



基因 II 型草鱼呼肠孤病毒病毒样颗粒的构建与鉴定

郜 婷^{1,2}, 吴斯宇², 高彩霞^{1,2}, 夏苏东¹, 尹纪元²,
王英英², 李莹莹², 石存斌², 王 庆^{2*}

(1. 天津农学院水产学院, 天津 300384;

2. 中国水产科学研究院珠江水产研究所, 农业农村部渔药创制重点实验室,
广东省水产动物免疫技术重点实验室, 广东广州 510380)

摘要: 为研究 II 型草鱼呼肠孤病毒 (GCRV) 病毒样颗粒 (VLPs) 疫苗, 实验利用杆状病毒-昆虫细胞表达系统 (BEVS) 将具有免疫原性的 GCRV-VP3/VP4/VP35 蛋白进行 GCRV-VLPs 的组装。实验将编码 VP35 蛋白的 GCRV-s11 基因克隆入杆状病毒载体 pFastBacHTA™, 然后将鉴定正确的重组质粒转化至 DH10Bac 感受态细胞, 筛选得到重组穿梭质粒 Bacmid-VP35。将穿梭质粒 Bacmid-VP35 以及实验室前期构建的重组穿梭质粒 Bacmid-VP3、Bacmid-VP4 分别转染 Sf9 昆虫细胞获得重组杆状病毒 pFHB-VP35、pFHB-VP3 以及 pFHB-VP4。利用 Bac-PAK 快速滴定试剂盒测定重组杆状病毒滴度, 并通过间接免疫荧光 (IFA) 和蛋白质印迹法 (Western blot) 鉴定重组蛋白的表达情况。结果显示, 实验获得了较高滴度的重组杆状病毒, 并且重组蛋白在杆状病毒感染的 Sf9 昆虫细胞中正确表达。将成功表达蛋白的重组杆状病毒 pFHB-VP35、pFHB-VP3 以及 pFHB-VP4 共感染 Sf9 细胞组装 GCRV-VLPs, 通过透射电镜 (EM) 观察 VLPs 的组装情况。结果显示, GCRV-II 的 3 个蛋白在 Sf9 昆虫细胞中可以完成自我组装, 形成与天然病毒结构形似的 VLPs, 直径为 65~72 nm。本实验结果为进一步研制安全、高效的 GCRV-VLPs 疫苗奠定了基础。

关键词: 草鱼; 草鱼呼肠孤病毒; 重组杆状病毒; 病毒样颗粒

中图分类号: Q 785; S 941.41

文献标志码: A

草鱼 (*Ctenopharyngodon idella*) 是我国重要的水产养殖品种之一, 具有重要的经济价值^[1]。据《中国渔业统计年鉴》, 2019 年草鱼产量超过 550 万 t, 占淡水鱼总产量的 21.72%。然而, 由草鱼呼肠孤病毒 (grass carp reovirus, GCRV) 引起的草鱼出血病 (grass carp hemorrhagic disease, GCHD) 是一种主要影响草鱼的严重传染病, 给我国的水产养殖业造成严重的经济损失^[2]。草鱼出血病病毒是我国在 1983 年分离出的第 1 株水生动物病毒,

1991 年国际病毒分类委员会将其正式命名为草鱼呼肠孤病毒, 归属于呼肠孤病毒科 (*Reoviridae*) 水生呼肠孤病毒属 (*Aquareoviridae*)^[3]。病毒粒子为直径 65~72 nm 的正二十面体球形颗粒, 无囊膜, 基因组由 11 条分节段的双链 RNA 组成^[4]。通过对不同毒株序列的比较分析, 可以将 GCRV 分为 I、II 和 III 等 3 种基因型^[5]。根据目前的流行病学调查, GCRV-II 型为主要的流行毒株, 可引起严重的出血性症状, 死亡率达到 80%^[6]。

收稿日期: 2021-05-07 修回日期: 2021-08-31

资助项目: 国家重点研发计划 (2019YFD0900103); 中国水产科学研究院基本科研业务费 (2021SJ-XK1); 国家大宗淡水鱼产业技术体系 (CARS-45); 广东省现代农业产业技术体系创新团队建设专项 (2021KJ150)

第一作者: 郜婷 (照片), 从事水生动物病毒学研究, E-mail: 13838217125@163.com

通信作者: 王庆, 从事水产病害防治研究, E-mail: wangqing@prfri.ac.cn



目前针对 GCHD 仍然没有有效的治疗方法, 疫苗接种是最为可行的防控措施之一^[7]。病毒样颗粒 (virus-like particles, VLPs) 疫苗是目前抗病毒新型疫苗研究的热点^[8]。VLPs 是由病毒的一个或几个结构蛋白自组装成的不含病毒核酸的空心颗粒, 其空间结构与天然的病毒粒子高度相似并且具有良好的免疫原性, 因此易被宿主免疫系统有效地识别、摄取和呈递, 诱导宿主产生细胞和体液免疫^[9]。同时 VLPs 不含病毒核酸, 不能进行自我复制, 因此无毒力返强的风险^[10]。杆状病毒-昆虫细胞表达系统 (baculovirus expression vector system, BEVS) 是目前用于构建 VLPs 的表达系统之一。BEVS 构建方便, 可以容纳大量异源 DNA, 并且可以大规模表达目的蛋白。同时昆虫细胞对蛋白表达后修饰加工的方式与哺乳动物细胞接近, 能够识别并进行信号肽的切除以及磷酸化、糖基化反应, 因此表达的产物正确率高, 蛋白活性好^[11-12]。BEVS 的安全性高, 不会对人体以及牲畜造成危害^[13]。

前期研究表明, II 型 GCRV-s11、s3 和 s6 片段编码的结构蛋白 VP35、VP3 和 VP4 具有良好的免疫原性。由 s11 基因编码的 VP35 蛋白为 GCRV-II 的外衣壳蛋白, 在病毒入侵细胞以及诱导宿主产生免疫应答的过程中发挥着重要作用^[14]。由 s3 基因编码的 VP3 蛋白具有解旋酶功能, 参与病毒 RNA 的转录^[15]。由 s6 基因编码的 VP4 蛋白为病毒的主要外衣壳蛋白, 参与病毒感染和复制^[16]。本实验室前期已经成功构建由 GCRV-S3 和 GCRV-S6 基因片段编码蛋白构建的重组穿梭质粒^[17], 在本次实验中构建表达 VP35 蛋白的重组杆状病毒并与表达 VP3 和 VP4 的重组杆状病毒共感染 Sf9 昆虫细胞, 从而进行 GCRV 病毒样颗粒的组装试验, 为研究 GCRV 新型疫苗奠定基础。

1 材料与方法

1.1 病毒及细胞

GCRV-II 型 HuNan1307 株由中国水产科学研究院珠江水产研究所水产病害与免疫研究室分离并保存, Sf9 昆虫细胞由中国水产科学研究院珠江水产研究所病害与免疫研究室保存。

1.2 主要试剂

PrimeScript™ RT reagent Kit (Perfect Real Time)、PrimeSTAR GLX DNA Polymerase、18T-Vector、限制性内切酶 QuickCut™ BamH I、

QuickCut™ Xho I 快切酶、T4 连接酶、BacPAK 杆状病毒滴度快速测定试剂盒均购自 TaKaRa 公司。E.Z.N.A.TM Plasmid Mini Kit I、DNA 胶回收纯化试剂盒、去内毒素质粒大提试剂盒 EndoFree Plasmid Maxi Kit 购自美国 OMEGA biotek 公司。大肠杆菌 (*Escherichia coli*) DH5α、DH10Bac 感受态购自上海昂羽生物技术有限公司。pFast-BacHTA™ -Vector 购自淼灵生物科技有限公司。Cellfectin II Reagent、sf-900™ II SFM 培养基、Grace's Insect Medium (unsupplemented) 培养基均购自 Gibco 公司。卡那霉素、庆大霉素、四环素、X-gal、IPTG 均购自北京索莱宝科技有限公司。HRP、FITC 标记的羊抗兔 IgG 以及 DAB 显色试剂购自上海威奥生物科技有限公司。

1.3 引物设计与基因合成

根据 GenBank 中提交的 GCRV-II HuNan 1307 株 s11 (GenBank 登录号: KU254575) 的基因序列, 采用软件 Primer premier 5.0 设计 s11 的特异性扩增引物。上游引物为 5'-TGTGGATCCTA CCAATTATCGGTAAGTATGGAA-3' (下划线为 BamH I 酶切位点), 下游引物为 5'-CTGCTCG AGATTGGTATGGAATCAGTCATTACTG-3' (下划线为 Xho I 酶切位点), 由生工生物工程(上海)股份有限公司合成引物, 根据 TRIzol Reagent 试剂盒说明书提取 GCRV-HuNan1307 毒株总 RNA, 反转录合成 cDNA 后以 cDNA 为模板进行 PCR 扩增, 反应程序为 98 °C 变性 10 s, 60 °C 退火 15 s, 68 °C 延伸 2 min, 30 个循环。扩增完成后, 将 PCR 产物经 1% 琼脂糖凝胶电泳分析, 并进行切胶纯化。

1.4 重组供体质粒的构建

将切胶纯化后获得的 s11 基因片段连接到克隆载体 pMD18-T 上, 在 16 °C 连接 2 h 后转化至 DH5α 感受态细胞, 提取质粒后用快切酶 BamH I 和 Xho I 进行双酶切验证并测序。将构建成功的 pMD18T-S11 质粒与 pFastBacHTA™ 载体分别经 BamH I 和 Xho I 双酶切, 回收目的片段以及线性化的 pFastBacHTA™ 载体后, 用 T4 连接酶在 16 °C 低温连接仪中连接过夜。反应结束后将连接产物转化至 DH5α 感受态细胞, 涂布于含有氨苄的 LB 平板上, 将平板置于 37 °C 恒温培养箱中培养 12 h, 挑取单克隆后接种到含有氨苄的 LB 液体培养基中, 37 °C、200 r/min 振荡培养 12 h, 提取质粒后进行 BamH I 和 Xho I 双酶切鉴定及

测序验证, 鉴定正确的质粒命名为 pFastBacHTA™-VP35。

1.5 重组穿梭质粒 Bacmid-VP35 的构建

将鉴定正确的 pFastBacHTA™-VP35 重组质粒转化至 DH10Bac 感受态细胞, 37 °C、200 r/min 复苏 4 h 后取 100 μL 菌液涂布在含有 X-gal (40 μg/mL)、IPTG (40 μg/mL)、抗生素 (50 μg/mL 卡那霉素、7 μg/mL 庆大霉素、10 μg/mL 四环霉素) 的固体 LB 平板上, 37 °C 培养 24 h 后进行蓝白斑筛选, 挑取白斑后再次划线接种于 LB 固体平板上, 37 °C 培养过夜, 然后挑取单克隆白斑菌落接种于含有相同抗生素 (50 μg/mL 卡那霉素、7 μg/mL 庆大霉素、10 μg/mL 四环霉素) 的液体 LB 培养基中, 置于 37 °C 摇床中 200 r/min 培养 12 h, 然后用通用引物 M13F/R 进行菌落 PCR 鉴定。将构建成功的重组穿梭质粒命名为 Bacmid-VP35。

1.6 重组杆状病毒的获得

将 Sf9 细胞接种于六孔板中, 每孔接种密度为 1.0×10^6 个细胞/mL, 放入 27 °C 培养箱培养 24 h 后, 用转染试剂 Cellfectin II Reagent 将成功构建的重组穿梭质粒 Bacmid-VP35 以及实验室前期构建的 Bacmid-VP3 和 Bacmid-VP4 进行 Sf9 细胞转染。转染后的细胞放入 27 °C 培养箱后每天观察, 当细胞出现体积增大, 胞内出现颗粒状病变时, 收集细胞上清液作为第 1 代重组杆状病毒, 命名为 pFHB-VP35、pFHB-VP3 和 pFHB-VP4。按照感染复数 (MOI)=1 感染 Sf9 细胞, 连续接种 3 代, 收集上清液置于 -80 °C 保存。按照 Bac-PAK 杆状病毒滴度快速测定试剂盒说明书计算重组杆状病毒滴度。

1.7 间接免疫荧光 (IFA) 鉴定蛋白表达

通过 IFA 检测蛋白的表达情况。将第 3 代重组杆状病毒悬液感染 Sf9 细胞, 置于 27 °C 培养 72 h 后吸出细胞培养上清液, 用预冷的甲醇在 -20 °C 冰箱中固定 10 min; 吸弃甲醇, 用 PBST 清洗 3 次, 加入 0.5% Triton-X100 透化剂室温透化 10 min; 吸弃 Triton-X100, 用 PBST 清洗 3 次, 加入 5% 脱脂牛奶 37 °C 封闭 1 h; 吸弃封闭液, 用 PBST 清洗 3 次后, 加入兔抗 VP35、VP3 和 VP4 蛋白抗体, 37 °C 孵育 1.5 h; 吸弃抗体, 用 PBST 清洗 3 次后, 加入 FITC 标记的羊抗兔 IgG, 37 °C 避光孵育 50 min; 用 PBST 清洗 3 次后加入 PI

染液, 室温避光染色 10 min。待反应结束后使用倒置荧光显微镜观察并采集图像。

1.8 Western blot 鉴定蛋白表达

将第 3 代重组杆状病毒感染 Sf9 细胞, 待细胞发生明显病变后收获细胞沉淀, PBS 重悬后, 加入 5× Loading Buffer 混合均匀, 沸水浴裂解 10 min, 经聚丙烯酰胺凝胶电泳 (SDS-PAGE) 后将蛋白转移至硝酸纤维素 (NC) 膜上, 再将 NC 膜置于 5% 脱脂奶粉中 4 °C 冰箱封闭过夜; 加入兔抗 VP35、VP3 和 VP4 蛋白的抗体作为一抗, 37 °C 孵育 1.5 h; 用 PBST 清洗 3 次后加入 HRP 标记的羊抗兔 IgG 作为二抗, 37 °C 孵育 45 min, 用 PBST 清洗 3 次, 按照 DAB 显色试剂盒说明进行显色操作并观察结果。

1.9 GCRV-VLPs 的构建及透射电镜观察

获得第 3 代重组杆状病毒 pFHB-VP35、pFHB-VP3 和 pFHB-VP4 后, 按照 MOI=1 : 2 : 2 共感染 Sf9 细胞组装 GCRV-VLPs, 当细胞出现明显病变后, 通过蔗糖密度梯度离心进行病毒纯化。病毒液在 -20 °C 冻融 2 次后分别通过 5 000 和 9 600 r/min 离心 30 min 进行差速离心, 去除沉淀, 收集上清液至热封管中, 37 000 r/min 超速离心 2 h, 弃上清液, 磷酸盐缓冲溶液 (PBS) 重悬沉淀。配制 30%、40%、50% 和 60% 的蔗糖溶液, 利用穿刺针按照浓度从低到高的顺序将蔗糖溶液加入超速离心管, 将病毒液贴壁缓慢加至最上层, 37 000 r/min 离心 1 h。收集蔗糖层间的白色条带, 37 000 r/min 离心 1.5 h 进行脱糖处理, 弃上清液, PBS 重悬沉淀, 即获得纯化的病毒样颗粒。取 1 μL 纯化的病毒液经磷钨酸负染后进行透射电镜观察 VLPs 的组装情况。

2 结果

2.1 目的片段 s11 的扩增

以 GCRV-II HuNan1307 株作为模板进行 RT-PCR 扩增, 成功获得 s11 基因, 扩增产物经 1% 琼脂糖凝胶电泳检测, 大小为 1 024 bp, 与预期结果相符 (图 1)。

2.2 重组供体质粒 pFastBacHTA™-VP35 的鉴定

将扩增出的 s11 目的基因通过 T-A 克隆连接至 pMD18-T 克隆载体上, 经 BamH I 和 Xho I 双

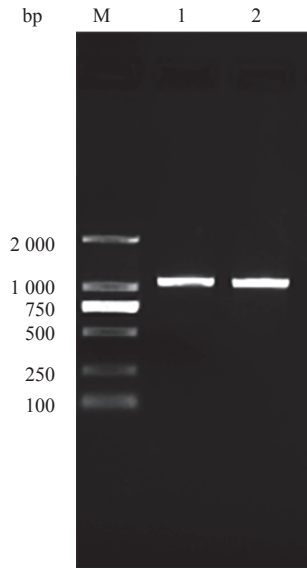


图1 s11 目的片段 PCR 扩增结果

M. 标准物质 2 000; 1~2. s11 扩增产物。

Fig. 1 Amplification results of s11 by PCR

M. marker 2 000; 1-2. amplification product of s11.

酶切后进行 1% 琼脂糖凝胶电泳, 结果可见 2 692 bp 的载体片段和 1 024 bp 的目的基因片段, 证明克隆质粒构建成功 (图 2-a)。重组供体质粒 pFast-BacHTA™-VP35, 经 *Bam*H I 和 *Xho* I 双酶切后进行 1% 琼脂糖凝胶电泳, 结果可见 4 856 bp 的载体片段和 1 024 bp 的目的基因片段, 证明供体质粒构建成功 (图 2-b)。

2.3 重组穿梭质粒 Bacmid-VP35 的构建及鉴定

将构建成功的供体质粒 pFastBacHTA™-VP35 转化至 DH10Bac 感受态细胞, 培养 24 h 后

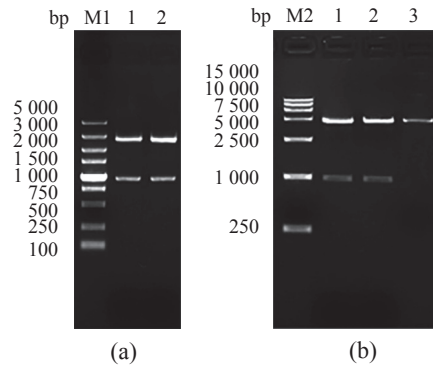


图2 pMD18T-VP35 和 pFastBacHTA™-VP35 的双酶切验证

(a) M1. 标准物质 5 000; 1~2. pMD18T-VP35 双酶切; (b) M2. 标准物质 15 000。1~2. pFastBacHTA™-VP35 双酶切; 3. 线性化的 pFastBacHTA™ 质粒。

Fig. 2 Identification of double-enzyme digestion of the recombinant plasmid pMD18T-VP35 and pFastBacHTA™-VP35

(a) M1. marker 5 000; 1-2. double-enzyme digestion of pMD18T-VP35; (b) M2. marker 15 000. 1-2. double-enzyme digestion of pFastBacHTA™-VP35; 3. linear pFastBacHTA™ plasmid.

通过蓝白斑筛选挑取白色菌落 (图 3-a, b)。用 M13 通用引物对穿梭质粒 Bacmid-VP35 进行 PCR 鉴定, 扩增产物大小为 3 454 bp (图 3-c), 与预测大小一致, 说明重组穿梭质粒 pFastBacHTA™-VP35 构建成功。

2.4 重组杆状病毒的获得

将构建成功的重组穿梭质粒利用脂质体转染法转染 Sf9 细胞, 27 °C 培养箱培养 72 h 后发现细胞出现体积增大、脱落, 胞内颗粒状病变, 而正

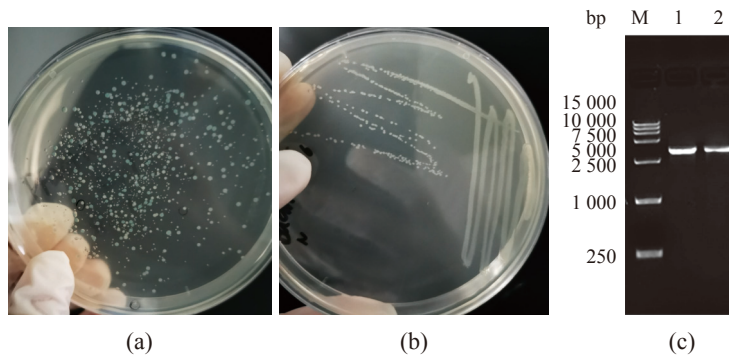


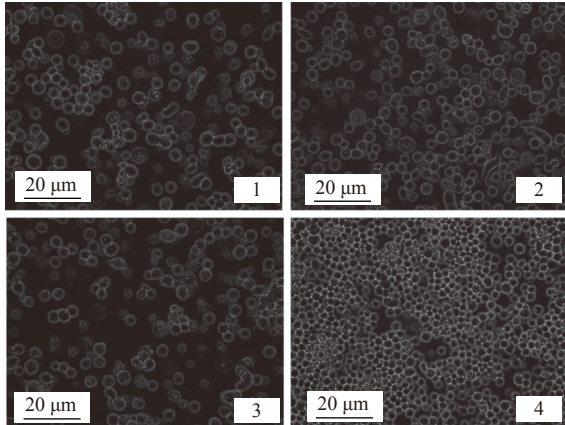
图3 Bacmid-VP35 的构建及验证

(a) 转化后生长 24 h 的菌落; (b) 白色单菌落划线后的菌落; (c) M13 引物对重组 Bacmid 质粒 PCR 检测, M. 标准物质 15 000, 1~2. Bacmid-VP35。

Fig. 3 Construction and identification of Bacmid-VP35

(a) colony growing for 24 h after transformation; (b) white single colony after scribing; (c) recombinant bacmids were confirmed using PCR analysis with M13, M. marker 15 000, 1-2. Bacmid-VP35.

常未转染细胞则形状规则 (图版 I)。收集细胞培养上清液, 用 Bac-PAK 杆状病毒滴度快速测定试剂盒检测第 3 代杆状病毒滴度, pFHB-VP35、pFHB-VP3 和 pFHB-VP4 病毒滴度分别为 3.2×10^7 、 2.4×10^6 和 3.2×10^6 IFU/mL (infectious units per mL)。



图版 I 重组 Bacmid 转染 Sf9 细胞后的病变情况
1. Bacmid-VP3; 2. Bacmid-VP4; 3. Bacmid-VP35; 4. 正常细胞。

Plate I Cytopathic effect of Sf9 cells transfected by recombinant Bacmid

1. Bacmid-VP3; 2. Bacmid-VP4; 3. Bacmid-VP35; 4. normal control Sf9 cell.

2.5 IFA 鉴定重组杆状病毒蛋白的表达

通过 IFA 检测重组杆状病毒感染 Sf9 细胞后蛋白的表达。结果显示, 重组杆状病毒表达的蛋白可以被相应的抗体识别, 荧光显微镜下可观察到特异性绿色荧光, 而未感染病毒的 Sf9 细胞则无特异性荧光反应, 荧光显微镜下仅观察到红色的细胞核 (图版 II)。

2.6 Western blot 检测重组蛋白的表达

对 P3 代重组杆状病毒进行 Western blot 分析。

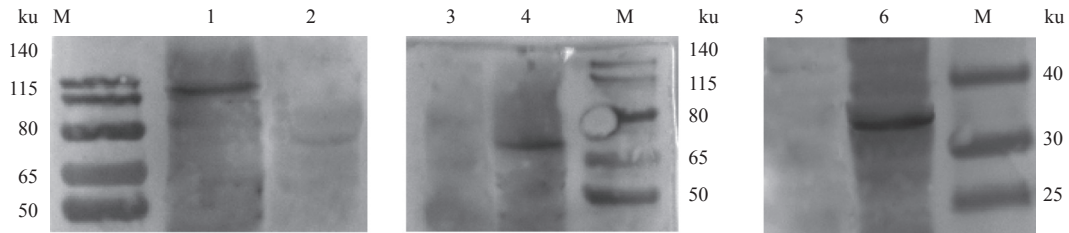
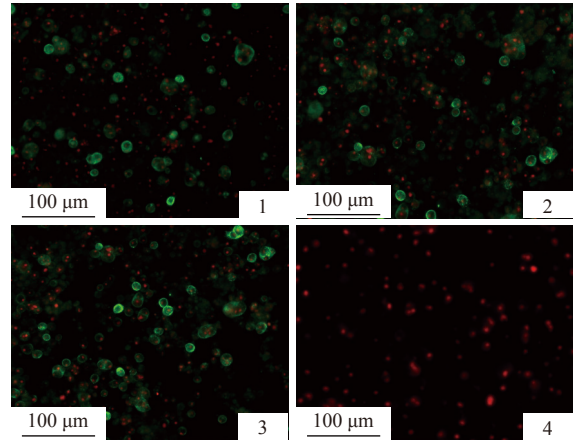


图 4 Western blot 检测重组杆状病毒蛋白表达

M. 蛋白质分子标准; 1. GCRV-VP3; 4. GCRV-VP4; 6. GCRV-VP35; 2、3、5. 未感染的 Sf9 细胞上清液。

Fig. 4 Identification of recombinant baculovirus protein expression by Western blot

M. protein marker; 1. GCRV-VP3; 4. GCRV-VP4; 6. GCRV-VP35; 2, 3, 5. the supernatant of normal Sf9 cells.



图版 II IFA 检测重组杆状病毒蛋白表达

1. pFBH-VP3; 2. pFBH-VP4; 3. pFBH-VP35; 4. 正常细胞。

Plate II Identification of recombinant baculovirus protein expression by indirect immunofluorescence

1. pFBH-VP3; 2. pFBH-VP4; 3. pFBH-VP35; 4. normal control Sf9 cell.

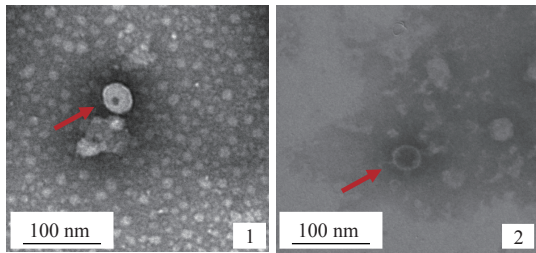
结果显示, 分别在 115~140、65~80 与 30~40 ku 检测出与目的蛋白 VP3 (136 ku)、VP4 (68.34 ku) 与 VP35 (35.4 ku) 分子大小一致的条带 (图 4), 表明重组杆状病毒在 Sf9 细胞中成功表达了相应的蛋白。

2.7 GCRV-VLPs 电镜观察

使用透射电镜观察纯化的病毒, 可以看到与野生型 GCRV-II 病毒粒子相似的 VLPs (图版 III), 证明 3 种重组杆状病毒表达的蛋白可以组装成病毒样颗粒。

3 讨论

疫苗接种是预防和控制 GCHD 最有效的方法之一, 因此疫苗的研发对于该病的防治意义重大。目前在水产上常用的疫苗包括弱毒疫苗、灭活疫苗、亚单位疫苗以及 DNA 疫苗^[18-21]。弱毒疫苗是



图版 III VLPs 电镜观察

1. GCRV-VLPs; 2. GCRV-II. 红色箭头处为病毒样颗粒 (VLPs).

Plate III Electron microscopy results of VLPs

1. GCRV-VLPs; 2. GCRV-II. The virus-like particle is at the red arrow.

通过人工制弱或自然筛选获得的弱毒株完全病原疫苗。例如目前市场上唯一获得法规许可的弱毒疫苗就是 GCRV 疫苗, 其通过在细胞上连续传代致弱的方法获得^[22]。弱毒疫苗的优点是在免疫机体内繁殖, 免疫原性好并且免疫持续期长。然而弱毒疫苗在机体内可能存在毒力返强风险, 甚至病原特征突变的情况, 从而对一些易感动物造成一定的威胁。灭活疫苗是防控 GCHD 最早使用的疫苗, 其制备方法包括组织浆灭活以及细胞培养灭活, 特点是安全性高、操作简单^[23]。但是灭活疫苗由于失活过程中某些抗原特性的改变导致疫苗效力降低, 并且其不能像弱毒疫苗那样在机体内繁殖, 因此对机体的保护效果和持续时间有限。亚单位疫苗是通过基因重组技术在体外表达抗原蛋白的一种蛋白制剂, 其纯度较高, 是目前 GCRV 疫苗研究的热点。Pei 等^[24]利用大肠杆菌表达 GCRV-VP56 蛋白制成亚单位疫苗免疫草鱼, 草鱼的相对存活率达到 71%~75%。然而亚单位疫苗存在制备费用高并且免疫效果较差的缺点。DNA 疫苗是将克隆了抗原蛋白基因的质粒注射到机体内, 使用机体的转录机制作为表达系统表达抗原蛋白从而激发机体产生免疫应答。Gao 等^[14]将编码 VP35 蛋白的 GCRV-S11 片段克隆至真核表达载体构成重组质粒 pcDNA3.1-S11, 对草鱼的保护率可达到 70.4%~73.3%。目前 DNA 疫苗的安全性存在一定的争议, 因为 DNA 疫苗将表达载体质粒注射到机体内, 这是否会对机体产生危害以及其他副作用还不明确, 因此 DNA 疫苗的安全评估周期较长^[25]。基于目前 GCRV 疫苗的研发现状, 开发一种能够克服现有疫苗不足的新型疫苗具有重要的现实意义。

VLPs 疫苗相比于传统疫苗具有更大的优势, 可以克服传统疫苗的局限性。1955 年通过烟草花

叶病毒 (TMV) 的重组首次描述了 VLPs 的产生, 此后, VLPs 成为疫苗发展过程中重要的研究方案^[26]。同时 VLPs 疫苗的安全性和有效性也在实践中得到了验证, 例如已经获得生产许可的人乳头瘤病毒 (HPV)、乙型肝炎病毒 (HBV) 和猪圆环病毒 (PCV) 商品化 VLPs 疫苗^[27-28]。目前, VLPs 在水产上也逐渐进入研究阶段。例如已被广泛研究的传染性胰脏坏死病毒 (IPNV)、鲑鱼甲病毒 (SAV) 以及神经坏死病毒 (NNV) VLPs 疫苗。Shivappa 等^[29]用杆状病毒表达系统在昆虫细胞中表达了高产量的 IPNV 蛋白并构建 IPNV-VLPs, 用其免疫大西洋鲑, 攻毒后免疫组死亡率为 56%, 低于对照组 77%。SAV 主要感染大西洋鲑 (*Salmo salar*) 和虹鳟 (*Oncorhynchus mykiss*), Metz 等^[30]利用 SAV 中 2 种主要的免疫蛋白 E1 和 E2 在昆虫细胞中成功构建 SAV-VLPs。神经坏死病毒 (NNV) VLPs 是目前研究最多的针对鱼类病毒的 VLPs 疫苗, Lin 等^[31]克隆了编码衣壳蛋白的 RNA2 片段并利用杆状病毒表达系统在 Sf21 昆虫细胞中构建了 VLPs, 在电子显微镜下观察到与 NNV 天然病毒粒子相似的大小为 31 nm 的颗粒。有研究用昆虫细胞表达构建 NNV-VLPs 并免疫舌齿鲈 (*Dicentrarchus labrax*), 病毒感染 27 d 后免疫组的存活率可以达到 91.5%, 而未免疫组存活率为 19.5%^[32]。以上研究表明, VLPs 疫苗在水产疫苗的研发中具有广阔的前景。

目前, 已有学者利用杆状病毒-昆虫细胞表达系统构建 GCRV 亚单位疫苗。Mu 等^[33]利用杆状病毒表达系统在蚕蛹胚胎细胞和蚕蛹中表达基因 II 型 GCRV-VP35-VP4 重组蛋白, 制成冻干粉后, 通过口服免疫的方式免疫草鱼, 攻毒后草鱼的相对存活率可以达到 56%。Liu 等^[34]同样用重组杆状病毒在蚕蛹中表达了 GCRV-VP6-VP7 重组蛋白, 由此制备了口服冻干粉疫苗。但是利用杆状病毒-昆虫细胞表达系统构建 GCRV-VLPs 疫苗的研究还很少。本实验室前期首次报导利用杆状病毒-昆虫细胞表达系统成功组装 GCRV-VLPs, 发现其对草鱼的相对保护率可以达到 83.33%^[17], 证明 GCRV-VLPs 具有较大的研发前景, 但是对于 GCRV 其他具有免疫原性基因片段的 VLPs 的组装以及免疫效果仍然未知。本实验采用 GCRV-VP3/VP4/VP35 蛋白进行 GCRV-VLPs 的组装。GCRV-VP35 蛋白是基因 II 型 GCRV 编码的结构蛋白, 在前期研究中证明, 抗 VP35 血清能够有

效中和 GCRV 感染, 已被选择作为抵抗 GCRV 感染的潜在疫苗^[35]。Gao 等^[36]表达重组 VP35 蛋白并通过草鱼实验评价其免疫保护效果, 攻毒后草鱼的相对存活率可以达到 60%, 证明重组 VP35 蛋白可以对草鱼提供有效的免疫保护。有研究报道, 用重组 VP4 蛋白免疫草鱼可以对草鱼产生免疫保护作用, 特异性 IgM 抗体水平显著上调^[37]。Chen 等^[38]用含有 VP4 的 DNA 疫苗免疫草鱼, GCRV 攻毒后草鱼的相对存活率可以达到 59.9%。Mu 等^[39]用 VP4 和 VP35 联合构建的亚单位疫苗免疫稀有鮠鲫 (*Gobiocypris rarus*), 其存活率达到了 67%。以上研究证明, 这些蛋白具有研发 GCRV 疫苗的潜力。

杆状病毒-昆虫细胞表达系统的关键是重组质粒的构建。将目的基因克隆至 pFastBacHTA™ 载体构建重组供体质粒, 通过供体质粒 Tn7 位点介导的特异性转座, 在 DH10Bac 大肠杆菌感受态细胞中将目的基因转座至穿梭载体 Bacmid, 以获得重组质粒^[40]。重组 Bacmid 通过脂质体转染法转染至 Sf9 昆虫细胞中获得第 1 代重组杆状病毒。因第 1 代病毒滴度较低, 因此需要进行连续传代以获得高病毒滴度的重组杆状病毒, 但是并不能无限次传代, 本实验中将病毒传至第 3 代。获得重组杆状病毒后保存在 -80 °C, 反复的冻融会对病毒滴度造成影响, 因此在本实验中, 将实验室前期构建的重组穿梭质粒 (Bacmid-VP3/VP4) 重新转染昆虫细胞获得重组杆状病毒。实验采用 BacPAK 快速滴定试剂盒进行病毒滴度的测定, 结果显示, 病毒滴度最高可以达到 3.2×10^7 IFU/mL。重组杆状病毒蛋白的表达采用间接免疫荧光 (IFA) 和蛋白质印迹法 (Western blot) 进行检测, 结果显示, 3 种重组杆状病毒均表达目的蛋白。

VLPs 的构建有两种方式: 共表达和共感染。共表达是将携带了多个目的基因的重组质粒转染到昆虫细胞进行多种蛋白的表达并组装成 VLPs^[41]。其优点是保证了每个表达的外源蛋白具有固定的化学摩尔比, 但是重组杆状病毒的构建相当困难, 因为要在同一杆状病毒中克隆多个外源基因, 载体上可用的酶切位点变少, 并且多个目的基因使得重组质粒变大, 导致细胞的转染效率降低^[42]。共感染的组装方式是指将多个表达单个蛋白的重组杆状病毒共同感染昆虫细胞, 蛋白表达后进行 VLPs 的组装。本实验采用共感染的构建方式, 这种方式虽然不能保证每个表达的外源蛋白具有固

定的化学摩尔比, 但是重组杆状病毒的构建相对容易, 构建 VLPs 的蛋白可以灵活组装^[43]。在实验前期构建了 3 种 GCRV-VLPs 并评价了其免疫保护效果, 结果显示, 由 3 种蛋白组装的 VLPs 的免疫保护效果高于 2 种蛋白组装的 VLPs^[44], 因此, 在本实验中选择 3 种蛋白进行 VLPs 的组装。通过蔗糖密度梯度离心获得纯化的 VLPs 并通过透射电镜观察, 可以观察到与 GCRV 病毒粒子形态相似的颗粒。

本实验成功构建了重组杆状病毒 pFBH-VP35, 通过透射电镜观察到 pFBH-VP35 可以与表达 VP3 和 VP4 蛋白的重组杆状病毒在 Sf9 细胞中自我组装成与 GCRV 病毒粒子相似的 VLPs。GCRV-VLPs 在昆虫细胞中的成功构建, 为进一步研发 GCRV-VLPs 疫苗奠定了基础, 本实验制备的病毒样颗粒作为疫苗的使用效果和前景, 还需要进一步研究。

(作者声明本文无实际或潜在的利益冲突)

参考文献 (References):

- [1] Cao L, Naylor R, Henriksson P, et al. China's aquaculture and the world's wild fisheries[J]. *Science*, 2015, 347(6218): 133-135.
- [2] Attoui H, Fang Q, Jaafar F M, et al. Common evolutionary origin of aquareoviruses and orthoreoviruses revealed by genome characterization of golden shiner reovirus, grass carp reovirus, striped bass reovirus and golden ide reovirus (genus *Aquareovirus*, family *Reoviridae*)[J]. *Journal of General Virology*, 2002, 83(8): 1941-1951.
- [3] 毛树坚, 邵健忠, 杭绮, 等. 草鱼出血病的病原研究[J]. *水产学报*, 1989, 13(1): 1-4, 79. Mao S J, Shao J Z, Hang Q, et al. On pathogen of hemorrhage of grass carp (*Ctenopharyngodon idellus* C. et V.)[J]. *Journal of Fisheries of China*, 1989, 13(1): 1-4, 79 (in Chinese).
- [4] Subramanian K, Hetrick F M, Samal S K. Identification of a new genogroup of aquareovirus by RNA-RNA hybridization[J]. *Journal of General Virology*, 1997, 78(6): 1385-1388.
- [5] Wang Q, Zeng W W, Liu C, et al. Complete genome sequence of a reovirus isolated from grass carp, indicating different genotypes of GCRV in China[J]. *Journal of*

- Virology*, 2012, 86(22): 12466.
- [6] Liu S X, Wang Y Y, Chen J M, *et al.* Establishment of a cell line from egg of rare minnow *Gobiocypris rarus* for propagation of grass carp reovirus genotype II[J]. *Microbial Pathogenesis*, 2019, 136: 103715.
- [7] Su H, Su J G. Cyprinid viral diseases and vaccine development[J]. *Fish & Shellfish Immunology*, 2018, 83: 84-95.
- [8] Ho J K T, Jeevan-Raj B, Netter H J. Hepatitis B virus (HBV) subviral particles as protective vaccines and vaccine platforms[J]. *Viruses*, 2020, 12(2): 126.
- [9] Mohsen M O, Augusto G, Bachmann M F. The 3Ds in virus-like particle based-vaccines: "design, delivery and dynamics"[J]. *Immunological Reviews*, 2020, 296(1): 155-168.
- [10] Roden R B S, Stern P L. Opportunities and challenges for human papillomavirus vaccination in cancer[J]. *Nature Reviews Cancer*, 2018, 18(4): 240-254.
- [11] Ailor E, Betenbaugh M J. Modifying secretion and post-translational processing in insect cells[J]. *Current Opinion in Biotechnology*, 1999, 10(2): 142-145.
- [12] Berger I, Fitzgerald D J, Richmond T J. Baculovirus expression system for heterologous multiprotein complexes[J]. *Nature Biotechnology*, 2004, 22(12): 1583-1587.
- [13] Han X, Huang Y X, Hou Y L, *et al.* Recombinant expression and functional analysis of antimicrobial *Siganus oramin* l-amino acid oxidase using the Bac-to-Bac baculovirus expression system[J]. *Fish & Shellfish Immunology*, 2020, 98: 962-970.
- [14] Gao Y, Pei C, Sun X Y, *et al.* Plasmid pcDNA3.1-s11 constructed based on the s11 segment of grass carp reovirus as DNA vaccine provides immune protection[J]. *Vaccine*, 2018, 36(25): 3613-3621.
- [15] Fang Q, Attoui H, Biagini J F P, *et al.* Sequence of genome segments 1, 2, and 3 of the grass carp reovirus (genus *Aquareovirus*, family *Reoviridae*)[J]. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 2000, 274(3): 762-766.
- [16] Su H, Fan C J, Liao Z W, *et al.* Grass carp reovirus major outer capsid protein VP4 interacts with RNA sensor RIG-I to suppress interferon response[J]. *Biomolecules*, 2020, 10(4): 560.
- [17] Gao T, Gao C X, Wu S Y, *et al.* Recombinant baculovirus-produced grass carp reovirus virus-like particles as vaccine candidate that provides protective immunity against GCRV genotype II infection in grass carp[J]. *Vaccines (Basel)*, 2021, 9(1): 53.
- [18] Zeng W W, Wang Q, Wang Y Y, *et al.* Immunogenicity of a cell culture-derived inactivated vaccine against a common virulent isolate of grass carp reovirus[J]. *Fish & Shellfish Immunology*, 2016, 54: 473-480.
- [19] Rao Y L, Su J G. Insights into the antiviral immunity against grass carp (*Ctenopharyngodon idella*) reovirus (GCRV) in grass carp[J]. *Journal of Immunology Research*, 2015, 2015: 670437.
- [20] Tian Y Y, Ye X, Zhang L L, *et al.* Development of a novel candidate subunit vaccine against grass carp reovirus Guangdong strain (GCRV-GD108)[J]. *Fish & Shellfish Immunology*, 2013, 35(2): 351-356.
- [21] Collins C, Lorenzen N, Collet B. DNA vaccination for finfish aquaculture[J]. *Fish & Shellfish Immunology*, 2019, 85: 106-125.
- [22] 许淑英, 李焕林, 邓国成, 等. 草鱼出血病细胞培养弱毒疫苗的制备及其免疫效果[J]. *水产学报*, 1994, 18(2): 110-117.
- Xu S Y, Li H L, Deng G C, *et al.* The preparation and immune effect of attenuated live vaccine obtained through cell culture for hemorrhage of grass carp[J]. *Journal of Fisheries of China*, 1994, 18(2): 110-117 (in Chinese).
- [23] Dhar A K, Manna S K, Thomas Allnut F C. Viral vaccines for farmed finfish[J]. *Virus Disease*, 2014, 25(1): 1-17.
- [24] Pei C, Gao Y, Sun X Y, *et al.* A developed subunit vaccine based on fiber protein VP56 of grass carp reovirus providing immune protection against grass carp hemorrhagic disease[J]. *Fish & Shellfish Immunology*, 2019, 90: 12-19.
- [25] Jeong K H, Kim H J, Kim H J. Current status and future directions of fish vaccines employing virus-like particles[J]. *Fish & Shellfish Immunology*, 2020, 100: 49-57.
- [26] Fraenkel-Conrat H, Williams R C. Reconstitution of active tobacco mosaic virus from its inactive protein and nucleic acid components[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 1955, 41(10): 690-698.

- [27] Roldão A, Mellado M C M, Castilho L R, *et al.* Virus-like particles in vaccine development[J]. *Expert Review of Vaccines*, 2010, 9(10): 1149-1176.
- [28] Chan H L Y, Thompson A, Martinot-Peignoux M, *et al.* Hepatitis B surface antigen quantification: why and how to use it in 2011 - a core group report[J]. *Journal of Hepatology*, 2011, 55(5): 1121-1131.
- [29] Shivappa R B, McAllister P E, Edwards G H, *et al.* Development of a subunit vaccine for infectious pancreatic necrosis virus using a baculovirus insect/larvae system[J]. *Developments in Biologicals (Basel)*, 2005, 121: 165-174.
- [30] Metz S W, Feenstra F, Villoing S, *et al.* Low temperature-dependent salmonid alphavirus glycoprotein processing and recombinant virus-like particle formation[J]. *PLoS One*, 2011, 6(10): e25816.
- [31] Lin C S, Lu M W, Tang L, *et al.* Characterization of virus-like particles assembled in a recombinant baculovirus system expressing the capsid protein of a fish nodavirus[J]. *Virology*, 2001, 290(1): 50-58.
- [32] Thiéry R, Cozien J, Cabon J, *et al.* Induction of a protective immune response against viral nervous necrosis in the European sea bass *Dicentrarchus labrax* by using betanodavirus virus-like particles[J]. *Journal of Virology*, 2006, 80(20): 10201-10207.
- [33] Mu C Y, Zhong Q W, Meng Y, *et al.* Oral vaccination of grass carp (*Ctenopharyngodon idella*) with baculovirus-expressed grass carp reovirus (GCRV) proteins induces protective immunity against GCRV infection[J]. *Vaccines (Basel)*, 2021, 9(1): 41.
- [34] Liu L J, Suzuki T, Tsunemitsu H, *et al.* Efficient production of type 2 porcine circovirus-like particles by a recombinant baculovirus[J]. *Archives of Virology*, 2008, 153(12): 2291-2295.
- [35] 宗乾坤, 张也, 吕利群. II型草鱼呼肠孤病毒VP4、VP35蛋白多克隆抗体制备及其免疫原性分析[J]. *水产学报*, 2016, 40(3): 355-362.
- Zong Q K, Zhang Y, Lv L Q. Preparation and immunogenicity of polyclonal antibodies against VP4, VP35 protein of type II grass carp reovirus[J]. *Journal of Fisheries of China*, 2016, 40(3): 355-362 (in Chinese).
- [36] Gao Y, Pei C, Sun X Y, *et al.* Novel subunit vaccine based on grass carp reovirus VP35 protein provides protective immunity against grass carp hemorrhagic disease[J]. *Fish & Shellfish Immunology*, 2018, 75: 91-98.
- [37] Jiang H Y, Bian Q, Zeng W W, *et al.* Oral delivery of *Bacillus subtilis* spores expressing grass carp reovirus VP4 protein produces protection against grass carp reovirus infection[J]. *Fish & Shellfish Immunology*, 2019, 84: 768-780.
- [38] Chen D D, Yao Y Y, Cui Z W, *et al.* Comparative study of the immunoprotective effect of two DNA vaccines against grass carp reovirus[J]. *Fish & Shellfish Immunology*, 2018, 75: 66-73.
- [39] Mu C Y, Vakharia V N, Zhou Y, *et al.* A novel subunit vaccine based on outer capsid proteins of grass carp reovirus (GCRV) provides protective immunity against GCRV infection in rare minnow (*Gobiocypris rarus*)[J]. *Pathogens*, 2020, 9(11): 945.
- [40] Elbaz Y, Danieli T, Kanner B I, *et al.* Expression of neurotransmitter transporters for structural and biochemical studies[J]. *Protein Expression and Purification*, 2010, 73(2): 152-160.
- [41] Pushko P, Tumpey T M, Bu F, *et al.* Influenza virus-like particles comprised of the HA, NA, and M1 proteins of H9N2 influenza virus induce protective immune responses in BALB/c mice[J]. *Vaccine*, 2005, 23(50): 5751-5759.
- [42] 刘拂晓. 小反刍兽疫病毒样颗粒的构建及对小鼠免疫效力的评价 [D]. 吉林: 吉林大学, 2013.
- Liu F X. Construction of peste des petits ruminants virus-like particles and evaluation of their immune effects in mice[D]. Jilin: Jilin University, 2013 (in Chinese).
- [43] Ho Y, Lin P H, Liu C Y Y, *et al.* Assembly of human severe acute respiratory syndrome coronavirus-like particles[J]. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 2004, 318(4): 833-838.
- [44] 高彩霞. 草鱼呼肠孤病毒基因II型病毒样颗粒的制备及免疫效果评价 [D]. 天津: 天津农学院, 2020.
- Gao C X. Preparation and immune effect evaluation of grass carp reovirus genotype II virus-like particles[D]. Tianjin: Tianjin Agricultural University, 2020 (in Chinese).

Construction and identification of genotype II grass carp reovirus virus-like particles

GAO Ting^{1,2}, WU Siyu², GAO Caixia^{1,2}, XIA Sudong¹, YIN Jiyuan²,
WANG Yingying², LI Yingying², SHI Cunbin², WANG Qing^{2*}

(1. Department of Aquaculture, Tianjin Agricultural University, Tianjin 300384, China;

2. Key Lab of Fishery Drug Creation of Ministry of Agriculture and Rural Affairs,

Key Lab of Aquatic Animal Immune Technology of Guangdong Province, Pearl River Fisheries Research Institute,
Chinese Academy of Fishery Sciences, Guangzhou 510380, China)

Abstract: In order to construct genotype II grass carp reovirus (GCRV) virus-like particles (VLPs) based vaccines, the immunogenic GCRV-VP3/VP4/VP35 protein was assembled into GCRV-VLPs using baculovirus expression system (BEVS). The structural protein VP35 encoded by the segment S11 of GCRV-II was inserted into baculovirus vector pFastBacHTATM using BEVS, and the identified recombinant vector was transformed into DH10Bac competent cells to screen recombinant plasmid Bacmid-VP35. Recombinant baculovirus pFHB-VP35 was obtained by transfecting recombinant plasmid Bacmid-VP35, recombinant baculovirus pFHB-VP3 and pFHB-VP4 was obtained by transfecting recombinant plasmid Bacmid-VP3 and Bacmid-VP4 which have been successfully constructed in our laboratory. Then the titers of recombinant baculovirus were determined by Bac-PAK rapid titer kit and the expression of proteins was identified by IFA and Western blot. The results showed that high titers of pFHB-VP35, pFHB-VP3, and pFHB-VP4 were obtained, and the corresponding proteins were successfully expressed in infected Sf9 cells. GCRV-VLPs were assembled co-infection of Sf9 cells with pFHB-VP35, pFHB-VP3, and pFHB-VP4, and the GCRV-VLPs were identified by electron microscopy (EM). The results showed that the three proteins could self-assemble in Sf9 cells and formed VLPs with diameter of 65-72 nm similar with natural viruses. This study lays a foundation for development of novel vaccines for preventing the disease caused by GCRV genotype II.

Key words: *Ctenopharyngodon idella*; grass carp reovirus (GCRV); recombinant baculovirus; virus-like particles (VLPs)

Corresponding author: WANG Qing. E-mail: wangqing@prfri.ac.cn

Funding projects: National Key Research and Development Program of China (2019YFD0900103); Central Public-interest Scientific Institution Basal Research Fund, Chinese Academy of Fishery Sciences (2021SJ-XK1); China Agriculture Research System (CARS-45); Guangdong Provincial Special Fund for Modern Agriculture Industry Technology Innovation Teams (2021KJ150)