

# I型牛疱疹病毒 TK<sup>-</sup>/gE<sup>-</sup> 基因双缺失 突变株生物学特性

定明<sup>1,2</sup>, 范强<sup>2</sup>, 时彦胜<sup>1</sup>, 张小飞<sup>1</sup>, 张广州<sup>1</sup>, 李春<sup>3</sup>, 白杰英<sup>1</sup>, 刘正飞<sup>2</sup>

(1. 军事医学科学院实验动物中心, 北京 100071; 2. 华中农业大学, 武汉 430070; 3. 解放军第208医院, 长春 130062)

**【摘要】** 目的 构建I型牛疱疹病毒(BHV-1)的TK<sup>-</sup>/gE<sup>-</sup>双缺失突变株,检测其生物学功能,为治疗牛传染性鼻气管炎提供参考。方法 构建了带有EGFP表达盒的BHV-1 TK<sup>-</sup>/gE<sup>-</sup>双缺失突变株。通过southern杂交、蛋白质斑点印迹、空斑试验、MDBK细胞增殖实验等技术方法,对重组基因所构成病毒突变株的生物学特性进行鉴定。结果 Southern杂交及蛋白质斑点印迹表明,课题组成功构建了带有EGFP表达盒的双缺失突变株;该突变株具有与野生株相当的繁殖力,但TK<sup>-</sup>/gE<sup>-</sup>成功缺失,毒力大幅减弱;BHV-1 TK<sup>-</sup>/gE<sup>-</sup>遗传稳定,不会返强。结论 本项目组成功构建了I型牛疱疹病毒(BHV-1)的TK<sup>-</sup>/gE<sup>-</sup>双缺失突变株,该缺失株具有良好的安全性和稳定性,为该突变株进一步作为生物安全疫苗和多价病毒载体提供了依据,为预防和治疗牛传染性鼻气管炎提供了技术支持。

**【关键词】** 牛疱疹病毒;TK<sup>-</sup>/gE<sup>-</sup>突变株;生物学特性

**【中图分类号】** R332 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856(2012)07-0005-04

doi: 10.3969/j.issn.1671.7856.2012.007.002

## Study on the Characteristics of BHV-1 TK<sup>-</sup>/gE<sup>-</sup>/EGFP<sup>+</sup> Gene-deleted Mutant Virus Strain

DING Ming<sup>1,2</sup>, FAN Qiang<sup>2</sup>, SHI Yan-sheng<sup>1</sup>, ZHANG Xiao-fei<sup>1</sup>, ZHANG Guang-zhou<sup>1</sup>, LI Chun<sup>3</sup>,  
BAI Jie-ying<sup>1</sup>, LIU Zheng-fei<sup>2</sup>

(1. Laboratory Animal Center of Academy of Military Medical Sciences, Beijing 100071, China;  
2. Key Laboratory of Agricultural Microbiology, Huazhong Agricultural University, Wuhan 430070, China;  
3. The 208<sup>th</sup> hospital of PLA, Changchun 130062, China)

**【Abstract】 Objective** To detect the function of I BHV-1 TK<sup>-</sup>/gE<sup>-</sup>/EGFP<sup>+</sup> gene-deleted mutant virus strain, find a new method to prevent infectious bovine rhinotracheitis (IBR), the charaction of TK<sup>-</sup>/gE<sup>-</sup>/EGFP<sup>+</sup> gene-deleted mutant virus strain was further studied. **Methods** Southern hybridization, western dot blot and Plaques test were employed in this investment. **Results** TK gene is deleted and the mutant cannot produce glycoprotein E when gE gene is deleted. The diameter of mutant strain much smaller than that of field strain, the mutant strain grows on MDBK cells and the virus titer can keep 106.0TCID<sub>50</sub>/0.1 mL for more than 40 hours, which indicated that the mutant strain inherit instantly. **Conclusion** The gene-deleted mutant virus strain was successful constructed in this study, and the mutant

**【基金项目】** 农业公益性行业科研专项资助项目(200803018)。

**【作者简介】** 定明,男,(1986-),研究实习员,主要从事人兽共患传染病研究。E-mail: raydming@yahoo.com.cn。

**【通讯作者】** 白杰英(1977-),男,副研究员,主要从事人兽共患传染病病原学研究。E-mail: baijieying@126.com;

刘正飞(1973-),男,教授。主要从事动物病原微生物致病机制的研究。E-mail: lzf6789@mail.hzau.edu.cn。

virus strain was stable. This will be useful for the further study of IBR.

**【Key words】** Bovine hebetes virus; TK<sup>-</sup>/gE<sup>-</sup> gene-deleted mutant virus strain; Biological characteristic

牛传染性鼻气管炎 (*Infectious Bovine Rhinotracheitis*, IBR) 是由 I 型牛疱疹病毒 (BHV-1) 引起的一种牛的接触性传染病, 被 OIE 列为 B 类疾病, 其爆发和流行给世界养牛业造成了巨大的经济损失。许多国家都制定了根除计划, 其中英国、丹麦等国采用的是扑杀措施; 捷克和斯洛文尼亚用 gE 基因缺失疫苗和鉴别诊断方法相结合, 而美国主要是使用 TK 基因缺失疫苗对其加以控制<sup>[5]</sup>。

我国自 20 世纪 80 年代首次从新西兰进口奶牛群中分离到病毒<sup>[8]</sup>, 当前已有多个省市的抽样调查中发现该病毒。据近年相关流行病学调查表明, 我国牛群阳性感染率逐年上升, 部分地区甚至达到 67% 以上, 因此, 制定我国的牛传染性鼻气管炎根除计划势在必行。目前我国还未研制出具有自主知识产权的基因缺失疫苗, 为了适应我国市场的需要和我国加入 WTO 后的国际形势, 我们构建了同时缺失 TK、gE 基因的双缺失突变株。本研究通过对该双缺失突变株的生物学特性作进一步地研究, 为其临床应用提供科学依据, 同时为其作为更加安全的病毒载体奠定理论基础。

## 1 材料和方法

1.1 病毒和细胞。BHV-1 野生株由本课题组分离, BHV-1 TK<sup>-</sup>/gE<sup>-</sup>/EGFP<sup>+</sup> 由本课题组构建, 牛肾传代细胞 MDBK 购自上海中国典型培养物保藏中心。

1.2 各种限制性内切酶购自 TaKaRa 公司, DNA 回收试剂盒购自上海生物工程技术服务有限公司。

```
ACGGGCTGGGAAAGACAACAACGGGCCGCGCTCGCGCCGCTCCACCGCTGGGAGGGCGT
GCTCTTTTCCCGGAGCCGATGGCGTACTGGCGCACGATGTTTGGTACGGACGCCTTAAGTGCTTA
AGAGATACCT ACAGCGTGAGCTATGAGAAAGCGCCACGCTTCCCGAAGGGAGAAAGCGGACAG
GTATCCGGTAAGCGGACGGGTCGGAACAGGAGAGCGCACGAGGGAGCTTCCAGGGGAAACGCC
TGGTATCTTTATAGTCTGTCGGGTTTCCGCACCTCTGACTTGAG
```

图 1 TK 探针核苷酸序列

Fig. 1 Nucleotide sequence of TK probe

## 2.2 蛋白质斑点印迹鉴定

接种 BHV-1 TK<sup>-</sup>/gE<sup>-</sup>/EGFP<sup>+</sup> 和 BHV-1 于铺满单层的 MDBK 细胞, 待出现较多的 CPE 和有层状脱落时收获。在 -20℃ 中冻融 3 次, 取冻融液 3 μL 滴于硝酸纤维膜膜上, 风干后重复滴加 2 次。以鼠

司, 地高辛标记与检测试剂盒购自 GibcoBRL 公司, gE 单克隆抗体由本课题组制备, 羊抗鼠 HRP-IgG 为二抗购自 SBA 公司。

1.3 TK 寡核苷酸探针的制备。以 BHV-1 TK<sup>-</sup>/EGFP<sup>+</sup> 基因组 DNA 为模板, 设计引物扩增出一段 TK 与 EGFP 的连接处, 约 300 bp 的 DNA 片段, 用 DNA 回归试剂盒回收后, 用地高辛标记与检测试剂盒标记, 置于 -20℃ 保存备用。

1.4 参照文献<sup>[6]</sup>中方法进行 southern 杂交和蛋白质斑点印迹。

1.5 空斑试验。将 BHV-1 TK<sup>-</sup> 与 BHV-1 分别接毒于长满 MDBK 细胞的 6 孔细胞培养板, 进行空斑试验, 比较两者在 48 h 空斑大小<sup>[7]</sup>。

1.6 病毒组织培养半数感染致死量 (TCID<sub>50</sub>) 的测定按 Reed-muench 两氏法计算。

## 2 结果与分析

### 2.1 BHV-1 TK<sup>-</sup>/EGFP<sup>+</sup> 的 Southern 杂交鉴定

以 BHV-1 TK<sup>-</sup>/EGFP<sup>+</sup> 基因组 DNA 为模板, 扩增出长为 303 bp 的 DNA 片段作为探针, 其序列如图 1, 将 BHV-1 与 BHV-1 TK<sup>-</sup>/EGFP<sup>+</sup> 基因组 DNA 分别用 *Sph* I 酶切, 经 1.0% 琼脂糖凝胶电泳, EB 染色, 转膜、预杂交、杂交。结果显示 BHV-1 TK<sup>-</sup>/EGFP<sup>+</sup> DNA 经酶切后杂交条带约 4.8 kb (其中含有 1932 bp 的 EGFP 表达盒), 而 BHV-1 DNA 酶切后杂交条带约 3.5 kb, 图 2 所示, 测序结果证实 TK 基因已经缺失, 缺失大小为 632 bp。

抗 gE 单克隆抗体为一抗, 羊抗鼠 HRP-IgG 为二抗, 经二氨基联苯胺显色, 结果如图 3。BHV-1 打点后显出深褐色, 为阳性; 而 BHV-1 TK<sup>-</sup>/gE<sup>-</sup>/EGFP<sup>+</sup> 及 MDBK 细胞对照为阴性。这表明 gE 基因删除后, BHV-1 TK<sup>-</sup>/gE<sup>-</sup>/EGFP<sup>+</sup> 不能表达 gE 糖蛋白。

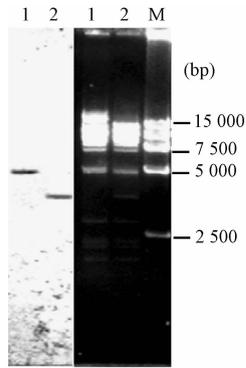


图 2 BHV-1 TK<sup>-</sup>/EGFP<sup>+</sup> 的 southern 杂交鉴定

Fig. 2 Identification of BHV-1 TK<sup>-</sup>/EGFP<sup>+</sup> by southern hybridization

1: BHV-1 TK<sup>-</sup>/EGFP<sup>+</sup> DNA /Sph I; 2: BHV-1 DNA /Sph I; M: DL15,000 DNA molecular marker

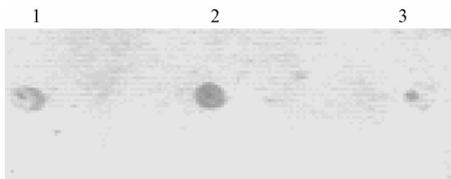


图 3 TK<sup>-</sup>/gE<sup>-</sup>/EGFP<sup>+</sup> 的蛋白质斑点印迹

Fig. 3 Identification of BHV-1 TK<sup>-</sup>/gE<sup>-</sup>/EGFP<sup>+</sup> by western blot

1: MDBK cell control; 2: BHV-1; 3: BHV-1 TK<sup>-</sup>/gE<sup>-</sup>/EGFP<sup>+</sup>

### 2.3 空斑大小比较

按 Kolmogorov Smirnov 法<sup>[1]</sup>测定比较,并通过 *t* 检验对数据进行了分析。结果显示: BHV-1 TK<sup>-</sup> 空斑大小为 0.42 mm ~ 0.72 mm; 而野生株 BHV-1 空斑为 0.52 mm ~ 1.06 mm, 缺失突变株形成的空斑明显小于野生株。这表明, TK 的缺失可能影响了

BHV-1 在细胞上的增殖后扩散能力, 这与文献<sup>[4]</sup>TK 功能缺失的毒株, 毒力大幅下降, 而且其在神经细胞等非分裂细胞中只有很低的增殖扩散能力的结论相符。

### 2.4 BHV-1 TK<sup>-</sup>/gE<sup>-</sup>/EGFP<sup>+</sup> 的增殖特性

测定 BHV-1 TK<sup>-</sup>/gE<sup>-</sup>/EGFP<sup>+</sup> 传代细胞冻融液毒价, 结果为 10<sup>-6.4</sup>/0.1 mL (1.92 × 10<sup>6</sup> PFU)。以 100 μL、10 μL、1 μL、0.1 μL、0.01 μL、0.001 μL 分别接种于长满 MDBK 细胞的 6 孔细胞培养板, 待出现 CPE 后收获上清, 分别测定毒价, 结果如表 1、图 4。结果显示, 取原液 1 μL 或 0.1 μL 毒价较高, 其说明在 TK、gE 基因双缺失后, 突变株仍能在细胞培养物上增殖, 且增殖能力并未大幅度丢失。

表 1 接种不同体积病毒原液后的毒价变化

Tab. 1 Variation of virus titer with different volume of BHV-1 TK<sup>-</sup>/gE<sup>-</sup>/EGFP<sup>+</sup>

Viral dose(μL)	100	10	1	0.1	0.01	0.001
TCID <sub>50</sub> /0.1mL	10 <sup>-5.15</sup>	10 <sup>-6.52</sup>	10 <sup>-6.90</sup>	10 <sup>-6.81</sup>	10 <sup>-6.77</sup>	10 <sup>-5.71</sup>

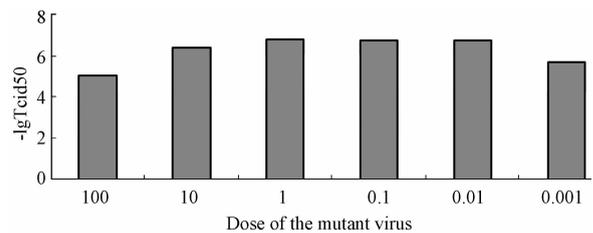


图 4 接种不同体积病毒原液后的毒价变化

Fig. 4 Variation of virus titer with different volume of BHV-1 TK<sup>-</sup>/gE<sup>-</sup>/EGFP<sup>+</sup>

取 BHV-1 TK<sup>-</sup>/gE<sup>-</sup>/EGFP<sup>+</sup> 传代细胞冻融液 1 μL 接种于细胞的 6 孔细胞培养板, 每隔 8 h 收获毒一次, 分别测定毒价, 结果如表 2:

表 2 接种病毒后不同时间的毒价变化

Tab. 2 Variation of of BHV-1 TK<sup>-</sup>/gE<sup>-</sup>/EGFP<sup>+</sup> titer in different time

Inocu. time	8 h	16 h	24 h	32 h	40 h	48 h	56 h	64 h	72 h	80 h	88 h	96 h
(-lgTCID <sub>50</sub> /0.1mL)	2.86	3.65	5.52	6.27	6.53	7.03	7.02	6.85	6.93	5.14	4.41	2.74

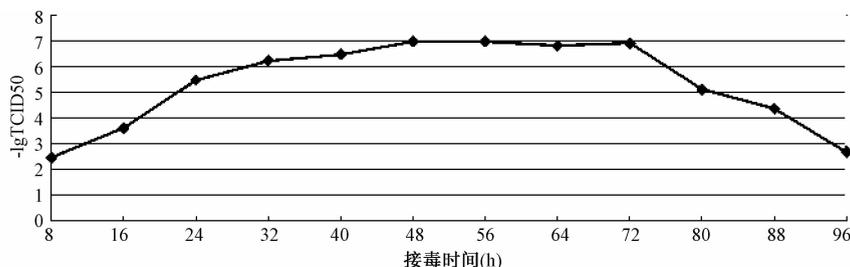


图 5 接种病毒后不同时间的毒价变化

Fig. 5 Variation of BHV-1 TK<sup>-</sup>/gE<sup>-</sup>/EGFP<sup>+</sup> titer in different time

由上表可见,随着时间的推移 BHV-1 的毒价呈先升高,而后又逐渐下降。 $-\lg\text{TCID}_{50}/0.1\text{ mL}$  高于 6.0 的时间可维持 40 h 以上。

而生长曲线显示,  $\text{BHV-1 TK}^-/\text{gE}^-/\text{EGFP}^+$  能在 MDBK 细胞上增殖良好。不同时相比较毒价时,以 48 h 增殖滴度最高。结果如图 5:

### 2.5 BHV-1 $\text{TK}^-/\text{gE}^-/\text{EGFP}^+$ 的遗传稳定性

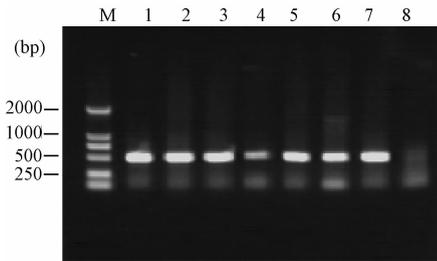


图 6 BHV-1  $\text{TK}^-/\text{gE}^-/\text{EGFP}^+$  的遗传稳定性

Fig. 6 The heredity stability of BHV-1  $\text{TK}^-/\text{gE}^-/\text{EGFP}^+$

M: DL2000 DNA molecular marker; 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7: PCR product of different generations of BHV-1  $\text{TK}^-/\text{gE}^-/\text{EGFP}^+$ ; 8: Negative control

将  $\text{BHV-1 TK}^-/\text{gE}^-/\text{EGFP}^+$  在 MDBK 细胞上连续接种 9 代,用 PCR 鉴定,结果均能扩出缺失 gE 基因后剩余的约 500 bp 大小的条带,如图 6。表明  $\text{BHV-1 TK}^-/\text{gE}^-/\text{EGFP}^+$  在 MDBK 细胞上稳定遗传而不发生返强。

### 3 讨论

通过 Southern 杂交和蛋白质斑点印迹鉴定试验表明 TK 基因完全缺失,而 gE 基因在缺失绝大部分 1731 bp 后,突变株不能产生 gE 糖蛋白,这为  $\text{BHV-1 TK}^-/\text{gE}^-/\text{EGFP}^+$  的临床应用提供了一个鉴别标志,也就是说,牛在注射该基因缺失疫苗病毒后,血液中不产生针对 gE 的抗体,结合 gE 鉴别 ELSA 方法即可将疫苗免疫牛和野毒感染牛相区分,从而淘汰野毒感染牛,建立健康牛群,因此  $\text{BHV-1 TK}^-/\text{gE}^-/\text{EGFP}^+$  是一株血清学“标志”疫苗<sup>[2]</sup>。

胸苷激酶基因 TK 和糖蛋白基因 gE 均是牛传染性鼻气管炎病毒重要的毒力基因,二者缺失后,牛传染性鼻气管炎病毒仍能在细胞培养物上增殖,

但由于 gE 基因与病毒在培养细胞之间的扩散有关,因此缺失 gE 后,病毒的滴度相对于野毒下降了。据有关文献报道<sup>[3]</sup>,  $\text{BHV-1}$  在 MDBK 上的增殖滴度可以达到  $10^{-7.5}\text{TCID}_{50}/0.1\text{ mL}$ ,而  $\text{TK}/\text{gE}$  缺失后的突变株很难达到  $10^{-7.0}\text{TCID}_{50}/0.1\text{ mL}$ 。gE 基因的缺失,不仅导致了牛传染性鼻气管炎病毒增殖能力下降,也影响到该病毒的其他生物学特性。

基因缺失疫苗的遗传稳定性也是疫苗研究的重要内容,将  $\text{BHV-1 TK}^-/\text{gE}^-/\text{EGFP}^+$  在 MDBK 细胞连续传代,收毒后扩增 gE<sup>-</sup> 约 500 bp 的片断。结果表明传至 9 代以上仍只能扩出 gE 缺失后的 500bp 基因片断,不能扩增出原基因 gE 的片断。生产中的疫苗一般不能超过 5 代,因此  $\text{BHV-1 TK}^-/\text{gE}^-/\text{EGFP}^+$  突变株可以满足生产疫苗的要求。本研究为该突变株的临床应用提供了科学依据,并为其进一步作为生物安全疫苗及多价病毒载体奠定理论基础。

### 参考文献:

- [1] Graham, F. L. and Van der Eb [J]. A. J. Virology, 1973, 52: 456.
- [2] Hutchings DL. Lymphocyte proliferative responses to separated bovine herpesvirus 1 proteins in immune cattle [J]. J Virol, 1990, 64: 5114-5122.
- [3] Kaashoek M. J. Early immunity induced by a live gE-negative bovine herpesvirus 1 marker vaccine [J]. J. Vet. Microbiol, 1996, 53: 20-26.
- [4] Smith GA. Development and trial of a bovine herpesvirus 1 - thymidine kinase deletion virus as a vaccine [J]. Aust Vet J, 1994; 71: 65-70.
- [5] 李继昌,于少军,等.牛传染性鼻气管炎病的研究进展[J].黑龙江畜牧兽医,2002,4:50.
- [6] 萨姆布鲁克(美),E. F. 弗里奇, T 曼尼阿蒂斯著.金冬雁,黎孟枫等译.分子克隆实验指南(第二版)[M/T].科学技术出版社,1996.
- [7] 殷震,刘景华.动物病毒学(第二版)[M].北京:科学出版社,1997.
- [8] 周泰冲,叶章明,等.从新西兰进口奶牛中分离传染性鼻气管炎病毒[J].兽医科技杂志,1981:8-11.

[修回日期]2012-07-05