

猪圆环病毒 2 型 ORF2 基因在昆虫细胞中的表达及其特性

The Expression of Porcine Circovirus Type 2 ORF2 Gene in Insect Cells and its Character

樊惠英, 陈焕春*, 佟铁铸, 琚春梅, 吕建强, 黄红亮

FAN Hui-Ying, CHEN Huan-Chun*, TONG Tie-Zhu, JU Chun-Mei, LÜ Jian-Qiang and HUANG Hong-Liang

华中农业大学动物医学院动物病毒室, 武汉 430070

Laboratory of Animal Virology, College of Veterinary Medicine, Huazhong Agricultural University, Wuhan 430070, China

摘 要 利用 Bac-to-Bac 杆状病毒表达系统将圆环病毒 2 型的 ORF2 全基因克隆到杆状病毒转移载体 pFastBacTM 中, 获得重组转移载体 pFast-ORF2, 再将其转化进含穿梭载体 Bacmid 的感受态细胞 DH10Bac 中, 发生转座作用, 经蓝白菌落筛选得到含 ORF2 基因的重组穿梭载体 Bac-ORF2。以脂质体介导的方法将重组穿梭载体转染 s9 细胞, 获得重组病毒, 命名为 Ac-ORF2。间接免疫荧光分析表明, PCV2 阳性血清能使 Ac-ORF2 感染的 s9 昆虫细胞呈强的荧光着色; SDS-PAGE 与 Western-blotting 分析可见大小约为 28kD 的特异性带, 表明 Ac-ORF2 在 s9 细胞中成功表达了 PCV2 ORF2 蛋白。将该表达蛋白纯化并经磷酸胺负染后, 通过电镜观察可见形态与 PCV2 病毒粒子相似的病毒样颗粒(VLPs), 其中某些颗粒由于中心浓染而似空衣壳, 其直径也为 17nm 左右。

关键词 猪圆环病毒 2 型, ORF2 蛋白, 昆虫细胞表达, 病毒样颗粒

中图分类号 Q786 文献标识码 A 文章编号 1000-306X(2005)06-0975-04

Abstract To produce the recombinant baculovirus transfer plasmid pFast-ORF2, the ORF2 gene of Porcine Circovirus type 2 (PCV2) was subcloned into baculovirus transfer vector (pFastBacTM) using Bac-to-Bac baculovirus expression system. *E. coli* DH10Bac (Gibco BRL) containing baculovirus shutter vector (bacmid) and helper vector was transformed with recombinant plasmid pFast-ORF2. Within *E. coli* DH10Bac, the ORF2 gene was transposed into the bacmid. The colonies of *E. coli* containing recombinant bacmid (Bac-ORF2) were collected by blue/white selection. The Bac-ORF2 was transfected into s9 cells to yield AcNPV carrying the PCV2 ORF2 gene, referred to as Ac-ORF2. Expression of the ORF2 gene of PCV2 was confirmed by indirect immunofluorescent assay (IIFA), SDS-PAGE and Western-blotting. The expressed ORF2 gene product had a molecular mass of 28kD and could be recognized by the positive serum of PCV2. The results indicated the ORF2 gene was properly expressed in s9 cell. It was noteworthy that many self-assembled virus-like particles (VLPs) were found in purified and phosphotungstic acid (PTA) stained PCV2 ORF2 protein by electron microscope. The particles were of similar morphology to the PCV2 virion and some self-assembled virus-like particles had darkly stained centers that made them appear to be empty capsids. Both PCV2 particles and self-assembled particles were approximately 17nm in diameter.

Key words porcine circovirus type 2, ORF2 protein, expression in insect cell, VLPs

Received: June 2, 2005; Accepted: July 12, 2005.

This work was supported by the grant from the National Natural Sciences Foundation of China (No.30170701).

* Corresponding author. Tel 86-27-87282608; E-mail: hzauvet@public.wh.hb.cn or fanhy@webmail.hzau.edu.cn

国家自然科学基金资助项目 (No.30170701)

猪圆环病毒(Porcine Circovirus, PCV)属于圆环病毒科,是迄今发现的一种最小的病毒,直径仅为17nm,无囊膜,二十面体对称,共价闭环状单股DNA病毒。PCV有PCV-1与PCV-2两个基因型。PCV-1无致病性,在健康猪群中可检测到PCV-1的抗体。PCV-2具有致病性,主要引起断奶仔猪多系统衰竭综合征(Post-weaning multisystemic wasting syndrome, PMWS)。PMWS于1991年在加拿大首次爆发^[1],其临床症状主要表现为进行性消瘦、呼吸道症状、发热及黄疸等,相似的疾病相继在美国^[2]、法国^[4]、西班牙^[5]、北爱尔兰^[3]等国出现,给全球养猪业造成了相当大的经济损失。在国内,朗洪武等^[6]和曹胜波等^[7]分别通过血清学和病原学调查表明,我国已有PCV2的流行。

PCV2基因组为一条长约1.76 kb的单股DNA,含有2个主要的开放阅读框,其中ORF2基因编码病毒的衣壳蛋白,是主要的结构蛋白,也是主要的免疫原性蛋白,是发展新型疫苗的良好目标基因。Mahe等通过对合成肽扫描分析绘出ORF2序列中的几个PCV2型特异性抗原表位,并证实B133表位可作为区分PCV1和PCV2的型特异性表位^[8]。已有研究发现ORF2蛋白可自我装配成类病毒粒子,并且在*E. coli*中表达的ORF2融合蛋白可与PCV2多抗反应^[9]。Truong等^[10]、Nawagitgul等^[11]及Blanchard等^[12]都先后利用PCV2 ORF2特异性抗原表位或完整蛋白作为诊断抗原建立了PCV2特异性ELISA方法,并在临床检测中取得了良好的效果。基于ORF2蛋白的作用与功能,本研究利用Bac-to-Bac杆状病毒表达系统,在昆虫细胞中表达PCV2 ORF2基因,为研制安全有效的PCV2的基因工程亚单位疫苗奠定基础。

1 材料和方法

1.1 质粒、菌株及细胞

含猪圆环病毒2型Yu-A株全基因组的重组质粒pT-PCV2由本室构建^[7],Bac-to-Bac杆状病毒表达系统(包含转移载体质粒pFastBacTM及感受态DH10Bac受体菌),购自美国Invitrogen公司;昆虫细胞sf9及DH5 α 感受态细胞均为本室保存。

1.2 工具酶与试剂

限制酶、T4 DNA连接酶、Taq酶均购自大连宝生物工程公司;辣根过氧化物酶标记的羊抗猪IgG购自SIGMA公司;昆虫细胞培养基(Grace's)及LipofectamineTM2000转染试剂,购自美国Invitrogen公司。

1.3 引物的设计与PCR扩增

扩增PCV2 ORF2全基因(705 bp)的PCR引物,由上海生物工程公司合成。其中上游引物P1引入了Pst I的酶切位点,下游引物P2引入了Kpn I的酶切位点,引物序列如下:

上游引物P1 5'-TCACTGCGAGGATGACGTATCCAAGG-3'

下游引物P2 5'-GAAGGTACCTCACTTAGGGTTAAGTGG-3'

扩增条件为:95℃ 5min 变性后进入循环,循环参数为:95℃ 1min,58℃ 1min,72℃ 1min,35个循环后72℃延伸10min 0.8%的琼脂糖凝胶电泳鉴定PCR产物。

1.4 质粒的构建、纯化、连接、转化及酶切分析

均按分子克隆实验指南进行^[14]。

1.5 重组杆状病毒的获得与PCR鉴定

质粒的转座、DH10Bac目的菌落的筛选与纯化、Bacmid DNA的提取、转染、重组病毒的扩增与空斑滴定等,按Invitrogen公司Bac-to-Bac表达系统操作手册进行。按文献[13]所述的方法制备PCR模板。应用通用引物PUC/M13,进行PCR扩增,循环参数的设置参照Bac-to-Bac表达系统操作手册。

1.6 重组病毒的扩增与ORF2蛋白的表达

扩增病毒时,以0.1pfu的重组病毒接种sf9细胞,48h后收集培养上清,-70℃避光保存备用。表达蛋白时,以5~8pfu的重组病毒接种长至70%~80%的单层sf9细胞,72h后分别收集上清与细胞进行检测。

1.7 表达产物的间接免疫荧光检测

将重组病毒感染72h后的sf9细胞,用PBS(pH7.4)洗涤2次,甲醇固定20min,用含10%胎牛血清的PBS封闭30min,PBS洗涤细胞2次,与PCV2阳性血清(1:200稀释)作用1h,PBS洗涤2次后与FITC标记的羊抗猪IgG作用1h,再经PBS洗涤3次后直接置于倒置荧光显微镜(Olympus,IX70)下观察荧光。同时设杆状病毒野毒感染(Ac.NPV)的sf9细胞对照与正常sf9细胞对照。

1.8 表达产物的Western-blotting分析

收集病变细胞,处理后进行SDS-PAGE电泳。将SDS-PAGE电泳的蛋白带电转至硝酸纤维素膜,用含5%BSA的PBST封闭过夜,以PCV2阳性血清作为一抗,HRP标记的羊抗猪IgG为二抗,DAB显色。

1.9 ORF2蛋白的粗纯化与电镜观察

在刚长成单层的sf9细胞上以5~8pfu/cell的感染复数接种Ac.ORF2,72h后收集病变的细胞,用PBS洗涤2次,1000r/min离心5min,重悬于50mmol/L NaHCO₃(pH8.3)中,超声波裂解后,12000r/min离心15min,上清中含有表达的ORF2蛋白。将上清铺于40%的蔗糖溶液上,35000r/min超速离心6h后,将沉淀重悬于双蒸水中,然后通过磷钨酸负性染色,利用H7000透射电子显微镜进行观察。

2 结果

2.1 重组表达质粒的构建

以重组质粒pT-PCV2为模板扩增PCV2 ORF2全基因,PCR产物用限制酶Pst I和Kpn I双酶切,纯化回收后,将此ORF2基因亚克隆到用同样方法处理过的pFastBacTM1载体,转化*E. coli* DH5 α 感受态细胞,获得重组转移载体pFast-ORF2(图略)。

2.2 重组病毒的获得与检测

提取重组质粒Bac.ORF2的DNA,电泳检测完整性,在脂质体的介导下,将其转染sf9细胞,约72h后可观察到细胞病变,如细胞变圆,停止分裂,折光率增强,直到细胞裂解,正常细胞则无这种变化。分别提取重组杆状病毒与野毒的DNA,

用 PUC/M13 引物进行 PCR 扩增,重组病毒的 PCR 产物的大小应该是 2300bp 加上外源片段的大小,电泳可见在 3000bp 出现特征性条带,而野毒对照中 PCR 产物的大小是 300bp 左右,与预期结果一致,说明 ORF2 基因已经整合到重组杆状病毒中(图 1)。因此,所得到的病毒为目的病毒,将其命名为 Ac. ORF2。

2.3 表达产物的间接免疫荧光检测

将重组病毒感染 72h 的 sf9 细胞进行间接免疫荧光试验,结果发现,在 Ac. ORF2 感染的细胞中,亮绿色的荧光分布于整个细胞质,并非聚集在细胞核中,而对照细胞则呈阴性(图 2)。

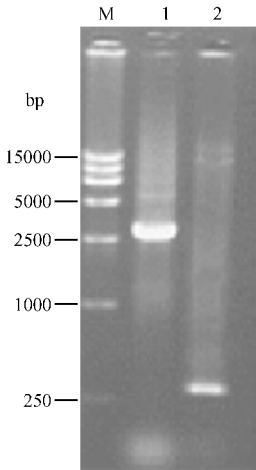


图 1 重组杆状病毒 Ac. ORF2 的 PCR 的鉴定(引物 PUC/M13)

Fig. 1 Identification of Ac. ORF2 by PCR with primers(PUC/M13)

1 :DNAs from Ac. ORF2 infected sf9 cells were amplified by PCR with primers(PUC/M13);2 :DNAs from wt. AcNPV infected sf9 cells were amplified by PCR with primers(PUC/M13).

2.4 表达蛋白的 Western-blotting 分析

收集 Ac. ORF2 感染 72h 后的病变细胞,经 SDS-PAGE 与 Western-blotting 分析证实,在 28kD 处出现特征性条带,与预期的大小基本相当,而野毒感染的细胞与正常细胞对照组则无此特征性条带(图 3)。

2.5 电镜观察

对杆状病毒表达的 PCV2 ORF2 蛋白进行纯化、负性染色后,在电子显微镜下可以看到病毒样颗粒(Virus-like particles , VLPs)的存在,呈典型的二十面体,无囊膜,直径为 17nm 左右,其形态大小均与全病毒粒子相似(图 4)。

3 讨论

近年来,PCV2 的致病作用逐渐被认识,但国内尚无商品化的疫苗可供使用。因此疫苗的研制成为急需解决的首要问题。目前,PCV2 相关疾病的疫苗研究限于全病毒灭活疫苗、弱毒疫苗^[15]、DNA 疫苗^[16]、亚单位疫苗及 PCV1-PCV2 重组疫苗^[17]。Kamstrup 等^[18]对 DNA 疫苗进行了研究,结果表明,在第 2 次免疫后小鼠体内即出现 PCV2 的特异性抗体,

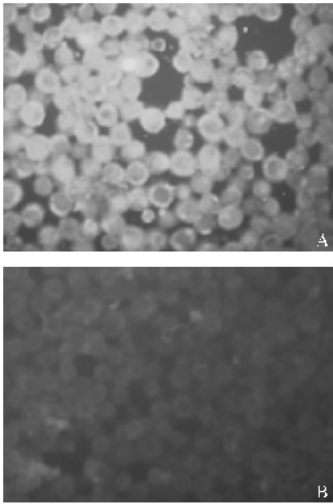


图 2 PCV2 的阳性血清与 Ac. ORF2 感染的 sf9 细胞的间接免疫荧光检测

Fig. 2 Insect cells infected with Ac. ORF2 were detected by indirect immunofluorescence assay using positive serum against PCV2
A :insect cells infected with Ac. ORF2 ;B :insect cells infected with wild-type AcNPV .

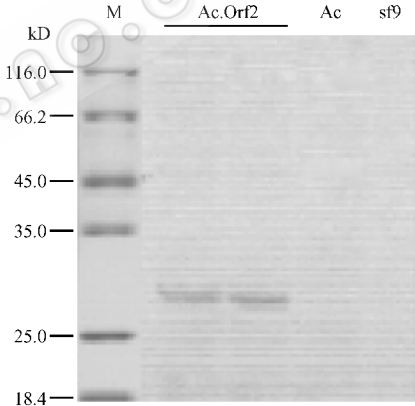


图 3 Western 印迹分析 sf9 细胞中表达的 PCV2 ORF2 蛋白

Fig. 3 Western-blotting analysis of the PCV2 ORF2 protein expressed in sf9 cells

M :protein molecular weight standard ; Ac. ORF2 :Ac. ORF2 infected sf9 cells ;Ac :wt. AcNPV infected sf9 cells ; sf9 :non-infected sf9 cells .

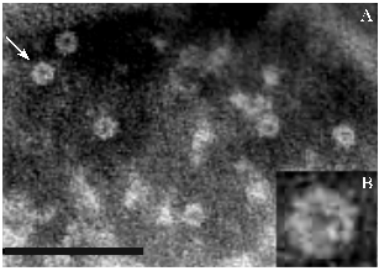


图 4 PCV2 ORF2 蛋白的病毒样颗粒结构的电镜图

Fig. 4 Electron micrographs of PCV2 ORF2 protein expressed in sf9 cells showing virus-like particles

A :many VLPs were amplified by 200 000 × ;B :a single VLP was amplified by 750 000 × ;Bar represent 100nm in length .

在第3次免疫后,小鼠体内的抗体可达到1:400~1:3200,说明ORF2蛋白可诱导小鼠产生一定水平的抗体。Fenaux等^[17]研究表明嵌合病毒PCV1-2DNA,即把PCV2的ORF2基因插入到PCV1基因组中代替PCV1的ORF2基因的感染性克隆,可以使猪体产生抗PCV2衣壳蛋白的特异性抗体,并且对猪的致病性大大减弱。但考虑到疫苗的安全性问题,这两种疫苗在临床应用上将受到很大限制。近年来,由于亚单位疫苗既不含有核酸成分,又不具有复制能力,是一种安全、有效的疫苗而备受广泛关注。作为PCV2最主要的结构蛋白与免疫原性蛋白,ORF2是设计PCV2新型疫苗的良好目标基因。基于此,本研究利用杆状病毒Bac-to-Bac系统成功表达Yu-A株PCV2 ORF2蛋白。

杆状病毒表达系统具有与动物细胞相似的转录翻译及翻译后加工等功能,表达的外源蛋白基本保持原有的生物活性,迄今已成功地表达了多种病毒抗原,并且有些病毒的结构蛋白可以形成病毒样颗粒(Virus-like particles, VLPs),如细小病毒(PPV)、多瘤病毒(PAV)和E型肝炎病毒等。在本试验中证实,体外表达的猪圆环病毒2型ORF2蛋白也可自行装配成病毒样粒子,电镜观察呈二十面体对称结构,直径约为17nm左右,但并不完全像纯化的PCV2病毒颗粒那样形态规则、排列有序,其中可能存在不正确组装现象,这一现象在细小病毒中也有报道。细小病毒的结构蛋白由VP1和VP2组成,其中VP1较小,VP2是主要的结构蛋白,二者由一个基因共同编码,VP2在VP1的作用下才能组装成完整的病毒衣壳样颗粒,将VP1截短,可能导致不正确的组装^[18]。但对PCV2而言,其ORF2蛋白是否缺少像VP1这样的辅助结构蛋白或基因来完善其组装过程还有待于进一步研究。Ac-ORF2感染s9细胞后,重组病毒大量存在于上清液中,尤其以感染后的48h最高,而表达的ORF2蛋白则存在于s9细胞的细胞浆内,这与Kim等^[19]的报道的结果一致,Western-blotting结果表明,表达的ORF2蛋白具有生物学活性,可以与猪圆环病毒2型的阳性血清发生特异性的反应。

上述初步研究结果,为开展PCV2基因工程亚单位疫苗的研制开辟了一条途径,同时也为进一步研究病毒结构蛋白的功能奠定了基础。目前,表达蛋白的动物试验的研究正在进行之中。

REFERENCES(参考文献)

[1] Clark EG. Post-weaning multisystemic wasting syndrome. *Proc Am Assoc Swine Pract*, 1997, **28**: 499-501

[2] Daft B, Nordhausen R, Latimer KS *et al.* Interstitial pneumonia and lymphadenopathy associated with circoviral infection in a six week-old pig. *Proc Am Assoc Vet Lab Diag*, 1996, **39**: 32

[3] Kennedy S, Allan G, McNeilly F *et al.* Porcine circovirus infection in Northern Ireland. *Vet Rec*, 1998, **142**: 495-496

[4] LeCann P, Albina E, Madec F *et al.* Piglet wasting disease. *Vet Rec*, 1997, **141**: 660

[5] Segales J, Sitjar M, Domingo M *et al.* First report of post-weaning multisystemic wasting syndrome in pigs in Spain. *Vet Rec*, 1997, **141**: 600-660

[6] Lang HW(朗洪武), Zhang GC(张广川), Wu FQ(吴发权). Detection of serum antibody against postweaning multisystemic wasting syndrome. *Chinese Science of Veterinary Medicine(中国兽医科技)* 2000, **30**(3): 3-5

[7] Cao SB(曹胜波), Chen HC(陈焕春), Xiao SB(肖少波) *et al.* Cloning and sequencing of complete genome of porcine circovirus type 2 (PCV2) YU A strain. *Chinese Journal of Virology(病毒学报)* 2000, **18**(2): 137-141

[8] Mahe D, Blanchard P, Truong C *et al.* Differential recognition of ORF2 protein from type 1 and type 2 porcine circoviruses and identification of immunorelevant epitopes. *J Gen Virol*, 2000, **81**: 1815-1824

[9] Nawagitgul P, Morozov I, Bolin SR *et al.* Open reading frame 2 of porcine circovirus type encodes a major capsid protein. *J Gen Virol*, 2000, **81**: 2281-2287

[10] Truong C, Mahe D, Blanchard P *et al.* Identification of an immunorelevant ORF2 epitope from porcine circovirus type 2 as a serological marker for experimental and natural infection. *Arch Virol*, 2001, **146**: 1197-1211

[11] Nawagitgul P, Harms PA, Morozov I *et al.* Modified indirect porcine circovirus (PCV) type 2-based and recombinant capsid protein (ORF2)-based enzyme-linked immunosorbent assays for detection of antibodies to PCV. *Clin Diagn Lab Immunol*, 2002, **9**: 33-40

[12] Blanchard P, Mahé D, Cariolet R *et al.* An ORF2 protein-based ELISA for porcine circovirus type 2 antibodies in post-weaning multisystemic wasting syndrome. *Vet Microbiol*, 2003, **94**: 183-194

[13] Fang LR(方六荣), Chen HC(陈焕春), Xiao SB(肖少波) *et al.* Expression of the gE gene of pseudorabies virus in insect cells. *Chinese Journal of Biotechnology(生物工程学报)*, 2000, **18**(2): 137-141

[14] Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. 2nd ed. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1998

[15] Fenaux M, Opriessning T, Halbur PG *et al.* Two amino acid mutations in the capsid protein of type 2 porcine circovirus (PCV2) enhanced PCV2 replication *in vitro* and attenuated the virus *in vivo*. *J Virol*, 2004, **78**(24): 13440-13446

[16] Kamstrup S, Barfoed AM, Frimann TH *et al.* Immunisation against PCV2 structural protein by DNA vaccination of mice. *Vaccine*, 2004, **22**: 1358-1361

[17] Fenaux M, Opriessning T, Halbur PG *et al.* Immunogenicity and pathogenicity of chimeric infectious DNA clones of pathogenic porcine circovirus type 2 (PCV2) and nonpathogenic PCV1 in weanling pigs. *J Virol*, 2003, **77**(2): 11232-11243

[18] Wong S, Momoeda M, Field A *et al.* Formation of empty B19 parvovirus capsids by the truncated minor capsid protein. *J Virol*, 1994, **68**: 4690-4694

[19] Kim Y, Kim J, Kang K *et al.* Characterization of the recombinant proteins of porcine circovirus type 2 field isolate expressed in the baculovirus system. *J Vet Sci*, 2002, **3**(1): 19-23