

# 昆虫杆状病毒系统表达口蹄疫病毒 3ABC 基因

罗宝正<sup>1</sup>, 薄清如<sup>2</sup>, 陈金顶<sup>3</sup>, 王伟毅<sup>4</sup>, 程 钢<sup>4</sup>, 何蕴韶<sup>4\*\*</sup>

(1. 中山大学中山医学院, 广东广州, 510080; 2. 珠海出入境检验检疫局, 广东珠海, 519015; 3. 华南农业大学兽医学院, 广东广州, 510642; 4. 中山大学达安基因股份有限公司, 广东广州, 510080)

## Expression of FMDV 3ABC Gene in Bac-to-Bac Baculovirus Expression System

LUO Bao-zheng<sup>1</sup>, BO Qing-ru<sup>2</sup>, CHEN Jin-ding<sup>3</sup>, WANG Wei-yi<sup>4</sup>, CHENG Gang<sup>4</sup>, HE Yun-shao<sup>4\*\*</sup>

(1. Zhongshan Medical College of Zhongshan University, Guangzhou Guangdong 510080, China; 2. Zhuhai Entry-Exit Inspection and Quarantine Bureau, Zhuhai 519015, China; 3. Veterinary College of South China Agricultural University, Guangdong 510642, China; 4. Daan Gene co., Ltd of Zhongshan University, Guangzhou 510080, China)

**Abstract:** The nonstructural protein gene 3ABC of Foot-and-mouth disease virus (FMDV) was amplified by reverse transcription (RT) PCR and the PCR product was inserted into transfer vector pFastbac HT. Then, the recombinant vector pFastbac HT-3ABC was extracted and transferred into DH<sub>10</sub>Bac containing a shuttle vector Bacmid. 3ABC gene was integrated into Bacmid by site specific transposition. Subsequently, recombinant shuttle vector Bacmid-3ABC was transfected with Hi Five insect cells. Identification by PCR amplification demonstrated that 3ABC gene was correctly inserted into baculovirus genome at the downstream of polyhedrin promoter. SDS-PAGE and Western blot analysis detected a band of about 50 kDa in the expression product of 3ABC gene in insect cells. The successful expression of 3ABC gene in Bac-to-Bac expression system should provide a new technical platform for the development of novel approaches for distinguishing the infected animals from vaccinated animals.

**Key words:** Foot-and-mouth disease virus; Nonstructural protein gene 3ABC; Baculovirus Expression System; Expression

**摘要:**以 O 型口蹄疫病毒为研究对象, 经过 RT-PCR 扩增得到非结构蛋白 3ABC 基因, 克隆到转移载体 pFastbac HT, 将其转入含穿梭载体 Bacmid 的 DH<sub>10</sub>Bac, 与 Bacmid 发生位点特异性转座作用, 得到 3ABC 的重组穿梭载体 Bacmid-3ABC, 再将其转染昆虫细胞 Hi Five。PCR 鉴定证实 3ABC 基因正确地插入到病毒基因组的多角体蛋白基因启动子下游, 经过 SDS-PAGE 和 Western blot 检测, 3ABC 基因在昆虫细胞中表达了大小约为 50kDa 的蛋白条带, 3ABC 基因在 Bac-to-Bac 系统中的成功表达为建立以基因工程产品为抗原、鉴别诊断自然感染和免疫动物的方法提供了技术条件。

**关键词:** 口蹄疫病毒; 非结构蛋白 3ABC; 杆状病毒; 鉴别诊断

中图分类号: S852.65 文献标识码: A 文章编号: 1003-5125(2005)03-0303-04

口蹄疫 (Foot-and-mouth disease, FMD) 是由口蹄疫病毒 (Foot-and-mouth disease virus, FMDV) 感染引起的偶蹄动物共患的急性、热性、接触性传染病。患病动物的口、舌、唇、蹄和乳房等部位发生水泡, 破溃弄形成烂斑。人和非偶蹄动物也可感染该病, 但症状较轻。FMDV 有 A、O、C、Asia-1、SA T1、

SA T2 和 SA T3 等 7 个血清型, 各血清型之间无交叉免疫现象。该病在世界范围分布广, 感染率高, 传播迅速。由于口蹄疫对畜牧业发展造成巨大的危害, 国际兽疫局 (OIE) 将其列为 A 类传染病之首。欧盟国家虽然从 1991 年以来已经禁止接种疫苗, 但是在疫情暴发的时候仍需要进行紧急接种。无论接

收稿日期: 2004-12-10, 修回日期: 2005-03-03

作者简介: 罗宝正 (1975 - ), 男, 山东青岛籍, 博士生, 主要从事病原体基因诊断方向的研究。

\*\* 通讯作者. Corresponding author. Tel: 020-37617475, E-mail: yshe@gzsums.edu.cn

受过免疫与否,猪都可以成为病毒的携带者,因此,有必要在出现疫情的时候鉴别诊断自然感染和免疫猪。在 FMD 流行并且进行常规免疫的国家,鉴别自然感染和免疫动物对于控制疫情进而根除口蹄疫显得更为重要。

1966 年 Cowan 等人鉴定到 FMDV 的一种非结构蛋白 VIAA (virus infection associated antigen, 后来证实是 3D 蛋白) 可以通过血清反应区别自然感染和免疫动物<sup>[1]</sup>。由此建立的免疫扩散试验与动物食道咽部病毒分离技术相结合曾一度被认为是一种可靠的鉴别诊断方法。但后来发现,重复接种灭活疫苗的动体内会不同程度地产生抗 VIAA 抗体<sup>[2]</sup>,因此该方法受到质疑。于是,很多研究人员将目标转移到 FMDV 的其它非结构蛋白,如 2C、3AB 和 3ABC 等<sup>[3~5]</sup>。其依据是,疫苗中的主要成分是结构蛋白,非结构蛋白 3ABC、3AB 和 2C 等在疫苗的制作过程中随着抗原的纯化被去掉,因此注射疫苗几乎不可能诱导动物机体产生非结构蛋白的抗体<sup>[6]</sup>。Mezencio 等证明猪的 3ABC 抗体比 2C 抗体衰退的要慢,猪感染 FMDV 后一年还可以检测到 3ABC 抗体<sup>[7]</sup>,并且注射疫苗的动物偶尔也能检测到 2C 抗体。研究人员最终认为非结构蛋白 3ABC 抗体是检测 FMD 感染的最可靠的指标。国外已经有很多实验室建立了利用大肠杆菌和杆状病毒表达的蛋白检测 3AB 和 3ABC 抗体的方法<sup>[5, 8, 9]</sup>。在国内,曹轶梅<sup>[10]</sup>等以在大肠杆菌中表达的 3ABC 蛋白为抗原建立了鉴别自然感染与免疫动物的间接 ELISA 方法。在本研究中,我们克隆了口蹄疫病毒 3ABC 基因并在杆状病毒系统中进行了表达,期望为自行研制鉴别诊断 ELISA 提供大量的 3ABC 蛋白。

## 1 材料与方法

### 1.1 病毒和细胞

FMD 病毒株为 O 型口蹄疫病毒的细胞培养毒。BHK21 (仓鼠肾传代细胞) 由广州出入境检验检疫局赠送。

### 1.2 FMD 病毒基因组 RNA 的提取

细胞毒经 12 000r/min 冷冻离心 15min 后,弃掉培养液,加入 1mL 提取液 (Trizol),反应管室温放置 15~20min (或 4 较长时间),加入 0.2mL 氯仿/1mL 提取液,用力震荡 15s,室温静置 10min,在 4 下 12 000r/min 离心 15min。小心将 1/2~1/3 体积上层水相转移到一干净离心管中,加等体积异丙醇,-20 静置 20min (或过夜),12 000r/min 离心 15min。取上清,加入 1mL 75% 的乙醇洗涤 RNA 沉

淀,混匀,4、10 000r/min 离心 5 min,小心吸去大部分乙醇。将沉淀在空气中干燥 10min,用适量无 RNase 的纯水 (DEPC 处理过的蒸馏水) 溶解沉淀。

### 1.3 引物、探针的设计与合成

从 GenBank 中获得口蹄疫病毒基因组序列,用 Oligo6.0 设计引物,引物合成在上海生工公司完成。上游引物:5'-CAGGAATTCA TTTCAA TCCC TTCCAGAA-3'; 下游引物:5'-TC AAA GCTT TCACAACCCCTCGTGGTGTGG-3'; 上游引物的 5 端加有保护碱基和 *EcoR* 酶切位点,下游引物的 5 端加有保护碱基和 *Hind* 酶切位点。其中下游引物作为逆转录引物。

### 1.4 RT-PCR

用晶美公司的逆转录试剂盒进行第一链 cDNA 的合成,方法按照试剂盒说明书进行。取 2μL 提取的核酸溶液在 PE9600 上进行 PCR 反应,反应条件为 93 预变性 2min,然后 93 30s,57 30s,72 120s,35 个循环,最后 72 10 min 延伸。产物经 1% 的琼脂糖凝胶电泳。

### 1.5 3ABC 基因的克隆与转座

3ABC 的 PCR 产物 T 克隆到 pMD-18 载体,送博亚公司测序。PCR 产物进行 *EcoR* 和 *Hind* (Fermentas 公司) 双酶切,切胶纯化 (QIA GEN 公司切胶纯化试剂盒) 之后与同样酶切的 pFastbac HT 进行连接过夜,转化感受态 DH5 (本实验室保存)。

挑取阳性克隆扩大培养,提取质粒 pFastbac HT-3ABC,转化感受态 DH10 Bac (含 Bacmid)。挑取白色菌落培养,用 M13 引物进行 PCR 鉴定 (M13 引物位置见图 1)。

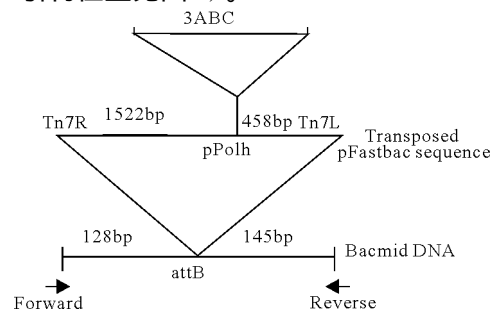


图 1 重组杆状病毒构建

Fig. 1 Construction of recombinant Bacmid (PCR Product produced by M13 primers is 2300 bp plus the size of the insert 3ABC).

### 1.6 表达与鉴定

Bacmid-3ABC 转染昆虫细胞 Hi Five,上清中收获重组杆状病毒颗粒,感染 Hi Five 昆虫细胞。细胞裂解后进行 SDS-PAGE 和 Western blot 鉴定。

pFastbacHT、DH<sub>10</sub>Bac 和昆虫细胞 Hi Five 由中山大学生物防治国家重点实验室王<sup>←</sup>章教授赠送。

## 2 结果

### 2.1 RT-PCR、克隆及其鉴定

RT-PCR 产物在 1% 的琼脂糖凝胶上电泳,出现一条约 1 300bp 大小的条带,与预期的大小相符。PCR 产物 T 克隆之后测序结果与 HKN/2002 株 (A Y317098) 同源性最高 (96%), 所得序列提交 GenBank。重组载体 pFastbacHT-3ABC 的酶切与 PCR 结果与预期相符 (图 2)。

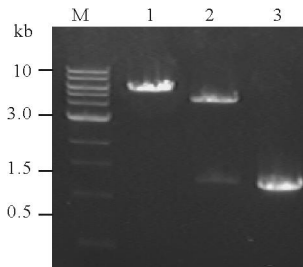


图 2 重组质粒 pFastbacHT-3ABC 的酶切与 PCR 鉴定  
Fig. 2 Identification of recombinant pFastbacHT-3ABC by enzyme digestion and PCR

M, DNA Marker; 1, pFastbacHT-3ABC/ *EcoR*; 2, pFastbacHT-3ABC/ *EcoR*、*Hind*; 3, PCR product of pFastbacHT-3ABC.

### 2.2 转座

重组载体 pFastbacHT-3ABC 转化感受态 DH<sub>10</sub>Bac, PCR 鉴定结果。由于 PCR 引物位于 Bacmid 中 mini att Tn7 两端序列,所以在未经 pFastbacHT-3ABC 转化的 DH<sub>10</sub>Bac 中, Bacmid 的 PCR 扩增产物为大约 300bp 的 DNA 片段,转化之后的 DH<sub>10</sub>Bac 中,重组 Bacmid-3ABC 的 PCR 扩增产物为大约 3700bp 的 DNA 片段 (图 3),与预期值相符,重组正确。

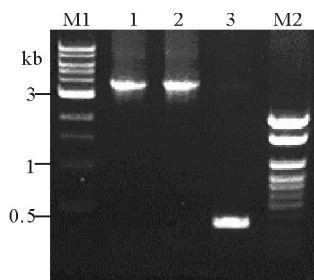


图 3 PCR 鉴定 Bacmid-3ABC  
Fig. 3 PCR analysis of bacmid-3ABC

M1, 500bp DNA Marker; 1-2, PCR product of Bacmid-3ABC; 3, PCR product of Bacmid; M2, 100bp DNA Marker.

### 2.3 表达及鉴定

提取重组病毒 Bacmid-3ABC 感染 Hi Five 细胞, SDS-PAGE 分析表达蛋白, 比对照组多出一蛋

白条带, 分子量约 50kDa, 与 3ABC 融合蛋白的大小一致 (图 4)。Western blot 显示该蛋白能与抗口蹄疫病毒的抗体反应, 证实 3ABC 基因得到了表达 (图 5)。

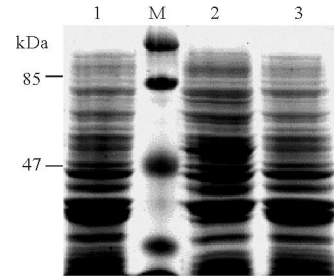


图 4 感染 Hi Five 细胞 72h 之后细胞总蛋白

Fig. 4 SDS-PAGE analysis of the total cellular proteins of Hi Five cells 72h post infection

M, Protein marker; 1, Hi Five cells; 2, Hi Five cells infected with Bacmid-3ABC; 3, Hi Five cells infected with Bacmid.

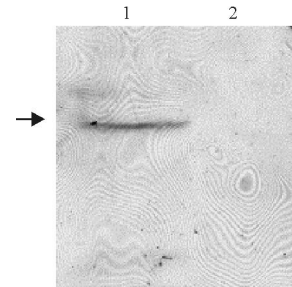


图 5 表达蛋白的 Western blot 鉴定

Fig. 5 Identification of expressed protein by Western blot 1, Hi Five cells infected with Bacmid-3ABC; 2, Hi Five cells infected with Bacmid.

## 3 讨论

目前常用的 FMDV 抗体检测是基于结构蛋白和全病毒的诊断方法,但这些方法难以区别感染和免疫动物。本研究用基因工程技术生产重组 3ABC 蛋白,可望替代全病毒抗原建立重组 3ABC 蛋白-ELISA,将给我国的 FMD 监测和普查带来极大便利,具有十分广阔的应用前景。此前,我们用原核系统对 FMD 病毒 3ABC 基因进行了表达,尽管表达效率较高,但由于重组蛋白的纯化比较困难,残留的大肠杆菌抗原成分会与动物体内的大肠杆菌抗体发生非特异性反应<sup>[11,12]</sup>,而且在大肠杆菌中表达的蛋白常常形成所谓“包涵体”,需将它们用变性剂溶解后小心地复性才能保持其生物学活性。因此,本研究选择了与哺乳动物无交叉抗原的昆虫杆状病毒表达系统取代大肠杆菌表达系统。

多数情况下,昆虫杆状病毒系统中表达的重组蛋白在细胞中进行了加工、修饰,并且在细胞中定位

下来。近几年来,对昆虫杆状病毒转移载体的改造也取得了较大突破,Bac-to-Bac系统大大缩短重组病毒的纯化时间。用传统的BEVS(Baculovirus expression vector systems)表达蛋白,重组病毒的获得需要多轮的空斑纯化,而用新型的Bac-to-Bac系统,基因操作完全是在大肠杆菌中进行,得到的重组子可以直接感染培养的昆虫细胞,大大提高了工作效率并节省了时间。与其他真核表达系统相比,昆虫杆状病毒系统中目的基因表达效率高,其表达产物为N末端带有6个组氨酸残基的融合蛋白,可用镍螯合树脂简易地纯化重组蛋白。另外,杆状病毒的宿主范围窄,仅限于特异的无脊椎生物,对脊椎动物没有感染力,因而比其它哺乳动物病毒更加安全。

我们用O型口蹄疫病毒做为模板,经过RT-PCR得到了3ABC基因,通过转座将3ABC基因克隆到杆状病毒载体上并在昆虫细胞中进行表达。经Western blot鉴定,证实得到的是特异性蛋白,为建立3ABC蛋白ELISA进而拥有我国自主知识产权的FMD鉴别诊断技术奠定了一定的基础。

## 参考文献

- [1] Cowan K M, Graves J H. A third antigenic component associated with foot-and-mouth disease infection[J]. *Virology*, 1966,30:528-540.
- [2] Pino A A, Garland A J. Immune response to virus-infected associated antigen in cattle repeatedly vaccinated with foot-and-mouth disease virus inactivated by formalin or actylethyleneimine[J]. *J Hyg*, 1979,82:41-50.
- [3] Lubroth J, Grubman M J, Burrage T G, *et al.* Absence of protein 2C from clarified foot-and-mouth disease virus vaccines provides the basis for distinguishing convalescent from vaccinated animal[J]. *Vaccine*,1996,14(5):419-427.
- [4] Silberstein E, Kaplan G, Taboga O, *et al.* Foot-and-mouth disease virus-infected but not vaccinated cattle develop antibodies against recombinant 3AB1 nonstructural protein[J]. *Arch Virol*, 1997,142:795-805.
- [5] Sorensen K J, Madsen K G, Madsen J S, *et al.* Differentiation of infection from vaccination in foot-and-mouth disease by the detection of antibodies to the non-structural proteins 3D,3AB and 3ABC in ELISA using antigen expressed in baculovirus[J]. *Arch Virol*, 1998,143:1461-1476.
- [6] Rodriguez A, Dopazo J, Saiz J C, *et al.* Immunogenicity of non-structural proteins of foot-and-mouth disease virus: differences between infected and vaccinated swine[J]. *Arch Virol*, 1994,136:123-131.
- [7] Mezenzio J M, Babcock G D, Meyer R F, *et al.* Differentiating foot-and-mouth disease virus-infected from vaccinated animals with baculovirus-expressed specific proteins[J]. *Vet Q*, 1998,20,suppl(2):11-13.
- [8] Diego M D, Brocchi E, Mackay D, *et al.* The non-structural polyprotein 3ABC of foot-and-mouth disease virus as a diagnostic antigen in ELISA to differentiate infected from vaccinated cattle[J]. *Arch Virol*, 1997,142:2021-2033.
- [9] Chang H K, Young J K, Won K, *et al.* Development of a foot-and-mouth disease NSP ELISA and its comparison with differential diagnostic methods[J]. *Vaccine*,2003,21:1409-1414.
- [10] 曹轶梅,刘在新,卢曾军,等. 口蹄疫病毒非结构蛋白3ABC基因的克隆及3AB基因的原核表达[J]. *中国兽医学报*, 2004,24(1):31-34.
- [11] Silberstein E, Kaplan G, Taboga O, *et al.* Foot-and-mouth disease virus-infected but not vaccinated cattle develop antibodies against recombinant 3AB1 nonstructural protein[J]. *Arch Virology*, 1997,142:795-805.
- [12] Meyer R F, Babcock G D, Newman J F E, *et al.* Baculovirus expressed 2C of foot-and-mouth disease virus has the potential for differentiating convalescent from vaccinated animals[J]. *J Virol Methods*,1997,65:33-43.