

姜智文, 秦颖, 陈杰, 等. 稳定表达绿色荧光蛋白的盖塔病毒的构建与鉴定 [J]. 畜牧与兽医, 2025, 57 (3): 74-78.

JIANG Z W, QIN Y, CHEN J, et al. Reconstruction and characterization of a stable Getah virus strain expressing green fluorescent protein [J]. Animal Husbandry & Veterinary Medicine, 2025, 57 (3): 74-78.

## 稳定表达绿色荧光蛋白的盖塔病毒的构建与鉴定

姜智文, 秦颖, 陈杰, 粟硕\*

(南京农业大学三亚研究院, 海南 三亚 572000)

**摘要:** 为了开发表达外源基因的重组盖塔病毒, 通过反向遗传技术, 在盖塔病毒 nsP3 基因的 C 端插入绿色荧光蛋白 ZsGreen, 并通过转染至 BHK-21 细胞拯救重组病毒并研究其生长特性。结果: 感染性 cDNA 克隆 pSM-GETV-nsP3/ZsGreen 转染 BHK-21 细胞后表达绿色荧光蛋白, 所拯救的报告病毒可以在 BHK-21 细胞上稳定传代 (至少 10 代), 并表现出良好的遗传稳定性; 多步生长曲线试验表明, 报告病毒 GETV-ZsGreen 在 BHK-21 细胞上的增殖能力略低于亲本毒株, 但仍能达到较高病毒滴度。综上, 本研究构建并拯救了 1 株遗传稳定的 GETV 报告病毒 GETV-ZsGreen。

**关键词:** 盖塔病毒; 感染性克隆; 报告病毒

**中图分类号:** S852.4 **文献标志码:** A **文章编号:** 0529-5130(2025)03-0074-05

## Reconstruction and characterization of a stable Getah virus strain expressing green fluorescent protein

JIANG Zhiwen, QIN Ying, CHEN Jie, SU Shuo\*

(Sanya Institute of Nanjing Agricultural University, Sanya 572000, China)

**Abstract:** In order to develop a recombinant Getah virus capable of expressing exogenous genes, this study employed reverse genetic technology to insert the ZsGreen protein at the C-terminus of the nsP3 gene of Getah virus by transfecting a cDNA clone pSM-GETV-nsP3/ZsGreen into BHK-21 cells and investigated its growth characteristics. Our findings demonstrated that, upon transfection into BHK-21 cells, the infectious cDNA clone pSM-GETV-nsP3/ZsGreen expressed green fluorescent protein, and subsequently rescued reporter virus exhibiting stable propagation (for at least 10 passages) in BHK-21 cells with excellent genetic stability. The multi-step growth curve analysis revealed that GETV-ZsGreen reporter virus displayed slightly reduced replication ability compared with its parental strain in BHK-21 cells; nevertheless, it still achieved a high viral titer. In summary, we successfully constructed and rescued a genetically stable GETV report virus, designated GETV-ZsGreen.

**Keywords:** Getah virus; infectious clone; report virus

盖塔病毒 (Getah virus, GETV) 属于披膜病毒科、甲病毒属的蚊媒甲病毒, 可引起妊娠母猪流产, 新生仔猪腹泻、精神沉郁、消瘦等临床症状, 严重的出现死亡<sup>[1]</sup>; 马感染 GETV 后表现发热、后肢关节肿大等关节炎症状<sup>[2]</sup>。GETV 于 1964 年首次在我国海南省被分离、鉴定, 命名为 alphavirus-M1, 随后通过分子病原学和血清学调查, 在我国多个省份的猪群

中鉴定到 GETV 感染。此外, 在我国的牛、蓝狐、小熊猫、貉等多种动物中分离或鉴定到 GETV, 提示该病毒表现出频繁地跨宿主传播<sup>[3]</sup>。重要的是, 在早期的血清学调查中, 在人类的血清中 GETV 的中和抗体, 表明既往感染和潜在的公共卫生风险<sup>[3]</sup>。

GETV 基因组为单股正链 RNA, 全长约 12 000 bp, 包含 2 个开放阅读框 (ORF), 分别编码非结构蛋白 nsP1~4 以及结构蛋白 Cap、E3、E2、6K/TF 和 E1; 5' 和 3' 非编码区以及在 2 个 ORF 之间的间隔序列<sup>[4]</sup>。以病毒基因组为载体表达外源基因在抗病毒药物筛选、中和抗体测定以及疫苗研发等方面具有重要价值。甲病毒属成员具有表达外源基因的能力, 目前已经成功构建了多种甲病毒属成员的报告病毒, 包

收稿日期: 2024-10-17; 修回日期: 2025-01-31

基金项目: 三亚崖州湾科技城科技专项资助项目 (SCKJ-JYRC-2022-08)

第一作者: 姜智文, 男, 博士研究生

\* 通信作者: 粟硕, 教授, 主要从事动物分子病毒学研究, E-mail: shuosu@njau.edu.cn.

括基孔肯亚病毒、辛德比斯病毒等。外源基因可以置于甲病毒基因组的多个位置, 目前已知的位置包括位于 nsP3 基因的 C 端、亚基因组启动子与 Cap 基因之间、Cap 基因与 E3 基因之间、E3 基因与 E2 基因之间以及 E1 基因之后<sup>[5-6]</sup>。在 GETV 上, 当前已有国内学者报告了多种报告基因插入策略, 不同的构建策略导致报告病毒的遗传稳定性各有差异。然而, 尚未报告基于 nsP3 基因的 GETV 报告病毒构建方法。

本研究在已构建的 GETV-HN 株感染性克隆的基础上, 通过反向遗传操作技术, 将 ZsGreen 基因引入 GETV nsP3 基因 C 端 HVD 区域, 成功构建和拯救了表达绿色荧光蛋白的 GETV 报告病毒 GETV-ZsGreen, 为后续研究 nsP3 基因的功能奠定基础。

表 1 GETV 报告病毒构建引物

引物名称	引物序列 (5'→3')	扩增长度/bp
GETV-C-Bgl II -F	TTATGCCAAGACTCCAAGATGCT	399
GETV-C-ZsGreen-R	GCTTGACTGGCCGATGAAATGACCATGCCGAT	
ZsGreen-F	GCCCAGTCCAAGCACGGCCT	690
ZsGreen-R	GGGCAAGCGGAGCCGGA	
GETV-C-ZsGreen-F	CTCCGCCTTGCCCGAAACGACCTACGAAACCATG	1 284
GETV-C-SgrA I -R	CGTCGTTATGTTTTCGGTGGTGAT	

### 1.3 GETV 绿色荧光报告病毒全长 cDNA 的构建

按照高保真酶、DNA 回收试剂盒和无内毒素质粒提取试剂盒的说明书操作步骤进行。使用 GETV-C-Bgl II -F、GETV-C-ZsGreen-R 和 GETV-C-ZsGreen-F、GETV-C-SgrA I -R 引物对扩增 GETV 的上、下片段; 随后使用 ZsGreen-F/R 扩增 ZsGreen 基因, 然后以上片段和 ZsGreen 的回收产物为模板, 使用 GETV-C-Bgl II -F 和 ZsGreen-R 融合扩增上中片段; 最后以上中片段和下片段为模板, 使用 GETV-C-Bgl II -F 和 GETV-C-SgrA I -R 引物, 扩增最终的上中下片段。使用 Bgl II 和 SgrA I 限制性内切酶分别酶切上中下片段以及 pSM-GETV-HN<sup>FL</sup>质粒, 反应条件为 37 °C 孵育 1 h。酶切结束后, 直接过柱回收酶切过的片段; 酶切的质粒进行凝胶电泳, 并切胶回收大于 10 000 bp 的载体。

将回收后的载体和片段按照摩尔比 1 : 7 比例进行连接, 使用 T4 连接酶 1 μL、T4 连接酶 Buffer 1 μL, 剩余用 ddH<sub>2</sub>O 补足至 10 μL, 在 16 °C 金属浴中过夜连接。连接完成后, 将其转化至 DH10B 感受态细胞。菌液 PCR 鉴定为阳性的克隆送至上海生工生物有限公司测序处理, 测序正确的阳性克隆菌液扩摇后提取质粒备用, 阳性质粒命名为 pSM-GETV-

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

BHK-21 细胞、pSM-GETV-HN<sup>FL</sup>质粒<sup>[7]</sup>均由本实验室保存。DMEM 培养基购自 Gibco 公司; 胎牛血清购自 BI 公司; 高保真酶购自诺唯赞公司; 无内毒素质粒提取试剂盒购自 OMEGA 公司; DNA 回收试剂盒购自康为世纪公司; DNA Marker 购自 TaKaRa 公司; 限制性内切酶购自 NEB 公司; Lip2000 转染试剂购自 Thermo 公司。

### 1.2 引物设计

根据分段扩增、融合的构建策略, 设计扩增 GETV-HN、ZsGreen 对应基因序列的引物 (表 1)。引物由生工生物 (南京) 有限公司合成。

nsP3/ZsGreen。

### 1.4 病毒拯救

根据 Lip2000 转染试剂的说明书操作步骤, 将 2 μg pSM-GETV-nsP3/ZsGreen 质粒与 4 μL 转染试剂混合, 室温静置 15 min 后, 加到 BHK-21 细胞中。在转染后 4~6 h 更换含有 2% 血清的 DMEM 培养基, 继续培养 3~5 d, 直至出现约 80% 病变时, 收集上清液作为 P0 代病毒, 命名为 GETV-nsP3/ZsGreen, 后续简称为 GETV-ZsGreen。使用亲本 pSM-GETV-HN<sup>FL</sup>质粒作为转染阳性对照。

### 1.5 GETV-ZsGreen 的生长特性研究

BHK-21 细胞传至 24 孔板培养, 待长满后按照感染复数 (MOI) = 0.1 接种亲本病毒 WT GETV 或报告病毒 GETV-ZsGreen, 感染后 1 h 更换维持培养基继续培养 (含 2% 血清)。在感染后 12、24、36、48 h 收取培养上清液用于病毒滴度测定, 每个时间点 3 个重复。病毒滴度由 TCID<sub>50</sub>法测定, 随后绘制病毒生长曲线。

### 1.6 GETV-ZsGreen 的遗传稳定性研究

将收集的 P0 代上清液在 BHK-21 细胞上传代, 收集的上清液作为 P1 代病毒, 并测定病毒滴度后备用。随后以 MOI=0.01 在 BHK-21 细胞上连续传代,

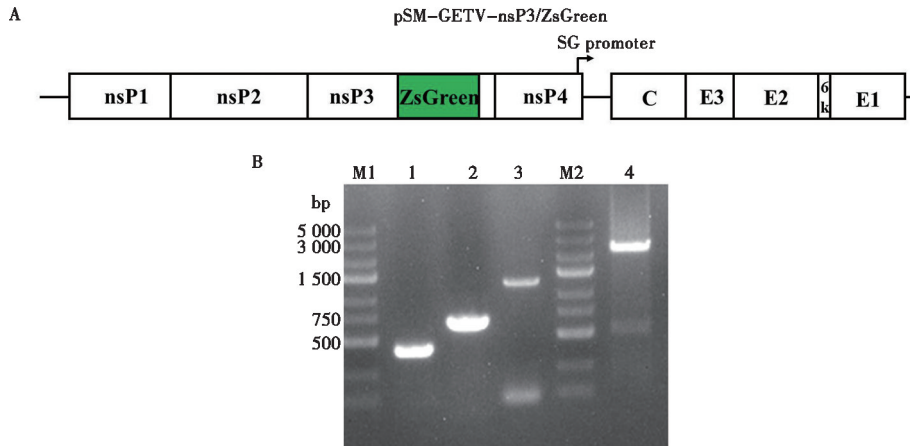
观察病毒绿色荧光蛋白的表达情况，并通过 PCR 鉴定插入区域是否出现基因缺失。

## 2 结果

### 2.1 GETV-ZsGreen 全长 cDNA 克隆的构建

在已建立的 GETV-HN 全长感染性克隆的基础

上，通过在 nsP3 基因 C 端 HVD 区域引入绿色荧光蛋白 ZsGreen (图 1A)。通过 PCR 分段扩增、融合的方式获得了插入外源基因的完整 C 片段 (图 1B)，将该片段重新克隆至亲本克隆后，构建了新的 pSM-GETV-nsP3/ZsGreen。



A. GETV 报告病毒的基因组示意图; B. C 片段扩增, 其中 M1, M2 为 DNA Marker, 1 为 C-ZsGreen-上, 2 为 C-ZsGreen-中, 3 为 C-ZsGreen-下, 4 为 C-ZsGreen-融合产物。

图 1 GETV 报告病毒感染性克隆示意图及扩增情况

### 2.2 GETV-ZsGreen 的拯救与鉴定

将 pSM-GETV-nsP3/ZsGreen 质粒转染至 BHK-21 细胞拯救报告病毒, 在转染约 4 d 后细胞出现病变, 并在荧光显微镜下观察显示绿色荧光, 表明

GETV-ZsGreen 被成功拯救 (图 2), 而亲本病毒作为对照则没有表达绿色荧光。待出现 80% 病变时, 收集上清液, 标记为 P0 代。

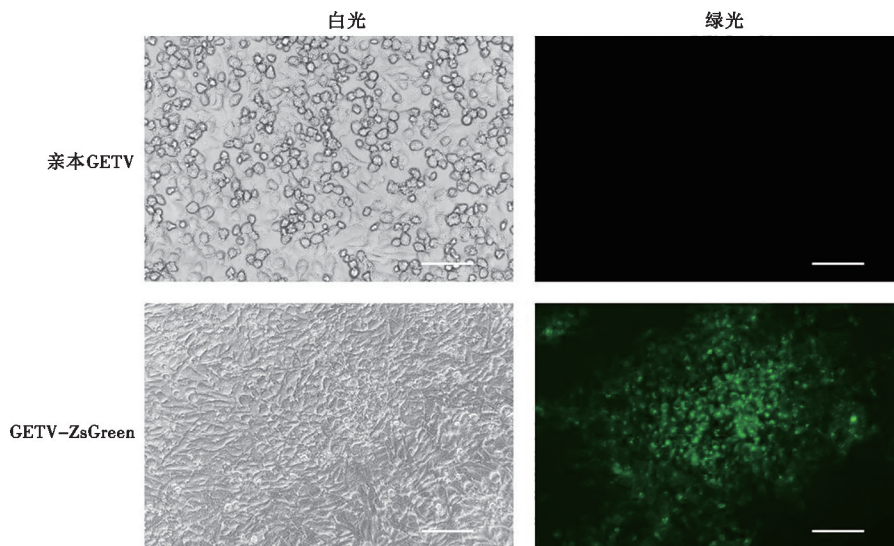


图 2 GETV-ZsGreen 拯救病毒的鉴定 (标尺=500 μm)

### 2.3 GETV-ZsGreen 在 BHK-21 细胞上的生长特性

报告病毒 GETV-ZsGreen (P0) 接种 BHK-21 细

胞 12 h 后在荧光显微镜下观察。结果显示, 感染 GETV-ZsGreen 的细胞出现明显的绿色荧光, 而对照细胞未见荧光 (图 3)。收集 P1 代上清液进行病毒滴

度测定,结果显示病毒滴度为  $10^{7.5}$  TCID<sub>50</sub>/mL。空斑试验结果显示报告病毒 GETV-ZsGreen 在 BHK-21 细胞上形成的空斑直径略小于其亲本毒株 (图 4)。此外,在 BHK-21 细胞上的多步生长曲线结果显示,

报告病毒 GETV-ZsGreen 感染后的滴度略低于亲本毒株,但仍能达到较高滴度 (图 5),能够适用于下游试验。

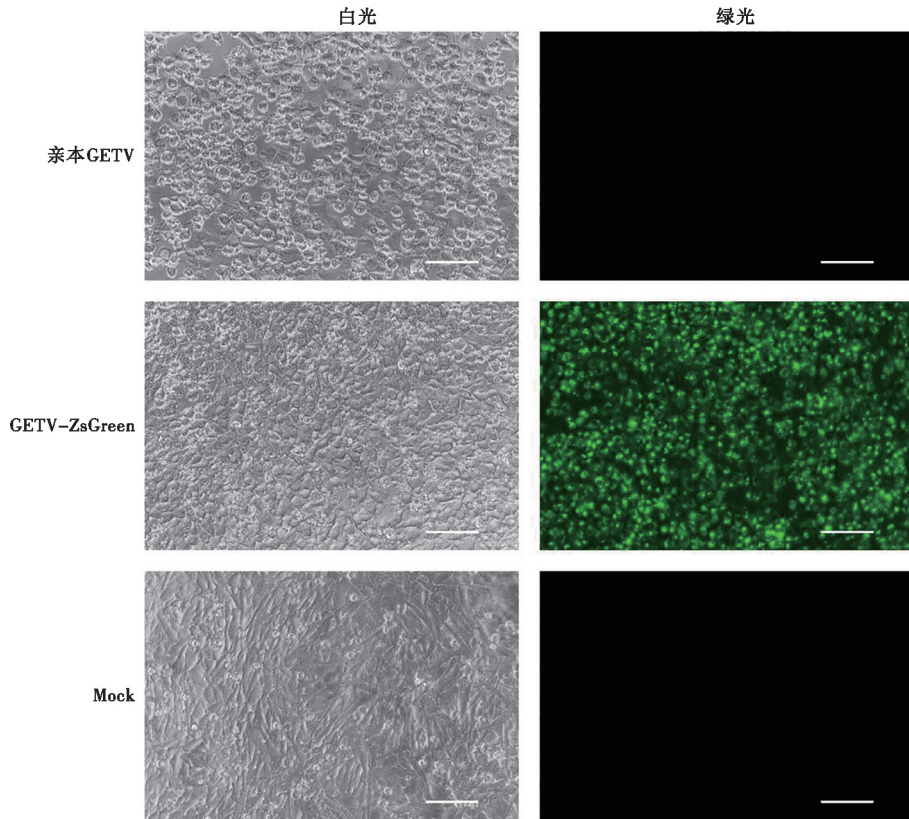


图 3 GETV 报告病毒荧光鉴定图 (标尺 = 500 μm)

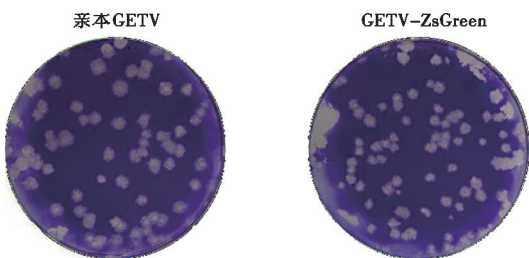


图 4 GETV 报告病毒及其亲本病毒的空斑

## 2.4 GETV-ZsGreen 的遗传稳定性研究

报告病毒 GETV-ZsGreen 在 BHK-21 细胞上连续传代,在 10 次传代后,报告病毒仍能稳定表达绿色荧光蛋白,并且感染细胞出现病变,随后细胞死亡、脱落。病毒基因组鉴定结果显示 (图 6),在传代过程中,扩增条带大小没有出现改变,表明 GETV-nsP3/ZsGreen 基因组稳定,没有出现外源基因的丢失。

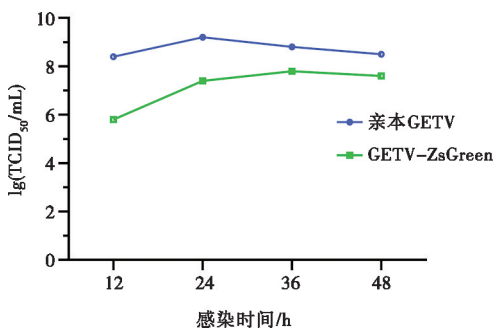


图 5 亲本 GETV 及报告病毒的生长曲线

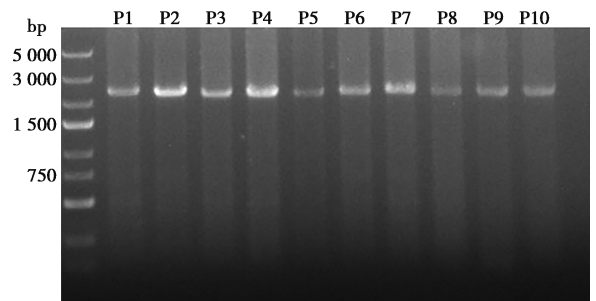


图 6 GETV-ZsGreen 的遗传稳定性鉴定

### 3 讨论

GETV 主要对马和猪等哺乳动物产生危害, 近年来 GETV 在我国的流行趋势不断增高, 在猪中引起的疫情对养殖业危害较大<sup>[8-10]</sup>。此外, GETV 最近在许多非常规宿主中被鉴定, 如狐狸、小熊猫等, 提示该病毒频繁的跨种传播<sup>[11]</sup>。GETV 潜在的人畜共患风险提示有必要对该病毒进行研究, 从而明确其致病机制、传播能力以及流行情况<sup>[12]</sup>。

随着反向遗传学技术的不断发展, 大多数甲病毒已经成功建立了反向遗传学系统, 用以研究其病毒特定氨基酸位点或基因的功能。对于 GETV 而言, 近几年开发了几个反向遗传系统<sup>[13-14]</sup>, 均使用 CMV 启动子, 可以直接将质粒转染易感细胞后拯救病毒; 所构建的报告病毒由于外源基因插入位置的差异, 通常会显现出不同的复制能力和遗传稳定性。本研究在 GETV nsP3 基因中插入了绿色荧光蛋白 ZsGreen, 由于与 nsP3 基因融合表达, 其定位与 nsP3 蛋白高度相似。由于甲病毒 nsP3 蛋白 C 端 HVD 区域高度多变, 其功能可能存在差异, 该 GETV 报告病毒更有利于研究 GETV nsP3 蛋白的功能。此外, 在 nsP3 基因的插入位点更换其他新的报告基因, 如萤火虫萤光素酶 (Fluc)、红色荧光蛋白 (RFP) 等等, 可以构建用于不同体内、体外试验研究的重组报告病毒<sup>[15]</sup>。

综上, 本研究构建并拯救了 1 株能稳定表达绿色荧光蛋白的 GETV 报告病毒 GETV-ZsGreen, 该病毒至少能够在体外稳定传代 10 次, 为后续建立 GETV 高通量抗病毒药物筛选平台以及新型疫苗的创制提供良好的理论依据。

### 参考文献:

- [1] 吕文珂, 羊露露, 周峰, 等. 猪源盖塔病毒流行病学及诊断技术研究进展 [J]. 佛山科学技术学院学报 (自然科学版), 2023, 41 (4): 23-29.
- [2] LU G, OU J, JI J, et al. Emergence of Getah virus infection in horse with fever in China, 2018 [J]. *Front Microbiol*, 2019, 10: 1416.
- [3] LI B, WANG H, LIANG G. Getah virus (alphavirus): an emerging, spreading zoonotic virus [J]. *Pathogens*, 2022, 11 (8): 945.
- [4] 王玉玲, 米勇, 江朝源, 等. 盖塔病毒研究进展 [J]. *病毒学报*, 2021, 37 (6): 1502-1507.
- [5] SUN C, GARDNER C L, WATSON A M, et al. Stable, high-level expression of reporter proteins from improved alphavirus expression vectors to track replication and dissemination during encephalitic and arthritogenic disease [J]. *J Virol*, 2014, 88 (4): 2035-2046.
- [6] REN T, LIU M, ZHOU L, et al. A recombinant getah virus expressing a GFP gene for rapid neutralization testing and antiviral drug screening assay [J]. *Virology*, 2024, 598: 110174.
- [7] WANG N, ZHAI X, LI X, et al. Attenuation of Getah virus by a single amino acid substitution at residue 253 of the E2 protein that might be part of a new heparan sulfate binding site on alphaviruses [J]. *J Virol*, 2022, 96 (6): e01751-21.
- [8] ZHAO J, DELLICOUR S, YAN Z, et al. Early genomic surveillance and phylogeographic analysis of Getah virus, a reemerging arbovirus, in livestock in China [J]. *J Virol*, 2023, 97 (1): e01091-22.
- [9] CHU P P, GUO H, ZHOU X, et al. Emergence of a novel GIII Getah virus variant in pigs in Guangdong, China, 2023 [J]. *Microbiol Spectr*, 2024, 12 (8): e0048324.
- [10] YANG T, LI R, HU Y, et al. An outbreak of Getah virus infection among pigs in China, 2017 [J]. *Transbound Emerg Dis*, 2018, 65 (3): 632-637.
- [11] SHI N, ZHU X, QIU X, et al. Origin, genetic diversity, adaptive evolution and transmission dynamics of Getah virus [J]. *Transbound Emerg Dis*, 2022, 69 (4): e1037-e50.
- [12] ZHAO J, WAN W, YU K, et al. Farmed fur animals harbour viruses with zoonotic spillover potential [J]. *Nature*, 2024, 634 (8032): 228-233.
- [13] 周景业, 孟慧, 鹿田原, 等. 猪盖塔病毒感染性克隆构建及病毒拯救 [J]. *扬州大学学报 (农业与生命科学版)*, 2023, 44 (6): 62-69.
- [14] 杜炳辰, 王铭, 刘春国, 等. 盖塔病毒 SC483 株 cDNA 感染性克隆的构建 [J]. *中国农业科学*, 2023, 56 (17): 3479-3486.
- [15] REN T, ZHOU L, MIN X, et al. Development of a recombinant reporter Getah virus for antiviral drug screening assays [J]. *Vet Microbiol*, 2023, 281: 109742.