亚洲Ⅰ型口蹄疫病毒全长可读框的表达及其产物免疫原性分析

李志勇① 易咏竹② 殷相平① 张志芳②* 柳纪省①*

(① 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;
② 中国农业科学院生物技术研究所, 北京 100081. * 联系人, E-mail: liujixing@hotmail.com, zhangzf@caas.net.cn)

摘要 将亚洲Ⅰ型口蹄疫病毒(foot-and-mouth disease virus, FMDV)全长约为 6.9 kb的可读框(ORF)克隆到家蚕杆状病毒转移载体pVL1393 中, 构建重组家蚕杆状病毒转移质粒pVL-ORF. pVL-ORF与线性化的亲本病毒Bm-BacPAK6 DNA共转染家蚕细胞, 经空斑筛选后成功获得携带有FMDV全长ORF的重组病毒Bm-ORF. 免疫荧光技术证明, 重组病毒能够正确表达插入的外源基因. 将获得的重组病毒Bm-ORF感染家蚕 5 龄起幼虫, 双抗体夹心ELISA法和电子显微镜观察证明, 目的基因在蚕体中获得较高水平表达并组装成空衣壳. 用蚕表达产物作抗原制备疫苗免疫牛, 免疫动物均产生了特异性抗体. 免疫后 21 d进行病毒攻击保护实验, 获得了 2/4 的完全保护.

关键词 **FMDV** **ORF** 家蚕杆状病毒载体 免疫原性 疫苗

口蹄疫(foot-and-mouth disease, FMD)是由口蹄疫病毒(foot-and-mouth disease virus, FMDV)引起偶蹄动物的一种急性、高度接触性、发热性传染病, 以传播迅速、感染率高而著称. 该病一旦爆发将会造成巨大的经济损失. FMDV属于小RNA病毒科口蹄疫病毒属的成员, 有A, O, C, 亚洲Ⅰ, SAT1, SAT2 和SAT3 型 7 个血清型, 型间无交叉免疫保护. FMDV基因组RNA呈线状, 全长约 8.5 kb, 由 5′端非编码区、单一可读框(ORF)、3′端非编码区和Poly(A)组成. ORF由L基因、P1 结构蛋白基因(包括VP4, VP2, VP3, VP1基因)、P2 (包括 2A, 2B, 2C基因)、P3 (包括 3A, 3B, 3C, 3D基因)非结构蛋白基因组成, 共同编码一多聚蛋白, 多聚蛋白逐级裂解最终组装成病毒衣壳. L基因, 2A基因, 3C基因编码FMDV的 3 种主要蛋白水解酶, 在多聚蛋白的裂解及病毒衣壳的组装过程中发挥重要作用[1].

发展中国家由于经济原因, 大多采用疫苗接种的方法来防控FMD爆发. 当前使用的灭活疫苗存在病毒逃逸等安全隐患[2], 因此迫切需要研制安全、稳定、高效的新型FMD疫苗. 免疫学研究表明, 病毒空衣壳和病毒粒子具有相似的免疫原性[3,4], 使用空衣壳免疫可以模仿病毒粒子的免疫, 因此制备空衣壳疫苗是个可行的选择. 杆状病毒表达体系是制备空衣壳疫苗的优选体系, 国外用做载体的杆状病毒主要为苜蓿银纹夜蛾核型多角体病毒(AcNPV)[5]. 而家蚕/BmNPV表达体系具有表达效率高、安全性好、可插入较大外源DNA片段, 表达产物后加工完善等优点[6,7].

2005 年在我国爆发的亚洲Ⅰ型FMD对国民经济造成巨大的损失[8]. 亚洲Ⅰ型FMDV作为 7 个血清型中定型最晚的一个, 研究资料相对较少, 对其抗原表位的研究并不十分清楚. 目前A和O型FMD空衣壳疫苗已分别用DNA疫苗、腺病毒载体、痘病毒、转基因植物等表达系统进行了研究[9~14], 但在亚洲Ⅰ型FMDV研究中未见报道. 本研究选用家蚕杆状病毒表达体系表达亚洲Ⅰ型FMDV全长ORF, 并免疫牛进行了病毒攻击保护实验, 为FMD候选基因工程疫苗的制备奠定了基础.

1 材料与方法

(ⅰ) 主要材料. FMDV的亚洲Ⅰ/XJ株、兔抗FMDV阳性血清、豚鼠抗FMDV阳性血清、BHK-21细胞由中国农业科学院兰州兽医研究所保存; pVL1393, DH10B, 亲本病毒Bm-BacPAK6[15], Bm-N细胞和供试家蚕品种JY1 为中国农业科学院生物技术研究所保存; RNA提取试剂盒购自Qiagen公司; 工

2007-04-19 收稿, 2007-06-30 接受
国家高技术研究发展计划(批准号: 2006AA02Z440)和科技部社会公益研究专项(批准号: 2005DIB4J041)资助项目

具酶为 Promega 公司产品; 脂质体 lipofect-AMINE2000 购自Invitrogen公司; FITC-羊抗兔IgG, HRP-兔抗豚鼠IgG为Sigma 公司产品.

(ⅱ) 重组杆状病毒转移载体的构建. 按 Qiagen 公司的RNA提取试剂盒说明书, 从FMDV亚洲Ⅰ/XJ株细胞培养液中提取 RNA. 将提取的总 RNA 用 $Oligo(dT)_{18}$ 引物在 AMV 反转录酶的作用下, 42℃反转录制备 cDNA. 以获得的 cDNA 为模板, 用特异性引物(上游引物: 5′-GCGACTAGTACCATGGAATTC-ACACTTCACAACGGTG AG-3′, 引入 *Spe* Ⅰ酶切位点); 下游引物: 5′-ATAGCGGCCGCAGGGATTATG-CGTCACCGCACAC-3′, 引入 *Not* Ⅰ酶切位点)进行 PCR 扩增. PCR 条件: 95℃, 1 min; 94℃, 40 s, 60℃, 40s, 72℃, 8 min; 30 个循环; 72℃延伸 10 min. PCR 产物用 10 g/L 琼脂糖凝胶电泳鉴定.

将鉴定正确的目的片段 ORF 经 *Spe* Ⅰ, *Not* Ⅰ酶切后与经 *Xba* Ⅰ, *Not* Ⅰ酶切的杆状病毒转移载体 pVL1393 进行黏端连接, 使其置于多角体蛋白强启动子控制下. 按常规方法将连接产物转化大肠埃希氏菌 JM109, 在含氨卞抗性的琼脂平板上筛选, 挑选克隆后, 提取质粒. 经测序鉴定正确后, 命名为 pVL-ORF.

(ⅲ) 构建与筛选重组全长 ORF 的杆状病毒. 将 pVL-ORF DNA 2 μg 与线性化的亲本病毒 Bm-BacPAK6 基因组 DNA 1 μg 在 lipofect-AMINE2000 作用下共转染 Bm-N 贴壁细胞进行细胞内同源重组. 27℃培养至细胞感染浮起, 经过两轮空斑纯化和鉴定获得重组病毒 Bm-ORF.

(ⅳ) ORF 在 Bm-N 细胞内表达. 将纯化的重组病毒 Bm-ORF 在 Bm-N 细胞上扩增后, 以 MOI 10 感染 Bm-N 细胞, 48 h 后进行间接免疫荧光检测. PBS 液漂洗细胞 1~2 次, 冷丙酮–20℃固定 30 min, 漂洗后吸干液体. 滴加兔抗 FMD 阳性血清, 37℃湿盒中孵化 30 min , PBS 液漂洗 5 次, 加 FITC-羊抗兔 IgG, 37℃湿盒中染色 30 min, 甘油封片, 于 Olympus 荧光显微镜下观察. 以感染 Bm-BacPAK6 的 Bm-N 细胞作为阴性对照.

(ⅴ) ORF 在家蚕中的表达. 将重组病毒培养液按 10^5 pfu/头注射 5 龄起蚕, 4~5 d 后收集发病蚕血淋巴, –20℃冻存以进行双抗体夹心 ELISA 法检测. 96 孔酶标板用兔抗 FMDV 阳性血清包被, 4℃过夜. 脱脂奶粉封闭后, 将 FMDV 抗原、感染 Bm-ORF 的家蚕收获的蚕血、感染 Bm-BacPAK6 的家蚕收获的蚕血做 2 倍梯度稀释. 37℃作用 1 h 后, 洗涤, 加入豚鼠抗 FMDV 阳性血清, 37℃作用 1 h. 洗涤后加入 HRP-兔抗豚鼠 IgG, 37℃作用 1 h. 加入底物 OPD-H_2O_2, 于 37℃作用 15 min, 用终止液结束反应, 于 492 nm 处测定 *A* 值.

(ⅵ) FMDV空衣壳电子显微镜观察. 收集发病蚕血淋巴, 离心取上清, 按照文献 [16]报道的方法由兰州大学电子显微镜室协助进行病毒空衣壳观察.

(ⅶ) 免疫动物. 将收获的蚕血淋巴经超声波破碎, 离心去细胞碎片后, 与等体积油佐剂混合. 取 3 mL/头颈部肌肉免疫牛. 实验组免疫 4 头牛(Bm-ORF 表达产物制备的疫苗), 设立 2 头牛的对照组(Bm-BacPAK6 感染家蚕收获的血淋巴制备的对照). 在注射疫苗前, 采用世界动物卫生组织(OIE)标准方法液相阻断 ELISA (LPBE)法对候选牛进行抗体水平的检测, 挑选其效价低于 1/8 的牛在兰州兽医研究所的隔离动物房进行实验.

(ⅷ) LPBE 法检测血清抗体. 收集免疫后 21 d 的牛血清, 采用 LPBE 检测牛血清中的抗 FMDV 抗体水平, 具体操作按照中国农业科学院兰州兽医研究所生产的液相阻断 ELISA(LPBE)法检测试剂盒说明书进行.

(ⅸ) 病毒攻击保护实验. 免疫 21 d 后, 按照 OIE 的标准方法, 采用 10000 BID_{50} 的同源病毒接种牛舌, 连续观测 10 d, 检测唇部及四蹄发病情况.

2 结果

2.1 重组病毒 Bm-ORF 的构建

重组转移质粒 pVL-ORF 经 PCR 鉴定、酶切分析后送公司测序, 其结果与本毒株的序列相符, 含有完整的 L, P1, P2, P3 基因, 全长为 6.9 kb. 将 pVL-ORF 与线性化的 Bm-BacPAK6 基因组 DNA 共转染 Bm-N 细胞, 27℃条件下培养 4 d 左右, 出现明显的细胞病变. 取培养上清液, 经两轮空斑筛选和分子检测后得到重组病毒 Bm-ORF.

2.2 ORF 在 Bm-N 细胞中表达结果

通过间接免疫荧光方法, 感染 Bm-ORF 的细胞飞片和感染 Bm-BacPAK6 的细胞飞片经荧光染色后, 在电子显微镜下观察并拍照. 结果显示, 感染 Bm-ORF 的 Bm-N 细胞出现了特异荧光, 而对照细胞只有微弱的荧光背景(图 1), 表明 ORF 在细胞中得到正确表达.

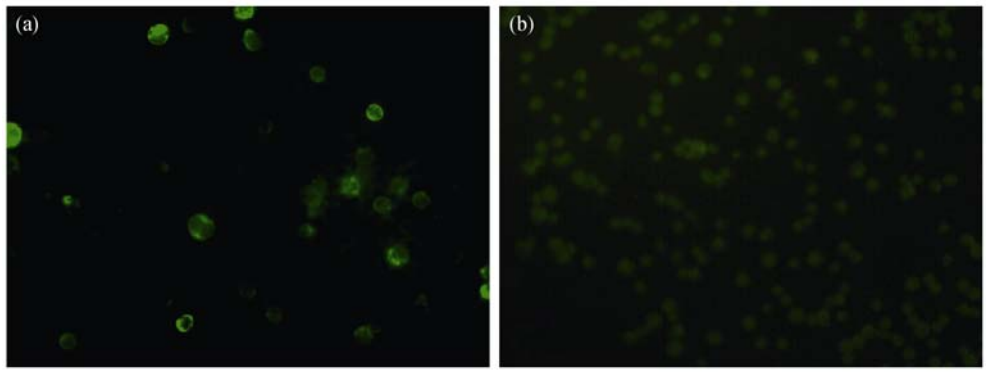


图 1 间接免疫荧光方法检测 ORF 在 Bm-N 细胞中的表达情况
(a) 感染 Bm-ORF 病毒的 Bm-N 细胞; (b) 感染 Bm-BacPAK6 的 Bm-N 细胞

2.3 ORF 在蚕体中的表达结果

收集病蚕血淋巴, 用双抗体夹心 ELISA 法检测抗原在蚕体中的表达. 结果显示从感染 Bm-ORF 的家蚕中收获的血淋巴 *A* 值随倍比稀释度的增加逐渐下降, 其变化规律与 FMDV 抗原的 *A* 值变化规律相同. 从 *A* 值测定实验结果来看, 其表达量大约为阳性对照传统细胞疫苗病毒抗原表达水平的一半, 而对照 Bm-BacPAK6 感染的蚕血淋巴中未检测到抗原表达(图 2).

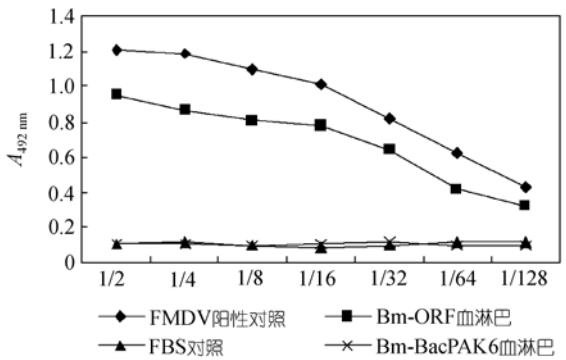


图 2 双抗体夹心 ELISA 法检测 ORF 在家蚕体内的表达情况

2.4 电子显微镜观察结果

将发病蚕血淋巴用于电子显微镜观察, 结果显示, 血淋巴中可观察到类似 FMDV 病毒粒子的空衣壳, 直径约为 30 nm (图 3), 表明在家蚕杆状病毒表达体系中, 病毒衣壳蛋白的加工系统的功能得到了正常发挥.

2.5 血清中抗 FMDV 特异性抗体

收集免疫后 21 d 血清, 通过 LPBE 方法测定抗 FMDV 特异性抗体效价. 结果显示, 在免疫后 21 d 时,

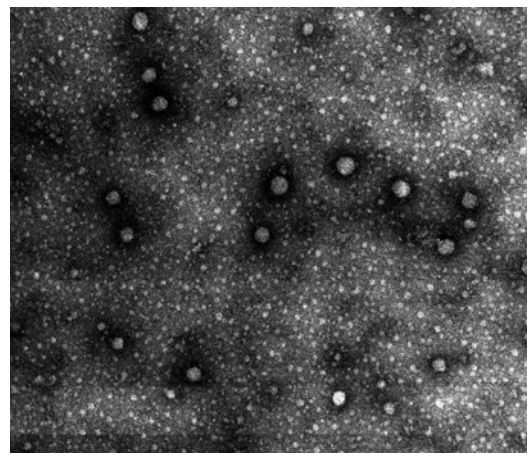


图 3 电子显微镜观察蚕血淋巴中形成的 FMDV 空衣壳 (×80000)

对照组牛抗体效价未见提高, 而 Bm-ORF 组的 4 头牛都获得了一定程度的提高(表 1).

2.6 攻毒保护实验

免疫 21 d, 对实验动物进行 10000 BID_{50} 同源病毒攻击. 于攻毒后 3, 5, 7, 10 d 进行检测, 记录唇部及四蹄发病情况, 结果见表 1.

3 讨论

2005 年亚洲 I 型FMDV在我国部分地区爆发, 从最初证实在山东泰安和江苏无锡两个独立的牛场同时发病以来, 疫情很快蔓延到新疆等 10 个省市, 对国民经济造成了巨大的损失[8]. 亚洲 I 型FMDV于 1954 年被首次分离于巴基斯坦[17], 主要在东南亚和印度半岛呈地方性流行, 在中东及东南亚周边地区散发. 目前在我国主要使用传统的灭活疫苗来防控亚洲 I 型FMD. 在FMDV感染的细胞中可获得几种中间体, 即 140S完整病毒粒子、75S空衣壳、12S

表 1 免疫动物抗体水平及病毒攻击保护实验

动物编号	接种疫苗	抗体水平	发病情况/d				保护效果
			3	5	7	10	
115	Bm-ORF	1/128	无发病症状	无发病症状	无发病症状	无发病症状	完全保护
140	Bm-ORF	1/90	无发病症状, 舌面有较小溃疡	无发病症状, 舌面溃疡减小	无发病症状	无发病症状	完全保护
126	Bm-ORF	1/32	无发病症状, 舌面有较大溃疡	唇部水疱	上下唇+2 蹄水疱	康复中	不完全保护
141	Bm-ORF	1/45	无发病症状, 舌面有较大溃疡	2 蹄水疱	上下唇+2 蹄水疱	康复中	不完全保护
103	Bm-BacPAK6	<1/8	舌面较大溃疡, 上下唇+4 蹄水疱	上下唇+4 蹄水疱	康复中	康复中	不保护
117	Bm-BacPAK6	<1/8	舌面较大溃疡 上下唇+4 蹄水疱	上下唇+4 蹄水疱	康复中	康复中	不保护

亚单位及 5S原体. 有实验显示, 75S空衣壳与 140S完整病毒粒子具有相似的抗原性, 能诱导产生相同的特异性中和抗体 [3,4]. 因此, FMDV空衣壳对于研制新型疫苗是个很好的选择. 目前对于FMDV组装的具体细节仍然不是十分清楚. 张兴旺等人 [18]曾构建了含有O型FMDV全长ORF的重组腺病毒, 在电子显微镜下观测到了病毒空衣壳. 本研究利用家蚕/杆状病毒表达系统表达了FMDV的全长ORF, 通过间接免疫荧光技术和双抗体夹心ELISA方法检测到了ORF在Bm-N细胞内和家蚕体内获得表达, 并在电子显微镜下观测到了FMDV空衣壳.

昆虫杆状病毒表达系统自 20 世纪 80 年代初问世以来, 已经成功表达了多种外源蛋白. 外源基因一般置于多角体蛋白启动子控制之下, 在昆虫培养细胞或昆虫体内高效表达外源蛋白. 杆状病毒表达载体具有容载大片段外源基因的优点, 较大的外源DNA插入(约 10 kb)不影响病毒的复制与装配 [19], 故可将与病毒衣壳组装相关的多个外源基因同时插入杆状病毒载体中, 进行病毒样颗粒(virus-like particle, VLP)的研究. 利用杆状病毒表达系统获得的VLP产量高、免疫原性好, 因此该系统被认为是大规模生产空衣壳疫苗的优选表达系统 [5,20~22]. 国外主要用昆虫细胞/AcNPV表达系统进行相关研究, 而家蚕/BmNPV表达系统与之相比具有明显的优势: 重组有外源基因的BmNPV不仅可以感染家蚕培养细胞进行体外表达, 还可以通过注射家蚕幼虫或蛹方式实现体内表达 [6,7]. 在家蚕虫体内表达的重组蛋白量通常高于同体积的细胞培养液 50 倍以上. 家蚕的饲养成本低廉, 可以以极低的成本获得较多的抗原, 且蚕没有与动物交叉的病原物, 而成本和安全因素恰恰是新型动物疫苗能否进入市场的一个关键. 本研究结果表明, 利用家蚕/BmNPV表达系统表达即使长达6.9 kb的大片段外源基因, 仍然可以获得较高的抗原表达量并能够进行正确的后加工和组装, 这一结果使研制的新型FMD疫苗最终走向市场成为可能.

在畜牧业生产中往往要求疫苗作到一次免疫后就对动物产生足够的保护, 因此本研究尝试了进行一次免疫后的病毒攻击保护实验. 实验中, 免疫组的 4 头牛抗体水平都得到了一定程度的提高, 对照组牛没有变化. 进行同源病毒攻击之后, 免疫组牛取得了 2/4 的完全保护, 不完全保护的两头牛也推迟了发病时间, 并减轻了发病症状, 而对照组牛发病迅速且病症严重. 由于牛是FMDV最易感动物, 在攻毒实验中选取的病毒量达到 10000 BID_{50}, 所以对牛进行的病毒攻击保护实验往往无法取得理想的结果, 即使常规疫苗也很难取得完全保护的免疫效果. 在基因工程疫苗的研究中, 仅见Plum Island Animal Disease Center (USA)发表的腺病毒活载体疫苗, 每头牛注射 5×10^9 pfu Ad-A24, 进行病毒攻击实验, 取得了理想的保护, 而在有关亚洲Ⅰ型FMDV的研究中未见相应报道 [10]. 本次实验动物之间特异性抗体效价差异较大, 我们认为可能是由于下述原因所致: (ⅰ) 血淋巴中同体积的抗原含量仍然低于常规灭活疫苗抗原含量, 由于抗原量偏低从而无法使牛产生足够坚强的免疫; (ⅱ) 由于本实验疫苗制备是采用注射器乳化的手工方式, 可能在制备过程中没有做到抗原的均匀分布, 导致免疫剂量不均一; (ⅲ) 在FMDV的抗感染免疫中, 虽然体液免疫发挥了主要作用, 但是细胞免疫因素可能也有一定作用. 因此下一步研究需要进行蚕血中抗原的浓缩工作或通过提高系统的表达效率、进一步缩减ORF中与病毒衣壳形成无关的序列等措施以提高表达量, 并适当引入细胞免疫因子, 以期能成功研制新型FMD疫苗.

参 考 文 献

1 Mason P W, Grubman M J, Baxt B. Molecular basis of pathogenesis of FMDV. Virus Res, 2003, 91(1): 9—32[DOI]

2 Beck E, Strohmaier K. Subtyping of European foot-and-mouth disease virus strains by nucleotide sequence determination. J Virol, 1987, 61: 1621—1629

3 Rweyemamu M M, Terry G, Pay T W. Stability and immunogenicity of empty particles of foot-and-mouth disease virus. Arch Virol, 1979, 59: 69—79

4 Rowlands D J, Sangar D V, Brown F. A comparative chemical and serological study of the full and empty particles of foot-and-mouth disease virus. J Gen Virol, 1975, 26: 227—238

5 Noad R, Roy P. Virus-like particles as immunogens. Trends Microbiology, 2003, 11(9): 438—444[DOI]

6 Lin X A, Zhang W, Chen Y, et al. Overexpression of *celB* gene coding for β-Glucosidase from *Pyrococcus furiosus* using baculovirus expression vector system in silkworm, *Bombyx mori*. Z Natforsch, 2006, 61: 595—600

7 Choi J Y, Woo S D, Lee H K, et al. High-level expression of canine parvovirus VP2 using *Bombyx mori* nucleopolyhedrovirus vector. Arch Virol, 2000, 145(1): 171—177

8 Guo H, Liu X, Liu Z. Recent outbreaks of foot-and-mouth disease type Asia 1 in China. J Vet Med B, 2006, 53: 29-33[DOI]

9 Mayr G A, O′Donnell V, Chinsangaram J, et al. Immune responses and protection against foot-and-mouth disease virus (FMDV) challenge in swine vaccinated with adenovirus-FMDV constructs. Vaccine, 2001, 19: 2152—2162[DOI]

10 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. Vaccine, 2003, 22: 268—279[DOI]

11 Pacheco J M, Brum M C S, Moraes M P, et al. Rapid protection of cattle from direct challenge with foot-and-mouth disease virus (FMDV) by a single inoculation with an adenovirus-vectored FMDV subunit vaccine. Virology, 2005, 337: 205—209[DOI]

12 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. Vaccine, 2002, 20: 1631—1639[DOI]

13 Guo H C, Liu Z X, Sun S Q, et al. Immune response in guinea pigs vaccinated with DNA vaccine of foot-and-mouth disease virus O/China99. Vaccine, 2005, 23: 3236—3242[DOI]

14 Dus Santos M J, Carrillo C, Ardila F. Development of transgenic alfalfa plants containing the foot and mouth disease virus structural polyprotein gene P1 and its utilization as an experimental immunogen. Vaccine, 2005, 23: 1838—1843[DOI]

15 吴祥甫, 杨冠珍, 胡建新. 重组救活可线性化家蚕核多角体病毒基因工作载体. 中国专利, CN1242428. 2000-01-26

16 郑海学, 刘湘涛, 尚佑军, 等. 猪水泡病病毒 HK/70 株全长 cDNA 分子克隆感染性的鉴定. 科学通报, 2006, 51: 1900—1905

17 Brown F. The history of research in foot-and-mouth disease. Virus Res, 2003, 91: 3—7[DOI]

18 张兴旺, 王勤, 柳纪省, 等. 细菌内同源重组法制备 FMDV 聚蛋白编码基因重组腺病毒. 微生物学报, 2006, 46: 223—226

19 吕鸿声. 昆虫病毒分子生物学. 北京: 中国农业科技出版社, 1998. 547

20 Rueda P, Fominaya J, Langeveld J P M, et al. Effect of different baculovirus inactivation procedures on the integrity and immunogenicity of porcine parvovirus-like particles. Vaccine, 2000, 19: 726—734[DOI]

21 Maranga L, Cruz P E, Aunins J G, et al. Production of core and virus-like particles with baculovirus infected insect cells. Adv Biochem Eng Biotechnol, 2002, 74: 183—206

22 Mortola E, Roy P. Efficient assembly and release of SARS coronavirus-like particles by a heterologous expression system. FEBS Letters, 2004, 576(1-2): 174—178[DOI]