

猪细小病毒 VP2 蛋白在干酪乳杆菌表面的表达

The Surface Display of Porcine Parvovirus VP2 Protein in *Lactobacillus casei*

徐义刚¹, 崔丽春², 马广鹏¹, 唐丽杰¹, 葛俊伟¹, 夏春丽¹, 乔薪媛¹, 赵丽丽¹, 李一经^{1*}

XU Yi-Gang¹, CUI Li-Chun², MA Guang-Peng¹, TANG Li-Jie¹, GE Jun-Wei¹, XIA Chun-Li¹,
QIAO Xin-Yuan¹, ZHAO Li-Li¹ and LI Yi-Jing^{1*}

1 东北农业大学动物医学院 哈尔滨 150030

2 东北林业大学 哈尔滨 150040

1 Department of Veterinary Medicine, Northeast Agricultural University, Harbin 150030, China

2 Northeast Forestry University, Harbin 150040, China

摘 要 将编码猪细小病毒主要免疫保护性抗原 VP2 基因插入干酪乳杆菌细胞表面表达载体 pPG 中, 构建了重组表达载体 pPG-VP2, 将其电转化干酪乳杆菌 *Lactobacillus casei* 393, 获得了表达猪细小病毒 VP2 蛋白的重组干酪乳杆菌系统, 经 2% 乳糖在 MRS 培养基中的诱导表达, SDS-PAGE 检测表明, 有约 74kD 蛋白得到了表达, 表达蛋白的大小与理论值相符。Western-blot 结果分析表明, 表达的蛋白可被鼠源 PPV 抗血清所识别, 间接免疫荧光实验结果表明, 所表达的蛋白能够在干酪乳杆菌菌体表面检测到。

关键词 猪细小病毒, VP2 蛋白, 干酪乳杆菌, 表面表达

中图分类号 Q786 文献标识码 A 文章编号 1000-306X(2007)02-0315-04

Abstract *Lactobacillus casei* 393 was selected as a bacterial carrier for the expression of Porcine Parvovirus (PPV) protective antigen VP2 protein. The gene encoding PPV VP2 protein was cloned into the *Lactobacillus casei* surface expression vector pPG, and then the constructed recombinant vector pPG-VP2 was electrotransformed into *Lactobacillus casei* 393 generating the recombinant system pPG-VP2/*L. casei*393 expressing PPV VP2 protein. The recombinant strain was induced by 2% Lactose in MRS and about 74kD protein was detected with SDS-PAGE. The result of Western-blot indicated that the expressed protein possessed the antigenic specificity which could be recognized by mouse anti-PPV serum. The indirect immunofluorescent test showed that the expressed protein was secreted on the cell surface *Lactobacillus casei*.

Key words PPV, VP2 protein, *Lactobacillus casei* 393, surface display

猪细小病毒(Porcine Parvovirus, PPV)是引起猪繁殖障碍的重要病毒性传染病。病毒经口、鼻等黏膜感染是其主要感染途径^[1,2]。怀孕母猪感染后可

通过胎盘感染引起母猪流产、死胎、木乃伊胎及新生仔猪死亡^[3]。因该病流行面广、危害严重, 给养猪业带来重大经济损失^[4]。

Received: September 27, 2006; Accepted: November 6, 2006.

This work was supported by a grant from National Natural Science Foundations of China (No.30371074)

* Corresponding author. Tel: +86-451-55190385; E-mail: yijingli@yahoo.com

国家自然科学基金(No.30371074)资助。

PPV 基因组编码 3 种结构蛋白,分别是 VP1、VP2、VP3,其中 VP2 是构成病毒粒子的主要衣壳蛋白,约占病毒衣壳蛋白总量的 80%,VP2 蛋白携带主要的抗原决定簇,可诱导机体产生中和抗体,VP2 对病毒感染、发挥其致病性方面亦起关键作用^[5]。因此,PPV VP2 蛋白在 PPV 诊断和免疫防治等方面发挥重要作用。

对本病的防治效果表明,常规弱毒活疫苗免疫效果明显优于灭活苗,但活疫苗接种后机体排散病毒、毒力返强等诸多不安全因素限制了该苗的应用^[6]。因此开发安全无毒、能够有效刺激黏膜免疫应答的新型疫苗对防治本病具有实际意义。

干酪乳杆菌是定植于人及动物黏膜表面的重要益生菌群之一,具有免疫佐剂、吸附粘膜、抗胆汁酸能力,而本身又具有低免疫原性。因此,以干酪乳杆菌为载体,作为外源基因的传递和表达系统,研制口服疫苗,刺激黏膜免疫系统产生有效的免疫应答,具有重要开发前景^[7-11]。

依据本病黏膜免疫特点和干酪乳杆菌安全无毒及在肠道定植特点,本实验将 PPV 主要免疫保护性衣壳蛋白基因 VP2 插入干酪乳杆菌表面表达型载体 pPG,构建了表达 PPV VP2 蛋白的干酪乳杆菌表达系统,以乳糖为诱导剂获得了表达,并对表达的蛋白及表达于细胞的部位进行了鉴定。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 菌株、质粒 pMel_{BacA}-VP2,含有 PPV VP2 全基因序列,由本实验室构建保存;干酪乳杆菌表面表达载体 pPG,含有分泌信号肽基因序列(ssUSP)、氯霉素(Cm)抗性基因和锚定结构序列(anchor),由荷兰 NIZO 研究所惠赠;干酪乳杆菌 *Lactobacillus casei* 393 本实验室保存;感受态 JM109、pMD18-T 载体购自大连宝生物工程有限公司。

1.1.2 主要试剂 羊抗鼠 IgG/HRP、荧光抗体羊抗鼠 IgG/FITC 购自北京中杉公司,用前分别用 0.01mol/L pH 7.2 PBS 和含 0.01% 伊文思蓝的 0.01mol/L pH 7.2 PBS 液稀释成所需要的浓度;鼠源抗 PPV 高免血清由本实验室制备保存;MRS 培养基购自 Sigma 公司。

1.1.3 引物 根据 PPV VP2 基因序列,设计一对引物 P1、P2,上游引物引入 *Bam*H I 酶切位点,下游引物引入 *Xho* I 酶切位点。引物由大连宝生物公司合成,引物序列如下:

P1: 5'-CGAGGATCCTATGGTTCACCTGGTTCGACGACCGCGAG-3'

P2: 5'-AGCTTCTCGAGCCATGCTACCTGATTAACCGAGTAACCTG-3'

1.2 方法

1.2.1 重组干酪乳杆菌表达载体的构建及鉴定 以 pMel_{BacA}-VP2 为模版,P1 和 P2 为引物,PCR 扩增目的基因 VP2,反应体系 50 μ L,模版 DNA 1 μ L, *Taq* DNA 聚合酶 0.5 μ L, 10 \times PCR Buffer 5 μ L, dNTP 4 μ L, P1 引物 1 μ L, P2 引物 1 μ L, 去离子水 37.5 μ L;反应条件: 95 $^{\circ}$ C 预变性 5min 后进入 PCR 循环,94 $^{\circ}$ C 1min,55 $^{\circ}$ C 80s,72 $^{\circ}$ C 2min,30 个循环,最后 72 $^{\circ}$ C 延伸 10 min。Gel Extract Mini 试剂盒回收 PCR 产物与 pMD18-T Simple 载体连接,转化感受态细胞 JM109,将转化子涂布于 SOC(含氨苄青霉素 100 μ g/mL)固体培养基,37 $^{\circ}$ C 过夜培养,筛选并鉴定阳性克隆,重组质粒命名为 pMD18-T-VP2。

重组质粒 pMD18-T-VP2 经 *Bam*H I 和 *Xho* I 双酶切后回收目的基因片段 VP2,与经同样双酶切的 pPG 载体连接,连接体系及反应条件: pPG 质粒 3 μ L,目的基因 9 μ L, T4 DNA 连接酶 1 μ L, Buffer 2 μ L, 40% PEG8000 2 μ L, dH₂O 3 μ L, 16 $^{\circ}$ C 反应 20h,电转化感受态 *L. casei* 393,电转条件: 2.5kV、100 Ω 、25 μ F,将转化子涂布于 MRS(含氯霉素 10 μ g/mL)固体培养基,37 $^{\circ}$ C 厌氧培养 36h,挑选菌落,提取质粒进行酶切和 PCR 鉴定阳性克隆,重组质粒命名为 pPG-VP2。

1.2.2 目的蛋白的诱导表达 将含有 pPG-VP2 重组质粒的 *L. casei* 393 单个菌落接种 5mL MRS 液体培养基中过夜培养使菌种活化,活化菌种按 1:10 比例接种于 10mL 含 2% 乳糖的 MRS 培养基中进行诱导。样品以 12 000r/min 离心 5min,菌体用 500 μ L 10mg/mL 的溶菌酶 37 $^{\circ}$ C 水浴作用 40min,12 000r/min 离心 5min,弃上清,加入 SDS-PAGE 样品缓冲液(含 DTT)混匀,沸水浴 10min,12 000r/min 离心 5min,以蛋白质标准分子量为参考,在 10% SDS-PAGE 上进行电泳分析。

1.2.3 表达产物鉴定:

(1)免疫印迹(Western-blot):SDS-PAGE 电泳结束后,将凝胶中蛋白经 SAV140 型 MINI BLOT MOUDLE 转印装置,0.5 ~ 1mA/cm² 转印 1h,转移到经转印缓冲液平衡的硝酸纤维素膜上。转印结束后,鼠源抗 PPV 高免血清作为第一抗体,以辣根过氧化物酶标记羊抗鼠 IgG 作为第二抗体,4-氯-1-萘酚底物显色溶液中显色 15min,观察结果。

(2)间接免疫荧光 取经诱导的重组干酪乳杆菌和含空质粒的干酪乳杆菌各 0.5 mL 离心去上清后, 分别用 PBS 洗菌体 3 次, 加入鼠源抗 PPV 高免血清作为第一抗体, 混匀, 37℃ 作用 60min, 4000r/min 离心 5min 去上清, PBS 离心洗菌体 3 次; 加入稀释的 FITC 标记抗鼠荧光二抗, 悬浮混合后 37℃ 作用 60min, 4000r/min 离心 5min 去上清, PBS 离心洗菌体 3 次, 菌体沉淀物悬浮于 200μL PBS 缓冲液中, 取适量涂片, 自然干燥后, 预冷丙酮固定 30min 后, 荧光显微镜观察。

2 结果

2.1 重组干酪乳杆菌表达质粒 pPG-VP2 的鉴定

以 P1、P2 为引物, pMel_{BacA}-VP2 为模板, 经 PCR 扩增获得约 1.8kb 的基因片段, 该片段经 0.8% 琼脂糖凝胶纯化, 纯化产物用 *Bam*H I 和 *Xho* I 双酶切, 与相同双酶切的载体 pPG 进行连接, 电转化 *L. casei* 393, 经氯霉素 MRS 平板培养基选择培养, 挑取单个菌落 pPG-VP2/*L. casei*393 扩大培养, 提取质粒后经 *Bam*H I 和 *Xho* I 单酶切约有 5500bp 的目的片段, 双酶切分别切出 3700bp 和 1800bp 目的片段, PCR 鉴定扩增出约 1800bp 的基因片段(图略), 测序鉴定结果表明外源基因 PPV VP2 正确插入 pPG 中(测序结果略)。

2.2 PPV VP2 蛋白在干酪乳杆菌中的表达与鉴定

将含有 pPG-VP2 重组质粒的 *L. casei* 393 单个菌落接种于 5mL MRS 培养基过夜培养活化, 活化菌液按 1:10 接种于含 2% 乳糖 MRS 培养基中, 37℃ 诱导表达, 当细菌生长到 *OD*₆₀₀ 达 1.0 左右时, 取诱导菌液, 溶菌酶裂解, 经 10% SDS-PAGE 凝胶电泳鉴定, 结果表明有约 74kD 的蛋白泳带, 初步证明目的蛋白获得表达。表达蛋白经 SDS-PAGE 电泳和 NC 膜转印后, 分别与鼠源抗 PPV 高免血清和羊抗鼠 IgG/HRP 作用, 结果表明, pPG-VP2/*L. casei*393 在表达蛋白带的预期位置出现明显的反应, 说明表达的蛋白可被鼠源抗 PPV 血清所识别, 结果如图 1 所示。

以重组干酪乳杆菌 pPG-VP2/*L. casei*393 和 pPG/*L. casei*393 所进行的间接免疫荧光实验结果表明, 诱导的重组干酪乳杆菌 pPG-VP2/*L. casei*393 经荧光显微镜检查可见明显的黄绿色荧光(图 2a), pPG/*L. casei*393 未发现绿色荧光, 菌体被伊文思蓝染成红色(图 2b)。由此也表明, 重组干酪乳杆菌表达了外源蛋白 PPV VP2, 同时也表明表达的重组蛋白存在

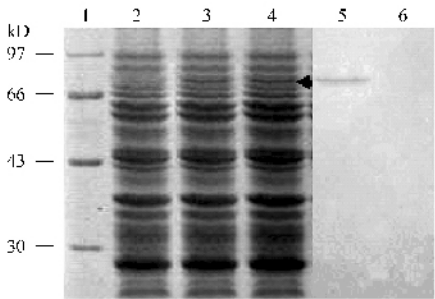


图 1 重组干酪乳杆菌 pPG-VP2/*L. casei*393 表达 VP2 蛋白 SDS-PAGE 及 Western-blot 鉴定结果

Fig.1 the identification of PPV VP2 protein expression in *L. casei* 393 by SDS-PAGE and Western-blot 1: protein marker(97kD ~ 14kD); 2: pPG-VP2/*L. casei*393 noninduced by 2% Lactose ; 3 4: pPG-VP2/*L. casei* 393 induced by 2% Lactose , as arrow showing 5: the expressed protein in pPG-VP2/*L. casei*393 induced by 2% Lactose was transformed onto NC membrane , then reacted with mouse anti PPV serum and sheep anti mouse IgG/HRP , result showed that the expressed protein appeared clear immune blot ; 6: pPG-VP2/*L. casei*393 noninduced by 2% Lactose , the result of Western-blot was negative .

于菌体的表面。

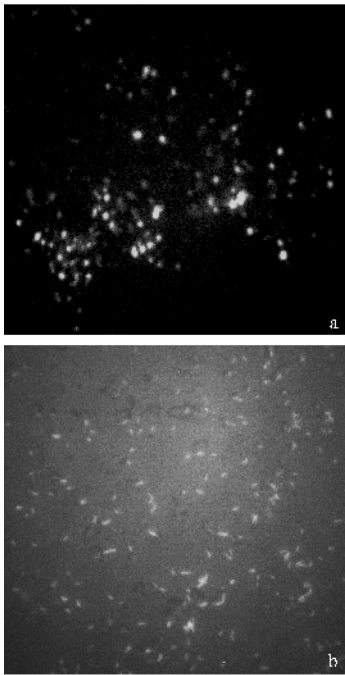


图 2 重组干酪乳杆菌 pPG-VP2/*L. casei*393 免疫荧光结果

Fig. 2 The immunofluorescence result of induced recombinant strain pPG-VP2/*L. casei* 393 a: the pPG-VP2/*L. casei*393 was induced , there were green-yellow fluorescence on the surface of the bacteria via immunofluorescence ; b: the result of immunofluorescence of pPG/*L. casei*393 was negative , the bacteria were red dyed by Evans blue. © 中国科学院微生物研究所期刊联合编辑部 <http://journals.im.ac.cn>

3 讨论

疫苗接种是病毒性疾病预防的主要措施。在猪细小病毒的免疫防治中,弱毒活疫苗的免疫效果明显优于灭活苗,但活疫苗接种后机体的排散病毒、毒力返强等不安全因素使该苗的应用受到限制。因此,寻求免疫原性强、安全性能好的新型疫苗对本病的有效防治具有实际意义。VP2 蛋白是 PPV 的主要衣壳蛋白,在猪细小病毒感染过程起着极为重要的作用,缺失 VP2 蛋白的突变体丧失了对宿主细胞的感染性^[12-14]。以 VP2 制备的类病毒粒子(Virus-like Particles, VLPs)具有与完整病毒一样的血凝活性和免疫原性,用其免疫母猪能诱导产生免疫应答,血清抗体水平与完整的 PPV 病毒几乎没有差别^[15]。因此,PPV VP2 在刺激机体产生特异性免疫保护作用中起着极为重要的作用。

针对本病黏膜免疫特点,采用口服免疫是较为理想的预防途径。口服免疫突出的优点是可有效地刺激黏膜免疫细胞产生分泌型 IgA 并引起全身免疫,但口服免疫需要克服免疫保护性抗原在到达肠道黏膜之前在胃和肠道中被降解或灭活的可能,满足这一要求的必须是活的载体系统来传递完整无损的抗原成分。以细菌、病毒为活载体均可达到这一目的,但作为安全无毒,能在肠道黏膜定居的活载体系统,乳酸菌是最合适的载体系统。据此,本研究设计了以编码 PPV 起主要免疫保护作用的 VP2 衣壳蛋白为目的基因,将其插入乳酸杆菌表达载体中,并转化干酪乳杆菌,构建了重组乳杆菌活菌载体表达系统,经糖诱导后,进行的 SDS-PAGE 结果显示,菌体裂解物可见约 74kD 蛋白的表达,与预期设计的分子量大小一致。Western-blot 结果证实表达的蛋白可被鼠源 PPV 抗血清所识别。

目前普遍认为,在宿主细胞表面表达外源抗原,是活载体疫苗向黏膜免疫系统提呈抗原的最佳方式。本研究所使用的 pPG 表达载体,具有 ssUSP 分泌信号肽,同时具有锚定结构,属表面表达型载体。诱导表达后的活菌体免疫荧光试验表明,所表达的蛋白能够分泌于菌体的表面。存在菌体表面的目的蛋白,为抗原物质有效刺激免疫系统,提高机体的免疫水平奠定了基础。

REFERENCES (参考文献)

[1] Bican J, Svoboda M, Drabek J. Porcine parvovirus infection in boars in the Czech Republic. *Acta Vet Bmo*, 2002, **71**: 45-49.

[2] Mengeling WL, Cutlip RC, Wilson RA, Parks JB, Marshall RF. Fetal mummification associated with porcine parvovirus infection. *J Am Vet Med Assoc*, 1975, **166**: 993-995.

[3] Carwright SF, Huck RA. Viruses isolated in association with herd infertility, abortions and stillbirths in pigs. *Vet Rec*, 1967, **81**: 196-197.

[4] Mengeling WL, Lager KM, Zimmerman JK, et al. A current assessment of the role of porcine parvovirus as a cause of fetal porcine death. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*, 1991, **3**(1): 33-35.

[5] Molitor TW, Joo HS, Collett MS. Porcine parvovirus parvovirus: virus purification and structural and antigenic properties of virion polypeptides. *J Virol*, 1983, **45**(2): 842-854.

[6] Mengeling WL, Paul PS, Guntekunst DE, et al. Vaccination for reproductive failure caused by porcine parvovirus. *Proc Int Congr Pig Vet Soc*, 1980b, **6**: 61.

[7] Maassen CBM, Laman JD, Heijne den Bak-Glashouwer MJ, et al. Instruments for oral disease-intervention strategies: recombinant *Lactobacillus casei* expressing tetanus toxin fragment C for vaccination or myelin proteins for oral tolerance induction in multiple sclerosis. *Vaccine*, 1999, **17**: 2117-2128.

[8] Lorenz Scheppler, Monique Vogel, Adrian W Zuercher, et al. Recombinant *Lactobacillus johnsonii* as a mucosal vaccine delivery vehicle. *Vaccine*, 2002, **20**: 2913-2920.

[9] Maria Leonor S Oliveria, Vicente Monedero, Eliane N Miyaji, et al. Expression of *Streptococcus pneumoniae* antigens, PsaA and PspA by *Lactobacillus casei*. *FEMS Microbiology Letters*, 2003, **227**: 25-31.

[10] Tomohiko Ogawa, Yasuyuki Asai, Kenji Yasuda, et al. Oral immunoadjuvant activity of a new symbiotic *Lactobacillus casei* subsp *casei* in conjunction with dextran in BALB/c mice. *Nutrition Research*, 2005, **25**: 295-304.

[11] Ho PS, Kwang J, Lee YK. Intragastric administration of *Lactobacillus casei* expressing transmissible gastroenteritis coronavirus spike glycoprotein induced specific antibody production. *Vaccine*, 2005, **23**: 1335-1342.

[12] Brown CS, Van Lent JWM, Vlak JM, et al. Assembly of empty capsids by using baculovirus recombinants expressing human parvovirus B19 structural protein. *Virology*, 1991, **65**: 2702-2706.

[13] Maetinz C, Dalsgaard K, De Turiso JAL, et al. Production of porcine parvovirus empty capsids with high immunogenic activity. *Vaccine*, 1992, **10**: 684-690.

[14] Tullis GE, Burger LR, Pintel DJ, et al. The minor capsid VP1 of the autonomous parvovirus minute of mice is dispensable for encapsidation of progeny single-stranded DNA but is required for infectivity. *Virol*, 1993, **67**: 131-141.

[15] Sedlik C, Saron M, Sarraseca J, et al. Recombinant parvovirus-like particles as an antigen carrier: a novel nonreplicative exogenous antigen to elicit protective antiviral cytotoxic T cell. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1997, **94**(14): 7503-7508.