

网络出版时间:2022-04-27 14:28

DOI:10.13207/j.cnki.jnwafu.2022.11.002

网络出版地址:https://kns.cnki.net/kcms/detail/61.1390.S.20220426.1600.001.html

C-端嵌合 PRRSV T 细胞抗原表位对 PCV2 VLPs 稳定性的影响

刘项羽, 聂庆庆, 杜恩岐

(西北农林科技大学 动物医学院, 陕西 杨凌 712100)

【摘要】【目的】利用大肠杆菌原核表达系统表达猪圆环病毒 2 型 Cap 蛋白及在其 C-端嵌合 PRRSV T 细胞抗原表位的 Cap 嵌合蛋白,对 Cap 蛋白形成的病毒样颗粒(VLPs)的稳定性、免疫原性以及 C-端嵌合 PRRSV T 细胞抗原表位 VLPs 的热稳定性进行研究,为猪圆环病毒 2 型(PCV2) VLPs 疫苗的高效制备及基于 Cap VLPs 纳米骨架展示技术嵌合疫苗的开发奠定基础。【方法】采用分子生物学方法合成 PCV2b 型强毒株 ZJ 的 *cap* 基因,在其 C-端插入 PRRSV T 细胞抗原表位 T1、T2、T3、T4、T5,构建 *cap-T1~cap-T5* 基因;将 *cap* 及 *cap-T1~cap-T5* 基因与 pET28a 表达载体连接,构建重组表达载体,转染大肠杆菌 ClearColi™ BL21(DE3)进行诱导表达,并对表达产物的热稳定性及免疫效果进行检测。【结果】实现了 Cap 蛋白及其 C-端嵌合 PRRSV T 细胞抗原表位的 Cap-T1、Cap-T2、Cap-T3、Cap-T4 和 Cap-T5 嵌合蛋白在大肠杆菌中的可溶性表达,并成功观察到了 VLPs;表达产物热稳定性分析显示,在 60 °C 处理 30 min 条件下,Cap VLPs 保持稳定,而 C-端嵌合 PRRSV T 细胞抗原表位的 VLPs 热稳定性大幅下降;小鼠免疫效果检测显示,Cap VLPs 诱导产生了高水平特异性抗体,其中 VLPs+佐剂 S350 组效果最好。【结论】利用大肠杆菌表达系统表达的 PCV2 Cap 蛋白可高效自组装成耐热和高免疫原性的 VLPs,但在 Cap 蛋白 C-端嵌合 PRRSV T 细胞抗原表位后的嵌合 VLPs 组装效果和稳定性急剧下降,提示 PCV2 VLPs 作为纳米骨架用于传染病疫苗研发仍有较大局限性。

【关键词】 猪圆环病毒;Cap 蛋白;C-端嵌合;病毒样颗粒;热稳定性;免疫原性

【中图分类号】 S858.28;S852.65⁺9.2 **【文献标志码】** A **【文章编号】** 1671-9387(2022)11-0009-08

Effect of C-terminal chimeric PRRSV T cell epitopes on stability of PCV2 VLPs

LIU Xiangyu, NIE Qingqing, DU Enqi

(College of Veterinary Medicine, Northwest A&F University, Yangling, Shaanxi 712100, China)

Abstract: 【Objective】To lay foundation for the efficient preparation of PCV2 VLPs vaccine and the development of chimeric vaccine based on Cap VLPs nanoskeleton display technology, porcine circovirus type 2 Cap protein and its chimeric protein were expressed by *Escherichia coli* prokaryotic expression system and stability and immunogenicity of VLPs were studied. 【Method】The Cap protein of PCV2b ZJ (Nanjing) was expressed in ClearColi™ BL21(DE3). On this basis, PRRSV T cell epitopes of T1, T2, T3, T4, and T5 were inserted into the C-terminal of *cap* gene to construct *cap-T1*, *cap-T2*, *cap-T3*, *cap-T4*, and *cap-T5* genes. Then, the recombinant expression vector was constructed and transfected into ClearColi™ BL21(DE3), and the thermal stability and immune effect of the expressed product were detected. 【Result】

〔收稿日期〕 2021-11-18

〔基金项目〕 “十三五”涉农专项(2016YFD0500306);国家自然科学基金项目(31572556)

〔作者简介〕 刘项羽(1985—),男,河南漯河人,博士,主要从事动物疫苗研究。E-mail:xy_liu2011@126.com

〔通信作者〕 杜恩岐(1977—),男,陕西蓝田人,副教授,博士,博士生导师,主要从事新型动物疫苗及纳米抗体领域的研究。
E-mail:807178758@qq.com

The soluble expression of Cap, Cap-T1, Cap-T2, Cap-T3, Cap-T4, and Cap-T5 in ClearColi™ BL21 (DE3) was obtained and VLPs were successfully observed. The thermal stability of the expressed product showed that VLPs remained stable at 60 °C for 30 min, while the thermal stability of chimeric VLPs decreased significantly. Immunoassay results showed that Cap VLPs induced high level of Cap-specific antibodies in mice, and the vaccine group (VLPs+adjuvant S350) had the highest specific antibody level. 【Conclusion】 The PCV2 Cap protein expressed by ClearColi™ BL21(DE3) can be highly self-assembled into heat-resistant and immunogenicity VLPs. However, the assembly efficiency and stability of chimeric VLPs decreased sharply after the C-terminal chimeric PRRSV T cell epitope, suggesting that PCV2 VLPs has major limitations as nano skeleton in the research and development of infectious disease vaccine.

Key words: porcine circovirus; Cap protein; C-terminal chimeric; VLPs; thermostable; immunogenicity

猪圆环病毒 2 型(Porcine circovirus type 2, PCV2)是引起断奶仔猪多系统衰竭综合征(postweaning multisystemic wasting syndrome, PMWS)的主要病原,同时还与猪皮炎与肾病综合征、仔猪先天性震颤、流产和渗出性皮炎等有关^[1]。该病广泛流行于世界各地,在中国猪群中流行较为严重,临床上常与猪繁殖与呼吸综合征病毒(porcine reproductive and respiratory syndrome virus, PRRSV)、猪瘟病毒和猪细小病毒等混合或继发感染,给养猪业造成了巨大的经济损失^[2]。

PCV2 开放阅读框 2(ORF2)编码的 Cap 蛋白(约 30 ku)形成的病毒样颗粒(VLPs)与完整的 PCV2 病毒粒子相似,是 PCV2 疫苗研制的理想靶标^[3]。PCV2 亚单位疫苗是利用杆状病毒表达系统、酵母表达系统或大肠杆菌表达系统等高效表达 PCV2 Cap 蛋白,然后对 Cap 蛋白进行提取、纯化、灭活,再与适宜佐剂乳化后制备而成。由 VLPs 制备的疫苗免疫原性良好^[4-6],可诱导猪产生免疫保护反应,对 PCV2 病毒产生完全保护^[7-8]。VLPs 具有很多独特的性质,如能够进行自我装配;允许外源基因或基因片段的插入而形成嵌合型 VLPs,并将外源性抗原表位展示在其表面,可以作为疫苗呈递工具,能有效地将表位或基因呈递给靶细胞,因此在疫苗研究中受到广泛关注。外源基因的大小以及展示位点可影响 VLPs 的形成。Khayat 等^[9]深入分析了 Cap 单体以及 VLPs 的结构,结果发现 Cap 蛋白 N 末端在结构内部,而 C 末端暴露在结构外部。研究表明,在 Cap 蛋白的 C-端插入相应外源细胞表位,能够同时诱导机体产生针对 Cap 和外源细胞表位的免疫反应,且不影响 VLPs 的形成^[10],但目前关于 Cap 蛋白 C 末端展示外源基因后对 VLPs 稳定性的影响研究尚比较少。为此,本研究采用分子生物学方法合成 *cap* 基因及其 C-端嵌合 PRRSV T 细胞抗原

表位的 *cap*-T1、*cap*-T2、*cap*-T3、*cap*-T4 和 *cap*-T5 基因,构建其重组菌并进行诱导表达,对表达产物的热稳定性及 VIPs 的免疫效果进行检测,以期开发稳定、免疫效果良好的 PCV2 VLPs 疫苗提供依据。

1 材料与方法

1.1 材料

pET28a、ClearColi™ BL21 (DE3),由西北农林科技大学新兽药研究团队保存。质粒提取试剂盒,购自 NEB;TIGEN 基因组提取试剂盒、primeSTAR max premix,购自 TaKaRa;DNA Marker、限制性内切酶,购自大连宝生物工程有限公司;IPTG,购自 Genview 公司;蛋白 Marker,购自 Thermo 公司;琼脂糖,购自国药集团;Elisa 检测试剂盒,购自韩国金诺;冷冻透射电镜,来自中国科学院武汉病毒研究所;SDA25 和 SQ 佐剂,购自赛德奥生物科技有限公司;S350 佐剂,购自桑米特生物科技有限公司。

1.2 *cap* 及其 C-端嵌合 PRRSV T 细胞抗原表位基因的合成

从 GenBank 中获取 1 株 PCV2b 型毒株(ZJ 株)的 *cap* 基因,对其密码子进行优化。同时,在 *cap* 基因 C-端分别引入经筛选的 PRRSV T 细胞抗原表位 T1(SSSHLQLIY)、T2(LLDTKGKLY)、T3(KVD-VGGHLI)、T4(RRYVLSSIY-AV)和 T5(FLDTV-GLITVSTAGYYHRR),对其密码子进行优化,构建 *cap*-T1、*cap*-T2、*cap*-T3、*cap*-T4 和 *cap*-T5 基因,将构建的基因送生工生物工程(上海)股份有限公司合成。

1.3 重组菌株的构建

根据上述合成的基因序列,利用 DNASTAR 软件设计扩增 *cap*、*cap*-T1、*cap*-T2、*cap*-T3、*cap*-T4、*cap*-T5 基因的引物 F、R、F/R-T1、F/R-T2、F/R-T3、F/R-T4、F/R-T5,交由生工生物工程(上海)股

份有限公司合成。引物及其序列详见表 1。

表 1 试验用引物及其序列信息
Table 1 Primer sequence information

引物名称 Primer name	序列信息(5'→3') Sequence information(5'→3')
F	CATGCCATGGGCCGTCACCGTTATCGTTGGCG
R	GCAAGCTTTTAAGAACCACCACCACCCGATTTCAGAGGCGGATC
F/R-T1	CCCAAGCTTTTAGTACAGTTTACCTTTGGTATCCAGCAGAGAACACCACCACCACCCGGA
F/R-T2	CCCAAGCTTTTAAAGCGCTCATTACGCCAATCGGTACCAGAACACCACCACCACCCGGA
F/R-T3	CCCAAGCTTTTAGCGGCGATGATAATAACCTGCGGTAGAAACGGTAATCAGACCAACG
F/R-T4	CCCAAGCTTTTAGATCAGGTGACCACCAACATCAACTTTAGAACACCACCACCACCCGGA
F/R-T5	CCCAAGCTTTTAGTAGATCAGCTGCAGGTGAGAAGAAGAACCACCACCACCACCCGGA

注:CCATGG 为 *Nco* I 酶切位点,AAGCTT 为 *Hind* III 酶切位点。
Note:CCATGG is the *Nco* I site and AAGCTT is the *Hind* III site.

利用上述引物对合成的 *cap* 基因序列进行 PCR 扩增,PCR 反应体系(20 μL)为:*Taq* 预混酶 10 μL,引物 F、R(0.5 μmol/L)各 0.5 μL,合成的 *cap* 基因模板(约 200 ng/μL)0.5 μL,ddH₂O 8.5 μL。PCR 扩增条件为:94 ℃预变性 5 min;94 ℃变性 30 s,56 ℃退火 30 s,72 ℃延伸 50 s,35 个循环;72 ℃延伸 5 min。以相同的 PCR 反应体系和扩增条件,分别用引物 F/R-T1、F/R-T2、F/R-T3、F/R-T4 和 F/R-T5 扩增基因 *cap-T1*、*cap-T2*、*cap-T3*、*cap-T4* 和 *cap-T5*。用 1%琼脂糖凝胶对所有基因的扩增产物进行电泳检测,用胶回收试剂盒回收目的基因条带。

分别将回收到的目的基因 *cap*、*cap-T1*、*cap-T2*、*cap-T3*、*cap-T4*、*cap-T5* 及载体 pET28a,用 *Nco* I/*Hind* III 双酶切,酶切体系(20 μL)为:目的基因 10 μL,限制性内切酶 *Nco* I 1 μL,限制性内切酶 *Hind* III 1 μL,缓冲液 2 μL,ddH₂O 6 μL,37 ℃反应 3.5 h,用 1%的琼脂糖凝胶电泳检测酶切效果,用胶回收试剂盒回收目的基因条带及 pET28a 载体条带。将回收到的目的基因与 pET28a 载体连接(连接体系为 10 μL:pET28a 1 μL,目的基因 4 μL,连接酶混合液 solution I 5 μL),16 ℃连接 2 h,通过 42 ℃热击法转化 ClearColi™ BL21(DE3)感受态细胞(制备参照常规大肠杆菌感受态细胞制备方法),用涂布含卡那霉素抗性(终质量浓度 50 μg/mL)的 LB 平板进行筛选,挑取单克隆进行 PCR 验证和测序验证。将测序正确的菌株分别命名为重组菌 pET28a-*cap*/ClearColi™ BL21(DE3)、pET28a-*cap-T1*/ClearColi™ BL21(DE3)、pET28a-*cap-T2*/ClearColi™ BL21(DE3)、pET28a-*cap-T3*/ClearColi™ BL21(DE3)、pET28a-*cap-T4*/ClearColi™ BL21(DE3)和 pET28a-*cap-T5*/ClearColi™ BL21(DE3),并进行菌种保藏。

1.4 重组蛋白的诱导表达

挑取上述 6 株单克隆菌,分别接种于含卡那霉素(终质量浓度 50 μg/mL)的 LB 液体培养基中,34 ℃培养过夜,按照体积分数 2%的接种量转接至发酵培养基(其中含有酵母提取物 20 g/L,胰蛋白胨 10 g/L,硫酸铵 20 mmol/L,硫酸镁 6 mmol/L,PB 50 mmol/L,甘油 10 g/L,调 pH 为 7.2)中,37 ℃ 220 r/min 培养至菌液在 600 nm 处吸光度(OD₆₀₀)为 0.6 左右时,加入终浓度为 1 mmol/L 的 IPTG,于 28 ℃诱导培养 9 h。取诱导培养液,12 000 r/min 离心 5 min,收集重组菌体,按照 1 g 菌体加 9 mL PBS 缓冲液(pH 7.2)的比例制备菌悬液,于 ATS 均质机中进行细胞破碎(压力为 80 000 kPa,破碎 2 遍),收集细胞破碎液。

分别取上述 6 种细胞破碎液 200 μL 于 1.5 mL 离心管中,12 000 r/min 离心 5 min,取上清 200 μL,加入 5×蛋白上样缓冲液 50 μL;沉淀加入 200 μL PBS 缓冲液(pH 7.2)重悬,混匀后同样加入 5×蛋白上样缓冲液 50 μL。将上清和沉淀液蛋白均置于 100 ℃水浴中处理 3 min,12 000 r/min 离心 5 min,取上清 10 μL 进行 SDS-PAGE 蛋白电泳验证。

1.5 热处理对 PCV2 Cap VLPs 样品稳定性的影响

分别取上述细胞破碎液 500 μL 于 1.5 mL EP 管中,置 60 ℃水浴锅中处理 30 min,取样,加入蛋白上样缓冲液,100 ℃处理 3 min。对照为未经过热处理的细胞破碎液上清。离心后取样进行 SDS-PAGE 检测。

对热处理后的细胞破碎液上清进行抗体-抗原琼脂糖平板扩散验证试验。将热处理后的细胞破碎液上清样品于“V”型板上做 2,4,8,16,32,64,128,256 倍稀释,在制备好的琼脂糖扩散平板(直径 4 mm 的梅花形打孔器打孔,中间孔与外周孔距离为 3

mm)6 个周围孔中加入稀释好的样品 60 μ L/孔,在中间孔加入 Cap 阳性血清(60 μ L),将琼脂糖扩散平板放入湿盒,盖好盖放入 37 $^{\circ}$ C 温箱中反应 48~72 h 后取出,琼脂糖扩散平板读数;按照成线清晰及重复孔是否一致读数,判定效价。试验重复 2 次,对照为未经过热处理的细胞破碎液上清。

1.6 PCV2 VLPs 颗粒的冷冻透射电镜观察

分别将 pET28a-cap/ClearColiTM BL21 (DE3)、pET28a-cap-T4/ClearColiTM BL21 (DE3) 细胞破碎液 60 $^{\circ}$ C 热处理 30 min,取上清放置在碳包覆的铜网格上,用滤纸干燥,用质量分数 2% 磷钨酸负染,室温下放置 24 h;用透射电子显微镜(HT7700)在 120 kV 的加速电压下进行电镜观察,确定 Cap 蛋白是否组装成 VLPs 颗粒。

1.7 VLPs 免疫效果检测

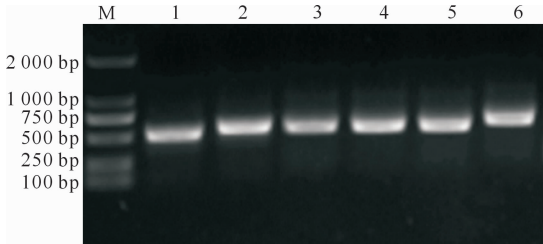
取 20 只小鼠,随机分为阳性对照(市场苗)、阴性对照(生理盐水)、VLPs+佐剂 SQ、VLPs+佐剂 S350 和 VLPs+佐剂 SDA25 等 5 个组,每组 4 只。由于 C-端嵌合 PRRSV T 细胞抗原表位后导致 VLPs 不稳定,故小鼠试验未设计 C-端融合外源基因的试验组。

免疫程序为:免疫 1 针,注射剂量 100 μ L/只(免疫剂量为 20 μ g/只),阴性对照组注射等体积生理盐水代替疫苗。分别于免疫后 7,14,21 和 28 d 采血,使用 PCV-2 抗体检测试剂盒的 Elisa 定量抗体水平。

2 结果与分析

2.1 目的基因的 PCR 扩增

以合成的基因为模板进行 PCR 扩增,结果(图 1)显示,目的条带单一清晰,cap、cap-T1、cap-T2、cap-T3、cap-T4 和 cap-T5 基因大小分别为 633,660,660,660,666 和 690 bp,均与预期扩增片段大小一致。



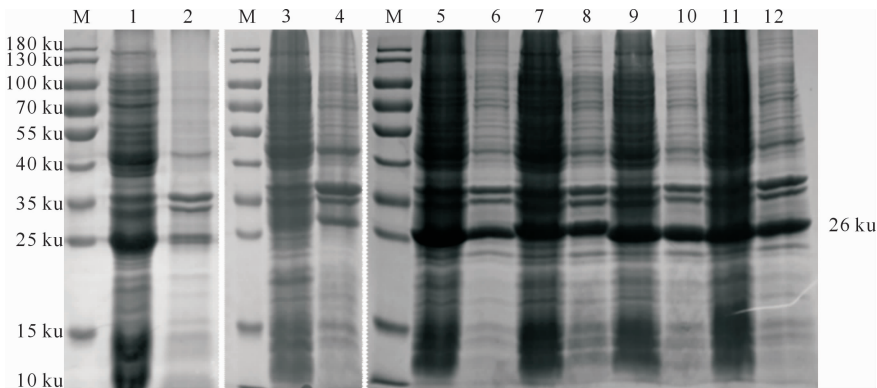
M, DNA Marker;1~6 分别为 cap、cap-T1、cap-T2、cap-T3、cap-T4 和 cap-T5

M, DNA Marker;1-6 are cap, cap-T1, Cap-T2, Cap-T3, cap-T4 and cap-T5, respectively

图 1 PCV2 cap 基因及 cap-T1/T2/T3/T4/T5 的 PCR 扩增
Fig. 1 PCR amplification of the PCV2 cap and cap-T1/T2/T3/T4/T5

2.2 重组蛋白的诱导表达

将上述验证正确的重组菌株接种于发酵培养基中,诱导表达后收集菌体,细胞破碎后经 SDS-PAGE 蛋白电泳验证,结果见图 2。



M. 蛋白 Marker;1,2. pET28a-cap/ClearColiTM BL21(DE3) 重组菌破碎后的上清和沉淀;3,4. pET28a-cap-T1/ClearColiTM BL21(DE3) 破碎后的上清和沉淀;5,6. pET28a-cap-T2/ClearColiTM BL21(DE3) 重组菌破碎后的上清和沉淀;7,8. pET28a-cap-T3/ClearColiTM BL21(DE3) 重组菌破碎后的上清和沉淀;9,10. pET28a-cap-T4/ClearColiTM BL21(DE3) 重组菌破碎后的上清和沉淀;11,12. pET28a-cap-T5/ClearColiTM BL21(DE3) 重组菌破碎后的上清和沉淀

M. Protein Marker;1,2. Supernatant and precipitation after crushing of pET28a-cap/ClearColiTM BL21(DE3);3,4. Supernatant and precipitation after crushing of pET28a-cap-T1/ClearColiTM BL21(DE3);5,6. Supernatant and precipitation after crushing of pET28a-cap-T2/ClearColiTM BL21(DE3);7,8. Supernatant and precipitation after crushing of pET28a-cap-T3/ClearColiTM BL21(DE3);9,10. Supernatant and precipitation after crushing of pET28a-cap-T4/ClearColiTM BL21(DE3);11,12. Supernatant and precipitation after crushing of pET28a-cap-T5/ClearColiTM BL21(DE3)

图 2 重组蛋白 Cap 及 Cap-T1/T2/T3/T4/T5 的诱导表达

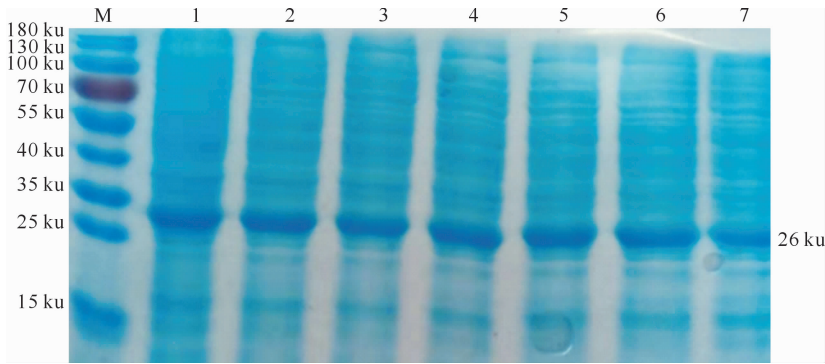
Fig. 2 Expression of recombinant protein Cap and Cap-T1/T2/T3/T4/T5

由图 2 可知,获得的 Cap 蛋白及 Cap-T1、Cap-T2、Cap-T3、Cap-T4 和 Cap-T5 嵌合蛋白大小正确,条带清晰,其分子质量约为 26 ku,灰度分析显示 60% 以上的蛋白为可溶性表达。

2.3 热处理对 PCV2 Cap VLPs 样品稳定性的影响

2.3.1 SDS-PAGE 试验 由图 3 可知,60 ℃ 处理

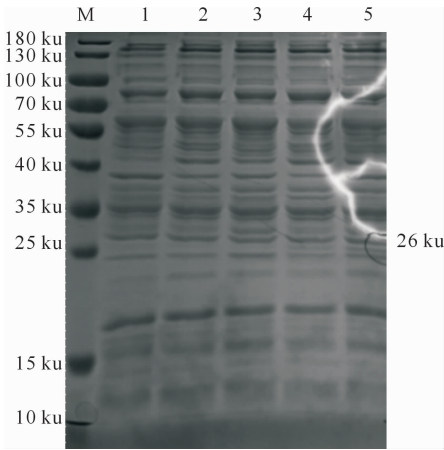
不同时间对目的蛋白 Cap 含量几乎无影响,说明 PCV2 Cap 蛋白具有一定的热稳定性,这为后期利用原核系统规模化生产高质量的 PCV2 VLPs 疫苗奠定了基础。图 4 表明,60 ℃ 处理 30 min 时, Cap-T1、Cap-T2、Cap-T3、Cap-T4 和 Cap-T5 嵌合蛋白大部分遭到损失。



M. 蛋白 Marker;1~7. pET-28a-cap/ClearColi™ BL21(DE3) 重组菌破碎后上清热处理(60 ℃) 0,10,20,30,40,50 和 60 min
M. Protein Marker;1-7. Heat treatment (60 ℃) pET28a-Cap/ClearColi™ BL21(DE3) supernatant after breaking cells with 0,10,20,30,40,50 and 60 min

图 3 热处理(60 ℃)时间对 PCV2 Cap 蛋白稳定性的影响

Fig. 3 Effects of heat treatment (60 ℃) time on stability of PCV2 Cap protein



M. 蛋白 Marker;1~5. pET28a-cap-T1/ClearColi™ BL21(DE3)、pET28a-cap-T2/ClearColi™ BL21(DE3)、pET28a-cap-T3/ClearColi™ BL21(DE3)、pET28a-cap-T4/ClearColi™ BL21(DE3) 和 pET28a-cap-T5/ClearColi™ BL21(DE3)

M. Protein Marker;1~5. pET28a-cap-T1/ClearColi™ BL21(DE3)、pET28a-cap-T2/ClearColi™ BL21(DE3)、pET28a-cap-T3/ClearColi™ BL21(DE3)、pET28a-cap-T4/ClearColi™ BL21(DE3) and pET28a-cap-T5/ClearColi™ BL21(DE3)

图 4 热处理(60 ℃ 30 min)对 Cap-T1/T2/T3/T4/T5 稳定性的影响

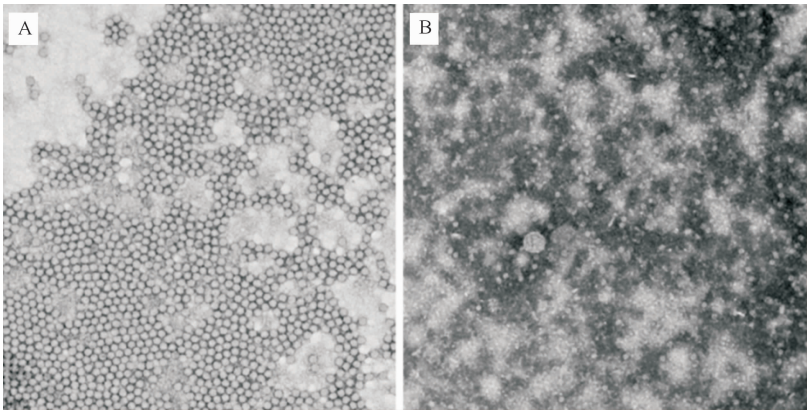
Fig. 4 Effect of heat treatment (60 ℃, 30 min) on stability of Cap-T1/T2/T3/T4/T5

2.3.2 血清抗体-抗原琼脂糖扩散试验 琼脂糖扩

散试验结果显示,所有重组菌株细胞破碎液上清液琼脂糖扩散效价均为 8,说明 cap 基因 C-端嵌合 PRRSV T 细胞抗原表位具有可行性,结合前述 SDS-PAGE 结果可知, cap 基因 C-端嵌合 PRRSV T 细胞抗原表位并未影响 Cap 蛋白的表达量,但热处理(60 ℃ 30 min)后, pET28a-cap/ClearColi™ BL21(DE3) 细胞破碎液上清琼脂糖扩散效价未下降,而 C 端嵌合 PRRSV T 细胞抗原表位的重组菌株细胞破碎液上清琼脂糖平板扩散效价均有大幅下降,其中 pET28a-cap-T1/ClearColi™ BL21 (DE3)、pET28a-cap-T2/ClearColi™ BL21 (DE3)、pET28a-cap-T3/ClearColi™ BL21 (DE3) 琼脂糖扩散效价降为 0,而 pET28a-cap-T4/ClearColi™ BL21 (DE3)、pET28a-cap-T5/ClearColi™ BL21 (DE3) 琼脂糖扩散效价降为 2。

2.4 Cap 蛋白的 VLPs 颗粒电镜观察

由图 5 电镜观察结果可以看出,在 pET28a-cap/ClearColi™ BL21(DE3) 细胞破碎液 60 ℃ 处理 30 min 后的上清液中,能够清晰地看到大量 PCV2 VLPs 的形成;而在 pET28a-cap-T4/ClearColi™ BL21(DE3)的细胞破碎液 60 ℃ 热处理 30 min 后的上清中,依然能够观察到大量处于半解聚状态的 VLPs 颗粒,VLPs 的不规则性明显增加。



A. pET28a-cap/ClearColi™ BL21(DE3)(×40 000); B. pET28a-cap-T4/ClearColi™ BL21(DE3)(×25 000)

图 5 PCV2 VLPs 颗粒的冷冻透射电镜观察

Fig. 5 Cryo-TEM of PCV2 VLPs particles

2.5 VLPs 的小鼠免疫效果评价

由图 6 可知,无论是市场苗,还是来源于原核 VLPs 的自配苗,免疫后 21 d 抗体均达到了较高水平,其中 VLPs+佐剂 SDA25 组免疫效果与阳性对照效果相当,VLPs+佐剂 S350 组免疫效果较阳性对照效果更好。

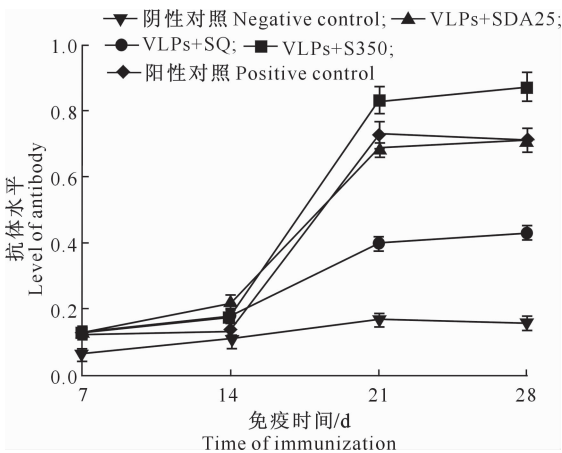


图 6 PCV2 VLPs 的小鼠免疫效果

Fig. 6 Immunological effects of PCV2 VLPs on mice

3 讨论

目前,人们已经利用真核和原核表达系统成功制备出 PCV2 Cap 基因工程疫苗,如张家明^[11]用 Bac-to-Bac 杆状病毒表达系统表达的 PCV2 Cap 蛋白制备亚单位疫苗,张永武等^[12]采用 bacPAK 杆状病毒表达系统表达的 PCV2 Cap 蛋白制备亚单位疫苗,梁翠琴^[13]将 Cap 蛋白在 Sf9 细胞中进行表达并对其免疫原性进行了检测。目前,利用杆状病毒表达系统表达 PCV2 Cap 蛋白,其表达量已经能够提升到 198 mg/L^[14],但限于培养时间及培养成本,由

其生产的疫苗价格依然偏高。大肠杆菌表达系统具有遗传背景清楚、操作简便、培养周期短、可以大规模发酵培养、产量高、成本低等优点,是现阶段规模化生产重组蛋白常用的表达系统。2005 年,Shang 等^[15]最先采用大肠杆菌表达了信号肽定点突变的 Cap 蛋白,并通过 PCV2 阳性血清反应验证了其特异性,开启了原核表达制备亚单位疫苗的先河。杨莹莹等^[16]利用原核表达系统获得了免疫原性良好的高纯度重组 Cap 蛋白;另外,有研究者利用 PCV2 Cap 蛋白结合一系列融合标签(SUMO 标签、His 标签、谷胱甘肽转移酶 GST 等)进行共同表达,使 Cap 蛋白的免疫效果得到了明显提高^[17]。

Beach 等^[18]成功地构建了在 PCV2 Cap N-端和 C-端插入标签的重组嵌合型病毒,其中插入到 PCV2 Cap 蛋白 C-端的标签能够诱导猪同时产生抗 Cap 和抗标签蛋白的抗体,证明外源基因的插入并未影响 PCV2 重组病毒的繁殖,Cap 蛋白 C-端能够插入最少 27 个氨基酸,同时不影响 VLPs 的结构。Huang 等^[19]在 PCV2a/CL 株 Cap 蛋白 C-端插入猴副流感病毒 V5 表位基因的重组 PCV2,此重组病毒能够诱导小鼠产生抗 Cap 和 V5 标签的抗体。PCV2 Cap 蛋白 N-端的精氨酸残基可能参与绑定病毒的 DNA^[20],位于病毒粒子的内部,C-端位于病毒粒子的表面^[21-23]。已有文献报道,在 Cap 蛋白 C-端串联表达其他外源基因后于杆状系统中进行表达,纯化后的目的蛋白能够有效地与 PCV2 单克隆抗体发生特异性反应,并且可以在体外自组装形成均一的直径约 17 nm 的病毒样颗粒^[24];Li 等^[25]将 Cap 蛋白 C-端 4 个氨基酸残基替换成猪繁殖与呼吸障碍综合征病毒的抗原表位基因,利用原核表达系统进行 Cap 蛋白的表达,成功地检测到了 VLPs。

本课题组在前期研究中,对 VLPs 组装工艺进行了优化,并发现经优化工艺组装的 PCV2 Cap VLPs 颗粒具有热稳定性^[26]。本研究发现,在 60 ℃ 条件下处理 30 min 以上,Cap 蛋白依然保持稳定;在此基础上以 PCV2 Cap VLPs 颗粒作为载体,在 Cap 蛋白的 C-端嵌合 PRRSV T 细胞抗原表位,成功实现了 Cap 嵌合蛋白的大量可溶性表达,并观察到了 VLPs 颗粒,但 C-端嵌合 PRRSV T 细胞抗原表位的 VLPs 颗粒的热稳定性大幅下降,其中插入 7 个氨基酸(T1/T2/T3)时完全检测不到琼脂糖扩散效价,插入 11 及 19 个氨基酸(T4/T5)时,虽然能够检测到蛋白和琼脂糖扩散效价,但均大幅降低,可能的原因是 C-端嵌合外源基因导致 VLPs 的结构发生了改变,T 细胞表位呈疏水性,Cap 蛋白的 C-端暴露在外,为亲水性,C-端的亲水性一旦被疏水性的 T 细胞表位破坏,就有可能导致 VLPs 的组装及稳定性出现问题。由于 Cap C-端嵌合 PRRSV T 细胞抗原表位会导致其生成的 VLPs 颗粒的稳定性发生改变,故本试验仅对 Cap 蛋白的免疫效果进行了验证,并对佐剂进行了初步筛选,结果发现,原核系统表达 PCV2 Cap 蛋白形成的 VLPs 能够诱导较好的特异性抗体,其中以 VLPs+佐剂 S350 的效果最好。

以原核表达系统表达的 PCV2 Cap 形成的 VLPs 颗粒疫苗,成本是杆状病毒表达系统表达的 PCV2 Cap 形成的 VLPs 疫苗的 1/5 左右,且疫苗生产周期缩短了 3/4,工艺更为简单。该结果证明了利用原核表达系统进行 PCV2 VLPs 疫苗开发的可行性,同时进一步证明了 Cap 蛋白羧基端在维持 VLPs 颗粒稳定性,特别是热稳定性方面发挥着重要作用,为后期进一步改进 VLPs 颗粒、生产高质量且稳定的 PCV2 VLPs 疫苗奠定了基础。

[参考文献]

- [1] López-Lorenzo G, Díaz-Cao J M, Prieto A, et al. Environmental distribution of porcine *Circovirus* type 2 (PCV2) in swine herds with natural infection [J]. *Scientific Reports*, 2019, 9: 14816.
- [2] Ge X N, Wang F, Guo X, et al. Porcine *Circovirus* type 2 and its associated diseases in China [J]. *Virus Research*, 2012, 164 (1/2): 100-106.
- [3] Nawagitgul P, Harms P A, Morozov I, et al. Modified indirect porcine *Circovirus* (PCV) type 2-based and recombinant capsid protein (ORF2)-based enzyme-linked immunosorbent assays for detection of antibodies to PCV [J]. *Clinical and Vaccine Immunology*, 2002, 9(1): 33-40.
- [4] Masuda A, Lee J M, Miyata T, et al. Purification and characterization of immunogenic recombinant virus-like particles of porcine *Circovirus* type 2 expressed in silkworm pupae [J]. *The Journal of General Virology*, 2018, 99(7): 917-926.
- [5] Crisci E, Bárcena J, Montoya M. Virus-like particles; the new frontier of vaccines for animal viral infections [J]. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 2012, 148(3/4): 211-225.
- [6] Blanchard P, Mahé D, Cariolet R, et al. Protection of swine against post-weaning multisystemic wasting syndrome (PMWS) by porcine *Circovirus* type 2 (PCV2) proteins [J]. *Vaccine*, 2003, 21(31): 4565-4575.
- [7] Wu P C, Chen T Y, Chi J N, et al. Efficient expression and purification of porcine *Circovirus* type 2 virus-like particles in *Escherichia coli* [J]. *Journal of Biotechnology*, 2016, 220: 78-85.
- [8] Chen Y Y, Yang W C, Chang Y K, et al. Construction of polycistronic baculovirus surface display vectors to express the PCV2 Cap(d41) protein and analysis of its immunogenicity in mice and swine [J]. *Veterinary Research*, 2020, 51(1): 112.
- [9] Khayat R, Brunn N, Speir J A, et al. The 2.3-angstrom structure of porcine *Circovirus* 2 [J]. *Journal of Virology*, 2011, 85 (15): 7856-7862.
- [10] Huang L P, Zhang F Y, Tang Q H, et al. A recombinant porcine *Circovirus* type 2 expressing the VP1 epitope of the type O foot-and-mouth disease virus is infectious and induce both PCV2 and VP1 epitope antibodies [J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2014, 98(22): 9339-9350.
- [11] 张家明. 猪圆环病毒 2 型 ORF2 基因在昆虫杆状病毒表达系统的表达及亚单位疫苗的初步研究 [D]. 郑州: 河南农业大学, 2010.
Zhang J M. Expression of ORF2 gene of porcine *Circovirus* type 2 in baculovirus expression system and its immune effect to mice as subunit vaccine [D]. Zhengzhou: Henan Agricultural University, 2010.
- [12] 张永武, 连海, 张锦霞, 等. 表达猪圆环病毒 2 型 Cap 蛋白的重组杆状病毒的构建及鉴定 [J]. *动物医学进展*, 2016, 37 (3): 14-18.
Zhang Y W, Lian H, Zhang J X, et al. Construction and identification of a recombinant baculovirus expressing cap protein of porcine *Circovirus* type 2 [J]. *Progress in Veterinary Medicine*, 2016, 37(3): 14-18.
- [13] 梁翠琴. 猪圆环病毒 2 型 Cap 蛋白在 Sf9 细胞中的表达及其对小鼠的免疫原性 [D]. 杭州: 浙江大学, 2016.
Liang C Q. Expression of porcine circovirus type 2 Cap protein in Sf9 cells and its immunogenicity to mice [D]. Hangzhou: Zhejiang University, 2016.
- [14] López-Vidal J, Gómez-Sebastián S, Bárcena J, et al. Improved production efficiency of virus-like particles by the baculovirus expression vector system [J]. *PLoS One*, 2015, 10 (10): e0140039.
- [15] Shang S B, Zhou J Y, Wu J X, et al. Antigenic analysis of the recombinant capsid protein of porcine *Circovirus* type 2 [J].

- Acta Microbiologica Sinica, 2005, 45(3): 377-381.
- [16] 杨莹莹, 刘永刚, 郝立沙, 等. 猪圆环病毒 2 型 Cap 蛋白的原核表达、纯化及抗原性分析 [J]. 黑龙江畜牧兽医, 2016(5): 14-19.
- Yang Y Y, Liu Y G, Hao L S, et al. Prokaryotic expression, purification and antigenicity analysis of the Cap protein of porcine *Circovirus* type 2 [J]. Heilongjiang Animal Science and Veterinary Medicine, 2016(5): 14-19.
- [17] 陈春丽, 郭宇飞, 陈筱薇, 等. 利用 SUMO 系统高效表达可溶性猪圆环病毒 2 型 Cap 蛋白 [J]. 华南农业大学学报, 2012, 33(3): 393-397.
- Chen C L, Guo Y F, Chen X W, et al. Efficient expression of cap gene of porcine *Circovirus* type 2 by pCold-SUMO expression vector [J]. Journal of South China Agricultural University, 2012, 33(3): 393-397.
- [18] Beach N M, Smith S M, Ramamoorthy S, et al. Chimeric porcine circoviruses (PCV) containing amino acid epitope tags in the C *Terminus* of the capsid gene are infectious and elicit both anti-epitope tag antibodies and anti-PCV type 2 neutralizing antibodies in pigs [J]. Journal of Virology, 2011, 85(9): 4591-4595.
- [19] Huang L P, Lu Y H, Wei Y W, et al. Construction and biological characterisation of recombinant porcine *Circovirus* type 2 expressing the V5 epitope tag [J]. Virus Research, 2011, 161(2): 115-123.
- [20] Finsterbusch T, Mankertz A. Porcine circoviruses: small but powerful [J]. Virus Research, 2009, 143(2): 177-183.
- [21] Lekcharoensuk P, Morozov I, Paul P S, et al. Epitope mapping of the major capsid protein of type 2 porcine *Circovirus* (PCV₂) by using chimeric PCV₁ and PCV₂ [J]. Journal of Virology, 2004, 78(15): 8135-8145.
- [22] Shang S B, Jin Y L, Jiang X T, et al. Fine mapping of antigenic epitopes on capsid proteins of porcine *Circovirus*, and antigenic phenotype of porcine *Circovirus* type 2 [J]. Molecular Immunology, 2009, 46(3): 327-334.
- [23] Wang N D, Zhan Y, Wang A B, et al. In silico analysis of surface structure variation of PCV2 capsid resulting from loop mutations of its capsid protein (Cap) [J]. The Journal of General Virology, 2016, 97(12): 3331-3344.
- [24] 任春晓, 冯 华, 张 腾, 等. 中和表位串联的 PCV2b 病毒样颗粒在昆虫细胞中的表达与鉴定 [J]. 河南农业科学, 2021, 50(7): 154-160.
- Ren C X, Feng H, Zhang T, et al. Expression and identification of PCV2b virus-like particles with neutralizing epitopes in tandem in insect cells [J]. Journal of Henan Agricultural Sciences, 2021, 50(7): 154-160.
- [25] Li G P, Liu L, Xu B J, et al. Displaying epitope B and epitope 7 of porcine reproductive and respiratory syndrome virus on virus like particles of porcine *Circovirus* type 2 provides partial protection to pigs [J]. The Journal of Veterinary Medical Science, 2021, 83(8): 1263-1272.
- [26] 杜恩岐, 李折折, 石聿勇, 等. 一种热处理去除 PCV2 VLPs 中非 VLPs 蛋白的方法: CN108588154A [P]. 2018-09-28.
- Du E Q, Li Z Z, Shi Y Y, et al. A method for removing non-VLPs proteins by heat treatment: CN108588154A [P]. 2018-09-28.

(上接第 8 页)

- [21] 高爱琴, 李金泉, 李 宁, 等. 绵羊 *FGF5* 基因 SNP 的生物信息学分析 [J]. 中国畜牧杂志, 2008, 44(5): 5-7.
- Gao A Q, Li J Q, Li N, et al. Bioinformatics analysis of SNP in sheep *FGF5* gene [J]. Chinese Journal of Animal Science, 2008, 44(5): 5-7.
- [22] 艾锦新, 龙安炬, 罗卫星, 等. 黔北麻羊 FABP3 基因多态性及其与生长性状的相关性研究 [J]. 畜牧与兽医, 2021, 53(1): 13-18.
- Ai J X, Long A J, Luo W X, et al. Polymorphism of the FABP3 gene and its correlation with the growth traits of Qianbei Ma goat [J]. Animal Husbandry & Veterinary Medicine, 2021, 53(1): 13-18.
- [23] 冯 贺, 赵英哲, 孙学钊, 等. ASB12 基因 SNPs 位点多态性与延边黄牛生长性状关联分析 [J]. 畜牧与兽医, 2019, 51(9): 11-16.
- Feng H, Zhao Y Z, Sun X Z, et al. Polymorphism of the ASB12 gene and its association with growth traits of Yanbian Yellow cattle [J]. Animal Husbandry & Veterinary Medicine, 2019, 51(9): 11-16.
- [24] 罗 柳, 黄 鹏, 王婷婷, 等. 母亲糖尿病及 *UCP2* 基因多态性与子代先天性心脏病关联的病例对照研究 [J]. 中国当代儿科杂志, 2020, 22(10): 1092-1099.
- Luo L, Huang P, Wang T T, et al. Association of maternal diabetes mellitus and *UCP2* gene polymorphism with congenital heart disease in offspring: a case-control study [J]. Chinese Journal of Contemporary Pediatrics, 2020, 22(10): 1092-1099.
- [25] 吴 雪, 张 继, 邱淦远, 等. 江口萝卜猪 *UCP2* 基因启动子变异分析 [J]. 南方农业学报, 2019, 50(10): 2314-2321.
- Wu X, Zhang J, Qiu G Y, et al. *UCP2* gene promoter variation in Jiangkou Luobo pig [J]. Journal of Southern Agriculture, 2019, 50(10): 2314-2321.
- [26] 张 娟, 母 童, 蔡正云, 等. *UCP* 基因多态性及与黑安格斯牛生长性状的关联分析 [J]. 农业生物技术学报, 2018, 26(7): 1195-1202.
- Zhang J, Mu T, Cai Z Y, et al. The polymorphism of *UCP* gene and its association with growth traits of Black Angus cattle (*Bos taurus*) [J]. Journal of Agricultural Biotechnology, 2018, 26(7): 1195-1202.