

PPV VP2 和 PCV2 ORF2 重组病毒样颗粒的获得及其免疫原性研究^①

徐志文^② 蒋清蓉 郭万柱^③ 朱 玲 胡秋灵 陈 扬 廖晓丹

(四川农业大学动物生物技术中心动物疫病与人类健康实验室 雅安 625014)

摘 要 将 PCV2 ORF2 基因插入 PPV VP2 基因 *Hind*III 酶切位点(即 PPV VLPs 的 N 端 1/3 处)获得重组基因 VP2. ORF2, 并将其克隆到真核表达载体 pEGFP-C1 中得到重组质粒 pEGFP-VP2. ORF2, 经转染及电镜观察表明成功获得 VP2. ORF2 重组病毒样颗粒。重组病毒样颗粒经超速离心纯化后免疫小鼠, 同时设立 PPV 普通疫苗、PCV2 弱毒株及空白对照组, 并在不同时期检测小鼠 CD3⁺、CD4⁺、CD8⁺ T 淋巴细胞动态变化情况以及 PPV 和 PCV2 抗体水平。结果显示: VP2. ORF2 重组病毒样颗粒免疫小鼠后能诱导较高水平的细胞免疫和高于同等条件普通疫苗和弱毒株的体液免疫水平。此研究结果为进一步探索 VP2. ORF2 重组病毒样颗粒的形成机制提供了依据, 也为 PPV-PCV2 二联疫苗的研发打下了基础。

关键词 猪细小病毒, 猪圆环病毒, 病毒样颗粒, 免疫应答

0 引 言

猪 2 型圆环病毒(porcine circovirus 2, PCV-2)可引起包括断奶仔猪多系统衰竭为特征的多种疾病, 并常与其它病原混合感染而引起更严重的损伤, 被誉为最有可能的一种新的人兽共患病病原。特别是它与猪细小病毒(porcine parvovirus, PPV)的混合感染备受关注, 这种感染不仅由于二者都对快速分化的淋巴等组织有很强的嗜性, 造成猪的免疫系统损害, 从而干扰其它疫苗免疫, 而且 PPV 感染宿主细胞后能刺激细胞加快分裂进入 S 期, 从而促进了 PCV-2 的复制, 因此使 PCV-2 引起的疾病症状更加严重。PCV-2 感染已成为影响养猪业发展的新的重要因素之一。但是到目前为止, 还未研制出确实有效的疫苗用于 PCV-2 引起的系列疾病的预防和控制。PPV VP2 基因编码的 579aa 是 PPV 衣壳蛋白主要构成成分, 包含了 PPV 的主要抗原决定簇^[1], 具有血凝活性^[2], 并且能自我装配成类病毒粒子(virus-like particles, VLPs)。VLPs 是一种良好的抗原运载体, 能容纳外源抗原决定簇并诱导相应免疫反应^[3]。同时 PPV VLPs 是灵活的抗原表位承载工具, 在不同位点插入不同抗原表位对病毒样颗粒的装配及抗原表位的呈递均有很大影响^[4-6]。本研究旨在利用 PPV

VP2 蛋白自我装配形成的病毒样颗粒具有递呈外源多肽的优点, 将圆环病毒 2 型 ORF2 基因插入 VP2 基因, 构建表达 PCV2 和 PPV 抗原蛋白并能装配成病毒样颗粒载体, 为开发预防和控制猪断奶后多系统衰竭综合征(PMWS)和猪细小病毒混合感染奠定基础。重组病毒样颗粒疫苗不具有常规疫苗中常存在灭活不完全或毒力返强等生物安全性问题, 又没有 PPV 和 PCV2 完整感染性核酸的存在, 因此疫苗的免疫效果将更加安全可靠。该研究所获结果不仅为进一步探索 VP2. ORF2 重组病毒样颗粒的形成机制提供了依据, 也为发展新型动物疫苗提供了新的思路。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 细胞、菌株及质粒

ST 细胞、Cos7 细胞、DH5 α 、PPV SC-1 株、质粒 pEGFP-C1 和 pPI-2. EGFP. VP2. ORF2, 由四川农业大学动物生物技术中心保存。

1.1.2 酶及其它试剂

*Hind*III、*Kpn*I、*Bam*HI 和 *Bst*BI, 购自宝生物工程(大连)有限公司; LIPOFECTIN Reagent 2000, 购自 Invitrogen 公司; anti mouse CD3⁺/APC、CD4⁺/PE、CD8⁺/

① 国家自然科学基金(30500019)资助项目。

② 男, 1972 年生, 博士, 副教授; 研究方向: 动物病毒学; E-mail: ahtcxzw@126.com

③ 通讯作者, E-mail: wzguo@126.com

(收稿日期: 2008-09-01)

FTTC, 购自晶美公司; PPV 抗体检测试剂盒, 购自 Svanova Biotech AB; PCV2 抗体检测试剂盒, 购自北京世纪元亨动物防疫技术有限公司; 其他载体等均购自宝生物工程(大连)有限公司。

1.2 方法

1.2.1 引物设计及合成

根据 GenBank 登录的 PPV NADL-2 株和 PCV2 的序列, 分别设计一对特异性引物 P1/P2 和 P3/P4 用于 PPV VP2 基因和 PCV2 ORF2 基因的扩增, 并在引物 P1 上引入 *Kpn*I 酶切位点, P2 上引入 *Bam*HI 酶切位点和 P3、P4 上均引入 *Hind*III 酶切位点。VP2 和 ORF2 预计扩增大小分别为 2046bp 和 702bp。引物均由宝生物工程(大连)有限公司合成。

P1: 5'-TTAGGTACCTCAATGAGTGAATAATGTCGAAC -3'

P2: 5'-TACAGGATCCGTAAACACATGAGAGCTTG -3'

P3: 5'-CCCAAGCTTCATGACGTATCCAAGGAGG-3'

P4: 5'-CCCAAGCTTATCTTAGGGTTAAGTGGGGGGTCT -3'

1.2.2 VP2 和 ORF2 基因的 PCR 扩增、克隆及序列测定

以 PPV SC-1 病毒 DNA 为模板, 以 P1/P2 为引物 PCR 扩增 PPV VP2 基因。PCR 反应程序: 95℃ 预变性 5min, 95℃ 30s, 54℃ 45s, 72℃ 2min, 35 个循环; 72℃ 延伸 10min。PCR 产物经琼脂糖凝胶电泳分析后, 克隆至 pMD18-T Simple 中并转化 DH5 α , *Kpn*I 和 *Bam*HI 双酶切鉴定正确后送大连宝生物公司进行序列测定, 测序正确后命名为 pMD-VP2。

以质粒 pPI-2. EGFP. VP2. ORF2 DNA 为模板, 以 P3/P4 为引物 PCR 扩增 ORF2 基因。PCR 反应程序: 95℃ 预变性 5min, 95℃ 30s, 60℃ 30s, 72℃ 45s, 30 个循环; 72℃ 延伸 10min。PCR 产物经琼脂糖凝胶电泳分析后, 克隆到 pMD18-T Simple 中并转化 DH5 α , *Hind* III 单酶切鉴定正确后送大连宝生物公司进行序列测定, 测序正确后命名为 pMD-ORF2。

1.2.3 重组基因 VP2. ORF2 的构建

分别回收 *Hind* III 单酶切的 ORF2 基因片段和 *Hind* III 线性化的重组质粒 pMD-VP2, 混合连接后转化 DH5 α , 重组质粒经 *Hind* III 单酶切鉴定和 *Bam*HI & *Bst*BI 双酶切方向鉴定正确后命名为 pMD-VP2. ORF2。

1.2.4 重组表达载体 pEGFP-VP2. ORF2 的构建

用 *Kpn*I 和 *Bam*HI 分别双酶切消化质粒 pMD-VP2. ORF2 和 pEGFP-C1 经后, 回收重组基因片段 VP2. ORF2 和线性化 pEGFP-C1 载体, 混合连接后转化 DH5 α , 重组质粒经 *Kpn*I 和 *Bam*HI 双酶切鉴定正

确后命名为 pEGFP-VP2. ORF2。

1.2.5 重组质粒 pEGFP-VP2. ORF2 转染 Cos7 细胞及细胞切片的电镜观察

分别将重组质粒 pEGFP-VP2. ORF2 和 2 μ L Lipofectamine 稀释至 50 μ L, 混合后加入至细胞板孔中, 于 CO₂ 培养箱中 37℃ 培养 24h 后在倒置荧光显微镜(波长 420~490nm)下直接观察绿色荧光, 将有强烈荧光的细胞于转染后 72h 制成细胞切片, 电镜观察 VLPs。

1.2.6 VLPs 的纯化

参照《分子克隆实验指南》(第二版)的方法对 VLPs 进行超速离心纯化, 离心获得的病毒样颗粒悬浮于 SM 缓冲液中并于 4℃ 保存备用^[7]。

1.2.7 VLPs 的免疫原性分析

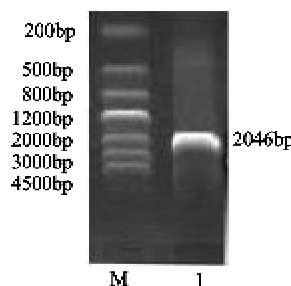
选取 4~6 周龄健康小白鼠 32 只, 血清中抗体 PPV、PCV2 阴性, 随机分成 A、B、C、D 4 组(8 只/组)进行腿部肌肉免疫。其中 A 组接种 VP2. ORF2 病毒样颗粒, B 组接种猪细小病毒普通疫苗, C 组接种猪圆环病毒 2 型病毒液, D 组为生理盐水空白对照。免疫程序为: 免疫前 3d 腿部肌肉注射普鲁卡因, 首免时相同部位肌肉注射, 首免后第 14d 相同部位相同剂量进行二免。每组在相同条件下隔离饲养。

每只小白鼠分别于接种后 0d、14d、21d、28d 前断尾采取抗凝血(采用 4% EDTA 二钠抗凝)和凝血各 1 份。抗凝血用流式细胞仪分析 T 细胞亚群 CD3⁺、CD4⁺、CD8⁺ 数量变化关系; 凝血分离血清用于 PPV、PCV2 抗体检测。

2 结果与分析

2.1 VP2 基因及 ORF2 基因的 PCR、克隆及序列测定

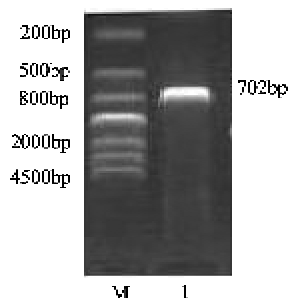
以提取的 PPV SC-1 病毒基因组 DNA 为模板, 以 P1/P2 为引物对 VP2 基因进行 PCR 扩增, 扩增产物经琼脂糖凝胶电泳观察到大小约为 2000bp 的特定条带, 与预期大小一致。电泳结果见图 1。



M: Marker III; 1: PCR products of PPV-SC1 VP2 gene

图 1 PPV-SC1 VP2 基因的 PCR 扩增

以本实验室构建的重组质粒 pPT-2. EGFP. VP2. ORF2 为模板,以 P3/P4 为引物对 ORF2 基因进行 PCR 扩增,扩增产物经琼脂糖凝胶电泳观察到大小约为 700bp 的特异性条带,与预期大小一致。扩增产物的电泳结果如图 2 所示。

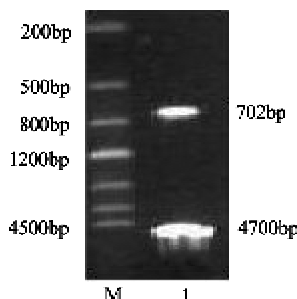


M: Marker III; 1: PCR products of PCV2 ORF2 gene

图 2 PCV2 ORF2 基因的 PCR 扩增

2.2 重组基因 VP2. ORF2 的鉴定

重组基因 VP2. ORF2 克隆载体质粒经 *Hind*III 单酶切后,琼脂糖凝胶电泳观察到大小约为 4700bp 和 700bp 的两条特异性条带,分别与预期大小一致。电泳结果如图 3 所示。



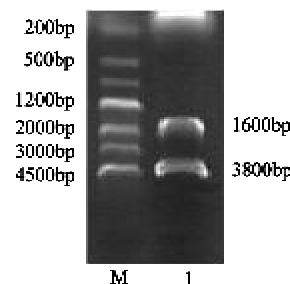
M: Marker III; 1: pMD-VP2. ORF2 Enzyme digestion product/*Hind* III

图 3 pMD-VP2. ORF2 的单酶切鉴定

用 *Bam*HI 与 *Bst*BI (*Bst*BI 酶切位点靠近 ORF2 基因 3' 端,且为重组质粒中单一的酶切位点)进行双酶切消化重组质粒 pMD-VP2. ORF2。消化产物经琼脂糖凝胶电泳观察到大小约为 1600bp 和 3800bp 的两条特异性条带,与预期大小一致,结果显示 ORF2 基因已正向插入到 VP2 基因中。电泳结果如图 4 所示。

2.3 重组基因 VP2. ORF2 荧光表达载体的鉴定

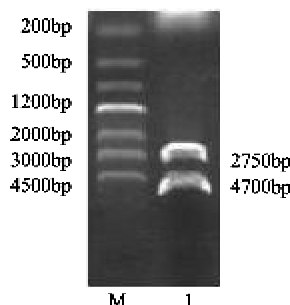
*Kpn*I 和 *Bam*HI 分别双酶切处理 pMD-VP2. ORF2 和 pEGFP-C1,回收重组基因 VP2. ORF2 和线性化 pEGFP-C1 载体质粒,混合连接后转化得到重组质粒。*Kpn*I 和 *Bam*HI 对重组质粒进行双酶切消



M: Marker III; 1: pMD-VP2. ORF2 Enzyme digestion products

图 4 pMD-VP2. ORF2 的方向鉴定

化,消化产物经琼脂糖凝胶电泳分析观察到大小约为 2750bp 和 4700bp 两条特异性条带,与预期大小一致,结果表明成功构建重组表达质粒 pEGFP-VP2. ORF2。电泳结果如图 5 所示。



M: Marker III; 1: pEGFP-VP2. ORF2 Enzyme digestion product

图 5 pEGFP-VP2. ORF2 的酶切鉴定

2.4 重组质粒 pEGFP-VP2. ORF2 转染 Cos7 细胞及细胞切片的电镜观察

采用脂质体介导法将 pEGFP-VP2. ORF2 DNA 转染 Cos7 细胞,转染后 24h 左右能观察到明显的绿色荧光,结果如图 6 所示。透射电镜观察到细胞切片中存在大量的病毒样颗粒,大小约为 20 ~ 30nm,结果如图 7 所示。



图 6 重组质粒 DNA 转染 Cos7 细胞后的绿色荧光



图 7 转染产物的电镜观察

2.5 VLPs 免疫原性分析

各组小鼠分别在免疫后 0d、14d、21d 和 28d 断尾采血,用于 CD_3^+ 、 CD_4^+ 、 CD_8^+ 、PPV 抗体以及 PCV2 抗体的检测。

外周血 CD_3^+ 淋巴细胞数量的动态变化见图 8。由图可知,除空白组外,其余组免疫后 CD_3^+ 淋巴细胞在外周血淋巴细胞中的比率均逐渐升高,其中病毒样颗粒免疫后激发 CD_3^+ 淋巴细胞分化增殖的频率与最高值接近。

外周血 CD_4^+ 淋巴细胞数量的动态变化见图 9。

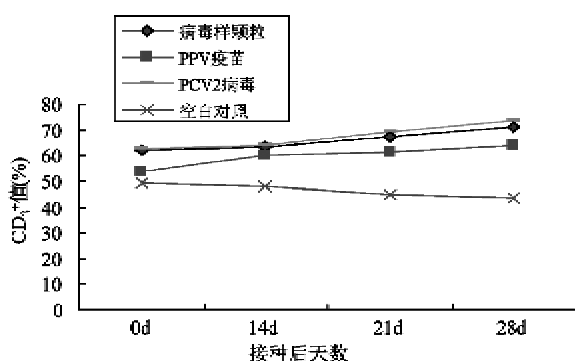


图 8 小白鼠外周血 CD_3^+ 淋巴细胞数量的动态变化

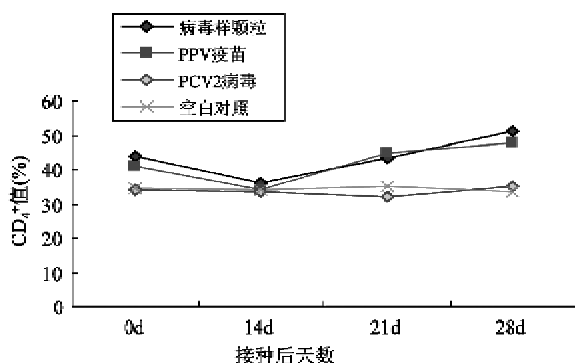


图 9 小白鼠外周血 CD_4^+ 淋巴细胞数量的动态变化

由图可知,除空白对照组外,所有实验组 CD_4^+ 淋巴细胞在外周血淋巴细胞中的比率均在免疫后 14d 有所下降,之后又呈上升趋势。

外周血 CD_8^+ 淋巴细胞数量的动态变化见图 10。由图可知,小白鼠 PCV2 病毒组 CD_8^+ 淋巴细胞在外周血淋巴细胞中的比率一直呈上升趋势,病毒样颗粒和 PPV 疫苗组在免疫后 14d 有所降低,随后又缓慢升高,其中病毒样颗粒组升高较明显,而空白对照组则一直降低。

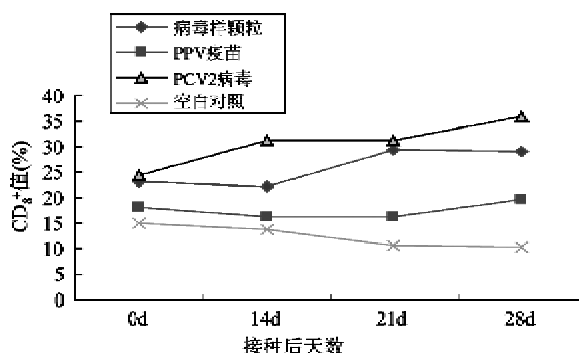


图 10 小白鼠外周血 CD_8^+ 淋巴细胞数量的动态变化

病毒样颗粒免疫小白鼠后,经 ELISA 检测 PPV 抗体,其 PI 值如图 11 所示。由图可知,病毒样颗粒和 PPV 疫苗组免疫后 14d 即呈阳性,PI 值逐渐升高且病毒样颗粒组升高较明显;而空白组则一直为阴性。

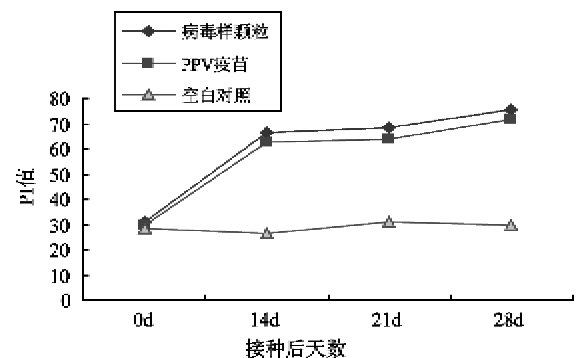


图 11 小白鼠血清中 PPV-Ab 的动态变化

病毒样颗粒免疫小白鼠后,经 ELISA 检测 PCV2 抗体,其 OD_{450} 值如图 12 所示。由图可知,病毒样颗粒和 PCV2 病毒组免疫后 14d 即呈阳性, OD_{450} 值先升高,后在免疫后 21d 有所回落,然后再升高,且病毒样颗粒组升高较明显;而空白组则一直为阴性。

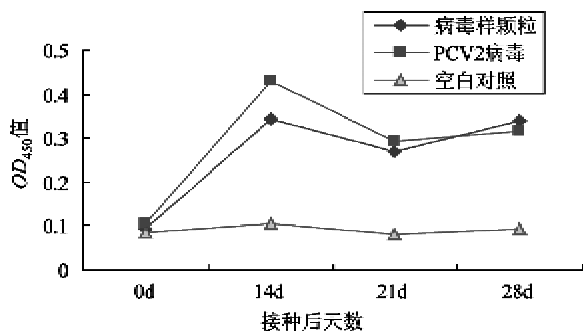


图 12 小白鼠血清中 PCV2-Ab 的动态变化

3 讨论

Casal 等^[8]认为,要成功构建病毒样颗粒的传递系统,必须确保插入位点的适当。Sedlik 等^[9]将骨髓灰质炎病毒的抗原决定簇相应基因插入自主装配成病毒样颗粒的 VP2 基因的 N 末端和 C 末端来分析 VLPs 容纳外源抗原决定簇的能力。结果显示,C 末端的完整性是保持衣壳蛋白空间结构所必需的,N 末端能插入 T 细胞抗原表位并产生免疫应答,但不适合 B 细胞抗原表位的插入。后来通过遗传学方法在 VP2 蛋白的 N 末端插入 T 细胞抗原表位,此位点完全被包在里面,抗体不能与之结合。在对抗体不能到达,且位于环状结构不同位置的 B 细胞抗原决定簇嵌合体进行体液免疫应答分析显示,插入位点在抗体反应上引起很大变化。Hurtado 等^[10]分别缺失 CPV VP2 基因 loop1,2,3,4 内的相应基因,再用杆状病毒表达系统表达,结果 loop1,3,4 的缺失突变株均不能表达出病毒样颗粒,而 loop2 的缺失突变株则能装配出规则的病毒样。他们进一步研究证明 loop2 能容纳外源抗原决定簇。本研究通过将 PCV2 ORF2 基因插入 PPV VP2 基因中,构建了重组基因 VP2. ORF2,并于 Cos7 细胞中成功表达出相应病毒样颗粒,免疫小鼠后获得了免疫后指标的变化,为探索细小病毒 VLPs 作为疫苗递呈系统在病毒样颗粒中允许的插入位点提供了基础:该位点是否干涉病毒样颗粒的结构和装配,所承载的外源多肽是否具有免疫原性。本研究通过倒置荧光显微镜观察到了转染有 pEGFP-VP2. ORF2 质粒 DNA 的细胞样品有大量的绿色荧光存在,说明融合蛋白均得到了有效表达。通过透射电镜对转染的 Cos7 细胞切片进行观察时,观察到了大量的病毒样颗粒存在,其形态与天然的病毒颗粒相似,直径大小在 20nm 左右且颗粒是中空的。结果表明:在 PPV VP2 基因的 N 端 1/3 处插入 PCV ORF2 基因并不影响其正确形成病毒样

颗粒的能力,这与 Sedlik 等 C 末端的完整性是保持衣壳蛋白空间结构所必需的这一结论相符合。与 Alicia Hurtado 等 loop2 的缺失突变株则能装配出规则的病毒样颗粒且能容纳外源抗原决定簇的结论也很接近。

根据 T 淋巴细胞动态变化结果分析得知,PPV VP2 基因 N 端 1/3 处重组 PCV2 ORF2 基因的 VLPs 和 PCV2 弱毒组能够诱导较高水平的细胞免疫,其余组诱导的细胞免疫水平较弱甚至几乎没有。该结果表明 N 端 1/3 处重组 PCV2 ORF2 基因的 PPV VLPs 能像天然病毒粒子一样诱导很强的细胞免疫。本实验 PPV 和 PCV2 抗体水平的检测也表明没有任何佐剂的情况下 PPV VLPs 引起了强烈免疫反应,产生了丰富的特异性抗 PPV、PCV2 抗体,并且抗体效价高于同等条件下的普通疫苗组或弱毒组。这与范京惠等^[11]的研究结论一致。

本研究成功构建了重组基因 VP2. ORF2,并获得含 PCV2 ORF2 抗原表位的 PPV VLPs,免疫小白鼠能诱导较强的细胞免疫和体液免疫。这为 PPV VLPs 的形成机制的进一步探索提供了依据,也为 PPV-PCV2 二联疫苗的研发打下了基础。

参考文献

- [1] Kamstrup S, Langeveld J, Botner A, et al. Mapping the antigenic structure of porcine parvovirus at the level of peptides. *Virus Res*, 1998, 53(2): 163-173
- [2] Molitor TW, Joo H S, Collett M S. Porcine parvovirus: virus purification and structural and antigenic properties of virion polypeptides. *Virol*, 1983, 45(2): 842-854
- [3] Martinez C, Ddlsgaard K, Lopez de Turiso J A, et al. Production of porcine parvovirus empty capsids with high immunogenic activity. *Vaccine*, 1992, 10(10): 684-690
- [4] Rueda P, Martinez-Torrecuadrada J L, Sarraseca J, et al. Engineering parvovirus-like particles for the induction of B-cell, CD4(+) and CTL responses. *Vaccine*, 1999, 18(3-4): 325-332
- [5] Rueda P, Hurtado A, Del Barrio M, et al. Minor displacements in the insertion site provoke major differences in the induction of antibody responses by chimeric parvovirus-like particles. *Virology*, 1999, 263(1): 89-99
- [6] Rueda P, Moron G, Sarraseca J, et al. Influence of flanking sequences on presentation efficiency of a CD8⁺ cytotoxic T-cell epitope delivered by parvovirus-like particles. *Gen Virology*, 2004, 85(Pt3): 563-572
- [7] Sambrook J, Fritsch E F, Maniatis T. 分子克隆实验指南. 北京:科学出版社,1992.136

- [8] Casal J I, Rueda P, Hurtado A. Parvovirus-like particles as vaccine vectors. *Methods*, 1999, 19: 174-186
- [9] Sedlik C, Sarraseca J, Rueda P, et al. Immunogenicity of poliovirus B and T cell epitopes presented by hybrid porcine parvovirus particles. *Gen Virol*, 1995, 76 (9): 2361-2368
- [10] Hurtado A, Rueda, Nowicky J, et al. Identification of domains in canine parvovirus VP2 essential for the assembly of virus-like particles. *Virology*, 1996, 70(8): 5422-5429
- [11] 范京惠, 左玉柱, 唐丽杰等. 含 CSFV T 细胞表位的猪细小病毒样颗粒的表达及小鼠免疫试验. 农业生物技术学报, 2007, 15(5): 746-751

Recombinant virus-like particles obtained with PPV VP2 and PCV2 ORF2 and their immunogenicity

Xu Zhiwen, Jiang Qingrong, Guo Wanzhu, Zhu Ling, Hu Qiujiang, Chen Yang, Liao Xiaodan
(Laboratory of Animal Disease and Human Health, Animal Biotechnology Center,
Sichuan Agricultural University, Ya'an, 625014)

Abstract

The recombinant gene VP2. ORF2 obtained by inserting PCV2 ORF2 into the *Hind*Ⅲ position (located at 1/3 N terminus of PPV VLPs) of PPV VP2 gene was cloned into eukaryotic expression vector pEGFP-C1, and the recombinant plasmids of pEGFP-VP2. ORF2 were constructed. The electronmicroscope observation and the transfection showed that the recombinant virus-like particles were obtained successfully. The particles were then purified by ultracentrifugation. The healthy mice were immunized with the recombinant virus-like particles, also, the porcine parvovirus vaccine, attenuated porcine circovirus and 0.9% NaCl were taken as the controls respectively, and the dynamic variation of blood T lymphocytes and the antibody variation of PPV and PCV2 in serum were measured at different times after immunizing. The results showed that the recombinant virus-like particles can induce cell mediated immunity and higher humoral immunity than PPV vaccine and attenuated porcine circovirus. It laid a foundation for further study on the morphogenesis of recombinant virus-like particles and further research on bigeminy vaccine of PPV and PCV2.

Key words: porcine parvovirus, porcine circovirus, virus-like particle, immune response