

猪瘟伪狂犬病重组病毒 SA215(A) 株的构建及生物学特性研究

徐志文, 郭万柱*, 朱 玲, 王 印, 王晓玉
(四川农业大学 动物生物技术中心, 雅安 625014)

摘 要: 采用磷酸钙转染系统, 将伪狂犬病三基因缺失疫苗 SA215 株 DNA 与 PP63LacZE2 DNA 共转染 Vero 细胞, 获得 SA215(A) 1 SA215(A) 2 和 SA215(A) 3 等 12 个重组病毒株。以光生物素标记的 HCV E2 基因为探针进行初步鉴定后, 挑选 SA215(A) 1 株作 *Bam*HI 酶切和 southern 转印杂交鉴定, 结果表明构建是成功的, 将其命名为 SA215(A)。直接荧光抗体检测 SDS-PAGE 电泳和 western 免疫印迹检测结果表明 HCV E2 基因在重组病毒内获得表达, 产生大小约 51 ku 的囊膜糖蛋白。对 SA215(A) 株进行部分生物学特性研究, 培养特性观察试验表明该毒株可适应 Vero、BHK21 和鸡胚成纤维细胞等多种细胞, 但对不同细胞系表现有一定的差异。SA215(A) 株 10^5 PFU/mL 接种 21 日龄健康仔猪(伪狂犬病和猪瘟检测阴性), 接种后 28 d 用 10^6 PFU 的 PRV Fa 强毒株滴鼻攻毒, 42 d 用猪瘟 SM 株血毒 1 mL (10^5 MLD/mL) 肌肉注射攻击, 结果表明接种猪能抵御 2 次病毒攻击, 表明 SA215(A) 株具有良好免疫原性, 是一株优秀的猪瘟、伪狂犬病二价疫苗候选株。

关键词: 重组病毒; 猪瘟; 伪狂犬病; 生物学特性; 疫苗

中图分类号: S852.5⁺ 2; S855.3

文献标识码: A

文章编号: 0366-6964(2005)10-1033-05

猪瘟因传染性强、死亡率高, 与口蹄疫、伪狂犬病等一道被认为是严重危害和制约养猪业发展的重要传染病。国际兽疫局将其列为 16 种 A 类传染病之一, 国家《动物防疫法》将其列为一类传染病。疫苗接种是目前控制猪瘟最为重要的方法, 疫苗的使用使猪瘟在一定程度上得以控制。芬兰、加拿大、英国和日本等 20 多个国家相继宣布为无猪瘟国家。国内猪瘟曾基本得到控制, 发病率总体小于 3%。近年来猪瘟疫情控制却并未像人们想象的那样顺利, 反而呈现逐步上升的趋势, 在许多国家和地区大量流行, 如英国、瑞士等国家重新出现了猪瘟流行。包括新型疫苗研究在内的各项针对猪瘟开展的研究工作又引起重视, 国内在新型猪瘟伪狂犬病重组病毒活载体疫苗的研究工作取得突破性进展, 笔者利用包含 HCMV 和 SV40 双重强启动子的 PRV SA215 株为载体实现了对 HCV E2 基因表达, 试验证明表达确实, 重组病毒具有良好免疫原性, 可抵御伪狂犬病和猪瘟的双重攻击。

1 材料与方 法

1.1 质粒与毒株

重组质粒 PP63LacZE2、PRV SA215 株、猪瘟病毒石门株等均由四川农业大学动物生物技术中心繁殖保存。

1.2 细胞

Vero 细胞、BHK21 细胞等均购自武汉病毒所细胞保藏中心。

1.3 标准血清及抗猪瘟荧光抗体

猪瘟和伪狂犬病标准阳性血清由四川农业大学动物生物技术中心研制保存; 抗猪瘟荧光抗体购自中国兽医药品监察所。

1.4 猪瘟伪狂犬病重组病毒疫苗株 SA215(A) 的构建

1.4.1 重组质粒 DNA 和病毒 SA215 株 DNA 同源重组 参照文献[1, 2] 采用磷酸钙转染法进行。

1.4.2 猪瘟伪狂犬病重组病毒 SA215(A) 株初步鉴定

1.4.2.1 Dot-blots 杂交检测: 参照文献以光生物素标记的猪瘟病毒 E2 基因扩增产物为探针, 检测 SA215(A) 1 SA215(A) 2 SA215(A) 3 等 12 株重组病毒液, 同时设立阳性和阴性对照^[1, 3, 4]。

1.4.2.2 DNA 酶切鉴定: 着重对重组病毒 SA215(A) 1 株进行系统研究, 并将其命名为猪瘟伪狂犬病

收稿日期: 2004-06-17

基金项目: 国家“十五”重点攻关项目(2002BA514A-16-7); 教育部重点科技攻关项目

作者简介: 徐志文(1972-), 男, 四川邛崃人, 博士, 从事动物传染病与预防兽医学科研工作

* 通讯作者: 郭万柱

重组病毒 SA215(A) 株, 简称 SA215(A) 株。整个酶切操作参照文献进行^[1,2]。

1.4.2.3 Southern 转印杂交检测: 参照文献以光生物素标记的 HCV E2 基因扩增产物为探针, 检测转印有重组病毒 SA215(A) DNA *Bam*HI 酶切片段的 NC 膜, 同时设立相应阴性、阳性对照^[1,2,5]。

1.5 猪瘟疫病毒 E2 基因在 PRV SA215 株中的表达检测

1.5.1 SA215 表达猪瘟疫病毒 E2 基因的直接荧光抗体检测 参照文献采用直接荧光抗体法检测接种重组病毒 SA215(A) 株的 Vero 细胞飞片, 设未接种病毒的 Vero 细胞为对照^[6,7]。

1.5.2 SA215 表达猪瘟疫病毒 E2 基因的 SDS-PAGE 电泳和 western 印迹分析 具体参照文献进行^[1,2,5]。

1.6 猪瘟疫伪狂犬病重组病毒 SA215(A) 株的部分生物学特性研究

1.6.1 重组病毒 SA215(A) 株的培养增殖特性 按常规方法分别制备 Vero 细胞、BHK21 细胞、IBRS 细胞、PK15 细胞、MDBK 细胞和鸡胚成纤维细胞致密细胞单层各 2 瓶。各取 1 瓶用于接种重组病毒 SA215(A) 株 0.3 mL, 留 1 瓶作对照。置 37℃ 培养箱内培养, 每天观察细胞病变情况。同时, 另备致密 Vero 细胞单层 2 瓶, 分别接种重组病毒 SA215(A) 株和 PRV SA215 株各 0.3 mL, 置 37℃ 培养箱内培养观察细胞病变情况, 以比较分析重组病毒 SA215(A) 株培养特性与亲本株之间的差异。

1.6.2 重组病毒 SA215(A) 株的免疫原性研究^[8]

选 21 日龄断奶仔猪 24 头 (PRV、HCV 血清学阴性), 随机分成 6 组, 每组 4 头。4 个试验组每猪分别接种 1 mL (10^5 PFU/mL) 重组病毒 SA215(A) 株、PRV 基因缺失活疫苗 SA215 (批号: 99001) 1 头份/mL、猪瘟疫牛睾丸细胞苗 1 头份/mL 和猪瘟疫兔化弱毒疫苗 1 头份/mL; 余下 2 个组作对照, 每猪接种维持营养液 1 mL。接种后第 28 天对接种 SA215(A) 株和疫苗 SA215 的 2 个试验组及 1 个对照组以 10^6 PFU 的 PRV Fa 强毒株进行滴鼻攻毒。观察攻毒后 14 d 内猪只的临床症状及死亡头数。接种 42 d 后 SA215(A) 株接种组内存活仔猪连同猪瘟疫牛睾丸细胞苗、猪瘟疫兔化弱毒疫苗接种组及余下 1 个对照组, 每头猪用猪瘟疫强毒石门株血毒 1 mL (10^5 MLD/mL) 肌肉注射攻击, 临床观察 14 d, 记录猪只发病和死亡情况。

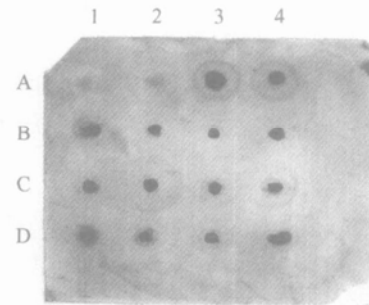
2 结果

2.1 猪瘟疫伪狂犬病重组病毒 SA215(A) 株的构建

重组质粒 PP63LacZE2 DNA 与 PRV SA215 株 DNA 共转染 Vero 细胞, 共获得 12 个无色病毒噬斑, 分别进行纯化和扩繁, 获得 12 株可能的重组病毒株, 将其依次命名为 SA215(A) 1 SA215(A) 2、SA215(A) 3SA215(A) 12。

2.2 Dot-blots 杂交检测鉴定

用光生物素标记的猪瘟疫病毒 E2 基因扩增产物为探针, 检测 SA215(A) 1 SA215(A) 2 SA215(A) 3 等 12 株重组病毒液, 结果 12 株病毒液均出现阳性斑点, 同时阳性和阴性结果成立, 表明挑取的 12 个无色病毒噬斑均含有外源基因 E2。



A1. PRV SA215 株; A2. 维持液; A3. PP63LacZE2;
A4. HCV E2 基因; B1. SA215(A) 1; B2. SA215(A) 2;
B3. SA215(A) 3; B4. SA215(A) 4; C1. SA215(A) 5;
C2. SA215(A) 6; C3. SA215(A) 7;
C4. SA215(A) 8; D1. SA215(A) 9; D2. SA215(A) 10;
D3. SA215(A) 11; D4. SA215(A) 12

图 1 Dot-blots 检测猪瘟疫伪狂犬病重组病毒 SA215(A) 株
Fig. 1 Determination of HCV-PRV recombinant virus SA215(A) strain by Dot-blots nucleotide acid hybridization

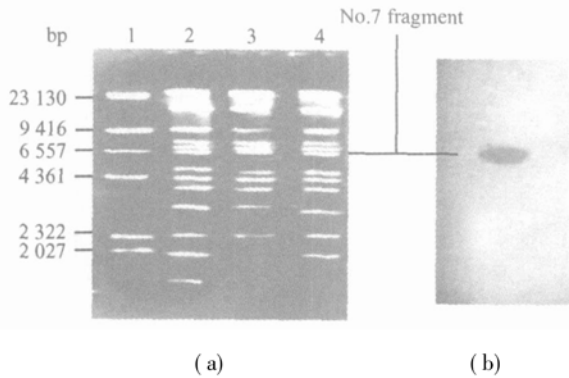
2.3 重组病毒 SA215(A) 株鉴定

结果所获亲本 SA215 株及重组病毒 SA215(A) 株 DNA 的 *Bam*HI 酶图谱表现预期差异, 重组病毒与亲本 SA215 株的图谱相比较, 其 *Bam*HI 酶切第 7 片段迁移速度变慢 (图 2)。

电泳凝胶 Southern 转移后, 以光生物素标记的猪瘟疫病毒 E2 基因扩增产物为探针进行杂交检测, 结果在重组病毒 SA215(A) 株 DNA 酶切电泳泳道的相应片段获得阳性结果, 而亲本毒株 SA215 对应片段结果为阴性 (图 2)。

2.4 猪瘟疫病毒 E2 基因在 SA215(A) 株中的表达检测

2.4.1 SA215(A) 表达猪瘟疫病毒 E2 基因的直接荧光抗体检测 在接种重组病毒 SA215(A) 株 24、36、



1. λ DNA/*Hind* III marker; 2. PRV Fa strain;
3. SA215(A) strain; 4. SA215 strain

图 2 SA215(A) *Bam*HI 酶切图谱(a)和 Southern 转印(b)
Fig.2 Restriction enzyme digestion patterns of SA215(A) (a) and southern hybridization with biotin labeled HCV E2 (b)

48 h 后 Vero 细胞飞片均观察到特异性荧光, 表现为细胞浆内呈现亮绿色荧光, 而胞核不着色。未接种病毒的 Vero 细胞飞片则未见到荧光(图 3)。

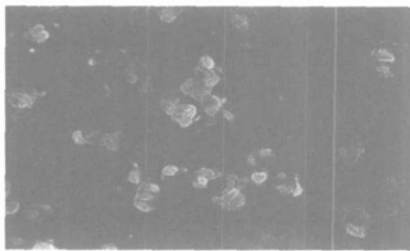
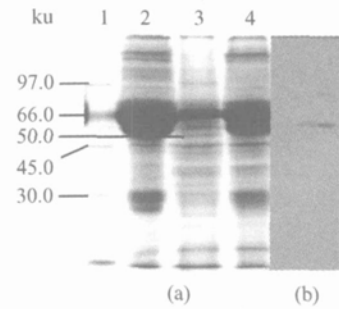


图 3 接种 SA215(A) 株 48 h 后荧光检测结果
Fig.3 The detected result of SA215(A) strain infection in Vero cells 48 h by IFT

2.4.2 SA215(A) 表达 HCV E2 基因的 SDS-PAGE 电泳及 western 转印杂交检测 重组病毒 SA215(A) 株与 PRV Fa 株的蛋白质电泳图谱呈现明显差异。SA215(A) 至少缺少 2 个条带, 同时在大小约 51 ku 位置处却明显多了 1 个条带。电泳转移蛋白质于硝酸纤维膜, 用特异性抗猪瘟血清和

SPA-HRP 为抗体进行免疫学测定, 结果在 51 ku 位置出现阳性条带(图 4)。



1. Marker; 2. PRV Fa strain; 3. SA215(A) strain; 4. SA215 strain

图 4 E2 基因在 SA215(A) 株中表达的 SDS-PAGE 电泳(a)和 western 印迹(b)检测

Fig.4 The expression of the E2 gene in SA215(A) strain

2.5 猪瘟伪狂犬病重组病毒 SA215(A) 株的部分生物学特性研究结果

2.5.1 SA215(A) 株的培养增殖特性观察 重组病毒可适应 Vero 细胞、BHK21 细胞、IBRS 细胞、PK15 细胞、MDBK 细胞和鸡胚成纤维细胞并获得增殖。但对不同细胞系表现一定的差异, 在 BHK21 细胞上不能形成明显空斑, 其余 5 种细胞上均能形成明显空斑, IBRS 细胞上所成空斑较小, Vero 细胞、PK15 细胞、MDBK 细胞和鸡胚成纤维细胞上空斑均发展为“拉网状”。虽重组病毒 SA215(A) 株与亲本株均可在 Vero 细胞上生长并引起细胞病变, 但两者致细胞病变能力有很大差异, 重组病毒 SA215(A) 株引起细胞病变所需时间延长, 且最终形成的空斑大大小于亲本病毒 SA215。

2.5.2 SA215(A) 株的免疫原性研究 2 次攻毒后, 各组试验动物表现了不同程度的临床反应。比较而言试验组所产生的临床反应明显要轻于对照组, 详细结果如表 1 和表 2 所示。

表 1 免疫猪伪狂犬病病毒攻毒保护试验结果

Table 1 The results of the vaccinated piglets challenged with PRV

组别 Group	死亡头数/ 试验头数 Dead/ All	增重受阻时间/d	发热期/ d Febrile phase
SA215(A) 试验组 SA215(A) trail group	0/4	4	4
SA215 试验组 SA215 trail group	0/4	5	5
对照组 Control group	3/4	> 7*	> 7*

“*”表示该数据来自存活仔猪; “*” Indicated data obtained form survival piglets

表2 免疫猪猪瘟病毒攻毒保护试验结果

Table 2 The results of the vaccinated piglets challenged with HCV

组别 Group	死亡头数/ 试验头数 Dead/ All	发热期/d Febrile phase	平均体温升高幅度/ °C
SA215(A) 试验组 SA215(A) trail group	0/4	1	0.6
牛睾丸细胞苗组 Cattle testicle cell vaccine group	1/4	1	0.7
兔化弱毒疫苗组 HCV C strain group	0/4	0	0
对照组 Control group	4/4	-	-

“-”表示因猪只死亡未进行统计;“-” indicated non-statistics due to piglets died

3 讨论与分析

将 HCV E2 基因插入病毒载体与之重组研究活载体疫苗始于 Van Zijl 等在 PRV gX 位点插入 HCV E2 基因实现表达, 该试验还同时证实了保持 E2 蛋白跨膜区完整性对于诱导中和抗体产生具有重要意义^[9]。Rümenapf 等通过表达 HCV 不同囊膜糖蛋白和核蛋白组合, 获得了能抵御猪瘟病毒强毒攻击的重组疫苗, 并证实若疫苗含有完整 E2 基因, 核蛋白基因的存在与否同动物产生抗体滴度高低无关^[10]。Peeters 等利用 PRV gD 缺失株为载体表达了 HCV E2 基因, 实现了重组病毒对伪狂犬病和猪瘟的双重保护^[11]。本次研究中选择 PRV Fa TK⁻/gE⁻/gI⁻/LacZ 基因缺失 SA215 株为载体, 其含有可供外源基因插入表达的多克隆位点, 是构建动物活载体疫苗的通用载体系统, 可作为将目的基因引入宿主的理想载体, 所含报告基因为 LacZ 基因, 其表达产物 β 半乳糖苷酶有利于同源重组后缺失株的筛选和观察, 同时 HCMV 强启动子及 SV40 早期启动子的引入确保了外源基因的高效表达^[12]。根据伪狂犬病病毒基因组庞大不易进行体外操作这一特点, 采用磷酸钙转染系统, 将 SA215 株 DNA 与 PP63LacZE2 DNA 共转染 Vero 细胞, 构建猪瘟伪狂犬病重组病毒 SA215(A) 株, 并以光生物素标记的 HCV E2 基因为探针进行的核酸杂交鉴定、BamHI 酶切鉴定和 southern 转印杂交鉴定, 结果表明重组病毒构建是成功的。现有研究结果显示^[7], 重组病毒在细胞上增殖引起细胞病变的时间会显著延长, 其可能原因为外源基因导致其插入位基因的失活, 影响病毒复制和在细胞间传导能力。本次试验中通过比较重组病毒 SA215(A) 株与亲本病毒 SA215 株在 Vero 细胞上增殖所致的细胞病变情况证实了这一现象。同时发现除了时间有所延长和空斑大小变化外, 其对细胞的选择特异性及所致细胞病变情况并无明显变化。SA215(A) 株与

亲本株一样均可在 Vero 细胞、BHK21 细胞、JBR5 细胞、PK15 细胞、MDBK 细胞和鸡胚成纤维细胞上增殖并产生细胞病变, 病变出现时间与病变特征存在细胞间差异。

本研究中经同源重组后获得的重组病毒 SA215(A) 内 HCV E2 基因位于 PRV gE 基因启动子 SV40 启动子和 HCMV 启动子控制之下, 理论上应获得良好表达。通过直接荧光抗体染色, 在感染重组病毒 SA215(A) 株的 Vero 细胞浆内检测到特异性荧光, 并在无细胞处或细胞间也检测到少量荧光。分析原因可能为本次插入的 HCV E2 基因包含有完整的信号肽编码区, 试验已证实在 HCV 病毒中信号肽作用下会导致 E2 基因部分表达产物以分泌形式释放。在猪瘟病毒内 E2 基因的表达产物可能以几种形式存在, 其非糖基化产物大小约为 41 ku, 糖基化产物大小则在 50~53 ku 之间, 少部分产物会形成分子量约 110 ku 的同源二聚体^[13]。SDS-PAGE 电泳分析, SA215(A) 与 PRV Fa 两个毒株的蛋白质电泳图谱呈现明显差异。重组病毒至少缺少 2 个条带, 同时在大小约 51 ku 位置处却明显多了 1 个条带。电泳转移蛋白质于硝酸纤维素膜后进行免疫学测定, 结果在 51ku 位置出现阳性条带, 表明 HCV E2 基因在 PRV 中获得表达和加工, 其大小与来自猪瘟病毒本身的 E2 蛋白基本一致, 应为糖基化蛋白。据此推测重组病毒 SA215(A) 株表达的 E2 蛋白与猪瘟病毒自身表达 E2 蛋白生物学功能应该相当。

现有相关研究中通常以 10 周龄仔猪为试验对象, 根据伪狂犬病发病特点即使该年龄猪只在未进行任何疫苗接种情况受到强毒攻击也不会表现明显临床症状, 仅形成潜伏感染^[14]。参照《中华人民共和国兽用生物制品质量标准》(2001 年版)^[18]对伪狂犬病活疫苗和猪瘟活疫苗有关规定, 作者在试验中对试验动物年龄选择和攻毒时间上作了调整。选择 21 日龄仔猪为试验动物, 并在接种重组病毒 SA215

(A) 后第 28 天和第 42 天分别进行 PRV (PRV Fa 强毒株, 剂量 10^6 PFU) 和 HCV (猪瘟疫强毒石门株病毒 1mL, 含 10^5 MLD) 攻毒保护试验, 并以临床症状、体温、增重为主要观察指标。结果表明重组病毒 SA215(A) 具有良好的免疫原性, 对于伪狂犬病与猪伪狂犬病基因缺失活疫苗 SA215 相当; 针对猪瘟则介于猪瘟牛睾丸细胞苗和猪瘟兔化弱毒疫苗之间。据此结果, 认为本研究构建的猪瘟疫伪狂犬病重组病毒 SA215(A) 株具有良好免疫原性, 是一株可以同时用于预防猪瘟和伪狂犬病的疫苗候选株。

参考文献:

- [1] 萨姆布鲁克 J, 弗里奇 E F, 曼尼阿蒂斯 T, 等. 分子克隆实验指南 [M]. 第 2 版. 北京: 科学出版社, 1998.
- [2] 奥斯伯 F, 布伦特 R, 金斯顿 R E, 等. 精编分子生物学实验技术指南 [M]. 北京: 科学出版社, 1998.
- [3] 郭万柱, 冯炳芳, 庄冬跃, 等. 应用 32 P 标记 DNA 探针检测伪狂犬病病毒的研究 [J]. 四川农业大学学报, 1991, 9(1): 52~ 56.
- [4] 王 琴, 郭万柱, 阴文奇. 应用光生物素标记探针检测伪狂犬病病毒的研究 [J]. 中国病毒学, 1996, 11(3): 284~ 286.
- [5] 姜 泊, 张亚历, 周殿元. 分子生物学常用实验方法 [M]. 北京: 人民军医出版社, 1997.
- [6] 国家标准化管理委员会. 中国强制性国家标准汇编 (农林卷) [S]. 第 2 版. 北京: 中国标准出版社, 1997.
- [7] 黄毓茂. PRV Fa 株缺失转移载体构建及 HCV E2 基因在 PRV 中的表达 [D]. 长春: 中国人民解放军军需大学, 1999.
- [8] 中华人民共和国农业部. 中华人民共和国兽用生物制品质量标准 [S]. 北京: 中国农业科技出版社, 2001.
- [9] van Zijl M, Wensvoort G, de Kluyver E, et al. Live attenuated pseudorabies virus expressing envelope glycoprotein E1 of hog cholera virus protects swine against both pseudorabies and hog cholera [J]. J Virol, 1991, 65(6): 2 761~ 2 765.
- [10] Rumenapf T, Stark R, Meyers G, et al. Structural proteins of hog cholera virus expressed by vaccinia virus: Further characterization and induction of protective immunity [J]. J Virol, 1991, 65(2): 589~ 597.
- [11] Peeters B, Bienkowska-Szewczyk K, Hulst M, et al. Biologically safe, non-transmissible pseudorabies virus vector vaccine protects pigs against both Aujeszky's disease and classical swine fever [J]. J Gen Virol, 1997, 12(78): 3 311~ 3 315.
- [12] 徐志文, 郭万柱, 朱 玲, 等. 伪狂犬病病毒 3 基因缺失株 (SA215) 的遗传稳定性研究 [J]. 畜牧兽医学报, 2004, 35(6): 694~ 697.
- [13] König M, Lengsfeld T, Pauly T, et al. Classical swine fever virus: Independent induction of protective immunity by two structural glycoproteins [J]. J Virol, 1995, 69(10): 6 479~ 6 486.
- [14] 斯特劳 B E, 阿莱尔 S D, 蒙加林 W L, 等. 猪病学 [M]. 第 8 版. 北京: 中国农业大学出版社, 2000.

Construction and Characterization Analysis of the Recombinant Virus SA215(A) Strain of Pseudorabies Virus-Hog Cholera Virus

XU Zhi-wen, GUO Wan-zhu^{*}, ZHU Ling, WANG Yin, WANG Xiao-yu
(Sichuan agricultural University, Yaan 625014, China)

Abstract: By cotransfection of PRV Fa SA215 DNA and PP63LacZE2 DNA in Vero cells, 12 recombinants named SA215(A) 1, SA215(A) 2 ..., and SA215(A) 12 were obtained with calcium phosphate transfection system. The recombinant strains were determined preliminarily by biotin-labeled probe of HCV E2, then SA215(A) 1 strain were identified by *Bam*HI digestion and Southern-blot acid hybridization. The results indicated that the recombinant virus of PRV and HCV named SA215(A) was successful. IFT, SDS-PAGE, electrophoresis and Western-blot all confirmed that HCV E2 gene was expressed in recombinant virus, about 51 ku fragment of envelope glycoprotein E2 were acquired. Research on culture characteristics of SA215(A) strain indicated recombinant virus could be replicated very well on Vero cells, BHK21 cells and so on, but showing variability in culture on different cell lines. 21-day-old SPF pigs were inoculated with SA215(A) strain. After 28 days, the pigs were affected with 10^6 PFU high-dose virulent PRV Fa strain; and 14 days later affected with 10^5 MLD high-dose virulent HCV SM strain. All of the inoculated pigs were protected. The results indicated SA215(A) was high efficacy.

Key words: recombinant virus; hog cholera; pseudorabies; biological characteristics; vaccine

* Corresponding author