

doi:10.11751/ISSN.1002-1280.2021.10.02

表达红色荧光蛋白的重组 鸭肠炎病毒的构建及鉴定

苗清新, 宋亚芬, 王静文, 张兵, 张敏, 杨承槐*

(中国兽医药品监察所, 北京 100081)

[收稿日期] 2021-06-11 [文献标识码] A [文章编号] 1002-1280 (2021) 10-0007-07 [中图分类号] S859.65

[摘要] 前期研究发现,随着病毒的不断传代,插入到鸭肠炎病毒(DEV)UL2 基因中的报告基因绿色荧光蛋白(GFP)会发生点突变或缺失,严重影响了重组 DEV 的反向筛选。为筛选更加稳定的报告基因,通过酶切连接的方法以表达红色荧光蛋白(RFP)的表达盒取代重组质粒 pT-UL2-GFP-gpt 中的 GFP-gpt 表达盒,构建表达 RFP 的 UL2 基因缺失转移载体 pT-UL2-RFP。该转移载体与 DEV 共转染鸡胚成纤维细胞(CEF)后,经克隆纯化获得表达 RFP 的重组 DEV。通过测定重组病毒及其亲本毒的一步生长曲线及用 PCR 测定不同代次重组病毒的 RFP 序列发现,重组病毒在细胞和上清中的病毒含量分别在 48 h 和 84 h 达到峰值 $10^{6.4}$ TCID₅₀/0.1 mL 和 $10^{6.83}$ TCID₅₀/0.1 mL,与亲本毒无明显差异($P>0.05$);RFP 表达盒在重组 DEV 连续传 12 代后仍可稳定表达,表明在 DEV UL2 区域插入 RFP 表达盒不影响病毒的繁殖,且 RFP 表达盒比 GFP 表达盒更适合作为报告基因。该研究结果对重组 DEV 的构建、筛选具有重要意义。

[关键词] 鸭肠炎病毒;红色荧光蛋白;重组病毒

Construction and Identification of Recombinant Duck Enteritis Virus Expressing Red Fluorescent Protein

MIAO Qing-xin, SONG Ya-fen, WANG Jing-wen, ZHANG Bing, ZHANG Min, YANG Cheng-huai*

(China Institute of Veterinary Drug Control, Beijing 100081, China)

Corresponding author: YANG Cheng-huai, E-mail: ychenghuai@163.com

Abstract: Previous studies have found that the consecutive passage of the Duck enteritis virus (DEV) might lead to mutations or deletions of the reporter gene green fluorescent protein (GFP) inserted into the UL2 gene of DEV. The

基金项目: 中国兽医药品监察所“兽药行业公益性重点专项”-重组动物疱疹病毒研究平台的建立(GY202017);国家重点研发计划“水禽重要疫病免疫防控新技术研究”(2017YFD0500800)

作者简介: 苗清新,硕士研究生,从事微生物与免疫学研究。

通讯作者: 杨承槐。E-mail: ychenghuai@163.com

mutations or deletions will seriously affect the screening of recombinant DEV. In order to screen for a more stable reporter gene, the GFP - gpt gene cassette in the recombinant plasmid pT - UL2 - GFP - gpt was replaced with a gene cassette expressing red fluorescent protein (RFP) by restriction enzyme digestion and ligation method, construction of the UL2 gene deletion transfer vector pT - UL2 - RFP expressing RFP. After the transfer vector and DEV are co - transfected into chicken embryo fibroblasts (CEF), the recombinant DEV expressing RFP is obtained by cloning and purification. By measuring the one - step growth curve of the recombinant virus and its parental virus and using PCR to determine the RFP sequence of the recombinant virus of different generations, it was found that the virus titer of the recombinant virus in the cell and supernatant reached the peak at 48 h and 84 h respectively, which was $10^{6.4}$ TCID₅₀/0.1 mL and $10^{6.83}$ TCID₅₀/0.1 mL. There is no significant difference from the parental virus ($P > 0.05$); RFP gene cassette can still be stably expressed after 12 consecutive passages of recombinant DEV, indicating that the insertion of RFP gene cassette in the DEV UL2 region does not affect the virus reproduction and RFP gene cassette is more suitable as a reporter gene than GFP gene cassette. This research is of great significance to the construction and screening of recombinant DEV.

Key words: duck enteritis virus; RFP; recombinant virus

鸭肠炎病毒(Duck enteritis virus, DEV)又称鸭瘟病毒,可引起鸭病毒性肠炎,是一种泛嗜性全身性感染的病毒,也是危害养鸭业最为严重的病原之一^[1]。该病毒对不同品种、年龄的鸭均可致病。患病鸭临床表现为急性败血症过程,其特征是血管损伤,体腔溢血,消化道出血、炎症和坏死等。

DEV 属于疱疹病毒科马立克病毒属,具有基因组大、非必需基因多、遗传稳定性好等特性^[2-4]。这些特性使 DEV 作为病毒载体成为可能。以 DEV 为载体,已成功表达了小鹅瘟病毒 VP2 基因^[5]、新城疫病毒 F 基因^[6]、H5N1 型高致病性禽流感病毒 HA 基因^[7]。在 DEV 基因组中插入报告基因可快速高效地筛选重组病毒。目前常用绿色荧光蛋白(GFP)、增强型绿色荧光蛋白(EGFP)、红色荧光蛋白(RFP)以及 β - 半乳糖苷酶基因(LacZ)标记重组病毒。

孙莹等^[8]通过同源重组将 GFP 表达盒插入 DEV UL2 基因,筛选并纯化了表达绿色荧光蛋白的 UL2 基因缺失的重组 DEV。但研究发现 GFP 在 DEV 中不能稳定表达,随着重组病毒的不断传代,GFP 会发生点突变或缺失^[1],因此有必要筛选更加稳定的报告基因。

本研究将带有 RFP 的 UL2 基因缺失转移载体 pT - UL2 - RFP 与 DEV 共转染鸡胚成纤维细胞(Chicken embryo fibroblast, CEF),经过 5 轮蚀斑筛选、纯化,获得表达 RFP 的重组 DEV,通过测定重组病毒及其亲本毒的一步生长曲线以及用 PCR 测定不同代次重组病毒的 RFP 序列,以期获得更稳定的报告基因,为后期重组病毒的筛选奠定基础。

1 材料与方法

1.1 试验材料

1.1.1 主要试剂 限制性内切酶、T4 DNA 连接酶购自北京 NEB 公司;Ex Taq DNA 聚合酶购自大连 TaKaRa 公司;胶回收试剂盒、质粒小提中量试剂盒等均购自天根生化科技(北京)有限公司;胎牛血清、M199 培养液购自 Hyclone 公司;OPTI - MEM 培养液购自 Gibco 公司;7.5% NaHCO₃ 购自北京庄盟国际生物基因科技有限公司。

1.1.2 菌(毒)株与细胞 DEV 细胞适应毒以及重组质粒 pT - UL2 - GFP - gpt^[9]、pT - RFP 由中国兽医药品监察所菌种保藏与检测室构建、保存;DH5 α 受体菌购自天根生化科技(北京)有限公司。

1.1.3 SPF 鸡胚 购自北京勃林格殷格翰维通生

物技术有限公司。

1.1.4 鉴定引物 ORFC17F:5' - ATGCCCGACG-ATAGGCT - 3', ORFC17R:5' - TTATACTGTTC-CACAAGG - 3', 由赛默飞世尔科技公司 (Thermo Fisher Scientific) 合成。

1.2 试验方法

1.2.1 重组质粒 pT - UL2 - RFP 构建 重组质粒 pT - UL2 - GFP - gpt 用限制性内切酶 *Nhe* I - HF、*Bam*H I - HF 双酶切, 切除重组质粒 GFP - gpt 表达盒, 回收 6.2 kb 片段, 质粒 pT - RFPNX 用限制性内切酶 *Nhe* I - HF、*Bam*H I - HF 双酶切, 回收大小为 711 bp RFP 片段, 通过 T4 DNA 连接酶将 RFP 替换 GFP - gpt, 构建重组质粒 pT - UL2 - RFP。

1.2.2 重组病毒的制备、纯化 DEV 细胞适应毒接种 CEF (MOI = 0.01), 吸附 1 ~ 2 h 后, 按 Lipofectamine 3000 说明书转染高纯度质粒 pT - UL2 - RFP。转染后 72 ~ 96 h, 观察细胞病变情况, 待 80% 细胞产生病变后, 反复冻融 3 次, 接种于新鲜 CEF 单层的六孔培养板中, 用含 5% 血清、1% 双抗、1% 琼脂的 M199 培养液覆盖, 37 °C、5% CO₂ 培养箱中培养 48 ~ 72 h。观察荧光, 挑取单个有红色荧光的蚀斑, 在细胞上重复多次传代, 直至所有的蚀斑都带有红色荧光, 确定为纯化的重组病毒。

1.2.3 重组病毒基因组 DNA 的提取 取重组 DEV 病毒液 437.5 μL, 加入蛋白酶 K (20 mg/mL) 12.5 μL, 10% SDS 50 μL; 56 °C 水浴 1 h; 分别用酚/氯仿/异戊醇 (25:24:1)、氯仿各抽提一次; 取上清, 加入 1/10 体积 3 mol/L 醋酸钠和两倍体积的无水乙醇, -20 °C 放置 30 min; 12000 g 离心 10 min, 去除上清后, 70% 乙醇洗涤沉淀一次, 沉淀溶于 30 μL 去离子水中, -20 °C 保存备用。

1.2.4 重组病毒鉴定 重组病毒 DNA 用鉴定引物 ORFC17F、ORFC17R 进行 PCR 扩增, PCR 产物送北京华大基因生物公司测序。

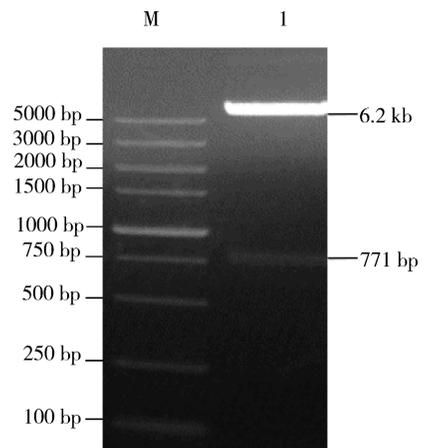
1.2.5 一步生长曲线 将重组病毒及其亲本毒分别接种于 8 瓶 25 cm² (MOI = 0.01) 的 CEF 中, 接种后每隔 12 h 取出一瓶接毒细胞, 收集细胞培养液

上清作为上清样品, 再加入 1 mL 含有 1% FBS 的 M199 细胞维持液, 冻融后取上清作为细胞样品。将重组病毒及亲本毒的病毒悬液做 10 倍系列稀释, 取 4 个适宜稀释度, 接种新鲜的 CEF 单层 96 孔细胞培养板, 每孔接 0.1 mL, 每个稀释度接 5 孔, 37 °C 吸附 1 h 后每孔加入 0.1 mL 细胞维持液, 37 °C、5% CO₂ 培养箱中培养 5 d。观察致细胞病变效应 (Cytopathic Effect, CPE), 记录每个稀释度出现 CPE 的孔数, 按 Reed - Muench 法计算病毒 TCID₅₀, 并绘制一步生长曲线。

1.2.6 重组病毒的稳定性 将重组病毒接种 CEF (MOI = 0.01), 待 80% 细胞产生病变后, 反复冻融 3 次, 再接种 CEF, 按此方法连续传代 12 次。荧光显微镜下观察每代重组病毒的红色荧光表达情况。按 1.2.3 方法提取第 5 代、第 10 代、第 12 代病毒 DNA, 用鉴定引物 ORFC17F、ORFC17R 通过 PCR 鉴定外源基因 RFP 是否稳定存在。PCR 产物送北京华大基因公司进行测序。

2 结果与分析

2.1 重组质粒 pT - UL2 - RFP 的酶切鉴定 重组质粒 pT - UL2 - RFP 用限制性内切酶 *Nhe* I - HF 以及 *Bam*H I - HF 双酶切鉴定, 得到大小约为 6.2 kb 和 711 bp 的两个片段 (图 1), 符合理论值。



M: D5000; 1: 重组质粒 pT - UL2 - RFP 的双酶切
M: D5000; 1: Recombinant plasmid pT - UL2 - RFP
by double enzyme digestion

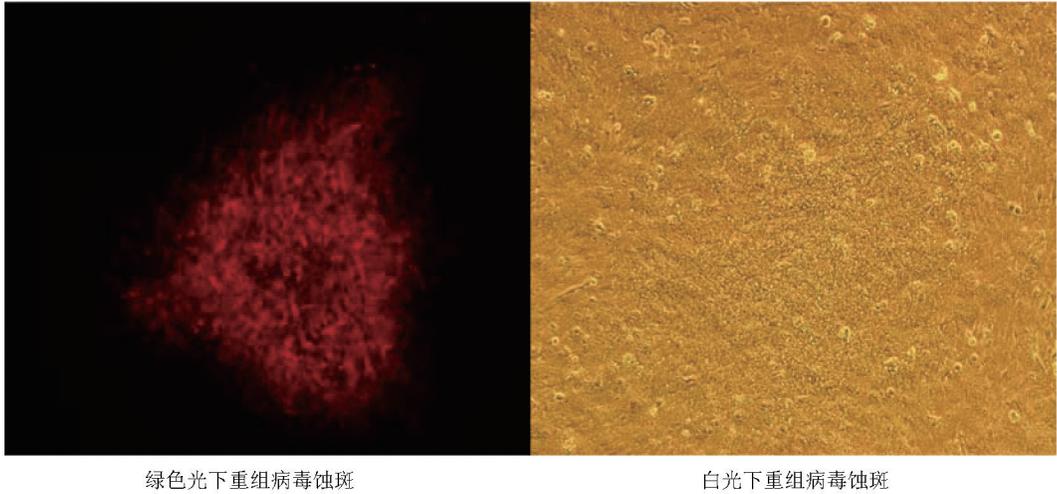
图 1 重组质粒鉴定

Fig 1 Identification of the recombinant plasmid

2.2 重组病毒的制备、纯化和鉴定

2.2.1 重组病毒的筛选 用质粒小提中量试剂盒提取高纯度转移载体质粒 pT - UL2 - RFP, 将质粒浓缩为 1 μg/μL 后, 将该转移质粒载体与 DEV 共转染 CEF, 24 h 后, 即可在荧光显微镜下观察到带有红色荧光的梭形细胞, 说明质粒在该细胞中表达,

待 80% 细胞产生病变后, 收获细胞并反复冻融 3 次, 将其接种到长有新鲜 CEF 单层的六孔培养板中, 用含 5% 血清、3% NaHCO₃、1% 双抗、1% 琼脂的 M199 培养液覆盖, 观察荧光, 挑取单个有红色荧光的蚀斑, 再接种到新的细胞上, 经过 5 轮筛选, 所有的蚀斑都带有红色荧光, 获得纯化的重组病毒(图 2)。



绿色光下重组病毒蚀斑

白光下重组病毒蚀斑

图 2 表达红色荧光的重组 DEV 病毒

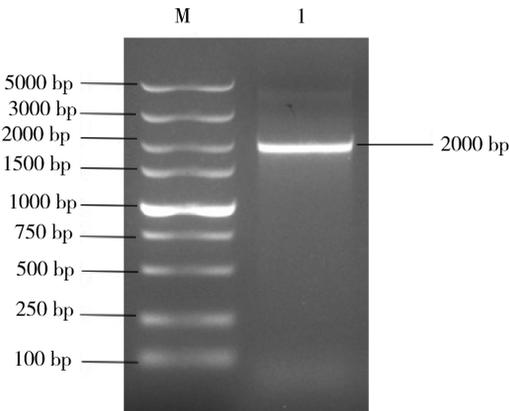
Fig 2 Recombinant expressing the red fluorescent protein

2.2.2 重组病毒的鉴定 用鉴定引物 ORFC17F/ ORFC17R 对重组病毒进行 PCR 扩增鉴定, 得到大小约为 2000 bp 的片段(图 3), 与理论值相符。

将 PCR 产物送北京华大基因生物公司测序, 结果显示重组病毒缺失 UL2 基因, 且带有 RFP 标记基因。

2.3 一步生长曲线 绘制重组病毒及其亲本毒的一步生长曲线。图 4 结果表明, 亲本毒接种 CEF 后 48 h, 病毒含量达到峰值 10^{6.5} TCID₅₀/0.1 mL, 84 h 上清样品病毒含量达到峰值 10^{6.75} TCID₅₀/0.1 mL。而表达红色荧光蛋白的重组病毒细胞的病毒含量在 48 h 达到峰值, 为 10^{6.4} TCID₅₀/0.1 mL, 上清样品的病毒含量在 84 h 达到峰值, 为 10^{6.83} TCID₅₀/0.1 mL, 与亲本毒无差异(P > 0.05)。

2.4 重组病毒的传代稳定性 重组病毒经传代 12 次, 荧光显微镜下观察红色荧光在 1 ~ 12 代均可稳定表达, 所有产生 CPE 的细胞均带有红色荧光(图 5)。重组病毒第 5 代、第 10 代、第 12 代 PCR 均扩增出 2000 bp 片段(图 6)。测序结果表明, RFP 序列未出现变异。



M: D5000; 1: 重组 DEV 病毒 PCR 鉴定产物

M: D5000; 1: PCR amplification of recombinant DEV

图 3 重组病毒的鉴定

Fig 3 Identification of the recombinant DEV

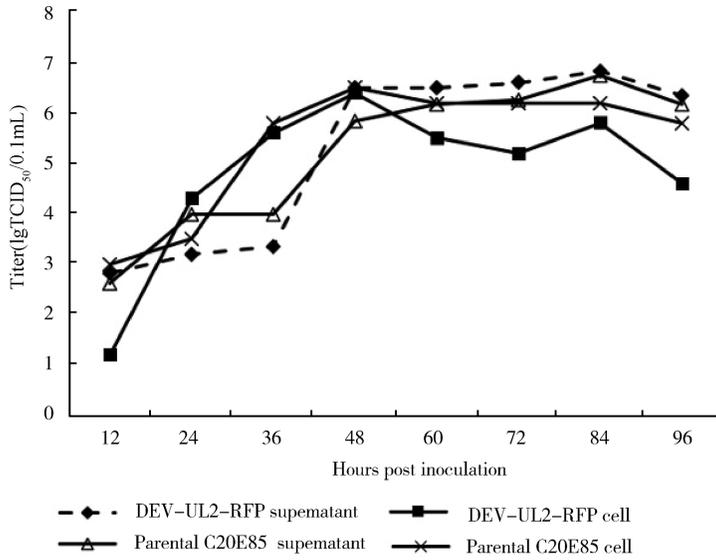


图 4 重组病毒 rDEV - ΔUL2 - RFP 的一步生长曲线

Fig 4 One step growth curve of recombinant rDEV - ΔUL2 - RFP in CEF

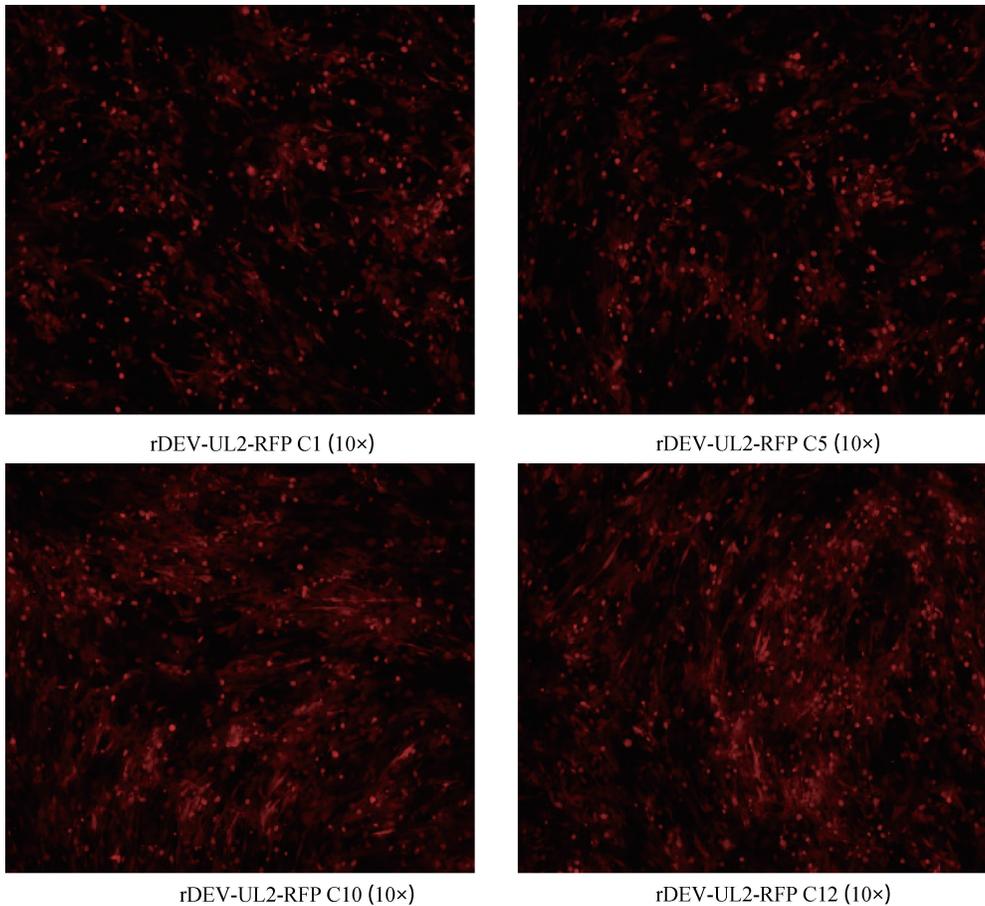
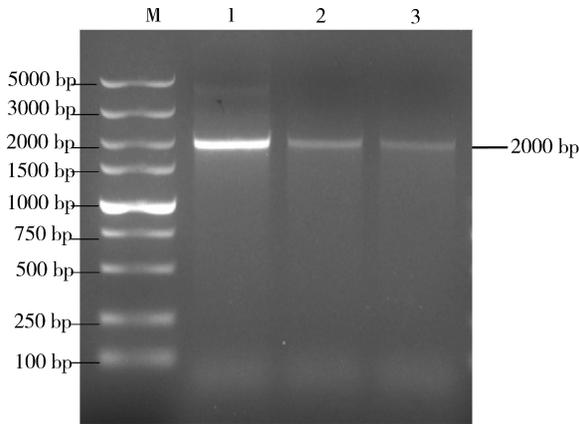


图 5 重组病毒的传代稳定性检测

Fig 5 Identification of stability of the recombinant DEV



M: D5000; 1: 重组病毒第 5 代扩增片段; 2: 重组病毒第 10 代扩增片段; 3: 重组病毒第 12 代扩增片段

M: D5000; 1: The amplified fragment of the 5th generation of recombinant virus; 2: The amplified fragment of the 10th generation of recombinant virus; 3: The amplified fragment of the 12th generation of recombinant virus

图 6 重组病毒传代 PCR 鉴定

Fig 6 Identification of recombinant virus by PCR

3 讨论与结论

本研究筛选并纯化了表达 RFP 的 UL2 基因功能缺失的重组鸭肠炎病毒, 并对其生物学进行初步研究。研究表明该重组病毒的生长特性与亲本毒相似, 并且可在 CEF 上连续稳定传代。与 GFP 相比, RFP 在 DEV 中更稳定, 至少在 UL2 基因内, RFP 更适合重组 DEV 的反向筛选。

传统同源重组技术常以 GFP、RFP、LacZ 等作为重组病毒筛选标记基因, LacZ 作为标记基因其缺点是分子量较大, 不便于启动子克隆时重组质粒的构建, 通过化学显色, 检测灵敏度低, 操作繁琐; 荧光蛋白如 GFP、RFP 分子量小, 发光强, 操作简单, 可直接在荧光显微镜下观察, 易于检测, 对基因功能、蛋白表达、定位示踪等诸多研究发挥了重要作用^[10-11]。但是目前已有研究表明, GFP 在重组病毒中不稳定, 随着传代次数的增加易发生点突变或缺失^[1], Fang 等^[12]构建表达 GFP 的北美 1 型猪繁殖与呼吸综合症的感染性克隆, 拯救出含有 GFP 的病毒粒子, 当病毒连续传代至第 7 代时, 发现 GFP 基因发生突变; 孙莹等^[1]研究显示表达 GFP

的重组鸭瘟病毒, 绿色荧光在 1~5 代可以稳定表达, 从第 6 代开始可观察到少量没有荧光的细胞病变, 15~20 代绝大部分细胞病变无绿色荧光, 对重组 DEV 的筛选带来极大困难。红色荧光蛋白 (RFP) 出现较 GFP 稍晚, 其可以激发和发射波长段也不同。本研究将 RFP 替代 GFP, 获得了一株表达红色荧光的重组 DEV, 且一步生长曲线表明 RFP 对 DEV 的生长无影响; RFP 连续传代 12 代, 能够稳定表达且无突变。试验证明 RFP 稳定性更强, 与研究报道一致^[13-14]。根据本实验室在重组 DEV 筛选方面的经验, 通常在 10 代以内就能够克隆纯化到重组病毒, 因此本研究仅将 RFP 连续传代至 12 代, 未进行更多的传代。本研究结果对重组 DEV 的构建、筛选具有很好的借鉴意义。

参考文献:

- [1] 杜翔宇, 胡桂学, 董浩. 鸭肠炎病毒基因研究现状[J]. 中国兽医杂志, 2016(8): 71-74.
Du X Y, Hu G X, Dong H. Research status of duck enteritis virus gene [J]. Chinese Journal of Veterinary Medicine, 2016 (8): 71-74.
- [2] Jing Yan-chun, Wu Ying, Sun Kun-feng, et al. Role of duck plague virus glycoprotein C in viral adsorption: Absence of specific interactions with cell surface heparan sulfate [J]. Journal of Integrative Agriculture 2017(5): 169-176.
- [3] Hu X, Wang M, Chen S, et al. The duck enteritis virus early protein, ULI3, found in both nucleus and cytoplasm, influences viral replication in cell culture [J]. Poult Sci, 2017, 96(8): 2899-2907.
- [4] Liu C, Cheng A, Wang M, et al. Regulation of viral gene expression by duck enteritis virus UL54 [J]. Sci Rep, 2017, 7 (Pt 8): 1076.
- [5] 陈柳, 余斌, 倪征, 等. 表达小鹅瘟病毒 VP2 蛋白重组鸭瘟病毒的构建及其生物学特性[J]. 中国农业科学, 2016, 49(14): 2813-2821.
Chen L, Yu B, Ni Z, et al. Construction and biological characteristics of recombinant duck plague virus expressing gosling plague virus VP2 protein [J]. Chinese Agricultural Sciences, 2016, 49(14): 2813-2821.
- [6] 张苗苗, 李慧昕, 韩宗玺, 等. 表达新城疫病毒 F 基因重组鸭肠炎病毒的构建[J]. 中国预防兽医学报, 2016, 38(2): 92-95.

- Zhang M M, Li H X, Han Z X, *et al.* Construction of recombinant duck enteritis virus expressing Newcastle disease virus F gene [J]. Chinese Journal of Preventive Veterinary Medicine, 2016, 38(2): 92-95.
- [7] Liu X, Wei S, Liu Y, *et al.* Recombinant duck enteritis virus expressing the HA gene from goose H5 subtype avian influenza virus[J]. Vaccine, 2013, 31(50): 5953-5959.
- [8] 孙莹, 李俊平, 黄小洁, 等. 表达绿色荧光蛋白重组鸭肠炎病毒构建[J]. 中国农业科学 2016, 49(14): 2805-2812.
- Sun Y, Li J P, Huang X J, *et al.* Construction of recombinant duck enteritis virus expressing green fluorescent protein [J]. Chinese Agricultural Sciences, 2016, 49(14): 2805-2812.
- [9] 孙莹, 张兵, 李岭, 等. 表达 H9 亚型禽流感病毒 HA 基因重组鸭肠炎病毒的构建[J]. 中国农业科学, 2019, 52(23): 4398-4405.
- Sun Y, Zhang B, Li L, *et al.* Construction of recombinant duck enteritis virus expressing HA gene of H9 subtype avian influenza virus [J]. Chinese Agricultural Sciences, 2019, 52(23): 4398-4405.
- [10] Giepmans B N, Adams S R, Ellisman M H. The fluorescent toolbox for assessing protein location and function[J]. Science, 2006, 312(5771): 217-224.
- [11] Huang W Y, Aramburu J, Douglas P S. Transgenic expression of green fluorescence protein can cause dilated cardiomyopathy[J]. Nat Med, 2000, 6(5): 482-483.
- [12] Fang Y, Rowland R, Roof M, *et al.* Full-length cDNA infectious clone of North American type 1 porcine reproductive and respiratory syndrome virus; expression of green fluorescent protein in the Nsp2 region [J]. Journal of Virology, 2006, 80(23): 11447-11455.
- [13] Shaner N C, Campbell R E, Steinbach P A, *et al.* Improved monomeric red, orange and yellow fluorescent proteins derived from *Discosoma* sp. red fluorescent protein [J]. Nat Biotechnol, 2004, 22(12): 1567-1572.
- [14] 王飞, 杨海涛, 王泽方. 红色荧光蛋白的研究进展[J]. 生物技术通报, 2017, 33(9): 32-47.
- Wang F, Yang H T, Wang Z F. Research progress of red fluorescent protein [J]. Biotechnology Bulletin, 2017, 33(9): 32-47.

(编辑:李文平)