

利用 BrdU 在 CEF(TK<sup>-</sup>) 细胞中筛选 TK 重组鸡痘病毒

郭志儒, 金宁一, 方厚华, 罗 坤, 夏志平, 殷 震 (解放军军需大学 军事兽医研究所, 吉林 长春 130062)

**摘要:** 将新城疫病毒 (NDV) 四平株 HN 基因, 插入不含报告基因, 以 TK 为侧翼的鸡痘病毒表达载体 pUTA-2 中的复合启动子下游, 获得重组表达质粒 pUTA-2HN。将重组表达质粒转染鸡痘病毒 (FPV) 感染的鸡胚成纤维细胞 (CEF), 培养, 收获病毒后, 用含 40 mg/L 5-溴-2-脱氧尿嘧啶 (BrdU) 的培养液, 在 CEF(TK<sup>-</sup>) 细胞中筛选培养 2 代, 然后用不含 BrdU 的培养液进行病毒蚀斑纯化, 成功筛选出表达 NDV HN 蛋白的 TK<sup>-</sup> 重组鸡痘病毒。

**关键词:** BrdU; 鸡痘病毒; TK 基因; 重组病毒

**中图分类号:** S852.65 **文献标识码:** A **文章编号:** 1005-4545(2001)06-0543-03

重组鸡痘病毒 (rFPV) 的构建和筛选大多基于重组痘苗病毒 (rVV) 的构建和筛选技术。由于痘病毒胸苷激酶 (TK) 基因是病毒生长的非必需基因, 因此, TK 基因作为外源基因的插入位点已用于多种重组痘病毒的构建<sup>[1]</sup>。在 rVV 的筛选方法中, 应用 5-溴-2-脱氧尿嘧啶 (5-bromo-2'-deoxy-uridine, BrdU) 和哺乳动物 TK<sup>-</sup> 细胞系, 筛选由于在痘苗病毒 (VV) TK 基因中插入外源基因而导致的 TK<sup>-</sup> 表型的 rVV 是最常用的方法之一<sup>[2]</sup>。但是, 由于目前缺少禽类的 TK<sup>-</sup> 细胞系, 而 FPV 又不能在哺乳动物 TK<sup>-</sup> 细胞系中复制产生有感染性的病毒粒子, 因此, 用筛选 TK<sup>-</sup> rVV 的方法来筛选 TK<sup>-</sup> 的 rFPV 被认为是不可能的<sup>[3]</sup>。但 Nazerian 等<sup>[4]</sup>和 Parks 等<sup>[5]</sup>在研究以 TK 基因为插入位点的 rFPV 和由不同方式重组产生的 rFPV 的稳定性时发现, 单变换 (single cross-over) 重组产生的携带完整 TK 基因的 rFPV, 用含 BrdU 的培养基, 在 TK<sup>-</sup> 的 CEF 细胞上也不能生长形成蚀斑。因此, 本研究利用 TK<sup>-</sup> 的 CEF 细胞, 尝试用 BrdU 筛选以 TK 基因为外源基因插入位点的 TK<sup>-</sup> rFPV, 成功地筛选出了表达 NDV HN 蛋白的 TK<sup>-</sup> rFPV。

## 1 材料与方 法

**1.1 材料** 所用病毒为我国 FPV 鹤鹑化弱毒 282E4 株。细胞为用 SPF 鸡胚 (购自中国农科院哈尔滨兽医研究所) 按常规方法制备的 CEF 原代细胞, 采用含 2% 犊牛血清的 MEM 培养液, 37℃、5% CO<sub>2</sub> 条件下培养。

BrdU 购自 Boehringer Mannheim 公司。转染试剂 DOTAP Liposomal 购自 GIBCO-BRL 公司。抗 NDV HN 蛋白的单克隆抗体由扬州大学农学院惠赠。碱性磷酸酶标记的抗鼠 IgG 购自 Promega 公司。

质粒 pUTA-2, 由作者构建<sup>[6]</sup>, 即在 FPV 282E4 株 TK 基因中插入痘病毒复合启动子 (由牛痘病毒 A 型包涵体启动子和 20 个串联的痘病毒突变型 P7.5 早期启动子先后串联构成) 构成。其余质粒由作者所在实验室保存。

**1.2 重组表达质粒的构建** 用 XbaI 和 BamHI 消化含有

NDV 四平株 HN 基因的质粒 pKSPHN, 回收 NDV HN 基因, 用 Klenow 补平末端, 然后将其插入质粒 pUTA-2 中的复合启动子下游的 SmaI 位点, 限制性内切酶酶切、琼脂糖凝胶电泳筛选鉴定 HN 基因正向插入的重组表达质粒。

**1.3 细胞转染、同源重组及病毒 PFU 测定** 常规方法制备 CEF 原代细胞, 以  $1 \times 10^5$  个 / mL 继代于 6 孔细胞培养板中, 每孔 3 mL, 待细胞长至 70% ~ 80% 单层时, 吸去培养液, PBS 洗细胞 2 次, 然后按 0.2 PFU / 个接种 FPV 282E4 株, 37℃ 吸附 1~1.5 h。其间将 10~20 μg 构建的重组表达质粒稀释到 50 μL 无血清 MEM 中, 将 20 μL DOTAP 转染试剂稀释到 100 μL 无血清的 MEM 中, 按 DOTAP Liposomal 使用说明, 将稀释好的质粒与 DOTAP 转染试剂轻轻混匀, 室温放置 30 min 以上。待病毒吸附后, 吸去培养孔中的病毒液, 将质粒与转染试剂的混合液用无血清 MEM 补至体积 1 mL, 加到已被 FPV 感染的细胞上, 37℃、5% CO<sub>2</sub> 培养 14~18 h。然后每孔补加 2 mL 含 2% 犊牛血清的 MEM 培养液, 继续培养 32~56 h, 收获病毒, 用 CEF 细胞按常规方法测定病毒的 PFU。

**1.4 TK<sup>-</sup> 病毒的筛选** 首先在 6 孔培养板中制备 CEF 单层, 在接种病毒前 24 h 用含 40 mg/L BrdU 的 MEM 培养液培养, 设 1 个不加 BrdU 的培养孔作对照。然后以 2 PFU / 个量接种转染后收获的病毒, 37℃ 吸附 1.5 h 后, 再用含 40 mg/L BrdU 的培养液继续培养, 观察细胞病变 (CPE)。接毒后 120 h, 收获感染病毒的细胞, 冻融 3 次后, 将病毒按上述方法再传 1 代。然后将病毒接种于 CEF 细胞, 用无 BrdU 的营养琼脂糖 (由含 4% 犊牛血清的 2× MEM 培养液与 1% 琼脂糖按体积比 1:1 混合而成) 培养, 挑选单个病毒蚀斑, 进行 2 次蚀斑纯化后扩增病毒。

**1.5 表达 HN 蛋白的重组病毒鉴定** 将 1.4 中挑取的单个病毒蚀斑纯化、扩增后, 测定病毒 PFU, 以 5 PFU / 个接种于 CEF 单层细胞, 感染后 36~40 h 收获细胞, 用细胞裂解液 (10 mmol/L Tris-HCl, pH 7.4~8.0, 1 mmol/L MgCl<sub>2</sub>, 0.5% NP-40, 20 mg/L Dnase I) 裂解后, 对细胞总蛋白作 SDS-PAGE 和 Western blot 分析, 检测 HN 蛋白的表达。

## 2 结 果

**2.1 重组质粒的构建** 将 NDV HN 基因插入质粒 pUTA-2 中的 SmaI 位点, 得到重组质粒 pUTA-2HN。其构建策略如

收稿日期: 2000-10-14

基金项目: 国家“863”计划资助项目 (101-05-03-01)

作者简介: 郭志儒 (1968-), 男, 助理研究员, 博士。

图 1 所示。

**2.2 BrdU对 TK<sup>+</sup>和 TK<sup>-</sup>病毒复制的抑制作用** 用不含 BrdU的培养液培养的 CEF细胞,在接种转染收获的病毒后 48 h,即出现明显的 CPE 而用含 BrdU的培养液预处理、培养的 CEF细胞,接种病毒后 72~96 h时,也不出现明显 CPE 延长培养时间至 120~150 h时,有局限的 CPE产生(由 TK<sup>-</sup>FPV所致)。

**2.3 重组病毒的筛选鉴定** 见图 2 将筛选、蚀斑纯化、扩增后的病毒接种于 CEF单层细胞,36~48 h后收获,将全细胞裂解物作 SDS-PAGE和 Western blot检测,分别得到了 3株表达 NDV 四亚株 HN蛋白的 rFPV,同时也检测到 1株不表达 HN蛋白的 FPV。

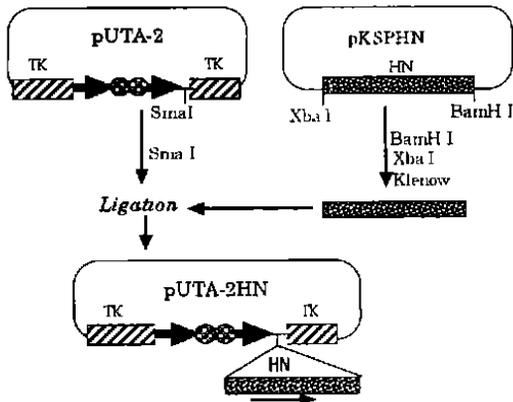


图 1 重组表达质粒的构建



图 2 rFPV的 Western blot鉴定 1. FPV 282E4; 2, 3, 5. rFPV; 4. TK<sup>-</sup>mutant

### 3 讨论

重组 DNA技术使人们可以根据不同的目的在痘病毒基因组中插入多种外源基因。为了筛选表达外源基因的重组病毒,人们在病毒基因组中插入外源基因的同时,往往又插入一些筛选标志基因(报告基因),如插入抗生素基因<sup>[7]</sup>,或可形成不同病毒蚀斑颜色的报告基因等<sup>[8]</sup>。报告基因的应用,大大减少了筛选重组病毒的工作量。但是,在得到的重组病毒基因组中,除所需要的目的基因外,又都同时携带了这些报告基因,而其中的某些报告基因又给重组病毒作为疫苗应用带来许多弊端,如携带抗生素基因的重组病毒免疫动物,会使动物产生相应抗药性;携带大肠杆菌 lacZ基因的重组病毒免疫动物,可能由于 lacZ基因的表达而干扰重组病毒的免疫效果。所以,人们往往在通过报告基因的表达得到重组病毒后,又利用反向筛选等方法去除报告基因,或直接寻找不用报告基因来

筛选重组病毒,其中用 BrdU在哺乳动物 TK<sup>-</sup>细胞上来筛选 TK<sup>-</sup>表型的 rVV是最常用的方法之一。

TK基因编码胸苷激酶,其催化外源性胸腺嘧啶核苷,参与核酸合成,但 TK不是痘病毒生长所必需的。BrdU为胸腺嘧啶核苷类似物,其被 TK催化利用后,作为胸腺嘧啶核苷的替代物被掺入病毒基因组,使病毒核酸合成不能继续。所以在有 BrdU存在下,只有 TK<sup>-</sup>病毒能够复制。CEF细胞为 TK<sup>+</sup>细胞,理论上其核酸合成同样受到 BrdU的抑制作用,但仍能在有 BrdU的培养基中维持生长。我们认为可能是因为首先在无 BrdU的情况下,将 CEF细胞培养成单层后,再用 BrdU处理,这样 CEF细胞是在一种无细胞分裂的状态下维持细胞的基本生理功能(无 DNA的合成),因此,对 BrdU不太敏感。另一个原因可能是 CEF细胞的 TK不如 FPV的 TK对 BrdU的利用率,使细胞能够在有 BrdU的情况维持生长。

本研究成功地筛选到了表达 NDV HN蛋白的 rFPV,说明即使在 TK<sup>+</sup>细胞上,仍能使 TK<sup>-</sup>的 FPV的复制受到抑制,使 TK<sup>-</sup>的 rFPV筛选出来。这种方法不受 TK<sup>+</sup>细胞系的限制,因此可以在以 TK基因为插入位点的其他重组病毒的筛选中尝试。由于 FPV同源重组率很低,只有 0.00%左右<sup>[4,9]</sup>,因此用这种方法在以 TK基因为插入位点的 rFPV构建和筛选上,可以大大减少工作量。同时由于这种方法筛选得到的重组病毒不含有目的基因外的其他基因,在 rFPV作为疫苗使用上优于用报告基因筛选得到的 rFPV。

在含有 BrdU和不含 BrdU的培养液中培养 FPV,在感染 48 h后,不含 BrdU的 CEF细胞出现由于 FPV复制产生的 CPE,而用含有 BrdU的培养液培养的 FPV感染的 CEF细胞,直到感染后 120 h左右,才有可见的局限的 CPE产生。这说明 BrdU对 TK<sup>+</sup>和 TK<sup>-</sup>的 FPV的复制都有抑制作用,只不过 TK<sup>+</sup>病毒不能复制,而 TK<sup>-</sup>病毒虽然在 BrdU存在下复制率下降,但仍能复制,所以延长培养时间后,仍有局限的 CPE产生。可能是由于病毒复制要利用宿主细胞的营养成分,而 BrdU对 CEF细胞的一些正常生理功能的影响干扰了 TK<sup>-</sup>FPV在细胞中的复制。

在 TK<sup>-</sup>细胞系中,用含 BrdU的培养基筛选 TK<sup>-</sup>重组 VV时,有不表达外源蛋白的 TK<sup>-</sup>突变体产生<sup>[2,10]</sup>。本研究将转染后收获的病毒在 BrdU选择压力下传代 2次,从中筛选出来的 TK<sup>-</sup>病毒也有的不表达目的蛋白。同时,试验还发现,将亲体 FPV 282E4株在 BrdU选择压力下传代 2次,也有个别病毒能够形成蚀斑。这说明 FPV与 VV一样,TK<sup>-</sup>病毒在 BrdU选择压力下能够发生 TK<sup>-</sup>突变,或者在亲本 FPV中有 TK<sup>-</sup>突变体。因此,用这种方法筛选得到的 TK<sup>-</sup>病毒,不一定都能表达目的蛋白,所以必须进一步确认目的蛋白的表达。

研究中还发现,用含 BrdU的培养液培养筛选得到的 TK<sup>-</sup>病毒,在不含 BrdU的培养液中培养第 1代时,与不用 BrdU处理的亲本毒株相比,在形成蚀斑速度上慢于亲本株,同等时间内形成的蚀斑也小于亲本株形成的蚀斑。从第 2代开始这种差别变得不明显,似乎 TK<sup>-</sup>病毒的复制,从有 BrdU到无 BrdU的培养液中培养,存在着一个恢复和适应过程,其具体的机制有待进一步研究。

参考文献:

- [1] Moss B. Genetically engineered poxviruses for recombinant gene expression, vaccination, and safety[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 1996, 93: 11 341~ 11 348.

- [2] Mackett M, Smith G L, Moss B. General method for production and selection of infectious vaccinia virus recombinants expressing foreign genes [J]. *J Virol*, 1984, 49: 857- 864.
- [3] Boyle D B, Coupar B E H. Construction of recombinant fowlpox viruses as vectors for poultry vaccine [J]. *Virus Res*, 1988, 10: 343- 356.
- [4] Nazeian K, Dhawale S. Structural analysis of unstable intermediate and stable forms of recombinant fowlpox virus [J]. *J Gen Virol*, 1991, 72: 2791- 2795.
- [5] Parks R J, Krell P J, Derbyshire B, *et al.* Studies of fowlpox virus recombination in the generation of recombinant vaccines [J]. *Virus Res*, 1994, 32: 283- 297.
- [6] 郭志儒, 金宁一, 王兴龙, 等. 鸡痘病毒 282E4 株表达载体的构建及新城疫病毒 F 蛋白的表达 [J]. *中国兽医学报*, 2000, 20 (5): 423- 428.
- [7] Boyle D B, Coupar B E H. A dominant selectable marker for the construction of recombinant poxviruses [J]. *Gene*, 1988, 65: 123- 128.
- [8] Chakrabarti S, Brechling K, Moss B. Vaccinia virus expression vector: coexpression of  $\beta$ -galactosidase provides visual screening of recombinant virus plaques [J]. *Mol Cell Biol*, 1985, 5: 3403- 3409.
- [9] Spehner D, Drillien R, Lewcq J. Construction of fowlpox virus vectors with intergenic insertions: expression of the beta-galactosidase gene and the measles virus fusion gene [J]. *J Virol*, 1990, 64: 527- 533.
- [10] Mackett M, Smith G L, Moss B. Vaccinia virus: A selectable eukaryotic cloning and expression vector [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1982, 79: 7415- 7419.

## Selection of TK<sup>-</sup> Recombinant Fowlpox Virus in CEF Cell (TK<sup>-</sup>) in the Presence of BrdU

GUO Zhi-ru, JIN Ning-yi, FANG Hou-hua, LUO Kun, XIA Zhi-ping, YIN Zhen

(The Military Veterinary Institute, Quartermaster University of PLA, Changchun 130062, China)

**Abstract** A recombinant expression plasmid pUTA-2HN was constructed by inserting the HN gene of Newcastle disease virus (NDV) strain Siping, into the SmaI site downstream of a hybrid poxvirus promoter which is flanked by the TK gene of fowlpox virus (FPV) strain 282E4. For production and selection recombinant fowlpox virus expressing the HN gene of NDV and without containing additional reporter gene, the constructed pUTA-2HN was firstly transfected into chicken embryo fibroblast (CEF) cells preinfected with FPV strain 282E4, then the viruses resulted from the transfection were selected for 2 passages by culturing in CEF cells with MEM medium containing 40 mg/L 5-bromo-2'-deoxy-uridine (BrdU). The selected viruses were plaque-purified in CEF cells cultured with MEM media without BrdU. After Western blot analysis the lysate of CEF cells which were infected by the purified FPV, recombinant FPVs (rFPVs) expressing the HN protein were obtained. This indicated that rFPVs containing a foreign gene interrupted TK gene (TK<sup>-</sup>) could be selected in the CEF(TK<sup>-</sup>) cell in the presence of BrdU.

**Key words** BrdU; fowlpox virus; TK gene; recombinant virus

## 解放军军需大学博士后科研流动站招生

中国人民解放军军需大学隶属于解放军总后勤部,位于吉林省长春市。学校历经解放军兽医大学-农牧大学-军需大学 3 个阶段的建设发展,已形成雄厚的教学、科研实力,拥有一大批国内外知名专家和中青年学者。现承担国家、军队级以上科研课题 130 余项,科研经费累计达 3 700 多万元。为发挥学校办学优势,加强学术交流,现面向军内外招收博士后科研人员。

### 一、设站学科及专业

(一)生物学 设站专业:生物化学与分子生物学

(二)兽医学 设站专业:1. 预防兽医学 2. 基础兽医学 3. 临床兽医学

二、进站条件 符合做博士后申请资格,身体健康,年龄在 40 周岁以下。自觉执行党的路线、方针、政策,坚持四项基本原则,崇尚科学。

三、进站待遇 根据国家人事部、博士后管理委员会以及军队有关规定确定工资待遇,一般略高于同期博士毕业未做博士后研究人员。另外享受每人每月 100 元博士后生活补助和我校其他一切福利待遇。学校设有博士后公寓,优先解决子女入学、入托。

### 四、联系方式

通信地址:吉林省长春市西安大路 175 号军需大学干部处 邮政编码:130062

联系人:杨传社 邵俊涛

联系电话:0431-7983164,0431-7973911 转 86222(地方线);0321-86222(军线)

欢迎来函索取简章。