

表达新城疫病毒 F48E8 株融合蛋白基因的 重组鸡痘病毒及其免疫效力

吴艳涛 彭大新 刘秀梵 刘伟忠 张如宽

(扬州大学农业部畜禽传染病学重点开放实验室 扬州 225009)

摘 要 将新城疫病毒(NDV)F48E8 株融合蛋白基因导入鸡痘病毒(FPV)插入载体 pFG1175-1 的 P7.5 启动子下游,得到转移载体 pFG1175-1 重组质粒。采用脂质体转染技术,将该质粒转染 FPV282E4 株感染的鸡胚成纤维细胞(CEF)。经过多次蓝斑筛选纯化,获稳定的重组病毒 rFPV-NDF。间接免疫荧光试验表明,rFPV-NDF 感染的 CEF 中表达了 NDV 的融合蛋白。用 rFPV-NDF 免疫的 SPF 试验鸡能产生对 NDV 强毒攻击的免疫力,保护率达 96.3%。

关键词 重组鸡痘病毒,新城疫病毒 F48E8 株,融合蛋白

中图分类号 Q78,S858.31 文献标识码 A 文章编号 1000-3061-(2000)05-0591-04

新城疫(Newcastle Disease,ND)是鸡的一种烈性、病毒性传染病,被国际兽疫局列为对动物危害最大的 A 类传染病之一,每年给国家造成上百亿元的经济损失。本病病原为新城疫病毒(NDV),分类上归于副粘病毒科、腮腺炎病毒属,是一种有囊膜的单链、不分节段、负极性 RNA 病毒。位于 NDV 囊膜上的两种糖蛋白为融合蛋白(F)和血凝素-神经氨酸酶(HN),与病毒的致病性和免疫原性密切相关。其中 F 负责病毒穿入细胞,产生细胞融合和溶血作用;HN 负责病毒吸附到细胞受体和破坏细胞受体。F 常以 F₀ 前体的形式被合成,F₀ 经宿主细胞酶切割成具有生物活性的 F1 和 F2 多肽,F1 多肽起融合作用。F₀ 酶切部位的氨基酸序列决定其能否被宿主细胞酶识别,因而决定了病毒的毒力^[1]。

由于 NDV 强毒在我国流行非常普遍,而常规疫苗的短期免疫保护率虽高,免疫期却不长,致使鸡的整个饲养期内需要多次使用疫苗。在存在各种免疫抑制因素的情况下,免疫监测稍有疏忽,鸡群就会发生 ND。为了研制免疫保护率高、免疫期长的 ND 新一代疫苗,国内外不少实验室已采用多种途径表达了 NDV 的结构基因,这些重组体对 NDV 强毒攻击具有保护作用^[2,3]。本文将报道表达 NDV 中国标准强毒 F48E8 株 F 基因的重组鸡痘病毒(pFPV)

构建及其免疫效力,为研制 ND 基因工程疫苗打下基础。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 病毒、SPF 鸡和鸡胚:NDV 中国标准强毒 F48E8 株、NDV LaSota 疫苗株和鸡痘病毒(FPV)282E4 疫苗株,由中国兽药监察所提供。表达 NDV F48E8 株 HN 基因的 rFPV(rFPV-NDF)由本室刘伟忠等构建^[4]。SPF 鸡和鸡胚购自斯巴法斯公司。

1.1.2 质粒和宿主菌:含 NDV F48E8 株 F 基因的质粒 pF37 由吴艳涛等构建^[5],F 基因插入片段全长 1690bp,包括一个编码 553 个氨基酸的开放阅读框架。FPV 插入载体 pFG1175-1 由本室王志亮等构建^[6],含疫苗病毒启动子 P7.5 和 P11,以及 FPV 复制非必需片段、筛选标记 Lac Z 基因和多克隆酶切位点。宿主菌 TG1 购自华美生物工程公司。

1.1.3 分子生物学试剂:限制酶、T4DNA 聚合酶、T4DNA 连接酶、DOSPER lipofectin 试剂盒等购自 Roche 公司、羊抗鸡 IgG-FITC 荧光抗体购自 Sigma 公司。

1.1.4 F 基因狄高辛探针:由本室刘伟忠等制备。

1.1.5 鸡抗新城疫病毒阳性血清:由本室制备。以

0.3% 甲醛灭活超速离心提纯的 F48E8 株 NDV ,制备成油乳剂灭活疫苗 ,两次免疫 SPF 鸡 ,采集血清备用。

1.2 方法

1.2.1 含 NDV F 基因的 FPV 转移载体的构建 :方法见图 1。以 *Sal* I 酶切 pF37 ,经 T4 DNA 聚合酶补平末端 ,再以 *Hind* III 切割 ,低熔点琼脂糖电泳提纯长约 1.7 kb 的 NDV F 基因开放阅读框架 ;pFG1175-1 以 *Sma* I 和 *Hind* III 酶切割 ,提纯长约 9.7 kb 的片段 ,两者于 0℃ 经 T4 DNA 连接酶作用连接 48 h。将上述连接产物转化感受态大肠杆菌 TG1 ,涂布含氨苄青霉素、X-gal 和 IPTG 的 LB 平板 ,37℃ 培养 16~18 h。挑取 30 个蓝色菌落 ,用狄高辛标记的 F 基因探针进行原位杂交 ,筛选到的阳性重组质粒命名为 pFGF1175-1。

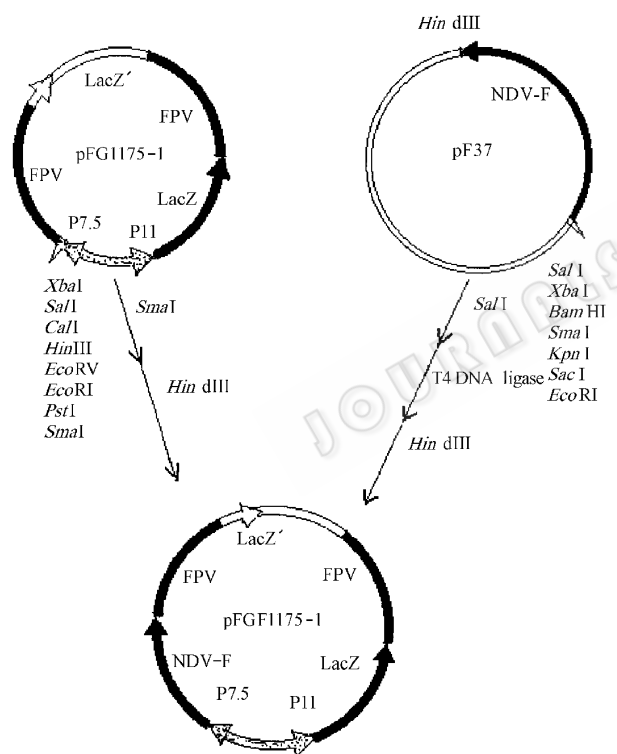


图 1 含 NDV F 基因的 FPV 转移载体 pFGF1175-1 的构建
Fig.1 Construction of PFV transfer vector pFGF1175-1 containing the F gene of NDV1

1.2.2 含 NDV F 基因的 rFPV 构建 :参照 DOSPER Lipofectin 试剂盒说明书进行。在 50 mL 方瓶中 ,培养 SPF 鸡胚成纤维细胞 (CEF)至形成单层 ;以 0.1 mL 的 FPV282E4 株感染 CEF ,37℃ 培养 3 h ;用 3 mL 无血清 DMEM 培养基洗细胞面两次 ,再加入 2mL 无血清 DMEM 培养基。分别在两个灭菌指形管中用 HBS (20 mmol/L Hepes ,150 mmol/L

NaCl ,pH7.4)分别稀释脂质体、质粒 pFGF1175-1 至 50 μ L ,使脂质体与质粒的比例为 5:1 ;将两管物质合为一管 ,轻轻混匀 ,室温静置 15~30 min。将上述 100 μ L 脂质体 - 质粒复合物缓缓加入到 CEF 细胞单层的无血清培养基中 ,轻轻混匀 ,37℃ 培养 6 h。加入 2 mL 含 10% 犊牛血清的 DMEM 培养基 ,继续培养 18 h ,换含 1% 犊牛血清的 DMEM 培养基培养 48~72 h。待细胞完全病变后收获病毒 , - 70℃ 反复冻融 3 次 ,低速离心去细胞碎片 ,上清即可能含 rFPV。

1.2.3 含 NDV F 基因的 rFPV 纯化 :将上一步骤转染的病毒液作 1:10 稀释 ,取 0.5 mL 感染培养于直径为 60 mm 平皿内的次代 CEF 单层 ,待出现单个分散的病毒蚀斑时 ,倒掉培养液 ,加入终浓度 150 μ g/mL X-gal 的营养琼脂 (2 \times 细胞培养液与 1.6% 琼脂等体积混合) 5 mL ,凝固后翻转平皿 ,37℃、5% CO₂ 培养。待蓝斑出现后 ,将其吸出 ,转入 0.5 mL 细胞培养液中 , - 30℃ 冻融 3 次 ,重复进行这一步骤 ,连续蓝斑筛选 3 次。

1.2.4 表达 NDV F 基因的 rFPV 鉴定 :采用间接免疫荧光试验进行 ,以 FPV282E4 株感染的 CEF 和未感染病毒的 CEF 为对照。将纯化的 rFPV 感染 24 孔培养板上的 CEF ,72 h 后移去培养液 ,用 PBS 洗涤 1 次 ,再以冷甲醇固定 ,洗涤后加工作浓度的鸡抗新城疫病毒阳性血清 ,37℃ 孵育 1 h ;洗涤 3 次后再加入羊抗鸡 IgG-FITC 荧光抗体 ,45 min 后充分洗涤并观察荧光 ,阳性者命名为 rFPV-NDF。

1.2.5 表达 NDV F 基因的 rFPV (rFPV-NDF)免疫效力试验 :将 1 日龄 SPF 鸡随机分组 ,隔离饲养。28 日龄时 ,每只试验鸡分别肌肉接种 10⁴ 个半数细胞感染量 (TCID₅₀) 的 rFPVNDF、rFPVNDHN 和 rFPVNDF/rFPVNDHN (两者各占 0.5 \times 10⁴ TCID₅₀) ,疫苗对照组接种 0.2 mL 1:100 稀释的 NDV LaSota 病毒株鸡胚尿囊液。42 日龄时以 NDV F48E8 强毒肌肉注射攻毒 ,每只鸡接种 10⁵ 个鸡胚半数致死量 (EID₅₀) 病毒 ,观察记录试验鸡发病死亡情况。本试验还设有攻毒对照组和空白对照组。

2 结果

2.1 构建含 NDV F 基因的 FPV 转移载体
经一系列步骤将 NDV F48E8 株 F 基因正向置于 FPV 插入载体 pFG1175-1 的痘苗病毒启动子 P7.5 下游 ,以狄高辛标记的 F 基因探针原位杂交

筛选到 4 个阳性克隆,命名为 pFGF1175-1。

2.2 表达 NDV F 基因的 rFPV 构建和鉴定

以脂质体和质粒 pFGF1175-1 转染 FPV282E4 疫苗株感染的 CEF,经过连续 3 次的蓝斑筛选,得到纯化的 rFPV-NDF。间接免疫荧光试验可见 rFPV-NDF 感染的 CEF 细胞中有明显的特异性黄绿色荧光,表明 NDV F 基因得到表达(见图 2)。而作为对照的 CEF 中均未出现荧光。

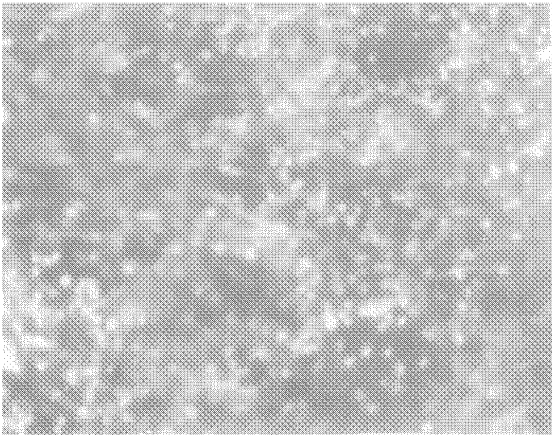


图 2 间接免疫荧光试验检测 rFPV-NDF 感染的鸡胚成纤维细胞中 NDV F 基因表达

Fig.2 Immunofluorescence detection of NDV fusion protein expressed in the rFPV-NDF infected CEF cells

2.3 rFPV-NDF 的免疫效力

应用 SPF 鸡所进行的免疫效力试验结果见表 1。rFPV-NDF、rFPV-NDHN 和 rFPV-NDF/rFPV-NDHN 免疫组对 NDV 强毒攻击均有很高的保护作用,试验鸡在免疫接种 rFPV 到攻毒期间未出现任何不良反应。

3 讨论

融合蛋白是 NDV 的重要结构成分,用 FPV 作为载体对其进行表达是研制 ND 基因工程疫苗的途径之一,这一技术路线有明显的优越性。首先作为载体的 FPV282E4 毒株本身是鸡常用的疫苗株,免疫期长,具有严格的宿主限制性,不感染人类和哺乳动物,用于预防鸡痘安全有效;其次,FPV 表达系统是真核系统,表达产物经糖基化等修饰后更接近于天然成分,能产生良好的免疫原性。

NDV F 基因能否在 FPV 中高效表达,与插入载体关系密切,一方面取决于插入载体的痘苗病毒启动子性质;另一方面取决于与 FPV 发生同源重组的复制非必需片段。本室构建的 pFG1175-1 是一种高效插入载体,马立克氏病毒 gB 基因和 NDV HN 基因均已用该载体导入到 FPV 中,并产生了对相应病原体的免疫保护性^[7]。本试验亦采用

表 1 rFPV-NDF 免疫鸡群对 NDV 强毒攻击的保护率

Table 1 Protective efficacy of the chickens inoculated with rFPV-NDF against virulent NDV challenge

Group	No. of chickens	Dose of Inoculation (TCID ₅₀ /chicken)	Dose of challenge (EID ₅₀ /chicken)	Ratio of Survivor	Protection Rate/%
rFPV-NDF	30	10 ⁴	10 ⁵	29/30	96.7
rFPV-NDHN	30	10 ⁴	10 ⁵	28/30	93.3
rFPV-NDF/rFPV-NDHN	30	10 ⁴	10 ⁵	28/30	93.3
LaSota	30	0.2 mL(Commercial vaccine)	10 ⁵	30/30	100.0
Control 1	15	—	10 ⁵	0/15	0.0
Control 2	15	—	—	15/15	—

pFGF1175-1 插入载体,构建了含 NDV F 基因的转移载体 pFGF1175-1,并用脂质体方法转染 FPV282E4 株感染的 CEF,获得 rFPV-NDF。

影响脂质体转染效率的重要因素是脂质体与转移载体质粒的比例和转染时间,因此必须优化转染条件。经过反复试验,确定了脂质体和质粒比例为 5:1,转染时间选择在 FPV282E4 株感染 CEF 后 3~4 h,在此条件下可获得较高的转染效率,在含 X-gal 营养琼脂的平皿上获得多个呈蓝色的重组病毒。

初步的动物试验表明,rFPV-NDF 和 rFPV-NDHN 一样,都能刺激鸡体产生对 NDV 强毒攻击的免疫保护作用,而 rFPV-NDF 和 rFPV-NDHN 的组合并没有进一步提高保护率。关于重组 ND 疫苗的合适免疫剂量以及组合,尤其是免疫持续的时间还有待研究,如何提高 ND 基因工程疫苗的细胞免疫水平亦仍需作深入探索。在这些问题解决以后,ND 基因工程疫苗可望进入实用阶段,这将为 ND 的控制提供新的手段。

参 考 文 献

- [1] Rhonal L G ,Richard J S ,Ronald M I *et al.* . *J Virol* ,1988 ,**62** :354~356
- [2] Talor J ,Edbauer C ,Senelonge A R *et al.* . *J Virol* ,1990 ,**64** :1441~1450
- [3] Bournsnell M E G ,Green R T ,Samson A C R *et al.* . *Virol* ,1990 ,**178** :297~300
- [4] 刘伟忠 ,吴艳涛 ,姜 焱等.微生物学报 ,1998 ,**38** (5) :259~364
- [5] 吴艳涛 ,刘秀梵 ,张如宽.病毒学报 ,1999 ,**15** (2) :143~146
- [6] 王志亮 ,彭大新 ,刘秀梵.病毒学报 ,1996 ,**12** (1) :48~54
- [7] LIU X ,PENG D ,WU X *et al.* . *Acta Virologica* ,1999 ,**43** :201~205

A Recombinant Fowlpox Virus Expressing the Fusion Protein of Newcastle Disease Virus Strain F48E8 and Its Protective Efficacy

WU Yan-Tao PENG Da-Xin LIU Xiu-Fan LIU Wei-Zhong ZHANG Ru-Kuan
(Ministry Key Laboratory of Animal Infectious Diseases ,Yangzhou University ,Yangzhou 225009)

Abstract The transfer vector pFGF1175-1 was constructed by insertion the fusion protein gene of Newcastle disease virus(NDV) F48E8 strain into the insertion vector pFG1175-1 ,downstream of P7. 5 promotor ,and then transfected chicken embryo fibroblast (CEF) cell cultures which had been infected with fowlpox virus (FPV) Chinese vaccine strain 282E4 for 3~4 hours. Recombinant FPV with blue plaques were selected and purified in CEF cell culture laid agar containing X-gal. The recombinant FPV named rFPV-NDF was confirmed expressing NDV fusion protein by indirect immunofluorescence assay ,and could protect chickens against virulent NDV challenge ,The protective rate was 96. 7% .

Key words Newcastle disease virus , fusion protein , recombinant fowlpox virus