



张晶晶,孙慧敏,宋家升,等. 猫疱疹病毒 I 型 *gIgE* 基因缺失毒株的构建及生物学特性分析[J]. 南京农业大学学报,2024,47(3):515-521.  
ZHANG Jingjing,SUN Huimin,SONG Jiasheng,et al. The construction and the biological characteristics of feline herpesvirus I *gIgE* gene deletion strain[J]. Journal of Nanjing Agricultural University,2024,47(3):515-521.

## 猫疱疹病毒 I 型 *gIgE* 基因缺失毒株的构建及生物学特性分析

张晶晶<sup>1</sup>,孙慧敏<sup>2</sup>,宋家升<sup>2\*</sup>,鲍恩东<sup>1\*</sup>

(1.南京农业大学动物医学院,江苏 南京 210095;2.浙江迪福润丝生物科技有限公司,浙江 杭州 310051)

**摘要:**[目的]为了开发一种能够预防感染、阻止潜伏期建立的猫疱疹病毒 I 型(FHV-1)弱毒疫苗,利用同源重组以及 CRISPR/Cas9 技术将 FHV-1 的 *gIgE* 基因替换为红色荧光蛋白基因(*RFP*)。[方法]构建针对 *gIgE* 基因的 3 条 sgRNA 及表达 *Cas9* 蛋白的质粒,将含有 sgRNA 及 *Cas9* 蛋白的质粒与含有 *RFP* 的转移载体共转染到猫肾细胞(F81),通过噬斑纯化以及有限稀释方法进行病毒纯化,以重组病毒感染 F81 细胞连续 10 代验证其遗传稳定性,通过测定重组病毒以及亲本病毒 H07 的病毒滴度、一步生长曲线以及判断噬斑大小评价其生物学特性。[结果]成功构建了 FHV-1 *gIgE* 基因缺失毒株并将其命名为 FHV- $\Delta$ *gIgE-RFP*;提取重组病毒 DNA,通过 PCR 验证 *gIgE* 基因无目的条带,表明重组病毒纯化成功,再通过 PCR 验证 *RFP* 基因有目的条带,表明重组病毒成功插入外源基因。病毒滴度测定结果显示,与亲本病毒相比重组病毒的病毒滴度下降了 90%;在 F<sub>1</sub>—F<sub>10</sub> 连续传代过程中 *RFP* 荧光表达且无减弱现象,表明重组病毒可稳定表达外源基因;测定 FHV- $\Delta$ *gIgE-RFP* 以及 H07 的生长曲线,重组病毒的生长趋势与亲本病毒大致相同,表明插入外源基因并不会改变病毒本身的生长特性;噬斑观察及染色结果显示,在病毒感染细胞前、后期,重组病毒的噬斑都小于亲本病毒,表明缺失 *gIgE* 基因后病毒毒力下降。[结论]成功构建并筛选出 FHV-1 *gIgE* 基因缺失致弱毒株,为开发疱疹病毒弱毒活载体疫苗奠定了基础。

**关键词:**猫疱疹病毒 I 型(FHV-1);致弱毒株;重组病毒;病毒筛选

中图分类号:S852.6

文献标志码:A

文章编号:1000-2030(2024)03-0515-07

## The construction and the biological characteristics of feline herpesvirus I *gIgE* gene deletion strain

ZHANG Jingjing<sup>1</sup>,SUN Huimin<sup>2</sup>,SONG Jiasheng<sup>2\*</sup>,BAO Endong<sup>1\*</sup>

(1.College of Veterinary Medicine,Nanjing Agricultural University,Nanjing 210095,China;

2.Zhejiang Difference Biotechnology Co.,Ltd.,Hangzhou 310051,China)

**Abstract:**[Objectives]To develop a attenuated feline herpesvirus I (FHV-1) vaccine that could prevent infection and prevent latency establishment,the *gIgE* gene of FHV-1 was replaced with a red fluorescent protein gene(*RFP*) using homologous recombination and CRISPR/Cas9 technology. [Methods]Three sgRNA for *gIgE* gene and plasmids expressing *Cas9* protein were constructed,and the plasmids containing sgRNA and *Cas9* protein and the transfer vector containing *RFP* were co-transfected into cat kidney cells(F81),and the virus was purified by plaque purification and limited dilution method. F81 cells were infected with recombinant virus for 10 successive generations to verify its genetic stability,and its biological characteristics of recombinant virus and parent virus H07 were evaluated by measuring the virus titer,one-step growth curve and judging the size of plaque. [Results]The FHV-1 *gIgE* gene deletion strain was successfully constructed and named FHV- $\Delta$ *gIgE-RFP*;the recombinant DNA was extracted and PCR was used to verify that *gIgE* gene had no target band,indicating that the recombinant virus was successfully purified. Then PCR was used to verify that *RFP* gene had target band,indicating that the recombinant virus had successfully inserted foreign genes. The virus titer of recombinant virus decreased by 90% compared with that of parent virus;the fluorescence expression of *RFP* was observed in the continuous passage of F<sub>1</sub>—F<sub>10</sub>,which showed that the recombinant virus could stably express foreign genes;the growth curves of FHV- $\Delta$ *gIgE-RFP* and H07 were determined,the growth trend of recombinant virus was roughly the same as that of parent virus,indicating that the insertion of foreign genes did not change the growth characteristics of the virus itself;the plaque observation and staining results showed that the plaque of recombinant virus was smaller than that of parent virus in both early and late stages of virus infection,indicating that the virulence of the virus decreased after the deletion of *gIgE* gene. [Conclusions]The FHV-1 *gIgE* gene deletion attenuated strain was successfully constructed and screened in this study,which laid a foundation for the development of herpes virus attenuated live vector vaccine.

**Keywords:**feline herpesvirus I (FHV-1);attenuated strain;recombinant virus;virus screening

收稿日期:2023-07-19

基金项目:江苏省农业科技自主创新资金项目[CX(22)2016];南京农业大学校企合作项目(技术服务类)

\*通信作者:鲍恩东,教授,研究方向为免疫病理学及新兽药研发,E-mail:b\_endong@njau.edu.cn;宋家升,博士,研究方向为分子生物学及病毒学,E-mail:songjiaosheng@diff\_biotech.com。

猫疱疹病毒 I 型 (feline herpesvirus I, FHV-1) 属于疱疹病毒科  $\alpha$  疱疹病毒亚科, 自 1958 年分离得到以来被认为是最具临床意义的可以引起猫呼吸系统疾病的病原体<sup>[1]</sup>, 也是引起猫眼部疾病的重要原因。临床上导致幼猫罹患病毒性呼吸系统疾病的病原因子中约 50% 都是由于感染了 FHV-1 的缘故。FHV-1 感染后的潜伏期一般为 2~6 d, 所致的典型临床症状为猫眼鼻处出现大量浆液性分泌物, 患猫精神沉郁、食欲不振、打喷嚏, 眼部症状严重时还会引发角膜出现溃疡<sup>[2]</sup>。感染 FHV-1 后很难彻底根治, 原因是病毒可潜伏于三叉神经节中造成终生带毒。当猫免疫力低下或者处于应激状态时, 潜伏于三叉神经的病毒可快速复制并造成多次感染, 且可间歇性通过眼鼻进行排毒。因此临床上所有康复的猫均有可能是带毒动物, 成为其他健康猫的传染源<sup>[3-4]</sup>。检测 FHV-1 血清和抗体呈阳性的猫占猫群的 50%~75%<sup>[5-6]</sup>。由于疱疹病毒的潜伏特性, 因此开发一种能够预防感染、阻止潜伏期建立的疫苗十分必要。目前, 针对 FHV-1 的疫苗大多数是与猫杯状病毒、猫瘟病毒联合使用的多联苗, 但这些疫苗只能减轻临床症状, 并不能阻止病毒的脱落以及潜伏<sup>[7]</sup>。

FHV-1 基因组中有很多关键毒力基因, 如胸苷激酶 (*TK*) 基因。*TK* 缺失后不仅可以实现病毒的毒力下降<sup>[8]</sup>, 理论上还可以在缺失位点插入其他外源基因以改造病毒基因组, 而这种致弱活疫苗载体甚至可以成为针对 FHV-1 的弱毒疫苗平台。位于 FHV-1 基因组 US 区的 *gIgE* 基因也是其主要的毒力基因<sup>[9-10]</sup>。当 *gI* 或 *gE* 基因单独表达时, 很难在细胞表面检测到基因表达产物; 当两者共表达时, 其转录复合物从内质网中运输并在细胞表面表达<sup>[11]</sup>。这说明 *gI* 和 *gE* 需相互协作才能更好表达。糖蛋白 *gIgE* 在疱疹病毒家族中高度保守, 属于非必需糖蛋白<sup>[12]</sup>。这类糖蛋白对于病毒生长复制来说不是必需的, 但缺失后能明显改变病毒毒力<sup>[13-15]</sup>。在伪狂犬病毒 (PRV)、水痘带状疱疹病毒 (VZV)、单纯疱疹病毒 (HSV-1) 以及猫疱疹病毒 (FHV-1) 中, *gI* 和 *gE* 糖蛋白是形成合胞体以及感染正常细胞所必需的磷酸蛋白<sup>[16-18]</sup>, 也是病毒感染宿主神经系统的主要毒力基因。有研究表明, 与野毒相比, 接种 *gI* 或 *gE* 基因缺失株的动物几乎未在中枢神经系统中分离出病毒, 而中枢神经系统感染是导致潜伏期建立的重要原因<sup>[19-20]</sup>。鉴于此, 本试验拟利用同源重组及 CRISPR/Cas9 技术, 将 FHV-1 的 *gIgE* 基因替换为红色荧光蛋白基因 (*RFP*), 分析其体外生长特性, 为开发基于 FHV-1 弱毒疫苗载体以及相关多联疫苗提供理论基础。

## 1 材料与方法

### 1.1 试验材料

**1.1.1 细胞、毒株及试剂** 亲本病毒株 (FHV-1 H07) 由浙江迪福润丝生物科技有限公司提供; 猫肾细胞 (F81) 购自中国科学院细胞库; Stbl3 大肠杆菌感受态细胞购自北京金沙生物科技有限公司; 琼脂糖凝胶 DNA 回收试剂盒、无内毒素质粒小提试剂盒购自天根生化科技 (北京) 有限公司; 2×Rapid *Taq* Master Mix 购自南京诺唯赞生物科技股份有限公司; Body fluid Viral RNA 购自爱思进生物技术 (杭州) 有限公司; Lip2000 购自赛默飞世尔科技 (中国) 有限公司; DEME、胎牛血清购自南京生航生物技术有限公司; 4% 多聚甲醛固定液购自 Phygene Scientific (美国); 草酸铵结晶紫染色液购自上海麦克林生化科技有限公司; T4 连接酶购自 NEB (美国)。

**1.1.2 主要仪器** CO<sub>2</sub> 恒温培养箱 (311)、高速离心机 (LEGEND MICRO 17) 购于 Thermo Scientific 公司; 洁净工作台 (SW-CG-2FD) 购于苏净集团苏州安泰空气技术有限公司; 基因扩增仪 (TC-E-480) 购于杭州博日科技股份有限公司; 荧光显微镜 (CKX3-SLP) 购于杭州全谱实验室设备有限公司; 蓝光切胶仪 (T-48) 购于浙江迪福润丝生物科技有限公司; 核酸电泳仪 (DYY-6C) 购于北京六一生物科技有限公司。

### 1.2 试验方法

**1.2.1 FHV-1 *gIgE* 基因左右同源臂序列的获取** 提取亲本病毒 FHV-1 H07 基因组 DNA 作为模板, 根据 GenBank (登录号 FJ478159.2) C-27 株的序列设计扩增包含 *gIgE* 左同源臂、*gIgE* 基因以及 *gIgE* 右同源臂整个片段的引物, 引物序列为 *gIgE*-F/R: aaaaccgatagatagcgaagag/cgaataatgaagaatctaccg, 产物大小 3 789 bp, 将产物进行测序, 从而获取 *gIgE* 基因左右同源臂的序列。

**1.2.2 转移载体的合成** 将 *gIgE* 基因左右同源臂、红色荧光蛋白 *RFP* 基因序列送至金唯智生物科技有限公司, 合成针对 *gIgE* 基因的转移载体, 命名为 pUC-*gIgE*-L-*RFP*-R。

**1.2.3 sgRNA 质粒的构建** 设计 3 条针对 *gIgE* 基因的 sgRNA, 引物序列如表 1 所示。使用 T4 聚合酶将 sgRNA-oligo 退火成双链, 通过 PCR 合成 sgRNA1、sgRNA2、sgRNA3 片段。将质粒 pX458-*Neo* R 进行酶切,

酶切产物进行琼脂糖凝胶电泳并回收,使用 T4 连接酶与 3 个 sgRNA 片段进行室温过夜连接后转化至 *Sbt13* 大肠杆菌感受态细胞中,将测序正确的菌液进行质粒提取。

**1.2.4 重组病毒的构建** 使用 Lip2000 将 2  $\mu\text{g}$  转移载体 pUC-*gIgE*-L-RFP-R 和 3 条 sgRNA(各 0.5  $\mu\text{g}$ )

转染至生长状态良好的单层 F81 细胞 6 孔板中,并将亲本病毒 FHV-1 H07 按  $\text{MOI} = 0.1$  的接毒量感染细胞。6 孔板置于  $\text{CO}_2$  恒温培养箱培养 48 h 后,在荧光显微镜下观察有无红色荧光蛋白(RFP)表达,将细胞培养混合液冻融 1 次后吸取上清液,按  $10^{-1} \sim 10^{-6}$  稀释度分别接种 F81 细胞 6 孔板,接种 6 h 后于每孔加入  $30^\circ\text{C}$ 、1.5 mL  $10 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$  低熔点琼脂糖( $20 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$  低熔点琼脂糖与  $20 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$  FBS DMEM 培养基按体积比为 1:1 的比例混合)。待琼脂糖冷却凝固后置于  $\text{CO}_2$  培养箱中培养 72 h,在荧光显微镜下挑取表达 RFP 的噬斑,洗脱到  $500 \mu\text{L}$   $20 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$  FBS DMEM 培养基中。将噬斑洗脱液冻融 1 次后再分别按  $10^{-1} \sim 10^{-6}$  稀释度接种 F81 细胞,培养并挑取噬斑。反复此操作直到显微镜中视野下表达 RFP 的细胞病变占总细胞病变的 80%~90%时,将噬斑洗脱液进行有限稀释,按  $10^{-6} \sim 10^{-8}$  稀释度分别接种 F81 细胞。每个稀释度接种 96 孔板,每孔 100  $\mu\text{L}$  病毒液,置于  $\text{CO}_2$  培养箱培养。72 h 后在显微镜下筛选细胞病变处有 RFP 表达的单个孔,96 和 120 h 再次观察筛选出来的单个孔是否有野毒生长。最终将筛选出来的单个孔中的培养物冻融 1 次,12 000  $\text{r} \cdot \text{min}^{-1}$  离心 2 min,吸取上清液并保存。

**1.2.5 重组病毒的鉴定** 将筛选出的重组病毒进行测序。设计分别用于验证 RFP 和 *gIgE* 的引物对,引物序列如表 2 所示。提取重组病毒的基因组作为模板进行 PCR,以亲本病毒 H07 的结果作为对照,将进行琼脂糖凝胶电泳后有目的条带的 PCR 原液测序。

表 2 鉴定重组病毒的引物

Table 2 The identification primer of the recombinant virus

引物名称 Primer name	引物序列 Primer sequences(5'→3')	产物大小/bp Product size
cx- <i>gIgE</i> -F/R	ctactattcaagaagtaacg/atgactccatcattatcacccg	419
cx-RFP-F/R	atgggagagagtcaccacatacgc/cctcctgattcttccagctcg	314

**1.2.6 重组病毒与亲本病毒组织半数感染量( $\text{TCID}_{50}$ )的测定** 将重组病毒与亲本病毒原液从  $10^{-1}$  稀释到  $10^{-10}$ ,接种到含生长状态良好的 F81 细胞的 96 孔板中,每孔 100  $\mu\text{L}$  病毒液,每个稀释度 3 个重复,置于  $\text{CO}_2$  培养箱中培养 72 h 后在荧光显微镜下记录每个稀释度有荧光或有细胞病变的孔数,用 Reed-Muench 方法<sup>[21]</sup>计算重组病毒与亲本病毒的  $\text{TCID}_{50}$ 。

**1.2.7 重组病毒的稳定性分析** 将重组病毒在铺满 F81 细胞的 48 孔板中进行传代观察。48 h 后待所有细胞都完全病变时,将培养液冻融 1 次并继续传下一代。从  $F_1$  传至  $F_{10}$ ,每一代均需在荧光显微镜下观察重组病毒 RFP 的表达情况。

**1.2.8 重组病毒的体外生长特性分析** 在铺有 F81 细胞 48 孔板中每孔以 250  $\text{TCID}_{50}$  接毒量接种重组病毒以及 H07 病毒液,分别在 24、48、72 和 96 h 收获。每种病毒液在每个时间点设 3 个重复孔,用 Reed-Muench 方法计算收获的所有病毒液的  $\text{TCID}_{50}$ ,最后用 GraphPad Prism 软件绘制病毒生长曲线。

**1.2.9 噬斑观察及染色** 在铺有 F81 细胞 6 孔板中接种重组病毒以及 H07 病毒液,接种 6 h 后于每孔加入  $30^\circ\text{C}$ 、1.5 mL  $10 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$  低熔点琼脂糖。待琼脂糖冷却凝固后置于  $\text{CO}_2$  培养箱中培养 48 h 后在荧光显微镜下观察噬斑形态;培养 72 h 后向每孔加入 1 mL 多聚甲醛固定液,静置 30 min 后吸出,再加入 1 mL 草酸铵结晶紫染色液静置 20 min。用镊子小心将孔中的琼脂糖胶块去除,清水多次小心清洗,待孔中每个噬斑清晰可见时拍照并计数。

### 1.3 数据的统计与分析

采用 GraphPad Prism 8.0 软件绘图,应用 SPSS 25.0 软件对试验数据进行方差分析和 *t* 测验。

## 2 结果与分析

### 2.1 *gIgE* 同源臂片段的鉴定

以 FHV-1 H07 作为模板,通过 PCR 获得包含整个 *gIgE* 左同源臂、*gIgE* 基因以及 *gIgE* 右同源臂片段。

表 1 sgRNA 引物信息

Table 1 The information of sgRNA primer

引物名称 Primer name	引物对序列 Primer pairs sequences(5'→3')
sgRNA1-oligo1/2	caccatataatggctgtgctggg/aaacccagcagacacattat
sgRNA2-oligo1/2	caccctttaaacaactcaca/aaactgtgaagttttgtaagg
sgRNA3-oligo1/2	cactctttccaattctcacacc/aaacgggtgtgagaattggaaca

PCR 结果(图 1)中出现 1 条 3 789 bp 的目的条带,回收后进行基因序列测定,将测序结果与 C-27 株的序列进行比对,表明成功获取同源臂片段。

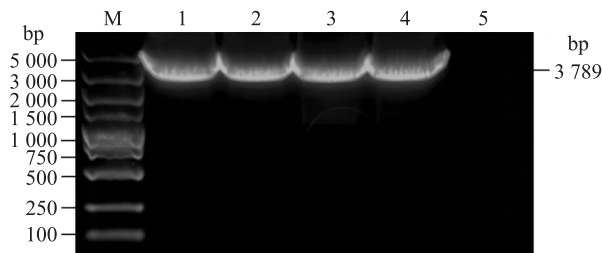


图 1 *gIgE* 同源臂片段的 PCR 结果

Fig. 1 PCR results of *gIgE* homologous arm

M. DL-5000 Marker; 1~4. 包含 *gIgE* 左同源臂、*gIgE* 基因以及 *gIgE* 右同源臂的片段 PCR amplified fragments of *gIgE* left homologous arm, *gIgE* gene and *gIgE* right homologous arm; 5. 阴性对照 Negative control.

## 2.2 敲除质粒 sgRNA 的构建与验证

酶切 pX458-*Neo* R 质粒获得的线性载体片段的电泳结果(图 2-A)显示了 1 条 9 400 bp 的目的条带,回收此条带并分别与 3 条 sgRNA 片段室温过夜连接后转化感受态 Stb13 大肠杆菌。次日每种 sgRNA 各挑取单个菌落,培养 3~4 h 后吸取 100  $\mu$ L 菌液进行测序,将与图谱序列一致的菌种(图 2-B)质粒进行提取,即是敲除质粒 sgRNA。

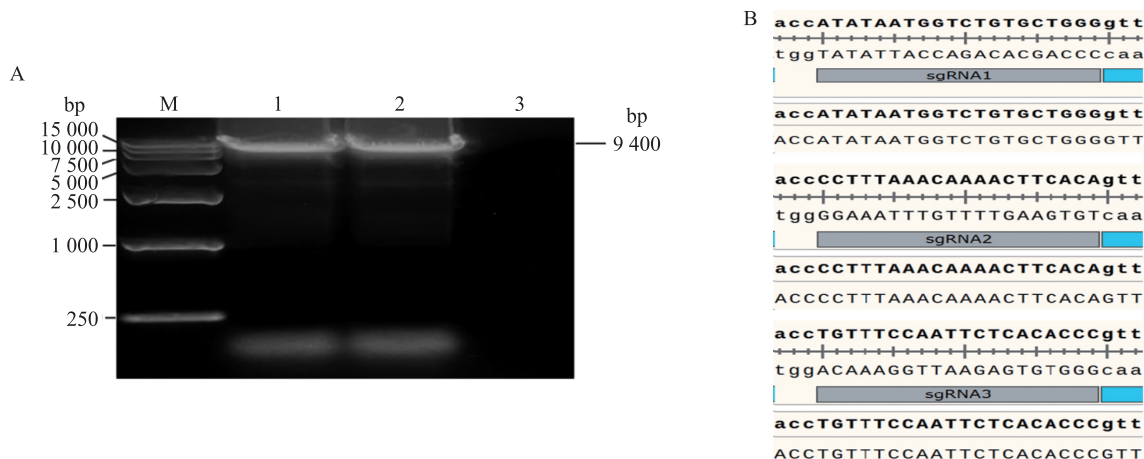


图 2 sgRNA 质粒的构建与验证结果

Fig. 2 Construction and verification results of sgRNA plasmid

A. 质粒 pX458-*Neo* R 线性化的 PCR 结果 PCR results of plasmid pX458-*Neo* R linearization; B. 3 条 sgRNA 片段分别与 pX458-*Neo* R 线性载体连接后的测序结果 The sequencing results were obtained after three sgRNA fragments were connected with pX458-*Neo* R linear vector.

M. DL-15 000 Marker; 1, 2. 质粒 pX458-*Neo* R 线性化后的 PCR 结果 Linearized PCR results of plasmid pX458-*Neo* R; 3. 阴性对照 Negative control.

## 2.3 *gIgE* 基因缺失病毒的免疫荧光鉴定

将合成的转移载体 pUC-*gIgE*-L-*RFP*-R 和 3 条 sgRNA 分别转染 F81 细胞,再用 FHV-1 H07 感染 F81 细胞。48 h 后在荧光显微镜下观察到有零星红色荧光产生(图 3-A),表明红色荧光蛋白 RFP 得到成功表达。用重组病毒、野病毒混合液进行噬斑纯化,待显微镜下观察有 RFP 表达的细胞病变占总细胞病变的 80%~90% 时进行有限稀释及进一步纯化,筛选到有细胞病变处且都有 RFP 表达的单个孔(图 3-B、C),命名此病毒为 FHV- $\Delta$ *gIgE*-*RFP*。

## 2.4 重组病毒 PCR 的鉴定结果

提取 FHV- $\Delta$ *gIgE*-*RFP* 以及 H07 基因组 DNA,用验证 *gIgE* 引物 *cx-gIgE*-F/R 进行 PCR,电泳结果显示, FHV- $\Delta$ *gIgE*-*RFP* 无任何条带,说明重组病毒已纯化成功,而 H07 作为阳性对照出现了 1 条 419 bp 的目的条带(图 4-A)。用验证 *RFP* 引物 *cx-RFP*-F/R 进行 PCR,电泳结果显示, FHV- $\Delta$ *gIgE*-*RFP* 出现 1 条 314 bp 的目的条带,说明红色荧光蛋白基因 *RFP* 已成功插入 FHV-1 基因组中并成功表达(图 4-B)。将有目的条带的 PCR 产物测序,结果显示与预期序列一致。

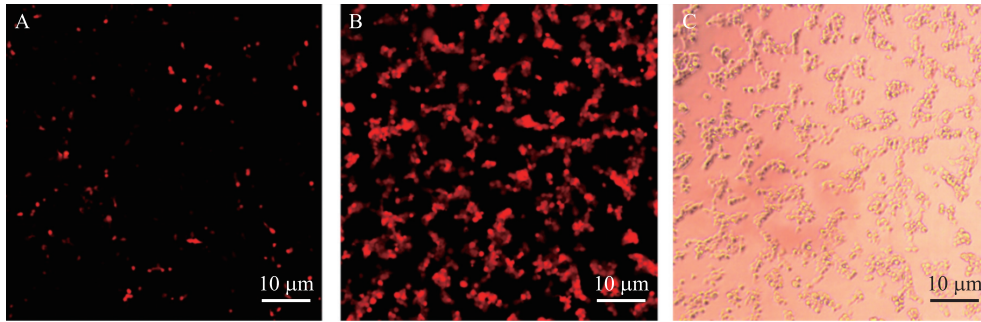


图 3 荧光显微镜下 *gIgE* 基因缺失重组病毒构建及鉴定

Fig. 3 Construction and identification of *gIgE* gene deletion virus under fluorescence microscope

A. 重组病毒转染、感染 F81 细胞 48 h; B. 有限稀释后荧光视野; C. 有限稀释后无荧光视野。

A. Recombinant virus transfected and infected F81 cells for 48 h; B. Limited dilution fluorescence field; C. Limited dilution without fluorescent field of view.

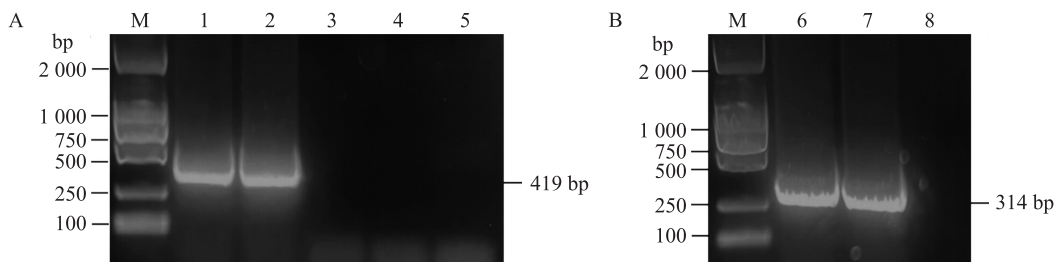


图 4 重组病毒的 PCR 鉴定

Fig. 4 PCR identification of recombinant virus

A. FHV-1 H07 和 FHV- $\Delta gIgE$ -RFP 中 *gIgE* 鉴定结果 FHV-1 H07 and FHV- $\Delta gIgE$ -RFP *gIgE* identification results; B. FHV- $\Delta gIgE$ -RFP 中 RFP 鉴定结果 FHV- $\Delta gIgE$ -RFP RFP identification results.

M. DL-2000 Marker; 1, 2. FHV-1 H07 中 *gIgE* 鉴定结果 FHV-1 H07 *gIgE* identification results; 3, 4. FHV- $\Delta gIgE$ -RFP 中 *gIgE* 的鉴定 FHV- $\Delta gIgE$ -RFP *gIgE* identification results; 5. 空白对照 Blank control; 6, 7. FHV- $\Delta gIgE$ -RFP 中 RFP 鉴定结果 FHV- $\Delta gIgE$ -RFP RFP identification results; 8. 阴性对照 Negative control.

### 2.5 重组病毒与亲本病毒的 TCID<sub>50</sub>

使用 Reed-Muench 方法计算重组病毒与亲本病毒的病毒滴度 (TCID<sub>50</sub>)。结果显示,亲本病毒的病毒滴度为  $10^{7.5}$  mL<sup>-1</sup>,而重组病毒的病毒滴度为  $10^{6.5}$  mL<sup>-1</sup>,与亲本病毒相比滴度显著下降 ( $P < 0.001$ )。

### 2.6 重组病毒的稳定性鉴定

将纯化并鉴定成功的重组病毒在铺有 F81 细胞 48 孔板中进行 10 轮传代,每一代置于 CO<sub>2</sub> 培养箱中培养 48 h 后收获并继续传下一代。结果 (图 5) 显示,从 F<sub>1</sub>—F<sub>10</sub>,红色荧光蛋白 RFP 都稳定表达,无减弱现象,说明 FHV- $\Delta gIgE$ -RFP 可稳定表达外源 RFP 基因。

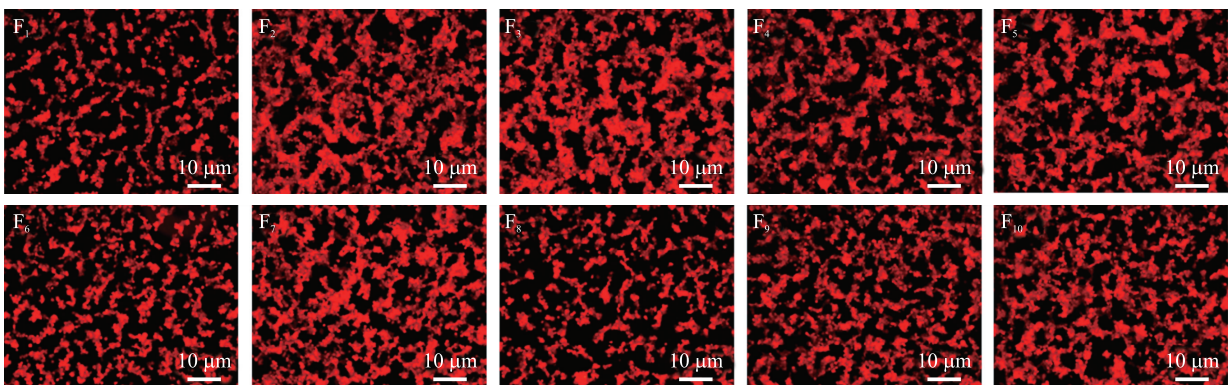


图 5 F<sub>1</sub>—F<sub>10</sub>代重组病毒 FHV- $\Delta gIgE$ -RFP RFP 蛋白表达结果

Fig. 5 Expression results of RFP protein of F<sub>1</sub>—F<sub>10</sub> generation of recombinant virus FHV- $\Delta gIgE$ -RFP

## 2.7 重组病毒体外生长特性分析

用 Reed-Muench 方法计算 24、48、72 和 96 h 收获病毒液的 TCID<sub>50</sub>, 并用 GraphPad Prism 软件绘制病毒生长曲线。结果(图 6)显示:亲本病毒 H07 在 24~48 h 快速复制生长,之后复制速度减缓,而重组病毒整体的生长趋势与 H07 大致相同,表明本试验的这种基因改造并不会改变 FHV-1 本身的生长特性。

## 2.8 重组病毒噬斑观察及染色结果

将 FHV- $\Delta gIgE$ -RFP 以及 FHV-1 H07 接种到铺满 F81 细胞的 6 孔板中并加入 10 g·L<sup>-1</sup> 低熔点琼脂糖,培养 48 h 后在显微镜下观察噬斑形态;培养 72 h 后取出,用多聚甲醛固定液进行固定后再加入草酸铵结晶紫染色液进行噬斑染色。结果(图 7)显示,在病毒感染细胞前、后期,重组病毒的噬斑都小于亲本病毒,说明 *gIgE* 基因是 FHV-1 基因组重要的毒力基因,缺失后毒力降低。

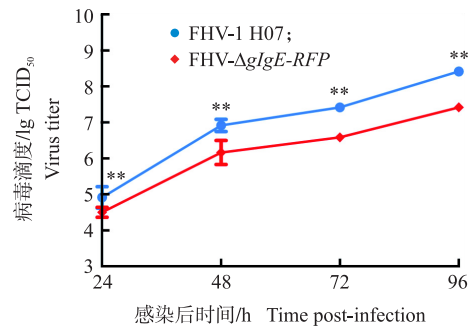


图 6 重组病毒与亲本病毒生长曲线

Fig. 6 Growth curves of recombinant virus and parent virus

\*\*  $P < 0.01$ .

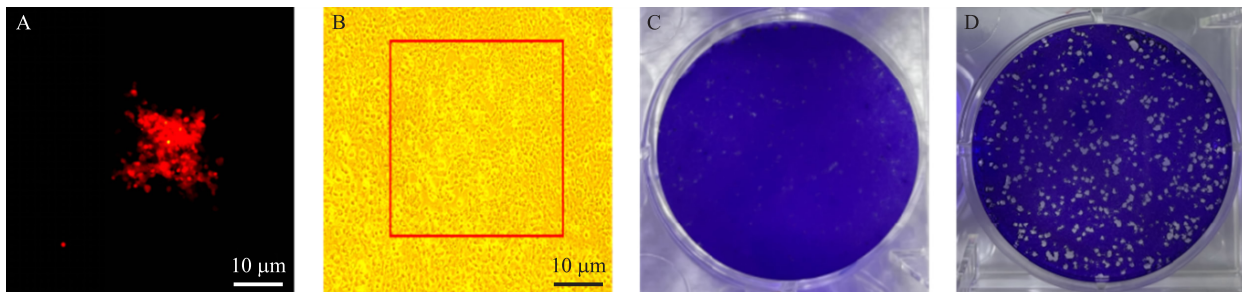


图 7 重组病毒与亲本病毒噬斑观察及染色结果

Fig. 7 Observation and staining results of recombinant poison and parental poison plaque

A. FHV- $\Delta gIgE$ -RFP 噬斑观察结果(48 h) FHV- $\Delta gIgE$ -RFP plaque observation results(48 h); B. FHV-1 H07 噬斑观察结果(48 h) FHV-1 H07 plaque observation results(48 h); C. FHV- $\Delta gIgE$ -RFP 噬斑染色结果(72 h) FHV- $\Delta gIgE$ -RFP plaque staining results(72 h); D. FHV-1 H07 噬斑染色结果(72 h) FHV-1 H07 plaque staining results(72 h).

## 3 讨论

本研究运用同源重组以及 CRISPR/Cas9 两种基因编辑技术构建疱疹病毒 FHV-1 重组病毒,sgRNA 结合 Cas9 蛋白可靶向使 *gIgE* 基因停止转录、翻译,降低生物活性,使外源基因 *RFP* 更容易将其替换,提高了重组效率。缺失 *gIgE* 基因后重组病毒毒力减弱,后续可利用此生物学特性构建基于此 FHV-1 重组病毒的二联或多联致弱苗。例如可以将翻译狂犬病毒的 G 糖蛋白、杯状病毒的 VP1 蛋白或者猫免疫缺陷病毒的包膜蛋白基因替换 *RFP*<sup>[22-25]</sup>,设计针对 *RFP* 的 sgRNA,利用反向筛选技术,再通过噬斑纯化以及有限稀释去纯化无 *RFP* 表达的二联或多联毒株,为防控猫各种常见且难以控制的病毒性疾病提供借鉴。

纯化带有报告基因的重组病毒最常用的方法就是噬斑纯化,但此方法耗时较长,并且不同种病毒从接种细胞开始到挑取噬斑的时间也需要摸索。本试验运用的亲本病毒株 FHV-1 H07 挑取噬斑的周期一般为 3 d,如果培养时间过短则表达红色荧光的噬斑较小,此时挑取极易取到附近的亲本病毒,不利于纯化;如果培养时间过长,由于固体培养基的营养已被细胞消耗殆尽,病毒活力也会降低,荧光变弱,给挑取噬斑增加了难度。因此把控好试验周期非常重要。在纯化过程中发现 FHV-1 H07 的生长速度要远高于重组病毒,所以当重组病毒的纯度达到 80% 以上时就很难有突破,此时噬斑纯化方法就不适用,改为进行有限稀释后的进一步纯化。将病毒混合液进行高度稀释,就容易获得与亲本病毒完全分离开的重组病毒粒子,后续只需进行几轮接种培养,即可获得纯化的重组病毒。因此,前期做噬斑纯化的重组病毒纯度越高,后续做有限稀释筛选出纯化的重组病毒的概率也会提高,缩短纯化时间。

本研究运用同源重组以及 CRISPR/Cas9 技术成功构建 FHV-1 *gIgE* 基因缺失株 FHV- $\Delta gIgE$ -RFP,并验证此毒株可稳定传代且其毒力降低,而生长趋势与 FHV-1 亲本病毒大致相同。

## 参考文献 References:

- [1] Gaskell R, Dawson S, Radford A, et al. Feline herpesvirus[J]. *Veterinary Research*, 2007, 38(2): 337-354.
- [2] Maggs D J. Update on pathogenesis, diagnosis, and treatment of feline herpesvirus type 1[J]. *Clinical Techniques in Small Animal Practice*, 2005, 20(2): 94-101.
- [3] Gaskell R, Povey R. Experimental induction of feline viral rhinotracheitis virus re-excretion in FVR-recovered cats[J]. *Veterinary Record*, 1977, 100(7): 128-133.
- [4] Richter M, Schudel L, Tobler K, et al. Clinical, virological, and immunological parameters associated with superinfection of latently with FeHV-1 infected cats[J]. *Veterinary Microbiology*, 2009, 138(3/4): 205-216.
- [5] Povey R C, Johnson R H. A survey of feline viral rhinotracheitis and feline picornavirus infection in Britain[J]. *Journal of Small Animal Practice*, 1971, 12(4): 233-247.
- [6] Studdert M J, Martin M C. Virus diseases of the respiratory tract of cats[J]. *Australian Veterinary Journal*, 1970, 46(3): 99-104.
- [7] Lappin M R, Sebring R W, Porter M, et al. Effects of a single dose of an intranasal feline herpesvirus 1, calicivirus, and panleukopenia vaccine on clinical signs and virus shedding after challenge with virulent feline herpesvirus 1[J]. *Journal of Feline Medicine & Surgery*, 2006, 8(3): 158-163.
- [8] Lee Y, Maes R, Kiupel M, et al. Characterization of feline herpesvirus-1 deletion mutants in tissue explant cultures[J]. *Virus Research*, 2020, 284: 197981.
- [9] Grail A, Harbour D A, Chia W. Restriction endonuclease mapping of the genome of feline herpesvirus type 1[J]. *Archives of Virology*, 1991, 116(1): 209-220.
- [10] Sussman M D, Maes R K, Kruger J M, et al. A feline herpesvirus-1 recombinant with a deletion in the genes for glycoproteins gI and gE is effective as a vaccine for feline rhinotracheitis[J]. *Virology*, 1995, 214(1): 12-20.
- [11] Mijnes J D, de Groot R J. Structure-function analysis of the feline herpesvirus virulence factors gE and gI[J]. *Veterinary Microbiology*, 1999, 69(1/2): 89-91.
- [12] Spatz S J, Rota P A, Maes R K. Identification of the feline herpesvirus type 1 (FHV-1) genes encoding glycoproteins G, D, I and E; expression of FHV-1 glycoprotein D in vaccinia and raccoon poxviruses[J]. *The Journal of General Virology*, 1994, 75: 1235-1244.
- [13] Tang A, Zhu M, Zhu J, et al. Pathogenicity and immunogenicity of *gI/gE/TK*-gene-deleted Felid herpesvirus 1 variants in cats[J]. *Virology Journal*, 2023, 20(1): 87.
- [14] Jacobs L. Glycoprotein E of pseudorabies virus and homologous proteins in other *Alphaherpesvirinae*[J]. *Archives of Virology*, 1994, 137(3): 209-228.
- [15] Yao Z, Grose C. Unusual phosphorylation sequence in the gpIV(gI) component of the varicella-zoster virus gpI-gpIV glycoprotein complex (VZV gE-gI complex)[J]. *Journal of Virology*, 1994, 68(7): 4204-4211.
- [16] Zsak L, Zuckermann F, Sugg N, et al. Glycoprotein gI of pseudorabies virus promotes cell fusion and virus spread via direct cell-to-cell transmission[J]. *Journal of Virology*, 1992, 66(4): 2316-2325.
- [17] Dingwell K S, Brunetti C R, Hendricks R L, et al. *Herpes simplex* virus glycoproteins E and I facilitate cell-to-cell spread *in vivo* and across junctions of cultured cells[J]. *Journal of Virology*, 1994, 68(2): 834-845.
- [18] Dingwell K S, Doering L C, Johnson D C. Glycoproteins E and I facilitate neuron-to-neuron spread of herpes simplex virus[J]. *Journal of Virology*, 1995, 69(11): 7087-7098.
- [19] Kritas S K, Pensaert 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]. *Journal of General Virology*, 1994, 75(9): 2319-2327.
- [20] Mulder W A M, Jacobs L, Priem J, et al. Glycoprotein gE-negative pseudorabies virus has a reduced capability to infect second- and third-order neurons of the olfactory and trigeminal routes in the porcine central nervous system[J]. *Journal of General Virology*, 1994, 75(11): 3095-3106.
- [21] Reed L J, Muench H. A simple method of estimating fifty per cent endpoints[J]. *American Journal of Epidemiology*, 1938, 27(3): 493-497.
- [22] 马梓承, 刘星, 白娟, 等. 利用 CRISPR/Cas9 基因编辑技术构建伪狂犬病病毒 UL21 基因缺失重组病毒[J]. *畜牧与兽医*, 2023, 55(6): 101-107.
- Ma Z C, Liu X, Bai J, et al. Construction of recombinant pseudorabies virus with UL21 gene deletion using the CRISPR/Cas9 gene-editing technology[J]. *Animal Husbandry & Veterinary Medicine*, 2023, 55(6): 101-107 (in Chinese with English abstract).
- [23] Chen T, Zhou X T, Qi Y, et al. Feline herpesvirus vectored-rabies vaccine in cats: a dual protection[J]. *Vaccine*, 2019, 37(16): 2224-2231.
- [24] Yokoyama N, Fujita K, Damiani A, et al. Further development of a recombinant feline herpesvirus type 1 vector expressing feline calicivirus immunogenic antigen[J]. *The Journal of Veterinary Medical Science*, 1998, 60(6): 717-723.
- [25] Sato E, Yokoyama N, Miyazawa T, et al. Efficient expression of the envelope protein of feline immunodeficiency virus in a recombinant feline herpesvirus type 1 (FHV-1) using the gC promoter of FHV-1[J]. *Virus Research*, 2000, 70(1/2): 13-23.