

狂犬病毒糖蛋白基因的重排及病毒的拯救

郭霄峰¹, 富振芳²

(¹华南农业大学预防兽医学系, 广东广州 510642; ² Department of Pathology, the University of Georgia, Athens, Georgia, 30602, USA)

摘要: 为了从分子水平研究狂犬病糖蛋白基因(G)从第4位重排至第1位后病毒的结构、功能及病毒致病性的变化, 运用基因突变、反向遗传技术的原理与方法, 将狂犬病毒(RV)糖蛋白基因从野生型的第4位(N-P-M-G-L)重排于第1位(G-N-P-M-L), 并成功地拯救已发生基因重排的狂犬病毒。

关键词: 狂犬病毒; 反向遗传操作系统; 糖蛋白基因; 基因重排

中图分类号: S855.3 文献标识码: A 文章编号: 1001-411X(2006)01-0104-03

Moving the Glycoprotein Gene of Rabies Virus to Promoter-Proximal

Position and the Generation of the Virus

GUO Xiao-feng¹, FU Zhen-fang²

(¹ Department of Preventive Veterinary, South China Agric. Univ., Guangzhou 510642, China;

² Department of Pathology, the University of Georgia, Athens, Georgia, 30602, USA)

Abstract: Rabies virus contains nonsegmented negative-sense RNA in its genome. The 11-kb genome encodes five genes in the order 3'-N-P-M-G-L-5' and transcription is obligatorily sequential from the single 3' promoter. The G protein plays an important role in viral pathogenicity. Previous studies have demonstrated that moving the N gene to successively more promoter-distal position resulted in stepwise attenuation of replication and lethality for mice. In the present a full-length plasmid with the G gene at promoter-proximal position was constructed and a new rabies virus were rescued by reverse genetics.

Key words: rabies virus; reverse genetic system; glycoprotein; gene rearrangement

狂犬病毒(RV)是弹状病毒科的一个重要成员, 可引起人和多种动物的狂犬病。其基因组为12 kb左右的单链负股RNA, 编码5种功能不同的结构蛋白^[1]。核蛋白(N)紧紧地包裹基因组RNA, 形成核糖核蛋白体复合物(RNP)。大蛋白(L)与磷蛋白(P)是依赖RNA的RNA聚合酶复合体。基质蛋白(M)是RNP与糖蛋白(G)胞浆域的桥梁。G蛋白是病毒的跨膜蛋白, 由胞浆域和胞外域2部分组成, 可诱导感染动物产生中和抗体, 调节病毒的转录与复制, 是病毒的主要免疫原蛋白^[2]。Schnell等^[3]首先报道从cDNA克隆分子中拯救出狂犬病毒, 建立了

负股RNA病毒的反向遗传操作系统。之后, 多位作者以相同的方法已拯救水泡性口膜炎病毒^[4]、人呼吸综合症病毒^[5]、仙台病毒^[6]等单股负链RNA病毒, 并广泛开展病毒转录、复制、基因表达、调控的研究。Wertz等^[7]的研究表明, 如将水泡性口膜炎病毒(VSV)基因组的N基因从第1位重排至第2位, 由于N蛋白合成的减少, 可导致病毒复制和病毒毒力的降低。如将VSV病毒的G基因重排于第1位, 则可大大提高G蛋白的表达量, 增强感染鼠的免疫反应^[8]。鉴于狂犬病毒与水泡性口膜炎病毒同属于弹状病毒科, 基因结构十分相似, 均为3'-N-P-M-G-L-

收稿日期: 2005-09-13

作者简介: 郭霄峰(1963-), 男, 教授, 博士, E-mail: xfguo@scau.edu.cn

基金项目: 美国NIH资助项目(051060)

5'。因此,本研究旨在将狂犬病毒的 G 基因从第 4 位重排致第 1 位,为探索 RV 各基因的结构、功能及对病毒致病性的影响、为研制高效安全的狂犬病毒基因工程疫苗奠定基础。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 细胞、病毒及抗体 BSR 细胞(BHK 细胞的 1 个克隆)、BSRT7 细胞(可稳定地表达 T7 RNA 聚合酶)、狂犬病毒 SN10 弱毒株由 Dr. Fu 的实验室提供。荧光素标记的抗 N 蛋白抗体购自 Centocor 公司。

1.1.2 质粒 pTIT-N、pTIT-P、pTIT-L、pTIT-G 和 pSAD-L16(含有狂犬病毒 SAD-L16 弱毒株全基因组)由 Dr. Schnell 惠赠。pGEM-GHL 含有 SAD-L16 毒株 *Xho*I 酶切片段,由 Dr. Fu 实验室构建。

1.1.3 工具酶 Superfect Transfection Reagent 购自 Qiagen 公司。AccuPrime™ Taq 高保真 DNA 聚合酶购自 Invitrogen 公司。

1.2 方法

1.2.1 全长基因质粒的构建 通过引物 5' AACATCCCTCAAAGAC 3' 和 5' ACATTTTTCCTTTGCAATTG 3' 将 pSAD-L16 的 NPM 3 个基因删除,命名为 pSAD-L16GL。接着以 *Xho*I 处理 pSAD-L16GL,切除 G、L 基因的部分片段并自连,该质粒命名为 pSAD-L16GLΔ*Xho*I。以 pSAD-L16 为模板,5' AACACCCCTACAATGG 3' 和 5' AATAGTTTTTTTCACATC 3' 为引物扩增 SAD-L16 的 NPM 基因,并在其两端加入 *Hpa*I 酶切位点。该 PCR 产物纯化后插入 pGEM-GHL 的 *Hpa*I 位点,该质粒命名为 pGEM-G1N2。以 *Xho*I 处理 pGEM-G1N2,酶切片段插入 pSAD-L16GLΔ*Xho*I 的 *Xho*I 位点,获 G 基因重新定位的全长基因质粒,命名为 pSAD-L16G1N2。

1.2.2 病毒的拯救 细胞的制备。转染前 24 h 在 12 孔细胞培养板中制备 BSRT7 细胞,使其浓度达到 2.5×10^6 /每孔。转染前细胞密度为 60%。

转染。先用 1 mL 1 × PBS(pH7.4)洗涤细胞,再加入 0.44 μg pSAD-L16G1N2, 0.2 μg pTIT-N, 0.11 μg pTIT-P, 0.11 μg pTIT-L, 0.11 μg pTIT-G 的混合液。在 37 °C 的 CO₂ 培养箱孵育 2.5 h,弃去培养液,再用 1 mL 1 × PBS(pH7.4)洗涤细胞。将细胞置于 37 °C 的 CO₂ 培养箱孵育 48 h,再转入 34 °C 的 CO₂ 培养箱孵育 96 h。

病毒的筛选。冻融细胞 3 次。取 60 μL 细胞液与新鲜制备的 40 μL BSR 细胞液混合,加于 96 孔微

量板中。37 °C 培养 48 h,接着 34 °C 培养 96 h。加体积分数为 80% 丙酮于细胞孔,约 10 s,立即弃去。再加丙酮以固定细胞,于 -20 °C 作用 1 h。弃去丙酮,自然干燥。加入 1:60 荧光标记的抗 N 抗体,37 °C 孵育 1 h。用 1 × PBS 洗涤细胞 2 次,每次 5 min;再用双蒸水洗涤细胞 1 次。自然干燥,在荧光显微镜下观察。

2 结果

2.1 基因的重排

为了将 SAD-L16 毒株的 G 基因从基因组的第 4 位重排致第 1 位,笔者首先删除了全长基因质粒 pSAD-L16 中的 N-P-M 3 个基因,但仍然保留着 N 基因上游的非编码区。然后再将 N-P-M 3 个基因插入 G-L 之间,构建成功 G 基因位于基因组第 1 位的全长基因质粒 pSAD-L16G1N2(图 1),其基因顺序为 3'-G-N-P-M-L-5'。

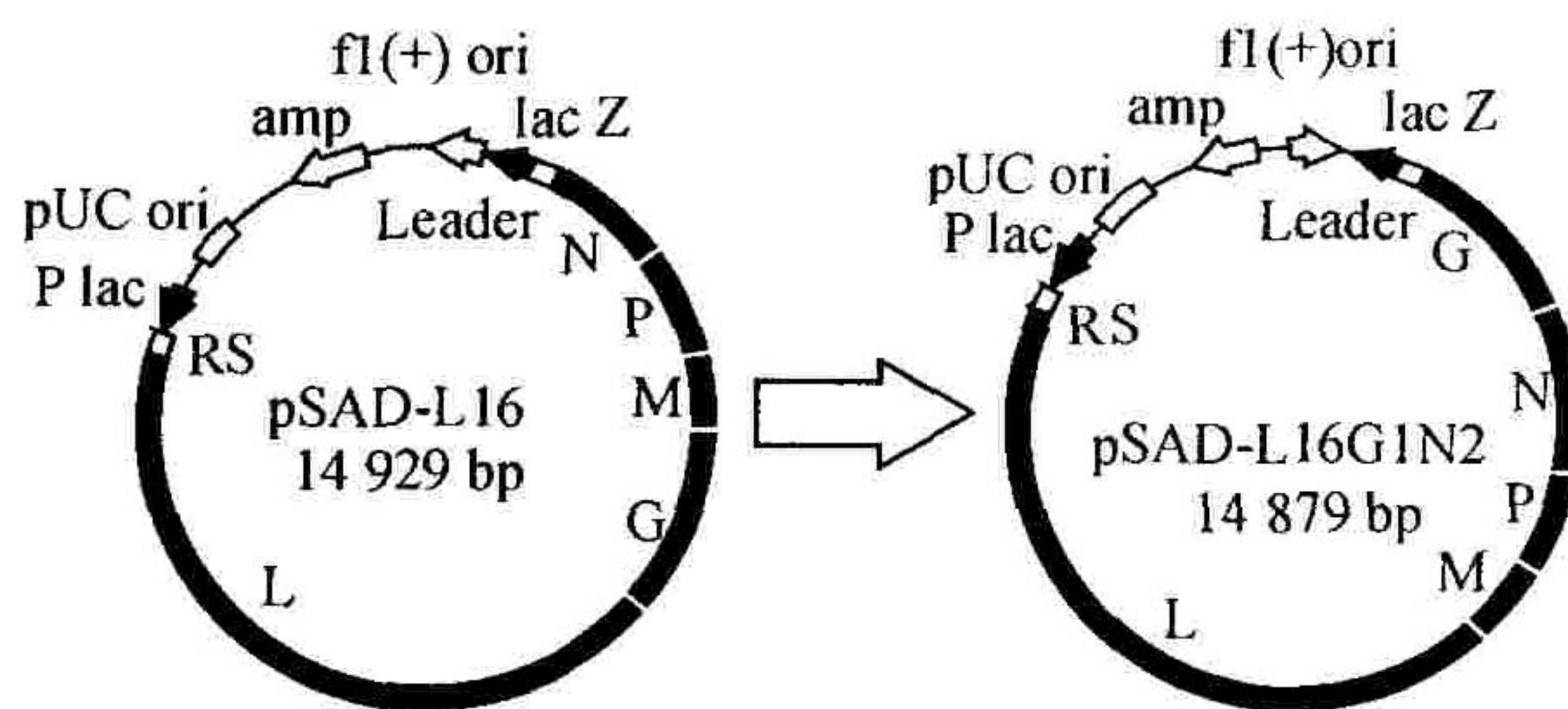


图 1 全长基因质粒的构建

Fig. 1 Construction of rabies virus full-length plasmid

2.2 病毒的拯救

全基因质粒 pSAD-L16G1N2 与 pTIT-N、pTIT-P、pTIT-L、pTIT-G 按一定比例混合后,转染 BSRT7 细胞,37 °C 培养 5 d。上清液再接种于 BSR 细胞,37 °C 培养 5 d。经荧光素标记的抗 N 抗体染色,荧光显微镜下可发现大量荧光斑点,表明已成功将病毒拯救(图 2、3)。



图 2 在 BSR-T7 细胞中的狂犬病毒

Fig. 2 Rabies virus antigen observed after transfection with full-length genome

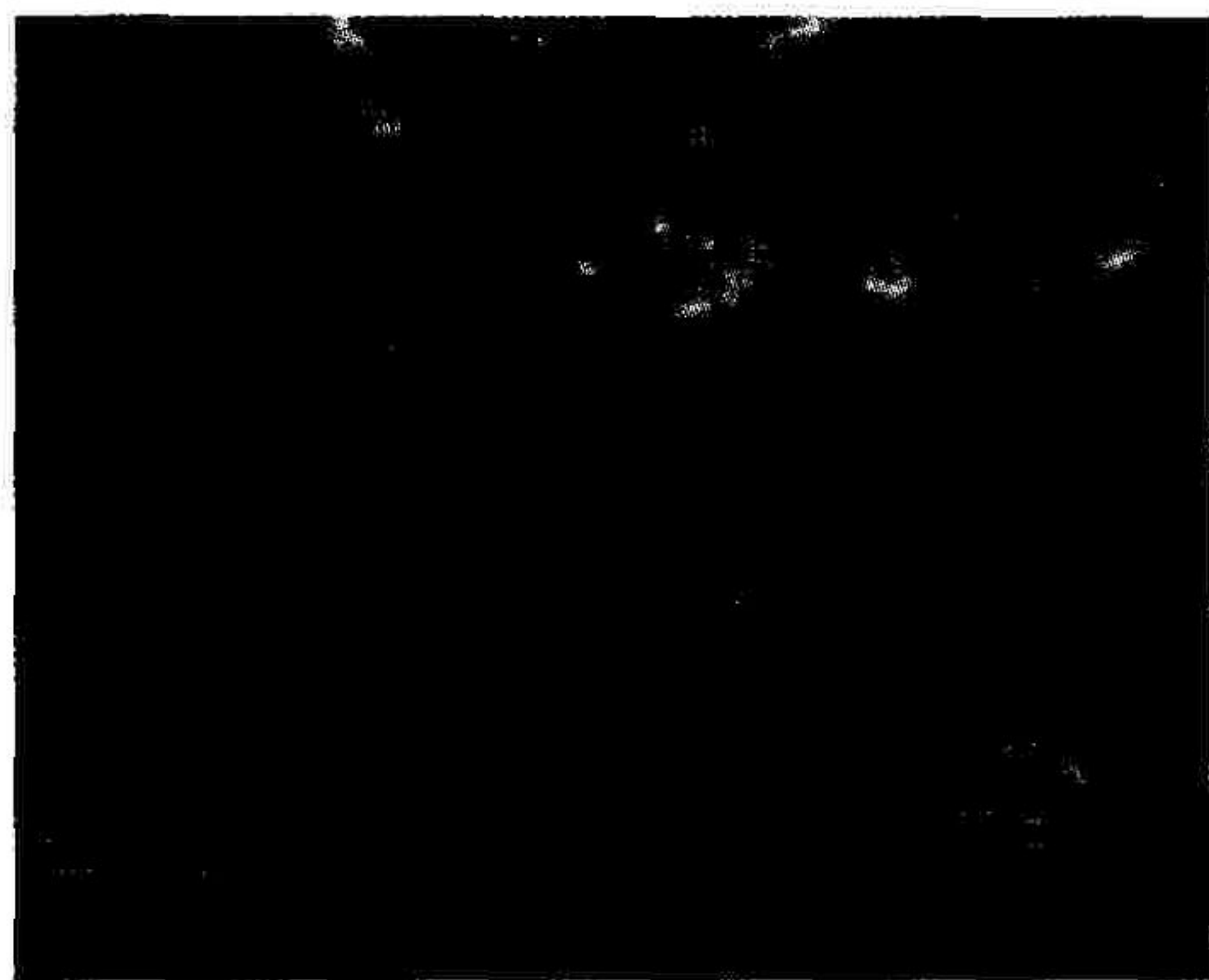


图3 SN10 毒株感染的细胞

Fig.3 Rabies virus antigen observed after infection with RV SN10

3 讨论

Schnell^[3]等于1994年首先建立了狂犬病毒的反向遗传操作系统,为研究负链RNA病毒的转录、复制开辟了一条全新的途径.以该系统拯救RV,需要痘苗病毒的参与,因该病毒可提供辅助质粒转录所需的T7RNA聚合酶.这个系统存在着明显的缺陷:一是痘苗病毒接种细胞后,可引起严重的细胞病变,从而减少了狂犬病毒的拯救效率;二是由痘苗病毒表达的T7RNA聚合酶所启动的辅助质粒的表达易导致全长基因与辅助质粒间的同源重组^[9];三是痘苗病毒干扰狂犬病毒的进一步鉴定.因此,Ito等^[10]在构建稳定表达T7RNA聚合酶的BHKT7细胞的基础上,对狂犬病毒的反向遗传操作系统进行了改进.以该系统拯救RV,只须将全长基因质粒,N、P、L、G质粒同时转化BHKT7,就能使病毒获得拯救,大大节省了操作的时间和提高了拯救效率.本实验参考Schnell^[11]和Wu^[12]的方法,运用相似的系统,成功地拯救G重排于基因组第1位的RV.

利用反向遗传操作技术从cDNA拯救病毒是一个系统而又复杂的工程,影响的因素很多,其中全基因质粒与辅助质粒的含量、它们之间的比例最为重要.实验中,我们采取方阵组合的方法,每一浓度、每一比例同时接种12孔板,但仅仅0.44 μg pSAD-L16G1N2, 0.2 μg pTIT-N, 0.11 μg pTIT-P, 0.11 μg pTIT-L, 0.11 μg pTIT-G这一浓度、比例可拯救出病毒,尽管如此,也仅4孔为阳性.

G基因置于第一位RV在细胞中的繁殖效率、G蛋白的表达量、该病毒的毒力、该病毒诱导机体产生的免疫反应等仍在研究中.

参考文献:

[1] CONZELMANN K K, COX J H, SCHNEIDER L G, et

al. Molecular cloning and complete nucleotide sequence of the attenuated rabies virus SAD B19[J]. Virology, 1990, 175:485-499.

- [2] MEBATSION T, WEILAND F, CONZELMANN K K. Matrix protein of rabies virus is responsible for the assembly and budding of bullet-shaped particles and interacts with transmembrane spike glycoprotein[J]. J Virol, 1999, 73: 242-250.
- [3] SCHNELL M J, MEBATSION T, CONZELMANN K K. Infectious rabies viruses from cloned cDNA. [J]. EMBO J, 1994, 13:4 195-4 203.
- [4] LAWSON N D, STILLMAN E A, WHITT M A. Recombinant vesicular stomatitis viruses from DNA[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 1995, 92:4 477-4 481.
- [5] COLLINS P L, HILL M G, CAMARGO E. Production of infectious human respiratory syncytial virus from cloned cDNA confirms an essential role for the transcription elongation factor from the 5'proximal open reading frame of the M2 mRNA in gene expression and provides a capability for vaccine development[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 1995, 92:11 563-11 567.
- [6] KATO A, SAKAI Y, SHIODA T. Initiation of sendai virus multiplication from transfected cDNA or RNA with negative or positive sense[J]. Genes Cells, 1996, 1:569-579.
- [7] WERTZ G W, PEREPELITSA V P, BALL L A. Gene rearrangement attenuates expression and lethality of a non-segmented negative strand RNA virus[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 1998, 95:3 501-3 506.
- [8] FLANGAN E B, BALL L A, WERTZ G W. Moving the glycoprotein gene of vesicular stomatitis virus to promoter-proximal positions accelerates and enhances the protective immune response[J]. J Virol, 2000, 74:7 895-7 902.
- [9] HOFFMAN M A, BANERJEE A K. An infectious clone of human parainfluenza virus type 3[J]. J Virol, 1997, 71: 4 272-4 277.
- [10] ITO N, ITO M T, YAMADA K. Improved recovery of rabies virus from cloned cDNA using a vaccine virus-free reverse genetics system[J]. Microbiol Immunol, 2003, 47 (8):613-617.
- [11] SCHNELL M J, FOLEY H D, SILER C A. Recombinant rabies virus as potential live-viral vaccines for HIV-1[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 1999, 97:3 544-3 549.
- [12] WU Xian-fu, GONG Xiao-ming, FOLEY H D. Both viral transcription and replication are reduced when the rabies virus nucleoprotein is not phosphorylated[J]. J Virol, 2001, 76(9):4 153-4 161.

【责任编辑 柴 焰】