

# 伪狂犬病病毒 TK<sup>-</sup>/gG<sup>-</sup> 缺失株的构建及其生物学特性研究

徐晓娟 徐高原 陈焕春\* 刘正飞 何启盖

(华中农业大学动物医学院病毒室,武汉 430070)

**摘 要** 将伪狂犬病病毒 TK<sup>-</sup>/gG<sup>-</sup>/LacZ<sup>+</sup> 突变株的基因组 DNA 与含有缺失的 gG 基因的转移质粒 pUSKBB 共转染猪肾传代细胞 PK-15,待完全病变后收获病毒进行空斑试验,用 PCR 筛选 gG 缺失的重组病毒。空斑纯化 3 次后,随机挑取空斑进行 PCR 扩增,证实所获得的病毒为均一的 TK<sup>-</sup>/gG<sup>-</sup> 缺失株。遗传稳定性试验表明该重组病毒能在 PK-15 细胞上稳定遗传,动物试验表明该缺失株对 Balb/c 小鼠极为安全且能保护 Balb/c 小鼠抵抗致死量 PRV 强毒的攻击。该突变株的获得为我国伪狂犬病的控制和根除奠定了基础。

**关键词** 伪狂犬病病毒,TK<sup>-</sup>/gG<sup>-</sup>/LacZ<sup>+</sup> 突变株,TK<sup>-</sup>/gG<sup>-</sup> 缺失株

中图分类号 Q754 文献标识码 A 文章编号 1000-3061(2004)04-0532-04

伪狂犬病病毒(Pseudorabies Virus,PRV)属于疱疹病毒科  $\alpha$ -疱疹病毒亚科的猪 I 型疱疹病毒,能引起家畜和多种野生动物的急性传染病(伪狂犬病)。该病对猪的危害尤为严重,主要引起妊娠母猪流产,公猪睾丸发炎、萎缩、丧失种用能力,初生仔猪急性发病而大量死亡,猪是该病毒的贮藏宿主和传染源<sup>[1]</sup>。上个世纪六七十年代,该病在世界各地广泛存在,大多数西欧国家和美国都出现了该病的发生和流行,90 年代以来,伪狂犬病在我国也开始出现,而且日益严重。目前,该病遍布我国大部分地区,严重地危害着养猪业的发展,并造成了重大的经济损失。

对于伪狂犬病,目前已建立了多种诊断方法,也有多种疫苗可以进行免疫预防。但是,由于伪狂犬病的潜伏感染以及养猪业的规模化,使得猪场一旦感染此病便难以根除。所以,为了进一步控制并最终根除此病,尚需建立一种新型疫苗,既对猪产生安全有效的保护力,又能通过血清学方法区分疫苗接种猪和自然感染猪。目前这方面的研究主要是 gE 和 gX(gG) 标记疫苗的研究<sup>[2-4]</sup>。

TK<sup>-</sup>/gG<sup>-</sup>/LacZ<sup>+</sup> 重组病毒株<sup>[5]</sup>含有外源标记基因 LacZ,且 gG 基因是通过 LacZ 插入而失活。如果将其改造为不含有外源标记基因,且 gG 基因为缺

失失活的 TK<sup>-</sup>/gG<sup>-</sup> 重组病毒株,将更适合于作为疫苗株。因此在 TK<sup>-</sup>/gG<sup>-</sup>/LacZ<sup>+</sup> 重组病毒株的基础上,我们构建了 TK<sup>-</sup>/gG<sup>-</sup> 双缺失株。在临床上用该缺失株生产的疫苗免疫猪,结合鉴别诊断方法,即能将疫苗接种猪和自然感染猪区分开,从而淘汰自然感染阳性猪,进而建立健康猪群。

## 1 材料与方 法

### 1.1 材 料

**1.1.1 毒株和细胞**:伪狂犬病病毒鄂 A(Ea)株,由本室分离鉴定并保存<sup>[6]</sup>,伪狂犬病病毒 TK<sup>-</sup>/gG<sup>-</sup>/LacZ<sup>+</sup> 突变株由本室构建并保存<sup>[5]</sup>。PK-15 细胞和 IBRS-2 细胞均购自中国兽药监察所细胞室并由本室保存。

**1.1.2 质粒与菌株**:伪狂犬病病毒 gG 基因转移质粒 pUSK 由本室构建<sup>[7]</sup>,系在 pUC18 质粒的多克隆位点插入伪狂犬病病毒 Ea 株基因组 *Sph* I/*Kpn* I 片段(2.6kb)而成,该片段含有 PRV Ea 株完整的 gG 基因及 PK 基因的部分下游序列和 gD 基因部分上游序列。大肠杆菌 DH5 $\alpha$  由本室保存。

**1.1.3 工具酶、试剂盒及主要生化试剂**:各种 DNA 限制性内切酶均为 TaKaRa 公司产品,CIAP,TaqDNA 聚合酶及 T4DNA 连接酶购自华美生物工程公司。

DNA 快速回收试剂盒和 DMEM 培养基由原平皓生物技术公司提供。脂质体转染试剂盒为 GIBCO-BRL 公司产品。5-溴-4-氯-3-吡啶半糖苷(X-gal)购自武汉中健科技发展有限公司。

**1.1.4 实验动物** 4~6 周龄伪狂犬病血清学阴性的雌性 Balb/c 小鼠购自武汉生物制品研究所。

## 1.2 方法

**1.2.1 病毒核酸的提取** 参照文献进行<sup>[8]</sup>。

**1.2.2 转移质粒的构建** 因 gG 基因内部含有单一的 BamH I 和 BstE II 位点,用该两种酶消化含有 gG 基因的质粒 pUSK,回收大片段,末端补平后再自连。

**1.2.3 共转染与重组病毒的筛选及纯化** 将 PRV TK<sup>-</sup>/gG<sup>-</sup>/LacZ<sup>+</sup> 突变株基因组 DNA(约 0.5 μg)和转移质粒(约 2.5 μg)用脂质体法共转染已长满单层的 IBRS-2 细胞,待细胞完全病变后,收毒。反复冻融 3 次,将其作连续 10 倍稀释(10<sup>-1</sup>~10<sup>-6</sup>),然后接种 PK-15 细胞已长满单层的 6 孔细胞培养板,37℃ 吸附 1h 后,覆盖含 1% 甲基纤维素和 3% 犊牛血清的 DMEM 2d 后弃去覆盖层,再用含 1% 低熔点琼脂糖,150 μg/mL X-gal 及 3% 犊牛血清的 DMEM 覆盖,待空斑出现后挑取白斑接种于 PK-15 细胞已长成单层的 24 孔培养板,待出现明显病变后,收毒提取核酸作为模板进行 PCR 鉴定。

**1.2.4 重组病毒的鉴定**:

(1)PCR 鉴定:将纯化后的重组病毒扩大培养,提取 DNA 模板用 PCR 分别对 gG 缺失基因和 LacZ 基因进行扩增鉴定。其中用于扩增 gG 基因的 PCR 引物为:P<sub>F</sub>:5'-TCAACAATGAAGTGGGCAAC-3',P<sub>R</sub>:5'-TGGTGTTGGTGGTCTCGGTC-3'。

(2)测序鉴定:以纯化好的重组病毒 TK<sup>-</sup>/gG<sup>-</sup> 基因组 DNA 为模板扩增缺失后的 gG 基因,送上海生工以双脱氧末端终止法测序。

**1.2.5 重组病毒遗传稳定性研究** 将纯化好的 TK<sup>-</sup>/gG<sup>-</sup> 重组病毒在 PK-15 细胞上连续传 10 代,分别提取基因组 DNA,用 PCR 扩增缺失后的和全长的 gG 基因,同时设 PRV Ea 株和正常 PK-15 细胞为对照。

**1.2.6 重组病毒的增殖特性** 在 PK-15 细胞上测定 PRV TK<sup>-</sup>/gG<sup>-</sup>/LacZ<sup>+</sup> 及 PRV TK<sup>-</sup>/gG<sup>-</sup> 缺失株的 TCID<sub>50</sub>。

**1.2.7 安全性试验** 取 2 倍的病毒原液(200 μL),原液(100 μL),10 倍稀释(100 μL),100 倍稀释液(100 μL)采用足垫注射的方法分别接种 Balb/c 小鼠,

每组 8 只,逐日观察 2 周,记录其死亡情况。

**1.2.8 效力试验** 重组病毒以 10<sup>5.0</sup> TCID<sub>50</sub> 的剂量采用足垫注射接种于 Balb/c 小鼠,7d 后,以 100LD<sub>50</sub> 剂量的 PRV Ea 株(强毒株)进行攻击,同时设立 PBS 注射组作为对照。逐日观察并记录其死亡情况。

## 2 结果

### 2.1 转移质粒 pUSKBB 的构建

用 BamH I 和 BstE II 双酶切质粒 pUSK,去掉其 gG 基因内部大约 1.1kb 的片段补平后自连,经酶切和 PCR 鉴定证明构建正确,重组质粒命名为 pUSKBB。

### 2.2 重组病毒的筛选及鉴定

重组中间转移质粒与 PRV TK<sup>-</sup>/gG<sup>-</sup>/LacZ<sup>+</sup> 共转染 IBRS-2 细胞 40h 后出现明显的细胞病变,收毒后做空斑,在含 X-gal 的琼脂糖覆盖下,出现典型的蓝白斑。第一次挑取的 24 个白斑中有 20 个扩增出缺失后的 gG 基因片段。经 3 次空斑纯化后,已无蓝斑,以第三次所挑空斑扩大后提取的基因组 DNA 为模板分别对 gG 基因和 LacZ 基因进行扩增,所有重组病毒都能扩增出 gG 基因缺失的片段,但扩增不到 LacZ 基因片段。而以 TK<sup>-</sup>/gG<sup>-</sup>/LacZ<sup>+</sup> 突变株 DNA 为模板则不能得到 gG 基因缺失后的片段,但能扩增出 LacZ 基因特异性条带。结果见图 1 和 2。这表明重组病毒 TK<sup>-</sup>/gG<sup>-</sup> 已完全得到纯化。

### 2.3 序列分析

将从 TK<sup>-</sup>/gG<sup>-</sup> 突变株中扩增到的 gG 基因的 PCR 产物进行测序分析,结果表明,与 Ea 株相比,该缺失株中的 gG 基因已发生了 1076bp 的缺失(完整的 PRV Ea 株 gG 基因在 GenBank 的登录号为 AY319929),这与我们预期的结果一致。这一结果表明,我们确实已获得 TK<sup>-</sup>/gG<sup>-</sup> 重组病毒。

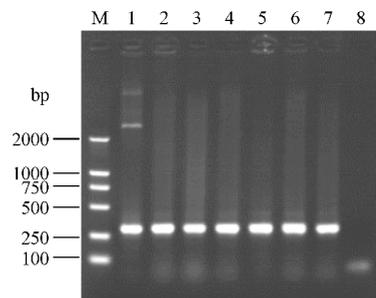


图 1 重组病毒 TK<sup>-</sup>/gG<sup>-</sup> 的 PCR 鉴定

Fig.1 Identification of recombinant virus TK<sup>-</sup>/gG<sup>-</sup> by PCR  
1: positive control 2~7: sample of treated cells 8: cells control

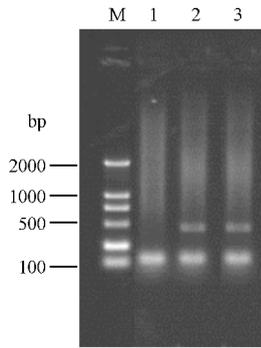


图2 重组病毒 TK<sup>-</sup>/gG<sup>-</sup>的纯化鉴定

Fig.2 Identification of purified recombinant virus by PCR to amplify LacZ gene

1 :LacZ amplification from treated cells infected with TK<sup>-</sup>/gG<sup>-</sup> ;2,3 : LacZ amplification from treated cells infected with TK<sup>-</sup>/gG<sup>-</sup>/LacZ<sup>+</sup>

## 2.4 重组病毒的遗传稳定性

将 TK<sup>-</sup>/gG<sup>-</sup> 缺失株在 PK-15 细胞上连续传 10 代用 PCR 鉴定,结果均能扩增出 gG 基因缺失的条带(300bp),不能扩增出 gG 全基因 1600bp 的条带,而 PRV Ea 株则能扩增出 gG 全基因 1600bp 的条带但不能扩增出 gG 基因缺失的条带(300bp),而且 PK-15 细胞对照中无特异性扩增带。这表明 TK<sup>-</sup>/gG<sup>-</sup> 缺失株在 PK-15 细胞上能稳定遗传。

## 2.5 重组病毒的增殖特性

在 PK-15 细胞上 PRV TK<sup>-</sup>/gG<sup>-</sup>/LacZ<sup>+</sup> 和 PRV Ea TK<sup>-</sup>/gG<sup>-</sup> 突变株的 TCID<sub>50</sub> 分别为 10<sup>-7.1</sup> 和 10<sup>-7.2</sup>, 表明 gG 的缺失对 PRV Ea 株在细胞上的增殖能力没有影响。

## 2.6 安全性试验

接种 TK<sup>-</sup>/gG<sup>-</sup> 缺失株的各组小鼠均没有观察到临床症状,无死亡,而接种 PRV Ea 株的小鼠则表现出典型的伪狂犬病病毒感染症状并于 2 周内全部死亡。这表明 TK<sup>-</sup>/gG<sup>-</sup> 缺失株对小鼠是非常安全的。

## 2.7 效力试验

攻毒后,TK<sup>-</sup>/gG<sup>-</sup> 接种组没有表现出临床症状,全部存活。而对照组则表现出典型的伪狂犬病临床症状,且在 1 周内全部死亡。这表明 TK<sup>-</sup>/gG<sup>-</sup> 缺失株能够诱导小鼠产生保护性免疫。

## 3 讨论

通过同源重组来产生重组病毒是一种广泛使用的构建重组病毒的方法,但将不经任何修饰的伪狂犬病毒基因组与转移质粒直接转染细胞,其重组效率非常低,如果再没有有效的筛选标记,工作量将非常大,想获得重组病毒将是非常困难的。为了克服

这一问题,我们采用 PRV TK<sup>-</sup>/gG<sup>-</sup>/LacZ<sup>+</sup> 突变株作为载体病毒。这是因为 LacZ 本身是一种标记,以 TK<sup>-</sup>/gG<sup>-</sup>/LacZ<sup>+</sup> 作为载体病毒进行重组时,所获得的重组病毒 TK<sup>-</sup>/gG<sup>-</sup> 在 X-gal 存在下形成的空斑呈白色,而未发生重组的亲本株形成的空斑呈蓝色,这样仅凭肉眼就可直接初步筛选重组病毒,另外,伪狂犬病病毒基因组 DNA 中不存在 EcoR I 的酶切位点,而 LacZ 基因编码区含有单一的 EcoR I 位点,当用 EcoR I 消化的 PRV TK<sup>-</sup>/gG<sup>-</sup>/LacZ<sup>+</sup> 基因组与转移质粒共转染时,理论上只有重组病毒才会形成完整的病毒进而产生细胞变,这无疑会极大的提高重组效率,大大减少工作量。本研究中,重组效率为 83.3%。远远高于常规方法的重组效率(不足 2%)。这为重组病毒的获得打下了坚实的基础,也为其它重组病毒的构建提供了可供借鉴的方法。

TK 基因为伪狂犬病病毒的主要毒力基因之一,将其缺失不仅不会影响伪狂犬病病毒在培养细胞上的增殖,而且会使伪狂犬病病毒的感染能力大大降低。gG 基因是伪狂犬病病毒的主要糖蛋白基因之一。又是 PRV 的非必需基因。gG 缺失后,病毒将不能表达 gG 蛋白,接种动物后不产生抗 gG 抗体,因此结合我们实验室研制的伪狂犬病病毒鉴别 ELISA 和 LAT 试剂盒可将疫苗免疫猪与野毒感染猪区分开来,从而为伪狂犬病的根除提供有用的工具。本研究中构建的 TK<sup>-</sup>/gG<sup>-</sup> 缺失株不含外源报告基因,这就消除外源基因可能存在的对 PRV 本身生物学特性的影响及在临床上可能引起的副作用,尽管这种可能性到目前还未发现。另外,TK<sup>-</sup>/gG<sup>-</sup> 缺失株是由 gG 基因内部缺失了 1.1kb 构建而成,这就不存在外源基因的丢失而可能产生的突变。初步动物实验表明,该缺失株对 Balb/c 小鼠是安全的且能保护 Balb/c 小鼠抵抗致死性 PRV 强毒攻击。因而本缺失株更适合作为疫苗株。

伪狂犬病是危害全球养猪业的重大疫病之一,给世界养猪业特别是我国养猪业造成巨大的经济损失。因此,有效防制直至根除伪狂犬病已成为当前养猪业之急需,本重组缺失病毒的成功构建将为我国伪狂犬病的防制乃至今后根除计划的启动打下基础。

## REFERENCES(参考文献)

- [1] Yin Z(殷震), Liu JH(刘景华). Animal Virology(2nd). Beijing, Science Press, 1997
- [2] Rob JM, Moroman M *et al.* Inactivation of the thymidine kinase

still highly immunogenic vaccine strain. *J G Virol*, 1990, **71**:1592 - 1595

- [ 3 ] Marchioli CC, Yancy RJ *et al*. A vaccine strain of Pseudorabies Virus with deletion in Thymidine Kinase and glycoprotein gX gene. *Am J Vet Res*. 1987, **43**:1577 - 1583
- [ 4 ] Zhou FC (周复春), Chen HC (陈焕春), Fang LR (方六荣) *et al*. Construction of the mutants of pseudorabies virus strain Ea with the genotype gG<sup>-</sup>/LacZ<sup>+</sup>. *Acta Veterinaria et Zootechnica Sinica* (畜牧兽医学报) 2001, **32**(2):134 - 138
- [ 5 ] Chen HC (陈焕春), Zhou FC (周复春), Fang LR (方六荣) *et al*. Construction of TK<sup>-</sup>/gG<sup>-</sup>/LacZ<sup>+</sup> mutant of pseudorabies virus Ea strain. *Chinese Journal of Virology* (病毒学报), 2001; **7**(1) 9

- 74

- [ 6 ] Chen HC (陈焕春), Fang LR (方六荣), He QG (何启盖) *et al*. Study on the isolation and identification of the Ea strain of pseudorabies virus. *Acta Veterinaria et Zootechnica Sinica* (畜牧兽医学报) 1998, **29**(2):156 - 161
- [ 7 ] Zhou FC (周复春). Construction of the gene-deleted mutants of pseudorabies virus strain Ea. Ph.D degree thesis, Wuhan, Huazhong Agricultural University, 1998
- [ 8 ] Liu ZF (刘正飞), Chen HC (陈焕春), Zhou FC (周复春) *et al*. Construction of TK<sup>-</sup>/LacZ<sup>+</sup> mutant strain of pseudorabies virus Bartha strain and the study on its biological property. *Acta Veterinaria et Zootechnica Sinica* (畜牧兽医学报), 2002, **33**(3) 304 - 307

## Construction and Characterization of a Pseudorabies Virus TK<sup>-</sup>/gG<sup>-</sup> Mutant

XU Xiao-Juan XU Gao-Yuan CHEN Huan-Chun\* LIU Zheng-Fei HE Qi-Gai

(Laboratory of Animal Virology, College of Veterinary Medicine, Huazhong Agricultural University, Wuhan 430070, China)

**Abstract** To construct a TK<sup>-</sup>/gG<sup>-</sup> mutant of pseudorabies virus, the gG-detected transfer vector pUSKKBB and genomic DNA of pseudorabies virus TK<sup>-</sup>/gG<sup>-</sup>/LacZ<sup>+</sup> were co-transfected into IBRS-2 cells. Transfection progeny were plated onto PK-15 cells and incubated for 2 days under methylcellulose. Then the overlay was removed and replaced by 1% low melting point agarose in DMEM supplemented with 150 μg/mL X-gal. After 2 days, white plaques were screened for and purified 4 times. By PCR amplification of gG-deleted gene and LacZ gene, a recombinant virus with TK<sup>-</sup>/gG<sup>-</sup> phenotype was confirmed. Sequence of the PCR product revealed that there were 1,176 bp deletion in gG gene of the PRV TK<sup>-</sup>/gG<sup>-</sup> mutant. Amplifying the gG-deleted gene of different generations of the TK<sup>-</sup>/gG<sup>-</sup> mutant showed that the mutant was stable within PK-15 cells. TCID<sub>50</sub> assay indicated that the recombinant virus grows well on PK-15 cells. The mice immunized with the TK<sup>-</sup>/gG<sup>-</sup> virus showed no sign of abnormality. As a control, all mice inoculated with PRV strain died from the infection. All mice that received TK<sup>-</sup>/gG<sup>-</sup> survived after a lethal PRV challenge. However none of the mice injected with phosphate-buffer saline (PBS) survived from the challenge. The above results demonstrated that the recombinant virus could be a candidate marker vaccine strain for eradicating pseudorabies in pig herds.

**Key words** Pseudorabies virus, TK<sup>-</sup>/gG<sup>-</sup>/LacZ<sup>+</sup> mutant, TK<sup>-</sup>/gG<sup>-</sup> mutant

Received: 11-28-2003

This work was supported by Grant from the National High Technology Research and Development Program of China (No. 2002AA245071)

\* Corresponding author. Tel: 86-27-87282608 Fax: 86-27-87282608 E-mail: xuzhao@public.wh.hb.cn (徐晓娟) http://journals.im.ac.cn