

杆状病毒表面展示系统研究进展

沈 佳 吕正兵 陈 健 张耀洲*

(浙江理工大学生命科学学院 杭州 310018)

摘 要: 杆状病毒表面展示系统是近年发展起来的一种新的真核生物表面展示系统。通过与病毒衣壳或囊膜蛋白融合表达, 可以将外源肽展示在杆状病毒表面, 形成刺猬状“伪病毒”。该文结合作者本人的实际工作, 简要介绍此系统的原理、特点, 并综述其在单抗制备、新型疫苗研制、基因转导与基因治疗等领域的最新研究进展。相信经过改进与优化, 其可展现出更广阔的应用前景。
关键词: 杆状病毒, 表面展示, 伪病毒, 融合表达

The Advancement about Baculovirus Surface Display System

SHEN Jia LV Zheng-Bing CHEN Jian ZHANG Yao-Zhou*

(College of Life Science, Zhejiang Sci-Tech University, Hangzhou 310018)

Abstract: At present, microbe surface display system mainly involves phage surface display system, bacterial surface display system, yeast surface display system and virus surface display system. Baculovirus surface display system is a new type of eukaryote surface display system which developed based on deeply understanding of construction and function of virus genome in recent years. Through fused expression with viral capsid or membrane proteins exogenous peptides can be displayed on the surface of the virus and formed hedgehog-shape “fake virus”. Baculovirus surface display system was characterized by safeness and high performance, furthermore, this system can complete post-translation processing and modification of protein to enhance the bioactivity of exogenous product. Combined with the author’s experimental work, this paper briefly introduces the mechanism and traits of this system and summarizes the newest research development on its application in the field of monoclonal antibody preparation, new-type vaccine development, genes transduction and genes therapy. It is believed that the system above may show extensive application through further improvement and optimization.

Keywords: Baculovirus, Surface display, Fake virus, Fused expression

90年代初, McCafferty 等构建噬菌体表面展示系统, 大大简化了抗体库构建及单链抗体筛选过程。Stahl S 等成功开展了细菌展示技术相关实验, 开辟了细菌展示技术的先河。至今, 噬菌体和细菌展示技术在抗原表位筛选, 酶抑制剂和受体拮抗剂

分离, 细胞信号转导途径以及抗体工程研究等方面得到广泛运用。但是, 噬菌体和细菌表面展示技术系原核表达系统, 由于缺乏真核生物蛋白正确折叠所需的分子伴侣及相关酶类, 所以不能完成复杂真核生物蛋白糖基化、二硫键异构化等翻译后修饰,

致使表达展示的蛋白质活性受到限制。近年来,人们发展了酵母和杆状病毒表面展示技术等新的真核生物表面展示技术。尤其是杆状病毒表面展示系统,在经过不断地研究与改进后,表现出了极为广阔的应用前景。

1 杆状病毒表面展示的原理

杆状病毒科可分为核型多角体病毒(nuclear polyhedrosis virus, NPV)属和颗粒体病毒(granulosis virus, GV)属。其中,苜蓿银纹夜蛾核多角体病毒(*autographa californica nuclear polyhedrosis virus*, AcMNPV)和家蚕核型多角体病毒(*bombyx mori nuclear polyhedrosis virus*, BmNPV)等属于Ⅰ型核多角体病毒。杆状病毒在感染昆虫细胞后,复制产生的出芽型病毒(budded virus, BV)以出芽的方式释放到细胞间质,进而感染其它细胞、组织,最终导致宿主死亡。

研究发现, gp64 是 AcMNPV 等Ⅰ型出芽病毒的主要糖蛋白,以二硫键相连形成三聚体,位于杆状病毒囊膜表面,可介导病毒与受感染细胞的融合过程。采用 RNA 干扰技术,沉默 gp64 的表达,体外、体内实验均发现可抑制 AcMNPV 的感染^[1]。AcMNPV 的 gp64 有 512 个氨基酸, N 端为信号肽序列,近 C 端为跨膜结构域,外源蛋白在信号肽的 C 端与 gp64 的 N 端之间发生融合。融合蛋白经过真核细胞内质网加工后,信号肽被切除,形成的 N 端融合蛋白可稳定地展示于杆状病毒的表面,形成刺猬状“伪病毒”。另外,也有将目的蛋白融合于 gp64 的膜锚定结构域中,即将目的基因插入到 gp64 基因的 ORF 中,虽然破坏了 gp64 的完整性,但也可以实现目的蛋白的表达展示^[2]。Ⅰ型核多角体病毒包括棉铃虫核多角体病毒(*helioverpa armigera single nucleocapsid nuclear polyhedrosis virus*, HaSNPV)等,没有 gp64,却使用另一类称为 F 的膜融合蛋白。除了 gp64、F 膜融合蛋白作为目的多肽或蛋白融合表达的对象,还有将目的多肽或蛋白融合于 gp64 信号肽与异源血凝素(haemagglutinin, HA)、水泡性口膜炎病毒 G 糖蛋白(*vesicular stomatitis virus G glycoprotein*, VSV-G)膜锚定结构域之间,展示于杆状病毒表面^[3]。另外,近年来也有将神经氨酸酶(neuraminidase, NA)等作为目的多肽或蛋白融合展示的靶标。

2 杆状病毒表面展示系统的特点

杆状病毒基因组较大,因此可以容纳较大的外源 DNA 片段。病毒基因组中多角体蛋白基因是病毒感染晚期高效表达的基因,却是病毒复制增殖的非必需区,因此适于插入外源基因的多拷贝。该基因受强启动子调控,可较高水平表达外源蛋白^[4]。外源 DNA 插入多角体蛋白基因内,使此基因功能丧失,不能再合成多角体蛋白。而野生型病毒多角体蛋白基因表达出大量产物形成包涵体,筛选时极易将之与重组病毒区别开来。另外,杆状病毒表面展示系统能够完成翻译后蛋白质的加工修饰,使外源产物具有较高生物学活性。

3 杆状病毒表面展示系统研究概况

杆状病毒表面展示技术,是在对病毒基因组结构和功能的深刻认识基础上发展起来的。1995 年, Boublik 等最先提出了杆状病毒表面展示的设计,首次将标记基因谷胱甘肽-S-转移酶(*glutathione-S-transferase*, GST)与杆状病毒 AcMNPV 的 gp64 蛋白融合表达并展示在 AcMNPV 囊膜表面。目前,杆状病毒表面展示系统已经将许多复杂真核蛋白表达展示。通过对目的蛋白进行分子设计与修饰,人们实现了许多新药物的筛选与配体的鉴定。如将杆状病毒展示系统作为平台,用荧光标记的 TCR 在激光共聚焦显微镜下筛选感染细胞展示的 MHC 与 MHC 多肽复合物^[5,6]。近年来,杆状病毒表面展示技术应用于单克隆抗体的制备、新型疫苗的研制、基因转导与基因治疗等领域成为研究热点。

3.1 单克隆抗体的制备

随着多种生物功能基因组学工作的开展,快速获得各种蛋白质的相应抗体,已是迫切需要。同时,细胞表面抗原特异性抗体的获得是开发抗体药物的重要课题^[7]。由于单克隆抗体具有特异性高、亲和力高等优点,目前,单克隆抗体在肿瘤治疗和诊断领域受到越来越多的关注。众所周知,蛋白质免疫原的设计与制备常常是生产该蛋白质单克隆抗体的限速步骤。传统方法是通过蛋白分离纯化获得免疫原,相当耗时耗力。而利用杂交瘤方法制备的单抗存在异源反应明显、成本较高等缺点。利用杆状病毒表面展示技术,可将表面表达有抗原蛋白的整个重组病毒作为免疫原免疫动物制备单抗,免去了繁

琐的抗原蛋白纯化工作, 成本相对较低, 而且获得的抗体效价也很高。Lindley KM 等^[8]利用杆状病毒展示人肝细胞核受体 (LXR) 和类法尼醇X受体 (FXR), 制备了高亲和力的人源 LXR 和 FXR 单克隆抗体。Urano Y 等^[9]将内质网膜蛋白 SCAP 表达展示于杆状病毒囊膜表面, 比直接用细胞表达更加有利于单克隆抗体的筛选。

3.2 新型疫苗的研制

对于病毒性疾病, 当前的最佳策略是接种疫苗。目前用于预防人和动物病毒性疾病的疫苗, 无论是灭活苗、弱毒苗、还是亚单位苗, 都需要大量培养致病微生物。这不仅给疫苗研制方面带来不便, 同时在安全性、免疫原性、产量及保存等诸多方面存在着不足, 因而迫切需要研制高效的新型疫苗来预防疾病。人们利用杆状病毒表面展示技术在该方面开展了一系列的研究, 并取得一定成效。

2006 年, Feng Q 等^[10]将 SARS 冠状病毒表面 S 蛋白 (SARS-Cov spike S protein) 表达展示于杆状病毒表面, 用该重组病毒免疫小鼠后, 成功获得对 SARS 病毒具有中和活性的抗血清。2007 年, Lu L 等^[11]将 H5N1 型禽流感病毒 (avian influenza virus, AIV) 的血凝素 HA 展示于杆状病毒蛋白衣壳表面, 检测表明该重组病毒具有红细胞血凝活性。小鼠肌肉注射纯化的重组杆状病毒后, 制的抗血清具有良好血凝抑制作用。Yang DG 等^[12]将 HA 与 gp64 融合并展示于杆状病毒囊膜表面, 与对照组比较后发现, gp64 胞浆区结构域 (cytoplasmic domain, CTD) 对 HA 紧密融合展示起决定作用, 能显著提高重组病毒的免疫原性。杆状病毒展示技术可以作为一种潜在的新方法抵抗禽流感病毒的感染。将口蹄疫病毒 (foot-and-mouth disease virus, FMDV) A 位点 (含有病毒衣壳蛋白 VP1 的 142-160 位氨基酸, 是重要的侵染细胞位点), 融合 gp64 表达展示于杆状病毒表面, 用重组病毒免疫的小鼠获得较强抵抗口蹄疫病毒感染的能力^[13]。Rahman MM 等^[14]用 BmNPV 表达展示了小反刍兽疫病毒 (peste des petits ruminants virus, PPRV) 表面 F 糖蛋白和貉细小病毒 (Parvovirus) 表面 H 蛋白, 免疫小鼠后发现小鼠能较好抵抗相应病毒的感染。Yoshida S 等^[15]用 AcMNPV 展示伯格(氏)鼠疟原虫 (*Plasmodium berghei*) 环孢子蛋白抗原序列, 重组杆状病毒免疫小鼠后使其获得抵抗疟疾孢子感染的感染的能力。

Peralta A 等^[16]将牛疱疹病毒-1 (bovine herpes virus, BHV-1) D 糖蛋白融合 gp64 表达展示于杆状病毒囊膜表面, 免疫小鼠获得抗体在体外可很好地中和病毒。另外, 我学院生物化学研究所长期开展家蚕杆状病毒表达系统相关研究, 利用家蚕杆状病毒高效表达体系, 已建立了家蚕生物反应器生物制药的技术平台。目前, 实验室正在开展利用家蚕杆状病毒表面展示技术制备人用禽流感疫苗的工作。我们构建了重组家蚕杆状病毒, 将 H5N1 型禽流感病毒表面 HA 蛋白与杆状病毒囊膜表面 gp64 蛋白在家蚕细胞中融合表达, 其定位于受重组杆状病毒感染的家蚕细胞膜表面。当杆状病毒通过出芽方式从细胞释放出来时, 大部分病毒会形成带有融合蛋白的病毒包膜。这样, 通过筛选就可以鉴定出表面展示有目的蛋白 (HA 蛋白) 的重组杆状病毒 (参考图 1)。HA 蛋白是禽流感病毒的主要抗原, 而家蚕杆状病毒本身对哺乳动物包括人类无毒害作用, 所以通过下游相关处理即可制成疫苗。目前我们已获得疫苗粗制品, 免疫小鼠后发现疫苗具有较好的保护效果。后续工作正在进一步开展之中。

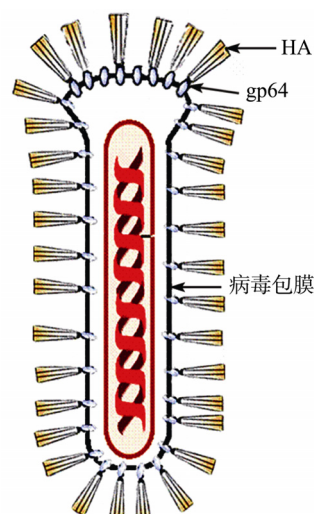


图 1 融合 gp64 的“伪病毒”模式图

Fig. 1 The ideograph of gp64-fused fake recombinant virus

3.3 基因转导与基因治疗

杆状病毒表面展示技术除了可以作为一种有价值的蛋白表达展示工具, 还可以介导外源基因转导哺乳动物细胞。实验表明, 表面展示有相应细胞特异性配基的出芽型杆状病毒可在体外、体内^[17,18]感

染多种哺乳动物细胞, 这为靶向性基因治疗提供了基础。通过病毒的“表面工程”, 即通过在病毒囊膜或衣壳表面表达展示相关蛋白, 如有效地展示能结合哺乳动物细胞表面受体的配体蛋白或介导病毒进入细胞的多肽, 可使特异性的靶向细胞基因转导成为可能^[19,20], 且具有安全、高效等优点^[21]。

水泡性口膜炎病毒 G 糖蛋白 (VSV-G) 展示于杆状病毒囊膜表面, 因其能高效转导各种哺乳动物细胞及具有较高抵抗动物血清钝化作用能力而被认为是一种很有应用前景的基因转移载体^[22]。将 EB 病毒在侵染 B 淋巴细胞时与细胞表面受体 CD21 结合的 gp350/220 的一条短肽基序与杆状病毒囊膜蛋白 gp64 融合, 表达展示在杆状病毒表面, 实验证明该重组病毒对 B 淋巴细胞具有极高的侵染性^[23]。Ernst W 等^[24]用 AcMNPV 展示口蹄疫病毒 (FMDV) VP1 蛋白的由 23 个氨基酸组成的 RGD 肽链, 发现此种修饰可大大加强杆状病毒对哺乳动物细胞的转染。PepT1 是 G 蛋白偶联受体家族成员, 在胰腺癌细胞表面高表达, 被认为是肿瘤治疗新靶点, Saitoh R 等^[25]成功构建了展示 PepT1 的重组杆状病毒, 为进一步开展基因治疗工作打下基础。

4 讨论与展望

gp64 为 Ⅱ型跨膜蛋白, 在氨基端含有信号肽序列, 在羧基末端是跨膜结构域序列。分子生物学实验室构建 cDNA 文库时, 所获得的大部分序列在读码框内具有终止密码子。若将这类序列融合 gp64 膜蛋白表达展示构建表达文库, 最终可能会导致展示失败。因为使用 gp64 等 Ⅱ型跨膜蛋白作为展示靶位点时, 一般只能将目的多肽或蛋白融合在信号肽与跨膜蛋白跨膜结构域之间或跨膜结构域编码框之内, 因此目的基因插入这些位点后, 理论上融合蛋白的形式为信号肽-目的肽-跨膜区或信号肽-跨膜区-目的肽-跨膜区(实际上“目的肽”插入已使分离的跨膜结构域失活)。由于存在目的基因内部的终止序列及 poly-A 尾等会使细胞无法翻译出完整的融合蛋白, 从而导致目的蛋白展示失败。这也是目前存在的 Ⅱ型跨膜蛋白表达展示系统在 cDNA 文库表达展示方面存在的局限性。而神经氨酸酶 (neuraminidase, NA) 等 Ⅲ型跨膜蛋白, 由于基因结构上的差异, 由于基因结构上的差异, 人们可将

cDNA 或目的基因重组到该类蛋白跨膜结构域的编码框后面。这样, 细胞所翻译出的融合蛋白形式为信号肽-跨膜区-目的肽, 而目的肽的终止序列可充当整个融合蛋白的终止序列。通过将信号肽与跨膜结构域共同安排到目的展示蛋白氨基末端, 从而可有效解决杆状病毒 Ⅱ型跨膜蛋白展示系统所可能导致融合蛋白表达提前中止以及编码框移码等问题^[26]。利用杆状病毒表面展示技术, 我们可以构建多肽或蛋白质表达文库, 进而鉴定蛋白质之间相互作用。在基因转导与基因治疗等临床研究领域, 一种简单有效的重组病毒分离纯化手段是极其重要的。Hu YC 等^[27]将 His 6 融合 gp64 表达展示于杆状病毒囊膜表面, 通过金属亲和和层析技术收集重组病毒。另外, 如何提高基因治疗杆状病毒载体在机体内抵抗宿主的各种保护机制, 如免疫细胞破坏载体、血清钝化作用等^[28], 人们还需对该系统进行不断优化。但是, 我们相信, 随着生物化学、分子生物学和其他生命科学相关学科的发展, 尤其是新的实验技术和实验方法的建立, 杆状病毒表面展示技术通过不断改进, 将会应用于更多的领域, 发挥更大的作用。

参考文献

- [1] Valdes VJ, Sampieri A, Sepulveda J, *et al.* Using double-stranded RNA to prevent in vitro and in vivo viral infections by recombinant baculovirus. *J Biol Chem*, 2003, **278**(21): 19317–19324.
- [2] Mottershead D, van der Linden I, von Bonsdorff CN, *et al.* Baculoviral display of the green fluorescent protein and rubella virus envelope proteins. *Biochem Biophys Res Commun*, 1997, **238**(3): 717–722.
- [3] Chapple SD, Jones IM. Non-polar distribution of green fluorescent protein on the surface of Autographa californica nucleopolyhedrovirus using a heterologous membrane anchor. *J Biotechnol*, 2002, **95**(3): 269–275.
- [4] Oker-Blom C, Airene KJ, Grabherr R, *et al.* Baculovirus display strategies: Emerging tools for eukaryotic libraries and gene delivery. *Brief Funct Genomic Proteomic*, 2003, **2**(3): 244–253.
- [5] Wang Y, Rubtsov A, Heiser R, *et al.* Using a baculovirus display library to identify MHC class I mimotopes. *PNAS*, 2005, **102**(7): 2476–2481.
- [6] Crawford F, Jordan KR, Stadinski B, *et al.* Use of baculovirus MHC/peptide display libraries to characterize T-cell receptor ligands. *Immunol Rev*, 2006, **210**: 156–170.
- [7] Adams GP, Weiner LM. Monoclonal antibody therapy of

- cancer. *Nat Biotechnol*, 2005, **23**(9): 1147–1157.
- [8] Lindley KM, Su JL, Hodges PK, *et al.* Production of monoclonal antibodies using recombinant baculovirus displaying gp64-fusion proteins. *J Immunol Methods*, 2000, **234**(1-2): 123–135.
- [9] Urano Y, Yamaguchi M, Fukuda R, *et al.* A novel method for viral display of ER membrane proteins on budded baculovirus. *Biochem Biophys Res Commun*, 2003, **308**(1): 191–196.
- [10] Feng Q, Liu Y, Qu X, *et al.* Baculovirus surface display of SARS coronavirus (SARS-CoV) spike protein and immunogenicity of the displayed protein in mice models. *DNA Cell Biol*, 2006, **25**(12): 668–673.
- [11] Lu L, Yu L, Kwang J, *et al.* Baculovirus surface-displayed hemagglutinin of H5N1 influenza virus sustains its authentic cleavage, hemagglutination activity, and antigenicity. *Biochem Biophys Res Commun*, 2007 May 10 [Epub ahead of print].
- [12] Yang DG, Chung YC, Lai YK, *et al.* Avian influenza virus hemagglutinin display on baculovirus envelope: cytoplasmic domain affects virus properties and vaccine potential. *Mol Ther*, 2007, **15**(5): 989–996.
- [13] Tami C, Peralta A, Barbieri R, *et al.* Immunological properties of FMDV- gp64 fusion proteins expressed on SF9 cell and baculovirus surfaces. *Vaccine*, 2004, **23**(6): 840–845.
- [14] Rahman MM, Shaila MS, Gopinathan KP, *et al.* Baculovirus display of fusion protein of Peste des petits ruminants virus and hemagglutination protein of Rinderpest virus and immunogenicity of the displayed proteins in mouse model. *Virology*, 2003, **317**(1): 36–49.
- [15] Yoshida S, Kondoh D, Arai E, *et al.* Baculovirus virions displaying Plasmodium berghei circumsporozoite protein protect mice against malaria sporozoite infection. *Virology*, 2003, **316**(1): 161–170.
- [16] Peralta A, Molinari P, Conte-Grand D, *et al.* A chimeric baculovirus displaying bovine herpesvirus-1 (BHV-1) glycoprotein D on its surface and their immunological properties. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2007 Feb 7[Epub ahead of print].
- [17] Sarkis C, Serguera C, Pacheco CD, *et al.* Efficient transduction of neural cells in vitro and in vivo by a baculovirus-derived vector. *PNAS*, 2000, **97**(26): 14638–14643.
- [18] Schaubert CA, Tuerk MJ, Pacheco CD, *et al.* Lentiviral vectors pseudotyped with baculovirus gp64 efficiently transduce mouse cells in vivo and show tropism restriction against hematopoietic cell types *in vitro*. *Gene Ther*, 2004, **11**(3): 266–275.
- [19] Ojala K, Mottershead DG, Suokko A, *et al.* Specific binding of baculoviruses displaying gp64 fusion proteins to mammalian cells. *Biochem Biophys Res Commun*, 2001, **284**(3): 777–784.
- [20] Riikonen R, Matilainen H, Rajala N, *et al.* Functional display of an alpha2 integrin-specific motif (RKK) on the surface of baculovirus particles. *Technol Cancer Res Treat*, 2005, **4**(4): 437–445.
- [21] Kost TA, Condreay JP, Jarvis DL, *et al.* Baculovirus as versatile vectors for protein expression in insect and mammalian cells. *Nat Biotechnol*, 2005, **23**(5): 567–575.
- [22] Mangor JT, Monsma SA, Johnson MC, *et al.* A GP64-null baculovirus pseudotyped with vesicular stomatitis virus G protein. *J Virol*, 2001, **75**(6): 2544–2556.
- [23] Ge J, Huang Y, Hu X, *et al.* A surface-modified baculovirus vector with improved gene delivery to B-lymphocytic cells. *J Biotechnol*, 2007, **129**(3): 367–372.
- [24] Ernst W, Schinko T, Spenger A, *et al.* Improving baculovirus transduction of mammalian cells by surface display of a RGD-motif. *J Biotechnol*, 2006, **126**(2): 237–240.
- [25] Saitoh R, Ohtomo T, Yamada Y, *et al.* Viral envelope protein gp64 transgenic mouse facilitates the generation of monoclonal antibodies against exogenous membrane proteins displayed on baculovirus. *J Immunol Methods*, 2007, **322**(1-2): 104–117.
- [26] Borg J, Nevsten P, Wallenberg R, *et al.* Amino-terminal anchored surface display in insect cells and budded baculovirus using the amino-terminal end of neuraminidase. *J Biotechnol*, 2004, **114**(1-2): 21–30.
- [27] Hu YC, Tsai CT, Chung YC, *et al.* Generation of chimeric baculovirus with histidine-tags displayed on the envelope and its purification using immobilized metal affinity chromatography. *Enzyme and Microbial Technology*, 2003, **33**(4): 445–452.
- [28] Guibinga GH, Friedmann T. Baculovirus GP64-pseudotyped HIV-based lentivirus vectors are stabilized against complement inactivation by codisplay of decay accelerating factor (DAF) or of a GP64-DAF fusion protein. *Mol Ther*, 2005, **11**(4): 645–651.