维普资讯 http://www.cqvip.com

34-39 15952(6)

第11卷第1期 中国病毒学 Vol.11 No.1
1996年3月 VIROLOGICA SINICA Mar. 1996

一株新的狂犬病重组痘苗病毒某些生物学性质的研究

吴 雷 朱家鸿 R512.990.3
(卫生部武汉生物制品研究所,武汉 430060) R392-33

A

提要 对表达狂犬病毒糖蛋白的重组痘苗病毒 VVM11KRG 株生物学性质进行了研究,该重组病毒的特点是:(1)糖蛋白基因插入到痘苗病毒天坛株基因组 Hind Ⅲ M 片段中;(2)启动子为痘苗病毒天坛株 P11 晚期启动子;(3)不含外源 lac 基因。该重组病毒在 CV-1 细胞和鸡胚细胞上繁殖滴度略高于另一株重组痘苗病毒 VVTK11KRG,在鸡胚细胞中繁殖滴度第三天达到最高,在 CV-1 细胞中第二天达到最高。温度稳定性与天坛株相比没有明显改变。重组病毒在家兔皮内的毒力比亲本株(天坛株)低。间接免疫荧光和 Western blot 都证明了狂犬病毒糖蛋白有良好的表达。通过 Southern blot 证实糖蛋白基因准确地插入到 Hind Ⅲ M 片段中。重组痘苗病毒启动子与部分糖蛋白基因克隆到 pGEM3zf(-)质粒上,对该段 DNA 序列分析表明不会产生移码和融合蛋白,从而为该重组病毒的使用提供了明确的基因背景资料。

关键词: 狂犬病毒糖蛋白,重组痘苗病毒,生物学性质

痘苗病毒作为哺乳动物细胞基因工程表达载体,近年来被广泛地利用,并已成功地表达了多种外源基因,由于它的基因组容量大,可在非必需区插入大量外源 DNA。因此,又是构建多价疫苗的理想载体[1]。我们为进一步研究基因工程狂犬疫苗,构建了一株表达狂犬病毒糖蛋白重组痘苗病毒 VVM11KRG。该病毒主要特点是利用痘苗病毒 P11 晚期启动子,把狂犬病毒糖蛋白基因(RG 基因)插入痘苗病毒天坛株基因组 HindⅢ M 片段中。本实验对该重组病毒生物学性质进行了研究,并在某些性质上与以前构建的重组痘苗病毒 VVTK11KRG 株作了比较。

材料与方法

1 **病毒与质粒** 重组痘苗病毒 VVM11KRG 株、VVTK11KRG 株(RG 基因插入 TK 区)由本科室构建[2]。痘苗病毒天坛株(TK^+)、质粒 p69LacS-1 由中国预防医学科学院病毒研究所提供、在本科室长期保存。

2 **抗体** 抗狂犬病毒糖蛋白单克隆抗体由本科室及美国疾病控制中心(CDC)提供。辣根过氧化物酶(HRP)标记羊抗鼠单克隆抗体购自 Sigma 公司。

3 **病毒滴定** 非洲绿猴肾细胞(CV-1)接种至 24 孔板形成单层后、病毒连续 10 倍稀释,每个稀释度取 0.3ml,吸附 1 h 后加维持液置 37℃、48 h 后结晶紫染色,根据空斑数计算病毒滴度(PFU/ml)。

4 **重组病毒的繁殖特性和温度的稳定性** 用细胞空斑滴定法、计算出不同时间和不同细胞中重组病毒的增殖情况、及在不同温度下重组病毒的稳定性。

5 **家兔皮内接种的毒力试验** 将重组病毒和痘苗病毒天坛株分别作 10 倍系列稀释,各用 0.1 ml 皮内接种家兔,背部左侧接种痘苗病毒天坛株,右侧接种重组痘苗病毒,第 4 天反应高峰时、测皮肤红肿的直径。

6 **间接免疫荧光和 Western blot 试验** CV-1 细胞长成单层后、感染重组病毒。病变后,刮下细胞离心浓缩、

本文于 1995 年 3 月 11 日收到,6 月 6 日修回

维普资讯 http://www.cqvip.com

点样于玻片上、干燥,丙酮固定,间接免疫荧光染色。取细胞裂解液,SDS-PAGE 电泳,转膜染色,Western blot 方法详见文献[3]。

7 **Southern blot** 提取重组病毒及天坛株 DNA[4],Hind Ⅲ 酶切,0.7%琼脂糖凝胶电泳过夜、变性、中和、转膜采用 DNA 从琼脂糖凝胶同时向两个固体转移的方法。后与 α-^{32}PdCTP 标记的 RG 基因及 M 基因(来自 p69LacS-1 质粒)探针进行杂交,在双面增感屏中放 X 光片 -70℃曝光 4 d。

8 **P_{11}启动子与部分 RG 基因序列的克隆及测定** 克隆出 RG 基因及其启动子于 puc18 质粒上。亚克隆部分 RG 基因和 P_{11}启动子于 pGEM3zf(-)质粒上,双脱氧法质粒测序。P_1 反向引物,用 Pharmacia LKB 测序仪。方法见文献[3]。

结　果

1 **繁殖特性及温度稳定性** 重组病毒 VVM11KRG 株比 VVTK11KRG 株在鸡胚细胞和 CV-1 细胞中繁殖能力略高。两种重组病毒在鸡胚细胞中繁殖能力第三天达到最高,CV-1 细胞中则第二天达到最高。如图 1。用 5%蛋白胨分别将重组病毒和天坛株稀释至 10^7PFU/ml,分装小管,各置 37℃、室温(22℃)和 4℃若干天后 -20℃保存,每个温度组标本收齐后立即做空斑滴定。如表 1。三种温度下经过一段时间后病毒滴度都有一定下降,但重组病毒的下降程度与天坛株无明显差别。

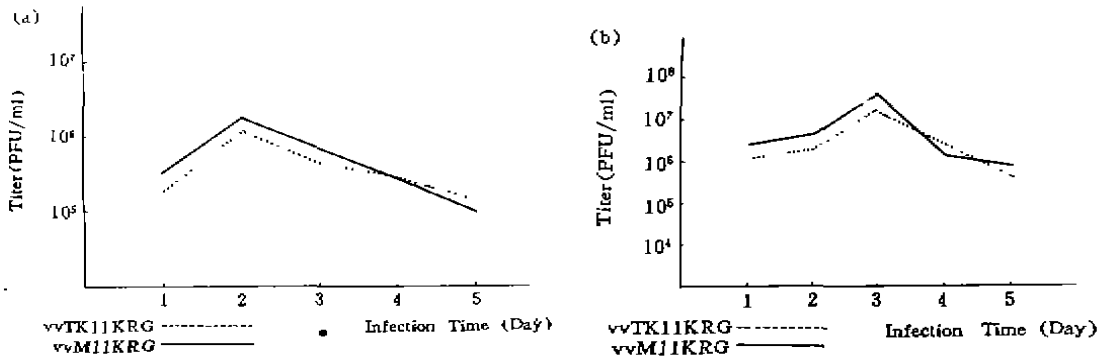

图 1　重组病毒在(a)CV-1 细胞(b)鸡胚细胞不同时间的增殖曲线

Fig 1 The curve of growth in (a) CV-1 cell (b) chicken embryo cell in different time

2 **重组病毒的毒力** 家兔皮内注射后 4 天的皮肤红肿反应结果见表 2。天坛株引起皮肤红肿反应所需的病毒量明显少于重组病毒。这说明 VVM_{11}KRG 株在家兔皮内毒力略高于以前构建的 $VVTK_{11}$KRG 株。

3 **狂犬病毒糖蛋白表达的检定** 糖蛋白在细胞膜上表达,与荧光抗体结合后在荧光显微镜下出现荧光物质(图 2a)。SDS-PAGE 电泳转膜,与糖蛋白单抗特异性反应,显色后重组病毒在 67000 Da 处有一明显的狂犬病毒糖蛋白带(图 2b)。

维普资讯 http://www.cqvip.com

表1 重组病毒在不同温度下的稳定性

Tab 1 The stability of recombinant vaccinia virus at different temperatures

温度 Temp.	病毒 Virus	病毒滴度 Titer(× 10^6PFU/ml) 0	2	4	7	14D	1M	3M
37℃	VVM11KRG	15	6.5	4.8	3.5			
	VVTK11KRG	25	10 8	5.5	3.3			
	V.V.	20	8.6	7.2	5.0			
22℃	VVM11KRG	15			2.7	2.5	0 6	
	VVTK11KRG	25			3.1	2.9	1.5	
	V.V.	20			3.4	2.3	0.9	
4℃	VVM11KRG	15					7.4	5.4
	VVTK11KRG	25					4.5	4.1
	V.V.	20					8.5	4.2

表2 重组病毒与痘苗病毒在家兔皮内毒力的比较

Tab 2 Comparison of the intradermal virulence of recombinant virus and vaccinia virus in rabbits (Diameters of dermal lesions in cm)

病毒 Virus (1 6 × 10^8PFU/ml)	皮肤红肿的直径(cm) Diameters of dermal lesions in cm −2	−3	−4	−5	−6	−7
VVIK11KRG	0 6	0.4	0 2	0.0	0.0	
VVM11KRG	0 8	0.6	0.6	0 4	0.2	0 0
Vaccinia Virus *	未测	未测	0.8	0.7	0.6	0 5

* 痘苗病毒天坛株 Vaccinia Virus (Tiantan strain)

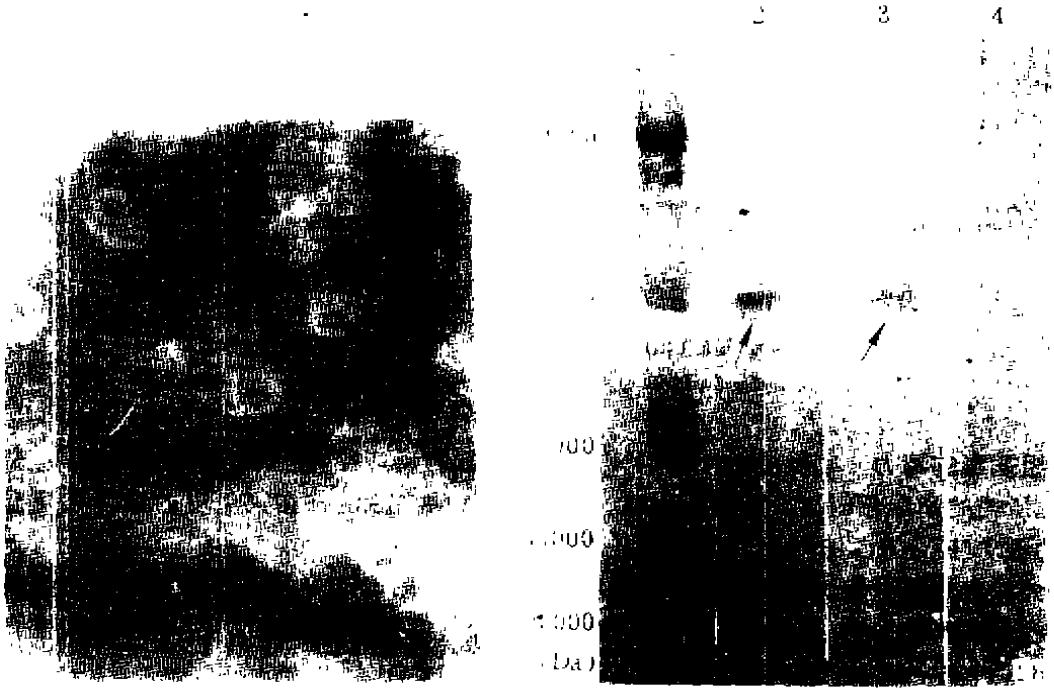

图2 a 间接免疫荧光结果 b Western blot 结果 1. 分子量标准 2. VVM11KRG 株

维普资讯 http://www.cqvip.com

3　VVTK11KRG株　　4.　痘苗天坛株

Fig 2　a　IFA of the recombinant vaccinia virus VVM11KRG-infected CV-1 cell

b　Western blot of the recombinant vaccinia virus VVM11KRG－infected cell

(1) molecular weight marker　　(2) VVM11KRG strain

(3) VVTK11KRG strain　　(4) vaccinia virus (Tiantan strain)

4　Southern blot　放射自显影结果图3可见,重组病毒VVM11KRG株DNA与M基因和RG基因探针杂交,M片段消失,代之以4.1 kb片段,而天坛株DNA与G基因探针杂交不出现反应,表明RG基因插入到天坛株HindⅢ M片段中。

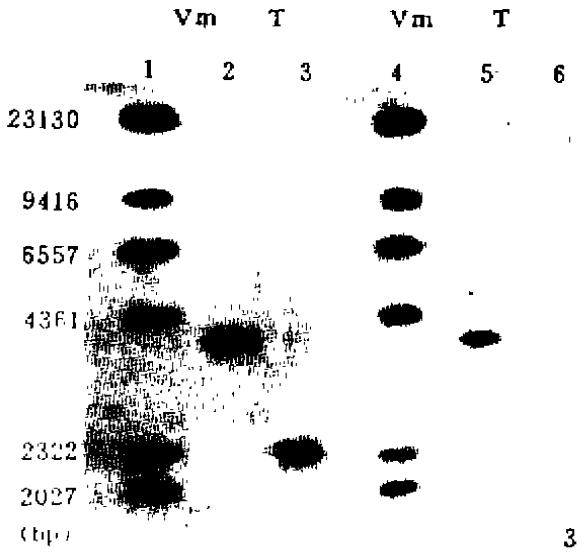

图3　Southern blot检测狂犬病毒G基因存在及其在重组痘苗病毒DNA中的位置

2.3　为痘苗病毒M基因探针杂交结果;

5.6　为狂犬病毒G基因探针杂交结果;

1.4　为DNA分子量标准;

2.5　重组病毒VVM11KRG株;

3.6　痘苗病毒天坛株。

Fig.3 Identified RG gene and location by Southern blot hybridization

2.3 hybridization with α-32p-M DNA probe

5.6 hybridization with α-32p-G DNA probe

1.4 molecular weight marker

2.5 recombinant vaccinia virus (VVM11KRG strain)

3.6 vaccinia virus (Tiantan strain)

5　P_{11}启动子与糖蛋白基因间隔序列分析　DNA克隆、亚克隆酶切鉴定结果如图4。间隔序列测定结果如下:

5′GGGAT　CC TCT AGAAG　CGATG　CTACA　CTAGT　CACAA　TCACC

XbaI

ACTTT　CATAT　TTACA　ATATA　TGGTA　AAAAT　ATAGT　AGAAT

TTCAT　TTTGT　TTTTT　TCTAT　GCTA T　AA*ATG　AATTC　C TAG▲G

CCTCG　AGATC　CCCAT　CGAAT　TCGGG　C ATGG　TTCCT　CAGGT

TCTTT　TGTTT　GTACT　CCTTC　TGGGT　TTTTC　GTTGT　GTTTC

维普资讯 http://www.cqvip.com

TAA* ATG 为痘苗病毒转录起始特殊序列，TAA* 之前为 P_{11}晚期启动子。TAG* 为翻译终止密码子，TAA* 与 ATG 之间为间隔序列。

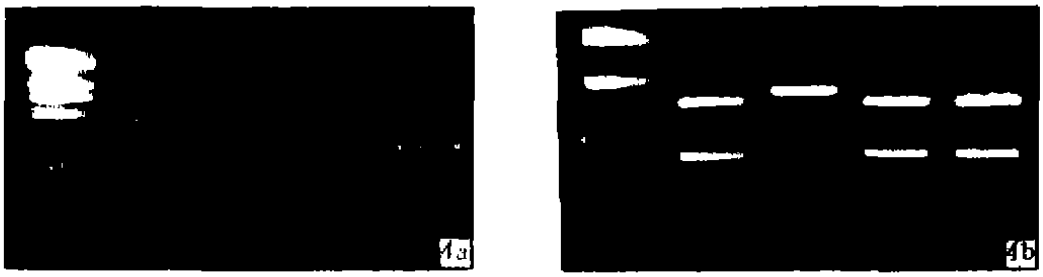

图4 克隆(a)及亚克隆(b)酶切鉴定结果

Fig.4 Electrophoresis of endonuclease restriction of clone plasmids(a) and subclone plasmids (b)

讨 论

作为基因工程疫苗的研究，了解以痘苗病毒为载体，外源基因插入后对痘苗病毒生物学性质的影响是很重要的。

较多学者是利用痘苗病毒的胸腺核苷激酶(TK)区插入外源基因。而我们研究的重组痘苗病毒是将狂犬病毒糖蛋白基因插入到痘苗病毒另一个非必需区—HindⅢ M 片段。根据我们的研究结果来看，该重组病毒有良好的繁殖、温度稳定性和表达糖蛋白的能力，较好的中和抗体诱导能力和对 CVS 株攻击免疫保护力。据报道痘苗病毒 HindⅢ M 区适合外源基因表达和基因工程疫苗的研究[5]。

重组痘苗病毒 RG 基因置于 P_{11}启动子控制下，P_{11}启动子比 $P_{7.5}$启动子表达量要高[6]，启动子自身所带的 ATG 与 RG 基因 ATG 之间设有翻译终止信号 TAG，不会产生融合蛋白。

作为表达载体的痘苗病毒，尽可能降低它的毒性，提高外源蛋白表达量是研究的一个重要方面。通过对痘苗病毒基因组非必需区的插入、缺失等方法使其毒力降低，但所表达的外源蛋白能诱导产生中和抗体，有良好的免疫保护力，都是疫苗所必需的。

参 考 文 献

1 Perkus M E, Piccini A, Lipinskas B R, *et al*. Recombinant vaccinia virus: Immunization against multiple pathogens. Science, 1985; 229: 981

2 蔡兵，朱家鸿，胡巧玲等. 构建以痘苗病毒为载体的人用狂犬病基因工程疫苗株的研究. 中华实验和临床病毒学杂志, 1994; 8(2): 105

3 Sambrook J, Fritsch E F, Maniatis T. Molecular cloning 2nd ed. New York, USA: . Cold spring harbor laboratory press, 1989

4 Esposito J J, Knight J C, Shaddock J H, *et al*. Successful oral rabies vaccination of raccoons with raccoon poxvirus recombinants expressing rabies virus glycoprotein. Virology, 1988; 165(1): 313

5 徐水蝉，阮力，朱既明. 痘苗病毒天坛株非必需区与病毒生物学性状的关系. 病毒学报, 1992, 8(4): 293

6 Esposito J J. Vaccinia virus recombinants expressing rabiesvirus glycoprotein against rabies virus. Virus Genes, 1987; 1: 17

维普资讯 http://www.cqvip.com

Biological Properties of a New Strain of Recombinant Vaccinia Virus Expressing Rabies Virus Glycoprotein

Wu Lei　Zhu Jiahong

(*Wuhan Institute of Biological Products, Ministry of Public Health, Wuhan*, 430060)

The recombinant vaccinia virus (VVM11KRG strain) contains rabies virus glycoprotein gene (RVGG) which was inserted into the Hind Ⅲ M fragment of vaccinia virus (V. V.) genome. The RVGG was promoted by p11 promoter of V. V. The VVM11KRG does not contain lac gene. The study showed that its titer is higher than that of another recombinant vaccinia virus (VVTK11KRG strain) in chicken embryo cell and CV-1 cell. Its titer reaches the highest point in chicken embryo cell in the third day and in CV-1 cell in the second day after inoculation. Its stability is no difference comparing with parent strain at different temperatures. The virulence of VVM11KRG is lower than that of vaccinia virus. Western blot and IFA proved that rabies virus G protein was expressed. Southern blot showed that the RVGG was inserted into Hind Ⅲ M fragment of vaccinia virus. The fragment between glycoprotein gene and promoter was cloned to plasmid pGEM3zf(−). The DNA was sequenced by Pharmacia LKB DNA sequencer. Thus we obtained a clear DNA reference data for the usage of recombinant vaccinia virus.

Key words　Rabies virus glycoprotein, Recombinant vaccinia virus, Biological properties