

鸡新城疫病毒 HeB02 分离株 F 基因的克隆及其 DNA 疫苗的研究 Cloning of F Gene of Newcastle Disease Virus HeB02 Isolate and the Study of Its DNA Vaccine

李楠, 孙一敏, 赵宝华*

LI Nan, SUN Yi-Min and ZHAO Bao-Hua*

河北师范大学生命科学学院, 石家庄 050016

College of Life Science, Hebei Normal University, Shijiazhuang 050016, China

摘 要 根据 GenBank 报道的鸡新城疫病毒 F 基因序列设计了一对引物, 以鸡新城疫病毒 HeB02 分离株基因组为模板, 通过 RT-PCR 扩增出了 1.66kb 左右的 F 基因片段, 序列分析表明 HeB02 株 F 基因与国内标准强毒株 F48 E9 及弱毒疫苗 La Sota 和 Clone30 的 F 基因核苷酸序列的同源性分别为 88.1%、84.9% 和 83.8%。将 HeB02 株 F 基因插入真核表达载体 pVAX1 中, 构建了真核表达质粒 pSV-F, 通过脂质体转染 COS-7 细胞, SDS-PAGE 分析可见表达的特异蛋白条带; Western blot、ELISA 和中和试验检测结果表明: 真核表达的蛋白与抗新城疫病毒的抗体发生特异性反应, 说明 F 蛋白具有很好的免疫原性。采用活体电击法以真核表达质粒 pSV-F 免疫 3 周龄 SPF 鸡, 剂量为 50 μ g/只, 3 周后加强免疫 1 次, 5 周后以 100 倍鸡胚感染剂量 (EID) 的 F 基因同源病毒对所有鸡进行攻毒, 攻毒前后每周分别以喉拭子进行病毒分离和 HI 效价测定。结果显示对照组在攻毒前一直没有检测到抗体效价, 攻毒后检测效价为 3.0 log₂ \pm 1.40, 并且于攻毒后第 9 天全部死亡; 活疫苗组和实验组免疫后第 2 周检测到抗体效价, 第 5 周最高, HI 效价分别为 8.3 log₂ \pm 1.30 和 7.2 log₂ \pm 1.23, 攻毒 1 周后 HI 效价分别达 9.8 log₂ \pm 1.55 和 8.9 log₂ \pm 1.77, 极显著高于对照组 ($P < 0.01$)。免疫组未分离到新城疫病毒, 对照组全部分离到新城疫病毒。表明所构建的 F 基因真核表达质粒可作为候选基因疫苗诱导鸡产生免疫保护反应。

关键词 新城疫病毒, F 基因, 克隆和表达, DNA 疫苗

中图分类号 Q785 文献标识码 A 文章编号 1000-3061(2006)03-0445-06

Abstract In order to amplify F gene of NDV HeB02 strain, one pair of primers was designed according to the GenBank sequence, and a 1.66 kb F gene fragment was obtained by RT-PCR. Sequence analysis indicated that the homologies of the nucleotide sequence of HeB02 strain to those of F48 E9, La Sota and Clone30 strains were 88.1%, 84.9% and 83.8% respectively. The expression plasmid pSV-F was constructed by inserting the F gene into the pVAX1 vector, and transfected into the cultured COS 7 cell line via liposomes. The specific 5.9 kD protein was detected by SDS-PAGE and the immunogenicity of the expressed F protein was confirmed by Western blot, ELISA and neutralization test. 3 week-old SPF chickens were subcutaneously immunized twice at week 0 and 3 with 50 μ g DNA of plasmid pSV-F by electroporation. 5 weeks later, all chickens were challenged with 100 \times EID₅₀ of NDV HeB02 strain, 1 week post challenge all chickens were sampled by larynx swabbing to isolate virus and the HI level of NDV was measured. The results indicated that the virus isolation was negative in all vaccinated chickens and positive in all control chickens. The HI titres reached to 8.3 log₂ \pm 1.30 and 7.2 log₂ \pm 1.23 induced by NDV vaccine and positive cells (pSV-F), respectively, the HI titres induced by Control cells (pVAX1) was not detected.

Received: November 16, 2005; Accepted: January 23, 2006.

This work was supported by a grant from Hebei Natural Science Fund (No. 2004000154).

* Corresponding author. Tel: 86-311-6268434; E-mail: zhaobaohua86178@sohu.com

河北省自然科学基金资助 (No. 2004000154).

Furthermore, the HI titres reached to $9.8\log_2 \pm 1.55$ and $8.9\log_2 \pm 1.77$ in vaccinated group with NDV vaccine and positive cells (pSV-F), respectively, were significantly higher than that of the control cells (pVAX1) immunized group (HI titers was $3.0\log_2 \pm 1.40$, $P < 0.01$) after challenge. These results showed that the plasmid pSV-F could be as a candidate of DNA vaccine to provide protective immune response against NDV infection.

Key words Newcastle disease virus (NDV), F gene, DNA vaccine

鸡新城疫是由鸡新城疫病毒 (Newcastle disease virus, NDV) 引起的一种急性败血性传染病, NDV 属于副粘病毒科, 副粘病毒亚科, 腮腺炎病毒属, 是一种含囊膜的负链 RNA 病毒^[1]。自 1926 年首次爆发于印度尼西亚的爪哇和英国的新城以来, 新城疫曾有过三次大规模的流行, 目前该病已经传播到全世界的许多国家和地区, 一直是严重危害养鸡业发展的主要禽病之一^[2]。

目前防治新城疫的有效方法仍是疫苗接种, 国内外用于防治鸡新城疫的弱毒疫苗存在以下缺点: 毒力普遍偏强, 弱毒疫苗和强毒一样也能导致潜伏感染, 疫苗免疫不能阻止继发的强毒感染, 免疫鸡常成为潜在的传染源。而灭活苗又存在免疫效果差、成本高等缺点, 同时这些疫苗的使用还会影响 NDV 疫情的监测^[3]。因此采用传统的方法很难控制和消灭该病, 加大新城疫新型疫苗的研发力度乃新城疫防制的当务之急。

对 NDV 分子生物学的研究表明, 该病毒基因组是负单链 RNA, 全长 15 156 个核苷酸, 整个基因组为单一开放阅读框, 95% 以上是编码区, 共编码 6 种结构蛋白, 这 6 种蛋白根据分布可分为内部蛋白和外部蛋白。前者包括: 核衣壳蛋白 (Nucleocapsid protein, N)、磷酸化蛋白 (Phosphate protein, P)、高分子量的 RNA 聚合酶 (Large protein, L); 后者包括: 血凝素-神经氨酸酶蛋白 (Haemagglutinin-neuraminidase protein, HN)、融合蛋白 (Fusion protein, F) 及基质蛋白 (Matrix, M)^[4]。其中 N, P, L 三种蛋白在功能上相互促进, 共同参与病毒 RNA 的复制和转录, 形成有活性的 mRNA。HN 和 F 为两种糖基化形式蛋白, 是 NDV 重要的免疫原成分。其中 F 蛋白是该病毒的主要保护性抗原成分, 可以作为研制亚单位疫苗、活载体疫苗和 DNA 疫苗的候选抗原^[5]。

从上世纪 80 年代末开始国内外许多研究室采用重组 DNA 研制 ND 基因工程疫苗, 在亚单位疫苗、活载体疫苗和 DNA 疫苗方面进行了探索^[6]。如 NDV BI Hitchnel 株、Miyadera 株、D26 株的 HN 和 F 基因已经在杆状病毒系统中表达并制备 NDV 亚单位疫苗^[7], 近年来, NDV 基因工程疫苗的研制热点转

向以采用病毒或细菌为载体的活疫苗技术路线^[8], 经过实验, 这些重组体作为疫苗是有效的, 兼有活疫苗和亚单位疫苗的特点, 可成功地诱导各种形式的免疫应答^[9]。核酸疫苗 (Nucleic acid vaccine), 又称基因疫苗 (gene vaccine), 是将编码某种抗原蛋白的外源基因 (DNA 或 RNA) 直接导入动物体细胞内, 通过宿主细胞的转录系统合成抗原蛋白, 并诱导宿主产生对该抗原蛋白的免疫应答, 以达到预防和治疗疾病的目的^[10]。由于核酸疫苗可诱导机体产生全面的免疫应答, 并且对不同亚型的病原体具有交叉防御作用, 同时具有安全、可靠、生产方便等优点, 故被认为是继减毒活疫苗、灭活疫苗和基因工程亚单位疫苗之后的第三代疫苗^[11]。本研究克隆了 NDV HeB02 分离株的 F 基因, 构建了 F 基因真核表达质粒 pSV-F, 并对其作为候选基因疫苗的免疫保护性进行了初步研究。

1 材料与方法

1.1 材料

新城疫病毒 HeB02 株: 分离于河北省衡水某鸡场 30 日龄左右的发病鸡群, 由河北农业大学动物科技学院分离鉴定和保存, pVAX1 质粒和 COS-1 细胞由清华大学何宏轩博士后惠赠。新城疫病毒标准强毒株 F48E9 购自中国兽药监察所, La Sota 株标准阳性血清和 SPF 鸡胚由辽宁省益康生物制品厂提供; DNA 凝胶回收纯化 Kit 购自 Promega 公司; AMV Rnasin, dNTP, Taq 酶, 蛋白酶 K, 分子量标准 DL2000 和低分子量标准蛋白, 限制性内切酶等购自 TaKaRa 公司; TRIZOL LS Reagent 购自 Gibco 公司。RPMI 1640 培养基干粉购自 Hyclone 公司, 阳离子脂质体 Lipofectin Reagent 购自 Invitrogen 公司; 标准胎牛血清购于杭州四季青生物工程技术公司。

1.2 方法

1.2.1 NDV HeB02 分离株 F 基因的克隆与序列分析: 根据 GenBank 公布的 NDV La Sota 基因组全序列而设计一对引物 P1 和 P2, P1 和 P2 的 5' 端分别加有 BamH I 和 Kpn I 的识别序列, 跨幅为 1.63kb, 引物序列见表 1。

表 1 PCR 扩增所用的引物及其序列

Table 1 Primer sequences used for the PCR amplification

Construct	Primer sequence
P1	5'-CGGGATCCTGGCCCCAAATCTTCTACCCAG-3'
P2	5'-CGGGGTACCCAGATTGTAGTGGCCCTCA-3'

取出冻干保存的 NDV HeB02 分离株,用生理盐水作 100 倍稀释,以 0.1mL/枚蛋的注射量逐个注入 SPF 鸡胚中,于 37℃ 培养,保持一定湿度,取 36h 存活的鸡胚于 4℃ 冰箱过夜,冻死鸡胚。在无菌条件下收集尿囊液于无菌瓶中并做无菌检验。按 Gibco 公司试剂盒说明,从尿囊液中提取 RNA。将沉淀抽干的 RNA 溶于 10 μ L DEPC 水中,加入下游引物 P2 1.5 μ L,70℃ 水浴 10min,立即冰浴 5min,然后依次加入 5 \times Buffer 4.0 μ L, Rnasin 1.5 μ L, dNTP 2.0 μ L, AMV 1.0 μ L,轻轻弹匀,瞬时离心,42℃ 1h,96℃ 10min,4℃ 5min。瞬时离心后,立即进行 PCR 反应。PCR 反应在 50 μ L 体系中进行,10 \times Buffer 5.0 μ L, dNTP 4.0 μ L, P1 1 μ L, cDNA 8 μ L, ddH₂O 32.3 μ L,95℃ 5min 后,冰浴 2min,再加 Taq 酶 0.7 μ L,混匀后按下列条件 PCR 扩增:94℃ 1min,46℃ 1min,72℃ 3min,30 个循环,再 72℃ 延伸 10min。将 RT-PCR 扩增的 F 基因与 pGEM-T 载体连接,转化受体菌 JM109,提取质粒后进行酶切鉴定,重组质粒命名为 pST-F。将含 F 基因片段的重组质粒 pST-F 送大连宝生物工程公司进行序列测定;采用 DNA Star 序列分析软件将 HeB02 株 F 基因与国内部分参考毒株进行核苷酸序列同源性分析。

1.2.2 NDV HeB02 分离株 F 基因真核表达质粒的构建与大量制备:重组质粒 pST-F 和 pVAX1 载体分别用 *Bam*H I 和 *Kpn* I 双酶切后,得到 1.66kb 的 F 基因片段和 pVAX1 载体的线性片段,将 F 基因片段与 pVAX1 载体的线性片段进行连接,转化受体菌 Top10,提取质粒用 *Bam*H I 和 *Kpn* I 酶切鉴定,获得阳性重组表达质粒 pSV-F,按分子克隆有关方法进行重组质粒的大量制备。

1.2.3 NDV HeB02 分离株 F 基因在 COS-7 细胞中的表达:首先采用 RPMI 1640 培养基,于 37℃,5% 的 CO₂ 条件下培养 COS-7;然后分别大量提取质粒 pVAX1(空载体)和 pSV-F(重组质粒),采用 Lipofectin Reagent 转染试剂盒,按试剂盒操作说明将上述 2 种无任何降解的质粒 DNA 经脂质体包裹后分别转染细胞。参照文献[12],采用 SDS-PAGE 和 Western blotting 分析 F 基因的表达情况。

1.2.4 NDV HeB02 分离株 F 基因表达产物的免疫

原性分析:首先分别将适量转染细胞培养上清和细胞裂解液进行间接 ELISA 检测。用收集的上清和细胞裂解液作为抗原包被后,用 1:200 稀释的 NDV F₃₈ E₉ 株多克隆血清(一抗)作用 1h,再与 1:600 稀释的兔抗鸡酶标抗体(二抗)作用 1h,加底物显色液测 OD₄₉₀ 值。然后用表达产物免疫 SPF 鸡,制备免疫血清,将待测鸡血清 8 倍稀释,与 100 EID₅₀ NDV 病毒等体积混合、摇匀,于 20~25℃ 作用 1h,接种无 NDV 抗体的敏感鸡胚 6 个,每胚 0.2mL,同时设病毒对照和正常对照,在 37℃ 继续孵育,观察至 144h,观察出现典型病变或死亡情况。

1.2.5 NDV HeB02 分离株 F 基因表达产物的动物免疫试验:30 只 3 周龄 SPF 鸡分为 3 组(活疫苗组、实验组和对照组),每组 10 只。活疫苗组用微量注射器将相应剂量的鸡新城疫活疫苗注入每只鸡的右腿内侧。实验组采用活体电击法注射阳性重组质粒,首先用微量注射器将 50 μ g pSV-F 注入每只鸡的右腿内侧,然后将电转基因仪(ECM830, BTX, America)2 根探针插入每只鸡的右腿内侧,覆盖住肌肉注射处进行电击。电击条件为 200V/cm,脉冲时间 40ms,脉冲个数 8 个(+4, -4)频率 1Hz,电击针的长度为 5 mm,两根针的距离为 5 mm。对照组采用电击法,每羽腿肌注射 50 μ g pVAX1 空质粒,免疫当天及免疫后每隔 5 天对所有鸡翅静脉采血 1 次,分离血清,用 HI 检测血清中抗体效价。3 周后加强免疫 1 次,免疫 5 周后,用 100 倍 EID₅₀ 的 F 基因同源病毒对所有鸡以滴鼻途径攻毒。攻毒前后每周喉拭子采集样品,经鸡胚尿囊腔繁殖后,采用血凝试验和 RT-PCR 检测病毒。

2 结果

2.1 NDV HeB02 分离株 F 基因的 RT-PCR 扩增结果

从图 1 可以看出,RT-PCR 扩增的 F 基因片段为 1.66kb,与实验设计相符。

2.2 NDV HeB02 分离株 F 基因重组质粒的酶切鉴定

将 F 基因与 pGEM-T 载体连接,转化受体菌 JM109,提取质粒后进行双酶切鉴定(见图 2),可以看出 *Bam*H I 和 *Kpn* I 双酶切后得到了 1.66kb 片段,表明获得了 HeB02 分离株 F 基因的重组质粒,阳性重组质粒命名为 pST-F。

2.3 NDV HeB02 分离株 F 基因的序列测定及与参考毒株的同源性分析

pST-F 中 F 基因大小为 1 662bp,为完整的 F 基

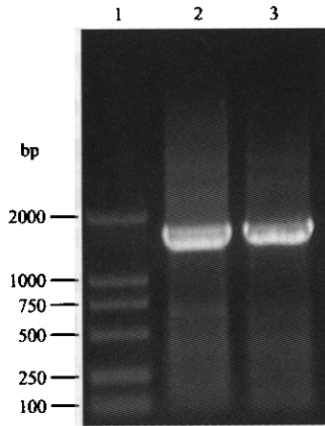


图1 NDV HeB02 分离株 F 基因的 RT-PCR 扩增结果

Fig.1 Amplification of F gene from NDV HeB02 isolate by RT-PCR

1: DNA marker DL2000; 2,3: the amplified F product of NDV HeB02 isolate by RT-PCR.

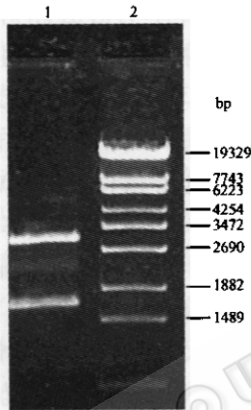


图2 重组质粒 pST-F 的酶切鉴定

Fig.2 Identification of recombinant plasmid pST-F

1: pST-F/*Bam*H I + *Kpn* I ; 2: λ -EcoT14 I digest fragment.

因序列,该基因已在 GenBank 登录,申请得到国际基因库接受号 (Accession No: AY427817)。应用 DNA Star 分析软件将 HeB02 分离株的 F 基因与 F48 E9 (AJ629062), La Sota (AY727881) 和 Clone30 (AY727882) 3 个参考毒株的 F 基因进行同源性分析,结果表明,HeB02 株 F 基因与国内标准强毒株 F48 E9 及弱毒疫苗 La Sota 和 Clone30 的 F 基因核苷酸序列的同源性分别为 88.1%、84.9% 和 83.8%。

2.4 重组表达质粒 pSV-F 的构建与鉴定

用 *Kpn* I 和 *Bam*H I 双酶切目的片段和载体,分别回收后将二者连接,转化至受体菌 DH5 α ,提取质粒进行酶切鉴定(图3),可以看出 *Kpn* I 和 *Bam*H I 双酶切后得到 2 个片段,即 3.0kb 左右的 pVAX1 载体片段和 1.66kb 的目的基因片段,表明获得了 F 基因的重组表达质粒 pSV-F。

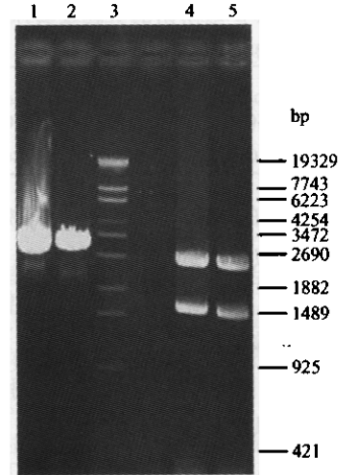


图3 重组表达质粒 pSV-F 酶切鉴定

Fig.3 The identification of recombinant plasmid pSV-F

1: pSV-F/*Bam*H I ; 2: pSV-F/*Kpn* I ; 3: λ -EcoT14 I fragment; 4,5: pSV-F/*Bam*H I + *Kpn* I .

2.5 表达产物的 SDS-PAGE 和 Western blot 分析

经 SDS-PAGE,比较蛋白条带,发现含阳性重组质粒 pSV-F 的 COS-7 细胞裂解物中有一明显的约为 59kD 的蛋白条带,大小与 F 蛋白的理论值相符合,而含空质粒 pVAX1 的细胞裂解物中未见此蛋白条带(见图4)。将分离的蛋白转印到 NC 膜上,用 NDV F48E9 株多抗血清进行 Western blot 检测,结果也显示含阳性重组质粒 pSV-F 的细胞裂解物中有约为 59kD 的显色条带(见图5)。

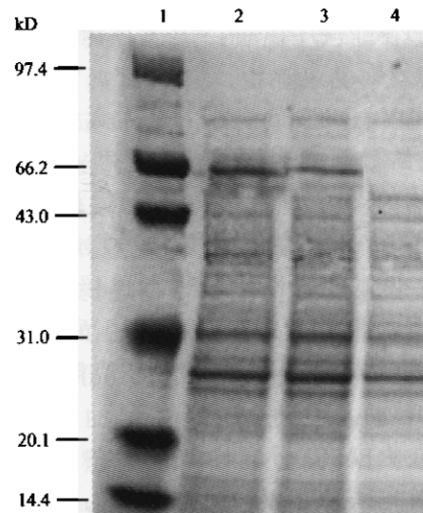


图4 表达产物的 SDS-PAGE 分析

Fig.4 SDS-PAGE analysis of expressed products in COS-7 cells

1: protein marker; 2,3: cell lysate of pSV-F; 4: cell lysate of pVAX1.

2.6 表达产物 ELISA 检测结果

转染后得到阳性细胞克隆和对照细胞,经扩大培养后,分别收集细胞培养上清和制备细胞裂解物,

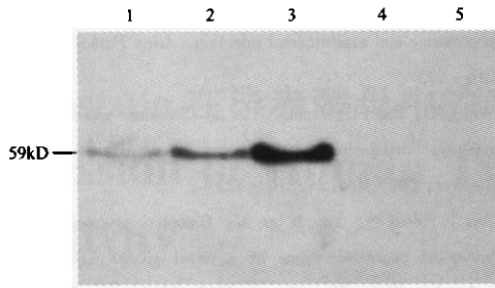


图 5 表达产物的 Western blot 分析

Fig. 5 Western blot analysis of expressed products in COS-7 cells
1: cell lysate of pSV-F (10 μ l); 2: cell lysate of pSV-F (20 μ l); 3. positive control; 4: cell lysate of pVAX1.

进行 ELISA 检测(见表 2)。可以看出阳性克隆的细胞裂解物和上清中 OD_{490} 值较高,而对照细胞裂解物和上清 OD_{490} 值均在 0.2 以下,进一步说明重组质粒

pSV-F 在细胞中得到表达并具有较好的抗原性。

表 2 表达蛋白的 ELISA 检测结果

	COS-7 cells/pSV-F		COS-7 cells/pVAX1 (control)	
	Lysate	Supernatant	Lysate	Supernatant
OD_{490}	0.69 \pm 0.11	0.46 \pm 0.08	0.12 \pm 0.05	0.15 \pm 0.07

2.7 鸡胚中和试验

参照方法 1.2.5 用 NDV 活疫苗和培养细胞裂解物分别免疫 SPF 鸡,制备免疫鸡血清,将待测鸡血清 8 倍稀释,与 100EID50 病毒量等体积混合、摇匀,于 20 ~ 25 $^{\circ}$ C 作用 1h,接种无 NDV 抗体的敏感鸡胚 10 个,每胚 0.2mL,同时设病毒对照和正常对照,在 37 $^{\circ}$ C 继续孵育,观察至 144h,结果如表 3 所示,活疫苗和实验组全部健活,没有出现病变,含空质粒对照组 100% 出现典型病变或死亡。

表 3 重组细胞株的鸡胚中和试验

Table 3 Neutralization test of recombinant cell strain for chick embryo

Groups	Inoculated embryos (number)	Observation time/d	Abnormal embryos/total embryos
Sera immunized with NDV vaccine	10	6	0/10
Sera immunized with lysate of positive cells(pSV-F)	10	6	10/10
Sera immunized with lysate of control cells(pVAX1)	10	6	0/10

2.8 动物免疫保护试验

活疫苗组用微量注射器将相应剂量的鸡新城疫活疫苗注入每只鸡的右腿内侧。实验组采用活体电击法注射阳性重组质粒 pSV-F,对照组采用活体电击法注射空质粒 pVAX1 50 μ g,免疫当天及免疫后每隔 5 天对所有鸡翅静脉采血 1 次,分离血清,用 HI 检测血清中抗体效价,5 周后采用滴鼻法攻毒,攻毒前后每周喉拭子采集样品,经鸡胚尿囊腔繁殖后,采用血凝试验和 RT-PCR 检测病毒,结果如表 4 所示。对照组在攻毒前一直没有检测到抗体效价,攻毒后

检测效价为 3.0 $\log_2 \pm 1.40$,并且于攻毒后第 9 天全部死亡;活疫苗组和实验组免疫后第 2 周检测到抗体效价,第 5 周最高,HI 效价分别为 8.3 $\log_2 \pm 1.30$ 和 7.2 $\log_2 \pm 1.23$,攻毒后 HI 效价分别达 9.8 $\log_2 \pm 1.55$ 和 8.9 $\log_2 \pm 1.77$,极显著高于对照组 ($P < 0.01$),并且没有死亡。活疫苗组和实验组均未分离到病毒,而对照组全部分离到病毒。表明活疫苗组和实验组鸡获得了对攻毒的完全保护,对照组则完全未被保护。

表 4 鸡新城疫抗体 HI 效价测定结果

Table 4 Detection of Newcastle disease HI titers after immunity

Groups	Antigen immunized	Geometric mean HI titers ($\log_2 \pm SD$) of 1st immunization			Geometric mean HI titers ($\log_2 \pm SD$) of 2nd immunization	
		2week	3week	4week	5week	6week
		1	NDV vaccine	5.9 \pm 1.64	6.3 \pm 1.23	7.7 \pm 1.25
2	Positive cells(pSV-F)	3.7 \pm 2.14	5.1 \pm 0.83	6.9 \pm 2.03	7.2 \pm 1.23	8.9 \pm 1.77
3	Control cells (pVAX1)	-	-	-	-	3.0 \pm 1.40

3 讨论

新城疫病毒 HeB02 分离株为本研究室从河北省衡水市某鸡场发病鸡群中分离所得,通过病毒的形态结构、生物学特性分析证实所分离的 HeB02 毒

株为 NDV 强毒株^[13]。本研究首先根据已发表的 NDV F 基因核苷酸序列设计一对引物,采用 RT-PCR 对 HeB02 毒株进行 PCR 扩增,并将其克隆到 pGEM-T 载体上,通过酶切鉴定得到阳性重组质粒 pST-F,核苷酸序列分析的结果表明获得了 1 662bp 的 F 基

因片段,它是一完整的开放阅读框,HeB02株与国内标准强毒株F48 E9及目前广泛应用的弱毒疫苗La Sota和Clone30的F基因核苷酸序列的同源性分别为88.1%、84.9%和83.8%,由此可以看出HeB02分离株与标准毒株和疫苗株在F基因上有较高的同源性,这为研制其基因工程疫苗提供了理想的基因材料,同时也为疾病新的诊断与防治方法的研究打下了坚实的基础。了解该毒株的变异情况,可以有针对性地防治本病毒疫情的蔓延,并为其提供可靠的理论指导。

目前使用疫苗预防鸡新城疫最大的问题是疫苗的免疫期短;其次当有母源抗体存在时,许多疫苗的免疫效果会受到干扰,而DNA疫苗可以克服以上两种缺陷^[14]。DNA疫苗不仅可诱导体液免疫应答,而且还可诱导细胞免疫应答,并兼有亚单位苗的安全性和弱毒疫苗的高效性,已经成为国际疫苗研究领域最热门的课题之一。在NDV疫苗的研究方面,日本学者Sakaguchi等将NDV F基因插入质粒载体,一周龄试验鸡肌肉内注射重组质粒后,产生了高水平针对F蛋白的抗体,但由于使用的是裸质粒DNA免疫,鸡体内免疫效果较差,可能的原因是构建的真核表达质粒在机体内降解降低了机体细胞对质粒的摄取量^[15]。本研究成功构建了含F基因编码序列的真核表达质粒pSV-F,并采用脂质体包裹质粒DNA的方法进行动物免疫,实验结果表明:本研究所构建的F基因表达质粒采用脂质体包裹法转染后可诱导鸡对同源病毒的攻击产生确实的免疫保护,展示了基因疫苗诱人的应用前景。推测其原因:一是脂质体包裹质粒DNA后,可使质粒DNA免受机体细胞内核酸酶的降解;二是脂质体与受体细胞结合可促进质粒DNA被机体细胞吸收,其中关键的环节之一是脂质体进入细胞并在细胞内释放。然而有关其转入细胞内的机制目前尚不清楚,需要进一步研究。

REFERENCES (参考文献)

- [1] Yang Cheng-Yao, Shieh Happy K, Lin Yeou-Liang. Newcastle disease virus isolated from recent outbreaks in Taiwan phylogenetically related to viruses (Genotype VI) from recent outbreaks in Western Europe. *Avian Diseases*, 1999, 43(1): 125 - 130
- [2] Wan H, Chen L, Wu L *et al.* Newcastle disease in geese: natural occurrence and experimental infection. *Avian Pathol*, 2004, 33(2): 216 - 221
- [3] Wang XJ, Bai YD, Zhang Gz *et al.* Structure and function study of paramyxovirus fusion protein heptad repeat peptides. *Arch Biochem Biophys*, 2005, 436(2): 316 - 322
- [4] Zou J, Shan S, Yao N *et al.* Complete genome sequence and biological characterizations of a novel goose paramyxovirus-SF02 isolated in China. *Virus Genes*, 2005, 30(1): 13 - 21
- [5] Lee YJ, Sung HW, Choi JG *et al.* Molecular epidemiology of Newcastle disease viruses isolated in South Korea using sequencing of the fusion protein cleavage site region and phylogenetic relationships. *Avian Pathol*, 2004, 33(5): 482 - 491
- [6] Senne DA, King DJ, Kapczynski DR. Control of Newcastle disease by vaccination. *Dev Biol*, 2004, 119: 165 - 170
- [7] Li J, Quinlan E, Mirza A *et al.* Unrelated form of the Newcastle disease virus hemagglutinin-neuraminidase interacts with the homologous fusion protein despite deficiencies in both receptor recognition and fusion promotion. *J Virol*, 2004, 78(10): 5299 - 5310
- [8] Kho CL, Tan WS, Tey BT *et al.* Regions on nucleocapsid protein of Newcastle disease virus that interact with its phosphoprotein. *Arch Virol*, 2004, 149(5): 997 - 1005
- [9] Peroulis I, O' Riley K. Detection of avian paramyxoviruses and influenza viruses amongst wild bird populations in Victoria. *Aust Vet J*, 2004, 82(1-2): 79 - 82
- [10] Huang Z, Panda A, Elankumaran S *et al.* The hemagglutinin-neuraminidase protein of Newcastle disease virus determines tropism and virulence. *J Virol*, 2004, 78(8): 4176 - 4184
- [11] Mori AH, Tawara H, Nakazawa H. Expression of the NDV fusion glycoprotein and vaccination against NDV challenge with a recombinant baculovirus. *Avian Dis*, 1994, 38: 772 - 777
- [12] Seal BS, Wise MG, Pedersen JC *et al.* Genomic sequences of low-virulence avian paramyxovirus-1 (Newcastle disease virus) isolates obtained from live-bird markets in North America not related to commonly utilized commercial vaccine strains. *Vet Microbiol*, 2005, 106(1-2): 7 - 16
- [13] Sun YM(孙一敏), Yu XJ(于秀俊), Zhao BH(赵宝华). The biological characteristics of NDV HeB02 isolate and its gene cloning and sequence analysis. *Microbiology(微生物学通报)*, 2004, 31(4): 5 - 8
- [14] Bournsnel MEG, Green PF, Samson ACR *et al.* A recombinant fowl pox virus expressing the HN gene of NDV protects chickens against challenge by NDV. *Virology*, 2000, 178: 297 - 300
- [15] Sakaguchi T, Toyoda T, Gotoh B *et al.* Newcastle disease virus evolution I, Multiple lineages defined by sequence variability of the hemagglutinin-neuraminidase gene. *Virology*, 1999, 169: 260 - 272