

微生物学报 *Acta Microbiologica Sinica*
50(2):256-262; 4 February 2010
ISSN 0001-6209; CN 11-1995/Q
<http://journals.im.ac.cn/actamicrocn>

基于狂犬病病毒 G 蛋白 scFv 介导的靶向 shRNA 制备与鉴定

杨瑞梅^{1,2,3}, 崔燕¹, 杨松涛², 王承宇², 单虎³, 王化磊², 夏咸柱^{2*}

(¹甘肃农业大学动物医学院, 兰州 760030)

(²军事医学科学院军事兽医研究所, 长春军事兽医研究所, 长春 130062)

(³青岛农业大学动物科技学院, 青岛 266109)

摘要:【目的】探讨以狂犬病病毒 G 糖蛋白单链抗体介导的载体表达 shRNA 靶向制剂, 靶向抑制狂犬病毒复制的可行性。【方法】应用 PCR 技术获得狂犬病病毒 G 糖蛋白单链抗体 scFv(G) 和绿脓杆菌跨膜区-酵母 DNA 结合结构域 ETA-GAL4 基因, 通过搭桥 PCR 法获得 scFv(G)-ETA-GAL4(SEG) 嵌合基因; 克隆至原核表达载体 pET28a(+), 构建重组表达质粒 pET28a(+)-scFv(G)-ETA-GAL4(pET28a-SEG); 在大肠杆菌 BL21(DE3) 中经 IPTG 诱导表达, 利用镍柱亲和层析法纯化包涵体, 经复性、鉴定制得 SEG 蛋白; ELISA 法检测表达蛋白与狂犬病毒特异结合活性; 将 SEG 蛋白与含 shRNA 的质粒(pRNATU6.3-shRNA) 连接制成靶向 shRNA, 接入 100 TCID₅₀ 狂犬病毒感染 BHK-21 细胞, 35 h 观察细胞中绿色荧光蛋白(GFP) 表达情况; 48 h 用直接免疫荧光抗体试验测定复合物抑制病毒效果。【结果】克隆得到 1557 bp 的 SEG 蛋白编码基因, 大肠杆菌中成功表达 57 KDa 的 SEG 蛋白, 能与抗 His 的单克隆抗体发生特异性反应, SEG 蛋白经镍柱纯化、复性后得率为 2.8 mg/mL。ELISA 试验证明 SEG 蛋白在一定浓度范围内与 RV 结合呈正相关。细胞试验表明 GFP 在细胞内得到表达; 直接免疫荧光试验测定该复合物能抑制 76% 病毒复制。【结论】SEG 蛋白能与携带 shRNA 的质粒结合, 可运送该质粒至 RV 感染 BHK-21 细胞中, 抑制狂犬病毒的复制。

关键词: 狂犬病毒; 单链抗体; 绿脓杆菌外毒素跨膜区; 基因运送; shRNA

中图分类号: Q78 **文献标识码:** A **文章编号:** 0001-6209 (2010) 02-0256-07

狂犬病是危害严重的人兽共患传染病, 由弹状病毒科的狂犬病毒(Rabies virus, RV) 感染引起。在人主要由携带有病毒的犬咬伤而引起, 病死率几乎 100%^[1]。对带毒犬咬伤后主要采取高免血清注射, 接种疫苗和清洗伤口等暴露后处置措施。该方法在暴露后防制本病中起到重要作用, 但一旦狂犬病病毒性脑炎发生, 目前没有任何有效治疗方法。由于在发展中国家, 狂犬病仍是一个重要的社会公共问题^[2-3], 所以仍需有效药物对暴露后人群进行

预防或治疗。

Murphy 等^[4] 研究发现狂犬病毒可在入侵部位的肌肉细胞内增殖, 并指出这是 RV 从局部组织侵入神经组织之前的重要感染源, 且病毒在细胞内增殖时可引起感染细胞膜发生变化, 细胞膜上出现有病毒糖蛋白成分的新抗原, 中和性抗体可与这种新抗原发生特异性结合。Dietzschold 等^[5] 研究发现 RV 街毒感染后, 机体产生的有效抑制病毒的成分不能进入中枢神经系统, 不能对细胞内病毒产生作

基金项目: 国家“863”计划(2006AA02Z456); 农业公益性行业项目(200803014)

* 通信作者。Tel: +86-431-86985808; E-mail: Xia_xzhu@yahoo.com.cn

作者简介: 杨瑞梅(1975-), 女, 陕西长安人, 博士生, 研究方向为动物病原生物学与免疫学。E-mail: yrm.cc@163.com

收稿日期: 2009-10-16; 修回日期: 2009-11-26

用,以至于引起严重的神经症状。根据 RV 以上感染特性,我们猜想用 RV G 糖蛋白单链抗体特异识别病毒感染细胞并将治疗分子运送进入细胞中,以实现病毒的抑制。

RNA 干扰 (RNAi) 是近年来发现的短链双股 RNA 可高效阻断其互补 mRNA 转录的现象,该现象在包括人类在内的大多数物种体内广泛存在^[6],是研究基因功能、肿瘤治疗、抗病毒感染的新工具^[7]。目前 RNAi 技术在人免疫缺陷病毒 (HIV)、乙肝病毒 (HBV)、口蹄疫病毒 (FMDV) 等抗病毒感染方面的成功尝试,为预防和治疗病毒感染提供了新的工具^[8-10]。

一些细菌毒素能特异结合目标细胞表面受体,通过受体介导的细胞内摄作用进入细胞,同时能顺利逃逸内含体而运送生物活性蛋白质进入细胞质中。通过用抗体或自然配基代替毒素的细胞识别区域,使细菌毒素能够重新定向而作用特定细胞^[11]。目前,基因靶向治疗已成为药物投递的研究热点之一。国外应用单链抗体和绿脓杆菌外毒素跨膜区等形成嵌合蛋白,靶向性传递质粒进入乳腺癌细胞,已获得成功^[12]。但在病毒病治疗方面,尚无人进行此方面报道。本研究在该方法基础上,使用 RV G 糖蛋白单链抗体、绿脓杆菌跨膜区和酵母 DNA 结合结构域蛋白 GAL4 构成嵌合基因,表达蛋白后与表达 shRNA 的质粒载体结合,首次证实此复合物能有效识别感染细胞,并将 shRNA 带入细胞中抑制 RV 复制,为 RV 暴露后新型治疗药物的开发奠定基础。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 病毒、细胞、菌株:狂犬病毒 ERA 株 (TCID₅₀ = 10^{-5.66}/0.1 mL)、乳仓鼠肾细胞系 BHK-21、大肠杆菌 BL21 (DE3) 本实验室保存。

1.1.2 质粒:表达载体 pET28a (+) 为本实验室保存。质粒 PE40-GAL4-T 由本室构建。克隆载体 pMD18-T 载体购自 TakaRa 公司。

质粒 pRNATU6.3-shRNA: 含有 2 个 5luc 重复序列和针对 RV G 糖蛋白 shRNA 的表达载体 pRNATU6.3Hygro-shRNA (pRNATU6.3-shRNA) 由本室构建 (见图 1-A), 此质粒中增强型 CMV 启动子后为 U6 启动子, 启动 shRNA 转录, 其后为普通 CMV 启动子表达的 GFP, 当观察到绿色荧光蛋白, 可判断质粒已转入细胞, 并且启动了 shRNA 的转录。在载体的 Hygro 基因处插入 2 个 5luc 序列, 可

实现与 GAL4 蛋白结合。其中 shRNA 序列为 RV G 蛋白 ORF 第 937 位的 shRNA (下划线部分为茎环部序列): G1a: 5' - GATCCGTCAGTGAGTTTCAGACGTTCAAGAGAACGTCTGAACTCACTGACTTTTTTGGAAA - 3'; G1b: 5' - AGCTTTTCCAAAAAATCAGGTCTCAGGAGTTGACTCTCTTGAAGTCAACTCCTGAGACCTGACG - 3'。

1.1.3 主要试剂和仪器:Taq DNA 聚合酶、各种限制性内切酶和连接酶、DNA 分子 Marker、PrimeSTAR HS DNA polymerase 为 TakaRa 公司产品; 胶回收试剂盒、质粒小量抽提试剂盒购自 Axygen 生物技术 (杭州) 有限公司。山羊抗小鼠 IgG-HRP 购自博士德生物工程有限公司; 抗 6His 标签鼠单抗购自北京普利莱基因技术有限公司; 兔抗绿脓杆菌外毒素多抗由本室制备; HRP-羊抗兔购自北京鼎国生物有限公司。镍离子金属螯合柱 His-Trap HP 1 ml 购自 GE Healthcare 公司; 硝酸纤维素膜 (NC 膜) 购自 Amersham 公司。DMEM、脂质体 Lipofectamine 2000 购自 Invitrogen 公司; 胎牛血清为奥地利 PAA 公司产品; 多聚赖氨酸溴化氢 pL236 购自 Sigma 公司。

1.1.4 引物:根据扩增序列 RV G 单链抗体 (scFv)、PE40-GAL4 核苷酸序列设计两对引物扩增目的序列。P1: 5'-CCATGGATATTGTGTTGACACAGTCCTAT-3' 含 NcoI 酶切位点, P2: 5'-TTCATGTCGGCGTTGGCCGC-3'; P3: 5'-CCGACATGAAGCTACTGTCTTCTATCGAACAAG-3', P4: 5'-AAGCTTCA GTTCATCTTTTCGATACAGTCAAGCAGC-3' 含 Hind III 酶切位点。引物合成由 TaKaRa 公司完成。

1.2 scFv(G)-ETA-GAL4 嵌合蛋白基因的构建

由 GenBank 登录号 (AY192962, AY172958) 获得人源化 scFv(G) 的单链抗体基因, 由大连 TaKaRa 公司合成并连入 simple pMD18-T 载体中获得 scFv(G)-T。用引物 P1P2 扩增, 电泳回收, 获得 scFv(G) 基因片段; 用引物 P3P4 从质粒 PE40-GAL4-T 扩增获得 ETA-GAL4 片段, 胶回收后用 scFv(G) 和 ETA-GAL4 为模板用 P1P4 引物, PrimeSTAR HS DNA polymerase 扩增, 获得 scFv(G)-ETA-GAL4 (如图 1-B), 反应条件: 预变性 98℃ 3 min; 95℃ 40 s, 55℃ 40 s, 72℃ 1 min 20 s, 共 30 个循环; 反应后延伸 72℃ 10 min; 加 A 尾后连于 simple pMD18-T 载体, 酶切鉴定正确后, 经 NcoI、HindIII 双酶切处理后, 连于 pET28a (+) 载体, 然后进行 PCR 和酶切鉴定, 阳性质粒送 TaKaRa 公司测序。测序鉴定正确的阳性重组质粒命名为 pET28a-SEG。

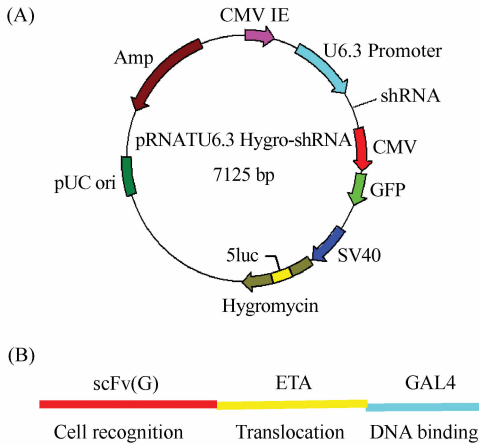


图1 质粒 pRNATU6.3-shRNA 和 SEG 蛋白结构示意图

Fig. 1 Schematic map of recombinant plasmid pRNATU6.3-shRNA and SEG protein. (A): Schematic map of recombinant plasmid pRNATU6.3-shRNA. (B): Schematic representation of chimeric multidomain carrier proteins SEG.

1.3 scFv(G)-ETA-GAL4 蛋白表达、纯化

将 pET28a-SEG 转化表达菌 BL21 (DE3), 挑取单菌落于 LB 培养基中 37℃ 过夜, 次日按 1:100 转接, 37℃ 培养至 OD_{600} 值达 0.6-0.8, 加入终浓度 1 mmol/L IPTG, 37℃ 诱导 5 h; 离心收集菌体。按常规方法进行 12% SDS-PAGE, 观察蛋白表达结果。对表达大小正确的蛋白, 250 mL 扩大培养后, 收集包涵体, 过镍离子金属螯合预装柱 HisTrap HP 收集样品峰, SDS-PAGE 观察回收蛋白纯度, 透析复性, PEG20000 浓缩后获得复性蛋白。经 Bradford 法定量纯化的 SEG 蛋白浓度。

1.4 scFv(G)-ETA-GAL4 纯化蛋白鉴定

1.4.1 Western blotting: SDS-PAGE 分离后, 采用电转移装置, 恒流 32 mA, 12.5 h, 将电泳后凝胶上的蛋白成份转移到硝酸纤维素膜上, 4% 脱脂牛奶封闭, 以抗 His 标签单抗为一抗, HRP-羊抗鼠抗体为二抗, DAB 显色。

1.4.2 ELISA 法鉴定 SEG 蛋白与 RV 结合特异性: 狂犬病毒 ERA 株细胞毒 ($TCID_{50} = 10^{-5.66}/0.1$ mL) 5 倍稀释后每孔 100 μ L 包被 96 孔板, 4℃ 过夜; SEG 纯化蛋白 0.28、2.8、28、70、280、700、2800 nmol/L 浓度分别加入孔中, 每个稀释度 6 个重复, 然后一抗加入 200 倍稀释兔抗绿脓杆菌外毒素多抗, 二抗加入 5000 倍稀释 HRP-羊抗兔 IgG。

1.5 scFv(G)-ETA-GAL4 与质粒 pRNATU6.3-shRNA 最佳结合比例测定

终浓度为 4 nmol/L 质粒 pRNATU6.3-shRNA 分

别与 80、40、20、8 nmol/L 的 SEG 融合蛋白在缓冲液中室温作用 15 min, 溶于 50 mmol/L HEPES pH7.5, 50 mmol/L KCl, 100 μ mol/L $ZnCl_2$, 5 mmol/L $MgCl_2$ 的缓冲液中。为便于 Pr-DNA 聚合, 200 nmol/L 多聚赖氨酸溴化氢 (pL236) 缓慢加入上述混合液中, 室温再作用 15 min。凝胶阻滞试验观察结果。

1.6 SEG 蛋白与 pRNATU6.3-shRNA 载体复合物对病毒感染细胞的作用

1.6.1 SEG 蛋白转运 pRNATU6.3-shRNA 质粒进入病毒感染细胞检测: BHK21 细胞 2×10^5 /孔接入 24 孔板中, 16 h 后接入 100 $TCID_{50}$ RV ERA 株, 8 h 后细胞用无血清无双抗 DMEM 洗 3 次; 将 5、10、20、50、100、500、1000、1500 nmol/L 质粒, 以质粒: SEG 蛋白: PL236 为 1:5:50 摩尔比与 SEG 蛋白按 1.5 方法形成复合物, 加入细胞孔中; 35 h 后, 荧光显微镜观察 GFP 表达情况。

1.6.2 SEG/pRNATU6.3-shRNA 复合物抑制病毒复制检测: 再在上述细胞中, 于接毒后 48 h 用直接免疫荧光法检测病毒含量变化, 具体操做如下: 单层细胞弃培养基后, 以 80% 丙酮溶液室温固定 30 min, 倾去丙酮, 自然风干约 10 min; 以 PBS 稀释抗 RV 核蛋白的荧光抗体, 加入终浓度 0.01% 的伊文思蓝, 37℃ 温育 1 h 后, 以 PBS 浸洗 3 次, 每次 3 min; 滴加少量缓冲甘油 (以 pH9.0 的碳酸盐缓冲液配制的 80% 甘油溶液) 后荧光显微镜下观察, 200 \times 紫外视野下, 每孔随即选取 20 个视野, 以数码相机拍照, 在 Photoshop 软件辅助下计数有荧光染色的细胞数目, 以每孔 20 个视野荧光细胞的平均数作为病毒增殖的定量指标, 以待检细胞与病毒对照细胞荧光细胞数目的百分比作为 RNA 干扰效果的定量评价指标, 利用公式 $(1 - \text{加入复合物细胞染毒比率} / \text{病毒对照细胞染毒比率}) \times 100\%$ 作为该加入复合物细胞对狂犬病毒复制的抑制率^[13]。

2 结果和分析

2.1 scFv(G)-ETA-GAL4 原核表达载体的构建与鉴定

用 P1P2 引物从载体 scFv(G)-T 扩增出 776 bp scFv(G) 片段; 用 P3P4 引物从载体 PE40-GAL4-T 上扩增出 ETA-GAL4 片段; 将二者用搭桥 PCR 法获得 SEG (1557 bp)。将 SEG 连入 pET28a 后, 酶切鉴定正确, 测序后结果证实质粒中插入片段为 SEG 的序列, 可用于 SEG 蛋白的表达试验。

2.2 SEG 表达产物 SDS-PAGE 鉴定

SDS-PAGE 电泳结果显示,在约 57 kDa 处出现特异性目的条带,大小与预期相符,而 pET28a 空载体对照无此特异性条带;利用 Bandscan 软件分析目的蛋白的表达量在 41% 左右。过镍离子金属螯合预装柱纯化后,获得纯化的蛋白(图 2-A)。Bradford 法测得纯化蛋白浓度为 2.8 mg/mL。

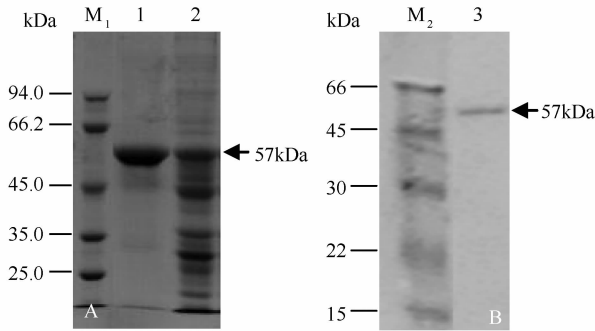


图 2 SEG 在大肠杆菌中表达及蛋白免疫印迹鉴定

Fig. 2 Test of recombinant fusion protein SEG by SDS - PAGE (A) and Western blot (B) analysis. 1. purified SEG; 2. Crude extract of *E. coli* BL21 (DE3) /pET28a (+) - SEG; 3. Western blot analysis of expression of SEG in BL21 (DE3), a 57 KDa band of SEG; M₁. Protein molecular weight markers; M₂. Pre - stained protein

2.3 scFv(G)-ETA-GAL4 纯化蛋白特异性鉴定

2.3.1 Western blot 结果: Western blot 结果表明,表达 SEG 蛋白能与抗 6His 单克隆抗体在 57 kDa 处发生特异性显色反应(图 2-B)。

2.3.2 ELISA 结果: 使用 ELISA 法检测 SEG 蛋白与狂犬病毒结合活性。用不同浓度 SEG 分别加入到 96 孔板,试验测得两者结合活性如图 3 所示,在 SEG 蛋白浓度 2.8 - 1000 nmol/L 范围内,SEG 与 RV 结合成正相关,表明 SEG 蛋白与 RV 有特异结合作用。

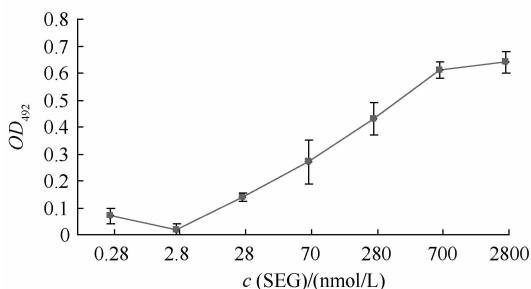


图 3 ELISA 试验分析 SEG 与狂犬病毒的特异性结合

Fig. 3 The SEG specific binding of RV analyzed in an ELISA experiment.

2.4 SEG 蛋白与质粒 pRNATU6.3-shRNA 最佳比例测定结果

用凝胶阻滞试验测定质粒 pRNATU6.3-shRNA 与 SEG 蛋白最佳比例,结果如图 4,当二者比例 1:20、1:10、1:5 时能完全阻滞质粒移动,使其处在凝胶加样孔中;1:2 时部分质粒移动到琼脂中。所以选质粒:蛋白质为 1:5 摩尔比为二者最佳比例。

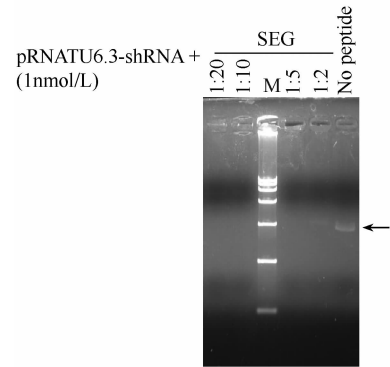


图 4 凝胶阻滞试验检测融合蛋白 SEG 与质粒 pRNATU6.3-siRNA 的特异性结合

Fig. 4 The ability of the SEG protein to bind to plasmid pRNATU6.3-siRNA used gel retardation analysis. M. DL15000 DNA Marker. The band of plasmid pRNATU6.3-siRNA is indicated as arrow.

2.5 SEG 蛋白与质粒 pRNATU6.3-shRNA 复合物接入病毒感染细胞结果

2.5.1 BHK-21 细胞中 GFP 观察: 根据 2.4 结果,选终浓度为 5 nmol/L SEG 蛋白、1 nmol/L 质粒 pRNATU6.3-shRNA、50 nmol/L pL₂₃₆ 作为三者最适比例室温作用后,加入病毒感染 8 h 后的 BHK-21 细胞中,35 h 后,荧光显微镜下观察,RV 感染细胞有亮绿色荧光(图 5-A);未加病毒细胞没有 GFP(图 5-B);脂质体转运质粒作为阳性对照有 GFP 表达(图 5-C),说明 SEG-pRNATU6.3-shRNA 能识别病毒感染 BHK-21 细胞,不识别非感染细胞。

2.5.2 直接免疫荧光抗体检测结果: 为了检测 SEG 将 shRNA 输入细胞后 shRNA 对病毒复制的抑制效果。接毒后 48 h,荧光抗体染色,加入复合物组(图 6-A)荧光灶数量比病毒对照组(图 6-B)明显减少;按公式计算对 RV 复制的抑制率,结果表明不同浓度复合物对 RV ERA 株的复制均有干扰作用(图 7),在加入质粒为 500 nmol/L、蛋白为 2500 nmol/L 时(即二者比例为 1:5 时),对病毒抑制率为 76%,表明此复合物对 RV 有明显抑制作用,且复合物中质粒浓度为 500 - 1500 nmol/L 时,其干扰作用无剂量效应关系。阳性对照组脂质体 Lipofectamine 2000 与 500 nmol/L 质粒复合物对病毒复制的抑制率最高,可达 89%。

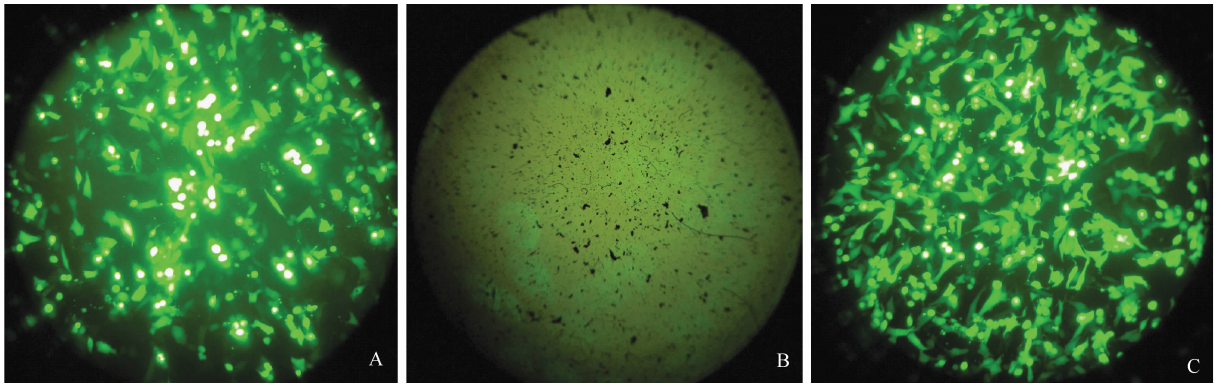


图5 SEG蛋白转运质粒进入感染细胞后GFP观察

Fig. 5 GFP expression in RV infected BHK-21 cell after SEG fusion protein mediates transfer of plasmid. A: RV infected BHK-21 cells. B: none viral infection BHK-21 cells. C: Lipofectamine 2000 + pRNATU6.3-shRNA.

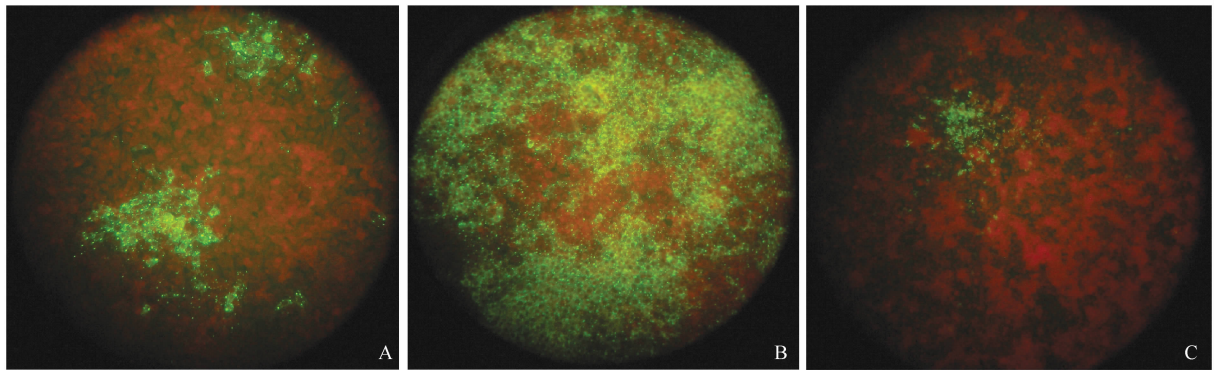


图6 直接免疫荧光抗体染色(DIF)检测RV增殖

Fig. 6 Replication of RV detected by DIF. A: 500 nmol/L SEG + 100 nmol/L pRNATU6.3-shRNA. B: RV control. C: Lipofectamine 2000 + 100 nmol/L pRNATU6.3-shRNA.

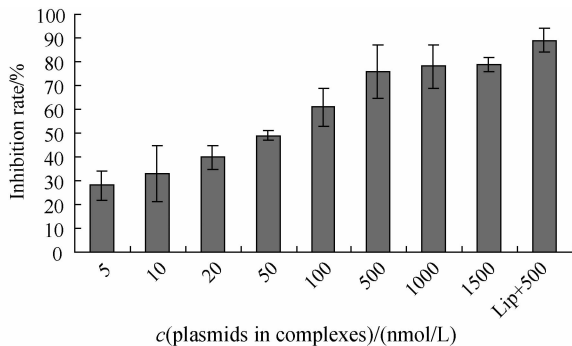


图7 不同浓度质粒 pRNATU6.3-shRNA 与 SEG 蛋白(1:5)复合物对 RV 复制的抑制作用

Fig. 7 Inhibition of RV replication by plasmid pRNATU6.3-shRNA and protein SEG (1:5) complexes at different concentrations. The inhibition rate percentage was determined by the averages of triplicate results \pm standard deviations.

3 讨论

siRNA 技术可用于有效抑制特定基因的表达,在基因功能研究和疾病治疗等方面已展现出广阔的应用前景,用 siRNA 技术抑制 RV 已成为可

能^[14-15]。由于 siRNA 进入细胞后只是抑制特定基因,而对细胞不产生任何损害,将其应用于暴露后早期肌肉周围注射治疗,或是后期神经细胞感染治疗中,应是一个理想方法。所以本研究选择针对狂犬病毒 G 糖蛋白的 shRNA 作为“弹头”,来抑制感染细胞内 RV 复制。

尽管非病毒载体的效率没有病毒载体高,但它的优点在于可实现细胞靶向性传递、不会产生病毒毒力增强而感染的危险、不限制携带 DNA 分子大小等。Fominaya^[12]、Barati^[16]、Uherek^[17] 等以单链抗体为识别部分,分别使用绿脓杆菌外毒素、破伤风毒素 C、白喉毒素结构构建基因靶向运载蛋白,实现质粒向癌症细胞、神经细胞等的转运。他们是以单链抗体为配体与癌症细胞或神经细胞表面特异受体之间结合来实现质粒运转;而本研究通过单链抗体和感染细胞表面出芽的病毒抗原的结合来实现靶向作用,本试验验证了此种靶向性传递是可行的。这与 Wen 等^[18] 的研究结果一致。另外本研究最显著的特点是将运送 siRNA 变为运送表达 shRNA 的质粒

进入细胞, 由于质粒易于提取, 可大量获得, 比 siRNA 成本低, 从而为实现产业化奠定基础。

试验中使用的单链抗体是针对 RV G 糖蛋白的, 它是由人源单克隆抗体 SO57 可变区序列进行人工合成而得到, SO57 单抗对 RV 固定株及街毒株的中和谱相当广泛^[19-20], 是一个研究最多的强效单抗。试验结果表明所合成的 scFv(G) 与 RV 特异结合, 显示了较好的识别病毒感染细胞能力。本研究用绿脓杆菌外毒素 252-366 位氨基酸来实现易位转运, 便于蛋白质内化、逃逸溶酶体和内含体作用而到达细胞质中; GAL4 蛋白部分能识别含 5luc 的 DNA 序列, 并对其有高度亲和性, 载体 pRNATU6.3-shRNA 含有 2 个 5luc 重复序列, 因此能与 GAL4 蛋白结合。本试验结果显示从哺乳动物、细菌、酵母来源的异源蛋白质装配在一起, 形成嵌合蛋白质 SEG, 能将质粒转运进入细胞中, 说明异源蛋白组合在一起, 仍然没有影响各自的功能, 这可能是由于三个蛋白区域分别各自折叠, 不受其它蛋白质区域影响, 从而保持各自功能。

总之, 本研究成功构建靶向狂犬病毒感染细胞并能将表达 shRNA 的质粒转入到细胞内的基因, 实现原核表达, ELISA 试验证明 scFv(G)-ETA-GAL4 蛋白能与狂犬病毒特异结合。BHK-21 细胞试验证明 SEG 能将含 shRNA 质粒传递进入细胞中, 并能明显抑制 RV 的复制。以上结果证明所表达的蛋白有良好生物学活性, 形成复合物后具有抗病毒能力, 从而为新型狂犬病靶向药物研发奠定基础。

参考文献

- [1] 俞永新. 狂犬病和狂犬病疫苗. 第二版. 北京: 中国医药科技出版社, 2001: 5.
- [2] Jackson AC, Wunner WH. Rabies. 2nd ed. London: Academic Press, 2007, 324.
- [3] Centers for Disease Control and Prevention. Human rabies prevention-United States, 1999. Recommendations of the Advisory Committee on Immunization Practices (ACIP). *Morbidity and Mortality Weekly Report*, 1999, 48(No. RR-1), 1-21.
- [4] Murphy FA, Bauer SP, Harrison AK, et al. Comparative pathogenesis of rabies and rabies-like viruses. Viral infection and transit from inoculation site to the central nervous system. *Laboratory investigation; a journal of technical methods and pathology*, 1973, 28(3): 361-376.
- [5] Dietzschold B, Kao M, Zheng YM, et al. Delineation of putative mechanisms involved in antibody-mediated clearance of rabies virus from the central nervous system. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 1992, 89(15): 7252-7256.
- [6] Boshier JM, Labouesse M. RNA interference: genetic wand and genetic watchdog. *Nature Cell Biology*, 2000, 2(2): E31-E36.
- [7] Tuschl T, Borkhardt A. Small interfering RNAs: a revolutionary tool for the analysis of gene function and gene therapy. *Molecular Interventions*, 2002, 2(3): 158-167.
- [8] Qin XF, An DS, Chen IS, et al. Inhibiting HIV-1 Infection in human T cells by lentiviral-mediated delivery of small interfering RNA against CCR5. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2003, 100(1): 183-188.
- [9] Radhakrishnan SK, Layden TJ, Gartel AL, et al. RNA interference as a new strategy against viral hepatitis. *Virology*, 2004, 323(2): 173-181.
- [10] Elbashir SM, Harborth J, Lendeckel W, et al. Duplexes of 21-nucleotide RNAs mediate RNA interference in cultured mammalian cells. *Nature*, 2001, 411(6836): 494-498.
- [11] Wels W, Biburger M, Müller T, et al. Recombinant immunotoxins and retargeted killer cells: employing engineered antibody fragments for tumor-specific targeting of cytotoxic effectors. *Cancer Immunology Immunotherapy*, 2004, 53(3): 217-226.
- [12] Fominaya J, Wels W. Target cell-specific DNA transfer mediated by a chimeric multidomain protein. *The Journal of Biological Chemistry*, 1996, 271(18): 10560-10568.
- [13] 张守峰, 李清竹, 李忠, 等. 细胞水平狂犬病毒感染的 RNA 干扰. *病毒学报 (Chinese Journal of Virology)*, 2006, 22(6): 462-465.
- [14] Kim D, Rossi J. RNAi mechanisms and applications. *Biotechniques*, 2008, 44(5): 613-616.
- [15] Brandão PE, Castilho JG, Fahl W, et al. Short-interfering RNAs as antivirals against rabies. *The Brazilian Journal of Infectious Diseases*, 2007, 11(2): 224-225.
- [16] Barati S, Chegini F, Hurtado P, et al. Hybrid tetanus toxin C fragment-diphtheria toxin translocation domain allows specific gene transfer into PC12 cells. *Experimental Neurology*, 2002, 177(1): 75-87.
- [17] Uherek C, Fominaya J, Wels W. A modular DNA carrier protein based on the structure of diphtheria toxin mediates target cell-specific gene delivery. *The Journal of Biological Chemistry*, 1998, 273(15): 8835-8841.
- [18] Wen WH, Liu JY, Qin WJ, et al. Targeted inhibition of HBV gene expression by single-chain antibody mediated

- small interfering RNA delivery. *Hepatology*, 2007, 46 (1): 84-94.
- [19] Dietzschold B, Gore M, Casali P, et al. Biological characterization of human monoclonal antibodies to rabies virus. *Journal of Virology*, 1990, 64(6): 3087-3090.
- [20] Goudsmit J, Marissen WE, Weldon WC, et al. Comparison of an anti-rabies human monoclonal antibody combination with human polyclonal anti-rabies immune globulin. *The Journal of Infectious Diseases*, 2006, 193 (6): 796-801.

Targeted inhibition of Rabies Virus replication in vitro by single chain antibody domain mediated vector expression shRNA delivery

Ruimei Yang^{1,2,3}, Yan Cui¹, Songtao Yang², Chengyu Wang², Hu Shan³, Hualei Wang², Xianzhu Xia^{2*}

(¹ College of Animal Veterinary Medicine, Gansu Agriculture University, Lanzhou 760030, China)

(² Institute of Military Veterinary, Academy of Military Medical Sciences, Changchun 130062, China)

(³ College of Animal Science and Veterinary Medicine, Qingdao Agriculture University, Qingdao 265200, China)

Abstract: [**Objective**] Single chain antibody-mediated delivery is a novel approach for targeting shRNA to appropriate cells. In this report, we studied whether this shRNA delivery strategy would be effective against rabies virus. [**Methods**] Rabies virus scFv(G) gene and ETA-GAL4 gene were amplified by PCR from vector scFv(G)-T and PE₄₀-GAL4-T respectively. Then, the chimeric gene scFv(G)-ETA-GAL4 was constructed by lapextension PCR and cloned into the prokaryotic expression vector pET28a(+). Recombinant expression plasmid of pET28a(+)-scFv(G)-ETA-GAL4 was constructed and then transformed into the competent *E. coli* BL21(DE3) cells for expression under the induction of IPTG. scFv(G)-ETA-GAL4 protein was purified by Ni-NTA His Bind Resin affinity chromatograph and identified by SDS-PAGE gel and Western blot assay. Binding of the fusion protein scFv(G)-ETA-GAL4 to rabies virus was determined by ELISA. Complexes which formed spontaneously by the fusion protein scFv(G)-ETA-GAL4 with plasmid pRNATU6.3-shRNA were added to BHK-21 cells culture medium that infected with RV. Green fluorescent protein (GFP) was observed after 35 h and judged the transferring efficiency of the complexes. The inhibition of RV replication by shRNA was detected by direct immune fluorescence test. [**Results**] A 1557 bp DNA encoding scFv(G)-ETA-GAL4 protein gene was cloned and successfully expressed in inclusion body with approximate molecular weight of 57.0 kDa, which could be recognized by anti-His mAb. The scFv(G)-ETA-GAL4 proteins were purified by Ni-NTA column, and after renatured with the yield of 2.8 mg/mL. The ELISA results showed that when concentration of the scFv(G)-ETA-GAL4 protein ranging from 2.8 nmol/L to 1000 nmol/L, binding affinity is directly related with RV. The GFP expressed in BHK-21 cell after transfection with the complexes and effectively inhibited RV replication in BHK-21 cell. [**Conclusion**] scFv(G)-ETA-GAL4 fusion protein could mediated plasmid pRNATU6.3-shRNA transferred into BHK-21 cell infected with RV, and then inhibited RV replication.

Keywords: rabies virus; single chain antibody; *pseudomonas* exotoxin A translocation domain; gene delivery; shRNA

(本文责编:张晓丽)