

## 口蹄疫病毒多基因重组质粒在 BHK-21 细胞中的表达

郭慧琛 刘在新 孙世琪 卢增军 周广清 祁淑云 靳野 刘湘涛 谢庆阁\*

(中国农科院兰州兽医研究所 农业部畜禽重点实验室,兰州 730046)

**摘要** 利用定点突变的原理,获得包含有口蹄疫病毒 P1 2A 3C 及部分 2B 编码区的目的基因片段,经 *Kpn* I 和 *Xba* I 双酶切后,定向克隆于真核表达质粒载体 pcDNA3.1(+),经筛选、鉴定及 DNA 序列分析后,将重组质粒 pcDNA3.1/P12X3C 转染 BHK-21 细胞,通过双抗体夹心 ELISA 方法和间接免疫荧光标记方法,检测细胞中表达的口蹄疫病毒抗原。结果表明,口蹄疫病毒基因片段正确克隆到真核表达质粒载体上,重组质粒 pcDNA3.1/P12X3C 可在 BHK-21 细胞中表达 FMDV 目的蛋白。

**关键词** 口蹄疫病毒,真核表达质粒,BHK-21

中图分类号 Q786 文献标识码 A 文章编号 1000-3061(2003)03-0376-04

口蹄疫(Foot-and-mouth disease, FMD)是偶蹄动物共患的一种急性、烈性、接触性传染病,该病的爆发流行给畜牧业生产及人民生活造成极大损失。尽管目前普遍应用的口蹄疫灭活苗对于该病的防治是有效的,但其在制作过程和实际应用中还存在不足之处,因此,世界各国的相关研究室都在致力于研制安全、有效的新型口蹄疫疫苗。

在口蹄疫病毒(Foot-and-mouth disease virus, FMDV)感染细胞中,由病毒基因组 RNA 编码合成的多聚蛋白,首先在病毒蛋白酶的作用下,裂解为 4 个原始的裂解产物,即前导蛋白(L)、P1-2A、P2 和 P3<sup>[1]</sup>。P1-2A 氨基末端对于衣壳的正确组装是必须的<sup>[2,3]</sup>。随后,病毒蛋白酶 3C 将结构蛋白前体 P1-2A 裂解为衣壳蛋白 VP0、VP3、VP1 及非结构蛋白 2A<sup>[1]</sup>。衣壳的组装伴随着其他结构的形成,包括 VP0、VP3、VP1 五聚物的形成及无病毒 RNA 的空衣壳的形成。非感染性病毒前体包含 RNA、VP0、VP1 和 VP3,随后 VP0 裂解为 VP4 和 VP2,从而使病毒前体成为成熟的病毒粒子<sup>[4]</sup>。

基因免疫方法避免了传统疫苗的安全隐患,而且基因疫苗在细胞内的蛋白表达、合成、加工、递呈等过程与自然病毒很相似,因此,基因疫苗能同时刺激产生体液免疫和细胞免疫,这也是近年来基因疫苗成为疫苗研究领域中的一大热点的原因。

本文利用 FMDV 衣壳蛋白的免疫学特点及基因疫苗的免疫优势,构建包含 FMDV P1 2A 3C 及部分 2B 编码区的真核表达质粒,并检测其在真核细胞中的蛋白表达,这将为口蹄疫 DNA 疫苗的研究提供实验依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 主要材料

pGEM/P12X3C 质粒由本室构建, JM109、BHK-21、口蹄疫兔阴性血清、口蹄疫豚鼠阳性血清均由本室保存, pcDNA3.1(+), Lipofectamine Plus<sup>TM</sup> Reagent 购自 Invitrogen 公司, 工具酶为 Promega 公司产品, FITC-羊抗兔 IgG、HRP-兔抗豚鼠 IgG 为 Sigma 公司产品。

### 1.2 引物的设计和合成

根据 FMDV 毒株 Akesu/58, China/99 株的序列<sup>[5]</sup>及定点突变的原理<sup>[6]</sup>设计了 3 对引物,分别为 A(上游) A1(下游); B(上游) B1(下游) C(上游) C1(下游)。其中在引物 A1 和 B 中引入突变的 *Xba* I 位点,在引物 C 中引入 *Kpn* I 酶切位点和 ATG 起始密码子,在引物 C1 中引入 *Xba* I 酶切位点和 TAG 终止密码子。引物由大连宝生物工程公司合成。

### 1.3 目的基因的获得

根据定点突变的原理<sup>[6]</sup>,从 pGEM/P12X3C 质粒上分别扩增 3'端突变的部分序列(I 片段)和 5'端突变的另一部分序列(II 片段),将两段序列用表达引物 C、C1 通过 PCR 扩增连接成全长目的片段 P12X3C,在其 5'端和 3'端分别引入 *Kpn* I 和 *Xba* I 位点。PCR 条件:94℃ 5min, 94℃ 80s, 58℃ 80s, 72℃ 3.5min, 72℃ 10min, PCR 产物用 1% 琼脂糖凝胶电泳鉴定。

### 1.4 真核表达质粒的构建及鉴定

将回收得到的目的基因片段经 *Kpn* I、*Xba* I 酶切后,与经同样酶切处理的 pcDNA3.1(+ )连接,转化大肠杆菌 JM109

并经电泳、酶切、PCR 扩增等方法鉴定筛选, 得到阳性重组质粒, 定名为 pcDNA3.1/P12X3C。

### 1.5 序列测定及分析

将筛选出的阳性真核表达质粒 pcDNA3.1/P12X3C 测序, 测序结果用 DNASTar 软件分析。

### 1.6 BHK-21 细胞的转染

按照 Lipofectamine Plus™ Reagent 说明书操作,  $A_{1tg}$  质粒 DNA 溶于 250  $\mu$ L 培养液中(无胎牛血清和抗生素), 再加入 8  $\mu$ L Plus™ Reagent, 混合后室温放置 20min, 另将 12  $\mu$ L Lipofectamine Reagent 转染试剂溶于 250  $\mu$ L 培养液中(无胎牛血清和抗生素)室温放置 20min, 两者混合后于室温放置 20min, 将混合液缓慢添加到细胞中, 37°C 孵化 5h, 移去转染混合液, 添加 5mL 含有 10% 胎牛血清的营养液, 37°C 培养 24 ~ 48h 后, 收获转染细胞, 进行检测。

### 1.7 间接免疫荧光检测

收取培养皿中转染细胞生长密度达 90% 以上的盖玻片, PBS 液漂洗 1 ~ 2 次, 冷丙酮 -20°C 固定 30min, 漂洗后吸干液体, 滴加口蹄疫兔阳性血清, 37°C 湿盒中孵化 30min, PBS 液漂洗 5 次, 加 FITC-羊抗兔 IgG, 37°C 湿盒中染色 30min, 甘油封片于 Olympus 荧光显微镜下观察。

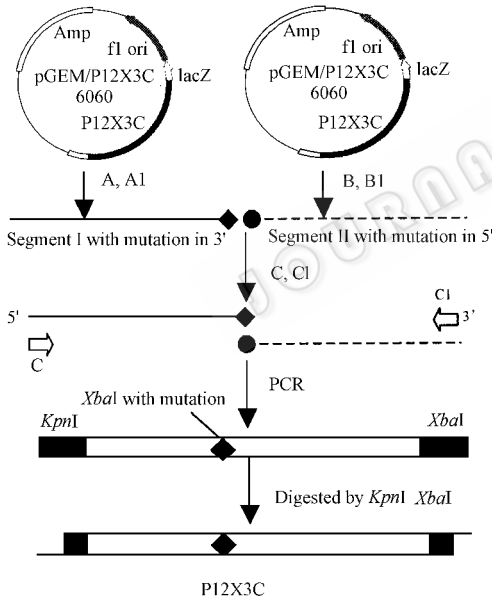


图 1 全长目的基因的获得

Fig.1 Cloning strategy of the full length target gene P12X3C

### 1.8 双抗体夹心 ELISA 检测

按文献报道的方法略加改进<sup>[7,8]</sup>。转染 48h 后取出细胞, PBS 洗涤后胰酶消化, 离心弃上清, 细胞沉淀裂解并离心, 上清用于 ELISA 检测。96 孔酶标板用口蹄疫兔阳性血清包埋, 4°C 过夜, 马血清封闭后, 将 FMDV 抗原、转染 pcDNA3.1/P12X3C 的细胞裂解液、转染 pcDNA3.1(-) 的阴性对照细胞裂解液及未转染的空白对照细胞裂解液以 2 倍梯度稀释, 每个稀释度设两复孔, 37°C 1h 后洗涤, 加入口蹄疫豚鼠阳性抗血清, 37°C 作用 1h, 洗涤后加入 HRP-兔抗豚鼠 IgG, 37°C

作用 1h, 加入底物 OPD-H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 于 37°C 作用 15min, 用终止液结束反应, 于波长 492nm 处测定 OD 值。

## 2 结果

### 2.1 目的基因的获得

为了将 P1 基因上的一个 *Xba* I 位点突变, 采用定点突变的方法, 分别扩增得到 3' 端突变的片段 I 和 5' 端突变的片段 II, 将两段序列用表达引物 C, C1 通过 PCR 扩增连接成全长的片段 P12X3C (见图 1), 经 1% 琼脂糖凝胶电泳, 可见得到了与预期大小相同的目的片段 (见图 2)。

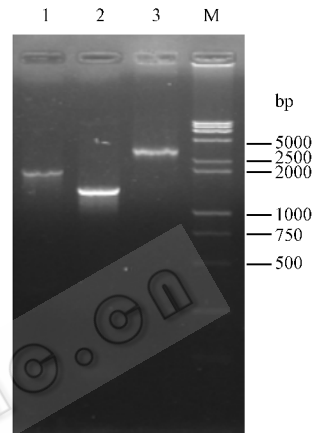


图 2 目的片段电泳结果

Fig.2 Agarose gel electrophoresis map of PCR products. M.  $\lambda$  DNA 15000bp ladder; 1. Fragment I with 3' mutation; 2. Fragment II with 5' mutation; 3. Full length gene P12X3C

### 2.2 真核表达质粒的构建及鉴定

将所得目的基因片段 P12X3C 和质粒载体 pcDNA3.1 (+) 分别用 *Kpn* I、*Xba* I 酶切后连接, 阳性重组质粒经 *Eco* R I、*Kpn* I、*Xba* I 酶切鉴定, PCR 鉴定, 结果表明重组真核表达质粒成功构建 (见图 3)。

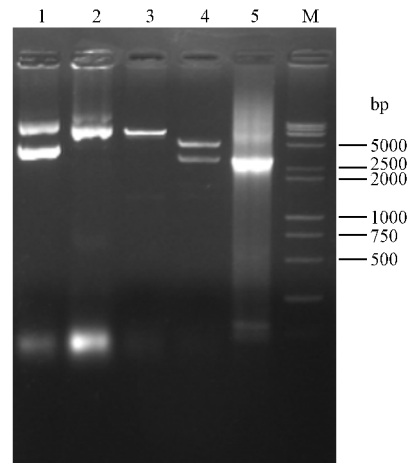


图 3 重组质粒电泳分析

Fig.3 Electrophoretic analysis for the recombinant plasmid

1. Plasmid pcDNA3.1(+); 2. Recombinant plasmid pcDNA3.1/P12X3C; 3. Enzymatic digestion with *Eco*RI; 4. Enzymatic digestion with *Xba*I, *Kpn*I; 5. PCR product with primers C and C1. M.  $\lambda$  DNA 15000bp ladder

### 2.3 重组质粒的序列测定及分析

测定的序列用 DNASTar 软件分析,结果表明目的基因约 3046 个核苷酸,编码 1015 个氨基酸,与需要的完整 P12X3C 序列相符(序列略),且其以正确方向连接于质粒载体 pcDNA3.1(+)

### 2.4 夹心 ELISA 的检测结果

转染 48h 后收获的细胞裂解液用双抗体夹心 ELISA 方法进行检测,结果显示,A 组的 OD 值与 B、C、D 组的 OD 值差异极显著( $P > 0.01$ ),B 组与 C、D 组差异显著( $P < 0.01$ ),而 C 与 D 组间的 OD 值差异不显著( $P < 0.05$ ,见表 1)

表 1 夹心 ELISA 法检测 BHK-21 细胞中的目的蛋白表达情况

Table 1 Expression of target protein in BHK-21 cells tested with sandwich-ELISA

Group	Dilution multiple							
	Undiluted	1:2	1:4	1:8	1:16	1:32	1:64	1:128
A	1.73 ± 0.01	1.60 ± 0.02	1.51 ± 0.01	1.24 ± 0.01	0.92 ± 0.03	0.73 ± 0.01	0.58 ± 0.04	0.45 ± 0.00
B	0.58 ± 0.02	0.50 ± 0.04	0.37 ± 0.01	0.34 ± 0.02	0.22 ± 0.02	0.20 ± 0.00	0.16 ± 0.00	0.13 ± 0.03
C	0.18 ± 0.00	0.14 ± 0.01	0.15 ± 0.03	0.13 ± 0.02	0.13 ± 0.02	0.22 ± 0.03	0.16 ± 0.03	0.15 ± 0.05
D	0.18 ± 0.09	0.14 ± 0.02	0.15 ± 0.02	0.12 ± 0.00	0.13 ± 0.03	0.17 ± 0.01	0.13 ± 0.00	0.16 ± 0.04

A(positive control): FMDV antigen obtained from cultural cell; B(tested sample): the lysate from transfected BHK-21 cell with pcDNA3.1/P12X3C; C(negative control): the lysate from transfected BHK-21 cell with pcDNA3.1; D(blank control): the lysate from untransfected BHK-21 cell.

随着倍比稀释度的提高,B 组的 OD 值和 A 组的 OD 值同时逐渐降低,但 C 组的 OD 值及 D 组的 OD 值变化不大(见图 4)。

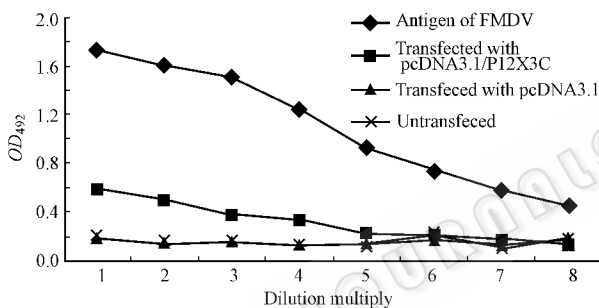


图 4 ELISA 折线图

Fig.4 Curve of ELISA

◆ Antigen of FMDV ;  
■ Transfected with pcDNA3.1/P12X3C ;  
▲ Transfected with pcDNA3.1 ; × Untransfected

### 2.4 间接免疫荧光检测结果

将分别转染 pcDNA3.1/P12X3C 和 pcDNA3.1(+ )的细胞飞片以及未转染细胞的飞片,经荧光染色后,在镜下观察并拍照。结果显示,转染 pcDNA3.1/P12X3C 的 BHK-21 细胞中有特异荧光产生,而转染 pcDNA3.1(+ )的阴性细胞及未转染的空白细胞中未出现特异荧光,说明目的蛋白在 BHK-21 细胞中正确表达。

## 3 讨论

在 FMDV 病毒空衣壳和病毒粒子上存在线性及构象位点<sup>[9,10]</sup>,抗空衣壳的血清具有血清型特异性,与抗病毒粒子的血清相同<sup>[11]</sup>,说明空衣壳的免疫原性和完整病毒粒子的免疫原性相同,提示 FMDV 空衣壳可用于模拟病毒粒子的免疫性。病毒蛋白酶 3C 将结构蛋白前体 P1-2A 裂解为蛋白 VP0、VP3 和 VP1 以及非结构蛋白 2A,P1-2A 编码区的氨基末端的

烷酰化对于病毒衣壳的正确组装是必需的<sup>[12]</sup>。但由于大肠杆菌不具有烷酰化酶,无法使包含有 P1-2A 和 3C 编码区的重组质粒正确表达,产生大量的衣壳蛋白<sup>[13]</sup>。为了克服这一问题,本文利用基因疫苗的优势,构建了包含有 FMDV P1、2A、3C 及部分 2B 的真核表达质粒,P1 上携带有 B、T 细胞表位以确保能刺激与完整病毒粒子相似的体液免疫和细胞免疫,2B 蛋白是细胞免疫反应及体液免疫反应的刺激因子<sup>[14,15]</sup>,同时 P1 上加上 2A 蛋白酶和 3C 蛋白酶,对于 P1 多聚蛋白形成 VP1、VP3 和 VP0 也是必需的。本实验利用已经构建好的质粒 pGEM/P12X3C,采用定点诱变的方法获得 Xba I 位点突变的完整目的基因 P12X3C,这一获得目的基因的方法突破了通常采用的酶切连接法,简化了实验步骤,提高了实验的准确性和成功率。

由于基因疫苗安全性好,免疫期长,成本较低,易于设计构建改造,尤其是它可以同时诱导体液免疫和细胞免疫反应,被公认为免疫学上的第三次革命。因此,基因疫苗将在病毒、细菌和寄生虫疾病的免疫保护及变态反应性疾病、自身免疫病和肿瘤的治疗方面提供新的希望。本文根据基因疫苗的基本特点及研制原则,选择能够在哺乳动物细胞中高效表达目的蛋白的真核表达质粒载体 pcDNA3.1(+),以确保重组质粒在导入动物体内后,目的蛋白得以表达,继而刺激机体产生体液免疫和细胞免疫反应。本文为验证目的蛋白能否在体外哺乳动物细胞中表达,并为检测目的蛋白的免疫原性,将鉴定及序列分析证实的、正确的真核表达质粒转染 BHK-21 细胞后,采用双抗体夹心 ELISA 方法和荧光标记方法对目的蛋白的表达情况进行检测。结果表明,目的蛋白在转染重组质粒的 BHK-21 细胞中正确表达,且具有免疫原性,但 ELISA 检测结果显示,目的蛋白的表达量远低于 FMDV 抗原量,这可能与转染条件及收获时间有关,因此,摸索质粒 DNA 和转染试剂之间的最适比例以及转染操作的最佳条件将有利于提高转染效率,从而提高目的基因的表达量,同时转染后细胞的最佳收获时间也是影响目的蛋白检测结果的

一个因素,因此,针对研究选用的真核表达质粒载体的特点,掌握目的蛋白表达量最高的时间段,将有利于保证实验结果的真实性和可信度。

连接于真核表达质粒载体 pcDNA3.1(+ )上的目的基因能够在体外细胞中正确表达,这不仅说明成功构建了真核表达质粒,而且提示带有 FMDV 抗原蛋白基因的真核表达质粒 pcDNA3.1/P12X3C 也可能在动物体内表达目的蛋白,从而可能刺激机体产生特异的免疫反应,这一部分工作将在今后继续进行。本研究结果为口蹄疫基因免疫的基础研究提供了实验数据,为研制口蹄疫基因疫苗奠定了实验基础。

#### REFERENCES (参考文献)

[ 1 ] Ward G , Rieder E , Mason P W . Plasmid DNA encoding replicating foot-and-mouth disease virus genomes induces antiviral immune responses in swine. *J Virol* ,1997 **71** :7442 - 7447

[ 2 ] Abrams C C , King A M Q , Belsham G J . Assembly of foot-and-mouth disease virus empty capsids synthesized by a vaccinia virus expression system. *J Gen Virol* ,1995 **76** :3089 - 3098

[ 3 ] Krausslich H G , Holscher C , Reuer Q *et al.* . Myristoylation of the poliovirus polyprotein is required for proteolytic processing of capsid and for viral infectivity. *J Virol* ,1990 **64** :2433 - 2436

[ 4 ] Knipe T , Rieder E , Baxt B *et al.* . Characterization of synthetic foot-and-mouth disease virus provirions separates acid-mediated disassembly from infectivity. *J Virol* ,1997 **71** :2851 - 2856

[ 5 ] Forss S , Strebel K , Schaller H . Nucleotide sequence and genome organization of foot-and-mouth disease virus. *Nucl Acids Res* ,1984 **12** :6587 - 6601

[ 6 ] Steffan N Ho , Henry D H , Robert M H *et al.* . Site-directed mutagenesis by overlap extension using the polymerase chain reaction. *Gene* ,1989 **77** :51 - 59

[ 7 ] DU N X ( 杜念兴 ) . *Veterinary Immunology ( 兽医免疫学 )* . 2<sup>nd</sup> ed , Shanghai Science and Technology Press of Shanghai , 1989

[ 8 ] YANG H ( 杨汉春 ) . *Immunology of Animals ( 动物免疫学 )* . 2<sup>nd</sup> ed , Beijing : Chinese Agricultural University Publishing house , 1996

[ 9 ] Doel T R , Chong W K T . Comparative immunogenicity of 146s , 75s and 12s particles of foot-and-mouth disease virus. *Arch Virol* ,1982 **73** :185 - 191

[ 10 ] Rowlands D J , Sangar D V , Brown F . A comparative chemical and serological study of the full and empty particles of foot-and-mouth disease virus. *J Gen Virol* ,1975 **26** :227 - 238

[ 11 ] Rweyemamu M M , Terry G , Pay T W F . Stability and immunogenicity of empty particles of foot-and-mouth disease virus. *Arch Virol* ,1979 **56** :69 - 79

[ 12 ] Duronio R J , Jackson-Machelsky E , Heuckeroth R O *et al.* . Protein N-myristoylation in *Escherichia coli* : reconstitution of a eukaryotic protein modification in bacteria. *Pro Natl Acad Sci USA* 1990 **87** :1506 - 1510

[ 13 ] Grubman M J , Lewis S A , Morgan D O . Protection of swine against foot-and-mouth disease virus with viral capsid proteins expressed in heterologous systems. *Vaccine* ,1993 **11** :825 - 829

[ 14 ] Foster M , Cook A , Cedillo L *et al.* . Serological and cellular immune responses to non-structural proteins in animals infected with foot-and-mouth disease virus. *Vet Q* ,1998 **20** ( suppl 2 ) :s28 - s30

[ 15 ] Collen T , Baron J , Childerstone A *et al.* . Hereotypic recognition of recombinant foot-and-mouth disease virus proteins by bovine T-cell : the polymerase ( P3Dpol ) as an immunodominant T-cell immunogen. *Virus Reseach* ,1998 **56** :125 - 133

## Expression of Recombinant Plasmid pcDNA3.1/P12X3C with Multi-genes of Foot-and-mouth Disease Virus in BHK-21 Cells

GUO Hui-Chen LIU Zai-Xin SUN Shi-Qi LU Zeng-Jun ZHOU Guang-Qing  
QI Shu-Yun JIN Ye LIU Xiang-Tao XIE Qing-Ge\*

( Chinese Academy of Agricultural Sciences , Lanzhou Veterinary Research Institute , Lanzhou 730046 , China )

**Abstract** In order to obtain the gene P12X3C of Foot-and-Mouth Disease Virus ( FMDV ) that includes full length P1 , 2A , 3C and a part of 2B , the site mutation strategy was used . After being digested by *Kpn* I and *Xba* I respectively , the gene P12X3C was cloned into the pcDNA3.1(+ ) expression vector . The recombinant plasmid was checked by restriction enzyme analysis and nucleic acid sequencing , and then named pcDNA3.1/P12X3C . Further , BHK-21 cells was transfected with pcDNA3.1/P12X3C by using lipid . The proteins of Foot-and-Mouth Disease Virus , which were expressed in BHK-21 cells , were confirmed by sandwich-ELISA and fluoroscopy . The result shows the gene P12X3C is cloned into eukaryotic expression plasmid , and the recombinant eukaryotic expression plasmid pcDNA3.1/P12X3C could express proteins of Foot-and-Mouth Disease Virus in BHK-21 cells , which have immunocompetence . This study demonstrates that delivery of a recombinant eukaryotic expression plasmid containing P12X3C coding regions results in the assembly of FMDV capsid structures , which will offer experimental base to DNA vaccine of FMDV .

**Key words** foot-and-mouth disease virus ( FMDV ) , eukaryotic expression plasmid , BHK-21

Received : 12-30-2002

This work was supported by Grant from " 973 " Major State Basic Research Development Program of China ( No. G1999011903 ) .

\* Corresponding author . Tel : 86-931-8342585 ; Fax : 86-931-8340799 ; E-mail : xieqgkey@public.lz.gs.cn

© 中国科学院微生物研究所期刊联合编辑部 <http://journals.im.ac.cn>