



龚祖新, 李金明, 邹艳丽, 等. 牛结节性皮肤病病毒荧光重组毒株的构建及其在抗病毒药物研究中的应用[J]. 南京农业大学学报, 2026, 49(4): 865–873.

Gong Z X, Li J M, Zou Y L, et al. Construction of fluorescent gene recombinant strain of lumpy skin disease virus and its application in antiviral drug research[J]. Journal of Nanjing Agricultural University, 2026, 49(4): 865–873.

牛结节性皮肤病病毒荧光重组毒株的构建 及其在抗病毒药物研究中的应用

龚祖新¹, 李金明², 邹艳丽², 李林², 刘珊², 戴佳琦¹, 冷益凡¹,
仇亚伟¹, 王志亮^{2*}, 杨振^{1*}, 刘功关^{1*}

(1. 南京农业大学动物医学院, 江苏 南京 210014; 2. 中国动物卫生与流行病学中心, 山东 青岛 266032)

摘要: [目的] 本文旨在构建 1 株牛结节性皮肤病病毒(lumpy skin disease virus, LSDV) 荧光重组毒株, 并应用于抗病毒药物研究。[方法] 基于 CRISPR/Cas9 技术构建 LSDV XJ 株重组毒株(rLSDV), 并通过 TCID₅₀ 试验测定病毒的生长曲线, 再以纯化后的病毒样品作为免疫原制备兔多克隆抗体; 用 Western blot(WB) 试验评估 rLSDV 荧光信号强度与病毒蛋白表达量的相关性; 用间接免疫荧光(IFA) 试验评估 rLSDV 自发荧光信号的特异性; 采用 CCK8 试验评价不同浓度 3'-甲氧基鸟苷对 MDBK 细胞的毒性, 利用 rLSDV 荧光成像、WB、qPCR 和 TCID₅₀ 试验检测抗病毒药物 3'-甲氧基鸟苷对 LSDV 在 MDBK 细胞中增殖的影响。[结果] 通过 CRISPR/Cas9 技术成功构建了 rLSDV, TCID₅₀ 试验测定的 rLSDV 与亲本病毒株的生长曲线基本一致; WB 试验结果显示, rLSDV 产生的荧光信号强度与病毒蛋白的表达量呈极显著正相关($P < 0.01$); IFA 结果显示, 抗体标记与 rLSDV 自身的荧光区域高度重合, 且荧光信号强度趋势一致; 在进一步的抗病毒药物研究中, CCK8、rLSDV 荧光成像、WB、qPCR 和 TCID₅₀ 试验结果均表明 3'-甲氧基鸟苷在安全浓度范围内对 LSDV 在 MDBK 细胞中的增殖具有极显著的抑制作用($P < 0.01$)。[结论] 基于 CRISPR/Cas9 技术成功制备了 rLSDV, rLSDV 能够准确反映病毒的复制水平, 3'-甲氧基鸟苷在体外能有效抑制 rLSDV 的增殖, 可作为抗 LSDV 的一个潜在候选药物。

关键词: 牛结节性皮肤病病毒; CRISPR/Cas9; 荧光重组毒株; 抗病毒药物; 3'-甲氧基鸟苷

中图分类号: S855.3

文献标志码: A

文章编号: 1000-2030(2026)04-0865-09

Construction of fluorescent gene recombinant strain of lumpy skin disease virus and its application in antiviral drug research

GONG Zuxin¹, LI Jinming², ZOU Yanli², LI Lin², LIU Shan², DAI Jiaqi¹, LENG Yifan¹,
QIU Yawei¹, WANG Zhiliang^{2*}, YANG Zhen^{1*}, LIU Gongguan^{1*}

(1. College of Veterinary Medicine, Nanjing Agricultural University, Nanjing 210014, China;

2. China Animal Health and Epidemiology Center, Qingdao 266032, China)

Abstract: [Objectives] This study aimed to construct a fluorescent gene recombinant strain of lumpy skin disease virus (LSDV) and apply it to antiviral drug research, laying the foundation for further elucidating the infection and defense mechanisms of LSDV. [Methods] Construction of a fluorescent gene recombinant strain (rLSDV) of LSDV XJ strain based on CRISPR/Cas9 technology and the growth curve of the virus was determined by TCID₅₀ assay. Simultaneously, rabbit polyclonal antibody was prepared using purified virus samples as immunogens. The correlation between the fluorescence signal intensity of rLSDV and viral protein expression was evaluated through Western blot (WB) assays. The autofluorescence signal of rLSDV was validated through indirect immunofluorescence assays (IFA). The cytotoxicity of 3'-O-methylguanosine on MDBK cell lines was examined by CCK8 assay. Furthermore, the inhibitory effects of 3'-O-methylguanosine on LSDV proliferation in MDBK were evaluated through rLSDV, WB, qPCR, and TCID₅₀ assays. [Results] The rLSDV was successfully constructed using CRISPR/Cas9 technology, and the growth curve of rLSDV, as determined by the TCID₅₀ assay, was consistent with that of the parental strain. WB results showed a significant positive correlation

收稿日期: 2025-01-08

基金项目: 国家重点研发计划项目 (2022YFD1800500)

作者简介: 龚祖新, 硕士研究生。* 通信作者: 刘功关, 教授, 博导, 主要从事动物病原感染与免疫学研究, E-mail: gliu21@njau.edu.cn; 杨振, 副教授, 主要从事跨境动物传染病和家畜群体医学方面的研究, E-mail: yangzhen@njau.edu.cn; 王志亮, 研究员, 博导, 主要从事重大外来动物疫病综合防控技术研究, E-mail: wangzhiliang@cahec.cn。

($P < 0.01$) between the fluorescence signal intensity produced by rLSDV and the expression level of viral proteins. IFA results indicated that the antibody labeling highly overlapped with the fluorescent regions of rLSDV, and the fluorescence signal intensity trends were consistent. In further antiviral drug research, CCK8, IFA, qPCR, and TCID₅₀ assays collectively demonstrated that 3'-O-methylguanosine significantly ($P < 0.01$) inhibited the proliferation of LSDV in MDBK cells within a non-toxic concentration range. [Conclusions] The rLSDV was successfully constructed using CRISPR/Cas9 technology, and it accurately reflected the replication level of the virus. Furthermore, 3'-O-methylguanosine was identified as a potent inhibitor of LSDV proliferation *in vitro*, providing a promising drug candidate for further antiviral drug development.

Keywords: lumpy skin disease virus (LSDV); CRISPR/Cas9; fluorescent gene recombinant strain; antiviral drugs; 3'-O-methylguanosine

牛结节性皮肤病 (lumpy skin disease, LSD) 是由牛结节性皮肤病病毒 (lumpy skin disease virus, LSDV) 引起的一种亚急性至急性传染病, 其典型临床特征为牛体表皮肤出现多发性结节样病变^[1-2]。LSDV 属于痘病毒科 (Poxviridae) 山羊痘病毒属 (*Capripoxvirus*)^[3]。该病致死率较低 (通常低于 10%), 但发病率高达 90%^[4], 对养牛业造成严重的经济损失。LSD 最早于 1929 年在非洲赞比亚首次报道, 流行病学调查显示, 国际贸易和人员流动是导致 LSDV 跨境传播的主要途径^[5]。俄罗斯于 2015 年首次报告 LSD 疫情^[6], 又因疫苗的使用不当, 于 2017 年出现了全球首例疫苗样重组毒株^[7]。2019 年, 包括我国在内的多个东亚和东南亚国家相继发现了与俄罗斯重组病毒株基因组高度相似的重组毒株^[8-10]。我国新疆伊犁地区首次报道 LSD 疫情, 2020 年后安徽、浙江、江西、福建、广东等多个省份陆续报告 LSD 疫情^[10], 该病已对我国养牛业构成重大威胁。目前, 国内外缺乏对 LSDV 致病与免疫机制及防控技术的系统研究, 建立完善的重组 LSDV 技术体系能极大地推动抗病毒药物研发与病毒基因功能的研究。在痘病毒研究领域, 痘苗病毒 (vaccinia virus, VACV), 作为根除天花的疫苗株, 已发展成为痘病毒研究经典模式病毒^[11-12]。并且 VACV 荧光重组毒株已被广泛应用于基础研究领域^[13]。目前, 已有研究报道了 LSDV 重组毒株的构建策略^[14-15], 然而这些基于同源重组的方法在效率方面仍有待提升。簇规律间隔短回文重复序列 (clustered regularly interspaced short palindromic repeats, CRISPR) 与其功能相关的 Cas9 核酸内切酶共同组成 CRISPR/Cas9 系统。该系统源自细菌获得性免疫系统^[16-18], 已高效用于细胞和动物^[19-20] 以及包括 VACV 在内一些病毒的基因组编辑^[21-22]。目前, 尚未见 CRISPR/Cas9 系统应用于 LSDV 基因编辑的相关报道。基于此, 本研究旨在建立基于 CRISPR/Cas9 技术的 LSDV 重组毒株构建策略, 通过改进 LSDV 荧光重组毒株的制备方法, 提高 LSDV 荧光重组毒株的构建效率, 并评估其在药物发现试验中的应用效果, 为进一步开展 LSDV 基础研究奠定基础。

1 材料与方法

1.1 试验材料

MDBK (ATCC CCL-22) 细胞系、LSDV XJ 毒株 (GenBank: OM984485) 由中国动物卫生与流行病学中心保存。本研究中所涉及的所有 LSDV 活毒试验均在中国动物卫生与流行病学中心 ABSL-3 试验室完成。大肠杆菌 DH5 α 感受态细胞购自擎科生物公司; px458 质粒 (Addgene #48138) 由本课题组保存, pVAX-H5-mCherry 质粒由擎科生物公司合成; 限制性内切酶 *Bbs* I、Alexa Fluor 488 标记的山羊抗兔 IgG 购自 Thermo Fisher Scientific 公司; DMEM 培养基和胎牛血清购自森贝伽公司; CCK8、DNA 抽提试剂盒、qPCR SYBR Green Mix、限制性内切酶 *Kpn* I 和高保真 PCR 酶购自 YEASEN 公司; DNA 纯化试剂盒购自诺唯赞公司; 无内毒素质粒小提中量试剂盒购自天根生物公司; 弗氏佐剂购自 Sigma-Aldrich 公司; β -丙内酯购自上海泰坦科技股份有限公司; 3'-甲氧基鸟苷购自 MCE 公司。

1.2 质粒构建

据报道, LSDV 的 *orf50* 和 *orf51* 是 2 个相邻的基因, 在这 2 个基因中间插入外源基因不会影响病毒复制^[23-24]。参照 VACV 等病毒 CRISPR 基因编辑方法^[23], 按照图 1 中的质粒构建策略, 根据 LSDV XJ 毒株基因组序列设计引物 (表 1), 以 pVAX-H5-mCherry 质粒为模板扩增片段 A 和 C; 以 XJ 毒株 DNA 作为模板, 扩增目的片段 B 和 D; 产物经过 DNA 纯化试剂盒纯化后利用碧云天无缝克隆试剂盒将 A、B、C 和 D 4 个片段连接起来, 形成 Donor 供体质粒, 转化 DH5 α 并扩增质粒。根据 PX458 序列设计 3 对引物, 分 3 段扩增质粒骨架中不包含 *Cas9* 首尾两端的核定位信号基因的部分 (E、F 和 G 片段), 3 个片段经过同源重组形成 rPX458 质粒, 转化 DH5 α 并扩增质粒。

量为 1×10^5 超滤管 4°C 、 $4\,000\text{ r}\cdot\text{min}^{-1}$ 离心去除病毒悬液中的蔗糖,得到病毒样品,通过 TCID_{50} 试验测定纯化前、后病毒的滴度。向纯化后的病毒液中加入 $0.5\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ 的 β -丙内酯,于 37°C 灭活 2 h。取 $20\text{ }\mu\text{L}$ 病毒样品于碳支持膜铜网上吸附 2 min,用 $20\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ 磷钨酸 ($\text{pH}6.5$) 染色 15 s,干燥后进行透射电子显微镜 (日立 HT7800) 观察。

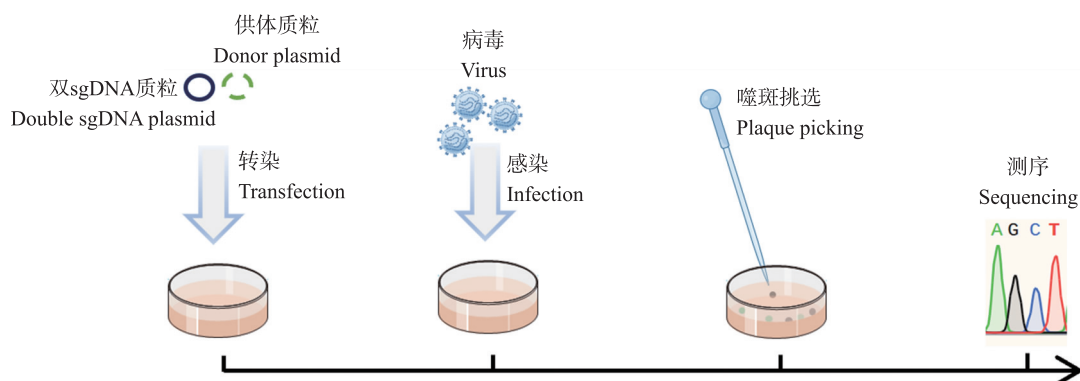


图2 重组 LSDV 的纯化示意图

Fig. 2 The schematic workflow for purification of rLSDV

1.5 噬斑试验与 TCID_{50} 测定

将 MDBK 细胞铺至 48 孔板中待长至单层时使用,将收集的病毒液用空培养基 (无血清和双抗的 DMEM) 进行 10 倍梯度稀释,取稀释后的病毒液 $100\text{ }\mu\text{L}$ 加入孔中吸附 2 h,然后用 $1\times\text{PBS}$ 洗涤细胞 3 次,更换为维持培养基 (含 $30\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ FBS 和 $5\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ 甲基纤维素的 DMEM),维持培养 96 h,在荧光显微镜下对最大稀释度孔中发光位置进行标记,用 $10\text{ }\mu\text{L}$ 移液管吸取标记位置细胞及培养基并冻融 1 次作为下一代病毒的接种物。

将 MDBK 细胞铺至 96 孔板中并待长至单层时使用,将纯化前、后的 LSDV 病毒液用空培养基进行 10 倍梯度稀释,每个梯度 8 个复孔,取稀释好的病毒液 $100\text{ }\mu\text{L}$ 加入孔中吸附 2 h,然后用 $1\times\text{PBS}$ 清洗洗涤细胞 3 次后更换为维持培养基 (含 $30\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ FBS 的 DMEM) 并孵育 144 h,最后在显微镜下观察每孔病变情况,根据 Reed-Muench 法计算病毒液 TCID_{50} 。

1.6 兔多克隆抗体的制备

将 β -丙内酯灭活的 LSDV 病毒与弗氏完全佐剂按体积比 1:1 混合并乳化后作为免疫原,按照 $0.5 \times 10^{6.2}$ TCID_{50} 剂量皮下多点注射免疫普通级新西兰大白兔。后续每隔 14 d 以相同的剂量用弗氏不完全佐剂加强免疫 1 次,共免疫 3 次。在第 3 次免疫 14 d 后收集血清,置于 -20°C 保存。

1.7 Western blot (WB) 测定病毒蛋白的表达水平

用 PBS 清洗细胞 1 次后用 RIPA 裂解液裂解细胞,提取总蛋白,加入 $5\times\text{SDS}$ loading buffer,使用金属浴 100°C 加热 5 min, 4°C 、 $15\,000\text{ r}\cdot\text{min}^{-1}$ 离心 5 min 后取上清液进行 SDS-PAGE 及蛋白转印,然后用含 $50\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ 脱脂奶粉的 PBST 室温封闭 2 h。加一抗并 4°C 孵育过夜, PBST 清洗 4 次后加 HRP 标记的羊抗兔二抗室温孵育 1 h。PBST 洗涤 4 次后使用化学发光仪曝光。

1.8 间接免疫荧光 (IFA)

以 $\text{MOI}=0.1$ 剂量的 rLSDV 感染 MDBK 细胞系 72 h,弃培养基后加入 $40\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ 多聚甲醛并室温固定 20 min。PBS 清洗 3 次后用含 $3\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ Triton X-100 的 PBS 室温通透 20 min。PBS 清洗 3 次后用含 $30\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ BSA 的 PBS 室温封闭 1 h。加入 PBST 稀释的 LSDV 多克隆抗体, 4°C 孵育 8 h。PBST 清洗 3 次后加入 Alexa Fluor 488 标记的羊抗兔二抗 (1:3 000) 并室温孵育 1 h, PBST 清洗 3 次后使用荧光显微镜观察。同时设立未感染组作为阴性对照。

1.9 CCK8 法测定 3'-甲氧基鸟苷的细胞毒性及其抗 rLSDV 增殖能力

3'-甲氧基鸟苷是一种能够抑制 VACV 增殖的小分子化合物^[27],将 MDBK 铺至 96 孔板中,使用维持培养基将 3'-甲氧基鸟苷进行 3 倍梯度稀释,共 8 个稀释度 (药物最大浓度为 $100\text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$),用稀释后的各浓度 3'-甲氧基鸟苷溶液处理细胞 72 h,每个浓度设立等体积二甲基亚砜 (DMSO) 对照组。向每孔加入

10 μL CCK8 溶液后将培养板在培养箱内孵育 2 h,用酶标仪测定吸光值(A_{450})。相对细胞活性计算公式:相对细胞活性 = $(A_{\text{加药组}} - A_{\text{空白组}}) / (A_{\text{对照组}} - A_{\text{空白组}}) \times 100\%$ 。用 MOI 为 0.1 剂量的 rLSDV 感染 MDBK 细胞,再添加不同浓度 3'-甲氧基鸟苷处理细胞,并设置 DMSO 溶剂对照组,72 h 后在荧光显微镜下采集 mCherry 的荧光图像。

1.10 荧光定量 PCR 试验(qPCR)测定病毒 DNA 的相对丰度

将 MDBK 铺至 24 孔板中,弃掉细胞培养基。将 LSDV 与药物加入 200 μL 维持培养基中,放于培养箱中吸附 2 h。弃液体后用 PBS 清洗 1 次,将 1 000 μL 含药物的维持液加入 MDBK 孔中,继续培养 72 h。采用 DNA 提取试剂盒收集细胞样品并提取全部 DNA,置于 $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ 保存备用。向每个体系加入 $2 \times \text{SYBR Green Mix}$ 10 μL ,上、下游引物各 0.5 μL ,模板 DNA 1 μL ,ddH₂O 7 μL ,根据 SYBR Green Mix 试剂说明书推荐程序进行 qPCR 检测。病毒基因组 DNA 的相对丰度经用内参基因 *actin* 的丰度进行标准化后计算获得。

1.11 数据处理与统计学分析

使用 Image J 软件分析图像中的荧光信号强度和灰度值;使用 GraphPad Prism10.0 软件进行数据处理和绘图。相关性分析中, R^2 值越接近 1,则说明 2 组数据的相关性越强, $P < 0.01$ 表示 2 组数据具有极显著的相关性;采用独立样本 t 检验对 2 组数据进行差异显著性分析。

2 结果与分析

2.1 重组荧光毒株的纯化与生长曲线测定

为了获得单克隆的 rLSDV 毒株,通过噬斑试验在荧光显微镜下对发光的病毒进行纯化。如图 3-A 所示,LSDV 在 MDBK 细胞系中引起的细胞病变表现为细胞聚集突起,第 1 代病毒液中荧光病毒仅占少数。病毒在经过 3 轮传代纯化后,荧光病毒与细胞病变 100% 重合。提取纯化 3 代病毒的 DNA 进行 PCR 鉴定,如图 3-B 所示,以亲本病毒株 DNA 为模板的 PCR 产物大小为 699 bp,以第 4 代纯化病毒 DNA 为模板的 PCR 产物大小为 1 488 bp,因此,纯化后的病毒液中不含亲本病毒株的 DNA。进一步通过 TCID₅₀ 试验测定了 rLSDV 与亲本病毒株的生长曲线,结果显示,rLSDV 与亲本病毒株的生长曲线基本一致。此结果表明了 rLSDV 的构建成功。

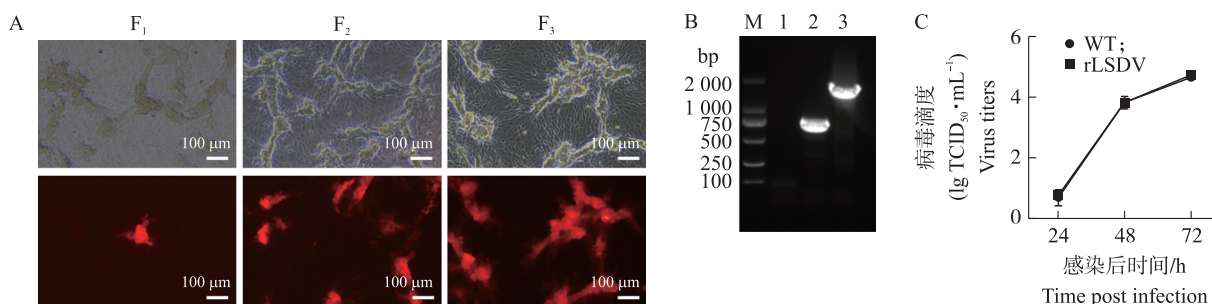


图3 rLSDV 的纯化鉴定与生长曲线测定

Fig. 3 Purification and growth curve determination of rLSDV

A. F₁—F₃ 代 rLSDV 的纯化及荧光鉴定;B. PCR 鉴定 rLSDV 的纯化情况(M. DNA 标准品;1~3. 阴性对照、亲本病毒株、第 4 代纯化病毒);C. TCID₅₀ 法测定 rLSDV 与亲本病毒株的生长曲线(WT: 亲本病毒株)。

A. Purification and fluorescence identification of F₁ to F₃ of rLSDV; B. Purity assessment of rLSDV by PCR (M. DNA marker; 1~3. Negative control, parental strain, fourth filial purified virus); C. Growth curves of rLSDV and the parental strain (WT) determined by TCID₅₀ assay.

2.2 免疫原的制备

为了减少病毒液中杂质引起的非特异性免疫反应,对 LSDV 进行蔗糖密度梯度离心纯化和浓缩。通过 TCID₅₀ 试验对纯化前、后的病毒滴度进行测定。结果(图 4-A)显示,纯化后的 LSDV 样品滴度平均值从纯化前的 $10^{5.5}$ TCID₅₀ · mL⁻¹ 提高至 $10^{6.2}$ TCID₅₀ · mL⁻¹。为了分析灭活后病毒颗粒的完整性,在电子显微镜下对病毒液中病毒颗粒的形态进行观察,结果(图 4-B)显示,经纯化、灭活后的 LSDV 在电子显微镜高倍放大视野下,可观察到具有完整包膜与哑铃状核心的椭圆形病毒颗粒,病毒形态与文献报道^[26-27] 基本一致。这些结果提示,经过蔗糖密度梯度离心纯化后 LSDV 样品的病毒滴度明显提高,并且经过 β -丙内酯

灭活后病毒的结构完整性良好,适合用于制备多克隆抗体。

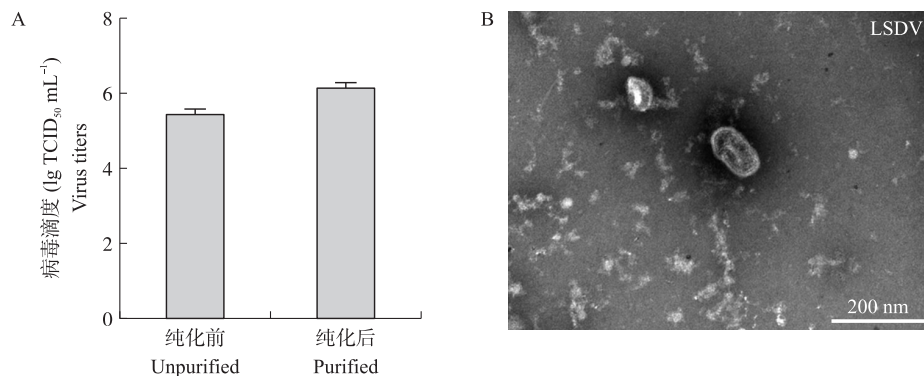


图 4 LSDV 免疫原制备效果的评价

Fig. 4 Evaluation of LSDV immunogen preparation effectiveness

A. 纯化前、后 LSDV 的滴度;B. 灭活后病毒颗粒的电镜观察。

A. LSDV titers of unpurified and purified;B. Observation of inactivated LSDV particles by electron microscope.

2.3 rLSDV 荧光信号强度与基于 WB 的病毒蛋白表达量的相关性

为了分析 rLSDV 的荧光信号是否能够准确反映病毒蛋白的表达量,以 MOI = 0.1 剂量的 rLSDV 感染 MDBK 细胞,在感染后 72 h 采集 mCherry 的荧光图片,并收集蛋白样品,采用 WB 试验检测病毒蛋白的表达水平。试验结果(图 5)显示,细胞中产生 mCherry 的荧光信号与病毒蛋白表达量均随感染的 MOI 值增加而增加,并且 mCherry 的荧光信号与病毒蛋白表达量呈极显著($P=0.0004$)的正相关关系。这些结果表明,rLSDV 感染过程中产生的荧光信号能够准确反映病毒蛋白的表达水平。

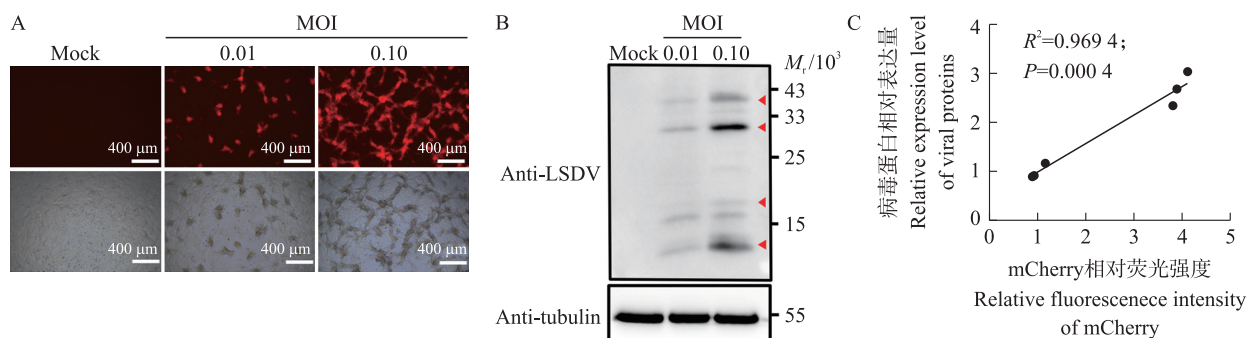


图 5 rLSDV 荧光信号观察病毒蛋白表达量及其相关性分析

Fig. 5 Analysis of the correlation between rLSDV fluorescent signals and viral protein expression levels by WB

A. rLSDV 感染 MDBK 后荧光图;B. WB 检测 rLSDV 病毒蛋白的表达(Mock:阴性对照组;箭头指示病毒蛋白);C. 荧光强度与病毒蛋白表达量的相关性分析。

A. Fluorescence image of rLSDV infected MDBK cells;B. Detection of rLSDV viral protein expression levels by WB (Mock: Negative control; Arrow head denotes the viral proteins);C. Correlation analysis between fluorescence intensity and viral protein expression levels.

2.4 基于 IFA 评价 rLSDV 自发荧光信号的特异性

为了评估 rLSDV 自发荧光信号的特异性,以 MOI 为 0.01 剂量的 rLSDV 接种 MDBK 细胞;感染 72 h 后固定 MDBK 细胞,利用制备的抗体对细胞进行 IFA 检测,采集 IFA 图像时一并采集 mCherry 的荧光图像。IFA 结果如图 6 所示:阴性对照组(Mock)无荧光信号,抗体标记与 rLSDV 自身的荧光区域高度重合,且荧光信号强度趋势一致。此结果说明 rLSDV 与 IFA 成像检测具有同样的效果。

2.5 3'-甲氧基鸟苷抑制 LSDV 增殖的效果评估

使用不同浓度药物处理 MDBK 细胞,通过 CCK8 试验测定细胞的相对活性,以评估 3'-甲氧基鸟苷对 MDBK 的细胞毒性。结果如图 7-A 所示,药物浓度为 0.05 ~ 100 μmol · L⁻¹ 时, MDBK 细胞活性均大于 90%。说明在这一浓度范围内,3'-甲氧基鸟苷对 MDBK 细胞的毒性较小。进一步测试了 3'-甲氧基鸟苷对 rLSDV 增殖的影响。结果如图 7-B 所示:在 rLSDV 感染过程中,3'-甲氧基鸟苷能够呈浓度依赖性地抑制 rLSDV mCherry 荧光蛋白的表达。利用野生型 LSDV 感染模型对上述结果加以验证:分别以 MOI 为

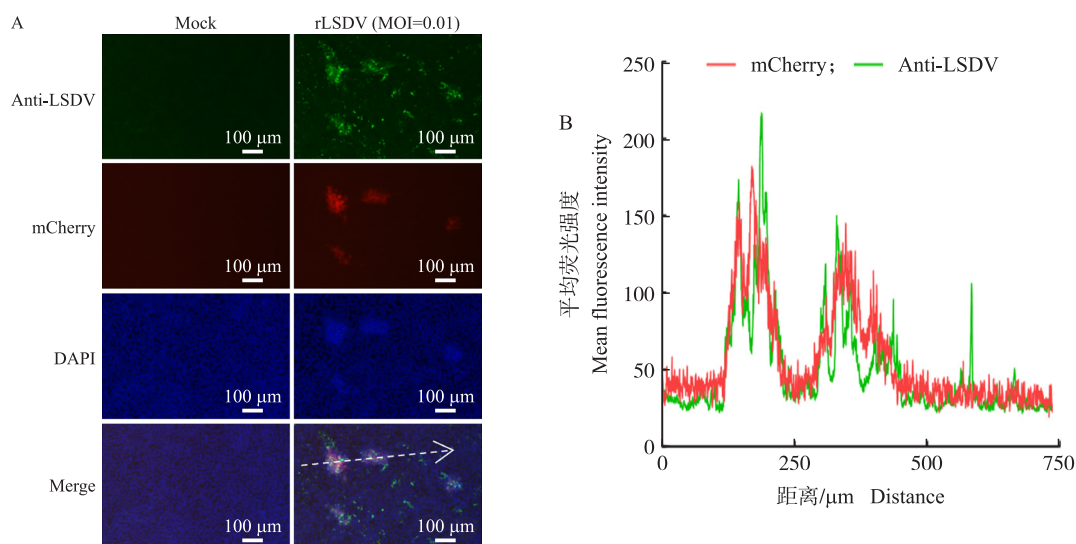


图 6 基于 IFA 评价 rLSDV 自发荧光信号的特异性

Fig. 6 The specificity of rLSDV autofluorescence signal validated by IFA

A. 用 LSDV 抗体进行 IFA 染色与 rLSDV 发光情况对比; B. A 图中虚线位置红色与绿色荧光的强度分析。

A. Comparison of IFA staining with LSDV antibody and mCherry of rLSDV; B. Analysis of intensity of the red and green fluorescence in Figure A (outlined by dashed lines).

0.01 和 0.1 剂量的野生型 LSDV 感染 MDBK 细胞,并在感染过程中添加 $100 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的 3'-甲氧基鸟苷,72 h 后收集细胞样品,进行 WB 试验。结果如图 7-C 所示,3'-甲氧基鸟苷能够明显抑制 LSDV 病毒蛋白的表达。同时,用 MOI 为 0.1 剂量的野生型 LSDV 感染 MDBK 细胞,添加同等浓度药物处理 72 h 后收集细胞样品,使用 qPCR 试验和 TCID₅₀ 试验进一步验证 3'-甲氧基鸟苷的抗病毒效果。结果如图 7-D、E 所示,3'-甲氧基鸟苷能够极显著降低 LSDV 病毒 *orf72* 基因的表达水平和病毒滴度。总之,3'-甲氧基鸟苷

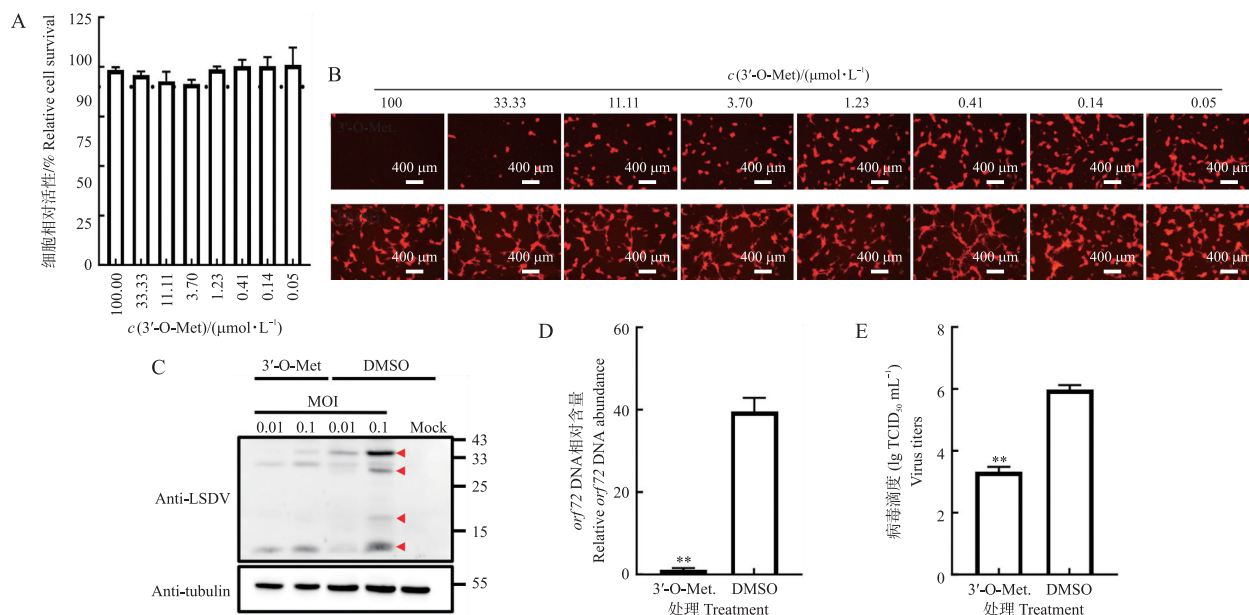


图 7 3'-甲氧基鸟苷(3'-O-Met)抑制 LSDV 增殖的效果评估

Fig. 7 Evaluation of the inhibitory effect of 3'-O-methylguanosine(3'-O-Met) on the proliferation of LSDV

A. CCK8 测定不同浓度 3'-甲氧基鸟苷对 MDBK 细胞活性的影响; B. 不同浓度 3'-甲氧基鸟苷对 rLSDV 增殖的影响; C. WB 法检测 3'-甲氧基鸟苷对不同 MOI LSDV 的抑制作用; D. qPCR 检测 3'-甲氧基鸟苷对 LSDV 的抑制作用; E. TCID₅₀ 法测定 3'-甲氧基鸟苷对 LSDV 的抑制作用(箭头指示病毒蛋白)。** $P < 0.01$ 。

A. The effect of different concentrations of 3'-O-Met on the viability of MDBK cells was determined by CCK-8 assay; B. The effect of different concentrations of 3'-O-Met on LSDV proliferation; C. WB was performed to evaluate the inhibitory effect of 3'-O-Met on LSDV at different MOI; D. The inhibitory effect of 3'-O-Met on LSDV was detected by qPCR; E. The inhibitory effect of 3'-O-Met on LSDV was determined by TCID₅₀ assay (Arrow head denotes the viral proteins). ** $P < 0.01$.

是抑制 LSDV 在 MDBK 细胞中增殖的有效化合物,并且本研究构建的 rLSDV 毒株在实际应用中能够准确反映病毒的复制水平。

3 结论与讨论

LSD 是一种重要的牛病毒性传染病,在牛群中传播范围广,危害严重。目前,LSD 已在我国多个地区流行,严重威胁着国内养牛业。目前关于该病机制的报道较少。作为痘病毒科的模式病毒,VACV 已被广泛研究。尽管 LSDV 与 VACV 的氨基酸序列同源性较低^[3],但两者在病毒结构和复制周期上高度相似;因此,VACV 的研究方法对于 LSDV 具有重要参考价值。在 VACV 研究中,荧光重组毒株作为一种重要的工具被广泛使用^[13]。然而,传统的同源重组方法在构建重组毒株时效率较低,本研究通过 CRISPR/Cas9 技术构建了 LSDV 荧光重组病毒 rLSDV,该方法可以加快重组病毒的构建^[22]。

荧光重组毒株在病毒学研究中具有多重应用价值,包括高通量抗病毒药物筛选^[28-30]、中和抗体检测^[31-32]、疫苗开发^[33-34]以及致病机制研究^[35]。在抗病毒药物筛选中,通过酶标仪定量检测荧光信号,可精确计算药物的半数抑制浓度;在病毒滴度测定与中和抗体滴度测定中,荧光重组毒株能够显著降低传统方法中基于细胞病变效应判读的主观性;在疫苗开发研究中,荧光重组毒株常用于构建基因缺失毒株,以便于子代病毒的筛选和纯化;在致病机制研究中,与野生型毒株相比,荧光重组毒株具有操作简便、实时观察、高灵敏度、强特异性及高稳定性等优势,并可应用于动物活体成像。因此,本研究构建的 rLSDV 在 LSDV 抗病毒药物筛选、抗体检测、疫苗开发和致病机制研究等方面具有重要应用潜力。

本试验结果进一步验证了 rLSDV 良好的实际应用效果。WB 结果显示 rLSDV 感染过程中产生的荧光信号强度随病毒接种量及病毒蛋白表达量的增加而增强;IFA 结果表明荧光信号与抗体染色产生的荧光信号高度重合,证实 rLSDV 在感染过程中发出的荧光信号能够特异性反映病毒的复制水平。将 rLSDV 应用于 3'-甲氧基鸟苷抗病毒研究,发现其能够精准反映不同浓度药物对 LSDV 的抑制作用。基于这些结果,未来我们将利用 rLSDV 毒株开展大规模高通量药物筛选工作,以期筛选出更加安全高效的抗 LSDV 药物,这对 LSD 的防控工作具有重要意义。值得注意的是,在 MDBK 细胞系中,3'-甲氧基鸟苷在较小细胞毒性浓度范围内能够有效抑制 LSDV 增殖。因此,可以考虑将 3'-甲氧基鸟苷作为抗病毒候选药物。

综上所述,本研究构建的 rLSDV 在病毒复制水平和成像检测以及药物筛选中具有良好的效果,是开展 LSDV 基础研究的实用工具。

参考文献 References:

- [1] Davies F G. Lumpy skin disease, an African capripox virus disease of cattle[J]. The British Veterinary Journal, 1991, 147(6): 489-503.
- [2] Ma J, Yuan Y, Shao J, et al. Genomic characterization of lumpy skin disease virus in southern China[J]. Transboundary and Emerging Diseases, 2022, 69(5): 2788-2799.
- [3] Tulman E R, Afonso C L, Lu Z, et al. Genome of lumpy skin disease virus[J]. Journal of Virology, 2001, 75(15): 7122-7130.
- [4] Babiuk S, Bowden T R, Boyle D B, et al. Capripoxviruses: an emerging worldwide threat to sheep, goats and cattle[J]. Transboundary and Emerging Diseases, 2008, 55(7): 263-272.
- [5] Sprygin A, Pestova Y, Wallace D B, et al. Transmission of lumpy skin disease virus: a short review[J]. Virus Research, 2019, 269: 197637.
- [6] 孙映雪, 宋建德, 郑雪光, 等. 2020—2022 年全球牛结节性皮肤病流行状况[J]. 中国动物检疫, 2023, 40(5): 1-4.
Sun Y X, Song J D, Zheng X G, et al. Global prevalence of lumpy skin disease from 2020 to 2022[J]. China Animal Health Inspection, 2023, 40(5): 1-4 (in Chinese).
- [7] Kononov A, Byadovskaya O, Kononova S, et al. Detection of vaccine-like strains of lumpy skin disease virus in outbreaks in Russia in 2017[J]. Archives of Virology, 2019, 164(6): 1575-1585.
- [8] Mathijs E, Vandenbussche F, Nguyen L, et al. Coding-complete sequences of recombinant lumpy skin disease viruses collected in 2020 from four outbreaks in northern Vietnam[J]. Microbiology Resource Announcements, 2021, 10(48): e0089721.
- [9] Sprygin A, Sainnokhoi T, Gombo-Ochir D, et al. Genetic characterization and epidemiological analysis of the first lumpy skin disease virus outbreak in Mongolia, 2021[J]. Transboundary and Emerging Diseases, 2022, 69(6): 3664-3672.
- [10] Lu G, Xie J, Luo J, et al. Lumpy skin disease outbreaks in China, since 3 August 2019[J]. Transboundary and Emerging Diseases, 2021, 68(2): 216-219.
- [11] McFadden G. Poxvirus tropism[J]. Nature Reviews: Microbiology, 2005, 3(3): 201-213.
- [12] Moss B. Smallpox vaccines: targets of protective immunity[J]. Immunological Reviews, 2011, 239(1): 8-26.

- [13] Zhao Y, Lu Y, Richardson S, et al. TRIM5 α restricts poxviruses and is antagonized by CypA and the viral protein C6[J]. *Nature*, 2023, 620(7975): 873–880.
- [14] Ren S, Zhang Y, Gao X, et al. 2024 Platform establishment of the Cre-loxP recombination system for genetic manipulation of the lumpy skin disease virus[J]. *Veterinary Microbiology*, 2024, 294: 110122.
- [15] Wang J, Ji J, Zhong Y, et al. Construction of recombinant fluorescent LSDV for high-throughput screening of antiviral drugs[J]. *Veterinary Research*, 2024, 55(1): 33.
- [16] van der Oost J, Jore M M, Westra E R, et al. CRISPR-based adaptive and heritable immunity in prokaryotes[J]. *Trends in Biochemical Sciences*, 2009, 34(8): 401–407.
- [17] Jansen R, van Embden J D A, Gaastra W, et al. Identification of genes that are associated with DNA repeats in prokaryotes[J]. *Molecular Microbiology*, 2002, 43(6): 1565–1575.
- [18] Brouns S J J, Jore M M, Lundgren M, et al. Small CRISPR RNAs guide antiviral defense in prokaryotes[J]. *Science*, 2008, 321(5891): 960–964.
- [19] Niu Y, Shen B, Cui Y, et al. Generation of gene-modified cynomolgus monkey via Cas9/RNA-mediated gene targeting in one-cell embryos[J]. *Cell*, 2014, 156(4): 836–843.
- [20] Cong L, Ran F A, Cox D, et al. Multiplex genome engineering using CRISPR/Cas systems[J]. *Science*, 2013, 339(6121): 819–823.
- [21] Bi Y, Sun L, Gao D, et al. High-efficiency targeted editing of large viral genomes by RNA-guided nucleases[J]. *PLoS Pathogens*, 2014, 10(5): e1004090.
- [22] Yuan M, Zhang W, Wang J, et al. Efficiently editing the vaccinia virus genome by using the CRISPR-Cas9 system[J]. *Journal of Virology*, 2015, 89(9): 5176–5179.
- [23] Yuan M, Wang P, Chard L S, et al. A simple and efficient approach to construct mutant vaccinia virus vectors[J]. *Journal of Visualized Experiments*, 2016(116): 54171.
- [24] van Diepen M, Chapman R, Douglass N, et al. Advancements in the growth and construction of recombinant lumpy skin disease virus(LSDV) for use as a vaccine vector[J]. *Vaccines*, 2021, 9(10): 1131.
- [25] Goswami B B, Sharma O K. Inhibition of vaccinia virus growth and virus-specific RNA synthesis by 3'-O-methyl adenosine and 3'-O-methyl guanosine[J]. *Journal of Virology*, 1983, 45(3): 1164–1167.
- [26] Schlosser-Perrin L, Holzmüller P, Fernandez B, et al. Constitutive proteins of lumpy skin disease virion assessed by next-generation proteomics[J]. *Journal of Virology*, 2023, 97(10): e00723–23.
- [27] Cyrklaff M, Risco C, Fernández J J, et al. Cryo-electron tomography of vaccinia virus[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2005, 102(8): 2772–2777.
- [28] Tan L, Shu X, Xu K, et al. Homologous recombination technology generated recombinant pseudorabies virus expressing EGFP facilitates to evaluate its susceptibility to different cells and screen antiviral compounds[J]. *Research in Veterinary Science*, 2022, 145: 125–134.
- [29] Fu P F, Cheng X, Su B Q, et al. CRISPR/Cas9-based generation of a recombinant double-reporter pseudorabies virus and its characterization *in vitro* and *in vivo*[J]. *Veterinary Research*, 2021, 52(1): 95.
- [30] 刘铭, 邢晓旭, 孙东波. 紫铆因对新冠病毒的体外抗病毒作用[J]. *东北农业大学学报*, 2025, 56(6): 126–134.
- Liu M, Xing X X, Sun D B. Antiviral activity of butein on bovine coronavirus *in vitro*[J]. *Journal of Northeast Agricultural University*, 2025, 56(6): 126–134(in Chinese with English abstract).
- [31] Frumence E, Viranaicken W, Gadea G, et al. A GFP reporter MR766-based flow cytometry neutralization test for rapid detection of Zika virus-neutralizing antibodies in serum specimens[J]. *Vaccines*, 2019, 7(3): 66.
- [32] 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(in Chinese with English abstract).
- [32] Hubert M, Guivel-Benhassine F, Bruel T, et al. Complement-dependent mpox-virus-neutralizing antibodies in infected and vaccinated individuals[J]. *Cell Host & Microbe*, 2023, 31(6): 937–948.e4.
- [33] Lu C, Li H, Chen W, et al. Immunological characteristics of a recombinant alphaherpesvirus with an envelope-embedded Cap protein of circovirus[J]. *Frontiers in Immunology*, 2024, 15: 1438371.
- [34] Liu Y, Shen Z, Xie Z, et al. African swine fever virus I73R is a critical virulence-related gene; a potential target for attenuation[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2023, 120(15): e2210808120.

责任编辑:周广礼