

狂犬病两株不同毒力克隆株病毒的神经毒力和全长基因序列比较

石磊泰, 李玉华, 俞永新

摘要:目的 对 2 株毒力不同的狂犬病病毒克隆株(CTN181-3 和 CTN181-12)进行神经毒力和全长基因序列的比较。
方法 分别对 2 株病毒用 10、14 和 21 日龄小鼠脑内接种, 测定小鼠的致死力(LD_{50}) ;同时用空斑法测定 2 株病毒的病毒滴度(PFU), 以 $IgPFU/IgLD_{50}$ 比较 2 株病毒的毒力差异; 分别对 2 株病毒进行全基因序列测定并分析, 找出毒力差异关键基因位点。
结果 2 株病毒对 10、14 和 21 日龄小鼠的 $IgPFU/IgLD_{50}$, CTN181-3 株为 0.07、3.40 和 6.60, CTN181-12 株为 <-0.9、<-0.6 和 1.04。全基因序列分析表明, 二者共有 8 个核苷酸和 6 个位点的氨基酸存在差异。
结论 CTN181-3 株的神经毒力明显低于 CTN181-12 株, 两者间 6 个氨基酸的差异是其毒力差异的分子基础。

关键词: 狂犬病减毒株; 克隆株; 毒力; 全基因序列分析

中图分类号: R373.9

文献标识码: A

文章编号: 1002-2694(2018)11-0986-05

Comparison of neurovirulence and full-length sequence of two rabies virus clones with different virulence

SHI Lei-tai, LI Yu-hua, YU Yong-xin

(Arboviral Vaccine Division, National Institutes for Food and Drug Control, Beijing 102629, China)

Abstract: We aimed to compare the neurovirulence and genome sequence differences between two rabies virus clones with different virulence. The different ages(10 d, 14 d and 21 d) of mice were tested for the neurovirulence(LD_{50}) of the two clones by intracerebral inoculation. The inoculated virus content(PFU) was tested by plaque assay. The $IgPFU/IgLD_{50}$ values of the two clones were calculated and compared. The full-length genomes of the two clones were sequenced and compared. The results showed the values of $IgPFU/IgLD_{50}$ tested in the 10 d, 14 d, and 21 d-old mice with CTN181-3 strain were higher (0.07, 3.40 and 6.60, respectively) than that of the CTN181-12 strain(<-0.9, <-0.6 and 1.04, respectively), which indicated the neurovirulence of CTN181-3 strain was lower than that of CTN181-12 strain. The full-length sequence analysis showed that there were eight nucleotides and six amino acids differences between the two virus clones. The neurovirulence of CTN181-3 is lower than that of CTN181-12 strain and the six amino acids difference between them are the molecular basis for the neurovirulence.

Keywords: rabies virus attenuated strain; clonal strain; virulence; full-length sequence analysis

Corresponding author: Yu Yong-xin, Email: yuyongxin@nicpbp.org.cn

狂犬病在世界范围内广泛分布,除南极洲以外的所有大洲都有报告。进入 21 世纪后,狂犬病仍然是一个重要的公共健康威胁,每年大约有 60 000 人死于狂犬病,它是最致命的动物传播传染病^[1]。目前,99% 的人类狂犬病发生在发展中国家,主要在亚洲、非洲、拉丁美洲和加勒比海地区。亚洲狂犬病病

例居世界首位,每年约有 30 000 人死亡(95% CI, 8 100-61 400)^[2]。印度是狂犬病疫情最严重的国家,其次是中国,2007 年报告病例数达到 3 300 例^[3]。2004—2014 年,狂犬病死亡人数居我国法定感染性疾病前 3 位,中国狂犬病疫情形势十分严峻。

在控制和消除人类狂犬病的基本措施中,除了对人类进行有效接种外,还必须对狗进行大规模免疫。在西欧、中欧、加拿大和美国大部分地区,用诱饵对野生动物进行口服免疫已成功地消除了当地的

狐狸狂犬病并减少和控制了人类狂犬病^[4]。同时,世界卫生组织(WHO)大力鼓励研究和开发安全有效的犬类口服疫苗,并为犬类口服疫苗的研究和现场应用制定了指南^[5],一些高度减毒的疫苗株,如SAG2和VRG,已被WHO推荐用于流浪狗的口腔免疫^[6],并在许多国家得到广泛应用^[7]。

本实验室对狂犬病减毒活疫苗的研究从20世纪80年代就开始了,已成功筛选出1株减毒株CTN-181。CTN-181减毒株对4周龄小鼠不致病,但对4周龄以下的小鼠而言仍会致病^[8],且该病毒具有异质性和遗传稳定性差。为培育出具有更高同质性,减毒更稳定和更好免疫原性的减毒株,我们将CTN-181通过豚鼠颌下腺内连续传3代,后空斑纯化,发现不同的空斑病毒毒力变化很大。毒力高的可达3.16 lgLD₅₀,低的则不致病^[9]。

本文就筛选到的一株对小鼠脑内无致病性的CTN181-3株和另一株毒力较强的CTN181-12克隆株进行毒力和全基因序列对比研究。

1 材料与方法

1.1 毒种和细胞 狂犬病毒减毒株CTN181^[10]、CTN181-3和CTN181-12为本室筛选并保存;BHK-21细胞由美国泛特里军事医学研究所赠送,用含10%牛血清的MEM 37℃培养。

1.2 实验动物 昆明鼠,SPF级,10日龄/14日龄/21日龄,由本院动物所提供,实验动物饲养许可证编号为SCXK(京)009-0017,操作遵守《实验动物管

理条例》动物福利要求。

1.3 小鼠脑内毒力测定 将CTN181-3和CTN181-12病毒分别接种于10、14和21日龄的小鼠脑内,观察14 d,记录小鼠的发病情况,利用Reed-Muench法计算LD₅₀。

1.4 病毒空斑实验^[8] 在六孔板中制备单层BHK21细胞,将病毒稀释至10⁻¹~10⁻⁷系列,每孔接种0.2 mL,每个稀释度做复孔,并加两孔稀释液作空白对照,轻轻摇晃,置于37℃,5%CO₂培养箱中培养1 h,每孔加入4 mL含有1%甲基纤维素和2%HEPES的覆盖物,置于35℃,在5%CO₂培养箱中培养。7 d后,弃覆盖物。在每孔加入2 mL结晶紫染料溶液。染色15 min后弃掉染料,计算空斑形成单位(PFU/mL)。

1.5 菌株、质粒及主要试剂 感受态DH5α购自天根生化科技北京有限公司;克隆载体pGEM-T Easy Vector system购自Promega公司;QIAamp Viral RNA试剂盒,购自QIAGEN公司;逆转录试剂Go-Script Reverse Transcription System,购自Promega公司;Phusion超保真DNA聚合酶Kit,购自New England Biolabs;QIA quick Gel Extraction Kit试剂盒,购自QIAGEN公司。

1.6 引物设计及合成 根据GenBank中登录号为FJ959397的CTN-1株设计8对引物,用于CTN181-3株和CTN181-12株的全基因组分段扩增和序列测定,见表1。

表1 狂犬病病毒CTN-1克隆株全基因组分段扩增用引物
Tab.1 Primers for whole genome amplification of rabies virus CTN-1 clone

| 片段 | 引物 | 引物序列(5'-3') | 位置/nt |
|----|-----------|------------------------|--------------|
| 1 | CTN-N-F | TACGCTTAACAACCAAATC | 1-815 |
| | CTN-N-R | CTGCTTTATGAACCCTGT | |
| 2 | CTN-NP-F | TCAGGGCTAGTATCGTTT | 780-2 367 |
| | CTN-NP-R | ATTCAACTTGCTCTGGCTC | |
| 3 | CTN-PM-F | TCAAAC TGCC TGTGGTCC | 2 040-3 475 |
| | CTN-PM-R | TCCTTCGTCCTCCACAAC | |
| 4 | CTN-MGL-F | ATACGGGCTTA ACTCCAACCT | 3 157-5 471 |
| | CTN-MGL-R | GCTCGGCCTCTGACTCAAT | |
| 5 | CTN-GL-F | AAGAAAGAATACTTGCTCCTA | 5 235-6 797 |
| | CTN-GL-R | TGATTGGTAGCCTGTGCC | |
| 6 | CTN-L1-F | TATGGCTTATAGACATTG | 6 503-8 404 |
| | CTN-L1-R | CTCAGAGTTCTCCACCTTA | |
| 7 | CTN-L2-F | GCTTCACTCGGCTTCTCG | 8 277-9 903 |
| | CTN-L2-R | CCCTCCTTCATCGTGGTC | |
| 8 | CTN-L3-F | CTGCTTACCCGACCACGAT | 9 876-11 925 |
| | CTN-L3-R | TACGCTTAACAAAAAGACCAT | |

注:引物名称中的“F”表示正向引物,引物名称中的“R”表示反向引物。

1.7 病毒 RNA 的提取及病毒基因组的分段 PCR 扩增 用 QIAamp Viral RNA 分别提取狂犬病毒克隆株 CTN181-3 和 CTN181-12 的基因组 RNA。采用 GoScript Reverse Transcription System 将 RNA 反转录成 cDNA, 以其为模板, 用表 1 中引物进行分段 PCR 扩增。反应体系: $5 \times$ Phusion HF 缓冲液 10 μL , 10 mmol/L dNTP 1 μL , 10 $\mu\text{mol/L}$ 上、下游引物各 2.5 μL , DMSO 1.5 μL , DNA 聚合酶 0.5, cDNA 2 μL , 去离子水补足 50 μL 。反应条件: 初始变性 98 $^{\circ}\text{C}$ 30 s; 98 $^{\circ}\text{C}$ 10 s, 53 $^{\circ}\text{C}$ 30 s, 72 $^{\circ}\text{C}$ 90 s, 共 30 个循环; 72 $^{\circ}\text{C}$ 再延伸 5 min。PCR 产物经 1% 琼脂糖凝胶电泳鉴定, 采用 QIA quick Gel Extraction Kit 纯化回收。

1.8 PCR 扩增产物的克隆、序列测定及序列拼接与分析 将 PCR 纯化产物分别与 pGEM-T Easy Vector system 连接, 转化感受态 DH5 α , 挑选阳性克隆并通过菌落 PCR 鉴定, 由上海立菲生物技术有限公司(北京)测序, 每个片段发送至少 3 个阳性克隆用于双向测序。使用 DNASTAR MegAlign 软件剪接测序结果并进行分析。

2 结 果

2.1 CTN181-3 株和 CTN181-12 株的空斑形成情况 CTN181-3 株和 CTN181-12 株在 BHK21 细胞上可形成空斑, 形成的空斑均为针尖大小, 大小均匀(见图 1)。

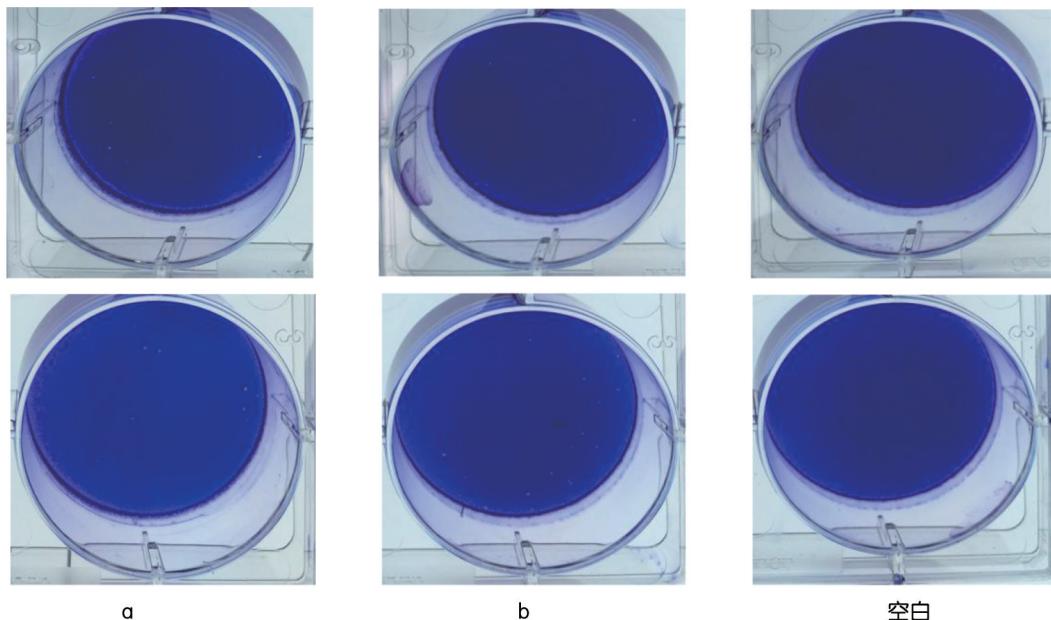


图 1 狂犬病毒 CTN181-3 株(a)和 CTN181-12 株(b)在 BHK21 细胞上形成空斑

Fig.1 Plaque in BHK21 of CTN181-3 and CTN181-12

2.2 CTN181-3 株和 CTN181-12 株毒力比较 当测定减毒株的毒力 LD₅₀ 时, 同时测定病毒滴度(PFU)。毒力高低以二者对比 lgPFU/lgLD₅₀ 表示, 即引起动物死亡的 LD₅₀ 的病毒量(PFU)越大, 毒力越低, 反之毒力越高。结果显示, 在病毒感染量差不多(6.6~7.3 lgPFU/mL)的情况下, CTN181-3 对 21 日龄小鼠的脑内接种未致死, 而 CTN181-12 的 LD₅₀ 高达 6.26 lgLD₅₀/mL。对 14 d 和 10 d 龄小鼠的 LD₅₀, CTN181-3 亦较 CTN181-12 低。若以 PFU 和 LD₅₀ 的差值比较, 则 CTN181-3 和 CTN181-12 二株对 10、14 和 21 d 日龄小鼠的 lgPFU/lgLD₅₀ 差值分别为 0.07、3.40, >5.1 和 <-0.9、<-0.6, 1.04。前者明显大于后者, 表明 CTN181-3

株的毒力明显低于 CTN181-12 株(见表 2)。

2.3 CTN181-3 株和 CTN181-12 株的全基因组序列比较 狂犬病病毒 CTN181-3 株和 CTN181-12 株全基因组序列全长均为 11 924 nt, 其中 CTN181-3 株已被 GenBank 收录, 登录号为 KU946961。

CTN181-3 株和 CTN181-12 株相比, P 基因和 M 基因各存在 1 个核苷酸位点不同, G 基因存在 4 个位点不同, L 基因有 2 个位点不同。这 8 个核苷酸位点导致 2 株病毒共 6 个氨基酸位点的不同, 即 P 蛋白和 M 蛋白各 1 个位点、G 蛋白 2 个位点、L 蛋白 2 个位点, 如表 3 所示。

以上 P、M、G 和 L 区内的 6 个氨基酸突变应该是 CTN181-3 株毒力较 CTN181-12 株低的分子基础。

表 2 2 株狂犬病毒克隆株对不同日龄小鼠的毒力比较

Tab.2 Virulence comparison of CTN181-3 and CTN181-12 in different age mice

| 克隆株 | 感染量 (lgPFU/mL) | 不同日龄小鼠的死亡情况 | | |
|-----------|--------------------------|-------------|-------|------|
| | | 10 d | 14 d | 21 d |
| CTN181-3 | 6.60 | 5/5 | 4/5 | 0/5 |
| | 5.60 | 5/5 | 1/5 | 0/5 |
| | 4.60 | 5/5 | 0/5 | — |
| | 3.60 | 5/5 | 2/5 | — |
| | 2.60 | 5/5 | 5/5 | — |
| | 1.60 | 2/5 | 0/5 | — |
| | 0.60 | 0/5 | 1/5 | — |
| | lgLD ₅₀ /mL | 6.53 | 3.20 | <1.5 |
| CTN181-12 | lgPFU/lgLD ₅₀ | 0.07 | 3.40 | >5.1 |
| | 7.30 | 5/5 | 5/5 | 2/5 |
| | 6.30 | 4/4 | 5/5 | 4/5 |
| | 5.30 | 5/5 | 5/5 | 5/5 |
| | 4.30 | 5/5 | 5/5 | 5/5 |
| | 3.30 | 5/5 | 5/5 | 5/5 |
| | 2.30 | 5/5 | 5/5 | 4/5 |
| | 1.30 | 5/5 | 4/5 | 0/5 |
| | lgLD ₅₀ /mL | >8.2 | >7.9 | 6.26 |
| | lgPFU/lgLD ₅₀ | <-0.9 | <-0.6 | 1.04 |

注:“—”未测

表 3 CTN181-3、CTN181-12 株核苷酸和氨基酸位点差异

Tab.3 Site differences of nucleotide and amino acid between CTN181-3 and CTN181-12

| | 核苷酸 | | 氨基酸 | | | |
|-----|---------|----------|-----------|--------|----------|-----------|
| | 位点 | CTN181-3 | CTN181-12 | 位点 | CTN181-3 | CTN181-12 |
| P | 416 | G | A | 139 | R(AGA) | K(AAA) |
| M | 560 | C | T | 187 | P(CCG) | L(CTG) |
| G | 506 | A | G | 150 | H(CAT) | R(CGT) |
| | \ | \ | \ | 194 | N(AAC) | N(AAC) |
| 883 | G | T | 276 | V(GTG) | L(TTG) | |
| | \ | \ | \ | 333 | Q(CAA) | Q(CAA) |
| | 1404 | A | G | \ | \ | \ |
| L | 1482 | A | G | \ | \ | \ |
| | 2974 | G | C | 992 | V(GTG) | L(CTG) |
| | 4486-87 | TG | AT | 1496 | W(TGG) | M(ATG) |

注:括号内为三联体遗传密码,括号外为一位氨基酸编码

G 蛋白中 333 的精氨酸或赖氨酸是狂犬病病毒致病的决定因素^[11-12],当 G333 精氨酸或赖氨酸突变为谷氨酰胺、丝氨酸等其他氨基酸时,病毒的神经毒性显著降低。许多现有的狂犬病弱毒株,如 SAG2,Flury HEP、ERA 等,这个位点都突变和其他氨基酸^[13-15]。另有研究表明,G194 位点由天冬酰

3 讨 论

狂犬病病毒属于 Rhabdovirus 家族的弹状病毒属。它是一条单链负链 RNA。病毒 RNA 中每个基因的顺序是:3' UTR-NPMGL-5' UTR,每个基因组由 3 个部分组成:3'非编码区、编码区和 5'非编码区。3'非编码区以 UUGU 序列开始,5'非编码区以 U7 结束。病毒基因组大小约 12 kb,其中约 91% 的核苷酸参与编码 5 种已知蛋白,即核蛋白 N、磷蛋白 P、基质蛋白 M、糖蛋白 G 和 RNA 依赖性 RNA 聚合酶 L。N、P、L 蛋白和基因组 RNA 形成核糖核蛋白复合物(RNP),M 和 G 蛋白被包裹在 RNP 的外部并与 RNP 相互作用。

糖蛋白 G 是一种跨膜蛋白,在病毒表面构成 1 个突出物,它是狂犬病病毒与细胞受体结合的配体,介导病毒与靶细胞的结合及其在神经系统中的分布,以及病毒的毒性,这与疾病是密切相关的。糖蛋白的总长度为 524 个氨基酸,N-末端 19 个氨基酸构成疏水信号肽,诱导新生蛋白通过粗面内质网膜。成熟糖蛋白含有 505 个氨基酸残基,分为膜外区、跨膜区和膜内区。

胺突变为赖氨酸^[16]会引起毒力的回升。本文中虽然 CTN181-3 株和 CTN181-12 株 G333 位点均为谷氨酰胺,G194 位点也均为天冬酰胺,但 CTN181-3 株的毒力完全减弱,而 CTN181-12 株虽较其他狂犬病野毒株的毒力弱,但仍保留一定的毒力。如该二株的原始株 CTN-1 和攻击毒 CVS 株对 3 周龄小

鼠的 lgPFU/lgLD₅₀ 值分别为 -1.0 和 -1.1^[17]，而 CTN181-12 株为 1.04。

狂犬病病毒 G 蛋白存在 3 个中和抗原位点，其中抗原位点 II 位于 34~200 位氨基酸区段，是一个典型的空间构象位点。根据 T 细胞的线性表位分析，糖蛋白上的 18-44、244-291、292-323 和 336-452 的氨基酸片段是必不可少的^[10]。本文中 CTN181-3 株和 CTN181-12 株的 G150 位点存在不同，该位点位于抗原位点 II；另一关键位点 G276 也存在差异，该位点位于 T 细胞线性表位。两个关键位点的差异应是二者毒力不同的关键因素。

本研究通过 CTN181-3 株和 CTN181-12 株的全基因组分析，结果发现，P、M、G、L 蛋白发生了 8 个核苷酸突变，导致 6 个位点的氨基酸变化，其中 G150 和 G276 氨基酸的不同，是毒力减弱的 2 个关键位点，认为这 6 个氨基酸位点的不同是 2 株病毒毒力不同的分子基础。

参考文献：

- [1] Hampson K, Coudeville L, Lembo I, et al. Estimating the global burden of endemic canine rabies[J]. Plos Negl Trop Dis, 2015, 9(4):e0003709. DOI:10.1371/journal.pntd.0003786
- [2] Knobel DL, Cleaveland S, Coleman PG, et al. Re-evaluating the burden of rabies in Africa and Asia[J]. Bull World Health Organ, 2005, 83(5):360.
- [3] Yao HW, Yang Y, Liu K, et al. The spatiotemporal expansion of human rabies and its probable explanation in mainland China, 2004-2013[J]. PLoS neglected tropical diseases, 2015, 9 (2): e0003502. DOI:10.1371/journal.pntd.0003502
- [4] 俞永新.人和动物狂犬病防制研究进展[J].中国人兽共患病学报, 1998, 14(4):56-60.
- [5] Guidance for research on oral rabies vaccine and field application of oral vaccination of dogs against rabies [S]. World Health Organization, 2007.
- [6] WHO expert consultation on rabies, 2nd report. Technical report series 982[R]. World Health Organization, 2013:84.
- [7] Philippe M, Florence C, Anne LG, et al. Twenty year experience of the oral rabies vaccine SAG2 in wildlife: a global review[J]. Veterinary Research, 2014, 45:77.
- [8] 石磊泰, 刘景华, 俞永新, 等. 一株狂犬病病毒减毒株 CTN-181 的表型特性研究[J]. 中国病毒病杂志, 2012, 2(1):47-52.
- [9] 石磊泰, 邹剑, 俞永新, 等. 狂犬病病毒 CTN-181 减毒株在豚鼠颌下腺的繁殖动态及其低毒力克隆株的筛选研究[J]. 中国病毒病杂志, 2015(3):217-222.
- [10] 俞永新.狂犬病和狂犬病疫苗[M].北京:中国医药科技出版社, 2009:268-269.
- [11] Dietzschold B, Wunner WH, Wiktor TJ, et al. Characterization of an antigenic determinant of the glycoprotein that correlates with pathogenicity of rabies virus[J]. Proceedings Nation Acad Sci, 1983, 80(1): 70-74. DOI:10.1073/pnas.80.1.70
- [12] Mebatson T. Extensive attenuation of rabies virus by simultaneously modifying the dynein light chain binding site in the P protein and replacing Arg333 in the G protein[J]. J Virol, 2001, 75(23): 11496-11502. DOI:10.1128/JVI.75.23.11496-11502.2001
- [13] Tuffereau C, Leblois H, Benejean J, et al. Arginine or lysine in position 333 of ERA and CVS glycoprotein is necessary for rabies virulence in adult mice[J]. Virology, 1989, 172 (1): 206-212. DOI:10.1016/0042-6822(89)90122-0
- [14] Takayama-Ito M, Inoue K, Shoji Y, et al. A highly attenuated rabies virus HEP-Flury strain reverts to virulent by single amino acid substitution to arginine at position 333 in glycoprotein [J]. Virus research, 2006, 119(2): 208-215. DOI:10.1016/j.virusres.2006.01.014
- [15] Tao L, Ge J, Wang X, et al. Molecular basis of neurovirulence of flury rabies virus vaccine strains: importance of the polymerase and the glycoprotein R333Q mutation [J]. J Virol, 2010, 84(17): 8926-8936. DOI:10.1128/JVI.00787-10
- [16] Faber M, Faber ML, Papaneri A, et al. A single amino acid change in rabies virus glycoprotein increases virus spread and enhances virus pathogenicity [J]. J Virol, 2005, 79 (22): 14141-14148.
- [17] 汤重发, 俞永新, 刘景华, 等. 狂犬病病毒不同毒株的生物学特性研究[J]. 中国病毒病杂志, 2014(3):179-186.