

doi: 10.3969/j.issn.1008-0589.2013.01.11

猪圆环病毒 2 型 Cap 蛋白与猪 O 型口蹄疫病毒 VP1 蛋白 在杆状病毒中共表达及鉴定

王一平, 郭龙军, 唐青海, 刘 丹, 危艳武, 李胜斌, 刘建波, 黄立平, 吴洪丽, 刘长明*

(中国农业科学院哈尔滨兽医研究所 兽医生物技术国家重点实验室 / 猪传染病研究室, 黑龙江 哈尔滨 150001)

摘 要: 为在真核细胞中共表达猪圆环病毒 2 型(PCV2) Cap 蛋白与猪 O 型口蹄疫病毒(FMDV) VP1 蛋白, 本研究将其各自编码基因克隆于杆状病毒双表达载体(pFastBac™ Dual)中构建重组转移质粒(pFBD-Cap-VP1), 转化至 DH10Bac™ 感受态细胞中制备重组杆粒(rBacmid-Cap-VP1), 并转染 Sf21 昆虫细胞, 拯救出能够共表达 PCV2-Cap 和 FMDV-VP1 蛋白的重组杆状病毒(rBac-Cap-VP1)。SDS-PAGE 和 western blot 检测结果表明, 共表达的重组 PCV2-Cap 和 FMDV-VP1 蛋白产物的分子量分别为 28 ku 和 30 ku, 各占总蛋白含量的 11.6 %和 3.4 %, 能够分别与 PCV2 和 FMDV 抗体发生特异性反应, 表明共表达蛋白具有良好的反应原性。本研究为 PCV2 和 FMDV 基因工程二联亚单位疫苗的研制奠定了基础。

关键词: 猪圆环病毒 2 型; 猪 O 型口蹄疫病毒; Cap 蛋白; VP1 蛋白; 共表达

中图分类号: S852.65

文献标识码: A

文章编号: 1008-0589(2013)01-0044-04

Co-expression and identification of porcine circovirus type 2 capsid protein and foot and mouth disease virus serotype O VP1 protein using baculovirus system

WANG Yi-ping, GUO Long-jun, TANG Qing-hai, LIU Dan, WEI Yan-wu, LI Sheng-bin, LIU Jian-bo,
HUANG Li-ping, WU Hong-li, LIU Chang-ming*

(Division of Swine Infectious Diseases, State Key Laboratory of Veterinary Biotechnology, Harbin Veterinary Research Institute,
Chinese Academy of Agricultural Sciences, Harbin 150001, China)

Abstract: To co-express porcine circovirus type 2 (PCV2) capsid (Cap) protein and foot and mouth disease virus (FMDV) serotype O VP1 protein using baculovirus system, the genes of PCV2-Cap and FMDV-VP1 proteins were cloned into the dual expression vector (pFastBac™ Dual) and transformed into DH10Bac™ competent cells to construct recombinant bacmid of rBacmid-Cap-VP1. The recombinant baculovirus rBac-Cap-VP1 co-expressing PCV2-Cap and FMDV-VP1 was generated by transfection with rBacmid-Cap-VP1 into Sf21 cells. SDS-PAGE and western blot analysis showed that the co-expressed PCV2-Cap and FMDV-VP1 proteins were about 28 ku and 30 ku, and accounting for 11.6% and 3.4% in total proteins, respectively, which were able to react positively with either PCV2 or FMDV specific antibodies, indicating that they had good immunoreactivity. This study provides the basis for the development of bivalent subunit vaccines for control of both PCV2 and FMDV infections.

Key words: porcine circovirus type 2; foot and mouth disease virus; PCV2-Cap; FMDV-VP1; co-expression

*Corresponding author

收稿日期: 2012-03-12

基金项目: 国家 863 计划(2011AA10A208); 公益性行业(农业)专项(201203039); 国家自然科学基金(31101837)

作者简介: 王一平(1987-), 男, 四川芦山人, 硕士研究生, 主要从事动物病毒学研究。

* 通信作者: E-mail: lcm@hvri.ac.cn

猪圆环病毒2型(Porcine circovirus type 2, PCV2)是引起断奶仔猪多系统衰竭综合征(PMWS)的主要病原,为单股环状DNA病毒,直径为17 nm,基因组约1.7 kb^[1-2]。PCV2含有两个主要的开放阅读框(ORFs),其中ORF1编码与病毒复制相关的蛋白Rep和Rep^[3],ORF2编码病毒的结构蛋白Cap^[4]。PCV2-Cap蛋白是病毒的主要免疫保护性抗原,能够诱导机体产生特异性免疫应答,是研制基因工程亚单位疫苗的理想靶抗原^[5]。口蹄疫病毒(Foot and mouth disease virus, FMDV)是感染偶蹄目动物的重要病原,为单股线状RNA病毒,直径为20 nm~25 nm,基因组约8.5 kb^[6-7]。FMDV衣壳蛋白由VP1、VP2、VP3和VP4 4种结构蛋白各60个分子组成,其中VP1蛋白包含病毒的主要抗原位点,为病毒的主要免疫原性蛋白,能够诱导机体产生中和抗体^[8-9]。

研究表明,利用重组蛋白研制的亚单位疫苗对PCV2和FMDV感染具有良好的免疫效果,因此研制同时预防这两种病毒性疫病的二联亚单位疫苗具有重要意义。本研究采用杆状病毒双表达系统,共表达PCV2-Cap和FMDV-VP1蛋白,为进一步研制PCV2与FMDV二联亚单位疫苗奠定基础。

1 材料和方法

1.1 质粒、菌株、细胞和主要试剂 转移载体pFastBac™ Dual、转染试剂Cellfectin® Reagent、*E.coli* DH10Bac™感受态细胞和昆虫细胞株(Sf21)均购自Invitrogen公司;Grace's昆虫细胞培养基购自GIBCO公司;高保真酶KOD-Plus-Neo购自TOYOBO公司;辣根过氧化物酶标记的葡萄球菌A蛋白(HRP-SPA)购自Zymed公司;DAB显色试剂盒购自北京中杉金桥生物科技有限公司;PCV2重组质粒pMD18-PCV2a/CL和O型FMDV-VP1基因重组质粒pMD18-VP1均由本实验室构建并保存;PCV2和FMDV阳性血清由本研究所相关实验室提供。

1.2 引物设计与目的基因扩增 根据pMD18-PCV2a/CL基因序列设计引物,P1-F:5'-ACGCGTCGACACCATGGCGTATCCAAGGAGGCGTTTC-3'(*Sal*);P1-R:5'-AAAACTGCAGTCAATGGTGATGGTGATGATGGGGTTTAAGTGGGGGGTCTTT-3'(*Pst*)。根据pMD18-VP1基因序列设计引物,P2-F:5'-CCGCTCGAGACCATGGCCACTTCGACAGGCGAGTCG-3'

(*Xho*);P2-F:5'-ACATGCATGCTCAATGGTGATGGTGATGATGTAAGGACTGCTTTACAGGTGCCACT-3'(*Sph*)。P1-F和P2-F中5'-ACCATGG-3'为“Kozak”序列。引物由北京六合华大基因科技股份有限公司合成。采用高保真酶扩增PCV2-Cap和FMDV-VP1基因,PCR反应程序为:94℃ 5 min;94℃ 30 s、62℃ 30 s、68℃ 45 s,35个循环;68℃ 7 min。

1.3 重组转移载体的构建及鉴定 将PCV2-Cap和FMDV-VP1基因分别克隆至pFastBac™ Dual P_{PH}和P_{P10}启动子下游多克隆位点MCS和MCS处,构建单表达PCV2-Cap和FMDV-VP1蛋白的重组转移载体pFBD-PCV2-Cap和pFBD-FMDV-VP1。将FMDV-VP1基因克隆至pFBD-PCV2-Cap P_{P10}启动子MCS处,构建共表达PCV2-Cap与FMDV-VP1蛋白的重组转移载体pFBD-Cap-VP1。经PCR、双酶切及测序鉴定。

1.4 重组杆粒的构建及鉴定 将pFBD-PCV2-Cap、pFBD-FMDV-VP1和pFBD-Cap-VP1分别转化DH10Bac™感受态细胞,在含有X-gal和IPTG的三抗平板(含卡那霉素、庆大霉素和四环素)上进行两轮蓝白斑落筛选,构建重组杆粒rBacmid-PCV2-Cap、rBacmid-FMDV-VP1和rBacmid-Cap-VP1。根据操作手册中介绍的方法提取重组杆粒,以M13通用引物进行PCR鉴定。

1.5 重组杆状病毒的制备 参照转染试剂说明书,将rBacmid-PCV2-Cap、rBacmid-FMDV-VP1和rBacmid-Cap-VP1分别转染对数生长期的Sf21细胞,培养至出现细胞病变(CPE),收获上清,即为P1代重组杆状病毒(rBac-PCV2-Cap、rBac-FMDV-VP1和rBac-Cap-VP1),传代增殖。

1.6 重组蛋白的表达及鉴定 取P3代重组杆状病毒感染Sf21细胞,27℃培养72 h~96 h后收获细胞培养物,经SDS-PAGE电泳,薄层扫描测定重组蛋白含量。采用western blot试验检测重组蛋白的反应原性:一抗为PCV2阳性血清(1:100)和/或FMDV阳性血清(1:200),二抗为HRP-SPA(1:4 000),DAB显色。

2 结果

2.1 目的基因的PCR扩增 PCR扩增产物经1%

琼脂糖凝胶电泳检测, PCV2-Cap 与 FMDV-VP1 基因分别在预期位置出现特异性片段, 表明目的基因扩增正确(图 1)。

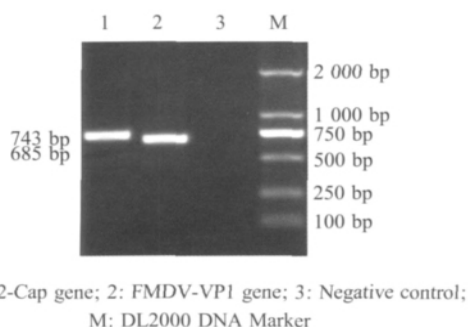
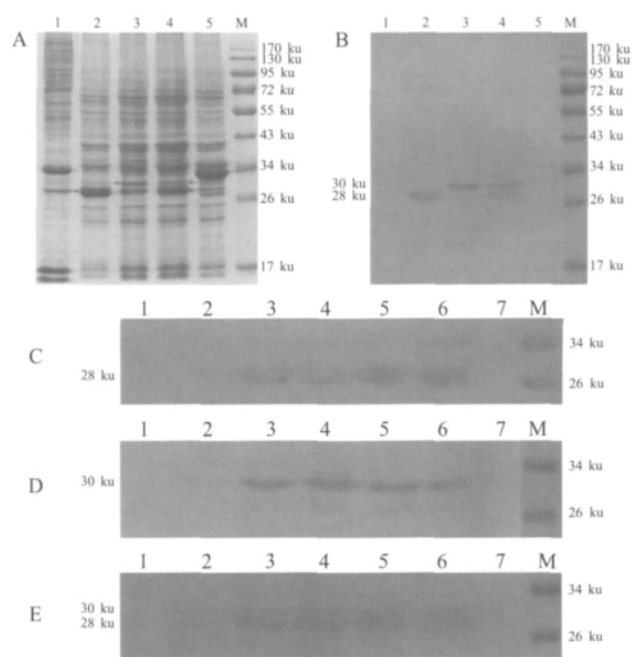


图 1 PCV2-Cap 与 FMDV-VP1 基因的 PCR 扩增
Fig.1 Amplification of PCV2-Cap and FMDV-VP1 genes by PCR

2.2 重组转移载体的鉴定 pFBD-PCV2-Cap 和 pFBD-Cap-VP1 经 PCR 扩增获得 743 bp 片段, pFBD-FMDV-VP1 和 pFBD-Cap-VP1 经 PCR 扩增获得 685 bp 片段, 分别与 PCV2-Cap 和 FMDV-VP1 基因片段大小相符。经双酶切分析, 3 种重组质粒在预期位置均出现特异性条带, 并且测序结果与预期相符, 表明这 3 种重组转移载体构建正确。

2.3 重组杆粒的 PCR 鉴定 采用 M13 正反向通用引物分别对空杆粒和 3 种重组杆粒进行 PCR 扩增, 空杆粒扩增部位为 mini-attTn7 元件, 扩增片段大小约为 300 bp, 重组杆粒扩增部位为 Tn7R、Tn7L 元件和目的基因, rBacmid-PCV2-Cap、rBacmid-FMDV-VP1 及 rBacmid-Cap-VP1 扩增片段大小分别约为 3 300 bp、3 200 bp 和 4 000 bp, 与预期片段大小 (3 293 bp、3 236 bp 和 3 969 bp) 一致, 表明这 3 种重组杆粒构建正确。

2.4 重组蛋白表达的鉴定 SDS-PAGE 和 western blot 检测结果表明, 单表达的重组 PCV2-Cap 蛋白产物在 28 ku 处出现特异性条带, 占总蛋白含量的 24.6%, 可以与 PCV2 抗体发生特异性反应(图 2A、B 和 C); 单表达的重组 FMDV-VP1 蛋白产物在 30 ku 处出现特异性条带, 占总蛋白含量的 5.6%, 可以与 FMDV 抗体产生特异性反应(图 2A、B 和 D); 共表达的重组 PCV2-Cap 与 FMDV-VP1 蛋白产物分别在 28 ku 和 30 ku 处出现两条特异性条带, 但蛋白表达量有所下降, 分别占总蛋白含量的 11.6% 和 3.4%, 与 PCV2 和 FMDV 抗体均能够发生特异性反应(图 2A、B 和 E)。



A, B 1: Normal Sf21 cells; 2: PCV2-Cap protein; 3: FMDV-VP1 protein; 4: Co-expressed proteins of PCV2-Cap and FMDV-VP1 proteins; 5: Wild-type baculovirus; M: Protein Marker;
C, D, E 1: Normal Sf21 cells; 2-6: PCV2-Cap protein, FMDV-VP1 protein and co-expressed proteins of PCV2-Cap and FMDV-VP1 proteins harvested at different times, respectively; 7: Wild-type baculovirus; M: Protein Marker

图 2 PCV2-Cap 与 FMDV-VP1 蛋白在昆虫细胞中单表达及两者共表达的 SDS-PAGE 和 western blot 鉴定

Fig.2 Identification of expression of PCV2-Cap, FMDV-VP1 proteins and their co-expression in the insect cells by SDS-PAGE and western blot

3 讨论

本研究选用的杆状病毒双表达转移载体 pFast-Bac™ Dual 包含两个启动子, 即 PPH 和 PP10 启动子, 它们均为晚期基因增强型启动子, 可以同时高效表达两个外源基因, 共表达产物中的两种蛋白均保持各自独立的生物活性^[10-11]。为提高 PCV2-Cap 和 FMDV-VP1 这 2 种外源蛋白的表达效率, 本实验在设计引物时引入 Kozak 序列^[12], 以期获得高产的共表达产物。本研究中 2 种外源基因的表达效率存在差异, 根据其各自占总蛋白的比例显示, 无论单表达或是共表达, PCV2-Cap 蛋白的表达效率均显著高于 FMDV-VP1 蛋白, 这与两种蛋白编码基因序列自身性质密切相关, 但具体原因有待进一步研究。

PCV2-Cap 蛋白是 PCV2 的主要免疫保护性抗原, 能够诱导机体产生中和抗体, 为研制 PCV2 亚

单位疫苗的理想靶抗原^[5]。FMDV-VP1 蛋白是 FMDV 的主要免疫保护性抗原, 能够诱导机体产生中和抗体, 为研制 FMDV 亚单位疫苗的理想靶抗原^[9]。目前, 防控 PCV2 和 FMDV 的感染和传播主要采用灭活疫苗, 研究表明, 采用重组蛋白亚单位疫苗可以有效预防这 2 种病毒性疾病, 研制同时预防这 2 种疾病的二联亚单位疫苗具有重要应用价值。本研究采用杆状病毒双表达系统, 共表达 PCV2-Cap 与 FMDV-VP1 蛋白, 并证明共表达产物具有良好的反应原性, 已基本满足作为研制亚单位疫苗的条件。下一步工作将利用单表达的重组 PCV2-Cap 蛋白、FMDV-VP1 蛋白, 以及两者共表达产物制备几种不同形式的亚单位疫苗, 开展猪体免疫攻毒试验, 对其免疫原性进行评价, 为 PCV2 与 FMDV 二联亚单位疫苗的研发奠定基础。

参考文献:

- [1] Allan G M, Ellis J A. Porcine circoviruses: a review [J]. Vet Diagn Invest, 2000, 12(1): 3-14.
- [2] Tischer I, Gelderblom H, Vettermann W, et al. A very small porcine virus with circular single-stranded DNA [J]. Nature, 1982, 295: 64-66.
- [3] Cheung A K. Transcriptional analysis of porcine circovirus type 2 [J]. Virology, 2003, 305(1): 168-180.
- [4] Nawagitgul P, Morozov I, Bolin S R, et al. Open reading frame 2 of porcine circovirus type 2 encodes a major capsid protein [J]. J Gen Virol, 2000, 81(9): 2281-2287.
- [5] Blanchard P, Mahe D, Cariolet R, et al. Protection of swine against post-weaning multi-systemic wasting syndrome (PMWS) by porcine circovirus type 2 (PCV2) proteins [J]. Vaccine, 2003, 21(31): 4565-4575.
- [6] Grubman M J, Baxt B. Foot-and-mouth disease [J]. Clin Microbial Rev, 2004, 17(2): 465-493.
- [7] Domingo E, Baranowski E, Escarmis C, et al. Foot-and-mouth disease virus [J]. Comp Immunol Microbiol Infect Dis, 2002, 25 (5-6): 297-308.
- [8] Doel T R, Collen T. Qualitative assessment of 146S particles of FMDV in preparations destined for vaccines [J]. J Biol Stand, 1982, 10(2): 69-81.
- [9] Wang Jia-long, Liu Ming-qiu, Han Ji, et al. A peptide of foot-and-mouth disease virus serotype Asia 1 generating a neutralizing antibody response, and an immunostimulatory peptide [J]. Vet Microbiol, 2007, 125(3-4): 224-231.
- [10] Weyer U, Possee R D. A baculovirus dual expression vector derived from the Autographa californica nuclear polyhedrosis virus polyhedron and p10 promoters: co-expression of two influenza virus genes in insect cells [J]. J Gen Virol, 1991, 72 (12): 2967-2974.
- [11] Gatehouse L N, Markwick N P, Poulton J, et al. Expression of two heterologous proteins depends on the mode of expression: comparison of *in vivo* and *in vitro* methods [J]. Bioproc Biosyst Eng, 2008, 31(5): 469-475.
- [12] Kozak M. Compilation and analysis of sequences upstream from the translational start site in eukaryotic mRNAs [J]. Nucleic Acids Res, 1984, 12(2): 857-872.

(本文编辑: 张朝霞)