

糖蛋白 G 基因在基因组 P-M 位的插入重组表达对狂犬病毒 Flury LEP 致病力的影响

翟洪月¹, 陶丽红¹, 葛金英¹, 王喜军¹, 冯娜², 帅磊¹, 马良³, 步志高^{1*}

¹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/农业部兽医公共卫生重点开放实验室, 哈尔滨 150001

²军事医学科学院军事兽医研究所, 长春 130122

³东北农业大学动物医学学院, 哈尔滨 150030

摘要 【目的】研究狂犬病病毒 Flury 鸡胚低代毒株(Flury LEP) 在基因组 P-M 位增加糖蛋白基因(G 基因) 的重组表达对病毒致病力的影响。【方法】利用反向遗传操作技术, 构建了 P、M 基因之间额外插入 G 基因的重组狂犬病病毒 Flury LEP 株(rLEP-PGM) , 并对重组病毒的生物学特性及对小鼠的致病性进行了初步研究。【结果】亲本株和重组病毒具有相似的生长特性, LEP 和 rLEP-PGM 在 BHK-21 细胞的生长滴度分别为 4×10^6 FFU/mL 和 2.5×10^6 FFU/mL, 在小鼠神经母细胞(NA) 的生长滴度分别为 4×10^7 FFU/mL 和 2.5×10^7 FFU/mL; 嗜神经指数均为 1; Western blot 显示, rLEP-PGM 在感染细胞的 G 蛋白表达量比 LEP 显著提高; 小鼠感染试验显示, rLEP-PGM 与 LEP 脑内注射小鼠的 LD₅₀ 分别为 3 FFU 和 1 FFU, 肌肉注射途径的 LD₅₀ 分别为 4×10^4 FFU 和 3.2×10^5 FFU。【结论】P、M 基因之间插入一个额外的 G 基因能够提高 G 蛋白的表达水平, 同时增强重组病毒外周侵入中枢神经系统的能力。

关键词: 反向遗传技术, 狂犬病毒重组表达, 糖蛋白, 致病性

中图分类号: Q933 文献标识码: A 文章编号: 0001-6209 (2011) 08-1098-08

狂犬病是由狂犬病病毒(Rabies virus, RV) 引起的人兽共患病。几乎所有的温血动物都对 RV 易感。至今尚未研究出有效的治疗方法, 一旦发病几乎 100% 死亡。其中大多数病例是由动物狂犬病引起的。RV 属于弹状病毒科(*Rhabdoviridae*) 狂犬病病毒属(*Lyssavirus*) [1–3]。RV 基因组是不分节段的单股负链 RNA, 由约 12 kb 个核苷酸组成, 分子量约 4.6×10^6 Da, 其中有 5 个大的开放性阅读框架(ORF)。基因组从 3' 端至 5' 端的排列依次为 N、P、M、G 和 L 基因, 分别编码病毒 N、P、M、G 和 L 共 5

种蛋白。RV 的主要特征是其神经侵入性[4], 即病毒感染宿主后会以其独特的方式从外周神经通过神经节轴突运输侵入中枢神经系统。G 蛋白与 RV 的神经嗜性有关[4–6], 并与病毒的致病性相关, 同时也是诱导机体产生病毒中和抗体(VNA) 的主要抗原[2–3, 7]。国、内外已有实验室分别将 G 基因重组到基因组第一位(N 基因之前)、N-P 位, 或者在 G-L 位插入额外 G 基因, 构建出含有两个[8–10] 甚至 3 个 G[4] 基因的重组 RV, 并发现这些重组病毒与亲本病毒相比, 均表现为致病力降低, G 蛋白在感染细胞中

基金项目: 国家科技重大专项(2009ZX10004-214)

* 通信作者。Tel: +86-451-51997173; Fax: +86-451-51997166; E-mail: zgbu@yahoo.com

作者简介: 翟洪月(1985–), 女, 江苏宿迁人, 硕士研究生, 主要从事动物病毒的分子生物学研究。E-mail: zhaihongyue@sohu.com

收稿日期: 2011-02-26; 修回日期: 2011-04-15

的表达量提高,免疫原性增强的趋势。但是在 P-M 位插入额外 G 基因对重组病毒致病力和免疫原性的影响,尚未有报道。本研究利用负链 RNA 病毒反向遗传技术,构建了基因组 P-M 位插入 G 基因的重组 RV Flury LEP 株,并就重组病毒体外生长滴度、G 蛋白的表达水平及对小鼠的致病力等生物学特性,与亲本株 LEP 进行了比较研究。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 病毒株: RV Flury LEP 由本实验室保存,在 BHK-21 细胞上扩增,滴定后 -70℃ 冻存备用。

1.1.2 质粒: *pCAGGS*(pC) 、*pBluescript II KS*(pB) 和含有丁肝核酶序列的 pCI 由本实验室保存。pCI-LEP、pB-A(LEP) 及辅助质粒 pC-N、pC-P、pC-L 本实验室构建保存^[5]。

1.1.3 小鼠和细胞: 6 周龄 *BALB/c* 成年雌性小鼠购自北京维通利华实验动物技术有限公司。BHK-21 细胞和小鼠脑神经瘤细胞 NA 细胞由本实验室传代培养,培养基分别为含 10% 胎牛血清(FBS) 的 DMEM 和含 5% FBS 的 MEM(GIBCO) 。

1.1.4 主要试剂和仪器: T4 DNA 连接酶、限制性内切酶 *Nhe I*、*Sph I*、*Mlu I*、*EcoR I*、*Kpn I* 和 *EcoR V* 购自 TaKaRa 公司。Phusion™ 超保真 DNA 聚合酶和限制性内切酶 *Rsr II*、*Pme I* 购自 NEB 公司。RNA 提取试剂盒、SuperScript™ III 反转录酶、无血清培养基 Opti-MEM 和转染试剂 Lipofectamine™ 2000 购自 Invitrogen 公司。胎牛血清(FBS) 、DMEM 和 MEM 购自 Gibco 公司。胶回收试剂盒(Gel Extraction Mini Kit) 及质粒小量提取试剂盒(Plasmid Mini Kit) 购自 OMEGA 公司。质粒中量提取试剂盒(QIAfilter Plasmid Midi Kit) 购自 QIAGEN 公司。鼠抗 RV 高免血清由本研究室制备。FITC 标记的羊抗鼠荧光二抗和 IRDye™ 700DX 标记的羊抗鼠 IgG 二抗购自 Sigma 公司。

PCR 仪购自 Applied Biosystem 公司。核酸测序仪为 BECKMAN CEQ 8000 自动测序仪,所用试剂均为 BECKMAN 公司产品。荧光显微镜购自德国 ZEISS 公司。

1.1.5 引物设计与合成: 根据 GenBank 已提供的 Flury LEP 基因组部分序列(序列号 DQ099524) ,设

计并合成引物。所用引物(表 1) 均由上海英俊生物技术有限公司合成。

RV G 蛋白基因的克隆参照 Flury LEP 株 G 蛋白基因序列并加上 M 基因的起始信号及 Kozark 序列^[5,11] 设计两对引物: G-PF、G-PR; 在 LEP 的 A 片段引入 *Pme I* 位点: 将 2429-2436 位碱基由 CTCTAGAT 突变为 GTTTAAAC,设计两对引物: AF1、AR1 和 AF2、AR2,引物序列如表 1 所示。

表 1 重组病毒 LEP-PGM 基因组全长 cDNA 克隆构建及鉴定所用引物

Table 1 Primers used for construction and identification of full-length cDNA of recombinant virus LEP-PGM

Primers	Sequences(5'→3')
A-F1	TGCGCTAGCTGTTAAGCGTCTGATGAGTCCGTG
A-R1	TTTTCATTGTTTAAACCGGAATGAATTGGAAGACTCG
A-R2	CCGAGAAGTCCACATAAAGTCTGAGTTTGC
A-F2	TTCATTCCGTTTAAACAATGAAAAGTCTGATGTCAAT
G-PF	GCAATGTTTAAAC AACACCACT GCCACC ATGGTTCCTC
	AGGTTCTTTT
G-PR	GTACGTTTAAACTCAGAGTCTGGTCTCGCCTC
F1739	AAGTATCGAGAGGACTTTCA
R2548	TTTTCGGTGTCTCATCCCTA

The underlined letters are specific sequence of virus, bold sequences represent restriction enzyme sites, Italics are protection sequence, the starting signal for M gene is highlighted, Kozark sequences is bordered.

1.2 基因组全长 cDNA 克隆的构建

利用 PCR 定点突变的方法,在 A 片段 P、M 基因之间引入 *Pme I* 限制性酶切位点(GTTTAAAC) 。以 pCI-LEP 全长质粒为模板,分别以 F1-PF、A-R1 和 A-F2、F1-PR 为引物,扩增出片段 A1 和片段 A2,再以 A1 和 A2 为模板,以 F1-PF 和 F1-PR 为引物,利用 Overlapping PCR 扩增出含有 *Pme I* 位点的片段,命名为 A(*Pme I*),经测序无误后将其克隆至 *pBluescript II KS*(Agilent) 多克隆位点,命名为 pB-A(*Pme I*)。按照同样的方法,以质粒 pCI-LEP 为模板,G-PF 和 G-PR 为引物,扩增出带有 M 基因起始信号的 G 基因,并用 *Pme I* 处理后将其连接到用相同酶处理过的 pB-A(*Pme I*) 载体上,构建质粒 PB-A-G; 将质粒 pCI-AB(LEP) 经 *Xho I* 和 *Nhe I* 双酶切回收 pCI-B 部分,将质粒 PB-A-G 经 *Xho I* 和 *Nhe I* 双酶切处理后回收 A-G 部分并克隆到 pCI-B 上,构建质粒 pCI-AB-G; 将全长质粒 pCI-LEP 用 *Not I* 和 *Mlu I* 处理后回收 C 片段,并将其连接到用 *Not I* 和 *Mlu I* 处理过的 pCI-AB-G 上,构建全长重组质粒 pCI-LEP-PGM(图 1) 。构建完成的全长重组质

粒用 *Pme* I 和 *Hind* III 酶切鉴定无误后进行转染。

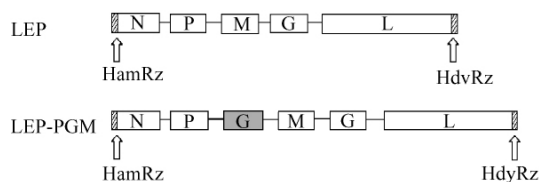


图1 重组RV LEP-PGM基因组结构图

Fig. 1 Genome structure of the recombinant RV LEP-PGM.

1.3 病毒拯救

BHK-21 细胞在 6 孔板上过夜培养,当细胞密度达到 80% 以上时进行转染。按转染试剂 Lipofectamine™ 2000 提供的方法将重组质粒 pCI-LEP-PGM 和辅助质粒 pC-N、pC-P、pC-L 分别以 4、2、1、1 μg 的量加入到 250 μL OPTI-MEM 中,混匀。取 15 μL Lipofectamine™ 2000 加入 250 μL OPTI-MEM 中,混匀后在室温静置 5 min;然后将 Lipofectamine™ 2000 与转染质粒充分混合均匀,室温孵育 30 min。在此期间用 OPTI-MEM 洗涤 BHK-21 细胞 2 次,然后每孔加入 OPTI-MEM 1 mL,最后将 Lipofectamine™ 2000 与质粒的混合液加入细胞培养孔中,置于 37℃、5% CO₂ 培养箱中培养 8 h 后弃去转染上清,加入 10% DMEM 继续培养。72 h 后,仔细吹落培养板上的细胞,将培养液及细胞混合物全部接种至 BHK-21 细胞。取 F1 代的部分细胞培养上清接种 NA 细胞,48 h 后用间接免疫荧光(IFA)检测是否拯救成功。将获救的病毒继续在 BHK-21 细胞上进行传代扩增,37℃ 培养 72 h 为一代,收获每一代病毒的上清,于 -70℃ 冻存,用于对救获病毒的进一步滴定及生物学特性分析。

1.4 救获病毒的鉴定

提取救获病毒的 RNA,反转录后利用特定引物 F1739 和 R2548(表 1)进行 PCR,扩增出包含重组 G 基因的片段,通过电泳和酶切初步鉴定大小之后进行测序,用 DNA STAR 软件分析,比较救获病毒的序列与标准序列是否一致。

1.5 种毒的制备及滴定

将鉴定无误的病毒在 BHK-21 细胞上进行扩增,37℃ 培养 72 h 后收获上清,分装,存于 -70℃。

滴定前一天在 24 孔板上铺 BHK-21 细胞或 NA 细胞,待细胞密度达到约 80% 时即可接毒。将待滴定的病毒在冰上作 10 倍连续稀释。24 孔板每孔接种 100 μL 稀释好的病毒液,每个稀释度做 3 个重复,

于 37℃ 感作 1 h,弃去上清,每孔加入 500 μL 2% 的 DMEM。37℃ 培养 48 h,用 IFA 测定病毒滴度。

1.6 病毒生长动力学曲线的测定

将重组病毒和其亲本株以 MOI(Multiplicity of infection) 0.1 分别感染单层 NA 细胞和 BHK-21 细胞。感作 1 h 后用 PBS 洗 2 次,并分别加入含 2% FBS 的 MEM 和 DMEM 于 37℃ 培养。分别于接种后 24、72 和 120 h 取细胞培养液上清测定病毒滴度,并绘制病毒生长动力学曲线。

1.7 Western blot 检测重组病毒 G 蛋白表达

重组病毒株 rLEP-PGM 和亲本株 LEP 均以 MOI 为 1 感染单层 BHK-21 细胞,并设空白细胞为对照,3 d 后收集细胞制备蛋白样品进行 SDS-PAGE 电泳。将蛋白转移到硝酸纤维素(NC)膜上,用 5% 脱脂乳封闭过夜,分别以 100 倍稀释的鼠抗 G 蛋白高免血清和抗 β-actin 为一抗,1:5000 稀释的 IRDye™ 700DX 标记的羊抗鼠 IgG 为二抗。用 Odyssey 红外荧光扫描成像系统进行结果分析。各个条带的灰度值用 Photoshop CS2 和 ImageJ 进行定量。G/β-actin 值为 G 蛋白条带的灰度值除以 β-actin 条带的灰度值。

1.8 病毒毒力测定

将病毒用 DMEM 作 10 倍连续稀释。6 周龄的 BALB/c 雌性小鼠每组 10 只,每只小鼠脑内接种 30 μL 病毒液,或后腿肌肉注射 100 μL 病毒液。连续观察 21 d,记录每组小鼠的体重变化和死亡情况。利用 Reed-Muench 法计算小鼠半数致死量(LD₅₀)^[6,12],以上实验均重复 3 次。

2 结果

2.1 重组病毒基因组全长 cDNA 的构建及拯救

将构建完成的含有双 G 基因的全长重组 cDNA 克隆命名为 pCI-LEP-PGM(图 1)。将质粒 pCI-LEP-PGM 及辅助质粒 pC-N、pC-P 和 pC-L 共转染 BHK-21 细胞,转染 3 d 后收获细胞液,在 BHK 细胞上盲传一代后进行 IFA 检测,荧光显微镜下观察到 RV 感染细胞的特征性荧光灶,呈阳性结果(图 2)。拯救获得的病毒命名为 rLEP-PGM。

2.2 救获病毒的鉴定

提取拯救病毒的 RNA 进行 RT-PCR,扩增出包含 P-M 非编码区的片段(图 3-A),胶回收 PCR 产

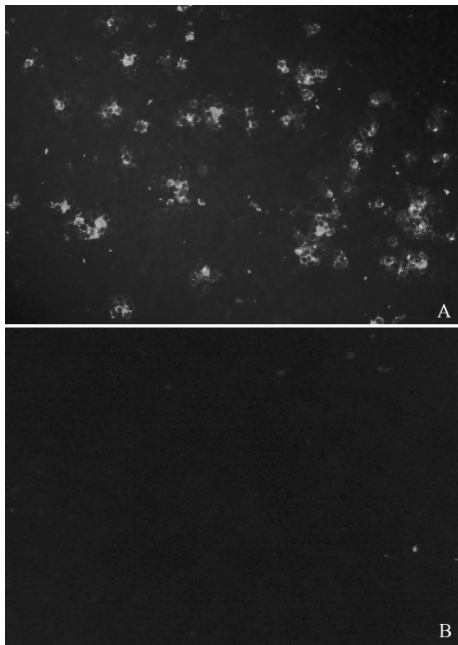


图 2 IFA 检测拯救病毒感染 NA 细胞

Fig. 2 Indirect immunofluorescence analysis of rescued recombinant rabies virus infected NA cells. A: NA cells infected with rescued recombinant rabies virus; B: NA cells infected with non-virus DMEM.

物后进行酶切鉴定和测序分析。PCR 产物经 *Pme* I、*Sph* I 酶切鉴定(结果如图 3-B 所示) 大小正确; 测序结果显示: 在 P-M 非编码区第 2430 到 2437 之间(*Pme* I 位点) 多出一段 G 基因序列, 其碱基序列与预期相符, 两端含有引入的限制性酶切位点 *Pme* I (GTTTAAAC) 。结果表明, 我们利用反向遗传操

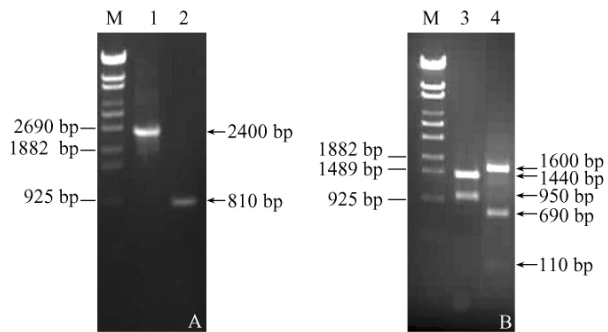


图 3 救获病毒的鉴定

Fig. 3 Identification of rescued virus. A: RT-PCR amplification of fragment 1739-2548 of rLEP-PGM and LEP with identical primers. B: *Pme* I and *Sph* I digestion of fragment 1739-2548 of rLEP-PGM strain. M: λ -*EcoT14* I digest marker; 1: fragment 1739-2548 of rLEP-PGM strain; 2: fragment 1739-2548 of LEP strain; 3: *Pme* I digestion of fragment 1739-2548 of rLEP-PGM strain; 4: *Sph* I digestion of fragment 1739-2548 of rLEP-PGM strain.

作技术成功地从全长 cDNA 克隆拯救得到重组病毒 rLEP-PGM。

2.3 病毒体外生长特性

rLEP-PGM 和 LEP 的生长能力用病毒在神经元细胞 NA 和非神经元细胞 BHK-21 上的多步生长曲线来检验。两株病毒在这两种细胞上的多步生长动力学曲线如图 4 所示, 重组病毒的滴度比亲本株略低, 但并无显著差异; rLEP-PGM 和 LEP 体外嗜神经指数也极为相近(表 2) 。

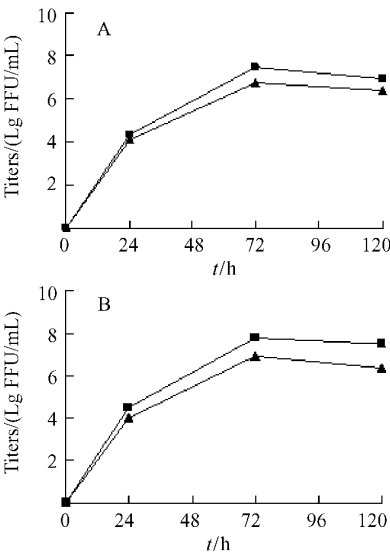


图 4 Lep 和 rLEP-PGM 在 BHK-21 细胞 (A) 和 NA 细胞 (B) 上的生长动力学曲线

Fig. 4 The virus growth curves of Lep and rLEP-PGM in BHK-21 cells (A) and NA cells (B) .

(■: titers of Lep; ▲: titers of rLep-PGM) .

表 2 LEP 和 rLEP-PGM 在 NA 和 BHK-21 细胞上的滴度及体外嗜神经指数

Table 2 Growth titers and neurotropism index of LEP and rLEP-PGM strains in NA and BHK cells

Strain	Titer ^a (LgFFU/mL)		Neurotropism index ^b index _b
	NA	BHK-21	
LEP	7.6	6.6	1.0
rLEP-PGM	7.4	6.4	1.0

^a Virus titers were determined by using an IFA test as described in materials and methods. ^b The neurotropism index equals the logarithm of the titer in NA cells subtracted by the logarithm of the titer in BHK-21 cells.

Western blot 分析结果显示 rLEP-PGM 感染 BHK-21 细胞 G 蛋白表达量高于 LEP(图 5) 。在 LEP 感染的 BHK-21 细胞中 G/β-actin 的灰度比值为 1.2; 而在 rLEP-PGM 感染的 BHK-21 细胞中该比

值为 1.7 ,是前者的 1.5 倍。

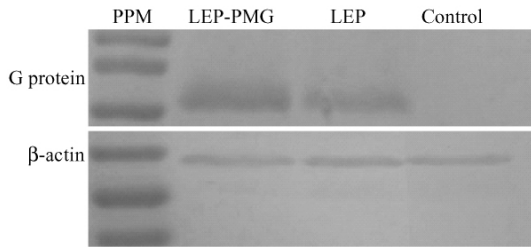


图 5 western blot 分析 LEP 或 rLEP-PGM 感染 BHK-21 细胞 G 蛋白的表达

Fig. 5 Western blot analysis of glycoprotein expression in BHK-21 cells infected with LEP or rLEP-PGM strain.

为了检验 rLEP-PGM 在体外传代过程中的稳定性,将 rLEP-PGM 在 BHK-21 细胞上连续传 10 代。各代次的病毒滴度如图 6 所示,从第 5 代开始,病毒滴度稳定保持在 5×10^6 FFU/mL- 1×10^7 FFU/mL 之间。对第 10 代病毒进行 RT-PCR,扩增出含有重组 G 基因的 1739-2548 片段,结果与图 3-A 一致。

2.4 对小鼠的致病性

小鼠脑内接种感染 rLEP-PGM 与 LEP 后均表现出消瘦、发抖、兴奋、沉郁等临床症状,最后死亡,但

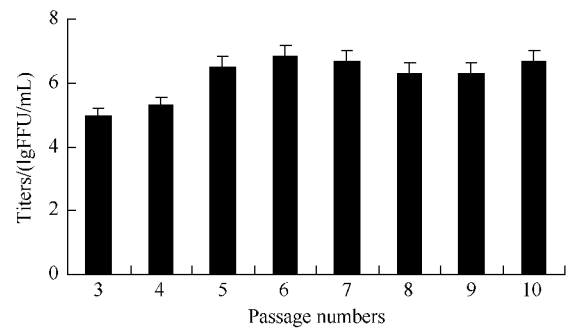


图 6 rLEP-PGM 株在 BHK-21 细胞上连续传代各代次的滴度

Fig. 6 Virus titer of rLEP-PGM strain serially propagated in BHK-21 cells.

rLEP-PGM 发病较 LEP 提前 2-3 d。LEP 和 rLEP-PGM 通过脑内注射途径感染成年小鼠的 LD_{50} 3 次重复平均值分别为 1 FFU 和 3 FFU,差异不大(图 7);通过肌肉注射感染小鼠可以测定 RV 的神经侵入能力,rLEP-PGM 通过后腿肌肉注射感染小鼠的 LD_{50} 平均为 4×10^4 FFU,而 LEP 肌肉注射感染小鼠的 LD_{50} 平均为 3.4×10^5 FFU,经统计学分析,差异显著(t 检验, $P < 0.01$),结果表明,rLEP-PGM 的外周神经侵入能力显著高于 LEP。

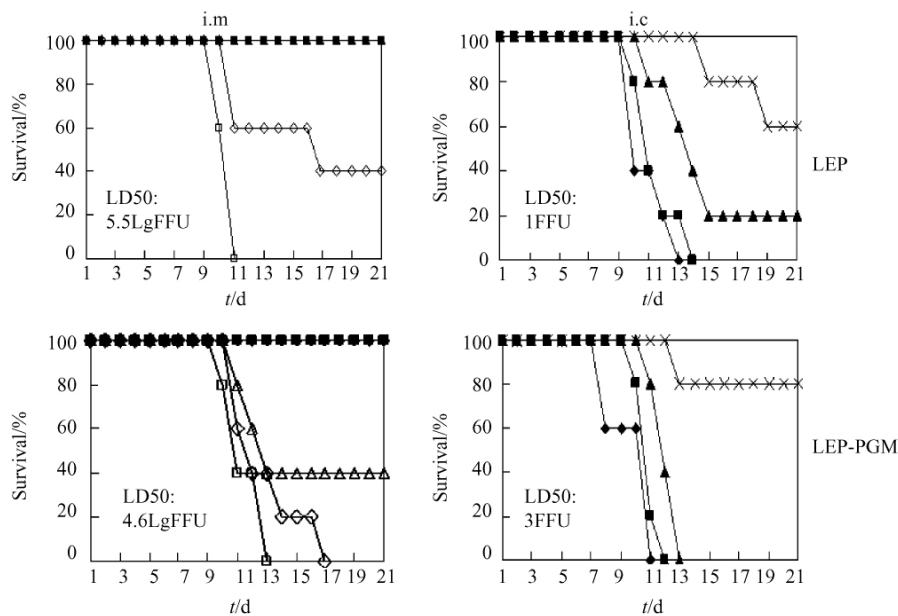


图 7 LEP 和 rLEP-PGM 对成年小鼠的致病性

Fig. 7 Pathogenicity of LEP and rLEP-PGM strains in adult mice. Six-week-old BALB/c mice were infected with LEP or rLEP-PGM strain by i. c. in a 30 μ L volume or by i. m. in a 100 μ L volume with the doses of 10^0 to 10^6 FFU. \square 10^6 FFU; \diamond 10^5 FFU; Δ 10^4 FFU; \blacklozenge 10^3 FFU; \blacksquare 10^2 FFU; \blacktriangle 10^1 FFU; \times 10^0 FFU.

3 讨论

1940 年 Koprowski 等^[5] 从一个患狂犬病死亡的女孩脑内分离到一株强毒,命名为 Flury 株,Flury 株连续在一日龄雏鸡脑内传 138 代,然后经鸡胚卵黄囊传 40-50 代,再在鸡胚传 178 代,使其丧失对动物的致病力,为便于区别,在鸡胚传代 68 代以前的称为 LEP 株(low egg passage),高于 136 代的称为 HEP 株(high egg passage),LEP 和 HEP 株都具有良好的免疫原性,被广泛用于人和动物用疫苗的生产。在少数国家,包括中国,还被作为活疫苗免疫动物。但 Flury LEP 疫苗有时能够在 3 月龄幼犬引起狂犬病,因此为了安全起见,更多的被作为灭活疫苗研究与应用^[5]。

RV 的主要特征是其神经侵入性,即病毒感染宿主后会以其独特的方式从外周神经通过神经节轴突运输侵入中枢神经系统。RV 的神经侵入力和神经毒力的一个重要参数为体外嗜神经指数^[13],即病毒在 NA 细胞相对于 BHK-21 细胞上的感染性比例。嗜神经指数为 1 表示病毒在神经元细胞上感染的能力比在非神经细胞上的高 10 倍。致病性毒株与弱毒株相比通常具有较高的嗜神经指数;致病性毒株的嗜神经指数一般大于 1,而弱毒株的嗜神经指数通常接近于 0^[5,7,13]。RV G 蛋白对病毒在神经细胞间的跨突触传播具有重要作用^[14-5]。致病性强的毒株比致病性弱的毒株在宿主细胞内的复制速度慢,在感染早期 G 蛋白表达量较弱毒株低^[4],从而躲避机体免疫系统早期监测,保护机体神经节结构,利用神经节的轴突逆向运输达到中枢神经系统^[14-5]。

自从 1994 年 Schnell 等^[14-16] 第 1 次运用反向遗传技术成功的改造并拯救出狂犬病毒 SAD B19 株,反向遗传技术在 RV 新型疫苗的研究中就起着非常重要的作用。利用反向遗传技术,国内外有许多实验室选择在 G-L 基因的间隔序列上插入额外的 G 基因,构建表达双 G 蛋白甚至三 G 蛋白的重组 RV: Faber^[17]、Hosokawa-Muto^[7] 等分别构建了在 G-L 位置插入一个同源 G 基因的重组病毒 SPBNGA-GA 和 RC-HL,并发现双 G 重组病毒的生长性能与亲本株 rRC-HL 相似,但 G 蛋白在细胞中的表达量较亲本株高 1.5 倍;刘晓慧等人^[9] 构建并拯救了携带两

个 G 基因的 Flury-HEP 株(HEP-dG),并发现其比亲代病毒病毒滴度高、致病性低、免疫原性高;为了增强 LEP 株作为灭活疫苗的免疫原性,本实验室构建了表达双 G 基因的重组 Flury LEP 病毒 rLEP-G 株^[5],同样发现该毒株具有与野生型 LEP(wtLEP)相似的生物学特性,但在感染细胞中 G 蛋白的表达量显著提高。且利用该毒株制备狂犬病灭活疫苗免疫小鼠和比格犬,诱导的 VNA 水平均显著高于 wtLEP 灭活疫苗。RV 与 VSV(Vesicular stomatitis virus)同属于弹状病毒科,在基因结构上相似性很大,Wertz^[18]、Ball^[19] 等以 VSV 为模板,通过改变 VSV G 蛋白基因的位置来改变其表达量,证实了负股 RNA 病毒具有介导其基因组发生变化的能力,并发现将 G 基因重排至离启动子越近的地方,其 G 蛋白表达量越高。Xianfu Wu 等^[20] 构建了 G 基因与 M 基因互换位置的重组 RV: ERAgm,使得 G 基因更靠近启动子区域,发现重组病毒在 BSR 细胞上的适应性并未发生改变,但重组病毒的 mRNA 表达量高达亲本株的 1.3 倍。郭霄峰等人^[9,21] 分别构建了将 RV G 基因重排到基因组第一位和第二位的重组病毒,发现与亲本株相比,重组病毒发生 G 蛋白表达量提高、毒力降低等特性变化,并得出与 VSV 研究结果相同的结论:将 G 基因重排至离启动子越近的地方,其 mRNA 表达量越高。

综上所述,在基因组 G-L 位增加一个或两个 G 蛋白基因,可以增加 G 蛋白的表达量及毒株的免疫原性,将 G 基因重排至离启动子越近的地方,其 mRNA 表达量越高。那么,在基因组 P-M 位增加一个 G 基因的插入重组表达对 Flury LEP 致病力的影响如何呢?基于以上思路,本研究在亲本株 Flury LEP 反向遗传操作系统基础上,构建含有 2 个序列同源的 G 基因,但另一个 G 基因重排至基因组第三位的全长 cDNA 克隆,成功拯救表达双 G 蛋白的重组病毒株 rLEP-PGM。对重组毒的生物学特性研究发现,重组病毒株 rLEP-PGM 在神经细胞 NA 细胞和非神经细胞 BHK-21 细胞上滴度与亲本株 LEP 相似,嗜神经性指数相同,通过 Western blot 分析在感染细胞中 G 蛋白的表达量显著高于 LEP,证实了增加一个 G 蛋白基因,可以提高 G 蛋白的表达量的结论。G 蛋白在 RV 的致病性中起着极为重要的作用,因此有必要检验增加一个 G 基因对病毒致病性的影响。本实验通过脑内感染(i.c)和肌肉注射(i.

m) 两种不同的感染途径来测定病毒对小鼠的致病力^[5-6]。rLEP-PGM 与 LEP 脑内注射小鼠的 LD₅₀ 差异不大,但二者肌肉注射途径致病性相差约 10 倍,即 G 基因在 P-M 位的插入重组增加了肌肉注射病毒对小鼠的致病性,增强了病毒从外周侵入中枢神经系统的能力。但是该重组病毒对小鼠肌肉注射致病性增加的机理尚需进一步研究。

本研究下一步将致力于重组病毒株 rLEP-PGM 对小鼠及犬的免疫保护实验及重组病毒株 rLEP-PGM 致病性增强的机理研究。

参考文献

- [1] 扈荣良. 狂犬病理论、技术与防治. 北京: 科学出版社, 2007: 6-13.
- [2] 殷震, 刘景华. 动物病毒学. 第 2 版. 北京: 科学出版社, 1997: 777-795.
- [3] 韦平, 秦爱建 主编. 重要动物病毒分子生物学. 北京: 科学出版社, 2008: 370-375.
- [4] Faber M, Li J, Kean RB, Hooper DC, Alugupalli KR, Dietzschold B. Effective preexposure and postexposure prophylaxis of rabies with a highly attenuated recombinant rabies virus. *Proceedings of the National Academy Sciences, USA*, 2009, 106 (27): 11300-11305.
- [5] 陶丽红. 狂犬病 Flury 病毒致弱分子机制及新型疫苗的研究. 中国农业科学院博士学位论文, 2010: 7-9, 15-24, 43-53.
- [6] Tao LH, Ge JY, Wang XJ, Zhai HY, Hua T, Zhao BL, Kong DN, Yang CL, Chen HL, Bu ZG. Molecular basis of neurovirulence of Flury rabies virus vaccine strains: importance of the polymerase and the glycoprotein R333Q mutation. *Journal of Virology*, 2010, 84 (17): 8926-8936.
- [7] Ito N, Takayama M, Yamada K, Sugiyama M, Minamoto N. Rescue of rabies virus from cloned cDNA and identification of the pathogenicity-related gene: glycoprotein gene is associated with virulence for adult mice. *Journal of Virology*, 2001, 75(19): 9121-9128.
- [8] Hosokawa-Muto J, Ito N, Yamada K, Shimizu K, Sugiyama M, Minamoto N. Characterization of recombinant rabies virus carrying double glycoprotein genes. *Microbiology and Immunology*, 2006, 50 (3): 187-196.
- [9] 刘晓慧, 艾军, 孙招金, 陈晶, 孙京臣, 郭霄峰. 狂犬病病毒 Hep-dG 株的拯救. 第二中国人兽共患病学报 (*Chinese Journal of Zoonoses*), 2009, 25(3): 203-206.
- [10] 郭霄峰, 富振芳. 狂犬病毒糖蛋白基因的重排及病毒的拯救. 华南农业大学学报 (*Journal of South China Agricultural University*), 2006, 27(1): 104-106.
- [11] 葛金英. 新城疫病毒反向遗传操作基础与应用研究. 南京农业大学博士毕业论文, 2006: 38-39.
- [12] Reed LJ, Muench H. A simple method of estimating fifty percent endpoints. *American Journal of Hygiene*, 1938, 27: 493-497.
- [13] Morimoto K, Hooper DC, Carbaugh H, Fu ZF, Koprowski H, Dietzschold B. Rabies virus quasispecies: implications for pathogenesis. *Proceedings of the National Academy Sciences, USA*. 1998, 95(6): 3152-3156.
- [14] Schnell MJ, Mebatsion T, Conzelmann KK. Infectious rabies viruses from cloned cDNA. *European Molecular Biology Organization*, 1994, 13(18): 4195-4203.
- [15] Arun Ammayappan, Scott E. LaPatra, Vikram N. Vakharia. A vaccinia-virus-free reverse genetics system for infectious hematopoietic necrosis virus. *Journal of Virological Methods*, 2010, 167(2): 132-139.
- [16] Ito N, Takayama, Ito M, Yamada K, Hosokawa J, Sugiyama M, Minamoto N. Improved recovery of rabies virus from cloned cDNA using a vaccinia virus-free reverse genetics system. *Microbiology and Immunology*, 2003, 47(8): 613-617.
- [17] Faber MR, Pulmanusahakul SS, Hodawadekar S, Spitsin JP, McGettigan MJ, Schnell, Dietzschold B. Overexpression of the rabies virus glycoprotein results in enhancement of apoptosis and antiviral immune response. *Journal of Virological Methods*, 2002, 76 (7): 3374-3381.
- [18] Wertz GW, Perepelitsa VP, Ball LA. Gene rearrangement attenuates expression and lethality of a nonsegmented negative strand RNA virus. *Proceedings of the National Academy Sciences, USA*, 1998, 95 (7): 3501-3506.
- [19] Ball LA, Pringle CR, Flanagan B, Perepelitsa VP, Wertz GW. Phenotypic consequences of rearranging the P.M. and G genes of vesicular stomatitis virus. *Journal of Virology*, 1999, 73(6): 4705-4712.
- [20] Wu X, Rupprecht CE. Glycoprotein gene relocation in rabies virus. *Virus Research*, 2008, 131(1): 95-99.
- [21] 陈晶, 刘晓慧, 艾军, 孙京臣, 薛素强, 郭霄峰. 狂犬病毒 HEP-Flury 株糖蛋白基因重排至第二位的拯救及其生物学特性研究. 中国畜牧兽医学学会兽医公共卫生学分会成立大会暨第一次学术研讨会论文集, 2008: 107-113.

Insertion of glycoprotein gene between P and M gene influences the pathogenicity of the rabies virus Flury LEP

Hongyue Zhai¹, Lihong Tao¹, Jinying Ge¹, Xijun Wang¹, Na Feng², Lei Shuai¹, Liang Ma³, Zhigao Bu^{1*}

¹Veterinary Public Health Laboratory of Ministry of Agriculture and State Key Laboratory of Veterinary Biotechnology, Harbin Veterinary Research Institute of Chinese Academy of Agricultural Sciences, Harbin 150001, China

²Institute of Military Veterinary, Academy of Military Medical Sciences, Changchun 130122, China

³School of Veterinary Medicine, Northeast Agricultural University, Harbin 150030, China

Abstract [Objective] To study the biological characteristics and pathogenicity of a recombinant rabies virus Flury LEP (low egg passage) that has two glycoprotein genes (G gene). **[Methods]** By using reverse genetics techniques, we constructed a recombinant virus Flury LEP that has an additional G gene between P and M gene (rLEP-PGM). Then we studied the biological characteristics of the recombinant virus and its pathogenicity on mice. **[Results]** The *in vitro* growth characteristic of rLEP-PGM were similar to the LEP strain. Western blot analysis of glycoprotein expression showed that the glycoprotein expression level of rLEP-PGM was 1.5 times higher than LEP. The LD₅₀ of rLEP-PGM and LEP was 3 FFU and 1 FFU by intracerebral injection. However, the LD₅₀ of intramuscular injection was 4×10^4 Lg FFU and 3.2×10^5 Lg FFU, respectively. **[Conclusion]** Insertion of an additional G gene between P and M gene can significantly raise the expression level of glycoprotein and enhance the ability to invade central nervous system from peripheral sites.

Keywords: Reverse genetics technique, Recombinant rabies virus, Glycoprotein, Pathogenicity

(本文责编: 张晓丽)

Supported by the National Science Major Technology Projects(2009ZX10004-214)

* Corresponding author. Tel: +86-451-51997173; Fax: +86-451-51997176; E-mail: zgbu@yahoo.com

Received: 26 February 2011/Revised: 15 April 2011

梅特勒-托利多参加第八届中国涂料峰会

第八届中国涂料峰会于2011年6月14日在上海浦东淳大万丽酒店顺利召开。本次峰会由荣格工业传媒主办,梅特勒-托利多、阿克苏诺贝尔、奇瑞汽车等企业赞助协办。此次峰会将“第八届汽车涂料及涂装技术研讨会”,“第四届紫外光固化涂料及涂装技术研讨会”,“工业防腐涂料及涂装技术研讨会”及“第三届木器涂料及涂装技术研讨会”进行整合,还特邀了美国涂料协会官员出席,介绍了水性涂料的新进展。

梅特勒-托利多作为主要参展商之一,带来了全方位涂料行业的解决方案,展示了分析天平、快速水分测定仪、卡尔费休水分仪、熔点仪等在内的实验室仪器。会上,与会气氛热烈,许多参会代表驻足梅特勒-托利多展台,就如何提供用户环保及高效灵活的检测方法及解决方案进行了充分的交流。

梅特勒-托利多是全球领先的精密仪器和服务供应商,是全球最大的实验室、工业和食品零售业称重设备的制造商和销售商。

更多关于梅特勒-托利多公司的讯息请登录: www.mt.com