

• 动物及兽医生物技术 •

## 犬瘟热病毒 CDV-3 株感染性克隆的构建与鉴定

卜研, 闫喜军, 赵建军, 李海涛, 赵传芳, 薛向红

中国农业科学院特产研究所, 吉林 长春 130122

卜研, 闫喜军, 赵建军, 等. 犬瘟热病毒 CDV-3 株感染性克隆的构建与鉴定. 生物工程学报, 2021, 37(1): 178-186.

Bu Y, Yan XJ, Zhao JJ, et al. Construction and identification of an infectious clone for CDV-3 strain of canine distemper virus. Chin J Biotech, 2021, 37(1): 178-186.

**摘要:** 以国内商品化水貂犬瘟热病毒疫苗所用毒株 CDV-3 为模板, 构建犬瘟热病毒感染性 cDNA 克隆, 为犬瘟热病毒新型疫苗研制、致病机理研究提供理论基础。设计 13 对引物对其全基因组序列测定, 分析单一酶切位点, 将 CDV-3 的全长分 5 个片段进行 RT-PCR 扩增。经酶切拼接, 将 5 个片段顺次插入到酶切位点改造后的真核载体 pcDNA3.2 的多克隆酶切位点处, 同时在 F1 首端和 F5 末端分别加入锤头状核酶和丁型肝炎核酶序列, 获得 CDV-3 株的全长 cDNA 质粒 (pcDNA3.2-CDV-3)。构建表达 CDV-3 N、P、L 蛋白的 3 个辅助质粒。利用转染试剂 Lipofectamine™ 2000 将全长质粒和 3 个辅助质粒共转染 293T 细胞, 3 d 后, 将上清接种到 Vero 细胞。观察犬瘟热病毒典型合胞体病变, 对重组病毒进行免疫荧光鉴定和标签鉴定。最后, 比较 wtCDV-3 和 rCDV-3 的生长特性。全长质粒和辅助质粒的酶切鉴定和序列测序均正确。拯救的重组病毒能在 Vero 细胞上形成典型的合胞体病变, 经 RT-PCR、间接免疫荧光和电镜观察鉴定, 证明成功拯救出重组病毒 rCDV-3 株。rCDV-3 的病毒滴度最高达到  $10^{7.667}$  TCID<sub>50</sub>/mL, 比 wtCDV-3 的滴度  $10^{6.667}$  TCID<sub>50</sub>/mL 高出约 10 倍。rCDV-3 感染 Vero 细胞后, 迅速大量增殖, 于感染后 36 h 达到最高病毒滴度。而 wtCDV-3 增殖平缓, 感染后 72 h 时病毒含量达到最大。文中建立的高效 CDV-3 株反向遗传操作平台, 为犬瘟热病毒新型疫苗研制和致病机理研究奠定基础。

**关键词:** 犬瘟热病毒, CDV-3 株, 感染性克隆, 反向遗传系统

## Construction and identification of an infectious clone for CDV-3 strain of canine distemper virus

Yan Bu, Xijun Yan, Jianjun Zhao, Haitao Li, Chuanfang Zhao, and Xianghong Xue

*Institute of Special Wild Economic Animal and Plant Science, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Changchun 130122, Jilin, China*

**Abstract:** In order to establish an infectious clone for CDV-3, a commercial vaccine strain of canine distemper virus for

**Received:** May 3, 2020; **Accepted:** September 9, 2020

**Supported by:** National Natural Science Foundation of China (No. 31902275), National Key Research and Development Program of China (No. 2016YFD0501001), Central Public-Interest Scientific Institution Basal Research Fund (No. 1610342020017).

**Corresponding author:** Xianghong Xue. Tel: +86-431-81919856; E-mail: xuexianghong@caas.cn

国家自然科学基金 (No. 31902275), 国家重点研发计划 (No. 2016YFD0501001), 中央级公益性科研院所基本科研业务费专项 (No. 1610342020017) 资助。

网络出版时间: 2020-09-25

网络出版地址: <https://kns.cnki.net/kcms/detail/11.1998.Q.20200924.1119.002.html>

mink, to provide reference for the studies of pathogenesis and novel vaccine development of CDV. Thirteen pairs of primers were used to amplify the full-length genome of CDV-3 strain. Five long fragments were obtained based on single restriction site analysis of the whole genome of CDV-3 by RT-PCR. Five fragments were successively inserted into the multiple clone sites in the modified eukaryotic vector of pcDNA3.2 by restriction enzymes and splicing. Meanwhile, the hammerhead ribozyme and hepatitis delta virus ribozyme sequences were added to the beginning of F1 fragment and the ending of F5 fragment, respectively. Then, the full-length cDNA recombinant plasmid of CDV-3 was obtained and named as pcDNA3.2-CDV-3. In addition, three helper plasmids, expressing the N protein, P protein and L protein of the CDV-3 strain respectively, were constructed. The 293T cells were transfected with the full-length cDNA recombinant plasmid and three helper plasmids by Lipofectamine™ 2000. At 3 days post transfection, the supernatant was added to the monolayer of Vero cells to observe the typical syncytium of CDV. Indirect immunofluorescence and artificial label identification of recombinant virus rCDV-3 were conducted after the occurrence of lesions. Finally, the growth characteristics of wtCDV-3 and rCDV-3 were compared after passaging of rCDV-3. The identification of the full-length cDNA recombinant plasmid and three helper plasmids by restriction enzyme digestion and sequencing were consistent with expected. The Vero cells infected with the recombinant rCDV-3 showed typical syncytic. The identification of indirect immunofluorescence and labeled marker, and observation under electron microscope proved that the rCDV-3 was indeed rescued from the recombinant plasmid of pcDNA3.2-CDV-3. In comparison of the virus titers of wtCDV-3, rCDV-3 replicated massively and rapidly and reached the maximize virus titer of  $10^{7.667}$  TCID<sub>50</sub>/mL within 36 h post infection (p.i.) in Vero cells, while wtCDV-3 grew gradually to  $10^{6.667}$  TCID<sub>50</sub>/mL at 72 h p.i. in Vero cells. This reverse genetic system of CDV-3 strain has been established successfully, to provide reference for the studies of pathogenesis and novel vaccine development of CDV.

**Keywords:** canine distemper virus, CDV-3 strain, infectious clone, reverse genetic system

犬瘟热 (Canine distemper, CD) 是由犬瘟热病毒 (Canine distemper virus, CDV) 感染犬、水貂等多种肉食动物而引起的一种高度接触性传染病<sup>[1]</sup>。该病传染性高、发病率高、临床症状多样, 感染后期容易形成继发和混合感染<sup>[2-3]</sup>。近年来, 犬瘟热病毒自然感染宿主不断扩大<sup>[4]</sup>。据报道, 野生动物老虎、狮子、豹和海豹, 甚至大熊猫群体中都暴发过犬瘟热。2015年1月, 我国陕西省珍稀野生动物抢救饲养研究中心圈养的5只大熊猫因感染CDV强毒而死亡, Feng等在实验室对组织病料进行了CDV分离鉴定, 证实此毒株属于Aisa I型强毒株, 命名为giant panda/SX/2014<sup>[5]</sup>。2015年, 广东省的动物园发生了2起独立的犬瘟热疫情, 西伯利亚虎和小熊猫因感染犬瘟热病毒而死亡<sup>[6]</sup>。实际上, 我国和日本学者都曾报道, CDV能够自然感染非人灵长类动物, 如我国猕猴和日本食蟹猴<sup>[7-8]</sup>。而且, 在人变形性骨炎Paget's患者体内检测到CDV核酸<sup>[9]</sup>。可见, 犬瘟热病毒正在给全球动物养殖业和生物多样性带来极大的损失和危害。同时, 随着我国经济的快速发展,

人们对犬猫等宠物的拥有量逐年增多, 犬瘟热引起的社会公共危害越来越受到人们重视。因此, 犬瘟热预防和治疗迫在眉睫。目前世界范围内, 犬瘟热的预防一直依靠弱毒活疫苗。但是, 犬瘟热病毒的感染和传播依然不容乐观<sup>[10]</sup>。近几年数据显示, 虽然许多动物接种弱毒活疫苗, 但仍然存在免疫后犬瘟热发病的案例<sup>[11-12]</sup>。反向遗传技术是新兴的一种定向修饰或改造病毒的重要技术, 应用前景非常广阔<sup>[4-13]</sup>。近十几年, 国内外许多学者利用反向遗传学技术拯救出多株犬瘟热病毒。2000年Uta Gassen等首次利用痘病毒提供T7 RNA聚合酶, 从位于T7启动子下游的Onderstepoort株全长cDNA拯救获得感染性病毒<sup>[14]</sup>。2001年Parks等拯救出高效表达荧光素酶的重组Onderstepoort株<sup>[15]</sup>。2004年Plattet等建立了CDV野毒A75/17 Vero细胞适应株A75/17-V的感染性克隆, 在基因组3'端插入EGFP基因, 重组病毒能在细胞上持续性表达EGFP<sup>[16]</sup>。2007年Fujita等在日本CDV野毒Yanaka株骨架上插入EGFP, 获得表达EGFP的重组犬瘟热病毒<sup>[17]</sup>。

2012年 Wang 等构建了弱毒疫苗株 CDV/R-20/8 感染性克隆, 获得了表达狂犬病病毒 G 蛋白的重组犬瘟热病毒, 在小鼠和犬体内, 能诱发针对两种病原的高水平抗体<sup>[18]</sup>。2015年 Li 等将狂犬病毒 Flury-FEP 株 G 基因插入到犬瘟热病毒基因组, 重组病毒 rCDV-RV-G 免疫小鼠和犬, 机体内均能产生抗 CDV 和 RV 的中和抗体<sup>[19]</sup>。本研究以国内商品化水貂犬瘟热病毒疫苗毒 CDV-3 株为病毒模型, 构建了高效的 CDV-3 株病毒拯救系统, 为毛皮动物 CDV 活载体基因工程疫苗的开发提供平台。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

#### 1.1.1 毒株和细胞

犬瘟热病毒 CDV-3 株由中国农业科学院特产研究所动物疫病研究室保存; 293T 和 Vero 细胞由中国农业科学院特产研究所动物疫病研究室保存。

#### 1.1.2 主要试剂

培养液 DMEM、青链霉素和小牛血清 FBS, 均购自 Gibco 公司; 真核表达载体 pcDNA3.1 购自 Invitrogen 公司; 克隆载体 pEASY-Blunt 或 pEASY-Simple-Blunt、高保真酶 TransStart FastPfu DNA 聚合酶和 FITC 标记的羊抗鼠二抗购自北京全式金生物技术有限公司; 各种限制性内切酶和 T4 DNA 连接酶均购自 Thermo 公司; 转染试剂 Lipofectamine™ 2000 和反转录试剂盒 SuperScript III First-Strand Synthesis SuperMix 购自 Invitrogen 公司; 质粒小量提取试剂盒、DNA 凝胶回收试剂盒, 购自 AXYGEN 公司; RNeasy Mini Kit 和 EndoFree Plasmid Maxi Kit 购自 QIAGEN 公司; 抗体 CDV-NP 购自 Veterinary Medical Research and Development 公司。

### 1.2 方法

#### 1.2.1 CDV-3 株全基因组克隆及序列测定

取冻存的犬瘟热病毒 CDV-3 株细胞培养悬液 200 μL, 根据 RNeasy Mini Kit 操作说明, 提取总

RNA。用 SuperScript III First-Strand Synthesis SuperMix 试剂盒反转录合成 cDNA。根据 GenBank 已公布的 CDV-3 株参考序列, 用软件 Primer Premier 5.0 设计了 13 对特异性引物 (表 1), 由生工生物工程 (上海) 股份有限公司合成。用 TransStart FastPfu DNA 聚合酶试剂盒进行 PCR 扩增, 对目的片段进行回收纯化, 连接至 pEASY-Blunt 载体, 转化至 Trans-T1 感受态, 涂菌至含有氨苄抗性的平板, 筛选 3 个以上的阳性克隆子送生工生物工程 (上海) 股份有限公司进行序列测定。

表 1 全基因组扩增用引物序列

Table 1 Sequences of Primers for the whole genome amplification

Primer name	Primer sequences (5'-3')	Position of the full-length (nt)
1F	ACCAGACAAAGTTGGCTAWGG	1
1R	GAGCCGGATACATAGTTTCAAT	957
2F	GAAACAGGATTGCTGAGGAC	766
2R	TACCTTCGGGATTATGTGGG	2 455
3F	GGATTCTGGCGAAGATTATT	2 259
3R	TCTGTAACCTCCATCGTCTG	3 947
4F	AACTGCAGGTGTCAAGGAAC	3 739
4R	TGAGAGCCTGAGTTGATTGC	5 278
5F	CGCAAGCGAGGATTGAGGGT	4 503
5R	TGACGGTTTCTTGGGTAGCCTC	5 787
6F	GTTCCAAGGCTCAGATACAT	5 329
6R	TCTCGTTTAGCTTTTGTGGC	7 418
7F	AAGAGGATATGGAGAAATCAGAGG	7 301
7R	GGTTACATGAGAATCTTATACGGAC	8 888
8F	CATCGCCAACCTACAACCA	8 829
8R	CCTGAGGCATGAGCATTCT	10 312
9F	CATTAACGGTTATCGGGATAGACAT	10 217
9R	CTCGGGTCTCATCCACTATTGTT	11 625
10F	GCACCTGGTCCTATGCCCTG	11 383
10R	GATGAGAGAGGTCCCTGAGTATTTG	12 944
11F	GGCCTATGGTGATGATGACG	12 770
11R	CTTTCTAAGCATCCAACAGCATC	14 128
12F	TGCAACCTGATCTATAACTGT	13 725
12R	GACAATCCTGGTAATTTCTGT	15 392
13F	TGGGTTGGGAGTGTTGATTG	14 595
13R	ACCAGACAAAGCTGGGTATGAT	15 690

### 1.2.2 CDV-3 株全基因组 cDNA 重组质粒的构建

利用软件 DNAMAN 分析 1.2.1 中所获得的 CDV-3 株全基因组序列的单一性酶切位点, 选取适当的位置作为衔接点。利用 Primer Premier 5.0 设计特异性引物 (表 2), 为了便于拼接, 引物两端携带相应的酶切位点。用 1.2.1 中合成的 cDNA 为模板进行 PCR 扩增, 扩增产物依次命名为: F1、F2、F3、F4 和 F5。其中, 引物 F1F 的 5'端加入了 *Spe* I 酶切位点 (斜体) 和锤头状核酶序列 (黑体)。引物 F5R 的 5'端加入了部分丁型肝炎核酶序列 (黑体)。之后, 改造载体 pcDNA3.1 的多克隆位点, 用内切酶 *Pme* I 酶切 pcDNA3.1, 连接入事先制备的双链 DNA (上游引物: 5'-GGC CGCATTTCGTACGAATTTTGTACATTTTCGGTCC GACCTGGGCATCCGAAGGAGGACGCACGTCC

ACTCGGATGGCTAAGGGAGGGCG-3'; 下游引物: 5'-CGCCCTCCCTTAGCCATCCGAGTGGAC GTGCGTCCTCCTTCGGATGCCAGGTCGGAC CGAAATGTACAAAATTCGTACGAAATGC-3'), 最终 pcDNA3.1 的多克隆位点变为 *Nhe* I -*Not* I -*Bsiw* I -*Bsp*1407 I -*Cpo* I -部分丁型肝炎核酶序列, 改造后的 pcDNA3.1 称为 pcDNA3.2。将 F1 连接至 pEASY-Blunt, 获得 pEASY-Blunt-F1, *Spe* I 和 *Not* I 双酶切 pEASY-Blunt-F1, 回收纯化 F1 片段; *Nhe* I 和 *Not* I 双酶切 pcDNA3.2, 回收纯化载体片段; *Spe* I 和 *Nhe* I 属于同尾酶, T4 DNA 连接酶连接 F1 片段和 pcDNA3.2 载体片段, 获得 pcDNA3.2-F1。将 F2 和 F3 分别连接到克隆载体 pEASY-Blunt Simple 或 pEASY-Blunt 上获得 pEASY-Blunt-F3 和 pEASY-Blunt-F2。用 *Not* I 和

表 2 CDV-3 株 cDNA 克隆构建用引物序列

Table 2 Primer sequences for construction of CDV-3 cDNA clones

Primer name	Primer sequences (5'-3')	Position in full-length (nt)	T <sub>m</sub> (°C)
QF1-F	<b>ACTAGT</b> <i>GTTAAGCGTCTGATGAGTCCGTGAGGACGAAACTATAGGAA</i> <b>AGGAATTCCTATAGTCACCAGACAAAGTTGGCTATGGA</b>	1	72
QF1-R	GAT <b>GTTTAAAC</b> CAGTTTTGCGCCGG	3 385	
QF2-F	<b>GTTTAAAC</b> ATCGCTTAAAAGCAATTATA	3 364	55
QF2-R	TCTGCCCAACTAATTCACATGACAT	5 871	
QF3-F	<b>CATATG</b> TCATGTGAATTAGTTGGGC	5 844	57
QF3-R	C <b>CGTACG</b> TTTTCTGCTGCTGTT	10 142	
QF4-F	CAGAAAA <b>CGTACG</b> GAAACACATGAATCAAC	10 129	58
QF4-R	GGATT <b>TGTACA</b> GATATTTCTTGGTATGACGAC	13 216	
QF5-F	GAGTCCCAGGGCTCAGAAATGTCG	13 165	72
QF5-R	<b>TCCGACCG</b> CGAGGAGGTGGAGATGCCATGCCGACCCACCAGACAAA GCTGGGTATGATAAC	15 690	
N-F	GGGTCAATGAT <b>GGTACC</b> TTAGAGA	74	60
N-R	<b>GCGGCCGC</b> TTAATTGAGTAG	1 684	
P-F	GAC <b>CTTAAG</b> TTCTATCCCTAAATGGCAG	1 788	59
P-R	<b>GCGGCCGC</b> TTAAGCATGAGTA	3 326	
L-F	CA <b>GGTACC</b> TTTTAGCCATGGACTCTGTGTCAAGTGAAC	9 014	72
L-R	<b>GCGGCCGC</b> TTAGTGATTTCTAATCAGTGCATAACCTAAC	15 592	

The box is the restriction site carried by each primer. ACTAGT *Spe* I, GTTTAAAC *Pme* I, CATATG *Nde* I, CGTACG *Bsiw* I, TGTACA *Bsp*1407 I, CGGACCG *Cpo* I, GGTACC *Kpn* I, GCGGCCGC *Not* I, CTTAAG *Afl* II.

*Nde* I 分别双酶切 pEASY-Blunt-F3 和 pEASY-Blunt-F2, 回收纯化 F2 片段和 F3 载体部分, T4 DNA 连接酶连接, 获得 pBlunt-F2-F3。将 F4 和 F5 片段分别连接到克隆载体 pEASY-Blunt 上, 获得 pEASY-Blunt-F4 和 pEASY-Blunt-F5。*Not* I 和 *Bsp*1407 I 分别双酶切 pEASY-Blunt-F4 和 pEASY-Blunt-F5, 回收纯化 F4 片段和 F5 载体片段, T4DNA 连接酶连接, 获得 pBlunt-F4-F5。用 *Bsiw* I 和 *Cpo* I 双酶切 pBlunt-F4-F5 和 pcDNA3.2-F1, 回收纯化 F4-F5 片段部分和 pcDNA3.2-F1 载体部分, 连接酶连接获得 pcDNA3.2-F1-F4-F5。*Pme* I 和 *Bsiw* I 双酶切 pcDNA3.2-F1-F4-F5 和 pBlunt-F2-F3, 回收纯化 F2-F3 片段和 pcDNA3.2-F1-F4-F5 载体部分, T4 DNA 连接酶连接, 获得 CDV-3 全基因组重组质粒 pcDNA3.2-CDV-3。最后用 *Pme* I 和 *Bsp*1407 I 双酶切鉴定全长重组质粒, 筛选出正确的重组子 pcDNA3.2-CDV-3 (图 1)。按照 EndoFree Plasmid Maxi Kit 的操作说明, 大量提取全长重组质粒 pcDNA3.2-CDV-3, 测定浓度后分装, 于 -70 °C 保存待用。

### 1.2.3 CDV-3 株辅助质粒的构建

针对 CDV-3 株 N、P 和 L 基因的开放阅读框区域, 利用 Primer Premier 5.0 设计特异性引物 (表 2), 用 1.2.1 中合成的 cDNA 为模板, 进行 PCR 扩增, 获得扩增产物 N、P 和 L。回收纯化片段 N、P 和 L, 分别连接至 pEASY-Blunt-Simple 上, 获得 pEASY-Blunt-Simple-N、pEASY-Blunt-

Simple-P 和 pEASY-Blunt-Simple-L。*Kpn* I 和 *Not* I 双酶切 pEASY-Blunt-Simple-N 和 pEASY-Blunt-Simple-L, *Afl* II 和 *Not* I 双酶切 pEASY-Blunt-Simple-P, 同时用相同内切酶组合双切载体 pcDNA3.1。回收纯化 N、P、L 片段和 pcDNA3.1 载体片段, T4 DNA 连接酶连接。筛选出正确的重组子 pcDNA3.1-N、pcDNA3.1-P 和 pcDNA3.1-L。按照 EndoFree Plasmid Maxi Kit 的操作说明, 大量提取辅助质粒 pcDNA3.1-N、pcDNA3.1-P 和 pcDNA3.1-L, 测定浓度后分装, 于 -70 °C 保存待用。

### 1.2.4 rCDV-3 株的拯救

转染前 24 h, 于 6 孔板中接种  $2 \times 10^5$  个 293T 细胞/孔, 第 2 天细胞生长密度至 80% 以上, 开始转染, 每个质粒用量为: 全长质粒 pcDNA3.2-CDV-3 5  $\mu$ g, 辅助质粒 pcDNA3.1-N 1  $\mu$ g, pcDNA3.1-P 0.8  $\mu$ g 和 pcDNA3.1-L 0.5  $\mu$ g, 转染试剂 22  $\mu$ L。按照 Lipofectamine™ 2000 说明书进行操作。共转染 3 h, 更换为含 10% FBS 的 DMEM 细胞培养液, 37 °C、5% CO<sub>2</sub> 条件下培养 72 h。刮取细胞悬液, 取 300  $\mu$ L 至单层 Vero 细胞, 观察细胞病变。出现犬瘟热病毒典型的合胞体样细胞病变时, 反复冻融收获病毒液。

### 1.2.5 rCDV-3 的鉴定

将收获的 rCDV-3 病毒液接种至 Vero 细胞, 培养 72 h。用 4% 多聚甲醛固定细胞, 0.5% Triton X-100 通透细胞, 一抗 CDV-NP 作用 1 h, 加入 FITC 标记抗羊抗鼠 IgG 荧光二抗染色。最后, DAPI

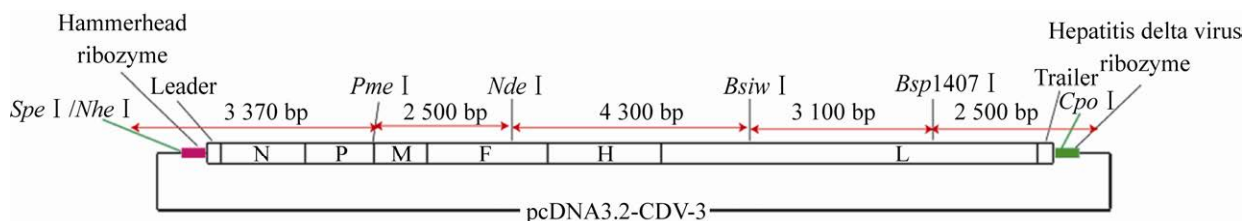


图 1 CDV-3 株全长 cDNA 克隆构建策略

Fig. 1 Construction strategy of CDV-3 full-length cDNA clone.

染核,在荧光显微镜下观察绿色荧光。分别提取 wtCDV-3 和 rCDV-3 的总 RNA,反转录合成病毒基因组 cDNA。根据 P-M 处设计引物(JD-F: 5'-TGGTATTACTCTGGGCTCA-3'和 JD-R: 5'-CTT TGAACATGCTCAAATTA-3'),以各自的 cDNA 为模板,进行 PCR 扩增,1%琼脂糖凝胶电泳后回收片段,用 *Pme* I 酶切。rCDV-3 由于基因组中被人引入 *Pme* I 位点,因此可以被切割开;而 wtCDV-3 序列中并无 *Pme* I 位点,无法被切割。分别取病毒 wtCDV-3 和 rCDV-3 上清液 100  $\mu$ L,磷钨酸负染,电子显微镜观察和比较两种病毒粒子的形态大小。

### 1.2.6 rCDV-3 生长特性研究

将 rCDV-3 在 Vero 细胞上传代 10 次,取每一代病毒液 300  $\mu$ L,测定 TCID<sub>50</sub>。在 Vero 细胞上分别按感染复数 (MOI=0.1) 接种 wtCDV-3 和 rCDV-3,35  $^{\circ}$ C、5% CO<sub>2</sub> 培养 5 d。于感染后 12、24、48、72、96、120 h,分别取病毒液上清和细胞,测定上清和细胞中病毒的 TCID<sub>50</sub>。以上试验至少重复 3 次。

## 2 结果与分析

### 2.1 CDV-3 全基因组序列测定结果与分析

覆盖 CDV-3 株全基因组的 13 个目的片段,用 RT-PCR 方法扩增后,经 1%琼脂糖凝胶电泳,可以看到 13 个目的条带的大小跟预期结果一致(图 2A)。拼接获得了本实验所用 CDV-3 全基因组序列,与 GenBank CDV-3 (登录号: EU726268.1) 的序列比对发现:全基因组共 5 个碱基不同,分别引起 P 蛋白 1 个、H 蛋白 2 个和 L 蛋白 2 个氨基酸发生改变。

### 2.2 CDV-3 全基因组 cDNA 重组质粒的鉴定

CDV-3 株全长分 5 段 PCR 克隆,获得 5 个片段,大小依次为:3 400 bp、2 500 bp、4 300 bp、3 100 bp 和 2 500 bp,与预期大小一致(图 2B)。质粒 pcDNA3.2-CDV-3 经 *Pme* I 和 *Bsp*1407 I 双

酶切,酶切产物经 1%琼脂糖凝胶电泳,得到大小约 9 900 bp 和 12 000 bp 的目的条带(图 2C),与预期结果一致。

### 2.3 辅助质粒鉴定

辅助质粒 pcDNA3.1-N、pcDNA3.1-P 和 pcDNA3.1-L 分别用构建时各自上下游引物添加的单一性限制内切酶进行双酶切鉴定,酶切产物经 1%琼脂糖凝胶电泳,分别得到约 1 700 bp、1 600 bp、6 500 bp 和 5 400 bp 目的条带,与预期结果一致(图 2D)。

### 2.4 rCDV-3 重组病毒的鉴定

4 个质粒共转染后,接种到 Vero 细胞,观察到典型的合胞体细胞病变(图 3A),同时空白对照组 Vero 无病变(图 3B)。为了进一步确定,用免疫荧光鉴定,可以看到发生病变的细胞能特异性与 CDV-NP 抗体结合,呈阳性信号(图 3C),空白对照组为阴性(图 3D)。为区别 wtCDV-3 污染,利用特异性鉴定引物 JD-F/R PCR 扩增,纯化后的扩增产物用预先添加的 *Pme* I 酶切,可以看到 rCDV-3 能被切割开,而 wtCDV-3 不能被切开(图 3E)。电镜下观察 rCDV-3,可以看到直径约为 200 nm、有囊膜的犬瘟热病毒粒子(图 3F)。

### 2.5 rCDV-3 的生长特性

将重组病毒 rCDV-3 连续传代培养,分别测定每代病毒悬液的 TCID<sub>50</sub>(图 4A)。重组病毒 rCDV-3 传代稳定后,按 MOI=0.1 接种 Vero 细胞,于不同时间点收集上清和细胞,测定 TCID<sub>50</sub>,绘制出生长曲线。同样绘制 wtCDV-3 的生长曲线,并进行比较(图 4B)。

## 3 讨论

反向遗传技术是深入研究 RNA 病毒结构与功能关系、感染与免疫机制、开发新型疫苗的有力手段。近年来,犬瘟热病毒自然感染宿主不断扩大,流行毒株不断变异,毒力也有增强<sup>[20]</sup>。这

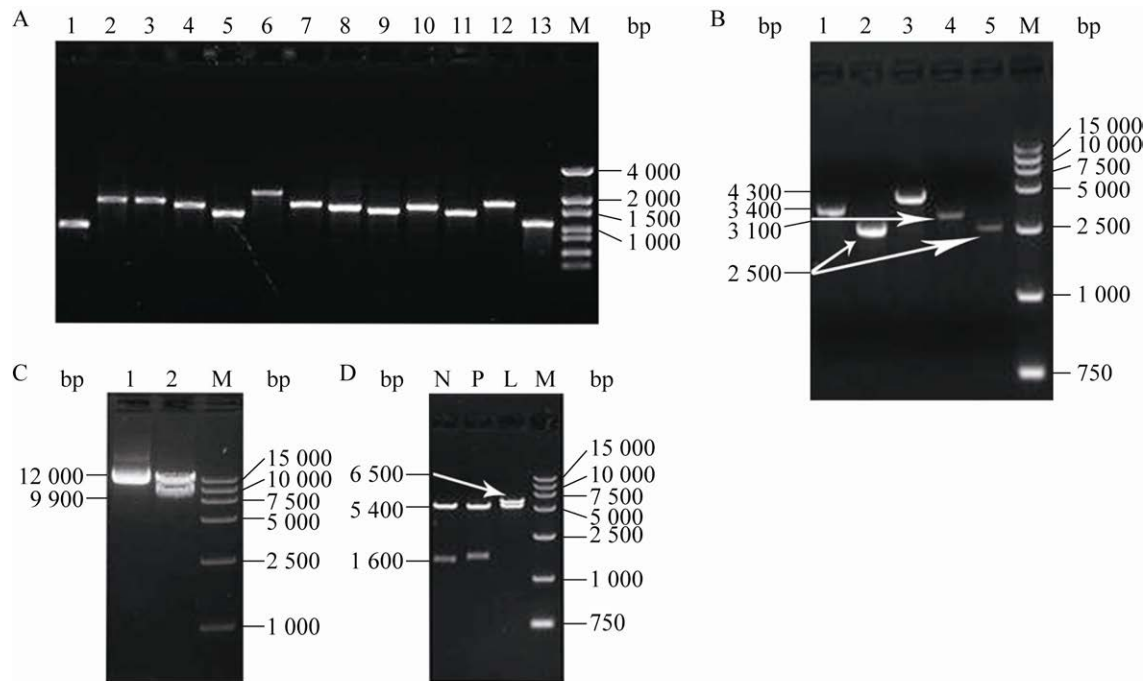


图 2 犬瘟热病毒 CDV-3 株全长重组 cDNA 和辅助质粒的鉴定

Fig. 2 Identification of full-length recombinant cDNA and helper plasmids of CDV-3 canine distemper virus. (A) The results of CDV-3 strain whole genome amplification; 1–13: amplification result of 13 fragments covering the whole genome of CDV-3 strain, M: trans 4K DNA marker. (B) CDV-3 strain segmented amplification results; 1–5: amplification results of 5 long fragments from CDV-3 strain, M: DL DNA 15 000 marker. (C) pcDNA3.2-CDV-3 identification results; 1: recombinant plasmid pcDNA3.2-CDV-3, 2: *Pme* I and *Bsp*1407 I double digestions identification results of pcDNA3.2-CDV-3, M: DNA 15 000 marker. (D) Identification result of the helper plasmids; N: *Kpn* I and *Not* I double digestion of pcDNA3.1-N, P: *Afl* II and *Not* I double digestion of pcDNA3.1-P, L: *Kpn* I and *Not* I double digestion of pcDNA3.1-L, M: DNA 15 000 marker.

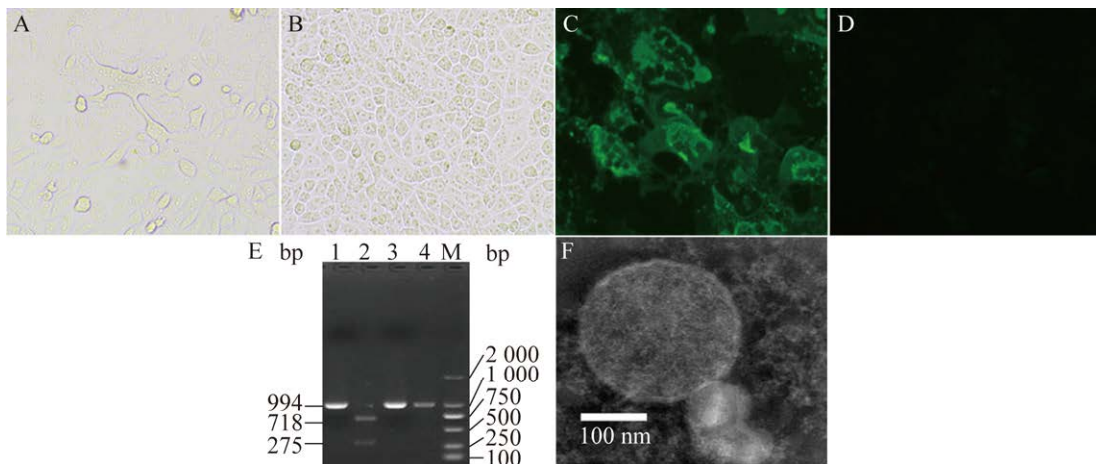


图 3 重组病毒 rCDV-3 的鉴定

Fig. 3 Identification of recombinant virus rCDV-3. (A) rCDV-3 cell pathology ( $\times 100$ ). (B) Negative Vero cells ( $\times 100$ ). (C) rCDV-3 immunofluorescence ( $\times 100$ ). (D) Negative Vero cells immunofluorescence ( $\times 100$ ). (E) *Pme* I label identification of rCDV-3; 1, 3: RT-PCR amplification results of the P-M region of rCDV-3 and wtCDV-3, 2, 4: *Pme* I digested products from lane 1 and 3, M: DL DNA 2 000 marker. (F) Electron microscopic appearance of rCDV-3.

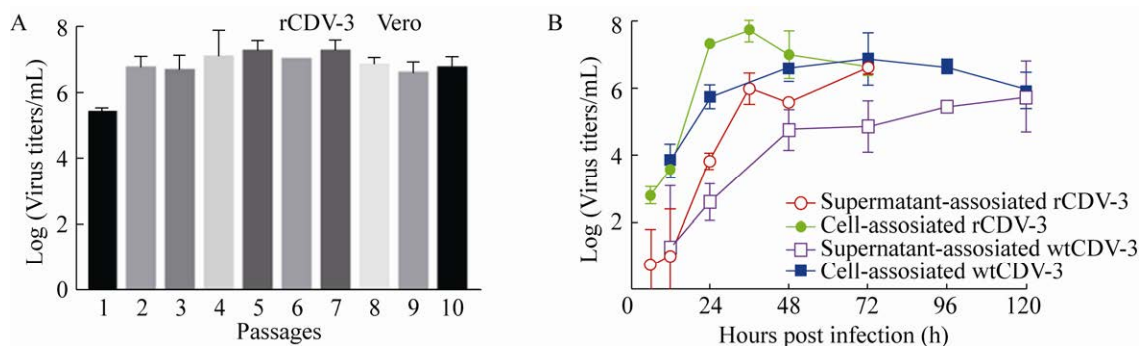


图 4 rCDV-3 的生长特性

Fig. 4 Growth characteristics of rCDV-3. (A) The passage stability of rCDV-3. (B) The growth curves of wtCDV-3 and rCDV-3.

不仅对宠物犬猫饲养、毛皮动物养殖造成了巨大经济损失,而且还严重威胁了人类公共卫生安全。因此,建立犬瘟热病毒疫苗株 CDV-3 株的反向遗传操作平台,有利于我们针对流行变异毒株,精准研发安全高效的新型疫苗,从而防控犬瘟热的流行。目前,国内外已经成功构建了多株犬麻疹病毒的反向遗传系统,包括疫苗株 Onderstepoort、CDV/R-20/8 和 CDV-L 株、强毒株 A75/17 和 5804P 等。随着生命科学的飞速发展,副粘病毒的反向遗传系统,从全长 cDNA 的克隆,构建到病毒拯救方法,都发生了许多改进。克隆策略从单一的酶切连接改进到快速高效的同源重组。病毒拯救,最初利用复制缺陷型痘病毒载体提供 T7 RNA 聚合酶,之后,建立了稳定表达 T7 RNA 聚合酶的细胞系用于提高病毒拯救效率。犬瘟热病毒虽然能广泛地感染多种动物的多种细胞,但是在体外,最适合犬瘟热病毒增殖的细胞是 Vero 细胞。由于 Vero 细胞的拯救效率较低,因此病毒拯救时,需要先利用高效表达的 293T、BHK 等细胞进行转染,然后再用 Vero 细胞进行重组病毒的增殖。这也增加了犬瘟热病毒的拯救难度。此外,学者们通过不同原理的转染试剂、优化转染试剂与质粒比例等条件来提高病毒的拯救效率。目前并没有犬瘟热病毒 CDV-3 株反向遗传系统的建立。

本研究利用酶切连接策略,以 pcDNA3.1(+)

为骨架,构建了犬瘟热病毒 CDV-3 株的全长 cDNA 重组质粒。利用脂质体转染试剂,各个质粒比例为全长 5  $\mu$ g、N 1  $\mu$ g、P 0.8  $\mu$ g 和 L 0.5  $\mu$ g,共转染 293T 细胞,转染试剂与质粒比例为 3:1,建立了犬瘟热病毒 CDV-3 株反向遗传操作平台。重组病毒 rCDV-3 按 MOI=0.1,接种单层 Vero 细胞时,生长速度显著快于 wtCDV-3 的。rCDV-3 感染细胞 3 d 内,能使 Vero 细胞病变率达到 95%,而 wtCDV-3 则需要 4-5 d 才能达到相同的病变率。此外,两种病毒的生长曲线也证明了这一点,rCDV-3 在感染后 36 h,上清和细胞相关病毒滴度均达到最高值,而 wtCDV-3 在感染后 72 h,达到峰值(图 4B),wtCDV-3 病毒增殖速度平缓。rCDV-3 连续传代时,最大病毒滴度能较为稳定地达到  $10^{7.667}$  TCID<sub>50</sub>/mL(图 4A),wtCDV-3 的病毒滴度一般稳定在  $10^{6.667}$  TCID<sub>50</sub>/mL。多次重复测定,结果证明,两种病毒的最高滴度存在显著性差异  $P<0.05$ (数据未呈现)。rCDV-3 的电镜形态呈现球形,属于犬瘟热病毒的经典形态。rCDV-3 增殖较快的分子机制尚不清楚,因此,后续我们将探索重组病毒 rCDV-3 增殖速度快、滴度高的分子机制。

## 4 结论

本研究成功通过优化病毒拯救系统,成功建立犬瘟热病毒疫苗株 CDV-3 株反向遗传平台。研



究结果表明, 通过该平台拯救获得的重组病毒 rCDV-3 具有增殖快、滴度高的特点。

## REFERENCES

- [1] Sawatsky B, Cattaneo R, Von Messling V. Canine distemper virus spread and transmission to naive ferrets: selective pressure on Signaling Lymphocyte Activation Molecule-dependent entry. *J Virol*, 2018, 92(15): e00669-18.
- [2] Maganga GD, Labouba I, Ngoubangoye B, et al. Molecular characterization of complete genome of a canine distemper virus associated with fatal infection in dogs in Gabon, Central Africa. *Virus Res*, 2018, 247: 21-25.
- [3] Duque-Valencia J, Sarute N, Olarte-Castillo XA, et al. Evolution and interspecies transmission of canine distemper virus—an outlook of the diverse evolutionary landscapes of a multi-host virus. *Viruses*, 2019, 11(7): 582-605.
- [4] Budaszewski RDF, Hudacek A, Sawatsky B, et al. Inactivated recombinant rabies viruses displaying canine distemper virus glycoproteins induce protective immunity against both pathogens. *J Virol*, 2017, 91(8): e02077-16.
- [5] Feng N, Yu YC, Wang TC, et al. Fatal canine distemper virus infection of giant pandas in China. *Sci Rep*, 2016, 6: 27518.
- [6] Zhang H, Shan F, Zhou X, et al. Outbreak and genotyping of canine distemper virus in captive Siberian tigers and red pandas. *Sci Rep*, 2017, 7: 8132.
- [7] Sun ZZ, Li AX, Ye HH, et al. Natural infection with canine distemper virus in hand-feeding Rhesus monkeys in China. *Veterin Microbiol*, 2010, 141(3/4): 374-378.
- [8] Sakai K, Nagata N, Ami Y, et al. Lethal canine distemper virus outbreak in cynomolgus monkeys in Japan in 2008. *J Virol*, 2013, 87(2): 1105-1114.
- [9] Hoyland JA, Dixon JA, Berry JL, et al. A comparison of in situ hybridisation, reverse transcriptase-polymerase chain reaction (RT-PCR) and in situ-RT-PCR for the detection of canine distemper virus RNA in Paget's disease. *J Virol Methods*, 2003, 109(2): 253-259.
- [10] Romanutti C, Calderón MG, Keller L, et al. RT-PCR and sequence analysis of the full-length fusion protein of Canine Distemper Virus from domestic dogs. *J Virol Methods*, 2016, 228: 79-83.
- [11] Budaszewski RAF, Pinto LD, Weber MN, et al. Genotyping of canine distemper virus strains circulating in Brazil from 2008 to 2012. *Virus Res*, 2014, 180: 76-83.
- [12] Martella V, Elia G, Buonavoglia C. Canine distemper virus. *Vet Clin North Am Small Anim Pract*, 2008, 38(4): 787-797.
- [13] Sawatsky B, Von Messling V. Canine distemper viruses expressing a hemagglutinin without N-glycans lose virulence but retain immunosuppression. *J Virol*, 2009, 84(6): 2753-2761.
- [14] Gassen U, Collins FM, Duprex WP, et al. Establishment of a rescue system for canine distemper virus. *J Virol*, 2000, 74(22): 10737-10744.
- [15] Parks CL, Wang HP, Kovacs GP, et al. Expression of a foreign gene by recombinant canine distemper virus recovered from cloned DNAs. *Virus Res*, 2001, 83(1/2): 131-147.
- [16] Plattet P, Zweifel C, Wiederkehr C, et al. Recovery of a persistent Canine distemper virus expressing the enhanced green fluorescent protein from cloned cDNA. *Virus Res*, 2004, 101(2): 147-153.
- [17] Fujita K, Miura R, Yoneda M, et al. Host range and receptor utilization of canine distemper virus analyzed by recombinant viruses: Involvement of heparin-like molecule in CDV infection. *Virology*, 2007, 359(2): 324-335.
- [18] Wang XJ, Feng N, Ge JY, et al. Recombinant canine distemper virus serves as bivalent live vaccine against rabies and canine distemper. *Vaccine*, 2012, 30(34): 5067-5072.
- [19] Li ZL, Wang JG, Yuan DL, et al. A recombinant canine distemper virus expressing a modified rabies virus glycoprotein induces immune responses in mice. *Virus Genes*, 2015, 50(3): 434-441.
- [20] Zhao JJ. Development of models for pathogenesis in fur bearing animals to study the mechanisms of high virulence of canine distemper virus variant strain[D]. Beijing: Chinese Academy of Agricultural Sciences, 2016.

(本文责编 郝丽芳)