

doi:10.11751/ISSN.1002-1280.2018.05.05

表达猪瘟 E2 基因的重组伪狂犬病毒 构建及其生物学特性分析

韩 爽,陈晓春,邓 永,吴华伟,曹明慧,李俊平*,夏业才*

(中国兽医药品监察所,北京 100081)

[收稿日期] 2018-02-09 [文献标识码] A [文章编号] 1002-1280 (2018) 05-0029-09 [中图分类号] S852.65

[摘 要] 以构建的 TK、gI、gE、US9、部分 gN 基因缺失的绿色荧光标记猪伪狂犬病毒 rPRV-BE 为亲本株,通过同源重组构建了表达猪瘟病毒(CSFV C 株)主要免疫原性基因 E2 的重组伪狂犬病毒 rPRV-CSFV PE2SC。经 PCR、间接免疫荧光试验(IFA)鉴定证实构建正确,并能成功表达 E2 蛋白。同时,对重组病毒在 PK15 细胞中的遗传稳定性、增殖特性等进行了研究,结果显示第 5、10、15、20 代重组病毒经 PCR 均能扩增出与原代重组病毒相同大小的约为 3469 bp 含猪瘟病毒 E2 基因的重组片段;第 20 代重组病毒感染细胞孔中出现明显的针对 E2 蛋白的荧光,表明重组病毒在体外连续传 20 代后仍能稳定遗传。一步生长曲线测定结果表明,与野毒 PRV(SX 株)、亲本毒 rPRV-BE 相比,重组病毒 rPRV-CSFV PE2SC 前期增殖速度较快,病毒滴度到达峰值的时间早,峰值病毒滴度低于野毒,与亲本毒相当,最高病毒滴度依次为 $10^{6.7}$ TCID₅₀/mL、 $10^{8.0}$ TCID₅₀/mL、 $10^{7.0}$ TCID₅₀/mL。结果显示构建的重组病毒具有良好的遗传稳定性及体外复制能力,为进一步对其免疫效果的评价以及 PRV 基因缺失重组疫苗的研制奠定基础。

[关键词] 伪狂犬病毒;猪瘟病毒;基因缺失;同源重组;生物学特性

Construction of Recombinant Pseudorabies Virus (PRV) Expressing E2 Gene of Classical Swine Fever Virus (CSFV) and Analysis of Its Biological Characteristics

HAN Shuang, CHEN Xiao-chun, DENG Yong, WU Hua-wei, CAO Ming-hui, LI Jun-ping*, XIA Ye-cai*

(China Institute of Veterinary Drug Control, Beijing 100081, China)

Corresponding authors: LI Jun-ping, E-mail: xiayecai@ivdc.org.cn; XIA Ye-cai, E-mail: lijunping03@163.com

Abstract: Based on one TK、gI、gE、US9 and partial gN gene deletion and green fluorescent labeling strain rPRV-BE, the recombinant pseudorabies virus rPRV-CSFV PE2SC, which expressed the major immunogenicity gene E2 of the classical swine fever virus (CSFV C strain) was constructed by homologous recombination. Through

基金项目: 中国兽医药品监察所所级课题(201601)

作者简介: 韩 爽,硕士研究生,从事猪病毒学及兽用生物制品学研究。

通讯作者: 夏业才, E-mail: xiayecai@ivdc.org.cn; 李俊平, E-mail: lijunping03@163.com

PCR and indirect immunofluorescent assay (IFA), it was proved that the construction was correct and the E2 protein could be expressed successfully. At the same time, the genetic stability and proliferation of rPRV-CSFV PE2SC in PK15 cells were detected. The results showed that the amplified fragment, which containing E2 gene of CSFV, was about 3469 bp of the 5th、10th、15th、20th generation recombinant virus by PCR. The length of the amplified fragment is the same as recombinant virus rPRV-CSFV PE2SC amplified with the same primer pairs. What's more, obvious fluorescence pointed to E2 protein was observed in the 20th generation recombinant virus infected cells, which showed that the recombinant virus has good genetic stability after 20 generations in vitro. One step growth curve showed that compared with wild strain (PRV SX) and parental strain (rPRV-BE), the proliferation of recombinant virus was faster at first and virus titer reached to peak value earlier. The titer of recombinant virus was lower than that of wild virus and equivalent to the parent one. The titer of three virus strains were $10^{6.7}$ TCID₅₀/mL、 $10^{8.0}$ TCID₅₀/mL、 $10^{7.0}$ TCID₅₀/mL in turn. The results showed that the recombinant virus rPRV-CSFV PE2SC has good genetic stability and proliferation ability in vitro, which lays a foundation for further evaluation of its immunogenicity and the development of PRV gene deletion recombinant vaccine.

Key words: pseudorabies virus (PRV); classical swine fever virus (CSFV); gene deletion; homologous recombination; biological characteristics

猪瘟(Classical swine fever, CSF)作为世界动物卫生组织(OIE)规定必须报告的疫病,对世界养猪业造成极大危害,是养猪业防控的重要疾病^[1]。因此,涉及猪病防控用新型疫苗的研究非常活跃。E2 囊膜糖蛋白是猪瘟病毒的主要结构蛋白,介导病毒感染,诱导机体产生中和抗体,是重要的保护性抗原^[2]。因此,猪瘟 E2 蛋白是研制新型活载体疫苗、亚单位疫苗及研究猪瘟病毒致病机理的重要靶蛋白。已有研究表明,杆状病毒表达 E2 亚单位灭活疫苗、重组猪瘟 E2 基因的腺病毒活载体疫苗、重组猪瘟 E2 基因的伪狂犬病毒活疫苗均表现出良好的免疫效果^[3-6]。

伪狂犬病(Pseudorabies, PR 或 Aujeszky's disease, AD)是一种由伪狂犬病毒(Pseudorabies virus, PRV)感染引起的急性传染病,可引起仔猪的高死亡率,母猪的繁殖障碍,育肥猪的神经及呼吸系统症状,公猪的种用性能降低或丧失等,对养猪业危害极大^[7]。PRV 基因组为线性双链 DNA,约 145 kb,可编码 70~100 种病毒蛋白,其中含有大量与病毒增殖无关的非必需区可供外源基因的插入,是优良的活病毒载体^[8]。PRV 重组活疫苗对由与载体遗传关系相近的 PRV 强毒引起的 PR 具有良

好的免疫效果。

2011 年以来,一度得到很好控制的猪伪狂犬病在我国又出现广泛流行态势。有研究表明,当前流行毒株与之前的 PRV 毒株相比发生了较大变异,现使用的弱毒疫苗株无法对变异株的感染提供完全保护^[9]。基于 PRV 流行情况的变化,实验以 CSFV(C 株)的主要保护性抗原基因 E2 为目标基因,用一株由 PRV 流行株(SX 株)构建的五基因缺失绿色荧光标记病毒 rPRV-BE^[10]为亲本株,通过同源重组技术构建了表达猪瘟病毒 E2 基因的四基因缺失重组伪狂犬病毒 rPRV-CSFV PE2SC,并对其体外增殖特性进行了初步研究,以期重组病毒的进一步开发应用提供实验基础。

1 材料

1.1 毒株 PRV(SX 株)为中国兽医药品监察所病毒制品检测室人员在 2012 年于山西某猪场分离到的一株高致病性流行毒株;rPRV-BE,是以 PRV(SX 株)为基础构建的 gI、gE、US9、TK 和部分 UL49.5 基因缺失,引入增强型绿色荧光蛋白基因 EGFP 的重组病毒^[10];CSFV(C 株)由中国兽医药品监察所菌种保藏室保存。

1.2 细胞 PK15 细胞,由中国兽医药品监察所保存。

1.3 载体及质粒 pMD18-T 载体购自宝生物工程(大连)有限公司;pEASY-Blunt Simple Cloning Kit 购自北京全式金生物技术有限公司;质粒 pMD-US6-EGFP-US2 由实验室自行制备保存。

1.4 主要试剂 限制性内切酶 *Sbf* I、*Afl* II、*Age* I、*Spe* I、T4 DNA 连接酶购自纽英伦生物技术(北京)有限公司;Top10 感受态细胞、质粒小提试剂盒、质粒小提中量试剂盒购自天根生化科技(北京)有限公司;EX-Taq 酶、2×GC EX-Taq Buffer、dNTPs、One Step RT-PCR Kit 购自宝生物工程(大连)有限公司;CSFV E2 单抗为勃林格公司惠赠;FITC 标记的羊抗鼠 IgG 购自 Sigrma(上海)贸易有限公司;

DNA/RNA 提取试剂盒购自康宁生命科学(吴江)有限公司;KOD FX Neo 购自东洋纺(上海)生物科技有限公司。

1.5 主要仪器设备 二氧化碳培养箱(三洋)、恒温培养箱(三洋)、水浴锅(上海博信)、PCR 仪(Biometra)、电泳仪(Bio-Rad)、荧光倒置显微镜(奥林巴斯)、凝胶成像系统(GOLD-SIM)等。

2 方法

2.1 引物设计与合成 根据 GenBank 上的 PRV 和 CSFV 序列,自行设计合成系列扩增及鉴定引物(表 1),用于扩增左同源臂和 gI 基因、E2 基因以及鉴定重组病毒。

表 1 各片段扩增引物
Tab 1 Sequences of PCR primer pairs

扩增片段 Amplified fragment	引物名称 Name	引物序列(5'-3') Primer sequence	酶切位点 Cutting site	片段长度/bp Fragment length
左同源臂+gI 基因	rUS6F	TCCTGCAGCGCTGACGACGGTCCCCT	<i>Sbf</i> I	2324
	rUS7R2	ACTTAAGGTCTCAACCCCGGTGTGTG	<i>Afl</i> II	
CSFV E2 基因	CSFVrE2Fs	TACCGGTCGCCACCATGTTATTAAGGGGACAGA TCGTGCAAGGTGTGTTGCTAG	<i>Age</i> I	1208
	CSFVrE2R	GACTAGTTTACTTGTACAGCTCGTCCATG	<i>Spe</i> I	
gI 和 gE/EGFP/gI 和 E2	PUS6dF	CGAAGGGGTATCGCCTCCTGG	3550/ 1584/ 3469	
	PUS9bR	GAGGAAGGCTGCTGTGTGCG		

下划线部分为引物酶切位点
The underline part is the enzyme cutting site

2.2 转移质粒 pMD-US6-US7-E2-US2 的构建

2.2.1 CSFV E2 基因扩增 采用 DNA/RNA 提取试剂盒提取 CSFV(C 株)基因组,以其为模板用下游引物 CSFVrE2R 反转录成 cDNA,然后用引物 CSFVrE2Fs/CSFVrE2R 扩增 E2 基因,连接 pEASY-Blunt Simple 克隆载体,构建质粒 pEASY-Blunt-PE2S,测序正确后备用。

2.2.2 左同源臂+gI 基因扩增 采用 DNA/RNA 提取试剂盒提取 PRV(SX 株)基因组,以其为模板,用引物 rUS6F/rUS7R2 扩增左同源臂和 gI 基因,扩增的目的片段连接 pEASY-Blunt Simple 克隆载体,构建重组质粒 pEASY-Blunt-US6-US7,测序正确后备用。

2.2.3 转移质粒构建 质粒 pMD-US6-EGFP-US2 与 pEASY-Blunt-US6-US7 经 *Sbf* I/*Afl* II 双酶切,

回收目的片段后用 T4 连接酶连接,获得转移质粒 pMD-US6-US7-EGFP-US2;再以 *Age* I/*Spe* I 分别双酶切质粒 pEASY-Blunt-PE2S 和 pMD-US6-US7-EGFP-US2,回收相应片段后用 T4 连接酶连接,最终获得转移质粒 pMD-US6-US7-E2-US2(构建示意图见图 1),提取高浓度质粒,备用于转染。

2.3 重组病毒的拯救

2.3.1 同源重组 病毒的同源重组在 24 孔细胞培养板上进行,取 rPRV-BE 病毒液 15 μL,与 3 μg 转移质粒 pMD-US6-US7-E2-US2 采用脂质体法共转染长至 90%左右的 PK15 细胞。转染 24 h 后,观察细胞病变情况,当病变达 80%以上后冻融裂解细胞,裂解液在 PK15 细胞上盲传 3 代,出现无绿色荧光细胞病变即可初步判断重组病毒拯救成功。

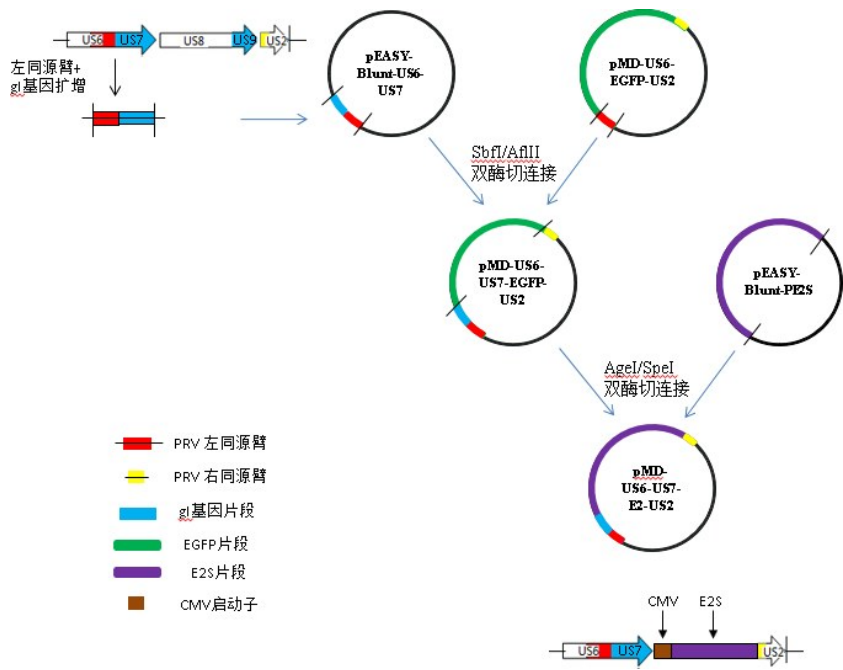


图 1 pMD-US6-US7-E2-US2 转移载体构建示意图
Fig 1 Schematic diagram of transfer carrier construction

2.3.2 重组病毒的筛选 将初步获得的疑似含有 CSFV E2 基因的拯救病毒 rPRV-CSFV PE2SC 病毒液接种已长成良好单层的 PK15 细胞 6 孔细胞板, 吸附 1 h 后, 弃去吸附液, 铺上 1% 的低熔点琼脂糖, 继续培养。接种 48 h 后在荧光显微镜下观察, 挑选无荧光的单个噬斑于 0.5 mL DMEM 营养液中, 震荡混匀后, 继续接种已长成良好单层的 PK15 细胞 6 孔细胞板, 如此纯化 4 次, 将获得的重组病毒命名为 rPRV-CSFV PE2SC。

2.3.3 鉴定

2.3.3.1 基因鉴定 将获得的重组病毒 rPRV-CSFV PE2SC 用 PUS6dF/PUS9bR 引物进行 PCR 鉴定, 同时与野毒 PRV(SX 株)、亲本毒 rPRV-BE 相同鉴定引物扩增结果进行比较。

2.3.3.2 免疫荧光鉴定 用针对 CSFV E2 蛋白的单克隆抗体 (Mab) 进行 IFA 试验, 检测 E2 蛋白表达情况。将重组病毒 rPRV-CSFV PE2SC 接种 PK15 细胞 96 孔细胞板, 待病变达到 80%~90% 时弃掉上清, 经灭菌 PBS 洗细胞 2 次后用 80% 冷丙酮固定, 晾干后加入抗 CSFV E2 的 Mab, 置于湿盒中 37 ℃ 作用 1 h, 再用 PBS 洗涤 3 次后, 加入 FITC 标

记的羊抗鼠 IgG, 再次置于湿盒中 37 ℃ 作用 1 h, 用 PBS 洗涤 3 次后, 置于荧光倒置显微镜下观察。

2.4 重组病毒的遗传稳定性研究 将筛选获得的病毒 rPRV-CSFV PE2SC 在 PK15 细胞上连续传 20 代, 每 5 代提取感染细胞总 DNA, 按步骤 2.3.3.1 的方法进行 PCR 鉴定, 重组病毒 rPRV-CSFV PE2SC、第 20 代重组病毒 rPRV-CSFV PE2SC 按步骤 2.3.3.2 的方法进行 IFA 鉴定。

2.5 重组病毒一步生长曲线测定 将重组病毒 rPRV-CSFV PE2SC、野毒 PRV(SX 株)、亲本毒 rPRV-BE, 以 0.01 MOI 各接种 PK15 细胞 12 瓶, 吸附 1 h, 用含有 2% 胎牛血清的 DMEM 补液后继续培养, 分别在感染后 6、12、18、24、30、36、48、60、72、84、96、108 h 收集感染细胞, 冻融 3 次后收毒, 分别测定三种病毒不同收毒时间的滴度并绘制一步生长曲线。

3 结果

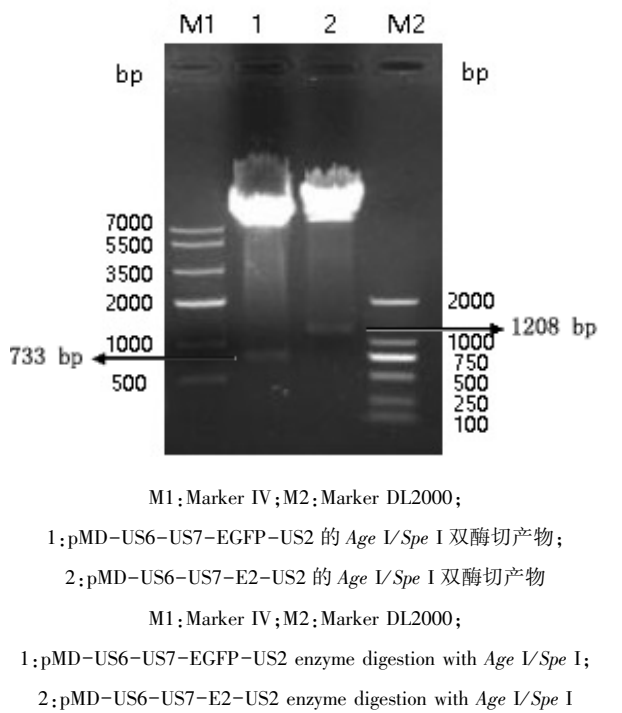
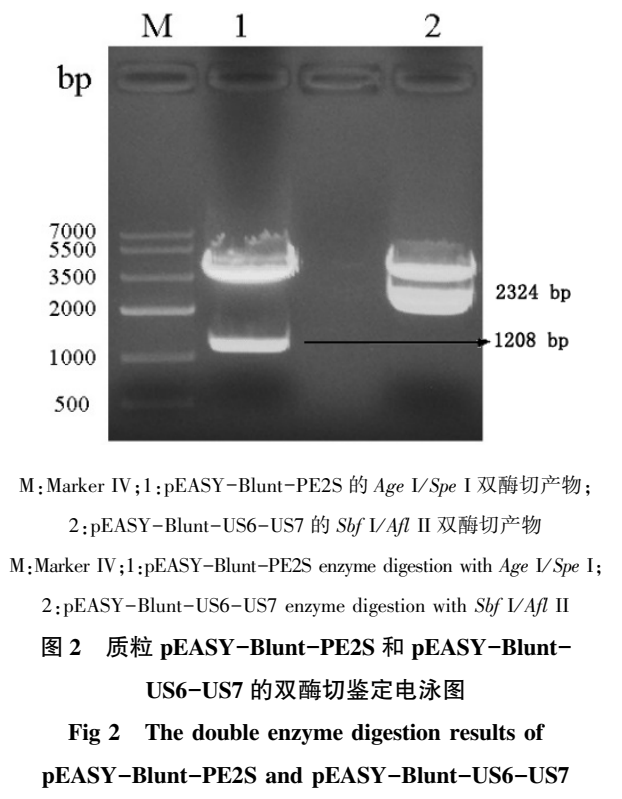
3.1 转移质粒的构建 质粒 pEASY-Blunt-US6-US7 用 *Sbf* I/*Afl* II 双酶切, 切出大小约为 2324 bp 和 3830 bp 的两个片段 (图 2); 质粒 pEASY-Blunt-PE2S 用 *Age* I/*Spe* I 双酶切, 切出大小约为 1208 bp

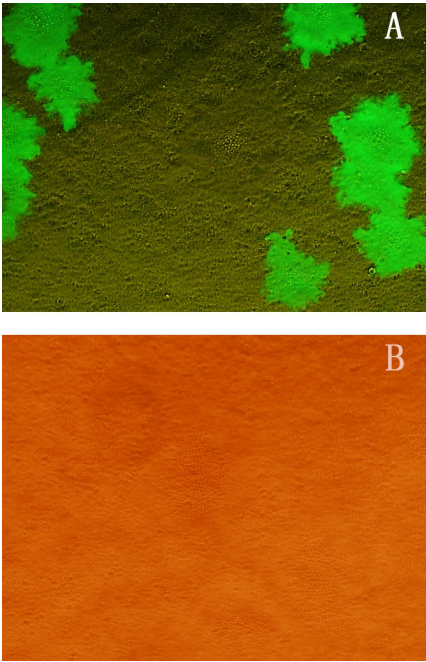
和 3830 bp 的两个片段(图 2),与预期大小一致。经测序,结果与理论序列一致,表明质粒 pEASY-Blunt-US6-US7 和质粒 pEASY-Blunt-PE2S 构建成功。质粒 pMD-US6-US7-EGFP-US2 用 *Age* I/*Spe* I 能切出大小约为 733 bp 和 6852 bp 的两个片段(图 3),引入 CSFV E2 基因构建的质粒 pMD-US6-US7-E2-US2,用 *Age* I/*Spe* I 能切出大小约为 1208 bp 和 6852 bp 的两个片段(图 3)。经测序,结果与理论序列一致,表明转移质粒 pMD-US6-US7-EGFP-US2 和 pMD-US6-US7-E2-US2 构建成功。

3.2 重组病毒的拯救、纯化及鉴定 转染所收细胞裂解液,在 PK15 细胞上盲传 3 代后出现了无绿色荧光细胞病变(图 4A),初步判定重组病毒拯救成功。挑选无荧光的单个噬斑接种于长成良好细胞单层的 PK15 细胞,纯化 4 次后获得重组病毒 rPRV-CSFV PE2SC(图 4B)。用引物 PUS6dF/PUS9bR 进行 PCR 鉴定,rPRV-CSFV PE2SC 扩增到大小约为 3469 bp 的条带,野毒 PRV(SX 株)和亲本毒 rPRV-BE 用相同引物扩增,分别得到大小约为 3550 bp 和 1584 bp 的条带(图 5)。经测序证实,重组病毒缺失了 EGFP 基因,并成功引入了 PRV gI 基因和 CSFV(C 株)E2 基因。

用针对 CSFV E2 蛋白的 MAb 进行 IFA 试验,结果显示,感染重组病毒 rPRV-CSFV PE2SC 的 PK15 细胞孔中出现明显的荧光,而阴性对照组则没有荧光出现(图 6)。

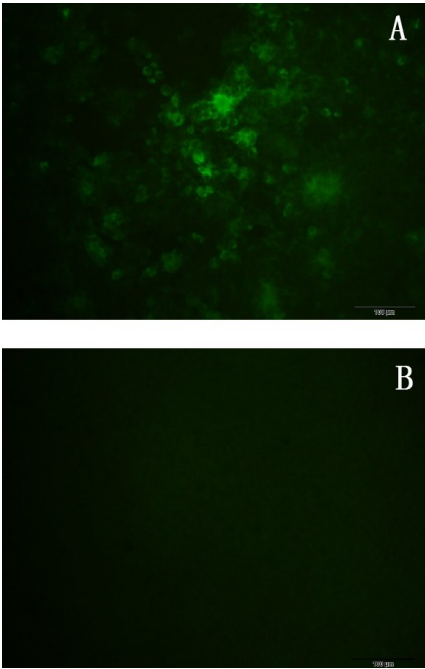
3.3 重组病毒的遗传稳定性 重组病毒 rPRV-CSFV PE2SC 在 PK15 细胞上连续传了 20 代,分别以重组病毒 rPRV-CSFV PE2SC、第 5、10、15、20 代重组病毒 DNA 为模板,用引物 PUS6dF/PUS9bR 进行 PCR 扩增鉴定,结果均扩增出大小约为 3469 bp 的目的片段(图 7)。取重组病毒 rPRV-CSFV PE2SC、第 20 代重组病毒进行免疫荧光鉴定,结果重组病毒 rPRV-CSFV PE2SC、第 20 代重组病毒感染孔中均出现明显的荧光(图 6、8),且荧光亮度相似,表明重组病毒能够稳定遗传。





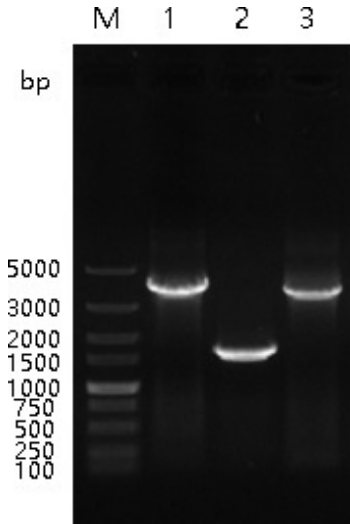
A.盲传出现的无绿色荧光细胞病变;
B.纯化得到的重组病毒 rPRV-CSFV PE2SC
A.Cytopathy without green fluorescence;
B.Purified recombinant virus rPRV-CSFV PE2SC

图 4 筛选到的重组病毒 rPRV-CSFV PE2SC(10×10)
Fig 4 Screened recombinant virus rPRV-CSFV PE2SC(10×10)



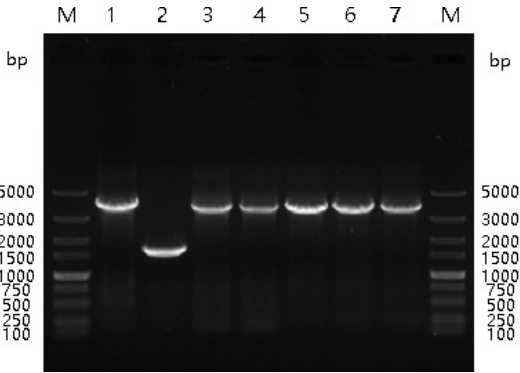
A.纯化后的重组病毒 rPRV-CSFV PE2SC
感染 PK15 细胞;B.阴性对照
A. Purified recombinant virus rPRV-CSFV PE2SC
infected PK15 cells;B. Negative control

图 6 重组病毒 rPRV-CSFV PE2SC 在 PK15 细胞中
E2 蛋白表达的 IFA 检测结果
Fig 6 Detection of E2 expression in PK15 cells infected
with recombinant virus rPRV-CSFV PE2SC by IFA



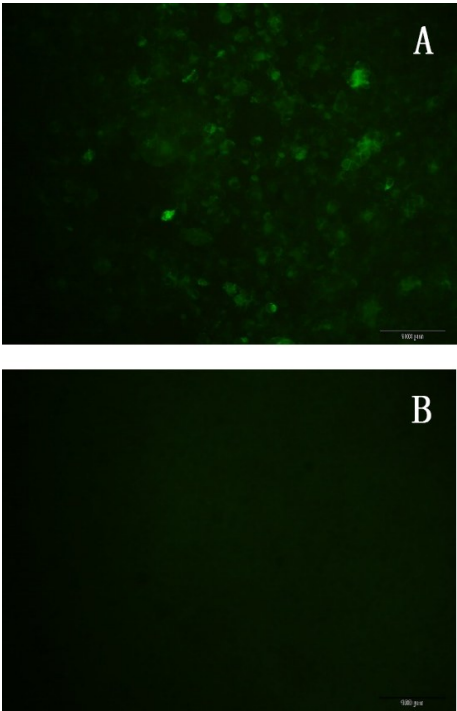
M;Marker DL5000;1:PRV(SX 株);2:rPRV-BE;3:rPRV-CSFV PE2SC

图 5 重组病毒 rPRV-CSFV PE2SC 的
PCR 扩增鉴定电泳图
Fig 5 Identification of recombinant virus
rPRV-CSFV PE2SC by PCR



M;Marker DL5000;1:PRV(SX 株);2:rPRV-BE;
3:rPRV-CSFV PE2SC;4:rPRV-CSFV PE2SC(P5);
5:rPRV-CSFV PE2SC(P10);6:rPRV-CSFV PE2SC(P15);
7:rPRV-CSFV PE2SC(P20)

图 7 重组病毒 rPRV-CSFV PE2SC
各代次 PCR 扩增鉴定电泳图
Fig 7 Identification of several generations of
recombinant virus rPRV-CSFV PE2SC by PCR



A. 纯化后的重组病毒 rPRV-CSFV PE2SC
第 20 代感染 PK15 细胞; B. 阴性对照

A. The 20th generation purified recombinant virus
rPRV-CSFV PE2SC infected PK15 cells; B. Negative control

图 8 第 20 代重组病毒 rPRV-CSFV PE2SC
在 PK15 细胞中 E2 蛋白表达的 IFA 检测结果

Fig 8 Detection of E2 protein expression in PK15 cells
infected with the 20th generation recombinant
virus rPRV-CSFV PE2SC by IFA

3.4 一步生长曲线测定 将重组病毒 rPRV-CSFV PE2SC、野毒 PRV(SX 株)、亲本毒 rPRV-BE 感染 PK15 细胞,6、12、18、24、30、36、48、60、72、84、96、108 h 后所收病毒液分别进行病毒滴度测定,绘制了一步生长曲线(图 9)。结果表明,重组病毒 rPRV-CSFV PE2SC 在细胞内增殖速度较快,接种后 6 h 滴度达 $10^{1.7}$ TCID₅₀/mL,而且接种 18 h 之前滴度一直高于另外两株毒,病毒滴度到达平台期时间较快;最高滴度出现时间三株毒都在 72 h,之后重组病毒 rPRV-CSFV PE2SC 的滴度开始下降,其最高滴度($10^{6.7}$ TCID₅₀/mL)低于野毒 PRV(SX 株)的 $10^{8.0}$ TCID₅₀/mL,与亲本毒 rPRV-BE ($10^{7.0}$ TCID₅₀/mL)相近,到达平台后滴度下降比另外两株病毒快。

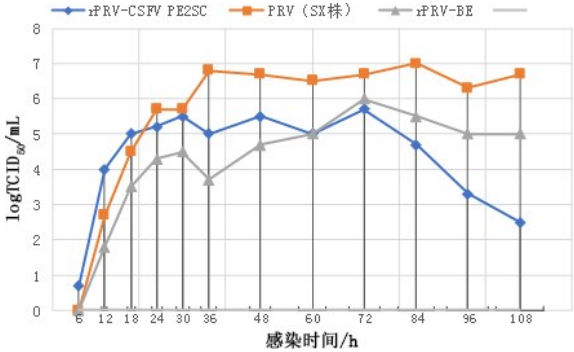


图 9 重组病毒 rPRV-CSFV PE2SC 及野毒 PRV(SX 株)、
亲本毒 rPRV-BE 感染 PK15 细胞的一步生长曲线
Fig 9 One step growth curve of recombinant virus
rPRV-CSFV PE2SC, wild strain(PRV SX) and
parental strain(rPRV-BE)

4 讨论

基因缺失的伪狂犬病毒因其具备安全性好、基因组容量大、培养简单、免疫期长、宿主范围广等优点,作为病毒载体极具开发潜力^[11]。同时,随着对伪狂犬病毒基础研究的逐步深入,其作为重组表达载体的类型也越来越丰富。目前,已有猪繁殖与呼吸综合征病毒(PRRSV) GP5 基因^[12]、乙型脑炎病毒(JEV) NS1 基因^[13]、H3N2 亚型猪流感病毒(SIV) HA 基因^[14]、犬瘟热病毒(CDV) H 基因^[15]、猪细小病毒(PPV) VP2 基因和猪圆环病毒 2 型(PCV2) ORF2 基因^[16]等多种外源基因在伪狂犬病毒中获得高效表达。

猪瘟发病率和死亡率较高,对养猪业危害很大,该病和伪狂犬病是目前威胁我国养猪业健康发展的两种主要传染病,如果防控不好,能够造成严重的经济损失。因此,开发一种安全有效的二价疫苗同时预防猪瘟和伪狂犬病两种疾病,在实际生产中具有重要意义。Hoof 等^[17]于 1996 年构建了表达猪瘟病毒囊膜蛋白 E1 的重组伪狂犬病毒二联基因工程疫苗 M402,该疫苗免疫猪后,能同时低抗 CSFV 和 PRV 的强毒攻击,展示了以基因缺失型伪狂犬病毒作为活病毒载体构建重组疫苗的良好前景。除 E1 外,猪瘟病毒主要保护性抗原基因 E2 也是构建重组病毒时优先考虑的基因。重组猪瘟 E2 基因的伪狂犬病毒 rPRVTJ-delgE/gI-E2、rPRVTJ-delgE/gI/TK-E2、SA215(A)等^[18-20],均

表现出良好的免疫原性。

gI、gE 和 TK 基因已被证实与 PRV 致病性有关,是构建 PRV 缺失株的主要靶基因,gI、gE 双基因缺失疫苗^[18],gI、gE 和 TK 三基因缺失疫苗^[19-20]已广泛使用。近年来,对疱疹病毒的研究结果表明,US9 形成 KIF1A-US9 复合物,介导病毒在神经细胞中的顺行传导过程^[21-23],US9 基因的缺失能降低 PRV 的毒力;UL49.5 基因编码囊膜蛋白 gN,gN 能抑制 TAP 介导的多肽往内质网的转运,从而阻断 MHC I 类复合体的装配,下调其在细胞表面的表达,从而使病毒有可能逃避宿主 CD8⁺ T 细胞的识别。1 型牛疱疹病毒(BHV-1) UL49.5 胞质尾缺失和胞外域 30~40aa 部分缺失能增强病毒侵染宿主的能力,诱导更强的细胞免疫和体液免疫^[24],在疫苗研制方面更具优势,为伪狂犬病毒缺失株的构建提供了新思路。同时,gI、gE 都属于糖蛋白,可以产生中和抗体,保留 gI 有助于提高 PRV 的免疫原性。因此,兼顾降低 PRV 的致病性、提高 PRV 免疫原性和保证目的基因的高效表达,构建成功了 TK、gE、US9 全基因缺失及部分 gN 基因缺失,表达猪瘟疫病毒(CSFV C 株) E2 蛋白的重组伪狂犬病毒 rPRV-CSFV PE2SC。

重组病毒 rPRV-CSFV PE2SC 在 PK15 细胞传 20 代后,PCR 及 IFA 检测其插入和缺失不变,该结果与周国辉等^[14]构建的表达 H3N2 亚型猪流感病毒 HA 基因的重组伪狂犬病毒 rPRV-HA,Lei 等^[19]构建的重组病毒 rPRVTJ-delgE/gI/TK-E2 株的研究结果一致,表明这种插入和缺失是稳定的。重组病毒能在 PK15 细胞中快速增殖,到达平台期时间早,病毒滴度峰值可达 $10^{6.7}$ TCID₅₀/mL,与方六荣等^[12]构建的表达猪繁殖与呼吸综合征病毒(PRRSV) GP5 的重组伪狂犬病毒 TK⁻/gG⁻/GP5⁺ 株($10^{7.2}$ TCID₅₀/mL),Wang 等^[18]构建的 rPRVTJ-delgE/gI-E2 株($10^{7.0}$ TCID₅₀/mL)的实验结果相近。而且重组病毒 rPRV-CSFV PE2SC 最高滴度与亲本毒 rPRV-BE 相近,低于野毒 PRV(SX 株)的实验结果与 Wang 等^[18]构建的 rPRVTJ-delgE/gI-E2 株的实验结果相一致。因此,用伪狂犬病毒作为载体构建含有猪瘟疫 E2 基因的重组活载体疫苗株,在理论和实践上均是可行的。研究结果为表达猪瘟疫 E2 基因重组伪狂犬病毒 rPRV-CSFV PE2SC

的进一步开发应用提供了依据。

除此之外,基因缺失的疫苗株免疫动物后,不产生针对缺失蛋白的抗体;重组疫苗只产生针对重组 CSFV E2 蛋白的抗体,不会产生针对 CSFV 其他蛋白的抗体,所以可以通过血清学的方法将疫苗免疫猪和野毒感染猪加以区分^[25],可为 CSFV 和 PRV 根除计划的实施提供技术保障。

参考文献:

- [1] 王 琴. 猪瘟疫病毒流行病学、病原致病特性及猪瘟疫综合防控研究[J]. 中国农业科技导报,2006,8(5):13-18.
Wang Q. Epidemiology, characterization of pathogenicity of classical swine fever virus and control strategies of classical swine fever[J]. Review of China Agricultural Science and Technology, 2006,8(5):13-18.
- [2] Wang Z, Nie Y, Wang P, *et al.* Characterization of classical swine fever virus entry by using pseudotyped viruses: E1 and E2 are sufficient to mediate viral entry [J]. Virology, 2004, 330(1): 332-341.
- [3] 张文杰,李向东,赵铁柱,等. 猪瘟疫病毒 E2 基因在昆虫细胞/杆状病毒中的表达[J]. 中国实验动物学报,2007(1):30-34.
Zhang W J, Li X D, Zhao T Z, *et al.* Expression of E2 gene of classical swine fever virus in insect cell/baculovirus expression system[J]. Acta Lab Anim Sci Sin, 2007(1):30-34.
- [4] 范学政,王 琴,陈振海,等. 绿色荧光蛋白基因与猪瘟疫化弱毒疫苗株 E2 基因在杆状病毒中的融合表达[J]. 中国兽医学报,2005(6):6-8.
Fan X Z, Wang Q, Chen Z H, *et al.* Fusion expression of GFP and HCLV E2 gene in baculovirus system[J]. Chin J Vet Sci, 2005(6):6-8.
- [5] 何 雷,张彦明,徐彦召,等. 共表达猪瘟疫病毒 E2 基因和猪白细胞介素 2 基因的重组腺病毒的构建及其免疫原性研究[J]. 病毒学报,2010,26(5):385-391.
He L, Zhang Y M, Xu Y Z, *et al.* Construction and immunogenicity of a recombinant adenovirus co-expressing the E2 protein of classical swine fever virus and the porcine interleukin 2 in rabbits[J]. Chinese Journal of Virology, 2010,26(5):385-391.
- [6] 孙 元,祁巧芬,梁冰冰,等. 表达猪瘟疫病毒 E2 蛋白的重组腺病毒的构建及其在兔体内的免疫原性分析[J]. 生物工程学报,2008(10):1734-1739.
Sun Y, Qi Q F, Liang B B, *et al.* Generation and immunogenicity of a recombinant adenovirus expressing the E2 protein of classical swine fever virus in rabbits[J]. Chinese Journal of Biotechnology, 2008(10):1734-1739.
- [7] 陆承平,黄青云,吴 润,等. 兽医微生物学[M]. 4 版. 北京:中国农业出版社,2007.
Lu C P, Huang Q Y, Wu R, *et al.* Veterinary Microbiology[M].

- 4th edition. Beijing: China Agricultural Press, 2007.
- [8] Tian Z, Zhou G, Zheng B, *et al.* A recombinant pseudorabies virus encoding the HA gene from H3N2 subtype swine influenza virus protects mice from virulent challenge[J]. *Vet Immunol Immunopathology*, 2006, 111(3/4): 211–218.
- [9] An T Q, Peng J M, Tian Z J, *et al.* Pseudorabies virus variant in Bartha-K61–vaccinated pigs, China, 2012[J]. *Emerging Infectious Diseases*, 2013, 19(11): 1749–1755.
- [10] 李俊平. 伪狂犬病病毒双荧光标记 5 基因缺失株的构建[P]. 中国: CN105385666A, 2016–03–09.
- Li J P. Construction of a 5 genes deletion and double fluorescent labeling pseudorabies virus [P]. China: CN105385666A, 2016–03–09.
- [11] 陈焕春, 何启盖. 伪狂犬病[M]. 北京: 中国农业出版社, 2015: 225–229.
- Chen H C, He Q G. Pseudorabies[M]. Beijing: China Agricultural Press, 2015: 225–229.
- [12] 方六荣, 肖少波, 江云波, 等. 表达猪繁殖与呼吸综合征病毒 (PRRSV) GP5 的重组伪狂犬病病毒 TK⁻/gG⁻/GP5⁺ 的构建及其生物学特性初步探讨[J]. *病毒学报*, 2004, 20(3): 249–254.
- Fang L R, Xiao S B, Jiang Y B, *et al.* Construction of the recombinant pseudorabies virus TK⁻/gG⁻/GP5⁺ expressing GP5 of porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV) and the preliminary study on its biological characterization[J]. *Chinese Journal of Virology*, 2004, 20(3): 249–254.
- [13] Xu G, Xu X, Chen H C. Construction of recombinant pseudorabies virus expressing NS1 protein of Japanese encephalitis (SA14–14–2) virus and its safety and immunogenicity[J]. *Vaccine*, 2004, 22(15/16): 1846–1853.
- [14] 周国辉, 倪健强, 田志军, 等. 表达 H3N2 亚型猪流感病毒 HA 基因重组伪狂犬病病毒的构建[J]. *畜牧兽医学报*, 2005(10): 1043–1048.
- Zhou G H, Ni J Q, Tian Z J, *et al.* Construction of a recombinant pseudorabies virus expressing the HA gene of H3N2 subtype swine influenza virus[J]. *Acta Veterinaria et Zootechnica Sinica*, 2005(10): 1043–1048.
- [15] 李业伟, 孙程龙, 韩乃君, 等. 表达犬瘟热 H 基因重组伪狂犬病毒的构建及生物学特性研究[J]. *安徽农业科学*, 2011, 39(24): 14899–14901, 14974.
- Li Y W, Sun C L, Han N J, *et al.* Construction of recombinant pseudorabies virus expressing canine distemper virus H gene and analysis on its biological characters[J]. *Anhui Agricultural Science*, 2011, 39(24): 14899–14901, 14974.
- [16] 徐志文, 郭万柱, 陈 杨, 等. 联合表达 PPV VP2 和 PCV2 ORF2 基因的重组 PRV 的构建[J]. *中国兽医科学*, 2009, 39(10): 873–879.
- Xu Z W, Guo W Z, Chen Y, *et al.* Construction of recombinant pseudorabies virus co-expressing ORF2 gene of porcine circovirus type 2 and VP2 gene of porcine parvovirus[J]. *Chinese Veterinary Science*, 2009, 39(10): 873–879.
- [17] Hooft van Iddekinge B J, de Wind N, Wensvoort G, *et al.* Comparison of the protective efficacy of recombinant pseudorabies viruses against pseudorabies and classical swine fever in pigs; influence of different promoters on gene expression and on protection[J]. *Vaccine*, 1996, 14(1): 6–12.
- [18] Wang Y M, Yuan J, Cong X, *et al.* Generation and efficacy evaluation of a recombinant pseudorabies virus variant expressing the E2 protein of classical swine fever virus in pigs[J]. *Clinical and Vaccine Immunology*, 2015, 22(10): 1121–1129.
- [19] Lei J L, Xia S L, Wang Y, *et al.* Safety and immunogenicity of a gE/gI/TK gene-deleted pseudorabies virus variant expressing the E2 protein of classical swine fever virus in pigs[J]. *Immunol Lett*, 2016, 174(1): 64–71.
- [20] 徐志文, 郭万柱, 朱 玲, 等. 猪瘟伪狂犬病重组病毒 SA215 (A) 株的构建及生物学特性研究[J]. *畜牧兽医学报*, 2005, 36(10): 1033–1037.
- Xu Z W, Guo W Z, Zhu L, *et al.* Construction and characterization analysis of the recombinant virus SA215(A) strain of pseudorabies virus hog cholera virus[J]. *Acta Veterinaria et Zootechnica Sinica*, 2005, 36(10): 1033–1037.
- [21] Kratchmarov R, Kramer T, Greco T M, *et al.* Glycoproteins gE and gI are required for efficient KIF1A-dependent anterograde axonal transport of alpha herpesvirus particles in neurons[J]. *Virology*, 2013, 87(17): 9431–9440.
- [22] Gu Z, Dong J, Wang J, *et al.* A novel inactivated gE/gI deleted pseudorabies virus (PRV) vaccine completely protects pigs from an emerged variant PRV challenge [J]. *Virus Research*, 2015, 195: 57–63.
- [23] Lyman M G, Feierbach B, Curanovic D, *et al.* Pseudorabies virus Us9 directs axonal sorting of viral capsids[J]. *Journal of Virology*, 2007, 81(20): 11363–11371.
- [24] Wei H, Wang Y, Chowdhury S I. Bovine herpesvirus type 1 (BHV-1) UL49.5 luminal domain residues 30 to 32 are critical for MHC-I down-regulation in virus-infected cells[J]. *PLoS One*, 2011, 6(10): 257–264.
- [25] Kimman T G, de Leeuw O, Kochan G, *et al.* An indirect double-antibody sandwich enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) using baculovirus-expressed antigen for the detection of antibodies to glycoprotein E of pseudorabies virus and comparison of the method with blocking ELISAs[J]. *Clin Diagn Lab Immunol*, 1996, 3(2): 167–174.