江苏农业学报(*Jiangsu J.of Agr.Sci.*),2018,34(4):866~870
http://www.jsnyxb.com

谭业平,赵 静,郭霄峰,等. 一株携带犬细小病毒 *VP2* 融合基因的重组狂犬病毒的构建[J].江苏农业学报,2018,34(4):866-870.
doi:10.3969/j.issn.1000-4440.2018.04.022

一株携带犬细小病毒 *VP2* 融合基因的重组狂犬病毒的构建

谭业平[1], 赵 静[2], 郭霄峰[2], 何孔旺[1]
(1.江苏省农业科学院兽医研究所,农业部兽用生物制品工程技术重点实验室,国家兽用生物制品工程技术研究中心,江苏 南京 210014; 2.华南农业大学兽医学院微生物学与免疫学教研室,广东 广州 510642)

摘要: 为构建预防狂犬病毒和犬细小病毒的疫苗候选毒株,将编码狂犬病毒 G 蛋白的中和抗原表位的碱基序列插入犬细小病毒 *VP2* 基因中,再将 *VP2* 融合基因插入狂犬病毒全基因组的 *G* 和 *L* 基因之间,然后应用反向遗传操作技术构建重组狂犬病毒。直接免疫荧光染色结果显示成功获得重组狂犬病毒 rHEP-r*VP2*;生物学特性研究结果显示重组病毒随着在 BHK-21 细胞上传代次数的增加,病毒滴度逐渐升高,呈现良好繁殖特性;RT-PCR 结果显示携带 *VP2* 融合基因的重组病毒具有良好遗传稳定性,重组病毒免疫小鼠可诱导产生保护性抗狂犬病毒和犬细小病毒抗体。

关键词: 狂犬病毒; 犬细小病毒 *VP2* 基因; 反向遗传技术
中图分类号: S852.65$^+$5 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-4440(2018)04-0866-05

Construction of a recombinant rabies virus carrying canine parvovirus *VP2* fusion gene

TAN Ye-ping[1], ZHAO Jing[2], GUO Xiao-feng[2], HE Kong-wang[1]
(1.*Institute of Veterinary Medicine*, *Jiangsu Academy of Agricultural Sciences*, *Key Laboratory of Veterinary Biologicals Engineering and Technology*, *Ministry of Agriculture*, *National Center for Engineering Research of Veterinary Bio-products*, *Nanjing* 210014, *China*; 2.*Department of Microbiology and Immunology*, *College of Veterinary Medicine*, *South China Agricultural University*, *Guangzhou* 510642, *China*)

Abstract: To build the vaccine candidate strain of rabies virus and canine parvovirus, the canine parvovirus *VP2* gene which contained the rabies virus G protein neutralizing epitope was inserted into the rabies virus genome between the *G* and *L* gene. And then a recombinant rabies virus carrying canine parvovirus *VP2* fusion gene was rescued using reverse genetic technology. The successful restructuring of rabies virus rHEP-r*VP2* was confirmed by indirect immunofluorescence assay with antibody against RV-N protein. The results of biological characteristics showed that as the number of passages of recombinant strains in BHK-21 increased, virus titers gradually increased, showing good reproductive characteristics. Genetic stability of recombinant virus carrying *VP2* fusion gene was confirmed by RT-PCR. Immunogenicity of recombinant rabies virus rHEP-r*VP2* was tested in Kunming mice. Recombinant viruses rHEP-r*VP2* induced high level of rabies antibody compared with HEP-Flury and high level of antibodies against *VP2*, which could protect against canine parvovirus infection.

Key words: rabies virus; canine parvovirus *VP2* gene; reverse genetic technology

收稿日期:2017-10-30
基金项目:江苏省自然科学青年基金项目(BK20130705)
作者简介:谭业平(1980-),男,山东莱阳人,博士,副研究员,主要从事动物疫病风险评估与防控研究,(E-mail)yepingtan@163.com

狂犬病毒(RV)属于弹状病毒科狂犬病毒属,其基因组核酸为单股负链 RNA。该病毒基因组长约 12 kb,从 3′到 5′端依次为编码 N、M1、M2、G、L 蛋白质的 5 个基因,各个基因间还含非编码的间隔序列。

在狂犬病毒基因组的 *G* 基因与 *L* 基因之间存在一个不编码蛋白质的假基因,在该基因内插入的外源基因可以有效表达[1]。

犬细小病毒(Canine parvovirus, CPV),是犬类烈性传染性病毒之一,世界各地均有流行。CPV 粒子的衣壳蛋白由 VP1、VP2 和 VP3 3 种结构蛋白构成。其中 VP2 是主要组成部分,由 8 个反向平行的 β 片层基序和 4 个展示在外的多肽 loop 组成,loop1 和 loop3 上集中了 CPV 主要的 B 细胞表位。VP2 蛋白可自行组装成犬细小病毒样粒子,而 loop2 插入外源性抗原表位,不影响病毒粒子装配[2]。本研究以 RV 线性中和抗原表位序列替换 loop2 部分序列构建 *VP2* 融合基因,并将其插入 HEP-Flurry 株 *G*、*L* 基因之间构建重组狂犬病毒,并对重组毒株生物学特性进行研究,探索其作为 RV 和 CPV 二联疫苗候选毒株的可行性。

1 材料和方法

1.1 细胞和抗体

仓鼠肾细胞(BHK-21)购自武汉生物制品研究所。荧光素标记的抗 N 蛋白抗体购自 Centocor 公司。

1.2 质粒和毒株

表达狂犬病毒 HEP-Flury 弱毒株 N、P、L 和 G 蛋白的辅助质粒 pH-N、pH-P、pH-L、pH-G 及 pHEP-3.0 全长质粒由日本国立传染病研究室 Dr. Morimoto 惠赠。犬细小病毒分离株 1130CPV-2b 由华南农业大学兽医微生物教研室分离鉴定。

1.3 试剂

AMV 反转录酶、T4 DNA Ligase、内切酶 *Bsi*W Ⅰ 和 *Pst* Ⅰ 均购自 TaKaRa 公司,KOD DNA Polymerase 购自 TOYOBO 公司,Gel/PCR DNA Fragments Extraction Kit 购自 Geneaid 公司,QIAGEN© Plasmid Midi Kit 和 Superfect Transfection Reagent 购自 QIAGEN 公司,其他试剂均为进口或国产分析纯。

1.4 *VP2* 融合基因的构建

设计 *VP2* 基因的正向引物 VP2-P1:5′-AGTCGTACGATGAGTGATGGA-3′(*Bsi*W Ⅰ 酶切位点),反向引物 VP2-P4:5′-CCTGCTAGCTTAATATAATTT-3′(*Nhe* Ⅰ 酶切位点)。设计引物 23aa-P2:5′-TCTGAGCGAAAGTCGTGCAAATTCACCAACTGACCTGGAGGAGTTCCAGTATGA-3′,23aa-P3:5′-ACTTTCGCTCAGACGAGATTGAGCATCTCGTTGAGGAAGAGAGTGGCACACCA-3′,目的是在 *VP2* 基因 loop2 序列的相应位点中引入 RV-G 蛋白中和抗原表位编码碱基序列。

提取 CPV 分离株 1130CPV-2b 的基因组 DNA 作为模板,以 VP2-P1 和 23aa-P2、23aa-P3 和 VP2-P4 2 对引物进行 PCR 扩增,分别获得 P1P2 和 P3P4 片段。以 P1P2 和 P3P4 片段为模板,VP2-P1 和 VP2-P4 为引物进行 PCR 扩增,获得含有 RV 中和抗原表位编码碱基序列的 *VP2* 融合基因(图 1)。经过纯化、回收、连接、转化 DH5α 感受态细胞,抽提重组质粒,进行酶切和测序鉴定。

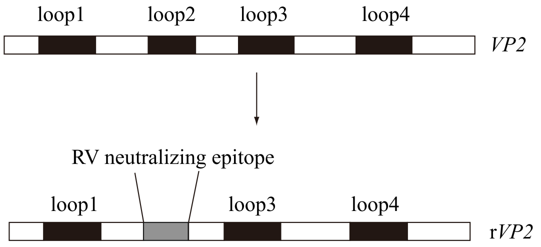


图 1 插入 RV-G 蛋白中和抗原表位编码碱基序列的 *VP2* 融合基因

Fig.1 The *VP2* fusion gene with the neutralization epitope of the RV-G protein

1.5 携带 *VP2* 融合基因的 HEP-Flury 株全长 cDNA 构建

将含有 *VP2* 融合基因的质粒和 pHEP-3.0 质粒分别用 *Nhe* Ⅰ和 *Bsi* W Ⅰ进行双酶切,用凝胶回收试剂盒进行回收,将回收产物连接转化 XL10-Gold 感受态细胞,筛选阳性克隆,抽提重组质粒,构建携带 *VP2* 融合基因的重组质粒(图 2)。然后用 *Bsi*W Ⅰ和 *Nhe* Ⅰ进行双酶切鉴定,质粒送上海英骏生物工程有限公司进行序列测定,质粒命名为 pHEP-r*VP2*。

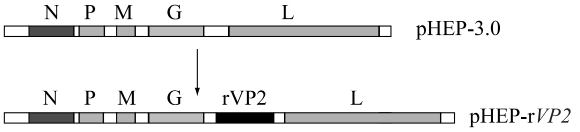


图 2 携带 *VP2* 融合基因的 HEP-Flury 株全长 cDNA

Fig.2 Full length cDNA of HEP-Flury with *VP2* fusion gene

1.6 重组病毒 rHEP-r*VP2* 的拯救

转染和病毒筛选方法参照郭霄峰等[3]和 Ito 等[4]的方法。在 12 孔细胞培养板中加入 BHK-21

细胞(每孔 1×10^5 个),采用含 10%胎牛血清的培养液在 37 ℃培养 12~16 h,至细胞 50%~60%汇合时,分别取 1.250 μg 重组质粒 pHEP-r*VP2*、0.625 μg pH-N、0.312 μg pH-P、0.125 μg pH-L 和 0.188 μg pH-G 共转染 BHK-21 细胞,详细方法参照 Superfect Transfection Reagent 说明书。37 ℃培养 2.5~3.0 h,吸去 DMEM 培养液,用 PBS 缓冲液洗涤细胞 1 次。重新添加营养液(DMEM 液含 10%小牛血清和 100 U/ml青链霉素),在 37 ℃、5% CO_2培养箱中培养 48 h,细胞 95%长满后转入 34 ℃、5%CO_2培养箱培养 96 h,拯救病毒命名为 rHEP-r*VP2* 株。

1.7 重组病毒 rHEP-r*VP2* 的鉴定

在 6 孔细胞培养板中加入 BHK-21 细胞约 1 ml 2×10^5个,按病毒液体积∶培养液总体积比例为 1∶10 进行接种病毒。细胞在 37 ℃、5% CO_2培养箱中培养约 48 h,待细胞长满后再放入 34 ℃、5%CO_2培养箱中培养约 96 h。在-80 ℃/室温冻融细胞 1 次,收获病毒,分装后-80 ℃保存备用。依次传代至第 10 次,检测病毒滴度,RT-PCR 扩增 *VP2* 融合基因,测定序列。直接免疫荧光方法筛选鉴定重组病毒,具体方法如下:在 96 孔板进行病毒接种培养后,吸出细胞培养液,于每孔中加入 80%预冷的丙酮溶液 100 μl,快速倾去丙酮溶液,再次加入丙酮溶液 200 μl,置-20 ℃中反应 1 h,弃去丙酮,自然风干后每孔加入 25 μl 抗狂犬病毒 N 蛋白荧光抗体,37 ℃孵育 1 h,弃去荧光抗体,用1×PBS 洗涤细胞 3 次,每次 5 min,自然干燥,荧光显微镜下观察。

1.8 重组病毒 rHEP-r*VP2* 在 BHK-21 细胞上的生长特性测定

用细胞培养液调整 BHK-21 细胞密度为 1 ml 2×10^5个,将狂犬病毒 HEP-Flury 株和 rHEP-r*VP2* 株分别按照感染复数(Multiplicity of infection,MOI)为 0.1 接种细胞,于 5% CO_2、37 ℃培养箱中培养。每隔 24 h 收集 100 μl 上清培养液用直接免疫荧光法测定不同时间点病毒滴度。

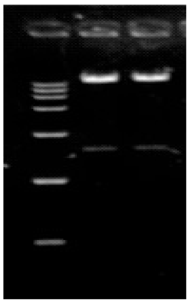
1.9 重组病毒 rHEP-r*VP2* 小鼠免疫试验

6~8 周龄的清洁级昆明系雌性小鼠分为 3 组,设置 rHEP-r*VP2* 病毒液免疫组、HEP-Flury 病毒液免疫组和空白对照组,每组 10 只。免疫组每只小鼠肌肉注射 1×10^6 FFU 病毒剂量,空白对照组肌肉注射 100 μl DMEM。免疫后 21 d 尾静脉采血制备血清,用国际兽医局(OIE)推荐的检测狂犬病抗体 ELISA 试剂盒(Synbiotics 公司)检测血清中 RV 抗体水平。以分离株 1130CPV-2b 进行血凝试验,稀释 8 单位抗原,测定血清中 CPV 血凝抑制(HI)抗体效价,方法参照文献[5]。

2 结 果

2.1 重组质粒 pHEP- r*VP2* 的鉴定

重组质粒 pHEP- r*VP2* 的 *Nhe* I 和 *Bsi* W I 双酶切产物电泳图谱显示,2 条特异条带大小与理论值相符,分别为 *VP2* 融合基因片段(1 830 bp)和 RV 全长基因组载体片段(图 3)。测序结果显示,*VP2* 融合基因正确插入 HEP-Flury 株全长 cDNA 中 *G-L* 基因之间的 *Nhe* I 和 *Bsi* W I 位点。



M:Marker;1、2:pHEP-r*VP2*。

图 3 重组质粒 pHEP-r*VP2* 的酶切鉴定

Fig.3 Enzymatic identification of recombinant plasmid pHEP-r*VP2*

2.2 重组病毒 rHEP- r*VP2* 的鉴定

将重组病毒 rHEP-r*VP2* 感染细胞培养液吸去上清液,加入抗狂犬病毒 N 蛋白荧光抗体,在荧光显微镜下观察。结果显示:低倍镜下在单层细胞的一些区域可见绿色荧光团块,说明拯救的病毒在细胞中复制、扩增并感染周边细胞;高倍镜下可见在细胞质中存在大量绿色荧光斑点,说明大量 RV 核蛋白存在于感染细胞质中,而阴性对照未见荧光(图 4)。

提取病毒 RNA,RT-PCR 方法检测第 1 代和第 10 代的重组病毒 *VP2* 基因的遗传稳定性。结果显示,第 1 代和第 10 代及阳性对照均扩增出与 *VP2* 融合基因长度相符的特异条带(图 5),BHK-21 细胞阴性对照未扩增出特异条带,说明 *VP2* 融合基因在重组病毒 rHEP-r*VP2* 中遗传稳定。病毒滴度测定结果显示,随着传代次数增加病毒滴度不断升高,稳定在1×10^7 FFU/ml(图 6)。

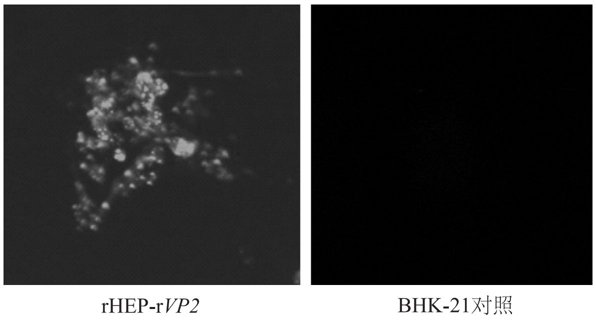
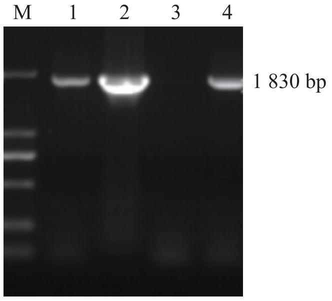


图 4 重组病毒 rHEP-r*VP2* 的直接免疫荧光染色鉴定(×200)

Fig.4 Identification of rHEP-r*VP2* by direct immunofluorescence staining(×200)



1:第 1 代病毒;2:第 10 代病毒;3:阴性对照;4:阳性对照。

图 5 重组病毒 rHEP-r*VP2* 中 *VP2* 基因的检测

Fig.5 Detection of *VP2* gene in recombinant virus rHEP-r*VP2*

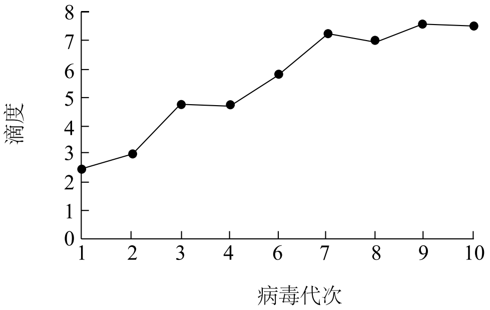


图 6 重组病毒 rHEP-r*VP2* 不同代次滴度

Fig.6 Virus titers of rHEP-r*VP2* in different generations

2.3 重组病毒 rHEP-r*VP2* 在 BHK-21 细胞上的生长曲线

构建的重组毒株 rHEP-r*VP2* 具有良好的生长特性,与亲本株 HEP-Flury 具有相似的生长趋势,重组毒株在前期比亲本株繁殖快,亲本株在 72 h 到 96 h 时间段繁殖较快,二者在 96 h 时滴度达到峰值,高于 1×10^7 FFU/ml(图 7)。

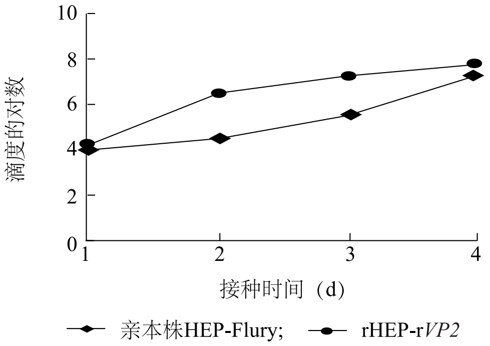


图 7 重组病毒 rHEP-r*VP2* 在 BHK-21 细胞上的生长曲线

Fig.7 Growth curves of recombinant virus rHEP-r*VP2* in BHK-21 cells

2.4 重组病毒 rHEP-r*VP2* 诱导的小鼠抗体水平

重组毒株 rHEP-r*VP2* 免疫小鼠后 21 d,尾静脉采血,进行 RV 抗体水平和血凝抑制抗体效价分析。结果(图 8)显示,重组毒株 rHEP-r*VP2* 能诱导产生较高水平的 CPV HI 抗体,效价达到1∶256,可以抵抗 CPV 感染[6],而亲本株 HEP-Flury 抗体不与 CPV 反应,与空白对照组 HI 抗体效价同为1∶32。重组毒株 rHEP-r*VP2* 和亲本株免疫小鼠 21 d 时抗体水平均高于 5 EU/ml(图 9),免疫小鼠抗狂犬病毒抗体水平高于 0.6 EU/ml时被认为达到保护水平[7]。

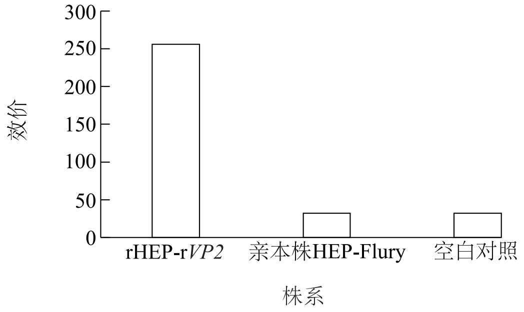


图 8 重组毒株 rHEP-r*VP2* 免疫小鼠的抗犬细小病毒 HI 抗体水平

Fig.8 HI antibody titers in mice immunized with recombinant virus rHEP-r*VP2* against canine parvovirus (CPV)

3 讨 论

狂犬病毒基因操作的反向遗传系统首先在 1994 年由 Schnell 等在 SAD B19 株中建立[8]。应用该技术可以从提高安全性和免疫原性等方面对狂犬病毒基因进行修饰改良,从而大大增加了研发安全、有效的“新一代狂犬病疫苗”的可行性[9]。在基因

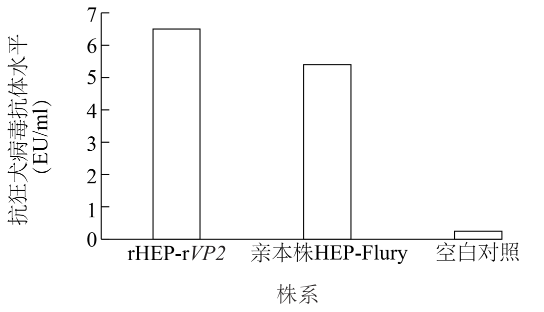


图 9　重组毒株 rHEP-r*VP2* 免疫小鼠的抗狂犬病毒抗体水平

Fig.9　HI antibody titers in mice immunized with recombinant virus rHEP-r*VP2* against rabies virus (RV)

水平上操作狂犬病毒,仅需要通过常规的分子克隆方法改变基因组质粒上病毒 cDNA 序列,然后将改造过的基因组质粒同辅助质粒一起转染细胞拯救出病毒。与将病毒在培养细胞上多次传代的经典方法相比,利用这种病毒基因操作系统获得疫苗候选毒株要快得多。而且在这个系统中,为了提高疫苗毒株的安全性和免疫原性,可以有意识地改变它的某些生物学性状,而经典的方法则依赖于减毒相关性突变在传代过程中随机和偶然地发生。因此,狂犬病毒反向遗传系统作为技术平台在研发新一代狂犬病疫苗中具有广阔的前景。

本研究将犬细小病毒 *VP2* 基因插入狂犬病毒基因组 *G*、*L* 基因之间,旨在构建狂犬病毒和犬细小病毒二联疫苗候选毒株。前期研究结果显示在 *G*、*L* 基因之间插入外源基因是降低病毒毒力的可选途径,例如在 HEP-Flury 株的 *G*、*L* 基因之间插入荧光素酶基因后拯救毒株对乳鼠的毒力相比于亲本株毒力减弱[1],这有利于减毒活疫苗的研制。携带 *VP2* 基因的重组毒株 rHEP-r*VP2* 免疫小鼠能诱导较高水平的抗犬细小病毒 HI 抗体产生。有研究结果证明仅 VP2 蛋白可自行组装成犬细小病毒样粒子,loop1、loop3 和 loop4 对于病毒样粒子的组装起主要作用,而 loop2 可容许插入外源性抗原表位,不影响病毒粒子装配,且能将外源表位展示在病毒样粒子表面[10]。重组毒株 rHEP-r*VP2* 诱导产生比亲本株更高的抗 RV 抗体水平,推测与 VP2 蛋白可自行组装成病毒样颗粒并展示 RV 中和抗原表位相关。有研究者用重组杆状病毒在蚕蛹中表达了 loop2 区域部分序列被 RV 中和抗原表位替换的 VP2 融合蛋白,电镜观察证实 VP2 融合蛋白可以自行组装成 VLPs,经 Western blot 鉴定,RV 中和抗原表位具有免疫反应性[2]。重组毒株 rHEP-r*VP2* 生物学特性研究结果显示经过连续传代后,在 BHK-21 细胞中具有良好繁殖特性和遗传稳定性,说明重组毒株 rHEP-r*VP2* 具有 RV 和 CPV 二联疫苗候选毒株的潜质。

参考文献:

[1] LIANG H, TAN Y, DUN C, et al. A recombinant rabies virus expressing luciferase[J]. Acta Virol, 2010, 54(2): 269-274.

[2] FENG H, LIANG M, WANG HL, et al. Recombinant canine parvovirus-like particles express foreign epitopes in silkworm pupae [J]. Vet Microbiol, 2011, 154(1/2): 49-57.

[3] 郭霄峰,FU Z F. 狂犬病毒糖蛋白基因的重排及病毒的拯救[J]. 华南农业大学学报,2006, 27(1): 104-106.

[4] ITO N, TAKAYAMA I M, YAMADA K, et al. Improved recovery of rabies virus from cloned cDNA using a vaccinia virus-free reverse genetics system [J]. Microbiology and Immunology, 2003, 47 (8):613-617.

[5] SENDA M, HIRAYAMA N, YAMAMOTO H, et al. An improved hemagglutination test for study of canine parvovirus[J]. Vet Microbiol, 1986,12(1):1-6.

[6] POLLOCK R V, CARMICHAEL L E. Maternally derived immunity to canine parvovirus infection: transfer, decline, and interference with vaccination[J]. Javma J Am Vet Med A, 1982,180 (1):37-42.

[7] 孙招金,薛素强,刘晓慧,等. ELISA 与 FAVN 方法检测犬狂犬病抗体的比较[J]. 中国预防兽医学报, 2009, 3(31):204-206.

[8] SCHNELL M J, MEBATSION T, CONZELMANN K K. Infectious rabies viruses from cloned cDNA [J]. EMBO J, 1994, 13: 4195-4203.

[9] 谭业平,祝艳蕾,郭霄峰. 狂犬病毒反向遗传学研究进展[J]. 中国兽医学报, 2010, 30(2): 282-288.

[10] RUEDA P, MARTNEZ-TORRECUADRADA J, SARRASECA J, et al. Engineering parvovirus-like particles for the induction of B-cell, CD4+ and CTL responses[J]. Vaccine, 1999, 18: 325-332.

(责任编辑:张震林)