

## 火鸡疱疹病毒细菌人工染色体的构建

兰德松<sup>1</sup>, 石星明<sup>1</sup>, 王云峰<sup>1\*</sup>, 崔红玉<sup>2</sup>, 刘长军<sup>1</sup>, 王玫<sup>1</sup>, 胡文玮<sup>1</sup>, 童光志<sup>1\*</sup>

(<sup>1</sup> 中国农业科学院哈尔滨兽医研究所兽医生物技术国家重点实验室禽传染病研究室, 哈尔滨 150001)

(<sup>2</sup> 河北北方学院动物科技学院动物医学系, 张家口 075131)

**摘要:** 火鸡疱疹病毒 (HVT) 为一种  $\alpha$  疱疹病毒, 因其与马立克氏病病毒 (MDV) 抗原相关性而被广泛用作预防马立克氏病 (MD) 的活疫苗。【目的】本研究的目的是构建 HVT 全基因组感染性细菌人工染色体 (BAC)。【方法】利用 Eco-gpt (黄嘌呤鸟嘌呤磷酸核糖转移酶) 基因和 BAC 载体 pBeloBAC11 的基本功能序列, 构建重组病毒转移载体 pGAB-gpt-BAC11。通过将 pGAB-gpt-BAC11 与 HVT 感染细胞总 DNA 共转染原代鸡胚成纤维细胞 (CEF), 待出现病毒噬斑后, 利用霉酚酸 (MPA) 阻断核酸代谢途径, 经过筛选获得纯化的重组病毒 purified-rHVT。提取 purified-rHVT 感染细胞总 DNA 电转化大肠杆菌 DH10B 感受态细胞, 在氯霉素抗性平板上筛选阳性克隆, 并用酶切和 PCR 方法对其进行鉴定。随机选取 BAC 克隆提取 BAC DNA 转染次代 CEF, 完成 HVT 重组病毒的拯救。

【结果】经过 6 轮筛选后获得纯化的重组病毒, 并筛选到 25 个 BAC 分子克隆化病毒。其中 BAC6、BAC8 和 BAC10 再次启动病毒感染, 产生与野生型 HVT 感染 CEF 相似的病毒噬斑形态, 说明已经获得拯救出的 HVT 重组病毒。【结论】本研究构建了 HVT 全基因组感染性细菌人工染色体, 建立了 HVT 反向遗传操作技术平台。

**关键词:** 火鸡疱疹病毒; 病毒拯救; 细菌人工染色体; BAC 分子克隆化病毒

中图分类号: Q933-3 文献标识码: A 文章编号: 0001-6209 (2008) 06-0811-07

火鸡疱疹病毒 (HVT) (或 Meleagrid 疱疹病毒 1) 是一种无致病性的  $\alpha$  疱疹病毒, 最初于 20 世纪 60 年代末期从火鸡体内分离得到<sup>[1]</sup>。HVT 的基因组为线性、双股 DNA 分子, 大小约为 160 kb<sup>[2]</sup>。HVT 与鸡的高度传染性、致瘤性疾病马立克氏病 (MD) 的病原 MDV 在遗传学和血清学上具有相关性<sup>[3-6]</sup>。MD 由致病性的 MDV-1 型病毒感染所引起, 它是一种以商品鸡的 T 细胞淋巴瘤和严重的免疫抑制为特征的恶性传染病, 每年给养禽业造成至少 10 亿美元的经济损失, 因此 MD 被各国视为养禽业最重要的疾病之一<sup>[7]</sup>。

HVT Fc-126 株作为原型 MD 疫苗自 1970 年以来一直使用, 该疫苗无致瘤性, 保护效果良好, 可以冻干, 使用方便, 而且与其它疫苗株联合使用 (如

HVT+SB-1, HVT+CVI988) 时表现出明显协同保护效果, 使得其在控制 MD 上具有重要价值<sup>[5, 8, 9]</sup>。HVT 疫苗在全球范围内的广泛使用, 极大地降低了 MD 带来的经济损失<sup>[10]</sup>。因而从根本上弄清 HVT 基因的功能和决定其表现独特性质的分子基础, 将有助于提高由 HVT 诱导的免疫应答。

另外, HVT 作为病毒载体携带外源保护性抗原基因方面, 与其它病毒载体相比具有许多优势。目前, 国外已成功利用 HVT 作为载体表达了多种禽病原保护性抗原基因<sup>[5, 11]</sup>, 展现了 HVT 作为载体疫苗的良好应用前景。

但是 HVT 基因组庞大, 结构复杂, 而且具有很强的细胞结合特性, 使用在真核细胞中的重组操作技

基金项目: 国家“863 计划”(2003AA213020)

\*通讯作者: Tel: +86-451-85935058; E-mail: yfwang@hvri.ac.cn; gztong@hvri.ac.cn

作者简介: 兰德松(1982-), 男, 湖北洪湖人, 硕士研究生, 主要从事畜禽病毒分子生物学及基因工程疫苗的研究。

收稿日期: 2007-11-05; 修回日期: 2008-03-20

术对其进行操作和研究,显得困难重重,而且费时费力。近年来,细菌人工染色体(BAC)技术在疱疹病毒上的应用解决了这一难题<sup>[12]</sup>。通过构建HVT BAC,就可以在大肠杆菌中对HVT基因组进行遗传修饰。与在真核细胞中相比,在大肠杆菌中操作的重组技术具有更快速、有效而且可靠的优点<sup>[5, 13, 14]</sup>。

本研究的目的构建HVT全基因组感染性BAC。通过将加压筛选标记基因gpt和BAC载体功能序列插入到HVT基因组中的复制非必需区,解决了细胞结合型重组病毒的筛选以及电转化获取BAC分子克隆化病毒的困难。利用创新性的加压筛选方法,筛选、富集和纯化了重组病毒,且利用改进的电转方法,获得了HVT Fc-126株全基因组感染性BAC。对进一步研究HVT的基因功能以及开发新型HVT活载体疫苗具有重要的意义。同时对MDV的致瘤机制、潜伏机制和基因功能的研究也具有重要的作用。

## 1 材料和方法

### 1.1 材料

1.1.1 质粒载体、工程菌和毒株:pGEM-T载体购自Promega公司;克隆载体pMD18-T购自TaKaRa(大连)

公司;pBeloBAC11质粒购自Invitrogen公司;pN1-gpt质粒由本实验室构建;大肠杆菌(*Escherichia coli*)DH5 $\alpha$ 和DH10B由本实验室保存;火鸡疱疹病毒(Herpesvirus of turkey, HVT) Fc126株由本实验室保存。

1.1.2 主要试剂和仪器:限制性核酸内切酶PacI购自NEB公司;其它限制性核酸内切酶、T4 DNA连接酶、牛小肠碱性磷酸酶、ATP、dNTP及LA Taq酶均购自TaKaRa(大连)公司;DMEM培养基购自Invitrogen公司;胰酶购自Difco公司。Calcium Phosphate Transfection Kit购自Promega公司;Qiagen plasmid Midi kit购自Qiagen公司。PCR产物回收试剂盒购自Bioflux公司;霉酚酸(mycophenolic acid, MPA)、黄嘌呤(xanthine)和次黄嘌呤(hypoxanthine)购自Sigma公司;Gene Pulser Xcell™ Electroporation System购自Bio-Rad公司;其它试剂为分析纯。

1.1.3 试验用SPF鸡胚:9~10日龄SPF鸡胚由中国农业科学院哈尔滨兽医研究所实验动物中心提供。

### 1.2 引物设计与合成

根据GenBank上发表的HVT Fc126株全长基因组序列(AF291866)、pN1-gpt质粒序列及pBeloBAC11序列设计了以下PCR引物(表1),引物由Invitrogen公司合成。

表1 重组病毒转移载体构建及鉴定引物

Table 1 Primer pairs used for amplification of fragments for construction of transfer vector and verification of the recombinant virus

Name of primers	Sequence of primers(5' -3')	Description of target gene
A-F	ATAGTCGACACATCGGGCCACGTTCCGCC	homologous arms
A-R	ATATTAATTAAGGATCCGATGAGCTGACGTGTGGA	
B-F	ATCTTAATTAAGGCTTACTAATATGGGCACAC	
B-R	ATCGGGCCCTGGCCCATCTAGGTGATTAT	
gpt-F	ATGTTAATTAACGCCATGCATTAG	selectable marker gene
gpt-R	ATGTTAATTAAGCTTACAATTTACGC	
repA-F	CTCCAATGCGCCTCTCATAAT	BAC function genes
repA-R	ATGTATGAGAGGCGCATTGGAG	
sopB-F	ATTCGTTAATTGCGCGCGTAGG	
sopB-R	GAATATTCAGGCCAGTTATGCT	
gC-F	TGGGTGGGCATATTTCTAGTTCTG	
gC-R	CGCGACTGAACATGAGTCAT	
gD-F	CGTCTTCTCGCGTAGTACCAAAT	
gD-R	TCCGCCCAAGTTTCACACGTGATC	
gE-F	GGATTTCCGTTTGCCTGACAAT	Genes essential for HVT growth in vitro and/or in vivo
gE-R	GGTACCCGAGTATGCCTAATGTC	
gH-F	ACAGCGGTAGCGATGTAGGTTGC	
gH-R	CTAAGGGCCCTCAGTCTGATT	
gI-F	TGAAACTTGGGCGGACCTGTATC	
gI-R	ATCATACTCGCCGAGATCGTC	
gK-F	GCG CTC GCT CAT ATT TAG C	
gK-R	TGA GAA AAA TGC CGG AAA C	
UL41-F	CCGATTCACGTGTACTTTAGGTCA	
UL41-R	CCGAAAGTGGTGTGTATATGGGTAG	
UL48-F	ACAATACTTCCACCGTCTTCC	
UL48-R	GCCCCATTGCCATAGCTAGACTT	

### 1.3 重组病毒转移载体的构建

用 9~10 日龄 SPF 鸡胚, 按照文献[15]中描述的方法进行原代及次代鸡胚成纤维细胞 (CEF) 的制备和培养。24 h 细胞长成单层后, 按  $1 \times 10^5$  PFU/细胞接种 HVT, 约 72 h, 70% 细胞出现病变后, 收取细胞。根据文献[16]方法提取病变细胞总 DNA, 作为 PCR 模板, 用设计的引物扩增 HVT Fc126 株 US2 基因两侧的左、右同源臂 A(核苷酸序列位于 137758~139758) 和 B(核苷酸序列位于 140762~143442), 大小分别为 2.0 kb 和 2.7 kb, 定向克隆到 pGEM-T 载体上, 获得的质粒命名为 pGAB; 以 pN1-gpt 质粒为模板, PCR 扩增出两侧带有 *PacI* 酶切位点的 gpt 表达盒, 经 *Pac* 酶切后回收, 克隆到 pGAB 的 *Pac* 位点, 构建出质粒 pGAB-gpt; pBeloBAC11 质粒经 *Hind* 酶切后回收, 克隆到质粒 pGAB-gpt 的 *Hind* 位点, 最终获得重组病毒转移载体 pGAB-gpt-BAC11。

### 1.4 重组病毒的构建

根据文献[16]描述的方法提取感染 HVT 的细胞总 DNA, 经凝胶扫描仪进行 dsDNA 的定量, dsDNA 浓度控制在 0.1~0.2  $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ ; pGAB-gpt-BAC11 用 Qiagen plasmid Midi kit 提取纯化, 并经 Eppendorf Biophotometer 仪进行定量, 浓度控制在 0.5  $\mu\text{g}/\mu\text{L}$  左右。将 5~10  $\mu\text{g}$  重组病毒转移载体 pGAB-gpt-BAC11 与 2  $\mu\text{g}$  感染细胞总 DNA 共转染原代 CEF, 转染按 Calcium Phosphate Transfection Kit 说明书进行。当细胞病变达到 70% 左右时, 传到新鲜制备的单层 CEF 上, 培养液在 1 小时前换成加压筛选培养液(含 2% 血清、1% S/P, 300  $\mu\text{g}/\text{mL}$  萘酚酸、60  $\mu\text{g}/\text{mL}$  黄嘌呤和 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$  次黄嘌呤的 DMEM), 每 24 h 换一次加压筛选培养液。当病变细胞达到 70% 左右时传到另一新鲜制备的单层 CEF 上, 经过 6 轮加压筛选后, 开始提取病变细胞总 DNA, 用于电转化 *E. coli* DH10B 电转化感受态细胞, 同时作为 PCR 模板扩增 US2 区, 以鉴定重组病毒是否获得纯化, 获得的纯化的重组病毒命名为 purified-rHVT。

### 1.5 BAC 分子克隆化病毒的获得

按照 Bio-Rad 电转仪说明书描述的方法, 制备 *E. coli* DH10B 电转化感受态细胞, 并贮存于 -80 备用。适时提取经过 6 轮加压筛选后的病变细胞总 DNA, 电转化到新鲜制备的 *E. coli* DH10B 电转化感受态细胞中。37 振荡活化后, 细菌沉淀用 100  $\mu\text{L}$  左右 SOC 重悬并均匀涂布于含有 30  $\mu\text{g}/\text{mL}$  氯霉素的 LB 平板上, 37 温箱中培养 24 h。挑取单菌落接种

于含有 30  $\mu\text{g}/\text{mL}$  氯霉素的 LB 培养液中, 37 振荡培养过夜(或 16 h 左右)。然后通过如下方法进行 BAC 分子克隆化病毒的鉴定: 用 Qiagen plasmid Midi kit 提取质粒, 在 0.8% 的琼脂糖凝胶上电泳分析; 初步鉴定为大分子的质粒, 用限制性核酸内切酶 *EcoR*、*Hind*、*Pst* 和 *Sal* 分别进行酶切, 进行酶切图谱分析; PCR 进行 BAC-gpt 序列中部分基因及 HVT 基因组中部分基因的鉴定。

### 1.6 重组病毒的拯救

用 Qiagen plasmid Midi kit 提取并纯化经鉴定正确的 BAC DNA, 按照 Calcium Phosphate Transfection Kit 说明书的方法, 转染次代 CEF。待细胞病变产生的噬斑发展到一定程度时, 传到新鲜制备的单层 CEF 上。当病变细胞达到 70% 左右时, 用常规方法收获并冻存细胞, 保存于液氮中, 即为拯救的重组病毒, 命名为 BAC-derived rHVT。

### 1.7 重组病毒体外生长特性的测定

将野生病毒 (wt-HVT)、纯化的重组病毒 (purified-rHVT) 和 BAC DNA 拯救的重组病毒 (BAC-derived rHVT) 按  $1 \times 10^{-3}$  PFU/细胞分别接种到单层原代 CEF 上培养, 比较病变细胞形态大小, 测定病毒蚀斑<sup>[5]</sup>, 绘制病毒的生长曲线, 从而比较 wt-HVT、purified-rHVT 和 BAC-derived rHVT 在体外 CEF 上培养时的生长特性。

## 2 结果和分析

### 2.1 重组病毒转移载体鉴定结果

以 HVT 感染细胞总 DNA 为模板进行 PCR 扩增, 分别得到约 2.0 kb 的同源臂 A 和 2.7 kb 的同源臂 B; 以 pN1-gpt 质粒为模板进行 PCR 扩增, 得到约 1.3 kb 的 gpt 表达盒, 大小均与预期一致, 经测序比对均正确。构建的重组病毒转移载体质粒 pGAB-gpt-BAC11 大小为 16.6 kb, 左、右同源臂 A 和 B 之间为 BAC-gpt 核心序列, 大小为 8.8 kb; 具有氨苄青霉素和氯霉素双抗性, 方便筛选鉴定, 质粒经 0.8% 琼脂糖凝胶电泳分析, 可见 16.6 kb 左右特异的条带, 经 *Hind*、*BamH* 酶切进一步鉴定, 大小与预期结果一致。

### 2.2 重组病毒的加压筛选和纯化

重组病毒转移载体 pGAB-gpt-BAC11 与 HVT 感染细胞总 DNA 通过磷酸钙沉淀法共转染次代 CEF。转染 5 d 后, 观察到 HVT 特异性病毒噬斑。经过 4 轮加压筛选后, 提取病变细胞总 DNA 为模板, PCR

仍能扩增到 0.8 kb 的野生型 HVT 的 US2 区；而经过 6 轮加压筛选后，PCR 则扩增不到 0.8 kb 的野生型 HVT 的 US2 区，表明经过 6 轮加压筛选后重组病毒得到了纯化。

### 2.3 BAC 分子克隆化病毒的鉴定结果

通过琼脂糖凝胶电泳初步分析及 PCR 扩增部分 HVT 基因表明，获得多个大分子量的克隆。用 Qiagen plasmid Midi kit 提取并纯化其中 6 个 BAC DNA，琼脂糖凝胶电泳表明，BAC DNA 纯化效果较好，大小与预期一致(图 1)；将 BAC10 DNA 分别用限制性内切酶 *EcoR*、*Hind*、*Pst* 和 *Sal* 酶切，酶切结果与软件分析结果一致；同时 PCR 特异性扩增出 BAC-gpt 部分功能基因和 HVT 基因组基因(图 2)进一步证实，本研究共获得 25 个 HVT 全基因组 BAC 分子克隆化病毒。

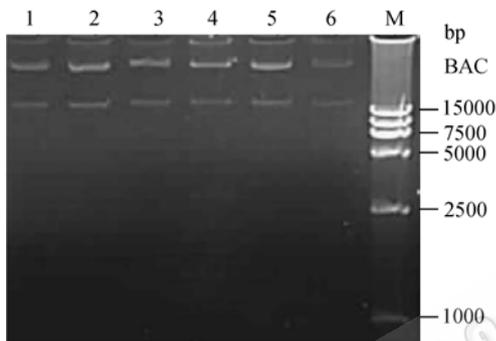


图 1 HVT BACs 凝胶电泳图

Fig. 1 Electrophoresis pattern of purified HVT-BACs DNA. 1. BAC6; 2. BAC8; 3. BAC10; 4. BAC12; 5. BAC16; 6. BAC18; M. DNA Marker DL15000.

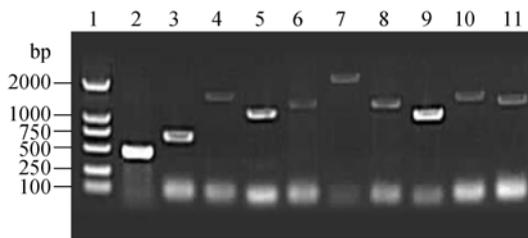


图 2 BAC-gpt 核心序列及 HVT 基因组部分必需基因 PCR 鉴定图

Fig. 2 Some essential genes of BAC-gpt fragment and HVT genomic DNA were analyzed by PCR tests. 1. DNA Marker DL2000; 2. gpt ORF(462bp); 3. repA(681bp); 4. gC (1564bp); 5. gD(1247bp); 6. US8(1367bp); 7. gH(2346bp); 8. gI(1362bp); 9. gK(1082bp); 10. UL41(1524bp); 11. UL48(1379bp).

### 2.4 从 BAC DNA 拯救重组病毒

随机选取了 6 个 BAC 克隆，提取并纯化了 BAC

DNA 后转染次代 CEF，其中标记为 HVT-BAC6，HVT-BAC8 和 HVT-BAC10 的 BAC 克隆在 CEF 上再次启动感染，拯救了 HVT 重组病毒，分别命名为 BAC6-derived rHVT、BAC8-derived rHVT 和 BAC10-derived rHVT。

### 2.5 重组病毒与野生病毒体外生长特性比较

wt-HVT、purified-rHVT 和 BAC-derived rHVT 在 CEF 上形成的噬斑形态和大小相似(图 3)，wt-HVT 和 purified-rHVT 在 CEF 上的增殖曲线也相似，但是 BAC-derived rHVT 在 CEF 上的增殖曲线与前二者明显不同，BAC-derived rHVT 在 CEF 上的增殖较慢(图 4)。

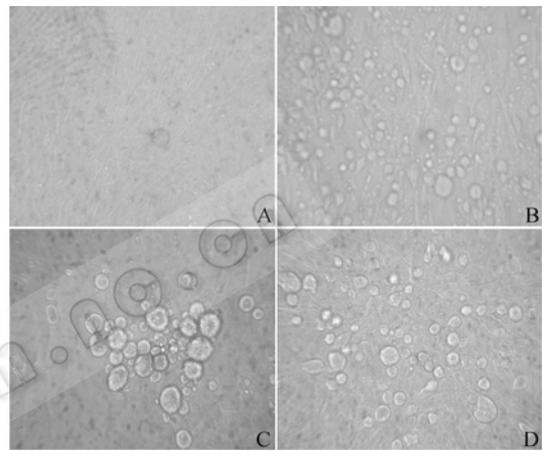


图 3 wt-HVT、purified-rHVT 和 BAC10-derived rHVT 在 CEF 上形成的噬斑形态比较

Fig. 3 Morphology of the plaques on CEFs 96 h after infection with wt-HVT、purified-rHVT and BAC10-derived rHVT. A: Normal CEF; B: wt-HVT infected CEF(96 h); C: purified-rHVT infected CEF(96 h); D: BAC10-derived rHVT infected CEF(96 h).

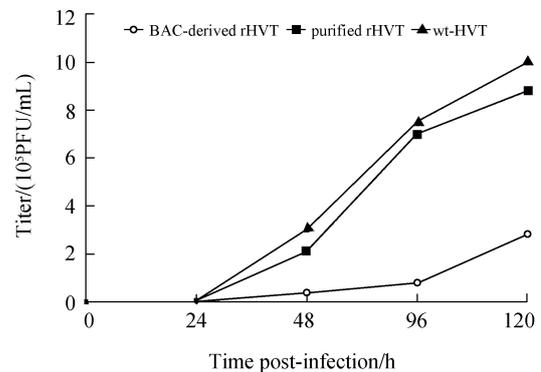


图 4 wt-HVT、purified-rHVT 和 BAC-derived rHVT 在 CEF 上的生长曲线比较

Fig. 4 Comparison of the growth curves of wt-HVT, purified-rHVT and BAC10-derived rHVT on CEFs.

### 3 讨论

自 1997 年 Messerle 等<sup>[17]</sup>人首次报道把鼠巨细胞病毒 (MCMV) 全基因组克隆为感染性 BAC 以来, BAC 技术在 $\alpha$ 、 $\beta$ 和 $\gamma$ 疱疹病毒亚科成员的感染性克隆构建中相继获得成功<sup>[14, 18, 19]</sup>。1999 年, Suter 等<sup>[20]</sup>人将基因组大小为 152 kb 的 HSV-1 构建成 BAC (fHSV), 并对 fHSV 进行了修饰, 去掉了病毒粒子基因组 DNA 包装信号, 使之不能产生子代病毒, 命名为 fHSV $\Delta$ pac。将 fHSV $\Delta$ pac DNA 通过金颗粒轰击方法肌内注射免疫小鼠, 结果能诱导产生 HSV-1 特异性 T 细胞毒性反应和特异性抗体, 并且能够提供对 200LD<sub>50</sub> 脑内接种野生型 HSV-1 攻毒后保护。这说明免疫 fHSV $\Delta$ pac DNA 能诱导广泛的细胞免疫及体液免疫, 并且保护小鼠抵抗致死剂量 HSV-1 攻击。HSV-BACs 作为一种新型 DNA 疫苗在小鼠模型上感染 HSV 的保护性试验上的成功应用, 首次展示了 BAC 疫苗的良好应用前景。

随后一些科学家也做了这方面的研究, 每年都有相关研究成果被报道。最近在 2007 年, Osterrieder 等<sup>[21]</sup>人在 EHV-1 疫苗株 RacH 的细菌人工染色体 (pRacH1) 的基础上, 构建了表达西尼罗河病毒 (WNV) prM 和 E 蛋白的重组 EHV-1 BAC 疫苗。动物实验结果表明, 接种这种重组疫苗后能够诱导试验马体内产生 WNV E 蛋白特异的 IgG(T), IgG(B) 以及中和抗体, 能同时抵抗 EHV-1 和 WNV 强毒的攻击。同年, Yoshii 等<sup>[22]</sup>人在他们将水痘带状疱疹病毒 Oka 疫苗株 (vOka) 构建成感染性 BAC (pOka) 的基础上, 在大肠杆菌中应用 RecA 介导同源重组的修饰方法, 将流行性腮腺炎病毒 (MuV) 的 HN 基因插入到 pOka 基因组的 ORF13 基因中, 获得了 vOka-HN-BAC。动物实验结果表明, rvOka-HN 免疫豚鼠能够诱导 VZV 和 HN 特异性抗体。有趣的是, 诱导产生的抗体具有很强的针对 MuV 和 VZV 感染的中和活性。这种表达 MuV HN 蛋白的新型痘病毒疫苗可作为一种有效预防 VZV 和 MuV 的多价活载体疫苗。

BAC 分子克隆化病毒在现代疫苗的研究和应用还只是探索阶段, 但其表现出来的优势令人鼓舞。BAC 技术在疱疹病毒中的成功应用代表了疱疹病毒基因组学发展的里程碑, 为研究病毒的复制、生长特性、致病性、病毒与宿主之间的相互关系如侵袭与免疫、潜伏感染、细胞嗜性、调解细胞信号功能等提供

了一个崭新而高效的手段。

BAC 是以 *E. coli* 的 F 因子的重要位点及基因为主体的大容量人工载体, BAC 在重组缺陷型 (Rec-) 宿主菌 (如 DH10B) 中严格的以单拷贝形式存在<sup>[23]</sup>。本研究使用的 BAC 载体 pBeloBAC11, 大小只有 7.4 kb, 保留了 F 因子的自主复制、拷贝数控制及质粒分配等基本功能相关的基因: oriS、repE、parA、parB、parC 和 cos, 其容纳外源插入片段的能力可达 350 kb, 并且能稳定遗传。基于 BAC 的分子克隆化病毒具有很多优点: 在大肠杆菌中很稳定, 服从于大肠杆菌基因操作技术, 转染真核细胞后能引起产毒性复制而无需同源重组和序列修复<sup>[19]</sup>。特别是最近发展起来的随机转座突变方法、Red/ET 克隆修饰系统和 Cre/loxP 克隆修饰系统在 BAC 遗传修饰上的应用, 使得可以对 BAC 分子克隆化病毒基因组上任何位点进行定向插入、缺失、替换和点突变等任意人为的遗传修饰, 而且筛选和获得重组子的过程非常简便和快速<sup>[24, 25]</sup>。

构建 HVT 全基因组感染性细菌人工染色体成功的关键有以下几个方面: 第一, 筛选标记基因的选择。本课题组在筛选标记上做过几种尝试, 曾使用过 lacZ 和 eGFP 作为标记基因, 但在重组病毒的纯化上遇到了很大的困难, 因为 HVT 也具有明显的细胞结合特性, 在噬斑纯化过程中完全去除野毒非常困难。本研究最终使用了自主构建的 Eco-gpt 作为加压筛选标记基因, 因为在鸟嘌呤从头合成途径中, 催化 IMP 到 XMP 反应的是 IMP 脱氢酶, 而霉酚酸 (MPA) 是该酶的不可逆阻断剂, 在恰当浓度的 MPA 存在下, 阻断了野生病毒的嘌呤代谢途径, 而重组病毒表达黄嘌呤-鸟嘌呤磷酸核糖基转移酶 (XGPRT, gpt), 该酶利用外源黄嘌呤完成鸟嘌呤的外源补救合成途径, 补救了重组病毒 DNA 的复制, 从而有利于重组病毒的筛选、富集和纯化。

另外, 在 Eco-gpt 表达盒构建过程中, 并不是简单地将 gpt 编码框直接克隆到 CMV 早期启动子和 SV40 多聚腺苷酸 (poly(A)) 尾之间, 而是将 gpt 编码框的起始密码子 ATG 的上游序列经过改进使其符合 KoZaK 规则的要求, 加强了核糖体小亚基对翻译起始序列的识别, 保证了在 CEF 中能够强烈和正确地表达 gpt 酶, gpt 酶的大量正确表达, 是保证获得纯化重组病毒的关键。

第二, BAC 载体基本功能基因的完整性。本研

究中使用了 pBeloBAC11 载体,利用了其 Cat 基因和 loxP 位点之间的 Hind 位点,酶切后作为 BAC 载体用于重组病毒转移载体构建,没有破坏 BAC 载体的必需功能区,确保了 BAC 基本功能基因的完整性,为下一步电转化获得 BAC 转化子打下基础。

第三,适时提取纯化的重组病毒基因组 DNA 立即用于电转化。HVT 和大多数疱疹病毒一样,基因组 DNA 为线性形式,但在病毒的复制过程中有一个自我环化的过程,此时提取重组病毒基因 DNA 用于电转化才能获得 BAC 转化子。

第四,加压筛选条件和电转化参数的优化。本研究中适当的提高了 MPA 和黄嘌呤的浓度,MPA 从 250  $\mu\text{g}/\text{mL}$  提高到了 300  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ,黄嘌呤的浓度从 50  $\mu\text{g}/\text{mL}$  提高到 65  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ,目的是在增加选择压力的同时又保证重组病毒必需营养物质的供给,加速重组病毒的纯化过程。同时在电转化过程中,恰当的参数设置也是获得感染性 BAC 的必要条件之一。本研究结果表明,电转参数设置为 1500 V、25  $\mu\text{F}$ 、200  $\Omega$ 、1 mm,电击时间在 5 ms 时,获得 BAC 转化子的效率最高。

本研究以自主构建的 Eco-gpt 基因作为筛选基因,人工载体 pBeloBAC11 作为 BAC 载体,利用改进的加压筛选方法和优化的电转化条件,构建了 HVT 全基因组感染性细菌人工染色体,为进一步利用 Red/ET、Cre/loxP 等现代基因重组系统等病毒进行反向遗传操作提供了技术平台,同时为研究 HVT 基因功能及开发新型 HVT 活载体基因工程疫苗奠定了基础。另外,对 MDV-1 型病毒严格的细胞结合特性、致癌机制和潜伏感染机制的研究也将起到重大促进作用。

### 参 考 文 献

- [1] Kawamura H, King DJ, Anderson DP, *et al.* A herpesvirus isolated from kidney cell culture of normal turkeys. *Avian Dis*, 1969, 13: 853–863.
- [2] Afonso CL, Tulman ER, Lu Z, *et al.* The genome of turkey herpesvirus. *J Virol*, 2001, 75(2): 971–978.
- [3] Purchase HG, Burmester BR, Cunningham CH, *et al.* Pathogenicity and Antigenicity of Clones from Strains of Marek's Disease Virus and the Herpesvirus of Turkeys. *Infect Immun*, 1971, 3(2): 295–303.
- [4] Witter RL, Nazerian K, Purchase HG, *et al.* Isolation from turkeys of a cell-associated herpesvirus antigenically related to Marek's disease virus. *J Vet Res*, 1970, 31: 525–538.
- [5] Baigent SJ, Petherbridge LJ, Smith LP, *et al.* Herpesvirus of turkey reconstituted from bacterial artificial chromosome clones induces protection against Marek's disease. *J Gen Virol*, 2006, 87: 769–776.
- [6] Gibbs CP, Nazerian K, Velicer LF, *et al.* Extensive homology exists between Marek disease herpesvirus and its vaccine virus, herpesvirus of turkeys. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1984, 81(11): 3365–3369.
- [7] Nair V. Evolution of Marek's disease -- a paradigm for incessant race between the pathogen and the host. *Vet J*, 2005, 170(2): 175–183.
- [8] Witter RL, Kreager KS. Serotype 1 viruses modified by back-passage or insertional mutagenesis: approaching the threshold of vaccine efficacy in Marek's disease. *Avian Dis*, 2004, 48(4): 768–782.
- [9] Schat KA. Isolation of Marek's disease virus: revisited. *Avian Pathol*, 2005, 34(2): 91–95.
- [10] Witter RL. The changing landscape of Marek's disease. *Avian Dis*, 1998, 27(supplement 1): 46–53.
- [11] Osterrieder N, Kamil JP, Schumacher D, *et al.* Marek's disease virus: from miasma to model. *Nature*, 2006, 4: 283–294.
- [12] Brune W, Messerle M, Koszinowski UH. Forward with BACs: new tools for herpesvirus genomics. *Trends Genet*, 2000, 16: 254–259.
- [13] 卢建红, 唐运莲, 李桂源. 以 BAC 为基础的疱疹病毒感染性克隆技术. *中国生物工程杂志(China Biotechnology)*, 2006, 26(6): 78–82.
- [14] Schumacher D, Tischer BK, Fuchs W, *et al.* Reconstitution of Marek's disease virus serotype 1 (MDV-1) from DNA cloned as a bacterial artificial chromosome and characterization of a glycoprotein B-negative MDV-1 mutant. *J Virol*, 2000, 74(23): 11088–11098.
- [15] 殷震, 刘景华. *动物病毒学*. 第二版. 北京: 科学出版社, 1997.
- [16] Morgan RW, Cantello JL, McDermott CH, *et al.* Transfection of chicken embryo fibroblasts with Marek's disease virus DNA. *Avian Dis*, 1990, 34(2): 345–351.
- [17] Messerle M, Crnkovic I, Hammerschmidt W, *et al.* Cloning and mutagenesis of a herpesvirus genome as an infectious bacterial artificial chromosome. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1997, 94(26): 14759–14763.

- [18] McGregor A, Schleiss MR. Recent advances in herpesvirus genetics using bacterial artificial chromosomes. *Mol Genet Metab*, 2001, 72(1): 8–14.
- [19] Adler H, Messerle M, Koszinowski UH, *et al.* Cloning of herpesviral genomes as bacterial artificial chromosomes. *Rev Med Virol*, 2003, 13(2): 111–121.
- [20] Suter M, Lew AM, Grob P, *et al.* BAC-VAC, a novel generation of (DNA) vaccines: A bacterial artificial chromosome (BAC) containing a replication-competent, packaging-defective virus genome induces protective immunity against herpes simplex virus 1. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1999, 96(22): 12697–12702.
- [21] Osterrieder N, Rosas CT, Tischer BK, *et al.* Live-attenuated recombinant equine herpesvirus type 1 (EHV-1) induces a neutralizing antibody response against West Nile virus (WNV). *Virus Res*, 2007, 125(1): 69–78.
- [22] Yoshii H, Somboonthum P, Takahashi M, *et al.* Cloning of full length genome of varicella-zoster virus vaccine strain into a bacterial artificial chromosome and reconstitution of infectious virus. *Vaccine*, 2007, 25: 5006–5012.
- [23] Shizuya H, Birren B, Kim U, Mancino V, *et al.* Cloning and stable maintenance of 300-kilobase-pair fragments of human DNA in *Escherichia coli* using an F-factor-based vector. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1992, 89(18): 8794–8797.
- [24] Chattoo JP, Stevens MP, Nair V, *et al.* Rapid identification of non-essential genes for in vitro replication of Marek's disease virus by random transposon mutagenesis. *J Virol Methods*, 2006, 135(2): 288–291.
- [25] Rivero-Müller A, Lajić S, Huhtaniemi I. Assisted large fragment insertion by Red/ET-recombination (ALFIRE)--an alternative and enhanced method for large fragment recombineering. *Nucleic Acids Res*, 2007, 35(10): 1–8.

## Reconstituting turkey herpesvirus with bacterial artificial chromosome clones

Desong Lan<sup>1</sup>, Xingming Shi<sup>1</sup>, Yunfeng Wang<sup>1\*</sup>, Hongyu Cui<sup>2</sup>,  
Changjun Liu<sup>1</sup>, Mei Wang<sup>1</sup>, Wenwei Hu<sup>1</sup>, Guangzhi Tong<sup>1\*</sup>

(<sup>1</sup> Division of Avian Infectious Diseases, National Key Laboratory of Veterinary Biotechnology, Harbin Veterinary Research Institute the Chinese Academy of Agricultural Sciences, Harbin 150001, China)

(<sup>2</sup> Department of Animal Medicine, College of Animal Science and Veterinary Medicine, Hebei North University, Zhangjiakou 075131, China)

**Abstract:** Herpesvirus of turkey (HVT) is an alpherpesvirus and widely used as a live vaccine against Marek's disease (MD) because of its antigenic relationship with Marek's disease virus (MDV). **[Objective]** The aim of this study was to construct Herpesvirus of turkey Fc126 strain as an infectious bacterial artificial chromosome (BAC). **[Methods]** Using the selection marker Eco-gpt (Xanthine-guanine phosphoribosyl transferase)(1.3 kb) and BAC vector pBeloBAC11(7.4 kb), we constructed the transfer plasmid pGAB-gpt-BAC11. Then, the transfer plasmid and HVT-infected cells' total DNA were cotransfected into primary chicken embryo fibroblasts (CEFs). After six rounds of selection in medium containing mycophenolic acid, xanthine and hypoxanthine, we obtained purified recombinant viruses. Genomic DNA was extracted and electroporated into *Escherichia coli* DH10B competent cells. BAC clones were identified by restriction enzyme digestion and PCR analysis, and then tested for infectivity after transfection into CEFs using calcium phosphate. **[Results]** We obtained 25 BAC clones, and reconstituted recombinant viruses by transfection of HVT-BAC6 DNA, HVT-BAC8 DNA and HVT-BAC10 DNA into CEFs respectively. **[Conclusion]** In this study, we cloned the complete genome of HVT Fc126 strain as an infectious bacterial artificial chromosome.

**Keywords:** Herpesvirus of turkey; virus rescued; bacterial artificial chromosome(BAC); BAC molecular cloned virus

Supported by the National Programs for High Technology Research and Development of China (2003AA213020)

\*Corresponding author. Tel: +86-451-85935058; E-mail: yfwang@hvri.ac.cn; gztong@hvri.ac.cn

Received: 5 November 2007/ Revised: 20 March 2008