

研究报告



表达 PEDV S 和 PoRV VP7 蛋白的重组伪狂犬毒株构建

毛汐语^{Δ1} 周雪珂^{Δ3} 殷鑫欢¹ 邓益超¹ 龚双燕¹ 李小璟¹ 李幽幽¹ 徐志文¹
朱玲^{*1,2}

1 四川农业大学动物医学院 四川 成都 611130

2 动物疫病与人类健康四川省重点实验室 四川 成都 611130

3 四川大学生命科学学院 四川 成都 610064

摘要:【背景】猪流行性腹泻、猪轮状病毒病与猪伪狂犬病是严重危害全球养猪业的 3 种重要传染病,混合感染往往导致猪场更严重的损失。【目的】利用同源重组技术构建共表达猪流行性腹泻病毒(Porcine epidemic diarrhea virus, PEDV) S 蛋白和猪轮状病毒(Rotavirus, PoRV) VP7 蛋白的猪伪狂犬三联基因工程疫苗株,并研究其部分生物学特性。【方法】通过序列比对、蛋白结构分析筛选 *s* 基因的 475–804 aa 和 *vp7* 基因的 17–339 aa 作为毒株构建的目的片段,依次构建了 pMD-S、pMD-VP₇、pMD-VP₇.S 克隆载体和 pEGFP-VP₇.S 转移载体。将质粒 pEGFP-VP₇.S 和 PRV XJ 亲本株同源重组,空斑纯化得到重组毒株 PRV (CM),对其稳定性和增殖特性进行研究。【结果】构建了共表达 S 蛋白和 VP7 蛋白的伪狂犬基因工程病毒,连续传代 20 次,均能检测到 *vp7* 和 *s* 基因,而 *gE* 基因阴性;Western blotting 证实 2 种外源基因在重组病毒中均能实现良好的表达;测定亲本毒株和重组毒株的 TCID₅₀ 分别是 10^{-7.59}/0.1 mL 和 10^{-7.25}/0.1 mL。【结论】获得了伪狂犬基因工程重组弱毒株 PRV (CM),外源基因稳定存在,毒力基因稳定缺失,增殖特性差异不大,为 PRV、PEDV 和 PoRV 基因工程三联苗研究奠定了基础。

关键词: 猪伪狂犬病毒,猪流行性腹泻病毒,猪轮状病毒,同源重组,毒株构建

Foundation items: National Science and Technology Program in Rural Areas During the 12th Five-Year Plan Period of China (2015BAD12B04-2.3); Science and Technology Program of Sichuan Province (2017NZ0038, 2015NZ0072); National Key Research Program During the 13th Five-Year Plan Period of China (2018YFD0500802); Program of Sichuan Veterinary Medicine and Drug Innovation Group of China Agricultural Research System (CARS-SVDIP)

ΔThese authors equally contributed to this work

*Corresponding author: E-mail: abtcz172@126.com

Received: 07-12-2018; Accepted: 03-09-2019; Published online: 27-09-2019

基金项目:“十二五”农村领域国家科技计划(2015BAD12B04-2.3);四川省科技支撑计划(2017NZ0038, 2015NZ0072);“十三五”国家重点研发计划(2018YFD0500802);国家农业产业技术体系四川兽药创新团队专项(CARS-SVDIP)

Δ对本文贡献相同

*通信作者: E-mail: abtcz172@126.com

收稿日期: 2018-12-07; 接受日期: 2019-09-03; 网络首发日期: 2019-09-27

Construction of recombinant pseudorabies virus strain expressing PEDV S and PoRV VP7 protein

MAO Xi-Yu^{Δ1} ZHOU Xue-Ke^{Δ3} YIN Xin-Huan¹ DENG Yi-Chao¹ GONG Shuang-Yan¹
LI Xiao-Jing¹ LI You-You¹ XU Zhi-Wen¹ ZHU Ling^{*1,2}

1 College of Veterinary Medicine, Sichuan Agricultural University, Chengdu, Sichuan 611130, China

2 Sichuan Key Laboratory of Animal Disease and Human Health, Chengdu, Sichuan 611130, China

3 College of Life Sciences, Sichuan University, Chengdu, Sichuan 610064, China

Abstract: [Background] Porcine epidemic diarrhea, porcine rotavirus disease and pseudorabies are three important infectious diseases that seriously endanger the global pig industry. Mixed infections often lead to more serious losses on the farm. [Objective] A homologous recombination technique was used to construct a triple genetic engineering attenuated strain of pig pseudorabies co-expressing *s* gene and *vp7* gene. [Methods] Through the sequence alignment and protein structure analysis of PEDV *s* and PoRV *vp7* genes, 475–804 aa of *s* gene and 17–339 aa of *vp7* gene were selected as candidate regions for the construction of strains. Three cloning vectors of pMD-S, pMD-VP₇ and pMD-VP₇.S and one transfer vector of pEGFP-VP₇.S were constructed, respectively. Plaque purification was employed to obtain recombinant strain. [Results] A genetically engineered pseudorabies strain co-expressing S protein and VP7 protein was constructed. The strain was serially passaged for 20 generations, and both *vp7* and *s* genes were detected without *gE* gene. Western blotting experiments confirmed foreign gene expression by recombinant virus. The TCID₅₀ of the parent strain and the recombinant strain was determined by the Reed-Muench method to be 10^{-7.59}/0.1 mL and 10^{-7.25}/0.1 mL, respectively. [Conclusion] Recombinant pseudorabies strain PRV (CM) was obtained, which stably carried the two foreign genes, but with the deletion of virulence genes. The recombinant strain owned a similar proliferation characteristic with the parent strain. The study laid the foundation for further study on development of PRV, PEDV and PoRV triple genetic engineering vaccine.

Keywords: Pseudorabies virus, Porcine epidemic diarrhea virus, Porcine rotavirus, Homologous recombination, Strain construction

猪流行性腹泻是由猪流行性腹泻病毒(Porcine epidemic diarrhea virus, PEDV)引起的一种急性、高度接触性的肠道传染病, 伴随有严重的腹泻、呕吐和脱水症状^[1], 初生仔猪是主要的感染对象, 常会引起 100% 的发病率和死亡率^[2]。PEDV 是单股正链 RNA 病毒, 完整的基因组大小约 28 kb, 含有 7 个开放阅读框^[3], 其中 *s* 基因编码病毒的纤突糖蛋白, 在病毒粒子与细胞表面受体结合以及感染宿主机体后介导中和抗体的过程中发挥着重要功能^[4-5]。轮状病毒(Rotavirus, RV)是重要的人兽共患病原之一, 2–6 周龄猪只最易感猪轮状病毒(Porcine rotavirus, PoRV), 出现急性肠胃炎症状^[6]。PoRV 全基因组大小约为 18 kb, 含有 11 个双链 RNA 片段, 编码的 VP7 蛋白是构成病毒外壳最丰

富的蛋白和主要的中和抗原蛋白^[7]。猪伪狂犬病毒(Pseudorabies virus, PRV)属于疱疹病毒科、水痘疱疹病毒属, 基因组大小约 150 kb^[8]。新生仔猪感染 PRV 表现为神经症状和高致死性, 保育和育肥猪以呼吸道症状为主, 怀孕母猪会出现流产、产木乃伊胎^[9-10]。

临床上 PEDV、PoRV 与 PRV 的混合感染往往使猪场面临更加严重的威胁, 疫苗免疫是预防猪病的理想解决方式, 但多次接种可能超出猪只免疫耐受范围, 特别是哺乳仔猪和配种母猪, 导致免疫应答迟缓甚至免疫抑制, 一针多免是理想的解决途径。以 PRV 作为重组活疫苗载体的策略已经应用于多种动物疫苗的研制, 如猪瘟伪狂犬二价基因重组疫苗^[11], 猪细小病毒和伪狂犬病毒样颗粒疫

苗^[12], 猪瘟细小、伪狂犬三价基因重组疫苗^[13], 以及乙脑细小伪狂犬三价基因工程疫苗^[14]等, 为改善现有疫苗或者开发新疫苗提供了新的思路。本研究将 PEDV *s*、PoRV *vp7* 基因优势抗原表位克隆到 pEGFP-gI28k 转移载体中, 构建伪狂犬转移质粒 pEGFP-VP₇.S, 与 PRV XJ 株共转染 293T 细胞, 成功获得共表达 S 和 VP7 蛋白的重组伪狂犬病毒 *gE/gI28K* 缺失株, 为后续伪狂犬三联基因工程疫苗的研发奠定基础。

1 材料与方法

1.1 质粒、菌株和细胞

含有伪狂犬 *gI* 和 28K 基因序列同源臂的 pEGFP-gI28k 真核表达质粒由四川农业大学动物生物技术中心构建; PRV XJ、PEDV EM-P、PoRV SC-R 株均由四川农业大学动物生物技术中心分离鉴定并保存; Vero、BHK-21、PK-15、293-T、MA-104 细胞由四川农业大学动物生物技术中心购买并保存。

1.2 主要试剂和仪器

反转录酶试剂盒(PrimeScript™ RT Reagent Kit)、限制性内切酶(*Bam*H I、*Xho* I、*Sal* I、*Kpn* I)、pMD19-T (Simple) Vector、2×*Taq* PCR Master Mix、2×GC Buffer、*Taq*has、dNTPs、Solution I、DL2000 和 DL10000 DNA marker 均购自宝日医生物技术(北京)有限公司; 胎牛血清、DMEM 细胞培养液购自 Gibco 公司; 琼脂糖购自 Sigma 公司; 琼脂糖凝胶纯化回收试剂盒购自天根生化科技(北京)有限公司; Lipofectamine™ 3000 购自 Invitrogen 公司; 辣

根过氧化物酶(HRP)标记羊抗鼠 IgG (H+L) 酶标二抗、质粒小量抽提试剂盒(GeneJET Plasmid Miniprep Kit)购自 Thermo Fisher Scientific 公司; 去内毒素质粒小量抽提试剂盒购自 Omega 公司; TGX Stain-Free™ FastCast™ Acrylamide Kit 购自 Bio-Rad 公司; PEDV 阳性血清(鼠抗)、PoRV 阳性血清(鼠抗)由四川农业大学动物生物技术中心制备并保存。

PCR 仪、Gel Doc™EZ imager 凝胶成像系统, Bio-Rad 公司; TS100 型倒置显微镜, Nikon 公司; CO₂ 细胞培养箱, Thermo Forma 公司; 恒压恒流电泳仪, 北京六一生物科技有限公司。

1.3 含 PEDV *s* 和 PoRV *vp7* 基因的 PRV 转移载体的构建

从 NCBI 上下载多条 PEDV *s* 和 PoRV *vp7* 全基因片段, 利用 MEGA 5.0 和 DNASTar 的 Protean 软件分别对其同源性、氨基酸疏水性、抗原表位等进行预测和分析, 利用 Primer 5.0 软件设计特异性扩增引物, 上、下游引物分别引入相应的柔性肽序列 (5'-ggcggcggcggcggcggcgtcc-3')、酶切位点和保护性碱基, 具体参照表 1。用表 1 中引物分别对 PEDV EM-P 株和 PoRV SC-R 株进行扩增, 得到大小为 1 028 bp 和 1 017 bp 的两条基因片段, 分别连接至 pMD19-T 载体, 用限制性内切酶 *Kpn* I、*Bam*H I 分别对 pMD-VP₇ 和 pMD-S 质粒进行酶切, 回收目的片段连接, 构建 pMD-VP₇.S 克隆质粒。再将 pMD-VP₇.S 质粒和 pEGFP-gI28K 质粒进行 *Xho* I、*Sal* I 酶切连接, 成功构建 PRV 转移载体 pEGFP-VP₇.S。

表 1 引物名称、序列及酶切位点

Table 1 Names, sequences of primers and restriction sites

| 目的基因 | 引物名称 | 引物序列 | 退火温度 | 酶切位点 | 扩增长度 |
|-----------------|-------------|--|----------------------------|---|-----------------|
| Gene | Primer name | Primers sequence (5'→3') | Annealing temperature (°C) | Restriction site | PCR length (bp) |
| PEDV <i>s</i> | S-a | GCGGTACCggcggcggcggcggcggcgtcc TTTGACCTTGACGATGGTTTTTAC | 60.6 | <i>Kpn</i> I | 1 028 |
| | S-b | GCGGATCCGTCGACATCAACACT AACAGGCGTGTGT | | <i>Bam</i> H I, <i>Sal</i> I | |
| PoRV <i>vp7</i> | VP7-a | GCCTCGAGAAggcggcggcggcggcggc tccATGTATGGTATTGAATATAC | 60.2 | <i>Xho</i> I | 1 017 |
| | VP7-b | GCGGATCCAAGCTTGGTACCATA AAAGGCAGCAGAATC | | <i>Bam</i> H I, <i>Hind</i> III, <i>Kpn</i> I | |

1.4 重组病毒的构建

参照 LipfectamineTM 3000 转染试剂盒说明书, 用 Omega 公司的去内毒素质粒小量抽提试剂盒提取 pEGFP-VP₇S 质粒, 转染至生长状态良好、细胞密度为 90% 的 293T 细胞中, 24 h 后加入 PRV XJ 株病毒液(TCID₅₀=10^{-7.5}/0.1 mL), 置 37 °C、5% 的 CO₂ 条件下培养 1–2 d 后观察细胞病变和荧光, 待细胞出现 80% 的病变时, 置 -20 °C 冰箱反复冻融 3 次, 收集病毒液。

1.5 重组病毒的筛选

将收集的病毒液用 DMEM 维持液梯度稀释, 接种至生长于 96 孔板中的单层 BHK-21 细胞, 每孔接种 100 μL, 置于 37 °C、5% 的 CO₂ 中培养 2 d, 显微镜下观察并收集有细胞病变并发出绿色荧光的细胞孔中的病毒液, 反复冻融 3 次, 相同方式将收集病毒液继续接种到生长至 6 孔板的 BHK-21 细胞中, 吸附 1 h 后, 用无血清 DMEM 洗涤细胞, 在表面覆盖含有 1% 低熔点琼脂糖的 DMEM 培养液, 培养 48 h 后挑选含有绿色荧光的病毒噬斑, 反复挑斑纯化重复操作, 并结合 PEDV *s*、PoRV *vp₇* 和 PRV *gE* 基因片段 PCR 筛选, 得到纯化的重组病毒。

1.6 重组病毒的 PCR 鉴定

抽提纯化的重组病毒和亲代毒株 PRV XJ、PEDV、PoRV 的基因组, 针对 PRV *gE*、PEDV *s*、PoRV *vp₇* 基因进行 PCR 扩增, 采用表 1 中的引物, PCR 反应体系(50 μL): 上游引物 S-a/VP7-a (20 μmol/L) 2 μL, 下游引物 S-b/VP7-b (20 μmol/L) 2 μL, 模板(291 ng/μL 和 173 ng/μL) 3 μL, ddH₂O 18 μL, 2×Taq PCR Master Mix 25 μL。PCR 反应条件: 95 °C 5 min; 95 °C 30 s, 60.2 °C (*vp₇* 基因)/60.6 °C (*s* 基因) 30 s, 72 °C 1 min, 35 个循环; 72 °C 7 min。*gE* 基因上游引物: 5'-ATCTGGACG TTCCTGCCC-3'; *gE* 基因下游引物: 5'-GTAGATGC AGGGCTCGTACA-3', 扩增长度为 534 bp。PCR 反应体系(50 μL): 2×GC buffer 25 μL, dNTP

mixture 5 μL, 上、下游引物(20 μmol/L)各 2.5 μL, ddH₂O 9.5 μL, Taq HS 0.5 μL, 模板(273 ng/μL) 5 μL。PCR 反应条件: 95 °C 5 min; 95 °C 30 s, 60 °C 30 s, 72 °C 30 s, 35 个循环; 72 °C 7 min。引物由生工生物工程(上海)股份有限公司合成。

1.7 重组病毒的 Western blotting 鉴定

将重组病毒第 5 代次接种于 BHK-21 细胞中, 待出现细胞病变并且细胞将要脱落时, 弃去多余的培养基, 收集剩余细胞和少量细胞上清, 反复冻融 5 次, 沸水煮 10 min, 6 000 r/min 离心 5 min 取上清, 加入适量的 5×SDS-PAGE loading buffer 混匀待用。12% 的 SDS-PAGE 电泳后将胶电转至硝酸纤维素膜, 设置等量的亲本 PRV-XJ 株接种 BHK-21 细胞作为阴性对照, 用鼠抗的 PEDV 和 PoRV 多克隆抗体分别作为一抗(1:100), HRP 标记的羊抗鼠 IgG (1:1 000)作为二抗, Western blotting 检测重组病毒中外源基因的表达情况。

1.8 重组病毒的稳定性鉴定

制备单层的 BHK-21 细胞, 将重组病毒在 BHK-21 细胞上连续传代 20 代, 每间隔 5 代取样, 收集第 5、10、15、20 代重组病毒液, 抽提重组病毒的 DNA 制备模板, 用普通 PCR 方法检测 *s* 基因和 *vp₇* 基因以及 PRV *gE* 基因。

1.9 病毒 TCID₅₀ 的测定

将 BHK-21 细胞传代 96 孔细胞培养板, 待其长成致密单层, 以 10⁻¹–10⁻¹⁰ 梯度稀释 PRV (CM) 株和 PRV XJ 株病毒液, 每一稀释度做 8 孔重复, 每孔加入稀释病毒液 100 μL, 同时加入 100 μL 细胞维持液于未接毒细胞培养孔中设置为阴性对照。随后将 96 孔培养板置于 37 °C、5% CO₂ 培养箱中培养, 每日在显微镜下观察并记录出现细胞病变的细胞孔数, 连续观察 5 d。按照 Reed-Muench 法计算重组病毒株和 PRV XJ 株的 TCID₅₀。

2 结果与分析

2.1 重组片段的扩增及蛋白分析

筛选出 PEDV *s* 部分基因(475–804 aa)和 PoRV

vp7 部分基因(17-339 aa)作为目的基因候选区域,应用 DNASTar Protean 软件对 S 蛋白和 VP7 蛋白二级结构进行预测,由 Gamier-Robson 分析方法可知, S 蛋白具有 25 个大小不同的 β 折叠、20 个转角和 15 个不规则卷曲; VP7 蛋白具有 17 个 α 螺旋、26 个 β 折叠、20 个转角和 5 个不规则卷曲; Chou-Fasman 分析方法预测发现 S 蛋白有 2 个 α 螺旋、17 个 β 折叠和 34 个转角; VP7 蛋白具有 6 个 α 螺旋、12 个大小不等的 β 折叠和 27 个大小比较均匀的转角。对 S 蛋白和 VP7 蛋白的 B 细胞抗原表位 4 个主要参数预测结果见表 2,综合分析可见 S 蛋白和 VP7 蛋白均具有良好的抗原参数。

2.2 伪狂犬转移质粒的构建

运用表 1 引物扩增得到 *s* 基因和 *vp7* 基因片段(图 1A),用限制性内切酶 *Kpn* I、*Bam*H I 对 pMD-VP₇.S 质粒进行双酶切鉴定,得到与预期大小一致的约 1 028 bp 和 3 709 bp 的两条片段(图 1B)。将 pEGFP-VP₇.S 质粒 DNA 用 *Xho* I、*Sal* I 进行双

酶切鉴定,获得大小约 2 023 bp 和 6 840 bp 的两条片段,与预期大小一致(图 1C),序列测定结果显示 VP₇.S 融合基因片段成功连入 pEGFP-gI28k 伪狂犬转移载体,无碱基突变和缺失,相应的酶切位点和 Linker 序列引入位置正确,伪狂犬转移质粒 pEGFP-VP₇.S 构建成功。

表 2 B 细胞抗原表位主要参数预测结果

Table 2 Prediction of major parameters of B cell epitopes

| 预测参数 Prediction parameters | S 蛋白(aa) S protein | VP7 蛋白 VP7 protein (aa) |
|---|--|----------------------------------|
| 亲水性 Hydrophilicity | 2-34, 87-116, 255-279 | 2-12, 53-74, 96-111, 205-301 |
| 潜在 B 细胞 抗原表位 Potential B cell epitopes | 2-18, 25-43, 62-82, 96-105, 138-172, 239-279 | 2-12, 51-71, 95-112, 188-303 |
| 表面可及性 Surface probability | 27-31, 258-274 | 2-9, 96-110, 204-223, 244-300 |
| 柔韧性 Flexible regions | 5-36, 63-70, 139-171, 250-278, 289-317 | 58-68, 203-214, 242-295 |

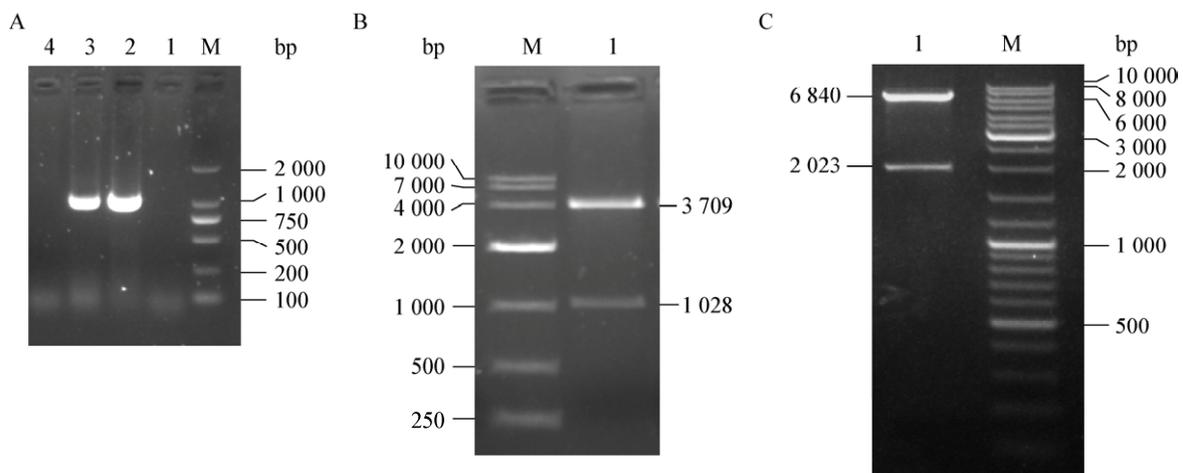


图 1 目的片段的扩增和酶切鉴定

Figure 1 Amplification and restriction enzyme digestion of the target fragment

注: A: M: DL2000 DNA marker; 1: PEDV *s* 阴性对照; 2: PEDV *s* 片段; 3: PoRV *vp7* 片段; 4: PoRV *vp7* 阴性对照. B: M: DL10000 DNA marker; 1: pMD-VP₇.S 的 *Kpn* I、*Bam*H I 双酶切. C: M: DL10000 DNA marker; 1: pEGFP-VP₇.S 的 *Xho* I、*Sal* I 双酶切.

Note: A: M: DL2000 DNA marker; 1: PEDV negative control; 2: The amplified fragment of PEDV *s*; 3: The amplified fragment of PoRV *vp7*; 4: PoRV negative control. B: M: DL10000 DNA marker; 1: *Kpn* I and *Bam*H I enzyme digestion on pMD-VP₇.S. C: pEGFP-VP₇.S identification with *Xho* I and *Sal* I enzyme digestion. M: DL10000 DNA marker; 1: Fragments released by digestion of pEGFP-VP₇.S with *Xho* I and *Sal* I enzyme.

2.3 重组病毒的构建和筛选

参照 Lipfectamine™ 3000 转染试剂盒说明书和图 2 的构建模式图, 将 pEGFP-VP_{7,S} 质粒 DNA 转染 293T 细胞, 24 h 后在倒置显微镜下可以看到细胞发出绿色荧光(图 3A), 说明带有 EGFP 荧光蛋白的 pEGFP-VP_{7,S} 质粒成功转入了

293T 细胞。在转染 24 h 后接种 PRV XJ 株病毒液(TCID₅₀=10^{-7.5}/0.1 mL), 收集混合病毒液继续培养, 在倒置荧光显微镜下观察具有细胞病变并发出绿色荧光的细胞孔(图 3B), 收集扩大培养(图 3C), 经噬斑挑选反复纯化(图 3D), 直到纯化完全。

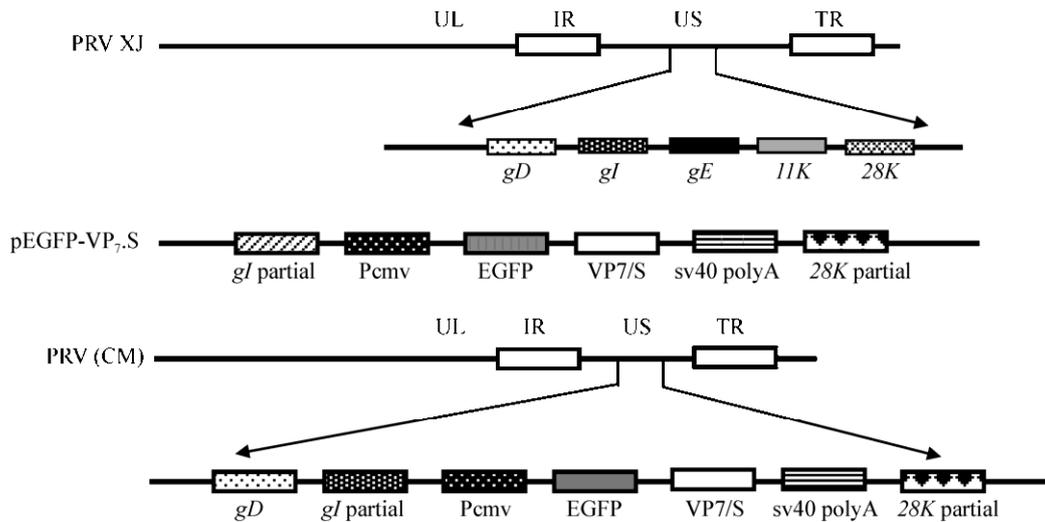


图 2 重组病毒的构建模式图

Figure 2 The construction patterns of recombinant viruses

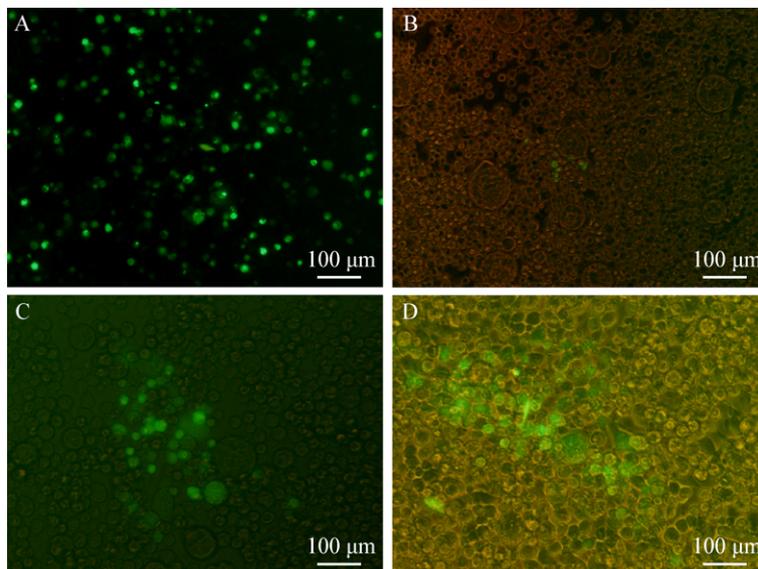


图 3 重组病毒的筛选(200×)

Figure 3 Screening of recombinant viruses (200×)

注: A: 293-T 细胞转染 pEGFP-VP_{7,S} 质粒 24 h; B: 首次观察到的重组病毒; C: 扩大培养后的重组病毒; D: 噬斑纯化。

Note: A: 293-T cells transfected with pEGFP-VP_{7,S} plasmid 24 h later; B: Recombinant virus observed for the first time; C: Expanded culture of recombinant virus; D: Plaque purification.

2.4 Western blotting

为验证重组病毒表达外源蛋白情况,使用鼠抗 PEDV 高免血清和鼠抗 PoRV 高免血清分别作为一抗对第 5 代次重组毒株进行 Western blotting, 在大约 101 kD 位置, 都出现与预期的分子量相当的特异性阳性条带(图 4), 说明重组病毒株能正确表达 S 蛋白和 VP7 蛋白。

2.5 重组病毒稳定性检测

将纯化的重组 PRV (CM)病毒在 BHK-21 细胞上连续传代 20 代, 分别对 5、10、15、20 代病毒液抽提 DNA 制备模板检测 *s*、*vp7* 和 PRV *gE* 基因, 均能扩增出大小约为 1 017 bp 的 *vp7* 基因片段

(图 5A)和大小约为 1 028 bp 的 *s* 基因片段(图 5B), 表明 *s* 基因和 *vp7* 基因已经稳定插入到伪狂犬病毒基因组中, 没有发生外源基因的丢失, *gE* 基因扩增结果相比较亲本株未能检测到(图 5C), 说明 *gE* 基因已经稳定缺失, 重组病毒纯化完全, 无亲本株的污染。

2.6 毒株 TCID₅₀ 的测定

根据细胞病变记录结果(表 3), 按照 Reed-Muench 法计算出重组病毒 PRV (CM)株的 TCID₅₀ 为 $10^{-7.25}/0.1$ mL; PRV XJ 株的 TCID₅₀ 为 $10^{-7.59}/0.1$ mL, 证明重组毒株与亲本毒株在侵染细胞能力上没有太大差异。

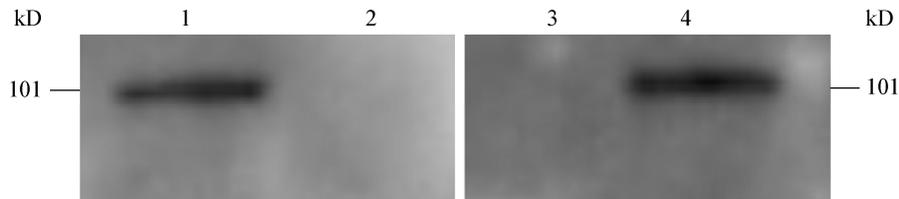


图 4 Western blotting 分析重组 PRV (CM) S-VP7 蛋白的表达

Figure 4 Western blotting analysis of expression of S-VP7 protein by PRV (CM)

注: 1: PRV (CM)感染细胞—抗 PEDV 阳性血清 Western blotting; 2: PRV XJ 株感染细胞; 3: PRV XJ 株感染细胞; 4: PRV (CM)感染细胞—抗 PoRV 阳性血清 Western blotting.

Note: 1: Western blotting is probed with PEDV sera; 2: PRV XJ strain infected cells; 3: PRV XJ strain infected cells; 4: Western blotting is probed with PoRV sera.

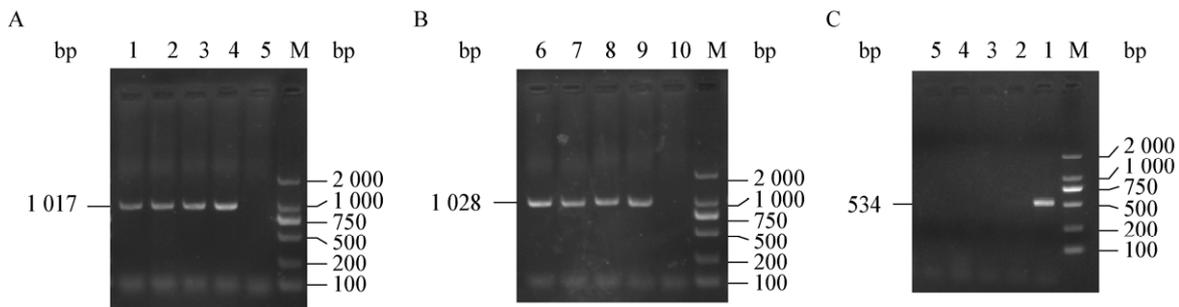


图 5 重组病毒的稳定性检测

Figure 5 Stability test of recombinant virus

注: 外源基因的 PCR 鉴定. A: PEDV *s* 片段检测(1、2、3、4: 重组病毒 F₅、F₁₀、F₁₅、F₂₀, 5: PRV XJ 株); B: PoRV *vp7* 片段检测(6、7、8、9: 重组病毒 F₅、F₁₀、F₁₅、F₂₀; 10: PRV XJ 株); C: *gE* 基因检测(1、2、3、4 代表重组病毒; 5: PRV XJ 株); M: DL2000 DNA marker.

Note: PCR identification of inserted genes. A: Detection of PEDV *s* gene; 1, 2, 3, 4: recombinant viruses F₅, F₁₀, F₁₅ and F₂₀; 5: PRV XJ. B: Detection of PoRV *vp7* gene; 6, 7, 8, 9: PoRV *vp7* recombinant viruses F₅, F₁₀, F₁₅ and F₂₀; 10: PRV XJ. C: Detection of *gE* gene; 1, 2, 3, 4 Recombinant virus; 5: PRV-XJ. M: DL2000 DNA marker.

表 3 PRV (CM)和 PRV XJ 株病毒滴定结果

Table 3 Titration results of PRV (CM) and PRV XJ

| Dilution | | Dead | | Alive | | Total dead | | Total alive | | Mortality ratio | | Mortality (%) | |
|------------------|------------------|------|----|-------|----|------------|----|-------------|----|-----------------|----|---------------|------|
| CM | XJ | CM | XJ | CM | XJ | CM | XJ | CM | XJ | CM | XJ | CM | XJ |
| 10 ⁻¹ | 10 ⁻¹ | 8 | 8 | 0 | 0 | 54 | 57 | 0 | 0 | 54 | 57 | 100 | 100 |
| 10 ⁻² | 10 ⁻² | 8 | 8 | 0 | 0 | 46 | 49 | 0 | 0 | 46 | 49 | 100 | 100 |
| 10 ⁻³ | 10 ⁻³ | 8 | 8 | 0 | 0 | 38 | 41 | 0 | 0 | 38 | 41 | 100 | 100 |
| 10 ⁻⁴ | 10 ⁻⁴ | 8 | 8 | 0 | 0 | 30 | 33 | 0 | 0 | 30 | 33 | 100 | 100 |
| 10 ⁻⁵ | 10 ⁻⁵ | 8 | 8 | 0 | 0 | 22 | 25 | 0 | 0 | 22 | 25 | 100 | 100 |
| 10 ⁻⁶ | 10 ⁻⁶ | 8 | 8 | 0 | 0 | 14 | 17 | 0 | 0 | 14 | 17 | 100 | 100 |
| 10 ⁻⁷ | 10 ⁻⁷ | 5 | 7 | 3 | 1 | 6 | 9 | 3 | 1 | 9 | 10 | 66.7 | 90.0 |
| 10 ⁻⁸ | 10 ⁻⁸ | 1 | 2 | 7 | 6 | 1 | 2 | 10 | 7 | 11 | 9 | 9.0 | 22.2 |

注: CM 代表重组毒株 PRV (CM); XJ 代表亲本株 PRV XJ 株。

Note: CM represents the recombinant strain PRV (CM); XJ represents the parent strain PRV XJ.

3 讨论与结论

PRV 基因组结构清晰, 遗传背景清楚, 庞大的基因组可编码很多非必需基因, 显示了强大的转录机制, 因此可以利用基因同源重组技术对其基因组进行改造, 缺失病毒复制非必需毒力基因制备弱毒疫苗, 或者在缺失主要毒力基因的同时引入外源基因的优势抗原区域, 制备多联基因工程疫苗, 预防可能共同感染或者诱发的其他疾病, 同时避免多次接种超出免疫耐受范围, 特别是哺乳仔猪和配种母猪, 导致免疫应答迟缓甚至免疫抑制。国内 Jiang 等^[15]将猪繁殖与呼吸综合征病毒(Porcine reproductive and respiratory syndrome virus, PRRSV) CH 1a 株 GP5 基因和 LacZ 基因表达盒共同连接到 PRV 转移载体 pBdTK-Uni 中, 构建了含 GP5 基因和报告基因的转移载体 pGP5-LacZ, 将 pGP5-LacZ 与伪狂犬病弱毒疫苗 Bartha-K61 株基因组 DNA 脂质体法共转染到 Vero 细胞, 得到重组病毒株 rPRV-GP5, 相比市售的 PRRSV 灭活疫苗, rPRV-GP5 表现了更高的体液免疫和细胞免疫反应, 表明 PRV 可作为病毒活载体开发 PRV、PRRSV 的二价基因工程病毒疫苗。Chen 等^[12]将含有猪细小病毒(Porcine parvovirus, PPV) VP2 基因的质粒和 PRV SA215 三基因缺失株病毒 DNA 共转染得到重组毒株 PRV SA215/VP2, 免疫仔猪引发了 PRV 和 PPV 特异性体液免疫反应, 对 PRV 病毒株

攻毒可提供完全的保护。国外使用细菌人工染色体 (Bacterial artificial chromosome, BAC) 技术生成共表达猪 H1N1 病毒 HA 基因和 PRV 的疫苗, 滴鼻免疫仔猪可产生高水平抗体, 也能抵抗 H1N1 病毒的挑战^[16]。

PRV 广泛流行于国内外猪场, 导致母猪繁殖障碍及新生仔猪急性死亡, 并伴有呕吐、腹泻、震颤和运动失调症状。PEDV 和 PoRV 是目前主要困扰世界生猪产业的主要猪病毒性腹泻病原, 致病机理相似, 组织嗜性一致^[17], PEDV 会感染各个阶段的猪只, 流行病学调查显示华南地区阳性率可达 43.0%^[18], 华中地区甚至高达 60.2%^[19]。PoRV 感染率低, 但死亡率高, 与 PRV、PEDV 以及细菌的混合感染使猪场面临更加严重的威胁。疫苗免疫在 3 种病毒防控中起到十分重要的作用, 近年来针对 PRV 的商品灭活疫苗, 由于毒株的变异与当前流行毒株不匹配, 免疫途径不能产生满意的黏膜免疫, 导致免疫预防效果不理想^[20], 中国农业科学院哈尔滨兽医研究所研制的猪传染性胃肠炎、猪流行性腹泻与猪轮状病毒(G5 型)三联活疫苗应用较为广泛, 但是针对流行的不同基因型病毒其效果不明显^[21]。目前还没有关于猪流行性腹泻、轮状病毒、伪狂犬病毒联苗的研究, 因此, 利用 PRV 作为多联活疫苗载体并且能成功同时表达 S 蛋白和 VP7 蛋白具有重要意义。

PEDV 的 S 蛋白分为 S1 (1-735 aa) 和 S2 (736-1 383 aa) 结构域, S1 区包含多个病毒主要中和表位和受体结合域, S1 基因中 COE 基因 (499-638 bp) 经乳酸杆菌表达的 COE 蛋白具有很强的免疫原性^[22], 孙东波^[23]鉴定出 S1P1 (248-280 aa)、S1P2 (442-499 aa)、S1P3 (679-742 aa) 3 个高亲和性的 B 细胞抗原表位和 1 个中和表位区 SID (636-789 aa), 并发现 S1P3 表位的抗原性极强。猪轮状病毒 VP6 是抗原性最强的病毒蛋白, 但不能在体外中和试验中抑制病毒的复制, 没有中和活性, VP7 蛋白是构成病毒外壳最丰富的蛋白, 为病毒外膜的重要糖蛋白和主要中和抗原蛋白, 是研究 PoRV 基因工程疫苗的理想区域。

本研究构建了 PRV 转移质粒 pEGFP-VP7.S, 在含有人巨细胞病毒早期启动子(CMV)的 pEGFP-C1 真核表达质粒基础上改造, 保留了质粒的荧光蛋白基因序列(EGFP)和载体本身全部的多克隆位点, 插入 s 基因 475-804 aa 片段, 包括已鉴定的 COE 区域和中和表位 SID 区, 也包括抗原性极强的 S1P3 区域和 vp7 基因 17-339 aa 片段^[24], 无完整的病毒基因组, 从根本上杜绝了毒力返祖情况的发生, 1 117 bp 的 gI 同源臂插入在 pEGFP-C1 AseI 酶切位点中, 28K 同源臂大小为 1 005 bp, 插入在 pEGFP-C1 MluI 酶切位点; 采用新分离的已鉴定与 Bartha 株同源性较低、更加接近当前流行趋势的 PRV XJ 株野毒株^[25]作为亲本株, 与 pEGFP-VP7.S 载体在 MA-104 细胞中进行自然同源重组, 随着病毒的传代, 同源重组成功的重组病毒株会由于 EGFP 的插入发出绿色荧光, 并能明显看到细胞病变, 将此毒株命名为 PRV (CM)。

Western blotting 试验表明重组病毒株能正确表达外源 S 蛋白和 VP7 蛋白, 将 PRV (CM) 传代 20 代能稳定检测到外源 s 基因和 vp7 基因, 但 gE 毒力基因呈现阴性, 而亲本毒株检测不到 s 基因和 vp7 基因, gE 基因阳性存在, 说明重组毒株具有遗传稳定性。刘琥构建的表达猪流感 HA 基因和 NA 基因的重组伪狂犬病毒株与亲本株的 TCID₅₀ 相比

较下降了 2 个数量级^[26]; Klingbeil 将 H1N1 HA 基因重组伪狂犬和亲本株具有相似的增值滴度^[16], 而对 PRV (CM) 的进一步 TCID₅₀ 测定显示, 亲本株 PRV XJ 株 (10^{7.59} TCID₅₀/mL) 和以该毒株作为载体的重组病毒株 PRV (CM) (10^{7.25} TCID₅₀/mL) 在 BHK-21 细胞上增值滴度没有明显差异, 略有降低, 说明外源基因片段 VP7.S 的插入并没有影响病毒的增殖。综合考虑 VP7.S 融合基因的插入不影响重组毒株 PRV (CM) 的基本生物学特性, 并且该重组毒株使用 PRV 本身的宿主机制来复制和表达 VP7 和 S 蛋白, 具有在翻译后更高的正确修饰、折叠的可能性, 可近似模拟自然感染时的真实情况, 诱导产生体液免疫和细胞免疫甚至粘膜免疫, 因此可进一步研究其免疫原性, 为开发 PEDV、PoRV、PRV 三联基因工程疫苗奠定基础。

REFERENCES

- [1] Kocherhans R, Bridgen A, Ackermann M, et al. Completion of the porcine epidemic diarrhoea coronavirus (PEDV) genome sequence[J]. *Virus Genes*, 2001, 23(2): 137-144
- [2] Sun DB, Wang XY, Wei S, et al. Epidemiology and vaccine of porcine epidemic diarrhea virus in China: a mini-review[J]. *Journal of Veterinary Medical Science*, 2016, 78(3): 355-363
- [3] Sun J, Li QJ, Shao CY, et al. Isolation and characterization of Chinese porcine epidemic diarrhea virus with novel mutations and deletions in the S gene[J]. *Veterinary Microbiology*, 2018, 221: 81-89
- [4] Sun DB, Feng L, Shi HY, et al. Spike protein region (aa 636789) of porcine epidemic diarrhea virus is essential for induction of neutralizing antibodies[J]. *Acta Virologica*, 2007, 51(3): 149-156
- [5] Chu VC, McElroy LJ, Chu V, et al. The avian coronavirus infectious bronchitis virus undergoes direct low-pH-dependent fusion activation during entry into host cells[J]. *Journal of Virology*, 2006, 80(7): 3180-3188
- [6] Marthaler D, Rossow K, Culhane M, et al. Identification, phylogenetic analysis and classification of porcine group C rotavirus VP7 sequences from the United States and Canada[J]. *Virology*, 2013, 446(1/2): 189-198
- [7] Lu XH, McDonald SM, Tortorici MA, et al. Mechanism for coordinated RNA packaging and genome replication by rotavirus polymerase VP1[J]. *Structure*, 2008, 16(11): 1678-1688
- [8] Gu J, Hu D, Peng T, et al. Epidemiological investigation of pseudorabies in Shandong Province from 2013 to 2016[J]. *Transboundary and Emerging Diseases*, 2018, 65(3): 890-898
- [9] Pomeranz LE, Reynolds AE, Hengartner CJ. Molecular biology of pseudorabies virus: impact on neurovirology and veterinary medicine[J]. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 2005, 69(3): 462-500
- [10] Mettenleiter TC. Immunobiology of pseudorabies (Aujeszky's

- Disease)[J]. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 1996, 54(1/4): 221-229
- [11] Li XM, Liu RF, Tang HJ, et al. Induction of protective immunity in swine by immunization with live attenuated recombinant pseudorabies virus expressing the capsid precursor encoding regions of foot-and-mouth disease virus[J]. *Vaccine*, 2008, 26(22): 2714-2722
- [12] Chen Y, Guo WZ, Xu ZW, et al. A novel recombinant pseudorabies virus expressing parvovirus VP2 gene: immunogenicity and protective efficacy in swine[J]. *Virology Journal*, 2011, 8: 307
- [13] Hong Q, Qian P, Li XM, et al. A recombinant pseudorabies virus co-expressing capsid proteins precursor P1-2A of FMDV and VP2 protein of porcine parvovirus: a trivalent vaccine candidate[J]. *Biotechnology Letters*, 2007, 29(11): 1677-1683
- [14] Chen DS. Development of trivalent genetic engineering live veter vaccine against porcine Japanese encephalitis, porcine parvovirus and pseudorabies[D]. Ya'an: Doctoral Dissertation of Sichuan Agricultural University, 2011 (in Chinese)
陈弟诗. 猪乙型脑炎病毒-细小病毒-伪狂犬病毒活载体疫苗的研究[D]. 雅安: 四川农业大学博士学位论文, 2011
- [15] Jiang YB, Fang LR, Xiao SB, et al. Construction and immunogenicity of recombinant pseudorabies virus expressing the modified GP5m protein of porcine reproduction and respiratory syndrome virus[J]. *Frontiers of Biology in China*, 2007, 2(1): 85-91
- [16] Klingbeil K, Lange E, Teifke JP, et al. Immunization of pigs with an attenuated pseudorabies virus recombinant expressing the haemagglutinin of pandemic swine origin H1N1 influenza A virus[J]. *Journal of General Virology*, 2014, 95: 948-959
- [17] Chen FZ. Infection and molecular characteristics of porcine epidemic diarrhea virus and application of next generation sequencing in new pathogen discovery[D]. Wuhan: Doctoral Dissertation of Huazhong Agricultural University, 2017 (in Chinese)
陈芳洲. 猪流行性腹泻病毒的感染和分子特征及下一代测序技术在挖掘新病原的应用研究[D]. 武汉: 华中农业大学博士学位论文, 2017
- [18] Li ZL, Zhu L, Ma JY, et al. Molecular characterization and phylogenetic analysis of porcine epidemic diarrhea virus (PEDV) field strains in south China[J]. *Virus Genes*, 2012, 45(1): 181-185
- [19] Zheng FM, Huo JY, Zhao J, et al. Molecular characterization and phylogenetic analysis of Porcine Epidemic Diarrhea Virus field strains in central China during 2010-2012 outbreaks[J]. *Chinese Journal of Virology*, 2013, 29(2): 197-205 (in Chinese)
郑逢梅, 霍金耀, 赵军, 等. 2010-2012 年华中地区猪流行性腹泻病毒分子特征和遗传进化分析[J]. *病毒学报*, 2013, 29(2): 197-205
- [20] He QG, Tong GZ, Yang HC, et al. Epidemiological characterization of swine pseudorabies, eradication technologies and application[J]. *Chinese Journal of Animal Science*, 2015, 51(24): 68-74 (in Chinese)
何启盖, 童光志, 杨汉春, 等. 猪伪狂犬病流行病学特征、净化技术及其应用示范[J]. *中国畜牧杂志*, 2015, 51(24): 68-74
- [21] Yuan L. Isolation and identification of porcine rotavirus G4P[6] strain and the establishment and application of novel diagnostic methods[D]. Beijing: Doctoral Dissertation of China Agricultural University, 2018 (in Chinese)
原霖. 猪轮状病毒 G4P[6]株的分离鉴定及新型检测方法的建立与应用[D]. 北京: 中国农业大学博士学位论文, 2018
- [22] Dong LN, Gao FS, Xu CB, et al. Construction and identification of the expression recombinants for PEDV COE gene in *Lactococcus lactis*[J]. *Acta Veterinaria et Zootechnica Sinica*, 2008, 39(12): 1743-1747 (in Chinese)
董丽娜, 高凤山, 许崇波, 等. 表达猪流行性腹泻病毒 COE 基因的重组乳酸菌的构建与鉴定[J]. *畜牧兽医学报*, 2008, 39(12): 1743-1747
- [23] Sun DB. Identification of antigenic epitopes and screening receptor binding domain on the spike protein of porcine epidemic diarrhea virus[D]. Beijing: Doctoral Dissertation of Chinese Academy of Agricultural Sciences, 2008 (in Chinese)
孙东波. 猪流行性腹泻病毒 S 蛋白抗原表位鉴定及受体结合域的初步筛选[D]. 北京: 中国农业科学院博士学位论文, 2008
- [24] Liu PJ. Construction and immunogenicity study of a bivalent DNA vaccine based on PoRV VP7 and PEDV S gene[D]. Chengdu: Master's Thesis of Sichuan Agricultural University, 2016 (in Chinese)
刘鹏娟. 基于 PoRV VP7 与 PEDV S 基因二联 DNA 疫苗的构建及免疫效力评价[D]. 成都: 四川农业大学硕士学位论文, 2016
- [25] Liu XW. Isolation and identification of pseudorabies virus and construction of a *gI/gE* double gene deletion strains[D]. Chengdu: Master's Thesis of Sichuan Agricultural University, 2016 (in Chinese)
刘小琬. 伪狂犬病毒的分离鉴定及 *gI/gE* 双基因缺失株的构建[D]. 成都: 四川农业大学硕士学位论文, 2016
- [26] Liu H. Construction of recombinant pseudorabies virus expressing both HA and NA gene of a swine influenza virus H1NA[D]. Wuhan: Master's Thesis of Huazhong Agricultural University, 2008 (in Chinese)
刘琥. 表达猪流感 H1N1 HA 基因和 NA 基因的重组伪狂犬毒株的构建[D]. 武汉: 华中农业大学硕士学位论文, 2008