

## 狂犬病病毒糖蛋白在昆虫细胞中的表达及其免疫学特性分析

王晓蕾<sup>1,2</sup>,陈芳芳<sup>3</sup>,袁伟<sup>1</sup>,钱国强<sup>3</sup>,耿以如<sup>1,2</sup>,张晓<sup>2</sup>,杨瑾<sup>1,2</sup>,熊四平<sup>1,2</sup>,陈雅<sup>1,2</sup>,唐奇<sup>2</sup>,仇镇宁<sup>2</sup>,  
冯振卿<sup>1,2\*</sup>,朱进<sup>2,4\*</sup>

(<sup>1</sup>南京医科大学病理学系,<sup>2</sup>卫生部抗体技术重点实验室,江苏南京210029;<sup>3</sup>江阴力博医药生物技术有限公司,江苏江阴214400;<sup>4</sup>南京军区军事医学研究所,江苏南京210002)

**[摘要]** 目的:利用 Bac-To-Bac 杆状病毒昆虫细胞表达系统对狂犬病病毒糖蛋白(rabies virus glycoprotein, RVG)基因进行克隆、表达、纯化,并对重组 RVG 进行免疫学特性鉴定。方法:参照 GenBank 收录的狂犬病病毒 CVS-11 株 RVG 基因序列,设计特异性引物,扩增目的基因。RVG 基因经 *Bam*H I/*Kpn* I 双酶切后定向克隆到 pFastBac-GP67B 载体上,阳性重组转座质粒进一步转化 *E. coli* DH10Bac 感受态细胞,经蓝白斑筛选及 PCR 鉴定后获得重组穿梭载体 rBacmid-RVG,将其转染至对数生长期的 Sf-9 昆虫细胞,进行重组 RVG 的真核表达。His-TrapHP 纯化目的蛋白,SDS-PAGE 和 Western blot 进行鉴定。重组 RVG 免疫小鼠,检测其免疫原性和血清中和活性。结果:用 Bac-To-Bac 杆状病毒昆虫细胞表达系统表达并纯化了重组 RVG,分子量约 58 000。经重组 RVG 免疫后的小鼠血清具有中和活性。结论:重组 RVG 具有天然 RVG 的活性,为进一步研制亚单位疫苗及制备筛选中和抗体奠定了基础。

**[关键词]** 狂犬病病毒;狂犬病病毒糖蛋白;Bac-To-Bac 杆状病毒昆虫细胞表达系统;纯化;抗体

**[中图分类号]** R392.11

**[文献标志码]** A

**[文章编号]** 1007-4368(2015)06-772-05

**doi:**10.7655/NYDXBNS20150603

## Expression of insect cell-based rabies virus glycoprotein and assessment of its immunogenicity efficacy in mice

Wang Xiaolei<sup>1,2</sup>, Chen Fangfang<sup>3</sup>, Yuan Wei<sup>1</sup>, Qian Guoqiang<sup>3</sup>, Geng Yiru<sup>1,2</sup>, Zhang Xiao<sup>2</sup>, Yang Jin<sup>1,2</sup>, Xiong Siping<sup>1,2</sup>, Chen Ya<sup>1,2</sup>, Tang Qi<sup>2</sup>, Qiu Zhenning<sup>2</sup>, Feng Zhenqing<sup>1,2\*</sup>, Zhu Jin<sup>2,4\*</sup>

(<sup>1</sup>Department of Pathology, <sup>2</sup>Key Laboratory of Antibody Technique of Ministry of Health, NJMU, Nanjing 210029; <sup>3</sup>Jiangyin Libo Pharmaceutical Biotechnology Co. Ltd, Jiangyin 214400; <sup>4</sup>Huadong Medical Institute of Biotechniques, Nanjing 210002, China)

**[Abstract]** **Objective:** Rabies virus glycoprotein (RVG) was cloned using Bac-to-Bac baculovirus expression vector system and expressed in *Spodoptera frugiperda* (Sf-9) cells. Furthermore, the purified r-RVG protein was used to evaluate the immunological characteristics. **Methods:** Referring to the sequence of G protein gene of rabies virus CVS-11 strain from GenBank, we designed a pair of specific primers for PCR amplification, cDNA worked as the PCR template. The sequence of G protein gene was amplified by specific primers designed according to the CVS-11 strain from GenBank. The PCR-amplified RVG gene was cloned into the pFastBac-GP67B plasmids with digestion by restriction enzyme *Bam*H I and *Kpn* I. Positive clone was transformed into *E. coli* DH10Bac competent cells and then the recombinant rBacmid-RVG was identified by blue/white selection and PCR analysis. The recombinant baculovirus was generated by transfecting Sf-9 cells and the recombinant RVG from eukaryotic expression was purified with His-Trap, characterized by SDS-PAGE and Western-blot analysis. The immunogenicity and serum neutralizing activity of recombinant RVG were assessed using mice model. **Results:** Recombinant RVG protein was efficiently expressed in eukaryotic expression and purified, with molecular weight of 58 000. The mice serum showed neutralizing activity after immunization by recombinant RVG. **Conclusion:** The results of the study indicated that recombinant RVG retained the biological activity as the native conformation, thereby paving the way

**[基金项目]** 国家自然科学基金项目(81273325,81202370);江苏省社会发展项目(BE2011842);大学生创新计划(Ky101J201217)

\*通信作者(Corresponding author), E-mail: fengzhenqing@njmu.edu.cn; zhujin1968@njmu.edu.cn

for producing efficacious subunit vaccine and screen neutralizing antibodies in future research.

[Key words] rabies virus; rabies virus glycoprotein(RVG);Bac-to-Bac baculovirus expression system; purification;antibody

[Acta Univ Med Nanjing, 2015, 35(06): 772-776, 822]

狂犬病是由狂犬病病毒(rabies virus, RV)所致的自然疫源性人畜共患急性传染病。临床表现主要为恐水、畏光、吞咽困难、狂躁等,发病后病死率为 100%。狂犬病病毒为负链 RNA 病毒,可编码核蛋白、磷蛋白、基质蛋白、糖蛋白和转录酶大蛋白,其中糖蛋白是狂犬病病毒的主要保护性抗原,有多个线性及构象抗原表位<sup>[1-2]</sup>。利用基因工程构建重组糖蛋白防治狂犬病已经成为新的研究热点。本实验室已利用原核表达系统表达并纯化了糖蛋白,构建了全人源抗狂犬病病毒 scFv 噬菌体抗体库,筛选到 1 株具有中和活性的 scFv<sup>[3-4]</sup>。但是原核表达系统无法完成蛋白的加工修饰过程,表达的蛋白没有空间构象,而利用真核表达系统则可克服这一缺点,表达的蛋白活性较高。本课题组曾利用杆状病毒昆虫细胞表达系统表达了 H5N1 型高致病性禽流感病毒血凝素(hemagglutinin, HA)蛋白,筛选到 4 株 scFv 抗体可与 6 株 H5N1 型禽流感病毒起中和反应<sup>[5-6]</sup>。据此,本研究通过杆状病毒昆虫细胞表达系统表达重组狂犬病病毒糖蛋白(rabies virus glycoprotein, RVG),这对于狂犬病病毒感染诊断,制备亚单位疫苗及筛选治疗性抗体都具有重要意义。

## 1 材料和方法

### 1.1 材料

#### 1.1.1 动物、载体、菌种及细胞

6~8 周 Balb/c 雌性小鼠,清洁级(扬州大学比较医学中心),体重 15~18 g。Bac-To-Bac 杆状病毒昆虫细胞表达系统(转移载体 pFastBac-GP67B 和感受态细胞 *E.Coli DH5 $\alpha$* 、*E.Coli DH10Bac* (Invitrogen 公司,美国)。kSf-9 细胞(*Spodoptera frugiperda*)于 Sf-900™ III SFM(Gibco 公司,美国)培养基 27℃ 培养。狂犬病病毒 Flury 株由军事医学科学院军事兽医研究所提供。

#### 1.1.2 引物、工具酶和试剂

根据 GenBank 狂犬病病毒 CVS-11 株糖蛋白基因核苷酸序列(GenBank:EU126641.1)设计引物。上游引物中引入 *Bam*H I 位点,下游引物中引入 *Kpn* I 位点:上游:5'-CGGGATCCATGGTTCCTCAGGTTCTTTT G-3'和下游:5'-CGGGGTACCCTAATGGTGATG-

GTGCAGTCTGATCTCACCTCCACT-3' (划线处为酶切位点),6 个组氨酸碱基添加至下游引物上,序列为 5'-CATCACCACCATCAC-3',由南京金丝瑞公司合成。

*ExTaq* 酶、*T4* DNA 连接酶、限制性内切酶 *Bam*H I 和 *Kpn* I,DL 2000 Marker、DL 6000 Marker 及蛋白 Marker 等(TaKaRa 公司,日本);DNA Transfection Reagent 转染试剂(Roche 公司,瑞士);透析袋(截留分子量:8 000~14 400)(Biosharp 公司,美国);His-TrapHP 亲和层析柱(GE 公司,美国);辣根过氧化物酶(HRP)标记的鼠抗 6 ×His IgG 抗体(南京金斯瑞公司)。弗氏完全佐剂、弗氏不完全佐剂(Sigma 公司,美国),柱式动物 DNA 抽提试剂盒(北京天恩泽公司),过氧化物酶底物显示液(TMB)(北京索莱宝公司)。

### 1.2 方法

#### 1.2.1 重组表达载体 rBacmid-RVG 的构建

提取狂犬病病毒 CVS-11 株(南京军区军事医学研究所保存)总 RNA,反转录为 cDNA 后,用特异性引物扩增 RVG 基因。将 PCR 产物和 pFastBac-GP67B 经 *Bam*H I 和 *Xho* I 双酶切后回收连接,连接产物转化 *E.Coli DH5 $\alpha$*  感受态细胞,酶切鉴定后,筛选出重组质粒 pFastBac-GP67B-RVG。将阳性重组质粒 pFastBac-GP67B-RVG 转化 *E.Coli DH10Bac* 感受态细胞,通过蓝白斑筛选和 PCR 鉴定阳性克隆后提重组表达质粒 rBacmid-RVG。

#### 1.2.2 重组 RVG 的表达

重组的 rBacmid-RVG 质粒转染昆虫 Sf-9 细胞。将 Sf-9 细胞置于 Sf-900™ III SFM 昆虫细胞培养基 27℃ 孵育。6 孔板中加入细胞  $8 \times 10^5$  个/孔,待细胞稳定后加入重组的 rBacmid-RVG 与 Roche 试剂结合成的脂质体-DNA 复合物,27℃ 孵育 7 d,细胞出现明显病变并收集含病毒的培养上清,1 000 r/min 离心 5 min,弃去细胞和碎片。细胞沉淀用 1 × PBS 洗 3 次,裂解细胞提取总蛋白,样品进行电泳分析。细胞沉淀提取 DNA,RVG 特异性引物 PCR 扩增分析。

#### 1.2.3 Western blot 检测重组 RVG

感染细胞的蛋白及培养上清用 Western blot 检测。通过 SDS-PAGE 电泳转膜,用辣根过氧化物酶

标记的鼠抗 His IgG 抗体孵育,通过化学发光系统检测。

### 1.2.4 重组 RVG 的纯化及 SDS-PAGE 分析

收集病变细胞培养上清,透析 3 d 后,用 0.22 μm 滤膜过滤除去杂质,用 His-TrapHP 亲和层析柱进行纯化,洗脱浓缩蛋白,SDS-PAGE 分析。

### 1.2.5 重组 RVG 免疫小鼠

收集病变细胞上清,透析袋透析 3 d,1 500 r/min 离心 5 min,去除细胞沉淀,后经 50 000 超滤管 3 000 r/min 离心浓缩重组蛋白上清,用于免疫小鼠。

6~8 周 Balb/c 雌性小鼠 26 只,随机分成 5 组: 5 μg/(只·次)6 只小鼠;20 μg/(只·次)6 只小鼠; 50 μg/(只·次)6 只小鼠;注射等容量 1 × PBS 6 只小鼠作为阴性对照;未免疫 2 只小鼠作为空白对照。按每组小鼠免疫所需重组 RVG 蛋白量,取不同体积浓缩蛋白上清用 1 × PBS 稀释至每只小鼠用量为 50 μL,然后与 50 μL 弗氏完全佐剂混合,充分乳化后腹腔注射;后 2 次注射于 2 周及 4 周后,改用弗氏不完全佐剂,注射剂量及方法不变。

随机选取每组小鼠 1 只,于第 3 次免疫后 10 d 取尾静脉血,用间接酶联免疫吸附实验(enzyme-linked immunosorbent assay,ELISA)检测免疫后小鼠的血清抗重组 RVG IgG 抗体效价。重组 RVG 按 1.2 μg/mL 包板,4℃ 过夜;洗板后 1.0% BSA 37℃ 封闭 2 h;每组随机选取免疫后的小鼠血清 1:100 稀释,再按 1:4 倍比稀释后加入对应包被孔,37℃ 孵育 1 h,洗板后加入 1:5 000 稀释的 HRP 标记的羊抗鼠 IgG 抗体,37℃ 孵育 1 h;洗板后加 TMB 显色,1 mol/L H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 终止反应,测定 450 nm 处的吸光度值。

### 1.2.6 免疫小鼠的血清中和活性鉴定

重组 RVG 免疫后小鼠的血清中和活性由军事医学科学院军事兽医研究所采用荧光抗体中和试验(fluorescent antibody virus neutralization,FAVN)完成。将免疫后小鼠的血清倍比稀释后加入狂犬病病毒,然后作用于 BHK-21 细胞,培养一定时间后用丙酮固定,加荧光标记的抗狂犬病病毒抗体,通过检测细胞荧光信号强弱来测定免疫后小鼠血清抗体的中和活性。

### 1.2.7 间接免疫荧光检测

将 BHK-21 细胞培养于 6 孔板中,使细胞附着板底,24 h 后用狂犬病病毒 Flury 株感染上述 BHK-21 细胞;同时设阴性对照孔,即不感染病毒。感染 72 h 后用 1 × PBS 清洗 3 次,分别加入稀释的免疫后小鼠的血清;室温孵育 2 h,用 1 × PBST(含 0.05% Tween

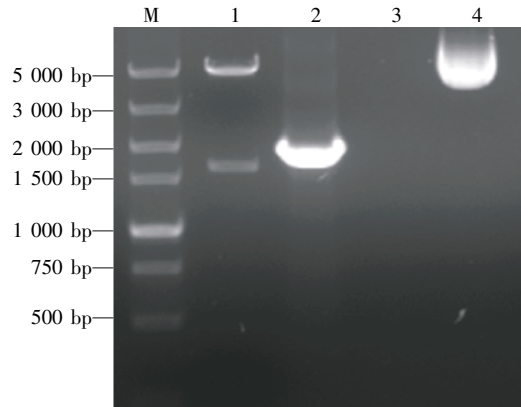
20)洗涤 3 次;加入 FITC 标记的抗鼠二抗(1:100 稀释),室温孵育 1 h;再用 1 × PBST 洗涤 3 次,用荧光显微镜观察,细胞显示强绿色荧光判为阳性。

## 2 结果

### 2.1 重组质粒的鉴定

将转座载体 pFastBac-GP67B-RVG 经 BamH I 和 Kpn I 双酶切,重组转座载体包括 pFastBac-GP67B(4 700 bp)和 RVG(1 500 bp)2 个条带;RVG 特异性引物 PCR 扩增结果在 1 500 bp 左右(图 1)。

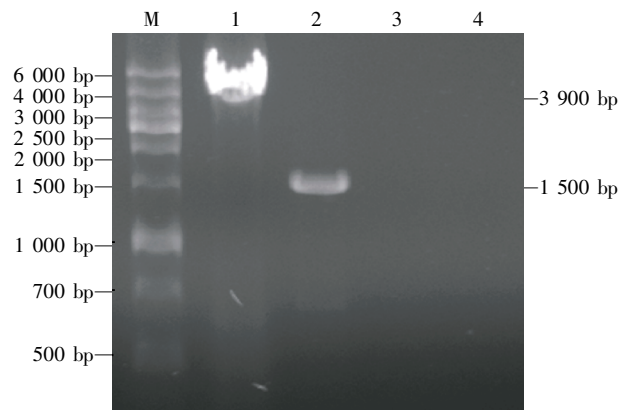
用 M13 上下游通用引物及 RVG 特异性引物对 rBacmid-RVG 进行 PCR 扩增,片段在 3 900 bp 及 1 500 bp 左右,与预期相符(图 2)。酶切鉴定和菌液 PCR 结果表明重组转座载体构建正确。



M:DNA Marker;1:pFastBac-GP67B-RVG 的双酶切产物;2:pFastBac-GP67B-RVG 用 RVG 特异性引物 PCR 扩增结果;3:空白对照;4:pFastBac-GP67B-RVG 质粒。

图 1 pFastBac-GP67B-RVG 的酶切鉴定

Figure 1 Restriction digestion of pFastBac-GP67B-RVG



M:DNA Marker;1:rBacmid-RVG 的 PCR 鉴定;2:rBacmid-RVG 用 RVG 特异性引物 PCR 扩增结果;3:M13 引物空白对照;4:RVG 特异性引物空白对照。

图 2 rBacmid-RVG 的 PCR 鉴定

Figure 2 Agarose gel electrophoresis of PCR products of rBacmid-RVG

## 2.2 重组 RVG 的表达、纯化及鉴定

阳性重组穿梭质粒 rBacmid-RVG 转染 Sf-9 细胞,显微镜放大 400 倍下观察病变细胞,形态不规则,胞浆内颗粒增多,颜色变深,出现空泡,脱落甚至裂解,与正常 Sf-9 细胞形态差别明显(图 3)。

从病毒感染的 Sf-9 细胞中提取总 DNA,用 RVG 特异引物扩增产物约 1 500 bp。表明重组质粒 rBacmid-RVG 基因被转染至 Sf-9 细胞中(图 4)。

Western blot 检测显示病毒上清液和病变细胞沉淀裂解物在 58 000 处均有特异性条带,未感染细胞及上清液都没有特异条带(图 5)。

以 His-TrapHP 亲和层析柱纯化重组 RVG 蛋白,SDS-PAGE 电泳,考马斯亮蓝染色(图 6)。在 58 000 处有 1 条特异性条带,说明蛋白纯度较高。

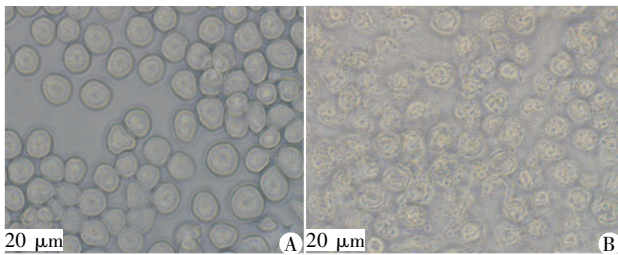
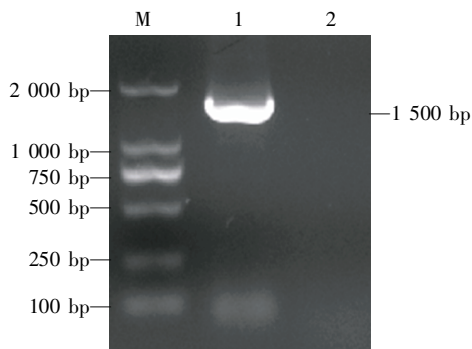


图 3 正常 Sf-9 细胞(A) 和病毒感染的 Sf-9 细胞(B)(×400)  
Figure 3 Untransfected Sf-9 cells(A) and virally-infected Sf-9 cells(B)(×400)



M: DNA Marker; 1: 病变细胞 DNA 的 PCR 鉴定; 2: 空白对照。

图 4 病变细胞 DNA 分析

Figure 4 DNA analysis of virally-infected cells



1: 感染病毒 Sf-9 细胞上清; 2: 感染病毒 Sf-9 细胞沉淀; 3: 正常 Sf-9 细胞上清; 4: 正常 Sf-9 细胞沉淀; 5: Sf-900™ III SFM 昆虫细胞培养基。

图 5 重组 RVG 蛋白的 Western blot 鉴定

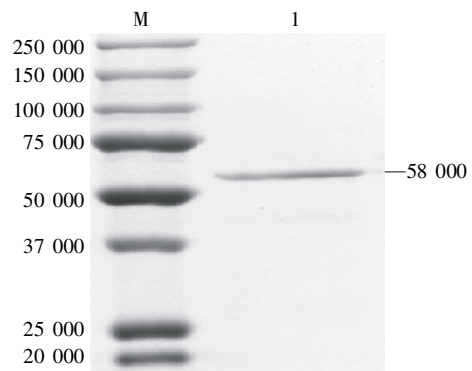
Figure 5 Western blot analysis of the r-RVG

## 2.3 重组 RVG 免疫小鼠的血清效价分析及中和活性鉴定

第 3 次免疫后每组随机选取小鼠 1 只,利用间接 ELISA 方法检测血清抗重组 RVG IgG 抗体效价(图 7)。留取血清检测对狂犬病病毒的中和活性,其中重组 RVG 蛋白 50 μg/(只·次)免疫小鼠的血清中和效价为 0.04 U/mg, 5 μg/(只·次)及 20 μg/(只·次)免疫小鼠的血清中和效价 < 0.04 U/mg。

## 2.4 间接免疫荧光检测

为进一步验证小鼠免疫血清与狂犬病病毒的结合能力,将抗体与狂犬病病毒 Flury 株感染的 BHK-21 共孵育,加入 FITC-抗鼠 IgG。结果显示狂犬病病毒感染的细胞呈现绿色荧光,而未被病毒感染的细胞没有绿色荧光(图 8)。



M: 蛋白 Marker; 1: rBacmid-RVG 感染的 Sf-9 昆虫细胞表达的重组蛋白。

图 6 纯化重组 RVG 蛋白的 SDS-PAGE 鉴定

Figure 6 SDS-PAGE analysis of purified r-RVG

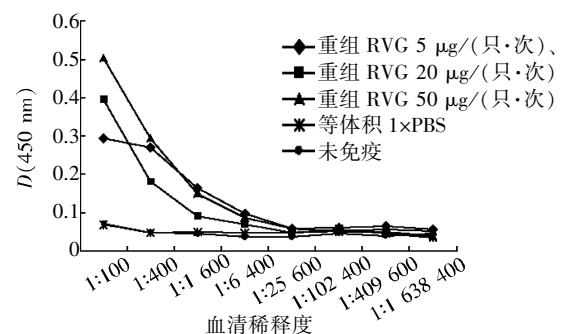


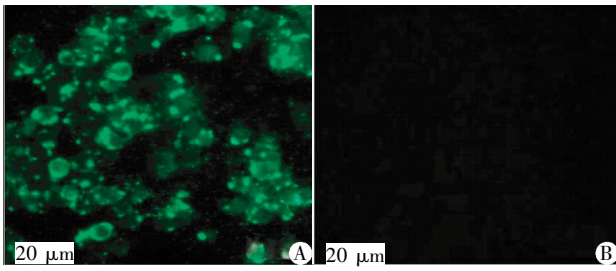
图 7 间接 ELISA 法检测免疫小鼠的血清抗重组 RVG IgG 抗体效价

Figure 7 ELISA analysis of antibody titer of mouse anti-r-RVG IgG antibody

## 3 讨论

狂犬病病毒基因组包括 5 个不同片段,其中





A: 感染狂犬病病毒的 BHK-21 细胞; B: 未感染狂犬病病毒的 BHK-21 细胞。

图 8 间接免疫荧光检测免疫血清与狂犬病病毒的结合能力( $\times 400$ )

Figure 8 Detection of mouse anti-rRVG IgG serum binding to rabies-virus by IFA( $\times 400$ )

编码糖蛋白的 G 基因变化最大,可直接改变狂犬病病毒的抗原性。RVG 也是狂犬病病毒唯一的表面蛋白,在蛋白与神经细胞受体的相互作用下,狂犬病病毒以胞饮方式进入细胞。病毒膜与溶酶体液泡融合,把核衣壳释放到细胞质中,在宿主细胞质中进行转录、翻译、复制,完成病毒的繁殖过程<sup>[2,7-8]</sup>。

目前临床上主要应用人狂犬病免疫球蛋白(human rabies immunoglobulin, HRIG)和马狂犬病免疫球蛋白(equine rabies immunoglobulin, ERIG)用于狂犬病的被动免疫治疗。但 HRIG 价格昂贵, ERIG 存在异种蛋白引起过敏反应的风险,且 HRIG 和 ERIG 均不易大量获取,因此急需研制其他血清替代品<sup>[9-10]</sup>。通过噬菌体抗体展示技术构建人源抗狂犬病病毒免疫型抗体库筛选 scFv<sup>[11-13]</sup>,利用转人 IgM 基因小鼠通过杂交瘤技术筛选全人源抗狂犬病病毒单克隆抗体<sup>[14]</sup>,将多株具有中和活性的人源单克隆抗体联合应用的“鸡尾酒”疗法具有较好的应用前景。但应用狂犬病病毒具有筛选效率低的缺点,应用原核生物表达的 RVG 蛋白只能筛选针对线性表位的抗体,不能筛选针对构象表位的抗体<sup>[4,15]</sup>,而利用真核生物表达 RVG 蛋白则可制备或筛选针对构象表位、具有较高中和活性的治疗性抗体<sup>[16-19]</sup>。

本研究结果表明,通过 Bac-to-Bac 杆状病毒昆虫细胞表达系统表达的 RVG 蛋白分子量约 58 000。提取病变细胞 DNA, PCR 结果显示重组 RVG 基因被转染到 Sf-9 细胞中, Western blot 结果表明表达的重组 RVG 能被抗 His 抗体特异性识别。重组 RVG 免疫小鼠,具有较好的免疫原性,小鼠血清具有抗狂犬病病毒的中和活性,可与感染狂犬病病毒的 BHK-21 细胞特异性结合。提示本研究表达的重组 RVG 具有天然 RVG 的特性,且具有较好的免疫活性。

利用表达的重组 RVG 可从人源抗狂犬病病毒免疫型抗体库中筛选针对构象表位、具有中和活性的 scFv,也可免疫转人 IgM 基因小鼠通过杂交瘤技术制备具有中和活性的人源单克隆抗体,优化组合针对不同表位的高效中和抗体,用于预防和治疗狂犬病,有望显著提高中和保护作用,提升我国狂犬病的防治水平,也为进一步研制狂犬病亚单位疫苗奠定基础。

#### [参考文献]

- [1] Fooks AR, Banyard AC, Horton DL, et al. Current status of rabies and prospects for elimination[J]. *Lancet*, 2014, 384(9951): 1389-1399
- [2] Driver C. Rabies: risk, prognosis and prevention[J]. *Nurs Times*, 2014, 110(14): 16-18
- [3] 冯晓敏, 卞颖华, 徐伟, 等. 狂犬病病毒 G 蛋白基因的克隆、表达及生物学活性鉴定[J]. *南京医科大学学报: 自然科学版*, 2011, 31(7): 986-990
- [4] 张倩倩, 赵茜, 张晓, 等. 全人源抗狂犬病病毒 G 蛋白单链抗体制备及中和活性鉴定[J]. *南京医科大学学报: 自然科学版*, 2013, 33(7): 927-931
- [5] Zhang X, Qi X, Zhang Q, et al. Human 4F5 single-chain Fv antibody recognizing a conserved HA1 epitope has broad neutralizing potency against H5N1 influenza A viruses of different clades[J]. *Antiviral Res*, 2013, 99(2): 91-99
- [6] 金秋, 刘哲, 陆敏华, 等. H5N1 高致病性禽流感病毒 HA 基因在昆虫细胞中的表达[J]. *南京医科大学学报: 自然科学版*, 2011, 31(11): 1583-1586
- [7] Johnson N, Cunningham AF, Fooks AR. The immune response to rabies virus infection and vaccination[J]. *Vaccine*, 2010, 28(23): 3896-3901
- [8] Zhang G, Wang H, Mahmood F, et al. Rabies virus glycoprotein is an important determinant for the induction of innate immune responses and the pathogenic mechanisms[J]. *Vet Microbiol*, 2013, 162(2-4): 601-613
- [9] Liu X, Liu Q, Feng X, et al. Rabbit anti-rabies immunoglobulins production and evaluation[J]. *Trop Biomed*, 2011, 28(1): 138-148
- [10] Jackson AC. Current and future approaches to the therapy of human rabies[J]. *Antiviral Res*, 2013, 99(1): 61-67
- [11] 李琛, 林红, 刘新建, 等. 人源抗狂犬病病毒免疫型抗体库的构建及特异性抗体筛选与鉴定[J]. *南京医科大学学报: 自然科学版*, 2010, 30(5): 575-578
- [12] Li C, Zhang F, Lin H, et al. Generation and characterization of the human neutralizing antibody fragment Fab091 against rabies virus[J]. *Acta Pharmacol Sin*, 2011, 32(3): 329-337

(下转第 822 页)