

DOI: 10.3724/SP.J.1118.2017.16319

大鲵虹彩病毒 MCP 蛋白在杆状病毒表达系统中的表达与纯化

张星朗¹, 高志¹, 杨平凹², 周小愿¹, 贾秋红¹, 韩亚慧¹, 高宏伟¹

1. 中国水产科学院 黄河水产研究所, 陕西 西安 710086;

2. 甘肃省陇南市徽县水产工作站, 甘肃 陇南 742399

摘要: 为研制基于杆状病毒表达系统的大鲵虹彩病毒(Chinese giant salamander iridovirus, CGSIV)新型亚单位疫苗, 将CGSIV主要衣壳蛋白(major capsid protein, MCP)基因克隆至杆状病毒穿梭载体 pFastBac1 质粒中, 构建了重组质粒 pFastBac-MCP。转化 *E. coli* DH10Bac 感受态细胞, 经 PCR 筛选和测序获得了阳性重组杆粒 rBacmid-MCP, 在昆虫细胞转染试剂介导下将该重组杆粒转染 Sf9 细胞, 获得重组杆状病毒。重组杆状病毒感染的 Sf9 昆虫细胞, 经超薄切片电镜观察, 可见大量重组杆状病毒存在于细胞中。按不同感染复数(MOI=2、5、10)将重组杆状病毒感染 Sf9 细胞进行 CGSIV MCP 的表达。SDS-PAGE 检测结果表明, 在 MOI=10 时, 目的蛋白的表达量最高; 间接免疫荧光观察结果显示, 目的蛋白在感染细胞中得到表达, 且分布在细胞表面。以抗 CGSIV MCP 单抗为抗体制备的免疫磁珠纯化目的蛋白并利用兔抗 CGSIV MCP 多抗血清检测目的蛋白的生物学活性。SDS-PAGE 和 Western blot 结果显示, 纯化的目的蛋白纯度很高, 而且具有抗原活性, 能够被兔抗大鲵虹彩病毒 MCP 多抗血清识别。利用杆状病毒表达系统成功进行了 CGSIV MCP 的表达, 并应用免疫磁珠法进行了目的蛋白的纯化, 为 CGSIV 新型亚单位疫苗的研制奠定了基础。

关键词: 大鲵虹彩病毒; 主要衣壳蛋白; 杆状病毒表达系统; 蛋白纯化

中图分类号: S94

文献标志码: A

文章编号: 1005-8737-(2017)06-1271-09

大鲵虹彩病毒(Chinese giant salamander iridovirus, CGSIV)是导致近年来中国许多地区养殖大鲵(*Andrias davidianus*)大规模死亡的病原, 属于虹彩病毒科(Iridoviridae)、蛙病毒属(*Ranavirus*), 为双链 DNA 病毒且呈二十面体, 病毒颗粒直径约 150 nm^[1-4]。CGSIV 可感染大鲵的肾、肝、肺以及肠道等多种组织器官, 造成这些组织的组织坏死、功能丧失, 最终导致受感染大鲵的快速死亡, 且大鲵感染后的死亡率在 90%以上^[5-6]。

主要衣壳蛋白(major capsid protein, MCP)是虹彩病毒科病毒的主要结构蛋白, 占病毒粒子可溶性蛋白的 90%^[7]。研究表明, MCP 基因中含有许多高度保守的结构域, 其基因序列及编码氨基酸序列的同源性可以反映不同虹彩病毒株之间的

亲缘关系, 是研究虹彩病毒分类及系统演变的靶基因^[8], 同时 MCP 也是病毒的抗原相关蛋白, 已成为设计和制备基因重组疫苗的关键靶标^[9-11]。

为控制 CGSIV 病的暴发和流行, 国内众多学者利用 MCP 及其基因的上述特性, 在 CGSIV 的检测和疫苗防控等方面开展了大量研究工作。如在 CGSIV 的分子生物学检测方面, 学者们针对 MCP 基因建立了多种不同的检测方法^[12-14]。周小愿等^[15-16]根据 MCP 编码氨基酸的亲/疏水性分析, 将截短后的 CGSIV MCP 基因在原核表达系统中成功表达并以获得的重组蛋白为抗原制备了抗 MCP 多抗血清和单克隆抗体, 以期为病毒的免疫学检测方法的建立奠定基础。Zhou 等^[17]将 CGSIV MCP 编码氨基酸经过密码子优化, 成功在毕赤醇

收稿日期: 2016-10-26; 修订日期: 2017-01-16.

基金项目: 陕西省科学技术发展计划项目(2014k01-20-02; 2012K01-18).

作者简介: 张星朗(1964-), 男, 研究员, 主要从事水产养殖与水产动物疾病研究. E-mail: zxlang029@sina.com

通信作者: 周小愿, 副研究员, 主要从事水产养殖病害研究. E-mail: zhouxy_2005@163.com

母(*Pichia pastoris*)中表达,并进行了重组蛋白的免疫保护实验。曾宪辉等^[18]构建了 MCP 基因 DNA 疫苗,并对其免疫效果进行了研究。目前,有关利用杆状病毒表达系统(baculovirus expression system, BES)进行 CGSIV MCP 表达的研究尚未见报道。

30 多年来,作为一种重要的真核表达系统, BES 在多种重组蛋白和高效疫苗的研制方面发挥了巨大作用^[19]。这主要是由于 BES 具有表达蛋白进行翻译后加工、表达产物与天然蛋白的生物活性一致、安全性高等优点^[20]。为此,本研究将 CGSIV MCP 全长基因在 BES 中进行表达,旨在为 CGSIV 新型亚单位疫苗的研制提供基础。

1 材料和方法

1.1 菌株、载体及细胞

含 CGSIV MCP 全长基因的重组质粒 pMD-18T-MCP 由本实验室构建并保存, *E. coli* DH5 α 、*E. coli* DH10Bac 感受态细胞、pFastBac1 杆状病毒穿梭载体购于湖南科爱医疗器械有限公司, Sf9 昆虫细胞购于上海哈灵生物科技有限公司。

1.2 工具酶和主要试剂

T4 DNA 连接酶及 *EcoR* I 和 *Hind* III 限制性内切酶购于 NEB(北京), 质粒小量抽提试剂盒购于 Omega 公司, PCR 产物纯化试剂盒购于 Promega 公司, Insect GeneJuice[®] Transfection Reagent 购于 Merck Millipore 公司, Bluo-gal、异丙基- β -D-硫代半乳糖苷(Isopropyl β -D-thiogalactoside, IPTG)、氨苄青霉素(Ampicillin, Amp)、卡拉霉素(Kanamycin, Kan)、庆大霉素(Gentamicin, Gen)、四环素(Tetracycline, Tet)购于陕西博达生物科技有限公司, Sf-900 II 培养基购于上海哈灵生物科技有限公司, NHS 磁珠购于中国海狸纳米科技有限公司; 辣根过氧化物酶(HRP)标记的羊抗兔 IgG 和异硫氰酸荧光素(FITC)标记羊抗鼠 IgG 购自 Sigma 公司, 小鼠抗大鲵虹彩病毒 MCP 单抗和兔抗大鲵虹彩病毒 MCP 血清由本实验室制备并保存。其他试剂均为国产分析纯。

1.3 引物设计与合成

参照已发表的大鲵虹彩病毒略阳株(CGSIV-

LY)MCP 基因序列(GenBank 登录号: KF023635), 利用 Primer6.0 设计一对引物对 MCP 全长基因进行扩增, 引物由武汉天一辉远生物科技有限公司合成。引物序列如下:

P1: 5'-CCGGAATTCATGTCTTCTGTAAGTGG-3'(*EcoR* I);

P2: 5'-CCCAAGCTTTTACAAGATTGGGAA-TCC-3'(*Hind* III)。

1.4 目的基因扩增

以 pMD-18T-MCP 为模板进行 MCP 全长基因扩增, 总体积为 50 μ L 的反应体系为: 0.5 μ L Ta-KaRa Ex *Taq* (5 U/ μ L), 5.0 μ L 10 \times Ex *Taq* Buffer (Mg²⁺ Plus), 0.25 nmol/L dNTPs 4.0 μ L, 引物 (50 pmol/L)各 1.0 μ L, DNA 模板 1 μ L, ddH₂O 补充至 50 μ L。反应条件为: 95 $^{\circ}$ C 3 min; 95 $^{\circ}$ C 45 s, 60 $^{\circ}$ C 45 s, 72 $^{\circ}$ C 1 min, 30 个循环; 72 $^{\circ}$ C 充分延伸 10 min。10 g/L 的琼脂糖凝胶电泳检测 PCR 产物, 胶回收 PCR 产物。

1.5 重组质粒 pFastBac-MCP 的构建

分别用 *EcoR* I 和 *Hind* III 限制性内切酶双酶切 pFastBac1 载体和 MCP 基因, 回收纯化后用 T4 DNA 连接酶连接, 再转化至 *E. coli* DH5 α 感受态细胞中, 涂布含 AMP (100 mg/mL)的平板, 筛选阳性克隆, 挑取阳性克隆扩大培养后用质粒抽提试剂盒抽提质粒, 进行酶切鉴定及测序, 将鉴定正确的重组质粒命名为 pFastBac-MCP。

1.6 重组杆粒 rBacmid-MCP 的构建及鉴定

参照 Bac to Bac Baculovirus Expression Systems 使用手册进行操作, 具体如下: 将重组质粒 pFastBac-MCP 转化 *E. coli* DH10Bac 感受态细胞, 涂布三抗(Gen、Kan、Tet)、Bluo-gal、IPTG 平板进行蓝白斑筛选, 挑取白色菌落 3 次划线纯化, 经 M13 通用引物和 MCP 特异性引物 PCR 初步鉴定后, 将阳性菌落送武汉天一辉远生物科技有限公司测序进一步鉴定。将确认结果正确的阳性重组转座子, 命名为 rBacmid-MCP。

1.7 重组杆状病毒的制备及其超薄切片的观察

按 Insect GeneJuice[®] Transfection Reagent 操作说明书的方法, 首先碱裂解法提取 rBacmid-MCP 质粒, 然后将 2 μ g 的 rBacmid-MCP 质粒与 10 μ L 转染试剂轻轻混合后转染于 Sf9 单层细胞

(细胞密度约为 1×10^6 个/mL), 27°C 继续培养, 待 80% 细胞出现病变后, 收集细胞上清标记为 P1 代重组杆状病毒, 将 P1 代重组病毒继续感染 Sf9 细胞, 经 3 代扩大培养; 同时参照 Bac to Bac Baculovirus Expression Systems 使用手册中的蚀斑法测定各代重组病毒滴度, 进行重组病毒的筛选。收集高滴度的重组病毒细胞培养物上清作为重组病毒母液, 4°C 避光保存备用。将该重组杆状病毒命名为 AcNPV-MCP。

AcNPV-MCP 感染 Sf9 细胞 72 h 后, 弃掉培养液, 刮集细胞于 10 mL 离心管中, 3000 r/min 离心 20 min, 弃上清; 经 2.5% 戊二醛固定, 乙醇脱水, 环氧树脂包埋后, 用 Leica CM1950 超薄切片机制备厚度为 50~80 nm 的超薄切片, 置于有支持膜的铜网上, 醋酸铀及柠檬酸铅染色, 然后置于 H-7650 型透射电镜(日立)在 80 kV 下观察。

1.8 目的蛋白的表达

根据病毒滴度, 参照文献[22]确定不同感染复数(multiplicity of infection, MOI)时病毒的用量, 将 AcNPV-MCP 按不同感染复数(MOI=2、5、10)接种处于对数生长期的 Sf9 细胞(细胞密度约为 1×10^6 个/mL), 进行 MCP 基因表达。待 80% 以上细胞出现明显细胞病变后, 收集细胞, 1000 r/min 离心 10 min, 上清 4°C 避光保存, 收集细胞沉淀。将细胞沉淀用预冷的 PBS 洗涤两次, 加入细胞裂解液缓冲液重悬, 之后超声破碎(200 HZ, 运行 15 s 间歇 30 s, 3 个循环), 13000 r/min 4°C 离心 30 min, 然后取上清以 12% 凝胶进行 SDS-PAGE 电泳, 完毕后经考马斯亮蓝染色, 后将凝胶置于 syngene 化学发光凝胶成像系统进行观察和拍照。同时设野生型杆状病毒感染的 Sf9 细胞为对照。

1.9 间接免疫荧光法分析目的蛋白的表达

将无菌盖玻片置于 6 孔板(corning)中培养单层的 Sf9 细胞, AcNPV-MCP 感染细胞 72 h 后弃去培养液, 经 4% 多聚甲醛固定过夜, PBST 洗涤, 3% BSA 封闭 2 h, 以小鼠抗大鲵虹彩病毒 MCP 单抗(1 : 3000)为一抗, 室温下孵育 2 h。PBST 洗涤后, 以 FITC 标记的羊抗小鼠 IgG(1 : 2500)为二抗, 室温避光孵育 2 h。PBST 洗涤后用荧光染料 Hoechst 33258 进行染色。将盖玻片有细胞的一面朝下,

50% 甘油封片置于载玻片上, 荧光显微镜(Olympus BX-51)下观察, 拍照。同时, 设野生型杆状病毒感染的 Sf9 细胞作阴性对照。

1.10 目的蛋白的纯化及 Western blot 鉴定

根据操作说明书, 经实验确定, 按每 500 μ L 磁珠可结合 350 μ L 的小鼠抗大鲵虹彩病毒 MCP 单抗制备免疫磁珠。将 1.8 确定的最佳表达条件下收获的含有目的蛋白表达产物的 Sf9 细胞用 Triton X-100 冰上裂解 1 min, 4°C 600 g 离心 3 min, 收集上清, 再与制备好的免疫磁珠混匀, 37°C 孵育 2 h, 用磁力架收集磁珠, 洗涤 2 次, 将磁珠悬浮于 500 μ L pH 2.5 Gly-HCl, 孵育 5 min, 磁力收集磁珠, 上清用 100 μ L pH 8.0 Tris-HCl 中和, 即获得纯化后的目的蛋白。取纯化的目的蛋白经 SDS-PAGE 电泳, 利用灰度分析测定纯度, BCA 蛋白浓度测定试剂盒(Sigma)测定蛋白浓度。为检测纯化蛋白的生物活性, 按常规进行纯化蛋白的 SDS-PAGE 电泳, 之后将电泳产物电转到 PVDF 膜上, 同时以野生型杆状病毒感染 Sf9 细胞的裂解物为阴性对照。氨基黑染色 5 min, 甲醇褪去背景色。4°C, 50 g/L 脱脂奶粉封闭 2 h; 用 PBST 洗涤后, 置于 1 : 500 稀释的兔抗大鲵虹彩病毒 MCP 血清中, 室温孵育过夜; PBST 洗涤后, 加 HRP 标记的羊抗兔 IgG(1 : 3000), 室温孵育 2 h; PBST 洗涤 3 次, ECL 法检测。

2 结果与分析

2.1 MCP 基因扩增与重组 pFastbac-MCP 质粒的构建及鉴定

以 pMD-18T-MCP 为模板, 采用 MCP 特异性引物(P1/P2) 通过 PCR 扩增 MCP 全长基因, 产物经电泳检测大小为 1392 bp(图 1), 符合预期。经常规 DNA 酶切和连接, 将 MCP 插入到 pFastBac1 载体中, 通过酶切鉴定(图 2)和测序, 表明成功构建了 pFastBac-MCP 重组质粒。

2.2 重组杆粒 rBacmid-MCP 的鉴定

将构建的重组杆粒利用 M13 通用引物和 MCP 特异性引物(P1/P2)进行 PCR 鉴定(图 3), 并将阳性样品送生物公司测序, 结果证明成功构建了 rBacmid-MCP 重组杆粒。

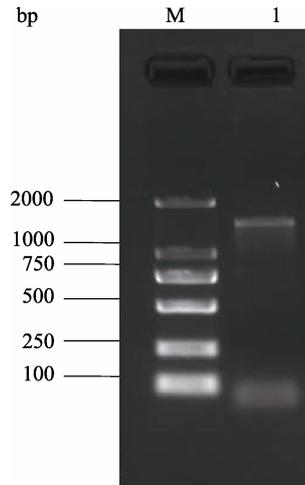


图 1 MCP 基因扩增产物电泳图
M: DL2000DNA 分子量标准; 1: MCP 扩增产物.
Fig. 1 Electrophoresis patterns of MCP
M: DL2000 marker; 1: PCR product of MCP.

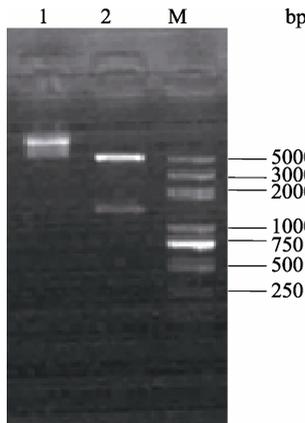


图 2 重组质粒 pFastBac-MCP 的酶切鉴定
M: DL5 000 分子量标准; 1: pFastBac1 单酶切产物;
2: pFastBac-MCP 双酶切产物.
Fig. 2 Identification of pFastBac-MCP by
restriction endonuclease
M: DNA Marker DL5 000; 1: digestion production
of pFastBac1; 2: digestion production of pFastBac-MCP.

2.3 重组杆状病毒的制备及其超薄切片观察

重组杆粒 rBacmid-MCP 转染 Sf9 昆虫细胞 3 d 后, 可发现被感染细胞出现典型的细胞病变, 即细胞体积变大、变得透亮, 聚集漂浮在培养基中, 而对照细胞则没有此种现象(结果略)。病毒滴度测定结果显示, P1 代重组病毒的滴度为 5×10^6 PFU/mL, P2 代重组病毒的滴度逐渐升高, 为 2×10^7 PFU/mL; P3 代和 P4 代病毒的滴度均为 1×10^8 PFU/mL。因此, 选择 P3 代重组病毒感染细胞的培养上清作为重组病毒母液。

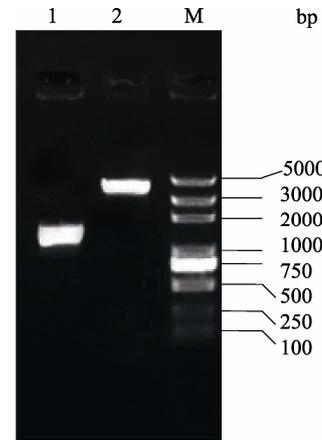


图 3 重组杆粒 rBacmid-MCP 的 PCR 鉴定
M: DL5000 DNA 分子量标准; 1: MCP 的 PCR 扩增产物;
2: rBacmid-MCP 的 PCR 扩增产物.
Fig. 3 Identification of recombinant rBacmid-MCP by PCR
M: DL5000 marker; 1: PCR products of MCP;
2: PCR products of rBacmid-MCP.

重组杆状病毒(AcNPV-MCP)感染 Sf9 细胞后, 经超薄切片, 电子显微镜观察。如图 4 所示, 大量杆状病毒存在于细胞中(图中箭头所示), 大小约为 $200 \text{ nm} \times 40 \text{ nm}$, 具有典型的杆状病毒形态, 说明已成功获得了大量重组杆状病毒。

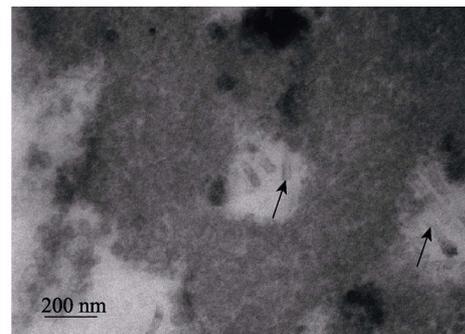


图 4 重组杆状病毒(AcNPV-MCP, 箭头所示)的电镜观察
Fig. 4 Electronic microscope observation of AcNPV-MCP
(as arrows showing)

2.4 目的蛋白的表达及检测

MCP 蛋白的理论相对分子量为 50 kU, 而 AcNPV-MCP 感染 Sf9 昆虫细胞后, 经 SDS-PAGE 分析, 和对照相比, 在 53 kU 处出现一条较为明显的目的条带, 而且感染复数 MOI 为 10 时, 目的蛋白的表达量最高(图 5)。

2.5 间接免疫荧光法分析目的蛋白的表达

间接免疫荧光检测结果显示, AcNPV-MCP 感

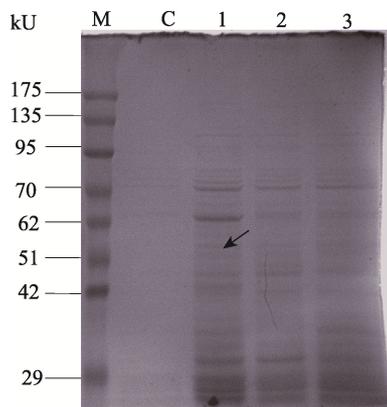


图 5 重组 MCP 蛋白的 SDS-PAGE 鉴定

M: 蛋白分子量标准; C: 阴性对照; 1: rBacmid-MCP 转染 Sf9 昆虫细胞(MOI=10); 2: rBacmid-MCP 转染 Sf9 昆虫细胞(MOI=5); 3: rBacmid-MCP 转染 Sf9 昆虫细胞(MOI=2).

Fig. 5 Identification of recombinant MCP protein by SDS-PAGE

M: protein molecular weight marker; C: negative control; 1: Sf9 cells infected by rBacmid-MCP with MOI=10; 2: Sf9 cells infected by rBacmid-MCP with MOI=5; 3: Sf9 cells infected by rBacmid-MCP with MOI=2.

染的 Sf9 细胞出现特异性的绿色荧光(图 6), 且荧光分布在细胞表面, 而阴性对照细胞未出现荧光。实验结果表明, CGSIV MCP 已成功在昆虫细胞中表达, 且分布在细胞表面。

2.6 目的蛋白的纯化和 Western blot 鉴定

收获表达 MCP 基因的昆虫细胞, 经 Triton X-100 裂解和离心, 收集上清, 利用结合有小鼠抗大鲵虹彩病毒 MCP 单抗的免疫磁珠进行纯化。纯化蛋白经 SDS-PAGE 电泳检测。结果只有一条带, 相对分子质量约为 53 kU(图 7a), 与预期大小相符合。纯化蛋白的纯度和定量测定结果显示, 纯化目的蛋白的纯度为 90.8%, 蛋白浓度为 0.85 mg/mL。

将纯化的目的蛋白和野生型杆状病毒感染的 Sf9 细胞裂解物进行 Western blot 反应, 结果如图 7b 所示: 纯化蛋白在 PVDF 膜上可见单一条带印记, 且大小符合预期, 而阴性对照则无此条带, 表明表达的目的蛋白具有抗原活性, 且能够被兔抗大鲵虹彩病毒 MCP 血清识别。

3 讨论

MCP 是虹彩病毒的二十面体衣壳蛋白, 为一个单一的多肽。MCP 在病毒的包装和感染过程中具有重要作用^[23], 其具有丰富的抗原表位, 有良好的免疫原性。利用基因工程技术表达具有免疫原性的 MCP 重组蛋白已成为制备抗体和亚单位

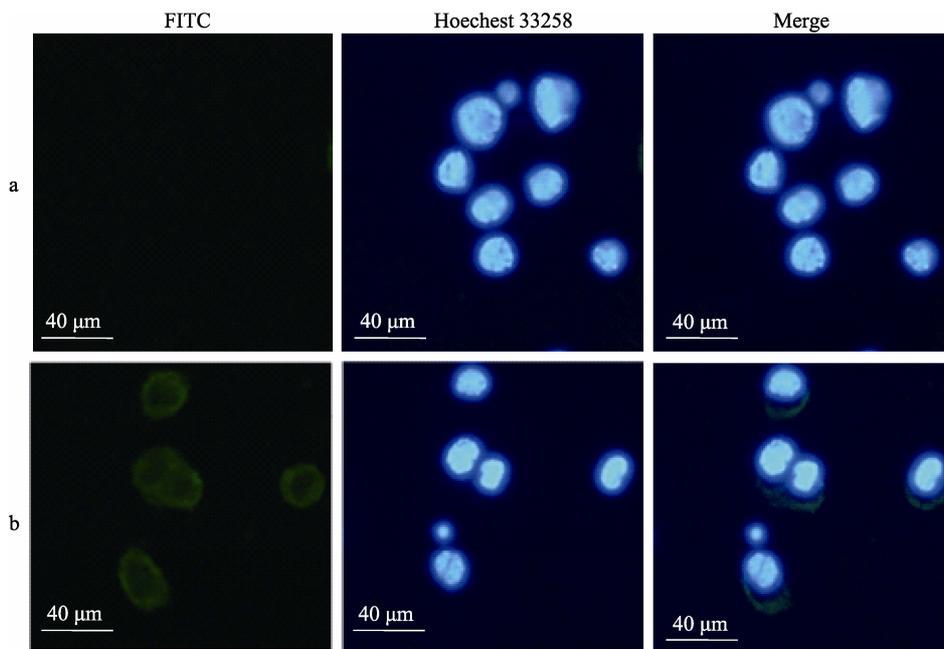


图 6 间接免疫荧光法检测重组 MCP 蛋白的表达

a. 野生型杆状病毒感染的 Sf9 细胞(72 h); b. 感染 AcNPV-MCP 后 72 h 的 Sf9 细胞。

Fig. 6 Identification of the recombinant MCP protein by indirect immunofluorescence assay

a. Sf9 cells infected with wild type baculovirus at 72 h pi; b. Sf9 cells infected with AcNPV-MCP at 72 h pi.

疫苗,从而有效防控虹彩病毒的主要技术手段。

目前很多研究采用原核表达系统表达 MCP^[11, 24-25],虽然原核表达具有操作简单、成本低廉和表达效率高等优点,但原核表达系统翻译后加工修饰体系不完善,制备的重组蛋白基本以包涵体的形式表达,其纯化过程需要变性、复性,操作繁琐,纯化蛋白的生物活性也较差。也有少数学者利用酵母表达系统制备表达 MCP 以制备亚单位疫苗^[17, 26]。酵母表达系统确有许多优点,但其表达的蛋白产物在翻译修饰方面和 BES 相比,还有一定的差距。BES 表达的重组蛋白具有完整的生物学功能、能进行翻译后的加工修饰、表达水平高、能容纳大分子的插入片段、能同时表达多个基因,并且杆状病毒对脊椎动物无感染性,安全性高^[27]。

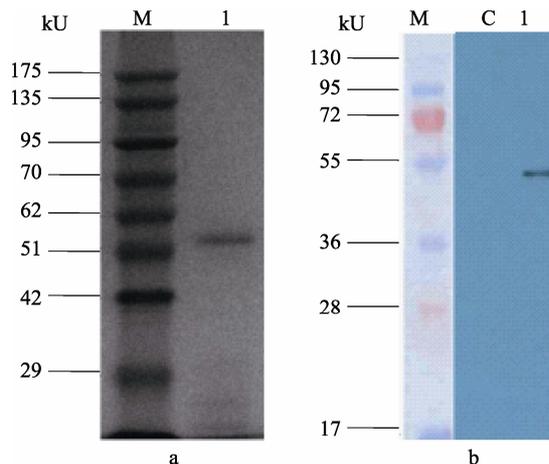


图 7 纯化重组 MCP 蛋白的 SDS-PAGE 和 Western blot 鉴定

a. 纯化 MCP 蛋白的 SDS-PAGE 鉴定; b. 纯化 MCP 蛋白的 Western blot 鉴定. M: 蛋白分子量标准; C: 阴性对照; 1: 纯化的 MCP 蛋白。

Fig. 7 Identification of purified recombinant MCP protein by SDS-PAGE and Western blot assays

a. identification of purified recombinant MCP protein by SDS-PAGE; b. identification of purified recombinant MCP protein by Western blot. M: protein molecular weight marker; C: negative control; 1: purified MCP protein.

目前,在水生动物病毒病防控技术领域,已有多位学者利用 BES 成功地进行了重组蛋白的表达,而且制备的重组蛋白具有良好的免疫活性^[28-30]。这些研究表明, BES 将可能成为水生动物病毒性疾病预防技术领域的有力技术手段。

本研究利用 BES 成功表达了 CGSIV MCP。

但是,在本研究中,目的蛋白的表达量并没有像已往多数 BES 表达重组蛋白的研究结果表现的那么高,以至于未纯化前的目的蛋白在 SDS-PAGE 胶通过考马斯亮蓝染色后并不能观察到特别明显的条带。这可能与 CGSIV MCP 蛋白编码氨基酸的特性和表达系统的密码子偏爱性有关。在 Seo 等^[26]和 Zhou 等^[17]的研究中,为提高 MCP 在酵母表达系统中的表达量,他们均对 MCP 编码氨基酸进行了密码子优化。为此,在后续的研究中,我们也可以尝试通过 CGSIV MCP 编码氨基酸的密码子优化,以适应 BES 的密码子偏爱性,从而提高 BES 对 MCP 的表达量。

本研究的间接免疫荧光实验结果显示, CGSIV MCP 不仅在 BES 中得到表达,而且分布在细胞的表面。根据刘红等^[30]对类似实验结果的分析,我们推测 CGSIV MCP 很有可能也整合到重组杆状病毒的囊膜上。如果这一推测得到后续实验的进一步证实,就可以直接收集制备的重组杆状病毒作为疫苗^[31]。此外,对感染重组病毒的细胞超声破碎后离心取上清进行 SDS-PAGE,从电泳图中可以看到目的蛋白的条带,说明表达的蛋白是可溶性的。

为获得具有完整生物活性的重组蛋白及便于后续研究的进行,本研究并没有采用带有 His 标签的镍柱亲和层析法,而是利用免疫磁珠法进行目的蛋白的纯化。纯化结果显示,免疫磁珠法纯化的目的蛋白纯度很高。Western blot 的实验结果表明,纯化的目的蛋白具有良好的免疫原性。本研究发现,免疫磁珠法在纯化蛋白方面确实具有纯化条件温和、步骤简单、快速以及纯化后蛋白能最大限度保持其免疫原性等诸多优点^[32]。当然,利用免疫磁珠法纯化蛋白,首先要摸索出结合到磁珠上抗体的最佳浓度和包被时间;再者,拟纯化蛋白的含量不能太低,否则纯化很可能不成功,此时,需要利用其他方法进行拟纯化蛋白的初步富集;最后,如果要利用免疫磁珠法大量制备纯化蛋白,代价还是有点偏高。

本研究在 BES 中成功表达了 CGSIV MCP 蛋白,并利用免疫磁珠法纯化了该蛋白,检测结果显示表达的目的蛋白具有良好的生物学活性,从

而为 CGSIV 新型亚单位疫苗的研制和病毒防控奠定了基础。

参考文献:

- [1] Dong W Z, Zhang X M, Yang C M, et al. Iridovirus infection in Chinese giant salamanders, China, 2010[J]. *Emerg Infect Dis*, 2011, 17(12): 2388–2389.
- [2] Jiang Y L, Zhang M, Jing H L, et al. Isolation and characterization of an iridovirus from sick giant salamander (*Andrias davidianus*)[J]. *Chinese Journal of Virology*, 2011, 27(3): 274–282. [江育林, 张旻, 景宏丽, 等. 患病中国大鲵中分离到一株虹彩病毒及其特性的研究[J]. *病毒学报*, 2011, 27(3): 274–282.]
- [3] Gao Z Y, Zeng L B, Xiao H B, et al. Studies on the physical, chemical and biological characteristics of giant salamander iridovirus[J]. *Freshwater Fisheries*, 2012, 42(5): 17–21. [高正勇, 曾令兵, 肖汉兵, 等. 大鲵虹彩病毒理化及生物学特性研究[J]. *淡水渔业*, 2012, 42(5): 17–21.]
- [4] Zhou X Y, Zhang X L, Ji H, et al. Morphology of Chinese giant salamander (*Andrias davidianus*) iridovirus and characterization of its inclusion bodies[J]. *Freshwater Fisheries*, 2015, 45(1): 62–66. [周小愿, 张星朗, 吉红, 等. 大鲵虹彩病毒的形态结构及其包涵体特征[J]. *淡水渔业*, 2015, 45(1): 62–66.]
- [5] Geng Y, Wang K Y, Li C W, et al. Pathological changes of cultured Chinese giant salamander (*Andrias davidianus*) naturally infected with ranavirus[J]. *Chinese Journal of Veterinary Science*, 2011, 31(11): 1640–1644. [耿毅, 汪开毓, 李成伟, 等. 养殖大鲵蛙病毒自然感染的病理形态学观察[J]. *中国兽医学报*, 2011, 31(11): 1640–1644.]
- [6] Zhou X Y, Jia Q H, Ji H, et al. Pathogeny of disease characterized by the cysts of lung and kidney of Chinese giant salamander (*Andrias davidianus*)[J]. *Progress in Veterinary Medicine*, 2014, 35(10): 47–51. [周小愿, 贾秋红, 吉红, 等. 大鲵肺肾囊肿的病原学研究[J]. *动物医学进展*, 2014, 35(10): 47–51.]
- [7] Chinchar V G, Yu K H, Jancovich J K. The molecular biology of frog virus 3 and other iridoviruses infecting cold-blooded vertebrates[J]. *Viruses*, 2011, 3(10): 1959–1985.
- [8] Tidona C A, Schnitzler P, Kehm R, et al. Is the major capsid protein of iridoviruses a suitable target for the study of viral evolution?[J]. *Virus Genes*, 1998, 16(1): 59–66.
- [9] Qin Q W, Shi C Y, Gin K Y H, et al. Antigenic characterization of a marine fish iridovirus from grouper, *Epinephelus* spp. [J]. *J Virol Methods*, 2002, 106(1): 89–96.
- [10] Li W, Zhang X, Weng S, et al. Virion-associated viral proteins of a Chinese giant salamander (*Andrias davidianus*) iridovirus (genus *Ranavirus*) and functional study of the major capsid protein (MCP)[J]. *Vet Microbiol*, 2014, 172(1–2): 129–139.
- [11] Liu H I, Chiou P P, Gong H Y, et al. Cloning of the major capsid protein (MCP) of grouper iridovirus of Taiwan (TGIV) and preliminary evaluation of a recombinant MCP vaccine against TGIV[J]. *Int J Mol Sci*, 2015, 16(12): 28647–28656.
- [12] Zhou Y, Zeng L B, Meng Y, et al. Establishment of a TaqMan real-time PCR assay for detecting the giant salamander iridovirus[J]. *Journal of Fisheries of China*, 32(5): 772–778. [周勇, 曾令兵, 孟彦, 等. 大鲵虹彩病毒 TaqMan 实时荧光定量 PCR 检测方法的建立[J]. *水产学报*, 2012, 32(5): 772–778.]
- [13] Meng Y, Zhang H, Liang H W, et al. Development of a loop-mediated isothermal amplification assay for rapid detection of iridovirus in Chinese giant salamander[J]. *J Virol Methods*, 2013, 194(1–2): 211–216.
- [14] Liu X X, Geng Y, Zhou Z Y, et al. Development of a nested PCR detection method for Chinese giant salamanders ranavirus[J]. *Chinese Journal of Veterinary Science*, 2014, 34(3): 406–410. [刘星星, 耿毅, 周赵英, 等. 大鲵蛙病毒巢氏 PCR 检测方法的建立[J]. *中国兽医学报*, 2014, 34(3): 406–410.]
- [15] Zhou X Y, Zhang X L, Jia Q H, et al. Prokaryotic expression and antiserum preparation for major antigenic epitope region of major capsid protein of Chinese giant salamander (*Andrias davidianus*) iridovirus[J]. *Chinese Journal of Cellular and Molecular Immunology*, 2016, 32(10): 1407–1411. [周小愿, 张星朗, 贾秋红, 等. 大鲵虹彩病毒 MCP 蛋白主要抗原表位区原核表达及抗血清制备[J]. *细胞与分子免疫学杂志*, 2016, 32(10): 1407–1411.]
- [16] Zhou X Y, Zhang X L, Jia Q H, et al. Preparation and preliminary application of a monoclonal antibody against MCP COE protein of Chinese giant salamander (*Andrias davidianus*) iridovirus[J]. *Journal of Fisheries of China*, 40(12): 1923–1930. [周小愿, 张星朗, 贾秋红, 等. 抗大鲵虹彩病毒 MCP COE 蛋白单克隆抗体的制备及初步应用[J]. *水产学报*, 2016, 40(12): 1923–1930.]
- [17] Zhou Y, Fan Y, LaPatra S E, et al. Protective immunity of a *Pichia pastoris* expressed recombinant iridovirus major capsid protein in the Chinese giant salamander, *Andrias davidianus*[J]. *Vaccine*, 2015, 33(42): 5662–5669.
- [18] Zeng X H, Zeng L B, Zhou Y, et al. Construction and immune efficacy of an MCP-containing DNA vaccine for Chinese giant salamander iridovirus[J]. *Journal of Fishery Sciences of China*, 2015, 22(5): 1055–1067. [曾宪辉, 曾令兵, 周勇, 等. 大鲵虹彩病毒主衣壳蛋白 MCP 基因 DNA 疫苗

- 的构建及其免疫效果[J]. 中国水产科学, 2015, 22(5): 1055–1067.]
- [19] Yu Y L. Retrospective consideration on development of baculovirus expression vector system and related vaccine research in passed thirty years[J]. Progress in Microbiology and Immunology, 2015, 43(4):1–15 [于永利. 昆虫杆状病毒表达载体系统与疫苗研制的 30 年回顾[J]. 微生物学免疫学进展, 2015, 43(4): 1–15.]
- [20] Philips B, Forstner M, Mayr L M. A baculovirus expression vector system for simultaneous protein expression in insect and mammalian cells[J]. Biotechnol Progr, 2005, 21(3): 708–711.
- [21] Xu D, Jiang C, Chen Y, et al. Expression, purification and immunogenicity analysis of recombinant MPB64 using baculovirus expression system[J]. Chinese Journal of Immunology, 2014, 30(7): 921–926. [徐丹, 姜潮, 陈昱, 等. MPB64 在杆状病毒系统中的表达纯化及免疫原性鉴定[J]. 中国免疫学杂志, 2014, 30(7): 921–926.]
- [22] Ding J Y, Zhang Z L, Sun L Y, et al. Optimization of condition for amplifying the baculovirus coding for HPV18 L1 and expressing the corresponding protein[J]. International Journal of Biologicals, 2009, 32(2): 68–70. [丁军颖, 张振龙, 孙丽媛, 等. 含编码人乳头瘤病毒 18 型 L1 蛋白基因的杆状病毒扩增及相应蛋白表达的条件优化[J]. 国际生物制品学杂志, 2009, 32(2): 68–70.]
- [23] Sample R, Bryan L, Long S, et al. Inhibition of iridovirus protein synthesis and virus replication by antisense morpholino oligonucleotides targeted to the major capsid protein, the 18 kDa immediate-early protein, and a viral homolog of RNA polymerase II[J]. Virology, 2007, 358(2): 311–320.
- [24] Lin H Y, Liou C J, Cheng Y H, et al. Development and application of a monoclonal antibody against grouper iridovirus (GIV) major capsid protein[J]. J Virol Methods, 2014, 205: 31–37.
- [25] Fu X, Li N, Lai Y, et al. Protective immunity against iridovirus disease in mandarin fish, induced by recombinant major capsid protein of infectious spleen and kidney necrosis virus[J]. Fish Shellfish Immun, 2012, 33(4): 880–885.
- [26] Seo J Y, Chung H J, Kim T J. Codon-optimized expression of fish iridovirus capsid protein in yeast and its application as an oral vaccine candidate[J]. J Fish Dis, 2013, 36(9): 763–768.
- [27] Sokolenko S, George S, Wagner A, et al. Co-expression vs. co-infection using baculovirus expression vectors in insect cell culture: benefits and drawbacks[J]. Biotechnol Adv, 2012, 30(3): 766–781.
- [28] Luo W, Tian F Y, Liu H, et al. A study on the biological character of capsid protein expressed in insect cells from fish viral nervous necrosis virus[J]. Journal of Fisheries of China, 2008, 32(4): 651–656. [罗卫, 田飞炎, 刘荭, 等. 鱼类神经坏死病毒衣壳蛋白在昆虫细胞中的表达及其特性[J]. 水产学报, 2008, 32(4): 651–656.]
- [29] Huang F T, Xiong H L, Cao S B, et al. Expression of channel catfish virus ORF6 gene in insect cells[J]. Journal of Fisheries of China, 2010, 34(7): 1034–1039. [黄锋涛, 熊海林, 曹胜波, 等. 斑点叉尾鮰囊膜蛋白 ORF6 在昆虫细胞中的表达[J]. 水产学报, 2010, 34(7): 1034–1039.]
- [30] Liu H, Zheng X C, Yu L, et al. Expression and identification of spring viremia of carp virus glycoprotein in baculovirus expression system[J]. China Animal Health Inspection, 2014, 31(6): 74–78. [刘红, 郑晓聪, 于力, 等. 鲤春病毒血症病毒糖蛋白在杆状病毒表达系统中的表达与鉴定[J]. 中国动物检疫, 2014, 31(6):74–78.]
- [31] Tani H, Limn C K, Yap C C, et al. In vitro and in vivo gene delivery by recombinant baculoviruses[J]. J Virol, 2003, 77(18): 9799–9808.
- [32] Hao H, Yan Q P, Zou W Z, et al. Purification of IgG from rabbit sera by immunomagnetic beads and protein A affinity chromatography[J]. Journal of Jimei University: Natural Science, 2011, 16(2): 87–91. [郝华, 鄢庆祺, 邹文政, 等. 比较免疫磁珠法与 A 蛋白亲和层析法纯化兔抗血清中的 IgG[J]. 集美大学学报: 自然科学版, 2011, 16(2): 87–91.]

Expression and purification of major capsid protein of chinese giant salamander (*Andrias davidianus*) iridovirus in baculovirus expression system

ZHANG Xinglang¹, GAO Zhi¹, YANG Pingwa², ZHOU Xiaoyuan¹, JIA Qihong¹, HAN Yahui¹, GAO Hongwei¹

1. Yellow River Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences, Xi'an 710086, China;

2. Fishery Workstation of Hui County, Longnan 742399, China

Abstract: This work was conducted to provide a useful basis for development of a new subunit vaccine against Chinese giant salamander iridovirus (CGSIV). In order to express major capsid protein (MCP) of CGSIV in baculovirus expression system, the gene of MCP was subcloned into baculovirus transfer vector (pFastBac1). The recombinant plasmid pFastBac-MCP was identified by restriction enzyme digestion and gene sequencing, and then transformed into *Escherichia coli* DH10Bac competent cells containing baculovirus shuttle vectors. After identification by blue/white selection, PCR analysis, and gene sequencing, a recombinant bacmid (rBacmid-MCP) was obtained. Thereafter, the recombinant bacmid was transfected into Sf9 cells with Insect GeneJuice[®] Transfection Reagent and recombinant baculoviruses were obtained in Sf9 cells, which could be observed by electron microscopy in the ultra-thin sections of infected Sf9 cells and were named AcNPV-MCP. The recombinant baculovirus infected Sf9 cells with different multiplicities of infection (MOI=2, 5, or 10) showed the highest production of recombinant protein of MCP. The result of SDS-PAGE analysis showed that the production of expressed MCP could be the highest with MOI=10. By immunofluorescence assay, the presence of MCP was observed on the surface of infected Sf9 cells. The recombinant protein of MCP was purified with the prepared immunomagnetic bead with monoclonal antibodies against CGSIV MCP and its bioactivity was verified by western blot assay with the rabbit antisera against CGSIV MCP. The results of SDS-PAGE and western-blotting assays indicated that the recombinant protein was highly purified and had good immunogenicity, which could specifically react with the rabbit antisera. In conclusion, the recombinant protein of CGSIV MCP was successfully expressed in baculovirus expression system and purified with the immunomagnetic bead assay, which laid a solid foundation for the development of a new subunit CGSIV vaccine in the future.

Key words: Chinese giant salamander iridovirus; major capsid protein; baculovirus expression system; protein purification

Corresponding author: ZHOU Xiaoyuan. E-mail: zhouxy_2005@163.com