



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 107881157 B

(45) 授权公告日 2021.07.30

(21) 申请号 201711355686.6

(22) 申请日 2017.12.16

(65) 同一申请的已公布的文献号
申请公布号 CN 107881157 A

(43) 申请公布日 2018.04.06

(73) 专利权人 中山大学
地址 510275 广东省广州市海珠区新港西路135号

(72) 发明人 何建国 郭长军 翁少萍 林易凡

(74) 专利代理机构 广州市南锋专利事务有限公司 44228

代理人 张小黎

(51) Int. Cl.

C12N 7/01 (2006.01)

C12N 15/90 (2006.01)

C12N 15/65 (2006.01)

A61K 39/12 (2006.01)

A61P 31/20 (2006.01)

C12R 1/93 (2006.01)

(56) 对比文件

CN 101926990 A, 2010.12.29

WO 2015195949 A2, 2015.12.23

欧阳岁东. 虎纹蛙病毒TK基因鉴定、缺失株的构建及其转染斑马鱼特性研究.《万方数据知识服务平台》.2010,第7,93页.

王庆等. 云斑尖塘鳢肿大细胞病毒属虹彩病毒的分离与鉴定.《水生生物学报》.2010,第34卷(第6期),1150-1156.

Jian G. He等.Complete Genome Analysis of the Mandarin Fish Infectious Spleen and Kidney Necrosis Iridovirus.《Virology》.2001,第291卷(第1期),126-139.

B E H Coupar等.Identification of a Bohle Iridovirus Thymidine Kinase Gene and Demonstration of Activity Using Vaccinia Virus.《Archives of Virology》.2005,第150卷(第9期),1797-1812.

审查员 储巧玲

权利要求书1页 说明书10页

序列表3页 附图6页

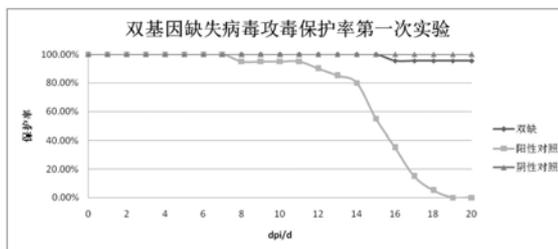
(54) 发明名称

一种肿大细胞病毒vSOCS/vTK双基因敲除株及其制备方法和应用

(57) 摘要

本发明提供了一种肿大细胞病毒vSOCS/vTK双基因缺失株及其制备方法和应用,为肿大细胞病毒株缺失vSOCS基因和vTK基因后制成的减毒病毒株。本发明还提供了一种带筛选标记的肿大细胞病毒vSOCS/vTK双基因缺失株及其制备方法和应用,为肿大细胞病毒缺失了vSOCS基因和vTK基因,且在基因缺失的部位通过同源重组分别插入第一筛选标记基因和第二筛选标记基因后制成的减毒病毒株。本发明提供的肿大细胞病毒vSOCS/vTK双基因缺失株是一种敲除了vSOCS和vTK致病基因的重组基因工程疫苗,毒力很弱,不会导致被免疫的鱼类发病死亡,采用浸泡免疫即可达到显著的免疫效果,无须注射,应用价值极

大。



1. 一种鳊传染性脾肾坏死病毒vSOCS/vTK双基因缺失株,其特征在于,所述鳊传染性脾肾坏死病毒vSOCS/vTK双基因缺失株为鳊传染性脾肾坏死病毒株缺失vSOCS基因和vTK基因后制成的减毒病毒株。

2. 一种带筛选标记的鳊传染性脾肾坏死病毒vSOCS/vTK双基因缺失株,其特征在于,为鳊传染性脾肾坏死病毒缺失了vSOCS基因和vTK基因,且在基因缺失的部位通过同源重组分别插入第一筛选标记基因和第二筛选标记基因后制成的减毒病毒株。

3. 如权利要求2所述的带筛选标记的鳊传染性脾肾坏死病毒vSOCS/vTK双基因缺失株,其特征在于,所述第一筛选标记基因和第二筛选标记基因不同,且分别独立地选自插入绿色荧光蛋白基因、红色荧光蛋白基因。

4. 一种鳊传染性脾肾坏死病毒vSOCS/vTK双基因缺失重组病毒疫苗,其特征在于,包括如权利要求1所述的鳊传染性脾肾坏死病毒vSOCS/vTK双基因缺失株或如权利要求2所述的带筛选标记的鳊传染性脾肾坏死病毒vSOCS/vTK双基因缺失株。

5. 如权利要求4所述的鳊传染性脾肾坏死病毒vSOCS/vTK双基因缺失重组病毒疫苗,其特征在于,所述鳊传染性脾肾坏死病毒vSOCS/vTK双基因缺失重组病毒疫苗还包括及药学上接受的诊断剂、载剂、赋形剂或稀释剂。

6. 如权利要求1所述的鳊传染性脾肾坏死病毒vSOCS/vTK双基因缺失株或如权利要求2所述的带筛选标记的鳊传染性脾肾坏死病毒vSOCS/vTK双基因缺失株在制备预防传染性脾肾坏死病毒疾病的试剂或药物中的应用。

一种肿大细胞病毒vSOCS/vTK双基因敲除株及其制备方法和应用

技术领域

[0001] 本发明涉及水产养殖疾病防控领域,具体涉及一种肿大细胞病毒vSOCS/vTK双基因敲除株及其制备方法和应用。

背景技术

[0002] 鳊鱼是我国“四大淡水名鱼”之一,是经济价值很高的名贵优质经济鱼类。鳊鱼在市场上较受欢迎,在看好鳊鱼养殖业发展前景的同时,越来越突出的病害问题成为了制约鳊鱼养殖业发展的瓶颈,严重影响了养殖户的积极性。其典型例子是1994年在我省爆发流行的鳊鱼虹彩病毒细胞肿大病毒病,导致养殖鳊鱼在一周内大批量死亡。目前该病仍严重威胁着鳊鱼养殖业的发展。

[0003] 细胞肿大属虹彩病毒是养殖鳊鱼暴发流行病的主要病原,也是养殖鱼类中流行性最广、致病力最强的病毒性病原之一,每年对水产养殖业造成了巨大的经济损失。虹彩病毒(Iridovirus)是一类正二十面体的大型双链DNA病毒,属于虹彩病毒科(Iridoviridae),能感染水生无脊椎动物和冷血脊椎动物,包括鱼类(如石斑鱼、鳊鱼、大菱鲆等名贵经济养殖鱼类)、两栖类(如蛙和蝾螈等)和爬行类动物(如龟、中华鳖、蛇等),能够被细胞肿大病毒属虹彩病毒感染的鱼类包括鳊鱼(*Siniperca chuatsi*)、真鲷(*Pagrus major*)、大菱鲆(*Scophthalmus maximus*)、鲈鱼(*Epinephelus spp.*)、鲑鱼(*Lateolabrax sp.*)等。

[0004] 当前,已报道肿大细胞病毒属中,其代表种为分离于鳊鱼的传染性脾肾坏死病毒(Infectious Spleen and Kidney Necrosis Virus, ISKNV)。在我国ISKNV可以感染70多种野生和养殖淡、海水鱼类,感染鱼类的造血组织,受感染的鱼会有贫血的症状,造成鳃部出血肿大,脾脏肥大褪色,鳍、体表有黑点,急性感染的鳊鱼死亡率高达100%。可以看出,水产养殖鱼类发生的虹彩病毒细胞肿大病毒病对鱼类养殖业造成巨大威胁,同时也是水产养殖鱼类转型和发展的重要制约因素之一。因此,开展细胞肿大病毒疫苗的研究具有重大的现实意义。

[0005] 现在许多文献已经报道了基因缺失减毒活疫苗可以有效、安全地起到保护的效果,例如牛传染性气管炎病毒和伪狂犬病毒的TK基因缺失疫苗,猴和人免疫缺陷病毒的nef基因缺失疫苗、牛白血病病毒的px基因缺失疫苗等。而构建成功双基因缺失疫苗,即缺失2个与毒力有关的基因,这样的疫苗株当然更为安全,如狂犬病毒发生TK缺失,再发生gE/gI基因缺失毒株,而获得的双基因缺失疫苗。

[0006] 申请人所在的研究团队建立了基于鳊鱼细胞系的ISKNV细胞灭活疫苗,其在实验室内对免疫鳊鱼的保护率可稳定在90%以上,相关成果已经申请了国家发明专利(申请号:200910038692.8)。但是,灭活疫苗由于免疫期短、用量大、需要佐剂、缺乏自然感染的免疫保护,而且需要耗费大量的人力物力,给每尾鱼注射疫苗等不足,不易在水产养殖中进行大规模的推广和应用。就虹彩病毒而言,Pallister等构建了饰纹蛙虹彩病毒(BIV)真核转录起始因子(eIF2 α)的缺失病毒株,显示虹彩病毒是能够进行病毒重组的,技术上具有可行

性。申请人前期研究工作显示，vSOCS、vTK是细胞肿大病毒重要的致病非必需基因。利用基因工程原理将含GFP基因替换ISKNV病毒基因组中的vSOCS基因，建立了重组vSOCS基因缺失病毒（ISKNV Δ vSOCS）。通过鳊鱼活体实验，结果表明ISKNV Δ vSOCS对鳊鱼仍有20%的致死率，而未死亡的鳊鱼对野生型病毒ISKNV的免疫保护率为100%。

[0007] 因此，有必要提供一种免疫效果好、使用便捷、应用性强、无须注射的肿大细胞病毒疫苗及其制备方法和应用。

发明内容

[0008] 为解决以上问题，本发明提供一种免疫效果好、使用便捷、应用性强、无须注射的肿大细胞病毒疫苗及其制备方法和应用。在ISKNV Δ vSOCS的基础上，再敲除了vTK基因，构建了vSOCS和vTK双基因缺失病毒（ISKNV Δ vSOCS Δ vTK）。相比灭活疫苗的注射免疫方式，浸泡免疫是基因缺失疫苗的最大优势，这是鱼类病毒性疫苗免疫方式的重大创新，具有广阔的应用空间。

[0009] 本发明第一方面提供了一种肿大细胞病毒vSOCS/vTK双基因缺失株，为肿大细胞病毒株缺失vSOCS基因和vTK基因后制成的减毒病毒株。

[0010] 优选地，所述vSOCS基因序列为与SEQ ID NO:1所示序列具有至少90%、至少95%、至少98%、至少99%或100%同源性的核苷酸序列。

[0011] 优选地，所述vTK基因序列为与SEQ ID NO:2所示序列具有至少90%、至少95%、至少98%、至少99%或100%同源性的核苷酸序列。

[0012] 第二方面，本发明提供了一种带筛选标记的肿大细胞病毒vSOCS/vTK双基因缺失株，为肿大细胞病毒缺失了vSOCS基因和vTK基因，且在基因缺失的部位通过同源重组分别插入第一筛选标记基因和第二筛选标记基因后制成的减毒病毒株。

[0013] 优选地，所述vSOCS基因序列为与SEQ ID NO.1所示序列具有至少90%、至少95%、至少98%、至少99%或100%同源性的核苷酸序列。

[0014] 优选地，所述vTK基因序列为与SEQ ID NO.2所示序列具有至少90%、至少95%、至少98%、至少99%或100%同源性的核苷酸序列。

[0015] 优选地，所述第一筛选标记基因和第二筛选标记基因不同，且分别独立地选自插入绿色荧光蛋白基因、红色荧光蛋白基因。

[0016] 进一步优选地，所述红色荧光蛋白基因为DsRed2蛋白基因。

[0017] 第三方面，本发明提供了一种肿大细胞病毒vSOCS/vTK双基因缺失株的构建方法，包括：分离并鉴定肿大细胞病毒株；再进行步骤1)或2)的任一步骤：

[0018] 1) 通过同源重组的方法先后将肿大细胞病毒株的vSOCS基因、vTK基因进行缺失，获得肿大细胞病毒vSOCS/vTK双基因缺失株；

[0019] 2) 通过同源重组的方法先后将肿大细胞病毒株的vTK基因、vSOCS基因进行缺失，获得肿大细胞病毒vSOCS/vTK双基因缺失株。

[0020] 优选地，所述vSOCS基因序列为与SEQ ID NO.1所示序列具有至少90%、至少95%、至少98%、至少99%或100%同源性的核苷酸序列。

[0021] 优选地，所述vTK基因序列为与SEQ ID NO.2所示序列具有至少90%、至少95%、至少98%、至少99%或100%同源性的核苷酸序列。

[0022] 第四方面,本发明提供了一种带筛选标记的肿大细胞病毒vSOCS/vTK双基因缺失株的构建方法,包括:分离并鉴定肿大细胞病毒株;再进行步骤1)或2)的任一步骤:

[0023] 1)通过同源重组的方法先后将肿大细胞病毒株的vSOCS基因、vTK基因进行缺失,并在基因缺失的部位分别插入第一筛选标记基因和第二筛选标记基因,获得肿大细胞病毒vSOCS/vTK双基因缺失株;

[0024] 2)通过同源重组的方法先后将肿大细胞病毒株的vTK基因、vSOCS基因进行缺失,并在基因缺失的部位分别插入第一筛选标记基因和第二筛选标记基因,获得肿大细胞病毒vSOCS/vTK双基因缺失株。

[0025] 优选地,所述vSOCS基因序列为与SEQ ID NO.1所示序列具有至少90%、至少95%、至少98%、至少99%或100%同源性的核苷酸序列。

[0026] 优选地,所述vTK基因序列为与SEQ ID NO.2所示序列具有至少90%、至少95%、至少98%、至少99%或100%同源性的核苷酸序列。

[0027] 优选地,所述第一筛选标记基因和第二筛选标记基因不同,且分别独立地选自插入绿色荧光蛋白基因、红色荧光蛋白基因。

[0028] 进一步优选地,所述红色荧光蛋白基因为DsRed2蛋白基因。

[0029] 优选地,所述步骤1)具体包括:

[0030] a)改造筛选基因

[0031] 将第一筛选标记基因克隆到Puc19载体的多克隆位点,获得第一Puc19重组载体;

[0032] 将第二筛选标记基因克隆到Puc18载体的多克隆位点,获得第一Puc18重组载体;

[0033] b)转移载体的构建

[0034] b-1)重组vTK基因缺失病毒转移载体的构建:以ISKNV株基因组DNA为模板,通过PCR获得vTK的上臂基因和vTK的下臂基因;将所得vTK的上臂基因和vTK的下臂基因,克隆到步骤a)所制备的第一Puc19重组载体中,得到第二Puc19重组载体中,所得第二Puc19重组载体中,第一筛选标记基因位于vTK的上臂基因和vTK的下臂基因之间;

[0035] b-2)重组vSOCS基因缺失病毒转移载体的构建:以ISKNV株基因组DNA为模板,通过PCR获得vSOCS的上臂基因和vSOCS的下臂基因;将所得vSOCS的上臂基因和vSOCS的下臂基因,克隆到步骤a)所制备的第一Puc18重组载体中,得到第二Puc18重组载体中,所得第二Puc18重组载体中,第二筛选标记基因位于vSOCS的上臂基因和vSOCS的下臂基因之间;

[0036] c)同源重组

[0037] 第一同源重组:使用构建好的第二Puc18重组载体转染鳃鱼细胞,在转染后加入ISKNV病毒液攻毒,收集发病的细胞,得到含ISKNV Δ vSOCS的病毒液;采用有限稀释法纯化病毒液,获得ISKNV Δ vSOCS重组病毒;

[0038] 第二同源重组:使用构建好的第二Puc19重组载体转染鳃鱼细胞,在转染后加入纯化的ISKNV Δ vSOCS病毒液攻毒,收集发病的细胞,得到含ISKNV Δ vSOCS Δ vTK与ISKNV Δ vSOCS混合的病毒液;采用有限稀释法纯化病毒液,获得肿大细胞病毒vSOCS/vTK双基因缺失株。

[0039] 进一步优选地,所述步骤c)第一同源重组中,采用有限稀释法纯化5-10代获得ISKNV Δ vSOCS重组病毒。

[0040] 进一步优选地,所述步骤c)第二同源重组中,采用有限稀释法纯化5-10代获得肿

大细胞病毒vSOCS/vTK双基因缺失株。

[0041] 更进一步优选地,所述步骤c)第二同源重组中,采用有限稀释法纯化5-10代获得肿大细胞病毒vSOCS/vTK双基因缺失株具体包括:

[0042] 将所得的ISKNV Δ vSOCS Δ vTK与ISKNV Δ vSOCS混合病毒液反复冻融3-5次,滤膜过滤除菌,稀释后感染健康的鳊鱼细胞,发病后挑选同时表达第一筛选标记基因和第二筛选标记基因的细胞,稀释后感染健康的鳊鱼细胞,继续培养、观察;

[0043] 等培养的细胞发病后,挑选同时表达第一筛选标记基因和第二筛选标记基因的细胞,稀释后感染健康的鳊鱼细胞,继续培养、观察;如此反复,利用有限稀释的方法纯化5-10代,获得纯化的肿大细胞病毒vSOCS/vTK双基因缺失株。

[0044] 第五方面,本发明提供了一种肿大细胞病毒vSOCS/vTK双基因缺失重组病毒疫苗,包括第一方面所述的肿大细胞病毒vSOCS/vTK双基因缺失株或第二方面所述的带筛选标记的肿大细胞病毒vSOCS/vTK双基因缺失株。

[0045] 优选地,所述肿大细胞病毒vSOCS/vTK双基因缺失重组病毒疫苗还包括药理学上接受的诊断剂、载剂、赋形剂或稀释剂。

[0046] 第六方面,本发明提供了一种第一方面所述的肿大细胞病毒vSOCS/vTK双基因缺失株或第二方面所述的带筛选标记的肿大细胞病毒vSOCS/vTK双基因缺失株按下述一种或多种方法进行应用:

[0047] (1) 将所述肿大细胞病毒vSOCS/vTK双基因缺失株单独进行应用;

[0048] (2) 将所述肿大细胞病毒vSOCS/vTK双基因缺失株与一种或几种疫苗联合应用;

[0049] (3) 采用浸泡的方式将所述肿大细胞病毒vSOCS/vTK双基因缺失株投放至养殖水体进行应用;

[0050] (4) 采用投喂的方式将所述肿大细胞病毒vSOCS/vTK双基因缺失株投放至养殖水体进行应用。

[0051] 第七方面,本发明提供了一种第一方面所述的肿大细胞病毒vSOCS/vTK双基因缺失株或第二方面所述的带筛选标记的肿大细胞病毒vSOCS/vTK双基因缺失株在制备诊断、预防、治疗肿大细胞病毒疾病的试剂或药物中的应用。

[0052] 优选地,所述的肿大细胞病毒包括鳊传染性脾肾坏死病毒、真鲷虹彩病毒、条石鲷虹彩病毒、海鲈虹彩病毒、大黄鱼病毒、台湾石斑鱼虹彩病毒、斜带石斑鱼虹彩病毒中的一种或多种。

[0053] 本发明有益效果:

[0054] 本发明构建了鳊鱼传染性脾肾坏死病毒 (ISKNV) 的 Δ vSOCS Δ vTK双基因缺失病毒株,毒株经过纯化后即获得有免疫原性的重组基因工程疫苗。

[0055] 本发明提供的重组基因工程疫苗是一种具有良好免疫原性的减毒疫苗,该疫苗拥有较灭活疫苗更好的免疫原性,能够诱发鱼类更好的产生免疫反应,具有免疫的效果。此外,重组基因工程疫苗能够诱发被免疫鱼类长期而有效的产生特异性抗体,与灭活疫苗相比,有着同样卓越的保护率。其次,相比其他种类的疫苗,重组基因工程疫苗有着免疫率高的优点,在生产应用中能够达到更好的免疫效果。

[0056] 更重要的是,重组基因工程疫苗因具备一定的病毒学活性,在免疫方式上更便捷,可以采用浸泡免疫的方法,使病毒从鳃或消化道进入鱼体内,发挥免疫原性,诱导鱼类产生

免疫反应。可在生产应用中节省大量成本。同时,由于本发明构建的重组基因工程疫苗敲除了vSOCS和vTK致病基因,所以毒力很弱,不会导致被免疫的鱼类发病死亡,从而达到免疫效果。

[0057] 本发明提供的重组基因工程疫苗制备方法简单:在ISKNV Δ vSOCS单基因缺失病毒株的基础上,以DsRed2红色色荧光蛋白基因作为筛选标记,利用基因工程技术构建含有vTK基因重组臂的重组转移载体,利用转染技术使重组转移载体和野生型病毒在鳊鱼细胞中进行同源重组,敲除野生型中的vSOCS基因和vTK基因,获得ISKNV Δ vSOCS Δ vTK的病毒悬液,再通过有限稀释法纯化ISKNV Δ vSOCS Δ vTK病毒株,最后利用细胞培养技术扩大培养缺失病毒株,提纯制成重组基因工程疫苗。

附图说明

[0058] 图1为验证ISKNV Δ vSOCS Δ vTK双基因敲除病毒株是否成功敲除TK基因的巢式PCR检测一扩电泳图,方框表示扩增得到的为标签基因的大小,说明原TK基因已经敲除;

[0059] 图2为验证ISKNV Δ vSOCS Δ vTK双基因敲除病毒株是否成功敲除TK基因的巢式PCR检测二扩电泳图,方框表示二扩依然扩增不到TK基因,说明TK基因已经清除;

[0060] 图3为检测病毒粒子数绘制ISKNV病毒生长曲线图,其中双基因缺失重组病毒株的生长速度相比野生型毒株下降明显;

[0061] 图4为双基因缺失重组病毒与野生型病毒感染滴度对比图,其中双基因缺失重组病毒的感染滴度明显低于野生型毒株;

[0062] 图5为透射电镜观察双基因缺失重组病毒与野生型病毒粒子的形态图,左图放大倍率为100000X,右图放大倍率为40000X,结果显示双基因缺失重组病毒与野生型病毒粒子形态相似;

[0063] 图6为双基因缺失重组病毒与野生型病毒攻毒后鳊鱼脾脏形态变化图,其中显示左图双基因缺失重组病毒攻毒后脾脏未明显肿大,而右图野生型组别在濒死时脾脏明显肿大发病;

[0064] 图7为双基因缺失重组病毒攻毒存活率第一次实验结果图,显示双基因缺失重组病毒攻毒后并未明显影响鳊鱼的存活;

[0065] 图8为双基因缺失重组病毒攻毒保护率第一次实验结果图,显示双基因缺失重组病毒攻毒后使鳊鱼对野生型病毒产生很好的免疫能力;

[0066] 图9为双基因缺失重组病毒攻毒存活率第二次实验结果图,显示双基因缺失重组病毒攻毒后并未明显影响鳊鱼的存活;

[0067] 图10为双基因缺失重组病毒攻毒保护率第二次实验结果图,显示双基因缺失重组病毒攻毒后使鳊鱼对野生型病毒产生很好的免疫能力;

[0068] 图11为双基因缺失重组病毒清除时相,方框部分显示双基因缺失重组病毒12-15天左右清除病毒;

[0069] 图12为双基因缺失重组病毒攻毒后鳊鱼血液IgM表达量变化图,显示双基因缺失重组病毒攻毒后,在12天内能有效刺激鳊鱼血液中抗体IgM的表达量升高,揭示了双基因缺失病毒产生保护效果的原因;

[0070] 图13为双基因缺失重组病毒攻毒后鳊鱼血液Mx表达量变化图,显示双基因缺失重

组病毒攻毒后,在12天内能有效刺激鳊鱼血液中抗病毒基因Mx的表达量升高,揭示了双基因缺失病毒产生保护效果的原因。

具体实施方式

[0071] 以下所述是本发明的优选实施方式,应当指出,对于本技术领域的普通技术人员来说,在不脱离本发明原理的前提下,还可以做出若干改进和润饰,这些改进和润饰也视为本发明的保护范围。

[0072] 下面将结合附图,对本发明的优选实施例进行详细的描述。实施例中未注明具体条件的实验方法,通常按照常规条件。本发明实施例中若无特别说明,所用试剂及耗材均为市售商品。

[0073] 本发明实施例提供了一种肿大细胞病毒vSOCS和vTK基因缺失重组病毒疫苗的制备方法,包括如下步骤:

[0074] 1. 构建带RFP表达元件的pUC19-Red载体

[0075] 1.1改造可被利用作为取代vTK基因的标记蛋白,针对pDsRed-Monomer-N1载体的RFP序列设计引物:

[0076] RFP-F: ATAGTAATCAATTACGGGGT (SEQ ID NO.3),

[0077] RFP-R: TGATGAGTTTGGACAAACCA (SEQ ID NO.4),

[0078] 利用PCR的方法将载体第9bp至第1590bp的碱基序列扩增,使用Toyobo公司的KodF_x聚合酶系统,PCR反应50μL体系为:

	试剂	用量 (共 50μL 体系)	单位: μL
[0079]	Kod Fx DNA 热稳定聚合酶	1	
	2×Kod Buffer	25	
[0080]	无菌水	10	
	dNTPs	10	
	RFP-F	1.5	
	RFP-R	1.5	
	pDsRed 载体 (200ng/μL)	1	

[0081] PCR反应条件如下:变性温度95℃,时间30s,退火温度55℃,时间30s,延伸温度62℃,延伸时间1分钟,进行30个循环。

[0082] 1.2利用Overlap的方法删除由步骤1.1得到的RFP序列原有的MCS序列,

[0083] 设计Overlap引物:

[0084] RFP-OL-F: CAGATCCGCTAGCGCTCGCCACCATGGACAACACCG (SEQ ID NO.5),

[0085] RFP-OL-R: GTTGTCCATGGTGGCGAGCGCTAGCGGATCTGACGG (SEQ ID NO.6),

[0086] 利用重叠PCR (Overlap) 的方法删除原有的MCS序列 (第591bp至第671bp的碱基序列),便于连接入新的重组转移载体。

[0087] Overlap PCR的第一次扩增分别用RFP-F/RFP-OL-R扩增出9-591bp的序列、以及用

RFP-OL-F/RFP-R扩增出671-1590bp的序列,其体系为:

[0088]	试剂	用量(共50 μ L体系) 单位: μ L
	Kod Fx DNA热稳定聚合酶	1
	2 \times Kod Buffer	25
	无菌水	10
	dNTPs	10
	RFP-F/RFP-OL-R	1.5
	RFP-OL-F/RFP-R	1.5
	DsRed2模板	1

[0089] PCR反应条件如下:变性温度95 $^{\circ}$ C,时间30s,退火温度50 $^{\circ}$ C,时间30s,延伸温度62 $^{\circ}$ C,延伸时间30秒,进行30个循环。

[0090] 第二扩增体系以第一次扩增的两段序列的PCR产物作为模板进行第二次扩增,其体系为:

	试剂	用量(共50 μ L体系) 单位: μ L
[0091]	Kod Fx DNA 热稳定聚合酶	1
	2 \times Kod Buffer	25
	无菌水	9
	dNTPs	10
[0092]	RFP-F	1.5
	RFP-R	1.5
	第一次扩增产物(共两种)	1/1

[0093] 第二次扩增反应条件如下:变性温度95 $^{\circ}$ C,退火温度进行Touchdown PCR,从55 $^{\circ}$ C-46 $^{\circ}$ C下降10个循环,再以50 $^{\circ}$ C进行25个循环,延伸温度62 $^{\circ}$ C,延伸时间1分钟。

[0094] 1.3构建1509bp大小的RFP表达元件

[0095] 通过Overlap PCR得到的将第9bp至第590bp和第672bp至第1590bp连接起来的序列,使用TAKARA的普通Taq酶进行72 $^{\circ}$ C加尾反应20分钟,连入TAKARA的Pmd-19T载体,构成1509bp大小的RFP表达元件。

[0096] 1.4将RFP表达元件连接入pUC19载体

[0097] 设计带酶切位点的引物RFP-K-F和RFP-B-R,利用相同的Kod Fx体系,以连入改造的RFP的T载为模板,通过PCR扩增得到带有酶切位点的改造RFP。之后我们利用带KpnI和BamHI限制性核酸内切酶分别对上一步得到的PCR产物和Puc19载体进行酶切反应,并用T4DNA连接酶将该表达元件连接入pUC19载体中,构建带RFP的pUC19-Red载体。酶切体系如下:

[0098]	试剂	用量(共50 μ L体系)
	KpnI限制性内切酶	2 μ L
	BamHI限制性内切酶	2 μ L

10×酶切buffer	5μL
PCR产物	2μg
无菌水	up to 50μL

[0099] 酶切反应37°C 12h,并用T4DNA连接酶将该表达元件连接入pUC19载体中,构建成带DsRed2的pUC19-Red载体。

[0100] 2. 构建vTK基因缺失重组转移载体

[0101] 提取ISKNV DNA,将其稀释为50μg/mL作模板,从ISKNV的基因组中扩增出vTK的上臂 (ISKNV基因组中第28441bp至29446bp) 和下臂 (ISKNV基因组中第30062至31140bp) 分别使用EcoRI、KpnI和BamHI、HindIII限制性核酸内切酶连接入Puc19-Red载体上,构成vTK重组转移载体。引物序列为:

[0102] TK上臂-F:GGAATTCTCTGACGGCAACATAAATGGC (SEQ ID NO.7);

[0103] TK上臂-R:GGGGTACCCCAGCGACATACAGAGCAATTG (SEQ ID NO.8);

[0104] TK下臂-F:CGGGATCCTATTAGCCACAAATACAACACTGTGGG (SEQ ID NO.9);

[0105] TK下臂-R:CCCAAGCTTTGCCTTAGGGGGACCTTATGTTAG (SEQ ID NO.10)。

[0106] PCR反应体系如下:

试剂	用量(共50μL体系)单位:μL
Kod Fx DNA热稳定聚合酶	1
2×Kod Buffer	25
无菌水	10
dNTPs	10
TK上臂/下臂-F	1.5
TK上臂/下臂-R	1.5
ISKNV模板	1

[0108] PCR产物加入10μL的6×DNA电泳Loading Buffer,混匀后电泳鉴定并进行胶回收。回收产物分别使用EcoRI、KpnI和BamHI、HindIII限制性核酸内切酶酶切回收后利用T4连接酶连接入上一步构建好的Puc19-Red载体上,构成vTK重组转移载体。酶切体系如下:

试剂	用量(共50μL体系)
EcoRI/BamHI限制性内切酶酶	2μL
KpnI/HindIII限制性内切酶酶	2μL
10×酶切buffer	5μL
PCR产物	2μg
无菌水	up to 50μL

[0110] 3. vTK重组转移载体转染鳊鱼细胞

[0111] 使用构建好的vTK重组转移载体转染鳊鱼细胞,转染采用电转的方法,电转电压250V,电击10ms,转染24h之后按照每毫升 1.30×10^5 个病毒拷贝数加入ISKNV Δ vSOCS病毒液,攻毒72h后,将培养基混合发病的细胞一起收集,得到ISKNV Δ vSOCS Δ vTK与ISKNV Δ vSOCS混合的病毒液。

[0112] 4. 挑纯ISKNV Δ vSOCS Δ vTK双基因敲除病毒株

[0113] 将混合的病毒液反复冻融3次,再按照1:100的比例感染健康的鳊鱼细胞,72h左右

观察荧光,戳取同时发出绿色荧光和红色荧光的细胞,粗略估计戳取的数量,按照每个细胞200 μ L DMEM培养基的比例添加,再分至种有鳊鱼细胞的96孔板中,每个板中100 μ L培养基。如此利用有限稀释的方法纯化5代以上,挑纯ISKNV Δ vSOCS Δ vTK双基因敲除病毒株。

[0114] 5. 验证ISKNV Δ vSOCS Δ vTK双基因敲除病毒株是否成功敲除TK基因

[0115] 将挑纯的ISKNV Δ vSOCS Δ vTK病毒株扩大培养,提取病毒DNA,并在vTK基因的两侧和内部分别设计一扩引物和二扩引物,引物序列为:

[0116] TK-outer-F:GGCGGCATAGTATTTACCAC (SEQ ID NO.11);

[0117] TK-outer-R:ACCTGTGGCAATAACAACCTC (SEQ ID NO.12);

[0118] TK-middle-F:ATGTGGCGCACTCAAAAAA (SEQ ID NO.13);

[0119] TK-middle-R:TGTGTAACAATTCAATAAAC (SEQ ID NO.14)。

[0120] 进行巢式PCR鉴定。如图1/2所示,一扩outer引物结果,方框表示扩增到的为标签基因的大小,说明原TK基因已经敲除,二扩middle引物结果,方框表示二扩依然扩增不到TK基因,说明TK基因已经清除。

[0121] 6. 细胞水平鉴定ISKNV Δ vSOCS Δ vTK双基因缺失重组病毒株的生长曲线和感染滴度

[0122] 在得到纯化后的双基因缺失重组病毒株后,在细胞水平鉴定了病毒的生长曲线和感染滴度。首先使用该双基因缺失重组病毒株和野生型毒株进行绝对定量PCR检测,计算病毒物理滴度。随后培养鳊鱼细胞,计数并按相同细胞浓度分别传12孔和96孔细胞培养板。待细胞生长至对数期,用两种病毒株以1MOI的物理滴度分别感染细胞。生长曲线测定使用12孔板,分别在2、4、8、12、24、48、72、96h收取细胞病毒混合液,提取DNA后使用绝对定量PCR检测病毒粒子数,绘制两种病毒生长曲线图3,结果显示该双基因缺失重组病毒株的生长速度相比野生型毒株下降明显,在终末时相相比野生型毒株下调38%。感染滴度测定使用96孔板,使用连续梯度有限稀释法测定两株病毒的Tcid50指标,每株病毒重复3次,结果用Karber法计算,结果显示双基因缺失重组病毒株Tcid50为 $10^{-4.375}/0.1\text{mL}$,野生型病毒株为 $10^{-4.75}/0.1\text{mL}$,如图4所示,双基因缺失重组病毒株病毒滴度明显低于野生型毒株。

[0123] 7. 透射电镜观察ISKNV Δ vSOCS Δ vTK双基因缺失重组病毒株形态

[0124] 使用鳊鱼细胞富集ISKNV Δ vSOCS Δ vTK病毒株,利用等密度梯度离心法纯化病毒粒子,使用透射电镜观察形态,如图5所示,结果显示与野生型相比没有明显变化。

[0125] 8. 鳊鱼活体攻毒实验

[0126] 以ISKNV Δ vSOCS Δ vTK双基因缺失重组病毒株进行了两次鳊鱼活体攻毒实验,实验选用平均体重 $175\text{g} \pm 30\text{g}$ 的鳊鱼作为样本。图6显示双基因缺失重组病毒攻毒后脾脏未明显肿大,而野生型组别在濒死时脾脏明显肿大发病。第一次实验设置双基因缺失重组病毒实验组、野生型病毒组、DMEM对照组,样本数分别为33/20/20尾。实验组以物理滴度 $9.0\text{E}3/\text{mL}$ 的浓度浸泡攻毒3h,随后换水;野生型病毒组以 $8.0\text{E}5/\text{mL}$ 的浓度同样方法攻毒,对照组在水体中加入20mL DMEM培养基。养殖30d后以 $8.0\text{E}6/\text{mL}$ 的浓度攻毒野生型毒株,20d后统计结果。结果如图7/8所示,双基因缺失重组病毒实验组死亡率0%,保护率95%。第二次实验实验组别设计同第一次实验,样本数量分别为100/20/50尾,实验组以 $5.7\text{E}4/\text{mL}$ 的浓度攻毒,野生型组以 $8.0\text{E}5/\text{mL}$ 的浓度攻毒,对照组设定与攻毒方法与第一次实验相同,养殖周期与保护时攻毒浓度同样与第一次实验相同。统计结果如图9/10所示,双基因缺失重组病毒实

验组死亡率17%，保护率97%。实验结果还揭示了在取得有效免疫保护效果过程中，双基因缺失重组病毒的攻毒浓度应使用低浓度剂量，在 $1.0E4/mL$ 为宜。

[0127] 9. 验证ISKNV Δ vSOCS Δ vTK双基因缺失重组病毒株的免疫保护效果

[0128] 在第二次攻毒实验进行过程中，在三个组别之外设置同样浓度攻毒的双基因缺失重组病毒组30尾，与攻毒实验攻毒浓度相同，在攻毒后每三天分别取存活无明显病征的双基因缺失重组病毒组3尾，取脾脏提取DNA检测病毒清除情况，取血液提取RNA检测血液中IgM和抗病毒基因Mx的表达情况。图11，结果表明双基因缺失重组病毒12-15天左右清除病毒。图12/13结果显示双基因缺失重组病毒攻毒后，在12天内能有效刺激鳊鱼血液中抗体IgM和抗病毒基因Mx的表达量升高，揭示了双基因缺失病毒产生保护效果的原因。

[0129] 以上实施例仅用以说明本发明的技术方案而非对本发明保护范围的限制，尽管参照较佳实施例对本发明作了详细说明，本领域的普通技术人员应当理解，可以对本发明的技术方案进行修改或者等同替换，而不脱离本发明技术方案的实质和范围。

- [0001] 序列表
- [0002] <110> 中山大学
- [0003] <120> 一种肿犬细胞病毒vSOCS/vTK双基因敲除株及其制备方法和应用
- [0004] <130> 2017
- [0005] <160> 14
- [0006] <170> SIPOSequenceListing 1.0
- [0007] <210> 1
- [0008] <211> 402
- [0009] <212> DNA
- [0010] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
- [0011] <400> 1
- [0012] atgtgctccc cgacgtcadc ggcacagggt ctgagcgatc atttcctgt cttttcctgc 60
- [0013] aaagaggact acaacatcat catggacact gtcagacaac tggaacaaag tggtttctac 120
- [0014] tggggtcctt tgggggtcga ggaggacat cgtatgctgc gcaactcggc actgggcagc 180
- [0015] tttctcattc gggatagcag gcaaaaggac gtcttgttca cgctgtcgta tcaactctgtg 240
- [0016] accggaccgc tcagtgtgag gattgaatac aaggacaagc aattttcctt ggctgggagc 300
- [0017] aaacagaggt tttcatcggt ctttctcctg ttggaccatt acatcgggtg gcccaataat 360
- [0018] actttaggca ttccatatat gaagcgggtg caaacacagt aa 402
- [0019] <210> 2
- [0020] <211> 615
- [0021] <212> DNA
- [0022] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
- [0023] <400> 2
- [0024] atgtggcgca ctcaaaaaaa cataccccag gtatgcgcat atgacaaaat ggctcctgta 60
- [0025] tatactgtgt ttggccatgt gggcgtgggt aagtcgagcc tgctgcgcag cctcgcaaac 120
- [0026] actggcatta acgtcgtgct tgagcccaca gacacatggg agccgttctt ccaattgtac 180
- [0027] tacaagatc cgtgcatg ggcgcgcgcg ttccaaatga cggtgatacg cagctacagt 240
- [0028] cacatataca gcgctaataa agataaccca ctgccaactg tagtcgagcg gtccccacag 300
- [0029] tgctgccgcg cttttgttgc atggctgtat gccaccggtc agttagacac cgtgtcgcac 360
- [0030] gacaccatca acacctacat agcggcggtg ccatggttca gcaatgtgac ccaagtctat 420
- [0031] ttgcgttgca gccccacagt ggccgctgca cgtgcgttgg cgcgcccga cgaactcaac 480
- [0032] ccatgcgcgc cagactacat ggccttccca cacacgcaat gggaggctag agtaacccca 540
- [0033] gacaccataa taattgatgc agaacaagat atggacactg taagacggca gtttattgaa 600
- [0034] ttgttacaca tataa 615
- [0035] <210> 3
- [0036] <211> 20
- [0037] <212> DNA
- [0038] <213> 人工序列(Artificial Sequence)

- [0039] <400> 3
[0040] atagtaatca attacggggt 20
[0041] <210> 4
[0042] <211> 20
[0043] <212> DNA
[0044] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[0045] <400> 4
[0046] tgatgagttt ggacaaacca 20
[0047] <210> 5
[0048] <211> 36
[0049] <212> DNA
[0050] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[0051] <400> 5
[0052] cagatccgct agcgctcgcc accatggaca acaccg 36
[0053] <210> 6
[0054] <211> 36
[0055] <212> DNA
[0056] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[0057] <400> 6
[0058] gttgtccatg gtggcgagcg ctagcggatc tgacgg 36
[0059] <210> 7
[0060] <211> 28
[0061] <212> DNA
[0062] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[0063] <400> 7
[0064] ggaattctct gacggcaaca taaatggc 28
[0065] <210> 8
[0066] <211> 30
[0067] <212> DNA
[0068] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[0069] <400> 8
[0070] ggggtacccc agcgacatac agagcaattg 30
[0071] <210> 9
[0072] <211> 33
[0073] <212> DNA
[0074] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[0075] <400> 9
[0076] cgggatccta ttagccacaa atacaactgt ggg 33
[0077] <210> 10

- [0078] <211> 33
[0079] <212> DNA
[0080] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[0081] <400> 10
[0082] cccaagcttt gccttagggg gaccttatgt tag 33
[0083] <210> 11
[0084] <211> 20
[0085] <212> DNA
[0086] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[0087] <400> 11
[0088] ggcgcatag tatttaccac 20
[0089] <210> 12
[0090] <211> 20
[0091] <212> DNA
[0092] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[0093] <400> 12
[0094] acctgtggca ataacaactc 20
[0095] <210> 13
[0096] <211> 20
[0097] <212> DNA
[0098] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[0099] <400> 13
[0100] atgtggcgca ctcaaaaaa 20
[0101] <210> 14
[0102] <211> 20
[0103] <212> DNA
[0104] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[0105] <400> 14
[0106] tgtgtaacaa ttcaataaac 20

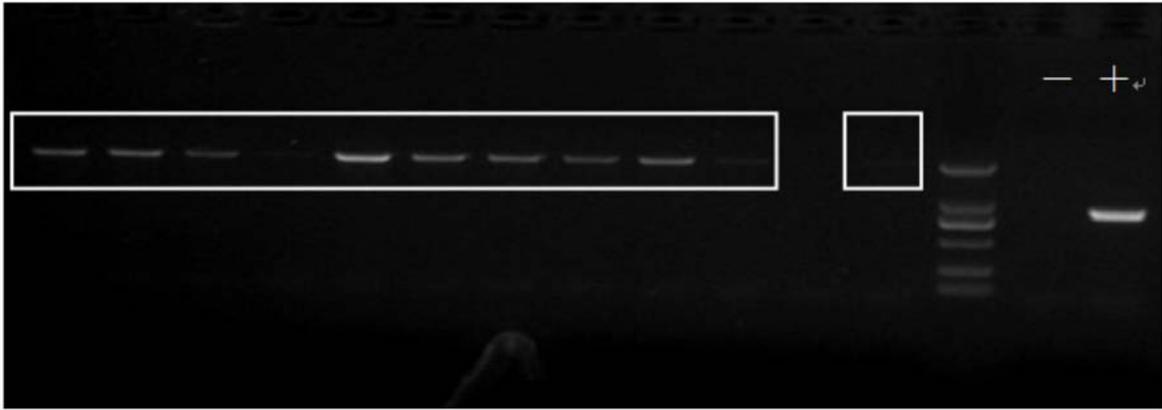


图1

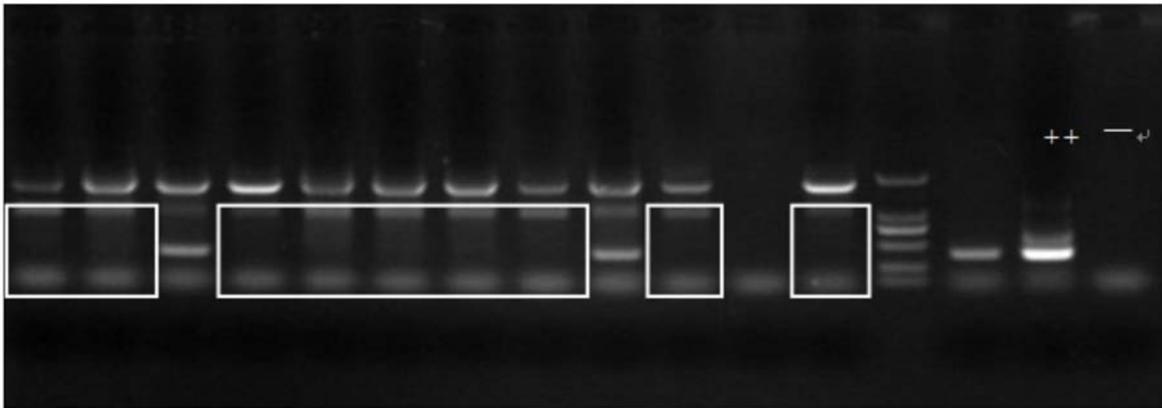


图2

双基因缺失病毒生长曲线

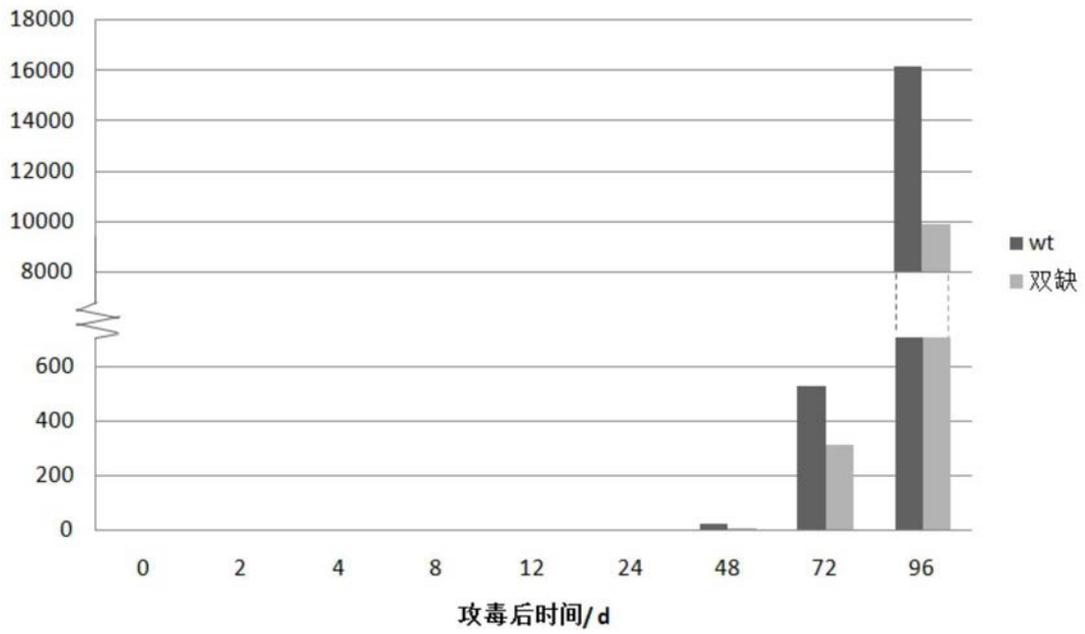


图3

双基因缺失重组病毒感染滴度

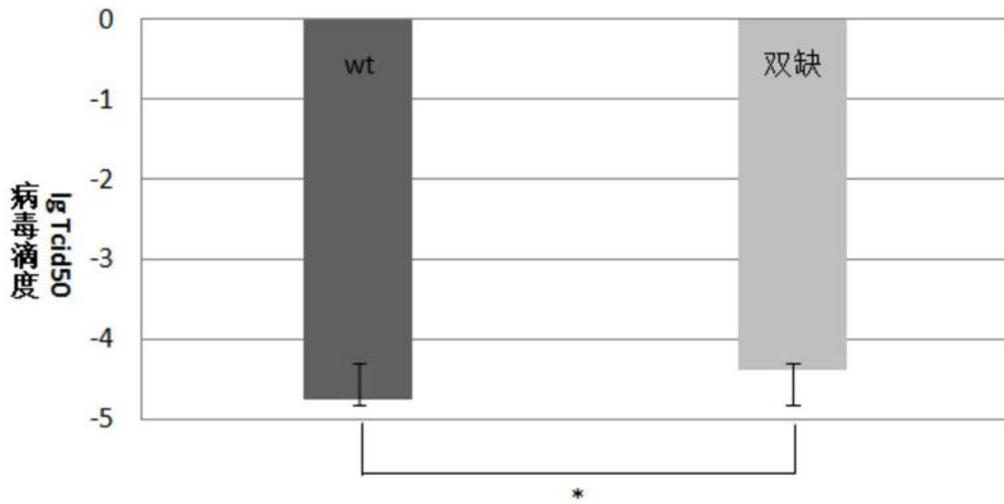


图4

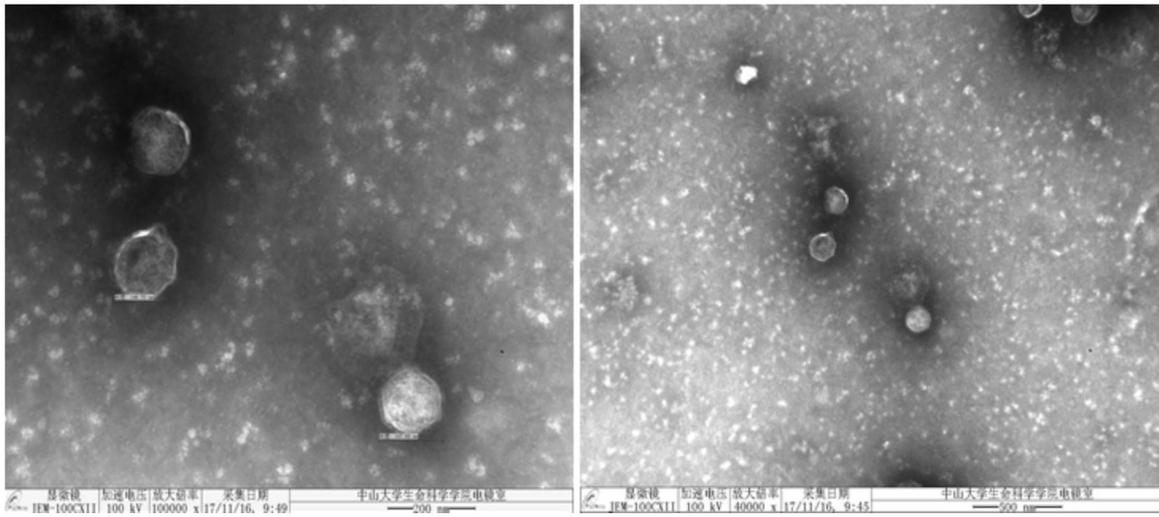


图5



图6

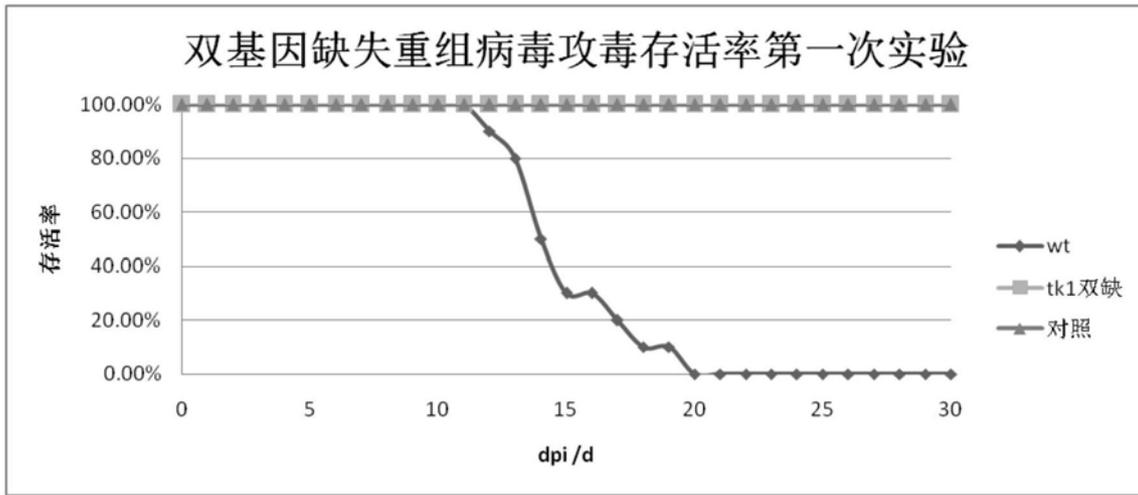


图7

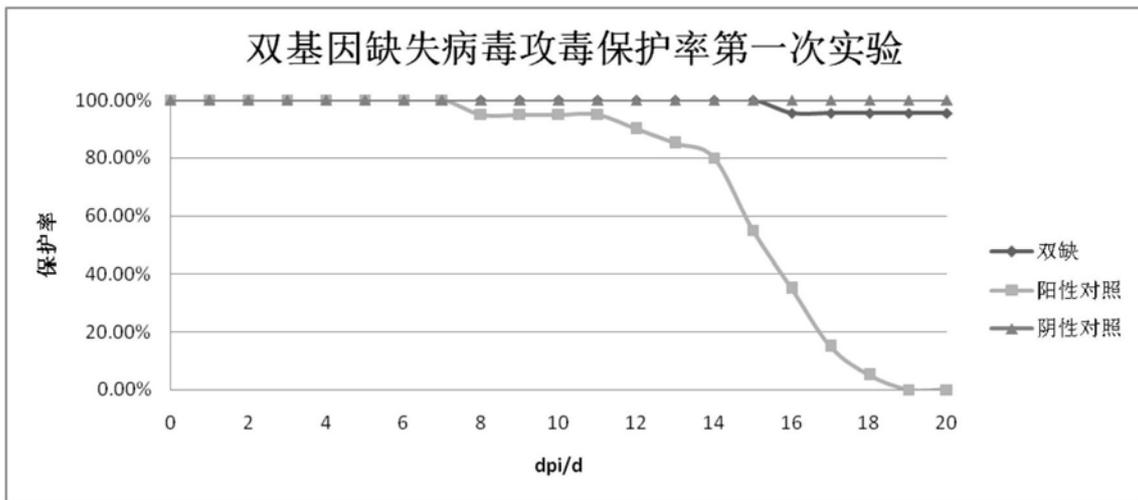


图8

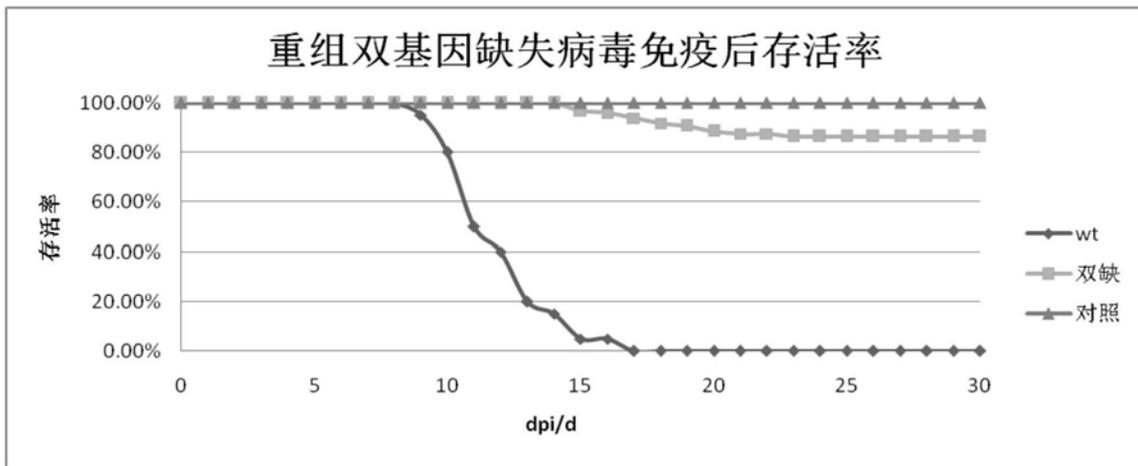


图9

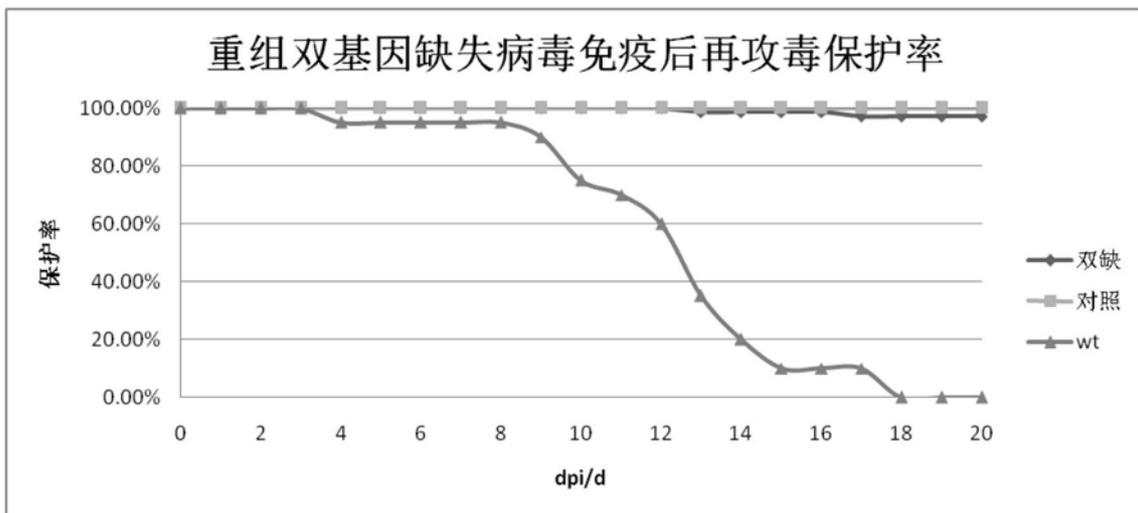


图10

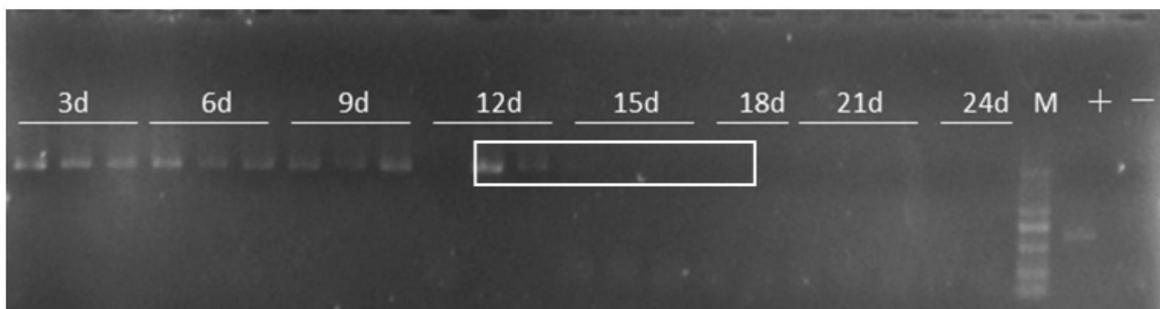


图11

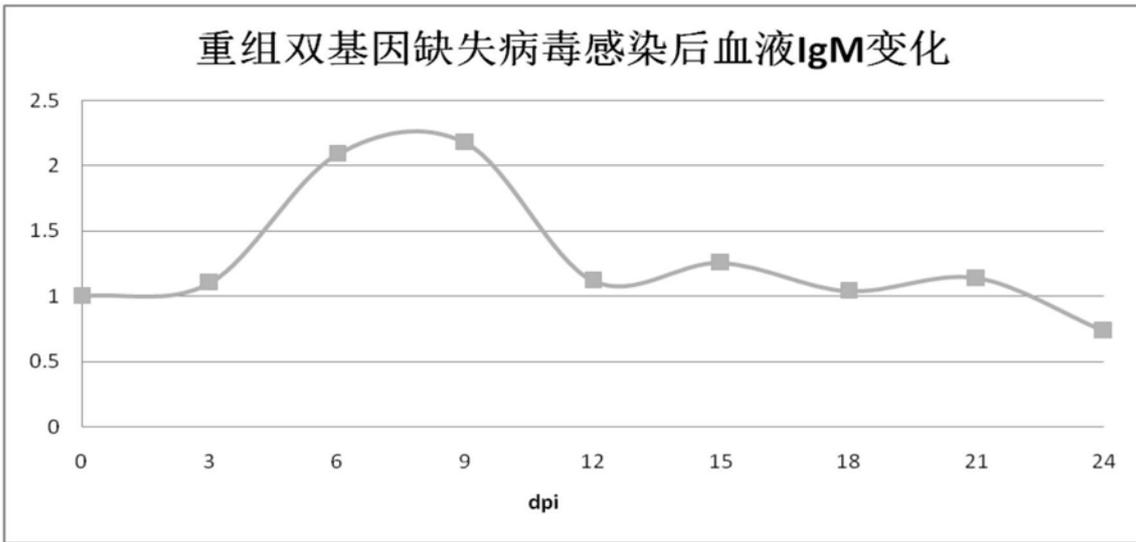


图12

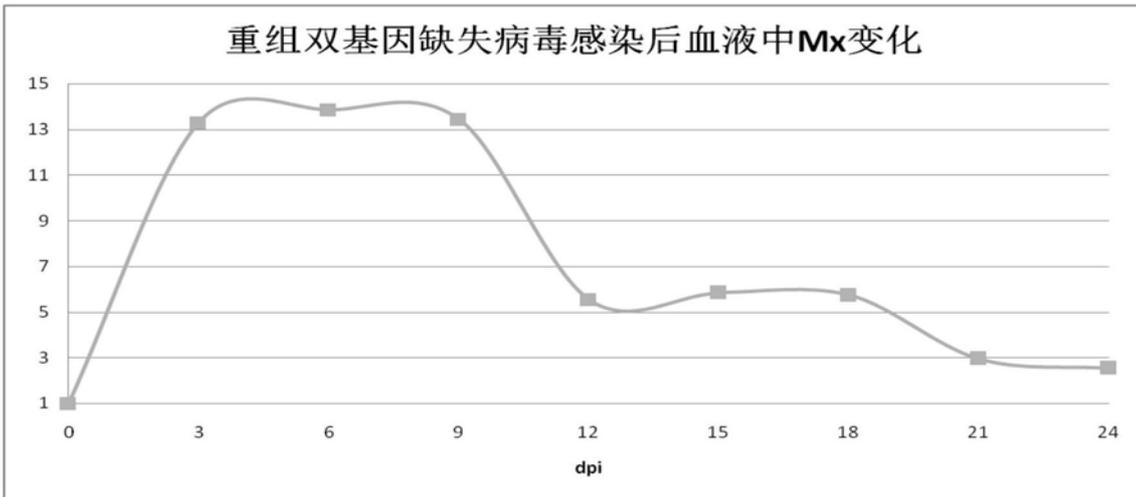


图13