

## 共表达口蹄疫病毒衣壳前体蛋白 P1-2A 基因和蛋白酶 3C 基因牛肾细胞株的筛选及稳定性

李炯, 刘艳红\*, 刘湘涛, 尚佑军, 刘俊林, 安芳兰, 殷宏\*

(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, 国家口蹄疫参考实验室, 兰州 730046)

**摘要:**【目的】筛选稳定表达口蹄疫病毒衣壳蛋白的牛肾细胞 (Madin-Darby bovine kidney, MDBK) 株。【方法】采用聚合酶链式反应 (Polymerase chain reaction, PCR) 方法从重组质粒 pMD-P1-2A 和 pMD-3C 中分别扩增口蹄疫病毒衣壳前体蛋白 P1-2A 基因和蛋白酶 3C 基因, 将两基因依次插入逆转录病毒载体 pBABE-puro。重组逆转录病毒载体 pBABE-puro/P1-2A-3C 和 pVSV-G 质粒载体用脂质体介导共转染 GP2-293 包装细胞。产生的重组逆转录病毒感染 MDBK 细胞后使用嘌呤霉素筛选抗性细胞。利用克隆环套取法得到单克隆细胞。经间接免疫荧光和酶联免疫吸附测定 (Enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA) 方法检测 MDBK 细胞中衣壳蛋白的表达, 并在电镜下观察口蹄疫病毒空衣壳。【结果】成功筛选到稳定表达口蹄疫病毒衣壳蛋白的 MDBK 细胞株, 衣壳前体蛋白 P1-2A 在蛋白酶 3C 裂解作用下正确组装成空衣壳。【结论】该研究为口蹄疫亚单位疫苗的研制提供了实验材料。

**关键词:** 逆转录病毒载体 口蹄疫病毒 衣壳蛋白 MDBK 细胞

中图分类号: S852.65 文献标识码: A 文章编号: 0001-6209 (2008) 11-1520-06

口蹄疫 (Foot-and-mouth disease, FMD) 是猪、牛、羊和野生偶蹄动物的一种急性、烈性传染病<sup>[1]</sup>。该病传播速度快、感染率高, 一旦爆发将给发病国家和地区畜牧业和进出口贸易造成巨大损失。疫苗注射是控制该病的有效手段。传统的灭活疫苗在 FMD 的防控中发挥着主导作用, 但其安全性存在一定缺陷, 因此研究更为安全、有效的新型疫苗迫在眉睫。近年来基因工程疫苗的研究发展迅速, 并逐渐成为 FMD 疫苗研究的热点<sup>[2~6]</sup>。

亚单位疫苗是基因工程疫苗的一种, 由于其只含有病原体的一部分, 不会引起动物发病, 安全性很高, 所以成为基因工程疫苗研究的热点之一<sup>[6~8]</sup>。选择何种病毒抗原及如何有效、持续性的获得抗原是疫苗研究中首要解决的问题。口蹄疫病毒 (Foot-and-mouth

disease virus, FMDV) 空衣壳由 VP0、VP1 和 VP3 各 60 个拷贝组成, 其不含病毒核酸, 无感染能力。实验表明空衣壳不仅能诱导机体产生免疫反应, 而且能诱导产生与全病毒相似的特异性中和抗体<sup>[9]</sup>, 因此其成为疫苗研究的候选抗原之一。逆转录病毒载体具有将目的基因高效转染细胞, 并稳定表达的优点<sup>[10]</sup>。如能利用该载体转移 FMDV 抗原基因, 并筛选到稳定表达抗原基因的细胞株, 就能解决疫苗研究中抗原持续性获取的问题, 这必将为成功研制口蹄疫亚单位疫苗奠定良好的基础。

最早 Cone<sup>[11]</sup>和 Karlsson<sup>[12]</sup>等用逆转录病毒载体实现了人珠蛋白基因的正确表达, 1990 年美国科研人员使用逆转录病毒载体进行了第一例人类基因治疗并取得成功<sup>[13]</sup>。在兽医领域科研人员已经使用该载体进

基金项目: 国家“863 计划”(2006AA10A204); 甘肃省科技攻关项目(ZGS052-A41-0006-03); 中国农业科学院兰州兽医研究所所长基金

\*通讯作者。Tel: +86-931-8342706; Fax: +86-931-8340977; E-mail: liuyh@gssctc.gov.cn, yinhong@public.lz.gs.cn

作者简介: 李炯(1979-), 男, 山西省长治人, 博士研究生, 研究方向为动物病毒分子生物学。E-mail: lijiongmail@yahoo.com.cn

收稿日期: 2008-04-25; 修回日期: 2008-07-21

行了禽流感、新城疫、马立克氏病、猪瘟、伪狂犬病、猪水泡病等病原相关基因的表达研究<sup>[14-19]</sup>, 但利用该载体进行 FMDV 抗原基因表达尚未见报道。

本实验旨在利用逆转录病毒载体, 将 FMDV 衣壳前体蛋白 P1-2A 基因和蛋白酶 3C 基因转入 MDBK 细胞, 筛选稳定表达 FMDV 衣壳蛋白的细胞株, 希望通过培养转基因细胞株来获得空衣壳, 为进一步研制口蹄疫亚单位疫苗提供材料。

## 1 材料和方法

### 1.1 材料

**1.1.1 主要材料:** A 型 FMDV 重组质粒 pMD-P1-2A、pMD-3C、逆转录病毒载体 pBABE-puro、pVSV-G 载体、MDBK 细胞、GP2-293 包装细胞、JM109 菌株均为本实验室构建或保存; A 型 FMDV 阳性抗原由马军武副研究员惠赠。

**1.1.2 主要试剂和仪器:** 工具酶购自美国 Promega 公司, 质粒提取试剂盒、胶回收试剂盒和基因组 DNA

提取试剂盒购自美国 OMEGA 公司, 细胞培养基 DMEM 和胎牛血清购自美国 HyClone 公司, 脂质体 Lipofectamine™2000 和 opti-MEM 培养基购自美国 Invitrogen 公司, FITC-羊抗兔 IgG、HRP-兔抗豚鼠 IgG 购自美国 Sigma 公司。其它试剂均为国产分析纯。PCR 仪为英国 Techne 公司 TC312 型 PCR 仪, 荧光显微镜为日本 Olympus 公司 BX51TF 型显微镜, 酶标仪为美国 Bio-rad 公司 680 型酶标仪。

**1.1.3 引物:** 表 1 为本研究中所用的引物。

**1.2 重组逆转录病毒载体 pBABE-puro/P1-2A-3C 的构建**<sup>[20]</sup>

根据逆转录病毒载体 pBABE-puro 的多克隆位点及已知的 FMDV P1-2A、3C 基因的核苷酸序列, 分别设计引物, 引物序列见表 1。该引物由大连宝生物工程公司合成。

用 P1-2A 的上、下游引物, 以重组质粒 pMD-P1-2A 为模板, 扩增带有相应酶切位点的 P1-2A 基因; 用 3C 的上、下游引物, 以重组质粒 pMD-3C 为模板, 扩增带

表 1 本文研究所用引物  
Table 1 The primer used in this study

Primer	Sequences(5' 3')	Product size/bp
P1-2A	Forward: CGCGGATCC <sub>BamH I</sub> GCCACCATGG <sub>Kozak</sub> GCGCCGACAATCCA Reverse: CCGGAATTC <sub>EcoR I</sub> CATGTCTCCTGCATCTTGC	2361
3C	Forward: CCGGAATTC <sub>EcoR I</sub> AGTGGTGCTCCGCCGACCGACT Reverse: CCGGAATTC <sub>EcoR I</sub> CTCGTGATGAGGCTCGGGGTC	639
VP1	Forward: CTGTTGAGAACTACGGTGGTG Reverse: TCCGTTTGTGTCTGTCTTGGC	582

有相应酶切位点的 3C 基因。P1-2A 基因经过酶切纯化后首先插入经 *BamH I* 和 *EcoR I* 酶切处理的 pBABE-puro 载体, 然后再将重组的 pBABE-puro-P1-2A 质粒用 *EcoR I* 酶切, 5 端去磷酸化处理后与 3C 基因连接。用该产物转化大肠杆菌 JM109, 挑选单个菌落, 提取质粒。用酶切方法鉴定重组质粒, 得到的阳性质粒命名为 pBABE-puro/P1-2A-3C。

### 1.3 假型逆转录病毒的包装

利用脂质体介导法将重组的逆转录病毒载体 pBABE-puro/P1-2A-3C 和 pVSV-G 载体共转染 GP2-293 包装细胞。转染前使 GP2-293 包装细胞的生长密度达到  $1 \sim 2 \times 10^6$  细胞 (培养皿直径为 60 mm)。具体方法见美国 Clontech 公司操作指南。

### 1.4 假型逆转录病毒感染 MDBK 细胞及单克隆细胞的筛选

感染前 20 h 将 MDBK 细胞低密度传至 60 mm 培养皿中, 重组病毒液中加入聚凝胺 (Polyberne) 使其

终浓度为  $8 \mu\text{g/mL}$ 。将上述病毒液 5 mL 加到已弃去原培养基的 MDBK 细胞上, 感染 4 h 后去除病毒液, 加入含 10% 胎牛血清的 DMEM 培养基继续培养。待细胞长至 70%~80% 融合度时加入嘌呤霉素 ( $2.5 \mu\text{g/mL}$ ) 进行抗性筛选, 每 24 h 换液一次, 连续筛选 10~14 d。同时设正常的 MDBK 细胞作为阴性对照。将筛选到的抗性细胞进行稀释传至新培养皿中, 每日观察细胞, 待单克隆细胞长至一定数量后, 用克隆环套取后扩大培养。

**1.5 间接免疫荧光检测 MDBK 细胞中衣壳蛋白的表达**  
在细胞培养皿中放置盖玻片, 按常规方法培养 MDBK 单克隆细胞。当细胞融合度达到 80% 时, 收集盖玻片, 具体方法参照文献[21]。同时设感染 pBABE-puro 病毒的 MDBK 细胞作阴性对照。

**1.6 双抗体夹心 ELISA 检测 MDBK 细胞中衣壳蛋白的表达**

取  $1 \times 10^8$  单克隆细胞, PBS 溶液漂洗 3 次, 4

1000×g 离心 5 min。将细胞沉淀用细胞裂解液裂解，离心后取上清。分别以 A 型 FMDV 阳性抗原、pBABE-puro 病毒感染 MDCK 细胞裂解物和正常 MDCK 细胞裂解物作为阳性和阴性对照，具体方法参照文献[22]。

### 1.7 细胞连续传代后衣壳蛋白基因的稳定整合及表达检测

由于 FMDV 衣壳蛋白是由 VP0、VP3、VP1 各 60 个拷贝组成，因此可根据扩增 VP1 片段来鉴定衣壳蛋白基因在 MDCK 细胞中的稳定整合。扩增不同代次 MDCK 细胞基因组中整合的 VP1 基因。

从确定阳性细胞克隆之日起，每隔 3 d 传一代，连续传代至 35 代。分别选取第 2 代、第 5 代、第 15 代、第 25 代、第 35 代细胞，收取细胞裂解物，用 ELISA 方法检测 MDCK 细胞中衣壳蛋白稳定表达，方法如上。

### 1.8 病毒空衣壳的电镜观察

收获 MDCK 单克隆细胞，PBS 溶液漂洗 3 次后，细胞沉淀用细胞裂解液裂解。离心得到的上清液浓缩后用于电镜观察。

## 2 结果

### 2.1 重组逆转录病毒载体的构建

重组质粒 pBABE-puro/P1-2A-3C 经酶切后的片段与预期大小相符，说明含有衣壳前体蛋白基因 P1-2A 和蛋白酶 3C 基因的逆转录病毒表达载体 pBABE-puro/P1-2A-3C 构建成功。测序结果显示：P1-2A-3C 片段长 3000 个核苷酸，编码 1000 个氨基酸。分析测序结果 P1-2A-3C 的读码框正确，主要抗原位点处的氨基酸未发生突变。

### 2.2 表达 FMDV 衣壳蛋白的 MDCK 单克隆细胞筛选

重组逆转录病毒感染 MDCK 细胞后，用嘌呤霉素进行抗性细胞筛选。筛选 10–14 d 后，非表达抗性基因的细胞陆续死亡，而抗性细胞则能贴壁生长，并有单个细胞集落长出。挑选生长状态良好的细胞克隆，用克隆环套取后扩大培养。

### 2.3 单克隆 MDCK 细胞中衣壳蛋白表达结果

通过间接免疫荧光方法染色，在荧光显微镜下观察。结果显示感染 pBABE-puro/P1-2A-3C 逆转录病毒的 MDCK 细胞出现了特异荧光，而感染 pBABE-puro 逆转录病毒的 MDCK 细胞只有微弱的荧光背景（图 1）。表明衣壳蛋白在 MDCK 细胞中得到了表达。

收获经感染和未感染的 MDCK 细胞，用双抗体

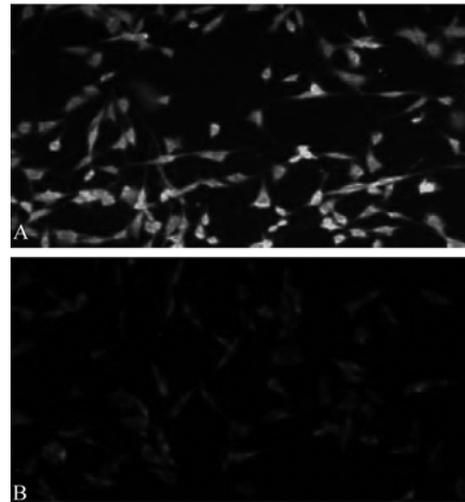


图 1 间接免疫荧光检测衣壳蛋白的表达(200×)

Fig. 1 Detection of the capsid protein expression by indirect immunofluorescent assay(200×). A: 5<sup>th</sup> generation MDCK cells infected by pBABE-puro/P1-2A-3C recombinant virus; B: 5<sup>th</sup> generation MDCK cells infected by pBABE-puro recombinant virus.

夹心 ELISA 法检测衣壳蛋白的表达。结果显示从感染 pBABE-puro/P1-2A-3C 逆转录病毒的 MDCK 细胞得到的裂解物光密度 (Optical density, OD) 值随倍比稀释度的增加逐渐下降，其变化规律与 FMDV 标准抗原的 OD 值变化规律相同。表明衣壳蛋白在 MDCK 细胞中表达。而在感染 pBABE-puro 逆转录病毒的 MDCK 细胞和未感染的 MDCK 细胞裂解物中未检测到衣壳蛋白的表达 (图 2)。

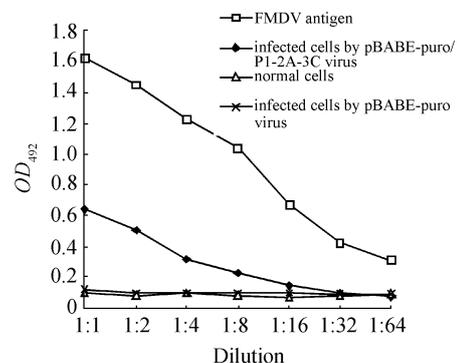


图 2 双抗体夹心 ELISA 检测衣壳蛋白的表达

Fig. 2 Detection of the capsid protein expression by sandwich-ELISA

### 2.4 细胞连续传代后衣壳蛋白基因的稳定整合及表达结果

分别提取第 2 代、5 代、15 代、25 代、35 代 MDCK 细胞基因组 DNA，扩增 VP1 基因。结果显示所筛选的 MDCK 单克隆细胞第 2 代、5 代、15 代、25 代、35 代细胞基因组中均扩增出大小约为 580bp 的片段，而正常的 MDCK 细胞基因组中未扩增出条带(图略)。表明衣壳

蛋白基因在所筛选的 MDBK 单克隆细胞中稳定整合。

分别收获第 2 代、5 代、15 代、25 代、35 代 MDBK 细胞,用双抗体夹心 ELISA 法进行检测,结果显示各代细胞中均有衣壳蛋白的表达(图 3)。

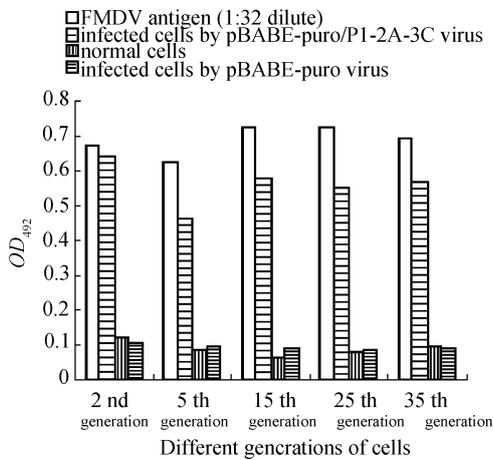


图 3 不同代次细胞中衣壳前体蛋白稳定性表达  
Fig. 3 Stable expression of capsid precursor protein in screened cell strain of various passages.

### 2.5 FMDV 空衣壳的电镜观察

将 MDBK 单克隆细胞裂解后,浓缩裂解产物进行电镜观察。结果显示感染 pBABE-puro/P1-2A-3C 逆转录病毒的 MDBK 细胞裂解物中出现类似的病毒空衣壳,大小约为 30 nm。说明 FMDV 衣壳前体蛋白 P1-2A 在 3C 蛋白酶的作用下裂解为成熟的结构蛋白并正确组装成空衣壳(图 4)。

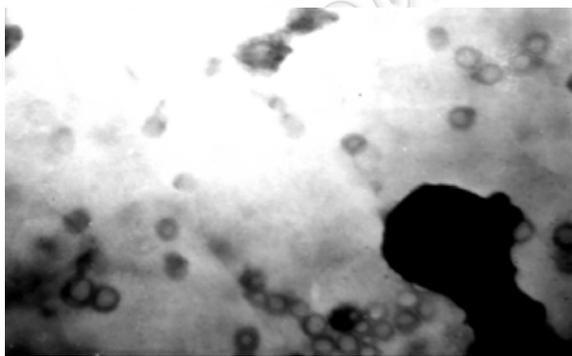


图 4 电镜观察 MDBK 细胞中形成的空衣壳(80000×)  
Fig. 4 The morphology observation the empty capsid by the electron microscope(80000×).

## 3 讨论

FMDV 属于小 RNA 病毒科口蹄疫病毒属,其基因组读码框由 L 基因、P1 结构蛋白基因、P2 和 P3 非结构蛋白基因以及起始密码子和终止密码子组成。读码框编码的多聚蛋白经过初级裂解形成 L-P1-2A、

2BC、P3 三种前体蛋白<sup>[23]</sup>。16 个氨基酸的多肽 2A 能催化 P1-2A 从 2B 处裂解<sup>[24]</sup>,次级裂解由蛋白酶 3C 完成,3C 蛋白酶能使 P1-2A 裂解成 VPO、VP3 和 VP1,同时 3C 蛋白酶还能裂解宿主细胞的组蛋白 H3,阻断宿主细胞的转录<sup>[25]</sup>。小 RNA 病毒组装的细节尚不清楚,但在病毒感染细胞及体外翻译实验中获得几种中间体,它们包括:由 VPO、VP3 和 VP1 各一个拷贝组成的 5S 原体,5 个拷贝 5S 原体组成的 12S 五聚体,12 个拷贝 12S 五聚体组成的 70S 空衣壳。由于衣壳前体蛋白 N 端的十四烷酰化及 3C 蛋白酶的裂解作用将影响空衣壳的组装和稳定性<sup>[26]</sup>,因此本研究选择了 FMDV P1-2A 基因和 3C 基因。

逆转录病毒载体由于其基因转移技术的相对成熟而在人类免疫缺陷病毒、乙肝病毒、流感病毒、严重急性呼吸综合征冠状病毒等重要病原的研究中被广泛使用<sup>[27-30]</sup>。逆转录病毒载体系统包括两部分:一是带有包装信号 $\phi$ 及相关序列的逆转录病毒载体;二是能提供病毒结构蛋白但缺乏包装信号的包装细胞。常用的逆转录病毒载体来源于 Moloney 小鼠白血病病毒,通过切除其中三个病毒结构蛋白基因序列 pol、gag 和 env,保留其中的长末端重复序列和包装信号 $\phi$ 而成为复制缺陷型病毒,因此它不具备感染能力。它必须与一种经过改造的含有辅助病毒基因组的包装细胞重组后,才能产生具有感染能力的新的病毒。但传统的逆转录病毒载体系统存在一些缺点:如病毒滴度低、可感染的宿主范围小等。利用水疱性口炎病毒 G 蛋白(vesicular stomatitis virus G, VSV-G)代替逆转录病毒自身 env 基因编码的外膜糖蛋白来包装病毒可以扩大病毒感染宿主的范围和增加病毒的感染效率。

本研究根据逆转录病毒载体的特点,将 FMDV 衣壳前体蛋白 P1-2A 基因和蛋白酶 3C 基因转移至 MDBK 细胞中,筛选稳定表达衣壳蛋白的细胞株。结果显示成功筛选到了稳定表达衣壳蛋白的 MDBK 细胞株,并在电镜下观察到了正确组装的病毒空衣壳。但我们筛选到的细胞株中抗原蛋白的表达量低于 FMDV 感染细胞中抗原蛋白的表达量,这可能与我们的挑选的单克隆细胞数较少有关。提示在今后进行类似的研究中,必须挑选足够数量的单克隆细胞。在研究中我们利用嘌呤霉素来筛选抗性细胞,一个筛选周期要 14 d 左右,筛选周期较长,工作量较大。如能在载体中引入更为直观的筛选标记,如绿色荧光蛋白,就能加快筛选周期,减少工作量。本研究首次利用逆转录病毒载体进行 FMDV 抗原基因的转移并成功筛选到

稳定表达衣壳蛋白的 MDBK 细胞株,为下一步口蹄疫亚单位疫苗的研究提供了实验数据和前期材料。

### 参 考 文 献

- [1] He Y, Qian P, Zhang K, *et al.* Construction and immune response characterization of a recombinant pseudorabies virus co-expressing capsid precursor protein (P1) and a multiepitope peptide of foot-and-mouth disease virus in swine. *Virus Genes*, 2008, 36(2): 393–400.
- [2] Wu Q, Moraes MP, Grubman MJ. Recombinant adenovirus co-expressing capsid proteins of two serotypes of foot-and-mouth disease virus (FMDV): in vitro characterization and induction of neutralizing antibodies against FMDV in swine. *Virus Res*, 2003, 93(2): 211–219.
- [3] 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). *Virus Genes*, 2006, 33(3): 337–344.
- [4] Wang CY, Chang TY, Walfield AM, *et al.* Effective synthetic peptide vaccine for foot-and-mouth disease in swine. *Vaccine*, 2002, 20(19-20): 2603–2610.
- [5] Pan L, Zhang Y, Wang Y, *et al.* Foliar extracts from transgenic tomato plants expressing the structural polyprotein, P1-2A, and protease, 3C, from foot-and-mouth disease virus elicit a protective response in guinea pigs. *Vet Immunol Immunopathol*, 2008, 121(1-2): 83–90.
- [6] Shi XJ, Wang B, Zhang C, *et al.* Expressions of Bovine IFN-gamma and foot-and-mouth disease VP1 antigen in *P. pastoris* and their effects on mouse immune response to FMD antigens. *Vaccine*, 2006, 24(1): 82–89.
- [7] Su C, Duan X, Wang X, *et al.* Heterologous expression of FMDV immunodominant epitopes and HSP70 in *P. pastoris* and the subsequent immune response in mice. *Vet Microbiol*, 2007, 124(3-4): 256–263.
- [8] Li Z, Yi Y, Yin X, *et al.* Expression of Foot-and-Mouth Disease Virus capsid proteins in Silkworm-Baculovirus expression system and its utilization as a subunit vaccine. *PLoS ONE*, 2008, 3(5): e2273.
- [9] Rowlands DJ, Sangar DV, Brown F D.A comparative chemical and serological study of the full and empty particles of foot-and-mouth disease virus. *J Gen Virol*, 1975, 26(3): 227–238.
- [10] Somia N. Gene transfer by retroviral vectors: an overview. *Methods Mol Biol*, 2004, 246: 463–90.
- [11] Cone RD, Weber-Benarous A, Baorto D, *et al.* Regulated expression of a complete human beta-globin gene encoded by a transmissible retrovirus vector. *Mol Cell Biol*, 1987, 7(2): 887–897.
- [12] Karlsson S, Papayannopoulou T, Stamatoyannopoulos G, *et al.* Regulated expression of human globin genes following transfer with retroviral vectors. *Prog Clin Biol Res*, 1987, 251: 595–603.
- [13] Blaese RM, Culver KW. Gene therapy for primary immunodeficiency disease. *Immunodef Rev*, 1992, 3(4): 329–349.
- [14] Brown DW, Kawaoka Y, Webster RG, *et al.* Assessment of retrovirus-expressed nucleoprotein as a vaccine against lethal influenza virus infections of chickens. *Avian Dis*, 1992, 36(3): 515–520.
- [15] Morrison T, Hinshaw VS, Sheerar M, *et al.* Retroviral expressed hemagglutinin-neuraminidase protein protects chickens from Newcastle disease virus induced disease. *Microb Pathog*, 1990, 9(6): 387–396.
- [16] 段玉友, 崔治中, 秦爱建, 等. 由反转录病毒载体转移的马立克病毒糖蛋白 D 基因在感染细胞中的表达. 病毒学报(*Chinese Journal of Virology*), 1998, 14(2): 151–157.
- [17] 许信刚, 胡建和, 张彦明. 反转录病毒载体介导的猪瘟病毒 E2 基因在真核细胞中表达及动物免疫试验初报. 中国农学通报(*Chinese Agricultural Science Bulletin*), 2005, 21(5): 20–23.
- [18] 李祥敏, 钱平, 金梅林, 等. 反转录病毒载体介导表达伪狂犬病病毒 PK 基因 MDBK 细胞系的建立. 中国生物化学与分子生物学报(*Chinese Journal of Biochemistry and Molecular Biology*), 2003, 19(3): 396–400.
- [19] 田宏, 吴锦艳, 龚真莉, 等. 稳定表达猪水泡病病毒 P1 基因的 PK-15 细胞系的建立. 畜牧兽医学报(*Acta Veterinaria et Zootecnica Sinica*), 2008, 39(4): 478–482.
- [20] 刘艳红, 李炯, 刘俊林, 等. 口蹄疫病毒 P1 2A 和 3C 基因重组反转录病毒表达载体的构建. 中国兽医科学(*Veterinary Science in China*), 2006, 36(8): 606–610.
- [21] 李志勇, 易咏竹, 殷相平, 等. 亚洲型口蹄疫病毒全长可读框的表达及其产物免疫原性分析. 科学通报(*Chinese Science Bulletin*), 2007, 52(16): 1903–1907.
- [22] 郭慧琛, 刘在新, 孙世琪, 等. 口蹄疫病毒多基因重组质粒的体外表达及衣壳组装. 病毒学报(*Chinese Journal of Virology*), 2005, 21(3): 228–234.
- [23] 江鹏斐, 赵启祖, 谢庆阁. 口蹄疫研究进展. 中国农业科学(*Scientia Agricultura Sinica*), 1999, 32(6): 93–100.
- [24] de Felipe P, Hughes LE, Ryan MD, *et al.* Co-translational, intraribosomal cleavage of polypeptides by the foot-and-mouth disease virus 2A peptide. *J Biol Chem*, 278(13): 11441–11448.
- [25] van Rensburg H, Haydon D, Joubert F, *et al.* Genetic heterogeneity in the foot-and-mouth disease virus Leader and 3C proteinases. *Gene*, 2002, 289(1-2): 19–29.
- [26] Abrams CC, King AM, Belsham GJ. Assembly of foot-and-mouth disease virus empty capsids synthesized by a vaccinia virus expression system. *J Gen Virol*, 1995, 76: 3089–3098.
- [27] Iglesias MC, Mollier K, Beignon AS, *et al.* Lentiviral vectors encoding HIV-1 polyepitopes induce broad CTL responses in vivo. *Mol Ther*, 2007, 15(6): 1203–1210.

- [28] Markusic DM, Kanitz A, Oude-Elferink RP, *et al.* Preferential gene transfer of lentiviral vectors to liver-derived cells, using a hepatitis B peptide displayed on GP64. *Hum Gene Ther*, 2007, 18(7): 673–679.
- [29] McKay T, Patel M, Pickles RJ, *et al.* Influenza M2 envelope protein augments avian influenza hemagglutinin pseudotyping of lentiviral vectors. *Gene Ther*, 2006, 13(8): 715–724.
- [30] Giroglou T, Cinatl J Jr, Rabenau H, *et al.* Retroviral vectors pseudotyped with severe acute respiratory syndrome coronavirus S protein. *J Virol*, 2004, 78(17): 9007–9015.

## Screening and stability of Madin-Darby bovine kidney cell strain co-expressing the capsid precursor protein P1-2A gene and the protease 3C gene of Foot-and-mouth Disease Virus

Jiong Li, Yanhong Liu\*, Xiangtao Liu, Youjun Shang, Junlin Liu, Fanglan An, Hong Yin\*

(State Key Laboratory of Veterinary Etiological Biology, Key Laboratory of Animal Virology of Ministry of Agriculture, National Foot-and-Mouth Disease Reference Laboratory, Lanzhou Veterinary Research Institute of Chinese Academy of Agricultural Science, Lanzhou 730046, China)

**Abstract:** [Objective] To screen the Madin-Darby bovine kidney[CO1] cell strains for stable expression of capsid protein of foot-and-mouth disease virus (FMDV[CO2]). [Methods] We obtained two genes coding for capsid precursor protein (P1-2A) and protease (3C) of FMDV by PCR from recombinant plasmids pMD-P1-2A and pMD-3C. The recombinant retroviral vector pBABE-puro/P1-2A-3C was constructed by inserting P1-2A gene and 3C gene into pBABE-puro. Both the recombinant plasmid pBABE-puro/P1-2A-3C and the plasmid pVSV-G were co-transfected into packaging cells GP2-293 by liposome-mediated transfection method. As a result, the recombinant pseudovirus was produced. The pseudovirus infected the interesting target cell MDBK. The infected MDBK cells were selected by puromycin (2.5 µg/mL) for 2 weeks. The monoclonal cells were selected using cloning rings. The expression of capsid protein was detected by indirect immunofluorescence and sandwich-ELISA. The empty capsids of FMDV were observed under electron microscope. [Results] The capsid protein of FMDV was expressed in MDBK cells. The expression levels in screened cell strains of various passages showed no significant difference. [Conclusion] The MDBK cell strains for stable expression capsid protein of FMDV were successfully screened, which laid a foundation of development of FMDV subunit vaccine.

**Keywords:** retroviral vector; FMDV; capsid protein; MDBK cell

Supported by the National Programs for High Technology Research and Development of China (2006AA10A204), the Gansu Key Technologies R&D Program (ZGS052-A41-0006-03) and the Programs for Director Fund of Lanzhou Veterinary Research Institute

\*Corresponding author. Tel: +86-931-8342706; Fax: +86-931-8340977; E-mail: liuyh@gsstc.gov.cn

Received: 25 April 2008 / Revised: 21 July 2008