

# HEP-Flury 株病毒辅助质粒包装 CTN 株病毒基因组拯救狂犬病病毒

黄莹 唐青 扈荣良

**【摘要】** 目的 以 CTN 株狂犬病病毒全长基因组 cDNA 重组质粒(pCTN-GFP)和 HEP-Flury 株病毒 N、P、L 辅助质粒共转染拯救具有活性的 CTN 株重组狂犬病病毒(CTN-GFP)。方法 将 CTN 株狂犬病病毒全长基因组分 4 段进行扩增,体外连接扩增片段并克隆入表达载体中,构建 CTN 株狂犬病病毒全长基因组 cDNA 重组质粒,基因组 $\psi$ 基因被标识基因 GFP 取代,通过与 HEP-Flury 株病毒 N、P、L 3 个辅助质粒共转染 BHK-21 细胞,拯救能够稳定表达 GFP 的重组病毒 CTN-GFP。结果 成功扩增全长基因组的 4 个基因片段,并将其克隆入表达载体,构建了 CTN 株狂犬病病毒全长基因组 cDNA 重组质粒 pCTN-GFP,经酶切鉴定和序列测定证明 pCTN-GFP 为正确克隆,可直接用于病毒拯救。将 pCTN-GFP 与 HEP-Flury 株病毒辅助质粒共转染 BHK-21 细胞 4 d 后,成功拯救出 CTN 株重组狂犬病病毒,重组病毒能够表达标识基因 GFP,荧光显微镜下可直接观察到标识基因 GFP 的表达,设计跨 GFP 和 L 基因的特性引物对重组病毒进行 RT-PCR 检测,结果证明此病毒是从克隆的质粒中拯救的重组病毒。结论 HEP-Flury 株病毒的结构蛋白能够包装并转录 CTN 株病毒的基因组 RNA。

**【关键词】** 狂犬病病毒;基因组;结构蛋白;病毒拯救

The function of helper plasmids from HEP-Flury strain rabies virus on encapsidating the full-length genome of CTN strain HUANG Ying\*, TANG Qing, HU Rong-liang. \*Agriculture Department of Jilin University, Changchun 130062, China

Corresponding author: TANG Qing, Email: qtang04@sina.com

**【Abstract】** Objective To identify the helper plasmids from HEP-Flury strain rabies virus that could encapsidate the full-length genome of CTN strain. Methods Four overlapped fragments covering the full-length genome of rabies virus CTN strain were cloned into expression vector. A recombinant full-length genome plasmid (pCTN-GFP) contained the full-length genome of the CTN strain expect for  $\psi$  gene which was replaced by GFP gene was then constructed using restriction enzyme cleavage and ligation in vitro. In order to obtain the recombinant rabies virus CTN-GFP, the pCTN-GFP was transfected with helper plasmids carrying N, P, L gene of HEP-Flury strain. Results The four gene fragments of the genome were amplified and cloned into the expression vector. The recombinant genome cDNA plasmid pCTN-GFP was constructed and subjected to restriction endonuclease digestions. After sequenced to assure no absence and mutations compared with their parental viruses, it was ready for virus rescue. After the transfection of both pCTN-GFP and the helper plasmids from HEP-Flury strain into BHK-21 cells, the recombinant rabies virus CTN-GFP was rescued and confirmed by fluorescence analysis and RT-PCR, which demonstrated that the CTN-GFP was recovered from cloned cDNA. Conclusion The proteins of HEP-Flury strain rabies virus could encapsidate and transcribe the CTN strain rabies virus RNA genome.

**【Key words】** Rabies virus; Genome; Structural proteins; Virus rescue

狂犬病病毒为单股负链 RNA 病毒,其基因组编码核蛋白(N)、磷蛋白(P)、基质蛋白(M)、糖蛋白(G)和转录酶蛋白(L)5种结构蛋白<sup>[1]</sup>。N、P、L蛋白

和基因组 RNA 相互作用形成具有遗传信息功能的核糖核蛋白(RNP)复合物<sup>[2]</sup>。因此在狂犬病病毒反向遗传系统中,除含病毒全长基因组质粒外,必须提供 N、P、L 3 个结构基因构成的辅助质粒。本研究为不同遗传背景的狂犬病病毒结构蛋白和基因组之间可以相互包装拯救狂犬病病毒提供依据。

## 材料与方法

### 1. 病毒、细胞及 HEP-Flury 株病毒辅助质粒来

DOI: 10.3760/cma.j.issn.0254-6450.2009.05.020

基金项目:国家“863”高科技计划(2006AA02Z110, 2007AA02Z402);

国家自然科学基金(30630049)

作者单位:130062 长春,吉林大学农业系(黄莹);中国疾病预防控制中心病毒病预防控制所病毒基因工程国家重点实验室(唐青);军事医学科学院军事兽医研究所(扈荣良)

通信作者:唐青,Email:qtang04@sina.com

源:CTN 株狂犬病病毒的亲代病毒是 1953 年从山东省淄博市 1 例感染狂犬病的患者脑组织中分离得到的,将分离到的病毒在鼠脑中连续传代 56 代,随后在人二倍体细胞(BMK-17)上继续传代 50 代得到的狂犬病病毒减毒疫苗株,并于 1983 年和 2005 年被 WHO 批准作为中国狂犬病疫苗生产用毒株<sup>[3]</sup>,此病毒株由中国药品生物制品检定所惠赠。仓鼠肾细胞(BHK-21, ATCC, USA)、小鼠神经瘤母细胞(MNA, 武汉生物制品研究所惠赠)。HEP-Flury 株狂犬病病毒的 N、P、L 基因分别克隆入 pcDNA3.1 载体中,构成 pH-N、pH-P、pH-L 3 个参与病毒转录及复制的辅助质粒,以上 3 种辅助质粒由 Moromoto 博士惠赠。

2. 病毒总 RNA 的提取和反转录形成 cDNA 文库:用 TRIZOL (Invitrogen, USA) 从感染有 CTN 株狂犬病病毒的冻小鼠脑中提取总 RNA。将 32 μl 提取的总 RNA 和 1 μl 浓度为 0.2 μg/ml 的随机引物 Pd (N), (TaKaRa) 用 Ready-To-Go You-Prime First-Strand Beads (Amersham Biosciences) 进行反转录,得到 cDNA 文库。

3. CTN 株病毒全长基因组分段扩增及克隆:根据 CTN 株狂犬病病毒基因组特点,选择其中的单一酶切位点将病毒基因组分成 4 段(F1、F2、F3、F4)进行扩增,用表 1 中的 4 对引物和 Easy-A High-Fidelity PCR Cloning Enzyme (Stratagene, USA) 扩增除 G-L 间隔区(ψ基因)序列以外的全基因组序列。将扩增获得的 4 个基因片段经 QIAquick Gel Extraction Kit (QIAGEN, Germany) 凝胶回收,并与 pGEM-T Easy Vector (Promega, USA) 连接,经转化后,筛选并挑取疑似阳性菌落进行扩大培养,培养产物用 QIAprep Spin Miniprep Kit (QIAGEN, Germany) 提取质粒。分析这 4 个重组 T 质粒内的酶切位点,选取合适的限制性内切酶(NEB, USA) 分别进行酶切鉴定。酶切鉴定正确的克隆送上海生物工程技术服务有限公司测序,最终得到分别克隆有 4 个基因片段的重组质粒,分别命名为 pT-F1、pT-F2、pT-F3、pT-F4。

4. CTN 株病毒全长基因组 cDNA 重组质粒的构建:从分别克隆了 F1、F2、F3、F4 基因片段的 pT-F1、pT-F2、pT-F3、pT-F4 重组质粒中酶切获得各个基因片段后,依次克隆入 pVAX-R 载体的 Kpn I /EcoR I、EcoR I /BssH II、Nhe I Apa I、Apa I /Not I 位置<sup>[4]</sup>,构建成 pVAX-R-F1234 重组质粒。将 GFP 基因从 pGFP 质粒中(Clontech, USA) 酶切回收后直接克隆入 pVAX-R-F1234 重组质粒的 BssH II /Nhe I 位置,最终得到含有 CTN 株全长基因组 cDNA 以及分子

表 1 全基因组分段扩增引物

引物名称	引物序列(5' ~ 3')	目的片段长度(bp)
F1F-Kpn I	GGT ACC CTA TAG TCA CGC TTA ACA ACC AAA TC	3019
F1R-EcoR I	CCG GAA TTC ATG TTG ATA CAC CAT ACC C	
F2F-EcoR I	GAT CCG CGC GGG GCG TGG TGT ATC AAC ATG AAT TCT AGA AC	1921
F2R-BssH II	GCG CGC TTT TTT TGG ACT TGA AAT ATG AAG GAG ATG ACC TGC C	
F3F-Nhe I	GCT AGC AAC ACT TCT CAT CTT GAA ACT C	3613
F3R-Apa I	GTG AGA GGG CCC TTT TTA CTA CAT G	
F4F-Apa I	GCC GGC GGC GGG GCC CTC TCA CTA AAA GAA TCT ATA AA	2943
F4R-Not I	GCG GCC GCT CCG ACC CAC GCT TAA CAA AAA GAC CAT AA	

注: F:上游引物; R:下游引物; Kpn I、EcoR I、BssH II、Nhe I、Apa I、Not I:引物中所带的酶切位点

标识的重组真核表达质粒(pCTN-GFP),酶切鉴定 pCTN-GFP 重组质粒,将酶切鉴定正确的克隆送上海生物工程技术服务有限公司测序。

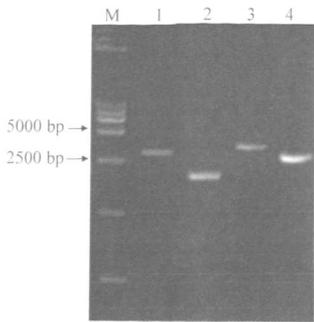
5. 转染及拯救重组病毒:在含 10% FBS 的 D-MEM 培养基的六孔板(Coring, USA) 中过夜培养 BHK-21 细胞,待长成单层(约 4×10<sup>5</sup> ~ 6×10<sup>5</sup> 个细胞/孔)后用于转染。用 10 μl Lipofectamine 2000 Transfection Reagent (Invitrogen, USA) 将 2 μg pCTN-GFP, 1 μg pH-N, 0.5 μg pH-P 和 0.5 μg pH-L 4 个质粒共转染 BHK-21 细胞。转染后在 10% 的 D-MEM 培养基培养 3 ~ 5 d。转染细胞及上清混合物反复冻融 3 次收获重组病毒, MNA 细胞连续传 2 代,扩增拯救后的重组病毒。

6. 重组病毒的鉴定:拯救后的重组病毒 MNA 细胞连续传代,荧光显微镜下观察细胞中重组病毒标识基因 GFP 的表达。为鉴定 CTN-GFP 的病毒基因组 RNA,从感染 CTN-GFP 的细胞上清液中提取细胞总 RNA,进行 RT-PCR 鉴定。针对重组狂犬病病毒 CTN-GFP 的基因特点,设计了一对特异性引物(GFP-F 和 L-R),此引物包括自 GFP 基因 5' 端 301 nt 至 L 基因 5' 端 304 nt 的一段核酸序列,用 GoTaq green mix (Promega, USA) 进行 PCR 扩增,目的片段长度约 890 bp。引物序列:GFP-F:5' (5119 nt ~ 5142 nt)-GCC AAC ACT TGT CAC TAC TTT CT-3', L-R:5' (5986 nt ~ 6009 nt)-ACC CAC TTT GAG GGA ACC CAG AT-3'。扩增条件:94℃预变性 3 min, 94℃变性 30 s, 55℃退火 40 s, 共 30 个循环后 72℃延伸 10 min; 1% 琼脂糖凝胶电泳分析扩增结果。

结 果

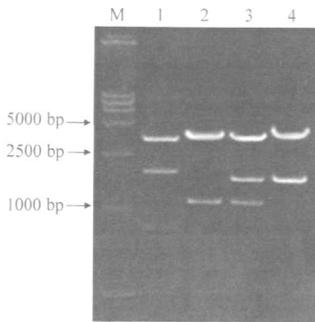
1. CTN 株病毒全长基因组分段扩增结果: F1、F2、

F3、F4 为基因组分段扩增后得到的 4 个基因片段,长度分别为 3019 bp、1921 bp、3613 bp 和 2943 bp(图 1)。



注: M:DL15000 Marker; 1~4:分别为 F1、F2、F3 和 F4 的 PCR 产物  
图 1 CTN 株狂犬病病毒全长基因组分段扩增结果

2. 病毒全长基因组分段扩增产物的 TA 克隆结果: 将上述 4 个基因片段分别克隆入 pGEM-T Easy 载体中得到 pT-F1、pT-F2、pT-F3、pT-F4 的 4 个重组质粒,选择重组质粒中适当的酶切位点对其进行鉴定。Dra I 酶切鉴定 pT-F1,获得的预期片段长度分别为 3490 bp、1818 bp 和 692 bp; Pvu I 酶切鉴定 pT-F2,得到的预期片段长度分别为 1096 bp 和 3825 bp; BamH I 酶切鉴定 pT-F3,获得 1097 bp、1657 bp 和 3559 bp 3 个预期片段; Hind III/Mlu I 酶切鉴定 pT-F4,得到 1642 bp 和 4301 bp 2 个预期片段,酶切鉴定结果如图 2 所示。

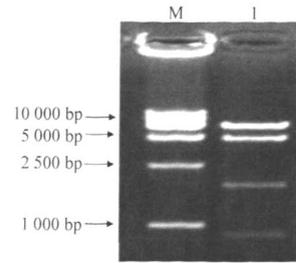


注: M: DL15000 Marker; 1:Dra I 酶切鉴定 pT-F1 结果; 2:Pvu I 酶切鉴定 pT-F2 结果; 3: BamH I 酶切鉴定 pT-F3 结果; 4: Hind III/Mlu I 酶切鉴定 pT-F4 结果

图 2 基因组分段扩增产物 TA 克隆结果

3. 病毒全长基因组重组真核表达质粒鉴定结果: 病毒全长基因组重组真核表达质粒 pCTN-GFP 全长 15 293 bp, 根据 pCTN-GFP 质粒中酶切位点所处的位置和种类,选择其中的 2 个 Pst I (6064 nt 和 11 786 nt) 和 2 个 Hind III (4303 nt 和 10 928 nt) 将 pCTN-GFP 质粒分成 7810 bp、4882 bp、1743 bp 和 858 bp 4 个片段进行鉴定,酶切鉴定结果如图 3 所示。

4. 重组病毒绿色荧光蛋白表达鉴定结果: 转染细



注: M:DL15000 Marker; I:Hind III/Pst I 酶切鉴定 pCTN-GFP 结果

图 3 病毒全长基因组 cDNA 重组质粒 pCTN-GFP 酶切鉴定结果

胞及上清混合物反复冻融 3 次收获重组病毒, MNA 细胞连续传 2 代后重组病毒 CTN-GFP 最高滴度可达  $1 \times 10^4$  ffu/ml。以 MOI=0.1 的感染剂量接种单层 MNA 细胞, 37℃ 5% CO<sub>2</sub> 培养箱中培养 3~4 d, 荧光显微镜下可见绿色荧光蛋白在细胞中的表达(图 4)。

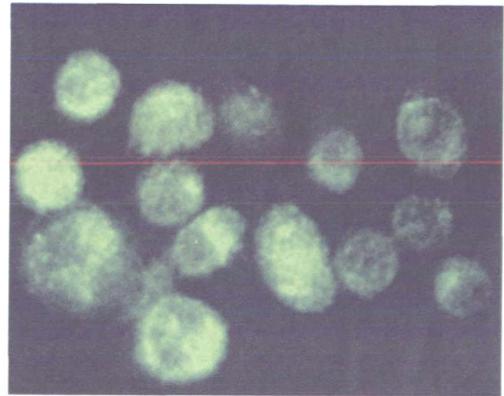
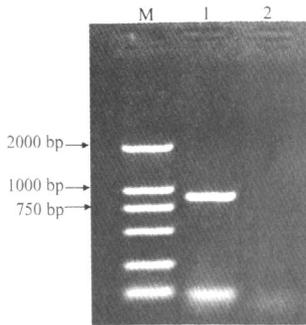


图 4 CTN-GFP 感染的 MNA 细胞在荧光显微镜下观察结果(200×)

5. 重组病毒 RT-PCR 检测结果: 为验证 CTN-GFP 是通过共转染 pCTN-GFP 和 pH-N、pH-P、pH-L 4 个质粒而获得的重组病毒, 用 CTN-GFP 感染单层 MNA 细胞, 感染 3 d 后取细胞上清液用一对跨 GFP 基因和 L 基因的引物 GFP-F 和 L-R 进行 RT-PCR 鉴定, 鉴定结果图 5 所示。

### 讨 论

非反转录 RNA 病毒不同于 DNA 病毒, 它的复制不经过 DNA 阶段, 这一特点严重限制了 RNA 病毒的研究进展, 直到 20 世纪 90 年代反向遗传技术的出现, 使 RNA 病毒的研究有了突飞猛进的发展。自 1994 年 Schnell 等<sup>[1]</sup>第一次建立狂犬病病毒反向遗传系统以来, SAD-B19、RC-HL 和 HEP-Flury 这 3 株减毒株狂犬病病毒也相继被拯救成功, 3 株病毒均通过共转染病毒自身的全长基因组 cDNA 质粒和辅



注: M: DL2000 Marker; 1: RT-PCR 鉴定 CTN-GFP 病毒结果; 2: 阴性对照

图 5 重组病毒 CTN-GFP RT-PCR 鉴定结果

助质粒拯救病毒。2002 年, Le Mercier 等<sup>[6]</sup>构建了一个包含荧光素酶基因的模拟狂犬病病毒的迷你基因组, 用狂犬病相关病毒 Mokola 株作为辅助病毒<sup>[7]</sup>, 对其进行拯救, 结果荧光素酶基因在转染的细胞中获得稳定表达。本研究构建了 CTN 株狂犬病病毒全长基因组 cDNA 重组质粒, 用 HEP-Flury 株狂犬病病毒 N、P、L 辅助质粒包装 CTN 株病毒重组基因组, 拯救 CTN 株重组狂犬病病毒, 结果表明 HEP-Flury 株病毒的 N、P、L 蛋白和 CTN 株病毒的全长基因 cDNA 重组质粒共转染, 可以拯救出 CTN 株重组狂犬病病毒, 说明 HEP-Flury 株的结构蛋白可以辅助转录 CTN 株病毒基因组 RNA, 并与之形成具有活性的 RNP 复合物。本研究为不同遗传背景的狂犬病病毒结构蛋白和基因组之间可以相互包装提供了实验依据。

负链 RNA 病毒的反向遗传系统中, 全长基因组和结构蛋白基因需分别克隆入合适的表达载体, 通过共转染宿主细胞拯救病毒。以往的研究中 pcDNA3.1、pcDNA1.1/Amp 被选择作为狂犬病病毒反向遗传系统的表达载体<sup>[8,9]</sup>, 本研究选择 pVAX1 (pVAX-R 为 pVAX1 的改造体) 作为表达载体, 具有如下优点: pVAX1 为 pcDNA3.1 的衍生载体, 去除了 pcDNA3.1 的衍生载体中与基因复制和外源蛋白表达的无关序列, 降低载体基因组与宿主细胞染色体发生整合的可能性; pVAX1 载体大小仅有 3 kb, 比 pcDNA3.1 和 pcDNA1.1/Amp 小 2 kb 左右, 更便于转染, 并且 pVAX1 载体中的 CMV 启动子在细胞 RNA 聚合酶 II 作用下起始转录, CMV 比 T7 启动子更方便, 并且对于基因组相对较小的狂犬病病毒基因组的转录更有效。

在狂犬病病毒的反向遗传系统中, 转染过程中所有的质粒比例各有不同, 本研究全长基因组和 N、P、L 辅助质粒比例为 4:2:1:1 时, 具有最大的病毒拯救效率。分析原因一方面可能由于各个拯救系统所用的表达载体类型和大小有所不同, 进入细胞的能

力存在差别; 另一方面转染所用的细胞种类、状态及代次均有不同, 这些综合因素可能导致不同毒株狂犬病病毒拯救系统中质粒用量的不同。

狂犬病病毒 G-L 间隔区为病毒的伪基因 ( $\psi$  基因), 不编码任何多肽, 它的缺失不影响与病毒的繁殖和致病性<sup>[1,10]</sup>, 因此比较适合插入外源基因。本研究将 GFP 作为标识基因取代  $\psi$  基因, 通过 GFP 的表达检测重组病毒是否拯救成功。同时在荧光显微镜下可直接观察 GFP 的表达, 使拯救病毒的鉴定变得更直观、便捷。重组病毒 CTN-GFP 能稳定表达外源基因且 CTN 为弱毒疫苗株狂犬病病毒, 遗传背景清晰, 可以作为病毒载体。此外, 通过狂犬病病毒反向遗传操作对病毒基因组进行加工、修饰, 或改变结构基因的排序, 替换不同遗传背景毒株的结构蛋白来研究病毒结构与功能, 以及致病性之间的关系<sup>[11-13]</sup>, 本研究为此提供了一个技术平台。

#### 参 考 文 献

- [1] McGettigan JP, Pomerantz RJ, Schnell MJ, et al. Second-generation rabies virus-based vaccine vector expressing human immunodeficiency virus type 1 gag have greatly reduced pathogenicity but are highly immunogenic. *J Virol*, 2003, 77(1): 237-244.
- [2] Ito N, Takayama M, Yamada K, et al. Rescue of rabies virus from cloned cDNA and identification of the pathogenicity-related gene: glycoprotein gene is associated with virulence for adult mice. *J Virol*, 2001, 75(19): 9121-9128.
- [3] 俞水新. 国内外狂犬病疫苗的发展和现状. *上海预防医学杂志*, 2006, 18(5): 216-218.
- [4] 明平刚, 黄莹, 唐青, 等. 狂犬病病毒毒株全长基因 cDNA 克隆的构建及鉴定. *病毒学报*, 2009, 25(1): 17-22.
- [5] Schnell MJ, Mebatsion T, Conzelmann KK. Infectious rabies viruses from cloned cDNA. *EMBO J*, 1994, 13(18): 4195-4203.
- [6] Le Mercier P, Jacob Y, Tanner K, et al. A novel expression cassette of lyssavirus shows that the distantly related Mokola virus can rescue a defective rabies virus genome. *J Virol*, 2002, 76(4): 2024-2027.
- [7] Le Mercier P, Jacob Y, Tordo N. The complete Mokola virus genome sequence: structure of the RNA-dependent RNA polymerase. *J Gen Virol*, 1997, 78(Pt 7): 1571-1576.
- [8] Ito N, Takayama-Ito M, Yamada K, et al. Improved recovery of rabies virus from cloned cDNA using a vaccinia virus-free reverse genetics system. *Microbiol Immunol*, 2003, 47(8): 613-617.
- [9] Inoue K, Kurane I, Morimoto K, et al. An improved method for recovering rabies virus from cloned cDNA. *J Virol Methods*, 2003, 107(2): 229-236.
- [10] McGettigan JP, Sarma S, Orenstein JM, et al. Expression and immunogenicity of human immunodeficiency virus type 1 gag expressed by a replication-competent rhabdovirus-based vaccine vector. *J Virol*, 2001, 75(18): 8724-8732.
- [11] Wu X, Rupprecht CE. Glycoprotein gene relocation in rabies virus. *Virus Res*, 2008, 131(1): 95-99.
- [12] Schnell MJ, Mebatsion T, Conzelmann KK. Mokola virus glycoprotein and chimeric protein can replace rabies virus glycoprotein in the rescue of infective rabies virus particles. *J Virol*, 1995, 69(3): 1444-1451.
- [13] Pulmanasahakul R, Li J, Schnell MJ, et al. The glycoprotein and the matrix protein of rabies virus affect pathogenicity by regulating viral replication and facilitating cell-to-cell spread. *J Virol*, 2008, 82(5): 2330-2338.

(收稿日期: 2009-02-10)

(本文编辑: 尹廉)