



试验
研究

兔出血症病毒衣壳蛋白 N 端携带双串联卵清蛋白 T 细胞表位嵌合体的构建与表达

张燕^{1,2}, 王芳^{2*}, 胡波², 宋艳华², 范志宇², 魏后军², 姜平^{1*}

(1. 南京农业大学动物医学院, 江苏 南京 210095;

2. 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)

摘要: 在兔出血症病毒 (RHDV) 主要结构蛋白 VP60 的 N 端插入双串联卵清蛋白 (OVA) CD8⁺T 细胞表位 (OVA 第 257-264 位氨基酸), 研究外源片段对 VP60 蛋白表达及病毒样颗粒 (VLPs) 装配的影响, 分析 VP60 作为载体的可行性和对外源基因长度的耐受性。通过分子生物学方法将双串联 OVA CD8⁺T 细胞表位 (257-264aa) 插入至 RHDV 衣壳蛋白 VP60 基因序列的 N 端, 得到重组 VP60 基因。利用杆状病毒表达系统表达嵌合蛋白, 并命名为 DN。经 RT-PCR、间接免疫荧光、SDS-PAGE、Western blot 方法鉴定嵌合蛋白 DN 的表达, 利用电镜观察嵌合蛋白病毒样颗粒的形成。结果表明嵌合 VP60 蛋白在杆状病毒表达系统中得到高效表达, 且可形成与 RHDV VLPs 类似的病毒样颗粒。本研究为 VP60 作为载体系统, 有效提呈外源片段的研究提供了重要依据, 同时也为 VLPs 疫苗的研制奠定了基础。

关键词: 兔出血症病毒; VP60; OVA; T 细胞表位; 病毒样颗粒

中图分类号: S858.291 文献标志码: A 文章编号: 0529-5130(2014)06-0001-08

Construction and expression of chimeric RHDV VP60 N-terminus carrying double OVA T-cell epitopes

ZHANG Yan^{1,2}, WANG Fang^{2*}, HU Bo², SONG Yanhua², FAN Zhiyu², WEI Houjun², JIANG Ping^{1*}

(1. Key Laboratory of Animal Diseases Diagnostic and Immunology, College of Veterinary Medicine, Nanjing Agricultural University, Nanjing 210095, China;

2. 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)

Abstract: The aim of present study was to investigate whether the amino acid insertion of VP60 could affect the expression of VP60 and the ability of self-assembling into virus-like particles (VLPs). In order to obtain the chimeric protein of VP60 carrying double ovalbumin (OVA) T-cell epitopes, the fragment of double OVA T-cell epitopes was inserted into the N-terminus of VP60. The recombinant baculovirus (rAc-V-DN) was constructed using Bac-to-Bac baculovirus expression system. The chimeric protein named DN was expressed effectively in insect cells and confirmed by RT-PCR, IFA, SDS-PAGE and Western blot. The chimeric protein was correctly expressed and could self-assemble into VLPs by Electron microscopy analysis. This study is very valuable for enhancing the understanding of using RHDV-VLPs as a carrier for foreign genes. Meanwhile, it would be useful for the development of VLPs vaccine in future.

Key words: RHDV; VP60; OVA; T-cell epitopes; VLPs

兔出血症 (Rabbit hemorrhagic disease, RHD) 是

收稿日期: 2013-12-19

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 (12) 3079)

作者简介: 张燕 (1987-), 女, 硕士, 主要从事畜禽传染病防控研究

* 通信作者: 姜平 (1964-), 教授, 博士, 主要从事猪禽重要疫病病原分子流行病学及基因工程疫苗研究, E-mail: jiangp@njau.edu.cn; 王芳 (1972-), 研究员, 博士, 主要从事畜禽传染病免疫机理及防控研究, E-mail: rwangfang@126.com

由兔出血症病毒 (rabbit hemorrhagic disease virus, RHDV) 引起的一种急性、败血性、高度接触传染性、致死性和以全身实质器官出血为主要特征的兔传染病^[1]。RHDV 粒子的衣壳由一种 60 ku 的主要结构蛋白 (VP60) 多重拷贝组成。研究发现 VP60 衣壳蛋白在没有其他任何成分存在的体外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)^[2-3]。

近年来, 随着对 VLPs 研究的不断深入, VLPs 在

体液免疫和细胞免疫中的活性已被人们认知，其在基础研究、疾病预防及疾病治疗方面的优势愈加明显^[4-5]。病毒样颗粒具有安全性高、免疫原性强、稳定性好和可改造等优点。随着反向遗传学研究的不断深入，一些病毒结构蛋白的非必需氨基酸序列逐渐被人们所发现，这些氨基酸的缺失或改变并不影响VLPs的组装及其免疫原性^[6]。这一结果的发现使人们对VLPs的改造有了理论基础，并在随后的研究中也得以证实和应用^[7-8]。目标表位可通过基因操作插入至VLP基因中，从而形成具有安全好、耐受性强以及免疫原性高的疫苗。目前，VLPs在预防性疫苗的研制中已取得突破性进展，如人类免疫缺陷病毒样颗粒、流感病毒样颗粒、肝炎病毒样颗粒等。种种迹象表明，VLPs疫苗将是未来疫苗发展的主题。

然而目前对兔出血症病毒样颗粒的研究较少，Chen等^[9]研究显示，VP60 P1区域的408、417、423、425等41个氨基酸位点，P2区域的280、291、316、317等13个氨基酸为保守位点，其余P区域变异程度较高。Barcena等^[10]研究发现VP60三维构象的形成与各个亚基的N-末端序列有关，N端42个氨基酸是VLPs装配非必须的，而缺少C端氨基酸则不能形成VLPs。Crisci等^[7]研究RHDV作为表位载体，在其第2位、第306位氨基酸处插入OVA CD8⁺T细胞表位，体外试验表明嵌合VP60-VLPs不仅可激活树突细胞分泌IFN- γ ，也可加工和递呈给特异性的T细胞。本研究将双串联的OVA CD8⁺T细胞表位（以柔性氨基酸GS连接，序列为GSSIINFEKLGSSI-INFEKLG S）插入VP60蛋白的N端，研究其对嵌合蛋

白的表达和病毒样颗粒组装的影响，初步评价VP60-VLPs作为外源表位展示系统的可行性和耐受性。

1 材料与方法

1.1 种毒、质粒、细胞和菌种

供体质粒 pFastBac1-VP60、重组杆状病毒 rBac-VP60^[11]和大肠杆菌 DH10 Bac 感受态由本实验室构建并保存；P-N 序列（双串联 OVA CD8⁺T 细胞表位连接 VP60 1-41aa）由 Invitrogen 公司合成；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；杆状病毒 Bac-to-Bac 表达系统（包括转座质粒 pFastBac 1 和 *E. coli* DH10Bac 受体菌）购自 Invitrogen 公司；Sf9 昆虫细胞由本实验室培养。

1.2 主要试剂和仪器

限制性内切酶 *EcoR* I、*Pst* I、*Hind* III、T4 DNA 连接酶、*Pfx* DNA 聚合酶、*Taq* 高保真酶、DNA Marker DL2000 及 DL15000、凝胶回收纯化试剂盒等购自大连宝生物工程有限公司；柱式动物 RNAout、柱式质粒 DNAout 试剂盒购自北京天恩泽基因科技有限公司；酶标兔抗小鼠 IgG（FITC-IgG）、羊抗小鼠（HRP-IgG）购自北京鼎国昌盛生物技术有限公司；小鼠抗 VP60 单抗 A3C 为本实验室保存^[12-13]；DAB 显色试剂盒购自武汉博士德生物工程有限公司。

1.3 引物设计

根据 GenBank 数据库 RHDV 皖阜株 VP60 基因序列（FJ794180），用 Primer 5.0 软件设计引物（由 Invitrogen 公司合成），引物序列见表 1。

表 1 引物序列

引物	序列 (5'→3')
引物 1: VP60-F:	5'-TTTGAATTCATGGAGGGCAAAGCCCGCAC-3' (<i>EcoR</i> I)
引物 2: VP60-R:	5'-GCCAAGCTTTCAGACATAAGAAAAGCC-3' (<i>Hind</i> III)

根据 GenBank 数据库 RHDV 皖阜株 VP60 基因序列（FJ794180）和卵清蛋白（OVA）257-264aa 的碱基序列，设计合成基因序列 P-N（由 Invitrogen 公司合成），该基因序列编码如下氨基酸片段：在 VP60 1-45 位 aa 的基础上，于起始密码子之后插入双串

联 OVA CD8⁺T 细胞表位（GSSIINFEKLGSSIINFEK-LGS）；酶切位点分别为 *EcoR* I 和 *Pst* I，其中 *EcoR* I 在起始密码子之前，*Pst* I 为 VP60 序列内部自带的酶切位点，即 44-45 位 aa。P-N 基因序列如下：

GAATTCATGGGTTCTCCATCATCAACTTCGAGAAGCTGGGTTCCAGCATCATCAA
CTTCGAAAAGTTGGGATCCGAGGGCAAAGCCCGCACAGCGCCGCAAGGCCAAGC
AGCAGGCACTGCTACCACAGCATCAGTTCCCGGAACCACGACCGACGGCATGGAT
CCTGGTGTAGTGGCCGCAACTAGTGTGGTCA CTGCAG (*EcoR* I /*Pst* I)

1.4 目的基因的构建

将由 Invitrogen 公司合成的 P - N 序列和由本实验室保存的质粒 pFastBac1 - VP60 分别进行双酶切 (*EcoR* I 和 *Pst* I), 产物经 1% 琼脂糖凝胶电泳后, 切胶回收 P - N (202 bp) 和 pFastBac1 - VP60₍₄₆₋₅₇₉₎ (约 6 500 bp) 片段。通过 T4 DNA 连接酶将含有黏

性末端 (位点为: GAATTC, *EcoR* I 酶切位点; CTGCAG, *Pst* I 酶切位点) 的两个目的片段 4 °C 连接过夜。见图 1。

双串联 OVA T 细胞表位插入 VP60 蛋白上相应位点见图 2。

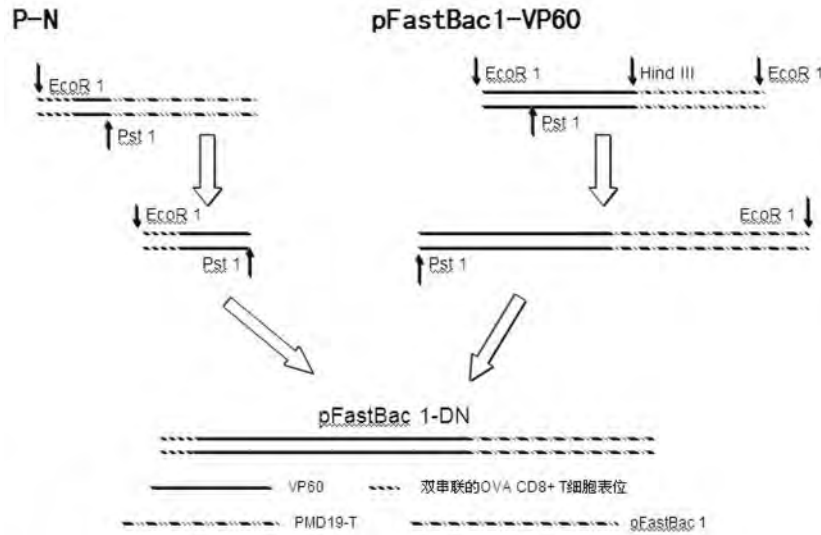


图 1 目的基因 pFastBac1 - DN 构建示意图

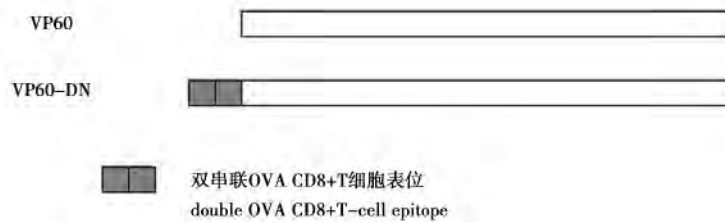


图 2 双串联 OVA T 细胞表位序列插入 VP60 氨基酸序列示意图

1.5 重组转移载体的构建与鉴定

将 4 °C 连接过夜的产物转化 DH5 α 感受态细胞, 在含有氨苄青霉素的 LB 平板上筛选阳性菌落, 试剂盒提取质粒 DNA 后进行双酶切鉴定 (*EcoR* I、*Hind* III), 得到重组转移载体并命名为 pFastBac1 - DN, 将阳性克隆菌液送 Invitrogen 公司测序。测序正确的阳性质粒转座至感受态大肠杆菌 DH10 Bac 中, 用三抗 (庆大霉素、卡那霉素和四环素) 抗性筛选及蓝白斑筛选, 挑取白色菌落, 通过碱裂法提取重组穿梭质粒, 以 M13 上、下游引物进行 PCR 鉴定。扩增条件如下: 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。阳性重组穿梭质粒命名为 Bacmid - V - DN。

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 LipofectamineTM2000 为共转染试剂, 将重组穿梭载体 Bacmid - V - DN 转染至昆虫 Sf9 单层细胞。细胞出现明显病变后, 收集细胞上清液, 得到重组杆状病毒 rBac - V - DN, 无菌分装重组杆状病毒原液, 4 °C 保存备用。

1.7 RT - PCR 鉴定重组病毒

收集感染 rBac - V - DN 的 Sf9 细胞, 用柱式动物 RNAout 试剂盒提取杆状病毒 RNA, 以目的基因上、下游引物 (引物 1 和引物 2) 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 扩增体系为: 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 (IFA) 检测

rBac - V - DN 感染培养于 24 孔的单层 Sf9 细胞，培养至发生病变时，弃掉培养上清液，加入 -20 °C 预冷的丙酮 - 乙醇固定液固定 1 h，PBS 洗 3 次，室温吹干，以本实验室制备的 VP60 单抗 A3C^[11] 为一抗 (1: 100)，FITC 羊抗鼠 IgG 为二抗 (1: 100)，同时设重组杆状病毒 rBac - VP60 感染细胞 (阳性对照)，野生型杆状病毒感染细胞 (阴性对照) 和正常 Sf9 细胞 (空白对照) 为对照。

1.8.2 SDS - PAGE

将重组杆状病毒 rBac - V - DN 和 rBac - VP60 感染单层 Sf9 细胞，5 d 后 3 000 r/min 离心收集细胞沉淀，磷酸盐缓冲液 PBS 重悬细胞，洗涤 3 次，加入 200 μL PBS，反复冻融 3 次后超声裂解细胞，裂解物以 12% 的分离胶进行 SDS - PAGE。

1.8.3 Western blot

SDS - PAGE 完成后取下凝胶，将其转印至硝酸

纤维素膜上，5% 脱脂乳封闭过夜，以 1: 100 倍稀释的 VP60 单抗 A3C 为一抗，1: 5 000 倍稀释 HRP 羊抗鼠 IgG 为二抗，DAB 显色鉴定。

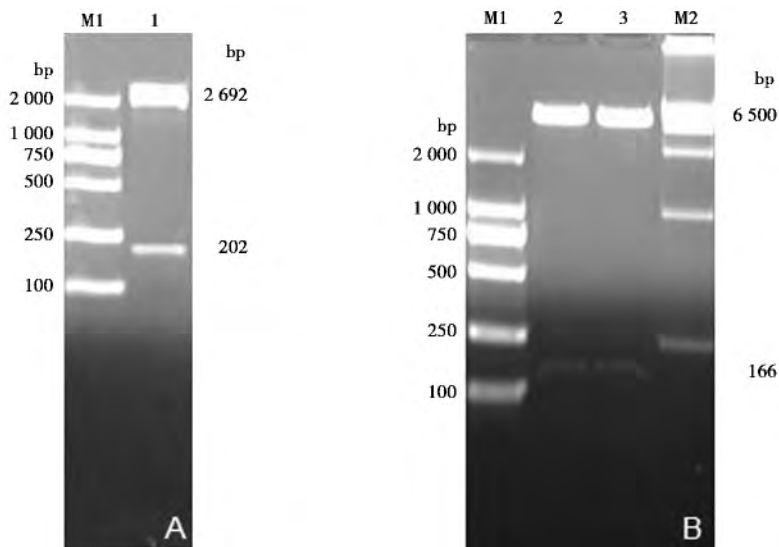
1.9 电镜观察

rBac - V - DN 和 rBac - VP60 感染单层 Sf9 细胞至明显病变，反复冻融 3 次后超声裂解，3 000 r/min 离心分离细胞碎片与上清，取上清用超滤管进行浓缩，浓缩 10 倍后，用 H - 7650 型透射电镜观察。

2 结果

2.1 目的基因的构建

将 Invitrogen 公司合成的基因序列 pMD18 - T - P - N 进行双酶切 (*EcoR* I 和 *Pst* I)，获取所需的基因片段 P - N (202 bp)；本实验室保存的 pFastBac1 - VP60 使用相同的酶进行酶切，产物经 1% 琼脂糖凝胶电泳，获得 6 500 bp 左右的条带 (图 3)，回收目的片段经 T4 连接酶连接过夜。



M1. DNA 分子质量标准 (DL2000) 1. pMD18 - T - P - N (*EcoR* I 和 *Pst* I) M2. DNA 分子质量标准 (DL15000) 2, 3. pFastBac1 - VP60 (*EcoR* I 和 *Pst* I)

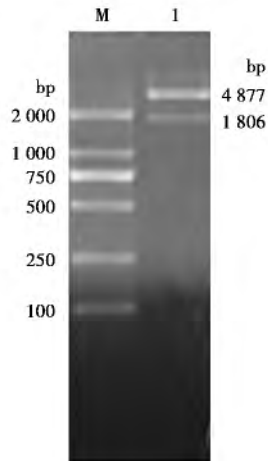
图 3 pFastBac1 - DN 构建

2.2 重组表达载体的酶切鉴定

将 pFastBac1 - DN 转化大肠杆菌 DH5α 感受态细胞，提取质粒，进行双酶切鉴定 (*EcoR* I 和 *Hind* III)，得到一条约 4.8 kb 的载体带和一条约为 1 800 bp 的片段，与预期片段的大小相符 (图 4)，经测序分析，结果表明双串联 OVA CD8⁺T 细胞表位序列已成功插入至 VP60 N 端。

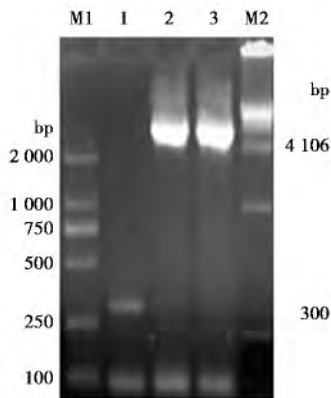
2.3 重组 Bacmid 鉴定

以 Bacmid - V - DN 为模板，M13F 和 M13R 为引物进行 PCR 鉴定，产物经 0.8% 琼脂糖电泳后在约 4 100 bp 处可见特异性条带，而 M13F 和 M13R 引物对未插入外源基因的空 Bacmid 质粒进行扩增，产物大小约为 300 bp (图 5)，证明转座成功，重组杆状病毒基因构建完成。



M. DNA 分子质量标准 (DL2000);
1. 重组质粒 pFastBac1 - DN 酶切 (*EcoR* I / *Hind* III)

图 4 重组质粒 pFastBac 1 - DN 的酶切鉴定



M1. DNA 分子质量标准 (DL2000);
1. 穿梭载体 Bacmid;
2, 3. 重组穿梭载体 Bacmid - V - DN;
M2. DNA 分子质量标准 (DL15000)

图 5 重组 Bacmid 的 PCR 鉴定

2.4 表达产物的鉴定

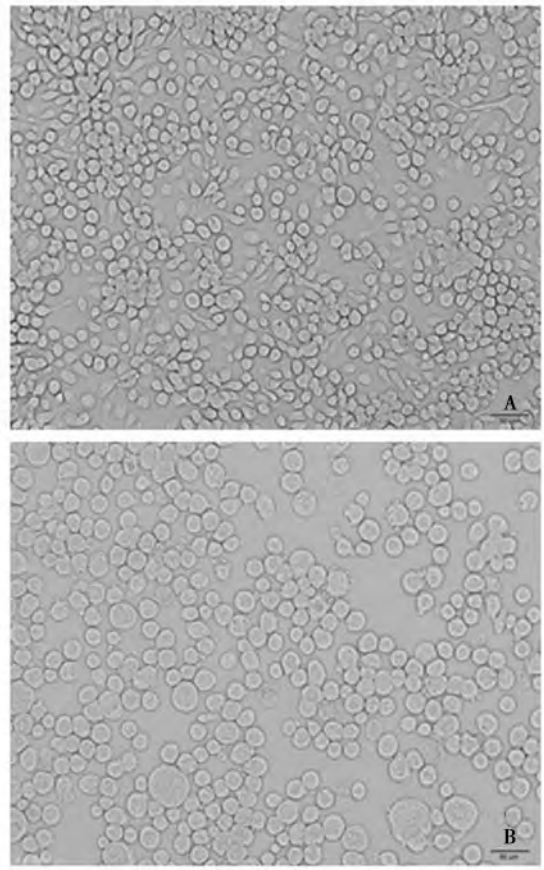
2.4.1 细胞病变 (CPE)

在脂质体 Lipofectamine™2000 介导下, 将重组质粒 Bacmid - V - DN 转染 Sf9 细胞, 对照细胞和转染细胞显示不同状态。对照组细胞生长及形态基本没有变化; 转染后细胞则呈现明显病变, 细胞变圆变大, 胞核扩大, 部分细胞裂解死亡, 说明转染成功 (图 6)。

2.4.2 RT - PCR 鉴定重组病毒

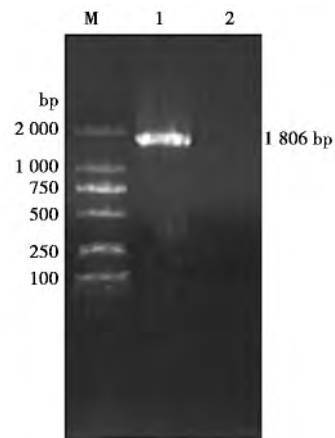
提取感染 rBac - V - DN 的 Sf9 细胞总 RNA, 以感染野生型杆状病毒的细胞为对照。以 VP60F 和 VP60R 为引物进行 RT - PCR, 得到与目的基因大小一致的目的条带 (1 806 bp), 而感染野毒的细胞无

特异性条带 (图 7)。



A. 正常细胞对照;
B. 转染后病变细胞

图 6 Bacmid - V - DN 转染 Sf9 细胞



M. DNA 分子质量标准 (DL2000);
1. 重组病毒 rBac - V - DN;
2. 野生型杆状病毒

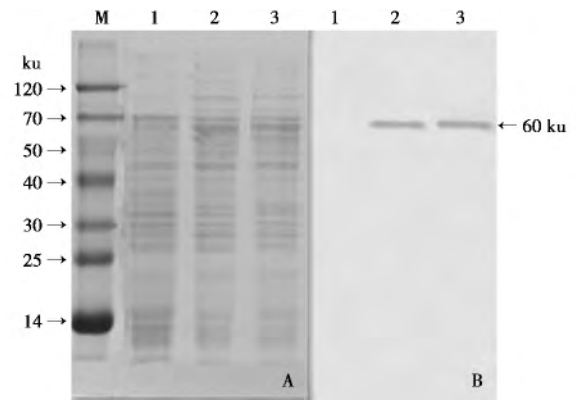
图 7 RT - PCR 鉴定重组病毒 mRNA

2.4.3 SDS-PAGE 及 Western blot 检测

以感染 rBac - V - DN 的 S9 细胞裂解上清液进行 SDS - PAGE, 结果显示, 在约 60 ku 处有目的蛋白出现, 与预期大小基本一致, 说明嵌合蛋白 DN 得到有效表达 (图 8)。Western blot 结果与电泳的目的条带位置相符, 说明嵌合蛋白 DN 具有反应原性 (图 8)。

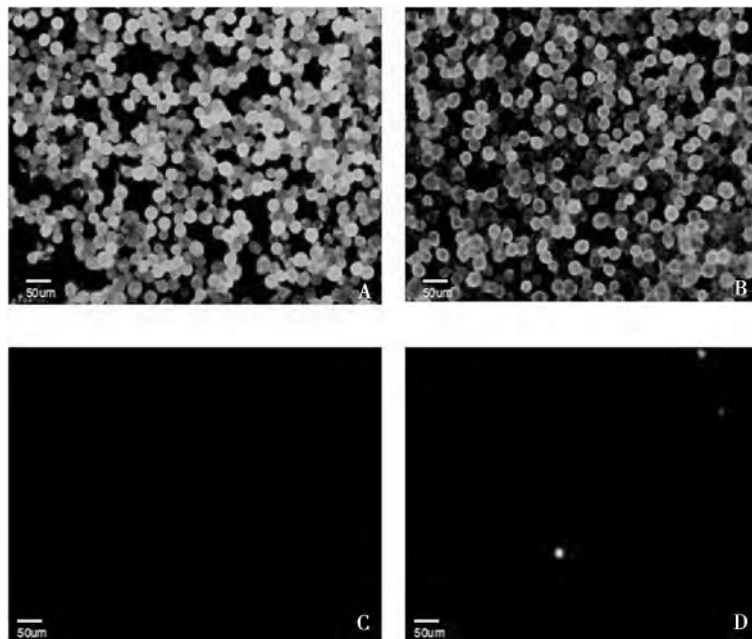
2.4.4 间接免疫荧光检测嵌合蛋白的表达

重组病毒感染 S9 细胞至病变后, 进行 IFA 鉴定。结果显示, 感染重组杆状病毒 rBac - VP60 的细胞 (阳性对照) 和感染 rBac - DN 的 S9 细胞具有很强的特异性荧光, 而感染野生型杆状病毒的细胞 (阴性对照) 和正常细胞 (空白对照) 无特异性荧光 (图 9)。说明重组蛋白在杆状病毒中有效表达。



M. 预染蛋白分子量标准; 1. 野生杆状病毒表达蛋白; 2. 重组 VP60 蛋白; 3. 嵌合蛋白 DN

图 8 嵌合蛋白电泳 (A) 和免疫印迹 (B) 鉴定结果



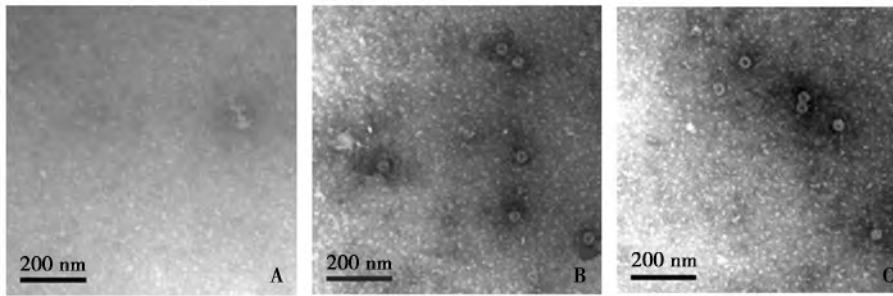
A. 感染重组病毒 rBac - VP60 的 S9 细胞 (阳性对照);
B. 感染重组病毒 rBac - DN 的 S9 细胞;
C. 正常细胞 (空白对照);
D. 感染野生型杆状病毒的 S9 细胞 (阴性对照)

图 9 间接免疫荧光检测表达产物的载体特异性

2.5 嵌合蛋白病毒样颗粒电镜观察

将 rBac - VP60 (阳性对照) 和 rBac - DN 分别感染 S9 细胞至明显病变, 收集细胞培养物浓缩 10 倍

后进行负染透射电镜观察。结果表明, 嵌合蛋白 DN 能形成与 VP60 粒子相似的 VLPs (图 10)。



A. 野生型杆状病毒表达产物; B. 嵌合蛋白 DN 形成的病毒样颗粒; C. VP60 形成的病毒样颗粒

图 10 嵌合蛋白电镜

3 讨论

目前, 国外对 VLPs 的研究已经应用于抗艾滋病、抗乙型肝炎等新型疫苗及治疗肿瘤、自身免疫疾病的新药物研发^[14]。RHDV 作为杯状病毒的成员之一, 其主要结构蛋白 VP60 可自行装配形成 VLPs, 但其作为展示系统的可行性、效果及其适用范围需要进一步的深入研究。最近, Wang 等^[15]通过低温电镜和晶体学技术, 对 RHDV 的结构进行研究, 发现 VP60 可分为三个主要区域: N 端臂 (NTA 区, 1-65aa); 框架区 (S 区, 66-229aa) 组成病毒衣壳表面; 突出区 (P 区, 238-579aa) 构成病毒衣壳表面突起部分, 可进一步分为 P1 和 P2 两个亚区域。其中 NTA 区在电子密度不够高的情况下很难被追踪到, 这表明 NTA 区在晶体结构内部是相当灵活的。Crisci 等^[7]研究发现在 VP60 N 端的氨基酸为病毒样颗粒形成的非必需氨基酸, 并且在该区域插入外源表位比在外表面的 Loop 区更有优势。本试验通过分子生物学技术将 VP60 蛋白的 N 端插入双串联 OVA T 细胞表位, 利用杆状病毒表达系统表达嵌合蛋白。对 VP60 嵌合蛋白进行电镜观察发现, 其可形成完整的 VLPs, 故推测 N 端可能是 VP60 作为载体展示外源基因的最佳位置。

Barcena 等^[10]构建了 12 个不同重组 VP60 蛋白, 表明 130 位突变 (Gly - Arg), 296 位突变 (Asp - Gly) 影响 VP60 颗粒的形成; N 端前 29 位氨基酸缺失导致 90% 以上形成 30 nm 颗粒, 少部分 40 nm; 前 42 和 61 位的缺失会形成 30 nm 颗粒, 但前 61 位缺失后形成颗粒的效率很低。蓝舌病毒衣壳蛋白 VP7 的 Btag (6 个 aa 的表位) 取代 VP60 前 30 位 aa 形成 27 nm 的 VLPs。Laurent 等^[6]研究了 RHDV 衣壳蛋白的构成, 证明缺失 N 端 31-93 位氨基酸形成了较小的颗粒, 而缺失 N 端前 75 位氨基酸 VLPs 不能形成。本试验选择在 VP60 蛋白的 N 端插入外源表位, 未取

代或缺失 VP60 的任何氨基酸, 发现其可形成完整的 VLPs, 大小约为 40 nm, 形态与天然 VP60 病毒样粒子一致。同样, Barecena 等^[10]研究发现, 在 N 端插入传染性肠胃炎病毒 (TGEV) 核蛋白基因也可形成与天然 VP60 颗粒类似的 VLPs。结合本研究结果, 推测在 N 端插入外源基因比替换或缺失 N 端序列更能保证病毒样颗粒形态的天然性。

Crisci 等^[7]在 RHDV 的 VP60 第 2 位氨基酸后插入单个 OVA CD8⁺ 表位 (SIINFEKL, 共 8 个 aa), 结果显示可形成嵌合的病毒样粒子。而本研究在相同的位点插入双串联 OVA T 细胞表位序列 (GSSIINFEK-LGSSIINFEKLGS, 共 22 个氨基酸) 后, 不仅未影响 VLPs 的自我组装, 并且 VP60 载体的反应原性也未受到影响。因此本研究扩展了 VP60 - VLPs 作为载体所能携带的外源基因长度。

本试验以 VP60 - VLPs 为基础, 通过在 VP60 N 端插入双串联 OVA T 细胞表位序列, 研究插入外源基因对 VP60 - VLPs 自我组装的影响, 表明 VP60 的 N 端适合外源基因插入, 且能够展示 22 个氨基酸长度的外源片段。此外, 该区域对所展示氨基酸序列长度的最大容纳性, 其展示氨基酸的构象、抗原性是否会发生变化, 与免疫分子结合或被免疫细胞识别的能力是否存在变化等, 这些问题仍需要深入研究。

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] 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.
- [3] 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.

含马动脉炎病毒 N 基因的病毒样颗粒的制备

王宇^{1,2}, 张晓文², 王群², 梁成珠^{2*}, 汪东风¹

(1. 中国海洋大学食品科学与工程学院, 山东 青岛 260003;

2. 山东出入境检验检疫局检验检疫技术中心, 山东 青岛 266002)

摘要: 为了构建易于纯化且耐 RNase 酶的含有马动脉炎病毒 N 基因的病毒样颗粒, 通过 RT-PCR 扩增马病毒性动脉炎病毒的 N 基因, 将其克隆至含有组氨酸标签的 pNH-MS2his 载体中, 构建重组原核表达载体 pNH-MS2his-N。将重组质粒 pNH-MS2his-N 转化表达菌株大肠杆菌 BL21 (DE3), 1 mmol/L IPTG 诱导表达、纯化。对病毒样颗粒进行鉴定及稳定性实验。结果表明该病毒样颗粒含马病毒性动脉炎病毒 N 基因, 并且稳定性良好, 构建的病毒样颗粒可以作为 RNA 病毒检测时的标准品和质控品使用。

关键词: 马动脉炎病毒; 病毒样颗粒; 装甲 RNA

中图分类号: S852.65+2

文献标志码: A

文章编号: 0529-5130(2014)06-0008-04

Construction of virus-like particles containing N gene of equine arteritis virus

WANG Yu^{1,2}, ZHANG Xiaowen², WANG Qun², LIANG Chengzhu^{2*}, WANG Dongfeng¹

(1. College of Food Science and Engineering, Ocean University of China, Qingdao 266003, China;

2. Technical Center of Inspection and Quarantine, Shandong Entry-exit Inspection and Quarantine Bureau, Qingdao 266002, China)

Abstract: The aim of this study is to construct purifiable and RNase-resistant virus-like particles (VLPs) containing N gene of equine arteritis virus (EAV). The N gene of EAV was amplified by RT-PCR, then the gene was cloned into vector pNH-MS2his with MS2 phage coat protein, mature enzyme gene and histidine-tag to construct the prokaryotic expression vector pNH-MS2his-N. The recombinant plasmid pNH-MS2his-N was transformed into *E. coli* strain BL21 (DE3) and induced to express with 1 mmol/L IPTG. The virus-like particles

作者简介: 王宇 (1985-), 男, 硕士研究生

* 通信作者: 梁成珠, 研究员, 硕士生导师, 主要研究方向为动物及其产品的检验检疫, E-mail: liangcz@163.com

收稿日期: 2014-02-26

项目基金: 国家质检总局科技计划项目 (2011HK010)

- [4] Mao C, Solis D J, Reiss B D, et al. Virus-based toolkit for the directed synthesis of magnetic and semiconducting nanowires [J]. *Science*, 2004, 30: 213-217.
- [5] Wang Q, Lin T, Tang L, et al. Icosahedral virus particles as addressable nanoscale building blocks [J]. *Angew Chem Int Edit*, 2002, 41: 459-462.
- [6] Laurent S, Kut E. 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.
- [7] Crisci E, Almanza H, Mena I L, et al. Chimeric calicivirus-like particles elicit protective anti-viral cytotoxic responses with out adjuvant [J]. *Virology*, 2009, 387: 303-312.
- [8] Peacey M, Wilson S. Virus-like particles from rabbit hemorrhagic disease virus can induce an anti-tumor response [J]. *Vaccine*, 2008, 26(42): 5334-5337.
- [9] Chen Rong, Neill John D, Noel Jacqueline S, et al. Inter- and intragenus structural variations in caliciviruses and their functional implications [J]. *J Virol*, 2004; 78(12): 6469-6479.
- [10] Barcena J, Verdaguer N, Roca 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: 118-134.
- [11] 王芳, 胡波, 任雪枫, 等. 兔出血症病毒衣壳蛋白在昆虫细胞中的表达及对家兔的免疫保护效果 [J]. *畜牧兽医学报*, 2008, 10: 1382-1387.
- [12] 蔡少平, 王芳, 贾华敏, 等. 兔出血症病毒胶体金免疫层析试纸条诊断方法的建立及初步应用 [J]. *畜牧兽医学报*, 2012, 11: 1795-1801.
- [13] 杨廷亚, 王芳, 姜平, 等. 应用噬菌体展示技术筛选兔出血症病毒抗原模拟表位 [J]. *畜牧兽医学报*, 2012, (8): 1281-1286.
- [14] Chackerian Bryce. Virus-like particles: flexible platforms for vaccine development [J]. *Expert Review of Vaccines*, 2007, 6: 381-390.
- [15] Wang X, Xu F T, Liu J S, et al. Atomic model of rabbit hemorrhagic disease virus by cryo-electron microscopy and crystallography [J]. *PLoS Pathogens*, 2013, 91.