

## 兔病毒性出血症 3C 基因荧光表达载体的构建 及其在 293T 细胞中的表达

刘鹏<sup>1</sup>, 陈全刚<sup>2</sup>, 袁红花<sup>1</sup>, 张锦萍<sup>1</sup>, 吴连连<sup>2</sup>, 胡安康<sup>2</sup>, 陈仁金<sup>2</sup>, 朱孝荣<sup>2\*</sup>

(1. 徐州医科大学神经生物学研究中心, 江苏 徐州 221004; 2. 徐州医科大学实验动物中心)

**摘要:**目的 构建 EGFP 与 3C 融合表达的真核表达质粒, 为研究 RHDV 3C 蛋白在病毒感染中的作用提供基础。方法 RHDV 3C 基因的片段经过反转录成 cDNA, 纯化的 PCR 产物经 *EcoR* I 和 *Sal* I 双酶切后克隆到 pEGFP-C1 载体, 构建 EGFP 与 3C 融合表达的真核表达质粒。pEGFP-C1-3C 真核表达载体转染 293T 细胞, 24 h 后荧光显微镜检测及 Western blot 检测 EGFP-3C 融合蛋白表达情况。结果 24 h 后荧光显微镜及 Western blot 检测表明 RHDV 3C 基因全长编码序列能够成功插入到 pEGFP-C1 载体。结论 EGFP-3C 融合表达质粒能够被成功构建, 从而有助于探索 RHDV 3C 蛋白在 RHDV 感染过程中的功能, 为深入探讨 RHDV 的防治提供基础。

**关键词:**兔病毒性出血症病毒; 3C 蛋白; 真核表达载体

中图分类号: Q781; S855.3 文献标志码: A 文章编号: 1000-2065(2016)07-0446-03

### Construction of pEGFP-C1-3C plasmid about rabbit viral hemorrhagic disease and its expression in 293T cells

LIU Peng<sup>1</sup>, CHEN Quangang<sup>2</sup>, YUAN Honghua<sup>1</sup>, ZHANG Jinping<sup>1</sup>, WU Lianlian<sup>2</sup>,  
HU Ankang<sup>2</sup>, CHEN Renjin<sup>2</sup>, ZHU Xiaorong<sup>2\*</sup>

(1. Research Center for Neurobiology, Xuzhou Medical University, Xuzhou, Jiangsu 221004 China;  
2. Laboratory Animal Center, Xuzhou Medical University)

**Abstract: Objective** To construct a recombinant eukaryotic plasmid containing EGFP and 3C genes in order to provide evidence for investigation of the function of rabbit hemorrhagic disease virus (RHDV) 3C protein in viral infection. **Methods** The cDNA fragment of RHDV 3C was reverse-transcribed into cDNA. Then the purified cDNA products were digested by *EcoR* I and *Sal* I enzymes and cloned into a pEGFP-C1 vector for construction of a recombinant eukaryotic plasmid pEGFP-3C. The pEGFP-3C plasmid was transfected into 293T cells and the level of 3C there were detected by fluorescence microscopic examination and Western blotting 24 h later. **Results** The full coding sequence of RHDV 3C was successfully inserted into the pEGFP-C1 vector. **Conclusion** The EGFP-3C fusion eukaryotic expression plasmid is successfully constructed, which can promote the investigation about the function of RHDV 3C protein in RHDV viral infection, and provide the evidence for in-depth discussion of prevention and control of RHDV.

**Key words:** rabbit hemorrhagic disease virus, 3C protein; eukaryotic expression plasmid

兔病毒性出血症(RHD)是由兔病毒性出血症病毒(RHDV)引起的一种高度接触性、急性致死性传染病,以肝脏坏死、呼吸系统的出血、实质脏器的水肿、出血、淤血为特征。RHD 又称兔瘟,在兔中是一种烈性传染病<sup>[1-2]</sup>。1984 年该病首次在中国爆发,并迅速扩散到全球,1995 年欧洲的另一兔瘟病毒在澳大利亚爆发<sup>[3]</sup>,2010 年有报道称兔瘟病毒在法国传播并造成大量的家兔和野兔死亡<sup>[4]</sup>,此外还有报道称名为 RHDVa 的变异株在德国、意大利、法国和美国出现过<sup>[5-8]</sup>。RHDV 基因组含 2 个开放阅读框(ORF):

ORF1 和 ORF2。其中 ORF1 编码一条相对分子质量 257 000 的多聚蛋白,并经切割形成 pro1、pro2、2C-like 蛋白酶、pro3、VPg、3C-like 蛋白酶、RNA 复制酶及 VP60,其中 VP60 为衣壳蛋白,是 RHDV 的主要抗原区域,ORF2 与 ORF1 部分重叠,编码相对分子质量 12 000 的 VP2 蛋白。

目前对 RHDV 感染及致病机制还知之甚少, RHDV 各蛋白在感染中的作用更是鲜有报道。为此,本研究首次克隆 RHDV 3C 蛋白全长基因,并将其插入 pEGFP-C1 真核表达载体中,从而构建

pEGFP-C1-3C 融合表达质粒,后经酶切及测序鉴定正确,并通过转染 293T 细胞,通过 Western blot 鉴定其在细胞中的成功表达,为进一步研究 3C 基因的定位、功能,揭示其在 RHDV 感染及致病中的作用奠定了基础。

## 1 材料和方法

**1.1 主要试剂及病毒** 典型 RHD 症状病死兔肝脏、293T 细胞、pEGFP-C1 质粒均为本实验室保存,工具酶购自 New England Biolabs 公司,Trizol 购自 Ambion,胎牛血清为 Gibco141,脂质体 2000 购自 Invitrogen 公司,DMEM 高糖培养基为 Gibco,小鼠源 EGFP-抗购自 abcam,配胶试剂盒购自碧云天公司,引物由生物工程股份有限公司合成,反转录试剂盒购自天根公司,感受态 DH5 $\alpha$  购自天根公司。

**1.2 3C 基因真核表达载体的构建** 本研究参照已经报道的 RHDV 基因组序列设计扩增引物,并由生物工程股份有限公司合成。上游引物 EGFP-3C-F: GAGGAATTCTATGGGCCTACCTGGTTT-TATGAG;下游引物 EGFP-3C-R: GCGGTCGACT-TATTCGTAAACTCCCTTTGTGA。首先,提取感染 RHDV 兔肝脏的总 RNA,按照天根反转录试剂盒说明书操作进行反转录。经 PCR 扩增之后进行琼脂糖凝胶电泳,切胶回收 3C 基因。回收的目的片段和相应的载体分别经 *EcoR* I 和 *Sal* I 双酶切,经琼脂糖凝胶电泳纯化回收后 T<sub>4</sub> DNA 连接酶连接。转化感受态 DH5 $\alpha$ 、经卡那霉素抗性平板筛选阳性克隆后进行双酶切鉴定后送公司进行测序。将该重组载体命名为 pEGFP-C1-3C。

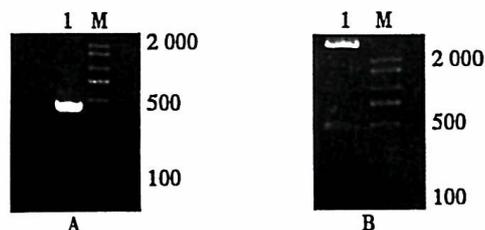
**1.3 3C 基因的表达** 将重组质粒 pEGFP-C1-3C 和空载体质粒 pEGFP-C1 分别用脂质体 2000 转染 293T 细胞,37 $^{\circ}$ C 孵育 6 h 后弃去上清液,换含 10% 胎牛血清的 DMEM 高糖培养基,经 37 $^{\circ}$ C、5%

CO<sub>2</sub> 培养箱培养 24 h,并实时观察细胞状态。

**1.4 3C 基因的表达产物 3C 蛋白酶的鉴定** 取 70  $\mu$ g 蛋白上样,80 V 电压下 10% SDS-PAGE 凝胶电泳,等条带到达浓缩胶与分离胶接触面时换成 100 V 电压电泳 100 min,然后用半干电转仪将胶上蛋白转移到 NC 膜上,转膜完成后用 5% BSA 封闭 6 h。然后加入小鼠抗 EGFP 单克隆抗体 (1:1 000; abcam),4 $^{\circ}$ C 过夜。加入相应的二抗 (IRDyeTM680CM 标记的山羊抗小鼠抗体 (1:200; LI-COR)),室温避光孵育 1 h;washing buffer 洗膜。Odyssey 激光成像系统扫描。

## 2 结果

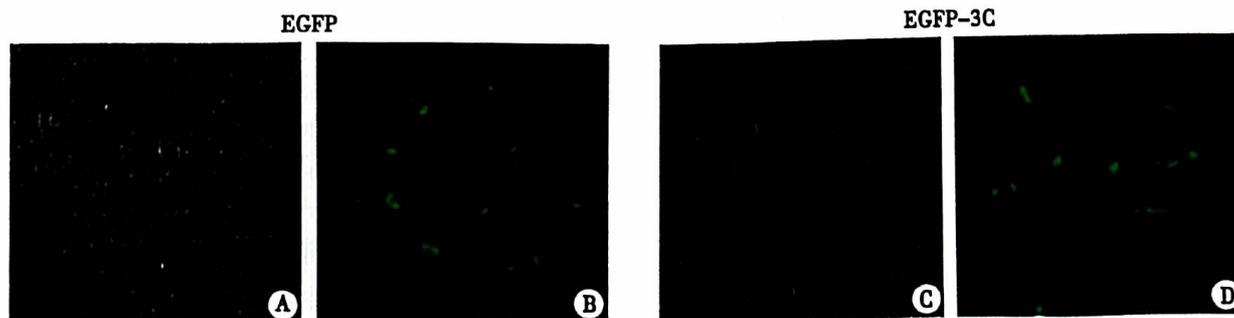
**2.1 pEGFP-C1-3C 重组质粒的鉴定** RHDV 3C 基因全长编码序列大小为 435 bp,PCR 扩增产物的目的片段大小与理论值相符。该重组质粒经 *EcoR* I 和 *Sal* I 双酶切鉴定有 2 条带且与理论值相符。对测序结果分析进一步证明该重组质粒是含有 RHDV 3C 基因全长编码序列的重组质粒 (图 1)。



A. 3C PCR 琼脂糖凝胶电泳鉴定结果; B. 重组载体 *EcoR* I / *Sal* I 双酶切琼脂糖凝胶电泳结果 (M. Marker D2 000; 1. 3C PCR; 2. 重组载体的双酶切片段)

图 1 琼脂糖凝胶电泳

**2.2 3C 基因表达产物的鉴定** pEGFP-C1-3C 质粒和空载体质粒分别转染 293T 细胞,24 h 后荧光显微镜检测其表达情况 (图 2),并收取样品,通过 Western blot 检测蛋白表达情况。



A. EGFP 明场组; B. EGFP 荧光组; C. EGFP-3C 明场组; D. EGFP-3C 荧光组

图 2 荧光显微镜检测表达情况 (SP,  $\times 20$ )

结果显示,空载体组表达相对分子质量 27 000 的 EGFP 蛋白,而转染 pEGFP - C1 - 3C 质粒组表达相对分子质量 43 000 的蛋白条带,该条带大小与融合蛋白理论大小相符。从而证实 EGFP - 3C 蛋白得到了正确表达(图 3)。

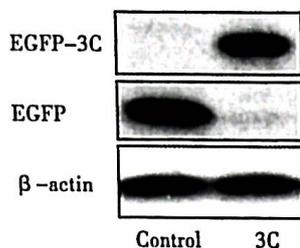


图3 免疫印迹分析

### 3 讨论

RHDV 是一种十二面体、无外包膜的正链 RNA 病毒,属于杯状病毒科<sup>[9-10]</sup>。RHDV 基因组约为 7.4 kb,其结构蛋白 VP60 约为 2.2 kb<sup>[11]</sup>。RHDV 有较强的致死性,但目前对病毒感染及致病机制知之甚少。而同种属的病毒中,3C 蛋白酶在病毒的感染及致病过程中发挥重要作用,其中脊髓灰质炎病毒 3C 蛋白酶<sup>[12]</sup>与口蹄疫病毒 3C 蛋白酶均可诱导细胞凋亡<sup>[13]</sup>。RHDV 3C 蛋白酶与脊髓灰质炎病毒 3C 蛋白酶、口蹄疫病毒 3C 蛋白酶功能较为相似。

pEGFP - C1 质粒含有绿色荧光基因,绿色荧光蛋白可以与 3C 蛋白酶在宿主细胞内融合表达。本实验首先采用 RT - PCR 技术从典型 RHD 症状病死兔肝脏组织中扩增出 3C 基因 cDNA 序列。接着通过 PCR 技术扩增出 3C 基因序列,以 3C 基因为目的片段并且以 pEGFP - C1 质粒为载体构建 pEGFP - C1 - 3C 融合表达质粒。载体经测序无误。随后,我们通过脂质体介导方法将重组质粒 pEGFP - C1 - 3C 和空载体质粒 pEGFP - C1 分别转染 293T 细胞,37 °C 孵育 6 h 后换液,转染 24 h 后荧光显微镜下检测荧光表达情况,结果显示 EGFP - 3C 与 EGFP 组均有大量绿色荧光表达。最后提取细胞总蛋白,通过 Western blot 方法鉴定融合蛋白的表达情况,结果显示 3C 蛋白成功在 293T 细胞中成功表达,证明该重组真核表达载体构建成功。

本实验的研究结果为以后对 3C 蛋白的功能、定位及揭示 RHDV 的致病机制研究奠定了基础。

### 参考文献:

- [1] Teixeira L, Marques RM, Águas AP, et al. A simple and rapid method for isolation of caliciviruses from liver of infected rabbits [J]. *Res Vet Sci*, 2011,91(1):164 - 166.
- [2] Tuñón MJ, San Miguel B, Crespo I, et al. Melatonin attenuates apoptotic liver damage in fulminant hepatic failure induced by the rabbit hemorrhagic disease virus [J]. *J Pineal Res*, 2011,50(1):38 - 45.
- [3] Fenner F. Deliberate introduction of the European rabbit, *Oryctolagus cuniculus*, into Australia [J]. *Rev Sci Tech*, 2010,29(1):103 - 111.
- [4] Le Gall - Reculé G, Zwingelstein F, Boucher S, et al. Detection of a new variant of rabbit haemorrhagic disease virus in France [J]. *Vet Rec*, 2011,168(5):137 - 138.
- [5] Capucci L, Fallacara F, Grazioli S, et al. A further step in the evolution of rabbit hemorrhagic disease virus: the appearance of the first consistent antigenic variants [J]. *Virus Res*, 1998,58(1 - 2):115 - 126.
- [6] Le Gall - Reculé G, Zwingelstein F, Laurent S, et al. Phylogenetic analysis of rabbit haemorrhagic disease virus I France between 1993 and 2000, and the characterization of RHDV antigenic variants [J]. *Arch Virol*, 2003,148(1):65 - 81.
- [7] McIntosh MT, Behan SC, Mohamed FM, et al. A pandemic strain of calicivirus threatens rabbit industries in the Americas [J]. *Virology*, 2007,4:96.
- [8] Schirmeier H, Reimann I, K - llner B, et al. Pathogenic, antigenic and molecular properties of rabbit haemorrhagic disease virus (RHDV) isolated from vaccinated rabbits: detection and characterization of antigenic variants [J]. *Arch Virol*, 1999,144(4):719 - 735.
- [9] Meyers G, Wirblich C, Thiel HJ. Genomic and subgenomic RNAs of rabbit hemorrhagic disease virus are both protein - linked and packaged into particles [J]. *Virology*, 1991,184(2):677 - 686.
- [10] Ohlinger VF, Haas B, Meyers G. Identification and characterization of the virus causing rabbit hemorrhagic disease [J]. *J Virol*, 1990,64(7):3331 - 3336.
- [11] OEM JK, LEE KN, ROH IS, et al. Identification and characterization of rabbit hemorrhagic disease virus genetic variants isolated in Korea [J]. *J Vet Med Sci*, 2009,71(11):1519 - 1523.
- [12] Angel B, Elena F, Luis C. Poliovirus protease 3C kill cells by apoptosis [J]. *Virology*, 2000,266(2):352 - 360.
- [13] 吴海祥, 郑从义, 屈三甫. 口蹄疫病毒诱导宿主细胞凋亡的研究 [J]. *中国病毒学*, 2001, 16(2): 175 - 178.

收稿日期:2016 - 01 - 25 修回日期:2016 - 06 - 29

本文编辑:程春开