

研究报告

共表达 PRRSV 修饰的 GP5 与 M 蛋白的重组改良型痘苗病毒安卡拉株的构建及其生物学特性

郑其升^{1,2}, 李鹏¹, 曹瑞兵¹, 侯继波², 陈溥言¹

1 南京农业大学动物医学院, 南京 210095

2 江苏省农业科学院国家兽用生物制品工程技术研究中心, 南京 210014

摘要: 将猪繁殖与呼吸综合征病毒(Porcine reproductive and respiratory syndrome virus, PRRSV)修饰的 ORF5(MORF5)与 ORF6 基因分别克隆入笔者构建的改良型痘苗病毒安卡拉株(Modified vaccinia virus ankara, MVA) 转移载体 pLR-gpt 的两个多克隆位点中, 构建重组转移载体 pLR-MORF5/ORF6。经脂质体介导, 将构建好的 pLR-MORF5/ORF6 转染已感染亲本 MVA 2h 的 BHK-21 细胞单层, 用药物选择性培养基(MXHAT)在 24 孔板上进行连续筛选纯化, 得到带有筛选标记的重组病毒 rMVAgpt-MGP5/M。将 rMVAgpt-MGP5/M 感染表达 Cre 重组酶的 BHK-21 细胞(BHK-Cre), 获得删除筛选标记的重组病毒 rMVA-MGP5/M。PCR 证明 MORF5 与 ORF6 成功插入 MVA 基因组中; Western blotting 与间接免疫荧光证明重组病毒能表达 MGP5 与 M 蛋白; 重组病毒的生长特性表明与亲本 MVA 出现病变的时间及病毒滴度基本一致。结果表明, 本研究成功构建了共表达 PRRSV MGP5 与 M 蛋白的重组 MVA, 并且表达产物具有免疫原性; 外源基因的插入不影响 MVA 复制, 具较好的稳定性, 从而为 PRRSV 新型基因工程疫苗的研制奠定了良好的基础。

关键词: 猪繁殖与呼吸综合征病毒, 改良型痘苗病毒安卡拉株, 修饰的 GP5 与 M 蛋白, 共表达

Construction and Biological Characteristic for the Recombinant Modified Vaccinia Virus Ankara Co-expressing Modified GP5 and M Protein of Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome Virus

Qisheng Zheng^{1,2}, Peng Li¹, Ruibing Cao¹, Jibo Hou², and Puyan Chen¹

1 College of Veterinary Medicine, Nanjing Agricultural University, Nanjing 210095, China

2 National Veterinary Biological Medicine Engineering Research Center, Nanjing 210014, China

Abstract: Modified ORF5 (MORF5) and ORF6 gene of PRRSV were cloned into two multiple cloning sites of MVA transfer vector pLR-gpt to construct the recombinant plasmid pLR-MORF5/ORF6. Homologous recombination between pLR-MORF5/ORF6 and the wtMVA on BHK-21 cell line was mediated with liposome by infecting the cell with 0.01 MOI wtMVA two hours before transfecting the recombinant plasmid into the cell. When the cytopathic effect (CPE) was obvious, virus was collected from the cell plate and the recombinant virus was selected with drug selecting medium (2% MXHAT). After 12 cycles of selection, rMVA with a selection marker *Eco* gpt was obtained and named as rMVAgpt-MGP5/M. By infecting BHK-Cre expressing Cre recombinant enzyme, the *Eco* gpt marker in rMVAgpt-MGP5/M was deleted and this rMVA was named as rMVA-MGP5/M. The insertion of

Received: September 13, 2007; Accepted: December 15, 2007

Corresponding author: Puyan Chen. Tel: +86-25-84396028; Fax: +86-25-84396335; E-mail: aid@njau.edu.cn

MORF5 and ORF6 into the MVA genome was confirmed with PCR analysis and the expression of MGP5 and M protein was identified with Western blot and IFA. Through biological study on the recombinant MVA, no obvious difference was observed between rMVA-MGP5/M and the wtMVA regarding to the CPE and growth curve. The recombinant MVA constructed in this study could coexpress the modified GP5 and M protein and the expressed product had good immunocompetence. Furthermore, the insertion of the MORF5 and ORF6 into MVA genome had no obvious effect on the replication and biological characteristics of this virus.

Keywords: PRRSV, MVA, GP5 and M protein, co-expression

猪繁殖与呼吸综合征(Porcine reproductive and respiratory syndrome, PRRS)是由 PRRSV 引起的一种严重危害养猪业的传染病^[1]。该病于 1987 年在美国首次报道。郭宝清等于 1996 年在国内首次分离到 PRRSV, 证实本病在国内存在^[2]。PRRSV 具有抗原变异特性, 且主要靶细胞是具有重要免疫功能的肺泡巨噬细胞, 所以 PRRSV 感染常引发其他病原的继发感染或混合感染, 尤其是呼吸道病原感染, 给养猪业造成重大经济损失。目前用于 PRRSV 预防的疫苗主要是传统的灭活苗和弱毒苗, 但存在免疫保护效果差或容易返强等危险^[4], 因此迫切需要研制更加安全、有效的新型疫苗。PRRSV 有三个主要的结构蛋白, 由 ORF5 编码的糖基化囊膜蛋白(GP5)、ORF6 编码的非糖基化基质蛋白(M)和 ORF7 编码的核衣壳蛋白(N)。GP5 与 M 蛋白是 PRRSV 中最重要的两个膜蛋白, 其它的囊膜蛋白仅占很少的数量。25~27 kD 的 GP5 是 PRRSV 最丰富的囊膜蛋白, 并且是诱导动物产生中和抗体的主要免疫原性蛋白。PRRSV 18~19 kD 的 M 蛋白是一个缺少 N-端信号肽的囊膜蛋白, 与冠状病毒 M 蛋白类似^[5-8], 动脉炎病毒的 M 蛋白在病毒粒子的组装与出芽过程中具有十分重要的作用, 并且, M 蛋白具有很强的免疫原性, 体外表达的重组 M 蛋白可以作为血清学试验的靶抗原^[9]。GP5 与 M 蛋白以异源二聚体的形式存在于病毒粒子的表面, 通过二硫键结合的 GP5/M 聚合物形成于感染细胞的内质网。GP5/M 聚合物在病毒对肺泡巨噬细胞附着和侵染中起重要作用, 聚合物主要是与肺泡巨噬细胞表面的肝磷脂受体发生反应^[10]。

MVA 是亲本痘苗病毒安卡拉株经 CEF 连续传代 516 次后获得的高度减毒的复制缺陷型痘苗病毒株。与传统的复制型痘苗病毒相比, MVA 基因组发生了大量的缺失(10%)和突变, 导致多个与宿主范围和致病性相关的基因功能的丧失, 除 CEF 和极少数哺乳动物细胞(BHK-21)外, MVA 在多数哺乳动物

细胞中不能有效增殖。尽管如此, MVA 在非许可细胞中仍然可以高效地表达外源基因, 并可诱导宿主产生特异的免疫应答^[11,12]。鉴于 MVA 突出的安全性和免疫原性, 近年来通过基因重组构建的 rMVA 已被广泛应用于多种重要传染病及肿瘤的疫苗研究中, 并取得良好的效果^[13,14]。

随着生命科学的不断发展以及对 PRRSV 的分子生物学与免疫学研究的不断深入, 基因工程重组疫苗已逐渐成为当前研究的热点。笔者在以前的研究中以 MVA 为载体, 研究了 PRRSV GP5 与 M 蛋白以不同的方式表达对其免疫效力的影响, 结果表明共表达 GP5 与 M 蛋白的重组 MVA 能够增强其免疫原性; 利用 DNA 疫苗研究了 PRRSV GP5 胞外域糖基化位点的突变以及 A 表位的修饰对其免疫效力的影响, 结果显示 ORF5 的修饰明显增强了其 DNA 疫苗的免疫效力^[17], 并且对 MVA 表达系统的转移载体进行改造, 方便了重组病毒的纯化, 提高了重组病毒的生物安全性^[18]。综合前面的研究结果, 在本研究中, 我们构建了共表达 PRRSV 修饰的 GP5(MGP5)与 M 蛋白的重组 MVA, 并对其生物学特性进行了初步的研究, 为 PRRSV 的基因工程疫苗的后续研究奠定了基础。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 病毒、细胞及载体

PRRSV NJ-a 株为本实验室从南京某急性发病猪群中分离的美洲型 PRRSV 强毒, 由农业部动物疫病诊断与免疫重点开放实验室鉴定、保存; MVA 由农业部动物疫病诊断与免疫重点开放实验室引进保存, 利用 BHK-21 细胞培养扩增, 按文献方法^[10]进行纯化并测定 TCID₅₀, Marc-145 细胞与 BHK-21 细胞购自中国典型培养物中心; 表达 Cre 重组酶的 BHK-21 细胞系(BHK-Cre)由本室苏鑫铭博士构建; 宿主大肠杆菌 DH5 α 购自 Promega 公司; 重组质粒

pcDNA-M5A-6A 由笔者自行构建(另文发表); MVA 转移载体 pLR-gpt 由笔者自行构建。

1.1.2 主要试剂

限制性内切酶 *Sac* I、*Apa* I 与 *ExTaq* DNA 聚合酶、T4DNA 连接酶等工具酶购自 TaKaRa 公司; 限制性内切酶 *Pme* I、*Asc* I 为基因公司产品; 胶回收试剂盒购自上海华舜生物公司; DMEM 培养基为 GIBCO 公司产品; 胎牛血清为杭州四季青生物公司产品; 霉酚酸(Mycophenolic Acid, MPA)购自 Sigma 公司; 黄嘌呤、氨基蝶呤、胸苷均购自 Promega 公司; LipofectaminTM 2000 转染试剂盒购自 Invitrogen 公司; 胰酶购自 Difco 公司; 兔抗 PRRSV NJ-a 株高免血清由本室制备, 系用纯化的 PRSSV NJ-a 株多次免疫家兔制备; 兔抗 PRRSV NJ-a 株 GP5、M 蛋白的特异性多抗由本室制备, 系分别用纯化的原核表达的重组 GP5 与 M 蛋白多次免疫家兔制备; HRP 标记的羊抗兔 IgG、FITC 标记的羊抗兔 IgG 均为购自晶美生物公司。

1.2 方法

1.2.1 重组痘苗病毒转移载体的构建

(1) 引物设计: 根据 PRRSV NJ-a 株 ORF5 与 ORF6 的核酸序列设计两对特异性引物, 分别用于扩增完整的 ORF5 与 ORF6。引物为自行设计, 由上海英骏生物技术有限公司合成。

ORF5-1: 5' -CACGTTTAAACATGTTGGAGAAATGCTT-3' *Pme* I

ORF5-2: 5' -TATGGCGCGCCCTAAGGACGACCCATT-3' *Asc* I

ORF6-1: 5' -TATACGCGTATGGGGTCGTCCTTA-3' *Mlu* I

ORF6-2: 5' -CCGGGCCCATT^{TTTTATAAAAAT}TTATTTGGCATATTT-3' *Apa* I 痘病毒早期转录双向终止信号

(2) 重组转移载体的构建: 利用引物 ORF5-1、ORF5-2, 以重组质粒 pcDNA-M5A-6A 为模板, 扩增 PRRSV NJ-a 株 MORF5 基因, 用 *Pme* I 与 *Asc* I 双酶切后克隆入 MVA 转移载体 pLR-gpt 相应的位点中, 获得重组质粒 pLRgpt-MORF5; 利用引物 ORF6-1、ORF6-2, 以重组质粒 pcDNA-M5A-6A 为模板, 扩增 PRRSV NJ-a 株 ORF6, 用 *Mlu* I 与 *Apa* I 双酶切后克隆入 pLRgpt-MORF5 相应的位点中, 获得共表达 PRRSV NJ-a 株 MORF5 与 ORF6 的 MVA 重组转移载体 pLRgpt-MORF5/ORF6。

1.2.2 转染用质粒 pLRgpt-MORF5/ORF6 的制备

参照文献[3]介绍方法进行。

1.2.3 MPA 浓度和亲本毒的定量

(1) 亲本病毒的增殖: 取用含 10%胎牛血清的 DMEM 培养成单层的 BHK-21 细胞, PBS 漂洗 3 次, 加入 5 mL 无血清的 DMEM 覆盖其表面, 接种 MVA, 37°C 吸附 2 h; 弃营养液, PBS 漂洗 3 次, 加入 10 mL 2% DMEM 维持液; 置 37°C, 5% CO₂ 培养箱中培养, 逐日观察, 至出现 80%左右病变时, 冻融 3 次收毒, -20°C 保存备用。

(2) 选择性培养基 2%MXHAT: 按 Marshall^[8]和 David^[9]研究中所用的 MPA 浓度 25 μg/mL 为基值, 选取 MPA 分别为 10 μg/mL、15 μg/mL、20 μg/mL、25 μg/mL、30 μg/mL 和 40 μg/mL; 黄嘌呤 250 μg/mL; 次黄嘌呤 14 μg/mL; 氨基蝶呤 2 μg/mL; 胸苷 8 μg/mL 的 2%胎牛血清的 DMEM 培养基(2% MXHAT)在 24 孔板上进行 BHK-21 细胞对选择性培养基的耐受性试验。

(3) BHK-21 细胞对选择性培养基的耐受性试验: 以 2×10⁵ 个/孔的细胞量接种 BHK-21 细胞于 24 孔细胞培养板, 于接种后的 12 h、24 h 和 36 h 换成 2% MXHAT 培养基, 以后每天观察细胞的生长情况以确定选择性培养基中药物的浓度。

(4) 转染时亲本毒的定量: 取长成单层的 BHK-21 细胞, 用 0.5%胰酶消化传代到 96 孔细胞板, 细胞接种量为 8×10⁴ 个/孔, 在 37°C, 5%CO₂ 培养箱中培养 24 h 至 80%~90%长满单层; 取 MVA100 μL, 分别用含 2%胎牛血清的 DMEM 和 MXHAT 选择性培养基以 10 倍连续稀释法稀释病毒 10⁻¹~10⁻⁸, 每个稀释度各接 1 列(8 孔), 100 μL/孔, 同时设空白对照组; 37°C, 5% CO₂ 培养箱中培养, 逐日观察病变出现情况并记录, 直至终点; 计算 MVA 分别在含 2%胎牛血清的 DMEM 和 MXHAT 中的 TCID₅₀, 取选择性培养基能抑制其复制、不出现细胞病变的病毒接种量作为转染时亲本病毒的用量。

1.2.4 细胞的转染

参照文献[10]介绍方法进行。

1.2.5 重组病毒的筛选与纯化

用 2%的 MXHAT 10 倍连续稀释病毒后接种到长满单层 BHK-21 细胞的 24 孔板(2×10⁵ 个/孔), 接毒量 500 μL/孔, 37°C 吸附 1 h, 用 PBS 洗涤 2 次, 用含

2%胎牛血清的 MXHAT 选择性培养基维持, 每隔 48 h 换一次液, 逐日观察, 收获稀释倍数大且出现病变孔的病毒液, 如此反复, 直到病毒在选择性培养基和正常培养基中的 TCID₅₀ 值达到一致为止, 表明重组病毒已纯化^[9,10]。为防止细胞脱落, 在接毒前 2 h 更换选择性培养基。

1.2.6 重组病毒的鉴定

(1) 重组病毒 PCR 鉴定: 将在选择性培养基中出现 90%细胞病变的细胞单层用 PBS 漂洗 1 次, 用无菌橡皮塞刮下细胞, 4000 r/min 离心 10 min, 收集细胞, 每瓶细胞加 1 mL PBS, 提取病毒基因组作为模板, 利用 P_L、P_R 为引物进行目的基因的扩增, 以鉴定目的基因在 MVA 基因组中的插入, 同时以亲本 MVA 基因组 DNA 作为对照。

(2) 重组病毒 Western blotting 分析: 将纯化的 rMVAgpt-MGP5/M 按 2.0 MOI 接种单层的 BHK-21 细胞, 48 h 后收集并裂解细胞, 进行 SDS-PAGE 分离、转膜后以兔抗 PRRSVN-J-a 株多克隆抗体为一抗, 以 HRP 标记的羊抗兔 IgG 抗体为二抗进行显色反应, 显色后观察是否存在与预期蛋白大小一致的蛋白反应条带。

(3) 重组病毒 IFA 鉴定: 将纯化的 rMVAgpt-MGP5/M 按 2.0 MOI 接种单层的 BHK-21 细胞, 在感染后 48 h, 弃营养液, 每孔用 PBS (pH 7.4) 洗涤 3 次, 加 -20℃ 预冷的固定液(丙酮: 乙醇=6:4), 固定 5 min, 用 PBS 漂洗 3 次后空气干燥; 分别加入 1:100 稀释的兔抗 PRRSV GP5 或 M 蛋白的高免血清, 37℃ 作用 30 min; PBS 漂洗 3 次后, 加入 FITC 标记的羊抗兔抗体, 37℃ 作用 45 min; PBS 漂洗 3 次, 风干后直接观察荧光。同时以 MVA 感染细胞作对照。

1.2.7 利用 BHK-Cre 除去重组病毒 Eco gpt 表达盒

以 0.1 MOI 接种纯化的 rMVAgpt-MGP5/M 于长满 BHK-Cre 细胞的 6 孔细胞板, 37℃、5% CO₂ 培养至细胞病变明显后收获病毒。收获病毒分为两份, 一份重新接种 BHK-Cre 细胞, 另一份接种 BHK-21 细胞, 用 2% 的 MXHAT 选择性培养基培养, 连续反复传代筛选, 直到所收获病毒在 BHK-21 细胞上以 2% 的 MXHAT 培养不形成病变, 得到重组病毒 rMVA-MGP5/M。

1.2.8 rMVA-MGP5/M PCR 鉴定

根据 Eco gpt 基因序列设计一对特异性引物用于

rMVA-MGP5/M 的 PCR 鉴定, 引物如下:

P1: 5' -AGCGAAAAATACATCGTCACCTGG-3'

P2: 5' -ACACCATTGTGTGTCATCATCAGAC-3'

提取 rMVAgpt-MGP5/M 与 rMVA-MGP5/M 病毒核酸, 用 P1、P2 扩增。同时设亲本病毒 MVA 核酸作为对照。

1.2.9 重组病毒的生长曲线测定

取纯化的 rMVA-MGP5/M、rMVAgpt-MGP5/M 和亲本 MVA, 分别以 2.0 MOI 感染 24 孔板 BHK-21 细胞单层, 37℃ 吸附 1 h, 用 DMEM 冲洗 3 次, 加入含 2% FCS 的 DMEM 与 2% MXHAT, 于 37℃ 5% CO₂ 培养箱中培养。分别在接毒后 12、24、48 和 72 h 时, 收获病毒, 测定病毒的 TCID₅₀, 绘制生长曲线。

2 结果

2.1 重组转移载体的鉴定

重组转移载体用 *Pme* I + *Asc* I 或 *Mlu* I + *Apa* I 双酶切, 酶切产物电泳, 出现 4000 bp 的载体片段及 603 bp 的 ORF5 与 525 bp 的 ORF6 基因, 表明重组转移载体构建成功(图 1)。

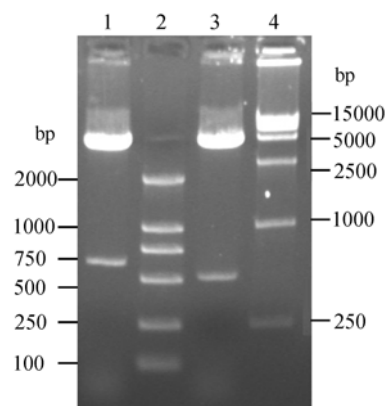


图 1 重组质粒 pLRgpt-MORF5/ORF6 双酶切鉴定

Fig. 1 Identification for the recombinant plasmid pLRgpt-MORF5/ORF6

1: pLRgpt-MORF5/ORF6 treated with *Pme* I and *Asc* I ; 2: DNA molecular marker (DL2000); 3: pLRgpt-MORF5/ORF6 treated with *Mlu* I and *Apa* I ; 4: DNA molecular marker (DL15000)

2.2 霉酚酸浓度和亲本毒的定量

用 MPA 为 10 μg/mL、15 μg/mL、20 μg/mL、25 μg/mL、30 μg/mL 和 40 μg/mL 的 2% MXHAT 分时段进行 BHK-21 对选择性培养基的耐受性试验, 结果表明 MPA 为 10 μg/mL 和 15 μg/mL 的 2%

MXHAT 对 BHK-21 细胞的维持没有影响;而 MPA 为 20 $\mu\text{g/mL}$ 。25 $\mu\text{g/mL}$ 、30 $\mu\text{g/mL}$ 和 40 $\mu\text{g/mL}$ 的 2% MXHAT 在不同的时间加入都引起细胞的脱落和死亡。

2.3 转染时所用亲本毒的定量

亲本毒在 MPA 为 15 $\mu\text{g/mL}$ 的 2% MXHAT 和 2% DMEM 中的 TCID_{50} 分别为 $10^{3.19}/0.1 \text{ mL}$ 和 $10^{7.6}/0.1 \text{ mL}$, 即分别为 3.98×10^7 个 $\text{TCID}_{50}/\text{mL}$ 和 1.55×10^3 个 $\text{TCID}_{50}/\text{mL}$ 。选取 10^{-3} 倍稀释 100 μL 的病毒液作为转染时病毒的接种量, 即 2510 个 TCID_{50} 。

2.4 转染用质粒 DNA 的制备

大量提取和纯化 MVA 重组转移载体 pLRgpt-MORF5/ORF6, 取小量样品用 DNA/RNA 微量测定仪测定其 DNA 的含量, 结果为 1436 $\text{ng}/\mu\text{L}$ 。

2.5 重组病毒的筛选纯化结果

用 2% MXHAT 培养基筛选 12 代后, rMVAgpt-MGP5/M 在 2% DMEM 和 2% MXHAT 培养基中均生长良好, 且与亲本 MVA 出现病变的时间基本一致。rMVAgpt-MGP5/M 在选择性培养基和普通培养基中的病毒滴度已基本达到一致, 表明重组病毒已经得到了纯化; rMVAgpt-MGP5/M 的滴度和亲本毒 MVA 的滴度也基本一致, 说明外源基因的引入没有影响 MVA 的复制。

2.6 重组病毒鉴定结果

2.6.1 重组病毒 PCR 鉴定结果

以从重组病毒感染的 BHK-21 细胞提取的基因组 DNA 作为模板, 以 P_L 与 P_R 为引物进行 PCR 扩增,

电泳分析可见 1500 bp 的目的基因(图 2), 而亲本毒 MVA 对照未扩出任何条带, 证明了目的基因在 MVA 基因组中的插入。

2.6.2 重组病毒间接免疫荧光鉴定结果

纯化的 rMVAgpt-MGP5/M 和亲本毒 MVA 分别感染 BHK-21 细胞, 待病变明显后进行间接免疫荧光染色, 结果 rMVAgpt-MGP5/M 感染细胞经与兔抗 GP5、M 蛋白特异性多抗反应后均呈现很强的绿色荧光(图 3), 而亲本 MVA 感染细胞没有荧光, 进一步证明重组病毒能同时表达 MGP5 和 M 蛋白。

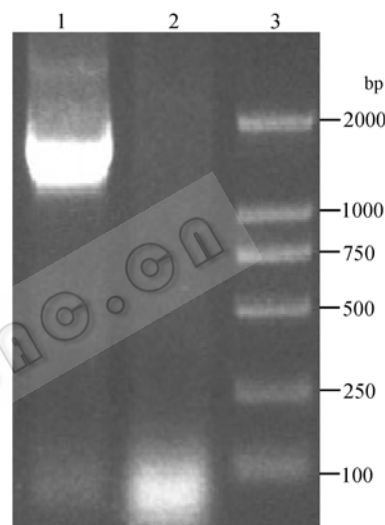


图 2 重组病毒 rMVAgpt-MGP5/M PCR 鉴定
Fig. 2 PCR identification for the recombinant virus rMVAgpt-MGP5/M

1: rMVAgpt-MGP5/M amplified with primer P_L and P_R ; 2: wtMVA amplified with primer P_L and P_R ; 3: DNA molecular marker (DL2000)

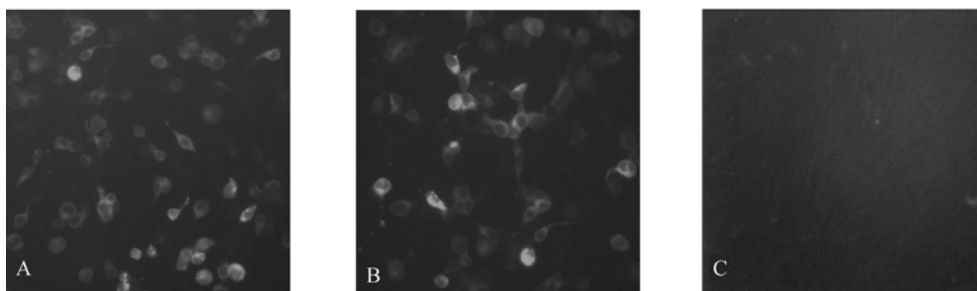


图 3 IFA 检测重组病毒感染 BHK-21 细胞中 PRRSV 蛋白的表达

Fig. 3 Immunofluorescence assay with rMVAgpt-MGP5/M-infected BHK-21 cells

A: rMVAgpt-MGP5/M infected BHK-21 cells reacted with GP5-specific antiserum; B: rMVAgpt-MGP5/M infected BHK-21 cells reacted with M-specific antiserum; C: negative control

2.6.3 重组病毒 Western blot 分析结果

将纯化的 rMVAgpt-MGP5/M 与亲本毒 MVA 分别感染 BHK-21 细胞, 待病变明显后收集细胞进行裂解处理作为抗原, 进行 Western blot 分析。由图 4 可见, rMVAgpt-MGP5/M 感染的细胞能够出现 25 kD 和 19 kD 的蛋白印迹条带, 而亲本毒对照孔没有任何条带。结果表明, 构建的重组病毒能够同时表达 MGP5 和 M 蛋白, 并且表达产物具有与兔抗 PRRSV NJ-a 株阳性血清结合的能力。

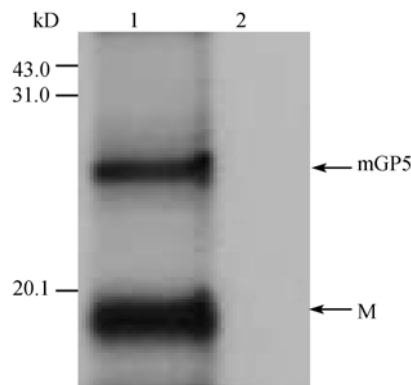


图 4 rMVAgpt-MGP5/M 的 Western blot 鉴定

Fig. 4 Western blot analysis for rMVAgpt-MGP5/M

1: rMVAgpt-MGP5/M reacts with PRRSV positive serum; 2: MVA reacts with PRRSV positive serum

2.7 rMVA-MGP5/M 的鉴定

以 rMVAgpt-MGP5/M 为亲本毒, 在 BHK-Cre 细胞上筛选纯化后得到 rMVA-MGP5/M。rMVA-MGP5/M 在 2%MXHAT 选择性培养基中完全不能产生病变, 说明在 Cre 酶的作用下, rMVAgpt-MGP5/M 中的 *Eco gpt* 表达盒已被正确删除。以亲本毒 MVA、rMVAgpt-MGP5/M 与 rMVA-MGP5/M 的基因组 DNA 为模板, 利用引物 P1、P2, 分别扩增 *Eco gpt* 表达盒, 结果见图 5; rMVAgpt-MGP5/M 中带两个同向 *LoxP* 位点的 *Eco gpt* 表达盒为 890bp, rMVA-MGP5/M 由于 *Eco gpt* 表达盒被删除, 所以没有扩增产物。结果表明, 在 Cre 酶的作用下, *Eco gpt* 表达盒被正确除去。

2.8 重组病毒在 BHK-21 细胞上的生长特性

rMVA-MGP5/M 与 rMVAgpt-MGP5/M 在 BHK-21 细胞上分别以 2%DMEM 与 2%MXHAT 培养的

生长曲线见图 6 与 7。由图 6 可见, 当两个重组病毒在 2%DMEM 中培养时, 滴度与亲本毒 MVA 基本一致, 说明外源基因的插入不影响病毒的增殖; 由图 7 可见, 当两个重组病毒在 2%MXHAT 选择性培养基中培养时, rMVAgpt-MGP5/M 滴度未发生明显的变化, 而 rMVA-MGP5/M 与亲本毒 MVA 的生长被完全抑制, 也表明在 Cre 酶的作用下, rMVAgpt-MGP5/M 中的 *Eco gpt* 表达盒已被正确删除。

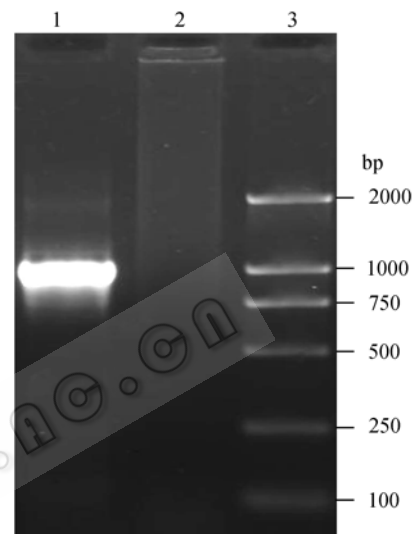


图 5 重组病毒 rMVA-MGP5/M 的 PCR 鉴定

Fig. 5 PCR identification for the recombinant virus rMVA-MGP5/M

1: rMVAgpt-MGP5/M amplified with primer P1 and P2; 2: DNA molecular marker (DL2000); 3: rMVA-MGP5/M amplified with primer P1 and P2

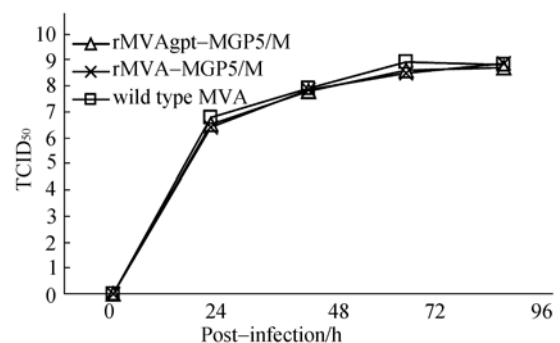


图 6 重组病毒 rMVAgpt-MGP5/M、rMVA-MGP5/M 与亲本毒 MVA 在 2%DMEM 培养基中的生长曲线

Fig. 6 One-step growth curve for rMVAgpt-MGP5/M, rMVA-MGP5/M and wtMVA in DMEM containing 2% FCS

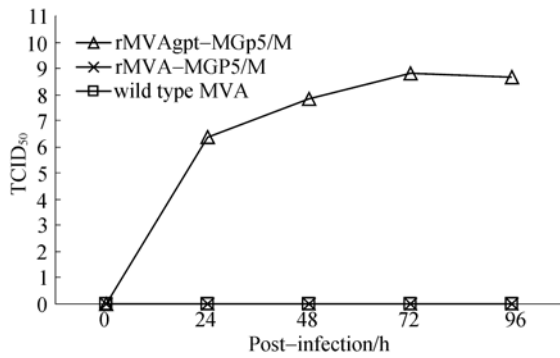


图7 重组病毒 rMVAgpt-MGP5/M、rMVA-MGP5/M 与亲本毒 MVA 在 2%MXHAT 培养基中的生长曲线

Fig. 7 One-step growth curve for rMVAgpt-MGP5/M, rMVA-MGP5/M and wtMVA in DMEM containing MXHAT and 2% FCS

3 讨论

基因片段剔除是 Cre/loxP 系统最广泛的应用方式。Cre 重组酶可以特异性的识别 loxP 位点, 切除两个同向的 loxP 位点之间的全部序列, 保留一个 loxP 位点, 外部序列全被保留, 达到两个重组位点之间或之外不同序列设计获得不同的定点修饰靶基因的目的^[33]。传统重组病毒研究中经常使用的报告分子如 GFP、lacZ、Eco gpt 等存在于重组病毒基因组中, 获得的重组病毒基因组中含有这些报告基因, 特别是抗生素基因与药物筛选基因, 给重组病毒的应用带来一定困难。本研究构建的重组病毒 rMVAgpt-MGP5/M 性质稳定, 标记基因两侧带有 loxP 位点, 为进一步利用 Cre/LoxP 系统进行下游的基因工程操作打下良好的基础。

本研究采用 Eco gpt 作为重组病毒筛选标记。以前研究表明, 仅仅在培养液中添加霉酚酸(MPA)不能完全抑制亲本毒的生长, 但在添加氨基蝶呤, 黄嘌呤, 次黄嘌呤以及胸腺嘧啶后, 就可以完全抑制亲本毒的生长。药物浓度对重组病毒的筛选非常重要, 根据以前研究结果, 我们选用含 15 μg/mL MPA、250 μg/mL 黄嘌呤、14 μg/mL 次黄嘌呤、2 μg/mL 氨基蝶呤和 8 μg/mL 胸腺嘧啶脱氧核苷的 2%胎牛血清 DMEM 培养基。其中的药物浓度不引起 BHK-21 细胞的脱落和死亡, 但能抑制 MVA 在 BHK-21 细胞上复制、不出现病变, 而表达 Eco gpt 的 rMVAgpt-MGP5/M 却可以正常生长。同时本试验在转染后直接用选择性培养基培养对提高筛选效率也是有利的^[19]。

PRRS 是一种以母猪繁殖障碍和仔猪呼吸道症状及高死亡率为主要特征的传染病, 几乎遍及世界所有养猪国家, 在中国的流行和分布也日益广泛, 危害日趋严重。本病的传播不仅给全球养猪业造成巨大的直接经济损失, 而且易导致其它病原的继发感染、混合感染和免疫抑制, 对现行的免疫策略和疫苗研制提出严峻的挑战。GP5 是 PRRSV 的主要免疫保护性抗原, 该蛋白含有 6 个抗原决定簇, 能诱导机体产生特异性中和抗体和细胞免疫^[8]。笔者在以前的研究中对 PRRSV GP5 进行修饰, 提高了其免疫原性^[17, 18]。M 蛋白由 ORF6 编码, 经用感染猪康复血清进行的免疫印迹试验证明具有很强的免疫原性, 感染后 10 d 就可以检测特异抗体, 体外表达的 M 蛋白可作为检测早期感染的抗原^[5]; 在体外, M 蛋白诱导的 T 细胞增生反应比其它结构蛋白更强烈, 表明 M 蛋白在细胞免疫反应中可能起主要作用^[9, 10]。

正是基于以上研究结果, 本研究构建了共表达 PRRSV 修饰的 GP5(MGP5)与 M 蛋白的重组改良型痘苗病毒安卡拉株, 并利用 Cre/LoxP 系统成功去除筛选标记基因(Eco gpt), 提高了重组病毒的生物安全性。重组病毒在 2%MXHAT 及 DMEM 培养基中的滴度及生物学特性表明, 当两个重组病毒在 2%DMEM 中培养时, 滴度与亲本毒 MVA 基本一致, 说明外源基因插入不影响病毒的增殖, 在 2%MXHAT 培养基中, rMVAgpt-MGP5/M 滴度未发生明显变化, 而 rMVA-MGP5/M 与亲本毒 MVA 的生长被完全抑制, 也说明在 Cre 酶作用下, rMVAgpt-MGP5/M 中的 gpt 表达盒已被正确删除, 对重组病毒的 PCR 鉴定也证明了我们的结论。对重组病毒进行间接免疫荧光试验, 结果均出现了特异性绿色荧光, 而对照组没有出现黄绿色荧光; 同时, 对重组病毒表达产物的 Western blot 检测结果表明, 目的片段在重组病毒感染的 BHK-21 细胞中成功得到了表达, 而且表达产物具有免疫反应性。该重组 MVA 的构建成功, 为进一步开发新型的抗 PRRSV 基因工程疫苗的研奠定基础。

REFERENCES

- [1] Baustista EM, Meulenber JJ, Choi CS. Structural polypeptides of the American (VR2332) strain of porcine epidemic abortion and respiratory virus. *Arch Virol*, 1996,

- 141(1): 1357–1365.
- [2] Guo BQ, Chen ZS, Liu WX, *et al.* Studies on PRRSV isolation from PRRSV like infection abolish fetus. *Chinese Animal Infectious Disease*, 1996, **18**(2): 1–4.
郭宝清, 陈章水, 刘文兴, 等. 从疑似 PRRS 流产胎儿分离 PRRSV 的研究. *中国预防兽医学报*, 1996, **18**(2): 1–4.
- [3] Benfield D, Harris L, Nelson E. Properties of SIRS virus isolate ATCC VR2332 in the united state and preliminary characterization of a monoantibody to this virus. *Am Assoc Swine Pract Newsletter*, 1992, **4**(2): 19–21.
- [4] Meng XJ. Heterogeneity of Porcine reproductive and respiratory syndrome virus: Implications for current vaccine efficacy and future vaccine development. *Veterinary Microbiology*, 2000, **74**(1): 309–329.
- [5] Lopez Fuerees L, Domentch N, Alvarez B. Analysis of cellular immune response in pigs recovered from porcine respiratory and reproductive syndrome infection. *Virus Res*, 1999, **64**(1): 38–42.
- [6] Saito A, Kanno T, Murakami Y, Muramatsu M. Characteristics of major structural protein coding gene and leader-body sequence in subgenomic mRNA of porcine reproductive and respiratory syndrome virus isolated in Japan. *J Vet Med Sci*, 1996, **58**(1): 377–380.
- [7] Delputte P.L. Involvement of the matrix protein in attachment of porcine reproductive and respiratory syndrome virus to a heparin-like receptor on porcine alveolar macrophage. *J Virol*, 2002, **71**(1): 9170–9197.
- [8] Kreutz L.C., Mengeling W.L. Baculovirus expression and immunological detection of the major structural proteins of porcine reproductive and respiratory syndrome virus. *Vet Microbiol*, 1997, **12**(1): 1–13.
- [9] Yoon KJ, Wu LL, Zimmerman JJ. Field isolates of porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV) vary in their susceptibility to antibody dependent enhancement (ADE) of infection. *Veterinary Microbiology*, 1997, **55**(2): 277–287.
- [10] Meulenberg JJ, Essen-Zanbergena, Langeveld JP. Post-translational processing and identification of a neutralization domain of the GP4 protein encoded by ORF4 of Lelystad virus. *J Virol*, 1997, **71**(1): 6061–6067.
- [11] Meyer H, Sutter G, Mayr A. Mapping of deletions in the genome of the highly attenuated vaccinia virus MVA and their influence on virulence. *J Gen Virol*, 1991, **72**(4): 1031–1038.
- [12] Sutter G, Moss B. Nonreplicating vaccinia vector efficiently expresses recombinant genes. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1992, **89**(1): 10847–10851.
- [13] Espenschied J, Lamont J, Longmate J. CTLA24 blockade enhances the therapeutic effect of an attenuated poxvirus vaccine targeting p53 in an established murine tumor model. *J Immunol*, 2003, **170**(3): 3401–3407.
- [14] Cosma A, Nagaraj R, Buhler S, Hinkula J, Busch DH, Sutter G. Therapeutic vaccination with MVA-HIV-1 nef elicits Nef-specific T-helper cell responses in chronically HIV-1 infected individuals. *Vaccine*, 2003, **22**(1): 21–29.
- [15] Sternberg N, Sauer B, Hoess R, *et al.* Bacteriophage P1 cre gene and its regulatory region. Evidence for multiple promoters and for regulation by DNA methylation. *J Mol Biol*, 1986, **187**(2): 197–212.
- [16] Meseda C A, Schmeisser F, Pedersen R. DNA immunization with a herpes simplex virus 2 bacterial artificial chromosome. *Virology*, 2004, **318**(1): 420–428.
- [17] Zheng QS, Li P, Bi ZX, Cao RB, Zhou B, Chen DS, Chen PY. Influence of epitope A modification and N-linked glycosylated site mutation of PRRSV NJ-a strain ORF5 gene on the ability to induce neutralizing antibodies and T cell proliferation response. *Chinese Journal of Biotechnology*, 2007, **23**(1): 33–39.
郑其升, 李鹏, 毕志香, 曹瑞兵, 周斌, 陈德胜, 陈溥言. PRRSV NJ-a 株 ORF5 基因 A 表位的修饰与糖基化位点的突变对其 DNA 疫苗免疫效力的影响. *生物工程学报*, 2007; **23**(1): 33–39.
- [18] Zheng QS. Study on the immune efficacy of recombinant modified vaccinia virus Ankara co-expressing the modified GP5 and M protein of Porcine reproductive and respiratory syndrome virus. Doctoral dissertation of Nanjing Agricultural University.
郑其升. PRRSV ORF5 与 ORF6 基因重组改良型痘苗病毒安卡拉株的免疫效力研究. 南京农业大学博士论文.
- [19] Marshall DR, Reilly JD, Silva RF. Selection of Marek disease virus recombinants expressing the *Escherichia coli* gpt gene. *J Virol*, 1993, **195**(3): 638–648.

第 13 届国际生物技术大会暨展览会即将在大连举行

始于 1960 年, 每四年举办一届、各大洲轮流举办并首次登陆中国的第 13 届国际生物技术大会暨展览会(IFS-2008)将于 2008 年 10 月 13 日在大连举行。(IFS-2008)是生物技术领域公认的规模最大、学术水平最高、社会影响最强的国际盛会, 堪称是生物技术领域的奥林匹克大会。本次大会邀请生物技术领域取得突出成就而享誉全球的一百五十多位科学家做学术报告, 包括 3 位诺贝尔奖获得者, 数十位各国科学院和工程院院士及多位国际上著名的生物技术公司 CEO 和的研发部门 CTO 等。更多详情请登录: <http://cn.ifs2008.org/exhibition.html>。