

鸡马立克氏病病毒 814 株细菌人工染色体的构建

崔红玉^{1,2}, 王云峰¹, 石星明¹, 童光志¹, 兰德松¹, 何来¹, 仇华吉¹, 刘长军¹, 王玫¹

1 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

2 河北北方学院动物科技学院动物医学系, 张家口 075131

摘要: 为构建全基因组鸡马立克氏病病毒 814 株感染性细菌人工染色体(bacterial artificial chromosome, BAC), 首先通过构建表达 Eco-gpt(xanthine-guanine phosphoribosyl transferase, XGPRT, gpt)的哺乳动物细胞基因转移遗传选择标记(1.3 kb)和带有细菌人工染色体的基本功能基因序列的鸡马立克氏病病毒重组病毒转移载体 pUAB-gpt-BAC11, 将重组病毒转移载体与鸡马立克氏病病毒细胞总 DNA 共转染鸡胚成纤维细胞, 在选择培养基中经过 8 轮加压筛选, 获得并纯化重组病毒; 将重组病毒细胞总 DNA 电转化大肠杆菌, 筛选共获得 38 个 BAC 分子克隆化病毒, 提取 BAC-DNA 转染鸡胚成纤维细胞以拯救重组病毒。结果表明, MDV-BAC2 DNA 再次启动病毒感染, 拯救了重组鸡马立克氏病病毒。成功构建了鸡马立克氏病病毒 814 株基因组全长感染性细菌人工染色体, 为方便利用现代 RED/ET 基因重组系统对病毒进行反向遗传操作提供了技术平台; 同时为研究鸡马立克氏病病毒的基因功能和开发新型马立克氏病疫苗奠定了基础。

关键词: 鸡马立克氏病病毒, 细菌人工染色体, 分子克隆化病毒, 感染性分子克隆

Construction of Marek's Disease Virus Serotype 814 strain as an Infectious Bacterial Artificial Chromosome

Hongyu Cui^{1,2}, Yunfeng Wang¹, Xingming Shi¹, Guangzhi Tong¹, Desong Lan¹, Lai He¹, Huaji Qiu¹, Changjun Liu¹, and Mei Wang¹

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

2 Department of Animal Medicine, College of Animal Science and Veterinary Medicine, Hebei North University, Zhangjiakou 075131, China

Abstract: The aim of this study was to construct the complete genome of Marek's disease virus serotype 814 strain as an infectious bacterial artificial chromosome (BAC). Using self-designed selection marker Eco-gpt (1.3 kb) and BAC vector pBeloBAC11 (7.5 kb), we constructed the transfer plasmid pUAB-gpt-BAC11. The plasmid pUAB-gpt-BAC11 and MDV total-DNA were cotransfected into secondary CEFs; we put the virus-containing cells in selection medium for eight rounds and obtained purified recombinant viruses. Recombinant viral genomes were extracted and electroporated into *E. coli*, BAC clones were identified by restriction enzyme digestion and PCR analysis. Finally, we obtained 38 BAC clones, DNA from various MDV-1 BACs was transfected into CEFs, and recombinant virus was reconstituted by transfection of MDV-BAC2 DNA. We successfully cloned the complete genome of MDV-1814 strain as an infectious bacterial artificial chromosome. With these cloned genomes, a revolutionary MDV-DNA engineering platform utilizing RED/ET recombination system was constructed successfully, which can help the understanding of

Received: September 4, 2007; **Accepted:** November 23, 2007

Supported by: Open Fund of Key Laboratory of Veterinary Biotechnology (No. NKLBV2005-05).

Corresponding author: Yunfeng Wang and Guangzhi Tong. Tel: +86-451-8593-5058; Fax: +86-451-8593-5059; E-mail: yfwang@hvri.ac.cn
兽医生物技术国家重点实验室开放基金(No. NKLBV2005-05)资助。

MDV gene functions and promote the using of MDV as a vector for expressing foreign genes. In addition, it opens the possibility to generate novel MDV-1 vaccines based on the BACs.

Keywords: Marek's disease virus, bacterial artificial chromosome, molecular cloning virus, infectious clone

鸡马立克氏病(Marek's disease, MD)是危害养鸡业的主要传染病之一,该病以 T 淋巴细胞增生、高度接触性传染以及造成鸡的严重免疫抑制为特征;其病原为鸡马立克氏病病毒(Marek's disease virus, MDV),属于疱疹病毒科 α -疱疹病毒亚科双链 DNA 病毒,基因组大小约为 180 kb^[1-5,27,28]。MD 作为研究病毒性肿瘤的理想模型一直得到了病毒学界、医学界和兽医界的广泛重视^[27,28],但由于 MDV 是典型的细胞结合病毒,基因组庞大难以提取,使得在哺乳动物细胞中对 MDV 基因组进行基因操作和研究十分困难。细菌人工染色体技术的出现解决了这一难题^[23],通过构建 MDV 细菌人工染色体,可以在大肠杆菌中方便地对 MDV 基因组进行操作和研究^[3,5,7,8,10-21,27]。

本研究的目的是构建鸡马立克氏病病毒 814 株全长基因组感染性细菌人工染色体。通过构建正选择标记基因和携带细菌人工染色体基本功能基因的目的插入序列;解决了严格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,成功获得了鸡马立克氏病病毒 814 株全长基因组感染性细菌人工染色体。对进一步研究鸡马立克氏病病毒的致瘤机制、潜伏机制和基因功能,以及新型 MDV 疫苗的开发等都具有重要的意义。

1 材料与方法

1.1 材料

细胞和病毒:原代和次代鸡胚成纤维细胞,由 10 日龄 SPF 鸡胚制备,SPF 鸡胚由哈尔滨兽医研究所实验动物中心提供;MDV 814 株病毒是 MDV-1 型弱毒疫苗株,由本室保存,在原代鸡胚成纤维细胞上传 23 代。质粒与试剂:pBeloBAC11 和 LipofectamineTM 2000 购自 Invitrogen 公司;pEco-gpt 由本室构建。限制性内切酶、T4 DNA 连接酶、ATP、牛小肠碱性磷酸酶(CIAP)、dNTP 和 LA Taq 酶均为 TaKaRa 公司产品;霉酚酸(mycophenolic acid, MPA)、黄嘌呤

(xanthine)和次黄嘌呤(hypoxanthine)均为 Sigma 公司产品;Qiagen plasmid Midi kit 购自 Qiagen 公司。

1.2 方法

1.2.1 重组病毒转移载体的构建

按常规方法制备原代鸡胚成纤维细胞(CEF),24 h 后按 1×10^5 PFU/细胞接种 MDV 814,待 80% 细胞出现病变时,SDS 裂解法提取病毒感染细胞总 DNA^[22],整瓶细胞用 PBS 洗剂洗 2 次,每个 75 cm² 的细胞瓶加入 5 mL 裂解液(0.2 g/L 蛋白酶 K, 0.6% SDS, 100 mmol/L NaCl, 10 mmol/L Tris-Cl, 1 mmol/L EDTA),裂解液先注入瓶的一角,立即用裂解液覆盖整层细胞,水平放入 37°C 的温箱中,不要晃动细胞,30 min 后裂解液混合物导入一个无菌的 50 mL 的离心管中,37°C 水浴 4 h,酚抽提 1 次,等体积酚、氯仿抽提 1 次,氯仿异戊醇(24:1)抽提 2 次,2 倍乙醇沉淀,用 TE (pH 8.0) 300 μ L 溶解;以此总 DNA 为模板,用引物(表 1)PCR 扩增 MDV 814 株 US2 基因两侧的 2.1 kb 和 3.0 kb 的左、右同源臂,定向克隆到 pUC119 载体上,获得质粒 pUAB;将 PCR 扩增的两侧带有 Sal I 位点的 gpt 表达盒;经 Sal I 位点克隆到质粒 pUAB 上,获得质粒 pUAB-gpt,其中 gpt 表达盒含有 CMV 早期启动子、gpt 编码框和 SV40 poly (A) 尾;pBeloBAC11 经 Sph I 酶切克隆到质粒 pUAB-gpt 的 Sph I 位点,获得转移载体质粒 pUAB-gpt-BAC11(图 1),转移载体 pUAB-gpt-BAC11 含有命名为 BAC-gpt 的 8.8 kb 目的插入片段(图 2-(3))。pUAB-gpt-BAC11 经 Qiagen Plasmid Midi Kit 试剂盒纯化后,用于共转染 CEF。

1.2.2 重组病毒的获得

按 1.2.1 描述的方法提取感染病毒的细胞的总 DNA,经凝胶扫描分析 dsDNA 的浓度,总 DNA 浓度控制在 0.1 μ g/ μ L 左右。将等量的 pUAB-gpt-BAC11 和细胞总 DNA 按 LipofectamineTM 2000 说明共转染次代 CEF,9 h 后换成维持培养液,待 80% 细胞出现病变时,进行常规胰酶消化,转接到新鲜制备的原代 CEF 上增殖;待 80% 的细胞出现病变时,胰酶消化后再将细胞转接到 1 h 前已更换成加压筛选培养基(含 5%血清、300 μ g/mL 霉酚酸、65 μ g/mL

表 1 BAC 分子克隆化病毒构建所用部分引物
Table 1 Primers used to amplify different regions

Primer	Sequence (5'-3')	Description
A-upper	ACAGGATCCGTGTTTGAATACTGG	2.1 kb fragment of left side homologies
A-lower	ATATTAATTAATGTCGACCCGGTAGTCATTAGC	
B-upper	ATCTTAATTAAGCATGCTTTGGCAAACGGAATAG	3.0 kb fragment of right side homologies
B-lower	CGCAAGCTTAATATGAATCTCTAAACTTCTCGGC	
gpt-upper	ATGGTCGACGGATCCCGCCATGCATTAG	Primers used to identify 1.3 kb gpt gene.
gpt-lower	ATGGTCGACGGATCCCGCTTACAATTACGC	
US2-upper	ATATTAATTAAGCTAATGACTACCGG	Primers used to identify 8.9 kb BAC-gpt
US2-lower	ATCTTAATTAATCTATTCCGTTTGGCAA	
repA-upper	CAT GGC GGA AAC AGC GGT TAT C	Primers used to identify BAC essential genes (repA)
repA-lower	ATG TAT GAG AGG CGC ATT GGA G	
sopB-upper	ATT CGT TAA TTG CGC GCG TAG G	Primers used to identify BAC essential genes (sopB)
sopB-lower	GAA TAT TCA GGC CAG TTA TGC T	

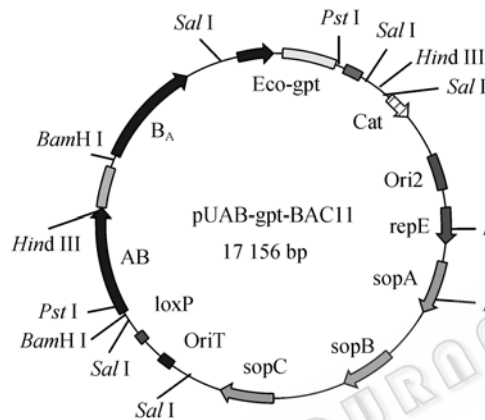


图 1 质粒 pUAB-gpt-BAC11 的物理图谱

Fig. 1 Schematic map of plasmid pUAB-gpt-BAC11

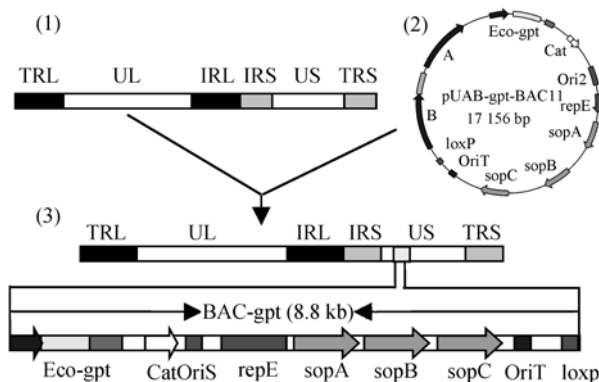


图 2 通过转移载体将细菌人工染色体核心序列重组到 MDV 814 病毒基因组示意图

Fig. 2 Cloning procedure of the transfer plasmid to introduce the 8.8 kb fragment into MDV 814 genome

1: the organization of MDV 814 genome; 2: the schematic map of the transfer plasmid pUAB-gpt-BAC11; 3: the 8.8 kb BAC-gpt fragment containing the Eco-gpt (1.3 kb) and the BAC11 sequence (the essential genes of BAC vector) was inserted into US2 gene to obtain recombinant virus

黄嘌呤和 100 $\mu\text{g/mL}$ 次黄嘌呤的 DMEM) 的原代 CEF 上进行重组病毒的加压筛选^[2,3,5], 每 24 h 换加压液 1 次。待 80% 细胞出现病变时, 将细胞再次传代到制备好的单层原代 CEF 上进行第 2 轮加压筛选, 经 5 轮加压筛选之后, 按 1.2.1 描述的方法提取细胞总 DNA, 用 US2 基因两侧的 1 对引物(表 1)PCR 扩增目的插入片段 BAC-gpt, 以鉴定重组病毒的富集和纯化程度。获得的重组病毒命名为 rv-MDV 814。

1.2.3 电转化感受态细胞 DH10B 的制备

按照 BIO-RAD 使用说明书制备电转化大肠杆菌感受态细胞 DH10B。用枪头挑取单克隆 DH10B 菌落, 投入盛有 5 mL LB 液体培养基的 5 mL 离心管中, 同时做培养基和枪头的空白对照, 37 $^{\circ}\text{C}$, 220 r/min, 培养 14~16 h。第二天, 以 1:100 的比例将 2 mL 菌液倒入 200 mL LB 液体培养基中, 37 $^{\circ}\text{C}$ 、220 r/min, 振荡 1~3 h, 每半小时测一次 OD 值, 当 OD 值达到 0.4~0.5 时, 停止培养。将菌液在冰上预冷 30 min, 随后将菌液分装到 500 mL 预冷的离心杯中, 4 $^{\circ}\text{C}$, 5500 r/min 离心 10 min; 弃上清, 离心杯中加入少量预冷的无菌 ddH₂O, 轻轻使沉淀悬浮后, 再将水注满离心杯, 4 $^{\circ}\text{C}$, 4000 r/min 离心 10 min; 弃上清, 加少量预冷的灭菌 ddH₂O, 重悬菌体, 再将预冷的水注满离心杯, 4000 r/min, 4 $^{\circ}\text{C}$, 离心 10 min; 弃上清, 往离心杯中加入少量含 10% 甘油预冷的灭菌 ddH₂O, 轻轻重悬菌体, 再加满含 10% 甘油预冷的灭菌 ddH₂O, 4 $^{\circ}\text{C}$, 4000 r/min, 离心 10 min; 弃上清, 离心杯中加入 100 mL 预冷的含 10% 甘油的灭菌 ddH₂O, 轻轻使沉淀悬浮后, 再次 4 $^{\circ}\text{C}$, 5000 r/min, 离心 5 min;

弃上清,离心杯中加入1~2 mL预冷的含10%甘油的灭菌 ddH₂O,轻轻使沉淀悬浮后,将每管菌液 500 μ L 分装于 1.5 mL 的离心管中,此时感受态细胞密度维持在较高的 $2 \times 10^{10} \sim 3 \times 10^{10}$ /mL,置冰上,并立即用于电转化筛选 BAC 分子克隆化病毒。

1.2.4 BAC 分子克隆化病毒的筛选

在 25 μ L 新鲜制备的电转化感受态细胞 DH10B 中加入 5 μ L 至 10 μ L 新鲜制备的重组病毒总 DNA(0.2 μ g/ μ L),用吸头轻轻混匀,冰浴 3~5 min,吸入到 0.1 cm 的预冷的电转杯中,电转条件为 2000 V、200 Ω 、25 μ F,电击完成后立即在电转杯中加入 37 $^{\circ}$ C 预热的 SOC 培养基(LB 中含 0.2 mmol/L 葡萄糖,0.1 mmol/L MgSO₄,0.1 mmol/L MgCl₂),吸出转移到 1.5 mL 无菌 Eppendorf 管中,振荡培养 1 h 后,将细菌沉淀涂布于 LB 培养板上(含氯霉素 30 μ g/mL),37 $^{\circ}$ C 培养 24 h,挑取单克隆菌落,通过下述方法鉴定 BAC 分子克隆化病毒:将提取的大分子量质粒 DNA 分别用限制性内切酶 *Bam*H I、*Eco*R I、*Pst* I 酶切后作普通电泳酶切图谱分析;PCR 鉴定目的插入片段 BAC-gpt;PCR 鉴定 MDV 全基因组中的部分体内、体外复制必需基因的 23 个基因区域^[15-18,24-27](图 4-1)。

1.2.5 BAC-DNA 拯救重组病毒生长特性的测定

按照转染试剂 Lipofectamine™ 2000 的说明,将 Qiagen Plasmid Midi Kit 试剂盒提取的 BAC-DNA 转染次代 CEF,待病毒蚀斑形成之后,将病变细胞传代至已铺满为单层的原代 CEF 上,待 80% 细胞出现病变后,收获细胞,液氮保存,即为拯救的重组病毒(命名为 BAC-derived MDV 814)。将野生病毒(wt-MDV814)、原重组病毒(rv-MDV814)和拯救重组病毒(BAC-derived MDV 814)按 1×10^{-3} PFU/细胞分别接种到单层的原代 CEF 上,分别接种 5 块 6 孔细胞培养板,在 24 h、48 h、96 h、120 h、144 h 时分别测定 1 块 6 孔细胞培养板的各孔的病毒平均滴度,即测定每毫升的病毒蚀斑数^[28],最后绘制病毒的生长曲线,比较 wt-MDV 814、rv-MDV 814 和 BAC-derived MDV 814 在 CEF 上生长特性。

2 结果

2.1 重组病毒转移载体

构建的重组病毒转移载体质粒 pUAB-gpt-

BAC11 大小为 17 156 bp(图 1),具有氨苄青霉素和氯霉素双抗性,左、右同源臂之间 8893 bp 的目的插入序列 BAC-gpt 中,依次包含 1372 bp 的 *gpt* 基因表达盒和 7521 bp 的细菌人工染色体基本功能基因序列,BAC-gpt 的末端还含有一个 34 bp 的 *loxP* 位点。转移载体 pUAB-gpt-BAC11 经部分限制性内切酶 *Bam*H I、*Hind* III、*Pst* I、*Sal* I 酶切后作普通电泳酶切图谱分析酶切结果完全正确(图 3),转移载体 pUAB-gpt-BAC11 经测序,结果完全正确。

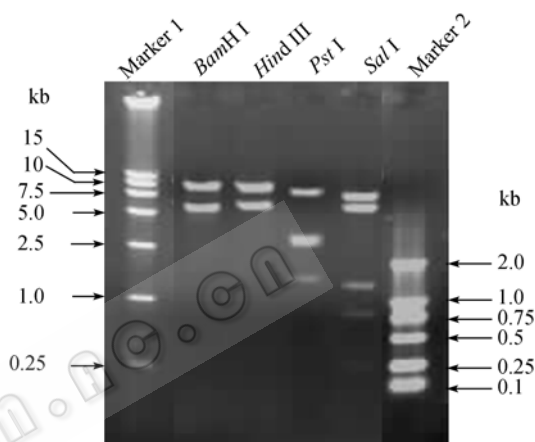


图 3 质粒 pUAB-gpt-BAC11 的酶切鉴定图

Fig. 3 Identification of pUAB-gpt-BAC11 by restriction enzyme digestion

*Bam*H I: 11 kb, 6.2 kb; *Hind* III: 10.5 kb, 6.7 kb; *Pst* I: 9.3 kb, 3.2 kb, 3 kb, 1.5 kb; *Sal* I: 8.2 kb, 6.5 kb, 1.3 kb, 0.8 kb, 0.3 kb

2.2 重组病毒的加压富集和纯化

经过 8 轮加压筛选和富集后,PCR 扩增目的插入片段 BAC-gpt,结果只扩增到大小约为 8.9 kb 的目的插入片段,而没有扩增出约 0.9 kb 的野生病毒 US2 基因片段(图 4-3),表明经 8 轮加压筛选后重组病毒已完全纯化。

2.3 BAC 分子克隆化病毒的鉴定

经过普通凝胶电泳初步鉴定,电转化共获得 52 个有较大分子量的质粒 DNA 克隆编号为 MDV-BAC2 的质粒部分限制性内切酶酶切结果(图 4-2)表明,该 DNA 与参考毒株 MDV-GA 株全基因组 DNASTAR 软件分析的酶切片段相一致。MDV-BAC2 保留了完整的 *Eco*-gpt 和 BAC 基本功能基因序列(图 4-3),且所有鉴定的 23 个基因区域(图 4-1)均得到正确扩增。MDV-BAC2 中的 16 个基因区域的扩增结果正确(图 4-3 和 4-4)。通过以上鉴定方法,本研究从获得的 52 个较大分子量的质粒 DNA 克隆中初步鉴定获得 38 个 MDV 全基因组 BAC 分子克隆化病毒。

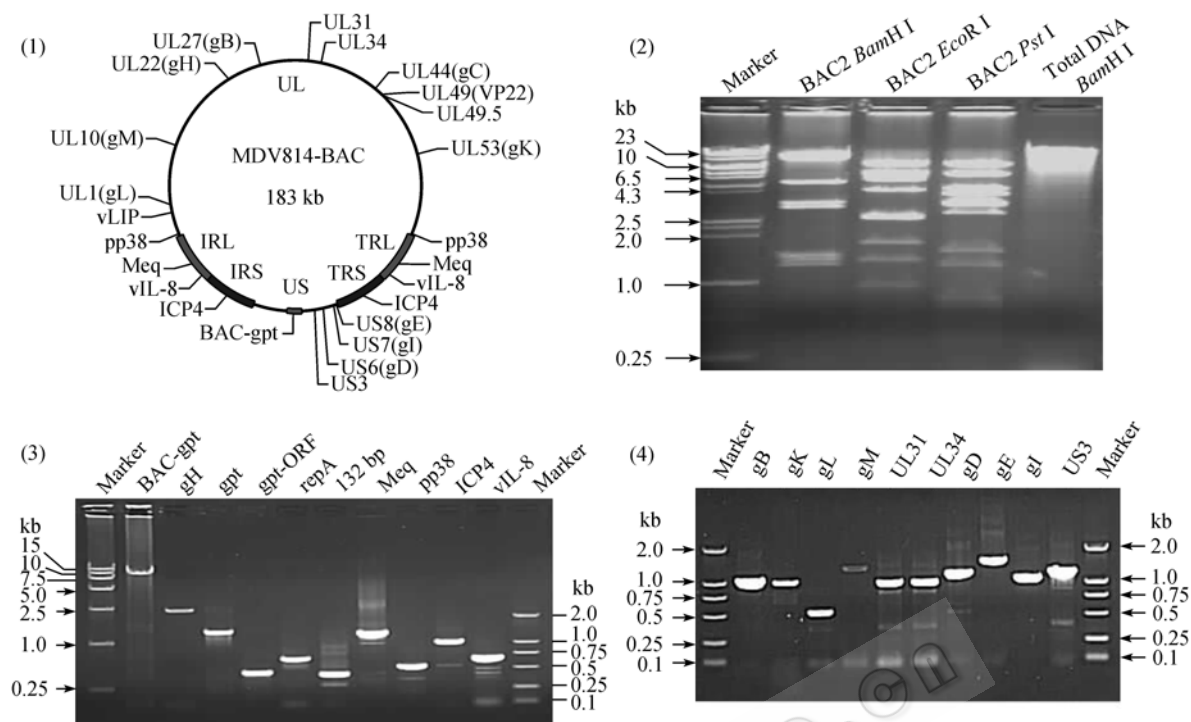


图 4 MDV 814-BAC 的物理图谱、部分限制性内切酶酶切图谱分析和 PCR 鉴定

Fig. 4 Schematic map of MDV 814-BAC, restriction enzyme digestion and PCR analysis

1: schematic map of MDV 814-BAC, in which the BAC-gpt fragment was inserted into US2 gene to obtain recombinant virus; 2: MDV-BAC2 agarose gel electrophoresis after restriction enzyme digestion; 3: some essential genes of BAC-gpt fragment and repeat regions of MDV were analyzed by PCR (BAC-gpt, 8946 bp; gH, 2437 bp; gpt, 1372 bp; gpt-ORF, 462 bp; repA, 681 bp; 132 bp region, 432 bp; Meq, 1104 bp; pp38, 532 bp; ICP4, 1022 bp; vIL-8, 672 bp); 4: some essential genes in UL and US regions of MDV were analyzed by PCR (gB, 1100 bp; gK, 1003 bp; gL, 582 bp; gM, 1270 bp; UL31, 815 bp; UL34, 836 bp; gD, 1163 bp; gE, 1486 bp; gI, 1056 bp; US3, 1212 bp)

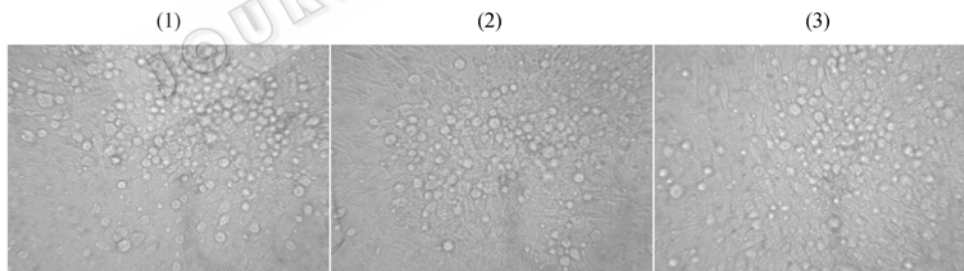


图 5 从 MDV814-BAC2 拯救的重组病毒、重组病毒和野生病毒三者鸡胚成纤维细胞上的病毒生长曲线的比较

Fig. 5 Comparison of plaque sizes and growth characteristics of wt-MDV 814, rv-MDV 814 and BAC2-derived MDV 814

1: plaque produced by wt-MDV814 (96 h, $\times 200$); 2: plaque produced by rv-MDV814 (96 h, $\times 200$); 3: plaque produced by BAC2-derived MDV814 (96 h, $\times 200$)

2.4 从 BAC-DNA 拯救重组病毒

按 1.2.4 所描述的方法, 用克隆 MDV 814-BAC2 DNA 转染 CEF, 成功拯救出重组病毒(BAC2-redrived MDV814), wt-MDV814, rv-MDV814 和 BAC2-derived MDV814 三病毒的蚀斑形成过程和形态相似(图 5), 三者在 CEF 上的增殖曲线近似(图 6), 表明 BAC-gpt 替换 US2 基因后, 病毒在 CEF 上的复制特性没有受到显著的影响。

3 讨论

3.1 筛选标记是试验取得成功的关键因素

构建鸡马立克氏病病毒的细菌人工染色体重组病毒, 选择和使用何种筛选标记是决定试验过程的难易以及成功与否的关键因素。血清 1 型鸡马立克氏病病毒是严格的细胞结合型病毒, 在构建鸡马立克氏病病毒的重组病毒过程中, 曾经使用非加压选择标记 LacZ 和 eGFP 作为遗传标记, 由于在表达非加压选择标记基因的细胞中含有大量的野生病毒, 增加了

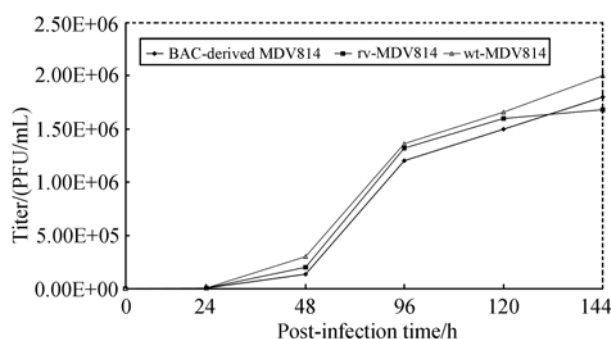


图6 野生病毒、重组病毒和拯救重组病毒蚀斑大小及生长特点的比较

Fig. 6 Growth curves of BAC2-derived MDV 814, rv-MDV 814 and wt-MDV 814

蚀斑稀释法筛选重组病毒的难度, 结果在重组病毒的筛选和富集过程中遇到了很大的困难, 使病毒的蚀斑纯化难以进行。本研究中使用 *Eco-gpt* 作为加压筛选标记基因, 在加压条件下, 霉酚酸(MPA)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(XGPR, *gpt*), 该酶利用外源黄嘌呤完成鸟嘌呤的外源补救合成, 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。

在构建 BAC-*gpt* 过程中, 并没有简单地将 *gpt* 编码框直接克隆到 CMV 早期启动子和 SV40 poly(A) 尾之间, 而是将 *gpt* 编码框的起始密码子 ATG 的上游序列 “5'-GACACTTCACATGA-3'” 改进为 “5'-CTCGAGTACCATGA-3'”, 这样既保证引入了克隆酶切位点, 又使改进的序列基本符合 *Kozak* 序列 “5'-GCCGCCACCATGG-3'” 的要求, 加强了核糖体小亚基对翻译起始序列的识别, 以保证在 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。

3.2 BAC 载体基本功能基因的完整性是确保 BAC 形成的重要环节

在构建细菌人工染色体重组病毒转移载体的目的插入序列 BAC-*gpt* 时, 应确保所用的 BAC 基本功能基因序列不被切断, 以防止碱基的改变可能带来的基因功能的丧失, 导致电转化后不能形成 BAC 转化子。本研究中利用 pBeloBAC11 载体中 *Cat* 基因和 *loxP* 位点之间的 *Sph* I 位点, 将 BAC 载体基本功能基因序列酶切后, 用于目的插入序列 BAC-*gpt* 的构建, 确保了 BAC 载体基本功能基因序列结构与功能的完整性。

此外, 在构建目的插入序列 BAC-*gpt* 的过程中, 我们仅仅使用了 1.3 kb 的 *Eco-gpt* 真核表达基因作为加压筛选标记和 7.5 kb 的细菌人工染色体基本功能基

因序列, 而没有同时使用 LacZ、eGFP 等非加压选择遗传标记, 尽量缩短了目的插入片段的长度, 防止过大的目的插入片段造成不利于重组病毒产生的结果。

3.3 加压筛选条件和电转条件的优化

在配制加压筛选培养液时, 为保证霉酚酸、黄嘌呤和次黄嘌呤在 DMEM 中充分溶解和利用, 本研究改进了试剂的配制方法, 分别用 1 mol/L 的氢氧化钠溶液 1 mL 溶解 3 种试剂, 立即过滤除菌加入到 200 mL DMEM 中, 混匀后用 1 mol/L 的盐酸调整 pH 值到 7.5, 即可用于加压筛选。此外, 本研究中对 Schumacher 等的加压筛选条件做了如下改进^[3]: 将霉酚酸的浓度从 250 μ g/mL 提高到了 300 μ g/mL, 黄嘌呤的浓度从 50 μ g/mL 提高到 65 μ g/mL, 目的是在提高选择压力以利于重组病毒的富集的同时又保证重组病毒必需营养物质的供给。此外, 电转化体系由常规的 20 μ L 提高到 25 μ L, 并且细胞密度维持在较高的 $2 \times 10^{10} \sim 3 \times 10^{10}$ /mL, 在这种优化的电转条件下, 每个电转体系可以获得 1~5 个 BAC 分子克隆化病毒。

3.4 BAC 分子克隆化病毒的鉴定

本研究中全基因组 BAC 分子克隆化病毒主要通过 PCR 和体外转染拯救重组病毒来鉴定。血清 1 型马立克氏病毒各毒株基因组的同源性在 99% 以上^[27], 以 MDV-1 型 GA 株(GenBank Accession No. AF147806)为参考毒株设计扩增体内和体外复制必需基因部分区域的引物, PCR 鉴定 MDV-1 型 814 株的全基因组 BAC 分子克隆化病毒。国外学者主要采用 Southern blotting 杂交、脉冲场凝胶电泳酶切图谱分析和 PCR 的方法来鉴定全基因组细菌人工染色体^[3,5,7,8,10-17,27]。与前人的鉴定方法相比, 本研究的鉴定方法比较粗略, 采用 PCR 鉴定体内和体外复制必需相关基因, 主要是通过体外将 BAC-DNA 转染 CEF 后, 能拯救出重组病毒来鉴定全基因组感染性细菌人工染色体。先采用 PCR 进行初步鉴定, 再结合体外转染拯救病毒等试验, 也可以鉴定全基因组感染性细菌人工染色体。

4 结论

本研究成功构建了鸡马立克氏病病毒 814 株全基因组感染性细菌人工染色体, 为方便利用现代 RED/ET 基因重组系统对病毒进行反向遗传操作提供了技术平台; 同时为研究鸡马立克氏病病毒的基因功能, 研究以鸡马立克氏病病毒作为外源基因的表达载体, 以及开发新型马立克氏病疫苗等奠定了基础。

REFERENCES

- [1] Cantello JL, Anderson AS, Francesconi A, Morgan RW. Isolation of a Marek's disease virus (MDV) recombinant containing the *lacZ* gene of *Escherichia coli* stably inserted within the MDV US2 gene. *Journal of Virology*, 1991, **65**: 1584–1588.
- [2] Lee LF, Wu P, Sui D, Ren D, Kamil J, Kung HJ, Witter RL. The complete unique long sequence and the overall genomic organization of the GA strain of Marek's disease virus. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 2000, **97**: 6091–6096.
- [3] Schumacher D, Tischer BK, Fuchs W, Osterrieder N. Reconstitution of Marek's disease virus serotype 1 (MDV-1) from DNA cloned as a bacterial artificial chromosome and characterization of a glycoprotein negative MDV-1 mutant. *Journal of Virology*, 2000, **74**: 11088–11098.
- [4] Borst E.M., Hahn G, Koszinowski UH, Messerle M. Cloning of the human cytomegalovirus (HCMV) genome as an infectious bacterial artificial chromosome in *Escherichia coli*: a new approach for construction of HCMV mutants. *Journal of Virology*, 1999, **73**: 8320–8329.
- [5] Messerle M, Crnkovic I, Hammerschmidt W, Ziegler H, Koszinowski UH. Cloning and mutagenesis of a herpes virus genome as an infectious bacterial artificial chromosome. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 1997, **94**: 14759–14763.
- [6] Suter M, Lew AM, Grob P, Adema GJ, Ackermann M, Shortman K, Fraefel C. 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. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 1999, **96**: 12697–12702.
- [7] Smith GA, Enquist LW. Construction and transposon mutagenesis in *Escherichia coli* of a full-length infectious clone of pseudorabies virus, an alpha herpes virus. *Journal of Virology*, 1999, **73**: 6405–6414.
- [8] Smith GA, Enquist LW. A self-recombining bacterial artificial chromosome and its application for analysis of herpes virus pathogenesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 2000, **97**: 4873–4878.
- [9] Delecluse HJ, Hilsendegen T, Pich D, Zeidler R, Hammerschmidt W. Propagation and recovery of intact, infectious Epstein-Barr virus from prokaryotic to human cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 1998, **95**: 8245–8250.
- [10] Petherbridge L, Howes K, Baigent SJ, Sacco MA, Evans S, Osterrieder N, Nair V. Replication-competent bacterial artificial chromosomes of Marek's disease virus: novel tools for generation of molecularly defined herpesvirus vaccines. *Journal of Virology*, 2003, **77**: 8712–8718.
- [11] Reddy SM, Lupiani B, Gimeno IM. Rescue of a pathogenic Marek's disease virus with overlapping cosmid DNAs: use of a pp38 mutant to validate the technology for the study of gene function. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 2002, **99**: 7054–7059.
- [12] Petherbridge L, Brown AC, Baigent SJ, Howes K, Sacco MA, Osterrieder N, Nair VK. Oncogenicity of virulent Marek's disease virus cloned as bacterial artificial chromosomes. *Journal of Virology*, 2004, **78**: 13376–13380.
- [13] Parcells MS, Anderson AS, Cantello JL, Morgan RW. Characterization of Marek's disease virus insertion and deletion mutants that lack US1, US10, and /or US2 and neighbouring short-compent open reading frames. *Journal of Virology*, 1994, **68**: 8239–8253.
- [14] Baigent SJ, Petherbridge LJ, Smith LP, Yg Zhao, Chesters PM, and Nair VK. Herpesvirus of turkey reconstituted from bacterial artificial chromosome clones induces protection against Marek's disease. *Journal of General Virology*, 2006, **87**: 769–776.
- [15] Dorange F, Tischer BK, Vautherot JF, and Osterrieder N. Characterization of Marek's disease virus serotype 1 (MDV-1) deletion mutants that lack UL46 to UL49 genes: MDV-1 UL49, encoding VP22, is indispensable for virus growth. *Journal of Virology*, 2002, **76**: 1959–1970.
- [16] Osterrieder N, Schumacher D, Trapp S, Beer M, von Einem J, Tischer K. Generation and exploitation of infectious bacterial artificial chromosome (BAC) clones of animal herpesviruses. *Berl Munch Tierarztl Wochenschr*, 2003, **116**: 373–380.
- [17] Schumacher D, Tischer BK, Reddy SM, Osterrieder N. Glycoproteins E and I of Marek's disease virus serotype 1 are essential for virus growth in cultured cells. *Journal of Virology*, 2001, **75**: 11307–11318.
- [18] Tischer BK, Schumacher D, Messerle M, Wagner M, Osterrieder N. The products of the UL10 (gM) and the UL49.5 genes of Marek's disease virus serotype 1 are essential for virus growth in cultured cells. *Journal of General Virology*, 2002, **83**: 997–1003.
- [19] Muylers JP, Zhang Y, Testa G, Stewart AF. Rapid modification of bacterial artificial chromosomes by ET-recombination. *Nucleic Acids Research*. 1999, **27**: 1555–1557.
- [20] Narayanan K, Williamson R, Zhang Y. Efficient and precise engineering of a 200 kb beta-globin human/ bacterial artificial chromosome in *E. coli* DH10B using an inducible homologous recombination system. *Gene Therapy*, 1999, **6**: 442–447.
- [21] Zhang Y, Buchholz F, Muylers JP, and Stewart AF. A new logic for DNA engineering using recombination in *Escherichia coli*. *Nature Genetics*, 1998, **20**: 123–128.
- [22] Morgan RW, Cantello JL, McDermott CH. Transfection of chicken embryo fibroblasts with Marek's disease virus DNA. *Avian Disease*, 1990, **34**: 345–351.
- [23] Sambrook J, David WR. Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 3rd ed, New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, 2001.
- [24] Osterrieder N. Sequence and initial characterization of the UL10 (glycoprotein M) and UL11 homologous genes of serotype 1 Marek's disease virus. *Archieve Virology*, 1999, **144**: 1853–1863.
- [25] Schumacher D, Tischer BK, Trapp S, Osterrieder N. The protein encoded by the US3 ortholog of Marek's disease virus is required for efficient de-envelopment of perinuclear viruses and involved in actin stress fiber breakdown. *Journal of Virology*, 2005, **79**: 3987–3997.
- [26] Brune W, Menard C, Hobom U, Odenbreit S, Messerle M, Koszinowski UH. Rapid identification of essential and nonessential herpesvirus genes by direct transposon mutagenesis. *Nature Biotechnology*, 1999, **17**: 360–364.
- [27] Osterrieder N, Kamil JP, Schumacher D, Tischer BK, Trapp S. Marek's disease virus: from miasma to model. *Nature*, 2006, **4**: 283–294.
- [28] Yin Z, Liu JH. Animal Virology, 2nd ed. Beijing: Science Press, 1997.

殷震, 刘景华. 动物病毒学(第二版). 北京: 科学出版社, 1997.