

FMDV 3C 蛋白酶基因的克隆及在昆虫细胞中的表达

曹轶梅, 卢曾军, 孙普, 孙甲川, 刘在新*

(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, 兰州 730046)

摘要: 口蹄疫病毒 3C 蛋白酶在病毒的致病机理、聚蛋白前体的加工和 RNA 的复制上起着很重要的作用,是当前抗病毒研究的一个重要靶点。本研究从 Asia I 型 FMDV 适应细胞毒中提取 RNA, 用 RT-PCR 技术扩增 3C 基因, 首先克隆到 pGEM-T 载体, 再亚克隆到杆状病毒转移载体 pMelBac B 中, 构建出重组转移载体 pMel-3C。最后将含有目的基因的转移载体与线性化的杆状病毒 DNA 共转染 Sf9 细胞, 通过噬斑筛选和 PCR 鉴定, 获得了重组杆状病毒。重组病毒经扩增后以 10 个 MOI 感染 Sf9 细胞, 接种病毒 72 h 后收获细胞, 样品经 SDS-PAGE 和 Western blot 证实 3C 蛋白获得表达, 分子量约 23kDa, 与预测蛋白大小一致, 且能被 FMDV 感染阳性血清所识别。本研究为空衣壳的体外组装及新型抗病毒药物设计的研究奠定了基础。

关键词: FMDV; 3C 蛋白酶基因; Sf9 细胞; 杆状病毒; 表达

中图分类号: Q786 **文献标识码:** A **文章编号:** 0001-6209 (2008) 03-0312-05

口蹄疫(foot-and-mouth disease, FMD)是牛、猪、绵羊和山羊等偶蹄动物的一种高度接触性传染病,虽然感染动物通常不发生死亡,但病毒粒子往往通过气溶胶的形式迅速传播,因而必须采取严格的措施来控制该病的暴发^[1]。口蹄疫在全球范围内不断造成巨大的经济损失,在一定程度上与使用疫苗所产生的技术和政治难题有关。因此,通过对病毒复制和发病机理的深入研究来寻求控制该病的新方法是目前的一个研究热点。

FMDV 是小 RNA 病毒科,口蹄疫病毒属成员,为单股正义 RNA 病毒,小 RNA 病毒科成员有脊髓灰质炎病毒(PV),人鼻病毒(HRV)和甲肝病毒(HAV)^[2]。小 RNA 病毒具有相同的复制策略,病毒基因组先翻译成聚蛋白前体,被病毒编码的蛋白酶裂解成一些病毒衣壳蛋白和复制所必须的蛋白^[3,4]。对 FMDV 来说,病毒一旦将其 RNA 运送到宿主细胞胞质,它的感染过程就开始。病毒 RNA 立即作为 mRNA 指导

聚蛋白的合成,这个聚蛋白首先被裂解成 14 个独立的蛋白,13 个裂解位点中的 11 个由 FMDV 3C 蛋白酶(FMDV 3C^{pro})所裂解,3C 蛋白酶(3C^{pro})起初也包含在病毒聚蛋白中^[4]。保守的 3C^{pro} 是小 RNA 病毒科蛋白酶中唯一一个在所有属中都相同的蛋白酶,在聚蛋白的加工过程中起着关键的作用,抑制其催化功能可有效抑制病毒前体蛋白的切割,阻断病毒复制,是病毒药物治疗研究的靶点之一。

杆状病毒表达系统具有表达产物在结构及功能上接近天然蛋白、还有对重组蛋白进行定位的功能,如将核蛋白转送到细胞核,膜蛋白定位在膜,分泌蛋白则可分泌到细胞外以及表达水平高等优点,因此,在许多重组蛋白的表达中得到广泛应用。本研究先将 FMDV 3C 基因插入到转移载体中,置于杆状病毒启动子(P_{PH})控制之下,构建成重组转移载体。然后把重组转移载体和杆状病毒 DNA 共转染昆虫细胞 Sf9,通过同源重组将外源片段插入到病毒基因组中。通过噬

基金项目: 国家“973 项目”——国家重大基础研究发展规划(2005CB523201)

*通讯作者。Tel: +86-931-8342587; E-mail: liukey@public.lz.gs.cn

作者简介: 曹轶梅(1976-),女,甘肃会宁人,博士,从事动物病毒分子生物学研究。E-mail: caoym518@126.com

收稿日期: 2007-08-10; 修回日期: 2007-09-17

斑筛选和 PCR 鉴定获得重组杆状病毒。由于杆状病毒原来的非必需区段被外源片段取代, 当重组病毒在昆虫细胞内复制时, 目的基因也可得到表达。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 细胞和毒株: Asia I 型 FMDV 适应细胞毒及 Sf9 细胞由本实验室保存。

1.1.2 主要试剂和仪器: Asia I 型 FMDV P1-2A 蛋白由本实验室表达并保存; RNeasy Mini Kit 购自 Qiagen 公司, pGEM-T 载体、T4 DNA 连接酶为 Promega 公司产品, Ta KaRa RNA PCR Kit (AMV) Ver. 3.0、感受态细胞 DH5 α 、DNA Marker、低分子量蛋白 Marker、DNA 片段纯化试剂盒、质粒快速提取试剂盒、Taq DNA 聚合酶、限制性内切酶 *Sal* I、*Bam*H 和 *Bgl* 均为大连宝生物工程有限公司(TaKaRa)产品, 转移载体 pMelBac B、Grace's 昆虫细胞培养基、昆虫细胞完全培养基 TNM-FH 和 S.N.A.P.TM MidiPrep Kit、Bac-N-BlueTM 杆状病毒表达系统试剂盒均购自 Invitrogen 公司。引物参考 GenBank 中 Asia I FMDV JS/China 株基因序列设计特异引物。引物序列如下: 3C+: 5'-AGAGATCTGAGTGGTGCCCCACCGACTG-ACTTGCA-3'; 3C-: 5'-AGGTCGACTTACTCGTGG-TGTGGTTCGGGGTCGATG-3'。上游引物引入 *Bgl* 酶切位点, 下游引物引入 *Sal* I 酶切位点, 引物均由宝生物工程(大连)有限公司合成。

1.2 RNA 的提取

从 Asia I 型 FMDV 适应细胞毒中提取细胞总 RNA, 操作按 RNeasy Mini Kit 说明书进行, 所有器皿和试剂均经 0.1% 的 DEPC(焦碳酸二乙酯)水溶液去 RNase 处理。

1.3 RT-PCR

参考 TaKaRa RNA PCR Kit (AMV) Ver. 3.0 说明书操作。

1.4 基因的克隆与鉴定

将纯化的 PCR 产物和 pGEM-T 载体于 4 $^{\circ}$ C 连接过夜, 转化感受态细胞 DH5 α , 均匀涂布于含有 Amp 的 LB 琼脂平板上, 挑取单个菌落。以质粒快速提取试剂盒小量制备质粒, 并进行酶切和 PCR 鉴定, 将鉴定为阳性的重组质粒命名为 pGEM-3C。

1.5 重组转移载体的构建

将上节鉴定正确的重组质粒 pGEM-3C 经 *Bgl*

和 *Sal* I 双酶切后, 与经 *Bam*H I 和 *Sal* I 酶切处理的 pMelBac-B 连接, 转化大肠杆菌 DH5 α , 挑取单个菌落, 以质粒快速提取试剂盒小量制备质粒, 经电泳和 PCR 鉴定筛选, 初步鉴定为阳性的重组质粒送宝生物工程(大连)有限公司进行测序, 序列测定确认后命名为 pMel-3C。

1.6 重组转移载体与杆状病毒共转染昆虫细胞

用 Invitrogen 公司生产的 S.N.A.P.TM MidiPrep Kit 试剂盒提取 pMel-3C 质粒 DNA, 具体方法按照该试剂盒说明书进行。将提取的高纯度的 pMel-3C 质粒 DNA 4 μ g 与 0.5 μ g 线性化的杆状病毒 Bac-N-BlueTM DNA 用 Cellfectin[®] 转染试剂共转染对数生长期的 Sf9 细胞。转染后, Sf9 细胞逐渐发生改变, 倒置显微镜下观察, 到细胞发生典型病变后, 收获细胞培养上清, 4 $^{\circ}$ C 保存备用。

1.7 重组杆状病毒的噬斑筛选和 PCR 鉴定

取 1mL 不同稀释倍数(10^{-1} ~ 10^{-6})的上述细胞培养上清加到 Sf9 细胞中, 室温放置 1h。另将 2mL Grace's 细胞培养基、2mL 低熔点琼脂糖、1mL 胎牛血清、150 μ g/mL X-gal 和 5mL 细胞完全培养基 TNM-FH 混合物加热至 47 $^{\circ}$ C 后混匀, 1h 后, 吸弃细胞中的培养基, 缓慢加入上述混合物, 27 $^{\circ}$ C 培养至出现蓝斑。

挑取上述蓝斑进行病毒传代, 提取病毒 DNA, 利用 Bac-N-BlueTM 载体所附的一对鉴定引物进行重组杆状病毒 PCR 鉴定。上游引物: 5'-TTTACTGTTTT-CGTAACAGTTTTG-3'; 下游引物: 5'-CAACAACGC-ACAGAATCTAGC-3'。

1.8 重组蛋白的表达与检测

将鉴定正确的重组杆状病毒用噬斑法确定滴度后, 以 10 个感染复数(Multiplicity of Infection, MOI)的重组病毒接种对数生长期的 Sf9 昆虫细胞, 72h 后收获细胞。收获样品用细胞裂解液(含 100 μ g/mL PMSF, 0.5 μ g/mL leupeptin)裂解后, 进行 SDS-PAGE 检测, 以正常 Sf9 昆虫细胞以及野生型杆状病毒感染细胞裂解物作为阴性对照。在 western blot 检测中, 同时以杆状病毒表达系统表达的 Asia I 型 FMDV P1-2A 蛋白作为阳性对照。

将电泳蛋白带转印至硝酸纤维素膜上, PBST 洗涤硝酸纤维素膜后, 用 5% 的脱脂奶 37 $^{\circ}$ C 封闭 45min, 再用 PBST 洗涤后加入 Asia I 型 FMDV 感染猪血清于 37 $^{\circ}$ C 作用 1h。PBST 洗涤后加入 1:20000 稀释的 HRP-兔抗猪 IgG 37 $^{\circ}$ C 作用 1h。充分洗涤, 加

入 DAB-H₂O₂ 显色, 观察特异性条带。

1.9 3C 蛋白酶裂解活性分析

将表达的 3C 蛋白 10 μ M 与同样表达系统表达的 Asia I 型 FMDV 衣壳蛋白 P1-2A 100 μ Mol/L 在 50mMol/L Tris-HCL, 150mMol/L NaCl 缓冲液中于 4 $^{\circ}$ C 作用 16h, 进行 SDS-PAGE 后, 将电泳蛋白带转印至硝酸纤维素膜上, 进行 Western blot 分析。

2 结果和分析

2.1 RT-PCR

以提取的 RNA 为模板反转录合成 cDNA, 以 3C+和 3C-为引物, 通过 PCR 扩增得到大小约为 639bp 的片段(图 1), 与预期大小一致。

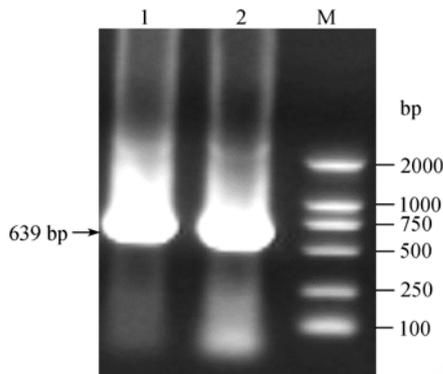


图 1 3C 基因 PCR 产物电泳图

Fig. 1 Amplification of 3C gene by PCR. Lane M is DNA Marker; Lanes 1 and 2 are PCR products

2.2 重组质粒的酶切及 PCR 鉴定

重组质粒经 *Bgl* II 和 *Sal* I 双酶切, 酶切产物和分子量 Marker 一同电泳, 显示有一条 639bp 的酶切片段。以重组质粒为模板, 用引物 3C+和 3C-进行扩增, 获得 639bp 的片段, 说明插入片段为目的基因 3C。

2.3 重组转移载体的鉴定

重组转移载体 pMel-3C 用 PCR 扩增得到约为 639bp 的片段, 与预期大小相符。初步证明目的基因与转移载体连接正确。将初步鉴定正确的 pMel-3C 进行测序确证, 序列分析表明目的基因的阅读框架长 639bp, 编码 213 个氨基酸, 并按正确的读码框连接成功(序列略)。

2.4 重组杆状病毒的筛选与鉴定

将重组质粒 pMel-3C 与杆状病毒 DNA 共转染 Sf9 细胞, 120h 后细胞发生典型病变。收取发生病变

的细胞, 在含有 X-gal 的琼脂糖平板上进行蓝斑筛选, 蓝色噬斑为初步确定发生重组的阳性克隆。挑取蓝色噬斑进一步感染 Sf9 细胞, 120h 后收集细胞上清, 提取病毒 DNA 进行 PCR 鉴定。如果为野生型杆状病毒, PCR 扩增产物大小应为 839bp; 如果为重组杆状病毒, PCR 产物大小应为 905bp; 如果噬斑中两种病毒混合, PCR 产物应为两条大小分别为 839bp 和 905bp 的片段(图 2)。筛选出一株 PCR 产物大小为 905 bp 病毒, 将该株病毒继续感染 Sf9 细胞 72~96h 后, 观察到细胞发生典型病变, 表明转染成功, 并获得了重组的杆状病毒。

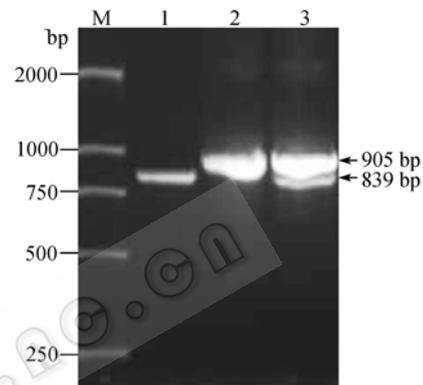


图 2 重组杆状病毒 PCR 鉴定结果

Fig. 2 Identification of recombinant baculovirus by PCR. Lane M is DNA Marker; Lane 1 is wild-type baculovirus plaque; Lane 2 is recombinant baculovirus plaque; Lane 3 is mixture of recombinant and wild-type baculovirus plaque.

2.5 表达产物的 SDS-PAGE 和 Western blot 检测

将鉴定正确的重组杆状病毒液接种于 Sf9 细胞, 感染 72 h 后收集细胞(4 $^{\circ}$ C 5000 \times g 离心 20 min), 处理后进行 SDS-PAGE 分析, 结果表明 FMDV 3C 基因在昆虫杆状病毒系统中进行了成功的表达, 且大小与预测 3C 大小一致, 约为 23kDa(图 3-A)。对上述表达产物进行 Western blot 分析, 结果出现一条特异性反应带, 而野生型杆状病毒和正常细胞均无任何反应带(图 3-B)。证明表达产物能与 FMDV 阳性血清发生反应, 且具有很高的特异性。

2.6 3C 蛋白酶裂解活性分析

表达的 3C 蛋白与衣壳蛋白 P1-2A 作用后, Western blot 分析表明部分 P1-2A 被裂解成大小约为 33 kDa(可能为 VP0)和 25 kDa(可能为 VP1 和 VP3)的片段(图 4)。这说明表达的 3C 蛋白酶具有裂解活性。

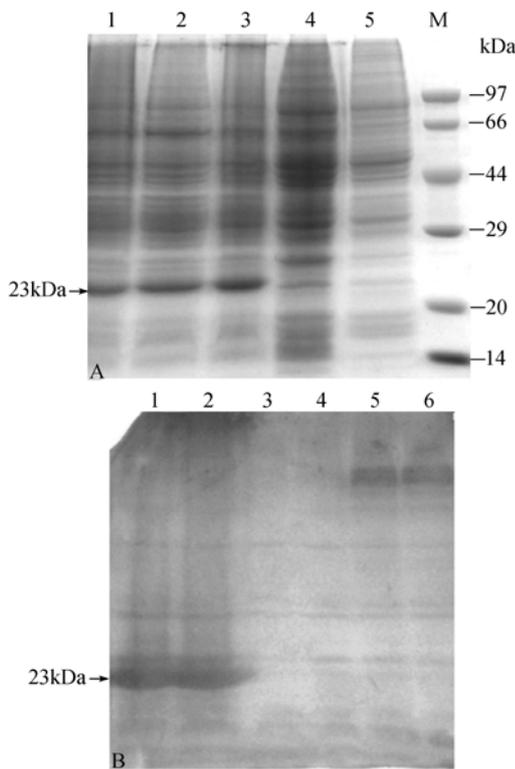


图3 表达产物 SDS-PAGE(A)和 western blot 分析(B)

Fig. 3 Analysis of the expressed products by SDS-PAGE (A) and western blot (B). A: Lane M is protein molecular weight marker; Lanes 1~3 are Sf9 cell infected with recombinant baculovirus; Lane 4 is Sf9 cell infected with wild-type baculovirus; Lane 5 is normal Sf9 cell. B: Lanes 1 and 2 are Sf9 cell infected with recombinant baculovirus; Lane 3 is normal Sf9 cell; Lane 4 is Sf9 cell infected with wild-type baculovirus; Lane 5 and 6 are FMDV P1-2A protein.

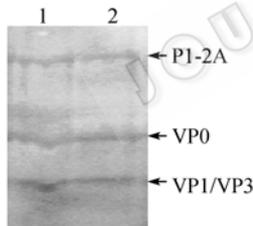


图4 3C 蛋白酶活性分析

Fig. 4 Activity assay of 3C protease. Lanes 1 and 2 are proteolytic products of FMDV P1-2A by 3C protease.

3 讨论

小 RNA 病毒结构蛋白组装成病毒粒子是一个复杂的过程, 空衣壳组装的许多细节尚未研究清楚, FMDV 衣壳在感染细胞中的组装要求非结构蛋白 3C 或 3CD 将 P1 聚蛋白裂解成几种单独的结构蛋白。每一个衣壳亚单位由一个分子的 VP0, VP1 和 VP3 组成。VP1, VP3 和 VP0 自发的形成 5S 原体, 每 5 个 5S 原体随后组装成 12S 五聚体, 12 个五聚体再组装成二

十面体对称的 70S 空衣壳^[5]。3C 蛋白酶负责聚蛋白的大部分裂解工作。VP0 是 VP2 和 VP4 的前体, VP0 的裂解是自我催化裂解, 通常在包装有 RNA 的成熟病毒粒子中 VP0 才裂解为 VP2 和 VP4。在大多数小 RNA 病毒感染过程中均会产生一定量的空衣壳。虽然它含有和正常病毒粒子一样的总蛋白成分, 但它没有感染性, 通常被认为是感染过程的副产品或者是衣壳蛋白的存储形式。许多研究表明空衣壳蛋白通常具有天然病毒粒子的免疫原性和抗原性特征。虽然已有许多应用各种表达系统来合成 FMDV 空衣壳样粒子的研究, 但目前还没有建立起体外合成大量病毒空衣壳粒子以做为实际应用的有效方法。

重组杆状病毒在昆虫细胞内表达的外源蛋白几乎都是可溶性的, 其抗原性、免疫原性以及生物功能非常接近天然来源的分离物。由于其独特的生物学优势, 可利用杆状病毒表达系统生产各种动物疾病的诊断药盒, 免疫疫苗和治疗药物等。Jae-Ku Oema 等^[6]用杆状病毒表达系统在昆虫细胞中表达了 O 型 FMDV 五聚体结构, 并且有效释放到培养基中。五聚体结构虽然具有一定程度的抗原性, 但在电子显微镜下观察到的五聚体结构比真实的 FMDV 粒子小得多, 这种五聚体结构是空衣壳组装过程中产生的中间体, 之所以没能成功地组成完整的空衣壳, 主要原因是昆虫细胞培养基的 pH 值影响了空衣壳的组装。FMDV 的衣壳在 pH<6.5 的环境下就会分裂成 12S 的五聚体亚单位。为此, 我们采用在昆虫细胞中单独表达 FMDV 空衣壳组装所必需的 3C 蛋白酶, 在保证表达产物天然活性的前提下, 在体外缓冲系统中, 与所需的结构蛋白成分进行配比, 以期能组装成完整稳定的空衣壳结构。

另外, 小 RNA 病毒 3C^{pro} 是集丝氨酸蛋白酶和半胱氨酸蛋白酶特性为一体的特殊酶类, 主要切割 Gln-Gly 结合位点, 而且其宿主细胞内无同源性位点存在, 这些特性引发了人们把 3C 蛋白酶作为药物作用靶点的极大兴趣。且已有研究表明, 一种单一的药物能对不同来源的该酶均有较好的抑制作用^[7-9]。FMD 是具有巨大经济影响的疾病, 疫苗的应用引起许多问题, 生物药物的研究成果有可能应用于该病的预防性控制, 有可能吸引更多的投资。鉴于此本研究构建了 FMDV 3C^{pro} 基因的重组杆状病毒, 并在昆虫细胞 Sf9 中进行表达得到了大量的 3C^{pro}。为制备接近天然的 FMDV 3C^{pro} 提供了一种方法, 为空

衣壳的体外组装及抗病毒药物的研究奠定了基础。

参 考 文 献

- [1] Grubman MJ, Baxt B. Foot-and-mouth disease. *Clin Microbiol Rev*, 2004, 77 (2): 465–493.
- [2] Mason PW, Grubman MJ, Baxt B. Molecular basis of pathogenesis of FMDV. *Virus Res*, 2003, 97(1): 9–32.
- [3] Leong LEC, Cornell CT, Semler BL. Processing determinants and functions of cleavage products of picornavirus proteins. In: B L Semler and E Wimmer (eds). *Molecular Biology of Picornaviruses*. Washington, DC: ASM Press, 2002.
- [4] Mason PW, Grubman MJ, Baxt B. Molecular basis of pathogenesis of FMDV. *Virus Res*, 2003, 97(1): 9–32.
- [5] Belsham GJ. Distinctive features of foot-and-mouth disease virus, a member of the picornavirus family; aspects of virus protein synthesis, protein processing and structure. *Prog Biophys Mol Biol*, 1993, 60: 241–60.
- [6] Jae-Ku Oema, Jong-Hyeon Park, Kwang-Nyeong Lee, *et al.* Characterization of recombinant foot-and-mouth disease virus pentamer-like structures expressed by baculovirus and their use as diagnostic antigens in a blocking ELISA. www.elsevier.com/locate/vaccine.
- [7] Mosiman SC, Lowe C, Shechosky S, *et al.* Peptide aldehyde inhibitors of Hepatitis A virus 3C proteinase. *Biochemistry*, 1995, 34: 8172–8179.
- [8] Sheperhd TA, Cox GA, Mckinney E, *et al.* Small peptidic aldehyde inhibitors of human rhinovirus 3C protease. *Bioorg Med Chem Lett*, 1996, 2893–2896.
- [9] Kaldor SW, Hammond M, Dressman B A, *et al.* Tripeptide aldehyde inhibitors of Human Rhinovirus 3C protease: Design, synthesis, biological evaluation, and cocrystal structure solution of P1 glutamine isosteric replacements. *J Med Chem*, 1998, 41: 2786–2805.

Cloning and expression of 3C protease gene from foot-and-mouth disease virus in insect cell

Yimei Cao, Zengjun Lu, Pu Sun, Jiachuan Sun, Zaixin Liu*

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

Abstract: The 3C protease from foot-and-mouth disease virus (FMDV 3C^{pro}) is critical for viral pathogenesis, has vital roles in both processing of the polyprotein precursor and RNA replication, and is a potential anti-viral drug target. In the study, 3C gene of FMDV from serotype Asia I was obtained through Polymerase Chain Reaction (PCR), and subcloned into baculovirus transfer vector pMelBac-B. The recombinant transfer plasmid and linearized baculovirus DNA were co-transfected into sf9 insect cell, and the recombinant baculovirus were screened by plaque cloning and PCR identification. After amplification of recombinant baculovirus on cell passages, the recombinant virus were seeded on sf9 cell with 10 multiplicity of infection (MOI), and cells were harvested 72 hours after infection. The expressing product of 3C gene in insect cells was detected by Sodium Dodecyl Sulphate PolyAcrylamide Gel Electrophoresis (SDS-PAGE) and Western blot. The result demonstrated that the 3C gene was successfully expressed in insect cells. The product was a 23 kDa protein and could be recognized by anti-FMDV serum in western blot. The results provide a basis for research of the assembly of FMDV empty capsids in vitro and the design of antiviral drug.

Keywords: FMDV; 3C protease; baculovirus; sf9 cell; expression

Supported by the Major Project of Chinese National Programs for Fundamental Research and Development (2005CB523201)

*Corresponding author. Tel: +86-931-8342587; Fax: +86-931-8342052; E-mail: liukey@public.lz.gs.cn

Received: 10 August 2007/ Revised: 17 September 2007