

# 稳定表达猪水疱病病毒 P1 基因的 PK-15 细胞系的建立

田 宏,吴锦艳,龚真莉,郑海学,孙世琪,尚佑军,刘湘涛\*,谢庆阁

(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:** 从猪水疱病全长感染性 cDNA 中,应用 PCR 技术扩增到 SVDV 结构蛋白 P1 基因,并在目的片段的 5' 端引入 Kozak 序列(Kozak, 1987),定向克隆于逆转录病毒载体 pBABE puro。经 PCR、酶切和序列分析鉴定,获得阳性重组质粒。将该重组质粒与水疱性口炎病毒载体 pVSV-G 共转染 GP2-293 细胞,收获假型病毒,在 Polybrene 的介导下感染 PK-15 细胞,嘌呤霉素筛选阳性细胞克隆。免疫荧光连续检测阳性克隆传代细胞,发现在不同代次的细胞中均有 SVDV P1 蛋白表达,而且表达的蛋白可被 SVD 阳性血清所识别;同时应用 PCR 技术,可从体外反复传代阳性细胞基因组中扩增到 SVD P1 基因。表明本次所筛选的阳性细胞克隆不但能持续稳定地表达 SVD P1 蛋白,而且可携带外源基因进行传代,具有良好的遗传稳定性。

**关键词:** 猪水疱病病毒 P1 基因;重组逆转录病毒载体;PK-15 细胞;基因表达

中图分类号:Q813

文献标识码:A

文章编号:0366-6964(2008)04-0478-05

## Establishment of a Stable PK-15 Cell Line Expressing the P1 Gene of Swine Vesicular Disease Virus

TIAN Hong, WU Jin-yan, GONG Zhen-li, ZHENG Hai-xue,

SUN Shi-qi, SHANG You-jun, LIU Xiang-tao\*, XIE Qing-ge

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

**Abstract:** P1 gene of swine vesicular disease virus (SVDV) was amplified by PCR using specific primers from SVDV HK/70 genome. The amplified fragment was cloned into pBABE puro vector for sequence analysis, and the recombinant plasmid was named pBABE puro-P1. Then pBABE puro-P1 and pVSV-G were cotransfected into GP2-293 packaging cells by liposomes, and recombinant retrovirus was acquired. The recombinant retroviruses was transfected into PK-15 cell by polybrene. The transfectants were selected by paromycin. Results of immunofluorescence, PCR analysis and Western blot showed that the foreign gene was integrated into the chromosome of transfected PK-15 cells and the expressed protein could react with positive serum against SVDV.

**Key words:** SVDV P1 gene; retroviral vector; PK-15 cell; gene expression

猪水疱病(Swine vesicular disease, SVD)是由猪水疱病病毒(Swine vesicular disease virus,

SVDV)引起的猪的一种高度接触性传染病<sup>[1]</sup>,被世界动物卫生组织(OIE)列为通报疫病,是国际贸易中必检必查病种之一。目前尚无预防猪水疱病的有

收稿日期:2007-04-06

基金项目:国家 863 高技术研究发展计划(2003AA241110)

作者简介:田 宏(1976-),女,甘肃庆阳人,博士,主要从事动物微生物学和病毒分子生物学研究,E-mail:ltth1977@163.com

\* 通讯作者:刘湘涛,E-mail:hnxiaogao@hotmail.com

效疫苗。SVDV 基因组具有一个大的开放阅读框 (ORF), 编码一条由 2 185 个氨基酸组成的多聚蛋白, 经初级裂解产生 P1、P2、P3。其中 P1 区由 VP1、VP2、VP3 和 VP4 区编码, 他们组成 SVDV 粒子衣壳的基本结构单位。对 SVDV 结构蛋白的研究发现, 在衣壳蛋白上既有构象依赖型抗原表位, 又有线性表位, 而且线性表位与构象表位非常临近, 甚至重叠。VP1-VP3 可望作为 SVDV 新型疫苗研究的重要候选蛋白。

逆转录病毒载体因其具有传统载体所不具备的独特魅力已经成为哺乳动物细胞表达领域研究的热点。本研究利用基因克隆及重组技术将含 SVDV 全部结构蛋白基因 (P1 区) 插入逆转录病毒载体 pBABE puro, 获得了具有嘌呤霉素抗性的 PK-15 细胞系, 分子检测证明外源基因确实整合到 PK-15 细胞的基因组, 且达到同质化, 并对该细胞表达的蛋白进行了检测。

## 1 材料与方法

### 1.1 质粒、菌株

逆转录病毒载体 pBABE puro、水疱性口炎病毒载体 (pVSV-G) 由笔者实验室保存, SVD HK/70 全长感染性 cDNA 由本实验室的郑海学博士构

建<sup>[2]</sup>、PK-15 细胞及 GP2-293 由笔者实验室保存; 大肠杆菌 JM 109 购自大连宝生物有限公司。

### 1.2 工具酶与试剂盒

限制性内切酶 *EcoR* I、*Bam*H I、*Sal* I、*Hind* III 均购自 Promega 公司; 碱性磷酸酶 (SAP) 和 DNA 连接试剂盒购自大连宝生物有限公司; 聚乙二醇 (PEG800) 购自美国 BBI 公司; DNA 回收试剂盒和质粒提取试剂盒购自上海生物工程有限公司; 琼脂糖购自美国 Biowest 公司; 转染试剂采用 Invitrogen 公司的 Lipofectamine™ 2000 转染试剂盒; 细胞培养基及优等胎牛血清采用 Hyclone 公司产品; 猪水疱病兔阳性血清由中国农业科学院兰州兽医研究所病毒病研究室张强博士惠赠; 细胞 DNA 提取采用 U-gene 公司的组织 DNA 提取试剂盒 (Tissue DNA Kit); 其他试剂均为国产分析纯级产品。

### 1.3 引物的设计与合成

参考 GenBank 中 SVDV HK/70 的序列 (AY429470), 借助 DNASTAR 软件设计了引物 P1F 和 P1R, 引物设计见表 1。在上游引物的 5' 端引入了保护碱基、*Bam*H I 酶切位点、符合 Kozak 规则的序列和起始密码子 ATG; 下游引物中引入了 *EcoR* I 位点。该引物由大连宝生物工程有限公司合成。

表 1 引物的序列、位置和长度

Table 1 The sequence, location and length of the primers

	序列 Sequence	位置 Location	长度 Length/bp
P1F	5'-AAGAATTCCACCATGGTAGGGAATTCAACCATAACCAC-3'	1 014-1 029	39
P1R	5'-CGGAATTCGGTTTTGACGTGCTTTGG-3'	3 166-3 186	26

### 1.4 重组逆转录病毒载体的构建

参照《分子克隆试验指南》<sup>[3]</sup>, 采用 PCR 技术从 SVD HK/70 全长感染性 cDNA 扩增 P1 基因, 其中扩增程序: 97℃ 2 min; 94℃ 2 min, 58℃ 1 min, 72℃ 80 s, 循环 35 次; 72℃ 延伸 10 min。1% 琼脂糖电泳回收 PCR 产物。*EcoR* I、*Bam*H I 双酶切 PCR 产物及载体 pBABE puro, 回收目的片段连接、转化, 将鉴定为阳性的质粒命名为 pBABE puro-P1。

### 1.5 细胞培养方法

GP2-293 细胞的培养条件为 37℃、5% CO<sub>2</sub>、10% FBS 的 DMEM 培养基, 每 3 d 传代 1 次, 中间发现培养液的 pH 值偏低时, 应及时更换培养液; PK-15 细胞按常规细胞培养方法进行培养。

### 1.6 重组假型病毒的包装

以 5 × 10<sup>5</sup> 将包装细胞 GP2-293 细胞接种于 6 孔细胞培养板中。待细胞密度达 60% ~ 80% 时, 在脂质体 Lipfection 2000 的介导下将 2 μg 的 pBABE puro-P1 与 2 μg 的 pVSV-G 共转染 GP2-293, 转染后 8~10 h 吸出培养液, 加入 3 mL 完全培养基培养 48~72 h, 收集包装细胞的培养液, 用 0.45 μm 的醋酸纤维素膜过滤。滤液 -80℃ 冻存备用。

### 1.7 病毒滴度的检测

收集 48 h 培养上清, 作 1:100、1:1 000 和 1:10 000 稀释, 加入聚凝胺使其终浓度达 8 μg/mL, 接种正常的 GP2-293 细胞, 37℃ 5% CO<sub>2</sub> 培养 48 h 后, 更换含嘌呤霉素的选择培养基, 10~

14 d 后嘌呤霉素抗性克隆形成。抗性克隆数与病毒液稀释倍数之积即为病毒的滴度。

### 1.8 假型重组逆转录病毒感染 PK-15 细胞

选取生长良好的 PK-15 细胞,加入假型病毒上清及 Polybrene 8  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ,置 37 $^{\circ}\text{C}$ 、5%  $\text{CO}_2$ ,其间每 30 min 摇 1 次培养瓶,持续吸附 2 h。然后倒掉感染液,加入含 10% 胎牛血清的 DMEM 培养液,37 $^{\circ}\text{C}$  5%  $\text{CO}_2$  培养箱中继续培养 2 d 后,加入 60  $\mu\text{g}/\text{mL}$  的嘌呤霉素,每 3 d 换 1 次培养液,持续 2 周可获得嘌呤霉素抗性的 PK-15 细胞。

### 1.9 P1 基因体外表达的检测

1.9.1 P1 基因在 PK-15 细胞中的整合及其稳定性鉴定 采用 U-gene 公司的组织 DNA 提取试剂盒 (Tissue DNA Kit) 提取被感染的 PK-15 细胞 DNA (具体方法参考该试剂盒的操作说明进行),用 P1 基因的特异性引物扩增 P1 基因,同时设未转染细胞作为阴性对照。扩增引物参照“1.3”,扩增条件参照“1.4”,以重组 PK-15 细胞基因组 DNA 为模板作整合鉴定。以不同代次的重组 PK-15 细胞 (分别选取第 1、8、16 代和 30 代) DNA 为模板进行整合稳定性鉴定。

1.9.2 间接免疫荧光检测 P1 基因的表达 将盖玻片放入 6 孔细胞培养板制备飞片,按常规方法培养阳性克隆细胞及对照组细胞。取出细胞飞片,在 0.01 mol/L pH 7.0~7.2 PBS 中冲洗,干燥,置 100% 丙酮中,在 4 $^{\circ}\text{C}$  固定 60 min 后,取出并用 1 $\times$  PBS 洗脱 2 次,室温干燥。于飞片上滴加 SVDV 兔阳性血清 (事先用 PBS 以 1:300 稀释),置于湿盒内 37 $^{\circ}\text{C}$  感作 30 min。1 $\times$  PBS 洗脱 2 次,滴加 FITC-山羊抗兔 IgG (以 1:40 稀释),置于湿盒内 37 $^{\circ}\text{C}$  感作 45 min,于 0.01 mol/L pH 7.0~7.2 PBS 中洗脱未结合的荧光抗体,干燥后封片,置荧光显微镜下观察。

1.9.3 Western blot 对表达的 P1 蛋白的反应性分析 取阳性细胞裂解产物在 12% 的分离胶中进行 SDS-PAGE 电泳。按文献 [3] 介绍的 Western blot 方法对重组蛋白进行分析。

## 2 结果

### 2.1 SVDV HK/70 P1 基因的 PCR 扩增结果

SVDV HK/70 P1 基因的 PCR 扩增产物在 1.0% 琼脂糖凝胶中可见到 1 条 2.1 kb 左右的特异

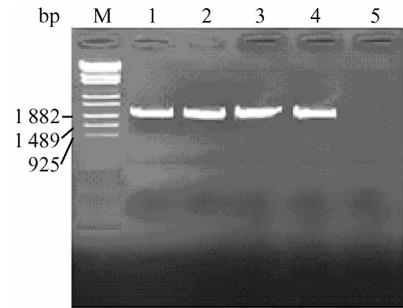
条带,与预期大小一致 (图略)。

### 2.2 重组质粒 pBABE puro-P1 的鉴定结果

重组质粒 pBABE puro-P1 的 PCR、双酶切及单酶切鉴定结果表明:PCR 可以扩增出 2.1 kb 左右的片段;双酶切也可以释放出 2.1 kb 左右的片段;单酶切可得到 7.2 kb 左右的目的条带,这些结果与预期的大小均相符。同时测序结果也证明 P1 基因插入的位置、大小、碱基序列及读码框均正确,与预期的结果一致 (测序结果略)。

### 2.3 假病毒感染 PK-15 细胞后 PCR 鉴定 P1 基因的整合结果

从假病毒感染的 PK-15 细胞可扩增出 2.1 kb 的片段,空白对照没有扩增出条带 (图 1)。



M. DNA Marker DL2000; 1. 第 1 代感染细胞的鉴定结果; 2~4. 第 8、16、30 代感染细胞的鉴定结果; 5. 空白对照

M. DNA Marker DL2000; 1. PCR identification of infected 1st generation cells; 2-4. PCR identification of infected 8th, 16th, 30th generation cells; 5. Black cell control

图 1 P1 基因的整合及稳定性鉴定

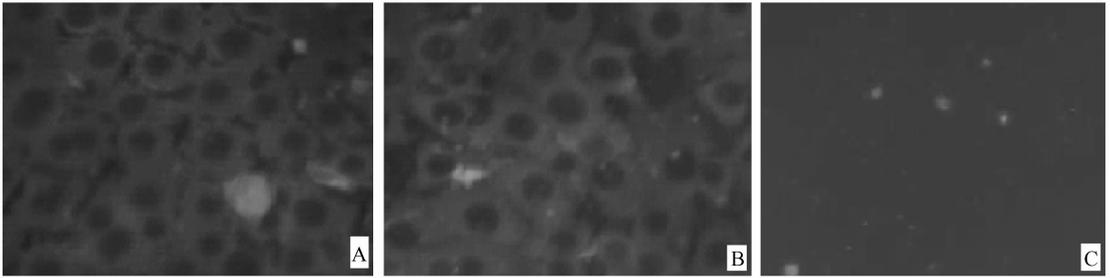
Fig. 1 Identification of stability of infected PK-15 cells

### 2.4 P1 基因的稳定整合鉴定结果

对筛选出的整合细胞的第 1、8、16 代和 30 代均可扩增出 2.1 kb 左右的片段,但同批对照没有扩增出条带 (图 1)。

### 2.5 免疫荧光检测 PK-15 细胞中 P1 基因的表达

通过间接免疫荧光检测发现 SVDV HK/70 P1 基因在假病毒的介导下得到了表达,而且表达的蛋白能被荧光标记抗体所识别。另外,从荧光图片中发现所表达的蛋白富集在 PK-15 细胞质中,细胞形态及细胞核清晰可见 (图 2)。而对照 (未经假病毒感染的 PK-15 细胞) 没有典型的荧光着色细胞。



A. 第 1 代细胞;B. 第 10 代细胞;C. 空白对照

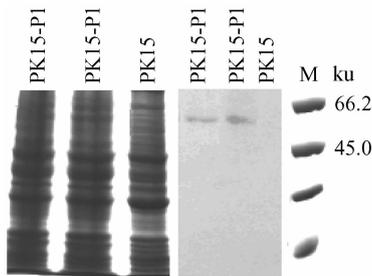
A, B. The expression of P1 protein in 1st and 10th generation infected cells, respectively; C. Uninfected PK-15 cells

图 2 PK-15 细胞中 P1 基因的免疫荧光检测

Fig. 2 Identification of expression of P1 gene in PK-15 by indirect fluorescence assay

## 2.6 Western blot 对表达的 P1 蛋白反应性分析

如图 3 所示, SDS-PAGE 检测显示表达产物约 65 ku, 与预期结果一致。经 Western blot 鉴定, 它可被猪水疱病阳性血清所识别。



M. 低分子质量蛋白质标准; PK15-P1. 阳性细胞表达产物; PK15. 未转染的 PK-15 细胞电泳结果  
M. Protein molecular weight marker; PK15-P1. Protein of transfected PK-15 cell; PK15. Protein of untransfected PK-15 cell

图 3 表达产物的 Western blot 分析

Fig. 3 Western blot analysis of the expressed products

## 3 讨论

现代逆转录病毒基因转移技术建立在包装细胞系、逆转录病毒表达载体和水疱性口炎病毒载体的基础上, 包装细胞系的发展为逆转录病毒载体系统创造了一种安全、可控的新技术。由包装细胞产生的假病毒能泛向型感染哺乳动物和非哺乳动物细胞, 其外壳糖蛋白来自水疱性口炎病毒 (VSV-G), 该蛋白不同于其它的包装蛋白, 可通过与细胞膜上的脂偶联及细胞膜融合调节病毒的进入<sup>[4-5]</sup>, 从而扩大了假病毒的感染宿主谱。本研究选用复制缺陷型逆转录病毒表达载体 pBABE puro, 水疱性口炎病

毒载体 pVSV-G 和包装细胞 GP2-293; 以猪水疱病病毒为研究对象, 构建了重组逆转录病毒载体 pB-ABE puro-P1, 所获得的假病毒可感染 PK-15 细胞, 目的基因在该细胞中得到了表达, 而且表达的 P1 前体蛋白可被猪水疱病阳性血清所识别。这说明该表达系统在哺乳动物细胞中表达外源基因是切实可行的。

对 SVDV 结构蛋白的研究发现, 病毒中和性抗原位点在病毒的外壳蛋白上, SVDV P1 基因编码结构蛋白的前体蛋白, 含有众多的线性 (或序列依赖型) 抗原位点。而且多肽扫描 (pepscan) ELISA 研究显示在 SVDV 所诱导的抗体中, 不仅有针对衣壳结构的, 也有针对结构蛋白前体的<sup>[6-7]</sup>。而且在其他的小 RNA 病毒中, 线性表位也参与体液免疫应答。加工剪辑完整的病毒样颗粒的免疫原性要比衣壳前体蛋白好, 但是若加入负责剪切 P1 前体蛋白的各种非结构蛋白基因, 就增加了外源基因的长度, 影响转染与表达, 同时有的非结构蛋白会对宿主细胞造成负面影响; 例如, 2A 蛋白酶虽有诱导翻译起始因子 eIF4G 裂解的作用<sup>[8-9]</sup>, 但可抑制宿主细胞的蛋白质合成。另外, 肠病毒 3C 蛋白酶能裂解转录因子 DII 的 TATA 结合蛋白亚基和转录因子 IIIc, 使它们失活, 从而抑制宿主细胞 3 种 RNA 聚合酶的转录活性<sup>[10-11]</sup>。

Lipofectin 为一种阳离子脂质体, 在加入待转移的呈负电性 DNA 水溶液后, 该正电性络合物很容易与负电性细胞表面结合, 经内吞作用进入细胞。通过脂质体介导的方法将人 HLA-B7 基因导入动物系统的肿瘤细胞导致肿瘤排斥, 获得较好的结果<sup>[12-13]</sup>。本试验用脂质体 2000 (Lipofectin 2000) 将重组质粒与水疱性口炎病毒载体转染 GP2-293

包装细胞,同样也取得了满意的假病毒滴度,表明在介导逆转录病毒表达系统的细胞转染方面采用 Lipofectin 是可行的<sup>[14]</sup>。在逆转录病毒表达载体 pB-ABE puro-P1 与 pVSV-G 的共转染过程中,由于 VSV-G envelope 蛋白的表达,介导了邻近细胞的融合,从而形成多核细胞,而且会产生漂浮的外观,这属于正常现象,据报道合胞体的形成表明了高的转染效率,将会有很高的病毒滴度<sup>[15-16]</sup>。本研究也发现了类似的情况。

用所收集的假病毒感染靶细胞 PK-15 细胞,间接免疫荧光检测发现,感染 24 h 后,约 20% 的细胞 P1 蛋白表达阳性,经筛选出嘌呤霉素抗性的细胞株后,全部细胞均表达 P1 蛋白,在无嘌呤霉素维持筛选的情况下,稳定株连续传代 3 次,细胞仍全部呈阳性表达,说明假病毒感染 PK-15 细胞后,凡具有嘌呤霉素抗性的细胞确实可以稳定地表达 P1 蛋白。本文同时还应用 PCR 技术分别扩增体外连续传代的第 1、8、16 和 30 代阳性克隆细胞。结果表明扩增产物与理论值片段大小一样,可判定外源性基因随着靶细胞的传代能稳定而持续地存在,具有一定的遗传稳定性。

#### 参考文献:

[1] 殷震,刘景华. 动物病毒学[M]. 第2版. 北京:科技出版社,1997:652-664.

[2] 郑海学,刘湘涛,尚佑军,等. 用 RACE 快速构建忠实性 SVDV HK/70 株基因组全长 cDNA[J]. 中国兽医科技,2005,35(S2):181-184.

[3] 萨姆布鲁克 J,弗里奇 E F,曼尼阿蒂斯 T. 分子克隆实验指南[M]. 第2版. 北京:科学出版社,1995.

[4] GALIPEAU J, LI H, PAQUIN A, et al. Vesicular stomatitis virus G pseudotyped retrovector mediates effective *in vivo* suicide gene delivery in experimental brain cancer[J]. Cancer Res, 1999, 59(10):2 384-2 394.

[5] WILLIAM C, SCOTT K, MARY W, et al. Enumeration of the simian virus 40 early region elements necessary for human cell transformation[J]. Molecular and Cellular Biology, 2002, 22(7):2 111-2 123.

[6] BROCCHI E, BERLINZANI A, GAMBA D, et al. Development of two novel monoclonal antibody based ELISAs for the detection of antibodies and the identification of swine isotypes against swine vesicular dis-

ease virus[J]. J Virol Methods, 1995, 52(1-2):155-167.

[7] 孙世琪,郭慧琛,尹双辉,等. 猪水疱病自杀性 DNA 疫苗的初步研究[J]. 畜牧兽医学报,2006, 37(10): 1 016-1 020.

[8] CLEMENS M J, BUSHELL M, MORLEY S J. Degradation of eukaryotic polypeptide chain initiation factor (eIF) 4G in response to induction of apoptosis in human lymphoma cell lines[J]. Oncogene, 1998, 17(22):2 921-2 931.

[9] GRADI A, SVITKIN Y V, IMATAKA H, et al. Proteolysis of human eukaryotic translation initiation factor eIF4GII, but not eIF4GI coincides with the shutoff of host protein synthesis after poliovirus infection[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 1998, 95(19): 11 089-11 094.

[10] BELSHAM G J, MCINERNEY G M, ROSS-SMITH N. Foot-and-mouth disease virus 3C protease induces cleavage of translation initiation factors eIF4A and eIF4G within infected cells[J]. J Virol, 2000, 74(1): 272-280.

[11] BERGMANN E M, MOSIMANN S C, CHERNAIA M M, et al. The refined crystal structure of the 3C gene product from hepatitis-A virus: specific proteinase activity and RNA recognition[J]. J Virol, 1997, 71(3):2 436-2 448.

[12] WATANABE Y, SAKATA T. Highly efficient action of autocrine mouse interferon expressed via a retroviral vector[J]. Eur J Immunol, 1988, 18(10): 1 627-1 630.

[13] 辛军,王晓雄,王鑫,等. 逆转录病毒载体介导的人 IFN- $\gamma$  基因在膀胱癌细胞中的表达[J]. 中华医学杂志,1997,77(10):778-780.

[14] KOZAK S L, KABAT D. Ping-pong amplification of retroviral vector achieves high-level gene expression: human growth hormone production[J]. J Virol, 1990, 64(7):3 500-3 506.

[15] THOMAS R, BAUER J R, DENNIS D, et al. Transduction of human hematopoietic cells and cell lines using a retroviral vector containing a modified murine CD4 reporter gene[J]. Hum Gene Ther, 1997, 8(2):243-248.

[16] 王建安,马宏进,赖春宁,等. 外源基因在人造血干祖细胞中的转移和表达[J]. 中国免疫学杂志, 1996, 12: 335-339.