

表达 LacZ 基因的重组 CVI988 病毒的构建及特性研究*

邱亚峰, 葛菲菲, 张雪莲, 徐学清, 陈溥言**

(南京农业大学动物疫病诊断与免疫重点实验室, 江苏南京 210095)

Construction and Characterization of Recombinant Marek's Disease Virus

CVI988 Expressing the *E. coli* LacZ Gene*

QIU Ya-feng, GE Fei-fei, ZhANG Xue-lian, XU Xue-qing, CHEN Pu-yan**

(Key Laboratory of Animal Disease Diagnostic and Immunology, Ministry of Agriculture, Nanjing Agricultural University, Nanjing, 210095, China)

Abstract: The *LacZ* gene controlled under the Marek's disease virus (MDV) glycoprotein B (gB) promoter was excised from plasmid pSK-gB-LacZ and inserted into US10 gene. Two plasmids were constructed, pUS-gB-LacZ (L) and pUS-gB-LacZ(U), which differ with regard to the orientation of the expression cassette. Then pUS-gB-LacZ (L) was transfected into secondary Chicken embryo fibroblasts (secondary CEF) cells and super-infected with the MDV CVI988 strain. The recombinant virus (rCVILacZ) expressing the *lacZ* gene was isolated and purified in secondary CEF. The growth curve of rCVILacZ was similar to that of the parent virus in CEF.

Key words: Recombinant virus; Marek's disease; *lacZ* gene; Promoter

关键词: 重组病毒, 马立克氏病毒, *LacZ* 基因, 启动子

中图分类号: S852.65

文献标识码: A

文章编号: 1003-5153(2006)01-0071-04

马立克氏病 (MD) 是一种鸡的淋巴增生性肿瘤疾病, 是由马立克氏病病毒血清 1 型 (Marek's disease virus serotype 1, MDV1) 引起的, 但是, 可以由致弱的或天然不致病的疫苗株进行防制。疫苗株分为三种类型: 致弱的血清 1 型, 天然不致瘤的血清 2 型 (MDV2) 和天然不致病的火鸡疱疹病毒 (HVT)。

相对于 HVT, 致弱的 MDV1 作为载体有几个优点: (a) MDV1 如 CVI988 在对 MD 的防制方面要优于 HVT, 尤其对超强毒 (vMDV) 或超超强毒 (vvMDV) 防制; (b) 对于 MDV1 的分子生物学和免疫学的理解要比 HVT 透彻。对于重组病毒的构建, 首先是选择外源片断插入的位点即为病毒复制非必须区, 此外, 是选择控制外源片段转录的启动

子。在构建 MD 重组病毒时常用的启动子为 SV40 启动子^[2,3]、CMV 启动子^[4]等。

本文是利用 MDV1 的 US10 为插入位点, *lacZ* 基因为报告基因, 选择 MDV1 囊膜糖蛋白 B (gB) 基因的启动子为控制 *lacZ* 基因转录的启动子, 构建重组病毒, 并初步探讨了重组病毒的特性。

1 材料和方法

1.1 实验材料

鸡胚成纤维细胞 (CEF) 按常规方法由 9-10 日龄 SPF 鸡胚 (购自南京药械厂) 制备, 用于病毒的增殖; CVI988/Rispens 由本组保存。含有 MDV1 US10 区域的质粒 pBUS10 以及含有 gB 基因启动子和 *lacZ* 基因构成的表达盒的质粒 pSK-gB-LacZ 质

收稿日期: 2005-06-07, 修回日期: 2005-09-12

* 基金项目: 国家 863 高新技术发展项目 (2002AA245051)

作者简介: 邱亚峰 (1978-), 男, 山东济宁人, 博士生, 研究方向为预防兽医学。

** 通讯作者: 陈溥言 (1942-), 男, 江苏南京人, 教授, 研究方向为预防兽医学。

Corresponding author. Tel: 86-25-84396028, E-mail: aid@njau.edu.cn

粒由本室构建保存, 宿主菌 DH5 由本室保存。限制性内切酶, T₄DNA 聚合酶, T₄DNA 连接酶, 牛小肠碱性磷酸酶 (CIAP), dNTP 为大连宝生物公司产品; X-gal 为 Promega 公司产品; DNA 胶回收试剂盒为上海华舜公司产品, Lipofectin 2000 为 GIBCO 公司产品, 其他试剂为分析纯。

1.2 转移载体的构建

利用 *Xba* 消化 pSK-gB-LacZ, 电泳回收 4.3Kb 的条带, 补平, 用作连接的目的片段; 同时, 用 *Bal* 消化 pBUS10, 沉淀回收后, 用作载体; 将上述片段进行连接, 按常规的方法转化, 涂布平板 (涂时加入 X-gal 和 IPTG) 挑蓝斑、提质粒及酶切鉴定; 然后, 对阳性的质粒鉴定表达盒的转录方向与重组臂的转录方向, 方向相同的重组质粒命名为 pUS-gB-LacZ (L), 方向相反的质粒命名为 pUS-gB-LacZ (U)。

1.3 重组病毒的构建、筛选和纯化

选择培养至 80% ~ 90% 满的继代鸡胚成纤维细胞, 感染 CVI988 病毒 30 ~ 40PFU/35 mm 平皿, 感作 3 h, 用无小牛血清及抗生素的 DMEM 洗涤 3 次, 按照 Lipofectin 2000 的说明书进行转染, 转染结束后继续培养 4 d 收获病毒, 将其接种于新鲜的鸡胚成纤维细胞, 培养 4-5d, 当有病变出现时, 将培养液换为 1 ml, 加入 X-gal (终浓度为 200μg/mL), 继续培养, 当有蓝斑出现时, 挑取蓝斑, 将分离到的重组病毒接种于新鲜的 CEF 上^[5], 如此重复上述操作, 直到所有的蚀斑都是 1/2 乳糖苷酶活性阳性, 将此重组病毒命名为 rCVI1acZ。

1.4 病毒生长曲线的测定

方法参照文献^[6], 并作一些改动, 具体步骤如下: 重组病毒和亲本毒 CVI988 在接种 24 孔培养板后于 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7d 收集细胞, 每天收集的细胞毒作 3 个重复, 接种到新鲜的细胞单层上, 记录每天收集的细胞毒 (3 个重复) 的蚀斑总数, 最后, 得到病毒在每天的平均蚀斑数, 利用 Excel 软件绘制曲线。

2 结果

2.1 转移载体的构建

技术路线见图 1。

所构建的重组质粒经 *Xho* 单一酶切位点鉴定, 产生 10.0kb 左右的条带, 另外, 用 *Hind* 酶切以确定表达盒的连接方向, 当表达盒的转录方向与重组臂的转录方向相同时, 仅切出 5.0kb 左右的条带; 当表达盒的转录方向与重组臂的转录方向相

反时, 切出 7.0kb 和 1.7kb 的两条带。结果见图 2 和 3。

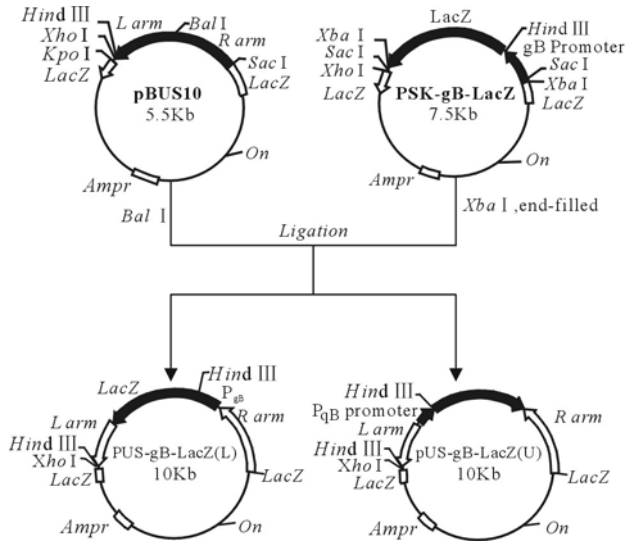


图 1 质粒载体构建路线

Fig.1 Scheme for construction of plasmid vector

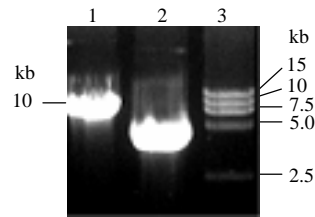


图 2 pUS-gB-LacZ 酶切鉴定

Fig.2 Restriction enzyme analysis of pUS-gB-LacZ

1, pUS-gB-LacZ (*Xho*) ; 2, pSK-gB-LacZ (*Bal*) ; 3, Marker DL15000

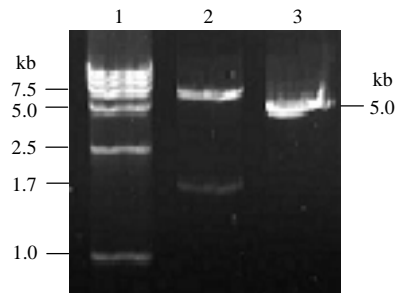


图 3. pUS-gB-LacZ 中表达盒方向鉴定

Fig.3 Analysis of the orientation of the expression cassette in pUS-gB-LacZ

1, Marker DL 15000; 2, pUS-gB-LacZ (U) (*Hind*) ; 3, pUS-gB-LacZ (L) (*Hind*)

2.2 重组病毒的构建

将转移质粒载体 pUS-gB-LacZ (L) 用脂质体转染感染 CVI988 的 CEF, 4 d 后收集病毒, 将其接

种于新鲜的 CEF 上, 5 d 以后, 进行蓝斑的挑取, 将挑取的蓝斑接种于新鲜的 CEF 上, 如此重复上述步骤, 获得纯化的重组病毒 rCVILacZ 见图 4。

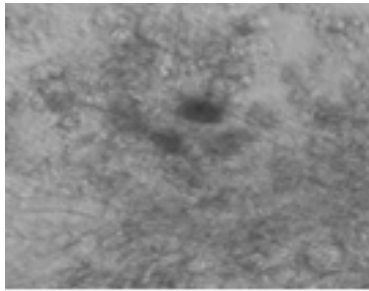


图 4 重组病毒 rCVILacZ 感染 CEF 形成的蓝斑
Fig.4 The blue plaques of rCVILacZ in CEF

2.3 病毒生长曲线的测定

重组病毒和亲本毒 CVI988 接种 CEF, 于接毒后不同时间收集细胞毒接种于新鲜单层细胞, 6d 后观察并记录每天收集细胞毒产生的蚀斑, 得到每天的平均蚀斑数, 绘制的生长曲线如图 5。

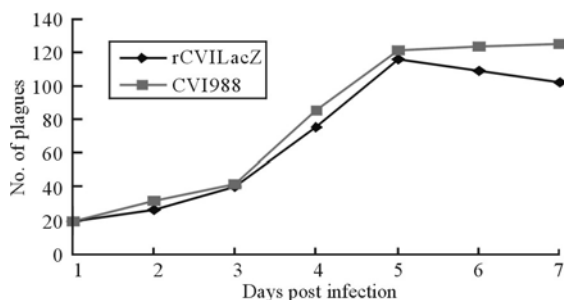


图 5 病毒在细胞上的生长曲线
Fig.5 The growth curves of viruses

3 讨论

大肠杆菌编码 β -半乳糖苷酶的 *lacZ* 基因, 经常用于 MDV 重组病毒的构建, 以筛选病毒复制非必须区。通过插入表达 *lacZ* 基因的方法证实 US1、US10、US2、US3、US6 区为病毒复制非必须区^[6,10-13], 其中在 US10 和 US3 区中插入外源基因获得的重组病毒较稳定^[9]。

此外, 在构建转移载体时, 由各种启动子控制的 *lacZ* 基因组成的基因表达盒, 在插入带有单一酶切位点的 MDV DNA 片段时, 存在方向性, 有试验表明^[5], 当 *lacZ* 基因表达盒以与两重组臂反方向插入时, 获得的重组病毒不能稳定表达, 可能是外源基因表达盒反方向插入后, 会发生通读, 从而干

扰病毒基因组中位于该插入位点周边基因的正常转录。

本文利用 gB 启动子和 *lacZ* 基因构建成基因表达盒, 插入 MDV1 US10 DNA 片段中, 并选择表达盒转录方向与两重组臂转录方向相同的 pUS-gB-LacZ (L) 转移载体转染 CVI988 感染的 CEF, 经蓝斑筛选获得纯化的病毒; 通过测定病毒的生长曲线发现, 重组病毒与亲本毒的区线基本一致, 同时, 重组病毒在体外连续传代的过程中, 形态与亲本毒一致, 并且, 可以稳定表达 β -半乳糖苷酶, 这些说明了, gB 启动子不影响重组病毒的稳定性, 而且, 还可以稳定地表达外源基因, 这一结果与 Kengo S 等报道的一致。另外, 利用 gB 启动子构建重组病毒避免了病毒对外源启动子的排斥, 提高了疫苗对商品鸡的免疫保护力^[9]。这为下一步, 利用 gB 启动子进行适宜启动子的筛选以及 MDV 重组病毒的构建奠定了基础。

References

- [1] Masashi S, Yumiko H, Hiroaki M, *et al.* Construction of recombinant Marek's disease virus type 1(MDV1) expressing the *Escherichia coli LacZ* gene as a possible live vaccine vector: the US10 gene of MDV1 as a stable insertion site[J]. *Vaccine*, 1994, 12 (10): 953-957.
- [2] Masashi S, Hideki N, Kengo S. Protection of chickens with or without maternal antibodies against both Marek's and Newcastle diseases by one-time vaccination with recombinant vaccine of Marek's disease virus type 1 [J]. *Vaccine*, 1998, 5 (16): 472-475.
- [3] Kenji T, Chiaki Y, Nobuhiko T. Protection of chickens against very virulent infectious bursal disease virus (IBDV) and Marek's disease virus (MDV) with a recombinant MDV expressing IBDV VP2[J]. *Virology*, 1999, 257: 352-362.
- [4] Zhang X L. Construction and immune efficacy of recombinant CVI988 viruses expressing the major gB antigenic epitopes of MDV serotypes 1 and 3[D]. Nanjing Nanjing Agricultural University, PHD thesis, 2003.
- [5] John L, Cantillo, Amy S A, *et al.* Isolation of a Marek's disease virus (MDV) recombinant containing the *LacZ* gene of *Escherichia coli* stable inserted within the MDV US2 gene[J]. *J Virol*, 1991, 65(3):1584-1588.
- [6] Parcels 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 neighbouring short-compent open reading frames[J]. *J Virol*, 1994, 68 (12) :8239-8253.
- [7] Schat K A, *et al.* Open reading frame L1 of Marek's disease virus is not essential for *in vitro* and *in vivo* virus replication and

- establishment of latency[J]. *J Gen Virol*, 1998, 79:841-849.
- [8] Hirai K, Sakaguchi M, Maeda H, *et al.* Construction of recombinant Marek's disease virus type 1 expressing the *LacZ* gene of *E.coli* [A]. 4th international Symposium on Marek's disease, Proceeding of 19th World poultry Congress[C], American, pp 150-155.
- [9] Kengo S, Masashi S, Hiroshi O. Development of an effective polyvalent vaccine against both Marek's and Newcastle Disease based on recombinant Marek's Disease virus type 1 in commercial chickens with maternal antibody[J]. *J Virol*, 2000, 74(7):3217-3226.
- [10] Sakaguchi 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.
- [11] Parcels M S, Anderson A S, Morgan R W, *et al.* Retention of oncogenicity by a Marek's disease virus mutant lacking six unique short region genes[J]. *J Virol*, 1995, 69:7888-7898.
- [12] 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.
- [13] Cantello J L, Anderson A S, Francesconi A, *et al.* Isolation of a Marek's disease virus recombinant containing the *lacZ* gene of *E coli* stably inserted within the MDV US2 gene[J]. *J Virol*, 1991, 1584-1588.

中国科学院武汉病毒研究所学科组长招聘启事

中国科学院武汉病毒研究所建于 1956 年,是中国科学院唯一专业从事病毒学研究的综合性研究机构,具备一流的科研设施、高等级生物安全平台和良好的科研氛围。

为推动研究所在中国科学院三期知识创新工程中跨越发展,拟在医学病毒和新生疾病等重点学科方向招聘学科组长若干名。招聘的主要研究方向为:病毒免疫、新生病毒、虫媒病毒、病毒与宿主相互作用、病毒性疾病的动物模型、病理学、生物信息学等。受聘者将组织独立的研究小组开展科研工作。欢迎有识之士积极应聘。

应聘者须具有博士学位,良好的科研工作经历,在国际知名学术期刊上发表过高质量论文。年龄一般在 45 周岁以下。

研究所将为受聘者提供优厚的工作和生活条件,薪酬及科研启动经费将根据受聘者的资历决定。

应聘者需提供以下材料:(1)个人简历;(2)大学及以上学历、学位证明和 5 篇代表性论文复印件;(3)应聘后工作设想;(4)3 封专家推荐信。报名截止期 2006 年 3 月 25 日。

同时招聘副研究员和助理研究员若干名,研究领域主要有:肿瘤病毒、肝炎病毒、流感病毒、人畜共患病毒、水生病毒、艾滋病毒、病毒复制与抗病毒药物、病毒资源及生物信息、病毒功能基因组学、微生物遗传和应用微生物等,欢迎有相应资历者前来应聘。

地址:湖北省武汉武昌小洪山中区 44 号 中国科学院武汉病毒所人事处

邮编:430071

网址:<http://www.whiov.ac.cn>

联系电话:86-27-87199413 87199145, 传真:86-27-87198072

联系人:袁志明 尚纳新

电子邮箱:yzm@wh.iov.cn shang@pentium.whiov.ac.cn