

伪狂犬病毒 PK/gG/GFP 重组转移载体的构建和表达

罗满林¹, 卜春玲¹, 陈溥言², 徐刚³, 刘镇明¹

(1 华南农业大学 兽医学院, 广东 广州 510642; 2 南京农业大学 动物医学院, 江苏 南京 210095;

3 西南农业大学 荣昌分院, 四川 荣昌 402460)

摘要: 在构建了含伪狂犬病毒(pseudorabies virus PRV)湖北株部分 PK 基因和 gG 基因转移载体的基础上, 利用平端连接的方法将绿色荧光蛋白(GFP)的基因表达盒插入到缺失的部分, 并在下游引入了 1 个多克隆位点, 构建了重组转移载体 KGDF. 用限制性内切酶鉴定重组转移载体 KGDF. 根据质粒 EGFP-C1 中的 GFP 基因序列设计 1 对引物鉴定 GFP 表达盒插入的正确性. 用脂质体转染试剂盒将 KGDF 和 PRV HB 的基因组或病毒共转染 BHK-21 细胞, 在荧光显微镜下将出现病变的荧光斑挑出得到重组病毒. 将重组病毒扩大培养后提取基因组鉴定重组病毒中的 GFP 基因, 并通过挑取病变的荧光斑的方法纯化重组病毒.

关键词: 伪狂犬病毒; 重组病毒; PK/gG/GFP 缺失株; 绿色荧光蛋白(GFP)

中图分类号: S852.65

文献标识码: A

文章编号: 1001-411X(2003)04-0064-03

伪狂犬病(pseudorabies)是由伪狂犬病毒(pseudorabies virus, PRV)引起的家畜和野生动物的一种重要传染病. PRV 属于疱疹病毒科 α 疱疹病毒属^[1]. PRV 基因组为双股线状 DNA, 大小约为 150 kb, 可以编码 100 多种蛋白质, 目前 PRV 基因组的 90% 已经被测序, 其中 UL 区被测序的基因有 gB、gC、gH、gK、gL、gM、gN、TK 等基因, US 区已经全部被测序, 定位的基因有 gD、gE、gG、gI、蛋白激酶(PK)基因、11 kD 和 28 kD 蛋白基因^[2,3]. PRV 的毒力是由多个基因决定的, 虽然 PK 基因的毒力机制还没有阐明, 但 PK 基因缺失后毒力的下降充分说明了 PK 基因确实是 PRV 众多毒力基因中的一个, 而且 PK 基因缺失后不影响 PRV 的免疫力^[4,5]. gG 是 PRV 的主要糖蛋白之一, 也是 PRV 的非必需蛋白, 将这类非必需基因缺失或插入失活所获得的突变株具有与野毒株相似的生物学特性, 但不能表达相应的蛋白质. 在临床上用这些缺失病毒株生产疫苗免疫猪, 结合 ELISA 检测, 就能将野毒自然感染猪和疫苗免疫猪区分开, 从而为逐步淘汰自然感染的血清学阳性猪, 建立健康猪群, 并最终根除和消灭此病成为可能^[6]. 绿色荧光蛋白(green fluorescent protein, GFP)是近年来发展起来的一种新的报告分子, 它以具有活体、实时表达; 无需另外增加底物或辅助因子协助指示; 检测方便等优点

而被广泛应用于分子生物学研究领域. EGFP 是在 GFP 基础上发展起来的一种增强型标记基因, 而且更加适于在哺乳动物中表达^[7,8]. 本试验旨在利用 GFP 作为筛选标记基因来构建 PRV 的 PK/gG 基因缺失疫苗株.

1 材料与方法

1.1 病毒、细胞系

PRV HB 株为华南农业大学兽医学院传染病教研室保存; BHK-21 细胞购自中国(武汉)典型物培养中心.

1.2 质粒和菌株

质粒 pPKgGD 为作者构建^[9]; pEGFP-C1 由南京农业大学动物医学院陈溥言教授惠赠; 菌株 DH5 α 由华南农业大学兽医学院传染病实验室保存.

1.3 工具酶与试剂

*Bam*HI、*Eco*RI、*Xho*I 等限制性内切酶, Klenow 大片段, 小牛碱性磷酸酶(CIAP)以及 T4 DNA 连接酶均为 TAKARA 公司产品; DNA 回收试剂盒为上海生工产品; 脂质体 DOSPER Liposomal Transfection Regent 为德国 BOEHRNER MANNHEIM 公司产品.

1.4 含 GFP 基因的重组质粒载体的构建

用 *Xho*I 酶消化质粒 pPKgGD, 用 Klenow 补平并

去磷酸化,同时用 *Apal*I 和 *Mlu*I 酶消化质粒 pEGFP-C1,用回收试剂盒回收大小为 2 000 bp 的片段,用 Klenow 补平,与经处理的 pPKgGD 在 16 °C 连接,转化新鲜制备的 DH5 α 感受态细胞,涂于含 Amp⁺ 的 LB 平板,扩增培养后,碱裂解法提取质粒,然后进行 PCR 和酶切鉴定.阳性克隆命名为 KGDF.

1.5 GFP 基因的鉴定

1.5.1 引物的设计与合成 根据质粒 pEGFP-C1 中 EGFP 的序列 (Genbank Accession NO, U55763) 设计 1 对引物.引物 1: 5' - CGTGTGACCT-GATTCTGTGGATAACG-3'; 引物 2: 5' - CCGCTC-GAGGGACAAACCACAACACTAGA-3'.

1.5.2 PCR 扩增 PCR 扩增以质粒 pEGFP-C1 为模板,加入引物、PCR Buffer、Mg²⁺、dNTP、*Taq* 酶等组分,反应条件为: 94 °C 预变性 7 min,循环参数为 94 °C 1 min, 61 °C 1 min, 72 °C 2.5 min, 35 个循环后 72 °C 延伸 10 min,扩增产物用 0.008 g/mL 琼脂糖凝胶电泳检测.

重组载体 pPKgGD-GFP 用 *Bam*HI、*Bgl*II 进行酶切鉴定.

1.6 转染与共转染

病毒基因组的提取参考文献[9]方法进行.碱裂解法大量提取质粒 KGDF,PEG 纯化、酚、氯仿抽提数次、RNase 充分消化以对质粒进行纯化. BHK-21 细胞以 2 \times 10⁵ 孔⁻¹接种 35 mm 平皿,待细胞长至约 80% 融合时取质粒 KGDF 5 μ g,脂质体法进行转染.共转染时在转染前 1 h 接 PRV HB 株 10 个 PFU 进行孵育或取纯化的基因组 DNA 1 μ g 和重组质粒进行共转染.转染方法按脂质体说明书进行.

2 结果

2.1 重组转移载体的鉴定

重组质粒 KGDF 用 *Bgl*III 单酶切后得到 1 条大小约为 6 700 bp 的 DNA 条带;用 *Bam*HI 酶切后得到大小分别为 900 bp 和 5 800 bp 的条带;重组转移质粒 KGDF 经 PCR 扩增后得到 1 条大小约为 1 700 bp 的特异性条带.均符合预期结果.以上所有鉴定证明转移载体的构建是正确的(图 1,见封三).

2.2 重组病毒的鉴定

2.2.1 荧光鉴定 KGDF 单独或与病毒基因组(或病毒)进行共转染,4 h 后在荧光显微镜下观察,均可以看到淡绿色的单个细胞中发出的荧光,但单独转染重组载体的荧光细胞数远远少于共转染的有荧光的细胞数.

2.2.2 重组病毒 GFP 基因的鉴定 取转染后的第 2 代重组病毒提取基因组做模板,用 EGFP 的 PCR 条件进行 EGFP 的扩增,0.008 g/mL 琼脂糖电泳得到 1 条约 1 700 bp 的特异性条带,以没有转染的细胞提取 DNA 做模板作为阴性对照,质粒 EGFP-C1 质粒作为阳性对照,阴性对照没有条带出现(图 2,见封三).

2.2.3 重组病毒分离和纯化 仔细连续观察共转染细胞中的荧光斑,等出现的病变和荧光斑相吻合时刮下有荧光的细胞,反复冻融 3 次后稀释 1 000 倍接种新长满的 Vero 细胞,接毒后仍能观察到荧光(图 3,见封三).如此反复纯化 3 次.

3 分析与讨论

基因缺失标记疫苗在世界各国猪的伪狂犬病根除计划中发挥了巨大作用.研究已经表明 PK 和 gG 基因缺失后不影响 PRV 的免疫原性,而且还可以通过缺失的糖蛋白对野毒感染猪和疫苗免疫猪进行区分^[10].本试验旨在探索以 GFP 作为筛选标记来筛选 PK 和 gG 基因双缺失的疫苗株的可能性.本试验在引物设计时缺失了 PK 基因中 474 个编码 158 个氨基酸的核苷酸、PK 和 gG 之间 65 个核苷酸的间隔序列以及 gG 中包括起始密码子在内编码 392 个氨基酸的 1 176 个核苷酸序列共 1 715 个核苷酸序列的片段,而且中间又插入了 GFP 基因,这样就保证了 PK 和 gG 基因的失活^[11].GFP 作为筛选标记或体外病毒复制及体内病毒跟踪标记已经有诸多成功的验证^[7,12],本试验将 GFP 基因插入到 PK 和 gG 中通过与基因组或病毒共转染在细胞中得到了表达,在荧光显微镜下可以观察到明亮的绿色荧光.虽然只转染重组质粒的阴性对照也能看到荧光,但相同的平皿荧光数量明显的比共转染平皿中少得多;而且只转染重组质粒的荧光一般在转染后 72 h 后荧光就变弱甚至消失,而只有与基因组发生重组后由于病毒的繁殖荧光才能持续表达,作者做了多次转染都观察到了这种现象.而且重组病毒提取基因组后用 PCR 方法能将 GFP 的基因扩增出来,进一步说明了 GFP 基因已经得到了表达并且重组病毒已经繁殖.这些都为我国猪伪狂犬病的根除奠定了基础.

参考文献:

- [1] 殷震,刘景华.动物病毒学[M].第3版.北京:中国农业出版社,2001.411-483.
- [2] 姜高明,费恩阁,杜伟贤.PRV 分子生物学研究进展[J].预防兽医学进展,1999,1(4):9-13.

- [3] 魏才文. 伪狂犬病毒蛋白在毒力、致病机理及传染中的作用[J]. 中国兽药杂志, 1999, 33(1): 49-52.
- [4] KIMMAN T G, WIND N, OEF-LIE N, et al. Contribution of single genes within the unique short region of Aujeszky's disease virus (suid herpesvirus type 1) to virulence, pathogenesis and immunogenicity[J]. Journal of General Virology, 1992, 73: 243-251.
- [5] KIMMAN T G, WIND N, BRUIN T, et al. Inactivation of glycoprotein gE and Thymidine kinase or the US3-encoded protein kinase synergistically decrease *in vivo* replication of pseudorabies virus and the induction of protective immunity [J]. Virology, 1994, 205: 511-518.
- [6] 周富春, 陈焕春, 方六荣, 等. 伪狂犬病病毒鄂A株 gG/LacZ+ 突变株的构建[J]. 畜牧兽医学报, 2001, 32(2): 129-133.
- [7] CHALFIE M, TU Y, EUSKIRCHEN G, et al. Green fluorescent proteins as a marker for green protein[J]. Science, 1994, 263(1): 802-805.
- [8] 杨红宇, 增耀英, 曹艳英, 等. 穿梭质粒 pEGFP-CMV 启动子重组体的构建[J]. 暨南大学学报(医学版), 2000, 21(2): 12-17.
- [9] 罗满林, 黄毓茂, 刘镇明, 等. 伪狂犬病毒 gG-gD 基因片段的扩增及克隆和序列测定[J]. 中国兽医科技, 2001, 31(8): 3-5.
- [10] 闽平, 张楚瑜, 潘兹书. 伪狂犬病病毒蛋白 G 基因的结构分析及其原核表达[J]. 中国病毒学, 2002, 17(2): 166-171.
- [11] THOMAS J R, JAMES G T, GRAHAM W L, et al. Mapping and sequence of the gene for the pseudorabies virus glycoprotein which accumulates in the medium of infected cells [J]. J Virology, 1985, 54(1): 21-29.
- [12] JONS A, THOMAS C, METTENLEITER. Green fluorescent expressed by recombinant pseudorabies virus as an *in vivo* marker for viral replication[J]. Journal of Virological Methods 1997, 66: 283-292.

The Construction and Expression of PRV PK/ gG/ GFP Recombinant Transfer Vector

LUO Man-lin¹, BU Chun-ling¹, CHEN Pu-yan², XU Gang³, LIU Zhen-ming¹

(1 College of Veterinary Medicine, South China Agric. Univ., Guangzhou 510642 China;

2 College of Animal Medicine, Nanjing Agric. Univ., Nanjing 210095, China;

3 Rongchang College of South West Agric. Univ., 402460, China)

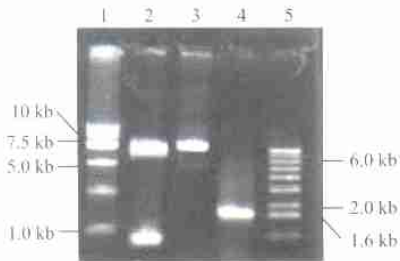
Abstract: A transfer plasmid, KGDF was constructed from the plasmids containing part PK and gG genes. A report gene expression cassette, GFP containing a multicloning sites, was inserted bluntly into pPKgGD to construct a recombinant transfer vector, KGDF. That KGDF was constructed correctly was proven by restriction digestion and PCR analysis of GFP. KGDF was used to co-transfect BHK-21 cell together with the genome or the virus of PRV HB, and the recombinant virus with green fluorescence was picked using fluorescent microscope. The recombinant virus was further identified and purified using PCR of the gene GFP and pickup from the fluorescent cells.

Key words: pseudorabies virus; recombinant virus; PK/gG/GFP deleted strain; green fluorescent protein(GFP)

【责任编辑 柴焰】

罗满林等: 伪狂犬病毒PK/gG/GFP重组转移载体的构建和表达

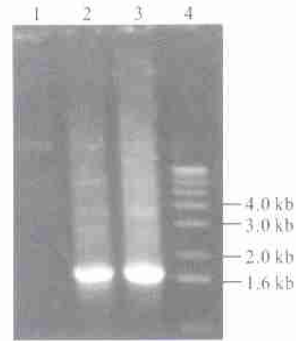
LUO Man-lin et al: The Construction and Expression of PRV
PK/gG/GFP Recombinant Transfer Vector



1: 1.5 kb 分子量标记; 2: KGDF 的 *Bam*HI 酶切产物;
3: KGDF 的 *Bgl*II 酶切产物; 4: KGDF 的 GFP PCR 扩增产物;
5: 1 kb 分子量标记
1: 1.5 kb Marker; 2: products of KGDF cut by *Bam*HI;
3: products of KGDF cut by *Bgl*II; 4: GFP PCR products of KGDF;
5: 1 kb Marker

图 1 KGDF 的酶切鉴定

Fig.1 Enzyme analysis of KGDF



1: 细胞基因组中 GFP PCR 的阴性对照;
2: 重组病毒基因组 GFP 的 PCR 产物;
3: 质粒 EGFP-C1 的 GFP PCR 阳性对照;
4: 1 kb 分子量标记
1: PCR of GFP negative control cell genome;
2: PCR products of recombinant virus genome;
3: PCR of positive control plasmid EGFP-C1;
4: 1 kb Marker

图 2 重组病毒基因组中 GFP 的 PCR 扩增产物

Fig.2 PCR products of GFP of recombinant virus



图 3 转移载体和 PRV 基因组共转染细胞后的荧光观察 (10×20)

Fig.3 Photomicrographs of fluorescent cells co-transfected with transfer vector and PRV genome