

293-295

维普资讯 http://www.cqvip.com
426(14)

用 Lac 基因筛选表达狂犬病毒糖蛋白的重组痘苗病毒

李萍萍 陈乃民 朱家鸿

(卫生部武汉生物制品研究所, 武汉, 430060)

R373.9

关键词: 狂犬病毒糖蛋白基因 重组痘苗病毒

为了研制基因工程狂犬病疫苗,我国于1991年首次报道了在痘苗病毒天坛株中表达狂犬病毒糖蛋白^[1],但报道中重组病毒的选择是先经人骨髓瘤细胞(TK-143)在诱变剂5-溴脱氧尿苷(BrudR)作用下通过标记拯救技术筛选出携带有同源基因的重组病毒,然后再利用重组病毒中携带的Lac基因为选择标记,通过噬斑纯化获得重组病毒,用这种选择方式获得的重组病毒,经过了TK-143细胞和BrudR,因此不宜发展成疫苗,本研究探索不经过TK-143细胞和BrudR,仅利用Lac基因为选择标记,直接在鸡胚细胞上通过噬斑纯化获得重组病毒,现将研究结果报道如下。

1 重组痘苗病毒的构建及纯化

以本室构建的带有狂犬病毒糖蛋白基因的痘苗病毒表达质粒pWS-4通过Lipofectin™ Reagent在鸡胚细胞内与痘苗病毒同源重组,使狂犬病毒糖蛋白基因整合到痘苗病毒天坛株的TK区并使TK区插入灭活,然后在鸡胚细胞上纯化,由于重组病毒携带有Lac基因,而野生型痘苗病毒不带Lac基因,因此在X-gal和中性红同时存在的琼脂糖中,重组病毒呈蓝色噬斑,野生型痘苗病毒呈白色噬斑,在此条件下,在鸡胚细胞上将单个蓝斑连续挑斑纯化后,得到了纯化的重组病毒。

2 重组病毒的 Dot blot 检测结果

用Dig标记的狂犬病毒糖蛋白cDNA作为探针进行DNA的斑点杂交,杂交结果重组痘苗病毒DNA呈现阳性杂交信号,阴性对照天坛株DNA不显现杂交信号(图1),证明重组病毒中有狂犬病毒糖蛋白基因插入。

3 间接免疫荧光检测结果

用狂犬病毒ERA株糖蛋白单克隆抗体作为第一抗体进行荧光检测,结果被重组病毒感染的细胞在胞浆及胞膜处可见强阳性荧光反应,阴性对照天坛株感染的细胞未见荧光反应,证明重组病毒有与狂犬病毒糖蛋白单克隆抗体特异性结合的能力,狂犬病毒糖蛋白在痘苗病毒中得到了表达。

4 动物试验

• 本文于1992年5月25日收到,1993年3月1日修回。

4.1 中和试验及保护性试验:将滴度为 10^7 PFU 的重组病毒以 0.3ml(对 16—18 克小白鼠皮下接种,一周后加强一针,结果初免后 14 天已有抗狂犬病毒中和抗体产生,随着时间的延长抗体滴度增高,第 28 天抗体水平达 2430(表 1);初免后 14 天用致死量狂犬病毒对免疫小鼠进行脑内攻击,保护率达 87.9%(表 1)。



图 1 Dot blot 结果

A, 重组病毒; B, 天坛株; C, 狂犬病毒糖蛋白 cDNA

Fig. 1 Dot blot result of recombinant vaccinia virus

A, Recombinant vaccinia virus; B, Vaccinia Virus; C, Rabies virus glycoprotein.

表 1 重组病毒免疫小鼠诱导的狂犬病毒中和抗体及其保护力

Tab. 1 Neutralization antibody and protection against rabies induced by recombinant vaccinia viruses in mice

免疫原 Immune agent	免疫后(天)中和抗体滴度 Rabies neutralization antibody titre post-Yaccination (day)				脑内攻击的保护力* Protection from rabies(I. c) (No. survivor/No. of challenge)
	0	14	21	28	
重组病毒 Recombinant virus	<10	118	499	2430	9/10
天坛株 Tian Tan strain	<10	<10	<10	<10	1/6

* 攻击毒 CVS 剂量 50—100LD₅₀

* CVS challenge were Performed in a dose of 50—100 LD₅₀

4.2 致病性试验:用重组病毒对小鼠及家兔进行眼角膜划痕、皮肤划痕及滴眼,天坛株作为对照,观察两组病毒的发痘情况,结果重组病毒发痘高峰时仅达卅,两周完全恢复,而天坛株发痘高峰达卅卅,两周视力严重下降(表 2)。这表明外源基因插入失活痘苗病毒 TK 区后,致病性明显减弱,虽然如此,却不影响诱生中和抗体和保护性,这与文献报道是一致的^[2,3,4]。说明重组痘苗病毒有可能发展成活疫苗。

实验证明,仅以 Lac 基因为选择标记,直接在鸡胚细胞上连续挑取蓝斑纯化的重组病毒,能诱生抗狂犬病毒中和抗体,对狂犬病毒致死量攻击有较好的保护作用,致病性明显减弱。另外,我们将重组病毒传至 30 代,其免疫原性、生物学特性及遗传性均稳定,详细内容另外发表,这些都与文献报道相一致^[1,2,3,4]。证明本研究的选择方式是可行的,为进一步研究和发

病基因工程疫苗奠定了基础。

表2 致病性试验结果

Tab. 2 Pathogenicity result of recombinant vaccinia viruses

动物 Animals	材料 Materials	眼角膜划痕(天) Cornea scarify (day)			皮肤划痕(天) Derma scarify (day)			滴眼 Eye dropping (day)		
		3	7	14	3	7	14	3	7	14
		小鼠 Mice	重组病毒 Recombinant virus	/	/	/	+	±	-	+
	天坛株 Tian Tan strain	/	/	/	+++	+	-	+++	++	-
家兔 Rabbits	重组病毒 Recombinant virus	++	++	-	+	+	-	+	±	-
	天坛株 Tian Tan strain	+++	+++	视力 严重 下降	++	+++	结痂	++	+	-

参 考 文 献

- 1 林枫,等.表达狂犬病毒糖蛋白的重组痘苗病毒的构建与鉴定.自然科学进展—国家重点实验室通讯,1991,(5):415—418
- 2 Cheng K C, et al. Selective Synthesis and Secretion of Particles Composed of the Hepatitis B Virus Middle Surface Protein Directed by a Recombinant Vaccinia Virus, Induction of Antibodies to Pre-S and Epitopes, 1987, 61(4):1286—1290
- 3 侯云德主编.分子病毒学.北京:学苑出版社,1990,19—71
- 4 高峰,等.甲型肝炎重组痘苗病毒(VMSIHAV25)的构建及其某些生物学性质.病毒学报,1992,8(2),110—114

Isolation of Vaccinia Virus Recombinants Expressing Rabies Virus Glycoprotein by Lac Gene

Li Pingping Chen Naimin Zhu Jiahong

(Wuhan Institute of Biological Products, Wuhan, 430060)

The expression plasmid pWS-4 containing Rabies virus glycoprotein gene was recombined with vaccinia viruses in the presence of Lipofectin™ Reagent by homologous recombination technique in chicken embryonic cells. The Lac gene on the recombinant was used as a selected marker for isolation of TK recombinants with blue plaque on cells. Dot blot showed that the rabies virus glycoprotein gene was inserted into vaccinia genome. The recombinant was responded specifically with McAb of rabies virus ERA strain by indirect immunofluorescence test. Mice immunized with recombinant produce rabies virus antibodies against rabies virus and were protected from the lethal challenge of rabies virus CVS strain.

Key words: Rabies virus glycoprotein gene Recombinant vaccinia virus