

## 人诺如病毒衣壳蛋白的密码子优化及在昆虫细胞中的表达\*

郭 丽<sup>1</sup>, 周红莉<sup>1</sup>, 屈建国<sup>1</sup>, 王健伟<sup>1\*\*</sup>, 徐樾巍<sup>2</sup>, 洪 涛<sup>1</sup>

( 1. 中国疾病预防控制中心病毒病预防控制研究所, 北京 100052; 2. 北京儿童医院, 北京 100045 )

### Codon Optimization and Expression of Norovirus

#### Capsid Proteins in Insect Cells

GUO Li<sup>1</sup>, ZHOU Hong-li<sup>1</sup>, QU Jian-guo<sup>1</sup>, WANG Jian-wei<sup>1\*\*</sup>, XU Xi-wei<sup>2</sup>, HUNG Tao<sup>1</sup>

( 1. National Institute for Viral Disease Control and Prevention, China CDC, Beijing 100052, China; 2. BeiJing Children's Hospital, Beijing 100045, China )

**Abstract :** Norovirus is currently the predominant human calicivirus that causes diarrhea in China. Among the documented noroviruses, types 4, 1 and 3 are the leading genetics groups. In order to improve the expression of the norovirus capsid, we re-designed and artificially synthesized the full-length norovirus capsid genes by adopting the codons preferentially used in insect cells without any changing of the amino acid sequences. The codon optimized capsid genes of Norovirus GGIII1, GGII3, GGII4 and GGII7 were respectively expressed in insect cell Sf9 using baculovirus vector. The results showed that, compared to the wild type, the expression levels of the optimized genes were remarkably increased. The assembly of norovirus-like particles was observed in the Sf9 cells infected with the recombinant baculovirus expressing the capsid protein. The recombinant capsid expression peaked at 72h post infection of the recombinant baculoviruses. The results obtained in the present work will lay a foundation for the development of the immunological diagnostic reagents as well as vaccines for human caliciviruses.

**Key words:** Norovirus; Capsid; Virus-like particle; Expression; Codon optimization

**摘要 :** 诺如病毒是当前在中国引起腹泻的主要人类杯状病毒, 其中GGII4、GGII1和GGII3等为主要流行遗传型。为了提高诺如病毒衣壳蛋白的表达量, 我们将其编码基因按杆状病毒喜用密码子进行了优化设计和人工合成。以杆状病毒为载体, 在昆虫细胞Sf9中对密码子优化后的诺如病毒GGIII1、GGII3、GGII4和GGII7型衣壳蛋白基因进行了表达。结果显示, 与野生型基因相比, 经过密码子优化的基因在昆虫细胞中的表达水平得到明显提高, 并可装配成病毒样颗粒。重组杆状病毒感染Sf9细胞72h表达量达到高峰。这些结果的取得, 为我国人杯状病毒免疫学检测试剂和疫苗的开发打下了基础。

**关键词 :** 诺如病毒; 衣壳蛋白; 杆状病毒载体; 表达; 病毒样颗粒

中图分类号: R373

文献标识码: A

文章编号: 1003-5125(2006)02-0121-05

人类杯状病毒是引起急性非细菌性胃肠炎的重要病原, 主要通过污染的食物、水源或人-人接触引起人的感染<sup>[1]</sup>。目前已知杯状病毒科主要分为4个属: 兔病毒 (*Lagovirus*), 囊泡病毒 (*Vesivirus*), 诺如病毒 (*Norovirus*) 和札如病毒 (*Sapovirus*)

后两种属于人类杯状病毒<sup>[2,3]</sup>。诺如病毒有3个遗传型 (Genetic group, GG): GGI, GGII 和 GGIII, 札如病毒有4个遗传型: SGI, SGII, SGIII和SGIV, 但只有GGI、GGII型诺如病毒和SGI、SGII、SGIV型札如病毒感染人类<sup>[4,5]</sup>。我国目前流行的人类杯状

收稿日期: 2005-10-24, 修回日期: 2005-11-30

\* 基金项目: 国家“十五”科技攻关计划“新发传染病等防治研究与应用”专项课题 (2003BA712A03-04)

作者简介: 郭 丽 (1974 - ), 女, 安徽砀山籍, 助理研究员, 在职博士生, 主要从事病毒基因工程与分子病毒学的研究。

\*\* 通讯作者. Corresponding author. E-mail: wangjw28@vip.sina.com.

病毒主要以诺如病毒GGII4, GGII3, GGII1等为主, 札如病毒罕见<sup>[6]</sup>。我国对于人类杯状病毒的研究还刚起步。

由于缺乏有效的细胞培养系统和动物模型, 使得对杯状病毒的分类以及分子生物学、生物化学、遗传学以及诊断等方面的研究工作受到了一定的限制。利用昆虫细胞<sup>[7,8]</sup>表达诺如病毒衣壳蛋白, 可以产生病毒样颗粒 (Virus-like particle, VLP), 可利用VLP进行病毒侵入、装配、免疫和诊断等方面的研究。但目前诺如病毒衣壳蛋白的表达量不高, 影响了实验的效率。为了提高杯状病毒蛋白的表达量, 本文按昆虫细胞喜用密码子在不改变氨基酸序列的前提下, 人工合成了我国当前流行的主要的诺如病毒基因型——GGII1、GGII3、GGII4和GGII7的衣壳蛋白基因, 并利用杆状病毒系统在昆虫细胞 (Sf9) 中进行了表达。

## 1 材料与方法

### 1.1 试剂与材料

杆状病毒表达系统, 包括载体 pFastBac1、昆虫细胞 Sf9 和 *E.coli* DH10Bac 为美国 Invitrogen 公司产品。克隆载体 pCDNAII 和 *E.coli* DH10B 为美国 Invitrogen 公司产品。所用限制性内切酶均为 New England Biolabs 公司产品, 连接酶为日本 Takara 公司产品。Trizol、Grace 培养基、转染试剂 Cellfectin 为美国 Invitrogen 公司产品。胎牛血清为美国 Hyclone 公司产品。蛋白酶抑制剂购自美国 Roche 公司。BCA<sup>TM</sup> 蛋白定量试剂盒和 SuperSignal<sup>®</sup> West Pico 化学发光底物购自美国 Pierce 公司。小鼠抗杯状病毒衣壳蛋白混合抗体为本实验室自制, 辣根过氧化物酶标记的羊抗鼠 IgG 购自美国 Sigma 公司。腹泻儿童粪便标本由北京儿童医院和山东大学齐鲁医院提供。

### 1.2 野生型诺如病毒衣壳蛋白基因 cDNA 的克隆

按说明书方法, 用 Trizol 提取腹泻儿童粪便标本中总 RNA, 根据已发表序列, 设计 GGII3 型杯状病毒衣壳蛋白基因引物, PCR 引物由上海生工生物工程公司合成, 序列如下: GGIIIF: GGCGAATT CATGAAGATGGCGTCAAT; GGIIIR: ACTCTCG AGTTATAGTGCACGTCT ACG; 上、下游引物分别引入 *EcoR* I 和 *Xho*I 酶切位点。用 RT-PCR 方法扩增出 GGII3 型杯状病毒衣壳蛋白基因, 克隆到 pCDNAII 载体中, 阳性质粒送大连宝生物公司测序确证, 命名为 pCDNA II/90C。

### 1.3 诺如病毒衣壳蛋白基因密码子的优化

按杆状病毒喜用密码子<sup>[9]</sup>进行人工设计, 委托

上海生工生物工程公司合成了我国当前流行的诺如病毒 GGII1、GGII3、GGII4 和 GGII7 型的衣壳蛋白基因。所有合成基因经大连宝生物公司和上海博亚生物技术公司测序确证正确后, 用于衣壳蛋白的表达。

### 1.4 杆状病毒表达载体的构建与重组杆状病毒的获得

将4种密码子优化 (GGII1C, GGII3C, GGII4C 和 GGII7C) 的野生型 GGII3 (90C) 诺如病毒衣壳蛋白基因分别用 *EcoR* I、*Xho* I 双酶切, 克隆到用相同双酶切线性化的 pFastBac1 载体上, 得到重组杆状病毒表达载体 pFB1/GGII1C、pFB1/GGII3C、pFB1/GGII4C、pFB1/GGII7C 和 pFB1/90C。根据 Invitrogen 公司 Bac-to-Bac<sup>®</sup> 杆状病毒表达系统说明书, 制备 Bacmid DNA 并用 PCR 方法进行鉴定。根据产品说明书用 Cellfectin 转染试剂分别将鉴定正确的 5 种 Bacmid DNA 转染丰度为 50%~70% 的 Sf9 细胞, 置 27℃ 培养, 每日观察细胞病变情况。72h 后收获转染细胞上清, 分装至无菌冻存管中, 置 4℃ 或 -80℃ 保存。将此病毒感染 Sf9 细胞进行扩增传代。

### 1.5 目的蛋白在昆虫细胞 Sf9 中的表达鉴定及表达量的比较

待 Sf9 细胞生长至 70%~80% 丰度时, 分别接种等量重组杆状病毒 (M.O.I = 5)。在感染后不同时间刮下病变的细胞, 用 PBS 洗涤后, 将细胞沉淀用 200 μl 含蛋白酶抑制剂的 RIPA 裂解液 (50mmol/L Tris-HCl, pH 7.4, 150 mmol/L NaCl, 0.1% SDS, 1% NP40, 0.5% 脱氧胆酸钠) 重悬, 置冰上裂解 1h, 然后于 4℃ 12,000 r/min 离心 10min, 收集上清, 用 BCA 蛋白定量试剂盒对提取的胞浆蛋白进行定量后, 将蛋白浓度调整至 5000 μg/mL, 取 10 μl 总蛋白行 12% SDS-PAGE 电泳, 转印硝酸纤维素膜, 用 5% 脱脂奶室温封闭 2h 后, 用小鼠抗杯状病毒衣壳蛋白混合抗体 (本实验室自制) 室温孵育 2h, 用含 0.05% Tween-20 的 TBS 缓冲液 (TBST) 洗涤 3 次后, 用辣根过氧化物酶标记的羊抗鼠 IgG 室温孵育 1h。TBST 充分洗涤后, 用 SuperSignal<sup>®</sup> West Pico 化学发光底物进行显色。

### 1.6 诺如病毒样颗粒的观察

将 Sf9 细胞接种重组杆状病毒, 待细胞病变完全后, 收获病变的细胞, 用 RIPA 裂解液裂解后, 取上清, 加 1:2000 稀释的杯状病毒衣壳蛋白特异性单克隆抗体 V6D6 并充分混匀, 置 37℃ 孵育 30min 后进行磷钨酸负染, 在 Tecnai12 透射电子显微镜 (美国 Tecnai 公司) 下观察。

## 2 结果

### 2.1 诺如病毒衣壳蛋白基因密码子的优化

由于野生型杯状病毒基因密码子与真核细胞密码子使用频率存在一定差异,在对诺如病毒衣壳蛋白基因进行密码子优化时,优先选择昆虫细胞使用频率最高的密码子。根据具体情况作适当调整,若不能使用频率最高的密码子,则选择使用频率次高的密码子,选用的密码子归纳于表 1。我们以发表的诺如病毒衣壳蛋白(其 GeneBank 登录号分别为:07611, U22498, X86557, AJ277608)以及自行克隆的 GGII3 型 cDNA 为模板,按上述方案人工设计并合成了 GGII4, GGII3, GGII1 和 GGII7 的全长 cDNA 编码基因(限于篇幅,序列未显示)。所有合成基因均经两个不同公司进行序列分析确证无误,其推导的氨基酸序列与原始基因完全一致。

表 1 诺如病毒衣壳蛋白基因优化所选用的密码子

Table 1 Adopted codons for the artificial synthesis of genes encoding norovirus capsid

Amino Acid	Codon	Amino Acid	Codon
Ala(A)	GCT GCC	Asn(N)	AAC AAT
Cys(C)	TGC TGT	Pro(P)	CCC CCT
Asp(D)	GAC GAT	Gln(Q)	CAG CAA
Glu(E)	GAG GAA	Arg(R)	CGT CGC
Phe(F)	TTC TTT	Ser(S)	TCC TCT
Gly(G)	GGT GGC	Thr(T)	ACC ACT
His(H)	CAC CAT	Val(V)	GTG GTC
Ile(I)	ATC ATT	Trp(W)	TGG
Lys(K)	AAG AAA	Tyr(Y)	TAC TAT
Leu(L)	CTG CTC	*	TAA

### 2.2 野生型衣壳蛋白基因的克隆

用 GGII3 型诺如病毒衣壳蛋白基因引物,进行 RT-PCR 扩增,从幼儿腹泻粪便标本中扩增出其衣壳蛋白编码 cDNA 并克隆到 pCDNA II 载体上,得到 pCDNA II/90C,用 *EcoR* I 和 *Xho* I 进行酶切鉴定,切下 1647bp 的片段,与预期相符。将酶切鉴定正确克隆进行序列分析,证实克隆产物完全正确(结果未显示)。将 pCDNA II/90C 用 *EcoR* I、*Xho* I 双酶切后,克隆到经相同酶切的杆状病毒表达载体 pFastBac I 上,得到 pFB1/90C,酶切鉴定表明质粒构建正确(图 1)。

### 2.3 重组杆状病毒的获得及目的蛋白的表达鉴定

按产品说明书方法,分别将含有密码子优化的 GGII4、GGII3、GGII1 和 GGII7 以及野生型 GGII3 诺如病毒衣壳蛋白编码基因的重组杆状病毒载体

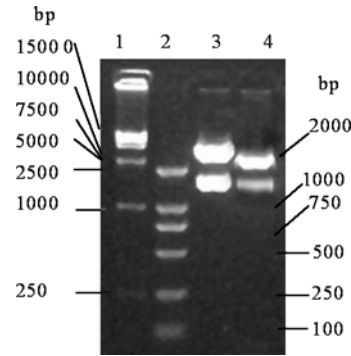


图 1 pFB1/90C 和 pCDNAII/90C 的酶切鉴定

Fig. 1 Restrictive endonuclease analysis of pFB1/90 and pCDNAII/90C

1,DL15000Markers; 2,DL2000 Markers; 3,pFB1/90C; 4,PCDNAII/90C

分别导入 *E.coli* DH10Bac 后,挑取白色菌落提取 BacmidDNA。将 Bacmid DNA 转染 Sf9 细胞,72 h 后出现肿胀、变圆、脱落等典型的细胞病变(CPE),取病变细胞培养上清感染 Sf9 细胞进行扩增,得到 5 种重组杆状病毒,分别命名为 rvBacGGII1C、rvBacGGII3C、rvBacGGII4C、rvBacGGII7C 和 rvBac90C。分别将这些病毒感染 Sf9 细胞,提取胞浆蛋白后行 Western blot 检测,结果显示,野生型 GGII3 及 4 种基因密码子优化衣壳蛋白在 60kDa 附近都有特异性条带出现,大小与预期相符,而在无外源基因插入的杆状病毒感染的 Sf9 细胞中则无任何条带出现,说明杆状病毒携带的杯状病毒衣壳蛋白基因在昆虫细胞中得到表达。重复 3 次实验,分别用 TotalLab 软件进行半定量扫描,结果显示优化基因的表达式为野生型 GGII3 基因(90C)表达量的 5~10 倍(图 2),提示经密码子优化后可显著提高诺如病毒衣壳蛋白的表达式。

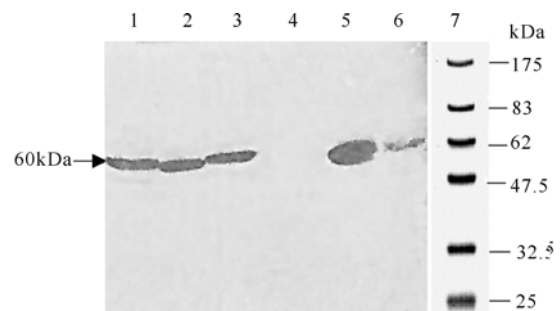


图 2 密码子优化的诺如病毒衣壳蛋白的表达式得到提高  
Fig. 2 Increased expression of the codon-optimized norovirus capsid gene

1, rvBacGGII1; 2, rvBacGGII4; 3, rvBacGGII7; 5, rvBacGGII3; 6, rvBac90C; 7, prestained protein Markers; 4, Negative control.

### 2.4 衣壳蛋白最佳表达时相的确定

为了优化表达条件,我们将重组病毒 rvBacG

GGII3 以 M.O.I.=5 感染 Sf9 细胞,分别在感染后 24h、48h、72h 和 96h 收获细胞,提取胞浆蛋白后行 western-blot 检测。结果显示,细胞在感染后 24h 尚无蛋白的明显表达,48h 开始有目的蛋白的表达,72h 表达量达到高峰,96h 开始下降(图 3)。说明在感染后 72h 收获细胞为好。

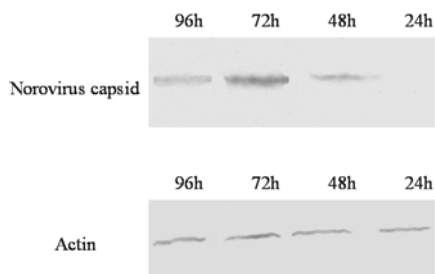


图 3 诺如病毒衣壳蛋白在昆虫细胞中的表达时相

Fig. 3 Time-phase of norovirus capsid expression in insect cells

### 2.5 诺如病毒样颗粒的形成

为了初步确定表达量增大后,重组衣壳蛋白是否具有正常的结构和功能,用 RIPA 裂解液裂解病变 Sf9 细胞,离心后取上清进行非标记抗体的免疫电镜操作,磷钨酸负染后,在 Tecnai12 透射电子显微镜下观察,可见在病变的 Sf9 细胞中有典型的空心杯状病毒样颗粒出现,其直径为 30~40nm,与以往文献报道一致(图 4),说明重组衣壳蛋白可形成病毒样颗粒,与预期一致。

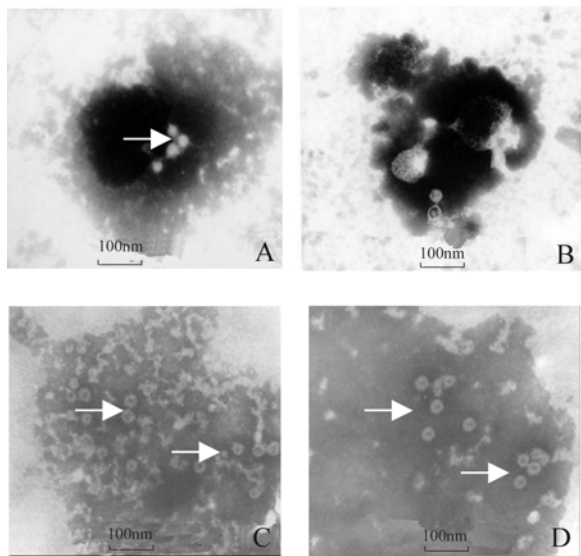


图 4 在昆虫细胞中表达的诺如病毒衣壳蛋白形成病毒样颗粒

Fig. 4 Assembly of norovirus-like particles in Sf9 cells after the recombinant capsid expression

A: Wild norovirus in stool. B: Norovirus formed virus-like particle in stool. C: Codon optimized GGII3 norovirus capsid protein formed virus-like particle in insect cell. D: Wild type GGII3 norovirus capsid protein formed virus-like particle in insect cell.

## 3 讨论

杯状病毒是导致无菌性胃肠炎的重要病原,据统计,在美国大约 96% 的成人无菌性胃肠炎是由杯状病毒引起<sup>[10]</sup>,我国近年来也不断有人杯状病毒腹泻暴发出现。天然的杯状病毒在腹泻患者的粪便标本中含量极低,一般用免疫电镜才能观察到标本中的病毒颗粒<sup>[1]</sup>,因此电镜技术难以广泛用于诊断。由于免疫学检测具有快速、灵敏、经济的特点,适合于在我国推广使用。但我国对杯状病毒的免疫检测研究目前尚属空白,大大限制了疾控工作和临床诊断的开展,因此亟需开展这方面的研究。由于人杯状病毒目前不能培养,对其进行免疫学检测只能使用基因工程抗原,因此改进抗原制备技术是发展我国杯状病毒免疫诊断技术的基础。我们通过对诺如病毒衣壳蛋白基因密码子进行优化,使其表达量得到了明显提高,对于杯状病毒检测试剂开发和疫苗研究等均具有重要意义。

在本研究中,为了获得阳性杯状病毒标本,我们首先对从北京、济南等地收集的儿童腹泻标本利用文献报道的针对多聚酶区引物进行了常规 RT-PCR 筛选。对阳性 PCR 产物进行了序列分析。结果表明,目前主要的流行的人杯状病毒型为诺如病毒,札如病毒罕见。在 412 份标本中,札如病毒只有 1 例,其余均为诺如病毒。诺如病毒主要以 GGII4、GGII1、GGII3 为主,与吕红霞等研究结果基本相符<sup>[6]</sup>,这提示目前对于 GGII4、GGII1、GGII3 等的检测应是关注的重点。

现有研究表明,在生物界,不同种类生物对同义密码子的使用频率是不同的,优势密码子与基因表达水平呈正相关<sup>[11]</sup>,因此通过进行密码子优化,在某种程度上可以有效提高特定基因的表达水平<sup>[12,13]</sup>。对密码子使用频率分析的结果表明,野生型杯状病毒衣壳蛋白基因的密码子与真核细胞密码子的使用频率存在差异,某些氨基酸的同义密码子在真核细胞中使用频率最低,而在杯状病毒中使用频率是最高的,如天冬酰胺、苯丙氨酸等,所以,用昆虫细胞或哺乳动物细胞表达野生型的衣壳蛋白时,可能会影响蛋白的表达量。为了提高目的蛋白的表达水平,我们对我国主要流行的杯状病毒衣壳蛋白密码子进行了优化和人工合成,用杆状病毒系统在昆虫细胞中分别对野生型和密码子优化的衣壳蛋白基因进行了表达。结果表明,与野生型相比,优化后的衣壳蛋白基因表达量都得到明显提高并可形成病毒样颗粒,具有良好的功能。我们同时

还用重组腺病毒系统在哺乳动物细胞中表达了密码优化的和野生型的 GGII3 衣壳蛋白基因(另文报道), 结果显示, 优化后的衣壳蛋白基因表达量同样都得到明显提高, 这说明按昆虫细胞密码子优化的基因, 与其野生型基因相比, 在哺乳动物细胞中也可以显著提高其表达量, 也说明我们优化的基因具有广泛的用途。

杯状病毒只含有一个结构蛋白——衣壳蛋白, 由其 ORF2 基因编码<sup>[1]</sup>。近年来的研究表明<sup>[8,14]</sup>, 重组杯状病毒 VLP 可以刺激粘膜免疫反应。此外, 有研究表明, 杯状病毒 VLP 可在 N 端或 C 端携带外源抗原表位<sup>[15]</sup>, 这为疫苗的发展提供了一个新的平台, 因为杯状病毒一个蛋白即可以形成 VLP, 作为表位携带者, 它比多亚单位系统, 如蓝舌病毒核心样颗粒在应用上更为方便、简单。本文成功地提高了诺如病毒衣壳蛋白表达量, 因此也为这一疫苗载体的开发利用打下了基础。

## References

- [1] Knipe D M, Howley P M, *et al.* Fields Virology[M], 4th ed New York: Lippincott Williams & Wilkins, 2001. pp841-874.
- [2] Green K Y. The role of human caliciviruses in epidemic gastroenteritis [J]. Arch Virol, 1997, 13 Suppl: 153-165.
- [3] Green K Y, Ando T, Balayan M S, *et al.* Taxonomy of the caliciviruses [J]. J Infect Dis, 2000, 181(Suppl. 2): S322-S330.
- [4] Katayama K, Shirato-horikoshi H, Kojima S, *et al.* Phylogenetic analysis of the complete genome of 18 Norwalk-like viruses[J]. Virology, 2002, 299: 225-239.
- [5] Okada M, Shinozaki K, Ogawa T, *et al.* Molecular epidemiology and phylogenetic analysis of Sapporo-like viruses [J]. Arch Virol, 2002, 147: 1445-1451.
- [6] Lv H X(吕红霞). Molecular epidemiological study of HuCV among children with acute diarrhea in China [D]. Beijing: National Institute for Viral Disease Control and Prevention, China CDC (中国疾病预防控制中心病毒病预防控制研究所). 2003.
- [7] Jiang X, Wang M, Graham D Y, *et al.* Expression, self-assembly, and antigenicity of the Norwalk virus capsid protein [J]. J Virol, 1992, 66: 6527-6532.
- [8] Jamot B N, Ogier A, Piroth L, *et al.* Recombinant virus-like particles of a norovirus (genogroup II strain) administered intranasally and orally with mucosal adjuvants LT and LT(R192G) in BALB/c mice induce specific humoral and cellular Th1/Th2-like immune responses [J]. Vaccine, 2004, 22: 1079-1086.
- [9] Kazusa DNA Res. Inst. Codon Usage Database. <http://www.kazusa.or.jp/codon/>.
- [10] Fankhauser R L, Noel J S, Monroe S S, *et al.* Molecular epidemiology of "Norwalk-like virus" in outbreaks of gastroenteritis in the United States [J]. J. Infect. Dis, 1998, 178:1571-1578.
- [11] Ramakrishna L, Anand K K, Mohankumar K M, *et al.* Codon optimization of the tat antigen of human immunodeficiency virus type 1 generates strong immune responses in mice following genetic immunization [J]. J Virol, 2004, 78(17):9174-9189.
- [12] Bernardi G. Codon usage and genome composition [J]. J Mol Evol, 1985, 22(4): 363-365.
- [13] Moore M J, Dorfman T, Li W, *et al.* Retroviruses Pseudotyped with the Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus Spike Protein Efficiently Infect Cells Expressing Angiotensin-Converting Enzyme 2 [J]. J Virol, 2004, 78 (19): 10628-10635.
- [14] Nagesha H S, Wang L F, Hyatt A D, *et al.* Self-assembly, antigenicity and immunogenicity of the rabbit haemorrhagic disease virus (Czechoslovakian strain V-351) capsid protein expressed in baculovirus [J]. Arch Virol, 1995, 140: 1095-1108.
- [15] Nagesha H S, Wang L F, Hyatt A D, *et al.* Virus-like particles of calicivirus as epitope carriers [J]. Arch Virol, 1999, 144: 2429-2439.