第 21 卷 2 期　　中 国 病 毒 学　　21（2）：148-152
2006 年 3 月　　VIROLOGICA SINICA　　March 2006

猪细小病毒 *vp*2 基因的表达和类病毒颗粒的构建*

司艳红，方明刚，王汉中**

（中国科学院武汉病毒研究所，分子病毒学重点实验室，湖北武汉，430071）

Expression of Porcine Parvovirus *vp2* Gene and Construction of Virus Like Particles

SI Yan-hong，FANG Ming-gang，WANG Han-zhong**

(Key laboratory of Molecular Virology, Wuhan Institute of Virology, Chinese Academy of Sciences, Wuhan 430071, China)

Abstract：In this study, the open reading frame of PPV *vp*2 was amplified by PCR, sequenced, cloned and expressed both in prokaryotic and insect cells. In *E. coli*, by using pET-32(a) expression vector, VP2 was expressed as a Trx-His-S Tag fusion protein with the size of 84 kDa and the protein was used to immunize rabbits for generating specific antibody. Moreover, *vp*2 gene was cloned into pFastBacDUAL and expressed in baculovirus/insect cell expression system: AcMNPV Bac-to-Bac system. SDS-PAGE and Western-blot analysis showed a single band with the size of 64 kDa. In Sf-21 cells, virus like particles could be observed under electron microscope.

Key words：*vp*2; PPV; expression; virus like particle

摘要：利用PCR方法从病毒基因组中获得了*vp*2 完整的编码区并经测序后克隆到原核表达载体pET-32(a) 上。在大肠杆菌中诱导表达了VP2与Trx-His-S Tag的融合蛋白，通过免疫家兔获得了高特异性的兔抗血清。另外，将*vp2*克隆到pFastBacDUAL载体上，利用昆虫表达系统，即AcMNPV的Bac-to-Bac系统对*vp2* 进行了表达，经SDS- PAGE和Western blot分析，表达产物为64kD，并且该蛋白能在昆虫细胞中形成类病毒颗粒。

关键词：*vp*2；猪细小病毒；表达；类病毒颗粒

中图分类号：S852. 65　　文献标识码：A　　文章编号：1003-5125(2006)02-0148-05

猪细小病毒(*Porcine parvovirus*, PPV)是猪繁殖障碍和胎儿畸形的主要病原之一，在世界范围内广泛的传播和流行，给养猪业带来了巨大的经济损失[1]。因此，它与猪伪狂犬病毒，猪圆环病毒一起成为猪病研究的热点之一[2,3]。同其它病毒病的防治一样，PPV 的防治也主要以免疫预防为主。目前用于猪细小病毒病的疫苗主要有弱毒活疫苗和灭活疫苗两种。

猪细小病毒基因组编码三种结构蛋白 VP1 、VP2 、VP3 。其中 VP2 是构成病毒粒子的主要衣壳蛋白,也是中和抗体作用的靶蛋白[4,5]。在 PPV 组织培养物中，完整病毒粒子与不含 DNA 的空衣壳病毒粒子同时存在[6]。Choi 等报道，PPV 空衣壳可影响病毒在传代细胞和猪体内的增殖[7]。本实验通过克隆完整的 vp2 基因，在大肠杆菌中成功表达全长的 VP2 蛋白，并制备兔抗血清；同时，利用苜蓿银蚊夜蛾多角体病毒(*Autographa California* nucleopolyhedrovirus，AcMNPV) Bac-to-Bac 表达系统在 Sf-21 细胞中表达完整 VP2 蛋白，并在 Sf-21 内观察到完整的细小病毒类病毒颗粒的存在，为进一步研究 PPV 的结构蛋白奠定基础，并为研制基因工程疫苗提供理论依据。

收稿日期：2005-08-25，修回日期：2005-10-18
* 基金项目：中国科学院二期创新项目资助,项目编号 KSCX2-SW-302。
作者简介：司艳红（1978-），女，河南藉，博士研究生，研究方向为动物病毒学。
** 通讯作者：王汉中（1956-），男，博士，研究员。Corresponding author. E-mail:wanghz@wh.iov.cn

© 1994-2006 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.cnki.net

1 材料与方法

1.1 实验材料

PCR 克隆载体 pGEM-T easy 购自 Promega 公司，大肠杆菌高效表达载体 pET-32 (a) 和菌株 BL21 为 Novagen 公司产品；转移载体 pFastBac DUAL 和 AcMNPV Bac-to-Bac 系统为 Invetrogen 公司产品；大肠杆菌 DH5α、DH10B 及 Sf -21 细胞由本室保存。限制性内切酶均购自 Takara 公司；碱性磷酸酶标记的羊抗兔 IgG 和 BCIP/NBT 显色试剂盒购自华美生物工程公司；Grace's 培养基和胎牛血清购自 GIBCO 公司；转染试剂 Lipofectin 购自 Invitrogen 公司。

1.2 *vp2* 基因的克隆

根据 GenBank 上所发表的中国株PPV VP2的序列（AY583318）设计*vp2* 的正向和反向引物：*vp*2-F：***GGATCC***ATGAGTGAAAATGTGGAAC AAC，vp2-R：***TCTAGA*** TTATT TACAGAGTTA TTTCTAGTA。把 PPV 感染的细胞培养的上清用超速离心的方法纯化PPV病毒粒子，并从中提取基因组DNA作为模板。PCR 产物克隆到 pGEM-T easy载体上获得质粒 pT-vp2，利用*Eco*R I 和 *Bam* H I酶切鉴定，并对克隆片段进行序列测定，确定基因序列的正确性。

利用 *Bam*H I 和 *Sal* I 双酶切将含有*vp2* 基因的质粒 pT-vp2 双酶切后回收vp2片段，克隆到 pET-32(a) 原核表达载体上获得质粒，然后将其转化到大肠杆菌 BL21 中，生长到OD_{600}＝0.6～0.8，加入 IPTG 至终浓度1 mmol/L, 37℃诱导培养4h后收集菌体，用1倍的冰冷的PBS 重悬并超声波破碎。菌体裂解液用低速离心(5000 g,5min)沉淀包涵体。包涵体用100 mmol/L的 Tris-HCL 洗涤两次后，用10%的 SDS-PAGE 分离蛋白组分。将 SDS-PAGE 胶上的目的蛋白切割下来，研磨后免疫兔子[8]以获得兔抗血清，并用 Western-blot 检测抗血清的特异性和效价。

用 *Bam*H I 和 *Not* I 酶切 pEGFP-N1 和 pFsat Bac DUAL，琼脂糖凝胶电泳后用胶回收试剂盒回收 *egfp* 基因和pFsatBac DUAL 片段，连接，转化 DH5α受体菌，经庆大霉素和氨苄青霉素双抗筛选，获得重组质粒 pFBG。用*Sma* I 和 *Xho* I 酶切pFBG，回收；同时用 *Bam*H I 酶切 pET-32(a) -vp_2,然后用 Klenow Fragment 补平，再用 *Xho* I 酶切，回收vp_2片段，与pFBG连接，转化DH5α，获得克隆 pFBG-vp2。

参考 AcMNPV Bac-to-Bac 系统操作手册，将 *egfp* 和*vp2* 转座到Acbacmid上。重组 Bacmid DNA 转染昆虫细胞采用Lipofectin方法，详见 Lipofectin 试剂说明书。细胞发生病变后，收集上清得到重组病毒 AcGvp2（图3）。

1.3 SDS-PAGE 及 Western-blot 检测

用终点稀释法测定重组病毒的滴度后，以5个 M.O.I 感染Sf-21细胞。25℃培养72h后，收集细胞，PBS 清洗3次，以两份相同的样品进行聚丙稀酰胺凝胶电泳，一份考马斯亮蓝染色，一份用于 Western-blot 检测。

1.4 电镜观察

取感染后72h的 Sf-21 细胞制作电镜超薄切片并用电子透射电镜观察。

2 结果

2.1 *vp2* 基因的克隆

从纯化的病毒粒子中提取DNA作为模板，用 vp2-F 和vp2-R作为上下游引物，经 PCR 扩增后，以琼脂糖凝胶电泳鉴定，发现在预计的1.8kb 处有一阳性带。回收该带连接到 pGEM-T easy 上，得到质粒 pT-vp2。用*Eco*R I 和 *Bam*H I酶切鉴定表明PCR 产物已正确连接到载体上(图1)。插入片段的测序结果表明全长的 *vp2* 基因已被正确克隆。

从 pEGFP-N1 质粒上用 *Bam*H I 和 *Not* I 消化后的 *egfp* 片段以及从 pET-32(a)-vp2 上经 *Bam* H I 和 *Xho* I 消化、Klenow fragment 处理的 *vp2* 片段，克隆到 pFast Bac DUAL 上，经酶切鉴定正确（图4）。转移质粒命名为 pFBGvp2。

将重组转移质粒 pFBGvp2 转化含有AcBac mid 及 helper 质粒的 DH10B 大肠杆菌中，在含有 IPTG/X-gal 以及 Kan、Gen、Tet 抗生素的 LB 固体平板中筛选白色阳性菌落。阳性菌落用 mini-attTn7 位点外的 M13 上下游引物进行 PCR 鉴定。PCR 产物理论值为5kb，包括引物之间的 mini-attTn7 位点、转座上去的 pFastBac DUAL 自身片段以及 *vp*2 基因和 *egfp* 基因。PCR鉴定结果表明目的基因已经正确转座到 AcBacmid 上（图5），重组 Bacmid 命名为 AcGvp2。

2.2 VP2 蛋白在原核细胞中的表达以及特异性抗体的制备

vp2 基因克隆到载体 pET-32(a) 得到表达载体 pET-32(a)-vp2，经 *Bam*H I + *Sal* I 酶切鉴定正确(图1)。

© 1994-2006 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

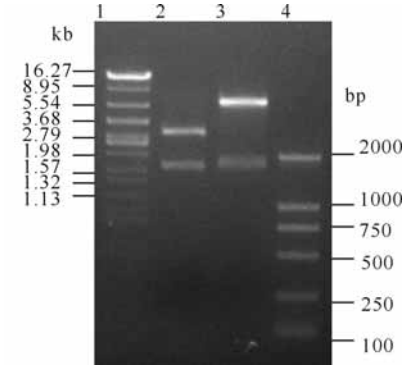

图1 *vp2* 基因克隆结果

Fig.1 Indentification of cloning of vp2 gene

1, λDNA/*Eco*R I+*Bam*H I+*Hin*d III; 2, pT-vp$_2$ digested by *Bam*H I and *Xba* I; 3, pET-32(a)-vp2 digested by *Bam*H I and *Sal* I; 4, DL2000 Marker.

含 pET-32(a)-vp2 的大肠杆菌 BL21 诱导表达后，菌体裂解液经 SDS-PAGE 分析。结果显示经诱导的菌体在 84kDa 左右的位置出现一条表达带(图2)，分子量与理论计算值相符，而没有诱导的菌体在此位置的表达带不明显；用抗 His-tag 的抗体进行Western检测，在84kDa处有一条特异性带。

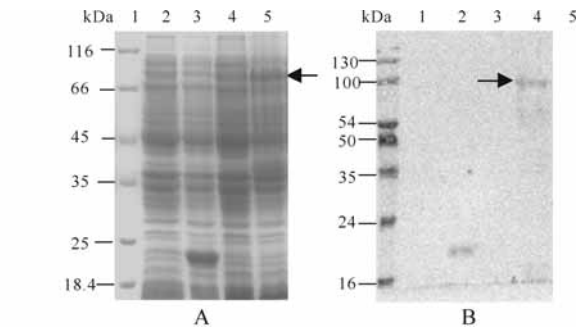

图2 pET-32(a)-vp2 在原核细胞中的诱导表达(A)和 Western 检测(B)

Fig.2 Induced expression of pET-32(a)-vp2 in prokaryotic cell(A) and Western analysis(B)

1,protein marker; 2,uninduced BL21/pET-32(a); 3, induced BL21/pET-32(a); 4,uninduced BL21/pET-32(a)-vp2; 5, induced BL21/pET-32 (a)-vp2. The antibody is anti-His-tag.

将 84kDa 的表达产物经包涵体纯化后免疫家兔获得抗血清。Western-blot 分析，发现所得的抗体能与pET-32(a) -vp2 表达的用于免疫的蛋白发生特异性反应。

AcGvp$_2$ DNA 转染 Sf-21 细胞，25℃培养6h后，在荧光显微镜下可以观察到部分细胞出现荧光且发生病变，如细胞生长缓慢或停滞，变圆，细胞核膨大等，取培养基上清感染新鲜的 sf-21 细胞，2-3h后细胞出现同样的症状，表明转染成功并获得了重组病毒（图6）。

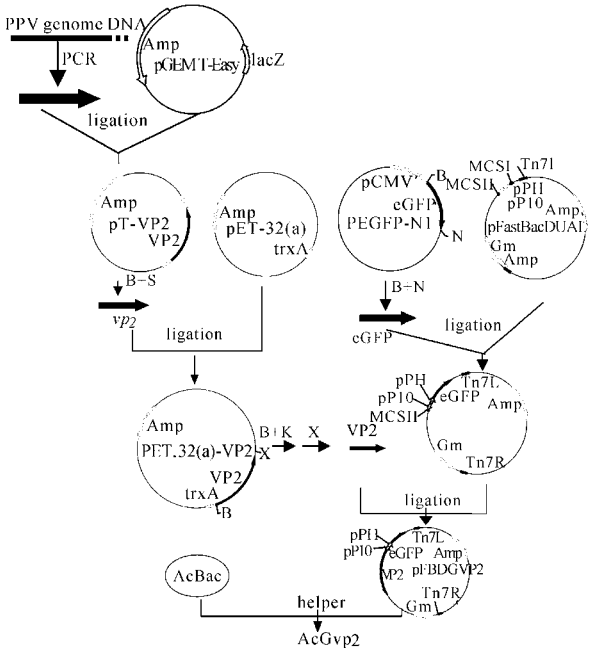

图3 *vp2*基因的克隆

Fig. 3 Cloning of *vp2* gene

B, *Bam*H I; N, *Not* I; K, Klenow fragment; X, *Xho* I; S,*Sal* I; MCS, multiple cloning sites

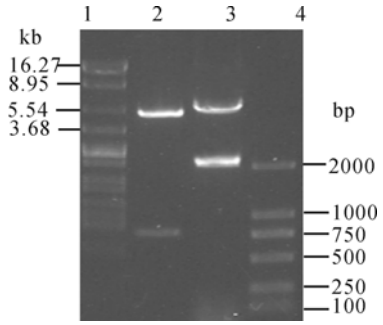

图4 pFBG和pFBGvp2的酶切鉴定

Fig. 4 Identification of pFBG and pFBGvp2

1. λDNA/*Eco*R I+*Bam*H I+*Hin*d III; 2. pFBG digested by *Bam*H I and *Not* I; 3. pFBGvp2 digested by *Bam*H I and *Xho* I; 4. DL2000 Marker.

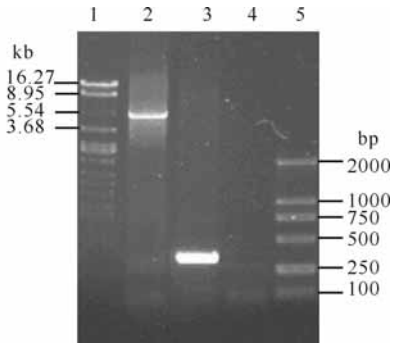

图5 AcGvp2 的 PCR鉴定结果

Fig. 5 PCR detection of AcGvp2

1. λDNA/*Eco*R I+*Bam*H I+*Hin*d III；2. PCR result of AcGvp2；3. PCR result of AcBacmid；4. negative control；5. DL2000 Marker

© 1994-2006 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

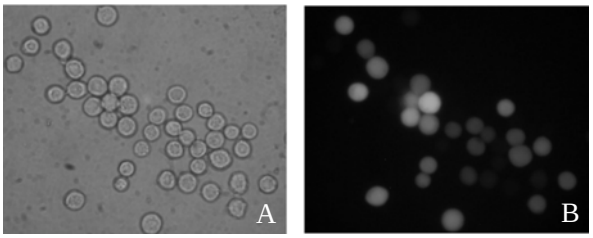

图6 转染后 Sf-21 细胞的显微图片

Fig. 6 Micrograph of *sf*-21 tansfected

A: Sf-21 transfected exposed to visible light; B: sf-21 transfected exposed to ultraviolet light.

2.3 *vp2* 基因在昆虫细胞中的表达

分别用重组病毒 AcGvp2 和病毒 AcBacmid 感染 Sf-21 细胞，于72h收集细胞进行SDS-PAGE分析。蛋白质电泳结果显示，在重组病毒 AcGvp2 感染的Sf-21 细胞中具有一条分子量为64kDa 的蛋白带。经 Western-blot 鉴定，这种蛋白能与兔抗 84 kDa VP2 抗血清发生反应（图7）。

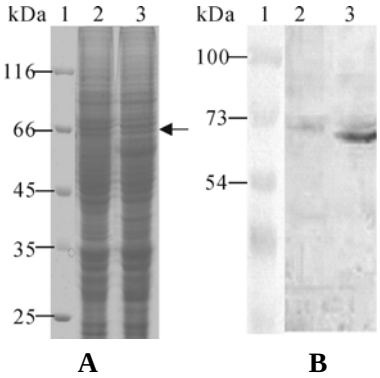

图7 VP_2 在 *sf*-21 细胞中的表达分析

Fig. 7 Analysis of expression product of VP_2 gene in sf-21

A and B are SDS-PAGE and Western-blot of Sf-21 infected by AcBacmid and AcGvp2. 1. protein marker; 2. Sf-21 infected by AcBacmid; 3. Sf-21 infected by $AcGvp_2$

取 $AcGvp_2$ 感染72h的细胞制备电镜超薄切片样品进行电镜观察。发现在细胞中有一些聚集在一起的直径在20～30nm的球形颗粒，该颗粒的形态大小均与PPV的全病毒粒子相近，就是由VP2蛋白形成的PPV的病毒样粒子（VLP）（图8）。

3 讨论

我们在原核细胞中成功地表达了猪细小病毒的 VP2 蛋白，这与赵俊龙等报道的*vp2* 基因的3’端的结构使该基因的全长的表达受到影响[9]有一定的差异，这说明影响外源基因在大肠杆菌中的表达的因素，除了基因本身的特性，如二级结构，5’端和3’端的稳定性，密码子的偏爱性等，表达载体和宿主菌的选择也有很重要的影响。

杆状病毒的 Bac-to-Bac 表达系统作为一种非常成熟的商品化的真核表达系统，具有与动物细胞类似的转录、翻译及翻译后加工等功能，广泛的用于外源蛋白的表达，而且其表达产物基本保持原有的生物学活性，利用该系统表达的某些病毒的结构蛋白还可以形成病毒样粒子[10,11]。本研究证实，体外表达的猪细小病毒 VP2 蛋白也能自行装配成病毒样粒子，电镜下呈球形颗粒，直径20～30nm，形状大小与全病毒粒子相似。利用原核表达的 VP2 蛋白制得的兔抗血清进行 Western blot 检测，也能得到特异性的 VP2 蛋白带。Martinez 等证实，体外表达的猪细小病毒 VP2 蛋白具有良好的免疫原性，免疫动物后可诱导产生保护性免疫反应，与商品化疫苗的免疫效果相同[5]。

在昆虫细胞中成功表达VP2蛋白并形成病毒样粒子，为研制猪细小病毒的基因工程疫苗奠定了基础。在当前应用较多的弱毒疫苗和灭活疫苗中，存在不同程度的缺陷和不足，如弱毒疫苗发生重组及毒力反强的潜在威胁，以及灭活疫苗免疫效果不稳定等。因此寻找和发展更为安全有效的疫苗一直是猪细小病毒病免疫预防研究的主题。细小病毒的*vp2* 基因可以独立地或者形成杂合的[12]类病毒粒子并引起宿主产生免疫应答，说明VP2蛋白产生的类病毒粒子具有良好的免疫原性，而且作为一种抗原的转运载体具有很大的潜在价值，为进行多价重组疫苗的研究创造了良好的条件。

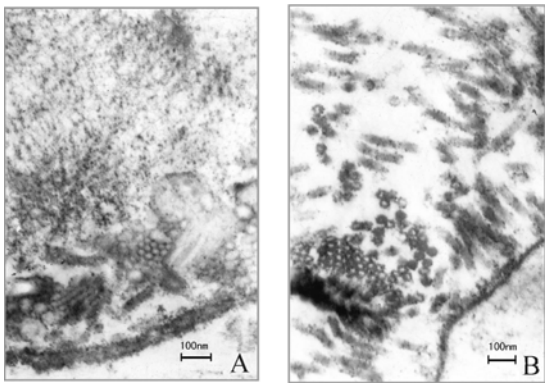

图 8 细胞中形成的病毒样粒子

Fig. 8 VLPs in Sf-21 cells. A and B are portion of different cells.

References

[1] Yin Z, Liu J H (殷 震, 刘景华). Animal Virology (动物病毒学) [M]. 2nd ed, Beijing: Science Press, 1997.

[2] Cao S, Chen H, Zhao J, *et al*. Detection of porcine circovirus type 2, porcine parvovirus and porcine pseudorabies virus from pigs with postweaning multisystemic wasting syndrome by multiplex PCR [J].

© 1994-2006 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

Vet Res Commun, 2005, 29 (3): 263-269.

[3] Huang C, Hung J J, Wu C Y, *et al*. Multiplex PCR for rapid detection of pseudorabies virus, porcine parvovirus and porcine circoviruses [J]. Vet Microbiol, 2004，101 (3) : 209-214.

[4] Kamstrup S, Langeveld J, Botner A. *et al*. Mapping the antigenic structure of porcine parvovirus at the level of peptides [J]. Virus Res, 1998，53:163-73.

[5] Martinez C, Dalsgaard K, Lopez de Turiso J A, *et al*. Production of porcine parvovirus empty capsids with high immunogenic activity [J]. Vaccine 1992，10: 684-690.

[6] Molitor T , Joo H , Collett M, *et al*. Porcine Parvovirus: Virus purification and Structural and Antigentic properties of Virion Polypeptides [J]. J Virol, 1983, 45 : 842-854.

[7] Choi C , Molitor T, Joo H, *et al*. Inhibition of Porcine Parvovirus replication by Empty Virus Particles [J]. Arch Virol , 1987, 96: 75-87.

[8] Ausubel F M, Kingston R E, Seidman J G, *et al* /translated by Ma X J (马学军), Short Protocols in Molecular Biology (精编分子生物学实验指南) [M]. 4th ed, BeiJing : Science Press, 2004.

[9] Zhao J L, Chen H C, Lv J Q, (赵俊龙，陈焕春，吕建强) *et al*. Study on Clone, Sequence Analysis and Expression of Porcine Parvovirus VP_2 Gene [J]. Acta Veterinaria et Zootechnica Sinica (畜牧兽医学报)，2003，34 (2): 195-198

[10] Li T C, Yamakawa Y, Suzuki K, *et al*. Expression and self-assem bly of empty virus-like particles of hepatitis E virus [J]. J Virol, 1997, 71 (10): 7207-7213

[11] Baumert TF, Vergalla J, Satoi J, *et al*. Hepatitis C virus-like particles synthesized in insect cells as a potential vaccine candidate [J]. Gastroenterology, 1999, 117: 1397-1407.

[12] Sedlik C , Dadaglio G, Saron M, *et al* . In Vivo Induction of a High-Avidity, High-Frequency Cytotoxic T-Lymphocyte Response Is Associated with Antiviral Protective Immunity [J]. J Virol, 2000, 74 (13) : 5769-5775.

© 1994-2006 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net