

伪狂犬病病毒上海株 *gE* 和 *gI* 基因的克隆及缺失转移载体的构建*姜 焱¹, 侯玉峰², 陈德胜¹, 陈溥言^{1**}

(1. 南京农业大学动物医学院, 江苏 南京 210095; 2. 南京出入境检验检疫局, 江苏 南京 210001)

Cloning, Construction of *gE* Gene and *gI* Gene Partial Deletion Mutant of Pseudorabies Virus SH StrainJIANG Yan¹, HOU Yu-feng², CHEN De-sheng¹, CHEN Pu-yan^{1**}

(1. College of Veterinary Medicine, Nanjing Agriculture University, Nanjing 210095, China;

2. Nanjing Entry-Extry Inspection and Quarantine Bureau, Nanjing 210001, China)

Abstract: According to the Genbank open sequence, two pairs of primer were designed in order to amplify *gE* gene and partial *gI* gene of pseudorabies virus Shanghai strain, respectively. The *gE* gene and partial *gI* gene were obtained by polymerase chain reaction(PCR), subsequently cloned into pGEM-T vector. Then both of them were inserted into pUC18 vector. The recombinant plasmid pgEI deleted part of *gI* gene was constructed.

Key words: Pseudorabies virus; *gI* gene; *gE* gene

摘要: 根据已发表的伪狂犬病病毒(Pseudorabies Virus, PRV)的 *gI* 和 *gE* 基因序列, 设计两对引物用 PCR 方法扩增出 PRV-SH *gI* 和 *gE* 基因, 将其克隆入 pUC18 载体中, 获得了缺失部分 *gI* 基因的转移载体质粒, 命名为 pgEI。

关键词: 伪狂犬病病毒; *gI* 基因; *gE* 基因

中图分类号: R373.9 文章标识码: A 文章编号: 1003-5125(2002)02-0149-04

伪狂犬病病毒(Pseudorabies Virus, PRV)可引起多种家畜和野生动物的伪狂犬病, 尤其是猪的伪狂犬病已成为危害当今养猪业最严重的传染病之一^[1]。但各种灭活疫苗及弱毒疫苗对该病的预防、根除及对持续性感染的预防都是不成功的^[1]。随着分子生物学的发展, 对一些传染病病原的分子剖析, 使致病基因和免疫保护性抗原基因的鉴定和分离得以实现^[2]。自 20 世纪 70 年代以来, 通过对 PRV 基因组的改造已先后研制了多种 PRV 基因缺失疫苗。这些基因缺失疫苗株有的是缺失病毒的主要毒力基因, 以降低其毒力; 有的缺失了病毒的糖蛋白基因, 从而可以通过血清学等方法将疫苗免疫猪和自然感染野毒猪区分开来, 使控制并最终消灭此病成为可能^[3]。*gE* 和 *gI* 是以非共价键形式结合成

复合体 *gI/gE*, 是影响 PRV 生长的功能成分^[13]。*gE* 基因是影响毒力的重要基因之一, 且决定毒力的部位在第 125 位和第 126 位的两个氨基酸, 只要突变这两个氨基酸, 其毒力就会大大的降低^[4]。现已证明, *gI* 也与毒力有关, 且对诱导完全保护是必须的^[5]。

本研究用 PCR 的方法扩增了 *gI* 的部分基因和 *gE* 全基因, 并克隆到 pUC18 中, 构建了 pgEI 转移载体, 这样在 *gE* 和 *gI* 基因之间缺失了 250bp, 即保留了部分 *gI* 基因又破坏了 *gE* 基因的阅读框。为构建 PRV 的缺失株打下了基础。

1 材料与方法

1.1 病毒和细胞系

收稿日期: 2001-08-08, 修回日期: 2001-11-16

* 基金项目: 上海市委重点攻关课题(98-05-7)。

作者简介: 姜 焱(1972~), 女, 江苏省泗阳县, 博士生, 研究方向为传染病学与预防兽医学。

** 通讯作者。Correspondence author

PRV-SH 和 RK 细胞由本实验室保存。

1.2 质粒和菌株

pUC18 和 DH5 α 由本实验室保存。

1.3 酶和试剂

*Bam*H I、*Hind* III 等限制性内切酶和 Taq DNA 聚合酶等修饰酶购自宝生物工程(大连)有限公司。DNA 回收试剂盒购自四川博大公司。

1.4 PCR 引物设计

参照发表的 PRV *gE* 和 *gI* 基因,设计并合成了两对引物,同时在引物的 5' 端加上合适的酶切位点:

gE 基因的引物:

5' primer 5'-GACGGATCCCCATGCGGCCCT-TTCTGCTGCGCGCC-3'

3' primer 5'-GCCAAGCTTCGGAATGCGGGC-GGACCGGTTCTCCC-3'

gI 基因的引物

5'-primer 5'-ACTGAATTCACGTGACCCGGC-TCCCCG-3'

3'-primer 5'-CGGGATCCGCCGGTAGATGCG-ATTCC-3'

1.5 PRV DNA 提取

按文献^[6]提取 PRV DNA。用 100TCID₅₀ 的 PRV-SH 株接种长满方瓶的兔肾细胞(RK 细胞),待细胞出现 80%~90% 病变时,收获病毒液,冻融 2 次后取 500 μ L 病毒液,加 10% SDS 至终浓度 1%,充分混匀后,加 20mg/mL 蛋白酶 K 4 μ L, 55 $^{\circ}$ C 30min,取出后加酚、酚:氯仿和氯仿各抽提一次,加 1/10 体积的 NaAC(3mol/L, pH 5.2) 和 2 倍体积的无水乙醇, -20 $^{\circ}$ C, 30min, 12 000r/min 离心 15min, 70% 乙醇洗一次,凉干,溶于 30 μ L 超纯水中作 PCR 模板。

1.6 PCR 法扩增 PRV-SH 的 *gE* 和 *gI* 基因

以提取的 PRV-SH 的 DNA 为模板进行目的基因的扩增,反应体系为:PRV-SH DNA 2 μ L, 引物各 1 μ L(20pmol/ μ L), dNTP(2.5mmol/L)4 μ L, 10XPCR 反应缓冲液 5 μ L, MgCl₂(25mmol/L)4 μ L, 二甲基亚砜(DMSO)5 μ L, TritonX-100 2.5 μ L, Taq(5U/ μ L)0.5 μ L。其中 PRV DNA 先煮沸 10min 变性后加入反应体系中。PCR 反应的循环参数:95 $^{\circ}$ C 2min; 94 $^{\circ}$ C 50s, 64 $^{\circ}$ C 1min, 72 $^{\circ}$ C 2.5min, 40 个循环,然后

72 $^{\circ}$ C 10min, 置于 4 $^{\circ}$ C。反应结束后,取 8 μ L PCR 产物电泳。

1.7 PRV-SH 的 *gE* 和 *gI* 基因的克隆

PCR 产物经琼脂糖电泳后,用试剂盒回收目的片段,在 T4 DNA 连接酶的作用下,将纯化的基因片段连接到 pGEM-T 载体上,转化 DH5 α 大肠杆菌感受态细胞,挑取白色菌落进行培养,按文献^[7]提取质粒,用 *Eco*R I 进行酶切鉴定。

1.8 缺失载体的构建

将克隆在 pGEM-T 载体上的 *gE* 和 *gI* 基因分别用 *Bam*H I + *Hind* III 和 *Bam*H I + *Eco*R I 消化,琼脂糖电泳后用试剂盒回收目的片段,同时用 *Bam*H I + *Eco*R I 消化 pUC18, 在 T4 DNA 连接酶的作用下,将纯化的 *gI* 基因连接到 pUC18 载体上,转化 DH5 α 大肠杆菌感受态细胞,挑取白色菌落进行培养,按文献^[7]提取质粒,用 *Bam*H I + *Eco*R I 进行酶切鉴定,将阳性质粒命名为 pUCgI。再用 *Bam*H I + *Hind* III 消化 pUCgI, 用同样的方法将纯化的 *gE* 基因连接到 pUCgI 载体中,通过 *Hind* III、*Bam*H I 和 *Eco*R I 酶切鉴定,构建了缺失载体 pGEI。构建流程见图 1。

2 结果

2.1 PCR 法扩增 PRV-SH 的 *gE* 和 *gI* 基因

参照已发表的 *gE* 和 *gI* 基因序列,分别设计并合成两对引物,以 PRV-SH 感染的细胞培养液提取的病毒 DNA 为模板,用 PCR 的方法分别扩增出一条约 960bp 和一条约 1 740bp 的基因片段,其大小与目的基因片段大小相符(图 2)。

2.2 目的基因的克隆

将纯化的 PCR 产物与 pGEM-T 载体连接后,转化 DH5 α 大肠杆菌感受态细胞,挑取白色菌落进行培养,提取质粒,用 *Eco*R I 进行酶切鉴定(图 3),表明 *gE* 和 *gI* 基因已克隆入 pGEM-T 载体中,分别命名为 pGEM-*gE* 和 pGEM-*gI*。

2.3 缺失载体的构建

用 *Bam*H I + *Hind* III 和 *Bam*H I + *Eco*R I 消化 pGEM-*gE* 和 pGEM-*gI*, 琼脂糖电泳后用试剂盒回收目的片段,与用相同的酶消化的 pUC18 进行连接,转化 DH5 α , 挑取白色菌落培养,提取质粒,用

*Bam*H I + *Hind* III 和 *Bam*H I + *Eco*R I 消化(图 4), 表明 *gE* 和 *gI* 基因已克隆入 pUC18 中, 分别命名为 pUCgE 和 pUCgI。然后用 *Bam*H I + *Hind* III

消化 pUCgI, 与用 *Bam*H I + *Hind* III 消化的 *gE* 基因进行连接, 通过 *Hind* III、*Bam*H I 和 *Eco*R I 酶切鉴定(图 5), 证明成功的构建了缺失载体 pgEI。

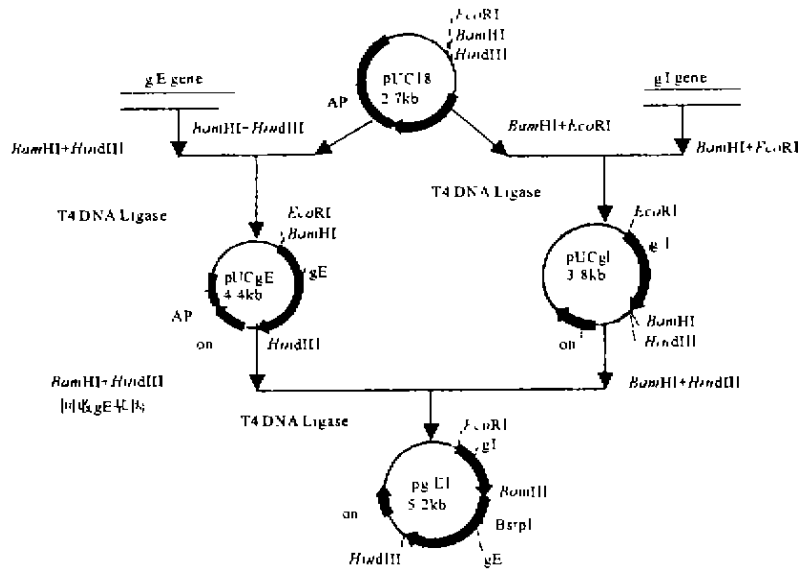


图 1 pgEI 缺失载体构建的流程图

Fig. 1 Construction of the deleted vector of pgEI

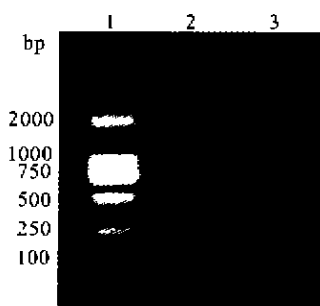


图 2 PCR 扩增产物

Fig. 2 The result of PCR product

1, Marker DL-15 000; 2, The *gE* gene of PRV-SH; 3, The *gI* gene of PRV-SH.

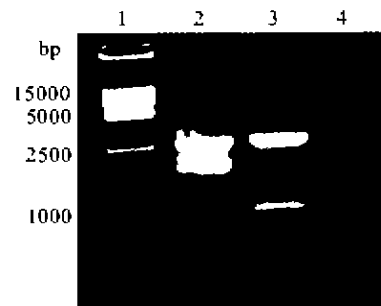


图 4 酶切鉴定结果

Fig. 4 The result of RE analysis

1, Marker; 2, pUCgE (*Bam*H I + *Hind* III); 3, pUCgI (*Eco*R I + *Bam*H I); 4, pUC18 (*Eco*R I)

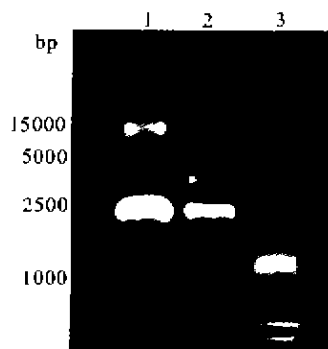


图 3 酶切鉴定结果

Fig. 3 The result of RE analysis

1, Marker; 2, pGEM-T-*gE* (*Eco*R I); 3, pGEM-T-*gI* (*Eco*R I)

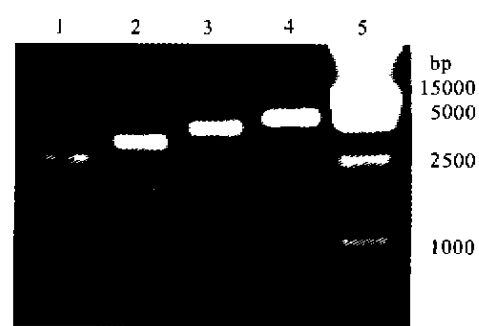


图 5 pgEI 酶切鉴定结果

Fig. 5 The result of RE analysis pgEI

1, pgEI (*Eco*R I + *Hind* III); 2, pgEI (*Bam*H I + *Hind* III); 3, pgEI (*Eco*R I + *Bam*H I); 4, pgEI (*Eco*R I); 5, Marker.

3 讨论

据报道^[8-14],在过去研究者们常采用在某些细胞系中多次传代 PRV,使之适应于该细胞,在适应过程中造成 PRV 的某些毒力基因的丢失;或先通过构建基因文库,然后用外切核酸酶人为地剪切掉某个毒力基因来构建缺失转移载体,此方法费时费力。本研究采用了成熟的 PCR 技术,通过设计两条特异性引物扩增出 *gE* 和 *gI* 基因,使 *gE* 和 *gI* 基因之间缺失掉 250bp,将 *gE* 和 *gI* 基因克隆到 pUC18 中,构建了缺失转移载体 pgEI,此方法简单、方便。

伪狂犬病病毒的原发宿主是猪,成年猪往往是潜伏感染状态,但排出有感染性毒力的病毒传染其它易感动物时都能引起严重的疾病,甚至死亡^[6,8]。缺失 *gE* 基因的 PRV 缺失疫苗接种猪后能抑制病毒的神经侵袭性和传播力,具有较好的安全性^[15]。完全缺失了 *gE* 和 *gI* 基因的缺失疫苗不能完全的保护强毒的攻击。据报道,*gI* 对完全保护的诱导是必须的^[4]。*gE* 基因是主要的毒力基因之一,而它的决定性是第 125 位和 126 位的两个氨基酸,只要突变掉两个氨基酸,PRV 的毒力就会大大下降。*gE* 和 *gI* 是以非共价键的形式结合成复合体,形成功能单位^[5]。本研究用 PCR 法将 *gE* - *gI* 之间缺失掉 250bp,这样即保留了部分 *gI* 基因,同时也能改变 *gE* 基因的阅读框,从而破坏了 *gE* 具有毒力的条件,这为进一步构建 PRV-SH 的缺失株打下了基础。

参考文献

- [1] 袁庆志,吴裕祥.伪狂犬病流行和疫苗免疫概况[J].家畜传染病,1986,27:63-65.
- [2] 袁世山,徐宜为.动物基因工程疫苗研究进展及我国应采取的对策[J].中国畜禽疾病,1995,(2):62-68.
- [3] Marchioni C C, Kit S, Ichimura H, et al. A vaccine strain of Pseudorabies Virus with deletions in the thymidine kinase and glycoprotein X gene[J]. Am J Vet Res, 1987, 48:780-793.
- [4] Kimman T G, Wind D E, O'El-Lie N, et al. Construction of single genes within the unique short region of ADV(suid herpesvirus type 1) to virulence, pathogenesis and immunogenicity[J]. J Gen Virol, 1992, 73:243-251.
- [5] Liesbeth J, Raba H J, Kimman T G, et al. Deleting valine-125 and cysteine-126 in glycoprotein gI of Pseudorabies virus strain NIA-3 decrease plaque size and reduce virulence in mice [J]. Arch Virol, 1993, 131:251-264.
- [6] 殷震,刘景华.动物病毒学[M].第二版,北京:科学出版社,1997.
- [7] 萨姆布鲁克 J, 弗里奇 EF, 曼尼阿蒂斯 D (金冬雁, 黎孟枫等译). 分子克隆实验指南[M]. 第二版, 北京: 科学出版社, 1998.
- [8] Van Oirschot J T, Gielkens A L J, Moormann R J M, et al. Marker vaccine virus protein-specific antibody assays and the control of Aujeszky's disease[J]. Vet Microb, 1990, 23:85-89.
- [9] Van Zijl M, Wensvoort G, Kluyver E D, et al. Live attenuated Pseudorabies virus expressing envelop glycoprotein E of hog cholera virus protects swine against both pseudorabies and hog cholera[J]. J Virol, 1991, 65:2761-2766.
- [10] Thomsen D R, Marotti K R, Palermo D P, et al. Pseudorabies virus as a live virus vector for expressing of foreign genes[J]. Gene, 1987, 57:261-269.
- [11] Calvin L K, Mary E W, Lynn M E. Construction of an infectious pseudorabies virus recombinant expressing a glycoprotein g III- β -galactosidase fusion protein[J]. Gene, 1986, 50:215-220.
- [12] 姜高明, 曹恩阁, 宣华, 等. 伪狂犬病病毒分子生物学[A]. 中国畜牧兽医学学会家畜传染病学分会第五次研讨会论文集[C]. 1992, 45-48.
- [13] Federico A, et al. Complex between glycoproteins gI and gp63 of pseudorabies virus: its effect on virus replication[J]. J Virol, 1988, 62:4622-4629.
- [14] Quint W, Gielkens A, Van Oirschot J, et al. Construction and characterization of deletion mutants of pseudorabies virus: a new generation of "live" vaccines[J]. J Gen Virol, 1987, 68:523-529.
- [15] Maurice B, Pensaert, B, Mettenleiter T C. Role of envelope glycoproteins gI gp63 and gIII in the invasion and spread of Aujeszky's disease virus in the olfactory nervous pathway of the pig[J]. J Gen virol, 1994, 75:2319-2327.