

# 伪狂犬病病毒鄂 A 株 gG<sup>-</sup> / LacZ<sup>+</sup> 突变株的构建

周复春, 陈焕春, 方六荣, 周 锐, 吴 斌, 何启盖  
(华中农业大学畜牧兽医学院动物病毒实验室, 武汉 430070)

**摘 要:** 以从湖北某猪场分离鉴定的鄂 A 株为亲本, 提取其基因组 DNA, 克隆含 gG 基因的 Sph I / Kpn I 片段, 然后将 LacZ 基因融合到 gG 启动子下游, 得到重组质粒 pUSKZ, 将重组质粒与鄂 A 株基因组共转染 PK-15 细胞, 待细胞完全病变后, 在 X-gal 存在下, 作蓝斑筛选纯化。经斑点杂交和 PCR 扩增证实得到的是基因型为 gG<sup>-</sup> / LacZ<sup>+</sup> 的重组伪狂犬病病毒。

**关键词:** 伪狂犬病病毒; 鄂 A 株; gG<sup>-</sup> / LacZ<sup>+</sup> 突变株

**中图分类号:** S855.3    **文献标识码:** A    **文章编号:** 0366- 6964(2001)02- 0134- 05

伪狂犬病病毒(Pseudorabies virus, PRV) 是引起动物伪狂犬病的病原, 它属于疱疹病毒科的  $\alpha$ -疱疹病毒亚科<sup>[1]</sup>, 含有双链 DNA, 长约 150 kb, 糖蛋白 gG 是伪狂犬病病毒的主要糖蛋白之一, 也是伪狂犬病病毒的非必需糖蛋白。将伪狂犬病病毒基因组中的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, 在用这些突变株免疫的动物体内就没有相应蛋白的抗体。在临床上用这些缺失病毒生产疫苗免疫猪, 结合 ELISA 检验, 即能将自然感染野毒的猪和疫苗株免疫猪区分开, 从而为逐步淘汰自然感染血清学阳性猪, 建立健康猪群, 使最终根除和消灭此病成为可能。目前这方面的研究主要是 gE 缺失(L. Jacobs, 个人交流) 和 gX(gG) 缺失<sup>[2]</sup> 的标记疫苗的研究。在本研究中, 将 LacZ 基因插入 gG 基因中构建了 gG<sup>-</sup> / LacZ<sup>+</sup> 突变株, LacZ 的插入为筛选重组病毒提供了显而易见的标志, 大大简化了操作步骤并提高了筛选与纯化的准确性。本研究所获得的 gG<sup>-</sup> / LacZ<sup>+</sup> 突变株具有很好的应用前景, 可以作为标记疫苗, 为我国根除伪狂犬病提供了一个有力的工具。

## 1 材料与方 法

**1.1 毒株和细胞** 伪狂犬病病毒鄂 A 株, 由本室分离鉴定并保存<sup>[3]</sup>。PK-15 细胞, 本室保存。

**1.2 质粒与菌株** 质粒 pBR322-pUC18 购自华美生物技术公司。质粒 pADV-BamHI7A 含有 gG 基因的部分编码序列 gD 基因全序列和 gE 基因的部分编码序列, 由英国 M. Banks 博士惠赠。质粒 pSPT-18Z<sup>+</sup> 含有 gG/LacZ 表达盒, 由德国 Thomas C. Mettenleiter 教授惠赠。大肠杆菌 DH<sub>5</sub> $\alpha$  由本室保存。

收稿日期: 1999-09-15

基金项目: 本课题为“九五”国家科技攻关计划生物技术资助项目(96-C01-04-03)

作者简介: 周复春(1968~), 男, 汉族, 湖北孝感, 博士, 主要从事病毒分子生物学的研究工作。

1.3 工具酶 SphI、KpnI、SalI、BamHI、PstI 均购自华美生物技术公司。T<sub>4</sub>DNA 连接酶为 GIBCO-BRL 公司产品。CIAP 为 Promega 公司产品。

1.4 试剂盒 DNA 回收试剂盒为原平生物技术公司产品。地高辛标记与检测试剂盒为德国 Boehringer Mannheim 公司产品。

1.5 病毒的纯化和核酸的提取 参照文献略作修改进行<sup>[4]</sup>。

1.6 转移质粒的构建 技术路线见图 1。

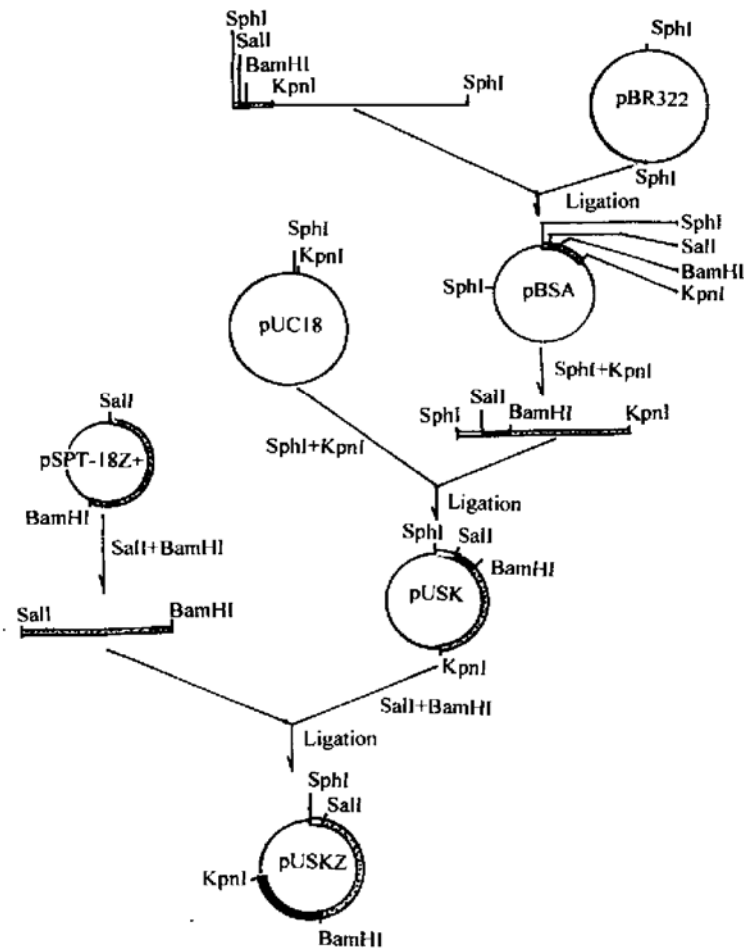


图 1 转移质粒 pUSKZ 的构建

Fig. 1 Construction of shuttle plasmid pUSKZ

将纯化和提取的病毒核酸,用 SphI 酶切,经 0.7% 琼脂糖凝胶电泳后转膜,用地高辛标记来自 pADV<sub>BamHI7A</sub> 的 gG 基因作探针,通过 Southern 杂交从伪狂犬病病毒的基因组中钓取含 gG 基因的 SphI 片段,然后回收该片段,首先将此片段克隆到 pBR322 质粒中,再亚克隆到 pUC18 质粒中构成 pUSK 质粒,最后将含 gG-LacZ 的表达盒插入到 pUSK 质粒中的 gG 基因的 SalI/BamHI 位点,构建成转移质粒 pUSKZ。探针的标记、转印杂交按 Boehringer Mannheim 公司的说明书进行。片段的回收按回收试剂盒说明书进行。质粒 DNA 的酶切分

析、连接及细菌转化按文献进行<sup>[5]</sup>。

**1.7 转染及重组病毒筛选** 参考<sup>[5,6]</sup>略作改进。将伪狂犬病病毒基因组 DNA(约 0.5 ug)和转移质粒 pUSKZ(约 2.5 ug)用脂质体法共转染 PK-15 细胞,待细胞完全病变后,反复冻融 3 次,将其作连续 10 倍稀释,接种 PK-15 细胞已长成单层的 6 孔细胞培养板,37 ℃ 吸附 1 h 后覆盖含 1% 甲基纤维素、3% 犊牛血清的 DMEM,2 d 后弃去覆盖层,再用含 1% 低熔点琼脂糖、150 ug/ml X-gal、3% 犊牛血清的 DMEM 覆盖,再过 2 d 后挑取蓝斑接种于 PK-15 已长成单层的 24 孔板,待病变出现后,扩大培养提取 DNA,用地高辛标记的 LacZ 基因作探针进行斑点杂交,斑点杂交按 Boehringer Mannheim 公司地高辛标记与检测试剂盒说明书进行。

**1.8 重组病毒的纯化及鉴定** 取杂交信号最强的蓝斑,按以上所述方法再纯化 3 次。纯化的重组病毒扩大培养,提取核酸作模板<sup>[7]</sup>,用 PCR 对 LacZ 基因进行扩增鉴定。

## 2 结果与分析

**2.1 转移质粒构建** 经印迹杂交确定一个 15 kb 的 SphI 片段含有 gG 基因(见图 2),于是回收该片段并克隆于 pBR322 的 SphI 位点,构成质粒 pBSA,再用 SphI、KpnI 酶切该质粒,0.7% 琼脂糖凝胶电泳后,回收长约 2.6 kb 含 gG 基因的 SphI/KpnI 片段,进一步亚克隆于 pUC18 的 SphI/KpnI 位点,然后将从 pSPT-18Z<sup>+</sup> 中获得的长约 3.875 kb 含 gG-LacZ 表达盒的 SalI/BamHI 片段插入亚克隆的 gG 基因的 SalI/BamHI 位点,转化大肠杆菌 DH<sub>5a</sub>,通过 PCR 对 LacZ 基因进行扩增筛选到阳性重组子,并命名为 PUSKZ。gG-LacZ 表达盒的插入恰好能将 gG 基因的启动子和部分编码序列替代,该质粒为构建 gG 基因缺失疫苗打下了基础,同时也为重组病毒的蓝斑筛选提供了显而易见的标志。因为 gG 的启动子是伪狂犬病病毒基因组中最强的启动子之一<sup>[8]</sup>,为了便于以后利用伪狂犬病病毒表达一些重大传染病病原的保护性抗原基因,我们对一个含 gG 启动子和 gG 的部分编码序列的片段进行了测序,结果表明鄂 A 株 gG 序列与国外发表的序列<sup>[9]</sup>有较大的差别。进一步的详细研究还在进行中。

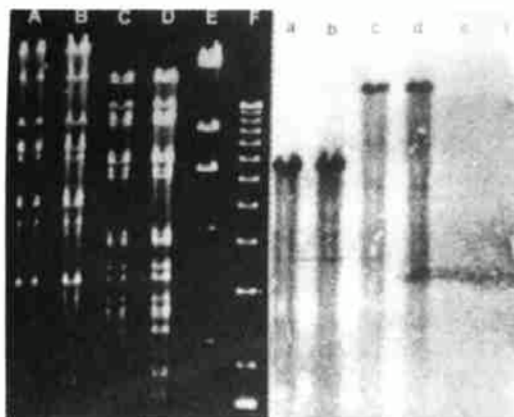


图 2 用地高辛标记 gG 基因探针杂交结果

Fig.2 Southern blot result with gG gene probe

- |                     |                    |
|---------------------|--------------------|
| A. a:PRV DNA/BamHI  | B. b:PRV DNA/BamHI |
| C. c:PRV DNA/SphI   | D. d:PRV DNA/SphI  |
| E. e:λ DNA/Hind III | F. f:1kb ladder    |

**2.2 重组病毒的筛选及鉴定** 构建的转移质粒 pUSKZ 与鄂 A 株病毒基因组经脂质体法共转染 PK-15 细胞,36 h 后,出现典型的细胞病变,收毒再接种 PK-15 细胞,在含 X-gal 琼脂糖覆盖下,出现典型的蓝斑,挑取蓝斑接种于 PK-15 细胞,扩大培养后,提取核酸作斑点杂交,结果

表明 4、7、11、12 杂交信号较强(图 3), 进一步对杂交信号较强的 4、7、11、12 克隆进行反复纯化 3 次, 分别提取来自 4、7、11、12 已纯化的重组病毒制备模板对 LacZ 进行 PCR 扩增, 结果都能得到一条特异的大小约 430 bp 的扩增带, 其大小与用含 LacZ 基因的质粒作模板所得的扩增带一致, 而鄂 A 野毒制备的模板不能得到此带(见图 4)。这说明 LacZ 基因确实已插入到伪狂犬病病毒基因组中。这一点加上病毒在 X-gal 存在下在细胞上形成的蓝斑, 证明确实已获得  $gG^- / LacZ^+$  重组病毒。

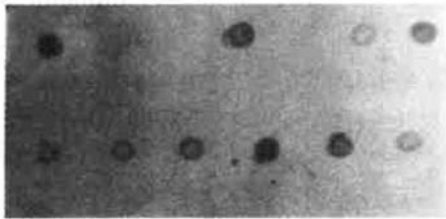


图 3 用地高辛标记 LacZ 基因探针作斑点杂交结果

Fig. 3 Dot hybridization with LacZ gene probe

1. Positive control(pUSKZ); 2. DNA of PK-15 cell; 3. DNA of W. T. PRV Ea strain; 4~ 13. These DNA are extracted from different cell; inoculating with different blue plaque virus



图 4 PCR 扩增结果

Fig. 4 Amplification of LacZ gene

1. 8PCR marker; 2. Positive control(Template is plasmid containing LacZ gene); 3. Negative control (Template is DNA of W. T PRV); 4~ 7: Specific band amplifying from purified DNA of  $gG^- / LacZ^+$  mutants

**2.3 伪狂犬病是严重危害全球养猪业的一种疾病** 伪狂犬病病毒鄂 A 株  $gG^- / LacZ^+$  缺失突变株的构建为研究伪狂犬病的致病机理和伪狂犬病基因缺失疫苗, 利用伪狂犬病病毒作载体表达其它外源基因构建多价疫苗打下了基础。

#### 参考文献:

- [1] 殷震, 刘景华. 动物病毒学[M]. 北京: 科学出版社, 第 2 版, 1997.
- [2] Wardley R C, Post L E. The use of the  $gX$  deleted vaccine PRV  $\Delta TK \Delta gX-1$  in the control of Aujeszky's Disease Vaccination and control of Aujeszky's Disease J. T. Van Oirschot, Kluwer Academic Publishers, 1988, 13~ 25.
- [3] 陈焕春, 方六荣, 等. 猪伪狂犬病病毒鄂 A 株的分离鉴定[J]. 畜牧兽医学报, 1998, 29(2): 156~ 161.
- [4] 王柳, 等. 人巨细胞病毒的分子克隆及其特异性 DNA 探针的制备[J]. 生物技术, 1994, 4(4): 33~ 35.
- [5] J. 萨姆布鲁克等著. 分子克隆实验指南. 金冬雁 黎孟枫等译. 北京: 科学出版社, 第 2 版, 1992.
- [6] 马延高, 陈蔚梅译. 基因融合技术[M]. 武汉大学出版社, 1990. 266~ 278.
- [7] Dangler CA, Henderson L, et al. Direct isolation and identification of recombinant pseudorabies virus strains from tissues of experimentally co-infected swine [J]. Am J Vet Res, 1993, 54: 540~ 545.
- [8] Thomas C. Mettenleiter, Isabella Rauh. A glycoprotein  $gX-\beta$ -galactoside fusion gene as insertional marker for rapidly identification of pseudorabies virus mutants [J]. J Virol Meth, 1990, 30: 55~ 66.
- [9] Thomas J. Rea, et al. Mapping and sequence of the gene for the pseudorabies virus glycoprotein which accumulates in the medium of infected cells[J]. Journal of virology, 1985, 54(1): 21~ 29.

CONSTRUCTION OF THE MUTANTS OF PSEUDORABIES VIRUS  
STRAIN Ea WITH THE GENOTYPE  $gG^- / LacZ^+$

Zhou Fuchun, Chen Huanchun, Fang Liurong,  
Zhou Rui, Wu Bin, He Qigai

(*Lab of Animal Virology, College of Animal Science and Veterinary Medicine,  
Huazhong Agricultural University, Wuhan 430070, China*)

**Abstract:** Pseudorabies virus (PRV) is the causative agent of Aujeszky's disease in swine. After the bacterial  $\beta$ -galactoside gene was fused to the downstream of the gG promoter, this construct and the genome of pseudorabies virus strain Ea were cotransfected into PK-15. Transfection progeny were plated onto PK-15 and incubated for 2 days under methlcellulose. Then the overlay was removed and replaced by 1% low melting point agarose in DMEM supplemented with 150ug/ml X-gal. After 2 days, blue plaques were picked and purified 4 times. By means of dot hybridization and PCR  $\beta$ -galactoside gene insered into the genome of pseudorabies virus was demonstrated.

**Key words:** Pseudorabies virus; Ea;  $gG^- / LacZ^+$  Mutant

下 期 目 次 预 告

- 1 膨化处理对全脂大豆抗营养因子及营养价值的影响
- 2 中型褐壳产蛋鸡饲料非植酸磷适宜水平的研究
- 3 不同阶段生长肥育猪可消化赖、蛋+胱、苏、色氨酸平衡模式研究
- 4 泌乳母猪饲料适宜赖氨酸水平的初步研究
- 5 猪小腔卵泡卵母细胞体外成熟研究
- 6 大熊猫卵巢中“连体卵”的分离及其电镜观察
- 7 牛体外牛黄发生器内培植牛黄技术研究
- 8 口蹄疫病毒 Zc 基因的克隆及表达
- 9 伪狂犬病病毒 Ea 株 gD 基因的克隆及序列分析
- 10 伪狂犬病病毒鄂 A 株  $TK^- / LacZ^+$  突变株的构建
- 11 用 SDS-PAGE 进行鸡败血霉形体结构蛋白分析
- 12 柔嫩艾美耳球虫氯喹苯乙氧抗性株与氯羟吡啶抗性株的实验室诱导
- 13 鸡球虫微线基因 Etmic-2 的一种蛋白异形体的发现
- 14 强效艾美耳牌鸡球虫苗 I 型的田间试验
- 15 雏鸡柔嫩艾美耳球虫感染与体内 NO 的生成
- 16 中华蜜蜂欧洲幼虫腐臭病病原的药物试验研究