

张华伟, 周明光, 侯真真, 等. 基于 CRISPR/Cas9 介导的同源重组技术构建 TK、gE 和 gI 基因缺失的伪狂犬病病毒[J]. 华中农业大学学报, 2020, 40(2): 206-212. DOI: 10.13300/j.cnki.hnlkxb.2021.02.022

基于 CRISPR/Cas9 介导的同源重组技术构建 TK、gE 和 gI 基因缺失的伪狂犬病病毒

张华伟, 周明光, 侯真真, 朱娴静, 郝根喜, 金建云, 徐高原

武汉科前生物股份有限公司研发中心, 武汉 430200

摘要 为构建 TK、gE 和 gI 基因缺失的伪狂犬病病毒(pseudorabies virus, PRV), 采用 CRISPR/Cas9 介导的同源重组技术, 对从湖北某猪场送检的病料中分离到的 PRV HB2017 株进行基因编辑, 并利用蚀斑纯化等方法获取基因缺失株。随后, 采用 PCR、基因测序、间接免疫荧光试验、生长曲线测定及安全性和效力试验对基因缺失株的特性进行初步研究。结果显示: PRV HB2017 株的 TK、gE 和 gI 基因已缺失, 缺失毒株 PRV HB2017 Δ TK Δ gE/gI 与亲本毒株 PRV HB2017 株在 PK-15 细胞中的生长曲线差异不明显且具有较高的病毒滴度; PRV HB2017 Δ TK Δ gE/gI 株传代至 30 代, TK 和 gE/gI 基因缺失部分序列稳定, 不能恢复; PRV HB2017 Δ TK Δ gE/gI 株对仔猪是安全的; 将该基因缺失株以 $10^{6.0}$ TCID₅₀ 和 $10^{7.0}$ TCID₅₀ 的病毒剂量接种仔猪, 可保护仔猪免受 $10^{8.0}$ TCID₅₀ 病毒剂量强毒的攻击。

关键词 伪狂犬病病毒; CRISPR/Cas9; 同源重组; 基因缺失; 基因工程疫苗; 病毒编辑; 疫苗研制

中图分类号 S 852.65⁺1 **文献标识码** A **文章编号** 1000-2421(2021)02-0206-07

伪狂犬病(pseudorabies, PR)是由伪狂犬病毒(pseudorabies virus, PRV)引起的一种急性传染病, 其主要特征为患病动物体温升高、打喷嚏、呼吸困难和神经系统障碍^[1]。猪是 PRV 的天然宿主和主要传染源。PRV 可引起妊娠母猪流产、死胎, 公猪不育, 仔猪死亡, 育肥猪呼吸困难、生长停滞等, 养殖场一旦暴发伪狂犬病, 就会造成巨大的经济损失。

目前, 防制和净化 PR 的主要策略仍是接种疫苗。灭活疫苗和传统减毒活疫苗对早期 PR 的防控起到了一定的积极作用, 尤其是 Bartha-K61 株弱毒疫苗, 在 2011 年前对我国 PR 的防控起到了关键性作用。但灭活疫苗存在接种剂量大、免疫期短和免疫途径单一等缺点; 传统弱毒活疫苗存在毒力返强、运输和保存条件受限等缺点。为此, 研究人员进行了基因工程疫苗的研制, 例如基因缺失弱毒疫苗、亚单位疫苗、嵌合疫苗, 其中基因缺失弱毒疫苗相对成熟, 我国研究人员已成功研制了一批具有自主知识产权的、技术先进并且效果良好的基因缺失弱毒疫苗^[2-4]。

基因缺失弱毒疫苗主要是通过分子生物学的手段, 对 PRV 基因组中毒力基因的若干碱基进行删除, 使基因彻底失活。以往研制基因缺失弱毒疫苗主要是采用同源重组的方法, 重组效率非常低, 后期也需要花费大量的时间进行纯化。CRISPR/Cas9 技术是最近几年在研究领域极其热门的技术^[5], 被广泛应用于病毒编辑、疫苗研制等方面。2016 年, Tang 等^[6]利用 CRISPR/Cas9 技术成功构建了 TK、gE 和 gI 基因缺失的伪狂犬病病毒。CRISPR/Cas9 虽然具有同时敲除多个基因, 或者多个 sgRNA 靶向一个基因的优势, 但是仍存在脱靶、精准修复率低以及后期需要在蛋白水平上多次验证的问题。DNA 双链断裂后, 通常以 2 种方式进行修复: 非同源末端连接和同源介导的双链 DNA 修复^[7]。CRISPR/Cas9 系统导致的双链断裂通常以非同源末端连接的方式进行修复, 通过同源介导的双链 DNA 修复方式修复的比例不足 10%^[8-9]。因此, 很难按照研究者的意愿进行精确地定点编辑。CRISPR/Cas9 介导的同源重组技术是以 CRISPR/

收稿日期: 2020-05-11

基金项目: 武汉市科技计划项目(2019020702011378); 武汉东湖高新区“3551 光谷人才计划”; 湖北省技术创新专项重大项目(2017ABA056)

张华伟, E-mail: 13523496906@163.com

通信作者: 徐高原, E-mail: KQyanfa@163.com

Cas9为媒介将DNA双链断裂开,然后使用同源重组的方法,将转入细胞的序列补在缺口上,从而完成基因组的编辑^[10]。该技术使用转移质粒将同源序列转入到细胞中,可提高同源介导的双链DNA修复的比例,弥补CRISPR/Cas9技术精确修复率低和同源重组技术重组效率低等问题,大幅提高基因编辑的效率,缩短疫苗的研发周期,使疫苗更好地预防当前流行毒株,达到最佳的免疫效果。

2011年,猪的伪狂犬病在我国再度流行,很多免疫Bartha-K61株伪狂犬病弱毒疫苗的猪场也出现了疫情,并且表现出典型的伪狂犬病临床症状,研究表明出现了新的、致病力更强的伪狂犬病病毒变异毒株^[11]。因此有必要以当前流行的PRV变异毒株为基础,研制新的伪狂犬病病毒基因缺失弱毒疫苗。

1 材料与方法

1.1 试验材料

pX335质粒、pBluescript II-SK(+)质粒、pcDNA3.1(+)质粒购自Addgene公司;限制性内切酶、pMD18-T载体购自TaKaRa公司;FastDigest Bpil购自Thermo scientific公司;T4 PNK购自NEB(北京)有限公司;胶回收试剂盒和DNA提取试剂盒购自天根公司;质粒提取试剂盒购自北京全式金生物技术有限公司;病毒核酸DNA/RNA提取试剂盒(柱提法)由武汉科前生物股份有限公司提供;脂质体转染试剂Lipofectamine 2000 Reagent购自Invitrogen公司;DNA抽提液购自广州捷倍斯生物科技有限公司;PRV gB和gD单克隆抗体由武汉科前生物股份有限公司研发中心制备;Alexa Fluor 488标记山羊抗小鼠IgG(H+L)购自上海碧云天生物技术有限公司;胎牛血清(FBS)、DMEM购自Gibco公司;PRV HB2017株由武汉科前生物股份有限公司研发中心在湖北某猪场的病料中分离所得;猪肾细胞(PK-15)、猪睾丸细胞(ST细胞)购自美国标准菌种收藏中心;21日龄的伪狂犬病病毒阴性仔猪购于湖北武汉某猪场。

1.2 病毒基因组提取

提前24 h将PK-15细胞传代于T25细胞培养瓶中,然后将病毒以1 MOI(multiplicity of infection, MOI)感染剂量接种于细胞,待细胞出现80%病变时,弃去细胞培养液,加1 mL的细胞裂解液,均匀晃动使所有细胞裂解,冰中放置20 min,倾倒

至2 mL EP管中。逐滴加入660 μ L的5 mol/L NaCl,轻轻混匀后,置于冰上5 h或置于4 $^{\circ}$ C冰箱过夜。4 $^{\circ}$ C 12 000 r/min离心30 min。用剪去尖端的枪头吸取上清于新的2 mL EP管中,加入等体积的DNA抽提液,轻轻上下颠倒EP管5 min,4 $^{\circ}$ C 12 000 r/min离心10 min,重复利用DNA抽提液抽提蛋白3次。换1.5 mL的EP管,最后的上清液加入预冷的2倍体积的无水乙醇,轻柔混匀,-20 $^{\circ}$ C静置2 h或过夜。4 $^{\circ}$ C 12 000 r/min离心10 min,弃上清,沉淀加入预冷的75%的无水乙醇,4 $^{\circ}$ C 12 000 r/min离心10 min洗涤2遍。弃上清,4 $^{\circ}$ C 12 000 r/min离心1 min,吸取残余液体,风干后加入15 μ L的去离子水溶解基因组,4 $^{\circ}$ C保存备用。

1.3 CRISPR/Cas9 sgRNA质粒的构建

将病毒基因组序列输入sgRNA在线设计网站(<http://crispr.mit.edu>),寻找有PAM(NGG)的sgRNA序列,选择脱靶率最低的sgRNA,将其克隆至pX335载体^[12],sgRNA序列如表1所示。

表1 用于靶向病毒相关基因的sgRNA序列

Table 1 sgRNA sequences for targeting virus-related genes

引物名称 Primer name	引物序列(5'-3') Sequences(5'-3')
sg-TK-F	CACCGCGCTTGTACGCGCCGAAGA
sg-TK-R	AAACTCTTCGGCGCGTACAAGGCGC
sg-gE/I-F1	CACCGGGCAGGAACGTCCAGATCC
sg-gE/I-R1	AAACGGATCTGGACGTTCTGCCCC
sg-gE/I-F2	CACCGTCGTGCCACGATCCGACGAC
sg-gE/I-R2	AAACGTCGTGGATCGTGGCAGCAC

1.4 转移质粒pcDNA3.1- Δ TK和pSK- Δ gI Δ gE的构建

以PRV HB2017株基因组为模板扩增TK和gI/gE基因部分序列,然后将其连接到pMD18-T载体上,随后依次酶切连接到pcDNA3.1(+)或pBluescript II-SK(+)载体上,用以构建转移质粒pcDNA3.1- Δ TK和pSK- Δ gI Δ gE。其中,TK左右同源序列间插入猴空泡病毒40(sv40)poly A序列;扩增引物序列如表2所示。

1.5 重组病毒的构建

PK-15细胞传代于6孔细胞板中,细胞汇合度达80%~90%时进行转染。将2 μ g同源臂转移质粒、2 μ g sgRNA和病毒基因组(约2 μ g)加入到150 μ L Opti-MEM中,轻轻混匀,与此同时,将12 μ L LiP2000 DNA转染试剂加入到150 μ L Opti-MEM

表 2 与转移质粒构建相关的引物序列

Table 2 Primer sequences related to transfer plasmid construction

引物名称 Primer name	引物序列(5'-3') Sequences(5'-3')
TK-L- <i>Hind</i> Ⅲ-F	CCCAAGCTTCGGCAGAGCACCACGGC- CCGGGTG
TK-L- <i>Xho</i> I-R	CCCTCGAGCCAGCATGGCGTAGACGTT- GCGCAG
TK-R- <i>Xho</i> I-F	CCGCTCGAGGTGCACGCGTGGGCGATG- GACGCGC
TK-R- <i>Xba</i> I-F	CCCTTAGACCTCCAGCGGCAGGAAG- GAGCGCAG
Sv40 poly A- <i>Xho</i> I-F	CCTCGAGCGTTAAGATACATTGATGAG
Sv40 poly A- <i>Xho</i> I-R	GCTCGAGCCAGCATGGCGTAGA
gI- <i>Xho</i> I-F	CCGCTCGAGCGTCGACGGCGTGAA- CATCCTCACC
gI- <i>Hind</i> Ⅲ-R	CCCAAGCTTCCAGGGCCGTCAGCA- CAAAGAGGTCC
gE- <i>Hind</i> Ⅲ-F	CCCAAGCTTGGACGACGGGCTGTACGT- GCGCCCCGAG
gE- <i>Eco</i> RI-R	CGGAATTCGGTTCGGCGCGCCAG- GATCCACAGGT

表 3 重组病毒鉴定引物

Table 3 Recombinant virus identification primers

引物名称 Primer name	引物序列(5'-3') Sequences(5'-3')	扩增片段大小 Amplified fragment size
gE/gI_ide-F	GATAGACGGGACGCTGCTGTT	缺失型 663 bp;野生型 2 971 bp The deletion type is 663 bp,the wild-type is 2 971 bp
gE/gI_ide-R	TCGTTGTCGCTCTCGCTGTA	
TK_ide-F	GCTTCATCGTCGGGACATCAG	缺失型 583 bp;野生型 433 bp The deletion type is 583 bp, the wild-type is 433 bp
TK_ide-R	GCCACGAGCGCTCCATC	

细胞出现病变时,弃去培养基,PBS 洗涤 3 遍后,丙酮 4 °C 固定 30 min,2% BSA 37 °C 封闭 1 h,然后用 PBS 洗涤 3 遍。随后 3 组细胞中的 5 个孔加入 100 μ L gB 单克隆抗体(1:500 稀释),另外 5 个孔加入 100 μ L gE 单克隆抗体(1:500 稀释),37 °C 孵育 1 h;PBS 洗涤 3 遍后,加入 50 μ L 羊抗鼠 IgG(1:300 稀释),37 °C 孵育 45 min;PBS 洗涤 3 遍后,置于荧光显微镜下观察。

1.8 重组病毒遗传稳定性测定

重组病毒 PRV HB2017 Δ TK Δ gE/gI 株在 PK-15 细胞上连续传代,选取第 5、10、15、20、25 和 30 代病毒,使用引物 gE/gI_ide-F/R 和 TK_ide-F/R 对缺失基因的部分序列进行 PCR 扩增,并将 PCR 产物送至武汉擎科生物公司测序。

中,轻轻混匀,5 min 内将转染试剂混合液加入到质粒混合液,轻轻混匀,室温孵育 20 min,在此期间,将待转染的细胞用不含血清的 DMEM 洗涤 2 次,加 1.7 mL 不含血清的 DMEM,随后,将转染复合物均匀地滴加到 6 孔细胞板中。转染 12 h 后更换成含 5% FBS 的 DMEM,将培养板继续放于 37 °C 细胞培养箱中培养 48~96 h。

1.6 重组病毒的 PCR 鉴定

利用病毒核酸 DNA/RNA 提取试剂盒提取重组病毒的基因组,根据病毒基因缺失位置,利用 Primer 5.0 软件设计引物,然后以重组病毒的基因组为模板进行 PCR 扩增,核酸电泳及测序后进行比较与鉴定,引物序列如表 3 所示。

1.7 重组病毒的间接免疫荧光鉴定

将 ST 细胞接种于 96 孔细胞板中,分为 3 组,每组 10 个孔,待细胞长满单层后,其中 1 组接种重组病毒 PRV HB2017 Δ TK Δ gE/gI 株(MOI=0.01),另外 1 组接种亲本毒株 PRV HB2017 株(MOI=0.01),第 3 组加入 DMEM 作为对照组(Mock)。待 80% 的

1.9 重组病毒一步生长曲线绘制

将 PK-15 细胞以 2×10^5 个/孔传代于 24 孔细胞板中,待细胞贴壁后将病毒以 0.1 MOI 的感染剂量接种细胞,吸附 2 h 后换成含 2% FBS 的培养基继续培养。自接种时起,每隔 6 h 收集 1 次,将细胞培养板置于一 80 °C 冰箱冻融 3 次后收获病毒。采用蚀斑实验和 Reed-Muench 法在 ST 细胞上测定并计算其 TCID₅₀^[13],绘制一步生长曲线。

1.10 重组病毒安全性试验

选取 21 日龄的伪狂犬病毒阴性仔猪(gB 抗体和 gE 抗体均为阴性)15 头;随机分为 3 组,每组 5 头,其中 1 组的仔猪滴鼻接种 PRV HB2017 Δ TK Δ gE/gI 株($10^{7.0}$ TCID₅₀/头),另 1 组的仔猪滴鼻接种 PRV HB2017 株($10^{7.0}$ TCID₅₀/头),第 3 组滴鼻接种 1 mL 的 DMEM 作为对照

组。接种后观察21 d,每天测量体温,观察和记录临床症状。

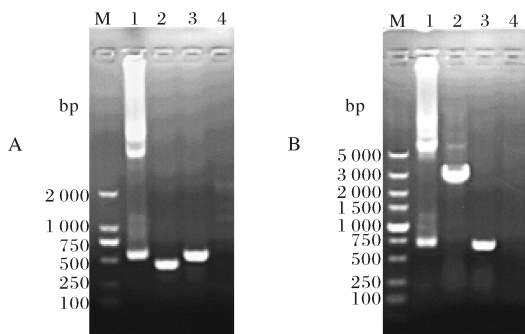
1.11 重组病毒对仔猪的免疫保护力试验

选取21日龄的伪狂犬病病毒阴性仔猪20头(gB抗体和gE抗体均为阴性),随机分为4组,每组5头,隔离饲养。2个免疫组分别肌注PRV HB2017 Δ TK Δ gE/gI株 $1.0 \times 10^{6.0}$ TCID₅₀/头份或 $1.0 \times 10^{7.0}$ TCID₅₀/头份,另2组注射1 mL DMEM,作为攻毒对照组和自然对照组。免疫后第28天,使用PRV HB2017株对2个免疫组和攻毒对照组进行滴鼻攻毒,攻毒剂量为 $1.0 \times 10^{8.0}$ TCID₅₀/头,空白对照组滴鼻1 mL的DMEM,攻毒后观察21 d,每天观察2次,测量体温,记录症状。

2 结果与分析

2.1 PRV 基因缺失病毒 HB2017 Δ TK 株的构建与鉴定

将PRV HB2017基因组、含TK同源臂的转移质粒pcDNA3.1- Δ TK和sgRNA sg-TK共转染到PK-15细胞中,随后利用PK-15细胞进行蚀斑纯化。经过3轮蚀斑纯化后,利用鉴定引物TK_{ide}对重组病毒进行PCR鉴定,PCR产物经1%琼脂糖凝胶电泳后结果显示,HB2017亲本毒株扩增产物大小为433 bp,HB2017 Δ TK毒株和pcDNA3.1- Δ TK质粒扩增产物大小一致,为583 bp(图1A),表明获得了HB2017 Δ TK株。



A和B分别为重组病毒TK、gE/gI基因的鉴定结果,A和B的M泳道分别为DL2 000和DL5 000;1为转移质粒;2为亲本毒株HB2017;3为重组病毒;4为阴性对照。A and B are the identification results of TK and gE/gI genes of recombinant viruses, respectively, and the M lanes of A and B are DL2 000 and DL5 000, respectively. 1 is transfer plasmid, 2 is the parent strain HB2017, 3 is the recombinant virus, and 4 is the negative control.

图1 PCR鉴定重组病毒

Fig.1 Identification of recombinant viruses by PCR

2.2 PRV 基因缺失病毒 HB2017 Δ TK Δ gE/gI 株的构建与鉴定

将重组毒PRV HB2017 Δ TK株基因组、含gE/gI同源臂的转移质粒pSK- Δ gE/gI和sgRNA sg-gE/I-1和sg-gE/I-2共转染到PK-15细胞中,随后利用PK-15细胞进行蚀斑纯化。经过3轮蚀斑纯化后,利用鉴定引物gE/gI_{ide}对重组病毒进行PCR鉴定,PCR产物经1%琼脂糖凝胶电泳后结果显示,HB2017亲本毒株扩增产物大小为2 971 bp,HB2017 Δ TK Δ gE/gI毒株和pSK- Δ gE/gI质粒扩增产物大小一致,为663 bp(图1B)。

将重组病毒HB2017 Δ TK Δ gE/gI和亲本毒株HB2017接种ST细胞,随后利用PRV gB和gE的单克隆抗体进行间接免疫荧光实验。结果发现,用gB单克隆抗体孵育后,接种重组病毒HB2017 Δ TK Δ gE/gI和亲本毒株HB2017的细胞均可观察到绿色荧光,然而用gE单克隆抗体孵育后,只有接种亲本毒株HB2017的细胞可观察到绿色荧光(图2),表明重组病毒中gE基因已有效缺失。以上结果表明,获得了TK、gE和gI基因缺失的PRV基因缺失毒株PRV HB2017 Δ TK Δ gE/gI株。

2.3 重组病毒遗传稳定性测定

为了检测PRV HB2017 Δ TK Δ gE/gI株的遗传稳定性,进行了细胞连续传代试验,将该毒株在PK-15细胞上连续培养30代,每隔5代进行PCR扩增和测序,结果显示PRV HB2017 Δ TK Δ gE/gI株在TK(图3A)和gE/gI(图3B)基因缺失部分非常稳定,不能恢复。

2.4 PRV HB2017 Δ TK Δ gE/gI 株一步生长曲线绘制

通过对重组病毒PRV HB2017 Δ TK Δ gE/gI和其亲本毒PRV HB2017进行生长曲线的测定,发现PRV HB2017 Δ TK Δ gE/gI在6~30 h的病毒滴度略低于其亲本毒PRV HB2017,随后在36~48 h两者无明显差别且进入平台期(图4)。

2.5 PRV HB2017 Δ TK Δ gE/gI 株对仔猪的安全性试验

PRV HB2017 Δ TK Δ gE/gI接种仔猪后,仔猪未表现出体温升高、打喷嚏、厌食、颤抖、共济失调等发病症状,而PRV HB2017接种仔猪后则出现持续高热、打喷嚏、死亡,表明缺失gI、gE、TK基因后的PRV HB2017 Δ TK Δ gE/gI已充分致弱,对仔猪是安全的。

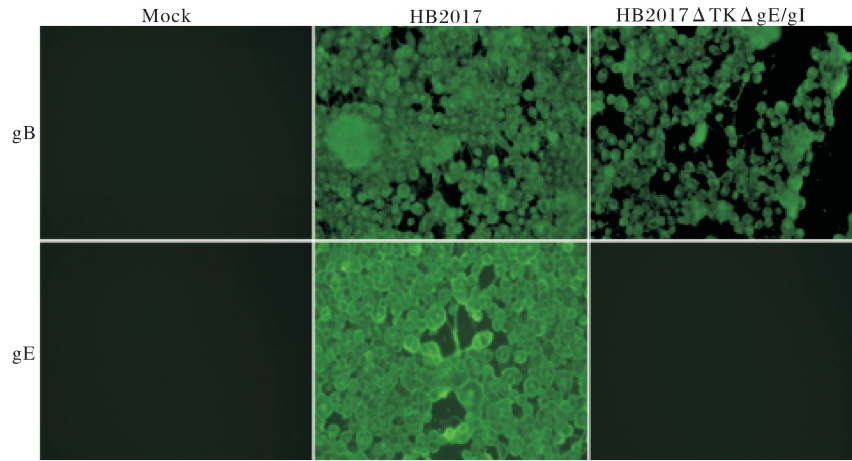
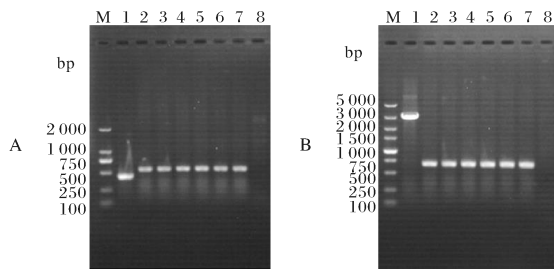


图 2 间接免疫荧光鉴定重组病毒

Fig.2 Identification of recombinant viruses by indirect immunofluorescence



A 和 B 分别为重组病毒 TK、gE/gI 基因的鉴定结果, A 和 B 的 M 泳道分别为 DL2000 和 DL5000; 1 为 PRV HB2017; 2~7 为重组病毒在 PK-15 中传代至 5、10、15、20、25 和 30 代, 收获的病毒; 8 为阴性对照。A and B are the identification results of TK and gE/gI genes of recombinant viruses respectively, and the M lanes of A and B are DL2000 and DL5000 respectively. 1 is PRV HB2017, 2-7 are the virus harvested after the recombinant virus passed to 5, 10, 15, 20, 25 and 30 generations in PK-15, and 8 is the negative control.

图 3 重组病毒在 PK-15 中的遗传稳定性

Fig.3 Genetic stability of recombinant viruses in PK-15

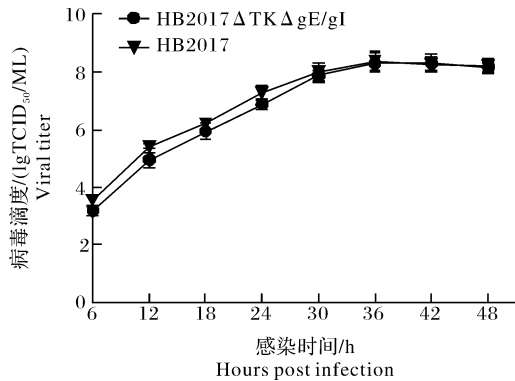


图 4 PRV HB2017ΔTKΔgE/gI 和 HB2017 在 PK-15 细胞中的生长曲线图

Fig.4 Growth curves of PRV HB2017ΔTKΔgE/gI and HB2017 in PK-15 cells

表 4 重组病毒对仔猪的安全性试验结果

Table 4 Safety test results of recombinant virus in piglets

组别 Group	持续高热 (≥41℃) Continuous high fever	打喷嚏 Sneeze	神经症状 Neurological symptoms	死亡 Death
HB2017ΔTKΔgE/gI	0/5	0/5	0/5	0/5
HB2017	5/5	5/5	2/5	5/5
对照组 Control group	0/5	0/5	0/5	0/5

2.6 PRV HB2017ΔTKΔgE/gI 对仔猪的免疫保护力

免疫组在试验第 1 天接种 PRV HB2017ΔTKΔgE/gI 后未出现发病症状, 在第 28 天接种 PRV HB2017 后也未出现发病症状; 攻毒对照组在试验第 28 天接种 PRV HB2017 后第 3 天出现厌食、高热、打喷嚏或神经症状, 并在攻毒后第 7 天出现死亡; 空白对照组在试验中未表现出发病症状, 仔猪发病情况见表 5。表明 PRV HB2017ΔTKΔgE/gI 对仔猪具有良好的保护能力。

3 讨论

2011 年, 很多免疫 Bartha-K61 株伪狂犬病弱毒疫苗的猪场出现了伪狂犬病疫情, 提示以 PRV 最新流行毒株构建疫苗毒株的必要性。疫苗引起的免疫反应属于特异性免疫反应, 不同毒株间的交叉反应存在差异, 以新的国内流行毒株为亲本毒株可以产生更好的免疫效果。本研究采用的 2017 年在湖北某猪场分离得到的变异毒株 HB2017 株与国内流行毒株尤其是与 2011 年之后的流行毒株处于同一个进化分支, 而与包括 Bartha-K61 株在内的欧美毒株处于不同的进化分支, 以变异毒株 HB2017 株

表 5 重组病毒对仔猪免疫保护力的试验结果

Table 5 Test results of immune protection of piglets with recombinant virus

组别 Group	病毒接种(TCID50) Virus infection (TCID50)		发病情况 Morbidity			
	HB2017ΔTK ΔgE/gI (1 d)	HB2017 (28 d)	持续高热(≥41℃) Continuous high fever	打喷嚏 Sneeze	神经症状 Neurological symptoms	死亡 Death
免疫 1 组 Immunization Group 1	10 ⁶	10 ⁸	0/5	0/5	0/5	0/5
免疫 2 组 Immunization Group 2	10 ⁷	10 ⁸	0/5	0/5	0/5	0/5
攻毒对照组 Inoculated virus control group	0	10 ⁸	5/5	4/5	2/5	5/5
空白对照组 Normal group	0	0	0/5	0/5	0/5	0/5

为亲本毒株制备伪狂犬基因缺失弱毒株可更好地应用于国内伪狂犬病的防控与净化。

TK 和 gE 基因是 PRV 的主要毒力基因,TK 基因的缺失对毒力的影响较为显著^[14],TK 是构建基因缺失活疫苗的重要候选基因;gE 基因与 PRV 的神经嗜性和 PRV 在细胞间的扩散相关,gE 基因的缺失会减少 PRV 在三叉神经和交感神经元中的感染;gI 在 PRV 侵入过程中,能够促进病毒在神经系统中的复制,对病毒的神经嗜性有很大的影响^[15]。

本研究以当前流行的伪狂犬病病毒变异毒株 HB2017 株为亲本株,采用 CRISPR/Cas9 介导的同源重组技术对毒株的毒力基因 TK、gE 和 gI 进行敲除,高效快速地构建了缺失弱毒株 PRV HB2017ΔTKΔgE/gI 株。之后,对其特性进行了初步研究,显示 PRV HB2017ΔTKΔgE/gI 株的细胞增殖曲线与亲本株相似,而且具有遗传稳定、安全性高和免疫原性好等优点,该基因缺失株的构建将为伪狂犬病疫苗的研制提供优良的候选毒株,并为 PR 疫苗的高效研制提供参考。

参考文献 References

[1] METTENLEITER T C. Immunobiology of pseudorabies (Aujeszky's disease)[J]. Vet Immunol Immunopathol, 1996, 54 (1/2/3/4): 221-229.
 [2] 何启盖,方六荣,吴斌,等. 猪伪狂犬病基因缺失疫苗的制备、安全性、免疫原性、保存期测定及区域试验[J]. 畜牧兽医学报, 2005, 36(10): 1055-1063. HE Q G, FANG L R, WU B, et al. The preparation of gene-deleted vaccine against swine pseudorabies, measurement of its safety, immunogenicity, shelf life and the evaluation of vaccine by field trials[J]. Acta veterinaria et zootechnica sinica, 2005, 36 (10): 1055-1063 (in Chinese with English abstract).

[3] HU R M, ZHOU Q, SONG W B, et al. Novel pseudorabies virus variant with defects in TK, gE and gI protects growing pigs against lethal challenge[J]. Vaccine, 2015, 33(43): 5733-5740.
 [4] 郭万柱,徐志文,王小玉,等. 新型伪狂犬病病毒基因缺失株的构建及生物学特性研究(初报)[J]. 四川农业大学学报, 2000, 18(1): 1-3. GUO W Z, XU Z W, WANG X Y, et al. Construction and biological characteristics of a novel pseudorabies virus gene deletion strain[J]. Journal of Sichuan Agricultural University, 2000, 18(1): 1-3 (in Chinese with English abstract).
 [5] PENNISI E. The CRISPR craze[J]. Science, 2013, 341(6148): 833-836.
 [6] TANG Y D, LIU J T, WANG T Y, et al. Live attenuated pseudorabies virus developed using the CRISPR/Cas9 system[J]. Virus Res, 2016, 225: 33-39.
 [7] HSU P D, LANDER E S, ZHANG F. Development and applications of CRISPR-Cas9 for genome engineering [J]. Cell, 2014, 157(6): 1262-1278.
 [8] PAQUET D, KWART D, CHEN A, et al. Efficient introduction of specific homozygous and heterozygous mutations using CRISPR/Cas9[J]. Nature, 2016, 533(7601): 125-129.
 [9] MIYAOKA Y, BERMAN J R, COOPER S B, et al. Systematic quantification of HDR and NHEJ reveals effects of locus, nuclease, and cell type on genome-editing[J/OL]. Sci Rep, 2016, 6: 23549 [2020-05-11]. [https://www. sigmaaldrich. com/ catalog/ papers/ 27030102](https://www.sigmaaldrich.com/catalog/papers/27030102). DOI: 10.1038/srep23549.
 [10] 綦世金,华再东,刘西梅,等. CRISPR/Cas9 介导的同源重组技术构建猪肌抑素基因敲除细胞系[J]. 中国生物化学与分子生物学报, 2016, 32(10): 1161-1167. QI S J, HUA Z D, LIU X M, et al. Generation of porcine MSTN knockout cell line using CRISPR/Cas9-mediated homologous recombination [J]. Chinese journal of biochemistry and molecular biology, 2016, 32 (10): 1161-1167 (in Chinese with English abstract).
 [11] SUN Y, LUO Y, WANG C H, et al. Control of swine pseudorabies in China: opportunities and limitations[J]. Vet Microbiol, 2016, 183: 119-124.
 [12] CONG L, RAN F A, COX D, et al. Multiplex genome engineering using CRISPR/Cas systems[J]. Science, 2013, 339(6121):

- 819-823.
- [13] REED L M H. A simple method of estimating 50 percent end-points [J]. *Am J Hyg*, 1938, 27: 493-497.
- [14] METTENLEITER T C. Pseudorabies (Aujeszky's disease) virus: state of the art, August 1993 [J]. *Acta Vet Hung*, 1994, 42 (2/3): 153-177.
- [15] KRITAS S K, PENSART M B, METTENLEITER T C. Role of envelope glycoproteins gI, gp63 and gIII in the invasion and spread of Aujeszky's disease virus in the olfactory nervous pathway of the pig [J]. *J Gen Virol*, 1994, 75: 2319-2327.

Constructing pseudorabies viruses with *TK*, *gE*, and *gI* gene deletions based on CRISPR/Cas9-mediated homologous recombination techniques

ZHANG Huawei, ZHOU Mingguang, HOU Zhenzhen,
ZHU Xianjing, HAO Genxi, JIN Jianyun, XU Gaoyuan

Wuhan Keqian Biology, Ltd. R & D Center, Wuhan 430200, China

Abstract In this study, CRISPR/cas9-mediated homologous recombination technology was used to genetically edit the pseudorabies virus (PRV) HB2017 strain isolated from a pig farm in Hubei Province, and a PRV with deletion of *TK*, *gE* and *gI* genes was constructed. Afterwards, the gene-deleted PRV strain was obtained by techniques such as plaque purification. Subsequently, characteristics of the attenuated PRV were preliminarily studied by PCR, gene sequencing, indirect immunofluorescence assay, growth curve determination, vaccine safety and efficacy tests. The results showed that the *TK*, *gE* and *gI* genes of the PRV HB2017 strain had been deleted, and the growth curves of the attenuated PRV strain PRV HB2017 Δ TK Δ gE/gI and the parent strain PRV HB2017 strain in PK-15 cells were not significantly different and had high virus titer. After the PRV HB2017 Δ TK Δ gE/gI strain was transmitted to the 30th generation, the deletion sequences of the *TK* and *gE/gI* genes were stable and could not be recovered. The PRV HB2017 Δ TK Δ gE/gI strain is safe for piglets. Vaccinating piglets with $10^{6.0}$ TCID₅₀ or $10^{7.0}$ TCID₅₀ of the PRV HB2017 Δ TK Δ gE/gI strain could protect them from the attack of $10^{8.0}$ TCID₅₀ of the PRV virulent strains.

Keywords pseudorabies virus; CRISPR/Cas9; homologous recombination; gene deletion; genetically engineering vaccine; virus editing; vaccine development

(责任编辑:边书京)