

猪细小病毒 VP2 蛋白 N 端甘氨酸富集区的缺失对病毒样颗粒形成及免疫原性的影响

陈弟诗¹, 郭万柱¹, 陈杨¹, 徐志文¹, 李雯², 任玉鹏¹, 王小玉¹

1 四川农业大学 动物生物技术中心, 雅安 625014

2 四川省畜牧科学研究院, 成都 610066

摘要: 猪细小病毒 (PPV) VP2 蛋白 N 端连续 9 个甘氨酸富集的编码区是 VP3 蛋白的切割位点, 常规 PCR 扩增容易导致该区段的缺失, 为研究该缺失对 PPV 病毒样颗粒 (VLPs) 的影响, 探索 VP2 病毒样颗粒上适合外源基因插入的位点, 构建了该区段缺失的 VP2 的真核表达载体 pCI- Δ VP2, 并以完整 VP2 作为对照, 采用脂质体介导法转染 Vero 细胞, 通过生物信息学技术、SDS-PAGE、Western blotting、间接免疫荧光以及正染和免疫电镜对表达产物进行分析观察; 进一步将重组质粒以核酸疫苗的方式直接肌注免疫小鼠, 采用间接 ELISA 试验、淋巴细胞增殖试验和 T 细胞亚群流式细胞技术, 分析免疫小鼠的体液和细胞免疫应答。结果显示, 缺失 Δ VP2 和完整 VP2 在 Vero 细胞中均能自我装配成 VLPs, 并具有与完整病毒粒子类似血凝性, pCI- Δ VP2 和 pCI-VP2 均可诱导小鼠产生较强的特异性体液免疫应答和良好的细胞免疫应答。结果表明, 甘氨酸富集区的缺失不影响 VP2 病毒样颗粒的装配和免疫原性, Δ VP2 同样可进行 PPV VLPs 疫苗和抗原转运载体的研制, 为 VLPs 载体改造和修饰位点的探索提供了新方向, 为 VP2 基因结构与蛋白质功能的关系提供了新的理论依据。

关键词: 猪细小病毒, VP2, 甘氨酸富集区, 缺失, 病毒样颗粒

Effect of the Glycine-rich region deleted PPV VP2 to the VLPs

Dishi Chen¹, Wanzhu Guo¹, Yang Chen¹, Zhiwen Xu¹, Wen Li², Yupeng Ren¹, and Xiaoyu Wang¹

1 Animal Biotechnology Center, Sichuan Agricultural University, Ya'an 625014, China

2 Sichuan Academy for Animal Sciences, Chengdu 610066, China

Abstract: The N-terminal of porcine parvovirus (PPV) viral protein 2 (VP2) links a glycine-rich domain which is a cleavage site of PPV VP3. In order to confirm that the glycine-rich domain was essential for the self-assembling of virus-like particles (VLPs). The VP2 gene with glycine-rich domain deleted and the complete VP2 gene were inserted to eukaryotic expression vector pCI-neo and

Received: January 10, 2011; **Accepted:** August 5, 2011

Supported by: Program for Changjiang Scholars and Innovative Research Team in University (PCSIRT) (No. IRT 0555).

Corresponding author: Wanzhu Guo. E-mail: wzguo@126.com

教育部长江学者和创新团队发展计划 (No. IRT0555) 资助。

were named pCI- Δ VP2 and pCI-VP2. Then, pCI- Δ VP2, pCI-VP2 and pCI-neo were transferred into Vero Cells by liposome and the VLPs was detected by SDS-PAGE, Western blotting, indirect immunofluorescence and immunoelectron microscopy. Furthermore, 56 female Kunming mice were divided into 5 groups and injected intramuscularly with pCI- Δ VP2, pCI-VP2 and pCI-neo as DNA vaccine, PPV inactivated vaccine and normal saline separately. The peripheral blood of the mice was collected to analyze the subgroups of the peripheral blood mononuclear cell by flow cytometry, to detect the antibody and lymphocyte proliferation by indirect-ELISA and MTT assay separately. The results show that the VLPs were observed both in the pCI- Δ VP2 and pCI-VP2 transferred Vero Cells. The two VLPs could agglutinate guinea pig erythrocytes. The results also show that both the pCI- Δ VP2 and pCI-VP2 vaccine induced special cellular and humoral immunity effectively. Those results revealed that the glycine-rich domain is not essential for the VLP's self-assembling. This study provides a new theoretical evidence for the relationship between the gene structure and protein function of VP2.

Keywords: porcine parvovirus (PPV), VP2, glycine-rich region, deletion, virus-like particles (VLPs)

猪细小病毒 (Porcine parvovirus, PPV) 属于细小病毒科细小病毒属的自主型病毒。以前该病毒作为引起猪繁殖障碍的严重病原之一受到诸多学者关注, 近来在断奶仔猪多系统衰竭综合征 (PWMS) 中, 由于能促进猪圆环病毒 II 型 (Porcine circovirus type2, PCV2) 的复制而显著增强其致病作用, 因此, 作为 PCV2 的协同病毒倍受重视。成熟完整的 PPV 病毒粒子呈圆形或六角形的二十面体对称结构, 无囊膜, 直径为 23~25 nm。包含 PPV 主要抗原决定簇以及决定 PPV 种系进化、血凝活性、组织嗜性和宿主范围^[1]的主要结构蛋白基因 VP2, 是不完整“空壳”粒子的主要构建者, 在体外表达能够自我装配成类似天然病毒衣壳的结构病毒样颗粒 (Virus-like particles, VLPs)。这种颗粒不含病毒核酸无感染性但有血凝活性, 具有与完整病毒类似的良好免疫原性和稳定性, 并能在适当的位点容纳外源抗原同时保持三维结构并诱导相应免疫反应, 因此研究作为新型疫苗和良好的转运载体具有很大的应用前景。本课题组致力于 PPV VP2 病毒样颗粒研究, 现已将其作为载体携带猪圆环病毒 PCV2 主要免疫抗原 ORF2 进行重组病毒样颗粒疫苗的研究, 并进行了关于 VP2 N 端^[2]、C 端^[2-3]作为 ORF2 的插入位点对 PPV VLPs 形成影响的研究, 以及 VP2 上 2 个半胱氨酸残基位点 Cys-402 和 Cys-214 突变^[4]对 VLPs 形成影

响的研究, 并取得一定成果。

有趣的是, 在研究过程中我们发现对 VP2 基因进行 PCR 扩增时, 在 5'端 73~108 nt 处有 36 bp 缺失, 而该区段是 VP2 蛋白 N 端连续 9 个甘氨酸富集的编码区 (25~33 aa), 且可能是产生 VP3 蛋白的切割位点^[5-6]。为此, 我们构建了 PPV VP2 缺失突变体的真核表达载体, 以完整 VP2 作为对照, 研究了该区段的缺失对 PPV VLPs 形成以及免疫原性的影响, 为深入探讨 PPV VP2 基因结构与蛋白质功能特性的关系提供了新的理论依据, 有助于 VP3 的研究, 丰富了 PPV 分子生物学内容, 为探索 VP2 上外源基因插入位点以及研制 PPV VLPs 疫苗和抗原转运系统提供了新的方向。

1 材料与方法

1.1 毒株、菌株、质粒和细胞

猪细小病毒 (PPV) SC-1 株^[7]由本实验室分离鉴定保存; 真核表达载体质粒 pCI-neo 由本实验室保存; pMD19-T Simple Vector 购自宝生物工程 (大连) 有限公司; 大肠杆菌 *Escherichia coli* DH5 α 菌种和 Vero 细胞由本实验室保存。

1.2 主要试剂

限制性内切酶、*Taq* DNA 聚合酶、低分子量蛋白预染 Marker 均购自宝生物工程 (大连) 有限公司; DNA 凝胶纯化试剂盒、*Pfu* PCR MasterMix 购

自天根生化科技(北京)有限公司; FuGENE HD Transfection Reagent 和 High pure Plasmid Isolation Kit 自 Roche 公司; PPV 抗体检测试剂盒购自深圳绿诗源生物科技有限公司; Rabbit anti-pig IgG/FITC 和 HRP 购自北京博奥森生物技术有限公司; anti mouse CD₃⁺/APC、CD₄⁺/PE、CD₈⁺/FITC 购自晶美公司。

1.3 试验动物

6~8 周龄雌性的昆明小白鼠, 体重 18~20 g, 购自四川大学实验动物中心。猪细小病毒灭活苗购自中牧实业有限公司。

表 1 Δ VP2 和 VP2 的扩增引物

Table 1 Primer sequences for PCR amplification of Δ VP2 and VP2

Primer name	Primer sequence (5'-3')	Restriction site	PCR length (bp)
P1a	TCTAGAATGAGTGAAAATGTGGAA	<i>Xba</i> I	1 752 (Δ 1 716)
P2a	GTCGACCTAGTATAATTTCTTGTA	<i>Sal</i> I	
P1b	TCTAGAATGAGTGAAAATGTGGAA	<i>Xba</i> I	2 054
P2b	GTCGACGTAAACACATGAGAGCTT	<i>Sal</i> I	

1.4.2 PPV VP2 缺失基因和完整基因的 PCR 扩增、克隆及序列测定

以 P1a/P2a 为引物从实验室保存的 PPV DNA 模板中 PCR 扩增 PPV VP2 基因, 反应体系为 20 μ L, 其中: P1a/P2a 各 0.5 μ L, 2 \times Pfu PCR MasterMix 10 μ L, PPV DNA 1 μ L, dH₂O 8 μ L。以 P1b/P2b 为引物扩增 VP2 完整基因, 反应体系为 20 μ L, 其中: P1b/P2b 各 0.5 μ L, 2 \times GC buffer I 10 μ L, dNTPs 0.5 μ L, *LA Taq* DNA 聚合酶 0.5 μ L, PPV DNA 1 μ L, dH₂O 7 μ L。扩增条件均为: 94 $^{\circ}$ C 5 min; 94 $^{\circ}$ C 1 min, 55 $^{\circ}$ C 1 min, 72 $^{\circ}$ C 2 min, 35 个循环; 72 $^{\circ}$ C 延伸 10 min。2 条 PCR 产物特异条带经琼脂糖凝胶电泳分析后回收, 克隆至 pMD19-T Simple 中并转化大肠杆菌 DH5 α , 筛选氨苄青霉素平板上单个菌落扩大培养, 提取质粒进行 PCR 以及 *Xba* I /*Sal* I 双酶切鉴定, 正确后送上海 Invitrogen 公司测序, 命名为 pMD- Δ VP2 和 pMD-VP2。

1.4 PPV VP2 缺失基因和完整基因的 PCR 扩增、克隆及序列测定

1.4.1 引物设计与合成

根据 PPV VP2 基因的核苷酸序列 (GenBank Accession No. NC001718) 设计一对引物 P1a/P2a, 扩增 VP2 完整 ORF, 仅从 ATG 到 TAG, 预期大小为 1 740 bp。同时设计一对引物 P1b/P2b, 扩增 VP2 完整 ORF, 并适当向 ORF 两端外延伸。在 2 对上下游引物的 5'端都引入 *Xba* I 和 *Sal* I 酶切位点 (引物序列见表 1)。

1.5 重组真核表达载体 pCI- Δ VP2 和 pCI-VP2 的构建

用 *Xba* I /*Sal* I 分别双酶切 pMD- Δ VP2 和 pMD-VP2 以及 pCI-neo 载体, 将回收的 VP2 以及 Δ VP2 基因片段分别接入 pCI-neo 载体, 转化大肠杆菌 DH5 α , 重组质粒经 *Xba* I /*Sal* I 双酶切和 PCR 鉴定正确后命名为 pCI- Δ VP2 和 pCI-VP2。

1.6 重组质粒 pCI- Δ VP2 和 pCI-VP2 的表达

1.6.1 重组质粒 pCI- Δ VP2 和 pCI-VP2 的转染 Vero 细胞

pCI- Δ VP2 和 pCI-VP2 在 Vero 细胞中的表达采用脂质体介导法, 具体操作参照 Roche 公司的转染试剂盒 FuGENE HD Transfection Reagent 说明书进行, 同时设立空载体对照。使用核酸蛋白仪分别测定重组质粒的浓度, 按照质粒 DNA 与脂质体 2 μ g: 5 μ L 的比例混合转染, 转染后将细胞置于 CO₂ 培养箱, 37 $^{\circ}$ C 培养 24~72 h。

1.6.2 重组质粒的表达产物 Western blotting 检测和间接免疫荧光检测

转染 48 h 分别收集转染细胞及上清进行 SDS-PAGE 和 Western blotting 检测, 具体操作参见《分子克隆》第 3 版, 一抗为猪抗 PPV 的多克隆抗体 (1:100 稀释), 二抗为 HRP-兔抗猪 IgG 抗体 (1:1 000)。另用 4%多聚甲醛固定转染细胞进行间接细胞免疫荧光鉴定, 以猪抗 PPV 多克隆抗体为一抗 (1:100 稀释), FITC 荧光标记的兔抗猪 IgG 为二抗, 于荧光显微镜下观察结果。

1.6.3 表达产物的电镜观察

刮下转染后 72 h 的 Vero 细胞, 15 000 r/min、4 °C 离心 30 min, 沉淀用 2.5%的戊二醛 4 °C 固定后, 经电镜样品处理后, 用透射电镜观察 VLPs 的形成。

1.6.4 VLPs 的粗纯及免疫电镜观察

将用重组质粒 pCI- Δ VP2 和 pCI-VP2 分别转染 10 cm² 细胞瓶的 Vero 细胞 56 h 后, 弃培养上清, 用 PBS 洗 2 次, 留约 1 mL PBS, 轻刮下细胞, 收集 2 至 3 瓶转染细胞后, -20 °C 反复冻融拍打 3 次在超声波使细胞完全裂解, 8 000 r/min、4 °C 离心 30 min, 吸取上清, 参考文献[8]对其进行超离纯化。向纯化后的样品液中加入等量的兔抗 PPV 高免血清 (1:40 倍稀释) 于 37 °C 作用 1 h, 25 000 r/min 离心 1 h, 沉淀用 50 μ L 无菌去离子重悬, 作为免疫电镜样品进行负染观察。

1.7 红细胞凝集试验

取 Δ VP2 和 VP2 病毒样颗粒的粗纯化物进行红细胞凝集试验, 以 PPV 全病毒作对照。操作参照猪细小病毒红细胞凝集抑制试验操作规程 (SN/1919-2007) 进行。

1.8 Δ VP2 真核表达的免疫原性的研究

1.8.1 实验动物分组与免疫

选取 6~8 周龄昆明小白鼠 56 只, 随机分成 5 组, 每组 12 只。其中 I 组, 接种 pCI- Δ VP2 (100 μ g/只); II 组, 接种 pCI-VP2 (100 μ g/只); III 组, 接种猪细

小病毒灭活疫苗 (0.2 头份/只); IV 组, 接种 pCI-neo 空载体; V 组为生理盐水空白对照。免疫方式为后肢肌肉注射, 免疫前 3 天该部位注射 0.5%普鲁卡因 100 μ L, 首免时相同部位肌肉注射, 首免后第 14 天相同部位相同剂量进行二免。每组小鼠随机选 4 只分别于 0、7、14、21、42、56 d 断尾采血取凝血和抗凝血各 1 份; 分别于首免后 42 d 无菌摘取脾脏用于淋巴细胞增殖实验。凝血分离血清用于 PPV 抗体检测, 抗凝血用于 T 淋巴细胞亚群的动态监测。

1.8.2 PPV 抗体监测

使用深圳绿诗源生物科技有限公司的 PPV 抗体检测试剂盒, 使用羊抗鼠二抗替换试剂盒中的羊抗猪二抗, 工作浓度为 1:2 500, 具体方法根据说明书。

1.8.3 T 淋巴细胞转化实验

无菌将小鼠脾制成脾细胞悬液浓度调整为 2×10^6 个/mL, 于 96 孔板中加入 100 μ L/孔, 每只小鼠为 9 孔, 其中 3 孔为 ConA 刺激组, ConA 终浓度为 5 mg/L; 3 孔为 PPV 刺激组, 加入 PPV 病毒液 10 μ L (HA 效价为 1:1 280); 3 孔为正常脾细胞组。37 °C 培养 68 h 左右, 加入 MTT 终浓度 0.5 g/L, 于振荡器上混匀, 继续培养 4 h 后, 每孔加入 DMSO 150 μ L, 充分混匀, 静置数分钟后于 1 h 内测 OD_{570} 值, 计算刺激指数 (SI), 计算公式为: $SI=A/B$, A 为刺激组 OD_{570} 值, B 为正常组脾细胞 OD_{570} 值。

1.8.4 T 淋巴细胞亚群的动态监测

将抗凝血置于 FCM 测量管中; 加入 2 mL 溶红细胞液, 充分混匀, 在 4 °C 冰箱中反应 10 min, 以 1 500 r/min 离心 5 min, 去上清; 加入 5 mL PBS 液洗涤, 收集细胞, 重复 2 次。加入 0.5 g/L CD_3^+ /APC 单克隆抗体 2 μ L, 0.1 g/L CD_4^+ /PE、 CD_8^+ /FITC 单克隆抗体试剂各 10 μ L, 充分混匀后在 4 °C 冰箱中避光反应 30 min; 再加 1 mL PBS 缓冲液, 以 1 500 r/min 离心 5 min, 弃上清; 将管底细胞用 1 mL PBS 悬浮, 上机检测。检测结果用 Cellquest 软件分析。

2 结果

2.1 PPV Δ VP2 和 VP2 的 PCR 扩增及分析

以 PPVSC-1 病毒基因组 DNA 为模板, 用 P1a/P2a 和 P1b/P2b 引物分别进行 PCR 扩增 VP2 基因, 经 0.7% 琼脂糖凝胶电泳分析, 结果显示在 1 700 bp 和 2 000 bp 处有特异条带, 与预期大小相符 (图 1)。将其分别克隆至 pMD19-T Simple 载体测序鉴定。

测序后与 PPV NADL-2 株 VP2 进行比对发现, Δ VP2 从 73~108 nt 缺失 36 bp, 缺失片段为: GGGGGTGGGGGCGGCGGTGGCGGGGGTAGGGGTGCT, 即从 25~36 aa 缺失 12 个氨基酸, 缺失氨基酸为: GGGGGGGGGRGA; 2 个碱基发生突变: 713 位 C \rightarrow T, 1 115 位 G \rightarrow A 导致 372 位氨基酸由 A \rightarrow T (丙氨酸 \rightarrow 苏氨酸), 而 VP2 仅 2 个碱基发生突变, 突变位置与 Δ VP2 相同。利用 SWISS-MODEL 和 PDB 数据库进行同源建模预测 Δ VP2 和 VP2 蛋白的三维结构, 应用 Swiss-PdbViewer 和 VectorNTI 软件进行分析 (图 2)。

2.2 含 PPV Δ VP2 和 VP2 真核表达载体的构建

经 *Xba* I / *Sal* I 双酶切后, pCI- Δ VP2 得到

1 700 bp 和 5 400 bp 两条带, pCI-VP2 得到大小约 2 000 bp 和 5 400 bp 的两条带 (图 3), 分别用 P1a/P2a 和 P1b/P2b 引物 PCR 鉴定, 同样得到 1 700 bp 和 2 000 bp 两条带, 与预期相符。表明真核表达载体 pCI- Δ VP2 和 pCI-VP2 构建成功。

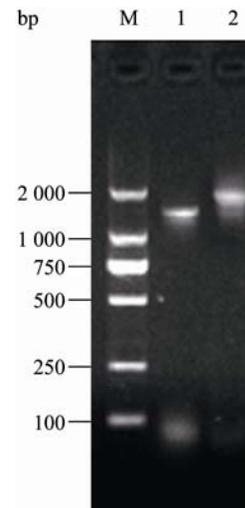


图 1 PPV Δ VP2 和 VP2 的 PCR 扩增

Fig.1 PCR amplification of PPV Δ VP2 and VP2. M: DNA marker; 1: PCR product of Δ VP2; 2: PCR product of VP2.

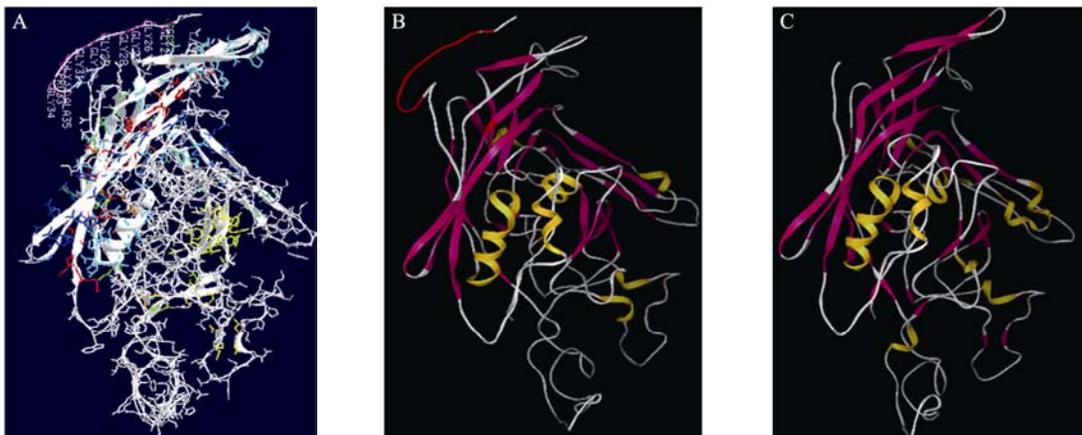


图 2 VP2 蛋白的三级结构预测

Fig. 2 Tertiary structure prediction of capsid protein VP2. (A) Tertiary structure model of PPV VP2, show α -helix and arrows (β -strand) as well as side chain, the purplish solid pipe represent deletion fragment on which labeled amino acid' name and position. (B) Tertiary structure model of CPV VP2 homologous with PPV VP2, show secondary structure and C-main chain, red pipe represent deletion fragment. (C) Tertiary structure model of PPV VP2 which deleted 37 aa in the N-terminus.

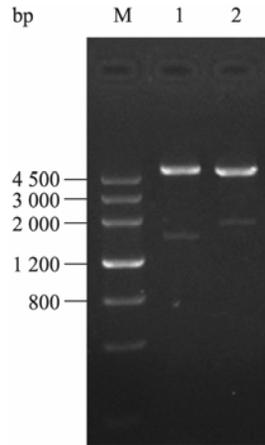


图3 pCI- Δ VP2 和 pCI-VP2 的双酶切鉴定

Fig. 3 Identification of pCI- Δ VP2 and pCI-VP2 by enzyme digestion. M: marker III; 1: pCI- Δ VP2 digested with *Xba* I and *Sal* I; 2: pCI-VP2 digested with *Xba* I and *Sal* I.

2.3 SDS-PAGE 和 Western blotting 检测重组质粒的表达产物

转染 48 h 分别收集 pCI- Δ VP2 和 pCI-VP2 转染细胞进行 SDS-PAGE, 考马斯亮蓝染色, 发现两者在约 64 kDa 处均有明显蛋白条带; 用猪抗 PPV 多克隆抗体进行 Western blotting 检测, 结果显示在约 64 kDa 处均出现对应特征性条带 (图 4), 说明 Δ VP2 和完整 VP2 在 Vero 细胞中均成功表达, 猪抗 PPV 多克隆抗体能够识别 Δ VP2, 且表达的 63.6 kDa 蛋白具有与 PPV VP2 表达的 64.3 kDa 蛋白相似的抗原特性。

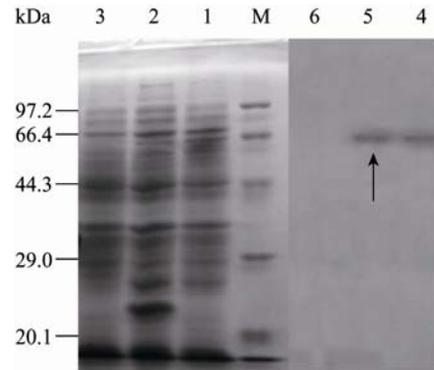


图4 SDS-PAGE 和 Western blotting 分析 pCI- Δ VP2 和 pCI-VP2 在 Vero 细胞中的表达

Fig.4 SDS-PAGE and Western blotting analysis of expression products of pCI- Δ VP2 and pCI-VP2. M: protein molecular weight marker (low); 1: expression result of pCI-VP2 in vero, after transfected 48 h; 2: pCI- Δ VP2; 3: pCI-neo; 4: Western blotting result of the expressed protein of pCI-VP2; 5: Western blotting result of the expressed protein of pCI- Δ VP2; 6: pCI-neo control.

2.4 重组质粒表达的间接免疫荧光检测

将 pCI- Δ VP2 和 pCI-VP2 重组质粒转染 Vero 细胞, 培养 48 h 后, 进行间接免疫荧光试验, 在荧光显微镜下可以观察到转染 pCI- Δ VP2 和 pCI-VP2 的 Vero 细胞均有明显的亮绿色荧光, 而空载体转染未见有 (图 5)。结果表明真核表达质粒 pCI- Δ VP2 和 pCI-VP2 在 Vero 细胞中进行了表达, VP2 的缺失不影响小鼠抗 PPV 多克隆抗体对表达产物的识别。

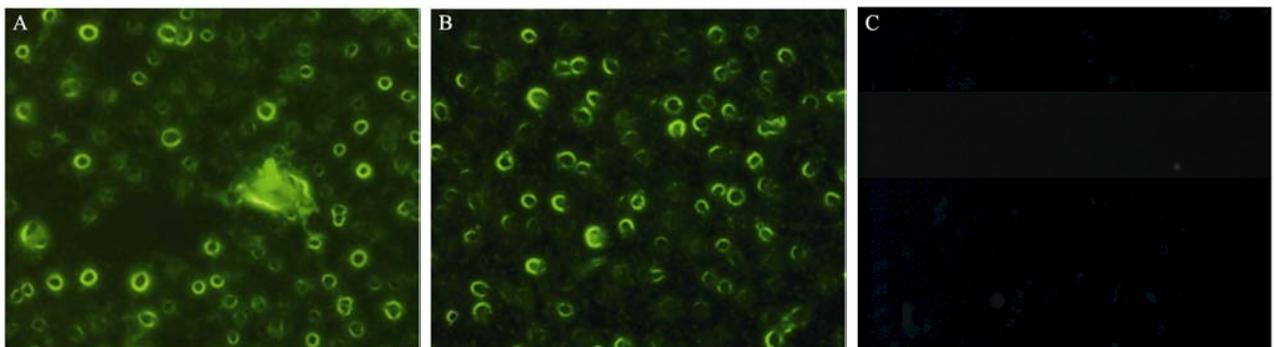


图5 间接免疫荧光检测 pCI- Δ VP2 和 pCI-VP2 在 Vero 细胞中的表达 (200 \times)

Fig.5 Detection of pCI- Δ VP2 和 pCI-VP2 expressed in Vero cells by indirect immunofluorescence assay (IFA) (200 \times). (A) IF of pCI- Δ VP2 expressed in vero after 48 h of transfection. (B) IF of pCI-VP2 expressed in vero after 48 h of transfection. (C) Blank control.

2.5 表达产物的电镜观察

经固定和染色, 在透射电镜下观察转染 48 h 的细胞, 发现 pCI- Δ VP2 和 pCI-VP2 的表达产物在 Vero 细胞中均形成了病毒样颗粒, 直径大约为 20 nm (图 6), 形态大小类似于全病毒粒子。进一步纯化表达产物 (VLPs) 进行免疫电镜观察。

2.6 表达产物的免疫电镜观察

pCI- Δ VP2 和 pCI-VP2 表达产物经纯化与兔抗 PPV 的阳性血清反应后, 负染进行电镜观察, 均能

观察到表达产物所形成的病毒样颗粒 (图 7), 呈典型的六角型, 无囊膜, 无核酸, 大小约为 20 nm, 表明 VP2 N 端甘氨酸富集区的缺失对病毒样颗粒的形成无明显影响。

2.7 红细胞凝聚试验

用 Δ VP2 和 VP2 病毒颗粒样的粗纯化物进行血凝试验, 发现表达的 PPV Δ VP2 和 VP2 蛋白均具有类似于全病毒的血凝活性, 血凝价可达到 1:128。

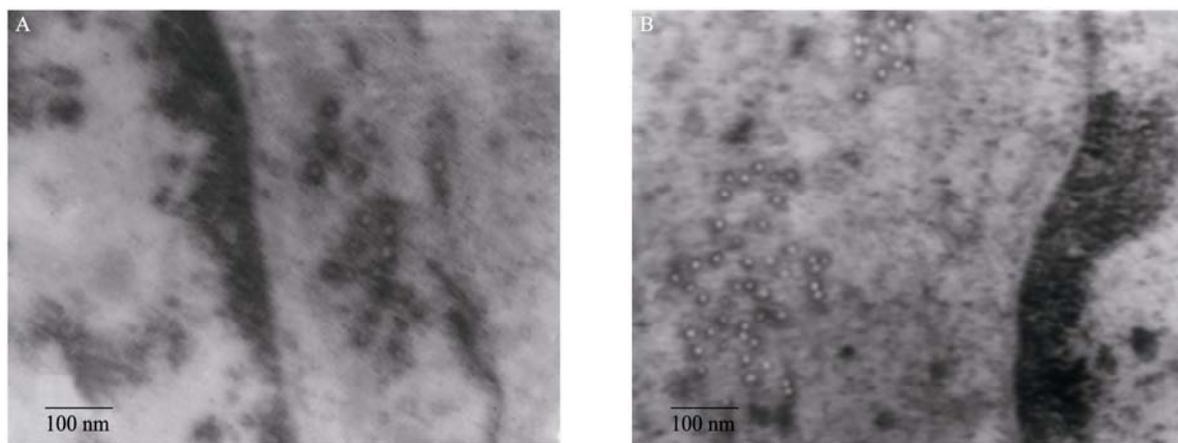


图 6 电镜观察表达产物在 Vero 细胞中形成的病毒样颗粒

Fig.6 Electron microscopy analysis of VLPs pCI- Δ VP2 and pCI-VP2 expressed in Vero cells. (A) pCI- Δ VP2 expressed VLPs. (B) pCI-VP2 expressed VLPs.

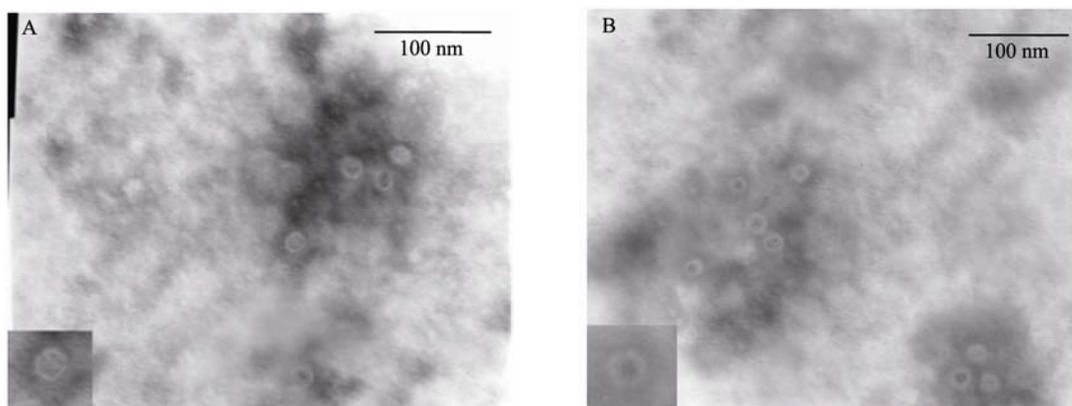


图 7 pCI- Δ VP2 和 pCI-VP2 表达粗提物经免疫电镜负染观察

Fig.7 Observation of the crude protein of pCI- Δ VP2 and pCI-VP2 expressed by negative staining and immunoelectron microscope. (A) The crude protein of pCI- Δ VP2 expressed. (B) The crude protein of pCI-VP2 expressed.

2.8 小鼠的体液免疫应答

试剂盒采用间接 ELISA 方法进行测定, 结果见图 8。真核表达质粒 pCI- Δ VP2 和 pCI-VP2 组在首免小鼠后 2 周血清抗体 OD_{630} 值有明显升高, 二免后抗体水平显著提升, 到第 5 周达到较高水平, 抗体 OD 值在第 14~56 天极显著 ($P<0.01$) 高于空载体和生理盐水对照组, 而 pCI- Δ VP2 和 pCI-VP2 组间无明显差异。猪细小灭活苗组在首免后 3 周检出 PPV 阳性抗体, 二免后第 2 周抗体水平迅速上升。表明真核表达质粒 pCI- Δ VP2 和 pCI-VP2 均可诱导小鼠产生特异性抗 PPV 的体液免疫应答, 而缺失对体液免疫的诱导无影响。

2.9 免疫小鼠脾细胞增殖试验

真核表达质粒 pCI- Δ VP2 和 pCI-VP2 组, 经特异性刺激物 PPV 刺激后均能够诱导强烈的脾淋巴细胞增殖反应, 与 pCI-neo 和生理盐水对照组差异极显著 ($P<0.01$), 而 pCI- Δ VP2 和 pCI-VP2 组间无明显差异, 虽然与猪细小灭活苗组在数值上有明显差异, 但在统计学上差异不显著 (表 2)。表明缺失对

VP2 刺激脾淋巴细胞增殖无明显影响, 且 pCI- Δ VP2 和 pCI-VP2 在诱导细胞免疫方面可达疫苗水平。

表 2 免疫小鼠脾脏细胞增殖试验结果

Table 2 The results of spleen lymphocyte proliferation response with PPV in mice immunized

Group	SI _{PPV} (n=4)	P<0.01
pCI- Δ VP2	2.101±0.159	A
pCI-VP2	2.158±0.290	A
PPVinactivated vaccine	1.936±0.161	A
pCI-neo	1.322±0.143	B
Normal saline	1.198±0.110	B

2.10 T 淋巴细胞亚群动态结果

经流式细胞仪检测, 统计分析显示, pCI- Δ VP2 和 pCI-VP2 组 CD4⁺T 淋巴细胞数量在第 14~42 天极显著 ($P<0.01$) 高于 pCI-neo 和生理盐水对照组, 但 pCI- Δ VP2 组和 pCI-VP2 组间无明显差异; 猪细小病毒灭活苗组 CD4⁺T 淋巴细胞数量在 7~14 d、28 d 显著 ($P<0.05$) 高于 pCI- Δ VP2 和 pCI-VP2 组 (图

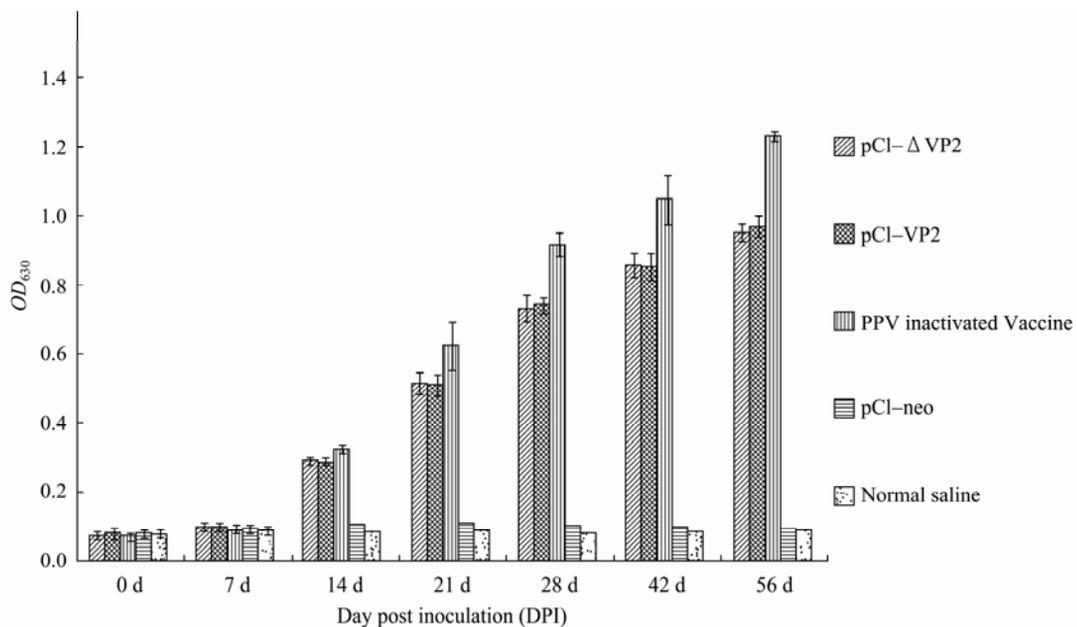


图 8 免疫后小鼠血清中 PPV 抗体的变化

Fig.8 PPV antibody immune response induced by the different group of vaccines in the serum of the immunized mice.

9)。pCI- Δ VP2 和 pCI-VP2 组 CD8⁺T 淋巴细胞数量在第 7~42 天极显著 ($P<0.01$) 高于 pCI-neo 和生理盐水对照组, 在 21~28 d 显著 ($P<0.05$) 高于细小病毒灭活苗组, pCI- Δ VP2 组和 pCI-VP2 组间无明显

差异 (图 10)。表明 pCI- Δ VP2 和 pCI-VP2 不仅能刺激 CD4⁺淋巴细胞的明显增殖, 而且在刺激 CD8⁺淋巴细胞的增殖方面明显优于灭活苗, 缺失对刺激 T 淋巴细胞亚群无明显影响。

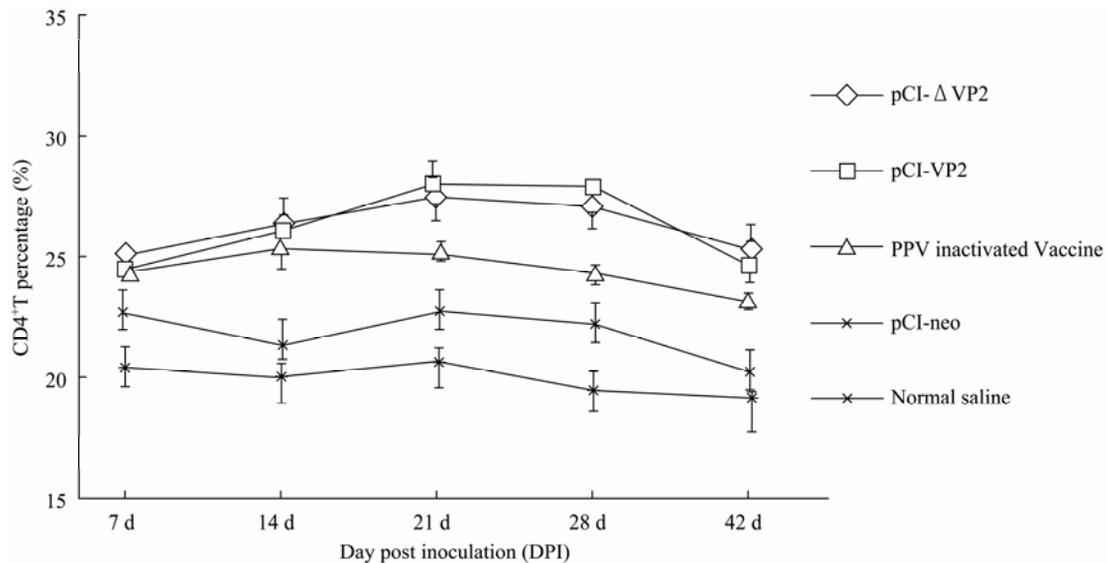


图 9 小白鼠外周血 CD4⁺淋巴细胞数量的动态变化

Fig.9 The dynamic change of CD4⁺ T-lymphocyte by Peripheral blood leukocytes of the immunized mice.

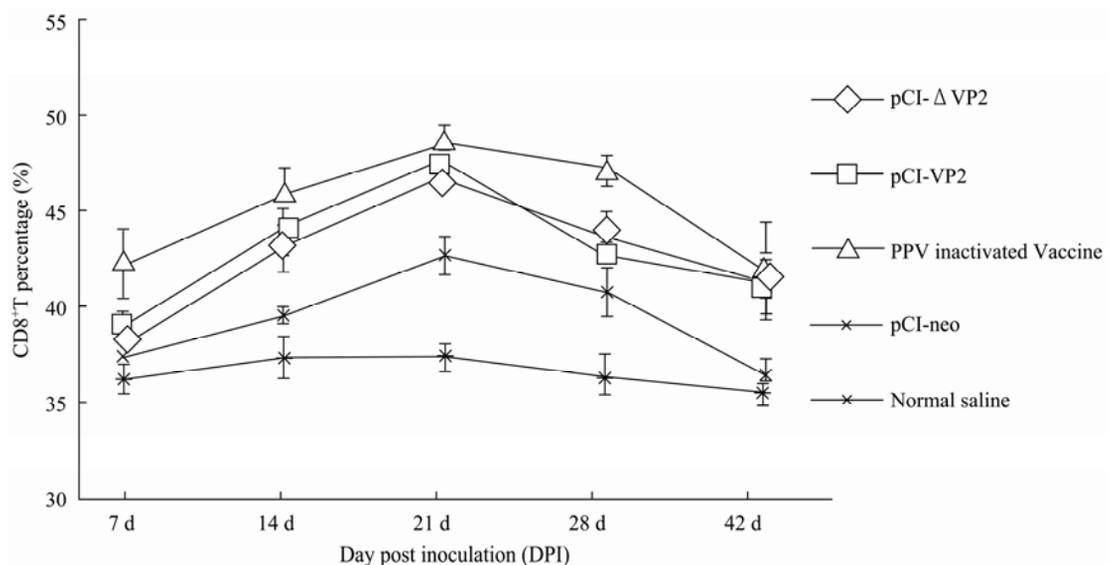


图 10 小白鼠外周血 CD8⁺淋巴细胞数量的动态变化

Fig.10 The dynamic change of CD8⁺ T-lymphocyte by peripheral blood leukocytes of the immunized mice.

3 讨论

VP2 作为 PPV 的主要结构蛋白, 早已成为 PPV 的研究方面的重点, 在诊断试剂和疫苗研究方面已彰显潜力, 尤其在动物生物制品日新月异的今天, VP2 更是 PPV 的研究关键和新型疫苗的首选目标。现已应用于预防 PPV 的核酸疫苗^[9-12], 动物^[13-14]和细菌^[15]的基因工程活载体疫苗, 基因工程亚单位疫苗^[16-19]等方面研究中。PPV VP2 不仅可以用于 PPV 疫苗的开发, 而且可用作多价基因工程疫苗的载体^[20-22]。因此, 对 VP2 结构与功能深入透彻地探究有助于 PPV 的研究和相关疫苗的开发。

笔者为进行 VP2 病毒样颗粒新型疫苗研究, 在利用 PPV 基因组 DNA 或克隆在 T 载体中的 VP2 (2 047 bp) 进行从 ATG 到 TAG 的完整 ORF 的常规 PCR 扩增时, 经多次多种方法试验和测序后发现 PCR 产物总会缺失相同的区段 73~108 nt, 该区段是甘氨酸富集区也是 VP3 切割位点。缺失的具体原因还不清楚, 推测以 PPV 基因组为模板其 DNA 的存在形式对 VP2 的缺失可能有一定关系, 成熟 PPV DNA 为单股负链, 3'端存在发夹结构^[23], VP2 靠近发夹结构, 发夹结合并包裹 VP2 形成位阻, 甚至导致 VP2 PCR 扩增困难, PPV 复制型 RF-DNA 中间体可能有助于 VP2 的完整性扩增, 这与 PPV 繁殖复制及抽提时间有密切关系; 而以 T-VP2 (2 047 bp) 为模板, 缺失区段可能形成特殊稳固的 DNA 二级结构埋藏于链内部, 都阻碍引物在 DNA 聚合酶的作用下向模板的该位置延伸。但为什么通过设计引物 3'端向 VP2 ORF 外延伸能够扩增出无缺失 VP2, 原因是不是远离 3'的引物有利于引物绕过 3'端二级结构的位阻和通过稳固区段, 这有待其他研究证实; 而 GC buffer 可促进 G 含量超高的缺失部位充分变性, 是否是两者共同作用保证了 VP2 的完整扩增。

缺失区可折叠形成 α -螺旋结构, 根据同源模建的蛋白质 3D 结构可以看出该区段位于 3D 结构外

侧, 缺失区段并未破坏蛋白折叠成高级结构的二硫键, 也未破坏 VP2 形成的蛋白单体的内部空间结构, 预测不会破坏 VP2 病毒样颗粒的形成。Pan 等^[24]将 PCV II 的 Cap 蛋白的抗原表位 108 bp (第 165~200 位氨基酸) 嵌合到 N 端缺失 108 bp 的 PPVVP2 基因, 通过重组腺病毒成功表达了能自行装配的 PCV2 Cap-PPV VP2 嵌合病毒样粒子, 形态大小和血凝活性与 PPV 全病毒粒子相似, 在不使用佐剂的情况下比单独的 PCV2 腺病毒重组体能够诱导更强的抗体反应, 表明 PPV VP2 N 端 108 bp 的缺失并不影响 VLPS 的装配。Gilbert 等^[25]将犬细小病毒 VP2 的 N 端缺失突变体 (缺失 14、23 和 40 个氨基酸残基) 与增强绿色荧光蛋白基因 (EGFP) C 末端融合, 重组杆状病毒用昆虫细胞进行表达经纯化后, 利用流式细胞分类技术监测到缺失 23、40 个氨基酸的 EGFP-VP2 能装配成发出绿色荧光病毒样颗粒结构, 而缺失 14 个氨基酸的 EGFP-VP2 则不能, 且缺失 23 个氨基酸的融合 VP2 比无缺失的具有稍大的流体半径, 还证明了缺失 40 个氨基酸的 VP2 更适宜于融合多肽进一步展示在衣壳样结构的表面。这两个试验均表明 VP2 N 端一定部位的缺失并不影响病毒样颗粒的形成, 同时还有利于嵌合多肽的抗原递呈。

由于缺失区段的特殊构成, 特别位置和特异功能, 引起了笔者的关注, 为研究该缺失对 PPV VLPs 的影响, 构建了 pCI- Δ VP2 和 pCI-VP2 真核表达质粒。细胞转染试验, 表明两者均在体外自我装配成 VLPs, 笔者推测两真核表达载体进入活动物体内细胞同样能装配成 VLPs, 因此, 本研究未使用纯化的病毒样颗粒进行动物实验, 而将其作为核酸疫苗直接免疫小鼠, 这样通过小鼠血清 PPV 抗体水平、T 淋巴细胞的增殖和 T 细胞亚群分析试验, 很大程度上也能反映和评价 VP2 甘氨酸富集区的缺失对病毒样颗粒免疫效果影响。PPV VP2 蛋白有 9 个已经被证实的线性抗原表位^[26], 缺失区 (25~36 位氨基酸)

覆盖了中和能力最强的第 1 个线性抗原表位 21~33 位氨基酸 (21-GNESGGGGGGG-33) 的 2/3; 同时, 缺失的 VP2 由于碱基突变导致 372 位氨基酸由 A 变为 T, 导致与 PPV 中和反应有关的第 6 抗原表位 367~383 氨基酸 (367-DEPNGAIRFTMDYQHG-383) 的变异。但小鼠的体液免疫实验结果表明缺失 VP2 与完整 VP2 以 DNA 疫苗方式诱导的抗 PPV 特异性抗体效价几乎相同, 显示出较为理想的抗体水平和变化规律, 缺失区和突变点虽然引起少量抗原表位的变化但未影响 VP2 的体液免疫原性。

从免疫小鼠脾细胞增殖试验和 T 淋巴细胞亚群动态数据反应: 缺失和非缺失的 VP2 都能明显刺激 CD8⁺ 淋巴细胞增殖, 诱导机体 MHC I 型免疫应答反应, 在细胞免疫方面都展现出非凡的潜力, 说明缺失和非缺失的 VP2 很可能在细胞内成功表达并装配成病毒样颗粒, 这论证了笔者将其作为核酸疫苗直接免疫小鼠的观点, 同时缺失和非缺失诱导的 CD4⁺、CD8⁺ 淋巴细胞动态变化趋势无明显差异, 证明了 VP2 甘氨酸富集区的缺失对病毒样颗粒在细胞免疫方面无明显影响。

近来, 很多学者对以 PPV VP2 VLPs 作为疫苗递呈系统在病毒样颗粒中的合适插入位点进行了探索, 发现 VP2 的 N 端^[27], VP2 蛋白质三级结构的 loop2 处^[28], 以及 N 端^[2,29] 1/3 处 (肽链的 171 和 172 位氨基酸间) 均可作为外源蛋白的插入位点, 其中 loop2 处的研究相对深入, 但在抗原肽的展示、运载的容量、病毒样颗粒的包装等方面各自尚存在缺陷。本研究探索了 VP2 N 端甘氨酸富集区的缺失对病毒样颗粒的影响, 结果显示缺失对 VP2 在病毒样颗粒的形成、血凝活性、免疫原性等方面几乎无影响, 表明该位点有可能作为携带外源抗原的候选位点, 而外源抗原在该位点的插入对病毒样颗粒的影响, 外源抗原的免疫递呈, 该位点对外源抗原的承载能力等都需要进一步试验证明。

综上所述, 甘氨酸富集区的缺失不影响 VP2 病

病毒样颗粒的装配和免疫原性, Δ VP2 同样可进行 PPV VLPs 疫苗和抗原转运载体的研制, 而该缺失阻断了 VP3 的水解, 避免了病毒重组的回复突变, 因此, 应用 Δ VP2 可能更具生物安全性。本研究为以 PPV VLPs 为基础的多价疫苗和抗原转运系统的研究提供理论参考, 为 VLPs 载体改造和修饰位点的探索提供了新方向, 为 VP2 基因结构与蛋白质功能的关系提供了新的理论依据, 并为进一步防治 PPV 的流行提供了分子流行病学资料。

REFERENCES

- [1] Zimmermann P, Ritzmann M, Selbitz HJ, et al. VP1 sequences of German porcine parvovirus isolates define two genetic lineages. *J Gen Virol*, 2006, 87(2): 295-301.
- [2] Zhu L, Guo WZ, Jiang QR, et al. Discovery of candidate site in virus-like particles (VLPs) of porcine parvovirus (PPV) for inserting foreign protein and the construction of the recombinant VLPs contained the ORF2 protein of porcine circovirus type 2 (PCV2). *J Agri Biotech*, 2010, 18(3): 431-436.
朱玲, 郭万柱, 蒋清蓉, 等. 猪细小病毒 VLPs 供外源蛋白插入的候选位点发现及其重组 PCV2-ORF2 的病毒样颗粒构建. *农业生物技术学报*, 2010, 18(3): 431-436.
- [3] Xu ZW, Guo WZ, Jiang QR, et al. Influence of insertion of porcine circovirus type 2 ORF2 gene into the 3' end of porcine parvovirus VP2 gene on formation of virus-like particle. *Chin Vet Sci*, 2009, 39(2): 95-100.
徐志文, 郭万柱, 蒋清蓉, 等. 猪圆环病毒 2 型 ORF2 基因插入猪细小病毒 VP2 基因 3' 端对病毒样颗粒形成的影响. *中国兽医科学*, 2009, 39(2): 95-100.
- [4] Xu ZW, Hu QJ, Guo WZ, et al. A primary study on effects of Cys-402 and Cys-214 of VP2 protein on PPV VLPs. *Heilongjiang Animal Sci Vet Med*, 2009(7): 17-19.
徐志文, 胡秋灵, 郭万柱, 等. VP2 蛋白 Cys-402、Cys-214 对猪细小病毒 VLPs 影响的初步研究. *黑龙江畜牧兽医*, 2009(7): 17-19.
- [5] Rhode SL 3rd. Nucleotide sequence of the coat protein gene of canine parvovirus. *J Virol*, 1985, 54(2): 630-633.
- [6] Chen KC, Shull BC, Moses EA, et al. Complete nucleotide sequence and genome organization of bovine parvovirus. *J*

- Virology, 1986, 60(3): 1085-1097.
- [7] Yin HP, Guo WZ, Xu ZW, et al. Isolation and identification of porcine parvovirus strain SC1. *Heilongjiang Animal Sci Vet Med*, 2006(7): 63-65.
殷华平, 郭万柱, 徐志文, 等. 猪细小病毒 (PPV) SC1 株的分离鉴定. *黑龙江畜牧兽医*, 2006(7): 63-65.
- [8] Zhou XH, Dong LX, Song JD, et al. Preparation of human parvovirus B19 virus-like particles. *Chin J Biotech*, 2009, 25(4): 575-579.
邹小辉, 董流昕, 宋敬东, 等. 人细小病毒 B19 病毒样颗粒的制备. *生物工程学报*, 2009, 25(4): 575-579.
- [9] Zhao JL, Chen HC, Lü JQ, et al. Study on gene immunity of porcine parvovirus structural protein genes VP1 and VP2. *Chin J Virology*, 2003, 19(1): 47-51.
赵俊龙, 陈焕春, 吕建强, 等. 猪细小病毒结构蛋白 VP-1 和 VP-2 的基因免疫研究. *病毒学报*, 2003, 19(1): 47-51.
- [10] Wei ZY, Wang XB, Cui BA, et al. Construction of porcine parvovirus VP2 nucleic acid vaccine and analysis of its immunogenicity in mice. *China Biotechnol*, 2006, 26(12): 63-67.
魏战勇, 王学斌, 崔保安, 等. 猪细小病毒核酸疫苗的构建及其对小鼠免疫原性的研究. *中国生物工程杂志*, 2006, 26(12): 63-67.
- [11] Wang Y, Wang X, Guo WZ. Construction and immunogenicity of nucleic acid vaccine of porcine parvovirus VP2 gene. *Chin J Vet Sci*, 2009, 29(5): 533-536.
王印, 王新, 郭万柱. 猪细小病毒 VP2 基因核酸疫苗的构建及免疫原性. *中国兽医学报*, 2009, 29(5): 533-536.
- [12] Cui BA, Wei ZY, Wang XB, et al. Construction of the eukaryotic expression vector with IL-2 gene and VP2 gene of PPV and research on immunogenicity. *Chin J Biotech*, 2006, 22(3): 426-429.
崔保安, 魏战勇, 王学斌, 等. IL-2 与猪细小病毒 VP-2 基因双表达载体的构建及免疫原性的研究. *生物工程学报*, 2006, 22(3): 426-429.
- [13] Luo Y, Guo WZ, Xu ZW, et al. Construction of a recombinant Pseudorabies virus coexpressing porcine parvovirus VP2 gene and a marker enhanced green fluorescence protein gene. *Acta Vet Zootech Sin*, 2005, 36(10): 1064-1068.
罗燕, 郭万柱, 徐志文, 等. 含绿色荧光蛋白基因的猪细小病毒病-伪狂犬病重组病毒的构建. *畜牧兽医学报*, 2005, 36(10): 1064-1068.
- [14] Wang X, Guo WZ, Zhou T. Study on the immunogenicity of recombinant virus of pseudorabies-porcine circovirus type 2-porcine parvovirus. *China Biotechnol*, 2008, 28(7): 43-47.
王新, 郭万柱, 周婷. 猪圆环病毒 2 型-细小病毒-伪狂犬重组病毒免疫小鼠试验研究. *中国生物工程杂志*, 2008, 28(7): 43-47.
- [15] Wang XQ, Ou D, Ren AQ, et al. Co-expression of PPV VP2 and LTB on the surface of *Lactobacillus casei*. *Microbiol China*, 2009, 36(10): 1536-1541.
王相清, 欧笛, 任安琦, 等. 猪细小病毒 VP2 与大肠杆菌不耐热肠毒素 B 亚单位在干酪乳杆菌表面共表达. *微生物学通报*, 2009, 36(10): 1536-1541.
- [16] Rymerson RT, Babiuk L, Menassa R, et al. Immunogenicity of the capsid protein VP2 from porcine parvovirus expressed in low alkaloid transgenic tobacco. *Mol Breed*, 2003, 11(4): 267-276.
- [17] Martínez C, Dalsgaard K, López de Turiso JA, et al. Production of porcine parvovirus empty capsids with high immunogenic activity. *Vaccine*, 1992, 10(10): 684-690.
- [18] Maranga L, Rueda P, Antonis A, et al. Large scale production and downstream processing of a recombinant porcine parvovirus vaccine. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2002, 59(1): 45-50.
- [19] Antonis AFG, Brusckhe CJM, Rueda P, et al. A novel recombinant virus-like particle vaccine for prevention of porcine parvovirus-induced reproductive failure. *Vaccine*, 2006, 24(26): 5481-5490.
- [20] Sedlik C, Saron MF, Sarraseca J, et al. Recombinant parvovirus-like particles as an antigen carrier: a novel nonreplicative exogenous antigen to elicit protective antiviral cytotoxic T cells. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1997, 94(14): 7503-7508.
- [21] Lo-Man R, Rueda P, Sedlik C, et al. A recombinant virus-like particle system derived from parvovirus as an efficient antigen carrier to elicit a polarized Th1 immune response without adjuvant. *Eur J Immunol*, 1998, 28(4): 1401-1407.
- [22] Xu ZW, Guo WZ, Chen Y, et al. Construction of recombinant pseudorabies virus co-expressing ORF2 gene of porcine circovirus type 2 and VP2 gene of porcine

- parvovirus. *Chin Vet Sci*, 2009, 39(10): 873–879.
- 徐志文, 郭万柱, 陈杨, 等. 联合表达 PPV VP2 和 PCV2 ORF2 基因的重组 PRV 的构建. *中国兽医科学*, 2009, 39(10): 873–879.
- [23] Bergeron J, Hébert B, Tijssen P. Genome organization of the Kresse strain of porcine parvovirus: identification of the allotropic determinant and comparison with those of NADL-2 and field isolates. *J Virol*, 1996, 70(4): 2508–2515.
- [24] Pan Q, He K, Huang K. 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.
- [25] Gilbert L, Toivola J, Väililehto O, et al. Truncated forms of viral VP2 proteins fused to EGFP assemble into fluorescent parvovirus-like particles. *J Nanobiotechnol*, 2006, 4(12): 13.
- [26] Kamstrup S, Langeveld J, Bøtner A, et al. Mapping the antigenic structure of porcine parvovirus at the level of peptides. *Virus Res*, 1998, 53(2): 163–173.
- [27] Sedlik C, Sarraseca J, Rueda P, et al. Immunogenicity of poliovirus B and T cell epitopes presented by hybrid porcine parvovirus particles. *J Gen Virol*, 1995, 76(9): 2361–2368.
- [28] Hurtado A, Rueda P, Nowicky J, et al. Identification of domains in canine parvovirus VP2 essential for the assembly of virus-like particles. *J Virol*, 1996, 70(8): 5422–5429.
- [29] Jiang QR, Xu ZW, Guo WZ, et al. The Influence of the insertion of ORF2 gene of porcine circovirus on the expression of VP2 gene of porcine parvovirus. *J Sichuan Agri Univ*, 2008(2): 185–190.
- 蒋清蓉, 徐志文, 郭万柱, 等. 猪圆环病毒 ORF2 基因的插入对猪细小病毒 VP2 基因蛋白表达的影响. *四川农业大学学报*, 2008(2): 185–190.