

狂犬病病毒 CVS-11 株全序列测定及其感染性克隆的构建

薛向红^{1,2,3}, 郑学星^{2,3}, 盖微微^{2,3}, 梁红茹^{1,2,3}, 马金柱^{2,3}, 李岭^{1,2,3}, 王铁成^{2,3},
冯娜^{2,3}, 黄耕^{2,3}, 赵永坤^{2,3}, 杨松涛^{2,3*}, 夏咸柱^{1,2,3*}

¹ 吉林大学畜牧兽医学院, 长春 130062

² 军事医学科学院军事兽医研究所, ³ 吉林省人兽共患病预防与控制重点实验室, 长春 130122

摘要: 【目的】测定狂犬病病毒标准攻击毒 CVS-11 株全基因组序列, 构建 CVS-11 株全长 cDNA 感染性克隆。【方法】RT-PCR 扩增 CVS-11 株全基因组得到有重叠的 12 个片段, 分别克隆至平端载体 pEASY-Blunt, 测定 CVS-11 株全基因组核苷酸序列。用软件 DNAMAN 分析 CVS-11 全序列单一性酶切位点, 设计引物, 分 4 段扩增 CVS-11 全基因组, 扩增产物经多步酶切、连接逐步插入至真核表达载体 pcDNA3.1, 获得全长质粒 pcDNA3.1-CVS-11。pcDNA3.1-CVS-11 与其辅助质粒 pcDNA3.1-N、P、L、G 共转染 NA 细胞, 经免疫荧光染色、RT-PCR 鉴定, 拯救得到重组病毒 rCVS-11。【结果】CVS-11 全基因组序列由 11 927 个核苷酸组成, 编码 5 个结构蛋白, 结构基因排列同已知的其他狂犬病病毒一致。成功构建了 CVS-11 全长 cDNA 重组质粒 pcDNA3.1-CVS-11 和其辅助质粒 pcDNA3.1-N、P、L 和 G。经共转染, 成功拯救了重组病毒 rCVS-11。【结论】CVS-11 株感染性克隆的构建为从分子水平上进一步研究狂犬病病毒奠定了基础。

关键词: 狂犬病病毒, CVS-11, 全序列测定, 感染性 cDNA 克隆

中图分类号: R392 文献标识码: A 文章编号: 0001-6209 (2013) 04-0409-07

狂犬病病毒 (rabies virus) 属于弹状病毒科狂犬病病毒属, 其基因组大小约 12 kb, 是单股负链非分节段 RNA, 编码 5 个结构蛋白。狂犬病病毒能感染多种动物和人, 引起神经性疾病, 感染病死率高达 100%。标准攻击毒 CVS-11 株^[1] 是 WHO 规定的狂犬病病毒中和抗体的检测毒株。CVS-11 于 1882 年分离于法国巴黎一头疯牛, 后经兔脑、鼠脑、细胞多次传代而成为一种实验室固定强毒株, 已经适应了实验室 NA、BHK-21 细胞。近十年, 国内外许多学

者利用反向遗传学技术拯救了多株狂犬病病毒弱毒株^[2-4], 国内包括弱毒株 ERA, SRV9, HEP-Flury 和疫苗株 CTN, LEP-Flury; 并对其基因组结构与功能的相互关系^[5-7]; 将其作为病毒载体表达外源基因^[8-9]; 以及用于制备新型疫苗^[10-11] 等方面进行了深入研究, 发现弱毒株的神经嗜性明显弱于狂犬病病毒强毒株^[12]。基于狂犬病病毒强毒株的拯救难度大, 或者拯救后病毒的细胞适应能力差, 国内外对狂犬病病毒强毒株反向遗传系统的建立还比较少,

基金项目: 公益性行业 (农业) 科研专项 (201103032); “十一五” 国家科技支撑计划重点项目 (2010BAD04B03)

* 通信作者。夏咸柱, Tel: +86-431-86985508, E-mail: xia_xzh@yahoo.com.cn; 杨松涛, Tel: +86-431-86985922, E-mail: yst610223@yahoo.com.cn

作者简介: 薛向红 (1985 -), 女, 山西吕梁人, 博士, 主要从事狂犬病病毒研究。E-mail: red99.smile@163.com

收稿日期: 2012-10-26; 修回日期: 2013-01-14

严重局限了对狂犬病病毒毒力位点、致病机制等方面的深入研究。为此,本研究以标准攻击毒 CVS-11 株为研究对象,探索构建其感染性克隆,方便将某些标记基因插入 CVS-11 株基因组,用于狂犬病病毒中和抗体检测。同时,CVS-11 反向遗传操作系统的建立也为进一步修饰或改造 CVS-11 基因组结构和深入开展狂犬病病毒致病机制与疫苗研究等奠定了基础。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 病毒株、细胞与载体

标准攻击毒 CVS-11 株,NA 细胞,本室保存; pEASY-Blunt 购自全式金公司; pcDNA3.1 购自 Invitrogen 公司。

1.1.2 主要试剂: TransStart Fast Pfu DNA Polymerase 购自全式金公司; Super transfection reagent 购自 QIAGEN 公司; FITC 标记抗狂犬病毒 N 蛋白荧光抗体由本室制备保存。

1.2 测序引物设计与合成

参照 GenBank 中的 CVS-11 全基因组序列 (GQ918139),利用软件 Primer Premier 6.0 设计重叠覆盖 CVS-11 全基因组的 12 对测序引物(表 1),序列由 TAKARA 公司合成。

1.3 CVS-11 全基因组克隆及测序

提取 CVS-11 株细胞毒的总 RNA,反转录合成病毒基因组 cDNA。用表 1 中引物,参照 TransStart

Fast Pfu DNA Polymerase 说明书对 cDNA 进行扩增。扩增产物经回收纯化,连接至平端载体 pEASY-Blunt,筛选 3 个阳性克隆,送上海生工进行序列测定。

1.4 CVS-11 全基因组 cDNA 重组质粒的构建

表 1. 狂犬病病毒 CVS-11 株全基因组测序引物

Table 1. Primers used to sequence the complete genome of rabies virus CVS-11 strain

Primer name	Primer sequence (5'→3')	Position of the full-length (nt)
1F	ACGCTTAACAACAAAACCAGAGA	1-933
1R	TGGATGAAATAAGACTGAGGAAC	
2F	CAGAGTGGGCACACTCGTCA	742-2034
2R	ACCATCCTAGCTTTCGAAGGTTG	
3F	CCCAACCTCCTGTTCCAATCGTACC	1778-2986
3R	ATATGACATTGCTTTGGCCTCACTC	
4F	CATAGGATGATTGGGTTAGTCA	2754-4011
4R	TCATCCACAAAGCCGCAAGTCTT	
5F	TGACAGATTTGGACCCATATGACA	3792-5087
5R	CTAGAAGATCTCCCGTATTAAGAG	
6F	ATAGGAGTGGAGGTGAGATCAG	4866-6084
6R	CACAATCAACAGTCCCCATATT	
7F	CTCAAAGTGGCGGAACTGC	5674-7061
7R	TCGATCTCAACTCCCGTTCTT	
8F	GGGCTGTTCCTAGCGAGAAG	6910-8094
8R	TAGGTAGATTATCCGCGACAT	
9F	AGTATCCACCAATGCGCTGAC	7899-9155
9R	TATCTGGCAGACTTGAACCTA	
10F	ACTCCCGTCCCTCGATCAGT	8856-9965
10R	GTGATTGCCTCTCGCTCATA	
11F	CCCTGTCAACATATACGGCAAAG	9627-10877
11R	CCATCTATAGACAATGCGAAATC	
12F	TCCACTGCCTCCTTACGAATCA	10632-11927
12R	ACGCTTAACAACAAAACAATAAAAGA	

F: Forward primer R: Reverse primer

表 2. CVS-11 全基因组分段扩增引物

Table 2. Primers for four-segments amplification of the complete genome of CVS-11

Primer name	Primer sequence (5'→3')	Restrict enzyme site underlined	Annealing temperature/°C
F1-F	AGCTGGTACCCTATAGTCACGCTTAACAAC	<i>Kpn</i> I	63
F1-R	CATCTTGCATGATTTTGCTTAGCTTGTC	<i>Bln</i> I	60
F2-F	CGAGGCTGACAAGCTAAGCAAAATCATGCAAGA	<i>Bln</i> I	65
F2-R	AAACGTACGTTAGCGCGCAAGTGTAGTTTTTTGGTTATCCT	<i>Bsiw</i> I, <i>BssH</i> II	69
F3-F	CGTACGTAAGAACCAGCGGCTGGGTCATCTAAG	<i>Bsiw</i> I, <i>Sac</i> II	69
F3-R	GTAACACAAAATCGATCTGTTGCCTTCTCTCATAGTGG	<i>Cla</i> I	70
F4-F	TTGCCCTTGCAACCCATCGATTTTGTGTTACCTCCAAC	<i>Cla</i> I	66
F4-R	GCGGCGCTCCGACCCACGCTTAACAACAAAAC	<i>Not</i> I	65

用软件 DNAMAN 分析 1.3 中 CVS-11 全基因组序列的单一性酶切位点,设计引物(表 2),为便于拼接基因组片段,引物添加相应酶切位点。以 1.3 中

cDNA 为模板,用表 2 中引物扩增 F1、F2、F3、F4 片段。F1 和 F4 片段分别连接至 pEASY-Blunt Simple 载体,F2 和 F3 片段分别连接至 pEASY-Blunt 载体。

将 pEASY-F1 和 pEASY-F2 用 *Kpn* I 和 *Blp* I 双酶切, 回收 F1 片段和 F2 载体片段, T4 连接酶连接, 转化 trans 10 感受态, 挑取阳性克隆, 得到 pEASY-F1-F2。将 pEASY-F3 和 pEASY-F4 用 *Cla* I 和 *Not* I 双酶切, 将 F4 片段和 F3 载体片段连接, 得到 pEASY-F3-F4。将 pEASY-F1-F2 和 pEASY-F3-F4 用 *Bsiw* I 和 *Not* I 双酶切, 将 F3-F4 片段和 F1-F2 载体片段连接, 得到 pEASY-CVS-41。其中, G-L 伪基因区替换为 *BssH* II、*Bsiw* I 和 *Sac* II 3 个限制性内切酶序列, 便于对 CVS-41 基因组的应用和改造。

为了使病毒 cDNA 转录时能够产生精确的 5' 末端和 3' 末端, 提高病毒拯救效率, 在病毒 cDNA 两端分别添加锤头状核酶 (HamRz) 和丁型肝炎核酶 (HdvRz) 序列。根据两种核酶的二级结构及作用,

合成 HamRz 和 HdvRz 序列 (表 3), HamRz-A、B 经变性退火形成两端为 *Nhe* I、*Kpn* I 黏性末端的双链 HamRz-AB。pcDNA3.1 载体经 *Nhe* I、*Kpn* I 双酶切后与 HamRz-AB 连接, 得到 pcDNA3.1-HamRz-AB。HdvRz-A、B 变性退火形成两端为 *Not* I、*Pme* I 末端的双链 HdvRz-AB, pcDNA3.1-HamRz-AB 经 *Not* I、*Pme* I 双酶切与 HdvRz-AB 连接, 得到 pcDNA3.1-HamRz-HdvRz。pEASY-CVS-41 和 pcDNA3.1-HamRz-HdvRz 进行 *Kpn* I 和 *Not* I 双酶切, 将全长病毒基因组 cDNA 片段和 pcDNA3.1-HamRz-HdvRz 载体片段连接, 得到病毒 cDNA 全长质粒 pcDNA3.1-CVS-41。用 HiSpeed Plasmid Midi Kit (QIAGEN) 中量制备质粒, 于 -70°C 保存待用。全长质粒 pcDNA3.1-CVS-41 的构建策略如图 1。

表 3. 合成的核酶序列

Table 3. Synthesized Hammerhead Ribozyme and Hepatitis delta virus Ribozyme sequences

Ribozyme name	Ribozyme sequence (5'→3')	Restrict enzyme site underlined
HamRz-A	CTAGTGTAAAGCGTCTGATGAGTCCGTGAGGACGAAACTATAGGGTGAGGTAC	<i>Nhe</i> I, <i>Kpn</i> I
HamRz-B	CTCACCTATAGTTTCGTCCTCACGACTCATCAGACGCTTAACA	
HdvRz-A	GGCCGCAGGGTCCACCTCCTCGCGGTCCGACCTGGGCATCCGAAGGAGGACGCACGTCCACTCGGAT	<i>Not</i> I, <i>Pme</i> I
	GGCTAAGGGACCC	
HdvRz-B	GGGTCCCTTAGCCATCCGAGTGGACGTGCGTCTCCTTCGGATGCCAGGTCGGACCGGAGGAG	
	GTGGACCCTGC	

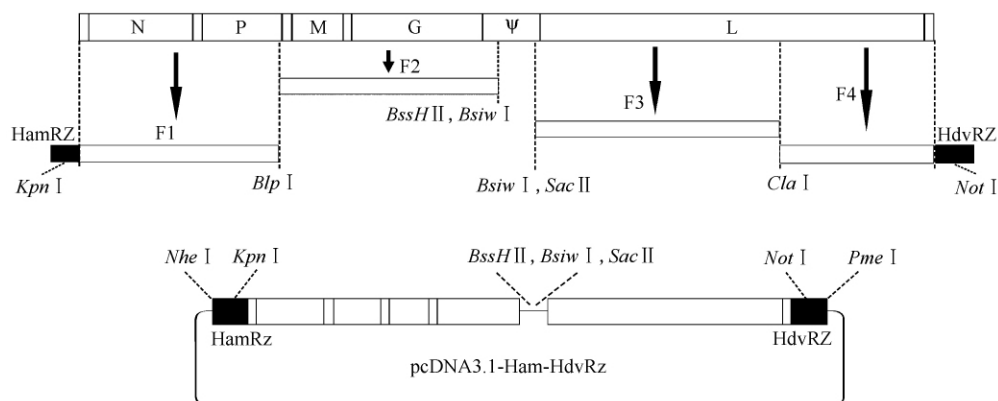


图 1. pcDNA3.1-CVS-41 构建示意图

Figure 1. Construction strategy of pcDNA3.1-CVS-41.

1.5 辅助质粒的构建

以 1.3 中 cDNA 为模板, 利用表 4 中的引物, 对 CVS-41 的 N、P、G 和 L 基因的开放阅读框 (ORF) 进行 PCR 扩增, L 基因分两段进行扩增。最后分别克

隆至 pcDNA3.1, 得到辅助质粒 pcDNA3.1-N、pcDNA3.1-P、pcDNA3.1-G 和 pcDNA3.1-L。中量制备质粒, 于 -70°C 保存待用。

表 4. N、P、G 和 L 基因扩增引物
Table 4. Primers for N, P, G and L gene amplification

Primer name	Primer sequence (5'→3')	Restrict enzyme site underlined	Annealing temperature/°C
N-F	ACACCGCTAGCATGGATGCCGAC	<i>Nhe</i> I	63
N-R	GGGGTACCTTATGAGTCATTGCAATACGTCT	<i>Kpn</i> I	64
P-F	CCTTTCAAACGGTACCAAATATGAGCAA	<i>Kpn</i> I	59
P-R	TCGAGAATTCGGTTAGCAGGATGTATAG	<i>Eco</i> R I	61
G-F	GACTTAAGGAAAGATGGTTCTCAGGTTCTTTGTTTG	<i>Afl</i> II	65
G-R	GGGGATGCTTCACAGTCTGATCTCACCTCCACTCTTA	<i>Bam</i> H I	68
L1-F	TGCTAGCATGCTAGATCCGGGAGAG	<i>Nhe</i> I	63
L1-R	CACAAAATCGATCTGTGCCTTCTCTCAT	<i>Cla</i> I	61
L2-F	ACAGATGGATTTTGTGTTACCTC	<i>Cla</i> I	55
L2-R	GTAGGTACCGGCTTACAACAACACTG	<i>Kpn</i> I	58

1.6 病毒的拯救

6 孔板中 NA 细胞的密度生长至 60% - 80% 时开始转染, 每个质粒用量为: 全长质粒 pcDNA3.1-CVS-41 2 μg, 辅助质粒 pcDNA3.1-N 0.5 μg, pcDNA3.1-P 0.25 μg, pcDNA3.1-G 0.15 μg 和 pcDNA3.1-L 0.1 μg, 转染试剂 15 μL。按照 Super transfection reagent (QIAGEN) 说明书进行操作。共转染 3 h 后, 更换为含 5% 胎牛血清的 DMEM 细胞培养液, 37°C 5% CO₂ 条件下培养 6 d, 盲传 1 代, 反复冻融收获病毒液。

1.7 直接免疫荧光染色鉴定 rCVS-41

将收获的病毒液接种 NA 细胞, 培养 48 h, 丙酮固定, FITC 标记抗狂犬病毒 N 蛋白荧光抗体染色, 荧光显微镜下观察绿色荧光。

1.8 RT-PCR 鉴定

分别提取 wtCVS-41 和 rCVS-41 细胞毒的总 RNA, 反转录合成病毒基因组 cDNA (方法同 1.3)。根据 wtCVS-41 的 G-L 处设计引物, 上游 5'-ACAGGGGGGAATGTGTCAGTC-3' 和下游 5'-TGTTCCCTGTCTTCAACCATTC-3', 以各自的 cDNA 为模板, 进行 PCR 扩增, 1% 琼脂糖凝胶电泳鉴定。

2 结果

2.1 CVS-41 全基因序列测定结果与分析

用 RT-PCR 方法扩增得到覆盖 CVS-41 株全基因组的 12 个目的基因片段, 经 1% 琼脂糖凝胶电泳, 得到 12 个目的条带, 大小跟预期结果一致 (图 2)。CVS-41 全基因序列测定结果与 GenBank

(GQ918139) CVS-41 序列比对发现: 全基因组共 5 个碱基不同, 分别引起 P 蛋白 1 个、G 蛋白 2 个和 L 蛋白 2 个氨基酸发生改变。

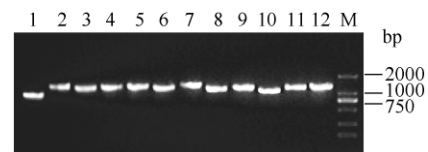


图 2. CVS-41 基因组 RT-PCR 扩增结果

Figure 2. RT-PCR amplification of the complete genome of CVS-41 strain. Lane 1 - 12, amplified bands by 12 primers; M, DL 2000bp maker.

2.2 CVS-41 全长质粒鉴定

CVS-41 株全长质粒 pcDNA3.1-CVS-41 经 *Nhe* I 和 *Kpn* I 双酶切, 酶切产物经 1% 琼脂糖凝胶电泳, 得到大小约 5400 bp 和 12000 bp 的目的条带 (图 3), 同预期结果一致。

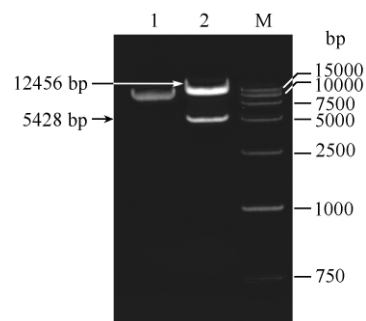


图 3. 重组全长质粒双酶切鉴定结果

Figure 3. Identification of full-length recombinant plasmids digested by *Not* I and *Kpn* I. M, DL 15000bp maker; Lane 1, pcDNA3.1-CVS-41; Lane 2, pcDNA3.1-CVS-41 was digested by *Not* I and *Kpn* I.

2.3 辅助质粒鉴定

辅助质粒 pcDNA3.1-N、pcDNA3.1-P、pcDNA3.1-G 和 pcDNA3.1-L 分别用构建插入的单一性限制内切酶进行双酶切鉴定, 酶切产物经 1% 琼脂糖凝胶电泳, 分别得到约 1400、900、1600、6600 和 5400 bp 目的条带, 同预期结果一致(图 4)。

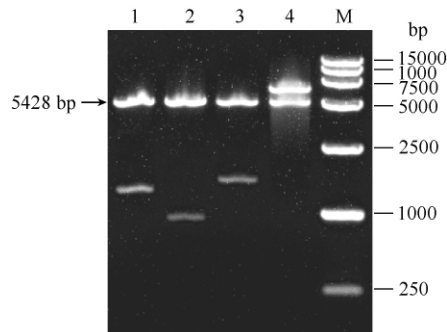


图 4. 辅助质粒双酶切鉴定结果

Figure 4. Identification of four Help plasmids digested by two restriction enzymes. M, DL 15000bp maker; Lane 1, pcDNA3.1-N was digested by *Nhe* I and *Kpn* I; Lane 2, pcDNA3.1-P was digested by *Kpn* I and *EcoR* I; Lane 3, pcDNA3.1-G was digested by *Afl* II and *BamH* I; Lane 4, pcDNA3.1-L was digested by *Nhe* I and *Kpn* I.

2.4 直接免疫荧光染色鉴定 rCVS-11

拯救的病毒上清液接种 NA 细胞, 培养 4 天, 丙酮固定, 用 FITC 标记抗狂犬病病毒 N 蛋白荧光抗体染色, 在荧光显微镜下观察到绿色荧光(图 5), 证实病毒拯救成功。

2.5 RT-PCR 方法鉴定结果

用 RT-PCR 方法分别扩增 wtCVS-11 和 rCVS-11 全基因组 G-L 处, 扩增产物经 1% 琼脂糖凝胶电泳。wtCVS-11 扩增后得到约 780 bp 的目的条带, rCVS-11 由于删除了伪基因区, 得到约 440 bp 的目的条带, 同预期结果一致(图 6)。

3 讨论

反向遗传操作是近年来迅速发展的技术, 负链不分节段 RNA 病毒的反向遗传系统中最为复杂的是病毒全长质粒的构建和病毒拯救。目前为止, 国内外对狂犬病病毒的拯救大多局限于弱毒株, 本研究采用分段克隆方式, 将标准攻击毒 CVS-11 株的全基因组分 4 段扩增, 扩增片段依次连接至真核表达载体 pcDNA3.1。有研究表明转录后病毒基因组 RNA 3'和 5'末端的精确性对病毒的成功拯救至关

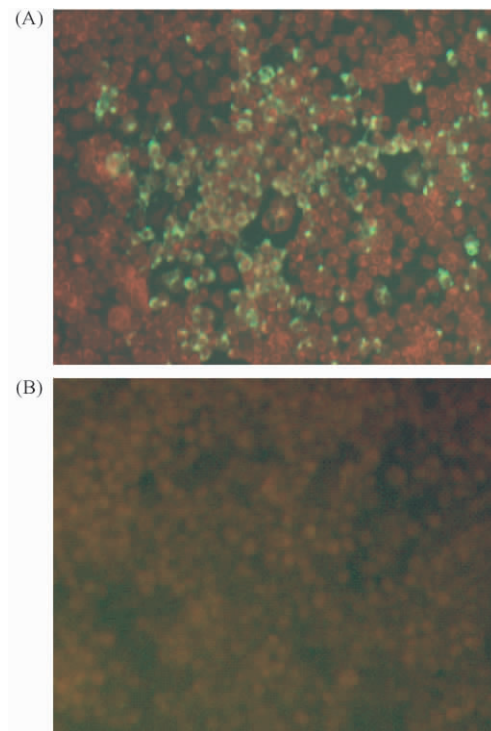


图 5. 拯救病毒 rCVS-11 直接荧光染色鉴定结果

Figure 5. Identification of rescued virus of rCVS-11 by DFA. A: DFA positive result of rCVS-11 in NA cell; B: DFA negative cells.

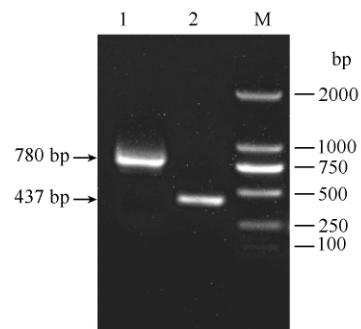


图 6. RT-PCR 鉴定结果

Figure 6. Identification of rCVS-11 by RT-PCR. M, DL 2000bp maker; Lane 1, RT-PCR amplification of G-L region from wtCVS-11; Lane 2, RT-PCR amplification of G-L region from rCVS-11.

重要^[13], 所以合成了 HamRz 和 HdvRz 序列, 经变性退火形成双链, 分别插入至病毒 cDNA 两端, 能够保证全长质粒转录时产生精确的 5'末端和 3'末端, 提高了病毒的拯救效率。通过与其它毒株进行序列比较, 发现 CVS-11 株 G 基因转录后成熟 mRNA 有较长 5'非编码区, 假基因区仅有 24 个核苷酸, 删除了 CVS-11 株 G 基因的部分 5'非编码区和全部假基因区, 将 G-L 处替换为 3 个限制性内切酶序列, 这种改

造没有影响 CVS-11 株的拯救,可以推测:病毒 G 基因较长 5'非编码区对病毒的复制转录是非必需的。最后,在病毒的拯救方面总结出一些经验:(1)相对于致弱毒株或疫苗株,强毒株的拯救难度大;(2)用低代次细胞进行转染时,成功几率比较高;(3)转染用质粒最好用刚制备好的,尽量不要反复冻融;(4)转染后的细胞处理也比较关键,盲传比冻融接“毒”更容易获得拯救病毒。标准攻击毒 CVS-11 株反向遗传操作系统的建立为从分子水平上进一步修饰或改造 CVS-11 基因组结构提供了有效平台,为开展狂犬病病毒致病机制、诊断研究奠定了基础。

参考文献

- [1] Cliquet F, Albert M, Sagne L. Development of a fluorescent antibody virus neutralisation test (FAVN test) for the quantitation of rabies-neutralising antibody. *Journal of Immunological Methods*, 1998, 212 (1) :79-87.
- [2] Schnell MJ, Mebatsion T, Conzelmann KK. Infectious rabies viruses from cloned cDNA. *The EMBO Journal*, 1994, 13 (18) :4195-4203.
- [3] Ito N, Takayama M, Yamada K, Sugiyama M, Minamoto N. Rescue of rabies virus from cloned cDNA and identification of the pathogenicity-related gene: glycoprotein gene is associated with virulence for adult mice. *Journal of Virology*, 2001, 75 (19) :9121-9128.
- [4] Inoue K, Shoji Y, Kurane I, Iijima T, Sakai T, Morimoto K. An improved method for recovering rabies virus from cloned cDNA. *Journal of Virological Methods*, 2003, 107 (2) :229-236.
- [5] Morimoto K, Shoji Y, Inoue S. Characterization of P gene-deficient rabies virus: propagation, pathogenicity and antigenicity. *Virus Research*, 2005, 111 (1) :61-67.
- [6] Takayama-Ito M, Inoue K, Shoji Y, Inoue S, Iijima T, Sakai T, Kurane I, Morimoto K. A highly attenuated rabies virus HEP-Flury strain reverts to virulent by single amino acid substitution to arginine at position 333 in glycoprotein. *Virus Research*, 2006, 119 (2) :208-215.
- [7] Ito N, Sugiyama M, Yamada K, Shimizu K, Takayama-Ito M, Hosokawa JJ, Minamoto N. Characterization of M Gene-Deficient Rabies Virus with Advantages of Effective Immunization and Safety as a Vaccine Strain. *Microbiology and Immunology*, 2005, 49 (11) :971-979.
- [8] Pulmanusahakul R, Faber M, Morimoto K, Spitsin S, Weihe E, Hooper DC, Schnell MJ, Dietzschold B. Overexpression of cytochrome C by a recombinant rabies virus attenuates pathogenicity and enhances antiviral immunity. *Journal of Virology*, 2001, 75 (22) :10800-10807.
- [9] McGettigan JP, Koser ML, McKenna PM, Smith ME, Marvin JM, Eisenlohr LC, Dietzschold B, Schnell MJ. Enhanced humoral HIV-1-specific immune responses generated from recombinant rhabdoviral-based vaccine vectors co-expressing HIV-1 proteins and IL-2. *Virology*, 2006, 344 (2) :363-377.
- [10] Faber M, Li JW, Kean RB, Hooper DC, Alugupalli KR, Dietzschold B. Effective preexposure and postexposure prophylaxis of rabies with a highly attenuated recombinant rabies virus. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 2009, 106 (27) :11300-11305.
- [11] Hosokawa-Muto JJ, Ito N, Yamada K, Shimizu K, Sugiyama M, Minamoto N. Characterization of recombinant rabies virus carrying double glycoprotein genes. *Microbiology and Immunology*, 2005, 50 (3) :187-196.
- [12] Faber M, Pulmanusahakul R, Hodawadekar SS, Spitsin S, McGettigan JP, Schnell MJ, Dietzschold B. Overexpression of the Rabies Virus Glycoprotein Results in Enhancement of Apoptosis and Antiviral Immune Response. *Journal of Virology*, 2002, 76 (7) :3374-3381.
- [13] Le Mercier P, Jacob Y, Tanner K, Tordo N. A novel expression cassette of lyssavirus shows that the distantly related Mokola virus can rescue a defective rabies virus genome. *Journal of Virology*, 2002, 76 (4) :2024-2027.

Sequencing the complete genome of rabies virus CVS-11 strain and constructing its full-length infectious cDNA clone

Xianghong Xue^{1,2,3}, Xuexing Zheng^{2,3}, Weiwei Gai^{2,3}, Hongru Liang^{1,2,3}, Jinzhu Ma^{2,3}, Ling Li^{1,2,3}, Tiecheng Wang^{2,3}, Na Feng^{2,3}, Geng Huang^{2,3}, Yongkun Zhao^{2,3}, Songtao Yang^{2, 3*}, Xianzhu Xia^{1,2,3*}

¹ College of Animal Science and Veterinary Medicine, Jilin University Department of Prologue and Veterinary, Jilin University, Changchun, 130062, China

² Institution of Military Veterinary, Academy of Military Medical Sciences, ³Jilin Province Key Laboratory for Disease Prevention and Control, Changchun, 130122, China

Abstract: [Objective] To sequence the complete genome of CVS-11 strain and establish a reverse genetic system of CVS-11 to further study its pathogenic mechanism, virulence genes and antigenic sites. [Methods] We amplified 12 fragments covering the complete genome of the CVS-11 strain by RT-PCR, and then cloned to pEASY-Blunt vector for sequencing the complete genome of CVS-11. We analyzed single restriction enzyme sites of the full length cDNA of the CVS-11 strain by DNAMAN and designed 4 pairs of specific primers. We amplified the full-length cDNA of CVS-11 by RT-PCR. We obtained four fragments and cloned into pcDNA3.1. We named the full-length cDNA plasmid pcDNA3.1-CVS-11. We also cloned helper plasmids pcDNA3.1-N, P, L and G expressing N, P, L and G protein of CVS-11 strain, respectively. We co-transfected NA cells with the full-length plasmid and four helper plasmids. We identified the supernatant of the transfected and then passaged NA cells by immunofluorescence staining and RT-PCR and found the recombinant virus rCVS-11 rescued successfully. [Results] Sequencing results showed that the complete genome of CVS-11 was composed of 11 927 nucleotides. The complete genome of CVS-11 encoded 5 structure proteins and gene array was the same as other reported rabies viruses. We successfully constructed a reverse genetic system of CVS-11, namely the full length plasmid pcDNA3.1-CVS-11 and 4 help plasmids pcDNA3.1-N, P, L, G and rescued the rCVS-11 from a full-length infectious cDNA clone. [Conclusion] The reverse genetic system of the CVS-11 strain laid the foundation for future studies on rabies virus.

Keywords: rabies virus, CVS-11, the complete genome sequence, infectious cDNA clone

(本文责编: 张晓丽)

Supported by the Public Welfare (Agricultural) Industry Research Special Program (201103032) and by the 11th Five Years Project of the National Scientific Technique Program Supported Plan (2010BAD04B03)

* Corresponding authors. Xianzhu Xia, Tel: +86-431-869858808, Fax: +86-431-86758799, E-mail: xia_xzh@yahoo.com.cn; Songtao Yang, Tel: +86-431-869858922, Fax: +86-431-86758799, E-mail: yst610223@yahoo.com.cn

Received: 26 October 2012/Revised: 14 January 2013