

# 表达狂犬病病毒糖蛋白膜外区重组犬 2 型腺病毒的构建 及其免疫原性研究

王永志<sup>1,2</sup> 张守峰<sup>1</sup> 扈荣良<sup>1\*</sup> 王 莘<sup>2</sup> 肖跃强<sup>1</sup>

(<sup>1</sup>军事医学科学院军事兽医研究所 长春 130062)

(<sup>2</sup>吉林农业大学生物技术学院 长春 130118)

**摘 要:**为研制 1 种以犬 2 型腺病毒为载体的狂犬病疫苗,以狂犬病病毒 SRV<sub>9</sub> 株基因组为模板,通过 RT-PCR 技术扩增得到狂犬病病毒糖蛋白膜外区序列,以其为目的基因构建以 CMV 为启动子、SV40 polyA 为终止信号的表达盒。将犬 2 型腺病毒的 E3 区克隆入中间质粒中,然后对其进行部分缺失,并将表达盒克隆入缺失处,再以此重组的 E3 区置换犬 2 型腺病毒的 E3 区。以重组的犬 2 型腺病毒基因组转染 MDCK 细胞,最终获得了表达盒分正向和反向插入 E3 区的重组犬 2 型腺病毒。用两株重组腺病毒免疫幼犬,均在犬体内产生了针对狂犬病病毒的抗体。

**关键词:** 狂犬病,糖蛋白,犬 2 型腺病毒,重组病毒

中图分类号: 文献标识码: A 文章编号: 0001-6209(2005)02-0213-05

狂犬病(Rabies)是一种古老而严重的人兽共患传染病,在我国流行已久,长期位居法定报告传染病死亡数之首。自 1951 年起开展全国性灭犬运动以来,狂犬病控制工作大见成效,但从 20 世纪 90 年代后期疫情又开始上升并日趋严重。据卫生部公布的数据表明,2001 年全国狂犬病发病人数 891 例,死亡 854 例;2002 年全国狂犬病发病人数 1122 例,死亡 1003 例;2003 年发病数为 2037 例,死亡 1980 例;2004 年 1~6 月,我国已有 842 人死于狂犬病,这些病例大部分是由带毒犬咬伤引起的。目前我国用于犬狂犬病预防的疫苗主要是浓缩的灭活苗和弱毒活疫苗,前者由于制备成本昂贵,主要在发达城市推广使用,后者虽然相对便宜,但存在毒力返祖的潜在危险,因此研制安全、有效、廉价的犬用狂犬病疫苗具有重要的实际意义。

活载体疫苗具有成本低、效果好和使用安全、方便等诸多优点。犬 2 型腺病毒(Canine adenovirus type 2,CAV-2)弱毒株是批准用于犬传染性肝炎和犬传染性喉气管炎的疫苗株。CAV-2 有 4 个早期转录区,其中 E3 区是病毒复制的非必需区,缺失或插入外源基因不会影响病毒的复制。因此,CAV-2 具有发展成为活疫苗载体的潜力。国内外未见狂犬病病毒(Rabies virus,RV)糖蛋白基因重组 CAV-2 的报道。

本试验选用犬 2 型腺病毒 YCA18 株<sup>[1]</sup>作为载体,将其 E3 区部分缺失,克隆进狂犬病病毒糖蛋白膜外区的表达盒,以期获得表达狂犬病病毒糖蛋白膜外区的重组犬 2 型腺病毒。

## 1 材料和方法

### 1.1 菌株、病毒、细胞和质粒

大肠杆菌(*Escherichia coli*)DH5 $\alpha$ 、DH10B、狂犬病病毒 SRV<sub>9</sub> 株、犬肾传代细胞系 MDCK 均由本室保存;pMD18-T 购自 TaKaRa(大连)公司,含 YCA18 株犬腺病毒全基因组质粒 pCAV-2 由本室构建,绿色荧光蛋白真核表达载体 pEGFP-C1 由本室保存。

### 1.2 细菌的培养和质粒的酶切、连接及转化

具体操作参照文献[2]的方法进行。

### 1.3 狂犬病病毒 SRV<sub>9</sub> 株糖蛋白膜外区的克隆

根据狂犬病病毒 SRV<sub>9</sub> 株糖蛋白核酸序列(GenBank Acc. No. AF499686)设计一对引物:WY2-F:5'-TCCATGGTTCCTCAGGCTCTCTGTTTG(NcoI);WY2-R:5'-TCGGCCGTTACAAGTCAACTCCTGAGAC-CTG(EagI),以 TRIzol 法提取狂犬病病毒 SRV<sub>9</sub> 株 BHK-21 细胞培养毒总 RNA。以 M-MLV 反转录酶在 42℃ 反应 1h 生成 cDNA 链。以此产物为模板用 Vent DNA 聚合酶进行 PCR 扩增,PCR 反应条件:

基金项目 国家自然科学基金(30170704),国家“863 计划”(2004AA213101)

\* 通讯作者。Tel/Fax 86-431-7961260 E-mail h\_rongliang@hotmail.com

作者简介 王永志(1978-)男,吉林抚松人,硕士研究生,研究方向为生物工程学。E-mail w\_yz7807@yahoo.com.cn

收稿日期 2004-09-22,修回日期 2004-12-30

98℃ 10min, 94℃ 30s, 58℃ 40s, 72℃ 78s, 25 个循环。回收扩增产物, 加 0.5U *Taq* 酶, 72℃ 继续作用 20min, 克隆入 pMD18-T 载体中, 送上海联合公司测序。

#### 1.4 表达盒和重组腺病毒基因组的构建

**1.4.1 构建以 CMV 为启动子、SV40 polyA 为终止信号的表达盒质粒:** 将含有目的基因的 T 载体质粒用 *Eag* I / *Nco* I 酶切、补平后回收 1.3kb 糖蛋白的膜外区片段, 同时用 *Nhe* I / *Bam* H I 酶切 pEGFP-C1, 补平脱磷后回收大片段。两片段用 T4 DNA Ligase 连接过夜, 转化 *CaCl*<sub>2</sub> 感受态大肠杆菌 DH5 $\alpha$ , 挑选鉴定正向插入的阳性重组子。

**1.4.2 CAV-2 E3 区的部分缺失及表达盒的插入:** 用 *Ssp* I / *Dra* III 双酶切含有腺病毒 E3 区的载体质粒 pVAX1E3, 缺失掉 1044bp, 补平、脱磷后回收 6.8kb 片段; 用 *Ase* I / *Mlu* I 双酶切表达盒质粒, 补平后回收 2194bp 的表达盒片段; 与上面 E3 区部分缺失的 6.8kb 片段连接、转化, 鉴定获得正、反向重组子。

**1.4.3 重组腺病毒基因组:** 用 *Sal* I / *Nru* I 双酶切上面获得的正、反向重组子及含有 CAV-2 全基因组的质粒 pCAV-2<sup>31</sup>, 分别回收 5.3kb、5.3kb、29.2kb 片段; 分别将两个 5.3kb 片段与 29.2kb 片段连接, 电激转化 DH10B 感受态大肠杆菌, 挑选阳性重组子, 构建好重组 CAV-2 基因组质粒。

#### 1.5 转染 MDCK 细胞

以 *Asc* I / *Cla* I 双酶切重组 CAV-2 基因组质粒, 从质粒中释放出重组 CAV-2 全基因组 DNA, 取 5 $\mu$ g 全基因组 DNA 溶于 300 $\mu$ L MEM 培养基中, 取 25 $\mu$ L 脂质体 Lipofectamine 2000 溶于另一 300 $\mu$ L MEM 培养基中, 混合两者, 室温放置 20min 后再补加 MEM 培养基至 2mL, 然后加至长成 90% 单层的 MDCK 细胞培养瓶中, 在 5% CO<sub>2</sub>、37℃ 饱和湿度下培养 10h 后, 弃掉单层细胞上的液体, 加入 6mL 含 5% FBS 的 MEM 完全培养基, 在 5% CO<sub>2</sub>、37℃ 饱和湿度下培养, 每日观察细胞病变情况。

#### 1.6 重组病毒基因组的提取和酶切鉴定

病变细胞用 PBS 洗 2 次, 加入 800 $\mu$ L 新鲜配制的细胞裂解液 (0.6% SDS, 10mmol/L EDTA, 100 $\mu$ g/mL Proteinase K), 37℃ 放置 1h 后加入 200 $\mu$ L 5mol/L NaCl, 冰上放置 1h, 然后 4℃、12000r/min 离心 20min。上清用酚和氯仿各抽提 1 次, 无水乙醇沉淀, 70% 乙醇润洗, 室温干燥 5min。用含 10 $\mu$ g/mL RNase A 的水溶液溶解沉淀, 37℃ 放置 20min。酶切

后用 1% 琼脂糖凝胶电泳鉴定。

#### 1.7 重组病毒 TCID<sub>50</sub> 的测定和 Western blot 分析

TCID<sub>50</sub> 参照文献 [4] 采用 Reed-Muench 法测定, 使用狂犬病病毒糖蛋白基因疫苗免疫的犬阳性血清进行 Western blot 分析, 具体方法参照文献 [5]。

#### 1.8 免疫原性研究

将表达盒正向插入和反向插入腺病毒基因组的两株病毒, 以冻融的病变细胞混合物的形式免疫 1 月龄幼犬, 每株病毒免疫 4 条犬, 8 × 10<sup>8</sup> TCID<sub>50</sub>/条。采集 0、7、10、14d 犬的血清, 用正常 MDCK 细胞冻融物将血清作 200 倍稀释, 并 4℃ 感作 24h, 1200r/min 离心 5min, 取上清, 包被 BHK-21 细胞培养的狂犬病病毒 SRV<sub>9</sub> 株悬液作为阳性抗原, 再分别包被未感染重组病毒的 MDCK 细胞和正常的 BHK-21 细胞悬液作为阴性抗原, 4℃ 感作 24h 后加入稀释的被检血清, 37℃ 感作 1h, Sigma 公司的羊抗犬酶标二抗 37℃ 感作 1h; OPD 显色 10min, 测定 490nm 处 OD 值; 采用 SPSS11.0 统计软件分析检测数据。

## 2 结果

### 2.1 RV 糖蛋白膜外区的克隆

琼脂糖凝胶电泳显示 RT-PCR 产物与预期大小 (1353bp) 相符, 酶切含糖蛋白膜外区的 T 载体连接产物 pMDG<sub>2</sub>, 结果与预期大小一致。测序结果表明, 得到的核酸序列与 GenBank Acc. No. AF499686 中的狂犬病病毒糖蛋白膜外区序列相同, 并在其编码区的 3' 末端加了一个终止密码子。

### 2.2 表达盒和重组腺病毒基因组的构建

用 pMDG<sub>2</sub> 中的糖蛋白膜外区基因置换 pEGFP-C1 中的绿色荧光蛋白基因后, 得到表达盒质粒 pERVG<sub>2</sub>。在含 CAV-2 E3 区序列的质粒 pVAX-E3 中, 将 E3 区缺失 1044bp 后, 表达盒插入其中, 获得了表达盒正、反向插入的 pVAXE3-G2F、pVAXE3-G2R。然后用重组后的 E3 区置换 CAV-2 全基因组质粒中的 E3 区, 获得含有 RV 糖蛋白膜外区表达盒的重组 CAV-2 基因组质粒 pCAV-2G<sub>2</sub>F 和 pCAV-2G<sub>2</sub>R (图 1)。重组质粒分别经 *Hind* III、*Sac* I、*Nde* I 和 *Bam* H I 酶切鉴定后, 转染 MDCK 细胞。

### 2.3 重组病毒的包装及其 TCID<sub>50</sub>

*Cla* I / *Asc* I 双酶切 pCAV-2G<sub>2</sub>F 和 pCAV-2G<sub>2</sub>R, 转染 MDCK 细胞, 表达盒正向插入的重组基因组转染细胞后第 9 天出现病变, 转染细胞 2 次的第 6 天就出现病变, 表达盒反向插入的重组基因组, 转染细

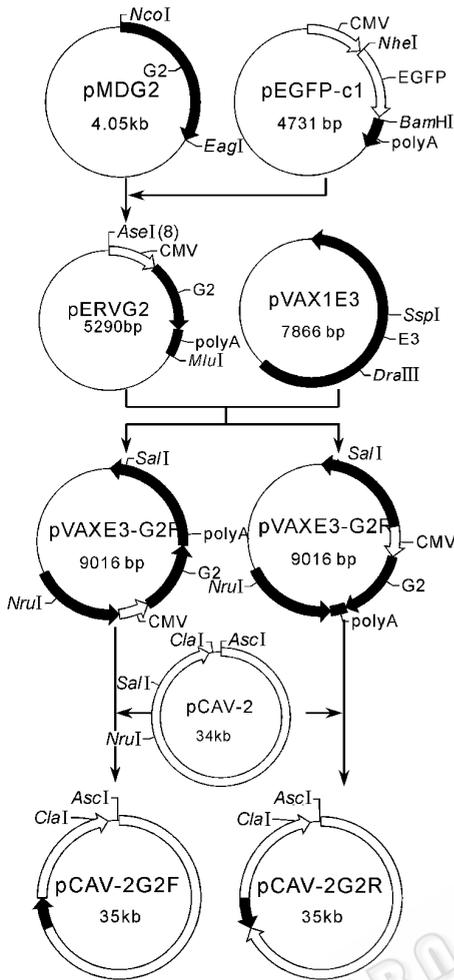


图 1 表达盒及重组腺病毒基因组的构建策略

Fig. 1 Construction strategy of expression box (composed of CMV promoter, external glycoprotein gene and SV40 early mRNA polyadenylation signal) and recombinant Canine adenovirus type 2 genome (expression box replaced part of E3 region)

胞 3 次后于第 7 天出现病变。病变初期呈葡萄串状,后期呈拉网状态(图 2)。提取腺病毒基因组后,酶切鉴定结果初步证明,这两株重组 CAV-2(CAV-2G<sub>2</sub>F,CAV-2G<sub>2</sub>R)基因组分别含有正、反向插入 E3 区的表达盒,重组病毒的 TCID<sub>50</sub>为 10<sup>-7.2</sup>/0.1mL。

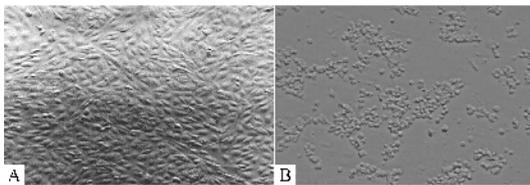


图 2 细胞病变前(A)后(B)变化

Fig. 2 CPE of MDCK (A: Normal cells; B: infected cells) transfected by recombinant Canine adenovirus type-2 genome contained RV external part of glycoprotein

### 2.4 RV 糖蛋白膜外区的表达

将重组病毒接种于 100% 汇合的 MDCK 细胞,

当呈现拉网状 CPE 时收集细胞;冻融 3 次后进行 SDS-PAGE 及 Western blot,用 RV 糖蛋白基因疫苗免疫的犬血清作为阳性血清。Western blot 的结果显示(图 3),有一条较弱的 A 带(约 90kD)和一条较清晰的 B 带(约 48kD);在阴性对照中,即用未被重组病毒感染的 MDCK 细胞作转膜后与阳性血清作用,也有 A 带存在,但没有 B 带;说明重组病毒感染后的 MDCK 细胞液中存在和 RV 阳性血清特异性结合的蛋白,且与预计大小(48.6kD)相符,说明重组病毒携带的目的基因在 MDCK 细胞中得到了有效表达;但 A 带产生的原因不明。

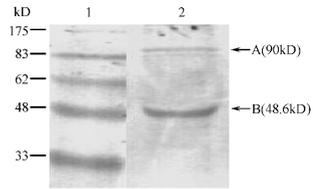


图 3 Western blot 分析

Fig. 3 Analysis of western blot with RV glycoprotein gene vaccine positive serum of dogs

1. Prestained protein marker; 2. MDCK cells infected by CAV-G<sub>2</sub>(A: Unspecific band; B: Specific band).

### 2.5 免疫原性分析

用 CAV-2G<sub>2</sub>F 免疫的 4 条犬的血清检测结果见图 4。免疫后 7d 内血清抗体效价上升不显著,7~10d 抗体水平迅速上升,10d 后抗体水平仍持续升高,但升高的速度变慢,第 14 天的抗体水平(P)与免疫前的抗体水平(N)的比值是 P/N ≥ 5.10。用不同抗原检测免疫犬的血清时,出现阴性抗原也能检测到抗体水平升高的现象,但比阳性抗原检测到的抗体水平低的多(图 5);这是由于免疫时使用的重组病毒中含有胎牛血清和死亡 MDCK 细胞,使犬血清中含有一定量针对胎牛血清蛋白和细胞成分的抗体,而两种阴性抗原中也都会含有牛血清和细胞成分,所以会出现也能检测到抗体水平升高这一现象;从 10~14d 的抗体水平上升趋势看,阳性抗原检测到的抗体水平上升速度较快,而阴性抗原检测的抗体水平上升速度缓慢,这一现象符合活载体疫苗的免疫趋势,因为活载体疫苗能在被免疫的动物体内持续的表达抗原,引起抗体水平的持续升高,而由胎牛血清和细胞成分引起的免疫应答会较早的进入平台期。用 CAV-2G<sub>2</sub>R 免疫的 4 条犬的血清检测结果与 CAV-2G<sub>2</sub>F 的类似,但是抗原性没有 CAV-2G<sub>2</sub>F 好, P/N ≥ 2.08。

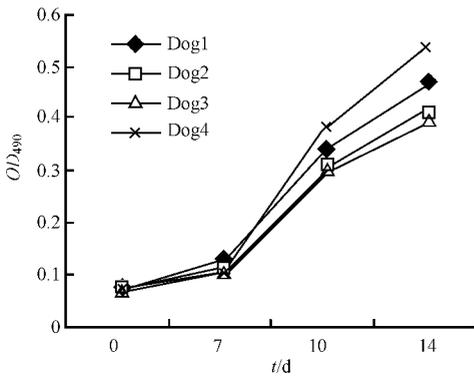


图4 ELISA 检测 CAV-2G<sub>2</sub>F 免疫血清中的抗体水平

Fig.4 Anti-RVG antibody measuring of four dogs serum vaccinated with CAV-2G<sub>2</sub>F ( Selected four one month dogs , vaccinated with  $8 \times 10^8$  TCID<sub>50</sub> CAV-2G<sub>2</sub>F per dogs , collected serum before vaccination and 7 , 10 ,14 days after vaccination . )

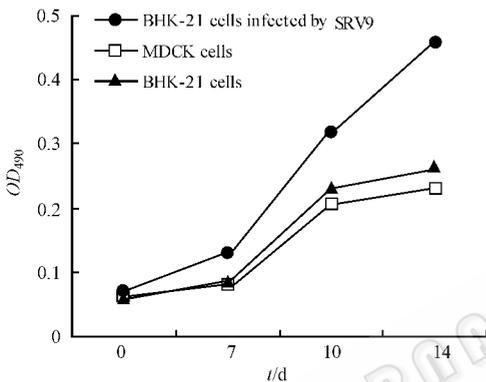


图5 不同抗原检测的抗体水平差异分析

Fig.5 Analysis of anti-RVG antibody through different antigen( BHK-21 cells infected by RV SRV<sub>9</sub> strain , MDCK cells , BHK-21 cells ) , the serum was diluted by MDCK cells and incubated in 4°C for 24h , centrifuged and collected the liquid for ELISA

### 3 讨论

腺病毒载体所能容纳的外源基因的大小是有限的,因此外源基因不能过大。狂犬病由 RV 引起, RV 的基因组分别编码 N、NS、M、G、L 等 5 种蛋白。糖蛋白是 RV 中唯一能刺激机体产生中和抗体的成分,且膜外区的抗原性与完整糖蛋白的抗原性相同<sup>[6]</sup>,去掉跨膜区有可能使膜外区蛋白分泌到胞外及体液中,激发较强的免疫应答,因此本试验选取 RV 糖蛋白基因的膜外区,而不是完整的糖蛋白基因。本研究获得的重组 CAV-2 基因组的大小是未重组基因组的 103.8%,基因组转染 MDCK 细胞后包装出复制型重组病毒。

RV 的糖蛋白基因分别重组到人 5 型腺病毒<sup>[7]</sup>、痘苗病毒、金丝雀痘病毒中,并证实均有免疫原性。

重组犬 2 型腺病毒的获得,有可能成为 RV 糖蛋白重组疫苗的重要内容之一,首先,犬是 CAV-2 的天然宿主,容易在犬体内增殖,使外源基因得到充分表达;其次,CAV-2 可以通过呼吸道或口腔接种免疫,使用方便;第三,CAV-2 携带的外源蛋白能抵抗母源抗体,使机体产生对外源蛋白的主动免疫<sup>[8]</sup>;且 CAV-2 是无包膜 DNA 病毒,对热、pH 稳定,贮存和运输均较方便;疫苗的成本低,可大范围推广;能同时预防由犬 1 型腺病毒引起的传染性肝炎。

初步的动物免疫结果显示,无论表达盒是正向还是反向插入基因组, RV 糖蛋白膜外区在犬体内均得到了有效表达;但正向插入的重组病毒的免疫效果好于反向,具体原因尚待阐明。

本试验成功地对 CAV-2 自然弱毒株 YCA18 株的 E3 区进行了缺失、重组,并最终包装出重组 CAV-2。在本研究之前,法国 Fischer 等<sup>[8]</sup>第一次构建了以 CAV-2 为载体的犬瘟热活疫苗,他们对 E3 区的克隆、缺失和表达盒的构建都是通过多次 PCR 来完成的,过程不但烦琐,而且容易造成碱基突变,而本试验经过细致的设计,使上述步骤通过简单的酶切、连接完成,因此本研究建立了一种高效地构建重组犬 2 型腺病毒的方法,具有重要的实际应用价值和一定的理论意义。为犬传染病防治平台的构建打下一定基础。

### 参 考 文 献

- [1] 夏咸柱, 范泉水, 胡桂学, 等. 犬 II 型腺病毒自然弱毒株的分离与鉴定. 中国兽药杂志, 2000, 34(3):1-4.
- [2] Sambrook J, David W, Russe L L. 分子克隆实验指南. 黄培堂, 等译. 第三版. 北京: 科学出版社, 2002.
- [3] 张守峰, 扈荣良, 牛建强, 等. 感染性犬 2 型腺病毒全基因组克隆及鉴定. 中国兽医学报, 2002, 22(6):533-535.
- [4] 殷震, 刘景华主编. 动物病毒学. 第二版. 北京: 科学出版社, 1997, 329-331.
- [5] 卢圣栋主编. 现代分子生物学实验技术. 第二版. 北京: 高等教育出版社, 2000, 326-330.
- [6] Dietzchold B, Wiktor T J, Wiktor W H, et al. Chemical and immunological analysis of the rabies soluble glycoprotein. *Virology*, 1983, 124(2):330-337.
- [7] Prevec L, Campbell J B, Christie B S, et al. A recombinant human adenovirus vaccine against rabies. *J Infectious Disease*, 1990, 161:27-30.
- [8] Fischer L, Tronel J P, Pardo-David C, et al. Vaccination of puppies born to immune dams with a canine adenovirus-based vaccine protects against a canine distemper virus challenge. *Vaccine* 2002, 20:3485-3497.

## Construction and immunogenicity of recombinant *Canine adenovirus* type 2 with the external part of glycoprotein of *Rabies virus*

WANG Yong-zhi<sup>1 2</sup> ZHANG Shou-feng<sup>1</sup> HU Rong-liang<sup>1\*</sup> WANG Xin<sup>2</sup> XIAO Yue-qiang<sup>1</sup>

(<sup>1</sup> Military Veterinary Institute, Academy of Military Medical Sciences, Changchun 130062, China)

(<sup>2</sup> College of Biotechnology, Jilin Agricultural University, Changchun 130118, China)

**Abstract** : The cases of rabies increase greatly in recent years in China and rabies continues to be a serious problem in developing countries due to the reservoirs of *Rabies virus* in dogs and wildlife vectors. The control of rabies depends on the development of safe effective economical vaccines that may be used for preexposure vaccination in animals. For this purpose, the external part of glycoprotein gene of *Rabies virus* strain SRV<sub>9</sub>(RVG) was amplified by the RT-PCR and cloned into pEGFP-C1 with replacement of the GFP gene. The expression cassette pERVG<sub>2</sub> is composed of CMV promoter, external glycoprotein gene and SV40 early mRNA polyadenylation signal. The expression cassette was released by *Ase* I / *Mlu* I double digestion and it was cloned rightwards and leftwards into *Canine adenovirus* type 2 (CAV-2) E3 region plasmid pVAXE3 in which E3 region was deleted partly by *Ssp* I / *Dra* III digestion. After the replacement of CAV-2 E3 region in plasmid pCAV-2 which contains CAV-2 genome with the recombinant E3 region, recombinant CAV-2 genome plasmid was obtained. Recombinant CAV-2 genome was released from plasmid by *Asc* I / *Cla* I digestion and then transfected into MDCK cells. Two replication-competent recombinant CAV2 expressing *Rabies Virus* external part of glycoprotein were produced. Vaccination experiment showed that the recombinant viruses can elicit an efficient antibody response in dogs.

**Key words** : Rabies, Glycoprotein, *Canine adenovirus* type 2, Recombinant virus

Foundation item : Chinese National Natural Science Fund ( 30170704 ); Chinese National High Technology Research and Development Program ( 2004AA213101 )

\* Corresponding author. Tel/Fax 86-431-7961260 E-mail hrongliang@hotmail.com

Received date 09-22-2004

## 科学出版社生命科学编辑部新书推介

基因Ⅷ(译)

Benjamin Lewin 编著 余龙 江松敏 赵寿元 等译

2005年2月出版 ISBN 7-03-014597-6/Q-1520 定价:198元

从《基因Ⅰ》到现在的《基因Ⅷ》,该系列已成为20多年来经久不衰的经典名著,堪称分子生物学的国际第一书。每一版的更新都紧跟学科发展,更加适应当前的学习和研究。

作为最新一版,本书继承了原有的核心内容,包括系统介绍了基因的结构、组织与表达,蛋白质与细胞的分子活动等。同时,还增加了许多新的内容与特色,首先是对章节进行了新的编排,以基因组学贯穿全书,对基因组的组织、DNA复制、修复、重组、转录、翻译、基因调控等内容进行了全面的更新,增加了许多新的专题,扩充了原核生物的内容,图解也更加丰满详尽。中译版很好地保持了原书风貌,更加适合方便了中国的学生和老师的学习参考。本书是公认的学习分子生物学、分子遗传学、基因组学的最佳参考书。

《基因》这部巨著自问世以来,二十年间共修订了8次。这不仅反映了基因研究的迅猛发展和所取得的丰硕成果,同时也表明了《基因》一书深受广大读者的喜爱。此次科学出版社出版了2004年《基因Ⅷ》的中译本,它增加了许多新的内容,并综述了最新进展。信息量大,图文并茂,突出地阐明了基因是生命活动的基本原因这一观点。《基因Ⅷ》是生命科学各个分支学科的师生和研究人员必备的教科书和参考读物。

(复旦大学赵寿元 供稿)

