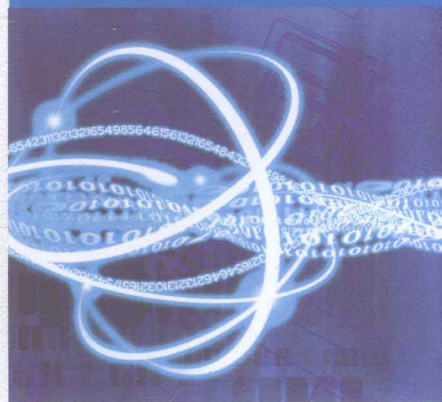




学者书屋系列

病毒重组与 突变技术实例

尹杰超 韩秀娥 袁肖寒◎主编



学者书屋系列

病毒重组与突变技术实例

主编 尹杰超 韩秀娥 袁肖寒

哈尔滨工程大学出版社

内 容 简 介

本书通过介绍两个病毒重组和突变技术的实例,展示了病毒基因工程操作的一般步骤和原理。共分为两大部分,第一部分主要介绍 DNA 病毒的重组技术,通过建立细胞内同源重组体系,对重组病毒的免疫特性进行了系统研究;第二部分主要介绍 RNA 病毒的突变技术,通过构建感染性克隆,研究了突变病毒株与亲本毒株的生物学现状。

本书取材广泛,内容系统,不仅可作为高等院校相关专业教学参考,也可供广大读者学习使用。

图书在版编目(CIP)数据

病毒重组与突变技术实例/尹杰超,韩秀娥,袁肖寒
主编. —哈尔滨:哈尔滨工程大学出版社,2011.7
ISBN 978-7-5661-0159-4

I. ①… II. ①尹…②韩…③袁… III. ①病毒-
重组②病毒-突变 IV. ①Q939.4

中国版本图书馆 CIP 数据核字(2011)第 122794 号

出版发行 哈尔滨工程大学出版社
社 址 哈尔滨市南岗区东大直街 124 号
邮政编码 150001
发行电话 0451-82519328
传 真 0451-82519699
经 销 新华书店
印 刷 哈尔滨市石桥印务有限公司
开 本 787mm×960mm 1/16
印 张 14.5
字 数 247 千字
版 次 2011 年 7 月第 1 版
印 次 2011 年 7 月第 1 次印刷
定 价 28.00 元
<http://press.hrbeu.edu.cn>
E-mail:heupress@hrbeu.edu.cn

前 言

随着现代分子生物学理论的发展和基因工程技术的不断进步,人们已经可以按照自己的意愿,运用人工方法对生物的基因组进行“移花接木”式改造和重组。

在自然界中,如果一个细胞同时被两个以上的病毒株感染,偶尔也会发生自然的重组现象。但是这种重组带有一定的随机性,而且多是亲缘性较近的同一种属但不同毒株之间的重组。由于病毒可以感染相应的宿主细胞,并且可使自身的遗传物质在细胞内增殖,因此病毒是一个优秀的基因传递工具,所以科学家们一直以来都希望将外源基因插入到病毒的基因组当中,通过重组病毒感染细胞,将外源基因传递到细胞当中。

重组病毒就是利用重组 DNA 技术将外源的基因片断人为地插入到病毒的基因组中,以此方法产生的病毒可以作为重组活载体疫苗或是基因治疗的载体。被插入的外源基因既可以是短发夹 RNA (Short Hairpin RNA, shRNA) /微小 RNA (MicroRNA, SmiRNA) 也可以是某一基因的开放阅读框 (Open Reading Frame, ORF)。随着各种重组病毒技术平台的建立,目前已经有腺病毒、痘病毒、疱疹病毒、逆转录病毒、副黏病毒等很多重组病毒系统,这些重组病毒系统也被广泛地应用于基因治疗、药物基因的开发、细胞通路的鉴定、多价重组活载体疫苗的构建、哺乳动物表面展示技术。

病毒突变一般分为自发突变和诱导突变。自发突变是在没有任何已知诱变剂的条件下,病毒子代产生高比例的突变体。诱导突变则是利用不同的物理或化学诱变剂处理病毒,提高病毒群体突变率,诱导病毒子代出现特定的突变类型。DNA 病毒和 RNA 病毒在突变频率上有较大的差别。

由此可见,在自然界中的病毒可发生一定概率的重组和突变,但大都是不定向的,带有很强的随机性。但通过人工方法建立的病毒重组和突变体系可人为地控制病毒重组发生的部位以及通过同源重组插入何种外源基因,也可控制病毒突变的位点以及发生何种突变。

本书通过介绍两种病毒重组和突变的实例,展示了病毒基因工程操作的一般步骤和原理。本书共分为两部分,第一部分主要介绍 DNA 病毒的重组技术,通过建立细胞内同源重组体系,将猪传染性胃肠炎的纤突蛋白基因重组到疱疹病

毒——伪狂犬病病毒的基因组中并且对重组病毒的免疫特性进行了系统研究。第二部分主要介绍 RNA 病毒的突变技术,通过构建感染性克隆,对相应基因位点进行定点突变,同时比较了突变病毒株与亲本毒株的生物学性状。

本书在编写过程中,参考或引用了国内外一些专家学者的著述,在此表示衷心的感谢!

由于编者学识水平和能力有限,编写时间仓促,书中难免有疏漏和不妥之处,诚恳希望广大读者提出宝贵意见。

编 者
2011 年 4 月

目 录

第一编 DNA 病毒重组技术研究实例

第 1 章 绪论	3
1.1 伪狂犬病病毒的分子生物学研究进展	4
1.2 重组伪狂犬病病毒活载体研究进展	9
1.3 重组伪狂犬病毒的筛选	13
1.4 重组伪狂犬病毒的评价	14
1.5 猪传染性胃肠炎病毒 S 基因分子生物学研究进展	15
1.6 猪传染性胃肠炎病毒发病机理与免疫机制	19
1.7 猪传染性胃肠炎的防治	20
1.8 猪传染性胃肠炎病毒疫苗研究现状	21
1.9 重组活载体疫苗及其研发原则	23
第 2 章 转移载体 pUGS-LacZ 的构建	27
2.1 含 PrV PK(部分)和 gG 基因的重组质粒 pUG 的构建	27
2.2 含 TGEV Sa 基因和 SV40 PolyA 序列的重组质粒 pHSV 的构建	33
2.3 表达 TGEV S 基因主要抗原位点的 PrV 转移载体构建	38
2.4 小结	41
第 3 章 重组伪狂犬病病毒的获得	46
3.1 转移载体 pUGS-LacZ 质粒的提取	46
3.2 PrV/Bartha K-61 基因组的提取	47
3.3 转移载体与 Bartha K-61 基因组的共转染	48
3.4 小结	49
第 4 章 重组病毒 rPrV-TGEV-S1 的筛选、纯化和鉴定	51
4.1 重组病毒 rPrV-TGEV-S1 的筛选和纯化	51
4.2 重组病毒 rPrV-TGEV-S1 的 PCR 鉴定	51

4.3 小结	55
第5章 重组病毒 rPrV-TGEV-S1 中 S1 片段的表达检测	57
5.1 Western blotting 检测	57
5.2 间接免疫荧光检测	58
5.3 小结	59
第6章 重组病毒 rPrV-TGEV-S1 与亲本毒株在毒种特性上的比较	61
6.1 重组病毒 rPrV-TGEV-S1 与亲本毒株在不同细胞上的毒价和病变形态的比较	61
6.2 重组病毒 rPrV-TGEV-S1 与亲本毒株在穿入能力上的比较	63
6.3 重组病毒 rPrV-TGEV-S1 与亲本毒株一步生长曲线的比较	63
6.4 重组病毒 rPrV-TGEV-S1 与亲本毒株在理化性质上的比较	64
6.5 小结	65
第7章 重组病毒 rPrV-TGEV-S1 接种 BALB/C 小鼠实验	68
7.1 实验动物分组	68
7.2 腹腔免疫实验	68
7.3 鼻腔免疫实验	68
7.4 免疫小鼠血清抗体检测	69
7.5 免疫小鼠鼻腔灌洗物与肠黏液的抗体检测	71
7.6 免疫小鼠乳汁中的抗体检测	72
7.7 免疫小鼠血清的中和抗体实验	73
7.8 小结	75

第二编 RNA 病毒突变技术研究实例

第8章 绪论	81
8.1 EIAV 认知历史和现状	84
8.2 EIAV 的生物学特性	85
8.3 EIAV 的分子生物学	87
8.4 EIAV 基因非编码区 LTR 相关研究进展	95
8.5 EIAV 主要基因的变异研究进展	101
8.6 EIAV 的免疫学研究进展	105

8.7	中国 EIA 弱毒疫苗及相关研究进展	111
8.8	慢病毒与糖基化	116
8.9	本研究的目的和意义	121
第 9 章	强弱毒包含完整 S2 和 gp90 及部分 gp45 基因的扩增	122
9.1	驴白细胞的培养	122
9.2	EIAV 病毒 RNA 的提取及基因扩增	122
9.3	小结	135
第 10 章	EIAV _{FDDV} N-连接糖基化回复突变感染性克隆的构建	139
10.1	pMD18-Tg5, pMD18-Tg9, pMD18-Tg10, pMD18-Tg5g9, pMD18-Tg5g10, pMD18-Tg9g10, pMD18-Tg5g9g10 突变克隆的构建	139
10.2	pLGFDg5, pLGFDg9, pLGFDg10, pLGFDg5g9, pLGFDg5g10, pLGFDg9g10, pLGFDg5g9g10 突变克隆的构建	144
10.3	小结	147
第 11 章	转染及感染性	150
11.1	质粒的提取和纯化	150
11.2	质粒在细胞培养中的转染和传代	152
11.3	转染传代后细胞培养物中 EIAV 的检查	156
11.4	嵌合病毒复制动力学分析	163
11.5	病毒与抗血清的中和实验	167
11.6	小结	169
附录		172
附录 A	转移载体 pUG-LacZ 构建流程图	172
附录 B	转移载体 pUG-LacZ 与亲本病毒 Bartha K-61 同源重组后外源 基因插入示意图	173
附录 C	实验材料	174
附录 D	马克隆 EIAV 强毒(EIAV _L)env 基因 gp90 的核苷酸序列	177
附录 E	实验材料	197
参考文献		200

第 一 编

DNA 病毒重组技术研究实例

第 1 章 绪 论

DNA 病毒可分为双链 DNA 病毒和单链 DNA 病毒。其中双链 DNA 病毒又可分为痘病毒科、疱疹病毒科、非洲猪瘟病毒科、乳头瘤病毒科以及腺病毒科等。单链 DNA 病毒又可分为细小病毒科及圆环病毒科。

与 RNA 病毒相比较,对 DNA 病毒进行遗传操作更为简单,尤其是双链 DNA 病毒。本书以构建重组有猪传染性胃肠炎病毒纤突蛋白基因(S 基因)的伪狂犬病病毒为例,探讨 DNA 病毒的重组技术。

猪传染性胃肠炎(Transmissible gastroenteritis, TGE)和伪狂犬病(Pseudorabies, PR)是由猪传染性胃肠炎病毒(Transmissible gastroenteritis virus, TGEV)和伪狂犬病病毒(Pseudorabies virus, PrV)所引起的两种重要的猪传染病,是引起哺乳仔猪早期死亡的主要原因。它们广泛分布于世界各地,给畜牧业造成严重的损失。因此针对这两种疾病的防治,对养猪业的健康发展具有重要意义。传统疫苗防治 TGE 方面有一定的缺陷,例如:灭活疫苗需要多次注射,由于弱毒疫苗的使用,很难用血清学的方法区别免疫接种猪与自然感染猪。利用病毒活载体疫苗防治 TGE 可避免传统疫苗的这些缺点。随着对 PrV 遗传背景的深入了解以及其基因工程苗取得的巨大成功,PrV 作为一种新型高效的病毒活载体已经受到了广泛重视。

利用基因重组技术构建表达 TGEV S1 基因(S 基因主要抗原位点片断)的重组伪狂犬病病毒并对其毒种特性与免疫效力进行研究。首先构建了含有 PrV gG 启动子控制下的 TGEV S 基因主要抗原位点片段——S1 基因(2 100 bp)与 CMV 启动子控制下的 LacZ 表达盒(4 300 bp)的伪狂犬病病毒转移载体——pUGS-LacZ,然后将该载体和亲本病毒 Bartha K-61(gE - /TK + 表型)的基因组共转染。转移载体、与亲本病毒基因组在 Vero 细胞细胞核中发生同源重组,形成重组病毒,该病毒于 X-gal 存在的情况下可在 Vero 细胞单层中形成蓝色蚀斑。于镜下挑取蓝色蚀斑, Vero 细胞扩增,经过 10 代蓝斑的纯化获得了一株稳定表达 TGEV S1 基因与 LacZ 基因的重组病毒,命名为 rPrV-TGEV-S1。通过套式 PCR 与 PCR 扩增 S1 基因内部 760 bp 与 LacZ 基因内部 430 bp 的片断,对第十代重组病毒进行检测,证明外源基因稳定地插入到亲本病毒 Bartha K-61 的基因组中。

将重组病毒与亲本病毒在毒种特性上进行比较,实验结果表明:亲本病毒与重组病毒具有相似的毒种特性,外源基因的插入并不影响病毒粒子的繁殖复制与理化特性。该实验为重组病毒未来的工业化生产提供重要的实验依据。

Western blotting 与间接免疫荧光实验证实,rPrV-TGEV-S1 感染细胞的裂解物中可检测到 S1 基因的表达,而在释放到上清中的病毒粒子中未检测到 S1 蛋白,表达的蛋白主要分泌到感染细胞的胞浆中或可能在细胞膜上而不存在于病毒粒子表面。

通过重组病毒对实验小鼠免疫效力的研究表明:该重组病毒稳定表达外源基因,经腹腔免疫可诱导实验动物产生有效的体液免疫,抗体具有中和 TGEV 的能力;经鼻黏膜免疫可刺激小鼠产生一定程度的黏膜免疫;该重组病毒可诱导哺乳小鼠乳汁中产生抗 TGEV-S 蛋白的 IgG 与 IgA 抗体。并且由于外源基因的插入使亲本毒株 gG 基因失活,因此可通过血清学的方法鉴别免疫接种动物与自然感染动物。

1.1 伪狂犬病病毒的分子生物学研究进展

伪狂犬病(Pseudorabies, PR)是由伪狂犬病病毒(Pseudorabies virus, PrV)引起的感染多种家畜和野生动物的一种急性传染病。由于其感染动物范围广和特殊的传播机制,成为家畜重要的传染病之一。该病在猪群中具有传播速度快、死亡率高、流行范围广、传播途径多和病原体持续存在的特点,可引发妊娠母猪流产、死胎等繁殖障碍疾病以及呼吸道感染,对初生仔猪则引起神经症状,出现运动失调,麻痹,衰竭死亡,病死率达 100%,给养猪业造成了巨大损失。

自 1902 年匈牙利兽医学家 Aujeszky 发现该病以来,全世界已有 44 个国家和地区发生和流行该病。我国自 1948 年首次发现猫 PrV 以来,现已有 21 个省(市)相继报道了本病的发生。20 世纪 60 年代前,已经从猪中分离出该病毒,但当时对养猪业造成的损失不大。20 世纪 60 年代以后,出现 PrV 强毒株,伪狂犬病在世界范围内频繁暴发,已遍及欧洲、东南亚、美国、南美洲及非洲等 40 多个国家和地区,仅芬兰、挪威等少数国家无伪狂犬病的报道。我国周边一些国家,如泰国、韩国、日本、菲律宾、老挝、马来西亚、新加坡和越南等都有过伪狂犬病的流行。

伪狂犬病病毒属于疱疹病毒科、 α 疱疹病毒亚科、异病毒属成员。由一个含基

因组的核芯、含 162 个壳粒的正二十面体的衣壳和蛋白质样的皮层以及来自细胞膜的含病毒编码糖蛋白的脂质双层膜构成。经推断的氨基酸序列与同源蛋白的比较, PrV 与牛疱疹病毒 I 型(*Bovine herpesvirus-1*, BHV-1) 和水痘——带状疱疹病毒(*Varicell-Zoster herpesvirus*, VZV) 有很近的亲缘关系(Van Oirschot J T, et al., 1990; Ben Peeter, et al., 1992; Nathalie Babic, et al., 1993)。

1.1.1 基因组结构

伪狂犬病毒基因组为线状双链 DNA, 在核内以高分子量的连环体存在, 核苷酸长度约为 150 kb, 分子量 95 ~ 105 kDa, GC 含量高达 73%, 含有至少 70 个基因, 编码 70 ~ 100 种病毒蛋白, 成熟病毒粒子大约含有 50 种蛋白质。基因组分为独特长区(UL)和独特短区(US), 在 US 区两侧有末端反向重复序列(TRs)和内部重复序列(IRs)。另外, 病毒基因组有一个大约 40 kb 的颠倒重复序列存在于 UL27 ~ 44 区之间。

目前, 对于 PrV 基因组的 90% 的测序工作已经完成。基因组中已经有大约 65 种基因被定位, UL 区被定位的基因有 56 种, US 区被定位的基因有 7 种, IR 区段被定位的基因有 2 种, 并且大多数基因的功能已经明确。这些基因所编码蛋白的主要功能为: 病毒的结构蛋白、转录因子、毒力蛋白、病毒复制相关酶类和复制结合位点。

值得一提的是在 PrV 基因组有很多病毒复制非必需基因。在已经测定的功能蛋白中, 包括 PrV 的 11 种糖蛋白, 即 gB(g II), gC(g III), gD(gp50), gE(g I), gG(g X), gH, gI(gp63), gK, gL, gM 和 gN。其中 gB, gD, gH, gL 是病毒体外复制和感染所必需的糖蛋白(Ben Peeter, et al., 1992; Klupp B G, et al., 1994); gC, gE, gG, gI 和 gM 对 PrV 的复制是非必需的(Alan K, et al., 1986; Mettenleiter T C, et al., 1986; Jacobs L, 1994; Karger A, et al., 1995; 李柠, 1995)。另外, 与 PrV 毒力有关的基因如胸苷激酶(TK)基因、核苷酸还原酶(RR)基因、蛋白激酶(PK)基因等其缺失也不影响病毒的复制。

1.1.2 糖蛋白及其功能

迄今, 已经发现了 PrV 的 11 种糖蛋白, 除 gG 是外分泌蛋白之外, 其他 10 种结构蛋白均定位于囊膜上。目前, 已对这些糖蛋白的功能有了比较全面而深刻的了解。

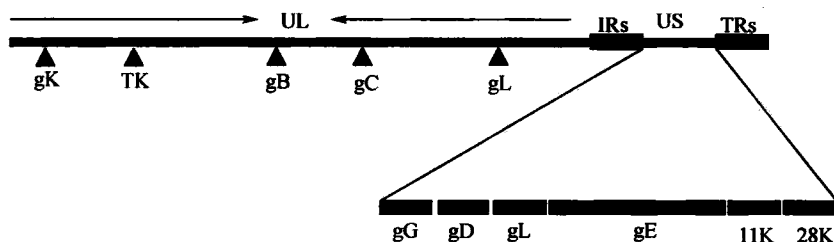


图 1-1 伪狂犬病病毒基因组结构示意图

1. 必需糖蛋白

(1) gB 糖蛋白

gB 糖蛋白是由 3 个糖蛋白亚基通过二硫键共价联结的复合体。是病毒囊膜蛋白的一个重要组分,与细胞的融合有关,对于病毒感染的建立十分重要,gB 缺失的病毒无感染能力。gB 糖蛋白参与 3 个膜融合过程:在侵入过程中,病毒包膜与细胞膜融合;在核衣壳进入细胞核过程中,包膜化的病毒体与外层核膜融合;感染细胞与邻近非感染细胞细胞膜融合 (Marchili C, et al., 1987; Ben Peeter, et al., 1992)。

此外,gB 蛋白还能诱导动物体产生依赖于补体和不依赖于补体的两种中和抗体。不同病毒株的 gB 基因存在抗原差异,并且在某些抗原结构域上是可变的。像 gB 蛋白这样免疫学上重要糖蛋白的变异性也许是 PrV 在自然界中逃避被感染动物免疫反应的有利武器。

(2) gD 糖蛋白

gD 糖蛋白由 402 个氨基酸组成,该蛋白具有糖蛋白所固有的特征,包括信号肽序列、跨膜蛋白和胞质结构域序列。与其他的疱疹病毒相反,gD 对于病毒在细胞中的繁殖以及与邻近非感染细胞的融合是非必需的,但对于病毒感染的建立有着重要的意义。gD 是病毒识别靶细胞受体所必需的糖蛋白,参与病毒的吸附和侵入过程,首先是非必需糖蛋白 gC 与细胞表面的蛋白多糖结合,然后是必需蛋白 gD 的牢固结合 (Eloit M, et al., 1988)。

gD 不仅是病毒入侵细胞的必需蛋白,而且也是一种重要的中和抗原,能诱导较好的免疫保护反应。

(3) gH 糖蛋白和 gL 糖蛋白

gH 糖蛋白为病毒复制所必需的糖蛋白,对于病毒侵入靶细胞或感染细胞与邻近非感染细胞的融合是必需的(Ben Peeter,1992; Babic N, et al., 1996)。

gL 糖蛋白含有 156 个氨基酸,分子量为 16.5 kDa。对 gH 突变体的分析显示 gL 的定位依赖于 gH 的存在,推测 gH 及 gL 很可能作为一个功能实体存在,二者相互作用(Klupp B G, et al., 1994; Flamand A, 2001)。

2. 非必需糖蛋白

(1) gC 糖蛋白

gC 糖蛋白在 PrV 在细胞增殖时是非必需的,但在病毒感染细胞时,尤其是病毒吸附细胞方面发挥着重要的作用。gC 蛋白 25 ~ 157 氨基酸之间的区域,在介导病毒与细胞表面硫酸乙酰肝素蛋白多糖地有效吸附上起主要作用。但 gC 介导地吸附并非是所有类型的细胞感染所必需的。将 gC 缺失的突变株分别接种表达乙酰肝素和不表达乙酰肝素的细胞,其感染效率相同,初步证实在 PrV 进行感染时除了 gC 与肝素样受体结合这条主要吸附途径外,还存在另一吸附路径(Flynn S J, et al., 1993)。

此外, gC 与 gE/gI 间相互作用介导病毒的释放和影响毒力,而且 gC 有血凝活性(能凝集小鼠的红细胞),还能与 C1 结合从而激活补体系统,是 PrV 中诱导体液和细胞免疫的主要抗原。

(2) gE 糖蛋白和 gI 糖蛋白

gE 蛋白具有典型的膜蛋白特征。启动子后面是末端引导肽(151 位的氨基酸),之后为疏水氨基酸和转膜氨基酸。在 C 末端(429 ~ 453 的氨基酸)包含有很强的疏水残基,可能是跨膜片断。其后的亲水片段(453 ~ 577 的氨基酸)可能构成膜蛋白的胞质区。PrV 的 gE 糖蛋白的抗原决定簇中,有 5 个定位在 gE 蛋白的前 238 个氨基酸,3 个定位在 52 ~ 123 的氨基酸,2 个定位在 78 ~ 238 的氨基酸(Mettenleiter T C, et al., 1987)。

gE 基因是一个主要的毒力基因,其编码的 gE 蛋白是一种促进细胞融合的糖蛋白,能促进感染细胞与临近非感染细胞的融合,介导着病毒从细胞到细胞之间的扩散,是 PrV 从视网膜、嗅觉上皮细胞、三叉神经节侵入中枢神经系统所必需的。gE 缺失株能感染第一级三叉神经和控制鼻黏膜的交感神经,但不感染或极少感染三叉神经中第二级神经节和交感神经元,而野生型和 gE 完整型病毒则能发生三叉神经、交感神经和副交感神经的跨神经元感染。

随着分子生物学的发展,人们发现 gE 蛋白的氨基酸序列中第 125 位的缬氨酸和第 126 位的半胱氨酸对病毒的生物学功能有重要的影响,缺失它们会降低病毒的毒力嗜神经性,但不影响免疫原性。由于含 gE 基因缺失的弱毒疫苗比其他 PrV 的缺失苗更为安全,现已被广泛应用,而且欧盟和美国已规定只准使用含 gE 基因缺失的疫苗(Pensaert M, et al., 2004)。研究人员通过调查比对所收集的 1 200 多个伪狂犬病野毒株,发现它们全部含有 gE 基因。这说明, gE 可以作为鉴别野毒株和疫苗株的依据。

目前,对于 gI 基因的报道较少, gE 和 gI 二者共同形成一个非共价结合的复合体,且该复合体在感染的细胞膜和病毒的囊膜均可发现。二者对 PrV 侵袭神经系统及其传播起着一定的作用,但它们无共同的抗原决定簇。

Knapp 等将牛疱疹病毒 I 型(BHV-1) gE 和 gI 基因整合于 gE、gI 双缺失 PrV 突变株的 gG 位点进行表达,研究发现, gE、gI 双基因缺失的 PrV 病毒丧失的毒力因 BHV-1 gE 和 gI 基因的整合而恢复,这表明 gE、gI 蛋白不依赖于病毒宿主的固有毒力因子(Knapp, et al., 1997)。这对发展 PrV 基因缺失和重组活载体疫苗具有积极的指导意义。

(3) gG 糖蛋白

gG 基因是 PrV 的非必需基因,位于 PrV 基因组 *Bam*H I-7 片段上,长 1 497 bp,编码 498 个氨基酸,GC 含量高达 70% 以上。gG 基因属于晚期基因,其启动子较强,属于 β 级启动子。gG 蛋白是病毒增殖中大量释放的一种糖蛋白,并不是病毒的结构蛋白,成熟的病毒没有 gG 蛋白存在,其可聚集于感染细胞的培养基中。在靠近 gG 基因 C 端处,一些疏水氨基酸后紧跟着一些亲水氨基酸的区域很像是一个外膜蛋白的跨膜和胞质结构域,可以认为 gG 不是一个真正的分泌蛋白而是通过蛋白水解作用消除了这两个结构域后释放到胞外培养基中的。gG 蛋白对于病毒的吸附、侵入以及细胞到细胞的扩散均是非必需的,目前尚不知其作用(Thomsen D R, et al., 1987)。

1.1.3 毒力相关基因

PrV 的毒力是由多个基因决定的,在 UL 区的毒力相关基因较多,有 UL10 (gM), UL13, UL21, UL23, UL39/40, UL44 (gC), UL50。US 区的毒力基因有: US3 (PK), US7 (gI), US8 (gE)。这些基因共同控制着 PrV 的毒力,所以某些单独基因的缺失不足以引起明显的毒力降低。但是, PK 基因和 TK 基因的缺失却可以使

PrV 的毒力下降,尤其是 TK 基因的缺失对 PrV 的毒力影响最为显著。

1. PK 基因

PK 基因位于 US3 区,PK(蛋白激酶)在体外具有对病毒粒子的一种磷蛋白的磷酸化作用,而这种磷蛋白对病毒有效繁殖是必需的。不表达 PK 的突变株对猪的毒力减弱(Kimman T G,1994),而不影响 PrV 的免疫力(Kimman T G, et al., 1992)。最近的研究表明 PK 还可以在感染后期抑制 PrV 诱导的 ST 细胞的凋亡,这更加有利于病毒的繁殖(Geenen K,2005)。

2. TK 基因

TK 基因位于 PrV 的 UL23 区,全长 894 bp,共编码 297 个氨基酸。TK 基因是 PrV 的重要毒力基因之一,其编码的胸苷激酶参与病毒的复制和潜伏感染,对病毒在宿主中枢神经系统中的复制有重要作用(Van Oirschot J T, et al., 1990),TK 毒力基因的失活可使 PrV 对猪和反刍动物的毒力大大降低,同时降低该病毒潜伏感染的能力,并且不影响病毒在组织培养中的增殖,所以几乎所有的 PrV 基因缺失苗都存在着 TK 基因的缺失。

1.2 重组伪狂犬病病毒活载体研究进展

PrV 基因工程疫苗已在亚单位疫苗、DNA 疫苗、基因缺失疫苗等几个层次上进行了大量的研究,取得了许多令人鼓舞的阶段性成果。基因工程缺失疫苗已经在世界上一些国家推广应用,对预防伪狂犬病的流行起了关键性作用。伴随 PrV 基因组结构和功能、基因表达调控及其诱导机体免疫应答机理的揭示,构建新的缺失突变株疫苗和发展双价或多价载体疫苗将是今后 PrV 基因工程疫苗发展的主要方向,因此构建一个高效的伪狂犬病病毒转移载体是得到成功而且实用的重组病毒活载体苗的关键。

PrV 基因组中含有多个非必需基因,如:gC,gE,gG,gI 和 gM 等糖蛋白基因;胸苷激酶(TK)基因;核苷酸还原酶(RR)基因;蛋白激酶(PK)基因等毒力有关基因;插入的外源基因总量从理论上讲,可达到 40 kb。

1.2.1 TK 基因缺失活载体的研究进展

TK 基因的缺失可以影响 PrV 在宿主神经系统中的复制,降低病毒的潜伏感染