

## 人细小病毒 B19 病毒样颗粒的制备

邹小辉<sup>1,2</sup>, 董流昕<sup>2</sup>, 宋敬东<sup>2</sup>, 屈建国<sup>2</sup>, 于修平<sup>1</sup>, 鲁茁壮<sup>2</sup>, 洪涛<sup>2</sup>

1 山东大学医学院 微生物学教研室, 济南 250012

2 中国疾病预防控制中心病毒病预防控制所, 北京 100052

**摘要:** 采用昆虫杆状病毒表达系统, 制备人细小病毒 B19 病毒样颗粒(VLPs)。先通过 PCR 方法合成细小病毒 B19 衣壳蛋白基因 VP2, 将其克隆到 pFastBac1 质粒, 然后转化含杆状病毒穿梭载体 Bacmid 的 *E. coli* DH10Bac 感受态细胞, 获得重组杆状病毒表达质粒 Bacmid-VP2。在脂质体介导下转染 Sf9 昆虫细胞, 包装重组杆状病毒 rBac-VP2。利用 rBac-VP2 感染 Sf9 细胞表达 B19 VP2 蛋白, 通过间接免疫荧光、Western blotting 等方法鉴定目的蛋白表达。采用两次超速离心的方法对表达产物进行纯化, 纯化产物在透射电镜下可见直径约 22 nm 的 VLPs。本研究成功制备了人细小病毒 B19 的 VLPs, 为 B19 感染血清学检测方法的建立提供了参考。

**关键词:** 细小病毒 B19, VP2, 杆状病毒, 病毒样颗粒

## Preparation of human parvovirus B19 virus-like particles

Xiaohui Zou<sup>1,2</sup>, Liuxin Dong<sup>2</sup>, Jingdong Song<sup>2</sup>, Jianguo Qu<sup>2</sup>, Xiuping Yu<sup>1</sup>, Zhuozhuang Lu<sup>2</sup>, and Tao Hong<sup>2</sup>

1 Department of Microbiology, School of Medicine, Shandong University, Jinan 250012, China

2 Institute for Viral Disease Control and Prevention, Chinese Center for Disease Control and Prevention, Beijing 100052, China

**Abstract:** The baculovirus expression system was employed to prepare the virus-like particles (VLPs) of human parvovirus B19. The synthesized VP2 gene of B19 was inserted into the multi-cloning site (MCS) of pFastBac1 vector; the resulting plasmid was transferred to the *Escherichia coli* DH10Bac competent cells, which contain a baculovirus shuttle vector (Bacmid), to generate Bacmid-VP2 by site-specific transposition. Recombinant baculovirus carrying VP2 gene (rBac-VP2) was then rescued from Bacmid-VP2-transfected Sf9 cells. Indirect immunofluorescence and Western blotting were used to identify the VP2 protein in rBac-VP2-infected Sf9 cells, and the VLPs were observed under transmission electron microscope after being enriched by ultracentrifugation. The B19 VLPs were successfully produced in insect cells with baculovirus expression system, which will facilitate the development of diagnostic reagents to detect the antibody against B19 virus in human serum.

**Keywords:** parvovirus B19, VP2, baculovirus, virus-like particles

人细小病毒 B19(Human parvovirus B19)属于细小病毒科(Parvoviridae)红病毒属(Erythrovirus), 是目前已知的细小病毒科中唯一引起人类疾病的病原

体。对于免疫功能正常的人群, B19 主要引起儿童传染性红斑(又称第五病), 感染成人主要引起类风湿样急性多关节病, 暂时性再生障碍性危象; 而对于

Received: December 1, 2008; Accepted: January 5, 2009

Supported by: National Key Technology Research & Development Program (No. 2008BAI56B01).

Corresponding author: Xiuping Yu. Tel: +86-531-88382386; E-mail: yuxp@sdu.edu.cn

Zhuozhuang Lu. Tel: +86-10-63511368; Fax: +86-10-63529809; E-mail: luzz@bmi.ac.cn

国家科技支撑计划(No. 2008BAI56B01)资助。

免疫力低下(Immunocompromised)者,感染B19会引起单纯红细胞再生障碍及慢性贫血;对于孕妇,B19感染严重时可致胎儿水肿、宫内死胎等<sup>[1]</sup>。B19基因组为线性单链DNA分子,长约5.6 kb;病毒粒子直径约22~24 nm。其衣壳由VP1及VP2两种蛋白组成,VP2分子量58 kD,占衣壳蛋白的96%,而VP1占4%,分子量84 kD<sup>[2]</sup>。能够用细菌<sup>[3]</sup>、哺乳动物细胞<sup>[4]</sup>及昆虫细胞<sup>[5]</sup>表达VP1或VP2。利用细菌表达时,蛋白表达量高且周期短,但得到的是变性蛋白,不能用于检测人血清中的构象型抗体。VP2蛋白在哺乳动物或昆虫细胞中表达时能够自我组装成形态结构及免疫原性均与天然病毒粒子相似的病毒样颗粒(Virus-like particles, VLPs)<sup>[5]</sup>,能有效地结合构象型抗体,是用于血清抗体检测的理想抗原。国外在上世纪90年代初已利用昆虫细胞表达B19 VP2蛋白,并观察到VLPs的生成<sup>[5,6]</sup>;国内有利用细菌或杆状病毒表达系统表达B19 VP2蛋白的实验研究,但未见制备VLPs的相关报道。本研究尝试将B19 VP2基因克隆到杆状病毒表达载体,在Sf9昆虫细胞中进行表达,并经过超速离心等步骤制备B19 VLPs。

## 1 材料与方法

### 1.1 主要材料及试剂

Bac-to-Bac 杆状病毒表达系统及 Grace 昆虫细胞培养基购自美国 Invitrogen 公司; KOD-PLUS DNA 聚合酶购自日本 TOYOBO 公司; pMD18-T 载体、限制性内切酶、PCR 引物为日本 TaKaRa 公司产品;小鼠抗人细小病毒 B19 VP2 单克隆抗体(MAb8293)购自美国 Millipore 公司;山羊抗小鼠 IgG 为美国 Jackson 公司产品。

### 1.2 VP2 基因的合成

根据 GenBank(Accession No. NC\_000883)中的 B19 VP2 基因的编码区序列,设计 60 条引物,并在两端引物中分别引入 *EcoR* I 及 *Xho* I 酶切位点,通过 PCR 的方法<sup>[7]</sup>,使用 KOD-PLUS DNA 聚合酶合成 B19 VP2 基因,扩增片段末端加 A 后,连接到 pMD18-T 载体,得到质粒 pMD-VP2,对 VP2 序列部分进行测序(TaKaRa 公司)。

### 1.3 重组杆状病毒表达载体 Bacmid-VP2 的构建

使用 *EcoR* I、*Xho* I 双酶切质粒 pMD-VP2,获

得的含 VP2 基因的片段(1685 bp)连接至由相同酶切的 pFastBac1 质粒的多克隆位点,得到质粒 pFast-VP2。将 pFast-VP2 转化含杆状病毒穿梭载体 Bacmid 的 *E. coli* DH10Bac 感受态细胞,与 Bacmid 发生位点特异性转座,通过蓝白斑筛选,挑取 2 个克隆分别提取质粒,获得 2 个重组杆状病毒表达质粒 Bacmid-VP2(分别编号为 1 与 2)。参照说明书介绍的 PCR 方法进行鉴定:使用 M13 引物(上游引物:5'-gtttccagtcacgac-3';下游引物:5'-caggaaacagctatgac-3');扩增条件(93°C 3 min; 94°C 45 s, 55°C 45 s, 72°C 5 min, 30 个循环; 72°C 7 min);扩增片段大小为 3985 bp(2300 bp + VP2 基因的长度)。

### 1.4 重组杆状病毒 rBac-VP2 的制备及病毒滴度测定

按照 Invitrogen 公司的 Bac-to-Bac Baculovirus Expression System 操作手册进行操作,将鉴定正确且纯化除菌的 Bacmid-VP2 与转染试剂 Cellfectin Reagent 共转染对数生长期的 Sf9 细胞,27°C 培养 3~5 d,细胞出现典型细胞病变效应(CPE)时收获病毒,此为第 1 代重组杆状病毒 rBac-VP2。用第 1 代 rBac-VP2 感染 Sf9 细胞以获得高滴度的第 2 代重组杆状病毒。

病毒滴度测定使用类似腺病毒滴度测定的方法<sup>[8]</sup>,简述如下: rBac-VP2 经 10 倍梯度稀释后感染 96 孔板 Sf9 细胞,27°C 培养 7 d 后,先在普通光镜下观察并记录发生 CPE 的孔,对于临界稀释倍数的所有孔(该稀释倍数病毒感染孔中有部分孔发生 CPE)用免疫荧光法检测 VP2 的表达(见 1.5),以进一步确定有几个孔发生病毒复制,利用下列公式来计算病毒滴度: [病毒复制孔数/(该稀释度总孔数×单孔病毒液体积)]×稀释倍数。

### 1.5 VP2 在 Sf9 细胞中的表达与鉴定

用第 2 代 rBac-VP2 以 10 倍感染复数(Multiplicity of infection, MOI)接种 Sf9 细胞,待细胞出现典型 CPE 后去除培养基,加入冰甲醇于 -20°C 固定 15 min,吸去固定液,用含 1% 牛血清白蛋白的磷酸盐缓冲液(含 1% BSA 的 PBS,漂洗液)洗涤 3 次,每次 5 min;加入稀释的抗 VP2 抗体(使用 PBS 1:200 稀释)室温结合 1 h,漂洗液洗涤 3 次,每次 5 min;加入异硫氰酸荧光素(FITC)标记的山羊抗小鼠 IgG 室温结合 1 h(使用 PBS 1:200 稀释),漂

洗液洗涤 3 次后于荧光显微镜下观察。

### 1.6 B19 VLPs 的初步分离及电镜观察

收集感染 rBac-VP2 的 Sf9 细胞, 悬于 PBS 中, 超声破碎后,  $20\,000 \times g$  离心 10 min 以除去细胞碎片, 上清转移至铺有蔗糖(40%, W/W; PBS 配制)垫层的离心管中, 于  $4^{\circ}\text{C}$ 、 $34\,000\text{ r/min}$ (SW41 Ti 转子, Beckman)离心 2.5 h。超离后的沉淀用 PBS 重悬, 取样使用磷钨酸负染后于透射电镜下观察, 剩余部分使用非连续 CsCl 梯度(1.15、1.20、1.25 g/mL; PBS 配制)于  $4^{\circ}\text{C}$ 、 $34\,000\text{ r/min}$ (SW41 Ti 转子, Beckman)离心 2.5 h。分管收集的样品经 SDS 聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE)后, 银染或 Western blotting(抗 VP2 抗体)分析蛋白纯化情况; 并使用磷钨酸负染, 于透射电镜下观察 VLPs 形成情况。

## 2 结果

### 2.1 携带 VP2 基因的重组杆状病毒的制备

以 60 条引物通过 PCR 方法扩增出 1685 bp(两端含引入的酶切位点)目的基因片段(具体过程略)<sup>[7]</sup>, 经琼脂糖凝胶电泳鉴定片段大小正确(图 1A), 克隆到 pMD18-T 载体, 测序验证结果表明基因与设计序列相符。VP2 基因亚克隆到 pFastBac1 的多克隆位点后, 转化 *E. coli* DH10Bac 感受态细胞, 得到 Bacmid-VP2 质粒。Bacmid-VP2 质粒大小约 135 kb, 远大于目的基因长度(1685 bp), 不便于利用限制性内切酶酶切的方法进行鉴定, 故采用说明书推荐的 PCR 方法。使用的引物位于转座位点两侧, PCR 产物理论长度为 2 条引物至克隆位点的距离加上目的基因长度, 约 3985 bp; 实验结果表明获得的 2 个克隆是发生正确转座的目的克隆(图 1B)。Bacmid-VP2 转染 Sf9 细胞后, 获得的第 1 代重组杆状病毒 rBac-VP2 感染 Sf9 细胞, 得到第 2 代 rBac-VP2, 滴度为  $2.5 \times 10^7$ 。第 2 代 rBac-VP2 病毒冻存于  $-80^{\circ}\text{C}$ , 用于 Sf9 细胞的感染。

### 2.2 B19 VP2 蛋白在昆虫细胞中的表达

10 MOI rBac-VP2 感染 Sf9 3~4 d 后, 免疫荧光检测 VP2 表达。如图 2 所示, rBac-VP2 感染的 Sf9 细胞出现绿色荧光, 而 Sf9 对照细胞中未见荧光, 说明 rBac-VP2 感染后, Sf9 表达 VP2 蛋白。

### 2.3 VLPs 的初步纯化及电镜观察

10 MOI rBac-VP2 感染 Sf9 3~4 d, 待细胞病变

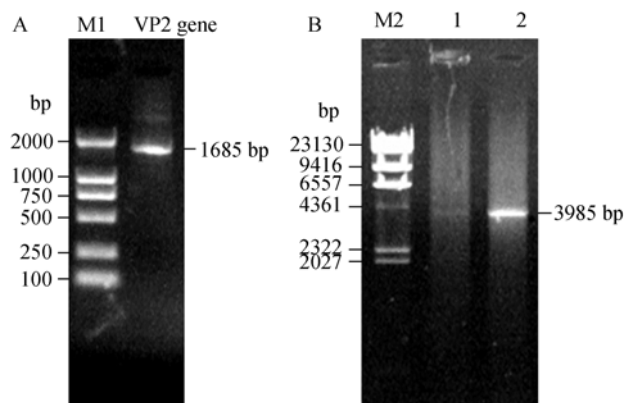


图 1 人细小病毒 B19 VP2 基因的克隆和表达载体的构建  
Fig. 1 Synthesizing and cloning of VP2 gene of human parvovirus B19. (A) Electrophoretic analysis of synthesized VP2 gene in agarose gel. (B) Identification of the Bacmid carrying VP2 gene (Bacmid-VP2) by PCR. 1, 2: PCR products using Bacmid-VP2#1 and #2 as the template, respectively; M1: DNA marker DL2000; M2: DNA marker  $\lambda$ /Hind III.

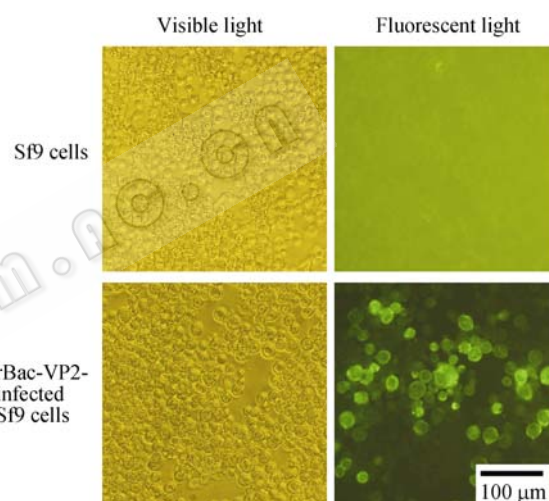


图 2 间接免疫荧光法检测 VP2 蛋白在 Sf9 细胞的表达  
Fig. 2 Detection of VP2 protein in rBac-VP2-infected Sf9 cells by the method of indirect immunofluorescence.

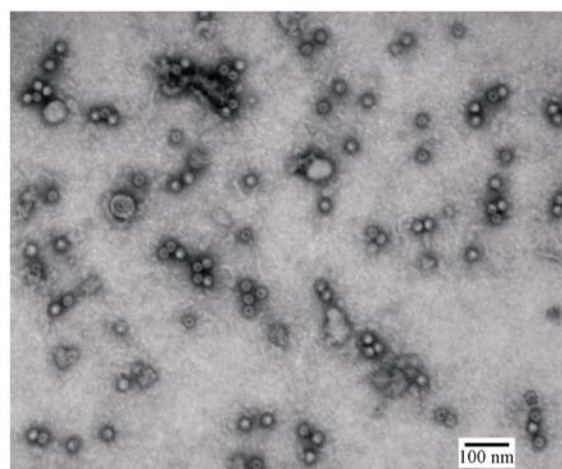


图 3 电镜观察超速离心纯化的 VLPs  
Fig. 3 Observation of purified VLPs by electron microscopy.

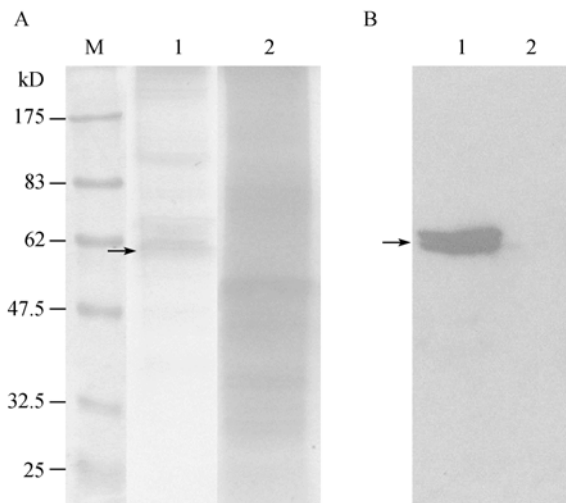


图4 SDS-PAGE(A)及 Western blotting(B)检测超速离心纯化的 VP2 蛋白

Fig. 4 Determination of ultracentrifugation-purified VLPs by SDS-PAGE (A) and Western blotting (B). The bands of VP2 are marked with arrows. M: protein marker; 1: protein components after ultracentrifugation; 2: total proteins of Sf9 cells.

明显,收集细胞。超声破碎后,离心除去细胞碎片,上清经蔗糖超速离心后,管底有沉淀聚集。使用 PBS 悬浮沉淀,取少量经磷钨酸负染后,电镜观察,可见 VLPs,但视野中杂质较多。将初次超离所得沉淀经非连续 CsCl 密度梯度离心,密度 1.20 g/mL 层以下区域有蛋白分布,分层收集,负染后,电镜观察,部分收集层可见数量较多的 VLPs,背景清晰(图 3)。SDS-PAGE 收集的蛋白后,银染结果显示,在分子量约 58 kD 处存在一条染色较深的蛋白带(图 4A),表明 VLPs 得到初步纯化;Western blotting 的结果进一步说明该 VLPs 是由 B19 VP2 蛋白形成的(图 4B)。

### 3 讨论

人细小病毒 B19 能引起人类多种疾病,尤其对于免疫缺陷患者,严重者甚至可致人死亡,2004 年,欧洲药典已将其列为部分血液制品制备过程中必须检测的项目之一<sup>[9,10]</sup>。在免疫功能正常的人群,感染 B19 后均能产生针对 VP1 及 VP2 的构象表位及线性表位的抗体,B19 特异性 IgM 抗体产生于病毒感染后第 2 周左右,并且可持续存在 5 个月或者更长时间;而针对 B19 的特异性 IgG 抗体在 IgM 产生之后数日内产生,在体内可维持数年,它的存在是 B19 既往感染的血清学标志。研究表明:B19 的 IgM 及

IgG 抗体对于 VP1 及 VP2 抗原的构象表位与线性表位具有不同的反应性,对于 IgM 抗体,针对 VP1 及 VP2 构象表位的特异性 IgM 抗体产生较早,消失最晚,为感染初期的主要抗体,而针对 VP2 线性抗原表位的 IgM 抗体只在感染后一段很短的时期内能够检出<sup>[11,12]</sup>;对于 IgG 抗体而言,针对 VP1 及 VP2 构象表位的 IgG 抗体存在于 B19 感染的各个阶段并且可以维持多年,而针对 VP2 线性抗原表位的 IgG 抗体只存在于 B19 感染的急性期,而在既往感染患者中几乎无法检出<sup>[11,12]</sup>。因此,使用构象表位的抗原检测患者体内的抗体要明显优于使用线性抗原。在免疫测定中,利用 VP2 衣壳蛋白作为抗原检测 B19 特异性 IgM 及 IgG 抗体已成为最佳选择<sup>[13]</sup>。

B19 病毒体外培养困难,而 B19 感染的症状出现于病毒血症之后,这又大大降低了从 B19 病毒感染患者血清中分离到病毒抗原的几率。总之,天然抗原的获得非常困难,只能通过基因工程的方法表达 VP2 蛋白以作检测使用。利用在 *E. coli* 中表达 B19 抗原,一般需经变性等步骤处理,得到的抗原缺乏构象表位,容易导致假阴性结果的出现<sup>[14]</sup>。使用杆状病毒表达系统表达 VP2 蛋白可以免去变性的步骤,得到构象完整的 VP2 衣壳蛋白,能够自我组装形成 VLPs,它具有与天然病毒粒子相似的结构及形态,因而具有与天然病毒粒子相同或相似的抗原性及免疫原性,可直接用于 B19 抗体的检测。本研究为 B19 血清学检测方法的建立奠定了基础。

### REFERENCES

- [1] Heegaard ED, Brown KE. Human parvovirus B19. *Clin Microbiol Rev*, 2002, **15**(3): 485-505.
- [2] Ozawa K, Young N. Characterization of capsid and noncapsid proteins of B19 parvovirus propagated in human erythroid bone marrow cell cultures. *J Virol*, 1987, **61**(8): 2627-2630.
- [3] Morinet F, D'Auriol L, Tratschin JD, *et al.* Expression of the human parvovirus B19 protein fused to protein A in *Escherichia coli*: Recognition by IgM and IgG antibodies in human sera. *J Gen Virol*, 1989, **70**(Pt11): 3091-3097.
- [4] Kajigaya S, Shimada T, Fujita S, *et al.* A genetically engineered cell line that produces empty capsids of B19 (human) parvovirus. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1989, **86**(19): 7601-7605.
- [5] Kajigaya S, Fujii H, Field A, *et al.* Self-assembled B19 parvovirus capsids, produced in a baculovirus system, are

- antigenically and immunogenically similar to native virions. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1991, **88**(11): 4646–4650.
- [6] Brown CS, Van Lent JW, Vlak JM, *et al.* Assembly of empty capsids by using baculovirus recombinants expressing human parvovirus B19 structural proteins. *J Virol*, 1991, **65**(5): 2702–2706.
- [7] Xiong AS, Yao QH, Peng RH, *et al.* A simple, rapid, high-fidelity and cost-effective PCR-based two-step DNA synthesis method for long gene sequences. *Nucleic Acids Res*, 2004, **32**(12): e98.
- [8] Nyberg-Hoffman C, Shabram P, Li W, *et al.* Sensitivity and reproducibility in adenoviral infectious titer determination. *Nat Med*, 1997, **3**(7): 808–811.
- [9] Koppelman MH, Cuypers HT, Emrich T, *et al.* Quantitative real-time detection of parvovirus B19 DNA in plasma. *Transfusion*, 2004, **44**(1): 97–103.
- [10] Anonymous. Human anti-D immunoglobulin. *European Pharmacopoeia*, 2002, **14**: 81.
- [11] Soderlund M, Brown CS, Spaan WJ, *et al.* Epitope type-specific IgG responses to capsid proteins VP1 and VP2 of human parvovirus B19. *J Infect Dis*, 1995, **172**(6): 1431–1436.
- [12] Kerr S, O'Keeffe G, Kilty C, *et al.* Undenatured parvovirus B19 antigens are essential for the accurate detection of parvovirus B19 IgG. *J Med Virol*, 1999, **57**(2): 179–185.
- [13] Corcoran A, Doyle S. Advances in the biology, diagnosis and host-pathogen interactions of parvovirus B19. *J Med Microbiol*, 2004, **53**(Pt 6): 459–475.
- [14] Jordan JA. Comparison of a baculovirus-based VP2 enzyme immunoassay (EIA) to an *Escherichia coli*-based VP1 EIA for detection of human parvovirus B19 immunoglobulin M and immunoglobulin G in sera of pregnant women. *J Clin Microbiol*, 2000, **38**(4): 1472–1475.

## 快 讯

### 美实现单个抗体绑定两种不同抗原

美国科学家近日通过研究,打破了一个古老的免疫学教条——一个抗体只能绑定到一个抗原上。他们成功地使一个抗体紧密地绑定到两个不同的抗原上。相关论文发表在 3 月 20 日的《科学》杂志上。

这一抗体作用于 2 种蛋白——血管内皮生长因子 (VEGF) 和人类表皮生长因子受体 2 (HER2), 前者被认为会促进肿瘤的生长, 而后者则在一些侵略性的乳腺肿瘤里高表达。

科学家以前经常发现一些抗体能够松散地绑定到多个抗原上, 但一直没有发现或通过操作实现单个抗体特异性地紧密绑定到 2 个不同抗原上。

在此次研究中, 美国加州基因技术公司的 Germaine Fuh 和同事突变了 HER2 的抗体, 然后在突变体中筛选出了能够同时绑定 HER2 和 VEGF 的变异。这是首次创造出能绑定到 2 种无关联蛋白的抗体。Fuh 说: “这将开启双重靶型疗法之门。”

重点研发抗体疗法的 Genmab 生物技术公司副总裁 Paul Parren 表示, 结果令人吃惊。他说: “我们以前根本没有这样考虑过抗体, 它让人不禁要猜测, 这种分子是否也有可能存在于自然界中。”

摘自《科学时报》