

伪狂犬病病毒上海株(PRV-SH)gE⁻/gI⁻/GFP⁺ 缺失株的构建

姜 焱¹ 侯玉峰² 陈溥言¹

(¹ 南京农业大学农业部动物疫病诊断与免疫重点实验室 南京 210095)

(² 南京出入境检验检疫局 南京 210001)

摘 要 在构建了含伪狂犬病病毒(Pseudorabies Virus ,PRV)上海株 gI 基因和 gE 基因克隆鉴定的基础上,采用酶切的方法构建了载体 pgEI。然后用限制性内切酶 *Bam*HI 和 *Bst*pI 缺失掉 gE 基因 5' 端 363bp,同时把绿色荧光蛋白(GFP)基因表达盒插入到缺失部分,并在下游引入一个多克隆位点,构建了缺失转移载体 pgEI-GFP。用 DOTAP 转染试剂盒将 pgEI-GFP 转染了感染 PRV-SH 的 BHK-21 细胞,待出现 80% 病变后收获病毒,并以蚀斑法得到纯化的缺失了 gE/gI 重组病毒株。小鼠试验证实了缺失株的毒力有所下降。

关键词 :伪狂犬病病毒 转移载体质粒 gE⁻/gI⁻/GFP⁺ 缺失株 绿色荧光蛋白(GFP)表达盒
中图分类号 :Q933 文献标识码 :A 文章编号 :0001-6209(2003)01-0015-06

伪狂犬病病毒(Pseudorabies Virus ,PRV)是引起多种家畜和野生动物以发热、流产和死亡、奇痒及脑脊髓炎为主要症状的一种疱疹病毒^[1]。基因组为线状双股 DNA,核酸长度约 150kb。猪是该病毒的主要宿主及传染来源。伪狂犬病对养猪业已造成了巨大的经济损失^[2]。各种灭活苗及弱毒疫苗的使用在对该病的防治中起到积极作用,但随着对该病研究的深入,发现利用常规疫苗对该病根除、持续感染的防治是不成功的。随着分子生物学的发展,人们已能对一些病原的基因进行改造,使其失去致病作用。国内外对 PRV 分子生物学方面的研究越来越深入,已确定了主要毒力基因。其中 gE 是一个重要的毒力基因^[3],而 gI 也与毒力有关。它们与 PRV 在神经系统中的侵袭和扩散作用密切相关。据 Jacobs 等^[4]报道,gE 决定毒力的部分是第 125 ~ 126 位的缬氨酸和半胱氨酸,只要缺失这两个氨基酸就能降低病毒的嗜神经性,而不影响免疫原性。同时 gI 糖蛋白对诱导完全保护是必须的^[5]。本研究在 PRV-SH 的 gE 和 gI 基因之间缺失 510bp 并插入了带 CMV 启动子和增强子的 GFP 报告基因,构建成转移载体质粒,并以蚀斑法得到纯化的缺失了 gE/gI 重组病毒株 rPRV-SH。由于在 GFP 的下游引入一个多克隆位点,这为将来构建多价苗打下基础。

1 材料和方法

1.1 病毒株、细胞株、载体

PRV-SH 和 BHK-21 细胞由本室保存。pEGFP-C1 由美国陈新斌博士赠送,pUCgI 和 pUCgE 由本人构建。大肠杆菌 DH5 α 由本室保存。

作者简介 姜 焱(1972-),女(汉族),江苏泗阳人,博士,主要从事动物病毒学和分子免疫学的研究。现工作单位:江苏省出入境检验检疫局动检实验室,南京白下路 1 号(210001),E-mail :jiangyan1029@yahoo.com.cn

收稿日期 2002-03-09,修回日期 2002-07-30

1.2 试剂及工具酶

*Bam*HI、*Hind*III、*Mlu*I、*Apa*LI、*Bst*PI 等限制酶和 T4DNA 连接酶、Klenow 等修饰酶购自宝生物(大连)有限公司,DNA 回收试剂盒购自四川博大公司。DOTAP 转染试剂盒购自 Roche 公司。

1.3 缺失载体的构建

构建流程图见图 1。用 *Bam*HI + *Hind*III 消化质粒 pUCgI 琼脂糖电泳回收大约 1.7kb 的 gE 基因,同时用相同的酶消化 pUCgI,在 T4 DNA 连接酶作用下,将 gE 与 pUCgI 连接,转化感受态细胞 DH5 α ,涂布 Amp⁺ 平板,挑取白色菌落进行小量培养,按文献^[6]提取质粒。

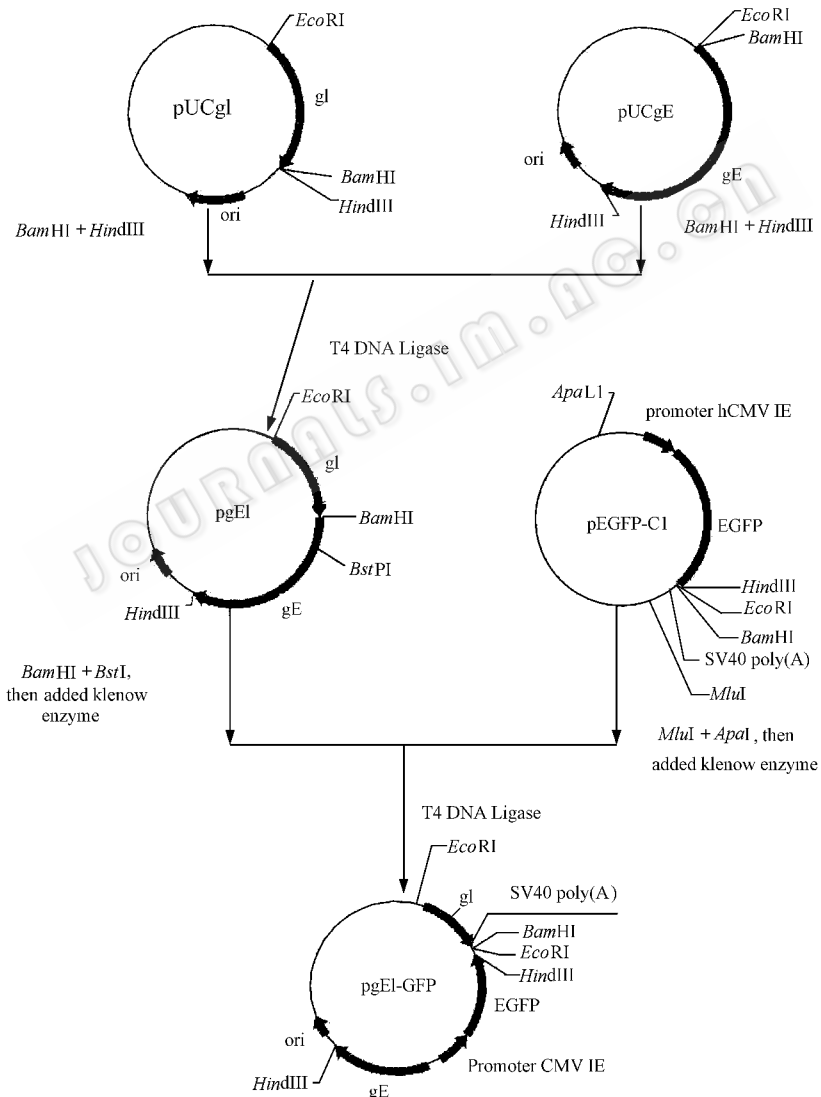


图 1 pgEl-GFP 缺失载体构建的流程图

Fig.1 Construction of the deleted vector of pgEl-GFP

用 *Bam*HI、*Hin*dIII 和 *Eco*RI 进行酶切鉴定。阳性克隆命名为 *pgEI*。

将 $5\mu\text{g}$ 的 *pEGFP-C1* 质粒,用 *Mlu*I、*Apa*LI 消化,试剂盒回收约 2.0kb 含 CMV 立即早期启动子的 GFP 片段。将回收的 GFP 以 Klenow 大片段及 dNTP 混合补平后,以酚/氯仿抽提,加入 1/10 体积的 3mol/L 的 NaAc (pH 5.2) 和 2 倍体积的无水乙醇沉淀 DNA,70% 乙醇洗一次,再以 $5\mu\text{L}$ TE (pH 8.0) 溶解,即为 GFP 基因表达盒片段。

用 *Bam*HI 和 *Bst*pI 消化 *pgEI*,用试剂盒回收 5kb 的目的片段,用 Klenow 酶补平。将 *pgEI* 酶切回收补平的片段与回收补平的 GFP 片段混合,加入 ATP 和 T4 DNA 连接酶,4℃ 过夜后,转化大肠杆菌 DH5 α 感受态细胞,涂布 Amp⁺ 平板,挑选白色菌落,37℃ 摇瓶培养,按文献^[6]提取质粒,重组质粒命名为 *pgEI-GFP*。

1.4 PRV gE^-/gI^- 缺失重组病毒的构建及筛选

于 35mm 的塑料平皿中培养 BHK-21 细胞成单层后,接种 PRV-SH 株 (10^3 TCID₅₀),37℃ 培养 1~2h 后,按 DOTAP 试剂盒说明书进行转染,然后放于 37℃ 5% CO₂ 培养至细胞出现 80% 以上的病变,收获病毒,于 -70℃ ~ 37℃ 反复冻融 3 次,低速离心去细胞碎片,上清中即可能含重组病毒。将转染获得的病毒上清液作 1:10 稀释,取 5~10 μL 接种培养于直径 60mm 平皿内的 BHK-21 细胞,待出现单个分散的病毒蚀斑时,在荧光显微镜下观察,将有荧光的蚀斑标记好,覆盖上琼脂后,用吸管将其吸出,置于 0.5mL 的维持液中,冻融 3 次,在 60mm 平皿中重复进行这一步骤 2 次后,于 96 孔板稀释纯化 3 次,即可得到稳定和纯化的重组病毒。

1.5 PRV gE^-/gI^- 缺失重组病毒的生物学特性

PRV gE^-/gI^- 缺失重组病毒株与 PRV-SH 株分别接种 BHK-21 细胞,比较两者所形成的空斑大小以及测定两者的 TCID₅₀。

1.6 小鼠试验

用重组病毒细胞培养物 0.2mL (约 2.0×10^7 PFU) 腹部皮下注射小鼠 (ICR 小鼠,为 PRV 血清阴性),分为 2 组,一组为对照组,2 周后用 2MLD (2.0×10^5 PFU) 剂量的 PRV-SH 攻毒,计算其保护率。

2 结果

2.1 *pgEI* 载体的构建

用 *Bam*HI + *Hin*dIII 消化 *pUCgE*,回收 *gE* 基因,与用同样酶切的 *gI* 进行连接,转化,挑取白色菌落培养提取质粒,经 *Eco*RI、*Bam*HI 和 *Hin*dIII 酶切鉴定(图 2),表明 *gE* 基因已克隆入 *pUCgI* 载体中。

2.2 含 GFP 基因缺失载体的构建

回收的 GFP 基因表达盒经 Klenow 酶补平与 *pgEI* 经 *Bst*pI 和 *Bam*I 酶切回收的大片段用 Klenow 酶补平进行连接,转化,涂布 Amp⁺ 平板,挑选白色菌落培养,提取质粒,经 *Hin*-dIII 和 *Eco*RI 酶切鉴定(图 3),表明 GFP 基因表达盒已插入到 *pgEI* 载体中,且是反向插入的,重组质粒命名为 *pgEI-GFP*。

2.3 重组病毒筛选

按 DOTAP 的说明书将 *pgEI-GFP* 转染感染了 PRV-SH 株的 BHK-21 单层细胞,待出现

80% 以上的病变时收获病毒。将收获病毒稀释后接种 BHK-21 细胞,以绿色荧光蛋白为标志,利用荧光显微镜通过蚀斑法得到纯化重组病毒(图 4)。

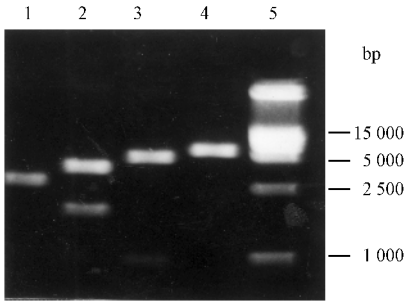


图 2 pgEI 酶切鉴定结果

Fig.2 The result of pgEI vector RE analysis

1. pgEI/*EcoRI* + *HindIII* 2. pgEI/*BamHI* + *HindIII* ;
3. pgEI/*EcoRI* + *BamHI* ;4. pgEI/*EcoRI* 5. Marker DL-15 000.

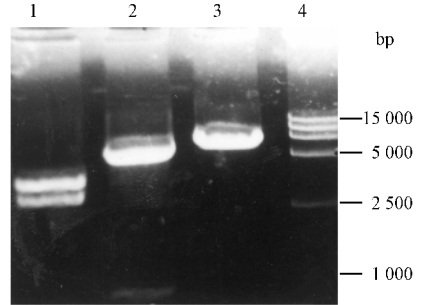


图 3 pgEI-GFP 酶切鉴定结果

Fig.3 The result of pgEI-GFP vector RE analysis

1. pgEI-GFP/*HindIII* ; 2. pgEI-GFP/*EcoRI* ;
3. pgEI-GFP/*BglII* ; 4. Marker DL-15 000.

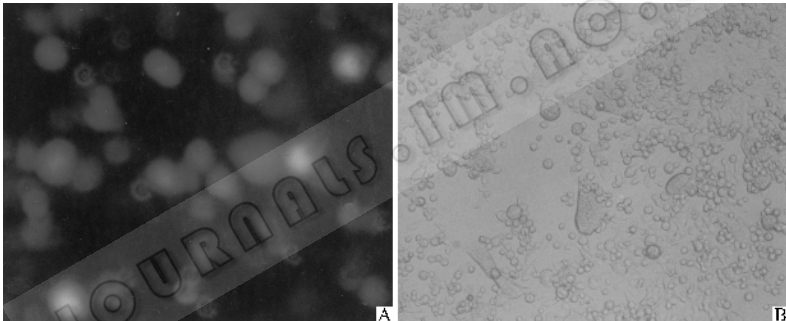


图 4 PRV gE^-/gI^- 缺失重组病毒在 BHK-21 细胞上的荧光

Fig.4 The result of screening the recombinant PRV gE^-/gI^- by fluorescence on BHK-21 cell

- A. Fluorescence of PRV gE^-/gI^- strain on BHK-21(10×10) ;
B. B. CPE infected by PRV gE^-/gI^- strain on BHK-21(10×10).

2.4 重组病毒的生物学特性

PRV-SH $gE^-/gI^-/GFP^+$ 缺失株和 PRV-SH 在 BHK-21 细胞上两者都具有较好的增殖能力,它们在 RK 细胞上的 $TCID_{50}$ 均可达 $10^{-7}/mL$ 。PRV-SH 株 $TCID_{50}$ 为 $10^{-7.1}/mL$,PRV-SH $gE^-/gI^-/GFP^+$ 缺失株 $TCID_{50}$ 为 $10^{-6.9}/mL$,说明 gE^-/gI^- 缺失后并不影响病毒在细胞上的增殖,这与 gE/gI 基因为 PRV 的非必需基因是一致的(图 5)。同时对缺失株和野毒株在 BHK-21 细胞上形成的空斑大小进行了比较,结果发现两者无明显差别。

表 1 攻击保护试验(用 PRV-SH 株进行攻毒)

Table 1 Protection of mice against challenge with PRV-SH containing 2MLD

Group	Quantity of mice	No. of deaths	Survivors	Mortality/%
PRV-SH $gE^-/gI^-/GFP^+$	6	2	4	33
Control	6	6	0	100

2.5 重组病毒的免疫试验

小鼠用所筛选的重组病毒免疫两周后进行攻毒保护试验,结果见表 1。用 PRV-SH 株的 2MLD 剂量攻毒下,对照组全部死亡,死亡率为 100%, 而用缺失病毒免疫过的小鼠却具有一定的保护力。

3 讨论

EGFP 是近年来 Clontech 推出的一种全新的哺乳动物细胞的标记分子,它是将 wtGFP 的 Ser65 用 Thr 代替, Phe64 用 Leu 代替,并用人蛋白中偏爱的密码子替代相应的 wtGFP 中密码子,从而提高了 GFP 在哺乳动物细胞中的表达效率。GFP 用作标记蛋白具有许多优点^[8] (1) 检测方便,因为 GFP 荧光反应不需要外加底物、酶或其他共反应因子,也就不存在这些物质可能难以进入细胞的问题;而且, GFP 发射的荧光用荧光显微镜就可以检测到,不会损伤正在生长的细胞和组织。(2) 荧光稳定, GFP 对光致漂白作用有强烈的耐受性,能耐受长时间的光照,从而延长可检测时间。(3) GFP 对生活的细胞基本无毒害。(4) 共用性和通用性, GFP 基因的共用性表现在它的表达几乎没有受体范围的限制。正是因为 GFP 有这些优点,选择 GFP 作为筛选 PRV 缺失弱毒株的报告蛋白,同时也为进一步研究 PRV 缺失株接种猪后在机体内的分布提供了简便的方法。

PRV 的核酸长度约 150kb, PRV 的非必需区较大,约 40%, 其容纳外源基因的能力很大,估计可达 30kb, 外源基因能稳定插入到 PRV 的 TK、gC、gE、gD 位点上。Van Ziji 等成功地建立了一株能表达引起古典猪瘟的猪瘟病毒 (SFV) 的主要免疫原性糖蛋白的 PRV 重组基因株,接种猪后,不仅使猪在 PRV 的攻击中得到保护,而且在 SFV 攻击中也受到保护^[7]。本研究构建的 p_{gE}-GFP 载体去除了 pUC18 中的多克隆位点,只在 GFP 基因的下游引入了一个常用的限制性内切酶的多克隆位点,这样可以克隆多个外源基因,进行“多价重组”,从而产生“一针防几病”的多价基因工程苗。这为以致弱的 PRV 株作为载体,把猪的其它病毒如传染性胃肠炎病毒、轮状病毒、细小病毒、流感病毒、猪繁殖与呼吸障碍综合症病毒 (PRRSV) 的免疫原性糖蛋白基因引入到 PRV 中形成 PRV 载体联合疫苗打下基础。另外,由于猪 PRV 对人无感染性,为此,以 PRV 的弱毒株作为通用载体,插入外源基因,以进行多联苗和其它有益产品的研制无疑有着广阔的应用前景。

gE 基因是 PRV 的主要毒力基因之一, gI 基因也于 PRV 的毒力有关,它们与病毒的增殖无关,但对病毒在神经组织中的增殖十分重要。研究的结果表明, gE/gI 基因缺失后的病毒同野毒株一样在培养细胞上增殖良好,小鼠试验表明获得的重组毒的毒力有所下降且具有一定的保护力。 gE 基因是 PRV 的主要糖蛋白之一,又是 PRV 的非必需基因,病毒

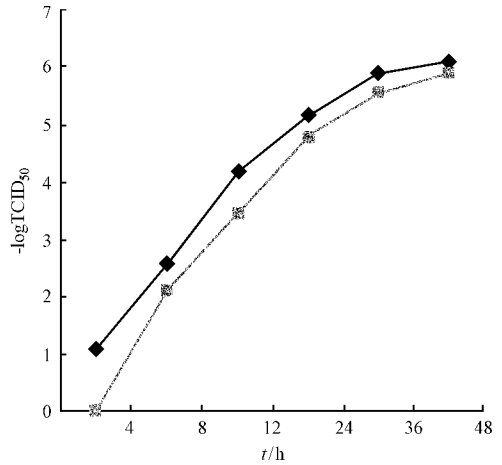


图 5 PRV-SH 株和 PRV-SH $gE^-/gI^-/GFP^+$ 在 BHK-21 细胞上的生长曲线

Fig. 5 One-step growth kinetics of PRV-SH $gE^-/gI^-/GFP^+$ and PRV-SH in normal BHK-21

◆ PRV-SH; ■ PRV-SH $gE^-/gI^-/GFP^+$.

感染后将不产生针对 gE 缺失的部分抗体 因此能通过血清学方法将缺失毒株与野毒感染猪区别开来。本研究中 构建的 PRV-SH 株 gE⁻/gI⁻/GFP⁺ 缺失株 不仅降低了毒力 也可利用血清学方法将缺失毒株免疫猪与野毒感染猪相区别 为淘汰野毒感染猪 建立无 PR 感染的猪群 并最终控制和消灭 PR 提供了有用的工具。

参 考 文 献

- [1] 殷 震,刘景华.动物病毒学.第二版.北京 科学出版社,1997.
- [2] Mettenleiter T C. Molecular biology of pseudorabies (Aujeszky 's disease) virus. *Comp Immunol Microbiol Infect Dis* ,1991 , **14**(2):151 ~ 163.
- [3] Jacobs L , Rziha H J , Kimman T G , *et al* . Deleting valine-125 and cysteine-126 in glycoprotein gI of Pseudorabies virus strain NIA-3 decrease plaque size and reduce virulence in mice. *Arch Virol* ,1993 **131** 251 ~ 264.
- [4] Jacobs L , Mulder W A , Van Oirschot J T , *et al* . Deleting two amino acids in glycoprotein gI of pseudorabies virus decreases virulence and neurotropism for pigs , but does not affect immunogenicity. *J General Virol* ,1993 **74**(10) 2201 ~ 2206.
- [5] Kimman T G , Scholten J W , Zwart R J , *et al* . Construction of single genes within the unique short region of AD ν (suid herpesvirus type I) to virulence , pathogenesis and immunogenicity. *J Gen Virol* ,1992 , **73** 243 ~ 251.
- [6] 萨姆布鲁克 J,弗里奇 E F,曼尼阿蒂斯 T(金冬雁,黎孟枫等译).分子克隆实验指南.第二版.北京 科学出版社,1998.
- [7] Van Ziji M , Wensvoort G , Kluyver E D , *et al* . Live attenuated Pseudorabies virus expressing envelop glycoprotein E of hog cholera virus protects swine against both pseudorabies and hog cholera. *J Virol* ,1991 , **65**(5) 2761 ~ 2766.
- [8] 周盛梅,孟凡国,黄大年,等.绿色荧光蛋白及其应用.生物工程进展,1999,19(2):56~60.

Construction of Pseudorabies Virus SH Strain with gE-gI Gene Partial Deletion Mutant Including GFP Reporter Gene

Jiang Yan¹ Hou Yufeng² Chen Puyan¹

(¹ Key Laboratory of Animal Diseases Diagnostic & Immunology of Agricultural Ministry ,
Nanjing Agricultural University , Nanjing 210095 ,China)

(² Nanjing Entry-Exit Inspection and Quarantine Beaury ,Nanjing 210001 ,China)

Abstract : On the basis of cloning and indentifying gE-gI gene of pseudurabie virus SH strain ,the transfer plasmid vector was constucted in order to get the gE-gI gene partial deletion mutant . At first , gE gene and gI gene were cloned into pUC18 ,constructed the pgEI vector. Then , the 5 'trminal sequence of gE gene was deleted 363bp using the restrict endonuclease in gE gene ,The GFP expressing cassette was inserted into the deleting site. The recombinant plasmid pgEI including GFP reporter gene deleted part of gE-gI gene was constructed. BHK-21 cell which was infected with PRV-SH for 1-2h were tansfected with the complex of pgEI-GFP and DOTAPA deletion mutant was selected and purified many times in BHK-21 cell through GFP. Inoculation of mice with 2.0X10⁷ PFU of the recombinant virus revealed that mice were partly protected against challenge with PRV-SH containing 2MLD.

Key words : Pseudorabies virus , Tansfer plasmid vector , gE⁻/gI⁻/GFP⁺ deletion mutant , GFP expressing castle