

传染性法氏囊病病毒多聚蛋白基因在家蚕中的表达

卢觅佳¹ 李建荣¹ 王莹飞² 金勇丰² 于涟^{1*}

(¹ 浙江大学动物预防医学研究所, ² 浙江大学生物化学研究所 杭州, 310029)

摘 要 将传染性法氏囊病病毒(IBDV)细胞致弱株(JD1 株)的基因组 A 节段基因重组于家蚕杆状病毒转移载体 pAcHLT-C 中, 获得的重组转移载体 pAcHLT-C-A 与线性化病毒 Bm-BacPAK6 DNA 共转染家蚕培养细胞, 获得重组病毒 BacPAK-A。DIG 标记的 DNA 点杂交证实重组病毒基因组中含有 A 节段基因, 重组病毒感染家蚕 5 龄幼虫进行表达, ELISA 和 Western blotting 等结果表明多聚蛋白基因在蚕体内得到了表达, 表达产物具有免疫反应性, 表达量在感染后 5~6 d 达到最高。家蚕生物反应器表达 IBDV 多聚蛋白具有我国的资源优势, 为今后研制低成本、实用化的 IBDV 基因工程疫苗打下基础。

关键词 传染性法氏囊病病毒(IBDV) 多聚蛋白(VP2/VP4/VP3) 家蚕杆状病毒载体 家蚕表达

中图分类号 S858.31 S852.65+95 文献标识码 A 文章编号 1000-3061(2002)04-0472-05

鸡传染性法氏囊病(IBD)是由传染性法氏囊病病毒(IBDV)引起的急性、高度接触性传染病。IBDV 主要侵害雏鸡的中枢免疫器官法氏囊中带有 SmIg 标记的 B 淋巴细胞, 最终导致免疫抑制, 病鸡常死于继发感染, 并导致对其它疫苗的免疫接种失败。

IBDV 属双股双节段 RNA 病毒, 基因组由一大一小的 A 节段和 B 节段组成, 前者含两个部分重叠的开放框(ORF): ORFA2 编码与病毒的致病性相关的 VP5 蛋白, ORFA1 则按 NH₂-VP2-VP3-VP4-COOH 的顺序编码一个多聚蛋白前体, 再由 VP4 蛋白剪切成 3 个独立的蛋白 VP2、VP3 和 VP4。VP2 既是外衣壳蛋白, 又是主要的宿主保护性抗原^[1], 其上至少有 2 个中和性抗原表位; VP3 是病毒的内衣壳蛋白, 涉及启动病毒的粘附过程(Reddy 等, 1992), 其上只有血清型特异性的抗原表位而无中和性抗原表位。VP2 的高变区被认为是病毒中和性单抗的结合必需区^[2], 该区的点突变是 IBDV 抗原漂移、毒力变异并进而造成经典疫苗免疫失败的主要原因^[3,4]。大肠杆菌^[5]、酵母^[6,7]、重组痘苗病毒^[8]、重组昆虫杆状病毒^[9]等表达系统中表达的 VP2 蛋白具有一定的免疫原性, 但其中有的不能产生中和性抗体, 有的则不能兼顾高保护力和囊损伤问题。近年来 A 片段编

码的多聚蛋白受到了广泛的关注, 体外表达的多聚蛋白可在宿主细胞内形成类似于病毒粒子的空衣壳(病毒样颗粒 VLPs)^[10,11], 这些类病毒颗粒能被抗 IBDV 抗体识别, 但当时没有进一步测定 VLPs 的免疫原性。国外已有的报道几乎都是用苜蓿银纹夜蛾核型多角体病毒-秋粘虫(AcMNPV-Sf)表达系统来进行表达的, 但宿主秋粘虫虫体微小, 接种困难且费用高, 不利于大规模推广应用。本研究以我国的特色资源-家蚕作为生物反应器表达了 IBDV 的细胞致弱株(JD1)^[12]的多聚蛋白。

1 材料与方 法

1.1 质粒、菌株、病毒株与细胞株

IBDV-JD1 株 A 节段基因(pCl-A)由本所保存, 杆状病毒载体 pAcHLT-C 和家蚕核型多角体病毒(Bm-BacPAK6)由中科院上海生化所吴祥甫教授惠赠, BmN 细胞由浙江大学生物化学研究所保存, *E. coli* DH5 α 菌株由本实验室保存。

1.2 试剂

各种限制酶及 T4 DNA 连接酶, Taq plus 酶均购自 TaKaRa 公司, 普通凝胶回收试剂盒与质粒抽提试剂盒购自上海生工公司; Dospers 脂质体和 DIG-High

收稿日期 2002-01-07, 修回日期 2002-04-15。

基金项目 浙江省科技厅重点项目资助(No. 001102270)。

* 通讯作者。 Tel 86-571-86971092; E-mail yulian@zju.edu.cn

Prime Kit 试剂盒购自宝灵曼公司;昆虫细胞培养基 TC-100、胎牛血清等均购自 GIBCO BRL 公司;IBDV 抗血清由本所保存,辣根过氧化物酶标记的兔抗鸡 IgG 购自 Promega 公司。

1.3 重组表达载体 pAcHLT-C-A 的构建

含有 IBDV 基因组 A 片段的重组质粒 pCI^A 在 A 片段的 5'端与 3'端各有 *EcoR* I 和 *Kpn* I 酶切位点, *EcoR* I / *Kpn* I 双酶切 pCI^A 后,用低熔点胶分离回收 3.2kb 的 A 片段基因。载体质粒 pAcHLT-C 的多克隆位点内有 *EcoR* I 和 *Kpn* I 酶切位点,将其 *EcoR* I / *Kpn* I 双酶切后用酚-氯仿回收。将 A 片段定向克隆到 pAcHLT-C 中,具体方法和操作参见分子克隆实验手册^[13]。重组质粒进行酶切鉴定和 PCR 鉴定,并以载体 pAcHLT-C 作阴性对照。

1.4 重组载体与线性 Bm-BacPAK6 DNA 共转染家蚕细胞,并筛选重组病毒

BmN 细胞在含有 10% 胎牛血清的 1 × TC-100 培养基中 27 °C 培养。

按分子克隆实验手册上的方法进行^[13],提取野生型 Bm-BacPAK6 DNA,并用 *Aoc* I 将其线性化。线性化的 Bm-BacPAK6 DNA 与重组载体 pAcHLT-C-A DNA 在脂质体的介导下共转染家蚕细胞。约 4 ~ 7 d 细胞出现病毒感染症状,收集病毒液进行 $10^{-2} \sim 10^{-8}$ 稀释,用低熔点胶进行空斑筛选,挑斑于铺有单层 BmN 细胞的 96 孔板中,27 °C 条件下培养 3 ~ 4 d,用 X-gal 挑选出白空斑,再进行 3 轮的筛选以纯化重组病毒。

1.5 DNA 点杂交

抽提重组杆状病毒 BacPAK-A 和 Bm-BacPAK6 感染细胞的总 DNA,分别作为待测样品和阴性对照,重组质粒 pCI^A 和 pAcHLT-C-A 作为阳性对照,用点膜器将样品点于尼龙膜上,80 °C 烘干变性 2 h,室温保存备用。以 pAcHLT-C-A 为模板 PCR 扩增 A 片段,酚-氯仿回收后沸水浴变性 10 min,用 DIG-High Prime Kit 37 °C 标记 20 h 后用 0.2 mol/L EDTA 终止反应,标记后的探针于 4 °C 保存备用,杂交和免疫学检测步骤均参考 DIG-High Prime Kit 试剂盒说明书。

1.6 重组多聚蛋白基因在家蚕幼虫中的表达

以 1×10^6 pfu/头接种五龄起蚕,对照组注射等量的病毒 Bm-BacPAK6,从第 3 ~ 6 天,每天分别收集蚕血淋巴,高速离心去杂质, -20 °C 贮存备用。

1.7 重组蛋白免疫反应性的检测

1.7.1 ELISA 检测多聚蛋白的表达:用所得的家蚕

血淋巴作抗原包被 96 孔酶标板(100 μL/孔),Bm-BacPAK6 感染的细胞与家蚕血淋巴作阴性对照,PBS 作空白对照。37 °C 温育 2 h 后转入 4 °C 冰箱过夜。1% BSA 封闭 2 h,加一抗后 37 °C 温育 1.5 h,加二抗后 37 °C 温育 45 min,加底物 37 °C 温育 10 min,最后用 2 mol/L H₂SO₄ 终止反应,以酶标仪(Labsystem - 352)记录 $\lambda = 492$ nm 处的 OD 值。根据《免疫学实验技术》^[14]将 *P/N* 值大于 2 的样品判为阳性,*P/N* 值小于等于 1.5 的孔判为阴性。

1.7.2 SDS-PAGE 和 Western blotting:将收集的蚕血在室温下解冻后,于 4 °C 以 5000 r/min 离心 5 min,上清用 PBS(0.02 mol/L, pH7.4)稀释 4 倍,再加等体积的上样缓冲液,充分混合后沸水浴 5 min 变性。变性后的样品用 5% 的浓缩胶和 12% 的分离胶进行电泳,考马斯亮蓝染色 4h 后脱色过夜。电泳后的凝胶于转移液中转移过夜以确保凝胶上的蛋白转移到硝酸纤维素滤膜上,将滤膜置于 1% 的 BSA 中 37 °C 封闭 2 h 后,置一抗中 37 °C 温育 1.5 h,用含 1% Tween20 的 PBS 漂洗 3 次,置二抗中 37 °C 温育 45 min, PBS 漂洗 3 次,加底物显色,出现条带后即用水冲洗滤膜。

2 实验结果

2.1 家蚕重组杆状病毒转移载体 pAcHLT-C-A 的构建

将 A 片段基因定向克隆到转移载体 pAcHLT-C 中的策略见图 1。重组质粒 pAcHLT-C-A 经 *EcoR* I / *Kpn* I 双酶切后出现 3.2kb 左右的 DNA 条带。将 pAcHLT-C-A 用 *Hind* III 酶切后出现了 1kb、0.9kb 和 0.8kb 条带;用 *Xho* I 酶切后出现了 1.6kb 和 0.8kb 条带,与理论设计完全相符。

PCR 鉴定重组质粒 pAcHLT-C-A 可扩增出 3.2 kb 的特异性条带,而以载体 pAcHLT-C 为模板的阴性对照无特异性条带。这表明 IBDV 基因组 A 片段已按正确的方向插入到 pAcHLT-C 启动子的下游。

2.2 共转染和重组病毒的筛选

共转染 7 d 后,BmN 细胞出现病毒感染症状,光镜下可见细胞圆缩易脱落,折光性增强等,提取细胞总 DNA,用 DIG 标记进行点杂交,被重组病毒感染的家蚕细胞基因组 DNA 和阳性对照均可检测到阳性杂交信号,而阴性对照则否(图 2),说明 IBDV 基因组 A 节段已经同源重组插入杆状病毒 Bm-BacPAK6 的基因组中。

2.3 表达产物的免疫反应性检测

2.3.1 ELISA 检测: ELISA 检测重组杆状病毒 BacPAK-A 在家蚕幼虫体内的表达动力学表明, 蚕体在感染重组病毒 3 d 后多聚蛋白的表达即可判为阳性, 在感染后 5 d 时表达量达到高峰, P/N 值为 3.22, 随后开始下降(图 3), 这说明表达的多聚蛋白具有免疫反应性。

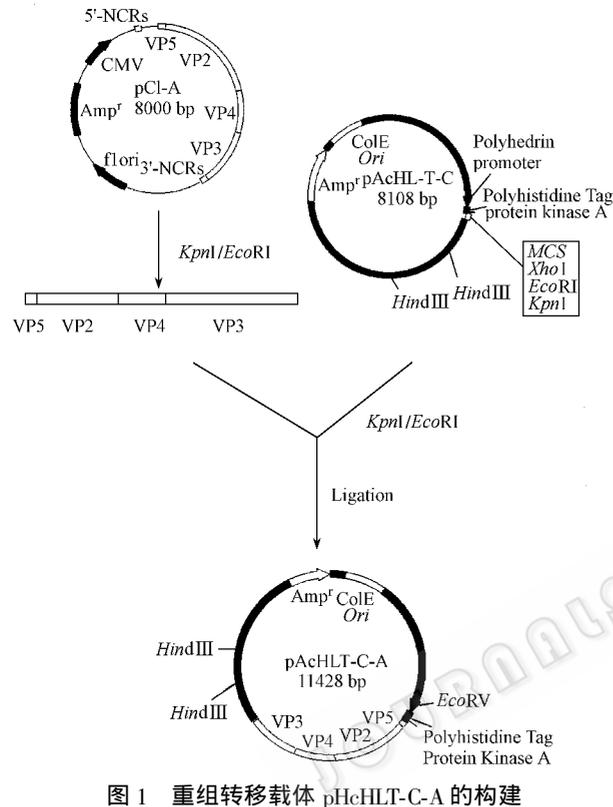


图 1 重组转移载体 pAcHLT-C-A 的构建

Fig.1 Construction of recombinant transfer vector pAcHLT-C-A

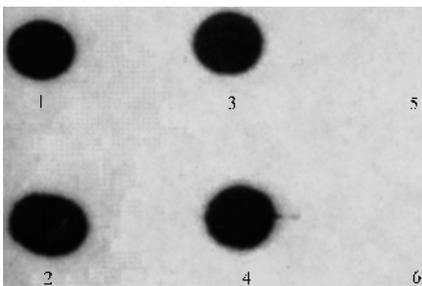


图 2 DIG 标记的 DNA 点杂交

Fig.2 DIG labeled DNA dot blotting

1. pCl-A 2. pAcHLT-C-A 3. 4. Total DNA of cells infected with recombinant BmNPV 5. Total DNA of cells infected with Bm-BacPAK6 6. Total DNA of normal cells

2.3.2 SDS-PAGE 和 Western blotting 鉴定 经野生型杆状病毒感染的家蚕血淋巴、正常蚕血淋巴和经重组病毒感染的家蚕血淋巴进行蛋白质电泳, 结果可见经重组病毒感染的家蚕血淋巴在 58 kD、42 kD 和

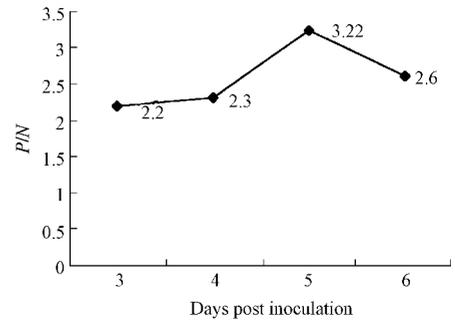


图 3 重组杆状病毒接种家蚕 3~6d 后用 ELISA 测蚕血淋巴中的多聚蛋白含量

Fig.3 Expression amount of polyprotein in silkworm infected with recombinant BmNPV 3~6 days PI by ELISA

30 kD 处各有一条特异性的条带, 分别与 VP2 蛋白前体、成熟 VP2 蛋白和 VP3 的分子量大小相符, 故推测多聚蛋白已在家蚕体内得到了表达(图 4), 但没有检测到与 VP4 分子量对应的特异性条带。相同的样品在进行 Western blotting 鉴定后, 可见经重组病毒感染的家蚕血淋巴在 58 kD、30 kD 处也有特异性条带(图 4), 提示表达的蛋白具有免疫反应性, 但没有检测出 42 kD 的 VP2 蛋白的 Western 印迹。

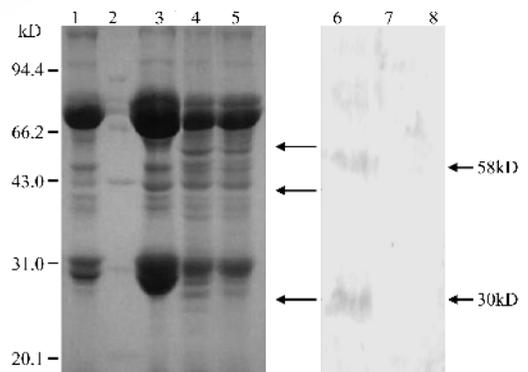


图 4 SDS-PAGE 和 Western blotting 检测多聚蛋白基因在家蚕中的表达

Fig.4 Identification of polyprotein gene expressed in larvae of silkworm infected with recombinant BmNPV by SDS-PAGE and Western Blotting

1. Haemolymph of larvae infected with Bm-BacPAK6 2. Marker 3. Haemolymph of healthy larvae 4. 5. Haemolymph of larvae infected with recombinant BmNPV 6. Haemolymph of larvae infected with recombinant BmNPV 7. Haemolymph of larvae infected with Bm-BacPAK6 8. Haemolymph of healthy larvae.

3 讨 论

防治 IBDV 的传统方法是使用弱毒苗和灭活苗, 但随着变异株和超强株的出现, 这些疫苗就显得

力不从心了。生物技术的发展使人们开始从分子水平对 IBDV 的抗原变异机理和新型疫苗的开发进行探索。在 Kost 等^[15]的研究中发现,许多病毒衣壳蛋白在体外有良好的自组装能力,所形成的 VLPs 是不含遗传物质的病毒空衣壳,因此没有感染性,但有良好的免疫原性。鉴于 VP2 与 VP3 共同构成病毒的衣壳,且 VP3 上亦含有特异性抗原表位,所以将 VP2 与 VP3 共表达似乎是一条开发 IBDV 亚单位疫苗的新路。Vakharia 等(1997)观察到感染了重组病毒 rIBD-7 的 Sf9 细胞中出现了形状和大小都与天然 IBDV 病毒粒子相似的 VLPs。Dybing 等构建了分别含 VP2、VP2/VP4 和 VP2/VP4/VP3 的杆状病毒表达载体,并在 Sf9 细胞上进行了表达,ELISA 检测表明在未经稀释的表达产物中,重组 VP2/VP4/VP3 的光吸收值大于重组 VP2,所以推测 VP2 和 VP3 的共表达可能会使两者的空间构象更接近于自然状态,因而与单独的 VP2 相比更易于被抗体识别,但其表达量不如后者。在动物实验中,两者诱导中和抗体的能力相似^[9,16]。

从 80 年代发展起来的重组昆虫病毒基因工程系统与其它载体相比,有着独特的优势和广阔的发展前景,已被用于表达了数百种外源蛋白,亦有很多表达 IBDV VP2 的报道,Wang 等用杆状病毒表达系统表达了 C-端带有 5 个组氨酸残基的嵌合蛋白 VP2H,动物实验表明该重组 VP2 蛋白对鸡有高度保护力^[17,18]。与国外普遍使用的苜蓿银纹夜蛾核型多角体病毒-秋粘虫(AcMNPV-Sf)表达系统相比,重组家蚕核型多角体病毒-家蚕(rBmNPV-Bm)表达系统具有蛋白表量高、生物活性好、表达产物的后加工容易、成本低廉等优点,产物的天然性质可与哺乳类细胞培养系统相媲美。而且 BmNPV 对人畜无害,重组 BmNPV 因丢失了多角体蛋白基而不会出现对蚕业危害^[19,20]。我国江浙一带的蚕桑业历史悠久,因而在工业化生产上更具资源和技术优势。

在本实验中,用 rBmNPV-Bm 系统表达了 IBDV 基因组的 A 节段,重组多聚蛋白经 VP4 加工后产生的 VP2 是个 N 端带 6 个 His 残基和一段多肽(部分 VP5 基因的移码翻译产物)的融合蛋白,其分子量稍大于病毒蛋白 VP2。在 SDS-PAGE 中检测到了与 VP3 蛋白、成熟 VP2 蛋白及其前体蛋白相对应的条带,但 VP4 的表达量似乎很低。Western Blotting 中只检测到了 VP3 蛋白和 58kD 的 VP2 前体蛋白,这可能是因为在 VP2 前加上了一段由 VP5 开读框移码翻译的一段多肽,影响了 VP2 前体的加工和 VP2

的正确折叠。ELISA 和 Western blotting 检测表明重组多聚蛋白具有免疫反应性,其中 ELISA 结果表明,家蚕幼虫在接种后第 5 天表达的重组蛋白量达到峰值,这对以后的工业化生产中最大限度地获得目的蛋白具有一定的参考价值。

有报道指出 VP2 的表达可以引起宿主细胞的凋亡^[21,22]。虽然杆状病毒基因组含有抗凋亡的 p35 或类似基因^[23,24],但与 p35 以类似的分子机制抑制凋亡的痘苗病毒基因 B13R 和 B22R 并不能抑制 VP2 诱导凋亡,而当 VP2 与 Bcl-2 共同表达时,所诱导的凋亡被推迟了(Arias AF 等,1997)。虽然 VP2 诱导凋亡的分子机制仍不十分明了,但可以考虑将 VP2 与 Bcl-2 等抗凋亡基因进行共表达,一方面可获得更多量的重组蛋白,另一方面或许可以减轻各种 IBDV 亚单位疫苗和重组活病毒载体难以克服的囊损伤作用。Tanimura 等(1998)发现 IBDV 诱导凋亡的能力与其毒株有关,这不仅与 VP2 上点突变造成毒力变异的观点一致,同时也提示在构建重组表达载体时对 IBDV 毒株的筛选及对 VP2 基因进行适当修饰的必要性。

REFERENCES (参考文献)

- [1] Fahey K J, Emy K, Crooks J. A conformational immunogen on VP2 of infectious bursal disease virus that induce virus-neutralizing antibodies that passively protect chickens. *J Gen Virol*, 1989, **70**(6):1473 ~ 1481
- [2] Azad A A, Jagadish M N, Brown m A *et al.* Deletion mapping and expression in *Escherichia coli* of the large genomic segment of a birnavirus. *Virology*, 1987, **161**(1):145 ~ 152
- [3] Bayliss C D, Spies U, Shaw K *et al.* A comparison of the sequences of segment A of four infectious bursal disease virus strains and identification of a variable region in VP2. *J Gen Virol*, 1990, **71**(6):1303 ~ 1312
- [4] Heine H G, Hariton M, Failla P *et al.* Sequence analysis and expression of the host - protective immunogen VP2 of a variant strain of infectious bursal disease virus which can circumvent vaccination with standard type I strains. *J Gen Virol*, 1991, **72**(8):1835 ~ 1843
- [5] Azad A A, Mckern N M, Macreadie I G *et al.* Physicochemical and immunological characterization of recombinant host-protective antigen (VP2) of infectious bursal disease virus. *Vaccine*, 1991, **9**:715 ~ 722
- [6] Jagadish M N, Vaughan P R, Irving R A *et al.* Expression and characterization of infectious bursal disease virus polyprotein in yeast. *Gene*, 1990, **95**(2):179 ~ 186
- [7] Macreadie I G, Vanhan P R, Chapman A J *et al.* Passive protection against infectious bursal disease virus by viral VP2 expressed in yeast. *Vaccine*, 1990, **8**:549 ~ 522
- [8] Bayliss C D, Peters R W, Cook J K A *et al.* A recombinant fowpox

- induces protection against mortality caused by the virus. *Archives of Virology*, 1991, **120**:193 ~ 205
- [9] Dybing J K, Jackwood D J. Expression of Md infectious bursal disease viral proteins in baculovirus. *Avian Dis*, 1996, **40**(3): 617 ~ 626
- [10] Bentley W E, Wang M Y, Vakharia V N. Development of an efficient bioprocess for poultry vaccines using high-density insect cell culture. *Annals of the New York Academy of sciences*, 1994, **745**:336 ~ 359
- [11] Fernandez-Arias A, Risco C, Martinez S *et al.* Expression of ORFA1 of infectious bursal disease virus results in the formation of virus-like particles. *J Gen Virol*, 1998, **79**(5):1047 ~ 1054
- [12] YU L(于涟), HUANG Y W(黄耀伟), LI J R(李建荣) *et al.* Genomic structure and proteins sequence analysis of full-length of segment A of three infectious bursal disease viruses. *Acta Microbiologica sinica*(微生物学报) 2001, **41**(5): 573 ~ 581
- [13] Sambrook J, Fritsch E F, Maniatis T. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. 2nd ed, New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989
- [14] YU L(于涟). *Experiment technology of immunology*. 1st ed, Zhejiang: Zhejiang University Press, 1992
- [15] Kost T A, Condreay J P. Recombinant baculovirus as expression vectors for insect and mammalian cells. *Current Opinion in Biotechnology*, 1999, **10**:428 ~ 433
- [16] Dybing J K, Jackwood D J. Antigenic and immunogenic properties of baculovirus-expressed infectious disease viral proteins. *Avian Dis*, 1998, **42**(1): 80 ~ 91
- [17] Wang M Y, Bentley W E, Vakharia V N. Purification from a recombinant protein produced in a baculovirus expression system by immobilized metal affinity chromatography. *Biotechnol Bioeng*, 1994, **43**(5): 349 ~ 356
- [18] Pitcovski J, Di-Castro D, Shaaltiel Y *et al.* Insect cell - derived VP2 of infectious bursal disease virus confers protection against the disease in chickens. *Avian Dis*, 1996, **40**(3):753 ~ 761
- [19] HE J L(何家禄), WU X P(吴祥甫). The recombinant *Bombyx mori* nuclear polyhedrosis virus(rBmNPV), industrialization of the *Bombyx mori* expression vector system. *Foreign Agriculture: Sericulture*(国外农业——蚕学), 1994, **57**:6 ~ 11
- [20] ZHANG Z F(张志芳). The development of baculovirus expression vector systems. *Foreign Agriculture: Sericulture*(国外农业——蚕学), 1994, **58**:5 ~ 9
- [21] Vasconcelos A C, Lam K M. Apoptosis induced by infectious bursal disease virus. *J Gen Virol*, 1994, **75**(7):1803 ~ 1806
- [22] Fernandez A A, Martinez S I, Rodriguez J F. The major antigen protein of infectious bursal disease virus VP2 is an apoptotic inducer. *J Virol*, 1997, **71**(10):8014 ~ 8018
- [23] Clem R J, Fechheimer M, Miller L K *et al.* Prevention of apoptosis by a baculovirus gene during infection of insect cells. *Science*, 1991, **254**(48):1388 ~ 1390
- [24] Crook N E, Clem R J, Miller L K *et al.* An apoptosis-inhibiting baculovirus gene with a zinc finger-like motif. *J virol*, 1993, **67**(4): 2168 ~ 2174

Expression of Polyprotein of Infectious Bursal Disease Virus in *Bombyx mori*

LU Mi-Jia¹ LI Jian-Rong¹ WANG Ying-Fei² JIN Yong-Feng² YU Lian^{1*}

¹(Institute of preventive veterinary medicine, Zhejiang University, Hangzhou 310029, China)

²(Institute of Biochemistry, Zhejiang University, Hangzhou 310029, China)

Abstract Segment A of the genome of infectious bursal disease virus(IBDV) encodes structure protein VP2 and VP3 and protease VP4. In this study a polyprotein gene of IBDV was inserted into a *Bombyx mori* baculovirus transfer vector pAchlT - C and cotransfected into BmN cells with linear genome DNA of virus Bm-BacPAK6. Dot hybridization suggested that the segment A of the virus genome was inserted in the genome of Bm-BacPAK6. The silkworm of fifth instars were infected by the recombinant virus and the immunogenicity of the infected larvae's blood were examined with ELISA, SDS-PAGE and Western blotting. It appears that the recombinant polyprotein has the property of immunoreactivity and the expression in larvae reached the pick 5-day post infection.

Key words infectious bursal disease virus, polyprotein, *Bombyx mori* baculovirus expression vector system, expression

Received: 01-07-2002

This work was supported by Grant from Science and Technology Department of Zhejiang Province(No.001102270).

* Corresponding author. Tel : 86-571-86971092 ;E-mail : yulian@zju.edu.cn

© 中国科学院微生物研究所期刊联合编辑部 <http://journals.im.ac.cn>