



# 牛 型疱疹病毒感染性细菌人工染色体的构建 和 *gN* 基因缺失病毒的细胞繁殖特性

张存, 叶伟成, 王一成, 袁秀芳, 尹龙勃, 尹文玲, 刘蔓雯

浙江省农业科学院畜牧兽医研究所, 杭州 310021;

西北农业大学动物医学院, 杨凌 712100

E-mail: [cunzh2004@yahoo.com.cn](mailto:cunzh2004@yahoo.com.cn)

2009-07-16 收稿, 2009-08-02 接受

浙江省农业科学院国际合作专项资助项目

**摘要** 通过同源重组将 pHA2 质粒插入到牛 型疱疹病毒 ZJ 分离株基因组的 UL15 和 UL18 基因之间, 构建了重组病毒 rBHV1-HA; 提取重组病毒的环状基因组 DNA, 转化大肠杆菌 DH10B, 获得了含有 BHV1 全基因组的感染性细菌人工染色体克隆 pBHV1. pBHV1 转染 MDBK 细胞可以拯救出病毒, 该病毒与野生毒株在细胞上的繁殖特性未见差异. 通过两步 Red E/T 重组, 构建了 *gN* 基因跨膜区缺失的 pBHV1 突变体, 并转染获得了重组病毒 rBHV1- $\Delta gN$ . 病毒繁殖动态曲线显示, rBHV1- $\Delta gN$  的滴度比野生毒株低 9%~20%. BHV1 感染性克隆的成功构建, 将为研究新型 *BHV-1* 基因缺失疫苗和牛的病毒载体疫苗提供技术平台.

**关键词**

牛 I 型疱疹病毒  
感染性克隆  
细菌人工染色体  
囊膜蛋白 *gN*  
UL49.5

牛 型疱疹病毒 (bovine herpesvirus type 1, BHV1) 可以引起多种临床疾病, 如牛传染性鼻气管炎 (infectious bovine rhinotracheitis, IBR)、传染性脓疱性外阴阴道炎 (infectious pustular vulvovaginitis, IPV) 以及流产等. 目前牛 型疱疹病毒感染在世界范围内广泛流行, 对乳牛的产奶量、公牛的繁殖力及役用牛的使役力均有较大影响, 给养牛业造成极大的经济损失. BHV1 是牛呼吸道疾病 (bovine respiratory disease, BRD) 的主要病原之一, 据估计仅美国每年因 BRD 造成的损失就超过 10 亿美元<sup>[1]</sup>. 我国最早于 20 世纪 80 年代初在进口种牛中发现该病, 并从进口的冷冻精液和发病牛体分离到病毒<sup>[2,3]</sup>. 国内部分省市地区的血清学普查结果表明, 广东、广西、河南、河北、新疆、山东、四川、贵州等地的中国荷斯坦奶牛、本地黄牛和水牛均有 BHV1 感染<sup>[3]</sup>, 艾玉萍等人<sup>[4]</sup>2004 年报道贵州省奶牛的血清阳性率是 5.4%, 被检测的 4 个地区的 39 个畜群中有 23 个阳性群.

BHV1 在分类上属于  $\alpha$  疱疹病毒亚科水痘病毒属, 根据病毒基因组的限制性酶切图谱分析, 可以将病毒分为 3 个基因型, 分别为 1.1, 1.2a 和 1.2b<sup>[5]</sup>. BHV1 基因组全长 135301 bp, 估计有 73 个基因 (GenBank 登录号: NC\_001847). 病毒编码 12 种囊膜蛋白, 其中 *gB*, *gC*, *gD*, *gE*, *gG*, *gH*, *gI*, *gL*, *gM* 和 *gK* 等 10 种是糖蛋白, 另两种 *gN* 和 *gJ* 为非糖基化蛋白<sup>[6]</sup>.

BHV1 囊膜蛋白 *gN* 由 UL49.5 基因编码, 分子量 9 kD, 由 96 氨基酸残基组成<sup>[7,8]</sup>. 在细胞内可以与抗原处理相关转运蛋白 (transporter associated with antigen processing, TAP) 结合, 从而抑制抗原多肽和 TAP 形成复合物, 阻断抗原转运到内质网, 进而阻断抗原与 MHC 类复合体的装配; 另外, *gN* 具有蛋白酶活性, 可以降解 TAP<sup>[9,10]</sup>. 因此推测 *gN* 蛋白可能与 BHV1 的毒力有关, 并可能抑制机体的免疫反应.

细菌人工染色体 (bacteria artificial chromosome, BAC) 可以容纳 300 kb 的 DNA, 并能稳定传代. BAC

**引用格式:** 张存, 叶伟成, 王一成, 等. 牛 型疱疹病毒感染性细菌人工染色体的构建和 *gN* 基因缺失病毒的细胞繁殖特性. 科学通报, 2009, 54: 3823~3829  
Zhang C, Ye W C, Wang Y C, et al. Bovine herpesvirus type 1 genome cloned as infectious bacterial artificial chromosome and replication of *gN* gene deletion mutant *in vitro* (in Chinese). Chinese Sci Bull (Chinese Ver), 2009, 54: 3823-3829, doi: 10.1360/972009-1208

技术在疱疹病毒基因结构和功能以及病毒载体的研究中显示了巨大的作用. 目前已经成功构建了 MDV-1, EBV, EHV-1 等多种动物疱疹病毒的感染性 BAC, BHV1 V155 株和 Schonboken 株已经成功克隆为 BAC<sup>[7,11~14]</sup>. 此外, 基于 BAC 的重组技术已经应用于疱疹病毒基因的精确插入、敲除和突变<sup>[15]</sup>. 为了开展 gN 基因功能的研究, 我们成功构建了 BHV1 分离株的感染性 BAC; 利用 Red E/T 重组技术缺失其 gN 基因跨膜域后, 转染细胞获得了 BHV1 分离株的 gN 基因缺失病毒. BHV1 感染性克隆的构建, 将对病毒基因结构与功能解析、基因缺失疫苗和病毒载体疫苗研究具有重要的推动作用.

## 1 材料与方 法

( ) 病毒、细胞和质粒. BHV1 ZJ 株由本室 2008 年分离自浙江某奶牛场的公牛精液, 在 MDBK 细胞上培养传代并进行空斑纯化; MDBK 购自 ATCC (CCL-22), 营养液为含 8%胎牛血清(四季青生物工程公司)的 DMEM (Gibco), 维持液为含 1%胎牛血清的 DMEM. pUL15-18-HA2 (图 1(c))由作者在 Cornell 大学访问期间构建, 并获得相关授权使用. 该质粒包含 BHV1 UL15 和 UL18 基因的同源序列, 中间序列源于 pHA2 质粒(源自 pBeloBac11, 德国汉诺威医学院 Messerle M 博士赠送)<sup>[16]</sup>, 包含 GFP 表达盒、氯霉素筛选标记等.

( ) BHV1 感染性 BAC 克隆的构建及鉴定. (1) 病毒基因组 DNA 的提取. 75 cm<sup>2</sup> 单层 MDBK 细胞, 接种 10 MOI 病毒, 37 5%CO<sub>2</sub> 培养至细胞出现 70%~80%病变时, 刮取细胞, 700×g 离心 5 min, 收获沉淀, 以 4 预冷的 10 mmol/L PBS (pH 7.4)洗涤 1 次, 加入 500 μL 预冷的 TE (pH 8.0)悬浮细胞, 冰浴 15 min; 再加入 5% NP-40 50 μL 和 RNase A 5 μL, 继续冰浴 15 min; 4 2000×g 离心 10 min, 小心吸取上清, 加入 50 U 微球菌核酸酶和适量缓冲液(大连宝生物工程有限公司), 37 孵育 30 min 后, 加入 EDTA 终止核酸酶作用. 加入终浓度为 0.5%的 SDS 和 0.2 mg/mL 的蛋白酶 K, 于 52 水浴中消化 2 h, 等体积苯酚-氯仿-异戊醇和氯仿抽提, 最后用异丙醇沉淀病毒 DNA, 洗涤干燥后溶解于 50 μL TE 中. 取 5 μL 以 *Hind* 进行酶切鉴定. (2) 病毒的重组和重组病毒的空斑纯化. 转移质粒 pUL15-18-HA2 以 Qiagen Midiprep kit 纯化后, 经 *Hind* 酶切, 采用琼脂糖凝胶电泳回收线性

DNA 分子用于共转染. 取 1 μg ZJ 株基因组 DNA 与 5 μg *Hind* 线性化的 pUL15-18-HA2, 以磷酸钙法(按 Promega 公司 Calcium Phosphate Transfection Kit 说明书进行)共转染 MDBK 细胞. 转染后 48 h 于荧光显微镜下观察, 待细胞病变达到 60%后收获病毒, 进行传代培养, 并以含 2.5%甲基纤维素的 DMEM 覆盖, 挑取具有荧光的病毒空斑. 连续挑取 3 代空斑, 获得纯化的重组病毒, 命名为 rBHV1-HA. (3) rBHV1-HA 病毒环状基因组的提取. 按照文献<sup>[17]</sup>方法加以修改. 详细过程为 25 cm<sup>2</sup> MDBK 单层细胞, 接种 0.1 MOI rBHV1-HA, 待出现 40%左右细胞病变时刮取细胞, 用 PBS 洗涤 1 次, 4000×g 离心 5 min, 沉淀以 100 μL TE (pH 7.5, 10 mmol/L Tris, 1 mmol/L EDTA)分散悬浮, 加入 500 μL 细胞裂解缓冲液 (pH 7.5, 10 mmol/L Tris, 0.6% SDS, 10 mmol/L EDTA)和 5 μL RNase, 室温放置 30 min, 加入 400 μL 5 mol/L NaCl, 立即颠倒数次混合液体, 4 放置 24 h, 15000×g 离心 30 min, 小心取出上清后以苯酚-氯仿-异戊醇抽提 1 次, 吸取上层水相, 以异丙醇沉淀 DNA, 70%乙醇洗涤干燥后, 加入 5 μL 纯水溶解. (4) rBHV1-HA 病毒环状基因组电转化 *E. coli*. 将 rBHV1-HA 病毒环状基因组 DNA 与 50 μL *E. coli* DH10B 感受态细胞混合后置于预冷的 0.1 cm 电转化杯中, 在 2500 V, 25 μF, 200 Ω 的条件下进行电击(Bio-Rad 电穿孔孔和电击杯). 电击后迅速加入 1 mL SOC 培养基, 置于 37, 摇床培养 1 h 后, 涂布于含 34 μg/mL 氯霉素(CAM)的 LB 琼脂平板, 37 培养 48 h, 挑取单菌落进行下一步筛选. (5) pBHV1 克隆的筛选和鉴定. 将上述电转化获得的 CAM 抗性的大肠杆菌转化子转接于 4.0 mL 含 CAM 的 LB, 37 培养过夜, 以碱裂解法小量提取质粒 DNA<sup>[18]</sup>. 质粒经 *Hind* 单酶切后, 以 0.8%琼脂糖凝胶电泳筛选, 获得阳性候选克隆; 对于阳性克隆再以 *Sal* 酶切, 进行限制性内切酶片段长度多态性分析作进一步鉴定, 获得的阳性克隆即为 BHV-1 ZJ 株的感染性 BAC, 命名为 pBHV1.

( ) 重组病毒的拯救. 参照 Lipofectamine<sup>TM</sup> 2000 (Invitrogen)说明进行. 取 Qiagen Midi Kit 试剂盒提取的 pBHV1 DNA 1.0 μg (或者与 pUL15-18 1.0 μg)稀释于 250 μL opti-MEM (Gibco); 同时取 10 μL Lipofectamine 稀释于 250 μL opti-MEM, 将两者混匀, 室温放置 15 min 后, 加入 6 孔板中约 70%左右密度的单层 MDBK 细胞. 置 37 5% CO<sub>2</sub> 条件下培养 6 h

后更换为无血清 DMEM, 继续培养 4 d, 待细胞病变达到 80% 左右, 冻融 3 次收获病毒。拯救的病毒命名为 BHV1-res。

( ) BHV1 gN 基因缺失突变体的构建。采用两步 Red E/T 重组法<sup>[15,19]</sup>构建 BHV1 ZJ 株 gN 基因缺失株。首先将 pBHV1 质粒转化 *E. coli* GS1783 株, 提取质粒以 *Hind* 酶切筛选, 阳性克隆命名为 pBHV1/GS1783。将 pBHV1/GS1783 接种于含有 CAM 的 LB 培养基, 32 220 r/min 培养至  $A_{600}$  为 0.5~0.7 时, 42 水浴摇床保温 30min 以诱导 Red 重组酶表达, 常规方法<sup>[17]</sup>制备感受态细胞。

第一步 Red 重组以 *Kan* 抗性基因替代 *gN* 基因跨膜结构域序列。具体方法为: 以引物  $\Delta gN$ -1stop-F 和  $\Delta gN$ -1stop-R (序列见表 1) 扩增 pEPKanS 质粒模板上含有 *-Sce* 酶切位点和卡那霉素抗性基因的 DNA 片段( *-Sce -Kan*), 产物经 Qiagen 胶回收试剂盒回收, 以纯水洗脱; 取 100 ng 电转化 pBHV1/GS1783 感受态细胞, 32 振荡培养 1 h 后涂布含 34  $\mu\text{g}/\text{mL}$  CAM 和 50  $\mu\text{g}/\text{mL}$  Kan 的 LB 平板, 32 培养 24~48 h。挑取阳性克隆提取质粒, *Sph* 酶切筛选正确重组的克隆(pBHV1- $\Delta gN$ -Kan)进行第二次重组。

第二步 Red 重组将 pBHV1- $\Delta gN$ -Kan 质粒中的 *Kan* 抗性基因删除。具体方法为: pBHV1- $\Delta gN$ -Kan 菌落, 液体培养过夜后转接于 2 mL CAM-LB, 32 220 r/min 振荡 2~4 h, 加入等量 2% *L*-阿拉伯糖, 继续培养 1 h 诱导表达 *-Sce* 核酸内切酶, 然后再转入 42 水浴摇床培养 30 min 进行 Red 重组, 最后 32 培养 1 h。将细菌悬液作  $10^{-3}$ ~ $10^{-5}$  稀释后涂布于 CAM 平板, 32 孵育 24~48 h, 挑取菌落同时点种于 CAM 和 Kan 平板。 *Sph* 酶切分析 *Cam* 阳性和 *Kan* 阴性的菌落, 以筛选正确重组的克隆(pBHV1- $\Delta gN$ )。

pBHV1- $\Delta gN$  作为模板, 以引物  $\Delta gN$ \_seq-s 和  $\Delta gN$ \_

seq-as (序列见表 1) 进行 PCR 反应, 扩增产物胶回收后测序。鉴定正确的 pBHV1- $\Delta gN$ , 按照( ) 拯救 rBHV1- $\Delta gN$  毒株。

( ) 重组病毒的繁殖特性。以常规病毒学方法<sup>[13,14]</sup>测定 BHV1, rBHV1-HA, rBHV1-res, rBHV1- $\Delta gN$  毒株的细胞繁殖特性。24 孔板内长成单层的 MDBK 细胞, 每孔接种  $1 \times \text{TCID}_{50}$  的病毒, 吸附 90 min 后, 以灭菌的 CBS 缓冲液(40 mmol/L 柠檬酸钠, 10 mmol/L 氯化钾, 135 mmol/L 氯化钠, pH 3.0)洗涤 1 次, 再以 PBS 洗涤 2 次后, 加入 1 mL 维持液继续培养。接种后 2, 4, 6, 12, 4, 48 和 72 h 分别收集细胞培养上清和细胞沉淀, -70 冷冻保存。细胞沉淀冻融 1 次, 5000 r/min 离心 5 min, 取上清和细胞培养上清, 同时测定  $\text{TCID}_{50}$ , 分析重组病毒的繁殖特性。

## 2 结果

### 2.1 BHV1 的重组和重组病毒的纯化

采用 BHV1 ZJ 株病毒基因组和线性化 pUL15-18-HA2 共转染的方法产生重组病毒, 构建示意图见图 1。由于 pHA2 质粒源于 pBeloBac11 质粒, 并携带 Pcmv 启动子控制的 GFP 表达盒, 因此可以通过荧光显微镜观察 GFP 的表达情况来筛选重组病毒。BHV1 ZJ 株基因组和转移质粒 pUL15-18-HA2 共转染后 72 h, 可以在荧光显微镜下见到绿色荧光的微小蚀斑, 继续培养直至细胞病变达到 80%, 收获病毒后转接 MDBK, 经过 3 次空斑实验, 获得纯化的重组病毒 rBHV1-HA (图 2)。

### 2.2 pBHV1 的转化和筛选

重组病毒 rBHV1-HA 接种 MDBK 细胞后 30 h, 细胞病变约 40%, 提取病毒的环状 DNA, 电转化 *E. coli* DH10B 感受态细胞。提取 CAM 抗性克隆的质粒进行 RLFP(*Hind* 和 *Sal*) 分析, 结果见图 3。BHV1 ZJ 毒株与从 pBHV1 拯救的毒株 BHV1-res, 两种酶

表 1 用于缺失 BHV1 gN(UL49.5)的引物

引物名称 <sup>a)</sup>	序列 <sup>b)</sup>
$\Delta gN$ -1stop-F	5'-CGAGGGGGCAATGGACTTTTGGAGCGCAGGCTGCTACGCGTAAAGGCTCATGGGCGCCAGCGGAGGATG ACGACGATAAGTAGGG-3'
$\Delta gN$ -1stop-R	5'-GCGACTCCTTTTATTGGGCCCGCTGGCGCCCATGAGCCTTTACGCGTAGCAGCCTGCGCTCCAACCAAT TAACCAATTCTGATTAG-3'
$\Delta gN$ _seq-s	5'-GTTTCATCTCGCTTTGCTGCTG-3'
$\Delta gN$ _seq-as	5'-CTGTTTTCTCGACCCAAAGGTC-3'

a) BHV1 参考序列参见 GenBank NC\_001847; b) 下画线部分为与 pEPKanS 质粒模板结合的序列; 两段斜体部分和 BHV1 gN 基因同源, 中间序列(*gN* 基因的跨膜域)将被删除, 并插入一个终止密码子(粗体表示)

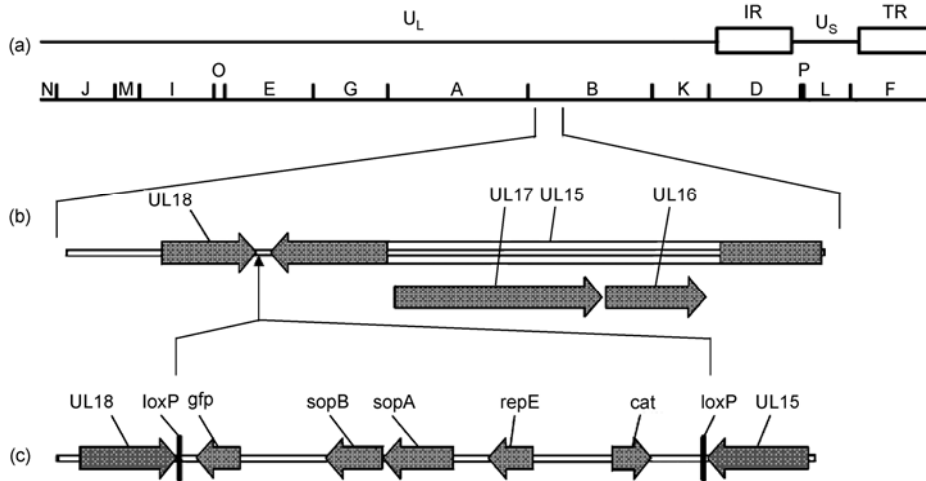


图1 pHA2质粒同源重组插入BHV-1病毒基因组示意图

(a) BHV-1基因组结构和限制性核酸内切酶 *Hind*III酶切位点图; (b) pHA2 DNA片段的插入位点在 UL18 和 UL15 之间的非基因结构区; (c)线性化的 BHV-1 转移质粒 pUL15-18-HA2, 2 个 loxP 位点间的序列为 pHA2 序列, 两端的序列为约 1.4 kb 的同源重组臂

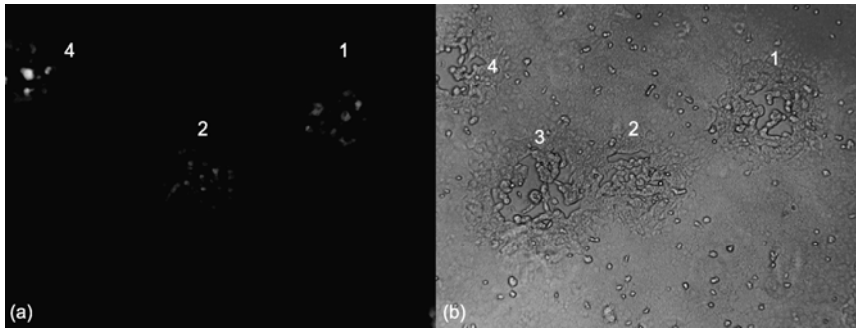


图2 重组病毒 rBHV-HA 空斑纯化

(a) 荧光照片; (b) 可见光照片. 1, 2 和 4, rBHV1-HA 空斑; 3, BHV1 空斑

切图谱完全一致. RLFP 分析结果显示, BHV1 ZJ 株经过同源重组和细菌转化后得到的 pBHV1 克隆, 除了 pHA2 质粒序列插入外, 未出现 *Hind* 和 *Sal* 酶切位点的变化和酶切片段大小的改变.

### 2.3 rBHV1-ΔgN 毒株的构建

质粒 pBHV1-ΔgN-Kan (第一步 Red 重组)和 pBHV1-ΔgN (第二步 Red 重组)经 *Sph* 酶切后电泳图谱见图 4, 电泳图显示了 *gN* 基因酶切片段的迁移率变化(箭头所示). 经过两步 Red 重组, 获得了 6 株 pBHV1-ΔgN 突变体, 其酶切图谱与预期的一致. 任意选择 2 个 pBHV1-ΔgN 克隆为模版, 以引物 ΔgN<sub>seq-s</sub> 和 ΔgN<sub>seq-as</sub> 扩增 *gN* 基因及其上下游部分序列进行测序, 结果显示 *gN* 基因的缺失与设计的结果完全一致, *gN* 基因跨膜域序列完全删除, 并插入了一个终止密码子. 上述酶切图谱和 PCR 产物测序结果显示, pBHV1-ΔgN 突变体构建成功.

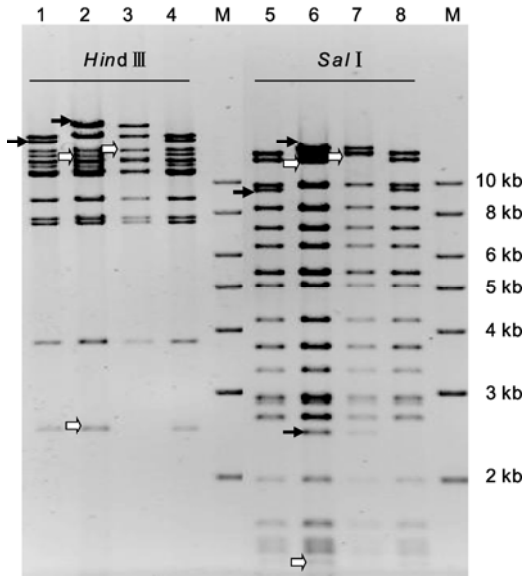
pBHV1-ΔgN 质粒转染 MDBK 细胞后 48 h, 在荧光显微镜下可以见到绿色的蚀斑, 表明成功拯救了 rBHV1-ΔgN 病毒. rBHV1-ΔgN 可以在 MDBK 细胞上繁殖和形成空斑, 因此 *gN* 基因不是 BHV1 在细胞上繁殖的必需基因.

### 2.4 病毒的繁殖特性

以一步法测定 BHV1 ZJ 株, rBHV1-HA, rBHV1-res 和 rBHV1-ΔgN 四个毒株在 MDBK 细胞上的生长曲线, 结果见图 5. 无论是细胞外还是细胞内的病毒滴度, 从 pBHV1 拯救的病毒 rBHV1-res 和野毒株都未见差异. 而缺失 *gN* 的病毒 rBHV1-ΔgN 在细胞上繁殖的滴度比其野毒株降低 9%~20%.

## 3 讨论和结论

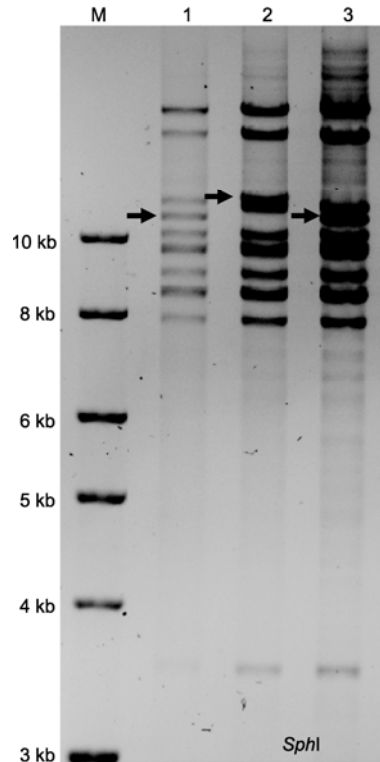
疱疹病毒基因功能的分析主要依赖构建病毒突变体进行研究. 疱疹病毒基因突变株的构建技术先



**图3 BHV1 ZJ 株及其重组毒株病毒基因组 DNA 和 pBHV1 质粒限制性核酸酶切电泳图**

图中显示了 *Hind* 和 *Sal* 两种限制性内切酶酶切结果. 泳道 1 和 5 为 BHV1 基因组, 由于 pHA2 质粒的片段插入导致了重组毒株 rBHV1-HA (泳道 2 和 6) 的电泳条带大小的变化(实心箭头所示); rBHV1-HA 基因组环化后转化大肠杆菌获得了 pBHV1 (泳道 3 和 7), 空心箭头显示了其电泳条带的差别. 泳道 4 和 8 为 BHV1-res 拯救毒株, 由 pBHV1 和 pUL15-18 共转染后的重组毒株, 其电泳谱带与 BHV1 一致

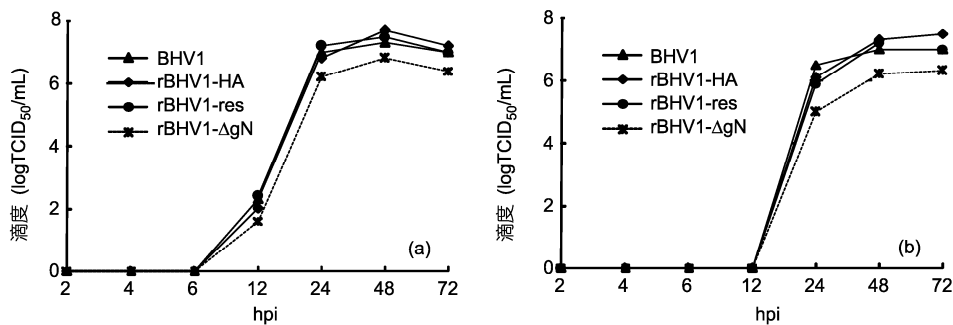
后经历了 3 个阶段: 随机突变、同源重组、反向遗传. 反向遗传构建疱疹病毒突变株在技术上经历了末端重合黏粒系统和细菌人工染色体两个阶段. 1988 年以末端重合的多个黏粒克隆重建伪狂犬病病毒 (PRV) 获得了成功<sup>[20]</sup>, 该方法产生重组病毒简单快速, 但其存在稳定性差、转染获得感染性病毒效率很低以及可能在重组位点产生意外重排问题<sup>[21]</sup>.



**图4 pBHV1 及其 gN 缺失突变体 SphI 酶切电泳图**

泳道 1 为 pBHV1, 经过第一步 RED 重组后获得了具有 *Kan* 抗性的突变体 pBHV1-ΔgN-kan (泳道 2), pBHV1-ΔgN-kan 经过第二步 RED 重组, 切除了的 *Kan* 抗性基因表达盒获得了 pBHV1-ΔgN (泳道 3), 箭头显示了 pBHV1-ΔgN 突变体两步 RED 重组的谱带变化. 图中的 DNA 分子量标记 (泳道 M) 为 GenScript 公司的 Ladder

1997 年以来, 将细菌人工染色体 (BAC) 技术引入疱疹病毒研究领域, 大大加速了对病毒基因组的操作<sup>[22]</sup>, HSV-1, Epstein-Barr 病毒 (EBV) 等许多人和动物疱疹病毒都克隆到 *E. coli* 并稳定保持为感染性克隆<sup>[16]</sup>. Timothy 和 Trapp 分别成功地将 BHV1 V155 和 Schon-



**图5 BHV1 毒株及其衍生毒株 rBHV1-HA, rBHV1-res 和 rBHV1-ΔgN 在 MDBK 细胞上的生长曲线**  
(a) 细胞内; (b) 细胞外

boken 毒株基因组克隆为 BAC<sup>[13,14]</sup>. BHV1 155 毒株是弱毒株, 其基因型为 1.2b, 目前仅仅存在于澳大利亚<sup>[13]</sup>; Schonboken 毒株基因型属于 1.2a, 是 1972 年从德国分离的强毒株. BHV1 ZJ 株从限制性酶切图谱分析, 可以归类于 1.2a, 因其分离自国内的奶牛, 在宿主种类、时间和地域分布上和 Schonboken 株差异较大, 因此可以认为 BHV1 ZJ 毒株不同于上述两种国外毒株; 将 BHV1 分离株构建为感染性 BAC 克隆, 在国内尚属首次报道, 对我国开展牛 I 型疱疹病毒的基因功能和病毒载体方面研究将具有重要的促进作用.

在构建 BHV1 感染性 BAC 时, Timothy 和 Trapp 分别选择了 *TK* 基因或 *gE* 基因为 BAC 质粒插入点, 为了不破坏基因组中任何基因结构, 我们选择了 UL15 和 UL18 基因之间的冗余序列作为 BAC 质粒插入位点, 从而保持了 BHV1 感染性克隆基因组的完整性, 降低了对其他基因功能进行研究时可能存在的影响.

本文在 pBHV1 BAC 克隆的基础上, 利用两次 Red E/T 介导的克隆技术, 方便地构建了 *gN* 基因部

分缺失的 pBHV1-Δ*gN*, 所构建的突变体与预期的完全一致, 未发现任何碱基意外的插入、缺失或突变. 该 BAC 突变体转染 MDBK 细胞后获得了重组病毒, 显示 *gN* 基因为 BHV1 体外复制非必需基因. BHV1 的 *gN* 蛋白在细胞内都可以阻断 TAP 与抗原肽的装配和引起 TAP 蛋白的降解<sup>[9,10]</sup>, 因而 *gN* 可能会阻断感染细胞的内源性抗原递呈途径. *gN* 基因缺失 BHV1 病毒的构建, 可以进而研究在病毒感染细胞内和动物体内 *gN* 蛋白的功能, 缺失 *gN* 基因有可能成为改进现有 *gE* 缺失疫苗免疫效果的途径.

利用随机转座子或定点 RecA-或 Red E/T 介导的克隆技术, 可以在短时间内快速构建病毒突变体<sup>[15]</sup>. 由于这种突变技术在大肠杆菌内进行, 不依赖于病毒在细胞内的繁殖, 因而可以对病毒基因组的任何位点(如病毒的必需基因)进行突变<sup>[23,24]</sup>. BHV1 基因组序列显示其编码基因超过 70 个, 借助 Red 克隆方法进行基因敲除, 能够方便地研究任意基因的作用和功能, 在此基础上可以进一步将 BHV1 改造成为一种通用的病毒载体, 用于牛重组疫苗的研究.

致谢 感谢美国 Cornell 大学兽医学院 NiKlaus Osterrieder, Kui Yang 和 Benedit Kaufer 三位博士, 他们提供了多种质粒和细胞株, 并在实验技术方面给予了帮助.

## 参考文献

- 1 Yates W D G. A review of infectious bovine rhinotracheitis, shipping fever pneumonia, and viral-bacterial synergism in respiratory disease of cattle. *Can J Comp Med*, 1982, 46: 225—263
- 2 童光志, 封启民, 王玟, 等. 牛传染性鼻气管炎病毒 DNA 的限制性内切酶分析. *中国畜禽传染病*, 1993, (5): 50—51
- 3 刘欣晏, 冯卫国, 吴春涛. 牛传染性鼻气管炎病的研究进展. *山东科学*, 2006, 19: 65—69
- 4 艾玉萍, 谭诗文, 冉懋韬, 等. 贵州省奶牛传染性鼻气管炎的血清学调查. *上海畜牧兽医通讯*, 2004, (5): 19
- 5 Ackermann M, Engels M. Pro and contra IBR-eradication. *Vet Microbiol*, 2006, 113: 293—302[doi]
- 6 Jones C, Chowdhury S. A review of the biology of bovine herpesvirus type 1 (BHV-1), its role as a cofactor in the bovine respiratory disease complex and development of improved vaccines. *Ani Heal Res Rev*, 2008, 8: 187—205
- 7 Rudolph J, Seyboldt C, Granzow H, et al. The gene 10 (UL49.5) product of equine herpesvirus 1 is necessary and sufficient for functional processing of glycoprotein M. *J Virol*, 2002, 76: 2952—2963[doi]
- 8 Wu S X, Zhu X P, Letchworth G J. Bovine herpesvirus 1 glycoprotein M forms a disulfide-linked heterodimer with the U(L)49.5 protein. *J Virol*, 1998, 72: 3029—3036
- 9 Koppers-Lalic D, Reits E A J, Rensing M E, et al. Varicelloviruses avoid T cell recognition by UL49.5-mediated inactivation of the transporter associated with antigen processing. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2005, 102: 5144—5149[doi]
- 10 Lipinska A D, Koppers-Lalic D, Rychlowski M, et al. Bovine herpesvirus 1 UL49.5 protein inhibits the transporter associated with antigen processing despite complex formation with glycoprotein M. *J Virol*, 2006, 81: 5822—5832[doi]
- 11 Adler H, Messerle M, Koszinowski U H. Cloning of herpesviral genomes as bacterial artificial chromosomes. *Rev Med Virol*, 2003, 13: 111—121[doi]
- 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 MDV-1 mutant. *J Virol*, 2000, 74: 11088—11098[doi]

- 13 Timothy J M, McCarthy F M, Gravel J L, et al. Construction and manipulation of an infectious clone of the bovine herpesvirus 1 genome maintained as a bacterial artificial chromosome. *J Virol*, 2002, 76: 6660—6668[[doi](#)]
- 14 Trapp S, Osterrieder N, Keil G M, et al. Mutagenesis of a bovine herpesvirus type 1 genome cloned as an infectious bacterial artificial chromosome: analysis of glycoprotein E and G double deletion mutants. *J Gen Virol*, 2003, 84: 301—306[[doi](#)]
- 15 Tischer B K, Einem J, Kaufer B, et al. Two-step Red-mediated recombination for versatile high-efficiency markerless DNA manipulation in *Escherichia coli*. *BioTechniques*, 2006, 40: 191—196[[doi](#)]
- 16 Adler H, Messerle M, Wagner M, Koszinowski U H. Cloning and mutagenesis of the murine gammaherpesvirus 68 genome as an infectious bacterial artificial chromosome. *J Virol*, 2000, 74: 6964—6974[[doi](#)]
- 17 Strive T, Hardy C M, French N, et al. Development of canine herpesvirus based antifertility vaccines for foxes using bacterial artificial chromosomes. *Vaccine*, 2006, 24: 980—988[[doi](#)]
- 18 Sambrook J, Russell D. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. 3rd ed. Cold Spring Harbor: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2001
- 19 Jarosinski K W, Margulis N G, Kamil J P, et al. Horizontal transmission of Marek's disease virus requires US2, the UL13 protein kinase and gC. *J Virol*, 2007, 81: 10575—10587[[doi](#)]
- 20 Zijl M, Quint W, Briaire J, et al. Regeneration of herpesviruses from molecularly cloned subgenomic fragments. *J Virol*, 1988, 62: 2191—2195
- 21 Horsburgh B C, Hubinette M M, Qiang D, et al. Allele replacement: An application that permits rapid manipulation of herpes simplex virus type 1 genomes. *Gene Ther*, 1999, 6: 922—930[[doi](#)]
- 22 Messerle M, Crnkovic I, Hammerschmidt W, et al. Cloning and mutagenesis of a herpesvirus genome as an infectious bacterial artificial chromosome. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1997, 94: 14759—14763[[doi](#)]
- 23 Yang K, Baines J D. The putative terminase subunit of herpes simplex virus encoded by UL28 is necessary and sufficient to mediate interaction between pUL15 and pUL33. *J Virol*, 2006, 80: 5733—5739[[doi](#)]
- 24 Robinson K E, Meers J, Gravel J L, et al. The essential and non-essential genes of Bovine herpesvirus 1. *J Gen Virol*, 2008, 89: 2851—2863[[doi](#)]

## Bovine herpesvirus type 1 genome cloned as infectious bacterial artificial chromosome and replication of *gN* gene deletion mutant *in vitro*

ZHANG Cun<sup>1</sup>, YE WeiCheng<sup>1</sup>, WANG YiCheng<sup>1</sup>, YUAN XiuFang<sup>1</sup>, YIN LongBo<sup>1,2</sup>,  
YIN WenLing<sup>1,2</sup> & LIU ManWen<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Institute of Animal Husbandry and Veterinary Science, Zhejiang Academy of Agricultural Sciences, Hangzhou 310021, China;

<sup>2</sup> School of Veterinary Medicine, Northwest A & F University, Xi'an 712100, China

**The recombinant bovine herpesvirus type 1 (rBHV1-HA) was constructed by inserting pHA2 plasmid into the viral genome between UL15 and UL18 cassettes. BHV1 infectious bacterial artificial chromosome had been confirmed after rBHV1-HA circular genome was extracted and transformed into *E. coli* strain DH10B. The resulting Bac clone, pBHV-1, was transfected into bovine kidney cells (MDBK) and the virus was rescued. The rescued virus, BHV1-res, have almost the same titres as the wildtype in replication *in vitro*. The transmembrane domain in *gN* open reading frame was deleted from pBHV-1 by Red E/T mutagenesis in *E. coli*. BHV-1 with partial deletion of *gN*, rBHV1-Δ*gN*, was reconstituted from the mutated Bac. rBHV1-Δ*gN* had lower titres by from 9% to 20% than rBHV-res in growth property in MDBK. This construction of infectious BHV1 clone should contribute greatly to the recombinant BHV1 vaccine with genes deletion and bovine universal viral vector.**

Bovine herpesvirus type 1, infectious clone, infectious bacterial artificial chromosome, membrane protein *gN*, UL49.5

doi: 10.1360/972009-1208