

[19] 中华人民共和国国家知识产权局

[51] Int. Cl⁷



[12] 发明专利说明书

C12N 7/01

C12N 15/38

A61K 39/265

C12Q 1/70

A61P 31/22

//C12R 1 : 93

[21] ZL 专利号 00803136.3

[45] 授权公告日 2005 年 4 月 20 日

[11] 授权公告号 CN 1197961C

[22] 申请日 2000.1.18 [21] 申请号 00803136.3

[30] 优先权

[32] 1999. 1. 29 [33] US [31] 09/240,173

[86] 国际申请 PCT/US2000/001085 2000. 1. 18

[87] 国际公布 WO2000/044884 英 2000. 8. 3

[85] 进入国家阶段日期 2001. 7. 26

[71] 专利权人 堪萨斯州立大学研究基金会

地址 美国堪萨斯州

[72] 发明人 S·I·乔杜利

审查员 吴通义

[74] 专利代理机构 上海专利商标事务所有限公司

代理人 徐 迅

权利要求书 2 页 说明书 9 页 附图 7 页

[54] 发明名称 BHV -1 基因缺失的病毒疫苗

[57] 摘要

产生一种安全的重组活病毒及疫苗，方法如下：缺失牛疱疹病毒 1 (BHV - I) 的天然糖蛋白 E (gE) 编码区部分，随后在 gE 基因座插入含有外源功能性 β - gal 的质粒。gE 基因的缺失使该病毒稳定地减毒，且可作为免疫学标记物来区分疫苗接种过的动物与感染的动物。另外，产生 β - gal 易于评估疫苗接种动物中的 gE Δ 3.1IBR β 病毒复制，且可作为表型标记物来与感染动物中野生型病毒的复制相区分。

I S S N 1 0 0 8 - 4 2 7 4

1. 一种减毒重组牛疱疹病毒 I 型病毒，其特征在于，所述的病毒中天然糖蛋白 E 编码区的一部分被缺失并被基因插入件所替换，所述的插入件含有外源β-半乳糖苷酶基因的编码区和人巨细胞病毒早期启动子，所述的重组病毒在宿主细胞中表达β-半乳糖苷酶，其中，所述天然糖蛋白 E 编码区的缺失部分约占所述天然糖蛋白 E 编码区的三分之二。

2. 如权利要求 1 所述的病毒，其特征在于，所述的插入件含有人巨细胞病毒早期启动子和所述的人巨细胞病毒早期启动子的增强子序列。

3. 如权利要求 2 所述的病毒，其特征在于，所述的插入件连接于 SV₄₀ 聚腺苷酸化位点。

4. 一种能有效诱导牛疱疹病毒 I 型中和抗体的疫苗，其特征在于，所述的疫苗包含权利要求 1 所述的重组病毒。

5. 如权利要求 4 所述的疫苗，其特征在于，所述插入件含有人巨细胞病毒早期启动子和所述的人巨细胞病毒早期启动子的增强子序列。

6. 如权利要求 4 所述的疫苗，其特征在于，所述插入件连接于 SV₄₀ 聚腺苷酸化位点。

7. 一种鉴别受权利要求 4 所述的重组病毒疫苗感染的动物方法，其特征在于，所述的方法包括如下步骤：

- (a) 从动物获得液体或组织样品；
- (b) 分析该样品中的β-半乳糖苷酶蛋白质或糖蛋白 E；和
- (c) 检测样品中的权利要求 4 所述的重组病毒疫苗；
- (d) 基于以上检测鉴别出受感染的动物。

8. 如权利要求 7 所述的方法，其特征在于，所述步骤 (b) 的分析包括检测β-半乳糖苷酶的存在与否。

9. 如权利要求 8 所述的方法，其特征在于，所述步骤 (d) 的鉴别是根据是否存在β-半乳糖苷酶的表达。

10. 如权利要求 7 所述的方法，其特征在于，所述步骤 (b) 的分析包括检测对糖蛋白 E 的特异性抗体应答反应。

11. 如权利要求 10 所述的方法，其特征在于，所述步骤 (d) 的鉴别是根据是否存在对糖蛋白 E 的特异性抗体应答反应。

12. 如权利要求 7 所述的方法，其特征在于，所述步骤 (b) 的分析包括用

原位组织化学方法检测 β -半乳糖苷酶的活性。

13. 如权利要求 7 所述的方法, 其特征在于, 所述步骤 (b) 的分析包括用原位免疫-组织化学方法检测 β -半乳糖苷酶蛋白质。

14. 如权利要求 7 所述的方法, 其特征在于, 所述步骤 (b) 的分析包括用免疫印迹检测 β -半乳糖苷酶蛋白质。

15. 如权利要求 7 所述的方法, 其特征在于, 所述步骤 (b) 的分析包括用原位组织化学方法检测糖蛋白 E 的方法。

16. 一种重组病毒, 其 ATCC 登录号为 No.VR-2637。

17. 一种质粒, 其 ATCC 登录号为 No.203607。

BHV-I 基因缺失的病毒疫苗

5 发明领域

本发明主要涉及重组牛疱疹病毒疫苗及其相应的构建方法。具体说，本发明涉及传染性重组牛疱疹病毒 I 型 (BHV-I) 的构建，其缺失天然糖蛋白 E (gE) 编码区，在 gE 基因座上插入了功能性 β -半乳糖苷酶基因 (β -gal)。天然 gE 编码区的缺失使该病毒减毒，且可作为基因型或免疫学标记，可将缺失 gE 的重组病毒与天然类型的病毒感染区分开。另外，插入 β -gal 基因提供一种通过宿主细胞中 β -gal 活性的表达，来检测是否存在缺失 gE 的重组病毒感染的表型方法。

现有技术的描述

牛疱疹病毒 I 型 (BHV-I)，也称为传染性牛鼻气管炎病毒 (IBRV)，与牛

的许多临床疾病相关，包括鼻气管炎、结膜炎、生殖道感染和偶然性流产、肠炎、

15 脑炎和牛全身系统的感染。BHV-I 基因组由约 140kb 的线性 dsDNA 分子构成。由侧接于内部和反向末端重复序列 (分别为 I_R 和 T_R) 的单一长 (U_L) 区域和单一短 (U_S) 区域构成。BHV-I 基因组编码约 70 种蛋白质 (Misra 等人，牛疱疹病毒 1 的特异性蛋白质 (传染性牛鼻气管炎, J.Virol.40: 367-378(1981)))。与其他几种动物的疱疹病毒相似，BHV-I 基因组编码糖蛋白 (g) gE 基因。已报道了两种

20 不同的菌株 BHV-I gE 基因序列，其编码 575 氨基酸(aa)残基 (Leung-Taek,P.等人，“牛疱疹病毒 I 型菌株 (ST 株) 短单一区域 (U_S) 的完整 DNA 序列和基因组成”，Virology 199: 409-421(1994);Rebordosa,X.等人，“对牛疱疹病毒 I 型的编码糖蛋白的基因 (与 HSV-1 的 gE 基因同源) 的作图、克隆和测序”，Gene, 149: 203-209(1994))。预计 gE 氨基酸在 N 端 (推定的信号序列) 和 C 端 (跨膜序列)

25 附近含有几段疏水性氨基酸，其通常是 I 类膜内在蛋白质。已显示 BHV-I gE 和其在其他疱疹病毒中的同类物在体外复制中不是必须的，但假性狂犬病病毒 (PRV) 基因组整个 gE 编码序列的缺失将导致活疫苗菌株 Norden 和 Bartha 的毒性减少 (Petrovskis,E.A.等人，“假性狂犬病病毒疫苗菌株中的缺失和它们对合成糖蛋白 gp63 的影响”，J.Virol.60: 1166-1169(1986)) 和神经侵袭性的改变 (Card,J.P.等人，“在大鼠目视系统的感染中假性狂犬病病毒包膜糖蛋白 gI 影响向神经性和毒性” J.Virol. 66:3032-3041(1992))。所以，在动物病毒的全致病效力中需要 gE 基因的表达但在组织培养物的生长中则不需要 (Kritas 等人，“鼻内接种后在猪三叉神经

30

路径中假狂犬病病毒(ADV)单一糖蛋白缺失突变体的侵入和蔓延”, Vet.Microbiol. 50:323-334(1994);Kritas 等人, “在猪嗅觉神经路径中假狂犬病病毒的侵入和蔓延中包膜糖蛋白 gI、gp63 和 gIII 的作用”, J,General Virol, 75:2319- 2327(1994)。

最近, 人们产生了将 PRV 和 IBR 的缺失 gE 基因的突变体用作不同标记疫苗
5 的兴趣。近期, 欧洲正将缺失 gE 的标记疫苗用于根除 IBR。但欧洲的这种 gE 缺
失型疫苗菌株没有 β -gal 标记物, 这种标记物可以用于检测 β -gal 酶活性的原位组
织化学方法和检测 β -gal 蛋白质的原位组织化学方法和免疫印迹方法。 β -gal 的编
码区也可作为该重组病毒的基因型标记物。不难用 Southern 印迹杂交检测此病毒,
也可用 PCR 测试来确定野生型疫苗病毒的遗传纯度。所以, 需要的是一种无毒的
10 gE 缺失型 IBRV 菌株, 其含有合适的表型/组织化学/基因型 β -gal 标记物。

发明概述

已构建了一种 BHV-I 重组病毒 ($gE\Delta 3.1IBR\beta$), 该病毒中缺失了含有编码
gE 基因序列部分的 gE 开放读框 (ORF's), 在其位置插入了一嵌合的报道基因/
15 标记基因。这种插入的 β -半乳糖苷酶 (β -gal) 基因在病毒的复制中无调节作用,
但可作为 $gE\Delta 3.1IBR\beta$ 病毒的表型标记物。

为了构建这种重组 BHV-I, 克隆了 BHV-IgE 基因编码区和侧翼上游和下游
序列。为了在 gE 基因编码区产生缺失, 用合适的酶消化上述克隆的 DNA, 释放出
该区域的三分之二的氨基, 并连接于 β -gal 基因。将得到的质粒 DNA 与全长野生
20 型 IBR 病毒株 Cooper 共转染到 MDBK 细胞中。噬斑纯化表达 β -gal 的重组病毒
(蓝色噬斑), 并进一步进行分析: 用印迹杂交分析遗传特性, 免疫印迹分析其对
BHV-IgE 肽的特异性兔多克隆抗体的反应性。对一种重组病毒 $gE\Delta 3.1IBR\beta$ 进行了
体外生长特性和牛体内致病性的分析。用噬斑减少试验研究了这种重组病毒诱导
受感染小牛中 BHV-I 中和抗体的能力。

25 嵌合性 β -gal 基因的调节和表达对这种重组 BHV-I 病毒有两种独特的方式。
这种重组病毒的第一种独特方面是 β -gal 基因受人巨细胞病毒立即早期 (HCMV
-IE) 强启动子 (不受 BHV-I-衍生的调节序列) 的调节。第二个独特的方面是
在感染的早期和晚期该基因以 BHV-I-编码的基因表达。通过与亲代 IBRV 菌株
Cooper 相比较, 分析了这种 gE 缺失型重组病毒的体外和体内特性。

30 在组织培养试验中, 感染后早期时间中 $gE\Delta 3.1IBR\beta$ 病毒生长比野生型 (亲代
菌株 Cooper) 的滴度较低, 但在感染后期该重组病毒的生长几乎达到与野生型菌
株相同的滴度。与野生型菌株 Cooper 相比, 比重组病毒通常产生的噬斑明显较小,

这可能是由于缺少细胞与细胞间的传播，这与其他疱疹病毒的结果相一致。

在动物试验中，在整个病毒排出期间，受 gE Δ 3.1IBR β 病毒感染的小牛比受亲代菌株 Cooper 感染的小牛排出少约 100 倍。病毒排出的持续时间 gE Δ 3.1IBR β 感染的小牛也短 2 天。受 gE Δ 3.1IBR β 病毒感染的小牛保持健康状态，而受亲代菌株 Cooper 感染的小牛表现出典型的 IBR 症状和病变。血清中和结果表明：受野生型和 gE 缺失型 IBRV 感染的小牛都诱生了相当的 BHV-I 中和抗体。已有报道表明：胸苷激酶（TK）基因缺失型 IBRV 在体外和体内生长的滴度明显较低（Chowdhury,S.I., “减毒牛疱疹病毒 I 型(BHV-I)重组病毒的构建和特性分析”，*Vet.Microbiol.*52: 13-23(1996)）。综合而言，这些结果表明即使与 TK 缺失型 IBR 相比重组 gE Δ 3.1IBR β 病毒生长相对良好，但 gE Δ 3.1IBR β 病毒对小牛实际上是无毒的。由重组 gE Δ 3.1IBR β 病毒所表现的减毒特性与如下所表现出的相一致：1) 如 Chowdhury,S.I., 在“减毒牛疱疹病毒 I 型 (BHV-I) 重组病毒的构建和特性分析”（*Vet.Microbiol.*52: 13-23(1996)中所显示的 BHV-I 中的 TK 缺失;2) 如 Kritas 等人在“鼻内接种后假狂犬病病毒 (ADV) 的单一糖蛋白缺失突变体在猪的三叉神经路径中的侵入和蔓延”（*Vet.Microbiol.*50: 323-334(1994)）和 Kritas 等人，“在猪嗅觉神经路径中假狂犬病病毒的侵入和蔓延中包膜糖蛋白 gI、gp63 和 gIII 的作用”（*J.General Virol.*75: 2319- 2327(1994)）中所显示的 PRV 中 gE 的缺失; 和 3) 如 Kaashoek 等人，在“基于牛疱疹病毒 1 的糖蛋白 E-阴性菌株的灭活疫苗诱导预期的免疫力并进行血清学鉴别”（*Vaccine* 13: 342-346(1995)）和 Van Englenburg 等人在“牛疱疹病毒 1 的糖蛋白 E 缺失型突变体感染与野生型病毒感染相同的有限量小牛组织但时间过程较短”（*J.Gen.Virol.*76: 2387-2392(1994)）中所显示的欧洲 gE 缺失型 IBRV 疫苗分离物。

本研究还证明了在该病毒的 gE 基因座上缺失 gE ORF 序列和插入功能性 β -gal 基因稳定地减弱了该病毒毒性。这种病毒的实际运用是其作为针对 IBR 的安全活疫苗的用途。gE 基因的缺失可作为一种免疫标记来区分接受疫苗接种的动物与受感染的动物。另外， β -gal 的产生使得在与欧洲目前的 gE 缺失型疫苗菌株（缺少表型 β -gal 标记物）相比时，能够容易地评估接种疫苗动物的鼻上皮中 gE Δ 3.1IBR β 病毒的复制，以及鉴别其与野生型 IBR 病毒引起的感染。

30 附图简述

图 1 是构建 gE 缺失型 BHV-I 病毒（gE Δ 3.1IBR β ）、和插入/缺失含有替代 gE 编码区三分之二氨基端的功能性 β -gal 基因的载体质粒的流程图；

图 2 是 gE 编码区缺失和在 gE 基因座上插入 β -gal 序列的 Southern 印迹杂交的再现;

图 3 显示了在野生型亲代 Cooper 菌株中检测到但在 gE 缺失型重组病毒 (gE Δ 3.1IBR β) 中未检测到的 BHV-I gE 蛋白质;

5 图 4 是说明一步生长试验的结果的图, 在 MDBK 细胞中 gE 缺失型 IBR 生长速率与野生型 IBR 生长速率相比较, 各数据点代表由每组小牛得到的结果的平均值;

图 5 将 gE 缺失型 IBR 感染的小牛每天的临床评分与受野生型 IBR 感染的小牛每天的临床评分相比, 其中各数据点代表由每组小牛得到的结果的平均值;

10 图 6 将 gE 缺失型 IBR 感染的小牛每天的直肠温度与受野生型 IBR 感染的小牛的每天直肠温度相比, 其中各数据点代表由每组小牛得到的结果的平均值; 和

图 7gE 缺失型 IBR 的鼻病毒排泄与野生型 IBR 的鼻病毒排泄相比较, 各数据点代表自每组小牛得到的结果的平均值。

15 优选实施例详述

以下实施例描述了传染性重组 BHV-I 的构建, 其含有缺失的天然 gE 编码区, 从而使病毒减毒, 并含有插入在 gE 基因座的功能性 β -gal 基因; 一种用该重组 BHV-I 作为疫苗免疫接种动物抵抗 BHV-I 导致的疾病的方法; 通过基因型和表型检测和鉴别该重组病毒与野生型病毒感染的方法。以下实施例仅起说明作用, 对
20 本发明的总体范围没有限制作用。

实施例 1

材料和方法

本试验产生了 gE 基因缺失型的和表达 β -半乳糖苷酶的重组 IBRV 并对其特性作分析。构建的该重组病毒含有一嵌合基因 (4.5Kb 长), 其替代了 BHV-I 的
25 gE 编码区。较佳地该嵌合基因由 HCMV-IE 启动子和其连接于 β -gal 基因编码序列 (连接于 SV₄₀ 聚腺苷酸化位点) 的增强子序列构成。较佳地, β -gal 编码序列是细菌的, 但据信任何 β -gal 基因编码序列都能起作用。

为了构建重组 BHV-I 并对其特性进行分析, 从美国典型培养物保藏中心获
30 得 IBRV 的 Cooper(Colorado-1)株。用 Chowdhury S.I., “呼吸道牛疱疹病毒 1 (BHV-I) 和神经毒力 BHV-5 的糖蛋白 C (gC) 之间抗原性变异的分子基础”, Virology 213: 558-568(1995)的方法 (本文将此方法引入作为参考), 在 Madin-Darby 小牛

肾细胞中增殖和滴定病毒。如 Chowdhury 等人, “在利比扎马 (lipizzaner stud) 中马疱疹病毒 I 型 (EHV-I) 诱导的流产和麻痹: 马疱疹病毒的分布和分类”, Arch.Virol.90: 273-288(1986)中所述, 用月桂基磺酸钠和蛋白质 K 裂解、苯酚/氯仿提取和乙醇沉淀来分离病毒 DNA, 此方法本文纳入作为参考。

5 根据预计的区域亲水性和抗原性合成了 BHV-IgE 特异性抗肽兔多克隆血清。合成了含有残基 378-398 的这种 gE 肽, 如 Leung-Taek,P.等人, “牛疱疹病毒 I 型菌株 (ST 菌株) 单一短区域 (U₅) 的整个 DNA 序列和基因组成”, Virology 199: 409-421(1994)所述, 该序列和基因组成本文纳入作为参考。用如 Abdelmagid 等人, “用型特异性多克隆抗体对牛疱疹病毒-1 (BHV-I) 糖蛋白 D(gD)中和表位精细
10 作图并与 BHV-5gD 作序列比较”, Virology 206: 242-253(1995)所述的 9-苄基-甲氧基羰基 (FMOC) 试剂来合成此 gE 肽, 此方法本文纳入作为参考。为了便于与匙孔血蓝蛋白 (KLH) 偶联, 在此肽的 C 端加入另一个无关的半胱氨酸 (C) (标记有 a*)。将 17 肽[H]-TSDRLVRAVTDHTRPEC*-[OH]与 KLH 偶联, 如 Kyte,J.,Doolittle,R.F., “一种展示蛋白质亲水性的简单方法”, J,Mol.Biol. 157:
15 105-132(1982)所述制备了抗血清, 本文将此方法纳入作为参考。

在如 Chowdhury S.I., “呼吸道牛疱疹病毒 I (BHV-I) 和神经毒力 BHV-5 的糖蛋白 C (gC) 之间抗原性变异的分子基础”, Virology 213: 558-568(1995)和 Laemli,U.K., “在噬菌体 T4 头部装配过程中结构蛋白的切割”, Nature(London) 227: 680-685(1970)所述的还原条件下 (本文将它们引入作为参考), 进行模拟和病毒感染细胞蛋白质的 SDS-PAGE 和 Western 印迹分析。
20

通过从 Dr. W. Lawrence (U. Pennsylvania, Philadelphia, USA) 获得质粒 pBHV1HK 和 pBHV1HF 实现重组质粒的构建。这些质粒分别含有 BHV-IDNA 的 HindIII-K 和 HindIII-F 片段。质粒 pBHV1HK 的 4.4Kb XhoI/HindIII 亚片段含有完整的 gD、gI 和一个部分, 优选将 gE 编码区的三分之二氨基端亚克隆入质粒
25 pGEM7Z(pBHV1gE5') 的 XhoI/HindIII 位点。然后将 pBHV1HF 的 1.15Kb HindIII/Bsu36I (用 Klenow 做成平头), 其含有 gE 编码区三分之一羧基端和完整 US9 ORF 编码序列, 亚克隆入质粒 PBluescript KS(pBHV1gE3') 的 HindIII/HincII 位点。最后, 为了将整个 gE 基因编码区及其侧翼序列装配起来, 将 pBHV1gE5' 的 4.4Kb HindIII/XbaI 载体位点片段 (含有 HindIII/XhoI 片段) 克隆入质粒 pBHV1gE3' 的
30 HindIII/XbaI 位点。将得到的克隆命名为 pBHV1gE5'3'。

为了去除 gE 编码区, 用 AsuII 部分消化 pBHV1gE5'3'DNA, 然后用 HindIII 再消化至完全。凝胶纯化较大的片段, 将其连接于 pCMVβ (获自 Clontch,Palo Alto,

CA,USA) 的 4.5Kb PstI 片段(用 T4 聚合酶做成平头), 其含有 CMV 早期启动子调节的 β -gal 序列。得到的 gE 缺失型/ β -gal 插入质粒, pBHV1gE $\Delta\beta$ 缺失了 1Kb BHV-I DNA 序列(含有编码前 372 个氨基酸的基因序列), 插入了在 CMV 启动子调节下的 β -gal 基因。该 β -gal 基因侧接有病毒特异性 3.32Kb 上游序列(含有完整的 gD 和 gI 基因序列和 gE 启动子序列)和 1.15Kb 下游序列(含有 gE 编码区三分之一的羧基端和整个 US9 基因序列), 这是与病毒 DNA 重组所需要的。

为了产生 gE 缺失型 IBR 重组病毒, 通过脂质转染, 将线性化的 pBHV1gE $\Delta\beta$ (ATCC 登录号 No.203607)和全长野生型 IBRV(菌株 Cooper)共转染入 Madin-Darby 牛肾(MDBK)细胞中。全长 IBRV 的 gE 基因座上 β -gal 的正确插入和随后的野生型 IBRV gE 编码区部分的缺失, 都是因为含有病毒 DNA 复制的该质粒中 BHV-I 特异性侧翼序列的同源性重组。将病毒特异性侧翼序列掺入到新合成的病毒 DNA 中, 产生该编码区的缺失和在同一区域中的插入。如 Chowdery,S.I., “减毒牛疱疹病毒 I 型(BHV-I)重组病毒的构建和特性分析”, Vet.Microbiol. 52: 13-23(1996)所述, 在卤代吡啶基- β -D-半乳糖苷(Bluo-Gal)覆盖层下筛选蓝色噬斑, 以噬斑纯化表达 β -gal 的重组病毒三次, 该法本文纳入作为参考。用印迹杂交和用抗 BHV-IgE 特异性抗肽兔多克隆血清进行免疫印迹进一步对几个重组分离物作特性分析。使用 Chowdery,S.I., “减毒牛疱疹病毒 I 型(BHV-I)重组病毒的构建和特性分析”, Vet.Microbiol. 52: 13-23(1996)所述的印迹杂交方法, 本文将其纳入作为参考。还使用 Chowdhury S.I., “呼吸道牛疱疹病毒 1 (BHV-I)和神经毒力 BHV-5 的糖蛋白 C(gC)之间抗原性变异的分子基础”, Virology 213: 558-568(1995)所述的免疫印迹方法, 本文将其纳入作为参考。

结果

用 Southern 印迹杂交分析了两种重组病毒, 即 gE Δ 3.1IBR β (ATCC 登录号 No.VR-2637)和 gE Δ 3.5IBR β 的 DNA 中预计的 gE 基因座上的缺失和 β -gal 序列的插入, 如图 2 所示。在分离物 gE Δ 3.1IBR β 和 gE Δ 3.5IBR β 中, gE 基因氨基端不存在编码前 372 个氨基酸的 1Kb AsuII-HindIII 片段序列, 而存在 β -gal 序列证明在这些分离物中以位点特异性方式发生了预期的重组。与此发现相一致, 用 BHV-IgE 特异性抗肽兔多克隆血清在野生型亲代 Cooper 菌株中检测到 92-95Kd BHV-IgE 蛋白质, 但在 gE 缺失型重组病毒 gE Δ 3.1IBR β 中则没有。结果见图 3, 该分离物用于进一步研究。另外, 通过用含有野生型 IBRV 的初始 gE 序列和侧翼序列的质粒共转染, gE Δ 3.1IBR β 可以回复到野生型 IBRV。这基本与用于产生 gE Δ

3.1IBR β 的共转染过程相反。

在感染后 3、6、12 和 24 小时，用组织化学法测定了病毒感染的 MDBK 细胞中 β -gal 表达的动力学。早至感染后 3 小时，晚至感染后 24 小时测得 β -gal 的活性。这表明在早期和晚期都表达 gE Δ 3.1IBR β 病毒的 CMV-IE 启动子调节的 β -半乳糖苷酶基因。另外，即使该嵌合基因由外源性人疱疹病毒 HCMV-IE 启动子调节且含有非病毒的 β -gal 序列以及增强子（对 β -gal 和 BHV-I 是外源的），它也作为真正的 BHV-I 基因受到调节和表达。所以， β -gal 对 BHV-I 而言是外源的（天然状态的 BHV-I 中不存在），且 HCMV-IE 及其增强子序列对 BHV-I 和 β -gal（受它们调节和/增强的）而言是外源的。

10 gE 基因的缺失可作为免疫学标记物来区分疫苗接种过的动物和受感染的动物。由疫苗菌株诱导的抗体应答将缺少 gE 特异性抗体，从而可与含有 gE 特异性抗体的野生型 BHV-I 感染诱导的应答相区分。所以可以在疫苗接种过的牧群中鉴定出和选出受感染的动物。这种血清学标记物对消灭牧群中的 BHV-I 而言非常重要。

15 用于产生重组病毒的质粒（pBHV1gE $\Delta\beta$ ）及产生的重组病毒 gE Δ 3.1IBR β 已保藏于美国典型培养物保藏中心（ATCC）。质粒（pBHV1gE $\Delta\beta$ ）被命名为 ATCC 登录号 No.203607，重组病毒（gE Δ 3.1IBR β ）被命名为 ATCC 登录号 No.VR-2637。

实施例 2

20 材料和方法

本试验测定 gE Δ 3.1IBR β 病毒对牛的致病性，并将这些结果与亲代 Cooper 菌株 IBRV 的致病性相比较。将 10 头 6 个月大的 Holstein 牛（无 IBRV 和牛病毒性腹泻病毒）随机分成两组（A 和 B），每组各 5 头牛。在相同的条件下将两组关养在分开的厩里。在试验前，所有牛都是健康的，且直到试验开始都保持血清阴性。

25 用重组 gE 缺失型 IBRV 鼻内接种组 A 的各头牛。用亲代 Cooper 菌株 IBRV 鼻内接种组 B 的各头牛。每头动物的接种物中含有 1×10^7 TCID₅₀ 个各自的病毒。所有接种都是用 DEVILBIS 型号 50 喷雾器（Delvis Co.,Somerset,Pennsylvania）进行喷雾接种，每个鼻孔用 2ml 接种物为时 30 秒到 1 分钟。

30 接触病毒（接种）后连续 14 天每日对所有牛进行密集的临床观察。每天记录直肠温度。特别注意以下状况：行为（抑郁）、食欲、咳嗽、眼睛和鼻的分泌物、鼻和口腔粘膜充血或病变、结膜炎和异常呼吸。分别给各种状况评分，将每头牛每天的临床评分以及各组的平均每天临床评分输入电脑（通过将各状况的分数加在一

起)。评分参数如下:

鼻分泌物	正常=0; 中等浆液性=1; 严重浆液性=2, 轻度微化脓性=2; 中等微化脓性=3; 和严重微化脓性=4
行为(抑郁)	没有=0; 轻度=1; 中等=2; 严重=3
鼻粘膜充血/发红	=1
鼻粘膜溃疡	=2
结膜炎	=2
咳嗽	=2
呼吸困难	=2
每天直肠温度	39.7-39.99°C=1; 40.0-40.5°C=2; 40.6-41.0°C=3; 超过41.0°C=4

结果

受 IBRV 亲代 Cooper 菌株(野生型 IBRV)感染的 B 组牛表现出典型的感染信号:抑郁、食欲降低、眼睛和鼻有分泌物、鼻溃疡/鼻生斑和咳嗽。这些临床发现结果产生了如图 5 所示的数天内的高临床评分。而受重组 gE Δ 3.1IBR β 病毒(组 A)感染的牛未表现出任何可检测到的临床信号(如图 5 所示),且它们的行为和食欲保持正常。图 6 比较了各组(A和B)牛的平均直肠温度。在亲代菌株 Cooper 感染的牛(组 A)中记录到数天内高的直肠温度(39.7-40.5°C)。在 gE Δ 3.1IBR β 感染的牛(组 A)中未记录到高于 38.9°C 的直肠温度。

10

实施例 3

材料和方法

本试验比较了 MDBK 细胞中的 gE Δ 3.1IBR β 和 MDBK 细胞中的亲代 IBR 菌株 Cooper 之间的生长动力学。分别用 5 噬斑形成单位(PFU)/细胞的重组 gE Δ 3.1IBR β 病毒或亲代菌株 Cooper 感染 MDBK 细胞的一系列复制培养物。感染后以连续间隔收获感染的培养物,制备病毒原液用于病毒滴度试验。

15

结果

如图 4 显示了一步生长试验的结果。病毒生长曲线表明 gE Δ 3.1IBR β 病毒和亲代菌株 Cooper 之间的后代病毒(增殖)时间过程相类似。但在感染后早期重组病毒的产量较少。

20

实施例 4

材料和方法

本试验分离和定量测定了组 A 和 B（上述实施例 3）中各动物的病毒。将一个普通棉签插入各鼻腔。在粘膜上旋转此棉签 3 次。室温将棉签上的病毒洗到 3ml 样品培养液（含有 100 μ g/ml 庆大霉素、3% v/v FBS、25 μ g/ml 两性霉素 B 的 MEM）中 1 小时。1000g 离心 5 分钟使样品澄清，-70 $^{\circ}$ C 储存。用 100 μ l 1: 10 稀释的棉签悬浮液进行 MDBK 细胞中的病毒分离。在微量滴定板上滴定病毒阳性样品。用培养液进行一系列 10 倍稀释，将 50 μ l 各稀释液加到 96 孔板上 8 个含有 1.5×10^5 个 MDBK 细胞的孔中。37 $^{\circ}$ C 培养 5 天后，显微镜读取板上的细胞病变效应（CPE）。按 Reed, L.J., 和 Muench, H., Am. J. Hyg. 27: 493 (1938) 所述的方法（本文将此方法纳入作为参考），计算 TCID₅₀ 病毒滴度。

结果

从鼻棉签分离出的病毒量表明：与亲代菌株 Coope 相比，gE Δ 3.1IBR β 病毒在鼻上皮细胞中生长的效率较低。图 7 显示了鼻分泌物中病毒的排出。就病毒的排出而言 gE Δ 3.1IBR β 病毒比野生型 BHV-I（亲代菌株 Cooper）低约 15-550 倍。而且 gE Δ 3.1IBR β 感染的牛比受野生型病毒感染的牛病毒排出的持续时间也要短 2 天。

实施例 5

材料和方法

本试验测定了采自 A 和 B 组牛（上述实施例 3 和 4）的血清中 BHV-I 中和抗体的滴度。在感染后第 13 天从 A 和 B 组各牛采集血液样品。如 Chowdhury, S.I., 等人“分离自反刍动物宿主的马疱疹病毒 1 (EHV-1) 的分子生物学特性”，Virus Res. 11: 127-139 (1988) 所述的噬斑减少方法（本文将此方法纳入作为参考），用 12 孔板测定了血清中 BHV-I 中和抗体的滴度。

结果

在牛中野生型（亲代菌株 Cooper）和 gE 缺失型 IBRV 病毒（gE Δ 3.1IBR β ）都诱导 BHV-I 中和抗体。但野生型感染的牛的血清中和滴度（1: 20-1: 35，平均滴度为 1: 30）比 gE 缺失型抗体滴度（1: 11-1: 30，平均滴度 1: 16）略高。

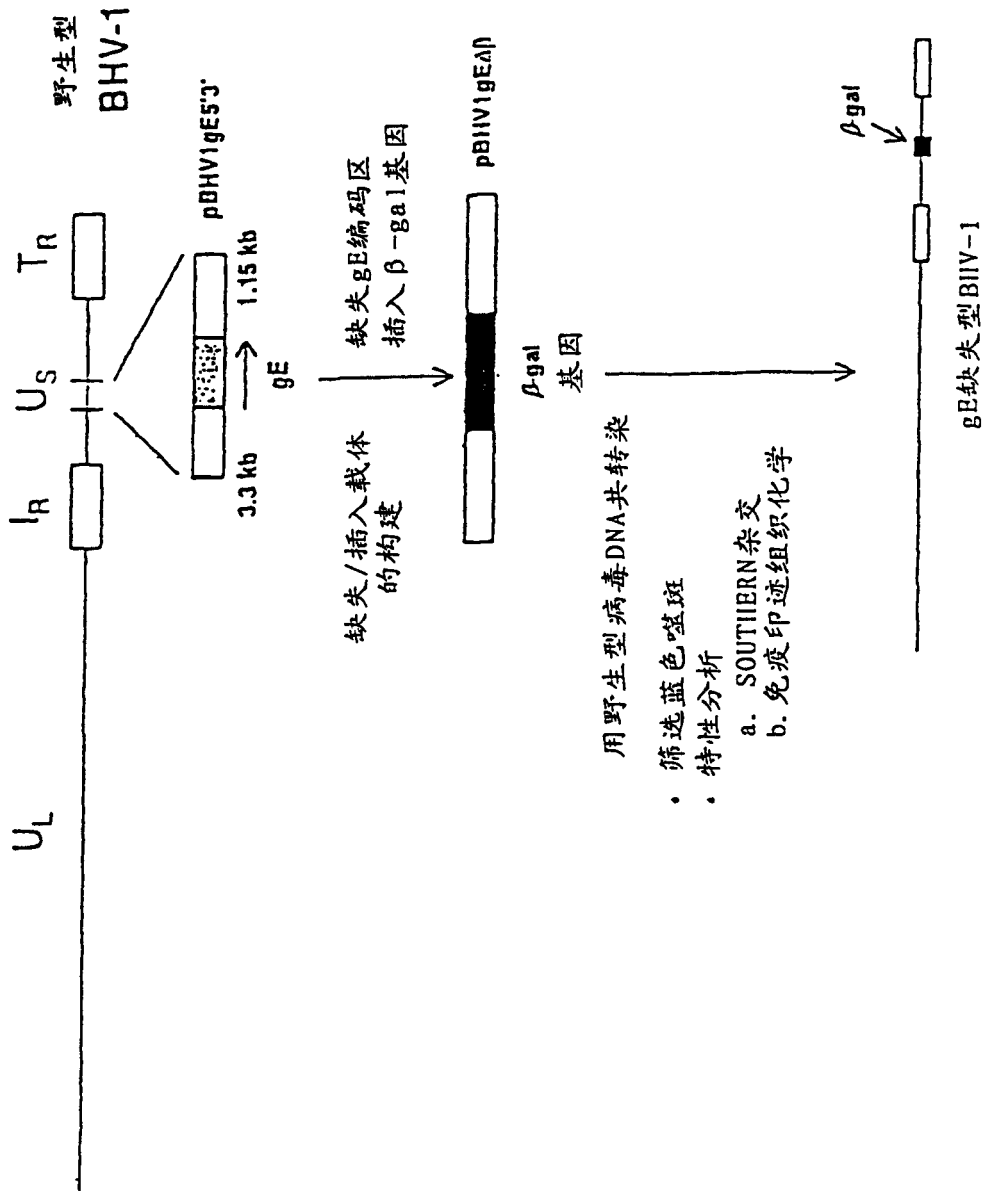


图 1

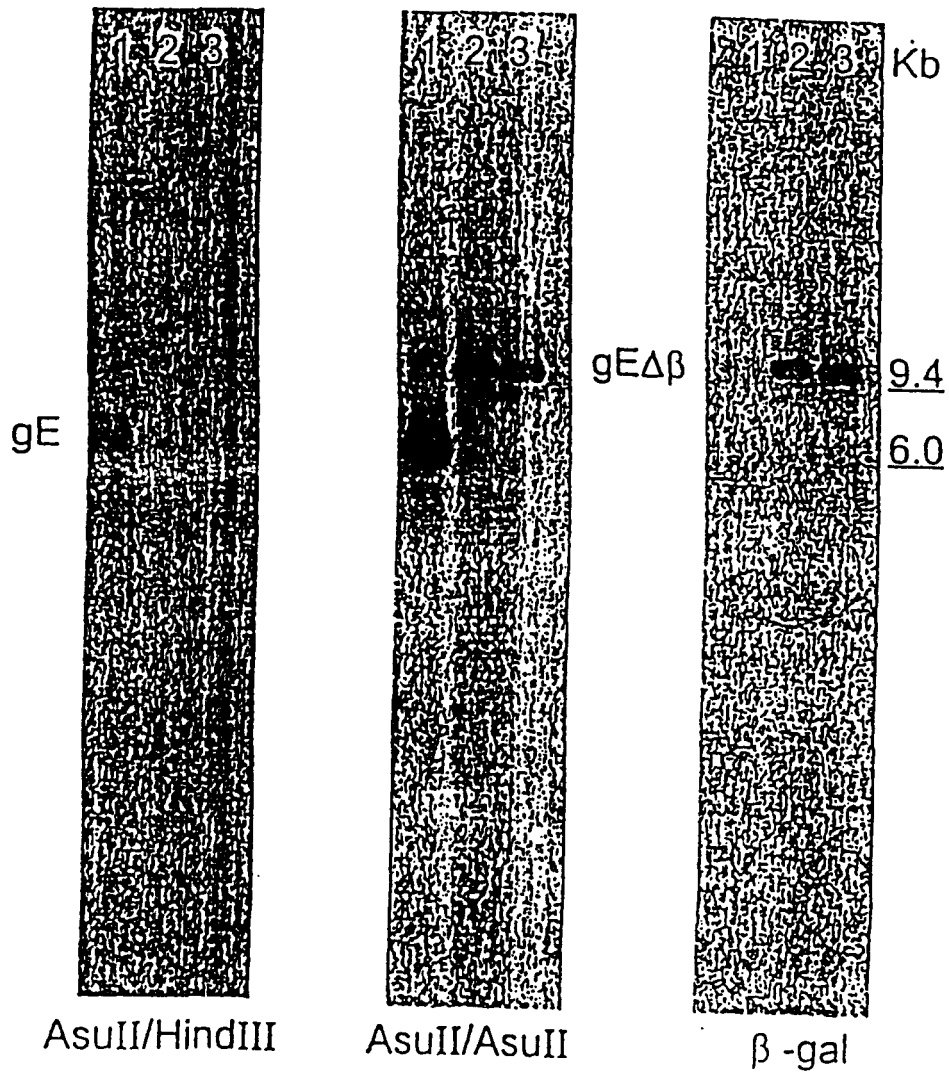


图 2

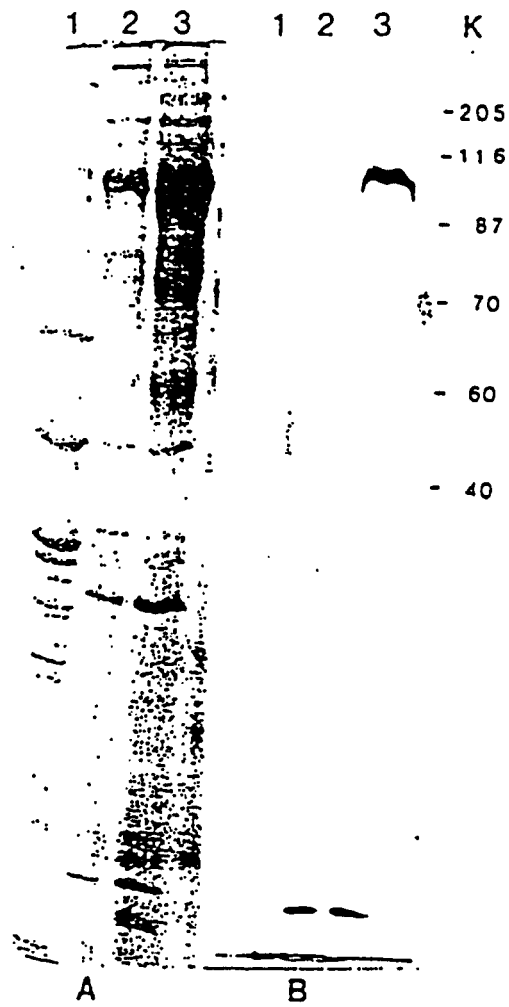


图 3

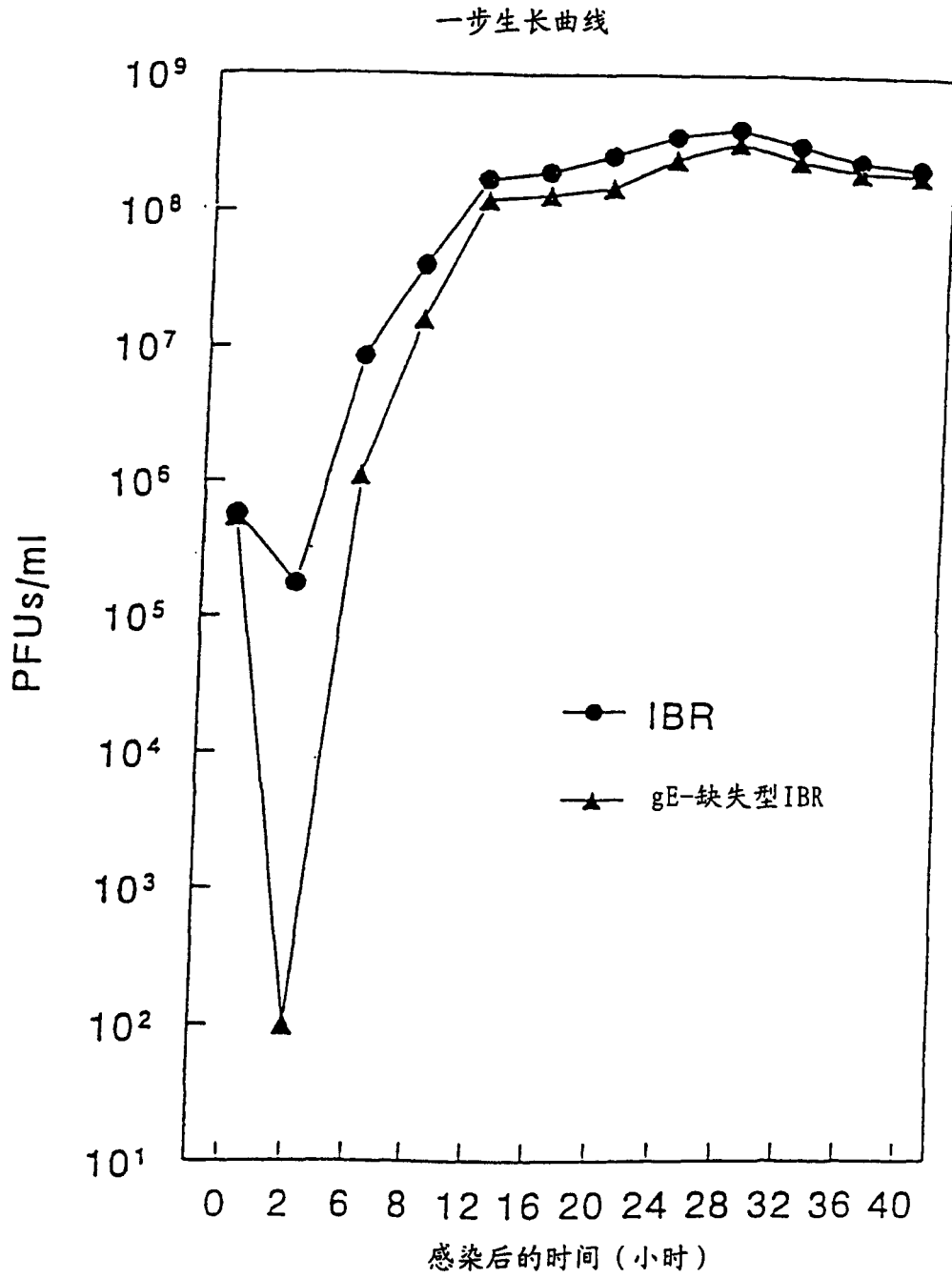


图 4

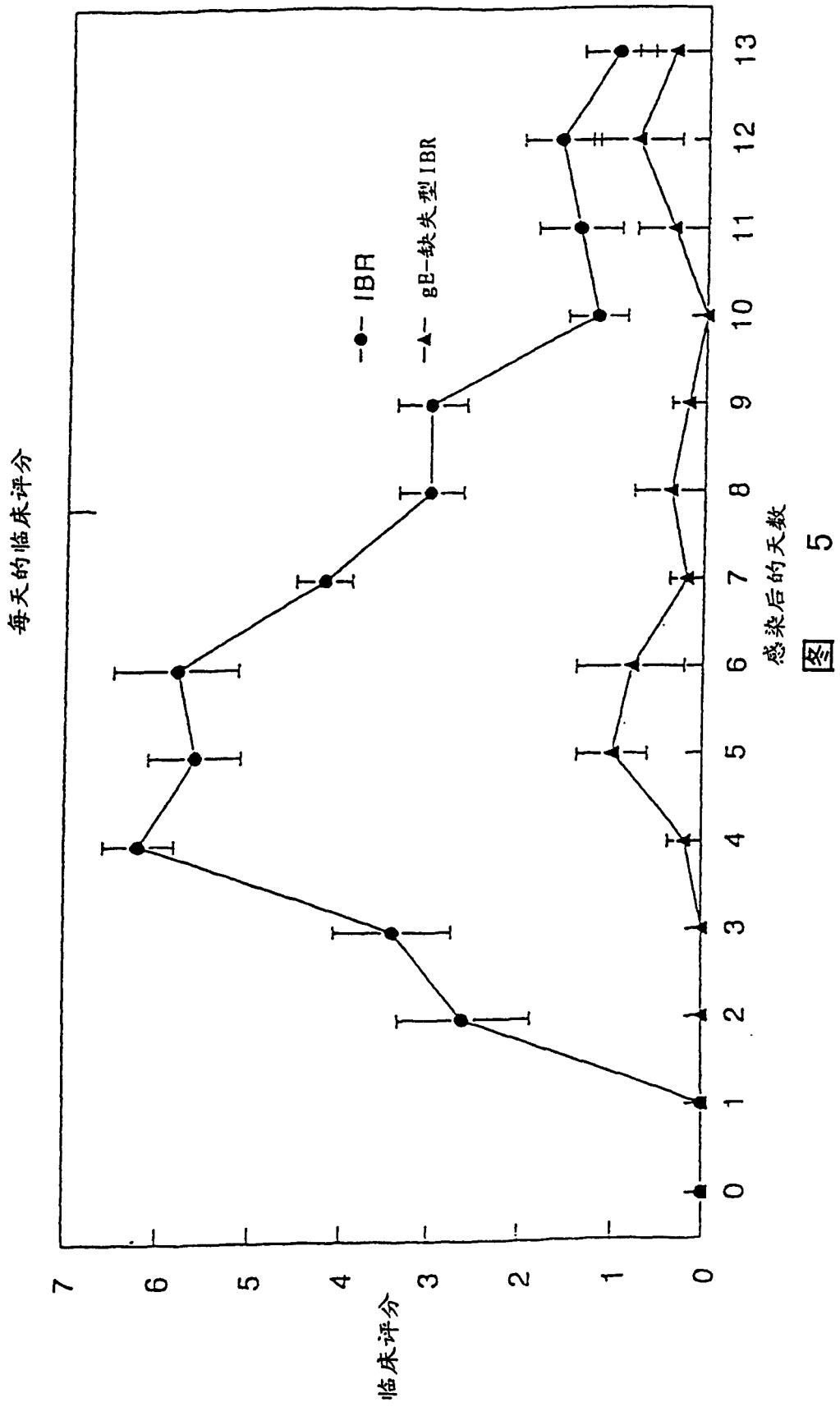
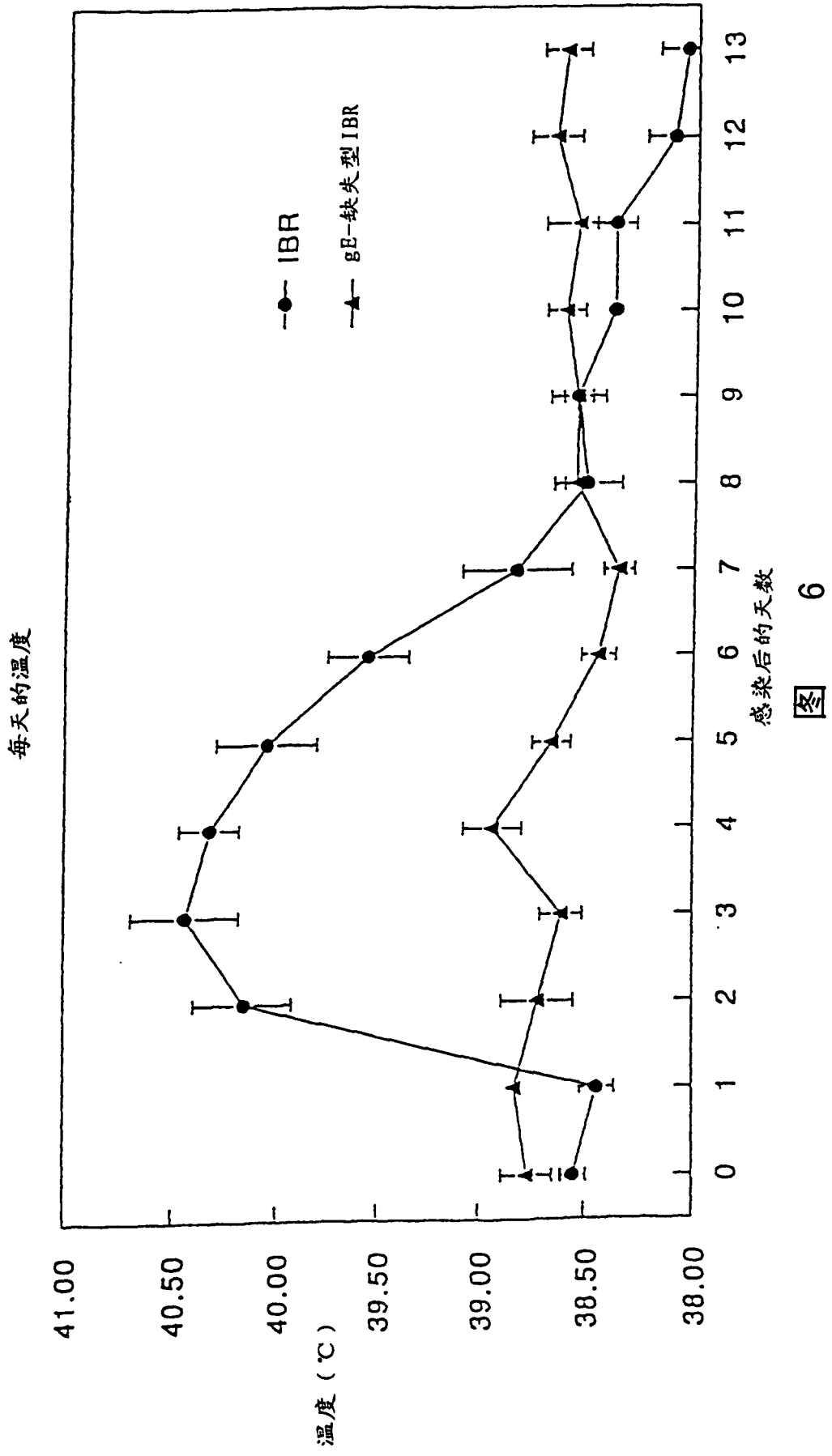


图 5



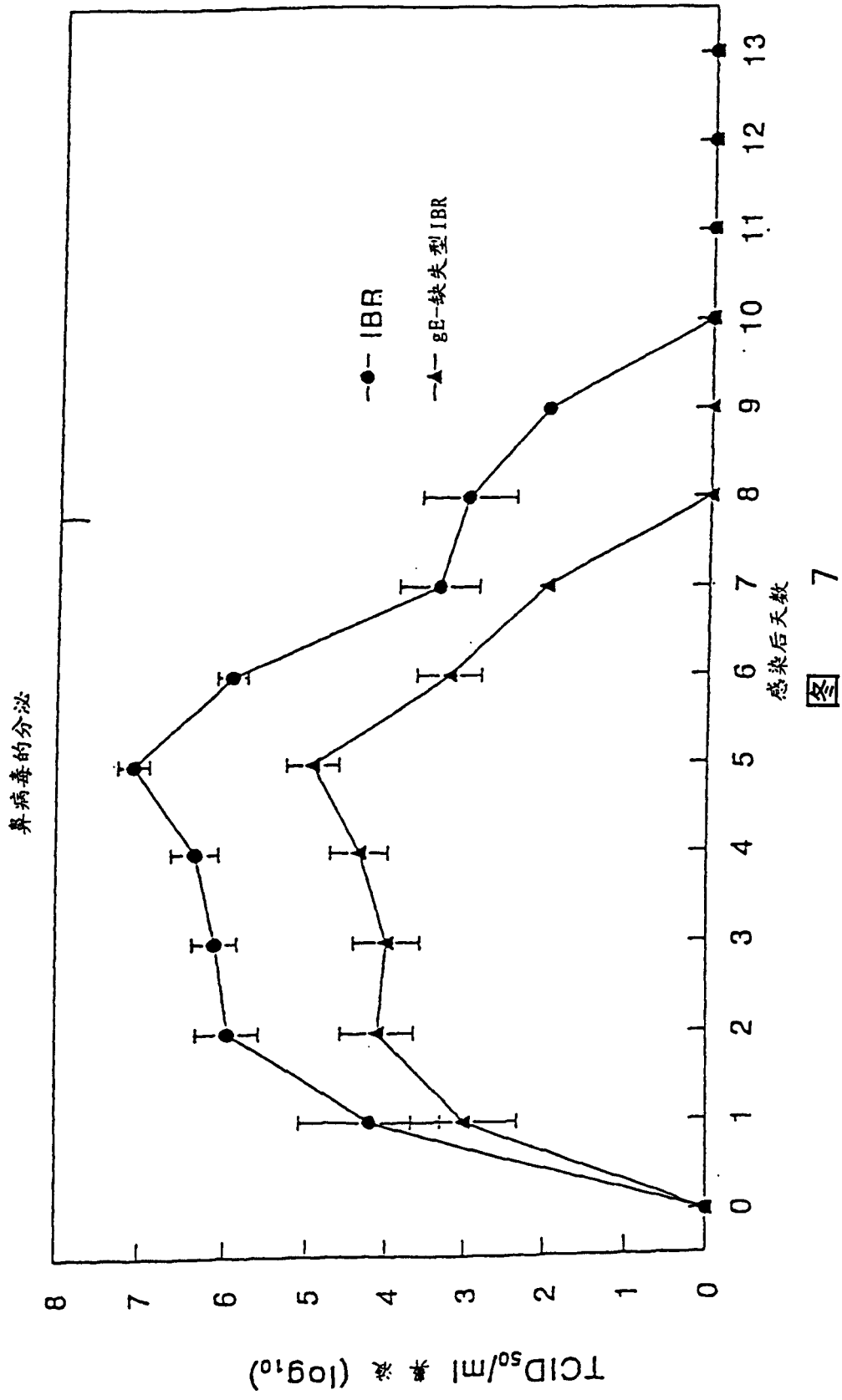


图 7

专利名称(译)	BHV - I基因缺失的病毒疫苗		
公开(公告)号	CN1197961C	公开(公告)日	2005-04-20
申请号	CN00803136.3	申请日	2000-01-18
申请(专利权)人(译)	堪萨斯州立大学研究基金会		
当前申请(专利权)人(译)	堪萨斯州立大学研究基金会		
[标]发明人	SI乔杜利		
发明人	S·I·乔杜利 S· I· 乔杜利		
IPC分类号	G01N33/53 A61K39/245 A61P31/16 A61P31/22 A61P37/04 C07K14/03 C12N7/01 C12N7/04 C12N15/09 C12N15/869 C12Q1/34 G01N33/573 C12N15/38 A61K39/265 C12Q1/70 C12R1/93		
CPC分类号	C07K14/005 A61K2039/5254 A61K2039/5256 A61K2039/543 C12N7/00 C12N15/86 C12N2710/16722 C12N2710/16743 C12N2710/16761		
代理人(译)	徐迅		
优先权	09/240173 1999-01-29 US		
其他公开文献	CN1364193A		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

产生一种安全的重组活病毒及疫苗，方法如下：缺失牛疱疹病毒1(BHV-1)的天然糖蛋白E(gE)编码区部分，随后在gE基因座插入含有外源功能性β-gal的质粒。gE基因的缺失使该病毒稳定地减毒，且可作为免疫学标记物来区分疫苗接种过的动物与感染的动物。另外，产生β-gal易于评估疫苗接种动物中的gEΔ3.1IBRβ病毒复制，且可作为表型标记物来与感染动物中野生型病毒的复制相区分。

