

表达尼帕病毒 G 囊膜糖蛋白重组牛痘病毒的研究

王喜军¹, 王清华², 葛金英^{1,3}, 胡 森¹, 步志高^{1*}

(¹ 中国农业科学院哈尔滨兽医研究所 兽医生物技术国家重点实验室 哈尔滨 150001)

(² 农业部青岛动物检疫所国家外来病诊断中心 青岛 266032)

(³ 南京农业大学动物医学院 南京 210095)

摘 要 采用牛痘病毒 WR 株, 构建了表达哺乳动物密码子优化的 NiV G 蛋白基因的重组病毒 rWR-NiV-G。Western blot 证实大小为 66kDa 的重组 G 蛋白在 rWR-NiV-G 感染的 Hela 细胞中获得表达, 采用兔抗 NiV 高免血清间接免疫荧光检测重组痘病毒表达 G 蛋白显示出良好的特异免疫反应原性。rWR-NiV-G 感染 NiV 敏感的 BHK 细胞系, 并与 NiV 融合蛋白 F 共同表达, 可形成强烈细胞融合现象。rWR-NiV-G 感染免疫 BALB/c 小鼠, 可诱导显著的 NiV G 蛋白特异体液免疫反应。以原核表达 NiV G 蛋白片段为包被抗原, 间接 ELISA 检测 rWR-NiV-G 感染免疫小鼠血清中的 G 蛋白特异抗体, 具有良好的敏感性和特异性。同时, rWR-NiV-G 感染免疫小鼠血清中的 G 蛋白特异抗体可有效中和 NiV 囊膜蛋白 F 和 G 介导的伪型 VSV 重组病毒侵入 NiV 易感宿主细胞的感染性。结果表明, 重组牛痘病毒表达的 NiV G 蛋白有良好的免疫原性和生物学活性功能, 为进一步深入研究 NiV G 蛋白生物学功能、免疫原性及重组活载体疫苗研究奠定了重要基础。

关键词: 尼帕病毒; G 蛋白; 重组牛痘病毒

中图分类号: Q93 文献标识码: A 文章编号: 1001-6209(2006)04-0644-06

尼帕病毒性脑炎(Nipah virus encephalitis)是由尼帕病毒(Nipah virus, NiV)引起的烈性的人兽共患传染病, 以急性发热性脑炎和高死亡率为特征。NiV 主要感染人和猪, 自然宿主为 Pteropus 属的果蝠。1998 ~ 1999 年, 马来西亚和新加坡爆发尼帕病毒性脑炎疫情, 共确诊人感染尼帕病毒病例 283 例, 死亡 109 例, 死亡率 38.5%^[1]。2004 年初, 在孟加拉国有 30 人食用因果蝠啃食污染 NiV 的水果导致感染发病, 其中死亡 17 人^[2]。

NiV 为副粘病毒科(Paramyxoviridae)副粘病毒亚科(Paramyxovirinae)的成员, 和亨德拉病毒(Hendra virus, HeV)共同组成 Henipavirus 属。NiV 病毒受体结合蛋白(G)是病毒的主要结构蛋白之一, 在病毒侵入宿主细胞的过程中与病毒融合蛋白(F)共同作用介导病毒囊膜与细胞膜发生融合, 同时也是诱导中和抗体的主要免疫原。本研究采用牛痘病毒 WR 株, 构建了表达哺乳动物密码子优化的 NiV G 蛋白基因的重组病毒 rWR-NiV-G。重组病毒表达 NiV G 蛋白有良好的免疫原性和生物学活性功能, 为进一步深入研究 NiV G 蛋白生物学功能、免疫原性及重组活载体疫苗研究奠定了重要基础。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 毒株和质粒: 牛痘病毒野生亲本株(WR 株), 质粒 pSC11、pBluescript-II-KS + (Stratagene), 均为本实验室保存。哺乳动物密码子优化 NiV 囊膜糖蛋白 G 和 F 基因(GenBank 序列 AY029767 和 AF238466)通过 Overlap-PCR 方法合成, 起始密码子前引入 Kozak 序列, 两末端引入相应限制酶序列, 分别克隆在 pMD 18-T 和 pUC 18 载体, 构成质粒 pMD 18-T-NiV-G 和 pUC 18-NiV-F; G 蛋白和 F 蛋白基因进一步亚克隆至 pCAGGS 多克隆位点鸡 β -actin 转录启动子下游, 分别构成 G 和 F 囊膜蛋白表达质粒 pCAGG-NiV-G 和 pCAGG-NiV-F。真核表达载体 pCAGGS 由 Y. Kawaoka 博士提供。VSV Δ G * GFP 为表达绿色荧光蛋白报告基因的重组水疱性口炎病毒(VSV), 其基因组缺失囊膜 G 蛋白, 囊膜蛋白通过外源瞬时表达获得同源, 因而具有感染、表达和复制能力, 但装配释放的子代病毒失去再感染能力。用于制备 VSV Δ G * GFP 的重组型 VSV 基因组 cDNA 克隆质粒 pVSV Δ G * GFP、结构与转录功能蛋白辅助表达质粒 pBS-G、pBS-L、pBS-N 和 pBS-P 均由 Whitt MA 博

基金项目: 国家“攻关”项目(2004BA519A19, 2005BA711A10), 国家“973”项目(2005CB523200)

* 通讯作者。Tel: 86-451-85935062; E-mail: zgb@hvri.ac.cn

作者简介: 王喜军(1977-), 男, 内蒙古人, 硕士, 主要从事分子病毒学研究。E-mail: wangxj06@yahoo.com.cn

收稿日期: 2005-10-08; 接受日期: 2005-11-14; 修回日期: 2006-03-13

士提供,表达 T7 聚合酶的重组痘病毒由 B. Moss 博士提供,制备与滴定过程按文献[34]进行,滴定后的病毒液-70℃保存备用。

1.1.2 细胞和血清:细胞系 TK⁻143、BHK、HeLa、Hep-2 均为本实验室保存。细胞生长及维持液均为含 10% 胎牛血清 DMEM。兔抗 NiV 病毒高免血清由澳大利亚动物健康实验室(CSIRO Livestock Industries, Australian Animal Health Laboratory)惠赠。

1.1.3 实验动物:BALB/c 小鼠购自北京维通利华实验动物公司。

1.2 重组病毒构建

首先以 BamH I 和 Hind III 双酶切质粒 pMD 18-T-NiV-G 和 pBluescript-II-KS⁺,将 NiV G 基因亚克隆至 pBluescript-II-KS⁺,命名为 pBlue-NiV-G,再以 BamH I 和 Kpn I 双酶切质粒 pBlue-NiV-G,将 NiV G 基因克隆于质粒 pET-30a 的 BamH I 和 Kpn I 位点之间,命名为 pET-30a-NG,后通过 Sal I 酶切将 F 基因亚克隆至 pSC11 的 Sal I 位点。采用 Xho I 和 Pst I 双酶切、琼脂糖凝胶电泳鉴定 NiV G 基因 ORF 正向插入 p7.5 启动子,构成转移质粒 pSC11-NiV-G。野生型 WR 痘病毒以 M.O.I 约 0.01 感染过夜生长至 80% 的单层 Hep-2 细胞。感染 1h 后,弃去病毒上清,洗涤两遍,pSC11-NiV-G 质粒 DNA 2 μ g 采用 lipofectamine 2000(Invitrogen)按转染试剂产品操作说明进行转染。5% CO₂ 37℃ 培养 48~72h,待 90% 细胞出现 CPE 时收获细胞及上清。反复冻融 3 次,超声分散病毒(3 次,10s/次,间隔 10s,功率为 15w, Ultrasonic Processor)。取适量病毒(M.O.I 约为 0.1)感染 80% 的单层 TK⁻143 细胞,培养液按 25 μ g/mL 浓度添加 BrdU,待 90% 细胞出现 CPE 时,收获病毒,冻融加超声处理后,按上述方法继续在 TK⁻143 细胞盲传 2 代后,10 倍连续稀释,覆盖含 10% FCS 和 1% 低熔点琼脂糖的 DMEM,按常规作蚀斑纯化。37℃ 培养待细胞出现明显蚀斑时,加覆 1% 低熔点琼脂糖的 DMEM,并按 40 μ g/mL 浓度添加 X-gal 进行染色。12h 后观察结果。挑取分散较好蓝色蚀斑,继续进行两代次蚀斑克隆纯化,获得纯粹单一的蓝色重组痘病毒 rWR-NiV-G,接种 HeLa 细胞进行扩增,SDS-蛋白酶 K 法提取感染上清中病毒基因组 DNA,利用引物 NiV-G-f: 5'-ACCGACGAATTCCCCAAGGTGTCCCTGAT-3' 和 NiV-G-r: 5'-GAGGACGTCGACCTGGTGCTGTTGTA-3' 进行 PCR 鉴定,收获病毒上清液-70℃分装冻存。

1.3 间接免疫荧光

重组病毒 rWR-NiV-G 和野生型痘病毒 WR 分别以 MOI 约为 0.01 感染培养于 24 孔平板的 HeLa 细

胞,待细胞出现明显病变时,弃去培养液,用 PBS 洗两次,用 90% 乙醇固定 30min,用 PBSI(0.05% 吐温-20)冲洗 5~10min,rWR-NiV-G 分别加入 1:20 倍稀释兔抗 NiV 高免血清或非免疫兔阴性对照血清,PBST 冲洗 5~10min,再加荧光标记的山羊抗兔 IgG(荧光素 FITC 标记的二抗,1:100 倍稀释,购于 sigma),室温作用 30min;用 PBST 冲洗 5~10min,置于荧光显微镜(Leica DMIRES2)下观察。

1.4 SDS-PAGE 和 Western blot

rWR-NiV-G 以 M.O.I 约为 1 感染培养于 35mm 平板的 HeLa 细胞,待细胞病变 90% 时弃去培养液,按每孔 50 μ L 体积加入 1 \times SDS 裂解缓冲液悬起细胞,煮沸 10min,12000 \times g 离心 10min,取上清进行 SDS-PAGE(Bio-Rad)电泳,将蛋白电转移(Bio-Rad)到尼龙膜上(Amersco),10% 脱脂乳封闭过夜,PBST(0.05% Tween20)洗涤后加入 1:50 稀释的 pCAGG-NiV-G 质粒 DNA 免疫鼠血清(pCAGG-NiV-G 质粒 DNA 按 100 μ g/只的剂量免疫 BALB/c 小鼠,免疫间隔时间 3 周,第 3 次免疫后 3 周采血分离 DNA 免疫血清)洗涤后加入 1:2500 倍 PBST 稀释辣根过氧化物酶(HRP)标记山羊抗鼠 IgG(Sigma),DAB 显色检测。

1.5 细胞融合活性检测

rWR-NiV-G 以 M.O.I 约为 0.1 感染 80% 单层 BHK 细胞,1h 后以 2 μ g NiV 融合蛋白 F 真核表达质粒 pCAGG-NiV-F 进行瞬时转染表达(lipofectamine 2000,Invitrogen),5% CO₂ 环境,37℃ 培养 16h,置于倒置显微镜下观察细胞融合现象。

1.6 重组牛痘病毒 rWR-NiV-G 免疫小鼠

重组痘病毒 rWR-NiV-G 和野生型痘病毒 WR 株分别按 10⁴ PFU/只剂量腹腔感染免疫 8 只小鼠,免疫 3 周后采血,分离血清,用于 ELISA 抗体及中和抗体检测。

1.7 间接 ELISA

以 pMD 18-T-NiV-G 为模板,PCR 扩增 NiV G 蛋白 ORF 第 319~1002bp 之间 228 氨基酸编码片段,引物两端分别引入 EcoR I 和 Sal I 酶切位点。将 PCR 扩增目的片段克隆于表达载体 pET 30a(+) EcoR I 和 Sal I 位点,使 G 蛋白片段表达框架与 His 标签融合。转化 BL21, IPTG 诱导表达, Ni 化琼脂糖柱(Pierce)亲和、洗脱,获得纯化的 NiV 重组 G 蛋白片段 G'。用 NaHCO₃ 包被液(pH 9.6)按 5 μ g/mL 浓度稀释原核表达纯化 G 蛋白片段,以每孔 100 μ L 量 4℃ 包被 96 孔 ELISA 板(Costar)过夜;5% 脱脂乳 PBST(0.05% Tween20)封闭;1:50 倍稀释的被检鼠血清为一抗,1:2500 倍稀释的 HRP 标记的山羊抗鼠 IgG(Sigma)为二抗;PBST 洗涤,底物(OPD)作用

25min 2mol/L 硫酸终止反应后,测定 OD_{490} (Bio-Rad, Benchmark plus)。每个血清稀释度至少设 3 个平行孔,取平均值计算 P/N 值。

1.8 中和试验

用于替代 NiV 感染性活病毒进行血清中和试验、具有感染和非生产性复制能力并表达绿色荧光蛋白报告基因的 NiV G 蛋白和 F 囊膜蛋白嵌合 (psudotyped) 重组病毒 VSVΔG * F/G 按文献 [34] 制备并滴定, -70°C 储存备用。血清中和试验基本参照文献 [5] 进行。VERO 细胞生长于 24 孔培养板过夜至 80% 密度备用。待检血清分别以完全 DMEM (10% FCS) 连续倍比稀释,每稀释度体积为 $25\mu\text{L}$,与含约 1×10^4 IU 的伪型病毒 VSVΔG * F/G 悬液混合, 37°C 感作 1h 后感染 VERO 细胞 (M.O.I 约为 0.1 ~ 0.2) 5% CO_2 环境, 37°C 培养 24h 后置于荧光显微镜 (Leica DMIRES2) 下观察 GFP 表达阳性细胞情况。血清每稀释度设 3 个平行对照孔。

2 结果

2.1 表达 NiV G 蛋白基因重组牛痘病毒 rWR-NiV-G 的构建

用 *Xho* I 和 *Pst* I 双酶切、琼脂糖凝胶电泳鉴定重组质粒 pSC-NiV-G, NiV G 基因 ORF 正向插入的重组质粒消化得到 954bp、3088bp 和 5430bp 3 个片段, NiV G 基因 ORF 反向插入的重组质粒消化得到 1623bp、3088bp 和 4761bp 3 个片段。琼脂糖凝胶电泳结果表明 NiV G 基因正向插入 P7.5 启动子下游,形成独立的转录表达单元。制备正向插入质粒 pSC-NiV-G 转染 Hep2 细胞,通过 NiV G 基因及 LacZ 基因转录表达单元两侧的 TK 基因同源臂,与共感染 Hep2 的野生型 WR 株牛痘病毒发生同源重组,收获病毒在 TK⁻143 细胞盲传 2 代后,获得重组牛痘病毒蓝色蚀斑 (图版 IV-A)。采用引物 NiV-G-f 和 NiV-G-r 进行 PCR 鉴定,扩增出预期 684bp 的产物,表明 NiV 的 G 基因在重组牛痘病毒 rVV-NiV-G 获得正确重组。

2.2 重组牛痘病毒表达 NiV G 蛋白免疫反应原性检测

为证实重组病毒 rWR-NiV-G 表达 G 蛋白的抗原性,分别以重组牛痘病毒 rWR-NiV-G 和野生型痘病毒 (WR) 感染 Hela 细胞为抗原,以免抗灭活 NiV 全病毒高免血清为一抗进行间接免疫荧光检测。结果 rWR-NiV-G 感染细胞检测免抗灭活 NiV 全病毒高免血清时显示强烈的绿色荧光信号 (图版 IV-B-a),而检测正常免血清时绿色荧光信号为阴性 (图版 IV-B-b)。野生型 WR 牛痘病毒感染细胞检测免抗灭活

NiV 全病毒高免血清的绿色荧光信号为阴性 (图版 IV-B-c)。结果显示重组牛痘病毒表达 NiV G 蛋白具有良好的免疫反应性。

2.3 Western blot 检测重组牛痘病毒表达 NiV G 蛋白

取重组牛痘病毒 rWR-NiV-G 和野生型 WR 株牛痘病毒感染 HeLa 细胞裂解物上清进行 SDS-PAGE。转膜后以 pCAGG-NiV-G 质粒 DNA 免疫鼠血清为一抗,Western blot 显示出特异的 66kDa 检测蛋白,与 G 的理论预期值相符 (图 1)。结果表明 NiV G 蛋白在重组牛痘病毒 rWR-NiV-G 感染的 Hela 细胞中获得表达。

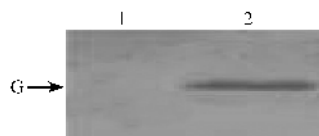


图 1 重组牛痘病毒 rWR-NiV-G 表达 G 蛋白

Fig.1 Expression of Gprotein of NiV from recombinant vaccinia virus (rWR-NiV-G). HeLa cells were infected with wild type WR (lane 1) and rWR-NiV-G (lane 2). At 90% cytopathic effect (CPE), cell lysates were prepared for SDS-PAGE and Western blot with polyclone serum from mouse immunized with pCAGG-NiV-G.

2.4 重组牛痘病毒表达 NiV G 糖蛋白的细胞融合活性

副粘病毒的融合蛋白前体 F 必须与受体结合功能糖蛋白 G 或 HN 蛋白共表达于同一细胞膜表面方可介导细胞膜融合的生物活性功能。为验证重组痘病毒 rWR-NiV-G 表达 G 蛋白融合活性, BHK 细胞感染 rWR-NiV-G 后 1h,再以表达 NiV F 蛋白的真核表达质粒 pCAGG-NiV-F 转染细胞为抗原,培养 24h,镜下观察到大量典型的细胞融合现象 (图 2)。结果表明,重组牛痘病毒表达 G 糖蛋白于宿主细胞膜表面,并完全保持其膜融合生物活性功能。

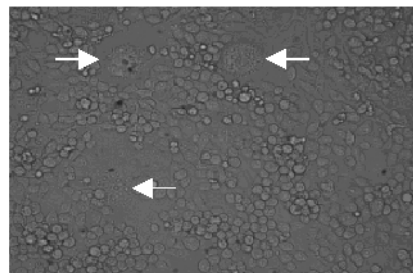


图 2 NiV F 和 G 蛋白共表达介导合胞体的形成

Fig.2 Syncytium formation mediated by co-expressing of NiV F and G. BHK-21 cells in 35mm well were co-infected/transfected with rWR-NiV-G and $2\mu\text{g}$ of pCAGGS-F. After incubated at 37°C for 24h, photograph was taken at $200\times$ magnification.

2.5 间接 ELISA 检测重组痘病毒感染免疫鼠 G 蛋白特异免疫反应

为测试重组痘病毒表达 NiV G 蛋白免疫原性,

用原核表达的 NiV G 蛋白片段为包被抗原进行间接 ELISA 检测。结果,分别以 50 倍稀释表达 NiV G 蛋白重组痘病毒 rWR-NiV-G 免疫小鼠血清和野生型痘病毒 WR 株感染小鼠血清作为被检血清, OD_{490} 平均值分别为 0.251 和 0.046, P/N 值为 5.5。结果显示 rWR-NiV-G 免疫小鼠可有效诱导 G 蛋白特异抗体产生。

2.6 血清中和和试验检测重组痘病毒感染免疫小鼠诱导 NiV 囊膜蛋白伪型 VSV 中和抗体

NiV 的 F 和 G 囊膜蛋白介导伪型重组病毒 VSV $\Delta G \ast F/G$ 侵入敏感宿主细胞的过程完全模拟了 NiV 本身感染、侵入宿主细胞的过程,因而 VSV $\Delta G \ast F/G$ 可替代高度生物安全危险的天然的 NiV 用于中和试验。试验结果表明(图版 IV-C),表达 NiV G 蛋白重组痘病毒 rWR-NiV-G 感染免疫小鼠可诱导显著的特异抗体反应,能显著有效中和 NiV 囊膜蛋白 F 和 G 介导的伪型 VSV 重组病毒侵入 NiV 易感宿主细胞的感染性,重组病毒免疫小鼠血清和兔抗 NiV 高免血清完全阻断 1×10^4 IU 的伪型病毒 VSV $\Delta G \ast F/G$ 的感染性的有效稀释倍数分别为 128 和 32;野生型痘病毒 WR 株免疫小鼠及非免疫对照免血清则完全不能阻断伪型病毒 VSV $\Delta G \ast F/G$ 的感染性。

3 讨论

本研究成功构建了表达哺乳动物密码子优化的 NiV 囊膜功能糖蛋白 G 蛋白基因的重组病毒 rWR-NiV-G。间接免疫荧光、Western blot、与 F 蛋白共表达膜融合试验结果证实重组病毒表达 NiV 的 G 蛋白具有良好的免疫反应原性和细胞膜受体结合生物学功能活性。进一步对免疫小鼠血清的 ELISA 和中和试验结果表明,rWR-NiV-G 感染免疫可诱导显著的 G 蛋白特异体液免疫反应及阻断 NiV 囊膜蛋白介导伪型重组病毒 VSV $\Delta G \ast F/G$ 侵入敏感宿主细胞的中和性抗体的形成。

副粘病毒的受体结合蛋白 G 或 HN 为 II 型膜糖蛋白,包括胞外结构域(羧基端)、跨膜结构域和胞内结构域(氨基端),以四聚体形式存在。G 蛋白功能主要是与细胞表面的受体结合,并且与 F 蛋白共同作用,诱导病毒囊膜和细胞膜发生融合,无血凝素和神经氨酸酶(HN)活性。一般认为,受体结合糖蛋白必须与 F 蛋白共表达于细胞膜或病毒囊膜表面才能使 F 蛋白发生构型改变,目前直接证据表明新城疫病毒(Newcastle disease virus)^[6]、人类副流感病毒(Human parainfluenza virus)^[7]和麻疹病毒(Measles virus)^[8]的 F 蛋白必须直接和 G 蛋白接触的方式产生膜融合。NiV F 和 G 蛋白缺少血凝素和神经氨酸

酶活性,只有共同存在于细胞表面时才可引起膜融合。G 蛋白与宿主细胞膜特定受体的结合可能诱导 F 蛋白发生一系列构象变化,引起病毒囊膜与细胞膜或细胞膜与细胞膜之间发生融合,其结果是病毒的基因组进入细胞浆或细胞融合形成典型的合胞体。研究表明,NiV 囊膜蛋白 F 和 G 可介导 BSC-1(猴肾细胞)、U373、BHK 21 和猫的胚胎细胞发生高水平的细胞膜融合^[9]。因此本研究选用 BHK 细胞作为融合的靶细胞,先感染 rWR-NiV-G,再转染 F 蛋白的高效真核表达质粒 pCagg-NiV-F 瞬时共表达 F 蛋白,结果证明重组痘病毒表达 G 蛋白保持细胞膜受体结合生物学功能活性,对进一步研究 NiV 乃至副粘病毒囊膜蛋白结构、功能研究具有重要价值。

RNA 病毒囊膜糖蛋白对病毒的宿主细胞受体结合及侵入融合(fusion)功能及中和抗体的诱导方面起决定性作用。VSV 和反转录病毒一样,具备和多种异源病毒囊膜蛋白形成伪型病毒(pseudotype)的能力。通过负链 RNA 病毒的反向遗传操作技术,人工缺失 VSV 囊膜 G 糖蛋白,使其完全被异源病毒相应功能囊膜蛋白取代,装配于病毒粒子表面,形成的伪型 VSV 在受体结合功能、侵入机制及对中和抗体的敏感性特性方面与囊膜蛋白供体病毒高度相似。利用这一特点,采用报告基因取代 VSV 或反转录病毒基因组囊膜蛋白基因,通过瞬时表达提供异源囊膜蛋白,形成的伪型病毒被许多研究者用来取代一些生物安全高度危险或细胞病变观察难度较大 RNA 活病毒进行中和抗体检测、受体结合特性及抗原性或中和表位的研究^[10,11]。我国目前尚未发现 NiV 存在,客观条件不允许引进或操作 NiV 活病毒,因此采用 GFP 报告基因取代基因组 G 蛋白基因的重组 VSV 系统,通过高水平的瞬时表达提供 NiV 功能囊膜蛋白 F 和 G,获得安全、稳定、高滴度、具备感染复制及 GFP 指示能力的 VSV 伪型病毒,取代 NiV 活病毒进行血清中和抗体检测,取得了良好的效果。

通过小动物模型的被动免疫保护试验证实,中和抗体可对 NiV 的致死性攻击形成免疫保护^[12]。NiV 的 G 蛋白与 F 一样,是诱导中和抗体形成的主要结构蛋白。对麻疹病毒的研究表明,在动物体内 HN 蛋白诱导的中和抗体水平高于 F 蛋白诱导的中和抗体水平^[13],而我们对 NiV 两种保护性抗原 F 和 G 蛋白 DNA 免疫的比较研究也表明,G 蛋白诱导 ELISA 抗体及中和抗体的能力均显著高于 F 蛋白(结果另报),针对特定抗原的免疫反应特别是体液免疫反应与该抗原蛋白的表达水平密切相关。采用哺乳动物密码子优化的免疫原基因,可显著提高重组病毒或 DNA 免疫外源基因的表达水平,因而大幅

度改进或提高免疫反应效果^[14,15]。本研究采用哺乳动物密码子优化的 NiV G 基因构建重组病毒,可望进一步提高重组病毒诱导特异性细胞免疫和体液免疫能力,为探讨新型活载体基因工程疫苗防制尼帕病毒性脑炎的可行性提供重要免疫试验模型,同时也为 NiV 受体结合蛋白 G 的结构与功能研究提供重要的研究工具。

参 考 文 献

- [1] Chua KB, Bellini WJ, Rota PA, *et al.* Nipah virus: a recently emergent deadly paramyxovirus. *Science*, 2000, **288**(5470):1432 – 1435.
- [2] Hsu VP, Hossain MJ, Parashar UD, *et al.* Nipah Virus encephalitis reemergence, bangladesh. *Emerging Infectious Diseases*, 2004, **10**(12):2082 – 2087.
- [3] Garbutt M, Liebscher R, Wahl-Jensen V, *et al.* Properties of replication-competent vesicular stomatitis virus vectors expressing glycoproteins of filoviruses and arenaviruses. *Journal of Virology*, 2004, **78**:5458 – 5465.
- [4] Takada A, Robison C, Goto H, *et al.* A system for functional analysis of Ebola virus glycoprotein. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1997, **94**:14764 – 14769.
- [5] 殷 震, 刘景华. 动物病毒学. 第二版. 北京:科学出版社, 1997, 336 – 340.
- [6] Deng R, Wang Z, Mahon PJ, *et al.* Mutations in the Newcastle disease virus hemagglutinin-neuraminidase protein that interfere with its ability to interact with the homologous F protein in the promotion of fusion. *Virology*, 1999, **253**(1):43 – 54.
- [7] Yao Q, Hu X, Compans RW. Association of the parainfluenza virus

fusion and hemagglutinin-neuraminidase glycoproteins on cell surfaces. *Virology*, 1997, **71**:650 – 656.

- [8] Plemper RK, Hammond AL, Cattaneo R. Measles virus envelope glycoproteins hetero-oligomerize in the endoplasmic reticulum. *J Biol Chem*, 2001, **276**:44239 – 44246.
- [9] Bossart KN, Wang LF, Flora MN, *et al.* Membrane fusion tropism and heterotypic functional activities of the nipah virus and hendra virus envelope glycoproteins. *Journal of Virology*, 2002, **76**(22):11186 – 11198.
- [10] Temperton NJ, Chan PK, Simmons G, *et al.* Longitudinally profiling neutralizing antibody response to SARS coronavirus with pseudotypes. *Emerging Infectious Diseases*, 2005, **11**(3):411 – 416.
- [11] Hofmann H, Hattermann K, Marzi A, *et al.* S Protein of severe acute respiratory syndrome-associated coronavirus mediates entry into hepatoma cell lines and is targeted by neutralizing antibodies in infected patients. *Journal of Virology*, 2004, **78**(12):6134 – 6142.
- [12] Guillaume V, Contamin H, Loth P, *et al.* Nipah virus: vaccination and passive protection studies in a hamster model. *Journal of Virology*, 2004, **78**:834 – 840.
- [13] Griffin DE, Bellini WJ. Measles virus. In: Fields BN, Knipe DM, Howley PM. *Fields Virology*. 3rd ed. Philadelphia: Lippincott-Raven Publishers, 1996, 1267 – 1312.
- [14] Andre S, Seed B, Eberly J, *et al.* Increased immune response elicited by DNA vaccination with a synthetic gp120 sequence with optimized codon usage. *Journal of Virology*, 1998, **72**:1497 – 1503.
- [15] Narum DL, Kumar S, Rogers WO, *et al.* Codon optimization of gene fragments encoding *Plasmodium falciparum* merozoite proteins enhances DNA vaccine protein expression and immunogenicity in mice. *Infect Immun*, 2001, **69**(12):7250 – 7253.

Generation of recombinant vaccinia virus expressing attachment glycoprotein of Nipah virus

WANG Xi-jun¹, WANG Qing-hua², GE Jin-ying³, HU Sen¹, BU Zhi-gao^{1*}

(¹ National Key Laboratory of Veterinary Biotechnology, Harbin Veterinary Research Institute, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Harbin 150001, China)

(² National Diagnostic Center for Exotic Animal Disease, National Animal Quarantine Institute of Ministry of Agriculture, Qingdao 266032, China)

(³ College of Veterinary Medicine, Nanjing Agricultural University, Nanjing 210095, China)

Abstract: The mammalian codon optimized G gene was synthesized by over-lapping PCR and used to generate recombinant vaccinia virus, rWR-NiV-G. The expression of Nipah virus G protein in rWR-NiV-G infected HeLa cells was confirmed by western-blot with NiV G protein specific mouse antiserum generated by DNA immunization. The recombinant G protein showed sensitive and specific antigenic reaction to rabbit serum anti-Nipah virus in indirect fluorescence. Syncytium formation was induced in BHK cells by rWR-NiV-G infection following NiV F protein expressing plasmid pCAGG-NiV-F transfection. Immunization with rWR-NiV-G elicited G protein specific antibody responses in mice. The prokaryotic expressing G protein fragment showed sensitive and specific antigenic reaction to NiV G protein specific antibody from rWR-NiV-G immunized mice serum in indirect ELISA. Furthermore, the G protein specific antibodies could neutralize the infectivity of the recombinant Vesicular Stomatitis Virus pseudotype VSVΔG * F/G, in which the VSV envelope protein G gene was replaced with the green fluorescent protein gene (VSVΔG * G, Whitt MA) and complemented with Nipah virus F and G glycoprotein expressed in transient (VSVΔG * F/G). The results here demonstrated the G protein expressed by rWR-NiV-G keeps native immunogenicity and biological activity. The recombinant virus could be promising vaccine strategy for the prevention of Nipah virus.

Keywords: Nipah virus; Attachment glycoprotein; Recombinant vaccinia virus

Foundation item: The programs for Science and Technology Development of China (2004BA519A19, 2005BA711A10); Major Project of Chinese National Programs for Fundamental Research and Development (2005CB523200)

* Corresponding author. Tel 86-451-85935062; E-mail: zgb@hvri.ac.cn

Received 8 October 2005 / Accepted 14 November 2005 / Revised 13 March 2006