

裂谷热病毒囊膜蛋白基因 DNA 免疫的研究

王清华^{1,2}, 王喜军¹, 胡 森¹, 葛金英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 中国检验检疫科学研究院 北京 100025)

摘 要 : 分别将裂谷热病毒(Rift Valley Fever Virus, RVFV)囊膜糖蛋白(GN, GC 和 G(N+C))基因亚克隆至真核表达载体 pCAGGS 多克隆位点鸡 β -actin 转录启动子下游, 分别构成 pCAGG-RVFV-GN、pCAGG-RVFV-GC 和 pCAGG-RVFV-G(N+C)。免疫沉淀试验结果表明, 重组 RVFV 蛋白 GN、GC 分别在 pCAGG-RVFV-GN、pCAGG-RVFV-G(N+C) 转染 HeLa 细胞中获得表达, 并具有良好免疫反应性。pCAGG-RVFV-GN、pCAGG-RVFV-GC 和 pCAGG-RVFV-G(N+C) 质粒 DNA 混合物按 100 μ g/只剂量肌肉注射免疫 6 周龄 BALB/c 小鼠。每隔 4 周用相同的剂量加强免疫, 第二次加强免疫 3 周后采血、分离血清备用。分别以杆状病毒表达 RVFV 囊膜蛋白 GN、GC 制备的抗原液包被 ELISA 板, 间接 ELISA 检测 DNA 免疫鼠血清中 RVFV 囊膜蛋白 G(N+C) 特异性抗体, 具有良好的敏感性和特异性。另外, DNA 免疫鼠血清中的特异抗体可有效中和 RVFV 囊膜蛋白 G(N+C) 介导的伪型 VSV 重组病毒侵入 RVFV 易感宿主细胞的感染性。结果表明, pCAGG-RVFV-GN、pCAGG-RVFV-GC 和 pCAGG-RVFV-G(N+C) 质粒 DNA 混合物作为 DNA 疫苗具有防制裂谷热的潜力。

关键词 : 裂谷热病毒; 囊膜蛋白; DNA 免疫

中图分类号: Q78; Q93 文献标识码: A 文章编号: 0001-6209(2007)04-0677-05

裂谷热(Rift Valley Fever)是由裂谷热病毒(Rift Valley Fever Virus, RVFV)引起的一种最急性或急性的人畜共患传染病, 宿主广泛, 主要流行于非洲反刍动物。RVFV 为虫媒传播, 病毒可在蚊卵内存活几十年。洪水泛滥或蚊虫活动旺盛的季节易暴发本病, 流行周期不确定, 每次暴发均引起严重的社会经济损失, 且流行后极难根除。人类对 RVFV 易感, 症状类似流行性感, 严重的可导致死亡。在一些动物宿主较少的国家, 通过媒介蚊虫叮咬感染人是其显著特征, 在这样的地区首先可能会在人群中发现 RVF。RVF 可引起实验室工作人员的严重病症, 处理病料时应备有高级别生物防护设施^[1,2]。

RVFV 属于布尼亚病毒科(Bunyaviridae)白蛉热病毒属(Phlebovirus)。RVFV 囊膜糖蛋白(G)是由 M 基因片段编码的, 翻译后修饰过程中裂解为两个蛋白(GN 和 GC 糖蛋白)^[3], 是病毒的主要免疫原结构蛋白。本研究分别构建了含有 RVFV 囊膜糖蛋白 GN、GC 和 G(N+C) 基因 cDNA 的真核表达质粒

pCAGG-RVFV-GN、pCAGG-RVFV-GC 和 pCAGG-RVFV-G(N+C), 其 DNA 混合物免疫 BALB/c 小鼠可诱导显著的 RVFV G 蛋白特异体液免疫反应, 产生的特异抗体能敏感、特异的检测出杆状病毒表达的 RVFV GN 和 GC 囊膜蛋白, 并可有效中和 RVFV 囊膜糖蛋白 G(N+C) 介导的伪型 VSV 重组病毒侵入 RVFV 易感宿主细胞的感染性。结果表明, pCAGG-RVFV-GN、pCAGG-RVFV-GC 和 pCAGG-RVFV-G(N+C) 质粒 DNA 混合物作为 DNA 疫苗具有防制裂谷热的潜力, 为 DNA 疫苗防制裂谷热的探索研究奠定了基础。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 质粒 : RVFV(ZH501 株) M 基因 cDNA 克隆质粒 pBlue-RVFV-GN(M 节段第 418-1943bp + TAA), pBlue-RVFV-GC(GCCGCCACCATG + M 节段第 2043bp-3613bp), pcDNA1.1-RVFV-G(N+C) M 节段

基金项目: 国家“攻关”项目(人类功能基因组研究)(2004BA519A19, 2005BA711A10); 国家“973”项目(2005CB523200); 国家科技支撑计划项目(2006BAD06A00)

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

作者简介: 王清华(1979-), 女, 山东人, 硕士, 主要从事外来疫病诊断与免疫防制技术的研究。E-mail: wangqinghua215@yahoo.com.cn

其他作者: 林祥梅³

收稿日期: 2006-11-10; 接受日期: 2007-01-04; 修回日期: 2007-03-01

第 302 ~ 3884bp) GN、GC 分别克隆于 pBluescriptIIKS (Stratagene) Sma I 位点, G(N+C) 克隆于 pcDNA1.1 BamH I 和 EcoR I 位点之间) 质粒 pSP72 (Promega) pET-30a(+) 由本实验室保存。真核表达载体 pCAGGS 由 Y. Kawaoka 博士提供。用于制备 VSVΔG*GFP 的重组型 VSV 基因组 cDNA 克隆质粒 pVSVΔG*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 M. Witte 博士提供。

1.1.2 病毒株: 重组杆状病毒 rBac-RVFV-GN、rBac-RVFV-GC 由本实验室保存。VSVΔG*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, 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。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^[4,5]进行, 滴定后的病毒液 -70℃ 保存备用。

1.1.3 试剂: HPR 标记的山羊抗鼠 IgG 购自 Sigma 公司。

1.2 pCAGG-RVFV-GN、pCAGG-RVFV-GC 和 pCAGG-RVFV-G(N+C) 真核表达质粒的构建

首先以 BamH I 和 EcoR I 双酶切 pBlue-RVFV-GN、pBlue-RVFV-GC 和 pcDNA1.1-RVFV-G(N+C) 分别将 GN、GC、G(N+C) 基因亚克隆到 pSP72 上 构成 pSP72-RVFV-GN、pSP72-RVFV-GC 和 pSP72-RVFV-G(N+C); 再以 Xho I 和 Bgl II 双酶切 pSP72-RVFV-GN、pSP72-RVFV-GC 和 pSP72-RVFV-G(N+C), 分别将 GN、GC、G(N+C) 基因亚克隆到 pCAGGS 上 构成 pCAGG-RVFV-GN、pCAGG-RVFV-GC 和 pCAGG-RVFV-G(N+C) 真核表达质粒, 按照文献^[6]大量制备质粒。

1.3 免疫沉淀

按照文献^[7]采用转染试剂 Lipofectamine 2000, 分别将 2μg pCAGG-RVFV-GN、pCAGG-RVFV-GC 和 pCAGG-RVFV-G(N+C) 质粒 DNA 转染生长过夜、密度约 80% 的 HeLa 细胞, 5% CO₂ 37℃ 培养 24h 后, 去除培养液, 细胞用 PBS 洗 3 次, 加入无甲硫氨酸 (Met) 和半胱氨酸 (Cys) 的 DMEM 培养, 30min 后再加入 [³⁵S] 甲硫氨酸和 [³⁵S] 半胱氨酸标记混合液进行标记。6h 后, 弃去细胞培养上清, 用 PBS 4℃ 漂洗细胞 3 次, 加入 1mL PBS (含 1mg/mL NHSSS-Biotin) 4℃ 孵育 30min, 用细胞裂解液裂解细胞, 4℃ 12000 × g 离心 5min 取上清, 用抗原核表达 RVFV GN 蛋白片

段 (10 ~ 152aa) 小鼠血清与抗原核表达 RVFV GC 蛋白片段 (162 ~ 324aa) 小鼠血清的混合抗血清和蛋白 A 琼脂糖微球 (Pierce) 沉淀细胞裂解上清中的 RVFV GN 或 GC 蛋白, 4℃ 过夜。用细胞裂解液漂洗抗原-抗体-蛋白 A 琼脂糖微球复合物 3 次, 加入 10% SDS, 95℃ 水浴孵育 15min。再用抗生素琼脂糖微球沉淀解离的蛋白, 4℃ 作用 3h 后, 用细胞裂解液漂洗 3 次。蛋白样品中加入等体积 2 × SDS 上样缓冲液, 95℃ 作用 5min 后进行 SDS-PAGE 分析。电泳完毕后干燥凝胶, 进行放射自显影检测。

1.4 DNA 免疫小鼠实验

pCAGG-RVFV-GN、pCAGG-RVFV-GC 和 pCAGG-RVFV-G(N+C) 质粒 DNA 混合物 (按比例 1:1:1 混合) 和 pCAGGS 质粒 DNA 分别以 100μg/只剂量肌肉注射免疫 10 只 6 周龄 BALB/c 小鼠, 间隔四周以相同剂量加强免疫, 3 免 3 周后采血, 分离血清, 用于 ELISA 抗体及中和抗体检测^[8]。

1.5 间接 ELISA

重组杆状病毒 rBac-RVFV-GN 和 rBac-RVFV-GC 种毒液按 1:10 体积比感染新鲜制备 sf9 细胞, 72h 后 1000r/min 离心收获感染细胞, PBS 离心洗涤, 按原培养液 10% 体积加入 PBS 悬起细胞, 超声波加两次冻融裂解细胞, 离心后收获上清, 制备成抗原液。分别以 NaHCO₃ (pH9.6) 缓冲液 1:100 倍稀释上述抗原液, 按每孔 100μL 包被 96 孔 ELISA 板 4℃ 过夜, 含 5% 脱脂乳的 PBST (0.05% Tween20) 封闭, 1:50 倍稀释 DNA 免疫鼠血清为一抗, 另设相同稀释倍数 pCAGGS 免疫鼠血清为阴性对照, 1:2500 倍 PBST 稀释 HPR 标记的山羊抗鼠 IgG 为二抗, PBST 洗涤, 底物 OPD 作用 25min, 2mol/L 硫酸终止反应后, 测定 OD₄₉₀。每个血清稀释度至少设 3 个平行孔, 取平均值计算 P/N 值。

1.6 裂谷热糖蛋白囊膜嵌合 VSV 假病毒颗粒中和试验

用于替代 RVFV 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 RVFV 病毒糖蛋白 G(N+C) 嵌合 (psudotyped) 重组病毒 VSVΔG*RVFV-G 按文献^[4], 5 制备并滴定。血清中和试验参照文献^[9]进行。

2 结果

2.1 pCAGG-rvfv-GN、pCAGG-rvfv-GC、pCAGG-rvfv-G(N+C) 构建与鉴定

将 pBlue-RVFV-GN、pBlue-RVFV-GC、pcDNA1.1-

RVFV- α N + C 载体上 RVFV GN、GC、 α N + C 基因亚克隆到真核表达载体 pCAGGS 上,构成 pCAGG-RVFV-GN、pCAGG-RVFV-GC 和 pCAGG-RVFV- α N + C)。Xho I 和 Bgl II 双酶切、琼脂糖凝胶电泳鉴定真核表达载体 pCAGG-RVFV-GN 和 pCAGG-RVFV-GC, 消化分别得到大小约为 4700bp、1550bp 两个片段和 4700bp、1600bp 两个片段,与预期结果相符。用 Sac I、Xba I 分别单酶切、琼脂糖凝胶电泳进行鉴定 pCAGG-RVFV- α N + C), Sac I 消化得到大小约为 6000bp、1230bp、1000bp 3 个片段, Xba I 消化得到大小约为 5800bp、2400bp 两个片段,与预期结果相符。

2.2 免疫沉淀

为了检测 RVFV 蛋白 GN、GC 的表达及其基因 DNA 的免疫反应原性,采用脂质体介导的方法分别将适量的 pCAGG-RVFV-GN 和 pCAGG-RVFV- α N + C)质粒 DNA 转染 HeLa 细胞,用放射性元素和生物素标记细胞后,以原核表达的 RVFV 蛋白片段 GN 和 GC 免疫鼠血清和蛋白 A 琼脂糖微球沉淀抗原,再进行 SDS-PAGE 分析、放射自显影。以 pCAGG-RVFV-GN 转染的 HeLa 细胞进行免疫沉淀反应,显示出特异的 60kDa 检测蛋白,与 GN 蛋白的理论值相符(图 1);以 pCAGG-RVFV- α N + C)转染的 HeLa 细胞进行免疫沉淀反应,显示出特异的 60kDa 和 65kDa 检测蛋白,与 GN 和 GC 蛋白的理论值相符(图 1)。结果表明, RVFV 蛋白 GN 和 GC 在 pCAGG-RVFV-GN 和 pCAGG-RVFV- α N + C)质粒 DNA 转染的 HeLa 细胞中获得有效表达。

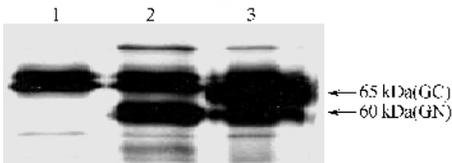


图 1 免疫沉淀检测重组真核表达质粒瞬时表达 RVFV GN 和 GC 蛋白

Fig.1 Expression of RVFV GN and GC protein in transient. HeLa cells were transfected with the DNA constructs encoding RVFV GN and α N + C) by using Lipofectamine 2000. At 24h posttransfection, the cells were labeled with [³⁵S]Met-Cys labeling mix for 6h, followed by surface biotinylation and immunoprecipitation as described in Materials and Methods. Protein samples were prepared and analyzed by SDS-PAGE and the radioautography. 1. Plasmid vector pCAGGS; 2. pCAGG-RVFV-GN; 3. pCAGG-RVFV- α N + C)。

2.3 间接 ELISA 检测 RVFV 囊膜蛋白基因 DNA 免疫鼠血清特异抗体

为测试 RVFV 囊膜蛋白基因 DNA 的免疫原性,分别以重组杆状病毒 rBac-RVFV-GN 和 rBac-RVFV-GC 感染 s9 细胞裂解物制备的抗原液包被 96 孔酶标板,检测 DNA 免疫鼠血清中 RVFV 囊膜蛋白 α N

+ C 特异性抗体。重组杆状病毒 rBac-RVFV-GN 表达 RVFV GN 蛋白(rGN)为包被抗原,50 倍稀释 DNA 免疫鼠血清为被检一抗的 OD₄₉₀ 平均值为 0.151, pCAGGS 免疫鼠血清为被检一抗的 OD₄₉₀ 平均值为 0.009, P/N 值为 16.78(图 2);重组杆状病毒 rBac-RVFV-GC 表达 RVFV GC 蛋白(rGC)为包被抗原,50 倍稀释 DNA 免疫鼠血清为被检一抗的 OD₄₉₀ 平均值为 0.078, pCAGGS 免疫鼠血清为被检一抗的 OD₄₉₀ 平均值为 0.011, P/N 值为 7.09(图 2)。

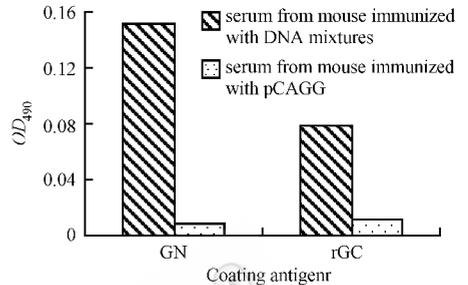


图 2 间接 ELISA 检测 DNA 免疫小鼠血清 G(N + C) 蛋白特异性抗体

Fig.2 Antibody response to DNA immunization with the mixture of pCAGG-RVFV-GN, pCAGG-RVFV-GC and pCAGG-RVFV- α N + C). Mice were bled at 3weeks post third immunization and the serums were 1 : 50 diluted for ELISA assay with recombinant baculoviruses expressing G(N + C) protein as coating antigen.

2.4 血清中和试验检测 RVFV 囊膜蛋白基因 DNA 免疫小鼠血清特异中和抗体

RVFV 的 α N + C)囊膜蛋白介导伪型重组病毒 VSV Δ G* RVFV-G 侵入敏感宿主细胞的过程完全模拟了 RVFV 本身感染、侵入宿主细胞的过程,因而

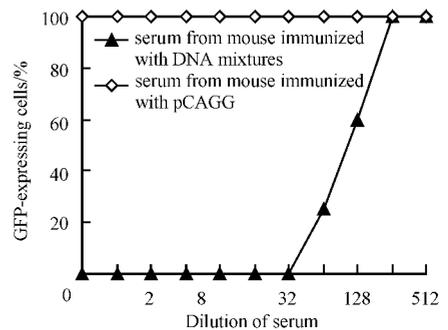


图 3 DNA 免疫鼠血清的中和曲线

Fig.3 Neutralization curves of serum from mouse immunized with DNA mixtures of pCAGG-RVFV-GN, pCAGG-RVFV-GC and pCAGG-RVFV- α N + C). 1×10^4 IU VSV Δ G* RVFV-G was added at each step of a serial twofold dilution of heat-inactivated DNA immunized mouse serum (\blacktriangle) 30min at 56 $^{\circ}$ C. in triplicate wells. After incubation for 1 hour at 37 $^{\circ}$ C, these mixtures containing 1×10^4 IU VSV Δ G* RVFV-G were added to the rinsed Vero E6 monolayers. Serum from pCAGGS immunized mouse(\diamond) were included in each test as controls. The GFP-expressing cells were counted at 24h post-transfection under a fluorescence microscope. The neutralizing titres were expressed as the reciprocal of the highest serum dilution that gave 80% reduce of the

VSV Δ G* RVFV-G 可替代高度生物安全危险的天然的 RVFV 用于中和试验。试验结果表明,表达 RVFV GN、GC 和 α (N+C) 囊膜蛋白的重组真核表达质粒 pCAGG-RVFV-GN、pCAGG-RVFV-GC 和 pCAGG-RVFV- α (N+C) DNA 混合物免疫小鼠可诱导显著的特异抗体反应,产生的抗体能显著有效中和 RVFV 囊膜蛋白 α (N+C) 介导的伪型 VSV 重组病毒侵入 RVFV 易感宿主细胞的感染性,DNA 免疫鼠血清完全阻断 1×10^4 IU 的伪型病毒 VSV Δ G* RVFV-G 的感染性的有效稀释倍数 32 倍以上,pCAGGS 免疫小鼠血清则完全不能阻断伪型病毒 VSV Δ G* RVFV-G 的感染性(图 3)。

3 讨论

本研究成功构建了表达 RVFV 囊膜糖蛋白 GN、GC 和 α (N+C) 的重组真核表达质粒 pCAGG-RVFV-GN、pCAGG-RVFV-GC 和 pCAGG-RVFV-G(N+C)。免疫沉淀试验结果表明,重组 RVFV 蛋白 GN、GC 在 pCAGG-RVFV-GN 和 pCAGG-RVFV-G(N+C) 质粒 DNA 转染的 HeLa 细胞中获得表达,同时 RVFV 蛋白 α (N+C) 基因表达的前体蛋白 G 可有效的裂解为蛋白 GN 和 GC,且具有良好的免疫反应性。间接 ELISA 和中和试验结果表明,pCAGG-RVFV-GN、pCAGG-RVFV-GC 和 pCAGG-RVFV-G(N+C) 质粒 DNA 混合物免疫可诱导显著的 GN 和 GC 囊膜糖蛋白特异体液免疫反应及阻断 RVFV 囊膜蛋白 α (N+C) 介导的伪型 VSV 重组病毒侵入 RVFV 易感宿主细胞的中和抗体的形成。

布尼亚病毒的囊膜糖蛋白是由 M mRNA 编码的,所有的病毒均具有一个连续的阅读框架,编码糖蛋白的前体,再裂解为两种糖蛋白(GN 和 GC);囊膜糖蛋白的主要功能是与细胞表面的受体结合。在布尼亚病毒侵入宿主细胞的过程中,首先是病毒的一种或两种囊膜糖蛋白介导病毒与细胞结合,再通过病毒囊膜与细胞膜融合过程或细胞对病毒粒子的吞噬作用进入宿主细胞。由于布尼亚病毒缺乏基质蛋白,所以糖蛋白对病毒粒子的成熟和释放具有重要作用。

RNA 病毒囊膜糖蛋白对病毒与宿主细胞受体结合、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异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 RVFV 存在,客观条件不允许引进或操作 RVFV 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 RVFV 功能囊膜蛋白 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 RVFV 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 RVFV 的致死性攻击形成免疫保护^[12]。研究表明 RVFV 的 GN 和 GC 蛋白一样,均能刺激机体产生抗体,而我们以重组杆状病毒表达 RVFV 囊膜糖蛋白 GN 和 GC 作为包被抗原检测 DNA 免疫血清的间接 ELISA 也表明 GN 和 GC 蛋白均能在体内诱导抗体产生,且 GN 囊膜蛋白诱导的 ELISA 抗体滴度高于 GC 蛋白。但在体内只有 GN 蛋白诱导形成中和抗体。本研究采用含有 RVFV 囊膜蛋白基因的真核表达质粒 DNA,渴望 DNA 疫苗能够诱导有效的特异性细胞免疫和体液免疫能力,为探讨 DNA 疫苗防制裂谷热的可行性提供重要免疫试验模型,同时也为 RVFV 囊膜糖蛋白的结构与功能研究提供重要的研究工具。

参 考 文 献

- [1] Rice RM, Erlick BJ, Rosato RR, et al. Biochemical characterization of Rift Valley Fever virus. *Virology*, 1980, **105**(1): 256-260.
- [2] Collett MS, Purchio AF, Keegan K, et al. Complete nucleotide sequence of the M RNA segment of Rift Valley Fever virus. *Virology*, 1985, **144**(1): 228-245.
- [3] Bishop DH, Calisher CH, Casals J, et al. Bunyaviridae. *Intervirology*, 1980, **14**(3-4): 125-143.
- [4] 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**(10): 5458-5465.
- [5] Takada A, Robison C, Goto H, et al. A system for functional analysis of Ebola virus glycoprotein. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1997,

- [6] Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T. 分子克隆实验指南. 金冬雁, 黎孟枫, 等译. 第二版. 北京: 科学出版社, 1993.
- [7] Bu Z, Ye L, Vzorov A, et al. Enhancement of immunogenicity of an HIV Env DNA vaccine by mutation of the Tyr-based endocytosis motif in the cytoplasmic domain. *Virology*, 2004, **328**(1): 62-73.
- [8] Herve M, Dupre L, Ban E, et al. Features of the antibody response attributable to plasmid backbone adjuvanticity after DNA immunization. *Vaccine*, 2001, **19**(31): 4549-4556.
- [9] 王喜军, 胡森, 葛金英, 等. 重组杆状病毒表达达尼帕病毒融合蛋白和受体结合蛋白的研究. *生物工程学报* 2006 **22**(3): 418-424.
- [10] Temperton NJ, Chan PK, Simmons G, et al. Longitudinally profiling neutralizing antibody response to SARS Coronavirus with Pseudotypes. *Emerg Infect Dis*, 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] Spik K, Shurtleff A, McElroy AK, et al. Immunogenicity of combination DNA vaccines for Rift Valley fever virus, tick-borne encephalitis virus, Hantaan virus, and Crimean Congo hemorrhagic fever virus. *Vaccine*, 2006 **24**(21): 4657-4666.

Study on DNA immune of envelope protein gene of Rift Valley Fever Virus

WANG Qing-hua^{1,2}, WANG Xi-jun¹, HU Sen¹, GE Jin-ying¹, 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 Chinese Academy of Inspection and Quarantine, Beijing 100025, China)

Abstract: DNA vaccines have successfully induced effective antibody and cellular immune response to many viral pathogens. The antibody response of DNA immunization induction in mouse model with envelope glycoproteins of Rift Valley Fever Virus (RVFV) (ΔN + C), GN and GC was investigated. For this purpose, three codon (ΔN + C), GN and GC gene were insert into mammalian expression vector pCAGGS under chicken β-actin promoter to construct pCAGG-RVFV-GN, pCAGG-RVFV-GC and pCAGG-RVFV-(ΔN + C). The expression of recombinant GN or / and GC protein in BHK cells transfected with pCAGG-RVFV-GC or pCAGG-RVFV-G (N + C) DNA were confirmed by immunoprecipitation. Six-week-old female BALB/c mice were intramuscularly primed with 100 μg pCAGG-RVFV-GN + pCAGG-RVFV-GC + pCAGG-RVFV-(ΔN + C), and boosted with same dose after 4 weeks. The serums were collected at 3 weeks post final boost. The serum IgG against Rift Valley Fever Virus (ΔN + C) protein were detect by indirect ELISA using recombinant Baculovirus expressed Rift Valley Fever Virus GN and GC glycoprotein. The mixture of pCAGG-RVFV-GN, pCAGG-RVFV-GC and pCAGG-RVFV-G (N + C) elicited much strong IgG response. For serum neutralization antibody assay, a recombinant Vesicular Stomatitis Virus pseudotype, in which the VSV envelope protein G gene was replaced with the green fluorescent protein gene (VSVΔG*G, Whitt M A) and complemented with Rift Valley Fever Virus (ΔN + C) glycoprotein expressed in transient (VSVΔG*RVFV-G), was use to replace the authentic Rift Valley Fever Virus. The mixture of pCAGG-RVFV-GN, pCAGG-RVFV-GC and pCAGG-RVFV-(ΔN + C) also induced high titer of neutralization antibody response. These result indicates that DNA immunization is an efficient vaccine strategy against Rift Valley Fever Virus.

Keywords: Rift Valley Fever Virus; envelope Protein; DNA immunization

Foundation item: Chinese National Programs for Science and Technology Development (2004BA519A19, 2005BA711A10); Major Project of Chinese National Programs for Fundamental Research and Development (2005CB523200); Key Technology of Chinese National Programs for Research and Development (2006BAD06A00)

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

Other author: LIN Xiang-mei³

Received: 10 November 2006/Accepted: 4 January 2007/Revised: 1 March 2007