

# 口蹄疫病毒样颗粒诱导表达型载体的构建及其 BHK-21 细胞池的筛获

谭书桢<sup>1</sup>, 董虎<sup>1</sup>, 孙世琪<sup>1</sup>, 郭慧琛<sup>1,2,3\*</sup>

- 1 中国农业科学院兰州兽医研究所/兰州大学 动物医学与生物安全学院 动物疫病防控全国重点实验室, 甘肃 兰州 730000
- 2 甘肃农业大学动物医学院, 甘肃 兰州 730070
- 3 云南省畜牧兽医科学院 云南热带亚热带动物病毒重点病实验室, 云南 昆明 650224

谭书桢, 董虎, 孙世琪, 郭慧琛. 口蹄疫病毒样颗粒诱导表达型载体的构建及其 BHK-21 细胞池的筛获[J]. 生物工程学报, 2023, 39(12): 4849-4860.

TAN Shuzhen, DONG Hu, SUN Shiqi, GUO Huichen. Construction of foot-and-mouth disease virus like particles-induced expression vectors and screening of BHK-21 cell pools[J]. Chinese Journal of Biotechnology, 2023, 39(12): 4849-4860.

**摘要:** 瞬时表达是目前利用哺乳动物细胞表达口蹄疫病毒(foot-and-mouth disease virus, FMDV)衣壳蛋白的主流方法。为实现染色体稳定表达 FMDV 衣壳蛋白并高效组装出病毒样颗粒(virus like particles, VLPs), 本研究构建了 piggyBac (PB)转座-组成型表达、PB 转座-四环素(tetracycline, Tet)诱导型表达两套质粒。利用荧光蛋白标记技术, 验证了质粒的功能。通过抗生素筛选得到了组成型表达 *P12A3C (WT/L127P)* 基因的 BHK-21 细胞池(C-WT、C-L127P)和诱导型表达 *P12A3C (WT/L127P)* 基因的 BHK-21 细胞池(I-WT、I-L127P)。荧光观察和 PCR 检测证明了绿色荧光蛋白、3C 蛋白酶、反向四环素转录激活因子等基因的 stable 整合。Western blotting、酶联免疫吸附法(enzyme linked immunosorbent assay, ELISA)实验证明了细胞池 I-L127P 具有更强的衣壳蛋白和 VLPs 生产能力。本研究首次实现了哺乳动物细胞染色体诱导表达 FMDV 衣壳蛋白, 有助于推动哺乳动物生产 FMDV VLPs 疫苗的技术工艺, 也为构建其他蛋白的哺乳动物细胞诱导型表达系统提供了参考。

**关键词:** 口蹄疫病毒; 病毒样颗粒; 质粒构建; 细胞池; 诱导表达

资助项目: 国家重点研发计划(2021YFD1800300, 2022YFD1800603); 国家自然科学基金(32072847, 32072859, 32002272); 科技人才与平台计划(202205AF150007)

This work was supported by the National Key Research and Development Program of China (2021YFD1800300, 2022YFD1800603), the National Natural Science Foundation of China (32072847, 32072859, 32002272), and the Science and Technology Talents and Platform Program (202205AF150007).

\*Corresponding author. E-mail: guohuichen@caas.cn

Received: 2023-02-17; Accepted: 2023-06-12; Published online: 2023-06-26

# Construction of foot-and-mouth disease virus like particles-induced expression vectors and screening of BHK-21 cell pools

TAN Shuzhen<sup>1</sup>, DONG Hu<sup>1</sup>, SUN Shiqi<sup>1</sup>, GUO Huichen<sup>1,2,3\*</sup>

1 State Key Laboratory for Animal Disease Control and Prevention, College of Veterinary Medicine, Lanzhou University, Lanzhou Veterinary Research Institute, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Lanzhou 730000, Gansu, China

2 College of Veterinary Medicine, Gansu Agricultural University, Lanzhou 730070, Gansu, China

3 Yunnan Provincial Key Laboratory of Tropical and Subtropical Animal Viral Diseases, Yunnan Academy of Animal Husbandry and Veterinary Sciences, Kunming 650224, Yunnan, China

**Abstract:** Transient expression is the major method to express foot-and-mouth disease virus (FMDV) capsid proteins in mammalian cells. To achieve stable expression of FMDV capsid proteins and efficient assembly of virus like particles (VLPs) in cells, the plasmids of piggyBac (PB) transposon-constitutive expression and PB transposon-tetracycline (Tet) inducible expression vectors were constructed. The function of the plasmids was tested by fluorescent proteins. By adding antibiotics, the constitutive cell pools (C-WT, C-L127P) expressing *P12A3C* (WT/L127P) genes and the inducible cell pools (I-WT, I-L127P) expressing *P12A3C* (WT/L127P) genes were generated. The genes of green fluorescent protein, 3C protease and reverse tetracycline transactivator (rtTA) were integrated into chromosome, which was confirmed by fluorescence observation and PCR testing. The cell pool I-L127P has a stronger production capacity of capsid proteins and VLPs, which was confirmed by Western blotting and enzyme linked immunosorbent assay (ELISA), respectively. In conclusion, inducing the chromosomal expression of FMDV capsid proteins was firstly reported, which may facilitate the technical process of mammalian production of FMDV VLPs vaccine and the construction of mammalian inducible expression systems for other proteins.

**Keywords:** foot-and-mouth disease virus (FMDV); virus like particles (VLPs); plasmid construction; cell pool; inducible expression

口蹄疫(foot-and-mouth disease, FMD)是由口蹄疫病毒(foot-and-mouth disease virus, FMDV)引起的一种急性、热性、高度接触性传染病,严重危害畜牧业<sup>[1]</sup>。对易感动物(猪、牛、羊)进行疫苗接种是预防该病的主要措施<sup>[2]</sup>, FMDV 病毒样颗粒(virus like particles, VLPs)不含病毒自身遗传物质,是由病毒衣壳蛋白 VP0、VP3、VP1 组成的空心颗粒<sup>[3-4]</sup>。与其他亚单位疫苗抗原相比,其形态和构象与天然病毒最为接近,具有高

免疫原性和安全性,是最具潜力的 FMDV 候选疫苗之一<sup>[5]</sup>。

目前,制备 FMDV VLPs 主要有原核表达系统和真核表达系统。在原核表达系统中,VP0、VP3 和 VP1 采用小泛素蛋白修饰分子(small ubiquitin-like modifier, SUMO)融合蛋白技术进行表达,并通过体外酶切和组装形成 VLPs<sup>[6-7]</sup>。在真核表达系统中,通过共表达衣壳蛋白前体 P12A 和 3C 蛋白酶(3C<sup>pro</sup>)实现 VLPs 在胞内自组

装<sup>[5]</sup>。3C<sup>pro</sup>已被报道对哺乳动物细胞具有强烈的毒性作用<sup>[8]</sup>,因而未能实现以组成型启动子稳定共表达 P12A 蛋白和 3C<sup>pro</sup>,从而获得 VLPs<sup>[9]</sup>。目前,在昆虫和哺乳动物细胞等真核表达系统中主要采用瞬时表达的方式制备 VLPs<sup>[10-14]</sup>。质粒转染 HEK293 细胞是利用哺乳动物细胞瞬时表达 VLPs 的主要方法之一<sup>[15]</sup>,但该方法耗时且使用成本高,不利于规模化生产。因此,需要构建稳定表达 FMDV VLPs 的哺乳动物细胞系或细胞池。

本研究构建了 piggyBac (PB)转座-组成型表达和 PB 转座-四环素(tetracycline, Tet)诱导型表达两套质粒,并成功生成了稳定整合 *P12A3C (WT/L127P)*基因的 BHK-21 细胞池。进一步通过比较组成型表达和诱导型表达对细胞池表达 FMDV 衣壳蛋白和 VLPs 的影响,发现诱导型表达是更加理想的方法。由此,通过 PB 转座-Tet 诱导型表达建立了能稳定表达 FMDV 衣壳蛋白的 BHK-21 细胞池。

## 1 材料与方法

### 1.1 质粒和菌株

pTT5、pPiggyBac Dual Promoter (pPBDP)购自广州萃本生物科技有限公司;pcDNA6/V5-HisB 购自北京华越洋生物科技有限公司; pTet-On-Advanced 购自长春市华益生物科技有限责任公司;pcDNA3.1 (+)、pEGFP-N1、pCS2+-mCherry、pTT5-P12A3C (WT)和 pTT5-P12A3C (L127P)由中国农业科学院兰州兽医研究所口蹄疫防控技术团队保存。

### 1.2 细胞和抗体

BHK-21 细胞在含有 10%胎牛血清(fetal bovine serum, FBS, Gibco)、100 U/mL 青霉素、100 μg/mL 链霉素的培养基中培养。Expi293F 细胞购自 Thermo Fisher Scientific 公司,293SFM 完全培养

基购自天信和(苏州)生物科技有限公司。辣根过氧化物酶(horseradish peroxidase, HRP)标记的兔抗猪 IgG 抗体、HRP 标记的山羊抗小鼠 IgG 抗体购自 Sigma-Aldrich 公司。小鼠抗 β-肌动蛋白(β-actin)单克隆抗体购自康为世纪生物科技股份有限公司。O 型 FMDV 猪阳性血清、VHH O7、生物素标记的 VHH O8 由中国农业科学院兰州兽医研究所口蹄疫防控技术团队保存。

### 1.3 主要试剂

线性聚乙烯亚胺固体粉末购自 Polysciences 公司,并按照说明书配制成 1 mg/mL 水溶液。T4 DNA 连接酶、限制性 DNA 内切酶、高保真 DNA 聚合酶和 DNA marker 购自宝生物工程(大连)有限公司。Protein marker 购自 SMOBIO Technology 公司。质粒提取试剂盒购自 Omega Bio-Tek 公司。DNA 同源重组酶购自南京诺唯赞生物科技股份有限公司。嘌呤霉素、杀稻瘟菌素、盐酸强力霉素(doxycycline hyclate, Dox-HCl)购自北京索莱宝科技有限公司。

### 1.4 基因及引物合成

根据中国仓鼠卵巢细胞嗜性密码子对已报道的高活性 PB 转座酶进行密码子优化。合成的 PB 转座酶基因命名为 *chyPBBase*。本文使用引物详见表 1。引物合成由北京擎科生物科技有限公司完成。

### 1.5 重组载体的构建

重组载体包括 PB 转座-组成型表达载体和 PB 转座-Tet 诱导型表达载体。载体构建流程见图 1。

#### 1.5.1 PB 转座-Tet 诱导型表达载体的构建

将合成的 *chyPBBase* 片段通过 *Hind* III 和 *Not* I 内切酶连接至 pTT5 载体,命名为 pTT5-*chyPBBase*。以质粒 pPBDP 为模板、Vector. FOR 和 Vector. REV 为引物扩增目的片段 *Fra*1,以质粒 pcDNA6/V5-HisB 为模板、Fragment. FOR 和

Fragment. REV 为引物扩增目的片段 Fra2。使用 DNA 同源重组酶连接 Fra1 和 Fra2, 生成转座母体质粒 pPBBS。进一步从质粒 pEGFP-N1 中切下 *eGFP* 基因连接至 pPBBS 多克隆位点中构成功能验证质粒 pPBBS-eGFP。以质粒

pTet-On-Advanced 为模板, 5'*Kpn* I for rtTA 和 3'*Bam*H I for rtTA 为引物, 扩增反向四环素转录激活因子 (reverse tetracycline transactivator, rtTA), 连接至 pPBBS 中 *Kpn* I 和 *Bam*H I 多克隆位点之间生成目的质粒 pPBBS-rtTA。

表 1 引物及序列

Table 1 Primers used in this study

Primer name	Primer sequence (5'→3')
Fragment. FOR	TTATGAGGGACAGCCCCTATGGTGCCTCTCAGTAC
Fragment. REV	TATCAGGGACAGCCCCTGTGGATAACCGTATTACCGC
Vector. FOR	GGGCTGTCCCTGATATCTATAACAAG
Vector. REV	GGCTGTCCCTCATAAAAAGTTTTGT
5' <i>Kpn</i> I for rtTA	ATATGGTACCGAATTCACCATGTCTAGAC
3' <i>Bam</i> H I for rtTA	GTCTGGATCCTTACTTAGTTAC
5' <i>Eco</i> R I for mCherry	AATTGAATTCGCCACCATGGTGAGCAAG
3' <i>Bam</i> H I for mCherry	ATATGGATCCTCATTTGTACAGCTCGTCC
5' <i>Not</i> I for 3C	AATTGCGGCCGCAGCGGCGCCCC
3' <i>Bam</i> H I for 3C	AATTGGATCCTCACTCGTGGTGG

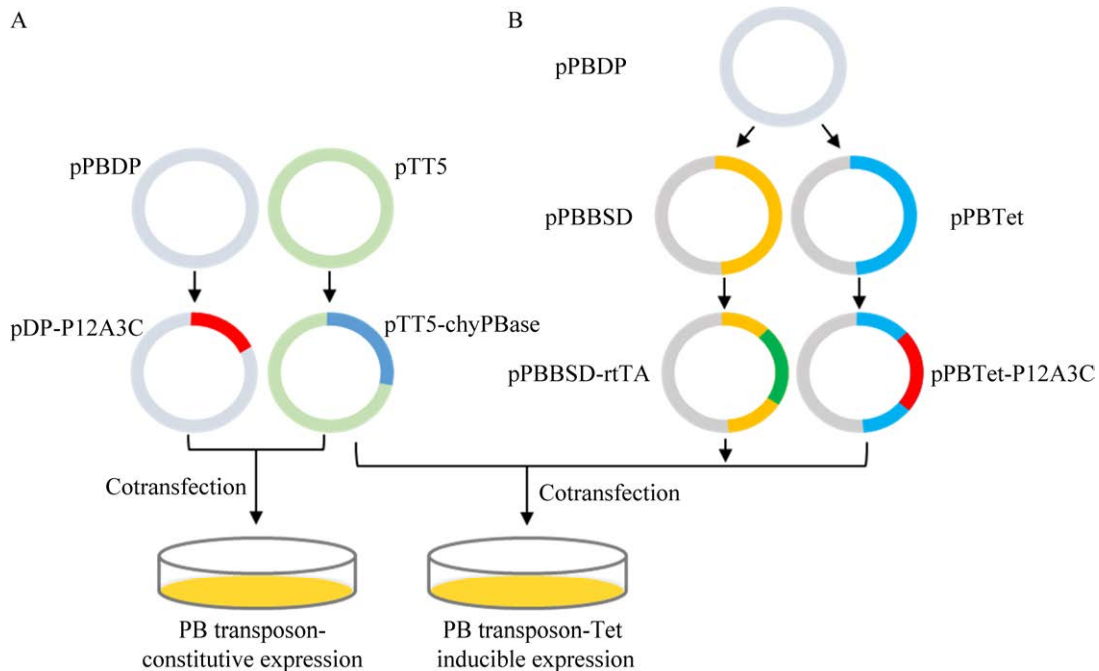


图 1 表达 *P12A3C* (WT/L127P) 基因的质粒构建流程示意图 A: PB 转座-组成型表达. B: PB 转座-Tet 诱导型表达

Figure 1 Diagram showing the construction of plasmids expressing *P12A3C* (WT/L127P) genes. A: PB transposon-constitutive expression. B: PB transposon-Tet inducible expression.

以转座质粒 pPBDP 为原始模板, 通过替换 CMV 启动子为第二代四环素诱导启动子 (SG/TRE), 并于多克隆位点下游添加牛生长激素多聚腺苷酸化信号形成转座-诱导母体质粒 pPBTet。以 pCS2+-mCherry 为模板, 5'*EcoR* I for mCherry 和 3'*Bam*H I for mCherry 为引物, 扩增 mCherry 基因并插入至 pPBTet 中 *EcoR* I 和 *Bam*H I 多克隆位点之间, 生成功能验证质粒 pPBTet-mCherry。P12A3C (WT/L127P) 基因由 *EcoR* I 和 *Bam*H I 双酶切 pTT5-P12A3C (WT)、pTT5-P12A3C (L127P) 获得, 并插入至 pPBTet 中生成质粒 pPBTet-P12A3C (WT)、pPBTet-P12A3C (L127P)。

### 1.5.2 PB 转座-组成型表达载体的构建

pTT5-chyPBase 的构建同 1.5.1。P12A3C (WT/L127P) 基因由 *EcoR* I 和 *Bam*H I 双酶切 pTT5-P12A3C (WT)、pTT5-P12A3C (L127P) 获得, 并插入至 pPBTet 中生成质粒 pDP-P12A3C (WT)、pDP-P12A3C (L127P)。

### 1.6 重组载体的功能检测

对于转座功能的检测, 质粒 pPBDP 与 pTT5-chyPBase, pPBBS-eGFP 与 pTT5-chyPBase, pPBTet 与 pTT5-chyPBase 分别以 9:1 (质量比) 转染 BHK-21 细胞, 转染后 1 d 加入 10  $\mu\text{g}/\text{mL}$  嘌呤霉素或杀稻瘟菌素进行细胞筛选, 每 2 天更换含抗生素的新鲜培养基。筛选 10–12 d 后于荧光显微镜下观察阳性克隆数。

对于诱导表达功能的检测, 质粒 pPBTet-mCherry 和 pTet-On-Advanced, pPBTet-mCherry 和 pPBBSD-rtTA 分别以 9:1 (质量比) 转染 BHK-21 细胞, 12 h 后加入 2  $\mu\text{g}/\text{mL}$  Dox-HCl, 转染 36 h 后于荧光显微镜下观察红色荧光。

为检验 P12A3C (WT) 基因的正确表达, 质粒 pPBTet-P12A3C (WT/L127P)、pPBBSD-rtTA 以

9:1 (质量比) 转染 Expi293F 细胞, 转染 24 h 后加入 2  $\mu\text{g}/\text{mL}$  Dox-HCl, 转染 48 h 后收获细胞进行 Western blotting 检测。质粒 pDP-P12A3C (WT/L127P) 转染 Expi293F 细胞, 转染 48 h 后收获细胞进行 Western blotting 检测。使用 O 型 FMDV 猪阳性血清作为一抗, HRP 标记的兔抗猪 IgG 抗体作为二抗, 鉴定 FMDV 衣壳蛋白。

### 1.7 BHK-21 细胞池的筛选及鉴定

重组质粒 pDP-P12A3C (WT/L127P) 对 BHK-21 细胞进行转染, 经 10  $\mu\text{g}/\text{mL}$  嘌呤霉素筛选 14 d, 得到的细胞池分别命名为 C-WT、C-L127P。重组质粒 pPBTet-P12A3C (WT/L127P)、pPBBSD-rtTA、pTT5-chyPBase 以 8:1:1 (质量比) 对 BHK-21 细胞进行转染, 经 10  $\mu\text{g}/\text{mL}$  嘌呤霉素和 5  $\mu\text{g}/\text{mL}$  杀稻瘟菌素筛选 14 d, 得到的细胞池分别命名为 I-WT、I-L127P。

多种细胞池筛选成功后连续盲传 3 代, 于荧光显微镜下观察荧光, 并比较不同细胞池的荧光强弱程度。进一步提取细胞池的基因组, 并使用引物 5'*Not* I for 3C、3'*Bam*H I for 3C 检测 3C 基因全长, 使用引物 5'*Kpn* I for rtTA、3'*Bam*H I for rtTA 检测 rtTA 基因全长。在细胞对数生长期分别于细胞池 I-WT 和 I-L127P 中加入 2  $\mu\text{g}/\text{mL}$  Dox-HCl, 24 h 后观察细胞形态, 并分别收获贴壁细胞和脱落细胞进行 Western blotting 检测 FMDV 衣壳蛋白。Western blotting 检测步骤同 1.6。

细胞池 I-WT、I-L127P 诱导 24 h 后取相同数量的细胞, 使用等体积的细胞裂解液充分释放细胞蛋白, 离心提取上清。上清于室温或 56  $^{\circ}\text{C}$  静置 1 h。以 VHH O7 为包被抗体、生物素标记的 VHH O8 为二抗、亲和素标记的 HRP 作为显色抗体进行对上清中的 VLPs 含量进行检测。

## 2 结果与分析

### 2.1 重组载体的构建

PB 转座系统能极大提高细胞池的生成概率，其功能的实现需要 PB 转座酶及其识别的 DNA 元件<sup>[16]</sup>。PB 转座-Tet 诱导表达的杂交系统是在 PB 转座系统的基础上引入 Tet 诱导表达系统形成的，其功能的实现需要编码 PB 转座酶的质粒、编码 rtTA 的 PB 转座质粒和含有 Tet 启动子的 PB 转座质粒<sup>[17]</sup>。表达 P12A3C (WT)基因的载体包含 PB 转座-组成型表达和 PB 转座-Tet 诱导型表达两组。PB 转座-组成型表达包含 pTT5-

chyPBBase、pDP-P12A3C, *P12A3C (WT/L127P)* 基因构建于组成型启动子下游，在理论上实现 FMDV 衣壳蛋白的持续表达。PB 转座-Tet 诱导型表达包含 pTT5-chyPBBase、pPBBS-rtTA、pPBtet-P12A3C, *P12A3C (WT/L127P)*基因构建于 Tet 启动子下游。pTT5-chyPBBase、pDP-P12A3C、pPBBS-rtTA 和 pPBtet-P12A3C 的质粒图谱见图 2。

### 2.2 重组载体的功能检测

实现 PB 转座功能依赖于 PB 转座酶和 PB 转座序列的相互作用，因此，需要对质粒 pTT5-chyPBBase、pPBBS-rtTA、pPBtet-P12A3C

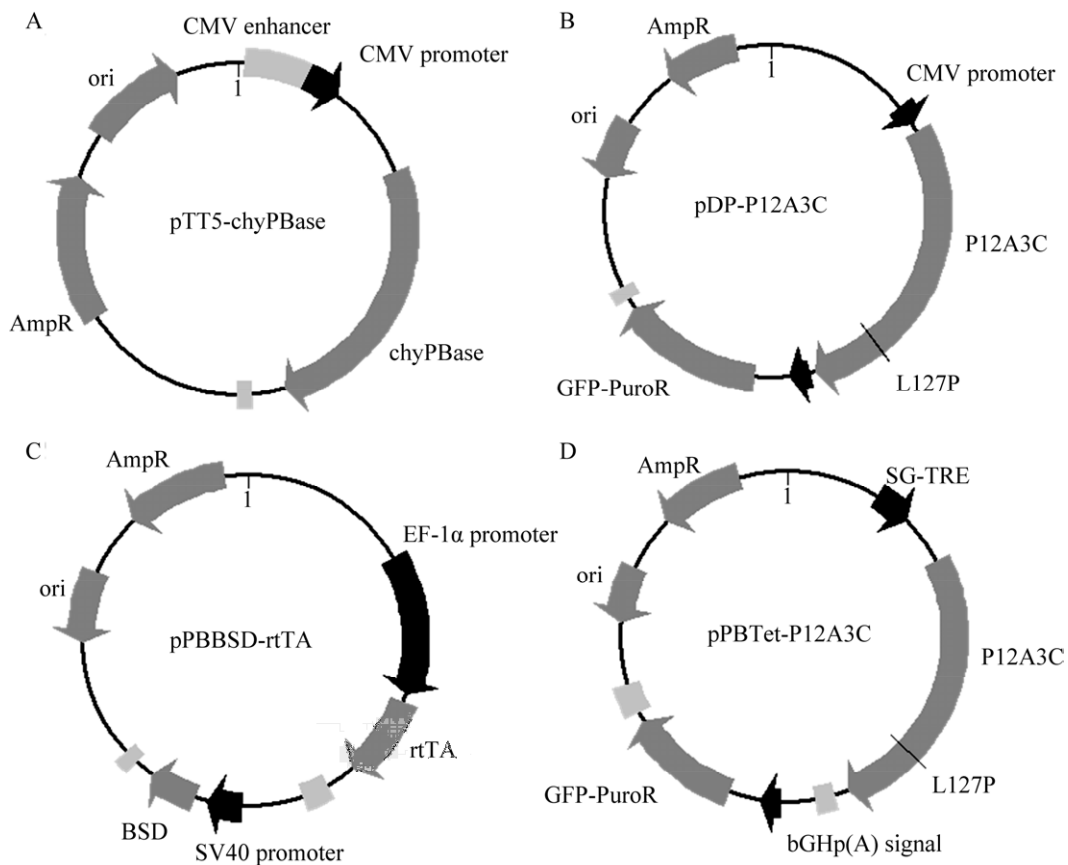
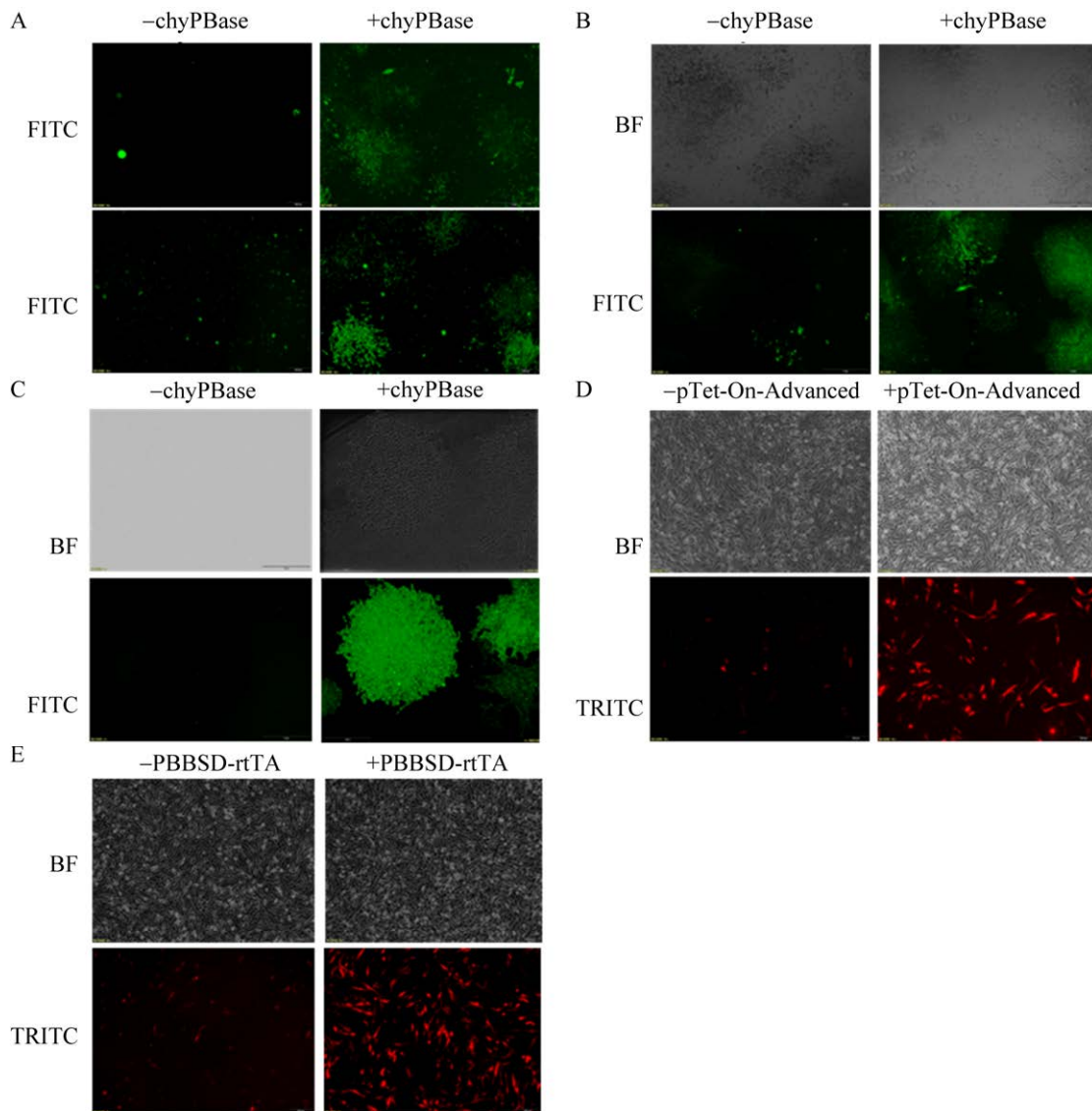


图 2 重组载体的质粒图谱 A: pTT5-chyPBBase. B: pDP-P12A3C (WT)和 pDP-P12A3C (L127P). C: pPBBS-rtTA. D: pPBtet-P12A3C (WT)和 pPBtet-P12A3C (L127P)

Figure 2 Maps of recombinant plasmids. A: pTT5-chyPBBase. B: pDP-P12A3C (WT) and pDP-P12A3C (L127P). C: pPBBS-rtTA. D: pPBtet-P12A3C (WT) and pPBtet-P12A3C (L127P).

(WT/L127P)的 PB 转座功能进行检测。首先对 PB 转座酶的转座活性进行检测, 商购的 PB 转座质粒 pPBDP 与 pTT5-chyPBBase 共转, 细胞经过高浓度嘌呤霉素筛选后产生的阳性克隆数量显著高于对照组(图 3A), 说明构建的 PB 转座酶具有高活性。由于 *rtTA* 基因、*eGFP* 基因插入

pPBBS D 中并不改变转座序列, 因此对 pPBBS D-eGFP 的转座序列功能进行检测。pPBBS D-eGFP 与 pTT5-chyPBBase 共转, 经杀稻瘟菌素筛选得到的阳性克隆数量显著高于对照组(图 3B), 说明 pPBBS D-rtTA 的转座序列能被 PB 转座酶识别并切割。由于 *P12A3C* (WT/L127P)



**图 3 PB 转座-Tet 诱导表达系统的功能检测** A: chyPBBase 转座活性的检测. B: pPBBS D 转座功能的验证. C: pPB Tet 诱导功能的检测. D: pPB Tet 转座功能的验证. E: pPBBS D-rtTA 表达 *rtTA* 蛋白的检验  
Figure 3 Functional verification of the plasmids of PB transposon-Tet inducible expression system. A: Transposase activity of chyPBBase. B: Transposase proficiency of pPBBS D. C: Transposase proficiency of pPB Tet. D: Inducible-expression proficiency of pPB Tet. E: Expression of *rtTA* in pPBBS D-rtTA.

基因、*mCherry* 基因插入 pPBtet 中并不改变转座序列, 因此对 pPBtet 的转座序列功能进行检测。pPBtet 与 pTT5-chyPBase 共转, 经嘌呤霉素筛选后产生的阳性克隆数量显著高于对照组(图 3C), 说明 pPBtet-P12A3C (WT/L127P) 的转座序列能与 PB 转座酶相互作用。

实现 Tet 诱导表达功能依赖于被诱导剂激活的 rtTA 蛋白与 Tet 启动子相互作用, 因此, 需要对 pPBtet-P12A3C (WT/L127P) 和 pPBBSD-rtTA 的相关功能进行检测。由于 *P12A3C* (WT/L127P) 基因、*mCherry* 基因插入 pPBtet 中并不改变 Tet 启动子的序列, 因此对 pPBtet-*mCherry* 的 Tet 启动子功能进行检测。pPBtet-*mCherry* 与表达 rtTA 蛋白的商购质粒 pTet-On-Advanced 共转获得的荧光强度远高于对照组(图 3D), 说明 pPBtet-P12A3C (WT/L127P) 的 Tet 启动子能与 rtTA 蛋白相互作用。pPBBSD-rtTA 与 pPBtet-*mCherry* 共转获得的荧光强度远高于对照组(图 3E), 说明 pPBBSD-rtTA 能正确表达 rtTA 蛋白。

最后, 通过瞬转实验检测了 pDP-P12A3C (WT/L127P)、pPBtet-P12A3C (WT/L127P) 能否

正确表达 *P12A3C* (WT/L127P) 基因。除 DP-WT-2 克隆外, 其余克隆均成功表达了 FMDV 衣壳蛋白(图 4A), 说明 pDP-P12A3C (WT/L127P) 正确表达 *P12A3C* (WT/L127P) 基因。诱导表达组在添加 Dox-HCl 后出现了 FMDV 衣壳蛋白的表达, 说明 pPBtet-P12A3C (WT/L127P) 正确表达 *P12A3C* (WT/L127P) 基因(图 4B)。

### 2.3 BHK-21 细胞池的筛选及鉴定

将 pDP-P12A3C (WT)、pDP-P12A3C (L127P) 分别与 pTT5-chyPBase 共转于 BHK-21 细胞, 经过嘌呤霉素筛选后得到 2 种组成型表达的细胞池 C-WT 和 C-L127P。将 pPBBSD-rtTA 和 pTT5-chyPBase 分别与 pPBtet-P12A3C (WT) 或 pPBtet-P12A3C (L127P) 共转, 得到诱导型表达的细胞池 I-WT 和 I-L127P。通过荧光观察证明 *GFP* 基因稳定整合于所有细胞池中(图 5A、5B)。通过细胞基因组 PCR 检测, 表明 3C 基因整合至所有细胞池, *rtTA* 基因整合至 I-WT 和 I-L127P (图 5C)。至此, 组成型与诱导型表达 *P12A3C* (WT/L127P) 的细胞池均构建成功。此外, 在诱导蛋白表达时, 发现 I-WT 出现了严重的细胞脱落现象(图 5D)。

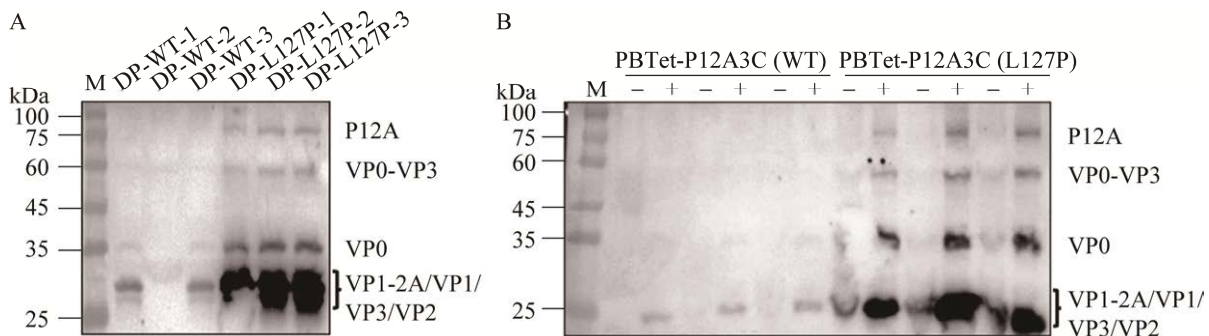


图 4 通过瞬转实验检测 *P12A3C* (WT/L127P) 基因的表达 A: 组成型表达. B: 诱导型表达

Figure 4 Detecting the expression of *P12A3C* (WT/L127P) genes by transient expression in Expi293F cells. A: pDP-P12A3C (WT) and pDP-P12A3C (L127P), three recombinant clones of each plasmid were done. B: pPBBSD-rtTA was cotransfected with pPBtet-P12A3C (WT) or pPBtet-P12A3C (L127P) at a 9:1 ratio, followed by Dox-HCl added into the cells, three recombinant clones of each plasmid were done.



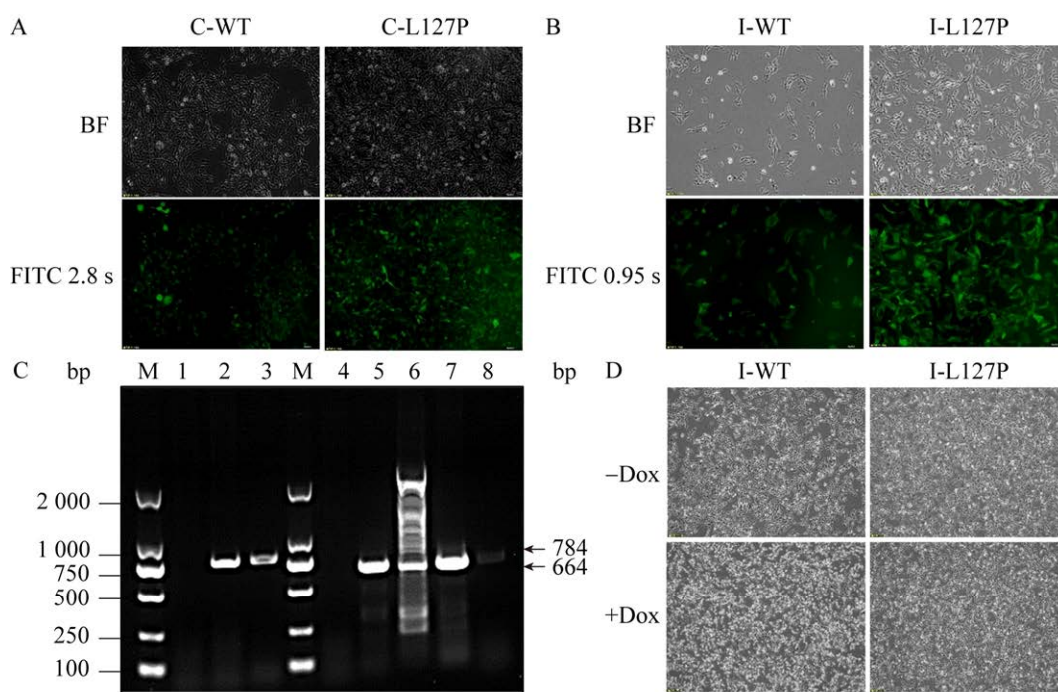
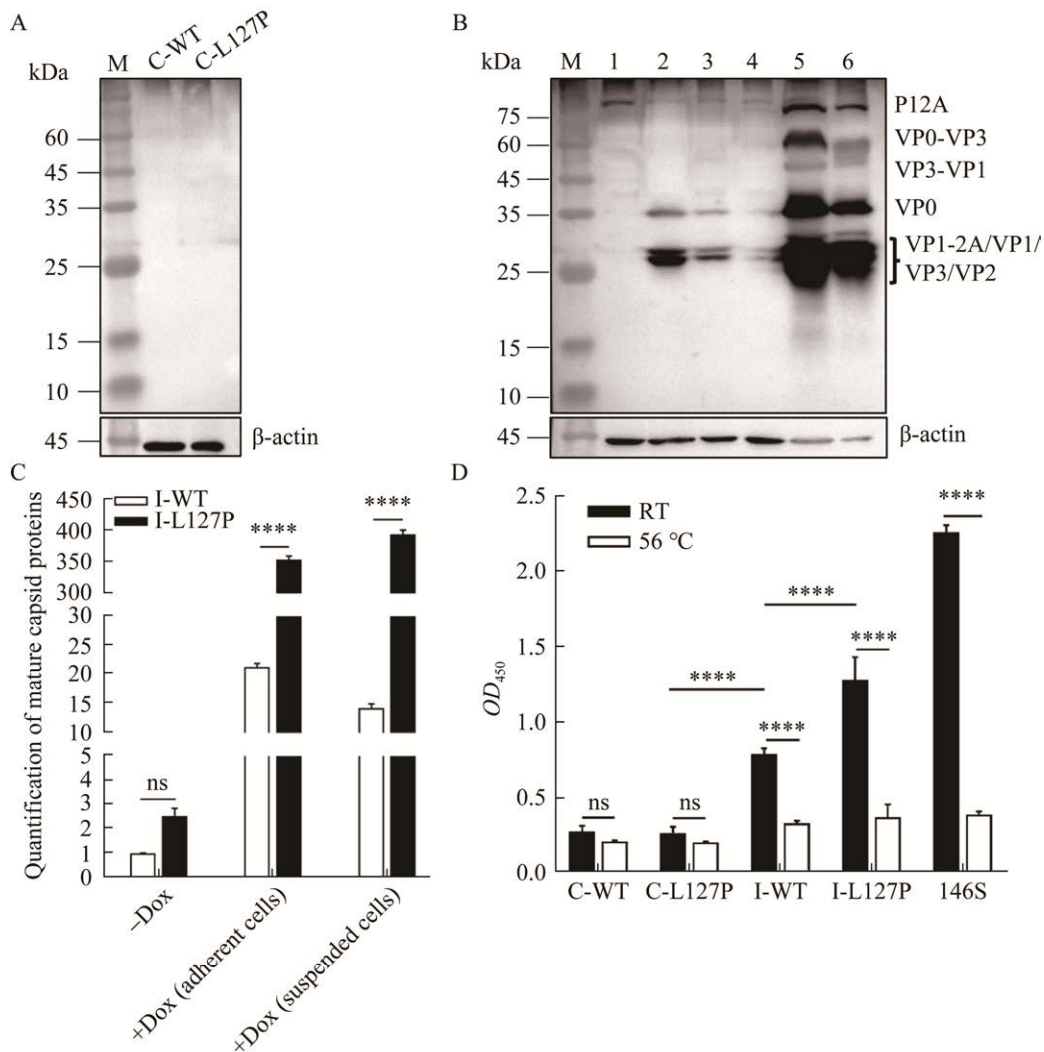


图5 BHK-21 细胞池的生成 A: 组成型表达细胞池的荧光观察. B: 诱导型表达细胞池的荧光观察. C: PCR 检测 3C 基因和 *rtTA* 基因. D: 诱导型表达细胞池的形态观察

Figure 5 Obtaining the BHK-21 cell pools. A: Cell pools C-WT and C-L127P were exposed on FITC channel for 2.8 seconds. B: Cell pools I-WT and I-L127P were exposed on FITC channel for 0.95 seconds. C: Detection of 3C gene and *rtTA* gene in cell pools *via* PCR. Lane 1–3 detected the full *rtTA* gene and lane 4–8 detected full 3C gene. Lane 1–3: Mock cells, I-WT, I-L127P. Lane 4–8: Mock cells, C-WT, C-L127P, I-WT, I-L127P. D: Morphological observation of I-WT and I-L127P with or without Dox-HCl added to the cells.

对所有细胞池 FMDV 衣壳蛋白和 VLPs 的表达情况进行检测。C-WT 和 C-L127P 未显示 FMDV 衣壳蛋白的表达(图 6A), 说明这两种细胞池不产生衣壳蛋白。I-WT 和 I-L127P 诱导表达后分别收集贴壁细胞和脱落细胞, 并检测衣壳蛋白的表达。I-WT 和 I-L127P 在添加诱导剂前几乎无衣壳蛋白表达, 而添加诱导剂后衣壳蛋白的表达大幅度增加(图 6B), 且 I-L127P 的衣壳蛋白表达量是 I-WT 的 15–30 倍(图 6C), 说明在 3C<sup>pro</sup> 中引入 L127P 突变有利于增强衣壳蛋白(VP0、VP3、VP1)的表达。I-L127P 在诱导表达后似乎降低了  $\beta$ -actin 的表达, 这值得进一步研究。为进一步检测细胞池的 FMDV VLPs 表达情

况, 对细胞裂解提取液进行了 ELISA 检测。该 ELISA 方法使用 VHH O7 识别 O 型 FMDV 的 146S (灭活病毒)或 75S (VLPs)粒子, 使用 VHH O8 识别 75S 及 12S 粒子<sup>[18-19]</sup>, 因此使用 VHH O7 作为 VLPs 的捕获抗体, VHH O8 作为检测抗体对样品进行检测, 并设置热处理对照和 146S 阳性对照。56 °C 热处理导致 VLPs 和 146S 粒子解聚, 因此热处理吸光值为样品本底值。与 Western blotting 结果一致, C-WT、C-L127P 几乎无 VLPs 的形成, I-WT、I-L127P 检出了 VLPs 的表达, 且 I-L127P 的 VLPs 表达量高于 I-WT (图 6D), 说明 Tet 诱导型表达 FMDV VLPs 是可行的方法, 且 L127P 突变增加了 VLPs 的表达量。



**图 6 BHK-21 细胞池表达 FMDV 衣壳蛋白和 VLPs 的检测** A: Western blotting 检测细胞池 C-WT、C-L127P. B: Western blotting 检测细胞池 I-WT、I-L127P. 1: I-WT 未加 Dox-HCl; 2: I-WT 加 Dox-HCl (贴壁形态细胞); 3: I-WT 加 Dox-HCl (悬浮形态细胞); 4: I-L127P 未加 Dox-HCl; 5: I-L127P 加 Dox-HCl (贴壁形态细胞); 6: I-L127P 加 Dox-HCl (悬浮形态细胞). C: 细胞池 I-WT、L-127P 表达 FMDV 衣壳蛋白的比较. D: ELISA 检测细胞池表达 FMDV VLPs

Figure 6 Detection of the expression of FMDV capsid proteins and VLPs in BHK-21 cell pools. A: Cell pools C-WT and C-L127P were detected by Western blotting. B: Cell pools I-WT and I-L127P were detected by Western blotting. 1: I-WT without Dox-HCl; 2: I-WT with Dox-HCl (adherent cells); 3: I-WT with Dox-HCl (suspended cells); 4: I-L127P without Dox-HCl; 5: I-L127P with Dox-HCl (adherent cells); 6: I-L127P with Dox-HCl (suspended cells). C: Comparison of the expression level of FMDV capsid proteins between I-WT and I-L127P, two-way ANOVA analysis was used. D: Relative quantification of FMDV VLPs by ELISA, two-way ANOVA analysis was used. \*\*\*\*:  $P < 0.0001$ ; ns: No statistically significant differences.

### 3 讨论与结论

FMDV VLPs 疫苗因其高安全性和有效性成

为最具潜力的换代疫苗之一。建立稳定表达 FMDV VLPs 的哺乳动物细胞系是研究者的美好愿望。目前主要采用瞬时表达的方式制备 FMDV

VLPs<sup>[5]</sup>。然而,瞬时表达稳定性差、操作繁琐、成本高。本研究构建了稳定表达 *P12A3C (WT/L127P)* 基因的 BHK-21 细胞池,实现了染色体稳定表达 FMDV 衣壳蛋白,避免了重复转染的繁重工作,为构建稳定表达 FMDV VLPs 的细胞系奠定了基础。

衣壳蛋白前体 P12A 在 3C<sup>pro</sup> 的切割作用下产生 FMDV 衣壳蛋白(VP0、VP3、VP1),后者等比例组装成 VLPs<sup>[20]</sup>。FMDV 2A 序列具有核糖体跳跃功能,常被用于双顺反子载体的构建<sup>[21]</sup>。将 3C 基因直接融合于 2A 序列的下游形成单个开放阅读框,既有利于控制 VP0、VP3、VP1 的表达比例,又有利于将 *P12A* 基因和 3C 基因共同整合至细胞染色体。3C<sup>pro</sup> 被报道可以降解多种宿主细胞蛋白,其中包括 eIF4AI 和 eIF4GI 等真核翻译起始因子<sup>[22-24]</sup>。因此,避免 3C<sup>pro</sup> 的细胞毒性成为构建稳定表达 FMDV VLPs 细胞系的关键。本研究引入了 PB 转座系统以提高生成细胞池的成功率<sup>[25-26]</sup>,但细胞池 C-WT、C-L127P 仍然未能表达衣壳蛋白和 VLPs,这可能是 *P12A3C (WT/L127P)* 基因表达被沉默所致。为进一步提高细胞池的生成概率,在 PB 转座系统的基础上引入 Tet 诱导表达系统,构成 PB 转座-Tet 诱导表达的杂交系统。Tet 诱导表达系统的引入使 *P12A3C (WT/L127P)* 基因只能在添加 Tet 及其衍生物之后表达,降低了筛选过程中 3C<sup>pro</sup> 对细胞的毒性作用,提高了 *P12A3C (WT/L127P)* 基因整合至染色体转录活性区的概率。此外, L127P 突变被报道破坏了 3C<sup>pro</sup> A2-B2  $\beta$ -sheet 之间的氢键结合进而影响 3C<sup>pro</sup> 对多种宿主蛋白的结合特异性,并可以提高 FMDV 衣壳蛋白的瞬时表达水平<sup>[27-28]</sup>。研究表明, L127P 突变也可以在细胞池中提高衣壳蛋白和 VLPs 的表达量。I-WT 和 I-L127P 细胞脱落现象的明显差异也从宏观上反映 L127P 突变增强了细胞对 3C<sup>pro</sup> 的耐受性。

本研究首次实现了哺乳动物细胞染色体诱

导表达 FMDV 衣壳蛋白,为构建更具有应用价值的悬浮细胞系奠定了基础,有利于推动 FMDV VLPs 疫苗的研究。

## REFERENCES

- [1] ALEXANDERSEN S, ZHANG Z, DONALDSON AI, GARLAND AJM. The pathogenesis and diagnosis of foot-and-mouth disease[J]. *Journal of Comparative Pathology*, 2003, 129(1): 1-36.
- [2] DIAZ-SAN SEGUNDO F, MEDINA GN, STENFELDT C, ARZT J, de LOS SANTOS T. Foot-and-mouth disease vaccines[J]. *Veterinary Microbiology*, 2017, 206: 102-112.
- [3] ROWLANDS DJ, SANGAR DV, BROWN F. A comparative chemical and serological study of the full and empty particles of foot-and mouth disease virus[J]. *The Journal of General Virology*, 1975, 26(3): 227-238.
- [4] DOEL TR, CHONG WT. Comparative immunogenicity of 146S, 75S and 12S particles of foot-and-mouth disease virus[J]. *Archives of Virology*, 1982, 73(2): 185-191.
- [5] MIGNAQUI AC, RUIZ V, DUROCHER Y, WIGDOROVITZ A. Advances in novel vaccines for foot and mouth disease: focus on recombinant empty capsids[J]. *Critical Reviews in Biotechnology*, 2019, 39(3): 306-320.
- [6] LEE CD, YAN YP, LIANG SM, WANG TF. Production of FMDV virus-like particles by a SUMO fusion protein approach in *Escherichia coli*[J]. *Journal of Biomedical Science*, 2009, 16(1): 69.
- [7] GUO HC, SUN SQ, JIN Y, YANG SL, WEI YQ, SUN DH, YIN SH, MA JW, LIU ZX, GUO JH, LUO JX, YIN H, LIU XT, LIU DX. Foot-and-mouth disease virus-like particles produced by a SUMO fusion protein system in *Escherichia coli* induce potent protective immune responses in guinea pigs, swine and cattle[J]. *Veterinary Research*, 2013, 44(1): 48.
- [8] GAO Y, SUN SQ, GUO HC. Biological function of foot-and-mouth disease virus non-structural proteins and non-coding elements[J]. *Virology Journal*, 2016, 13: 107.
- [9] MIGNAQUI AC, RUIZ V, WIGDOROVITZ A. Comparison of transient and stable expression of foot-and-mouth disease virus capsid proteins in mammalian cells[J]. *Advances in Bioscience and Biotechnology*, 2013, 4(12): 1024-1029.
- [10] MIGNAQUI AC, RUIZ V, PERRET S, ST-LAURENT G, SINGH CHAHAL P, TRANSGURACION J, SAMMARRUCO A, GNAZZO V, DUROCHER Y, WIGDOROVITZ A. Transient gene expression in

- serum-free suspension-growing mammalian cells for the production of foot-and-mouth disease virus empty capsids[J]. *PLoS One*, 2013, 8(8): e72800.
- [11] PORTA C, KOTECHA A, BURMAN A, JACKSON T, REN JS, LOUREIRO S, JONES IM, FRY EE, STUART DI, CHARLESTON B. Rational engineering of recombinant picornavirus capsids to produce safe, protective vaccine antigen[J]. *PLoS Pathogens*, 2013, 9(3): e1003255.
- [12] ABRAMS CC, KING AMQ, BELSHAM GJ. Assembly of foot-and-mouth disease virus empty capsids synthesized by a vaccinia virus expression system[J]. *Journal of General Virology*, 1995, 76(12): 3089-3098.
- [13] PORTA C, XU XD, LOUREIRO S, PARAMASIVAM S, REN JY, AL-KHALIL T, BURMAN A, JACKSON T, BELSHAM GJ, CURRY S, LOMONOSSOFF GP, PARIDA S, PATON D, LI YM, WILSDEN G, FERRIS N, OWENS R, KOTECHA A, FRY E, STUART DI, et al. Efficient production of foot-and-mouth disease virus empty capsids in insect cells following down regulation of 3C protease activity[J]. *Journal of Virological Methods*, 2013, 187(2): 406-412.
- [14] CAO YM, LU ZJ, SUN JC, BAI XW, SUN P, BAO HF, CHEN YL, GUO JH, LI D, LIU XT, LIU ZX. Synthesis of empty capsid-like particles of Asia I foot-and-mouth disease virus in insect cells and their immunogenicity in guinea pigs[J]. *Veterinary Microbiology*, 2009, 137(1/2): 10-17.
- [15] MIGNAQUI AC, FERELLA A, CASS B, MUKANKURAYIJA L, L'ABBÉ D, BISSON L, SÁNCHEZ C, SCIAN R, CARDILLO SB, DUROCHER Y, WIGDOROVITZ A. Foot-and-mouth disease: optimization, reproducibility, and scalability of high-yield production of virus-like particles for a next-generation vaccine[J]. *Frontiers in Veterinary Science*, 2020, 7: 601.
- [16] SOLODUSHKO V, BITKO V, FOUTY B. Minimal piggyBac vectors for chromatin integration[J]. *Gene Therapy*, 2014, 21(1): 1-9.
- [17] LI ZJ, MICHAEL IP, ZHOU DX, NAGY A, RINI JM. Simple piggyBac transposon-based mammalian cell expression system for inducible protein production[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2013, 110(13): 5004-5009.
- [18] DONG H, LIU P, BAI MY, WANG K, FENG R, ZHU DD, SUN Y, MU SY, LI HZ, HARMSSEN M, SUN SQ, WANG XX, GUO HC. Structural and molecular basis for foot-and-mouth disease virus neutralization by two potent protective antibodies[J]. *Protein & Cell*, 2022, 13(6): 446-453.
- [19] LI HZ, DEKKER A, SUN SQ, BURMAN A, KORTEKAAS J, HARMSSEN MM. Novel capsid-specific single-domain antibodies with broad foot-and-mouth disease strain recognition reveal differences in antigenicity of virions, empty capsids, and virus-like particles[J]. *Vaccines*, 2021, 9(6): 620.
- [20] MASON PW, GRUBMAN MJ, BAXT B. Molecular basis of pathogenesis of FMDV[J]. *Virus Research*, 2003, 91(1): 9-32.
- [21] LUKE G, ESCUIN H, de FELIPE P, RYAN M. 2A to the fore-research, technology and applications[J]. *Biotechnology and Genetic Engineering Reviews*, 2010, 26: 223-260.
- [22] LI W, ROSS-SMITH N, PROUD CG, BELSHAM GJ. Cleavage of translation initiation factor 4AI (eIF4AI) but not eIF4AII by foot-and-mouth disease virus 3C protease: identification of the eIF4AI cleavage site[J]. *FEBS Letters*, 2001, 507(1): 1-5.
- [23] STRONG R, BELSHAM GJ. Sequential modification of translation initiation factor eIF4GI by two different foot-and-mouth disease virus proteases within infected baby hamster kidney cells: identification of the 3Cpro cleavage site[J]. *Journal of General Virology*, 2004, 85(10): 2953-2962.
- [24] BELSHAM GJ, MCINERNEY GM, ROSS-SMITH N. Foot-and-mouth disease virus 3C protease induces cleavage of translation initiation factors eIF4A and eIF4G within infected cells[J]. *Journal of Virology*, 2000, 74(1): 272-280.
- [25] BALASUBRAMANIAN S, MATASCI M, KADLECOVA Z, BALDI L, HACKER DL, WURM FM. Rapid recombinant protein production from piggyBac transposon-mediated stable CHO cell pools[J]. *Journal of Biotechnology*, 2015, 200: 61-69.
- [26] BALASUBRAMANIAN S. Recombinant CHO cell pool generation using piggyBac transposon system[J]. *Methods in Molecular Biology*, 2018, 1850: 69-78.
- [27] PUCKETTE M, CLARK BA, SMITH JD, TURECEK T, MARTEL E, GABBERT L, PISANO M, HURTLE W, PACHECO JM, BARRERA J, NEILAN JG, RASMUSSEN M. Foot-and-mouth disease (FMD) virus 3C protease mutant L127P: implications for FMD vaccine development[J]. *Journal of Virology*, 2017, 91(22): e00924-17.
- [28] MARTEL E, FORZONO E, KURKER R, CLARK BA, NEILAN JG, PUCKETTE M. Effect of foot-and-mouth disease virus 3C protease B2  $\beta$ -strand proline mutagenesis on expression and processing of the P1 polypeptide using a plasmid expression vector[J]. *Journal of General Virology*, 2019, 100(3): 446-456.

(本文责编 郝丽芳)