

稳定表达脯氨酰寡肽酶基因的 PK15 细胞系的建立及其对口蹄疫病毒增殖的影响

王姿逸^{1,2,3}, 茹毅^{1,2}, 卢炳州^{1,2}, 杨洋^{1,2}, 赵陇和^{1,2}, 李亚军^{1,2}, 李建斌^{1,2},
李明桂^{1,2}, 马坤^{1,2}, 冷非凡³, 郝荣增^{1,2*}, 郑海学^{1,2,3*}

- 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
- 2 甘肃省病原生物学基础学科研究中心, 甘肃 兰州
- 3 兰州理工大学 生命科学与工程学院, 甘肃 兰州

王姿逸, 茹毅, 卢炳州, 杨洋, 赵陇和, 李亚军, 李建斌, 李明桂, 马坤, 冷非凡, 郝荣增, 郑海学. 稳定表达脯氨酰寡肽酶基因的 PK15 细胞系的建立及其对口蹄疫病毒增殖的影响[J]. 微生物学报, 2025, 65(10): 4458-4471.

WANG Ziyi, RU Yi, LU Bingzhou, YANG Yang, ZHAO Longhe, LI Yajun, LI Jianbin, LI Minggui, MA Kun, LENG Feifan, HAO Rongzeng, ZHENG Haixue. A PK15 cell line stably expressing prolyl oligopeptidase (POP) and its effect on the proliferation of foot-and-mouth disease virus[J]. *Acta Microbiologica Sinica*, 2025, 65(10): 4458-4471.

摘要: 【目的】利用 PiggyBac 转座子系统构建稳定表达脯氨酰寡肽酶(prolyl oligopeptidase, POP) 基因的猪肾 PK15 细胞系, 并系统评估 POP 蛋白表达对口蹄疫病毒(foot and mouth disease virus, FMDV)增殖的影响。【方法】构建重组表达质粒, 转染 PK15 细胞后通过 Western blotting 检测目的蛋白表达; 采用有限稀释法筛选获得稳定表达 POP 的单克隆细胞系, 并利用 RT-qPCR 和 Western blotting 检测 POP 基因和蛋白表达的稳定性; 通过 Cell Counting Kit-8 试验评估筛选细胞系的细胞活力; 综合运用 Western blotting、RT-qPCR 以及病毒滴度测定等方法, 系统分析 FMDV 在稳定表达细胞系中的复制。【结果】成功构建了稳定表达 POP 蛋白的 PK15 单克隆细胞系; 与对照细胞系相比, 该细胞系的细胞活力无显著差异; 单克隆细胞系传至 P30 代时, POP 蛋白表达水平保持稳定; 接种病毒实验结果显示, FMDV 在稳定表达 POP 的 PK15 细胞系中的增殖水平显著高于对照组, 并在不同代次细胞系中保持稳定。【结论】本研究成功构建了稳定表达 POP 蛋白的 PK15 细胞系, 并证实该细胞系可显著促进 FMDV 的复制, 为进一步解析 POP 蛋白促进 FMDV 复制的分子机制提供了实验材料。

关键词: 脯氨酰寡肽酶(POP); PiggyBac 转座子系统; PK15 细胞; 病毒增殖

资助项目: 国家自然科学基金(32372990); 甘肃省自然科学基金(23YFNA0011, 23JRRA549)

This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (32372990) and the Natural Science Foundation of Gansu Province (23YFNA0011, 23JRRA549).

*Corresponding authors. E-mail: ZHENG Haixue, zhenghaixue@caas.cn; HAO Rongzeng, haorongzeng@163.com

Received: 2025-03-09; Accepted: 2025-04-25; Published online: 2025-05-14

A PK15 cell line stably expressing prolyl oligopeptidase (POP) and its effect on the proliferation of foot-and-mouth disease virus

WANG Ziyi^{1,2,3}, RU Yi^{1,2}, LU Bingzhou^{1,2}, YANG Yang^{1,2}, ZHAO Longhe^{1,2}, LI Yajun^{1,2}, LI Jianbin^{1,2}, LI Minggui^{1,2}, MA Kun^{1,2}, LENG Feifan³, HAO Rongzeng^{1,2*}, ZHENG Haixue^{1,2,3*}

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

2 Gansu Province Research Center for Basic Discipline of Pathogen Biology, Lanzhou, Gansu, China

3 School of Life Science and Engineering, Lanzhou University of Technology, Lanzhou, Gansu, China

Abstract: [Objective] To construct a PK15 cell line stably expressing the prolyl oligopeptidase (POP) by using the PiggyBac transposon system and systematically investigate its regulatory role in the proliferation of foot-and-mouth disease virus (FMDV). **[Methods]** A recombinant PiggyBac vector carrying the *POP* gene was constructed and transfected into PK15 cells, and the expression of the target protein was detected by Western blotting. The monoclonal cell line stably expressing POP was isolated *via* the limiting dilution method. The stability of mRNA and protein levels of POP was verified by RT-qPCR and Western blotting, respectively. The viability of the selected cell line was assessed by the Cell Counting Kit-8 (CCK-8) assay. FMDV replication kinetics in the stable cell line were comprehensively analyzed by Western blotting, RT-qPCR, and the 50% tissue culture infective dose (TCID₅₀) assay. **[Results]** A PK15 cell line stably expressing POP was established. No significant differences in cell viability were observed between the stable cell line and the control cell line. The protein level of POP remained stable in the established cell line after 30 passages. The results of the viral infection assay demonstrated that the FMDV proliferation level in the PK15 cell line stably expressing POP was significantly higher than that in the control group, with this stimulatory effect being maintained across multiple passages. **[Conclusion]** We successfully constructed a PK15 cell line stably expressing POP. The results reveal that POP overexpression enhances FMDV replication in a passage-independent manner. These findings provide a valuable experimental model for elucidating the molecular mechanism underlying the role of POP in FMDV replication.

Keywords: prolyl oligopeptidase (POP); PiggyBac transposition system; PK15 cells; virus proliferation

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,具有快速远距离传播的特点。FMDV 主要感染猪、牛、羊、鹿、羚羊、骆驼等多种偶蹄类动物^[1-2],

感染动物的临床症状主要包括发热、跛行,以及在口腔、蹄部和乳房等部位出现水疱性病变^[3]。FMD 对全球畜牧业构成严重威胁,不仅影响动物及动物产品的国际贸易,还可能引发重大经济损失和社会影响,世界动物卫生组织

(World Organisation for Animal Health, WOA)将其列为法定报告的动物疫病^[4-5]。目前, FMDV 主要分布在非洲、中东和亚洲, 以及南美洲的部分地区^[6]。FMDV 属于小 RNA 病毒科 (Picornaviridae)、口蹄疫病毒属 (Aphthovirus), 是一种无囊膜的单股正链 RNA 病毒, 病毒粒子呈球形, 在电子显微镜下呈现典型的二十面体对称结构^[7]。FMDV 基因组编码 4 种结构蛋白 (VP1、VP2、VP3 和 VP4) 和 8 种非结构蛋白 (L^{pro}、2A、2B、2C、3A、3B、3C^{pro} 和 3D^{pol})^[8]。在病毒感染过程中, 病毒蛋白或基因组与多种宿主因子发生复杂的相互作用, 这些宿主因子在病毒的复制过程中起着促进或抑制的双重调控作用^[9]。

脯氨酰寡肽酶 (prolyl oligopeptidase, POP) 是一种在进化上高度保守的丝氨酸蛋白酶, 最初由 Walter 等^[10]在人子宫组织中发现。该酶能够特异性裂解 Pro-Leu 肽键, 具有重要的水解酶活性与非酶学功能^[11]。POP 蛋白由 2 个主要功能结构域组成: 一是具有典型 α/β 水解酶折叠的催化结构域, 负责底物的识别和催化; 二是独特的 β -螺旋结构域由七重四链 β 片层构成, 该结构虽无催化功能, 但在维持酶的整体构象和稳定性中起重要作用^[12-13]。研究表明 POP 在神经系统疾病的发生发展和治疗中具有重要功能。王姿逸等^[14]通过猪全基因组筛选和功能验证, 首次证明 POP 蛋白能有效促进 FMDV 的复制, 表明该蛋白与病毒复制密切相关, 这一发现为深入研究病毒-宿主相互作用提供了新的线索。

PiggyBac (PB) 转座子系统是一种高效的基因转移工具, 能够高效转座较大片段的 DNA, 定点整合目的基因序列, 显著降低外源基因的随机整合概率; 还具有独特的无痕切除特性, 能够将转座子从基因组中精确移除, 恢复原始基因组序列^[15]。基于这些优势, PiggyBac 转座子系统已被广泛应用于多个研究领域, 包括转基因动物制备、基因治疗、细胞系构建以及癌症研究等, 特别是在构建表达治疗性重组蛋白

的稳定细胞系和制备嵌合抗原受体 T 细胞 (CAR-T) 等方面展现出重要的应用价值^[16-17]。本研究利用 PiggyBac 转座子系统, 将包含 POP 基因的转座子质粒和表达转座酶的辅助质粒共转染 PK15 细胞, 通过筛选获得稳定表达 POP 基因的 POP-PK15 细胞系, 并对其表达稳定性和功能进行了系统验证, 研究该细胞系对 FMDV 增殖的影响, 以期深入探究 POP 促进 FMDV 感染和复制的分子机制提供可靠的细胞模型。

1 材料与方法

1.1 细胞、病毒、抗体

猪肾上皮细胞 (porcine kidney-15 cells, PK15 cells)、仓鼠肾细胞 (baby hamster kidney-21 cells, BHK-21 cells)、pCMV-HA-POP 质粒、PiggyBac transposase (pPBT) 转座酶质粒和 PiggyBac-EF1 α -GFP-puro 质粒均由本实验室保存; FMDV O/GDBY/CHA/2010 毒株由 WOA/国家口蹄疫参考实验室保存; 鼠抗 HA 标签单克隆抗体和兔抗 β -actin 单克隆抗体均购自上海碧云天生物技术股份有限公司; 兔抗 POP 多克隆抗体、FITC 标记的山羊抗兔 IgG 和 Alexa-594 标记的抗小鼠 IgG 均购自 Abcam 公司; HRP 标记山羊抗兔 IgG 和 HRP 标记山羊抗小鼠 IgG 均购自 Immunoway 公司。

1.2 主要试剂

限制性核酸内切酶 *Nhe* I 和 *Bam*H I、NEBuilder HiFi DNA Assembly Master Mix, NEB 公司; DNA 胶回收试剂盒、Plasmid DNA Mini Kit, Omega 公司; PAGE 凝胶快速制备试剂盒、ECL 显影液, 上海雅酶生物医药科技有限公司; 蛋白 marker, ThermoFisher Scientific 公司; 抗体稀释液、4% 多聚甲醛固定液、CCK-8 试剂盒, 上海碧云天生物技术股份有限公司; One Step PrimeScript RT-PCR Kit, 宝日生物技术有限公司 (北京) 有限公司; Polyplus jetPRIME 转染试剂, Polyplus Transfection 公司; 胎牛血清 (fetal

bovine serum, FBS), 苏州依科赛生物科技股份有限公司; 0.25% EDTA 胰酶和 DMEM 细胞培养基, Gibco 公司; DAPI 染色液, 北京索莱宝生物科技股份有限公司。

1.3 重组表达质粒的构建与引物设计

以实验室前期构建的真核表达质粒 pCMV-HA-POP 为模板, 通过 PCR 扩增获得 HA-POP 基因。使用 *Nhe* I 和 *Bam*H I 双酶切处理 PiggyBac-EF1 α -GFP-puro 载体, 并通过琼脂糖凝胶电泳回收线性化载体片段。将扩增的 HA-POP 基因片段与线性化载体通过同源重组方法连接, 连接产物转化至大肠杆菌 DH5 α 感受态细胞。转化后的菌液涂布于含有 100 mg/mL 氨苄青霉素的 LB 固体培养基上, 37 °C 倒置培养 12–16 h。挑取单克隆菌落进行扩大培养, 提取质粒后送生工生物工程(上海)股份有限公司测序验证。经序列比对确认正确的重组质粒命名为 PB-EF1 α -HA-POP-puro。

设计 POP 基因扩增引物、FMDV 引物和探针、内参基因 *GAPDH* 的引物、基因整合鉴定引物, 引物序列均由生工生物工程(上海)股份有限公司合成。相关序列信息见表 1。

1.4 POP 蛋白的表达验证

将 PK15 细胞按 5×10^5 个/mL 密度接种于 6 孔板中, 使用含有 10% FBS 的 DMEM 培养基, 置于 37 °C、5% CO₂ 细胞培养箱中培养。待细胞汇合度达到 70%–80% 时, 按照 jetPRIME 转染试剂说明书进行质粒转染。

在 1.5 mL EP 管中依次加入 200 μ L 转染 buffer、1.0 μ g 质粒(实验组为 PB-EF1 α -HA-POP-puro, 对照组为相应空载体)和 2.0 μ L jetPRIME[®] reagent, 轻柔混匀后室温静置 10 min, 配制转染复合物。将转染复合物逐滴加入细胞中, 轻轻混匀后继续培养。转染后 24 h 收取细胞样品, 采用预冷的裂解液(RIPA:蛋白酶抑制剂混合物=100:1)进行细胞裂解, 4 °C、13 000 r/min 离心 15 min 收集上清。将细胞裂解液与 5 \times 蛋白上样缓冲液按比例混合, 100 °C 煮样 10 min 制备总蛋白样品。蛋白样品经 10% SDS-PAGE 分离, 通过湿转法将蛋白转移至 NC 膜上, 用含 5% 脱脂奶粉的 TBST 溶液室温封闭 1 h, 随后分别加入鼠源抗 HA 标签一抗(1:2 000 稀释)和鼠源 β -actin 单抗(1:2 000 稀释), 4 °C 孵育过夜。TBST 洗涤 3 次后, 加入 HRP 标记山羊抗小鼠

表1 本研究所用的引物序列

Table 1 Sequence of primers used in this study

Primers name	Primer sequences (5'→3')
POP-F	<i>CCATTT</i> <u>CAGGTGTCGTGAAGGCCACCATGTACCCATACGATGTTCCAGATTACGCTC</u>
POP-R	<u>ATGGCTGATTATGATCTAGATTACGGAATCCAGTCGATGTTCCAGGCACC</u>
POP-qF	TTCAAAGGCACAGTCAAGGC
POP-qR	ATCTCGCTCCTGGAAGATGG
FMD-SYBR-F	TGGGACCATACAGGAGAAGT
FMD-SYBR-R	GTAGCTTGGAATCTCGAAGAGG
sus-GAPDH-F	ACTGAGGACCAGGTTGTGT
sus-GAPDH-R	AGGAAATGAGCTTGACGAAGTG
FMDV-qF	ACTGGGTTTTACAAACCTGTGA
FMDV-qR	GCGAGTCCTGCCACGGA
FMDV-Prob	FAM-TCCTTTGCACGCCGTGGGAC-TAMRA
PB-CF	TTAACCTAGAAAGATAATCATATTGTGACGTACG
PB CR	GATAATCCTGGATGGCGGTCT

斜体字母代表同源臂序列, 下划线字母代表HA标签序列。

The italicized letters represent the homologous arm sequences, and the underlined letters represent the HA tag sequences.

IgG 二抗(1:5 000 稀释), 室温孵育 1 h。使用 ECL 化学发光底物进行显色, 通过全自动化学发光成像系统采集和分析图像。

1.5 细胞转染与单克隆细胞的筛选鉴定

1.5.1 细胞转染

将 PK15 细胞接种于 6 孔板, 待生长密度达到 70% 时, 根据 jetPRIME 转染试剂操作说明书进行质粒转染。实验组: 共转染 3 μg POP 表达质粒和 1 μg pPBT 质粒; 对照组: 共转染 3 μg PiggyBac-EF1 α -GFP-puro 质粒和 1 μg pPBT 质粒。转染后 6 h 更换新鲜培养基, 于 37 $^{\circ}\text{C}$ 、5% CO_2 培养箱中继续培养 24 h 后, 使用荧光显微镜观察对照组细胞的 GFP 荧光表达情况, 以评估转染效率。

1.5.2 单克隆细胞的筛选

转染 24 h 后, 将 PK15 细胞按 1:3 的比例传代至 6 孔板, 在培养基中加入浓度为 5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的嘌呤霉素进行筛选, 置于 37 $^{\circ}\text{C}$ 、5% CO_2 培养箱中继续培养。每 3 d 更换抗性筛选培养基, 持续观察细胞状态, 待阴性对照细胞完全死亡时终止筛选, 更换为完全培养基。待细胞状态恢复正常后, 用 0.25% 胰酶消化细胞, 采用有限稀释法将细胞稀释至 10 个/mL, 将每孔 100 μL 细胞悬液接种于 96 孔板中, 置于 37 $^{\circ}\text{C}$ 、5% CO_2 培养箱中培养 2 周后挑选生长状态良好的单克隆细胞进行扩大培养并传代保存。

1.5.3 单克隆细胞的鉴定

取筛选的 4 株单克隆细胞和对照细胞, 分别用 Western blotting、RT-qPCR 和 RT-PCR 方法鉴定蛋白表达、基因水平和目标基因整合情况。

1.6 细胞系的生长活力检测

将上述筛选获得的 POP-PK15 细胞系、对照细胞系 GFP-PK15 和亲本细胞 WT-PK15 用 0.25% 胰酶消化后计数, 调整细胞密度至 2×10^5 个/mL, 每孔 100 μL 接种至 96 孔板, 置于 37 $^{\circ}\text{C}$ 、5% CO_2 培养箱中培养。于不同时间点(0、12、24、36、48 h)在板孔中加入 CCK-8 试剂 10 $\mu\text{L}/\text{孔}$,

继续在 37 $^{\circ}\text{C}$ 、5% CO_2 培养箱中避光孵育 2 h 后, 使用酶标仪测定每孔的 OD_{450} , 计算细胞相对活性, 如公式(1)所示。每个时间点设置 3 个复孔, 实验重复 3 次。

$$\text{细胞相对活性} = \frac{(\text{实验组 } OD_{450} \text{ 值} - \text{空白组 } OD_{450} \text{ 值})}{(\text{对照组 } OD_{450} \text{ 值} - \text{空白组 } OD_{450} \text{ 值})} \times 100\% \quad (1)$$

1.7 单克隆细胞系的传代稳定性分析

将 POP-PK15 细胞系和对照细胞系 GFP-PK15 进行连续传代培养, 分别收取第 1、5、10、15、20、25、30 代次(P1-P30)的细胞样品, 每次待细胞密度达到 80%–90% 时进行样品采集。采用 Western blotting 方法检测收集的细胞样品中的 POP 蛋白表达情况。具体方法参考 1.4 节, 以 β -actin 作为内参, 计算 POP 蛋白的相对表达量, 比较不同代次细胞中 POP 蛋白的表达水平, 评估细胞系的遗传稳定性。

1.8 单克隆细胞系对 FMDV 增殖的影响

分别将 POP-PK15 细胞系和对照细胞系 GFP-PK15 铺于 12 孔板中, 待细胞密度长至 70%, 将 FMDV 以病毒感染复数(multiplicity of infection, MOI)为 1.0 的滴度接种细胞, 轻轻混匀后继续培养。12 h 后收取 2 份细胞样品及细胞上清液。其中一份细胞样品用于 Western blotting 检测 FMDV VP1 蛋白水平, 具体方法参考 1.4 节。另一份细胞样品用于 RT-qPCR, 检测 FMDV mRNA 转录水平变化。提取病毒 RNA, 利用一步法荧光定量 PCR 对 FMDV 的病毒拷贝数进行定量。反应体系: 2 \times One Step RT-PCR Buffer III 10 μL , TaKaRa *Ex Taq* HS 0.4 μL , PrimeScript RT Enzyme Mix II 0.4 μL , 上、下游引物(10 $\mu\text{mol}/\text{L}$)各 0.4 μL , 探针(10 $\mu\text{mol}/\text{L}$) 0.8 μL , Viral RNA 2 μL , RNase free H_2O 补充至总体积 20 μL , 混匀。PCR 反应条件: 42 $^{\circ}\text{C}$ 逆转录 5 min, 95 $^{\circ}\text{C}$ 预变性 10 s; 95 $^{\circ}\text{C}$ 变性 5 s, 60 $^{\circ}\text{C}$ 退火 20 s, 72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 30 s, 共 40 个循环。所有

样品设置 3 个重复, 根据扩增的 C_T 值计算病毒拷贝数。

1.9 病毒 TCID₅₀ 的测定

收集病毒感染后 12 h 的细胞上清, 将 BHK-21 细胞铺于 96 孔板中, 用无血清 DMEM 培养基将病毒上清 10 倍连续稀释(1×10^{-1} – 1×10^{-10}), 每个稀释度样品重复 8 孔, 同时设置正常细胞对照组(NC)。感染后 48 h 观察并记录出现细胞病变效应(cytopathic effect, CPE)的孔数, 根据 Reed-Muench 法计算 TCID₅₀, 每个试验重复 3 次, 取其平均值。

1.10 间接免疫荧光试验

将生长状况良好的 POP-PK15 和 WT-PK15 细胞铺于共聚焦专用培养皿, 待细胞密度长至 60% 时接种 FMDV (MOI=0.1); 置于 37 °C、5% CO₂ 培养箱中培养 12 h, 弃病毒液并用预冷的 1×PBS 洗细胞 3 次, 每次 5 min; 加入 4% 多聚甲醛固定细胞, 室温固定 10 min; 用 PBS 洗细胞 3 次, 每次 5 min; 使用抗体稀释液稀释一抗 (1:300), 4 °C 孵育过夜; 用 PBS 清洗细胞 3 次, 每次 5 min; 用 PBS 稀释相应的荧光标记二抗 (1:1 000), 在避光条件下室温孵育 1 h; 用 PBS 洗细胞 3 次, 每次 5 min; 加入 DAPI 染料对细胞核进行染色, 室温孵育 10 min; 用 PBS 清洗细胞 3 次, 每次 5 min; 使用激光共聚焦显微镜进行观察并采集图像。

1.11 不同 MOI 的 FMDV 感染 POP-PK15 细胞对病毒增殖的影响

将 POP-PK15 细胞和对照细胞分别接种到 12 孔板, 待细胞密度达到 70% 时分别以不同 MOI (0、0.1、1.0、2.0) 的 FMDV 感染 2 种细胞。感染后 12 h 收取 2 份细胞样品及细胞上清液, 通过 Western blotting、RT-qPCR 以及 TCID₅₀ 评估不同 MOI 的 FMDV 感染 POP-PK15 细胞系对病毒增殖的影响。具体方法参考 1.4、1.8 和 1.9 节。

1.12 不同时间点 FMDV 感染 POP-PK15 细胞系对 FMDV 增殖的影响

将 POP-PK15 细胞和对照细胞分别铺于 35 mm 培养皿中。待细胞长满后以 MOI=0.1 接种 FMDV, 分别于 0–24 h 不同时间点收取 2 份细胞样品及细胞上清液。通过 Western blotting、RT-qPCR 以及 TCID₅₀ 评估不同时间点对病毒增殖的影响。具体方法参考 1.4、1.8 和 1.9 节。

1.13 不同传代次数的 POP-PK15 细胞系对 FMDV 增殖的影响

分别将对照细胞和 POP-PK15 细胞系在 37 °C、5% CO₂ 培养箱中培养至所需代次。选取第 10、20、30 代细胞, 将其接种到 6 孔板中, 以 MOI=0.1 接种 FMDV, 在感染后 12 h 收取 2 份细胞样品及细胞上清液, 通过 Western blotting、RT-qPCR 以及 TCID₅₀ 评估不同代次的 POP-PK15 细胞系对病毒增殖的影响。具体方法参考 1.4、1.8 和 1.9 节。

1.14 数据处理

本研究所有试验均重复 3 次, 应用 GraphPad Prism 8.0 软件进行统计分析, 采用 Student's *t* 检验和 one-way ANOVA 方差分析。统计学显著性差异表示为: ns ($P>0.05$) 表示无统计学差异性, * $P<0.05$ 表示数据具有统计学显著性差异, ** $P<0.01$ 表示数据具有高度统计学显著性差异, *** $P<0.001$ 表示数据具有极显著统计学差异。

2 结果与分析

2.1 重组表达质粒的鉴定

对 POP 蛋白重组表达质粒进行 *EcoR* I 和 *Bam* H I 双酶切鉴定。琼脂糖凝胶电泳分析结果显示 2 条明显的 DNA 条带, 分别为 6 600 bp 的载体片段和 2 500 bp 的 *POP* 基因片段(图 1), 与预期的基因片段大小相符; 同时基因测序结果也证明 PB-EF1 α -HA-POP-puro 质粒构建成功。

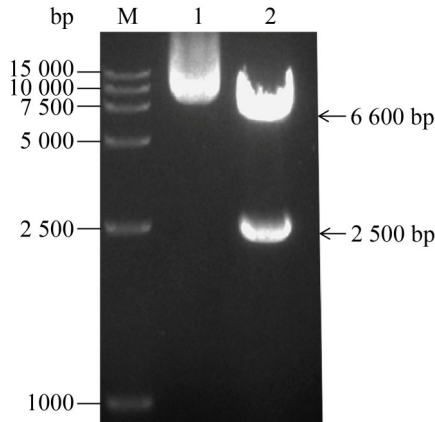


图1 重组质粒的双酶切鉴定

Figure 1 Identification of the recombinant plasmid through double restriction enzyme digestion. Lane M: DL15000 DNA marker; Lane 1: Undigested recombinant plasmid; Lane 2: Digested recombinant plasmid.

2.2 重组表达质粒转染细胞的蛋白表达鉴定

Western blotting 和蛋白条带灰度分析结果显示, POP 蛋白表达质粒转染细胞后能够成功表达 POP 蛋白, 且蛋白质分子量符合预期(图 2A、2B)。这表明本研究构建的 POP 真核表达质粒转染 PK15 细胞可以成功表达目标蛋白。

2.3 稳定细胞系的筛选和鉴定

Western blotting 结果显示, 筛选出的 4 株单克隆细胞均能表达 POP 蛋白(图 3A); POP mRNA 水平显著高于野生型对照细胞(图 3B); RT-PCR 特异性扩增条带表明 POP 基因已稳定整合到细胞基因组中(图 3C); 荧光显微镜观察显示, 对照细胞系 GFP-PK15 细胞内有明显的绿色荧光蛋白表达(图 3D)。上述结果表明目的基因已稳定整合, 且细胞内目标蛋白表达明显。

2.4 细胞活力检测

CCK-8 检测结果显示, 筛选的 POP 单克隆细胞系在各时间点的细胞活力与对照细胞相比无显著差异(图 4)。这表明 PK15 细胞稳定表达

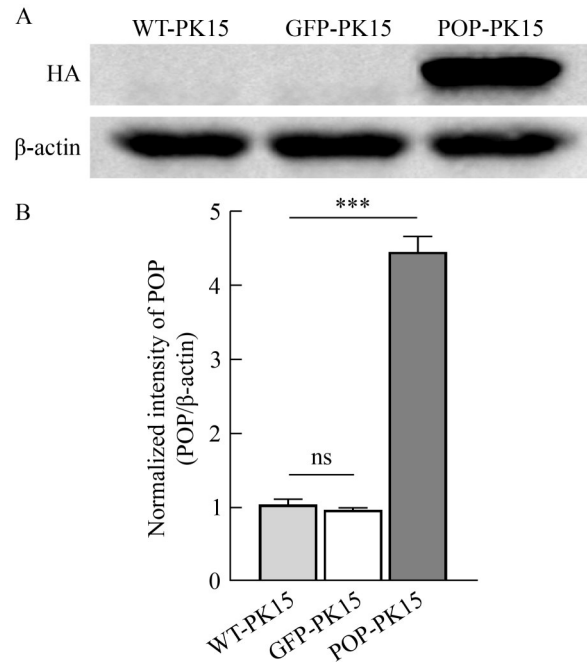


图2 鉴定POP蛋白在PK15细胞中的表达

Figure 2 Identification of the POP protein expression in PK15 cells. A: Analysis of POP protein expression in post-transfected PK15 cells by Western blotting; B: Quantification of POP protein level normalized to β -actin. ns: $P > 0.05$; ***: $P < 0.001$.

POP 蛋白对细胞增殖无影响。

2.5 POP-PK15 细胞系的传代稳定性鉴定

将 POP-PK15 细胞系和 GFP-PK15 细胞系连续传代培养至 30 代(P30), 分别在特定代次收集细胞样品。Western blotting 和蛋白表达灰度分析结果显示, 稳定细胞系在传代后 POP 蛋白表达水平未发生明显变化(图 5A、5B), 表明该细胞系可以稳定表达 POP 蛋白。

2.6 POP-PK15 细胞系对 FMDV 增殖的影响

Western blotting 及蛋白表达灰度分析结果表明, POP-PK15 细胞接种 FMDV 后 FMDV VP1 蛋白表达水平显著高于对照组(图 6A)。病毒滴度测定结果显示, 与对照组细胞相比,

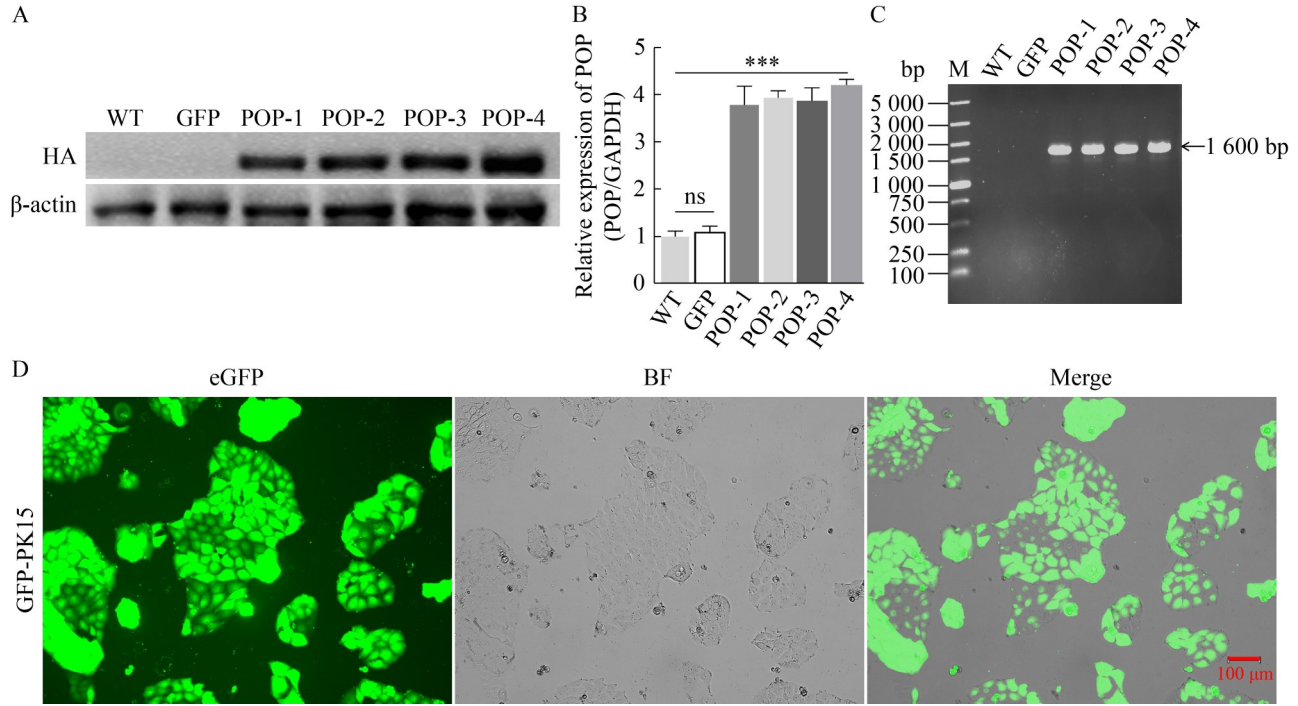


图3 稳定表达POP蛋白的POP-PK15细胞克隆的鉴定

Figure 3 Identification of the POP-PK15 cell clones stably expressing POP protein. A: Analysis of POP protein expression in the screened monoclonal cell lines by Western blotting; B: Quantification of the *POP* mRNA levels in the screened monoclonal cell lines by RT-qPCR (ns: $P>0.05$; ***: $P<0.001$); C: Identification of *POP* gene in the screened monoclonal cell lines by RT-PCR (Lane M: DL5000 DNA marker); D: Detection of eGFP expression in GFP-PK15 cells using fluorescence microscope.

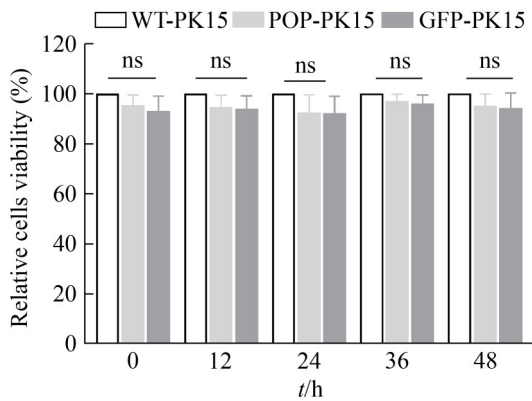


图4 检测POP-PK15细胞系的细胞活力

Figure 4 The cell viability of POP-PK15 cell line was detected by CCK-8 assay. ns: $P>0.05$.

POP-PK15 细胞中 FMDV 的滴度显著升高(图 6B)。同时, FMDV mRNA 水平显著高于对照组(图 6C)。

此外, 间接免疫荧光试验结果也显示, POP-PK15 细胞中 FMDV 的感染细胞数量明显多于 WT-PK15 对照组细胞(图 6D)。结果表明, POP-PK15 细胞系能够显著促进 FMDV 的增殖。

2.7 FMDV 接种 POP-PK15 细胞系后不同时间的增殖情况

Western blotting 及蛋白表达灰度分析结果表明, 病毒感染后 FMDV VP1 蛋白表达水平从 10 h 开始显著升高(图 7A、7B)。病毒滴度测定结果显示, POP-PK15 细胞中 FMDV 的滴度在 8-24 h 均显著高于对照细胞(图 7C)。RT-qPCR 结果显示, POP-PK15 细胞中 FMDV mRNA 水平从接种后 8 h 开始显著升高(图 7D)。上述结果表明 POP-PK15 细胞系可以显著促进 FMDV 的增殖。

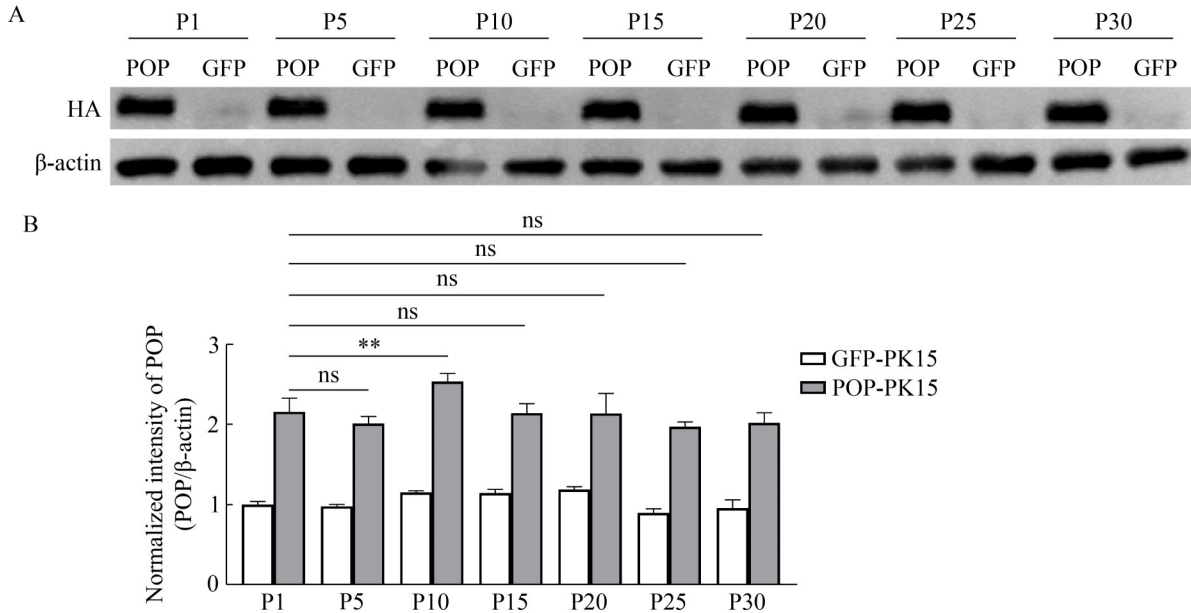


图5 POP-PK15细胞系的传代稳定性分析

Figure 5 Analysis of passage stability of POP-PK15 cell line. A: Detection of POP protein expression in the POP-PK15 cell lines at specific passages by Western blotting; B: Quantification of POP protein level normalized to β -actin. ns: $P > 0.05$; **: $P < 0.01$.

2.8 不同MOI的FMDV接种POP-PK15细胞系对病毒增殖的影响

Western blotting 和蛋白表达灰度分析结果表明, 不同MOI的FMDV接种POP-PK15细胞后FMDV VP1蛋白表达水平均显著高于对照组(图8A)。病毒滴度测定结果显示, POP-PK15细胞中的FMDV的滴度均显著高于对照细胞(图8B)。此外, RT-qPCR结果也表明, 与对照细胞相比, POP-PK15细胞系中FMDV mRNA水平显著升高(图8C)。上述结果表明POP-PK15细胞在接种不同MOI的FMDV后可以显著促进FMDV的增殖。

2.9 不同代次的POP-PK15细胞系对FMDV增殖的影响

Western blotting 及蛋白表达灰度分析结果表明, 分别接种P10、P20、P30代次的POP-PK15细胞系中FMDV VP1蛋白表达水平均显著高于GFP-PK15细胞(图9A、9B); 病毒滴度测定结

果也显示, POP-PK15细胞中FMDV滴度均显著高于对照细胞(图9C); 同时, POP-PK15细胞中FMDV mRNA水平也显著高于对照细胞(图9D)。

3 讨论

在病毒感染周期中宿主蛋白通过多种分子机制参与并调控病毒复制的各个环节。大量研究证实, 多种宿主蛋白在病毒识别、细胞入侵、基因组转录、蛋白翻译、病毒组装以及子代病毒释放等过程中发挥着重要的调控作用^[9,18]。FMDV结构蛋白VP3与宿主组蛋白去乙酰化酶8(histone deacetylase 8, HDAC8)发挥特异性相互作用, 显著促进病毒复制^[19]; 在登革热病毒研究中宿主蛋白酰基辅酶A硫酯酶2(acyl-CoA thioesterase 2, ACOT2)被证实参与病毒多聚蛋白加工过程, 为抗病毒药物研发提供了新的分子靶点^[20]。此外, FMDV结构蛋白VP1与宿主核

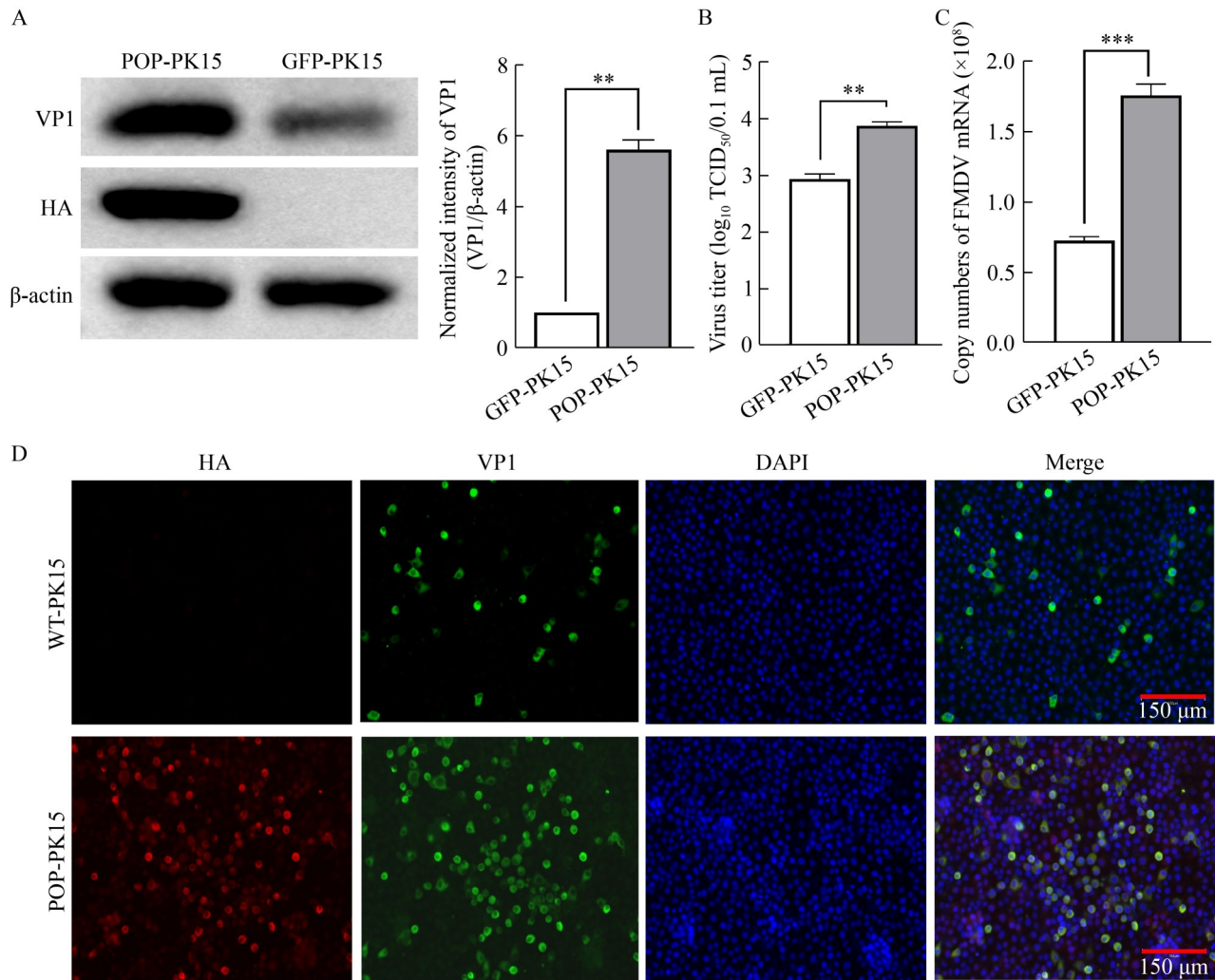


图6 FMDV在POP-PK15细胞系中增殖的分析

Figure 6 Analysis of FMDV proliferation in POP-PK15 cell lines. A: Detection of FMDV VP1 protein expression by Western blotting (**: $P < 0.01$); B: Detection of viral titers by TCID₅₀ assays in FMDV-infected POP-PK15 cells and GFP-PK15 cells (**: $P < 0.01$); C: Quantification of FMDV mRNA levels in FMDV-infected POP-PK15 cells and GFP-PK15 cells by RT-qPCR (***: $P < 0.001$); D: Immunofluorescence detection of FMDV-infected foci in POP-PK15 cell and WT-PK15 cells monolayers.

糖体蛋白 SA (ribosomal protein SA, RPSA) 的相互作用可通过双重机制促进病毒复制：一方面抑制 RPSA 的生理功能，另一方面维持丝裂原活化蛋白激酶 (mitogen-activated protein kinase, MAPK) 信号通路的持续激活^[21]。

近年来，通过构建稳定表达特定宿主蛋白的细胞系来增强病毒感染效率的研究策略取得了诸多进展。以丙型肝炎病毒 (hepatitis C virus,

HCV) 为例，研究人员成功构建了稳定表达 HCV 受体 CD81 和 SR-B1 的细胞系，显著提高了 HCV 的感染效率和复制能力^[22]。PiggyBac 转座子系统的应用为快速构建稳定表达特定基因的细胞株提供了高效解决方案。该系统不仅简化了实验操作、降低了研究成本，而且具有独特的优势：既可实现单个基因的转移和表达，又能完成多个基因的共表达，在基因组合调控研

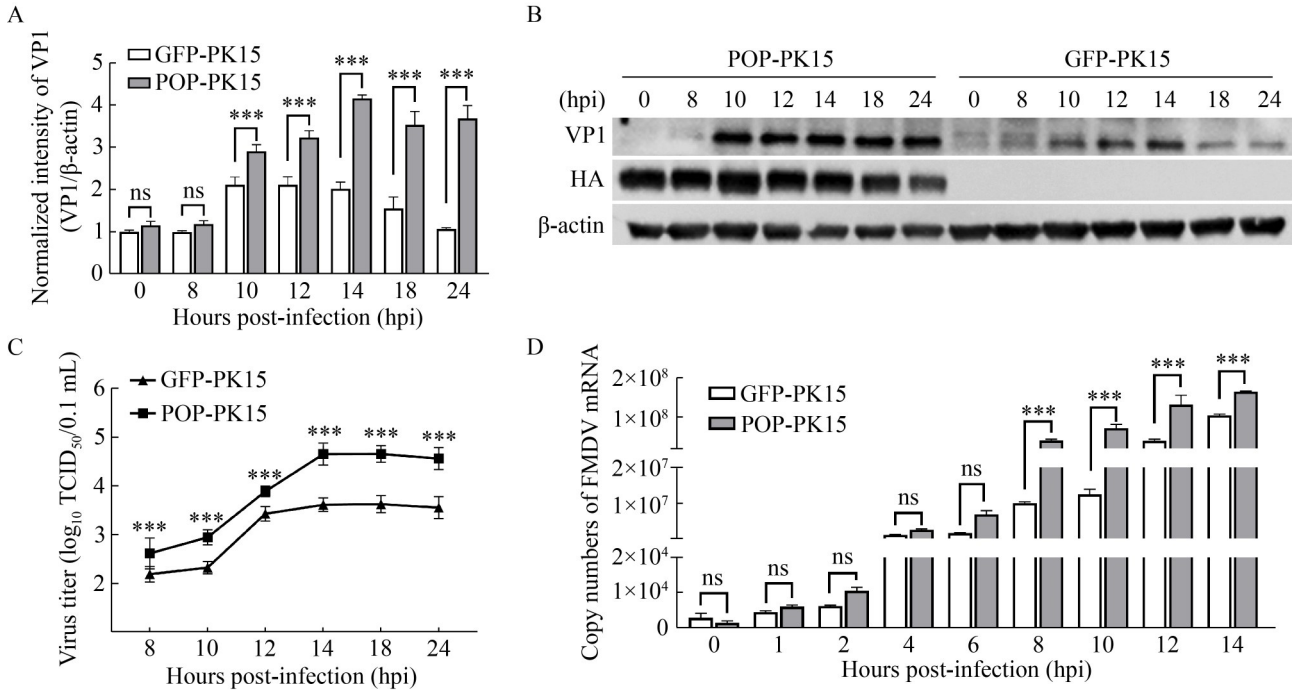


图7 FMDV接种POP-PK15细胞后不同时间点病毒增殖情况

Figure 7 Viral proliferation at different time points after FMDV inoculated POP-PK15 cells. A: Quantification of VP1 protein levels normalized to β -actin (ns: $P>0.05$; ***: $P<0.001$); B: Analysis of FMDV VP1 protein expression in POP-PK15 cells and GFP-PK15 cells by Western blotting; C: Detection of viral titers by TCID₅₀ assays in FMDV-infected POP-PK15 cells and GFP-PK15 cells (***: $P<0.001$); D: Quantification of FMDV mRNA levels in FMDV-infected POP-PK15 cells and GFP-PK15 cells by RT-qPCR (ns: $P>0.05$; ***: $P<0.001$).

究和药物开发等领域展现出广阔的应用前景^[15,23]。赵晓彤等^[24]利用 PiggyBac 转座子技术成功构建了 UL19 过表达的小鼠乳腺癌细胞模型，为深入研究 VP5 蛋白诱导免疫细胞发挥抗肿瘤活性的分子机制提供了理想的实验平台。综上所述，稳定表达特定宿主蛋白的细胞系不仅在病毒-宿主相互作用研究中具有重要价值，而且为抗病毒药物研发和病毒致病机制研究提供了强有力的技术支撑，展现出广阔的应用前景。

POP 作为一种多功能蛋白酶具有酶促活性和非酶活性，参与了许多生物学过程，在细胞生长和分化、炎症以及某些神经退行性和神经精神疾病的发展中发挥了作用。Jiang 等^[25]的研究发现炎症损伤后小鼠大脑中的 POP 水平显著

升高，而 POP 基因敲除小鼠对高脂饮食诱导的炎症反应明显减弱，这揭示了 POP 在神经系统疾病中的潜在作用。此外，在生命早期 POP 水平的上调可能与其参与多种细胞的增殖和分化过程有关，包括肝细胞、卵巢细胞、睾丸细胞及神经元^[11,26-27]。本课题组前期通过猪全基因组筛选鉴定出多个与 FMDV 感染相关的候选基因，前期研究证实猪 POP 蛋白与 FMDV 复制过程密切相关^[14]。基于此，本研究利用 PiggyBac 转座子系统成功构建了稳定表达 POP 基因的 PK15 细胞系。研究表明 POP 蛋白的过表达对细胞活力无显著影响($P>0.05$)，进一步研究发现与对照细胞相比，POP 过表达细胞系可显著促进 FMDV 的增殖($P<0.05$)，且该促进效应在细胞系传代过程中保持稳定。这一发现不仅为阐明

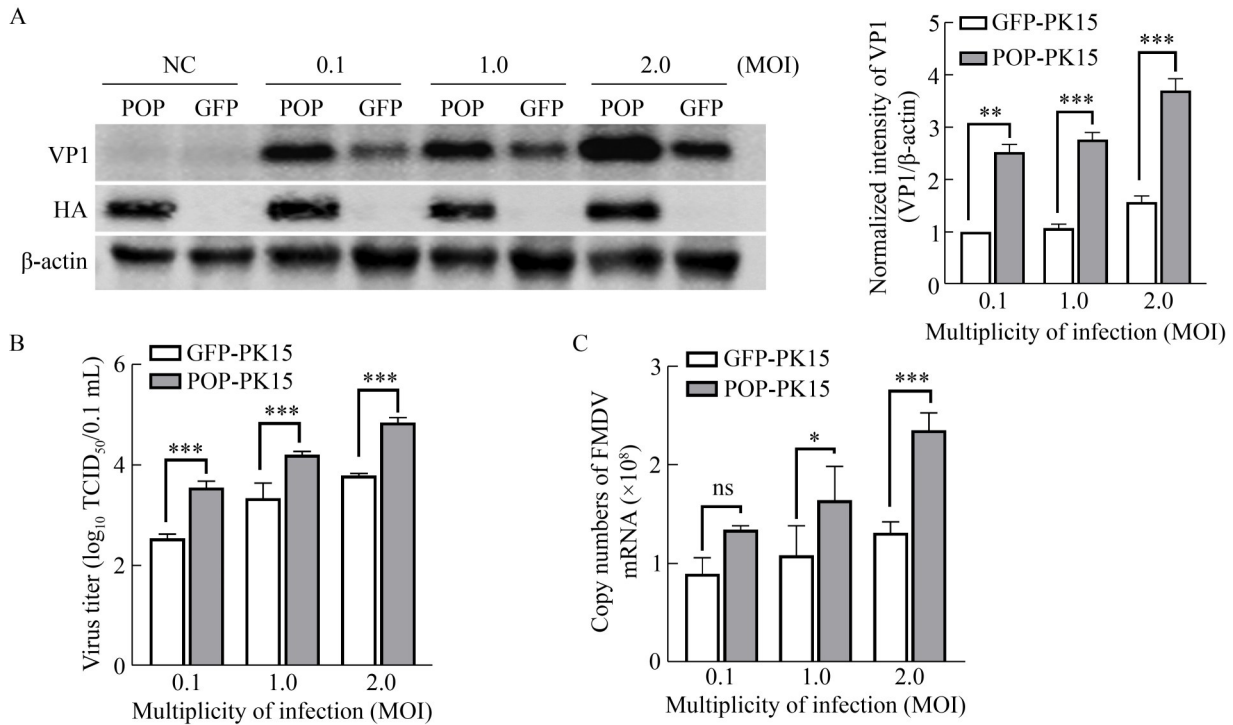


图8 不同MOI的FMDV接种POP-PK15细胞系对病毒增殖的影响

Figure 8 Impact of FMDV proliferation at different MOIs in FMDV-inoculated POP-PK15 cell lines. A: Detection of FMDV VP1 protein expression in FMDV-infected POP-PK15 cell lines at varying MOIs by Western blotting; B: Detection of viral titers in FMDV-infected POP-PK15 cell lines at varying MOIs by TCID₅₀ assays; C: Quantification of FMDV mRNA levels in FMDV-infected POP-PK15 cell lines at varying MOIs by RT-qPCR. ns: $P > 0.05$; *: $P < 0.05$; **: $P < 0.01$; ***: $P < 0.001$.

FMDV 与宿主相互作用的分子机制提供了新的线索，也为开发靶向宿主因子的抗病毒策略奠定了重要的实验基础。

本研究揭示了猪 POP 蛋白在促进 FMDV 增殖中的重要作用，这一发现拓展了对宿主因子与 FMDV 相互作用的认识。然而，POP 调控 FMDV 增殖的具体分子机制仍有待阐明。基于现有研究推测 POP 可能通过多种分子途径影响 FMDV 的复制过程：(1) 直接参与调控病毒生命周期的关键阶段；(2) 通过调节细胞内信号转导通路创造有利于病毒复制的微环境；(3) 可能影响宿主细胞的抗病毒免疫应答。值得注意的是，目前的研究仅限于体外细胞水平，尚缺乏体内实验数据的支持。因此，后续研究将着重构建

POP 基因敲除的动物模型和 POP 特异性小分子抑制剂的体内试验，从活体水平验证 POP 对 FMDV 感染的影响，探索 POP 作为潜在抗病毒靶点的可行性。这些研究将为进一步阐明 FMDV-宿主相互作用的分子机制提供新的视角，同时也为开发基于宿主因子的抗病毒策略奠定理论基础。

4 结论

本研究成功构建了稳定表达猪 POP 蛋白的 POP-PK15 细胞系，该细胞系具有良好的传代稳定性，并可以显著促进 FMDV 的增殖。本研究结果为进一步深入探究 POP 蛋白促进 FMDV 增殖的分子机制提供了可靠的细胞模型，对宿主

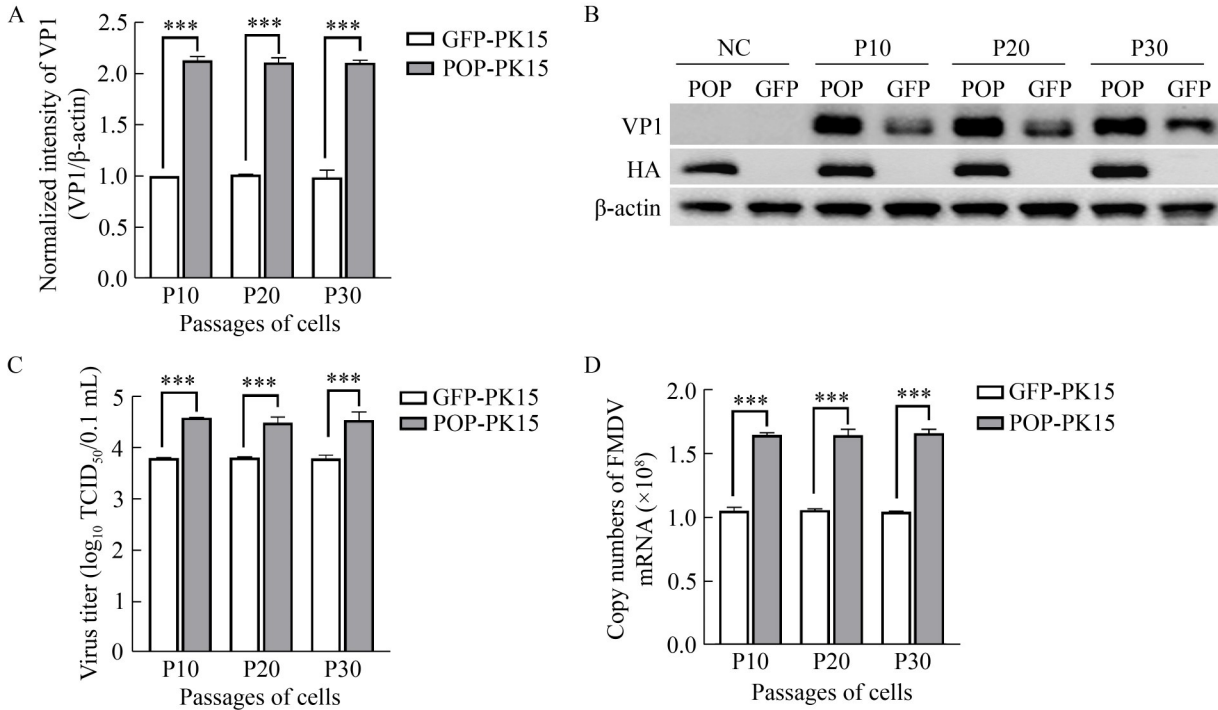


图9 不同代次的POP-PK15细胞系对FMDV增殖的影响

Figure 9 Impact of FMDV proliferation in POP-PK15 cell lines at different passages. A: Quantification of VP1 protein levels normalized to β -actin (***: $P < 0.001$); B: Detection of FMDV VP1 protein expression by Western blotting in FMDV-infected POP-PK15 cell lines at different passages; C: Detection of viral titers in FMDV-infected POP-PK15 cell lines at different passages (***: $P < 0.001$); D: Quantification of FMDV mRNA levels in FMDV-infected POP-PK15 cell lines at different passages by RT-qPCR (***: $P < 0.001$).

蛋白调控小RNA病毒复制的研究具有重要的参考价值。

致谢

感谢中国农业科学院兰州兽医研究所中心仪器室龚真莉老师和刘艳红老师等在仪器使用和实验平台方面给予的帮助和支持。

作者贡献声明

王姿逸：实验操作、核心数据分析和初稿写作；茹毅：提出概念；卢炳州：实验技术指导；杨洋：数据收集与监管；赵陇和：部分数据收集与分析；李亚军：软件程序；李建斌：数据收集；李明桂：数据分析；马坤：提供资源；冷非凡：稿件编辑和审阅；郝荣增：获取

基金、终稿修订；郑海学：监督指导。

作者利益冲突公开声明

作者声明不存在任何可能会影响本文所报告工作的已知经济利益或个人关系。

参考文献

- [1] 刘湘涛, 张强, 郭建宏. 口蹄疫[M]. 北京: 中国农业出版社, 2015.
LIU XT, ZHANG Q, GUO JH. Foot and Mouth Disease[M]. Beijing: China Agriculture Press, 2015 (in Chinese).
- [2] JAMAL SM, BELSHAM GJ. Foot-and-mouth disease: past, present and future[J]. *Veterinary Research*, 2013, 44(1): 116.
- [3] ALEXANDERSEN S, KITCHING RP, MANSLEY LM, DONALDSON AI. Clinical and laboratory investigations of five outbreaks of foot-and-mouth disease during the 2001 epidemic in the United Kingdom[J]. *Veterinary*

- Record, 2003, 152(16): 489-496.
- [4] PERRY BD, RICH KM. Poverty impacts of foot-and-mouth disease and the poverty reduction implications of its control[J]. *Veterinary Record*, 2007, 160(7): 238-241.
- [5] KNIGHT-JONES TJD, RUSHTON J. The economic impacts of foot and mouth disease-what are they, how big are they and where do they occur? [J]. *Preventive Veterinary Medicine*, 2013, 112(3/4): 161-173.
- [6] Woah. Foot and mouth disease[Z/OL]. 2024: <https://www.woah.org/en/disease/foot-and-mouth-disease/>.
- [7] LOGAN G, NEWMAN J, WRIGHT CF, LASECKA-DYKES L, HAYDON DT, COTTAM EM, TUTHILL TJ. Deep sequencing of foot-and-mouth disease virus reveals RNA sequences involved in genome packaging[J]. *Journal of Virology*, 2017, 92(1): e01159-17.
- [8] DOMINGO E, ESCARMÍS C, BARANOWSKI E, RUIZ-JARABO CM, CARRILLO E, NÚÑEZ JI, SOBRINO F. Evolution of foot-and-mouth disease virus[J]. *Virus Research*, 2003, 91(1): 47-63.
- [9] LI KL, WANG CC, YANG F, CAO WJ, ZHU ZX, ZHENG HX. Virus-host interactions in foot-and-mouth disease virus infection[J]. *Frontiers in Immunology*, 2021, 12: 571509.
- [10] WALTER R, SHLANK H, GLASS JD, SCHWARTZ IL, KERENYI TD. Leucylglycinamide released from oxytocin by human uterine enzyme[J]. *Science*, 1971, 173(3999): 827-829.
- [11] TARASZKIEWICZ A, SINKIEWICZ I, SOMMER A, STAROSZCZYK H. The biological role of prolyl oligopeptidase and the procognitive potential of its peptidic inhibitors from food proteins[J]. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 2024, 64(19): 6567-6580.
- [12] REA DA, HAZELL C, ANDREWS NW, MORTY RE, FÜLÖP V. Expression, purification and preliminary crystallographic analysis of oligopeptidase B from *Trypanosoma brucei*[J]. *Acta Crystallographica Section F, Structural Biology and Crystallization Communications*, 2006, 62(Pt 8): 808-810.
- [13] FÜLÖP V, BÖCSKEI Z, POLGÁR L. Prolyl oligopeptidase: an unusual beta-propeller domain regulates proteolysis[J]. *Cell*, 1998, 94(2): 161-170.
- [14] 王姿逸, 郝荣增, 茹毅, 卢炳州, 杨洋, 赵隲和, 李亚军, 马坤, 冷非凡, 郑海学. 脯氨酰寡肽酶在口蹄疫病毒复制中的功能分析[J/OL]. *生物工程学报*, 2025: 1-21. (2025-03-27). <https://link.cnki.net/doi/10.13345/j.cjb.240943>.
- [15] WANG ZY, HAO RZ, RU Y, LU BZ, YANG Y, ZHAO LH, LI YJ, MA K, LENG FF, ZHENG HX. Functional analysis of prolyl oligopeptidase (POP) in foot-and-mouth disease virus replication[J/OL]. *Chinese Journal of Biotechnology*, 2025: 1-21. (2025-03-27). <https://link.cnki.net/doi/10.13345/j.cjb.240943> (in Chinese).
- [16] ZHAO S, JIANG EZ, CHEN SS, GU Y, SHANGGUAN AJ, LV TF, LUO LG, YU ZH. PiggyBac transposon vectors: the tools of the human gene encoding[J]. *Translational Lung Cancer Research*, 2016, 5(1): 120-125.
- [17] FESCHOTTE C. The piggyBac transposon holds promise for human gene therapy[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2006, 103(41): 14981-14982.
- [18] MATASCI M, BALDI L, HACKER DL, WURM FM. The PiggyBac transposon enhances the frequency of CHO stable cell line generation and yields recombinant lines with superior productivity and stability[J]. *Biotechnology and Bioengineering*, 2011, 108(9): 2141-2150.
- [19] GRUBMAN MJ, BAXT B. Foot-and-mouth disease[J]. *Clinical Microbiology Reviews*, 2004, 17(2): 465-493.
- [20] ZHANG HJ, WANG XW, QU M, LI ZY, YIN XP, TANG LJ, LIU XT, SUN YF. Foot-and-mouth disease virus structural protein VP3 interacts with HDAC8 and promotes its autophagic degradation to facilitate viral replication[J]. *Autophagy*, 2023, 19(11): 2869-2883.
- [21] MA S, SHI S, XU BH, LIU MJ, XIE L, SU Y, LI JC, LIANG QQ, YE S, WANG YX. Host serine protease ACOT2 assists DENV proliferation by hydrolyzing viral polyproteins[J]. *mSystems*, 2024, 9(1): e0097323.
- [22] ZHU ZX, LI WW, ZHANG XL, WANG CC, GAO LL, YANG F, CAO WJ, LI KL, TIAN H, LIU XT, ZHANG KS, ZHENG HX. Foot-and-mouth disease virus capsid protein VP1 interacts with host ribosomal protein SA to maintain activation of the MAPK signal pathway and promote virus replication[J]. *Journal of Virology*, 2020, 94(3): e01350-19.
- [23] HASSAN N, GREVE B, ESPINOZA-SÁNCHEZ NA, GÖTTE M. Cell-surface heparan sulfate proteoglycans as multifunctional integrators of signaling in cancer[J]. *Cellular Signalling*, 2021, 77: 109822.
- [24] GU JC, SUMER H, CROMER B. Efficient generation of stable cell lines with inducible neuronal transgene expression using the piggyBac transposon system[J]. *Methods in Molecular Biology*, 2022, 2495: 49-66.
- [25] 赵晓彤, 王欣雅, 刘滨磊, 胡翰, 汪洋. 基于 PiggyBac 转座系统构建稳定表达 UL19 基因的小鼠乳腺癌细胞系 4T1[J]. *生物工程学报*, 2024, 40(11): 4138-4148.
- [26] ZHAO XT, WANG XY, LIU BL, HU H, WANG Y. Construction of a stable 4T1 cell line expressing UL19 by the PiggyBac transposon system[J]. *Chinese Journal of Biotechnology*, 2024, 40(11): 4138-4148 (in Chinese).
- [27] JIANG DX, ZHANG JB, LI MT, LIN SZ, WANG YQ, CHEN YW, FAN JG. Prolyl endopeptidase gene disruption attenuates high fat diet-induced nonalcoholic fatty liver disease in mice by improving hepatic steatosis and inflammation[J]. *Annals of Translational Medicine*, 2020, 8(5): 218.
- [28] AGIRREGOITIA N, BIZET P, AGIRREGOITIA E, BOUTELET I, PERALTA L, VAUDRY H, JÉGOU S. Prolyl endopeptidase mRNA expression in the central nervous system during rat development[J]. *Journal of Chemical Neuroanatomy*, 2010, 40(1): 53-62.
- [29] HANNULA MJ, MÄNNISTÖ PT, MYÖHÄNEN TT. Sequential expression, activity and nuclear localization of prolyl oligopeptidase protein in the developing rat brain[J]. *Developmental Neuroscience*, 2011, 33(1): 38-47.