

细菌内同源重组法制备 FMDV 聚蛋白编码基因重组腺病毒

张兴旺^{1,2,3}, 王 勤², 柳纪省^{1*}, 殷相平¹, 李志勇¹

(¹ 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 兰州 730046)

(² 兰州大学生命科学学院 兰州 730000) (³ 甘肃省人民医院检验中心 兰州 730000)

摘 要 采用 PCR 方法从重组质粒 pMD18-T/PP 中扩增出 FMDV 的聚蛋白 (PP) 编码基因, 再亚克隆至腺病毒穿梭质粒中, 形成重组穿梭质粒 rpAd-CMV/PP, 将获得的重组穿梭质粒与腺病毒骨架载体通过在大肠杆菌内质粒间同源重组获得重组腺病毒质粒 rpAd/PP。将腺病毒载体线性化后用脂质体介导转染 293 细胞从而获得含有口蹄疫病毒 PP 编码基因的重组腺病毒。通过倒置显微镜观测, 可见明显的细胞病变, 利用荧光显微镜可观测到报告基因绿色荧光蛋白的表达, 并在电镜下观察到 FMDV 的空衣壳。结果证明已成功获得了含有口蹄疫病毒 PP 编码基因的重组腺病毒 rAd/PP, 并成功表达组装 FMDV 空衣壳, 为 FMDV 腺病毒活载体疫苗的研究奠定了基础。

关键词 FMDV; 聚蛋白; 编码基因; 同源重组; 重组腺病毒; 空衣壳

中图分类号: Q786; S852 文献标识码: A 文章编号: 0001-6209(2006)02-0223-05

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、高度接触性、发热性传染病, 以传播迅速、感染率高而著称。被国际兽医局列为 A 类传染病之首。该病毒宿主范围广, 可以感染 20 个科近 70 种动物, 尤其对牛、羊、猪的威胁大。目前, 尽管传统疫苗在 FMD 预防控制中仍占主导地位, 但因其存在着难以避免的安全隐患等问题, 故核酸疫苗、蛋白亚单位疫苗及活载体疫苗等基因工程疫苗的研究迫在眉睫。

在 FMD 基因工程疫苗的研究中, 以腺病毒为表达载体的多基因活载体疫苗表现出了良好的应用前景^[1-5]。近年来在活载体疫苗研究中, 人们把研究的焦点主要集中在利用 FMDV 结构蛋白基因和非结构蛋白基因的不同组合, 以表达出病毒的空衣壳, 从而期望产生与自然病毒相似的免疫保护作用。口蹄疫病毒的空衣壳保留有病毒颗粒的大部分抗原特性, 故研究能够表达空衣壳的重组载体疫苗成为研究的热点。

本试验旨在以 O 型 FMDV 弱毒株 OMIII 的聚蛋白编码基因 (包括 L、P1、P2、P3 基因) 为外源基因, 与复制缺陷型腺病毒重组, 获得带有目的基因的重组腺病毒。以期通过 FMDV 全结构蛋白和非结构蛋白的比较完整的表达, 装配成 FMDV 的空衣壳, 进而提

高其免疫效力。为安全、高效的 FMD 活载体疫苗的研究奠定基础。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 载体、菌种和细胞 pMD18-T/PP 由本实验室构建; 腺病毒穿梭载体 pAdTrack-CMV、腺病毒骨架载体 pAdEasy-1、BJ5183、DH10B 菌株及人胚肾细胞 293 由中国医学科学院王树蕙教授馈赠; 大肠杆菌 (*Escherichia coli*) 菌株 JM109 等为本室保存。

1.1.2 试剂: LA-Taq 酶、T4 DNA 连接酶、*Xba* I、*Not* I 等限制性内切酶、Agarose Gel DNA Purification Kit、质粒快速提取试剂盒购自 TaKaRa 公司; *Pme* I、*Pac* I 等限制性内切酶购自华美公司; 饱和水酚、Tris 酚、DEPC、琼脂糖产自西班牙, 由上海 Sangon 公司进口分装; 其他试剂均为进口或国产分析纯。

1.2 引物设计和合成

设计合成下列引物: P-1: 5'-ATAGCGGCCGC ACCATGGATACAACCTGACTGTTTTATC-3' (*Not* I 酶切位点); P-2: 5'-ATATTCTAGACGTGACATCTGAGGGA TTATGCG-3' (*Xba* I 酶切位点)。引物由大连 TaKaRa 公司合成。

1.3 目的基因的扩增及重组腺病毒穿梭载体的获得 以 pMD18-T/PP 为模板, P-1、P-2 为引物扩增 PP

基金项目: 国家 863 计划 (2004AA213091); 国家 973 前期研究专项 (2004CCA00500)

* 通讯作者。Tel: 86-931-8342682; E-mail: Liujiqing@hotmail.com

作者简介: 张兴旺 (1973 -) 男, 河北东光人, 硕士, 主要从事分子病毒学研究。Tel: 86-931-8281605; E-mail: ZXW2002@xinhuanet.com

收稿日期: 2005-07-11; 接受日期: 2005-08-29; 修回日期: 2005-11-14

基因。PCR 条件: 95℃ 5min, 94℃ 1min, 58℃ 1min, 72℃ 7min30s, 30 个循环; 72℃ 10min。PCR 产物用 8g/L 琼脂糖凝胶电泳鉴定。

将回收得到的目的 PP 基因经 *Not* I 和 *Xba* I 双酶切后形成带有粘性末端的目的基因。同时, 将腺病毒穿梭载体 pAdTrack-CMV 经 *Not* I 和 *Xba* I 双酶切得到线性化的载体。使用 T4 DNA 连接酶对上述产物进行粘端连接。按常规化学转化方法将连接产物转化大肠埃希氏菌 JM109, 在含卡那抗性的琼脂平板上筛选, 挑选最小的克隆, 提取质粒。采用酶切、PCR 扩增等方法鉴定, 得到阳性重组质粒, 命名为 rpAdTrack-CMV/PP。

1.4 细菌内同源重组获得重组腺病毒质粒

先将骨架载体 pAdEasy-1 转化大肠杆菌 BJ5183, 制备携带腺病毒骨架载体的感受态菌。再将重组穿梭载体 pAdTrack-CMV/PP 经 *Pme* I 线性化后电转化感受态菌。电转后将细胞在 LB 培养液中于 37℃ 复苏 60min, 取适量细胞涂入含 50mg/mL 卡那霉素的培养板中, 于 37℃ 培养 20~24h, 挑选卡那霉素抗性克隆, 少量提取质粒 DNA, 用 8g/L 琼脂糖凝胶电泳进行电泳迁移率分析, 并进行限制性内切酶图谱分析。将所得的重组腺病毒质粒以上述同样条件电转化入宿主菌 DH10B, 在此宿主菌中可获得大量高质量的质粒, 挑取目的克隆, 命名为 rpAd/PP, 并送大连 TaKaRa 公司进行测序确认。

1.5 重组腺病毒质粒转染 293 细胞^[7]

提取重组质粒, *Pac* I 酶切完全消化以切去 *ori* 和 *kan* 抗性基因等质粒构件, 并暴露其反转末端重复序列 (ITR) 后, 乙醇沉淀灭菌, 溶解沉淀, 在 20cm² 培养皿用含 10% 小牛血清的 DMEM 完全培养液接种 293 细胞待其生长至 70%~80% 饱和时, 用 LipofectamineTM2000 转染试剂, 按说明书进行转染。在转染 2~3d 后取出长满 293 细胞的飞片, 用甘油封片, 置荧光显微镜下镜检。

1.6 病毒的传代培养

转染后 7~10d, 离心收集转染细胞, 用 PBS 重悬, 反复冻融 2 次, 离心, 取上清再次感染单层 293 细胞, 感染后 3~5d 收集细胞继续传代, 继续传代至细胞病变时间稳定, 收集病毒置 -70℃ 保存。

1.7 FMDV 空衣壳的电镜观察

第 10 代病毒感染后 24h, 细胞病变完全, 离心收集细胞, 加 PBS 重悬细胞, 冻融 2 次, 离心取上清 20μL 磷钨酸负染色, 置透射电子显微镜下观察 FMDV 空衣壳。

2 结果

2.1 目的基因的扩增

取 PCR 产物 5μL, 在 10g/L 琼脂糖凝胶上电泳, PCR 扩增的 PP 大小约为 6.9kb, 与预期大小相同。

2.2 重组腺病毒穿梭载体的构建

将所获得的含有目的基因 PP 的重组穿梭载体 pAdTrack-CMV/PP 经 *Not* I 和 *Xba* I 双酶切、PCR 鉴定都得到大小为 6.9kb 的目的基因片段, 证明重组腺病毒穿梭载体已成功构建。

2.3 重组复制缺陷型腺病毒质粒的鉴定

提取纯化的重组穿梭质粒用 *Pme* I 酶切线性化, 在适当的条件下^[7], 电击转化大肠杆菌 BJ5183 感受态细胞, 在 BJ5183 细胞内, 骨架载体 pAdEasy-1 以超螺旋形式存在, 而克隆有外源基因的穿梭载体以线性分子的形式存在。在细胞内同源重组相关酶系统的作用下, pAdEasy-1 与重组穿梭载体的同源序列区发生基因重组, 其结果就将外源基因整合于重组腺病毒质粒 *E₁* 区。穿梭载体的 right arm 与骨架载体的 right arm 同时共有 Ad5 病毒基因组 3534~5772 序列, 可有效介导二者同源重组; 而穿梭载体的 left arm 与骨架载体的 left arm 同时共有腺病毒 Ad5 的右侧末段 34931~35935 序列, 同源重组可在此区发生, 或在其共有的质粒复制原点 *ori* 处发生。

电转化感受态菌, 挑取阳性克隆, 少量提取质粒 8g/L 琼脂糖凝胶电泳, 可见重组腺病毒质粒与 pAdEasy-1 大小相似, 而大于穿梭载体 pAdTrack-CMV/PP 限制性内切酶 *Pac* I 酶切后可见约 4.5kb 和 33kb 的条带, 表明该重组腺病毒质粒是由 right arm 和 left arm 同源重组所得的, 命名为 rpAdORF。

2.4 重组腺病毒的包装

重组腺病毒质粒经 *Pac* I 酶切后经脂质体 lipofectamine2000 转染 293 细胞后 2~3d 可见示踪标记绿色荧光蛋白 (GFP) 的表达 (图版 I-a)。7~10d 后收集细胞, 反复冻融 2 次, 取病毒上清接种 293 细胞, 以含 2% 小牛血清的完全 DMEM 培养液于 37℃、5% CO₂ 培养箱中培养, 直至观察到细胞病变 (CPE), 结果如图版 I-b 所示。

2.5 电镜观察结果

电镜观察 FMDV 空衣壳直径约为 20nm, 呈球形, 大小和形状与 FMDV 相似。说明构建的重组腺病毒成功地组装成了 FMDV 的空衣壳 (图版 I-c)。

3 讨论

用腺病毒构建基因转移载体具有众多的优

点^[8] (1)作为真核基因调控研究的模式系统之一,人类对腺病毒在分子水平已有相当的认识(2)腺病毒有中等大小的基因组,适合于用最少的病毒序列构建高容量的载体(3)腺病毒可感染的宿主细胞范围广泛,并可感染非复制细胞(4)腺病毒相对稳定且易达到很高的滴度(5)可通过多种途径给药等。传统方法大都是在哺乳动物细胞中同源重组获得重组腺病毒,有一定的难度。我们采用的 AdEasy 系统^[9]在大肠杆菌内同源重组,使重组腺病毒 Ad/PP 的获得变得更快、更方便。该系统中,主要的改进为(1)含有大部分腺病毒基因组的载体为超螺旋质粒,而非线性 DNA,使病毒 DNA 操作更容易(2)同源重组在大肠杆菌内进行,使重组质粒的筛选更为简单。另外,我们采用的腺病毒载体质粒上带有独立、完整的 GFP 表达盒,以作为示踪标记,使得重组病毒的包装、单克隆化及感染可在“直视”下进行,方便了操作。从而避免了传统方法中存在的重组效率不高,且不能保证重组腺病毒基因组结构的均一性等缺点。利用两步法转化较共转化提高了重组效率。

FMDV VP1 上有 3 个保守的氨基酸序列具有与细胞受体结合的主要功能,以突起的形式暴露于病毒粒子的表面,在免疫中发挥重要的作用,因此早期的研究主要集中于此。基于 FMDV VP1 编码基因研制的基因工程疫苗报道很多,但效果并不理想^[10,11]。FMDV 感染细胞中,VP1 被 3C 蛋白酶催化裂解为 VP0、VP1、VP3,这 3 种蛋白相互作用形成 5S 原体,5 个 5S 原体形成一个五粒体,12 个五粒体形成一个的空衣壳^[12]。

近年来,空衣壳作为疫苗的抗原载体越来越受到广大科学家的重视,它模拟了病毒粒子结构,由于不包裹核酸,不能复制,因此也没有感染性^[13],因此是非常安全的,由于空衣壳的空间结构,其常常可以诱导产生较灭活疫苗和可溶性多肽更为强烈的体液免疫应答,因为其表面是以非感染性的颗粒状态模拟天然抗原呈递过程来呈递糖蛋白抗原的,而该法提呈引起的免疫应答优于溶解状态,故在保护作用中起重要作用的糖蛋白抗原引起的免疫应答可望更接近自然感染。现有研究表明空衣壳能诱导产生与完全病毒粒子相似的特异性中和抗体,因此可作为研究基因工程疫苗的一个很好选择^[14]。

本研究成功构建了以 FMDV 人工致弱毒弱毒株 OMIII 的 PP 编码的基因(包括 L、P1、P2、P3 基因)为外源基因的复制缺陷型重组腺病毒,通过 FMDV 结

构蛋白基因和非结构蛋白基因的比较完整的表达,成功地表达组装了 FMDV 的空衣壳,以期提高其免疫效力。这为 FMDV 复制缺陷型腺病毒活载体疫苗的研制奠定了基础。本研究的动物免疫实验已取得令人满意的结果。

参 考 文 献

- [1] Sanz-Parra A, Vazquez B, Sobrino F, et al. Evidence of partial protection against foot-and-mouth disease in cattle immunized with a recombinant adenovirus vector expressing the precursor polypeptide (P1) of foot-and-mouth disease virus capsid proteins. *J Gen Virol*, 1999, **80**: 671 - 679.
- [2] Mayr GA, Donnell VO, Chinsangaram J, et al. Immune responses and protection against foot-and-mouth disease virus (FMDV) challenge in swine vaccinated with adenovirus-FMDV constructs. *Vaccine*, 2001, **19**: 2152 - 2162.
- [3] Moraes MP, Mayr GA, Mason PW, et al. Early protection against homologous challenge after a single dose of replication-defective human adenovirus type 5 expressing capsid proteins of foot-and-mouth disease virus (FMDV) strain A24. *Vaccine*, 2002, **20** (11 - 12): 1631 - 1639.
- [4] Wang Y, Xiang Z, Pasquini S, et al. The use of an E1-deleted, replication-defective adenovirus recombinant expressing the rabies virus glycoprotein for early vaccination of mice against rabies virus. *J Virology*, 1997, **71** (5): 3677 - 3683.
- [5] Kleid DG, Yansura D, Small B, et al. Cloned viral protein vaccine food-and-mouth disease: Responses in cattle and swine. *Science*, 1981, **214**: 1125 - 1129.
- [6] Brodn F. New approaches to vaccination against foot-and-mouth disease. *Vaccine*, 1992, **10**: 1022 - 1026.
- [7] Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T. 分子克隆试验指南. 金冬雁, 黎孟枫, 等译. 第二版. 北京: 科学出版社, 1996.
- [8] Zhang WW. Development and application of adenoviral vectors for gene therapy of cancer. *Cancer Gene Therapy*, 1999, **6** (2): 113 - 138.
- [9] He TC, Zhou S, Costa LT, et al. A simplified system for generating recombinant adenoviruses. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1998, **95**: 2509 - 2514.
- [10] Belsham GJ. Distinctive features of foot-and-mouth disease virus, a member of the picornavirus family: aspects of virus protein synthesis, protein processing and structure. *Prog Biophys Molec Bio*, 1993, **60**: 241 - 260.
- [11] Rowlands DJ, Sangar DV, Brown F. A comparative chemical and serological study of full and particles of foot-and-mouth disease virus. *J Gen Virol*, 1975, **26**: 227 - 238.
- [12] Cedillo-Barron L. 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 Gen Virol*, 2001, **82**: 1713 - 1724.
- [13] Rob N, Polly R. Virus-like particle as immunogens. *Trends in Microbiology*, 2003, **11** (9): 438 - 444.
- [14] Michael T, Otfried M. Foot-and-mouth disease virus protease 3C inhibits cellular transcription and mediates cleavage of histone H3. *Virology*, 1990, **174**: 364 - 374.

Construction and identification of recombinant adenovirus containing the polyproteins coding regions of O type foot-and-mouth disease virus by homologous recombination in *Escherichia coli*

ZHANG Xing-wang^{1, 2, 3}, WANG Qin², LIU Ji-xing^{1*}, YIN Xiang-ping¹, LI Zhi-yong¹

(¹ Key Laboratory of Animal Virology of Ministry of Agriculture, State Key Laboratory of Veterinary Etiological Biology, Lanzhou Veterinary Research Institute, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Lanzhou 730046, China)

(² School of Life Science, Lanzhou University, Lanzhou 730000, China)

(³ Department of Clinical Laboratory, People's Hospital of Gansu Province, Lanzhou 730000, China)

Abstract : The gene coding for the polyprotein (PP) of foot-and-mouth disease virus (FMDV) was obtained by PCR from recombinant plasmid rpMD18-T/PP. The PCR product was digested with Xba I and Not I and inserted into the cloning site of the adenovirus shuttle vector pAdTrack-CMV, previously digested with the same enzymes. This recombinant shuttle plasmid was designated rpAd-CMV/PP. The recombinant adenovirus vector rpAd/PP was obtained by homologous recombination of plasmid rpAd-CMV/PP and adenovirus skeletal vector pAdeasy-1 in *E. coli*. Plasmid rpAd/PP was linearized by Pme I and transformed into 293 competent cells to pack the adenovirus using liposome mediated gene transfer method and, as a result, the recombinant adenovirus rAd/PP that contained the polyprotein coding gene was obtained. Obvious CPE could be observed under an inverted microscope, the green fluorescence protein expression can be detected under fluorescence microscope and the empty capsid of FMDV was observed under electron microscope. These results indicated that the recombinant adenovirus rAd/PP expressed the PP protein and that this protein could be assembled into the empty capsid of FMDV. The recombinant adenovirus obtained in this study can be used for further research for making FMDV recombinant adenovirus vaccine.

Keywords : Foot-and-mouth disease ; Polyprotein (PP) ; Homologous recombination ; Recombinant adenovirus ; Empty capsid

Foundation item : Chinese Nation Program for High Technology Research and Development (2004AA213091) ; Prophase Research of National Major Basic Research and Development Program of China (2004CCA00500)

* Corresponding author. Tel 86-931-8342682 ; E-mail : Liujiexing@hotmail.com

Received : 11 July 2005 / Accepted : 29 August 2005 / Revised : 14 November 2005