

鱼类病毒性神经坏死病毒衣壳蛋白在昆虫细胞中的表达及其特性

罗 卫^{1,2}, 田飞焱², 刘 荃¹, 陈焕春², 李惠芳²,
刘宗晓², 王 侃¹, 蔡伊娜¹, 吕建强¹

(1. 深圳出入境检验检疫局, 广东 深圳 518001;

2. 华中农业大学动物医学院, 湖北 武汉 430070)

摘要: 利用 RT-PCR 技术获得病毒性神经坏死病毒 0603 株的衣壳蛋白基因, 将其插入到杆状病毒 Bac-To-Bac 表达系统的 pFastBac I 质粒中, 构建了 pFastBac-cp 质粒。转化 DH₁₀Bac 大肠杆菌后获得重组穿梭载体 Bacmid-cp, 脂质体介导将其转染 Sf9 细胞产生有感染性的重组杆状病毒 AcNPV-cp。利用 AcNPV-cp 感染 Sf9 细胞后, SDS-PAGE 分析可见大小约为 37 ku 的特异性蛋白带, Western-blotting 分析发现, 其可以与病毒性神经坏死病毒阳性血清反应出现特异性的杂交带。试验结果表明, AcNPV-cp 在 Sf9 细胞中成功地表达了病毒性神经坏死病毒的衣壳蛋白, 其具有良好的免疫学活性。负染电镜观察发现, CP 蛋白可自行装配成病毒样颗粒, 其大小形态类似于病毒性神经坏死病毒。制备超薄切片后电镜观察发现, CP 蛋白自行装配成的病毒样颗粒呈晶格状排列在细胞质中。为研制有效防控鱼类病毒性神经坏死病的新颖颗粒性疫苗奠定了基础。

关键词: 病毒性神经坏死病毒; 衣壳蛋白; 病毒样颗粒

中图分类号: S917

文献标识码: A

鱼类病毒性神经坏死病毒(viral nervous necrosis virus, VNNV)属于诺达病毒科 Beta 诺达病毒属, 由于 Beta 诺达病毒只感染鱼类, 又称鱼类诺达病毒, 是迄今发现的最小鱼类病毒, 病毒粒子直径只有 25~34 nm, 由衣壳和核心两部分组成, 无囊膜, 而衣壳由 180 个衣壳亚单位组成^[1]。病毒基因组包括两条正义的、非聚腺苷酸化的 RNA 单链(RNA1 和 RNA2)^[2]。RNA1 的大小约为 3.0~3.2 kb, 主要编码非结构 A 蛋白, 是一种依赖 RNA 的 RNA 聚合酶, RNA2 的大小约为 1.3~1.4 kb, 其开放阅读框编码一个病毒衣壳蛋白(CP 蛋白)^[3-4]。

VNNV 能引起尖吻鲈(*Lates calcarifer*)、赤

点石斑鱼(*Epinephelus akaara*)、棕点石斑鱼(*E. fuscoguttatus*)、巨石斑鱼(*E. lauvina*)、红鳍多纪鲷(*Takifugu rubripes*)、条斑星鲷(*Verasper moseri*)、牙鲆(*Parakucgthy olivaceus*)和大菱鲆(*Scophthalmus marimus*)等多种海水鱼中枢神经组织和视网膜的空泡化^[5-6], 目前该病毒引起的疾病在除非洲以外的世界其它地方迅速蔓延开来, 给各国海水养殖业造成了巨大的损失, 受感染的鱼类已达 40 余种^[7-8], 我国沿海大规模网箱养殖的石斑鱼, 由于受神经坏死病毒感染的感染, 给育苗生产带来极大的损失。当前对该病还没有特效治疗药物, 主要以预防为主, 利用病毒衣壳蛋白作为抗原研制新型疫苗可能是有效的防治手段之一。

收稿日期: 2007-06-01

资助项目: 国家“八六三”高技术研究发展计划(2006AA100306)

作者简介: 罗 卫(1968-), 男, 天津人, 博士研究生, 主要从事动物检疫及动物病毒学研究, Tel:13509629680,

E-mail: luoweicq@163.com

通讯作者: 吕建强, Tel:0755-25588685, E-mail:lvjq75@163.com

为了对 VNNV 的衣壳蛋白进行深入研究,本研究采用杆状病毒表达系统 Bac-To-Bac 成功地体外表达了 CP 蛋白,并对其特性进行研究,为研究该蛋白的生物学功能、VNNV 形态发生及研制基因工程疫苗创造了条件。

1 材料与amp;方法

1.1 材料

病毒、载体和细胞 VNNV 病毒株 0603 是 2006 年由本实验室从福建沿海养殖发病的青石斑中分离获得,由本室保存、提供;pMD18-T 载体为 TaKaRa 公司产品;大肠杆菌 DH₅ α 及 DH₁₀ Bac、草地夜蛾卵巢细胞 (Sf9) 和 pFastBac I 载体均为 Invitrogen 公司产品;SSN-1 细胞(斑鳢细胞株 1)用于增殖 VNNV,购自泰国 Kasetsart 大学水生动物健康研究所,由本室保存、提供。

引物设计与合成 根据已报道的 VNNV 衣壳蛋白基因(cp gene)的核苷酸序列设计引物,并由上海生工生物工程技术有限公司合成,具体序列如下:上游引物:5' - TCACAATGGTACGCAAAGG - 3',下游引物:5' - CG GATG ACCCGGTTA GTT - 3'。

酶及化学试剂等 限制性内切酶、Viral RNA/DNA Extraction Kit、One Step RNA PCR Kit (AMV)、Agarose Gel DNA Fragment Recovery Kit、MiniBEST Plasmid purification Kit 等均购自宝生物工程(大连)有限公司;增强型 HRP-DAB 底物显色试剂盒为 TIANGEN 公司产品;SF-900 II SFM 培养基及脂质体转染试剂(CELLFECTIN REAGENT)均为 Invitrogen 公司产品;VNNV 阳性兔血清由本室制备、保存和提供;辣根过氧化物酶标记的羊抗兔二抗购自晶美生物工程有限公司。

1.2 方法

病毒 RNA 的提取 将 VNNV 接种 SSN-1 细胞单层,于 25 ℃ 恒温培养,当细胞病变达到 90% 时,收集细胞悬液,反复冻融 3 次后以 2 000 \times g 离心 10 min,收集上清液后利用 Viral RNA/DNA Extraction Kit 抽提病毒核酸,操作方法参照试剂盒说明书。

VNNV cp 基因的 RT-PCR 扩增 采用 One Step RNA PCR Kit 从 VNNV 基因组中扩增其衣壳蛋白基因(cp gene),扩增反应体系参

照试剂盒说明书,RT-PCR 反应程序如下:50 ℃ 40 min,94 ℃ 2 min;94 ℃ 45 s,55 ℃ 45 s,72 ℃ 1 min,如此重复 30 个循环;然后 72 ℃ 延伸 10 min,4 ℃ 保温。

VNNV cp 基因的克隆 用 TaKaRa Agarose Gel DNA Fragment Recovery Kit 回收纯化 VNNV cp 基因的扩增产物,将回收的 DNA 片断与 pMD 18-T 连接,蓝白斑筛选及 BamH I 酶切鉴定后,获得质粒 pMD18-cp,并由上海生工生物工程技术有限公司进行核苷酸序列测定。

重组穿梭载体 Bacmid-cp 的构建 用 EcoR I 和 Hind III 双酶切 pMD18-cp 质粒,将切下的目的片段,连接到已相应酶切过的 pFast-Bac I 质粒的相应位点,转化感受态大肠杆菌 DH₅ α 得到 pFast-cp,采用 BamH I 酶切鉴定 cp 基因插入的方向。再将其转化感受态大肠杆菌 DH₁₀ Bac,在含 IPTG、X-gal、卡那霉素、庆大霉素及四环素的 LB 平板上进行蓝白斑筛选,挑取白色菌落三次划线纯化,经 PCR 鉴定后,获得重组穿梭载体 DNA (Bacmid-cp)。

重组杆状病毒(AcNPV-cp)的获得 碱裂解法提取 Bacmid-cp DNA,利用 CELLFECTIN REAGENT 脂质体介导转染适应无血清培养基(SF-900 II)的 Sf9 细胞,当发生细胞病变后,收集细胞悬液,离心取上清即获得重组杆状病毒(AcNPV-cp),具体操作参照 Bac-To-Bac 杆状病毒表达系统操作手册及转染试剂盒说明书进行。

SDS-PAGE 和 Western-blotting 鉴定表达的目的蛋白 分别收集重组杆状病毒 AcNPV-cp 感染后 48 h 和 72 h 的病变 Sf9 细胞,PBS 洗 3 次,超声波裂解后,进行 SDS-PAGE,分离胶浓度为 12%。将蛋白从 SDS-PAGE 胶上转移至硝酸纤维膜上,用封闭液封闭 1 h 后,与 VNNV 阳性兔血清(1:800 稀释)在室温下反应 1.5 h,然后用洗涤液洗膜 3 次,每次 5 min。再加入辣根过氧化物酶标记的羊抗兔二抗(1:1 000),室温反应 1.5 h,彻底洗涤膜后,将膜置于含有 DAB 的显色液中显色至条带清晰,立即将膜放入蒸馏水中终止显色反应。在 SDS-PAGE 和 Western-blotting 中,感染 AcNPV 的 Sf9 细胞及正常 Sf9 细胞作为阴性对照及空白对照。

体外表达 CP 蛋白的粗纯化 在刚长成单

层的 Sf9 细胞上以 3~5 pfu 的感染复数接种 AcNPV-cp, 接种 3 d 后收集病变细胞, 用 PBS 洗 3 次后进行超声波裂解, 然后 $24\,000 \times g$ 离心 15 min, 上清液中含有体外表达的 VNNV CP 蛋白。收集的上清中缓慢加入硫酸铵至终浓度 45%, $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 搅拌过夜进行沉淀, 然后 $10\,000 \times g$ 离心 30 min, 沉淀重悬于 PBS 中, 透析、除盐即为体外表达的 CP 蛋白粗提物。

电镜观察 将 CP 蛋白的粗纯化物在 45% 的硫酸铵溶液中沉淀, $10\,000 \times g$ 离心 10 min, 取上清透析除盐后, 用 20% 的聚乙二醇 6 000 浓缩。然后负性染色, 利用 H7000 透射电子显微镜进行观察并照相。此外, 我们通过预冷的 3% 戊二醛固定感染了 AcNPV-MCP 的 sf9 细胞, 细胞切片后电镜观察。

2 结果和分析

2.1 VNNV cp 基因的克隆及鉴定

利用 RT-PCR 方法, 从 VNNV 基因组中扩增获得 VNNV cp 基因, 将其克隆到 pMD18-T 载体中, 筛选获得 pMD18-cp 质粒, 进行 cp 基因核苷酸序列测定发现, 其大小为 1 017 bp, 与已经报道的 VNNV cp 基因的核苷酸序列同源性达到 98.1% 以上。然后用 BamH I 酶切 pMD18-cp 质粒, 电泳出现约 3 040 bp 和 750 bp 左右大小的目的片段, 表明 VNNV cp 基因是正向插入到 pMD18-T 载体中 (图 1)。

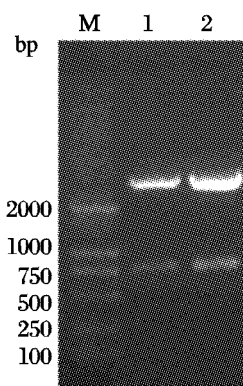


图 1 重组质粒 pMD18-cp 的酶切鉴定

M: DL-200 DNA 标准;
1, 2: BamH I

Fig. 1 Identification of plasmid pMD18-cp

M. DL-2000 DNA Marker;
1, 2. pMD18-cp cutted by BamH I

2.2 穿梭载体 Bacmid-cp 的构建

将 pMD18-cp 中的 cp 基因定向克隆至 pFastBac I 质粒的 EcoR I 和 Hind III 位点之间, 获得中间转移载体 pFastBac-cp, 由于目的基因的第 743 个碱基处及 pFastBac I 载体插入位点上游均存在 BamH I 酶切位点, 用 BamH I 单酶切后产生大小约为 750 bp 及 5 000 bp 左右的目的条带, 从而证实 cp 基因已正向插入到杆状病毒强的晚期启动子 pPolh 下游 (图 2)。将 pFastBac-cp 转化 DH₁₀ Bac 大肠杆菌, 筛选获得白色阳性菌落, 小量制备重组 Bacmid-cp DNA 备用。

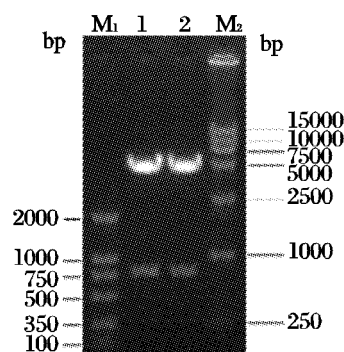


图 2 酶切鉴定 pFastBac-cp 质粒

M₁: DL-2000 DNA 标准; M₂: DL-1500 DNA 标准;
1, 2: BamH I 酶切 pFastBac-cp 质粒

Fig. 2 Restriction analysis of the pFastBac-cp

M₁. DL-2000 DNA Marker; M₂. DL-15000 DNA Marker;
1, 2. pFastBac-cp cutted by BamH I

2.3 重组杆状病毒 AcNPV-cp 的获得

在无血清条件下, 用 CELLFECTIN 脂质体介导 Bacmid-cp DNA 转染生长状态良好的 Sf9 细胞单层, 逐日观察发现, 转染 72 h 后细胞明显出现肿胀变大现象, 部分细胞脱落 (图 3), 而对照细胞生长良好, 表明已经获得重组杆状病毒 AcNPV-cp。收集病变细胞培养上清液, 低速离心去除细胞及碎片即为目的病毒液。

2.4 体外表达蛋白的鉴定

同时收集 AcNPV 及 AcNPV-cp 分别感染后 48 h、72 h 的病变细胞, 正常细胞作为空白对照, 经 SDS-PAGE、考马斯亮兰染色后发现, 在 lane 1 和 4 中均出现一条大小约为 37 ku 的特异性蛋白质带, 与预测的 VNNV CP 蛋白分子量相近, 而阴性对照及空白对照中未出现, 其中感染后 72 h 的表达量要高于感染后 48 h 的 (图 4-A)。

用 VNNV 阳性兔血清和辣根过氧化物酶标

记的羊抗兔抗体对表达的蛋白进行 Western-blotting 分析,结果发现,在 lane 1, 4 中出现特异性杂交带,其位于大小约 37 ku 处,其它泳道中则没有出现杂交带(图 4-B),表明体外表达的蛋白是 VNNV CP 蛋白,其具有良好的免疫学活性。

2.5 电镜观察

对重组杆状病毒 AcNPV-cp 表达的 VNNV

CP 蛋白进行粗纯化、负性染色后,在电子显微镜下可以看到许多病毒样粒子存在,呈典型的二十面立体对称结构,无囊膜,直径为 25 nm 左右,其形态大小均与 VNNV 全病毒粒子相近(图 5-A)。对感染 AcNPV-cp 后 48 h 的 Sf9 细胞进行超薄切片制备及硝酸铅染色,透射电子显微镜观察发现,在细胞质中有大量病毒颗粒呈晶格状排列(图 5-B)。

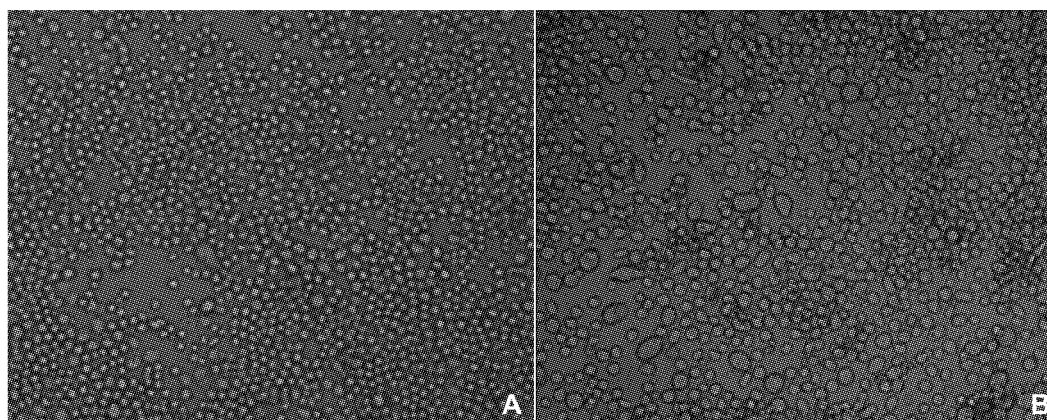


图 3 AcNPV-cp 感染前和感染后 72 h 的细胞状态比较($\times 40$)

A: AcNPV-cp 感染前的 Sf9 细胞; B: 感染 AcNPV-cp 后 72 h 的 Sf9 细胞

Fig. 3 Comparison of uninfected cells and infected cells 72 h post infection by AcNPV-cp

A: The uninfected cells by AcNPV-cp; B: The cells post-infected 72 h by AcNPV-cp

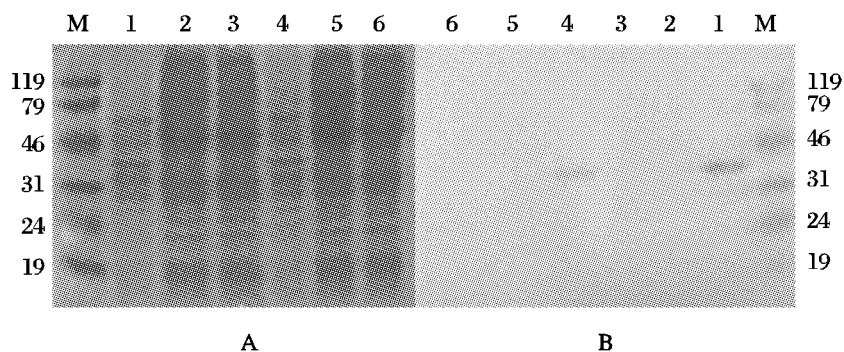


图 4 SDS-PAGE, Western-blotting 鉴定表达的 CP 蛋白

A: SDS-PAGE 分析 CP 蛋白; B: Western-blotting 鉴定 CP 蛋白; M: 蛋白分子量的标准; Lane1: AcNPV-cp 感染后 48 h 产物; Lane2: AcNPV 感染 48 h 产物; Lane3, 6: 正常细胞; Lane4: AcNPV-cp 感染 72 h 产物; Lane5: AcNPV 感染后 72 h 产物

Fig. 4 Identification of CP protein expressed by SDS-PAGE, Western-blotting

A. Analysis of CP protein by SDS-PAGE; B. Identification of CP protein by Western-blotting

M. Protein molecular weight Marker; Lane1. Product of AcNPV-cp post-infection 48 h; Lane2. Product of AcNPV post-infection; Lane3, 6. uninfected insect cells; Lane4. Product of AcNPV-cp post-infection 72 h; Lane5. Product of AcNPV post-infection 72 h

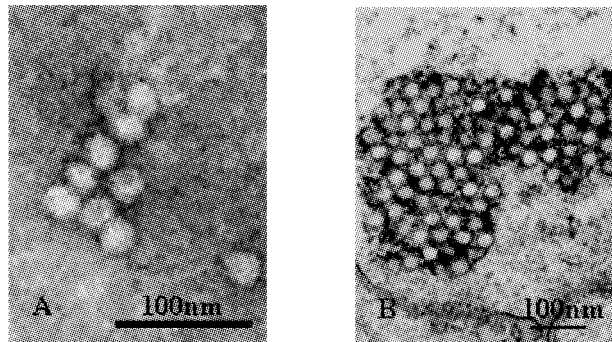


图5 VNNV CP蛋白形成的病毒样颗粒电镜图

A: 粗提物中 VNNV CP 蛋白自行组装成病毒样果粒, 200 000 倍; B: 在感染 Sf9 细胞中病毒样颗粒形成的晶格状结构, 80 000 倍

Fig. 5 Electron micrograph of VLPs formed by VNNV CP protein

A: The VLPs was self-assembled by VNNV CP protein in the crude extract, $\times 200\ 000$;
B: The crystalline structure formed by VLPs in the infected Sf9 cells, $\times 80\ 000$

3 讨论

根据神经坏死病毒 *cp* 基因将其分为 4 种基因型, 并且发现这 4 种基因型的 NNV 具有大量相同的抗原表位, 表明 NNV 的衣壳蛋白在病毒感染动物过程中以及诱导机体产生保护性抗体时起重要作用, 预示体外表达该病毒 CP 蛋白来研制抗病毒疫苗成为可能^[9-10]。目前用于蛋白表达研究的表达系统包括大肠杆菌原核表达系统、酵母表达系统、杆状病毒昆虫细胞表达系统和哺乳动物细胞表达系统 4 种。将含有斜带石斑鱼神经坏死病毒的衣壳蛋白基因在大肠杆菌 BL21 获得重组表达, 用表达的融合蛋白作为抗原免疫新西兰大白兔, 制备抗 CP 融合蛋白的阳性血清, 结果发现, 获得的抗血清能有效中和病毒, 实验组的相对存活率达 54.50%^[11]。

为了深入研究 VNNV CP 蛋白的功能及研制有效疫苗, 本研究利用杆状病毒 Bac-To-Bac 表达系统成功地表达了 CP 蛋白。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, 表达产生的外源蛋白基本保持原有的生物学活性, 操作简便、表达量高, 迄今已成功的用于表达多种病毒抗原, 有些病毒结构蛋白可形成病毒样颗粒 (virus-like particles, VLPs)^[12]。在本研究中发现, 构建的包含 VNNV *cp* 基因的重组杆状病毒 AcNPV-*cp* 感染 Sf9 细胞后, 重组病毒大量存在于上清液中, 尤其以感染后 48 h 时的滴度最高, 而表达的 CP 蛋白则存在于细胞内, SDS-PAGE 显示, 感染后 72 h 的表达量要高于感染后 48 h 的。

Western-blotting 结果表明, 体外表达产生的 CP 蛋白可以与抗鱼类神经坏死病毒血清发生特异性杂交反应, 具有与全病毒相似的生物学活性。对表达的 CP 蛋白进行粗纯化后, 负性染色电镜观察, 结果发现有大小均一的病毒样粒子存在, 其呈典型的二十面立体对称结构, 直径约为 25 nm 左右, 形态大小均与全病毒粒子相似。进一步用感染 AcNPV-*cp* 的细胞进行超薄切片后透射电镜观察, 结果发现病毒样颗粒呈晶格状排列在细胞质中。

试验结果还表明, 体外表达的 VNNV CP 蛋白具有原有的生物学特性, 并且可以自行装配成类似于 VNNV 全病毒粒子的病毒样颗粒, 这样可能使其的稳定性大大高于单独的蛋白单体, 并有利于保持类似于全病毒衣壳的抗原表位, 为研制 VNNV 新型亚单位疫苗奠定了基础。利用本研究获得的 VNNV CP 蛋白, 不仅可以制备单克隆抗体来建立 VNNV 免疫学检测方法, 而且可以用于研制 VNNV 疫苗来防制该病的发生。此外, 可以利用 VNNV CP 蛋白自行组装成病毒样颗粒的特性, 来研究 VNNV 病毒粒子的形态发生情况, 甚至可以为研究 VNNV 感染进入细胞的机制创造条件。

参考文献:

- [1] Ball L, Johnson K. Reverse genetics of nodaviruses [J]. *Adv Virus Res*, 1999, 53: 229 - 244.
- [2] Schneemann A, Reddy V, Johanson J. The structure and function of nodavirus particles: a paradigm for understanding chemical biology [J]. *Adv Virus Res*, 1998, 50: 381 - 446.
- [3] Johnson K, Zeddarn J, Ball L. Characterization and

-
- construction of functional cDNA clones of pariacoto virus, the first Aaphanodavirus isolated outside Australasia [J]. *J Virol*, 2000, 74: 5123 – 5132.
- [4] Krondiris J V, Sideris D C. Intramolecular disulfide bonding is essential for betanodavirus coat protein conformation [J]. *J Gen Virol*, 2002, 83: 2211 – 2214.
- [5] Munday B L, Nakai T. Special topic review: Nodaviruses as pathogens in larval and juvenile marine finfish [J]. *World J Microbiol Biotechnol*, 1997, 13: 375 – 381.
- [6] Nishizawa T, Furuhashi M, Nagai T, *et al.* Genomic classification of fish nodaviruses by molecular phylogenetic analysis of the coat protein gene [J]. *Appl Environ Microbiol*, 1997, 63: 1633 – 1636.
- [7] Munday B L, Kwang J, Moody N. Betanodavirus infections of teleost fish: a review [J]. *J Fish Dis*, 2002, 25: 127 – 142.
- [8] Lin L, He J G, Mori K, *et al.* Mass mortalities associate with viral nervous necrosis in hatchery-reared groupers in the People's Republic of China [J]. *Fish Pathol*, 2001, 36: 186 – 188.
- [9] Nishizawa T, Takano R, Nuroga K. Mapping a neutralizing epitope on the coat protein of striped jack nervous necrosis virus [J]. *J Gen Virol*, 1999, 80: 3023 – 3027.
- [10] Hegde A, Chen C L, Qin Q W, *et al.* Characterization pathogenicity and neutralization studies of a nervous necrosis virus isolated from grouper, *Epinephelus tauvina*, in Singapore [J]. *Aquaculture*, 2002, 213: 55 – 72.
- [11] 陈晓艳, 翁少萍, 殷志新, 等. 斜带石斑鱼神经坏死病毒主衣壳蛋白的原核表达与纯化[J]. *中山大学学报*, 2005, 44(6): 83 – 86.
- [12] Grgacic E, Anderson D. Virus-like particles: passport to immune recognition [J]. *Methods*, 2006, 40: 60 – 65.

The biological character of capsid protein expressed in insect cells from fish viral nervous necrosis virus

LUO Wei^{1,2}, TIAN Fei-yan², LIU Hong¹, CHEN Huan-chun²,
LI Hui-fang², LIU Zong-xiao², WANG Kan¹, CAI Yi-na¹, LV Jian-qiang¹
(1. *Shenzhen Entry-Exit Inspection and Quarantine Bureau, Shenzhen 518001, China*;
2. *Animal Medical College, Huazhong Agricultural University, Wuhan 430070, China*)

Abstract: Viral nervous necrosis virus (VNNV) causes the pathogenic effects in the nerve tissues of many marine fish, which caused great economic loss in mariculture of many countries. In this study, the capsid protein (CP) gene of VNNV 0603 Strain was amplified successfully by reverse-transcription polymerase chain reaction (RT-PCR), and inserted into plasmid pFastBac I of the Baculovirus expression system Bac-To-Bac to develop plasmid pFastBac-cp. Through homologous recombination between pFastBac-cp and Bacmid which was the modified genome of Autographa californica nuclear polyhedrosis virus (AcNPV), the recombinant shuttle vector named Bacmid-cp was obtained in *E. coli* DH10Bac. After transfection with Cellfectin Reagent, recombinant Baculovirus (AcNPV-cp) was formed in Sf9 cells. The specific 37 ku protein band and the hybridizing reaction between expressed protein and positive serum for VNNV were showed by analysis of SDS-PAGE and Western blotting, which indicated that VNNV CP protein had been expressed in insect cells Sf9 with immunological activity. The self-assembled virus-like particles (VLPs) were observed in the negative staining CP crude extract and in the ultra thin section of infected Sf9 cells with electron microscopy, which were similar to VNNV whole virion, and became a crystal array in cytoplasm. On the basis of present study, the particle vaccine of VNNV is expected to be developed and put into practice in the near future.

Key words: viral nervous necrosis virus; capsid protein; virus-like particles