

## 传染性喉气管炎病毒 *gB* 基因和新城疫病毒 *F* 基因 在重组禽痘病毒中共表达

智海东 王云峰\* 童光志\* 王 玫 张绍杰

(中国农业科学院哈尔滨兽医研究所 兽医生物技术国家重点实验室, 哈尔滨 150001)

**摘 要** 在重组禽痘病毒中表达多个禽类病原的主要免疫原基因是构建多价基因工程疫苗的前提,但相关研究很少。在表达传染性喉气管炎病毒(ILTV) *gB* 基因重组禽痘病毒的转移载体的基础上,构建了含有 ILTV *gB* 基因和新城疫病毒(NDV)*F* 基因的重组禽痘病毒转移载体 pSY-*gB-F*,采用脂质体转染禽痘病毒感染的鸡胚成纤维(CEF)细胞后,通过蓝斑试验筛选出重组禽痘病毒(rFPV-*gB-F*),并进行了 6 轮蚀斑纯化。Western-blot 试验和间接免疫荧光试验证明 ILTV *gB* 基因和 NDV *F* 基因在 rFPV-*gB-F* 感染的 CEF 细胞中获得表达。为传染性喉气管炎、新城疫与鸡痘活载体多价疫苗的研制奠定基础。

**关键词** 传染性喉气管炎病毒,糖蛋白 B,新城疫病毒,融合蛋白,重组禽痘病毒

**中图分类号** Q786 **文献标识码** A **文章编号** 1000-3061(2004)06-0963-04

随着集约化养禽业的发展,鸡呼吸系统疾病的预防越来越重要,其中传染性喉气管炎(ILT)和新城疫(ND)带来的危害严重,而且现有的疫苗都有一定的不足,导致疫病的防制困难,因此更寄希望于新型载体疫苗。禽类病毒的活载体疫苗主要有禽痘病毒、疱疹病毒和腺病毒。禽痘病毒作为活载体疫苗有如下优势:基因组结构庞大,能容纳较大的外源基因而不丧失其感染性;表达的外源蛋白能真实的被修饰,如糖基化、磷酸化等,可诱导机体产生细胞免疫和体液免疫;重组禽痘病毒作为疫苗免疫方法简单、生产成本低、安全性好;禽痘病毒非常稳定,反复冻融并不引起病毒的变异和失活。禽痘病毒表达系统是表达禽类病原基因的理想载体,到目前为止,已经有多种禽类病原的免疫原基因在禽痘病毒载体上被表达,如马立克氏病毒糖蛋白 *gB* 基因<sup>[1]</sup>、鸡传染性法氏囊炎病毒的 *VP<sub>2</sub>* 基因<sup>[2]</sup>、禽流感病毒的 *HA* 基因<sup>[3]</sup>、禽网状内皮细胞增生症病毒的 *env* 基因<sup>[4]</sup>等,这些重组病毒都可使免疫鸡产生抵抗强毒攻击的免疫力。而且多年的商品化应用表明该疫苗载体非常安全。童光志等研制了表达传染性喉气管炎 *gB* 基因重组禽痘疫苗<sup>[5]</sup>,本研究以此为基础,构建共表达传染性喉气管炎病毒 *gB* 基因和新城疫病毒 *F* 基因的重组病毒(rFPV-*gB-F*),为多价疫苗的制备奠定基础。

### 1 材料与方 法

#### 1.1 材 料

1.1.1 种毒和载体:禽痘病毒 S-FPV-017 疫苗株是一个可用

于 8 周龄以上鸡免疫的禽痘弱毒疫苗,质粒载体 pSY538 含有禽痘病毒早晚期启动子 LP<sub>2</sub>EP<sub>2</sub>,由美国 California 大学 Davis 分校的 Yilma 教授惠赠;含有 P<sub>11</sub> 启动下的 lacZ 报告基因以及 LP<sub>2</sub>EP<sub>2</sub> 启动下的 ILTV *gB* 基因的质粒 pSY781,由张绍杰博士构建<sup>[5]</sup>;NDV F48E9 株 *F* 基因由曹殿军研究员惠赠。

1.1.2 SPF 鸡胚:9~10 日龄,由中国农业科学院哈尔滨兽医研究所 SPF 实验动物中心提供。

1.1.3 工具酶和其他材料:限制性内切酶和 Taq DNA 聚合酶等购自 TaKaRa 公司;碱性磷酸酶标记兔抗鸡 IgG 和 FITC 标记的兔抗鸡荧光抗体购自 Sigma 公司;质粒纯化试剂盒 Wizard<sup>®</sup> Purification Plasmid 购自 Promega 公司;Lipofectamine Plus<sup>™</sup> 试剂盒和 DMEM 细胞培养试剂购自 Gibco 公司。

#### 1.2 方 法

1.2.1 含 *gB* 基因和新城疫 *F* 基因的禽痘病毒转移载体的构建:根据 *F* 基因的序列设计引物,上游引物:5'-TAGGAAT-TCGATGGGCCCAATCTTC-3',下游引物:5'-GAGCGAT-TCTGTTCAGATTCTGTAGT-3',在引物的两端引入 *EcoR* I 和 *Bam* H I 位点(斜体字母表示)。该引物可以扩增完整的 *F* 基因。扩增条件为:95℃ 预变性 5min;然后 94℃/1min,55℃/50s,72℃/3min,30 个循环;最后 72℃ 延伸 10 min。经 PCR 扩增后,通过 *EcoR* I 和 *Bam* H I 位点将目的片段克隆到含有 LP<sub>2</sub>EP<sub>2</sub> 启动子的质粒 pSY538 上,再用 *Not* I 切取 LP<sub>2</sub>EP<sub>2</sub> + *F* 片段,用 *Not* I 将 pSY781 部分酶切,脱磷后连接,筛选阳性克

收稿日期:2004-03-25,修回日期:2004-06-24。

基金项目:本课题获得国家“863”计划资助(No. 2001AA213041)。

\* 通讯作者。童光志 Tel:86-451-82734181; Fax:86-451-82734181; E-mail:gzong@public.hr.hl.cn

王云峰 Tel:86-451-82510712; Fax:86-451-82510712; E-mail:yfwang@hvri.ac.cn

隆,完成转移载体 pSY-gB-F 的构建。

**1.2.2 转染:**质粒的纯化按 Wizard<sup>®</sup> Purification Plasmid 说明进行。待鸡胚成纤维细胞(CEF)达到 80%时,用 DMEM 培养液洗涤,用禽痘病毒 S-FPV-017 感染细胞,2h 后进行转染;转染程序按 Lipofectamine Plus<sup>™</sup> Reagent 使用说明进行之后加培养液在 37℃,5% CO<sub>2</sub> 条件下培养。待细胞病变达到 80%时收获,冻融 3 次后,用于筛选病毒。

**1.2.3 重组病毒的筛选及纯化:**取上述病毒转染液稀释后接种 CEF 单层细胞,37℃ 感作 2h,倒掉上清液,铺盖含有完全培养液的 1% 营养琼脂糖,细胞培养箱中培养 72~96h,待出现典型的细胞病变,铺盖含 X-gal(250μg/mL)的营养琼脂染色,挑取蓝斑,放入 1mL 无血清 DMEM 培养液中,冻融 3 次后,进行新一轮的蚀斑纯化,共进行 6 轮蚀斑纯化。

#### 1.2.4 重组禽痘病毒的鉴定:

(1)禽痘病毒的 PCR 鉴定:收取 rFPV-gB-F 感染后产生病变的鸡胚成纤维细胞,采用常规 SDS-蛋白酶 K 法提取病毒 DNA。

用于扩增 ILTV WG 株 *gB* 基因检测的上游引物为 5'-TTTGGAAATGGCGACAGGTCA-3',下游引物为 5'-CCGAGCCT-ATGGTAGGAACG-3',该引物可以扩增 394bp 的片段。用于扩增 F48E9 株 NDV *F* 基因检测的上游引物为 5'-GTCCTA-CCTACTTGGAGACCTT-3',下游引物为 5'-TTGCTATTGCTT-TC-CTCTAACT-3',可以扩增 543bp 的片段。两个反应的 PCR 反应条件相同,即:95℃ 预变性 5min;94℃/30s,55℃/30s,72℃/30s,35 个循环;最后 72℃ 延伸 5min。

(2)*F* 蛋白的间接免疫荧光检测:在六孔板上制备单层鸡胚成纤维细胞,接种重组病毒 rFPV-gB-F,待产生细胞病变后,倒掉培养液,用 PBS(0.01mol/L,pH7.4)洗涤后,用 75% 的乙醇在 4℃ 固定 30min,自然干燥。取新城疫阳性血清为一抗。取 FITC 标记的兔抗鸡荧光抗体为二抗。滴加碱性甘油(pH9.8),加盖玻片,荧光显微镜下观察结果。

(3)ILTV *gB* 的 Western blot 检测:用 rFPV-gB-F、rFPV-gB 和 S-FPV-017 感染鸡胚成纤维细胞,待产生细胞病变达 100%后,倒掉培养液,用 PBS(pH7.4)洗细胞 2 次。以 10% 分离胶进行电泳,待染料移至底部时停止电泳,用于 Western blot 印迹。具体操作过程见分子克隆,以抗传染性喉气管炎病毒的阳性血清为一抗(1:100),碱性磷酸酶标记的兔抗鸡抗体为二抗(1:5000),最后加 NBT/BCIP 溶液中显色。

## 2 结 果

### 2.1 含 ILTV *gB* 基因和 NDV *F* 的禽痘病毒转移质粒的构建

经过一系列的克隆过程,完成转移载体 pSY681-gB-F 的构建,该载体含有用于同源重组的两端同源臂、LP<sub>2</sub>EP<sub>2</sub> 启动子控制下的 *F* 基因、LP<sub>2</sub>EP<sub>2</sub> 启动子控制下的 *gB* 基因以及 P<sub>11</sub> 控制下的报告基因 LacZ,该载体物理图谱见图 1,酶切鉴定见图 2。

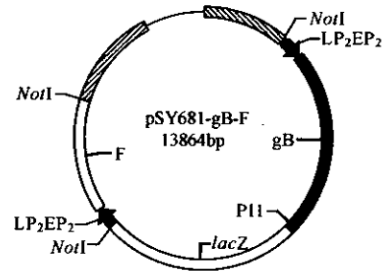


图 1 转移载体 pSY681-gB-F 的结构图

Fig.1 Map of transfer plasmid pSY681-gB-F

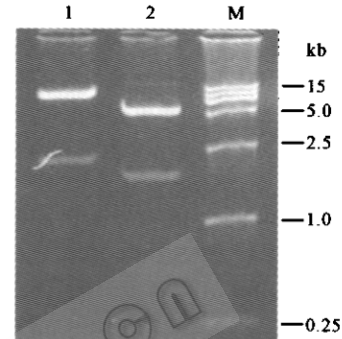


图 2 转移载体 pSY681-gB-F 的酶切鉴定

Fig.2 Identification of transfer plasmid by enzyme cut

1: Hind III 12.0+2.2;2: Not I 5.8+6.0+1.9

### 2.2 重组禽痘病毒的筛选与 PCR 鉴定

通过蓝斑筛选转染液获得重组病毒,将其命名为 rFPV-gB-F。经过 6 轮蚀斑纯化后,该重组病毒在以后的传代中稳定的表达报告基因,加入 X-gal 后,形成蓝色蚀斑。以 rFPV-gB-F 和 S-FPV-017 DNA 的为模板,分别以 *F* 基因和 *gB* 基因的引物进行 PCR 鉴定。结果表明,rFPV-gB-F 的 DNA 均能扩增出预计的 0.4kb 的 *gB* 基因和 0.5kb 的 *F* 基因的片段,说明所构建的重组禽痘病毒含有 *gB* 基因和 *F* 基因(见图 3 和 4)。

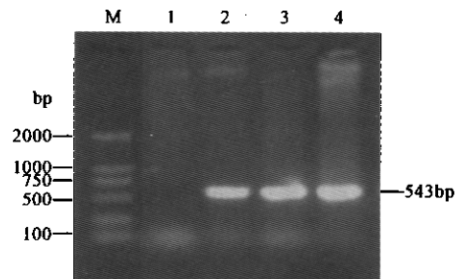


图 3 NDV *F* 基因的 PCR 鉴定

Fig.3 Identification of F gene in rFPV-gB-F DNA

1: S-FPV-017 2: positive control 3,4:rFPV-gB-F

### 2.3 表达产物 *F* 蛋白的间接免疫荧光检测

荧光显微镜下观察,在 rFPV-gB-F 感染细胞的细胞膜上,出现很强的亮绿色的荧光,表明 *F* 蛋白获得表达,并且主要定位在感染细胞的细胞膜上(见图 5)。

### 2.4 表达产物糖蛋白 *gB* 的分析

Western blotting 结果显示含有 ILTV *gB* 基因的 rFPV 感染

的 CEF 细胞样品在 110kd、95kd 和 58kd 处有条特异的反应带,与 Poulsen 的报道一致<sup>[6]</sup>,而其对照 S-FPV-017 感染的 CEF 细胞样品没有相应的反应条带(见图 6),从而说明 gB 蛋白在 rFPV-gB-F 中获得正确表达。

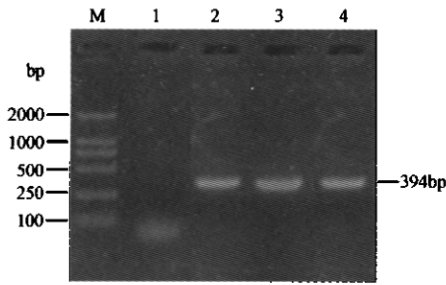


图 4 ILTV gB 基因的 PCR 鉴定

Fig.4 Identification of gB gene in rFPV-gB-F DNA  
1:S-FPV-017 2, 3:rFPV-gB-F 4:positive control

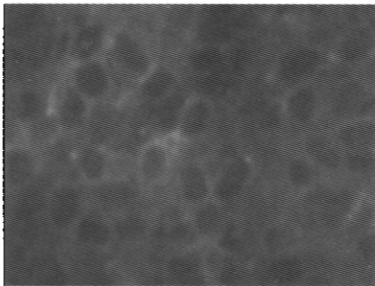


图 5 rFPV-gB-F 感染鸡胚成纤维细胞产生病变后,用抗新城疫阳性血清,作间接免疫荧光检测,亮绿色荧光表明 F 蛋白获得表达

Fig.5 Indirect-immunofluorescent test of the CEF cells infected with rFPV-gB-F. Bright fluorescence showed that F protein expressed on rFPV-gB-F infected CEF cells

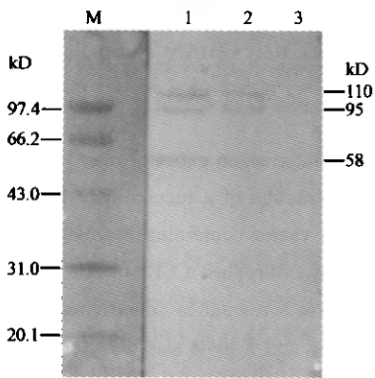


图 6 表达产物 gB 的 Western blotting 分析

Fig.6 Identification of gB expression of rFPV-gB-F with Western blot

- 1: CEF cells infected by rFPV-gB-F;
- 2: CEF cells infected by rFPV-gB;
- 3: CEF cells infected by S-FPV-017

苗是防治本病的重要手段,但其弱毒疫苗都有一定的不足,比如毒力偏强,接种后可以导致接种反应甚至发病,而且在复杂的环境中,导致疫苗的免疫效果不确实,使得两种疾病的防制困难重重<sup>[7,8]</sup>。以禽痘病毒为载体,表达多个病原体的主要免疫原基因,构建多价载体疫苗,将是解决这些问题的主要手段。

在活载体疫苗构建的过程中,需要筛选病原体的主要免疫原基因。ILTV 糖蛋白 gB 是病毒感染所必需的,在病毒接触和进入宿主细胞时起关键作用。ILTV 糖蛋白 gB 基因能编码 205kd 的糖蛋白复合物,由 ILTV gB 蛋白制备的亚单位疫苗能 100% 保护鸡抵抗临床发病和 83% 抑制强毒复制。所有这些都表明 ILTV gB 糖蛋白是主要保护性抗原,可作为研制亚单位疫苗、病毒活载体疫苗和 DNA 疫苗的候选抗原<sup>[9]</sup>。NDV 中有两个主要的成分-融合蛋白(F)和血凝素-神经氨酸酶(HN)都与病毒感染有关。HN 介导病毒与宿主细胞受体的结合,使病毒吸附到细胞膜上;F 介导病毒囊膜与宿主细胞浆膜的融合,促进病毒的穿入,还可以促进病毒在细胞间的感染。F 和 HN 均是病毒囊膜上的糖蛋白,均能产生中和抗体,因此都是制备疫苗的主要免疫原。目前有关表达新城疫病毒 F 或 HN 基因的报道非常多,对于新城疫都有一定的保护作用<sup>[10-13]</sup>。其中 F 是首选的免疫原,因为其没有 HN 的血凝活性,根据这一特性可以建立鉴别诊断,区分疫苗免疫和野毒的感染。

童光志等构建了表达 ILTV gB 基因的重组禽痘病毒<sup>[5]</sup>,在此基础上,我们将 LP<sub>2</sub>EP<sub>2</sub> 启动下的 F48E9 株 NDV F 基因和 LP<sub>2</sub>EP<sub>2</sub> 启动下的 ILTV gB 基因同时插入到 S-FPV-017 的复制非必需区,构建三价重组病毒。gB 表达产物在重组二价和三价病毒用 western-blot 都可以检测出来。F 蛋白在 western-blot 检测中,没有检测到有反应性的产物,但感染重组禽痘病毒细胞的超声裂解产物和新城疫阳性血清在液相 ELISA 条件下反应性很好(未报道结果),但是在间接免疫荧光试验中,在细胞膜上观察到强烈的荧光,表明 F 蛋白获得真实的表达,分析其原因,可能因为 F 蛋白是高度糖基化的蛋白,包含构象型表位较多<sup>[14]</sup>,线性表位比较少,在变性条件下,构象型表位破坏较多,从而造成检测结果的差异。

目前研究的重组禽痘病毒,都是表达一种病原体免疫原基因的重组禽痘病毒,但表达多个病原体免疫原基因的重组病毒目前报道很少。目前国内仅见有共表达 NDV F 基因、传染性法氏囊病病毒 VPO 基因的重组鸡痘病毒的研究<sup>[15]</sup>。表达 ILTV gB 基因的重组禽痘病毒对于 ILT 的保护非常理想,表现了极大的商品化前景,表达 ILTV gB 基因与 NDV F 基因的重组禽痘的构建,将进一步提高鸡痘载体疫苗的价值,为多价疫苗的制备奠定基础。

REFERENCES(参考文献)

[ 1 ] Yanagida N, Ogawa R, Li Y *et al*, Recombinant fowlpox virus expressing the glycoprotein B homologue and the pp38 gene of Marek's disease virus. *J Virol*, 1992, 66: 1402 - 1408

3 讨论

传染性喉气管炎和新城疫都是鸡的主要呼吸道疾病,疫

- [ 2 ] Shaw I, Davison TF. Protection from IBDV-induced bursal damage by a recombinant fowlpox vaccine, fpIBD1, is dependent on the titer of challenge virus and chicken genotype. *Vaccine*, 2000, 18(28): 3230 - 3241
- [ 3 ] Swayne DE, Garcia M, Beck JR *et al.* Protection against diverse highly pathogenic H5 avian influenza viruses in chickens immunized with a recombinant fowlpox vaccine containing an H5 avian influenza hemagglutinin gene insert. *Vaccine*, 2000, 18(11 - 12): 1088 - 1095
- [ 4 ] Cardona CJ, Reed WM, Witter RL *et al.* Protection of turkeys from hemorrhagic enteritis with a recombinant fowl poxvirus expressing the native hemagglutinin of hemorrhagic enteritis virus. *Avian Dis*, 1999, 43(2): 234 - 244
- [ 5 ] Tong C Zh, Zhang Sh J, Meng S Sh *et al.* Protection of chickens from infectious laryngotracheitis with a recombinant fowlpox virus expressing glycoprotein B of infectious laryngotracheitis virus. *Avian Pathology*, 2001, 30: 143 - 148
- [ 6 ] Poulsen DJ, Keeler CL Jr. Characterization of the assembly and processing of infectious laryngotracheitis virus glycoprotein B. *J Gen Virol*, 1997, 78(11): 2945 - 2951
- [ 7 ] Bagust JL, Johnson MA, Laryngotracheitis BW. Calnek (Ed.). *Disease of Poultry* [M] 10th ed. Iowa State University Press, Ames, IA, 1994, pp. 527 - 539
- [ 8 ] Alexander DJ. Newcastle disease and other avian Paramyxoviridae infection. B. W. Calne (Ed.). *Disease of poultry* [M] 10th ed. Iowa State University Press, Ames, IA, 1994, pp. 541 - 569
- [ 9 ] York JJ, Sonza S, Fahey KJ. Immunogenic glycoproteins of infectious laryngotracheitis herpesvirus. *Virology*, 1987, 161: 340 - 347
- [ 10 ] Boursnell MEG, Green PF, Campbell JIA *et al.* Insertion of the fusion gene of Newcastle disease virus into a non-essential region in the terminal repeats of fowlpox virus and demonstration of protective immunity induced by the recombinant. *J Gen Virol*, 1990, 71: 621 - 628
- [ 11 ] Taylor J, Christensen L, getting R *et al.* Efficacy of a recombinant fowlpox-based Newcastle disease virus vaccine candidate against veogenic and respiratory challenge. *Avian Dis*, 1996, 40: 173 - 180
- [ 12 ] Kiritani Y, Aoyama S, Takigami S *et al.* Antibody response to Newcastle disease virus (NDV) of recombinant fowlpox virus (FPV) expressing a Hemoagglutinin-neuraminidase of NDV into chickens in the presence of antibody to NDV or FPV. *Avian Dis*, 1991, 35: 659 - 661
- [ 13 ] Karaca K, Shama J M, Winalow BJ *et al.* Recombinant fowlpox viruses coexpressing chicken type I IFN and Newcastle disease virus HN and F genes; influence of IFN on protective efficacy and humoral responses of chickens following in ovo or post-hatch administration of recombinant viruses. *Vaccine*, 1998, 16(16): 1496 - 1503
- [ 14 ] Panshin A, Shihmanter E, Weisman Y *et al.* Variability of antigenic epitopes of the fusion protein of Newcastle Disease Virus. *Comp Immun Microbiol*, 1998, 21(1): 51 - 63
- [ 15 ] Xia ZP (夏志平), Jin NY (金宁一), Jin KS (金扩世) *et al.* Antigenicity and immunogenicity of a recombinant fowlpox virus expressing F gene of Newcastle disease virus and VPO gene of infectious Bursal Disease Virus. *Chinese Journal of Veterinary Science* (中国兽医学报), 2003, 23: 214 - 217

## Co-expression of Glycoprotein B (gB) of Infectious Laryngotracheitis Virus and Fusion Protein of Newcastle Disease Virus in a Recombinant Fowlpox Virus

ZHI Hai-Dong WANG Yun-Feng\* TONG Guang-Zhi\* WANG Mei ZHANG Shao-Jie

(National Key Laboratory of Veterinary Biotechnology, Harbin Veterinary Research Institute of Chinese Academy of Agricultural Science, Harbin 150001, China)

**Abstract** Fowlpox virus has been used as vector to successfully express protective immunogen genes of many avian virus, while co-expression immunogens from more virus was seldom reported. Based on the construction of a recombinant Fowlpox Virus expressing gB gene of Infectious Laryngotracheitis Virus (ILT) previously, a transfer vector containing F gene of Newcastle Disease Virus (NDV) and gB of ILTV was constructed, after transfection chicken embryo fibroblast (CEF) cells infected with FPV (S-FPV-017) by lipofectin method, recombinant FPV (designated as rFPV-gB-F) was screened by identifying blue plaques. gB and F gene inserted in the genome was identified by PCR, and expression of gB gene and F gene was detected by Western blotting and indirect immuno-fluorescence test. The results lay foundation for the development of tri-valent vaccine against ILT, ND and FP, and the immune potency of the recombinant virus needs further evaluation.

**Key words** Infectious Laryngotracheitis Virus (ILT), glycoprotein B (gB), Newcastle Disease Virus (NDV), fusion protein (F), Fowlpox Virus (FPV)

Received: 03-25-2004

This work was supported by Grants from National 863 Project (No. 2001AA213041).

\* Corresponding author. TONG Guang-Zhi Tel: 86-451-82734181; Fax: 86-451-82734181; E-mail: gzong@public.hr.hl.cn

WANG Yun-Feng Tel: 86-451-82510712; Fax: 86-451-82510712; E-mail: yfwang@hvri.ac.cn