

表达绿色荧光蛋白的重组 CVI988 病毒的构建及特性*

张雪莲, 范伟兴, 周玉传, 缪德年, 钱莺娟, 陈溥言**

(南京农业大学农业部动物疫病诊断与免疫重点开放实验室, 江苏南京, 210095)

Construction and Characterization of Recombinant CVI988 Expressing the Green Fluorescent Protein

ZHANG Xue-lian, FAN Wei-xing, ZHOU Yu-chuan, MIAO De-nian, QIAN Ying-juan, CHEN Pu-yan**

(Key Lab of Animal Diseases Diagnostic and Immunology, Ministry of Agriculture, Nanjing Agriculture University, Nanjing 210095)

Abstract: The US2 gene nonessential for viral replication was amplified by polymerase chain reaction(PCR) with DNA from CEF cells infected by MDV vaccine strain CVI988 as template, and was cloned into T-easy vector; The expression cassette including GFP gene controlled by CMV promoter and enhancer was cloned into US2 gene to give rise to a transfer vector pGUS2GFP, then the complex of pGUS2GFP and DOTAP was transfected into CEF cells infected CVI988 strain virus. Recombinant rCVIGFP expressing the green fluorescence protein was selected and purified. The characterization of recombinant virus was evaluated *in vivo* and *in vitro*. The growth curve of recombinant virus having EGFP gene are similar to that of the parent virus in CEF cells. The recombinat virus expressing GFP could infect chicken and be reisolated from the chickens following intra-abdominal inoculation of rCVIGFP.

Key words: Marek's disease virus; GFP; Transfection; Recombinat virus; Growth curves

摘要: 提取马立克氏病毒 I 型疫苗毒株 CVI988 的总 DNA 为模板, 利用 PCR 技术扩增出病毒生长非必需的 US2 基因并克隆入 T-easy 载体。将 CMV 启动子和增强子控制的含 GFP 基因表达盒克隆入 US2 基因中, 成功构建了含 GFP 基因的转移质粒载体 pGUS2GFP。用脂质体将其与 CVI988 株共转染 CEF 细胞, 用 96 孔板稀释法得到纯化的表达绿色荧光蛋白的重组 CVI988 病毒株 rCVIGFP, 并分别测定其在体内和体外的生长情况。表达 EGFP 基因的重组病毒在细胞上生长曲线与亲本毒 CVI988 类似, 体外实验表明, 1 日龄腹腔接种该重组毒后, 可以从鸡体内分离到表达绿色荧光的病毒。

关键词: 马立克氏病病毒; 绿色荧光蛋白; 转染; 重组病毒; 生长曲线

中图分类号: S852.65

文献标识码: A

文章编号: 1003-5125 (2003) 05-0468-05

马立克氏病 (Marek's disease, MD) 是由禽疱疹病毒马立克氏病病毒 (Marek's disease virus, MDV) 引起鸡的一种高度传染性肿瘤疫病^[1, 2]。MDV 的生物学特性与 γ 疱疹病毒类似, 而基因结构及序列则与 α 疱疹病毒接近^[3]。单纯疱疹病毒 (HSV-1) 基因组的短独特区 (US) 多为病毒生长的非必需区, MDV 的 US 区有 12 个开放阅读框

(ORF), 其中 7 个与 HSV-1 同源性^[4-6], US1、US10、US2、US3、US6 均为病毒生长非必需区^[7-12]。

绿色荧光蛋白 (Green fluorescent protein, GFP) 是 90 年代中期发展起来的一种全新的报告分子, 它是一个 238 氨基酸的蛋白质, 在 UV 或蓝光激发下产生绿色荧光, 可直接观察, 因此, 被广泛应用于生物学研究。增强绿色荧光蛋白 (Enhanced green

收稿日期: 2003-04-28, 修回日期: 2003-06-20

* 基金项目: 国家 863 计划 (2002AA245051)

作者简介: 张雪莲 (1975-), 女, 安徽灵璧籍, 在读博士生, 主要从事动物病毒学和免疫学研究。

** 通讯作者: 陈溥言 (1942-), 男, 江苏省南京籍, 教授, 博士生导师, 主要从事动物病毒学和免疫学的研究。

Corresponding author. Tel: 025-4396028; Fax: 025-4396335; E-mail: aid@njau.edu.cn

fluorescent protein, EGFP) 是一系列新的 GFP 突变体的一种, 它适合在动物细胞上表达^[13, 14]。在本研究中, 我们选用 CVI988 株的生长非必需区 US2 基因作为外源基因的插入位点, 以 96 孔板稀释法筛选出表达绿色荧光蛋白的重组病毒, 并测定其在体外和体内的生长情况, 旨在探讨增强型绿色荧光基因在重组 MDV 中的可能性, 为进一步研究新型抗 MD 的重组基因疫苗奠定基础。

1 材料与方 法

1.1 实验材料

按常规方法取 9-10 日龄 SPF 鸡胚 (购自南京药械厂), 制备鸡胚成纤维细胞单层, 增殖疫苗毒 CVI988 株, 计算病毒蚀斑数, 液氮保存。CVI988 株由密尼苏达大学医学院张玉根博士惠赠。pGEMT-easy 载体为 sigama 公司产品; 质粒 pEGFP-C1、宿主菌 DH5 α 为本组保存。限制性内切酶, Klenow 酶, T4DNA 连接酶, 牛小肠碱性磷酸酶 (CIAP), dNTP, rTaq 酶为宝生物 (大连) 公司产品; DNA 胶回收试剂盒为上海华舜公司产品, DOTAP 脂质体购自罗氏公司。

1.2 病毒基因组总 DNA 的提取

将出现 90% 细胞病变的细胞单层用 PBS 小心洗涤一次, 用无菌橡皮塞刮下细胞, 4 000g 离心 10min, 收集细胞, 每瓶细胞加 1mL 裂解液 (含 0.2mg/mL 蛋白酶 K, 0.1g/L SDS, 10mmol/L NaCl, 10mmol/L Tris-HCL pH8.0, 1mmol/L EDTA), 置 37 $^{\circ}$ C 水浴 3~4h。将裂解物用酚, 酚: 氯仿, 氯仿各抽提一次, 加入 2 倍体积无水乙醇, -20 $^{\circ}$ C 放置 30min, 10 000g 离心 10min 沉淀 DNA, 70% 乙醇洗涤一次, 待沉淀稍干后溶于适量 TE (pH8.0)。操作过程中所用的吸头切除尖端, 并在酒精灯过火处理, 动作轻柔, 避免对大分子 DNA 的剪切作用。

1.3 US2 基因的扩增与克隆

根据 GenBank 中公开发表的 I 型 MDV 生长非必需区 US2 序列, 设计一对引物, 扩增跨幅为 2kb 的片段。

上游 (P1) 5'-CGTCCTCTTGGTATATCCA-3';

下游 (P2) 5'-CAAGTGCAAGCAGTTCAGG-3'

PCR 扩增以病毒基因组总 DNA 为模板, 反应条件: 99 $^{\circ}$ C 变性 5min, 95 $^{\circ}$ C 变性 50s, 52 $^{\circ}$ C 退火 1min, 72 $^{\circ}$ C 延伸 3min, 30 个循环, 72 $^{\circ}$ C 10min, 4 $^{\circ}$ C 保存。回收 PCR 产物, 并克隆入 pGEMT-easy 载体中。序列测定由宝生物 (大连) 公司完成。

1.4 转移质粒载体的构建

用 *Mlu*I, *Apa*LI 内切酶消化 pEGFP-C1 质粒, 将 2 kb 含 CMV 立即早期启动子、GFP 基因及 SV40polyA 尾的表达盒片段补平后克隆入 US2 片段 *Bgl*II 位点。质粒提取、转化感受态、补平、去磷酸化、连接等 DNA 重组技术按常规方法进行。载体构建路线见图 1。

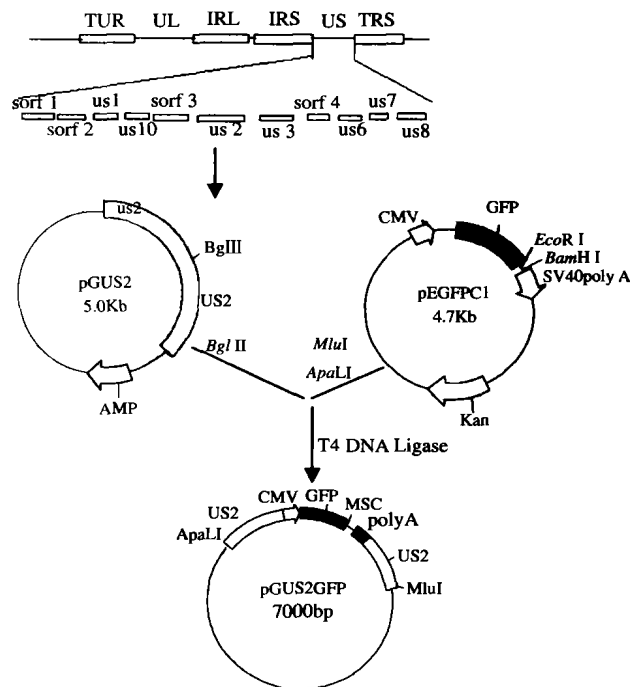


图 1 质粒载体构建路线

Fig.1 Scheme for construction of palmsmid vector

1.5 感染细胞的转染

按脂质体 (DOTAP) 使用说明书的方法进行转染, 具体步骤如下: 1) 转染前一天, 长势良好的原代 CEF 单层细胞用胰酶消化, 以 $8 \times 10^5 \sim 10^6$ 接种到 35mm 的平皿 (培养液为含 10% 血清的 DMEM), 待细胞长至 80%~90% 左右时即可用作转染; 2) 在细胞单层上接种 CVI988 病毒, 接毒量为 40PFU, 病毒吸附 3h; 3) 在无菌的 Eppendorf 管中加入 2.5 μ g 纯化的转移质粒载体 DNA, 用 25 μ L HBS 缓冲液 (20mmol/L HEPES, 150mmol/L NaCl, pH7.4) 将 DNA 稀释至 0.1 μ g/ μ L; 在另一 Eppendorf 管中加入 15 μ L DOTAP 脂质体和 35 μ L 的 HBS, 将两管混合物用移液器轻轻混匀, 室温放置 10~15min; 4) 培养皿中的细胞用无血清的 DMEM 洗涤 2 次, 吸干后重新滴加 1mL 无血清、无抗生素 DMEM, 将制备的 DOTAP / DNA 混合物加入培养基中, 边滴加边摇晃, 以便使混合物均匀分布; 5) 将培养皿放于 37 $^{\circ}$ C、5% CO $_2$ 条件下培养 6h 左右后, 吸弃上

清, 换上完全生长培养基继续培养, 12h 后换上维持液(含血清 3%)。

1.6 重组病毒的筛选纯化

转染后 12h, 开始观察荧光的出现情况。转染后第 4 天, 将 35mm 平皿中感染的 CEF 细胞用 0.05% 胰酶消化, 接种到有新鲜 CEF 细胞单层的 96 孔培养板上。观察荧光, 将有绿色荧光的蚀斑孔消化并接到新的细胞上, 如此重复多个循环, 直至确信所有的蚀斑都是荧光阳性, 依此确定为经蚀斑纯化的重组病毒。

1.7 重组病毒生长曲线的测定

将重组病毒和亲本毒 CVI988 接种在有 CEF 细胞单层的 24 孔细胞培养板(20PFU / 孔), 分别在接种后 1、2、3、5 和 7d 收集细胞, 并接到新鲜的细胞单层上, 每天收集的细胞分别做 4 个重复; 6d 后, 计算各孔的蚀斑数, 并计算出各天的平均蚀斑数。

1.8 鸡体内再分离重组病毒

将一日龄 SPF 白来航鸡(山东省家禽研究所提供)随机分成两组, 一组腹腔接种重组病毒, 另一组用 CVI988 亲本毒作对照, 每只鸡接种量为 4 000 PFU。接种后 7、10、14d, 每组每次采集 2~4 只鸡的抗凝全血。分离外周血的白细胞, 具体方法如下: 全血以 500r/min 离心 4~5min, 吸取上清(如仍有大量红细胞, 可重复一次), 再以 1 500r/min 离心 3min, 弃上清; 将沉淀的白细胞稀释, 以 2×10^5 个白细胞接种到有 CEF 单层的 24 孔细胞培养板上, 6d 后分别观察是否有带荧光的蚀斑。

2 结果与分析

2.1 重组臂 *US2* 基因的扩增与插入载体的构建

利用病毒总 DNA 为模板进行 PCR 反应, 扩增出与设计相一致的片段, 回收目的条带, 将其克隆入 pGEMT-easy 载体。测序结果得知, 目的基因长 2031 bp, 将其与 GenBank 中序列比较, 有三个碱基的突变, 结果未显示。因 T-easy 载体上没有 *Bgl* II 位点, 在克隆 T 的两端均为 *EcoR* I 位点, 相反 *US2* 片段中具有一个 *Bgl* II 位点而没有 *EcoR* I 位点, 因此, 用 *Bgl* II、*EcoR* I 可分别将筛选质粒线性化为 5.0kb 及切下 2.0kb 的 *US2* 片段(见图 2), 阳性质粒命名为 pGUS2。

2.2 转移质粒载体的构建

回收酶切后含 CMV 启动子和增强子的 GFP 基因 2.0kb 片段, 补平。用 *Bgl* II 消化 pGUS 2 载体, 补平去磷酸化后, 与目的片段连接。筛选出阳性质粒 pGUS 2 GFP (见图 3)。

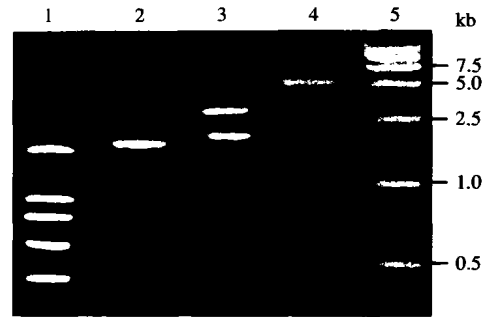


图 2 *US2* 基因的扩增与克隆

Fig.2 Application and clone of *US2* gene

1, DL2000 marker; 2, application result of *US2* gene; 3, pGUS 2 (*EcoR* I); 4, pGUS 2 (*Bgl* II); 5, DL15000 marker.

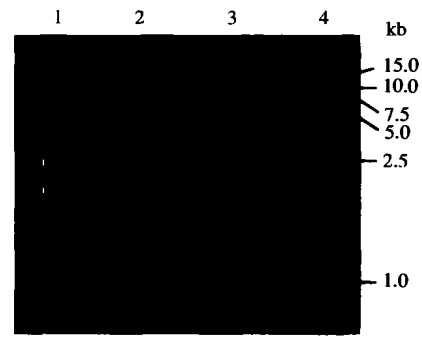


图 3 酶切电泳鉴定 pGUS 2 GFP

Fig.3 Agarose gel electrophoresis of pGUS 2 GFP

1, pGFP - C1 (*Mlu* I, *Apa* L I); 2, pGUS 2 (*Bgl* II); 3, pGUS 2 GFP (*Kpn* I); 4, DL15000 marker.

2.3 重组病毒的构建

转移质粒载体 pGUS2GFP 转染感染 CVI988 的 CEF 细胞, 在转染后 8h 即可见转染细胞中有许多荧光强度深浅不一的梭型细胞, 4d 后将转染的细胞接种到 96 孔板, 挑选带有绿色荧光的蚀斑孔接种新 CEF 细胞, 这样连续在 CEF 细胞上克隆纯化, 获得纯化的重组病毒 rCVIGFP(见封 3 彩版图 4)。rCVIGFP 与 CVI988 株在细胞上的空斑大小无明显差别, 但随着病变的变化, 死亡细胞的荧光逐渐消失。可见 *US2* 基因中插入外源基因并不影响病毒在细胞上的增殖, 这与 *US2* 基因是 MDV-1 的非必需基因是一致的^[8, 9, 12]。

2.4 病毒在细胞上的生长曲线测定

重组病毒和亲本毒 CVI988 在接种 24 孔细胞培养板后 1、2、3、5 和 7d 收集细胞, 并接到新鲜的细胞单层上; 6d 后计算蚀斑数。根据计算出接种后各天的平均蚀斑数, 得出生长曲线图 5。

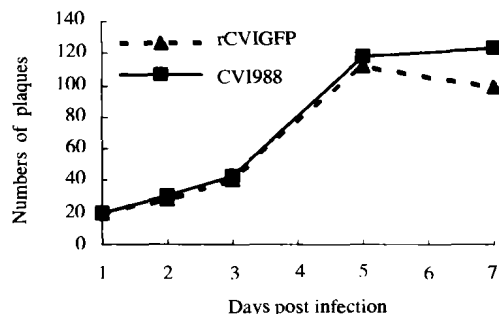


图5 病毒在细胞上的生长曲线

Fig.5 The growth curves of viruses in cells

2.5 病毒的再分离结果

在病毒免疫接种鸡后 7、10、14d, 分别分离外周血白细胞, 以 2×10^5 个白细胞接种到有 CEF 单层的 24 孔细胞培养板上, 6d 后分别观察蚀斑。在接种病毒后 7d, 重组毒组和亲本毒组均可分离到病毒, 说明此时鸡体已经出现病毒血症, 且到免疫接种后 10、14d, 鸡体内病毒血症一直保持较高水平。观察荧光, 可从接种重组病毒的鸡体内分离到带荧光的病毒 (见图 6)

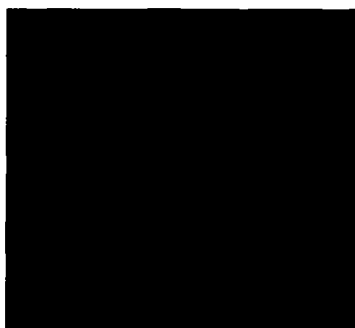


图6 重组病毒的再分离结果 (10×10)

Fig.6 The recombinant virus reisolation(10×10)

3 讨论

EGFP 是近年来 Clontech 推出的一种全新的标记基因, 它是将 wtGFP 的 Ser65 用 Thr 代替, 用 Phe64 用 Leu 代替, 从而提高了 GFP 在动物细胞中的表达效率^[14]。GFP 作为标记基因具有许多优点: 1) 检测方便, 因为 GFP 荧光不需要底物酶和其他反应因子, 可直接在荧光显微镜下观察; 2) 荧光稳定, 能耐受长时间的光照, 从而延长可检测时间; 正是因为 GFP 的这些优点, 选择其作为筛选 CVI988 株重组毒的报告基因。在本实验中的 EGFP 基因的下游有一多克隆位点, 这将有利于融合其他基因

(pp38、Meq), 来进一步研究马立克氏病毒某些基因的功能; 还可融合其他禽病病原的保护性抗原基因, 开发预防禽病的多价疫苗。

从重组毒在体外的生长曲线结果来看, 重组病毒与亲本病毒的生长曲线类似, 说明在 US2 区插入 EGFP 基因不会影响到病毒在细胞上的生长, 但重组病毒的滴度在接种细胞后第 5 天最高, 这一点为筛选重组马立克氏病毒提供启示: 由于 MDV 在 CEF 细胞上呈严格的细胞结合性, 不产生游离的病毒, 每个细胞内包含大量的病毒粒子, 且其中只有少量的重组病毒, 导致了重组病毒筛选的难度。在筛选的过程中, 应在接种病毒后 4~5d 就将其传代, 此时重组毒滴度最高, 从而能达到快速筛选到稳定的重组病毒的目的。

重组毒的体内分离实验看, 从接种病毒后 7d 的鸡外周血白细胞中就能分离到表达绿色荧光的病毒, 这说明 US2 基因是一个较稳定的外源基因插入位点, 用 CVI988 株病毒作为载体构建抗 MD 的新型重组疫苗具有较好的应用前景, 因为 HVT 在免疫后 2~3 周才能形成坚强的保护力, 免疫形成时间较长, 在免疫空白期内, 易遭受早期感染而导致免疫失败, 而该重组病毒在免疫后 1 周内即可产生病毒血症, 从而弥补病毒的早期感染问题。

参考文献

- [1] Churchill A E, Biggs P M. Agent of Marek's disease in culture[J]. Nature. 1967, 215-258.
- [2] Calnek B W, Witter R I. Marek's disease of poultry[R]. Iowa state University press, Ames, 1997, 365-400.
- [3] Buckmaster A E, Scott S D, Sanderson M J, et al. Gene sequence and mapping data from Marek's disease virus and herpesvirus of turkeys: implication for herpesvirus classification[J]. J Gen Virol, 1988, 69: 2033-2042.
- [4] Sakaguchi M, Urakawa T, Hirayama Y, et al. Sequence determination and genetic content of 8.9kb restriction fragment in the short unique region and the internal inverted repeat of Marek's disease virus type 1 DNA[J]. Virus Genes, 1992, 6: 365-378.
- [5] Ross N L J, Binns M M, Tyers P, et al. DNA sequence and organization of genes in a 5.5kb EcoR I fragment mapping in the short unique segment of Marek's disease virus (strain RB1B)[J]. J Gen Virol. 1991, 72: 949-954.
- [6] Brunovskis P, Velicer L F. The Marek's disease virus unique short region: alphaherpesvirus-homologous, fowlpox virus-homologous, and MDV-specific gene[J]. Virology, 1995, 206: 324-338.
- [7] Skaguchi M, Hirayama Y, Maeda H, et al. construction of recombinant Marek's disease virus type 1(MDV1) expressing the E.coli LacZ gene as a possible live vaccine vector: the US10 gene of

- MDV1 as a stable insertion site[J]. *Vaccine*, 1994, 12: 953-957.
- [8] Parcells M S, Anderson A S, Cantello J L, *et al.* Characterization of Marek's disease virus insertion and deletion mutants that lack US1, US10, and/or US2 and neighboring short-component open reading frames[J]. *J Virol*, 1994, 68: 8239-8253.
- [9] Parcells M S, Anderson A S, Morgan R W. Retention of oncogenicity by a Marek's disease virus mutant lacking six unique short region genes[J]. *J Virol*, 1995, 69: 7888-7898.
- [10] Sakaguchi M, Urakawa T, Hirayama Y, *et al.* Marek's disease virus protein kinase gene identified within the short unique region of the viral genome is not essential for viral replication in cell culture and vaccine-induced immunity in chickens[J]. *virology*, 1993, 195: 140-148.
- [11] Anderson A S, Parcells M S, Morgan R W. The glycoprotein D (US6) homolog is not essential for oncogenicity or horizontal transmission of Marek's disease virus[J]. *J Virol*, 1998, 72: 2548-2553.
- [12] Schumacher D, Tischer B K, Fuchs W, *et al.* Reconstitution of Marek's disease virus serotype 1(MDV-1) from DNA cloned as a bacterial artificial chromosome and characterization of a glycoprotein B-negative MAD-1 mutant[J]. *J Virol*, 2000, 74: 11088-11098.
- [13] Chalfie M, Tu Y, Euskirchen G, *et al.* Green fluorescent protein as a marker for gene expression[J]. *Science*, 1994, 263: 802-805.
- [14] Cubitt A B, Heim R. Understanding, improving and using green fluorescent proteins[J]. *Trends Biochem Sci*, 1995, 20: 448-455.

欢迎订阅《中国药理学通报》

《中国药理学通报》是由中国药理学会主办，安徽医科大学编辑出版的全国性学术性杂志。本刊主要刊登药理学研究论文，辟有论著、讲座与综述、小专论、实验方法学、新药介绍与老药新用、国内外药理学动态、研究简报、快报等专栏。

本刊荣获 2003 年国家期刊奖百种重点期刊奖，第 1、第 2 届全国国家科委、中共中央宣传部、国家新闻出版署优秀科技期刊二等奖，第 1、第 2 届中国科学技术协会优秀期刊二等奖，第 1 届华东地区优秀期刊一等奖，第 2 届华东地区最佳刊奖。

本刊已被中国科学院文献情报中心中国科学引文数据库确定为医学类核心期刊；被北京大学图书馆主编《中文核心期刊要目总览》第 1、第 2 版及 2000 版均选定为药学类核心期刊；被国际核心期刊研究会确定为核心期刊；被国家科委科技信息研究所确定为中国科技论文统计源期刊。

本刊已被国内几乎所有相关检索期刊及国际著名检索期刊 *Chemical Abstract*(美国)、《P_ж》(俄罗斯)、*Biochemical Abstract* (美国)、*Index medicus*(美国)、*EMBASE/Excerpta Medica*(荷兰)、*Kunst and Wissen*(德国)、*Centre for Agriculture and Biosciences international*(CAB international, 英国)等收录利用。连续 8 年进入《CA 千种表》。

本刊为月刊，大 16 开 120 页，每期定价 12.00 元，全年 144.00 元。邮发代号：26-52，请及时向当地邮局订阅，漏订读者请直接汇款至本刊编辑部，免收邮寄费。地址：安徽省合肥市安徽医科大学校内《中国药理学通报》编辑部，邮编：230032，联系人：吴慧、武明静。电话：0551-5161221，电子信箱：cpb@ahmu.edu.cn