

密级:

论文编号:



中国农业科学院

学位论文

伪狂犬病毒 pUL36 蛋白相关复合体装配动力学研究

博士研究生: 史智宾

学 号: 82101191245

指 导 教 师: 王靖飞 研究员

申请学位类别: 农学博士

专 业: 预防兽医学

研 究 方 向: 动物传染病病原学与流行病学

培 养 单 位: 哈尔滨兽医研究所

研究生院

2023年6月

Secrecy:

No.

Chinese Academy of Agricultural Sciences Thesis

Assembly Kinetics of pUL36 Protein Associated Complex of Pseudorabies Virus

Candidate: SHI Zhibin

Student ID: 82101191245

Supervisor: Professor WANG Jingfei

**Degree Type: Doctor of Philosophy in Preventive
Veterinary Medicine**

Major: Preventive Veterinary Medicine

**Research Field: Etiology and Epidemiology for
Animal Infectious Disease**

**Institution: Harbin Veterinary Research Institute
Graduate School**

June 2023

摘要

伪狂犬病毒 (Pseudorabies virus, PRV) 是 α -疱疹病毒亚科的重要成员, 猪作为其天然宿主被感染后可引起严重疾病。PRV 还可以感染多种野生动物及人类, 且随着人感染 PRV 病例的事件持续发生, 其人畜共患的风险不容忽视。目前 PRV 的研究主要集中在疫苗创制、特异性检测方法建立以及病毒潜伏-重新激活分子机制等方面, 而关于 PRV 装配机制依然存在诸多空白。已解析的 PRV 衣壳结构显示被膜蛋白 pUL36 与次要衣壳蛋白 pUL17 和 pUL25 组成病毒衣壳相关被膜蛋白复合体 (Capsid associated tegument complex, CATC), 然而 pUL36 同 CATC 各亚基之间完整互作模式、CATC 的完整结构以及它们在病毒粒子装配中的协同机制仍不清楚。

本研究利用 CRISPR/Cas9 技术构建了基于 pUL36 蛋白标记的重组 PRV, 通过 PCR 及 Western blot 等实验确定 EGFP 标签的正确插入且能够与 pUL36 蛋白融合表达。绘制病毒一步生长曲线结果显示两种重组 PRV 表现出与野生型 PRV 相同的复制能力; 透射电镜观察显示两种重组 PRV 与野生型 PRV 具有相似的形态学特征。另外, 利用慢病毒表达系统构建了稳定表达 pUL17 蛋白细胞系 (PK15-C17) 作为缺失病毒拯救的补充细胞, 在此基础上利用 CRISPR/Cas9 技术构建了重组缺失毒株 rPRV-36N-EGFP- Δ UL17。一步生长曲线结果显示该重组缺失 PRV 在 PK15-C17 细胞中表现出较亲本毒 rPRV-36N-EGFP 和野生型 PRV 更高的装配效率, 而在 PK15 细胞中未检测到感染性病毒粒子。透射电镜结果显示重组缺失 PRV 感染 PK15-C17 细胞中有大量释放到细胞外的成熟病毒粒子, 而 PK15 细胞中未见成熟病毒粒子, 仅见大量病毒空衣壳堆积于细胞核内。以上结果为后续研究 PRV 感染细胞内 CATC 装配提供重要材料。

为研究 CATC 在 PRV 感染细胞内装配动力学, 我们使用 qPCR 检测重组 PRV 感染后细胞内 UL36、UL17 和 UL25 基因的转录水平, 并通过高分辨率细胞成像系统观察细胞内 pUL17/pUL25、pUL25/pUL36、pUL17/pUL36 和 pUL36/内质网的共定位。结果揭示 PRV 感染细胞内 CATC 装配动力学过程: UL36 基因转录优先于 UL17 和 UL25 基因, 且其转录合成 mRNA 水平持续高于另两种基因; 表达后的 pUL17 和 pUL25 蛋白在细胞质中形成聚体被共同转运至细胞核中装配至病毒空衣壳上, 启动病毒基因组 DNA 装载, 形成 C 型衣壳通过同核膜融合被释放至核外; pUL36 蛋白表达后聚集于核膜附近内质网并在此与释放出核的病毒衣壳上 pUL17 和 pUL25 结合形成 CATC 复合物, 启动其他被膜蛋白及囊膜包装进程。另外, UL17 基因缺失直接影响了 pUL25 的入核且核内弥散分布的 pUL25 不能装配至病毒空衣壳上, 间接导致 pUL36 的装配失败。

鉴于以 pUL36 蛋白为核心的 CATC 完整结构与互作模式仍不清楚, 本研究利用杆状病毒表达系统表达了 pUL17、pUL25 和 pUL36CT (aa 2684~3150) 蛋白, 并进行体外组装并纯化。透射电镜结果显示体外组装 CATC 结构稳定且分散均匀。利用冷冻电镜及单颗粒重构技术初步解析体外组装 CATC 的结构模型, 并使用 AlphaFold 技术预测的各组成蛋白结构进行拟合, 结果显示最终得到 5 种不同组装模式的三维结构, 其中两类复合物与成熟病毒粒子上 CATC 具有相似的结构特征, 说明 CATC 体外装配成功。这些结果能够为进一步解析 CATC 完整结构提供重要基础。

综上, 本研究以 pUL36 蛋白为核心研究 CATC 在 PRV 感染细胞内的装配动力学和体外组装机制, 为深入探索 PRV 被膜蛋白网络的装配机制和结构研究奠定了良好基础。

关键词: 伪狂犬病毒, pUL36 蛋白, 衣壳相关被膜蛋白复合体, 装配动力学

Abstract

Pseudorabies virus (PRV) is an important member in the *Alphaherpesvirinae* subfamily. Pigs are the natural reservoir of the virus and their infections with the virus causing serious diseases. PRV also infect a variety of wild animals and humans as well, presenting an unignorable zoonotic risk. The studies of PRV have been mainly focused on such as development of vaccines, establishment of specific detection methods, and molecular mechanism of viral latency-reactivation. However, the viral particle assembly mechanisms are largely unknown. The resolved structure of PRV capsid shows that pUL36 interacted with pUL17 and pUL25 to form the capsid associated tegument protein complex (CATC). Although the interactions of the helix domains of CATC have been well characterized, the interactive patterns among pUL36 and the other two proteins, the whole structure of the complex, and their assembly dynamics have not been addressed.

First, by using CRISPR/Cas9-based gene editing techniques, we constructed the recombinant fluorescent viruses, which expressed an EGFP-fused pUL36 protein. The correct insertion of EGFP and its fusion with pUL36 protein were confirmed by PCR and Western blot. To compare the growth characteristics of the recombinant and wild-type PRVs, we plotted one-step growth curves of the viruses, which showed that the recombinant viruses had a similar replication ability with the wild-type PRV in PK15 cells. Transmission electron microscopy examinations revealed that all the viral particles were similar in morphological features. We constructed a cell line (PK15-C17) that stably expressed pUL17 protein using a lentiviral expression system, and then the cell line was used to rescue a UL17 knockout virus strain rPRV-36N-EGFP- Δ UL17 by CRISPR/Cas9-based gene editing technique. One-step growth curves showed that rPRV-36N-EGFP- Δ UL17 showed a higher assembly efficacy than the parental virus (rPRV-36N-EGFP) or wild-type PRV in the complemental cells, but didn't assembly into mature virions in PK15 cells. Transmission electron microscopy examinations showed that most mature progeny virions of rPRV-36N-EGFP- Δ UL17 could be observed in the cytoplasm and extracellular spaces in PK15-C17 cells, while many empty capsids accumulated in the nucleus in the rPRV-36N-EGFP- Δ UL17 infected PK15 cells. These results provide important materials for the subsequent study of CATC assembly in PRV-infected cells.

To study the assembly kinetics of the pUL36 protein and the other CATC components in PRV-infected cells, we detected the mRNA levels of UL36, UL17, and UL25 genes in cells after the recombinant PRV infection by qPCR. The co-localization of pUL17/pUL25, pUL25/pUL36, pUL17/pUL36, and pUL36/ER in PRV-infected cells was observed by a high-resolution cell imaging system. The results showed that the assembly dynamic of pUL36 and the other two proteins in PRV-infected cells are as follows: after the initiation of viral genome replication, UL36 was transcribed earlier than UL17 and UL25, and its mRNA levels were constantly maintained at higher levels than that of the other two genes. After the synthesis, pUL36 was transported and aggregated in the endoplasmic reticulum around the periphery of the nucleus. pUL17 and pUL25 were also expressed in the cytoplasm

and at where they polymerized into assumed heterotrimers. The trimers were then transported into the nucleus and assembled onto the vertexes of empty viral capsids to initiate the genome DNA loading. The C-type capsids, loaded with genome DNA, moved to the nuclear inner membrane with the assistance of the pUL17 and pUL25 complex to wrap the primary membrane. The C-type capsids were then released into the cytoplasm through fusion with the outer membrane. The waited pUL36 was then assembled onto the pUL17 and pUL25 complex to form CATC, which will help the assembly of other tegument proteins and the viral membrane. Moreover, the deletion of the UL17 gene directly affected the entry efficiency of pUL25 protein into the nucleus and led to a failure assembly of pUL25 to the empty viral capsid, and indirectly caused the failure of pUL36 assembly.

Given the complete structure of CATC and interaction patterns among its sub-units remain unclear, a *in vitro* assembly of the CATC complex was performed. We were first eukaryotic expressed the pUL17, pUL25, and pUL36CT (aa2684-3150) proteins in a baculovirus-insert cell system, and then were used to assemble *in vitro* and purify. Transmission electron microscopy examination showed that the structure of the CATC complexes was stable and evenly dispersed. The structural model of CATCs assembled *in vitro* was analyzed by Cryo-EM and single particle reconstruction technique. The structure of pUL17, pUL25, and pUL36CT proteins was predicted by AlphaFold and fitted into the CATC model. The results showed that the final five three-dimensional structures of different assembly models were obtained, and two of the complex models showed similar structural characteristics to CATC in mature virions, indicating successful assembly of CATC *in vitro*. These results provide an important basis for further analysis of the complete structure of CATC.

In summary, we focused on the pUL36 protein to study the assembly kinetics in PRV-infected cells and the assembly mechanism *in vitro* of CATC. This study will lay the foundations for further understanding the whole assembly mechanism of the tegument protein network of alphaherpesviruses.

Keywords: PRV, pUL36 protein, Capsid associated tegument protein complex (CATC), Assembly dynamic

目 录

第一章 绪论.....	1
1.1 伪狂犬病毒.....	1
1.2 PRV 结构.....	2
1.3 PRV 生命周期及主要参与蛋白.....	2
1.3.1 病毒吸附与侵入.....	3
1.3.2 病毒细胞质内转运及基因组释放.....	3
1.3.3 病毒基因组复制.....	4
1.3.4 病毒衣壳组装及核输出.....	4
1.3.5 病毒外膜包装及释放.....	5
1.4 PRV 蛋白组成及主要功能.....	6
1.5 PRV 被膜蛋白网络研究进展.....	8
1.6 PRV 衣壳相关被膜蛋白复合体研究进展.....	9
1.7 DNA 病毒基因组编辑技术.....	10
1.7.1 基于 Red/ET 的细菌人工染色体系统.....	10
1.7.2 CRISPR/Cas 基因编辑.....	11
1.7.3 Prime 编辑.....	11
1.8 研究目的及意义.....	12
第二章 重组荧光病毒 RPRV-36N-EGFP 和 RPRV-36C-EGFP 的构建及鉴定.....	13
2.1 主要实验材料.....	13
2.2 主要实验仪器.....	13
2.3 实验方法.....	13
2.3.1 pUL36 蛋白单克隆抗体的制备.....	13
2.3.2 sgRNA 引物、同源臂及荧光蛋白标签引物设计.....	15
2.3.3 sgRNA 重组质粒构建.....	16
2.3.4 PRV 基因组提取.....	17
2.3.5 同源供体重组质粒构建.....	17
2.3.6 sgRNA、同源供体重组质粒、PRV 基因组共转染.....	19
2.3.7 病毒收集及蚀斑纯化.....	19
2.3.8 重组荧光病毒的传代、基因组提取及 PCR 鉴定.....	20
2.3.9 重组荧光病毒的纯化.....	20
2.3.10 重组荧光病毒的 Western blot 鉴定.....	21
2.3.11 重组荧光病毒的 TCID ₅₀ 测定.....	21
2.3.12 重组荧光病毒的一步生长曲线测定.....	21

2.3.13 重组荧光病毒的纯化及形态学鉴定	22
2.4 实验结果	22
2.4.1 pUL36 蛋白单克隆抗体制备	22
2.4.2 同源供体重组质粒的构建及鉴定	25
2.4.3 重组荧光病毒的蚀斑纯化	26
2.4.4 重组荧光病毒基因组 PCR 鉴定	27
2.4.5 重组荧光病毒 rPRV-36N-EGFP 和 rPRV-36C-EGFP 的 Western blot 鉴定	28
2.4.6 重组荧光病毒 rPRV-36N-EGFP 和 rPRV-36C-EGFP 的 TCID ₅₀ 测定	29
2.4.7 重组荧光病毒 rPRV-36N-EGFP 和 rPRV-36C-EGFP 的一步生长曲线	29
2.4.8 重组荧光病毒形态学鉴定	30
2.5 讨论	30
第三章 重组荧光缺失病毒 RPRV-36N-EGFP- Δ UL17 的构建及鉴定	32
3.1 主要实验材料	32
3.2 主要实验仪器	32
3.3 实验方法	32
3.3.1 sgRNA 引物设计	32
3.3.2 sgRNA 重组质粒构建	33
3.3.3 rPRV-36N-EGFP 基因组准备	33
3.3.4 稳定表达 pUL17 蛋白细胞系的构建	34
3.3.5 sgRNA、rPRV-36N-EGFP 基因组共转染	37
3.3.6 病毒收集及蚀斑纯化	37
3.3.7 重组缺失病毒的传代及 PCR 鉴定	37
3.3.8 重组缺失病毒的 TCID ₅₀ 测定	37
3.3.9 重组缺失病毒的一步生长曲线测定	38
3.3.10 重组缺失病毒的电镜切片观察	38
3.4 实验结果	39
3.4.1 稳定表达 pUL17 蛋白细胞系的构建及鉴定	39
3.4.2 重组荧光缺失病毒 rPRV-36N-EGFP- Δ UL17 的构建及蚀斑纯化	41
3.4.3 重组荧光缺失病毒 rPRV-36N-EGFP- Δ UL17 的 PCR 鉴定	42
3.4.4 重组荧光缺失病毒 rPRV-36N-EGFP- Δ UL17 的 TCID ₅₀ 测定	43
3.4.5 重组荧光缺失病毒 rPRV-36N-EGFP- Δ UL17 的一步生长曲	

线	43
3.4.6 重组荧光缺失病毒 rPRV-36N-EGFP- Δ UL17 的切片鉴定	43
3.5 讨论	44
第四章 PRV 感染细胞中 PUL36 蛋白相关复合体的装配动力学 ..	46
4.1 主要实验材料	46
4.2 主要实验仪器	46
4.3 实验方法	46
4.3.1 内质网标记质粒的构建及鉴定	46
4.3.2 病毒接种	47
4.3.3 细胞总 RNA 提取	48
4.3.4 RNA 反转录	48
4.3.5 相对荧光定量 PCR	48
4.3.6 pUL36、pUL17 和 pUL25 蛋白细胞内共定位试验	49
4.3.7 pUL36 蛋白与内质网共定位试验	50
4.3.8 pUL36、pUL25 及 pUL17 蛋白的细胞内免疫标记	50
4.3.9 UL17 基因缺失后 pUL36 和 pUL25 蛋白的细胞内免疫标 记	51
4.4 实验结果	51
4.4.1 内质网标记	51
4.4.2 UL36、UL25 和 UL17 基因在病毒复制中转录合成 mRNA 水平	52
4.4.3 CATC 各蛋白组分装配的细胞内定位	54
4.4.4 pUL17/pUL25 蛋白在 PRV 感染细胞内装配分布	57
4.4.5 pUL36 蛋白在 PRV 感染细胞内的空间分布	58
4.4.6 pUL36 蛋白与内质网共定位	59
4.4.7 UL17 基因缺失后细胞内 UL36 和 UL25 基因的转录合成 mRNA 水平	60
4.4.8 UL17 基因缺失后细胞内 pUL36 和 pUL25 蛋白定位	60
4.4.9 UL17 基因缺失后细胞内 pUL36 和 pUL25 蛋白免疫标记	61
4.4.10 UL17 基因缺失后 pUL36 蛋白与内质网共定位	62
4.5 讨论	63
第五章 CATC 的体外表达及组装	66
5.1 主要实验材料	66
5.2 主要实验仪器	66
5.3 实验方法	66
5.3.1 引物设计	66
5.3.2 重组质粒的构建及鉴定	67

5.3.3 重组杆粒的制备.....	67
5.3.4 重组杆粒的鉴定.....	68
5.3.5 重组杆状病毒的包装.....	68
5.3.6 病毒扩增及蛋白表达鉴定.....	69
5.3.7 蛋白表达及纯化.....	69
5.3.8 蛋白复合物的孵育、分子筛纯化及质谱鉴定.....	69
5.3.9 蛋白复合物的电镜观察.....	70
5.3.10 蛋白复合物的冷冻电镜样品制备.....	70
5.3.11 数据采集及处理.....	70
5.4 实验结果.....	70
5.4.1 UL17、UL25 和 UL36CT 基因重组质粒的构建及鉴定 ...	70
5.4.2 重组杆粒的鉴定.....	71
5.4.3 重组蛋白的表达鉴定.....	72
5.4.4 重组蛋白的纯化.....	72
5.4.5 CATC 复合物的分子筛纯化及质谱鉴定.....	73
5.4.6 CATC 的电镜观察.....	73
5.4.7 CATC 复合物的数据处理.....	74
5.5 讨论.....	76
第六章 全文结论.....	78
参考文献.....	79

主要符号对照表

英文缩写	英文全称	中文名称
BAC	Bacterial artificial chromosomes	细菌人工染色体
BSA	Albumin from bovine serum	牛血清白蛋白
CATC	Capsid associated tegument complex	衣壳相关被膜蛋白复合体
CRISPR	Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats	成簇规律间隔的短回文重复序 列
DIC	Dynein intermediate chain	动力蛋白中间链
DMEM	Dulbecco's modified eagle medium	改良版细胞培养基
DTT	DL-Dithiothreitol	二硫苏糖醇
EGFP	Enhanced green fluorescent protein	增强型绿色荧光蛋白
ELISA	Enzyme linked immunosorbent assay	酶联免疫吸附测定
ER	Endoplasmic Reticulum	内质网
FBS	Fetal Bovine Serum	胎牛血清
IFA	Immunofluorescence assay	免疫荧光分析
INM	Inner Nuclear Membrane	内核膜
IRS	Internal repeat sequences	内部重复序列
MCPs	Major capsid proteins	主要衣壳蛋白
MOI	Multiplicity of infection	病毒感染复数
NPCs	Nuclear pore complexes	核孔复合物
OBP	Origin-binding protein	起始结合蛋白
ONM	Outer Nuclear Membrane	外核膜
PCR	Polymerase Chain Reaction	聚合酶链反应
PEI	Polyethylenimine	聚乙烯亚胺
PNS	Perinuclear space	核周间隙
PRV	Pseudorabies virus	伪狂犬病毒
PVDF	Polyvinylidene fluoride	聚偏二氟乙烯
SCPs	Small capsid proteins	小衣壳蛋白
TRS	Terminal repeat sequences	末端重复序列

第一章 绪论

1.1 伪狂犬病毒

伪狂犬病毒 (Pseudorabies virus, PRV) 是疱疹病毒科 (*Herpesviridae*), α -疱疹病毒亚科 (*Alphaherpesvirinae*), 水痘病毒属 (*Varicellovirus*) 的主要组成成员 (GATHERER et al., 2021; POMERANZ et al., 2005)。该病毒又称为猪疱疹病毒 I 型, 与 I 型单纯疱疹病毒 (*Herpes simplex virus I*, HSV-1) 和 II 型单纯疱疹病毒 (*Herpes simplex virus II*, HSV-2) 属于同一亚科。已有研究报道基于 PRV 全基因组序列进化分析将目前 PRV 流行株分为基因 I 型 (Genotype I) 和基因 II 型 (Genotype II) (LIU et al., 2020a)。PRV 基因 I 型主要包括欧美、东南亚及非洲等外国流行株; 而基因 II 型主要为中国流行株, 包括经典流行毒株和演化出的多种变异毒株 (BO and LI, 2022; LIU et al., 2020a)。该病毒的感染能够引起母猪的繁殖障碍和仔猪的神经系统性疾病, 给养猪业造成了严重损失 (METTENLEITER, 2000)。

尽管猪是 PRV 的天然贮存宿主和传播宿主, 但是 PRV 感染谱相当广泛 (王春芳 et al., 2022), 可以感染牛 (BITSCH, 1975; CHENG et al., 2020)、羊 (KONG et al., 2013)、貂 (LIU et al., 2017; MARCACCINI et al., 2008)、犬 (ABBATE et al., 2021; ZHANG et al., 2015) 等家养经济型动物或宠物, 也可以感染野猪 (LARI et al., 2006; MULLER et al., 2011)、熊 (BANKS et al., 1999)、狼 (VERPOEST et al., 2013)、豹子 (GLASS et al., 1994)、豺獭 (NAJERA et al., 2021)、蝙蝠 (REAGAN et al., 1953)、浣熊 (WEIGEL et al., 2003) 等野生动物, 严重威胁着动物健康。另外, 早期研究认为 PRV 容易感染恒河猴和狨猴等非人类灵长类动物, 而对于黑猩猩和人类等其他高级灵长类动物不易感 (BO and LI, 2022; ENQUIST, 1999)。但随着 PRV 的演化变异, 研究报道了超 20 例人感染 PRV 的病例 (WONG et al., 2019)。近年研究发现从人急性脑炎病例的脑脊液样本中分离出了一株名为 hSD-1/2019 的 PRV 毒株, 确认了其与中国 PRV 变异毒株的密切亲缘关系, 并且表现出高度相似的病原学特征 (LIU et al., 2021)。PRV 感染人能够引起发热、头痛等前驱症状, 继而诱发一系列的中枢神经系统和呼吸系统病变, 如急性脑炎综合征、呼吸衰竭、视网膜炎或眼内炎等 (HOU et al., 2022; LI et al., 2020a)。PRV 的高度变异使得其人畜共患风险大大增加, 给人类生命健康造成严重的威胁, 应该引起人类及研究科学家的高度重视 (OU et al., 2020; WONG et al., 2019)。

PRV 基因组是一个长度约为 140 kbp 的双链 DNA 分子, 包括两个独特的区域 UL 和 US 区, 其中 US 区两侧为内部重复序列 (Internal repeat sequences, IRS) 和末端重复序列 (Terminal repeat sequences, TRS) (POMERANZ et al., 2005), 病毒基因组包含多个编码区, 目前已知编码 70 多种蛋白质 (BO and LI, 2022)。研究发现从基因组 5'端至 UL-US 区交界处的序列复制和易位对 PRV 在不同宿主中的生长繁殖起重要作用 (REILLY et al., 1991)。PRV 编码的所有基因基本都可以在同一亚科成员 (如 HSV-1、HSV-2) 中匹配到同源物, 基因名称一般是根据 HSV-1 中编码区在 UL 和 US 区域内的顺序而得出的, 但可能不同病毒之间蛋白名称会有所不同 (POMERANZ et al., 2005)。由于 PRV 中许多基因对于病毒复制是非必需的, 如 TK、gE、gI 等可以被替换为外源基因, 因此 PRV 通常被作为携带外源基因的病毒载体以制备重组疫苗。迄今为止, 已有多种 PRV 重组疫苗株, 如重组表达 CSFV E2 蛋白的 PRV-JS-2012- Δ gE/gI-E2 (TONG et al., 2020)、重组表

达 ASFV CD2v 蛋白的 PRV- Δ gE/ Δ gI/ Δ TK-(CD2v) (FENG et al., 2020)、重组表达猪细小病毒 VP2 蛋白的 PRV-SA215/VP2(CHEN et al., 2011)、重组表达口蹄疫病毒 P12A 和 3C 蛋白的 PRV-P12A3C (ZHANG et al., 2011) 等一系列常见猪病毒重组疫苗株被开发研制(HUANG et al., 2022; ZHAO et al., 2022), 并表现出了较强的安全性, 具备良好的潜在应用前景。

1.2 PRV 结构

PRV 属于有囊膜包裹的大尺寸疱疹病毒, 病毒粒子结构从内到外依次为基因组双链 DNA、核衣壳、被膜蛋白层和囊膜蛋白层, 细胞核内形成的病毒核衣壳结构直径约为 110~120 nm, 而释放到细胞外成熟病毒粒子直径约为 130~150 nm (POMERANZ et al., 2005)。近期研究报道解析了 PRV A-衣壳 (4.53 Å) 和 C-衣壳 (4.43 Å) 的近原子分辨率结构 (图 1-1), 阐述了 PRV 与 HSV-1 (DAI and ZHOU, 2018)、HSV-2 (YUAN et al., 2018) 有着相似的核衣壳结构, 为 T=16 的二十面体结构, 是由主要衣壳蛋白 (Major capsid proteins, MCPs)、小衣壳蛋白 (Small capsid proteins, SCPs) 和三链体结构组成(WANG et al., 2022)。MCP 主要为 UL19 基因编码的 VP5 蛋白, 其在病毒衣壳结构中形成五聚体 (五邻体) 和六聚体 (六邻体), 六邻体位置的 MCP 被 SCP 即 UL35 基因编码的 VP26 蛋白所修饰, 而五邻体位置 MCP 缺少这种修饰。与其他疱疹病毒一样, PRV 衣壳结构的十二个顶点之一被认为包含一个可以装配和释放基因组的通道结构—Portal 结构, 该结构含有一个 pUL6 蛋白十二聚体形成的孔洞 (DAI and ZHOU, 2018; LIU et al., 2019)。三链体组分包括一个 VP19C 蛋白 (Tri1, UL38 基因编码) 和两个 VP23 蛋白 (Tri2, UL18 基因编码), 通过 Tri1 N-锚定器锚定到衣壳底部。根据其在病毒衣壳上的定位, 三链体可分为六种类型, 分别为 Ta、Tb、Tc、Td、Te、Tf (WANG et al., 2022)。由于疱疹病毒粒子结构中外层被膜和囊膜层结构的不对称性及具有较强柔韧性, 借助目前冷冻电镜和单颗粒重构技术还无法解析出完整的疱疹病毒粒子结构。但随着外层被膜和囊膜蛋白被逐步解析, 疱疹病毒完全结构的神秘面纱终将被揭开。

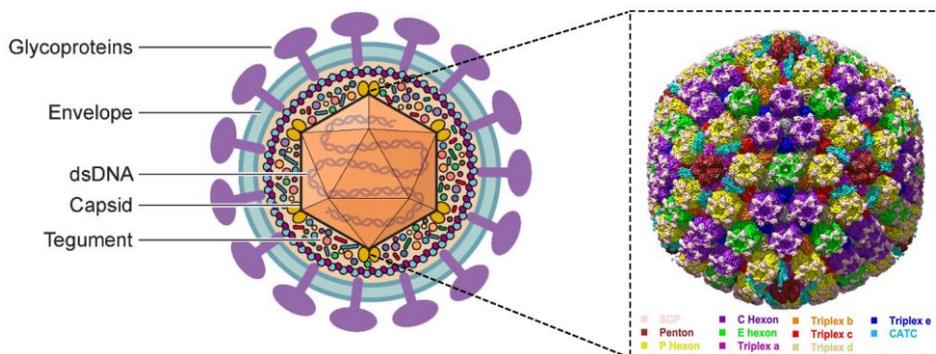


图 1-1 PRV 衣壳结构 (WANG et al., 2022)

Fig.1-1 Structure of PRV capsid (WANG et al., 2022)

1.3 PRV 生命周期及主要参与蛋白

PRV 与同属于 α -疱疹病毒亚科的 HSV-1、HSV-2 等成员的生命周期基本一致, 主要包括病毒吸附与侵入、细胞质内转运及基因组释放、病毒基因组复制、核内病毒衣壳组装及核输出、病毒

外膜包装及释放等过程。

1.3.1 病毒吸附与侵入

病毒吸附与侵入需要病毒表面多种囊膜糖蛋白的相互协同作用,参与该过程的主要病毒蛋白包括 gC、gD、gH、gL 和 gB (CONNOLLY et al., 2021; JAMBUNATHAN et al., 2021; VOLLMER and GRUNEWALD, 2020)。最初由病毒表面的囊膜糖蛋白 gC 和 gB 分别与细胞表面硫酸乙酰肝素蛋白聚糖相结合,将病毒束缚在细胞表面但不触发病毒的侵入 (CAIRNS and CONNOLLY, 2021; RESKE et al., 2007)。紧接着病毒表面糖蛋白 gD 作为膜融合和细胞-细胞扩散所必需核心糖蛋白之一与细胞表面受体进行结合。已有研究表明 gD 糖蛋白能够与宿主细胞表面三类受体相结合,分别为: nectin 和类 nectin 样蛋白、HVEM (属于肿瘤坏死因子受体超家族成员)、3-O-磺代硫酸乙酰肝素衍生物 (CAIRNS and CONNOLLY, 2021; PAN et al., 2023)。gD 糖蛋白与细胞受体的结合促进了 gD 与 gH/gL 异二聚体的相互作用,而 gH/gL 异二聚体作为融合调节器将融合信号传导至 gB 糖蛋白 (ATANASIU et al., 2010; CAIRNS and CONNOLLY, 2021)。gB 糖蛋白作为膜融合团队中发挥主要牵引作用成员,在接收到融合信号后由最初的亚稳态融合前构象重排形成延伸状态,将疏水残基插入到宿主细胞膜上,然后延伸状态的构象再次重新折叠成稳定的发夹状融合后构象,使膜插入区域与蛋白质的膜锚定物接近,从而促进病毒膜与细胞膜的融合,完成病毒侵入的最后一个膜融合步骤 (CAIRNS and CONNOLLY, 2021; WHITE et al., 2008)。虽然以上研究已经基本揭示多种囊膜糖蛋白介导的疱疹病毒吸附侵入模式,但 gD 如何向 gH/gL 二聚体传导信号、gH/gL 如何传导信号至 gB 蛋白的分子机制以及 gB 蛋白融合前后构象变化的结构基础仍不清楚。

1.3.2 病毒细胞质内转运及基因组释放

病毒经膜融合进入宿主细胞后病毒表面大部分蛋白发生裂解脱落,表面带有少部分被膜层蛋白的病毒衣壳向细胞核转运输送。疱疹病毒作为一类大分子物质能够在细胞质内招募细胞运动蛋白驱动蛋白来实现细胞内的长距离运输。研究发现疱疹病毒 HSV-1 使用细胞运动蛋白并调节激酶途径以促进细胞内病毒粒子衣壳的转运,参与该过程的主要病毒蛋白包括 pUL36、pUL37、pUS3 以及主要衣壳蛋白 VP5 (ANTINONE and SMITH, 2010; BUCH et al., 2017; RICHARDS et al., 2017)。pUL36 蛋白与 pUL37 蛋白在病毒感染后早期分别与细胞运动蛋白驱动蛋白和动力蛋白中间链 (Dynein intermediate chain, DIC) 发生相互作用,这种 pUL37-DIC 相互作用与感染细胞中 DIC 磷酸化同时发生。运动蛋白驱动蛋白和动力蛋白沿细胞骨架微管结构将病毒衣壳输送至细胞核周围准备释放病毒基因组入核。另外,最近的研究发现疱疹病毒衣壳主要组成蛋白 VP5 蛋白在病毒感染后早期能够与动力蛋白 (DCTN1/p150 和 DCTN4/p62) 和末端结合蛋白 (EB1) 发生相互作用,说明了 VP5 蛋白与 pUL36、pUL37 蛋白同样参与了病毒体衣壳到被感染细胞核的动力蛋白依赖性运输 (MUSARRAT et al., 2021)。

病毒基因组的释放主要通过病毒衣壳靶向运输至核孔附近,且衣壳顶点对准核孔经由病毒衣壳内压力释放将基因组释放入细胞核进行复制 (HUFFMAN et al., 2017; LIASHKOVICH et al., 2011; NEWCOMB et al., 2009; SMITH, 2021)。细胞核孔是由细胞外核膜与内核膜融合形成由大分子复合物-核孔复合物 (Nuclear pore complexes, NPCs) 占据的孔道,是非分裂细胞细胞质与细胞

核内部之间的唯一通讯路径，其可以允许 5 nm 的小分子物质被动转运 (ALBER et al., 2007; LIASHKOVICH et al., 2011; MOHR et al., 2009)。已有研究发现被膜蛋白 pUL36 和衣壳蛋白 pUL25 是参与该过程的有力候选效应物，首先这两种蛋白分别与 NPC 蛋白 Nup214 和 Nup358 相互作用结合至 NPCs 上 (COPELAND et al., 2009; PASDELOUP et al., 2009)，NPC 结合需要 importin β 和 RanGTP/GDP 循环的参与 (OJALA et al., 2000)，然后其中编码的温度敏感突变可以在非容许温度下与 NPC 对接 (BATTERSON et al., 1983; PRESTON et al., 2008)，最终在蛋白水解酶的作用下 pUL36 蛋白被消解 (JOVASEVIC et al., 2008)，衣壳内包裹的数十个大气压压力被释放，将病毒基因组通过核孔快速注入到细胞核中 (BAUER et al., 2013; HUFFMAN et al., 2017)。NPCs 中是否还有其他蛋白与 pUL25 和 pUL36 蛋白发生相互作用并参与该过程以及 pUL36 蛋白被消解后 pUL25 蛋白如何发挥作用以释放基因组的分子机制仍然是基因组释放研究的重点。另外一项研究显示病毒基因组释放时是 DNA 最后被包装的末端最先被弹出，这导致第一个进入宿主细胞核的基因成为 alpha4，这被鉴定为是表达早期基因所需的转录因子 (NEWCOMB et al., 2009)。

1.3.3 病毒基因组复制

病毒基因组复制发生在细胞核中，参与该生物过程的主要病毒蛋白包括 7 种，分别为：OBP (UL9 基因编码的起始结合蛋白)、ICP8 (UL29 基因编码的单链 DNA 结合蛋白)、Pol/UL42 (DNA 聚合酶) 和 UL5/UL8/UL52 三聚体 (DNA 解旋酶/伯氨酶) (MUYLAERT et al., 2011; WELLER and COEN, 2012)。疱疹病毒编码的诸多复制相关蛋白表现出真核生物 DNA 复制的功能类似物能力，具有信息相似性和差异性，帮助疱疹病毒基因组能够在细胞核内更有效的复制 (WELLER and COEN, 2012)。进入细胞核中的线性 DNA 分子似乎不会激活双链断裂反应，而是会在 DNA ligase IV/XRCC4 的激活下环化 (LILLEY et al., 2005; STRANG and STOW, 2005)，这种环化分子可以作为 DNA 合成的模板进行有效复制 (MUYLAERT and ELIAS, 2007)。DNA 复制起始于位于不同转录基因启动子调控区的 OriS 和 OriL 复制起始点，由起始结合蛋白 (Origin-binding protein, OBP) 识别并激活 (ELIAS et al., 1986; OLIVO et al., 1988)，然后由 Pol/UL42 异二聚体聚合酶、UL5/UL8/UL52 异三聚体解旋酶/伯氨酶以及 ICP8 组成的复制体完成 DNA 合成 (LEHMAN and BOEHMER, 1999)。病毒基因组复制合成的 DNA 分子为串联体 DNA，即由多个单体 DNA 串联在一起的长链 DNA 分子，这是产生子代病毒的重要步骤，形成的串联体 DNA 分子能够在电子显微镜下观察到。

1.3.4 病毒衣壳组装及核输出

病毒衣壳组装发生在细胞核中，会形成原衣壳、A-衣壳、B-衣壳和 C-衣壳四种衣壳形式 (GIBSON and ROIZMAN, 1972; RIXON and MCNAB, 1999)。这四种衣壳具有相似的外壳结构，但其衣壳外部的次要蛋白和腔内容物不同 (NEWCOMB et al., 2000)。原衣壳是病毒衣壳组装过程中形成的第一个完全封闭结构，其具有多孔外壳且大部分呈球形，是其他三种衣壳形式的前体状态 (CHURCH and WILSON, 1997; HEYMANN et al., 2003)。A-衣壳腔中含有少量的 DNA 和蛋白质，通常被认为是 DNA 包装失败的形态 (BOOY et al., 1991)。B-衣壳腔中含有 VP22a 和低丰度 UL26 基因编码的 VP21、VP24 组成的核心，被认为是在未遇到 DNA 包装机制的情况下提前

成熟 (LIU and ROIZMAN, 1993)。只有 C-衣壳是包含单个完整疱疹病毒基因组, 且可以经核输出后进一步组装呈感染性病毒体的成功产物 (BOOY et al., 1991; HEMING et al., 2017)。研究发现所有病毒衣壳体形式均在顶点处包装有 pUL17 和 pUL25 蛋白, 且猜测 pUL17 蛋白是招募病毒基因组末端酶复合体 (UL15/UL28/UL33), 顺利包裹 DNA 进入衣壳结构的重要作用因子 (HEMING et al., 2017; THURLOW et al., 2005)。最近的研究解析了 HSV-1 末端酶复合体的高分辨率结构并阐述了其可能的识别、包装、切割 DNA 的重要分子机制 (YANG et al., 2020)。在 DNA 包裹进入病毒衣壳后, 末端酶复合体自病毒衣壳解离形成 C-衣壳, 再经由核输出释放至细胞质中进行后续的包膜工作 (HENAFF et al., 2013)。

由于疱疹病毒核衣壳直径较大 (约为 120~130 nm), 导致其无法直接穿过核纤层 (间隙约为 15 nm) 和核孔 (最大处直径约为 38 nm) (ALBER et al., 2007; GOLDBERG et al., 2008; HELMBERG et al., 2016; LEE and CHEN, 2010)。早期研究总结疱疹病毒可能通过几种策略调节纤层构象以到达内核膜 (Inner Nuclear Membrane, INM): (i) 细胞和病毒激酶被招募以磷酸化 Lamin A/C 和 Lamin B, 导致纤层粘连蛋白的解离 (SHARMA and COEN, 2014; WU et al., 2016); (ii) 病毒编码的核输出复合体 (pUL34/pUL31) 直接与 Lamin A/C 相互作用, 破坏纤层粘连蛋白网络 (FUCHS et al., 2002b; KLUPP et al., 2007; LEELAWONG et al., 2011; REYNOLDS et al., 2004); (iii) 纤层粘连蛋白 emerlin 和 Lamin B 受体作为纤层粘连蛋白和 INM 之间桥梁被修饰和重新排布 (HAGE and MARSCHALL, 2022; LV et al., 2019; MORRIS et al., 2007)。关于疱疹病毒核输出复合体介导病毒核衣壳转运机制认为 pUL34 蛋白作为 II 型整合膜蛋白, 其通过 C 末端的跨膜螺旋定位在 INM 上 (SHIBA et al., 2000), pUL31 蛋白作为一种位于核质中的可溶性磷蛋白能够与病毒核衣壳表面蛋白发生互作 (REYNOLDS et al., 2001), 这一相互作用通过共聚焦和免疫共沉淀等实验被证实 (FUCHS et al., 2002b), 病毒核衣壳被 pUL31 蛋白牵引至锚定于 INM 上的 pUL34 蛋白相互作用, 造成 INM 的内陷, 在核周间隙 (Perinuclear space, PNS) 处形成包膜颗粒, 经过膜转移至外核膜 (Outer Nuclear Membrane, ONM) 并释放至细胞核外 (AHMAD and WILSON, 2020; BIGALKE and HELDWEIN, 2015; BIGALKE et al., 2014)。另外, 有研究指出 pUL25 蛋白通过与 NPCs 相互作用参与到了病毒核衣壳转运出核的生物过程, 认为位于病毒衣壳五邻体顶点的 pUL25 与 NPCs 互作后介导 INM 向内凹陷包裹病毒核衣壳形成六边形阵列, 在经过两次膜转移释放病毒核衣壳至胞浆中 (DRAGANOVA et al., 2020)。

1.3.5 病毒外膜包装及释放

病毒核衣壳输送至细胞质中后, 会在核周附近开始装配少许内被膜蛋白, 如 pUL36、pUL37 和 pUS3 等 (GUO et al., 2010)。随着病毒衣壳与内被膜被定向转运至二次包膜位置的过程中, 其他部分被膜蛋白相继被装配到病毒表面 (HOGUE, 2021)。病毒囊膜糖蛋白在翻译完成修饰后不会出现所有蛋白形成簇的形式, 而是以单体形式或异聚体形式被转运至二次包膜位置 (HOGUE, 2021; OWEN et al., 2015)。研究发现跨高尔基体网络 (Trans-Golgi network, TGN) 衍生出的膜囊泡是病毒发生二次包膜的主要场所, HSV 的感染能够引起高尔基体和 TGN 细胞器的重排, 使得高尔基体标记物更均匀分布在细胞质中 (GUO et al., 2010; JOHNSON and BAINES, 2011)。另外, 一些研究指出部分宿主蛋白, 如 Rab3A、Rab6A、Rab8a、Rab11a、GAP43、Kinesin-1 和 SNAP-25

参与了 HSV 和 PRV 病毒囊泡样结构运输至释放位点 (HOGUE et al., 2014; MIRANDA-SAKSENA et al., 2009)。包裹有成熟病毒粒子的囊泡被转运至细胞膜附近后与细胞膜发生融合, 通过胞吐途径将成熟的病毒粒子释放到细胞间隙, 完成一轮病毒增殖 (OWEN et al., 2015)。

1.4 PRV 蛋白组成及主要功能

如前所述, PRV 基因组被衣壳蛋白层紧紧包裹, 外层有被膜蛋白层和囊膜蛋白层的稳固加持。衣壳蛋白层主要为病毒遗传物质提供庇护场所, 同时部分蛋白参与到病毒的核衣壳运输 (PASDELOUP et al., 2009)、介导病毒基因组装配机制的发生 (HEMING et al., 2017)、参与病毒核衣壳向细胞核外输送等生物过程。被膜层蛋白主要参与病毒衣壳细胞质内转运 (RICHARDS et al., 2017)、与衣壳蛋白互作稳定衣壳结构 (DAI and ZHOU, 2018)、组装被膜层网络结构 (OWEN et al., 2015) 等。囊膜层蛋白主要参与病毒吸附与侵入宿主细胞 (CONNOLLY et al., 2021)、病毒衣壳二次包膜 (HOGUE, 2021)、病毒粒子释放等过程。

衣壳蛋白主要包括 VP5 (UL19 基因编码)、VP26 (UL35 基因编码)、VP19C (UL38 基因编码)、VP23 (UL18 基因编码)、pUL6、pUL17 以及 pUL25 (POMERANZ et al., 2005) (表 1-1)。其中 VP5、VP26、VP19C 和 VP23 是构成病毒核衣壳的主要成分, 任何一组分的缺失都影响病毒衣壳的正确组装。早期研究通过突变 VP26 以研究其在病毒感染细胞中的功能, 发现了其无效突变显著损害了 pUL25 蛋白装配至病毒衣壳上, 同时引起病毒基因组的不正确组装, 导致细胞核内大量 A-衣壳的积累, 证明了 VP26 是病毒衣壳在细胞核中正确定位的关键因子, 并通过介导 pUL25 蛋白装配引发衣壳成熟的重要调节因子 (KOBAYASHI et al., 2017)。VP19C 与 VP23 是构成三链体的主要成分, 位于病毒衣壳表面的不同位置, 其在控制壳间相互作用和衣壳稳定性方面发挥重要功能 (SAAD et al., 1999)。pUL6 蛋白以十二聚体筒状结构位于病毒核衣壳唯一顶点 Portal 位置, 主要与病毒基因组的装配与释放相关 (HEMING et al., 2017; LIU et al., 2019; NEWCOMB et al., 2001; YANG et al., 2009)。pUL17 与 pUL25 蛋白是病毒衣壳顶点位置重要组成成分, 主要介导基因组装配和参与病毒核衣壳的核输出 (TRUS et al., 2007)。这两种蛋白主要存在形式为异二聚体, 其相互作用需要多种病毒蛋白的参与, 才能在感染细胞中进行正确定位和发挥生物学功能 (KUHN et al., 2010; SCHOLTES and BAINES, 2009)。

成熟病毒粒子被膜占据了衣壳与外囊膜之间的空间, 是连接病毒内部衣壳和外囊膜的主要桥梁 (KELLY et al., 2009; METTENLEITER, 2004)。已有研究通过质谱分析 HSV-1 成熟病毒粒子被膜层成分, 鉴定出了至少 20 种被膜蛋白的存在 (LORET et al., 2008; OWEN et al., 2015) (表 1-1)。通过鉴定及预测发现被膜层蛋白大小跨度范围较大且丰度存在较大差异, 最小蛋白约为 10.5 kDa (pUL11) 而最大蛋白约为 330 kDa (pUL36, 也称为 VP1/2) (NEWCOMB et al., 2012)。丰度最高的几种蛋白分别为 pUL47 (VP13/14)、pUL48 (VP16) 和 pUL49 (VP22), 其在成熟病毒粒子上的拷贝数达到 600~1,300 (NEWCOMB et al., 2012; OWEN et al., 2015)。目前研究较多的被膜蛋白包括 VP1/2、pUL37、VP16、VP22、pUL16 及 pUL21 等。VP1/2 与 pUL37 蛋白被证实与宿主细胞内运动蛋白驱动蛋白或动力蛋白相互作用介导病毒侵入细胞后衣壳成分向细胞核的转运 (BUCKS et al., 2007; ZAICHICK et al., 2013), 在病毒组装阶段此二者蛋白向内结合到病毒衣壳表面与衣壳蛋白发生相互作用 (COLLER et al., 2007), 向外与其他被膜蛋白 VP16 等相互作用介

导被膜蛋白层的装配 (SVOBODOVA et al., 2012)。VP16 蛋白是病毒复制早期的一个重要反式激活因子, 其与宿主细胞因子-1 (HCF-1) 和 POU 结构域蛋白 Oct-1 两种细胞因子物理相关以产生 VP16 诱导复合物, 从而激活病毒即刻早期基因的转录和启动裂解程序 (DING et al., 2022; FAN et al., 2020), 在病毒复制后期主要参与被膜蛋白层的装配, 为被膜层主要成分之一 (FAN et al., 2020)。VP22 蛋白是一种翻译后修饰的磷酸蛋白 (HUTCHINSON et al., 2002; KNOPF and KAERNER, 1980), 其可以与病毒蛋白、细胞蛋白及染色质发生相互作用, 同时具有蛋白质转运功能, 在病毒复制期间其出现三种不同状态的亚细胞定位, 包括仅细胞质、细胞质和细胞核、仅细胞核 (WU et al., 2020)。病毒复制早期 VP22 蛋白能够促进一部分病毒 mRNA 积累, 而在感染后期可以促进病毒蛋白质的合成 (DUFFY et al., 2009)。pUL16 蛋白是所有疱疹病毒中最保守的蛋白, 其可以与病毒蛋白 pUL11、pUL21、VP22、gD 和 gE 发生相互作用, 另外其可以通过蛋白间相互作用协助衣壳蛋白 VP26 的核输入, 间接介导病毒核衣壳成分的正确装配 (XU et al., 2021)。pUL21 蛋白是一种病毒编码的蛋白磷酸酶 (PP1) 接头, 能够指导多种细胞和病毒蛋白的去磷酸化 (BENEDYK et al., 2021), 其中包括细胞神经酰胺转运蛋白 CERT, 另外研究发现 pUL21 蛋白的 C 末端与细胞蛋白 Roadlock-1 发生相互作用, 其有助于 PRV 的神经侵袭 (BENEDYK et al., 2022; 燕凯, 2019)。其他被膜蛋白如 pUL7、pUL51 等在病毒复制过程中也发挥了重要作用 (ALBECKA et al., 2017; BUTT et al., 2020)。

囊膜层位于成熟病毒粒子结构最外层, 迄今为止已发现了至少 10 种囊膜糖蛋白的存在, 主要包括 gB、gC、gD、gH、gL、gE、gI、gN、gM、gK、gG、pUS9 等 (表 1-1)。gB 糖蛋白作为疱疹病毒膜融合主要核心成员之一, 已有研究表明其可以与宿主细胞表面多种受体发生相互作用, 主要包括: HSPG、PILR α 、MAG 以及 myosin-9 (CAIRNS and CONNOLLY, 2021; FAN et al., 2009; SATOH et al., 2008; WANG et al., 2009)。其主要存在形式为三聚体形式, 能够与 gC、gD、gH 和 gL 相互协调介导疱疹病毒膜融合发生机制, 是其中主要的微调融合机器 (CAIRNS and CONNOLLY, 2021; CONNOLLY et al., 2021; COOPER and HELDWEIN, 2015; SATHIYAMOORTHY et al., 2017)。gC 蛋白除了在疱疹病毒膜融合前期病毒吸附过程中发挥作用外, 还能够与细胞内补体成分 C3b 结合, 从而抑制补体介导的免疫反应, 有研究表示缺乏 gC 蛋白使得 HSV-1 对一组 gB 单克隆抗体的补体非依赖性中和更敏感, 提示 HSV-1 可能通过 gC 蛋白保护 gB 不被中和作为免疫逃避的潜在机制 (KOMALA SARI et al., 2020a; KOMALA SARI et al., 2020b)。gH 与 gL 蛋白主要以异二聚体的形式锚定于病毒囊膜表面, 主要参与病毒膜融合过程, 其内在结构可塑性使其能够充当信号集成器, 接受不同的调节输入并将其转化为激活 gB 蛋白融合的触发信号 (CONNOLLY et al., 2021; GONZALEZ-DEL PINO and HELDWEIN, 2022)。糖蛋白 gE/gI 异二聚体与 pUS9 蛋白发挥相互协同作用, 能够促进病毒衣壳和糖蛋白从神经元细胞体顺行转运至初始轴突区段 (HOWARD et al., 2013; HOWARD et al., 2014; SNYDER et al., 2008), 另外由于 gE、gI 蛋白对于病毒毒力十分重要, 但不影响其免疫原性, 所以通常作为疫苗株首选缺失替换靶标 (CONG et al., 2016; ZHAO et al., 2020)。研究报道了 β -疱疹病毒 gM 与 gN 蛋白以异二聚体的形式存在于病毒囊膜表面, 能够与 v-SNARE 蛋白、囊泡相关膜蛋白 3 (VAMP3) 相互作用, 参与到病毒晚期成熟过程 (KAWABATA et al., 2014)。

表 1-1 PRV 主要蛋白及功能

Table 1-1 Function of major proteins of PRV

病毒位置	基因名称	编码蛋白	蛋白大小(kDa)	功能
衣壳	UL19	VP5	145.89	参与病毒衣壳的形成
	UL6	pUL6	70.43	形成病毒基因组泵入通道; 参与病毒 DNA 的装载
	UL17	pUL17	64.21	与 pUL25 蛋白相互作用; 参与病毒基因组装配
	UL25	pUL25	57.60	与 pUL17 蛋白相互作用; 参与病毒衣壳的运输; 与宿主蛋白相互作用参与病毒衣壳的核输出
被膜	UL36	VP1/2	330.68	与多种病毒蛋白互作; 泛素特异性蛋白酶作用; 参与病毒核衣壳的运输; 参与病毒粒子装配
	UL37	pUL37	98.20	参与病毒核衣壳的轴突运输; 参与病毒粒子装配
	UL48	VP16	45.21	反式激活病毒立早期基因; 参与基因调控; 参与病毒粒子装配
	UL49	VP22	25.46	参与病毒粒子装配; 可能参与 RNA 向未感染细胞的运输
	UL21	pUL21	55.67	与细胞微管相互作用; 参与病毒粒子装配
囊膜	UL27	gB	100.69	与宿主细胞表面分子相互作用; 参与病毒侵入细胞; 参与病毒的细胞间传播
	UL22	gH	71.77	与 gL 蛋白相互作用; 参与病毒膜融合过程
	UL1	gL	16.60	与 gH 蛋白相互作用; 参与病毒膜融合过程
	US6	gD	44.74	识别宿主细胞表面分子; 参与病毒膜融合过程
	US8	gE	62.64	与 gI 蛋白相互作用; 参与病毒的顺行转运
	US7	gI	38.62	与 gE 蛋白相互作用; 参与病毒的顺行转运

1.5 PRV 被膜蛋白网络研究进展

病毒被膜层是由多种被膜蛋白相互作用交织形成的巨大致密蛋白网络 (OWEN et al., 2015)。被膜蛋白通常会有内被膜蛋白和外被膜蛋白之分, 这取决于它们在病毒侵入和释放时与病毒核衣壳或病毒膜的优先结合, 以及它们脱离病毒的先后所决定的 (METTENLEITER et al., 2009; RADTKE et al., 2010)。研究报道了几种编码被膜蛋白基因 (如 UL7、UL11、UL16、UL21、UL36、UL37 以及 UL51) 在所有的疱疹病毒中是相对保守, 而 UL46、UL47、UL48 和 UL49 基因是 α -疱疹亚科成员所独具的 (KELLY et al., 2009; OWEN et al., 2015)。

pUL36 蛋白 (VP1/2) 作为整个 PRV 蛋白家族中最大的成员, 其与 pUL37 蛋白、pUS3 蛋白为主要的内被膜蛋白成分。已有研究发现 HSV-1 和 PRV 中 pUL36 蛋白的缺失会影响病毒粒子初次包膜和二次包膜的过程, 导致病毒核衣壳在细胞质中大量积累 (DESAI, 2000; SCHIPKE et al., 2012)。pUL36 蛋白中包含多个重要功能域, 其中 N-末端具有去泛素酶活性, 其有助于克服细胞

内 I 型干扰素介导的 HSV-1 感染早期和晚期对生产性感染的抑制,从而有效地启动裂解病毒复制过程 (BODDA et al., 2020; MOHNKE et al., 2022); 另外氨基酸残基 548~572 位置是与另一被膜蛋白 pUL37 结合的重要区域,该部分结构域的丢失严重影响病毒的复制 (KELLY et al., 2014); 该蛋白 C-末端是与病毒核衣壳成分相互作用的重要结构域,与衣壳蛋白相互作用后被锚定于病毒衣壳顶点位置,起到稳定衣壳顶点并连接外部蛋白的桥梁作用 (DAI and ZHOU, 2018)。pUL37 蛋白同样对于 PRV 的复制至关重要,其 C-末端 556~1,123 残基区域蛋白的过表达能够部分挽救全长 pUL37 蛋白缺失的表型 (BUCKS et al., 2011)。早期研究认为 pUL37 蛋白能够与衣壳顶点延伸出来的 pUL36 蛋白相互作用形成丝状结构并延伸至被膜层内部 (LAINE et al., 2015; NEWCOMB and BROWN, 2010)。基于这两者相互作用及重要氨基酸区域的确定,未来基于 pUL36/pUL37 蛋白复合物在成熟病毒粒子上的结构基础依然是研究的重点。

pUL46、pUL47、pUL48 和 pUL49 蛋白之间形成相互作用,连接内外被膜蛋白和病毒糖蛋白,成为被膜蛋白层主要的骨架 (OWEN et al., 2015)。在 HSV-1 中,只有 pUL48 被认为是病毒复制不可缺少的组分 (FOSSUM et al., 2009; WEINHEIMER et al., 1992),而在 PRV 中这四种蛋白的单独缺失是被允许的 (FUCHS et al., 2002a; MICHAEL et al., 2006),另外同时缺失四种蛋白虽然不会影响成熟病毒粒子的正常装配,但是其缺失后病毒复制的能力被强烈削弱 (FUCHS et al., 2003)。如前所述,pUL48 与 pUL49 蛋白在病毒复制过程中发挥重要的生物学功能,但对于 pUL46 和 pUL47 蛋白在病毒复制过程中发挥的作用知之甚微。已有研究发现 PRV-UL47 突变体在感染细胞质内积累了大量包裹部分被膜的衣壳,同时其病毒滴度降低了 10 倍,但 PRV-UL46 突变体并没有表现出明显的组装缺陷 (KOPP et al., 2002)。尽管早期研究通过酵母双杂交或蛋白质组学研究确定了许多这两种蛋白的相互作用分子,但只有少数几种蛋白已通过体外或细胞实验得到证实,进一步研究确定 pUL46 和 pUL47 蛋白对病毒组装的精准贡献是很有必要的。

被膜蛋白 pUL11、pUL16、pUL21 蛋白通过相互作用形成异三聚体在病毒复制过程中发挥重要的生物学功能。经过 GST-Pulldown 实验证实了 HSV-1 和 PRV 中这三者蛋白之间的相互关系为 pUL16 蛋白作为中间串联体连接 pUL11 和 pUL21 蛋白 (HARPER et al., 2010)。其中 pUL11 蛋白具有肉豆蔻酰和棕榈酰化修饰,与感染病毒细胞中的高尔基体膜结合 (LOOMIS et al., 2001),并且已有研究证实 pUL11 蛋白的膜结合特性也可以通过 gE 蛋白胞质区相互作用而被增强 (HAN et al., 2011)。研究认为 pUL11-pUL16-pUL21 蛋白复合物可以通过 pUL11 和 pUL16 组装在糖蛋白 gE 的胞质区与细胞膜相互作用,而 pUL11 蛋白与 gE 的直接结合也促进了 gE-pUL16 蛋白之间的相互作用 (HAN et al., 2012)。尽管这三种蛋白之间的相互作用关系已经被证实,但这些蛋白质如何促进正确病毒粒子组装的分子机制还需要更进一步的探索。

1.6 PRV 衣壳相关被膜蛋白复合体研究进展

PRV 最大被膜蛋白 pUL36 与衣壳蛋白 pUL17、pUL25 相互作用并结合形成衣壳相关被膜蛋白复合体 (Capsid associated tegument complex, CATC)。CATC 在所有疱疹亚科病毒结构上均存在,这一点通过已经获得三种亚科成员病毒的衣壳-被膜相关复合体原子结构能够得到证实。目前, α -疱疹亚科成员 HSV-1 (DAI and ZHOU, 2018)、HSV-2 (YUAN et al., 2018) 和 PRV (WANG et al., 2022), β -疱疹亚科成员 HHV-6B (ZHANG et al., 2019), γ -疱疹亚科成员 KSHV (GONG et al., 2019)

和 EBV (LI et al., 2020b) 的病毒衣壳结构均已经被解析, 这些结果使我们对不同亚科成员病毒粒子上部分 CATC 的装配有了初步了解。以 HSV-1 为例, 研究指出两个拷贝的 pUL36 蛋白 C-末端 (aa3092~aa3139) 与两个拷贝的 pUL25 蛋白 N-末端 (约 90 个氨基酸) 形成了四聚螺旋束, 然后与靠近的 pUL17 蛋白的螺旋延伸 (aa241~aa266) 相互作用形成了三蛋白组成的异五聚体螺旋束锚定于病毒衣壳顶点位置 (DAI and ZHOU, 2018)。CATC 在 α -疱疹亚科成员的成熟病毒粒子上均匀分布在病毒衣壳的各个顶点位置, 每个顶点位置包含五个这样的拷贝, 计算得到每一个成熟病毒粒子上 CATC 拷贝数约为 60 个 (DAI and ZHOU, 2018; YUAN et al., 2018)。在 β -和 γ -疱疹亚科成员的病毒衣壳结构上观察到了不同于 α -疱疹亚科成员的 CATC 结构, 存在着明显的不对称性和不均一密度 (GONG et al., 2019; ZHANG et al., 2019)。CATC 一侧与病毒衣壳上三链体 (只有 Ta 和 Tc) 相互作用被固定, 另一侧可能是由 pUL25 蛋白形成的 Portal-cap 结构被稳定在病毒衣壳顶点上 (DAI and ZHOU, 2018; YUAN et al., 2018)。由于 Portal-cap 位置解析密度较低, 现阶段无法确定该位置蛋白具体组成, 但基于 γ -亚科成员 KSHV 的衣壳及 CATC 结构解析则认为 Portal-cap 结构是由 pUL25 蛋白的 C-端结构域组成 (YUAN et al., 2018; GONG et al., 2019)。在解析的病毒粒子衣壳结构中, 其中之一顶点位置 CATC 结构正下方是介导病毒 DNA 组装的由 pUL6 蛋白十二聚体形成的通道结构, 而此位置的 CATC 结构非常契合的成为了病毒基因组装配后的病毒衣壳顶点的闸门开关 (HUET et al., 2020; LIU et al., 2019; VILLANUEVA-VALENCIA et al., 2021)。尽管目前 CATC 在成熟病毒衣壳上的螺旋结构已经得到解析, 然而其组成成分的全貌并未被揭开, 这三种蛋白与病毒中其他蛋白相互作用的结构基础应该被进一步的探索。在成熟病毒粒子上观察到了 CATC 螺旋结构及相互作用, 但在病毒复制过程中这些蛋白的装配模式仍不清晰, 深入挖掘它们在病毒复制阶段的装配模式对于全面了解 CATC 是非常重要的。

1.7 DNA 病毒基因组编辑技术

1.7.1 基于 Red/ET 的细菌人工染色体系统

细菌人工染色体 (Bacterial artificial chromosomes, BAC) 载体的创制之初的目的是促进分子生物学研究中大 DNA 片段的传播和操作, 主要用于基因组测序项目和遗传疾病模型等用途 (HALL et al., 2012)。早期研究首次证明了 BAC 作为载体克隆了大型双链 DNA 病毒的完整基因组, 通过克隆杆状病毒基因组以允许在大肠杆菌中增殖和操纵病毒基因组, 并成功拯救出了具有感染性病毒粒子 (LUCKOW et al., 1993)。随后的研究将鼠巨细胞病毒基因组完整克隆到 BAC 上, 成功将该技术引入疱疹病毒家族的研究中 (MESSERLE et al., 1997)。目前已有超过 20 种人畜重要疱疹病毒的基因组应用 BAC 技术成功构建感染性克隆 (ARII et al., 2006; HALL et al., 2012; MAHONY et al., 2002; SAEKI et al., 1998; SCHUMACHER et al., 2000), 同时通过开发基于 cDNA 的病毒感染性克隆的构建, 已经扩展到包括痘病毒在内的其他 DNA 病毒 (DOMI and MOSS, 2002) 以及冠状病毒和黄病毒等 RNA 病毒 (ALMAZAN et al., 2000; YUN et al., 2003)。Red/ET 是一种高效、强大的同源重组体系, 是由来自 rac 噬菌体或 lambda 噬菌体重组酶介导的同源重组, 只需要借助较短的同源臂通过转座的形式介导靶基因快速准确的删除、插入以及突变 (HALL et al., 2012)。与传统的基于同源重组的方法相比, 基于 Red/ET 的 BAC 系统以高保真持续传播基因组的能力为探索大型 DNA 病毒生物学的其他途径提供良好的技术支持 (ADLER et al., 2003;

BUCKLEY and ETTENSOHN, 2019)。基于 Red/ET 的 BAC 系统允许对病毒基因进行精确的定点突变, 并对重组病毒株进行基因工程, 这对提供治疗具有广泛的影响, 特别是在 DNA 疫苗开发领域。BAC 系统目前广泛用于转基因和敲除研究, 并用于监测基因表达和体内靶向特定组织 (HALL et al., 2012)。

1.7.2 CRISPR/Cas 基因编辑

CRISPR/Cas 系统是一种来源于细菌和古生菌中防御噬菌体感染和质粒转移的适应性免疫机制 (JIANG and DOUDNA, 2017)。根据 CRISPR/Cas 基因座的分类, 当前可以将 CRISPR 系统分为六种类型 (I-VI) (MAKAROVA et al., 2015; SHMAKOV et al., 2015), 每一种都是使用一组独特的 Cas 蛋白以及 crRNA 进行 CRISPR 干扰 (WRIGHT et al., 2016)。其中 II 型 CRISPR 系统使用单个 DNA 内切酶 Cas9 来识别 dsDNA 底物, 并使用不同的核酸酶结构域 (HNH 或 RuvC) 切割每条链 (JIANG and DOUDNA, 2017)。CRISPR/Cas9 基因编辑技术主要是通过由 gRNA 指定的靶序列处产生双链 DNA 断裂 (Double strand breaks, DSB) 以刺激靶 DNA 修饰, 但由于 Cas9 核酸酶本身不具有直接改变 DNA 序列的能力, 只能依靠宿主细胞本身的修复机制, 如非同源末端连接 (Non-homologous end joining, NHEJ) 和微同源介导的 DNA 末端连接 (Microhomology-mediated end joining, MMEJ), 来修复这种 DSB 中间体, 但在此过程中会产生插入或删除结果的混合产物。其中, NHEJ 是较普遍存在于哺乳动物细胞中的修复机制, 该过程需要多种修复酶的集体参与将两个断裂的 DNA 强行连接到一起, 产生的错误缺失或插入会引起基因编码区碱基移码等问题, 从而导致编码区编码不正确, 在其修复过程中可以引入外源 DNA 片段作为修补模板, 或携带外源基因插入到靶基因指定位点 (COBB et al., 2015)。CRISPR/Cas9 基因编辑技术目前已被重新用作基因组编辑、转录干扰、表观遗传调节和基因组成像等由 sgRNA 引导的 DNA 靶向平台。使用 sgRNA 文库, 基于 CRISPR 的全基因组筛选可用于识别药物靶点或抗病基因, 如新的肿瘤抑制剂或致癌基因, 并快速评估药物靶点 (DOMINGUEZ et al., 2016; DOUDNA and CHARPENTIER, 2014; SHALEM et al., 2015)。另外, CRISPR/Cas9 基因编辑技术在病毒学领域的研究中被应用于探究病毒-宿主相互作用关系、发现病毒基因功能以及重组疫苗和抗病毒药物研发等 (SHI et al., 2021; STONE et al., 2021; TANG et al., 2016; TSO et al., 2019; 汤艳东, 2018)。由于 CRISPR/Cas9 基因编辑技术具有设计简单、使用简单和高效等优势, 已被迅速实施为一种用于广泛生物基因组操作的强大工具。

1.7.3 Prime 编辑

应对精确和高度通用的基因编辑技术的需求, 最近的研究报道了一种新型的基因编辑技术—Prime 编辑 (ANZALONE et al., 2019)。该技术最初是通过将化脓性链球菌 Cas9 (SpCas9) H840A 突变株与小鼠白血病病毒的野生型逆转录酶 (Reverse transcriptase, RT) 融合创建了第一代 Prime—PE1 (ANZALONE et al., 2019)。PE1 借助一种名为 pegRNA 的工程化引导 RNA, 其包含用于将 PE1 引导至基因组靶位点的间隔序列, 以及一个关键的 3'端延伸, 使所需的编辑序列被模板化。Prime-pegRNA 复合物结合与 pegRNA 间隔物互补的基因组靶位点后形成一个 R 环, 致使其中置换的 ssDNA 被 Prime 切割。在此过程中该缺口释放出 3'末端与 pegRNA 延伸杂交, 并启动 pegRNA

模板区的逆转录。通过目标 DNA 链的引物延伸进行 DNA 聚合，然后生成一个 3' DNA flap，该结构域包含与下游基因组序列的 Prime 和同源性。3' flap 通过 flap 相互转化置换基因组 DNA 的相邻链 (CHEN et al., 2021; FERREIRA DA SILVA et al., 2022)，切除移位的 5' flap 后连接剩余的切口，并形成一个新的二联体，其中一条基因组链包含 prime。最后 DNA 修复或复制将 prime 复制到互补链，使得原始编辑永久化 (CHEN and LIU, 2023)。为了提高编辑效率和减少未编辑链产生的偏差，研究开发团队对 Prime 进行多次优化及更新，目前已经开发至 PE3b，相较于最初代 Prime 效率提高了 3~5 倍。PE3b 可以在不损害编辑效率的情况下几乎可以消除基因编辑过程中产生的错误产物 (FERREIRA DA SILVA et al., 2022)。与 Cas 核酸酶和碱基编辑器相比，Prime 编辑器为基因组编辑提供了一系列独特的优势。由于所需的编辑是在 pegRNA 模板内编辑的，因此能以高精度安装大量不同的编辑类型。另外，Prime 编辑很少在非目标基因组位点诱导 DNA 变化。与 Cas 核酸酶和碱基编辑器不同，prime 编辑需要三个互补碱基配对的检查点才能进行高效编辑。大量研究表明 Prime 编辑已被发现在哺乳动物细胞 (GAO et al., 2022)、哺乳动物类器官 (SCHENE et al., 2020)、小鼠胚胎 (LIU et al., 2020b; PARK et al., 2021) 和植物 (JIN et al., 2021) 中诱导很少检测到的脱靶基因组变化。与其他基因编辑技术相比，Prime 编辑提供了更大的通用性、产品纯度和目标序列特异性。Prime 编辑的潜力推动了许多创新研究，以提高其效率，扩大其能力，并展示了其在基础研究和治疗中的应用。

1.8 研究目的及意义

pUL36 蛋白作为 PRV 中最大的被膜蛋白，其与衣壳蛋白 pUL25、pUL17 相互作用在成熟病毒粒子上形成 CATC 复合物，该复合物的形成对于稳定病毒衣壳及连接外层被膜结构具有重要意义，然而这三种蛋白的相互作用模式、CATC 完整结构及其在病毒感染细胞中的协同装配机制仍不清晰。本研究拟利用 CRISPR/Cas9 基因编辑技术构建基于 UL36 基因的重组荧光 PRV 毒株和 UL17 基因缺失病毒，研究 pUL36 蛋白与 CATC 其他亚基的细胞内装配动力学及 pUL17 蛋白对 CATC 正确装配的重要性。同时利用冷冻电镜技术和 AlphaFold 预测技术初步探索 CATC 的体外组装机理。这些研究结果将为揭示 PRV 中 CATC 装配模式提供新视角，为深入探索 PRV 被膜网络装配机制奠定基础。

第二章 重组荧光病毒 rPRV-36N-EGFP 和 rPRV-36C-EGFP 的构建及鉴定

pUL36 蛋白作为 PRV 中最大的被膜蛋白, 在介导细胞内病毒衣壳的向细胞核转运以及病毒衣壳成熟出核后的被膜组装中均发挥重要的作用, 同时其是参与组装 CATC 结构的关键组分。本研究拟利用 CRISPR/Cas9 基因编辑技术构建 pUL36 蛋白标记的重组荧光病毒, 并鉴定其在细胞上的生物学特性, 为后续研究 PRV 感染细胞中 CATC 各亚基的细胞内动力学提供研究基础。

2.1 主要实验材料

PRV HLJ-2013 (GenBank 序列号: MK080279) 毒株由本实验室分离并保存, PK15 细胞和 PX330-Cas9、pOK 及 pEGFP-C3 质粒均由本实验室保存。

实验用 BALB/c 小鼠购自北京维通利华实验动物技术有限公司。

BbsI、XhoI 和 BamHI 核酸内切酶均购自 Thermo 公司; 氨苄青霉素和卡那霉素均购自 amresco 公司; opti-MEM 和 DMEM 细胞培养基、胎牛血清均购自 Gibco 公司; PBS 购自武汉普诺赛生命科技有限公司; PEI 购自 PolyScience 公司; T4 连接酶和 PrimeSTAR 高保真酶均购自 Takara 公司; 同源重组酶购自诺唯赞公司; 蔗糖和甲基纤维素均购自 Sigma 公司; DH5 α 感受态、胶回收试剂盒、小提试剂盒、无内毒素大提试剂盒均购自北京天根公司; Master PureTM DNA Purification Kit 购自 Epicentre 公司; 体液病毒 DNA/RNA 小量提取试剂盒购自 AxyPrep 公司。

2.2 主要实验仪器

PCR 仪 (Mastercycler[®] nexus)、常温高速离心机 (5427R) 均购自 Eppendorf 公司; 水浴锅 (DK-8D) 购自上海一恒科技公司; 金属浴 (BTC-100D) 购自杭州米欧仪器公司; 光学显微镜 (Eclipse E200) 购自 Nikon 公司; 涡旋振荡器 (M37610-33CN) 购自 Thermo 公司; 超速离心机 (OptimaTM XPN-100) 购自 Beckman 公司; 蔗糖密度梯度制备仪 (BioComp Gradient Master Model 108) 购自 Biocomp 公司; 核酸电泳仪 (DYCP-31CN) 购自北京六一仪器厂; 倒置荧光显微镜 (EVOS M5000) 购自 Life 公司; 透射电子显微镜 (H7650) 购自 HITACHI 公司。

2.3 实验方法

2.3.1 pUL36 蛋白单克隆抗体的制备

2.3.1.1 实验动物伦理

BALB/c 小鼠由哈尔滨兽医研究所动物实验中心饲养及管理, 本实验符合哈尔滨兽医研究所动物实验中心实验动物福利伦理标准, 编号为: HRVI-210621-03。

2.3.1.2 pUL36 截短蛋白的表达及纯化

以本实验室分离毒株 PRV HLJ-2013 基因组为参考序列, 将 UL36 基因 3228-6014 区段序列经

由华大基因股份有限公司优化合成并克隆至 pET29a-8His-NusA 质粒上形成重组质粒 pET29a-UL36-2。将得到的重组质粒阳转至 BL21 (DE3) 大肠杆菌感受态中进行蛋白的表达及纯化。将过夜活化的菌按 1: 100 的比例接种至含有卡那霉素 (K⁺) 抗性的 LB 培养基中后置于 37°C, 220 rpm/min 的摇床中培养, 待 OD₆₀₀ 值达到 0.7 时降温至 16°C 并加入 0.5 mmol/L 的 IPTG 诱导剂进行过夜诱导。于 7,000×g 离心 10 min 收集细菌后按照 40 mL/L 菌液量加入蛋白纯化 Buffer1 (25 mmol/L Tris-HCl pH8.0, 50 mmol/L NaCl, 10% glycerol, 2 mmol/L DTT) 进行菌体重悬, 向重悬菌液中加入终浓度为 1 mmol/L 的 PMSF 蛋白酶抑制剂, 上下颠倒混匀后进行菌体破碎。超声破碎仪设置超声时间 3 s, 间隔时间 5 s, 功率为 300 W 进行细菌破碎。将超声好的菌液在 4°C 条件下 13,000×g 离心 1 h, 收集离心上清液进行亲和层析纯化。

由于重组质粒 N 末端带有 8×His 标签, 故选用镍柱树脂进行纯化, 吸取 2 mL 镍柱树脂悬液加入到重力柱中, 待树脂沉降后加入 6×5 mL 蛋白纯化 Buffer1 进行柱平衡, 然后加入离心上清液进行蛋白的亲和挂柱, 加入 8×5 mL 蛋白纯化 buffer1 清洗树脂中残留的杂质蛋白, 向树脂悬液中加入 40 μL 的 PPase 蛋白酶反复吹匀 3 次后进行 4°C 酶切过夜。将过夜酶切的蛋白溶液收集至 50 mL 离心管中后使用 100 kDa 大小的超滤管离心 3,000×g, 20 min 进行蛋白浓缩, 吸取 10 μL 的浓缩蛋白样品加入等量 2×蛋白 Loading Buffer 于 100°C 金属浴煮样 10 min 后跑胶鉴定蛋白纯化情况。树脂使用蛋白纯化 Buffer2 (25 mmol/L Tris-HCl pH8.0, 50 mmol/L NaCl, 10% glycerol, 300 mmol/L imidazole, 2 mmol/L DTT) 进行蛋白洗脱后加入 20 mL 蛋白纯化 Buffer1 平衡并留存至 4°C 冰箱中重复使用。

2.3.1.3 小鼠免疫及单克隆细胞株筛选

将纯化的蛋白以 100 μg 的量与弗氏完全佐剂等体积混合乳化后皮下注射 6 周龄 BALB/c 雌鼠, 间隔 14 d 后以 100 μg 蛋白量与弗氏不完全佐剂等体积混合乳化后皮下接种小鼠, 分别采集第二次和第三次免疫后小鼠血清进行 ELISA 实验检测血清中抗体效价。于第四次加强免疫后 3 d 取小鼠脾细胞与骨髓瘤细胞 SP2/0 进行细胞融合, 细胞融合后 8 d 观察孔中细胞融合状态并补充含 20% FBS 的 DMEM 培养基继续培养, 待生长至第 10 d 吸取融合细胞上清进行 ELISA 检测, 选择 OD₄₀₅ 值高的细胞孔进行 10 倍稀释法亚克隆, 经过 3 次亚克隆后获得能够分泌针对 pUL36 蛋白的单克隆细胞株。将此单克隆细胞株进行扩培增殖, 进行单克隆细胞传代稳定性检测和亚型鉴定。

2.3.1.4 单抗腹水制备及纯化

首先向 10 周龄小鼠腹腔中注射 500 μL 弗氏不完全佐剂, 观察 7 d 后取 1×10⁶ 个单克隆细胞经由腹腔注射接种小鼠, 接种后 10 d 左右观察小鼠腹部情况并使用采集针收集小鼠腹水。将收集到的小鼠腹水使用 Protein G 树脂进行抗体纯化, 小鼠腹水以 1: 20 的比例稀释至抗体纯化 Buffer (20 mmol/L Na₃PO₄, pH7.0) 中, 使用 AKTA 蛋白纯化系统进行抗体亲和纯化, 首先使用 0.5 mol/L NaOH 和水分别清洗系统, 将预装柱 Protein G 装至仪器接口上, 以 1 mL/min 的流速使用抗体纯化 Buffer 平衡 Protein G 柱, 平衡后经进样口流入稀释好的腹水抗体溶液, 然后使用抗体纯化 Buffer 进行 Protein G 柱的洗杂, 最终使用抗体洗脱 Buffer (0.1 mol/L glycine-HCl, pH 2.7) 将抗体洗脱

至加有 100 μ L 0.5 mol/L Tris-HCl (pH 9.0) 缓冲液的 15 mL 离心管中。吸取 10 μ L 纯化抗体溶液加入等体积的 2 \times 蛋白 Loading Buffer 于 100 $^{\circ}$ C 金属浴煮样 10 min 后跑蛋白电泳鉴定抗体纯化情况, 测定纯化的抗体浓度并加入 50% 甘油后分装置于 -80 $^{\circ}$ C 冰箱中保存。

2.3.1.5 单抗鉴定

准备铺有单层的 PK15 细胞并以 MOI=1 病毒量接种 PRV, 待病毒感染后 24 h 弃掉细胞上清进行间接免疫荧光实验鉴定单抗特异性。加入 500 μ L 4% 多聚甲醛进行室温固定 30 min, 然后使用 PBS 溶液润洗 3 次, 加入 500 μ L 0.1% Triton X-100/PBS 透膜缓冲液于室温静置 15 min, 使用 PBS 溶液润洗 3 次后加入 500 μ L 1% BSA/PBS 封闭缓冲液于室温静置孵育 30 min。使用 0.1% Triton X-100/PBS 透膜缓冲液以 1: 1,000 比例稀释纯化的单抗和小鼠阴性血清, 于室温摇床孵育 1 h。PBS 溶液润洗 3 次后使用 1% BSA/PBS 封闭缓冲液以 1: 2,000 比例稀释羊抗鼠荧光二抗 Alexa Fluor 488 并于室温摇床孵育 1 h。使用 PBS 溶液润洗 3 次后置于倒置荧光显微镜下观察细胞内荧光情况。

准备 30 μ L 纯化的 PRV 溶液并加入等体积的 2 \times 蛋白 Loading Buffer 混匀后置于 100 $^{\circ}$ C 金属浴中煮沸 10 min 跑蛋白电泳。设置电泳仪参数 160 V 电泳 90 min, 电泳完成后进行湿转 100 V 转膜 2 h。室温下使用 5% 脱脂乳进行膜封闭, 然后以 1: 1,000 比例稀释单抗和小鼠阴性血清于室温摇床孵育膜 1 h。使用 TBST 溶液洗膜 3 次, 每次 5 min, 以 1: 10,000 比例稀释羊抗鼠荧光二抗 Alexa Fluor 800 于室温摇床避光孵育膜 1 h。使用 TBST 溶液避光洗膜 3 次后使用近红外荧光扫描成像系统进行成像。

2.3.2 sgRNA 引物、同源臂及荧光蛋白标签引物设计

选取 UL36 基因 N 末端启动密码子 (ATG) 和 C 末端终止密码子 (TAA) 前后各 100 bp 核苷酸序列, 分别提交至 CCTop 网站 (<https://cctop.cos.uni-heidelberg.de:8043/>) 进行滑窗查询 PAM 靶序列, 选择预测脱靶效率低及评分较高 (CRISPRater score \geq 70) 的 sgRNA, 设计 sgRNA 引物如表 2-1 所示:

表 2-1 sgRNA 引物

Table 2-1 Primers of sgRNA

引物名称	序列 (5'→3')
36N-sgRF1-F	CACCGACGGCCGACGCGGTGGTCGT
36N-sgRF1-R	AAACACGACCACCGCGTCGGCCGTC
36N-sgRF2-F	CACCGTTCAGCCATGACGGCCGACG
36N-sgRF2-R	AAACCGTCGGCCGTCATGGCTGAAC
36N-sgRF3-F	CACCGATAGCCGACGACCACCGCGT
36N-sgRF3-R	AAACACGCGGTGGTCGTCGGCTATC
36N-sgRR1-F	CACCGACCACCGCGTCGGCCGTCA
36N-sgRR1-R	AAACTGACGGCCGACGCGGTGGTC
36N-sgRR2-F	CACCGAAATAACACACGCGCGTGG

表 2-1 (续) sgRNA 引物

Table 2-1 (continued) Primers of sgRNA

引物名称	序列 (5'→3')
36N-sgRR2-R	AAACCCACGCGCGTGTGTTATTTTC
36N-sgRR3-F	CACCGTGAAATAACACACGCGCGTG
36N-sgRR3-R	AAACCACGCGCGTGTGTTATTTTCAC
36C-sgRF1-F	CACCgCAGCGCCCGCCGGTTCAACG
36C-sgRF1-R	AAACCGTTGAACCGGGCGGCGCTGC
36C-sgRF2-F	CACCgACCGCAGAGACAAACAGGTT
36C-sgRF2-R	AAACAACCTGTTTGTCTCTGCGGTC
36C-sgRR1-F	CACCGAATCAGGCGGACCTGAAAT
36C-sgRR1-R	AAACATTTTCAGTCCGCCTGATTC
36C-sgRR2-F	CACCgTTTATTAACCAAGAATCAGG
36C-sgRR2-R	AAACCCTGATTCTTGGTTAATAAAC
36C-sgRR3-F	CACCGAGACGCGGGCGAACCTCAA
36C-sgRR3-R	AAACTTGAGGTTCCGCCGCGTCTC

选择 UL36 基因 N 端起始密码子和 C 端终止密码子前后各约 600 bp 核苷酸序列作为同源臂, 同时将荧光标签 EGFP 插入到同源臂中间指定位置, 故设计同源臂及荧光标签引物如表 2-2 所示:

表 2-2 同源臂及荧光标签引物

Table 2-2 Primers of homologous arm and Fluorescent tag

引物名称	序列 (5'→3')	片段长度
36N-armL-F	CCACTAGTCCGAGGCCTCGAGTGGTCTGTTGGGCGAGG	596 bp
36N-armL-R	CATGGACGAGCTGTACAAGACGGCCGACGCGGTG	
36N-EGFP-F	CACCGCGTCGGCCGTCTTGTACAGCTCGTCCATG	748 bp
36N-EGFP-R	GTGTGTTATTTTCAGCCATGGTGAGCAAGGGCGAG	
36N-armR-F	CTCGCCCTTGCTCACCATGGCTGAAATAACACAC	664 bp
36N-armR-R	CGCCACGGCGATATCGGATCCGCCGAGGTCAACACG	
36C-armL-F	CCACTAGTCCGAGGCCTCGAGCGGACCCTGTTTATC	629 bp
36C-armL-R	GGACGAGCTGTACAAGTAATAAATTGTTTATTACC	
36C-EGFP-F	GTAATAAACAATTTATTACTTGTACAGCTCGTCCA	748 bp
36C-EGFP-R	GGTCCGCCTGATTCTTGGTGTGAGCAAGGGCGAG	
36C-armR-F	CTCGCCCTTGCTCACACCAAGAATCAGGCGGACC	631 bp
36C-armR-R	CGCCACGGCGATATCGGATCCGCTGCCGCCGCCCC	

以上所有引物均送至睿博兴科生物技术有限公司进行合成。

2.3.3 sgRNA 重组质粒构建

将各组 sgRNA 引物进行变性、退火以获得双链 sgRNA 产物, 条件如下: 95°C, 5 min;

60°C/53°C, 1 min; 4°C保温。使用 BbsI 内切酶进行 PX330-Cas9 质粒的酶切, 酶切体系为: PX330-Cas9, 5 μ L; BbsI, 1 μ L; 10 \times FD Buffer, 5 μ L; H₂O, 39 μ L。将以上各组分充分混匀后放置于 37°C 水浴锅中酶切 1 h, 然后置于 80°C 金属浴放置 5 min 进行酶灭活, 使用 1% 琼脂糖凝胶进行核酸电泳, 紫外灯下切出目的条带位置凝胶, 使用胶回收试剂盒进行回收。将 sgRNA 产物与线性化的 PX330-Cas9 载体进行 T4 连接, 连接体系为: 10 \times T4 buffer, 1 μ L; T4 Ligase, 1 μ L; 线性化 PX330-Cas9 载体, 4 μ L; sgRNA 产物, 4 μ L。将以上各组分充分混匀后置于 16°C 金属浴中连接过夜。取 DH5 α 感受态细胞置于冰上融化, 将全部连接产物加入到感受态细胞中, 轻弹管底进行混匀, 置于冰上作用 30 min, 于 42°C 水浴中热激 90 s, 然后立即置于冰上冷却 3-5 min, 向感受态细胞中加入 900 μ L 无抗 LB 培养基, 于 37°C, 220 rpm/min 摇床中摇菌 1 h。将菌液离心 6,000 \times g, 3 min, 剩余 100 μ L 上清后重悬菌体, 将其涂布于含有氨苄青霉素 (Ampicillin, A⁺) 的 LB 平皿上, 放置于 37°C 细菌培养箱中倒置培养 13~16 h。从过夜培养的平皿上挑取 1~2 个单克隆菌落置于 5 mL A⁺ 的 LB 培养基中进行扩播 14 h, 使用小提质粒试剂盒提取质粒后送至睿博兴科生物技术有限公司进行测序。经质粒测序正确后, 使用无内毒素大提质粒试剂盒进行 sgRNA 重组质粒的质粒提取, 测定质粒浓度后保存于 -40°C 冰箱备用。

2.3.4 PRV 基因组提取

使用 MasterPure™ DNA Purification Kit 进行 PRV 基因组的提取, 具体方法如下:

- (1) 首先准备 150 μ L 2 \times T&C 裂解液并加入 1 μ L 浓度为 50 μ g/ μ L 的 Proteinase K;
- (2) 取 150 μ L 纯化的 PRV 溶液加入到裂解液中并充分混匀;
- (3) 将以上混合液体置于 65°C 水浴锅中孵育 15 min, 每 5 min 取出上下颠倒混匀;
- (4) 待样品冷却至 37°C 后向其中加入 1 μ L 浓度为 5 μ g/ μ L 的 RNase A, 涡旋混匀;
- (5) 37°C 孵育 30 min, 然后将样品置于冰上冷却 3~5 min 后进行病毒 DNA 沉淀;
- (6) 向 300 μ L 裂解样品中加入 175 μ L MPC 蛋白沉淀试剂, 涡旋混匀 10 s;
- (7) 4°C 条件下, 10,000 \times g 离心 10 min;
- (8) 将离心后上清转移至新的 1.5 mL EP 管中, 向管中加入 500 μ L 异丙醇, 颠倒多次混匀;
- (9) 重复步骤 (7)
- (10) 将管中上清液吸干后使用 70% 乙醇润洗两遍, 再次进行离心后置于细胞超净台中晾干, 向管中加入 30 μ L 高压灭菌水过夜溶解 DNA 沉淀, 测定浓度后置于 -40°C 冰箱备用。

2.3.5 同源供体重组质粒构建

以本实验室 PRV 毒株 HLJ-2013 (GenBank 识别号: MK080279) 基因组为模板进行基因插入位点两端同源臂序列的扩增, EGFP 荧光标签从 pEGFP-C3 载体进行扩增, 共经过两轮融合 PCR 反应得到最终同源供体重组质粒。首先分别扩增基因插入位点两侧同源臂及 EGFP 荧光标签, PCR 体系如表 2-3 所示:

表 2-3 PCR 反应体系

Table 2-3 PCR reaction system

试剂	体积
2×PrimeSTAR GC Buffer	25 μ L
dNTP Mixture (2.5 mM)	8 μ L
上游引物 F (10 μ M)	4 μ L
下游引物 R (10 μ M)	4 μ L
模板	1 μ L
PrimeSTAR HS DNA Polymerase	1 μ L
H ₂ O	7 μ L

将以上各组分充分混匀后进行设置 PCR 程序进行扩增, 程序如下: 95°C 预变性 5 min; 98°C 变性 15 s, 65°C 退火 30 s, 72°C 延伸 1 min, 循环 35 次; 72°C 延伸 10 min; 4°C 保温。PCR 完成后使用 1% 琼脂糖凝胶进行核酸电泳, 切胶回收目的基因片段后进行融合 PCR。

第一轮融合 PCR 是将左同源臂 36N-armL (或 36C-armL) 与 EGFP 荧光标签进行融合, 首先配制 PCR 体系如下: 2×PrimeSTAR GC Buffer, 25 μ L; dNTP Mixture, 4 μ L; 36N-armL/EGFP (或 36C-armL/EGFP), 1.5 μ L; PrimeSTAR HS DNA Polymerase, 1 μ L; H₂O, 13 μ L。将以上组分加入到 PCR 管中充分混匀后进行 PCR 反应, 程序为: 95°C 预变性 5 min; 98°C 变性 15 s, 58°C 退火 20 s, 72°C 延伸 40 s, 循环 13 次; 72°C 延伸 10 min。向以上反应体系中加入 36N-armL-F (36C-armL-F) 和 36N-EGFP-R (36C-EGFP-R) 引物各 2 μ L, 混匀后再次进行 PCR 扩增, 设置程序如下: 95°C 预变性 5 min; 98°C 变性 15 s, 68°C 退火 30 s, 72°C 延伸 90 s; 98°C 变性 15 s, 67°C 退火 30 s, 72°C 延伸 90 s; 98°C 变性 15 s, 66°C 退火 30 s, 72°C 延伸 90 s; 98°C 变性 15 s, 65°C 退火 30 s, 72°C 延伸 90 s, 循环 32 次; 72°C 延伸 10 min。PCR 完成后使用 1% 琼脂糖凝胶进行核酸电泳, 切胶回收后进行第二次融合 PCR。第二次融合 PCR 反应是将上一轮产物 36N-armL-EGFP (或 36C-armL-EGFP) 与右同源臂 36N-armR (36C-armR) 进行融合, PCR 体系及反应程序与此前一致, 最后获得 36N-armL-EGFP-armR 和 36C-armL-EGFP-armR 同源供体序列。

将获得的同源供体序列连接至 pOK 载体上, 首先对载体进行线性化, 酶切体系如下: 10×FD Buffer, 5 μ L; XhoI 内切酶, 2.5 μ L; BamHI 内切酶, 2.5 μ L; pOK 质粒, 20 μ L; H₂O, 20 μ L。将以上各组分充分混匀后置于 37°C 水浴锅中酶切 40 min, 然后置于 80°C 金属浴中进行酶灭活 5 min, 经核酸电泳、切胶回收获得线性化 pOK 载体。使用同源重组将 36N-armL-EGFP-armR 和 36C-armL-EGFP-armR 同源供体序列分别与线性化 pOK 载体连接, 连接体系如下: 5×CE Buffer, 4 μ L; ExnaseII, 2 μ L; 36N-armL-EGFP-armR/36C-armL-EGFP-armR 产物, 5 μ L; 线性化 pOK 载体, 3 μ L; H₂O, 6 μ L。将上述各组分充分混匀后置于 37°C 水浴锅中作用 30 min, 然后立即置于冰上冷却。取 DH5 α 感受态细胞置于冰上融化, 取 10 μ L 连接产物加入到感受态细胞中, 轻弹管底进行混匀, 置于冰上作用 30 min, 于 42°C 水浴中热激 90 s, 然后立即置于冰上冷却 3~5 min, 向感受态细胞中加入 900 μ L 无抗 LB 培养基, 于 37°C, 220 rpm/min 摇床中摇菌 1 h。将菌液离心 6,000×g, 3 min, 剩余 100 μ L 上清后重悬菌体, 将其涂布于含有卡那霉素 (Kanamycin, K⁺) 的 LB 平皿上, 放置于 37°C 细菌培养箱中倒置培养 13~16 h。挑取过夜培养的菌落进行 PCR 鉴定, 将条带正确的菌落进行培养后小提质粒, 测定浓度后送至睿博兴科生物技术有限公司进行测序。

将测序正确的质粒大提后置于-40°C冰箱备用。

2.3.6 sgRNA、同源供体重组质粒、PRV 基因组共转染

转染前一天将 PK15 细胞铺 6 孔板，待细胞生长汇合度达到 60% 时准备转染。根据 UL36 基因 N 末端插入 EGFP 标签设计 sgRNA 进行配对共组成 9 种组合，分别为：36N-sgRNA-F1/R1、36N-sgRNA-F1/R2、36N-sgRNA-F1/R3、36N-sgRNA-F2/R1、36N-sgRNA-F2/R2、36N-sgRNA-F2/R3、36N-sgRNA-F3/R1、36N-sgRNA-F3/R2、36N-sgRNA-F3/R3。根据 UL36 基因 C 末端插入 EGFP 标签设计 sgRNA 进行配对组合，分别为：36C-sgRNA-F1/R1、36C-sgRNA-F1/R2、36C-sgRNA-F1/R3、36C-sgRNA-F2/R1、36C-sgRNA-F2/R2、36C-sgRNA-F2/R3。将 2 μg 的 sgRNA 质粒（F 与 R 各 1 μg ）、1 μg 的 PRV 基因组和 1 μg 同源供体线性化质粒加入到 100 μL 的 opti-MEM 培养基中充分混匀；按照质粒与 PEI 转染试剂质量体积比为 1 μg : 3 μL 的比例取 12 μL 的 PEI 转染试剂加入到 100 μL 的 opti-MEM 培养基中充分混匀，室温静置 5 min。将以上两组溶液混合后充分混匀并室温静置 20 min。转染的细胞使用 PBS 溶液润洗两遍之后加入 1.5 mL 的 opti-MEM 培养基，然后将上述混合液轻轻滴入细胞孔中，将细胞板置于 37°C 细胞培养箱中继续培养 8 h 后进行换液。使用 PBS 溶液润洗两遍细胞，更换为 2 mL 含有 2% FBS 的 DMEM 培养基继续培养，时刻观察细胞病变情况。

2.3.7 病毒收集及蚀斑纯化

待转染的细胞发生完全病变后收集细胞，将六孔板中细胞吹匀后转移至 1.5 mL 离心管中，2,000 \times g 离心 15 min 后弃沉淀，上清转移至新的 EP 管中准备进行蚀斑纯化。

PK15 细胞传代至 6 孔板中，待细胞生长汇合度达到 80% 时准备进行蚀斑试验。首先准备 5 只 1.5 mL EP 管并向各管中加入 900 μL 无血清 DMEM 培养基，对收集的细胞病毒液进行 10 倍稀释，从原液中吸取 100 μL 病毒液加入到含有 900 μL 无血清 DMEM 培养基的 EP 管中，充分混匀后吸取转移 100 μL 病毒液至下一个 EP 管中，共计得到 10^{-1} ~ 10^{-5} 共 5 个稀释度病毒液。使用 PBS 润洗一遍细胞后，将 10^{-3} ~ 10^{-5} 稀释度的病毒液加入到细胞孔中。将六孔板细胞置于 37°C 细胞培养箱中孵育 2 h，使用 PBS 润洗两遍后向细胞孔中加入 2 mL 含有 2% FBS 的甲基纤维素-DMEM 培养基，继续置于 37°C 细胞培养箱中培养。待细胞培养 48 h 取出细胞板准备进行蚀斑挑取，首先在细胞板底部使用记号笔标记出细胞病变斑点，然后使用倒置荧光显微镜进行标记位点的斑点荧光观察确认斑点处发出绿色荧光后进行蚀斑挑取。首先准备若干 1.5 mL EP 管并向其中加入 400 μL 无血清 DMEM 培养基，使用 1000 μL 枪头垂直伸入细胞板底部进行斑点的抠取，并置于 EP 管中进行混匀，于显微镜下观察斑点位置细胞确认病变位置细胞提取干净。将挑取的细胞蚀斑病毒液于液氮/37°C 水浴反复冻融两次，然后 2,000 \times g 离心 15 min，将上清液转移至新的 EP 管中准备进行第二次蚀斑纯化实验。第二次蚀斑纯化方法同前一致，但由于蚀斑斑点病毒量较少，在进行接毒时接种 10^{-2} 和 10^{-3} 两个稀释度的病毒液，经过两次蚀斑纯化的病毒可以进行病毒的传代与鉴定。

2.3.8 重组荧光病毒的传代、基因组提取及 PCR 鉴定

准备铺满六孔板的 PK15 细胞，使用 PBS 润洗两遍细胞后更换为无血清 DMEM 培养基，取 100 μL 蚀斑纯化后的病毒液加入到细胞孔中混匀，将细胞板置于 37°C 细胞培养箱中继续培养 48 h。细胞完全病变后将细胞吹落后转移至 1.5 mL EP 管中进行液氮/37°C 水浴反复冻融两次，2,000 \times g 离心 15 min 后将上清转移至新的 EP 管中，取出 50 μL 病毒用于继续传代，剩余病毒液置于 -40°C 保存备用。构建的重组荧光病毒分别命名为 rPRV-36N-EGFP 和 rPRV-36C-EGFP，病毒连续传代 6 代后取一定体积的各代次病毒液进行病毒基因组提取用于 PCR 鉴定。

使用 AxyPrep 体液病毒 DNA/RNA 小量提取试剂盒纯化重组荧光病毒基因组，具体步骤如下：

- (1) 取各代次病毒液 200 μL 置于 1.5 mL 的 EP 管中，向其中加入 200 μL Buffer V-L 后涡旋振荡混匀，置于室温静置 5 min；
- (2) 向管中加入 75 μL Buffer V-N，涡旋振荡混匀后于 12,000 \times g 离心 5 min；
- (3) 离心后将上清转移至新的 2 mL 的 EP 管中，向其中加入 300 μL 含 1% 冰乙酸的异丙醇溶液，上下颠倒混匀 6~8 次；
- (4) 将纯化柱置于 2 mL 离心管中，将上述混合液全部转移至纯化柱中，于 6,000 \times g 离心 1 min；
- (5) 离心后弃滤液，将纯化柱置回 2 mL 离心管中，加入 500 μL Buffer W1A 后室温静置 1 min，然后 12,000 \times g 离心 1 min；
- (6) 再次弃掉滤液，向纯化柱中加入 800 μL Buffer W2，于 12,000 \times g 离心 1 min；
- (7) 将纯化柱置回 2 mL 离心管后于 12,000 \times g 空离 2 min；
- (8) 将纯化柱置于新的 1.5 mL 离心管中，放置于细菌超净台中进行乙醇挥发晾干，向纯化柱膜中央滴加 30 μL 无菌水，室温静置 2 min 后于 12,000 \times g 离心 90 s 洗脱病毒 DNA。

以提取的重组荧光病毒 DNA 作为模板，野生型 PRV 基因组作为阳性对照，使用设计的鉴定引物（表 2-4）进行 PCR 鉴定。PCR 体系如下：2 \times PrimeSTAR GC Buffer，10 μL ；dNTP Mixtu re，2 μL ；36N-detection-F/R，各 1 μL ；PrimeSTAR HS DNA Polymerase，0.25 μL ；基因组模板，2 μL ；H₂O，3.75 μL 。将上述各组充分混匀后进行 PCR 扩增，扩增程序如下：95°C 预变性 5 min；98°C 变性 15 s，60°C 退火 30 s，72°C 延伸 1 min，循环 30 次；72°C 延伸 10 min；4°C 保存。配制 1% 琼脂糖凝胶进行核酸电泳，鉴定 UL36 基因目的位置荧光标签插入及稳定情况，同时胶回收目的条带送至睿博兴科生物技术有限公司进行测序鉴定荧光标签是否插入正确。

表 2-4 重组荧光病毒鉴定引物

引物名称	序列 (5'→3')	片段长度
36N-detection-F	CGCGCCCTCGTAGACGATCTTG	500 bp
36N-detection-R	GCCTTCACGCCCAGGAGCTG	
36C-detection-F	CAAGTCTTTGGGTCCCACAACC	500 bp
36C-detection-R	CGACGAGGACGAGGACGTCTCT	

2.3.9 重组荧光病毒的纯化

分别收集接种 PK15 细胞的 rPRV-36N-EGFP 和 rPRV-36C-EGFP 病毒上清液 200 mL，4°C 条

件下离心 3,000×g, 30 min 去除细胞碎片, 取上清进行超速离心。在进行超速离心富集病毒的过程中向离心管底部加入 5 mL 的 20% 蔗糖溶液作为蔗糖垫, 4°C 条件下 100,000×g 离心 2 h 后弃上清保留沉淀。使用 PBS 溶液浸泡沉淀 30 min 后重悬, 并准备进行蔗糖密度梯度离心。使用连续密度梯度制备仪制备 10%~60% 的连续蔗糖密度梯度, 将重悬的病毒液加入到蔗糖梯度上层, 4°C 条件下 160,000×g 离心 3 h 后吸取病毒层溶液。将吸出的病毒溶液转移到 PBS 溶液中并在 4°C 条件下 100,000×g 离心 1 h 进行病毒脱糖, 弃上清后使用 1 mL PBS 溶液重悬保存于 -80°C 备用。

2.3.10 重组荧光病毒的 Western blot 鉴定

各取 20 μL 纯化的野生型 PRV、rPRV-36N-EGFP 和 rPRV-36C-EGFP 病毒液加入等体积 2×蛋白 Loading Buffer 混匀后置于 100°C 金属浴中煮沸 10 min 跑蛋白电泳。设置电泳仪参数 160 V 电泳 1 h 15 min, 电泳完成后进行湿转 100 V 转膜 2 h。室温下使用 5% 脱脂乳进行膜封闭, 然后以 1:1,000 比例稀释 EGFP 抗体和 pUL36 蛋白单抗于室温摇床孵育膜 1 h。使用 TBST 溶液洗膜 3 次, 每次 5 min, 以 1:10,000 比例稀释羊抗鼠荧光二抗 Alexa Fluor 800 于室温摇床避光孵育膜 1 h。使用 TBST 溶液避光洗膜 3 次后使用近红外荧光扫描成像系统进行成像。

2.3.11 重组荧光病毒的 TCID₅₀ 测定

准备铺于 96 孔板的细胞生长汇合度达 80% 的 PK15 细胞, 使用稳定传代至 P5 代的 rPRV-36N-EGFP 和 rPRV-36C-EGFP 进行 TCID₅₀ 的测定。首先准备若干 1.5 mL 的 EP 管并向每管中加入 900 μL 无血清 DMEM 培养基, 将冻存在 -40°C 冰箱中的 P5 代 rPRV-36N-EGFP 和 rPRV-36C-EGFP 取出后于室温融化, 取 100 μL 病毒液加入至第一个 EP 管中, 涡旋混匀 10 s 后取 100 μL 病毒混合液加入到下一个 EP 管中, 以此类推, 倍比稀释最终得到 10⁻¹~10⁻¹¹ 稀释度的病毒液。使用 PBS 润洗一遍细胞后将上述各稀释度病毒液按每孔 100 μL 的体积加入到细胞板中, 最后一列细胞孔中加入 100 μL 的无血清 DMEM 培养基作为空白对照。将细胞板置回 37°C, 5% CO₂ 温箱中继续培养 60 h 后观察细胞病变情况, 并统计各病毒稀释度病变孔数, 按 Reed-Muench 法计算 rPRV-36N-EGFP 和 rPRV-36C-EGFP 的 TCID₅₀ 滴度。

2.3.12 重组荧光病毒的一步生长曲线测定

准备铺于 6 孔板的细胞生长汇合度达到 70%~90% 的 PK15 细胞, 使用稳定传代至 P5 代的 rPRV-36N-EGFP 和 rPRV-36C-EGFP 进行一步生长曲线的测定。以 MOI=10 的病毒量接种 PK15 细胞, 将接种病毒的细胞板置于 4°C 条件下孵育 1 h, 然后使用 PBS 润洗两遍细胞后更换为无血清 DMEM 培养基, 将细胞培养板置回 37°C, 5% CO₂ 培养箱中继续培养。分别于 0 h、4 h、8 h、12 h、16 h、20 h、24 h、28 h、32 h、36 h 收集细胞上清液, 于 4°C 条件下 2,000×g 离心 15 min, 将上清重新转移至新的 1.5 mL 离心管中暂存于 -40°C 冰箱。测定各时间点收集的病毒液的 TCID₅₀ 滴度, 重复实验 3 次, 计算各时间点病毒 TCID₅₀ 平均值并绘制一步生长曲线。

2.3.13 重组荧光病毒的纯化及形态学鉴定

取 20 μL 纯化的野生型 PRV、rPRV-36N-EGFP 和 rPRV-36C-EGFP 病毒悬液分别制备电镜负染样品，首先对电镜碳支持膜载网进行辉光放电，将病毒液滴加至样品制备工具台上，使用镊子将载网置于液滴上进行病毒吸附 1 min，使用滤纸吸干载网上多余液体后，将载网放置于 2% 磷钨酸染色液的液滴上染色 30 s，然后使用滤纸将载网上剩余的染色液吸干，于室温静置晾干后使用透射电子显微镜进行观察。

2.4 实验结果

2.4.1 pUL36 蛋白单克隆抗体制备

2.4.1.1 pUL36 截短蛋白的表达及纯化

使用基因优化合成的 pET29a-UL36-2 重组质粒进行目的蛋白的诱导表达，通过镍重力柱亲和层析纯化 pUL36 截短蛋白。蛋白纯化结果如图 2-1 所示，pUL36 截短蛋白预计大小约为 103 kDa，载体所带促溶标签 NusA 及纯化标签大小约为 60 kDa，经表达之后蛋白大小约为 163 kDa 左右，与电泳结果基本一致。为获得单一 pUL36 截短蛋白，使用纯化的 PPase 蛋白酶进行酶切过夜，经电泳可见位于 100~130 kDa 区间的蛋白条带，大小与预期结果相同（图 2-1），经超滤浓缩后可用于免疫小鼠。

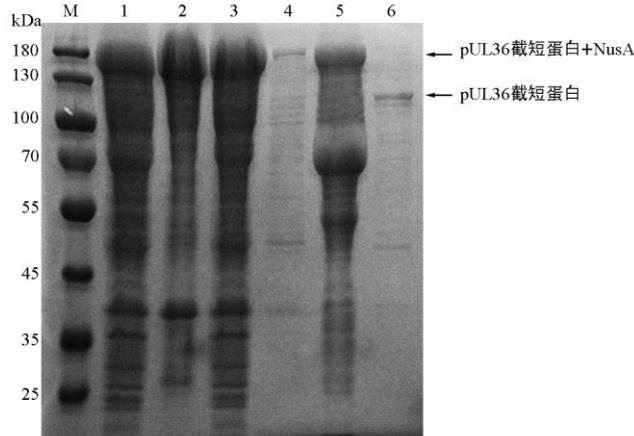


图 2-1 pUL36 截短蛋白的纯化

M: 蛋白 marker; 1: pET29a-UL36-2 诱导菌液超声上清; 2: pET29a-UL36-2 诱导菌液超声沉淀; 3: pET29a-UL36-2 纯化流穿液; 4: pET29a-UL36-2 纯化洗杂液; 5: pET29a-UL36-2 纯化树脂; 6: pUL36 截短蛋白酶切洗脱液

Fig. 2-1 Purification of the pUL36 truncated protein

M: Protein marker; 1: Induced BL21 supernatant of pET29a-UL36-2 by ultrasonication; 2: Induced BL21 sediment of pET29a-UL36-2 by ultrasonication; 3: Flow-through solution of purified pET29a-UL36-2; 4: Wash solution of purified pET29a-UL36-2; 5: resin of purified pET29a-UL36-2; 6: eluate solution of pUL36 truncated by enzyme digestion

2.4.1.2 pUL36 截短蛋白免疫小鼠鉴定

将纯化的 pUL36 截短蛋白以 100 μg /只小鼠的剂量进行小鼠免疫，使用第三次免疫后小鼠血清进行细胞接种 PRV 后的间接免疫荧光试验以及 ELISA 实验检测小鼠体内血清效价。结果显示，使用 pUL36 截短蛋白免疫后小鼠血清能与感染 PRV 细胞中 pUL36 蛋白发生特异性反应，可以观察到较强的荧光信号（图 2-2A），而使用阴性小鼠血清在感染 PRV 细胞中基本检测不到荧光信号（图 2-2B）。另外，经过 ELISA 实验检测小鼠体内抗体效价能够达到 1: 12,800。这些结果说明免疫 pUL36 截短蛋白的小鼠体内已经产生了较高的针对 pUL36 蛋白的抗体水平，经过加强免疫后可以继续进行细胞融合。

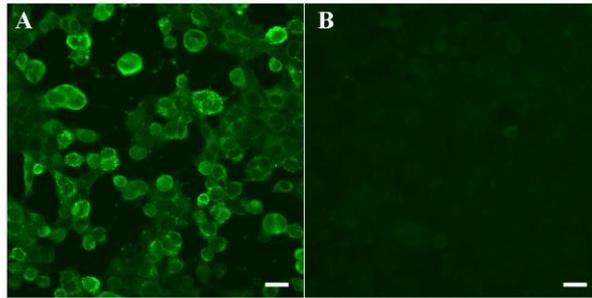


图 2-2 pUL36 截短蛋白免疫小鼠血清 IFA 鉴定（标尺为 50 μm ）

A: pUL36 截短蛋白免疫小鼠血清 (1: 1,000 稀释); B: 阴性小鼠血清 (1: 1,000 稀释)

Fig. 2-2 Identification of Serum from mouse immunized with pUL36 truncated protein by IFA (The scale is 50 μm)

A: Serum from mouse immunized with pUL36 truncated protein (Dilute 1: 1,000); B: Negative mouse serum (Dilute 1: 1,000)

2.4.1.3 pUL36 蛋白单克隆筛选及亚型鉴定

取加强免疫后小鼠脾细胞与骨髓瘤细胞 SP2/0 进行细胞融合，利用 ELISA 实验鉴定融合后杂交瘤细胞上清进行细胞亚克隆，经过 3 次后得到两株能够稳定分泌针对 pUL36 蛋白抗体的单克隆细胞株，并分别命名为 A3D8 和 E7A8。将这两株单克隆细胞株进行连续传代至 30 代后鉴定其抗体分泌稳定性，结果显示单克隆细胞上清中分泌的抗体依然能够与 pUL36 蛋白发生特异性反应，且抗体效价均高于 1: 6,400 倍。使用抗体亚类鉴定试剂盒鉴定这两株单克隆抗体的重链均为 IgG2a，轻链均为 Kappa 链（表 2-5）。

表 2-5 pUL36 蛋白单克隆抗体的亚型鉴定

Table 2-5 Subtype identification of monoclonal antibodies against pUL36 protein								
抗体	IgA	IgG1	IgG2a	IgG2b	IgG3	IgM	Kappa	Lambda
A3D8	0.074	0.066	1.442	0.066	0.080	0.068	0.322	0.064
E7A8	0.073	0.067	1.558	0.075	0.074	0.078	0.297	0.077

2.4.1.4 pUL36 蛋白单克隆抗体的纯化

将得到的两株单克隆细胞进行培养后注射 10 周龄小鼠用于抗体腹水的制备，然后使用 Protein G 树脂纯化抗体。电泳结果显示位于 55 kDa 大小位置的重链蛋白和位于 25 kDa 左右位置的轻链蛋白（图 2-3）。另外，测定获得的两株单克隆抗体的浓度分别为 7.8 mg/mL 和 8.3 mg/mL。

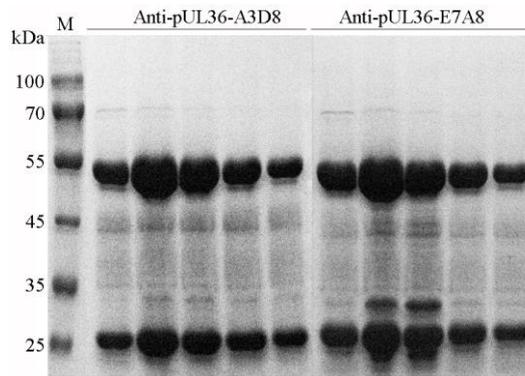
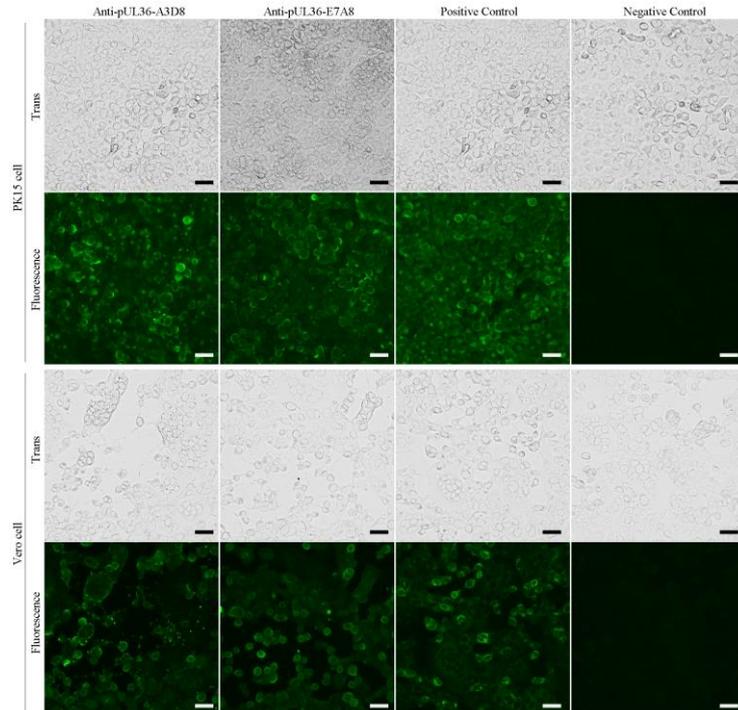


图 2-3 pUL36 蛋白单克隆抗体的纯化

Fig. 2-3 Purification of Monoclonal antibody against pUL36 protein

2.4.1.5 pUL36 蛋白单克隆抗体鉴定

将纯化后的两株单克隆抗体分别进行 IFA 和 Western blot 实验鉴定其特异性，首先使用这两株抗体分别孵育感染 PRV 的 PK15 细胞和 Vero 细胞，结果显示，1:1,000 比例稀释这两株抗体均能与感染 PRV 细胞中的 pUL36 蛋白发生特异性结合并在荧光显微镜下能够检测到较强的荧光信号，与使用 pUL36 截短蛋白免疫小鼠血清作为阳性对照的结果基本一致，且与阴性小鼠血清为阴性对照组结果成立（图 2-4）。Western blot 实验结果显示两株抗体均能够在 330 kDa 左右位置检测到目的条带，与 pUL36 蛋白预期大小一致（图 2-5）。这些结果说明本研究成功制备了两株能够特异性识别 PRV 中 pUL36 蛋白的单克隆抗体，能够为后续研究中 pUL36 蛋白的鉴定提供生物材料。

图 2-4 pUL36 蛋白单克隆抗体的 IFA 鉴定（标尺为 50 μm ）Fig. 2-4 Identification of monoclonal antibody against pUL36 protein by IFA (The scale is 50 μm)

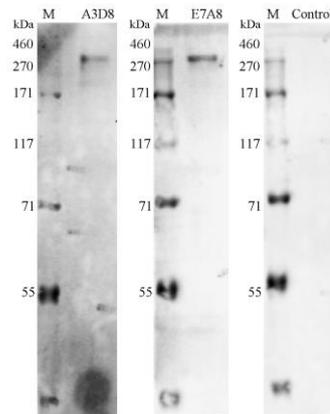


图 2-5 pUL36 蛋白单克隆抗体的 Western blot 鉴定 (对照使用小鼠阴性血清)

Fig. 2-5 Identification of monoclonal antibody against pUL36 protein by Western blot (The control was the negative serum of mice)

2.4.2 同源供体重组质粒的构建及鉴定

为了构建基于 UL36 基因 N 末端插入 EGFP 荧光标签的重组 PRV, 本研究首先构建提供同源序列的同源供体重组质粒, 分别从 PRV 基因组与 pEGFP-C3 质粒上扩增出 36N-armL、36N-armR 同源臂和 EGFP 标签, 三段基因序列的长度分别为 596 bp、664 bp 和 748 bp, 扩增结果如图 2-6A 所示, 目的条带大小与预期一致。使用融合 PCR 法经过两轮融合后得到 36N-armL-EGFP-armR 的目的片段, 两轮融合 PCR 结果如图 2-6B 所示, 目的条带大小符合实验预期。将 36N-armL-EGFP-armR 目的片段与线性化 pOK 载体同源重组后构建出 pOK/36N-armL-EGFP-armR 重组质粒, 经过菌液 PCR 鉴定后挑取目的条带大小正确的菌液 (12 和 14 号) 进行测序, 菌液 PCR 结果如图 2-6C 所示, 测序正确的重组质粒将用于后续重组荧光 PRV 的构建。

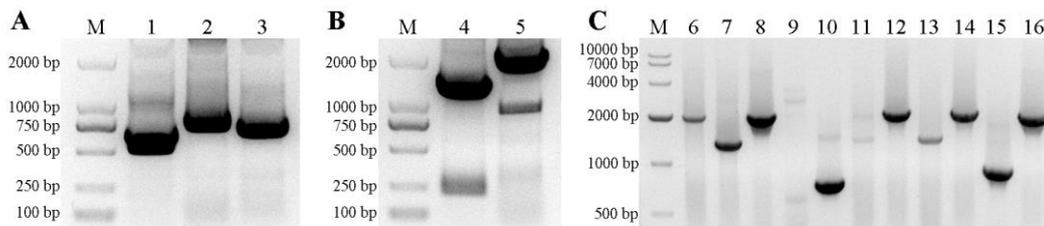


图 2-6 UL36 基因 N 端同源供体序列的 PCR 扩增及重组质粒鉴定

A: 目的序列扩增; B: 融合 PCR; C: pOK/36N-armL-EGFP-armR 重组质粒鉴定

M: DNA marker; 1: 36N-armL 同源臂; 2: EGFP 标签; 3: 36N-armR 同源臂; 4: 36N-armL-EGFP; 5: 36N-armL-EGFP-armR; 6~16: pOK/36N-armL-EGFP-armR 菌落

Fig. 2-6 PCR amplification of the homologous donor sequence at the N-terminus of UL36 gene and identification of recombinant vector

A: Amplification of target sequences; B: Overlapping PCR; C: Identification of the pOK/36N-armL-EGFP-armR recombinant vector

M: DNA marker; 1: 36N-armL; 2: EGFP tag; 3: 36N-armR; 4: 36N-armL-EGFP; 5: 36N-armL-EGFP-armR; 6~16: Bacterial colonies of pOK/36N-armL-EGFP-armR

另外, 为构建基于 UL36 基因 C 末端插入 EGFP 标签的重组荧光 PRV, 我们从 PRV 基因组与 pEGFP-C3 质粒上分别扩增出 36C-armL、36C-armR 同源臂和 EGFP 标签, 三段基因序列的长度分别为 629 bp、631 bp 和 748 bp, 扩增出的目的条带大小与预期一致(图 2-7A)。使用融合 PCR 法经过两轮融合后得到 36C-armL-EGFP-armR 的目的片段, 两轮融合 PCR 结果如图 2-7B 所示, 目的条带大小符合实验预期。将 36C-armL-EGFP-armR 目的片段与线性化 pOK 载体同源重组后构建出 pOK/36C-armL-EGFP-armR 重组质粒, 经过菌液 PCR 鉴定后(图 2-7C)挑取目的条带大小正确的菌液(8 和 12 号)进行测序, 测序正确的重组质粒将用于后续重组荧光 PRV 的构建。

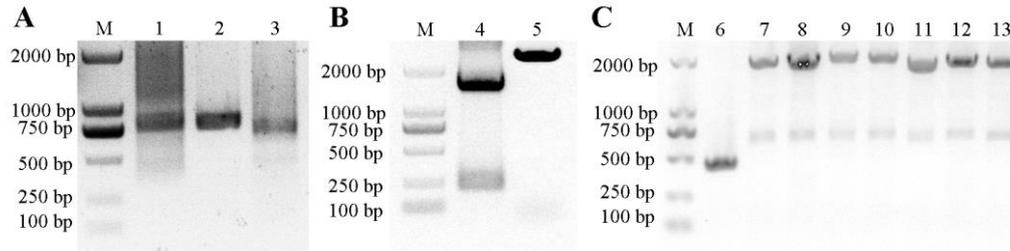


图 2-7 UL36 基因 C 端同源供体序列的 PCR 扩增及重组质粒鉴定

A: 目的序列扩增; B: 融合 PCR; C: pOK/36C-armL-EGFP-armR 重组质粒鉴定

M: DNA marker; 1: 36C-armL 同源臂; 2: EGFP 标签; 3: 36C-armR 同源臂; 4: 36C-armL-EGFP; 5: 36C-armL-EGFP-armR;

6~13: pOK/36C-armL-EGFP-armR 菌落

Fig. 2-6 PCR amplification of the homologous donor sequence at the C-terminus of UL36 gene and identification of recombinant vector

A: Amplification of target sequences; B: Overlapping PCR; C: Identification of the pOK/36C-armL-EGFP-armR recombinant vector

M: DNA marker; 1: 36C-armL; 2: EGFP tag; 3: 36C-armR; 4: 36C-armL-EGFP; 5: 36C-armL-EGFP-armR; 6~16: Bacterial colonies of

pOK/36C-armL-EGFP-armR

2.4.3 重组荧光病毒的蚀斑纯化

为了构建 UL36 基因 N 末端和 C 末端插入 EGFP 荧光标签的重组 PRV, 本研究利用 CRISPR-Cas9 重组技术将 PRV 基因组、sgRNA 重组质粒和线性化同源供体质粒共转染入 PK15 细胞中, 待细胞出现病变后收集细胞病毒液进行蚀斑纯化。基于 UL36 基因 N 端的 9 组 sgRNA 组合有 7 组能够进行正确编辑; 而基于 UL36 基因 C 端的 6 组 sgRNA 组合有 4 组能够进行正确编辑。第一轮蚀斑实验在光学显微镜下可以观察到局部细胞发生病变, 形成病毒蚀斑(图 2-8A, 图 2-9A), 于荧光显微镜下可以观察到蚀斑形成部位有绿色荧光信号(图 2-8B, 图 2-9B)。为了进一步提纯重组荧光病毒, 使用第一轮细胞病毒液进行二轮蚀斑实验, 结果显示在普通光镜下同样可以看到细胞形成的病变蚀斑点(图 2-8C, 图 2-9C), 于荧光显微镜下观察相同病变位置能检测到较强的绿色荧光信号(图 2-8D, 图 2-9D)。以上结果说明本研究利用 CRISPR-Cas9 重组技术得到了针对 UL36 基因 N 末端和 C 末端插入 EGFP 荧光标签的重组荧光病毒, 并分别命名为 rPRV-36N-EGFP 和 rPRV-36C-EGFP。

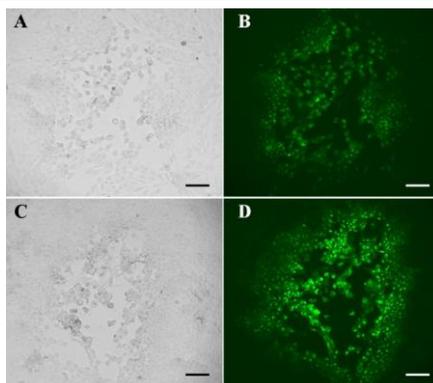


图 2-8 重组荧光病毒 rPRV-36N-EGFP 的蚀斑纯化 (标尺为 50 μm)

A/B: 一轮蚀斑纯化的细胞病变; C/D: 二轮蚀斑纯化的细胞病变

Fig. 2-8 Plaque purification of recombinant fluorescent virus rPRV-36N-EGFP (The scale is 50 μm)

A/B: Cell pathological change in the first plaque purification; C/D: Cell pathological change in the second plaque purification

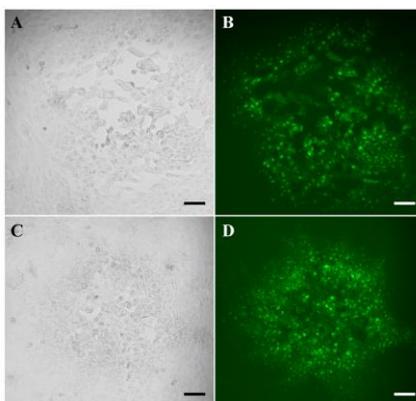


图 2-9 重组荧光病毒 rPRV-36C-EGFP 的蚀斑纯化 (标尺为 50 μm)

A/B: 一轮蚀斑纯化的细胞病变; C/D: 二轮蚀斑纯化的细胞病变

Fig. 2-9 Plaque purification of recombinant fluorescent virus rPRV-36C-EGFP (The scale is 50 μm)

A/B: Cell pathological change in the first plaque purification; C/D: Cell pathological change in the second plaque purification

2.4.4 重组荧光病毒基因组 PCR 鉴定

为了鉴定本研究中获得重组荧光病毒 rPRV-36N-EGFP 和 rPRV-36C-EGFP 的稳定性, 我们对该病毒进行连续传代至第 6 代, 提取各代次病毒基因组进行 PCR 鉴定, 以野生型 PRV 作为阳性对照, 结果如图 2-10 和图 2-11 所示。结果显示从各代次 rPRV-36N-EGFP 和 rPRV-36C-EGFP 基因组中可以扩增出大小约为 1200 bp 的目的条带, 对照野生型 PRV 中只扩增出大小约为 500 bp 的目的条带。前者目的条带大小约等于后者与 EGFP 基因 (717 bp) 长度之和, 说明构建的重组荧光病毒 rPRV-36N-EGFP 和 rPRV-36C-EGFP 中均成功插入了 EGFP 荧光标签, 同时经过测序后鉴定标签位置正确且核酸未发生突变或移码。另外, 从 PCR 鉴定结果可以看出从各代次 rPRV-36N-EGFP 和 rPRV-36C-EGFP 基因组中扩增出的目的序列大小基本一致, 这说明这两种重组病毒能够稳定传代, 本文中均使用 P5 代毒开展后续实验研究。

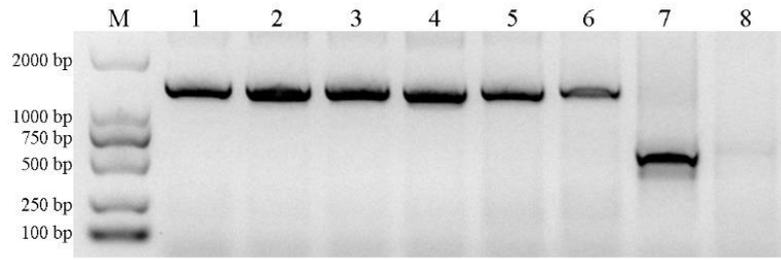


图 2-10 rPRV-36N-EGFP 基因组的 PCR 鉴定

M: DNA marker; 1~6: rPRV-36N-EGFP 的 P1~P6 代基因组; 7: 野生型 PRV 基因组; 8: 空白对照

Fig. 2-10 Identification of the genome of rPRV-36N-EGFP by PCR

M: DNA marker; 1~6: The genome of P1~P6 generations of rPRV-36N-EGFP; 7: genome of the WT PRV; 8: Blank control

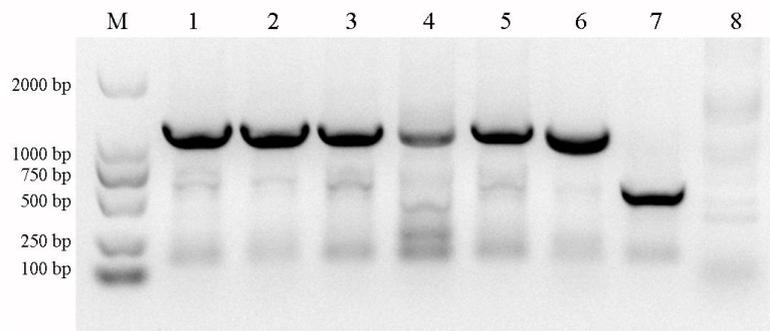


图 2-11 rPRV-36C-EGFP 基因组的 PCR 鉴定

M: DNA marker; 1~6: rPRV-36C-EGFP 的 P1~P6 代基因组; 7: 野生型 PRV 基因组; 8: 空白对照

Fig. 2-11 Identification of the genome of rPRV-36C-EGFP by PCR

M: DNA marker; 1~6: The genome of P1~P6 generations of rPRV-36C-EGFP; 7: genome of the WT PRV; 8: Blank control

2.4.5 重组荧光病毒 rPRV-36N-EGFP 和 rPRV-36C-EGFP 的 Western blot 鉴定

为进一步鉴定重组荧光病毒 rPRV-36N-EGFP 和 rPRV-36C-EGFP 中 EGFP 标签是否插入正确, 我们使用制备的 pUL36 蛋白单克隆抗体与 EGFP 标签抗体分别对纯化后的野生型 PRV、rPRV-36N-EGFP 和 rPRV-36C-EGFP 病毒粒子进行 Western blot 鉴定。结果显示, 使用制备的 pUL36 蛋白单克隆抗体鉴定三种病毒均可以检测到目标蛋白 (图 2-12A), 而使用 EGFP 标签抗体能够检测到 rPRV-36N-EGFP 和 rPRV-36C-EGFP 中目的蛋白大小的存在, 在野生型 PRV 中未检测到条带 (图 2-12B)。这些结果说明了重组荧光病毒 rPRV-36N-EGFP 和 rPRV-36C-EGFP 中 EGFP 的成功融合表达, 能够为后续实验研究提供重要工具。

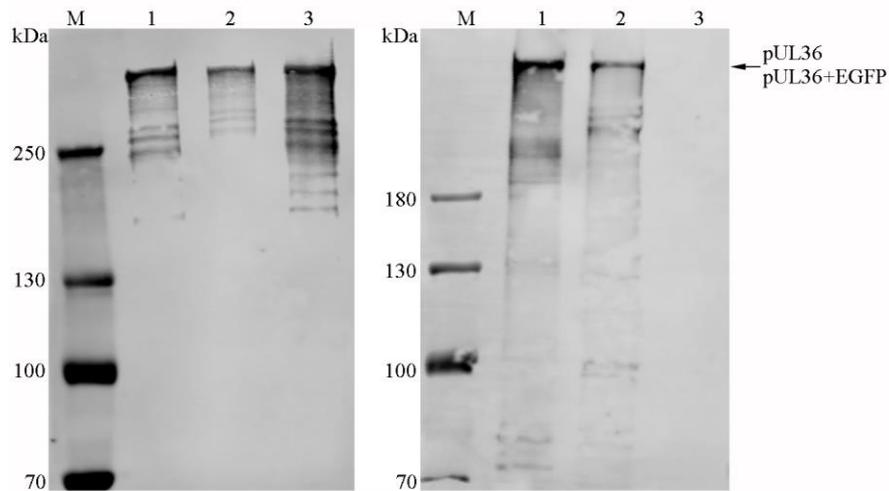


图 2-12 rPRV-36N-EGFP 和 rPRV-36C-EGFP 的 Western blot 鉴定

A: pUL36 蛋白单克隆抗体-A3D8 鉴定; B: EGFP 标签抗体鉴定

M: 蛋白 marker; 1: rPRV-36N-EGFP; 2: rPRV-36C-EGFP; 3: 野生型 PRV

Fig. 2-12 Identification of rPRV-36N-EGFP and rPRV-36C-EGFP by Western blot

A: Identification by A3D8 monoclonal antibody against pUL36 protein; B: Identification by EGFP antibody

M: Protein marker; 1: rPRV-36N-EGFP; 2: rPRV-36C-EGFP; 3: Wild type PRV

2.4.6 重组荧光病毒 rPRV-36N-EGFP 和 rPRV-36C-EGFP 的 TCID₅₀ 测定

为测定重组荧光病毒 rPRV-36N-EGFP 和 rPRV-36C-EGFP 的 TCID₅₀ 滴度, 使用 10^{-1} ~ 10^{-11} 梯度倍比稀释的病毒液接种 PK15 细胞, 于感染后 60 h 统计各稀释度病毒感染细胞情况, 使用 Reed-Muench 法计算出 rPRV-36N-EGFP 和 rPRV-36C-EGFP 的 TCID₅₀ 分别为 $6.31 \times 10^7/\text{mL}$ 和 $2.69 \times 10^7/\text{mL}$ 。

2.4.7 重组荧光病毒 rPRV-36N-EGFP 和 rPRV-36C-EGFP 的一步生长曲线

为了解 rPRV-36N-EGFP 和 rPRV-36C-EGFP 的生长特性, 以野生型 PRV 作为实验对照, 同时向 PK15 细胞接种 MOI=10 的病毒量, 间隔 4 h 收集细胞上清后测定各时间点下病毒的 TCID₅₀ 滴度, 并绘制一步生长曲线。结果显示重组荧光病毒 rPRV-36N-EGFP 与野生型 PRV (PRV HLJ-2013) 表现出相似的生长趋势, 随着时间的延长, 病毒 TCID₅₀ 滴度发生持续的升高, 在病毒感染 32 h 左右后达到峰值并保持基本不变 (图 2-13A)。同样地重组荧光病毒 rPRV-36C-EGFP 与野生型 PRV 在细胞水平也表现为相似的生长特性, 生长曲线基本相互吻合 (图 2-13B)。以上研究结果说明本文中构建的重组荧光病毒 rPRV-36N-EGFP 和 rPRV-36C-EGFP 的生长特性与野生型 PRV 基本相同, 能够用于后续实验研究的开展。

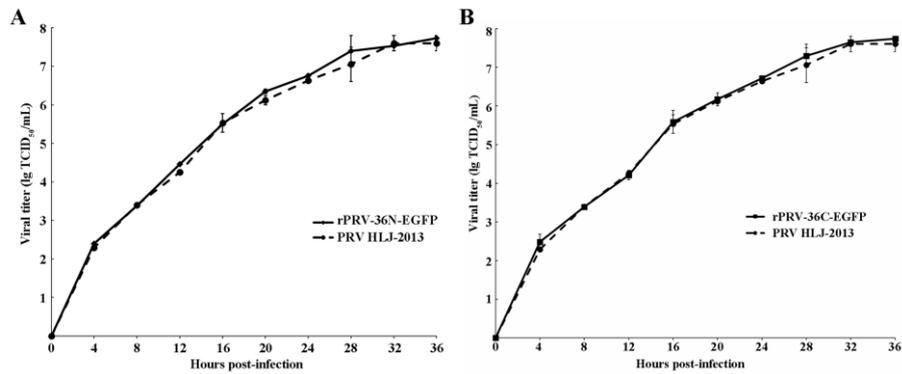


图 2-13 rPRV-36N-EGFP 和 rPRV-36C-EGFP 的一步生长曲线

A: rPRV-36N-EGFP 的一步生长曲线; B: rPRV-36C-EGFP 的一步生长曲线

Fig. 2-13 One-step growth curve of rPRV-36N-EGFP and rPRV-36C-EGFP

A: One-step growth curve of rPRV-36N-EGFP; B: One-step growth curve of rPRV-36C-EGFP

2.4.8 重组荧光病毒形态学鉴定

为进一步鉴定重组荧光病毒的形态，将纯化的重组荧光病毒 rPRV-36N-EGFP 和 rPRV-36C-EGFP 与野生型 PRV 同时制备电镜负染样品，使用透射电子显微镜观察这三种病毒的形态。电镜下观察到外囊膜包裹的有致密病毒衣壳结构的完整病毒粒子，同时重组荧光病毒 rPRV-36N-EGFP (图 2-14A) 和 rPRV-36C-EGFP (图 2-14B) 与野生型 PRV (图 2-14C) 表现为高度相似的形态结构。这说明构建的重组荧光病毒 rPRV-36N-EGFP 和 rPRV-36C-EGFP 与野生型 PRV 形态学结构基本无差异。

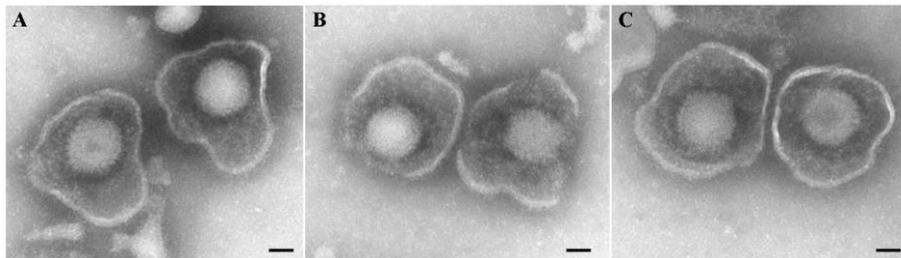


图 2-14 rPRV-36N-EGFP 和 rPRV-36C-EGFP 的形态学鉴定 (标尺为 50 nm)

A: rPRV-36N-EGFP 病毒粒子; B: rPRV-36C-EGFP 病毒粒子; C: 野生型 PRV 病毒粒子

Fig.2-14 Morphological identification of rPRV-36N-EGFP and rPRV-36C-EGFP (The scale is 50 nm)

A: Virion of rPRV-36N-EGFP; B: Virion of rPRV-36C-EGFP; C: Virion of wild type PRV

2.5 讨论

pUL36 蛋白是 α -疱疹病毒亚科中最大的被膜蛋白，其在所有疱疹病毒中相对保守，在 β -疱疹病毒亚科和 γ -疱疹病毒亚科中均存在同源物，分别为 pUL48 (BROCK et al., 2013) 和 ORF64 (GREDMARK et al., 2007)。这类蛋白质在疱疹病毒复制过程中发挥重要的生物学功能，主要表

现为去泛素化酶活性 (INN et al., 2011; MOHNKE et al., 2022; TULLMAN et al., 2014)、参与病毒核衣壳的向核转运 (KIM et al., 2016; ZAICHICK et al., 2013)、参与病毒的二次包膜 (DAS et al., 2014; IVANOVA et al., 2016; ROZEN et al., 2008) 等等。已有研究通过 fosmid 文库和 Red/ET 重组技术构建了基于 UL36 基因融合表达 EGFP 的 PRV 重组病毒株, 为示踪 PRV 在神经回路中的感染途径提供了重要工具 (QI et al., 2020)。

本研究利用 CRISPR/Cas9 基因编辑技术构建了基于 UL36 基因 N 末端和 C 末端融合表达 EGFP 荧光标签的重组荧光病毒 rPRV-36N-EGFP 和 rPRV-36C-EGFP。为了提高基因编辑效率, 我们在设计针对靶标位置挑选了预测脱靶效率低、编辑效率打分较高的 sgRNA 引物, 根据设计 sgRNA 排列组合在 N 末端与 C 末端分别形成 9 对和 6 对 sgRNA 组合, 研究结果显示 UL36 基因 N 末端 9 对 sgRNA 组合中有 7 对能够成功介导 EGFP 基因的插入, 成功率达 77.77%。而 UL36 基因 C 末端 6 对 sgRNA 组合中有 4 对能够成功介导 EGFP 基因的插入, 成功率为 66.67%。将 PRV 基因组、sgRNA 质粒组合以及同源替换质粒共同转染 PK15 细胞后, 3 d 左右在显微镜下即可观察到典型的 PRV 感染病变。收集细胞病毒液冻融后接种细胞进行蚀斑纯化, 经过连续两轮纯化后就可以拿到单一重组成功病毒。使用 CRISPR/Cas9 技术构建重组荧光病毒不需要像 fosmid 文库构建一样建立基于全基因组的 BAC 质粒, 只需要提取 PRV 基因组或按照一定 MOI 量接种细胞即可实现, 操作过程简单、高效。在使用 CRISPR/Cas9 技术编辑基因插入时需要我们提供含有同源臂较长的同源替换质粒, 同源臂选择一般为 500~1,000 bp 的长度, 而且由于 PRV 基因组中 GC 含量较高, 这给构建同源替换重组质粒的工作造成一定的困难。本研究使用高保真 PrimeSTAR HS DNA 聚合酶和高 GC 含量 Buffer 进行同源臂的扩增, 通过融合 PCR 反应实现两端同源臂和荧光标签的融合, 成功解决了这一问题。在本研究中构建的两株重组荧光病毒 rPRV-36N-EGFP 和 rPRV-36C-EGFP 进行鉴定时, PCR 鉴定 rPRV-36N-EGFP 和 rPRV-36C-EGFP 可见各代次病毒基因组中均可以扩增出含有 EGFP 的目的序列, 本研究均使用 P5 代毒进行后续实验。使用制备的 pUL36 蛋白的单克隆抗体和 EGFP 标签抗体鉴定重组荧光病毒 rPRV-36N-EGFP 和 rPRV-36C-EGFP 的标签插入情况, 结果证明了 EGFP 在 pUL36 蛋白上的正确融合表达。另外, 对得到的重组荧光病毒 rPRV-36N-EGFP 和 rPRV-36C-EGFP 在细胞水平的生长特性及形态学进行鉴定, 结果表明这两株重组荧光病毒与野生型 PRV HLJ-2013 毒株在 PK15 细胞的生长特性基本一致, 且电镜下观察纯化的病毒粒子形态相似, 这说明本研究构建的基于 UL36 基因 N 末端和 C 末端插入 EGFP 荧光标签不影响 PRV 在细胞水平的生长特性及病毒粒子的包装与成熟, 这一研究结果与之前的研究结论相一致 (QI et al., 2020)。基于 CRISPR/Cas9 技术的重组荧光病毒构建相较于 fosmid 文库的 Red/ET 重组技术周期更短、操作过程更简单化, 是用于疱疹病毒基因组编辑的更优选择。此外, 基于 PRV 病毒衣壳结构得知 pUL36 蛋白 C 末端是与衣壳蛋白 pUL17 和 pUL25 蛋白相互作用的关键区域, 且为排除 pUL36 蛋白 C 端插入 EGFP 标签对其相互作用影响, 本研究选用重组荧光病毒 rPRV-36N-EGFP 继续完成后续研究工作。

第三章 重组荧光缺失病毒 rPRV-36N-EGFP- Δ UL17 的构建及鉴定

pUL17 蛋白在 PRV 复制过程中起到介导病毒基因组装配机器就位, 启动病毒基因组装配的作用, 同时与衣壳蛋白 pUL25 和被膜蛋白 pUL36 形成稳定结构锚定于成熟病毒衣壳顶点上, 在维持病毒衣壳顶点结构稳定性方面也发挥重要功能。本研究拟利用 CRISPR/Cas9 基因编辑技术基于重组荧光病毒 rPRV-36N-EGFP 构建缺失 UL17 基因的重组荧光缺失病毒, 并在稳定表达 pUL17 蛋白的补充细胞系中鉴定其细胞水平生物学特性, 为后续研究 pUL17 蛋白在 CATC 复合物装配中的作用及装配机制提供生物材料。

3.1 主要实验材料

PK15 细胞、HEK293T 细胞均由本实验室保存; PX330-Cas9、pLVX-ZsGreen1、psPAX2、VSV-G 等质粒均由本实验室保存。

BbsI、EcoRI 和 SpeI 核酸内切酶均购自 Thermo 公司; DH5 α 感受态、PrimeSTAR 高保真酶均购自 Takara 公司; 同源重组酶购自诺唯赞公司; DMEM、opti-MEM、胎牛血清、双抗均购自 Gibco 公司; 转染试剂购自 Roche 公司; PBS 溶液购自武汉普诺赛公司; 氨苄青霉素购自 Amresco 公司; Strep 抗体购自北京博奥龙公司; 羊抗鼠荧光二抗、多聚赖氨酸购自 Invitrogen 公司; 甲基纤维素、PVDF 膜购自 Sigma 公司; 胶回收试剂盒、质粒小提试剂盒、无内毒素质粒大提试剂盒均购自天根公司; 体液病毒 DNA/RNA 小量提取试剂盒购自 AxyPrep 公司。

3.2 主要实验仪器

核酸电泳仪 (DYCP-31CN) 购自北京六一仪器厂; 超速离心机 (Optima™ XPN-100) 购自 Beckman 公司; 高速离心机 (5427R)、低温高速离心机、PCR 仪 (Mastercycler® nexus) 购自 Eppendorf 公司; 蔗糖密度梯度制备仪 (BioComp Gradient Master Model 108) 购自 Biocomp 公司; 流式细胞分选系统 (SH800S) 购自 Sony 公司; 近红外荧光扫描成像系统 (Odyssey CLX) 购自 Odyssey 公司; 倒置荧光显微镜 (EVOS M5000) 购自 Life 公司; 透射电子显微镜 (H7650) 购自 HITACHI 公司。

3.3 实验方法

3.3.1 sgRNA 引物设计

选取 UL17 基因 N 末端起始密码子 (ATG) 和 C 末端终止密码子 (TAG) 前后各 100 bp 核苷酸序列, 分别提交至 CCTop 网站 (<https://cctop.cos.uni-heidelberg.de:8043/>) 进行滑窗查询 PAM 靶序列, 选择预测脱靶效率低且评分较高 (CRISPRater score ≥ 70) 的 sgRNA 进行设计, 引物设计如表 3-1 所示:

表 3-1 针对 UL17 基因缺失的 sgRNA 引物

Table 3-1 Primers of sgRNA for the deletion of the UL17 gene

引物名称	序列 (5'→3')
17N-sgRF1-F	CACCGACGCCCGCGCGGCCAGGAG
17N-sgRF1-R	AAACCTCCTGGCGCGCGGGGCGTC
17N-sgRF2-F	CACCGACGATGACGTGCACGAGCG
17N-sgRF2-R	AAACCGCTCGTGCACGTCATCGTC
17N-sgRF3-F	CACCGCATCTGCTGCTTGGTCTCGT
17N-sgRF3-R	AAACACGAGACCAAGCAGCAGATGC
17C-sgRR1-F	CACCGCTTCTTCGCGACCCTCCGGC
17C-sgRR1-R	AAACGCCGGAGGGTCGCGAAGAAGC
17C-sgRR2-F	CACCGTCGCGACCCTCCGGCTGGAG
17C-sgRR2-R	AAACCTCCAGCCGGAGGGTCGCGAC
17C-sgRR3-F	CACCGCGGGCCACTCCAGCCGGA
17C-sgRR3-R	AAACTCCGGCTGGAGTGGCCCGCC

以上所有引物均送至睿博兴科生物技术有限公司进行合成。

3.3.2 sgRNA 重组质粒构建

将所有用于 UL17 基因缺失的 sgRNA 全部构建至 PX330-Cas9 质粒上。对各组 sgRNA 引物进行变性、退火以获得双链 sgRNA 产物，条件如下：95°C，5 min；60°C/53°C，1 min；4°C 保温。使用 BbsI 内切酶（ThermoFisher SCIENTIFIC, Shanghai）进行 PX330-Cas9 质粒的酶切，酶切体系为：PX330-Cas9，5 μL；BbsI，1 μL；10×FD Buffer，5 μL；H₂O，39 μL。将以上各组充分混匀后放置于 37°C 水浴锅中酶切 1 h，然后置于 80°C 金属浴放置 5 min 进行酶灭活，使用 1% 琼脂糖凝胶进行核酸电泳，紫外灯下切出目的条带位置凝胶，使用胶回收试剂盒进行回收。将 sgRNA 产物与线性化的 PX330-Cas9 载体经同源重组进行连接，连接体系为：5×CE buffer，4 μL；ExnaseII，2 μL；线性化 PX330-Cas9 载体，3 μL；sgRNA 产物，5 μL；H₂O，6 μL。将以上各组充分混匀后置于 37°C 水浴锅中孵育 30 min，立即置于冰上冷却。取 DH5α 感受态细胞置于冰上融化，将全部连接产物加入到感受态细胞中，轻弹管底进行混匀，置于冰上作用 30 min，于 42°C 水浴中热激 90 s，然后立即置于冰上冷却 3-5 min，向感受态细胞中加入 900 μL 无抗 LB 培养基，于 37°C，220 rpm/min 摇床中摇菌 1 h。将菌液离心 6,000×g，3 min，剩余 100 μL 上清后重悬菌体，将其涂布于含有氨苄青霉素（Ampicillin, A⁺）的 LB 平皿上，放置于 37°C 细菌培养箱中倒置培养 13~16 h。从过夜培养的平皿上挑取 1~2 个单克隆菌落置于 5 mL A⁺ 的 LB 培养基中进行扩播 14 h，使用小提质粒试剂盒提取质粒后送至睿博兴科生物技术有限公司进行测序。经质粒测序正确后，使用无内毒素大提质粒试剂盒进行 sgRNA 重组质粒的质粒提取，测定质粒浓度后保存于 -40°C 冰箱备用。

3.3.3 rPRV-36N-EGFP 基因组准备

收集 200 mL 稳定传代至第 5 代的重组荧光病毒 rPRV-36N-EGFP 用于病毒的纯化，经过病毒

富集、蔗糖密度梯度超速离心和病毒脱糖后准备病毒基因组的提取。本部分实验使用 MasterPure™ DNA Purification Kit 进行 rPRV-36N-EGFP 基因组的提取，具体方法详见第二章方法 2.3.3。

3.3.4 稳定表达 pUL17 蛋白细胞系的构建

本部分使用慢病毒操作系统构建稳定表达 pUL17 蛋白细胞系，宿主细胞选择 PK15 细胞进行，详细实验方法如下：

3.3.4.1 引物设计

根据本实验室 PRV 毒株 PRV HLJ-2013 (Genbank 号: MK080279) 基因组序列信息设计针对扩增 UL17 基因的引物，同时在 N 末端设计加入 Strep 标签 (标签序列 5'→3': TGGAGCCACCCGCAGTTCGAAAAG) 方便后续细胞系筛选及鉴定，设计针对 UL17 基因扩增引物如表 3-2 所示：

表 3-2 UL17 基因扩增引物

Table 3-2 Amplification primers of the UL17 gene

引物名称	引物序列 (5'→3')	片段长度
17-LVX-F	GGATCTATTTCCGGTGAATTCATGTGGAGCCACCCGCA	1866 bp
	GTTTCGAAAAGATGGACGCCACATCGCCAAC	
17-LVX-R	CGCGGCCGCTCTAGAACTAGTTTATCAAGCGTAATCTG	
	GAACATCGTATGGGTACACGCGCGGCACAGG	

以上引物序列送至睿博兴科生物技术有限公司进行合成并使用。

3.3.4.2 pUL17-pLVX-zsGreen1 重组质粒构建

首先进行 UL17 目的基因扩增，以提取的 PRV 基因组为模板，使用高 GC 含量 Buffer 进行 PCR 扩增，扩增体系如表 3-3 所示：

表 3-3 PCR 反应体系

Table 3-3 PCR reaction system

试剂	体积
2×PrimeSTAR GC Buffer	25 μL
dNTP Mixture (2.5 mM)	8 μL
17-LVX-F (10 μM)	4 μL
17-LVX-R (10 μM)	4 μL
PRV 基因组	2 μL
PrimeSTAR HS DNA Polymerase	1 μL
H ₂ O	6 μL

将以上各组充分混匀后进行 PCR 扩增，反应程序如下：95℃预变性 5 min；98℃变性 15 s，65℃退火 30 s，72℃延伸 2 min，循环 35 次；72℃延伸 10 min；4℃保温。配制 1% 琼脂糖凝胶进行核

酸电泳, 使用胶回收试剂盒回收目的片段后暂存于-20°C冰箱。

对载体质粒 pLVX-zsGreen1 进行酶切, 选用 EcoRI 和 SpeI 核酸内切酶进行实验, 酶切体系如表 3-4 所示:

表 3-4 酶切体系

Table 3-4 Digestion system

试剂	体积
10×FD Buffer	5 μ L
EcoRI	2.5 μ L
SpeI	2.5 μ L
pLVX-zsGreen1 质粒	15 μ L
H ₂ O	25 μ L

将以上各组分试剂进行充分混匀后, 置于 37°C 水浴锅中进行酶切 40 min, 然后置于 80°C 金属浴中进行酶灭活 5 min, 配制 1% 琼脂糖凝胶进行核酸电泳, 紫外灯照射下切回目的条带进行胶回收, 产物置于-20°C 冰箱保存。

使用同源重组试剂盒进行 UL17 基因片段与线性化 pLVX-zsGreen1 质粒进行连接, 具体连接、转化步骤与前述一致, 详见第二章方法 2.3.5 内容。构建的质粒经测序正确后大提质粒暂存于-40°C 冰箱备用。

3.3.4.3 慢病毒包装

将 2×10^6 个 HEK 293T 细胞铺于经多聚赖氨酸处理过的 10 cm 细胞皿中, 培养 24 h 后待密度达到约 80% 时进行细胞转染。转染质粒总量为 10 μ g, 质粒转染量比例为 pLVX-zsGreen1-UL17-Strep (慢病毒骨架质粒): psPAX2 (慢病毒外壳表达质粒): VSV-G (慢病毒膜蛋白表达质粒) = 2: 1: 1。首先准备 1.5 mL EP 管并加入 1 mL Opti-MEM 培养基, 向其中分别加入 5 μ g pLVX-zsGreen1-UL17-Strep 质粒、2.5 μ g psPAX2 和 2.5 μ g VSV-G, 使用移液枪充分混匀后加入 20 μ L 的 X-tremeGENE HP DNA Transfection Reagent 转染试剂, 再次充分混匀后于室温静置 20 min。使用 PBS 润洗两遍细胞更换为 Opti-MEM 培养基后将转染溶液轻轻滴加到细胞培养基中, 将细胞皿置于 37°C, 5% CO₂ 培养箱中继续培养 8 h 后更换为含 2% FBS 的 DMEM 培养基继续培养 48 h。

3.3.4.4 慢病毒感染 PK15 细胞

待 HEK 293T 细胞转染 48 h 后将细胞进行-80°C/37°C 反复冻融 3 次后于 2,000×g 离心 15 min, 将病毒上清转移至新的 15 mL 离心管中并分装成 1 mL 每管。准备铺于 6 孔板中细胞生长汇合度达 80% 的 PK15 细胞, 使用 PBS 润洗两遍后加入 1 mL 含有 2% FBS 的 DMEM 培养基, 然后将 1 mL 获得的慢病毒溶液加入到细胞孔中并轻轻混匀。将接种慢病毒的细胞板置于 37°C, 5% CO₂ 细胞培养箱中继续培养 24 h, 弃掉细胞上清后更换为含 5% FBS 的 DMEM 培养基继续培养。在接种慢病毒 48 h 后将细胞板置于荧光显微镜下观察细胞感染病毒情况, 准备进行下一步细胞筛选。

3.3.4.5 细胞系筛选及培养

由于慢病毒骨架质粒 pLVX-zsGreen1-UL17-Strep 中带有绿色荧光基因, 故该细胞系筛选我们选择使用流式细胞分选系统 (SONY-SH800S) 进行细胞的筛选。首先使用 PBS 溶液润洗细胞两遍, 加入 1 mL 0.25% 胰蛋白酶溶液于细胞皿中, 轻轻晃匀后将胰蛋白酶弃掉并将细胞置于 37°C 培养箱中进行细胞消化, 显微镜下观察细胞变圆情况。使用 700 μ L 无血清 DMEM 培养基将细胞吹落混匀后转移至流式管中, 然后使用流式细胞分选系统根据细胞荧光情况进行细胞筛选。首先使用未接种慢病毒的 PK15 细胞作为对照进行分选门的参照设置, 然后将准备好的接种慢病毒的 PK15 细胞置于流式细胞分选仪器上, 设置系统将检测到有绿色荧光信号的 PK15 细胞打入含有 100 μ L 2% FBS 和 2% SP 的 DMEM 培养基的 96 孔板中, 待细胞分选工作完成后将 96 孔细胞板置于 37°C, 5% CO₂ 细胞培养箱中培养, 于第 7~10 天观察孔中细胞生长情况并填补含 10% FBS 的 DMEM 培养基继续培养, 待 96 孔板中细胞生长至孔底面积的 1/2 时将细胞转移至 48 孔板中继续进行培养, 依次传代至 24 孔板、12 孔板、6 孔板、T25 细胞瓶、10 cm 细胞皿扩大培养, 将转移至 10 cm 细胞皿中的细胞定义为 P1 代, 随着细胞的传代进行 Western blot 鉴定细胞中 pUL17 蛋白表达情况。

3.3.4.6 细胞系鉴定

为了筛选出能够稳定表达 pUL17 蛋白的细胞, 收集每一代次细胞进行 2,000 \times g 离心 15 min, 弃上清后使用 40 μ L 的 PBS 溶液重悬细胞。向细胞悬液中加入 10 μ L 的 5 \times loading 蛋白上样缓冲液, 置于 100°C 金属浴中煮沸样品 10 min, 然后立即置于冰上冷却。准备配制好的 10% 的蛋白胶进行蛋白电泳, 以未接种的 PK15 作为对照, 每孔中加入 20 μ L 处理的细胞溶液, 于 160 V 电压条件下电泳 1 h 15 min。使用快速湿转仪进行转膜, 首先将 PVDF 膜置于甲醇溶液中激活 3~5 min, 然后将膜转移至 1 \times 平衡液中继续激活 1 min, 按照海绵垫、PVDF 膜、蛋白凝胶、海绵垫的顺序将其置于转膜板正极面, 将转膜板合拢后插入转膜仪中进行快速转膜 16 min。将转印好的 PVDF 膜浸泡于使用 TBST 溶液溶解的 5% 脱脂乳中, 于室温下封闭 1 h 后进行一抗孵育。由于 pUL17 蛋白 N 末端融合表达了 Strep 标签, 故选择鼠源 anti-Strep 抗体 (1: 1,000 稀释) 作为一抗于室温下孵育 1 h, 使用 TBST 溶液进行 PVDF 膜的清洗, 每次清洗 10 min, 重复 3 次。使用 Goat anti-Mouse IgG (H+L) Cross-Adsorbed 荧光二抗 (Alexa Fluor™ 800) (1: 10,000 稀释), 于室温避光孵育 1 h 后进行二抗清洗, 使用 TBST 溶液避光清洗 10 min, 重复 3 次。将孵育完成的 PVDF 膜置于近红外荧光扫描成像系统 (Odyssey CLX) 下进行成像。

3.3.4.7 细胞内 pUL17 蛋白表达定位鉴定

待铺于共聚焦细胞培养皿的细胞生长汇合度达到 60% 左右时, 使用 4% 多聚甲醛进行室温固定 30 min。PBS 溶液清洗 3 次后加入 500 μ L 0.1% Triton X-100/PBS 透膜缓冲液于室温透膜处理 15 min。PBS 溶液清洗 3 次后加入 500 μ L 1% BSA/PBS 封闭缓冲液于室温静置孵育 40 min。使用 0.1% Triton X-100/PBS 透膜缓冲液稀释鼠源 Strep 标签抗体 (1: 1,000 稀释) 于室温摇床孵育 1 h。PBS 溶液清洗 3 次细胞后使用 1% BSA/PBS 溶液稀释羊抗鼠荧光二抗 Alexa Fluoro 594 (1: 2,000

稀释)于室温摇床孵育 1 h。PBS 溶液清洗 3 次细胞后使用 DAPI 溶液进行细胞核染色 5 min, 再次使用 PBS 溶液清洗细胞后使用高分辨率活细胞成像系统进行观察。

3.3.5 sgRNA、rPRV-36N-EGFP 基因组共转染

向 1.5 mL 离心管中加入 200 μL 的 Opti-MEM 培养基,加入各 1 μg 的 6 组 sgRNA/PX330-Cas9 重组质粒和 2 μg 的 rPRV-36N-EGFP 基因组,充分混匀后加入 16 μL 的 X-tremeGENE HP DNA Transfection Reagent 转染试剂,轻轻混匀后于室温条件下静置 20 min。准备铺于 6 孔板的细胞生长汇合度达到 70%的 PK15-C17 细胞,使用 PBS 润洗两遍后加入 1.5 mL 的 Opti-MEM 培养基,将孵育完成的转染溶液轻轻滴加到细胞孔中,将其置于 37°C, 5%CO₂ 细胞培养箱中继续培养 8 h。弃掉细胞上清后更换为含有 2%FBS 和 1%SP 的 DMEM 培养基继续培养,转染细胞后时刻观察细胞病变情况。

3.3.6 病毒收集及蚀斑纯化

待转染的细胞发生完全病变后收集细胞,将六孔板中细胞吹匀后转移至 1.5 mL 离心管中,经过-80°C/37°C反复冻融两次后 2,000×g 离心 15 min 后弃沉淀,上清转移至新的 EP 管中准备进行蚀斑纯化。蚀斑纯化步骤与构建 rPRV-36N-EGFP 重组荧光病毒时基本一致,本环节所选用细胞为 PK15-C17 细胞,详细步骤见第二章方法 2.3.6。

3.3.7 重组缺失病毒的传代及 PCR 鉴定

取经过两轮蚀斑纯化后的病毒液 50 μL 加入到铺于 6 孔板中细胞生长汇合度达到 80%的 PK15-C17 细胞中,感染后 36~48 h 收集细胞毒,于 2,000×g 离心 15 min 后转移上清至新的 EP 管中进行下一代病毒繁殖,将病毒传代至第 6 代后提取各代次病毒基因组,病毒基因组提取步骤按照 AxyPrep 体液病毒 DNA/RNA 小量提取试剂盒说明书进行。

设计针对 UL17 基因检测的引物序列如下: UL17-detection-F: GTTCCAGGGGCCCTGGGATCCATGGACGCCACATCGCCAAC; UL17-detection-R: GTCACGATGCGGCCGCTCGAGTTATCACACGCGGCGGCACAGGCG。以各代次重组缺失病毒基因组作为模板,野生型 PRV 基因组作为阳性对照进行 PCR 鉴定。PCR 反应体系如下: 2×PrimeSTAR GC Buffer, 10 μL; dNTP Mixtures, 2 μL; UL17-detection-F, 1 μL; UL17-detection-R, 1 μL; 基因组模板, 2 μL; PrimeSTAR HS DNA Polymerase, 0.25 μL; H₂O, 3.75 μL。将以上各组分溶液充分混匀后置于 PCR 仪中进行扩增,PCR 反应程序如下: 95°C预变性 5 min; 98°C变性 15 s, 65°C退火 30 s, 72°C延伸 2 min, 循环 30 次; 72°C延伸 10 min; 4°C保温。配制 1%琼脂糖凝胶进行核酸电泳鉴定构建的重组缺失荧光病毒中 UL17 基因的缺失情况。

3.3.8 重组缺失病毒的 TCID₅₀ 测定

选择稳定传代至 P5 代的重组缺失荧光病毒 rPRV-36N-EGFP-ΔUL17 进行 TCID₅₀ 测定。将病毒液进行 10 倍倍比稀释,取 100 μL 收集的病毒液加入到 900 μL 无血清 DMEM 培养基中涡旋混

匀 10 s, 取出 100 μ L 混合液加入到新的 900 μ L 无血清 DMEM 培养基中涡旋混匀, 依次类推, 最终获得 10^{-1} ~ 10^{-11} 共计 11 个稀释度的病毒液。准备铺于 96 孔板中细胞生长汇合度达到 80% 的 PK15-C17 细胞, 使用 PBS 溶液润洗两遍细胞后按照每一纵列为同一稀释度的原则向每孔中加入 100 μ L 的病毒稀释液, 最后一列作为阴性对照每孔加入 100 μ L 无血清 DMEM 培养基。将接种病毒的 96 孔板置于 37°C, 5%CO₂ 细胞培养箱中继续培养 60 h, 于显微镜下统计各病毒稀释度下细胞病变孔数, 按照 Reed-Muench 法计算 rPRV-36N-EGFP- Δ UL17 的 TCID₅₀ 滴度。

3.3.9 重组缺失病毒的一步生长曲线测定

根据测定的 rPRV-36N-EGFP- Δ UL17 的 TCID₅₀ 滴度, 以 MOI=10 的病毒量接种铺于 6 孔板中生长汇合度达到 80% 的 PK15-C17 细胞, 将接种病毒的 6 孔板细胞置于 4°C 冰箱进行低温吸附 1 h, 然后使用 PBS 润洗细胞 3 遍将上清中未吸附到细胞上的病毒洗掉, 更换为含有 2%FBS 和 1%SP 的 DMEM 培养基继续培养。以此时间作为 0 h 开始收样, 分别于 0 h、4 h、8 h、12 h、16 h、20 h、24 h、28 h、32 h 和 36 h 收集细胞上清病毒液, 于 2,000 \times g 离心 15 min 后转移上清至新的 EP 管中, 测定各时间点下 rPRV-36N-EGFP- Δ UL17 的 TCID₅₀ 滴度, 重复实验 3 次, 取均值后绘制 rPRV-36N-EGFP- Δ UL17 的一步生长曲线。

3.3.10 重组缺失病毒的电镜切片观察

将亲本毒 rPRV-36N-EGFP 接种 PK15 细胞, rPRV-36N-EGFP- Δ UL17 分别接种 PK15 细胞和 PK15-C17 细胞进行鉴定观察。分别以 MOI=10 病毒量细胞接种病毒后置于 4°C 冰箱中吸附 1 h, 然后使用 PBS 润洗两遍细胞后更换为含 2%FBS 的 DMEM 培养基置于 37°C, 5%CO₂ 培养箱中继续培养 16 h, 准备进行透射电子显微镜切片样本制作。

使用细胞刮将 6 孔板中感染病毒的细胞刮下, 并将细胞悬液转移至 1.5 mL EP 管中, 于 1,500 \times g 离心 15 min 使细胞聚集成团块。将上清弃掉后加入 1 mL 的 2.5% 戊二醛固定液 (pH=7.3) 置于 4°C 条件下固定过夜。4°C 条件下, 使用 PBS 溶液清洗样品 3 次, 每次时长 15 min。弃掉样品上清液后加入 1 mL 的 1% 四氧化锇溶液置于 4°C 条件下固定 2 h, 然后使用 4°C 预冷的 PBS 溶液清洗样品 3 次, 每次时长 15 min。弃掉上清后使用梯度浓度丙酮溶液进行脱水, 分别使用 50%、70%、90% 丙酮溶液于 4°C 条件下脱水 15 min, 然后加入 100% 丙酮溶液于室温条件下脱水 10 min。使用 PBS 溶液清洗样品 3 次, 每次时长 15 min, 然后于室温条件下使用树脂溶液过夜浸透样本。将样本从树脂溶液中捞出后置于样本聚合架上, 再次加入树脂完全浸没样本并将其置于高温聚合炉中进行 70°C 聚合 60 h。将已经固化的树脂块使用 Leica UC6 切片机切出 60 nm 细胞超薄切片置于碳支持膜载网上, 使用醋酸双氧铀染色液室温染色 15 min 后使用滤纸吸干载网上残余的染色液, 再使用柠檬酸铅染色液染色 10 min 并使用滤纸吸干残余染色液, 待载网干燥后使用透射电子显微镜观察。

3.4 实验结果

3.4.1 稳定表达 pUL17 蛋白细胞系的构建及鉴定

3.4.1.1 pLVX-zsGreen1/UL17 重组质粒构建

为了构建稳定表达 pUL17 蛋白的细胞系,本研究使用慢病毒表达系统进行实验。首先以 PRV 基因组为模板扩增出 UL17 基因片段(图 3-1A),该目的基因片段大小为 1,794 bp,核酸电泳结果显示扩增出的目的条带位置接近于 2,000 bp 位置,符合预期大小。将扩增产物与线性化 pLVX-zsGreen1 质粒进行同源重组后成功构建了重组质粒 pLVX-zsGreen1/UL17。经过菌液 PCR 鉴定挑选可以扩增出目的基因大小的克隆菌进行测序(4 和 6 号)(图 3-1B),经测序正确后获得可用于后续慢病毒包装的骨架质粒。

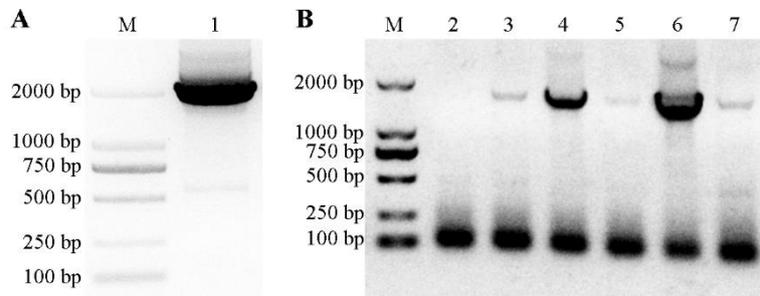


图 3-1 UL17 基因的扩增(A)及重组质粒的鉴定(B)

M: DNA marker; 1: UL17 基因; 2~7: pLVX-zsGreen1/UL17 克隆菌

Fig. 3-1 Amplification of the UL17 gene (A) and identification of the recombinant vector (B)

M: DNA marker; 1: UL17 gene; 2~7: Bacterial colonies of pLVX-zsGreen1/UL17

3.4.1.2 慢病毒包装及细胞系筛选

在成功构建慢病毒包装骨架质粒后,将其与外壳表达质粒和膜蛋白表达质粒共转染 HEK 293T 细胞,转染 24 h 后于荧光显微镜下观察可见较强的荧光信号(图 3-2A),说明质粒已在细胞中转录表达蛋白并组装慢病毒。为获得高滴度的慢病毒,将转染细胞继续培养至 48 h 进行收毒,然后将获得的慢病毒接种 PK15 细胞进行感染并整合目的基因至细胞基因组上。于感染后 48 h 使用倒置荧光显微镜观察细胞情况,结果显示有少量的接种细胞可检测到较弱的荧光信号(图 3-2B),说明这些细胞基因组可能已经整合上带有绿色标签的 UL17 基因表达盒。将细胞消化后使用流式细胞分选系统筛选带有绿色荧光的单克隆细胞,流式细胞分选结果显示有 6.07% 的细胞可检测到绿色荧光信号(图 3-2C),将这些细胞分选至细胞 96 孔板中继续进行培养及传代检测。

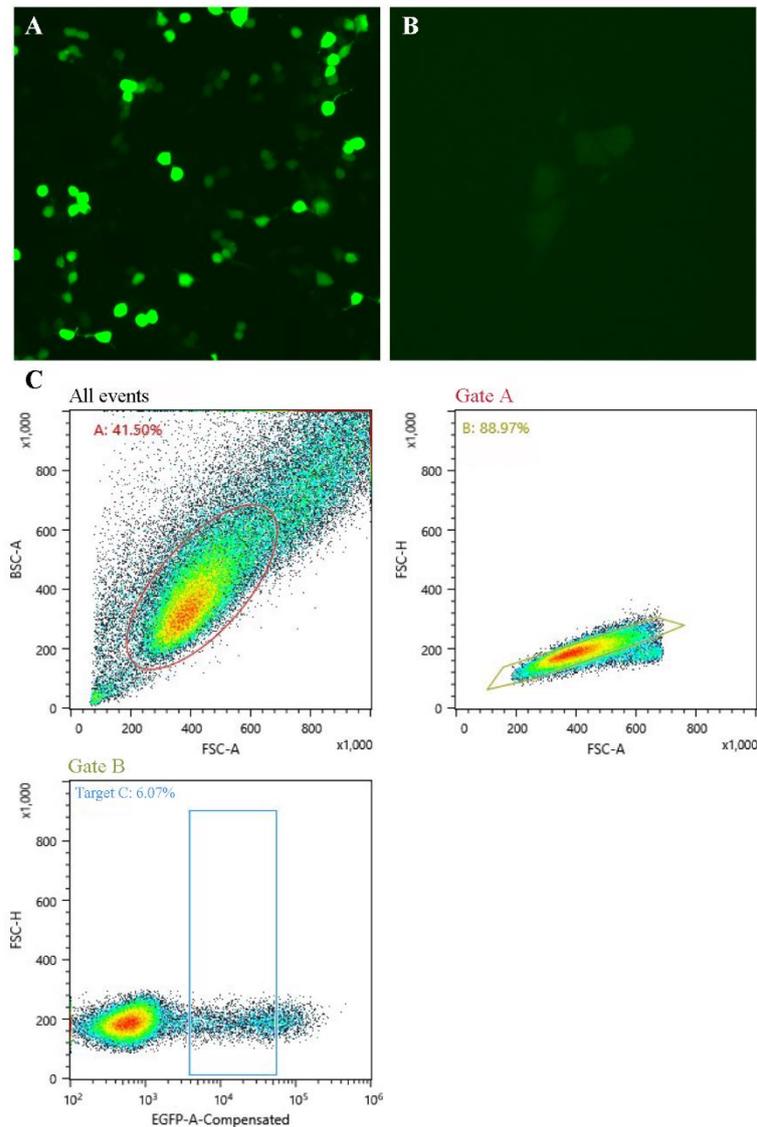


图 3-2 表达 pUL17 蛋白细胞系构建

A: 慢病毒包装; B: 慢病毒感染的 PK15 细胞; C: PK15 细胞的流式分选

Fig. 3-2 Construction of cell lines expressing pUL17 protein

A: Package of lentivirus; B: Lentivirus-infected PK15 cells; C: Fluorescence-activated cell sorting of PK15 cells

3.4.1.3 稳定表达 pUL17 蛋白细胞系的鉴定

对已经分选至细胞 96 孔板中单克隆细胞进行扩大培养, 利用 Western blot 鉴定扩培出的细胞中是否能够检测到 pUL17 蛋白的表达, 结果显示共计筛选出 3 株细胞能够在 70 kDa 左右位置检测到目的蛋白 (图 3-3A), 说明这三株细胞内表达了 pUL17 蛋白, 分别为 PK15-17-45-B10、PK15-17-25-E7-1、PK15-17-25-F4。为了进一步鉴定细胞系稳定表达 pUL17 蛋白的情况, 本研究选择 PK15-17-25-E7-1 细胞系进行连续传代, 将其命名为 PK15-C17, 并分别取 P5、P10 和 P15 代细胞进行 Western blot 鉴定, 鉴定结果显示细胞传代至 P15 代后仍然可以检测到目的蛋白的表

达（图 3-3B），说明构建的细胞系能够持续稳定的表达 pUL17 蛋白，能够为后续构建荧光缺失病毒提供实验材料。

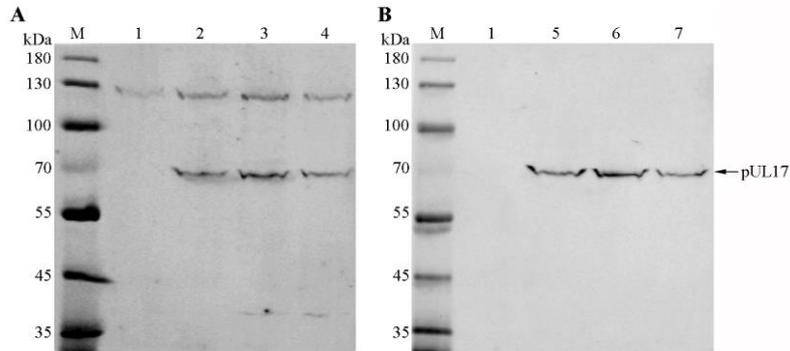


图 3-3 表达 pUL17 蛋白细胞系的鉴定

A: 细胞系筛选的 Western blot 鉴定; B: 细胞系传代的 Western blot 鉴定

M: 蛋白 marker; 1: PK15 细胞对照; 2: PK15-17-45-B10 细胞; 3: PK15-17-25-E7-1 细胞; 4: PK15-17-25-F4 细胞; 5: P5 代 PK15-C17 细胞; 6: P10 代 PK15-C17 细胞; 7: P15 代 PK15-C17 细胞

Fig. 3-3 Identification of the cell lines expressed pUL17 protein

A: identification of cell line screening by Western blot; B: identification of cell line passage by Western blot

M: Protein marker; 1: PK15 cell control; 2: PK15-17-45-B10 cell; 3: PK15-17-25-E7-1 cell; 4: PK15-17-25-F4 cell; 5: The fifth generation of PK15-C17 cells; 6: The tenth generation of PK15-C17 cells; 7: The fifteenth generation of PK15-C17 cells

3.4.1.4 细胞内表达 pUL17 蛋白的定位

将稳定表达 pUL17 蛋白的细胞进行固定后，使用该蛋白携带 Strep 标签的抗体对细胞内表达的 pUL17 蛋白定位。结果显示细胞内可见大量 pUL17 蛋白荧光信号，且信号只能在细胞质中检测到而在细胞核中检测不到（图 3-4）。该结果说明稳定表达 pUL17 蛋白的细胞系构建成功，且该蛋白单独表达时仅存在于细胞质中。

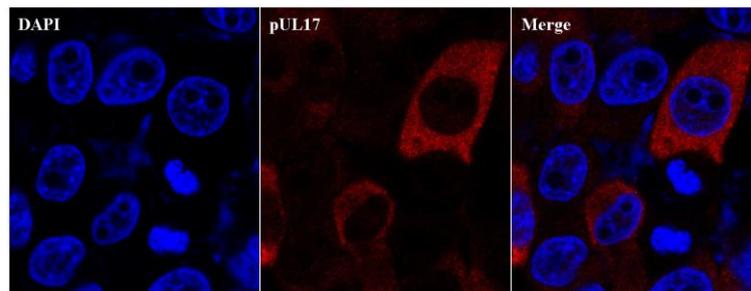


图 3-4 pUL17 蛋白的细胞内定位

Fig. 3-4 Intracellular localization of the pUL17 protein

3.4.2 重组荧光缺失病毒 rPRV-36N-EGFP- Δ UL17 的构建及蚀斑纯化

以构建的细胞系 PK15-C17 作为互补细胞系，使用 CRISPR-Cas9 重组技术构建重组荧光缺失病毒。在进行病毒基因组与 sgRNA 质粒共转染 48 h 后细胞后开始发生病变，72 h 后细胞发生完

全病变。收集细胞病毒液后进行两轮蚀斑纯化，第一轮蚀斑纯化时在普通光学显微镜下观察可看到病毒感染后细胞形成典型蚀斑（图 3-5A），荧光显微镜下观察蚀斑位置可见绿色荧光信号（图 3-5B）。为进一步提纯所构建的重组荧光缺失病毒，使用第一轮蚀斑病毒液进行二轮蚀斑纯化，细胞形成蚀斑结果（图 3-5C）和荧光信号检测结果（图 3-5D）同第一轮蚀斑纯化结果一致。经过两轮的蚀斑纯化得到了单克隆重组荧光缺失病毒，并命名为 rPRV-36N-EGFP- Δ UL17。

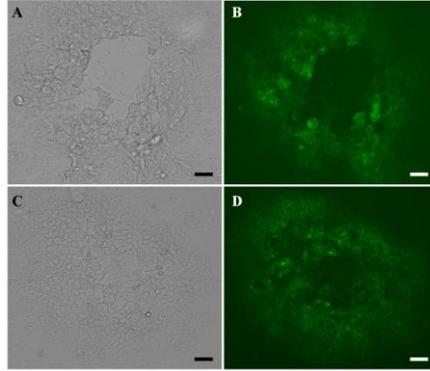


图 3-5 rPRV-36N-EGFP- Δ UL17 重组病毒的蚀斑纯化（标尺为 50 μ m）

A/B: 一轮蚀斑; C/D: 二轮蚀斑

Fig. 3-5 Plaque purification of the recombinant virus rPRV-36N-EGFP- Δ UL17 (The scale is 50 μ m)

A/B: The first plaque purification; C/D: The second plaque purification

3.4.3 重组荧光缺失病毒 rPRV-36N-EGFP- Δ UL17 的 PCR 鉴定

为了测定重组荧光缺失病毒 rPRV-36N-EGFP- Δ UL17 的基因缺失情况及传代稳定性，我们提取收集的各代次病毒基因组，使用针对 UL17 基因的特异性引物进行 PCR 扩增。对 P1~P6 代病毒检测的结果显示未能从各代次 rPRV-36N-EGFP- Δ UL17 的基因组中扩增出 UL17 基因片段，而野生型 PRV 组能够扩增出约 1,800 bp 长度的片段，为全长 UL17 基因的长度（图 3-6）。这说明本研究成功构建了重组荧光缺失病毒 rPRV-36N-EGFP- Δ UL17，且经过多次传代稳定，选用 P5 代重组荧光缺失病毒继续后续试验研究。

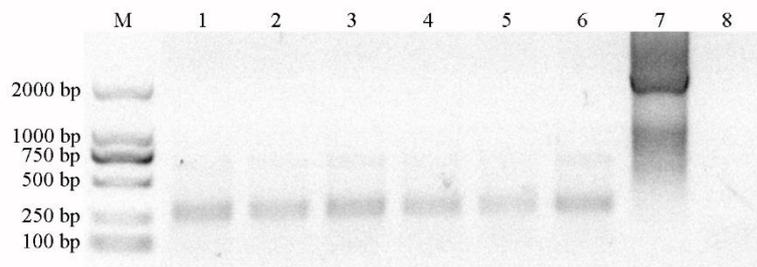


图 3-6 rPRV-36N-EGFP- Δ UL17 基因组的 PCR 鉴定

M: DNA marker; 1-6: rPRV-36N-EGFP- Δ UL17 的 P1~P6 代病毒基因组; 7: 野生型 PRV 基因组; 8: 阴性对照

Fig. 3-6 Identification of the genome of rPRV-36N-EGFP- Δ UL17 by PCR

M: DNA marker; 1-6: Viral genome of P1~P6 generation of rPRV-36N-EGFP- Δ UL17; Genome of the WT PRV; 8: Negative control

3.4.4 重组荧光缺失病毒 rPRV-36N-EGFP- Δ UL17 的 TCID₅₀ 测定

为了解重组荧光缺失病毒 rPRV-36N-EGFP- Δ UL17 的细胞毒力,选择稳定表达 pUL17 蛋白的 PK15-C17 细胞进行 TCID₅₀ 滴度的测定。以 10^{-1} ~ 10^{-11} 稀释度的 rPRV-36N-EGFP- Δ UL17 接种细胞,于 60 h 后观察并计算各稀释度病毒引起细胞病变的数量,按照 Reed-Muench 法计算出 rPRV-36N-EGFP- Δ UL17 的 TCID₅₀ 值为 2.69×10^8 /mL。

3.4.5 重组荧光缺失病毒 rPRV-36N-EGFP- Δ UL17 的一步生长曲线

为了探究重组荧光缺失病毒 rPRV-36N-EGFP- Δ UL17 的生长特性,以 MOI=10 的病毒量接种 PK15-C17 细胞,间隔 4 h 收集细胞上清中病毒后测定各时间点病毒 TCID₅₀ 滴度,绘制一步生长曲线如图 3-7 所示。结果显示 rPRV-36N-EGFP- Δ UL17 在 PK15-C17 细胞上病毒滴度有显著的提升,相较于亲本毒 rPRV-36N-EGFP 和野生型 PRV HLJ-2013 的滴度更高(除 8 h 外)。另外,在感染的 PK15 细胞上清中未检测到有 rPRV-36N-EGFP- Δ UL17 病毒滴度,说明该病毒感染 PK15 细胞后不能释放病毒粒子至细胞外。

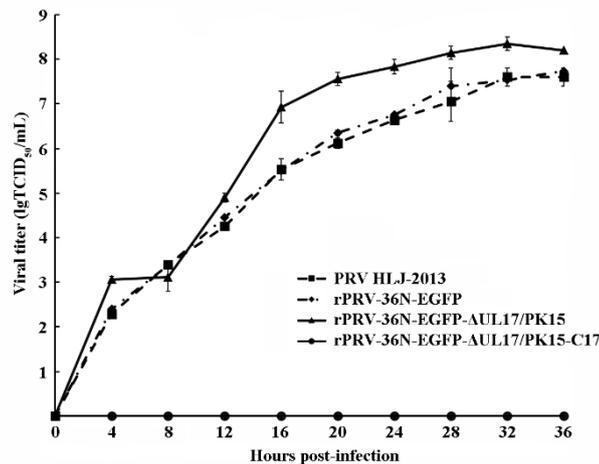


图 3-7 rPRV-36N-EGFP- Δ UL17 的一步生长曲线

Fig. 3-7 One-step growth curve of rPRV-36N-EGFP- Δ UL17

3.4.6 重组荧光缺失病毒 rPRV-36N-EGFP- Δ UL17 的切片鉴定

为进一步鉴定重组荧光缺失病毒 rPRV-36N-EGFP- Δ UL17,以亲本毒 rPRV-36N-EGFP 感染 PK15 细胞作为阳性对照,使用 rPRV-36N-EGFP- Δ UL17 分别感染 PK15-C17 细胞和 PK15 细胞,于感染后 16 h 将感染细胞固定处理制备电镜样品并使用透射电子显微镜观察。亲本毒 rPRV-36N-EGFP 感染 PK15 细胞后可在细胞质中和细胞外观察到大量的成熟病毒粒子(空心三角形标识),同时在细胞核中检测到大量晶格状排列的病毒衣壳(实线箭头标识)(图 3-8)。同样地, rPRV-36N-EGFP- Δ UL17 感染 PK15-C17 细胞能够形成完整的病毒粒子,在细胞质中可以观察到正在包装的病毒粒子,且能够在细胞膜外观察到释放到细胞外的成熟病毒粒子(空心三角形标识),同时在细胞核中能够观察到未包装出核的呈晶格状排列的病毒衣壳结构(实心三角形和实线箭头

标识); 而其感染 PK15 细胞后在细胞质及细胞外未观察到病毒粒子的存在, 但在细胞核中观察到大量的无规则、零散分布的病毒衣壳结构 (星形和虚线箭头标识)。这一结果与 rPRV-36N-EGFP- Δ UL17 的一步生长曲线结果相一致。

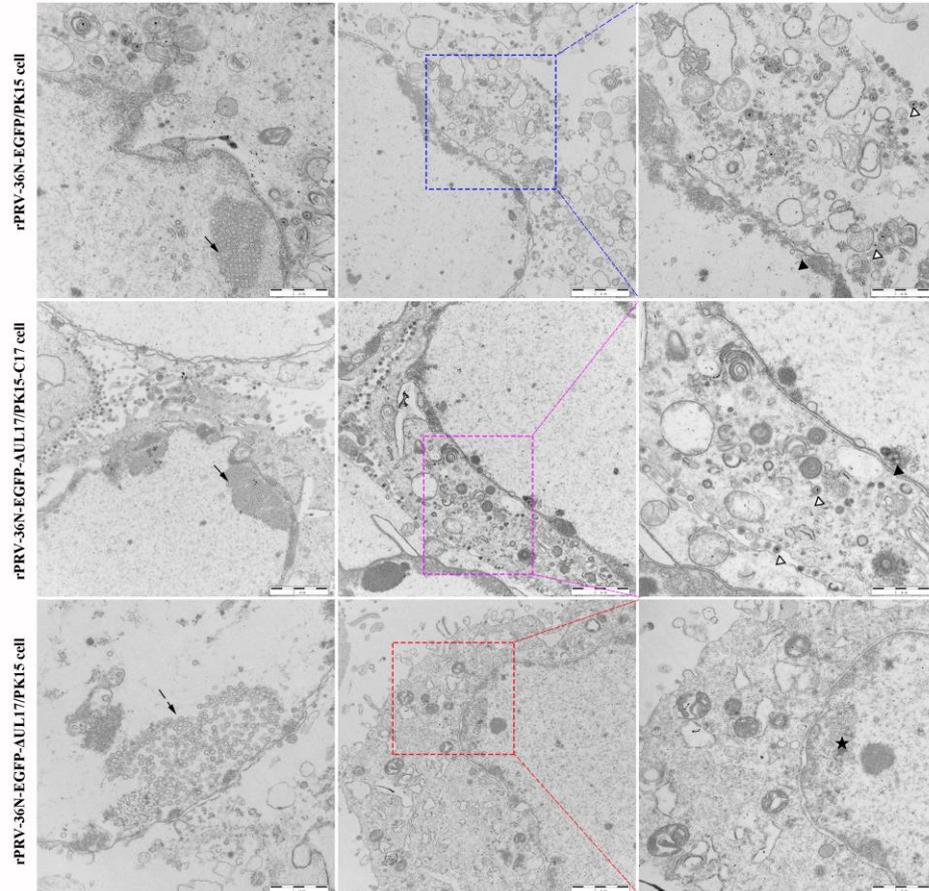


图 3-8 rPRV-36N-EGFP- Δ UL17 在 PK15-C17 和 PK15 细胞中的切片观察

Fig. 3-8 Observation of rPRV-36N-EGFP- Δ UL17 infected PK15-C17 and PK15 cells

3.5 讨论

α -疱疹病毒的 pUL17 蛋白是病毒复制过程中切割和包装病毒基因组 DNA 不可或缺的组分 (SALMON et al., 1998), 这一过程类似于 dsDNA 噬菌体的 DNA 成熟过程 (NEWCOMB et al., 2001)。已有研究通过负染免疫的方法对病毒粒子上的 pUL17 蛋白进行标记, 结果发现 A-衣壳中标记不到 pUL17 蛋白, 而在 B-衣壳的外部 and C-衣壳的内部均标记到了 pUL17 蛋白 (KLUPP et al., 2005)。早期研究鉴定了 pUL17 蛋白与另一衣壳蛋白 pUL25 发生相互作用, 并包装至病毒衣壳顶点位置, 在稳定病毒衣壳顶点方面发挥重要作用 (SNIJDER et al., 2017)。此外, 由于 pUL17/pUL25 异二聚体复合物在病毒结构上与病毒衣壳表面三链体成分相连, 研究指出三链体结构或 VP23 (三链体结构组分之一) 增强了此异二聚体之间的相互作用, 并且研究认为 VP23 和主要衣壳蛋白 VP5 可能诱导了 pUL17 和 pUL25 蛋白的构象变化 (SCHOLTES and BAINES, 2009)。在 HSV-1 感染细胞 16 h 后使用 pUL17 蛋白特异性 IgY 抗体进行免疫沉淀发现了其与被膜蛋白 VP13/14 (UL47

基因编码)发生共免疫沉淀,这一结果通过体外表达后共纯化实验得以验证,提示了 pUL17 蛋白在病毒粒子上将衣壳表面与 VP13/14 和相关被膜成分连接的可能性 (SCHOLTES et al., 2010)。

UL17 基因的缺失会严重影响 PRV 的基因组切割和包装,造成细胞核内大量空的病毒核衣壳积累 (KUHN et al., 2010; SALMON et al., 1998)。所以,细胞内能够持续表达 pUL17 蛋白是构建缺失 UL17 基因的重组病毒的重要前提。本研究中,我们最初尝试使用瞬时转染方式在细胞内过表达 pUL17 蛋白,但经过细胞内蛋白表达鉴定结果不理想,无法使用此方法完成重组缺失病毒的构建。故而,我们选择了使用慢病毒表达系统构建稳定表达 pUL17 蛋白的细胞系。逆转录病毒载体是通过病毒重组酶将外源片段整合入染色体中,其整合特性和病毒自身整合特性非常相似,而且由于其整合效率高且稳定,是构建稳定表达细胞株的理想工具。在构建细胞系过程中,我们使用构建载体上所带 ZsGreen 绿色荧光标记进行流式细胞筛选,将转染后带荧光细胞分选出单克隆至 96 孔细胞培养板中进行培养。使用荧光标签筛选单克隆细胞的优点是操作相对简单、周期较短,经过一次流式细胞分选即可获得目标细胞。细胞在扩大培养后,我们通过 Western blot 实验鉴定了细胞内 pUL17 蛋白的表达情况,结果能够在 70 kDa 左右位置检测到目的蛋白的条带,经过多次传代后细胞内能够稳定检测到目的蛋白的表达,可以作为 UL17 基因缺失的重组病毒构建的互补细胞系进行后续研究工作。

在本部分研究中,我们依然借助 CRISPR/Cas9 基因编辑技术构建 UL17 基因缺失的重组缺失 PRV。为了提高获得重组缺失病毒的成功率,我们分别在 UL17 基因 N 末端和 C 末端外侧非编码区各选择了 3 组 sgRNA,将其构建至含有 Cas9 基因的 PX330 质粒中,然后将这些 sgRNA 质粒与提取的 rPRV-36N-EGFP 重组荧光病毒基因组共转染至构建的补充 pUL17 蛋白的细胞系中,经过两次蚀斑纯化后得到了完全缺失 UL17 基因开放阅读框的重组荧光缺失病毒 rPRV-36N-EGFP- Δ UL17。在得到该重组缺失病毒株后,我们对其进行连续传代并进行 PCR 鉴定,结果显示该病毒的 UL17 基因完全缺失且能够在互补细胞系上稳定传代。细胞水平的病毒一步生长曲线结果显示重组缺失病毒 rPRV-36N-EGFP- Δ UL17 在互补细胞系上的复制能力明显强于亲本毒 rPRV-36N-EGFP 在正常 PK15 细胞的,各阶段该病毒滴度基本均高于亲本毒。造成这一结果的原因可能是细胞内 pUL17 蛋白的过表达加速了成熟病毒粒子的装配,使得释放到细胞外的病毒粒子增多。在 PK15 细胞上,重组缺失病毒 rPRV-36N-EGFP- Δ UL17 在各阶段未检测到病毒滴度,这说明 UL17 基因的缺失严重影响的 PRV 的装配与成熟,这与早期研究结果相较基本一致 (KLUPP et al., 2005; KUHN et al., 2010)。为进一步观察 UL17 基因缺失导致细胞内病毒粒子装配的形态,细胞感染该重组病毒后切片观察显示该重组缺失病毒能够在互补细胞系上正常装配与成熟出芽,细胞核内能观察到包装有基因组 DNA 的衣壳结构晶格状排列,且在细胞外检测到成熟的病毒粒子;而在正常 P15 细胞中只能在细胞核中观察到零散分布的无基因组 DNA 装配的空心衣壳结构,且在细胞质及细胞外未见成熟的病毒粒子。这一结果与早期构建 PRV Ka 的 UL17 基因缺失病毒相一致 (KLUPP et al., 2005; KUHN et al., 2010)。综合以上结果,本研究基于稳定表达 pUL17 蛋白的细胞系成功构建了缺失 UL17 基因的重组缺失病毒株 rPRV-36N-EGFP- Δ UL17,为开展后续相关研究工作提供重要材料。

第四章 PRV 感染细胞中 pUL36 蛋白相关复合体的装配动力学

pUL36 蛋白与衣壳蛋白 pUL17 和 pUL25 形成病毒衣壳相关被膜蛋白复合体—CATC, 该复合体在病毒复制过程中引导病毒核衣壳的向细胞核转运和病毒外膜装配发挥重要作用。尽管目前成熟病毒粒子上 CATC 的螺旋结构已经被解析, 然而其在病毒复制时细胞内转运定位及装配模式仍不清楚。本研究拟利用构建的重组荧光病毒 rPRV-36N-EFFP 和缺失毒株 rPRV-36N-EGFP- Δ UL17 分别接种细胞, 通过荧光定量 PCR 检测 CATC 各组分基因转录水平, 利用高分辨率细胞成像系统和免疫电镜等实验探究病毒复制中细胞内 CATC 蛋白组分的装配动力学, 同时探究 UL17 基因缺失对 pUL25 和 pUL36 蛋白在细胞内的行为及定位影响。

4.1 主要实验材料

PK15、PK15-C17 细胞系均由本实验室保存。

DMEM 培养基购自 Gibco 公司; PBS 溶液购自武汉普诺赛公司; Triton X-100、BSA、4% 多聚甲醛、DAPI 均购自 Sigma 公司; 反转录试剂盒、荧光定量检测试剂盒均购自 Takara 公司; 细胞总 RNA 提取试剂盒购自 BioFlux 公司; 标签抗体均购自 GeneTex 公司; 鼠抗 pUL25 蛋白阳性血清由本实验室制备并保存; 荧光二抗均购自 Invitrogen 公司; 金标二抗均购自 Sigma 公司。

4.2 主要实验仪器

PCR 仪 (Mastercycler® nexus)、微量高速离心机 (5427R) 均购自 Eppendorf 公司; 荧光定量 PCR 仪 (Applied Biosystems) 购自 Thermo 公司; 高分辨率活细胞共聚焦显微镜 (LSM880) 购自卡尔-蔡司公司; 切片机 (UC-6) 购自 Leica 公司; 透射电子显微镜 (H7650) 购自 HITACHI 公司。

4.3 实验方法

4.3.1 内质网标记质粒的构建及鉴定

CALR (Calreticulin) 是主要存在于细胞内质网 (Endoplasmic Reticulum, ER) 中的一种高度保守伴侣蛋白。KDEL 是内质网结构和功能蛋白羧基端的四肽序列, 也称为内质网滞留信号, 即带有该四肽序列的任何蛋白能够被特异性滞留于内质网内。本研究选择内质网标志蛋白 CALR 及 KDEL 作为细胞内质网标记的靶标蛋白, 使用目标序列分别为 CALR: ATGCTGCTCCCAGTCCC ACTACTGCTCGGCCTTGTCGGCCTGGCCGCCGCT 和 KDEL: AAGGACGAGCTG。

4.3.1.1 引物设计及目的基因扩增

内质网选择使用红色荧光标签 mCherry 进行标记, 根据实验需要将 CALR 与 KDEL 分别插入到 mCherry 标签两端, 设计引物如表 4-1。

表 4-1 内质网标记引物

Table 4-1 Primer for labeling Endoplasmic reticulum

引物名称	引物序列 (5'→3')	片段长度
ER-F	CGCTCTAGCCCGGGCGGATCCATGCTGCTCCCAGTCCCCTACTGCTCGGCCT TGTCGGCCTGGCCGCCGCTATGGTGAGCAAGGGCGAGGA	819 bp
ER-R	ATTAATTAAGGTACCGGGCCCTTATCACAGCTCGTCCTTCTGTACAGCTCGTC	

使用上述设计的引物以含有 mCherry 标签的重组载体为模板进行目的序列的扩增, PCR 体系为: 2×PrimeSTAR PreMix, 25 μL; ER-F, 2 μL; ER-R, 2 μL; 模板, 1 μL; ddH₂O, 20 μL。将以上各组分加入 PCR 管中充分混匀后置于 PCR 仪中进行扩增, 扩增程序为: 95°C 预变性 5 min; 98°C 变性 15 s, 60°C 退火 30 s, 72°C 延伸 1 min, 循环 35 次; 72°C 延伸 10 min; 4°C 保温。使用 1% 琼脂糖凝胶进行核酸电泳, 在紫外照射灯下切回含有目的片段的凝胶, 使用胶回收试剂盒进行目的片段的回收。

4.3.1.2 重组质粒的构建

将回收的目的片段连接至 pCMV 质粒上, 首先使用 BamHI 与 ApaI 核酸内切酶对 pCMV 质粒进行线性化。酶切体系如下: 10×FD Digestion Buffer, 5 μL; BamHI, 2.5 μL; ApaI, 2.5 μL; pCMV 质粒, 10 μL; ddH₂O, 30 μL。将上述溶液充分混匀后置于 37°C 水浴锅中酶切 40 min, 然后置于 80°C 金属浴进行酶灭活 5 min。配制 1% 琼脂糖凝胶进行核酸电泳, 使用胶回收试剂盒回收线性化 pCMV 质粒片段。使用同源重组试剂盒进行目的片段与线性化 pCMV 质粒的连接, 具体连接、转化步骤与前述一致, 详见第二章方法 2.3.5 内容。构建的质粒经测序正确后大提质粒暂存于 -40°C 冰箱备用。

4.3.1.3 重组质粒转染及鉴定

准备铺于共聚焦细胞皿中生长汇合度达 60% 的 PK15 细胞进行质粒转染。向 200 μL opti-MEM 培养基中加入 2 μg 的重组质粒 pCMV-ER 并充分混匀, 然后加入 2 μL 转染试剂 X-tremeGENE HP DNA Transfection Reagent 后轻轻混匀并置于室温条件下孵育 20 min。使用 PBS 溶液润洗两遍细胞后加入 1 mL opti-MEM 培养基, 然后将上述转染溶液轻轻滴入细胞上清中, 继续置于 37°C, 5% CO₂ 细胞培养箱中培养 8 h 后更换新鲜含 2% FBS 的 DMEM 培养基, 继续培养细胞 24 h 后使用高分辨率活细胞成像系统观察细胞中内质网标记情况。

4.3.2 病毒接种

准备铺于 6 孔板中生长汇合度达 80% 的 PK15 细胞和 PK15-C17 细胞, 以 MOI=100 的病毒量将重组病毒 rPRV-36N-EGFP 和 rPRV-36N-EGFP-ΔUL17 分别接种至两细胞中。将接种病毒的细胞板置于 4°C 条件下进行吸附 1 h, 使用 PBS 缓冲液润洗两遍细胞后加入 1 mL 无血清 DMEM 培养基继续置于 37°C, 5% CO₂ 细胞培养箱中培养, 分别于 0 h、1 h、2 h、3 h、4 h、5 h 和 6 h 使用细胞刮将细胞刮下后 3,000×g 离心 5 min, 收集细胞沉淀用于细胞总 RNA 的提取。

准备铺于 6 孔板中生长汇合度达 80% 的 PK15 细胞, 以 MOI=100 的病毒量将重组缺失病毒

rPRV-36N-EGFP- Δ UL17 接种细胞。将接种病毒的细胞板置于 4°C 条件下进行吸附 1 h，使用 PBS 缓冲液润洗两遍细胞后加入 1 mL 无血清 DMEM 培养基继续置于 37°C，5% CO₂ 细胞培养箱中培养，分别于 0 h、1 h、2 h、3 h、4 h、5 h 和 6 h 使用细胞刮将细胞刮下后 3,000×g 离心 5 min，收集细胞沉淀用于细胞总 RNA 的提取。

4.3.3 细胞总 RNA 提取

使用 Simply P 总 RNA 提取试剂盒进行细胞总 RNA 的提取，简要步骤如下：

- (1) 向已离心细胞中加入 100 μ L 裂解液 R1，振荡混匀后室温静置 3~5 min；
- (2) 向上述溶液中加入 600 μ L 裂解液 R2，上下颠倒充分混匀后室温静置 3~5 min；
- (3) 轻轻吸出溶液上清转移至收集管中，13,000×g 离心 1 min，弃除滤出液；
- (4) 向收集管中加入 600 μ L 洗涤液，13,000×g 离心 1 min，弃除滤出液；
- (5) 重复步骤 (4) 一次；
- (6) 将收集管置回离心机中，13,000×g 离心 2 min，然后将收集管置于新的 1.5 mL EP 管中；
- (7) 向收集管中加入 30 μ L 无菌水，室温静置 2 min 后 13,000×g 离心 1 min 30 s，收集于 1.5 mL EP 管底溶液即为提取的细胞总 RNA，可用于后续反转录或保存于 -80°C 冰箱备用。

4.3.4 RNA 反转录

RNA 反转录实验使用 PrimeScript™ RT reagent kit with gDNA Eraser 试剂盒进行操作。首先测定提取的细胞总 RNA 浓度，配制去除基因组 DNA 反应体系：5×gDNA Eraser Buffer，2 μ L；gDNA Eraser，1 μ L；Total RNA，1 μ g；RNase Free dH₂O，补足 10 μ L。将以上各反应组分充分混匀后置于 PCR 仪中 42°C 孵育 2 min，取出后置于冰上备用。配制反转录反应体系：PrimeScript RT Enzyme Mix I，1 μ L；RT Primer Mix，1 μ L；5×PrimeScript Buffer 2，4 μ L；RNase Free dH₂O，4 μ L；去除基因组 DNA 反应液，10 μ L。将上述各组分溶液轻柔混匀后置于 PCR 仪中进行反转录反应，42°C 孵育 15 min 后于 85°C 反应 5 s，取出后置于冰上或保存至 -20°C 冰箱备用。

4.3.5 相对荧光定量 PCR

为检测 PRV 复制周期中 UL36、UL25 和 UL17 基因的转录表达水平，根据 PRV HLIJ-2013 毒株基因组信息设计针对 UL36、UL25 和 UL17 基因的特异性荧光定量检测引物，同时设计针对细胞内参基因 GAPDH 的特异性引物，引物设计信息如表 4-2 所示。

表 4-2 荧光定量 PCR 引物

Table 4-2 Primers for quantitative PCR	
引物名称	引物序列 5'→3'
UL36-QF	CACAGTCGCCGAAAATCCAT
UL36-QR	GATGTGGAGACGGAGGTGC
UL25-QF	TGATGGTGTTCACCGTGGC
UL25-QR	CTCGTACCGCTACAACACTACG

表 4-2 (续) 荧光定量 PCR 引物

Table 4-2 (continued) Primers for quantitative PCR

引物名称	引物序列 5'→3'
UL17-QF	GCTACGTGACCTTCGAGAGC
UL17-QR	GAAGCGACACGCGAACTG
GAPDH-QF	TCTGGCAAAGTGGACATT
GAPDH-QR	GGTGAATCATACTGGAACA

以上所有引物送至赛文创新生物科技有限公司合成。

使用 TB Green® Premix Ex Taq™ II 试剂盒进行相对荧光定量 PCR 检测。使用以上引物检测 0~6 h 各时间点 rPRV-36N-EGFP 感染 PK15 细胞和 rPRV-36N-EGFP-ΔUL17 感染 PK15-C17 细胞内 UL36、UL25 和 UL17 基因的转录表达情况，每个样本重复 3 次。配制 PCR 反应体系于冰上进行操作：2×TB Green Premix Ex Taq II Buffer，10 μL；PCR Forward Primer (10 μM)，0.8 μL；PCR Reverse Primer (10 μM)，0.8 μL；ROX Reference Dye，0.4 μL；cDNA 模板，2 μL；DEPC H₂O，6 μL。将以上各组分避光轻柔混匀后进行荧光定量 PCR 反应，反应程序如下：95°C 预变性 30 s；95°C 变性 5 s，60°C 退火 30 s，循环 40 次。待程序运行完毕后导出结果进行分析。检测 rPRV-36N-EGFP-ΔUL17 感染 PK15 细胞中 UL36 和 UL25 基因的转录表达方法同上述一致。

4.3.6 pUL36、pUL17 和 pUL25 蛋白细胞内共定位试验

准备铺于激光共聚焦培养皿的 PK15 细胞，按照 MOI=100 病毒量接种重组病毒 rPRV-36N-EGFP，将接种病毒的共聚焦培养皿置于 4°C 条件下吸附 1 h，然后使用 PBS 润洗两遍细胞后补充 1 mL 无血清 DMEM 培养基，将培养皿置于 37°C，5%CO₂ 培养箱中继续培养，分别于 3 h、4 h、5 h、6 h 收集细胞样品进行间接免疫荧光实验。首先弃掉培养皿中液体后使用 PBS 清洗两遍，加入 4% 组织细胞固定液 1 mL 进行室温固定 45 min。PBS 清洗 3 次，每次 5 min，然后加入 0.1% Triton X-100/PBS 透膜缓冲液 1 mL 室温静置 20 min 进行透膜处理。PBS 清洗细胞 3 次，每次 5 min，加入 1% BSA/PBS 封闭缓冲液 1 mL 室温静置 40 min。使用透膜缓冲液稀释兔抗 EGFP 一抗 (1: 1,000) 和鼠抗 pUL25 蛋白血清 (1: 1,000)，充分混匀后加入到共聚焦培养皿中，置于摇床上室温孵育 1 h。PBS 清洗 3 次，每次 5 min，然后使用封闭缓冲液稀释 Alexa Fluoro Goat anti-Rabbit 488 (1: 2,000) 和 Alexa Fluoro Goat anti-Mouse 594 (1: 2,000) 荧光二抗，置于摇床上室温避光孵育 1 h。PBS 清洗 3 次，每次 5 min，然后向培养皿中加入 1 mL 10 μg/mL 的 DAPI 染色液室温避光染色 5 min，最后使用 PBS 清洗 3 次，每次 5 min。使用高分辨率活细胞共聚焦显微镜 LSM880-ZEISS 进行蛋白定位观察。

准备铺于激光共聚焦培养皿的 PK15-C17 细胞，以 MOI=100 病毒量接种重组缺失病毒 rPRV-36N-EGFP-ΔUL17，将接种病毒的共聚焦培养皿置于 4°C 条件下吸附 1 h，然后使用 PBS 润洗两遍细胞后补充 1 mL 无血清 DMEM 培养基，将培养皿置于 37°C，5%CO₂ 培养箱中继续培养，分别于 3 h、4 h、5 h、6 h 收集细胞样品进行间接免疫荧光实验。首先弃掉培养皿中液体后使用 PBS 清洗两遍，加入 4% 组织细胞固定液 1 mL 进行室温固定 45 min。PBS 清洗 3 次，每次 5 min，然后加入 0.1% Triton X-100/PBS 透膜缓冲液 1 mL 室温静置 20 min 进行透膜处理。PBS 清洗细胞

3 次, 每次 5 min, 加入 1%BSA/PBS 封闭缓冲液 1 mL 室温静置 40 min。使用透膜缓冲液稀释兔抗 Strep 一抗 (1: 1,000) 和鼠抗 pUL25 蛋白血清 (1: 1,000)、兔抗 Strep 一抗 (1: 1,000) 和鼠抗 EGFP 抗体 (1: 1,000), 充分混匀后加入到共聚焦培养皿中, 置于摇床上室温孵育 1 h。PBS 清洗 3 次, 每次 5 min, 然后使用封闭缓冲液稀释 Alexa Fluoro Goat anti-Rabbit 594 (1: 2,000) 和 Alexa Fluoro Goat anti-Mouse 405 (1: 1,000) 荧光二抗, 置于摇床上室温避光孵育 1 h。PBS 清洗 3 次, 每次 5 min。使用高分辨率活细胞共聚焦显微镜 LSM880-ZEISS 进行蛋白定位观察。

准备铺于激光共聚焦培养皿的 PK15 细胞, 按照 MOI=100 病毒量接种重组病毒 rPRV-36N-EGFP- Δ UL17, 将接种病毒的共聚焦培养皿置于 4°C 条件下吸附 1 h, 然后使用 PBS 润洗两遍细胞后补充 1 mL 无血清 DMEM 培养基, 将培养皿置于 37°C, 5%CO₂ 培养箱中继续培养, 分别于 3 h、4 h、5 h、6 h 收集细胞样品进行间接免疫荧光实验。详细实验步骤及孵育抗体与上述 rPRV-36N-EGFP 感染 PK15 细胞的间接免疫荧光实验一致。

4.3.7 pUL36 蛋白与内质网共定位试验

准备铺于共聚焦细胞皿中的生长汇合度达 50% 的 PK15 细胞, 首先进行内质网标记质粒的转染, 转染步骤同前述一致, 具体步骤详见 4.3.1.3。待转染后 24 h 进行 rPRV-36N-EGFP 和 rPRV-36N-EGFP- Δ UL17 病毒的感染, 以 MOI=100 的病毒量将上述两种病毒分别感染 PK15 细胞, 接种病毒的细胞置于 4°C 条件下孵育 1 h 后使用 PBS 溶液清洗 3 遍, 更换为含 2%FBS 的 DMEM 培养基继续进行培养。收集感染 rPRV-36N-EGFP 后 5 h 和 6 h 的 PK15 细胞以及感染 rPRV-36N-EGFP- Δ UL17 后 6 h 的 PK15 细胞使用 4% 多聚甲醛于室温固定 30 min。PBS 溶液清洗 3 次后加入 500 μ L 0.1% Triton X-100/PBS 透膜缓冲液于室温孵育 15 min。PBS 溶液清洗 3 次后加入 500 μ L 1%BSA/PBS 封闭缓冲液于室温孵育 40 min。使用 0.1% Triton X-100/PBS 溶液稀释兔源 EGFP 抗体 (1: 1,000 稀释) 于室温摇床孵育细胞 1 h。PBS 溶液清洗细胞 3 次后使用 1%BSA/PBS 溶液稀释羊抗兔荧光二抗 Alexa Fluor 488 (1: 2,000 稀释) 于室温摇床避光孵育细胞 1 h。PBS 溶液清洗细胞 3 次后加入 500 μ L DAPI 溶液进行细胞核染色 5 min, 再次使用 PBS 溶液清洗细胞后于高分辨率活细胞成像系统下观察。

4.3.8 pUL36、pUL25 及 pUL17 蛋白的细胞内免疫标记

准备铺于 6 孔板中细胞生长汇合度达到 90% 的 PK15 细胞和 PK15-C17 细胞, 以 MOI=100 的病毒量分别向两种细胞接种重组病毒 rPRV-36N-EGFP 和重组缺失病毒 rPRV-36N-EGFP- Δ UL17。将接种病毒的细胞置于 4°C 条件下进行吸附 1 h, 然后使用 PBS 清洗两遍细胞后加入 1 mL 无血清 DMEM 培养基继续置于 37°C, 5%CO₂ 培养箱中培养, 分别于感染后 3 h、4 h、5 h 和 6 h 时间点下收集细胞进行低温免疫电镜样本制备。将细胞刮下后 3,000 \times g 离心 15 min, 弃上清后加入 1 mL 固定液 (4% 多聚甲醛+0.5% 戊二醛) 置于 4°C 冰箱固定过夜。使用 50%、70%、90% 和 100% 梯度的 DMF 溶液进行样本逐步脱水, 每个梯度 DMF 溶液 4°C 作用 15 min, 100%DMF 溶液脱水步骤重复一次。弃掉上清液后加入 1 mL 的 DMF/LR 树脂混合液 (DMF: LR 树脂= 2: 1), 于室温静置作用 30 min。弃掉上清液后加入 1 mL 的 DMF/LR 树脂混合液 (DMF: LR 树脂= 1: 2), 于室温静置孵育 30 min。弃掉上清液后加入 1 mL LR 树脂, 置于 4°C 条件下浸透过夜。更换新的 LR

树脂后使用胶囊进行样品包埋，于-20°C冰箱紫外照射聚合 10 d 后准备样品切片及免疫。

将完全聚合的细胞样品取出后使用 Leica 切片机切出 60 nm 细胞超薄切片置于碳支持膜载网上，然后进行切片免疫实验。使用 3%BSA 封闭缓冲液对带有细胞样品的碳支持膜载网于室温条件下作用 30 min，滤纸吸净载网上水分。配制一抗缓冲液，共两组组分别为：兔抗 EGFP 一抗（1：50）、兔抗 Strep 一抗（1：50）和鼠抗 pUL25 蛋白血清（1：50）。将载网置于一抗溶液上室温孵育 40 min，滤纸吸净载网表面液体后使用蒸馏水漂洗 3 次，每次 5 min。配制鼠源（10 nm）和兔源（5 nm）金标二抗缓冲液（1：100），室温条件下孵育载网 40 min，滤纸吸净载网表面液体后使用蒸馏水漂洗 3 次，每次 5 min。最终使用醋酸双氧铀染色液染色 10 min，滤纸吸净载网表面溶液后于室温晾干后使用 H7650 型透射电子显微镜观察。

4.3.9 UL17 基因缺失后 pUL36 和 pUL25 蛋白的细胞内免疫标记

准备铺于 6 孔板中细胞生长汇合度达到 90%的 PK15 细胞，以 MOI=100 的病毒量重组缺失病毒 rPRV-36N-EGFP- Δ UL17。将接种病毒的细胞置于 4°C 条件下进行吸附 1 h，然后使用 PBS 清洗两遍细胞后加入 1 mL 无血清 DMEM 培养基继续置于 37°C，5%CO₂ 培养箱中培养，于感染后 6 h 时间点下收集细胞进行低温免疫电镜样本制备。免疫电镜样本制备方法同上述方法 4.3.6 一致。

将完全聚合的细胞样品取出后使用 Leica 切片机切出 60 nm 细胞超薄切片置于碳支持膜载网上，然后进行切片免疫实验。使用 3%BSA 封闭缓冲液对带有细胞样品的碳支持膜载网于室温条件下作用 30 min，滤纸吸净载网上水分。配制一抗缓冲液兔抗 EGFP 一抗（1：50）和鼠抗 pUL25 蛋白血清（1：50），将载网置于一抗溶液上室温孵育 40 min，滤纸吸净载网表面液体后使用蒸馏水漂洗 3 次，每次 5 min。配制鼠源（10 nm）和兔源（5 nm）金标二抗缓冲液（1：100），室温条件下孵育载网 40 min，滤纸吸净载网表面液体后使用蒸馏水漂洗 3 次，每次 5 min。最终使用醋酸双氧铀染色液染色 10 min，滤纸吸净载网表面溶液后于室温晾干后使用 H7650 型透射电子显微镜观察。

4.4 实验结果

4.4.1 内质网标记

为了构建内质网标记重组质粒，我们选择了 CALR 与 KDEL 两种内质网特异性蛋白作为靶标，将标志序列与红色荧光标签 mCherry 串联至同一开放阅读框中。PCR 扩增出目的条带位于 1,000 bp 和 750 bp 之间，与预期大小相一致（图 4-1A）。然后将该目的序列同源重组连接至 pCMV 载体上构建重组质粒 pCMV-ER，经菌落 PCR 鉴定可见全部菌落均可以扩增出目的条带（图 4-1B）。挑选正确菌落进行扩播后提取质粒测序，测序结果正确，说明成功构建了内质网标记重组质粒。

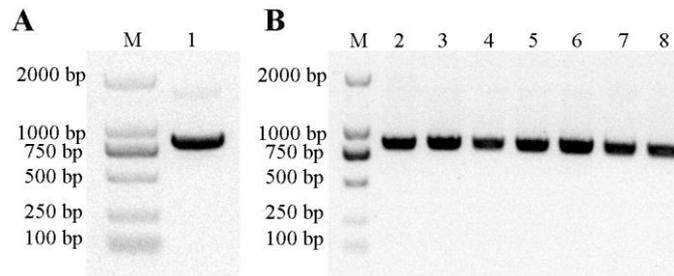


图 4-1 内质网标记质粒的构建

A: 目的序列的扩增; B: 重组质粒的 PCR 鉴定

M: DNA marker; 1: CALR-mCherry-KDEL 片段; 2~8: pCMV-ER 菌落

Fig. 4-1 Construction of the labelling vector of Endoplasmic reticulum

A: Amplification of the target sequence; B: Identification of the recombinant plasmid by PCR

M: DNA marker; 1: CALR-mCherry-KDEL segment; 2~8: Bacterial colonies of pCMV-ER

为鉴定内质网标记质粒的细胞内标记情况, 将重组质粒通过转染试剂 X-tremeGENE HP DNA Transfection Reagent 转导进入细胞, 经细胞内表达 24 h 后于共聚焦显微镜下观察细胞。结果显示, 质粒转染后能够在细胞中表达, 并可见大量红色荧光标记(图 4-2), 且由于红色荧光标签 mCherry 串联表达了 KDEL 内质网滞留信号肽, 其能够特异性定位于细胞内质网中。这说明本研究成功构建了内质网标记质粒且能够特异性标记内质网。

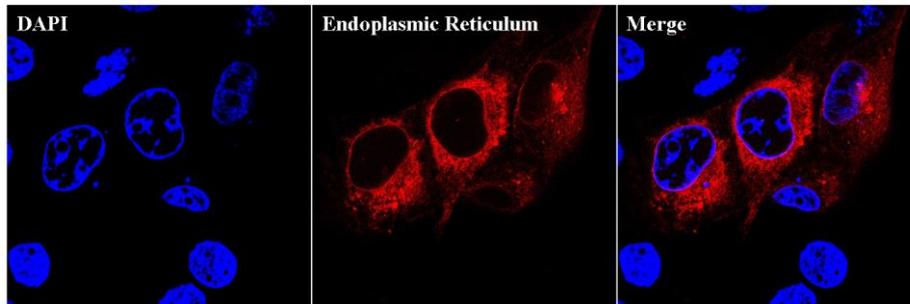


图 4-2 内质网标记

Fig. 4-2 Labelling of Endoplasmic Reticulum

4.4.2 UL36、UL25 和 UL17 基因在病毒复制中转录合成 mRNA 水平

为探究 UL36、UL25 和 UL17 基因在 PRV 复制周期内的基因转录合成 mRNA 水平, 我们设计针对这三种基因的特异性荧光定量检测引物, 同时以细胞基因 GAPDH 为内参对照, 对 rPRV-36N-EGFP 病毒感染 PK15 细胞后 0~6 h 的细胞中 mRNA 进行相对定量检测。结果显示这三种基因中 UL36 基因在 PRV 感染后首先进行基因转录, 在感染 1 h 后即可在细胞中检测到较高的基因表达量(图 4-3A), 感染后 2 h 后可以检测到一定量的 UL17 基因的转录(图 4-3B), 而在感染后 3 h 才可以检测到一定量的 UL25 基因的转录合成 mRNA(图 4-3C)。另外, 结果还显示 UL36 基因表现为持续的高转录合成 mRNA 水平, 而 UL17 和 UL25 基因表现为低转录水平。

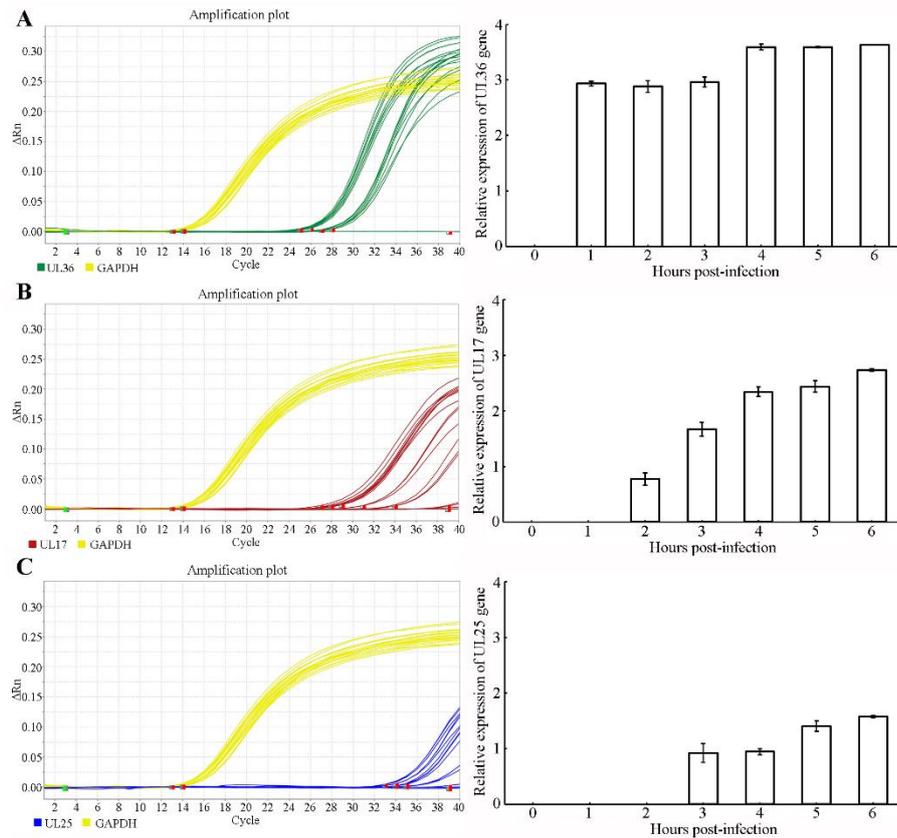


图 4-3 rPRV-36N-EGFP 感染 PK15 细胞的相对定量 PCR 检测

A: UL36 基因的 mRNA 合成水平检测; B: UL17 基因的 mRNA 合成水平检测; C: UL25 基因的 mRNA 合成水平检测

Fig.4-3 Detection of rPRV-36N-EGFP infected PK15 cell by relatively quantitative PCR

A: Detection of synthetic mRNA level of UL36 gene; B: Detection of synthetic mRNA level of UL17 gene; C: Detection of synthetic mRNA level of UL25 gene

另外,我们在重组缺失病毒 rPRV-36N-EGFP-ΔUL17 感染 PK15-C17 细胞的 0~6 h 后分别检测细胞中 UL36、UL17 和 UL25 基因的转录合成 mRNA 情况。结果显示 UL36 基因同样在 PRV 感染后 1 h 即可检测到 mRNA 量(图 4-4A),在 PRV 感染的各时间点均可以检测到 UL17 基因的转录(图 4-4B),而 UL25 基因在 PRV 感染的 4 h 后可以检测到少量的转录(图 4-4C)。尽管 rPRV-36N-EGFP-ΔUL17 感染 PK15-C17 细胞中 UL36、UL17 和 UL25 基因的转录合成 mRNA 量相较于 rPRV-36N-EGFP 感染 PK15 细胞中少,但其趋势相对一致。

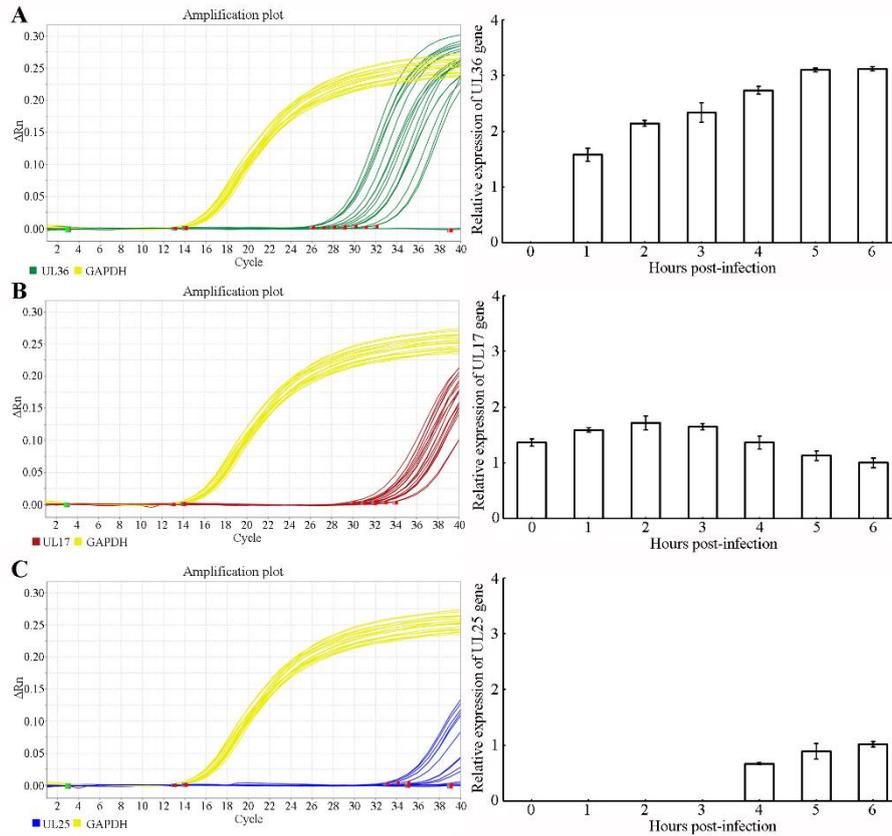


图 4-4 rPRV-36-EGFP- Δ UL17 感染 PK15-C17 细胞的相对定量 PCR 检测

A: UL36 基因的 mRNA 合成水平检测; B: UL17 基因的 mRNA 合成水平检测; C: UL25 基因的 mRNA 合成水平检测

Fig.4-4 Detection of rPRV-36N-EGFP- Δ UL17 infected PK15-C17 cell by relatively quantitative PCR

A: Detection of synthetic mRNA level of UL36 gene; B: Detection of synthetic mRNA level of UL17 gene; C: Detection of synthetic mRNA level of UL25 gene

4.4.3 CATC 各蛋白组分装配的细胞内定位

4.4.3.1 pUL17 与 pUL25 蛋白的细胞内定位

为鉴定 CATC 各蛋白组分蛋白 pUL36、pUL25 和 pUL17 在 PRV 复制周期内的装配动力学, 本研究使用特异性抗体或标签抗体对 PRV 感染后 3 h、4 h、5 h 和 6 h 的细胞内三种蛋白进行两两标记, 然后使用高分辨率活细胞成像系统进行观察。首先使用 strep 标签抗体和 pUL25 蛋白阳性血清分别标记 pUL17 和 pUL25 蛋白, 结果显示 PRV 感染后 3 h 时 pUL17 和 pUL25 蛋白在细胞质中表达, 其中 pUL25 蛋白表达量较低, 但可以观察到这两种蛋白在细胞质中的共定位 (图 4-5); PRV 感染后 4 h 后, 细胞核内检测到 pUL17 和 pUL25 蛋白的共定位信号, 且随着时间的变化, 这两种蛋白在细胞核中的共定位信号一直存在, 说明 pUL17 和 pUL25 蛋白可能是以聚体形式同时装配到病毒衣壳上的 (图 4-5)。另外, 病毒感染后 4 h 时, 细胞质中检测不到 pUL17 和 pUL25 蛋白的共定位信号, 而从感染后 5 h 细胞质中这种共定位信号开始出现且在 6 h 时能够观察到细胞质中增多的共定位信号, 这说明 pUL17 和 pUL25 蛋白可能在 3~4 h 共同转运至细胞核中并装配至病毒衣壳上, 于 5 h 左右开始病毒衣壳成熟出核释放到细胞质中 (图 4-5)。

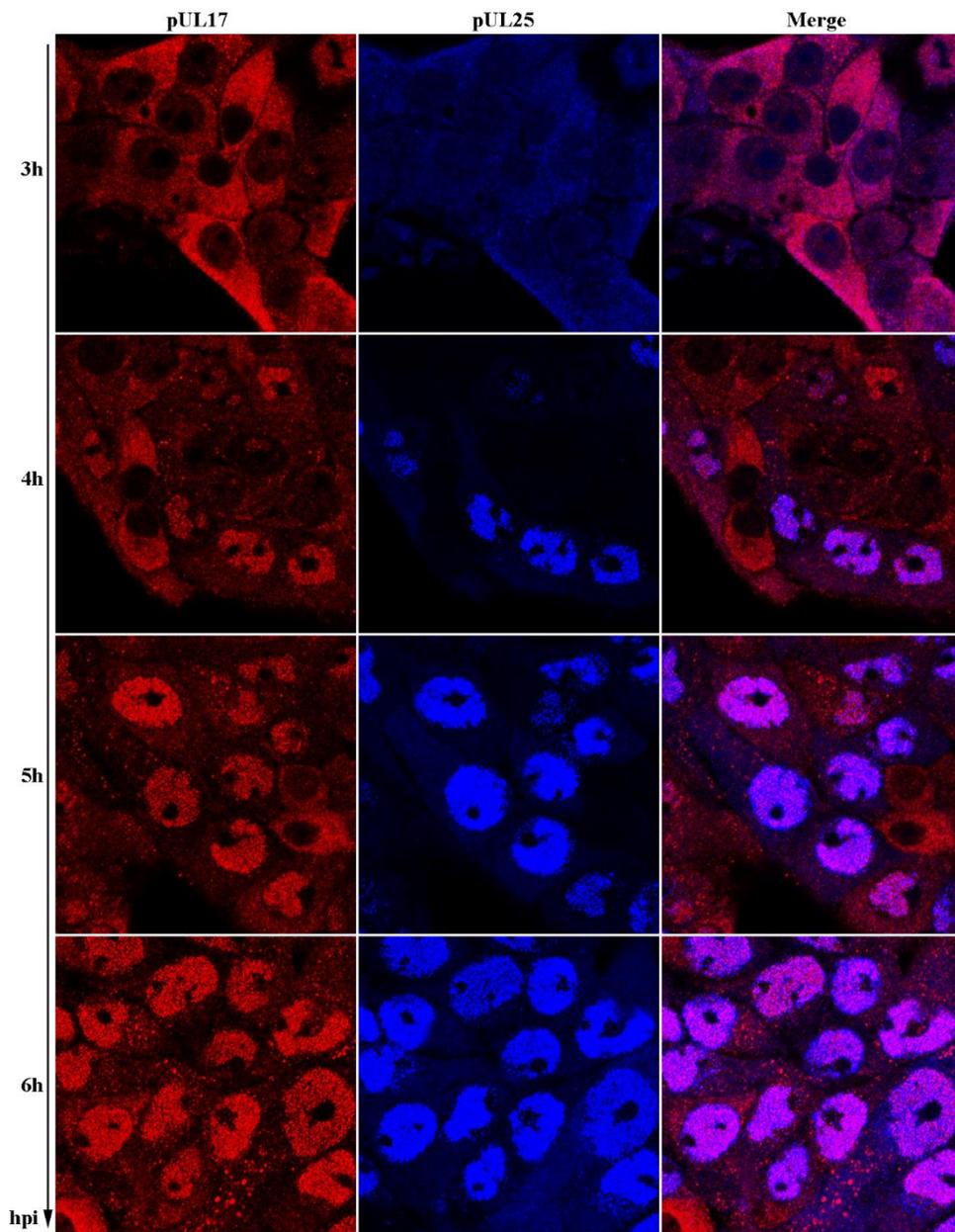


图 4-5 pUL17 和 pUL25 蛋白在 PRV 感染细胞内定位

Fig.4-5 Intracellular localization of pUL17 and pUL25 proteins during PRV infection

4.4.3.2 pUL36 与 pUL25 蛋白的细胞内定位

使用 EGFP 抗体和 pUL25 蛋白阳性血清分别标记 pUL36 和 pUL25 蛋白，结果显示，PRV 感染后 3 h 在细胞质中能够检测到这两种蛋白的表达，蛋白呈弥散状分布，且检测不到两种蛋白的共定位信号（图 4-6）；在 PRV 感染后 4 h 能够在细胞核内检测到 pUL25 蛋白的荧光信号，细胞质中无荧光信号，而 pUL36 蛋白的荧光信号主要聚集在细胞核周围，呈聚集性分布，细胞质其他位置呈散点状分布（图 4-6）；PRV 感染后 5 h，pUL25 蛋白荧光信号依然主要集中在细胞核中，pUL36 蛋白荧光信号主要集中于核周附近，细胞质其他位置基本检测不到信号，在细胞核膜附近

检测到 pUL25 和 pUL36 蛋白的共同定位信号，这说明 pUL36 蛋白在病毒衣壳出核后立即装配，并发生在核膜附近（图 4-6）；PRV 感染后 6 h，细胞质中 pUL25 和 pUL36 蛋白的共定位信号明显增强，部分荧光信号显著定位于细胞边缘，说明此时包裹有 pUL36 蛋白的病毒衣壳在细胞质内可能已经完成二次包膜过程并向细胞膜移动释放（图 4-6）。

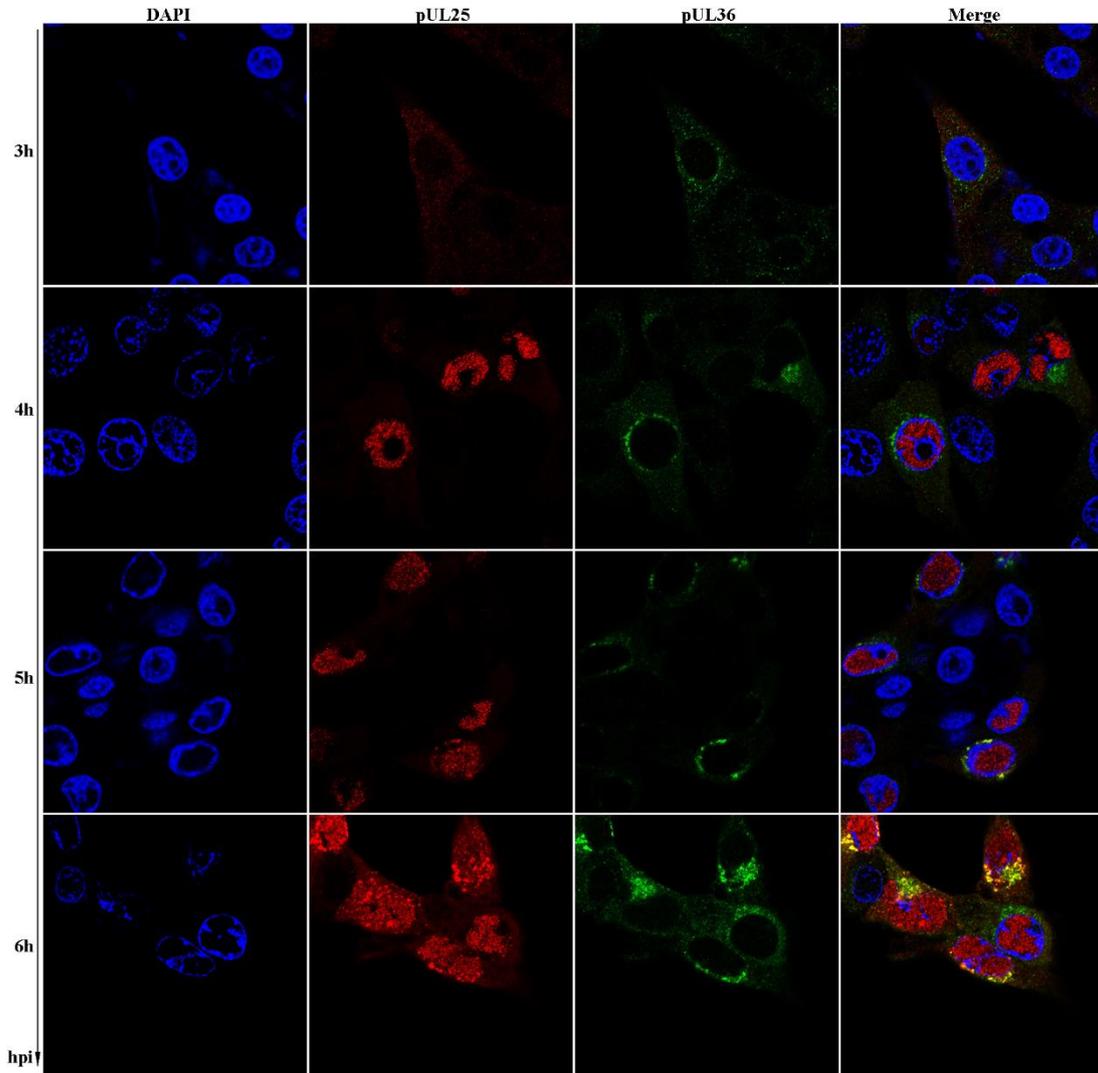


图 4-6 pUL36 和 pUL25 蛋白在 PRV 感染细胞内定位

Fig.4-6 Intracellular localization of pUL36 and pUL25 proteins during PRV infection

4.4.3.3 pUL17 与 pUL36 蛋白的细胞内定位

使用 Strep 和 EGFP 标签抗体分别标记 pUL17 和 pUL36 蛋白，结果显示，PRV 感染后 3 h 时能够检测到细胞质中大量 pUL17 和 pUL36 蛋白的表达，这两种蛋白在细胞质中呈弥散状分布（图 4-7）；PRV 感染 4 h 后，pUL17 蛋白的核定位荧光信号明显增强，而细胞质中依然存在且呈弥散状分布，而 pUL36 蛋白在细胞核膜附近荧光信号增强，细胞质其他位置呈弥散状分布（图 4-7）；PRV 感染后 5 h，pUL17 蛋白荧光信号主要集中于细胞核内，细胞质中荧光信号减弱，而 pUL36 蛋白核膜附近荧光信号再次增强，其他位置荧光信号较弱（图 4-7）；PRV 感染后 6 h 能够在细胞

核与细胞质中同时检测到大量 pUL17 蛋白荧光信号，同时检测到部分 pUL36 与 pUL17 蛋白的细胞质内共同定位信号，该结果与上述 pUL17/pUL25、pUL36/pUL25 细胞内定位结果基本一致（图 4-7）。

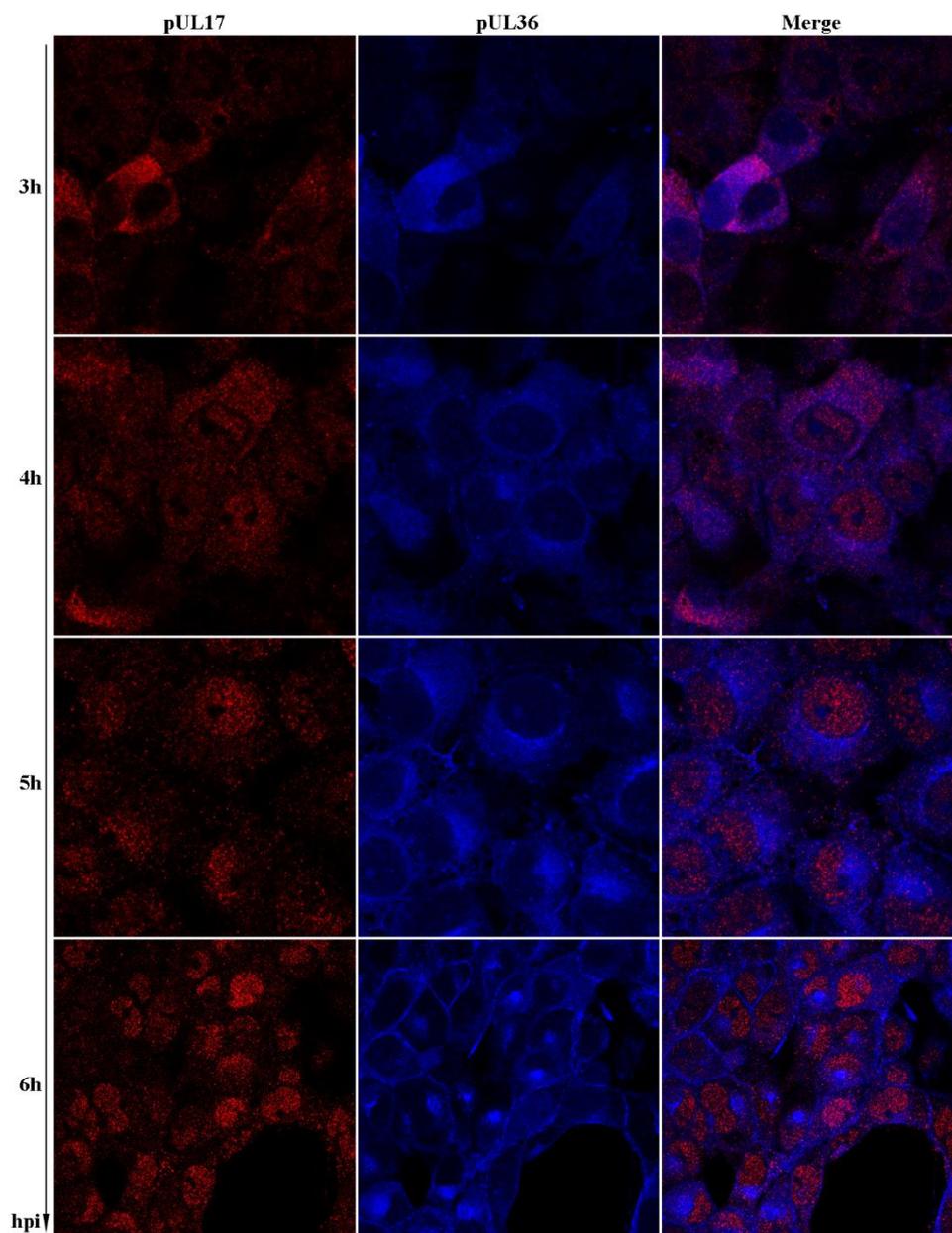


图 4-7 pUL17 和 pUL36 蛋白在 PRV 感染细胞内定位

Fig.4-7 Intracellular localization of pUL17 and pUL36 proteins during PRV infection

4.4.4 pUL17/pUL25 蛋白在 PRV 感染细胞内装配分布

为进一步探索 pUL17 与 pUL25 蛋白在 PRV 感染细胞内分布，本研究取 PRV 感染细胞制备免疫电镜样品，使用 Strep 标签抗体和 pUL25 蛋白阳性血清同时对感染细胞中 pUL17 和 pUL25 蛋白进行标记，然后使用 5 nm 和 10 nm 金标抗体进行二抗孵育标记。电镜结果显示，pUL17（5

nm, 白色箭头指示) 和 pUL25 (10 nm, 黑色箭头指示) 在细胞质内表达后被检测到共同标记, 说明 pUL17 与 pUL25 蛋白表达后在细胞质内可能互作并以聚体的形式存在和发挥作用(图 4-8A)。另外, 细胞核中观察到 pUL17 和 pUL25 蛋白的共同标记, 以及未包装病毒 DNA 的空心衣壳结构(空心三角标记)(图 4-8B)。以上结果与激光共聚焦检测 pUL17/pUL25 定位结果一致, 说明 pUL17 与 pUL25 蛋白的装配模式可能是在细胞质中表达后形成聚体, 以聚体形式被转运至细胞核中装配至病毒衣壳上。

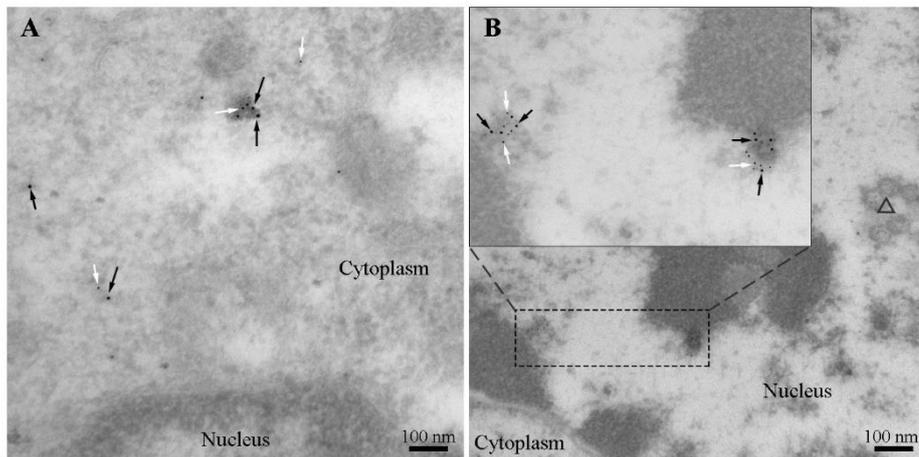


图 4-8 pUL17 和 pUL25 蛋白在 PRV 感染细胞内分布

Fig.4-8 Intracellular distribution of pUL17 and pUL25 proteins during PRV infection

4.4.5 pUL36 蛋白在 PRV 感染细胞内的空间分布

为进一步验证 pUL36 蛋白在 PRV 复制中细胞内装配分布, 本研究使用 EGFP 标记 PRV 感染后细胞内 pUL36 蛋白, 再使用 5 nm 金标抗体进行二抗孵育标记。电镜结果显示, pUL36 蛋白在细胞质中表达后表现出较强的核趋向性, 在核周附近能够观察到免疫标记聚集现象(图 4-9A), 这与激光共聚焦结果相一致; 另外观察到装配有病毒 DNA 的衣壳结构(实心三角标记)位于病毒核膜间隙瞬间, 同时在核外膜附近检测到 pUL36 蛋白的标记, 而在细胞核中观察到未包装病毒 DNA 的空心衣壳结构(图 4-9B); 最后在细胞核膜附近观察到完全出核的病毒衣壳(实心三角标记), 与 pUL36 蛋白处于同一标记区域内(五角星标记)(图 4-9C), 说明这可能是病毒衣壳出核后装配 pUL36 蛋白的场所。

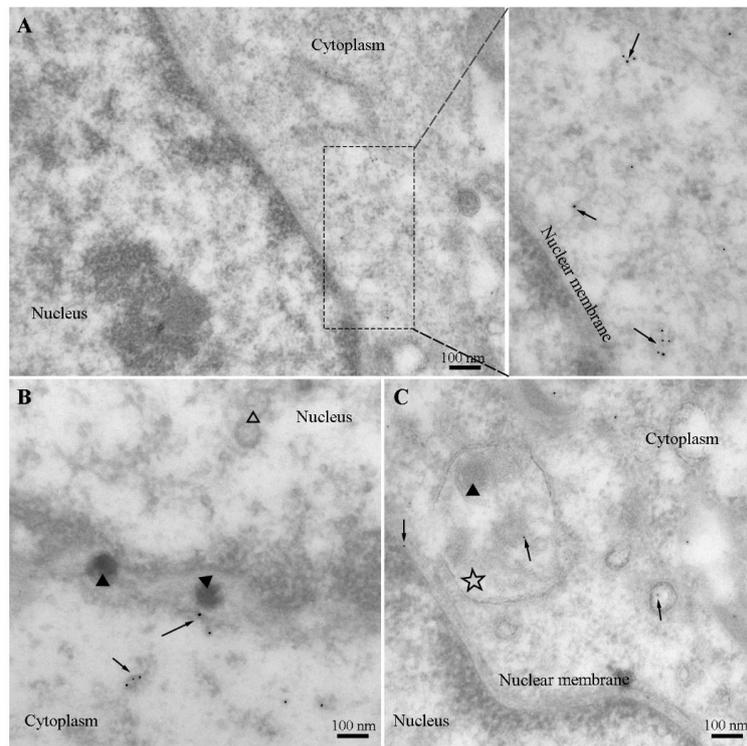


图 4-9 pUL36 蛋白在 PRV 感染细胞内分布

Fig.4-9 Intracellular distribution of pUL36 protein during PRV infection

4.4.6 pUL36 蛋白与内质网共定位

为进一步鉴定 pUL36 蛋白的装配是否与内质网有关，本研究将 rPRV-36N-EGFP 病毒感染已转染内质网标记质粒 24 h 的 PK15 细胞，分别于感染后 5 h 和 6 h 进行细胞固定，使用共聚焦显微镜观察细胞内 pUL36 蛋白与内质网共定位情况。结果显示，rPRV-36N-EGFP 感染后 5 h 和 6 h 在细胞核膜附近聚集的 pUL36 蛋白能够与内质网标记物产生共定位信号（图 4-10），这说明 PRV 感染过程中 pUL36 蛋白于核膜附近装配的场所可能为内质网。

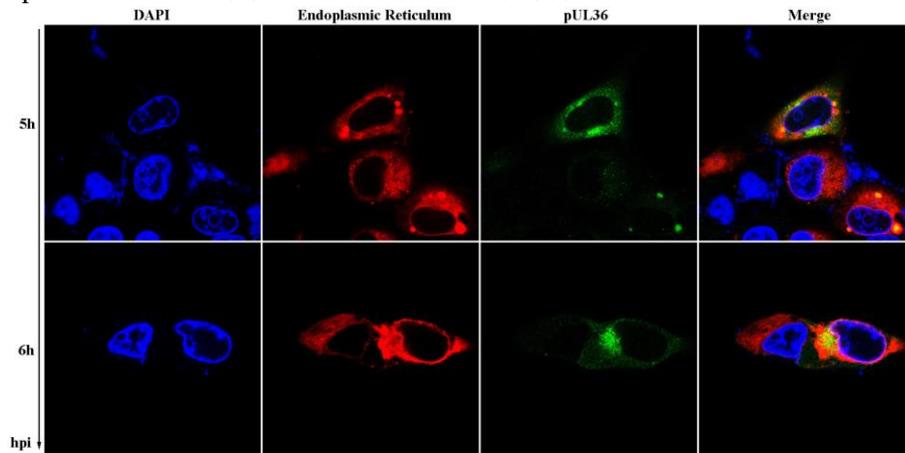


图 4-10 pUL36 蛋白与内质网细胞内共定位

Fig. 4-10 Intracellular co-localization of pUL36 protein and Endoplasmic Reticulum

4.4.7 UL17 基因缺失后细胞内 UL36 和 UL25 基因的转录合成 mRNA 水平

为鉴定 UL17 基因缺失对 pUL36 和 pUL25 蛋白装配的影响, 本研究首先将构建的重组缺失病毒 rPRV-36N-EGFP- Δ UL17 接种至 PK15 细胞, 分别于 0 h、1 h、2 h、3 h、4 h、5 h 和 6 h 收集细胞提取总 RNA, 以细胞基因 GAPDH 为内参对照, 使用荧光定量 PCR 方法检测细胞中 UL36 和 UL25 基因的转录水平。结果显示, PRV 感染后 1 h 即可检测到细胞内较高水平的 UL36 基因转录, 且随时间变化其基因表达量持续上升 (图 4-11A); 而 UL25 基因在感染后 2 h 能够检测到较低水平的转录, 且随时间变化基因表达量增多 (图 4-11B)。这一结果与 rPRV-36N-EGFP 感染 PK15 细胞时细胞内 UL36 和 UL25 基因转录水平基本一致, 说明 UL17 基因的缺失不会影响编码 CATC 其余蛋白组分的基因转录水平。

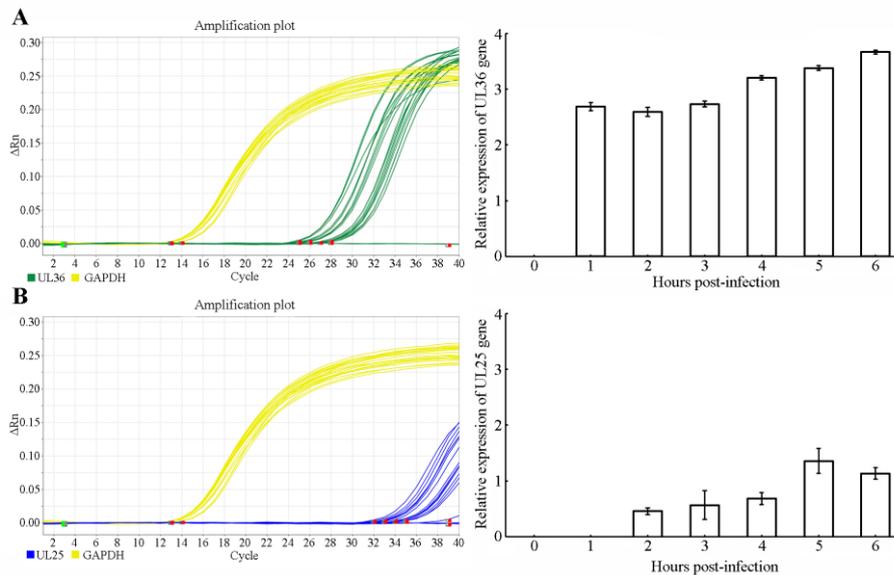


图 4-11 UL17 基因缺失后 UL36 和 UL25 基因转录表达检测

Fig. 4-11 Detection of UL36 and UL25 gene transcriptional expression after deleting UL17 gene

4.4.8 UL17 基因缺失后细胞内 pUL36 和 pUL25 蛋白定位

为进一步鉴定 UL17 基因缺失后对 CATC 其余组分 pUL36 和 pUL25 蛋白的装配影响, 本研究将重组缺失病毒 rPRV-36N-EGFP- Δ UL17 接种 PK15 细胞, 分别于感染后 3 h、4 h、5 h 和 6 h 固定细胞, 使用 pUL25 蛋白阳性血清和 EGFP 标签抗体分别标记 pUL25 和 pUL36 蛋白, 使用激光共聚焦成像系统观察细胞内 pUL25 和 pUL36 蛋白的表达及装配。结果显示, PRV 感染后 3 h, 能够在细胞质中检测到 pUL25 和 pUL36 蛋白荧光信号, 且在细胞质中呈弥散分布状态 (图 4-12); 在 PRV 感染后 4 h, 细胞质中两种蛋白荧光信号增强, pUL25 蛋白被少量的定位于细胞核中, 而 pUL36 蛋白则开始在核膜附近信号增强 (图 4-12); PRV 感染后 5 h 和 6 h, 细胞核中检测到明显的 pUL25 蛋白荧光信号增强, 但绝大部分 pUL25 蛋白被定位于细胞质中, 说明 UL17 基因的缺失直接影响了 pUL25 蛋白的核转移行为。pUL36 蛋白表现为明显的核膜附近聚集, 细胞质其他区域呈弥散斑点状分布, 这与其亲本毒 rPRV-36N-EGFP 感染 PK15 细胞检测结果相一致, 说明 UL17 基因的缺失未影响 pUL36 蛋白在细胞内的表达和核趋向性 (图 4-12)。另外, UL17 基因缺

失情况下,PRV 感染后期 pUL25 和 pUL36 蛋白在细胞质中表达后未检测到共定位信号(图 4-12),这可能是由于未包装出成熟病毒衣壳造成的。

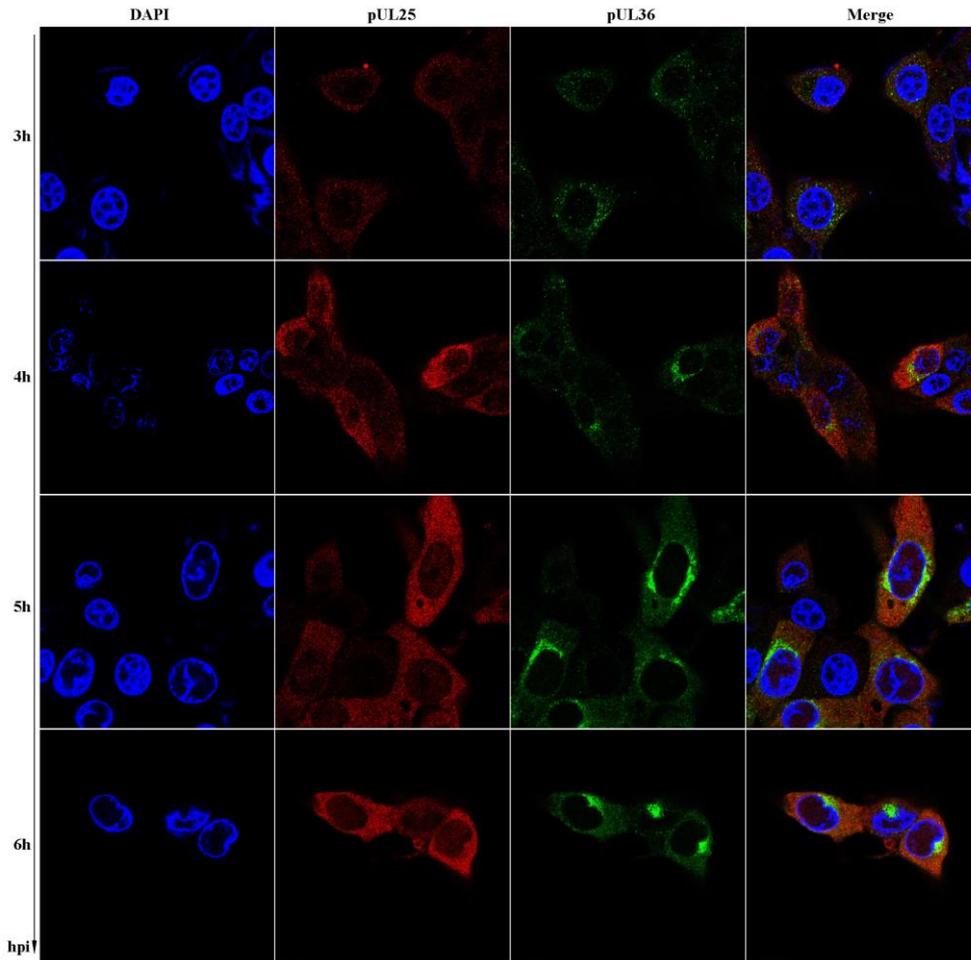


图 4-12 UL17 基因缺失后 pUL25 和 pUL36 蛋白的细胞内定位

Fig. 4-12 Intracellular localization of pUL25 and pUL36 proteins after deleting UL17 gene

4.4.9 UL17 基因缺失后细胞内 pUL36 和 pUL25 蛋白免疫标记

为验证 UL17 基因缺失后细胞内 pUL36 和 pUL25 蛋白的细胞空间分布,将重组缺失病毒 rPRV-36N-EGFP 接种 PK15 细胞后,收集细胞制备免疫电镜样品,以 EGFP 标签抗体和 pUL25 蛋白阳性血清分别对细胞内 pUL36 和 pUL25 蛋白标记,以 5 nm 和 10 nm 金标抗体作为二抗孵育标记。免疫电镜结果显示两种蛋白在细胞质中表达后,pUL25 蛋白(10 nm,黑色箭头标识)可以同时细胞质与细胞核中被定位到,而 pUL36 蛋白(5 nm,白色箭头标识)则在细胞质中被标记(图 4-13A);在细胞质中检测到 pUL25 和 pUL36 蛋白的空间距离较远,未检测到两种标记共定位的现象,这与激光共聚焦检测结果基本一致(图 4-13B);细胞核中检测到的 pUL25 蛋白的金标记呈分散分布,未显示多聚体标记现象,且未在病毒空衣壳(空心三角标识)上检测到金标记(图 4-13C),这与激光共聚焦结果中 pUL25 蛋白在细胞内定位结果相一致;另外,检测到与激光共聚焦一致的 pUL36 蛋白核膜附近定位的金标记,而在细胞内核膜附近聚集了大量未包装

病毒 DNA 的空心衣壳结构 (图 4-13D)。以上研究结果说明, UL17 基因的缺失直接影响了 pUL25 蛋白的核位移, 且细胞核内单独存在的 pUL25 蛋白无法装配至病毒空衣壳上, 导致了细胞核膜附近聚集大量的病毒空衣壳无法释放, 间接导致 pUL36 蛋白无法正常装配, 使 CATC 结构装配失败, 但其不影响 pUL36 蛋白的细胞内表达与核趋向性。

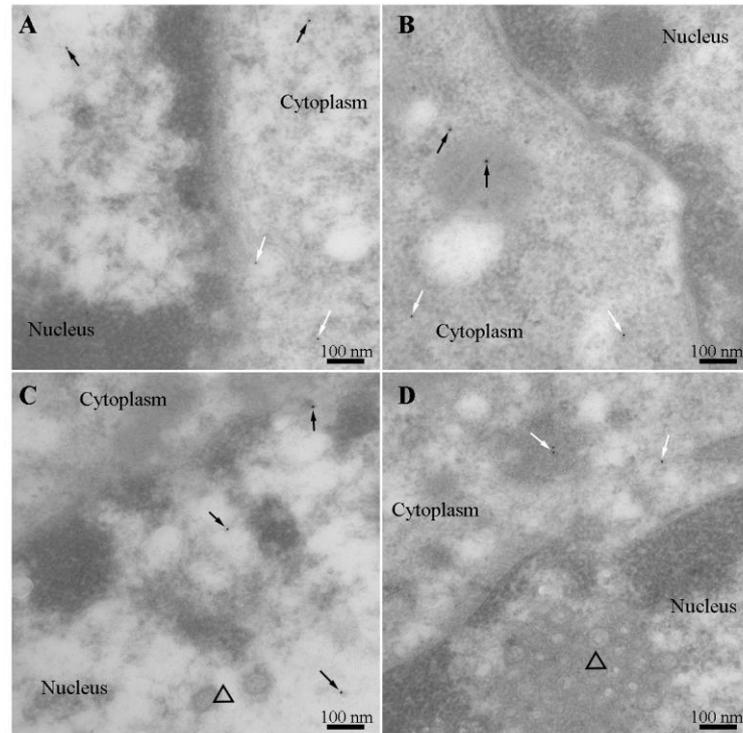


图 4-13 UL17 基因缺失后 pUL25 和 pUL36 蛋白的细胞内空间分布

Fig. 4-13 Distribution of pUL25 and pUL36 proteins within the cell after deleting UL17 gene

4.4.10 UL17 基因缺失后 pUL36 蛋白与内质网共定位

为进一步鉴定 UL17 基因缺失后是否影响 pUL36 蛋白与内质网的共定位, 观察 rPRV-36N-EGFP- Δ UL17 感染已转染内质网标记质粒的 PK15 细胞 6 h 后细胞内情况。结果显示, UL17 基因缺失后 pUL36 蛋白依然能够与内质网标记物产生共定位信号 (图 4-14), 这说明 UL17 基因的缺失不影响 pUL36 蛋白向核膜附近聚集并定位于内质网的行为。

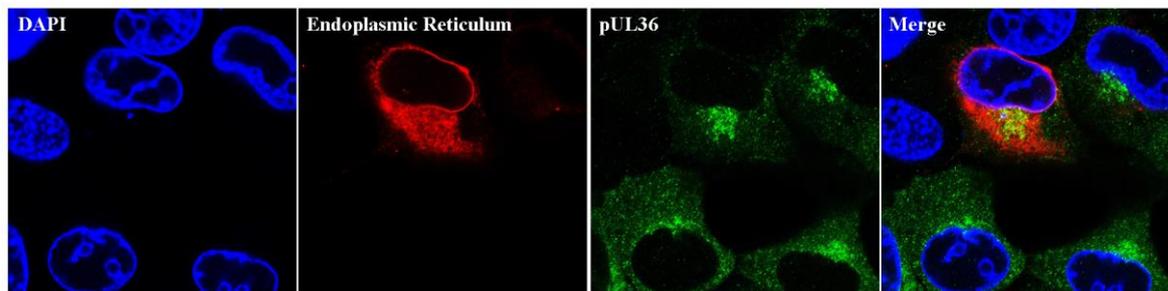


图 4-14 UL17 基因缺失后 pUL36 蛋白与内质网的细胞内共定位

Fig. 4-14 Intracellular co-localization of pUL36 protein and Endoplasmic Reticulum after deleting UL17 gene

4.5 讨论

CATC 结构是 PRV 成熟病毒粒子衣壳顶点的重要组成部分,其在稳定衣壳顶点和连接外被膜等方面发挥重要作用。近年来研究利用冷冻电镜技术解析了 α -疱疹病毒亚科几个成员,如 HSV-1、HSV-2 和 PRV 的衣壳及 CATC 部分结构,研究表明 CATC 是由两个被膜蛋白 pUL36、两个衣壳蛋白 pUL25 和一个 pUL17 蛋白相互作用形成的异五聚体被锚定于病毒衣壳顶点,蛋白之间通过 α -螺旋形成的螺旋束连接 (DAI and ZHOU, 2018; WANG et al., 2022; YUAN et al., 2018)。尽管 CATC 在成熟病毒粒子上的螺旋结果已经被解析,然而其各蛋白组分的细胞内装配动力学及装配机制仍然存在诸多未知。

本研究首先通过相对荧光定量 PCR 检测了 PRV 感染后细胞内 UL36、UL17 和 UL25 基因的转录表达量,确定了这三种基因的转录表达先后顺序,UL36 基因转录表达早于 UL17 基因,而 UL17 基因转录表达早于 UL25 基因,且 UL36 基因在 PRV 感染细胞中各时间点转录表达量均高于 UL17 和 UL25 基因。另外,分别检测了 rPRV-36N-EGFP 感染 PK15 细胞和 rPRV-36N-EGFP- Δ UL17 感染 PK15-C17 细胞中三种基因的转录表达情况,结果基本一致。但由于 PK15-C17 细胞为稳定表达 pUL17 蛋白的补充细胞系,所以在病毒感染的各个时间点均能检测到 UL17 基因的转录表达。基于这三种蛋白的相对荧光定量检测转录表达水平,选取 PRV 感染后 3 h、4 h、5 h 和 6 h 进行各蛋白的细胞内定位和免疫标记,探索 CATC 组分蛋白在 PRV 复制中细胞内装配动力学。

通过蛋白两两标记研究 CATC 各蛋白组分装配动力学过程,结果揭示了 pUL36 蛋白在病毒感染早期表达后弥散分布在细胞质中,感染后 4 h 能够在细胞核膜附近检测到大量荧光标记的 pUL36 蛋白聚集,其表现出较强的核趋向性,并在感染后 5~6 h 在核膜附近与衣壳蛋白共定位,这一研究结果与 HSV-1 感染细胞中 pUL36 蛋白的定位结果相一致 (IVANOVA et al., 2016; SCHIPKE et al., 2012)。这说明 pUL36 蛋白装配至病毒衣壳上的主要场所为核膜附近,但该蛋白的装配是游离发生在细胞质中或是位于其他细胞器上还需要进一步探究。另外,通过激光共聚焦观察到细胞中 pUL17 和 pUL25 蛋白表达后会在细胞质中检测到共定位信号,而在感染后 4 h 开始能够检测到细胞核内两种蛋白的共定位,细胞核中蛋白共定位结果与此前研究 HSV-1 复制中 pUL17/pUL25 蛋白复合物功能结果一致 (SCHOLTES and BAINES, 2009)。然而本研究中观察到这两种蛋白表达后的相互作用及向核转移机制还需要更多的证据。另外,本研究中由于缺乏针对 pUL17 蛋白的特异性抗体,所以选择使用 rPRV-36N-EGFP- Δ UL17 接种 pUL17 蛋白互补细胞 PK15-C17 进行 pUL17/pUL25 和 pUL17/pUL36 蛋白的共定位研究。前期研究证实了 pUL17 蛋白互补细胞能够促进缺失病毒 rPRV-36N-EGFP- Δ UL17 在细胞中的正常装配,其携带的 Strep 标签标记能够指示 pUL17 蛋白在病毒复制中的细胞内行为,为这一试验的可行性奠定基础。

为进一步探索 CATC 各组分蛋白的装配细胞内定位,本研究利用免疫电镜技术对 PRV 感染后细胞内 pUL17/pUL25 蛋白和 pUL36 蛋白进行免疫金标记。结果证实了在细胞质中检测到 pUL17 和 pUL25 蛋白表达后的共同标记,这与激光共聚焦结果相一致,提示 pUL17 与 pUL25 蛋白表达后即在细胞质中发生相互作用以聚体形式存在的可能性,这与之前研究中 pUL17 和 pUL25 蛋白在 HSV-1 感染细胞中可以发生免疫共沉淀的研究结果相一致 (KUHN et al., 2010)。同时在感染后能够在细胞核中检测到 pUL17/pUL25 蛋白聚体形式以及未包装有病毒 DNA 的空衣壳存在,这提

示 pUL17 和 pUL25 蛋白以聚体形式装配至未包装病毒 DNA 衣壳上的极大可能性。免疫电镜结果证明了 pUL36 蛋白在核膜附近聚集与激光共聚焦结果的一致性，通过蛋白共定位实验证明了在 PRV 感染过程中聚集于核膜附近的 pUL36 蛋白能够与内质网发生共定位，这一结果提示 pUL36 蛋白装配可能是与内质网上相关分子发生相互作用，借由内质网膜提供的场所装配至成熟出核的病毒衣壳上，这为研究 pUL36 蛋白在病毒衣壳出核后装配提供新的证据。另外，由于免疫电镜技术与免疫荧光技术的不同，细胞中检测到的 CATC 各蛋白组分信号存在差异。免疫荧光技术是将细胞内所有位置蛋白进行标记并通过荧光信号传导所呈现，而免疫电镜技术是将固定的细胞进行切割呈 60 nm 的细胞薄片，对暴露在这一位面的蛋白进行标记观察，其存在一定的局限性，但其蛋白标记的特异性相对准确。

本研究基于激光共聚焦和免疫电镜标记 CATC 各蛋白组分的细胞内定位与空间分布，将 CATC 在 PRV 感染细胞中的装配动力学过程大致描述为三个阶段：(i) pUL36、pUL17 和 pUL25 蛋白在细胞质中分别表达并呈弥散性分布状态；(ii) pUL17 与 pUL25 蛋白在细胞质中发生相互作用并以聚体形式转运至细胞核中，在细胞核中装配至未包装病毒 DNA 的空衣壳上，pUL36 蛋白表现为明显的核趋向性，向核周转移并聚集存在；(iii) pUL36 蛋白在核膜附近存在的内质网结构中装配至包裹病毒 DNA 和带有 pUL17/pUL25 蛋白的病毒衣壳上，启动其他被膜蛋白及外囊膜装配进程（图 4-15）。

pUL17 蛋白在所有疱疹病毒中是相对保守的，在 α -疱疹病毒的研究中其与另一衣壳蛋白 pUL25 发生相互作用，以异二聚体的形式发挥重要功能 (SNIJDER et al., 2017)。同时，该蛋白是构成病毒衣壳顶点 CATC 结构的关键组成部分，与 pUL25 及 pUL36 蛋白在成熟病毒粒子上的相互作用起到了稳定衣壳的作用，是通过局部增强顶点的机械强度以承受基因组 DNA 包装过程中产生的内部压力 (HUET et al., 2020; SNIJDER et al., 2017)。另外研究表明 pUL17 蛋白与病毒衣壳 portal 组分 pUL6 蛋白是使末端酶复合体与衣壳结合及随后将病毒基因组 DNA 切割、包装和稳定装配进病毒衣壳中的关键病毒因子 (HUET et al., 2020)。pUL17 蛋白的缺失会严重影响病毒粒子的正常装配，造成细胞核中大量沉积未包裹基因组 DNA 的空衣壳 (KUHN et al., 2010; SALMON et al., 1998)。

本研究通过构建缺失 UL17 基因的重组荧光缺失病毒 rPRV-36N-EGFP- Δ UL17，接种宿主细胞后研究 UL17 基因的缺失对 CATC 其余组分 pUL25 和 pUL36 蛋白的装配影响。首先使用相对荧光定量 PCR 检测了细胞感染缺失病毒后 UL36 和 UL25 基因的转录表达量，其与亲本毒 rPRV-36N-EGFP 感染结果基本一致，这说明了 UL17 基因的缺失不影响另外两种基因的转录表达，而是可能只影响病毒感染后期两种蛋白的装配。为进一步验证这一猜想，我们使用高分辨率活细胞成像系统观察重组缺失病毒 rPRV-36N-EGFP- Δ UL17 接种 PK15 细胞后 3~6 h 细胞内 pUL25 和 pUL36 蛋白表达及细胞内定位情况。结果发现感染早期细胞内 pUL25 和 pUL36 蛋白能够正常表达，但 pUL25 蛋白进核效率大打折扣，这与早期研究中 pUL17 对于 pUL25 蛋白的唯一核定位是必不可少的结论相一致 (SCHOLTES and BAINES, 2009)。然而，在完全缺失 UL17 基因的情况下，我们观察到依然有少量的 pUL25 蛋白被定位于细胞核中，这说明 UL17 基因的缺失虽然直接影响了 pUL25 蛋白的进核，但其可能不是介导 pUL25 蛋白进核的唯一作用因子。另外，UL17 基因的缺失未检测到 pUL36 蛋白在细胞中的表达及定位变化，pUL36 蛋白表达后仍表现为强的核趋向性，会在核膜附近形成大量聚集且能够定位于内质网中，但未检测到其与衣壳蛋白 pUL25

相互作用装配到病毒衣壳的事件发生,这说明 UL17 基因的缺失不会直接影响 pUL36 蛋白细胞内的行为变化。借助免疫电镜标记 UL17 缺失情况下细胞内 pUL25 和 pUL36 蛋白的空间定位,得到与激光共聚焦相一致的结论。UL17 基因缺失后,细胞质内表达的 pUL25 和 pUL36 蛋白之间不存在直接相互作用;细胞质与细胞核中均能够检测到 pUL25 蛋白的存在,而除 pUL17 介导的 pUL25 进核事件外是否还有额外病毒蛋白介导 pUL25 进核还需要进一步探索;细胞核内检测到的 pUL25 蛋白呈弥散分布,且装配不到病毒空心衣壳结构上;pUL36 蛋白在细胞核膜附近聚集,且在细胞核内检测到大量病毒空心衣壳的沉积。

我们通过缺失 UL17 基因研究了其对 pUL25 和 pUL36 蛋白的装配影响,其通过直接影响 pUL25 蛋白的进核机制,且在细胞核内无 pUL17 蛋白情况下病毒衣壳无法装配 pUL25 蛋白,造成大量未包裹基因组 DNA 空心衣壳沉积,进而阻止细胞核内成熟病毒衣壳的包装与核输出,间接影响了 pUL36 蛋白装配到病毒衣壳上的行为(图 4-15)。

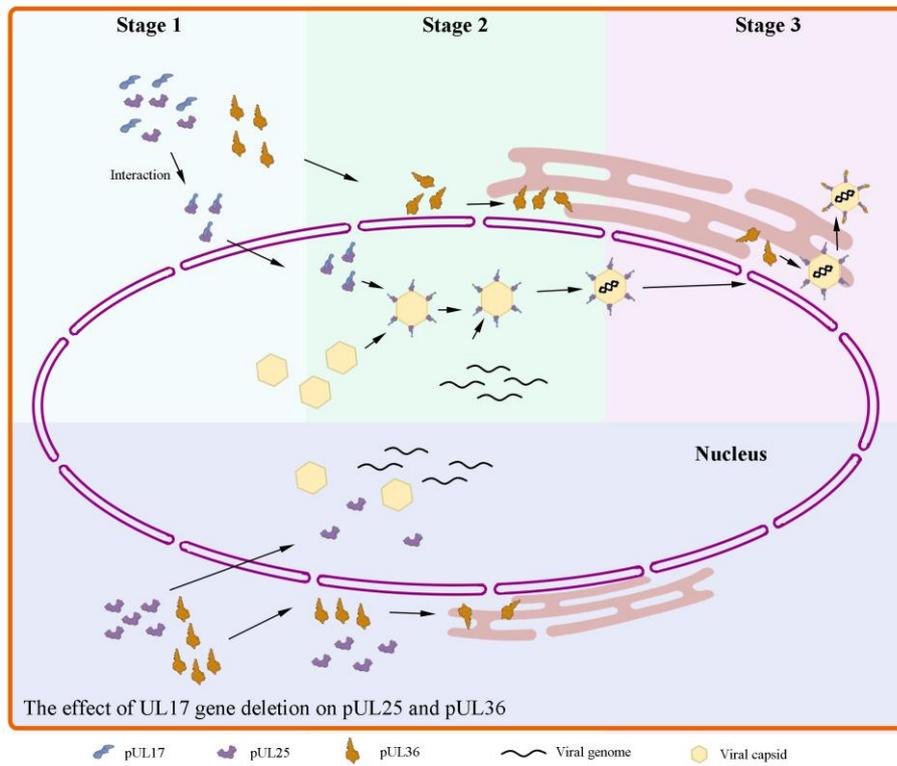


图 4-15 CATC 装配和 UL17 基因缺失对 pUL25 和 pUL36 蛋白影响示意图

Fig. 4-15 Schematic diagram of the assembly of CATC and the effect of UL17 gene deletion on pUL25 and pUL36 proteins

第五章 CATC 的体外表达及组装

CATC 是成熟疱疹病毒粒子上用于稳定衣壳和连接外膜的重要组成部分。已有研究报道了成熟疱疹病毒衣壳结构 CATC 是由 pUL36、pUL17 和 pUL25 蛋白之间形成的异五聚体螺旋束而组成的蛋白复合体,但其完整蛋白结构及相互作用机制尚不知晓。本研究拟通过体外表达 CATC 的三种蛋白组分,经体外组装并借助冷冻电镜单颗粒重构技术进行结构解析,进一步探索其蛋白复合体内部蛋白相互作用机制及结构变化,为全面揭示 CATC 的装配机制提供支持。

5.1 主要实验材料

sf9 昆虫细胞购自 Gibco 公司,由本实验传代并保存。

pFastBac-1 质粒由本实验室保存。

PrimeSTAR HS DNA polymerase 购自 Takara 公司;核酸内切酶 BamHI、XbaI 和蛋白交联剂 BS3 均购自 Thermo 公司;琼脂糖和 tetracycline 均购自 Solarbio 公司;胶回收试剂盒和 DH5 α 感受态均购自 TIANGEN 公司;同源重组试剂盒购自诺唯赞公司;DH10Bac 感受态购自博迈德公司;PVDF 膜、Gentamicin 和 Triton X-100 均购自 Sigma 公司;X-gal 购自 Biosharp 公司;Collectin 转染试剂和 Grace 培养基均购自 Gibco 公司;Superdex 200 Increase 购自 GE 公司;BAC/PAC Isolation kit 购自 OMEGA 公司;Strep 标签抗体购自博奥龙公司;羊抗鼠 Alexa Fluor 800 荧光二抗购自 Invitrogen 公司。

5.2 主要实验仪器

PCR 仪 (Mastercycler® nexus) 和微量离心机 (5427R) 购自 Eppendorf 公司;水浴锅 (DK-8D) 购自上海一恒科技公司;金属浴 (BTC-100D) 购自杭州米欧仪器公司;光学显微镜 (Eclipse E200) 购自 Nikon 公司;近红外扫描成像系统 (Odyssey CLX) 购自 Odyssey 公司;AKTA 蛋白纯化仪 (AKTA avant150) 购自 GE 公司;透射电子显微镜 (H7650) 购自 HITACHI 公司;冷冻电子显微镜 (Titan Krios 300kV) 购自 FEI 公司。

5.3 实验方法

5.3.1 引物设计

参照本实验室分离毒株 PRV HLJ-2013 基因组 (GenBank 号: MK080279) 为模板,设计针对 CATC 组分编码基因 UL17、UL25 和 UL36CT 的扩增引物,引物设计如表 5-1 所示。然后将其分别构建至昆虫细胞表达载体 pFastBac-1 质粒上,并于基因 N 末端添加 Strep 标签及 HRV 3C 蛋白酶切位点。

表 5-1 目的基因扩增引物

Table 5-1 Primers for amplifying the target gene

引物名称	引物序列 (5'→3')	片段长度
UL17-F	CTGTTCCAGGGGCCCGAATTCATGGACGCCACATC	1,794 bp
UL17-R	CTCGAGACTGCAGGCTCTAGATTACTACACGCGGCGGCA	
UL25-F	CTGTTCCAGGGGCCCGAATTCATGGACCGCGCGTGGTTC	1,611 bp
UL25-R	CTCGAGACTGCAGGCTCTAGATTATCAGGCGGCGGCGAA	
UL36CT-F	CTGTTCCAGGGGCCCGAATTCCTGCGGCCACCTGCT	1,398 bp
UL36CT-R	CTCGAGACTGCAGGCTCTAGATTATCAGCCCAGGATCAG	

以上引物均送至睿博兴科生物技术有限公司进行合成。

5.3.2 重组质粒的构建及鉴定

以提取的 PRV 基因组为模板, 使用上述合成的引物进行目的基因的扩增。PCR 扩增体系如下: 2×PrimeSTAR GC Buffer, 25 μL; dNTP Mixture, 8 μL; 引物 F, 2 μL; 引物 R, 2 μL; 模板, 1 μL; PrimeSTAR HS DNA Polymerase, 1 μL; ddH₂O, 11 μL。将上述各组分溶液加入到 PCR 管中充分混匀后置于 PCR 仪中进行目的基因的扩增。PCR 扩增程序如下: 95°C 预变性 5 min; 98°C 变性 15 s, 65°C 退火 30 s, 72°C 延伸 2 min, 循环 35 次; 72°C 延伸 10 min; 4°C 保温。另外, 需要对载体质粒 pFastBac-1 进行线性化处理, 使用快速核酸内切酶 BamHI 和 XbaI 进行酶切, 体系如下: 10×FD Digestion buffer, 5 μL; BamHI, 2.5 μL; XbaI, 2.5 μL; pFastBac-1 质粒, 10 μL; ddH₂O, 30 μL。将上述各组分溶液混匀后置于 37°C 水浴锅中孵育 40 min, 然后置于 80°C 金属浴中进行酶灭活 5 min。配制 1% 琼脂糖凝胶进行核酸电泳, 于紫外照射灯下切回目的条带位置凝胶, 使用胶回收试剂盒进行目的片段与线性化 pFastBac-1 载体片段的回收。

使用同源重组试剂盒进行目的片段与线性化 pFastBac-1 质粒的连接, 连接体系如下: 5×CE Buffer, 4 μL; ExnaseII, 2 μL; UL17/UL25/UL36CT 目的片段, 3 μL; 线性化 pFastBac-1 载体, 2 μL; H₂O, 9 μL。将上述各组分充分混匀后置于 37°C 水浴锅中作用 30 min, 然后立即置于冰上冷却。取 DH5α 感受态细胞置于冰上融化, 取 10 μL 连接产物加入到感受态细胞中, 轻弹管底进行混匀, 置于冰上作用 30 min, 于 42°C 水浴中热激 90 s, 然后立即置于冰上冷却 3-5 min, 向感受态细胞中加入 900 μL 无抗 LB 培养基, 于 37°C, 220 rpm/min 摇床中摇菌 1 h。将菌液离心 6,000×g, 3 min, 剩余 100 μL 上清后重悬菌体, 将其涂布于含有氨苄青霉素 (Ampicillin, A⁺) 的 LB 平皿上, 放置于 37°C 细菌培养箱中倒置培养 13~16 h。挑取过夜培养的菌落进行 PCR 鉴定, 将条带正确的菌落进行扩大培养后小提质粒, 测定浓度后送至睿博兴科生物技术有限公司进行测序。

5.3.3 重组杆粒的制备

将测序正确的质粒进行重组杆粒的制备。首先将 DH10Bac 感受态细胞从 -80°C 冰箱取出后置于冰上缓慢融化, 取 1 μL 测序正确的质粒加入到 40 μL DH10Bac 感受态细胞中并轻弹管壁使其充分混匀, 将其置于冰上孵育 30 min, 然后置于 42°C 水浴锅中热激 45 s 后立即置于冰上冷却 2

min, 向管中加入 900 μL 无抗 LB 培养基, 于 37°C, 220 rpm/min 摇床中摇菌 4 h。取 100 μL 菌液涂布于含有 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ Kanamycin、7 $\mu\text{g}/\text{mL}$ Gentamicin、10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ tetracycline、100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ X-gal 和 40 $\mu\text{g}/\text{mL}$ IPTG 的 LB 琼脂平板上, 置于 37°C 细菌培养箱中进行避光培养 48 h。待平板上生长出蓝白斑后挑取一定数量白斑加入到新鲜含有 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ Kanamycin、7 $\mu\text{g}/\text{mL}$ Gentamicin、10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ tetracycline 的 LB 培养基中继续扩播 24 h 后进行重组杆粒的提取。

重组杆粒的提取依照 BAC/PAC Isolation Kit 试剂盒说明书进行, 简要步骤如下:

- (1) 将培养 24 h 的菌体进行高速离心 13,000 \times g, 5 min;
- (2) 使用 260 μL 加有 RNase A 的 Buffer T1 溶液重悬细菌沉淀;
- (3) 向其中加入 260 μL Buffer T2 溶液并上下颠倒混匀 5~10 次以使得液体变澄清, 室温静置 5 min;
- (4) 加入 260 μL 预冷的 Buffer T3 溶液并上下颠倒混匀 15~20 次产生可见白色絮状沉淀, 置于冰上作用 5 min;
- (5) 4°C 条件下离心 14,000 \times g, 10 min;
- (6) 小心吸出离心上清并转移至新的 1.5 mL EP 管中, 加入 0.7 倍体积的异丙醇溶液和 2 μL linear polyacrylamides, 涡旋混匀 15 s;
- (7) 4°C 条件下离心 14,000 \times g, 10 min;
- (8) 轻轻吸出离心上清, 使用 500 μL 70% 乙醇清洗两次, 并于 4°C 条件下离心 14,000 \times g, 10 min;
- (9) 将上清弃掉后置于细胞超净台中进行吹干, 向管中加入 20 μL 高压灭菌水进行杆粒溶解。

5.3.4 重组杆粒的鉴定

通过交叉引物扩增的方式鉴定重组杆粒是否构建正确。使用杆粒自身包含的 M13 检测引物 (M13-F: GTTTCACAGTCACGAC; M13-R: CAGGAAACAGCTATGAC) 与目的基因引物组合, 形成 M13-F/M13-R、M13-F/目的基因-R、目的基因-F/M13-R 和目的基因 F/R 四种组合。PCR 扩增体系为: 2 \times PrimeSTAR GC Buffer, 10 μL ; dNTP Mixture, 4 μL ; 引物 F, 1 μL ; 引物 R, 1 μL ; 模板, 1 μL ; PrimeSTAR HS DNA Polymerase, 0.5 μL ; ddH₂O, 2.5 μL 。将上述各组分进行充分混匀后置于 PCR 仪中进行扩增, PCR 程序为: 95°C 预变性 5 min; 98°C 变性 15 s, 60°C 退火 30 s, 72°C 延伸 4 min, 循环 35 次; 72°C 延伸 10 min; 4°C 保温。配制 1% 琼脂糖凝胶进行核酸电泳鉴定重组杆粒情况。

5.3.5 重组杆状病毒的包装

将 PCR 鉴定正确的重组杆粒准备转染 sf9 细胞进行重组杆状病毒的包装。首先准备吸取 8 \times 10⁵ 个生长状态良好的 sf9 细胞铺于细胞 6 孔板中, 于室温静置 15 min 待细胞贴壁后进行转染。取 1 μg 纯化的重组杆粒加入到 100 μL Grace 培养基中混匀, 另取 6 μL Collectin 转染试剂加入到新的 100 μL Grace 培养基中混匀, 将上述两溶液混合并于室温静置 25~30 min。更换细胞培养基为新鲜的 Grace 培养基并将上述转染溶液轻轻加入到细胞培养基中, 将细胞 6 孔板置于 27°C 温箱中静置培养 5 h, 使用 PBS 溶液润洗两遍细胞后加入新鲜的含 10% FBS 的 Grace 培养基继续置于 27°C 温箱中培养, 于每日观察细胞病变情况。

5.3.6 病毒扩增及蛋白表达鉴定

待显微镜下观察到大量细胞核变大，细胞边缘皱缩时将孔中细胞吹下，将细胞悬液吹匀后分装冻存于-80℃冰箱中，此时病毒定义为 P0 代。以 1: 100 的比例接种 P0 代病毒于生长至 2×10^6 细胞密度的 sf9 细胞中，待细胞存活率降至 50% 以下时收集 P1 代毒，将病毒液转移至 50 mL 离心管中置于 4℃ 冰箱避光保存。同样以 1: 100 的比例接种 P1 代毒进行 P2 代杆状病毒的扩增。

蛋白表达鉴定选用 P1 代病毒进行，首先吸取 1 mL sf9 细胞和 UL17、UL25 及 UL36CT 的 P1 代杆状病毒悬液，将细胞进行 $3,000 \times g$ 离心 5 min。使用 100 μ L PBS 溶液重悬细胞后加入等体积的 2 \times 蛋白 Loading Buffer 混匀后置于金属浴中 100℃ 煮沸 10 min。样品处理完成后进行蛋白电泳，每孔上样 20 μ L，于恒压 160 V 电泳 1 h 10 min 后进行 PVDF 膜转移，膜转移使用快速湿转仪进行。室温条件下使用 5% 脱脂乳进行 PVDF 膜封闭 1 h，然后使用脱脂乳稀释鼠源 Strep 标签一抗（1: 1,000 稀释），于室温孵育 PVDF 膜 1 h。使用 TBST 溶液清洗 PVDF 膜 3 次，每次 10 min。使用脱脂乳稀释羊抗鼠荧光二抗 Alexa Fluor 800（1: 10,000 稀释）于室温避光孵育 PVDF 膜 1 h，然后使用 TBST 溶液清洗膜 3 次，每次 10 min，最终使用近红外扫描成像系统进行检测。

5.3.7 蛋白表达及纯化

首先准备 3×300 mL 生长至 2×10^6 细胞密度且状态良好的 sf9 细胞，向每瓶细胞中分别加入 3 mL 制备的基于 UL17、UL25 和 UL36CT 的 P2 代杆状病毒细胞液，将其置回 27℃，120 rpm/min 的昆虫细胞培养箱中进行培养及蛋白表达。待细胞接毒后 3 d 收集细胞，离心 $3,000 \times g$ ，10 min 获得细胞沉淀。使用 40 mL 蛋白纯化 Buffer3（50 mmol/L NaH_2PO_4 ，150 mmol/L NaCl，pH8.0）将细胞进行重悬，向其中加入终浓度为 1% 的 Triton X-100 溶液和终浓度为 10 mmol/L 的 PMSF 蛋白酶抑制剂，涡旋混匀后置于冰上孵育 30 min 进行细胞破碎。将处理好的细胞溶液进行 $10,000 \times g$ 离心 45 min 后收集上清进行蛋白纯化。吸取 1 mL Strep 标签树脂加入到重力柱中，待树脂沉降后使用 6 \times 5 mL 蛋白纯化 Buffer3 进行树脂的平衡。将离心上清分批次加入到树脂中进行亲和层析结合，然后加入 8 \times 5 mL 的蛋白纯化 Buffer3 进行树脂中杂蛋白清洗，再次加入 5 mL 蛋白纯化 Buffer3 进行树脂保存，并吸取树脂悬液后进行蛋白电泳检测蛋白挂柱效果。向树脂中加入 40 μ L PPase 蛋白酶重悬 3 次后进行过夜酶切，收集过夜酶切蛋白液进行浓缩，测定蛋白浓度后冻存至-80℃冰箱中备用。

5.3.8 蛋白复合物的孵育、分子筛纯化及质谱鉴定

取测定浓度的纯化的 pUL17、pUL25 和 pUL36CT 蛋白进行蛋白复合物的孵育，根据文献中报道成熟病毒粒子上 CATC 的组成比例为 pUL17: pUL25: pUL36=1: 2: 2，依照蛋白浓度换算各蛋白的摩尔质量，将摩尔质量按照组成比例吸取各蛋白溶液加入到 1.5 mL EP 管中，并向其中加入终浓度为 5 mmol/L 的 BS3 蛋白交联剂，轻轻混匀后置于冰上作用 2 h 后准备进行蛋白复合物的分子筛纯化。

分子筛纯化首先使用 0.5 mol/L 的 NaOH 溶液和水清洗 AKTA 蛋白纯化系统，纯化介质选择 GE 公司 Superdex 200 Increase 进行蛋白复合物的纯化，将该介质装至 AKTA 蛋白纯化系统中，

使用蛋白纯化 Buffer3 以 0.5 mL/min 流速进行平衡。上样 0.5 mL CATC 复合物孵育溶液后进行分子筛纯化, 设置检测峰 mAu 值将各检测峰蛋白收集至 15 mL 离心管中。收集各检测峰蛋白后进行电泳检测蛋白复合物纯化情况。将目的峰区域蛋白进行电泳后切胶送至华大基因进行质谱鉴定成分。

5.3.9 蛋白复合物的电镜观察

取经分子筛纯化后的 CATC 蛋白复合物 20 μ L 制备电镜负染样品, 首先对电镜碳支持膜载网进行辉光放电, 将蛋白液滴加至样品制备工具台上, 使用镊子将载网置于液滴上进行蛋白吸附 2 min, 使用滤纸吸干载网上多余液体后, 将载网放置于铀染色液的液滴上染色 5 min, 然后使用滤纸将载网上剩余的染色液吸干, 于室温静置晾干后使用电子透射显微镜进行观察。

5.3.10 蛋白复合物的冷冻电镜样品制备

CATC 蛋白复合物的冷冻电镜样品制备借助制样机器人完成操作。首先调节制样机器人参数至 4°C 条件及 100% 湿度环境, 设置合适的滤纸吸附时间与吸附力度。在准备制样前将需要使用的泡沫盒和铜杯用液氮进行冷却, 然后将乙烷气体导入铜杯使其液化并装满铜杯, 待铜杯中有固态乙烷产生后开始制样。吸取 3.5 μ L 纯化的 CATC 蛋白复合物溶液滴加至经辉光放电的金网表面, 蛋白吸附 10 s 后制样机器人根据设置好的参数进行载网表面多余液体的吸附。然后带有蛋白样品的载网被投入液态乙烷中进行快速冷冻。将制备好的蛋白样品置于液氮中可进行长时间保存, 从液氮中取出样品置于冷冻电子显微镜 (F200C) 进行样品观察及后续数据采集工作。

5.3.11 数据采集及处理

将冷冻样品转移至配备有 K2 直接电子探测相机的 300 kV 的冷冻电子显微镜 (FEI Titan Krios) 中, 设置数据收集参数如下: 放大倍数为 13,000 倍 (每个像素点对应样品平面 1.076Å), 电子剂量为 50e/Å², 欠焦值设为 -1.0 μ m~-2.5 μ m, 每一个 movie 为 32 帧, 总体曝光时间为 8.44 s。使用 Serial-EM 软件的 Super Resolution 模式进行图像采集。图像采集后使用 Cryosparc 3.0 软件进行数据处理, 首先使用 patch motion correction 进行数据漂移校正。为得到更加真实的蛋白颗粒二维投影信息, 使用 patch CTF estimation 进行 CTF 校正。在进行图像校正后进行蛋白单颗粒挑选, 在此基础上进行二维分类、三维分类及蛋白重构。

5.4 实验结果

5.4.1 UL17、UL25 和 UL36CT 基因重组质粒的构建及鉴定

为构建针对 UL17、UL25 和 UL36CT 基因的真核重组质粒, 首先以本实验分离毒株 PRV HLJ-2013 基因组为模板进行三个基因片段的扩增。PCR 结果显示扩增出了与预期目的基因大小一致的片段 (图 5-1A), 能够用于后续重组质粒的构建。将这三个基因片段分别连接至 pFastBac 载体质粒上构建出 pFastBac/UL17、pFastBac/UL25 和 pFastBac/UL36CT 三种重组质粒, 经过菌落 PCR 鉴定挑选出连接正确的菌落进行测序鉴定同样正确 (图 5-1B-D), 能够用于后续重组质粒的

构建。

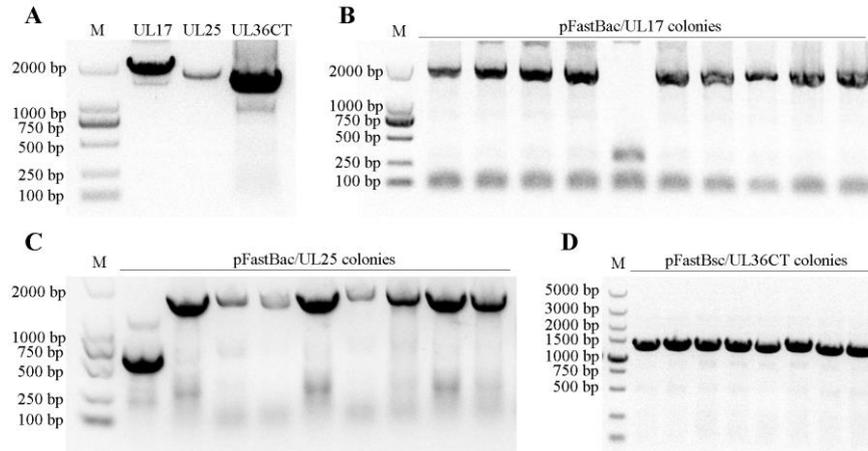


图 5-1 UL17、UL25 和 UL36CT 重组质粒的构建

A: UL17、UL25 和 UL36CT 片段的扩增; B: pFastBac/UL17 重组质粒的鉴定; C: pFastBac/UL25 重组质粒的鉴定; D: pFastBac/UL36CT 重组质粒的鉴定

Fig. 5-1 Construction of the recombinant vectors of UL17, UL25, and UL36CT

A: Amplification of the UL17, UL25, and UL36CT segments; B: Identification of the recombinant vector pFastBac/UL17; C: Identification of the recombinant vector pFastBac/UL25; D: Identification of the recombinant vector pFastBac/UL36CT

5.4.2 重组杆粒的鉴定

为构建基于 UL17、UL25 和 UL36CT 基因片段的重组杆粒，将测序正确的重组质粒阳转至 DH10Bac 感受态中，通过蓝白斑筛选及交叉引物 PCR 鉴定重组杆粒构建是否正确。结果显示，使用交叉引物扩增这三种基因重组杆粒均可以扩增出目的基因（图 5-2），且使用 M13-F/R 引物同样能够扩增出目的基因加空白 M13 片段大小的目的条带，这说明成功构建了基于 UL17、UL25 和 UL36CT 基因片段的重组杆粒。

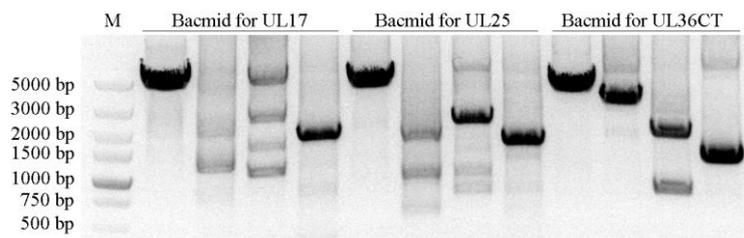


图 5-2 重组杆粒的鉴定

鉴定的交叉引物分别为 M13-F/M13-R、UL17-F/M13-R、M13-F/UL17-R、UL17-F/UL17-R、M13-F/M13-R、M13-F/UL25-R、UL25-F/M13-R、UL25-F/UL25-R、M13-F/M13-R、M13-F/UL36CT-R、UL36CT-F/M13-R、UL36CT-F/UL36CT-R

Fig. 5-2 Identification of the recombinant bacmid

The cross primers used for identification were M13-F/M13-R, UL17-F/M13-R, M13-F/UL17-R, UL17-F/UL17-R, M13-F/M13-R, M13-F/UL25-R, UL25-F/M13-R, UL25-F/UL25-R, M13-F/M13-R, M13-F/UL36CT-R, UL36CT-F/M13-R, and UL36CT-F/UL36CT-R

5.4.3 重组蛋白的表达鉴定

将成功构建的针对各目的基因的重组杆粒转染至 sf9 昆虫细胞中包装杆状病毒, 收集 P1 代细胞毒进行蛋白表达鉴定。Western blot 结果显示, 与阴性对照 sf9 细胞相比, 包装的基于 UL17、UL25 和 UL36CT 的 P1 代杆状病毒中均可以检测到目的蛋白的表达, 且蛋白大小与预期相一致(图 5-3), 这说明可以使用包装出的杆状病毒进行蛋白的表达及后续纯化。

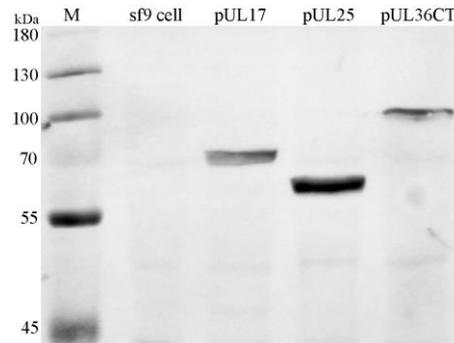


图 5-3 pUL17、pUL25 和 pUL36CT 蛋白表达的鉴定

Fig. 5-3 Identification of expression of pUL17, pUL25, and pUL36CT protein

5.4.4 重组蛋白的纯化

使用鉴定表达正确的各蛋白重组杆状病毒 P2 代大量接种细胞进行蛋白表达, 使用 Strep 标签树脂进行蛋白纯化。结果显示, pUL17 (图 5-4A)、pUL25 (图 5-4B) 和 pUL36CT (图 5-4C) 蛋白均能够特异性与 Strep 树脂相结合, 且树脂中杂质蛋白较少, 仅可见位于 130 kDa 左右存在的一条杂带。使用 PPase 蛋白酶进行酶切后可特异性洗脱下目的蛋白, 洗脱蛋白中目标蛋白为主要蛋白且基本无杂质蛋白, 经蛋白浓缩后可以用于后续蛋白复合物的制备。

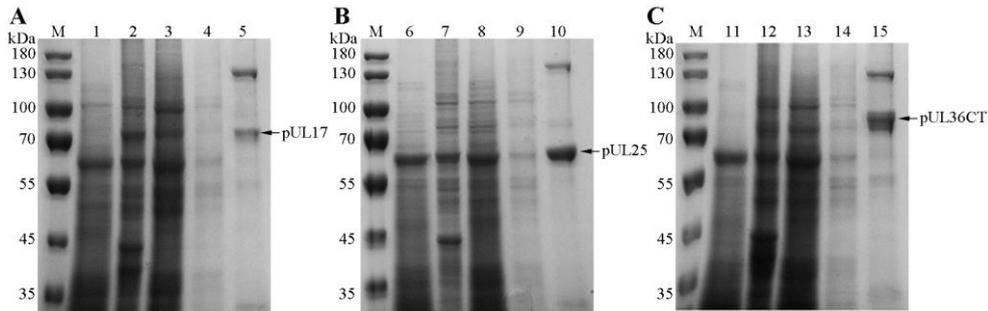


图 5-4 pUL17、pUL25 和 pUL36CT 蛋白的纯化

A: pUL17 蛋白的纯化; B: pUL25 蛋白的纯化; C: pUL36CT 蛋白的纯化

M: 蛋白 marker; 1: pUL17 蛋白裂解上清; 2: pUL17 蛋白裂解沉淀; 3: pUL17 蛋白流穿液; 4: pUL17 蛋白洗杂液; 5: pUL17 蛋白结合的树脂; 6: pUL25 蛋白裂解上清; 7: pUL25 蛋白裂解沉淀; 8: pUL25 蛋白流穿液; 9: pUL25 蛋白洗杂液; 10: pUL25 蛋白结合的树脂; 11: pUL36CT 蛋白裂解上清; 12: pUL36CT 蛋白裂解沉淀; 13: pUL36CT 蛋白流穿液; 14: pUL36CT 蛋白洗杂液; 15: pUL36CT 蛋白结合的树脂;

Fig. 5-4 Purification of pUL17, pUL25, and pUL36CT protein

A: Purification of pUL17 protein; B: Purification of pUL25 protein; C: Purification of pUL36CT protein

M: Protein marker; 1: lysis supernatant of pUL17; 2: lysis pellet of pUL17; 3: Flow through solution of pUL17; 4: Wash solution of pUL17; 5: Resin combined with pUL17; 6: lysis supernatant of pUL25; 7: lysis pellet of pUL25; 8: Flow through solution of pUL25; 9: Wash solution of pUL25; 10: Resin combined with pUL25; 11: lysis supernatant of pUL36CT; 12: lysis pellet of pUL36CT; 13: Flow through solution of pUL36CT; 14: Wash solution of pUL36CT; 15: Resin combined with pUL36CT

5.4.5 CATC 复合物的分子筛纯化及质谱鉴定

将纯化后的 pUL17、pUL25 和 pUL36CT 蛋白按照摩尔质量比为 1: 2: 2 的比例进行孵育，孵育后的蛋白复合物使用分子筛介质进一步纯化。结果显示，经分子筛纯化后可以检测到三个吸收峰（图 5-5），其中吸收峰 1（Peak 1）所处位置为预计 CATC 蛋白复合物大小位置，将该吸收峰获得的溶液进行跑胶鉴定及回收胶块进行质谱鉴定后证实了该吸收峰中蛋白组分为 pUL17、pUL25 和 pUL36CT 蛋白的复合物。

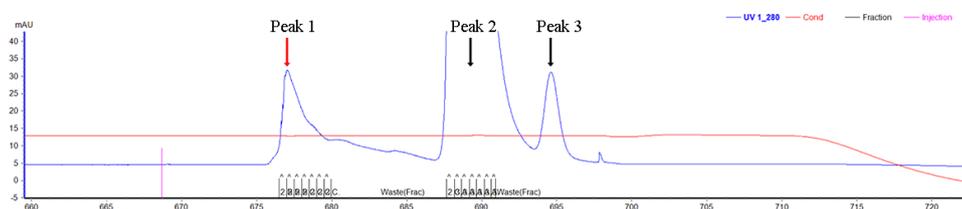


图 5-5 CATC 蛋白复合物的分子筛纯化

Fig. 5-5 Purification of the CATC complex by Gel filtration chromatographic

5.4.6 CATC 的电镜观察

为进一步鉴定纯化的 CATC 蛋白复合物形态及均一性，吸取纯化的蛋白溶液分别制备常温电镜蛋白样品和冷冻电镜蛋白样品进行观察。结果显示，透射电镜下能够观察到大小约为 10~15 nm 的分散较均匀的蛋白颗粒，且蛋白密度相对较大（图 5-6）。冷冻电镜下观察纯化的 CTAC 蛋白复合物，结果显示视野中可见较多与透射电子显微镜下形态较一致的蛋白结构，且蛋白分散相对均匀（图 5-7），可以尝试进行蛋白图像的采集并做进一步分析。

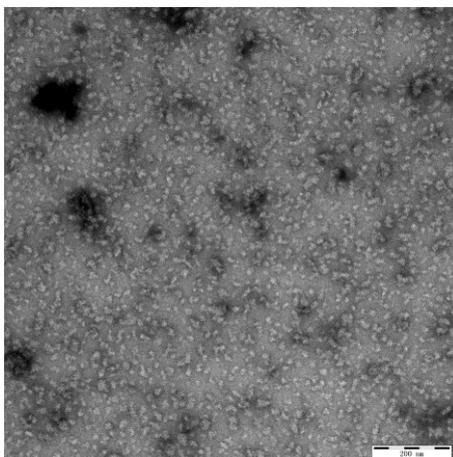


图 5-6 CATC 复合物的电镜鉴定

Fig. 5-6 Identification of the CATC complex by electron microscope

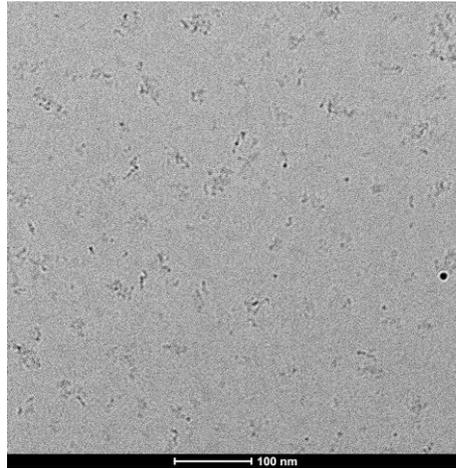


图 5-7 CATC 蛋白复合物的冷冻电镜观察

Fig. 5-7 Observation of the CATC complex using Cryo-EM

5.4.7 CATC 复合物的数据处理

将制备的 CATC 复合物冷冻电镜样品使用配备 K2 直接电子探测相机的 300 kV 冷冻电镜进行数据收集，结果共计采集得到 6,647 张电子图像。使用 CryoSPARC3 软件对采集的图像数据进行处理，经过单颗粒挑选得到 939,336 个颗粒，对这些颗粒进行二维分类结果如图 5-8 所示。

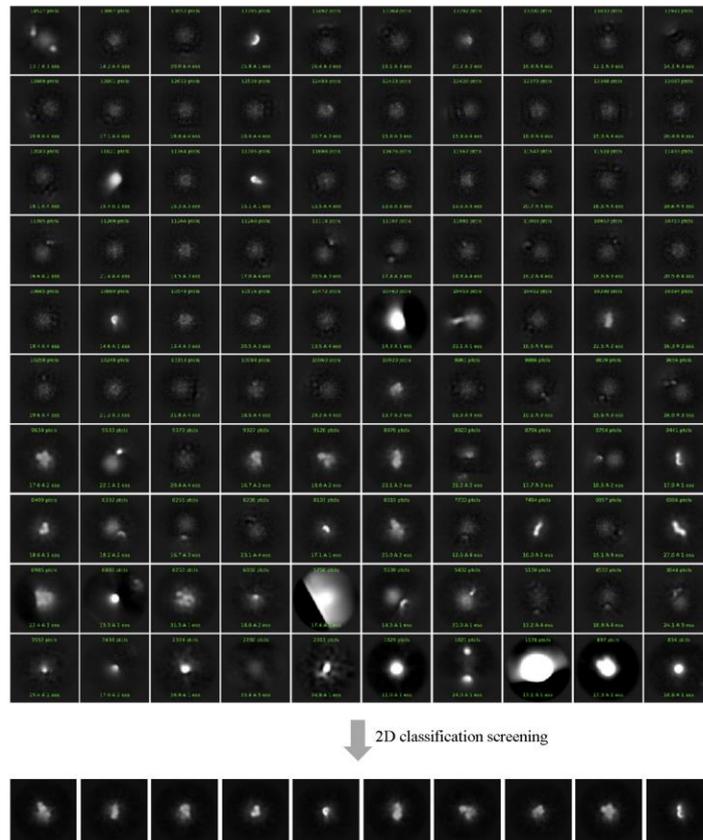


图 5-8 CATC 的二维分类及筛选

Fig. 5-8 2D classification and Screening of CATC

在得到的 100 种蛋白颗粒图像中未能够检测到较高分辨率及特定构象的蛋白颗粒，从中筛选出 10 种可能性较大的蛋白图像共计 92,901 个蛋白颗粒进行三维分类分析。三维分类结果如图 5-9 所示，共计分类得到 5 类三维图像，各类图像中蛋白颗粒占比分别为 17.86%、17.07%、21.14%、22.27% 和 21.66%。

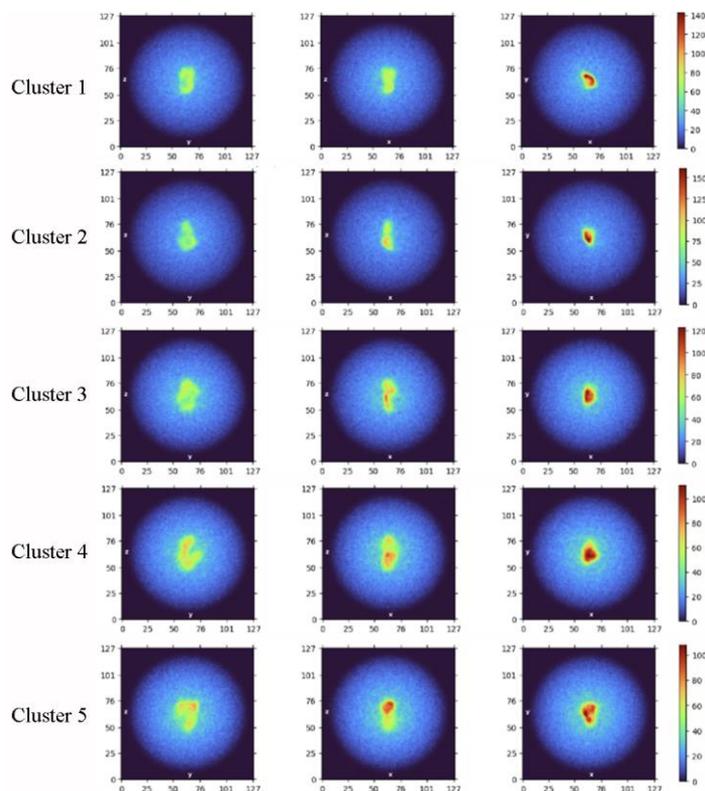


图 5-9 CATC 蛋白复合物的三维分类

Fig. 5-9 3D classification of the CATC complex

为进一步探究体外组装 CATC 的结构基础，我们将三维分类后的所有 Cluster 进行蛋白重构，并通过 AlphaFold 预测 pUL17、pUL25 和 pUL36CT 蛋白的结构与重构蛋白进行匹配。结果显示成功预测出三种蛋白的空间结构，其中 pUL17 与 pUL25 蛋白结构相对稳定，而 pUL36CT 蛋白除 C 末端螺旋结构稳定外，其他区域结构均为柔性弯曲结构（图 5-10A）。我们通过 UCSF Chimera 软件将结构较稳定的 pUL17 蛋白和 pUL25 蛋白 C 端结构域与重构的 5 类蛋白结构进行匹配，结果显示 Cluster 1 结构与 pUL17 蛋白单体密度匹配度较高；Cluster 2 结构能够匹配进两个 pUL25 蛋白 C 端结构，通过蛋白间相互作用形成聚体；Cluster 3 结构能够匹配 pUL17 和 pUL25 蛋白 C 端结构域的异二聚体形式；而 Cluster 4 和 Cluster 5 结构表现出相似的结构且能够匹配一个 pUL17 和两个 pUL25 蛋白 C 端结构域，表现出与成熟病毒粒子上相似 CATC 结构特征（图 5-10B）。以上结果说明本研究中体外组装 CATC 结构可能存在的多种结构形式，能够为深入探索和解析完整 CATC 结构重要基础和思路。

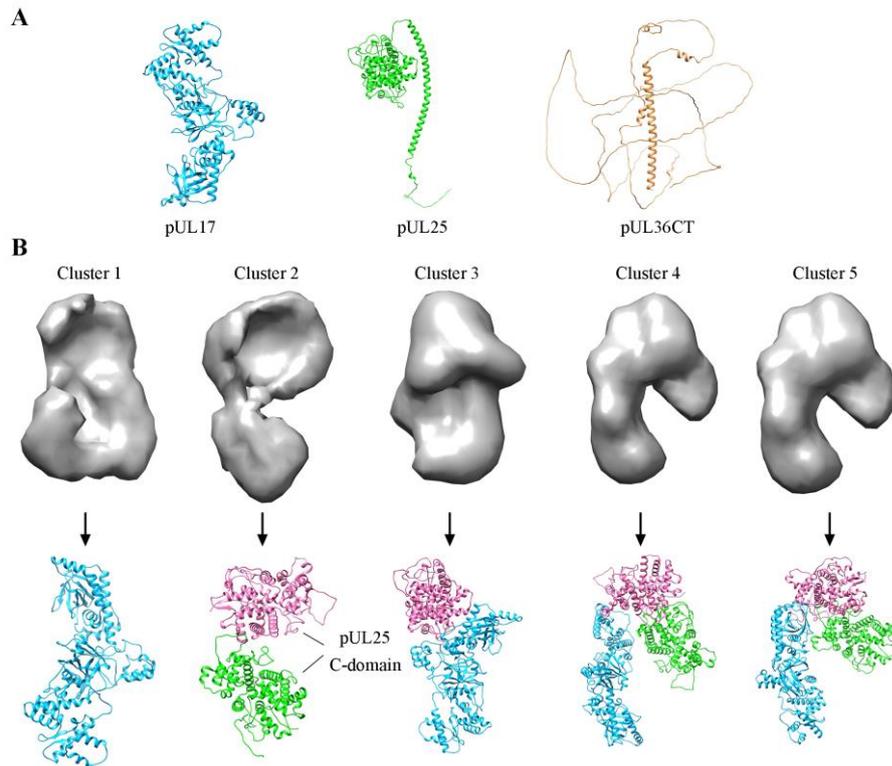


图 5-10 蛋白预测及模型重建

A: pUL17、pUL25 和 pUL36CT 蛋白结构预测; B: CATC 分类模型重构

Fig. 5-10 Protein prediction and model reconstruction

A: structural prediction of pUL17, pUL25, and pUL36CT; B: Model reconstruction of classified CATC

5.5 讨论

CATC 结构在所有疱疹病毒中是保守的，其在成熟病毒粒子上锚定于病毒衣壳顶点位置发挥重要的生物学功能 (DAI and ZHOU, 2018; HANG et al., 2019; GONG et al., 2019)。已有研究报道了成熟病毒衣壳顶点位置 CATC 是由 pUL17、pUL25 和 pUL36 蛋白中 α -螺旋相互作用形成异五聚体螺旋束而稳定 (YUAN et al., 2018; WANG et al., 2022)，但对于 CATC 复合物组分的完整结构目前仍未被解析出来。本研究中对 CATC 蛋白复合物进行蛋白的体外表达及组装，以期获得更多 CATC 复合物细节提供理论支持。

pUL36 蛋白作为疱疹病毒中最大的被膜蛋白参与到 CATC 结构的组成中， α -疱疹病毒中该蛋白全长约为 3,140 个氨基酸，其中包含多个功能域及特殊结构。研究初始我们对该蛋白二级结构进行了预测。结果发现 pUL36 蛋白 N 末端约 2,000 氨基酸的部分能够具有相对稳定的结构，主要由 α -螺旋及少量的随意弯曲组成，其 C 末端近 100 氨基酸长度包含了一大一小两个 α -螺旋，其中的大 α -螺旋被鉴定为是参与 CATC 复合物中异五聚体螺旋束形成的组成之一。而 pUL36 蛋白剩余部分氨基酸位置主要由随意弯曲构成，这可能与病毒被膜层不具备稳定构象是有关系的。在本研究中，由于全长 pUL36 蛋白无法进行体外表达，我们根据 pUL36 蛋白二级结构预测结果，选择了该蛋白 C 末端约 466 个氨基酸进行表达作为体外组装 CATC 的组分之一。另外，选择 pUL17

和 pUL25 蛋白全长进行表达用于 CATC 的体外组装。本研究选择使用昆虫细胞表达系统进行 pUL17、pUL25 和 pUL36CT 蛋白的表达，昆虫细胞表达系统具有糖基化作用、乙酰化作用、磷酸化作用等一系列的蛋白质翻译加工修饰功能，能够较好的保证蛋白发生正确折叠及二硫键形成，使得重组蛋白在结构与功能上更接近于天然蛋白构象。在进行各蛋白纯化过程中，pUL17 和 pUL25 蛋白均能够表达并纯化出与预期大小一致的重组蛋白，而 pUL36CT 蛋白在纯化后于约 100 kDa 位置出现条带，与预计蛋白大小（约 51 kDa）不一致，后经过蛋白质谱鉴定确认了纯化位置蛋白为 pUL36CT，这说明 pUL36CT 蛋白在表达后可能形成二聚体且主要以聚体形式存在。

将纯化后的三种蛋白进行体外组装并使用分子筛层析进行蛋白复合物的纯化，结果显示能够通过分子量大小将形成的蛋白复合物与其他蛋白进行分离，并且通过蛋白质谱确定了蛋白复合物中三种蛋白的存在。透射电镜下观察到 10~15 nm 左右大小的蛋白颗粒，且蛋白颗粒分散较均匀，初步鉴定其为体外组装的 CATC。为进一步鉴定体外组装的 CATC 结构形态，将纯化的蛋白复合物进行冷冻电镜样品的制备，并通过 300 kV 的冷冻电镜进行数据收集。将收集到的图像进行二维分类、三维分类后筛选得到可能的蛋白颗粒，重构后能够得到分辨率较低 ($> 10 \text{ \AA}$) 的 5 种蛋白重构体。为了能够进一步确定这些蛋白重构体中的蛋白组分，本研究通过使用 AlphaFold 蛋白预测软件对 pUL17、pUL25 和 pUL36CT 蛋白结构进行了预测，并使用 UCSF Chimera 软件将预测的三种蛋白结构与重构蛋白结构进行了匹配分析。结果发现了 pUL17 蛋白单体、pUL25 蛋白二聚体、pUL17 与 pUL25 蛋白异二聚体等多种蛋白组装形式，同时发现 Cluster 4 和 Cluster 5 的蛋白结构表现出与成熟病毒粒子上 CATC 相似的结构特征，能够将 pUL17 蛋白与两个 pUL25 蛋白 C 端结构域较好的匹配至重构蛋白中，且在两种结构中存在未被这两种蛋白匹配区域，这提示该区域可能是 pUL36CT 位置。然而由于 pUL25 蛋白 N 端螺旋与 C 端结构域间存在的柔性柔性区域及 pUL36CT 蛋白存在的大部分随意弯曲结构无法得到较好的匹配结果，且这种随意弯曲结构不具备稳定构象，这也造成了本研究中无法获得较高分辨率结构。在本研究中我们成功表达 CATC 蛋白组分并进行体外组装，经过冷冻电镜和 AlphaFold 预测技术获得了多种蛋白组装形式，这些结果为后续深入探究完整 CATC 的装配机制提供了重要基础。

第六章 全文结论

1. 成功构建了基于 pUL36 蛋白末端融合表达 EGFP 的重组荧光病毒 rPRV-36N-EGFP 和 rPRV-36C-EGFP，并基于稳定表达 pUL17 蛋白细胞系构建了 UL17 基因缺失病毒 rPRV-36N-EGFP- Δ UL17，为研究以 pUL36 蛋白为核心的 CATC 细胞内装配动力学提供重要生物材料。
2. 本研究揭示了 PRV 感染细胞内 CATC 亚基装配动力学过程为：UL36 基因优先于 UL17 和 UL25 基因进行转录，且其转录合成 mRNA 水平持续高于另两种基因；翻译表达后的 pUL17 和 pUL25 蛋白在细胞质中形成聚体并被共同转运至细胞核中装配至病毒空衣壳上，启动病毒基因组 DNA 装载，形成 C 型衣壳通过核内膜初次包膜和核外膜融合释放至核外；pUL36 蛋白表达后转运至核膜附近，聚集于内质网并在此与从细胞核内释放出的病毒粒子衣壳上的 pUL17 和 pUL25 结合形成 CATC 复合物，启动其他被膜蛋白及囊膜包装进程。
3. pUL17 蛋白是 PRV 病毒粒子上 CATC 结构正确装配的重要因子，其缺失直接影响了 pUL25 蛋白的入核效率且入核的 pUL25 蛋白不能装配至病毒空衣壳上，并通过影响 C 型衣壳成熟间接导致 pUL36 蛋白的装配失败。
4. 成功表达了 pUL17、pUL25 和 pUL36CT 蛋白并完成 CATC 体外组装，结合冷冻电镜及 AlphaFold 预测技术鉴定了体外组装 CATC 的多种装配模式，为深入探究完整 CATC 体外组装机制提供重要基础。

参考文献

- 汤艳东, 2018. CRISPR/Cas9 技术在伪狂犬病毒研究中的应用. 中国农业科学院.
- 王春芳, 付琦媛, 郑宾宾, 宋涛, 严世杰, 芮萍, 张志安, 马增军, 2022. 伪狂犬病毒跨物种感染与传播. 病毒学报. 38(04):1001-1006. DOI: 10.13242/j.cnki.bingduxuebao.004177.
- 燕凯, 2019. 伪狂犬病毒被膜蛋白 pUL21 与宿主胞质动力蛋白互作研究. 华中农业大学.
- ABBATE J M, GIANNETTO A, IARIA C, RIOLO K, MARRUCHELLA G, HATTAB J, CALABRO P, LANTERI G, 2021. First Isolation and Molecular Characterization of Pseudorabies Virus in a Hunting Dog in Sicily (Southern Italy). *Vet Sci*, 8(12). DOI: 10.3390/vetsci8120296.
- ADLER H, MESSERLE M, KOSZINOWSKI U H, 2003. Cloning of herpesviral genomes as bacterial artificial chromosomes. *Rev Med Virol*, 13(2):111-121. DOI: 10.1002/rmv.380.
- AHMAD I, WILSON D W, 2020. HSV-1 Cytoplasmic Envelopment and Egress. *Int J Mol Sci*, 21(17). DOI: 10.3390/ijms21175969.
- ALBECKA A, OWEN D J, IVANOVA L, BRUN J, LIMAN R, DAVIES L, AHMED M F, COLACO S, HOLLINSHEAD M, GRAHAM S C, CRUMP C M, 2017. Dual Function of the pUL7-pUL51 Tegument Protein Complex in Herpes Simplex Virus 1 Infection. *J Virol*, 91(2). DOI: 10.1128/JVI.02196-16.
- ALBER F, DOKUDOVSKAYA S, VEENHOFF L M, ZHANG W, KIPPER J, DEVOS D, SUPRAPTO A, KARNI-SCHMIDT O, WILLIAMS R, CHAIT B T, SALI A, ROUT M P, 2007. The molecular architecture of the nuclear pore complex. *Nature*, 450(7170):695-701. DOI: 10.1038/nature06405.
- ALMAZAN F, GONZALEZ J M, PENZES Z, IZETA A, CALVO E, PLANA-DURAN J, ENJUANES L, 2000. Engineering the largest RNA virus genome as an infectious bacterial artificial chromosome. *Proc Natl Acad Sci USA*, 97(10):5516-5521. DOI: 10.1073/pnas.97.10.5516.
- ANTINONE S E, SMITH G A, 2010. Retrograde axon transport of herpes simplex virus and pseudorabies virus: a live-cell comparative analysis. *J Virol*, 84(3):1504-1512. DOI: 10.1128/JVI.02029-09.
- ANZALONE A V, RANDOLPH P B, DAVIS J R, SOUSA A A, KOBLAN L W, LEVY J M, CHEN P J, WILSON C, NEWBY G A, RAGURAM A, LIU D R, 2019. Search-and-replace genome editing without double-strand breaks or donor DNA. *Nature*, 576(7785):149-157. DOI: 10.1038/s41586-019-1711-4.
- ARIJ J, HUSHUR O, KATO K, KAWAGUCHI Y, TOHYA Y, AKASHI H, 2006. Construction of an infectious clone of canine herpesvirus genome as a bacterial artificial chromosome. *Microbes Infect*, 8(4):1054-1063. DOI: 10.1016/j.micinf.2005.11.004.
- ATANASIU D, SAW W T, COHEN G H, EISENBERG R J, 2010. Cascade of events governing cell-cell fusion induced by herpes simplex virus glycoproteins gD, gH/gL, and gB. *J Virol*, 84(23):12292-12299. DOI: 10.1128/JVI.01700-10.
- BANKS M, TORRACA L S, GREENWOOD A G, TAYLOR D C, 1999. Aujeszky's disease in captive

- bears. *Vet Rec*, 145(13):362-365. DOI: 10.1136/vr.145.13.362.
- BATTERSON W, FURLONG D, ROIZMAN B, 1983. Molecular genetics of herpes simplex virus. VIII. further characterization of a temperature-sensitive mutant defective in release of viral DNA and in other stages of the viral reproductive cycle. *J Virol*, 45(1):397-407. DOI: 10.1128/JVI.45.1.397-407.1983.
- BAUER D W, HUFFMAN J B, HOMA F L, EVILEVITCH A, 2013. Herpes virus genome, the pressure is on. *J Am Chem Soc*, 135(30):11216-11221. DOI: 10.1021/ja404008r.
- BENEDYK T H, CONNOR V, CAROE E R, SHAMIN M, SVERGUN D I, DEANE J E, JEFFRIES C M, CRUMP C M, GRAHAM S C, 2022. Herpes simplex virus 1 protein pUL21 alters ceramide metabolism by activating the interorganelle transport protein CERT. *J Biol Chem*, 298(11):102589. DOI: 10.1016/j.jbc.2022.102589.
- BENEDYK T H, MUENZNER J, CONNOR V, HAN Y, BROWN K, WIJESINGHE K J, ZHUANG Y, COLACO S, STOLL G A, TUTT O S, SVOBODOVA S, SVERGUN D I, BRYANT N A, DEANE J E, FIRTH A E, JEFFRIES C M, CRUMP C M, GRAHAM S C, 2021. pUL21 is a viral phosphatase adaptor that promotes herpes simplex virus replication and spread. *PLoS Pathog*, 17(8): e1009824. DOI: 10.1371/journal.ppat.1009824.
- BIGALKE J M, HELDWEIN E E, 2015. Structural basis of membrane budding by the nuclear egress complex of herpesviruses. *EMBO J*, 34(23):2921-2936. DOI: 10.15252/embj.201592359.
- BIGALKE J M, HEUSER T, NICASTRO D, HELDWEIN E E, 2014. Membrane deformation and scission by the HSV-1 nuclear egress complex. *Nat Commun*, 5:4131. DOI: 10.1038/ncomms5131.
- BITSCH V, 1975. A study of outbreaks of Aujeszky's disease in cattle. I. Virological and epidemiological findings. *Acta Vet Scand*, 16(3):420-433. DOI: 10.1186/BF03546660.
- BO Z, LI X, 2022. A Review of Pseudorabies Virus Variants: Genomics, Vaccination, Transmission, and Zoonotic Potential. *Viruses*, 14(5). DOI: 10.3390/v14051003.
- BODDA C, REINERT L S, FRUHWURTH S, RICHARDO T, SUN C, ZHANG B C, KALAMVOKI M, POHLMANN A, MOGENSEN T H, BERGSTROM P, AGHOLME L, O'HARE P, SODEIK B, GYRD-HANSEN M, ZETTERBERG H, PALUDAN S R, 2020. HSV1 VP1-2 deubiquitinates STING to block type I interferon expression and promote brain infection. *J Exp Med*, 217(7). DOI: 10.1084/jem.20191422.
- BOOY F P, NEWCOMB W W, TRUS B L, BROWN J C, BAKER T S, STEVEN A C, 1991. Liquid-crystalline, phage-like packing of encapsidated DNA in herpes simplex virus. *Cell*, 64(5):1007-1015. DOI: 10.1016/0092-8674(91)90324-r.
- BROCK I, KRUGER M, MERTENS T, VON EINEM J, 2013. Nuclear targeting of human cytomegalovirus large tegument protein pUL48 is essential for viral growth. *J Virol*, 87(10):6005-6019. DOI: 10.1128/JVI.03558-12.
- BUCH A, MULLER O, IVANOVA L, DOHNER K, BIALY D, BOSSE J B, POHLMANN A, BINZ A, HEGEMANN M, NAGEL C H, KOLTZENBURG M, VIEJO-BORBOLLA A, ROSENHAHN B, BAUERFEIND R, SODEIK B, 2017. Inner tegument proteins of Herpes Simplex Virus are sufficient

- for intracellular capsid motility in neurons but not for axonal targeting. *PLoS Pathog*, 13(12): e1006813. DOI: 10.1371/journal.ppat.1006813.
- BUCKLEY K M, ETTENSOHN C A, 2019. Techniques for analyzing gene expression using BAC-based reporter constructs. *Methods Cell Biol*, 151:197-218. DOI: 10.1016/bs.mcb.2019.01.004.
- BUCKS M A, MURPHY M A, O'REGAN K J, COURTNEY R J, 2011. Identification of interaction domains within the UL37 tegument protein of herpes simplex virus type 1. *Virology*, 416(1-2):42-53. DOI: 10.1016/j.virol.2011.04.018.
- BUCKS M A, O'REGAN K J, MURPHY M A, WILLS J W, COURTNEY R J, 2007. Herpes simplex virus type 1 tegument proteins VP1/2 and UL37 are associated with intranuclear capsids. *Virology*, 361(2):316-324. DOI: 10.1016/j.virol.2006.11.031.
- BUTT B G, OWEN D J, JEFFRIES C M, IVANOVA L, HILL C H, HOUGHTON J W, AHMED M F, ANTROBUS R, SVERGUN D I, WELCH J J, CRUMP C M, GRAHAM S C, 2020. Insights into herpesvirus assembly from the structure of the pUL7:pUL51 complex. *Elife*, 9. DOI: 10.7554/eLife.53789.
- CAIRNS T M, CONNOLLY S A, 2021. Entry of Alphaherpesviruses. *Curr Issues Mol Biol*, 41:63-124. DOI: 10.21775/cimb.041.063.
- CHEN P J, HUSSMANN J A, YAN J, KNIPPING F, RAVISANKAR P, CHEN P F, CHEN C, NELSON J W, NEWBY G A, SAHIN M, OSBORN M J, WEISSMAN J S, ADAMSON B, LIU D R, 2021. Enhanced prime editing systems by manipulating cellular determinants of editing outcomes. *Cell*, 184(22):5635-5652 e5629. DOI: 10.1016/j.cell.2021.09.018.
- CHEN P J, LIU D R, 2023. Prime editing for precise and highly versatile genome manipulation. *Nat Rev Genet*, 24(3):161-177. DOI: 10.1038/s41576-022-00541-1.
- CHEN Y, GUO W, XU Z, YAN Q, LUO Y, SHI Q, CHEN D, ZHU L, WANG X, 2011. A novel recombinant pseudorabies virus expressing parvovirus VP2 gene: Immunogenicity and protective efficacy in swine. *Virol J*, 8:307. DOI: 10.1186/1743-422X-8-307.
- CHENG Z, KONG Z, LIU P, FU Z, ZHANG J, LIU M, SHANG Y, 2020. Natural infection of a variant pseudorabies virus leads to bovine death in China. *Transbound Emerg Dis*, 67(2):518-522. DOI: 10.1111/tbed.13427.
- CHURCH G A, WILSON D W, 1997. Study of herpes simplex virus maturation during a synchronous wave of assembly. *J Virol*, 71(5):3603-3612. DOI: 10.1128/JVI.71.5.3603-3612.1997.
- COBB R E, WANG Y, ZHAO H, 2015. High-efficiency multiplex genome editing of *Streptomyces* species using an engineered CRISPR/Cas system. *ACS Synth Biol*, 4(6):723-728. DOI: 10.1021/sb500351f.
- COLLER K E, LEE J I, UEDA A, SMITH G A, 2007. The capsid and tegument of the alphaherpesviruses are linked by an interaction between the UL25 and VP1/2 proteins. *J Virol*, 81(21):11790-11797. DOI: 10.1128/JVI.01113-07.
- CONG X, LEI J L, XIA S L, WANG Y M, LI Y, LI S, LUO Y, SUN Y, QIU H J, 2016. Pathogenicity and immunogenicity of a gE/gI/TK gene-deleted pseudorabies virus variant in susceptible animals.

- Vet Microbiol, 182:170-177. DOI: 10.1016/j.vetmic.2015.11.022.
- CONNOLLY S A, JARDETZKY T S, LONGNECKER R, 2021. The structural basis of herpesvirus entry. *Nat Rev Microbiol*, 19(2):110-121. DOI: 10.1038/s41579-020-00448-w.
- COOPER R S, HELDWEIN E E, 2015. Herpesvirus gB: A Finely Tuned Fusion Machine. *Viruses*, 7(12):6552-6569. DOI: 10.3390/v7122957.
- COPELAND A M, NEWCOMB W W, BROWN J C, 2009. Herpes simplex virus replication: roles of viral proteins and nucleoporins in capsid-nucleus attachment. *J Virol*, 83(4):1660-1668. DOI: 10.1128/JVI.01139-08.
- DAI X, ZHOU Z H, 2018. Structure of the herpes simplex virus 1 capsid with associated tegument protein complexes. *Science*, 360(6384). DOI: 10.1126/science.aao7298.
- DAS S, ORTIZ D A, GURCZYNSKI S J, KHAN F, PELLETT P E, 2014. Identification of human cytomegalovirus genes important for biogenesis of the cytoplasmic virion assembly complex. *J Virol*, 88(16):9086-9099. DOI: 10.1128/JVI.01141-14.
- DESAI P J, 2000. A null mutation in the UL36 gene of herpes simplex virus type 1 results in accumulation of unenveloped DNA-filled capsids in the cytoplasm of infected cells. *J Virol*, 74(24):11608-11618. DOI: 10.1128/jvi.74.24.11608-11618.2000.
- DING X, NEUMANN D M, ZHU L, 2022. Host factors associated with either VP16 or VP16-induced complex differentially affect HSV-1 lytic infection. *Rev Med Virol*, 32(6): e2394. DOI: 10.1002/rmv.2394.
- DOMI A, MOSS B, 2002. Cloning the vaccinia virus genome as a bacterial artificial chromosome in *Escherichia coli* and recovery of infectious virus in mammalian cells. *Proc Natl Acad Sci USA*, 99(19):12415-12420. DOI: 10.1073/pnas.192420599.
- DOMINGUEZ A A, LIM W A, QI L S, 2016. Beyond editing: repurposing CRISPR-Cas9 for precision genome regulation and interrogation. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 17(1):5-15. DOI: 10.1038/nrm.2015.2.
- DOUDNA J A, CHARPENTIER E, 2014. Genome editing. The new frontier of genome engineering with CRISPR-Cas9. *Science*, 346(6213):1258096. DOI: 10.1126/science.1258096.
- DRAGANOVA E B, ZHANG J, ZHOU Z H, HELDWEIN E E, 2020. Structural basis for capsid recruitment and coat formation during HSV-1 nuclear egress. *Elife*, 9. DOI: 10.7554/eLife.56627.
- DUFFY C, MBONG E F, BAINES J D, 2009. VP22 of herpes simplex virus 1 promotes protein synthesis at late times in infection and accumulation of a subset of viral mRNAs at early times in infection. *J Virol*, 83(2):1009-1017. DOI: 10.1128/JVI.02245-07.
- ELIAS P, O'DONNELL M E, MOCARSKI E S, LEHMAN I R, 1986. A DNA binding protein specific for an origin of replication of herpes simplex virus type 1. *Proc Natl Acad Sci USA*, 83(17):6322-6326. DOI: 10.1073/pnas.83.17.6322.
- ENQUIST L W, 1999. Life beyond eradication: veterinary viruses in basic science. *Arch Virol Suppl*, 15:87-109. DOI: 10.1007/978-3-7091-6425-9_7.
- FAN D, WANG M, CHENG A, JIA R, YANG Q, WU Y, ZHU D, ZHAO X, CHEN S, LIU M, ZHANG S, OU X, MAO S, GAO Q, SUN D, WEN X, LIU Y, YU Y, ZHANG L, TIAN B, PAN L,

- CHEN X, 2020. The Role of VP16 in the Life Cycle of Alpha herpesviruses. *Front Microbiol*, 11:1910. DOI: 10.3389/fmicb.2020.01910.
- FAN Q, LIN E, SATOH T, ARASE H, SPEAR P G, 2009. Differential effects on cell fusion activity of mutations in herpes simplex virus 1 glycoprotein B (gB) dependent on whether a gD receptor or a gB receptor is overexpressed. *J Virol*, 83(15):7384-7390. DOI: 10.1128/JVI.00087-09.
- FENG Z, CHEN J, LIANG W, CHEN W, LI Z, CHEN Q, CAI S, 2020. The recombinant pseudorabies virus expressing African swine fever virus CD2v protein is safe and effective in mice. *Virol J*, 17(1):180. DOI: 10.1186/s12985-020-01450-7.
- FERREIRA DA SILVA J, OLIVEIRA G P, ARASA-VERGE E A, KAGIOU C, MORETTON A, TIMELTHALER G, JIRICNY J, LOIZOU J I, 2022. Prime editing efficiency and fidelity are enhanced in the absence of mismatch repair. *Nat Commun*, 13(1):760. DOI: 10.1038/s41467-022-28442-1.
- FOSSUM E, FRIEDEL C C, RAJAGOPALA S V, TITZ B, BAIKER A, SCHMIDT T, KRAUS T, STELLBERGER T, RUTENBERG C, SUTHRAM S, BANDYOPADHYAY S, ROSE D, VON BRUNN A, UHLMANN M, ZERETZKE C, DONG Y A, BOULET H, KOEGL M, BAILER S M, KOSZINOWSKI U, IDEKER T, UETZ P, ZIMMER R, HAAS J, 2009. Evolutionarily conserved herpesviral protein interaction networks. *PLoS Pathog*, 5(9): e1000570. DOI: 10.1371/journal.ppat.1000570.
- FUCHS W, GRANZOW H, KLUPP B G, KOPP M, METTENLEITER T C, 2002a. The UL48 tegument protein of pseudorabies virus is critical for intracytoplasmic assembly of infectious virions. *J Virol*, 76(13):6729-6742. DOI: 10.1128/jvi.76.13.6729-6742.2002.
- FUCHS W, GRANZOW H, METTENLEITER T C, 2003. A pseudorabies virus recombinant simultaneously lacking the major tegument proteins encoded by the UL46, UL47, UL48, and UL49 genes is viable in cultured cells. *J Virol*, 77(23):12891-12900. DOI: 10.1128/jvi.77.23.12891-12900.2003.
- FUCHS W, KLUPP B G, GRANZOW H, OSTERRIEDER N, METTENLEITER T C, 2002b. The interacting UL31 and UL34 gene products of pseudorabies virus are involved in egress from the host-cell nucleus and represent components of primary enveloped but not mature virions. *J Virol*, 76(1):364-378. DOI: 10.1128/jvi.76.1.364-378.2002.
- GAO R, FU Z C, LI X, WANG Y, WEI J, LI G, WANG L, WU J, HUANG X, YANG L, CHEN J, 2022. Genomic and Transcriptomic Analyses of Prime Editing Guide RNA-Independent Off-Target Effects by Prime Editors. *CRISPR J*, 5(2):276-293. DOI: 10.1089/crispr.2021.0080.
- GATHERER D, DEPLEDGE D P, HARTLEY C A, SZPARA M L, VAZ P K, BENKO M, BRANDT C R, BRYANT N A, DASTJERDI A, DOSZPOLY A, GOMPELS U A, INOUE N, JAROSINSKI K W, KAUL R, LACOSTE V, NORBERG P, ORIGGI F C, ORTON R J, PELLETT P E, SCHMID D S, SPATZ S J, STEWART J P, TRIMPERT J, WALTZEK T B, DAVISON A J, 2021. ICTV Virus Taxonomy Profile: Herpesviridae 2021. *J Gen Virol*, 102(10). DOI: 10.1099/jgv.0.001673.
- GIBSON W, ROIZMAN B, 1972. Proteins specified by herpes simplex virus. 8. Characterization and

- composition of multiple capsid forms of subtypes 1 and 2. *J Virol*, 10(5):1044-1052. DOI: 10.1128/JVI.10.5.1044-1052.1972.
- GLASS C M, MCLEAN R G, KATZ J B, MAEHR D S, CROPP C B, KIRK L J, MCKEIRNAN A J, EVERMANN J F, 1994. Isolation of pseudorabies (Aujeszky's disease) virus from a Florida panther. *J Wildl Dis*, 30(2):180-184. DOI: 10.7589/0090-3558-30.2.180.
- GOLDBERG M W, FISEROVA J, HUTTENLAUCH I, STICK R, 2008. A new model for nuclear lamina organization. *Biochem Soc Trans*, 36(Pt 6):1339-1343. DOI: 10.1042/BST0361339.
- GONG D, DAI X, JIH J, LIU Y T, BI G Q, SUN R, ZHOU Z H, 2019. DNA-Packing Portal and Capsid-Associated Tegument Complexes in the Tumor Herpesvirus KSHV. *Cell*, 178(6):1329-1343 e1312. DOI: 10.1016/j.cell.2019.07.035.
- GONZALEZ-DEL PINO G L, HELDWEIN E E, 2022. Well Put Together-A Guide to Accessorizing with the Herpesvirus gH/gL Complexes. *Viruses*, 14(2). DOI: 10.3390/v14020296.
- GREDMARK S, SCHLIEKER C, QUESADA V, SPOONER E, PLOEGH H L, 2007. A functional ubiquitin-specific protease embedded in the large tegument protein (ORF64) of murine gammaherpesvirus 68 is active during the course of infection. *J Virol*, 81(19):10300-10309. DOI: 10.1128/JVI.01149-07.
- GUO H, SHEN S, WANG L, DENG H, 2010. Role of tegument proteins in herpesvirus assembly and egress. *Protein Cell*, 1(11):987-998. DOI: 10.1007/s13238-010-0120-0.
- HAGE S, MARSCHALL M, 2022. 'Come together'-The Regulatory Interaction of Herpesviral Nuclear Egress Proteins Comprises Both Essential and Accessory Functions. *Cells*, 11(11). DOI: 10.3390/cells11111837.
- HALL R N, MEERS J, FOWLER E, MAHONY T, 2012. Back to BAC: the use of infectious clone technologies for viral mutagenesis. *Viruses*, 4(2):211-235. DOI: 10.3390/v4020211.
- HAN J, CHADHA P, MECKES D G, Jr., BAIRD N L, WILLS J W, 2011. Interaction and interdependent packaging of tegument protein UL11 and glycoprotein e of herpes simplex virus. *J Virol*, 85(18):9437-9446. DOI: 10.1128/JVI.05207-11.
- HAN J, CHADHA P, STARKEY J L, WILLS J W, 2012. Function of glycoprotein E of herpes simplex virus requires coordinated assembly of three tegument proteins on its cytoplasmic tail. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 109(48):19798-19803. DOI: 10.1073/pnas.1212900109.
- HARPER A L, MECKES D G, Jr., MARSH J A, WARD M D, YEH P C, BAIRD N L, WILSON C B, SEMMES O J, WILLS J W, 2010. Interaction domains of the UL16 and UL21 tegument proteins of herpes simplex virus. *J Virol*, 84(6):2963-2971. DOI: 10.1128/JVI.02015-09.
- HELLBERG T, PASSVOGEL L, SCHULZ K S, KLUPP B G, METTENLEITER T C, 2016. Nuclear Egress of Herpesviruses: The Prototypic Vesicular Nucleocytoplasmic Transport. *Adv Virus Res*, 94:81-140. DOI: 10.1016/bs.aivir.2015.10.002.
- HEMING J D, CONWAY J F, HOMA F L, 2017. Herpesvirus Capsid Assembly and DNA Packaging. *Adv Anat Embryol Cell Biol*, 223:119-142. DOI: 10.1007/978-3-319-53168-7_6.
- HENAFF D, REMILLARD-LABROSSE G, LORET S, LIPPE R, 2013. Analysis of the early steps of

- herpes simplex virus 1 capsid tegumentation. *J Virol*, 87(9):4895-4906. DOI: 10.1128/JVI.03292-12.
- HEYMANN J B, CHENG N, NEWCOMB W W, TRUS B L, BROWN J C, STEVEN A C, 2003. Dynamics of herpes simplex virus capsid maturation visualized by time-lapse cryo-electron microscopy. *Nat Struct Biol*, 10(5):334-341. DOI: 10.1038/nsb922.
- HOGUE I B, 2021. Tegument Assembly, Secondary Envelopment and Exocytosis. *Curr Issues Mol Biol*, 42:551-604. DOI: 10.21775/cimb.042.551.
- HOGUE I B, BOSSE J B, HU J R, THIBERGE S Y, ENQUIST L W, 2014. Cellular mechanisms of alpha herpesvirus egress: live cell fluorescence microscopy of pseudorabies virus exocytosis. *PLoS Pathog*, 10(12):e1004535. DOI: 10.1371/journal.ppat.1004535.
- HOU Y, WANG Y, ZHANG Y, YU H, ZHAO Y, YI A, 2022. Human Encephalitis Caused by Pseudorabies Virus in China: A Case Report and Systematic Review. *Vector Borne Zoonotic Dis*, 22(7):391-396. DOI: 10.1089/vbz.2022.0002.
- HOWARD P W, HOWARD T L, JOHNSON D C, 2013. Herpes simplex virus membrane proteins gE/gI and US9 act cooperatively to promote transport of capsids and glycoproteins from neuron cell bodies into initial axon segments. *J Virol*, 87(1):403-414. DOI: 10.1128/JVI.02465-12.
- HOWARD P W, WRIGHT C C, HOWARD T, JOHNSON D C, 2014. Herpes simplex virus gE/gI extracellular domains promote axonal transport and spread from neurons to epithelial cells. *J Virol*, 88(19):11178-11186. DOI: 10.1128/JVI.01627-14.
- HUANG Y, XU Z, GU S, NIE M, WANG Y, ZHAO J, LI F, DENG H, HUANG J, SUN X, ZHU L, 2022. The recombinant pseudorabies virus expressing porcine deltacoronavirus spike protein is safe and effective for mice. *BMC Vet Res*, 18(1):16. DOI: 10.1186/s12917-021-03115-1.
- HUET A, HUFFMAN J B, CONWAY J F, HOMA F L, 2020. Role of the Herpes Simplex Virus CVSC Proteins at the Capsid Portal Vertex. *J Virol*, 94(24). DOI: 10.1128/JVI.01534-20.
- HUFFMAN J B, DANIEL G R, FALCK-PEDERSEN E, HUET A, SMITH G A, CONWAY J F, HOMA F L, 2017. The C Terminus of the Herpes Simplex Virus UL25 Protein Is Required for Release of Viral Genomes from Capsids Bound to Nuclear Pores. *J Virol*, 91(15). DOI: 10.1128/JVI.00641-17.
- HUTCHINSON I, WHITELEY A, BROWNE H, ELLIOTT G, 2002. Sequential localization of two herpes simplex virus tegument proteins to punctate nuclear dots adjacent to ICP0 domains. *J Virol*, 76(20):10365-10373. DOI: 10.1128/jvi.76.20.10365-10373.2002.
- INN K S, LEE S H, RATHBUN J Y, WONG L Y, TOTH Z, MACHIDA K, OU J H, JUNG J U, 2011. Inhibition of RIG-I-mediated signaling by Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus-encoded deubiquitinase ORF64. *J Virol*, 85(20):10899-10904. DOI: 10.1128/JVI.00690-11.
- IVANOVA L, BUCH A, DOHNER K, POHLMANN A, BINZ A, PRANK U, SANDBAUMHUTER M, BAUERFEIND R, SODEIK B, 2016. Conserved Tryptophan Motifs in the Large Tegument Protein pUL36 Are Required for Efficient Secondary Envelopment of Herpes Simplex Virus Capsids. *J Virol*, 90(11):5368-5383. DOI: 10.1128/JVI.03167-15.
- JAMBUNATHAN N, CLARK C M, MUSARRAT F, CHOULJENKO V N, RUDD J, KOUSOULAS

- K G, 2021. Two Sides to Every Story: Herpes Simplex Type-1 Viral Glycoproteins gB, gD, gH/gL, gK, and Cellular Receptors Function as Key Players in Membrane Fusion. *Viruses*, 13(9). DOI: 10.3390/v13091849.
- JIANG F, DOUDNA J A, 2017. CRISPR-Cas9 Structures and Mechanisms. *Annu Rev Biophys*, 46:505-529. DOI: 10.1146/annurev-biophys-062215-010822.
- JIN S, LIN Q, LUO Y, ZHU Z, LIU G, LI Y, CHEN K, QIU J L, GAO C, 2021. Genome-wide specificity of prime editors in plants. *Nat Biotechnol*, 39(10):1292-1299. DOI: 10.1038/s41587-021-00891-x.
- JOHNSON D C, BAINES J D, 2011. Herpesviruses remodel host membranes for virus egress. *Nat Rev Microbiol*, 9(5):382-394. DOI: 10.1038/nrmicro2559.
- JOVASEVIC V, LIANG L, ROIZMAN B, 2008. Proteolytic cleavage of VP1-2 is required for release of herpes simplex virus 1 DNA into the nucleus. *J Virol*, 82(7):3311-3319. DOI: 10.1128/JVI.01919-07.
- KAWABATA A, SERADA S, NAKA T, MORI Y, 2014. Human herpesvirus 6 gM/gN complex interacts with v-SNARE in infected cells. *J Gen Virol*, 95(Pt 12):2769-2777. DOI: 10.1099/vir.0.069336-0.
- KELLY B J, BAUERFEIND R, BINZ A, SODEIK B, LAIMBACHER A S, FRAEFEL C, DIEFENBACH R J, 2014. The interaction of the HSV-1 tegument proteins pUL36 and pUL37 is essential for secondary envelopment during viral egress. *Virology*, 454-455:67-77. DOI: 10.1016/j.virol.2014.02.003.
- KELLY B J, FRAEFEL C, CUNNINGHAM A L, DIEFENBACH R J, 2009. Functional roles of the tegument proteins of herpes simplex virus type 1. *Virus Res*, 145(2):173-186. DOI: 10.1016/j.virusres.2009.07.007.
- KIM Y E, OH S E, KWON K M, LEE C H, AHN J H, 2016. Involvement of the N-Terminal Deubiquitinating Protease Domain of Human Cytomegalovirus UL48 Tegument Protein in Autoubiquitination, Virion Stability, and Virus Entry. *J Virol*, 90(6):3229-3242. DOI: 10.1128/JVI.02766-15.
- KLUPP B G, GRANZOW H, FUCHS W, KEIL G M, FINKE S, METTENLEITER T C, 2007. Vesicle formation from the nuclear membrane is induced by coexpression of two conserved herpesvirus proteins. *Proc Natl Acad Sci USA*, 104(17):7241-7246. DOI: 10.1073/pnas.0701757104.
- KLUPP B G, GRANZOW H, KARGER A, METTENLEITER T C, 2005. Identification, subviral localization, and functional characterization of the pseudorabies virus UL17 protein. *J Virol*, 79(21):13442-13453. DOI: 10.1128/JVI.79.21.13442-13453.2005.
- KNOPF K W, KAERNER H C, 1980. Virus-specific basic phosphoproteins associated with herpes simplex virus type a (HSV-1) particles and the chromatin of HSV-1-infected cells. *J Gen Virol*, 46(2):405-414. DOI: 10.1099/0022-1317-46-2-405.
- KOBAYASHI R, KATO A, SAGARA H, WATANABE M, MARUZURU Y, KOYANAGI N, ARII J, KAWAGUCHI Y, 2017. Herpes Simplex Virus 1 Small Capsomere-Interacting Protein VP26

- Regulates Nucleocapsid Maturation. *J Virol*, 91(18). DOI: 10.1128/JVI.01068-17.
- KOMALA SARI T, GIANOPULOS K A, NICOLA A V, 2020a. Glycoprotein C of Herpes Simplex Virus 1 Shields Glycoprotein B from Antibody Neutralization. *J Virol*, 94(5). DOI: 10.1128/JVI.01852-19.
- KOMALA SARI T, GIANOPULOS K A, WEED D J, SCHNEIDER S M, PRITCHARD S M, NICOLA A V, 2020b. Herpes Simplex Virus Glycoprotein C Regulates Low-pH Entry. *mSphere*, 5(1). DOI: 10.1128/mSphere.00826-19.
- KONG H, ZHANG K, LIU Y, SHANG Y, WU B, LIU X, 2013. Attenuated live vaccine (Bartha-K16) caused pseudorabies (Aujeszky's disease) in sheep. *Vet Res Commun*, 37(4):329-332. DOI: 10.1007/s11259-013-9568-8.
- KOPP M, KLUPP B G, GRANZOW H, FUCHS W, METTENLEITER T C, 2002. Identification and characterization of the pseudorabies virus tegument proteins UL46 and UL47: role for UL47 in virion morphogenesis in the cytoplasm. *J Virol*, 76(17):8820-8833. DOI: 10.1128/jvi.76.17.8820-8833.2002.
- KUHN J, LEEGE T, GRANZOW H, FUCHS W, METTENLEITER T C, KLUPP B G, 2010. Analysis of pseudorabies and herpes simplex virus recombinants simultaneously lacking the pUL17 and pUL25 components of the C-capsid specific component. *Virus Res*, 153(1):20-28. DOI: 10.1016/j.virusres.2010.06.022.
- LAINÉ R F, ALBECKA A, VAN DE LINDE S, REES E J, CRUMP C M, KAMINSKI C F, 2015. Structural analysis of herpes simplex virus by optical super-resolution imaging. *Nat Commun*, 6:5980. DOI: 10.1038/ncomms6980.
- LARI A, LORENZI D, NIGRELLI D, BROCCHI E, FACCINI S, POLI A, 2006. Pseudorabies virus in European wild boar from central Italy. *J Wildl Dis*, 42(2):319-324. DOI: 10.7589/0090-3558-42.2.319.
- LEE C P, CHEN M R, 2010. Escape of herpesviruses from the nucleus. *Rev Med Virol*, 20(4):214-230. DOI: 10.1002/rmv.643.
- LEELAWONG M, GUO D, SMITH G A, 2011. A physical link between the pseudorabies virus capsid and the nuclear egress complex. *J Virol*, 85(22):11675-11684. DOI: 10.1128/JVI.05614-11.
- LEHMAN I R, BOEHMER P E, 1999. Replication of herpes simplex virus DNA. *J Biol Chem*, 274(40):28059-28062. DOI: 10.1074/jbc.274.40.28059.
- LI X D, FU S H, CHEN L Y, LI F, DENG J H, LU X C, WANG H Y, TIAN K G, 2020a. Detection of Pseudorabies Virus Antibodies in Human Encephalitis Cases. *Biomed Environ Sci*, 33(6):444-447. DOI: 10.3967/bes2020.059.
- LI Z, ZHANG X, DONG L, PANG J, XU M, ZHONG Q, ZENG M S, YU X, 2020b. CryoEM structure of the tegumented capsid of Epstein-Barr virus. *Cell Res*, 30(10):873-884. DOI: 10.1038/s41422-020-0363-0.
- LIASHKOVICH I, HAFEZI W, KUHN J M, OBERLEITHNER H, SHAHIN V, 2011. Nuclear delivery mechanism of herpes simplex virus type 1 genome. *J Mol Recognit*, 24(3):414-421. DOI:

- 10.1002/jmr.1120.
- LILLEY C E, CARSON C T, MUOTRI A R, GAGE F H, WEITZMAN M D, 2005. DNA repair proteins affect the lifecycle of herpes simplex virus 1. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 102(16):5844-5849. DOI: 10.1073/pnas.0501916102.
- LIU F, ROIZMAN B, 1993. Characterization of the protease and other products of amino-terminus-proximal cleavage of the herpes simplex virus 1 UL26 protein. *J Virol*, 67(3):1300-1309. DOI: 10.1128/JVI.67.3.1300-1309.1993.
- LIU H, LI X T, HU B, DENG X Y, ZHANG L, LIAN S Z, ZHANG H L, LV S, XUE X H, LU R G, SHI N, YAN M H, XIAO P P, YAN X J, 2017. Outbreak of severe pseudorabies virus infection in pig-offal-fed farmed mink in Liaoning Province, China. *Arch Virol*, 162(3):863-866. DOI: 10.1007/s00705-016-3170-7.
- LIU H, SHI Z, LIU C, WANG P, WANG M, WANG S, LIU Z, WEI L, SUN Z, HE X, WANG J, 2020a. Implication of the Identification of an Earlier Pseudorabies Virus (PRV) Strain HLJ-2013 to the Evolution of Chinese PRVs. *Front Microbiol*, 11:612474. DOI: 10.3389/fmicb.2020.612474.
- LIU Q, WANG X, XIE C, DING S, YANG H, GUO S, LI J, QIN L, BAN F, WANG D, WANG C, FENG L, MA H, WU B, ZHANG L, DONG C, XING L, ZHANG J, CHEN H, YAN R, WANG X, LI W, 2021. A Novel Human Acute Encephalitis Caused by Pseudorabies Virus Variant Strain. *Clin Infect Dis*, 73(11): e3690-e3700. DOI: 10.1093/cid/ciaa987.
- LIU Y, LI X, HE S, HUANG S, LI C, CHEN Y, LIU Z, HUANG X, WANG X, 2020b. Efficient generation of mouse models with the prime editing system. *Cell Discov*, 6:27. DOI: 10.1038/s41421-020-0165-z.
- LIU Y T, JIH J, DAI X, BI G Q, ZHOU Z H, 2019. Cryo-EM structures of herpes simplex virus type 1 portal vertex and packaged genome. *Nature*, 570(7760):257-261. DOI: 10.1038/s41586-019-1248-6.
- LOOMIS J S, BOWZARD J B, COURTNEY R J, WILLS J W, 2001. Intracellular trafficking of the UL11 tegument protein of herpes simplex virus type 1. *J Virol*, 75(24):12209-12219. DOI: 10.1128/JVI.75.24.12209-12219.2001.
- LORET S, GUAY G, LIPPE R, 2008. Comprehensive characterization of extracellular herpes simplex virus type 1 virions. *J Virol*, 82(17):8605-8618. DOI: 10.1128/JVI.00904-08.
- LUCKOW V A, LEE S C, BARRY G F, OLINS P O, 1993. Efficient generation of infectious recombinant baculoviruses by site-specific transposon-mediated insertion of foreign genes into a baculovirus genome propagated in *Escherichia coli*. *J Virol*, 67(8):4566-4579. DOI: 10.1128/JVI.67.8.4566-4579.1993.
- LV Y, ZHOU S, GAO S, DENG H, 2019. Remodeling of host membranes during herpesvirus assembly and egress. *Protein Cell*, 10(5):315-326. DOI: 10.1007/s13238-018-0577-9.
- MAHONY T J, MCCARTHY F M, GRAVEL J L, WEST L, YOUNG P L, 2002. Construction and manipulation of an infectious clone of the bovine herpesvirus 1 genome maintained as a bacterial artificial chromosome. *J Virol*, 76(13):6660-6668. DOI: 10.1128/jvi.76.13.6660-6668.2002.
- MAKAROVA K S, WOLF Y I, ALKHNABASHI O S, COSTA F, SHAH S A, SAUNDERS S J,

- BARRANGOU R, BROUNS S J, CHARPENTIER E, HAFT D H, HORVATH P, MOINEAU S, MOJICA F J, TERNS R M, TERNS M P, WHITE M F, YAKUNIN A F, GARRETT R A, VAN DER OOST J, BACKOFEN R, KOONIN E V, 2015. An updated evolutionary classification of CRISPR-Cas systems. *Nat Rev Microbiol*, 13(11):722-736. DOI: 10.1038/nrmicro3569.
- MARCACCINI A, LOPEZ PENA M, QUIROGA M I, BERMUDEZ R, NIETO J M, ALEMAN N, 2008. Pseudorabies virus infection in mink: a host-specific pathogenesis. *Vet Immunol Immunopathol*, 124(3-4):264-273. DOI: 10.1016/j.vetimm.2008.03.013.
- MESSERLE M, CRNKOVIC I, HAMMERSCHMIDT W, ZIEGLER H, KOSZINOWSKI U H, 1997. Cloning and mutagenesis of a herpesvirus genome as an infectious bacterial artificial chromosome. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 94(26):14759-14763. DOI: 10.1073/pnas.94.26.14759.
- METTENLEITER T C, 2000. Aujeszky's disease (pseudorabies) virus: the virus and molecular pathogenesis--state of the art, June 1999. *Vet Res*, 31(1):99-115. DOI: 10.1051/vetres:2000110.
- METTENLEITER T C, 2004. Budding events in herpesvirus morphogenesis. *Virus Res*, 106(2):167-180. DOI: 10.1016/j.virusres.2004.08.013.
- METTENLEITER T C, KLUPP B G, GRANZOW H, 2009. Herpesvirus assembly: an update. *Virus Res*, 143(2):222-234. DOI: 10.1016/j.virusres.2009.03.018.
- MICHAEL K, KLUPP B G, METTENLEITER T C, KARGER A, 2006. Composition of pseudorabies virus particles lacking tegument protein US3, UL47, or UL49 or envelope glycoprotein E. *J Virol*, 80(3):1332-1339. DOI: 10.1128/JVI.80.3.1332-1339.2006.
- MIRANDA-SAKSENA M, BOADLE R A, AGGARWAL A, TIJONO B, RIXON F J, DIEFENBACH R J, CUNNINGHAM A L, 2009. Herpes simplex virus utilizes the large secretory vesicle pathway for anterograde transport of tegument and envelope proteins and for viral exocytosis from growth cones of human fetal axons. *J Virol*, 83(7):3187-3199. DOI: 10.1128/JVI.01579-08.
- MOHNKE J, STARK I, FISCHER M, FISCHER P M, SCHLOSSER A, GROTHEY A, O'HARE P, SODEIK B, ERHARD F, DOLKEN L, HENNIG T, 2022. pUL36 Deubiquitinase Activity Augments Both the Initiation and the Progression of Lytic Herpes Simplex Virus Infection in IFN-Primed Cells. *J Virol*, 96(22):e0096322. DOI: 10.1128/jvi.00963-22.
- MOHR D, FREY S, FISCHER T, GUTTLER T, GORLICH D, 2009. Characterisation of the passive permeability barrier of nuclear pore complexes. *EMBO J*, 28(17):2541-2553. DOI: 10.1038/emboj.2009.200.
- MORRIS J B, HOFEMEISTER H, O'HARE P, 2007. Herpes simplex virus infection induces phosphorylation and delocalization of emerin, a key inner nuclear membrane protein. *J Virol*, 81(9):4429-4437. DOI: 10.1128/JVI.02354-06.
- MULLER T, HAHN E C, TOTTEWITZ F, KRAMER M, KLUPP B G, METTENLEITER T C, FREULING C, 2011. Pseudorabies virus in wild swine: a global perspective. *Arch Virol*, 156(10):1691-1705. DOI: 10.1007/s00705-011-1080-2.
- MUSARRAT F, CHOULJENKO V, KOUSOULAS K G, 2021. Cellular and Viral Determinants of HSV-1 Entry and Intracellular Transport towards Nucleus of Infected Cells. *J Virol*, 95(7). DOI:

- 10.1128/JVI.02434-20.
- MUYLAERT I, ELIAS P, 2007. Knockdown of DNA ligase IV/XRCC4 by RNA interference inhibits herpes simplex virus type I DNA replication. *J Biol Chem*, 282(15):10865-10872. DOI: 10.1074/jbc.M611834200.
- MUYLAERT I, TANG K W, ELIAS P, 2011. Replication and recombination of herpes simplex virus DNA. *J Biol Chem*, 286(18):15619-15624. DOI: 10.1074/jbc.R111.233981.
- NAJERA F, GRANDE-GOMEZ R, PENA J, VAZQUEZ A, PALACIOS M J, RUEDA C, CORONA-BRAVO A I, ZORRILLA I, REVUELTA L, GIL-MOLINO M, JIMENEZ J, 2021. Disease Surveillance during the Reintroduction of the Iberian Lynx (*Lynx pardinus*) in Southwestern Spain. *Animals (Basel)*, 11(2). DOI: 10.3390/ani11020547.
- NEWCOMB W W, BROWN J C, 2010. Structure and capsid association of the herpesvirus large tegument protein UL36. *J Virol*, 84(18):9408-9414. DOI: 10.1128/JVI.00361-10.
- NEWCOMB W W, COCKRELL S K, HOMA F L, BROWN J C, 2009. Polarized DNA ejection from the herpesvirus capsid. *J Mol Biol*, 392(4):885-894. DOI: 10.1016/j.jmb.2009.07.052.
- NEWCOMB W W, JONES L M, DEE A, CHAUDHRY F, BROWN J C, 2012. Role of a reducing environment in disassembly of the herpesvirus tegument. *Virology*, 431(1-2):71-79. DOI: 10.1016/j.virol.2012.05.017.
- NEWCOMB W W, JUHAS R M, THOMSEN D R, HOMA F L, BURCH A D, WELLER S K, BROWN J C, 2001. The UL6 gene product forms the portal for entry of DNA into the herpes simplex virus capsid. *J Virol*, 75(22):10923-10932. DOI: 10.1128/JVI.75.22.10923-10932.2001.
- NEWCOMB W W, TRUS B L, CHENG N, STEVEN A C, SHEAFFER A K, TENNEY D J, WELLER S K, BROWN J C, 2000. Isolation of herpes simplex virus procapsids from cells infected with a protease-deficient mutant virus. *J Virol*, 74(4):1663-1673. DOI: 10.1128/jvi.74.4.1663-1673.2000.
- OJALA P M, SODEIK B, EBERSOLD M W, KUTAY U, HELENIUS A, 2000. Herpes simplex virus type 1 entry into host cells: reconstitution of capsid binding and uncoating at the nuclear pore complex in vitro. *Mol Cell Biol*, 20(13):4922-4931. DOI: 10.1128/MCB.20.13.4922-4931.2000.
- OLIVO P D, NELSON N J, CHALLBERG M D, 1988. Herpes simplex virus DNA replication: the UL9 gene encodes an origin-binding protein. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 85(15):5414-5418. DOI: 10.1073/pnas.85.15.5414.
- OU J, CAI S, ZHENG F, LU G, ZHANG G, 2020. Human pseudorabies virus infection: A new threat in China. *J Infect*, 80(5):578-606. DOI: 10.1016/j.jinf.2019.12.018.
- OWEN D J, CRUMP C M, GRAHAM S C, 2015. Tegument Assembly and Secondary Envelopment of Alphaherpesviruses. *Viruses*, 7(9):5084-5114. DOI: 10.3390/v7092861.
- PAN Y, GUO L, MIAO Q, WU L, JING Z, TIAN J, FENG L, 2023. Association of THBS3 with Glycoprotein D Promotes Pseudorabies Virus Attachment, Fusion, and Entry. *J Virol*, 97(2): e0187122. DOI: 10.1128/jvi.01871-22.
- PARK S J, JEONG T Y, SHIN S K, YOON D E, LIM S Y, KIM S P, CHOI J, LEE H, HONG J I, AHN J, SEONG J K, KIM K, 2021. Targeted mutagenesis in mouse cells and embryos using an enhanced

- prime editor. *Genome Biol*, 22(1):170. DOI: 10.1186/s13059-021-02389-w.
- PASDELOUP D, BLONDEL D, ISIDRO A L, RIXON F J, 2009. Herpesvirus capsid association with the nuclear pore complex and viral DNA release involve the nucleoporin CAN/Nup214 and the capsid protein pUL25. *J Virol*, 83(13):6610-6623. DOI: 10.1128/JVI.02655-08.
- POMERANZ L E, REYNOLDS A E, HENGARTNER C J, 2005. Molecular biology of pseudorabies virus: impact on neurovirology and veterinary medicine. *Microbiol Mol Biol Rev*, 69(3):462-500. DOI: 10.1128/MMBR.69.3.462-500.2005.
- PRESTON V G, MURRAY J, PRESTON C M, MCDUGALL I M, STOW N D, 2008. The UL25 gene product of herpes simplex virus type 1 is involved in uncoating of the viral genome. *J Virol*, 82(13):6654-6666. DOI: 10.1128/JVI.00257-08.
- QI H, WU H, ABID M, QIU H J, SUN Y, 2020. Establishment of a Fosmid Library for Pseudorabies Virus SC Strain and Application in Viral Neuronal Tracing. *Front Microbiol*, 11:1168. DOI: 10.3389/fmicb.2020.01168.
- RADTKE K, KIENEKE D, WOLFSTEIN A, MICHAEL K, STEFFEN W, SCHOLZ T, KARGER A, SODEIK B, 2010. Plus- and minus-end directed microtubule motors bind simultaneously to herpes simplex virus capsids using different inner tegument structures. *PLoS Pathog*, 6(7): e1000991. DOI: 10.1371/journal.ppat.1000991.
- REAGAN R L, DAY W C, MARLEY R T, BRUECKNER A L, 1953. Effect of pseudorabies virus (Aujeszky strain) in the large brown bat (*Eptesicus fuscus*). *Am J Vet Res*, 14(51):331-332.
- REILLY L M, RALL G, LOMNICZI B, METTENLEITER T C, KUPERSCHMIDT S, BEN-PORAT T, 1991. The ability of pseudorabies virus to grow in different hosts is affected by the duplication and translocation of sequences from the left end of the genome to the UL-US junction. *J Virol*, 65(11):5839-5847. DOI: 10.1128/JVI.65.11.5839-5847.1991.
- RESKE A, POLLARA G, KRUMMENACHER C, CHAIN B M, KATZ D R, 2007. Understanding HSV-1 entry glycoproteins. *Rev Med Virol*, 17(3):205-215. DOI: 10.1002/rmv.531.
- REYNOLDS A E, LIANG L, BAINES J D, 2004. Conformational changes in the nuclear lamina induced by herpes simplex virus type 1 require genes U(L)31 and U(L)34. *J Virol*, 78(11):5564-5575. DOI: 10.1128/JVI.78.11.5564-5575.2004.
- REYNOLDS A E, RYCKMAN B J, BAINES J D, ZHOU Y, LIANG L, ROLLER R J, 2001. U(L)31 and U(L)34 proteins of herpes simplex virus type 1 form a complex that accumulates at the nuclear rim and is required for envelopment of nucleocapsids. *J Virol*, 75(18):8803-8817. DOI: 10.1128/jvi.75.18.8803-8817.2001.
- RICHARDS A L, SOLLARS P J, PITTS J D, STULTS A M, HELDWEIN E E, PICKARD G E, SMITH G A, 2017. The pUL37 tegument protein guides alpha-herpesvirus retrograde axonal transport to promote neuroinvasion. *PLoS Pathog*, 13(12):e1006741. DOI: 10.1371/journal.ppat.1006741.
- RIXON F J, MCNAB D, 1999. Packaging-competent capsids of a herpes simplex virus temperature-sensitive mutant have properties similar to those of in vitro-assembled procapsids. *J*

- Viol, 73(7):5714-5721. DOI: 10.1128/JVI.73.7.5714-5721.1999.
- ROZEN R, SATHISH N, LI Y, YUAN Y, 2008. Virion-wide protein interactions of Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus. *J Virol*, 82(10):4742-4750. DOI: 10.1128/JVI.02745-07.
- SAAD A, ZHOU Z H, JAKANA J, CHIU W, RIXON F J, 1999. Roles of triplex and scaffolding proteins in herpes simplex virus type 1 capsid formation suggested by structures of recombinant particles. *J Virol*, 73(8):6821-6830. DOI: 10.1128/JVI.73.8.6821-6830.1999.
- SAEKI Y, ICHIKAWA T, SAEKI A, CHIOCCA E A, TOBLER K, ACKERMANN M, BREAKFIELD X O, FRAEFEL C, 1998. Herpes simplex virus type 1 DNA amplified as bacterial artificial chromosome in *Escherichia coli*: rescue of replication-competent virus progeny and packaging of amplicon vectors. *Hum Gene Ther*, 9(18):2787-2794. DOI: 10.1089/hum.1998.9.18-2787.
- SALMON B, CUNNINGHAM C, DAVISON A J, HARRIS W J, BAINES J D, 1998. The herpes simplex virus type 1 U(L)17 gene encodes virion tegument proteins that are required for cleavage and packaging of viral DNA. *J Virol*, 72(5):3779-3788. DOI: 10.1128/JVI.72.5.3779-3788.1998.
- SATHIYAMOORTHY K, CHEN J, LONGNECKER R, JARDETZKY T S, 2017. The COMPLEXity in herpesvirus entry. *Curr Opin Virol*, 24:97-104. DOI: 10.1016/j.coviro.2017.04.006.
- SATO T, ARII J, SUENAGA T, WANG J, KOGURE A, UEHORI J, ARASE N, SHIRATORI I, TANAKA S, KAWAGUCHI Y, SPEAR P G, LANIER L L, ARASE H, 2008. PILRalpha is a herpes simplex virus-1 entry coreceptor that associates with glycoprotein B. *Cell*, 132(6):935-944. DOI: 10.1016/j.cell.2008.01.043.
- SCHENE I F, JOORE I P, OKA R, MOKRY M, VAN VUGT A H M, VAN BOXTEL R, VAN DER DOEF H P J, VAN DER LAAN L J W, VERSTEGEN M M A, VAN HASSELT P M, NIEUWENHUIS E E S, FUCHS S A, 2020. Prime editing for functional repair in patient-derived disease models. *Nat Commun*, 11(1):5352. DOI: 10.1038/s41467-020-19136-7.
- SCHIPKE J, POHLMANN A, DIESTEL R, BINZ A, RUDOLPH K, NAGEL C H, BAUERFEIND R, SODEIK B, 2012. The C terminus of the large tegument protein pUL36 contains multiple capsid binding sites that function differently during assembly and cell entry of herpes simplex virus. *J Virol*, 86(7):3682-3700. DOI: 10.1128/JVI.06432-11.
- SCHOLTES L, BAINES J D, 2009. Effects of major capsid proteins, capsid assembly, and DNA cleavage/packaging on the pUL17/pUL25 complex of herpes simplex virus 1. *J Virol*, 83(24):12725-12737. DOI: 10.1128/JVI.01658-09.
- SCHOLTES L D, YANG K, LI L X, BAINES J D, 2010. The capsid protein encoded by U(L)17 of herpes simplex virus 1 interacts with tegument protein VP13/14. *J Virol*, 84(15):7642-7650. DOI: 10.1128/JVI.00277-10.
- SCHUMACHER D, TISCHER B K, FUCHS W, OSTERRIEDER N, 2000. Reconstitution of Marek's disease virus serotype 1 (MDV-1) from DNA cloned as a bacterial artificial chromosome and characterization of a glycoprotein B-negative MDV-1 mutant. *J Virol*, 74(23):11088-11098. DOI: 10.1128/jvi.74.23.11088-11098.2000.

- SHALEM O, SANJANA N E, ZHANG F, 2015. High-throughput functional genomics using CRISPR-Cas9. *Nat Rev Genet*, 16(5):299-311. DOI: 10.1038/nrg3899.
- SHARMA M, COEN D M, 2014. Comparison of effects of inhibitors of viral and cellular protein kinases on human cytomegalovirus disruption of nuclear lamina and nuclear egress. *J Virol*, 88(18):10982-10985. DOI: 10.1128/JVI.01391-14.
- SHI J, ZHENG S, WU X, PENG Z, LI C, WANG S, XIN C, XU S, LI J, 2021. Efficient influence of ssDNA virus PCV2 replication by CRISPR/Cas9 targeting of the viral genome. *Mol Immunol*, 133:63-66. DOI: 10.1016/j.molimm.2021.01.024.
- SHIBA C, DAIKOKU T, GOSHIMA F, TAKAKUWA H, YAMAUCHI Y, KOIWA O, NISHIYAMA Y, 2000. The UL34 gene product of herpes simplex virus type 2 is a tail-anchored type II membrane protein that is significant for virus envelopment. *J Gen Virol*, 81(Pt 10):2397-2405. DOI: 10.1099/0022-1317-81-10-2397.
- SHMAKOV S, ABUDAYYEH O O, MAKAROVA K S, WOLF Y I, GOOTENBERG J S, SEMENOVA E, MINAKHIN L, JOUNG J, KONERMANN S, SEVERINOV K, ZHANG F, KOONIN E V, 2015. Discovery and Functional Characterization of Diverse Class 2 CRISPR-Cas Systems. *Mol Cell*, 60(3):385-397. DOI: 10.1016/j.molcel.2015.10.008.
- SMITH G A, 2021. Navigating the Cytoplasm: Delivery of the Alphaherpesvirus Genome to the Nucleus. *Curr Issues Mol Biol*, 41:171-220. DOI: 10.21775/cimb.041.171.
- SNIJDER J, RADTKE K, ANDERSON F, SCHOLTES L, CORRADINI E, BAINES J, HECK A J R, WUITE G J L, SODEIK B, ROOS W H, 2017. Vertex-Specific Proteins pUL17 and pUL25 Mechanically Reinforce Herpes Simplex Virus Capsids. *J Virol*, 91(12). DOI: 10.1128/JVI.00123-17.
- SNYDER A, POLCICOVA K, JOHNSON D C, 2008. Herpes simplex virus gE/gI and US9 proteins promote transport of both capsids and virion glycoproteins in neuronal axons. *J Virol*, 82(21):10613-10624. DOI: 10.1128/JVI.01241-08.
- STONE D, LONG K R, LOPRIENO M A, DE SILVA FELIXGE H S, KENKEL E J, LILEY R M, RAPP S, ROYCHOUDHURY P, NGUYEN T, STENSLAND L, COLON-THILLET R, KLOUSER L M, WEBER N D, LE C, WAGONER J, GOECKER E A, LI A Z, EICHHOLZ K, COREY L, TYRRELL D L, GRENINGER A L, HUANG M L, POLYAK S J, AUBERT M, SAGARTZ J E, JEROME K R, 2021. CRISPR-Cas9 gene editing of hepatitis B virus in chronically infected humanized mice. *Mol Ther Methods Clin Dev*, 20:258-275. DOI: 10.1016/j.omtm.2020.11.014.
- STRANG B L, STOW N D, 2005. Circularization of the herpes simplex virus type 1 genome upon lytic infection. *J Virol*, 79(19):12487-12494. DOI: 10.1128/JVI.79.19.12487-12494.2005.
- SVOBODOVA S, BELL S, CRUMP C M, 2012. Analysis of the interaction between the essential herpes simplex virus 1 tegument proteins VP16 and VP1/2. *J Virol*, 86(1):473-483. DOI: 10.1128/JVI.05981-11.
- TANG Y D, LIU J T, FANG Q Q, WANG T Y, SUN M X, AN T Q, TIAN Z J, CAI X H, 2016. Recombinant Pseudorabies Virus (PRV) Expressing Firefly Luciferase Effectively Screened for CRISPR/Cas9 Single Guide RNAs and Antiviral Compounds. *Viruses*, 8(4):90. DOI:

- 10.3390/v8040090.
- THURLOW J K, RIXON F J, MURPHY M, TARGETT-ADAMS P, HUGHES M, PRESTON V G, 2005. The herpes simplex virus type 1 DNA packaging protein UL17 is a virion protein that is present in both the capsid and the tegument compartments. *J Virol*, 79(1):150-158. DOI: 10.1128/JVI.79.1.150-158.2005.
- TONG W, ZHENG H, LI G X, GAO F, SHAN T L, ZHOU Y J, YU H, JIANG Y F, YU L X, LI L W, KONG N, TONG G Z, LI J C, 2020. Recombinant pseudorabies virus expressing E2 of classical swine fever virus (CSFV) protects against both virulent pseudorabies virus and CSFV. *Antiviral Res*, 173:104652. DOI: 10.1016/j.antiviral.2019.104652.
- TRUS B L, NEWCOMB W W, CHENG N, CARDONE G, MAREKOV L, HOMA F L, BROWN J C, STEVEN A C, 2007. Allosteric signaling and a nuclear exit strategy: binding of UL25/UL17 heterodimers to DNA-Filled HSV-1 capsids. *Mol Cell*, 26(4):479-489. DOI: 10.1016/j.molcel.2007.04.010.
- TSO F Y, WEST J T, WOOD C, 2019. Reduction of Kaposi's Sarcoma-Associated Herpesvirus Latency Using CRISPR-Cas9 To Edit the Latency-Associated Nuclear Antigen Gene. *J Virol*, 93(7). DOI: 10.1128/JVI.02183-18.
- TULLMAN J A, HARMON M E, DELANNOY M, GIBSON W, 2014. Recovery of an HMWP/hmwBP (pUL48/pUL47) complex from virions of human cytomegalovirus: subunit interactions, oligomer composition, and deubiquitylase activity. *J Virol*, 88(15):8256-8267. DOI: 10.1128/JVI.00971-14.
- VERPOEST S, CAY A B, BERTRAND O, SAULMONT M, DE REGGE N, 2013. Isolation and characterization of pseudorabies virus from a wolf (*Canis lupus*) from Belgium. *European Journal of Wildlife Research*, 60(1):149-153. DOI: 10.1007/s10344-013-0774-z.
- VILLANUEVA-VALENCIA J R, TSIMTSIRAKIS E, EVILEVITCH A, 2021. Role of HSV-1 Capsid Vertex-Specific Component (CVSC) and Viral Terminal DNA in Capsid Docking at the Nuclear Pore. *Viruses*, 13(12). DOI: 10.3390/v13122515.
- VOLLMER B, GRUNEWALD K, 2020. Herpesvirus membrane fusion - a team effort. *Curr Opin Struct Biol*, 62:112-120. DOI: 10.1016/j.sbi.2019.12.004.
- WANG G, ZHA Z, HUANG P, SUN H, HUANG Y, HE M, CHEN T, LIN L, CHEN Z, KONG Z, QUE Y, LI T, GU Y, YU H, ZHANG J, ZHENG Q, CHEN Y, LI S, XIA N, 2022. Structures of pseudorabies virus capsids. *Nat Commun*, 13(1):1533. DOI: 10.1038/s41467-022-29250-3.
- WANG J, FAN Q, SATOH T, ARII J, LANIER L L, SPEAR P G, KAWAGUCHI Y, ARASE H, 2009. Binding of herpes simplex virus glycoprotein B (gB) to paired immunoglobulin-like type 2 receptor alpha depends on specific sialylated O-linked glycans on gB. *J Virol*, 83(24):13042-13045. DOI: 10.1128/JVI.00792-09.
- WEIGEL R M, HAHN E C, SCHERBA G, 2003. Survival and immunization of raccoons after exposure to pseudorabies (Aujeszky's disease) virus gene-deleted vaccines. *Vet Microbiol*, 92(1-2):19-24. DOI: 10.1016/s0378-1135(02)00350-4.

- WEINHEIMER S P, BOYD B A, DURHAM S K, RESNICK J L, O'BOYLE D R, 2nd, 1992. Deletion of the VP16 open reading frame of herpes simplex virus type 1. *J Virol*, 66(1):258-269. DOI: 10.1128/JVI.66.1.258-269.1992.
- WELLER S K, COEN D M, 2012. Herpes simplex viruses: mechanisms of DNA replication. *Cold Spring Harb Perspect Biol*, 4(9): a013011. DOI: 10.1101/cshperspect.a013011.
- WHITE J M, DELOS S E, BRECHER M, SCHORNBERG K, 2008. Structures and mechanisms of viral membrane fusion proteins: multiple variations on a common theme. *Crit Rev Biochem Mol Biol*, 43(3):189-219. DOI: 10.1080/10409230802058320.
- WONG G, LU J, ZHANG W, GAO G F, 2019. Pseudorabies virus: a neglected zoonotic pathogen in humans? *Emerg Microbes Infect*, 8(1):150-154. DOI: 10.1080/22221751.2018.1563459.
- WRIGHT A V, NUNEZ J K, DOUDNA J A, 2016. Biology and Applications of CRISPR Systems: Harnessing Nature's Toolbox for Genome Engineering. *Cell*, 164(1-2):29-44. DOI: 10.1016/j.cell.2015.12.035.
- WU L, CHENG A, WANG M, JIA R, YANG Q, WU Y, ZHU D, ZHAO X, CHEN S, LIU M, ZHANG S, OU X, MAO S, GAO Q, SUN D, WEN X, LIU Y, YU Y, ZHANG L, TIAN B, PAN L, CHEN X, 2020. Alphaherpesvirus Major Tegument Protein VP22: Its Precise Function in the Viral Life Cycle. *Front Microbiol*, 11:1908. DOI: 10.3389/fmicb.2020.01908.
- WU S, PAN S, ZHANG L, BAINES J, ROLLER R, AMES J, YANG M, WANG J, CHEN D, LIU Y, ZHANG C, CAO Y, HE B, 2016. Herpes Simplex Virus 1 Induces Phosphorylation and Reorganization of Lamin A/C through the gamma134.5 Protein That Facilitates Nuclear Egress. *J Virol*, 90(22):10414-10422. DOI: 10.1128/JVI.01392-16.
- XU J J, CHENG X F, WU J Q, ZHENG H, TONG W, CHEN X, YE C, LIU Y, ZHU H, FU X, JIANG Y, KONG N, TONG G, GAO F, LI G, 2021. Pseudorabies virus pUL16 assists the nuclear import of VP26 through protein-protein interaction. *Vet Microbiol*, 257:109080. DOI: 10.1016/j.vetmic.2021.109080.
- YANG K, WILLS E, BAINES J D, 2009. The putative leucine zipper of the UL6-encoded portal protein of herpes simplex virus 1 is necessary for interaction with pUL15 and pUL28 and their association with capsids. *J Virol*, 83(9):4557-4564. DOI: 10.1128/JVI.00026-09.
- YANG Y, YANG P, WANG N, CHEN Z, SU D, ZHOU Z H, RAO Z, WANG X, 2020. Architecture of the herpesvirus genome-packaging complex and implications for DNA translocation. *Protein Cell*, 11(5):339-351. DOI: 10.1007/s13238-020-00710-0.
- YUAN S, WANG J, ZHU D, WANG N, GAO Q, CHEN W, TANG H, WANG J, ZHANG X, LIU H, RAO Z, WANG X, 2018. Cryo-EM structure of a herpesvirus capsid at 3.1 Å. *Science*, 360(6384). DOI: 10.1126/science.aao7283.
- YUN S I, KIM S Y, RICE C M, LEE Y M, 2003. Development and application of a reverse genetics system for Japanese encephalitis virus. *J Virol*, 77(11):6450-6465. DOI: 10.1128/jvi.77.11.6450-6465.2003.
- ZAICHICK S V, BOHANNON K P, HUGHES A, SOLLARS P J, PICKARD G E, SMITH G A, 2013.

- The herpesvirus VP1/2 protein is an effector of dynein-mediated capsid transport and neuroinvasion. *Cell Host Microbe*, 13(2):193-203. DOI: 10.1016/j.chom.2013.01.009.
- ZHANG K, HUANG J, WANG Q, HE Y, XU Z, XIANG M, WU B, CHEN H, 2011. Recombinant pseudorabies virus expressing P12A and 3C of FMDV can partially protect piglets against FMDV challenge. *Res Vet Sci*, 91(1):90-94. DOI: 10.1016/j.rvsc.2010.09.001.
- ZHANG L, ZHONG C, WANG J, LU Z, LIU L, YANG W, LYU Y, 2015. Pathogenesis of natural and experimental Pseudorabies virus infections in dogs. *Virology*, 12:44. DOI: 10.1186/s12985-015-0274-8.
- ZHANG Y, LIU W, LI Z, KUMAR V, ALVAREZ-CABRERA A L, LEIBOVITCH E C, CUI Y, MEI Y, BI G Q, JACOBSON S, ZHOU Z H, 2019. Atomic structure of the human herpesvirus 6B capsid and capsid-associated tegument complexes. *Nat Commun*, 10(1):5346. DOI: 10.1038/s41467-019-13064-x.
- ZHAO J, ZHU L, XU L, LI F, DENG H, HUANG Y, GU S, SUN X, ZHOU Y, XU Z, 2022. The Construction and Immunogenicity Analyses of Recombinant Pseudorabies Virus With NADC30-Like Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome Virus-Like Particles Co-expression. *Front Microbiol*, 13:846079. DOI: 10.3389/fmicb.2022.846079.
- ZHAO Y, WANG L Q, ZHENG H H, YANG Y R, LIU F, ZHENG L L, JIN Y, CHEN H Y, 2020. Construction and immunogenicity of a gE/gI/TK-deleted PRV based on porcine pseudorabies virus variant. *Mol Cell Probes*, 53:101605. DOI: 10.1016/j.mcp.2020.101605.