

犬冠状病毒 S 糖蛋白基因重组犬 2 型腺病毒的构建及其免疫原性研究

乔 军^{1,3} 夏咸柱^{1*} 杨松涛¹ 胡桂学² 谢之景¹

(¹中国人民解放军军事医学科学院军事兽医研究所 长春 130062)

(²吉林农业大学动物科技学院 长春 130118)

(³塔里木大学动物科技学院 阿拉尔 843300)

摘 要 :首次构建了能表达犬冠状病毒纤突糖蛋白(CCV S1)的重组犬 2 型腺病毒(CAV-2)。用 RT-PCR 方法从 CCV DXMV 株细胞培养物中扩增出编码 S 糖蛋白 A、B、C 和 D 4 个抗原位点的基因片段 S1,将其克隆到 pVAX1 中,然后将含有 CCV S1 基因的完整表达盒(CMV-S1-PolyA)进一步定向克隆到含有 CAV-2 E3 区的穿梭质粒 pVAXE3 中,构建出 pVAX△E3S1。通过 *Sal* I + *Nru* I 双酶切 pVAX△E3S1 回收含有目的基因的表达盒,将其克隆入含有 CAV-2 全基因组的骨架质粒 pPoly2-CAV-2 中,获得重组质粒 pCAV-2-CCV-S1。*Cla* I + *Ase* I 酶切 pCAV-2-CCV-S1 释放重组基因组,转染 MDCK 细胞,获得了重组病毒 CAV-2-S1。该重组病毒在 MDCK 细胞上能产生典型的腺病毒细胞病变。通过 mRNA 水平和 Western blot 检测,证实重组病毒能表达 CCV S1 蛋白。动物免疫试验表明,该重组病毒可以有效地诱导免疫犬产生抗 CCV 和 CAV-2 抗体。

关键词 :犬冠状病毒,纤突糖蛋白,重组犬 2 型腺病毒

中图分类号 :S85 文献标识码 :A 文章编号 :0001-6209(2005)04-0588-05

犬冠状病毒(*Canine coronavirus*, CCV)属于冠状病毒科冠状病毒属的单链正股 RNA 病毒,是引起犬急性胃肠炎的重要病原之一^[1]。此病毒既能单独致病,也能与其它病原混合感染,对我国养犬业和野生动物保护业危害较重^[2]。血清学调查结果显示,该病呈世界性分布^[3]。疫苗接种是控制此病的有效手段之一。目前使用的 CCV 疫苗主要有灭活疫苗和弱毒疫苗;灭活疫苗虽安全,但免疫原性较差;弱毒疫苗易与野毒重组,存在毒力返强的隐患^[4]。因此,通过基因工程手段研制安全、有效的新型活载体疫苗是 CCV 研究的热点。CCV 含有 4 种结构蛋白,其中纤突糖蛋白(S)是诱导机体产生中和抗体的主要保护性抗原^[5-7],而其抗原位点均位于该蛋白的前 1/2 序列中(S1 蛋白)。在本研究中,我们运用犬 2 型腺病毒(*Canine adenovirus type 2*, CAV-2)基因组为载体,首次构建了能表达 CCV S1 蛋白且能有效诱导机体产生抗 CCV 中和抗体的重组 CAV-2 病毒。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 病毒、细胞和质粒:犬冠状病毒大熊猫株

(DXMV)由本室分离、鉴定和保存。MDCK 细胞、大肠杆菌(*Escherichia coli*) JM109 菌株、质粒 pVAX1 由本室保存。含有 CAV-2 E3 区的质粒 pVAXE3 和含有 CAV-2 全基因组的 pPoly2-CAV-2 质粒由本室构建。

1.1.2 主要试剂:T4 DNA 连接酶、pGEM-T 和 AMV Reverse Transcriptase 购自 Promega 公司;Ex TaqTM、牛小肠碱性磷酸酶(CIAP)、DNA Blunting kit 和各种限制性内切酶均购自 TaKaRa 公司;*Ase* I 和 *Cla* I 购自纽英伦生物技术公司;犬抗 CCV 多克隆抗体由本室制备;辣根过氧化物酶标记的兔抗犬 IgG 抗体购自 Sigma 公司。

1.2 犬冠状病毒大熊猫株 S1 基因的克隆及重组质粒 pVAXS1 的构建

根据 GenBank 中 CCV DXMV 株 S 全基因序列(GenBank 登录号:AY436637)^[7],设计合成一对引物 P1 和 P2, P1:5'-ACGGATCCACAATGGTTAATGTGACACAA-3'; P2:5'-CAACTCGAGTCAGGCACCAACAGGATTCAA-3'。引物 5'端分别含有 *Bam* H I 和 *Xho* I 位点。从 DXMV 株细胞培养物中提取总 RNA,按常规方法进行 RT 反应。PCR 反应体系(50 μ L):10 \times

基金项目:国家自然科学基金资助项目(30001123);全军“十五”医药卫生重点项目(Z2001095)

* 通讯作者。Tel:86-431-6986748;E-mail:xia-xzh@yahoo.com.cn

作者简介:乔 军(1971-),男,新疆阿拉尔市人,博士研究生,副教授,主要从事分子病毒学研究。E-mail:qj710625@yahoo.com.cn

其他作者:闫 芳¹,高玉伟¹,黄 耕¹

收稿日期:2004-10-18,修回日期:2005-05-11

PCR 缓冲液 5 μ L, 25mmol/L MgCl₂ 5 μ L, 2.5mmol/L dNTP 4 μ L, 上、下游引物(均为 25pmol/ μ L)各 1 μ L, RT 产物 2 μ L, *Taq plus* DNA 聚合酶(5U/ μ L) 0.3 μ L, 补加 ddH₂O 至 50 μ L。PCR 反应条件: 96 $^{\circ}$ C 60s, 94 $^{\circ}$ C 40s, 72 $^{\circ}$ C 140s, 52 $^{\circ}$ C 50s, 35 个循环; 72 $^{\circ}$ C 10min。回收 PCR 产物, 将其克隆入 pGEM-T 中得到重组质粒 pTS1 进行序列测定。测序结果正确的重组质粒 pTS1 用 *Bam*H I + *Xho* I 双酶切, 回收目的基因片段, 将其进一步克隆入 pVAX1 载体中, 得到 pVAXS1 重组质粒。

1.3 穿梭质粒 pVAX Δ E3S1 的构建

用 *Mlu* I 和 *Spe* I 对 pVAXS1 双酶切, 进行凝胶电泳回收含有 S1 表达盒目的片段, 并对两粘端进行补平; 用 *Ssp* I 酶切 pVAXE3, 回收大片段并去磷酸化; 再将含有 S1 表达盒目的片段定向克隆到 pVAXE3 的 E3 区缺失处, 筛选 S1 表达盒方向与 E3 区转录方向一致的重组子, 经鉴定正确的重组子命名为 pVAX Δ E3S1。

1.4 含 CCV S1 表达盒的 CAV-2 基因组重组质粒 pCAV-2-CCV-S1 的构建

用 *Sal* I + *Nru* I 分别对 pPoly2-CAV-2 和 pVAX Δ E3S1 进行双酶切, 分别进行琼脂糖凝胶电泳回收目的片段, 将含目的基因的 S1 表达盒定向克隆入 pPoly2-CAV-2 载体, 构建出含 S1 表达盒重组 CAV-2 基因组的质粒 pCAV-2-CCV-S1, 分别用 *Xba* I、*Eco*RV、*Nde* I、*Pst* I、*Bgl* II 和 *Hind* III 进行酶切鉴定。

1.5 重组 CAV-2-S1 基因组转染 MDCK 细胞

用 *Cla* I + *Asc* I 对重组质粒 pCAV-2-CCV-S1 进行双酶切, 回收大片段, 利用脂质体介导转染 MDCK 细胞。按常规进行传代培养, 每隔 6d 传代一次, 出现 CPE 后, 按常规方法进行病毒增殖。获得的重组病毒命名为 CAV-2-S1。

1.6 重组病毒 CAV-2-S1 的鉴定

1.6.1 电镜观察: 取第 5 代重组病毒 CAV-2-S1 单层接种一瓶 10mL 细胞, 37 $^{\circ}$ C 培养, 待 80% 细胞出现典型 CPE 时, 弃上清, 刮取 CPE 细胞做细胞超薄切片, 电镜观察超微结构。

1.6.2 CAV-2-S1 重组病毒的 PCR 鉴定与表达盒的克隆测序: 根据 CAV-2 Toronto A26/61 株 (GenBank 登录号: U77082) E3 序列设计 1 对特异性引物, P1: 5'-ACTCTGTCGATGGCTATGAC-3'; P2: 5'-GGTAAGTTTATTTGACAAGC-3'。提取重组病毒 CAV-2-S1 基因组 DNA 为模板, 扩增含有 S1 表达盒核酸片段, 以

0.8% 琼脂糖凝胶电泳。回收 PCR 产物, 送上海联合基因有限公司测序。

1.7 重组病毒 CAV-2-S1 表达的 S1 蛋白的检测

取 CAV-2-S1 的第 5 代细胞培养物, 用 mRNA 提取试剂盒提取总 RNA, 用 S1 基因特异性引物进行 RT-PCR, 以检测 S1 基因是否转录。同时刮取 CPE 细胞加入 100 μ L 2 \times SDS 凝胶加样缓冲液, 100 $^{\circ}$ C 水浴 5min, 进行 SDS-PAGE 分析。电泳完毕后转膜, 进行 Western blot 分析。一抗用犬抗 CCV 多克隆抗体, 二抗用辣根过氧化物酶标记的兔抗犬 IgG 抗体。

1.8 重组病毒 CAV-2-S1 动物免疫试验

取 16 只 3 个月龄的健康幼犬(其血清中抗 CAV-2 HI 抗体小于 1:2, 抗 CCV SN 抗体效价小于 1:4), 10 只用重组的病毒 CAV-2-S1 免疫肌注 (1×10^5 TCID₅₀/只), 3 只用 CAV-2 弱毒苗肌注免疫 (1×10^5 TCID₅₀/只), 3 只用 CCV 弱毒苗肌注免疫 (1×10^5 TCID₅₀/只), 每次间隔 10d 免疫 1 次, 共免疫 3 次。免疫前和第 3 次免疫后 2 周采血分离血清。56 $^{\circ}$ C 30min 灭活, 用微量 HI 试验检测免疫犬血清中抗 CAV-2 HI 抗体效价, 用微量中和试验测定血清中抗 CCV SN 抗体。

2 结果

2.1 犬冠状病毒 DXMV 株 S1 基因的克隆及重组质粒 pVAXS1 的鉴定

经 0.8% 琼脂糖凝胶电泳, CCV DXMV 株 S1 基因 RT-PCR 产物大小约为 1836 bp, 与预期结果相符。重组质粒 pVAXS1 分别用 *Bam*H I 和 *Xho* I 双酶切, 可得到 3000 bp 和 1836 bp 两个片段; 用 *Xho* I 线性化可得到 4836bp 大小的核酸片段, 表明 pVAXS1 质粒构建正确。

2.2 重组质粒 pVAX Δ E3S1 和 pCAV-2-CCV-S1 的酶切鉴定

重组质粒 pVAX Δ E3S1 用不同的限制性内切酶酶切, *Eco*RV 酶切可得到 9.87kb 的片段; *Xho* I 酶切可得到 1.81kb、3.60kb 和 4.43kb 大小的核酸片段; *Hind* III 酶切可得到 0.91kb、1.26kb 和 7.72kb 大小的片段; *Kpn* I 可切出 4.69kb、3.31kb 和 1.96kb 3 个片段; *Xba* I 可切出 2.33kb、3.20kb 和 4.36kb 3 个片段; *Sal* I + *Nru* I 切出 1.61kb、2.50kb 和 5.78kb 3 个片段。重组质粒 pCAV-2-CCV-S1 用不同限制性内切酶酶切, 结果 *Nru* I + *Sal* I 可得到 29.25kb 和 6.09kb 两个片段; *Pst* I 可切出 14.55kb、8.00kb、6.06kb、3.85kb 和 2.85kb 5 个片段; *Rol* II 可切出

2.68kb 和 32.64kb 两个片段; *EcoRV* 可切出 13.35kb、9.11kb、6.04kb、2.95kb、2.76kb、和 0.78kb 等主要片段; *Nde I* 可切出 11.27kb、9.47kb、7.68kb、6.06kb 和 1.62kb 等主要片段; *BamH I* 可切出 13.73kb、9.56kb、9.29kb、2.06kb 和 0.62kb 等主要片段; *Xba I* 可切出 13.71kb、6.86kb、5.29kb、4.96kb 和 3.86kb 等主要片段。酶切鉴定结果与预期值一致, 表明 pVAXΔE3S1 和 pCAV-2-CCV-S1 重组质粒构建正确。

2.3 重组 CAV-2-S1 基因组转染 MDCK 细胞结果

MDCK 细胞经过 1 次转染后, 盲传至第 4 代时出现细胞肿胀变圆、葡萄串样等典型的 CAV-2 样细胞病变(图 1-A、B) 获得重组病毒 CAV-2-S1。

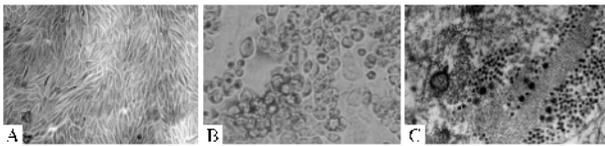


图 1 (A) 正常 MDCK 细胞 (B) 重组病毒在 MDCK 细胞产生的 CPE; (C) 病变 MDCK 细胞超薄切片中的重组 CAV-2-S1 (40000 ×)

Fig.1 (A) Normal MDCK; (B) CPE of MDCK cell resulted from recombinant CAV-2-S1 (C) Recombinant CAV-2-S1 in ultrathin section of CPE MDCK (40000 ×)

2.4 重组病毒 CAV-2-S1 的鉴定

刮取 CPE 细胞成分制备超薄切片, 电镜超微结构观察, 结果在其细胞核中可见有呈排列整齐的腺病毒样粒子(图 1-C)。提取重组病毒 CAV-2-S1 基因组 DNA 为模板, 用 E3 引物可扩增出 3538 bp 大小的片段, 用 S1 特异性引物可扩增出 1836 bp 大小的片段, 与预期值相一致; 而正常 CAV-2 只能扩增出 1519 bp 大小的片段(图 2)。将从重组病毒 CAV-2-S1 中扩增的片段纯化后进行测序, 结果序列中包含 CAV-2 E3 区相关序列、pVAX1 相关序列和 CCV S1 基因序列, 表明所构建的重组病毒 CAV-2-S1 完全正确。

2.5 重组病毒 CAV-2-S1 表达的 S1 蛋白及其检测

2.5.1 病毒中 S1 基因转录水平的检测 重组 CAV-2-S1 病毒用 RT-PCR 能扩增出 1836 bp 大小的 S1 基因片段, 而正常 CAV-2 感染的 MDCK 细胞扩增结果

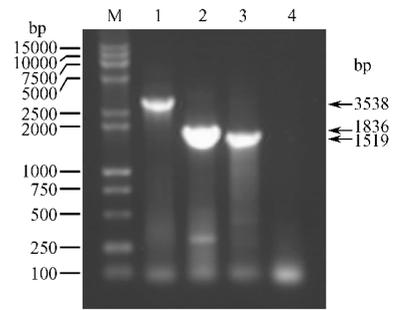


图 2 重组病毒的 RT-PCR 鉴定结果

Fig.2 Identification of recombinant CAV-2-S1

M. Marker DL15000 + 2000; 1. Recombinant CAV-2-S1 PCR/E3; 2. Recombinant CAV-2-S1 PCR/S1; 3. Normal CAV-2/E3; 4. Normal CAV-2/S1.

为阴性。

2.5.2 重组 CAV2-2-S1 病毒表达 S1 蛋白的 Western blot 检测 重组 CAV-2-S1 病毒的表达 S1 蛋白可被抗 CCV 多克隆抗体所识别, 表达蛋白分子量约为 74kD, 与预期的分子量相符(图 3)。

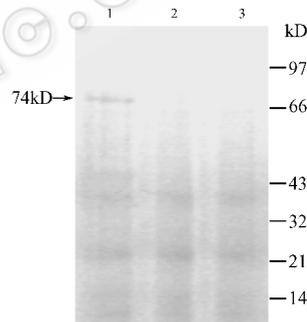


图 3 表达的 S1 蛋白的 Western blot 分析

Fig.3 Analysis of expressed CCV S1 protein by Western blot

1. MDCK infected by recombinant CAV-2-S1 2. MDCK infected by normal CAV-2 3. Normal MDCK.

2.6 重组病毒 CAV-2-S1 动物免疫试验结果

10 只 3 个月龄的健康幼犬经重组病毒 CAV-2-S1 免疫 3 次后, 血清中抗 CAV-2 HI 抗体的效价为 1:64 ~ 1:128, 抗 CCV SN 抗体效价为 1:16 ~ 1:32 (表 1)。3 只健康幼犬经 CAV-2 弱毒苗免疫 3 次, 血清中抗 CAV-2 HI 抗体效价为 1:64 ~ 1:128, 抗 CCV SN 抗体效价仍小于 1:2。3 只健康幼犬经 CCV 弱毒苗免疫 3 次后, 血清中抗 CAV-2 HI 抗体的效价小于 1:2, 抗 CCV SN 抗体效价为 1:128 ~ 1:256。

表 1 重组病毒 CAV-2-S1 免疫犬试验结果

Table 1 The immunization results of recombinant virus CAV-2-S1 in dogs

No.	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
HI Ab titer against CAV-2	1:64	1:64	1:128	1:64	1:128	1:128	1:64	1:128	1:64	1:64
SN Ab titer against CCV	1:32	1:16	1:16	1:16	1:32	1:32	1:16	1:16	1:16	1:32

3 讨论

CAV 属于腺病毒科哺乳动物腺病毒属成员,它包括两个血清型,犬 1 型腺病毒(CAV-1)和犬 2 型腺病毒(CAV-2)。CAV-1 型可引起犬传染性肝炎和狐狸、熊的脑炎以及单纯的呼吸道疾病,而 CAV-2 型则引起犬的传染性喉气管炎和肠炎^[2]。腺病毒作为载体的优越性已经在许多试验中得到了证实^[8-15]。随着 CAV 分子生物学背景的逐渐弄清,国内外正积极进行以 CAV 弱毒株为载体的狂犬病病毒、肠炎病毒以及犬瘟热病毒基因重组疫苗的研究^[15]。CAV-2 弱毒与其它腺病毒载体相比有明显的优点,其一是许多动物对 CAV-2 有易感性,易经口鼻感染,以其构建载体研制的基因重组苗可在体内复制,免疫效果比较理想。其二是作为载体的 CAV 对犬科动物来说本身即具免疫性,在其基因非必需区中插入某一种免疫原基因即为二价基因工程苗。由于 CAV-2 不仅有良好的免疫原性,对 CAV-1 具有完全的交叉保护能力,而且对免疫犬安全^[12,15],不会引起 CAV-1 免疫犬时出现的“蓝眼病”,因此 CAV-2 弱毒株作为病毒载体比 CAV-1 具有更多的优点。

在本研究中,构建重组 CAV-2-S1 病毒的策略与传统的重组方法有所不同。传统的重组 CAV 构建原理是首先克隆一段非必需区基因序列(如 E3 区),将其克隆入一个质粒,对其进行缺失,但保留其侧翼序列,然后将外源基因插入 E3 区缺失处,并使之与 E3 启动子的转录方向一致,然后与腺病毒基因组共同转染真核细胞,使其在细胞内进行同源重组,通过挑蚀斑和纯化,获得重组腺病毒。由于在真核细胞的重组率极低,加之纯化十分困难,所以很难获得纯化的重组病毒。目前比较流行的方法是利用细菌同源重组的机制来构建重组病毒。与传统方法不同的是,将含有外源目的基因片段 E3 区穿梭质粒与含有 CAV-2 全基因组的骨架质粒共转化 *E. coli* BJ 5183,使其发生同源重组得到含有目的基因的 CAV-2 全基因组质粒^[16],然后再将此质粒中的重组基因组释放并转染细胞而得到重组病毒。本试验的构建策略是先利用细菌同源重组的机制在 BJ 5183 菌中构建出含有 CAV-2 SY 株全基因组的骨架质粒 pPoly2-CAV-2,然后将含有目的基因的完整表达盒将其克隆到含 E3 区的穿梭质粒中,再利用骨架质粒和穿梭质粒 E3 区相同的酶切位点在体外连接的方式将表达盒克隆到骨架质粒中,最后将骨架质粒中的重组 CAV-2 基因组释放并转染 MDCK 细

胞即可得到重组病毒。本试验的构建策略显然比原有的方法更简便和省时省力,因而具有更高的成功率。本实验室利用此法已成功获得了多株能表达含有外源基因的重组 CAV-2。

CAV-2 基因组有 3 个区域(E1、E3 和 E4 的上游)可插入外源 DNA 而不影响病毒在细胞中的复制。有研究证实,HA5 腺病毒载体的包装能力最大为野生型 HA5 基因组的 105%。CAV-2 腺病毒基因组全长 31323bp, E3 区位于 24920~26411bp,全长 1491bp,包括两个 ORF, ORF1(24920~25279bp)和 ORF χ (25317~26411bp)。若将 E3 区全部缺失,根据 HA5 腺病毒载体的计算标准,则 CAV-2 外源基因的容量可达 3.0kb 左右。然而, E3 区全部缺失可能会对 CAV-2 的复制与包装产生不利的影 响。从现有成功试验的报道来看,构建重组 CAV-2 病毒时并未将 E3 区全部缺失。由于 CAV-2 E3 区缺失的大小直接会影响其容纳外源基因的容量,因此人们尽可能最大限度地缺失 E3 区,但到目前为止, E3 区可去掉的 DNA 片段的最大极限还不十分清楚,但显然不能延续到位于 E3 区侧翼的结构蛋白基因。在本研究中,我们对 CAV-2 E3 区 *Ssp* I 片段(859bp)进行了缺失,只破坏了 E3 区 ORF2 而保持了 ORF1 的完整性,然后装入了 2.9kb 的外源片段,成功的获得了重组 CAV-2-S1。通过本研究证明,在 E3 区缺失 ORF2 *Ssp* I 片段不会影响重组病毒的复制和包装。

近年来,通过血清学调查发现,CCV 感染的宿主范围有不断扩大的趋势,甚至大熊猫、小熊猫、老虎、狮子等珍稀野生动物也能感染 CCV^[17-20],因此研制安全、有效的 CCV 疫苗势在必行。S 糖蛋白位于 CCV 囊膜上,是 CCV 识别宿主细胞受体的主要成分,同时也是诱导机体产生中和抗体的主要保护性抗原,因此在本研究中我们对编码 S 糖蛋白 A、B、C 和 D 4 个抗原位点的基因片段 S1 进行克隆,并首次构建了重组 CAV-2 病毒。Western blot 分析表明,重组 CAV-2 在 MDCK 细胞中能够表达 CCV S1 糖蛋白;动物免疫试验表明,表达的 CCV S1 糖蛋白具有良好的免疫原性。重组 CAV-2-S1 有望在犬及野生动物 CAV-2 和 CCV 的免疫预防上发挥积极的作用。

参 考 文 献

- [1] 殷 震,刘景华主编. 动物病毒学(第二版). 北京:科学出版社,1997,695-697.
- [2] 夏咸柱主编. 养犬大全. 长春:吉林人民出版社,1993,561-564.

- [3] Tennant B J , Gaskell R C , Jones C J , *et al.* Studies on the epizootiology of canine coronavirus. *Veterinary Record* , 1993 ,**132** (2) : 7 - 11 .
- [4] Carmichael L E . Canine viral vaccines at a turning point--a personal perspective. *Adv Vet Med* ,1999 **41** :289 - 307 .
- [5] Horsburgh B C , Brierley I , David K B T , *et al.* Analysis of a 9.6kb sequence from the 3' end of canine coronavirus genomic RNA. *J Gen Virol* ,1992 **73** :2849 - 2862 .
- [6] Wesseling J G , Vennema H , Godeke G J , *et al.* Nucleotide sequence and expression of the spike (S) gene of canine coronavirus and comparison with the S proteins of feline and porcine coronavirus. *J Gen Virol* ,1994 **75** :1789 - 1794 .
- [7] 乔 军, 夏咸柱, 胡桂学, 等. 犬冠状病毒大熊猫株纤突蛋白全基因的克隆与序列分析. *中国病毒学* , 2004 ,**19**(5) : 481 - 486 .
- [8] Rosenthal K L , Copeland K F T , Gallichan W S . Recombinant adenovirus as vectors for mucosal immunity. *Mucosal vaccines* . San Diego : Academic Press ,1996 ,147 - 158 .
- [9] Papp Z , Middeltown D M , Mittal S K , *et al.* Mucosal immunization with recombinant adenoviruses : induction of immunity and protection of cotton rats against respiratory bovine herpesvirus type I infection. *J Gen Virol* , 1997 **78** :2933 - 2943 .
- [10] Papp Z , Babiuk L A , Baca-Estrada M E . The effect of pre-existing adenovirus-specific immunity on immune responses induced by recombinant adenovirus expressing glycoprotein D of bovine herpesvirus type I. *Vaccine* ,1999 **17** :933 - 943 .
- [11] Baer G M , Brooks R C , Foggin C M . Oral vaccination of dogs fed canine adenovirus in baits. *Am J Vet Res* , 1989 **50** :836 - 837 .
- [12] Summer J W , Shaddock J H , Wu G J , *et al.* Oral vaccination of an attenuated strain of canine adenovirus (type 2) to raccoons , foxes , skunk and mongoose. *Am J Vet Res* , 1988 **49** :169 - 171 .
- [13] Appel M , Carmichael L E , Robson D S . Canine adenovirus type 2-induced immunity to two canine adenoviruses in pups with maternal antibody. *Am J Vet Res* ,1975 **36** :1199 - 1202 .
- [14] Kremer E J , Boutin S , Chillon M , *et al.* Canine adenovirus : an alternative for adenovirus-mediated gene transfer. *J Virol* , 2000 **74** (1) : 505 - 512 .
- [15] 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**(29) :3485 - 3497 .
- [16] 张守峰, 扈荣良, 夏咸柱, 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 .
- [17] Mainka S A , Qiu X , He T , *et al.* Serologic survey of giant panda (*Ailuropoda melanoleuca*) , and domestic dogs and cats in the Wolong Reserve , China. *J of Wildlife Disease* , 1994 **30**(1) : 86 - 89 .
- [18] 何爱华, 杜胜芳, 林桂华, 等. 首次从腹泻熊猫粪便中检出冠状病毒简报. *中国人兽共患病杂志* ,1996 **12**(3) :4 .
- [19] 高凤山, 胡桂学, 夏咸柱, 等. 联合 PCR 诊断大熊猫犬瘟热和冠状病毒的混合感染. *吉林农业大学学报* , 2003 **25**(1) : 91 - 93 .
- [20] 胡桂学, 高凤山, 高玉伟, 等. 大熊猫犬冠状病毒的分离与鉴定. *畜牧兽医学报* , 2004 **35**(2) :202 - 207 .

Construction of recombinant *Canine adenovirus* type 2 expressing *Canine coronavirus* spike glycoprotein and its immunogenicity

QIAO Jun^{1,3} XIA Xian-zhu^{1*} YANG Song-tao¹ HU Gui-xue² XIE Zhi-jing¹

(¹ Institute of Military Veterinary , Academy of Military Medical Sciences of PLA , Changchun 130062 , China)

(² Department of Animal Science and Technology , Jilin Agricultural University , Changchun 130118 , China)

(³ Department of Animal Science and Technology , Tarim University , Alar 843300 , China)

Abstract : In order to construct a recombinant *Canine adenovirus* type 2 (CAV-2) expressing the spike glycoprotein of *Canine coronavirus* (CCV) , the S1 gene fragment of CCV strain DXMV , encoding major antigenic region A , B , C and D of S protein , was amplified by RT-PCR and cloned into pVAX1 vector. The complete S1 expression cassette was subcloned into the shuttle vector pVAXE3 , then further cloned into the backbone vector pPoly2-CAV2 containing complete genome of CAV-2. To gain the recombinant *Canine adenovirus* , the recombinant plasmid pCAV-2-CCV-S1 was linearized by *Cla* I / *Asc* I to release recombinant genome , and then transfected into MDCK cell. The recombinant virus CAV-2-S1 was gained through 4 passages in MDCK , which showed classical CPE of CAV-2. The expressed S1 protein of CCV , which was identified by RT-PCR and Western blot , can be specifically recognized by polyclonal antibody against CCV. The immunization in dogs indicated that the recombinant CAV-2 could effectively induce the specific antibodies against CCV and CAV.

Key words : *Canine coronavirus* , Spike Glycoprotein , Recombinant *Canine adenovirus* type 2

Foundation item : National Science Foundation of China (30000123) ; The Key Medical Project of PLA (Z2001095)

* Corresponding author. Tel : 86-431-6986748 ; E-mail : xia-xzh@yahoo.com.cn

Other authors : YAN Fang¹ , GAO Yu-wei¹ , HUANG Geng¹

Received date : 10-18-2004