

王浩, 刘聪, 贾笑冉, 等. 牛结节性皮肤病病毒 ORF005 基因缺失重组病毒的构建及生物学特性分析 [J]. 畜牧与兽医, 2025, 57 (12): 83-91.  
WANG H, LIU C, JIA X R, et al. Construction and biological characteristics of an ORF005 gene deleted lumpy skin disease virus strain [J]. Animal Husbandry & Veterinary Medicine, 2025, 57 (12): 83-91.

## 牛结节性皮肤病病毒 ORF005 基因缺失重组病毒的构建及生物学特性分析

王浩<sup>1</sup>, 刘聪<sup>1</sup>, 贾笑冉<sup>1</sup>, 温渊<sup>1</sup>, 廖凯<sup>2</sup>, 汤芳<sup>1,3</sup>, 戴建君<sup>1,3</sup>, 薛峰<sup>1,3,4\*</sup>

(1. 南京农业大学动物健康与食品安全国际合作联合实验室, 江苏 南京 210014;

2. 江苏省产品质量监督检验研究院, 江苏 南京 210007;

3. 中国药科大学, 江苏 南京 211198;

4. 南京农业大学三亚研究院, 海南 三亚 572000)

**摘要:** 旨在通过构建牛结节性皮肤病病毒 (lumpy skin disease virus, LSDV) ORF005 基因缺失重组病毒, 分析其复制能力和对宿主先天性免疫的影响, 为 LSDV ORF005 基因功能的研究奠定基础。本研究利用增强绿色荧光蛋白 (EGFP) 表达盒替代选取的 ORF005 基因, 扩增其上下游病毒同源臂序列, 通过同源重组连接至线性化 pUC57 载体中, 构建基因缺失转移载体 pLSDV- $\Delta$ ORF005-EGFP 质粒, 将转移载体质粒转染至非洲绿猴肾细胞 (Vero) 细胞, 随后感染 LSDV, 使 LSDV 病毒基因组与转移载体质粒发生同源重组, 利用多次药物压力筛选、挑取单克隆绿色荧光病变进行筛选和纯化以获得缺失 ORF005 基因的 LSDV 重组病毒株, 并分析其生物学特性和感染后对宿主先天性免疫的影响。结果: 成功构建出缺失 ORF005 基因的重组病毒 LSDV $\Delta$ ORF005-EGFP, 该重组病毒在 8 代细胞传代中能稳定表达 EGFP。病毒生长曲线表明, ORF005 基因的缺失削弱了 LSDV 在牛肾细胞 (MDBK) 细胞中的复制能力 ( $P < 0.05$ )。对比 LSDV 野毒株, 感染该 ORF005 基因缺失重组病毒增强了 MDBK 细胞中白细胞介素 1b (IL-1b)、肿瘤坏死因子 (TNF)、干扰素刺激基因 15 (ISG15) 和抗黏液病毒 1 蛋白 (Mx1) 基因的转录水平 ( $P < 0.05$ )。综上, 本研究成功构建了 ORF005 基因缺失的 LSDV 重组病毒株, 为解析 LSDV ORF005 基因的功能和 LSDV 基因缺失候选疫苗的奠定基础。

**关键词:** 牛结节性皮肤病病毒; ORF005 基因; 重组病毒; 先天免疫

中图分类号: S855.3 文献标志码: A 文章编号: 0529-5130(2025)12-0083-09

## Construction and biological characteristics of an ORF005 gene deleted lumpy skin disease virus strain

WANG Hao<sup>1</sup>, LIU Cong<sup>1</sup>, JIA Xiaoran<sup>1</sup>, WEN Yuan<sup>1</sup>, LIAO Kai<sup>2</sup>, TANG Fang<sup>1,3</sup>,

DAI Jianjun<sup>1,3</sup>, XUE Feng<sup>1,3,4\*</sup>

(1. Joint International Cooperation Laboratory of Animal Health and Food Safety, Nanjing Agricultural University, Nanjing 210014, China;

2. Jiangsu Product Quality Testing and Inspection Institute, Nanjing 210007, China;

3. China Pharmaceutical University, Nanjing 211198, China;

4. Sanya Institute of Nanjing Agricultural University, Sanya 572000, China)

**Abstract:** This study aimed to construct a recombinant Lumpy Skin Disease Virus (LSDV) strain with a deletion of the ORF005 gene to investigate its replication capacity and its impact on the innate immunity of the host, thereby laying a foundation for elucidating the function of the ORF005 gene. Using an enhanced green fluorescent protein (EGFP) expression cassette to replace the selected ORF005 gene, the upstream and downstream homologous arm sequences of the viral genome were amplified and cloned into a linearized pUC57 vector via homologous recombination, generating a gene-deletion transfer plasmid pLSDV- $\Delta$ ORF005-EGFP. The plasmid was transfected into Vero cells, followed by LSDV infection to induce homologous recombination between the viral genome and the transferred plasmid. After multiple rounds of

收稿日期: 2025-01-11; 修回日期: 2025-07-19

基金项目: 国家重点研发计划项目 (2023YFF0611500)

第一作者: 王浩, 男, 硕士研究生

\* 通信作者: 薛峰, 博士, 教授, 主要研究方向为人兽共患病防治新技术及其病原学基础研究, E-mail: xuefeng@njau.edu.cn.

drug selection and purification of monoclonal green fluorescent cytopathic effects, a recombinant LSDV strain lacking the ORF005 gene, LSDV $\Delta$ ORF005-EGFP, was successfully obtained. The recombinant virus stably expressed EGFP during eight passages in cell culture. The growth curve analysis showed that the deletion of ORF005 significantly impaired the replication capacity of LSDV in MDBK cells ( $P < 0.05$ ). Furthermore, the qPCR results revealed that, compared with the wild-type LSDV strain, infection with the ORF005-deleted recombinant virus significantly enhanced the transcription levels of innate immune-related genes, including interleukin 1b (IL-1b), tumor necrosis factor (TNF), interferon-stimulated gene 15 (ISG15), and myxovirus resistance 1 (Mx1), in the MDBK cells ( $P < 0.05$ ). In conclusion, the ORF005-deleted recombinant LSDV strain was successfully constructed, providing a valuable tool for understanding the function of the ORF005 gene and a reference for developing gene-deleted candidate vaccines against LSDV.

**Keywords:** lumpy skin disease virus; ORF005 gene; recombinant virus; innate immunity

牛结节性皮肤病 (lumpy skin disease, LSD) 又称牛疙瘩性皮肤病、牛结节性皮肤病或牛块状皮肤病, 是由牛结节性皮肤病病毒 (lumpy skin disease virus, LSDV) 引起的牛的急性、亚急性传染病或慢性传染病。LSD 主要通过昆虫媒介进行传播, 也可通过直接接触、人工授精、垂直传播等方式进行传播<sup>[1-2]</sup>。受动物品种、年龄、免疫状态等因素影响, LSD 的发病率为 5%~45%, 死亡率通常低于 10%<sup>[3]</sup>。发病时, 主要表现为发热, 皮肤、黏膜、器官表面出现广泛性结节<sup>[4-5]</sup>, 患病奶牛产奶量急剧下降, 其可能会导致母畜流产, 引起公牛睾丸炎症, 造成暂时或永久性不育, 若伴有继发性细菌感染, 严重时会导致死亡<sup>[6-8]</sup>。LSD 于 1929 年在赞比亚首次发现, 起初仅局限于非洲地区进行传播。自 2015 年以来, LSD 的传播已经蔓延到除非洲外的多个国家和地区<sup>[9-10]</sup>。2019 年 8 月, LSD 在我国新疆地区暴发, 随后在其他多个省份均检测到 LSD 病例<sup>[11]</sup>。由于对养牛业造成严重的经济影响, 世界动物卫生组织 (WOAH) 将其列为必须通报的疫病<sup>[12]</sup>, 我国农业农村部暂时将其列为二类动物疫病。

LSDV 为痘病毒科山羊痘病毒属双链 DNA 囊膜病毒, 基因组大小约 151 kb, 与山羊痘病毒 (goatpox virus, GTPV), 绵羊痘病毒 (sheeppox virus, SPPV) 的序列同源性为 96%~97%<sup>[13]</sup>。LSDV 基因组含有 156 个开放阅读框, 其中央编码区位于病毒基因组 ORF024 和 ORF123 之间, 编码一系列与病毒生命周期密切相关的基因。两侧分别是长 2.4 kb 的编码序列, 这些序列与病毒毒力、免疫调节和宿主选择范围有关。此外, LSDV 含有白细胞介素 10 (IL-10)、白细胞介素 1 (IL-1) 结合蛋白、G 蛋白偶联的 CC 趋化因子受体和表皮生长因子样蛋白同源物等基因, 这些基因在其他痘病毒属中也有发现<sup>[14]</sup>。痘病毒可以通过编码这些同源物来实现免疫逃避, 如黏液瘤病毒可以编码肿瘤坏死因子 (TNF) 受体类似物, 提前与胞外的 TNF 结合以实现免疫逃避<sup>[15]</sup>; LSDV 编码的干扰素 (IFN)  $\beta$  类似物可以竞争性结合 IFN 受体, 增强病毒毒力<sup>[16]</sup>。

LSDV ORF005 基因全长 513 bp, 编码 170 个氨基酸, 注释为 IL-10 样蛋白。IL-10 是一种重要的抗炎因子, 可以在感染和自身免疫期间抑制宿主的先天性免疫和适应性免疫反应<sup>[17]</sup>, 几种病毒已经进化出 IL-10 或其受体 (IL-10R) 的同源物<sup>[18-19]</sup>, 通过影响宿主的免疫反应以促进自身的复制。LSDV ORF005 基因的功能目前还未报道。因此, 本研究将 LSDV ORF005 基因作为靶标基因, 构建带有增强型绿色荧光蛋白 (EGFP) 的缺失重组病毒株, 并分析其生物学特性, 为 LSDV ORF005 基因的功能研究及减毒活疫苗的研制奠定基础。

## 1 材料与方法

### 1.1 细胞、载体及病毒

非洲绿猴肾细胞 (Vero)、牛肾细胞 (MDBK) 均购自武汉普诺赛生命科技有限公司; EGFP 表达盒和线性化 pUC57 载体由本实验室构建并保存; 大肠杆菌 DH5 $\alpha$  感受态细胞购自北京擎科生物科技股份有限公司。LSDV 病毒株保存于生物安全防护三级实验室。

### 1.2 主要试剂及设备

胎牛血清 (FBS)、DMEM 培养基、RPMI 1640 培养基购自上海逍鹏生物有限公司; 去内毒素质粒提取试剂盒、DNA 凝胶回收试剂盒、病毒基因组提取试剂盒购自 Omega 公司; 霉酚酸、黄嘌呤和次黄嘌呤购自上海麦克林生化科技股份有限公司; 通用型基因组提取试剂盒购自湖南艾科瑞生物工程有限公司; Hieff Trans<sup>®</sup> 脂质体核酸转染试剂、反转录试剂购自翌圣生物科技 (上海) 股份有限公司; 荧光定量 PCR 酶、高保真 PCR 酶 (P525)、同源重组酶购自南京诺唯赞生物科技股份有限公司。

### 1.3 转移质粒载体的构建

#### 1.3.1 引物设计

根据野生型 (WT) LSDV 的 ORF005 基因序列, 使用 SnapGene 软件, 在 LSDV ORF005 基因上下游分别设计上游同源臂 ORF005L (485 bp)、下游同源臂 ORF005R (491 bp) 和扩增它们的上、下游引物。

EGFP 表达盒及线性化 pUC57 载体由本实验室构建并保存, 设计 EGFP 表达盒插入序列的引物对以构建重

组 LSDV (rLSDV)。所有引物由北京擎科生物科技股份有限公司合成 (表 1)。

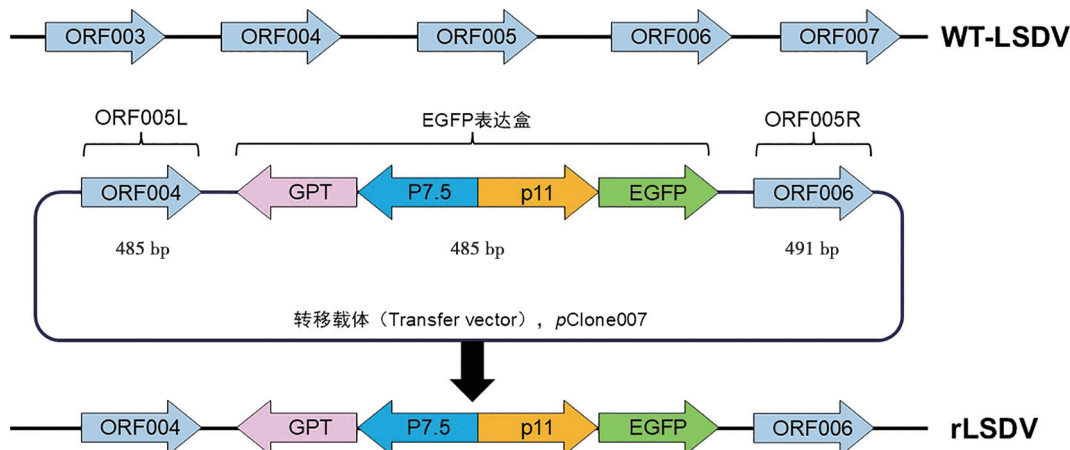


图 1 LSDV ORF005 基因缺失毒株构建示意

表 1 转移载体构建使用的引物序列

引物名称	引物序列 (5'→3')	产物长度/bp
ORF005L-F	AGGTCGACGGTATCGATCCCTCTGTTAGAAAGTCCTCCA	485
ORF005L-R	GTCGCTAAGAAGCTCCGGCAATGATAGGGTTAATGAATCC	485
EGFP-F	GGAGTTCCTTAGCGACCGGAG	1 845
EGFP-R	CAATTTACGCCTTAAGATACATTGATG	1 845
ORF005R-F	TTAAGCGCTAAATTGGGCTATGGGAGACTTTGATATTTTCATTA	491
ORF005R-R	GCTGCAGGAATTCGATACTTATGGTTGTACCCTGTATAAAATATTG	491

### 1.3.2 转移载体的构建及鉴定

使用高保真酶进行 PCR 扩增, 以提取的 LSDV 病毒株基因组 DNA 为模板, 扩增 LSDV ORF005 基因上、下同源臂; 以实验室构建的 EGFP 表达盒为模板, 使用引物 EGFP-F、EGFP-R 扩增 EGFP 区。PCR 产物经 1% 琼脂糖凝胶电泳鉴定后, 利用胶回收试剂盒纯化目的片段并测定其浓度, 放置于  $-20^{\circ}\text{C}$  备用。

利用同源重组试剂盒将 ORF005 基因上游同源臂、EGFP 表达盒及 ORF005 基因下游同源臂片段连接至线性化 pUC57 载体中, 连接产物转化入 DH5 $\alpha$  感受态后, 涂布于含有氨苄青霉素 ( $100\ \mu\text{g}/\text{mL}$ ) 的固体 LB 平板上进行筛选,  $37^{\circ}\text{C}$  细菌培养箱过夜培养, 挑取单个菌落摇菌进行 PCR 鉴定, 将 PCR 产物大小正确的菌液送至北京擎科生物科技股份有限公司进行测序, 测序结果正确后使用去内毒素质粒提试剂盒提取质粒, 将阳性质粒命名为 pLSDV- $\Delta$ ORF005-EGFP。

### 1.4 ORF005 缺失重组病毒的构建

当 6 孔板中的 Vero 细胞密度达到 60%~70% 时,

利用 Heff Trans 转染试剂, 将 pLSDV- $\Delta$ ORF005-EGFP 质粒转入 Vero 细胞。转染 24 h 后按照感染复数 (MOI) = 0.05 感染 LSDV, 2 h 后 PBS 清洗 3 遍, 更换为含有 2% FBS 的 DMEM 培养基, 同时以未处理的 Vero 细胞作为空白对照。于感染 24、48、72 h 后在荧光显微镜下观察细胞病变和绿色荧光情况, 待大部分细胞出现细胞病变且带有绿色荧光时, 反复冻融细胞 3 次, 使用  $0.45\ \mu\text{m}$  滤器过滤去除细胞碎片, 将收集到的病毒命名为 LSDV $\Delta$ ORF005-EGFP, 置于  $-80^{\circ}\text{C}$  超低温保存备用。

### 1.5 LSDV $\Delta$ ORF005-EGFP 重组病毒的筛选与纯化

将 Vero 细胞接种于 6 孔板中, 待细胞密度达到 80% 左右, 使用含有  $25\ \mu\text{g}/\text{mL}$  霉酚酸、 $250\ \mu\text{g}/\text{mL}$  黄嘌呤、 $15\ \mu\text{g}/\text{mL}$  次黄嘌呤和 2% FBS 的 DMEM 筛选培养基作用 6~8 h, 加入待纯化的病毒液, 感染 2 h 后, PBS 清洗 3 遍, 更换为新的筛选培养基继续培养, 并在荧光显微镜下连续观察 3~5 d, 待大部分细胞出现细胞病变和绿色荧光后, 反复冻融细胞 3 次, 使用  $0.45\ \mu\text{m}$  滤器过滤去除细胞碎片, 将收集到的病毒保存于  $-80^{\circ}\text{C}$ 。上述操作重复筛选 3 次后,

对 LSDV $\Delta$ ORF005-EGFP 重组病毒进行单克隆纯化。

6 孔板中接种 MDBK 细胞，待细胞密度达到 85% 左右，将 LSDV $\Delta$ ORF005-EGFP 重组病毒按照 10 倍稀释度连续稀释，将  $10^{-1}$  ~  $10^{-6}$  稀释度的病毒液分别接于不同孔中，感染 2 h 后 PBS 清洗 3 遍，更换为含有 1% 低熔点琼脂糖、2% FBS 的 1640 培养基，于室温冷却凝固后，于 37 °C 细胞培养箱中倒置培养 4 ~ 6 d，荧光显微镜下观察，待出现带有绿色荧光单克隆后，无菌条件下用枪头挑取最大稀释度对应细胞孔中的单个荧光单克隆于 300  $\mu$ L 无血清 DMEM 培养基中，反复冻融 3 次，重复以上纯化操作 3 次。

### 1.6 LSDV $\Delta$ ORF005-EGFP 重组病毒的鉴定

将纯化后的病毒在 MDBK 细胞中扩大培养后，

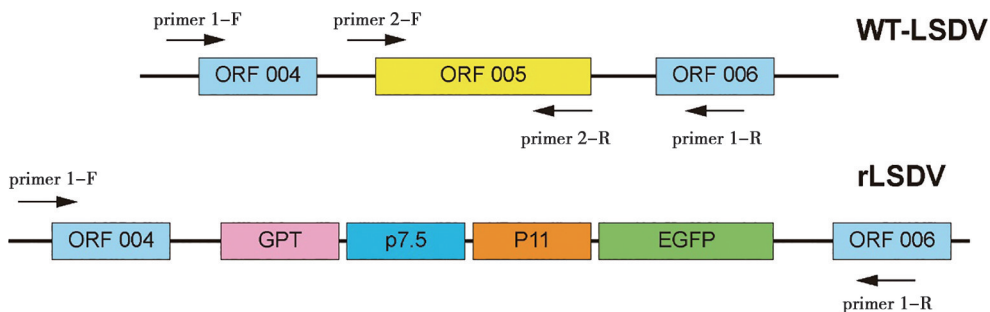


图 2 检测引物结合位点示意

表 2 检测 PCR 及 qPCR 的引物序列

引物名称	引物序列 (5'→3')
Primer 1-F	ACACAAACCACCTCGATACTACTG
Primer 1-R	CGAAGGACTTAACTCAACAGTACATTG
Primer 2-F	AGTATTTACCACCAACATGAAAACAAAC
Primer 2-R	CAAACCTCTCCCATAGCCTTATAAATACC
LSDV005-F	AGTTGTGCAATAGCATCGGCTA
LSDV005-R	CTATGCGACTCGTCAACTTGTC
LSDV043-F	ATTACTGCTAGAGCGTTGAAGA
LSDV043-R	TCGAGTTTAAAACGCTTAACGAA

### 1.7 LSDV $\Delta$ ORF005-EGFP 重组病毒滴度测定

MDBK 细胞接种于 96 孔板中，待细胞密度达 80% 时，将 LSDV $\Delta$ ORF005-EGFP 重组病毒 10 倍连续稀释至  $10^{-1}$  ~  $10^{-8}$  稀释度，每孔加入病毒稀释液 100  $\mu$ L，每个稀释梯度做 10 个孔重复，感染 2 h 后 PBS 清洗 3 遍，更换为含有 2% FBS 的 1640 培养基，于 37 °C 培养 5 ~ 6 d，荧光显微镜下观察并记录出现细胞病变和绿色荧光的细胞孔数，根据 Reed-Muench 法计算半数组织培养感染量 (TCID<sub>50</sub>)。

提取重组病毒和 WT 病毒基因组，按图 2 所示引物位置设计 PCR 引物，对重组病毒的纯化效果进行检测。以重组病毒 DNA 为模板使用引物 primer 1-F/R 和 primer 2-F/R 分别进行 PCR 鉴定，ddH<sub>2</sub>O 作为阴性对照，WT-LSDV DNA 作为阳性对照，并将鉴定后的 primer 1-F/R PCR 产物送至北京擎科生物科技股份有限公司进行测序；以 ORF043 作为 LSDV 基因组内参基因，ORF005 作为目的基因设计实时荧光定量 PCR (qPCR) 引物并进行 qPCR 检测，利用  $2^{-\Delta\Delta C_t}$  法计算纯化后 LSDV $\Delta$ ORF005-EGFP 重组病毒中 ORF005 基因的相对表达 (表 2)。

### 1.8 LSDV $\Delta$ ORF005-EGFP 重组病毒增殖曲线的测定

为比较 LSDV $\Delta$ ORF005-EGFP 重组病毒和 WT-LSDV 的复制差异，将 MDBK 细胞铺于 12 孔板中，待细胞密度达到 70%，每孔按照 MOI = 0.1 感染 LSDV $\Delta$ ORF005-EGFP 或 WT-LSDV，分别在感染 12、24、48、72 和 96 h 时收集细胞培养上清液，进行 TCID<sub>50</sub> 的测定并绘制病毒增殖曲线。

### 1.9 LSDV $\Delta$ ORF005-EGFP 重组病毒的传代稳定性

将 LSDV $\Delta$ ORF005-EGFP 重组病毒在 MDBK 细胞中连续培养 8 代，定期观察细胞感染状态和绿色荧光情况。

### 1.10 LSDV $\Delta$ ORF005-EGFP 重组病毒对先天性免疫的影响

MDBK 细胞接种于 24 孔板中，待细胞密度达到 80% 时，每孔按照 MOI = 0.1 分别感染 LSDV $\Delta$ ORF005-EGFP 或 WT-LSDV，空白对照孔中加入等量 PBS，感染 2 h 清洗 3 遍，更换为含 2% FBS 的 1640 培养基，放置于 37 °C 细胞培养箱中培养。感染 24 h 时，弃去培养基，PBS 清洗 3 遍，使用 RNA 提取试剂盒提取细胞 RNA，使用表 3 中的引物对细胞内先天性免疫相关基因，白细胞介素 1b (IL-1b)、TNF、干

扰素刺激基因 15 (ISG15) 和抗黏液病毒 1 蛋白 (Mx1) 基因的表达进行 qPCR 检测。

表 3 检测免疫相关基因表达所用的 qPCR 引物序列

引物名称	引物序列 (5'→3')
IL-1b-F	CCTCCGACGAGTTTCTGTGT
IL-1b-R	GCCAGCACCCAGGGATTTTTG
TNF-F	TGGTTCAAACACTCAGGTCC
TNF-R	CGGAGAGTTGATGTCGGCTA
ISG15-F	GTCTTTTGAAGGGAGGCCCA
ISG15-R	CTACCCACCCGAAGACGTA
Mx1-F	AGAGCAACCTGTACAGCCAA
Mx1-R	GCCTCAGCACAAAGAGGACAT

## 2 结果

### 2.1 转移载体质粒的构建

#### 2.1.1 转移载体片段 PCR 扩增

ORF005 上游同源臂 PCR 扩增大小为 485 bp, 下游同源臂 PCR 扩增大小为 491 bp, EGFP 基因表达盒 PCR 扩增大小为 1 845 bp, 均与预期大小相符 (图 3)。

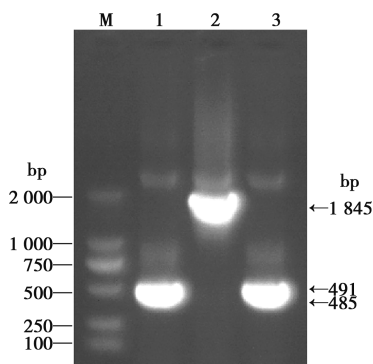


图 3 转移载体片段扩增情况

#### 2.1.2 菌液 PCR 鉴定

利用同源重组试剂盒将 PCR 片段连接至线性化 pUC57 载体中, 连接产物转化入 DH5 $\alpha$  感受态后, 涂布于具有氨苄抗性的固体 LB 平板上进行筛选, 37  $^{\circ}$ C 细菌培养箱过夜培养, 挑取单个菌落摇菌进行 PCR 鉴定 (图 4)。将 PCR 产物大小正确的菌液送至北京擎科生物科技股份有限公司进行测序, 测序结果正确的菌液使用去内毒素质粒提取试剂盒提取质粒, 将阳

性质粒命名为 pLSDV- $\Delta$ ORF005-EGFP。

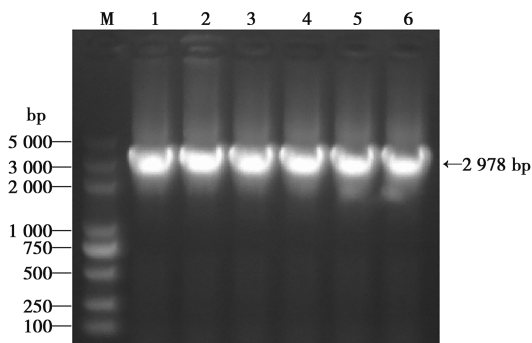


图 4 菌液 PCR 鉴定情况

### 2.2 LSDV $\Delta$ ORF005-EGFP 缺失重组病毒的构建

将 pLSDV $\Delta$ ORF005-EGFP 质粒转入 Vero 细胞, 转染 24 h 后按照 MOI=0.05 感染 LSDV, 使 LSDV 基因组与转移载体质粒 DNA 发生同源重组。同时以未处理的 Vero 细胞作为空白对照, 于感染 24、48、72 h 后在荧光显微镜下观察细胞病变和绿色荧光情况 (图 5)。结果表明, 转染质粒并且感染 LSDV 病毒的 Vero 细胞出现了绿色荧光, 并且荧光灶随感染时间的延长而逐渐增多变亮; 空白对照组 Vero 细胞未出现绿色荧光。

### 2.3 LSDV $\Delta$ ORF005-EGFP 重组病毒的筛选与纯化

将构建的 LSDV $\Delta$ ORF005-EGFP 重组病毒反复冻融 3 次, 接种于 MDBK 细胞进行多次药物压力筛选, 随后对其进行多次梯度稀释、标记并挑取荧光单克隆进行纯化。纯化的病毒感染细胞见图 6。

### 2.4 LSDV $\Delta$ ORF005-EGFP 重组病毒的鉴定

对纯化的重组病毒进行 PCR 鉴定, WT-LSDV DNA 作为阳性对照 (图 7)。用 Primer 1-F/R 扩增时, WT-LSDV 扩增条带为 1 042 bp, LSDV $\Delta$ ORF005-EGFP 重组病毒扩增的条带为 2 388 bp, 无 1 042 bp 条带 (图 7A); 用 Primer 2-F/R 扩增时, WT-LSDV 扩增条带为 485 bp, LSDV $\Delta$ ORF005-EGFP 重组病毒无扩增的条带 (图 7B)。

随后通过 qPCR 对重组病毒的纯化效果进行进一步鉴定。结果显示, WT-LSDV 中可以检测到 ORF005 基因表达, 但 LSDV $\Delta$ ORF005-EGFP 重组病毒中几乎无法检测到 ORF005 基因表达 (图 7C)。

以上结果表明, LSDV $\Delta$ ORF005-EGFP 重组病毒构建成功。

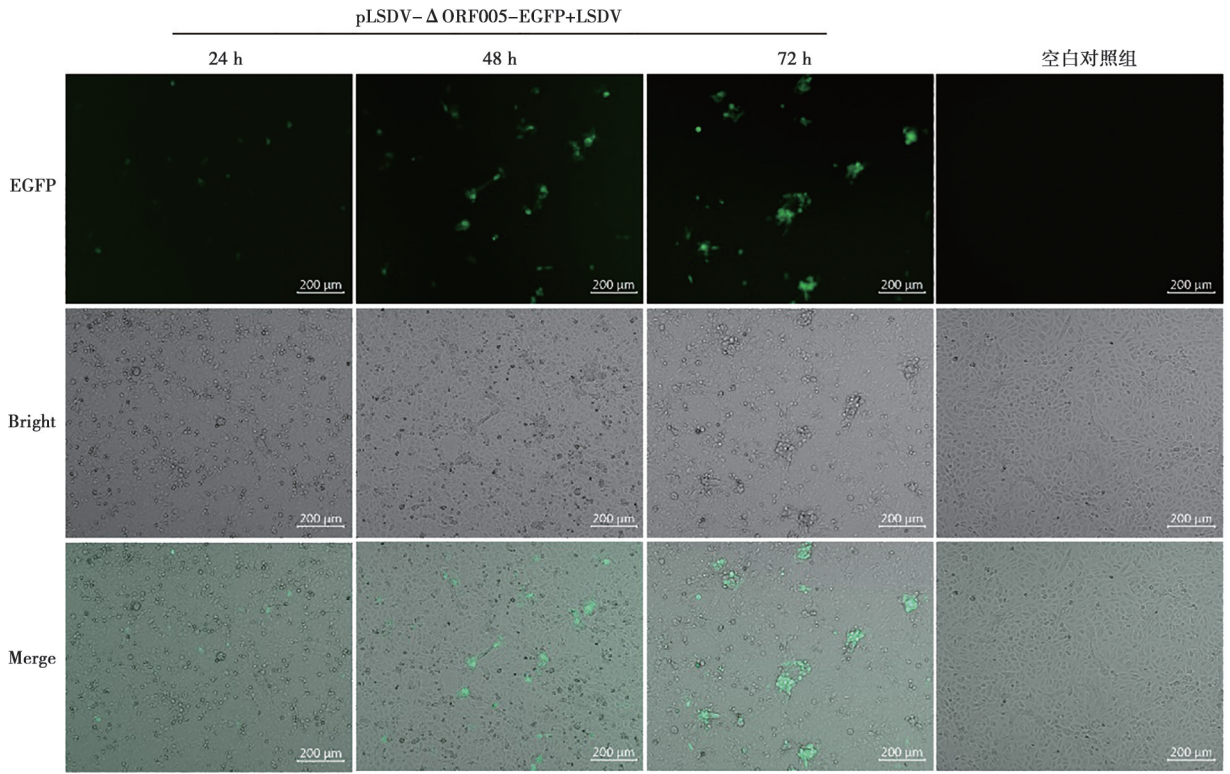
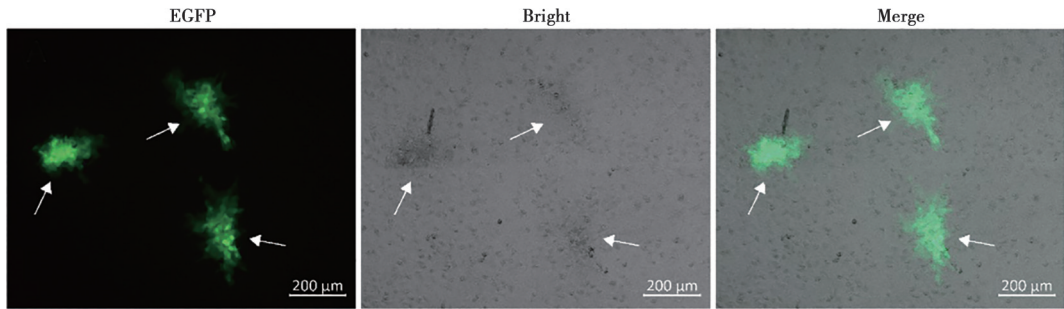
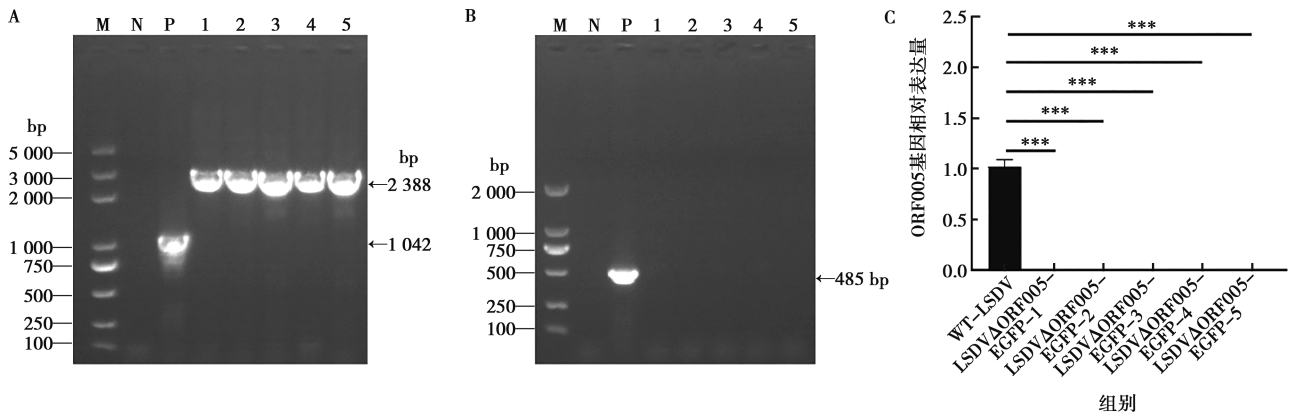


图 5 缺失 ORF005 基因的 LSDV 毒株的构建



箭头方向为明显细胞病变。

图 6 缺失 ORF005 基因的 LSDV 重组病毒的纯化



A. 引物对 Primer 1-F/R 鉴定, M 为 DL5000 DNA 分子量标准, N 为阴性对照, P 为阳性对照, 1~5 为纯化的 LSDV $\Delta$ ORF005-EGFP 重组病毒; B. 引物对 Primer 2-F/R 鉴定, M 为 DL2000 DNA 分子量标准, N 为阴性对照, P 为阳性对照, 1~5 为纯化的 LSDV $\Delta$ ORF005-EGFP 重组病毒; C. qPCR 鉴定, \* \* \* 表示  $P < 0.001$ 。

图 7 LSDV $\Delta$ ORF005-EGFP 重组病毒的鉴定情况

### 2.5 LSDVΔORF005-EGFP 重组病毒增殖曲线测定

由图 8 可知, 感染 24、48、72 和 96 h, LSDVΔORF005-EGFP 病毒滴度分别为  $1 \times 10^{1.78}$ 、 $1 \times 10^{2.87}$ 、 $1 \times 10^{3.72}$  和  $1 \times 10^{4.07}$  TCID<sub>50</sub>/0.1 mL; WT-LSDV 的病毒滴度分别为  $1 \times 10^{2.33}$ 、 $1 \times 10^{3.44}$ 、 $1 \times 10^{4.47}$  和  $1 \times 10^{4.64}$  TCID<sub>50</sub>/0.1 mL。LSDVΔORF005-EGFP 重组病毒的病毒滴度在感染 24 h 至 96 h 内始终低于 WT-LSDV ( $P < 0.05$ )。

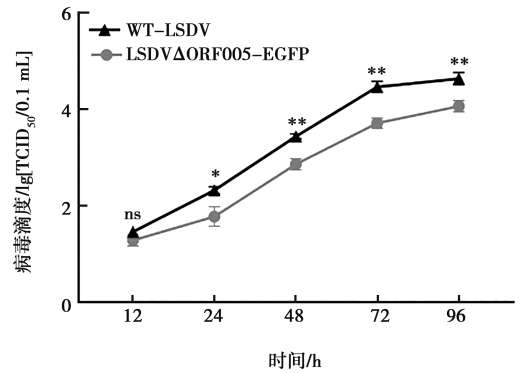
### 2.6 LSDVΔORF005-EGFP 重组病毒的遗传稳定性

将纯化的 LSDVΔORF005-EGFP 重组病毒在 MDBK 细胞上连续传代培养 8 代, 培养 48 h 后荧光显微镜观察该重组病毒在 8 代内能稳定遗传并表达绿色荧光 (图 9)。

### 2.7 LSDVΔORF005-EGFP 重组病毒对免疫相关基因表达的影响

图 10 显示, 感染 24 h 时, 对比 WT-LSDV, LSDVΔORF005-EGFP 重组病毒感染的 MDBK 细胞内

IL-1b、TNF、ISG15、Mx1 基因的表达水平都显著上升 ( $P < 0.05$ )。



ns 表示无显著差异; \* 表示  $P < 0.05$ ; \*\* 表示  $P < 0.01$ 。下同。

图 8 WT-LSDV 与 LSDVΔORF005-EGFP 重组病毒感染 MDBK 细胞的增殖曲线

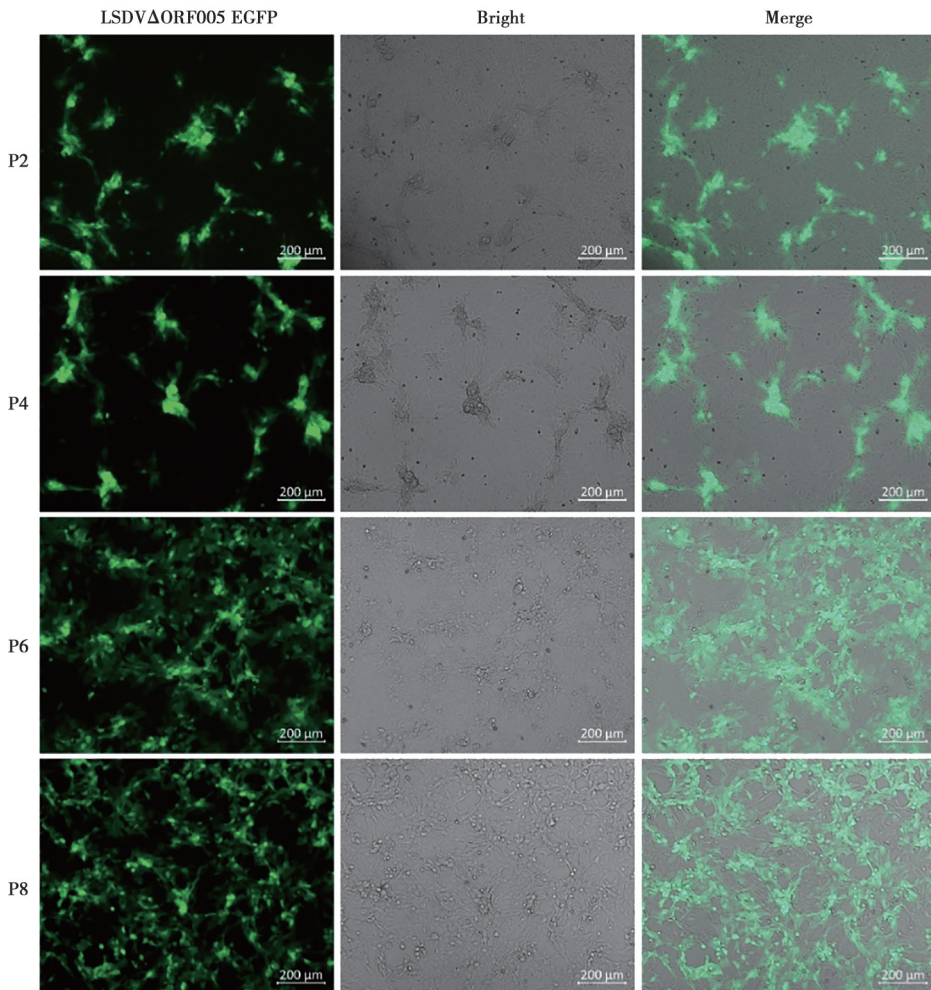


图 9 LSDVΔORF005-EGFP 重组病毒的遗传稳定性鉴定

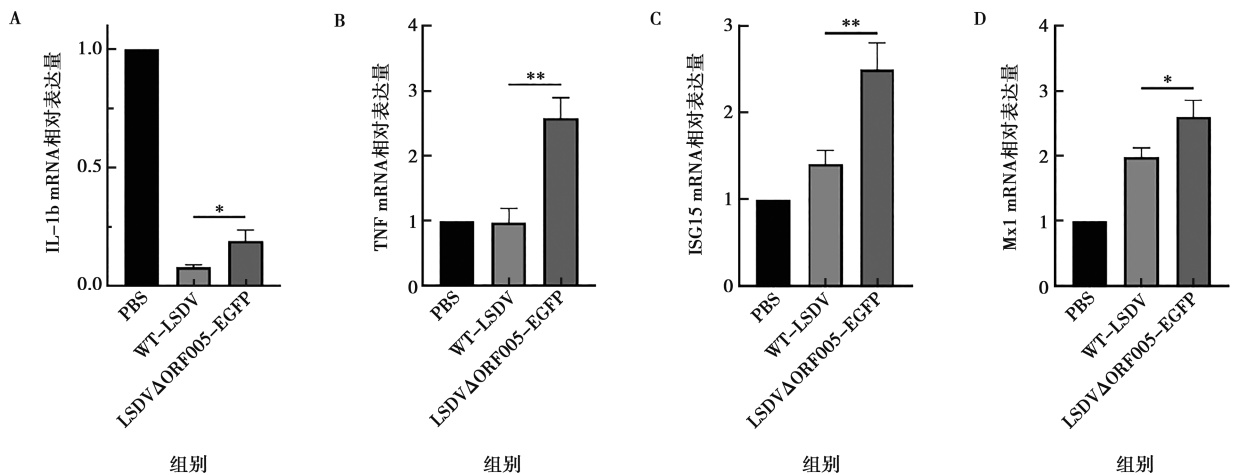


图 10 MDBK 感染不同病毒后免疫相关基因的表达

### 3 讨论

目前国外常用减毒活疫苗进行 LSD 的预防, 如使用南非分离的 Neethling 株在羔羊肾细胞中连续传代 60 代、再在鸡胚尿囊膜中连续传代 20 代后使病毒毒力减弱, 作为疫苗进行接种<sup>[20]</sup>。异源减毒活疫苗也作为重要的免疫手段, LSDV 与山羊痘病毒 (GTPV) 和绵羊痘病毒 (SPPV) 具有超过 97% 的核酸序列同源性, 埃及曾使用针对罗马尼亚 SPPV 疫苗控制 LSD 的暴发<sup>[21]</sup>, 我国农业农村部推荐使用 5 倍剂量的山羊痘疫苗用来预防 LSD 或使用相应的灭活疫苗<sup>[22-24]</sup>。减毒活疫苗的免疫效果显著, 但其减毒突变是随机发生的, 可能会发生毒力恢复的单点突变<sup>[25]</sup>。灭活疫苗虽然能诱导多种抗体反应, 并且安全性大大提高, 但其产生的免疫谱狭窄, 在诱导细胞介导的免疫和黏膜免疫作用有限<sup>[26]</sup>。因此, 研制安全有效的疫苗对于防控 LSD 仍然是十分必要的。

基因改造的重组疫苗是应对未来疫病暴发的重要方向。同其他痘病毒一样, LSDV 编码许多可以潜在调节宿主免疫反应的免疫调节基因, 可以通过基因工程技术缺失单个或多个这些基因, 用来构建安全有效的减毒活疫苗病毒株。Chervyakova 等<sup>[27]</sup>通过连续缺失 ORF005、ORF008、ORF066、ORF142 基因构建 LSDV 缺失重组病毒并对牛进行免疫, 发现未引起临床症状, 有较好的免疫效果。Munyanduki 等<sup>[28]</sup>发现缺失超氧化物歧化酶 (SOD) 基因后, 降低了 LSDV 在鸡胚尿囊膜和 MDBK 细胞中的增殖能力<sup>[28]</sup>。

痘病毒科成员可以通过编码免疫相关调节因子来逃避宿主的免疫应答, 如副痘病毒科的 Orf 病毒 (ORFV) 的 ORF116 基因可以编码干扰素反应的拮抗剂, 来抑制干扰素刺激基因 (ISGs) 和炎症因子的

表达<sup>[29]</sup>。LSDV ORF005 基因编码 170 个氨基酸, 被推定为编码 IL-10 样因子, 与 LSDV 的毒力和宿主选择范围有关。IL-10 作为一种重要的抗炎因子, 可以抑制多种病毒感染期间由免疫反应引起的宿主病理反应<sup>[30-31]</sup>, 但 IL-10 也可以限制宿主体内病毒的清除引起慢性感染<sup>[32]</sup>。因此, 本研究选取 ORF005 基因作为目的基因, 构建带有增强型绿色荧光蛋白 EGFP 筛选标记的 LSDV ORF005 基因缺失重组病毒。Imlach 等<sup>[33]</sup>发现 ORFV 编码的 IL-10 样因子可以抑制小鼠巨噬细胞的活化, 降低 LPS 诱导后巨噬细胞内 IL-1 和 TNF- $\alpha$  的水平。本试验发现 LSDV $\Delta$ ORF005-EGFP 重组病毒在 MDBK 中的复制低于其亲本病毒株; qPCR 检测感染 LSDV $\Delta$ ORF005-EGFP 重组病毒和 WT-LSDV 的 MDBK 细胞中相关免疫基因水平的变化, 发现缺失 ORF005 基因的重组病毒感染后 IL-1b、TNF、ISG15、Mx1 的基因表达水平相对增加, 说明 ORF005 基因可能在 LSDV 感染过程中发挥免疫逃避作用, 其具体作用机制还需进一步研究。

### 4 结论

本研究通过同源重组技术成功构建出带有 EGFP 标签的 ORF005 基因缺失 LSDV 重组病毒, 该重组病毒能够在 MDBK 细胞中有效复制且在 8 代内遗传稳定性较好, 但其复制能力低于亲本病毒株; qPCR 结果表明, 对比感染 LSDV 野毒株, ORF005 基因缺失重组病毒的感染增加了 MDBK 细胞中免疫相关基因的表达。本研究为 LSDV ORF005 基因功能的研究及重组疫苗的研制提供了参考。

## 参考文献:

- [1] SPRYGIN A, ARTYUCHOVA E, BABIN Y, et al. Epidemiological characterization of lumpy skin disease outbreaks in Russia in 2016 [J]. *Transbound Emerg Dis*, 2018, 65 (6): 1514-1521.
- [2] ROUBY S, ABOULSOUD E. Evidence of intrauterine transmission of lumpy skin disease virus [J]. *Vet J*, 2016, 209: 193-195.
- [3] NAMAZI F, KHODAKARAM TAFTI A. Lumpy skin disease, an emerging transboundary viral disease: a review [J]. *Vet Med Sci*, 2021, 7 (3): 888-896.
- [4] MENASHEROW S, RUBINSTEIN-GIUNI M, KOVTUNENKO A, et al. Development of an assay to differentiate between virulent and vaccine strains of lumpy skin disease virus (LSDV) [J]. *J Virol Meth*, 2014, 199: 95-101.
- [5] HAIDER A, ABBAS Z, TAQVEEM A, et al. Lumpy skin disease: insights into molecular pathogenesis and control strategies [J]. *Vet Sci*, 2024, 11 (11): 561.
- [6] ANWAR A, NA-LAMPANG K, PREYAVICHYAPUGDEE N, et al. Lumpy skin disease outbreaks in Africa, Europe, and Asia (2005-2022): multiple change point analysis and time series forecast [J]. *Viruses*, 2022, 14 (10): 2203.
- [7] ALEMAYEHU G, ZEWDE G, ADMASSU B. Risk assessments of lumpy skin diseases in Borena bull market chain and its implication for livelihoods and international trade [J]. *Trop Anim Health Prod*, 2013, 45 (5): 1153-1159.
- [8] BABIUK S, BOWDEN T R, BOYLE D B, et al. Capripoxviruses: an emerging worldwide threat to sheep, goats and cattle [J]. *Transbound Emerg Dis*, 2008, 55 (7): 263-272.
- [9] ABUTARBUSH S M, ABABNEH M M, AL ZOUBI I G, et al. Lumpy skin disease in Jordan: disease emergence, clinical signs, complications and preliminary-associated economic losses [J]. *Transbound Emerg Dis*, 2015, 62 (5): 549-554.
- [10] BEARD P M. Lumpy skin disease: a direct threat to Europe [J]. *Vet Rec*, 2016, 178 (22): 557-558.
- [11] LU G, XIE J, LUO J, et al. Lumpy skin disease outbreaks in China, since 3 August 2019 [J]. *Transbound Emerg Dis*, 2021, 68 (2): 216-219.
- [12] TUPPURAINEN E S M, OURA C A L. Review: lumpy skin disease: an emerging threat to Europe, the middle east and Asia [J]. *Transbound Emerg Dis*, 2012, 59 (1): 40-48.
- [13] TULMAN E R, AFONSO C L, LU Z, et al. Genome of lumpy skin disease virus [J]. *J Virol*, 2001, 75 (15): 7122-7130.
- [14] RATYOTHA K, PRAKOBWONG S, PIRATAE S. Lumpy skin disease: a newly emerging disease in Southeast Asia [J]. *Vet World*, 2022, 15 (12): 2764-2771.
- [15] XU X, NASH P, MCFADDEN G. Myxoma virus expresses a TNF receptor homolog with two distinct functions [J]. *Virus Genes*, 2000, 21 (1/2): 97-109.
- [16] SROLLER V, LUDVÍKOVÁ V, MARESOVÁ L, et al. Effect of IFN-gamma receptor gene deletion on vaccinia virus virulence [J]. *Arch Virol*, 2001, 146 (2): 239-249.
- [17] COUPER K N, BLOUNT D G, RILEY E M. IL-10: the master regulator of immunity to infection [J]. *J Immunol*, 2008, 180 (9): 5771-5777.
- [18] BARTLETT N W, DUMOUTIER L, RENAULD J C, et al. A new member of the interleukin 10-related cytokine family encoded by a poxvirus [J]. *J Gen Virol*, 2004, 85 (Pt 6): 1401-1412.
- [19] HSU D H, DE WAAL MALEFYT R, FIORENTINO D F, et al. Expression of interleukin-10 activity by Epstein-Barr virus protein BCRF1 [J]. *Science*, 1990, 250 (4982): 830-832.
- [20] HAEGEMAN A, DE LEEUW I, MOSTIN L, et al. Comparative evaluation of lumpy skin disease virus-based live attenuated vaccines [J]. *Vaccines (Basel)*, 2021, 9 (5): 473.
- [21] ALI A A, ESMAT M, ATTIA H, et al. Clinical and pathological studies on lumpy skin disease in Egypt [J]. *Vet Rec*, 1990, 127 (22): 549-550.
- [22] 农业农村部关于印发《牛结节性皮肤病防治技术规范》的通知(农牧发〔2020〕30号)[Z]. 中华人民共和国农业农村部公报, 2020 (8): 74-77.
- [23] 中华人民共和国农业农村部. 中华人民共和国农业农村部公告第670号[EB/OL]. [2023-05-17]. [http://www.moa.gov.cn/govpublic/xmsyj/202305/t20230517\\_6427790.htm](http://www.moa.gov.cn/govpublic/xmsyj/202305/t20230517_6427790.htm).
- [24] 中华人民共和国农业农村部. 中华人民共和国农业农村部公告第716号[EB/OL]. [2023-10-23]. [http://www.moa.gov.cn/govpublic/xmsyj/202310/t20231023\\_6438872.htm](http://www.moa.gov.cn/govpublic/xmsyj/202310/t20231023_6438872.htm).
- [25] MINOR P D, JOHN A, FERGUSON M, et al. Antigenic and molecular evolution of the vaccine strain of type 3 poliovirus during the period of excretion by a primary vaccinee [J]. *J Gen Virol*, 1986, 67 (Pt 4): 693-706.
- [26] 谢士杰, 朱俊达, 王天坤, 等. 牛结节性皮肤病疫苗研究进展 [J]. *中国畜牧兽医*, 2021, 48 (11): 4220-4230.
- [27] CHERVYAKOVA O, ISSABEK A, SULTANKULOVA K, et al. Lumpy skin disease virus with four knocked out genes was attenuated *in vivo* and protects cattle from infection [J]. *Vaccines (Basel)*, 2022, 10 (10): 1705.
- [28] MUNYANDUKI H, DOUGLASS N, OFFERMAN K, et al. Influence of the lumpy skin disease virus (LSDV) superoxide dismutase homologue on host transcriptional activity, apoptosis and histopathology [J]. *J Gen Virol*, 2020, 101 (6): 645-650.
- [29] ALDAIF B A, MERCER A A, FLEMING S B. The parapoxvirus Orf virus ORF116 gene encodes an antagonist of the interferon response [J]. *J Gen Virol*, 2021, 102 (12): 1-12.
- [30] TRANDEM K, ZHAO J, FLEMING E, et al. Highly activated cytotoxic CD8 T cells express protective IL-10 at the peak of coronavirus-induced encephalitis [J]. *J Immunol*, 2011, 186 (6): 3642-3652.
- [31] ZOU Q, WU B, XUE J, et al. CD8<sup>+</sup> Treg cells suppress CD8<sup>+</sup> T cell-responses by IL-10-dependent mechanism during H5N1 influenza virus infection [J]. *Eur J Immunol*, 2014, 44 (1): 103-114.
- [32] BROOKS D G, TRIFILO M J, EDELMANN K H, et al. Interleukin-10 determines viral clearance or persistence *in vivo* [J]. *Nat Med*, 2006, 12 (11): 1301-1309.
- [33] IMLACH W, MCCAUGHAN C A, MERCER A A, et al. Orf virus-encoded interleukin-10 stimulates the proliferation of murine mast cells and inhibits cytokine synthesis in murine peritoneal macrophages [J]. *J Gen Virol*, 2002, 83 (Pt 5): 1049-1058.