

表面展示猪圆环病毒2型衣壳蛋白 的重组杆状病毒的构建

程晓亮, 林文耀, 叶煜, 陈筱薇, 严常燕, 廖明, 樊惠英
(华南农业大学兽医学院, 农业部动物疫病防控重点实验室, 广东广州510642)

摘要:利用PCR方法扩增猪圆环病毒2型核定位信号区缺失的Cap蛋白基因, 将其亚克隆入杆状病毒表面展示质粒pBACsurf-1的gp64信号肽和gp64成熟蛋白之间。将此融合片段亚克隆到质粒pcDNA3.1(+), 获得重组质粒pcDNA3.1-gp64-dCap。然后将含有CMV启动子, gp64及dCap的基因片段克隆到杆状病毒转移质粒pFastBac-V, 得到重组质粒pFastBac-dCap-V。然后将此转化DH10Bac感受态细胞, 获得的重组穿梭质粒Bacmid-dCap-V, 经脂质体转染Sf9细胞, 获得重组杆状病毒Ac-dCap-V。该重组病毒感染Sf9细胞后可以产生典型的细胞病变, 转导哺乳动物细胞后经间接免疫荧光试验证明, 该重组杆状病毒成功转导哺乳动物细胞并表达dCap蛋白。

关键词:杆状病毒表面展示系统; 猪圆环病毒2型; dCap基因

中图分类号: S852.65

文献标志码: A

文章编号: 1001-411X(2011)04-0096-05

Construction of Recombinant Baculovirus Surface-Displayed the Capsid Protein of Porcine Circovirus Type 2

CHENG Xiao-liang, LIN Wen-yao, YE Yu, CHEN Xiao-wei, YAN Chang-yan, LIAO Ming, FAN Hui-ying
(Key Lab for Prevention and Control of Animal Diseases of the Ministry of Agriculture, College of
Veterinary Medicine, South China Agricultural University, Guangzhou 510642, China)

Abstract: The open capsid (Cap) protein gene without nuclear localization signal (NLS) of porcine circovirus 2 (PCV2) was amplified by PCR and sub-cloned into pBACsurf-1 between the upstream gp64 signal sequence and downstream gp64 mature domain. The fusion gene containing dCap and gp64 was inserted into pcDNA3.1(+) to construct the recombinant plasmid pcDNA3.1-gp64-dCap. A fragment of the CMV promoter-gp64-dCap fusion gene cassette was excised from pcDNA3.1-gp64-dCap and inserted into the baculovirus transfer vector pFastBac-V to construct the recombinant plasmid pFastBac-dCap-V. It was followed by the transformation of plasmid into *Escherichia coli* DH10Bac competent cells to obtain the recombinant shuttle vector Bacmid-dCap-V. Eventually, the recombinant Bacmid was transfected into Sf9 cells to produce the recombinant baculovirus Ac-dCap-V using the Lipofectamine™ 2000. The Sf9 cells produced cytopathic after infection of recombinant baculoviruses Ac-dCap-V. Indirect immunofluorescent assay demonstrated that the Ac-dCap-V efficiently transduced the mammalian cells *in vitro* and the dCap protein was expressed successfully.

Key words: baculovirus surface display; porcine circovirus 2; dCap gene

收稿日期: 2010-12-01

作者简介: 程晓亮(1985—), 男, 硕士研究生; 通信作者: 廖明(1968—), 男, 教授, 博士, E-mail: mliao@scau.edu.cn; 樊惠英(1977—), 女, 副教授, 博士, E-mail: fanhy@scau.edu.cn

基金项目: 863计划(2006AA10A205); 教育部新世纪优秀人才支持计划(NCET-06-0752); 国家自然科学基金青年基金(30800826); 广东省博士启动基金(8451064201001131); 农业微生物学重点实验室开发课题(20090010); 华南农业大学校长基金(5500-K08240)

猪圆环病毒 (Porcine circovirus, PCV) 是兽医学上已知动物病毒中最小的病毒, 属于圆环病毒科圆环病毒属成员, 是单股环状的 DNA 病毒, 无囊膜。圆环病毒包括 2 种基因型, 即不致病的 PCV1 和具有致病性的 PCV2。PCV2 可引起断奶仔猪多系统衰竭综合征 (Post-weaning multisystemic wasting syndrome, PMWS) 等疾病^[1-2]。PCV2 的基因组共编码 11 个开放阅读框架 (Open reading frames, ORFs), 其中功能上重要的是 ORF1 和 ORF2。ORF2 编码病毒的核衣壳 (Cap) 蛋白, 是病毒的唯一结构蛋白, 同时也是病毒主要的免疫原性蛋白, 可以刺激机体产生中和性抗体^[3-4]。因此关于 PCV2 基因工程疫苗的研究基本集中在 ORF2 基因上。杆状病毒作为一种新型的基因工程载体之一, 以其独到的优越性越来越引起人们的关注。目前杆状病毒载体经过一系列改进, 已成功构建出一种杆状病毒表面展示系统 (Baculovirus surface display system BSDS)。将外源基因插入到杆状病毒囊膜糖蛋白 gp64 的信号肽和成熟蛋白之间, 加工后信号肽被切除, 形成的 N 端融合蛋白借助杆状病毒稳定地表达, 并且将其展示在杆状病毒表面^[5]。本研究利用 BSDS 表达并表面展示 PCV2 的 dCap 蛋白, 此外为了使外源蛋白能够在哺乳动物细胞内进行表达, 同时利用哺乳动物启动子 CMV、水泡性口炎病毒 (Vesicular stomatitis virus, VSV) 膜融合蛋白 G 等元件对转移载体进行改造和修饰。这样构建的重组杆状病毒就能够进行二次表达, 从而为新型猪圆环 2 型病毒基因工程疫苗的研究提供新的选择。

1 材料与方 法

1.1 材 料

1.1.1 毒株与细胞 PCV2 毒株由华南农业大学农业部新兽药创制重点实验室分离并保存。Sf9 昆虫细胞为 GIBCO BRL 公司产品。

1.1.2 菌种与质粒 pFsatbac™ Dual, pcDNA3.1 (+) 质粒为 GIBCO BRL 公司产品, pBACsurf-1 为美国 Novagen 公司产品, pMD18-ORF2 由华南农业大学农业部新兽药创制重点实验室硕士研究生林文耀构建。大肠埃希菌 DH5a、DH10Bac 菌株由华南农业大学农业部新兽药创制重点实验室保存。

1.1.3 主要试剂 Ex™ TaqDNA 多聚酶、dNTP 为大连宝生物工程公司产品, T4DNA 连接酶和各种限制性内切酶等工具酶均为 NEB (New England BioLabs) 公司产品。DNA 凝胶纯化试剂盒为 Promega 公司产品。质粒抽提试剂盒为天根生化科技 (北京) 有限公司产品。昆虫细胞培养基 (Grace's) 和 Lipofectami-

ne™ 2000 转染试剂为美国 Invitrogen 公司产品。胎牛血清为奥地利 PAA 公司产品, 抗 PCV2 的小鼠阳性血清由华南农业大学农业部新兽药创制重点实验室樊惠英老师提供, FITC 标记山羊抗小鼠 IgG 为 Sigma 公司产品。

1.2 方 法

1.2.1 重组质粒 pFastBac-V 的构建 根据 VSV-G 序列设计合成 1 对引物 PVF/PVR, 在上游引物引入 *Xho* I, 下游引物引入 *Nhe* I 酶切位点, 扩增 VSV-G 片段, 预期大小为 1 535 bp, 引物序列如下, 由 Invitrogen 公司合成。

PVF: 5'-GCCA CTCGAG ATG AAG TGC CTT TTT TAC TTA GCC-3',

PVR: 5'-GTCA GCTAGC TTA CTT TCC AAG TCG GTT C-3'.

PCR 扩增产物用 *Xho* I 和 *Nhe* I 进行双酶切, 回收纯化酶切产物, 将其克隆到用同样方法处理的 pFastBac™ Dual 载体中, 构建重组质粒 pFastBac-V。

1.2.2 重组质粒 pBACsurf-1-dCap 的构建 根据 PCV2 序列设计合成 1 对引物 POF/POR, 在上下游引物均引入酶切位点 *Pst* I, 扩增去核定位信号衣壳蛋白基因 (dCap), 预期大小为 612 bp。引物序列如下, 由 Invitrogen 公司合成。

POF: 5'-GCG CTGCAG CACCACCACCACCAC-CAC AATGGCATCTTCAACACC-3',

POR: 5'-CAT CTGCAG AGG GTT AAG TGG GGG GTC-3'.

PCR 扩增 dCap 基因, 用 *Pst* I 酶进行单酶切, 回收纯化酶切产物, 将其克隆到用同样方法处理过的 pBACsurf-1 载体, 获得重组质粒 pBACsurf-1-dCap。

1.2.3 重组质粒 pcDNA3.1-gp64-dCap 的构建 根据 gp64 基因序列设计合成 1 对引物 PGF/PGR, 上游引物引入 *Nhe* I, 下游引物引入 *Hind* III 酶切位点, 以重组质粒 pBACsurf-1-dCap 为模板, 扩增 pBACsurf-1-dCap 上的 gp64 信号肽 + dCap + gp64 成熟蛋白基因片段。引物序列如下, 由 Invitrogen 公司合成。

PGF: 5'-GTT GCTAGC ATG GTA AGC GCT ATT GTT TTA TAT G-3',

PGR: 5'-GCG AAGCTT TTA ATA TTG TCT ATT ACG G-3'.

扩增产物用 *Nhe* I 和 *Hind* III 进行双酶切, 回收纯化酶切产物, 将其克隆到用同样方法处理的 pcDNA3.1 (+) 载体, 获得重组质粒 pcDNA3.1-gp64-dCap。

1.2.4 重组转移质粒 pFastBac-dCap-V 的构建 根据 CMV 启动子序列和 gp64 基因序列设计合成 1 对

引物 PCF/PCR, 上游引物引入 *Sal* I, 下游引物引入 *Hind* III 酶切位点, 以重组质粒 pcDNA3.1-gp64-dCap 为模板, 扩增 pcDNA3.1-gp64-dCap 上的 CMV 启动子 + gp64 信号肽 + dCap + gp64 成熟蛋白基因片段. 引物序列如下, 由 Invitrogen 公司合成.

PCF: 5'-GTT GTCGAC GTT GAC ATT GAT TAT TGA CTA GTT-3',

PCR: 5'-GCG AAGCTT TTA ATA TTG TCT ATT ACG G-3'.

扩增产物用 *Sal* I 和 *Hind* III 进行双酶切, 回收纯化酶切产物, 将其克隆到用同样方法处理的 pFastBac-V 载体中, 构建重组转移质粒 pFastBac-dCap-V (图 1).

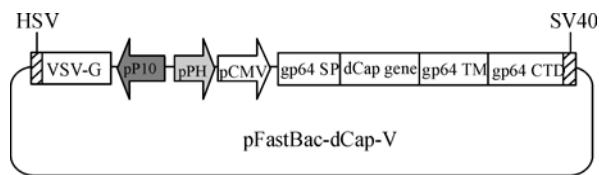


图 1 重组转移质粒 pFastBac-dCap-V

Fig. 1 Construction of recombinant donor plasmid pFastBac-dCap-V

1.2.5 重组杆状病毒的获得 重组质粒 pFastBac-dCap-V 转化 DH10Bac 感受态细胞, 然后通过蓝白斑筛选、纯化目的菌落, 并且对穿梭质粒 Bacmid 的 DNA 进行提取、转染 Sf9 昆虫细胞, 方法和过程均参照 Invitrogen 公司 Bac-to-Bac 表达系统操作手册进行. 穿梭质粒转染 Sf9 昆虫细胞后置于 28 °C 培养, 待出现细胞病变后, 收集培养物上清液获得重组杆状病毒 Ac-dCap-V.

1.2.6 重组杆状病毒转导哺乳动物细胞 将形态良好、新鲜的 BHK-21 细胞接种到 6 孔细胞培养板中, 37 °C 培养 12 h, 待细胞密度达到 70% ~ 80% 单

层时, 去除培养基, 用含钙、镁离子的 PBS 洗细胞, 将重组杆状病毒与 PBS 按照 1:2 的体积比混和后 (总体积为 1 mL), 将病毒感染液加入到 BHK-21 细胞中, 24 °C 转导 7 h, 然后弃去感染液, 用 PBS 洗 1 次, 加入 2 mL 细胞维持液, 放入 37 °C 细胞培养箱中继续培养 60 h 后, 用 PBS 洗涤 2 次, 甲醇固定细胞后, 抗 PCV2 的多克隆小鼠血清为一抗, FITC 标记的山羊抗小鼠 IgG 为二抗, 进行间接免疫荧光试验.

2 结果与分析

2.1 重组质粒 pFastBac-V 的构建

重组质粒 pFastBac-V 经过 *Xho* I 和 *Nhe* I 双酶切后产生大小为 1 536 和 5 238 bp 的 2 个片段, 与预期大小一致 (图 2). 在此基础上, 进一步对 pFastBac-V 进行测序, 证实无碱基突变.

2.2 重组质粒 pBACsurf-1-dCap 的构建

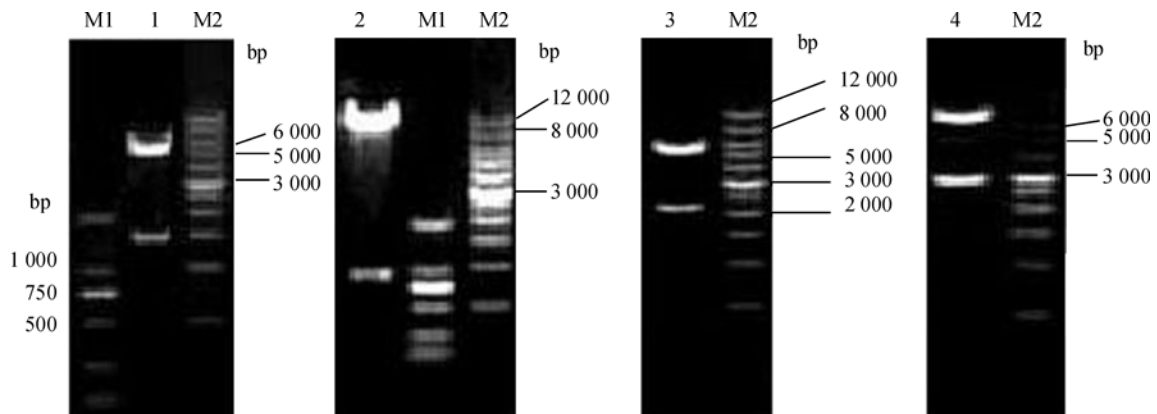
重组质粒 pBACsurf-1-dCap 经过 *Eco*r I 和 *Xho* I 双酶切后产生大小为 863 和 9 160 bp 的 2 个片段, 与预期大小一致 (图 2). 在此基础上, 进一步对 pBACsurf-1-dCap 进行测序, 证实无碱基突变.

2.3 重组质粒 pcDNA3.1-gp64-dCap 的构建

重组质粒 pcDNA3.1-gp64-dCap 经过 *Nhe* I 和 *Hind* III 双酶切后产生大小为 2 148 和 5 428 bp 的 2 个片段, 与预期大小一致 (图 2). 在此基础上, 进一步对 pcDNA3.1-gp64-dCap 进行测序, 证实无碱基突变.

2.4 重组转移载体 pFastBac-dCap-V 的构建

重组质粒 pFastBac-dCap-V 经过 *Sal* I 和 *Hind* III 双酶切后产生大小为 2 816 和 6 774 bp 的 2 个片段, 与预期大小一致 (图 2). 在此基础上, 进一步对 pFastBac-dCap-V 进行测序, 证实无碱基突变.



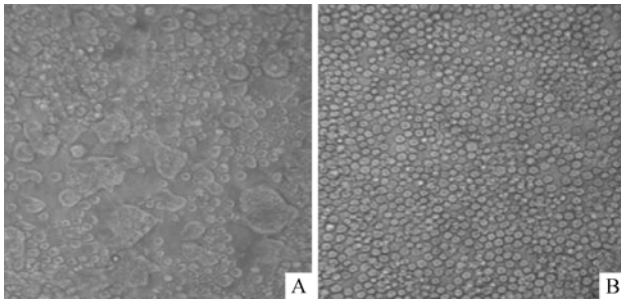
M1: DL2000 DNA marker; M2: Wide range DNA marker (500 ~ 12 000); 1: *Xho* I 和 *Nhe* I 双酶切 pFastBac-V 产物; 2: *Eco*r I 和 *Xho* I 双酶切 pBACsurf-1-dCap 产物; 3: *Nhe* I 和 *Hind* III 双酶切 pcDNA3.1-gp64-dCap 产物; 4: *Sal* I 和 *Hind* III 双酶切 pFastBac-dCap-V 产物.

图 2 重组质粒 pFastBac-V, pBACsurf-1-dCap, pcDNA3.1-gp64-dCap 和 pFastBac-dCap-V 的酶切鉴定

Fig. 2 Identification of recombinant vector pFastBac-V, pBACsurf-1-dCap, pcDNA3.1-gp64-dCap and pFastBac-dCap-V

2.5 重组杆状病毒 Ac-dCap-V 的获得

重组转移质粒 pFastBac-dCap-V 转化大肠埃希菌 DH10Bac, 48 h 后, 在含“三抗”平板产生大量蓝、白斑单菌落, 挑取白色菌落, 再次接种于含“三抗”的平板上, 仍为白色菌落, 表明获得了整合外源基因的重组穿梭质粒 bacmid. 重组穿梭质粒转染 Sf9 昆虫细胞 2~3 d 后出现细胞病变, 主要表现为细胞变大、膨胀、折光率增强等. 此外, 由于本研究所用的杆状病毒转移载体中引入了水泡性口炎病毒 VSV-G 蛋白, 因此, 除了细胞病变, 还可以观察到细胞间明显的融合现象(图 3). 这些现象说明重组穿梭载体 Bacmid-dCap-V 通过脂质体介导, 在昆虫细胞内产生了具有感染活性的重组杆状病毒.



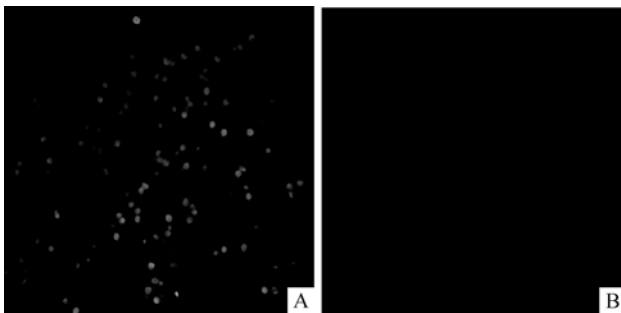
A: Ac-dCap-V 感染 Sf9 昆虫细胞 ×200; B: 正常 Sf9 昆虫细胞对照 ×200.

图 3 重组杆状病毒 Ac-dCap-V 感染 Sf9 昆虫细胞

Fig. 3 Sf9 cells infected by the recombinant baculovirus Ac-dCap-V

2.6 重组杆状病毒 Ac-dCap-V 转导哺乳动物细胞

重组杆状病毒转导 BHK-21 细胞 48 h 后, 进行间接免疫荧光试验. 结果表明, 重组杆状病毒 Ac-dCap-V 转导的 BHK-21 细胞能产生特异性免疫荧光, 而未转导重组杆状病毒的正常的 BHK-21 细胞未见特异荧光, 表明重组杆状病毒能够高效转导 BHK-21 细胞, 并在其转导细胞中表达 dCap 蛋白(图 4).



A: 转导 Ac-dCap-V 的 BHK-21 细胞 ×200; B: 正常 BHK-21 细胞对照 ×200.

图 4 Ac-dCap-V 转导 BHK-21 细胞的间接免疫荧光试验

Fig. 4 Indirect immunofluorescent assay of BHK-21 cells transduction with Ac-dCap-V

3 讨论

ORF2 基因编码的 PCV2 的核衣壳(Cap)蛋白, 是病毒的唯一结构蛋白, 同时也是病毒主要的免疫原性蛋白, Liu 等^[6]用大肠埃希菌表达了 ORF2 基因, 并证明该表达产物具有很强的免疫原性. 此外发现 Cap 蛋白在细胞中表达后, 表达蛋白定位于核周, 定位信号为 N 端第 1~41 位氨基酸, 进一步的突变分析发现第 12~18 及 34~41 位氨基酸区域的碱性氨基酸对定位起着关键作用. 而将该定位域缺失并不会影响 Cap 蛋白的免疫原性^[7-8].

杆状病毒载体是目前应用十分广泛的病毒载体之一, 它被广泛地应用于基因治疗、基因功能研究、疫苗开发等领域. 杆状病毒表达系统作为一种真核表达系统, 在外源基因表达方面具有糖基化、磷酸化和蛋白切割加工修饰过程, 表达产物的生物学特性与天然产物相似, 且具有高效表达和生物安全性高等优点^[9]. 此外研究发现, 这种表达载体还可用来介导外源基因投送至各种哺乳动物细胞, 并且通过哺乳动物启动子的驱动使外源蛋白得到高效稳定的表达^[10]. 杆状病毒表面展示系统(BSDS)是在对病毒基因组结构和功能深刻认识的基础上发展起来的. Feng 等^[11]将 SARS 冠状病毒表面 S 蛋白表达展示于杆状病毒表面, 用该重组病毒免疫小鼠后, 成功获得对 SARS 病毒具有中和活性的抗血清. 应用相同的策略, 一系列其他病原蛋白如柏格(氏)鼠疟原虫环孢子蛋白, 口蹄疫病毒 A 位点都被展示到杆状病毒粒子表面, 免疫动物均能获得理想的免疫原性^[12-13].

本研究利用杆状病毒表面展示技术表达 PCV2 的 dCap 蛋白. pFsatbac™ Dual 是基于 BSDS 所研制的一种新型转移载体, 它拥有 2 个多角体启动子 PH 和 P10. 水泡性口炎病毒 G 蛋白(VSV-G)是一种穿膜糖蛋白, 它能够利用其膜融合的活性介导病毒基因组从哺乳动物细胞内吞体中逃出, 从而能够提高重组杆状病毒转导各种哺乳动物细胞的效率^[14]. 本试验获得重组转移质粒 pFastBac-dCap-V 后, 再通过细菌内同源重组将转移载体上的外源基因整合到穿梭质粒 bacmid 中, 获得重组质粒后转染 Sf9 细胞拯救出重组杆状病毒, 然后对重组杆状病毒在实验室条件进行稳定性试验, 通过对重组杆状病毒的一系列鉴定, 证明了重组杆状病毒 Ac-dCap-V 的构建成功. 为猪圆环病毒 2 型候选疫苗的研究提供了新的思路, 具有重要的理论意义和潜在的应用价值.

参考文献:

- [1] CHOI C, KIM J, KANG I J, et al. Concurrent outbreak of PMWS and PDNS in a herd of pigs in Korea[J]. *Vet Rec*, 2002, 151: 484-485.
- [2] HARM P A, SORDEN S D, HALBUR P G. Three cases of porcine respiratory disease complex associated with porcine circovirus type 2 infection[J]. *Swine Health and Production*, 2002, 38: 528-539.
- [3] DOMINIQUE M, PHILIPPE B, CATHERINE T, et al. Differential recognition of ORF2 protein from type 1 and 2 porcine circovirus and identification of immunorelevant epitopes[J]. *J Gen Virol*, 2000, 81:1815-1824.
- [4] ANDRE L H, LIHUA L L, GOPIP S N. Nucleotide sequence of porcine circovirus associated with postweaning multisystemic wasting syndrome in pigs [J]. *J Virol*, 1998, 72:5262-5267.
- [5] MOTTERSHEAD D, VAN DER LINDEN I, VON BONS-DORFF C H, et al. Baculoviral display of the green fluorescent protein and rubella virus envelope proteins[J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 1997, 238(3):717-722.
- [6] LIU Qiang, WILLSON P, ATTOH P S, et al. Bacterial expression of an immunologically reactive PCV-2 ORF2 fusion protein[J]. *Protein Expr Puri*, 2001, 21(1):115-120.
- [7] LIU Qiang, TIKOO S K, BABIUK L A. Nuclear localization of the ORF2 protein encoded by porcine circovirus type 2[J]. *Virology*, 2001, 20; 285(1):91-98.
- [8] ZHOU Ji-yong, SHANG Shao-bin, GONG Hui, et al. In vitro expression, monoclonal antibody and bioactivity for capsid protein of porcine circovirus type II without nuclear localization signal[J]. *J Biotechnol*, 2005, 118(2):201-211.
- [9] DAVIES A H. Current methods for manipulating baculovirus [J]. *Biotechnology*, 1994, 12(1):47-50.
- [10] HOFMANN C, SANDIG V, JENNINGS G, et al. Efficient gene transfer into human hepatocytes by baculovirus vectors [J]. *PNAS*, 1995, 92(22):10099-10103.
- [11] FENG Qian, LIU Ying-ying, QU Xiu-xia, et al. Baculovirus surface display of SARS coronavirus (SARS-CoV) spike protein and immunogenicity of the displayed protein in mice models[J]. *DNA Cell Biol*, 2006, 25(12):668-673.
- [12] TAMI C, PERALTA A, BARBIERI R, et al. Immunological properties of FMDV-gp64 fusion proteins expressed on Sf9 cell and baculovirus surfaces[J]. *Vaccine*, 2004, 23(6):840-845.
- [13] YOSHIDA S, KAWASAKI M, HARIGUCHI N, et al. A Baculovirus dual expression system-based malaria vaccine induces strong protection against plasmodium berghei sporozoite challenge in mice [J]. *Infection and Immunity*, 2009, 77(5):1782-1789.
- [14] BARSOUM J, BROWN R, MCKEE M, et al. Efficient transduction of mammalian cells by a recombinant baculovirus having the vesicular stomatitis virus G glycoprotein [J]. *Hum Gene Ther*, 1997, 8(17):2011-2018.

【责任编辑 柴焰】