

O型口蹄疫病毒衣壳蛋白在昆虫细胞中的表达及其抗原性鉴定

解银丽, 马琪, 李志勇* (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, 甘肃兰州 730046)

摘要 为构建并表达 O 型口蹄疫病毒 (Foot-and-mouth disease virus, FMDV) 的空衣壳蛋白的重组杆状病毒并鉴定其抗原性。以质粒 pMD19-P12A3C 为模板, 扩增出编码 O 型 FMDV 衣壳蛋白前体 P12A 及其蛋白酶 3C 的 P12A3C 基因, 插入至杆状病毒转移载体 pFast-BacDual PH 启动子下, 构建出重组转移载体 pFastBacDual-P12A3C, 并转化 DH10Bac™ 大肠杆菌感受态细胞, 构建重组转座子 Bacmid-P12A3C, 将其转染 Sf9 细胞, 获得表达 O 型 FMDV 衣壳蛋白的重组杆状病毒 rBac-P12A3C。增殖重组杆状病毒然后用其感染 Sf9 细胞, 最后通过间接免疫荧光检测外源蛋白的表达。结果表明, 表达产物能够被 O 型 FMDV VP1 多克隆抗体识别, 并具有良好的反应原性, 表明表达 O 型 FMDV 衣壳蛋白的重组杆状病毒 rBac-P12A3C 构建成功。该研究为进一步研究 O 型 FMDV 空衣壳的体外组装提供前期实验材料, 并为后期研制出口蹄疫的基因工程亚单位疫苗奠定基础。

关键词 O 型口蹄疫病毒; 衣壳蛋白; 重组杆状病毒

中图分类号 S855 文献标识码 A 文章编号 0517-6611(2015)08-095-03

Expression and Identification of Capsid Protein of Foot-and-mouth Disease Virus Type O in Insect Cells

XIE Yin-li, MA Qi, LI Zhi-yong* (State Key Laboratory of Veterinary Etiological Biology, Lanzhou Veterinary Research Institute, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Lanzhou, Gansu 730046)

Abstract The capsid protein precursor P12A and protease 3C coding P12A3C gene of FMDV type O were amplified from the plasmid pMD19-P12A3C, then the gene P12A3C were inserted into the baculovirus transfer vector pFastBacDual to construct recombinant transfer vector pFastBacDual-P12A3C, in which the P12A3C gene were under the control of PH promoter. The recombinant baculovirus plasmids were transformed into Escherichia coli DH10Bac™ to construct the recombinant baculovirus bacmid Bacmid-P12A3C, then transfected into Sf9 cells, the recombinant baculovirus was harvested when obvious cytopathic effect was observed. After applied, the baculovirus were infected into the Sf9 cells. At last the expressed proteins were analyzed by the immunofluorescent assay. The result indicated that the expressed protein were expressed in Sf9 cells, and displayed specificity to FMDV type O VP1 polyclonal antibody. From this study, the recombinant baculovirus including the virus capsid P1 gene and 3C protease gene coding regions of FMDV type O were successfully obtained, this provides a basis for the research of FMDV type O empty capsid assembly in vitro and empty capsid vaccine research.

Key words Type O Foot-and-mouth disease virus; Capsid protein; Recombinant baculovirus

口蹄疫 (Foot-and-mouth disease, FMD) 是口蹄疫病毒 (Foot-and-mouth disease virus, FMDV) 引发牛、羊、猪等偶蹄动物易感染的一种动物疫病, 其传播速度快、感染率高^[1-2], 被世界动物卫生组织 (Office International Des Epizooties, OIE) 列为必须上报的传染病, 被我国列为一类动物传染病^[3-4]。FMDV 属于小 RNA 病毒科口蹄疫病毒属, 是单股的正链 RNA 病毒, 基因组全长约 8.5 kb, 包含编码 1 个多聚蛋白的开放阅读框 (ORF)。其中, 在非结构蛋白 3C 蛋白酶作用下, P1 结构蛋白被解离成单体蛋白 VP0、VP3、VP1, 然后 VP0 进一步解离成单体蛋白 VP4 和 VP2, FMDV 基因组 RNA 能与解离后的单体蛋白组装成为成熟的 146S 病毒粒子^[1]。接种疫苗是 FMD 防控最为有效的措施, 在控制 FMD 暴发的过程中, 口蹄疫灭活疫苗起到了极为重要的防控作用, 但是由于其在生产的过程中需要大量增殖 FMD 强毒, 存在散毒的风险。据报道, FMDV 空衣壳蛋白 75S 具有与完整 FMDV 146S 粒子非常相似的抗原特性, 可以引起与完整 FMDV 病毒粒子极其相似的免疫反应, 由于病毒空衣壳不含核酸成分, 安全性好, 不存在散毒风险^[5]。因此, 研制 FMDV 空衣壳疫苗显得极为重要。

目前, 杆状病毒表达系统 Bac-to-Bac 是杆状病毒表达系统中最常用的一种, 具有高效、快速的特性, 其表达的外源目

的蛋白, 可以在细胞内完成翻译后的修饰和加工, 因此生物功能和天然的目的蛋白更为接近。笔者采用杆状病毒表达系统 Bac-to-Bac, 成功构建并表达了 O 型 FMDV 衣壳蛋白的重组杆状病毒, 然后鉴定了所表达衣壳蛋白的抗原性, 以期研究基因工程亚单位疫苗奠定了基础。

1 材料与方法

1.1 病毒和细胞 质粒 pMD19-P12A3C 为家畜疫病病原生物学国家重点实验室构建并保存; Sf9 昆虫细胞为家畜疫病病原生物学国家重点实验室保存。

1.2 质粒、抗体及试剂 pFastBacDual 载体、DH10Bac™ 感受态细胞、转染试剂 CellfectinII Reagent、细胞培养基 Sf900-II SFM、PureLink™ Hipure Plasmid Miniprep Kit, 购自 Invitrogen 公司; JM109 感受态细胞、GXL 高保真 DNA 聚合酶及 DNA Marker 等均购自大连宝生物公司; T4 DNA 连接酶、限制性核酸内切酶 *Hind* III、*Spe* I 购自美国 NEB 公司; 切胶回收试剂盒、PCR 清洁试剂盒、质粒提取试剂盒, 均购自杭州爱思进生物技术有限公司; FITC 标记羊抗兔 IgG, 购自中杉金桥公司。

1.3 引物设计与合成 根据家畜疫病病原生物学国家重点实验室保存质粒 pMD19-P12A3C 中基因序列设计 1 对扩增 P12A3C 基因的特异性引物, 上游引物 P12A3CF: 5'-CG-CAAGCTTCCACCATGGGCGCCGGCAATCCA-3' 和下游引物 P12A3CR: 5'-CGCACTAGTTCCTCGTGGTGTGGTTC-3', 下划线分别为 *Hind* III 和 *Spe* I 限制性内切酶酶切位点。M13 通用引物为 Invitrogen 公司推荐的通用引物, 引物由苏州金唯智生物技术有限公司合成。

作者简介 解银丽 (1988 -), 女, 河南许昌人, 硕士研究生, 研究方向: 分子疫苗与动物免疫学。* 通讯作者, 副研究员, 博士, 硕士生导师, 从事分子疫苗与动物免疫学研究。

收稿日期 2015-02-02

1.4 重组转移载体 pFastBacDual-P12A3C 的构建 以质粒 pMD19-P12A3C 为模板,利用特异性引物 P12A3CF 和 P12A3CR 在 GXL 高保真 DNA 聚合酶作用下进行 PCR 扩增 P12A3C 基因,用限制性内切酶 *Spe* I 和 *Hind* III 分别将 PCR 产物 P12A3C 和供体质粒 pFastBacDual 双酶切后回收,然后用 T4 连接酶将 P12A3C 切胶回收产物与线性化的载体 pFastBacDual 连接,以使 P12A3C 定向插入到供体质粒 pFastBacDual。然后,转化 JM109 感受态细胞,利用 α -互补筛选、酶切鉴定与 PCR 鉴定得到疑似阳性克隆,命名为 pFastBacDual-P12A3C,由苏州金唯智生物技术有限公司对疑似阳性克隆进行测序。

1.5 重组转座子 Bacmid-P12A3C 的构建 将重组转移载体 pFastBacDual-P12A3C 转化入 DH10BacTM 感受态细胞,然后利用四环霉素、庆大霉素、卡那霉素以及 α -互补筛选出重组的转座子 Bacmid-P12A3C。同时,将无外源基因插入的供体质粒 pFastBacDual 转化 DH10BacTM 感受态细胞筛选出重组转座子 Bacmid-NC 为阴性对照。用 PureLinkTM Hipure Plasmid Miniprep Kit 对重组转座子进行质粒提取,采用通用引物 M13F 和 M13R PCR 鉴定外源基因的插入情况。

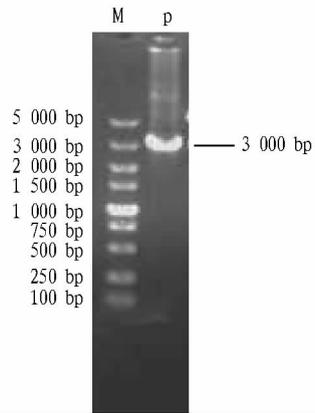
1.6 重组杆状病毒 rBac-P12A3C 的构建 在转染试剂 CellfectinII Reagent 的介导下,将重组转座子 Bacmid-P12A3C 和 Bacmid-NC 转染 Sf9 昆虫细胞,并作仅含 CellfectinII Reagent 的阴性对照,将细胞放置于 28 ℃ 下培养并观察。当转染的 Sf9 昆虫细胞出现病变时,收取病变的细胞培养上清,将收取的上清作为第 1 代的重组杆状病毒 rBac-P12A3C 和 rBac-NC。

1.7 间接免疫荧光 (IFA) 实验检测目的蛋白表达 将重组的杆状病毒 rBac-P12A3C 及 rBac-NC 接种 Sf9 昆虫细胞,细胞病变后,利用 4% 多聚甲醛固定,一抗为 O 型口蹄疫 VP1 多克隆抗体 (1:300),用 FITC 标记的山羊抗兔 IgG (1:300) 作为荧光二抗,进行 IFA 试验检测,置于荧光显微镜下观察荧光产生情况。

2 结果与分析

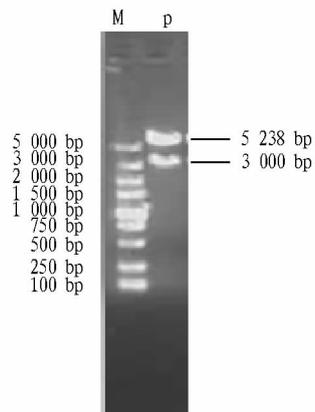
2.1 P12A3C 基因的克隆及鉴定 以质粒 pMD19-P12A3C 为模板,利用特异性引物 P12A3CF 和 P12A3CR 在 GXL 高保真 DNA 聚合酶作用下进行 PCR 扩增 P12A3C 基因得到大小约 3 000 bp 的条带,与预期结果相符 (图 1)。

2.2 重组转移载体 pFastBacDual-P12A3C 的构建及鉴定 以重组转移载体 pFastBacDual-P12A3C 为模板,利用特异性引物 P12A3CF 和 P12A3CR 在 GXL 高保真 DNA 聚合酶作用下进行 PCR 扩增 P12A3C 基因得到大小约 3 000 bp 的条带,与预期结果相符 (图 2);重组转移载体 pFastBacDual-P12A3C 由限制性内切酶 *Spe* I 和 *Hind* III 双酶切得到大小分别约 5 238 bp 和约 3 000 bp 的条带,与预计条带大小相符 (图 3),说明目的基因正确克隆入供体质粒上。将疑似阳性克隆质粒,寄送至南京金斯瑞生物技术有限公司测序。结果表明,重组转移载体 pFastBacDual-P12A3C 携带正确的 O 型 FMDV 毒株空衣壳的蛋白编码基因 P12A3C,进一步证明了



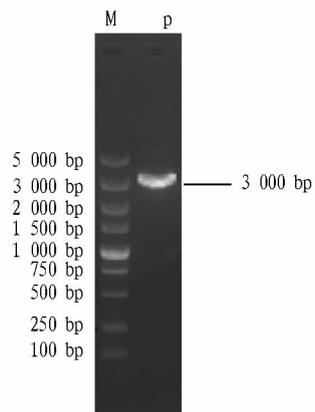
注:M. DNA 分子质量标准;p. P12A3C 基因的 PCR 产物。

图 1 P12A3C 片段的 PCR 扩增
包含完整的编码口蹄疫病毒空衣壳蛋白表达基因 P12A3C 的重组转移载体 pFastBacDual-P12A3C 构建成功。



注:M. DNA 分子质量标准;p. 重组质粒的 *Hind* III + *Spe* I 双酶切产物。

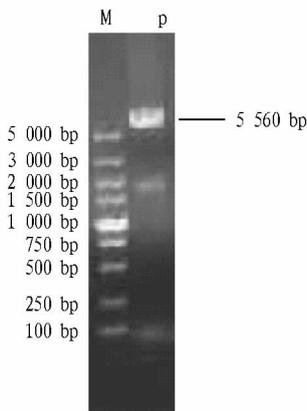
图 2 重组质粒 pFastBacDual-P12A3C 的双酶切鉴定



注:M. DNA 分子质量标准;p. P12A3C 基因的 PCR 产物。

图 3 重组质粒 pFastBacDual-P12A3C 的 PCR 鉴定

2.3 重组杆状病毒转座子 Bacmid-P12A3C 的构建与鉴定 以重组转座子 Bacmid-P12A3C 和 Bacmid-NC 为模板,采用通用引物 M13F 和 M13R 进行 PCR 扩增得到分别约 5 560 bp 和 2 560 bp 大小的条带 (图 4~5),说明重组转座子构建成功。

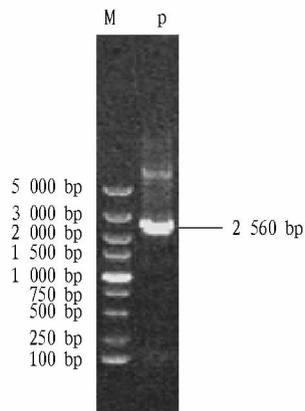


注:M. DNA 分子质量标准;p. PCR 产物。

图4 重组转座子 Bacmid-P12A3C 的 PCR 鉴定

2.4 重组杆状病毒 rBac-P12A3C 的构建 转染后的 S9 昆虫细胞在 28 °C 培养 5 d 后,出现细胞变大、脱落等明显的细胞病变效应(图 6),而阴性对照细胞未出现相应的病变。收取病变的 S9 昆虫细胞培养上清为第 1 代的重组病毒 rBac-P12A3C 和 rBac-NC。

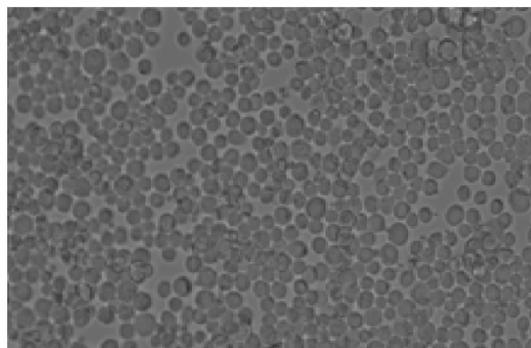
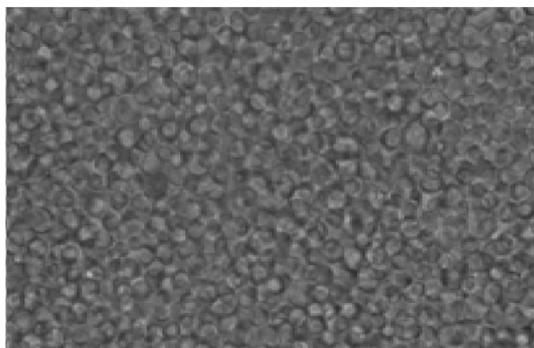
2.5 IFA 检测外源基因的表达 重组杆状病毒 rBac-



注:M. DNA 分子质量标准;p. PCR 产物。

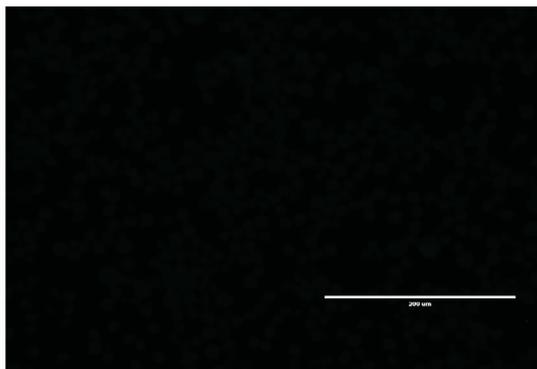
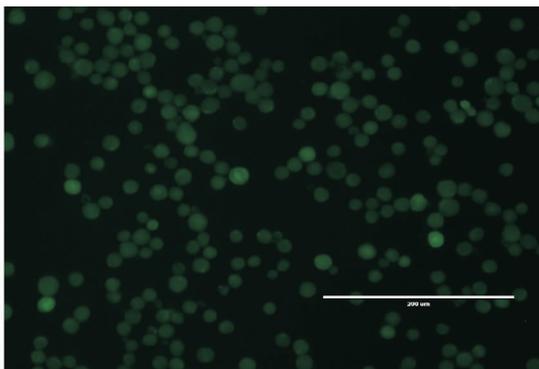
图5 重组转座子 Bacmid-NC 的 PCR 鉴定

P12A3C 和 rBac-NC 感染 S9 昆虫细胞 3 d 后,用 O 型 FMDV VP1 多克隆抗体进行 IFA 检测。结果表明,感染 rBac-P12A3C 的 S9 昆虫细胞,检测到明显的黄绿色荧光,而感染 rBac-NC 的 S9 昆虫细胞未检测到特异性黄绿色荧光(图 7)。这表明重组杆状病毒 rBac-P12A3C 中 P123CA 基因在 S9 昆虫细胞中表达成功。



注:A. 感染重组杆状病毒的 S9 细胞;B. 阴性对照。

图6 重组杆状病毒对 S9 细胞的致病变作用



注:A. 感染杆状病毒 rBac-P12A3C 的 S9 昆虫细胞;B. 感染杆状病毒 rBac-NC 的 S9 昆虫细胞。

图7 间接免疫荧光检测 S9 细胞中的目的蛋白

3 讨论

FMD 是全球范围重点防控的动物传染病之一,该病的预防和控制主要以疫苗接种为主,同时结合扑杀病畜、隔离疑似病畜、定期消毒等综合防控措施,但其对畜牧业的危害仍然不容忽视。研究 FMDV 衣壳蛋白的表达,然后以所表达

的以壳蛋白研制疫苗,是许多科学家关注的焦点。很多表达系统已经被用于表达 FMDV 空衣壳蛋白,但大都存在免疫原性不好、组装效率不高以及成本高缺点,生产的 FMDV 空衣壳蛋白不足以用作 FMDV 亚单位疫苗的研制^[6-7]。

(下转第 135 页)

发表的科技文献,采用《规范》的评估指标和方法,评估结果具有一定的规范性和参考性,能够反映大石门沟森林公园生态服务功能的真实状况。大石门沟森林公园7项生态服务功能的总价值为2 807.52万元/a,单位面积价值为5.62万元/($\text{hm}^2 \cdot \text{a}$)。该区域固碳释氧功能最高,为1 027.12万元/a,其中固碳价值为426.17万元/a,制氧总价值为600.95万元/a;其次为保护生物多样性功能,为1 000万元/a;森林涵养水源价值为276.36万元/a,其中调节水量价值为205.93万元/a,占涵养水源总价值量74.52%;净化大气环境功能价值为184.6万元/a,其中滞尘价值量最高达154.88万元/a,占净化大气功能价值量的83.89%,处理氯化物的价值量最低,为0.09万元/a,仅占价值量的0.05%;林木营养积累功能价值为170.89万元/a;森林游憩与生态文化功能价值为100.00万元;最低为保育土壤功能价值,仅为48.52万元/a,其中,保肥价值高于固土价值,为43.90万元/a,占保育土壤价值量90.48%。此次估算较保守,只是给出了大石门沟森林公园生态系统价值的潜在范围,而非准确的计算。由于数据有限,森林防护功能没有计算在内,所获得的数据都按较低值进行计算,实际生态系统服务功能要远高于此次评估,该研究为该区域以后的资源合理利用和经济发展提供基础依据。

(上接第97页)

Bac-to-Bac 杆状病毒表达系统是通过转座子原理构建重组转座子。该系统的转座过程全部在大肠杆菌内完成,重组转座子可直接用于转染,此系统还利用 α -互补原理筛选重组转座子,不会造成非重组型病毒和野生型病毒交叉污染。Bac-to-Bac 杆状病毒表达系统作为真核表达系统,表达的外源目的蛋白在昆虫细胞中可以进行翻译后修饰以及加工,所得目的蛋白的生物学功能与天然的目的蛋白更接近^[8]。活载体疫苗的研究也是FMD基因工程疫苗研究的热点,此前有学者尝试过用痘病毒^[6]、大肠杆菌^[9]、转基因植物^[10]、腺病毒载体^[11]和毕赤酵母^[12]等表达FMDV衣壳蛋白,但经比较发现杆状病毒表达系统是大规模生产表达FMDV空衣壳蛋白的最优体系之一。曹轶梅等在Bac-to-Bac杆状病毒表达系统中构建并表达了Asia 1型FMDV的P12A基因和3C蛋白酶基因,然后成功组装了其空衣壳,并用免疫豚鼠,产生了良好的免疫效果^[13]。

该研究将O型FMDV的P12A3C基因克隆至杆状病毒转移载体pFastBacDual中,并在大肠杆菌中进行转座重组,转染Sf9昆虫细胞后构建了重组杆状病毒rBac-P12A3C。经IFA试验检测发现,O型FMDV P12A3C基因在Sf9昆虫细胞中表达成功,且具有良好的反应原性。该研究为O型FMDV空衣壳蛋白的体外组装及其基因工程亚单位疫苗的研究奠定了基础。

参考文献

[1] MAHY B W J. Foot-and-mouth disease virus [M]. Springer-verlag Berlin and Heidelberg GmbH & Co. k, 2005.

参考文献

- [1] 李媛媛. 森林经营法律制度研究[D]. 哈尔滨:东北林业大学, 2005.
- [2] 李少宁. 江西省暨大冈山森林生态系统服务功能研究[D]. 北京:中国林业科学研究院, 2007.
- [3] 赵金龙, 王烁鑫, 韩海荣, 等. 森林生态系统服务功能价值评估研究进展与趋势[J]. 生态学杂志, 2013(8): 2229-2237.
- [4] 张佩霞, 侯长谋, 胡成志, 等. 广东省鹤山市森林生态系统服务功能价值评估[J]. 热带地理, 2010(6): 628-632, 662.
- [5] 靳芳, 鲁绍伟, 余新晓, 等. 中国森林生态系统服务功能及其价值评价[J]. 应用生态学报, 2005(8): 1531-1536.
- [6] 许纪泉. 武夷山区森林生态系统服务功能价值评估及其空间分布研究[D]. 福州:福建师范大学, 2007.
- [7] 王如松, 方精云, 冯宗炜. 现代生态学的热点问题研究[M]. 北京:中国科学技术出版社, 1996: 240-250.
- [8] 国家林业局. LY/T 1721-2008 森林生态系统服务功能评估规范[S]. 北京:国家林业局, 2008.
- [9] 翟洪波, 李吉跃. 油松栓皮栎混交林林地蒸散和水量平衡研究[J]. 北京林业大学学报, 2004, 26(2): 48-51.
- [10] 李世荣, 周心澄, 李福源, 等. 青海云杉和华北落叶松混交林林地蒸散和水量平衡研究[J]. 水土保持学报, 2006, 20(2): 118-121.
- [11] 肖登攀, 韩淑敏, 杨艳敏, 等. 太行山低山丘陵区不同地表类型降雨入渗产流规律研究[J]. 水土保持研究, 2009, 16(5): 35-39.
- [12] 靳芳, 余新晓, 鲁绍伟, 等. 中国森林生态系统生态服务功能及其评价[M]. 北京:中国林业出版社, 2007.
- [13] 王兵, 鲁绍伟, 尤文忠, 等. 辽宁省森林生态系统服务价值评估[J]. 应用生态学报, 2010, 21(7): 1792-1798.
- [14] 刘丰亮, 王洪俊, 陈建伟, 等. 吉林市圣母洞空气负离子浓度及变化规律[J]. 北华大学学报:自然科学版, 2011(1): 88-92.
- [15] 钟林生, 吴楚材, 肖笃宁. 森林旅游资源评价中的空气负离子研究[J]. 生态学杂志, 1998(6): 57-61.
- [16] 韩素芸, 田大伦, 闫文德, 等. 湖南省主要森林类型生态服务功能价值评价[J]. 中国林业科技大学学报, 2009, 29(6): 6-13.
- [2] SOBRINO F, DOMINGO E. Foot-and-mouth disease in Europe [J]. EMBO Reports, 2001, 2(6): 459-461.
- [3] DOMINGO E, BARANOWSKI E, ESCARMIS C, et al. Foot-and-mouth disease virus [J]. Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases, 2002, 25(5): 297-308.
- [4] BAXI M K, BAXI S, CLAUIJO A, et al. Microarray-based detection and typing of foot-and-mouth disease virus [J]. The Veterinary Journal, 2006, 172(3): 473-481.
- [5] RODRIGUEZ L L, GRUBMAN M J. Foot-and-mouth disease virus vaccines [J]. Vaccine, 2009, 27: 90-94.
- [6] 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]. Journal of General Virology, 1995, 76(12): 3089-3098.
- [7] GRUBMAN M J, MORAES M P, SCHUTTA C, et al. Adenovirus serotype 5-vectored foot and mouth disease subunit vaccines: the first decade [J]. Future Virology, 2010, 5(1): 51-64.
- [8] 兰丽盼, 吴小锋. 昆虫杆状病毒研究和应用新进展[J]. 农业生物技术学报, 2009, 16(6): 1056-1060.
- [9] KLEID D G, YANSURA D, SMALL B, et al. Cloned viral protein vaccine for foot-and-mouth disease: responses in cattle and swine [J]. Science, 1981, 214(4525): 1125-1129.
- [10] DUS SANTOS M J, CARRILLO C, ARDILA F, et al. Development of transgenic alfalfa plants containing the foot and mouth disease virus structural polyprotein gene P1 and its utilization as an experimental immunogen [J]. Vaccine, 2005, 23(15): 1838-1843.
- [11] MAYR G A, O'DONNELL V, CHINSANGARAM J, et al. Immune responses and protection against foot-and-mouth disease virus (FMDV) challenge in swine vaccinated with adenovirus-FMDV constructs [J]. Vaccine, 2001, 19(15): 2152-2162.
- [12] BALAMURUGAN V, RENJI R, SAHA S N, et al. Protective immune response of the capsid precursor polypeptide (P1) of foot and mouth disease virus type 'O' produced in *Pichia pastoris* [J]. Virus Research, 2003, 92(2): 141-149.
- [13] CAO Y, LU Z, SUN J, et al. Synthesis of empty capsid-like particles of Asia I foot-and-mouth disease virus in insect cells and their immunogenicity in guinea pigs [J]. Veterinary Microbiology, 2009, 137(1): 10-17.