

潘慧, 李艳华, 向柯宇, 等. 猪伪狂犬病病毒流行毒株 *gE/gI* 缺失突变株的构建及生物学特性研究[J]. 华南农业大学学报, 2018, 39(2): 9-15.

猪伪狂犬病病毒流行毒株 *gE/gI* 缺失突变株的构建及生物学特性研究

潘 慧[†], 李艳华[†], 向柯宇, 唐 栋, 程珍珠, 罗永文, 琚春梅
(华南农业大学 兽医学院/广东省动物源性人兽共患病预防与控制重点实验室, 广东 广州 510642)

摘要:【目的】为研制针对猪伪狂犬病病毒流行毒株的疫苗提供候选毒株。【方法】构建针对猪伪狂犬病病毒流行毒株的 *gE/gI* 缺失重组转移质粒 pMD-LA-RA 及携带 *EGFP* 标记基因的重组转移质粒 pMD-LA-EGFP-RA, 将 pMD-LA-EGFP-RA 与伪狂犬病病毒流行毒株 PRV AH 进行同源重组, 利用 *EGFP* 为筛选标记, 获得携带 *EGFP* 基因的 *gE/gI* 基因缺失突变株 PRV AH *gE⁻/gI⁻/EGFP⁺*, 以此毒株与 pMD-LA-RA 进行第 2 次同源重组, 筛选去除 *EGFP* 基因的 *gE/gI* 基因缺失突变株 PRV AH *gE⁻/gI⁻*, 并通过生长曲线、易感细胞连续传代和动物免疫评价其增殖能力、遗传稳定性及免疫原性。【结果】通过 2 次同源重组, 结合荧光观察、空斑纯化和 PCR 检测, 成功获得了 PRV AH *gE⁻/gI⁻*, 经 PCR 鉴定、荧光观察及测序鉴定, 证实该毒株 *gE* 和 *gI* 基因被成功缺失, 且不携带 *EGFP* 标记基因。生物学特性研究结果表明, 该毒株增殖能力与亲本毒株相当, 遗传稳定性及免疫原性良好。【结论】采用同源重组技术成功构建了免疫原性良好的猪伪狂犬病病毒流行毒株 *gE/gI* 基因缺失突变株, 为研制针对流行毒株的基因缺失疫苗奠定了一定的基础。

关键词: 猪伪狂犬病病毒; 流行毒株; 基因缺失; 同源重组; 生物学特性
中图分类号: S852.651 **文献标识码:** A **文章编号:** 1001-411X(2018)02-0009-07

Construction of a *gE/gI*-deleted mutant strain of epidemic porcine pseudorabies virus and its biological characteristics

PAN Hui[†], LI Yanhua[†], XIANG Keyu, TANG Dong, CHENG Zhenzhu, LUO Yongwen, JU Chunmei
(College of Veterinary Medicine, South China Agricultural University /Key Laboratory of Zoonosis Prevention and Control of Guangdong Province, Guangzhou 510642, China)

Abstract: 【Objective】To obtain a candidate vaccine strain against epidemic porcine pseudorabies virus. 【Method】A *gE/gI*-deleted transferring plasmid pMD-LA-RA and a recombinant plasmid carrying *EGFP* gene were constructed according to the sequence of epidemic porcine pseudorabies virus. The homologous recombination was operated between pMD-LA-EGFP-RA and PRV AH, and then the recombinant mutant virus PRV AH *gE⁻/gI⁻/EGFP⁺* was selected using *EGFP* as screening marker. In order to obtain the *gE/gI*-deleted mutant strain PRV AH *gE⁻/gI⁻* without the *EGFP* gene, the second homologous recombination was carried out between pMD-LA-RA and PRV AH *gE⁻/gI⁻/EGFP⁺*. The proliferation ability, genetic stability and immunogenicity of PRV AH *gE⁻/gI⁻* were evaluated by its growth curve, continuous passage in susceptible cells

收稿日期:2017-10-30 优先出版日期:2018-01-17
优先出版网址:<http://kns.cnki.net/kcms/detail/44.1110.S.20180117.1613.020.html>
作者简介:潘 慧 (1991—), 女, 硕士研究生, E-mail: 1595180937@qq.com; 李艳华 (1990—), 女, 硕士研究生, E-mail: 2537209144@qq.com, [†]对本文贡献相同; 通信作者: 琚春梅 (1976—), 女, 副教授, 博士, E-mail: juchunmei@scau.edu.cn
基金项目:广东省科技计划项目 (2016A020210046, 2016B090921009, 2014A020214006, 2015A020209100)

and animal immunization. 【Result】 PRV AH gE^-/gI^- was obtained through two homologous recombinations with fluorescence observation, plaque purification and PCR. The deletion of gE , gI genes and $EGFP$ gene marker in PRV AH gE^-/gI^- was identified by PCR, fluorescence observation and sequencing. PRV AH gE^-/gI^- had similar proliferation ability to the parental strain and had good genetic stability and immunogenicity. 【Conclusion】 A gE/gI -deleted mutant strain of epidemic porcine pseudorabies virus with good immunogenicity was constructed successfully, which provides a basis for the development of gene deleted vaccine targeting epidemic strains.

Key words: porcine pseudorabies virus; epidemic strain; gene deletion; homologous recombination; biological characteristic

伪狂犬病病毒 (Pseudorabies virus, PRV) 属疱疹病毒科 α 疱疹病毒亚科, 可感染各个年龄段的猪, 导致母猪发生流产、产死胎和木乃伊胎, 新生仔猪的大量死亡及成年猪的呼吸道症状等, 对养猪业危害巨大。采用基因缺失疫苗免疫结合相应的鉴别诊断方法可以有效区分疫苗免疫动物与野毒感染动物, 是防控伪狂犬病的重要措施^[1]。但自 2011 年以来, 我国猪伪狂犬病卷土重来, 老病新发^[2-4]。对新分离毒株的研究表明, 新流行毒株处于一个相对独立的分支, 与以往分离株遗传关系较远, 且比原有毒株致病性更强^[2, 5-6]。经 PRV 基因缺失疫苗免疫的猪场也未能控制猪伪狂犬病, 表明 Bartha-K61 等传统疫苗已不再能提供完全保护^[6-8]。因此, 有必要研究针对当前流行毒株的疫苗以控制该病的流行危害。

本研究拟采用同源重组技术构建针对当前 PRV 流行株的 gE/gI 缺失突变株, 并评价其增殖能力、遗传稳定性及免疫原性, 为进一步研制相应的 gE/gI 缺失弱毒疫苗或灭活疫苗奠定一定的基础。

1 材料与方法

1.1 试验动物

4 周龄 SPF 级雌性昆明系小鼠, 购自南方医科大学实验动物中心。

1.2 试验毒株和试剂

PRV AH 株病毒, 分离自我国安徽某发病猪群的流产仔猪, 经鉴定属 PRV 流行毒株^[9]; BHK-21 细胞、*Escherichia coli* DH5 α 、pEGFP-N1 质粒均由华南农业大学兽医学院微生物教研室保存; pMD[®]18-T、限制性内切酶 *Hind* III、*Pst* I、*EcoR* V、T4 DNA 连接酶、PrimeSTAR[®]HS DNA 聚合酶购自 TaKaRa 公司; 苯酚、三氯甲烷、蛋白酶 K、RNase 酶、低熔点琼脂糖购自 Sigma 公司; Lipofectamine[®] 2000

Reagent 购自 Invitrogen 公司; 质粒抽提试剂盒、DNA 凝胶回收试剂盒购自 Omega 公司; DMEM 细胞营养液与胎牛血清购自 Gibco 公司。

1.3 方法

1.3.1 引物设计 参照 GenBank 登录的 PRV ZJ01(GI:32187339) 序列, 用 Primer5.0 软件分别设计同源臂左臂 (LA) 和同源臂右臂 (RA) 的引物, LA 和 RA 分别位于 gE 基因的上、下游。参照 GenBank 登录的 pEGFP-N1 序列 (GI:1377911), 设计引物扩增 $EGFP$ 基因的完整表达盒。设计引物分别用于扩增 gE 基因、 $EGFP$ 基因短片段, 用于重组病毒的检测。引物由生工生物 (上海) 有限公司合成。引物序列见表 1。

1.3.2 PCR 扩增 以 PRV AH 株基因组为模板, 采用 PrimeSTAR[®]HS DNA 聚合酶分别扩增同源臂左臂 LA, 同源臂右臂 RA, PCR 反应条件为: 94 $^{\circ}\text{C}$ 预变性 5 min; 94 $^{\circ}\text{C}$ 变性 45 s, 退火 45 s, 72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 2 min, 循环 30 次; 72 $^{\circ}\text{C}$ 末次延伸 10 min。LA、RA 序列的 PCR 扩增最适退火温度分别为 60 和 55 $^{\circ}\text{C}$ 。以 pEGFP-N1 为模板, 采用 EGFP-R1、EGFP-R2 引物扩增 $EGFP$ 基因的表达盒, PCR 反应条件为: 94 $^{\circ}\text{C}$ 预变性 5 min; 94 $^{\circ}\text{C}$ 变性 1 min, 55 $^{\circ}\text{C}$ 退火 1 min, 72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 2 min, 循环 30 次, 72 $^{\circ}\text{C}$ 终延伸 10 min。

1.3.3 重组转移质粒的构建与鉴定 将 LA PCR 产物与 pMD[®]18-T 连接构建 pMD-LA, 经 *Hind* III 和 *Pst* I 双酶切后与经同样酶切的 RA PCR 产物连接构建重组转移质粒 pMD-LA-RA。将 pMD-LA-RA 与 $EGFP$ 基因的表达盒经 *EcoR* V 酶切后连接, 使 $EGFP$ 插入到 LA、RA 之间, 构建携带 $EGFP$ 基因表达盒的重组转移质粒 pMD-LA-EGFP-RA。重组转移质粒 pMD-LA-RA 与 pMD-LA-EGFP-RA 进行酶切与测序鉴定。

表 1 本试验所涉及的引物
Tab. 1 Primers used in this study

引物名称	引物序列(5'→3')	扩增位置(碱基位点)	扩增长度/bp
LA-F	CCGGAATTCACCAGCACCGCACGTACAAGTT	120 511~121 349	838
LA-R	CAGCAGCGTCCCGTCTATCGT		
RA-F	AAACTGCAGGATATCCGGAAGTGACGAATGG	124 033~124 994	961
RA-R	CTCGGTGGTGATGTAGAAAAGCTTGGG		
EGFP-F1	AACGATATCGTTTAAACGTTCTTTCCTGCGTTATCC	4 679~4 733; 0~1 755	1 809
EGFP-R1	AACGATATCAACCCTATCTCGGTCTATTCT		
EGFP-F2	GTGGATAGCGTTTGACTC	396~1 170	775
EGFP-R2	CACCTTGATGCCGTTCTT		
<i>gE</i> -F	GTGATGACCCACAACGG	123 426~123 717	292
<i>gE</i> -R	GCACGCAGAGCCAGAT		
LA-F2	AGTACCGGCGTCGATGATGA	121 144~121 348; 124 033~124 137	310
RA-R2	GGTCAAACGTGTCCATGTCG		

1.3.4 重组病毒的构建与筛选 将重组转移质粒 pMD-LA-EGFP-RA 转染 BHK-21 细胞, 4 h 后用 PRV AH 株接种转染的细胞, 使质粒与病毒基因组在细胞内发生同源重组, 收集病变细胞进行空斑纯化, 以 EGFP 为筛选标记, 筛选出含绿色荧光的空斑, 即可获得 *gE/gI* 基因缺失且携带 *EGFP* 基因的重组病毒 PRV AH *gE*⁻/*gI*⁻/*EGFP*⁺。为了剔除 *EGFP* 基因, 将重组转移质粒 pMD-LA-RA 转染 BHK-21 细胞后, 用 PRV AH *gE*⁻/*gI*⁻/*EGFP*⁺ 接种转染的细胞, 进行第 2 次同源重组, 然后进行空斑纯化, 筛选出不出现绿色荧光的空斑, 即可获得 *gE/gI* 基因缺失的重组病毒 PRV AH *gE*⁻/*gI*⁻。

1.3.5 重组病毒的鉴定 将重组病毒 PRV AH *gE*⁻/*gI*⁻/*EGFP*⁺ 及 PRV AH *gE*⁻/*gI*⁻ 接种 BHK-21 细胞, 病变后提取病变细胞的基因组作为模板, 用 *gE*、*EGFP* 基因检测引物进行 PCR 扩增, 以验证重组病毒构建是否成功。同时通过荧光显微镜观察重组病毒 PRV AH *gE*⁻/*gI*⁻/*EGFP*⁺ 及 PRV AH *gE*⁻/*gI*⁻ 接种 BHK-21 细胞后绿色荧光的表达情况, 以进一步鉴定重组病毒。为了进一步确定 PRV AH *gE*⁻/*gI*⁻ 的缺失区域, 利用 LA-F2/RA-R2 引物进行 PCR 扩增, 并进行测序及序列比对。

1.3.6 重组病毒的生物学特性研究 将重组病毒 PRV AH *gE*⁻/*gI*⁻/*EGFP*⁺、PRV AH *gE*⁻/*gI*⁻ 和亲本毒 PRV AH 株以 1 感染复数 (Multiplicity of infection, MOI) 的量接种长成单层的 BHK-21 细胞, 于不同时间点分别取样, 测定半数细胞培养物感染量 (TCID₅₀), 以不同时间点的 -lg(TCID₅₀) 值绘制各病毒的一步生长曲线, 评价 PRV AH *gE*⁻/*gI*⁻ 的增殖能

力。将 PRV AH *gE*⁻/*gI*⁻ 在 BHK-21 细胞上连续传代 15 代, 提取每代重组病毒的基因组, 利用 LA-F2/RA-R2 引物进行 PCR 扩增及序列测定, 评价病毒的遗传稳定性。将 PRV AH *gE*⁻/*gI*⁻ 灭活, 与 Montanide Gel 佐剂按体积比 9:1 制备灭活疫苗, 以 10^{5.0}TCID₅₀、10^{6.0}TCID₅₀ 免疫 4 周龄昆明系小鼠, 4 周后加强免疫 1 次, 于免疫前及首次免疫后 2、4、5、6、7、8 周分别眼球采血, 测定血清中和抗体效价, 并于首次免疫后 8 周分别以 100 LD₅₀ 的 PRV 经典毒株和 PRV AH 对免疫小鼠进行攻毒, 以评价 PRV AH *gE*⁻/*gI*⁻ 的免疫保护效果。

2 结果与分析

2.1 同源臂及 *EGFP* 基因表达盒的 PCR 扩增

提取 PRV AH 病毒基因组为模板, 用同源左臂 LA 和同源右臂 RA 的引物进行 PCR 扩增, PCR 产物经 10 g·L⁻¹ 琼脂糖凝胶电泳检测, 获得了 LA 和 RA 的特异性扩增条带, 大小约为 838 和 961 bp, 与预期结果相符 (图 1A)。

以提取的 pEGFP-N1 质粒为模板, 用扩增 *EGFP* 基因表达盒的引物进行 PCR, PCR 产物经 10 g·L⁻¹ 琼脂糖凝胶电泳检测, 获得了大小约为 1 809 bp 的特异性扩增条带, 与预期结果相符 (图 1B)。

2.2 重组转移质粒的鉴定

将重组转移质粒 pMD-LA-RA 用 *Pst* I 和 *Hind* III 进行双酶切, 酶切产物经 10 g·L⁻¹ 琼脂糖凝胶电泳检测, 从图 2A 中可以看到 2 条特异性条带, 大小约为 3 530 和 961 bp, 分别与 pMD-LA 和 RA 的预期大小相符。

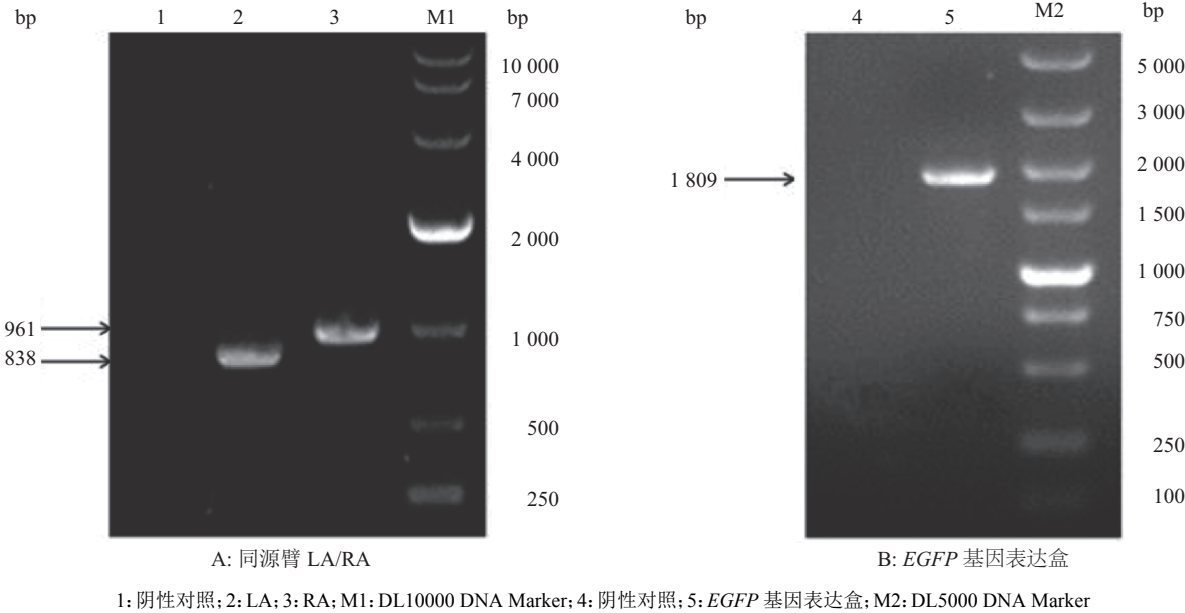


图 1 同源臂 LA/RA 与 *EGFP* 基因表达盒的 PCR 扩增结果

Fig. 1 PCR amplification of homologous arm LA/RA and *EGFP* gene expression cassette

将重组转移质粒 pMD-LA-EGFP-RA 用 *EcoRV* 进行单酶切, 酶切产物经 10 g·L⁻¹ 琼脂糖凝胶电泳检测, 从图 2B 中可以看到 2 条特异性条带, 大小约为 4 491 和 1 809 bp, 分别与 pMD-LA-RA

和 *EGFP* 基因表达盒的预期大小相符。对酶切鉴定正确的重组转移质粒 pMD-LA-RA 和 pMD-LA-EGFP-RA 进一步进行测序鉴定, 测序结果表明重组转移质粒构建成功。

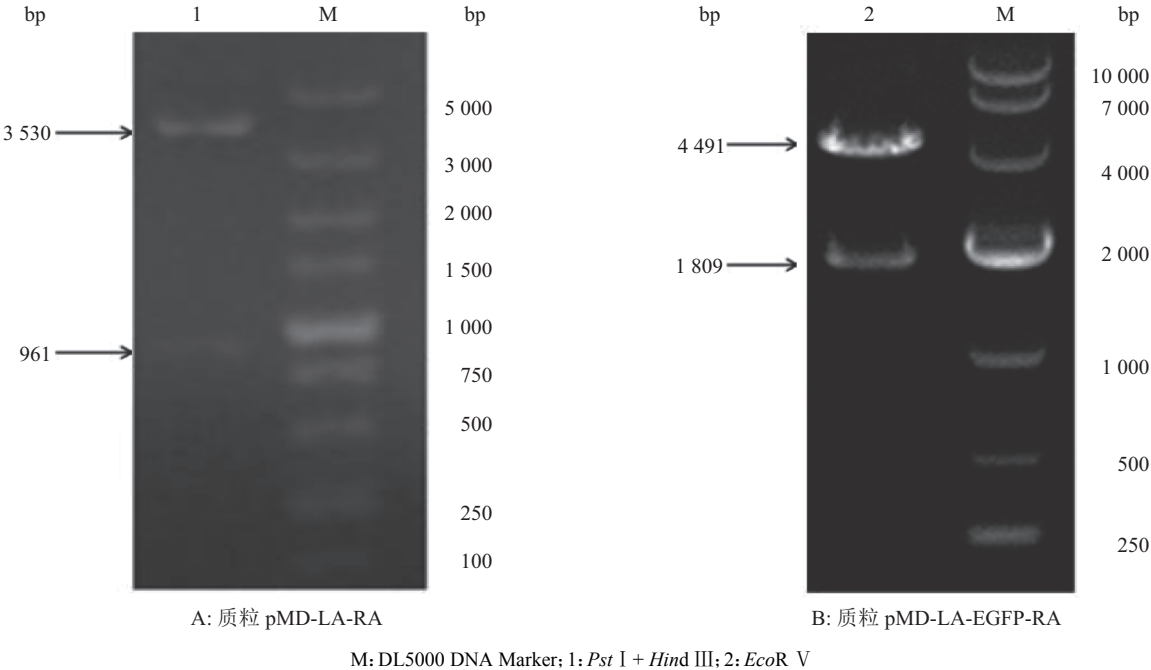


图 2 重组质粒的酶切鉴定结果

Fig. 2 Identification of recombinant plasmid by restriction enzyme digestion

2.3 重组病毒的鉴定

采用 EGFP-F2/EGFP-R2、gE-F/gE-R 2 对引物对重组病毒 PRV AH gE⁻/gI⁻/EGFP⁺ 及 PRV AH gE⁻/gI⁻ 进行 PCR 鉴定, 结果 (图 3) 显示, 从 PRV AH

gE⁻/gI⁻/EGFP⁺ 中可以扩增出 *EGFP* 基因, 但不能扩增出 *gE* 基因, 表明 PRV AH gE⁻/gI⁻/EGFP⁺ 已缺失 *gE* 基因, 且成功插入 *EGFP* 基因 (图 3A); 而从 PRV AH gE⁻/gI⁻ 中既不能扩增出 *EGFP* 基因, 也不

<http://xuebao.scau.edu.cn>

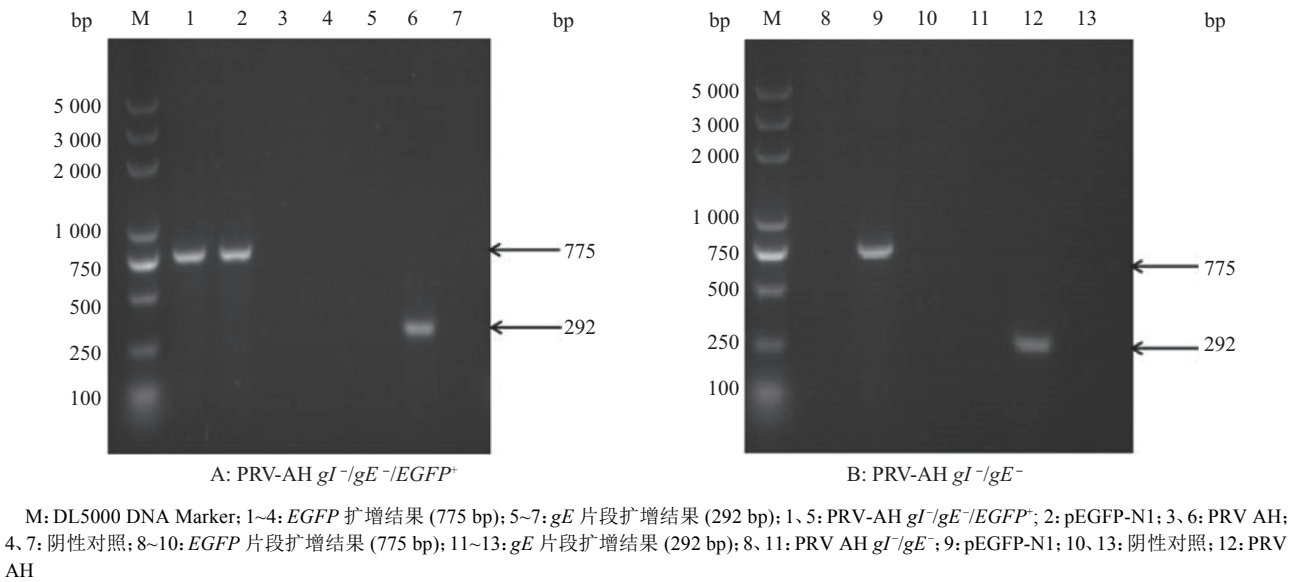


图3 重组病毒 PRV-AH *gI*⁻/*gE*⁻/*EGFP*⁺与 PRV-AH *gI*⁻/*gE*⁻的 PCR 鉴定结果

Fig. 3 Identification of recombinant virus PRV-AH *gI*⁻/*gE*⁻/*EGFP*⁺ and PRV-AH *gI*⁻/*gE*⁻ by PCR

能扩增出 *gE* 基因, 表明 PRV AH *gE*⁻/*gI*⁻不仅缺失 *gE* 基因, 也成功将标记基因 *EGFP* 删除 (图 3B)。

在 PCR 鉴定的基础上, 将重组病毒 PRV AH *gE*⁻/*gI*⁻/*EGFP*⁺及 PRV AH *gE*⁻/*gI*⁻接种 BHK-21 细胞, 通过荧光显微镜观察, PRV AH *gE*⁻/*gI*⁻/*EGFP*⁺接种细胞出现绿色荧光, 而 PRV AH *gE*⁻/*gI*⁻接种细胞不发荧光, 进一步表明标记基因 *EGFP* 被成功剔除 (图 4)。

利用 LA-F2/RA-R2 引物从 PRV AH *gE*⁻/*gI*⁻基因组中扩增出大小约 310 bp 的条带, 经测序并与 PRV ZJ01 株 (KM061380.1) 序列比对, 结果显示 PRV AH *gE*⁻/*gI*⁻基因组缺失区域对应于 PRV ZJ01 株碱基位点的 121 349~124 032, 缺失区域长 2 684 bp, 包括 *gI* 基因 3'端 906 bp、*gE* 基因 5'端 1 675 bp 及 *gI* 与 *gE* 之间的序列 103 bp。

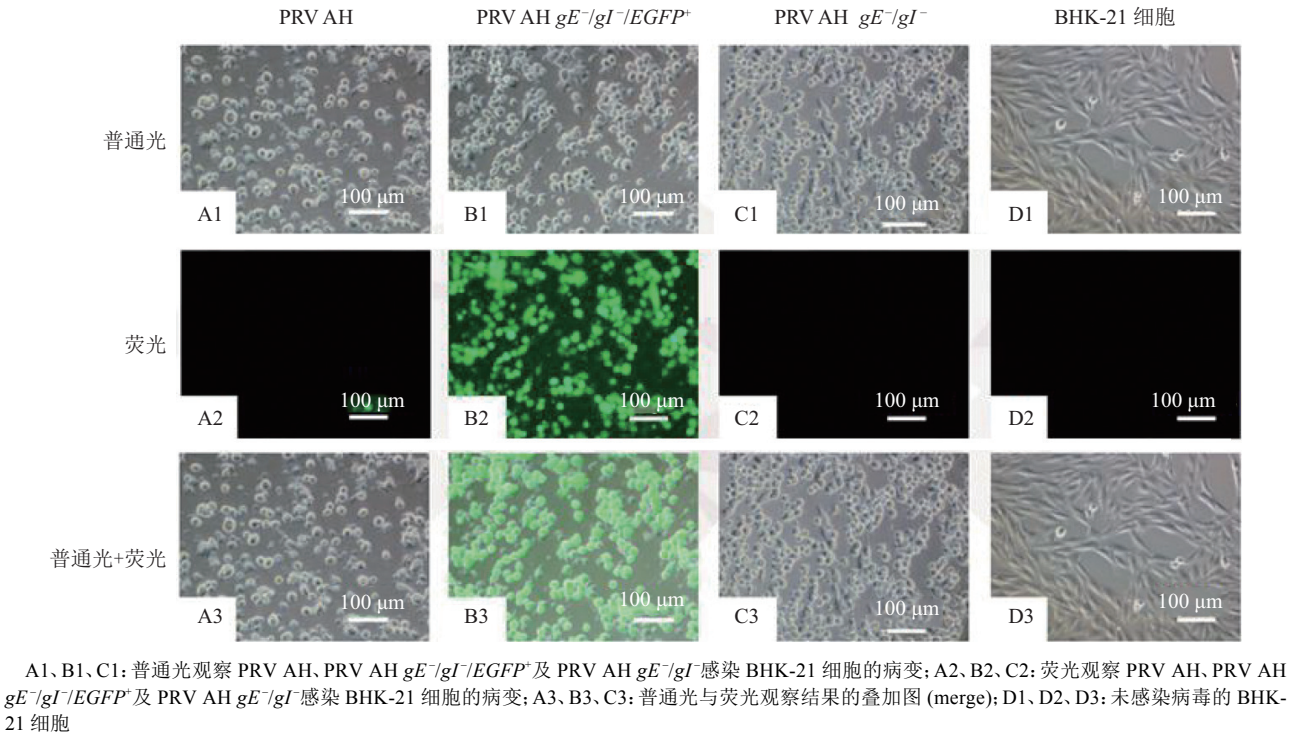


图4 重组病毒感染 BHK-21 细胞的病变情况

Fig. 4 Cytopathic effect of BHK-21 cells infected by recombinant viruses

2.4 重组病毒的生物学特性研究

将重组病毒 PRV AH $gE^-/gI^-/EGFP^+$ 、PRV AH gE^-/gI^- 和亲本毒株 PRV AH 接种 BHK-21 细胞, 以接毒后的时间为横坐标, 以 $-\lg(TCID_{50})$ 值为纵坐标绘制各病毒的一步生长曲线 (图 5), 结果显示, 在接毒后不同时间, 特别是在接毒后 54 h 前, 重组病毒 PRV AH gE^-/gI^- 的 $TCID_{50}$ 均低于亲本 PRV AH 毒株, 表明 gE 、 gI 基因的缺失对 PRV 的增殖有一定的影响, 这也与 gE 、 gI 基因的功能相符。PRV AH 株在接毒后第 48 小时滴度最高, $TCID_{50}$ 为 $10^{-7.63} \text{ mL}^{-1}$, PRV AH gE^-/gI^- 株滴度达到最高的时间略有延后, 在接毒后的第 54 小时滴度最高, $TCID_{50}$ 为 $10^{-7.13} \text{ mL}^{-1}$ 。

将 PRV AH gE^-/gI^- 在 BHK-21 细胞上连续传代 15 代, 对各代病毒进行 PCR 扩增及序列测定, 结果表明从每代病毒中均可扩增出大小约为 310 bp 的条带, 且扩增区域未见突变, 表明重组病毒 PRV AH gE^-/gI^- 具有良好的遗传稳定性。

将 PRV AH gE^-/gI^- 灭活疫苗免疫小鼠, $10^{5.0}TCID_{50}$ 免疫组在首次免疫后 6 周 (二免后 2 周) 小鼠血清中出现 PRV 中和抗体, $10^{6.0}TCID_{50}$ 免疫组

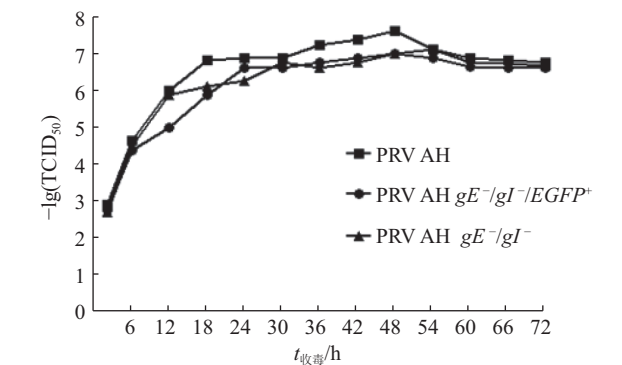


图 5 重组病毒和亲本病毒的生长曲线
Fig. 5 The growth curve of recombinant viruses and parental strain

在首次免疫后 4 周出现 PRV 中和抗体, 在首次免疫后 7 周, 各组免疫小鼠血清中和抗体水平达到最高 (表 2)。首次免疫后 8 周, 以 100 LD₅₀ 的 PRV 经典毒株和 PRV AH 对免疫小鼠进行攻毒, 免疫剂量为每只小鼠 $10^{5.0}TCID_{50}$ 时, 经 PRV AH 株攻毒后保护率为 62.5%(5/8), 经 PRV 经典株攻毒后保护率为 50%(4/8); 免疫剂量为每只小鼠 $10^{6.0}TCID_{50}$ 时, 经 PRV AH 株、PRV 经典株攻毒后均无死亡, 保护

表 2 不同剂量 PRV AH gE^-/gI^- 灭活疫苗免疫小鼠后的中和抗体水平							
Tab. 2 Neutralizing antibody titers of immunized mice with different dosages of PRV AH gE^-/gI^- inactivated vaccine							
组别(免疫剂量) ¹⁾	首次免疫后不同时间的抗性水平						
	0	2周	4周	5周	6周	7周	8周
A($10^{5.0}TCID_{50}$)	<2	<2	<2	<2	2.45±4.60	7.35±2.70	4.36±0.14
B($10^{5.0}TCID_{50}$)	<2	<2	<2	<2	2.13±0.30	6.88±0.27	4.18±0.30
C($10^{6.0}TCID_{50}$)	<2	<2	4.39±2.43	7.83±3.17	8.96±4.35	19.13±3.08	9.46±2.72
D($10^{6.0}TCID_{50}$)	<2	<2	3.98±1.54	7.37±5.86	7.70±4.73	15.73±6.06	9.28±6.89
E、F、G(未免疫对照)	<2	<2	<2	<2	<2	<2	<2

1) A、C、E 为 PRV AH 株; B、D、F 为 PRV 经典株; G 为空白对照

率为 100%(8/8), 表明 $10^{6.0}TCID_{50}$ 免疫剂量的 PRV AH gI^-/gE^- 灭活疫苗免疫小鼠对致死剂量 PRV AH 株、PRV 经典株均可获得完全保护。

3 讨论与结论

近几年来, 伪狂犬病在我国许多猪场再次流行, 给养猪业造成了严重的经济损失。为了控制 PRV 流行毒株对猪群的巨大危害, 国内已有多位学者开展了流行毒株基因缺失疫苗的研究。Wang 等^[10]通过同源重组技术构建了 PRV TJ 株的 gE 缺失突变株, 该毒株免疫 6 周龄的仔猪对 TJ 株的致死性攻击可获得完全保护。Gu 等^[11]、Tong 等^[12]分

别利用细菌人工染色体技术 (BAC)、同源重组技术构建了 PRV gI^-/gE^- 双缺失突变株, 并且以该毒株制备的疫苗对仔猪及母猪均具有很好的免疫保护效果。多位学者通过细菌人工染色体技术 (BAC)、同源重组技术、CRISPR/Cas9 系统构建了 PRV $TK^-/gI^-/gE^-$ 三缺失突变株, 并评价了该毒株对仔猪的免疫保护效果^[13-16]。

本研究以在国内猪场分离的流行毒株 PRV AH 为亲本毒株, 采用同源重组技术构建了 gE 、 gI 双缺失突变株。同源重组技术的关键步骤之一是构建转移载体, 本研究在构建转移载体时, 采用 PCR 技术扩增 2 条同源臂, 其中同源左臂长 838 bp, <http://xuebao.scau.edu.cn>

包含部分 *gD* 基因和部分 *gI* 基因,同源右臂长 961 bp,包含部分 *gE* 基因、全部 *US9* 基因和部分 *US2* 基因。将构建的转移载体与亲本毒株 PRV AH 进行同源重组后通过空斑纯化获得了 PRV *gE⁻/gI⁻* 双缺失突变株,经测序鉴定该突变株缺失了 2 684 bp。

在本研究中,进行同源重组时不是采用转移载体与病毒基因组共转染细胞的方式,而是采用先将转移载体转染细胞,然后再用病毒感染已转染细胞的方式,这样使病毒基因组以自然感染的方式进入转染细胞,与转移载体发生同源重组,这样既省去了提取病毒基因组的繁琐步骤,也不用考虑病毒基因组的纯度及完整性等对同源重组效率的影响。

本研究构建的基因缺失突变株具有良好的增殖能力、遗传稳定性及免疫原性,免疫小鼠后对致死剂量 PRV 经典毒株及流行毒株均可提供完全保护,有望作为一种新的疫苗候选株用于 PRV 的防控。同时该毒株缺失了 PRV *gE* 基因,在增殖过程中不能表达 *gE* 糖蛋白,因此以该毒株制备的疫苗免疫动物后不能刺激动物机体产生抗 *gE* 糖蛋白的抗体,可与目前常用的 PRV *gE* 鉴别诊断试剂盒配合使用,用于疫苗免疫动物和野毒感染动物的鉴别诊断,从而有利于猪场伪狂犬病根除计划的实施。

参考文献:

[1] 童光志,陈焕春. 伪狂犬病流行现状及我国应采取的防控措施[J]. 中国兽医学报, 1999, 19(1): 1-2.

[2] 彭金美,安同庆,赵鸿远,等. 猪伪狂犬病病毒新流行株的分离鉴定及抗原差异性分析[J]. 中国预防兽医学报, 2013, 35(1): 1-4.

[3] 童武,张青占,郑浩,等. 免疫后发病仔猪中伪狂犬病毒的分离和鉴定[J]. 中国动物传染病学报, 2013, 21(3): 1-7.

[4] 叶培根. 猪伪狂犬病: 剖析猪伪狂犬病的新动向[J]. 北方牧业, 2013, 12: 23.

[5] AN T Q, PENG J M, TIAN Z J, et al. Pseudorabies virus variant in Bartha-K61-vaccinated pigs, China, 2012[J]. Emerg Infect Dis, 2013, 19(11): 1749-1755.

[6] WU R, BAI C, SUN J, et al. Emergence of virulent pseu-

dorabies virus infection in Northern China[J]. J Vet Sci, 2013, 14(3): 363-365.

[7] YU X L, ZHOU Z, HU D M, et al. Pathogenic pseudorabies virus, China, 2012[J]. Emerg Infect Dis, 2014, 20(1): 102-104.

[8] LUO Y Z, LI N, CONG X, et al. Pathogenicity and genomic characterization of a pseudorabies virus variant isolated from Bartha-K61-vaccinated swine population in China[J]. Vet Microbiol, 2014, 174(1/2): 107-115.

[9] 向柯宇,潘慧,吉艺宽,等. 猪伪狂犬病病毒新流行株主要糖蛋白的分子特征分析[J]. 华南农业大学学报, 2016, 37(3): 23-28.

[10] WANG C H, YUAN J, QIN H Y, et al. A novel *gE*-deleted pseudorabies virus (PRV) provides rapid and complete protection from lethal challenge with the PRV variant emerging in Bartha-K61-vaccinated swine population in China[J]. Vaccine, 2014, 32(27): 3379-3385.

[11] GU Z Q, DONG J, WANG J C, et al. A novel inactivated *gE/gI* deleted pseudorabies virus (PRV) vaccine completely protects pigs from an emerged variant PRV challenge[J]. Virus Res, 2015, 195: 57-63.

[12] TONG W, LI G X, LIANG C, et al. A live, attenuated pseudorabies virus strain JS-2012 deleted for *gE/gI* protects against both classical and emerging strains[J]. Antiviral Res, 2016, 130: 110-117.

[13] ZHANG C L, GUO L H, JIA X R, et al. Construction of a triple gene-deleted Chinese pseudorabies virus variant and its efficacy study as a vaccine candidate on suckling piglets[J]. Vaccine, 2015, 33(21): 2432-2437.

[14] HU R M, ZHOU Q, SONG W B, et al. Novel pseudorabies virus variant with defects in *TK*, *gE* and *gI* protects growing pigs against lethal challenge[J]. Vaccine, 2015, 33(43): 5733-5740.

[15] CONG X, LEI J L, XIA S L, et al. Pathogenicity and immunogenicity of a *gE/gI/TK* gene-deleted pseudorabies virus variant in susceptible animals[J]. Vet Microbiol, 2016, 182: 170-177.

[16] LIANG X, SUN L Q, YU T, et al. A CRISPR/Cas9 and Cre/Lox system-based express vaccine development strategy against re-emerging Pseudorabies virus[J]. Sci Rep, 2016, 6: 19176.

【责任编辑 霍 欢】