

逆转录病毒载体介导的稳定表达口蹄疫病毒 3D 基因的 BHK21 细胞系的建立

毕研丽, 沈小燕*, 丛国正, 刘湘涛, 常惠芸, 才学鹏*

(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】研究口蹄疫病毒 RNA 聚合酶在 BHK-21 细胞中的稳定表达状况, 为研究 RNA 聚合酶生物学活性及其基因工程疫苗研制提供科学依据。【方法】从重质粒 pMD18-T-3D 扩增口蹄疫病毒 3D 基因, 通过分子克隆技术构建重组逆转录病毒表达载体 pBPSTR1-3D。用 pBPSTR1-3D 和 pVSV-G 双质粒瞬时转染 GP2-293 包装细胞, 收获重组逆转录病毒, 然后感染 BHK-21 细胞, 嘌呤霉素持续筛选 12 d 后获得阳性克隆, 并用有限稀释法挑选单个阳性细胞克隆。【结果】应用 PCR、RT-PCR 技术可从体外反复传代的阳性细胞中扩增到 3D 基因, 证实目的外源基因能转录并被稳定整合进宿主细胞基因组中。经 SDS-PAGE、Western blot、间接免疫荧光检测到在不同代次的阳性细胞中有目的蛋白表达。【结论】本试验利用逆转录病毒载体介导的基因转移技术, 将外源基因插入到靶细胞的基因组中, 构建了稳定表达口蹄疫病毒 RNA 聚合酶的包装细胞系, 为研究 3D 基因表达及其蛋白定位提供了方便, 也为下一步研究 RNA 聚合酶生物学功能和疫苗研制提供了科学依据。

关键词: 口蹄疫病毒; 3D 基因; 逆转录病毒载体 *pBPSTR1*; BHK-21 细胞系

中图分类号: Q933 文献标识码: A 文章编号: 0001-6209 (2008) 08-1115-06

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传染病, 对动物生产及其产品的国际贸易带来严重的不利影响, 并引起相关的政治、经济和社会问题, 为此世界各国对该病极为重视, 联合国粮农组织(FAO)和世界动物卫生组织(OIE)将其列入必须通报的动物疫病。根据动物交叉保护和血清学试验将 FMDV 分为 O、A、C、Asia、SAT1、SAT2 和 SAT3 七个血清型, 其中每个血清型又有多种亚型, 血清型间无交叉保护, 这给口蹄疫的防制增加了更大的难度^[1, 2]。FMDV 属于小 RNA 病毒科口蹄疫病毒属, 为单股正链 RNA 病毒, 其基因组全长约 8.5 kb, 只含有一个开放阅读框, 人为划分为 4 个不同的

区域: L 区编码病毒的蛋白酶, P1 区编码衣壳蛋白, P2 和 P3 区编码几种前体蛋白以及 9 种成熟的非结构蛋白^[3-5]。在病毒复制过程中, 病毒编码的 RNA 聚合酶是复制自身基因组的关键酶^[6], RNA 复制酶由 FMDV 的 3D 基因编码, 是一种 RNA 依赖的 RNA 多聚酶(RdRp), 主要催化病毒 RNA 的合成^[7, 8]。病毒以 VPg 为引物, 以 3D 为 RNA 聚合酶, 以 3A、2B、2C 及一些宿主蛋白形成复制复合体, 附着在胞质内膜结构上合成负链 RNA, 再以负链 RNA 为模板合成正链 RNA^[9, 10]。

为进一步研究 FMDV RNA 聚合酶的结构和功能活性, 建立一种可以稳定表达 3D 基因的体外表达细胞株是非常重要的。逆转录病毒载体是最早成功应用

基金项目: 2006 年度所长基金(2006-010); 国家科技支撑计划课题(2006BAD06A03)

*通讯作者。Tel: +86-931-8342706; E-mail: caixp@public.lz.gs.cn; shenxyy@163.com

作者简介: 毕研丽(1981-), 女, 山东莱芜人, 在读硕士, 从事分子细胞生物学研究。E-mail: biyanli81@163.com

收稿日期: 2008-03-06; 修回日期: 2008-04-20

于临床治疗的载体,它是在具有分裂功能的细胞中进行基因转移和表达最为成功的病毒载体之一。它借助包装载体形成的蛋白衣壳进入靶细胞后随机整合到细胞染色体中,可以在宿主细胞自身的调控下稳定传代,稳定表达外源基因^[11,12]。pBPSTR1 载体是一种四环素调控 (Tet-Off 系统) 的逆转录病毒载体,它与包装质粒共同转染真核细胞可以将外源基因插入到靶细胞的基因组中,从而可以建立稳定高效表达目的基因的细胞系^[13]。本试验利用逆转录病毒载体介导的基因转移技术,将 FMDV 3D 基因插入到靶细胞的基因组中,构建可以稳定表达 RNA 聚合酶的细胞系,为研究 3D 基因表达及其蛋白定位提供了方便,也为下一步研究 RNA 聚合酶生物学功能和疫苗诊断研制提供了科学依据。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 质粒和转化菌:带有 3D 基因的阳性重组质粒 PMD18-T-3D 由本试验室构建和保存、逆转录病毒载体 pBPSTR1 由香港科技大学谢雍教授惠赠、大肠埃希菌 (*Escherichia coli*) JM109、包装载体 pVSV-G、包装细胞 GP2-293 和猪口蹄疫病毒标准阳性血清均由本试验室保存。

1.1.2 主要试剂和仪器:质粒小量快速提取试剂盒和质粒大量超纯提取试剂盒购自博大泰克公司, pGEM-T easy 载体、T4 DNA 连接酶购自 Promega 公司。RNA PCR Kit (AMV) Ver. 3.0、*EcoR* 酶、*BamH* 酶、*Not* 酶、*Ex Taq*TM、组织 DNA 提取试剂盒、PCR 片段凝胶回收试剂盒和组织基因组提取试剂盒均购自大连宝生物工程有限公司 (TaKaRa)。RNeasy Mini Kit, 脂质体转染试剂 LipofectamineTM2000 购自 Invitrogen 公司。嘌呤霉素、无水四环素和 Polyberne 购自 Sigma 公司。低分子量蛋白质 Marker 和 HRP 标记羊抗猪 IgG 购自北京鼎国生物科技有限公司产品。胎牛血清购自杭州四季青公司, D-MEM 和胰酶购自 Hyclone 公司。其它试剂均为国产和进口分析纯。

1.2 引物设计与合成

参考已发表文献中的引物,由大连宝生物公司合成,其中,3D (+) 含有 *Not* I 酶切序列,3D (-) 含有 *BamH* I 酶切序列,均由下划线标出。3D (+): 5'-AA GCGGCCGCCCATGGGTTGATTGTCGACAC-3', 3D (-): 5'-AAGGATCCTCATTATGCGTCACCGCAC

CG-3。

1.3 3D 基因的克隆及其序列测定

以 3D (+), 3D (-) 为引物,从质粒 PMD18-T-3D 扩增 3D 基因。将纯化的 3D 基因产物克隆至 pGEM-T easy 载体,转化感受态细胞 JM109,挑取白色单菌落,培养细菌。按照质粒小量快速提取试剂盒说明书提取质粒,PCR 和酶切鉴定,将初步鉴定为阳性的重组质粒 pGEM-3D 送往大连宝生物工程公司测序。

1.4 逆转录病毒载体 pBPSTR1-3D 的构建及鉴定

将鉴定为阳性的重组质粒 pGEM-3D 与逆转录病毒载体 pBPSTR1 分别用限制性内切酶 *Not* / *BamH* 酶切后,将纯化的酶切产物与具有 *Not* I/*BamH* I 粘性末端的 pBPSTR1 载体于 16 °C 水浴进行过夜连接反应,转化感受态细胞 *E.coli* JM109,均匀涂布于含有 X-gal, Amp 和 IPTG 的 LB 琼脂平板上,挑取白色单菌落。将初步鉴定为含有阳性质粒的大肠杆菌菌液利用小型质粒提取试剂盒提取质粒。利用 *Not* / *BamH* 双酶切和 PCR 的方法进行鉴定。将初步鉴定为阳性的重组质粒 pBPSTR1-3D 送往大连宝生物工程有限公司测序。

1.5 嘌呤霉素筛选浓度及四环素调控浓度的测定

将培养好的 BHK-21 细胞按 6×10^5 个/mL 接种于 24 孔培养板中,每孔加入 1 mL 培养液。待细胞汇合度达到 80% 的 BHK 细胞顺次加入不同浓度的嘌呤霉素,使其终浓度依次为 0、3 μ g/mL、4 μ g/mL、5 μ g/mL、6 μ g/mL、7 μ g/mL、8 μ g/mL 和 10 μ g/mL,每种浓度设 3 个重复孔,37 °C,5% CO₂ 培养箱内培养。每隔两天换培养液,持续培养 6~14 d,选择能使细胞在 14 d 内全部死亡的最低浓度为最佳筛选浓度。此外,通过脂质体介导将质粒 pBPSTR1-3D 转染细胞汇合度达到 80% 的 BHK 细胞中,并分别利用 0.25 μ g/mL、0.5 μ g/mL、0.75 μ g/mL 和 1 μ g/mL 的四环素来调控转染后的 BHK 细胞以确定最佳调控浓度。

1.6 重组逆转录病毒的收获

将生长良好的包装细胞 GP2-293 按照 5×10^6 个/mL 细胞浓度培养于 100 mL 细胞瓶中,使其在 37 °C,5% CO₂ 培养条件下培养 24 h 后,汇合度达到 80% 的 GP2-293 包装细胞可用于转染。各取 5 μ g pVSV-G 和 pBPSTR1-3D,20 μ L 脂质体分别利用优化培养基溶解 5 min,然后将它们混合共同作用 20 min。将 1 mL 混合物铺于 GP2-293 包装细胞上作用 6 h,吸弃混合液,并加入 20 mL 无抗性完全培养液连续培养 72 h,然后收

获含重组逆转录病毒的上清液置于 -80°C 冻存备用。

1.7 阳性单克隆细胞的筛选

取生长良好的 BHK 细胞以 5×10^6 个/mL 细胞浓度接种于细胞瓶,按照常规细胞培养的方法培养 18 h,此时细胞汇合度达到 60%。将 $8 \mu\text{g/mL}$ Polyberne 和 10 mL 含有重组逆转录病毒的液体加入 BHK 细胞中持续感染 6~8 h 后换为含有四环素的完全培养基,并且在 24 h 后加入嘌呤霉素进行抗性筛选。此后每天更换含有嘌呤霉素和四环素的完全培养液,持续 12 d 后获得阳性细胞。同时设未经重组逆转录病毒感染的正常 BHK 细胞作阴性对照。经过 12 d 左右得到抗性克隆后,利用有限稀释法挑取单克隆,继续对单克隆增殖培养,其中部分冻存,其余继续传代以备检测。

1.8 稳定细胞系的检测

将感染重组逆转录病毒的阳性细胞单克隆多轮筛选后,提取不同代次阳性单克隆细胞的基因组 DNA,PCR 检测 3D 目的基因,同时设未感染重组逆转录病毒的 BHK 细胞作为阴性对照。

参考 RNeasy Mini Kit 操作说明,将感染重组逆转录病毒的阳性细胞单克隆多轮筛选过后,提取阳性单克隆细胞的总 RNA,RT-PCR 检测 3D 目的基因。

离心收集细胞,裂解后于 12% 的 SDS-PAGE 分离总蛋白,转移至 NC 膜,经含 10% BSA 的 PBS 封闭后用 1:200 稀释的 O 型 FMDV 感染全血清一抗和 1:1000 稀释的碱性磷酸酶标记的兔抗猪二抗进行免疫标记,用 DAB 底物显色,进行 3D 基因表达产物的 Western blot 鉴定。

收取培养皿中的盖玻片,其上富集生长汇合度达 80% 的 30 代的阳性克隆细胞,PBS 液漂洗 5 次,4% 的多聚甲醛固定 30 min,再 PBS 漂洗 5 次后自然干燥,滴加 1:200 稀释的 O 型口蹄疫猪阳性血清,37 $^{\circ}\text{C}$ 湿盒中孵育 50 min,PBS 漂洗 5 次,凉干后加入

1:1000 稀释的 FITC-兔抗猪 IgG,37 $^{\circ}\text{C}$ 湿盒中孵育 45 min,荧光显微镜下观察。同时设空载体逆转录病毒感染的 BHK-21 细胞及未感染的正常 BHK-21 细胞作对照。

利用组织 DNA 提取试剂盒提取重组 BHK 细胞 DNA,按操作说明进行,用 3D 基因的特异性引物扩增 3D 基因,同时设正常细胞 BHK-21 作为阴性对照。扩增模板为不同代次的重组 BHK 细胞 DNA,即第 1、2、5、10、20 和 30 代细胞。同时,将第 30 代细胞表达的 3D 蛋白的 Western blot 检测。

收集转染了 pBPSTR1、pBPSTR1-3D 的第 3 代 BHK-21 细胞 48 h 的上清液,4000 r/min 离心 30 min,取上清液,按照 1.6 的感染方法,感染 BHK-21 细胞,并以相同浓度的嘌呤霉素筛选抗性细胞。同时设转染 pBPSTR1-3D 质粒的假病毒及正常 BHK 细胞做阳性、阴性对照。

2 结果

2.1 3D 基因的扩增

凝胶电泳显示 3D 基因的 PCR 扩增产物条带约为 1400 bp,与预期结果符合。阳性重组质粒 pGEM-3D 经酶切鉴定获得一条约为 1400 bp 的片断(图略)。测序分析表明是口蹄疫病毒 3D 基因。

2.2 pBPSTR1-3D 重组质粒的鉴定

以重组质粒 pBPSTR1-3D 为模板 PCR 扩增 3D 基因,经琼脂糖凝胶电泳后,获得的片断与预期大小一致;Not I/BamH I 双酶切获得一条约为 1400 bp 的片断(图略)。测序结果显示 3D 基因的读码框正确。

2.3 嘌呤霉素筛选浓度及四环素调控浓度的测定

3 组重复试验发现,在各个浓度下,加入嘌呤霉素的当天,细胞即停止分裂;3~6 d 时有大量细胞死亡(图 1-B);8 d 几乎没有形态正常细胞存在,14 d

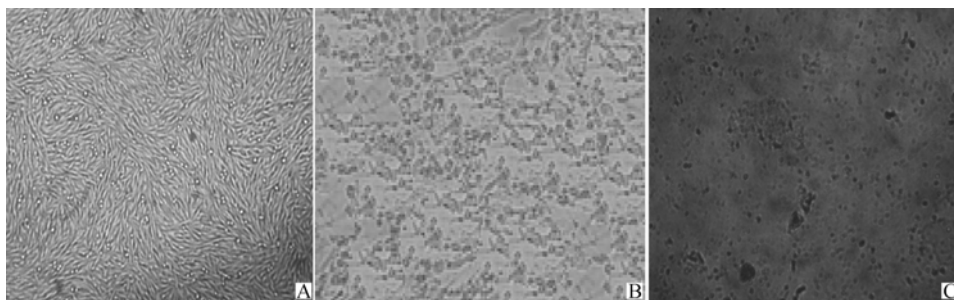


图 1 嘌呤霉素筛选 BHK-21

Fig. 1 BHK-21 cell screening with puromycin A: Normal BHK-21 Cell (20 \times 10); B: Screening with puromycin for 4 days; C: Screening with puromycin (20 \times 10) for 12 days.

时只有 3、4、5、6 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 浓度下存在个别形态不正常的细胞(图 1-C),其他浓度下没有存活细胞,故确定 7 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的嘌呤霉素浓度为 BHK-21 的最小致死浓度。通过利用不同浓度的四环素抑制 pBPSTR1-3D 在 BHK-21 细胞中的瞬时表达发现 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的四环素可以有效抑制 pBPSTR1-3D 的表达。

2.4 阳性单克隆细胞的选择与培养

用终浓度为 7 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的嘌呤霉素进行抗性筛选,结合有限稀释法连续筛选 30~45 d,筛选的阳性单克隆细

胞及细胞集落(图 2),体外反复传代阳性单克隆细胞。

2.5 PCR、RT-PCR 检测细胞表达情况

应用 PCR 技术,可从体外反复传代的阳性细胞基因组中扩增到 1400 bp 左右 3D 基因,但阴性对照细胞没有扩增出目的条带(图 3)。表明筛选的阳性细胞克隆能持续稳定地表达 FMDV 3D 蛋白,而且可携带外源基因传代,具有良好的遗传稳定性。RT-PCR 产物电泳显示,在 1400 bp 左右处有一特异性扩增条带(图 3),说明 3D 基因确实在 BHK-21 细胞中转录表达。

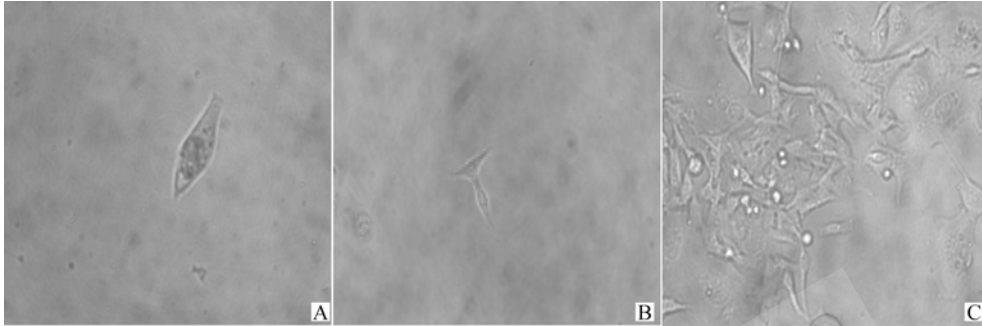


图2 阳性单克隆细胞的筛选

Fig. 2 positive monoclonal cell selected(20 \times 10). A: positive monoclonal cell selected by puromycin; B: positive monoclonal cell differentiation; C: Cluster of positive monoclonal cell selected.

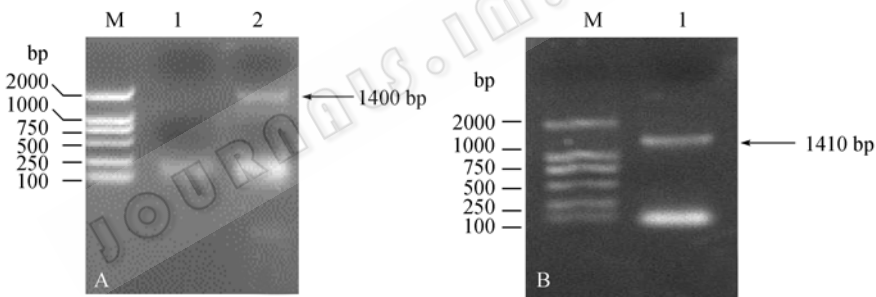


图3 3D 在 BHK 细胞中的稳定表达

Fig. 3 Analysis of 3D stable expression in BHK cells. A: PCR analysis of 3D stable expression in BHK cells; B: RT-PCR analysis of 3D stable expression in BHK cells.

2.6 表达产物的免疫活性结构分析

表达产物经 SDS-PAGE 电泳后,转移到 NC 膜上进行 Western blot,结果显示,表达的外源蛋白能与 O 型猪源口蹄疫病毒全血清反应,在 55 kDa 左右出现阳性条带,而空白对照组未出现特异条带,说明表达的外源蛋白具有免疫活性结构(图 4)。

2.7 间接免疫荧光检测

感染 pBPSTR1-3D 的第 30 代阳性 BHK-21 细胞可见明亮的淡绿色荧光,而 BHK 阴性细胞和空载体对照细胞没有荧光,显示阳性细胞内有 FMDV 的抗原,说明目的基因被成功克隆到了靶细胞的基因组内并被成功表达(图 5)。

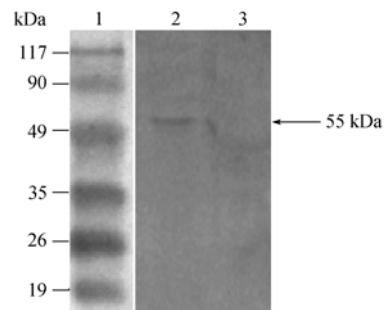


图4 表达产物的 Western blot 分析

Fig. 4 Western blot analysis of expression protein. 1. protein marker; 2. infected with pBPSTR1-3D; 3. BHK-21 cell of non-infection.



图5 间接免疫荧光鉴定3D基因在BHK-21细胞中的表达
Fig. 5 Detection of 3Dgene expression in BHK-21 cells by IFA (20×10). A: infected with pBPSTR1-3D; B: infected with pBPSTR1; C: BHK-21 cell of non-infection.

2.8 3D 基因在 BHK 细胞中整合的稳定性

筛选出的第 1、2、5、10、20、30 代整合的 BHK 细胞均可扩增出 1410 bp 大小相符的条带,而所设同批次阴性对照没有扩增出条带(图略)。同时,将第 30 代整合的 BHK 细胞 Western blot 检测,结果显示,3D 蛋白与猪血清反应阳性,在 55 kDa 左右出现阳性条带,表明 3D 蛋白得到了正确表达;而空白对照组未出现特异条带,说明表达的外源蛋白具有免疫活性(图 6)。

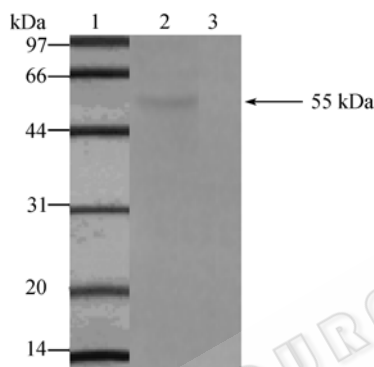


图 6 Western blot 检测 30 代 3D 表达产物
Fig. 6 Analysis of 30th generation 3D expression products by western blot. 1. protein marker; 2. infected with pBPSTR1-3D; 3. BHK-21 cell of non-infection.

2.9 野生型逆转录病毒的检测结果

阳性对照筛选到许多抗性集落,细胞上清液感染细胞及阴性对照细胞 8~12 d 全部死亡,说明克隆细胞株没有产生野生型病毒,其细胞提取物是安全的。

3 讨论

目前,逆转录病毒载体系统是基因治疗中应用最早、使用最多的病毒载体,较一般质粒介导的基因转染有更高的稳定性和转移效率^[12, 13]。逆转录病毒载体能将携带的外源基因整合进感染细胞的基因组中,使外源基因能随着细胞传代增殖而稳定表达,适合于研究外源基因的长期表达。而且逆转录载体经过特殊组

成的包装细胞得到缺陷型重组病毒,不产生感染性病毒颗粒,更为安全^[14]。来源于人胚肾细胞的 GP2-293,具有分裂能力强,转染效率高,产生假病毒滴度高等优点。因其基因组中不含有编码逆转录病毒被膜蛋白的 *env* 基因,疱疹性口炎病毒糖蛋白 G 基因 VSV-G 可以替代 *env* 基因,通过与细胞膜上的脂偶联和细胞膜融合调节/操纵病毒进入靶细胞,包装逆转录病毒基因组形成假病毒^[15]。pVSV-G 载体与逆转录病毒表达载体共转染 GP2-293 包装细胞可以提高转染效率,同时可以扩大假病毒感染靶细胞的范围^[16]。

本研究运用脂质体转染技术使重组逆转录病毒表达载体 pBPSTR1-3D 与 VSV-G 质粒转染 GP2-293 包装细胞,收获假病毒,然后感染 BHK-21 细胞,嘌呤霉素持续筛选 12 d 后获得阳性克隆,并用有限稀释法挑选单个阳性细胞克隆。应用 PCR、RT-PCR 技术可从体外反复传代的阳性细胞中扩增到 FMDV 3D 基因,证实目的基因能转录并被稳定整合进宿主细胞基因组中。阳性细胞的裂解产物经 SDS-PAGE 电泳后,转移到 NC 膜上进行 Western blot 分析。发现在不同代次的细胞中均有 3D 蛋白的表达,而且表达蛋白可被 FMDV 的阳性血清所识别,说明重组表达质粒 pBPSTR1-3D 在 BHK-21 细胞中能正确表达。稳定性实验证实所筛选的阳性细胞克隆能够持续稳定地表达 FMDV 3D 蛋白,而且可携带外源基因传代,具有良好的遗传稳定性。表明 3D 聚合酶基因已被整合进 BHK-21 细胞中,成功建立了稳定表达 3D 基因的体外表达细胞株,为今后研究 FMDV RNA 聚合酶蛋白的生物学活性,结构功能提供了工具。

参 考 文 献

- [1] Bachrach HL. Foot-and-mouth disease virus, properties, molecular biology and immunogenicity. In: Romberger, JA (Ed), Beltsville Symposia in Agricultural Research Virology in Agriculture, 1977, vol 1.
- [2] Sobrino F, Saiz M, Jimenez-Clavero MA, *et al.* A mechanism for all polymerases. *Nature*, 1998, 391: 231-232.
- [3] Belsham GJ. Genome organization, translation and replication of foot-and-mouth disease virus. In: Domingo, FSAE. (Ed.), Foot-and-mouth Disease. *Current Perspectives*. Horizon Bioscience, Norfolk, UK, 2004, 19-52.
- [4] Follett EA, Pringle CR, Pennington TH. Virus development in enucleate cells: echovirus, poliovirus, pseudorabies virus, reovirus, respiratory syncytial virus and Semliki Forest virus. *J Gen*

- Viol*, 1975, 26(2): 183–196.
- [5] Ryan MD, Donnelly ML, Flint M, *et al.* Foot-and-mouth disease proteinases. In: Domingo, F.S.a.E. (Ed.), *Foot-and-Mouth Disease. Current Perspectives*. Horizon Bioscience, Norfolk, UK, 2004, 53–76.
- [6] Newman JF, Cartwright B, Doel TR, *et al.* Purification and identification of the RNA-dependent RNA polymerase of foot-and-mouth disease virus. *Gen Virol*, 1979, 45 (2): 497–507.
- [7] Belsham GJ. Translation and replication of FMDV RNA. *Curr Top Microbiol Immunol*, 2005, 288: 43–70.
- [8] Lubinski JM, Ransone LJ, Dasgupta A. Primer-dependent synthesis of covalently linked dimeric RNA molecules by poliovirus replicase. *J Virol*, 1987, 61:2997–3003.
- [9] Nayak A, Goodfellow IG, Belsham GJ. Factors required for the uridylylation of the foot-and-mouth disease virus 3B1, 3B2, and 3B3 peptides by the RNA-dependent RNA polymerase (3Dpol) *in vitro*. *J Virol*, 2005, 79(12): 7698–7706.
- [10] Andino R, Boddeker N, Silvera D, *et al.* Intracellular determinants of picornavirus replication. *Trends Microbiol*, 1999, 7(2): 76–82.
- [11] Martinez-Salas E. Internal ribosome entry site biology and its use in expression vectors. *Curr Opin Biotechnol*, 1999, 10(5): 458–464.
- [12] Manfred G, Hermann B. An hydrotetracycline, a novel effector for tetracycline controlled gene expression system in eukaryotic cells. *Nucleic Acids Research*, 1993, 21: 4411–4412.
- [13] Werner P, Inge B, Frederick MB, *et al.* Self-contained, tetracycline-regulated retroviral vector system for gene delivery to mammalian cells. *J Virol*, 1996, 70(1): 62–67.
- [14] Miller N, Whelan J. Progress in transcriptionally targeted and regulatable vectors for genetic therapy. *Human Gene Therapy*, 1997, 8(3): 803–815.
- [15] Emi N, Friedmann T, Yee J. Pseudotype formation of murine leukemia virus with the G protein of vesicular stomatitis virus. *J Virol*, 1991, 65(3): 1202–1207.
- [16] Albritton LM, Tseng L, Scadden D, *et al.* A putative murine ecotropic retrovirus receptor gene encodes a multiple membrane-spanning protein. *Cell*, 1989, 57(4): 659–666.

Establishment of BHK-21 cell lines stably expressing FMDV 3D^{pol} gene by retroviral-mediated gene transfer technique

Yanli Bi, Xiaoyan Shen*, Guozheng Cong, Xiangtao Liu, Huiyun Chang, Xuepeng Cai*

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

Abstract: [Objective] The aim of the study is to establish *in vitro* cell line with stable and effective 3D^{pol} gene expression, so as to study the biological function of foot-and-mouth disease virus (FMDV) 3D^{pol} and foot-and-mouth disease (FMD) gene engineering vaccine. **[Methods]** FMDV 3D gene was amplified from pMD18-T-3D and inserted into pGEM-Teasy vector. By *NotI/BamHI* digestion, 3D gene with *NotI/BamHI* site was inserted into *NotI/BamHI* cloning site of the pBPSTR1 retroviral vector in order to obtain recombinant retroviral vector pBPSTR1-3D. The artificial retroviral viruses were obtained by both pBPSTR1-3D and pVSV-G envelope vector into the Gp2-293 package cells using Lipofectamine 2000. The BHK-21 cells were infected by artificial retroviral particles with 8 µg/mL Polybrene. The positive cell clones which genomes contained the 3D^{pol} gene were continually selected using puromycin and was regulated by tetracycline for 12 days. The single clone highly effective expressing 3D fusion protein was obtained by seeding the cells into 96-well plates with one cell per well. **[Results]** By using retroviral gene transfer technology, the 3D^{pol} gene was integrated into the chromosome of BHK-21 cells, then under selection pressure, the cell lines stably expressing 3D were established. Finally, a cell line stably expressing the 3D fusion protein was established. The fusion protein was confirmed to be expressed correctly by Western-blot. The transfected genes in the cell line were consistently expressed during 35 passages of the host cells. **[Conclusion]** Transgene cell strain stably carrying exogenous gene in subsequent passaging was successfully constructed. It provide a good experimental tool for the biological function of FMDV 3D^{pol} and FMD gene engineering vaccine research.

Keywords: foot-and-mouth disease virus; 3D^{pol} gene; pBPSTR1 vector; BHK-21 cell line

Supported by the Director Funds of Lanzhou Veterinary Research Institute in 2006 (2006-0101) and the National key Technology Research and Development Program of China (2006BAD06A03)

*Corresponding author. Tel: +86-931-8342706; Fax: +86-931-8342052; E-mail: caixp@public.lz.gs.cn; shenxy@163.com

Received: 6 March 2008/ Revised: 20 April 2008