

吴凤瑶, 卢凤英, 章丽娇, 等. 基于真核 CMV 启动子的 3 型鸭甲型肝炎病毒体内转录系统建立[J]. 江苏农业学报, 2025, 41(12): 2403-2408.

doi: 10.3969/j.issn.1000-4440.2025.12.012

基于真核 CMV 启动子的 3 型鸭甲型肝炎病毒体内转录系统建立

吴凤瑶, 卢凤英, 章丽娇, 韩凯凯, 杨婧, 赵冬敏, 黄欣梅, 刘宇卓, 尹馨, 苏丹, 张小飞, 刘青涛

(江苏省农业科学院兽医研究所/农业农村部兽用生物制品工程技术重点实验室, 江苏 南京 210014)

摘要: 本研究以 pCI 质粒为载体, 将 3 型鸭甲型肝炎病毒(DHAV-3)强毒株的全基因组序列插入其真核启动子 CMV 之后, 并在病毒全基因序列 3' 端添加丁型肝炎病毒核酶(*HdvRz*)序列获得重组质粒 pCI-SD。将 pCI-SD 转染乳仓鼠肾(BHK-21)细胞后接种鸭胚, 获得拯救病毒 rSD。通过 PCR 扩增和序列测定, 证明 rSD 为包含遗传标记(*EcoR* I 酶切位点)的拯救病毒。对 rSD 的半数致死量及其在感染雏鸭体内的组织分布进行测定和病理切片检测, 结果显示, rSD 与亲本病毒 SD 的毒价相近, 且在感染雏鸭体内各组织的病毒拷贝数与亲本病毒相似, 对各主要脏器的损伤也与亲本病毒相同, 表明本研究成功构建了采用体内转录的 DHAV-3 反向遗传操作系统。该系统避免了体外转录核糖核酸(RNA)的弊端, 简化了操作步骤, 提高了拯救效率, 为鸭甲型肝炎病毒的致病机制和新型疫苗研究提供了工具。

关键词: 3 型鸭甲型肝炎病毒; 体内转录; CMV 启动子; 反向遗传操作系统

中图分类号: S834 文献标识码: A 文章编号: 1000-4440(2025)12-2403-06

Establishment of an *in vivo* transcription system for duck hepatitis A virus type 3 based on the eukaryotic CMV promoter

WU Fengyao, LU Fengying, ZHANG Lijiao, HAN Kaikai, YANG Jing, ZHAO Dongmin, HUANG Xinmei, LIU Yuzhuo, YIN Xin, SU Dan, ZHANG Xiaofei, LIU Qingtao

(*Institute of Veterinary Medicine, Jiangsu Academy of Agricultural Sciences/Key Laboratory of Veterinary Biological Engineering and Technology, Ministry of Agriculture and Rural Affairs, Nanjing 210014, China*)

Abstract: This study constructed a recombinant plasmid, pCI-SD, by inserting the full-length genome of a highly virulent duck hepatitis A virus type 3 (DHAV-3) strain downstream of the eukaryotic CMV promoter in the pCI vector, followed by the addition of a hepatitis delta virus ribozyme (*HdvRz*) sequence at the 3' end. The pCI-SD plasmid was transfected into baby hamster kidney (BHK-21) cells, and the rescued virus (rSD) was subsequently obtained by inoculating duck embryos. PCR amplification and sequencing confirmed that rSD contained the genetic marker (an *EcoR* I restriction site). Biological characterization showed that the median lethal dose (LD_{50}) of rSD was similar to that of the parental virus SD. Tissue distribution analysis and histopathological examination in infected ducklings revealed that rSD exhibited comparable organ tropism and induced similar pathological damage as the parental virus, confirming the successful establishment of a DHAV-3 reverse genetics system based on *in vivo* transcription. This system avoids the drawbacks of *in vitro* RNA transcription, simplifies operational procedures, and improves rescue efficiency, providing a valuable tool for studying the pathogenesis of DHAV-3 and de-

收稿日期: 2025-08-12

基金项目: 国家自然科学基金项目(32202845)

作者简介: 吴凤瑶(1985-), 女, 四川成都人, 博士, 助理研究员, 主要从事水禽疫病病原致病分子机制研究。(E-mail) cdwfayao@126.com

通讯作者: 张小飞, (E-mail) xiaofei0804@sina.com; 刘青涛, (E-mail) taoqingliu2013@163.com

able organ tropism and induced similar pathological damage as the parental virus, confirming the successful establishment of a DHAV-3 reverse genetics system based on *in vivo* transcription. This system avoids the drawbacks of *in vitro* RNA transcription, simplifies operational procedures, and improves rescue efficiency, providing a valuable tool for studying the pathogenesis of DHAV-3 and de-

veloping novel vaccines.

Key words: duck hepatitis A virus type 3; *in vivo* transcription; CMV promoter; reverse genetics system

鸭甲型肝炎病毒(DHAV)是小RNA病毒科禽肝病毒属的重要成员^[1],也是引起雏鸭病毒性肝炎的主要病原。该病毒通常感染28日龄以下雏鸭,导致以肝脏出血为特征的急性肝炎,具有发病急、传播快的特点,发病率和死亡率可达90%以上^[2]。DHAV现有3种血清型,即DHAV-1、DHAV-2和DHAV-3^[3],目前在中国流行的主要是DHAV-1和DHAV-3^[4],给中国养鸭业造成巨大经济损失。自2013年DHAV-1弱疫苗推广应用以来,DHAV-1的流行得到有效控制,但DHAV-3的流行范围和规模逐年扩大,且已超过DHAV-1,成为制约中国养鸭业的严峻问题^[5]。因此,开展DHAV-3致病机制的研究及相关疫苗的研发,已成为当前亟待解决的关键课题。

稳定的病毒反向遗传操作系统是研究核糖核酸(RNA)病毒的关键工具,它不仅是研究病毒复制、病毒毒力、病毒与宿主相互作用的核心手段^[6],也是设计和研发新型基因工程疫苗的技术支撑^[7]。病毒反向遗传技术的核心是构建病毒感染性cDNA克隆,第一个被成功构建感染性克隆的RNA病毒是与鸭甲型肝炎病毒同一科的脊髓灰质炎病毒^[8],此后有很多RNA病毒的反向遗传操作系统相继构建成功。

传统弱毒疫苗研发周期长、成本高,且存在毒力返强的潜在风险。而借助反向遗传技术,可通过编辑病毒相关毒力基因快速构建减毒疫苗株,有效克服传统疫苗研制的上述局限性。此外,通过反向遗传技术对病毒基因组进行定点突变等精准操作,还能系统解析病毒基因在其致病机制中的功能及作用机制。因此,将反向遗传技术应用于DHAV的致病机制研究及新型疫苗研发,是该领域未来重要的发展方向^[9]。

本研究采用体内转录方法构建DHAV-3的反向遗传操作系统。拟将DHAV-3强毒株SD的全基因组序列克隆至pCI载体,转染乳仓鼠肾(BHK-21)细胞后接种至鸭胚传代,以期获得拯救病毒rSD,为DHAV-3的基因功能解析、致病机理研究及新型疫苗研发等提供稳定的技术平台。

1 材料与amp;方法

1.1 毒株、细胞及鸭胚

3型鸭甲型肝炎病毒强毒株SD由江苏省农业

科学院兽医研究所实验室分离保存,病毒滴度为0.5 mL $1 \times 10^{6.0}$ LD₅₀。BHK-21细胞为该实验室保存。无特定病原体(SPF)鸭胚购自中国农业科学院哈尔滨兽医研究所。

1.2 主要试剂

杜氏改良伊格尔培养基(DMEM)和胎牛血清均购自美国Gibco公司,转染试剂X-tremeGENE HP DNA Transfection Reagent购自瑞士Roche公司,荧光定量试剂盒Premix Ex Taq™(Probe qPCR)购自日本TaKaRa公司,4%多聚甲醛通用型组织固定液购自武汉赛维尔生物科技有限公司。

1.3 DHAV-3 SD株全长cDNA克隆的构建

应用Clone Manager软件分析DHAV-3 SD株基因组序列的单一酶切位点,选取4个酶切位点(*Bsu*36 I、*San*D I、*Acc* III和*Sbf* I),将基因组全长分为5段,分别命名为P1、P2、P3、P4、P5(图1)。由生工生物工程(上海)股份有限公司人工合成P1+*Bsu*36 I +*San*D I +*Acc* III +*Sbf* I +P5+丁型肝炎病毒核酶(*HdvRz*)序列,之后将以上序列插入pCI载体CMV启动子后获得质粒pCI-P15,接着分别将P2、P3和P4片段依次通过双酶切连接到pCI-P15质粒中,最终获得用于病毒拯救的质粒pCI-SD,构建的质粒利用Sanger测序技术进行验证。

1.4 质粒转染与拯救病毒

按照X-tremeGENE HP DNA Transfection Reagent转染试剂的说明书,将pCI-SD质粒用Opti-MEM配置成质量浓度为0.01 μg/μL的溶液,然后按照质粒与转染试剂质量体积比为1:4(W/V)加入转染试剂,轻柔混匀后将转染试剂-质粒复合物在室温(15~25℃)下孵育15 min。取状态良好生长到70%左右的BHK-21细胞,将转染复合物逐滴均匀加到细胞中,轻柔混匀后置于37℃、5% CO₂恒温培养箱中培养72 h。然后将细胞冻融3次,8 000 g离心10 min,收集上清液,经尿囊腔接种7~9日龄SPF鸭胚,每枚接种200 μL,弃去24 h内死亡鸭胚,孵育观察6 d,收集死亡鸭胚胚体和尿囊液,研磨、冻融3次后,以相同方法经SPF鸭胚传代2次获得拯救病毒rSD,分装保存于-80℃环境下。

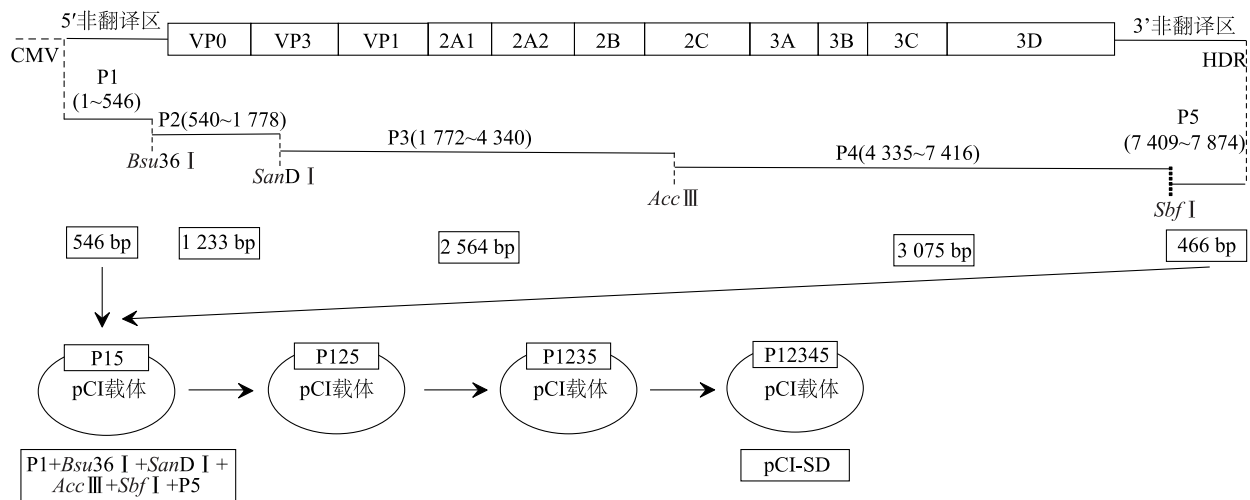


图 1 DHAV-3 SD 株感染性克隆构建策略图

Fig.1 Construction strategy of the infectious clone for DHAV-3 SD strain

1.5 拯救病毒的鉴定

用 SDF1/SDR1、SDF2/SDR2、SDF3/SDR3、SDF4/SDR4 4 对引物(表 1)对 rSD 病毒进行逆转录-聚合酶链式反应(RT-PCR)扩增,测定其全基因序列,并将其与亲本毒株 SD 进行比对,另外用遗传标记引物(rSDF、rSDR)对拯救病毒上的遗传标记(*Eco* R I 酶切位点)基因区域进行 RT-PCR 扩增,对扩增产物进行酶切鉴定。

表 1 本研究所用引物序列

Table 1 Primer sequences used in this study

引物名称	序列(5'→3')	产物长度(bp)
SDF1	TTTGAAAGCGGCTGTGGTGTAGACC	2 570
SDR1	TCAAACACCCCTGAAATGC	
SDF2	TACAAATGGACAATCTCAGCTTCTG	2 171
SDR2	ATAAAAACTCTTCCCAACACC	
SDF3	AACACACCCTCGCTCTAAGCA	1 886
SDR3	TGGGGCAAATGTATTTCGAATA	
SDF4	TGGTTCATGTGGTGGAGTGCTT	1 853
SDR4	TTTTAGGGTGGGAGGAATAGTAAA	
rSDF	GTGGTTACCATGGCTGAGAGT	551
rSDR	TGAAAATCCTTACCAACTCGC	

1.6 病毒半数致死量(LD₅₀)的测定

将 rSD 病毒液和亲本株 SD 病毒液分别用生理盐水进行 10 倍系列稀释,取其中 1×10⁻³、1×10⁻⁴、1×10⁻⁵、1×10⁻⁶、1×10⁻⁷ 5 个稀释度接种 1 日龄健康雏鸭,每个稀释度接种 5 只,每只皮下注射 0.5 mL。攻毒后每天观察各组鸭的发病与死亡情况,对死鸭进

行剖检,观察肝脏病变情况,并记录结果,根据 Reed-Muench 方法计算病毒液的 LD₅₀。

1.7 rSD 在感染雏鸭体内组织分布情况及组织病理学变化

用拯救病毒 rSD 和亲本病毒 SD 株分别对 5 日龄雏鸭进行攻毒,每组 5 只,攻毒剂量均为 0.5 mL (含 1×10⁴LD₅₀)。攻毒后 2 d 分别采集鸭的心、肝、脾、肺、肾、胰、肠、脑,一部分组织块研磨后提取总 RNA,用本实验室建立的 TaqMan 探针 qPCR 方法^[10]检测组织中的病毒拷贝数,另一部分组织块置于 4%多聚甲醛中固定,制备组织切片,苏木精-伊红(H.E)染色后观察组织病理学变化。

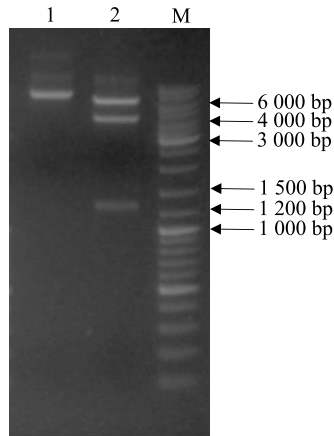
2 结果与分析

2.1 DHAV-3 SD 株全长 cDNA 克隆质粒的酶切与测序鉴定

将构建获得包含 SD 株全长 cDNA 的质粒 pCI-SD 用限制性内切酶 *Kpn* I 进行酶切鉴定,酶切条带与预期大小 1 294 bp、4 211 bp 和 6 375 bp 相符(图 2)。Sanger 测序比对结果显示,该质粒序列正确,证明全长 cDNA 质粒构建成功。

2.2 拯救病毒与鉴定结果

拯救病毒 rSD 引起鸭胚死亡的时间为接种后 48~120 h,死亡胚体上有充血现象(图 3A),与亲本病毒 SD 引起鸭胚体病变的情况相同(图 3B)。rSD RT-PCR 扩增结果显示,5 对引物均能扩增出预期大小的片段(图 4A)。测序结果显示,除人工设置的遗传标记位点外(即人为将亲本株 SD 的开放



M: DL10 000 DNA marker; 1: pCI-SD 质粒; 2: pCI-SD 质粒经 *Kpn* I 酶切产物条带。

图2 pCI-SD 质粒的 *Kpn* I 酶切鉴定电泳图

Fig.2 Electrophoretogram of *Kpn* I restriction enzyme digestion identification of pCI-SD plasmid

阅读框第1 233位的 C 变为 T, 形成一个 *EcoR* I 酶切位点, 但未改变氨基酸序列), rSD 与亲本病毒 SD 的基因序列一致。鉴定结果显示, 遗传标记区域的基因扩增片段可以被 *EcoR* I 内切酶切割为 2 段(图 4B)。上述结果表明, DHAV-3 SD 株感染性克隆拯救成功, 拯救病毒命名为 rSD。

2.3 病毒半数致死量 (LD_{50})

根据拯救病毒 rSD 鸭胚研磨原液各稀释度接种鸭死亡情况如表 2 所示, rSD 的毒价为 0.5 mL $1 \times 10^{6.50} LD_{50}$, 与亲本病毒 SD 的 0.5 mL $1 \times 10^{6.38} LD_{50}$ 毒价相近。

表 2 拯救病毒 rSD 与亲本病毒 SD 对雏鸭的毒力测定结果

Table 2 Virulence assessment results of rescued virus rSD and parental virus SD in ducklings

项目	稀释度					毒价 (LD_{50} , 0.5 mL)
	1×10^{-3}	1×10^{-4}	1×10^{-5}	1×10^{-6}	1×10^{-7}	
接种拯救病毒 rSD 鸭的死亡比例	5/5	5/5	5/5	5/5	0	$1 \times 10^{6.50}$
接种亲本病毒 SD 鸭的死亡比例	5/5	5/5	5/5	4/5	0	$1 \times 10^{6.38}$

2.4 病毒在雏鸭体内组织的分布

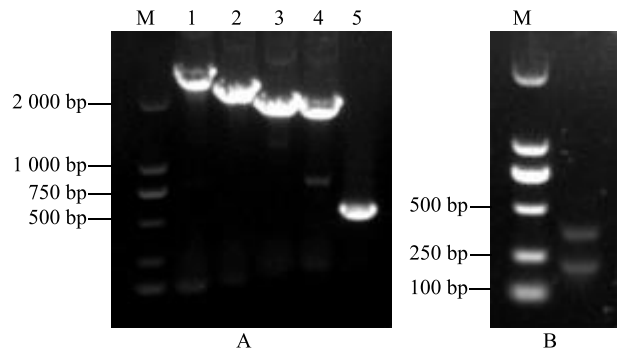
RT-qPCR 检测结果显示, 拯救毒株 rSD 和亲本病毒 SD 在雏鸭心、肝、脾、肺、胰中均具有较高的病毒拷贝数。其中, 肝组织中拷贝数最高, rSD 为 1 μ L 4.4×10^9 病毒拷贝数, SD 为 1 μ L 1.1×10^8 病毒拷贝数; 脾脏次之, rSD 为 1 μ L 1.1×10^8 病毒拷贝数, SD 为 1 μ L 1.6×10^8 病毒拷贝数; 脑组织中病毒拷贝



A: 接种拯救病毒 rSD 的死亡鸭胚尸体; B: 接种亲本病毒 SD 的死亡鸭胚尸体。

图3 拯救毒株 rSD 与亲本病毒 SD 接种鸭胚后的病变情况

Fig.3 Pathological changes in duck embryos infected with the rescued virus rSD and parental virus SD



A: 4 对全长引物和 1 对遗传标记扩增结果; B: 遗传标记酶切鉴定结果。M: DL 2 000 DNA marker; 1~4: 4 对 SD 全长引物扩增片段; 5: rSD 遗传标记扩增片段。

图4 拯救毒株 rSD 的 RT-PCR 扩增鉴定

Fig.4 RT-PCR characterization of the rescued rSD strain

数最低, rSD 为 1 μ L 1.5×10^5 病毒拷贝数, SD 为 1 μ L 1.6×10^5 病毒拷贝数(图 5)。

2.5 病毒感染雏鸭的组织病理学观察

对病毒感染雏鸭进行组织病理学观察, 结果(图 6)显示, 拯救病毒 rSD 与亲本病毒 SD 所导致的雏鸭各脏器的病理组织学变化类似。肝可见肝细胞变性、坏死, 肝窦大面积淤血, 伴有炎细胞浸润; 脾内

淋巴细胞坏死、数量减少,红髓淤血,伴有较多炎细胞浸润;肺间质可见明显淤血,伴有炎细胞浸润;十二指肠黏膜层结构不清晰、细胞坏死;脑组织中皮质神经元空泡变性,周围胶质细胞增生。

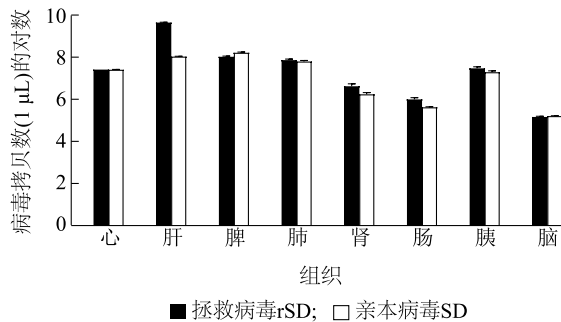


图 5 拯救病毒 rSD 与亲本病毒 SD 在感染雏鸭体内各组织的病毒拷贝数

Fig.5 Viral copy numbers of rescued virus rSD and parental virus SD in various tissues of infected ducklings

3 讨论

近年来,反向遗传学技术在 RNA 病毒体内转录系统构建及以外源基因表达为目的的体内转录系统改造中,已广泛应用于病毒蛋白功能解析、致病机制研究及新型疫苗研发等领域。此外,鸭甲型肝炎病毒(DHAV)反向遗传操作系统的构建也已有相关研究报道。Yun 等^[11]采用分段克隆结合重叠 PCR 技术,成功构建 1 型鸭肝炎病毒(DHAV-1)的全长 cDNA 克隆,通过在其 5'端引入 SP6 启动子进行体外转录,随后将转录产物转染乳仓鼠肾(BHK-21)细胞,最终拯救出重组病毒。该重组病毒在细胞培养体系及雏鸭体内均表现出与野生型病毒相似的增殖特性和致病性。2011 年有研究报道,将 DHAV-3 的全长 cDNA 克隆至低拷贝载体 pWSK29 中,通过低温培养提高克隆在细菌中的稳定性。该系统利用

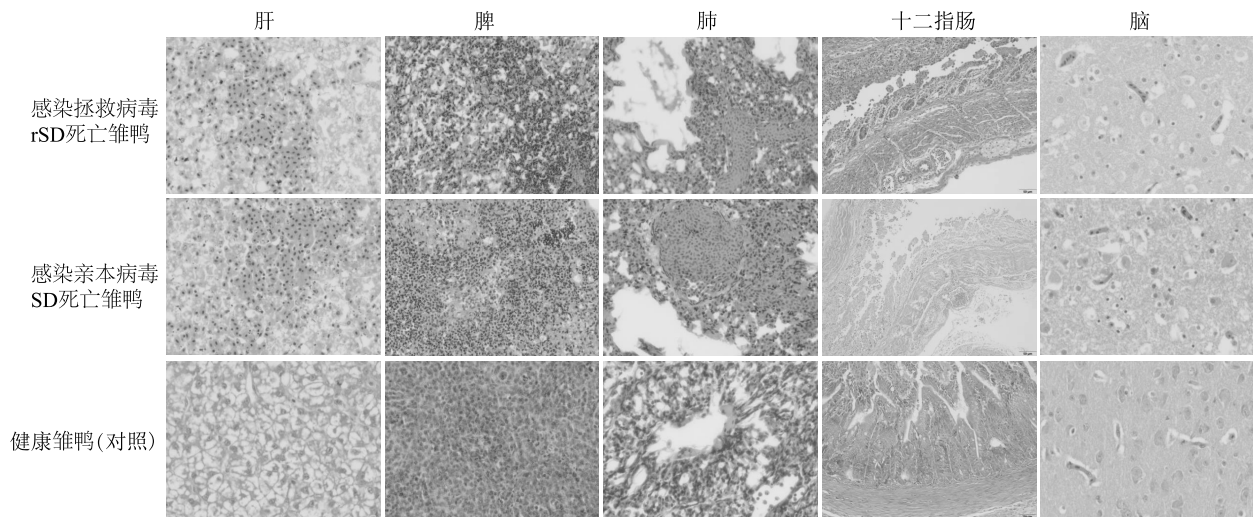


图 6 分别感染拯救病毒 rSD 与亲本病毒 SD 后死亡雏鸭主要脏器的组织病理学变化

Fig.6 Histopathological changes of major organs in ducklings that died after infection with rescued virus rSD and parental virus SD, respectively

T7 启动子进行体外转录,转录产物转染 BHK-21 细胞后进行病毒拯救,再经鸭胚传代扩增获得拯救病毒,试验结果证实其具有与亲本病毒相似的致病性和生物学特性^[12]。上述 DHAV 拯救系统均通过体外转录方法获得转录本,即利用 T7 或 SP6 启动子及相应酶系统在体外生成转录本,再转染细胞完成病毒拯救。而体外转录方法操作较繁琐,对 RNA 转录本的质量要求较高,且存在 RNA 降解风险,病毒 RNA 得率较低,这些因素可能影响拯救效率和拯救

成功率,进而延长病毒拯救周期。

本研究将 DHAV-3 全基因组序列克隆至 pCI 载体后转染 BHK-21 细胞,利用载体自带的 CMV 真核启动子在真核细胞内转录病毒 RNA 并完成病毒拯救,再经鸭胚接种扩增获得拯救病毒,成功建立基于体内拯救法的 DHAV-3 反向遗传操作系统。该方法具有显著优势:病毒 RNA 在细胞内直接合成,可有效规避体外转录过程中 RNA 降解风险;无需额外购置体外转录试剂,同时省略繁琐操作步骤,简化试验

流程。目前,CMV 启动子已逐步取代 T7 启动子,广泛应用于非核复制病毒的拯救,如小反刍兽疫病毒(PPRV)、新城疫病毒(NDV)、脑心肌炎病毒(EMCV)及禽传染性支气管炎病毒(IBV)等^[13-16],成为病毒拯救的新策略。本研究构建的系统成功拯救出 DHAV-3 强毒株,其毒价与亲本毒株相近,感染雏鸭的体内组织分布及对主要脏器的损伤特征也与亲本强毒株一致,相比 T7、SP6 启动子介导的体外转录法,该系统显著简化了操作并有效提升了拯救效率。

4 结论

病毒拯救是复杂的系统工程,涉及载体与启动子选择、病毒全长 cDNA 克隆策略、RNA 聚合酶系统及拯救细胞筛选等多个关键环节,目前尚无适用于所有 RNA 病毒的统一反向遗传操作系统构建标准。本研究基于体内转录建立的 DHAV-3 反向遗传操作平台为 DHAV 反向遗传体系的构建提供了新思路,也为后续 DHAV 致病机制解析、毒力位点鉴定、病毒与宿主互作研究,以及新型减毒疫苗和嵌合疫苗的研发奠定了基础。

参考文献:

- [1] 陆承平,刘永杰. 兽医微生物学[M]. 6 版. 北京:中国农业出版社,2021.
- [2] SWAYNE D E, GLISSON J R, MCDUGALD L R, et al. Diseases of poultry[M]. 13th edition. Hoboken:Wiley-Blackw,2013.
- [3] KANG M, ROH J H, JANG H K. Protective efficacy of a bivalent live attenuated vaccine against duck hepatitis a virus types 1 and 3 in ducklings[J]. Veterinary Microbiology,2018,214:108-112.
- [4] YANG C T, SHAH P T, BAHOUSSI A N, et al. Duck hepatitis a virus:full-length genome-based phylogenetic and phylogeographic view during 1986-2020[J]. Virus Research,2023,336:199216.
- [5] ZHOU S Y, LI S, WANG Y S, et al. Duck hepatitis a virus prevalence in mainland China between 2009 and 2021:a systematic review and meta-analysis[J]. Preventive Veterinary Medicine,2022,208:105730.
- [6] WANG M, WU J, CAO X, et al. Developments in negative-strand RNA virus reverse genetics[J]. Microorganisms,2024,12(3):559.
- [7] HENG W C, ZANG D, LI R Y, et al. A novel replication-deficient FCV vaccine provides strong immune protection in cats[J]. Journal of Virology,2025,99(8):0009325.
- [8] RACANIELLO V R, BALTIMORE D. Cloned poliovirus complementary DNA is infectious in mammalian cells[J]. Science,1981,214(4523):916-919.
- [9] ZHANG Y, WU S, LIU W, et al. Current status and future direction of duck hepatitis a virus vaccines[J]. Avian Pathology,2023,52(2):89-99.
- [10] 范鑫,吴凤瑶,卢凤英,等. 血清 3 型鸭甲型肝炎病毒 TaqMan RT-qPCR 检测方法的建立及初步应用[J]. 中国家禽,2019,41(16):34-39.
- [11] YUN T, NI Z, LIU G Q, et al. Generation of infectious and pathogenic duck hepatitis virus type 1 from cloned full-length cDNA[J]. Virus Research,2010,147(2):159-165.
- [12] PAN M, YANG X R, DU J G, et al. Recovery of duck hepatitis a virus 3 from a stable full-length infectious cDNA clone[J]. Virus Research,2011,160(1/2):439-443.
- [13] BELLO M B, YUSOFF K, IDERIS A, et al. Exploring the prospects of engineered Newcastle Disease Virus in modern vaccinology[J]. Viruses,2020,12(4):451.
- [14] 安琪,何宏轩,胡满. 猪脑心肌炎病毒感染性克隆构建及病毒拯救[J]. 中国兽医科学,2025,55(5):592-598.
- [15] 卢渊录,曾亦然,罗皓炜,等. 禽传染性支气管炎病毒感染性克隆的快速构建及应用[J]. 中国预防兽医学报,2024,46(4):333-341,349.
- [16] 关飞虎,宋亚芬,温立佳,等. 反向遗传学技术在动物 RNA 病毒研究中的应用进展[J]. 中国兽医科学,2024,54(7):962-967.

(责任编辑:黄克玲)