

利用 Red/ET 技术构建表达 H5 亚型禽流感病毒 HA 基因的重组火鸡疱疹病毒

兰德松^{1,2}, 石星明¹, 王云峰^{1*}, 刘长军¹, 王玫¹, 崔红玉¹, 田国彬¹, 李继松¹, 董光志³

(¹中国农业科学院哈尔滨兽医研究所, 哈尔滨 150001)

(²辽宁省动物疫病预防控制中心, 沈阳 100164)

(³中国农业科学院上海兽医研究所, 上海 200232)

摘要 【目的】本研究以火鸡疱疹病毒(HVT) BAC 分子克隆为平台, 构建表达禽流感 HA 基因的重组火鸡疱疹病毒, 以开发新型病毒活载体疫苗。【方法】利用 Red/ET 重组技术, 经过两步法重组: 第一步, 用两端带有 50 bp 大小左、右同源臂 a 和 b 的选择标记基因 rpsL-neo 表达盒替换 HVT 基因组 U_S2 区; 第二步, 用两端带有同样的 50 bp 左、右同源臂 a 和 b 的 HA 基因表达盒替换选择标记基因 rpsL-neo 表达盒。在含有氯霉素和链霉素双抗性的平板上筛选阳性克隆, 经卡那霉素抗性反向筛选和 PCR 进一步鉴定, 鉴定正确的克隆命名为 pHVT-HA。提取并纯化 pHVT-HA DNA, 转染原代鸡胚成纤维细胞(CEF), 以完成重组病毒的拯救。【结果】命名为 pHVT-HA3 的 BAC 克隆转染 CEF 后第 4 天, 出现病毒噬斑, 噬斑形态与野生型 HVT 相似, 获得拯救的重组病毒, 命名为 rHVT-HA3, 将重组病毒 rHVT-HA3 在 CEF 上连续传代培养, 经 PCR 和间接免疫荧光检测表明, 重组病毒在连续传代过程中仍能稳定表达 HA 蛋白。【结论】本研究以 HVT BAC 为平台, 利用 Red/ET 重组技术, 构建了表达禽流感 A/Goose/Guangdong/3/96(H5N1) 毒株的血凝素(HA)基因的重组火鸡疱疹病毒, 为新型禽流感重组活载体疫苗开发奠定基础。

关键词: 火鸡疱疹病毒; 细菌人工染色体; Red/ET 克隆; 禽流感病毒; HA 基因

中图分类号: Q392 **文献标识码:** A **文章编号:** 0001-6209(2009)01-0078-07

火鸡疱疹病毒(Herpesvirus of Turkey, HVT)是近年来研究开发并逐渐转向实际应用的一种新的病毒载体, 与其它禽病毒载体相比具有许多优势: 对鸡及其它动物均无致病性, 使用安全, 接种鸡体后病毒在鸡体内形成长达数周的病毒血症, 且终生潜伏感染, 可刺激机体产生较高的抗体水平并维持终生, 接种一次即可获得终生免疫; HVT 基因组庞大, 可插入较长外源基因, 可用于构建多价或多联重组病毒活疫苗; HVT 疫苗不仅生产成本低, 而且可以冻干, 易于贮存和运输; 即使在密度很高的鸡群, HVT 也不

发生水平传播, 因而减少了重组活载体疫苗散毒的危险。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, 展现了 HVT 作为载体疫苗的良好应用前景^[1-2]。

禽流感(avian influenza, AI)是由 A 型流感病毒引起的一种禽类(家禽和野禽)感染的疾病综合症, 是目前危害养禽业最严重的疫病之一。世界多个国家的禽流感的暴发, 并引起人的感染和死亡, 提示人们 AI 的防制具有重要的公共卫生意义^[3-5]。HA 是构成 AIV 囊膜的主要成分之一, 是病毒主要的表面

基金项目: 兽医生物技术国家重点实验室开放基金课题(NKLVBP200803)

* 通信作者。Tel: +86-451-85935058; Fax: +86-451-82510712; E-mail: yfwang@hvri.ac.cn

作者简介: 兰德松(1982-)男, 湖北洪湖人, 硕士, 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: 2008-08-14; 修回日期: 2008-10-17

抗原,可以刺激机体产生中和抗体,并介导病毒进入宿主细胞^[6-7],是开发药物和疫苗的主要研究对象。

“Red/ET 重组”是近年发展起来的一种基于同源重组原理在大肠杆菌中直接修饰各类 DNA 分子的新技术。这种同源重组是由 λ 噬菌体的重组蛋白 RecE/T 或 λ 噬菌体的 Red α/β 介导重组,将线性 DNA 片段引入环形 BAC DNA 中,从而实现应用 PCR 产物或体外合成的寡核苷酸直接对靶 DNA 分子进行各种有目的修饰。目前已有研究报道^[8-10]应用该技术对多株重组病毒进行修饰。充分显示了该技术的可操作性,这将在利用 BAC 资源开展基因组学研究方面具有深远意义。

本研究以构建的火鸡疱疹病毒全基因组感染性细菌人工染色体为平台^[11],利用现代 Red/ET 重组系统,经过两步法重组,将 H5 亚型高致病力禽流感病毒株 A/goose/Guangdong/3/96 的 HA 基因插入到 HVT 基因组的复制非必需区 U_s2 区,获得插入 HA 基因 BAC 克隆,并通过脂质体转染鸡胚成纤维细胞拯救出表达禽流感病毒 HA 基因的重组火鸡疱疹病毒,为禽流感新型活病毒载体基因工程疫苗的开发奠定基础。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 质粒载体、工程菌和毒株 ϕ MD18-T 载体购自宝生物工程(大连)有限公司。真核表达载体 pcDNA3.1(+)购自 Invitrogen 公司。大肠杆菌(*Escherichia coli*) DH5 α 及 BAC 宿主菌 DH10B 由本实验室保存。高致病

性 H5N1 禽流感病毒(A/goose/Guangdong/3/96)由哈尔滨兽医研究所禽流感国家参考实验室保存。含有 HVT Fc126 株全基因组的感染性细菌人工染色体 HVT BAC6 由本实验室构建并保存^[11]。

1.1.2 主要试剂: BamH I 和 Not I 等限制性核酸内切酶、T4 DNA 连接酶、dNTP、LA Taq 酶和反转录酶(AMV)均购自宝生物工程(大连)有限公司。DMEM 细胞培养基购自 Gibco 公司(美国)。胰酶购自 Difico 公司(美国)。PCR 产物回收试剂盒购自 Bioflux 公司(杭州)。LipofectamineTM 2000 购自 Invitrogen 公司(美国)。RNeasy Mini Kit 和 Qiagen plasmid Midi kit 购自 Qiagen 公司(荷兰)。Counter-Selection BAC Modification Kit 购自 Gene Bridges 公司(德国)。L-阿拉伯多糖、氯霉素、四环素、卡那霉素及链霉素购自 Sigma 公司(美国)。Gene Pulser XcellTM Electroporation System 购自 Bio-Rad 公司(美国)。鸡抗 H5 亚型 AIV 阳性血清由哈尔滨兽医研究所禽流感国家参考实验室提供。FITC 标记的兔抗鸡 IgG 购自 Sigma(美国)公司。

1.1.3 SPF 鸡胚及细胞系: 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。293T 细胞系由本实验室保存。

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(accession No.AF291866) BAC-gpt 序列、pcDNA3.1(+)序列及禽流感病毒 A/goose/Gongdong/3/96 株(H5N1)HA 基因序列设计了以下引物(表 1),引物由宝生物工程(大连)有限公司合成。

表 1 ET 重组所用线性 DNA 片段扩增引物

Table 1 Sequences of oligonucleotides used in PCR and ET cloning

Primers	Sequence of primers(5'→3')	Target gene
HA-F	CCGGATCCGCCATGAAAATGGAGAGAATAGTGCTT	HA gene
HA-R	GTCGCGCCGCTACAATCTGAACTCAATAAAT	
rpsL-neo-F	GGCCTGGTGATGATGGCGGGATCG	rpsL-neo gene
rpsL-neo-R	TCAGAAGAAGCTCGTCAAGAAGGCC	
RepL2-F	CTCCATACATTGAATAATTCCACACGTCAGCTCATCGGATCCTTAATTA GGCCTGGTGATGATGGCGGGATCG	rpsL-neo cassette for gpt deletion
RepL2-R	TGTGAGCGGATAACAATTTCCACACAGGAAACAGCTATG ACCATGATTACGTCAGAAGAACTCGTCAAGAAGGCC	
R2H-F	GGGCAATTCGTCGCGGACTCCATACATTGAATAATTCCACACGTCAGCTCATC GTTGACATTGATTATTGACT	HA cassette for rpsL-neo deletion
R2H-R	TGTGAGCGGATAACAATTTCCACACAGGAAA CAGCTATGACCATGATTACGAAGCCATAGAGCCACCCGATC	

1.3 重组质粒 pcD-HA 的构建

按照 RNeasy plus Mini Kit 的说明书提取禽流感病毒 A/goose/Gongdong/3/96 的 RNA, 并进行反转录, 以 cDNA 为模板进行 RT-PCR, PCR 反应的条件为: 95°C 5 min, 94°C 1 min, 52°C 45 s, 72°C 1.5 min, 30 个循环, 72°C 10 min。PCR 产物经回收纯化后克隆到 pMD18-T 载体上, 并进行测序鉴定。真核表达载体 pcDNA3.1(+) 和 HA 基因分别经 *Bam*H I 和 *Not* I 双酶切处理后连接转化大肠杆菌, 阳性的重组质粒命名为 pcD-HA。

1.4 重组质粒 pcD-HA 的瞬时表达检测

提取并纯化重组质粒 pcD-HA, 按照 Lipofectamine™ 2000 说明书方法转染 293T 细胞, 同时设 pcDNA3.1(+) 空载体转染 293T 细胞对照, 转染后 36 h, 用间接免疫荧光 (IIF) 试验检测 HA 基因在 293T 细胞中的瞬时表达情况, 鉴定正确的质粒作为 PCR 模板, 用于扩增 5' 端带有 CMV 启动子和 3' 端带有 poly(A) 尾的 HA 基因表达盒。

1.5 Red/ET 两步法重组修饰 HVT BAC6

1.5.1 PCR 扩增 rpsL-neo 基因表达盒: 选取 HVT BAC6 中位于 U₂ 区 *gpt* 基因 (构建 HVT BAC 时用于筛选重组子的筛选标记基因) 第一个外显子 ATG 前面的 50 个碱基序列为左同源臂 a, 选取 *gpt* 基因终止子 TAA 后面的 50 个碱基序列为右同源臂 b, 将 a 和 b 分别置于 rpsL-neo 上、下游特异引物 rpsL-neo-F/R 序列的 5' 端, 合成新引物 RepL2-F/R, 以质粒 pRPSL-Neo 为 PCR 模板, 扩增带有同源臂 a 和 b 的选择标记基因 rpsL-neo 表达盒。回收并纯化所得的 PCR 产物, 浓度控制在 100 ~ 200 ng/ μ L。

1.5.2 第一轮 Red/ET 重组: 按照 Counter-Selection BAC Modification Kit 中描述的方法制备包含 HVT BAC6 的 DH10B 电转化感受态细胞, 分成 30 μ L/管, 每管中加入 pRed/ET 质粒 1 ~ 2 μ L (20 ~ 40 ng), 电转参数设置为 1350 V, 10 μ F, 600 Ω , 1 mm, 电击完成后立即加入 1 mL 无抗 LB 培养液, 30°C 振荡培养 70 min 后, 取 100 μ L 菌液涂布于含有氯霉素 (Cmr, 30 μ g/mL) 和四环素 (Tet, 3 μ g/mL) 双抗性的 LB 平板上, 30°C 温箱中培养 24 h, 挑取单克隆, 接种到含有同样双抗性的 5 mL LB 培养液中, 30°C 振荡, 待 OD₆₀₀ 达到 0.3 左右时, 加入 10% L-阿拉伯糖 200 μ L (使其终浓度约为 0.4%), 37°C 振荡培养 45 ~ 60 min (诱导 pRedET 表达 Red α /Red β /Red γ /RecA 蛋白), 制备成电转化感受态细胞, 分成 30 μ L/管, 每管感受态细胞中加入 1 ~ 2 μ L 回收纯化的 rpsL-neo 表达盒

PCR 产物, 电转参数设置同上, 37°C 振荡培养 70 min (同源重组在此时发生), 取菌液 100 μ L 涂布于含有氯霉素 (Cmr, 30 μ g/mL), 四环素 (Tet, 3 μ g/mL) 和卡那霉素 (Kan, 15 μ g/mL) 3 种抗性的 LB 平板上, 30°C 温箱中培养 24 h (切勿在 37°C 温箱中培养过夜, 否则表达 Red α /Red β 蛋白的质粒 pRedET 将会完全消失, 无法进行下一步重组), 挑取单克隆, 接种到含有同样 3 种抗性的 5 mL LB 培养液中, 30°C 振荡培养 16 h 左右, 取少量菌液划线接种于含有氯霉素 (Cmr, 30 μ g/mL), 卡那霉素 (Kan, 15 μ g/mL) 和链霉素 (Str, 50 μ g/mL) 3 种抗性的平板上, 37°C 温箱中培养 24 h 左右, 以检测选择标记基因 rpsL-neo 功能是否正常发挥 (如果正常发挥, 则不能在具有链霉素抗性的平板上生长)。提取并纯化 BAC 质粒, 经过凝胶电泳为大分子 DNA 的克隆进一步做 PCR 鉴定, 阳性克隆用于下一步操作。

1.5.3 PCR 扩增 HA 基因表达盒: 以重组质粒 pcD-HA 为模板, 用设计的 5' 端分别带有同源臂 a、b 的引物对 R2H-F/R 扩增 5' 端带有 CMV 启动子和 3' 带有 poly(A) 尾的 HA 基因表达盒, 回收并纯化 PCR 产物。

1.5.4 第二轮 Red/ET 重组: 将包含 rpsL-neo 基因的 BAC 克隆, 制备成电转化感受态细胞, 分成 30 μ L/管, 每管感受态细胞加 1 ~ 2 μ L (100 ~ 200 ng) HA 基因表达盒, PCR 回收产物电转参数设置同上, 电击完成后立即加入 1 mL 无抗 LB 培养液, 混匀后转入到 1.5 mL 灭菌 EP 管中, 37°C, 220 r/min 振荡培养 70 min 左右 (同源重组在此时发生), 取 100 μ L 菌液涂布于含有氯霉素 (Cmr, 30 μ g/mL) 和链霉素 (Str, 50 μ g/mL) 两种抗性的平板上, 37°C 温箱中培养 24 h 左右 (pRedET 质粒此时丢失, 以防非预期重组的发生), 同一细菌单克隆用 20 μ L Tip 头各挑取一定量菌体, 分别接种到含有氯霉素 (Cmr, 30 μ g/mL) 与链霉素 (Str, 50 μ g/mL) 的双抗性 LB 培养液和含氯霉素 (Cmr, 30 μ g/mL) 与卡那霉素 (Kan, 15 μ g/mL) 双抗性的 LB 培养液中, 验证选择标记基因 rpsL-neo 是否被替换掉, 经抗性筛选正确的 BAC 克隆进一步通过 PCR 进行鉴定。

1.6 禽流感重组火鸡疱疹病毒的拯救

经鉴定正确的含禽流感病毒 HA 基因的 BAC 克隆, 提取并纯化其 DNA, 按照 Lipofectamine™ 2000 说明转染新鲜制备的原代 CEF, 37°C、5% CO₂ 细胞培养箱中培养 9 h 后, 换成含 2% 胎牛血清和 1% S/P 的 DMEM 细胞培养液培养, 72 h 后开始每天观察病毒噬斑形成情况。出现病毒噬斑后, 待 80% 细胞出

现病变时,传到新鲜制备的单层原代 CEF 上增殖。根据文献 [12] 描述的方法提取病变细胞总 DNA,通过 PCR 进一步验证,重组病毒在 CEF 上连续传代至第 10 代,再次通过 PCR 扩增 HA 基因,同时按照本文 1.2.3 中描述的方法进行间接免疫荧光检测重组病毒中禽流感病毒 HA 基因的表达情况。

2 结果和分析

2.1 HA 基因的 PCR 扩增及真核表达重组质粒 pcD-HA 的鉴定

以禽流感病毒 A/goose/Gongdong/3/96(H5N1)的 cDNA 为模板扩增出一条特异性条带,大小约为 1.7kb,与 HA 基因大小相符,经过测序进一步鉴定正确。将 HA 基因定向克隆到真核表达载体 pcDNA3.1(+)中,构建的真核表达重组质粒 pcD-HA 经酶切鉴定结果正确,说明载体构建成功。

间接免疫荧光结果显示,重组质粒 pcD-HA 转染 293T 细胞 36 h 后,出现特异性荧光,而空载体 pcDNA3.1(+)转染 293T 细胞对照则无荧光(图 1)表明 HA 基因能够正确表达,可以用于下一步试验。

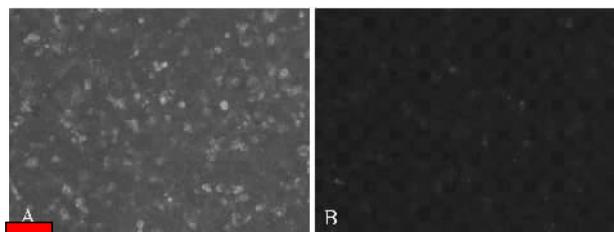


图 1 间接免疫荧光检测 HA 的表达

Fig. 1 Detection of HA expression by IFA assay. A: Immunofluorescence of pcD-HA transfected 293T cells; B: pcDNA3.1(+) transfected 293T cells as control.

2.2 rpsL-neo 基因替换 U_S2 区鉴定

在 L-阿拉伯糖的诱导下,pRedET 质粒表达 Red α /Red β /Red γ 等蛋白,介导同源重组发生,经抗性筛选,共获得 14 个细菌克隆,小量提取质粒,经过凝胶电泳初步鉴定确定均为大分子 DNA 的克隆,中量提取并纯化其中的 7 个 BAC 质粒,以设计的不带同源臂的引物进行 PCR 扩增,产物大小约为 1.3 kb,与预期大小一致(图 2-A),表明 rpsL-neo 基因插入到 HVT 基因组的 U_S2 区,鉴定正确的 BAC 克隆命名为 BAC-rpsL-neo。

2.3 HA 基因表达盒替换 rpsL-neo 基因鉴定

经抗性筛选,获得具有氯霉素和链霉素双抗性、并失去卡那霉素抗性的 BAC 克隆 12 个,分别命名为 pHVT-HA1-pHVT-HA12。经凝胶电泳初步鉴定为

大分子 DNA 的克隆,中量提取并纯化其中的 6 个 BAC 质粒,以设计的引物对(HA-F/R)特异性地扩增到大小约为 1.7 kb 的条带,与 HA 基因片段大小一致(图 2-B)。

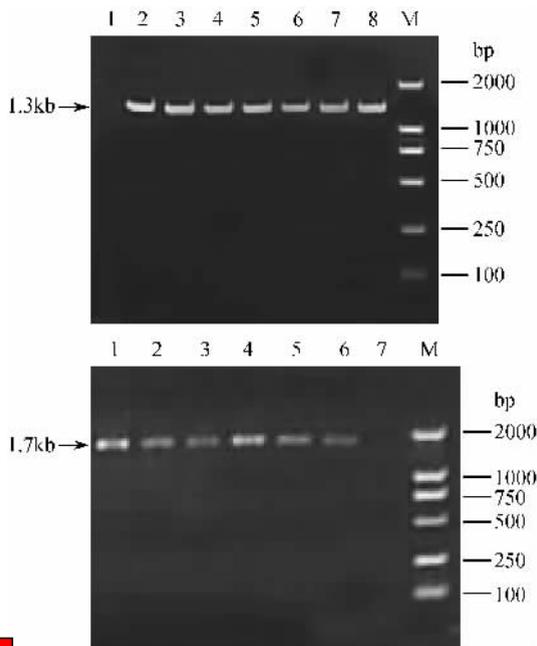


图 2 PCR 扩增 rpsL-neo 基因

Fig. 2 PCR amplification of rpsL-neo gene (A) and Ha gene (B). A: 1. Negative control; 2-8. rpsL-neo gene; M. DNA Marker DL2000; B: 1-6: HA gene; 7. Negative control; M. DNA Marker DL2000.

2.4 表达禽流感 HA 基因的重组火鸡病毒的拯救

随机选取 pHVT-HA1-pHVT-HA12 中的 6 个 BAC 克隆,中量提取并纯化 BAC DNA 后转染次代 CEF,其中标记为 pHVT-HA3 的 BAC 克隆在 CEF 上再次启动感染,拯救出禽流感重组火鸡疱疹病毒,命名为 rHVT-HA,图 3 为该 BAC 克隆在鸡胚成纤维细胞上培养 96 和 120 h 病毒形成的噬斑。

2.5 间接免疫荧光检测重组病毒中 HA 基因的表达

拯救的重组病毒 rHVT-HA 连续传至第 10 代,PCR 扩增到大小约 1.7 kb 的 HA 基因,间接免疫荧光结果表明,拯救的重组病毒 rHVT-HA 感染 CEF 后出现特异性荧光,而 CEF 对照则无荧光(图 4),表明重组病毒 rHVT-HA 能在 CEF 中正确表达 HA 蛋白。

3 讨论

禽流感自 1878 年意大利首次报道至今已有 130 年的历史。目前,该病在世界各地广泛存在,给养禽业带来巨大损失,而高致病性禽流感(HPAI)虽然对养禽业的危害却是毁灭性的。更值得注意的是近年来 HPAI 病毒感染人并致人死亡事件不断发生,由

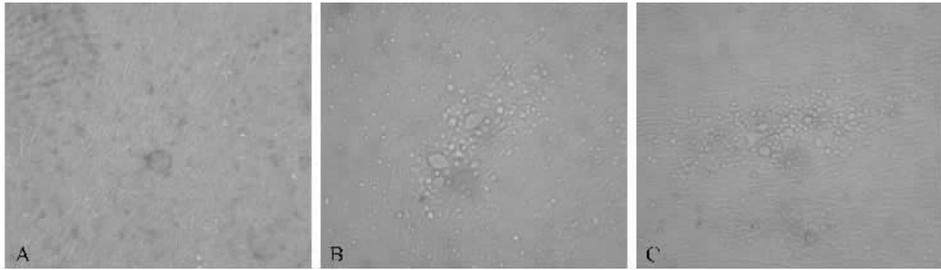


图3 pHVT-HA3 BAC 质粒转染鸡胚成纤维细胞后形成的噬斑形态

Fig.3 Morphology of the plaques on CEFs after tranfection with the BAC DNA of pHVT-HA3.

A: Normal CEFs; B: pHVT-HA3 BAC infected CEF(96 h)($\times 100$); C: pHVT-HA3 BAC infected CEF(120 h)($\times 100$).

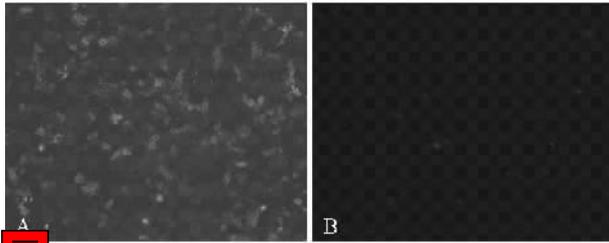


图4 间接免疫荧光检测重组病毒 rHVT-HA 感染鸡胚成纤维细胞后 HA 基因的表达

Fig.4 Immunofluorescence analysis of HA expression in rHVT-HA infected CEFs. A: Immunofluorescence detected on rHVT-HA infected CEFs; B: Normal CEFs.

由此可见,HPAI 病毒正在逐渐获得感染人的能力,人类可能面临着流感大爆发的威胁^[3,13]。

对 HPAI 的控制最初是采取隔离和扑杀,如今越来越多的国家倾向于应用疫苗进行免疫预防,实践证明全病毒灭活疫苗具有良好的免疫效果。但其最大的不足是疫苗接种诱导机体产生的抗体会导致免疫鸡与自然感染鸡难以区分,从而影响疫病的流行病学普查。近年来,DNA 重组技术的发展和运用使得疫苗的研究正逐渐从传统的灭活和减毒疫苗向基因工程疫苗过渡,以期克服常规疫苗的一些弊端,进而更好地满足生产的需要,其中病毒活载体疫苗以其独特的优势备受青睐。同灭活疫苗相比,活载体疫苗的用量少,又不需要添加佐剂,成本大大降低,而且免疫保护持续时间长,效果好。更重要的是,重组活载体疫苗在免疫鸡群后,HI 抗体和中和抗体都很低,而攻毒后两种抗体滴度都明显升高,从而既可以保护强毒的攻击,又不至于严重影响该病的监测和流行病学调查^[14]。一些科学家已经以鸡痘病毒(fowlpox virus)及新城疫病毒(Newcastle disease virus)为载体成功构建了表达禽流感 HA 基因的重组病毒^[6,15-17],而且动物试验结果表明,免疫效果良好,显示了重组病毒活载体疫苗良好的开发和应用前景。

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,是世界各国普遍使用的疫苗,尤其是 HVT 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 上仍然具有重要价值^[2,18-19]。

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,近些年来以 HVT 为载体的基因工程疫苗一直是国内外学者研究的热点。新城疫病毒(NDV)、血清 1 型 MDV、传染性法氏囊病毒(IBDV)、传染性喉气管炎病毒(ILTV)、禽白血病病毒(ALV)以及艾美尔球虫病(Eimeria)的保护性抗原都已在 HVT 载体中获得表达,而且能够抵抗致死剂量病原的感染,因而以 HVT 为载体的基因工程疫苗的研究具有广阔的应用前景^[2]。

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,过去使用在真核细胞中的重组操作技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。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^[2,20-21]。尤其是最近发展起来的“Red/ET 重组”技术在 BAC 修饰上的应用,更是促进了 BAC 技术的快速发展。

“Red/ET 重组”是近年发展起来的一种基于同源重组原理在大肠杆菌中直接修饰各类 DNA 分子的新技术。较之传统的酶切、连接、转化的方案更加快速方便,而且应用范围更广泛。这种同源重组是由 λ 噬菌体的重组蛋白 RecE/T 或 λ 噬菌体的 Red α/β 介导重组,将线性 DNA 片段引入环形 BAC DNA 中,发生重组所需要的同源臂仅为 30~50 bp^[9,22]。50 bp 的同源臂可以通过 PCR 的方法加载在打靶序列的两侧,也可以直接合成仅含两个

同源臂的寡核苷酸序列,在同源臂与 PCR 引物之间或两个同源臂之间还可以加入一些特殊序列,如 loxP 位点、限制性内切酶位点、蛋白质标签以及点突变等,从而实现应用 PCR 产物或体外合成的寡核苷酸直接对靶 DNA 分子进行各种有目的修饰^[22]。

本研究利用目前优化的 ET 克隆技术对 BAC 进行修饰,以表达 Red α /Red β /Red γ /RecA 的质粒 pRedET 为依托质粒,采用 rpsL-neo 为正/反向选择系统,理论上只需要 2~3 周即可完成对 BAC 进行插入、替换、删除等各种有目的修饰。之所以应用 rpsL-neo,一方面是因为 BAC 的宿主菌株 *E. coli* DH10B 为 rpsL 缺失突变株,其自身具有链霉素抗性,当插入并重新表达 rpsL 后 BAC 宿主菌又会变为链霉素敏感;同理,当 rpsL 再次被其它目的基因替换时宿主菌则又恢复链霉素抗性。因此,通过链霉素抗性筛选就可以实现非抗性目的基因对 BAC 的修饰,联合 neo 基因的目的在于能够通过卡那霉素做正向筛选,使 rpsL 顺利插入到 BAC 中。应用 rpsL-neo 另一方面是因为该联合基因只有 1.3 kb,易于进行 PCR 扩增以加载同源臂。另外,在进行第一轮 Red/ET 重组时由于能够进行卡那霉素做正向筛选,因而效率很高,在卡那霉素抗性平板获得的细菌克隆 80% 左右为正确的克隆。但进行第二轮 Red/ET 重组时,因为链霉素进行反向筛选的是缺失了 rpsL 的 BAC 突变株,在电转化过程中会有一定比例的突变,在链霉素抗性平板上的细菌克隆只有 20%~30% 为正确的克隆,不过 Red/ET 重组本身效率很高,因而很容易获得多个正确的 BAC 克隆。提取 BAC 质粒转染真核细胞,部分 BAC 克隆可以完成重组病毒的拯救。

本实验以本研究室构建的 HVT 感染性细菌人工染色体为平台,首次利用高效的 BAC 修饰技术——Red/ET 重组修饰系统对其进行操作,将禽流感病毒血凝素(HA)基因插入到 HVT 复制非必需区 U₅2,最终构建了表达禽流感 HA 基因的重组火鸡疱疹病毒,为新型 AI 重组活载体疫苗的开发奠定了基础。

参考文献

[1] Bublot M, Sharma J. Vaccination against Marek's disease. In Marek's Disease—An Evolving Problem(R). Edited by TF Davison & V Nair. London :Academic Press ,2004 :168 - 185.

[2] Baigent SJ, Petherbridge LJ, Smith LP, et al. Herpesvirus of turkey reconstituted from bacterial artificial chromosome clones induces protection against Marek 's disease. *Journal of General Virology* 2006 87(Pt 4) :769 - 776.

[3] Shortridge KF, Zhou NN, Guan Y, et al. Characterization of avian H5N1 influenza viruses from poultry in Hong Kong. *Virology* ,1998 ,252 :331 - 342.

[4] Sims LD, Y Guan, TM Ellis, et al. An update on avian influenza in Hong Kong 2002. *Avian Diseases* ,2003 ,47 (Suppl) :1083 - 1086.

[5] Horimoto T, Y Kawaoka. Pandemic threat posed by avian influenza A viruses. *Clinical Microbiology Reviews* ,2001 ,14 :129 - 149.

[6] Qiao C, K Yu, Y Jiang, et al. Development of a recombinant fowlpox virus vector-based vaccine of H5N1 subtype avian influenza. *Developmental Biology (Basel)* ,2006 ,124 :127 - 132.

[7] Manon M, J. Cox. Pandemic Influenza : Overview of Vaccines and Antiviral Drugs. *Yale Journal of Biology And Medicine* ,2006 ,79 :317 - 324.

[8] Leandro V, Zong-Qiang Tian, Robert M, et al. Rapid Engineering of the Geldanamycin Biosynthesis Pathway by Red/ET Recombination and Gene Complementation. *Applied and Environmental Microbiology* ,2005 ,71(4) :1829 - 1835.

[9] 王军平, 张友明, 粟永萍. Red/ET 同源重组介导细菌人工染色体的快速修饰. *生物化学与生物物理进展 (Progress Biochemistry Biophysics)* ,2005 ,32(5) :468 - 473.

[10] Tolmachov O, Palaszewski I, Bigger B, et al. RecET driven chromosomal gene targeting to generate a RecA deficient *Escherichia coli* strain for Cre mediated production of minicircle DNA. *BMC Biotechnology* ,2006 ,6 :17(1 - 12).

[11] 兰德松, 石星明, 王云峰, 等. 火鸡疱疹病毒细菌人工染色体的构建. *微生物学报 (Acta Microbiologica Sinica)* ,2008 ,48(6) :1 - 7.

[12] Morgan RW, Cantello JL, McDermott CH, et al. Transfection of chicken embryo fibroblasts with Marek 's disease virus DNA. *Avian Diseases* ,1990 ,34(2) :345 - 351.

[13] Liu JP. Avian influenza-a pandemic waiting to happen? *Journal of Microbiology, Immunology and Infection* ,2006 ,39 :4 - 10.

[14] Swayne DE, Garcia M, Beck JR, et al. Protection against diverse highly pathogenic H5 avian influenza viruses in chickens immunized with a recombinant fowlpox vaccine containing an H5 avian influenza hemagglutinin gene insert. *Vaccine* ,2000 ,18 :1088 - 1095.

[15] Veits J, D Wiesner, W Fuchs, et al. Newcastle disease virus expressing H5 hemagglutinin gene protects chickens against Newcastle disease and avian influenza. *The Proceedings of the National Academy of Sciences USA* ,2006 ,103 :8197 - 8202.

[16] Park MS, J Steel, A Garcia-Sastre, et al. Engineered viral vaccine constructs with dual specificity :avian influenza and Newcastle disease. *The Proceedings of the National Academy*

- of Sciences USA 2006 ,103 :8203 – 8208.
- [17] Ge J ,G Deng ,Z Wen ,et al. Newcastle disease virus-based live attenuated vaccine completely protects chickens and mice from lethal challenge of homologous and heterologous H5N1 avian influenza viruses. *The Journal of Virology* , 2007 ,81 :150 – 158.
- [18] Witter RL ,Kreager KS. Serotype 1 viruses modified by backpassage or insertional mutagenesis :approaching the threshold of vaccine efficacy in Marek 's disease. *Avian Diseases* ,2004 ,48 (4) :768 – 782.
- [19] Schat KA. Isolation of Marek 's disease virus :revisited. *Avian Pathology* ,2005 ,34 (2) :91 – 95.
- [20] 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.
- [21] 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. *The Journal of Virology* ,2000 ,74 (23) :11088 – 11098.
- [22] Zhang Y ,F Buchholz ,JP Muylers ,et al. 1998. A new logic for DNA engineering using recombination in *Escherichia coli*. *Nature Genetics* ,20 :123 – 128.

Construction of a recombinant HVT virus expressing the HA gene of avian influenza virus H5N1 via Rde/ET recombination system

Desong Lan^{1,2} ,Xingming Shi¹ ,Yunfeng Wang^{1*} ,Changjun Liu¹ ,Mei Wang¹ ,Hongyu Cui¹ ,Guobin Tian¹ , Jisong Li¹ ,Guangzhi Tong³

(¹ National Key Laboratory of Veterinary Biotechnology ,Harbin Veterinary Research Institute ,Chinese Academy of Agricultural Sciences ,Harbin 150001 ,China)

(² Liaoning Center for Animal Epidemic Disease Control and Prevention ,Shenyang 110164 ,China)

(³ Shanghai Veterinary Research Institute ,the Chinese Academy of Agricultural Sciences ,Shanghai 200232 ,China)

Abstract [Objective] In recent years ,manipulation of large herpesvirus genomes has been facilitated by using bacterial artificial chromosome(BAC) vectors . We have previously reported the construction of the BAC clones (HVT BACs) of herpesvirus of turkey (HVT). With these BAC clones in hand ,we manipulated the genome of HVT by utilizing Red/ET recombination system , and developed a biologically safe live vaccine based on the HVT BACs . **[Method]** In this two-step approach ,we first transformed the plasmid pRedET into the DH10B competent cells that carried the HVT BACs ,and added inducer L-arabinose into the cells . We prepared the cells into competent cells and electroporated the linear rpsL-neo counter-selection/selection cassette flanked by the 50 bp long homology arms into the cells . So the functional cassette was inserted into the U_s2 locus . Only colonies carrying the modified BAC would survive Kanamycin selection on the agar plates . The successful integration of the rpsL-neo cassette was monitored by PCR and Streptomycin selection ,for the insertion of rpsL-neo cassette cells will become Streptomycin sensitive . Secondly ,in the same way ,we replaced the rpsL-neo cassette with the hemagglutinin (HA) gene of (HPAIV)A/Goose/ Guangdong/1/96 (H5N1)flanked by the same homology arms . Only colonies which lost the rpsL-neo cassette will grow on Streptomycin containing plates . **[Results]** Finally ,we obtained many colonies of which the HA gene of the AIV was inserted into the U_s2 locus to be modified of HVT . And we reconstituted one recombinant virus from transfecting one of these BAC clones DNA into chick embryo fibroblasts(CEFs) . **[Conclusion]** We achieved one rescued recombinant virus which designated as rHVT-HA3 . The H5 subtype HA gene expression in this recombinant virus rHVT-HA3 was confirmed by immunofluorescence assay .

Keywords : herpesvirus of turkeys ; bacterial artificial chromosome ; Red/ET cloning ; Avian influenza virus ; hemagglutinin (HA) gene

(本文责编 张晓丽)