

## 双表达狂犬病毒基因的非复制型痘苗病毒改建及免疫效果\*

黄薇<sup>1</sup>, 徐葛林<sup>1</sup>, 胡巧玲<sup>1</sup>, 李萍<sup>1</sup>, 王继麟<sup>1</sup>, 严家新<sup>1</sup>,  
吴杰<sup>1</sup>, 祝玉桃<sup>1</sup>, 阮力<sup>2</sup>, 朱家鸿<sup>1\*\*</sup>

(1. 武汉生物制品研究所, 湖北武汉, 430070; 2. 中国疾病预防控制中心病毒病预防控制所, 北京, 100050)

## Construction and Immunogenicity Study of the Improved Non-replicating Vaccinia Recombinant Co-expressing Rabies Virus Glycoprotein and Nucleoprotein

HUANG Wei<sup>1</sup>, XU Ge-lin<sup>1</sup>, HU Qiao-ling<sup>1</sup>, LI Ping<sup>1</sup>, WANG Ji-lin<sup>1</sup>, YAN Jia-xing<sup>1</sup>,  
WU Jie<sup>1</sup>, ZHU Yu-tao<sup>1</sup>, RUAN Li<sup>2</sup>, ZHU Jia-hong<sup>1\*\*</sup>

(1. Wuhan Institute of Biological Products, Wuhan 430060, China; 2. Institute for Viral Disease Control and Prevention, The Chinese Centre for Disease Control and Prevention, Beijing 100050, China)

**Abstract:** To improve the safety of recombinant vaccinia virus, a non-replicating vaccinia recombinant co-expressing rabies virus glycoprotein(RG) and nucleoprotein(RN) without a selectable marker was reconstructed. LacZ between fragment C and fragment K in non-replicating recombinant vaccinia virus VTKRG $\Delta$ CKlacZ was deleted and was substituted with rabies virus nucleoprotein by homologous recombination resulting in VTKRG $\Delta$ CKRN. The recombinant vaccinia virus was screened by a two-step selection under G418 and with White/Blue plaque color change as well as immunofluorescence. By Dot Blot analysis, RG gene and RN gene were shown to integrate stably into the non-replicating vaccinia recombinants even after 20 passages in CEF cells. The virulence of VTKRG $\Delta$ CKRN was obviously less than that of VTKRG in naked mouse. The non-replicating characterization of VTKRG $\Delta$ CKRN was also stable. It was proved that VTKRG $\Delta$ CKRN could express RG and RN at the same time. VTKRG $\Delta$ CKRN could elicit viral neutralizing antibody(VNA) similar to that of VTKRG by inoculated into the mice, and thus protect the animals from lethal challenge of rabies virus. It could elicit efficient viral neutralizing antibody(VNA) and protect the dogs from lethal challenge of rabies street strain SBD by intramuscular inoculation at dose of only  $1.6 \times 10^6$  PFU. This study confirmed the efficacy and safety of non-replicating recombinant vaccinia virus VTKRG $\Delta$ CKRN.

**Key words:** Non-replicating vaccinia virus vector; Rabies virus glycoprotein; Rabies virus nucleoprotein; Recombinant Rabies vaccine

**摘要:** 为减少重组病毒非必需外源基因, 进一步提高非复制重组痘苗病毒狂犬病疫苗的安全性, 本研究改建不含报道基因 LacZ 的双表达狂犬病毒 aG 株 G、N 的非复制重组痘苗病毒 VTKRG $\Delta$ CKRN。采用 G418-neo 富集、蓝白斑及免疫蚀斑筛选等方法, 以表达狂犬病毒糖蛋白(RG)基因的非复制重组痘苗病毒 VTKRG $\Delta$ CKlacZ 作为亲本株, 利用同源重组原理, 删除 C 与 K 片段间 lacZ, 并将狂犬病毒核蛋白(RN)基因插入 C-K 片段间。经核酸及蛋白水平检测表明 VTKRG $\Delta$ CKRN 能同时稳定有效地表达狂犬病毒 G 和 N, 并具有非复制病毒生长特性。重组病毒裸鼠毒力实验表明 VTKRG $\Delta$ CKRN 较复制型重组痘苗病毒 VTKRG 病毒毒力显著减弱。VTKRG $\Delta$

收稿日期: 2004-02-06, 修回日期: 2004-03-27

\* 基金项目: 武汉市晨光计划资助项目(990035); 国家 863 高科技生物领域及国家自然科学基金资助(39525001)。

作者简介: 黄薇(1968-), 女, 湖北武汉籍, 博士研究生, 研究方向为分子病毒与免疫学

\*\* 通讯作者。Corresponding author. Tel: 0571-88861601, E-mail: zj9807@sohu.com

CKRN 免疫小鼠可诱生较高有效中和抗体,并能保护小鼠免于致死剂量狂犬病毒攻击。以  $1.6 \times 10^6$  PFU 较低免疫剂量、仅一次免疫即可保护狗经致死量中国狂犬病毒街毒株 SBD 株攻击后存活,诱生具有保护性中和抗体。非复制狂犬-痘苗重组病毒 VTKRG  $\Delta$  CKRN 免疫效果好、更具安全性。

**关键词:** 非复制型痘苗病毒载体; 狂犬病毒糖蛋白; 狂犬病毒核蛋白; 狂犬病重组疫苗

**中图分类号:** S852.65

**文献标识码:** A

**文章编号:** 1003-5125 (2004)04-0376-04

近年来表达狂犬病毒糖蛋白的重组痘苗 (VRG) 有效控制野生动物狂犬病的实验在 西欧、北美实验森林区获得成功<sup>[1]</sup>, 以痘苗病毒为载体的狂犬病重组疫苗显示出较大的应用前景。然而痘苗病毒接种人体后产生副反应, 特别是在免疫缺陷患者中可引起严重的并发症, 限制其广泛应用。我国预防医学科学院病毒所阮力教授等成功构建了我国非复制痘苗载体。该载体高度减毒, 在人体中不能繁殖后代, 但在病毒复制的早、晚期却能有效表达外源基因<sup>[2]</sup>, 保持了外源基因的免疫源性, 提高了载体的安全性。1999 年, 我所与中国预防医学科学院病毒所合作构建了双表达狂犬病毒糖蛋白、核蛋白的带有 LacZ 非复制重组痘苗病毒 VTKRG  $\Delta$  CKRN LacZ<sup>[3]</sup>。为了进一步提高疫苗毒株的安全性, 减少非必需外源基因的潜在危害, 本实验进一步以非复制痘苗病毒为载体, 按人用疫苗要求, 构建不含报道基因 LacZ 的双表达狂犬病毒糖蛋白、核蛋白的非复制重组痘苗病毒 VTKRG  $\Delta$  CKRN。并对该非复制重组痘苗病毒进行鉴定和免疫效果及减毒特性研究。

## 1 材料和方法

### 1.1 实验材料

VTKRG  $\Delta$  CKlacZ 为 TK 区插入中国狂犬病毒疫苗 5aG 株的 G 基因, N、M 片段和大部分 C、K 片段缺失被插入 lacZ 所取代的非复制重组痘苗病毒, 由本室与中国预防医学科学院病毒所合作构建。VTKRG 为 TK 区含有 5aG 株 G 基因的痘苗病毒天坛株, 由本室李萍构建<sup>[3]</sup>。VTT 为痘苗病毒天坛株, CVS 为狂犬病毒国际标准攻击毒株, SBD 为中国狂犬病毒街毒株, 人 TK143 细胞等来源见文献<sup>[4]</sup>。鸡胚纤维细胞 (CEF) 按常规方法制。质粒 pBluescript-RG、pGEM-3ZRN 分别含有中国狂犬病疫苗 5aG 株 G 基因及 N 基因的全序列, G 基因和 N 基因均由本室克隆、测序<sup>[5,6]</sup>。质粒 pNeoC 1175K 由中国预防医学科学院病毒所构建, 含有与痘苗病毒 C、K 片段同源的部分序列。重组质粒 pNeoC 1175RNK 由本室李萍构建, 将质粒 pGEM-3ZRN 经 XbaI、HindIII 双酶切, 回收 RN 基因,

Klenow 补平, T4DNA 连接酶连接, 获得重组质粒 pNeoC 1175RNK, RN 基因置于 P7.5 启动子下。

### 1.2 病毒的重组、筛选及鉴定

脂质体转染技术将重组质粒 pNeoC 1175RNK 与非复制型重组痘苗病毒 VTKRG  $\Delta$  CklacZ 共转染 CEF 细胞中。采用 G418-Neo 及蓝斑中挑白斑病毒的双重筛选法<sup>[7]</sup>。间接免疫荧光法<sup>[4]</sup>、Western Blot<sup>[4]</sup>、Dot Blot 及其在 CEF 细胞生长, 在 TK143 细胞中不生长的特性筛选、鉴定同时表达 RG、RN 的非复制重组病毒 VTKRG  $\Delta$  CKRN。抗 RG 单克隆抗体由美国 CDC Dr. JS Smith 赠; 抗 RN 单克隆抗体由本室提供; 回收质粒 pBluescript-RG、pGEM-3ZRN 中 RG、RN 片段, 按德国 Borhinger Mannheim 公司地高辛标记 DNA 标记及检测试剂盒说明书操作, 制备 RG、RN 地高辛标记探针。病毒 DNA 提取参见文献<sup>[4]</sup>。

### 1.3 动物免疫

10-12g 小鼠分六组, 以  $0.5\text{mL}(2 \times 10^7 \text{pfu/mL})$  的非复制型重组病毒 VTKRG  $\Delta$  CKRN、 $0.5\text{mL}(2 \times 10^7 \text{pfu/mL})$  复制型重组病毒 VTKRG、于 0, 7d 分别经腹腔、皮下免疫 2 次。于 7、14、21、28d 眼眶取血, 每份血样为 4-5 只小鼠的混合血样。以 RFFIT (快速荧光灶抑制实验) 检测中和抗体<sup>[8]</sup>。小鼠攻击试验方法参见文献<sup>[9]</sup>。

将体重相同的狗分为四组, 每组四只。同时设立生理盐水空白对照组。以  $10^5 - 10^8 \text{pfu/mL} \times 2\text{mL}$  剂量的重组病毒 VTKRG  $\Delta$  CKRN 分别经肌肉免疫狗一次, 于 28d 心脏取血, 每份血样为 4 只狗的混合血样。以 RFFIT (快速荧光灶抑制实验) 检测中和抗体。28d 后以  $28\text{LD}_{50}$  SBD 街毒株经肌肉途径途径攻击免疫狗, 连续观察 45d, 计算存活。

## 2 结果

### 2.1 非复制型重组痘苗病毒 VTKRG $\Delta$ CKRN 的构建

重组病毒 VTKRG  $\Delta$  CklacZ 作为亲本株, 与质粒 pNeoC1175RNK 在 CEF 细胞进行同源重组, 删除 C 与 K 间 lacZ, 并将 N 基因插入 C-K 片段间。采用 G418-Neo 及蓝斑中挑白斑病毒的双重筛选

法、免疫荧光法筛选获得双表达 RG 及 RN 且不带有 lacZ 的非复制重组病毒 VTKRG Δ CKRN。

### 2.2 VTKRG Δ CKRN 在 CEF 及 TK-143 中的生长特性

以相同的病毒量分别感染 CEF 和人 TK-143 细胞, 33°C 培养 72h, 结果可见 VTKRG Δ CKRN 在 CEF 细胞中形成许多病毒蚀斑。但在 TK-143 细胞未见蚀斑; 复制型重组病毒 VTKRG 在 CEF 和 TK-143 细胞中均能形成许多病毒斑 (图 1)。

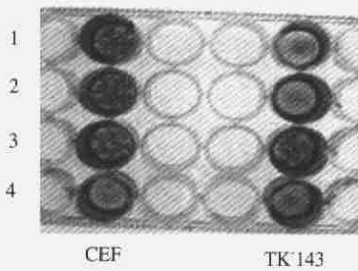


图 1 VTKRG Δ CKRN 在 CEF 及 TK-143 中生长特性的比较  
Fig.1 Comparison of growth character of VTKRG Δ CKRN in CEF and TK-143 TK-143 and CEF stained with crystal violet

1/2, Comparison of growth character of VTKRG Δ CKRN in CEF and TK-143; 3, Comparison of growth character of VTKRG in CEF and TK-143; 4, TK-143 and CEF

### 2.3 VTKRG Δ CKRN 及其表达产物的鉴定

将 VTKRG Δ CKRN 于 CEF 细胞及 CV-1 细胞上连续传代 20 代后, Dot Blot 检测表明 G 基因、N 基因插入了重组病毒 VTKRG Δ CKRN 的 DNA 中, 并稳定存在, 图略。间接免疫荧光检测结果显示, VTKRG Δ CKRN 能同时表达 RG、RN 蛋白, 见图 2。Western Blot 分析结果显示, 第 20 代 VTKRG Δ CKRN 表达蛋白在 65-kDa 和 50.kDa 处各有一特异酶染条带(图略)。上述试验表明 VTKRG Δ CKRN 可有效、稳定地表达 RG 和 RN 蛋白。

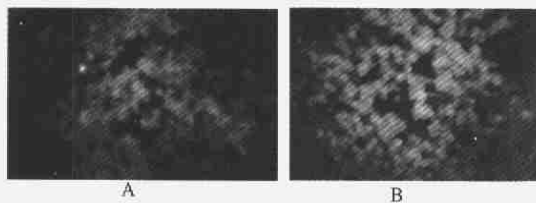


图 2 间接免疫荧光法检测 VTKRG Δ CKRN 在 CV-1 细胞中表达 RG、RN 的荧光灶

Fig.2 Detection of fluorescent focus of VTKRG Δ CKRN expressing RG、RN in CV-1

A, Detection of fluorescent focus of VTKRG Δ CKRN expressing RG in CV-1; B, Detection of fluorescent focus of VTKRG Δ CKRN expressing RN in CV-1

### 2.4 裸鼠体内毒力试验

将不同病毒量 VTKRG 与 VTKRG Δ CKRN、VTT 腹腔内接种 16-18g 裸鼠, 连续观察一个月, 记录裸鼠死亡数。表 1 结果显示: 以  $1 \times 10^7$  pfu 的 VTKRG Δ CKRN 腹腔接种裸鼠, 裸鼠无一死亡; 而接种  $1 \times 10^5$  pfu 的 VTKRG 10d 即可引起裸鼠死亡, 接种  $1 \times 10^3$  pfu 的 VTT 8d 即可引起裸鼠死亡。

表 1 VTKRG 和 VTKRG Δ CKRN、VTT 的裸鼠体内毒力比较  
Table1 Comparison of nude mice virulence among VTKRG

VTKRG Δ CKRN and VTT		
	Injected virus titer (pfu)	Death number
VTKRG Δ CKRN	$10^7$	0/4
	$10^6$	0/4
	$10^2$	0/4
VTKRG	$10^4$	0/4
	$10^5$	3/4
	$10^6$	4/4
VTT	$10^2$	0/4
	$10^3$	1/4
	$10^4$	4/4

### 2.5 重组病毒免疫小鼠诱生中和抗体的检测

以  $1 \times 10^7$  pfu 剂量 VTKRG Δ CKRN、VTKRG、VTT 于 0、7d 分别经腹腔、皮下免疫 2 次。于 7、14、21、28d 采血, 以 RFFIT 检测中和抗体。表 2 结果表明: VTKRG Δ CKRN、VTKRG 腹腔、皮下途径免疫均可诱生 VNA, 初免后 14d VNA 效价均大于 0.5IU, 14-21d 腹腔免疫较皮下免疫诱生 VNA 效价高 2-3 倍, 对照 VTT 免疫小鼠检测血清中和抗体为阴性。VTKRG Δ CKRN 诱生 VNA 与 VTKRG 诱生 VNA 效价相当。

表 2 重组病毒在小鼠体内诱生的中和抗体滴度的比较  
Table 2 Comparison of viral neutralizing antibody induced by recombinants in mice

Virus for immunization	Route	Titer of neutralizing antibody (IU)			
		7d	14d	21d	28d
VTKRG Δ CKRN	i.m	0.2	0.5	1.1	3.3
	i.p	0.3	1.6	3.3	4.7
VTKRG	i.m	0.25	0.5	1.1	2.8
	i.p	0.35	1.1	3.1	4.2
VTT	i.p	<0.1			

### 2.6 重组病毒 VTKRG Δ CKRN 免疫狗诱生中和抗体检测

以  $10^5 \sim 10^8$  pfu/mL  $\times$  2mL 剂量的重组病毒 VTKRG Δ CKRN 分别经肌肉免疫狗一次, 于 28d 心脏取血, 每份血样为 4 只狗的混合血样。以 RFFIT (快速荧光灶抑制实验) 检测中和抗体。见表 3。结果显

示:中和抗体检测表明该实验疫苗以较低的免疫剂量、仅一次免疫次数免疫狗 28d 可产生抗体, VNA 大于 0.5IU, 即产生了保护性免疫。

表 3 重组病毒在狗体内诱生的中和抗体滴度的比较  
Table 3 Comparison of viral neutralizing antibody induced by recombinants in dog

Virus for immunization	Injected virus titer (pfu)	Titer of neutralizing Ab (IU)
VTKRG $\Delta$ CKRN	$2 \times 8 \times 10^5$	0.8
	$2 \times 4 \times 10^6$	0.8
	$2 \times 2 \times 10^7$	1.0
	$2 \times 1 \times 10^8$	1.0
Control	0	0.2

Injection route: muscle i.m.; Injectes time: 1.

### 2.7 小鼠攻击保护实验

以  $1 \times 10^7$  pfu 剂量 VTKRG $\Delta$ CKRN、VTKRG、VTT 各自分别腹腔免疫四组 (每组 8 只) 小鼠, 于 7d 再同等剂量加强免疫一次。初免第 14d, 以狂犬病毒 CVS 株、SBD 街毒株经肌肉、脑内途径分别攻击免疫小鼠, 观察 21d, 结果表明, 经 VTKRG $\Delta$ CKRN、VTKRG 免疫各组小鼠均能获得 100% 保护。而免疫 VTT 的以狂犬病毒 CVS 株分别经肌肉、脑内途径攻击的二组小鼠以及免疫 VTT 的以 SBD 街毒株经肌肉、脑内途径分别攻击的二组小鼠全部死亡。

### 2.8 免疫狗的攻击保护效果

分别以  $1.6 \times 10^6$  pfu、 $8 \times 10^6$  pfu、 $4 \times 10^7$  pfu、 $2 \times 10^8$  pfu 剂量的重组病毒 VTKRG $\Delta$ CKRN 经肌肉免疫狗一次 (每剂量组 4 只狗), 28d 后以 28 L D<sub>50</sub>SBD 街毒株经肌肉途径途径攻击免疫狗, 连续观察 45d, 计算存活, 同时设立生理盐水空白对照组。结果表明, 经上述剂量 VTKRG $\Delta$ CKRN 免疫狗均能获得 100% 保护。对照全部死亡。

## 3 讨论

我国是世界上狂犬病高发国家之一, 为了降低狂犬病发病率, 控制传染源, 必须发展安全、有效、稳定、经济的基因工程狂犬疫苗。非复制痘苗病毒载体构建疫苗兼备灭活、活疫苗的优点, 既可有效表达外源抗原、诱生细胞及体液免疫; 又不可能水平传播, 因它在大多数哺乳动物细胞上流产性复制, 大大提高了痘苗病毒载体的安全性, 同时可降低机体内针对痘苗病毒的抗体<sup>[10]</sup>。新构建的重组病毒 VTKRG $\Delta$ CKRN 可有效、稳定地表达 RG 和 RN 蛋白, VTKRG $\Delta$ CKRN 免疫小鼠, 能 100% 保护致死量 CVS 株及 SBD 株攻击

并诱生中和抗体, 其效价与复制型的重组病毒 VTKRG 相当。VTKRG $\Delta$ CKRN 同时表达 RG、RN 基因, 可增强非复制重组疫苗免疫效果, N 蛋白在辅助中和抗体产生及产生 IFN, 对细胞免疫及免疫粘附方面都起到积极作用<sup>[11]</sup>。狗免疫、攻击保护实验结果表明, VTKRG $\Delta$ CKRN 以  $1.6 \times 10^6$  PFU 较低的免疫剂量、仅一次免疫次数免疫狗可保护狗经致死量 SBD 株攻击后存活, 诱生具有保护性中和抗体, 这一结果提示免疫狗疫苗生产不需浓缩, 将有利促进疫苗生产低成本。鉴于 VTKRG $\Delta$ CKRN 在人 TK-143 细胞中未出现细胞病变, 不能正常复制; 按疫苗安全性要求不含报道基因 (*lacZ*); 更可喜的裸鼠体内毒力试验证明非复制型重组痘苗病毒 VTKRG $\Delta$ CKRN 在免疫缺陷动物裸鼠体内的毒力较复制型重组病毒 VTKRG 显著降低,  $10^7$  PFU 病毒接种裸鼠仍无一发病。上述研究结果充分表明非复制型重组病毒 VTKRG $\Delta$ CKRN 更具安全性。现已进一步扩大动物免疫及优先免疫途径和剂量研究, 有望发展成更安全、高效、经济的兽用、人用基因工程狂犬病疫苗。

## 参考文献

- [1] Brochier B, Kieny M P, Costy F, *et al.* Large scale eradication of rabies using recombinant vaccinia rabies vaccine[J]. *Nature*, 1991, 354: 520-522.
- [2] 姜玉梅. 非复制重组痘苗病毒天坛株载体的构建及其特性研究[D]. 北京: 中国预防医学科学院病毒研究所, 1996.
- [3] 李萍, 朱家鸿, 严家新, 等. 狂犬病毒糖蛋白及核蛋白在非复制型痘苗病毒天坛株中的共同表达[J]. *中华微生物和免疫学杂志*, 2000, 20(5): 481-484.
- [4] 林枫, 朱家鸿, 陈乃民, 等. 表达狂犬病毒糖蛋白的痘苗病毒的构建与鉴定[J]. *病毒学报*, 1992, 8 (3): 210-214.
- [5] 温冷, 朱家鸿, 等. 狂犬病毒 5aG 株糖蛋白基因的克隆与序列分析[J]. *中华实验和临床病毒学杂志*, 1995, 9 (3): 198-202.
- [6] 欧阳沁春, 朱家鸿, 等. 狂犬病毒 5aG 株核蛋白基因的克隆与序列分析[J]. *中华实验和临床病毒学杂志*, 1997, 11(1): 14-16.
- [7] 李萍, 胡巧玲, 孙朝晖, 等. 表达狂犬病毒糖蛋白的非复制型痘苗病毒的构建与鉴定[J]. *中华实验和临床病毒学杂志*, 1999, 13(2): 170-174.
- [8] 严家新, 李承平, 朱家鸿, 等. 检测狂犬病毒中和抗体的快速荧光灶抑制试验(RFFIT)方法[J]. *中国生物制品学杂志*. 1998, 11(2): 93-96.
- [9] 朱家鸿, 王继麟, 蔡兵, 等. 表达狂犬病毒不同蛋白的重组痘苗病毒的免疫原性和致病性[J]. *中国病毒学*, 1996, 11(5):6.
- [10] 马海伦, 孙朝晖, 陆柔剑, 等. 同时表达多种外源基因的非复制型痘苗病毒的构建[J]. *病毒学报*, 1999, 15(1): 21-27.
- [11] Tollis M, Dietzschool B, Volia C, *et al.* Immunization of monkeys with rabies RNP confers protective immunity against rabies[J]. *Vaccine*, 1991, 9(2): 134-136.