技术与方法 文章编号:0253-3626(2011)03-0315-04

诺如病毒病毒样颗粒的表达及其与 HBGAs 受体的结合研究

张绪富[1],戴迎春[2],宋灿磊[2],周迎春[1]

(南方医科大学 1. 中医药学院中医基础理论教研室;2. 公共卫生与热带医学学院流行病学系,广州 510515)

【摘 要】目的:以杆状病毒为载体,在昆虫细胞 sf9 中表达 GⅡ-4 型野生株诺如病毒(Noroviruses,NoV)GZ121 的衣壳蛋白ORF2,并验证其与组织血型抗原(Histoblood group antigen,HBGAs)受体的结合活性。方法:双酶切质粒 PMD18-T-GZ121 ORF2 酶切,连接入线性化载体 PFastBacTM1,获得重组转座载体 pFastBac-GZ121 ORF2,利用 Bac-to-Bac 杆状病毒表达系统获得重组杆状病毒,将其转染昆虫 sf9细胞进行蛋白表达,用蔗糖超离方法纯化以及免疫印迹、透射电镜等方法鉴定表达产物,用 EIA 法检测 NoV-VLP 与 HBGAs 的结合特性。结果:成功表达了分子量约为 58 kD 的 NoV 衣壳蛋白,大小约 30 nm 与预期相符,NoV-VLP 与 A、B、O 型均能结合,与非分泌型唾液不结合,结合方式与 rVA387 相一致。结论:我国优势流行株 GⅡ4 型 NoV 病毒样颗粒(Virus-like particles,VLP)的表达成功及 NoV-VLP 和 HBGAs 受体结合模型的建立,为我国 NoV 疫苗的开发和防治药物的研究奠定了基础。

【关键词】诺如病毒;杆状病毒表达系统;病毒样颗粒;HBGAs 受体

【中国图书分类法分类号】R373 【文献标志码】A 【收稿日期】2010-06-25

Expression of GII-4 strain NoV virus-like particles and analysis of its binding activity with HBGAs receptor

ZHANG Xu-fu, et al

(*Department of Basic Theory of TCM, School of Traditional Chinese Medicine, Southern Medical Univeristy*)

【Abstract】*Objective*: To express the capsids of the predominant strain NoV (GⅡ-4) of our country and explore its binding activity and pattern model with HBGAs receptor. *Methods*: GZ121 NoV ORF2 gene was constructed into baculovirus expression system. After the transfection to sf9 cells, the recombinant proteins were purified by sucrose-ultra centrifugation, and then were identified by SDS-PAGE, Western blot and TEM. And the binding patterns of NoV to HBGAs antigens were identified by EIA. *Results*: VLPs expression was confirmed by using SDS-PAGE, Western blot and could bind to all secretors (OD>2.5), but not to all nonsecretors (OD≈0.3). *Conclusion*: The GⅡ-4 NoV VLP was successfully expressed and HBGAs receptor binding assays were established. These data will help us to explore the host adaptation character of NoV and apply the assays to screen drugs for antivirals against Noroviruses. The results obtained in the present work will also lay a foundation for the development of the immunological diagnostic reagents as well as vaccines for Norovirus.

【Key words】norovirus; baculovirus expression vector system; virus-like particles; HBGAs receptor

诺如病毒(Noroviruses,NoV)是全球范围内引起成人和儿童非菌性急性胃肠炎暴发流行的重要病原体,同时也是婴幼儿散发性胃肠炎的常见病原(仅次于轮状病毒),近年来其发病率呈逐渐升高的趋势[1,2]。目前已知 NoV 有 5 个基因组,其中仅Ⅰ、Ⅱ、Ⅳ组感染人。自 20 世纪 90 年代中期首次确认 GⅡ-4 型 NoV 毒株导致绝大部分 NoV 胃肠炎暴发和世界性大流行后,NoV GⅡ-4 型毒株一直为全球优势流行株。我们课题组自 2002 年以来对广东省多地 NoV 感染进行了前瞻性流行病学研究,结果表明 NoV GⅡ-4 型为主要流行株,占到总数的 82.9%[3]。

Jiang 等[4]1992 年成功证实 NoV ORF2 可在杆状病毒表达系统高效表达,编码的 58 kD 蛋白可自发组装成病毒样颗粒(Virus-like particles,VLP),其形态结构、抗原性、免疫原性都十分接近于天然的病毒粒子。ORF2 编码的主要衣壳蛋白 VP1 为 NoV 抗原主要决定簇,同时负责识别结合组织血型抗原(Histoblood group antigen,HBGAs)受体,近年来已成为 NoV 的主要研究对象。但目前尚无针对我国流行优势株 GⅡ-4 型 NoV 野生株进行衣壳蛋白表达的研究报道,本文在前期

作者介绍:张绪富(1975-),男,讲师,博士,
研究方向:中西医结合抗病毒性腹泻。

通信作者:周迎春,女,教授,Email: zhychun@126.com。

基金项目:国家自然科学基金资助项目(编号:30700716、30901992)。

成功构建含 GⅡ-4 型诺如病毒 ORF2 基因的重组质粒基础上[5],利用杆状病毒表达系统在昆虫细胞 sf9中进行了 VLP 的表达。同时建立 NoV-VLP 与 HBGAs 的结合实验模型,证实了其与 HBGAs 受体的结合特性。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 菌株和质粒 杆状病毒表达系统,包括载体 pFast-Bac1、昆虫细胞 sf9和感受态 *E.coli* DH10Bac、大肠杆菌Top10 均购自 Invitrogen 公司。重组质粒 PMD18-T-GZ121 ORF2为本室前期克隆成功并保存[5]。

1.1.2 工具酶及试剂 无血清培养基 Sf-900Ⅱ SFM,昆虫细胞转染试剂 Cellfectin 购自 Invitrogen 公司。限制性内切酶、高保真 Pfx 酶购自 TaKaRa 公司,DNA 提取及 PCR 凝胶回收试剂盒、dNTP、DEPC、RNA inhibitor 购自美国 Promega 公司,IPTG、X-gal 购自 Sigma 公司。重组 VA387-VLPs(rVA387)、纯化豚鼠抗 NoV 多抗血清(9 种不同 NoV 毒株交叉免疫获得)[6]、羊抗豚鼠辣根过氧化物 IgG 为美国辛辛那提大学感染性疾病研究室 Jiang Xi 教授提供。四甲基联苯胺(TMB)购自 Sigma 公司。

1.2 方法

1.2.1 杆状病毒表达载体的构建及重组杆状病毒的获得 用限制性内切酶 *BamH* Ⅰ和 *Hind*Ⅲ将质粒 PMD18-T-GZ121 ORF2 双酶切,将酶切后的目的 ORF2 基因克隆到用相同双酶切线性化的 pFastBac1 载体上,得到重组杆状病毒表达载体 pFastBac-GZ121 ORF2。依据 Invitrogen 公司 Bac-to-Bac 杆状病毒表达系统说明书,制备 Bacmid DNA 并用 PCR 方法进行鉴定[5]。根据产品说明书用 Cellfectin 转染试剂将鉴定正确的 Bacmid DNA 转染丰度为 50%~70%的 sf9 细胞,置 27℃培养,每日观察细胞病变情况(可见细胞停止生长,粘附,明显变大,变圆,呈颗粒状外观)。72 h 后收获转染细胞上清,分装至无菌冻存管中,置 4℃或 -80℃保存。将原代病毒感染 sf9 细胞进行扩增传代。

1.2.2 目的蛋白在昆虫细胞 sf9中的表达及纯化 待 sf9细胞生长至 70%~80%丰度时,接种等量重组杆状病毒(M.O.I=5),27℃孵育 96 h 后,反复冻融 5 次以破碎细胞。以 15 000 g 于 4℃离心 15 min,去除细胞碎片。细胞上清铺于 30%的蔗糖溶液(溶于 TBS 中)上,以 15 000 g 于 4℃离心 6 h。沉淀用 50 mmol/L Tris-100 mmol/L NaCl 重悬。铺于 20%~60%的蔗糖密度梯度溶液(溶于 50 mmol/L Tris-100 mmol/L NaCl 中)上,以 15 000 g 于 4℃离心 22 h。以 0.5 ml/份的量分别取出离心液,用于表达蛋白的鉴定及结合 HBGAs 受体的特性研究。

1.2.3 重组蛋白的鉴定 ①蛋白鉴定:取 5 μl 样品用 10%的 SDS-PAGE 凝胶进行电泳,转印硝酸纤维素膜,膜依次进行 5%牛奶封闭、纯化豚鼠抗 NoV 多抗血清(1:3 333)、羊抗豚鼠辣根过氧化物 IgG(1:5 000)作用、PBST 充分洗涤后,用置好的显色液(6.6 μl NTB 和 3.3 μl BCIP 溶于 1 ml TSM 中)进行显色。②电镜观察:将样品加在事先用 0.3%formvar- 氯仿镀膜的铜网上,数 10+ 秒后用滤纸将液体吸干,滴加 2%磷钨酸染液,数 10 +秒后吸去染液,用去离子水充分冲洗、干燥,于透射电镜下观察和拍照。

1.2.4 VLP 与 HBGAs 受体的结合活性 参考文献应用 EIA 法检测[7]:将不同唾液标本用 PBS(pH7.4)按 1:1 000 稀释包被于 96 孔酶标板(100 μl/孔),5%脱脂奶封闭;加入表达的重组蛋白(1 μg/ml);每孔加豚鼠抗 NoV 多抗血清 100 μl(1:3 333),37℃孵育 1 h;加入羊抗豚鼠辣根过氧化 IgG 100 μl(1:5 000)37℃孵育 1 h;以上步骤均以 0.05% PBS-Tween20 洗涤 5 次;加入含 TMB 的底物缓冲液(现配,100 μl/孔),避光室温放置 10 min 显色;加入 50 μl 2 mol/L H_2SO_4 终止反应,酶标仪上 450 nm 波长处测定 OD 值。

2 结 果

2.1 pFastBac-GZ121 ORF2 重组质粒的鉴定

分别用限制性内切酶 *BamH* Ⅰ和 *Hind*Ⅲ双酶切 PMD18-T-ORF2 克隆质粒,得到 2 条 1.6 kb 和 2.7 kb 目的条带,回收双酶切产物(即 ORF2 基因片段),转座载体 pFastBac1 也用同样的两个内切酶消化并回收,再将线性化载体和 ORF2 基因片段连接,转化宿主菌,提取质粒进行双酶切鉴定,酶切后获得 1.6 kb 和 4.7 kb 的两条目的片段,与预期相符(图1)。同时进行 PCR 扩增后测序及序列分析,扩增出 1.6 kb 目的条带,证实克隆产物序列正确(DNA 序列、氨基酸序列略)。可以确定重组杆状病毒表达载体即 pFastBac-GZ121 ORF2 构建成功。

2.2 衣壳蛋白的表达鉴定以及 VLPs 的形成

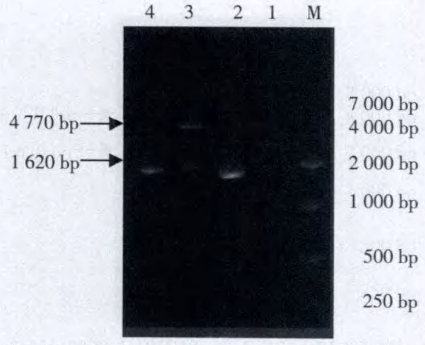
感染重组杆状病毒的 sf9细胞,在感染 P5 3 d 后,收集细胞及上清,反复冻融 5 次后,以 1 500 g 于 4℃离心 15 min 去除细胞碎片后,上清液进行 SDS-PAGE 蛋白电泳。电泳发现:rBac-GZ121 ORF2 表达了 1 条外源蛋白带,相对分子量约 58 kDa,与阳性对照 rVA387 相一致。结果证明 GZ121 ORF2 结构基因在 sf9细胞内得以成功表达(见图 2-A)。Western blot 结果显示:在分子量 58 kDa 附近有特异性条带出现,大小与预期相符。说明杆状病毒携带的 NoV 衣壳蛋白基因 ORF2 在昆虫细胞中得到表达(见图 2B)。

将重组杆状病毒感染的昆虫细胞反复冻融 5 次以破碎细胞。以 15 000 g 于 4℃离心 15 min,去除细胞碎片。细胞上清进行不连续蔗糖密度梯度超速离心,在蔗糖垫层中出现一条致密细微的蛋白带,轻轻吸出后电镜负染观察,可见在病变的 sf9细胞中有典型的空心杯状病毒样颗粒出现,其直径约为 30 nm,与以往文献报道一致(见图 3),说明重组衣壳蛋白在体外形成了 VLPs。

2.3 VLPs 与唾液 HBGAs 受体结合活性

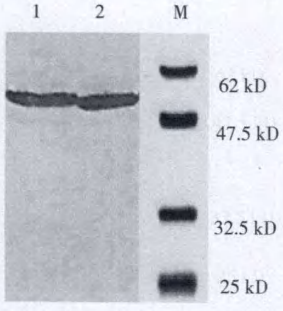
63 份唾液标本的采集和处理以及唾液 HBGAs 血型物

质的测定结果已另文报道[8]。2 次检测均设 2 个平行孔，据阴性对照吸光度 OD 值的分布情况，将 OD_{450} ≥1.0 者判定为阳性。GZ121-VLPs 与 13 例非分泌型 HBGAs 受体最大 OD_{450} 值为 0.326，均值为 0.21 ± 0.03，表明 GZ121-VLPs 与非分泌型不结合。而分泌型（包括 O、A、B、AB 型）唾液结合 GZ121-VLPs 的 OD_{450} 值均≥1（结果见图 4），表明 GZ121-VLPs 与分泌型 HBGAs 受体 O、A、B、AB 均能结合，其结合 HBGAs 受体方式与 rVA387 相同。



M. Maker ladder 2000；1. PMD18 -T- GZ121 ORF2 双酶切产物；2. PMD18 -T- GZ121 ORF2 为模版扩增 PCR 产物；3. pFastBac-GZ121 ORF2 双酶切产物；4. pFastBac-GZ121 ORF2 为模版扩增 PCR 产物

图 1　重组克隆质粒和表达质粒的酶切和 PCR 鉴定



M. Marker; 1. VA387 VLPs; 2. rBac-GZ121 ORF2 转染 Sf9 细胞上清中表达产物

图 2B　表达蛋白的 Western blot 分析

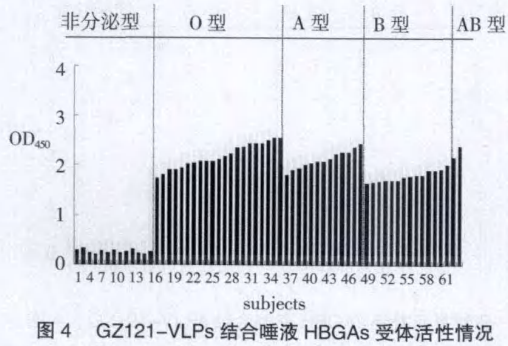
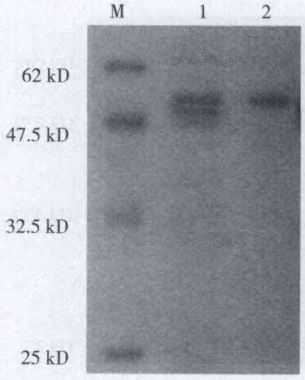


图 4　GZ121-VLPs 结合唾液 HBGAs 受体活性情况



M. 蛋白 Marker；1. rBac-GZ121 ORF2 转染 Sf9 细胞上清中表达产物；2. VA387 蛋白

图 2A　表达蛋白的 SDS-PAGE 电泳分析



图 3　梯度糖离心纯化后 VLPs 观察结果（×100 万倍）

3　讨　论

本研究在前期对 NoV ORF2 基因克隆成功的基础上，应用杆状病毒－昆虫细胞表达系统（Bac-to-Bac），表达了我国流行优势株 GⅡ-4型 NoV VLPs 及其体外结合 HBGAs 受体的活性研究。我们的实验结果，证明本研究中表达的 NoV 结构蛋白形成了 VLPs。第一，透射电镜的观察结果提供了形态学上的直观证据。颗粒大小约 30 nm，其形态大小与文献报道一致。第二，Western blot 分析发现其能与 NoV 多抗血清特异性反应，分子量约 58 kD，表明其 NoV 衣壳蛋白性质。第三，受体结合实验证实，表达的 VLPs 能与唾液 A、B、O 型 HBGAs 受体特异性结合，而与非分泌型不结合，其结合方式与 rVA387 相同，证明了其独有的受体结合反应原性。

近年来 VLPs 已广泛应用于 NoV 感染的诊断、免疫及疫苗等方面的研究，为 NoV 机制的研究带来了新的曙光。由于 NoV 目前不能培养，对其进行免疫学检测只能使用基因工程抗原，而利用杆状病毒表达系统表达抗原性、免疫原性与天然病毒非常接近的 VLPs 正好满足了该需求，为 NoV 诊断检测开发及其应用提供了可行途径。用我们表达成功的 GⅡ-4VLP 代替病毒抗原可以检测人体血清中的特异性抗体，还可以用 VLP 免疫动物获得特异性免疫血清，在 NoV 暴发流行时快速检测 GGⅡ-4病毒抗原。由于杆状病毒表达系统表达的的 VLPs 在形态学、抗原性等方面接近于自然的病毒颗粒，容易被胃肠道吸附，并且 1 个 VLPs 包含 180 个 VP1，对低 pH 值有很强的抵抗能力（适应胃肠道环境），冻干再溶解

不影响其免疫原性，这些独特的优点使得 VLPs 成为 NoV 疫苗研究的热点和重点[9,10]。

HBGAs 不仅存在于红细胞表面，而且广泛分布在其他细胞和组织，在肠道上皮细胞上表现为 ABH 和 Lewis 抗原，对应在红细胞上表现为分泌型(A、B、O 血型)和非分泌型。近年来，大量分子流行病学研究以及利用 NoV 对志愿者进行攻击的实验表明，HBGA 是 NoV 的天然受体或协同因子，这可能是 NoV 在人体肠道中寄生和入侵的一个重要机制，这一新发现为深入研究 NoV 病原学和宿主特异性及药物开发提供了新视角。目前发现至少共有 8 种 NoV 和 HBGAs 作用的方式，并可归为 2 大类：A/B 结合型(分泌型结合型)、Lewis 结合型(非分泌型结合型)[11,12]。

本研究利用杆状病毒表达系统表达了我国 GⅡ-4型 GZ121-VLPs，并从国外引进阳性对照 rVA387(GⅡ-4 基因型)、一抗、二抗同时收集我国健康志愿者唾液进行 HBGAs 表型鉴定[8]，建立了 NoV 结合唾液 HBGAs 受体的实验方法。研究结果表明：GZ121-VLPs 和 rVA387 主要结合 A、B 和 H 抗原，与非分泌型抗原则不结合，结果与报道完全一致，两者的结合能力无明显差异，这也充分表明了我们利用杆状表达系统表达的 GZ121-VLP 具有结合受体的特异性。该受体结合实验方法稳定可靠、重复性良好，稍作改良后即可用于NoV 和 HBGAs 受体阻断实验研究，从而能够用于 NoV 的 HBGAs 受体阻断剂的药物筛选[13]。

参 考 文 献

[1] Cremon C, de Giorgio R, Barbara G. Norovirus gastroenteritis [J]. N Engl J Med, 2010, 362 (6): 557, 557-558.

[2] Patel M M, Widdowson M A, Glass R I, et al. Systematic literature review of role of noroviruses in sporadic gastroenteritis[J]. Emerg Infect Dis, 2008, 14(8): 1224-1231.

[3] Dai Y C, Xia M, Zhan H C, et al. Surveillance and risk factors of norovirus gastroenteritis among children in a southern city of China in the fall-winter seasons of 2003-2006[J]. J Paediatr Child Health, 2009, 46 (1-2): 45-50.

[4] Jiang X, Wang M, Graham D Y, et al. Expression, self-assembly, and antigenicity of the Norwalk virus capsid protein[J]. J Virol, 1992, 66(11): 6527-6532.

[5] 张绪富，戴迎春，周迎春，等. GⅡ-4 型诺如病毒 ORF2 基因克隆及序列分析[J]. 中国公共卫生杂志，2010，26(2)：194-196.

[6] Jiang X, Wilton N, Zhong W M, Farkas T, et al. Diagnosis of human caliciviruses by use of enzyme immunoassays[J]. J Infect Dis, 2000, 181 (2s): 349-359.

[7] Huang P, Farkas T, Zhong W, et al. Norovirus and histo-blood group antigens: demonstration of a wide spectrum of strain specificities and classification of two major binding groups among multiple binding patterns [J]. J Virol, 2005, 79(11): 6714-6722.

[8] 张绪富，戴迎春，夏仁飞，等. GⅡ-4 型诺如病毒体外结合唾液 HBGAs 受体的检测与分析[J]. 中国人兽共患病学报，2009，25(6)：560-562.

[9] Harrington P R, Yount B, Johnston R E, et al. Systemic, mucosal, and heterotypic immune induction in mice inoculated with Venezuelan equine encephalitis replicons expressing Norwalk virus-like particles [J]. J Virol, 2002, 76(2): 730-742.

[10] Herbst-Kralovetz M, Mason H S, Chen Q. Norwalk virus-like particles as vaccines[J]. Expert Rev Vaccines, 2010, 9(3): 299-307.

[11] Tan M, Jiang X. Norovirus and its histo-blood group antigen receptors: an answer to a historical puzzle[J]. Trends Microbiol, 2005, 13(6): 285-293.

[12] Tan M, Jiang X. Norovirus-host interaction: implications for disease control and prevention[J]. Expert Rev Mol Med, 2007, 9(19): 1-22.

[13] 张绪富，戴迎春，周迎春. 抗诺如病毒性胃肠炎药物靶点研究新进展[J]. 中国药理学通报，2009，25(3)：421-423.

(责任编辑：关蕴良)

(上接封二)

参 考 文 献

[1] 张乃峥. 临床风湿病学[M]. 第 1 版. 上海：上海科学技术出版社，1999.300-305.

[2] 张乃峥. 临床风湿病学[M]. 第 1 版. 上海：上海科学技术出版社，1999.213-218.

[3] Zeuner M, Straub R H, Schlosser U, et al. Anti-phospholipid-antibodies in patients with relapsing[J]. Lupus, 1998, 7(1): 12-14.

[4] McAdam L P, O'Hanlan M A, Bluestone R, et al. Relapsing polychondritis: prospective study of 23 patients and a review of the literature [J]. Rheumatology cox ford, 2007, 46(11): 1738-1739.

[5] Michet C J, McKenna C H, Luthra H S, et al. Relapsing polychondritis survival and predictive role of early disease manifestation[J]. Ann Intern Med, 1986, 104(1): 74-78.

[6] Balsa-Criado A, Gonzalez-Hemandez T, Cuesta M V, et al. Lupus anticoagulant in relapsing polychondritis[J]. J Rheumatol, 1990, 17(10): 1426-1427.

[7] Quere I, Biron C, Dubois A. Lupus anticoagulant and thrombosis in relapsing polychondritis[J]. J Rheumatol, 1996, 23(5): 946-947.

[9] 许可见，刘跃华，蒋 明. 复发性多软骨炎的诊断和治疗[J]. 中国医学科学院学报，2007，2：171-173.

(责任编辑：关蕴良)