

研究报告

鸡痘病毒 NX10 株 TK 基因在病毒复制中不是完全非必需的

王曼曼¹ 赵妍^{1,2*} 张雪梅¹ 刘胜旺^{1*}

(1. 中国农业科学院哈尔滨兽医研究所 兽医生物技术国家重点实验室 禽呼吸道病创新团队

黑龙江 哈尔滨 150069)

(2. 东北农业大学动物科学技术学院 黑龙江 哈尔滨 150030)

摘要:【目的】禽痘病毒(FPV)是痘病毒科禽痘病毒属的成员。FPV 因其基因组庞大,含有大量复制非必需区,目前作为活病毒载体在禽类和哺乳动物中广泛使用。重组位点的选择是禽痘病毒载体构建的先决条件,外源基因的插入不影响病毒复制是筛选插入位点的前提。因此,鉴定可供外源基因插入的复制非必需位点将为重组病毒的构建提供更多选择。本研究拟鉴定 FPV NX10 株胸苷激酶(TK)基因在病毒复制中的必要性。【方法】以 TK 基因作为靶基因,增强型绿色荧光蛋白(EGFP)为筛选标记构建转移载体,FPV NX10 株为亲本病毒,通过同源重组筛选重组病毒 rFPV-ΔTK-EGFP。通过在 CEF 细胞培养物中添加 5-溴脱氧尿苷(BUdR)验证 TK 基因在 FPV 复制中的作用。【结果】构建了转移载体 pUC19-TK AB-EGFP。在转染后重组病毒克隆纯化过程中,蚀斑克隆中绿色荧光病变所占的比例逐渐增加,但在荧光蚀斑的边缘能观察到不带荧光病变的存在。对第 9–15 轮随机选取的蚀斑克隆的 Western blot 分析表明,重组病毒中插入的 EGFP 基因均能够正确表达,但 PCR 结果显示在重组病毒中始终存在野生型病毒。在细胞培养液中添加 BUdR 后,重组病毒不能继续生长。【结论】FPV NX10 毒株 TK 基因在该病毒的复制中不是完全非必需的。

关键词: 鸡痘病毒, TK 基因, 重组病毒, 复制非必需基因

Thymidine kinase gene of Fowlpox virus NX10 strain is partly essential in viral replication

WANG Man-Man¹ ZHAO Yan^{1,2*} ZHANG Xue-Mei¹ LIU Sheng-Wang^{1*}

(1. Division of Avian Infectious Diseases, State Key Laboratory of Veterinary Biotechnology, Harbin Veterinary Research Institute, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Harbin, Heilongjiang 150069, China)

(2. College of Animal Science and Technology, Northeast Agricultural University, Harbin, Heilongjiang 150030, China)

Abstract: [Objective] Fowlpox virus (FPV) is a member of Avipoxvirus. FPV is widely used as

Foundation item: China Postdoctoral Science Foundation (No. 2014M560245); Key Technologies R&D Program of China (No. 2015BAD12B03, 2015BAD12B05-05)

*Corresponding authors: E-mail: ZHAO Yan: zhaoyan02@caas.cn; LIU Sheng-Wang: swliu@hvri.ac.cn

Received: July 07, 2017; Accepted: October 30, 2017; Published online (www.cnki.net): November 15, 2017

基金项目: 中国博士后科学基金面上项目(No. 2014M560245); 国家科技支撑计划项目(No. 2015BAD12B03, 2015BAD12B05-05)

*通讯作者: E-mail: 赵妍: zhaoyan02@caas.cn; 刘胜旺: swliu@hvri.ac.cn

收稿日期: 2017-07-07; 接受日期: 2017-10-30; 优先数字出版日期(www.cnki.net): 2017-11-15

a living virus vector in poultry and mammals because of its large genome and containing large numbers of replication non-essential regions. The selection of recombination sites is a prerequisite to construct fowlpox virus vectors. The insertion of foreign genes that do not affect viral replication is a prerequisite for selection of the insertion sites. Therefore, identification of replication non-essential regions for foreign gene insertion would provide additional options to construct recombinant viruses. This study aimed to identify the necessity of thymidine kinase (TK) gene in the replication of FPV NX10. **[Methods]** The recombinant virus rFPV- Δ TK-EGFP was acquired by homologous recombination using FPV NX10 strain as parental virus and enhanced green fluorescent protein (EGFP) as selection marker. The bromodeoxyuridine (BUdR) was added to the culture of CEF cells to identify the role of TK in FPV replication. **[Results]** The transfer vector pUC19-TK AB-EGFP was constructed. Although the green fluorescent lesions increased in the cloning and purification of recombinant virus, non-fluorescent lesions can still be observed at the edge of the fluorescent plaque. Western blot analysis of the randomly selected plaque clones after 9 to 15 rounds showed that the EGFP gene inserted in the recombinant virus could be expressed correctly, but PCR results showed that the wild-type viruses accompanied with the recombinant virus. After adding BUdR to the cell culture medium, the recombinant virus could not continue to replicate. **[Conclusion]** The TK gene of FPV NX10 strain is partly essential for replication.

Keywords: Fowlpox virus, TK gene, Recombinant virus, Replication non-essential gene

禽痘病毒(FPV)是痘病毒科(Poxviridae family)痘病毒脊索亚科(Chordopoxvirinae subfamily)禽痘病毒属(Avipoxviruses)的代表成员^[1]。FPV 基因组由大约 260–309 kb 的双链 DNA 组成,比其他已报道的脊椎动物痘病毒(Chordopoxvirus, ChPV)基因组都大^[2]。FPV 有 260 个基因,分别编码转录、翻译、核苷酸代谢、DNA 复制与修复、蛋白质加工以及病毒粒子结构等有关的蛋白^[3]。与其他 DNA 病毒不同的是,FPV 是严格的胞浆内复制,其 DNA 不具有感染性。

胸苷激酶(TK)可根据其大小、四级结构、底物特异性以及反馈抑制敏感性的不同分为两类^[4]。痘病毒家族成员编码的 TK 属于 II 类^[5]。在痘病毒复制周期中,TK 基因表达产物对于 DNA 复制之前的 DNA 前体的生物合成是必需的^[6],在 DNA 合成的起始发挥酶促活性。TK 是核酸代谢补救途径的关键酶,能催化胸腺嘧啶和 ATP 生成 dTMP。通常 dTMP 也可以通过胸苷酸合成酶的从头合成途径合成,但是痘病毒不编码胸苷酸合成酶,所以无法通过从头途径生成 dTMP。痘病毒 DNA 复制过程中所需的 dTMP 只能通过核酸代谢的补救途径生成,

因此 TK 在痘病毒核酸代谢中发挥重要作用。此外,痘苗病毒的 TK 基因是正痘病毒属中研究最为广泛的基因,痘苗病毒的 TK 基因是该病毒复制非必需基因,作为外源基因的插入位点用于筛选重组病毒已获得广泛的应用^[7]。

鸡痘病毒以其基因组庞大、含有大量复制非必需区、具有两种递呈抗原的分子、宿主范围窄、复制过程严格、易于制备等诸多优势,目前已作为活病毒载体用于多种病原保护性抗原基因的表达^[8-12]。由于 FPV 复制仅限于禽类,因此它也被用于作为安全的非复制型载体疫苗接种哺乳动物^[13-15]。未来的疫苗策略可能需要同时表达不同的抗原或免疫共刺激分子^[16-18]。不同的外源基因可以插入到病毒基因组的同一位点,或分别插入到不同位点。外源基因的插入不影响病毒复制是筛选外源基因插入位点的前提。目前已鉴定出多个可供外源基因插入的复制非必需基因^[19-21]、末端反向重复区^[20]以及基因间隔区^[22]。因此,鉴定可供外源基因插入的复制非必需位点将为重组病毒的构建提供更多选择。

本研究以 TK 基因作为靶基因,将含有痘病毒早晚期启动子 LP2EP2 控制下的增强型绿色荧光蛋

白(EGFP)插入到 FPV NX10 株 TK 基因左右同源臂序列之间构建转移载体,以 FPV NX10 株为亲本病毒,通过在鸡胚成纤维细胞(CEF)中同源重组、蚀斑纯化,筛选重组病毒 rFPV- Δ TK-EGFP,并进一步通过在 CEF 细胞培养物中添加 5-Bromo-2'-deoxyuridine (BUdR)分析 TK 基因在 FPV 复制中的作用。

1 材料与方法

1.1 材料、试剂和仪器

1.1.1 病毒株、载体和细胞: FPV NX10 毒株于 2010 年分离自某养殖场 158 日龄蛋鸡,由中国农业科学院哈尔滨兽医研究所禽呼吸道病团队鉴定并保存; pUC19、pSY538 载体为本实验室保存;制备鸡胚成纤维细胞(CEF)的 9 日龄 SPF 鸡胚购自中国农业科学院哈尔滨兽医研究所实验动物中心。

1.1.2 酶与主要试剂: AxyPrep 体液病毒 DNA/RNA 小量试剂盒购自 Axygen 公司; ExTaq 预混液和 pMD18-T 载体购自 TaKaRa 公司;限制性内切酶和 T4 DNA Ligase 购自 NEB 公司; E.Z.N.A.[®] Gel Extraction Kit、E.Z.N.A.[®] Endo-Free Plasmid Mini Kit I 和 E.Z.N.A.[®] Endo-Free Plasmid Midi Kit 购自 Omega 公司;低熔点琼脂购自美国 Lonza 公司; DMEM 粉末、胎牛血清(FBS)、各种抗体均购自 Sigma 公司; TurboFect Transfection Reagen、Pierce[™] ECL Western Blotting Substrate 购自 Thermo

Scientific 公司; NC 膜购自 Millipore 公司; RIPA 裂解液(强)购自碧云天公司; 胶片购自 Biosharp 公司; 其他均为常用国产分析纯试剂。

1.1.3 仪器: PCR 仪购自 TaKaRa 公司; 紫外凝胶成像仪购自 Wealtec 公司; 生物安全柜、CO₂ 细胞培养箱购自 Thermo Scientific 公司; 倒置荧光显微镜购自 AMG 公司; 垂直电泳槽、半干转膜仪购自 Bio-Rad 公司。

1.2 方法

1.2.1 引物的设计: 根据 NCBI 上公布的鸡痘病毒 FPV US 株的基因组序列(GenBank 登录号: AF198100)设计 FPV TK 基因左、右同源臂扩增引物 TK-A F/R、TK-B F/R, 根据 EGFP ORF 序列设计扩增引物 EGFP F/R, 以及重组病毒的鉴定引物 TK-JD F/R (表 1)。在左、右同源臂引物 TK-A F/R、TK-B F/R 的 5'端分别引入限制性内切酶位点 *Sph* I /*Sal* I 和 *Kpn* I、*Not* I /*Sac* I, 在扩增引物 EGFP F/R 5'端引入 *Eco*R I /*Bam*H I, 均以下划线表示。引物 TK-JD F/R 能同时检测野生型病毒和重组病毒。上述引物均由哈尔滨博仕生物技术有限公司合成。

1.2.2 pSY538-EGFP 质粒的构建: 以 pEGFP-N1 为模板, 利用 EGFP F/R 引物扩增 EGFP 基因的 ORF, 经 *Eco*R I /*Bam*H I 酶切, 连接到以相同酶切处理的 pSY538 载体的痘病毒早晚期启动子 LP2EP2 的下游, 重组质粒命名为 pSY538-EGFP (图 1)。

表 1 本实验所有引物

Table 1 Primers used in this study

引物名称 Primer name	引物序列 Primer sequence (5'→3')	扩增长度 Length (bp)
TK-A F	<u>GCATGCTGTGGAATTT</u> CCTACGTAGCTGATAGAG	1 054
TK-A R	<u>GTCGACCCGTAGCCTCC</u> ATAACAATAGATCATG	
TK-B F	<u>GGTACCGCGGCCGCT</u> ATTAAATGATGGAGTTCAGG	1 313
TK-B R	<u>GAGCTCCA</u> ACTAGTACAGCTTTAACCATCTGAGG	
EGFP F	<u>GAATTC</u> CACCATGGTGAGCAAGGGCGAGGAGCT	736
EGFP R	<u>GGATCCTT</u> ACTTGTACAGCTCGTCCATGCCGAG	
TK-JD F	CGGTAAAACATCGGAGCTAGTAAG	1 530 (rFPV)/610 (wt)
TK-JD R	CTGCAAGAACTAATATCGAACTCC	

1.2.3 pUC19-TK AB 质粒的构建: 常规方法制备鸡胚成纤维细胞 (Chicken embryo fibroblast, CEF)^[23], 将 FPV NX10 以 0.01 MOI 接种铺满单层的 CEF 细胞, 细胞维持液为含 2% FBS 的 DMEM。接毒 72 h 收获培养细胞及上清, 反复冻融 3 次, 取 200 μL 病毒液按照 AxyPrep 体液病毒 DNA/RNA 小量试剂盒说明书提取 FPV 基因组 DNA 作为模板, 分别以左、右同源臂的引物 TK-A F/R 和 TK-B F/R 进行 PCR 扩增。50 μL PCR 反应体系: $2\times\text{ExTaq}$ (ExTaq 酶 1.25 U/25 μL , dNTP mixture 各 4 mmol/L, Mg^{2+} 4 mmol/L) 25.0 μL , 上下游引物 (10 $\mu\text{mol/L}$) 各 1.0 μL , FPV DNA (200 ng/ μL) 2 μL ,

灭菌超纯水补至 50 μL 。PCR 反应条件: 95 $^{\circ}\text{C}$ 5 min; 94 $^{\circ}\text{C}$ 30 s, 49–60 $^{\circ}\text{C}$ 30 s, 72 $^{\circ}\text{C}$ 1 min, 30 个循环; 72 $^{\circ}\text{C}$ 10 min, 4 $^{\circ}\text{C}$ 10 min。将 PCR 扩增获得的 TK-A 和 TK-B 片段用 1% 琼脂糖凝胶切胶回收后, 依次连接到 pUC19 载体中, 重组质粒命名为 pUC19-TK AB (图 1)。

1.2.4 转移载体 pUC19-TK AB-EGFP 的构建: 将构建的质粒 pSY538-EGFP 以 *Not* I 酶切后连接到 pUC19-TK AB 中, 获得的转移载体质粒命名为 pUC19-TK AB-EGFP (pTK-EGFP) (图 1)。按照 E.Z.N.A.[®] Endo-Free Plasmid Midi Kit 说明书对转移载体进行中量提取。

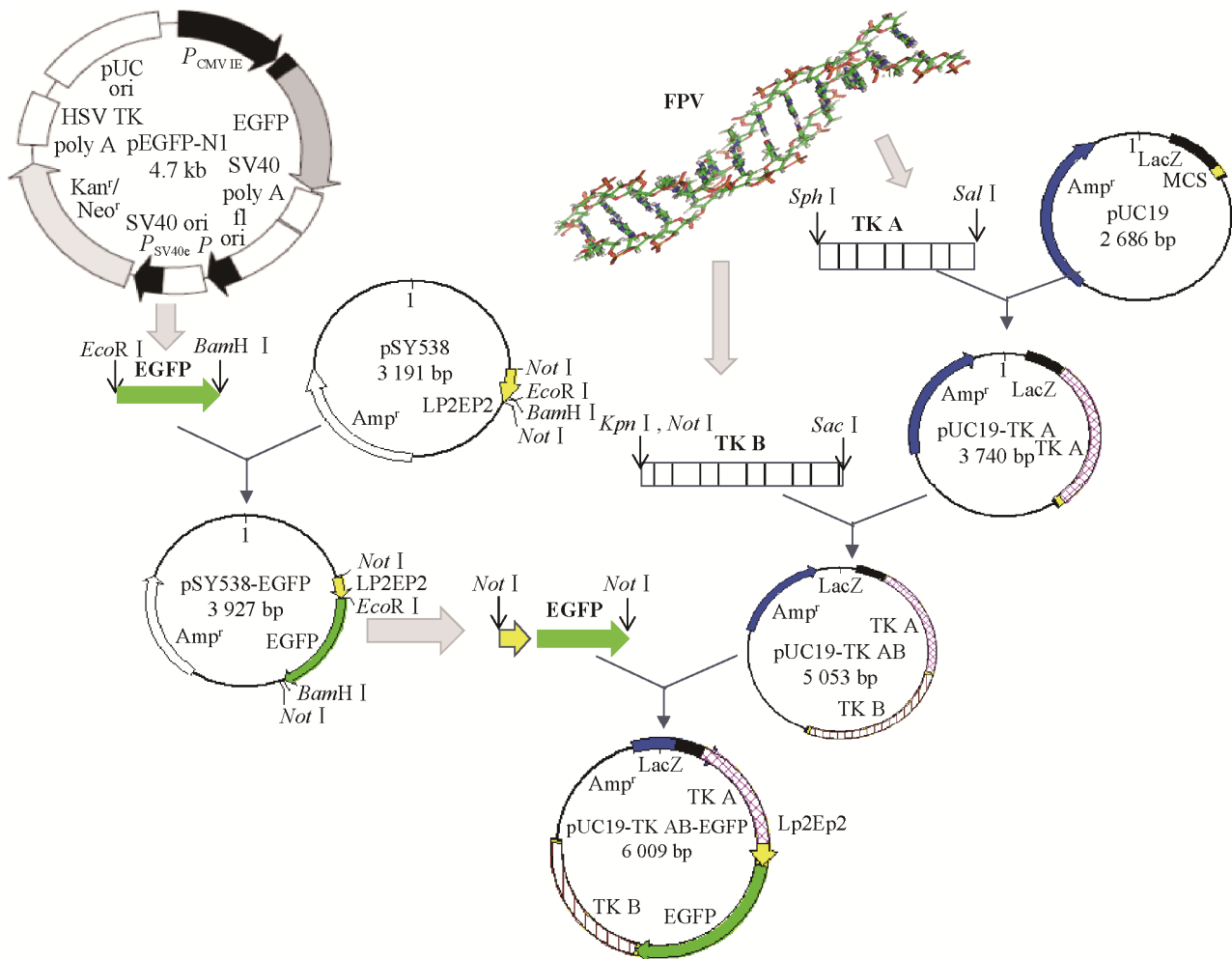


图 1 转移载体 pUC19-TK AB-EGFP 构建示意图

Figure 1 Construction map of transfer vector pUC19-TK AB-EGFP

1.2.5 重组病毒 rFPV- Δ TK-EGFP 的筛选、纯化及鉴定: 转染及重组病毒的克隆参照文献[24]进行。简述如下: 将 FPV NX10 株以 0.01 MOI 接种到密度为 80%–90% 的传代 CEF 细胞, 于 37 °C、5% CO₂ 细胞培养箱中培养 24 h 后, 将 *Sac* I 线性化的转移载体与 TurboFect Transfection Reagen 转染试剂按照 1:2 的比例混匀后进行转染(设立不接毒、只转染的细胞作为对照), 于转染后 48 h 收获细胞及培养液, 反复冻融 3 次, 6 000 r/min 离心 1 min, 上清液即为转染液。将转染液按 10⁻²、10⁻³、10⁻⁴ 稀释度接种铺满单层的传代 CEF 细胞, 铺胶后在细胞培养箱中倒置培养 72–96 h, 使用倒置荧光显微镜观察并挑取最高稀释度的孔中带有绿色荧光的蚀斑, 按照上述方法冻融、离心, 取上清液利用有限稀释法进行克隆纯化。随机选取第 9–15 代的蚀斑克隆进行 PCR 和 Western blot 鉴定。按照 1.2.3 中的方法提取病毒基因组, 以 TK-JD F/R 引物进行 PCR 扩增, 用 1% 琼脂糖凝胶检测 PCR 结果。随机选取第 9–15 代的蚀斑克隆接种 CEF 细胞 72 h 后, 以 RIPA 裂解液裂解细胞, 经 12% 蛋白胶进行 SDS-PAGE 电泳后转印 NC 膜, 以含 5% 脱脂乳的 TBS-T 37 °C 封闭 2 h。以 1:3 000 稀释的兔抗 GFP IgG 为一抗, 用 1:10 000 稀释的 HRP 标记的抗兔抗体为二抗, 分别在 37 °C 作用 1 h, 蛋白条带以增强型的化学发光试剂显色, 设置野生型病毒 NX10 作为对照。

1.2.6 BUdR 抑制 TK 基因的研究: 传代 CEF 细胞在接毒之前 24 h 以含有 40 μ g/mL BUdR 的培养液进行孵育, 同时设置不含有 BUdR 的培养液作为对照, 每个试验设置 3 个复孔。24 h 后, 向不同处理方式的 CEF 细胞中接种 P15 代的蚀斑克隆 20 μ L/孔, 使用接毒前各自的培养液继续培养 96 h, 用倒置荧光显微镜观察并记录结果。

2 结果与分析

2.1 同源臂及 EGFP 基因的 PCR 扩增

以 pEGFP-N1 为模板, 利用 EGFP F/R 引物

扩增 EGFP 基因; 以提取的 FPV 基因组 DNA 为模板, 分别用左、右同源臂的引物 TK-A F/R 和 TK-B F/R 进行 PCR 扩增; 扩增获得的片段经 1% 琼脂糖凝胶电泳分析, 可见 TK-A 1 000 bp 左右、TK-B 1 300 bp 左右、EGFP 700 bp 左右(图 2), 均与预期大小相符。

2.2 转移载体 pUC19-TK AB-EGFP 的构建与鉴定

将质粒 pSY538-EGFP 以 *Eco*R I、*Eco*R I/*Bam*H I 进行单、双酶切鉴定, 单酶切在 4 000 bp 左右有一条带, 双酶切在大约 3 200 bp 和 800 bp 各有一条带; 质粒 pUC19-TK A 以 *Sal* I、*Sph* I/*Sal* I 进行单、双酶切鉴定, 单酶切在 3 700 bp 左右有一条带, 双酶切在 2 700 bp 和 1 000 bp 左右各有一条带; 质粒 pUC19-TK AB 以 *Kpn* I、*Kpn* I/*Sac* I 进行单双酶切鉴定, 单酶切在 5 100 bp 左右有一条带, 双酶切在大约 3 750 bp 和 1 350 bp 各有一条带; 质粒 pUC19-TK AB-EGFP 以 *Not* I 进行单酶双切鉴定, 结果显示: 在 5 100 bp 和 800 bp 左右各有一条带(图 3)。经 1% 琼脂糖凝胶电泳分析, 酶切的片段大小均与预期相符。

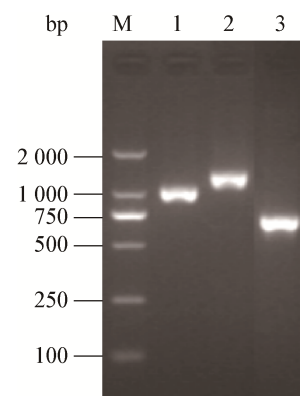


图 2 同源臂及 EGFP 基因的 PCR 扩增

Figure 2 Amplification of homologous arms and EGFP gene by PCR

注: M: DL2000 DNA 分子量标准; 1: TK-A PCR 扩增; 2: TK-B PCR 扩增; 3: EGFP 基因 PCR 扩增。

Note: M: DL2000 DNA marker; 1: Amplicon of TK-A; 2: Amplicon of TK-B; 3: Amplicon of EGFP gene.

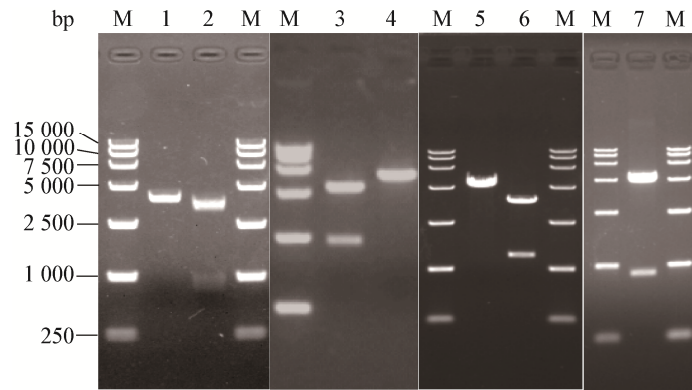


图 3 转移载体 pUC19-TK AB-EGFP 构建过程酶切鉴定图

Figure 3 Enzyme digestion map for the construction of transfer vector pUC19-TK AB-EGFP

注: M: DL15000 DNA 分子量标准; 1: pSY538-EGFP *EcoR* I 单酶切鉴定; 2: pSY538-EGFP *EcoR* I/*BamH* I 双酶切鉴定; 3: pUC19-TK A *Sph* I/*Sal* I 双酶切鉴定; 4: pUC19-TK A *Sal* I 单酶切鉴定; 5: pUC19-TK AB *Kpn* I 单酶切鉴定; 6: pUC19-TK AB *Kpn* I/*Sac* I 双酶切鉴定; 7: pUC19-TK AB-EGFP *Not* I 单酶切鉴定。

Note: M: DL15000 DNA marker; 1: Products from the pSY538-EGFP digested with *EcoR* I; 2: Products from the pSY538-EGFP digested with *EcoR* I and *BamH* I; 3: Products from the pUC19-TK A digested with *Sph* I and *Sal* I; 4: Products from the pUC19-TK A digested with *Sal* I; 5: Products from the pUC19-TK AB digested with *Kpn* I; 6: Products from the pUC19-TK AB digested with *Kpn* I and *Sac* I; 7: Products from the pUC19-TK AB-EGFP digested with *Not* I.

2.3 重组病毒 rFPV-ΔTK-EGFP 的蚀斑筛选

转染后 48 h, 在倒置荧光显微镜下观察可见, 接毒后转染的细胞孔中存在带有绿色荧光的细胞, 而不接毒、只转染的细胞中未见绿色荧光(图 4)。在蚀斑克隆的过程中, 每一轮均从最高稀释度的孔中挑取带有绿色荧光的蚀斑进行克隆纯化, 随着克隆代次的增加, 在倒置荧光显微镜下观察到蚀斑的绿色荧光呈逐渐增大的趋势, 在明场条件下可观察到蚀斑所形成的病变要多于发出绿色荧光的病变, 说明重组病毒的周围伴随有野生型病毒的存在(图 4)。

2.4 重组病毒 rFPV-ΔTK-EGFP 的鉴定

随机选取第 9-15 轮的 3-5 个蚀斑, 利用 TK-JD F/R 引物进行重组病毒的鉴定。PCR 结果显示, 各个代次重组病毒均能扩增出 1 500 bp 左右的代表重组病毒大小的 PCR 产物, 但其中仍然存在 600 bp 左右的代表野生型病毒的 PCR 产物(图 5A); 直至第 15 轮, 重组病毒中始终伴随有野生型病毒的存在。从第 9、11、13 和 15 轮的蚀斑中各选择 1 个克隆进行 Western blot 分析, 结果表明这几个重组病毒克隆中所插入的 EGFP 基因均能够正确表达(图 5B)。

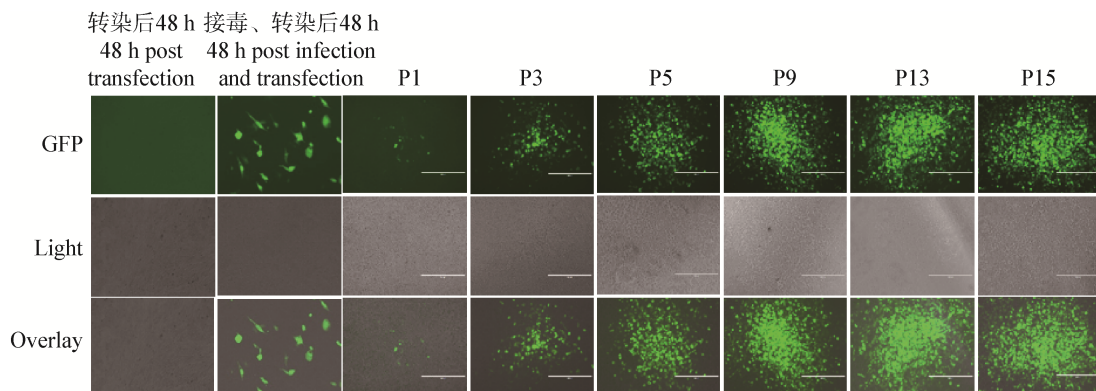


图 4 重组病毒 rFPV-ΔTK-EGFP 各代次蚀斑观察

Figure 4 Observation of plaques in each generation of rFPV-ΔTK-EGFP

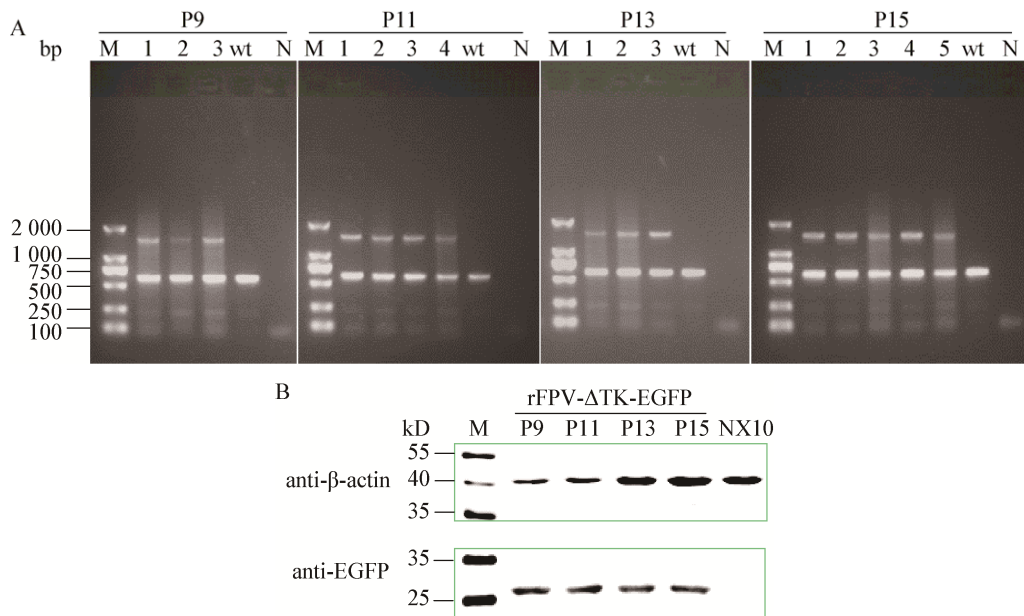


图5 重组病毒 rFPV-ΔTK-EGFP 的鉴定
Figure 5 Identification of rFPV-ΔTK-EGFP

注: A: 重组病毒 PCR 鉴定图; B: 重组病毒 rFPV-ΔTK-EGFP P9、P11、P13、P15 的 Western blot 分析, NX10 为野生型病毒对照。
Note: A: Identification of rFPV-ΔTK-EGFP by PCR; B: Identification of rFPV-ΔTK-EGFP P9, P11, P13, P15 by western blot, NX10 as a WT control.

2.5 BUdR 对重组病毒 rFPV-ΔTK-EGFP 生长的影响

重组病毒 rFPV-ΔTK-EGFP 在 BUdR⁻和 BUdR⁺培养液中培养 96 h, 在倒置荧光显微镜下观察可见: rFPV-ΔTK-EGFP 在 BUdR⁻的培养液能够正常生长, 视野中布满了绿色荧光; 而在 BUdR⁺的培养液未见有绿色荧光的出现, 并且未观察到细胞病变(图 6)。以野生型病毒作为阳性对照, 可见在 BUdR⁻的培养液能够正常生长, 而在 BUdR⁺的培养液中未观察到细胞病变, 说明 BUdR 能够抑制野生型病毒的生长(图 6)。未感染病毒组的细胞在 BUdR⁻和 BUdR⁺的

培养液中生长状态良好, 说明 BUdR 的添加对细胞没有影响(图 6)。

3 讨论

以禽痘病毒作为活病毒载体构建的基因工程疫苗在其天然的禽类宿主和哺乳动物宿主中广泛使用^[8-15]。其中, 重组位点的选择是禽痘病毒载体构建的先决条件, 它可能直接影响到重组病毒的复制能力以及外源基因的表达效率等。到目前为止, 很多研究者在禽痘病毒基因组中对外源基因可插入的位点进行了鉴定, 其中包括禽痘病毒复制非必需

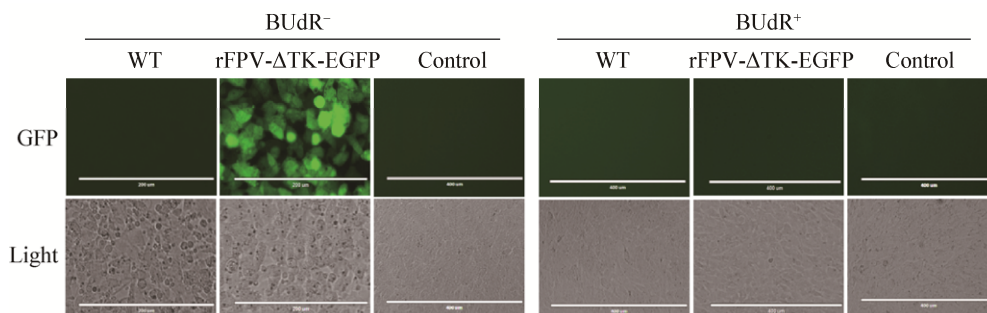


图6 BUdR 对 rFPV-ΔTK-EGFP 复制的影响
Figure 6 Effect of BUdR on the replication of rFPV-ΔTK-EGFP

区、末端重复序列和基因组间的非必需区^[19-22]。

本研究以 TK 基因作为靶基因, 构建并筛选重组病毒 rFPV- Δ TK-EGFP。一般来讲, 重组病毒在克隆 3-5 轮的情况下就可以获得纯化, 而本实验的研究结果表明: 重组病毒 rFPV- Δ TK-EGFP 在 CEF 细胞上克隆到第 5 代时, 虽然单个蚀斑所形成的细胞病变很致密, 但观察到的绿色荧光的病变很松散, 中间夹杂着不带荧光的细胞病变, 即野生型病毒。随着重组病毒克隆纯化代次的增加, 在第 9 轮之后, 利用有限稀释法进行蚀斑纯化与观察, 发现在最高稀释度的孔中所有的蚀斑均带有绿色荧光, 但在荧光蚀斑的边缘始终伴随有不带荧光的细胞病变, 即野生型病毒(图 4)。随机从第 9-15 轮的克隆中每隔一代选取 3-5 个克隆进行 PCR 鉴定, 并各选取 1 个代表性的蚀斑克隆进行 EGFP 基因表达的 Western blot 鉴定。结果表明: 从选取的这些重组病毒的蚀斑克隆中能够扩增获得大小约为 1 500 bp 的重组病毒片段, 并且插入的 EGFP 基因也能够正常表达, 直至第 15 轮克隆时, PCR 产物中仍存在亲本野生型病毒特有的 600 bp 左右的条带(图 5A)。在重组病毒纯化过程中, 随着克隆代次的增加, 蚀斑形成是逐渐增大的, 单个蚀斑提取的基因组中模板含量是逐渐增加的, 根据 PCR 过程中长片段扩增的效果往往受到短片段优先扩增的影响, 模板中野生型病毒在 PCR 扩增的过程中始终占有优势, 因此, 未能观察到重组病毒 PCR 条带明显增多的现象。假设 FPV NX10 株的 TK 基因在复制过程中是完全必需的, 那么在重组病毒的克隆过程中将不会观察到带有绿色荧光的重组病毒, 倘若 FPV NX10 株的 TK 基因是复制非必需的, 那么重组病毒将在 3-5 轮克隆中获得纯化。从本研究的实验结果分析, 在 TK 基因缺失重组病毒的克隆纯化过程中, 能够观察到带有绿色荧光的重组病毒但又始终伴随野生型病毒的存在, 说明 TK 基因对于 FPV NX10 株来说不是完全非必需的。因此, 重组病毒 rFPV- Δ TK-EGFP 无法获得完全纯化。

Nazerian 等研究表明, 在筛选鸡痘病毒 TK 基因缺失重组病毒时, 向 CEF 细胞培养物中添加

BUdR 后, 含有多拷贝 TK 基因的中间重组体和含有 TK 基因的亲本野生型病毒是不能够复制的, 只有 TK 基因缺失的重组病毒能够稳定存在, 在添加 BUdR 的培养液中连续传代 3 代后, TK 基因缺失的重组病毒获得完全的纯化, 并且纯化后的 TK 基因缺失重组病毒在没有 BUdR 的培养液中也能继续稳定存在^[25]。本研究在 TK 基因缺失的重组病毒多轮克隆且未获得纯化的情况下, 向培养液中添加了 BUdR。发现在接种重组病毒 rFPV- Δ TK-EGFP 后, 未见有绿色荧光病变的出现(图 6), 而重组病毒在不添加 BUdR 的培养液中能够正常生长。分析这一现象产生的原因, 由于 BUdR 能够抑制野生型鸡痘病毒中 TK 基因的活性, 因此, 在 BUdR⁺的培养液中野生型病毒的生长受到抑制。然而重组病毒 rFPV- Δ TK-EGFP 由于 TK 基因的缺失, 理论上是不应该受培养液中添加 BUdR 的影响, 但研究结果显示 rFPV- Δ TK-EGFP 在 BUdR⁺培养液中的生长受到了完全的抑制。分析其原因可能是 rFPV- Δ TK-EGFP 的有效复制依赖于细胞培养物中存在的野生型病毒 TK 基因提供的酶活性, 一旦野生型病毒受到 BUdR 的抑制, 将不再向缺失了 TK 基因的重组病毒提供外源 TK 的补给, 使得重组病毒 rFPV- Δ TK-EGFP 在 CEF 细胞中的复制受到了影响。Scheiflinger 等研究表明, 一些 FPV 毒株的 TK 基因是 FPV 高效复制所必需的^[26], 而且 TK 基因的缺失会导致 FPV 毒力和复制能力的降低, 若以完整的痘苗病毒 TK 基因取代 FPV TK 基因, 则能够获得纯化的 FPV 重组病毒, 并且其滴度与野生型 FPV 滴度相当^[26]。也就是说, 某些 FPV 毒株的 TK 基因缺失重组病毒需要外源 TK 的补给才能够稳定存在。而本研究中, 向重组病毒 rFPV- Δ TK-EGFP 提供 TK 活性补给的正是亲本鸡痘病毒。这也就解释了为什么 rFPV- Δ TK-EGFP 中始终伴随有野生型病毒的存在而未能获得纯化, 并进一步证明了 TK 基因在 FPV NX10 的复制过程中并非像疱疹病毒以及其他痘病毒属成员的 TK 基因那样是复制非必需的^[7,27-29]。

参 考 文 献

- [1] Adams MJ, Lefkowitz EJ, King AMQ, et al. Ratification vote on taxonomic proposals to the International Committee on Taxonomy of Viruses (2014)[J]. Archives of Virology, 2014, 159(10): 2831-2841
- [2] Mockett B, Binns MM, Bournsnel MEG, et al. Comparison of the locations of homologous fowlpox and vaccinia virus genes reveals major genome reorganization[J]. Journal of General Virology, 1992, 73(10): 2661-2668
- [3] Afonso CL, Tulman ER, Lu Z, et al. The genome of fowlpox virus[J]. Journal of Virology, 2000, 74(8): 3815-3831
- [4] Kit S, Jorgensen GN, Liav A, et al. Purification of vaccinia virus-induced thymidine kinase activity from [³⁵S]methionine-labeled cells[J]. Virology, 1977, 77(2): 661-676
- [5] Black ME, Hruby DE. Quaternary structure of vaccinia virus thymidine kinase[J]. Biochemical and Biophysical Research Communications, 1990, 169(3): 1080-1086
- [6] McAuslan BR. The induction and repression of thymidine kinase in the poxvirus-infected HeLa cell[J]. Virology, 1963, 21(3): 383-389
- [7] Mackett M, Smith GL, Moss B. Vaccinia virus: a selectable eukaryotic cloning and expression vector[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 1982, 79(23): 7415-7419
- [8] Ma MX, Jin NY, Wang ZG, et al. Construction and immunogenicity of recombinant fowlpox vaccines coexpressing HA of AIV H5N1 and chicken IL18[J]. Vaccine, 2006, 24(20): 4304-4311
- [9] Qiao CL, Tian GB, Jiang YP, et al. Vaccines developed for H5 highly pathogenic avian influenza in China[J]. Annals of the New York Academy of Sciences, 2006, 1081: 182-192
- [10] Wang YF, Sun YK, Tian ZC, et al. Protection of chickens against infectious bronchitis by a recombinant fowlpox virus co-expressing IBV-S1 and chicken IFN γ [J]. Vaccine, 2009, 27(50): 7046-7052
- [11] Swayne DE, Garcia M, Beck JR, et al. Protection against diverse highly pathogenic H5 avian influenza viruses in chickens immunized with a recombinant fowlpox vaccine containing an H5 avian influenza hemagglutinin gene insert[J]. Vaccine, 2000, 18(11/12): 1088-1095
- [12] Tong GZ, Zhang SJ, Meng SS, et al. Protection of chickens from infectious laryngotracheitis with a recombinant fowlpox virus expressing glycoprotein B of infectious laryngotracheitis virus[J]. Avian Pathology, 2001, 30(2): 143-148
- [13] Bissa M, Illiano E, Pacchioni S, et al. A prime/boost strategy using DNA/fowlpox recombinants expressing the genetically attenuated E6 protein as a putative vaccine against HPV-16-associated cancers[J]. Journal of Translational Medicine, 2015, 13: 80
- [14] Bissa M, Zanotto C, Pacchioni S, et al. The L1 protein of human papilloma virus 16 expressed by a fowlpox virus recombinant can assemble into virus-like particles in mammalian cell lines but elicits a non-neutralising humoral response[J]. Antiviral Research, 2015, 116: 67-75
- [15] Li JP, Yang T, Xu QY, et al. DNA vaccine prime and recombinant FPV vaccine boost: an important candidate immunization strategy to control bluetongue virus type 1[J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2015, 99(20): 8643-8652
- [16] Bissa M, Pacchioni SM, Zanotto C, et al. GFP co-expression reduces the A33R gene expression driven by a fowlpox vector in replication permissive and non-permissive cell lines[J]. Journal of Virological Methods, 2013, 187(1): 172-176
- [17] Emery S, Kelleher AD, Workman C, et al. Influence of IFN γ co-expression on the safety and antiviral efficacy of recombinant fowlpox virus HIV therapeutic vaccines following interruption of antiretroviral therapy[J]. Human Vaccines, 2007, 3(6): 260-267
- [18] García-Arriaza J, Esteban M. Enhancing poxvirus vectors vaccine immunogenicity[J]. Human Vaccines & Immunotherapeutics, 2014, 10(8): 2235-2244
- [19] Boulanger D, Baier R, Erfle V, et al. Generation of recombinant fowlpox virus using the non-essential F11L orthologue as insertion site and a rapid transient selection strategy[J]. Journal of Virological Methods, 2002, 106(1): 141-151
- [20] Bournsnel MEG, Green PF, Campbell JIA, et al. Insertion of the fusion gene from Newcastle disease virus into a non-essential region in the terminal repeats of fowlpox virus and demonstration of protective immunity induced by the recombinant[J]. Journal of General Virology, 1990, 71(3): 621-628
- [21] Du SW, Liu CX, Zhu YL, et al. Construction and characterization of novel fowlpox virus shuttle vectors[J]. Virus Research, 2015, 197: 59-66
- [22] Spohner D, Drillien R, Lecocq JP. Construction of fowlpox virus vectors with intergenic insertions: expression of the beta-galactosidase gene and the measles virus fusion gene[J]. Journal of Virology, 1990, 64(2): 527-533
- [23] Shahsavandi S, Ebrahimi MM, Mohammadi A, et al. Impact of chicken-origin cells on adaptation of a low pathogenic influenza virus[J]. Cytotechnology, 2013, 65(3): 419-424
- [24] Du SW, Li C, Wang YH, et al. Construction and evaluation of a new triple-gene expression cassette vaccinia virus shuttle vector[J]. Journal of Virological Methods, 2012, 185(2): 175-183
- [25] Nazerian K, Dhawale S. Structural analysis of unstable intermediate and stable forms of recombinant fowlpox virus[J]. Journal of General Virology, 1991, 72(Pt11): 2791-2795
- [26] Scheifflinger F, Falkner FG, Dorner F. Role of the fowlpox virus thymidine kinase gene for the growth of FPV recombinants in cell culture[J]. Archives of Virology, 1997, 142(12): 2421-2431
- [27] Buller RML, Smith GL, Cremer K, et al. Decreased virulence of recombinant vaccinia virus expression vectors is associated with a thymidine kinase-negative phenotype[J]. Nature, 1985, 317(6040): 813-815
- [28] Child SJ, Palumbo GJ, Mark R, et al. Insertional inactivation of the large subunit of ribonucleotide reductase encoded by vaccinia virus is associated with reduced virulence *in vivo*[J]. Virology, 1990, 174(2): 625-629
- [29] Mocarski ES, Post LE, Roizman B. Molecular engineering of the herpes simplex virus genome: insertion of a second L-S junction into the genome causes additional genome inversions[J]. Cell, 1980, 22(1): 243-255