

doi: 10.3969/j.issn.0490-6756.2017.03.041

诺如病毒衣壳蛋白在 Tn5 细胞中的表达及纯化

马玉晓^{1,2}, 刘兰军², 李玫颖², 张勇侠², 蔡峰²,
代云见², 范凤鸣², 张雪梅², 赵云¹

(1. 四川大学生命科学学院, 成都 610065; 2. 成都生物制品研究所有限责任公司, 成都 610063)

摘要: 将人诺如病毒 VA387 株 ORF2 基因插入载体 pFastBac1 中, 转化 DH10Bac 感受态细胞获得 Bacmid-NoV-ORF2; 脂质体介导转染 sf9 昆虫细胞, 获得表达 NoV-ORF2 的重组杆状病毒 Ac-NoV-ORF2. 冻融破碎经 Ac-NoV-ORF2 感染的 Tn5 细胞, 离心收集上清进行分子筛纯化. 10% SDS-PAGE 分析结果显示, 重组病毒感染的 Tn5 细胞可见特异的蛋白条带; 目的蛋白条带为相对分子质量 59 kD 和 56 kD 的两个条带; 电镜观察发现表达的诺如病毒衣壳蛋白成功装配成了大小约为 40~50 nm 的 VLPs. 结果表明在 Tn5 细胞中实现了诺如病毒衣壳蛋白的表达和 VLPs 的装配.

关键词: 诺如病毒; 病毒样颗粒; 昆虫细胞; 杆状病毒表达系统

中图分类号: Q81 **文献标识码:** A **文章编号:** 0490-6756(2017)03-0670-05

Expression of noro virus capsid protein in Tn5 cells

MA Yu-Xiao^{1,2}, LIU Lan-Jun², LI Mei-Ying², ZHANG Yong-Xia², CAI Feng²,
DAI Yun-Jian², FAN Feng-Ming², ZHANG Xue-Mei², ZHAO Yun¹

(1. College of Life Sciences, Sichuan University, Chengdu 610065, China;

2. Viral Vaccine Research Laboratory, Chengdu Institute of Biological Products Co., Ltd, Chengdu 610063, China)

Abstract: The ORF2 gene sequence of NoVs VA387 was synthesized and inserted into vector pFastBac1. The DH10Bac competent cells were transformed by pFastBac1-NoV-ORF2 to obtain Bacmid-NoV-ORF2. The sf9 cells transfected by Bacmid-NoV-ORF2 were harvested as recombinant baculovirus Ac-NoV-ORF2 virus. Tn5 cells were infected by Ac-NoV-ORF2 virus and clarified by centrifugation. Then the supernatant was extracted and purified by molecular sieve purified. Capsid protein were collected, analyzed for purity by 10% SDS-PAGE, and observed by electron microscopy. The Tn5 cells transfected with Ac-NoV-ORF2 virus showed specific protein by 10% SDS-PAGE profile. The result of 10% SDS-PAGE profile showed that the capsid protein mainly located in two bands with relative molecular masses of 59 kD and 56 kD. Electron microscopy showed that the expressed capsid protein was assembled to VLPs at sizes of about 40~50 nm. So the capsid protein of NoVs was successfully expressed in Tn5 cells and assembled into VLPs.

Keywords: NoVirus(NoVs); Virus-like particles(VLPs); Insect cell; Baculovirus expression vector system

收稿日期: 2016-03-29

基金项目: 自然科学基金(J1103518)

作者简介: 马玉晓(1989-), 女, 山东日照人, 硕士研究生, 研究方向为生物工程. E-mail: mayuxiao0329@126.com

通讯作者: 张雪梅. E-mail: zhangxuemei3@sinochem.com

1 引言

诺如病毒(NoVirus)属于杯状病毒科,诺如病毒属^[1]。目前已知 NoVs 有 GI、GII、GIII、GIV、GV 5 个基因组,其中仅 GI、GII、GIV 组基因型可感染人类。诺如病毒是一种单股正链 RNA 病毒,无包膜,表面粗糙,球形,呈二十面体对称,其基因组全长约为 7.7 kb,包含 3 个开放阅读框(ORF),ORF1 编码非结构蛋白,ORF2 编码结构蛋白 1,ORF3 编码结构蛋白 2^[2]。近年来,诺如病毒已成全球性非菌性急性肠胃炎感染的重要病原体,随着轮状病毒疫苗的普及推广,诺如病毒的发病率逐年呈上升趋势,诺如病毒研究也越来越受到关注^[3-4]。

迄今为止,诺如病毒尚未建立细胞培养系统和感染动物模型。近年来研究证明多种病毒蛋白在杆状病毒系统编码的蛋白可自发组装成病毒样颗粒(Virus-like particles, VLPs),具有十分接近于天然的病毒粒子的形态结构、抗原性和免疫原性^[5-9]而没有病毒感染性。重组杆状病毒系统具有简单、快速、高产等优势,据报道利用该系统表达的病毒样颗粒具有良好的免疫原性^[10,11]。本研究应用 Bac-to-Bac 杆状病毒表达系统在 Tn5 细胞中研究了诺如病毒结构蛋白的表达及 VLPs 的装配,为诺如病毒的进一步研究奠定基础。

2 材料与方 法

2.1 材料与试剂

2.1.1 基因 诺如病毒 VA387 株 ORF2 由苏州金唯智生物科技有限公司合成,在上下游分别添加酶切位点 *Bam*H I 和 *Xba* I,合成的基因克隆到 pUC57 载体中。

2.1.2 菌株、质粒及细胞 菌株 *E. coli* Top10、DH10BacTM;真核表达载体 pFastBac1、pFastBac1-GFP 和 sf9 细胞、Tn5 细胞均为成都生物制品研究所有限责任公司保存。

2.1.3 主要试剂 限制性内切酶、DNA 连接酶购自美国 NEB 公司;质粒提取试剂盒、琼脂糖凝胶和 DNA marker 购自日本 TaKaRa 公司;Cellfectin 转染试剂盒购自 Invitrogen 公司。SF900 II SFM 培养基,EXPRESS FIVE SFM 培养基购自 Invitrogen 公司;BCA 法蛋白定量试剂盒购自美国 Pierce 公司。

2.2 实验方法

2.2.1 NoV-ORF2 片段制备 将 pUC57-NoV-ORF2 进行 *Bam*H I 和 *Xba* I 双酶切,琼脂糖凝胶

电泳后回收 1.6 k 片段。

2.2.2 重组转座质粒的构建及鉴定 将 NoV-ORF2 片段插入 pFastBac1 载体的 *Bam*H I 和 *Xba* I 双酶位点中间,构建重组表达质粒 pFastBac1-ORF2,转化感受态 Top10 细胞,挑取单菌落小量提取质粒并进行酶切鉴定,将阳性克隆送金唯智公司测序。正确插入 NoV-ORF2 片段的转座质粒命名为 pFastBac1-NoV-ORF2。

2.2.3 重组 Bacmid 的构建及提取 将重组转座质粒 pFastBac1-NoV-ORF2 转化感受态 DH10BacTM 细胞,在含卡那霉素 50 μ g/mL,庆大霉素 7 μ g/mL,四环素 10 μ g/mL, X-gal 100 μ g/mL, IPTG 40 μ g/mL 的 LB 固体培养基上培养筛选。取单克隆进行扩增,用质粒提取试剂盒提取质粒,琼脂糖凝胶电泳验证片段大小。将验证正确的菌株接种到含有 50 μ g/mL 卡那霉素的 LB 液体培养基中摇瓶培养,37 $^{\circ}$ C,180 r/min,培养 18 h。使用质粒提取试剂盒提取重组 Bacmid 质粒。

2.2.4 重组 Bacmid 转染 sf9 细胞及重组杆状病毒制备 使用无血清 F900 II SFM 培养基培养 sf9 细胞,27 $^{\circ}$ C,无 CO₂ 条件下恒温培养,每 2~3 d 传代 1 次。按照 Invitrogen 公司的 Bac-to-Bac 表达系统操作手册提供的方法,使用 Cellfectin 转染试剂盒进行 sf9 细胞转染,设置 pFastBac1-GFP 对照载体转染 sf9 细胞。27 $^{\circ}$ C,无 CO₂ 条件下培养直到 CPE 出现,收集上清为重组杆状病毒 Ac-NoV-ORF2 P1 代病毒,-20 $^{\circ}$ C 保存。以 MOI=0.05 的接种比例感染 sf9 细胞制备 Ac-NoV-ORF2 P2, P3 代病毒。

2.2.5 Tn5 细胞感染及衣壳蛋白表达时间 对同一病毒接种比例下 Tn5 细胞内目的蛋白的最佳表达时间条件进行探究。以 Ac-NoV-ORF2 P3 代病毒 MOI=0.05 的接种比例感染对数生长期的 Tn5 细胞,27 $^{\circ}$ C 培养,每隔 24 h 取样(1 d~7 d)。12096 \times g 离心 5 mins 后收集细胞沉淀,10% SDS-PAGE 验证衣壳蛋白表达情况。

2.2.6 细胞裂解及衣壳蛋白纯化 以 Ac-NoV-ORF2 P3 代病毒 MOI=0.05 的接种比例感染对数生长期的 Tn5 细胞,在目的蛋白的最佳表达时间条件下收获细胞培养液,4 $^{\circ}$ C 12096 \times g 离心 30 mins 去除细胞上清,PBS(pH 7.2)清洗细胞 2 次,转移至新的离心管中。细胞沉淀用 PBS(pH 7.2)重悬溶解后,-20 $^{\circ}$ C 反复冻融两次,12096 \times g 离心 30 mins 保留上清,10% SDS-PAGE 分析上清中目

的蛋白的纯度;

用凝胶层析分子筛柱(superdex™ 200 10/300GL)纯化上清,0.2 M PBS(pH7.4)为缓冲液,流速 0.5 mL/min. 收集目标组分,10% SDS-PAGE 分析目的蛋白的纯度;

2.2.7 透射电镜观察 取凝胶层析分子筛纯化后样品进行常规磷钨酸负染,透射电镜下观察 VLPs.

3 结果与分析

3.1 重组转座质粒的鉴定

构建的重组转座质粒 pFastBac1-ORF2 与对照载体 pFastBac1-GFP 分别转化感受态 Top10 细胞,挑取单菌落小量提取质粒并进行 *Bam*H I 和 *Xba* I 双酶切. 构建的重组转座质粒 pFastBac1-ORF2 双酶切获得了约 1.6 kb 的外源插入片段(图 1). 阳性克隆的 pFastBac1-NoV-ORF2 经测序验证,结果显示基因片段两端为 *Bam*H I 和 *Not* I 酶切位点,基因全长为 1623 bp.

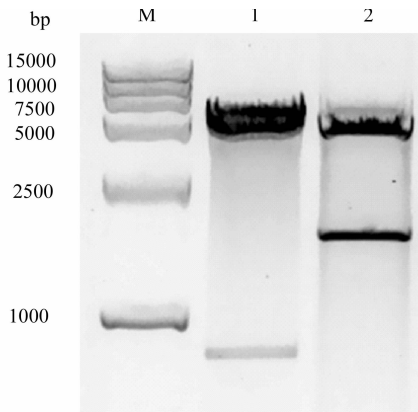


图 1 质粒 pFastBac1-ORF2, pFastBac1-GFP 的酶切鉴定

Fig. 1 Identification of plasmids pFastBac1-ORF2, pFastBac1-GFP

1: pFastBac1-GFP 的酶切结果; 2: pFastBac1-ORF2 的酶切结果; M: DL15000 DNA marker

3.2 Bacmid 构建及提取

将重组转座质粒转化的 DH10Bac™ 细胞涂布在含卡那霉素、庆大霉素、四环素、X-gal、IPTG 的 LB 固体培养基上,37 °C 培养 48 h 后得到白色菌落 8 株,挑选 2 株进行菌落 PCR 验证,结果显示重组表达质粒成功构建. 取验证正确的菌株在含卡那霉素的 LB 液体培养基中摇瓶培养,提取重组表达质粒 Bacmid-NoV-ORF2.

3.3 Bacmid-NoV-ORF2 转染 sf9 细胞

Bacmid-NoV-ORF2 转染 sf9 细胞 5 d 后细胞出现明显 CPE,取上清-20 °C 冻存即为 P1 代 Bac-

mid-NoV-ORF2 病毒. Bacmid-NoV-ORF2 P1 感染 sf9 细胞得到 Bacmid-NoV-ORF2 P2 病毒,同法制备 Bacmid-NoV-ORF2 P3 病毒,-20 °C 保存. 取 P2 代病毒感染 sf9 细胞、表达绿色荧光蛋白酶(GFP)的重组杆状病毒 Ac-GFP 为对照,培养 6 d 后,分别离心收集细胞沉淀进行 SDS-PAGE 检测. SDS-PAGE 检测结果显示, Bacmid-NoV-ORF2 病毒转染的 sf9 细胞中可见 59 kD 和 56 kD 特异的蛋白条带,预测为诺如病毒衣壳蛋白条带. GFP 对照载体转染的 sf9 细胞未见诺如病毒衣壳蛋白条带,可见 GFP 特异性蛋白条带. 未转染的 sf9 细胞未见诺如病毒衣壳蛋白与 GFP 特异性条带(图 2).

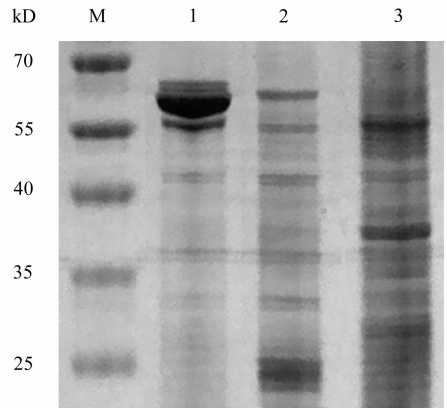


图 2 转染 sf9 细胞的 SDS-PAGE 分析

Fig. 2 SDS-PAGE of transfecting sf9 cells
1: Bacmid-NoV-ORF2 转染的细胞; 2: GFP 对照载体转染的细胞; 3: 未转染的细胞; M: 蛋白质 marker.

3.4 Ac-NoV-ORF2 感染 Tn5 细胞及衣壳蛋白表达

Ac-NoV-ORF2 P3 代病毒感染 Tn5 细胞,培养 5 d 后取样离心收集细胞沉淀. SDS-PAGE 检测结果显示,感染 Tn5 细胞可见特异的蛋白条带 2 条,相对分子量分别为 59 kD 和 56 kD(图 3),目标蛋白纯度较高. 诺如病毒衣壳蛋白基因含有两个翻译起始密码,推测相对分子量 56 kD 的蛋白是翻译越过第 1 个 ATG 后从第 2 个 ATG 翻译的产物,该蛋白比 59 kD 蛋白缺少 N-末端的 26 个氨基酸^[12]. 本结果显示感染 Tn5 细胞成功表达诺如病毒衣壳蛋白,且纯度较高.

感染 Tn5 细胞 1 d~7 d 内,每隔 24 h 取样,离心收集细胞沉淀,SDS-PAGE 检测结果显示,接种 72 h 后衣壳蛋白表达量明显并逐步增加,4 d 后产量达到稳定(图 4). 本实验期间,以 Ac-NoV-ORF2 P3 代病毒 MOI=0.05 的接种比例感染对数生长期的 Tn5 细胞,在接种 4 d 后诺如病毒衣壳蛋白产

量达到最高且质量稳定, 细胞收获时间为感染后 4~6 d 期间最佳.

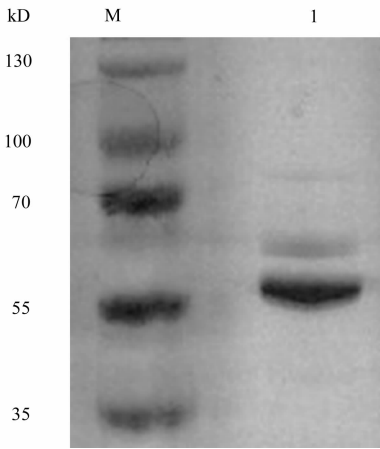


图 3 感染 Tn5 细胞的 SDS-PAGE 分析

Fig. 3 SDS-PAGE of infected Tn5 cells

1: 蛋白质 marker; 2: Ac-NoV-ORF2 病毒感染的 Tn5 细胞;

性诺如病毒. 对于人诺如病毒的研究多以其衣壳蛋白为目标, 而重组杆状病毒表达系统是则是公认的最高效的表达方法. 早在 90 年代就有研究报道诺如病毒 VP1 基因能够表达衣壳蛋白并自组装成 VLPs, 诺如病毒 VLPs 具有与天然病毒极为相似的形态结构, 抗原性和免疫原性. 本研究应用 Bac-to-Bac 杆状表达系统是目前重组杆状病毒表达系统中最为方便、快捷的方法, 由转移载体、穿梭质粒 Bacmid、辅助质粒和大肠杆菌菌株 DH10Bac™ 等共同组成的系统. 在含卡那霉素、四环素、庆大霉素及 X-gal 和 IPTG 的 LB 培养基上筛选白斑得到重组 Bacmid, 无需设置空斑试验辨别重组病毒, 整个重组病毒筛选的周期可缩短为 7~10 d^[13-14]. 本实验应用 Bac-to-Bac 杆状表达系统在昆虫细胞中成功表达诺如病毒 VLPs.

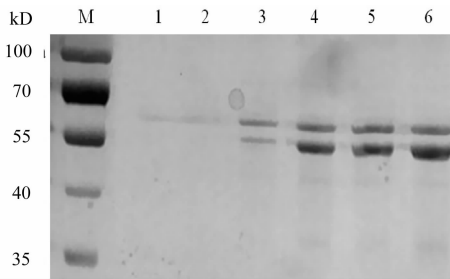


图 4 感染不同时期 Tn5 细胞的 SDS-PAGE 分析

Fig. 4 SDS-PAGE of infected Tn5 cells in different time

1: 感染 1 d 后 Tn5 细胞; 2: 感染 2 d 后 Tn5 细胞; 3: 感染 3 d 后 Tn5 细胞; 4: 感染 4 d 后 Tn5 细胞; 5: 感染 5 d 后 Tn5 细胞; 6: 感染 6 d 后 Tn5 细胞; M: 蛋白质 marker

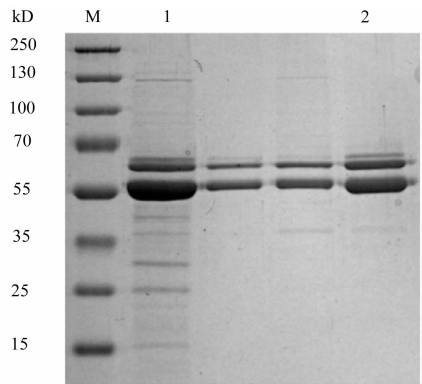


图 5 纯化后 Tn5 细胞的 SDS-PAGE 分析

Fig. 5 SDS-PAGE of infected Tn5 cells after purification

1: 离心后上清组分; 2: 分子筛纯化后组分; M: 蛋白质 marker

3.5 衣壳蛋白纯化及电镜观察

Ac-NoV-ORF2 P3 代病毒感染 Tn5 细胞, 培养 5 d 后取样离心收集细胞, 细胞破碎后离心收集上清, 上清经 SDS-PAGE 检测结果显示目的条带纯度较高, 有部分杂带. 分子筛纯化有效减少杂蛋白条带(图 5).

凝胶层析分子筛柱纯化后收集目标组分经电镜观察, 电镜结果可见表达的诺如病毒衣壳蛋白成功组装完成 VLPs, 100 nm 视野下可见诺如病毒衣壳蛋白颗粒, 大小约为 40 nm~50 nm, 内部无核酸, 成空壳状(图 6); BCA 法测蛋白浓度结果显示, 每升培养基可获得约 100 mg VLPs.

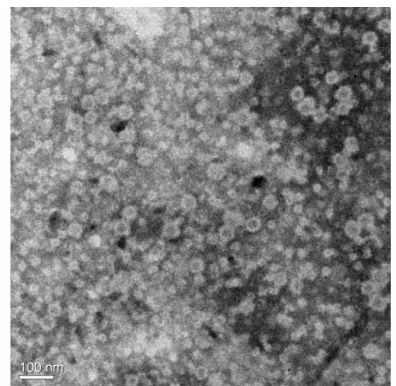


图 6 纯化后蛋白的电镜观察

Fig. 6 Electron microscopy of fraction collected after purification

4 讨论

由于诺如病毒不能在细胞中培养, 也缺乏感染动物模型等原因, 其生物学研究主要依赖于对鼠源

相比较传统的重组杆状病毒表达系统应用单种昆虫细胞表达重组蛋白, 本研究中使用两种昆虫细胞表达诺如病毒衣壳蛋白. 我们成功的获取了目

标重组 Bacmid-NoV-ORF2, 重组 Bacmid-NoV-ORF2 转染 sf9 细胞获得 Ac-NoV-ORF2 P1 代毒株, Bacmid-NoV-ORF2 P1 感染 sf9 细胞得到 Bacmid-NoV-ORF2 P2 病毒, 同法批量获得 Ac-NoV-ORF2 P3 代病毒, 具有病毒滴度高, 稳定性好特点. 由于 Tn5 细胞在病毒多角体产量和重组蛋白表达等方面明显高于 sf9 细胞^[15-16], 使用 Ac-NoV-ORF2 P3 代病毒感染 Tn5 细胞, 以使目的蛋白在 Tn5 细胞中呈较为良好的表达状态. 在试验中显示, 感染 5~6 d 后目的蛋白在 Tn5 细胞中表达量为最佳状态. 用 sf9 细胞获得高滴度的病毒, Tn5 细胞用于重组蛋白的高效表达, 大大提高系统稳定性和重组蛋白产量.

本实验中诺如病毒衣壳蛋白在 Tn5 细胞胞内表达, 冻融 2 次即可破碎细胞释放到 PBS 中, 纯化后经电镜观察结果显示, 细胞内表达的诺如病毒衣壳蛋白成功组装成了 VLPs, 产量较高. 实验感染昆虫细胞均为方瓶培养, 贴壁生长, 如果在生物反应器进一步优化条件, 目的蛋白的产量还有提高的空间.

常规血清培养基存在以下缺点: (1) 动物血清易引入支原体和其 它 异 源 病 毒 污 染; (2) 血 清 含 有 细 胞 生 长 抑 制 因 子 和 毒 性 因 子 影 响 细 胞 生 长; (3) 血清的存在给基因工程表达产物的后处理带来困难^[17-18]. 本研究中使用化学成分明确的无血清培养基, 培养基批次之间质量稳定, 避免了血清对细胞的毒性作用和血清源性污, 降低重组表达蛋白分离、纯化难度, 利于细胞培养产物诺如病毒衣壳蛋白的质量控制, 并实现高产量的病毒增殖和高水平的蛋白表达. 为大规模的商业化生产奠定了基础.

参考文献:

[1] Green K Y, Ando T, Balayan M S, *et al.* Taxonomy of the caliciviruses [J]. *J Infect Dis*, 2000, 181 Suppl 2(5): S322.

[2] Shirato H. NoVvirus and histo-blood group antigens [J]. *Jpn J Infect Dis*, 2011, 64(2): 95.

[3] Cremon C, de Giorgio R, Barbara G. NoVvirus gastroenteritis [J]. *N Engl J Med*, 2010, 362(6): 557.

[4] Patel M M, Marc-Alain W, Glass R I, *et al.* Systematic literature review of role of Noroviruses in sporadic gastroenteritis [J]. *Emerg Infect Dis*,

2008, 14(8): 1224.

[5] Roy P. Genetically engineered particulate virus-like structures and their use as vaccine delivery systems [J]. *Intervirology*, 1996, 39(1-2): 62.

[6] 张明程, 伊瑶, 刘崇柏, 等. 用杆状病毒系统表达戊型肝炎病毒全长结构基因的研究 [J]. *中华实验和临床病毒学杂志*, 2002, 16(4): 354.

[7] 赵培培, 孔枕枕, 刘海冰, 等. 肠道病毒 71 型 VP1 蛋白在昆虫杆状病毒表达系统的表达 [J]. *细胞与分子免疫学杂志*, 2015, 31(9): 1230.

[8] 郑瑾, 任斐, 余翔, 等. 利用昆虫-杆状病毒表达系统制备 HPV16E6 蛋白 [J]. *西北大学学报: 自然科学版*, 2008(5): 775.

[9] 王丽娜, 陈伟, 甘义明, 等. HPV58 型衣壳蛋白 L1 和 L2 基因的克隆表达及病毒样颗粒的装配 [J]. *中国实验诊断学*, 2010, 14(11): 1736.

[10] 杜瑞娟, 马雁冰, 唐浩, 等. 重组杆状病毒表达 HEV ORF2 抗原片段 [J]. *中华微生物学和免疫学杂志*, 2001, 21(5): 560.

[11] 李鸿钧. EV71 类病毒颗粒的表达及免疫原性的初步评价 [J]. *中国生物工程杂志*, 2013, 33(1): 8.

[12] 陈大桥, 蔡爱玲, 周明莉, 等. 诺如病毒衣壳蛋白在 293T 细胞中的表达及纯化 [J]. *中国生物制品学杂志*, 2014, 27(7): 906.

[13] 葛菁萍, 高冬妮, 陈娜, 等. 杆状病毒-高效蛋白表达载体 [J]. *中国预防兽医学报*, 2009, 31(10): 829.

[14] 刘瑞熙, 李晓雨, 杨硕, 等. 猴空泡病毒 40 病毒样颗粒的制备及纯化 [J]. *四川大学学报: 自然科学版*, 2016, 53(2): 57.

[15] Meng M J, Li T L, Li C Y, *et al.* A suspended cell line from *Trichoplusia ni* (Lepidoptera): Characterization and expression of recombinant proteins [J]. *Insect Science*, 2008, 15(5): 423.

[16] 李银花, 郑桂玲, 李长友, 等. 昆虫细胞 BTI-Tn-5B1-4 和 Sf-9 的无血清培养及其特性研究 [J]. *青岛农业大学学报: 自然科学版*, 2009, 26(2): 131.

[17] 曹翠平, 吴小锋, 鲁兴萌. 昆虫细胞无血清培养 [J]. *中国细胞生物学学报*, 2005, 27(2): 127.

[18] Taticek R A, Choi C, Phan S-E, *et al.* Comparison of Growth and Recombinant Protein Expression in Two Different Insect Cell Lines in Attached and Suspension Culture [J]. *Biotechnology Progress*, 2001, 17(4): 676.