

携带双串联卵清蛋白 T 细胞表位的嵌合兔出血症病毒衣壳蛋白自聚能力的研究

张燕^{1,2} 胡波¹ 宋艳华¹ 范志宇¹ 魏后军¹ 姜平² 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: 以兔出血症病毒(RHDV)衣壳蛋白 VP60 为载体, 构建 VP60 携带双串联 OVA T 细胞表位(Ovalbumin, 卵清蛋白第 257~264 位氨基酸)的嵌合蛋白, 研究外源基因对 VP60 蛋白表达及病毒样颗粒(VLPs)装配的影响, 分析 VP60 作为载体对外源基因长度的耐受性。运用基因克隆和重组技术, 通过 2 次 SOE 法(Splicing by overlap extension, 重叠延伸剪接术)将双串联 OVA T 细胞表位(257~264 位氨基酸)的基因序列取代 VP60 第 302~309 位氨基酸的基因序列, 得到嵌合 VP60 基因。利用杆状病毒表达系统表达嵌合蛋白, 命名为 DC。经 IFA、SDS-PAGE、Western Blot、RT-PCR 方法鉴定嵌合蛋白的表达, 并通过电镜观察嵌合蛋白自聚为病毒样颗粒的能力。嵌合 VP60 蛋白在杆状病毒表达系统中得到高效表达, 且可自聚形成病毒样颗粒。携带双串联外源表位的嵌合 VP60 蛋白得到有效表达, 并可形成 VLPs。该研究为嵌合 VP60 VLPs 的形成、结构功能的研究奠定基础, 同时扩展了 VP60 作为载体可携带的外源基因耐受性的研究资料。

关键词: 兔出血症病毒; VP60; 双串联 OVA T 细胞表位; 病毒样颗粒

中图分类号: S858.2912.65 文献标识码: A 文章编号: 1000-7091(2014)01-0055-07

Study on the Self-assemble Ability of Chimeric RHDV VP60 Carrying Double OVA T-cell Epitopes

ZHANG Yan^{1,2}, HU Bo¹, SONG Yan-hua¹, FAN Zhi-yu¹, WEI Hou-jun¹, JIANG Ping², WANG Fang¹
(1. 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. Key Laboratory of Animal Diseases Diagnostic and Immunology, College of Veterinary Medicine of Nanjing Agricultural University, Nanjing 210095, China)

Abstract: The aim of present study was to investigate whether the amino acid replacement of VP60 could affect the expression of VP60 and the capable of self-assembling into VLPs. In order to obtain the chimeric protein of VP60 carrying double OVA T-cell epitopes, the sequences of VP60 302-309aa were replaced by the genes of double OVA T-cell epitopes by SOE. The fused genes were cloned into the donor vector pFastBacTM HT 1 and the recombinant baculovirus(rAc-V-302-309) was constructed using Bac-to-Bac baculovirus expression system. The chimeric protein named DC was expressed effectively in insect cells and confirmed by IFA, SDS-PAGE, Western Blot and RT-PCR. The chimeric protein was correctly expressed in baculovirus system and could self-assemble into VLPs by Electron microscopy analysis. This manuscript should be very valuable for enhancing the understanding of using RHDV-VLPs as a carrier for foreign genes. Meanwhile, the length of the foreign genes which RHDV-VLPs carried was extended.

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

兔出血症(Rabbit hemorrhagic disease, RHD)是由兔出血症病毒(Rabbit hemorrhagic disease virus, RHDV)引起的一种急性、致死性传染病。

收稿日期: 2013-08-15

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, 江苏常州人, 在读硕士, 主要从事畜禽传染病防控研究。

通讯作者: 王芳(1972-), 女, 新疆伊宁人, 研究员, 博士, 主要从事畜禽传染病免疫机理及防控研究。

RHDV) 引起的一种以急性、败血性、高度接触传染性、致死性和全身实质器官出血为主要特征的兔传染病^[1]。RHDV 属杯状病毒科兔病毒属,无囊膜,为 20 面体对称结构,直径 40 nm^[2-3]。病毒粒子的衣壳由一种 60 kDa 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)^[4-5]。这种病毒样颗粒具有很好的免疫原性,本身可作为免疫佐剂,可以以胞吞或胞饮途径进入抗原提呈细胞,分别诱导体液免疫应答和细胞免疫应答。

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、疾病治疗方面的优势愈加明显^[6-7],已成为国内外专家学者一致认为最有潜力的下一代疫苗及疾病治疗手段^[8-9]。由于很多病毒的宿主范围很广,不仅可以感染人类,而且可以感染多种动物,这为 VLPs 作为疫苗和药物的应用带来了挑战。RHDV 宿主专一性较强,只对兔易感,对人和其他动物不存在安全威胁,同时 RHDV 作为杯状病毒的成员之一,其 VP60 可自行装配形成 VLPs^[4],因此,RHDV VP60 可以作为研究其他动物疾病甚至是人类疾病 VLPs 疫苗的潜在研究模型。将外源片段嵌合到病毒样颗粒表面而形成的嵌合 VLPs,有与病毒样颗粒相似的外部形态,在疾病的疫苗研究中起着重要作用。Barcena 等^[10] 研究者发现 VP60 三维构象的形成与各个亚基的 N-末端序列有关,N 端 42 个氨基酸为 VLPs 装配非必须的,而缺少 C 端氨基酸则不能形成 VLPs。Nagesha 等^[11] 研究发现在 C-端插入外源片段不影响 VLPs 的形成。Crisci 等^[12] 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。本研究利用双串联的 OVA CD8 + T 细胞表位(序列

为 SIINFEKL,以柔性氨基酸 GS 连接) 替代 VP60 蛋白的 302 ~ 309 位氨基酸,研究其对嵌合蛋白的表达和病毒样颗粒组装的影响,以期以 VP60 VLPs 作为外源片段展示载体的耐受性提供理论依据。

1 材料和方法

1.1 种毒、质粒、细胞和菌种

供体质粒 pFastBac1-VP60^[13] 和 pFastBac1-VP60-DN(双串联的 OVA T 细胞表位基因序列取代 VP60 第 2 ~ 14 位氨基酸的基因序列) 由江苏省农业科学院兽医研究所家兔与兽医生物技术研究室构建并保存;pMD19-T 载体购自 TaKaRa 公司;表达载体 pFastBac1 购自 Invitrogen 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;大肠杆菌 DH10 Bac 感受态由本实验室保存; 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、*Hind* III、T4 DNA 连接酶、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;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^[14-15]。病毒样颗粒的电镜观察在南京军区总院大型仪器平台的 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(OVA) 257 ~ 264 位氨基酸的碱基序列,用 Primer 5.0 软件设计引物(由 Invitrogen 公司合成),引物如下:

表 1 本试验中所用引物序列

Tab.1 The sequences of oligonucleotides used in the study

引物 Primers	序列(5'→3') Sequences
引物 1 Primer 1	VP60-F: 5'-TTGAATTCATGGAGGGCAAAGCCCGCAC-3'(<i>EcoR</i> I)
引物 2 Primer 2	VP60-R: 5'-GCCAAGCTTTCAGACATAAGAAAAGCC-3'(<i>Hind</i> III)
引物 3 Primer 3	OVA 302-P1: 5'-CATCGAAGAGGCAGTGGTTCCTCCATCATC-3'
引物 4 Primer 4	OVA 309-P2: 5'-CTGAAGCACGTTGGTGGATCCCAACTTTTC-3'
引物 5 Primer 5	OVA 310-P3: 5'-TACCAAAACTGAAGCACGTTGGT-3'
引物 6 Primer 6	VP60 301-P2: 5'-AGGAACCACTGCCTCTTCGATG-3'
引物 7 Primer 7	VP60 310-P1: 5'-TTGGGATCCACCAACGTGCTTCAG-3'

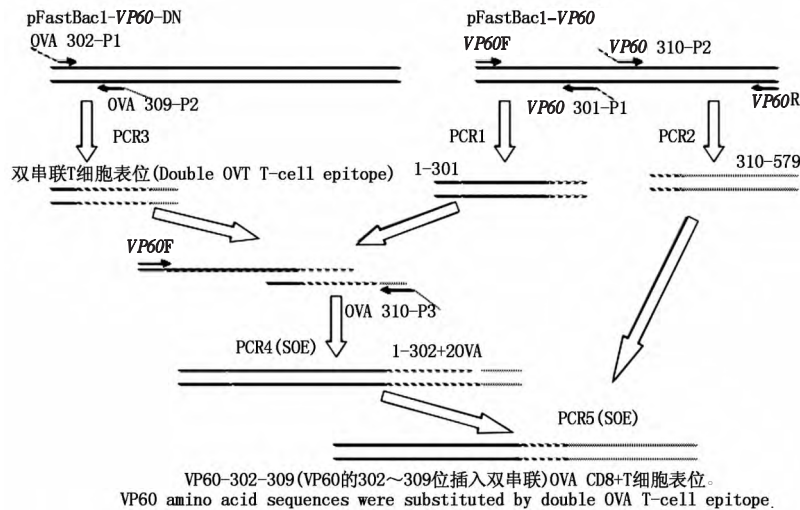


图 1 SOE 法示意图

Fig. 1 Diagram of SOE method

1.4 SOE 法(重叠区扩增基因拼接法)构建目的基因

经 2 次 SOE 法获得目的基因,构建步骤如下(图 1),PCR1:利用引物 1 和引物 6 扩增 VP60 第 1~301 位氨基酸的碱基序列,通过引物在片段末端引入 OVA T 细胞部分表位碱基。PCR2:利用引物 2 和引物 7 扩增 VP60 第 310~579 位氨基酸的碱基序列,利用引物在片段前端引入 OVA T 细胞表位的部分碱基。PCR3:利用引物 3 和引物 4 扩增双串联的 OVA T 细胞表位碱基序列,通过引物在片段两端分别引入 VP60 相应的部分碱基。PCR1 和 PCR3 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 PCR4 的模板。PCR4 反应体系(SOE 反应):10 × 高保真 PCR 缓冲液 5 μL,2.5 mmol/L 的 dNTP 4 μL,PCR 1 和 3 回收产物 10 倍稀释后各 4 μL,Taq 高保真 DNA 聚合酶 0.2 μL,50 mmol/L MgSO₄ 2 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。然后,向体系中添加引物 1 和引物 5,继续反应,反应体系如下: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,扩增 VP60 第 1~301 位氨基酸的碱基序列,并连接有双串联的 OVA T 细胞表位碱基序列,通过引物在片段末端引入 VP60 第 310 位氨基酸后部分碱基。PCR4 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 PCR5 的模板。PCR5 反应(SOE 反应):反应体系同 PCR4,引物为引物 1 和引物 2,PCR2 和 PCR4 的回收产物 10 倍稀释后作为模板,扩增出目的基因片段。

双串联 OVA T 细胞表位取代 VP60 蛋白上相应位点见图 2:

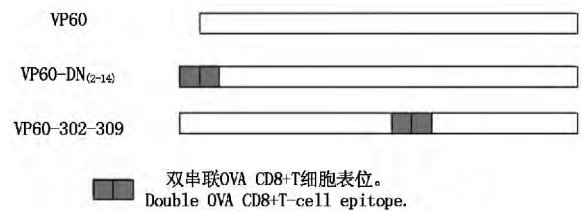


图 2 双串联 OVA T 细胞表位序列取代 VP60 部分氨基酸序列示意图

Fig. 2 Two parts of VP60 amino acid sequences were substituted by that of double OVA T-cell epitope

PCR5 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胶块,用 DNA 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。转化大肠杆菌 *E. coli* DH5α 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 酶切鉴定。酶切过后进行 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

通过 T4 DNA 连接酶将含有黏性末端(位点为:GAATTC *EcoR* I 酶切位点;AAGCTT *Hind* III 酶切位点)的回收的目的片段和 pFastBac1 载体 4 °C 连接过夜,转化 DH5α 感受态细胞。37 °C 温箱过夜培养,挑单个菌落摇床培养,柱式质粒 DNAout 试剂盒提取质粒 DNA,进行双酶切鉴定,得到重组转移载体并命名为 pFast-V-302-309,将阳性克隆菌液送 In-vitrogen 公司测序。测序正确的阳性质粒转座新鲜制备的 DH10 Bac 大肠杆菌感受态细胞中,经蓝白

斑筛选,通过碱裂法提取重组穿梭质粒 Bacmid-V-302-309,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,PCR 反应结束后取 10 μL 产物进行 0.8% 琼脂糖凝胶电泳分析。

1.6 重组穿梭质粒转染 Sf9 细胞

以脂质体 Lipofectamine™2000 为共转染试剂,将经 PCR 鉴定为阳性的重组质粒按照操作说明转染至 Sf9 单层细胞,转染在 24 孔板上进行,每 12 h 观察 1 次,直至出现明显的细胞病变时,收集细胞上清液,得到重组杆状病毒 rBac-v-302-309,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,收集细胞上清,此为第 2 代病毒液。依此方法获得所需病毒液。

1.7 RT-PCR 鉴定重组病毒

按照柱式动物 RNAout 试剂盒说明书,收集第 3 代感染重组病毒的 Sf9 细胞,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 反应体系为: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。反应结束后产物进行 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 VP60 单抗 A3C^[11]为一抗(1:100),FITC 羊抗鼠 IgG 为二抗

(1:100),采用间接免疫荧光法(IFA)检测嵌合蛋白的表达。

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 6 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,PBS 重悬细胞,洗涤 3 次,加入 200 μL 磷酸盐缓冲液 PBS,反复冻融 3 次,11 000 r/min 离心 5 min,取上清加入 5 × 上样缓冲液,煮沸 5 min,取上清 20 μL 进行蛋白质电泳。

1.8.3 Western Blot 用 1.8.2 的方法将样品电泳后,取下凝胶,将其转印于 NC 膜上,2 mA/cm² 转印 70 min 后,以 VP60 单抗 A3C^[11]为一抗(1:100),HRP 羊抗鼠 IgG 为二抗(1:5 000),进行 Western Blot 鉴定。

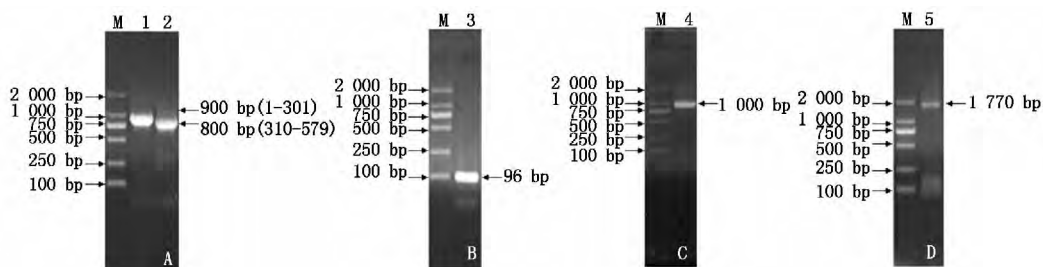
1.9 电镜观察

第 4 代重组病毒感染对数生长期的 Sf9 细胞至明显病变后吹下细胞,反复冻融 3 次,3 000 r/min 离心 5 min,分离细胞碎片与上清,取上清用超滤管进行浓缩,每次 6 000 r/min 离心 7 min,浓缩 10 倍后,电镜观察。

2 结果与分析

2.1 SOE 法获得目的基因及其鉴定

以本实验室保存的 pFastBac1-VP60 和 pFast-Bac1-VP60-DN 为模板,利用 Primer 5.0 设计退火温度,用设计的引物,进行 2 次 SOE,产物经 1% 琼脂糖凝胶电泳,获得符合目的片段大小的条带(图 3)。



A. PCR1 结果: M. DNA 分子质量标准(DL2000); 1. VP60 第 1~301 位氨基酸; 2. VP60 第 310~579 位氨基酸; B. PCR2 结果:

3. 双串联 OVA T 细胞表位氨基酸; C. PCR3 结果: 4. VP60 第 1~301 位氨基酸连接双串联 OVA T 细胞表位氨基酸;

D. PCR4 结果: 5. VP60 第 302~309 位携带双串联 OVA T 细胞表位氨基酸。

A. Result of PCR1: M. DNA Marker(DL2000); 1. 1~301 amino acids of VP60; 2. 310~579 amino acids of VP60; B. Result of PCR2: 3. Double amino acids of OVA T-cell epitopes; C. Result of PCR3: 4. 1~301 amino acids of VP60 connect with the double amino acids of OVA T-cell epitopes;

D. Result of PCR4: 5. Double amino acids of OVA T-cell epitopes replaced the 302~309 amino acids of VP60.

图 3 重组 VP60 基因 PCR 结果

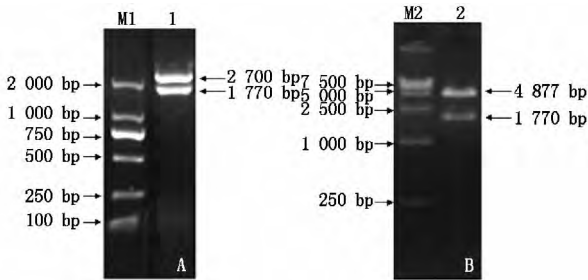
Fig. 3 PCR results of recombinant VP60 gene

2.2 重组表达载体的酶切鉴定

目的基因与 T 载体连接转化 DH5α 感受态细胞,挑菌提质粒进行双酶切鉴定后,进行 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,成功构建克隆质粒(图 4-A)。T/A 鉴定后,目的片段与真核表达载体 pFasterBac1 连接,转化大肠杆

菌 DH5 α 感受态细胞,提取质粒,进行双酶切鉴定,1% 琼脂糖凝胶电泳,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重组质粒(图 4-B)。



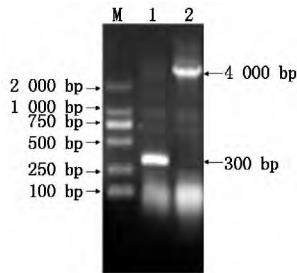
A. pMD19-T-V-302-309 酶切鉴定: M1. DNA 分子质量标准 (DL2000); 1. pMD19-T-V-302-309 酶切鉴定结果; B. 重组质粒 pFast-Bac1-V-302-309 酶切鉴定: M2. DNA 分子质量标准 (DL15000); 2. 真核质粒 pFastBac1-V-302-309 酶切鉴定。
A. Identification of pMD19-T-V-302-309: M1. DNA Marker (DL2000); 1. Identification of pMD19-T-V-302-309; B. Identification of the recombinant plasmid pFastBac1-V-302-309: M2. DNA Marker (DL15000); 2. Identification of the recombinant plasmid pFastBac1-V-302-309.

图 4 重组质粒的酶切鉴定

Fig. 4 Identification of the recombinant plasmid

2.3 重组 Bacmid 鉴定

用碱裂法提取 Bacmid 经 PCR 鉴定目的基因是否插入到 Bacmid 质粒中。以 pUC/M13 上、下游引物对重组质粒进行扩增,产物大小约为 4 000 bp,而以同样引物对未插入外源基因片段的空 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。



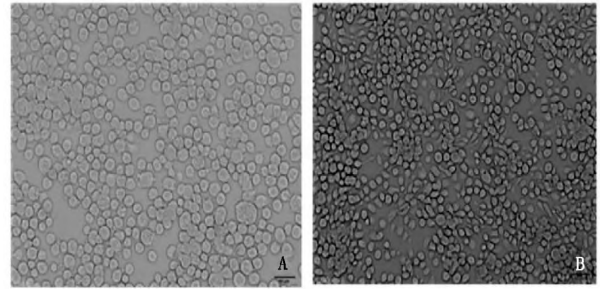
M. DNA 分子质量标准 (DL2000); 1. 穿梭载体 Bacmid; 2. 重组穿梭载体 Bacmid-V-302-309。
M. DNA Marker (DL2000); 1. Bacmid; 2. Bacmid-V-302-309.

图 5 重组质粒的 PCR 鉴定

Fig. 5 PCR identification of the recombinant plasmid

2.4 表达产物的鉴定

2.4.1 细胞病变(CPE) 在脂质体 LipofectamineTM 2000 介导下,将重组质粒 Bacmid-V-302-309 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。对照细胞生长基本上没有变化,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 CPE 变化,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(图 6)。

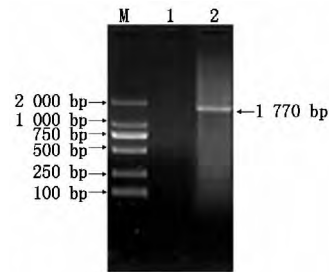


A. 转染后病变细胞; B. 正常细胞对照。
A. CPE cells after transfection with recombinant bacmid plasmid; B. Normal cells.

图 6 细胞病变图

Fig. 6 CPE cells after transfection with recombinant bacmid plasmid

2.4.2 RT-PCR 鉴定重组病毒 按照柱式动物 RNAout 试剂盒说明提取感染第 3 代重组病毒的 Sf9 细胞总 RNA,以感染野毒的细胞为阴性对照。以 VP60 上、下游引物进行 RT-PCR,目的条带约为 1 770 bp,与目的基因大小一致,而感染野毒的细胞无特异性条带(图 7)。



M. DNA 分子质量标准 (DL2000); 1. 野生型杆状病毒 mRNA RT-PCR 结果; 2. 重组病毒 rBac-V-302-309 mRNA RT-PCR 结果。

M. DNA Marker (DL2000); 1. RT-PCR result of the bacmid; 2. RT-PCR result of recombinant virus mRNA.

图 7 RT-PCR 鉴定重组病毒 mRNA

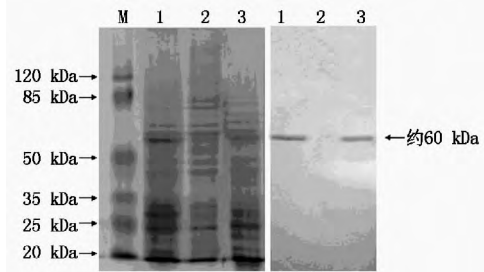
Fig. 7 RT-PCR of the recombinant virus mRNA

2.4.3 蛋白质电泳 (SDS-PAGE) 及免疫印迹 (Western Blot) 检测 重组杆状病毒在昆虫细胞中表达的产物经电泳后出现一条分子量约为 60 kDa 的特异性条带,与预期大小基本一致,说明嵌合蛋白得到有效表达。免疫印迹与电泳的目的条带位置相符,说明嵌合蛋白具有反应原性(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 Sf9 细胞 24 h 后,以 1:100 倍稀释的 VP60 单抗 A3C^[11] 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。结果表明(图 9) 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,而正常细胞(空白对照)和感染 Bacmid 野毒的细胞(阴性对照)无特异性荧光,说明重组杆状病毒在 Sf9 细胞中有效表达。

2.5 嵌合蛋白病毒样颗粒电镜观察

重组病毒感染 Sf9 细胞 6 d 后,收集细胞液,离心后用 PBS 重悬后,冻融 3 次,3 000 r/min 离心 5 min,分离细胞碎片与上清,取上清用超滤管进行浓缩,每次 6 000 r/min 离心 7 min,浓缩 10 倍后进行负染透射电镜观察。结果表明(图 10),嵌合蛋白能形成与天然 RHDV 粒子相似的 VLPs。

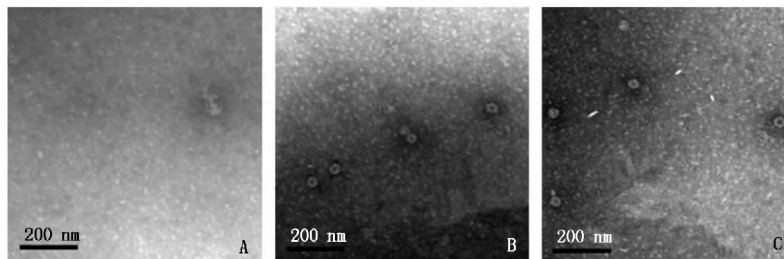


M. 预染蛋白分子量标准;1. 重组 VP60 蛋白;2. 野生杆状病毒表达蛋白;3. 嵌合蛋白 DC。

M. Prestained protein molecular weight standards; 1. VP60 protein; 2. The proteins expressed by wild-type virus; 3. The chimeric protein DC.

图 8 嵌合蛋白电泳和免疫印迹鉴定结果

Fig. 8 SDS-PAGE and Western blot detection of the chimeric protein



A. 野生型杆状病毒表达产物; B. 嵌合蛋白(VP60 302-309aa 被双串联 OVA 257-264aa 取代得到的蛋白)形成的病毒样颗粒; C. VP60 形成的病毒样颗粒。

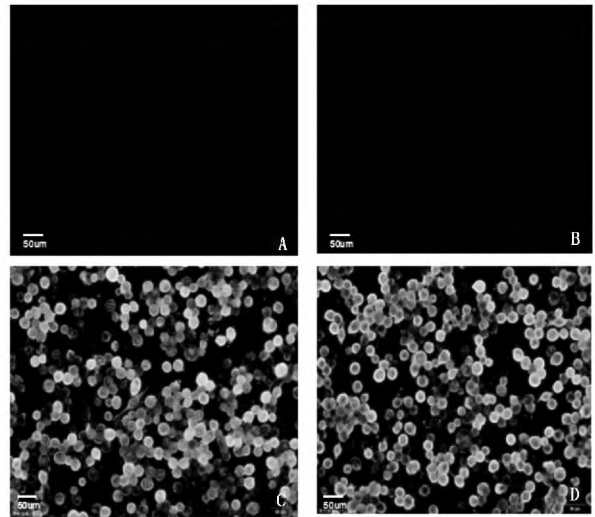
A. WT; B. Chimeric protein VLPs; C. VP60 VLPs.

图 10 嵌合蛋白电镜图

Fig. 10 Electron micrograph of chimeric protein

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的研发^[16]。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、效果及其适用范围的评价需要深入研究。X 线晶体研究显示 VP60 可分为 2 个主要区域:框架区(S 区)组成病毒衣壳表面;突出区(P 区)构成病毒衣壳表面突起部分,可进一步分为 P1 和 P2 2 个亚区域。与其他杯状病毒衣壳蛋白比较,S 区较为保守,而 P 区的 P1 相对保守,P2 为可变区^[17]。Chen 等^[18]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



A. 正常细胞(空白对照); B. 感染 Bacmid 野毒的 Sf9 细胞(阴性对照); C. 感染 VP60 皖阜株的 Sf9 细胞(阳性对照); D. 感染 Bacmid-V-302-309 的 Sf9 细胞。

A. IFA result of normal cells(Blank control); B. IFA results of Sf9 cells infected with wild-type virus(Negative control); C. IFA result of Sf9 cells infected with the Wanfu strain of VP60(Positive control); D. IFA result of cells infected with rBac-V-302-309.

图 9 间接免疫荧光检测表达产物的载体特异性

Fig. 9 The result of IFA that detect vector-specificity of the expression products

为保守位点,其余 P 区域变异程度较高。Crisci 等^[12]推测,位于 VP60 外表面区域的特定位点适合插入外源表位。本试验通过分子生物学技术将 VP60 蛋白的 302~309 氨基酸替换为双串联 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,大小约为 40 nm,形态与天然兔出血症病毒样粒子类似。最近,Wang 等^[17]通过低温电镜和晶体学技术,对 RHDV 的结构进行了解析,发现 VP60 的 300~318 位氨基酸含有一段位于病毒粒子最外表面的 Loop,处于高变区。本研究选取的替换位点为 302~309 位氨基酸,替换该位点后并没有影响 VLPs 的自我组装。位点 302~309 位氨基酸刚好包含在 300~318 位氨基酸中,位于 P2 亚单位突环处,且不包含保守氨基酸位点,故可能对外源基因

的耐受性较高。结合本研究结果,推测该位置可能是将外源片段展示于 VLPs 表面的最佳位置。另外,Crisci 等^[12]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。本研究结果也证明位于 P2 亚单位突环处的 302~309 位氨基酸对外源 T 细胞表位同样耐受。Crisci 等^[12]在 VP60 的 306 位氨基酸后插入单个 OVA CD8⁺ 表位(序列为 SIINFEKL,共 8 个氨基酸),结果显示可形成嵌合的 RHDV 样病毒粒子。而本研究在将位点 302~309 位氨基酸替换为 22 个氨基酸长度的双串联 OVA T 细胞表位序列后,VP60 载体的反应原性并未受到影响,且不影响 VLPs 的自我组装能力。该结果扩展了 VP60-VLPs 作为载体所能携带的外源基因长度。

本研究以 VP60-VLPs 为基础,通过在 VP60 302~309 位氨基酸插入双串联 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,研究表明 VP60 的 302~309 位氨基酸适合外源基因插入,且能够展示 22 个氨基酸长度的外源片段。此外,携带双串联 OVA T 细胞表位的嵌合 VP60 蛋白的免疫原性,插入表位的活性以及 VP60 作为载体所能容纳的最长外源基因长度仍需进一步研究。

参考文献:

- [1] 蔡宝祥. 家畜传染病学第三版[M]. 北京: 中国农业出版社, 1998: 299-301.
- [2] 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.
- [3] 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.
- [4] Barcena J, Morales M, Vazquez B *et al.* Horizontal transmissible protection against myxomatosis and rabbit hemorrhagic disease by using a recombinant myxoma virus [J]. Journal of Virology, 2000, 74: 1114-1123.
- [5] 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.
- [6] 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(303): 213-217.
- [7] Wang Q, Lin T, Tang L *et al.* Icosahedral virus particles as addressable nanoscale building blocks [J]. Angew Chem Int Ed Engl, 2002(41): 459-462.
- [8] Jennings G T, Bachmann M F. The coming of age of virus-like particle vaccines [J]. Biol Chem, 2008, 389(5): 521-536.
- [9] Ludwig C, Wagner R. Virus-like particles-universal molecular tool boxes [J]. Curr Opin Biotechnol, 2007, 18(6): 537-545.
- [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] Nagesha H S, Wang L F, Hyatt A D. Virus-like particles of calicivirus as epitope carriers [J]. Archives of Virology, 2000, 144(12): 2429-2439.
- [12] Crisci E, Almanza H, Mena I *et al.* Chimeric calicivirus-like particles elicit protective anti-viral cytotoxic responses with out adjuvant [J]. Virology, 2009, 387: 303-312.
- [13] 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, 39(10): 1382-1387.
- [14] 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, 43(11): 1795-1801.
- [15] 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, 43(8): 1281-1286.
- [16] Chackerian Bryce. Virus-like particles: flexible platforms for vaccine development [J]. Expert Review of Vaccines, 2007, 6: 381-390.
- [17] Wang X, Xu F, Liu J *et al.* Atomic model of rabbit hemorrhagic disease virus by cryo-electron microscopy and crystallography [J]. PLoS Pathogens, 2013, 9: 1003132.
- [18] Chen Rong, Neill John D, Noel Jacqueline S *et al.* Inter- and intragenus structural variations in caliciviruses and their functional implications [J]. Journal of Virology, 2004; 78(12): 6469-6479.