



gD 基因插入增强 *gI/gE/gM* 缺失重组伪狂犬病病毒对小鼠的免疫效果

陆灵光, 刘家齐, 卢佩琪, 吴瑞彬, 黄丹妮, 刘佳悦, 梁婉琪, 琚春梅*

(华南农业大学兽医学院 广东省动物源性人兽共患病预防与控制重点实验室, 广州 510642)

摘要: 本研究旨在构建双拷贝 *gD* 基因的重组伪狂犬病病毒 rPRV-AH-*gI*⁻/*gE*⁻/*gM*⁻/*gD*⁺, 并对其免疫效力进行评价。以 rPRV-AH-*gI*⁻/*gE*⁻ 为亲本毒株, 利用同源重组技术, 缺失 *gM* 基因并在其缺失位置插入 PRV *gD* 基因表达盒, 构建重组病毒 rPRV-AH-*gI*⁻/*gE*⁻/*gM*⁻/*gD*⁺。用 10^{7.0} TCID₅₀ 的 rPRV-AH-*gI*⁻/*gE*⁻、rPRV-AH-*gI*⁻/*gE*⁻/*gM*⁻、rPRV-AH-*gI*⁻/*gE*⁻/*gM*⁻/*gD*⁺ 制备灭活疫苗, 免疫 4 周龄昆明小鼠 2 次, 间隔 3 周, 并设商品化疫苗和 DMEM 对照组, 免疫后定期采血, 通过中和试验检测小鼠血清中和抗体水平, ELISA 试验检测小鼠血清总抗体水平, 在首免后 6 周用 10^{5.5} TCID₅₀ PRV-AH 进行攻毒试验。结果显示: rPRV-AH-*gI*⁻/*gE*⁻/*gM*⁻/*gD*⁺ 中插入的 *gD* 基因获得了表达, 表达蛋白大小约为 53 ku; rPRV-AH-*gI*⁻/*gE*⁻/*gM*⁻/*gD*⁺ 组小鼠在首免后 4、6 周中和抗体及血清总 IgG 抗体水平均显著高于 rPRV-AH-*gI*⁻/*gE*⁻、rPRV-AH-*gI*⁻/*gE*⁻/*gM*⁻ 组 ($P < 0.01$), 但与商品化疫苗组相比差异不显著 ($P > 0.05$); 用 PRV-AH 攻毒后, rPRV-AH-*gI*⁻/*gE*⁻/*gM*⁻/*gD*⁺、rPRV-AH-*gI*⁻/*gE*⁻/*gM*⁻、rPRV-AH-*gI*⁻/*gE*⁻ 和商品化疫苗组的攻毒保护率分别为 100%、70%、60% 和 90%。综上表明, *gD* 基因的插入可以提高重组病毒的免疫保护效果, 为 PRV 流行毒株候选疫苗的研制奠定了一定的基础。

关键词: 伪狂犬病病毒; 双拷贝 *gD*; 同源重组; 免疫效力

中图分类号: S852.659.1

文献标志码: A

文章编号: 0366-6964(2026)01-0327-10

Immune Effect of *gD* Gene Insertion-enhanced *gI/gE/gM* Deleted Recombinant Pseudorabies Virus in Mice

LU Lingguang, LIU Jiaqi, LU Peiqi, WU Ruibin, HUANG Danni,

LIU Jiayue, LIANG Wanqi, JU Chunmei*

(Guangdong Provincial Key Laboratory of Zoonosis Prevention and Control, College of Veterinary Medicine, South China Agricultural University, Guangzhou 510642, China)

Abstract: In this study, we aimed to develop recombinant PRV rPRV-AH-*gI*⁻/*gE*⁻/*gM*⁻/*gD*⁺ with double *gD* and evaluate its immune efficacy. The recombinant virus rPRV-AH-*gI*⁻/*gE*⁻/*gM*⁻/*gD*⁺ was constructed by deleting *gM* gene and inserting *gD* expression cassette at the deficient region. Four-week-old Kunming mice were immunized twice with 10^{7.0} TCID₅₀ inactivated rPRV-AH-*gI*⁻/*gE*⁻, rPRV-AH-*gI*⁻/*gE*⁻/*gM*⁻, rPRV-AH-*gI*⁻/*gE*⁻/*gM*⁻/*gD*⁺ at an interval of 3 weeks. Commercial vaccine and DMEM were as the control group. After immunization, regular blood was collected, neutralizing antibody levels in sera were detected by neutralization test, and total antibody

收稿日期: 2024-11-08

基金项目: 国家重点研发计划项目(2022YFD1800100)

作者简介: 陆灵光, 博士生, 主要从事病毒致病机制与防控研究, E-mail: lulingguang0401@163.com; 刘家齐, 硕士生, 主要从事病毒致病机制与防控研究, E-mail: ljql8853852097@163.com; 陆灵光和刘家齐为同等贡献作者

* 通信作者: 琚春梅, 主要从事病毒致病机制与防控研究, E-mail: juchunmei@scau.edu.cn

levels were detected by ELISA. At 6 weeks of first immunization, mice were challenged with $10^{5.5}$ TCID₅₀ PRV-AH. The inserted *gD* gene was expressed with the molecular weight of 53 ku in the rPRV-AH-*gI*⁻/*gE*⁻/*gM*⁻/*gD*⁺. The neutralizing and total IgG antibody levels of rPRV-AH-*gI*⁻/*gE*⁻/*gM*⁻/*gD*⁺ group were significantly higher than those of rPRV-AH-*gI*⁻/*gE*⁻ and rPRV-AH-*gI*⁻/*gE*⁻/*gM*⁻ at 4 and 6 weeks after first immunization ($P < 0.01$). However, compared with the commercial vaccine group, the difference was not significant ($P > 0.05$). After challenged with PRV-AH, the protection rates were 100%, 70%, 60% and 90% of the rPRV-AH-*gI*⁻/*gE*⁻/*gM*⁻/*gD*⁺, rPRV-AH-*gI*⁻/*gE*⁻/*gM*⁻, rPRV-AH-*gI*⁻/*gE*⁻ and commercial vaccine groups respectively. The results showed that the insertion of *gD* gene can improve the immune protection effect of the recombinant virus which is helpful in developing vaccine candidate for PRV control.

Keywords: pseudorabies virus; double *gD*; homologous recombination; immune efficacy

* **Corresponding author:** JU Chunmei, E-mail: juchunmei@scau.edu.cn

猪伪狂犬病(pseudorabies, PR)是由伪狂犬病病毒(pseudorabies virus, PRV)引起的重要传染病,对全球养猪业危害巨大,其症状主要表现为母猪流产、产死胎、木乃伊胎,仔猪神经症状及成年猪呼吸道症状等^[1-3]。国内主要采用疫苗免疫来防控PR,但2011年后出现了毒力更强的PRV变异毒株,导致PR疫情再度暴发,给我国养猪业造成了巨大的经济损失^[4]。多项研究表明,以Bartha-K61为代表的传统PRV疫苗已不能对变异毒株提供完全有效的保护^[5-6]。

PRV *gE*、*gI*、*gM*均为病毒的毒力基因,且为病毒增殖的非必需基因,缺失这些基因可使病毒的毒力降低^[7-8]。*gD*蛋白位于成熟的病毒粒子囊膜表面,分为胞外区和跨膜区,是病毒识别靶细胞受体所必需的糖蛋白,参与病毒的吸附和穿入过程^[9-10]。同时,*gD*糖蛋白也是PRV的主要保护性抗原,作为受体结合蛋白,无论补体是否存在,均能诱导机体产生高水平的中和抗体^[11-12]。本研究拟以rPRV-AH-*gI*⁻/*gE*⁻为亲本毒株,利用同源重组技术,缺失*gM*基因并在其缺失位置插入*gD*基因表达盒,构建重组病毒rPRV-AH-*gI*⁻/*gE*⁻/*gM*⁻/*gD*⁺,并对其免疫效力进行评价,以探讨提高*gD*表达量是否可增加PRV重组病毒疫苗的免疫效果,为PRV流行毒株候选疫苗的研制提供新思路。

1 材料与方法

1.1 毒株、细胞与质粒

rPRV-AH-*gI*⁻/*gE*⁻重组病毒株与pcDNA-*gD*均由本实验室前期构建。PRV-AH毒株、幼年叙利亚地鼠肾细胞(BHK-21)、pEGFP-N1质粒均由华

南农业大学兽医学院微生物学教研室保存。商品化疫苗为猪伪狂犬病灭活疫苗(HN1201-Δ*gE*株),购于普莱柯生物工程股份有限公司。

1.2 实验动物

4周龄SPF级雌性昆明鼠购自于南方医科大学实验动物中心。

1.3 引物设计

参考GenBank中登录的伪狂犬病病毒ZJ01株(GI:746719444)基因序列,设计引物*gM*-LA1-F/R和*gM*-F/R。根据Sosoo无缝克隆技术引物设计原则,设计引物Sosoo-EGFP-F/R和Sosoo-*gD*-F/R(表1)。

1.4 重组转移质粒的构建及鉴定

以PRV-AH基因组DNA为模板,分别使用引物*gM*-LA1-F/R和*gM*-RA1-F/R进行PCR,扩增同源臂*gM*-LA1、*gM*-RA1。将*gM*-LA1与pMD18-T进行连接得到质粒pMD-*gM*-LA1,然后将*gM*-RA1插入pMD-*gM*-LA1 *Hind* III和*Pst* I酶切位点之间,构建质粒pMD-LA1-RA1。以pEGFP-N1为模板,使用引物Sosoo-EGFP-F/R扩增EGFP基因表达盒;以pcDNA-*gD*为模板,使用引物Sosoo-*gD*-F/R扩增*gD*基因表达盒。将pMD-LA1-RA1经*Pst* I线性化,采用无缝克隆试剂盒将线性化的pMD-LA1-RA1分别与EGFP、*gD*基因表达盒进行无缝克隆,得到质粒pMD-LA1-EGFP-RA1和pMD-LA1-*gD*-RA1。对重组质粒pMD-LA1-RA1、pMD-LA1-EGFP-RA1和pMD-LA1-*gD*-RA1均进行PCR及测序鉴定。

1.5 重组病毒的构建与鉴定

将pMD-LA1-EGFP-RA1转染至BHK-21细

表 1 不同基因的引物序列

Table 1 Primer sequences of the different genes

引物名称 Gene name	引物序列(5'→3') Primer sequences
gM-LA1-F	CATCGTTCCCGTCTGGTGTG
gM-LA1-R	TTCGTCGAGGTCGTCGTGTC
gM-RA1-F	AGAGGCTGATGTGGAAGCTGTT
gM-RA1-R	TGATAGAGGTCTGCGGGTTCG
Sosoo-EGFP-F	ACCTGCAGGCATGCAAGCTTCGTTACATAACTTACGGTAAAT
Sosoo-EGFP-R	CCACATCAGCCTCTAAGCTTTAAGATACATTGATGAGTTTGG
Sosoo-gD-F	GCAGAAATCGTCGACCTGCAGGCATGCAAGCTTCAGATATACGCGTTGAC
Sosoo-gD-R	TCCTGGCCAACAGCTTCAACATCAGCCTCTACCTCAGAAG CCATAGAGC

胞中,然后用重组病毒 rPRV-AH- gI^-/gE^- 接种转染细胞,使 pMD-LA1-EGFP-RA1 和 rPRV-AH- gI^-/gE^- 在 BHK-21 细胞中进行同源重组。48 h 后收获细胞培养液,再接种于 BHK-21 细胞中,以 EGFP 为筛选标记进行 2~3 次空斑纯化得到 rPRV-AH- $gI^-/gE^-/gM^-/EGFP^+$ 。提取 rPRV-AH- $gI^-/gE^-/gM^-/EGFP^+$ DNA,使用 gM-LA1-F 与 gM-RA1-R 进行 PCR 鉴定及测序鉴定。同样,使用上述方法将 pMD-LA1-RA1、pMD-LA1-gD-RA1 分别与 rPRV-AH- $gI^-/gE^-/gM^-/EGFP^+$ 进行同源重

组,通过空斑纯化筛选不出现绿色荧光的感染细胞即可得到重组病毒 rPRV-AH- $gI^-/gE^-/gM^-/gD^+$,提取病毒 DNA,使用 gM-LA1-F 与 gM-RA1-R 进行 PCR 鉴定及测序鉴定。重组病毒 rPRV-AH- $gI^-/gE^-/gM^-/gD^+$ 构建如图 1 所示。

1.6 重组病毒 rPRV-AH- $gI^-/gE^-/gM^-/gD^+$ 中 *gD* 蛋白的表达检测

将重组病毒 rPRV-AH- $gI^-/gE^-/gM^-/gD^+$ 感染 BHK-21 后,提取细胞蛋白进行 SDS-PAGE,然

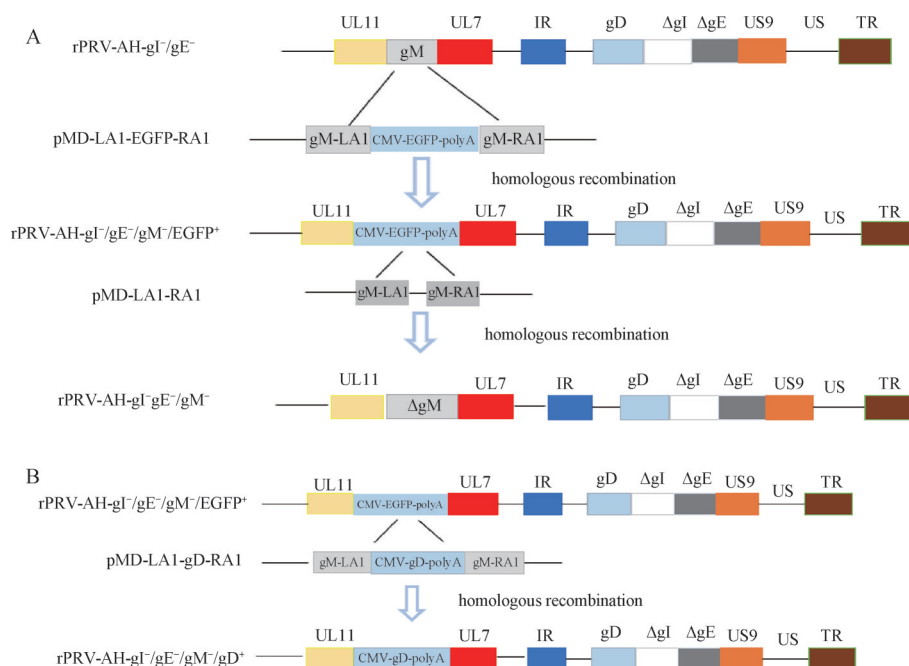
A. rPRV-AH- $gI^-/gE^-/gM^-$ 的构建; B. rPRV-AH- $gI^-/gE^-/gM^-/gD^+$ 的构建A. Construction of rPRV-AH- $gI^-/gE^-/gM^-$; B. Construction of rPRV-AH- $gI^-/gE^-/gM^-/gD^+$

图 1 重组病毒的构建策略

Fig. 1 Construction strategy of the recombinant virus

后将凝胶中的蛋白电转至 PVDF 膜上,以 His 鼠源一抗和 HRP 标记的山羊抗鼠二抗进行 Western blot,检测重组病毒中插入 gD 蛋白的表达;用 PRV gD 单克隆抗体和 AMCA 标记的山羊抗小鼠 IgG 抗体对重组病毒感染的 BHK-21 细胞进行间接免疫荧光实验检测总 gD 蛋白的表达。

1.7 动物试验

将 4 周龄的昆明小鼠随机分为 5 组(A~E 组),每组 8 只。A~C 组分别在后腿肌肉接种 $10^{7.0}$ TCID₅₀ 的 rPRV-AH-gI⁻/gE⁻、rPRV-AH-gI⁻/gE⁻/gM⁻和 rPRV-AH-gI⁻/gE⁻/gM⁻/gD⁺灭活疫苗。D 组接种商品化灭活疫苗,接种病毒量为 $10^{7.0}$ TCID₅₀,E 组接种 DMEM 作为对照组,接种剂量均为 100 μ L。首免后 3 周进行二免,免疫后 0、2、4、6 周分别对小鼠进行眼眶采血,采用中和试验检测血清中和抗体水平,ELISA 方法检测血清总 IgG 抗体水平。二免 3 周后对小鼠进行攻毒,每组小鼠接种 $10^{5.5}$ TCID₅₀ 的 PRV-AH 毒株。攻毒后 14 d 内每天

观察小鼠的临床症状及死亡情况并记录。

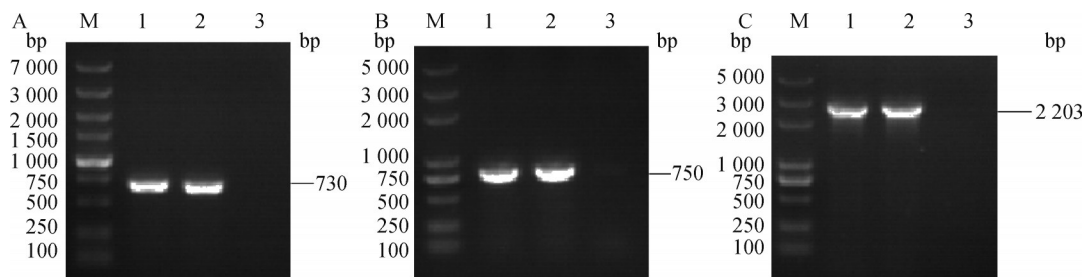
1.8 统计分析

试验数据用 GraphPad Prism version 6.0,通过 *t* 检验对不同组别之间的数据进行统计分析。统计学上显著性分别表示为*. $P < 0.05$, **. $P < 0.01$, ***. $P < 0.001$, ****. $P < 0.0001$ 。

2 结果

2.1 同源臂 gM-LA1、gM-RA1 和 gD 基因的 PCR 扩增

以 PRV-AH 基因组 DNA 为模板,分别使用引物 gM-LA1-F/R 和 gM-RA1-F/R 扩增 gM 同源臂 gM-LA1 和 gM-RA1,PCR 产物经 1.0% 琼脂糖凝胶进行电泳检测,结果如图 2A、2B 所示,gM-LA1 大小约为 730 bp, gM-RA1 约为 750 bp。以 pcDNA-gD 为模板,使用引物 Sosoo-gD F/R 扩增 gD 基因表达盒,结果如图 2C 所示,片段大小约为 2 203 bp。



M. DL5000 DNA 相对分子质量标准;A. gM-LA1;B. gM-RA1;C. gD

M. DL5000 DNA marker;A. gM-LA1;B. gM-RA1;C. gD

图2 gM-LA1、gM-RA1及gD基因PCR扩增

Fig. 2 PCR amplification of gM-LA1, gM-RA1 and gD gene

2.2 重组转移质粒 pMD-LA1-EGFP-RA1 的 PCR 鉴定

使用 gM-LA1-F 与 gM-RA1-R 对 pMD-LA1-EGFP-RA1 进行 PCR 鉴定,结果如图 3 所示,重组转移质粒 pMD-LA1-EGFP-RA1 的扩增片段大小约为 3 166 bp,而 pMD-LA1-RA1 扩增片段约为 1 455 bp,与预期大小相符。经测序鉴定,证实 pMD-LA1-EGFP-RA1 与 pMD-LA1-RA1 构建正确。

2.3 重组转移质粒 pMD-LA1-gD-RA1 的 PCR 鉴定

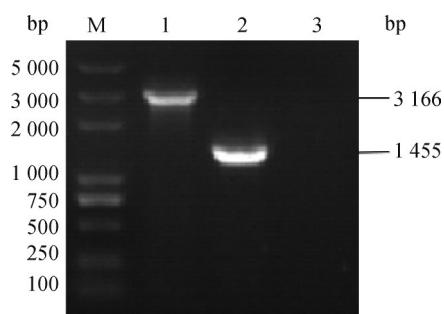
使用 gM-LA1-F 与 gM-RA1-R 对 pMD-LA1-gD-RA1 进行 PCR 鉴定,结果如图 4 所示,重组转移质粒 pMD-LA1-gD-RA1 的扩增片段大小约为

3 783 bp,质粒 pMD-LA1-RA1 扩增片段约为 1 455 bp,与预期大小相符。经测序鉴定,证实 pMD-LA1-EGFP-RA1 构建正确。

2.4 重组病毒 rPRV-AH-gI⁻/gE⁻/gM⁻/gD⁺ 的 PCR 及荧光鉴定

提取重组病毒 rPRV-AH-gI⁻/gE⁻/gM⁻/gD⁺ 基因组 DNA 为模板,使用引物 gM-LA1-F 与 gM-RA1-R 进行 PCR 扩增,以鉴定 gD 表达盒是否成功插入到 gM 缺失区域,结果如图 5 所示,重组病毒 rPRV-AH-gI⁻/gE⁻/gM⁻/gD⁺ 扩增片段大小约为 3 783 bp,而重组病毒 rPRV-AH-gI⁻/gE⁻/gM⁻/EGFP⁺ 扩增片段大小约为 3 166 bp,亲本毒株 rPRV-AH-gI⁻/gE⁻和野毒株 PRV-AH 扩增片段大

小约为 1 455 bp, 结果显示扩增片段大小与预期相符。

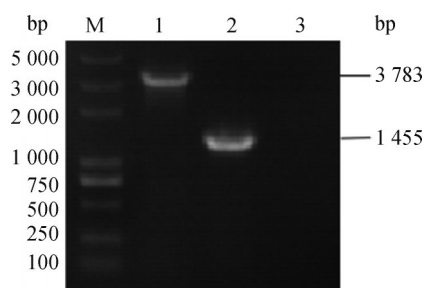


M. DL5000 DNA 相对分子质量标准; 1. pMD-LA1-EGFP-RA1; 2. pMD-LA1-RA1; 3. 阴性对照

M. DL5000 DNA marker; 1. pMD-LA1-EGFP-RA1; 2. pMD-LA1-RA1; 3. Negative control

图3 重组转移质粒 pMD-LA1-EGFP-RA1 的 PCR 鉴定

Fig. 3 Identification of the plasmid pMD-LA1-EGFP-RA1 by PCR



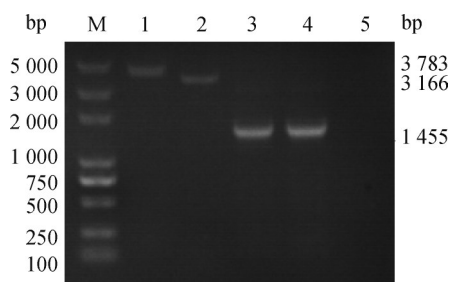
M. DL5000 DNA 相对分子质量标准; 1. pMD-LA1-gD-RA1; 2. pMD-LA1-RA1; 3. 阴性对照

M. DL5000 DNA marker; 1. pMD-LA1-gD-RA1; 2. pMD-LA1-RA1; 3. Negative control

图4 重组转移质粒 pMD-LA1-gD-RA1 的 PCR 鉴定

Fig. 4 Identification of the plasmid pMD-LA1-gD-RA1 by PCR

将重组病毒接种于 BHK-21 细胞中, 待病变细胞达到 80%~90% 时进行观察, 细胞病变主要表现为细胞变圆, 细胞间隙变大, 折光率改变并聚集成团。采用荧光显微镜观察, rPRV-AH-*gI*⁻/*gE*⁻/*gM*⁻/*EGFP*⁺ 感染的细胞出现绿色荧光, 而 rPRV-AH-*gI*⁻/*gE*⁻/*gM*⁻/*gD*⁺ 和 PRV-AH 感染的细胞观察不到绿色荧光, 如图 6 所示。以上结果表明重组转移质粒 pMD-LA1-gD-RA1 已与 rPRV-AH-*gI*⁻/*gE*⁻/*gM*⁻/*EGFP*⁺ 发生了同源重组, *EGFP* 基因被 *gD* 表达盒替换, 成功获得了双拷贝 *gD* 基因的重组病毒 rPRV-AH-*gI*⁻/*gE*⁻/*gM*⁻/*gD*⁺。



M. DL5000 DNA 相对分子质量标准; 1. rPRV-AH-*gI*⁻/*gE*⁻/*gM*⁻/*gD*⁺; 2. rPRV-AH-*gI*⁻/*gE*⁻/*gM*⁻/*EGFP*⁺; 3. rPRV-AH-*gI*⁻/*gE*⁻; 4. PRV-AH; 5. 阴性对照

M. DL5000 DNA marker; 1. rPRV-AH-*gI*⁻/*gE*⁻/*gM*⁻/*gD*⁺; 2. rPRV-AH-*gI*⁻/*gE*⁻/*gM*⁻/*EGFP*⁺; 3. rPRV-AH-*gI*⁻/*gE*⁻; 4. PRV-AH; 5. Negative control

图5 重组病毒 rPRV-AH-*gI*⁻/*gE*⁻/*gM*⁻/*gD*⁺ 中插入 *gD* 表达盒的鉴定

Fig. 5 Identification of inserted *gD* expression cassette in the recombinant virus rPRV-AH-*gI*⁻/*gE*⁻/*gM*⁻/*gD*⁺

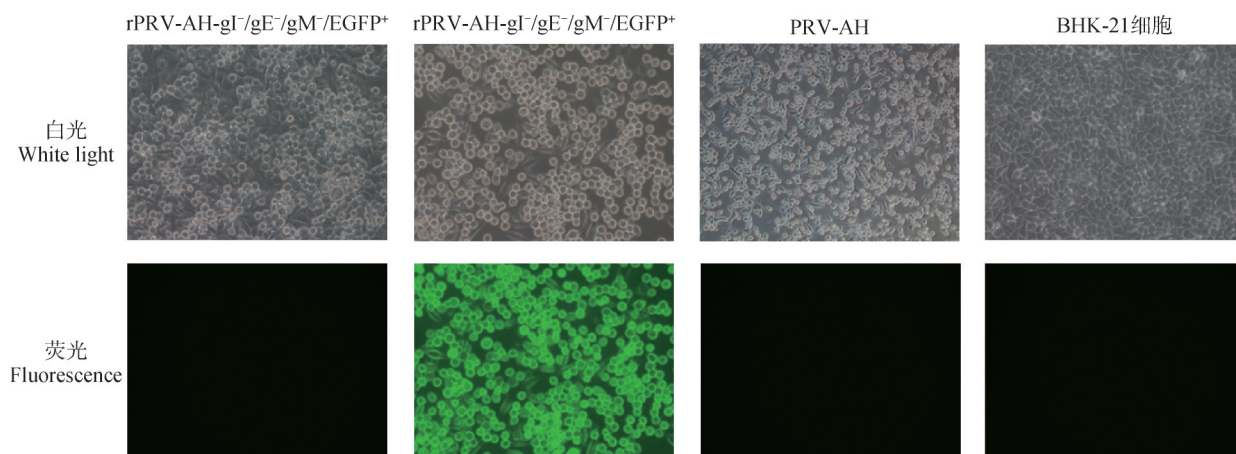


图6 重组病毒的荧光鉴定 (231×)

Fig. 6 Fluorescence identification of the recombinant viruses (231×)

2.5 重组病毒 rPRV-AH-gI⁻/gE⁻/gM⁻/gD⁺ 中 gD 基因的表达检测

将 rPRV-AH-gI⁻/gE⁻/gM⁻/gD⁺ 接种于 BHK-21 细胞中,待细胞病变完全时提取细胞总蛋白。因为在插入的 gD 基因编码区 5' 端引入了 His 标签序列,用鼠源 His-tag 单抗作为一抗,可通过 Western blot 检测外源 gD 基因的表达情况,结果如图 7 所示:重组病毒 rPRV-AH-gI⁻/gE⁻/gM⁻/gD⁺ 中插入的 gD 基因获得了表达,蛋白大小约为 53 ku,而 rPRV-AH-gI⁻/gE⁻ 和 PRV-AH 以及 BHK-21 细胞中均未见相应目的条带的表达;同时以 PRV gD 单克隆抗体和 AMCA 标记的山羊抗小鼠 IgG 抗体对重组病毒感染细胞进行间接免疫荧光检测,可以看出 rPRV-AH-gI⁻/gE⁻/gM⁻/gD⁺ 株中 gD 蛋白表达水平比 rPRV-AH-gI⁻/gE⁻/gM⁻ 更高(图 8),表明插入的 gD 基因获得成功表达。

2.6 rPRV-AH-gI⁻/gE⁻/gM⁻/gD⁺ 灭活疫苗免疫小鼠血清中和抗体检测

在首免后第 0、2、4、6 周分别对各组小鼠进行眼眶采血并分离血清,通过中和试验检测血清样品中

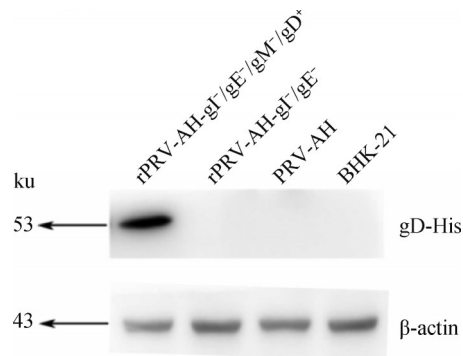
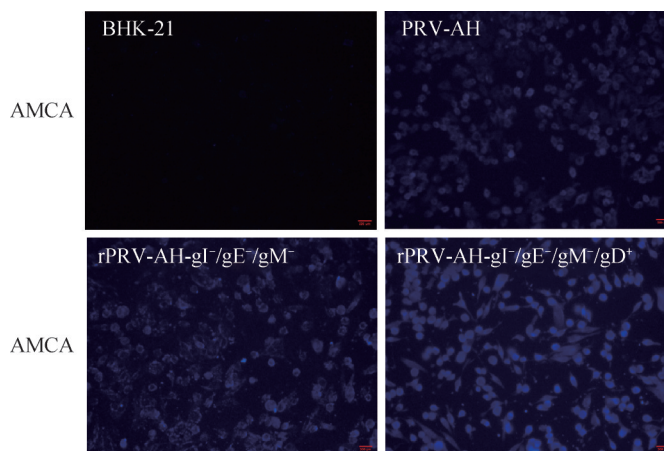


图 7 重组病毒 rPRV-AH-gI⁻/gE⁻/gM⁻/gD⁺ 中插入 gD 的 Western blot 检测

Fig. 7 Detection of inserted gD in the recombinant virus rPRV-AH-gI⁻/gE⁻/gM⁻/gD⁺ by Western blot

PRV 中和抗体水平。结果如图 9 所示,各组小鼠中和抗体水平在首免后 2~6 周均呈上升趋势。在首免后 2 周,各组免疫小鼠的血清中和抗体水平均不高;在首免 4 周与 6 周,血清中和抗体水平增长明显,特别是 rPRV-AH-gI⁻/gE⁻/gM⁻/gD⁺ 组,显著高于 rPRV-AH-gI⁻/gE⁻ 和 rPRV-AH-gI⁻/gE⁻/gM⁻ 免疫组 ($P < 0.0001$),但与商品化疫苗组相比差异不显著 ($P > 0.05$)。



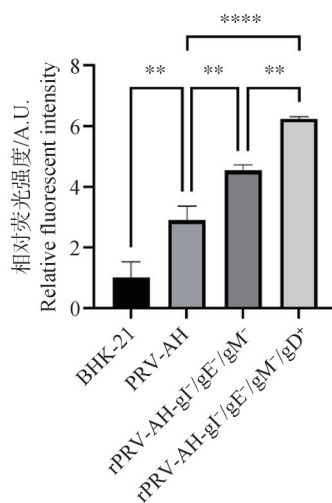
, $P < 0.01$; **, $P < 0.0001$

图 8 重组病毒 rPRV-AH-gI⁻/gE⁻/gM⁻/gD⁺ 中 gD 总蛋白的间接免疫荧光检测 (标尺=200 μm)

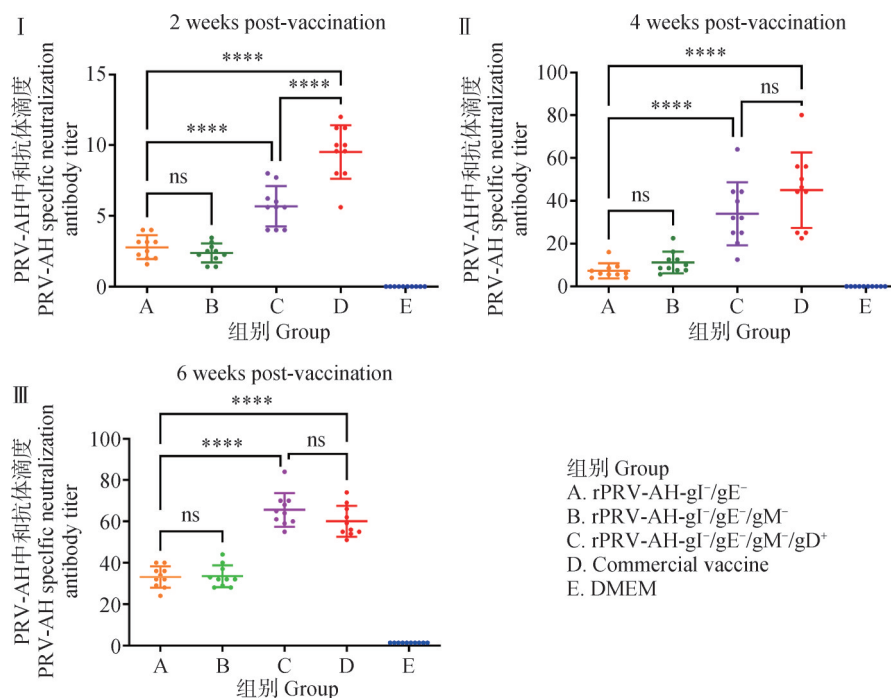
Fig. 8 Detection of total gD in the recombinant virus rPRV-AH-gI⁻/gE⁻/gM⁻/gD⁺ by IFA (Bar=200 μm)

2.7 rPRV-AH-gI⁻/gE⁻/gM⁻/gD⁺ 灭活疫苗免疫小鼠血清总 IgG 抗体检测

以纯化的 PRV-AH 病毒为包被抗原,对免疫后第 0、2、4、6 周小鼠血清进行 200 倍稀释后,采用间接 ELISA 对血清总 IgG 抗体进行检测,结果如图 10



所示, rPRV-AH-gI⁻/gE⁻/gM⁻/gD⁺ 和 rPRV-AH-gI⁻/gE⁻ 灭活疫苗组抗体水平在 0~6 周均逐渐升高,而 rPRV-AH-gI⁻/gE⁻/gM⁻ 和商品化疫苗组在首免后 4 周达到高峰后开始降低;在首免 4~6 周, rPRV-AH-gI⁻/gE⁻/gM⁻/gD⁺ 组与 rPRV-AH-gI⁻/



I. 首免后第2周; II. 首免后第4周; III. 首免后第6周。ns. $P > 0.05$; ****. $P < 0.0001$

I. The 2nd week post primary immunization; II. The 4th week post primary immunization; III. The 6th week post primary immunization. ns. $P > 0.05$; ****. $P < 0.0001$

图9 免疫后不同时间各组小鼠血清中和抗体水平

Fig. 9 The levels of neutralizing antibodies in sera of mice from each group at different times after immunization

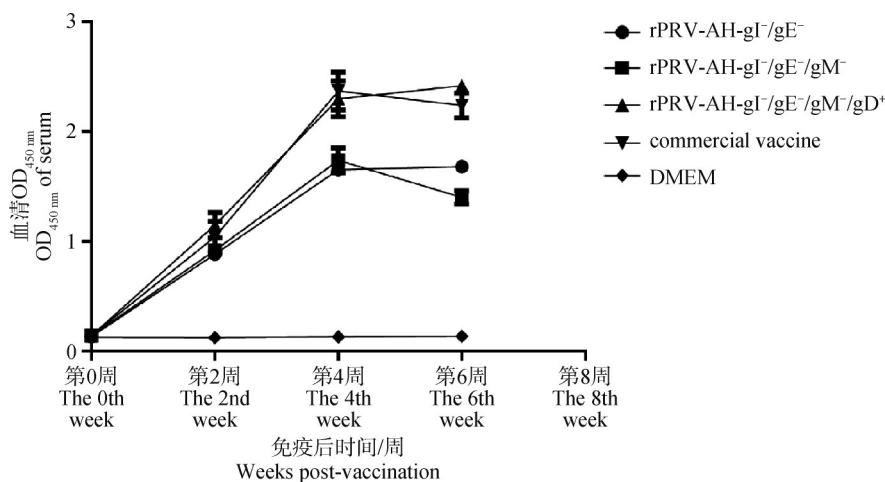


图10 ELISA 检测各组小鼠血清 IgG 抗体

Fig. 10 Detection of IgG antibodies in sera of the mice in each group by ELISA

gE^- 和 rPRV-AH- $gI^-/gE^-/gM^-$ 组相比, IgG 抗体水平差异显著 ($P < 0.01$), 与商品化疫苗组相比差异不显著 ($P > 0.05$)。

2.8 rPRV-AH- $gI^-/gE^-/gM^-/gD^+$ 灭活疫苗免疫小鼠攻毒保护效果检测

在首免后第6周, 用 PRV-AH 毒株对各组小鼠进行攻毒, 攻毒剂量为 $10^{5.5}$ TCID₅₀。攻毒后 14 d 内

每天观察小鼠的临床症状及死亡情况, 并记录绘制生存曲线。结果如图 11 所示, DMEM 组小鼠在攻毒后第 2 天出现奇痒症状, 3 d 后小鼠全部死亡。rPRV-AH- gI^-/gE^- 和商品化疫苗组小鼠均在攻毒第 3 天后陆续出现临床症状和部分死亡, rPRV-AH- gI^-/gE^- 免疫组小鼠死亡时间在攻毒后 3~6 d, 存活率为 60%, rPRV-AH- $gI^-/gE^-/gM^-$ 组死亡时

间在攻毒后4~6 d,存活率为70%,商品化疫苗免疫组有1只小鼠在攻毒后第6天出现临床症状并死亡,存活率为90%。rPRV-AH-gI⁻/gE⁻/gM⁻/gD⁺免疫组小鼠在攻毒后未出现死亡,攻毒保护率为

100%,与rPRV-AH-gI⁻/gE⁻组(60%)和rPRV-AH-gI⁻/gE⁻/gM⁻组(70%)相比差异显著($P < 0.05$),与商品化疫苗免疫组攻毒保护率(90%)相比,差异不显著($P > 0.05$)。

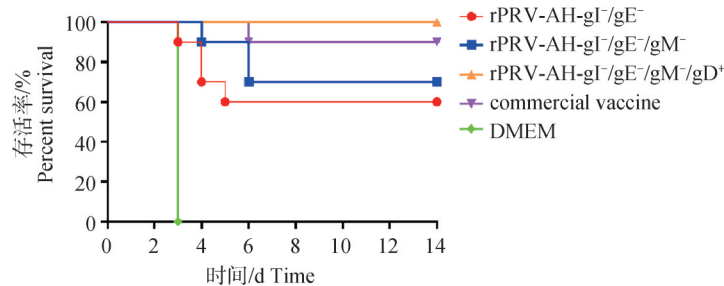


图 11 $10^{5.5}$ TCID₅₀ PRV-AH 攻毒后各组免疫小鼠的存活率

Fig. 11 Survival rate of immunized mice in each group after challenged with $10^{5.5}$ TCID₅₀ PRV-AH

3 讨论

伪狂犬病病毒可以感染大多数哺乳动物,除猪外,PRV 感染通常会导致严重瘙痒、中枢神经系统功能障碍^[13-14]。猪是其唯一的贮藏宿主^[15],且不同年龄段猪感染后会表现出不同的临床症状,如新生仔猪表现神经症状和死亡,母猪出现流产、死胎、产木乃伊胎,公猪丧失种用能力,成年猪多表现呼吸道症状^[16-17]。疫苗接种是防控该病的有效措施,国内外多采用基因工程技术缺失 PRV 毒力基因以研制基因工程疫苗^[18-19]。gE、gI 基因是 PRV 的毒力基因,也是病毒增殖过程中的非必需基因,缺失 gE、gI 基因后可使病毒的毒力降低,但不影响病毒在宿主细胞内的复制,因此 gE 和 gI 基因常作为 PRV 基因缺失疫苗的候选基因^[20-21]。此外,PRV gE 基因缺失株免疫动物不产生抗 gE 糖蛋白的抗体,因此配合 gE 鉴别诊断方法可鉴别野毒感染动物与疫苗免疫动物,有利于猪场 PRV 的净化^[22-24]。

gM 蛋白由 PRV UL10 基因编码,是 PRV 增殖的一种非必需糖蛋白,缺失 gM 基因的 PRV 可在细胞中正常复制,但由于 gM 参与病毒的膜融合过程,因此缺失 gM 基因会影响 PRV 在细胞间的扩散,从而导致空斑减小^[25-26]。gM 也是 PRV 重要的毒力相关因子,可通过 Caspase-3 介导的细胞凋亡参与病毒的复制及致病过程,缺失 gM 基因可使 PRV 毒力明显降低,因此可作为基因缺失疫苗的候选基因^[8,27]。gD 糖蛋白是 PRV 的重要保护性抗原,能刺激机体产生中和抗体,对控制 PRV 感染起着重要的

作用^[28-29]。有研究表明,使用表达 PRV-gD 基因的 DNA 疫苗对小鼠进行免疫,可以诱导 PRV 特异性淋巴细胞增殖反应和血清中和抗体的产生^[30]。本实验室前期研究显示 rPRV-AH-gI⁻/gE⁻ 对小鼠仍具有一定毒力^[31],因此本研究将重组病毒灭活制备灭活疫苗进行免疫效果评价。小鼠免疫及攻毒试验结果显示,重组病毒 rPRV-AH-gI⁻/gE⁻/gM⁻/gD⁺ 免疫组小鼠产生的血清中和抗体和血清 IgG 总抗体水平显著高于 rPRV-AH-gI⁻/gE⁻ 和 rPRV-AH-gI⁻/gE⁻/gM⁻ 免疫组; rPRV-AH-gI⁻/gE⁻/gM⁻/gD⁺ 免疫组小鼠在攻毒后未出现死亡,攻毒保护率为 100%,与 rPRV-AH-gI⁻/gE⁻/gM⁻ 组(70%)和 rPRV-AH-gI⁻/gE⁻ 组(60%)相比差异显著($P < 0.05$)。研究结果表明,通过在 PRV gM 基因缺失位置插入 gD 表达盒的方式提高 gD 蛋白表达量可以增强基因缺失疫苗的免疫保护效果。

4 结论

本研究通过同源重组获得了双拷贝 gD 基因的重组病毒 rPRV-AH-gI⁻/gE⁻/gM⁻/gD⁺,并评价了重组病毒灭活疫苗对小鼠的免疫效力。结果表明, rPRV-AH-gI⁻/gE⁻/gM⁻/gD⁺ 灭活疫苗免疫效果优于 rPRV-AH-gI⁻/gE⁻ 和 rPRV-AH-gI⁻/gE⁻/gM⁻,对小鼠的免疫保护率可达 100%,研究结果可为 PRV 变异株候选疫苗的研制提供一定的新思路。

参考文献 (References):

- [1] ZHENG H H, FU P F, CHEN H Y, et al. Pseudorabies virus: From pathogenesis to prevention

- strategies[J]. *Viruses*, 2022, 14(8):1638.
- [2] CHEN Y M, GAO J, HUA R Q, et al. Pseudorabies virus as a zoonosis: scientific and public health implications[J]. *Virus Gen*, 2025, 61(1):9-25.
- [3] ZHAO Y, DING C, ZHU Z B, et al. Pseudorabies virus infection triggers mitophagy to dampen the interferon response and promote viral replication[J]. *J Virol*, 2024, 98(10):e0104824.
- [4] REN J L, TAN S S, CHEN X X, et al. Genomic characterization and gE/gI-deleted strain construction of novel PRV variants isolated in Central China[J]. *Viruses*, 2023, 15(6):1237.
- [5] LIAN Z M, LIU P R, ZHU Z B, et al. Isolation and characterization of a novel recombinant classical pseudorabies virus in the context of the variant strains pandemic in China[J]. *Viruses*, 2023, 15(9):1966.
- [6] TAN L, YAO J, YANG Y D, et al. Current status and challenge of pseudorabies virus infection in China[J]. *Virol Sin*, 2021, 36(4):588-607.
- [7] WU Z Y, DENG J H, CHEN M J, et al. Additional insertion of gc gene triggers better immune efficacy of TK/gI/gE-deleted pseudorabies virus in mice [J]. *Viruses*, 2024, 16(5):706.
- [8] ZHOU Q Q, SHI D S, TANG Y D, et al. Pseudorabies virus gM and its homologous proteins in herpesviruses induce mitochondria-related apoptosis involved in viral pathogenicity[J]. *PLoS Pathog*, 2024, 20(4):e1012146.
- [9] 李 安. 猪伪狂犬病毒 gD 蛋白与受体 Nectin-1 相互作用的研究[D]. 南宁:广西大学, 2017.
- LI A. Study on the interaction of pseudorabies virus glycoprotein D with Nectin-1 receptors[D]. Nanning: Guangxi University, 2017. (in Chinese)
- [10] ZHAO M P, CHEN J, LUO S J, et al. Pseudorabies gD protein protects mice and piglets against lethal doses of pseudorabies virus [J]. *Front Microbiol*, 2023, 14:1288458.
- [11] GERAGHTY R J, JOGGER C R, SPEAR P G. Cellular expression of alphaherpesvirus gD interferes with entry of homologous and heterologous alphaherpesviruses by blocking access to a shared gD receptor. [J]. *Virology*, 2000(1):147-58.
- [12] ZHANG C J, LIU Y M, CHEN S S, et al. A gD&gC-substituted pseudorabies virus vaccine strain provides complete clinical protection and is helpful to prevent virus shedding against challenge by a Chinese pseudorabies variant[J]. *Bmc Vet Res*, 2019, 15(1):2.
- [13] HUAN C C, YAO J T, XU W Y, et al. Huaier polysaccharide interrupts PRV infection via reducing virus adsorption and entry [J]. *Viruses*, 2022, 14(4):745.
- [14] OU J J, CAI S Q, ZHENG F Y, et al. Human pseudorabies virus infection: A new threat in China[J]. *J Infect*, 2020, 80(5):578-606.
- [15] MÜLLER T, HAHNE C, TOTTEWITZ F, et al. Pseudorabies virus in wild swine: a global perspective [J]. *Arch Virol*, 2011, 156(10):1691-705.
- [16] 连拯民. 糖皮质激素对伪狂犬病毒潜伏感染的激活作用及机制研究[D]. 扬州:扬州大学, 2024.
- LIAN Z M. Glucocorticoids-induced reactivation and mechanism on latent infection of pseudorabies virus [D]. Yangzhou: Yangzhou University, 2024. (in Chinese)
- [17] LIU Q Y, KUANG Y, LI Y F, et al. The epidemiology and variation in pseudorabies virus: A continuing challenge to pigs and humans [J]. *Viruses*, 2022, 14(7):1463.
- [18] ZHOU M, ABID M, CAO S N, et al. Recombinant pseudorabies virus usage in vaccine development against swine infectious disease [J]. *Viruses*, 2023, 15(2):370.
- [19] SUN Y, LUO Y Z, WANG C H, et al. Control of swine pseudorabies in China: Opportunities and limitations. [J]. *Vet Microbiol*, 2016:119-124.
- [20] ZHANG H L, ZHANG R H, LIU G, et al. Evaluation of immunogenicity of gene-deleted and subunit vaccines constructed against the emerging pseudorabies virus variants [J]. *Virol J*, 2023, 20(1):98.
- [21] DONG J, GU Z Q, JIN L, et al. Polymorphisms affecting the gE and gI proteins partly contribute to the virulence of a newly-emergent highly virulent Chinese pseudorabies virus. [J]. *Virology*, 2018, 519:42-52.
- [22] YIN Y, XU Z W, LIU X W, et al. A live gI/gE-deleted pseudorabies virus (PRV) protects weaned piglets against lethal variant PRV challenge [J]. *Virus Gen*, 2017, 53(4):565-572.
- [23] SUN L Q, TANG Y J, YAN K J, et al. Construction of a quadruple gene-deleted vaccine confers complete protective immunity against emerging PRV variant challenge in piglets [J]. *Virol J*, 2022, 19(1):19.
- [24] ZHAO Y, WANG L Q, ZHENG H H, et al. Construction and immunogenicity of a gE/gI/TK-deleted PRV based on porcine pseudorabies virus variant [J]. *Mol Cell Probes*, 2020, 53:101605.
- [25] BRACK A R, DIJKSTRA J M, GRANZOW H, et al.

- Inhibition of virion maturation by simultaneous deletion of glycoproteins E, I, and M of pseudorabies virus. [J]. *J Virol*, 1999, (7):5364-5372.
- [26] KLUPP B G, NIXDORF R, METTENLEITER T C. Pseudorabies virus glycoprotein M inhibits membrane fusion. [J]. *J Virol*, 2000, (15):6760-6768.
- [27] TANG Y D, LIU J T, WANG T Y, et al. Comparison of pathogenicity-related genes in the current pseudorabies virus outbreak in China[J]. *Sci Rep*, 2017, 7(1):7783.
- [28] TONG L, ZHANG X, LI H H, et al. A self-amplifying mRNA vaccine expressing PRV gD induces robust immunity against virulent mutants [J]. *NPJ Vaccines*, 2025, 10(1):193.
- [29] JIANG Z Y, ZHU L, CAI Y, et al. Immunogenicity and protective efficacy induced by an mRNA vaccine encoding gD antigen against pseudorabies virus infection[J]. *Vet Microbiol*, 2020, 251:108886.
- [30] HAAGMANS B L, ROOIJ E M, DUBELAAR M, et al. Vaccination of pigs against pseudorabies virus with plasmid DNA encoding glycoprotein D. [J]. *Vaccine*, 1999(9-10):1264-71.
- [31] YAN Z B, CHEN M J, TANG D, et al. Better immune efficacy triggered by the inactivated gI/gE-deleted pseudorabies virus with the additional insertion of gC gene in mice and weaned pigs [J]. *Virus Res*, 2021, 296:198353.

(编辑 白永平)