

# 伪狂犬病病毒 Ea 株 TK<sup>-</sup>/gE<sup>-</sup>/gp63<sup>-</sup> 突变株 的构建及其生物学特性研究\*

刘正飞 陈焕春\*\* 何启盖 周复春 方六荣

(农业部农业微生物重点实验室 华中农业大学 武汉 430070)

关键词: 伪狂犬病病毒鄂 A 株, TK<sup>-</sup>/gE<sup>-</sup>/LacZ<sup>+</sup> 突变株, TK<sup>-</sup>/gE<sup>-</sup>/gp63<sup>-</sup> 突变株, 生物学特性  
中图分类号 S852.65 文献标识码: A 文章编号 0001-6209(2002)03-0370-05

伪狂犬病病毒(Pseudorabies Virus, PRV)属疱疹病毒科,具有在细胞培养物上快速生长、强烈的神经嗜性与潜伏感染性等特性。本病毒可感染多种家畜和野生动物,对养猪业的经济损失最大。伪狂犬病对养猪业的危害主要表现在(1)母猪流产,产死胎、木乃伊胎,临床以产死胎为主。(2)新生仔猪大量死亡,15日龄以内仔猪死亡率为100%。(3)断奶仔猪发病死亡,表现为拉稀,作划水样或转圈运动,口吐白沫、阵挛性痉挛及强性痉挛和搔痒等症状。(4)引起种猪不育。公猪发生睾丸肿胀、萎缩,失去种用能力。母猪表现为不发情、返情、屡配不孕等。(5)育肥猪表现为慢性呼吸道症状、增重迟缓、饲料报酬降低、推迟上市的时间,少数病例出现神经症状死亡情况。

PRV基因组为线状双链DNA分子,大小约150kb。整个基因组由独特长区UL,独特短区US及位于US两侧的末端重复序列TR和内部重复序列IR构成。PRV整个基因组至少含有70个基因,可编码70~100种蛋白质,其中毒力基因一直是PRV的研究热点之一。随着PRV分子生物学的深入开展,胸苷激酶TK、核糖核苷酸还原酶RR、蛋白激酶PK和蛋白丝氨酸-苏氨酸激酶S/T、碱性核糖核酸酶AN<sup>[1]</sup>、脱氧尿苷三磷酸激酶(dUTPase)<sup>[2]</sup>等酶类基因,gp63、gE、gC等糖蛋白基因均是PRV重要的毒力基因<sup>[3]</sup>。近年来研究也表明,其它基因如gM、UL21等也与PRV毒力有关<sup>[4]</sup>。gp63、gE可形成二价复合体<sup>[5]</sup>,二者的缺失可大大降低毒力。糖蛋白基因如gE、gG、gC缺失后,疫苗免疫猪不产生针对所缺失糖蛋白的抗体,结合ELISA和乳胶凝集试验(Latex Agglutination Test, LAT)<sup>[6]</sup>可区分疫苗免疫猪和野毒感染猪,从而淘汰野毒感染猪,世界许多国家正是比此原理制定伪狂犬病的根除计划,目前宣布根除伪狂犬病的国家有英国、芬兰、瑞典、捷克共和国等。在我国,2000年全国伪狂犬病普查结果表明,30%以上猪场有伪狂犬病感染发病,给养猪业造成巨大的损失。因此,制定我国的伪狂犬病根除计划已提上了日程,本研究以伪狂犬病地方分离株PRVEa株为材料构建的TK<sup>-</sup>缺失株,构建了PRVEa TK<sup>-</sup>/gE<sup>-</sup>/LacZ<sup>+</sup>突变株。在此基础上,又构建了PRVEa TK<sup>-</sup>/gE<sup>-</sup>/gp63<sup>-</sup>突变株,并通过运动试验对其生物学特性进行了研究。

## 1 材料和方法

### 1.1 试验材料

1.1.1 质粒、病毒、细胞、细菌:质粒pSPFZ、pSKFB、pUCPB4由本室构建,其中pSKFB为gE基因转移载体,pSPFZ为gE基因第366bp处被LacZ插入失活的pSKFB转移载体,pUCPB4为TK基因缺失205bp的转

\* 高等学校博士学科点专项科研基金资助项目和国家自然科学基金资助项目(39970559)

\*\* 通讯作者

作者简介:刘正飞(1973-),男,湖北谷城人,博士,主要从事病毒分子生物学研究。

收稿日期:2001-08-29,修回日期:2001-12-11

移载体。质粒 pMD18-T 购自 TaKaRa 公司, PRVEa 株由本室分离保存<sup>[7]</sup>, PRVEa TK<sup>-</sup> 由本室构建<sup>[8]</sup>, 猪肾传代细胞 PK-15 由本室保存。

**1.1.2 酶和其它化学试剂:** EcoRI、Stu I、BstE II、去磷酸化酶、T4DNA 连接酶、CIAP 购自 TaKaRa 公司, X-gal 购自武汉中健科技发展有限公司, 脂质体转染试剂盒购自 Gibco BRL 公司, DNA 回收试剂盒购自上海 Sangon 公司。

**1.1.3 试验动物** 5 周龄 Balb/C 小鼠购自武汉生物制品研究所。

**1.2 实验技术路线见图 1**

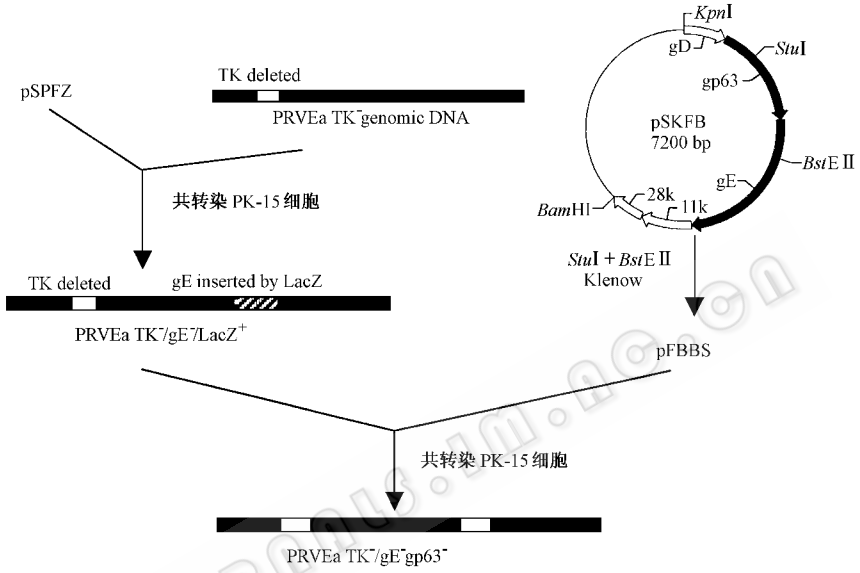


图 1 PRVEa TK<sup>-</sup>/gE<sup>-</sup>/LacZ<sup>+</sup> 突变株的构建

**1.3 试验方法**

**1.3.1 PCR 引物设计及合成:** TK<sup>-</sup> 和 LacZ 基因引物参考文献 [8], 根据文献根据 GenBank AF306511 和 AF171937 收录的 gE、gp63 序列设计 gE<sup>-</sup>/gp63<sup>-</sup> 引物

P1 5'-CTGCTACACCGAGTA-3';

P2 5'-TITGAATCTTACTACCACTCCAGCGT-3'。

**1.3.2 转移质粒 pFBBS 的构建:** 用 Stu I 和 BstE II 双酶切质粒 pSKFB 用去磷酸化 T<sub>4</sub> DNA 连接酶连接, 转化 E. coli DH5a 感受态细胞, 以质粒小量制备法提取质粒, -20℃ 贮存备用。

**1.3.3 重组病毒 PRVEa TK<sup>-</sup>/gE<sup>-</sup>/LacZ<sup>+</sup> 突变株的构建:** 用脂质体法将 PRVEa TK<sup>-</sup> 基因组与 pSPFZ 共转染 PK-15 细胞, 蓝斑筛选和空斑纯化参照文献 [9] 进行, 空斑纯化三次后, PCR 扩增 TK<sup>-</sup> 基因和 LacZ 基因, 提取重组病毒基因组, -20℃ 保存备用。

**1.3.4 重组病毒 PRVEa TK<sup>-</sup>/gE<sup>-</sup>/gp63<sup>-</sup> 突变株的构建:** 用 EcoRI 酶切 PRVEa TK<sup>-</sup>/gE<sup>-</sup>/LacZ<sup>+</sup> 基因组, 将酶切产物与质粒 pFBBS 共转染 PK-15 细胞, 空斑纯化三次后, PCR 扩增 gE<sup>-</sup>/gp63<sup>-</sup> 基因, 提取重组病毒基因组 -20℃ 保存。

**1.3.5 测序质粒的构建及序列分析:** 以 PRVEa TK<sup>-</sup>/gE<sup>-</sup>/gp63<sup>-</sup> 为模板, 扩增 gE<sup>-</sup>/gp63<sup>-</sup> 基因, PCR 产物用 DNA 回收试剂盒回收后, 用 T4DNA 连接酶接入 pMD18-T 载体, 提取重组质粒, 以双脱氧末端终止法测序。

**1.3.6 动物实验:** 用 PK-15 细胞测定 PRVEa TK<sup>-</sup>/gE<sup>-</sup>/gp63<sup>-</sup>, PRVEa TK<sup>-</sup>/gE<sup>-</sup>/LacZ<sup>+</sup>, PRVEa 的半数组织

细胞致死量(TCID<sub>50</sub>)并取 2 倍原液(200μL),原液(100μL),10 倍稀释(100μL),100 倍稀释(100μL)接种 Balb/C 小鼠,每组 6 只,逐日观察 2 周。Balb/C 小鼠分组如表 1,采用后肢足垫注射,接种病毒后观察 2 周。

表 1 Balb/C 小鼠接种试验

注射剂量	2 × <sup>a</sup>	1 × <sup>b</sup>	10 × <sup>c</sup>	100 × <sup>d</sup>
PRVEa TK <sup>-</sup> /gE <sup>-</sup> /gp63 <sup>-</sup>	6	6	6	6
PRVEa TK <sup>-</sup> /gE <sup>-</sup> /LacZ <sup>+</sup>	6	6	6	6
PRVEa	6	6	6	6

Note <sup>a</sup>.Inoculation with 200μL original virus solution <sup>b</sup>.Inoculation with 100μL original virus solution ;  
<sup>c</sup>.10 fold dilution of virus solution and inoculation with 100μL virus solution ;  
<sup>d</sup>.100 fold dilution of virus solution and inoculation with 100μL virus solution .

## 2 实验结果

### 2.1 重组质粒 pFBBS 的构建

用 *Stu* I 和 *Bst* E II 双酶切质粒 pSKFB,去掉大小约 1247bp 的片段;该质粒成为缺失部分 gE,部分 gp63 及二者中间区域共 1247bp 的 gE<sup>-</sup>/gp63<sup>-</sup> 转移质粒。

### 2.2 重组病毒 PRVEa TK<sup>-</sup>/gE<sup>-</sup>/LacZ<sup>+</sup> 的构建

将 PRVEa TK<sup>-</sup> 基因组与质粒 pSPFZ 共转染 PK-15 细胞,蓝斑筛选和空斑纯化,PCR 扩增出 TK<sup>-</sup>、LacZ 图略,这表明 LacZ 插入 PRVEa TK<sup>-</sup> 基因组中。

### 2.3 重组病毒 PRVEa TK<sup>-</sup>/gE<sup>-</sup>/LacZ<sup>+</sup> DNA 的鉴定

用 *Eco* R I 酶切 PRVEa TK<sup>-</sup>/gE<sup>-</sup>/LacZ<sup>+</sup> 基因组,并设未酶切的 PRVE 基因组作对照,在琼脂糖凝胶上电泳,图略。酶切后的基因组分为二部分,而未酶切的基因组仅一条带,进一步证实 LacZ 基因整合入 PRVEa 基因组中。

### 2.4 重组病毒 PRVEa TK<sup>-</sup>/gE<sup>-</sup>/gp63<sup>-</sup> 的构建

将 PRVEa TK<sup>-</sup>/gE<sup>-</sup>/LacZ<sup>+</sup> 基因组用 *Eco* R I 酶切后,与质粒 pFBBS 共转染 PK-15 细胞,空斑纯化三次后用 4 对引物分别扩增 TK<sup>-</sup>,LacZ,gE<sup>-</sup>/gp63<sup>-</sup>,gE,如图 2 从中可以扩出 TK<sup>-</sup> 基因 748bp 的片段和 gE<sup>-</sup>/gp63<sup>-</sup> 基因 500bp 的片段;不能扩出 gE 基因 804bp 的片段和 LacZ 基因 433bp 的片段,表明该毒株为 LacZ 已被置换掉,gE/gp63 已经缺失的突变株。

### 2.5 序列分析

将从 PRVEa TK<sup>-</sup>/gE<sup>-</sup>/gp63<sup>-</sup> PCR 扩增 gE<sup>-</sup>/gp63<sup>-</sup> 的产物连入 T 载体,重组质粒,双脱氧末端终止法测序,结果如图 3。将其与 GenBank AF306511 和 AF171937 收录的 gE、gp63 序列相比较,gE 和 gp63 基因及二者间隔序列共缺失了 1247bp。

PRVEa gp63 - gE :

### 2.6 突变株毒力试验

PRVEa TK<sup>-</sup>/gE<sup>-</sup>/gp63<sup>-</sup>,PRVEa TK<sup>-</sup>/gE<sup>-</sup>/LacZ<sup>+</sup>,PRVEa 的 (TCID<sub>50</sub>) 分别为 10<sup>-7.0</sup>、10<sup>-6.5</sup>、10<sup>-6.5</sup> 将 PRVEa TK<sup>-</sup>/gE<sup>-</sup>/gp63<sup>-</sup>,PRVEa TK<sup>-</sup>/gE<sup>-</sup>/LacZ<sup>+</sup> 接种四组小鼠,死亡情况见表 2。PRVEa

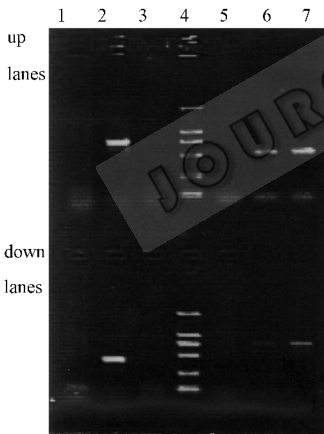


图 2 重组病毒 PRVEa TK<sup>-</sup>/gE<sup>-</sup>/gp63<sup>-</sup> 的构建

Up lanes :1,5. PK-15 cell control ;2. pSKFB ; 3, 6. PRVEa TK<sup>-</sup>/gE<sup>-</sup>/gp63<sup>-</sup> ; 7. pFBBS ;4. DL2000 DNA marker [ up to down ( bp ):2000 ,1000 ,750 ,500 ,250 ,100 ]. Down Lanes :1, 5. PK-15 cell control ;2. pSPFZ ;3,6. PRVEa TK<sup>-</sup>/gE<sup>-</sup>/gp63<sup>-</sup> ; 7. pUCPB4 ;4. DL2000 DNA marker .

```
GCACGTGCGCCGACGCGCGTCTCGTGCCCGGCGACGCGCCAACTGACGATAGACGGGACGCTGCTGTTTCTG
GAGGGGCCCTGCGCGAGCACTACAGCGGGCGGTGGAGCTGCTGCGCCTCGACCCCAAGCGCGCTGCTACACGC
GCGAGTACGCCGCGAGTACGACCTCTGCCCGCGGTGACCACGAGG-----
-----//-----
-----
-----GTGACCGTGTCCGAGGGCGCAACTTCACCTCGACGCGCGGGCGACGGCGCCGTGCTGGCC
GGGATCTGGACGTTCTCGCCGTCGCGGGCTGCGACGCCGTGTCGGTGACCACGGTGTGCTTCGAGACCGCGTGCC
ACCCGGACCTGGTGTGGCCGCGCCTGCGTCCCGAGGCCCGGAGATGGGCATCGGGGACTACCTGCCGCCGA
GGTGCCGCGGGTCCGCGCGAGCCGCCATCGTCACCCGGAGCGGTGGTCCGCGCACCTGAGCGTCTCGCGGGC
```

图 3 PRVEa 株 gp63 和 gE 缺失后剩余序列

-----//----- 为 gE<sup>-</sup>/gp63<sup>-</sup> 缺失碱基的区域

TK<sup>-</sup>/gE<sup>-</sup>/gp63<sup>-</sup>, PRVEa TK<sup>-</sup>/gE<sup>-</sup>/LacZ<sup>+</sup> 均没有死亡情况出现, 而 PRVEa 组全部死亡。这表明该突变株毒力大大下降。

### 3 讨论

表 2 接种病毒后 Balb/C 死亡情况

病毒	死亡鼠(死亡数/总数)			
	2 ×	1 ×	10 ×	100 ×
PRVEa TK <sup>-</sup> /gE <sup>-</sup> /gp63 <sup>-</sup>	0/6	0/6	0/6	0/6
PRVEa TK <sup>-</sup> /gE <sup>-</sup> /LacZ <sup>+</sup>	0/6	0/6	0/6	0/6
PRVEa	6/6	6/6	6/6	6/6

TK、gE、gp63 均是 PRV 重要的毒力基因, 人们将 TK 基因缺失, 获得第一代基因缺失疫苗。在此基础上, 缺失 gE、gp63 等基因, 获得第二代基因缺失疫苗。本文在 PRV Ea TK<sup>-</sup> 株 gE 基因中引入 LacZ 基因, 既可使 gE 基因插入失活, 又可以在该病毒基因组中引入

EcoR I 位点。用 EcoR I 酶切 PRVEa TK<sup>-</sup>/gE<sup>-</sup>/LacZ<sup>+</sup> 基因组, 再与质粒 pFBBS 共转染 PK-15 细胞, 从而获得 PRVEa TK<sup>-</sup>/gE<sup>-</sup>/gp63<sup>-</sup> 三基因缺失突变性。

由于 PRV 基因组庞大(150kb), 非必需基因和不编码区较多, 在这些区域引入其它病毒的基因如 HCV-E1、JEV-NS1、PPV-VP2、PRRSV-VP5 等, 构成二价基因工程疫苗, 疫苗接种猪可同时抵抗多种病原的侵袭<sup>[10]</sup>。因此, 开发 PRV 作为病毒载体已成为病毒学新的生长点, 本研究获得的 PRVEa TK<sup>-</sup>/gE<sup>-</sup>/LacZ<sup>+</sup> 正好适应这一趋势, TK、gE、gp63 均为病毒生长非必需基因, 在 LacZ 基因中的 EcoR I 位点, 十分方便外源基因整合入 PRV 基因组。

由于 LacZ 基因系菌源基因<sup>[11]</sup>, PRV 中引入 LacZ 对 PRV 本身的生物特性的影响及在临床上是否具有负作用, 还须深入观察。因此, 去除 LacZ 基因, 从根本上缺失 gE 和 gp63 基因, 是十分必要的。研究表明 TK 为 PRV 对病毒在中枢神经增殖是十分必要的, 在细胞上, TK 缺失的病毒与野毒一样能增殖良好。gp63、gE 致病机理为二者形成复合体, 侵入二级神经元。gp63 和 gE 缺失后, PRV 不能侵入二级神经<sup>[12]</sup>, 因此 gp63、gE 及 TK 缺失后 PRV 毒力大大降低, 这从 Balb/C 小鼠试验可以证实。目前我们正准备将该突变株接种兔、狗、猫、猪等动物, 进行安全性和保护力试验以期将之作为基因工程弱毒苗在临床上使用。

在 PRV 的各种糖蛋白中, gB、gC、gD 是 PRV 的主要免疫原, 诱导宿主产生中和抗体<sup>[13,14]</sup>。gB、gC、gD 缺失后, 尽管敏感性更高, 但 PRV 的免疫原降低; 而 gE、gp63 既非体液免疫主要靶蛋白又非细胞免疫的主要靶蛋白, 因而缺失 gE 和 gp63 不会降低疫苗的保护力<sup>[15,16]</sup>。由于 gE 系糖蛋白基因, gE 缺失疫苗免疫猪不产生针对 gE 的抗体, 结合 ELSIA 和 LAT 试验可将疫苗免疫猪和自然感染野毒株区分开。因此, PRVEa TK<sup>-</sup>/gE<sup>-</sup>/gp63<sup>-</sup> 的研制为伪狂犬病根除计划打下了基础。

## 参 考 文 献

- [ 1 ] Hsiang C Y ,Ho T Y ,Chang T J ,*et al.* *Gene* ,1996 ,**177** :109 ~ 113.
- [ 2 ] Jons A ,Gredts V Lange E ,Kaden V ,*et al.* *Vet Microbiol* ,1997 **56** :47 ~ 54.
- [ 3 ] Kritas S K ,Pensaerl M B ,Mettenleiter T C. *J Gen Virol* ,1994 **75** :2319 ~ 2327.
- [ 4 ] Nauwynck H J. *Vet Microbiol* ,1997 **55** :3 ~ 11.
- [ 5 ] Federico A ,Zuckermnn T C ,Christa S N ,*et al.* *J Virol* ,1988 **62** :4622 ~ 4626.
- [ 6 ] 何启盖 ,陈焕春 ,邱德新 ,等 . 中国兽医科技 ,1999 **29** ( 1 ) :7 ~ 9.
- [ 7 ] 陈焕春 ,方六荣 ,何启盖 ,等 . 畜牧兽医学报 ,1998 **29** ( 3 ) :156 ~ 161.
- [ 8 ] 陈焕春 ,周复春 ,方六荣 ,等 . 病毒学报 ,2001 **17** ( 1 ) :69 ~ 74.
- [ 9 ] 方六荣 ,周复春 ,陈焕春 ,等 . 畜牧兽医学报 ,2001 **32** ( 3 ) :244 ~ 248.
- [ 10 ] Van Zijl M ,Wensvoort G ,de Kluyver E ,*et al.* *J Virol* ,1991 **65** :2761 ~ 2765.
- [ 11 ] Fuchs W ,Baner B ,Mettenleiter T C ,*et al.* *J Virological Methods* ,1994 **46** :95 ~ 105.
- [ 12 ] Whealy M E ,Card J P ,Robbins A K. *J Virol* ,1993 **67** :3786 ~ 3797.
- [ 13 ] Ober B T ,Summerfield A ,Mattlinger C ,*et al.* *J Virol* ,1998 **72** ( 6 ) :4866 ~ 4873.
- [ 14 ] Karger A ,Schmidt J ,Mettenleiter T C. *J Virol* ,1998 **72** :7324 ~ 7348.
- [ 15 ] Moormann R J M ,de Rover T ,Briaire J ,*et al.* *J Gen Virol* ,1990 **71** :1591 ~ 1595.
- [ 16 ] Ferrari M ,Brack A ,Romanelli M ,*et al.* *J Vet Med Infect Dis Vet Public Health* ,2000 **47** :753 ~ 762.

## Construction of Pseudorabies Virus Ea TK<sup>-</sup>/gE<sup>-</sup>/gp63<sup>-</sup> Mutant Strain and the Study on Its Biological Property\*

Liu Zhenfei Chen Huanchun He Qigai Zhou Fuchun Fang Liurong

( Key Laboratory of Agricultural Microbiology ,Ministry of Agriculture ,  
Huazhong Agricultural University ,Wuhan 430070 ,China )

**Abstract** : Using pseudorabies virus Ea strain as material ,we inserted LacZ gene expression cassette into gE gene. After blue plaque and plaque purification a recombinant virus PRVEa TK<sup>-</sup>/gE<sup>-</sup>/LacZ<sup>+</sup> generated. Utilizing *EcoR* I site in LacZ gene , digested PRVEa TK<sup>-</sup>/gE<sup>-</sup>/LacZ<sup>+</sup> genome DNA was cotransfected into PK-15 cells with plasmid pFBBS ,then PRVEa TK<sup>-</sup>/gE<sup>-</sup>/gp63<sup>-</sup> generated after plaque purification. Four pairs of primers amplification demonstrated the virus was pure TK<sup>-</sup>/gE<sup>-</sup>/gp63<sup>-</sup> mutant virus. PCR product sequence indicates there were 205bp deletion in TK gene ;1247bp deletion in gE ,gp63 and intergenic region of PRVEa TK<sup>-</sup>/gE<sup>-</sup>/gp63<sup>-</sup> mutant virus genome DNA. Inoculation to Balb/C mice with PRVEa TK<sup>-</sup>/gE<sup>-</sup>/gp63<sup>-</sup> indicates the virulence is reduced greatly.

**Key words** : PRVEa strain , TK<sup>-</sup>/gE<sup>-</sup>/LacZ<sup>+</sup> mutant strain , TK<sup>-</sup>/gE<sup>-</sup>/gp63<sup>-</sup> mutant strain , Biological property