

伪狂犬病病毒基因缺失疫苗制苗用毒种特性研究*

陈 陆^{1,2}, 郭万柱^{1**}, 殷华平¹, 查光明²

(1. 四川农业大学动物生物技术中心, 四川雅安, 625014; 2. 河南农业大学牧医工程学院, 河南郑州, 450002)

The Characteristics of Pseudorabies Virus Gene-deleted Vaccine Strain

CHEN Lu^{1,2}, GUO Wan-zhu^{1**}, YIN Hua-ping¹, ZHA Guang-ming²

(1. Animal Biotechnology Center, Sichuan Agricultural University, Yaan, Sichuan, 625014, China; 2. Animal Husbandry and Veterinary College, Henan Agricultural University, Zhenzhou, Henan, 450002, China)

Abstract: In order to determine the effect of deletion of *gE*, *gI* and *TK* on the characteristics of virion, we studied the property in cell culture, physicochemical characters and the morphogenesis in vero cells of *Pseudorabies virus* (PRV) gene-deleted vaccine strain SA215. The results indicated that PRV SA215 had the similar process of adsorption and penetration kinetics as its parental strain Fa; however, the course of replication was prolonged. Furthermore, the deletion of *gE*, *gI* and *TK* only has slight effect on physicochemical characters. The comparative analysis of SA215 and Fa on the morphogenesis in cultured cells suggested that the process of budding from nucleus membrane and forming of secondary envelope were delayed or arrested. The results provide guidance for manufacture of PRV gene-deleted vaccine SA215.

Key words: *Pseudorabies virus*; Gene-deleted vaccine strain; Culture property; Physicochemical characters; Morphogenesis

摘要: 本试验通过对 PRV 基因缺失株 SA215 (*gE*/*gI*/*TK*) 细胞培养特性、理化特性及形态发生过程进行研究, 来确定 *gE*、*gI* 和 *TK* 基因缺失对病毒特性的影响。结果表明, 基因缺失对该毒株在培养细胞的吸附和穿入过程没有影响, 但与亲本株相比, 表现为生长掩蔽期延长, 增殖速度减缓, 但能达到相似的增殖滴度, 并且基因缺失对病毒的理化特性影响很小。形态发生过程观察结果表明, PRV SA215 株在细胞培养上形态发生正常, 能形成感染性病毒粒子, 但在由核膜出芽和囊膜形成上受到一定程度的阻碍。本研究为疫苗研制和生产提供指导和依据。

关键词: 伪狂犬病病毒; 基因缺失疫苗株; 培养特性; 理化特性; 形态发生

中图分类号: S852.65 文献标识码: A 文章编号: 1003-5125(2005)02-0130-05

伪狂犬病病毒 (*Pseudorabies virus*, PRV) 属于疱疹病毒科, 能感染多种家畜和野生动物。其中, 猪是其贮存宿主。猪在耐过 PRV 感染后能形成潜伏感染, 可终身带毒。在应激条件下易被激活而引起复发性感染和散毒, 因此对野毒感染猪的剔除在该病的防治上有重要意义。目前在欧美等国家主要通过接种基因缺失疫苗结合鉴别诊断来执行伪狂犬病的根除计划。基因缺失疫苗是通过病毒生长所非必需的且与毒力有关的基因进行缺失而获得的。*gE* 基因在 PRV 野毒株中都稳定表达, 抗体持续时间长^[1], 且不是刺激机体产生保护性免疫所必需, 所

以被作为最佳缺失 (标志) 基因。PRV 的毒力是受多基因控制的, 仅缺失 *gE* 的毒株仍保持一定程度的毒力, 因此, 商业用 *gE* 基因缺失疫苗株需通过与其他毒力基因如 *TK* 等共同缺失构建^[2]。

郭万柱教授在国内率先构建系列 PRV *gE* 基因缺失株, 其中在对 PRV SA215 株 (*gE*/*gI*/*TK*) 生物学特性研究的基础上, 确定其为一株安全、免疫原性好、免疫期长的疫苗株^[3]。本试验拟通过对其细胞培养特性和理化特性进行研究, 为以后的疫苗研制和生产提供依据和指导。同时通过电镜检测比较了其 PRV Fa 株在培养细胞中形态发生

收稿日期: 2004-09-07, 修回日期: 2004-10-20

* 基金项目: 国家“十五”攻关项目 (2002BA514A-16-7) 和国家“863”项目 (2002AA241341) 资助。

作者简介: 陈陆 (1971 -), 河南信阳籍, 博士, 研究方向: 动物病毒分子生物学。

** 通讯作者. Corresponding author. Tel: 0835-2882344. E-mail: wzguo@126.com

过程的差异,从而为缺失基因的功能研究提供依据。

1 材料与方 法

1.1 实验材料

PRV SA215 疫苗株:由四川农业大学动物生物技术中心构建。PRV Fa 强毒株:由中国兽药检验所提供。Vero 细胞:购自武汉大学典型物保藏中心。DMEM 培养基、胰酶和新生牛血清为 Gibco 公司产品。甲基纤维素为 Sigma 公司产品。

1.2 蚀斑试验

参照文献^[4]进行。

1.3 穿入动力测定

参照文献^[4]进行。在生长 Vero 细胞单层的 6 孔盘的上分别接种 200PFU 的 PRV Fa 株和 SA215 株,4 吸附 1h 后,覆盖 37 预温的营养液,以便穿入。分别于 0、5、10、20、40、60min 时,细胞单层用低 pH 值溶液(40mmol/L 柠檬酸,10mmol/L KCl,135mmol/L NaCl,pH3.0)处理 2min,以灭活胞外未穿入的病毒。细胞用 PBS 冲洗两次,覆盖甲基纤维素培养基,37 培养 2-3d 后,细胞固定和染色,噬斑计数,与穿入 1h 时用 PBS 处理的对照孔的噬斑数相比,计算穿入百分比。

1.4 一步生长曲线测定

在生长有 Vero 细胞单层的细胞瓶以 5MOI 的量分别接种 PRV Fa 和 SA215 株,4 吸附 1h 后,细胞覆盖预温的营养液,37 作用 90min,以便穿入。然后,胞外病毒以低 pH 值溶液处理灭活。加入维持液培养。每间隔 4h 分别收集细胞、上清液及两者混合物,通过蚀斑试验测定其病毒滴度。

1.5 病毒理化特性研究

1.5.1 耐热性试验:将 PRV Fa 株和 SA215 株病毒分别分装于小瓶中,置 56 恒温水浴中处理,分别在 15、30、45 和 60min 时取出,测定病毒滴度。设不做任何处理的病毒对照。

1.5.2 酸碱敏感实验:0.5mL PRV Fa 株和 SA215 株病毒液用 0.1mol/L HCl 或 NaOH 溶液调节 pH 值至 3.0、4.0、5.0、6.0、7.0、8.0、9.0、10.0 和 11.0,37 孵育 1h 后,用 HCl 或 NaOH 溶液调节 pH 值至 7.0。计算加入的 HCl 或 NaOH 溶液的总积。作蚀斑试验测定病毒滴度,确定酸碱处理对病毒滴度的影响。根据调节 pH 值时加入的 HCl 或 NaOH 的量,将病毒滴度换算成原体积时的数值。

1.5.3 冻融稳定性:将 PRV Fa 株和 SA215 株病毒经 37 5min 和 -20 20min 反复冻融,作蚀斑试验测定不同冻融次数对病毒滴度的影响。

1.6 形态发生过程观察

为了制作超薄切片,PRV Fa 株和 SA215 株以 1MOI 分别感染 Vero 单层,于感染后 0、4、8、12 和 24h,收集细胞,用 2.5% 的戊二醛固定 60min,低速离心成团。然后,按照常规方法制备超薄切片,染色后用 H600 透射电镜观察。

2 结 果

2.1 穿入动力测定

在不同时间,PRV Fa 株和 SA215 株病毒穿入百分率见图 1。由结果可以看出,两者具有相似的穿入动力,表明 PRV SA215 株穿入未受阻碍。

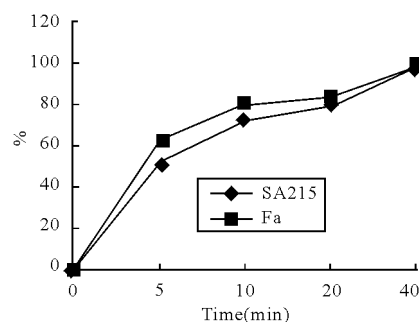


图 1 PRV SA215 与 Fa 穿入动力曲线

Fig. 1 Penetration kinetics of PRV SA215 and Fa

2.2 一步生长曲线的测定

SA215 疫苗株感染 Vero 细胞后不同时间时细胞内、外及两种混合后的病毒滴度见图 2。结果为,在第 8h 可以检测出病毒粒子,随后,病毒滴度上升很快,在 20~44h 内维持较高的病毒滴度。细胞内、外的病毒粒子滴度差异不显著(一个数量级以内)。与 Fa 株相比(见图 3),SA215 株表现为增殖速度缓慢,但能达到相似的增殖滴度,且能维持更长的时间。这与 SA215 相比于 Fa 株减弱的致细胞病变效应一致。

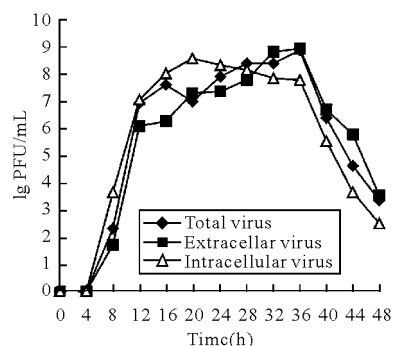


图 2 PRV SA215 株一步生长曲线图

Fig. 2 One-step growth analysis of PRV SA215

2.3 耐热性试验结果

PRV SA215 株和 Fa 株在 56 处理不同时间

后,均导致病毒滴度的显著降低,每 15min 约降低两个滴度。两者差异不显著(结果见图 4)。

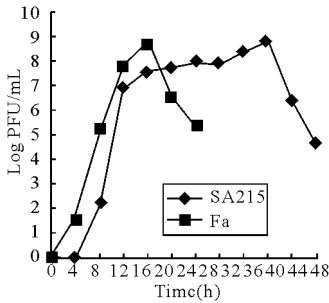


图 3 PRV SA215 株和 Fa 株一步生长曲线图

Fig. 3 One-step growth analysis of PrV SA215 and Fa

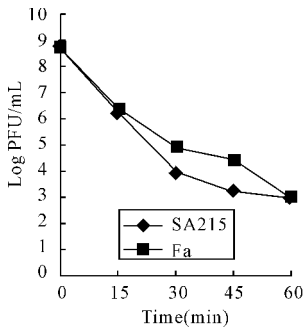


图 4 PRV SA215 株和 Fa 株对热敏感性

Fig. 4 Sensitivity of PRV SA215 and Fa to heat-inactivation at 56

2.4 酸碱稳定性试验

PRV SA215 株和 Fa 株在 pH3.0-11.0 范围内稳定性试验结果见图 5。在 pH 5-9 的范围内,病毒滴度下降不明显。pH 值超出该范围时,病毒滴度显著降低。在 pH3.0 和 pH 9.0 时,37 作用 1h 可导致病毒全部死亡。PRV SA215 株和 Fa 株表现出相似的对酸碱的稳定性。

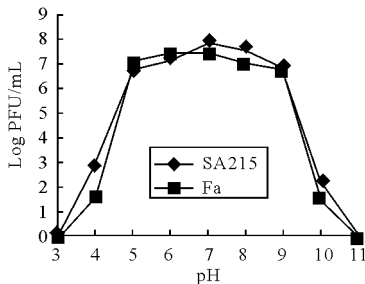


图 5 PRV SA215 株和 Fa 株对酸碱的敏感性

Fig. 5 Sensitivity of PRV SA215 and Fa to pH

2.5 冻融稳定性

不同的冻融次数对病毒稳定性影响的结果见图 6。由该图可以看出,冻融对 PRV SA215 株和 Fa 株的滴度有一定的影响,但不显著。冻融一次后,病毒的滴度降低范围在一个数量级内。两者表现出相

似的冻融稳定性。

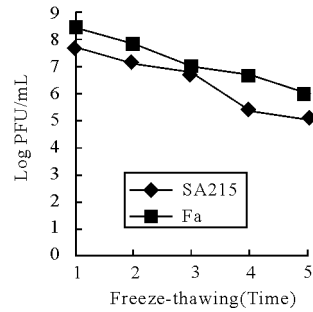


图 6 冻融对 PRV SA215 株和 Fa 株病毒滴度的影响

Fig. 6 Sensitivity of PRV SA215 and Fa to freeze-thawing

2.6 PRV SA215 株形态发生过程

为了探明 *gE*、*gI* 和 *TK* 基因缺失后对 PRV SA215 株在感染细胞上复制过程的影响,我们将其与亲本 Fa 株在 Vero 细胞上的形态发生过程进行了比较研究。

PRV Fa 株感染的细胞内,存在大量病毒粒子,处于疱疹病毒形态发生过程的各个典型阶段。与 PRV Fa 株相比,SA215 株病毒粒子在吸附和穿入(图 7-A)及 DNA 的衣壳化和核衣壳的形成(图 7-B)没有受到影响。核衣壳也能通过在内核膜出芽内释放到胞浆中(图 7-C),在胞浆中的核衣壳通过向转高尔基体区的囊泡中出芽获得次级囊膜(图 7-E),随后通过转运囊泡胞外分泌释放成熟病毒粒子到胞外区(图 7-F)。同时也发现一些异常过程:胞浆内存在与被认为是被膜蛋白聚积物衍生的电子密度材料相伴的非囊膜衣壳聚集而形成的包涵体(图 8-A);在某些区域也发现核衣壳在核膜下和核膜间隙聚集(图 8-B),在核内发现含有大量核衣壳的囊泡(图 8-C)。表明 PRV SA215 株感染 Vero 细胞后由核膜出芽和囊膜形成受到一定程度的阻碍和延缓。

3 讨论

PRV 与靶细胞的起始吸附与糖蛋白 GC 和细胞表面的硫酸乙酰肝素的相互作用有关,该过程对于外源肝素的加入敏感。二次吸附由糖蛋白 GD 介导的^[5]。吸附后伴有病毒囊膜与质膜的相互融合,与融合过程有关的糖蛋白(GB、GD、GH 和可能的 GL)对于病毒穿入是必需的^[6]。本试验对 PRV SA215 疫苗株的穿入动力学和一步生长曲线的测定结果表明,基因缺失对该毒株在培养细胞的吸附和穿入过程没有受到阻碍,说明糖蛋白 GE、GI 和 TK 没有参与这两个过程。但与亲本 Fa 株相比,表现为掩蔽期延长,增殖速度减缓,但能达到相似的增

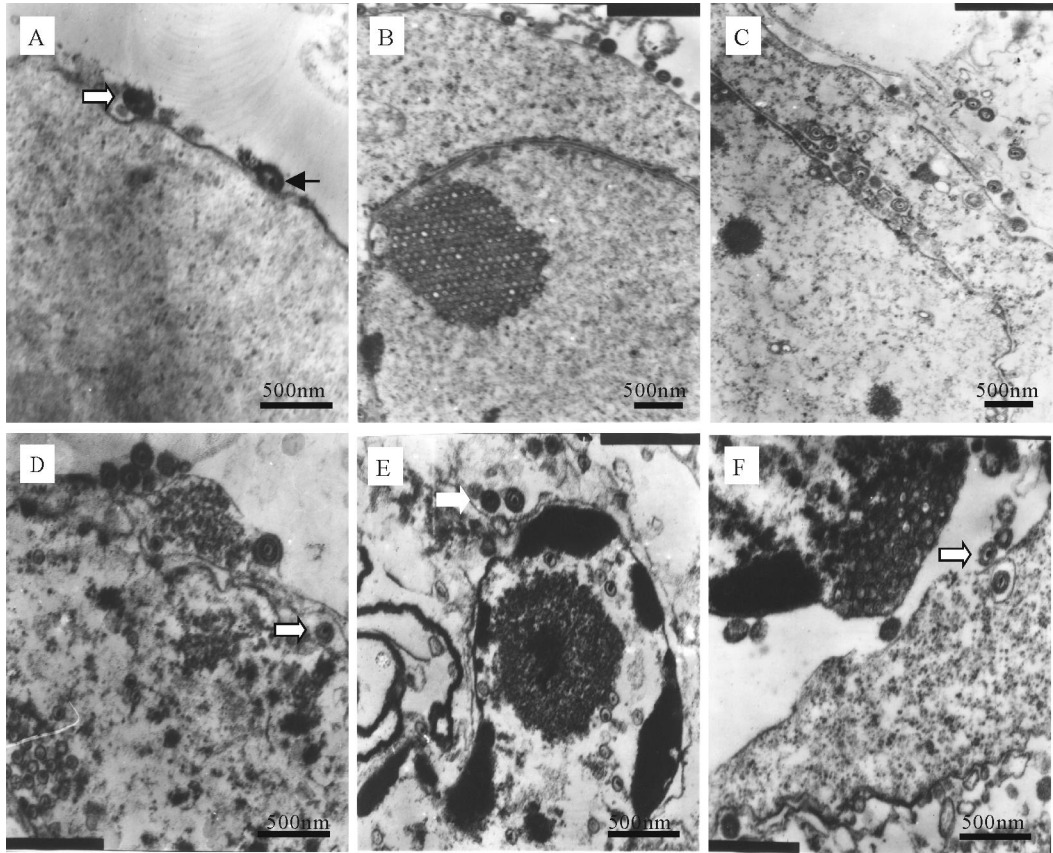


图 7 PRV SA215 株感染 Vero 细胞后的电镜照片

Fig. 7 Electron microscopy of PRV SA215-infected Vero cells

A, Attachment (white arrow) and penetration (black arrow) of PRV SA215; B, Intranuclear nucleocapsids were arranged as pseudocrystals. C, Primary envelope was formed by budding of capsid at the inner membrane and de-enveloped by fusion of primary envelope with the outer nuclear membrane; D, primary envelope was formed (arrow); E, Secondary envelopment of intracytoplasmic capsids by budding into vesicles (arrow), resulting in complete enveloped virions inside exocytic vesicles; F, Fusion of the vesicle membrane with the plasma membrane then leads to the release of the mature virions. Bars: 500nm.

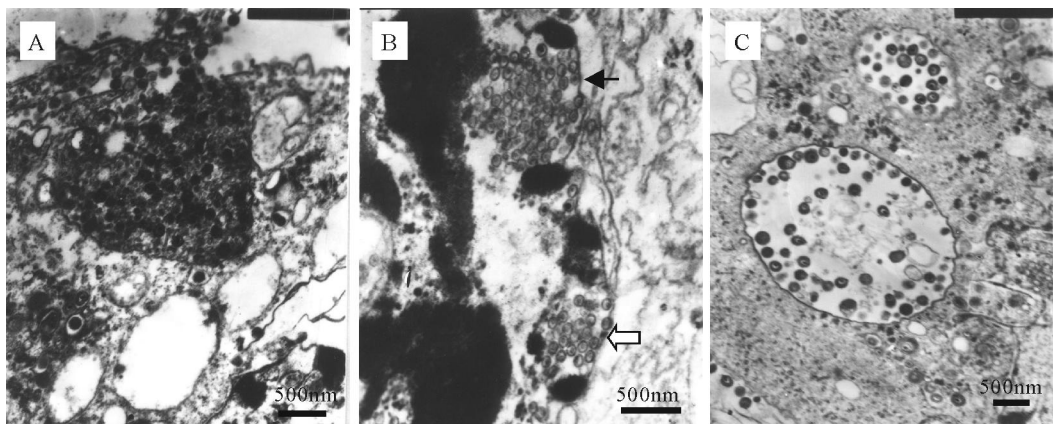


图 8 PRV SA215 株感染 Vero 细胞后的电镜照片

Fig. 8 Electron microscopy of PRV SA215-infected Vero cells

A, Accumulation of tegumented capsids; B, Accumulation of capsids under the nuclear membrane (black arrow) and the perinuclear space (white arrow); C, Vesicle with large amounts of capsids. Bars: 500nm.

殖滴度,且能维持更长的时间。这与缺失基因 *gE*、*gI* 及 *TK* 的功能是相符的。PRV 在感染细胞时有两种扩散方式,即直接的由细胞到细胞的扩散和释

放的病毒吸附到未感染的细胞,前者主要是由 *GE* 介导的,后者则是 *GC* 糖蛋白的功能。虽然 *GE* 缺失突变株由细胞到细胞的直接转运扩散能力有缺

陷,但 GC 可介导释放的病毒吸附到未感染的细胞上而扩散^[7],这一功能能保证其达到与野毒株相似的增殖滴度。GI 通过与 GE 形成复合体来行使其功能的,GI、GE 或者两者均缺失的突变体的特性相似^[8]。本结果说明了伪狂犬病基因缺失株 SA215 在细胞培养上易于生长和增殖,用作生产用毒种具有可行性。在病毒繁殖的对数上升期,病毒滴度迅速升高,并于 36h 时达到最高值。一步生长曲线不仅反映出 PRV SA215 株的增殖特性,还指示收毒的适宜时间,对于在生产上增殖病毒有指导意义。

PRV SA215 株的理化特性研究表明,其具有与 Fa 株相似的特性。结果表明基因缺失对病毒的理化特性影响很小。该数据的获得对于毒种的保存和疫苗试制时耐热保护剂的使用来延长疫苗的保存期具有指导意义。

本研究拟通过对 PRV SA215 株感染细胞的超微结构分析来确定其复制过程。与野毒 Fa 株相比,PRV SA215 株在感染细胞后,具有野毒疱疹病毒增殖过程的各个典型阶段。但是在一些阶段也出现一些异常情况。Brack^[4,9]曾发现在 *gE/gI* 双基因缺失株感染细胞的细胞质内积聚电子密度材料,但形态发生没受影响,可以看见二级囊膜化和胞外病毒粒子,该表型出现主要是由于 GE 胞质尾区与衣壳和/或被膜成分特异的相互作用导致胞内衣壳有效的二级囊膜化功能受影响造成的。*gE/gI* 双基因缺失在伴有 GM 缺失的三基因缺失株在感染细胞上,出现核衣壳在细胞质内的积聚,没有二级囊膜化和胞外病毒粒子出现,显著地阻碍了感染性病毒粒子形成。这是由于 *gM* 和 *gE/gI* 均涉及到通过与存在于囊泡膜上的被膜成分相互作用,将被膜

蛋白导向二级囊膜出芽位点,介导胞内衣壳的次级囊膜化过程,*gE* 胞质尾区以次要方式作用于该过程。由于 *gM* 功能代偿性作用,*gE* 和 *gI* 的缺失对于 PRV SA215 株在由核膜出芽和囊膜形成过程表现一定程度的阻碍和延缓作用,但不影响其正常形态发生。

参考文献

- [1] de Leeuw P W, van Oirschot J T. Vaccines against AD: evaluation of their efficacy under standardized laboratory conditions [J]. *Vet Q*, 1985, 7:191-197.
- [2] Berns A, van den Ouweland A, Quint W, *et al.* Presence of markers in the unique short region or repeat region or both of Pseudorabies virus [J]. *J Virol*, 1985, 53: 89-93.
- [3] 陈 陆, 郭万柱, 徐志文, 等. 伪狂犬病三基因缺失疫苗株 SA215 某些生物学特性研究[J]. *中国预防兽医学报*, 2000, 增刊. 153-157.
- [4] Brack A R, Klupp B G, Granzow H, *et al.* Role of the cytoplasmic tail of PRV glycoprotein E in virion formation [J]. *J Virol*. 2000, 74: 4004-4016.
- [5] Karger A, Mettenleiter T C. Glycoprotein gIII and gp50 play dominant roles in the biphasic attachment of Pseudorabies virus [J]. *Virology*, 1993, 194:654-664.
- [6] Peeters B, Pol J, Gelkens A, *et al.* Envelope glycoprotein gp50 of Pseudorabies virus is essential for virus entry but is not required for viral spread in mice [J]. *J Virol*, 1993, 67: 170-177.
- [7] Zsak L, Zuckermann F, Sugg N, *et al.* gI of Pseudorabies virus promotes cell fusion and spread via direct cell-to-cell transmission [J]. *J Virol*, 1992, 66: 2316-2325.
- [8] Kritas S K, Pensaert M B, Mettenleiter T C. Role of envelope glycoprotein gI. gp63 and gIII in the invasion and spread of ADV in the olfactory nervous pathway of the pig [J]. *J Gen Virol*, 1994, 75: 2319-2327.
- [9] Brack A R, Dijkstra J M, Granzow H, *et al.* Inhibition of virion maturation by stimulateous deletion of glycoprotein E, I and M of PRV [J]. *J Virol*. 1999, 97: 5364-5372.