

Construction and Identification of Recombinant Virus BHV-1 Expression of VP60 Gene of RHDV

Dongwei Yuan^{1*}, Wengeng Lu¹, Yanqiu Huang¹, Donghua Guo¹, Fei Xue², Liandong Qu²

¹College of Animal Science and Technology, Heilongjiang Bayi Agricultural University, Daqing Heilongjiang

²Natural Foci of Zoonosis Team, State Key Laboratory of Veterinary Biotechnology, Harbin Veterinary Research Institute, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Harbin Heilongjiang

Email: *yuandongwei@163.com

Received: Nov. 4th, 2017; accepted: Nov. 18th, 2017; published: Nov. 23rd, 2017

Abstract

In order to construct the recombinant bovine heper virus I which expressed RHDV VP60 gene, first, we constructed a transfer vector containing RHDV VP60 gene and CMV promoter, and then the mixtures of parental virus DNA and transfer vector were transfected into bovine lung cells. Then the propagated viruses were harvested. The recombinant virus was obtained by selection for white virus plaques which did not contain LacZ gene. PCR assay showed that VP60 gene had been inserted into the recombinant virus genome; the expression of VP60 in infected cells was proved by indirect immunofluorescence assay and Western blot. This study successfully constructed the recombinant virus BHV-1-VP60, which provided a basis for the development of a new type of RHDV vector vaccine.

Keywords

RHDV, VP60 Gene, Bovine Hepervirus-1, Selection for Virus White Plaques

表达兔瘟病毒VP60基因的重组病毒BHV-1的构建与鉴定

原冬伟^{1*}, 鲁文赓¹, 黄艳秋¹, 郭东华¹, 薛飞², 曲连东²

¹黑龙江八一农垦大学动物科技学院, 黑龙江 大庆

²中国农业科学院哈尔滨兽医研究所, 兽医生物技术国家重点实验室/自然疫源性人兽共患病研究团队, 黑龙江 哈尔滨

*通讯作者。

文章引用: 原冬伟, 鲁文赓, 黄艳秋, 郭东华, 薛飞, 曲连东. 表达兔瘟病毒 VP60 基因的重组病毒 BHV-1 的构建与鉴定[J]. 免疫学研究, 2017, 5(2): 11-18. DOI: 10.12677/is.2017.52002

摘要

为了构建表达兔瘟病毒VP60基因的牛疱疹病毒I型, 首先构建含有兔瘟病毒VP60基因和CMV启动子的转移载体, 然后将构建移载体与gE基因缺失的牛疱疹病毒I型基因组共转染牛肺细胞后收获增殖的病毒。通过蓝白斑筛选不含有LacZ基因的白色病毒蚀斑, 反复纯化获得重组病毒BHV-1-VP60。PCR方法验证VP60基因的成功插入, 间接免疫荧光试验和Western blot, 结果证明了BHV-1-VP60中的VP60基因在易感细胞中获得了表达。本研究成功地构建了兔瘟病毒VP60基因的重组病毒BHV-1-VP60, 为研制新型兔瘟活载体疫苗奠定了基础。

关键词

兔瘟病毒, VP60基因, 牛疱疹病毒I型, 蓝白斑筛选

Copyright © 2017 by authors and Hans Publishers Inc.

This work is licensed under the Creative Commons Attribution International License (CC BY).

<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>



Open Access

1. 引言

兔瘟是由兔瘟病毒(Rabbit hemorrhagic disease virus, RHDV)引起兔的一种急性、接触性传染病, 以呼吸系统出血, 实质器官水肿, 淤血及出血变化为特征, 该病传播快, 发病急, 发病率和死亡率极高, 是影响兔养殖业发展的重要传染病[1]。目前该病广泛使用 RHDV 组织灭活苗来进行预防。随着分子生物学技术的发展, 研究者逐渐将目光转向安全高效的基因工程疫苗的研制。已有报道兔瘟基因工程杆状病毒源亚单位疫苗已进入复合检验中, 在新型疫苗的研制中取得突破性进展[2]。活载体疫苗是一种新型疫苗, 利用基因工程方法改造病毒作为载体, 能够表达特定保护性抗原或免疫调节因子等, 特别是可以构建多价疫苗以达到一针防多病的目的[3]。疱疹病毒是一群较大的有囊膜的双链 DNA 病毒。I 型牛疱疹病毒(Bovine herpesvirus-1, BHV-1)为 α 疱疹病毒, 具有疱疹病毒科成员所共有的形态特征。BHV-1 宿主范围窄, 不易传播于其他生物, 尤其不会感染人类, 因而将减少公共健康方面的忧虑。BHV-1 基因组庞大, 结构中有许多非必需基因, 可以插入多个外源基因, 并能使免疫动物产生外源表达产物的抗体, 是成为构建多价疫苗的理想载体, 现已有很多外源病毒 DNA 成功地插入到了 BHV-1 基因组中[4]。本研究以 gE 基因缺失 BHV-1 为活病毒载体, 将兔瘟病毒唯一免疫原性基因 VP60 插入以获取重组病毒, 能够在易感细胞稳定增殖和表达, 为 BHV-1 作为病毒活载体研制兔瘟疫苗以及其他传染性疾病预防疫苗奠定了基础。

2. 材料和方法

2.1. 材料

牛肾细胞(MDBK), 牛肺细胞(BL), gE 基因缺失、并引入大肠杆菌 β -半乳糖苷酶基因(LacZ)的重组病毒、含有 BHV-1/gE 基因的上游同源重组序列及 CMV 控制下的 LacZ 基因的 pGEMTgILdgelacZ 质粒

及含有 BHV-1/gE 基因下游同源重组序列的质粒 pGEM-TgESN 均由哈尔滨兽医研究所大动物研究室构建并保存；含有 RHDV VP60 基因的重组质粒 pMD-VP60 由本哈尔滨兽医研究所自然疫源性人兽共患病研究室构建并保存。

2.2. 试剂

豚鼠抗 RHDV VP60 单克隆抗体(MAb)由本实验室制备保存；辣根过氧化物酶标记和异硫氰酸荧光素标记的山羊抗鼠 IgG、DMSO、X-gal 购自 Sigma 公司；新生胎牛血清、MEM 培养基、含 0.25%胰蛋白酶和 0.1%EDTA 的细胞消化液为 GIBCO 产品；质粒提试剂盒、连接酶及内切酶均购自 Promega 公司；病毒 DNA/RNA 提取试剂盒购自天根生物科技有限公司；甲基纤维素(MC)、低熔点琼脂糖购自 BBI 公司；其他试剂为国产分析纯。

2.3. 细胞培养、病毒增殖和基因组提取

含 10%新生胎牛血清的 MEM 用于培养 MDBK 和 BT，用细胞消化液消化分散细胞并传代培养。待细胞长成单层后，接种无血清的病毒稀释液，37℃ 孵育 1 h 后，弃上层液体，补加含 2%新生胎牛血清的 MEM 继续培养，当细胞病变达 80%左右时回收细胞。4℃ 超声破碎细胞，2000 rpm 低速离心 5 min，回收上清。4℃ 10,000 rct 高速离心 30 min，弃上清留底部约 200 μl，重复高速离心一次，最终留离心管底部 100 μl 液体用于病毒 DNA 提取。按病毒 DNA/RNA 提取试剂盒步骤提取病毒基因组用于 PCR 鉴定及转染试验。

2.4. 转移载体的构建

采用常规的分子生物学方法构建转移载体(如图 1)，将含有上游同源重组臂 pGEM-TgILdgELacZ 质粒与 pMD-VP60 质粒同时进行 *Hin*d III 和 *Xba*I 的双酶切，回收目的片段，纯化后连接构建重组质粒 pGEM-TgILdgEVP60；将其与含有下游同源重组臂 pGEM-TgESN 质粒分别进行 *Sma*I 和 *Nsi*I 双酶切，回收目的片段纯化后进行连接构建含有目的基因表达盒的转移载体 pGEM-TgILdgEVP60gESN 重组质粒。该转移载体含有巨细胞病毒(cytomegalovirus immediate-early, CMV)早期启动子控制下的 VP60 基因以及用于同源重组的 BoHV-1/gE 基因上、下游同源重组序列。

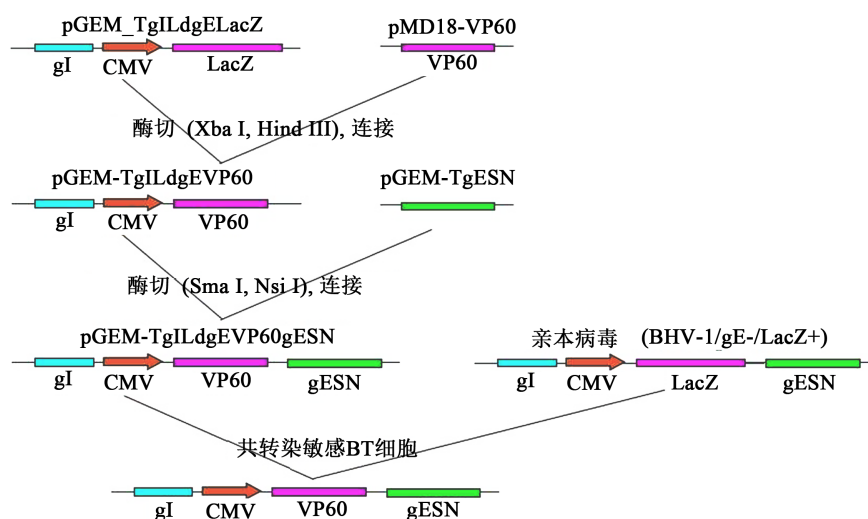


Figure 1. Construction of transfer vector and homologous recombination

图 1. 转移载体的构建及同源重组

2.5. 转移载体与亲本病毒基因组的共转染

采用磷酸钙介导法进行转染, 将 2.5 μg 经 *Ecot* 22 I 酶切的转移载体与亲本病毒基因组共转染 BL 细胞, 以 25% 的 DMSO 休克 3 min 后, 用无血清 MEM 洗涤两次, 加入含 10% 胎牛血清 MEM 培养基, 于 37 $^{\circ}\text{C}$ 培养, 待出现 80% 细胞病变(CPE)后收获培养物。

2.6. 重组病毒的筛选

将转染后收取的病毒液反复冻融后用 0.22 μm 的滤器过滤, 10 倍稀释后接种于 MDBK 细胞, 37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 1 h, 弃去上清, 然后覆盖以含 2% 血清和 1% 甲基纤维素的 MEM, 37 $^{\circ}\text{C}$ 培养, 待出现明显 CPE 时弃去培养液并充分洗涤。然后无菌覆盖含 3% 血清和 1% 低熔点琼脂糖的 MEM, 并添加 X-gal (150 $\mu\text{g}/\text{mL}$) 进行染色。37 $^{\circ}\text{C}$ 培养 24 h 后观察蓝白斑情况, 挑取白色病毒蚀斑继续进行蚀斑克隆纯化, 直到所有病毒蚀斑均为白色。

2.7. VP60 基因 PCR 鉴定

将筛选纯化病毒嗜斑接种 MDBK 细胞, 待产生明显病变后收取病毒, 提取病毒基因组。参照基因序列设计上游引物 P1:5'-TGGATATCATGGAGGGCAAAGCCCG-3'和下游 P2:5'-CGGGATCCTCAGACATAAGAAAAGCCATTG-3', 对 VP60 基因进行 PCR 鉴定。

2.8. Western Blot 检测

重组病毒 BHV-1-VP60 及亲本病毒接种 MDBK 细胞, 待出现明显细胞病变时收取细胞, 超声破碎后用 Millipore 蛋白浓缩管浓缩后进行 SDS-PAGE 电泳, 然后电转移至硝酸纤维素膜, 以豚鼠抗 RHDV VP60 蛋白的 MAbs (1:100) 为一抗, 山羊抗鼠 IgG-HRP (1:2000) 为二抗, DAB 显色检测蛋白表达情况。

2.9. 间接免疫荧光(IFA)检测

分别以 100 TCID₅₀ 的重组病毒及亲本病毒感染 MDBK 细胞, 待 CPE 达 80% 时弃去培养液, 以甲醇与丙酮按 1:1 混合固定细胞 30 min, 以豚鼠抗 RHDV VP60 蛋白的 MAbs (1:50) 为一抗, 山羊抗鼠 IgG-FITC (1:100) 为二抗, 荧光显微镜(Axiovert200)下观察, 检测 VP60 蛋白表达情况。

3. 结果

3.1. 转移载体的构建及共转染

成功构建了含有 VP60 表达盒的转移载体 pGEMTgILdGVP1gESN, 该转移载体含有用于同源重组的基因序列, 经酶切及 PCR 鉴定, 插入片段和扩增片断与理论大小一致(图 2), 测序结果正确; 用该转移载体与亲本病毒的基因组共转染 BL 细胞后, 可发生同源重组, 经筛选后可获得重组病毒。

3.2. 重组病毒 BHV-1-VP60 的筛选

依据 LacZ 在含有 X-gal 指示培养基上的显色反应, 逆向筛选白色病毒嗜斑。经 10 轮的病毒蚀斑筛选后不再有蓝色病毒蚀斑出现(图 3)。将白色病毒嗜斑连续纯化 10 轮后用于 PCR 及 Western blot 和间接免疫荧光试验检测。

3.3. 重组病毒 BHV-1-VP60 的 PCR 鉴定

将筛选的白色病毒蚀斑经 MDBK 细胞增殖后, 提取病毒基因 DNA, 经 VP60 特异性引物扩增, 琼脂糖凝胶电泳显示扩增出约 1617 bp 的特异性片段, 与预期大小相同, 而亲本病毒制备的 DNA 样品则

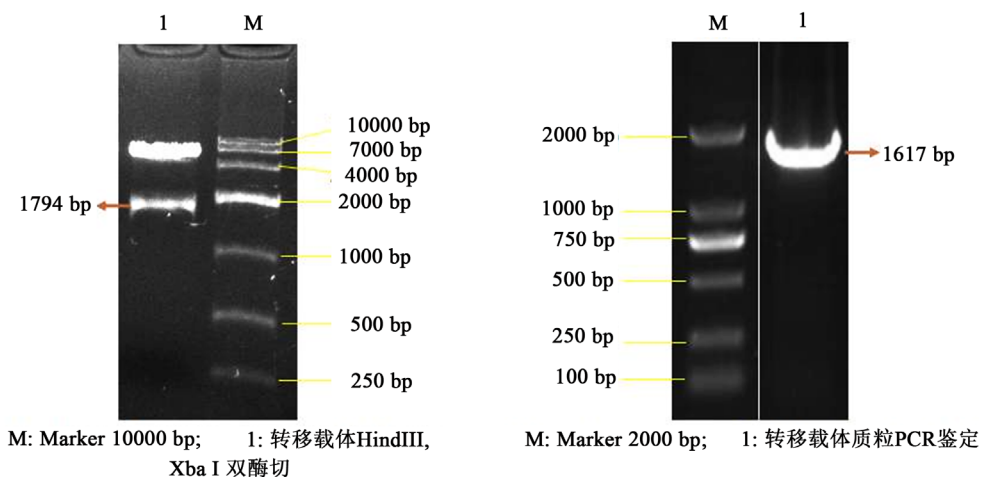


Figure 2. Identification of transfer vector for restriction enzyme digestion and PCR
图 2. 转移载体的酶切和 PCR 鉴定

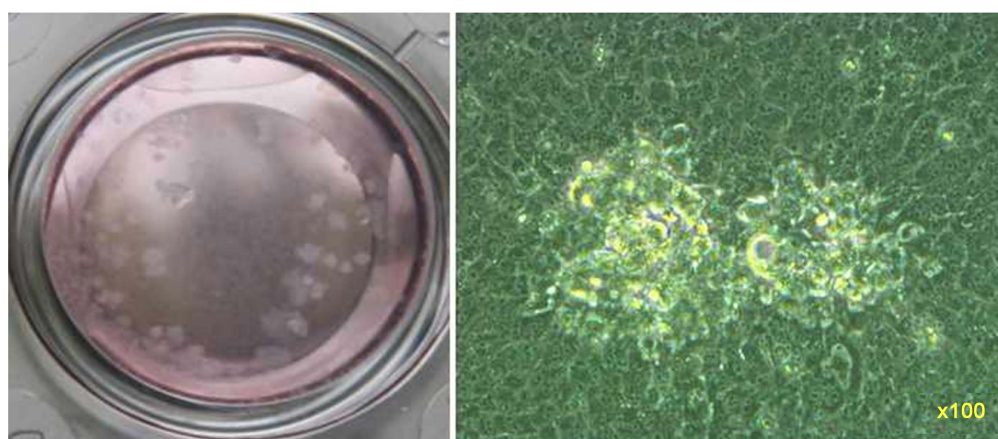


Figure 3. Observation of the recombinant virus
图 3. 眼观及镜下观测所获重组病毒嗜斑

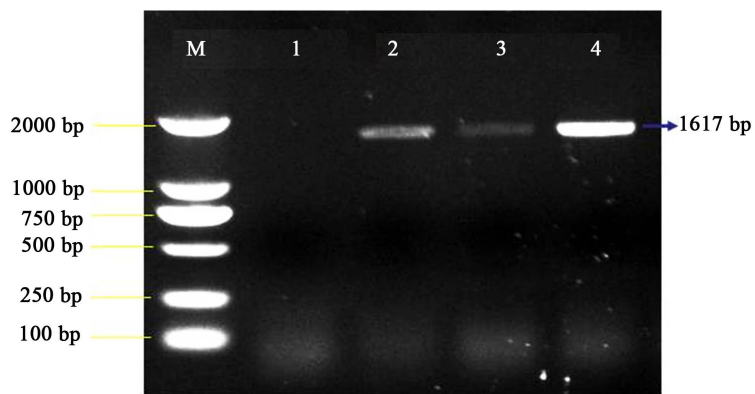
无特异性片段(图 4)。所示结果表明 RHDV VP60 基因已经成功插入到重组病毒 BHV-1-VP60 基因组中, 即已获得了在 gE 基因缺失位置插入外源基因的重组病毒。以噬斑纯化的重组病毒在 MDBK 细胞中连续传 20 代, 取不同代次病毒 提取基因组 DNA, 经特异性引物扩增, 结果显示均扩增出 VP60 基因, 表明该重组病毒具有良好的遗传稳定性。

3.4. VP60 基因表达的 Western Blot 检测

以重组病毒及亲本病毒感染 MDBK 细胞的裂解物进行 SDS-PAGE, 转移至硝酸纤维素膜后以抗 VP60 的单克隆抗体为一抗、HRP 标记的山羊抗鼠 IgG 为二抗分别作用后于 DAB 中显色。Western blot 结果显示在接种重组病毒 BHV-1-VP60 的样品中可见约 60 kDa 的免疫印迹条带, 与预期 VP60 蛋白分子量值相符, VP60 蛋白在 MDBK 细胞中获得了表达, 而接种亲本病毒的样品则无免疫印迹条带(图 5)。

3.5. VP60 基因表达的 IFA 检测

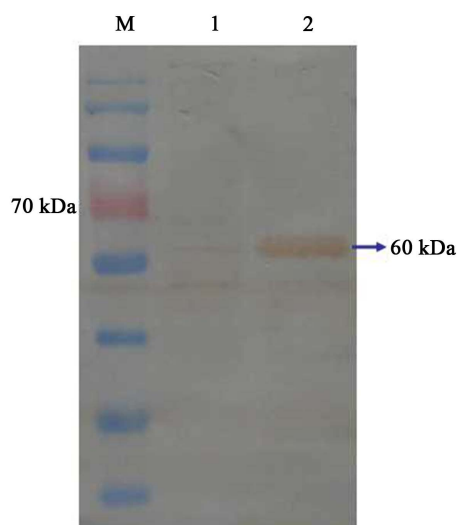
IFA 检测结果显示感染重组病毒 BHV-1-VP60 的 BL 细胞产生了红色的特异性荧光, VP60 蛋白在 MDBK 细胞中获得了表达, 而感染亲本病毒的 BL 细胞则无可见荧光(图 6)。



M: Marker 2000 bp; 1: 亲本病毒; 2,3,4: 10、15、20代次重组病毒

Figure 4. PCR identification for recombinant virus

图 4. 重组病毒 BHV-1-VP60 的 PCR 鉴定



M: Protein molecular weight Marker; 1: 亲本病毒;
2: 重组病毒BHV-1-VP60

Figure 5. Western blot detection results of recombinant virus

图 5. 重组病毒的 Western blot 检测结果

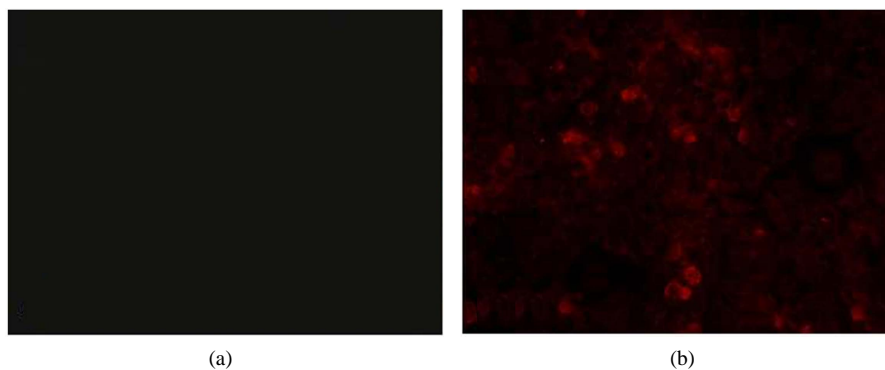


Figure 6. Identification of recombinant virus by IFA. (a) Infected parent virus MDBK cells; (b) Infection recombinant virus MDBK cells

图 6. 重组病毒 BHV-1-VP60 的 IFA 鉴定。(a) 感染亲本病毒 MDBK 细胞; (b) 感染重组病毒 MDBK 细胞

4. 讨论

RHD 为上世纪末期暴发的一种危害养兔业的烈性传染病, 针对 RHD 的预防只能通过注射疫苗来完成。目前国内研究学者已研制出多种常规疫苗, 如 RHD 组织灭活苗, RHD 油乳剂灭活苗, RHD 氢氧化铝佐剂苗, RHD 蜂胶佐剂灭活苗, 热灭活苗等[5]。由于 RHDV 没有合适的体外繁殖系统, 只能依赖传统方法从自然或人工感染致死的兔肝、肺组织中分离病毒抗原, 不仅增加了实验的成本和周期, 还给实验的准确性带来了很大的干扰。因此从基因工程学角度出发研制 RHD 新型疫苗势在必行。针对 RHDV 的唯一结构蛋白基因 VP60 能够在不同系统中表达的基因工程苗正在被研究开发, 并已取得了较好的效果, 如大肠杆菌表达亚单位疫苗, 昆虫细胞表达亚单位疫苗, 酵母细胞表达亚单位疫苗, 马铃薯表达的亚单位疫苗等, 以及重组牛痘病毒, 金丝雀痘病毒, 黏液病毒等活载体苗。活载体疫苗向宿主免疫系统提交免疫原性蛋白, 可诱导产生体液免疫和细胞免疫, 甚至黏膜免疫, 同时兼有免疫效力高、成本低及安全性好等优点; 若病毒载体中同时插入多个外源基因, 就可以达到预防多种疾病的目的, 因此活载体疫苗是当今与未来疫苗研制与开发的主要方向之一[6] [7]。随着疱疹病毒弱毒苗的问世及质量不断提高, 以此为为基础的活载体也逐渐成为研究目标。目前, 疱疹病毒作为活载体表达外源基因的研究主要有: 单纯疱疹病毒、伪狂犬病毒、火鸡疱疹病毒、牛疱疹病毒 I 型(BHV-1)、马疱疹病毒 I 型和传染性喉气管炎病毒等[8] [9]。本研究所采用 BHV-1 是目前从自然感染牛体内分离到的 8 种疱疹病毒之一, 与其他疱疹病毒科的成员具有相同的形态, 病毒核酸为线性双股 DNA。牛是该病毒的主要宿主, 而且 BHV-1 除了反刍动物之外, 不存在其他保毒宿主, 家兔可以通过鼻注或静注等途径感染而无发病症状[10], 而且在以 BHV-1 为活病毒载体的 RHD 基因工程疫苗的研究尚无相关报道。本研究是将中国兽医药品监察所于 20 世纪 80 年代从匈牙利引进的一株经过多年使用、证实安全性良好的 BHV-1 弱毒疫苗株 BarthaNu/67 人为缺失 gE 基因、并引入大肠杆菌 β -半乳糖苷酶基因的重组病毒作为活载体, 利用同源重组技术在病毒复制非必需区将 VP60 基因置于目前已知真核细胞中最强的启动子 CMV 之下, 使得 VP60 基因能够更有效地表达; 之后利用 β -半乳糖苷酶基因在含 X-gal 培养基中特殊显色作用, 逆向筛选表达 VP60 基因的白色病毒嗜斑进行纯化。Western blot 和 IFA 检测结果表明 VP60 基因在 MDBK 细胞中得到了表达。重组病毒及亲本病毒在同一易感细胞中均能够产生 CPE, 这也表明 VP60 基因的插入并未影响重组病毒的感染性。

5. 结论

本实验成功构建表达 RHDV-VP60 基因的重组病毒 BHV-1-VP60, 且载体病毒背景明确。重组病毒 BHV-1-VP60 的构建将改变以往使用组织灭活苗和亚单位疫苗在免疫过程中的缺陷, 具有安全、高效、操作简单、价格便宜等优点, 有着良好的应用前景, 为以后 RHD 活载体疫苗及多价疫苗的研制开发奠定了理论和实践基础。

基金项目

黑龙江省教育厅面上项目(12541580)。

参考文献 (References)

- [1] 张夏兰, 王红宁, 张昌菊, 等. 兔病毒性出血症基因工程疫苗的研究进展[J]. 中国预防兽医学报, 2007, 29(10): 821-824.
- [2] 范志宇, 魏后军, 胡波, 等. 兔出血症病毒杆状病毒载体灭活疫苗安全性及效力试验[J]. 江苏农业科学, 2015, 43(11): 272-275.
- [3] 邹伟斌, 陈丹, 谢少霞, 等. 基因工程活载体疫苗的研究进展[J]. 广东畜牧兽医科技, 2016, 41(4): 1-8.
- [4] Ren, X.-G., Xue, F., Zhu, Y.-M., Tong, G.-Z., Wang, Y.-H., Feng, J.-K., Shi, H.-F. and Gao, Y.-R. (2009) Construc-

tion of a Recombinant BHV-1 Expressing the VP1 Gene of Foot and Mouth Disease Virus and Its Immunogenicity in a Rabbit Model. *Biotechnology Letters*, **31**, 1159-1165. <https://doi.org/10.1007/s10529-009-9988-2>

- [5] 王芳, 陈萌萌, 宋艳华, 等. 兔出血症病毒新毒株 RHDV2 的流行与控制[J]. 江苏农业科学, 2016, 44(9): 1-3.
- [6] 李河林. 猪瘟病毒重组腺病毒载体疫苗的构建及免疫保护试验[D]: [博士学位论文]. 杨凌: 西北农林科技大学, 2015.
- [7] 张丽. 共表达 FMDV P1-2A、3C 基因重组 PRV TK-转移载体的构建及表达[D]: [硕士学位论文]. 长春: 吉林大学, 2007.
- [8] 孟庆峰, 徐展, 王伟利. 活载体疫苗的研究进展[J]. 黑龙江畜牧兽医, 2013(19): 28-31.
- [9] 李继昌, 鲁成武, 殷会成. I 型牛疱疹病毒活载体疫苗的构建及研究进展[J]. 东北农业大学学报, 2004, 35(3): 369-372.
- [10] Takashima, Y., Nagane, N., Hushur, O., Matsumoto, Y. and Otsuka, H. (2002) Bovine Herpesvirus-1 (BHV-1) Recombinant Expressing Pseudorabies Virus (PrV) Glycoproteins B and C Induces Type 1 Immune Response in BALB/c Mice. *Journal of Veterinary Medical Science*, **64**, 589-596. <https://doi.org/10.1292/jvms.64.589>

知网检索的两种方式:

1. 打开知网页面 <http://kns.cnki.net/kns/brief/result.aspx?dbPrefix=WWJD>
下拉列表框选择: [ISSN], 输入期刊 ISSN: 2330-166X, 即可查询
2. 打开知网首页 <http://cnki.net/>
左侧“国际文献总库”进入, 输入文章标题, 即可查询

投稿请点击: <http://www.hanspub.org/Submission.aspx>

期刊邮箱: is@hanspub.org