

# 狂犬病病毒 Evelyn- Rokitnicki-Abelseth 疫苗株反向遗传系统的建立

郭利<sup>1,2</sup>, 冯娜<sup>2</sup>, 杨松涛<sup>2</sup>, 王喜军<sup>3</sup>, 葛金英<sup>3</sup>, 夏咸柱<sup>2\*</sup>, 步志高<sup>3\*</sup>

(<sup>1</sup> 吉林农业大学研究生院, 长春 130118)

(<sup>2</sup> 军事医学科学院军事兽医研究所, 长春 130000)

(<sup>3</sup> 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)

**摘要** 【目的】建立狂犬病毒的反向遗传系统, 为研制不含狂犬病病毒致病性的新型安全高效的狂犬疫苗提供技术依据。【方法】本研究采用反向遗传学方法和分子克隆技术, 建立了狂犬病病毒 Evelyn- Rokitnicki-Abelseth (ERA) 疫苗株的 CMV/ T7、T7 启动子病毒拯救系统, 构建了表达 N、P、L 蛋白的辅助质粒。【结果】成功拯救出野生型病毒 rERA-VC, 在 Vero 细胞上的生长动力学特性与父母本 ERA 相同, 第三代可在 Vero 细胞上可获得很高的生长滴度。【结论】建立了狂犬病病毒的反向遗传系统, 拯救出的野生型病毒生物学特性与父母本相同。

**关键词:** 狂犬病病毒; ERA 疫苗株; 反向遗传系统

中图分类号: Q933.852 文献标识码: A 文章编号: 0001-6209(2009)07-0949-06

狂犬病(Rabies)是由狂犬病毒(Rabies Virus)引起的主要侵害中枢神经系统的接触性、高致死性人兽共患传染病, 几乎所有的温血动物都易感, 一旦感染, 死亡率接近 100%。犬类动物在传播人狂犬病过程中起主要作用, 是本病的主要宿主之一。据我国疾病预防控制中心统计, 2008 年我国人狂犬病发病数已突破 3000 例, 正在形成第 3 次流行高峰。流行病学调查表明, 95% 以上的人狂犬病病例是因为与患病或带毒的犬和猫直接或间接接触引起的。狂犬病疫情快速回升, 严重威胁着人和动物的公共卫生安全, 造成的财产损失更是无法估量。人类与其斗争了几百年, 仍无有效的治疗方法, 要消灭狂犬病仍是无法实现的事实, 所以疫苗的预防成为狂犬病防制的重要方法。狂犬病疫苗研究的目的是开发一

种既保留狂犬病毒的免疫原性, 又不含狂犬病毒致病性的新疫苗。鉴于现有的无毒变异株繁殖力低, 难以满足社会要求, 并有潜在毒力返强的危险, 因此, 开发既能大规模生产, 又价廉易得、安全有效的人(兽)用基因工程狂犬病疫苗, 近些年已成为各国狂犬病防治的中心课题之一。本试验选用的是 Vero 细胞适应的兽用 Evelyn- Rokitnicki-Abelseth (ERA) 疫苗株, Vero 细胞是干扰素缺陷型细胞, 病毒在细胞内可高水平复制, 繁殖滴度高。生物安全性高, 对受体的副作用小。ERA 毒株在 BHK13, 19, 21 细胞上传代, 抗原滴度只达  $LD_{50} \geq 10^{5.0}$ , 与 FLuLy 株相比较对动物毒副作用小, 动物接受谱广。

狂犬病毒为不分节段的单股负链 RNA 病毒, 属弹状病毒科, 狂犬病毒属。单分子负链病毒目全长

基金项目: 国家科技部支撑计划项目(2006BAD06A09); 国家“863 计划”项目(2006AA02Z456, 2006AA10A204); 国家自然科学基金重点项目(30630049)

\* 通信作者。Tel: +86-431-86985808, E-mail: xia\_xzh@yahoo.com.cn(夏咸柱); Tel: +86-451-85935063, E-mail: zgb@hvri.ac.cn(步志高)

作者简介: 郭利(1977-)女, 吉林省长春人, 博士研究生, 主要从事动物分子病毒学的研究。E-mail: jpiaogl110@163.com

收稿日期: 2008-11-25; 修回日期: 2009-03-10

cDNA 的拯救是在 1994 年由 Schnell 等<sup>[1]</sup>首先从狂犬病毒开始研究的。反向遗传技术通过构建 RNA 病毒的感染性分子克隆,在 DNA 分子水平上对其进行体外操作,从而研究病毒结构与功能的方法,如进行基因为点突变、缺失、插入、颠换、转位和互补等改造,以此来研究病毒的基因复制与表达调控机理, RNA 编辑和自发重组与诱导重组、病毒与宿主的关系、抗病毒策略、基因治疗研究,以及构建新型病毒表达载体表达外源基因和进行疫苗的研究。1994 年之后基于反向遗传学实验方法其他病毒如杆状病毒、VSV<sup>[2]</sup>、副粘病毒<sup>[3]</sup>、呼吸道合胞体病毒<sup>[4]</sup>、仙台病毒<sup>[5]</sup>等的反向遗传学也相继报道。

本试验采用具有良好的免疫原性狂犬病毒 Vero 细胞适应株 ERA 疫苗株,经蚀斑纯化,得到了相对较纯的“克隆株”,命名为 ERA-VC,建立了痘病毒辅助的 T7 启动子和 CMV/T7 启动子的反向遗传操作系统,两个系统均成功拯救出野生型 rERA-VC。其与亲本毒株 ERA-VC 相同对 Vero 细胞和 BHK 细胞均极为敏感,具有力良好的适应性。本研究为进一步开展更为安全高效的重组 RV 活载体疫苗研究及 RV 病毒相关机制奠定了技术基础。

## 1 材料和方法

### 1.1 材料

**1.1.1 毒株与细胞:**狂犬病毒 ERA 疫苗株纯化毒株 ERA-VC 和 Vero 细胞:由军事医学科学院军事科学研究所保存。痘病毒 vTF7-3 和 BHK 细胞:由中国

农业科学院哈尔滨兽医研究所人兽共患病研究室保存。表达核蛋白(NP)、磷酸蛋白(P)及转录酶的大蛋白(L)基因的两套转录辅助质粒 T7 单启动子拯救系统 pBlueN、pBlueP、pBlueL 和 T7/CMV 双启动子拯救系统 pCIN、pCIP、pCIL 由中国农业科学院哈尔滨兽医研究所人兽共患病研究室与军事医学科学院军事兽医研究所病毒学研究室联合构建。

**1.1.2 主要试剂和仪器:**PrimerSTAR HS DNA Polymerase, T4 DNA 连接酶,及其它限制性内切酶均购自 TaKaRa 公司。RNA 提取试剂 Trizol,鼠源反转录酶(MLV)试剂盒,无血清培养基 Opti-DMEM 及磷酸钙转染试剂盒(Calcium phosphate Transfection Kit)均购自 Invitrogen 公司,TPCK 处理胰酶和 FITC 标记的兔抗鼠荧光二抗购自 Sigma 公司。犊牛血清购自 BIOCHROM AG 公司。胶回收(Gel Extraction Mini Kit)及质粒小量提取试剂盒(Plasmid Mini Kit)均购自上海华舜。质粒中量提取试剂盒购自 QIAGEN 公司。荧光显微镜(Leica DM IRB)购自 Leica 公司。鼠抗 RV 糖蛋白高免疫性血清由本研究室制备。

**1.1.3 引物:**参照 GeneBank 中提供的狂犬病毒 ERA 株基因序列(序列号为 EF206707),用 DNASTar 软件分析,制作酶切图谱,选取基因上的 *SalI*、*Bst*1107I、*SphI*、*StuI*、*EcoRI* 及 *ApaI* 等酶切位点,在含有酶切位点的基因附近,设计 RT-PCR 引物,将全基因序列分成 7 段,序列如表 1。引物合成及测序在 Invitrogen 公司。

表 1 ERA-VC 全长 cDNA 克隆引物序列及酶切位点

Table 1 The primers sequence and exonuclease used to clone complete sequence of ERA-VC

Primer	Sequence(5'→3')and Restriction site
R1F	GTCAC <b>TGCTAGCT</b> GGTGTTAAGCGTCTGATGAGTCCGTGAGGACGAAACTATAGGAAAGGAATTCTATAGTACCGCTTAACAACCAGATCAAAG ( <i>NheI</i> /Ham)
R1R	ACTCGGCGAATGAGTTTGGA <b>C</b> ( <i>SalI</i> )
R2F	TCGAATCATGATGAATGGAGG
R2R	CAGCCCACTGGAAGATAAAG <b>C</b> ( <i>Bst</i> 1107I)
R3F	CTGAGGGCATGAAC <b>TGGG</b> TAT
R3R	TCCCTGTCCTCTGAGATT <b>G</b> ( <i>SphI</i> )
R4F	AAGAGTCAATCGATCAGAACC
R4R	CACAGGGACCGAAC <b>TCTCT</b> ( <i>StuI</i> )
R5F	AGAGAGCAGAAAAGTTAGGC
R5R	TTGCCTCTCGAAACTCTGAAT <b>(EcoRI)</b>
R6F	GACGAGGTGACAAAGTGGAG
R6R	CCCACTGAACCACTCTCAAG <b>C</b> ( <i>ApaI</i> )
R7F	CTCTGGAGCTTGACATAAGG
R7R	CAGTTCGGACCGGAGGAGTGGAGATGCCATGCCACCCACGCTTAACAATAACAACA( the part Sequence of <i>CpoI/Ribzom</i> )

**1.2 ERA-VC 全长 cDNA 感染性克隆 pCIRERA-VC 的构建**

应用表 1 中的引物,通过一系列 RT-PCR 反应,

经测序得到了序列完全正确的试验设计的 7 个全基因克隆片段,均构建在转移载体 pBlue 上。其中 R1 片段的 3' Leader 前端用 PCR 方法引入锤头状核酶

(Ham), R7 片段的 5' Trailer 后引入丁型肝炎核酶 (HdvRz)。为获得 ERA 全长基因组 cDNA 克隆。将各个片段经酶切、连接、克隆等步骤,将所得各片段顺次克隆与转移载体 pBlue 的 T7 启动子下游,组装完成的 cDNA 全长克隆,后转移至表达载体 pCI 的

T7/CMV 启动子之下。质粒命名为 pCIrERA-VC。将全长质粒测序分析,经比对得到理想的测序结果,其中包括试验设计的精确的核酶序列及全长基因组序列。测序在 Invitrogen 公司完成。序列分析使用 DNASTar 软件。全基因克隆过程如图 1 所示。

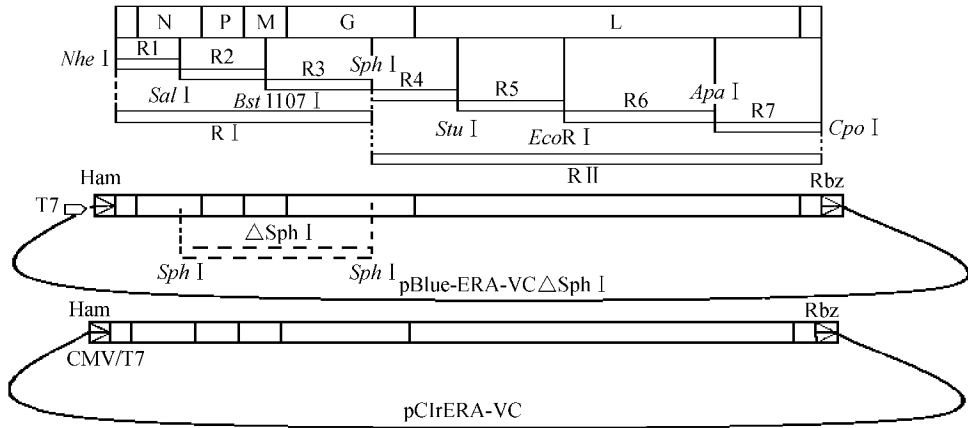


图 1 ERA 全长 cDNA 克隆表达质粒 pCIrERA-VC 的构建策略及感染性质粒图谱结构示意图

Fig. 1 A construction strategy of the cDNA expression plasmid of ERA pCIrERA-VC. It contains five structural proteins and ribozymes as indicated. T7/CMV promoter transcribes cDNA of ERA-VC to form strand RNA. A suitable exonuclease was selected and used in the sequence to yield seven fragments. And added Ham and Rbz sequences into the 3' leader and 5' trailer. First, fragments of R1-R3 and R4-R7 were cloned into pBluescript II next to the T7 promoter, named as pBlue-RI and pBlue-RII; Second, the pBlue-RI and pBlue-RII were cut with *SpeI* and *SphI* and yielded RI two fragments  $\Delta$ *SphI* and pBlue-RI $\Delta$ *SphI*. Third, pBlue-RI $\Delta$ *SphI* and R4-R7 were ligated, named pBlue-ERA-VC $\Delta$ *SphI*; Forth, after pBlue-ERA-VC $\Delta$ *SphI* and pCI containing the part of Rbz were cut with *NheI* and *CpoI*, respectively and ligated together to be the pCI- ERA-VC $\Delta$ *SphI*; To complete the construction,  $\Delta$ *SphI* was inserted into pCI- ERA-VC $\Delta$ *SphI*, and yielded the final construct named pCIrERA-VC.

### 1.3 病毒拯救

BHK 细胞培养于含 10% 胎牛血清的 DMEM 完全培养基中。转染前 1 h 以 vTF7-3 按 M.O.I. 约等于 1 感染细胞。为了对比转染效率,转染采用磷酸钙转染 (Invitrogen) 和脂质体 2000 转染法 (Invitrogen),操作参照试剂盒说明书进行。将质粒 pCIrERA-VC 分别与 pBlueN、pBlueP 及 pBlueL 辅助质粒系统、pCIN、pCIP、pCIL 辅助质粒系统共转染。磷酸钙转染法分别为 5  $\mu$ g、2.5  $\mu$ g、1.25  $\mu$ g 和 1.25  $\mu$ g; 脂质体 2000 的转染量为 2  $\mu$ g、1  $\mu$ g、0.5  $\mu$ g 和 0.5  $\mu$ g。磷酸钙法将转染细胞置 5% CO<sub>2</sub> 培养箱 37 $^{\circ}$ C 培养约 10 h 后,加入 1- $\beta$ -D-阿拉伯呋喃糖苷 (Ara. C, 25  $\mu$ g/mL),次日,再以 10% DMSO 的 PBS 休克 2.5 min,然后加入新鲜的完全 DMEM,同时加入 1- $\beta$ -D-阿拉伯呋喃糖苷后于 37 $^{\circ}$ C 5% CO<sub>2</sub> 培养箱培养,24 h 后观察细胞生长情况。脂质体 2000 转染法是将转染细胞置 5% CO<sub>2</sub> 培养箱 37 $^{\circ}$ C 培养约 4~6 h,后,弃掉上清,换 5% 的 DMEM 完全培养基,并加入 1- $\beta$ -D-阿拉伯呋喃糖苷 (Ara. C, 25  $\mu$ g/mL),于 37 $^{\circ}$ C 5% CO<sub>2</sub> 培养箱培养,24 h 后观察记录细胞生长状

态。72 h 后,将细胞反复冻融 3 次,收获病毒。将收获的病毒用 0.22 滤膜收集过滤,去除残留的痘病毒后与 Vero 细胞上传代 3 次以上,收获鉴定。

### 1.4 拯救病毒的鉴定

1.4.1 间接免疫荧光 (IFA) 鉴定:将拯救的病毒液用 0.22 滤膜收集过滤去除痘病毒后,单层接种与 Vero 细胞,于 37 $^{\circ}$ C 5% CO<sub>2</sub> 培养箱培养,72 h 后,将细胞反复冻融 3 次,收获病毒。如此反复传代 3 次,将收获的病毒液以 8000  $\times$  g 离心 5 min,收取上清液,以 DMEM 10 倍数系列稀释,50  $\mu$ L 体积感染生长于 24 孔板,密度为 80%~90% 的 Vero 细胞,37 $^{\circ}$ C,孵育 1 h 后,用 DMEM 洗涤 3 遍,然后加入完全 DMEM 培养基继续培养,96 h 后取出,弃细胞上清培养液,PBS 洗 3 遍后,用 80% 丙酮固定 (室温,20 min),以 5% 的 Tween20 的磷酸盐缓冲液 (PBST) 洗 3 遍,加入 50 倍稀释的鼠抗 RV 糖蛋白单因子免疫血清,以相同稀释倍数鼠阴性血清为对照,37 $^{\circ}$ C 孵育 30 min;用 PBST 洗 3 遍,加入 1:200 倍稀释的 FITC 标记兔抗鼠 IgG 二抗 (Sigma) 100  $\mu$ L 每孔,37 $^{\circ}$ C 孵育 30 min,用 PBST 洗 3 遍,荧光显微镜下观察结果。

**1.4.2 电镜观察及 RT-PCR 鉴定** :将收获病毒除去痘病毒后,在 Vero 细胞上盲传 3 代,收集感染细胞上清悬液,12000 × g 离心 30 min,送与电镜室,采用磷钨酸负染法制备样本,常规透射电镜观察病毒粒子形态,经检测样本为弹状病毒。

拯救的病毒经细胞传代培养,提取细胞总 RNA (Trizol 法)。为避免辅助质粒对 RT-PCR 反应阳性结果的干扰,选取 RV 全基因组上位于 M 基因上的引物对 P<sub>m</sub>(2785 ~ 3733)和 G 基因上的引物对 P<sub>g</sub>(3267 ~ 4487)进行 RT-PCR 反应。分别得到 P<sub>m</sub> 长 980 bp 和 P<sub>g</sub> 长 860 bp 的两条特异性片段,与预期大小相符,测序结果经 DNASTar 软件比对与全基因组序列相对应片段的碱基序列一致。

### 1.5 病毒滴定及生长动力学

将 Vero 细胞传代至 24 孔板培养过夜,生长密度约 80 ~ 90% 时用于感染拯救收获的病毒。病毒作 10 倍系列稀释,每孔接毒量为 50 μL。细胞于 37°C 5% CO<sub>2</sub> 培养箱培养 96 h 后,用 80% 丙酮固定(室温,20 min)后,以 5% 的 Tween20 的磷酸盐缓冲液(PBST)洗 3 遍,加入 50 倍稀释的鼠抗 RV 糖蛋白单因子免疫血清,37°C 孵育 30 min;用 PBST 洗 3 遍,加入 1:200 倍稀释的 FITC 标记兔抗鼠 IgG 二抗 100 μL 每孔,37°C 孵育 30 min,用 PBST 洗 3 遍,荧光

显微镜下观察结果。

## 2 结果

### 2.1 ERA-VC 全长 cDNA 感染性克隆 pCIRERA-VC 的构建

将构建好的 ERA-VC 全长 cDNA 感染性克隆 pCIRERA-VC 质粒全基因测序,结果显示 pCIRERA-VC 质粒中含有拯救病毒所需精准的 3' Leader 和 5' Trailer 及用 PCR 方法引入的锤头状核酶(Ham)、丁型肝炎核酶(HdvRz)序列。包含 ERA-VC 完整的 5 个结构蛋白和每个基因的 GS 与 GE 等转录识别结构调控原件。

### 2.2 CMV/T7 双启动子和 T7 启动子系统启动野生型 rERA-VC 的获救

为了从克隆的 cDNA 中拯救感染性 rERA-VC,首先以 pCIRERA-VC 质粒分别和表达 ERA-VC 的 N、P 和 L 蛋白的 T7 启动子辅助质粒共转染预感染表达 T7 聚合酶重组痘病毒的 BHK 细胞,培养 3 天后,收获转染细胞,做间接免疫荧光(IFA)鉴定结果为阳性。电镜观察可见典型弹状病毒粒子,RT-PCR 反应得到目的片段,如图 2 结果表明,通过反向遗传操作技术,利用 ERA-VC 疫苗株基因组 cDNA 克隆成功拯救具有感染性的子代病毒 rERA-VC。

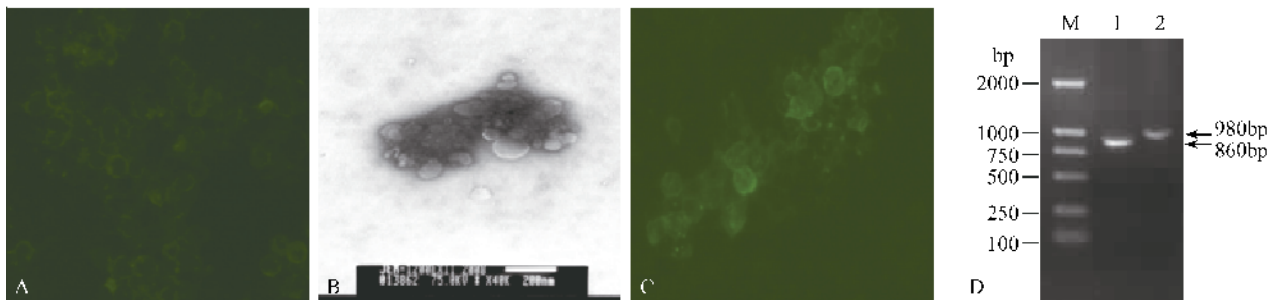


图 2 重组病毒 rERA-VC 鉴定结果

Fig.2 Identification results of recombinant virus rERA-VC. (A) IFA positive result of rERA-VC in Vero F3 (B) electron microscope result of rERA-VC in Vero F3 (C) IFA positive control result of parents ERA-VC (D) specificity RT-PCR result of rERA-VC. M is the DNA2000 Marker, track 1 is P<sub>m</sub>, 980bp; track 2 is P<sub>g</sub>, 860bp.

### 2.3 拯救病毒滴定(IFA)及在 Vero 细胞上的生长动力学

将经 T7 单启动子拯救系统和 T7/CMV 双启动子拯救系统的原代病毒用 0.22 滤膜收集过滤,去除残留的痘病毒后,在 Vero 细胞上盲传 F3 代,收获病毒。将病毒接种于 6 孔板,在 1 d、2 d、3 d、4 d、5 d 和 6 d 按时间顺序分别收获取样,反复冻融 3 次后,离心去除细胞碎片,接 24 孔细胞培养板培养病毒间接免疫荧光进行病毒滴定,TCID<sub>50</sub> 结果显示单纯 T7

启动子滴定病毒滴度在 10<sup>-4</sup> ~ 10<sup>-5</sup> 之间,而 T7/CMV 双启动子滴定结果在 10<sup>-6</sup> ~ 10<sup>-7</sup> 之间,说明双启动子的拯救效率高于 T7 单启动子。如图 3 所示,生长动力学实验结果表明病毒与 24 h 后开始复制,在第 5 d 达到最高峰,之后逐渐下降,表现为狂犬病毒病毒父母本 ERA-VC 株典型的生长动力学特性。

## 3 讨论

近年来反向遗传技术的发展使构建安全有效的

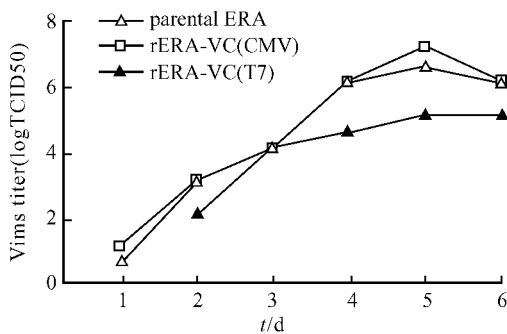


图3 野生型 rERA-VC 和父母本 ERA-VC 在细胞上的生长滴度时间曲线

Fig.3 Growth curves for the recombinant virus rERA-VC and parental ERA-VC. Subculturing rERA-VC tow times in Vero cells. Supernatant was collected from the infect Vero cells and diluted by ten times. IFN was determined by the use of titrated rERA-VC 50  $\mu$ l per well after culture 96 hours in 37 $^{\circ}$ C 5% CO $_2$  incubator. The results shows that CMV/T7 promoter system rescue rERA-VC titer was higher than the T7 promoter system about tow times. The growth was the highest on the fifth day. The growth characteristic of rERA-VC was the same as the ERA-VC.

狂犬病病毒活疫苗载体成为可能。狂犬病病毒为负链 RNA 病毒,因其拥有特殊的生物学特性使之成为大有前途的疫苗载体候选者。反向遗传技术为发展致弱活疫苗提供了有力的技术支持,此类活疫苗可以诱导体液免疫和细胞免疫,因此能够提高动物免受疾病攻击的保护率。这样的疫苗比传统的弱毒疫苗更稳定,更安全。反向遗传技术的关键之一在于,它必须以全长 cDNA 的正链为模板转录基因组 RNA,并且转录出的基因组 RNA 必须具有精确的 3'末端才能有效救获具有感染性的子代病毒,这一点对于病毒拯救至关重要。在本研究中,将犬五联弱毒疫苗中的狂犬病病毒 ERA 株来源的 cDNA 克隆到含双启动子的 pCI 载体的启动子下游,利用 T7 聚合酶转录产生病毒正链 RNA 模版,提高了病毒的拯救效率。并且在全基因两侧引入了锤头状核酶(Ham)和丁型肝炎核酶(Rbz),利用核酶的自我剪切功能使转录产生的病毒 RNA 模板具有精确的 3'末端。用能够持续产生 T7 聚合酶的重组痘病毒 vTF7-3 感染敏感细胞系,共转染 pCIrERA-VC 及辅助质粒拯救野生型病毒和重组病毒。通过对救获病毒的生长复制、生物学特性、抗原性、形态学及 RT-PCR 鉴定,证实本研究成功建立了狂犬病病毒 ERA-VC 株的反向遗传操作系统,并从基因组 cDNA 救获了野生型病毒 ERA 和重组病毒 rERA-VC。为构建筛选毒力减弱的狂犬病疫苗候选株提供能了有力的技术支持。经序列分析,实验株 GP333 位为精氨酸,是代表狂犬病毒毒力的

强度信号。在体外操对 ERA-VC 基因组 GP333 位进行分子突变,可减弱或消除疫苗在临床使用过程中毒力返强的潜在危险。ERA 株对 Vero 细胞有良好稳定的适应性,拯救出的 rERA-VC 在 Vero 细胞上生长也可获得很高的滴度,易于大量生产制备。

本试验构建了 T7/CMV 双启动子和 T7 启动子拯救系统,均成功拯救出了野生型 rERA-VC 病毒,但在 F2 代在 vero 细胞上的生长滴度 T7/CMV 双启动子高于 T7 启动子两个滴度。CMV 启动子可被真核细胞 RNA 聚合酶 II 识别,而 T7 系统是目前应用在动物负链 RNA 病毒拯救上最广泛的表达系统,当用重组 T7 pol 痘苗病毒(vTF7-3)和由 T7 启动子驱动的重组质粒先后转染细胞,vTF7-3 先在细胞内表达 T7 pol,再由 T7 pol 去转录插入 T7 启动子的外源病毒基因组(或反基因组),与 CMV 相比可以实现病毒的高效拯救。该系统的基因表达量 400~600 倍于由 RNA pol II 启动子驱动的重组质粒。但 vTF7-3 系统也有局限性,vv 的复制可能干扰被拯救病毒的产生。痘病毒在感染时产生细胞病变效应(CPE),最终会杀死细胞,因此外源基因表达并非一个连续过程,很可能外源病毒未被拯救时,负载的细胞已经破裂。本试验的数据结果显示 T7/CMV 双启动子对病毒的拯救效率高于 T7 启动子约 100 倍,可能与上述原因有关。

总之,随着拯救技术的发展成熟,反向遗传系统在 RNA 病毒功能基因组研究上将担当无可替代的作用。利用反向遗传学技术组成的改良型活性疫苗,可以产生更为可靠和更为广泛的免疫反应。本研究为开发一种既保留狂犬病毒的免疫原性,又不含狂犬病毒致病性的新疫苗候选毒株提供了技术平台,具有很好的实验研究和实际应用价值。

## 参考文献

- [1] Schnell MJ, Mebatsion T, Conzelmann KK. Infectious rabies viruses from cloned cDNA. *The EMBO Journal*, 1994, 13: 4195-4203.
- [2] Lawson ND, Stillman EA, Whirr MA, et al. Recombinant Vesicular Stomatitis Virus from DNA. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 1995, 92: 4477-4481.
- [3] Radecke F, Spielhofer P, Schneider H, et al. Rescue of Measles virus from cloned DNA. *The EMBO Journal*, 1995, 14: 5773-5784.
- [4] Bukreyev A, Camargo E, Collins PL. Recovery of infectious respiratory syncytial virus expressing an additional, foreign gene. *Journal of Virology*, 1996, 70(10): 6634-6641.

- [ 5 ] Garcin D , Pelet T , Calain P , et al. A highly recombinant system for the recovery of infectious Sendai paramyxovirus from cDNA : Generation of a novel copy-back nondefective interfering virus. *The EMBO Journal* , 1995 , 14 : 6087 – 6094.
- [ 6 ] Uta Gassen , Fergal M , Collins W , et al. Establishment of a rescue system for canine distemper virus. *Journal of Virology* 2000 , 10 : 10737 – 10744.
- [ 7 ] Milosz F , Faber ML , Li JW , et al. Dominance of a Nonpathogenic Glycoprotein Gene over a Pathogenic Glycoprotein Gene in Rabies Virus. *Journal of Virology* 2007 , 13 : 7041 – 7047.
- [ 8 ] Erich H , Follmann , Donald G , et al. Oral vaccination of captive arctic foxes with lyophilized SAG2 rabies vaccine. *Journal of Wildlife Diseases* , 2004 , 40( 2 ) 328 – 334.

## Reverse genetic system for rabies virus vaccine Evelyn-Rokitnicki-Abelseth strain

Li Guo<sup>1,2</sup> , Na Feng<sup>2</sup> , Songtao Yang<sup>2</sup> , Xijun Wang<sup>3</sup> , Jinying Ge<sup>3</sup> , Xianzhu Xia<sup>2\*</sup> , Zhigao Bu<sup>3\*</sup>

(<sup>1</sup> Graduate School , Jilin Agriculture University , Changchun 130118 , China )

(<sup>2</sup> Institute of Veterinary Medicine , Academy of Military Medical Science , Changchun 130000 , China )

(<sup>3</sup> National Key Laboratory of Veterinary Biotechnology , Harbin Veterinary Research Institute , Chinese Academy of Agricultural Sciences , Harbin 150001 , China )

**Abstract [ Objective ]** To establish a reverse genetic system of rabies virus for producing safe and efficient rabies vaccine.

**[ Method ]** By reverse genetic and molecular cloning technique , we established two rabies virus rescue systems including ( 1 ) helper plasmids expressing N , P and L protein , and ( 2 ) CMV/T7 and T7 promoter. **[ Results ]** Wild-type rERA-VC was rescued by both systems , and had the same growth kinetics as parental virus. The third generation virus could grow to high titer.

**[ Conclusion ]** The established reverse genetic system for rescuing wild-type rERA-VC provides the possibility of producing safe and efficient rabies virus vaccines.

**Keywords :** reverse genetic system ; rabies virus ; Evelyn- Rokitnicki-Abelseth ( ERA ) vaccine strain

( 本文责编 : 王晋芳 )

Supported by the National Key Program for Technology Research and Development of China Plan Grant ( 2006BAD06A09 ) , the National Programs for High Technology Research and Development of China ( 2006AA02Z456 , 2006AA10A204 ) and the Key Project of Chinese National Natural Science Foundation ( 30630049 )

\* Corresponding authors . Tel : + 86-431-86985808 , E-mail : xia-xzh@ yahoo . com . cn ( Xianzhu Xia ) ; Tel : + 86-451-85935063 , E-mail : zgb@ hvri . ac . cn ( Zhigao Bu )

Received 25 November 2008/Revised : 10 March 2009