

浣熊痘病毒 TK 基因对 5-BUdR 药物不敏感性的研究

赵卫国¹

Joseph J. Esposito² *Esposito, JJ*

(¹ 卫生部武汉生物制品研究所, 武汉, 430060; ² 美国疾病控制研究中心, 美国)

R373.12

A

提 要 本文在 Rat-2(TK) 细胞上, 对浣熊痘病毒 TK 基因作为病毒筛选标记的作用进行了研究。发现浣熊痘病毒虽然具有 TK 基因的序列和功能, 但对 5-溴脱氧尿嘧啶(5-BUdR) 药物的选择压力并不敏感。即使采用 HAT 培养基挑选的单斑病毒对 5-BUdR 也具有抵抗力。

关键词 浣熊痘病毒, TK 基因, 5-BUdR

近十年来, 以痘病毒为载体表达的外源性基因数目十分繁多^[1]。但是, 鉴于重组痘病毒在人类所引起的以及可能引起的副作用, 使得采用其他具有高度宿主特异性的痘病毒载体日益受到重视。例如, 禽痘病毒(Fowl Pox), 金丝雀痘病毒(Canary Pox) 浣熊痘病毒(Raccoon Pox) 和羊的 orf 病毒等^[2,3]。

浣熊痘病毒(简称 RCN) 归类于痘病毒科正痘病毒属, 其宿主范围仅限于浣熊类动物^[4]。现已证明, 采用 RCN 为载体表达的狂犬病毒糖蛋白重组体对浣熊和狗具有良好的口服免疫效果, 是一种很有希望的动物口服疫苗^[5]。我们在组建 RCN 重组体的过程中发现 RCN 与痘病毒(Vaccinia Virus, 简称 VAC) 不同。RCN 在 5-BUdR 的药物压力下仍能生长, 从而给 TK-重组病毒的筛选造成困难。为此, 我们用 HAT 培养基对 RCN 进行了 TK+病毒筛选, 发现 RCN 虽然具有 TK 基因的功能和序列, 但其 TK 基因可能不活跃, 因此 5-BUdR 对其增殖的影响不大。

材料和方法

- 1 **病毒** RCN CDC/V71-I-85A 株, 系美国疾病控制中心保存毒种, 参见文献^[6]。野型 VAC 天坛株以及 TK 基因插入失活的重组 VAC 表达狂犬病毒糖蛋白天坛株为本室自备。
- 2 **细胞** Rat-2TK 细胞系大鼠胚胎纤维细胞, 由美国 ATCC 提供。以 DMEM 培养基(内含 10% 小牛血清, 100IU/ml 青霉素及 100μg/ml 链霉素) 常规培养细胞。
- 3 **选择培养基** 5-BUdR 购于 Sigma 公司, 工作浓度为 25μg/ml。100 倍浓缩的 HAT 溶液购于美国 GIBCO 公司, 内含次黄嘌呤钠 10m mol/L, 氨基嘌呤 40m mol/L, 胸腺嘧啶 1.6m mol/L。
- 4 **病毒的筛选和滴定** 6 孔培养板中成层的 Rat-2 细胞经 HAT 培养液孵育 6 小时后, 按不同稀释度接种 RCN。吸附二小时, 覆盖一层含 1% 低熔点琼脂糖和 2% 小牛血清的 HAT 培养基。病毒空斑形成后, 以中性红染色, 挑出空斑病毒。空斑病毒经 24 孔板 Rat-2 细胞上增殖后, 分别在常规培养液中和在 5-BUdR 药物压力下进行空斑滴定。RCN 在接种细胞前均加终浓度为 0.25% 的胰蛋白酶, 于 37℃ 消化 30 分钟, 确保病毒空斑是由单一病毒感染造成的。
- 5 **Southern Blot** 按文献方法提取 RCN 和 VAC 天坛株病毒 DNA, 用 Hind III 酶切消化, 0.65% 琼脂糖凝胶电泳过夜。经变性、中和、转膜及干燥后, 与³²P 标记的 VAC NYBH 株 TK 基因杂交^[5]。

* 本文于 1993 年 2 月 19 日收到, 1993 年 4 月 6 日修回

结 果

1 RCN经HAT筛选后5-BUdR对其病毒滴度的影响

采用TK⁺的传代细胞筛选TK⁺病毒时,由于细胞本身的TK基因在HAT培养条件下激活,可能供给病毒核酸复制所需用的嘧啶核苷,故本试验采用TK⁻细胞。TK⁻Rat-2细胞在HAT培养基中能够维持48小时,感染RCN后36小时可以挑出病毒空斑。HAT培养基中三次空斑挑选的TK⁺RCN病毒在Rat-2细胞上的空斑形成滴定结果见表1。实验表明,RCN在5-BUdR选择培养基中,其滴度低于常规培养100倍左右。对照病毒VAC天坛株7×10⁴PFU的感染剂量在同样剂量的5-BUdR中全部死亡。5-BUdR对TK⁻表达狂犬病毒糖蛋白的重组VAC天坛株无任何压力。此外,RCN在Rat-2细胞上能够产生细胞融合,空斑为圆形,直径约1mm。在5-BUdR压力下,RCN产生的融合细胞变少,空斑变小且不规整。

表1 5-BUdR对HAT筛选前后RCN滴度的影响

Table 1 The effect of 5-BUdR on HAT selected RCN virus titer

病毒 (virus)		病毒滴度(PFU/ml)(virus titer)	
		5-BUdR ⁻	5-BUdR ⁺
RCN 筛选前 (Before HAT selection)		5.2×10 ⁶	6.0×10 ⁶
RCN 筛选后 (After HAT selection)	第1次空斑(1st round plaque)	2.0×10 ⁶	5.0×10 ⁴
	第2次空斑(2nd round plaque)	7.0×10 ⁴	9.0×10 ³
	第3次空斑(3rd round plaque)	1.2×10 ³	4.0×10 ⁴
对照病毒 VAC (VAC virus control)		7.0×10 ⁴	0
VAC/VVIT/RG		1.9×10 ⁷	1.0×10 ⁷

2 Southern Blot 检测 RCN 的 TK 基因:

由图1可见,RCN病毒DNA的Hind III E片断含有与VAC R株TK基因具有同源性的序

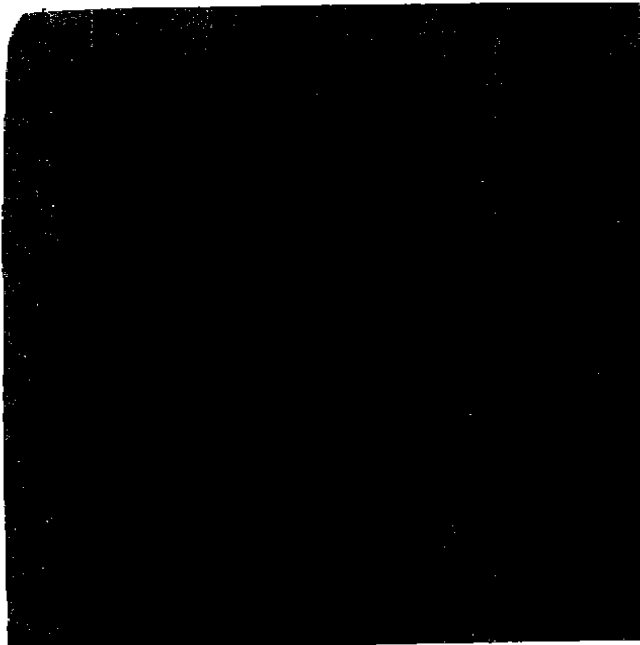


图1 Southernblot检测RCN病毒TK基因。2、3列分别显示RCN和VAC天坛株病毒DNA Hind III酶切以后,0.65%琼脂糖凝胶电泳结果。以VAC NYBH株TK基因为探针杂交,可见RCN Hind III E片断(4)和天坛株Hind III J片断(5)均于TK基因杂交,但信号强度相差很大。1列为DNA分子量标准。

Fig. 1 Southern blot detection of RCN TK gene. Lane 2 and 3 shows RCN and VAC Tian Tan strain virus DNA Hind III pattern after 0.65% agarose electrophoresis. Both RCN Hind III E fragment (lane4) and vaccinia virus Tian Tan strain Hind III J fragment (lane5) can hybridize with VAC NYBH strain TK gene probe, but the radioactive signal strength differs greatly. Lane 1 is DNA molecular marker.

列。但是,此序列与 NYBH 株 TK 基因杂交产生的放射性强度明显弱于 VAC 天坛株 TK 基因(位于 Hind III J 片断)的杂交强度。说明 RCN 虽然存在 TK 基因序列,但基因同源性与痘苗病毒 TK 基因相差较大。

讨 论

痘病毒是基因容量最大的病毒,几乎所有病毒增殖所需要的酶类均由病毒本身提供。从理论上,当氨基嘌呤阻断核酸的正常代谢途径之后,Rat-2TK⁻细胞不能提供胸苷激酶,因此,细胞与 TK⁻病毒均不能存活,只有 TK⁺的病毒才能增殖^[7]。实验证明,在 HAT 培养基中,RCN 与 VAC 一样可以复制,说明 RCN 具有 TK 基因的功能,编码胸苷激酶参加嘧啶核苷的代谢。与 VAC 不同的是,RCN 在 5-BUdR 药物作用下,虽然病毒产量低约 100 倍,但仍有相当一部分的 RCN 能够正常复制,而 VAC 7×10^4 个空斑形成单位的病毒在同样剂量的 5-BUdR 的作用下,病毒增殖完全被抑制。TK⁺的 RCN 抵抗 5-BUdR 的机制尚不清楚。推测是在 5-BUdR 培养条件下,RCN 的 TK 基因从活动状态转变为沉默(Silence)状态,从而躲过 5-BUdR 的错误掺入而造成的病毒死亡。另一种可能是 RCN 的 TK 基因平时是处于关闭状态,只是在 HAT 培养条件下才被激活。

据文献,RCN 在分子病毒学进行化树中距离其他正痘病毒比较远^[6]。本文结果也显示 RCN 的 TK 基因与 VAC 的 TK 基因同源性相差较大。因此进一步克隆 RCN 的 TK 基因并进行序列的测定与比较,对了解 RCN 的 TK 基因及其功能是很有必要的。

参 考 文 献

- 1 D. E. Hruby, Vaccinia virus vectors, New strategies for producing recombinant vaccines. *Clin. Microbiol Reviews*, 1990, 3 (2): 153-170
- 2 J. Taylor et al, 1988 A recombinant fowlpox virus induces protective immunity in non-avian species. *Vaccine*, 6: 497-503
- 3 J. Taylor et al, Efficacy studies on a canarypox-rabies recombinant virus. *Vaccine*, 1991, 9: 190-194
- 4 J. J. Esposito et al, Poxviridae. Classification and Nomenclature of viruses. Edited by R. I. B. Francki et al. Springer-Verlag Wien New York, 1991, 93
- 5 J. J. Esposito et al. Successful oral rabies vaccination of raccoons with raccoon poxvirus recombinants expressing rabies virus glycoprotein. *Virology*, 1988, 165: 313-316
- 6 J. C. Knight et al. Further analyses of the orthopoxviruses volepox virus and raccoon poxvirus. Submitted to *Virology*, 1992
- 7 B. Moss. Poxviridae and their replication. *Virology*, 2nd edn. Raven Press, Ltd. New York, 1990, 2079-2111

The TK Gene of Raccoon Pox Virus is not Sensitive to 5-BUdR

Zhao Weiguo¹ Joseph J. Esposito²

(¹Wuhan Institute of Biological Products, Wuhan, 430060;

²Centers For Disease Control, Atlanta, U. S. A)

In this assay, we studied the possibility of raccoon pox virus (RCN) TK gene as a viral selection marker on Rat-2 cells. Southern blot shows that RCN has TK gene sequence though it hybridizes weakly with vaccinia virus TK gene. But RCN is resistant to 5-BUdR even after it was plaque purified in HAT media.

Key words Raccoon poxvirus, TK gene, 5-BUdR