

表达兔出血症病毒 VP60 蛋白的重组兔粘液瘤病毒的构建与初步评价

王媛^{1*}, 于倩^{2*}, 李毅³, 董衍明⁴

1 湖北文理学院 医学院, 湖北 襄阳 441053

2 江苏大学 生命科学研究院, 江苏 镇江 212013

3 武汉生物工程学院 生命科学与技术学院, 湖北 武汉 430415

4 湖北大学 生命科学学院 省部共建生物催化与酶工程国家重点实验室, 湖北 武汉 430062

王媛, 于倩, 李毅, 等. 表达兔出血症病毒 VP60 蛋白的重组兔粘液瘤病毒的构建与初步评价. 生物工程学报, 2020, 36(10): 2083–2091.

Wang Y, Yu Q, Li Y, et al. Generation and evaluation of a recombinant myxomavirus expressing the VP60 protein of rabbit haemorrhagic disease virus. Chin J Biotech, 2020, 36(10): 2083–2091.

摘要: 兔出血症病毒 (Rabbit hemorrhagic disease virus, RHDV) 及兔粘液瘤病毒 (Myxoma virus, MYXV) 分别引起兔出血症 (兔瘟) 和兔粘液瘤病, 是两种严重危害家兔养殖业以及导致原产地欧洲野兔-穴兔 (*Oryctolagus cuniculus*) 种群近濒危的重要病原。VP60 为构成 RHDV 衣壳的主要抗原蛋白。为研制能同时免疫预防该两种疫病的重组二联疫苗, 本研究分别以 MYXV 和其复制非必需基因——胸腺激酶 (Thymidine kinase, TK) 基因为重组载体和同源重组靶基因, 构建穿梭载体 p7.5-VP60-GFP。将 p7.5-VP60-GFP 载体转染被 MYXV 感染的兔肾细胞株 RK13, 经同源重组后, 在荧光显微镜下筛选出表达 GFP 的重组病毒, 并将其命名为 rMV-VP60-GFP。通过 PCR 和 Western blotting 进行重组病毒 *vp60* 基因特异性插入和表达验证结果显示, *vp60* 和 *gfp* 基因成功插入 MYXV 基因组中并且可成功表达, 表明成功构建了表达 RHDV 衣壳蛋白基因 *vp60* 的重组 MYXV。动物攻毒保护试验表明, 制备的重组病毒能保护家兔抵抗 MYXV 的致死性攻击, 这为后续疫苗的研发奠定了基础。

关键词: VP60 蛋白, 胸腺激酶基因, 绿色荧光蛋白, 同源重组, 粘液瘤病毒, 兔出血症病毒

Received: March 10, 2020; **Accepted:** June 10, 2020

Supported by: Natural Science Foundation of Hubei Province, China (Nos. 2017CFB241, 2020CFB831), Teacher Research and Cultivation Fund of Hubei University of Art and Science (No. 2020kypyfy019), China Postdoctoral Science Foundation (No. 2019M650176), National Natural Science Foundation of China (No. 31800137), Startup Fund for Jiangsu University (No. 17JDG010).

Corresponding author: Yanming Dong. Tel: +86-27-88661237-6349, E-mail: dym615@icloud.com

*These authors contributed equally to this study.

湖北省自然科学基金 (Nos. 2017CFB241, 2020CFB831), 湖北文理学院教师科研能力培育基金 (No. 2020kypyfy019), 中国博士后科学基金 (No. 2019M650176), 国家自然科学基金 (No. 31800137), 江苏大学人才启动经费 (No. 17JDG010) 资助。

Generation and evaluation of a recombinant myxomavirus expressing the VP60 protein of rabbit haemorrhagic disease virus

Yuan Wang^{1*}, Qian Yu^{2*}, Yi Li³, and Yanming Dong⁴

¹ College of Medical, Hubei University of Art and Science, Xiangyang 441053, Hubei, China

² School of Life Sciences, Jiangsu University, Zhenjiang 212013, Jiangsu, China

³ School of Life Sciences and Technology, Wuhan University of Bioengineering, Wuhan 430415, Hubei, China

⁴ State Key Laboratory of Biocatalysis and Enzyme Engineering, School of Life Sciences, Hubei University, Wuhan 430062, Hubei, China

Abstract: Rabbit haemorrhagic disease virus (RHDV) and myxoma virus (MYXV), are two pathogens that have harmful effect on rabbit breeding and population decline of European rabbits in their native range, causing rabbit haemorrhagic disease (rabbit fever) and myxomatosis, respectively. The capsid protein VP60 of the RHDV represents the major antigenic protein. To develop a recombinant bivalent vaccine candidate that can simultaneously prevent these two diseases, we used the nonessential gene TK (thymidine kinase) of MYXV as the insertion site to construct a recombinant shuttle vector p7.5-VP60-GFP expressing the RHDV major capsid protein (VP60) and the selectable marker GFP. Then the shuttle vector p7.5-VP60-GFP was transfected into rabbit kidney cell line RK13 which was previously infected with MYXV. After homologous recombination, the recombinant virus expressing GFP was screened under a fluorescence microscope and named as rMV-VP60-GFP. Finally, the specific gene-knock in and expression verification of the *vp60* and *gfp* genes of the recombinant virus was confirmed by PCR and Western blotting. The results showed that these two genes were readily knocked into the MYXV genome and also successfully expressed, indicating that the recombinant MYXV expressing the *vp60* of RHDV was generated. Protection against MYXV challenge showed that the recombinant virus induced detectable antibodies against MYXV which would shed light on development of the effective vaccine.

Keywords: VP60 protein, thymidine kinase gene, GFP, homologous recombination, myxomavirus, rabbit haemorrhagic disease virus

兔出血症病毒 (Rabbit hemorrhagic disease virus, RHDV) 和兔粘液瘤病毒 (Myxomavirus, MYXV) 是严重危害家兔及其祖先欧洲野兔-穴兔 (*Oryctolagus cuniculus*) 的两种病毒^[1-3]。RHDV 于 1984 年首次在我国发现, 随后世界各地也相继有该病毒的相关报道, 是导致兔出血症病 (Rabbit hemorrhagic disease, RHD), 俗称兔瘟的病原^[2-3]。该病属于烈性、致死性传染病, 感染个体通常在 48-72 h 内死亡, 致死率为 100%^[3-4]。RHDV 属于杯状病毒科 (Caliciviridae)、兔病毒属 (*Lagovirus*), 为单股正链 RNA 病毒, 其基因组长度为 7.4 kb。RHDV 编码一 257 kDa 大小的多聚蛋白, 后经自身编码的蛋白水解酶裂解, 得到功

能较成熟的 p16、p60、p43、p72 和 VP60 蛋白, 其中 VP60 既构成病毒衣壳, 也是制备抗病毒疫苗的主要抗原^[3-5]。MYXV 属于痘病毒科 (Poxviridae) 野兔痘病毒属 (*Leporipoxvirus*), 为双链 DNA 病毒, 病毒基因组长度约为 163 kb, 病毒感染细胞后在细胞质内进行复制和装配, 可引起兔粘液瘤病 (Myxomatosis)^[1]。MYXV 对家兔和欧洲野兔-穴兔 (*Oryctolagus cuniculus*) 易感, 致死率可达 95% 以上, 可通过吸血昆虫如蚊子、跳蚤等媒介传播, 但是棉毛兔属 (*Sylvilagus*) 的美洲棉尾兔 (*S. brasiliensis*) 和林兔 (*S. bachmani*) 对该病毒不易感, 是其自然宿主。除兔对 MYXV 易感外, 其他动物和人类不易感^[1-2]。因此, RHDV 和

MYXV 不仅对家兔养殖业造成了极大的经济损失,也导致了家兔的祖先穴兔在原产地数量大大减少,如葡萄牙和西班牙在近年已经分别把穴兔列为近危物种和易危物种,所以加强其疫苗的研发显得十分必要^[2]。

鉴于 RHDV 尚未有合适的体外细胞培养系统,这限制了减毒或灭活疫苗的开发。但是,针对 RHDV 的唯一结构蛋白基因 *vp60* 的亚单位疫苗和病毒载体疫苗的研发取得了很大的进展^[6-10]。本研究根据兔粘液瘤病毒具有的痘病毒特点,利用其胸腺激酶基因 TK 作为同源重组的靶基因进行重组痘病毒载体的构建,进而为后续疫苗的研发奠定基础^[11-14]。我们以 MYXV 病毒 TK 基因作为靶基因,首先构建含有 TK 上下游基因、MYXV 病毒 p7.5 启动子、RHDV 的衣壳蛋白 VP60 以及 GFP 筛选标记的穿梭载体 p7.5-VP60-GFP;同时,选择毒力适宜的 MYXV 毒株为亲本病毒感染体外培养的 RK13 细胞,继而转染穿梭质粒 p7.5-VP60-GFP,利用同源重组的原理,使野生型 MYXV 病毒的 TK 基因与穿梭质粒的 TK 基因进行同源重组,最后以插入的 *gfp* 基因为筛选标记,利用空斑筛选法,在荧光显微镜下筛选出在 RK13 细胞中表达 GFP 的重组病毒 rMV-VP60-GFP。经 PCR 扩增和 Western blotting 法对重组病毒进行的鉴定表明,*vp60* 基因成功插入 MYXV 基因组中,并且感染细胞后可以表达 VP60。

1 材料与方法

1.1 材料

兔肾细胞系 RK13、大肠杆菌 DH5 α 和质粒 pEGFP-N1、pMAL-VP60 (*vp60* 基因 PCR 片段,经 *EcoR* I / *Hind* III 酶切后,克隆入 pMAL-c2X 载体)、pBluescript II SK(+))均为本实验室保存;兔粘液瘤病毒 FS98/Lau 和 RHDVcDNA 由法国 Bio Espace 公司提供;CsCl 梯度离心后的 VP60 蛋白由本实验室保存;免疫用日本大耳白兔购自湖北

省疾控中心。

High Pure Viral Nucleic Acid Kit 购自瑞士 Roche 公司;转染试剂 LipofectamineTM均购于 Invitrogen 公司;限制性内切酶购自 NEB 公司;辣根过氧化物酶 (HRP) 标记的羊抗鼠 IgG 购自 Proteintech 公司;蛋白酶 K 购自 Roche 公司。

1.2 融合蛋白 MBP-VP60 的表达纯化

将本实验室保存的重组质粒 pMAL-VP60 转化大肠杆菌 DH5 α ,挑取单菌落接种于含 Amp 的 LB 中,经过夜培养活化后;次日,取活化后菌液以 1:100 加入新鲜 LB 培养基,并置于 37 °C、220 r/min 继续培养约 2 h,加入 IPTG 至终浓度为 0.5 mmol/L,37 °C 继续培养 4 h,待 SDS-PAGE 鉴定融合蛋白的表达情况后,进行大规模诱导表达,超声波破碎,12 000 r/min 离心后收集上清液,0.4 μ m 滤膜除杂,Amylose•BindTM树脂孵育并进行亲和层析。

1.3 融合蛋白 MBP-VP60 多抗血清的制备

取约 1.5 mg 重组蛋白 MBP-VP60 加入适量完全弗氏佐剂至 4.5 mL,首次免疫 (500 μ g 重组蛋白)采用腭窝淋巴结注射新西兰大白兔,然后,分别于 2 周和 4 周后采用背部皮下多点注射各加强免疫一次 (500 μ g 重组蛋白/次),并于第 2 次免疫后取血,利用本实验室保存的 CsCl 梯度离心纯化的 VP60 蛋白进行 Western blotting 鉴定,鉴定正确后一周内颈动脉取血,分装放于 -80 °C 保存,成功制备多克隆抗体。

1.4 穿梭质粒 p7.5-VP60-GFP 构建策略

以 pBluescript SK II(+) 为载体,利用 *Bam*H I、*Eag* I、*Kpn* I、*Sac* I、*Sma* I 和 *Xho* I 这些酶切位点,分步构建同时插入了同源重组的两臂 TK up 和 TK down 以及痘病毒晚期启动子 p7.5 和 RHDV 结构蛋白 VP60 的重组型质粒 p7.5-VP60,将酶切验证后的质粒送南京金斯瑞生物科技有限公司测序进一步确证。运用重叠延伸法扩增出 p7.5-GFP 基因,利用酶切位点 *Sac* I,在重组质

粒 p7.5-VP60 中反向插入 p7.5-GFP 基因 (相对于 p7.5-VP60)。从而获得在同源臂 TK up 和 TK down 之间反向插入 p7.5-GFP 和 p7.5-VP60 的穿梭质粒 p7.5-VP60-GFP, 待酶切验证后, 将构建的质粒送南京金斯瑞生物科技有限公司测序进一步确证。

1.5 重组病毒 rMV-VP60-GFP 的构建

利用空斑法^[15]测定 MYXV 病毒滴度, 以

MOI=1 感染生长于 24 孔板中的单层 RK13 细胞, 置于 37 °C、5% CO₂ 的条件下培养 2 h, 移除含病毒培养基, 加入制备好的转染液(含 2 μg p7.5-VP60-GFP 和 6 μL Lipofectamine), 具体操作按照 Invitrogen 操作手册, 2-4 d 后荧光显微镜观察转染结果并收集病毒液用于后续筛选纯化。

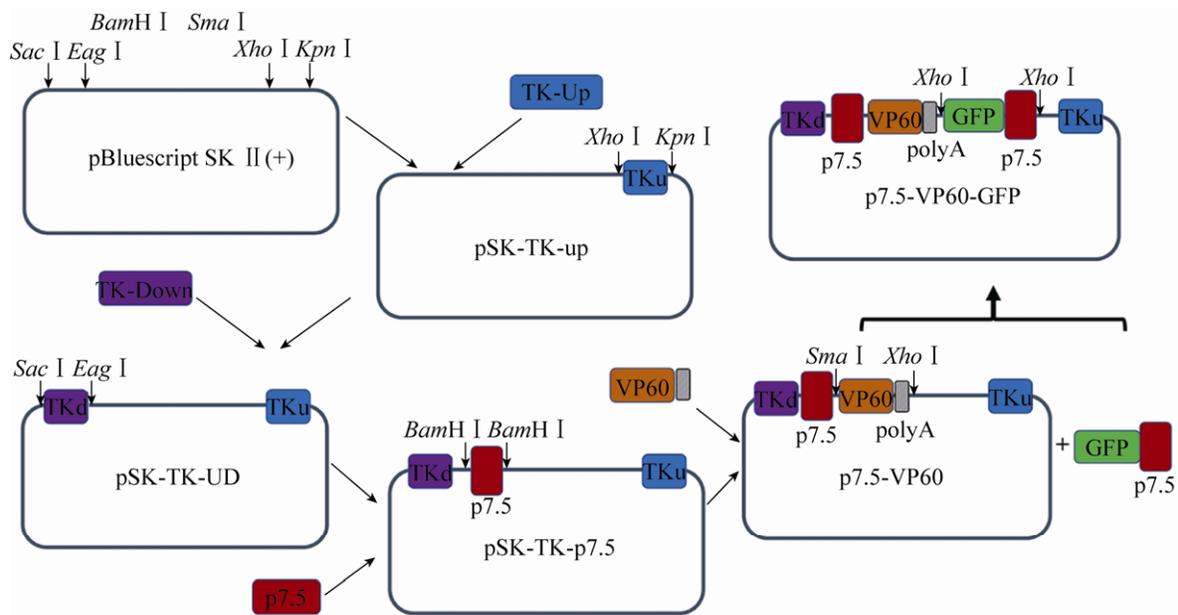


图 1 穿梭质粒 p7.5-VP60-GFP 的构建策略

Fig. 1 Construction strategy of the shuttle plasmid p7.5-VP60-GFP.

表 1 本研究应用的引物

Table 1 Primers used in this study

Primer name	Sequence (5'-3')	Size (bp)
TK up-F	GGGGTACCGCCATGTACGGGGGACAG	260
TK up-R	CCGCTCGAGCGATCACTTCGACGTGTTTCG	
TK down-F	CCGGCCGGACGAGGGACAGTTTTTCCC	260
TK down-R	CGAGCTCCTACACACCGATTTGTAAGTTG	
p7.5-F	CCGCTCGAGTGCAGGTTCGACATCTATATACTATAT	276
p7.5-R	CCTTGCTCACCATGGTGGCTGACTGTTCTTTATGATTC	
vp60+SV40-polyA-F1	TCCCCCGGGATGGAGGGCAAAGCCCGTGC	1 980
vp60+SV40-polyA-R1	CCGCTCGAGTTAAACACTGGACTCGCCAG	
p7.5+GFP-F	GAATCATAAAGAACAGTCAGCCACCATGGTGAGCAAGG	990
GFP-R	CCGCTCGAGTTAAGATACATTGATGAGTTTGGAC	
vp60-F2	TCATCACGAACTCAAAGTCTTCACT	405
vp60-R2	CGTCCAGCATTCTCCACAGA	

1.6 重组型病毒 rMV-VP60-GFP 的筛选

用经过同源重组得到的重组型病毒和野生型病毒的混合液感染六孔板中的单层细胞, 2 h 之后, 移除培养基, 加入含有 0.6% 琼脂糖的新鲜培养基, 待其凝固之后, 置于 37 °C、5% CO₂ 的培养箱中培养 3–4 d 后, 利用筛选标志 GFP (重组型病毒能够表达 GFP, 野生型病毒无 GFP) 在荧光显微镜下观察并圈定能够发出绿色荧光的空斑, 挑取该空斑, 用于新一轮的筛选。重复上面 5 次筛选步骤, 以便得到纯的重组型 rMV-VP60-GFP 病毒。

1.7 重组病毒的鉴定

将收集的重组型病毒 rMV-VP60-GFP 和野生型病毒分别感染 RK13 细胞, 取一部分提取细胞总蛋白, Western blotting 检测 RHDV 结构蛋白 VP60 的表达 (一抗: VP60 抗体); 同时, 待细胞大量死亡后收集病毒液, 利用 High Pure Viral Nucleic Acid Kit 提取的病毒基因组 DNA (参照 Roche 公司的操作手册) 作为模板进行 *vp60* 基因的 PCR 鉴定, 所用引物为 *vp60*-F2/R2 (表 1) 用于扩增 *vp60* 的部分片段, 大小为 402 bp。

1.8 MYXV 的动物保护试验

将制备好的重组病毒 rMV-VP60-GFP (10⁵ PFU/mL), 注射日本大耳白兔 (1 mL/只, 共 4 只, 雌雄各 2 只), 观察并记录注射重组病毒后兔粘液瘤病症出现及变化情况, 待症状全部消失

后, 注射病毒毒力和致死率最强的 MYXV 病毒株 Lau, 观察重组病毒产生抗体的保护效果。

2 结果与分析

2.1 融合蛋白 MBP-VP60 的表达纯化

按照方法 1.2 中的步骤, 表达与纯化 MBP-VP60 融合蛋白, 同时进行 SDS-PAGE 和 Western blotting 分析验证。如图 2 所示, 成功纯化到重组 MBP-VP60 蛋白。

2.2 融合蛋白 MBP-VP60 多抗血清的鉴定

为了验证制备的 MBP-VP60 多抗血清的特异性, 利用本实验室保存的来源于重组 VP60 杆状病毒制备的并经过 CsCl 梯度离心后的 VP60 蛋白进行 Western blotting 分析, 结果如图 3 所示, 制备的多抗血清成功检测到纯化的 VP60 蛋白。

2.3 重组型病毒 rMV-VP60-GFP 的构建、筛选及纯化

利用亲本病毒 MYXV 感染 RK13 细胞 2 h 后, 将穿梭质粒 p7.5-VP60-GFP 转染 RK13 细胞, 24 h 后荧光显微镜观察 GFP 表达情况, 收集荧光最强孔内的混合病毒液, 用于空斑筛选纯化, 反复进行 5 次空斑筛选之后得到的病毒进行空斑检测, 发现所有的空斑均能检测到绿色荧光, 最后挑选荧光强的空斑, 重新感染 RK13 细胞进行后续的重组病毒扩大和鉴定。结果表明, 成功筛选并纯化到重组型病毒 rMV-VP60-GFP (图 4)。

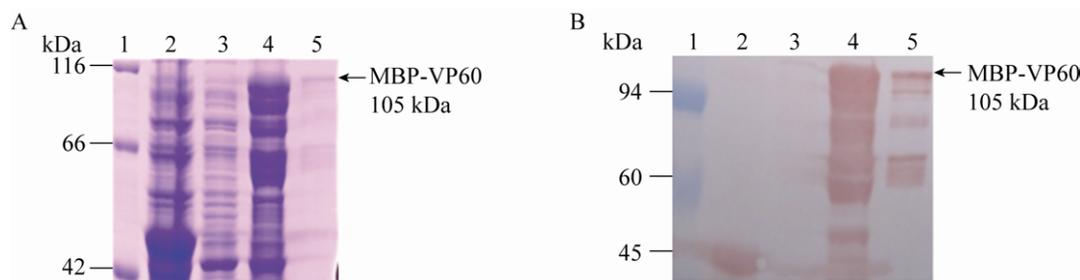


图 2 融合蛋白 MBP-VP60 的表达纯化 (A) 与 Western blotting 鉴定 (B)

Fig. 2 Expression and purification of the MBP-VP60 fusion protein (A) and Western blotting analysis (B). 1: protein marker; 2: pMAL-c2X (induced); 3: pMAL-VP60 (non-induced); 4: pMAL-VP60 (induced); 5: purified MBP-VP60.

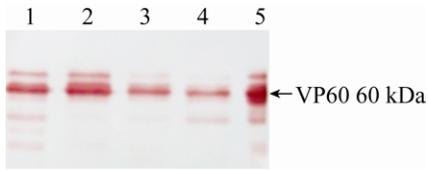


图3 VP60 抗血清的验证

Fig. 3 Identification of anti-VP60 sera. 1–5: purified VP60 protein with CsCl gradient centrifugation.

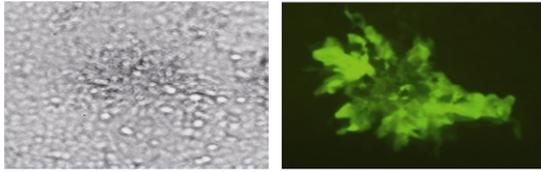


图4 重组病毒空斑形成的荧光显微镜观察鉴定

Fig. 4 Identification of the recombinant virus plaque formation by fluorescence microscopy. Left: white light; right: blue excitation.

2.4 重组病毒的鉴定

为了验证 *vp60* 基因是否也被成功插入重组病毒基因组中,以病毒液中提取病毒基因组 DNA 为模板,利用 *vp60* 检测引物 (*vp60*-F2/R2) 进行 PCR 扩增,琼脂糖凝胶电泳检测显示,PCR 扩增出约 400 bp 的目的条带,与阳性对照 (p7.5-VP60-GFP 为模板) 结果一致,而阴性对照 (以野生型 MYXV FS98 基因组 DNA 为模板) 没有检测到任何条带 (图 5)。该结果表明,重组型病毒 rMV-VP60-GFP 的基因组中插入了 *vp60*。

为了进一步分析插入重组病毒基因组的 *vp60* 能否顺利表达,利用制备的抗 VP60 多抗血清针对 VP60 的表达情况进行 Western blotting 检测,结果显示,重组病毒感染 RK13 细胞后 VP60 蛋白得到了表达 (图 6)。

2.5 重组型病毒的动物保护试验

由于缺乏野生型 RHDV 病毒,本研究只检测了重组病毒抵抗 MYXV 的动物保护效果。我们将制备好的重组病毒 rMV-VP60-GFP (10^5 PFU/mL),注射日本大耳白兔 (雌雄各 2 只),注射重组病毒

后,第 4 天全部兔背部出现兔粘液瘤病症出现,出现小包 (图 7A),第 7 天后小包变大变红,兔耳朵和眼睛无分泌物 (图 7B),第 20 天后兔粘液瘤症状全部消失 (图 7C)。

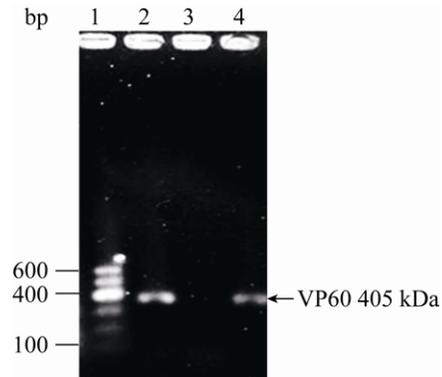


图5 重组病毒的 PCR 鉴定

Fig. 5 PCR identification of the recombinant virus. 1: 100 bp DNA marker; 2: recombinant virus; 3: FS98 (WT); 4: p7.5-VP60-GFP.

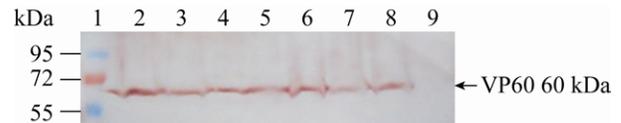


图6 Western blotting 检测 VP60 在重组病毒感染的 RK13 中的表达

Fig. 6 Western blotting analysis of the VP60 expression in infected RK13 cells with recombinant virus. rMV-VP60-GFP. 1: protein marker; 2–8: recombinant virus rMV-VP60-GFP; 9: FS98 (WT).

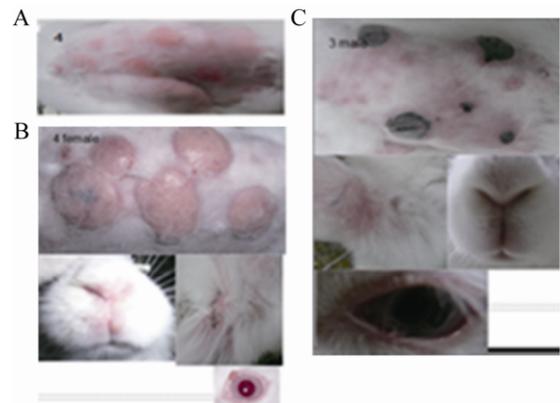


图7 MYXV 的动物保护试验

Fig. 7 Protection against MYXV challenge.

然后,注射病毒毒力和致死率最强的 MYXV 病毒株 Lau,观察重组病毒产生抗体的保护效果。结果显示,注射了重组病毒的兔子无病症,但是对照组的兔子全部死亡。虽然本实验未检测产生抗体的效价,但是根据上述兔粘液瘤病症出现和变化情况,可以判断本研究中筛选的重组病毒毒力合适,注射家兔后能产生抵抗 MYXV 的特异性抗体。

3 讨论

RHDV 和 MYXV 作为两种对家兔及其祖先欧洲野兔-穴兔致死性极强的病毒,是造成家兔极大经济损失和欧洲野兔-穴兔在其原产地逐渐成为近危或易危物种的重要原因^[2]。目前,鉴于 RHDV 尚未有合适的体外细胞培养系统,在其灭活疫苗开发过程中只能从自然或人工感染致死的兔肝或肺组织中分离病毒,增加了实验周期和成本^[16]。目前,针对 RHDV 的唯一结构蛋白 VP60 的亚单位疫苗和病毒载体疫苗的研发取得了很大的进展,如利用大肠杆菌、酵母、昆虫细胞以及马铃薯等表达系统的亚单位疫苗;利用重组牛痘病毒、黏液瘤病毒等的活载体疫苗^[6-10]。鉴于野兔的分布和习性,普通的疫苗虽然可以适用于家兔,但是却无法适用于野兔^[17]。因此,开发一种适用范围更广泛,尤其能方便应用于穴兔的野生种群保护的疫苗就显得非常必要。基于此,本研究中我们首次将 RHDV 的结构蛋白基因 *vp60* 通过同源重组插入兔粘液瘤病毒 MYXV 的非必需基因 TK 中,经过几轮重组病毒筛选和纯化,成功制备了插入 VP60 和带有筛选标记 GFP 的重组型病毒 rMV-VP60-GFP,并且初步动物实验表明,该重组型病毒能诱发家兔产生抵抗 MYXV 的特异性抗体。由于缺乏必要的 RHDV 病毒,我们未能检测该重组病毒是否能产生抵抗 RHDV 的特异性抗体,但是该重组型病毒的成功制备,为后续

开发可同时保护家兔和欧洲野兔-穴兔受兔瘟和粘液瘤病侵袭的二价疫苗成为可能。此外,动物攻毒保护试验显示,兔粘液瘤病症状可以持续十几天左右,可方便跳蚤等吸血昆虫叮咬并携带重组病毒,并在穴兔群中传播,起到有效保护穴兔原产地野生穴兔群免受兔粘液瘤病及兔出血症病的侵袭,起到缓解穴兔原产地被列为易危或近危物种的不利局面^[18-19]。

在重组痘病毒的构建和筛选过程中,传统上通常利用 *lacZ* 基因作为筛选标记。在本研究中,我们也尝试用 *lacZ* 基因作为筛选标记,但同源重组效果不理想,导致 X-gal 显色不明显,无法与野生型病毒形成的空斑区分开,进而难以成功筛选到重组型病毒^[20]。但当我们采用 *gfp* 基因作为筛选标记时,则能顺利获得正确的重组型病毒。其原因在于 *lacZ* 基因约为 3 500 bp,但 *gfp* 基因大小为 714 bp 远小于 *lacZ* 基因,因此其同源重组效果较好。同时,TK 基因作为同源重组构建重组病毒载体的靶基因,该基因的缺失被证明不影响病毒的增殖,但会降低重组病毒毒力,较易获得减毒株,故常应用于疫苗研发^[21-24]。不过,本研究的重要目的之一是应用于穴兔野生种群在原产地的生态保护,因此,为了避免连续传代导致病毒毒力降低,影响兔粘液瘤病的症状,进而不利于跳蚤等叮咬和传播,必须选取合适病毒毒力的毒株用于重组病毒筛选。此外,由于痘病毒在宿主细胞的细胞质内复制和装配,不插入到宿主细胞的基因组中,因此,在以痘病毒为亲本病毒时,穿梭载体中相应基因只有在痘病毒启动子作用下才能成功表达。本研究中,我们通过痘病毒启动子的优化,发现 p7.5 启动子为最适启动子(实验数据未发表)。鉴于此,本研究中的 GFP 筛选标记以及 p7.5 启动子是 rMV-VP60-GFP 重组病毒得以成功制备的关键,这也为其他重组痘病毒的构建提供了很好的借鉴。

总之,本重组病毒的成功制备,为后续开发可同时保护家兔和欧洲野兔-穴兔受兔瘟和粘液瘤病侵袭的二价疫苗奠定了基础,具有重要的理论意义和应用价值。

REFERENCES

- [1] Bertagnoli S, Marchandeu S. Myxomatosis. *Rev Sci Tech*, 2015, 34(2): 549–556, 539–547.
- [2] Rosell JM, de la Fuente LF, Parra F, et al. Myxomatosis and rabbit haemorrhagic disease: a 30-year study of the occurrence on commercial farms in Spain. *Animals (Basel)*, 2019, 9(10): 780.
- [3] Abrantes J, van der Loo W, Le Pendu J, et al. Rabbit haemorrhagic disease (RHD) and rabbit haemorrhagic disease virus (RHDV): a review. *Vet Res*, 2012, 43(1): 12.
- [4] Trzeciak-Ryczek A, Tokarz-Deptuła B, Deptuła W. The importance of liver lesions and changes to biochemical and coagulation factors in the pathogenesis of RHD. *Acta Biochim Pol*, 2015, 62(2): 169–171.
- [5] Qi RB, Zhu J, Miao QH, et al. Bioinformatics analysis of capsid protein of different subtypes rabbit hemorrhagic disease virus. *BMC Vet Res*, 2019, 15(1): 423.
- [6] Qi RB, Miao QH, Zhu J, et al. Construction and immunogenicity of novel bivalent virus-like particles bearing VP60 genes of classic RHDV(GI.1) and RHDV2(GI.2). *Vet Microbiol*, 2020, 240: 108529.
- [7] Jiang Q, Yu Z, Liu JS, et al. Recombinant canine adenovirus type 2 expressing rabbit hemorrhagic disease virus VP60 protein provided protection against RHD in rabbits. *Vet Microbiol*, 2018, 213: 15–20.
- [8] Wang L, Xia T, Guo TT, et al. Recombinant *Lactobacillus casei* expressing capsid protein VP60 can serve as vaccine against rabbit hemorrhagic disease virus in rabbits. *Vaccines*, 2019, 7(4): 172.
- [9] Fan ZY, Wang F, Hu B, et al. The research on efficiency of rabbit haemorrhagic disease virus baculovirus vector inactivated vaccine. *Chin J Vet Med*, 2019, 55(7): 30–33 (in Chinese).
- 范志宇, 王芳, 胡波, 等. 兔出血症病毒杆状病毒载体灭活疫苗临床免疫效力试验. *中国兽医杂志*, 2019, 55(7): 30–33.
- [10] Yan WW, Cui ZZ, Wang YK. Expression of capsid gene of Chinese isolate of rabbit hemorrhagic disease virus in *Pichia pastoris*. *Chin J Biotech*, 2005, 21(1): 135–138 (in Chinese).
- 严维巍, 崔治中, 王永坤. 兔出血症病毒衣壳蛋白基因在毕赤酵母中的表达. *生物工程学报*, 2005, 21(1): 135–138.
- [11] Zhou XY, Liu Y, Rao LQ, et al. Construction of vaccinia virus vector for vaccine screening. *Chin J Virol*, 2004, 20(4): 315–321 (in Chinese).
- 周小云, 刘颖, 饶力群, 等. 适用于疫苗株筛选的痘苗病毒载体的构建. *病毒学报*, 2004, 20(4): 315–321.
- [12] Merchlinsky M, Moss B. Introduction of foreign DNA into the vaccinia virus genome by *in vitro* ligation: recombination-independent selectable cloning vector. *Virology*, 1992, 190(1): 522–526.
- [13] Coupar BEH, Oke PG, Andrew ME. Insertion sites for recombinant Vacciniavirus construction: effects on expression of a foreign protein. *J Gen Virol*, 2000, 81(2): 431–439.
- [14] Guo W, Qu JJ, Xiang WH, et al. Construction of a universal goat pox virus deleted TK transfer vector. *J Jilin Agric Univ*, 2008, 30(5): 739–742 (in Chinese).
- 郭巍, 曲娟娟, 相文华, 等. 通用山羊痘病毒 TK 基因缺失转移载体的构建. *吉林农业大学学报*, 2008, 30(5): 739–742.
- [15] Irwin CR, Evans DH. Modulation of the Myxoma virus plaque phenotype by vaccinia virus protein F11. *J Virol*, 2012, 86(13): 7167–7179.
- [16] El-Jake JK, Moussa IM, Omran MS, et al. A novel bivalent Pasteurellosis-RHD vaccine candidate adjuvanted with Montanide ISA70 protects rabbits from lethal challenge. *Saudi J Biol Sci*, 2020, 27(3): 996–1001.
- [17] Torres JM, Ramírez MA, Morales M, et al. Safety evaluation of a recombinant myxoma-RHDV virus

- inducing horizontal transmissible protection against myxomatosis and rabbit haemorrhagic disease. *Vaccine*, 2000, 19(2/3): 174–182.
- [18] Bertagnoli S, Gelfi J, Le Gall G, et al. Protection against myxomatosis and rabbit viral hemorrhagic disease with recombinant myxoma viruses expressing rabbit hemorrhagic disease virus capsid protein. *J Virol*, 1996, 70(8): 5061–5066.
- [19] Laurent S, Vautherot JF, Madelaine MF, et al. Recombinant rabbit hemorrhagic disease virus capsid protein expressed in baculovirus self-assembles into virus like particles and induces protection. *J Virol*, 1994, 68(10): 6794–6798.
- [20] Yao XD, Evans DH. Effects of DNA structure and homology length on vaccinia virus recombination. *J Virol*, 2001, 75(15): 6923–6932.
- [21] Zhang D, Xu FW, Xiong ZC, et al. Establishment of an efficient recombinant vaccinia virus *Tiantan* strain vector system. *Chin J Virol*, 2019, 35(2): 175–182 (in Chinese).
- 张迪, 许丰雯, 熊梓辰, 等. 高效重组痘苗病毒天坛株载体系统的建立. *病毒学报*, 2019, 35(2): 175–182.
- [22] Irwin CR, Hitt MM, Evans DH. Targeting nucleotide biosynthesis: a strategy for improving the oncolytic potential of DNA viruses. *Front Oncol*, 2017, 7: 229.
- [23] Buller RML, Smith GL, Cremer K, et al. Decreased virulence of recombinant vaccinia virus expression vectors is associated with a thymidine kinase-negative phenotype. *Nature*, 1985, 317(6040): 813–815.
- [24] Kochneva GV, Urmanov IH, Ryabchikova EI, et al. Fine mechanisms of ectromelia virus thymidine kinase-negative mutants avirulence. *Virus Res*, 1994, 34(1): 49–61.

(本文责编 陈宏宇)