

人细小病毒 B19 VP1u 多克隆抗体的制备及其保守区外 N 端氨基酸对 sPLA2 活性影响的初步研究

王媛¹ 董衍明¹ 易千慧¹ 赵丹¹ 李毅^{1,2*}

(1. 华中师范大学 生命科学学院 昆虫所 湖北 武汉 430079)

(2. 武汉生物工程学院 生物工程系 湖北 武汉 430415)

摘要:【目的】制备人细小病毒 B19-VP1u 的多克隆抗体, 探究 VP1u 多克隆抗体及其保守区外 N 端氨基酸对病毒磷脂酶 A2 活性的影响。【方法】首先通过分子克隆方法构建相应原核表达载体; 利用原核表达系统纯化含 MBP 标签的 VP1u 全长及 N 端系列截短突变融合蛋白; 接着免疫新西兰大白兔制备全长 VP1u 蛋白的多克隆抗体; 最后利用磷脂酶 A2 活性检测试剂盒检测了纯化蛋白的磷脂酶 A2 活性。【结果】Western blot 及免疫荧光实验证实制备的多克隆抗体具有较高的特异性; 磷脂酶 A2 活性检测发现全长 VP1u-MBP 融合蛋白具有一定的活性, 该活性可以被 VP1u 的抗体抑制; N 端保守区外截短系列蛋白的酶活检测发现, N 端截掉 12 个氨基酸时酶活降低 53%, 截掉 67 个氨基酸时酶活性几乎完全丧失。【结论】首次发现 VP1u 保守区外 N 端氨基酸, 尤其是第 12 个氨基酸前的区域以及第 22–67 个氨基酸之间的区域, 对 sPLA2 活性的保持具有重要意义, 推测该区域可能对维持正常的蛋白构象起重要的作用; 而其特异性多克隆抗体的制备也为进一步研究 B19 病毒 VP1u 在病毒复制周期的作用奠定基础。

关键词: 人细小病毒 B19, VP1u, 多克隆抗体, 磷脂酶 A2

Preparation of polyclonal antibody against human parvovirus B19 VP1u and effect of N-terminal amino acids outside its conserved domain on the sPLA2 activity

WANG Yuan¹ DONG Yan-Ming¹ YI Qian-Hui¹ ZHAO Dan¹ LI Yi^{1,2*}

(1. College of Life Science, Central China Normal University, Wuhan, Hubei 430079, China)

(2. Bioengineering Department, Wuhan Bioengineering Institute, Wuhan, Hubei 430415, China)

Abstract: [Objective] To prepare the polyclone antibody of human parvovirus B19-VP1u and study the impact of anti-VP1u and N-terminal amino acids outside the VP1u conserved domain on the sPLA2. [Methods] In the present study, target genes were firstly cloned to the prokaryotic expression vectors to express and purify the full length and N terminal truncated VP1u-MBP fusion proteins by

基金项目: 国家自然科学基金面上项目(No. 30670081)

*通讯作者: Tel: 86-27-89645531; ✉: johnli2668@hotmail.com

收稿日期: 2013-03-25; 接受日期: 2013-04-16; 优先数字出版日期(www.cnki.net): 2013-10-11

using prokaryotic expression system. Purified MBP-VP1u was used to make the polyclonal antibody in New Zealand rabbit. The sPLA2 activities of the purified proteins were measured using a PLA2 assay kit. **[Results]** Western blot and immunofluorescence experiments showed that the polyclonal antibody against VP1u was specific. The purified VP1u-MBP fusion protein exhibits sPLA2 enzyme activity which was inhibited by anti-VP1u antibody. Meanwhile, when first 12 amino acids were truncated, the sPLA2 enzyme activity decreased 53% compared to the full length VP1u protein, and the activity was completely abolished when 67 amino acids were truncated. **[Conclusion]** Our research firstly determined that amino acids outside the conserved domain of VP1u, especially for the first N terminal 12 amino acids and the region from 22 to 67 amino acids play important roles in maintaining its sPLA2 enzyme activity, suggesting that the truncation of N terminal sequences may affect protein conformation. The prepared polyclonal antibody may provide a basis for the further studies on viral replication life cycle of parvovirus B19.

Keywords: Human parvovirus B19, VP1u, Polyclonal antibody, sPLA2

人细小病毒 B19 (Human parvovirus B19, HPV-B19), 属于红细胞病毒属(Erythrovirus), 细小病毒亚科(Parvovirinae), 它和 2005 年 Allander 发现的人博卡病毒(Human Bocavirus)是目前为止能够感染人类的仅有的两种已经确定的细小病毒科成员^[1]。B19 能感染儿童及成年人并引起一系列的疾病, 感染孕妇则会导致胎儿贫血、流产及胎儿水肿^[2-4]。

B19 病毒是一种单链 DNA 病毒, 基因组全长约为 5.6 kb, 两端都具有病毒复制所必需的反向重复序列(ITRs)^[5-6]。病毒基因组分为两个大阅读框(ORFs)主要编码非结构蛋白 NS1, 两个衣壳蛋白(VP1 和 VP2), 两个小非结构蛋白 7.5 kD 和 11 kD, 及一个潜在的编码 X 蛋白^[7-9]。其中 *vp1* 和 *vp2* 属于重叠基因, 与细小病毒科的其它成员一样, B19 病毒 VP1 的 N-末端存在一个 227 个氨基酸组成的保守区域, 即 VP1 独特区(VP1-unique, VP1u), 该区域氨基酸同源性很高, 具有磷脂酶活性(PLA2)^[10-12]。根据 B19 病毒 sPLA2 的结构和酶学特征, 将其划分为分泌型磷脂酶 A2 (sPLA2) XIII 型^[13]。研究发现, B19 病毒的 VP1u 所具有的磷脂酶 A2 活性对病毒进入细胞、病毒致病性的维持及炎症反应的发生等起着重要作用^[14-15]。VP1u 中的 130-195 位氨基酸为 sPLA2 活性的决定区及保守区, 保守区外的氨基酸是否影响其活性, 目前仍然无相关报道^[11]。另外, 靶向 VP1u 的抗体对病毒磷脂酶 A2 活性的影响也无相关报道。由于 VP1-VP2

的连接区和 VP1u 区是 B19 病毒主要的中和性抗体表位的集中区^[16-17], 因此制备特异性靶向 VP1u 的抗体将为 B19 病毒的血清学检测及探究 VP1u 在病毒侵染细胞过程中的作用提供重要工具。

本研究通过基因克隆技术和原核表达系统表达纯化含 MBP 标签的 VP1u 全长及 N 端系列截短的突变融合蛋白, 并制备了全长 VP1u 蛋白的多克隆抗体。经 Western blot 及免疫荧光实验证实制备的多克隆抗体具有较高的特异性; 磷脂酶 A2 活性检测发现: 全长 VP1u-MBP 融合蛋白具有一定的活性, 该活性可以被 VP1u 的抗体抑制; 同时 N 端保守区外第 12 个氨基酸前的区域以及第 22-67 个氨基酸之间的区域, 对 sPLA2 活性的保持也具有重要作用。

1 材料与方法

1.1 菌株和质粒

原核表达载体 pMAL-c2X, pUC-18a, 大肠杆菌 *E. coli* DH5 α /BL21(DE3)均为本实验室保存; B19 病毒感染性克隆 pB19-4244 由加拿大 Tijssen 教授赠送。

1.2 主要试剂及引物

限制性内切酶 *EcoR* I 和 *Hind* III 购于 Promega 公司; Pfu DNA 聚合酶、T4 DNA 连接酶购于 TaKaRa 公司; DNA 片段胶回收试剂盒购于鼎国生物有限公司; 实验中引物及 DNA 测序由南京金斯

瑞生物公司完成;蛋白 Marker 购自 Fermentas 公司;转染试剂 jetPEI Reagent 购自 Polyplus 公司;RPMI-1640 培养基、胎牛血清均购自 Wisent 公司;Anti-MBP 抗体、辣根过氧化物酶标记的羊抗兔 IgG 抗体、Amylose Resin 均购于 NEB 公司;BCA Protein Assay Kit 购于碧云天生物公司;sPLA2 Assay Kit 购于 Catalog 公司。

1.3 VP1u 全长及 N 端截短片段的 PCR 扩增及重组载体的构建

根据人类细小病毒 B19 (GenBank 登录号为 AY386330)的结构蛋白基因 *vp1* 独特区(*vp1u*)序列,运用 Oligo 6.0 软件设计扩增 VP1u 全长及 N 端截短片段的上下游引物(表 1),引物由南京金斯瑞生物公司合成。同时以 pB19-4244 质粒为模板,表 1 中的相应上下游引物,分别扩增 VP1u 全长及 N 端截短片段,经 1%琼脂糖凝胶电泳检测后,4 °C 保存备用。

PCR 产物 WT/ Δ N12/ Δ N22/ Δ N43/ Δ N67/ Δ N96-VP1u 分别经 *EcoR* I /*Hind* III 双酶切,连接入同样经 *EcoR* I /*Hind* III 处理后的载体 pMAL-c2X,上述连接产物转化 *E. coli* DH5 α 感受态细胞,挑单菌落摇菌,经 PCR 及酶切验证正确后,送南京金斯瑞生物技术公司测序。

表 1 构建 WT/ Δ N- <i>vp1u</i> -MBP 所用的引物 Table 1 Primers used for WT/ Δ N- <i>vp1u</i> -MBP construction	
引物 Primer	引物序列 Primer sequence (5'→3')
Δ N12-F	CCGGAATTCGATGATGAATTTGCTAAAGCTGTG
Δ N22-F	CCGGAATTCCAATTTGTGGAATTTTATGAAAAAGG
Δ N43-F	CCGGAATTCGATCATTATAATATTTCTTTAGAT
Δ N67-F	CCGGAATTCAAAAATAACCTTAAAAATTCTCCAGAC
Δ N96-F	CCGGAATTCCTCCAGTAGCAGTCATGCAGCC
Vp1u-F	CCGGAATTCAGTAAAGAAAGTGGCAAATGG
Vp1u-R	CCCAGCTTTAGCTTGGGTATTTTCTGAGGC

1.4 融合蛋白 WT/ Δ N12/ Δ N22/ Δ N43/ Δ N67/ Δ N96-VP1u-MBP 的诱导表达与纯化

将验证正确的含重组质粒 pMAL-WT/ Δ N12/ Δ N22/ Δ N43/ Δ N67/ Δ N96-VP1u 的菌种接种于 LB 培养液中,37 °C、220 r/min 过夜培养活化。次日,取活化后菌液以 1:100 加入 LB 培养基中 37 °C、220 r/min 继续培养约 2 h,加 IPTG 至终浓度分别为 0.5 mmol/L,以不加 IPTG 为阴性对照,置 37 °C 继续培养 4 h,SDS-PAGE 检测融合蛋白的表达情况。待诱导鉴定后,经大规模诱导表达,超声波破碎,12 000 r/min 离心 1 h,收集上清液,0.45 μ m 滤膜过滤杂质,Amylose-Bind™树脂孵育并进行亲和层析纯化。

1.5 融合蛋白 VP1u-MBP 多克隆抗体的制备及鉴定

BCA 法测定纯化后融合蛋白浓度,取 500 μ g 重组蛋白 VP1u-MBP 加入适量完全弗氏佐剂至 1.5 mL,首次免疫采用腘窝淋巴结注射新西兰大白兔,两周后加强免疫 1 次,采用背部皮下多点注射,共加强免疫 2 次,并于第 2 次免疫后一周耳缘静脉取血检测,鉴定正确后一周内颈动脉取血,成功制备多克隆抗体。

1.6 Western blot 检测

将纯化后的融合蛋白 MBP-VP1u 经 Factor Xa 酶切后,上样进行 SDS-PAGE 电泳,半干转印转移到硝酸纤维素滤膜上,以未注射前的兔血清作阴性对照。以制备得到的 MBP-VP1u 多克隆抗体(1:2 000 稀释)为一抗,与膜上的蛋白进行抗原-抗体反应,5%脱脂奶粉封闭 2 h 或 4 °C 过夜。然后 TBS-T 洗膜 3 次,每次 10 min;洗膜后加入含辣根过氧化物酶标记的羊抗兔 IgG 二抗(1:5 000 稀释)的封闭液中,反应 1 h。将 NC 膜转移到 AEC 显色系统显色,当颜色反应达到要求后停止反应,将 NC 膜用大量无菌水洗涤以终止反应,观察结果。

1.7 细胞培养与转染

Hela 细胞在 37 °C、5% CO₂ 环境下培养于含有 10%胎牛血清,100 mg/L 青霉素和 100 U/mL 链霉

素的 RPMI-1640 培养基中。转染前一天将细胞接种于培养板中,细胞汇合度约为 60%–70%。按照 jet PEI 转染试剂操作手册,将不同剂量的质粒转染于细胞中。

1.8 免疫荧光检测 VP1 蛋白在细胞内的表达

Hela 细胞接种于铺有盖玻片的 24 孔板中,将 0.5 μ g 感染性克隆 pB19-4244 质粒转染 Hela 细胞。转染后约 48 h,使用 4%多聚甲醛室温固定细胞 30 min,然后用含 0.2% TritonX-100 的 PBS 穿孔 15 min,含 1% BSA 的 PBS 室温封闭 1 h。加入制备的抗 VP1u 兔血清(1:1 000),37 $^{\circ}$ C 结合 2 h;1 \times PBST 洗 3 次,每次 10 min。然后加入 Dylight488 标记山羊抗兔二抗,37 $^{\circ}$ C 孵育 1 h;1 \times PBST 洗 3 次,每次 10 min。加入 DAPI 室温避光染色 15 min,1 \times PBST 洗 3 次,荧光显微镜观察 VP1 蛋白在细胞的表达情况。

1.9 融合蛋白 WT/ Δ N-VP1u-MBP 的磷脂酶活性测定

将纯化后融合蛋白 WT/ Δ N12/ Δ N22/ Δ N43/ Δ N67/ Δ N96-VP1u-MBP 分别采用 BCA 法测定蛋白浓度。按照 sPLA2 Assay Kit 操作手册检测磷脂酶活性,sPLA2 在 sn-2 位降解硫酸酯键,自由的硫酸化合物可以被底物 DTNB 检测到。样品浓度控制在 0.5 g/L,以 96 孔板内加样进行测定,每个样品加入 3 个孔,Bee venom (蜂毒)为阳性对照,在 405 nm 可见光下酶标仪测定 OD 值,至少读数 5 次;并根据吸光度的变化计算得出不同样品磷脂酶 A2 活性。公式如下:

$$\text{sPLA2 activity (U/mL)} = \frac{\Delta A_{405} / \text{min}}{10.66 \text{ mmol/L}} \times \frac{0.225 \text{ mL}}{0.01 \text{ mL}}。$$

2 结果与分析

2.1 VP1u 全长及 N 端截短片段的 PCR 扩增及重组载体的构建

以感染性克隆 pB19-4244 质粒为模板,表 1 中的全长及截短片段的 F、R 为引物,PCR 扩增 WT-vp1u 及 Δ N12/ Δ N22/ Δ N43/ Δ N67/ Δ N96-vp1u 基因片段,PCR 产物经 1%琼脂糖凝胶电泳显示单一

条带,分别为 681、648、618、555、483、396 bp,与预期大小一致(图 1A)。

按照 1.3 中方法将得到的重组质粒经 *Eco*R I / *Hind* III 双酶切,经 1%琼脂糖凝胶电泳检测有目的片段的插入(图 1B),同时经测序进一步证实重组质粒 pMAL-WT/ Δ N12/ Δ N22/ Δ N43/ Δ N67/ Δ N96-VP1u 构建成功。

2.2 融合蛋白 VP1u-MBP 的诱导表达与纯化

pMAL-VP1u 重组质粒的转化菌经 IPTG 诱导表达,10% SDS-PAGE 进行电泳分析,得到分子量大

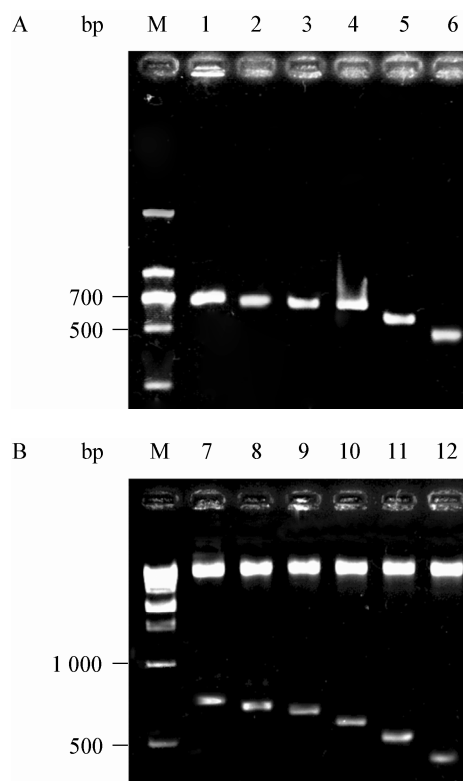


图 1 VP1u 全长及 N 端截短片段的 PCR 扩增(A)及重组载体的构建(B)

Figure 1 The PCR amplification (A) and the construction of recombinant vector (B) for full length and N terminal truncated VP1u

注: M: DNA marker; 1–6: WT/ Δ N12/ Δ N22/ Δ N43/ Δ N67/ Δ N96-VP1u PCR 扩增产物; 7–12: 重组载体 pMAL-WT/ Δ N12/ Δ N22/ Δ N43/ Δ N67/ Δ N96-VP1u 双酶切验证。

Note: M: DNA marker; 1–6: WT/ Δ N12/ Δ N22/ Δ N43/ Δ N67/ Δ N96-VP1u PCR fragments; 7–12: Digestion of pMAL-WT/ Δ N12/ Δ N22/ Δ N43/ Δ N67/ Δ N96-VP1u with restriction enzymes.

小约为 67 kD (麦芽糖结合蛋白 MBP 分子量为 42 kD, 目的蛋白的分子量为 25 kD) 的明显条带, 与预计的大小基本一致(图 2, 4 泳道)。按照同样的诱导条件, 大规模诱导表达蛋白, 收集菌体, -20°C 放置过夜, 次日冰浴超声波破碎裂解, 12 000 r/min 离心 1 h 后收集上清, 经 $0.45\ \mu\text{m}$ 滤膜过滤杂质, Amylose-Bind™ 树脂孵育并进行亲和层析纯化。10% SDS-PAGE 电泳鉴定纯化的融合蛋白, 如图 2 的第 5–7 泳道所示, 纯化后蛋白样品为比较单一的大小约为 67 kD 的条带, 经 BandsScan 软件分析, 蛋白纯度在 85% 以上。

2.3 融合蛋白 VP1u-MBP 多克隆抗体的制备及 Western blot 鉴定

按照 1.5 中的方法制备 VP1u-MBP 兔源多克隆抗体。为了检测制备的多克隆抗体的特异性, 选择非融合的 VP1u 蛋白作为抗原。由于载体 pMAL-c2X 在酶切位点处含有凝血因子 Xa (Factor Xa) 酶切位点, 纯化制备的 MBP-VP1u 融合蛋白可在 Factor Xa 的酶切作用下将标签蛋白 MBP 切割掉, 因此按 1 mg Factor Xa 可酶切 100 mg 融合蛋白体系将 MBP-VP1u 融合蛋白于 4°C 冰箱酶切过夜, 将酶切后的蛋白进行 10% SDS-PAGE, 未诱导的蛋白样品为阴性对照, 制备的多克隆抗体为一抗, Western

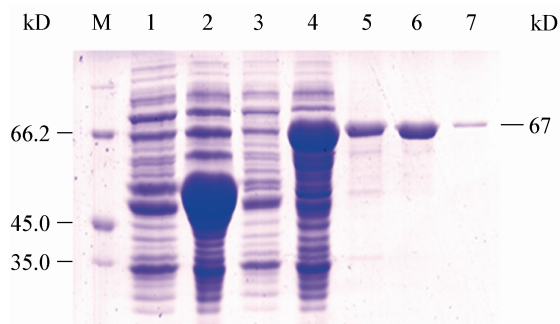


图 2 融合蛋白 VP1u-MBP 的诱导表达与纯化

Figure 2 The expression and purification of fusion protein VP1u-MBP

注: M: Protein marker; 1, 2: 空载体 pMAL-c2x 诱导前后; 3, 4: 重组质粒 pMAL-VP1u 诱导前后; 5, 6, 7: 融合蛋白 MBP-VP1u 的纯化。

Note: M: Protein marker; 1, 2: Uninduced and induced pMAL-c2x samples; 3, 4: Uninduced and induced pMAL-VP1u samples; 5, 6, 7: Purified MBP-VP1u.

blot 检测制备的融合蛋白 VP1u-MBP 多克隆抗体的特异性。结果如图 3 所示, 制备的多克隆抗体能与酶切后的 VP1u 蛋白反应, 同时也能与 MBP 蛋白反应。

2.4 VP1u-MBP 多克隆抗体检测 B19 结构蛋白 VP1 在细胞内的表达

为了进一步证实制备的多克隆抗体的特异性, 将 B19 病毒感染性克隆 pB19-4244 转染 Hela 细胞后, 利用制备的多克隆抗体检测 VP1 蛋白的表达情况。结果如图 4 所示, 与对照组相比, 转染了 pB19-4244 的实验组能检测到 VP1 蛋白的表达, 并且 VP1 蛋白分布于细胞核与细胞质, 且细胞核略多于细胞质。该结果表明制备的 VP1u 蛋白多抗血清具有较强的特异性。

2.5 VP1u N 端截短蛋白的诱导表达与纯化

将 -20°C 保存的测序正确的 N 端截短的 $\Delta\text{N12}/\Delta\text{N22}/\Delta\text{N43}/\Delta\text{N67}/\Delta\text{N96}$ -vp1u-pMAL 菌液, 摇菌活化培养, 经 IPTG 诱导, 12% SDS-PAGE 电泳检测, 与未经 IPTG 诱导的对照组相比, 实验组样品均检测到明显的目的蛋白条带, 且大小与理论值相符(图 5)。

重新取上述重组菌液活化, 经大规模诱导表达, 超声波破碎, 12 000 r/min 离心 1 h, 收集上清液, 利用 $0.45\ \mu\text{m}$ 滤膜过滤杂质, Amylose-Bind™ 树脂孵育并进行亲和层析纯化。经 SDS-PAGE 检测,

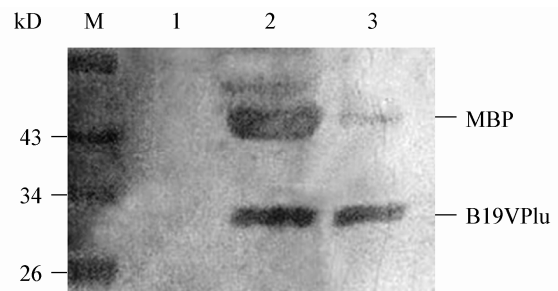


图 3 抗血清特异性的 Western blot 鉴定

Figure 3 The specific indentification of polyclonal antibody using Western blot

注: M: Protein marker; 1: 未诱导蛋白; 2, 3: Factor Xa 酶切的融合蛋白 MBP-VP1u。

Note: M: Protein marker; 1: Uninduced sample; 2, 3: Digested MBP-VP1u with Factor Xa.

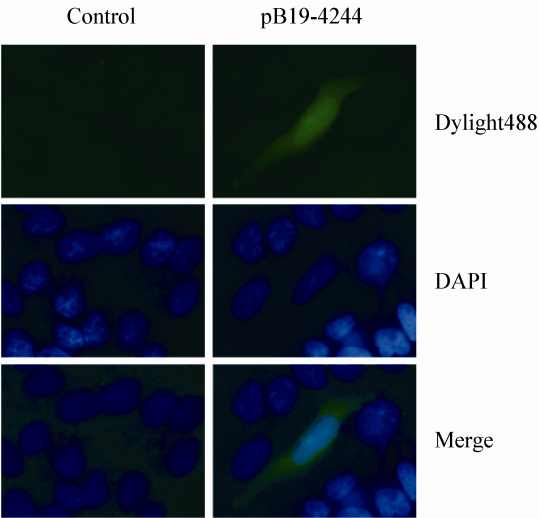


图 4 免疫荧光检测 VP1 蛋白在 HeLa 细胞内的表达
Figure 4 Detection of the expression of VP1 protein in HeLa cells by immunofluorescence detect

结果如图 6 所示， Δ N12/ Δ N22/ Δ N43/ Δ N67/ Δ N96-VP1u-MBP 融合蛋白都能纯化出比较单一的条带，利用低温浓缩离心仪浓缩蛋白，BCA 法测定蛋白浓度至 0.5 g/L 以上，分装于-20℃备用。

2.6 VP1u N 端截短蛋白的 sPLA2 活性测定

按照 1.9 中的方法，依据磷脂酶 A2 活性测定原理，以已知的具有磷脂酶 A2 活性的蜂毒 Bee

venom 为阳性对照，405 nm 可见光下用酶标仪测定发光产物不同时间的吸光度，并根据吸光度的变化换算得出磷脂酶 A2 活性值。结果如图 7 所示：阳性对照 Bee venom 磷脂酶 A2 (10 ng)活性可达 0.316 U/mL；而 B19 VP1u 蛋白的磷脂酶 A2 (5 μg)活性为 0.243 U/mL；用本文制备的 Anti-VP1u 兔多克隆抗体孵育处理后，B19 VP1u 磷脂酶 A2 活性下降为 0.043 U/mL,约为 VP1u 磷脂酶 A2 活性的 18%。该结果表明 B19 VP1u 具有磷脂酶 A2 的活性，但是与阳性对照相比，B19 VP1u 磷脂酶 A2 的活性处于比较低的水平；经过 Anti-VP1u 特异抗体孵育处理后，酶的活性明显受到了抑制。当把 VP1u 的 N 端截短 12 个氨基酸时，其 sPLA2 活性约为 0.116 U/mL，与完整 VP1u 相比约降低 53%；截短 22 个氨基酸时，sPLA2 活性与截短 12 个氨基酸基本相同；当截短 43 个氨基酸时，sPLA2 活性为 0.060 6 U/mL，与 VP1u 相比约降低 66%；截短 67 个氨基酸后，sPLA2 活性几乎完全丧失，约为 0.009 45 U/mL。截短 96 个氨基酸时，sPLA2 活性完全丧失。该结果表明，B19 VP1u 保守区 N 端第 12 个氨基酸之前的区域以及 22-67 位氨基酸之间的区域对其酶活性的保持起着重要的作用。

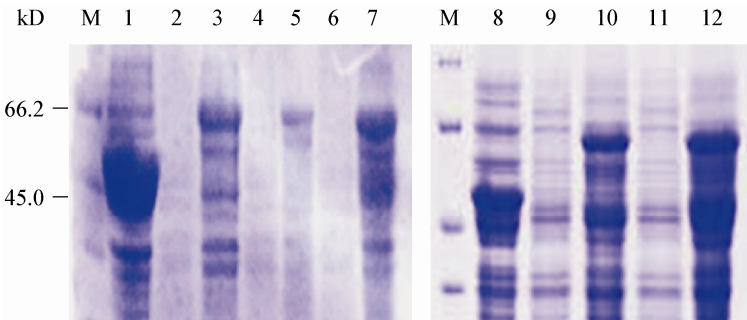


图 5 VP1u N 端截短蛋白的诱导表达
Figure 5 The inducible expression of VP1u N terminal truncated protein

注：M：Protein marker；1，8：空载体诱导；2，3： Δ N12-VP1u-MBP 未诱导对照与诱导组；4，5： Δ N22-VP1u-MBP 未诱导对照与诱导组；6，7： Δ N43-VP1u-MBP-VP1u 未诱导对照与诱导组；9，10： Δ N67-VP1u-MBP 未诱导对照与诱导组；11，12： Δ N96-VP1u-MBP 未诱导对照与诱导组。
Note: M: Protein marker; 1, 8: Induced pMal-c2X samples; 2, 3: Uninduced and induced Δ N12-VP1u-MBP samples; 4, 5: Uninduced and induced Δ N22-VP1u-MBP samples; 6, 7: Uninduced and induced Δ N43-VP1u-MBP-VP1u samples; 9, 10: Uninduced and induced Δ N67-VP1u-MBP samples; 11, 12: Uninduced and induced Δ N96-VP1u-MBP samples.

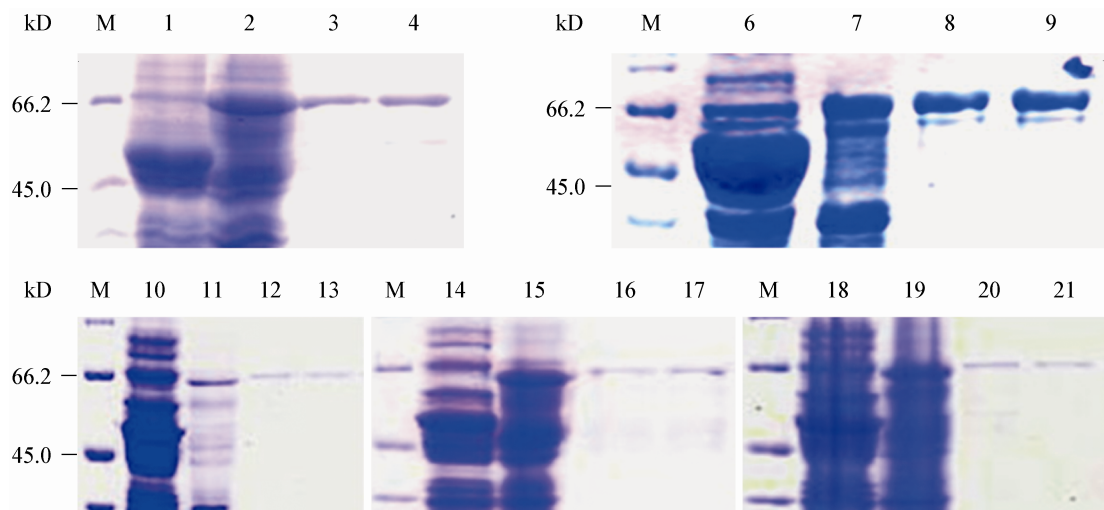


图 6 VP1u N 端截短蛋白的纯化

Figure 6 The purification of VP1u N terminal truncated protein

注: M: Protein marker; 1, 6, 10, 14, 18: 空载体诱导; 2, 3, 4: ΔN12-VP1u-MBP 纯化过柱前后; 7, 8, 9: ΔN22-VP1u-MBP 纯化过柱前后; 11, 12, 13: ΔN43-VP1u-MBP-VP1u 纯化过柱前后; 15, 16, 17: ΔN67-VP1u-MBP 纯化过柱前后; 19, 20, 21: ΔN96-VP1u-MBP 纯化过柱前后。

Note: M: Protein marker; 1, 6, 10, 14, 18: Induced pMal-c2x sample; 2, 3, 4: Unpurified and purified ΔN12-VP1u-MBP; 7, 8, 9: Unpurified and purified ΔN22-VP1u-MBP; 11, 12, 13: Unpurified and purified ΔN43-VP1u-MBP-VP1u; 15, 16, 17: Unpurified and purified ΔN67-VP1u-MBP; 19, 20, 21: Unpurified and purified ΔN96-VP1u-MBP.

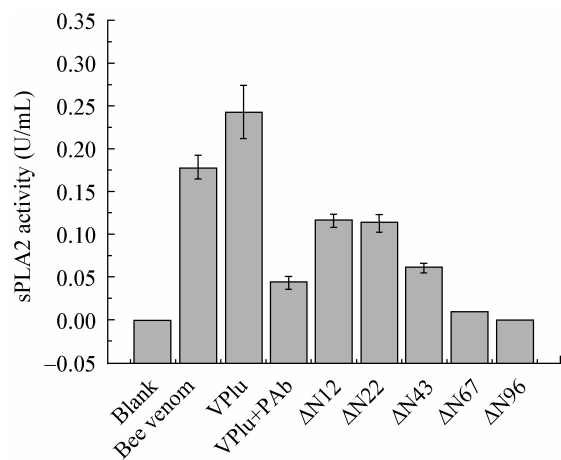


图 7 B19 病毒 VP1u N 端保守区氨基酸截短突变后对其 sPLA2 活性的影响

Figure 7 N-terminal amino acids outside the conserved domain of the VP1u on its sPLA2 activity

3 讨论

几乎所有细小病毒的 VP1u 都具有 40 个氨基酸的保守区并具有 sPLA2 活性, 如昆虫细小病毒 GmDNV 和猪细小病毒 PPV^[10,12]。研究发现 B19 病毒的 VP1u 的保守区同样具有磷脂酶 A2 的活性,

推测其在病毒进入细胞核脱壳过程中发挥重要的作用,同时其酶活被证明与各种各样的炎症反应有关,而对 VP1u 磷脂酶 A2 区域的关键氨基酸进行突变会导致酶活和病毒感染性的丧失^[14-15]。由于 B19 病毒具有很高的细胞趋性,对其高度敏感的红系原初祖母细胞的分离培养较为复杂且造价昂贵,限制了其相关的研究,因此目前 B19 病毒 VP1u 所具有的 sPLA2 的在病毒复制周期及对宿主的作用等具体功能还不清楚。

本实验中采用原核表达的方式获得了 VP1u 保守区外 N 端不同程度截短的 6 种带有 MBP 标签的融合蛋白,其主要以可溶性蛋白的形式存在上清中,酶活检测发现纯化的目的蛋白具有较高的活性。该结果表明虽然标签蛋白 MBP 为 42 kD,远远超过常用的 His 标签,但是由于其纯化操作简单,可以得到较纯的可溶性的目的蛋白,并且不会影响其本身的酶活性,因此在原核表达纯化具有相应酶活性的融合蛋白时,MBP 标签可以在一定程度上作为 His 标签的候选标签。在实验中也尝试利用 His

标签的 pET 表达系统,遗憾的是诱导表达的过程中形成了包涵体(该部分结果未列出)。

目前对于 B19 病毒 VP1u 磷脂酶 A2 活性的研究,主要集中在其保守区的关键氨基酸区域,对于保守区外的 N 端和 C 端的研究还没有相关的报道。我们通过对 B19-VP1u 的 N 端每隔 10 个或 30 个氨基酸截短 1 次,共截短了 5 段,通过构建重组原核表达载体、诱导表达与纯化、体外测酶活,探究了 VP1u 保守区外 N 端氨基酸对其磷脂酶 A2 活性的影响。结果显示 N 端截掉 12 个氨基酸时酶活性与全长 VP1u 的酶活性差别不大;当截掉 67 个氨基酸时其酶活性显著下降,而截掉 96 个氨基酸时几乎完全丧失了酶活。结果显示, N 端第 12 个氨基酸之前的区域或第 12–67 个氨基酸之间的区域对酶活有显著影响。虽然 N 端的区域不是细小病毒科成员的保守区,但是鉴于其对磷脂酶 A2 活性的影响,推测 N 端的这部分区域对于保持 VP1u 蛋白的相对空间结构的稳定起着重要作用,其缺失可能影响到了蛋白构象的改变。

另外,我们将纯化的融合蛋白免疫新西兰大白兔获得了 VP1u 特异性的多克隆抗体。同时通过免疫荧光检测了 B19 病毒结构蛋白 VP1 在 HeLa 细胞内的定位及表达情况,该结果显示 VP1 蛋白在 B19 病毒的非敏感细胞中表现为核质定位,并且细胞核内分布略多于细胞质。这与通过将 *vp1* 基因与 EGFP 融合后转染 HeLa 细胞后观察到的结果一致,推测其在 VP1u 上存在相应的人核信号。同时在体外检测 VP1u 蛋白磷脂酶 A2 活性时,将 VP1u 蛋白与制备的多克隆抗体孵育处理后,发现其活性显著降低,表明抗体与蛋白的结合可能遮盖了酶活性的关键区域,从而抑制了其活性。

本实验建立了纯化 B19 病毒 VP1u 蛋白的方法,为 VP1u sPLA2 活性及其他性质的研究提供了平台。同时阐明了 B19-VP1u 保守区外 N 端氨基酸对 sPLA2 活性的影响,这对于揭示和阐明 B19 sPLA2 在病毒吸附、穿入、细胞质中的运动等病毒复制过程的作用和影响提供了重要的参考,为进一步了解

B19 感染复制的分子生物学机制奠定了基础,为开发抗 B19 感染新药物的研制提供了科学依据。

参考文献

- [1] Tijssen P, Agbandje-McKenna M, Almendral JM, et al. Parvoviridae. In virus taxonomy: classification and nomenclature of viruses// Ninth report of the International Committee on Taxonomy of Viruses, King AMQ, Adams MJ, Carstens EB, et al, ed[M]. San Diego: Elsevier, 2011: 375-395.
- [2] Chisaka H, Morita E, Yaegashi N, et al. Parvovirus B19 and the pathogenesis of anaemia[J]. Reviews in Medical Virology, 2003, 13(6): 347-359.
- [3] Sheikh AU, Ernest JM. Clinical picture and consequences of fetal parvovirus B19 infection[J]. Annals Medicine, 1995, 27(1): 7-8.
- [4] Young NS, Brown KE. Parvovirus B19[J]. The New England Journal of Medicine, 2004, 350(6): 586-597.
- [5] Deiss V, Tratschin JD, Weitz M, et al. Cloning of the human parvovirus B19 genome and structural analysis of its palindromic termini[J]. Virology, 1990, 175(1): 247-254.
- [6] Zhi N, Zadori Z, Brown KE, et al. Construction and sequencing of an infectious clone of the human parvovirus B19[J]. Virology, 2004, 318(1): 142-152.
- [7] Ozawa K, Ayub J, Hao YS, et al. Novel transcription map for the B19 (human) pathogenic parvovirus[J]. Journal of Virology, 1987, 61(8): 2395-2406.
- [8] Ozawa K, Ayub J, Young N. Translational regulation of B19 parvovirus capsid protein production by multiple upstream AUG triplets[J]. The Journal of Biology Chemistry, 1988, 263(22): 10922-10926.
- [9] Ozawa K, Young N. Characterization of capsid and noncapsid proteins of B19 parvovirus propagated in human erythroid bone marrow cell cultures[J]. Journal of Virology, 1987, 61(8): 2627-2630.
- [10] Zadori Z, Szelei J, Lacoste MC, et al. A viral phospholipase A2 is required for parvovirus infectivity[J]. Developmental Cell, 2001, 1(2): 291-302.
- [11] Dorsch S, Liebisch G, Kaufmann B, et al. The VP1 unique region of parvovirus B19 and its constituent phospholipase A2-like activity[J]. Journal of Virology, 2002, 76(4): 2014-2018.
- [12] Li Y, Zadori Z, Bando H, et al. Genome organization of the densovirus from Bombyx mori (BmDNV-1) and enzyme activity of its capsid[J]. Journal of General Virology, 2001, 82(11): 2821-2825.
- [13] Canaan S, Zadori Z, Ghomashchi F, et al. Interfacial enzymology of parvovirus phospholipases A2[J]. The Journal of Biology Chemistry, 2004, 279(15): 14502-14508.
- [14] Balsinde J, Winstead MV, Dennis EA. Phospholipase A(2) regulation of arachidonic acid mobilization[J]. FEBS Letters, 2002, 531(1): 2-6.
- [15] Lehmann HW, von Landenberg P, Modrow S. Parvovirus B19 infection and autoimmune disease[J]. Autoimmunity Reviews, 2003, 2(4): 218-223.
- [16] Kawase M, Momoeda M, Young NS, et al. Most of the VP1 unique region of B19 parvovirus is on the capsid surface[J]. Virology, 1995, 211(2): 359-366.
- [17] Saikawa T, Anderson S, Momoeda M, et al. Neutralizing linear epitopes of B19 parvovirus cluster in the VP1 unique and VP1-VP2 junction regions[J]. Journal of Virology, 1993, 67(6): 3004-3009.