

O 型 FMDV *P1-2A* 基因与猪 *IFN- γ* 基因共表达质粒的构建及其在 BHK-21 细胞中的表达

吴国华,张 强,颜新敏,侯俊玲,赵志荀,崔力凡,李 健,朱海霞,朱彩珠

(中国农业科学院 兰州兽医研究所,家畜疫病病原生物学国家重点实验室,农业部畜禽病毒学重点开放实验室,甘肃 兰州 730046)

摘要:为了构建 O 型 FMDV *P1-2A* 基因与猪 *IFN- γ* 基因共表达质粒并在 BHK-21 细胞中进行表达,本研究利用聚合酶链式反应(PCR)从阳性质粒 pGEM-P12A 克隆到 *P1-2A* 基因,将扩增产物纯化、双酶切后连接到 pBudCE-IFN 载体,构建重组质粒 pBudCE-IFN-*P1-2A*。重组表达质粒鉴定后,在脂质体介导下转染 BHK-21 细胞,用 RT-PCR 和直接免疫荧光试验分别检测 *P1-2A* 和 *IFN- γ* 在 BHK-21 细胞中的表达。RT-PCR 检测显示,重组表达质粒转染细胞后 *P1-2A* 和 *IFN- γ* 基因成功转录出 mRNA;免疫荧光试验表明目的基因在 BHK-21 细胞中获得了表达。结果证明,本研究成功构建了重组质粒 pBudCE-IFN-*P1-2A* 并在体外进行了表达,这为研制抗 FMDV DNA 疫苗和 *IFN- γ* 的佐剂作用奠定了坚实基础。

关键词: FMDV; *P1-2A* 基因; *IFN- γ* 基因; 共表达

中图分类号: Q78 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-7091(2010)05-0011-05

Construction of Co-expressing Plasmid of FMDV *P1-2A* Gene with Porcine *IFN- γ* Gene and Expression in BHK-21 Cells

WU Guo-hua, ZHANG Qiang, YAN Xin-min, HOU Jun-ling, ZHAO Zhi-xun,

CUI Li-fan, LI Jian, ZHU Hai-xia, ZHU Cai-zhu

(Key Laboratory of Animal Virology of Ministry of Agriculture, State Key Laboratory of Etiological Biology, Lanzhou Veterinary Research Institute, Chinese Academy of Agriculture Sciences, Lanzhou 730046, China)

Abstract: To construct the co-expressing plasmid of FMDV *P1-2A* gene with porcine *IFN- γ* gene and express in BHK-21 cells. A *P1-2A* gene of foot-and-mouth disease virus(FMDV) was amplified by PCR from the plasmid pGEM-P12A and subcloned into pBudCE-IFN vector for sequencing after purification and digestion. A recombinant plasmid pBudCE-IFN-*P1-2A* was constructed and transformed into BHK-21 cells with liposome for in vitro expression. 48 hours after transfection, the mRNAs and expressed proteins of *P1-2A* and *IFN- γ* were detected by RT-PCR and direct immunofluorescence assay, respectively. The results showed that *P1-2A* and *IFN- γ* were successfully transcribed and expressed in BHK-21 cells. It was proved that the recombinant plasmid pBudCE-IFN-*P1-2A* was successfully constructed and expressed in vitro, providing a solid basis for development of DNA vaccine against FMDV.

Key words: FMDV; *P1-2A*; *IFN- γ* ; Co-expression

口蹄疫(Foot and mouth disease, FMD)是由口蹄疫病毒(Foot and mouth disease virus, FMDV)引起的偶蹄动物的一种急性、热性、高度接触传染的传染病,以传播迅速、发病率高而著称。世界动物卫生组织(OIE)将它列为 93 种法定报告的动物疫病之一。口蹄疫病毒属于小 RNA 病毒科口蹄疫病毒属,病毒

基因组为单股正链 RNA,约 8.5 kb,有 7 个血清型,型间无交叉保护。其开放阅读框由 *L* 基因、*P1* 结构蛋白基因(包括 *VP4*、*VP2*、*VP3*、*VP1* 基因)、*P2* 非结构蛋白基因(包括 *2A*、*2B*、*2C* 基因)和 *P3* 非结构蛋白基因(*3A*、*3B*、*3C*、*3D* 基因)组成^[1]。*P1* 结构蛋白决定了病毒的抗原性和血清型,是研究口蹄疫 DNA

收稿日期:2010-08-03

基金项目:国家科技支撑项目(2006BAD06A11);甘肃省重大科技项目(092NKDA032)

作者简介:吴国华(1977-),男,江西赣州人,助理研究员,博士,主要从事病原分子生物学及免疫学诊断的研究。

通讯作者:张 强(1972-),男,陕西西安人,副研究员,博士,主要从事病毒分子免疫与环境控制的研究。

疫苗的主要候选基因,2A 参与病毒蛋白的裂解^[2,3]。目前世界各国对于口蹄疫的防治采取扑灭根除、免疫控制和预防三种政策。大多数发展中国家由于经济方面的原因采取的方式是免疫控制。传统的灭活疫苗在口蹄疫的防治中发挥着主导作用,但其存在病毒灭活不彻底、活病毒从疫苗加工厂逃逸等安全性问题。因此,研制更为安全、有效的新型 FMD 疫苗显得尤为重要。Benvenisti 等^[4]将 FMDV 结构基因 *PI* 和非结构基因 *2A*、*3CD* 串联起来,同时加入脑心肌炎病毒内部核糖体进入位点,利用基因枪注射到猪皮肤中,部分猪可抵抗 FMDV 强毒的攻击。Cedillo-Barron 等^[5]将 FMDV *PI-2A*、*3C* 和 *3D* 基因插入真核表达载体 pcDNA3.1 中,将构建好的质粒免疫猪。连续免疫 3 次以后,猪体内产生了中和抗体,部分猪能抵抗 FMDV 强毒的攻击。为了增强疫苗的免疫效果,一些基因佐剂也应用到 FMDV 核酸疫苗的研究中。目前,用于 FMDV DNA 疫苗细胞因子基因佐剂主要有 IFN- γ 、TNF- α 、IL-6、IL-12、IL-2、IL-18 等^[6-9]。IFN- γ 为 II 型干扰素,具有调节免疫应答和抗病毒感染作用,能够促进 T 细胞分化成熟和增殖,激活细胞毒性 T 细胞和 NK 细胞,增强这些细胞的细胞毒性的杀伤作用。

本试验利用真核表达载体 pBudCE4.1,构建了共表达 O 型口蹄疫病毒 *PI-2A* 基因与 IFN- γ 基因的表达载体,为通过动物模型来研究干扰素- γ 作为 FMDV DNA 疫苗佐剂的可能性奠定了基础。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 重组质粒、菌种、载体以及细胞株 含 O 型 FMDV China/99 毒株 *PI-2A* 基因阳性克隆质粒 pGEM-P12A、菌种 DH5 α 、真核表达载体 pBudCE4.1 和 pBudCE-IFN 载体(带 IFN- γ 基因)均为农业部畜禽病毒学重点开放实验室保存。

1.1.2 酶与主要试剂 *Bam*H I、*Hind* III 限制性内切酶、T4 DNA 连接酶、质粒提取试剂盒、DNA 胶回收试剂盒 RT-PCR 试剂盒以及 DNA 聚合酶均购自大连宝生物工程有限公司;FITC 标记的 V5 抗体和 myc 抗体、博来霉素 Zeocin 及脂质体购自 Invitrogen 公司;胎牛血清为 Hyclone 公司产品;DMEM 培养基购自 Gibco 公司。

1.2 方法

1.2.1 引物设计与合成 以获得的基因序列为参考,设计 1 对引物扩增 *PI-2A*。上游引物: 5'-AAGCTTGGCGCCGGGCAATCCAGC-3', 下游引物:

5'-GGATCCCCCAGGGTTGGACTCGACGT-3', 斜体部分分别为 *Hind* III 和 *Bam*H I 酶切位点。引物由大连宝生物工程有限公司合成。

1.2.2 目的基因的获得 以 *PI-2A* 阳性克隆质粒 pGEM-P12A 为模板,扩增 *PI-2A* 基因,PCR 条件为: 95 $^{\circ}$ C 5 min; 94 $^{\circ}$ C 1 min, 58 $^{\circ}$ C 1.5 min, 72 $^{\circ}$ C 2 min, 进行 30 个循环; 72 $^{\circ}$ C 6 min。PCR 产物用 10 g/L 琼脂糖凝胶电泳鉴定。用 DNA 胶回收试剂盒纯化回收 PCR 产物。

1.2.3 *PI-2A* 基因和 pBud-IFN 载体的酶切 目的基因 *PI-2A* 和 pBudCE-IFN 载体按如下酶切体系进行双酶切: 10 \times Buffer 5 μ L, 目的基因或质粒 DNA 20 μ L, 0.1% BSA 2 μ L, *Bam*H I (10 U/mL) 2.5 μ L, *Hind* III (10 U/mL) 2.5 μ L, 灭菌蒸馏水加至 50 μ L。轻轻混匀离心后,置 37 $^{\circ}$ C 恒温热水器中酶切 5 h。用 1.0% 的琼脂糖凝胶进行电泳,切下目的条带,用 DNA 胶回收试剂盒回收纯化目的片段。

1.2.4 共表达口蹄疫病毒 *PI-2A* 与 IFN- γ 载体的构建 取目的基因 *PI-2A* 的酶切回收片段 7 μ L、酶切载体 pBud-IFN 1 μ L 混合,加入 10 \times Ligation Buffer 1 μ L、T4 DNA 连接酶 1 μ L (3 U/ μ L), 混匀后置 16 $^{\circ}$ C 连接过夜。取连接产物 10 μ L, 无菌加入 DH5 α 感受态细胞中进行转化,最后涂布含 Zeocin 的平板, 37 $^{\circ}$ C 过夜培养。挑选单菌落,用质粒快速提取试剂盒提取质粒,采用酶切方法和 PCR 扩增鉴定 *PI-2A* 阳性重组表达质粒。将筛选出的阳性重组表达质粒送至大连宝生物工程有限公司进行测序。重组质粒命名为 pBudCE-IFN-*PI-2A*。

1.2.5 高纯度质粒的提取 重组真核表达载体在经 PCR、酶切和测序确认读码框正确后,应用 Invitrogen 公司的 PureLinkTM HiPure Plasmid DNA Purification Kits 进行质粒的提取和纯化,质粒 1:100 稀释,在紫外分光光度计测定 λ 为 260 nm 和 280 nm 的 A 值,然后按如下公式计算: DNA (μ g/mL) = OD₂₆₀ \times 50 \times 100。DNA 的纯度: 当 OD₂₆₀/OD₂₈₀ 大于 1.8 时,说明质粒纯度符合要求。取符合要求的质粒进行细胞转染。

1.2.6 重组表达载体转染 BHK-21 细胞 转染前 1 d 将待转染细胞分于 6 孔细胞培养板中(培养基中不加抗生素),每孔 1×10^5 个细胞,待细胞融合度达到 80% 左右时转染。按 4.0 μ g DNA/孔,将 DNA 用 250 μ L 无血清培养基稀释,轻轻混匀;将脂质体轻轻混匀,取 10 μ L 稀释于 240 μ L 无血清培养基中,室温孵育 5 min;将稀释的 DNA 与脂质体混合(总体积 500 μ L),轻轻混匀,室温孵育 20 min;将 100 μ L

复合物加入到 1 孔细胞培养物中,轻轻摇动培养板以起到混合作用;细胞置于 37℃ 50 mL/L CO₂ 条件下培养,4~6 h 后更换为完全培养基。

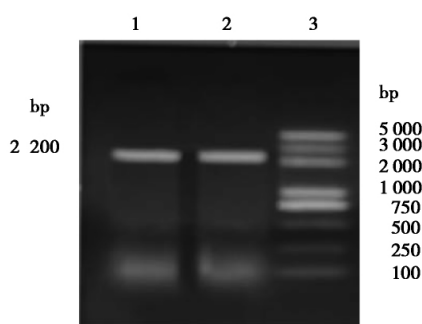
1.2.7 目的基因在 BHK-21 细胞中转录水平的检测 当转染的细胞培养 48 h 后,收获细胞,PBS 洗 3 次,离心收集细胞。应用 RT-PCR 检测质粒在转染细胞中的转录情况。提取 BHK-21 细胞总 RNA,以其为模板进行 RT-PCR 检测。

1.2.8 目的基因在 BHK-21 细胞中表达水平的检测 应用 FITC 标记的 myc 单克隆抗体检测 *PI-2A* 蛋白的表达,用 FITC 标记的 V5 单克隆抗体检测 *IFN-γ* 的表达,方法如下:取出预先放置的长满细胞的盖玻片,用 PBS 洗 3 次,每次 5 min;用预冷的丙酮于 -20℃ 固定 20~30 min,然后用 PBS 洗 3 次,每次 10 min,自然干燥;加入 1:500 稀释的 FITC 标记的单克隆抗体,于恒温箱 37℃ 温育 1 h;PBS 洗 3 次,每次 5 min,自然干燥;于荧光显微镜下观察结果。

2 结果与分析

2.1 *PI-2A* 基因的扩增

以 *PI-2A* 阳性克隆质粒 pGEM-*PI2A* 为模板,用设计的上下游引物,扩增出 2 200 bp 的目的条带,与预期结果相符(图 1)。



1,2. *PI-2A* 基因 PCR 扩增结果;3.5 000 bp DNA Marker.

1,2. PCR results of *PI-2A*; 3.5 000 bp DNA Marker.

图 1 *PI-2A* 基因的 PCR 扩增结果

Fig.1 Amplification of *PI-2A* gene

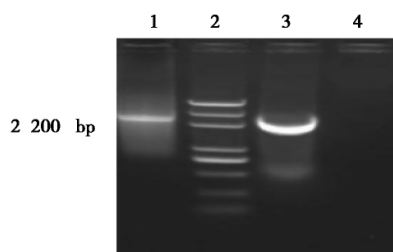
2.2 重组质粒的鉴定

重组表达质粒经 PCR 扩增,得到 2 200 bp 左右的片段,而空载体没有同样的条带扩出(图 2)。将重组表达质粒用 *Hind* III 和 *Bam* H I 进行双酶切,重组表达质粒切出约 2 200 bp 左右的目的片段,与预期结果符合(图 3)。重组表达质粒测序结果表明,*PI-2A* 基因正确地插入了表达载体。

2.3 基因转录水平的 RT-PCR 检测结果

重组质粒转染至 BHK-21 细胞中 48 h 后,用 RT-PCR 检测其 mRNA 的转录情况。RT-PCR 检测结果显示(图 4,5),*PI-2A* 和 *IFN-γ* 基因在 BHK-21

细胞中成功进行了转录。



1,3. *PI-2A* 基因 PCR 扩增结果;2.5 000 bp DNA Marker;

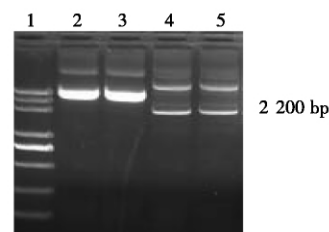
4. 空载体的 PCR 扩增结果。

1,3. PCR results of *PI-2A* gene; 2.5 000 bp DNA Marker;

4. PCR results from pBudCE4.1.

图 2 重组质粒的 PCR 鉴定

Fig.2 Identification of recombinant plasmid pBudCE-*IFN-PI-2A* by PCR



1.5 000 bp DNA Marker; 2,3. 重组质粒;

4,5. 重组质粒经 *Hind* III 和 *Bam* H I 双酶切。

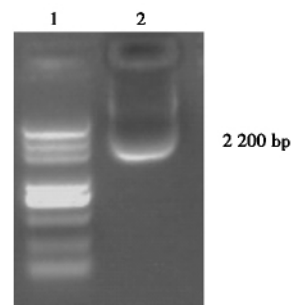
1.5 000 bp DNA Marker; 2,3. Recombinant plasmid

pBudCE-*IFN-PI-2A*;

4,5. pBudCE-*IFN-PI-2A* digested with *Hind* III and *Bam* H I.

图 3 重组质粒的酶切鉴定

Fig.3 Identification of recombinant plasmid pBudCE-*IFN-PI-2A* by RE digestion

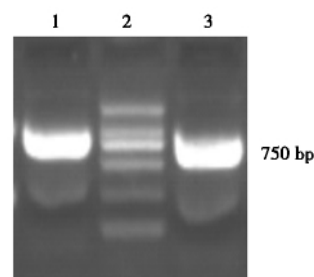


1.5 000 bp DNA Marker; 2. *PI-2A* 基因 RT-PCR 扩增结果。

1.5 000 bp DNA Marker; 2. RT-PCT result of *PI-2A* gene from mRNA.

图 4 *PI-2A* 基因的 RT-PCR 扩增结果

Fig.4 RT-PCT result of *PI-2A* gene



1,3. *IFN-γ* 基因 RT-PCR 扩增结果;2.2 000 bp DNA Marker.

1,3. RT-PCT result of *IFN-γ* gene from mRNA; 2.2 000 bp DNA Marker.

图 5 *IFN-γ* 基因的 RT-PCR 扩增结果

Fig.5 RT-PCT result of *IFN-γ* gene

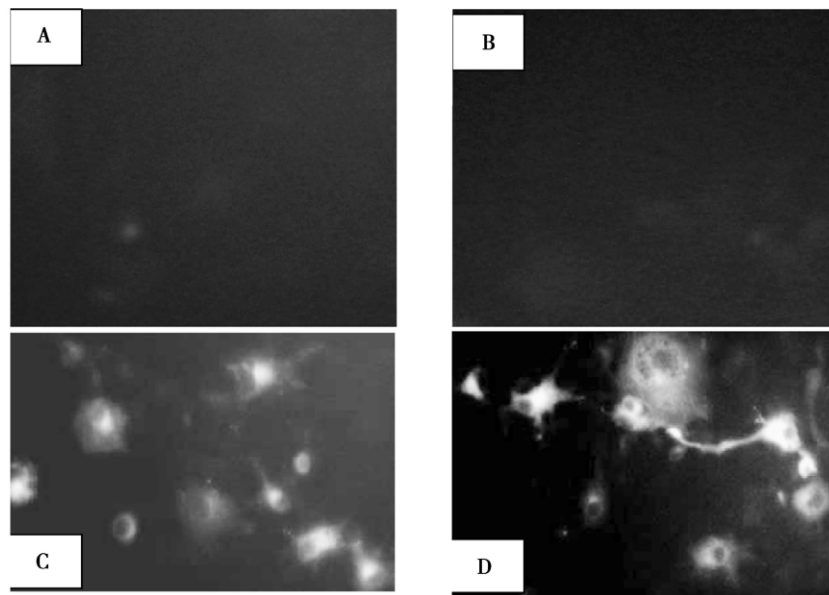
2.4 转染细胞中蛋白表达的检测

将分别转染阳性质粒、空质粒和未转染的细胞飞片经荧光染色后,经观察发现,转染重组。

2.5 蛋白表达水平的检测结果

经直接免疫荧光试验检测,阳性真核表达质粒

的细胞中出现了特异性荧光,而转染了空质粒和未转染的细胞中则无明显荧光(图6),表明构建的重组阳性质粒 pBudCE-IFN-P1-2A 在 BHK-21 细胞中可成功表达 P1-2A 和 IFN- γ 蛋白。



A. 未转染的 BHK-21 细胞; B. 转染空载体 pBudCE4.1 的 BHK-21 细胞; C. 重组质粒 pBudCE-IFN-P1-2A 转染 BHK-21 细胞后用 V5 抗体检测 IFN- γ 表达的结果; D. 重组质粒 pBudCE-IFN-P1-2A 转染 BHK-21 细胞后用 myc 抗体检测 P1-2A 表达的结果。
A. BHK-21 cells; B. BHK-21 cells transfected with pBudCE4.1; C. Expression of IFN- γ protein, BHK-21 cells transfected with pBudCE-IFN-P1-2A; D. Expression of P1-2A protein, BHK-21 cells transfected with pBudCE-IFN-P1-2A.

图6 重组质粒 pBudCE-IFN-P1-2A 在 BHK21 细胞中的表达

Fig. 6 Expression of recombinant plasmid pBudCE-IFN-P1-2A transfected in BHK-21 cells

3 讨论

口蹄疫在世界上许多国家和地区都有流行,疫苗接种是预防和控制该病的有效手段。灭活疫苗在疫苗接种策略中占据着主导地位,但其安全性还存在着较大缺陷,研制更为安全、有效的 FMD 疫苗是当前 FMD 疫苗策略中的重要任务。了解 FMD 病毒的抗原位点是研制更有效 FMD 疫苗的基础。口蹄疫病毒的含有多个抗原位点^[10-12],不同血清型病毒的抗原位点有所不同,O 型 FMDV 至少有 5 个中和抗原位点,其中抗原位点 1 由 VP1 G-H 环(133~157)和 C 端 200~213 位氨基酸的线性表位组成,是 FMDV 最重要的抗原位点,也是 FMDV 抗原变异的关键所在^[11,12]。虽然 VP1 是诱导产生口蹄疫抗体的主要成分,是研究口蹄疫 DNA 疫苗的热点^[4,13],但 VP2、VP3 也存在抗原表位,为了获得更多的中和抗原表位,使 FMDV DNA 疫苗刺激机体产生更加全面的免疫反应,保护动物免受 FMDV 的攻击,本试验选择 FMDV 衣壳蛋白前体 P1-2A 为候选抗原,通过构建真核表达载体来研究其免疫效果。

本试验所用的表达载体 pBudCE4.1 主要由以

下几部分组成:两个高效启动子 CMV 和 EF-1 α ,myc 和 V5 肽段,两个羧基末端多聚组氨酸(6 \times His)接头,5'端 T7 启动子引物结合位点,3'端牛生长因子下游引物结合位点,SV40 和牛生长因子多腺苷酸化信号,Zeocin 抗性基因,利于 T7 启动子在大肠杆菌中表达 Zeocin 抗性基因的 EM7 启动子,确保质粒在大肠杆菌中获得高拷贝数的 pUC 复制原点。该载体最显著的特点是具有两个多克隆插入位点,分别带有高效启动子—CMV 和 EF-1 α ,可在一个载体内同时独立表达两种蛋白,这样避免了用单启动子载体构建多价 DNA 疫苗时,蛋白质在空间结构上的相互影响,是构建多个基因进行共表达的良好载体。有研究表明,佐剂需要与抗原在同一部位才能起免疫增强作用。pbudCE4.1 上的两个插入位点:一个插入 IFN- γ 基因,一个插入抗原基因较好地满足了上述要求,注入动物肌细胞中,可使他们在同一细胞中得到表达,有利于其作用得到充分的发挥。

本试验构建了共表达 O 型口蹄疫病毒 P1-2A 基因与 IFN- γ 基因的表达载体,体外检测表明,目的基因在 BHK-21 细胞中成功进行了转录和表达,这为研究 FMDV 疫苗-佐剂一体化的新型疫苗奠定了

基础。

参考文献:

- [1] 谢庆阁. 口蹄疫 [M]. 北京: 中国农业出版社, 2004 : 30 - 31.
- [2] Yu X, Xiao S, Fang L, *et al.* Enhanced immunogenicity to food-and-mouth disease virus in mice vaccination with alphaviral replicon-based DNA vaccine expressing the capsid precursor polypeptide (P1) [J]. *Virus Genes*, 2006, 33 (3) : 337 - 344.
- [3] 金宁一, 张洪勇, 尹革芬, 等. 共表达口蹄疫病毒衣壳蛋白前体 P1-2A 基因和蛋白酶 3C 基因重组鸡痘病毒的构建及其免疫原性 [J]. *科学通报*, 2004, 49 (6) : 576 - 579.
- [4] Benvenisti L, Rogel A, Kuznetsova L, *et al.* Gene gun-mediated DNA vaccination against foot-and-mouth disease virus [J]. *Vaccine*, 2001, 19 (29) : 3885 - 3895.
- [5] Cedillo-Barron L, Foster-Cuevas M, Belsham G J, *et al.* Induction of a protective response in swine vaccinated with DNA encoding foot-and-mouth disease virus empty capsid proteins and the 3D RNA polymerase [J]. *J Gen Virol*, 2001, 82 (Pt7) : 1713 - 1724.
- [6] Guo H, Liu Z, Sun S, *et al.* Immune response in guinea pigs vaccinated with DNA vaccine of foot-and-mouth disease virus O/China99 [J]. *Vaccine*, 2005, 23 (25) : 3236 - 3242.
- [7] Baowei Sua, Junpeng Wanga, Xiao Wanga, *et al.* The effects of IL-6 and TNF- α as molecular adjuvants on immune responses to FMDV and maturation of dendritic cells by DNA vaccination [J]. *Vaccine*, 2008, 26 (40) : 5111 - 5122.
- [8] Wong H T, Cheng S C, Sin F W, *et al.* A DNA vaccine against foot-and-mouth disease elicits an immune response in swine which is enhanced by co-administration with interleukin-2 [J]. *Vaccine*, 2002, 20 (22) : 2641 - 2647.
- [9] Ma M X, Jin N Y, Liu H J, *et al.* Immunogenicity of plasmids encoding P12A and 3C of FMDV and swine IL-48 [J]. *Antiviral Res*, 2007, 76 (1) : 59 - 67.
- [10] 张 昱, 王永录, 张永光, 等. 口蹄疫病毒 3D 聚合酶 B 细胞表位的筛选鉴定 [J]. *华北农学报*, 2009, 24 (3) : 69-73.
- [11] Parry N R, Barnett P V, Ouldrige E J, *et al.* Neutralizing epitopes of type O foot-and-mouth disease virus. II. Mapping three conformational sites with synthetic peptide reagents [J]. *J Gen Virol*, 1989, 70 (6) : 1493-1503.
- [12] Pfaff E, Thiel H J, Beck E, *et al.* Analysis of neutralizing epitopes on foot-and-mouth disease virus [J]. *J Virol*, 1988, 62 (6) : 2033 - 2040.
- [13] Shieh J J, Liang C M, Chen C Y, *et al.* Enhancement of the immunity to foot-and-mouth disease virus by DNA priming and protein boosting immunization [J]. *Vaccine*, 2001, 19 (28) : 4002 - 4010.