

## 基于猪细小病毒病毒样颗粒的结肠癌靶向纳米载体的构建

吴丹丹<sup>1</sup> 周玉龙<sup>1\*</sup> 任亚超<sup>2</sup> 王新<sup>1\*</sup>

(1. 黑龙江八一农垦大学 黑龙江 大庆 163319)

(2. 哈尔滨医科大学 黑龙江 大庆 163319)

**摘要:** 【目的】获得具有结肠靶向的纳米载体。【方法】采用 SOE-PCR 方法将具有结肠靶向的 TK 肽序列插入到猪细小病毒(PPV)结构蛋白 VP2 的环 2 和环 4 区域得到 TK-vp2( $\Delta$ vp2)基因, 在 Bac-to-Bac<sup>®</sup> 杆状病毒表达系统中构建、表达和自组装。【结果】通过 SOE-PCR 方法扩增获得  $\Delta$ vp2 基因, 在 Bac-to-Bac<sup>®</sup> 杆状病毒表达系统中构建得到 Bacmid- $\Delta$ vp2, 经脂质体转染至 Sf9 昆虫细胞得到重组杆状病毒。直接免疫荧光试验、SDS-PAGE 和 Western blot 检测结果表明  $\Delta$ VP2 蛋白在 Bac-to-Bac<sup>®</sup> 杆状病毒表达系统中获得融合表达, 目的蛋白约 70 kD; 透射电子显微镜结果显示  $\Delta$ VP2 能自组装形成病毒样颗粒(TK-VLPs), 直径范围在 22 nm–30 nm。【结论】获得纳米载体 TK-VLPs, 为进一步研究其作为结肠靶向的纳米载体奠定物质基础。

**关键词:** TK 肽, 纳米载体, Bac-to-Bac<sup>®</sup> 杆状病毒表达系统, 病毒样颗粒

## Construction of colon-targeted nanocarriers based on porcine parvovirus-like particles

WU Dan-Dan<sup>1</sup> ZHOU Yu-Long<sup>1\*</sup> REN Ya-Chao<sup>2</sup> WANG Xin<sup>1\*</sup>

(1. Heilongjiang Bayi Agricultural University, Daqing, Heilongjiang 163319, China)

(2. Harbin Medical University, Daqing, Heilongjiang 163319, China)

**Abstract:** [Objective] To prepare colon-targeted nanocarriers. [Methods] SOE-PCR methods were used to prepare TK-vp2( $\Delta$ vp2) by inserting TK peptide gene into porcine parvovirus VP2 structural protein of loop2 and loop4. Then, TK-VP2 protein was constructed, expressed and self-assembled in the Bac-to-Bac<sup>®</sup> baculovirus expression system. [Results] The  $\Delta$ vp2 gene obtained through SOE-PCR methods, Bacmid- $\Delta$ vp2 was constructed in the Bac-to-Bac<sup>®</sup> baculovirus expression system and the recombinant baculovirus was successfully constructed in Sf9 insect cells. The results

**Foundation item:** Graduate Innovation Research Funding of Heilongjiang Bayi Agricultural University (No. YJSCX2016-Y22); Natural Science Foundation Project for the Youth of Heilongjiang Province (No. QC2013C029); Wu Liande Fund for the Youth of Harbin Medical University (No. WLD-QN1111)

\*Corresponding authors: ZHOU Yu-Long: Tel: 86-459-6819200; E-mail: zhouyulong1980@163.com

WANG Xin: Tel: 86-459-6819198; E-mail: wangxin777\_71@126.com

**Received:** January 04, 2017; **Accepted:** April 07, 2017; **Published online** (www.cnki.net): May 17, 2017

**基金项目:** 黑龙江八一农垦大学研究生创新科研资助项目(No. YJSCX2016-Y22); 黑龙江省自然科学基金-青年项目(No. QC2013C029); 哈尔滨医科大学伍连德基金(No. WLD-QN1111)

\*通讯作者: 周玉龙: Tel: 86-459-6819200; E-mail: zhouyulong1980@163.com

王新: Tel: 86-459-6819198; E-mail: wangxin777\_71@126.com

**收稿日期:** 2017-01-04; **接受日期:** 2017-04-07; **优先数字出版日期**(www.cnki.net): 2017-05-17

of the direct immunofluorescence, SDS-PAGE and Western blot assays showed that the  $\Delta$ VP2 proteins were expressed in the Bac-to-Bac<sup>®</sup> baculovirus expression system and the protein was approximately 70 kD. The transmission electron microscopy (TEM) results indicated that the  $\Delta$ VP2 proteins can self-assemble to form virus-like particles (TK-VLPs) ranging between 20 and 30 nm. [Conclusion] TK-VLPs nanocarrier was obtained, providing a basis to further study the feasibility of TK-VLPs as colon targeting nanoparticle.

**Keywords:** TK peptide, Nanocarrier, Bac-to-Bac<sup>®</sup> baculovirus expression system, Virus-like particles

自从 20 世纪 60 年代脂质体作为蛋白质和药物的载体在疾病的治疗方面被首次提出后<sup>[1]</sup>, 纳米技术在药物输送体系方面产生了深远影响。近年来, 随着纳米药物输送系统研究的逐渐深入, 新的纳米技术和材料也不断涌现, 以生物纳米技术为基础的药物科学研究得到了迅速发展, 促使纳米药物载体越来越趋于多功能化<sup>[2]</sup>, 成为药剂学研究的热点之一。病毒样颗粒(Virus-like particles, VLPs)在自然界不包含任何病毒的遗传信息, 是某种病毒一个或多个结构蛋白的空心颗粒的纳米级生物材料, 与天然病毒结构相似, 具有生物相容性和生物降解性, 在运载外源物质方面表现出巨大的应用潜力, 对新型药物递送载体的开发具有潜在的应用价值。

猪细小病毒(Porcine parvovirus, PPV)是细小病毒科细小病毒属成员, 是一种自主复制性细小病毒, 属于单股负链 DNA 病毒, 无囊膜, 病毒粒子的衣壳是一个直径约为 20 nm–25 nm 的 20 面体等轴对称体。PPV 基因组编码两条结构多肽 VP1 和 VP2, 三条非结构多肽 NS1、NS2 和 NS3, 其中 VP2 为主要结构蛋白, 结构表面有 4 个多肽环(环 1、环 2、环 3 和环 4), 是 PPV 特异性中和抗体的靶蛋白<sup>[3]</sup>, 分子量约为 64 kD。在 Bac-to-Bac<sup>®</sup>杆状病毒表达系统中 VP2 蛋白能够表达并自组装成病毒样颗粒(VLPs), 在大小和形态上很接近于天然病毒粒子<sup>[4-5]</sup>。病毒样颗粒虽然是安全、有效的纳米载体, 但是 VLPs 选择性相对较差, 缺乏对肿瘤细胞的选择性。若通过靶向配体修饰 VLPs 表面对肿瘤细胞的选择性, 将药物输送并选择性的浓集于肿瘤细胞和肿瘤组织的纳米递药系统, 这样对结肠肿瘤的治疗存在潜在的应用价值, 但目前尚未出现靶向配体修饰 PPV-VLPs 作为纳米载体的相关报道。

TK 肽(TWYKIAFQRNRK)是由 12 个氨基酸构成, 来源于层粘连蛋白 1 $\alpha$  链的羧基末端的球状结构域<sup>[6]</sup>, 不仅能增加 Caco-2 细胞吸收而且能增加肿瘤球状体的渗透, 具有靶向结肠肿瘤和肿瘤新生血管的功能<sup>[7]</sup>。因此, 本试验通过基因工程技术将具有结肠靶向的 TK 肽序列插入 vp2 基因序列的环 2 和环 4 区域构建嵌合 TK-VP2 蛋白, 在 Bac-to-Bac<sup>®</sup>杆状病毒表达系统中构建表达 TK-VP2 蛋白, 自组装成病毒样颗粒 TK-VLPs, 为研究其作为结肠靶向的纳米药物载体奠定基础。

## 1 材料与方 法

### 1.1 菌株和病毒株

TK 肽、pMD18-T-vp2 质粒、感受态 *Escherichia coli* DH5 $\alpha$  和昆虫细胞(Sf9)均由本实验室保存和提供。

### 1.2 主要试剂和仪器

pMD18-T 载体购自 TaKaRa 公司; 限制性内切酶 *Bam*H I、*Sal* I、Bac-to-Bac<sup>®</sup>杆状病毒表达系统和脂质体转染试剂盒 Lipofectin 2000 购自 Invitrogen 公司; KOD FX 和 2 $\times$ Quick *Taq* HS DyeMix 购自 TOYOBO 公司; 质粒提取试剂盒和 DNA 凝胶回收试剂盒购自 Axygen 公司; SDS-PAGE 凝胶制备试剂盒购自北京索莱宝科技有限公司; 抗 His 标记的鼠源单克隆抗体和 HRP 标记的山羊抗小鼠 IgG 抗体(IgG-HRP)购自 Sigma 公司; 二氨基联苯胺(DAB)购自生工生物工程(上海)股份有限公司; FITC 标记的抗猪细小病毒抗体购自中国兽药研究所。PTC2000 型 PCR 仪、Mini-PROTEAN Tetra 电泳槽、ChemiDoc XRS+凝胶成像系统和 Mini Trans-Blot 电泳转印槽购自美国 Bio-Rad 公司; 5424R 小型台式高速离心机购自德国艾本德公司; JEM-1400 型透

射电子显微镜购自日本 JEOL 公司; DMI3000 荧光显微镜购自德国 Leica 公司。

### 1.3 引物设计

参照 GenBank 上发表的中国株 PPV vp2 基因组序列(BJ07310845), 将 TK 肽序列插入 vp2 基因序列的环 2 和环 4 区域, 利用 Primer 5.0 软件设计 3 对 SOE-PCR 引物, 由生工生物工程(上海)股份有限公司合成。引物序列和 TK 肽序列见表 1。

### 1.4 TK-vp2 克隆质粒的构建

以 pMD18-T-vp2 质粒为模板, 采用 SOE-PCR 方法扩增 TK-vp2( $\Delta$ vp2)基因序列<sup>[8-9]</sup>。具体方法如下, 第一轮以质粒 pMD18-T-vp2 为模板, 通过引物对 P1/P2、P3/P4 和 P5/P6 分别扩增, 获得片段 P<sub>1-2</sub>、P<sub>3-4</sub> 和 P<sub>5-6</sub>。第二轮分别以 P<sub>1-2</sub>、P<sub>3-4</sub> 和 P<sub>3-4</sub>、P<sub>5-6</sub> 为模板, 通过引物 P1/P4 和 P3/P6 扩增, 获得片段 P<sub>1-4</sub> 和 P<sub>3-6</sub>。第三轮以 P<sub>1-4</sub> 和 P<sub>3-6</sub> 为模板, 通过引物 P1/P6 扩增得到 P<sub>1-6</sub>, 即获得  $\Delta$ vp2 基因。SOE-PCR 扩增反应体系(50  $\mu$ L): 2 $\times$ PCR buffer for KOD FX 25  $\mu$ L, 2 mmol/L dNTPs 10  $\mu$ L, 10  $\mu$ mol/L 上下游引物各 1.5  $\mu$ L, 1.0 U/ $\mu$ L KOD FX 1  $\mu$ L, 200 ng DNA 模板

2  $\mu$ L, ddH<sub>2</sub>O 9  $\mu$ L。SOE-PCR 反应条件为: 94  $^{\circ}$ C 2 min; 98  $^{\circ}$ C 10 s, 56  $^{\circ}$ C 30 s, 68  $^{\circ}$ C 2 min, 35 个循环; 68  $^{\circ}$ C 10 min, 用 1% 的琼脂糖凝胶电泳鉴定。然后按照常规方法将  $\Delta$ vp2 基因插入 pMD18-T 载体, 转化至感受态 *E. coli* DH5 $\alpha$  中, 37  $^{\circ}$ C 培养 12–16 h。挑取阳性单克隆菌落进行 *Bam*H I 和 *Sal* I 酶切鉴定, 将鉴定正确的阳性质粒进行测序鉴定, 命名为 pMD18-T- $\Delta$ vp2。

### 1.5 TK-vp2 在 Bac-to-Bac<sup>®</sup> 杆状病毒系统中的构建

用 *Bam*H I 和 *Sal* I 双酶切 pMD18-T- $\Delta$ vp2 质粒, 胶回收获得  $\Delta$ vp2 基因片段, 连接至经相同酶切的 pFastBac<sup>TM</sup>HT A 质粒的多克隆位点上, 将其转化至感受态 *E. coli* DH5 $\alpha$  中, 挑取阳性单克隆菌落进行 PCR 和双酶切的方法鉴定, 获得重组转移质粒命名为 pFast- $\Delta$ vp2。将鉴定正确的重组转移质粒 pFast- $\Delta$ vp2 转化到含有杆状病毒穿梭载体 Bacmid 的感受态 *E. coli* DH10Bac 中, 与 Bacmid 发生位点特异性转座, 在含有 50  $\mu$ g/mL 卡那霉素、7  $\mu$ g/mL 庆大霉素、10  $\mu$ g/mL 四环素、

表 1 扩增引物和 TK 肽序列  
Table 1 Amplification primers and TK peptide sequences

引物名称 Primer name	引物序列 Primer sequence (5'→3')	目的片段 Fragment size (bp)
TK-vp2 primers	P1 <b><u>GGATCCGATGAGTGAAAATGTGGAAC</u></b>	734
	P2 <b><u>GGAGAAATATCTATGTCTAGAAAACCAGGAAACTCCAGTGTATGTTGGTGG</u></b>	
	P3 <b><u>CTAGACATAGATATTCTCCGTTTCGCTGTTTCGCAATCACAACAAATAAC</u></b>	672
	P4 <b><u>GGAGAAATATCTATGTCTAGAAAACCAGGAAACTTCTAGGTTTAGTGGTG</u></b>	
	P5 <b><u>CTAGACATAGATATTCTCCGTTTCGCTGTTTCGAATACAAATAATGGAAC</u></b>	
	P6 <b><u>ACGCGTTCGACCTAGTATAATTTTCTTGGTATAAGTTG</u></b>	
pUC/M13 primers	Forward CCCAGTCACGACGTTGTAAAACG	2 430
	Reverse AGCGGATAACAATTTACACAGG	
TK sequence	<i><u>GTTTCCTGGTTTTCTAGACATAGATATTCTCCGTTTCGCTGTTTCG</u></i>	45

注: TK 肽序列用斜体字表示, 其中插入引物序列的下划线部分为重叠序列; 上游引物 5'端引入 *Bam*H I 酶切位点, 下游引物 5'端引入 *Sal* I 酶切位点, 两者均用粗体字下划线表示。

Note: TK peptide sequence is indicated by italics, and insert into the underlined part of the primer sequences as overlapping sequences; The forward primer 5' end into the *Bam*H I restriction enzyme site and the downstream primers 5' end into the *Sal* I, both are represented in bold and underlined.

100  $\mu\text{g}/\text{mL}$  Bluo-gal 和 40  $\mu\text{g}/\text{mL}$  IPTG 的 LB 琼脂平板上<sup>[10]</sup>, 37  $^{\circ}\text{C}$  培养 36–48 h, 通过蓝白斑筛选白色阳性菌落, 制备重组杆粒(Bacmid) DNA, 应用 pUC/M13 F/R 引物进行 PCR 鉴定, PCR 反应体系(50  $\mu\text{L}$ ): 2 $\times$ Quick *Taq* HS DyeMix 25  $\mu\text{L}$ , 10  $\mu\text{mol}/\text{L}$  上下游引物各 1  $\mu\text{L}$ , 50 ng 质粒 DNA 1  $\mu\text{L}$ , ddH<sub>2</sub>O 22  $\mu\text{L}$ 。PCR 反应条件为: 93  $^{\circ}\text{C}$  5 min; 94  $^{\circ}\text{C}$  1 min, 55  $^{\circ}\text{C}$  1 min, 72  $^{\circ}\text{C}$  5 min, 35 个循环; 72  $^{\circ}\text{C}$  10 min, 将鉴定正确的重组杆粒命名为 Bacmid- $\Delta\text{vp}2$ 。

利用转染试剂 Lipofectin 2000 将 Bacmid- $\Delta\text{vp}2$  转染至 Sf9 昆虫细胞中<sup>[11]</sup>, 27  $^{\circ}\text{C}$  培养 4 d, 待细胞出现典型细胞病变时收获上清液, 作为 P1 代重组杆状病毒。提取 P1 代病毒基因组, 用 pUC/M13 F/R 引物进行 PCR 鉴定, 获得 P1 代病毒命名为 rBac- $\Delta\text{vp}2$ 。继续增殖并收获病毒, 记为 P2 代病毒, 采用病毒蚀斑试验检测病毒滴度。

## 1.6 TK-VP2 在昆虫细胞 Sf9 中的表达鉴定

**1.6.1 SDS-PAGE 和 Western blot 鉴定:** 将收集的 P1 代野生型杆状病毒和重组杆状病毒 rBac- $\Delta\text{vp}2$  感染 Sf9 细胞, 80 h 后分别收获感染 Sf9 细胞的两种病毒以及未感染杆状病毒的 Sf9 细胞, 4  $^{\circ}\text{C}$ 、500 r/min 离心 5 min, 分别收集上清液和细胞沉淀, 细胞沉淀反复冻融 3 次用 1/10 体积 PBS 将其重悬, 裂解细胞提取总蛋白, 并以两份相同的样品进行 SDS-PAGE 电泳, 一份用于考马斯亮蓝染色, 一份用于 Western blot 检测, 以抗 His 标签的鼠源单克隆抗体为一抗, 以 HRP 标记的山羊抗小鼠 IgG 为二抗, 最后在 DAB 缓冲溶液中显色并观察<sup>[12]</sup>。

**1.6.2 直接免疫荧光鉴定:** 将 Sf9 细胞铺 48 孔板后, 将 P2 代 rBac- $\Delta\text{vp}2$  以 10 个 MOI 感染 48 孔板中的 Sf9 细胞, 感染 72 h 后用冷却的丙酮固定 30 min, 5% BSA 和 1% Triton X-100 通透处理 30 min, 用 FITC 标记的抗 PPV 抗体在室温避光孵育 1 h, PBS 洗 3 遍, 嵌入包埋剂后在荧光显微镜下观察。

## 1.7 病毒细胞电镜观察

P2 代病毒感染 Sf9 昆虫细胞 80 h 后收集上清液, 反复冻融 3 次, 4  $^{\circ}\text{C}$ 、500 r/min 离心 5 min, 取 100  $\mu\text{L}$  病毒上清液, 使用 4% 的磷钨酸染色, 透射电子显微镜观察 TK-VLPs 的包装情况。

## 2 结果与分析

### 2.1 pMD18-T- $\Delta\text{vp}2$ 克隆质粒的构建

重组克隆质粒 pMD18-T- $\Delta\text{vp}2$  经 *Bam*H I 和 *Sal* I 酶切鉴定出现 2 条带, 分别符合 2 692 bp 的 pMD18-T 载体和 1 854 bp 的  $\Delta\text{vp}2$  目的片段, 再经测序分析进一步表明 TK 肽序列成功插入 vp2 基因, 获得  $\Delta\text{vp}2$  基因(图 1)。

### 2.2 TK-VP2 在 Bac-to-Bac<sup>®</sup> 杆状病毒表达系统中的构建

重组杆粒 Bacmid- $\Delta\text{vp}2$  经过 pUC/M13 引物 PCR 鉴定结果显示, Bacmid 的 PCR 产物大小约为 2 430 bp, 加上外源插入  $\Delta\text{vp}2$  目的片段, 约为 4 284 bp, 而野生型杆状病毒扩增出 300 bp 目的片段, 这与预计的大小相一致, 表明  $\Delta\text{vp}2$  基因成功插入杆状病毒的基因组中(图 2)。

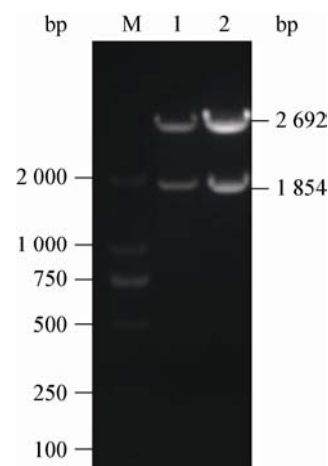


图 1 pMD18-T- $\Delta\text{vp}2$  重组质粒双酶切鉴定

Figure 1 Identification of recombinant plasmid pMD18-T- $\Delta\text{vp}2$  with restriction enzyme

注: M: DNA marker DL2000; 1–2: *Bam*H I/*Sal* I 双酶切重组质粒 pMD18-T- $\Delta\text{vp}2$ 。

Note: M: DNA marker DL2000; 1–2: The recombinant plasmid pMD18-T- $\Delta\text{vp}2$  digested by *Bam*H I and *Sal* I.

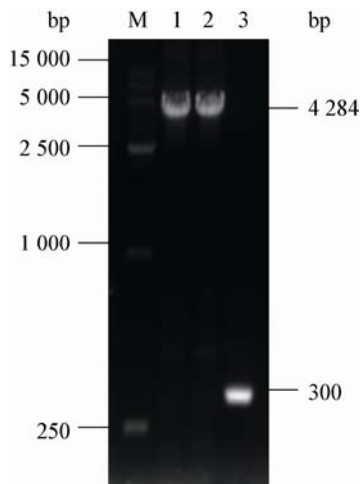


图2 Bacmid- $\Delta$ vp2 的 PCR 鉴定结果

**Figure 2 Identify of bacmid- $\Delta$ vp2 by PCR**

注: M: DNA marker DL2000; 1-2:  $\Delta$ vp2 PCR 产物; 3: 野生杆状病毒.

Note: M: DNA marker DL2000; 1-2:  $\Delta$ vp2 gene amplified by PCR; 3: Wild-type baculovirus.

**2.3 TK-VP2 的 SDS-PAGE 和 Western blot 鉴定**

SDS-PAGE 结果表明, 重组杆状病毒感染的 Sf9 细胞组与非重组杆状病毒感染的 Sf9 细胞组和无杆状病毒感染的 Sf9 细胞组相比, 在约 70 kD 出现目的蛋白条带, 这是因为 VP2 结构蛋白分子量约为 64 kD, 而 N 端连接了 28 个氨基酸残基(包括 6 $\times$ His, 分子量约为 3.6 kD, 能够进行融合表达), 二者表达的融合蛋白分子量约为 70 kD, 与预计的分子量相同, 而不含外源基因的野生杆状病毒则没有此带(图 3)。Western blot 结果表明,  $\Delta$ VP2 蛋白能够与抗 His 标记的鼠源单克隆抗体反应, 在约 70 kD 处出现特异性蛋白条带, 而在 2-6 泳道中则无特异性蛋白条带出现(图 4)。以上结果表明  $\Delta$ VP2 蛋白在 Bac-to-Bac<sup>®</sup> 杆状病毒表达系统中获得融合表达。

**2.4 直接免疫荧光鉴定**

直接免疫荧光试验结果显示感染重组杆状病毒的 Sf9 细胞能够与 FITC-标记的抗 PPV 抗体反应产生绿色荧光, 而对照组 Sf9 细胞未产生绿色荧光。结果表明重组杆状病毒在昆虫细胞内成功表达  $\Delta$ VP2 蛋白, 而且该蛋白具有良好的免疫原性(图 5)。

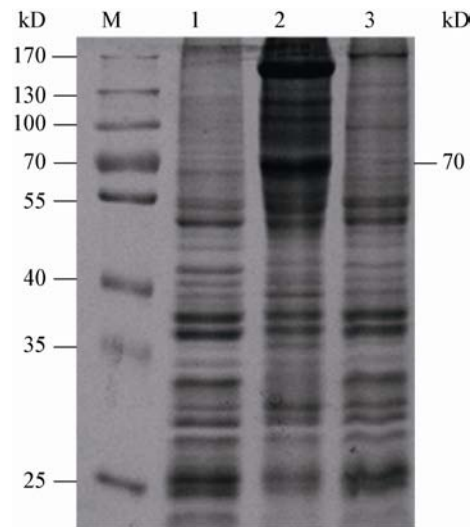


图3 重组蛋白 $\Delta$ VP2 的 SDS-PAGE 分析

**Figure 3 SDS-PAGE analysis of the  $\Delta$ VP2 protein**

注: M: 蛋白分子质量标准; 1: 感染 Sf9 细胞的非重组杆状病毒上清液; 2: 感染 Sf9 细胞的重组杆状病毒上清液; 3: 未感染杆状病毒的 Sf9 细胞上清液.

Note: M: Protein marker; 1: Infection Sf9 cells of non-recombinant baculovirus sedimentation; 2: Recombinant baculovirus infected Sf9 cells the supernatant; 3: Uninfected baculovirus Sf9 cells precipitation.

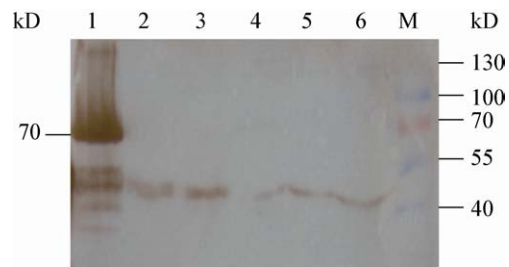


图4 重组蛋白 $\Delta$ VP2 的 Western blot 分析

**Figure 4 Western blot analysis of the recombinant protein  $\Delta$ VP2**

注: M: 蛋白分子质量标准; 1: 重组杆状病毒感染 Sf9 细胞的上清液; 2: 非重组杆状病毒感染 Sf9 细胞的上清液; 3: 非杆状病毒感染 Sf9 细胞的上清液; 4、5 和 6: 分别是 1、2 和 3 的细胞沉淀.

Note: M: Protein marker; 1: Recombinant baculovirus infected Sf9 cells the supernatant; 2: Infection Sf9 cells of non-recombinant baculovirus sedimentation; 3: Uninfected baculovirus Sf9 cells precipitation; 4, 5 and 6: Respectively is 1, 2 and 3 of the cells supernatant fluid.

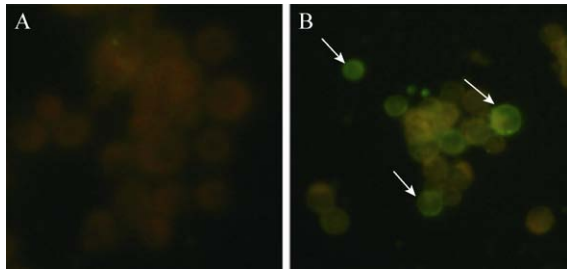


图 5 直接免疫荧光鉴定 $\Delta$ VP2 在 Sf9 细胞中的表达 (400 $\times$ )

Figure 5 Direct immunofluorescence assays to evaluate the expression of the  $\Delta$ VP2 proteins in the Sf9 cells (400 $\times$ )

注: A: FITC 标记的非杆状病毒感染的 Sf9 细胞; B: FITC 标记的感染杆状病毒的 Sf9 细胞。

Note: A: FITC labeled uninfected baculovirus of Sf9 cells; B: FITC labeled baculovirus infected of Sf9 cells.

## 2.5 电镜观察

重组杆状病毒通过透射电子显微镜观察可见 22 nm–30 nm 的球形病毒粒子, 与天然的 PPV 病毒粒子相似(图 6)。说明在昆虫细胞杆状病毒表达系统中成功表达 $\Delta$ VP2 蛋白, 能够自组装形成病毒样颗粒(TK-VLPs)。

## 3 结论与讨论

自从 1955 年纳米粒子治疗剂的概念出现以来, 随着科研人员的开发, 不同类型的病毒载体已经被广泛研究, 但病毒载体的研究开发仍然存在着巨大挑战。目前很多研究都是基于对病毒载体外表面进行化学修饰而开展的。Mark Young 研究小组<sup>[13]</sup>利用

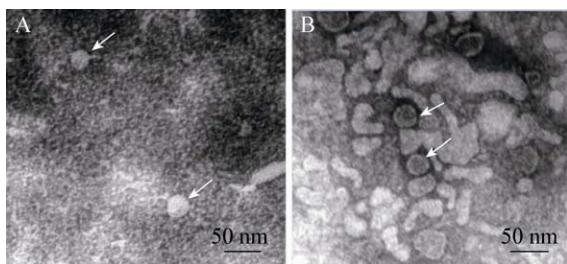


图 6 重组杆状病毒感染后产生的 TK-VLPs

Figure 6 Production of TK-VLPs in Sf9 cells after recombinant baculovirus infection

注: A: PPV 的病毒样颗粒(VLPs); B:  $\Delta$ VP2 结构蛋白的病毒样颗粒(TK-VLPs)。

Note: A: TEM images of PPV; B: TEM images of TK-VLPs.

豇豆退绿斑驳病毒蛋白衣壳自组装的 VLPs 作为模板组装制备纳米材料, 并得到了病毒-无机纳米粒子复合体系。Bogdan Dragnea 和其同事等从另一个角度, 以纳米粒子为模板, 诱导病毒外壳蛋白围绕纳米粒子进行组装<sup>[14]</sup>。在国内, 国家纳米中心刘东生团队利用最小为 50 个碱基对长度的双链核酸为模板, 成功实现了黄瓜花叶病毒衣壳蛋白的组装<sup>[15]</sup>。

本研究通过基因工程技术成功将具有结肠癌靶向的 TK 肽序列插入 vp2 基因序列的环 2 和环 4 区域, 获得 TK-vp2 基因, 利用昆虫细胞杆状病毒表达系统的 pFastBac<sup>TM</sup>HT A 载体构建、筛选、转染, 制备重组杆状病毒, 表达 TK-VP2 蛋白, 自组装形成病毒样颗粒。直接免疫荧光试验、SDS-PAGE 和 Western blot 检测结果显示重组杆状病毒在昆虫细胞内能成功表达 $\Delta$ VP2 蛋白, 目的蛋白约 70 kD。透射电镜观察该粒子为球形或椭圆形, 直径为 22 nm–30 nm, 在形态和大小上与天然的 PPV 病毒粒子相似, 说明 TK 肽的插入并未影响 VP2 蛋白天然构象, 其依然能够自组装形成病毒样颗粒(TK-VLPs)。综上所述, 本研究首次实现了靶向配体 TK 肽修饰 PPV 结构蛋白 VP2 的表面, 自组装形成 TK-VLPs, 成为具有潜在应用价值的新型纳米载体。

所以, TK 肽修饰结构蛋白 VP2 的表面是可行的, 为进一步研究装载药物活性、体内外的靶向性和细胞毒性等, 以期成为一种全新的结肠癌靶向纳米递药系统奠定了基础, 同时也给病毒的基础研究及其在生物学中的应用提供了新思路。

## 参考文献

- [1] Bangham AD, Horne RW. Negative staining of phospholipids and their structural modification by surface-active agents as observed in the electron microscope[J]. *Journal of Molecular Biology*, 1964, 8(8): 660-668
- [2] Shi JJ, Votruba AR, Farokhzad OC, et al. Nanotechnology in drug delivery and tissue engineering: from discovery to applications[J]. *Nano Letters*, 2010, 10(9): 3223-3230
- [3] Casal JI. Parvovirus diagnostics and vaccine production in insect cells[J]. *Cytotechnology*, 1996, 20(1): 261-270
- [4] Zhou HC, Yao GZ, Cui SJ. Production and purification of VP2 protein of porcine parvovirus expressed in an insect-baculovirus

- cell system[J]. Virology Journal, 2010, 7: 366
- [5] Martínez C, Dalsgaard K, López de Turiso JA, et al. Production of porcine parvovirus empty capsids with high immunogenic activity[J]. Vaccine, 1992, 10(10): 684-690
- [6] Nakahara H, Nomizu M, Akiyama SK, et al. A mechanism for regulation of melanoma invasion: ligation of  $\alpha_6\beta_1$  integrin by laminin G peptides[J]. Journal of Biological Chemistry, 1996, 271(44): 27221-27224
- [7] Ren YC, Mu Y, Song YP, et al. A new peptide ligand for colon cancer targeted delivery of micelles[J]. Drug Delivery, 2016, 23(5): 1763-1772
- [8] Li B, Liang JX, Zhao W, et al. Cloning, sequencing and bioinformatics analysis of VP2 gene of natural attenuated porcine parvovirus N strain[J]. Genomics and Applied Biology, 2010, 29(5): 849-856 (in Chinese)  
李斌, 梁家幸, 赵武, 等. 猪细小病毒自然弱毒 N 株 VP2 基因的克隆、测序及生物信息学分析[J]. 基因组学与应用生物学, 2010, 29(5): 849-856
- [9] Zhong ZC, Li CY, Zhu L, et al. An enhanced SOE-PCR can be used for fast and specific multiple gene ligations operation[J]. Journal of Tropical Medicine, 2010, 10(3): 253-257 (in Chinese)  
钟志成, 黎诚耀, 朱利, 等. 一种可用于多 DNA 片段连接的新 SOE-PCR 方法[J]. 热带医学杂志, 2010, 10(3): 253-257
- [10] Wei CY, Li RS, Huang CL, et al. Cloning of VP1 and VP3 genes of DHV and construction of their baculovirus expression vectors[J]. Chinese Veterinary Science, 2012, 42(2): 171-175 (in Chinese)  
魏春娅, 李日顺, 黄昌力, 等. 鸭肝炎病毒 VP1 和 VP3 基因的克隆及其杆状病毒表达载体的构建[J]. 中国兽医科学, 2012, 42(2): 171-175
- [11] Hu GQ, Guo H, Liang HR, et al. Expression of the VP2 gene of canine parvovirus in BmN cells/silkworm pupae[J]. Journal of Pathogen Biology, 2013, 8(7): 577-580 (in Chinese)  
胡桂秋, 郭鹤, 梁红茹, 等. 犬细小病毒 VP2 蛋白在家蚕/昆虫细胞中表达[J]. 中国病原微生物学杂志, 2013, 8(7): 577-580
- [12] Sun JH, Huang LP, Wei YW, et al. Expression of porcine parvovirus type 1 VP2 protein and preparation and application of monoclonal antibody against VP2 protein[J]. Chinese Veterinary Science, 2014, 44(12): 1279-1285 (in Chinese)  
孙建慧, 黄立平, 危艳武, 等. 猪细小病毒 1 型 VP2 蛋白的表达与单克隆抗体的制备及应用[J]. 中国兽医科学, 2014, 44(12): 1279-1285
- [13] Suci P, Kang S, Gmür R, et al. Targeted delivery of a photosensitizer to *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* biofilm[J]. Antimicrobial Agents and Chemotherapy, 2010, 54(6): 2489-2496
- [14] Daniel MC, Tsvetkova IB, Quinkert ZT, et al. Role of surface charge density in nanoparticle-templated assembly of bromovirus protein cages[J]. ACS Nano, 2010, 4(7): 3853-3860
- [15] Xu Y, Ye J, Liu HJ, et al. DNA-templated CMV viral capsid proteins assemble into nanotubes[J]. Chemical Communications, 2008, 1(1): 49-51