

猪 α 干扰素重组腺病毒的构建及其抗口蹄疫病毒活性研究*

杜以军, 姜平**, 李玉峰, 王先炜

(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 of Recombinant Adenovirus Containing Pocine IFN- α genes and Activity of Anti-Swine Foot-and-mouth Disease Virus

DU Yi-Jun, JIANG Ping**, LI YU-Feng, WANG Xian-Wei

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

Abstract: Pocine interferon α mature protein genes were amplified by reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR), and the recombinant replication-defective human adenovirus serotype 5 plasmid pAd-poIFN- α was constructed. When the recombinant plasmid pAd-poIFN- α was linearized with *PacI*, and then transferred into HEK-293A cells, the virus plaque was isolated and purified in HEK-293A cells by three of plaque purification passages. This recombinant adenovirus rAd-poIFN- α could be stably passaged in HEK-293A cells and generated titres in the order of 10^7 TCID₅₀/mL. The mRNA of the transgene in this recombinant adenovirus was detected by RT-PCR. As a result, the adenovirus exhibited high anti-swine FMDV activity in PK-15 cells and could be further studied in the control strategy of swine FMDV.

Key words: Pocine interferon α ; Recombinant adenovirus; Foot-and-mouth disease virus (FMDV)

摘要: 本研究利用 RT-PCR 方法扩增猪 α 干扰素成熟蛋白基因后构建了重组腺病毒质粒 pAd-poIFN- α , 经 *PacI* 酶切后转染 HEK-293A 细胞, 3 次噬斑纯化后获得了重组腺病毒 rAd-poIFN- α 。该重组腺病毒于 HEK-293A 细胞连续传代至 20 代滴度稳定, 为 10^7 TCID₅₀/mL。RT-PCR 检测证明目的基因在 mRNA 水平上可有效表达; 在 PK-15 细胞上可以检测到较强的抗猪口蹄疫病毒活性, 从而为研究猪口蹄疫免疫防治新技术奠定了重要基础。

关键词: 猪 α 干扰素; 重组腺病毒; 口蹄疫病毒

中图分类号: Q78

文献标识码: A

文章编号: 1003-5125 (2006) 04-0390-04

干扰素(IFN)是一类具有广谱抗病毒、抗肿瘤、免疫调节作用的细胞因子。IFN 可分为两个型, α 干扰素 (IFN- α) 属于 I 型干扰素, 是机体细胞抵抗病毒感染的第一道防线。Lefevre 等首先克隆了猪 IFN- α 基因并将其成熟蛋白基因在大肠杆菌中表达, 具有较强的抗病毒活性^[1]。曹瑞兵等克隆了一种新的猪 IFN- α 基因并在大肠杆菌中进行了其成熟蛋白的单纯表达, 表达产物具有较高的抗病毒活性^[2]。Chinsangaram 等的研究结果证实口蹄疫病毒对 IFN- α 高度敏感^[3,4], 从而为 IFN- α 在机体内抗口蹄疫病毒感染提供了可能。

本研究选用人血清 5 型复制缺陷型腺病毒表达系统来表达猪 IFN- α 成熟蛋白, 并通过细胞培养证明该重组病毒在 PK-15 细胞上的培养上清 (含有猪 IFN- α) 具有抑制口蹄疫病毒在 PK-15 细胞上增殖的作用, 现报告如下:

1 材料与方法

1.1 实验材料

HEK-293A 细胞由美国依利诺大学医学院荣立军博士惠赠, 大肠杆菌 BJ5183、腺病毒穿梭载体 pShuttle-CMV 和骨架载体 pAdEasy-1 均购自

收稿日期: 2006-02-27, 修回日期: 2006-04-18

* 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, 博士研究生, 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

公司, PK-15 细胞和猪 O 型口蹄疫病毒 LY 株和野生型腺病毒 wtAd 由本实验室保存。QIAGEN Plasmid 纯化试剂盒购自 QIAGEN 公司, TransFast Transfection Reagent 和 M-MLV 反转录酶购自 Promega 公司, Oligo d(T)、DNA Marker DL2 000、DL15 000、*pml*、*XhoI*、Ex TaqDNA 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, *PmeI*、*PacI* 购自 Biolab 公司。

1.2 引物设计和猪 IFN- α 基因扩增

根据 GenBank 登录的 poIFN- α 基因(X57191) 设计下列引物: P1:5-GAGGGTACCATGTGCGACC TGC AAC-3; P2:5-GCGCTCGAGTTATCACTCCTT CTCCTG-3, 用于扩增猪 IFN- α 成熟蛋白基因(去除信号肽部分)。采集临床上患猪呼吸与繁殖障碍综合征的病猪的血液 6mL (肝素抗凝血), 10 000g 离心 30s; 沉淀加入红细胞裂解液 1mL, 37°C 作用 15min, 10 000g 离心 1min; 用红细胞裂解液重复裂解一次; 裂解红细胞两次后, 将沉淀的白细胞重悬于 300 μ L PBS, 用 TRIzol 试剂提取总 RNA^[5], 经 Oligo d (T) 反转录后以 cDNA 为模板, P1、P2 为引物进行 PCR 扩增, PCR 反应体系 25 μ L:cDNA 1 μ L, Mg²⁺ 1.5mmol/L, dNTP 200 μ mol/L, 10 \times Ex Taq Buffer 2.5 μ L, P1/P2 浓度均为 400nmol/L, Ex Taq-DNA 聚合酶 1U。反应条件为: 预变性 95°C 5min; 95°C 45s, 62°C 45s, 72°C 1min; 共进行 35 个循环, 然后 72°C 延伸 10min, 取出产物在 20g/L 的琼脂糖凝胶上电泳, 得到 525bp 的目的片段。

1.3 基因的克隆与测序分析

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 *KpnI*、*XhoI* 双酶切, 按照 pAdEasyTM 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-poIFN- α 。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。

1.4 同源重组与重组腺病毒质粒的转染

按文献^[6]报道, 将骨架载体 pAdEasy-1 和 *PmeI* 线性化的 pShuttle-CMV-poIFN- α 在大肠杆菌 BJ 5183 中同源重组。获得的重组腺病毒质粒 pAd-poIFN- α 按 QIAGEN Plasmid 纯化试剂盒说明书进行纯化后, 用 *PacI* 酶切, 然后按 TransFast Transfection Reagent 说明书转染 HEK-293A 细胞。转染后 10d 出现明显 CPE, 收获重组腺病毒。

1.5 重组腺病毒的纯化及其 TCID₅₀ 测定

按常规方法^[6], 进行噬斑纯化 3 次后, 获得一株重组腺病毒 rAd-poIFN- α , 稳定传至 20 代, 取第 5、10、15 和 20 代重组腺病毒分别测定其 TCID₅₀。

1.6 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 500 μ L, 用 TRIzol 试剂提取总 RNA^[5], 以 P2 为引物进行反转录; PCR 反应以 cDNA 为模板, P1、P2 为引物进行扩增。

1.7 重组腺病毒表达的猪 IFN- α 抗口蹄疫病毒活性检测

参考 Chinsangaram 等方法^[4], 在生物安全三级 (P3) 实验室内完成。将 50TCID₅₀ 的第 5 代重组腺病毒 rAd-poIFN- α 和 50TCID₅₀ 的第 5 代野生型腺病毒 wtAd 同时接种长满单层的 PK15 细胞的 6 孔板, 每种病毒重复两个孔, 37°C 吸附 1h; 用 150mmol/L NaCl、20mmol/L MES(pH 6.0) 洗涤细胞面去除未吸附的病毒, 用 DMEM 洗涤 2 次后, 每孔加入含 2% 新生牛血清的 DMEM 维持液 2mL; 分别于 3、6、25 和 30h 分别取上清 450 μ L/孔; 上清作适当处理后, 将 rAd-poIFN- α 的样品作 10 倍比梯度稀释、wtAd 的样品作 2 倍比梯度稀释后加至长满单层的 PK15 细胞的 96 孔板, 37°C 孵育 24h; 弃上清, 感染 100 TCID₅₀ 的猪口蹄疫病毒, 同时设立病毒感染细胞、正常细胞对照。培养 2-3d, 观察 CPE, 以抑制 50% FMDV 细胞病变的 IFN- α 的最高稀释度的倒数作为 IFN- α 抗 FMDV 活性单位。

2 结果

2.1 猪 IFN- α 基因克隆与重组质粒 pShuttle-CMV-poIFN- α 的鉴定

用 RT-PCR 方法成功地扩增了猪 IFN- α 成熟蛋白的基因序列, 大小为 525bp。将其克隆入穿梭载体后获得的重组质粒 pShuttle-CMV-poIFN- α 经 PCR 和 *KpnI*、*XhoI* 双酶切鉴定。结果见图 1。表明目的基因已插入该穿梭载体。DNA 测序表明: 与 GenBank 登录的猪 IFN- α 基因(AY776245) 序列同源性分别为 99%, 氨基酸序列同源性分别为 99.4%, 并且编码的阅读框完全正确。

2.2 重组腺病毒质粒 pAd-poIFN- α 的鉴定

将电转化获得的重组质粒经 PCR 和 *PacI* 酶切鉴定。结果见图 2。*PacI* 酶切出 35kb 和 4.5kb 的条带, 表明同源重组成功。

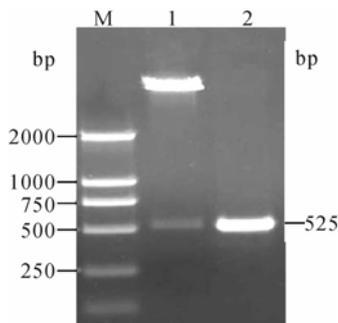


图 1 重组质粒 pShuttle-CMV-poIFN- α 鉴定

Fig.1 The identification of pShuttle-CMV- poIFN- α plasmid M, DNA Marker DL2 000; 1, Digestion of the recombinant plasmid with *KpnI/XhoI*; 2, poIFN- α gene amplified from the recombinant plasmid with PCR.

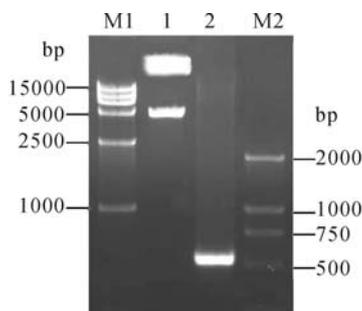


图 2 重组质粒 pAd-poIFN- α 鉴定

Fig.2 The identification of pAd-poIFN- α plasmid M1, DNA Marker DL15 000; M2, DNA Marker DL2 000; 1, Digestion of the recombinant plasmid pAd-poIFN- α with *PacI*; 2, poIFN- α gene amplified from the recombinant plasmid pAd- poIFN- α with PCR.

2.3 重组病毒的纯化与稳定性试验

经噬斑纯化 3 次, 获得一株重组腺病毒, 命名为 rAd-poIFN- α , 连续传代并测定其 TCID₅₀, 第 5、10、15 和 20 代重组腺病毒滴度均为 10⁷TCID₅₀/mL。

2.4 RT-PCR 检测目的基因在 mRNA 水平上的表达

图 3 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 525bp 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。

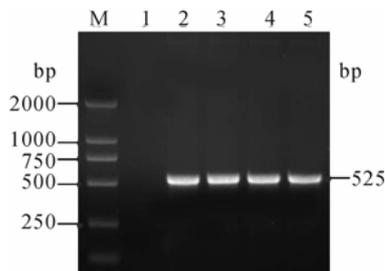


图 3 RT-PCR 检测 rAd-poIFN- α 表达的 poIFN- α 的 mRNA
Fig.3 Identification of mRNA of poIFN- α in recombinant adenovirus rAd-poIFN- α with RT-PCR

M, DNA Marker DL2 000; 1, Control of normal HEK-293A; 2-5 RT-PCR products from total RNA of HEK-293A infected with recombinant adenovirus passage 5,10,15,20 separately.

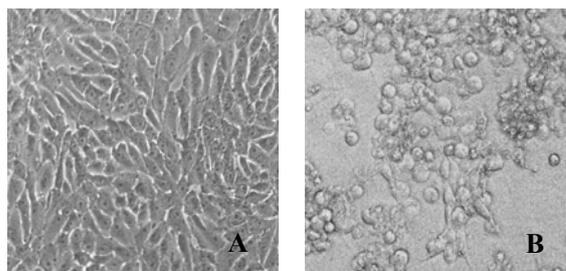


图 4 rAd-poIFN- α 表达的 poIFN- α 对猪口蹄疫病毒的抑制作用

Fig.4 Inhibition effect of poIFN- α expressed by rAd-poIFN- α on swine FMDV in PK-15 cells

A: After inoculated with swine FMDV, none CPE was observed in PK-15 cells which had been previously treated with poIFN- α ; B: Obvious CPE of swine FMDV in PK-15 cells.

2.5 重组腺病毒表达的猪 IFN- α 抗口蹄疫病毒活性检测

结果见图 4、表 1, 表明重组腺病毒 rAd-poIFN- α 接种的 PK-15 细胞产生的猪 IFN- α 孵育 PK-15 细胞后有明显的抗猪口蹄疫病毒活性, 而且在 25-30h 产生的 IFN- α 抗病毒活性明显提高。而野生型腺病毒 wtAd 接种的 PK-15 细胞上清孵育的 PK-15 细胞和正常的 PK-15 细胞在感染 100TCID₅₀ 的猪口蹄疫病毒后 2-3d 均出现明显的 CPE。

表 1 rAd-poIFN- α 和 wtAd 接种的 PK-15 上清抗猪 FMDA 的活性

Table 1 Anti-swine FMDV activity of supernatants from rAd-poIFN- α and wtAd-infected PK-15 cells

Time p.i. ^a (h)	Anti-swine FMDV activity in PK-15 cells for vector	
	rAd-poIFN- α	wtAd
3	10 ^b	<2
6	10	<2
25	50	<2
30	50	<2

^a time of post infection of rAd-poIFN- α and wtAd

^b the reciprocal of highest dilution that reduced FMDV CPE number by 50%

3 讨论

口蹄疫是目前危害世界养殖业的重要疾病之一。尽管 FMDV 灭活疫苗已成为防治该病的重要手段之一, 但其免疫效果仍不够理想, 只能提供短期保护, 而且存在病毒灭活不完全和病毒逃逸的潜在危险。Moraes 等 (2003) 用表达猪 IFN- α (包含信号肽) 的重组腺病毒 Ad5-IFN- α 和表达 FMDV A24 P1 蛋白和 FMDV A12 3C 蛋白的重组腺病毒 (Ad5A24) 联合免疫可以使猪体获得保护, 抵抗口蹄疫病毒攻击^[7]。本研究构建的重组腺病毒 rAd-poIFN- α 在 HEK-293A 细胞获得了表达, 接种 PK-15

细胞的上清具有较强的抗猪口蹄疫病毒的活性, 从而为我国研究猪口蹄疫免疫防治新技术奠定了重要基础。

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^[5], 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, 因此具有较好的生物安全性。本研究利用RT-PCR技术克隆了猪IFN- α 成熟蛋白基因并选用人血清5型复制缺陷型腺病毒表达系统来表达, 表达产物具有较强的抗猪口蹄疫病毒活性, 为进一步开展体内抗病毒感染研究奠定了基础。

References

- [1] Lefevre F, Lharidon R, Borrás-Cuesta F, *et al.* Production, purification and biological properties of an Escherichia coli-derived recombinant porcine alpha interferon [J]. *J Gen Virol*, 1990, 71: 1057-1063.
- [2] Cao R B, Zhang S F, Cai M H, (曹瑞兵, 张素芳, 蔡梅红) *et al.* Molecular Cloning of a Novel Porcine Interferon- α and Its Expression in Escherichia coli [J]. *Agr Biotechnol* (农业生物技术学报), 2004, 12 (3): 278-282.
- [3] Chinsangaram J, Koster M, Grubman M J. Inhibition of L-deleted foot-and-mouth disease virus replication by alpha/beta interferon involves double-stranded RNA-dependent protein kinase [J]. *J Virol*, 2001, 75 (12): 5498-5503.
- [4] Chinsangaram J, Piccone M E, Grubman M J. Ability of foot-and-mouth disease virus to form plaques in cell culture is associated with suppression of alpha/beta interferon [J]. *J Virol*, 1999, 73(12): 9891-9898.
- [5] Wu J, Li J Q, Sun M S, (吴娟, 李嘉琦, 孙茂盛) *et al.* The Immune Response Induced by Recombinant Adenovirus with Administration of Interaperitonea Injection [J]. *Virologica Sinica* (中国病毒学), 2002, 17 (1): 51-55.
- [6] Du Y J, Jiang P, Yang X W, (杜以军, 姜平, 杨晓玮) *et al.* Construction and Identification of Recombinant Adenovirus Containing Multiple Antigen Epitopes of Swine Foot-and-Mouth Disease Virus [J]. *Virologica Sinica* (中国病毒学), 2005, 20 (5): 511-514.
- [7] Moraes M P, Chinsangaram J, Brum M C S, *et al.* Immediate protection of swine from foot-and-mouth disease: a combination of adenoviruses expressing interferon alpha and a foot-and-mouth disease virus subunit vaccine [J]. *Vaccine*, 2003, 22: 268-279.