

兔出血症病毒 VP60 蛋白研究进展

申识川¹ 王文芳² 张玉红³

1.河南省濮阳市检验检疫服务中心,河南濮阳 457000;2.河南省濮阳市河道管理处,河南濮阳 457000;3.河南省濮阳市动物疫病预防控制中心,河南濮阳 457000

摘要 兔出血症是由兔出血症病毒引起的一种发病率高、致死率高的烈性传染病,以肝坏死和肺出血为典型组织病变。兔出血症病毒 VP60 蛋白是该病毒主要的结构蛋白和免疫原性蛋白,能够诱导机体发生免疫应答,产生保护性抗体,因此关于该蛋白的结构、表达及功能是研究该病毒的一个重要内容。本文综述了国内学者近几年关于 VP60 蛋白的基因、表达和变异研究进展情况,希望能为兔出血症病毒研究提供参考。

关键词 兔出血症病毒;VP60 蛋白;研究进展

兔病毒性出血症俗称“兔瘟”、兔出血热,是家兔及野兔的一种烈性、高致死性传染病,由兔出血症病毒(rabbit hemorrhagic disease virus,RHDV)引起,主要临床症状表现为呼吸系统出血、肝坏死及实质脏器水肿、淤血及出血性病变,以接触传播为主要传播方式。该病发病急、发病率和病死率较高,被我国兽医卫生行政部门列为必须检疫的二类传染病。

1 兔出血症病毒概述

兔出血症病毒在病毒学分类上属杯状病毒科兔病毒属成员,表面无囊膜,直径约 40 nm,核衣壳呈 20 面体对称,和其他病毒结构一样,由病毒基因组和 180 个衣壳蛋白亚单位聚合而成^[1]。病毒基因组为单股正链 RNA,整个基因组包括 7 437 个核苷酸碱基,基因组 5'末端没有帽子结构,3'末端有一个短的多聚腺嘌呤尾,编码 2 个开放阅读框 ORF1 和 ORF2,分别编码结构蛋白和非结构蛋白。RHDV 包括有血凝性和无血凝性 2 种,目前在我国这 2 种毒株均存在。

2 VP60 蛋白基因及结构

VP60 蛋白基因属于第 1 个开放阅读框的一部

分,第 1 个开放阅读框位于病毒基因组 5'的末端,从第 10 个核苷酸碱基开始延伸至第 7 041 个核苷酸碱基,编码 1 个多聚蛋白前体,其中 VP60 基因全长包括 1 740 个核苷酸碱基。

研究表明,RHDV 的 VP60 蛋白由多聚蛋白前体经蛋白酶裂解而成,包括 579 个氨基酸,分子质量为 60 ku,故名 VP60 蛋白^[2],其结构主要分为 3 个区域,NTA(氨基端 1~65aa)、S 区(66~229aa)和 P 区(238~579aa),第 230~237aa 是 S 区和 P 区连接处存在的一段短的铰链区。P 区主要由 P1 亚区和 P2 亚区组成,P2 亚区位于 RHDV 衣壳蛋白表面,含有病毒株特异性抗原表位和红细胞结合位点^[3]。

3 VP60 蛋白表达

VP60 蛋白是机体主要保护性抗原,为了进一步搞清楚 VP60 蛋白的结构和功能,目前国内学者构建了多个 VP60 蛋白表达系统,主要包括原核表达系统和真核表达系统。

3.1 原核表达系统

原核表达系统应用时间较长,技术成熟,表达量高、周期短,是早期研究 VP60 蛋白的首选,也是应用最广的表达系统。

安凯等^[4]克隆了 RHDV GS/YZ 株的 VP60 截短

基因,构建了原核表达质粒 pET-RHDV-VP60,转化大肠杆菌后表达出了 VP60 聚合蛋白。将表达产物纯化后免疫 Balb/C 小鼠制备多抗,然后应用间接 ELISA 和免疫印迹试验对重组蛋白的免疫原性进行分析。结果表明 GS/YZ 株 VP60 截短基因在大肠杆菌中成功表达,表达产物分子质量约 50 ku,其多抗效价为 1:32 000;免疫印迹试验证明表达产物具有很好的免疫原性;免疫重组蛋白后的易感兔在攻毒后全部存活,与传统灭活疫苗具有同样的保护效果,为研发亚单位疫苗提供了借鉴。

熊梅等^[9]利用扩增 RHDV 的 VP60 全长基因,构建了重组表达质粒 pGEX-VP60,转化大肠杆菌 BL21,成功表达重组蛋白,后续的免疫印迹试验表明表达的病毒蛋白具有与 VP60 单抗良好的反应原性。利用纯化后的 VP60 蛋白与兔的肝脏细胞膜蛋白进行 pull-down 实验,分析出与 RHDV VP60 蛋白相互作用的兔肝脏细胞膜蛋白为 ATP 合成酶 β 亚基,说明 ATP 合成酶 β 亚基可能与 RHDV 的感染有关。

李传山等^[6]应用利用原核表达载体 pET32a 构建成功了 RHDV 西北分离株 VP60 蛋白的重组表达质粒,诱导大肠杆菌 BL21 表达后,经聚丙烯酰胺凝胶电泳检测,VP60 蛋白成功表达,重组蛋白分子质量约为 75ku。随后的免疫印迹试验证明,原核表达的 VP60 蛋白具有免疫原性。该研究进一步表明兔出血症病毒在我国西北干旱半干旱的自然条件下其遗传变异和免疫学特征没有较大变化。

3.2 真核表达系统

张帅等^[7]运用分子克隆技术,使用 Hr1、Hr3、WPRE、SV40、CAG、Melt 等顺式作用元件及元件组合对 pFastBacDual 供体质粒进行改造后转染 sf9 细胞,成功提高了兔出血症病毒衣壳蛋白 VP60 在 Bac-to-Bac 系统的表达量。经免疫鉴定,表达的重组 VP60 蛋白既能够和 VP60 单抗发生反应,也能和 RHDV 多抗血清发生反应,具有良好的反应原性。

原冬伟等^[8]、张夏兰^[9]分别将 RHDV TP 株、Yaan 株的 VP60 基因扩增,插入到真核表达载体 pcDNA3.1(+),成功构建真核表达质粒 pcDNA-VP60,转染 RK13 细胞和 Vero 细胞后都表达出了 VP60 蛋白。随后他们又用重组质粒分别免疫了小鼠和 1 月龄试验兔。动物试验表明,重组质粒能够诱导动物机体产生保护性抗体。

陈柳等^[10]利用杆状病毒表达系统对 RHDV VP60 蛋白的表达和细胞定位进行了研究。研究结果表明,VP60 蛋白能在 sf9 昆虫细胞中正确表达,能自组装形成病毒样颗粒;表达的 VP60 蛋白定位于 sf9 细胞的细胞膜上,VP60 蛋白可能有助于 RHDV 感染并入侵宿主细胞。

4 VP60 变异研究

向华等^[11]、田浪等^[12]克隆出了国内 RHDV 不同分离株的 VP60 基因,与 GenBank 上的其他毒株进行了比较,他们的研究表明,VP60 基因序列全长都是 1 740 bp,都是编码 579 个氨基酸,各毒株核苷酸序列同源性在 90.0%到 98.0%之间,氨基酸同源性在 94.1%到 99.0%之间,强毒株间的氨基酸同源性为 95%~100%,氨基酸变异多发生于 C、E 区,且氨基酸变异没有引起 VP60 蛋白高级结构的根本性变化。

陈铭等^[13]应用 RT-PCR 方法克隆出了 RHDV 荣昌分离株的 VP60 主要抗原表位基因序列,测序后,与 RHDV 其他 16 株的主要抗原表位序列进行了比较分析,研究表明 RHDV 荣昌分离株的主要抗原表位基因大小为 506 bp,与其他 16 株的核苷酸序列同源性较高,推导的氨基酸同源性可达 80%。

5 展 望

VP60 蛋白是 RHDV 的结构蛋白,在感染宿主和诱导机体免疫应答过程中起着重要的作用,是国内外研究 RHDV 的一个热点和重要内容,除了原核表达和真核表达之外,也有学者尝试在马铃薯中表达该蛋白。随着生命科学技术和研究手段的更新,关于 VP60 蛋白的结构、在感染宿主中的作用和刺激机体产生保护性抗体的机理将会更清楚,也会促进学者研发出更有效的 RHDV 疫苗和诊断试剂,更有助于 RHDV 的防控和治疗,降低养兔业的损失,保障我国养兔业健康发展。

参 考 文 献

- [1] 殷震,刘景华.动物病毒学[M].2版.北京:科学出版社,1997:525-529.
- [2] 张玉颖,刘光清,吴润.兔出血症病毒分子生物学研究进展[J].动物医学进展,2006,27(3):9-11.
- [3] 宋艳华,李珊珊,王芳,等.VP60 Loop 区的突变对 RHDV VLP