

表达狂犬病病毒糖蛋白的重组犬 2 型腺病毒的构建*

张守峰, 扈荣良**, 肖跃强, 田向阳, 夏咸柱

(军事医学科学院军事兽医研究所, 吉林长春 130062)

Construction of Recombinant Canine Adenovirus Type-2

Expressing Rabies Virus Glycoprotein

ZHANG Shou-feng, HU Rong-liang**, XIAO Yue-qiang, TIAN Xiang-yang, XIA Xian-zhu

(Military Veterinary Institute, Academy of Military Medical Sciences, PLA, Changchun 130062, China)

Abstract: To construct a new type of vaccine for dog Rabies prevention, *Canine adenovirus* type-2 was developed for *Rabies virus* glycoprotein expression. A 1044bp fragment of the E3 region of canine adenovirus type-2 in plasmid pVAX-E3 (7.86kb) was deleted by *Dra* / *Ssp* double digestion, and an expression cassette of 2424bp in length, composed of the cytomegalovirus immediately early promoter, *Rabies virus* strain SRV₉ glycoprotein cDNA and SV40 polyadenylation signal, was cloned into the deleted site. The *Nru* -*Sal* fragment of pPoly -CAV-2 excluding the E3 region and the *Nru* -*Sal* fragment of pVAX-E3 containing the expression cassette of the *Rabies virus* glycoprotein were recombined into pPoly -CAV2-CGS. The recombinant CAV-2 genome was released by *Asc* / *Cla* digestion and was transfected into MDCK cells by Lipofectamine™ 2000. *Canine adenovirus* typical CPE and the recombinant virus, CAV-2-CGS, were observed 8 d after transfection. *Rabies virus* glycoprotein expression was confirmed by Western blotting analysis. Preliminary immunization trial in dogs showed that the recombinant virus could stimulate specific immune response to both vector virus and *Rabies virus*.

Key words: *Rabies virus*; Glycoprotein; *Canine adenovirus* Type-2; Recombinant virus

摘要: 本试验以犬 2 型腺病毒全基因组重组质粒 pPoly -CAV-2 及其 E3 区重组质粒 pVAX-E3 为基础, 通过 *Dra* 和 *Ssp* 双酶切, 缺失第 25097bp-26141bp 共 1044bp 的 E3 区片段, 按与编码链相同转录方向插入由 CMV 启动子、狂犬病病毒 SRV₉ 株糖蛋白基因、SV40 polyA 基因构成的总长 2424bp 的表达盒, 获得重组基因组质粒 pPoly -CAV-2-CGS(34.7kb)。以 *Asc* 和 *Cla* 双酶切, 游离重组基因组 (32.7kb), 在脂质体 Lipofectamine™ 2000 介导下, 转染 MDCK 细胞系, 获得了 E3 缺失区携带狂犬病病毒糖蛋白表达盒的重组犬 2 型腺病毒 CAV-2-CGS。Western 印迹试验表明, CAV-2-CGS 表达了狂犬病病毒糖蛋白。初步接种试验显示, 重组病毒可以诱导犬产生狂犬病病毒特异性抗体。

关键词: 狂犬病病毒; 糖蛋白; 犬 2 型腺病毒; 重组病毒

中图分类号 R 373.9

文献标识码: A

文章编号: 1003-5125(2005)02-0155-04

狂犬病是由狂犬病病毒 (*Rabies virus*, RV) 引起的危害严重的人兽共患传染病, 发病后死亡率极高 (>90%), 故备受疾病预防和控制部门重视。以我国为例, 2001 年至 2004 年上半年累计报告的人

狂犬病发病数达 4892 人, 病死率达 94.7%, 死亡数和病死率均高居各类传染病之首。我国人狂犬病发生多为狂犬 (俗称“疯狗”) 咬伤所致, 病犬是该病的最主要传染源, 预防犬狂犬病是人狂犬病防治的关

收稿日期: 2004-09-26, 修回日期: 2004-11-20

* 基金项目: 国家自然科学基金 (30170704)

作者简介: 张守峰 (1971-), 男, 吉林扶余县籍, 助理研究员, 硕士, 主要从事动物病毒学研究。

** 通讯作者: 扈荣良 (1964-), 男, 河北枣强县籍, 研究员, 博士, 从事动物病毒学及转基因动物研究。

Corresponding author. Tel: 0431-7961260, E-mail: hurongliang@hotmail.com

键环节。目前,我国犬狂犬病的预防主要采用 RV 弱毒活疫苗,该疫苗接种动物后,可在其体内增殖,有毒力返祖的潜在危险。而灭活苗及亚单位苗成本高,免疫程序复杂,在我国推广应用困难较大。犬腺病毒(*Canine adenovirus*, CAV)可感染犬科和猫科等多种动物,宿主范围较广,基因组 DNA 全长 31kb 左右,具有感染性,且其 E3 区为复制非必需区,部分缺失后有一定的容量以插入外源基因,是良好的重组病毒载体^[1,2]。本研究在前期成功克隆犬 2 型腺病毒(CAV-2)感染性全基因组的基础上,对其 E3 区进行了 1044bp 的缺失,插入了 2424bp 的 RV 糖蛋白表达盒,重组基因组在 MDCK 细胞系上实现了重组病毒的包装,该重组病毒可成功表达 RV 糖蛋白,为其应用于犬狂犬病的预防奠定了基础。

1 材料和方法

1.1 实验材料

E. coli DH10B 由本室保存;CAV-2 弱毒 YCA-18 株及 RV 弱毒 SRV₉ 株均由本室分离并保存;犬肾细胞系 MDCK 由本室保存。

含 CAV-2 感染性全基因组的质粒 pPoly-CAV-2^[3] (33.3kb)、含 CAV-2 E3 区的中间质粒 pVAX-E3 (7.8kb)、含 RV 糖蛋白的质粒 pTG^[4] (4.2kb) 均由本室构建并保存;含 CMV 启动子及 SV40 polyA 的真核表达载体 pEGFP-C1 (4.7kb) 购自 Clontech 公司。

各种限制性内切酶、T₄DNA 连接酶、DNA 聚合酶 Klenow 大片段、牛小肠碱性磷酸酶(CIAP)及预染蛋白 Marker 等为 NEB 产品;MEM 培养基、HRP 标记羊抗兔 IgG 及二氨基联苯胺(DAB)购自 Sigma 公司;硝酸纤维素膜为 PALL 产品;脂质体 Lipofectamine™ 2000 为 Invitrogen 产品;兔抗 RV 多抗血清由本室制备并保存;其它试剂均为进口或国产分析纯产品。

电激转化仪为 BTX 产品(ECM399)。

1.2 电激感受态细胞的制备及转化

参照推荐方法^[5]制备 *E. coli* DH10B 电激感受态细胞,分装成 30-40μL 小份后于液氮或-70℃ 冻存。转化时,每份感受态细胞冰水浴融化后加入连接产物 0.5~0.8μL 或质粒 DNA 约 20ng,混匀后置 1mm 间隙电激杯内,1250~1350V 电激 4~6ms,将电击后的菌液涂布于含相应抗生素的 LB 琼脂平板上,37℃ 培养后进行筛选和鉴定。

1.3 RV 糖蛋白表达盒的构建及 CAV-2 E3 区改造

将 RV 糖蛋白基因片段(1575bp)从质粒 pTG 切下,克隆入真核表达载体 pEGFP-C1 的 CMV 启动子和 SV40 polyA 之间,获得糖蛋白的表达盒;再将该表达盒按相同转录方向克隆至部分缺失的 E3 区内,完成对 CAV-2 E3 区的改造。具体构建策略见图 1,各步酶切、粘末端补平及去磷酸化操作均按常规方法进行。

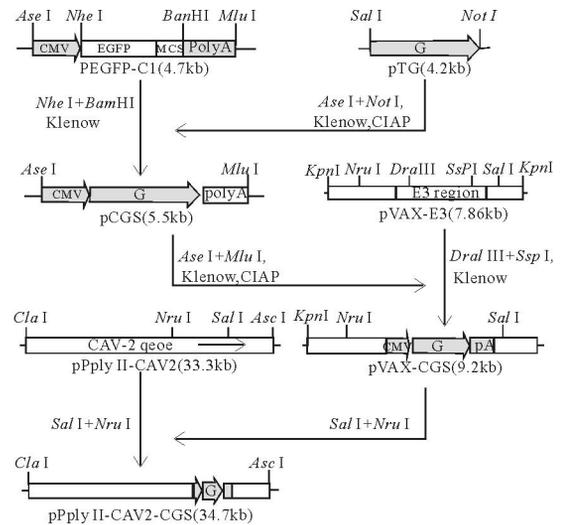


图 1 RV 糖蛋白表达盒构建及 CAV-2 全基因组改造策略
Fig. 1 Construction procedure of RV glycoprotein expression cassette and rebuilding of CAV-2 genome

1.4 重组 DNA 的转染和重组病毒的制备

取改造的重组全基因组质粒 5μg,以 *Asc* 和 *Cla* 双酶切,游离全基因组。氯仿抽提一次后,以 2 倍体积无水乙醇沉淀 DNA,无菌风干后即待转染 DNA。转染前 24h,MDCK 细胞传代入 50mL 细胞培养瓶,使次日生长至 60%~80% 覆盖,临转染时以无血清、无抗生素的 MEM 培养基洗涤单层细胞 2 次,去除残存的血清和抗生素,即为待转染单层细胞。具体转染操作参照 Lipofectamine™ 2000 推荐方案进行,转染后 6~12h 换完全培养基(含 5% 小牛血清的 MEM)。视细胞生长状况,每 2~3d 传代一次,直至出现腺病毒典型病变。

1.5 重组 CAV-2 基因组的提取及酶切鉴定

参照文献^[6]方法提取重组 CAV-2 全基因组,以不同限制性内切酶消化,琼脂糖凝胶电泳,鉴定外源基因的插入情况。

1.6 免疫印迹试验

重组 CAV-2 在 MDCK 细胞中大量增殖,取病变显著的单层细胞,连同培养基冻融 3 次后,取 20μL 进行不连续 SDS-PAGE,设同法处理的 CAV-2 YCA-18 株和 RV SRV₉ 株为对照。参照文献^[7]

方法进行 Western 印迹试验,其中抗体为兔抗 RV 多抗,二抗为 HRP 标记羊抗兔 IgG,显色剂为 DAB/H₂O₂ 系统。

1.7 重组病毒血凝、血凝抑制试验及 TCID₅₀的测定

参照文献^[8]介绍的方法进行。

1.8 犬的接种试验及抗体测定^[8]

取 8 只 RV 抗体阴性犬,每只皮下注射 0.8mL (10^{7.8} TCID₅₀/mL) 重组病毒培养液,2 周后以同样剂量加强免疫一次,接种前和免疫后每隔 1 周采集血液分离血清,通过间接 ELISA 检测血清中的狂犬病病毒和犬腺病毒特异性抗体。

2 结果

2.1 糖蛋白表达盒的构建、CAV-2 基因组 E3 区的缺失及改造

以 pVAX-E3 为中间质粒,通过 *Dra* (25097) 和 *Ssp* (26141) 双酶切缺失的 E3 区片段长 1044bp。以 CMV 启动子和 SV40 polyA 为调控序列元件的 RV 糖蛋白表达盒全长 2424bp,以平端连接方式克隆入 CAV-2 E3 区缺失部位,表达盒与 CAV-2 基因组转录方向一致。重组全基因组质粒 pPoly-CAV-2-CGS 的酶切鉴定结果见图 2。

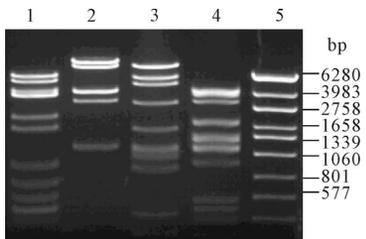


图 2 pPoly-CAV-2-CGS 酶切鉴定

Fig.2 Restriction enzyme identification of pPoly-CAV-2-CGS
1, Digested with *Stu* ;2, Digested with *Sac* ;3, Digested with *Pvu* ;4, Digested with *Hind* ;5, pT13/ *Hind* Marker.

2.2 重组病毒的包装及其基因组的酶切鉴定

E3 部分基因缺失区插入 RV 糖蛋白表达盒的全基因组经酶切游离后转染 MDCK 细胞,转染后 8d,细胞逐渐出现膨大、变圆、聚集,最终呈葡萄串样排列。取少量上清接入正常 MDCK 单层细胞,24h 后亦呈现上述变化。按腺病毒基因组提取方法,从病变的 MDCK 细胞中可提取得到与 CAV-2 基因组大小相当的 DNA 产物。以 *Hind*、*Nde* I、*Sac* I、*Xho* I 等分别酶切该 DNA,证实其确为腺病毒基因组,且其 E3 区内带有 RV 糖蛋白的表达盒(图 3),该重组病毒命名为 CAV-2-CGS。传至第 20 代,CAV-2-CGS 的基因组酶切图谱没有改变。

2.3 Western 印迹试验

重组犬 2 型腺病毒 CAV-2-CGS 可表达一大小约 66kDa,可与兔抗 RV 多抗血清反应的蛋白组分,与阳性对照 SRV₉ 糖蛋白的反应带一致,而阴性对照 CAV-2 则没有与该血清的反应带(图 4)。说明 CAV-2-CGS 成功表达了 RV 糖蛋白。

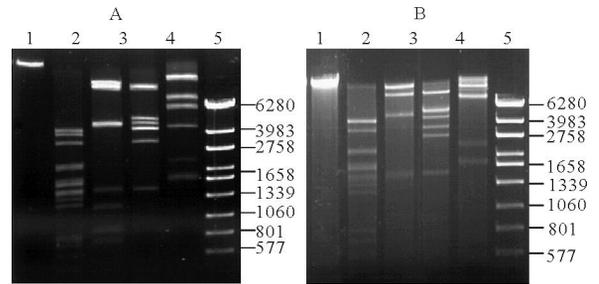


图 3 CAV-2-CGS 与其母源病毒 CAV-2 基因组 DNA 酶切图谱比较

Fig.3 Restriction enzyme digestion analysis of genome DNA from the recombinant virus CAV-2-CGS(A) and its original strain CAV-2(B)

1, Genome DNA;2, Digested with *Hind* ;3, Digested with *Nde* ;4, Digested with *Sac* ;5, Digested with *Xho* ;6, pT13/ *Hind* Marker.

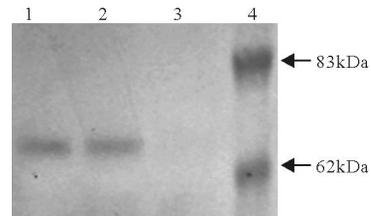


图 4 Western Blotting 结果

Fig.4 Result of Western Blotting

1, RV SRV₉;2, CAV-2-CGS;3, CAV-2;4, Prestained Protein Marker.

2.4 血凝试验及 TCID₅₀的测定

重组犬 2 型腺病毒 CAV-2-CGS 可凝集人红细胞,血凝效价为 1 1 280,且可被犬抗 CAV-2 高免血清抑制;以 Kärber 氏法测得该重组病毒的 TCID₅₀为 10^{-6.8}/0.1mL。

2.5 重组病毒诱导的特异性抗体

通过间接 ELISA 测定免疫前后犬体内的特异性抗体,结果显示,免疫前受试犬血清抗 RV 及 CAV-2 抗体水平 (OD₄₉₀) 分别为 0.169 ±0.038 和 0.192 ±0.052,二免后 14d,抗体水平 (OD₄₉₀) 分别升高至 0.461 ±0.082 ($p < 0.05$) 和 1.439 ±0.184 ($p < 0.01$)。重组病毒可以诱导犬产生针对 RV 的抗体;同时,犬体内亦产生了高水平的 CAV 抗体。

3 讨论

与其它具有廿面体衣壳结构的病毒相似,腺病

毒衣壳的稳定包装能力约为其基因组总量的105%,否则发生代偿性缺失的可能性大增加。本研究对全长31323bp的CAV-2基因组的E3区进行了1044bp的缺失后,插入2424bp的RV糖蛋白表达盒,改造后CAV-2基因组全长32703bp,为改造前基因组的104.4%,在病毒增殖传代过程中能够保证其基因组的遗传稳定性,多次传代后其DNA酶切图谱保持不变的结果,也证实了这一点。

外源基因或其表达盒插入后,其转录方向与腺病毒基因组转录方向一致时,表达水平较高,这一点上,本研究借鉴了相关研究^[9]的成功经验。

RV的糖蛋白是唯一可刺激机体产生中和抗体的RV结构蛋白,本研究重组入CAV-2的外源基因为本室克隆的RV SRV₉株糖蛋白基因(GenBank Accession No. AF499686),与GenBank库内其它代表毒株的氨基酸序列同源性均较高,因此表达该糖蛋白的重组CAV-2可作为预防动物狂犬病的候选疫苗株。由于该糖蛋白基因含有信号肽、跨膜区序列,其表达后可能定位于宿主细胞的细胞膜或内质网膜等膜结构,而不会作为结构蛋白参与病毒包装,具体定位有待进一步实验证实。

与母源毒株相比,重组病毒CAV-2-CGS在基因组水平缺失了早期蛋白E3基因的两个开放性读码框架(ORF)并插入了外源基因表达盒,而参与病毒装配和感染的晚期结构蛋白没有任何改变。从理

论上讲,该重组病毒的生物学特性不会有明显变化,其环境释放后的安全性也有足够的保证,适合作为动物狂犬病预防的疫苗毒株。

参考文献

- [1] Kremer E J, Boutin S, Chillon M, *et al.* Canine adenovirus vectors: an alternative for adenovirus-mediated gene transfer[J]. *J Virol*, 2000, 74:505-512.
- [2] Fisher K J, Choi H, Burda J, *et al.* Recombinant adenovirus deleted of all viral genes for gene therapy of cystic fibrosis[J]. *Virology*, 1996, 217:624-634.
- [3] 张守峰, 扈荣良, 牛建强, 等. 感染性犬2型腺病毒全基因组克隆及鉴定[J]. *中国兽医学报*, 2002, 22:533-535.
- [4] 袁慧君, 扈荣良, 张守峰, 等. 狂犬病病毒SRV₉株糖蛋白核酸序列及抗原特性研究[J]. *中国病毒学*, 2003, 18:63-67.
- [5] <http://www.pa.ipw.agrl.ethz.ch/research/protocols/ecomp.htm>.
- [6] Morikazu Shinagawa. A rapid and simple method for preparation of adenovirus DNA from infected cells[J]. *Microbiol Immunol*, 1983, 27:817-822.
- [7] 卢圣栋. 现代分子生物学实验技术[M], 第二版, 北京: 中国协和医科大学出版社, 1999. 400-403.
- [8] 殷震, 刘景华. 动物病毒学[M], 第二版, 北京: 科学出版社, 1997. 343-348, 329-331, 422-428.
- [9] Addison CL, Hitt M, Kunsken D, *et al.* Comparison of the human versus murine cytomegalovirus immediate early gene promoters for transgene expression by adenovirus vectors[J]. *J Gen Virol*, 1997, 78:1653-1661.