



赵冰倩,张妍,陈金霞,等.基于融合 PCR 构建猪瘟病毒反向遗传操作系统[J].南京农业大学学报,2026,49(4):845-852.

Zhao B Q,Zhang Y,Chen J X,et al. Construction of reverse genetic system of classical swine fever virus based on fusion PCR[J]. Journal of Nanjing Agricultural University,2026,49(4):845-852.

基于融合 PCR 构建猪瘟病毒反向遗传操作系统

赵冰倩^{1,2,3},张妍^{1,2},陈金霞^{1,2,3},陈婧^{1,2,3},邹林珂^{1,2,3},周斌^{1,2,3*}

(1.南京农业大学动物医学院,江苏 南京 210014;2.农业农村部动物细菌学重点实验室,江苏 南京 210014;
3.南京农业大学硕腾猪健康研发中心,江苏 南京 210014)

摘要:[目的]本文旨在建立猪瘟病毒(classical swine fever virus,CSFV)Shimen 株的反向遗传操作系统,为 CSFV 新型疫苗研制和致病机制研究提供技术平台。[方法]根据 CSFV Shimen 株的基因序列设计了 4 对引物,利用这 4 对引物扩增出 4 段涵盖 CSFV 基因组全长的 DNA 片段,并在第一段的 5'端引入 T7 启动子序列,随后通过同源重组的方法将 4 个片段分别克隆至低拷贝载体 pWSK-29 中。以构建的低拷贝质粒为模板,采用融合 PCR 方法,扩增出病毒基因组全长 DNA 序列,经体外转录并转染 PK-15 细胞。拯救的病毒分别经培养上清液传代和带毒细胞传代的方式进行繁殖。[结果]带毒细胞传代方式可获得更高滴度的病毒。间接免疫荧光试验结果显示,拯救病毒能够在 PK-15 细胞中产生特异性荧光信号。Western blot 检测证实拯救病毒能够表达 CSFV 特异性蛋白。病毒生长曲线分析表明,拯救病毒与亲本病毒具有相似的增殖特性,均在接种后 48~60 h 达到病毒滴度高峰。[结论]成功建立了 CSFV Shimen 株的反向遗传操作系统,为后续 CSFV 新型疫苗的研制、基因功能研究以及致病机制的深入探索奠定了重要基础。

关键词:猪瘟病毒;反向遗传技术;同源重组;融合 PCR

中图分类号:S855.3

文献标志码:A

文章编号:1000-2030(2026)04-0845-08

Construction of reverse genetic system of classical swine fever virus based on fusion PCR

ZHAO Bingqian^{1,2,3},ZHANG Yan^{1,2},CHEN Jinxia^{1,2,3},
CHEN Jing^{1,2,3},ZOU Linke^{1,2,3},ZHOU Bin^{1,2,3*}

(1.College of Veterinary Medicine,Nanjing Agricultural University,Nanjing 210014,China;2.Key Laboratory of Animal Bacteriology, Ministry of Agriculture and Rural Affairs,Nanjing 210014,China;3.Zoetis Swine Health Research Center, Nanjing Agricultural University,Nanjing 210014,China)

Abstract:[Objectives] The paper aimed to establish a reverse genetic system for the CSFV Shimen strain,providing a technical platform for the development of novel CSFV vaccines and the research into its pathogenic mechanisms. [Methods] Based on the genomic sequence of the CSFV Shimen strain,four pairs of primers were designed to amplify four DNA fragments that span the full length of the CSFV genome and T7 promoter sequence was introduced into the 5' end of the first segment. Subsequently,the four fragments were cloned into the low-copy vector pWSK-29 by homologous recombination. The full-length DNA sequence of the viral genome was amplified by fusion PCR using the constructed low-copy plasmids as templates,followed by *in vitro* transcription and transfection into PK-15 cells. The rescued virus was propagated using both standard virus passage(conventional viral propagation)and infected-cell passage. [Results] The experimental results confirmed that the infected-cell passage method yielded a higher viral titer. IFA results demonstrated that the rescued virus produced specific fluorescence signals in PK-15 cells. Western blot confirmed that the rescued virus expressed CSFV-specific proteins. Virus growth curve analysis indicated that the rescued virus exhibited proliferation characteristics similar to those of the parental virus,with both reaching peak titers at 48-60 h. Using these methods,a reverse genetic system for the CSFV Shimen strain was successfully established. [Conclusions] This study successfully established a reverse genetic system for the CSFV Shimen strain,providing a foundation for the development of novel CSFV vaccines, gene function studies,and further exploration of its pathogenic mechanisms. The establishment of this system will not only facilitate further studies of CSFV molecular biology but also offer valuable insights into the reverse genetic manipulation of other viruses in the *Pestivirus* genus.

Keywords: CSFV;reverse genetic technology;homologous recombination;fusion PCR

收稿日期:2025-01-15

基金项目:国家自然科学基金项目(32172840)

作者简介:赵冰倩,博士研究生。* 通信作者:周斌,教授,研究方向为动物分子病毒学与免疫学,E-mail:zhoubin@njau.edu.cn。

猪瘟疫病毒(classical swine fever virus, CSFV)属于黄病毒科(Flaviviridae)瘟疫病毒属(*Pestivirus*),与之关系密切的同属成员还有牛病毒性腹泻病毒(bovine viral diarrhea virus, BVDV)、边境病病毒(border disease virus, BDV)以及长颈鹿瘟疫病毒(giraffe pestivirus)^[1-2]。CSFV是含糖基膜蛋白和一个对称二十面体的包膜病毒,病毒粒子呈球形,直径20~60 nm,其基因组大小为12.3 kb,5'端为不加帽的非编码区,3'端的非编码区无polyA尾^[3-4]。CSFV基因组仅含有1个开放性阅读框(ORF),编码1个大的多聚蛋白前体,该多聚蛋白依靠病毒本身和宿主细胞蛋白酶的裂解作用产生4种结构蛋白(E^{ms} 、E1、E2、核衣壳蛋白C)以及8种非结构蛋白(Npro、p7、NS2、NS3、NS4A、NS4B、NS5A、NS5B)^[5-7]。其中E2蛋白是主要的抗原蛋白,不仅参与病毒的感染过程,还携带能刺激CSFV产生中和抗体的抗原决定簇,是目前疫苗研究的首选靶蛋白^[8-9]。此外, E^{ms} 蛋白也可以刺激机体产生微量的中和抗体并对CSFV强毒的攻击产生免疫保护^[10-12]。

病毒反向遗传学技术在病毒蛋白功能和病毒毒力的研究中发挥着不可替代的作用。反向遗传通常是指将连接有合适启动子的病毒基因组全长cDNA克隆整合到低拷贝载体中,然后将获得的全长cDNA进行体外转录或者细胞内转录,从而得到子代病毒^[13-14]。因此,可以在体外对病毒基因进行定点突变、重组、插入、置换等一系列操作,完成对基因的改造和修饰,再对病毒特定蛋白的结构和功能及其与宿主之间的相互作用进行研究,或是用于新型载体疫苗和基因工程疫苗的设计和研发^[15]。Moormann等^[16]在CSFV C株全基因组的5'端和3'端分别添加了T7启动子和线性化酶切位点,随后将其连接于pPRK载体中并通过体外转录的方法成功拯救出CSFV。然而,携带黄病毒科病毒全长cDNA的克隆质粒在大肠杆菌中存在表达不稳定现象,其主要原因在于构建cDNA克隆的遗传不稳定性,包括核苷酸替换、缺失和插入等,这增加了构建全长感染性克隆的难度^[17]。

为了降低基因不稳定性带来的克隆困难,本研究拟将CSFV全长基因组分4段分别克隆至低拷贝载体中,再以这4段DNA片段为模板,采用2轮融合PCR的方法,扩增出涵盖CSFV基因组全长的DNA序列,经过体外转录后转染PK-15细胞,以期成功拯救病毒。同时我们希望通过带毒细胞传代的方法提高CSFV的拯救效率,获得更高滴度的病毒,为后续CSFV嵌合病毒和定点突变病毒的构建提供更加稳定、方便、高效的平台。

1 材料与方法

1.1 病毒、细胞和质粒

高毒力猪瘟疫病毒石门株(GenBank:AF092448)、无CSFV污染PK-15细胞、pWSK-29低拷贝载体由南京农业大学农业农村部动物细菌学重点实验室保存。

1.2 主要试剂

RNA提取试剂TRIzol购自思科捷生物;反转录试剂盒、胶回收试剂盒购自宝生物工程(大连)有限公司;无缝克隆试剂盒购自南京诺唯赞生物科技股份有限公司;高保真Q5 DNA聚合酶购自NEB公司;无内毒素质粒提取试剂盒购自美国Omega公司;长链RNA转染试剂DMRIE-C购自美国Invitrogen公司;体外转录试剂盒购自Promega公司;FITC标记的羊抗鼠二抗,细胞核DAPI染料购自Abcam公司。

1.3 仪器设备

ABI-VERITI 96孔梯度PCR仪,ABI公司;倒置荧光显微镜,Carl Zeiss公司;二氧化碳细胞培养箱371型、细菌37℃恒温培养箱、37℃恒温摇床,Thermo有限公司;桌面台式冷冻离心机,Eppendorf公司;核酸紫外切胶仪器、DYY-6C型电泳仪,北京六一生物科技有限公司。

1.4 CSFV Shimen株基因组的提取和cDNA的制备

利用TRIzol方法提取病毒RNA,再按照反转录试剂盒说明书的步骤,将RNA反转录成cDNA,冻存于-80℃备用。

1.5 CSFV Shimen株基因组的分段克隆

根据GenBank公布的CSFV Shimen株(GenBank:AF092448)的序列,设计4对涵盖病毒基因组全长DNA片段的引物,并在第1个片段的上游引物中引入T7启动子序列。引物(表1)由生工生物工程(上海)股份有限公司合成。

以病毒基因组DNA为模板,利用表1中的引物对,在Q5 DNA聚合酶作用下采用PCR扩增获得各个基因片段。PCR扩增体系(50 μL):病毒cDNA 2 μL,5×Q5 Reaction Buffer 10 μL,dNTPs(10 mmol·L⁻¹)

1 μL , 上、下游引物 ($10\text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$) 各 $2.5\text{ }\mu\text{L}$, Q5 High-Fidelity DNA Polymerase $0.5\text{ }\mu\text{L}$, 用无酶双蒸水补足 $50\text{ }\mu\text{L}$ 。反应条件: $95\text{ }^{\circ}\text{C}\ 5\text{ min}$; $95\text{ }^{\circ}\text{C}\ 40\text{ s}$, $60\text{ }^{\circ}\text{C}\ 15\text{ s}$, $72\text{ }^{\circ}\text{C}\ 2\text{ min}$, 35 个循环; $72\text{ }^{\circ}\text{C}\ 10\text{ min}$, $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 结束反应。PCR 产物经 $10\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ 琼脂糖凝胶电泳后, 将目的条带进行切胶, 并用胶回收试剂盒回收扩增目的片段, 回收产物连接 pWSK-29 载体后送生工生物工程(上海)股份有限公司进行测序。

表 1 CSFV Shimen 株基因组扩增引物

Table 1 Primers used for cloning the genomic of CSFV Shimen

引物名称 Primer name	引物对序列 Primer pairs sequences (5'→3')
S1-T7-F/S1-R	<u>CGACGGTATCGATAAGCTT</u> TAATACGACTCACTATAG <u>GTATACGAGGTTAGTTCATTCT/</u> <u>GCTCTAGAAGTCTGGATCCTGGCATAGGGCCCACTCTTT</u>
S2-F/S2-R	<u>CGACGGTATCGATAAGCTT</u> GCATCAGATGAAAGACTGGG/ <u>GCTCTAGAAGTCTGGATCCTATCGACAACCACATCCAAG</u>
S3-F/S3-R	<u>CGACGGTATCGATAAGCTT</u> CTCTCCCGGACTTGGATGTG/ <u>GCTCTAGAAGTCTGGATCCTCTCTCACTTCTAGTGGGTCC</u>
S4-F/S4-R	<u>CGACGGTATCGATAAGCTT</u> CAGAGGCAGGACCCACTAG/ <u>GCTCTAGAAGTCTGGATCCGGCCGTTAGGAAATTACCT</u>
P1-T7-F/P1-R	TAATACGACTCACTATAG GTATACGAGGTTAG/TGGCATAGGGCCCACTCTTTCATCTGATGC
P2-F/P2-R	GCATCAGATGAAAGACTGGGCCCTATGCCA/TATCGACAACCACATCCAAGTCCGGGAGAG
P3-F/P3-R	CTCTCCCGGACTTGGATGTGGTTGTCGATA/CTCTCACTTCTAGTGGGTCCCTGCCTCTG
P4-F/P4-R	CAGAGGCAGGACCCACTAGAAGTGAGAGA/GGGCCGTTAGGAAATTACCTTAGTCCAAC

注:加粗字体为 T7 启动子序列;下划线部分为上游/下游片段(或载体)的同源臂序列。
Note: Bold text represents the T7 promoter sequence; the underlined portion represents the homologous arm sequence for the upstream/downstream fragment(or vector).

1.6 CSFV Shimen 株全长 cDNA 的克隆

以上述 4 个片段的克隆阳性质粒为模板, 利用 4 对特异性引物(表 1)扩增 CSFV Shimen 株的 4 段相互重叠的片段, 将扩增出的 4 个片段进行胶回收, 再利用 Fusion-PCR 方法获得病毒基因组的全长 DNA 序列。PCR 反应体系分为两部分, 具体如下: 片段 1/3 50 ng , 片段 2/4 50 ng , $5\times\text{Q5 Reaction Buffer}$ $10\text{ }\mu\text{L}$, dNTPs ($10\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$) $1\text{ }\mu\text{L}$, Q5 DNA Polymerase $0.5\text{ }\mu\text{L}$, 补充无酶双蒸水至 $50\text{ }\mu\text{L}$ 。反应条件: $98\text{ }^{\circ}\text{C}\ 30\text{ s}$; $92\text{ }^{\circ}\text{C}\ 15\text{ s}$, $60\text{ }^{\circ}\text{C}\ 30\text{ s}$, $72\text{ }^{\circ}\text{C}\ 3\text{ min}$, 12 个循环; $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 结束反应。将 2 部分反应体系混匀后再分为 2 管 $50\text{ }\mu\text{L}$ 的体系, 加入引物 P1-T7-F ($10\text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$) 与引物 P4-R ($10\text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$) 各 $1.5\text{ }\mu\text{L}$ 。按如下反应条件进行反应: $98\text{ }^{\circ}\text{C}\ 30\text{ s}$; $92\text{ }^{\circ}\text{C}\ 15\text{ s}$, $68\text{ }^{\circ}\text{C}\ 30\text{ s}$, $72\text{ }^{\circ}\text{C}\ 6\text{ min}$, 15 个循环; $72\text{ }^{\circ}\text{C}\ 10\text{ min}$, $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 结束反应。PCR 产物在 $10\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ 的琼脂糖凝胶中进行电泳, 将带有 T7 启动子的病毒全长 DNA 进行切胶回收获得 CSFV Shimen 株全长 cDNA。所有操作过程中防止 RNA 酶的污染。

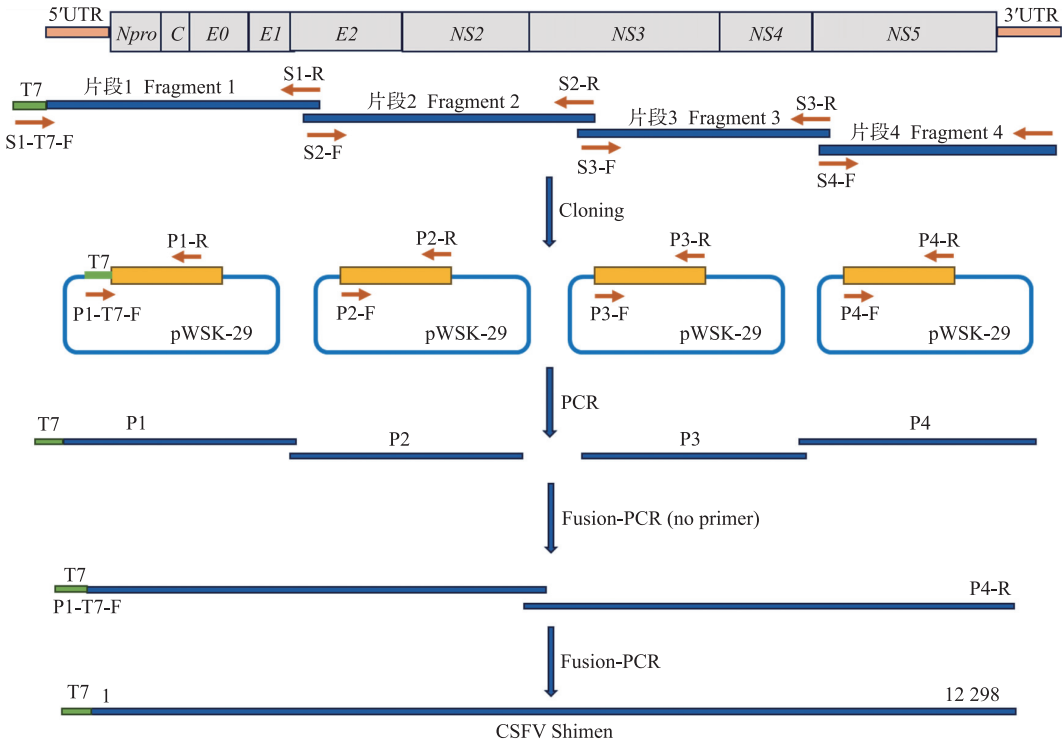


图 1 CSFV Shimen 株基因组全长构建

Fig. 1 Construction of the full-length CSFV Shimen genome

1.7 体外转录

获得携带 T7 启动子的病毒基因组 DNA 全长后,利用体外转录试剂盒 RiboMAX™ Large Scale RNA Production Systems 对其进行转录,获得不带有 7-甲基鸟嘌呤加帽的病毒 RNA。反应体系如下: T7 Transcription 5 × Buffer 4 μL, rNTPs (25 mmol·L⁻¹ ATP、CTP、GTP、UTP) 各 1.5 μL, 线性 DNA 模板 8 μL, Enzyme Mix (T7) 2 μL, 轻轻吹吸使反应液混匀, 后在 37 ℃ 孵育 2~4 h。加入 RQ1 RNase-Free DNase 1 μL, 37 ℃ 孵育 15 min。

1.8 病毒拯救

使用 PK-15 细胞进行病毒的拯救。待 PK-15 细胞在 6 孔板中长至铺满孔底 70%~80% 时, 弃掉培养基, 用无血清培养基洗涤 3 次。按照长链 RNA 转染试剂 DMRIE-C 试剂盒说明书进行转染, 并设空白对照 (即只加转染试剂和 Opti-MEM, 不加 RNA), 于 37 ℃ 培养箱中进行孵育。将 6 μL 转染试剂加入 1 mL Opti-MEM 中, 涡旋混匀后室温静置 15 min, 加入上述 RNA 产物, 并涡旋混匀, 将混合液加入 6 孔板中, 并设空白对照, 37 ℃ 孵育 6 h 后更换维持液。

1.9 拯救病毒的传代

本试验采用 2 种方法进行病毒传代, 即培养上清液传代和带毒细胞传代。培养上清液传代: 取 F₀ 代培养细胞的上清液, 离心后加入至生长密度达 80%~90% 的 PK-15 单层细胞中, 吸附 1.5~2 h 后更换为维持液, 继续培养 60~72 h 后进行检测。以此方法传代繁殖病毒。带毒细胞传代: 将转染后 (60~72 h) 长满的 PK-15 细胞 (F₀ 代) 按 1:3 传代, 同时保存培养上清液进行检测, 以此方法连续传代 3 次。

1.10 间接免疫荧光 (IFA) 试验

将上述病毒液接种 PK-15 细胞, 2 h 后更换为维持液继续培养 24 h; 弃培养基, 加入 4% 多聚甲醛固定 10 min, PBS 洗涤 3 次; 用含 0.1% Triton-100 的 PBS 透膜 20 min, PBS 洗涤 3 次; 加入 CSFV E2 多抗血清 (1:500), 4 ℃ 孵育过夜, PBS 洗涤 3 次; 加入 Alexa Fluor 488 标记的山羊抗鼠 IgG (1:2 000) 37 ℃ 避光孵育 45 min, PBS 避光洗涤 3 次, 加入 2 μg·mL⁻¹ 细胞核染色液 DAPI, 室温避光孵育 10 min 后弃掉染色液, PBS 避光洗涤 3 次后在荧光显微镜下观察。

1.11 蛋白印迹 (Western blot) 鉴定

为了检测病毒是否拯救成功, 采用 Western blot 方法检测病毒蛋白的表达情况。将所获得的病毒液以 MOI=1 接种 PK-15 细胞, 分别在培养 12、24、36 h 后弃上清液, 加入适量裂解液, 置于冰上裂解 30 min 后用细胞刮铲将细胞刮下, 4 ℃、12 000 g 离心 10 min 后收集上清液。取等体积裂解上清液, 加入 5×SDS 上样缓冲液, 煮沸变性。上述蛋白样品经 120 g·L⁻¹ SDS-PAGE 电泳 (80 V 30 min, 120 V 90 min) 分离后, 使用湿转法 (100 V, 90 min) 转印 PVDF 膜。转膜后, 用 5% 脱脂奶粉室温封闭 2 h; 加入抗 CSFV Npro 蛋白的小鼠单克隆抗体, 4 ℃ 孵育过夜; TBST 洗涤 3 次, 每次 10 min; 加入 HRP 标记的山羊抗小鼠 IgG 二抗, 室温孵育 1 h; TBST 洗涤 3 次, 每次 10 min。使用增强化学发光试剂盒显影, 用凝胶成像系统采集图像。

1.12 病毒的生长曲线测定

测定被拯救的病毒与其亲本病毒的多步生长曲线, 比较二者在复制特性上是否存在差异。分别将亲本病毒和拯救病毒以 MOI=1 剂量接种生长于 96 孔板中的单层 PK-15 细胞, 分别在感染后 8、16、24、36、48、60、72 h 收获细胞上清液。将上清液进行连续 10 倍比稀释, 然后取 8 个稀释度 (10⁻⁸~10⁻¹), 分别接种预先铺好 PK-15 细胞的 96 孔板, 每个稀释度接种 8 个孔。37 ℃、5% CO₂ 吸附 2 h 后更换为维持液继续培养 24 h。弃去孔中液体, 进行 IFA 染色和鉴定。记录不同稀释度的阳性细胞孔数与阴性细胞孔数, 按照 Reed-Muench 法计算病毒 TCID₅₀。

2 结果与分析

2.1 CSFV Shimen 株基因组分段扩增与克隆

以提取的 CSFV Shimen 毒株的 RNA 为模板, 逆转录合成其 cDNA 的第 1 条链, 随后利用设计的分段扩增引物成功扩增出 4 个相互重叠的 DNA 片段, 可以涵盖 CSFV Shimen 株基因组全长 (图 2-A)。将 CSFV Shimen 株的 4 个 DNA 片段利用同源重组的方法与线性化的低拷贝质粒 pWSK-29 进行连接, 并命名为 pWSK-SH-1 (含有 Shimen 株基因组片段 1~3 268, 并在 5' 端加入 T7 启动子序列)、pWSK-SH-2 (含有 Shimen 株基因组片段 3 230~6 546)、pWSK-SH-3 (含有 Shimen 株基因组片段 6 516~9 540)、pWSK-SH-4

(含有 Shimen 株基因组片段 9 511~12 298)。对上述 4 个质粒进行双酶切鉴定,结果显示酶切片段大小与预期一致(图 2-B)。将构建好的质粒进行测序验证,验证正确的质粒保存后进行下一步试验。

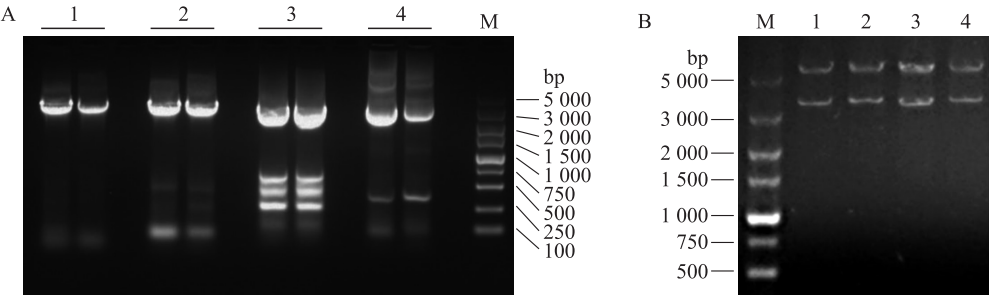


图 2 CSFV Shimen 株基因组分段 PCR 产物(A)及分段质粒双酶切鉴定(B)

Fig. 2 PCR electrophoresis of CSFV Shimen genome segments(A) and double enzyme digestion(B)
A. 1~4; CSFV Shimen 株 1~4 段 cDNA 扩增片段; B. 1~4; 质粒 pWSK-SH-1—pWSK-SH-4 双酶切验证。M. DL5000 DNA 标准品。
A. 1-4. cDNA amplification fragments of CSFV Shimen strain segments 1-4; B. 1-4; Double enzyme digestion verification of plasmids pWSK-SH-1-pWSK-SH-4. M. DL5000 DNA marker.

2.2 CSFV Shimen 株基因组全长 cDNA 扩增产物鉴定

以质粒 pWSK-SH-1、pWSK-SH-2、pWSK-SH-3、pWSK-SH-4 为模板,扩增互相重叠的 4 个 DNA 片段,且在 5'-UTR 处通过引物加入 T7 启动子,采用三步融合 PCR 方法获得携带有 T7 启动子的 CSFV Shimen 株病毒全长 cDNA(图 3)。

2.3 病毒的传代与鉴定

2.3.1 培养上清传代 间接免疫荧光检测(IFA)结果(图 4)表明,F₁ 代接毒细胞仅有少量为猪瘟抗原阳性,F₂ 代阳性细胞数比 F₁ 代更少,几乎没有。因此,放弃这种病毒传代方法,采用带毒细胞传代的方法繁殖病毒。

2.3.2 带毒细胞传代 试验中持续感染拯救的 CSFV Shimen 株的 PK-15 细胞状态良好,经间接免疫荧光法检测,带毒传代的 PK-15 细胞从 F₁ 代开始即可检出猪瘟阳性,并且从 F₁—F₃ 代阳性细胞数逐渐增多,阳性细胞比例接近 90%(图 5)。将拯救出的毒株命名为 rCSFV Shimen。

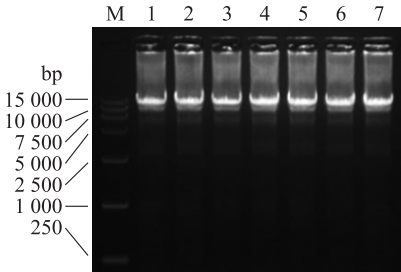


图 3 CSFV Shimen 株全长 cDNA 扩增电泳图
Fig. 3 Electrophoresis of whole cDNA amplification of CSFV Shimen

M. DL15000 DNA marker; 1~7. CSFV Shimen 全长 cDNA
Whole cDNA of CSFV Shimen.

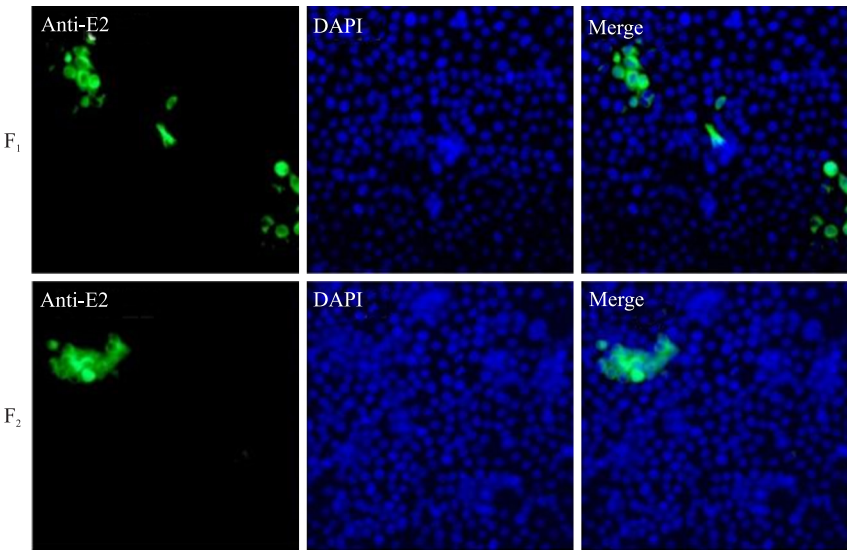


图 4 间接免疫荧光法鉴定上清传代病毒

Fig. 4 IFA identification of the supernatant virus

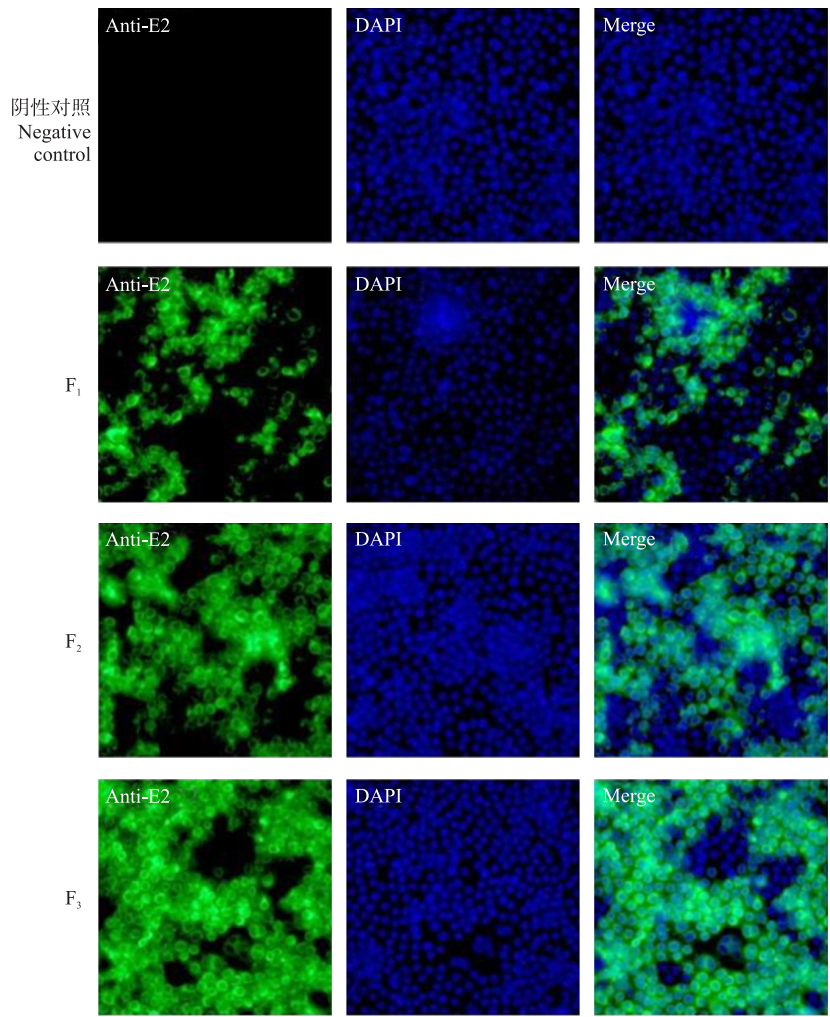


图 5 间接免疫荧光法鉴定细胞传代病毒

Fig. 5 IFA identification of the cell passage viruses

2.4 Western blotting 鉴定病毒蛋白表达结果

为了检测拯救毒株 rCSFV Shimen 是否能够正常表达病毒蛋白,拯救的毒株以 MOI = 1 的剂量感染 PK-15 细胞,24 h 后裂解细胞,收集细胞内的蛋白,检测相应病毒蛋白的表达情况。如图 6 所示,亲本病毒株和拯救毒株均能够检测到 CSFV-Npro 蛋白,说明拯救毒株可以正常表达病毒蛋白。

2.5 拯救病毒在 PK-15 细胞上的生长曲线

为了探究拯救毒株 rCSFV Shimen 及亲本病毒株 CSFV Shimen 在 PK-15 细胞中的增殖特性,以 MOI 为 1 剂量接种 PK-15 细胞,分别测定感染后 8、16、24、36、48、60、72 h 的病毒滴度,并绘制生长曲线(图 7)。rCSFV Shimen 在 PK-15 细胞中的生长动力学与亲本病毒株相当,在接毒后 8 h 即可在细胞上清中检测到子代病毒,在 48~60 h 达到病毒增殖的峰值,亲本病毒株的 TCID₅₀ 达到 10^{-5.75} mL⁻¹,rCSFV Shimen 毒株的

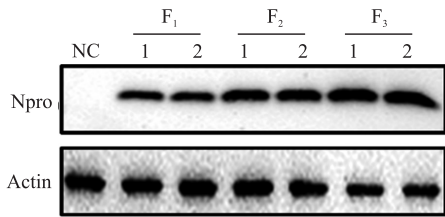


图 6 野生型和重组亲本病毒株感染 PK-15 细胞后的蛋白表达鉴定结果

Fig. 6 Identification of wild-type and recombinant parental strains infected PK-15 cells

1. CSFV;2. rCSFV.

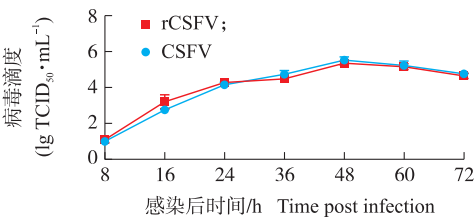


图 7 亲本病毒株和拯救毒株在 PK-15 细胞的生长曲线

Fig. 7 Growth efficiency of rescued viruses and the parental strains in PK-15 cells

TCID₅₀达到 $10^{-5.5}$ mL⁻¹。2种毒株显示出相似的生长曲线,这说明拯救的毒株在细胞上有良好的增殖能力,并与亲本病毒株具有相似的生物学特性。

3 讨论

CSF是一种接触性传染病,对各国养猪业以及国际贸易都造成了巨大损害^[18]。为了更好地防控CSF,针对CSFV的毒力基因、致病机制以及与宿主蛋白的相互作用成为当前研究的热点。CSFV Shimen株是经典强毒株,具有高致病性,在体外细胞培养中表现出优异的增殖能力,被广泛地用于CSFV的研究中。

反向遗传学技术在其诞生至今的几十年时间里高速发展,越来越多病毒的反向遗传系统已经被建立,并用于RNA病毒基因组的定点突变、基因缺失或基因突变,为解析病毒属蛋白功能、确定关键毒力位点以及开发新型疫苗提供了重要技术支撑^[19-21]。Velazquez-Salinas等^[22]在高毒力株Brescia(BICv)的遗传背景下使用定点突变技术构建了多个针对E2编码区的突变体,发现其中1种突变体感染猪后表现出病毒血症减少和延长,又没有表现出任何与CSF相关的临床症状,基于此提出了一种开发减毒活疫苗的方法。反向遗传学系统对RNA病毒的毒力及致病机制等研究起到了极大的推动作用,但是其在构建过程中存在大量困难。首先,对于基因组较大的病毒,难以获得高保真性的cDNA克隆。随着RNA序列的延伸,RT-PCR的保真性也会不断下降^[23]。其次,在选择载体的过程中,难以找到合适的能容纳较大外源基因的载体^[24-25]。最后,由于某些病毒基因组能够表达一些对细菌有毒性的蛋白,从而使细菌无法正常生长,最终由于病毒基因组全长的连接失败^[26-28]。

为了解决CSFV反向遗传学构建过程中的困难,本研究根据CSFV Shimen株的基因序列设计4对可以扩增出涵盖CSFV基因组全长的特异性引物,并在第1对引物的上游引入T7启动子序列,随后通过2轮融合PCR直接扩增出含有T7启动子的CSFV全长序列。为方便后续鉴定,在CSFV基因组第8215 bp处设计带有特定突变位点的引物,经扩增后引入新的Ava I酶切位点,该酶切位点本身不存在于基因组中。同时该碱基的突变为同义突变,不引起氨基酸序列的改变,可以通过酶切鉴定以区分亲本病毒株和拯救毒株。与常规方法不同,该方法利用PCR技术即可获得病毒基因组全长,避免了经大肠杆菌复制可能导致的序列不稳定风险。此外,该方法将4段病毒基因组cDNA分别克隆至低拷贝质粒中进行保存,提高了载体选择的包容性,减少了多片段扩增、连接带来的复杂性。值得一提的是,该方法通过对单个质粒进行改造即可实现CSFV全长基因组的改造,极大地简化了病毒改造的步骤。

本研究采用培养上清传代和带毒细胞传代2种方式进行拯救病毒的传代。培养上清传代的结果表明拯救的病毒在PK-15细胞中稳定增殖存在一定困难。病毒增殖效率主要取决于感染时的细胞状态以及病毒自身的稳定性和感染力。在直接培养上清液吸附组中,病毒接种时细胞处于单层生长状态,细胞状态良好,对病毒感染具有一定的抗性。同时,病毒与细胞通过静态吸附方式接触,接触率相对较低,使得培养上清液中的病毒滴度可能不足以完全感染新细胞^[29-30]。鉴于CSFV在PK-15细胞中不产生细胞病变,尝试采用带毒细胞传代的方式进行病毒传代。带毒细胞消化后呈圆缩状态,细胞膜通透性增加,对病毒的易感性显著提高。病毒与细胞悬液在混匀过程中充分接触,也能够显著提高感染效率。本试验结果表明该方法可以使拯救的CSFV在PK-15中稳定传代,提高拯救病毒的滴度,使病毒拯救更加高效和稳定。

本研究利用两步融合PCR方法建立CSFV Shimen株反向遗传系统,该方法不经过大肠杆菌进行克隆增殖。与传统方法相比,该方法具有稳定性高、省时方便等优点,为后续构建CSFV嵌合病毒和定点突变病毒提供了更加稳定的基础。

参考文献 References:

- [1] Chen J, Song H X, Hu J H, et al. Classical swine fever virus non-structural protein 5B hijacks host METTL14-mediated m6A modification to counteract host antiviral immune response[J]. PLoS Pathogens, 2024, 20(3): e1012130.
- [2] Hong T Q, Yang Y, Wang P Z, et al. Pestiviruses infection; interferon-virus mutual regulation[J]. Frontiers in Cellular and Infection Microbiology, 2023, 13: 1146394.
- [3] Li W H, Zhang Z L, Zhang L L, et al. Interaction of SERINC5 and IFITM1/2/3 regulates the autophagy-apoptosis-immune network under CSFV infection[J]. Virulence, 2022, 13(1): 1720-1740.
- [4] Fan J D, Liao Y X, Zhang M R, et al. Anti-classical swine fever virus strategies[J]. Microorganisms, 2021, 9(4): 761.
- [5] Liu C C, Zhao W, Su J, et al. HSP90AA1 interacts with CSFV NS5A protein and regulates CSFV replication via the JAK/STAT and NF-κB

- signaling pathway[J]. *Frontiers in Immunology*, 2022, 13: 1031868.
- [6] Song H T, Abdullah S W, Pei C C, et al. Self-assembling E2-based nanoparticles improve vaccine thermostability and protective immunity against CSFV[J]. *International Journal of Molecular Sciences*, 2024, 25(1): 596.
- [7] 侯金秀, 郑阳, 李照耀, 等. 猪瘟病毒非结构蛋白 NS3 和 NS5B 多克隆抗体的制备和鉴定[J]. *南京农业大学学报*, 2018, 41(6): 1093–1099.
- Hou J X, Zheng Y, Li Z Y, et al. Preparation and identification of polyclonal antibody against NS3 and NS5B proteins of classical swine fever virus[J]. *Journal of Nanjing Agricultural University*, 2018, 41(6): 1093–1099 (in Chinese with English abstract).
- [8] Tong W, Zheng H, Li G X, et al. Recombinant pseudorabies virus expressing E2 of classical swine fever virus (CSFV) protects against both virulent pseudorabies virus and CSFV[J]. *Antiviral Research*, 2020, 173: 104652.
- [9] Mi S J, Bao F, Liu Z D, et al. Generation and epitope mapping of novel neutralizing monoclonal antibodies against glycoprotein E2 of CSFV[J]. *International Journal of Biological Macromolecules*, 2024, 282: 136609.
- [10] Pavulraj S, Pannhorst K, Stout R W, et al. A triple gene-deleted pseudorabies virus-vectored subunit PCV2b and CSFV vaccine protects pigs against PCV2b challenge and induces serum neutralizing antibody response against CSFV[J]. *Vaccines*, 2022, 10(2): 305.
- [11] Frey C F, Bauhofer O, Ruggli N, et al. Classical swine fever virus replicon particles lacking the *E^{ms}* gene; a potential marker vaccine for intradermal application[J]. *Veterinary Research*, 2006, 37(5): 655–670.
- [12] Du F Y, Cao Z, Ye Z X, et al. Production and immunogenicity of a deoxyribonucleic acid *Alphavirus* vaccine expressing classical swine fever virus E2-Erns protein and porcine *Circovirus* Cap-Rep protein[J]. *Frontiers in Microbiology*, 2022, 13: 1065532.
- [13] Scholz J, Falkenhagen A, Bock C T, et al. Reverse genetics approaches for hepatitis E virus and related viruses[J]. *Current Opinion in Virology*, 2020, 44: 121–128.
- [14] Sandoval-Jaime C. Astrovirus reverse genetics systems, a story of success[J]. *Current Opinion in Virology*, 2020, 44: 57–65.
- [15] Yi W C, Zheng F W, Zhu H C, et al. Role of the conserved E2 residue G259 in classical swine fever virus production and replication[J]. *Virus Research*, 2022, 313: 198747.
- [16] Moormann R J, van Gennip H G, Miedema G K, et al. Infectious RNA transcribed from an engineered full-length cDNA template of the genome of a pestivirus[J]. *Journal of Virology*, 1996, 70(2): 763–770.
- [17] Blaney J E, Jr, Durbin A P, Murphy B R, et al. Development of a live attenuated dengue virus vaccine using reverse genetics[J]. *Viral Immunology*, 2006, 19(1): 10–32.
- [18] Liu Y Y, Liang X D, Liu C C, et al. Fatty acid synthase is involved in classical swine fever virus replication by interaction with NS4B[J]. *Journal of Virology*, 2021, 95(17): e0078121.
- [19] 陆儒杰, 武小琰, 宋家升, 等. 鹅源 NDV 基因 VII 型致弱株的构建及其生物学特性[J]. *南京农业大学学报*, 2026, 49(2): 364–372.
- Lu R J, Wu X Y, Song J S, et al. Construction and characterization of a weak strain of goose origin genotype VII Newcastle disease virus[J]. *Journal of Nanjing Agricultural University*, 2026, 49(2): 364–372 (in Chinese with English abstract).
- [20] 赵秀美, 张华, 贾惠, 等. 传染性支气管炎病毒反向遗传系统的构建策略与应用[J]. *畜牧与兽医*, 2023, 55(10): 109–115.
- Zhao X M, Zhang H, Jia H, et al. Construction strategy and application of the reverse genetic system of infectious bronchitis virus[J]. *Animal Husbandry & Veterinary Medicine*, 2023, 55(10): 109–115 (in Chinese with English abstract).
- [21] 于立辉, 孙小云, 王浩然, 等. 不同免疫增强剂对猫瘟疫苗免疫效力的影响[J]. *沈阳农业大学学报*, 2025, 56(2): 63–68.
- Yu L H, Sun X Y, Wang H R, et al. Effect of different immune enhancers on the immunological efficacy of feline distemper vaccine[J]. *Journal of Shenyang Agricultural University*, 2025, 56(2): 63–68 (in Chinese with English abstract).
- [22] Velazquez-Salinas L, Risatti G R, Holinka L G, et al. Recoding structural glycoprotein E2 in classical swine fever virus (CSFV) produces complete virus attenuation in swine and protects infected animals against disease[J]. *Virology*, 2016, 494: 178–189.
- [23] Yun S I, Kim S Y, Rice C M, et al. Development and application of a reverse genetics system for Japanese encephalitis virus[J]. *Journal of Virology*, 2003, 77(11): 6450–6465.
- [24] Almazán F, González J M, Pénzes Z, et al. Engineering the largest RNA virus genome as an infectious bacterial artificial chromosome[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2000, 97(10): 5516–5521.
- [25] 项钰, 郭衍冰, 孙兴忠, 等. 牛副流感病毒 3 型 NP 蛋白在昆虫杆状病毒系统中的表达[J]. *畜牧与兽医*, 2026, 58(1): 101–106.
- Xiang Y, Guo Y B, Sun X Z, et al. Expression of bovine parainfluenza virus type 3 NP protein in insect baculovirus system[J]. *Animal Husbandry & Veterinary Medicine*, 2026, 58(1): 101–106 (in Chinese with English abstract).
- [26] Rasmussen T B, Reimann I, Uttenthal Å, et al. Generation of recombinant pestiviruses using a full-genome amplification strategy[J]. *Veterinary Microbiology*, 2010, 142(1/2): 13–17.
- [27] Mishin V P, Cominelli F, Yamshchikov V F. A ‘minimal’ approach in design of flavivirus infectious DNA[J]. *Virus Research*, 2001, 81(1/2): 113–123.
- [28] Zhang F Q, Huang Q S, Ma W Y, et al. Amplification and cloning of the full-length genome of Japanese encephalitis virus by a novel long RT-PCR protocol in a cosmid vector[J]. *Journal of Virological Methods*, 2001, 96(2): 171–182.
- [29] 甄祖刚, 周荔葆, 王野, 等. 不同感染方式对狂犬病病毒在人二倍体细胞中增殖的影响[J]. *沈阳药科大学学报*, 2024, 41(2): 177–181.
- Zhen Z G, Zhou L B, Wang Y, et al. The effects of different infection methods on rabies virus proliferation in human diploid cells[J]. *Journal of Shenyang Pharmaceutical University*, 2024, 41(2): 177–181 (in Chinese with English abstract).
- [30] 高睿, 李河林, 焦铁军, 等. 猪圆环病毒 2 型培养工艺比较研究[J]. *动物医学进展*, 2021, 42(4): 44–47.
- Gao R, Li H L, Jiao T J, et al. Comparative study on different proliferation technologies of PCV2[J]. *Progress in Veterinary Medicine*, 2021, 42(4): 44–47 (in Chinese with English abstract).