

展示生长抑素的猪细小病毒样颗粒构建及其免疫原性

张雪花^{1,2}, 郑其升¹, 陈瑾¹, 薛刚^{1,2}, 侯红岩¹, 侯继波¹

1. 江苏省农业科学院 国家兽用生物制品工程技术研究中心, 南京 210014
2. 南京农业大学 农业部动物疫病诊断与免疫重点开放实验室, 南京 210095

摘要: 为了获得既可预防猪细小病毒感染又能促进生长的嵌合病毒样颗粒疫苗, 以 PPV NJ-a 株基因组 DNA 为模板扩增 VP2 基因片段, 在 VP2 基因 N 端融合人工合成的 4 拷贝生长抑素基因, 构建杆状病毒转移载体 pFast-SS4-VP2。通过转化 DH10Bac 感受态细胞, pFast-SS4-VP2 与穿梭载体 Bacmid 重组, 获得重组 Bacmid, 命名为 rBacmid-SS4-VP2。rBacmid-SS4-VP2 转染 Sf-9 细胞, 获得重组病毒 rBac-SS4-VP2。SDS-PAGE 与 Western blotting 鉴定可见约 68 kDa 的 rSS4-VP2 条带; rBac-SS4-VP2 感染细胞 IFA 检测产生很强的特异性绿色荧光; 感染细胞超薄切片电镜观察到大量特征性病毒样颗粒。将重组蛋白分别辅以铝胶、IMS 和白油不同佐剂免疫小鼠, 通过检测免疫小鼠 VP2 特异性 ELISA 抗体、PPV 特异性中和抗体、生长抑素的抗体水平及生长激素水平来评价嵌合病毒样颗粒的免疫原性。结果表明, 辅以铝胶与 IMS 佐剂重组蛋白组均产生了与 PPV 全毒组相似的 ELISA 抗体与中和抗体反应; 重组蛋白免疫组均产生较好的对生长抑素的抗体反应; 免疫小鼠体内生长激素的水平明显升高; 其中以铝胶佐剂组产生的各抗体水平最高, 白油佐剂组各抗体水平最低。为以后生产安全、有效的颗粒化亚单位疫苗提供了一个新的设计思路, 又为应用病毒样颗粒递呈外源肽, 从而生产多联亚单位疫苗奠定了基础。

关键词: 猪细小病毒, VP2 蛋白, 生长抑素, 杆状病毒, 病毒样颗粒

Construction and immunogenicity of recombinant porcine parvovirus-like particles with somatostatin

Xuehua Zhang^{1,2}, Qisheng Zheng¹, Jin Chen¹, Gang Xue^{1,2}, Hongyan Hou¹, and Jibo Hou¹

1. National Research Center of Veterinary Biological Engineering and Technology, Jiangsu Academy of Agricultural Sciences, Nanjing 210014, China
2. Key Laboratory of Animal Disease Diagnosis and Immunology, Ministry of Agriculture, Nanjing Agricultural University, Nanjing 210095, China

Abstract: In order to obtain a virus-like particle vaccine both for porcine parvovirus (PPV) prevention and growth-promotion, VP2 gene of PPV NJ-a strain was amplified with PCR, and four copies of synthetic somatostatin gene were fused to the N-terminal of VP2 gene. The fused gene was cloned into pFast-HT A to construct the recombinant plasmid pFast-SS4-VP2, then the pFast-SS4-VP2 was transformed into DH10Bac competent cells and recombined with shuttle vector Bacmid, followed by identification with blue-white screening and PCR analysis for three cycles, and the positive recombinant was named as rBacmid-SS4-VP2. The positive Sf-9 cells were transfected with rBacmid-SS4-VP2 by Lipofectamine to produce recombinant baculovirus. When the cytopathic effect

Received: December 23, 2009; **Accepted:** May 17, 2010

Supported by: Construction Projects of National Research Center of Veterinary Biologicals Engineering and Technology (No. 4910706), Scientific Research on Public Causes of National Agriculture (No. 200803020).

Corresponding author: Jibo Hou. Tel: +86-25-84392008; E-mail: houjibo@jaas.ac.cn

国家兽用生物制品工程技术研究中心建设项目 (No. 4910706), 国家农业公益性行业科研专项 (No. 200803020) 资助。

(CPE) was obvious, the transfected Sf-9 cell was harvested, and the positive recombinant virus was named as rBac-SS4-VP2. The insertion for the target gene into baculovirus genome was confirmed with PCR. SDS-PAGE and Western blotting revealed that the calculated protein of approximately 68 kDa was in the expressed in the insect cells. The Sf-9 cells infected with rBac-SS4-VP2 were stained positive against PPV antibody using the indirect immunofluorescence assay (IFA). Moreover, the virus particle self-assembly was observed under electron microscopy. 90 four-week-old mice were immunized by the recombinant protein coupled with different adjuvants alhydrogel, IMS and oil. VP2-specific ELISA antibodies, PPV-specific neutralizing antibody, somatostatin antibody and growth hormone levels were examined to evaluate the immunogenicity of this virus like particle. Results indicated that mice groups immunized rSS4-VP2 protein with alhydrogel and IMS developed similar humoral immune response comparing with inactivated PPV vaccine. Mice group immunized with rSS4-VP2 generated higher level of SS antibody and growth hormone comparing with negative control, mice receiving rSS4-VP2 with alhydrogel developed the highest antibody titre than all other groups, while the oil group developed the lowest antibody level. This study provides not only a new rout for production of safe and effective virus like particle subunit vaccine, but also the foundations for peptide presentation and multivalent subunit vaccine design.

Keywords: porcine parvovirus, VP2, somatostatin, baculovirus, virus-like particles

猪细小病毒 (Porcine parvovirus, PPV) 是引起猪繁殖障碍的主要病原之一, 导致初产母猪流产、死胎、木乃伊胎, 其中以胎儿木乃伊化为主, 成年猪不表现明显临床症状, 该病在世界范围内广泛流行, 造成了巨大的经济损失^[1]。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, 大小形态相同, 密度分别为 1.39 g/cm³ 和 1.33 g/cm³^[2]。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。体内外试验表明, 抑制作用依赖于空衣壳所占比例, 当空衣壳与全病毒的比例超过 30:1 时, 接种的猪不表现临床症状, 但 DNA 杂交显示有病毒存在的迹象^[3]。大量研究发现, 疫苗免疫接种是防治该病的关键, 许多学者成功研制了相应的灭活疫苗和弱毒活疫苗。此外, Martinez 等还证实, 体外表达的 PPV 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^[4]。

PPV 属于自主型细小病毒, 其基因组为线状单股负链 DNA, 大小约为 5 kb, 共有 2 个开放阅读框架 (Open reading frame, ORF), 一个编码结构蛋白 (VP1、VP2), 另一个编码非结构蛋白 (NS1、NS2 和 NS3) 其中 VP2 是构成病毒粒子的主要衣壳蛋白, 具有血凝活性, 约占病毒衣壳蛋白总量的 80%, VP2 蛋白携带主要的抗原决定簇, 可诱导机体产生保护性中和抗体, VP2 对病毒感染、发挥其致病性方面亦起关键作用。并且 VP2 蛋白在体外表达时可自主装配, 能自动形成完整的病毒样颗粒, 具有良

好的免疫原性, 成为病毒疫苗研究的主要方向^[5]。病毒样颗粒 (Virus-like particles, VLPs) 是某种病毒的一个或多个结构蛋白装配成的空心颗粒, 它既具有类似天然病毒的稳定性和免疫原性, 又具备携带外源蛋白或多肽的潜能, 不含有病毒的核酸没有感染性, 使其有望成为构建多价疫苗的良好载体^[6-8]。据报道, 使用昆虫杆状病毒表达系统获得了 PPV 的病毒样颗粒, 该 VLPs 能够诱导小鼠产生强烈的免疫应答^[9-10]。而在 VP2 基因的 5'端连接一段外源基因对 PPV VLPs 的形成影响较小^[11]。

生长抑素 (Somatostatin, SS) 是下丘脑释放的 14 氨基酸的小肽, 广泛分布于中枢神经系统和胃肠道组织中。SS 能抑制生长激素 (GH) 的分泌, 而 GH 处于动物生长轴的核心, GH 通过与受体结合诱导肝细胞产生胰岛素样生长因子 (IGF-1), 而 IGF-1 能直接作用于动物体内的多种组织, 促进蛋白质的合成, 促进细胞增殖, 从而促进骨骼、肌肉和内脏的生长^[12]。由于 SS 是一个只有 14 个氨基酸的小肽, 在体内稳定性较差, 需要承载于其他大的蛋白载体, 才能更好地发挥免疫原性。

本研究以猪细小病毒 VP2 蛋白为载体, 在其 N 端插入 4 拷贝生长抑素, 用杆状病毒表达系统获得自我装配的病毒样颗粒, 以期获得既可预防猪细小病毒病又能促进生长的双价亚单位疫苗。为了提高抗原的免疫原性, 使机体产生更好的免疫应答。本实验以白油、铝胶、IMS 1312、CpG 为佐剂设计了不同的免疫组, 旨在筛选出比较适合的佐剂来提高

抗原的免疫效力。

1 材料与试剂

1.1 菌株、质粒、毒株与细胞

转座用大肠杆菌宿主菌 DH10Bac (含杆状病毒穿梭载体质粒 Bacmid 和辅助质粒 Helper)、pFastBac HT A、草地贪夜蛾卵巢细胞 Sf-9 由江苏省农业科学院兽医研究所王芳老师惠赠; 四拷贝的生长抑素基因由大连 TaKaRa 公司人工合成; 大肠杆菌 DH5 α 、PK-15 细胞、猪细小病毒强毒株 (NJ-a 株) 由国家兽用生物制品工程技术研究中心保存。

1.2 主要试剂

Grace's 培养基、优级胎牛血清(FBS)、Sf-900 II SFM 无血清培养基、脂质体转染试剂盒 Lipofectamine 2 000 均购自 Invitrogen 公司; *Bam*H I、*Xho* I 工具酶, DNA Marker DL 2 000、15 000、 λ -*Hind* III、异丙基- β -D-硫代半乳糖苷(IPTG)、5-溴-4-氯-3-吡啶半乳糖苷 (X-gal)、T4 DNA 连接酶、*Ex Taq*

DNA 聚合酶、DNA 胶回收试剂盒购自大连 TaKaRa 公司; 蛋白 Marker 购自北京全式金生物技术有限公司; 质粒小提试剂盒购自 Axygen 公司; 猪细小病毒抗体检测试剂盒购自深圳绿诗源生物技术有限公司; 生长激素放射免疫分析检测试剂盒购自北京北方生物技术研究所; 豚鼠抗 PPV 阳性血清实验室保存; HRP 与 FITC 标记羊抗豚鼠 IgG 购自北京博奥森生物技术有限公司; HRP 标记羊抗小鼠 IgG 购自博士德生物工程公司; 人工合成的生长抑素由上海吉尔生化有限公司合成; 铝胶由南京天邦公司提供; IMS 1312 购自法国赛比克公司; 其余试剂均为国产或进口分析纯。

2 方法

2.1 引物的设计与合成

以 PPV NJ-a 株为模板, 用 Primer Premier 5.0 生物软件设计出 2 条引物(表 1), 用于扩增 *VP2* 全基因。

表 1 用于 PCR 扩增的引物

Table 1 Primers used for PCR amplification

Primers	Endonuclease	Sequences (5'-3')	Purpose
P1	<i>Bam</i> H I	CGCGGATCCCATGAGTGAAAATGTGG	Upstream primer for PPV- <i>VP2</i>
P2	<i>Xho</i> I	CGCCTCGAGCTAGTATAATTTTCTTGGTAT	Downstream primer for PPV- <i>VP2</i>

人工合成四拷贝猪生长抑素基因, 带有 *Bam*H I、*Bgl* II 酶切位点 GGATCCAAAAGCTGG TTGTAAGAACTTTTTTGGAAAGACTTTTACTTC TTGTGCTGGTTGTAAGAACTTTTTTGGAAAGACTTTTACTTCTTGTGCTGGTTGTAAGAACTTTTT TTGGAAGACTTTTACTTCTTGTGCTGGTTGTAA GAACTTTTTTGGAAAGACTTTTACTTCTTGTAG ATCT。

2.2 重组质粒 pFast-SS4-VP2 构建

以 P1、P2 为引物扩增 PPV *VP2*, PCR 产物克隆入 pMD18-T 载体, 获得质粒 pMD-*VP2*, 进行序列测定, 确定基因序列的正确性。

将人工合成的四拷贝生长抑素基因用 *Bam*H I、*Bgl* II 双酶切鉴定, 送测序进一步验证基因序列。

利用 *Bam*H I、*Xho* I 双酶切质粒 pMD-*VP2*, 回收 *VP2* 片段, 克隆至杆状病毒转移载体 pFastBac HT A, 得到重组质粒 pFast-*VP2*。

*Bam*H I 单酶切重组质粒 pFast-*VP2*, 使其完全线性化后, CIAP 去磷酸化, 回收。 *Bam*H I、*Bgl* II 双酶切人工合成的四拷贝生长抑素, 获得的四拷贝生长抑素片段与线性化的 pFast-*VP2* 进行连接, 获得重组质粒 pFast-SS4-*VP2*。

2.3 重组穿梭载体 rBacmid-SS4-VP2 的构建和鉴定

按照 Bac-to-Bac Baculovirus Expression System 操作说明, 将重组质粒 pFast-SS4-*VP2* 转化 DH10Bac 感受态细胞, 在 DH10Bac 中在 helper 质粒辅助作用下重组质粒 pFast-SS4-*VP2* 与 Bacmid 发生位点特异性转座作用。在含有 IPTG/X-gal、Kan、Gen 及 Tet 抗生素的 LB 固体平板中出现蓝白菌落, 经 3 次蓝白斑筛选, 利用通用引物 PUC/M13F 和针对目的基因 SS4-*VP2* 的引物进行 PCR 鉴定得到纯化的 rBacmid-SS4-*VP2*。

2.4 重组杆状病毒的制备和鉴定

按照 Lipofectamine™2 000 转染试剂说明书操作, 将重组穿梭载体 rBacmid-SS4-VP2 转染对数生长期的 Sf-9 (10% FBS Grace's 培养液培养) 细胞, 27°C 静置培养 5 d 以上, 直至细胞出现病变, 获得的重组病毒命名为 rBac-SS4-VP2。

PCR 鉴定: 从感染重组杆状病毒的 Sf-9 细胞中提取总 DNA, 分别用通用引物 PUC/M13F, 特异性引物扩增目的片段。

2.5 重组杆状病毒滴度的测定

按常规方法测重组杆状病毒的滴度, 病毒用 2% FBS Grace's 依次倍比稀释至最高稀释度 10^{-10} ; 每个病毒稀释度做 8 个平行复孔, 加样时从最高稀释度开始; 第 11 列和 12 列作为阴性对照, 阴性对照孔中加入 100 μ L 2% FBS Grace's; 于 27°C 培养, 每天观察病变情况, 直至对照细胞老化、脱落; 记录每一列中出现阳性的孔数; 按 Karber 法计算结果。

2.6 重组蛋白在 Sf-9 细胞中的表达及检测

2.6.1 SDS-PAGE 电泳分析

重组病毒分别以 MOI 0.01、0.05、0.1、0.5 感染处于对数生长期 Sf-9 (Sf-900 II SFM 培养液培养) 细胞, 同时以野生杆状病毒为对照。感染后 96~120 h 待细胞病变明显时收集细胞, 用 PBS 洗 3 次, 适量 PBS 重悬, 加入 5 \times SDS Loading Buffer, 用 10% SDS-PAGE 凝胶电泳分析。

2.6.2 Western blotting 检测

SDS-PAGE 方法同上; 半干法转印, DAB 显色, 拍照留图。

2.6.3 间接免疫荧光检测

重组病毒以 MOI 0.5 感染长满 Sf-9 单层的 6 孔板, 同时设立未感染的 Sf-9 昆虫细胞和野生杆状病毒感染的细胞作对照; 待 6 孔板内的细胞完全病变后, 弃上清, 用 75% 的酒精固定 40~60 min; 用含 1% BSA 的 PBS 洗 3 次, 自然风干; 加入 1:100 稀释的豚鼠抗 PPV 阳性血清(已与野生杆状病毒蛋白作用过), 37°C 湿盒孵育 2 h; 用含 1% BSA 的 PBS 洗 3 次, 自然风干; 加入 1:50 稀释的 FITC 标记的羊抗豚鼠二抗, 37°C 作用 30 min; 用含 1% BSA 的 PBS 洗 3 次, 自然风干; 荧光显微镜下观察结果。

2.6.4 电镜观察

以 MOI 0.5 感染 Sf-9 细胞, 120 h 待细胞完全病变后收毒, 用 PBS 洗 3 次, 2 000 r/min 离心 10 min 沉淀细胞, 2.5% 戊二醛 (0.1 mol/mL 磷酸缓冲液 pH 7.4) 固定液 4°C 固定过夜, 制备超薄切片, 电镜观察。

2.7 重组蛋白的纯化

重组病毒以 MOI 0.05 感染处在对数生长期的 Sf-9 细胞, 5 d 后收集病变细胞, 用 PBS 洗 2 次, 2 000 r/min 离心 15 min, 重悬于 25 mmol/L NaHCO₃ (pH 8.3) 中, 使细胞密度为 2×10^7 cells/mL, 超声波裂解后, 10 000 r/min 离心 15 min, 上清液中含有表达的 rSS4-VP2 蛋白。收集上清中加入饱和硫酸铵 (pH 7.0) 至终浓度 20%, 4°C 搅拌过夜进行沉淀, 然后 18 000 r/min 离心 10 min, 沉淀重悬于 PBS 中, 加 Triton X-100 和 TBP-磷酸三丁酯至浓缩物的 1% 和 0.3% 灭活杆状病毒, 室温静置 30 min, 透析除盐, 再用超滤管超滤离心, 去除杂蛋白, 即得到重组蛋白的纯化物^[13]。

2.8 小鼠免疫试验

2.8.1 试验设计

小鼠随机分组, 每组 10 只, 具体设计见表 2。

2.8.2 免疫程序

免疫 3 次, 每次免疫时间间隔为 2 周。免疫 200 μ L/只, 后腿各注射 100 μ L, 每只小鼠重组蛋白免疫剂量为 50 μ g。免疫后每周小鼠眼球采血, 常规分离血清, -20°C 保存待用。

2.9 抗体检测

2.9.1 猪细小病毒检测试剂盒检测抗体

具体操作步骤按试剂盒附带说明书: 用样品稀释液将血清 1:40 稀释后加入预包被的微孔板中, 每孔加 100 μ L; 同时设置阴、阳性对照孔, 每孔加 100 μ L; 另设一空白对照孔, 空白对照孔加 100 μ L 稀释液。OD₆₃₀ 测定结果。

2.9.2 免疫小鼠中和抗体的检测

采用固定病毒稀释血清法进行微量中和试验检测。其中血清无菌处理后作 2^{-1} 、 2^{-2} 、 2^{-3} …… 系列倍比稀释, 接种于长满 PK-15 细胞单层的 96 孔板中, 每孔 50 μ L。然后每孔加入用 DMEM (GIBCO) 稀释为 200 TCID₅₀ 的 PPV NJ-a 株 50 μ L, 同时设细

表 2 试验动物分组与疫苗制备

Table 2 Animal grouping and treatment

Group	Number	Dose	Adjuvant	Antigen:Adjuvant (V:V)	Immunization
I	10	50 μ g rSS4-VP2	Oil	1:3	Intramuscular injection
II	10	50 μ g rSS4-VP2	IMS	1:1	Intramuscular injection
III	10	50 μ g rSS4-VP2	Alhydrogel	1:1	Intramuscular injection
IV	10	50 μ g rSS4-VP2	CpG+Alhydrogel	1:1	Intramuscular injection
V	10	50 μ g rSS4-VP2	CpG+IMS	1:1	Intramuscular injection
VI	10	5 \times 10 ⁵ TCID ₅₀ / rBac-SS4-VP2	CpG+Alhydrogel	1:1	Intramuscular injection
VII	10	5 \times 10 ⁵ TCID ₅₀ /PPV Inactivated vaccine	CpG+Alhydrogel	1:1	Intramuscular injection
VIII	10	5 \times 10 ⁵ TCID ₅₀ / Wild Baculovirus	CpG+Alhydrogel	1:1	Intramuscular injection
IX	10	PBS	-	-	Intramuscular injection

The dose for CpG 50 μ g per mouse.

胞对照和病毒对照孔, 37 $^{\circ}$ C、2% CO₂ 培养箱中培养, 逐日观察并记录细胞病变结果, 以能完全保护细胞不发生病变的最高稀释倍数为被检血清中 PPV 特异性中和抗体的效价。

2.9.3 间接 ELISA 检测生长抑素抗体水平

以人工合成的生长抑素 (5 μ g/mL) 为抗原包被酶标板, 100 μ L/孔, 2 免后 2 周的小鼠血清为一抗 1:100 稀释, 检测血清抗生长抑素抗体水平。

2.9.4 GH 水平检测

取 100 μ L 2 免后 2 周的小鼠血清, 送南京军区总医院检测生长激素 (GH) 含量。

3 结果

3.1 重组转移载体的构建及酶切鉴定

载体 pFast-HT A 用 *Bam*H I 与 *Xho* I 双酶切, 使之完全线性化, 先与 VP2 相连, 酶切鉴定正确后, *Bam*H I 单酶切, 去磷酸化后与生长抑素连接, 酶切鉴定, 并命名为 pFast-SS4-VP2。由图可以看到酶切后得到一条 1 910 bp 的条带, 与目的条带大小相当, 证明重组载体构建成功 (图 1)。

3.2 重组穿梭载体的构建与鉴定

将空载体 pFast-HT A、重组载体 pFast-SS4-VP2 转入含穿梭质粒 Bacmid 的感受态细胞 DH10Bac 中, 在 Helper 质粒编码的转座酶的协助下, 重组转移载体 pFast-SS4-VP2 与 DH10Bac 发生位点特异性的转座作用, 将目的基因克隆入 Bacmid, 经 3 次蓝白菌

落筛选及利用通用引物 PUC/M13PCR 鉴定, 空载体与 Bacmid 重组后扩增出的条带大小为 2 430 bp, 重组载体与 Bacmid 重组后扩增出条带大小为 4 300 bp 左右, 与预期结果一致 (图 2)。

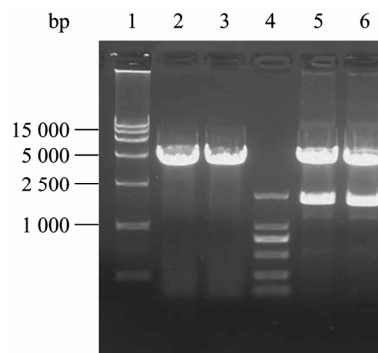


图 1 重组质粒的酶切鉴定

Fig. 1 Identification of the recombinant plasmid by enzyme digestion. 1: DL15 000 DNA marker; 2-3: pFast-HT A plasmid digested by *Bam*H I; 4: DL2 000 DNA marker; 5-6: pFast-SS4-VP2 recombinant plasmid digested by *Bam*H I and *Xho* I.

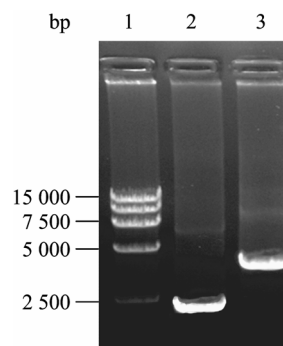


图 2 PCR 鉴定重组 Bacmid

Fig. 2 Identification of the recombinant Bacmid by PCR. 1: DL15 000DNA marker; 2: PCR product of rBacmid-pFast.

3.3 重组杆状病毒的制备

转染后每天观察细胞状态,对照细胞生长良好,轮廓清晰,胞体明亮,能看到明显的细胞分裂,增殖的哑铃型细胞,转染重组病毒的细胞开始没有明显变化;3 d后,细胞开始变化,细胞变大变圆,细胞核充满整个细胞,病变细胞随着时间增加,感染重组病毒细胞生长停止,细胞中出现囊泡、病毒包涵体,折光率增加,最后早起感染的细胞开始死亡,有细胞脱落、破裂(图3)。

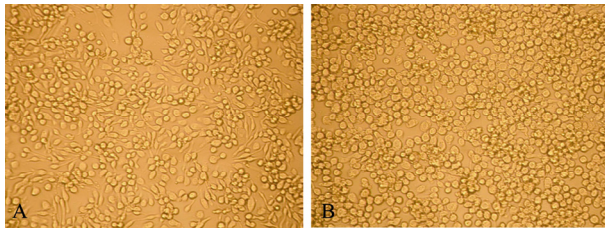


图3 重组杆状病毒 rBac-SS4-VP2 在 Sf-9 细胞上引起的细胞病变

Fig. 3 CPE on Sf-9 cells induced by rBac-SS4-VP2 infection. (A) Normal Sf-9 cell. (B) Sf-9 cell transfected with rBacmid-SS4-VP2.

3.4 重组杆状病毒的 PCR 鉴定

提取病变细胞 DNA 基因组,分别以 PUC/M13 通用引物、特异性引物进行 PCR 扩增,0.8% 琼脂糖凝胶电泳,可见条带与目的片段大小一致,且没有出现杂带,证明外源基因成功插入杆状病毒基因中,并说明病毒已得到纯化(图4)。

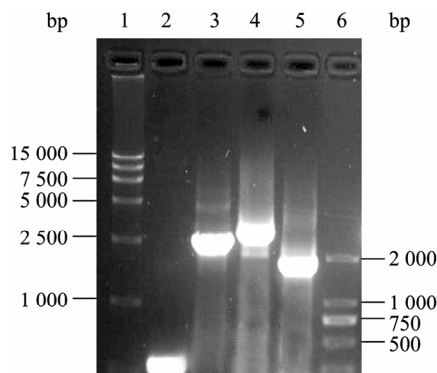


图4 重组杆状病毒 PCR 鉴定

Fig. 4 Identification of the recombinant baculovirus by PCR. 1: DL15 000 DNA marker; 2: PCR amplification with M13 primer for Bacmid transfected Sf-9 cells; 3: PCR amplification with M13 primer for rBacmid-pFast; 4: PCR amplification with M13 primer for rBac-SS4-VP2; 5: PCR amplification with specific primer for rBac-SS4-VP2; 6: DL2 000 DNA marker.

3.5 重组蛋白的 SDS-PAGE 鉴定

分别以不同 MOI 0.01、0.05、0.1、0.5 感染 Sf-9 细胞,96 h 后收集病变 Sf-9 细胞,用 PBS 洗涤 3 次后,加上样缓冲液煮沸 10 min 后进行 SDS-PAGE,结果表明,在 lane2~5 中均出现一条大小约为 68 kDa 的特异性蛋白质条带,与 DNASTar 分析的蛋白分子量基本一致,阴性对照 (lane1) 未出现该蛋白质条带,且不同的感染比感染细胞蛋白表达量相当(图5)。

3.6 重组蛋白的 Western blotting 鉴定

Western blotting 检测,以 MOI 0.1、0.5 感染细胞,制备样品方法同 SDS-PAGE,结果在 lane2、lane3 中出现特异性蛋白条带, lane4 中则没有出现特异性条带(图6),表明利用杆状病毒表达的 rSS4-VP2 蛋白可与 PPV 阳性血清发生特异性免疫反应,从而证实它具有生物学活性。

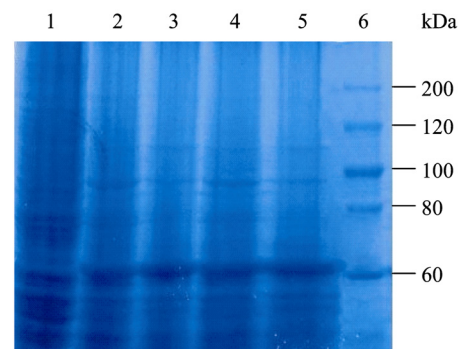


图5 重组蛋白的 SDS-PAGE 分析

Fig. 5 SDS-PAGE analysis of rSS4-VP2 protein. 1: wild baculovirus control; 2-5: Sf-9 cells infected with rBac-SS4-VP2 in the different MOI 0.01, 0.05, 0.1 and 0.5; 6: standard protein marker.

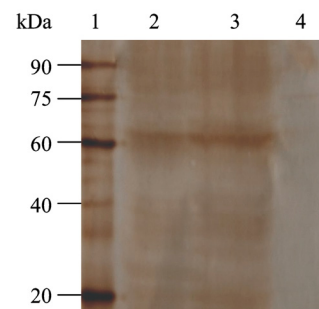


图6 重组蛋白的 Western blotting 分析

Fig. 6 Identification of rSS4-VP2 protein by Western blotting. 1: standard protein marker; 2-3: Sf-9 cells infected with rBac-SS4-VP2 in the different MOI 0.1 and 0.5; 4: wild baculovirus control.

3.7 间接免疫荧光检测

分别将野生杆状病毒、rBac-SS4-VP2 重组杆状病毒感染对数生长期细胞,待细胞完全产生病变后,用 75%乙醇固定细胞做间接免疫荧光,健康细胞 Sf-9 作对照。重组病毒与猪细小病毒豚鼠阳性血清特异性反应,显微镜下观察可见很强的绿色荧光,而野毒感染细胞只是在病变周围存在很弱的非特异性荧光,健康细胞未检测到荧光(图 7)。

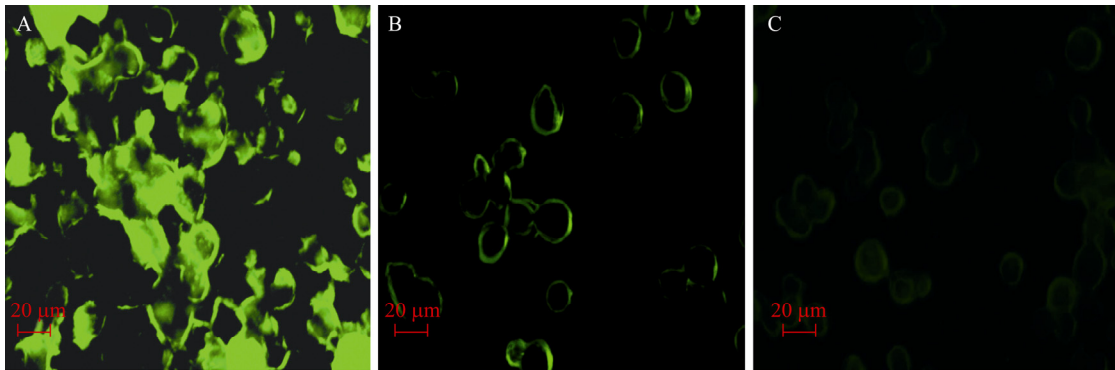


图 7 重组病毒的 IFA 检测

Fig. 7 Identification of the rSS4-VP2 protein expression by IFA. (A) Cells infected with rBac-SS4-VP2. (B) Cells infected with wild baculovirus. (C) Normal Sf-9 cells.

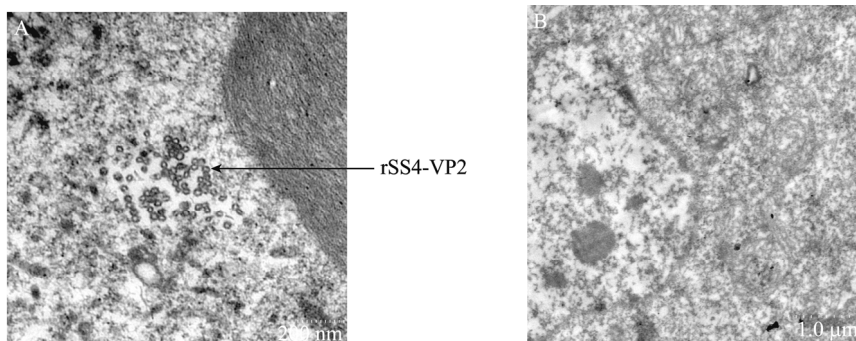


图 8 细胞中形成的病毒样颗粒

Fig. 8 VLPs in Sf-9 cells. (A) Sf-9 cells infected with rBac-SS4-VP2 through electron microscopy. (B) Sf-9 cells infected with wild baculovirus through electron microscopy.

3.9 猪细小病毒检测试剂盒检测抗体结果

利用试剂盒检测结果,免疫后 1 周没有检测到抗体,2 周可以检测到抗体但含量偏低,2 免后 1 周抗体逐渐升高,2 免后 2 周每组抗体明显升高(图 9)。从总体的抗体水平来看,2 免后 2 周 PPV 灭活苗组与重组蛋白组均产生了特异性抗体;从佐剂不同、抗原相同的组来看,抗体水平: Alhydrogel>IMS>CpG+Alhydrogel>CpG+IMS>Oil 组,但差异不显

3.8 电镜观察鉴定

取重组病毒感染 120 h 的细胞,戊二醛固定后,制备电镜超薄切片进行电镜观察。发现在细胞中有大量聚集在一起的直径约 20~30 nm 的球形颗粒,其形态大小均与 PPV 的全病毒粒子相近,证实 SS4-VP2 重组蛋白在杆状病毒表达系统中自我组装成嵌合病毒样颗粒 (Chimeric Virus-Like Particles, CVLP)(图 8)。

著;从佐剂相同、抗原不同的组比较看,抗体水平: PPV Inactivated vaccine>rSS4-VP2>rBac-SS4-VP2>Wild Baculovirus。

3.10 PPV 中和抗体的检测结果

利用中和试验检测免疫小鼠血清中和抗体滴度以评价重组病毒免疫后产生的体液免疫反应,2 免后 2 周每组血清中和抗体水平平均值(图 10)。在 9 个免疫组中,rSS4-VP2/Alhydrogel 免疫组产生的中

和抗体最高；PPV Inactivated vaccine/CpG+Alhydrogel 组次之；rSS4-VP2/IMS, rSS4-VP2/CpG+IMS, rSS4-VP2/CpG+Alhydrogel 免疫组所产生的中和抗体滴度相当，但稍低于前 2 组；rSS4-VP2/Oil 最差；Wild Baculovirus /CpG+Alhydrogel 与 PBS 对照组在整个试验中没有检测到任何 PPV 特异性中和抗体。

3.11 生长抑素抗体 ELISA 检测结果

间接 ELISA 检测 2 免后 2 周血清生长抑素抗体水平。结果表明:免疫重组蛋白 rSS4-VP2/Alhydrogel、rSS4-VP2/IMS、rSS4-VP2/CpG+IMS、rSS4-VP2/

CpG+Alhydrogel、rBac-SS4-VP2 均产生了特异性抗体，而对照组 Wild Baculovirus/CpG+Alhydrogel 与 PBS 组没有特异性抗体产生。rSS4-VP2/Alhydrogel 组抗体水平最高，稍高于其他组，其他重组蛋白免疫组间差异不显著 (图 11)。

3.12 生长激素浓度的检测结果

免疫重组蛋白的各免疫组 GH 浓度均有明显升高，rSS4-VP2/Alhydrogel 组 GH 水平最高，其他重组蛋白免疫组间差异不显著，rSS4-VP2/Oil 组稍微低一些，但与 Wild Baculovirus /CpG+Alhydrogel 和 PBS 对照组相比明显升高 (图 12)。

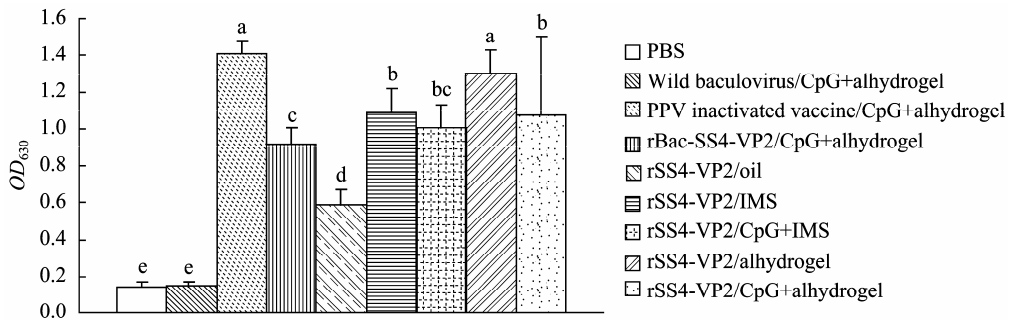


图 9 猪细小病毒试剂盒检测抗体

Fig. 9 Antibody detected by the kit. Values with different letters indicate significant differences ($P<0.05$).

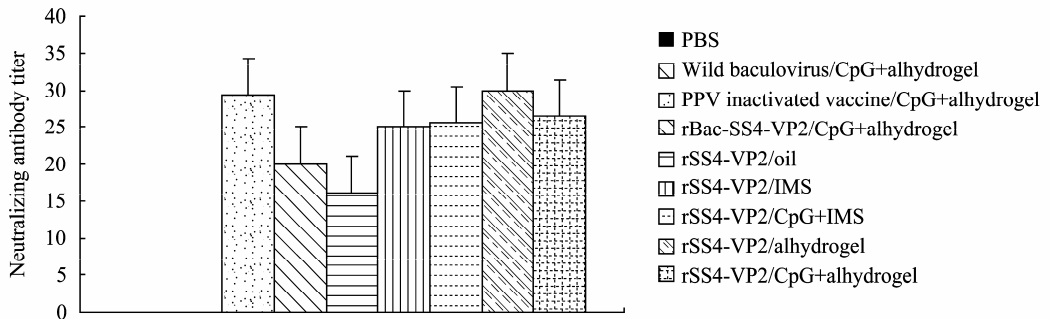


图 10 免疫小鼠 PPV 特异性中和抗体

Fig. 10 PPV specific neutralizing antibody detection for the immunized mice.

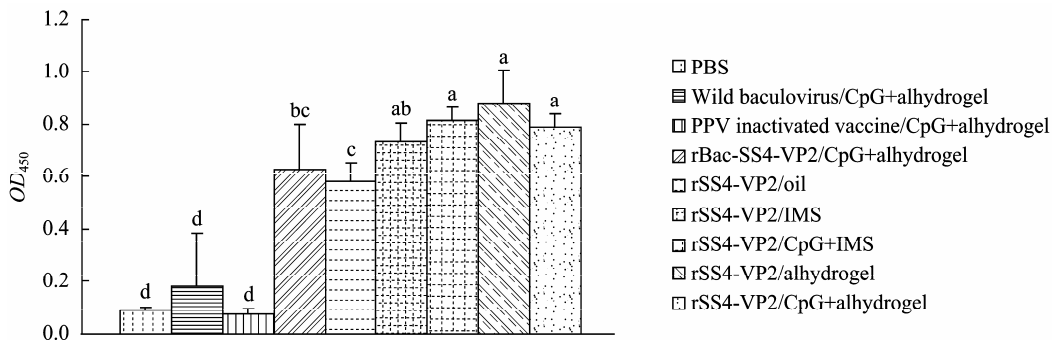


图 11 各组小鼠血清生长抑素抗体水平

Fig. 11 Antibody level in serum of the immunized mice. Values with different letters indicate significant differences ($P<0.05$).

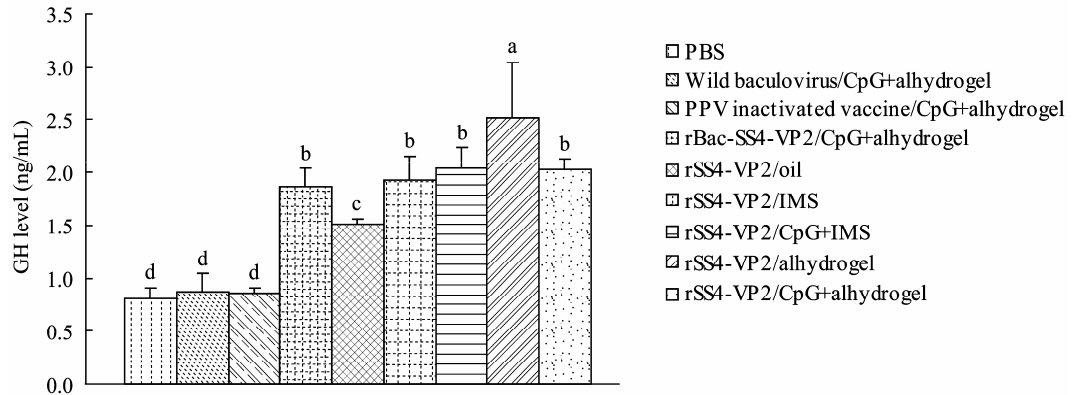


图 12 免疫小鼠生长激素水平检测

Fig. 12 GH level in serum of the immunized mice. Values with different letters indicate significant differences ($P < 0.05$).

4 讨论

猪细小病毒是一种重要的猪繁殖障碍疾病, 当前应用较多的是灭活疫苗, 但其存在着许多缺陷和不足。猪细小病毒在 PK-15 或 ST 细胞上增殖的滴度较低, 增加了灭活疫苗的生产成本, 并且在生产灭活苗的过程中涉及到强毒的繁殖, 因此存在散毒的潜在危险; 灭活疫苗产生抗体慢, 仅能诱发体液免疫应答, 不产生或仅产生轻微的细胞免疫应答和局部黏膜免疫应答; 灭活疫苗免疫保护时间短, 需多次或反复接种, 使用剂量大, 费用较高; 不能产生局部分泌型抗体 SIgA, 不能阻止病原微生物的局部感染; 以及灭活疫苗免疫效果的不稳定等。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重要内容。猪细小病毒的结构蛋白 VP2 可自我组装成病毒样颗粒 (VLPs), VLPs 不仅本身具有良好的免疫原性, 而且可以用作载体对半抗原分子进行展示, 以提高半抗原的免疫原性。王金良等^[14]将 VP2 全基因进行原核表达, 并利用所表达的蛋白建立了检测 PPV 血清抗体的间接 ELISA 方法。魏战勇等将 PPV VP2 基因克隆至 pCI-neo 真核表达载体中, 构建了 pCI-neo-VP2 重组质粒, 转染至 PK-15 细胞中, 并以小鼠为动物模型, 将 pCI-neo-VP2、pCI-neo 重组质粒、PPV 活疫苗和对照组通过肌肉注射进行免疫, 结果显示: pCI-neo-VP2 在体外能够诱导 PK-15 细胞表达 VP2 蛋白, 小鼠注射 pCI-neo-VP2 质粒 1 周后能够诱导机体产生抗体, 4 周时达到高峰, 与活疫苗对照组产

生的抗体滴度、诱导 T 淋巴细胞增殖和诱导强的细胞毒性基本一致。

杆状病毒表达系统具有与动物细胞相似的转录、翻译及翻译后加工等功能, 表达的外源蛋白保持原有的生物学活性, 迄今已成功用于表达多种病毒抗原, 有些病毒结构蛋白可形成病毒样粒子 (Virus-like particles, VLPs)^[15-16]。作为一种安全的抗原载体, 越来越多的学者将多肽基因与在大肠杆菌、酵母、杆状病毒等不同表达系统中能自我组装成病毒样颗粒的病毒衣壳蛋白基因融合^[17-18], 以增强多肽的免疫原性。Martinez 等^[19]将 PPV VP2 基因克隆至杆状病毒表达系统并在昆虫细胞中高产量表达。表达产物可自我装配成粒子, 在结构和抗原性上与常规的 PPV 衣壳并无差异。将高度提纯的表达产物 (类病毒粒子) 免疫猪, 其免疫效果与商品化的 PPV 疫苗的相同。Sedlik 等^[18]证明携带淋巴细胞性脉络丛脑膜炎病毒 (LCMV) 的 CTL 表位的 PPV VP2 自我装配形成的假病毒粒子, 免疫动物后, 免疫动物能抵抗致死量病毒的攻击。细小病毒的 VP2 基因可以独立地或者形成杂合的类病毒粒子并引起宿主产生免疫应答^[20-21], 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。

SS 是动物生长调节的一个重要因子。研究表明, 所有哺乳动物 SS 的分子结构均相同, 无种属特异性。猪免疫生长抑素后不影响猪肉品质, 人通过免疫后的猪肉摄入生长抑素或生长抑素的抗体, 不会

产生副作用, 因为生长抑素本身在人体内就是存在的, 而生长抑素的抗体在猪肉加工的过程中将会被破坏, 失去活性。并且已有多种文献报道, SS 已广泛用于治疗各种人类疾病, 具有较好的生物安全性。

本实验以猪细小病毒 VP2 蛋白可在杆状病毒表达中自我组装成病毒样颗粒为基础, 在 VP2 基因 5' 端连接一小段基因不影响装配的特性, 将其作为小分子量外源蛋白的运输载体。设计了以 PPV 的核衣壳蛋白 VP2 为支架载体, 以四拷贝的生长抑素为展示蛋白, 试图制备出携带生长抑素的 PPV 病毒样颗粒, 这种展示生长抑素的设计尚属首次。Western blotting、IFA 证明了杆状病毒表达的重组蛋白具有生物活性, 可以与猪细小病毒阳性血清发生特异性反应; 电镜观察发现, 在感染重组病毒的 Sf-9 细胞内含有直径约为 20~30 nm、形态大小均与全病毒粒子相似的病毒粒子, 也证实了在体外细小病毒能与其他蛋白自我组装成杂合的病毒样颗粒。

为了检测重组蛋白的免疫效力并筛选出能显著增强重组蛋白免疫效力的佐剂, 重组蛋白分别辅以铝胶、IMS 和白油不同佐剂免疫小鼠, 通过猪细小病毒特异性抗体水平, PPV 特异性中和抗体水平, 生长抑素抗体水平的检测, 结果均检测到了特异性抗体; 生长激素水平的检测, 发现生长激素水平明显提高, 证实重组蛋白具有较好的免疫效力。其中铝胶佐剂组抗体水平最高, 因其可吸附抗原形成凝聚性大颗粒, 易被细胞吞噬而增强抗原的免疫原性; 白油佐剂组抗体水平最低, 油乳苗产生免疫力慢, 抗体空白期长; CpG 效果不明显, 分析原因可能是 CpG 主要刺激机体产生细胞免疫; 从而筛选出铝胶佐剂是比较适合的佐剂。

本实验得到的细小病毒抗体水平达到了较高的水平。生长抑素相关测定数值整体都稍低, 这与免疫动物的日龄、免疫剂量、抗体水平测定时间有很大关系, 因动物体内存在 SS, 不同年龄存在量不同; SS 免疫不同动物免疫反应的强弱不同, 同种类甚至同群动物中, 抗体产生强度和速度也有明显变化。另一方面由于市场上无法买到小鼠生长激素放射免疫分析检测试剂盒, 所以本实验用的是人源的生长

激素放射免疫分析检测试剂盒, 存在着种属差异性, 测定值会稍有影响, 但对照组与实验组横向比较, 数据都明显升高。

总之, 重组蛋白在杆状病毒表达系统中形成的杂合病毒样颗粒在小鼠免疫试验中展现了良好的免疫效力, 为进一步研究既可预防猪细小病毒病, 也能提高猪生长速度的二联疫苗奠定了基础。目前正在进行重组蛋白猪体免疫效力试验。

REFERENCES

- [1] Yin Z, Liu JH. *Animal Virology*. 2nd ed. Beijing: Science Press, 1997.
殷震, 刘景华. *动物病毒学*. 2 版. 北京: 科学出版社, 1997.
- [2] Molitor T, Joo H, Collett M, *et al.* Porcine parvovirus: virus purification and structural and antigenic properties of virion polypeptides. *J Virol*, 1983, **45**: 842-854.
- [3] Choi C, Molitor T, Joo H, *et al.* Inhibition of porcine parvovirus replication by empty virus particles. *Arch Virol*, 1987, **96**: 75-87.
- [4] Martinez C, Dalsgaard K, Lopez de Turiso J, *et al.* Production of porcine parvovirus empty capsids with high immunogenic activity. *Vaccine*, 1992, **10**: 684-690.
- [5] Molitor TW. Identification and characterization of a porcine parvovirus nonstructural polypeptide. *J Virol*, 2002, **55**: 554-559.
- [6] Sedlik C, Saron MF, Sarraseca J, *et al.* Recombinant parvovirus-like particles as an antigen carrier: a non-replicative exogenous antigen to elicit protective antiviral cytotoxic T cells. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1997, **94**(14): 7503-7508.
- [7] Adriaan F, Christine J, PAaloma R, *et al.* A novel recombinant virus-like particle vaccine for prevention of porcine parvovirus-induced reproductive failure. *Vaccine*, 2006, **24**(24): 5481-5490.
- [8] Pan QX, He KW, Huang KH. Development of recombinant porcine parvovirus-like particles as an antigen carrier formed by the hybrid VP2 protein carrying immunoreactive epitope of porcine circovirus type 2. *Vaccine*, 2008, **26**(17): 2119-2126.
- [9] Martine ZC, Dalsgaard K, Lopez de Turiso JA, *et al.* Production of porcine parvovirus empty capsid with high immunogenic activity. *Vaccine*, 1992, **10**(10): 684-690.
- [10] Kim J, Chae C. Concurrent presence of porcine circovirus type 2 and porcine parvovirus in retrospective cases of

- exudative epidermitis in pigs. *Vet J*, 2004, **167**(1): 104–106.
- [11] Allan GM, Kennedy S, McNeilly F, *et al.* Experimental reproduction of severe wasting disease by coin-fec-tion of pigs with porcine circovirus and porcine parvovirus. *Comp Pathol*, 1999, **121**(1): 1–11.
- [12] Spencer GSG, Garssen GJ. A novel approach to growth promotion using autoimmunization against smatostatin III, effects in a commercial breed of sheep. *Livestock Pro Sci*, 1985, **13**: 43–52.
- [13] Adriaan FG, Christianne JM, Paloma R, *et al.* A novel recombinant virus-like particle vaccine for prevention of porcine parvovirus-induced reproductive failure. *Vaccine*, 2006, **24**: 5481–5490.
- [14] Wang JL, Shen ZQ, Tang N, *et al.* Prokaryotic expression of porcine parvovirus SD1 strain VP2 full gene and development of an indirect ELISA assay with the recombinant protein. *Ch J Vet Med*, 2008, **44**(7): 22–24.
王金良, 沈志强, 唐娜, 等. 猪细小病毒 PPV-SD1 株 VP2 全基因原核表达及间接 ELISA 检测方法的建立. 中国兽医杂志, 2008, **44**(7): 22–24.
- [15] Luckow V, Summers M. Trends in the development of baculovirus expression vectors. *Biotechnology*, 1988, **6**: 47–55.
- [16] Urakawa T, Ferguson M, Minor P, *et al.* Synthesis of immunogenic, but non-infectious, poliovirus particles in insect cells by a baculovirus expression vector. *J Gen Virol*, 1989, **70**: 1453–1463.
- [17] Casal JI, Rueda P, Hurtado A. Parvovirus-like particles as vaccine vectors. *J Virol Methods*, 1999, **19**: 174–186.
- [18] Sedlik C, Jaron M, Sarraseca J, *et al.* Recombinant parvovirus-like particles as an antigen carrier: a novel non-replicative exogenous antigen to elicit protective antiviral cytotoxic T cells. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1997, **94**(14): 7503–7508.
- [19] Martinez C, Dalsgaard K, Lopez de Turiso JA, *et al.* Production of porcine parvovirus empty capsids with high immunogenic activity. *Vaccine*, 1992, **10**: 684–690.
- [20] Brown C, Vanlent J, Vlak J, *et al.* Assembly of empty capsids by using baculovirus recombinants expressing human parvovirus B19 structural protein. *J Virol*, 1991, **65**: 2702–2706.
- [21] 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 Virol*, 2000, **74**(13): 5769–5775.