

DOI:10.13350/j.cjpb.190503

• 论著 •

水痘—带状疱疹病毒糖蛋白 gE 在昆虫细胞中的表达鉴定及其晶体培养*

姚巧缤¹, 李婷婷¹, 荣芮¹, 张玉云², 李泽凯², 薛文辉¹, 李瑾瑾², 朱瑞², 程通^{1,2}, 顾颖^{1,2}, 夏宁邵^{1,2}, 李少伟^{1,2**}

(1. 厦门大学生命科学学院, 国家传染病诊断试剂与疫苗工程技术研究中心, 福建厦门 361102; 2. 厦门大学公共卫生学院, 分子疫苗学与分子诊断学国家重点实验室)

【摘要】 目的 利用杆状病毒—昆虫表达系统建立纯化水痘带状疱疹病毒(VZV)包膜糖蛋白 gE 的方法, 筛选 gE 蛋白的晶体培养条件, 以期用于结构解析。方法 将 VZV 糖蛋白 gE 基因序列克隆至杆状表达载体 pAcgp67B 载体中, 利用 High FiveTM 昆虫细胞表达 gE 蛋白并进行 TALON 亲和层析纯化; 利用 WAVE 生物波浪反应器建立含硒代甲硫氨酸的 gE 蛋白方法, 以便在晶体结构解析中利用单波长或多波长异常散射进行相位解析; 通过分子排阻色谱、分析超离、差示扫描量热法和酶联免疫吸附试验等分析 gE 蛋白的理化性质; 利用结晶试剂盒对 gE498 和 gE354 蛋白的结晶条件进行初筛。结果 获得的 gE498 和 gE354 蛋白纯度约为 90%、产量为 8~10 mg/L。理化分析显示两种 gE 蛋白在溶液中主要以均一稳定的单体形式存在, 并呈现出良好的反应原性。在 gE354 晶体初筛中获得 3 个结晶条件: CrystalH3、PEGH12 和 IndexB10。结论 建立了 VZV 糖蛋白 gE 表达和纯化方法, 制备的蛋白纯度高, 且具有反应原性, 并筛选出 CrystalH3、PEGH12 和 IndexB10 这 3 个结晶条件, 为 gE 糖蛋白的结构与功能研究及新型疫苗开发奠定了基础。

【关键词】 水痘—带状疱疹病毒; 糖蛋白 gE; 杆状病毒—昆虫表达系统; 晶体培养; 硒代甲硫氨酸

【中图分类号】 R373.12

【文献标识码】 A

【文章编号】 1673-5234(2019)05-0505-06

[*Journal of Pathogen Biology*. 2019 May; 14(5): 505–510.]

Characterization and crystallization of glycoprotein gE from varicella-zoster virus expressed in insect cells

YAO Qiao-bin¹, LI Ting-ting¹, RONG Rui¹, ZHANG Yu-yun², LI Ze-kai², XUE Wen-hui¹, LI Jin-jin², ZHU Rui², CHENG Tong^{1,2}, GU Ying^{1,2}, XIA Ning-shao^{1,2}, LI Shao-wei^{1,2} (1. *National Institute of Diagnostics and Vaccine Development for Infectious Diseases, School of Life Sciences, Xiamen University, Xiamen 361102, Fujian, China*; 2. *State Key Laboratory of Molecular Vaccinology and Molecular Diagnostics, School of Public Health, Xiamen University*)

【Abstract】 Objective To express and purify the envelope glycoprotein gE of varicella-zoster virus (VZV) in a baculovirus-infected insect cell expression system and to then screen the conditions for crystal growth. **Methods** The gene encoding the VZV gE protein was cloned into a pAcgp67B vector to generate a recombinant baculovirus. The protein of interest was expressed in High FiveTM cells and purified using TALON affinity chromatography. The WAVETM bioreactor was used to prepare the gE protein on a large scale with Se-Met labelling for single-wavelength anomalous diffraction (SAD) of multiple-wavelength anomalous diffraction (MAD) phasing in the future. Size-exclusion chromatography, analytical ultracentrifugation, differential scanning calorimeter, and ELISA were performed to characterize the physical and chemical properties of gE498 and gE354 proteins. The two gE proteins were subjected to crystallization screening. **Results** Two types of gE proteins were generated in insect cells with a purity of over 90% and a yield of about 8–10 mg/L. In solution, the two recombinant proteins gE498 and gE354 indicated the presence of homogeneous species, and they had good reactivity against neutralizing antibodies. Three conditions for crystallization of gE354 were obtained in preliminary crystallization screening: CrystalH3, PEGH12, and IndexB10. **Conclusion** A robust approach was devised to express VZV gE proteins in insect cells, providing highly purified gE protein for crystallization that displayed excellent reactivity with neutralizing antibodies. Several preliminary crystallization conditions were obtained for further optimization of crystal growth, i. e. CrystalH3, PEGH12, and IndexB10. These results pave the way to investigate the structure and function of gE and to develop a VZV vaccine based on an insect cell expression system.

【Key words】 varicella-zoster virus; glycoprotein gE; baculovirus expression system; crystallization; antigenicity

* **【基金项目】** 国家自然科学基金项目(No. 81871648); 新药创制专项项目(No. 2018ZX09711003-005)。

** **【通讯作者】** 李少伟, E-mail: shaowei@xmu.edu.cn

【作者简介】 姚巧缤(1994—), 女, 硕士研究生, 主要从事 HPV 及 VZV 相关研究。E-mail: yaoqb810@nenu.edu.cn

色后用酶标仪于 450 nm 和 630 nm 双波长下读取反应值。使用 GraphPad Prism 软件(GraphPad software, Inc.)作图。

2.2.2 Western blot 分析 纯化的两种 gE 蛋白经 12% 的 SDS-PAGE 电泳后转膜进行 Western blot 检测。一抗为 1B11, 二抗为碱性磷酸酶标记羊抗鼠 IgG (1:1 000 稀释; Chemicon International 产品), 显色剂为硝基蓝四氮唑和 5-溴-4-氯-3-吡啶磷酸酯 (Bio-Rad Laboratories 产品)。VZV gE 蛋白在溶液中的均一性检测是利用高效液相色谱分子筛排阻实现 (HPSEC) 的。本实验所用的层析柱型号为 TSK-Gel PW5000, 规格为 17.8 mm×300 mm。以 0.5 ml/min 的流速将待检测样品通过层析介质, 并记录样品中各组分的吸收峰情况。

2.2.3 分析超离(AUC)测定 将纯化后的 VZV gE 蛋白稀释至 0.8 mg/ml, 选用装配 An60-Ti 转头和吸收光学检测装置的分析超离仪器 Beckman XL-A 以 30 000 r/min (离心半径 7.13 cm) 进行离心分析, 收集到的数据依照 $c(s)$ 的方法和 Sedifit 软件 (由美国 NIH 的 Dr. P. Schuck 提供) 进行处理, 结果展示采用 Origin 7.0 软件 (OriginLab Corporation) 分析。

2.2.4 热分析 采用差示扫描量热法 (DSC) 确定 VZV gE 蛋白由加热引起的蛋白质展开过程的能量变换, 获得蛋白热稳定性数据 T_m 值。MicroCal VP-DSC 仪为 (美国 GE Healthcare 公司生产)。所有样品

均稀释至 1 mg/ml, 按文献 [11] 的方法进行测量。

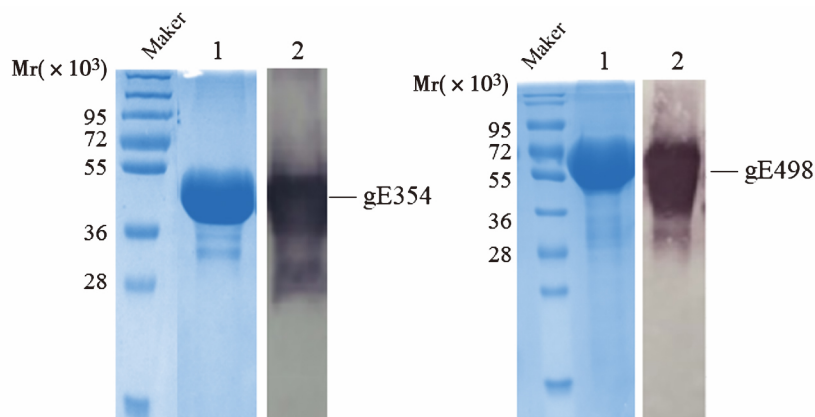
2.3 WAVE 表达硒代甲硫氨酸 gE 蛋白 在细胞培养过程中, 利用 WAVE 仪 (WAVE 25, GE Healthcare 公司生产) 进行换液, 用 Grace's 昆虫培养基 (Invitrogen) 取代 SF900-II SFM 培养基 (Invitrogen)。然后加入 50 mg/L L-(+)-Se-Met (Acros)。细胞继续培养 48 h, 收集培养上清, 进行蛋白纯化。

2.4 晶体筛选 取 96 孔晶体培养板, 每孔加入 0.1 ml 沉淀剂-缓冲液溶液。再在每个晶桥的中央加 1 μ l gE 蛋白质溶液及 1 μ l 沉淀剂-缓冲液溶液, 然后用透明封板膜密封。将晶体培养板静置于密闭的 20 $^{\circ}$ C 恒温箱内进行温育, 观察晶体形成情况, 确定晶体形成条件。试验所用试剂盒购自美国 Hampton Research 公司。

结果

1 VZV gE 蛋白的制备

重组状病毒 (P3) 感染昆虫细胞 High FiveTM, 收集培养上清, 经超滤透析后进行亲和层析纯化, 纯化的 gE498 和 gE354 蛋白进行 SDS-PAGE 和 WB 分析, 结果见图 1。纯化的两种目的蛋白纯度均达 90%, 变性后的蛋白相对分子质量分别约为 43×10^3 (gE354) 和 56×10^3 (gE498), 与相应氨基酸数所对应的理论分子质量相当。平均每批次纯化后 gE 蛋白产量为每升培养基 8~10 mg。



A M 标准品蛋白分子质量 1 gE 354 蛋白 2 gE 354 与 1B11 反应条带 B M 标准品蛋白分子质量 1 gE 498 蛋白 2 gE498 与 1B11 反应条带

图 1 VZV gE 蛋白 10% SDS-PAGE 和 Western blot 分析

A M Molecular weight standard 1 gE354 protein 2 Western blotting of gE354 using 1B11 antibody B M Molecular weight standard 1 gE498 protein 2 Western blotting of gE498 using 1B11

Fig. 1 SDS-PAGE and Western blotting analysis of VZV gE protein

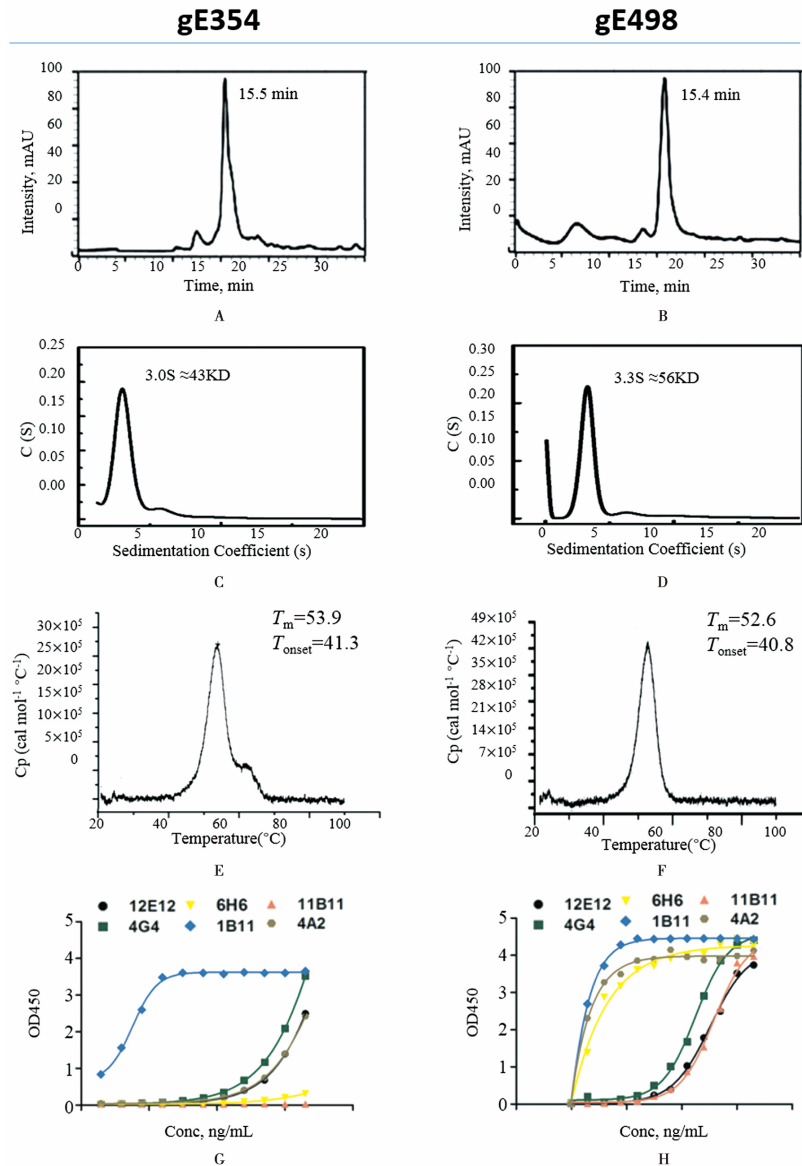
2 VZV gE 蛋白的理化性质鉴定

分别采用高效液相色谱、分析超离、差示扫描量热法和 ELISA 法检测 VZV gE 蛋白理化性质, 结果见图 2。分析超离 (AUC) 和高效液相色谱 (HPSEC) 结果显示, VZV gE 蛋白在溶液中的组分较为均一, 两种

蛋白的沉降系数分别为 3.0 S (gE354) 和 3.3 S (gE498), 对应的拟合分子质量分别为 43×10^3 (gE354) 和 56×10^3 (gE498)。差示扫描量热法 (DSC) 检测, 两种蛋白的 T_m 值 [12] 分别为 53.9 $^{\circ}$ C (gE354) 和 52.6 $^{\circ}$ C (gE498), 蛋白变性起始温度 (Tonset) 分别为

41.3 °C (gE354) 和 40.8 °C (gE498)。在一定程度上证明适当截短将提高 VZV gE 蛋白的热变性温度。ELISA 检测显示, gE498 蛋白和 gE354 蛋白与特异性单抗 1B11、4G4 以及 12E12 均具有良好的反应活性。其中特异性单抗 11B11^[13]、6H6 和 4A2 均与 gE498

蛋白反应活性较强, 与 gE354 反应活性较弱。表明重组 VZV gE498 和 gE354 蛋白在溶液中主要以均一稳定的单体形式存在, 并呈现出良好的反应原性。gE354 与 gE498 相比, 热稳定性相对更高。



A gE354 蛋白的分子筛色谱分析 B gE498 蛋白的分子筛色谱分析 C gE354 蛋白的沉降系数和表观分子量测定 D gE498 蛋白的沉降系数和表观分子量测定 E gE354 蛋白的热稳定性分析 F gE498 蛋白的热稳定性分析 G gE354 蛋白与抗体的反应性 H gE498 蛋白与抗体的反应性

图 2 VZV gE 蛋白的理化性质分析

A HPSEC analysis of gE354 B HPSEC analysis of gE498 C Sedimentation velocity analysis of gE354 D Sedimentation velocity analysis of gE498 E The thermal stability analysis of gE354 F The thermal stability analysis of gE498 G Antigenicity analysis of gE354 H Antigenicity analysis of gE498

Fig. 2 Characterization of VZV gE protein

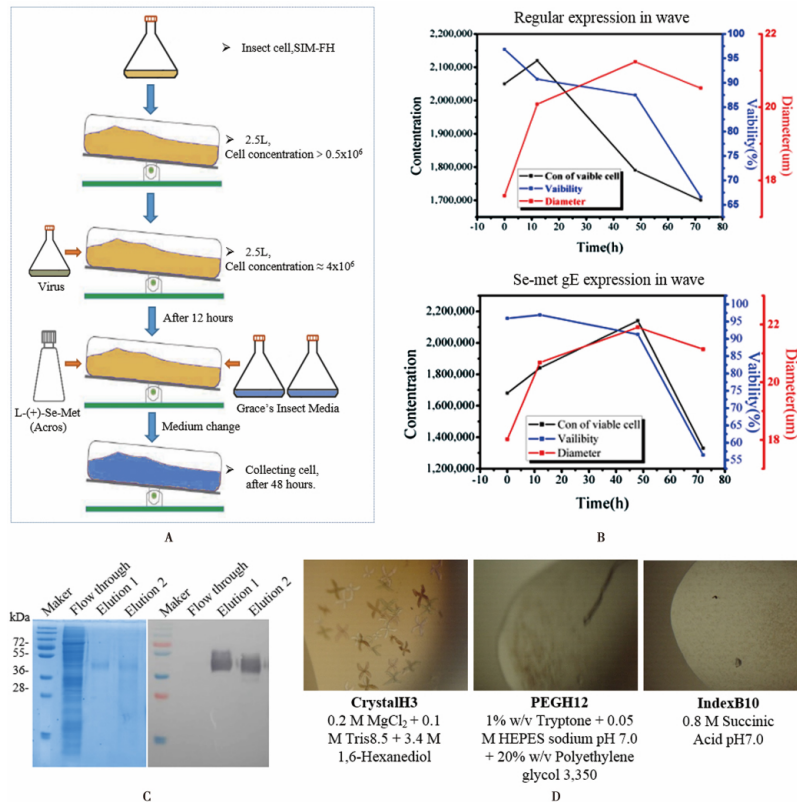
3 硒代甲硫氨酸 gE 蛋白的表达鉴定及 gE 蛋白的晶体筛选

PDB 上无其同源结构, 若通过 X-射线晶体衍射的方法解析 gE 结构, 除需获得 gE 的晶体, 还需利用 gE 同源或同晶的结构以作分子置换进行 gE 的结构解

析。本研究从多波长反常散射 (MAD) 的方法来解析 gE 结构, 通过在昆虫细胞中表达硒代甲硫氨酸的 gE 蛋白, 获得同晶的结构。利用 WAVE 表达工具进行一步培养基的置换, 并表达出硒代甲硫氨酸的 gE 蛋白 (图 3A)。在表达过程中对细胞的状态进行监测, 并

与 WAVE 中其他正常表达的细胞进行对比,同时检测细胞总数,活率及细胞直径大小,以确保表达硒代甲硫氨酸 gE 蛋白的病毒感染和细胞表达正常(图 3B)。硒代组表达均能出现病毒感染后直径变大现象,加入

硒代培养基后,细胞活率未出现异常。利用亲和层析法对硒代甲硫氨酸 gE 蛋白进行纯化。经 SDS 和 Western blot 检测,获得的蛋白纯度高,具有反应原性(图 3C)。



A 利用 WAVE 表达硒代甲硫氨酸 gE 蛋白的流程图 B 正常蛋白表达曲线和硒代甲硫氨酸蛋白表达曲线 C 硒代甲硫氨酸 gE 蛋白 SDS-PAGE 和 Western blot 分析(一抗为 1B11) D 晶体初步形态图

图 3 硒代表达及晶体筛选

A The flow diagram of SE-MET gE protein expression process by WAVE B Normal insect cell expression and SE-MET gE protein expression C SDS-PAGE and WB analysis of SE-MET gE protein (detecting antibody is 1B11) D Preliminary crystal morphology

Fig. 3 Se-Met gE expression and crystallization conditions of gE354

对 gE498 和 gE354 及硒代甲硫氨酸的 gE354 蛋白进行坐滴法晶体筛选,样品浓缩至 8.5 mg/ml,用结晶试剂盒对其结晶条件进行初步筛选,共尝试约 800~1 000 个条件。样品点样后观察,gE354 在 CrystalH3(0.2 mol/L MgCl₂, 0.1 mol/L Tris 8.5, 3.4 mol/L 1,6-Hexanediol)、PEGH12(1% Tryptone, 0.05 mol/L HEPES sodium, 20% Polyethylene glycol 3350)和 IndexB10(0.8 mol/L Succinic Acid, pH 7.0)3 个筛选条件下形成了初步的晶体,晶体形态见图 3D。其中 CrystalH3 条件下形成的晶型类似蝴蝶型,PEGH12 条件下形成棒状晶体,IndexB10 条件下形成块状晶体,晶型较好,近似单晶。而 gE498 和硒代 gE354 在此条件下未形成结晶。

讨论

gE 是 VZV 表面表达的糖蛋白,是 VZV 特异性抗体和 T 细胞反应的主要目标。针对 gE 的特异性带

状疱疹疫苗现已在美国上市(Shingrix, GSK)。gE 被选为疫苗抗原,是基于其在病毒复制和细胞转移中起到的作用:能促进病毒传播及皮肤损伤的发生和加重。不仅如此,gE 还在受感染细胞中被检出,可能参与带状疱疹(HZ)的重新激活与发作过程。Shingrix 疫苗(GSK)是在中国仓鼠卵巢细胞系(CHO)中产生的。CHO 细胞表达系统是真核细胞表达系统中备受瞩目的系统之一,其具有准确的转录后修饰功能、重组基因的高效扩增和表达能力,以及产物胞外分泌功能等。杆状病毒表达系统也是真核表达系统之一,具有培养、操作简便,花费较少,且可进行无血清悬浮培养等特点^[13]。目前利用杆状病毒表达系统进行抗原生产的两种商品化人用疫苗 Cervarix[®], GSK 和 Flublok[®], Protein Sciences Corporation 均呈现出良好的安全性。本研究利用杆状病毒表达系统表达了截短的 gE498(aa23-520)和 gE354(aa167-520),并证明均具有较好的反应原性。为利用杆状系统生产 VZV 病毒

的 gE 疫苗候选提供了实验基础^[2, 14], 也为我国自主研发新型水痘带状疱疹疫苗提供了理论依据。

由于 gE 在病毒复制和细胞转移中所起的重要作用, 针对 gE 的研究多集中于功能机制方面, 而解析 gE 的结构, 能够促进对 VZV 病毒感染模型及入胞机制的研究。此外, 鉴于 gE 蛋白在水痘-带状疱疹病毒重组疫苗中的应用情况, 明确 gE 蛋白中和表位的结构表征对新型表位疫苗的研发具有指导作用。近年来, 越来越多的由杆状病毒表达系统表达的重组蛋白被应用到蛋白的结构解析中, 杆状病毒表达系统在蛋白结构学研究中具有巨大潜力^[15]。本研究利用杆状病毒表达系统表达了 gE498、gE354 蛋白及硒代甲硫氨酸(Se-Met)的 gE354 蛋白, 并进行了初步的晶体培养摸索, 为 gE 蛋白的解析奠定了基础。硒代甲硫氨酸(Se-Met)的蛋白表达过程中需要进行培养基更换, 本研究利用 WAVE 仪器进行培养基的更换, 并在表达过程中对细胞的状态进行监测, 成功建立了昆虫细胞硒代表达的方法, 此方法也可尝试用于其他真核蛋白的硒代表达。

本研究在晶体形成条件筛选的过程中, 观察到了初步的 gE 晶体, 但由于蛋白晶体的形成是一个极其复杂的物理化学过程, 可能受某些因素影响, 目前尚未获得具备衍射条件的晶体。虽然蛋白质晶体的形成过程十分复杂, 但控制蛋白质晶体形成的具体参数并进行优化, 将对获得高质量蛋白质晶体, 进而得到高精度晶体结构起到重要作用。目前蛋白质优化技术包括: 温控技术、汽相扩散技术(调节沉淀剂浓度、水扩散速率控制法)、凝胶技术、微重力法, 甚至还包括热力学和动力学行为分析后确定相关参数再进行过程模拟优化的方法等^[16-17]。这些优化的方法已经取得了一定的效果, 但部分方法在推广及实现自动化方面还不够成熟^[17]。尝试用不同的方法对 gE 蛋白的结晶条件进行优化, 有望得到 gE 蛋白高精度的三维晶体结构, 为促进 gE 感染机制及中和表位研究、新型疫苗设计奠定基础。

【参考文献】

[1] Liu J, Ye X, Jia J, et al. Serological evaluation of immunity to the varicella-zoster virus based on a novel competitive enzyme-linked immunosorbent assay[J]. *Sci Rep*, 2016(6): 20577.
[2] Sawanyawisuth K, Phuttharak W, Tiamkao S, et al. MRI findings in acute disseminated encephalomyelitis following varicella in-

fection in an adult[J]. *J Clin Neurosci*, 2007, 14(12): 1230-3.
[3] Jain J, Thatte S, Singhai P. Periorbital varicella gangrenosa: A rare complication of chicken pox[J]. *Oman J Ophthalmol*, 2015, 8(1): 64-6.
[4] Bertrand B, Romain L, Patrick A, et al. Varicella-zoster virus acute myelitis in a patient with MS treated withnatalizumab[J]. *Neurology*, 2013, 81(26):1966-7.
[5] Takeshita J, Nomura E, Takemaru M, et al. Rapidly deteriorated lobar intracerebral hemorrhages; possible association of varicella zoster virus-vasculopathy[J]. *Clin Neurol*, 2018, 58(4):245-8.
[6] Kate EA, Philip LT, Kristine M, et al. Live zoster vaccination in an immunocompromised patient leading to death secondary to disseminated varicella zoster virus infection[J]. *Vaccine*, 2018, 36(27): 3890-3.
[7] 李春明, 朱晓文, 赫宝双, 等. 水痘一带状疱疹病毒糖蛋白 E 胞外区的真核表达及鉴定[J]. *中国生物制品学杂志*, 2016, 29(11): 1159-61, 1168.
[8] Dooling KL, Guo A, Patel M, et al. Recommendations of the advisory committee on immunization practices for use of herpes zoster vaccines[J]. *Morbidity Mortality Weekly Rep*, 2018, 67(3): 103-8.
[9] Oliver SL, Yang E, Arvin AM. Varicella-Zoster virus glycoproteins: entry, replication, and pathogenesis[J]. *Current Clinical Microbiol Rep*, 2016, 3(4): 204-215.
[10] Zhu R, Liu J, Chen C, et al. A highly conserved epitope-vaccine candidate against varicella-zoster virus induces neutralizing antibodies in mice[J]. *Vaccine*, 2016, 34(13):1586-89.
[11] Zhang X, Wei M, Pan H, et al. Robust manufacturing and comprehensive characterization of recombinant hepatitis E virus-like particles in Hecolin[J]. *Vaccine*, 2014, 32:4039-50.
[12] Deller MC, Kong L, Rupp B. Protein stability: a crystallographer's perspective[J]. *Acta Crystallographica Section F: Struct Biol Commun*, 2016, 72(2): 72-95.
[13] Marin M, Meissner HC, Seward JF. Varicella prevention in the United States: a review of successes and challenges[J]. *Pediatrics*, 2008, 122(3):e744-5.
[14] Vazquez M, LaRussa PS, Gershon AA, et al. The effectiveness of the varicella vaccine in clinical practice[J]. *N Engl J Med*, 2001, 344(13): 955-60.
[15] Somasundaram B, Chang C, Fan YY, et al. Characterizing Enterovirus 71 and Coxsackievirus A16 virus-like particles production in insect cells[J]. *Methods*, 2016,(95): 38-45.
[16] 舒占永, 毕汝昌. 蛋白质晶体的优化生长[J]. *生物化学与生物物理进展*, 1997,(5): 396-401.
[17] 刘晶晶. 蛋白质结晶过程的模拟优化和实验研究[D]. 青岛: 中国海洋大学, 2010.

【收稿日期】 2019-01-25 【修回日期】 2019-03-22