

表达新冠病毒 S 基因重组狂犬病病毒的构建及其免疫原性

罗均[#], 刘青[#], 张博越, 张月, 陈昱彤, 郭霄峰^{*}

华南农业大学兽医学院, 广东 广州 510642

罗均, 刘青, 张博越, 张月, 陈昱彤, 郭霄峰. 表达新冠病毒 S 基因重组狂犬病病毒的构建及其免疫原性[J]. 微生物学通报, 2022, 49(12): 5256-5265

Luo Jun, Liu Qing, Zhang Boyue, Zhang Yue, Chen Yutong, Guo Xiaofeng. Construction and immunogenicity of recombinant rabies virus expressing S gene of SARS-CoV-2[J]. Microbiology China, 2022, 49(12): 5256-5265

摘要:【背景】新型冠状病毒肺炎(coronavirus disease 2019, COVID-19)在全球流行已近3年,除对人类造成了巨大伤害,也影响了人类的伴侣动物。人的COVID-19疫苗已在全球应用,但动物用的新冠病毒疫苗却鲜有报道。【目的】研制兽用新冠病毒(severe acute respiratory syndrome coronavirus 2, SARS-CoV-2)和狂犬病病毒(rabies virus, RABV)的二联苗。【方法】将合成的SARS-CoV-2 S基因和SI基因分别克隆至RABV弱毒疫苗株rHEP-Flury基因组G与L基因间,并将2个重组质粒分别与辅助质粒共转染至BHK-21细胞中,拯救重组病毒rHEP-nCOV-S和rHEP-nCOV-S1。通过RT-PCR、Western blotting和荧光抗体染色,验证重组病毒、确证S和S1蛋白在RABV中成功表达。再将重组病毒接种NA细胞及成年小白鼠,测定病毒的体外生长特性、重组病毒的致病性及免疫原性。【结果】免疫荧光结果显示,转染7d后细胞上清均出现了绿色免疫荧光,表明已成功拯救嵌合SARS-CoV-2 S和SI基因的重组病毒RABV rHEP-nCOV-S和rHEP-nCOV-S1,并且rHEP-nCOV-S1的增殖和扩散能力强于亲本株rHEP-Flury,但rHEP-nCOV-S与亲本株无显著差异。Western blotting结果显示,在目的位置处均出现72 kDa和144 kDa特异性条带,表明S和S1蛋白在重组RABV中高效表达。重组病毒免疫6周KM小鼠后,小鼠的体重变化与亲本RABV基本一致,重组病毒诱导小鼠产生狂犬中和抗体。【结论】本研究拯救出了嵌合SARS-CoV-2 S/S1基因的重组RABV,为动物COVID-19载体疫苗的研发奠定了基础。

关键词: 新型冠状病毒; 狂犬病病毒; S基因; 疫苗; 免疫原性

基金项目: 国家自然科学基金(31772742); 国家重点研发计划(2022YFD1800100)

[#]对本文贡献相同

Supported by: National Natural Science Foundation of China (31772742); Key Research and Development Program of China (2022YFD1800100)

[#]These authors equally contributed to this work

***Corresponding author:** E-mail: xfguo@scau.edu.cn

Received: 2022-09-30; **Accepted:** 2022-10-18; **Published online:** 2022-10-31

Construction and immunogenicity of recombinant rabies virus expressing S gene of SARS-CoV-2

LUO Jun[#], LIU Qing[#], ZHANG Boyue, ZHANG Yue, CHEN Yutong, GUO Xiaofeng^{*}

College of Veterinary Medicine, South China Agricultural University, Guangzhou 510642, Guangdong, China

Abstract: [Background] The coronavirus disease 2019 (COVID-19) pandemic has lasted for nearly three years in the globe, which has not only caused serious harm to humans but also affected companion animals. The COVID-19 vaccines for human have been used globally, while those for animals are rarely reported. [Objective] To develop a bivalent vaccine against both severe acute respiratory syndrome coronavirus 2 (SARS-CoV-2) and rabies virus (RABV) for animal use. [Methods] We cloned the S and S1 genes of SARS-CoV-2 into the region between G and L genes of the attenuated RABV vaccine strain rHEP-Flury to construct the recombinant plasmids pHEP-nCOV-S and pHEP-nCOV-S1, respectively. The two plasmids were respectively co-transfected into BHK-21 cells with the helper plasmids and finally the recombinant viruses rHEP-nCOV-S and rHEP-nCOV-S1 were rescued. The recombinant viruses were confirmed by RT-PCR and direct fluorescent antibody staining against RABV N protein. Western blotting was employed to detect the expression of S and S1 proteins in the cells infected with the recombinant viruses. The growth curves, pathogenicity, and immunogenicity of recombinant viruses were confirmed in NA cells and mice. [Results] The rescued recombinant viruses rHEP-nCOV-S and rHEP-nCOV-S1 respectively carrying the S and S1 genes of SARS-CoV-2 were confirmed by direct fluorescent antibody assay based on the green fluorescence from the supernatants 7 days post infection. rHEP-nCOV-S1 rather than rHEP-nCOV-S showed stronger proliferation and diffusion abilities than the parental virus rHEP-Flury in NA cells. The specific bands at 72 kDa and 144 kDa in the Western blotting confirmed the efficient expression of S and S1 in the recombinant viruses, respectively. The mice vaccinated with the recombinant viruses did not show significant changes in the body weight compared with those vaccinated with rHEP-Flury, and the recombinant viruses induced the production of neutralizing antibody against RABV in mice. [Conclusion] The production of the recombinant RABV carrying the S/S1 gene of SARS-CoV-2 provides a foundation for the development of the bivalent vaccine against both SARS-CoV-2 and rabies virus for animal use.

Keywords: SARS-CoV-2; rabies virus; S gene; vaccine; immunogenicity

新型冠状病毒肺炎(coronavirus disease 2019, COVID-19), 是由新型冠状病毒(severe acute respiratory syndrome coronavirus-2, SARS-CoV-2)感染所引起的一种急性呼吸道传染病。2020年3月, 联合国世界卫生组织(World Health Organization, WHO)宣布 SARS-CoV-2 全球大流行^[1], 根据 WHO 统计, 截至目前已在全世界

超过 210 个国家和地区流行, 已致超过 600 万人死亡, 严重损害了人类健康, 对全球经济造成了巨大损失。SARS-CoV-2 不仅感染人类, 还会感染宠物和其他家养及野生动物^[2]。人类新型冠状病毒肺炎疫苗的推广应用为 SARS-CoV-2 的防控做出了巨大贡献, 但动物 SARS-CoV-2 的防控未引起足够的重视。因此, 动物 SARS-CoV-2

疫苗的研制可能有助于人类新型冠状病毒肺炎的根除。

SARS-CoV-2 为冠状病毒科(Coronaviridae) β -冠状病毒属(Betacoronavirus), 是第 7 种能够感染人的冠状病毒^[3]。该病毒为不分节段的单股正链 RNA 病毒, 有囊膜^[4]。该病毒含 4 种结构蛋白, 即膜蛋白(membrane protein, M)、包膜蛋白(envelope protein, E)、核衣壳蛋白(nucleocapsidprotein, N)及刺突蛋白(spikeprotein, S)^[5]。S 蛋白是病毒诱导机体产生免疫应答的主要结构蛋白^[6]。其中 S1 亚单位蛋白中的受体结合区域(receptor binding domain, RBD)是与人或动物细胞表面受体血管紧张素转换酶 2(angiotensin-converting enzyme 2, ACE2)结合的关键功能区域^[7], 其被证实是中和抗体干扰病毒与受体结合的主要靶点^[8-9]。

狂犬病病毒(rabies virus, RABV)属于弹状病毒科(Rhabdoviridae)狂犬病病毒属(Lyssaviruses)不分节段的单股负链 RNA 病毒^[10]。自 RABV 反向遗传操作系统建立以来^[11], RABV 已成为表达外源蛋白的良好载体^[12]。RABV 作为载体已成功表达了中东呼吸系统综合征冠状病毒和 SARS 冠状病毒的 S 蛋白, 而且诱导产生了能够抵抗致死性冠状病毒感染的中和抗体^[13-14]。迄今为此, RABV *G* 和 *L* 基因之间的假基因区已被广泛用于表达外源蛋白, 如犬瘟热病毒的 H 蛋白^[15]、犬细小病毒的 VP2 蛋白^[16]等。因此, 本研究以 RABV 为载体表达 SARS-CoV-2 的 S 和 S1 蛋白, 并分析它们的免疫原性, 以期为制备动物用狂犬病与新冠二联疫苗奠定基础。

1 材料与方法

1.1 质粒和病毒

pcDNA-3.0 (含 RABV HEP-Flury 全基因组 cDNA)和 pH-N、pH-P、pH-G 和 pH-L 质粒为

日本国立传染病研究所森本教授惠赠, RABV CVS-11 毒株为军事医学科学院军事兽医研究所夏咸柱院士惠赠, RABV 弱毒 rHEP-Flury 华南农业大学兽医微生物学与免疫学教研室从 pcDNA-3.0 质粒拯救获得。

1.2 主要试剂和仪器

转染试剂 Super Fect Transfection Reagent 和质粒中提试剂盒, Qiagen 公司; RNA 抽提试剂盒和质粒小提试剂盒, 广州美基生物科技有限公司; RNA 反转录试剂盒和 $2\times$ Taq Master Mix 预混液, 南京诺唯赞生物科技股份有限公司; Phusion 高保真 DNA 聚合酶, 赛默飞世尔科技(中国)有限公司。PCR 仪, Bio-Rad 公司; ECL 化学曝光仪器, 上海天能生命科学有限公司。

1.3 细胞和抗体

小鼠神经母细胞瘤细胞(mouse neuroblastoma, NA)、幼仓鼠肾(baby hamster kidney, BHK-21)细胞、大肠杆菌 DH5 α 和 XL10-Gold 感受态细胞均由华南农业大学兽医学院微生物学与免疫学教研室保存。HRP 标记的山羊抗鼠 IgG、山羊抗兔 IgG 购自上海碧云天生物技术有限公司; SARS-CoV-2 S 蛋白兔单抗购自北京义翘神州公司; SARS-CoV-2 S 蛋白鼠源性阳性血清由丽珠药业有限公司惠赠; 异硫氰酸荧光素(fluorescein isothiocyanate, FITC)标记的抗狂犬病病毒 N 蛋白抗体购自 FUJIREBIO 公司。

1.4 含 *S/S1* 基因的狂犬病基因组质粒的构建

根据 NCBI 公布的 SARS-CoV-2 Wuhan-Hu-1 (GenBank 登录号 MN908947.3)株 S 基因核苷酸序列, 在生工生物工程(上海)股份有限公司合成 S 基因和 S1 基因。含 SARS-CoV-2 S 基因和 S1 基因的狂犬病全长基因组构建如图 1 所示。

设计 2 对引物用于扩增 S 和 S1 基因, 在 2 对引物的 5'端分别插入 *Bsi*W I 和 *Nhe* I 酶切位

点(下划线)。引物序列为: S1-F: 5'-GGGGCGT ACGATGTTGTTTTTCTTG-3' (下划线为 *Bsi*W I 酶切位点序列), S1-R: 5'-AGTCGCTAGCAGAA TAAACACGCCAAG-3' (下划线为 *Nhe* I 酶切位点序列); S-F: 5'-ACACCTCTCGTACGATGTTT GTTTTTCTTG-3' (下划线为 *Bsi*W I 酶切位点序列); S-R: 5'-ACCGGTCCTGCTAGCTTATGT GTAATGTAATTTGACTCC-3' (下划线为 *Nhe* I 酶切位点序列)。

以合成的 S 基因 DNA 片段为模板, 利用高保真酶 Phusion 通过 PCR 扩增 S 和 S1 基因。PCR 反应体系: 5×Phusion GC Buffer 10.0 μL,

Phusion 高保真 DNA 聚合酶(2 U/μL) 0.5 μL, dNTPs (2.5 μmol/L) 4 μL, 上、下游引物(10 μmol/L) 各 1.5 μL, 质粒模板 20 ng, 超纯水补足 50 μL。PCR 反应条件: 98 °C 2 min; 98 °C 10 s, 62 °C 20 s, 72 °C 3 min, 30 个循环; 72 °C 5 min。将 PCR 产物和 pcDNA 3.0 分别用 *Bsi*W I 和 *Nhe* I 双酶切, 回收 DNA, 用 T4 连接酶按照说明书将两个回收产物连接并转化至大肠杆菌 XL10-Gold 感受态细胞中。通过 PCR 鉴定(鉴定引物见表 1, 鉴定策略见图 2)筛选出阳性质粒, 经测序鉴定后, 重组质粒命名为 pSARS-CoV-2-S 和 pSARS-CoV-2-S1。

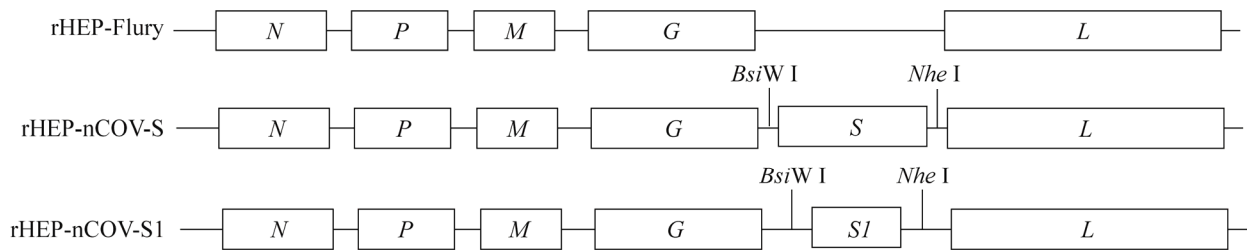


图 1 重组质粒构建图

Figure 1 Construction diagram of recombinant plasmid.

表 1 PCR 鉴定引物序列

Table 1 Primers sequence used for identification

Primer name	Primer sequences (5'→3')	Length of products (bp)	Location
G-S-F	TCGACCAGAATCTACACAAAGC	690	G gene
G-S-R	CGCACTAGAATAAACTCTGAACTC		S gene
S-L-F	CAGTTTATGATCCTTTGCAACC	673	S gene
S-L-R	AGAGTCCTCAATCAAAGGAG		L gene

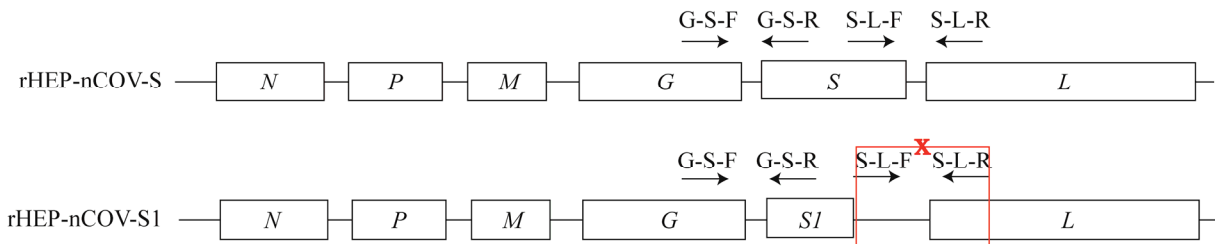


图 2 PCR 鉴定策略

Figure 2 PCR identification strategies.

1.5 病毒的拯救

将全长 cDNA 质粒 pSARS-CoV-2-S、pSARS-CoV-2-S1 分别与辅助质粒(pH-N、pH-P、pH-G、pH-L)共转染 BHK-21 细胞,利用异硫氰酸荧光素标记的抗狂犬病病毒 N 蛋白抗体对转染孔的上清进行直接免疫荧光鉴定,具体步骤参照文献[17-18]进行:取拯救的病毒细胞上清液各 40 μL ,接种于 96 孔板中贴壁的 NA 细胞,于培养箱中 37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 48 h 后,弃上清,每孔加入 150 μL 预冷的 80%丙酮后,放入 -20 $^{\circ}\text{C}$ 固定 30-60 min。弃去丙酮后用 PBS 清洗 3 次,每孔避光加入 30 μL FITC 标记的抗狂犬病病毒 N 蛋白荧光抗体,于 4 $^{\circ}\text{C}$ 避光孵育过夜。弃去荧光抗体,用 PBS 清洗 3 次后于荧光显微镜下观察绿色荧光。将重组病毒命名为 rHEP-nCOV-S 和 rHEP-nCOV-S1。

1.6 重组病毒的培养及鉴定

将经免疫荧光鉴定的阳性病毒细胞培养上清接种于 NA 细胞上,盲传 4 代。然后提取拯救病毒 rHEP-nCOV-S 和 rHEP-nCOV-S1 的 RNA,依 RNA 反转录试剂盒说明合成 cDNA,再用表 1 的引物进行 PCR 鉴定。PCR 反应体系:2 \times Taq Master Mix 10 μL ,上、下游引物(10 $\mu\text{mol/L}$)各 0.5 μL ,cDNA 模板 4.0 μL ,超纯水 5.0 μL 。PCR 反应条件:95 $^{\circ}\text{C}$ 5 min;95 $^{\circ}\text{C}$ 30 s,55 $^{\circ}\text{C}$ 30 s,72 $^{\circ}\text{C}$ 1 min,30 个循环;72 $^{\circ}\text{C}$ 10 min。

将重组病毒接种于 NA 细胞,于 37 $^{\circ}\text{C}$ 、5% CO_2 条件下继续培养 72 h,用抗 SARS-CoV-2 S1 蛋白兔单抗和 SARS-CoV-2 S 蛋白鼠源阳性血清进行 Western blotting 鉴定。

1.7 重组病毒的生长曲线

为检测重组病毒与亲本毒株 rHEP-Flury 在 NA 细胞上的复制动力学,将 rHEP-nCOV-S、rHEP-nCOV-S1 和 rHEP-Flury 分别以 MOI=0.01、MOI=1 的感染复数接种 NA 细胞,于 37 $^{\circ}\text{C}$ 、5%

CO_2 培养箱孵育 1 h 后弃去上清液,加入含 5% FBS 的 DMEM,并于 24、48、72 和 96 h 收集细胞上清,测定病毒 $TCID_{50}$,绘制病毒生长曲线。

1.8 重组病毒扩散能力检测

将重组病毒 rHEP-nCOV-S 和 rHEP-nCOV-S1 以 MOI=0.05 的感染复数,接种 NA 细胞,置于 37 $^{\circ}\text{C}$ 、5% CO_2 的细胞培养箱中培养。接毒后 24、36、48 和 60 h 弃去细胞上清液,对细胞进行直接免疫荧光检测。

1.9 重组病毒的安全性评价

将 6 周龄的雌性 KM 小鼠分为 4 组,每组 5 只。第 1、2、3 组分别肌肉注入 1.0×10^5 FFU 的 rHEP-nCOV-S1、rHEP-nCOV-S、rHEP-Flury,第 4 组肌肉注射 PBS 作为空白对照,每只 100 μL 。连续 21 d 监测小鼠的体重、饮食、饮水量,绘制体重变化图,评估重组疫苗的安全性。

1.10 小鼠中和抗体检测

将重组病毒 rHEP-nCOV-S1、rHEP-nCOV-S、rHEP-Flury 分别肌肉注射 6 周龄的雌性 KM 小鼠(1.0×10^5 FFU/只,每只 100 μL),同时设立 PBS 空白对照组。7 d 后作第 2 次免疫,并于第 21 天眼眶采血收集小鼠外周血,分离血清,以 FAVN 方法检测各组小鼠狂犬病病毒中和抗体水平。

2 结果与分析

2.1 含 S 和 S1 基因重组质粒的构建与鉴定

用 G-S 引物扩增部分 G 基因和 S 基因,S-L 引物扩增部分 S 基因及 L 基因。结果显示,G-S 扩增产物大小与预期的 690 bp 相符合(图 3 的泳道 1、2);S-L 引物扩增的 pSARS-CoV-2-S 产物大小与预期的 673 bp 相符(图 3 的泳道 3);此外,我们发现利用 S-L 引物未扩增出 pSARS-CoV-2-S1,说明两个重组质粒未形成交叉污染(图 3 的泳道 4)。

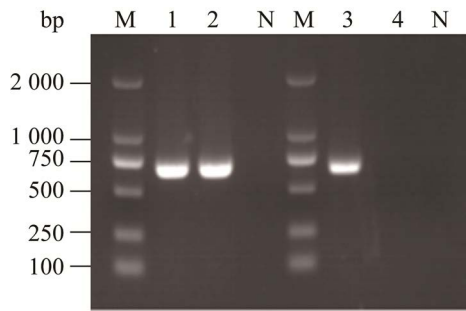


图 3 重组质粒 PCR 鉴定 M: DL2000 DNA Marker; 1、3: pSARS-CoV-2-S; 2、4: pSARS-CoV-2-S1; N: 阴性对照

Figure 3 Identification of recombinant plasmid with PCR. M: DL2000 DNA Marker; 1, 3: pSARS-CoV-2-S; 2, 4: pSARS-CoV-2-S1; N: Negative control.

2.2 重组病毒的拯救结果

将辅助质粒分别与重组质粒 pSARS-CoV-2-S1 及 pSARS-CoV-2-S 共转染至 BHK-21 细胞, 在转染第 7 天收集细胞上清, 通过免疫荧光鉴定, 成功拯救分别携带 S1 和 S 基因的重组 RABV 毒株, 分别命名为 rHEP-nCOV-S1 和 rHEP-nCOV-S, 免疫荧光染色结果见图 4。

2.3 重组病毒 RT-PCR 鉴定

分别提取重组病毒的 RNA, 反转录 cDNA 后, 以 G-S 和 S-L 引物进行 PCR 鉴定。结果显示, 以 G-S 为引物扩增 rHEP-nCOV-S 和 rHEP-nCOV-S1, 产物大小与预期的 690 bp 相符合(图 5

的泳道 1、2); 以 S-L 引物扩增 rHEP-nCOV-S 的产物大小与预期的 673 bp 相符(图 5 的泳道 4)。此外, 我们发现 S-L 引物未从 rHEP-nCOV-S1 扩增出 673 bp 的 DNA, 说明 2 个病毒未形成交叉污染(图 5 的泳道 3)。再将 G-L 引物扩增的片段测序, 结果与预期大小相符。

2.4 重组病毒 Western blotting 鉴定

为检测重组病毒是否有效表达 S 蛋白(144 kDa) 与 S1 蛋白(72 kDa), 将重组病毒在 NA 细胞中培养, 收集细胞, 裂解蛋白, 以抗 S 抗体进行 Western blotting 检测。结果显示, rHEP-nCOV-S1 在约 72 kDa 处出现特异性条带(图 6 泳道 1), rHEP-nCOV-S 大约在 144 kDa 处出现一条特异性条带(图 6 泳道 2), 而 rHEP-Flury 未出现特异性条带(图 6 泳道 3)。

2.5 重组病毒的生长曲线结果

为了研究 S1 或 S 基因的插入对 RABV 增殖的影响, 对 2 株重组病毒和亲本株进行生长曲线的测定。结果如图 7 所示, rHEP-nCOV-S1 在 MOI=0.01 (A)和 MOI=1 (B)时, 上清中的病毒滴度在 24 h 后均高于亲本株, 而 rHEP-nCOV-S 的复制与亲本株无显著差异。

2.6 重组病毒扩散能力检测结果

将重组病毒接种于 NA 细胞, 检测其在 NA 细胞上的扩散能力。结果如图 8 所示, 在感染重组病毒 24 h 后, 扩散无显著差异, 但是在感

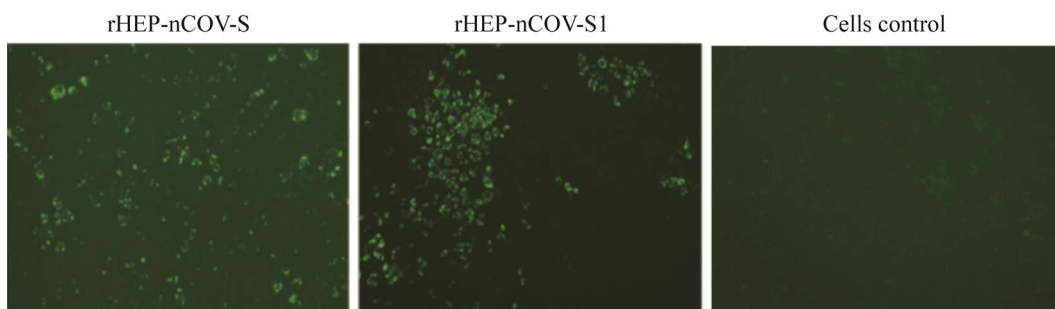


图 4 重组病毒免疫荧光鉴定

Figure 4 Identification of recombinant virus using direct fluorescent assay.

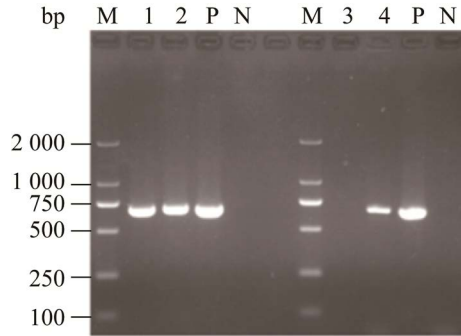


图 5 RT-PCR 鉴定重组病毒 M:DL2000 DNA Marker; 1、2: G-S 引物扩增 rHEP-nCOV-S1 和 rHEP-nCOV-S; 3、4: S-L 引物扩增 rHEP-nCOV-S1 和 rHEP-nCOV-S; P: 阳性对照(质粒 pSARS-CoV-2-S); N: 阴性对照

Figure 5 Identification of recombinant virus using RT-PCR. M: DL2000 DNA Marker; 1, 2: Amplification of rHEP-nCOV-S1 and rHEP-nCOV-S with G-S primer; 3, 4: Amplification of rHEP-nCOV-S1 and rHEP-nCOV-S with S-L primer; P: Positive control (plasmid pSARS-CoV-2-S); N: Negative control.

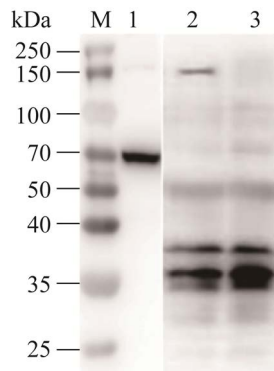


图 6 重组病毒 WB 检测 M: 蛋白 Marker; 1: rHEP-nCOV-S1 (一抗为羊抗兔 S 单抗); 2: rHEP-nCOV-S (一抗为鼠源性 S 多抗); 3: rHEP-Flury

Figure 6 Identification of recombinant virus using WB. M: Protein Marker; 1: rHEP-nCOV-S1 (primary antibody is goat anti-rabbit S monoclonal antibody); 2: rHEP-nCOV-S (primary antibody is S polyclonal antibody from mice); 3: rHEP-Flury.

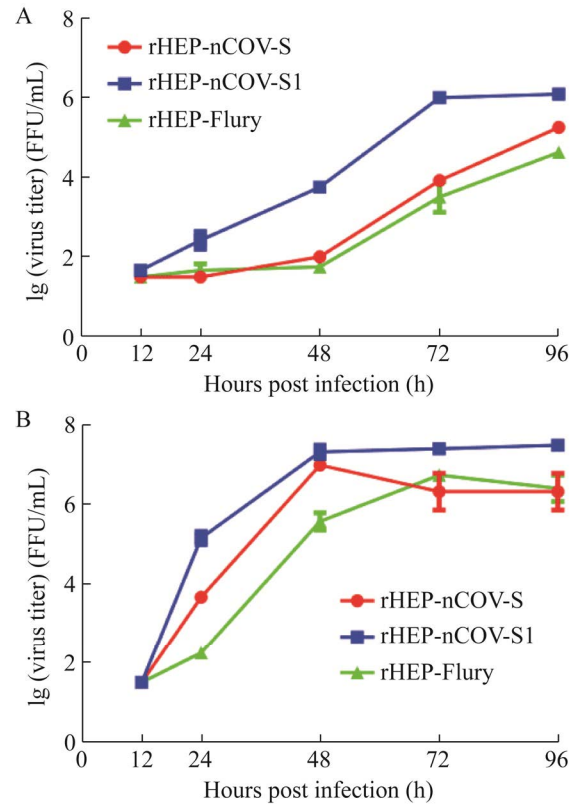


图 7 rHEP-nCOV-S1 和 rHEP-nCOV-S 在 NA 细胞上的生长曲线 A: 以 MOI=0.01 感染细胞后的生长曲线; B: 以 MOI=1 感染细胞后的生长曲线

Figure 7 Growth curves of rHEP-nCOV-S1 and rHEP-nCOV-S in NA cells. A: Cells were infected at an MOI of 0.01; B: Cells were infected at an MOI of 1.

染后 36、48 和 60 h, rHEP-nCOV-S1 的荧光灶显著大于亲本株, 而 rHEP-nCOV-S 的荧光灶与亲本株无显著差异。

2.7 重组病毒对小白鼠的致病性

将重组病毒接种小白鼠后, 每天称量小鼠的体重、观察小鼠的饮食及被毛, 连续 21 d。结果显示, 重组病毒 rHEP-nCOV-S1 和 rHEP-nCOV-S 接种后, 小鼠的体重变化与亲代病毒 rHEP-Flury 组无明显的差异(图 9), 说明 S 和 S1 基因的插入并未影响病毒的致病性。

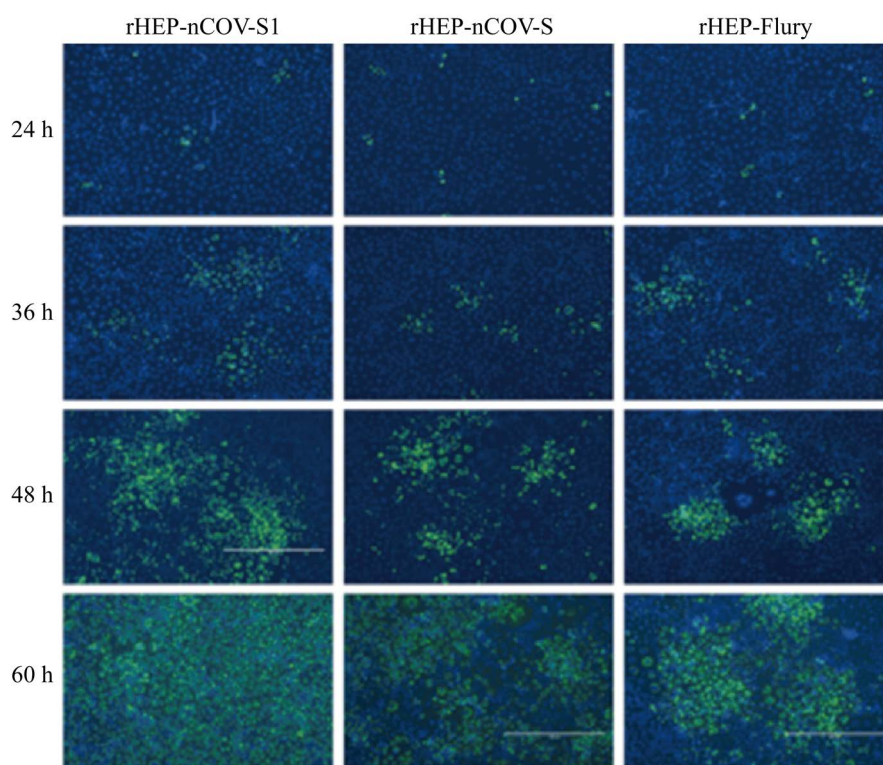


图 8 重组病毒在 NA 细胞上的扩散能力
Figure 8 Spread ability of recombinant virus in NA cells.

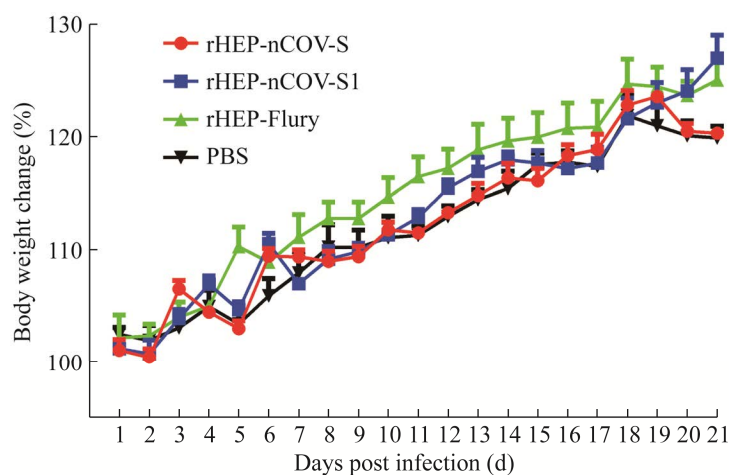


图 9 小鼠体重增长变化
Figure 9 Change in weight gain of mice.

2.8 重组病毒诱导 RABV 中和抗体的能力

重组病毒第 2 次免疫成年小鼠 21 d 后, 采血、分离血清、以 FAVN 法检测小鼠抗 RABV 的中和抗体效价。结果显示, rHEP-nCOV-S、rHEP-nCOV-

S1 组均能检测到中和抗体, 虽然抗体滴度低于亲本株 rHEP-Flury, 但是无显著性差异 ($P > 0.05$)。rHEP-nCOV-S 组中和抗体效价最高为 1.5 IU, rHEP-nCOV-S1 组中和抗体效价最高为 3.42 IU (图 10)。

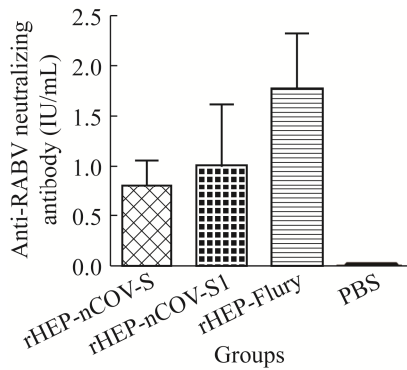


图 10 重组病毒诱导小鼠产生 RABV 中和抗体
Figure 10 Anti-RABV neutralizing antibody induced by recombinant virus in mice.

3 讨论与结论

RABV 的反向遗传自 1994 年建立以来^[19], 已经有大量的科学家应用其表达外源蛋白。尽管 RABV 能够作为良好的载体表达外源蛋白, 但不是所有的重组病毒都能够被成功拯救^[20]。本研究选择将 SARS-CoV-2 *S* 基因和 *SI* 基因插入到 RABV 的 *G* 和 *L* 基因之间, 未改变其他结构蛋白的基因间隔。*S* 蛋白作为 SARS-CoV-2 的刺突蛋白镶嵌于病毒的囊膜上。我们的研究表明, SARS-CoV-2 *S* 和 *SI* 基因的插入并未影响 RABV 的拯救, 并且随着病毒的复制 *S* 和 *S1* 蛋白获得高效表达。另外, 携带 *SI* 基因的重组病毒 rHEP-nCOV-S1, 其在细胞中的滴度与扩散能力均高于亲本株 rHEP-Flury, 而 rHEP-nCOV-S 与亲本株差异不大。rHEP-nCOV-S1 的免疫荧光灶显著高于 rHEP-nCOV-S 也进一步说明 *SI* 的插入提高了 RABV 的复制效率。Wang 等发现, 将干扰素 $\alpha 1$ 克隆至 HEP-Flury 的 *G* 和 *L* 基因之间, 重组病毒在 NA 细胞和 BSR 细胞上的滴度降低^[21], 然而将犬细小病毒的 *VP2* 基因表达于 HEP-Flury 的假基因区后, 重组病毒在 BHK-21 细胞上的滴度显著高于亲本毒株^[16]。因此, 我们与其他学者的研究确证, RABV *G* 与 *L* 间插

入较短的外源基因可提高 RABV 的繁殖, 但其长度的极限却需进一步的研究。

除了复制效率改变, RABV 基因组中嵌入外源基因还会影响 RABV 的致病性^[22]。在本研究中, 重组病毒 rHEP-nCOV-S1 和 rHEP-nCOV-S 感染成鼠后, 小鼠的体重变化与亲代病毒 rHEP-Flury 基本一致, 说明 *S* 和 *SI* 的插入并未增加重组病毒的致病性。这充分证明重组病毒 rHEP-nCOV-S1 和 rHEP-nCOV-S 用于制备疫苗是安全的。

本研究拯救获得了携带 SARS-CoV-2 *S* 基因和 *SI* 基因的重组狂犬病病毒, 这两株病毒可高效表达 *S* 和 *S1* 蛋白, 并可诱导小白鼠产生抗 RABV 中和抗体。因此, 重组 RABV 具有制备新冠和狂犬病二联疫苗的潜力。

REFERENCES

- [1] World Health Organization. WHO Director-General's Opening Remarks at the Media Briefing on COVID-19[Z]. [2020-03-11]. <https://www.who.int/director-general/speeches/detail/who-director-general-s-opening-remarks-at-the-media-briefing-on-covid-19---11-march-2020>
- [2] Kiros M, Andualem H, Kiros T, Hailemichael W, Getu S, Geteneh A, Alemu D, Abegaz WE. COVID-19 pandemic: current knowledge about the role of pets and other animals in disease transmission[J]. *Virology Journal*, 2020, 17(1): 1-8
- [3] Qiu TY, Mao TT, Wang Y, Zhou MD, Qiu JX, Wang JW, Xu JQ, Cao ZW. Identification of potential cross-protective epitope between a new type of coronavirus (2019-nCoV) and severe acute respiratory syndrome virus[J]. *Journal of Genetics and Genomics = Yi Chuan Xue Bao*, 2020, 47(2): 115-117
- [4] Lu RJ, Zhao X, Li J, Niu PH, Yang B, Wu HL, Wang WL, Song H, Huang BY, Zhu N, et al. Genomic characterisation and epidemiology of 2019 novel coronavirus: implications for virus origins and receptor binding[J]. *Lancet: London, England*, 2020, 395(10224): 565-574
- [5] Sakr MM, Elsayed NS, El-Housseiny GS. Latest updates on SARS-CoV-2 genomic characterization,

- drug, and vaccine development; a comprehensive bioinformatics review[J]. *Microbial Pathogenesis*, 2021, 154: 104809
- [6] Dai LP, Gao GF. Viral targets for vaccines against COVID-19[J]. *Nature Reviews Immunology*, 2021, 21(2): 73-82
- [7] Freitas FC, Ferreira PHB, Favaro DC, Oliveira RJ. Shedding light on the inhibitory mechanisms of SARS-CoV-1/CoV-2 spike proteins by ACE2-designed peptides[J]. *Journal of Chemical Information and Modeling*, 2021, 61(3): 1226-1243
- [8] Premkumar L, Segovia-Chumbez B, Jadi R, Martinez DR, Raut R, Markmann A, Cornaby C, Bartelt L, Weiss S, Park Y, et al. The receptor binding domain of the viral spike protein is an immunodominant and highly specific target of antibodies in SARS-CoV-2 patients[J]. *Science Immunology*, 2020, 5(48): eabc8413
- [9] Yuan M, Liu HJ, Wu NC, Wilson IA. Recognition of the SARS-CoV-2 receptor binding domain by neutralizing antibodies[J]. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 2021, 538: 192-203
- [10] Tordo N, Poch O, Ermine A, Keith G, Rougeon F. Completion of the rabies virus genome sequence determination: highly conserved domains among the L (polymerase) proteins of unsegmented negative-strand RNA viruses[J]. *Virology*, 1988, 165(2): 565-576
- [11] Schnell MJ, Mebatsion T, Conzelmann KK. Infectious rabies viruses from cloned cDNA[J]. *The EMBO Journal*, 1994, 13(18): 4195-4203
- [12] Huang Y, Tang Q, Nadin-Davis SA, Zhang SF, Hooper CD, Ming PG, Du JL, Tao XY, Hu RL, Liang GD. Development of a reverse genetics system for a human rabies virus vaccine strain employed in China[J]. *Virus Research*, 2010, 149(1): 28-35
- [13] Wirblich C, Coleman CM, Kurup D, Abraham TS, Bernbaum JG, Jahrling PB, Hensley LE, Johnson RF, Frieman MB, Schnell MJ. One-health: a safe, efficient, dual-use vaccine for humans and animals against middle east respiratory syndrome coronavirus and rabies virus[J]. *Journal of Virology*, 2017, 91(2): e02040-e02016
- [14] Faber M, Lamirande EW, Roberts A, Rice AB, Koprowski H, Dietzschold B, Schnell MJ. A single immunization with a rhabdovirus-based vector expressing severe acute respiratory syndrome coronavirus (SARS-CoV) S protein results in the production of high levels of SARS-CoV-neutralizing antibodies[J]. *The Journal of General Virology*, 2005, 86(Pt 5): 1435-1440
- [15] Wang FX, Zhang SQ, Zhu HW, Yang Y, Sun N, Tan B, Li ZG, Cheng SP, Fu ZF, Wen YJ. Recombinant rabies virus expressing the H protein of canine distemper virus protects dogs from the lethal distemper challenge[J]. *Veterinary Microbiology*, 2014, 174(3/4): 362-371
- [16] Luo J, Shi HH, Tan YP, Niu XF, Long T, Zhao J, Tian Q, Wang YF, Chen H, Guo XF. Two potential recombinant rabies vaccines expressing canine parvovirus virion protein 2 induce immunogenicity to canine parvovirus and rabies virus[J]. *Vaccine*, 2016, 34(37): 4392-4398
- [17] 郭霄峰, 富振芳. 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
- Guo XF, Fu ZF. Moving the glycoprotein gene of rabies virus to promoter-proximal position and the generation of the virus[J]. *Journal of South China Agricultural University*, 2006, 27(1): 104-106 (in Chinese)
- [18] Inoue KI, Shoji Y, Kurane I, Iijima T, Sakai T, Morimoto K. An improved method for recovering rabies virus from cloned cDNA[J]. *Journal of Virological Methods*, 2003, 107(2): 229-236
- [19] 翟洪月, 陶丽红, 葛金英, 王喜军, 冯娜, 帅磊, 马良, 步志高. 糖蛋白 G 基因在基因组 P-M 位的插入重组表达对狂犬病毒 Flury LEP 致病力的影响[J]. *微生物学报*, 2011, 51(8): 1098-1105
- Zhai HY, Tao LH, Ge JY, Wang XJ, Feng N, Shuai L, Ma L, Bu ZG. Insertion of glycoprotein gene between P and M gene influences the pathogenicity of the rabies virus Flury LEP[J]. *Acta Microbiologica Sinica*, 2011, 51(8): 1098-1105
- [20] 梅明珠, 杨先锋, 龙腾, 张琼, 赵静, 田钦, 彭娇娇, 罗均, 姜贺, 林颖仪, 等. 狂犬病病毒 HEP-Flury M 基因重排后在小鼠神经母细胞瘤细胞中的表型分析[J]. *华南农业大学学报*, 2020, 41(2): 33-39
- Mei MZ, Yang XF, Long T, Zhang Q, Zhao J, Tian Q, Peng JJ, Luo J, Jiang H, Lin YY, et al. Phenotypic consequences of M gene rearrangement of rabies virus HEP-Flury in mouse neuroblastoma cells[J]. *Journal of South China Agricultural University*, 2020, 41(2): 33-39 (in Chinese)
- [21] Wang YF, Tian Q, Xu XJ, Yang XF, Luo J, Mo WY, Peng JJ, Niu XF, Luo YW, Guo XF. Recombinant rabies virus expressing IFN α 1 enhanced immune responses resulting in its attenuation and stronger immunogenicity[J]. *Virology*, 2014, 468: 621-630
- [22] Finke S, Cox JH, Conzelmann KK. Differential transcription attenuation of rabies virus genes by intergenic regions: generation of recombinant viruses overexpressing the polymerase gene[J]. *Journal of Virology*, 2000, 74(16): 7261-7269