

doi:10.11751/ISSN.1002-1280.2018.11.04

伪狂犬病毒 5 基因缺失株体外重组 获得缺失基因的研究

陈晓春¹, 韩爽², 吴华伟¹, 邓永¹, 曹明慧¹, 李俊平^{1*}

(1. 中国兽药药品监察所, 北京 100081; 2. 青岛信得药业有限公司, 山东青岛 266100)

[收稿日期] 2018-09-05 [文献标识码] A [文章编号] 1002-1280 (2018) 11-0019-06 [中图分类号] S852.65

[摘要] 为研究伪狂犬病毒 5 基因缺失株体外重组情况, 将伪狂犬病毒 5 基因缺失毒株 PRV-gE⁻/gI⁻/US9⁻/ΔUL49.5/TK⁻ 株与野毒株等量混合, 经 PK15 细胞连续传代至第 10 代, 通过分析第 10 代培养物中毒株类型和比例了解缺失毒株体外同源重组的情况。结果发现, 除 PRV 野毒株和 PRV-gE⁻/gI⁻/US9⁻/ΔUL49.5/TK⁻ 株外, 出现了 5 种新的基因组合类型, 分别为 PRV(gI⁻/gE⁻/US9⁻/TK⁻)、PRV(gI⁻/gE⁻/US9⁻/gN⁻)、PRV(gI⁻/gE⁻/US9⁻)、PRV(TK⁻)、PRV(gN⁻), 病毒重组百分率为 72%。重组毒株中以 gI/gE/US9 三基因缺失型为主, 占重组蚀斑数的 41.7%, 占挑选蚀斑数的 30%, 高于野毒株和 5 基因缺失毒株的比例 (26% 和 2%), 成为主要的优势重组毒株。从各病毒类型比例上看, 缺失株同时获得所有缺失基因的几率很小, 且重组后的毒株趋向于稳定的自然缺失毒株 (如 gE 自然缺失的 Bartha 株)。5 种新的基因组合类型的毒株以 10^{3.0}TCID₅₀ 接种健康易感家兔, 未出现伪狂犬病典型临床症状, 安全性好。

[关键词] 伪狂犬病毒; 基因缺失; 同源重组

Homologous Recombination of 5 Gene-deletion Pseudorabies Virus with Wild Pseudorabies Virus in Cell Culture

CHEN Xiao-chun¹, HAN Shuang², WU Hua-wei¹, DENG Yong¹, CAO Ming-hui¹, LI Jun-ping^{1*}

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

Corresponding author: LI Jun-ping, E-mail: lijunping03@163.com

Abstract: In order to study the recombination of Pseudorabies virus in vitro, the five gene-deletion strain PRV-gE⁻/gI⁻/US9⁻/ΔUL49.5/TK and the PRV wild strain in equal amount were mixed. Then the viral mixture was cultured and passaged in PK15 for ten generations. To study the homologous recombination in vitro during the serial cell culture passage, the type and proportion of PRV strains within the tenth generation culture were analyzed. Result of the analysis demonstrated five novel genotypes of recombinants emerged in addition to PRV-

基金项目: 国家重点研发计划项目“兽用生物制品质量检验和控制标准”(2017YFF0208600, 2017YFF0208603)

作者简介: 陈晓春, 博士, 病毒类生物制品的检验和研究工作。

通讯作者: 李俊平。E-mail: lijunping03@163.com

$gE^-/gI^-/US9^-/\Delta UL49.5/TK$ and wild strain. Those distinct recombinants included $PRV(gE^-/gI^-/US9^-/TK^-)$, $PRV(gE^-/gI^-/US9^-/gN^-)$, $PRV(gE^-/gI^-/US9^-)$, $PRV(TK^-)$ and $PRV(gN^-)$. Furthermore, the recombinant strain with triple gene-deletion ($gE/gI/US9$) was found to be the major strain present, which percentage is higher than wild type and original mutant by 26% and 2% respectively. This mutant also accounts for 41.7% of all recombinant PFU and 30% of selected PFU, becoming the predominant strain in the population. Results show that it is hard to get all missing gene fragments at the same time, and the recombinated strains are tend to stable natural gene deleted mutant (e.g. Bartha, gE natural missing strains). The five novel PRV recombinant strains were safe to rabbit at $10^{3.0}$ TCID₅₀, which show that the safety is good.

Key words: PRV; gene deletion; homologous recombination

伪狂犬病毒 (*Pseudorabies virus*, PRV) 属于疱疹病毒科 (*Herpesviridae*) α 疱疹病毒亚科 (*Alphaherpesvirinae*) 水痘病毒属 (*Varicellovirus*) 的猪疱疹病毒 I (*Suid herpesvirus 1*), 为线状双股 DNA 病毒, 基因组全长约 150 kb, 含有至少 77 个开放阅读框编码。病毒基因组有大量的复制非必需基因, 如 TK, gG , gE , gI 等^[1-3]。这些基因编码的蛋白大多与毒力有关, 由单个或多个毒力基因缺失的伪狂犬病毒毒株制备的疫苗在应用上相对成熟^[4]。如商品化伪狂犬病毒活疫苗 (SA215 株) 为 gE 、 gI 、TK 三基因缺失疫苗, 猪伪狂犬病活疫苗 (HB-98 株) 为 TK 和 gG 双基因缺失疫苗, 猪伪狂犬病活疫苗 (Bartha-K61 株) 为 gE 、 gI 自然缺失疫苗。长期实践证明, 伪狂犬病毒基因缺失疫苗安全性良好, 且在伪狂犬病的防控中起到重要的作用。但随着我国养殖环境的改变和免疫压力的增加, 猪病流行呈现老病新发, 新病不断, 混合感染突出等趋势, 导致一些病原变异加剧, 毒力不断增加。2011 年以来, 许多使用基因缺失活疫苗免疫的规模化猪场出现了疑似 PR 流行, 给养猪业造成严重的经济损失, 可见现有疫苗已不能对变异的 PRV 株产生 100% 的保护力^[5-7]。

以一株伪狂犬流行毒株为亲本株, 人工构建了一株 5 基因缺失毒株 ($PRV-gE^-/gI^-/US9^-/\Delta UL49.5/TK^-$), 经试验证实, 该毒株在小鼠、家兔、山羊、仔猪和怀孕母猪上的安全性优于 Bartha-K61 株。本研究将其与亲本毒株在敏感细胞上共同培养, 分析培养物中毒株的类型、所占比例及对家兔的安全性,

以了解该毒株在体外从亲本毒株中获得缺失基因的能力及安全性, 为伪狂犬缺失疫苗的研制和转基因生物安全评价提供研究数据。

1 材料与方法

1.1 试验材料

1.1.1 病毒 伪狂犬病毒 5 基因缺失株 $PRV-gE^-/gI^-/US9^-/\Delta UL49.5/TK^-$ 株、PRV 野毒株 SX 株, 均由中国兽医药品监察所构建/分离、鉴定和保存。病毒含量分别为 $10^{7.5}$ TCID₅₀/mL、 $10^{7.25}$ TCID₅₀/mL。

1.1.2 细胞 PK15 细胞由中国兽医药品监察所保存。

1.1.3 主要试剂 DMEM 营养液, Gibco 公司产品; 胎牛血清, PAA 公司产品; 低熔点琼脂糖, Sigma 公司产品; DNA/RNA 抽提试剂盒, TIANGEN 公司产品; KOD FX Neo DNA 聚合酶购自 TOYOBO 公司; 胶回收试剂盒购自 Promega 公司。

1.1.4 鉴定引物 自行设计了 TK、UL49.5、 gE 、 gI 、US9 基因鉴定引物, 引物序列及扩增信息见表 1。

1.1.5 主要仪器设备 二氧化碳培养箱 (三洋)、恒温培养箱 (三洋)、PCR 仪 (Biometra)、电泳仪、紫外成像仪等。

1.2 方法

1.2.1 病毒传代 将 $PRV-gE^-/gI^-/US9^-/\Delta UL49.5/TK^-$ 株病毒液和 PRV 野毒株 SX 株病毒液用 DMEM 营养液分别稀释成病毒含量为 $10^{6.0}$ TCID₅₀/mL, 分别取 1 mL 混合, 接种已长成良好 PK15 细胞单层的 25 cm² 细胞瓶, 培养至 80% 细胞出现细胞病变时, 冻融 3 次, 离心去除细胞碎片, 取上清, 记为 F1,

分装成 1 mL/管,冻存或进行下一代接种,每代取 1 mL 接种 1 瓶 25 cm² 的 PK15 细胞单层进行传

代。如此连续传代 10 代,收获病毒液,记为 F10,分装成 1 mL/管,冻存。

表 1 引物序列及扩增信息

Tab 1 The information of primers and amplification

引物名称	引物序列	目标片段长度 (缺失前/缺失后)	退火温度/°C	用途
TK-F	5'-GACACGGTGGCCGGTATTTACG-3'	966/183	64.4	鉴定 TK 缺失
TK-R	5'-GGTGACGGGCACGGCAAAC-3'			
PUL50-F2	5'-AGACCTCGAAGAAGGGCAGC-3'	565/无	62.1	鉴定 gN 缺失(ΔUL49.5)
PUL50-R2	5'-AGCATCCGGGTGCACGTC-3'			
6d-F	5'-CGAAGGGGTATCGCCTCTCG-3'	3550/255	64	鉴定 gE/gI/US9 缺失
9b-R	5'-GAGGAAGGCTGCTGTGTGCG-3'			

1.2.2 病毒含量测定 将收获的 F10 病毒液用 DMEM 细胞培养液作 10 倍系列稀释,取 10⁻²、10⁻³、10⁻⁴、10⁻⁵、10⁻⁶ 5 个稀释度,分别接种已长成良好 PK15 细胞单层、弃去细胞培养液的 96 孔培养板,每个稀释度接种 8 孔,每孔 0.1 mL,同时设正常细胞对照 8 孔。置 37 °C、含 5% CO₂ 的培养箱培养 3 d。记录细胞病变情况,按 Reed-Muench 法计算 TCID₅₀。

1.2.3 病毒蚀斑挑选及培养 将收获的 F10 代病毒液按 10~20 TCID₅₀ 剂量接种已长成良好 PK15 细胞单层的 6 孔细胞培养板,吸附 1 h 后,弃去吸附液,铺上 1% 的低熔点琼脂糖,继续培养 48~72 h,共挑取 50 个病毒蚀斑,各浸于 1 mL DMEM 营养液中,冻融 1 次后,分别接种已长成良好单层的 PK15 细胞 6 孔板,每个蚀斑接种 1 孔,培养至病变达 50% 以上,收获病毒液,冻融 1 次后,进行 TK、UL49.5、gE、gI、US9 基因鉴定。

1.2.4 重组情况分析

1.2.4.1 重组病毒 PCR 鉴定 将挑选的 50 个病毒蚀斑采用表 1 中的引物分别进行 PCR 鉴定,初步确定基因缺失类型,并计算病毒重组的百分率,即除流行株和 5 基因缺失株外能扩增出 TK、UL49.5、gE/gI/US9 中任一基因或多个基因的克隆斑数/50。

1.2.4.2 重组病毒基因序列测定 将扩增条带大小

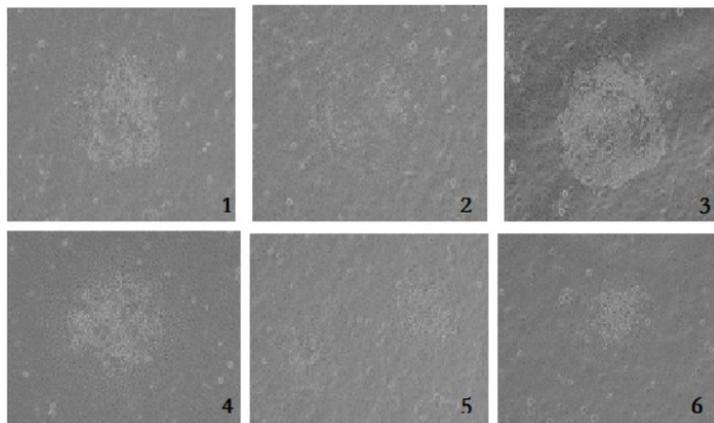
一致的蚀斑各选取 3 个样品进行序列测定,分析基因序列变异情况。

1.2.5 重组病毒安全性试验 取 12 只 2.5 kg 左右的健康易感家兔,随机分成 6 组,每组 2 只。第 1、2、3、4、5 组分别皮下接种新出现的重组毒株,每只接种 1 mL(含 10^{3.0} TCID₅₀);第 6 组不接种作为对照。隔离饲养观察 14 d,观察有无伪狂犬病临床症状。

2 结果

2.1 病毒蚀斑挑选 PRV-gE⁻/gI⁻/US9⁻/ΔUL49.5/TK⁻ 株病毒液和 PRV 野毒株 SX 株病毒液混合后传代,收获 F10 代病毒液进行蚀斑挑选,随机挑选出 50 个蚀斑(部分蚀斑图片见图 1)。

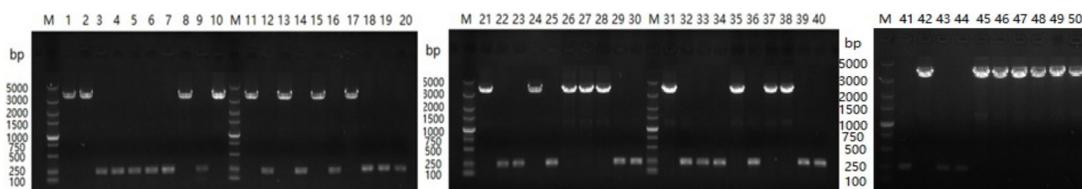
2.2 蚀斑 PCR 鉴定结果 将随机挑选的 50 个蚀斑采用 6d-F/9b-R、TK-F/TK-R、PUL50-F2/PUL50-R2 三对引物进行 PCR 鉴定。结果(图 2-图 4,表 2)发现,同时扩增出 gI/gE/US9、TK、gN 三段基因的有 13 个蚀斑(即野毒株),同时扩增出其中两段基因的有 26 个蚀斑,扩增出其中一段基因的有 10 个蚀斑,仅 1 个蚀斑未扩增出全部的三段基因(即 5 基因缺失株),共存在 7 种不同类型的毒株。即除 PRV 野毒株和 PRV-gE⁻/gI⁻/US9⁻/ΔUL49.5/TK⁻ 株外,出现了 5 种新的基因组合类型,分别为 PRV(gE⁻/gI⁻/US9⁻/TK⁻)、PRV(gE⁻/gI⁻/US9⁻/gN⁻)、PRV(gE⁻/gI⁻/US9⁻)、PRV(TK⁻)、PRV(gN⁻),蚀斑个



1-6: 代表不同大小和形态的蚀斑
 1-6: Different size and shape plaques

图 1 部分蚀斑图片 (×200)

Fig 1 The pictures of part plaques (×200)

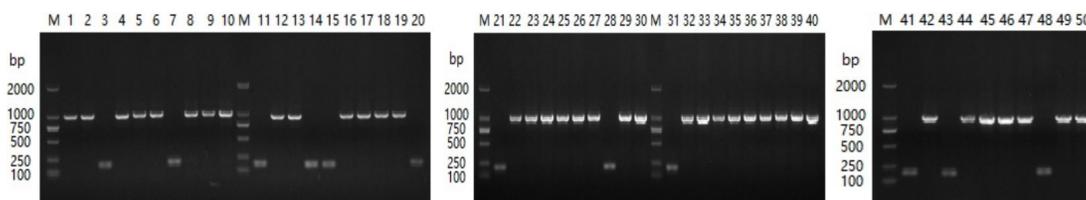


M: DNAMarker; 1-50: 50 个蚀斑

M: DNA Marker; 1-50: The 50 plaques

图 2 gE/gI/US9 三基因鉴定结果

Fig 2 Identification of gE/gI/US9 gene

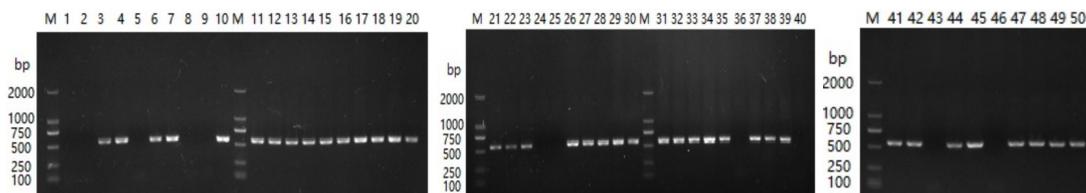


M: DNAMarker; 1-50: 50 个蚀斑

M: DNA Marker; 1-50: The 50 plaques

图 3 TK 基因鉴定结果

Fig 3 Identification of TK gene



M: DNAMarker; 1-50: 50 个蚀斑

M: DNA Marker; 1-50: The 50 plaques

图 4 gN 基因鉴定结果

Fig 4 Identification of gN gene

表 2 50 个蚀斑毒株类型、个数及所占比例

Tab 2 Type, number and proportion of the 50 plaques

序号	毒株类型	缺失基因个数	所扩增出的基因	蚀斑个数	所占比例
1	PRV 流行株(即含 gI/gE/US9、TK、gN)	0	gI/gE/US9、TK、gN	13	26%
2	PRV(gE ⁻ /gI ⁻ /US9 ⁻ /TK ⁻ /gN ⁻)	5	无	1	2%
3	PRV(gE ⁻ /gI ⁻ /US9 ⁻ /TK ⁻)	4	gN	5	10%
4	PRV(gE ⁻ /gI ⁻ /US9 ⁻ /gN ⁻)	4	TK	5	10%
5	PRV(gE ⁻ /gI ⁻ /US9 ⁻)	3	TK、gN	15	30%
6	PRV(TK ⁻)	1	gI/gE/US9、gN	6	12%
7	PRV(gN ⁻)	1	gI/gE/US9、TK	5	10%
合计	/	/	/	50	/

数分别为 13 个、1 个、5 个、5 个、15 个、6 个、5 个。病毒重组百分率 = (扩增出 1 段基因的蚀斑数 + 扩增出两段基因的蚀斑数) × 100% ÷ 50 = (10 + 26) × 100% ÷ 50 = 72%。重组毒株中以 gI/gE/US9 三基因缺失型为主,占重组蚀斑数的 41.7%,占挑选蚀斑数的 30%,高于流行株的比例,成为主要的优势重组毒株。

除流行株和 5 基因缺失株外,其他 5 种新类型按照单个基因扩增情况分析,扩增出 gI/gE/US9 段基因的蚀斑数为 11 个;扩增出 TK 基因的蚀斑数为 25 个,其中仅扩增出 TK 一段基因的有 5 个蚀斑,扩增出 TK+gN 或 gI/gE/US9+TK 两段基因的有 20 个蚀斑;扩增出 gN 基因的蚀斑为 26 个,其中仅扩增出 gN 一段基因的有 5 个蚀斑,扩增出 TK+gN 或 gI/gE/US9+gN 两段基因的有 21 个蚀斑。

2.3 扩增片段测序结果 对条带大小一致的样品随机选取 3 个进行序列测定,结果显示均未出现基因突变,说明出现任意两个或单个基因的重组时,是整段插入或缺失,不存在基因的突变现象。

2.4 重组病毒安全性试验 将新出现的 5 种毒株,即 PRV(gE⁻/gI⁻/US9⁻/TK⁻)、PRV(gE⁻/gI⁻/US9⁻/gN⁻)、PRV(gE⁻/gI⁻/US9⁻)、PRV(TK⁻)、PRV(gN⁻),经 PK15 细胞增殖,测定病毒含量,分别稀释成 10^{3.0} TCID₅₀/mL 皮下接种健康易感家兔,观察 14 d,未见异常临床反应。

3 讨论

对于伪狂犬病毒活疫苗的研制,人工致弱是筛

选候选毒株的最有效的方法。目前我国市场上使用的多种人工致弱(毒力基因缺失)的伪狂犬病毒活疫苗都具有良好的安全性。但人工致弱株的毒力返强或基因重组一直备受关注。本研究通过同源重组的方式构建了伪狂犬病毒 5 基因缺失的人工致弱毒株,在此基础上,通过体外细胞培养,了解 5 基因缺失株与野毒株的基因重组情况,为下一步疫苗开发提供数据。

研究结果显示,5 基因缺失株与野毒株混合培养,在体外连续传代 10 代,共获得包括野毒株和 5 基因缺失株在内的 7 种不同基因组合的毒株,符合伪狂犬病毒同源重组的规律。从缺失株 PRV-gE⁻/gI⁻/US9⁻/ΔUL49.5/TK⁻ 株病毒与野毒株混合培养,获得缺失基因的能力角度分析,除 13 个流行株蚀斑和 1 个五基因缺失 PRV(gE⁻/gI⁻/US9⁻/TK⁻/gN⁻) 的蚀斑外,出现其余 5 种新类型的 36 个蚀斑的可能性有两种:一是流行株在传代培养过程中缺失了 gI/gE/US9、TK、gN 中一段或两段基因;二是五基因缺失株在传代培养的过程中分别获得了 gI/gE/US9、TK、gN 中一段或两段基因。但从分子生物学角度分析,单个基因缺失或同源重组的几率应高于多个基因。在 36 个新类型的蚀斑中,有 26 个扩增出 gI/gE/US9、TK、gN 中的两段基因,提示我们这 26 个蚀斑可能来自流行毒株的缺失,其中 gI/gE/US9 段基因的缺失比例最高(15/36)。有 10 个扩增出 TK、gN 单个基因,提示我们这 10 个蚀斑可能来自 5 基因缺失株的同源重组。而且,未发现

有仅扩增出 gI/gE/US9 段基因的蚀斑,可能因其长度较长(3550bp),同源重组的几率较小,这也符合同源重组的分子生物学规律。

整体来看,流行毒株和 PRV($gE^-/gI^-/US9^-$)在 10 代培养物中所占比例较大,分别占 26%(13/50)和 30%(15/50),这说明流行株相对于 5 基因缺失株(仅 1 个蚀斑),仍属于体外培养的优势毒株,虽然不能排除基因缺失株重新获得 5 个基因的可能,但理论上有很大难度。而且其所占比例较培养前有所下降,也在一定程度上说明,缺失株同时获得所有缺失基因的几率很小。而 PRV($gE^-/gI^-/US9^-$)毒株所占比例较高,可能有两个方面的原因:一是在 10 代的培养中不断同源重组形成的,二是在最初几代的同源重组中获得细胞培养优势毒株,经多代不断培养增殖形成。值得注意的是,PRV($gE^-/gI^-/US9^-$)与商品化疫苗 Bartha 株基因缺失情况基本一致,Bartha 株属于自然缺失株,进一步说明 PRV($gE^-/gI^-/US9^-$)类型毒株可能具有一定的遗传优势。此外 PRV($gE^-/gI^-/US9^-/TK^-$)型与商品化 SA215 株(PRV- $gE^-/gI^-/TK^-/LacZ^+$)基因缺失疫苗的基因缺失情况相似。实践证明,Bartha 株、SA215 株等活疫苗长期使用过程中未出现过安全问题。可以推断,本研究出现的 PRV($gE^-/gI^-/US9^-$)、PRV($gE^-/gI^-/US9^-/TK^-$)两个类型的毒株是安全的,不存在引起烈性感染的危险。其他三种基因类型 PRV($gE^-/gI^-/US9^-/gN^-$)、PRV(TK^-)和 PRV(gN^-)蚀斑个数分别为 5 个、6 个、5 个,所占比例不高。家兔安全性试验证实,新出现的 5 种基因类型的毒株以 $10^{3.0}$ TCID₅₀ 剂量进行接种时,未见异常临床反应,是安全的。

实践证明,伪狂犬病毒弱毒疫苗无论是自然缺失株还是人工缺失致弱株,均具有良好的安全性^[4]。本研究通过体外培养研究 5 基因缺失株与野毒株混合感染时重组情况,结果显示病毒重组后

基因构成整体上趋向于目前常见的自然缺失株,符合病毒重组特性,新重组的伪狂犬病毒株安全性良好,为该毒株今后作为疫苗候选毒株提供一些数据参考。

参考文献:

- [1] Kit S, Kit M, Pirtle E C. Attenuated properties of thymidine kinase negative deletion mutant of Pseudorabies virus[J]. Am J Vet Res, 1985, 46(6):1359-1367.
- [2] Van Oirschot J T, Gielkens A L. Intranasal vaccination of pigs against pseudorabies: absence of vaccinal virus latency and failure to prevent latency of virulent virus[J]. Am J Vet Res, 1984, 45(10):2099-2103.
- [3] Mettenleiter T C. Pseudorabies (Aujeszky's disease) virus: state of the art [J]. Acta Vet Hung, 1994, 42(2/3): 153-177.
- [4] 薛爽. 猪伪狂犬基因缺失疫苗的研究进展[J]. 湖南畜牧兽医, 2016(4):194-47-49.
Xue S. Progress on gene-deleted vaccine against pseudorabies [J]. Hunan Journal of Animal Science and Veterinary Medicine, 2016(4):194:47-49.
- [5] 彭金美, 安同庆, 赵鸿远, 等. 猪伪狂犬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.
Pen J M, An T Q, Zhao H Y, et al. Identification and antigenic variation of new epidemiology of Pseudorabies virus from swine [J]. Chinese Journal of Preventive Veterinary Medicine, 2013, 35(1): 1-4.
- [6] Wang Y B, Qiao S L, Li X W, et al. Molecular epidemiology of outbreak-associated Pseudorabies virus (PRV) strains in central China[J]. Virus Genes, 2015, 50(3): 401-409.
- [7] Wang C H, Yuan J, Qin H Y, et al. A novel gE^- deleted Pseudorabies virus (PRV) provide 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.

(编辑:李文平)