

猪口蹄疫病毒多抗原表位重组腺病毒的构建与鉴定*

杜以军,姜平**,杨晓玮,汤景元,李玉峰,李永东

(南京农业大学农业部动物疫病诊断与免疫重点开放实验室,江苏南京,210095)

Construction and Identification of Recombinant Adenovirus Containing Multiple Antigen Epitopes of Swine Foot-and-Mouth Disease Virus

DU Yi-jun, JIANG Ping**, YANG Xiao-wei, TANG Jing-yuan, LI Yu-feng, LI Yong-dong

(Key Laboratory of Animal Diseases Diagnostic and Immunology, Ministry of Agriculture, Nanjing Agricultural University, Nanjing 210095, China)

Abstract: A recombinant replication-defective Human adenovirus serotype 5 plasmid pAd-VP, containing amino acids (21-60)-(141-160)-(200-213) coding region of swine foot-and-mouth disease virus serotype O VP1, was constructed using the method of homologous recombination in *E. coli* BJ5183. After the recombinant plasmid pAd-VP linearized with *PacI* transferred into HEK-293A cell, the recombinant virus was isolated and purified in HEK-293A cells by three times plaque purification. This recombinant adenovirus could be stably passaged in HEK-293A cells and TCID₅₀ was 10⁻¹⁰/mL. The mRNA of the gene was detected by RT-PCR. Obvious fluorescence was observed in the HEK-293A cell stained with standard serum of FMDV serotype O in IFA. The recombinant adenovirus could express the antigen of FMDV. The adenovirus containing multiple antigen epitopes of FMDV can be furtherly used to develop the FMDV vaccine.

Key words: Foot-and-mouth disease virus (FMDV); Recombinant adenovirus; Epitope

摘要: 本研究设计构建了含有猪 O 型口蹄疫病毒 VP1 (21-60)-(141-160)-(200-213) 位氨基酸的基因的重组腺病毒质粒 pAd-VP, 经 *PacI* 酶切后转染 HEK-293A 细胞, 3 次噬斑纯化获得了重组腺病毒 rAd-VP。该重组腺病毒于 HEK-293A 细胞连续传代至 20 代效价稳定, TCID₅₀ 为 10⁻¹⁰/mL。RT-PCR 检测证明目的基因在 mRNA 水平上可有效表达; 应用 O 型口蹄疫病毒标准阳性血清进行间接荧光抗体试验, 在 rAd-VP 感染的 HEK-293A 细胞的胞质可见清晰荧光。证明该重组腺病毒对 VP1 (21-60)-(141-160)-(200-213) 位氨基酸的基因进行了成功的表达, 从而为 FMDV 多抗原表位腺病毒活载体疫苗的研究奠定了基础。

关键词: 口蹄疫病毒; 重组腺病毒; 表位

中图分类号: S852.65 文献标识码: A 文章编号: 1003-5125(2005)05-0511-04

口蹄疫 (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。口蹄疫在全世界的分布范围广危害性之大使得消灭和控制口蹄疫成为各国政府共同关注的问题。灭活疫苗的免疫接种是控制该病的主要方法, 但只能提供短期保护, 对七种血清型具有型特异性^[1], 而且存在病毒灭活不完全和病毒逃逸的潜在危险, 因而基因工程疫苗的研究

成为 FMD 研究的热点之一。

FMDV 属微 RNA 病毒科口蹄疫病毒属, FMDV 完整的病毒颗粒由四种结构蛋白 VP1、VP2、VP3 和 VP4 各 60 个拷贝构成的衣壳包裹一条单股正链 RNA 组成。VP1 是主要的抗原蛋白, 其中, 21-40 位氨基酸肽段是一重要的 T 细胞抗原表位^[2]; 141-160、200-213 位氨基酸肽段能够保护动物抵抗病毒攻击^[3], 是重要的 B 细胞抗原表位; 40-60

收稿日期: 2005-03-25, 修回日期: 2005-05-16

* 基金项目: 国家自然科学基金 (B0270990); 新世纪优秀人才支持计划 (NCET-04-0502)

作者简介: 杜以军 (1981-), 男, 山东临沂人, 硕士研究生, 主要从事畜禽传染病防治研究。

** 通讯作者. Corresponding author. Tel: 025-84395504, E-mail: jiangp@njau.edu.cn

位氨基酸肽段具有调节 141-160、200-213 位氨基酸两个 B 细胞抗原表位的功能^[4],也是重要的 B 细胞抗原表位。所以,以上抗原表位是研究 FMDV 基因工程疫苗的首选抗原分子。

本研究的目的在于把 O 型口蹄疫病毒 VP1 第 21-60、141-160 和 200-213 位氨基酸分子串联后的基因(以下简称 VP)克隆入腺病毒穿梭载体,然后与骨架载体 pAdEasy-1 同源重组,构建重组腺病毒,为研究 FMDV 不同抗原表位组合的腺病毒活载体疫苗奠定基础。

1 材料与方法

1.1 细胞、血清、菌株和质粒

HEK-293A 细胞由美国依利诺大学医学院荣立军博士惠赠,猪抗 O 型 FMDV 标准阳性血清由兰州兽医研究所惠赠,腺病毒穿梭载体 pShuttle-CMV、骨架载体 pAdEasy-1、大肠杆菌 BJ5183 均购自 Qbiogene 公司,质粒 pT-VP1C-2B(含有 O 型 FMDV VP1 的全部基因),由本实验室构建并保存(另文报道)。

1.2 试剂和酶

QIA GEN Plasmid 纯化试剂盒购自 QIA GEN 公司,TransFast Transfection Reagent 和 M-MLV 反转录酶购自 Promega 公司,Marker 购自北京天为时代科技有限公司,DNA Marker、*Kpn* I、*Xho* I、*Hind* III、*rTaq* DNA 聚合酶、T4 DNA 连接酶、CIAP 去磷酸化酶和 DNA 凝胶回收试剂盒购自 TaKaRa 公司,*Pme* I、*Pac* I 购自 Biolab 公司,Protein A-FITC 购自武汉博士德生物工程有限公司。

1.3 引物设计和基因的合成

根据质粒 pT-VP1C-2B VP1 的基因序列设计合成引物 P1:5'-GCTGGTACCCAATGGA GACA CAGGTCCAGAG-3'; P2:5'-GATCTCGA GCCA GTGTGTGCA GGGGTTTGCA-3'; P3:5'-GAGG GTACCCAACA GCTGTTTCACAGGCG-3'。P1、P2 用于扩增 VP1(21-60)基因,P1 含有 *Kpn* I 酶切位点和起始密码子 ATG,P2 含有 *Xho* I 酶切位点,P3 用于重组质粒 pShuttle-CMV-VP、pAd-VP 的鉴定和重组腺病毒 rAd-VP 目的基因表达 mRNA 水平的鉴定。VP1(141-160)-GS-VP1(200-213)基因片段由上海博亚生物技术有限公司合成,VP1(141-160)基因和 VP1(200-213)基因之间通过 Gly-Ser 连接,该片段 5 端含有 *Xho* I 酶切位点,3 端终止密码子 TAA 后为 *Hind* 酶切位点。

1.4 串联基因的克隆与测序分析

以质粒 pT-VP1C-2B 为模板,P1、P2 为引物进行 PCR 扩增。参考 TaKaRa 公司 DNA 凝胶回收试剂盒说明书将 PCR 产物胶回收,然后将回收的 PCR 产物和 pShuttle-CMV 进行 *Kpn* I、*Xho* I 双酶切,按照 pAdEasy™ 载体系统操作说明构建重组质粒,利用 PCR 与酶切对重组质粒鉴定,得到阳性质粒 pShuttle-CMV-VP1(21-60)。再利用 *Xho* I、*Hind* III 将人工合成 FMDV VP1(141-160)-GS-VP1(200-213)基因插入该阳性重组质粒,分别用 PCR(以 P1 和 P3 为引物)与酶切对重组质粒鉴定,得到阳性重组质粒,命名为 pShuttle-CMV-VP。利用载体上测序引物序列合成一对引物,由 TaKaRa 公司测序,用 Vector NTI 和 DNAStar 软件分析所插入的基因序列和推导氨基酸序列。

1.5 同源重组与重组腺病毒质粒的转染

参考卢曾军等^[5]报道,将骨架载体 pAdEasy-1 和 *Pme* I 线性化的 pShuttle-CMV-VP 在大肠杆菌 BJ5183 中同源重组。获得的重组腺病毒质粒 pAd-VP 按 QIA GEN Plasmid 纯化试剂盒说明书进行纯化后,用 *Pac* I 酶切,然后按 TransFast Transfection Reagent 说明书转染 HEK-293A 细胞。转染 10-14d 出现明显 CPE 后,收获重组腺病毒。

1.6 重组腺病毒的纯化

按常规方法^[6],略作改进。将重组腺病毒按 10 倍梯度稀释后接种长满单层的 HEK-293A 细胞的 24 孔细胞板上,吸附 1.0h,然后加入含 2% 新生牛血清的 DMEM,37℃ 2h;弃上清,洗涤两次;每孔加入 1.0mL 含 2% 新生牛血清、1% 琼脂糖的预热(37℃)的 DMEM 营养液,使其覆盖整个细胞面,静置培养;挑取包含单个噬斑的琼脂糖块放入无菌离心管中,加入 200μL 无菌 PBS,将琼脂块捣碎后反复冻融三次,12000r/min 离心 5min,收获的病毒接种于一新的 24 孔细胞板中,如此反复纯化传代三次。

1.7 重组腺病毒 TCID₅₀ 测定

按常规方法^[6],分别将第 5、10、15 和 20 代重组腺病毒做 10 倍梯度稀释,接种于 96 孔 HEK-293A 细胞板,37℃ 培养 5d,观察 CPE,按 Reed-Muench 法计算 TCID₅₀。

1.8 重组腺病毒目的基因在 mRNA 水平上表达的检测

取第 5、10、15、20 代重组腺病毒和正常的 HEK-293A 细胞液各 500μL,用 TRIzol 试剂提取总 RNA^[7],以 P3 为引物进行反转录;PCR 反应以 cDNA 为模板,P1、P3 为引物进行扩增。

1.9 目的基因表达的检测

参考吴娟等^[7]和 Qian 等^[8]方法,将第 5、10、15 和 20 代重组腺病毒 1:50 稀释后接种于 HEK-293A 细胞,37℃ 培养 1d 后,用冰冷的无水乙醇固定;加入 1:10 稀释的猪抗 O 型 FMDV 阳性血清,37℃ 作用 1h,洗涤 5 次;加入 Protein A-FITC,37℃ 作用 1h,洗涤 5 次,然后于荧光显微镜下观察特异性荧光。

2 结果

2.1 重组性质粒 pShuttle-CMV-VP 的鉴定

挑取 2 个菌落获得的重组性质粒 pShuttle-CMV-VP1 (21-60) 经 PCR 和 *Kpn* I、*Xho* I 双酶切鉴定。结果见图 1。

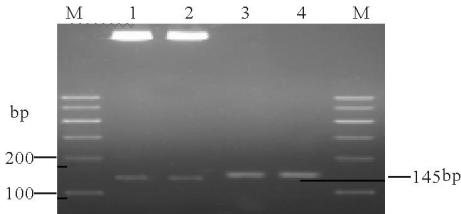


图 1 重组性质粒 pShuttle-CMV-VP1 (21-60) 鉴定

Fig. 1 The identification of pShuttle-CMV-VP1 (21-60).

M, Marker ; 1/2, Digestion of two recombinant plasmids with *Kpn* I/ *Xho* I; 3/4, VP1 (21-60) gene amplified from the recombinant plasmids with PCR.

插入 VP1 (141-160)-GS-VP1 (200-213) 基因后获得的 2 个重组性质粒 pShuttle-CMV-VP 经 *Kpn* I、*Hind* III 双酶切和 PCR 鉴定。结果见图 2 和 3,表

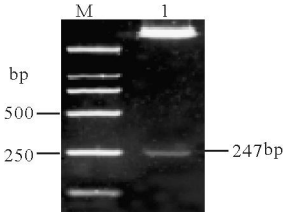


图 2 重组性质粒 pShuttle-CMV-VP *Kpn* I/ *Hind* III 鉴定

Fig. 2 Identification of pShuttle-CMV-VP.

M, DNA Marker DL2,000; 1, Digestion of pShuttle-CMV-VP with *Kpn* I/ *Hind* III

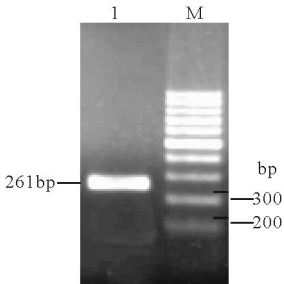


图 3 重组性质粒 pShuttle-CMV-VP PCR 鉴定

Fig. 3 The identification of pShuttle-CMV-VP with PCR
M, DNA Ladder Marker; 1, VP gene amplified from pShuttle-CMV-VP with PCR.

明目的基因已插入该穿梭载体,DNA 测序证明基因序列和阅读框完全正确,选择其中一个质粒进一步试验。

2.2 重组腺病毒质粒 pAd-VP 的鉴定

将电转化获得的重组质粒经 PCR 鉴定和 *Pac* I 酶切鉴定。结果见图 4, *Pac* I 酶切出 35kb 的含有目的基因 VP 的骨架载体大片段和 4.5kb 的小片段条带。

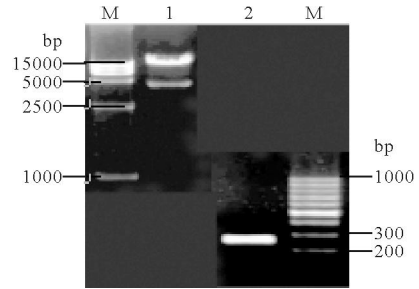


图 4 重组质粒 pAd-VP 鉴定

Fig. 4 The identification of recombinant pAd-VP plasmid
M, DNA Marker; 1, Digestion of pAd-VP with *Pac* I; 2, VP gene amplified from pAd-VP with PCR

2.3 重组病毒的克隆及稳定性试验

经噬斑纯化 3 次,获得一株重组腺病毒,命名为 rAd-VP,连续传代并测定其 TCID₅₀,第 5、10、15 和 20 代重组腺病毒 TCID₅₀ 分别为 10^{-9.5}/mL、10^{-9.6}/mL、10^{-9.6}/mL、10^{-10.5}/mL。

2.4 RT-PCR 检测目的基因在 mRNA 水平上的表达

图 5 结果表明,第 5、10、15、20 代重组腺病毒经 RT-PCR 均可获得大小为 261bp 的特异性条带,而正常的 HEK-293A 细胞没有条带,证明目的基因在 mRNA 水平上有效表达。

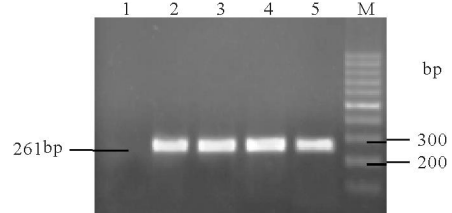


图 5 RT-PCR 检测重组腺病毒 rAd-VP 表达的 VP 蛋白 mRNA

Fig. 5 Identification of mRNA of VP in recombinant adenovirus rAd-VP with RT-PCR

M, DNA Ladder Marker; 1, Control of normal HEK-293A; 2-5 RT-PCR products from total RNA of HEK-293A infected with recombinant adenovirus passage 5th, 10th, 15th, 20th separately

2.5 IFA 检测目的基因的表达

图 6 结果表明,第 5、10、15 和 20 代重组腺病毒感染的 HEK-293A 细胞胞质均出现明显的荧光,而

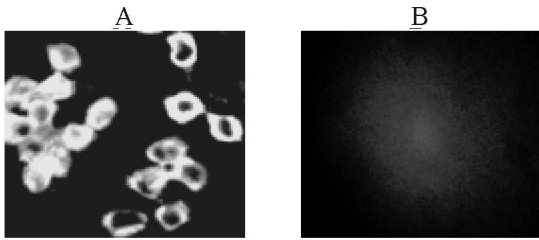


图6 重组腺病毒 rAd-VP 感染的 HEK293-A 细胞间接免疫荧光抗体染色结果

Fig. 6 The results of indirect immunofluorescence assay of HEK293-A cell infected with the recombinant adenovirus rAd-VP

A: HEK293-A cell infected with recombinant adenovirus and fluorescence was obvious; B: Control of normal HEK-293A and there was no fluorescence.

对照细胞没有荧光,说明该重组腺病毒可以稳定表达 VP 基因。

3 讨论

近年来,随着分子生物学技术的发展,FMD 基因工程疫苗不断涌现,如亚单位疫苗、合成肽疫苗、蛋白质载体疫苗、基因缺失疫苗、活载体疫苗、核酸疫苗等。这些疫苗安全性好、生产成本低,而且可以根据需要制备同一病毒多个成分或多价病毒疫苗,因此具有广阔的发展前景。人血清 5 型腺病毒是基因治疗、重组腺病毒疫苗载体及在哺乳动物细胞中高效表达外源基因的常用工具,E1 区缺失的复制缺陷型腺病毒由于不能在非许可性细胞中增殖,故不会造成病毒在自然界中的扩散^[7],而且重组腺病毒进入机体,以染色体外形式存在,不会整合到宿主的基因组中,不会激活原癌基因的表达。重组腺病毒同时也可表达多个基因,而且可以对表达的产物进行正确的翻译后修饰,所以这类载体的应用也日益广泛起来,如应用腺病毒表达的 p53 用于基因治疗现已进入三期临床阶段,并被证明效果较好^[9]。

外源基因克隆入穿梭载体 pShuttle-CMV 后,与携带骨架载体 pAdEasy-1 的 BJ5183 感受态细菌电转化,BJ5183 中含有重组酶,使穿梭载体与骨架载体发生同源重组。正确的重组有二种方式即左右臂之间同源重组和起始点与右臂同源重组,用 *Pac* 酶切可以切出 35 Kb 的大片段和 3.0 Kb 或 4.5 Kb 的小片段,本实验中切出 35 Kb 和 4.5 Kb 的条带,为起始点与右臂同源重组。

Moraes 等构建了包含 FMDV A24 P1 蛋白和 FMDV A12 3C 蛋白的重组腺病毒(Ad5A24),免疫

猪体后可以抵抗同源病毒的攻击^[10];Wu 等(2003)构建了 FMDV A24 Cruzeiro 和 O1Campos 两种血清型的 P1 蛋白的重组腺病毒(Ad5A24 + O1),免疫猪体后可以产生针对 A24 和 O1 的中和抗体^[11]。本研究立足于 FMDV 多抗原表位之间的组合构建重组腺病毒活载体疫苗,突出 FMDV 主要保护性表位的作用,串联表位 VP1 (21-60)-(141-160)-(200-213)基因,表位之间通过 Gly 和 Ser 连接,在 HEK-293A 细胞获得了表达。经连续传代至第 20 代,该重组腺病毒效价仍稳定且可有效表达目的基因,从而为继续研究 FMDV 不同抗原表位之间的组合的重组腺病毒活载体疫苗奠定了基础。

参考文献

- [1] Barterling S J, Vreeswijk J. Developments in foot and mouth disease vaccines[J]. *Vaccine*,1991,9:75-88.
- [2] Collen T, Dimarchi R, Doel T R. A T cell epitope in VP1 of foot-and-mouth disease virus is immunodominant for vaccinated cattle[J]. *J Immunol*,1991,146:749-755.
- [3] Bittle J L, Houghen R A, Alexander H, *et al.* Protection against foot-and-mouth disease by immunization with a chemically synthesized peptide predicted from the viral nucleotide sequence[J]. *Nature*,1983,298:31-33.
- [4] Parry N R, Fox G, Rowlands D, *et al.* Structural and serological evidence for a novel mechanism of antigenic variation in foot-and-mouth disease virus[J]. *Nature*,1990,347:569-572.
- [5] 卢曾军,曹轶梅,包惠芳,等. 同源重组法制备口蹄疫病毒多基因重组腺病毒[J]. *中国病毒学*,2004,19(2):125-128.
- [6] 殷震,刘景华,主编. *动物病毒学*[M]. 第二版,北京:科学出版社,1997. 240-242;329-330.
- [7] 吴娟,李嘉琦,孙茂盛,等. 腹腔注射重组腺病毒诱导的免疫反应[J]. *中国病毒学*,2002,17:51-55.
- [8] Qian P, Li X M, Jin M L, *et al.* An approach to a FMD vaccine based on genetic engineered attenuated pseudorabies virus: one experiment using VP1 gene alone generates an antibody responds on FMD and pseudorbies in swine[J]. *Vaccine*, 2004,22:2129-2136.
- [9] Stribley J M, Rehman K S, Niu H R, *et al.* Gene therapy and reproductive medicine[J]. *Fertil and Steril*, 2002,77:645-657.
- [10] Moraes M P, Mayr G A, Mason P W, *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[J]. *Vaccine*,2002,20:1631-1639.
- [11] Wu Q H, Moraes M P, Grubman M J. Recombinant adenovirus co-expression capsid proteins of two serotypes of foot-and-mouth disease virus(FMDV): in vitro characterization and induction of neutralizing antibodies against FMDV in swine [J]. *Virus Research*,2003,93:211-219.