

表达狂犬病毒糖蛋白抗原的重组犬 2 型腺病毒的构建及鉴定

赵忠鹏, 夏咸柱*, 扈荣良, 谢之景, 闫 芳

(军事医学科学院军事兽医研究所 长春 130062)

摘 要: 为研制一种预防犬科动物狂犬病的新型疫苗, 将含有狂犬病毒 ERA 株糖蛋白基因(Rabies glycoprotein, Rgp)表达盒的穿梭质粒 pVAX Δ E3Rgp 中的 Rgp 表达盒克隆入犬 2 型腺病毒(Canine adenovirus type 2, CAV2)骨架质粒 pPoly2-CAV2 中, 获得重组质粒 pPoly2-CAV2- Δ E3-Rgp, 释放其基因组, 转染 MDCK 细胞系, 获得 E3 缺失区(Deletion of early protein 3, Δ E3)含有 Rgp 表达盒的重组病毒 CAV2- Δ E3-Rgp。该重组病毒能在 MDCK 细胞上产生典型的腺病毒细胞病变。通过酶切、PCR、基因测序, 表明该重组病毒含有完整的 Rgp 表达盒。通过 RT-PCR、Western blot 等检测, 表明该重组病毒能够表达 Rgp 抗原。用该重组病毒免疫犬 3 次免疫后, 可以诱导犬产生特异的抗 CAV2 HI 抗体, 其效价超过 1:256 和抗狂犬病病毒(Rabies virus, RV)中和抗体, 其效价超过 0.50IU/mL。试验结果表明, 获得的重组病毒免疫犬后, 能够产生抗狂犬病毒和腺病毒的高效价保护性抗体, 是一种有潜力的犬科动物狂犬病毒腺病毒二联疫苗候选株。

关键词: 狂犬病毒; 犬 2 型腺病毒

中图分类号: Q939.91 Q78 文献标识码: A 文章编号: D001-6209(2007)02-0335-05

狂犬病(Rabies)是一种古老的人兽共患传染病, 但至今尚未研究出有效的治疗方法, 一旦发病几乎 100% 死亡。近年来我国狂犬病死亡人数居高不下, 位居全国重点传染病死亡数和病死率榜首, 且呈逐年上升的趋势。我国现用的狂犬病疫苗为其弱毒疫苗, 存在毒力返强的隐患, 因此, 研究安全性好的狂犬病疫苗势在必行。国内外已成功研制了多种基因工程狂犬病疫苗, 如核酸疫苗、痘苗病毒载体疫苗、腺病毒载体疫苗等^[1], 其中表达狂犬病毒糖蛋白(Rgp)基因的痘苗病毒和 E3 区缺失(Deletion of early protein 3, Δ E3)的人腺病毒载体活疫苗, 已成功地在北美地区大规模用于野生动物免疫^[2-4]。

狂犬病是一种自然疫源性疾病, 几乎所有温血动物对狂犬病病毒都敏感, 野生动物为本病的主要储存宿主, 而犬在传播狂犬病中起重要作用, 是人畜感染最主要的来源。因此, 研制免疫犬和野生动物的狂犬病疫苗更显迫切^[5]。犬 2 型腺病毒(CAV2)遗传性稳定, 能高效表达外源基因并能对外源蛋白进行翻译后加工, 如剪切、糖基化、磷酸化等, 表达的蛋白具有天然蛋白的特性, 能在犬、貉、狐等犬科动物和多种野生动物体内良好增殖, 对热、pH 稳定, 且

可经口感染, 非常适合用于重组口服狂犬病疫苗的研究。而且应用 CAV2 免疫的动物, 可有效的产生对犬 1 型腺病毒(CAV1)强毒的免疫力^[5]。

为给口服狂犬病重组活疫苗研究打基础, 本研究将狂犬病毒 ERA 株糖蛋白(Rgp)表达盒重组入 E3 缺失的犬 2 型腺病毒载体中, 构建成表达 Rgp 抗原的重组犬 2 型腺病毒(CAV2- Δ E3-Rgp), 并对其进行了鉴定。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 细菌、质粒和细胞: 大肠杆菌(*Escherichia coli*) JM109, 由本室保存。pGT(含有狂犬病毒 ERA 株糖蛋白基因) pVAX Δ E3^[6] (E3 缺失的穿梭质粒) pPoly2-CAV2^[7] (含 CAV2 全基因组) 由本室构建。pVAX1 购自 Invitrogen 公司, pMD18-T Vector System I 购自 TaKaRa 公司。MDCK 细胞, 由本室保存。

1.1.2 主要试剂: 限制性内切酶 *Pst* I、*Xba* I、*Eco*R I、*Sal* I 等均购自 TaKaRa 公司。限制性内切酶 *Asc* I、*Cla* I 购自 NEB 公司。牛小肠碱性磷酸酶(CIAP)、RNA 酶、DNA Blunting Kit 购自 TaKaRa 公

基金项目: “十五”军队医药卫生重点项目(Z2001095)、国家科技攻关项目(2004BA519A48)

* 通讯作者。Tel 86-431-86758799, E-mail: xia_xzh@yahoo.com.cn

作者简介: 赵忠鹏(1978-), 男, 山东青岛人, 博士研究生, 研究方向为微生物感染与免疫。E-mail: xiaozzp@hotmail.com

其他作者: 黄 耕, 杨松涛

收稿日期: 2006-07-10, 接受日期: 2006-09-06, 修回日期: 2006-11-13

司。T4 DNA 连接酶购自 Promega 公司。Rapid Plasmid DNA Daily Mini-prep Kit、DNA Gel Extraction Kit 购自 V-gene 公司。脂质体 Lipofectamine 购自 Invitrogen 公司。经典总 RNA 提取试剂盒购自上海 Sangon 公司。M-MLV 反转录酶购自 MBI 公司。辣根过氧化物酶标记山羊抗兔 IgG(进口分装)购自北京中山生物技术有限公司,兔抗狂犬病病毒阳性血清由本室保存。低分子量蛋白 Marker 购自上海生化所。LB 培养基为 OXOID 公司产品。DMEM 培养基为 GIBCO 公司产品。

1.1.3 试验动物 4 只 45 ~ 50 日龄犬(抗 CAV-2 HI 抗体效价小于 1:2,抗 RV 中和抗体小于 0.1IU/mL),吉林大学实验动物中心提供。

1.2 常规分子生物学试验

质粒的酶切按照各种酶的酶切说明书操作,酶切片段的回收按照 DNA Gel Extraction Kit 说明书操作。粘端连接按照 T4 DNA 连接酶说明书操作;线性质粒 DNA 5'端去磷按照 CIAP 说明书操作;平端连接按照 DNA Blunting Kit 说明书操作;化学(CaCl₂)感受态菌的制备、连接物的转化和琼脂糖凝胶电泳按照文献[8]方法操作;质粒提取按照 Rapid Plasmid DNA Daily Mini-prep Kit 说明书操作;细胞中总 RNA 的提取按照经典总 RNA 提取试剂盒说明书操作;cDNA 第一条链的合成按照 M-MLV 反转录酶说明书操作。

1.3 重组质粒 pPoly2-CAV2-ΔE3-Rgp 的构建

将 Rgp 基因从 pGT 质粒克隆至 pVAX1,将 Rgp 表达盒克隆入穿梭质粒 pVAXΔE3,构建成 pVAXΔE3Rgp,然后再克隆入 pPoly2-CAV2 中,获得重组质粒 pPoly2-CAV2-ΔE3-Rgp。

1.4 CAV2-ΔE3-Rgp 基因组转染 MDCK 细胞

用 *Asc* I、*Cla* I 内切酶从重组质粒 pPoly2-CAV2-ΔE3-Rgp 中释放 CAV2-ΔE3-Rgp 基因组,按照脂质体 Lipofectamine 说明书转染 MDCK 细胞。

1.5 MDCK 细胞中 CAV2 基因组的提取

具体操作按照文献[9]的方法进行。

1.6 CAV2-ΔE3-Rgp 病毒的鉴定

1.6.1 CAV2-ΔE3-Rgp 病毒的形态学观察:用 CAV2-ΔE3-Rgp 病毒第四代 MDCK 细胞培养物接种一瓶 MDCK 细胞,37℃静置培养至出现典型的 CPE(葡萄串样病变)。无菌将细胞刮下,戊二醛与锇酸双固定,用 F812 环氧树脂包埋,切片、染色作电镜超微结构观察。

1.6.2 CAV2-ΔE3-Rgp 病毒基因组酶切鉴定:用

CAV2-ΔE3-Rgp 病毒第四代 MDCK 细胞培养物接种一瓶 MDCK 细胞,37℃静置培养至大多数细胞出现 CPE,但是仍未脱落,提取 CAV2-ΔE3-Rgp 病毒基因组,用 *Pst* I、*Bst* P I、*Nde* I、*Ssp* I 内切酶进行初步鉴定。回收 *Nru* I 和 *Sal* I 双酶切后含有 ΔE3-Rgp 的 5.9kb 片段,用 *Xho* I、*Hind* III、*Ssp* I、*Nde* I 内切酶进行进一步鉴定。

1.6.3 CAV2-ΔE3-Rgp 病毒的 PCR 与 RT-PCR 鉴定:利用 Rgp 特异性引物 P1:5'-CCACCATGGTTCCTCAGGCTCTCC-3', P2:5'-GCGGCCGCTTACAGTCTCACC-3',用提取的 CAV2-ΔE3-Rgp 病毒基因组进行 PCR 鉴定,用经典总 RNA 提取试剂盒提取细胞中总 RNA 进行 RT-PCR 鉴定;利用 E3 区特异性引物^[6] E3F:5'-CAGTTCATTCTTAAGTACGAC-3', E3R:5'-CAAGTGGAAGTACCAAAGCTG-3',用提取的 CAV2-ΔE3-Rgp 病毒基因组进行 PCR,回收 PCR 产物,连接到 pMD18-T 转化 JM109,提取质粒鉴定,并对正确的质粒送上海 Sangon 公司进行测序。扩增 Rgp 的条件:94℃ 3min,94℃ 30s,57℃ 40s,72℃ 90s,25 个循环,72℃ 10mins。扩增 E3 的条件:94℃ 3min,94℃ 40s,52℃ 50s,72℃ 4min 40s,30 个循环,72℃ 10min。

1.6.4 CAV2-ΔE3-Rgp 病毒表达产物 Rgp 的检测:利用辣根过氧化物酶标记山羊抗兔 IgG(进口分装),兔抗狂犬病病毒阳性血清,按照文献[8]的方法进行 Western blot 检测。

1.6.5 CAV2-ΔE3-Rgp 病毒免疫犬试验:用 CAV-ΔE3-Rgp 免疫 4 只 45 ~ 50 日龄犬,肌注,剂量为 1 × 10⁴TCID₅₀/只,间隔 15d 免疫 1 次,共免疫 3 次,免疫前和第 3 次免疫后 15d 采血,制备血清,56℃ 30min 灭活,-20℃冻存待检。用 CAV-2 微量 HI 试验检测实验犬血清中抗 CAV-2 HI 抗体,试验犬血清中抗 RV 中和抗体送英国狂犬病检测中心测定。

1.6.6 抗 RV 中和抗体国际单位的测定:测定过程参见文献[10]。

2 结果

2.1 重组质粒 pPoly2-CAV2-ΔE3-Rgp 的酶切鉴定

经 *Pst* I 酶切,pPoly2-CAV2-ΔE3-Rgp 切出 10.86、7.76、5.49、4.0、3.2、3.04、0.3、0.26 和 0.2kb 大小的片段,而 pPoly2-CAV2 切出 7.76、5.49、4.64、4.47、4.0、3.2、3.04、0.3、0.26 和 0.2kb 大小的片段,其电泳谱型明显不同,尤其在 10.86、4.64、4.74 处更是明显;经 *Nde* I 酶切,pPoly2-CAV2-ΔE3-Rgp 切出 10.29、9.06、7.87、4.61、6.0、0.96、0.72kb 大小的片

段,而 pPoly2-CAV2 切出 14.82、9.06、7.87、1.6kb 大小的片段,其电泳谱型在 10.29、4.61、0.96、0.72、14.82kb 处明显不同;经 *Ssp* I 酶切,pPoly2-CAV2-ΔE3-Rgp 切出 8.81、6.58、4.19、3.95、3.8、3.77、3.02、0.99kb 大小的片段,而 pPoly2-CAV2 切出 6.94、6.58、4.19、3.95、3.8、3.03、3.02、0.99、0.86kb 大小的片段,其电泳谱型在 8.81/3.77/6.94/3.03/0.86kb 处明显不同。酶切结果与理论计算值一致,表明该质粒构建正确。

2.2 CAV2-ΔE3-Rgp 基因组转染 MDCK 细胞

经过 1 次转染,细胞盲传 2 次,出现了腺病毒特有的葡萄串样细胞病变(CPE)。用 CAV2-ΔE3-Rgp 病毒第四代 MDCK 细胞培养物接种一瓶 MDCK 细胞,37℃静置培养至出现典型的葡萄串样病变(图 1-A,B)。电镜超微结构观察可见腺病毒样病毒粒子呈晶格状排列(图 2)。

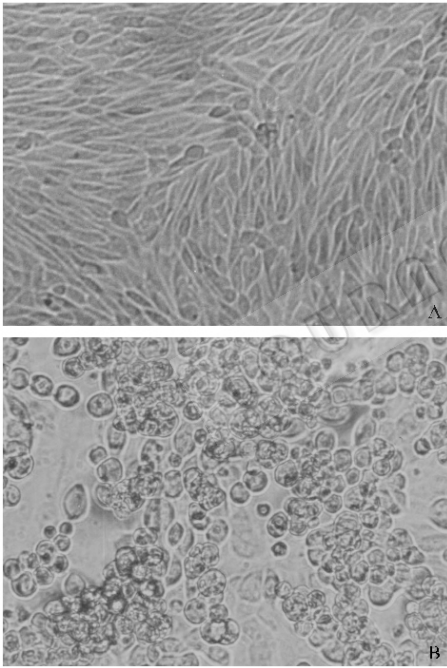


图 1 (A)正常 MDCK 细胞 (B)CAV2-ΔE3-Rgp 病毒引起的 MDCK 细胞病变(100 ×)

Fig.1 (A)Normal MDCK cell (B)Cytopathic effect of CAV2-ΔE3-Rgp in MDCK cell(100 ×).

2.3 CAV2-ΔE3-Rgp 病毒基因组酶切、PCR 及 RT-PCR 鉴定

将重组病毒基因组经 *Nru* I 和 *Sal* I 双酶切,切出 23.9、5.9、3.27kb 大小的片段,回收其 5.9kb 的片段,经 *Hind* III 酶切,切出 3.71、1.76、0.3、0.13kb 大小的片段,经 *Nde* I 酶切,切出 2.6、1.6、0.97、0.72kb 大小的片段,经 *Ssp* I 酶切,切出 3.3、2.65kb 大小的片段,经 *Xho* I 酶切,切出 3.3、2.28、0.33kb 大小的

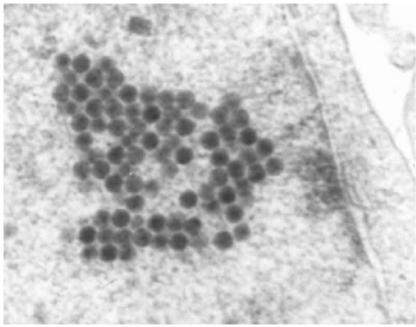


图 2 CAV2-ΔE3-Rgp 病毒感染 MDCK 细胞的电镜超微结构(40000 ×)

Fig.2 Electron micrograph of recombinant adenovirus CAV2-ΔE3-Rgp in MDCK cell(40000 ×).

片段。酶切结果与理论计算值一致,表明重组病毒 CAV2-ΔE3-Rgp 的 E3 区已经含有狂犬病毒糖蛋白的完整表达盒。

用 E3 区特异性引物扩增重组病毒基因组,获得 3.4kb 的片段;用 Rgp 特异性引物扩增重组病毒基因组和反转录产物,都获得 1.6kb 的片段。PCR 及 RT-PCR 鉴定结果与理论值一致,表明重组病毒 CAV2-ΔE3-Rgp 的 E3 区已经含有狂犬病毒糖蛋白的完整表达盒,并在 RNA 水平进行了 Rgp 转录。

2.4 CAV2-ΔE3-Rgp 病毒的表达产物 Rgp 的检测

CAV2-ΔE3-Rgp 病毒的表达产物 Rgp 可被兔抗狂犬病病毒阳性血清识别,表达的 Rgp 蛋白分子量约为 66kDa,与天然 Rgp 的分子量相符(图 3)。

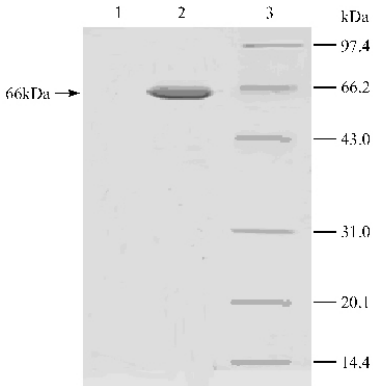


图 3 CAV-2/rgp 的 Western blot 分析

Fig.3 Western blot assay of CAV2-ΔE3-Rgp. 1. MDCK cell infected by CAV-2 2. MDCK cell infected by CAV2-ΔE3-Rgp ; M. Marker.

2.5 E3 区特异性引物所扩增片段的测序

E3 区特异性引物所扩增的 3.4kb 片段经测序,结果表明重组病毒 CAV2-ΔE3-Rgp 的 E3 区已经含有狂犬病毒糖蛋白的完整表达盒。

2.6 免疫犬抗体检测

免疫前犬血清抗 CAV-2 的 HI 抗体效价小于

1:2, 免疫 3 次效价 1:256 ~ 512; 免疫前犬血清抗狂犬病效价小于 0.1IU/mL, 免疫后 0.50 ~ 1.0IU/mL。免疫前犬血清效价表明, 所免疫的犬免疫前没有受到狂犬病毒和腺病毒的感染, 也没有接种过疫苗, 抗两种病毒的抗体效价均为阴性; 研究认为, 抗 CAV-2 的 HI 抗体效价大于 1:128 就能抵抗犬腺病毒的攻击, 而抗狂犬病毒中和抗体效价大于 0.50IU/mL, 就能抵抗狂犬病毒的攻击。免疫后犬血清效价表明, 所免疫的犬能够抵抗狂犬病毒和腺病毒的攻击。

3 讨论

3.1 狂犬病毒保护性抗原的选择

狂犬病毒编码 5 种结构蛋白, 其中糖蛋白和核蛋白为其主要保护性抗原, 能诱导中和抗体和细胞免疫。狂犬病毒糖蛋白(Rgp)在病毒外膜上形成突起, 是狂犬病毒识别宿主细胞的主要结构, 也是唯一诱导中和抗体产生的抗原^[5]。本研究选用的狂犬病毒糖蛋白(Rgp)为狂犬病毒 ERA 株糖蛋白, 其背景清楚, 免疫后对狂犬病毒攻击的保护作用在弱毒疫苗中和核酸疫苗中已经得到了充分证明。

3.2 CAV2 载体的选择

由于口服狂犬病弱毒疫苗对某些野生动物不安全, 1984 年美国 Wistar 研究所和法国 Trangen 合作, Kieny 等^[2]率先以痘苗病毒哥本哈根(Copenhagen)株为载体, 成功地将狂犬病病毒 ERA 株的糖蛋白基因克隆到痘苗病毒复制的非必需区-TK 基因内, 在痘苗病毒启动子(P7.5)调控下, Rgp 基因获得表达, 并具有良好的免疫原性和安全性, 区域性试验证明其具有有效性、无毒性和热稳定性的特点。另外, 已将狂犬病毒的糖蛋白基因分别重组到人腺病毒 5 型、金丝雀痘病毒等病毒中, 并证实均有免疫原性。而用能口服免疫的 CAV2 弱毒株作为载体, 其载体本身就是一个良好的犬腺病毒免疫原。

本研究所用的 1998 年范泉水等^[11]分离和致弱的 CAV2 沈阳株, 是经大规模临床试验证明安全的 CAV2 弱毒株, 并可与其它弱毒联合免疫。

3.3 CAV2 E3 区缺失部位和外源基因表达盒插入方向的选择

E3 区约 1500bp, 是 CAV2 繁殖的非必需区, 其基因产物在体内具有抑制宿主抗病毒免疫防御的作用。Fischer 等^[12]对 CAV2 的 E3 区进行了不同大小的缺失, 构建了表达犬瘟热病毒的 H 蛋白和 F 蛋白的重组 CAV2 病毒, 最大缺失达 1263bp。本研究所利用的 pVAX-E3⁶¹(E3 缺失的穿梭质粒), 缺失了

859bp 的 E3B 区的 Ssp I 片段。

外源基因表达盒在重组基因组中的方向会影响外源基因的表达, 插到 E3 区的外源基因表达盒的方向与 E3 区的方向一致时, 外源基因才能高效表达^[13]。本研究所构建的重组病毒 CAV2-ΔE3-Rgp, 插到 E3 区的 Rgp 表达盒方向与 E3 区的方向一致。

3.4 CAV2 病毒的包装容量

正常情况下, CAV2 的最大包装容量为野生型腺病毒基因组的 105%, 即在不缺失的情况下可插入 1.6kb 的外源基因。然而对 E3 区可缺失的最大 DNA 片段还不十分清楚, CAV2 的最大包装容量也还不十分清楚。Fischer 等^[12]所构建的表达犬瘟热病毒 H 蛋白和 F 蛋白重组 CAV2 病毒, 包装容量达到了 105.3%, Kremer 等^[14]用 CAV2 Toronto A26/61 株在 E1 反式互补细胞系中又构建了多个 CAV2 载体, 其中 CAV2βgal 达到了 105.7%。谢之景等^[6]所构建的表达 CPV VP2 基因重组 CAV2(CAV2/CPV 病毒)包装容量为 105.23%, 闫芳等^[15]所构建的表达犬瘟热病毒 H 蛋白的 CAV2(CAV2/CDVLP 病毒)包装容量达 106.17%。本研究所构建的重组病毒 CAV2-ΔE3-Rgp, 包装容量达到了 105.6%。

3.5 重组 CAV2-ΔE3-Rgp 基因组转染 MDCK 细胞

由于不明的原因, 同样的重组 CAV2-ΔE3-Rgp 基因组转染同样的 MDCK 细胞, 有的转染 1 次, 盲传 2 次就能出现病变, 而有的重复转染数 10 次, 也不出现病变。这可能与细胞的状态、DNA 与脂质体的结合状态等因素有关。

3.6 重组 CAV2-ΔE3-Rgp 病毒表达 Rgp 的检测

利用 RT-PCR 检测结果表明, 重组 CAV2-ΔE3-Rgp 病毒在细胞内繁殖的过程中能够正确地转录 Rgp mRNA。通过 Western blot 检测, 表明重组 CAV2-ΔE3-Rgp 病毒在细胞内繁殖的过程中能够正确地表达 Rgp, 并具有良好的反应原性。利用重组病毒免疫犬 3 次后, 所采集的犬血清抗腺病毒抗体 HI 效价和抗狂犬病毒中和抗体效价都大于能够提供保护的抗体效价的最低水平, 可以作为犬科动物狂犬病毒腺病毒二联疫苗候选株。

参 考 文 献

- [1] Paolazzi CC, Perez O, De Filippo J. Rabies vaccine: Developments employing molecular biology methods. *Mol Biotechnol*, 1999, **11** (2): 137-147.
- [2] Kieny MP, Lathe R, Drillien R, et al. Expression of rabies virus glycoprotein from a recombinant vaccinia-virus. *Nature*, 1984, **312**

- [3] Prevec L , Campbell JB , Christie BS , *et al.* A recombinant human adenovirus vaccine against rabies. *J Infect Dis* , 1990 , **161**(1) : 27 – 30.
- [4] Hanlon CA , Niezgoda M , Hamir AN , *et al.* First North American field release of a vaccinia rabies glycoprotein recombinant virus. *J Wild Dis* , 1998 , **34**(2) : 228 – 239.
- [5] 殷 震 , 刘景华主编. 动物病毒学(第二版). 北京 : 科学出版社 , 1997 : 777 – 794 , 1113 – 1116.
- [6] 谢之景 , 夏咸柱 , 扈荣良 , 等. 表达犬细小病毒 VP2 蛋白重组犬 2 型腺病毒的构建及鉴定. 病毒学报 , 2006 , **22**(3) : 214 – 219.
- [7] 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.
- [8] Sambrook J , Russell DW. 分子克隆实验指南. 第三版. 黄培堂 , 等译校. 北京 : 科学出版社 , 2002 : 387 – 396 , 1713 – 1724.
- [9] Shimagawa M , Massuda A , Ishiyama T , *et al.* A rapid and simple method for preparation of adenovirus DNA from infected cells. *Microbiol Immunol* , 1983 , **27**(9) : 817 – 822.
- [10] Cliquet F , Aubert M , Sagne L. Development of a fluorescent antibody virus neutralization test (FAVN test) for the quantitation of rabies neutralising antibody. *J Immunol Methods* , 1998 , **212**(1) : 79 – 87.
- [11] 夏咸柱 , 范泉水 , 胡贵学 , 等. 犬 2 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.
- [12] Fischer L , Tronel JP , 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 – 30) : 3485 – 3497.
- [13] Uvenne P , Hamelin C. Comparative analysis of the canAV-1 and canAV-2 genomes. *Intervirology* , 1986 , **26**(1 – 2) : 109 – 114.
- [14] Kremer EJ , Boutin S , Chillon M , *et al.* Canine adenovirus : an alternative for adenovirus-mediated gene transfer. *J Virol* , 2000 , **74**(1) : 505 – 512.
- [15] 闫 芳 , 夏咸柱 , 扈荣良 , 等. 表达犬瘟热病毒 H 基因的重组犬 2 型腺病毒的构建与鉴定. 中国兽医学报 , 2004 , **24**(5) : 425 – 428.

Construction and identification of recombinant canine adenovirus type 2 expressing exogenous rabies glycoprotein (Rgp)

ZHAO Zhong-peng , XIA Xian-zhu * , HU Rong-liang , XIE Zhi-jiang , YAN Fang

(Institute of Military Veterinary , Academy of Military Medical Science , Changchun 130062 , China)

Abstract Safe and effective vaccination is important for rabies prevention. Here , genetically engineered rabies vaccine CAV2- Δ E3-Rgp was developed and characterized. The recombinant genome pPoly2-CAV2- Δ E3-Rgp carrying the rabies glycoprotein (Rgp) cDNA was generated by a series of strictly gene cloning steps and infectious recombinant virus CAV2- Δ E3-Rgp was obtained by transfecting the recombinant genome into a canine kidney cell line , MDCK. To efficiently construct cloned recombinant canine adenovirus type 2 genome pPoly2-CAV2- Δ E3-Rgp bearing exogenous Rgp gene , The Rgp gene was first subcloned from the clone vector pMD18-T into the eukaryon expression vector pVAX1. The Rgp expression cassette was then subcloned into the shuttle vector pVAX Δ E3 and subsequently into the canine adenovirus type 2 backbone vector pPoly2-CAV2. To indirectly confirm pPoly2-CAV2- Δ E3-Rgp , conventional restriction endonuclease digestion was performed. CAV2- Δ E3-Rgp can generate typical CPE of CAV-2. CAV2- Δ E3-Rgp was tested by restriction endonuclease digestion , PCR , DNA sequencing. As a result , The Rgp expression cassette was successfully integrated into the target region of the CAV2 genome. It is confirmed by RT-PCR , Western blot that CAV2- Δ E3-Rgp can express Rgp antigen in MDCK cell. This recombinant virus , CAV2- Δ E3-Rgp , was intramuscularly injected into dogs. All vaccinated dogs produced effective antibodies against CAV and RV after three inoculations. This recombinant virus would be prospective in immunizing dogs against CAV and RV.

Keywords : rabies ; Canine adenovirus type 2 (CAV-2)

Foundation item : The 10th Five Army Medicine and Health Key Project (Z2001095) ; Chinese National Programs for Science and Technology Development (2004BA519A48)

* Corresponding author. Tel : 86-431-6985518 ; E-mail : xia _ xzh@yahoo . com . cn

Other authors : HUANG Geng , YANG Song-tao

Received : 10 July 2006 / Accepted : 6 September 2006 / Revised : 13 November 2006 © 中国科学院微生物研究所期刊联合编辑部 <http://journals.im.ac.cn>