为 300 bp,证明转座成功,重组杆状病毒基因构建完成。

2.4 表达产物的鉴定

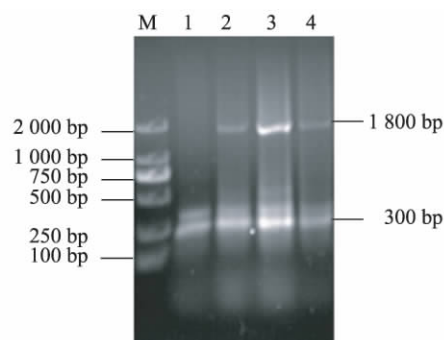
2.4.1 细胞病变 在脂质体 Lipofectamine™2000 介导下,将 3 种重组质粒 Bacmid-V-1、Bacmid-V-2、Bacmid-V-3 转染 Sf9 细胞。转染 5 d 后,对照细胞和转染细胞显示不同状态。对照细胞生长基本没有变

化,细胞轮廓清晰,大小均一,胞体明亮;转染后细胞则呈现明显的细胞病变(CPE),表现为:细胞直径明显增大,开始变圆、脱落,部分细胞裂解和死亡,说明转染成功。

2.4.2 RT-PCR 鉴定重组病毒 按试剂盒说明书提取各组感染第 2 代重组病毒的 Sf9 细胞总 RNA,以正常 Sf9 细胞为对照。以目的基因上下游引物进行 RT-PCR。目的条带约为 1 800 bp,与目的基因大小一致,而正常细胞无特异性条带(图 3)。

2.4.3 蛋白质电泳(SDS-PAGE)及免疫印迹(Western blot)检测 电泳和转印结果显示:3 种重组杆状病毒在昆虫细胞中表达后均出现 1 条分子量约为 6.0×10^4 的特异性条带,与预期大小基本一致,说明目的蛋白质得到表达(图 4)。免疫印迹与

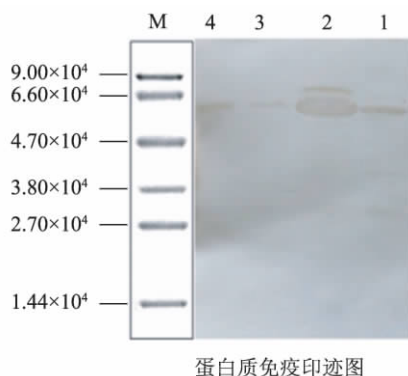
电泳的目的条带位置相符,说明 3 种嵌合蛋白质均具有反应原性(图 4)。



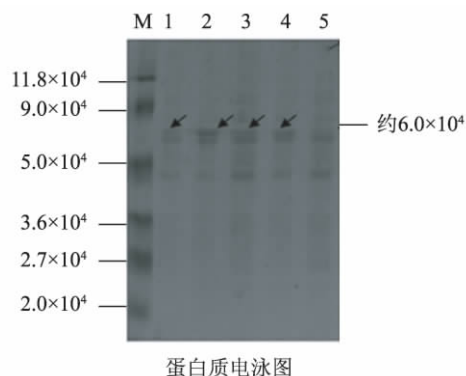
M: DNA 分子质量标准(DL2000); 1: 空白 Bacmid mRNA; 2~4: 第 1、2、3 组重组病毒 mRNA。

图 3 RT-PCR 鉴定重组病毒 mRNA

Fig. 3 RT-PCR of the recombinant virus mRNA



蛋白质免疫印迹图



蛋白质电泳图

M: 预染蛋白质分子量标准; 1、2、3: 分别为第 1、2、3 组的重组蛋白质; 4: VP60 蛋白; 5: 空 Bacmid 蛋白质。

图 4 3 种嵌合蛋白免疫印迹和 SDS-PAGE 电泳结果

Fig. 4 Western blot and SDS-PAGE of three chimeric proteins

2.4.4 间接免疫荧光检测 重组病毒感染 Sf9 细胞 24 h 后,以 1: 40 倍稀释的 RHDV 单抗 A3C 为一抗,1: 100 稀释度的 FITC 标记兔抗小鼠 IgG 为二抗,进行间接免疫荧光检测。结果(图 5)表明,感染重组病毒的 Sf9 细胞和感染 VP60 皖阜株的细胞具有很强的特异性荧光,而感染 Bacmid 的对照和空白对照无特异性荧光,说明重组杆状病毒在 Sf9 细胞中表达。

2.5 嵌合蛋白病毒样颗粒检测结果

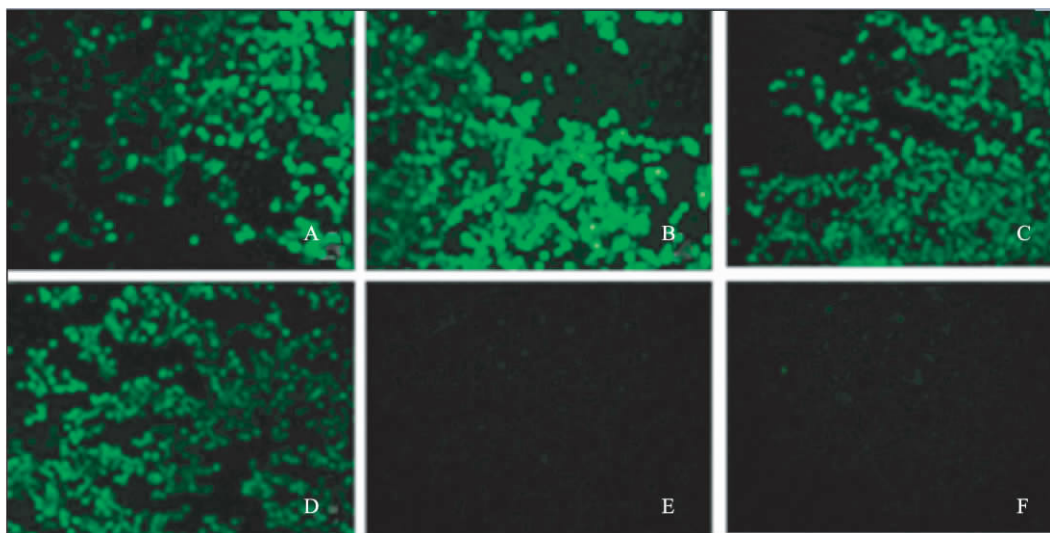
电镜观察结果(图 6)表明,VP60 蛋白不同位置被 OVA 替换形成的 3 组嵌合蛋白质都能形成与 VP60 皖阜株病毒颗粒大小和形态类似的病毒样颗粒(VLPs)。

3 讨论

病毒样颗粒(VLPs)作为新型疫苗既克服了传统灭活疫苗免疫原性不高的缺点,也克服了活疫苗安全性的限制,同时具有不含有遗传物质,可以大量制备,有良好的安全性和免疫原性等优点^[10-13]。兔出血症病毒 VLPs 展示载体的研究尚在起步阶段,目前在 N 末端、C 末端、306~307 位插入或替换外源 B 细胞表位或 T 细胞表位片段的研究较多。Barcena 等^[14]、Nagesha 等^[15]研究认为在 C 端插入外源氨基酸不会改变 VP60 形成 VLPs 的能力。Crisci 等^[8]预测 P2 亚单位突环处适合外源 B 细胞表位(诱导特异性抗体)插入,并证明插入外源片段可形

成 VLPs。P2 亚单位位于衣壳蛋白质表面,属于免疫优势区域,包含 VP60 第 306 ~ 307 位氨基酸。本研究中的 OVA T-细胞表位替换 VP60 302 ~ 309 位

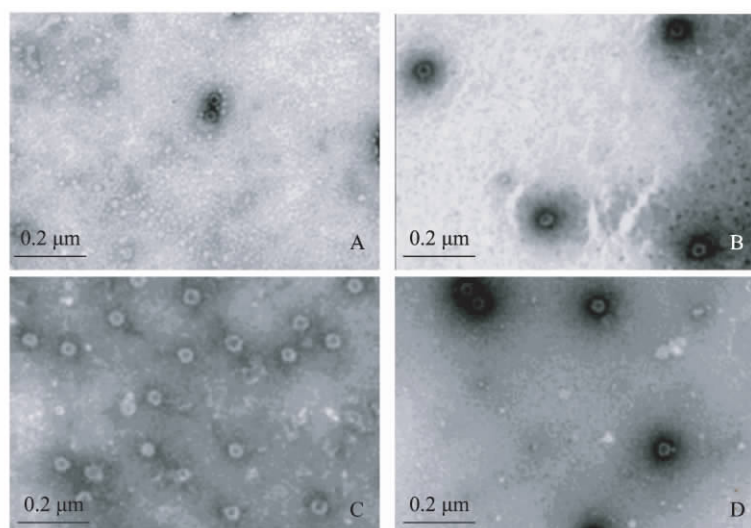
氨基酸形成了病毒样颗粒,表明此位点适合外源 T 细胞表位的替换,且外源片段替换后重组 VP60 可形成 VLPs。



A、B 和 C: 分别感染第 1、2、3 组重组杆状病毒的 S9 细胞; D: 感染 VP60 皖阜株的 S9 细胞(阳性对照); E: 感染 Bacmid 的 S9 细胞; F: 正常细胞(空白对照)。

图 5 间接免疫荧光检测重组蛋白

Fig. 5 Indirect immunofluorescence assay of the recombinant proteins



A: 嵌合蛋白质 Z1(VP60 502 ~ 510 位氨基酸被 OVA 257 ~ 264 位氨基酸取代得到的蛋白质) 形成的病毒样颗粒; B: 嵌合蛋白质 Z2(VP60 411 ~ 417 位氨基酸被 OVA 257 ~ 264 位氨基酸取代得到的蛋白质) 形成的病毒样颗粒; C: 嵌合蛋白质 Z3(VP60 302 ~ 309 位氨基酸被 OVA 257 ~ 264 位氨基酸取代得到的蛋白质) 形成的病毒样颗粒; D: VP60 形成的病毒样颗粒。

图 6 3 组嵌合蛋白形成的病毒样颗粒的电镜图

Fig. 6 Electron micrograph of virus-like particles formed by three chimeric proteins

嵌合型 VLPs 是将外源蛋白质与不同来源的 VLPs 进行基因融合或化学结合,生成嵌合型 VLPs^[16],从而

诱导针对外源性蛋白质表位的免疫应答。本研究选择了 VP60 的 3 个可变区: 502 ~ 510 位、411 ~ 417 位、

302~309 位。此 3 个位点的氨基酸分别用 1 个 OVA T 细胞表位替换,经杆状病毒表达系统表达得到 3 个重组杆状病毒。将病毒接种细胞培养一定时间,得到 3 组重组嵌合蛋白质 Z1、Z2 和 Z3。收获处理后进行电镜观察,发现 3 组重组病毒表达的嵌合蛋白质 Z1、Z2 和 Z3 均可以形成 VLPs,相同放大倍数的电镜视野中 Z3 形成的 VLPs 最多,Z2 形成的较多,Z1 形成的最少。我们认为此处的差异可能是由于接毒时各组毒价和/或病毒量不同造成的。重组颗粒大小约为 50 nm,与 VP60 皖阜株病毒颗粒的形态和大小类似,说明此 3 个位点分别用 1 个 OVA T 细胞表位替换后,能形成嵌合型 VLPs。我们同时发现,第 3 组 VLPs 密度最大,易寻找;第 2 组除 VLPs 外还可见少数比 VP60 稍大、透光性比 VP60 好、松散的不规则团状物;第 1 组 VLPs 不易寻找,且存在很多类似团状物。由于电镜样品在进行 SDS-PAGE 和 Western blot 时显示的杂带较少,由此推测不规则团状物为未自聚成型的重组 VP60 蛋白质,说明 VP60 不同位点被替换,对病毒样颗粒的自聚和组装能力造成了不同程度的影响。由于 302~309 位氨基酸位于 VP60 P2 亚单位突环处,可能对插入的外源片段耐受性更高,对颗粒形成几乎无影响,而 502~510 位和 411~417 位氨基酸的替换对 VP60 颗粒形成有一定影响,因此 302~309 位氨基酸位点可作为以 VP60 VLPs 为载体的嵌合疫苗中外源片段插入的潜在位点。

本研究中,免疫印迹结果表明 3 种重组蛋白质对 VP60 单抗具有反应原性,电镜检测结果说明能形成嵌合型 VLPs,但是,VP60 中的外源 OVA T-细胞表位能否引起动物机体的细胞免疫,以及此外源片段对 VP60 引起动物机体免疫反应的影响等还需要进一步研究。

参考文献:

- [1] 蔡宝祥. 家畜传染病学 [M]. 3 版. 北京: 中国农业出版社, 1998: 299-301.
- [2] GREEN KY, CHANOCK R M, KAPIKAN A Z. Human calicivirus [M] // Knipe D M, Howley P M. Fields virology. 4th ed. Philadelphia, Pa: Lippincott Williams & Wilkins, 2001: 841-874.
- [3] WIRBLICH C, THIEL H J, MEYERS G. Genetic map of the calicivirus rabbit hemorrhagic disease virus as deduced from In vitro translation studies [J]. Journal of Virology, 1996, 70(11): 7974-7983.
- [4] MARTIN-ALONSO J M, CASAIS R, BOGA J A, et al. Processing of rabbit hemorrhagic disease virus polyprotein [J]. Journal of Virology, 1996, 70(2): 1261-1265.
- [5] BARCENA J, MORALES M, VAZQUEZ B, et al. Horizontal transmissible protection against myxomatosis and rabbit hemorrhagic disease by using a recombinant myxoma virus [J]. J Virol, 2000, 74: 1114-1123.
- [6] FARNOS O, BOUE O, PARRA F, et al. High-level expression and immunogenic properties of the recombinant rabbit hemorrhagic disease virus VP60 capsid protein obtained in *Pichia pastoris* [J]. J Biotech, 2005, 117(3): 215-224.
- [7] FARNOS O, BOUE O, PARRA F, et al. High-level expression and immunogenic properties of the recombinant rabbit hemorrhagic disease virus VP60 capsid protein obtained in *Pichia pastoris* [J]. J Biotech, 2005, 117(3): 215-224.
- [8] CRISCI E, ALMANZA H. Chimeric calicivirus-like particles elicit protective anti-viral cytotoxic responses without adjuvant [J]. Virology, 2009, 387: 303-312.
- [9] LAURENT S, KUT E, REMY-DELAUNAY S, et al. Folding of the rabbit hemorrhagic disease virus capsid protein and delineation of N-terminal domains dispensable for assembly [J]. Arch Virol, 2002, 147: 1559-1571.
- [10] KEIM B. Controversy over cervical cancer vaccine spurs safety surveillance [J]. Nat Med, 2007, 13(4): 392-393.
- [11] VILLA L L, COSTA R L, PETTA C A, et al. Prophylactic quadrivalent human papillomavirus (types 6, 11, 16, and 18) L1 virus-like particle vaccine in young women: a randomised double-blind placebo-controlled multicentre phase II efficacy trial [J]. Lancet Oncol, 2005, 6(5): 271-278.
- [12] 龔晨, 孟继鸿. 一种新型戊型肝炎病毒样颗粒的表达、纯化及其免疫原性 [J]. 细胞与分子免疫学杂志, 2006, 22(3): 339-342.
- [13] HAMMONDS J, CHEN X, ZHANG X, et al. Advances in methods for the production, purification and characterization of HIV-1 gag-env-pseudovirion vaccines [J]. Vaccine, 2007, 25(47): 8036-8048.
- [14] BARCENA J, VERDAGUER N, RAMÓN R, et al. The coat protein of rabbit hemorrhagic disease virus contains a molecular switch at the N-terminal region facing the inner surface of the capsid [J]. Virology, 2004, 322(1): 118-134.
- [15] NAGESHA H S, WANG L F, HYATT A D. Virus-like particles of calicivirus as epitope carriers [J]. Arch Virol, 1999, 144(12): 2429-2439.
- [16] RAMQVIST T, ANDRESESAN A, DALIANIS T. Vaccination, immune and gene therapy based on virus-like particles against viral infections and cancer [J]. Expert Opin Biol Ther, 2007, 7(7): 997-1007.

(责任编辑: 张震林)