

表达鸡新城疫病毒 F、HN 基因和传染性喉气管炎病毒 gB 基因的重组鸡痘病毒的构建及其特性研究

Construction and Characterization of a Recombinant Fowlpox Virus Co-expressing F , HN Genes of Newcastle Disease Virus and gB Gene of Infectious Laryngotracheitis Virus

孙惠玲^{1 2 3}, 王云峰², 苗得园³, 张培君³, 智海东², 徐灵龙², 王 玫², 童光志^{1 2 *}, 汪 明^{1 *}

SUN Hui-Ling^{1 2 3}, WANG Yun-Feng², MIAO De-Yuan³, ZHANG Pei-Jun³, ZHI Hai-Dong², XU Ling-Long², WANG Mei², TONG Guang-Zhi^{1 2 *} and WANG Ming^{1 *}

1 中国农业大学动物医学院 北京 100094

2 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

3 北京市农业科学院畜牧兽医研究所 北京 100094

1 College of Veterinary Medicine, China Agricultural University, Beijing 100094, China

2 National Key Laboratory of Veterinary Biotechnology, Harbin Veterinary Research Institute, CAAS, Harbin 150001, China

3 Institute for Animal Husbandry and Veterinary Science, Beijing Academy of Agriculture and Forestry Science, Beijing 100089, China

摘 要 利用同源重组将新城疫病毒(NDV)的 F 和 HN 基因、传染性喉气管炎病毒(ILTV)的 gB 基因以及报告基因 LacZ 插入鸡痘病毒(FPV)的 017 株的复制非必需区,其中 NDV 的 F、HN 基因、ILTV 的 gB 基因以及报告基因 LacZ 是在早晚期启动子 LP2EP2 的控制下,大肠杆菌报告基因 LacZ 在晚期启动子 P11 的控制下。经过 10 轮蓝斑纯化获得了包含了 NDV 的 F 和 HN 基因、ILTV 的 gB 基因以及报告基因 LacZ 的重组鸡痘病毒,称为 rFPV-F/HN/gB/LacZ。经 PCR 方法证明 rFPV-F/HN/gB/LacZ 基因组中含有 NDV 的 F 基因、HN 基因和 ILTVgB 基因,间接免疫荧光试验和 Western-blot 试验表明 NDV 的 F、HN 蛋白和 ILTV gB 蛋白在 rFPV-F/HN/gB/LacZ 感染的 CEF 细胞中获得表达。与亲本毒相比,重组病毒在病毒的复制和致鸡胚成纤维细胞的病变方面无显著不同。这证明了在鸡痘病毒载体的一个复制非必需区可以同时插入多个禽类病原的多个外源基因,为制备多价基因工程疫苗奠定了基础。

关键词 重组鸡痘病毒,新城疫病毒,传染性喉气管炎病毒,F 基因,HN 基因,gB 基因

中图分类号 Q78 文献标识码 A 文章编号 1000-3061(2006)06-0931-09

Abstract The Fusion (F) and Haemagglutinin-Neuraminidase (HN) genes of Newcastle disease virus (NDV) and the glycoprotein B (gB) gene of infectious laryngotracheitis virus (ILTV) as well as a LacZ reporter gene were all inserted into a nonessential gene of fowlpox virus (FPV) 017 strain by homologous recombination. The NDV and ILTV genes were each under the control of a fowlpox virus immediate early/late promoter (LP2EP2) while the LacZ reporter gene expression cassette was

Received: April 10, 2006; Accepted: June 19, 2006.

This work was supported by The National High-Tech Program(863 Plan X No. 2001AA213041) and Beijing Science & Technology Program(No. H030730011030).

Corresponding author. Tel: 86-451-85935004; E-mail: gztong@hvri.ac.cn (Tong Guang-Zhi); wetdean@cau.edu.cn (Wang Ming)

国家高技术研究与发展计划项目(No. 2001AA213041)和北京市科技计划项目(No. H030730011030)资助。联合编辑部 <http://journals.im.ac.cn>

regulated by a P11 late promoter. A recombinant FPV harboring the F, HN and gB genes as well as the LacZ gene, designated as rFPV-F/HN/gB/LacZ, was obtained after ten cycles of blue plaque purification. The presence of the NDV and ILTV genes was confirmed by PCR. The expression of the recombinant proteins in rFPV-F/HN/gB/LacZ were characterized by Western blot (F and gB proteins) and indirect immunofluorescence test (F, HN and gB proteins). The results demonstrated that all four foreign proteins, which were encoded within a 10kb gene fragment, could be expressed authentically and efficiently. Compared to the parental virus, rFPV-F/HN/gB/LacZ showed no obvious difference with respect to virus replication and cytopathogenic effects in chicken embryo fibroblasts (CEF) cell culture. Overall, our work suggests that FPV can be a useful live virus vector for the expression of multi-foreign genes against multiple avian pathogens.

Key words recombinant fowlpox virus, Newcastle disease virus, infectious laryngotracheitis virus, F gene; HN gene, gB gene

随着集约化养殖的发展,禽类呼吸道疾病的危害变得愈加严重,新城疫、禽流感、传染性支气管炎和传染性喉气管炎等对养禽业造成了巨大损失,严重制约养禽业乃至国民经济的发展。尽管传统方法制备的疫苗在疾病的控制上曾经发挥重要的作用,但随着疾病根除计划的进行,需要用新型疫苗来替代常规疫苗。

新城疫是一种引起家禽以呼吸道、消化道黏膜出血为典型病变的急性、接触性传染病。目前典型新城疫已得到控制,但在免疫鸡群中常有非典型新城疫的存在,虽然致死率不高,但影响鸡群的生产性能及经济价值。NDV毒株间的毒力和抗原决定簇差异,导致常规疫苗的免疫原性虽然很好,但激发机体免疫活性不均衡,造成新城疫防治不彻底的局面。NDV的两个主要的成分——融合蛋白(Fusion, F)和血凝素-神经氨酸酶(Haemagglutinin-Neuraminidase, 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,都是新型基因工程疫苗的候选对象。传染性喉气管炎(ILT)是鸡的一种急性上呼吸道接触性传染病,对养禽业的危害严重。目前ILT的控制主要采用弱毒疫苗,但ILT弱毒疫苗存在以下缺点:(1)毒力普遍偏强;(2)弱毒疫苗和强毒一样也能导致潜伏感染;(3)无法通过现用的方法鉴别强弱毒感染^[1-3]。因此,研究表达ILTV主要免疫蛋白的活病毒载体疫苗就显得更为迫切。glycoprotein B(gB)基因编码ILTV的主要保护性抗原,该蛋白是病毒感染所必需的,与病毒吸附和穿入细胞有关,能诱导体液免疫和细胞介导的免疫应答,高度保守,经序列比较可确定各种疱疹病毒之间的进化关系。gB也因此成为构建ILTV亚单位疫苗及其它基因工程疫苗必须包含的成分^[4-6]。

禽痘病毒具备痘苗病毒的生物学特性,因此禽痘病毒表达系统是继痘苗病毒表达系统之后开发的另外的一个痘病毒表达系统。禽痘载体病毒具有活的弱毒疫苗的一切优点,而且也具有自己的独特优势,是动物基因工程疫苗研究中最有发展前途的领域。近10年来已经取得了许多可喜的进展,用禽痘病毒作为研制活载体病毒疫苗,具有巨大的开发潜力。许多学者已经用禽痘病毒载体表达几种禽病病原的保护性抗原基因,并且大多数获得表达的外源基因也提供了特异性的保护作用。

禽痘病毒载体的构建及应用研究取得了可喜的进展,但仍存在不少问题有待解决。首先,随着禽痘病毒载体重组病毒研究的深入,活载体的应用也就渐渐暴露出了一些缺陷:国内外市场上的痘病毒载体疫苗多数是针对单一病原的主要保护性基因,体内针对痘病毒产生的抗体的存在,无论是在免前还是免后,都会对再次使用同一载体的疫苗产生一定的影响,降低它的免疫效果。为此,设计了本试验,将F48E9株新城疫病毒(NDV)的F基因、HN基因和传染性喉气管炎病毒(ILTV)的gB基因以及筛选标记LacZ基因同时插入到鸡痘病毒(FPV)S-FPV-017的复制非必需区,构建三价重组病毒。以达到一针多防的目的,并且通过实验验证在鸡痘病毒载体的一个复制非必需区插入多个外源基因的可行性和表达上的稳定性。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 病毒株 :FPV017疫苗株由美国California大学Davis分校Yilma教授惠赠。NDV F48E9株源自中国兽药监察所。ILTV WG株为本实验室分离、鉴定并保存。

1.1.2 质粒 :克隆载体pSY681和pSY538是一对禽痘病毒的同源载体,由美国California大学Davis分校

校 Yilma 教授惠赠。pSY781 由本实验室构建^[7],该质粒含有鸡痘病毒早晚期启动子 LP2EP2 下的 gB 和 P11 启动子之下的 LacZ 基因,pSY538LPF 由智海东博士构建^[8],该质粒含有启动子 LP2EP2 下的 F 基因。

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

1.1.4 工具酶和试剂:TRIzol RNA 提取试剂盒购自 Gibco 公司;AMV Reverse Transcriptase XL、限制酶和 Taq DNA 聚合酶等购自宝生物工程(大连)有限公司;质粒纯化试剂盒 Wizard^R Purification Plasmid 购自 Promega 公司;Lipofectamine PlusTM 试剂盒和 DMEM 细胞培养试剂购自 Gibco 公司。F 基因的真核表达质粒免疫小鼠血清和兔抗 gB 蛋白血清由本实验室保存,HN 单抗由扬州大学刘秀梵教授惠赠。

1.2 方法

1.2.1 NDV 的 HN 基因扩增:

(1)新城疫病毒 F48E9 株的 cDNA 的合成:将新城疫病毒 F48E9 株接种于 9 日龄 SPF 鸡胚增殖。收集 24h 后死亡的鸡胚尿囊液。用 TRIzol RNA 提取试剂盒按照试剂盒说明书从尿囊液中提取 NDV 的总 RNA。参照 AMV Reverse Transcriptase 说明书进行,用随机引物作为反转录引物进行反转录合成 cDNA。反转录反应条件为:25℃ 10min,42℃ 1h,75℃ 15min。

(2)扩增 HN 基因 PCR 引物设计:参照新城疫病毒 F48E9 株的 HN 基因序列,应用 Oligo6.24 设计一

对引物,见表 1。两引物间包含完整的 HN 基因的读码框,在上下游引物的 5'端引入 BamH I 酶切位点。

(3)HN 基因的克隆、酶切鉴定及序列分析:以新城疫病毒 F48E9 株的 cDNA 为模板进行 PCR 扩增,反应条件为:95℃/5min;94℃/1min,56℃/50s,72℃/2min,35 个循环,最后 72℃延伸 10min。经 PCR 扩增后,与 T 载体连接,经测序正确后使用。

1.2.2 含有 NDV 的 F、HN 基因和 ILTV 的 gB 基因的鸡痘病毒转移载体的构建:将 1.7kb 的 HN 基因通过 BamH I 位点克隆到 pSY538 质粒的 FPV 早晚期启动子 LP2EP2 下游处,挑取正向连接产物命名为 pSY538-HN。用 Not I 从 pSY538-HN 上切下启动子 LP2EP2-HN 后补平,Sma I 酶切质粒 pSY538LPF,脱磷,与 LP2EP2-HN 相连,挑取正向连接产物命名为 pSY538-F-HN。Not I 酶切 pSY681 和 538-F-HN 经 Not I 酶切下来的 LP2EP2-F-LP2EP2-HN 相连,命名为 pSY681-F-HN。Not I 部分酶切 pSY681-F-HN,和 pSY781 经 Not I 酶切下来的片段 LP2EP2-gB-P11-LacZ 相连,命名为 pSY783。

1.2.3 鸡痘病毒转移载体的鉴定和 F、HN、gB 和 LacZ 基因插入顺序的鉴定:根据 NDV 的 F、HN 序列和 ILTV 的 gB 序列设计引物(见表 1),用于扩增 F、HN 的全基因序列和 gB 的部分基因序列。培养重组病毒,提取病毒 DNA,用上述引物进行 PCR 鉴定。转移载体质粒进行测序以鉴定转移载体中 F、HN、gB 以及 LacZ 各基因的插入顺序。

表 1 PCR 鉴定中扩增 NDV 的 F 和 HN 基因和 ILTV 的 gB 基因所用的引物序列

Table 1 Sequences of oligonucleotide primers used in PCR, identifying of the HN and fusion gene from NDV, glycoprotein B (gB) gene from infectious laryngotracheitis virus (ILTV)

Target gene	Primers	Sequence(5'-3')	Position	Size(bp)
HN	PH1	AA <u>GGATCCA</u> ATGGACCGTGTAGTTAG	1	1723
	PH2	T <u>GGATCC</u> TTAAATCCCATCATCCTT	1723	
F	PF1	CTAATCGATATGGGCCCCAAATCTTCTACC	1	1662
	PF2	TTACCCGGGGATTCTTGTAGTGGCCCTCAT	1662	
F	PF3	GTGCTACCTACTTGGAGACCTT	1016-1037	564
	PF4	TTGCTATTGCITTCCTCTAACT	1559-1580	
HN	PH3	GTGACCTTGTAGGCATACTGA	160-181	571
	PH4	CACAACATATCGCAACCTAAG	711-731	
gB	PB1	TTTGGAATGGCGACAGGTGA	703-722	393
	PB2	CCGAGCTATGCTAGGAACG	1077-1096	

Note PH1 and PH2 primers were used for cloning HN gene from NDV F48E9 strain and identifying HN gene from transfer vector. The sequence underlined is BamH I site. PF1 and PF2, PB1 and PB2 primers were used for identifying F and gB gene from transfer vector. PF3 and PF4, PH3 and PH4, PB1 and PB2 primers were used for identifying F, HN and gB gene from recombinant virus.

1.2.4 转移载体的纯化:按纯化试剂盒 Wizard[®] Purification Plasmid 使用说明进行。

1.2.5 重组鸡痘病毒的构建和筛选:首先制备单层的 CEF 细胞,用 S-FPV-017 感染该细胞,在 37℃ 作用 2h,其间每隔 20min 摇动病毒稀释液 1 次,然后倒掉病毒稀释液,洗涤细胞后进行转染。用纯化的转移载体质粒按 Lipofectamine Plus[™] Reagent 使用说明的转染程序进行转染。按照张绍杰^[9]等方法进行蚀斑的筛选和纯化。筛选到重组病毒以后再进行 10 轮蚀斑纯化。

1.2.6 重组病毒的鉴定:

(1)PCR 检测:根据 NDV 的 F、HN 序列和 ILTV 的 gB 序列设计鉴定引物,分别扩增 564bp 的 F 片段、571bp 的 HN 片段和 393bp 的 gB 片段。培养重组病毒和亲本病毒,分别提取病毒 DNA,用上述引物进行 PCR 扩增,鉴定重组病毒中外源基因的存在。

(2)重组病毒 F、HN 和 gB 蛋白的间接免疫荧光检测:用重组病毒、亲本 FPV 以及 NDV 感染单层 CEF 细胞的收集、处理和样品的制备参照智海东^[2]等检测程序进行。以 F 基因的真核表达质粒免疫小鼠血清、HN 单抗和兔抗 gB 蛋白血清为一抗,IFIC 标记的山羊抗鼠、山羊抗兔荧光抗体为二抗进行间接免疫荧光检测。

(3)重组病毒 F、HN 蛋白和 gB 糖蛋白的 Western blot 分析:用重组病毒与亲本 FPV 感染单层 CEF 样品的处理及 SDS-PAGE 电泳、转膜按照标准程序进行。分别以 F 基因的真核表达质粒免疫小鼠血清和兔抗 gB 血清为一抗,辣根过氧化物酶标记山羊抗鼠、山羊抗兔 IgG(H+L)为二抗(1:5000),反应结束时滴加化学发光底物并在 X-射线底片上曝光(一抗为小鼠血清)或者在 DAB 溶液(一抗为兔抗 gB 血清)中显色。

(4)重组病毒与亲本毒的比较研究:用重组病毒与亲本 FPV 感染单层 CEF,分别于接种后的 48h、72h、96h 和 120h 收获,反复冻融 3 次后在 CEF 细胞上测定形成的蚀斑数,计算病毒滴度。

2 结果

2.1 NDV HN 基因的克隆及鉴定

参照新城疫病毒 F48E9 株的 HN 基因序列,应用 Oligo6.24 设计一对引物,用 NDV 的 F48E9 株 DNA 进行 PCR,扩增出一条约 1.7kb 的 DNA 片段,与预期大小相符(图 1)。该片段与 T 载体连接,经

测序证明是正确的。

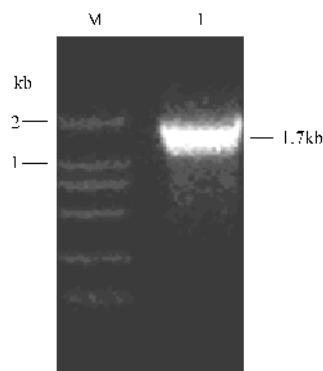


图 1 NDV HN 基因的 PCR 产物

Fig. 1 Amplification of HN gene of NDV by PCR

M 2 kb DNA ladder ;1 PCR of NDV HN

2.2 转移载体的构建

首先将 1.7kb 的 HN 基因通过 *Bam*H I 酶切位点与 pSY538 相连,经 *Eco*R I 酶切鉴定,判断插入基因的方向,取正向连接的质粒。用 *Not* I 从 pSY538HN 上切下 LP2EP2-HN 约 1.9kb 的片段后补平, *Sma* I 酶切 pSY538LPF 后脱磷,与 LP2EP2-HN 相连,用 *Bgl* II 鉴定方向,取 LP2EP2-F-LP2EP2-HN 方向连接的质粒,命名为 pSY538-F-HN。 *Not* I 酶切 pSY681 后脱磷,和 538-F-HN 经 *Not* I 酶切下来的 LP2EP2-F-LP2EP2-HN 约 3.5kb 的片段相连,命名为 pSY681-F-HN。 *Not* I 部分酶切 pSY681-F-HN,和 pSY781 经 *Not* I 酶切下来的 LP2EP2-gB-P11-LacZ 约 6.0kb 的片段相连,命名为 pSY783。构建流程见图 2。

2.3 转移载体的鉴定

用 NDV 的 F、HN 基因的扩增引物和 ILTV 的 gB 基因的鉴定引物对转移载体 pSY783 进行 PCR 扩增后,有 1.7kb 左右的 F 基因、1.7kb 左右的 HN 基因和 393bp 左右的 gB 基因片段的特异条带出现(见图 3),而阴性对照无这 3 条带。证明转移载体中含有 F、HN 及 gB 基因。经质粒测序后证明转移载体 pSY783 中各个基因的插入顺序为:LP2EP2-F-LP2EP2-HN-LP2EP2-gB-P11-LacZ(如图 2 所示)。

2.4 重组病毒的获得和纯化

转移载体和 FPV 感染 CEF 细胞后,含有鸡痘病毒同源臂的转移载体 pSY783 和 CEF 感染的鸡痘亲本病毒(FPV)会发生同源重组,因为重组进的外源基因含有 LacZ,所以发生了重组的病毒感染 CEF 后经 X-gal 染色会出现蓝色蚀斑,经过蓝白斑的筛选和纯化而获得了一株重组鸡痘病毒,命名为 rFPV-F/

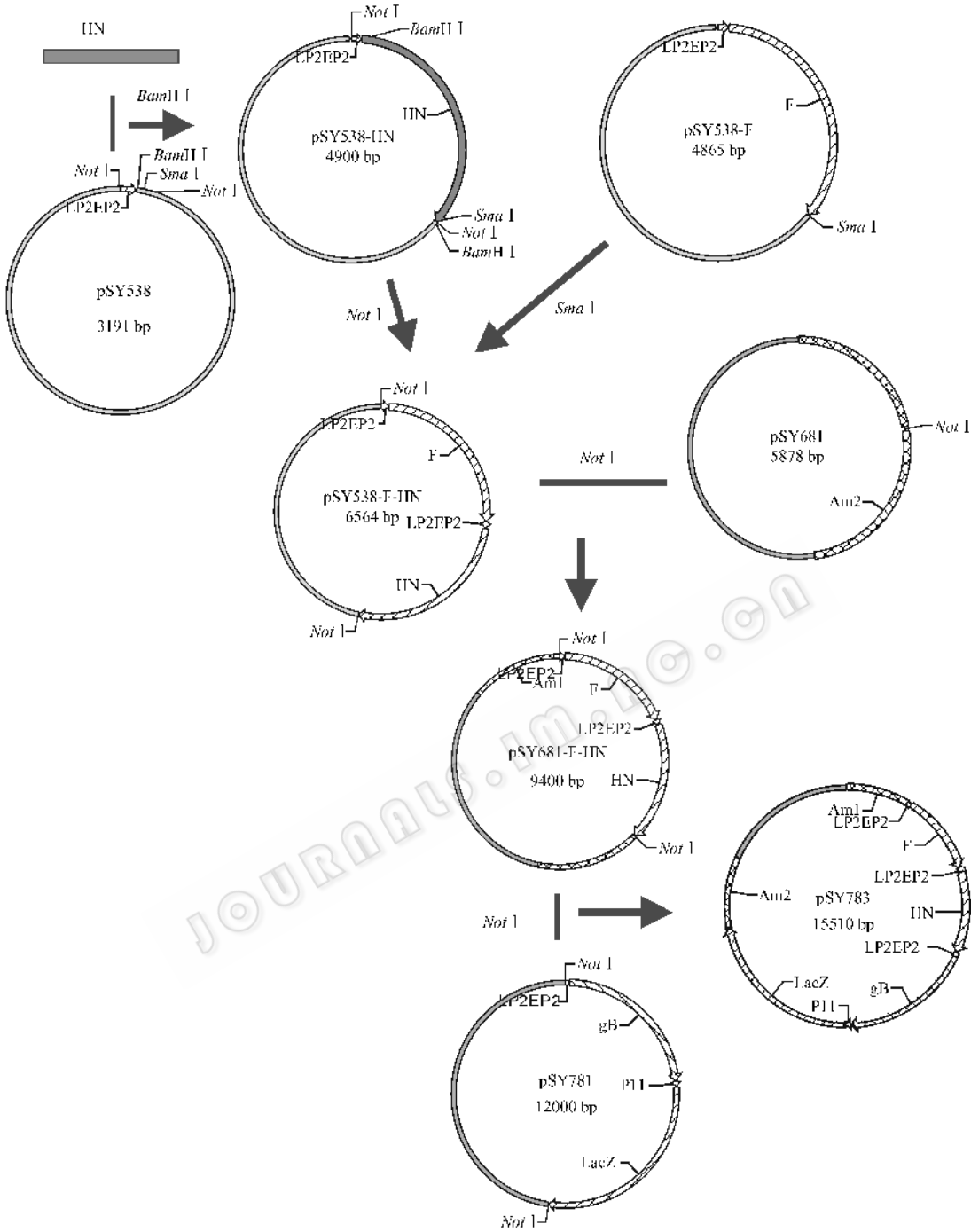


图 2 转移载体构建流程

Fig. 2 Construction of transfer vector

HN/gB/LacZ。经过 10 轮蚀斑纯化以后获得了稳定的无亲本鸡痘病毒的重组病毒(见图 4)。

2.5 重组病毒的鉴定

2.5.1 重组病毒 NDV 的 F、HN 基因和 ILTV 的 gB 基因的鉴定:培养重组病毒和亲本毒,提取病毒 DNA。用 NDV 的 F、HN 和 ILTV 的 gB 基因的鉴定引物进行 PCR 扩增。结果表明重组病毒 DNA 有大约 564bp 的 F 片段、571bp 的 HN 片段和 393bp 的 gB 片

段(见图 5),而亲本鸡痘病毒 DNA 和阴性对照则没有这几条特异条带出现。证明重组病毒 rFPV-F/HN/gB/LacZ 中有 F、HN 和 gB 基因的存在,而重组病毒的蓝斑已经证明有 LacZ 基因的存在。

2.5.2 重组病毒 F、HN 和 gB 蛋白表达的检测:用重组病毒和亲本鸡痘病毒分别接种 CEF 细胞,待细胞出现病变后收集和处理细胞,经涂片后进行间接免疫荧光检测,结果发现滴加 F 基因的真核表达质

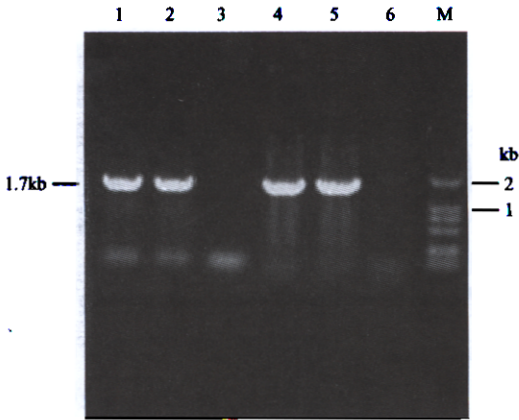


图 3-A 转移载体的 F、HN 基因的 PCR 鉴定

Fig. 3-A Amplification analysis of F and HN gene of transfer vector

1-3: PCR products of F gene; 1, 2: transfer vector; 3: water control; 4-6: PCR products of HN gene; 4, 5: transfer vector; 6: water control; M: 2 kb DNA ladders.

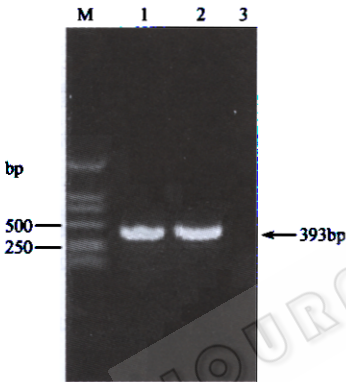


图 3-B 转移载体的 gB 基因的 PCR 鉴定

Fig. 3-B Amplification analysis of gB gene of transfer vector

M: 2 kb DNA ladders; 1-2: transfer vectot; 3: water control.

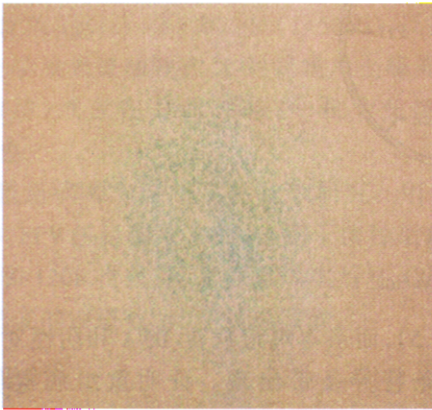


图 4 含 LacZ 基因的重组鸡痘病毒 rFPV-F/HN/gB/LacZ 在鸡胚成纤维细胞上形成的蓝色蚀斑

Fig. 4 Blue plaques formed by rFPV-F/HN/gB/LacZ in infected CEF cells (200 ×)

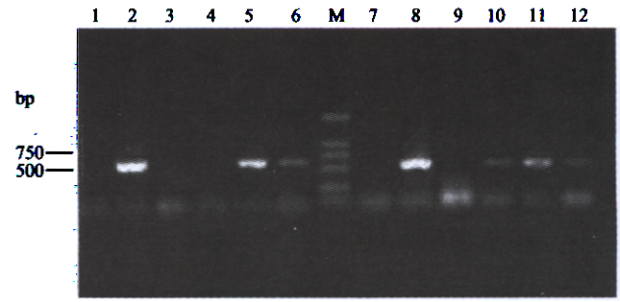


图 5-A 重组病毒的 F、HN 基因 PCR 鉴定

Fig. 5-A Amplification analysis of F and HN gene of recombinant virus

1-6: PCR products of F gene; 1: water control; 2: cDNA of NDV; 3: DNA of CEF; 4, 5, 6: recombinant virus genome; M: 2 Kb DNA ladder; 7-12: PCR products of HN gene; 7: water control; 8: cDNA of NDV; 9: DNA of CEF; 10, 11, 12: recombinant virus genome.

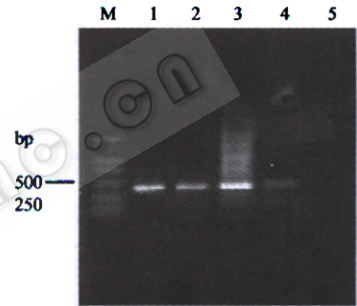


图 5-B 重组病毒的 gB 基因 PCR 鉴定

Fig. 5-B Amplification analysis of gB gene of recombinant virus

M: 2 Kb DNA ladder; 1: DNA of ILTV; 2, 3, 4: recombinant virus genome; 5: Water control.

有特异荧光出现,而接种亲本毒的细胞则没有特异性荧光(见图 6)。证明重组病毒 rFPV-F/HN/gB/LacZ 在体外 CEF 培养时 F、HN 和 gB 蛋白都获得了表达。

2.5.3 重组病毒 F 和 gB 蛋白表达的 Western blot 分析:重组病毒的细胞裂解物用含有 F 基因的真核表达质粒免疫小鼠血清和 gB 蛋白免疫兔血清进行了 Western blot 分析。与亲本毒相比, F 蛋白的 Western blot 分析结果显示在 63kD 和 56kD 处有两条反应条带,为特异性的 NDV 的 F 蛋白的条带,从而说明所构建的含新城疫 F 基因的重组鸡痘病毒能表达具有免疫活性的新城疫 F 蛋白; gB 蛋白的 Western blot 分析结果显示在 58kD 处有一条独有的反应带(见图 7),为特异性的 ILTV 的 gB 蛋白的条带,说明了所构建的含鸡传染性喉气管炎糖蛋白 gB 基因的重组鸡痘病毒能表达具有免疫活性的鸡传染性喉气管炎糖蛋白 gB。

2.6 重组病毒与亲本毒的比较研究

与亲本毒相比,重组病毒 rFPV-F/HN/gB/LacZ 在

粒免疫小鼠血清、HN 单抗和兔抗 gB 血清反应后都

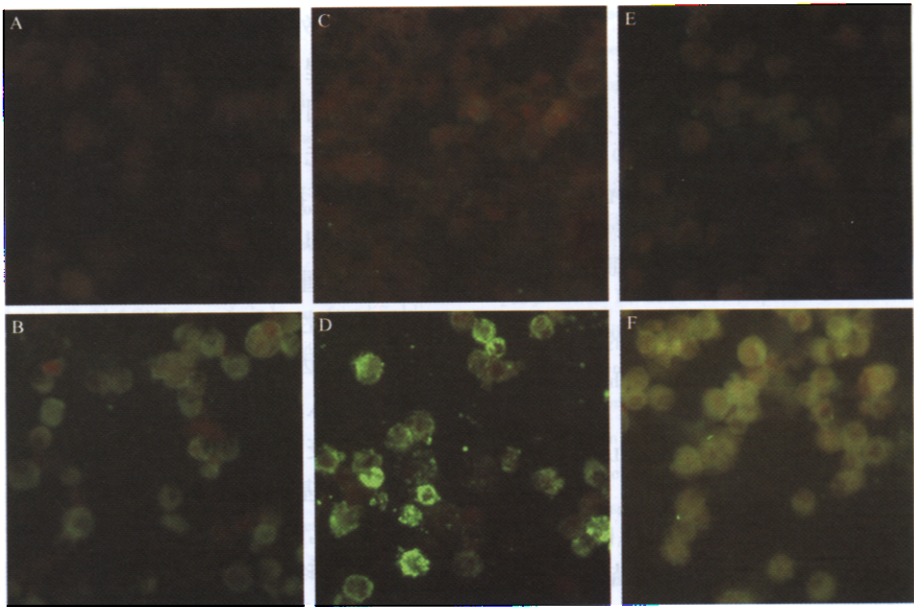


图 6 重组病毒的间接免疫荧光图片

Fig.6 Indirect immunofluorescent assay (IFA) of recombinant virus

A, C, E: CEF cells infected with the parent FPV; B, D, F: rFPV-F/HN/gB/LacZ-infected CEF cells; B: F protein; D: HN protein; F: gB protein(400 ×).

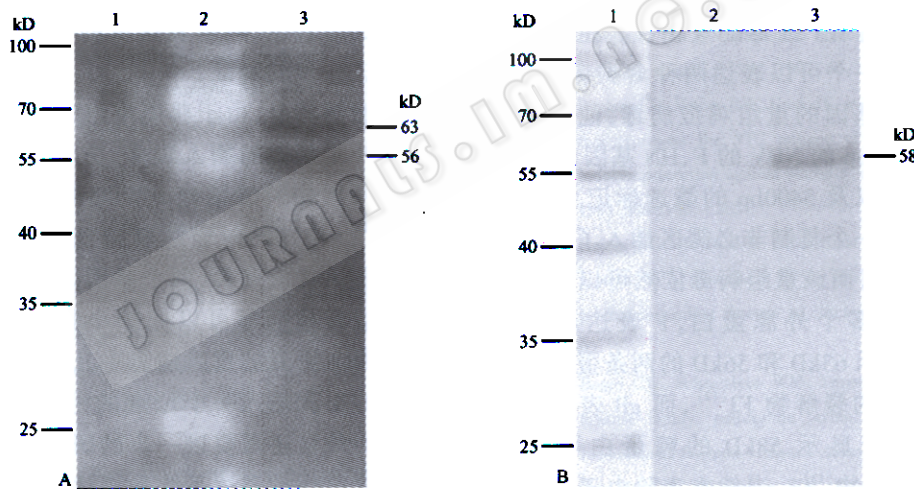


图 7 重组病毒在 CEF 细胞中表达 F 和 gB 蛋白的 Westernblot 分析

Fig. 7 Western blotting analysis of F and gB protein expressed in CEF cells infected by rFPV-F/HN/gB/LacZ

(A): Western blotting analysis of F protein. 1: CEF cells infected by the parent FPV; 2: protein marker; 3: CEF cells infected by rFPV-F/HN/gB/LacZ;
(B): Western blotting analysis of gB protein. 1: protein marker; 2: CEF cells infected by the parent FPV; 3: CEF cells infected by rFPV-F/HN/gB/LacZ.

CEF 上致细胞病变的时间没有显著的差别,并且同期收获的重组病毒和亲本鸡痘病毒在 CEF 细胞上形成的蚀斑数(滴度)也没有显著的差别(见图 8)。可见重组病毒中 F、HN、gB 及 LacZ 的表达并没有明显的影响病毒的生长。

3 讨论

禽痘病毒是目前所知最大的动物病毒,基因组长达 300kb,比痘苗病毒(197kb)长约 1/2,已知痘苗

病毒(VV)至少可容纳 25kb 的外源基因,足见禽痘病毒外源基因的容量之大,是构建多价疫苗的理想载体^[10]。与痘苗病毒不同,禽痘病毒宿主范围很窄,到目前为止,尚无报道证明禽痘病毒能感染除禽类之外的哺乳动物,因此该重组病毒疫苗的使用将不会威胁人类健康。禽痘病毒虽然不能在哺乳类细胞中有效的繁殖,但可在非禽源细胞中产生一过性感染,且能表达外源基因,因此表达哺乳动物病毒基因的重组禽痘病毒兼具灭活疫苗和活疫苗两者的优

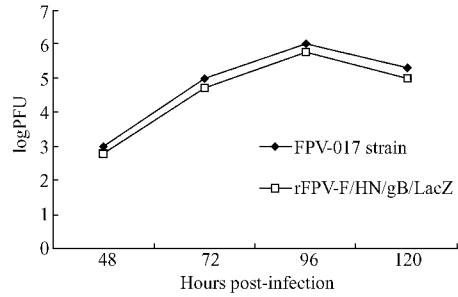


图 8 重组病毒与亲本毒在 CEF 上滴度的比较

Fig. 8 Comparison of CEF cells were infected with recombinant virus or parental virus
Rhombus parental FPV, Squares rFPV-F/HN/gB/LacZ.

越性,而无散毒之患,这种非复制型载体的出现,为研制高效安全用于哺乳动物的新型疫苗拓展了途径^[11]。新的更为复杂的研究疫苗的策略就包括了构建表达多个抗原的重组病毒。

通过同源重组的方法我室构建了表达 ILTV gB 基因的重组禽痘病毒,该重组病毒可以完全保护 SPF 鸡和商品鸡抵抗 ILT 强毒的攻击^[8]。在此基础上我们构建成功了一个可以表达两种禽类病原的 3 个基因和一个报告基因的重组鸡痘病毒,他们分别是长 1662bp 和 1723bp 的 NDV 的 F、HN 基因、2619bp 的 ILTV 的 gB 基因以及 3400bp 的筛选标记 LacZ 基因。在鸡痘病毒的一个复制非必需区插入了大小约为 10kb 的外源片段,而该重组病毒依然可以稳定的在体外传代、表达多个外源蛋白,F 表达产物的 Western blot 分析显示 63kD 和 56kD 的两条蛋白反应带可能是 F0 与 F0 的裂解物 F1^[12],而 gB 表达产物的 Western blot 分析显示 58kD 的糖蛋白可能是 205kD 糖蛋白的裂解物^[13]。当然本实验由于缺乏检测 HN 蛋白的抗体从而没有获得关于 HN 表达蛋白大小的资料,但是间接免疫荧光的结果也表明了 HN 获得了表达。现有的结果足以表明获得的三价重组病毒和二价重组病毒一样都可以稳定的表达其中的外源蛋白。因此本研究证实了鸡痘病毒能够在 一个位点表达插入的不同的抗原。

同其它 DNA 病毒一样,禽痘病毒基因的表达的调控主要在转录水平上,表达量的高低取决于上游启动子的强弱。与其它 DNA 病毒不同,禽痘病毒是严格的胞浆内复制,因为禽痘病毒能编码它自身的 RNA 聚合酶,并且其启动子仅能被其自身的 RNA 聚合酶识别,不能被别的种类的启动子所识别,因此,外源基因在禽痘病毒中表达必须选择痘病毒的启动

子。并且外源基因在重组鸡痘病毒中表达成功与否,很大程度上取决于启动子的选择与使用是否得当,就基因表达调控机理和重组疫苗的生物安全而言,应首先使用禽病毒本身的启动子。现在构建重组禽痘病毒常用的启动子主要有 P11、P7.5、TK、C4b、PFL1、PE/L 和 L2R 等,这些启动子都有各自的优点。在重组禽痘病毒构建中,一定要彻底分析启动子的特性,启动子与终止信号的调控关系,分析表达外源基因的特性,创造完善的重组禽痘病毒的构建平台,从而解决禽痘病毒载体疫苗外源基因表达含量、免疫原性和稳定性的问题,为构建商品化载体疫苗奠定基础。本研究中 4 个外源基因分别用了两种启动子,它们是早晚期启动子 LP2EP2 和 P11 启动子。乔传玲^[14](2001)采用 LP2EP2 启动子成功地构建了两株分别表达了禽流感病毒 HA、NA 和 HA、NP 基因双基因重组禽痘病毒,所有的基因都获得了表达,获得的重组禽痘病毒在动物实验上均取得理想的保护。从表达的效果分析,4 种外源蛋白均获得了稳定的表达,但是表达量的情况需要通过动物试验来进一步的验证。

遗憾的是,由于获得重组病毒具备一定的难度,关于外源基因的插入顺序、方向对表达的影响我们没有得到相关的结论。Wild 等(1990)采用 P7.5 启动子^[15]构建同时表达麻疹病毒 F 基因和 LacZ 基因的重组禽痘病毒,两个基因以头对头的方向表达,该重组禽痘病毒可以保护小鼠抵抗麻疹强毒的攻击。而本研究的重组病毒中几个外源基因是以首尾相连的形式插入一个位点的,至于这种形式是不是表达的最佳还需要进一步的研究。

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,譬如鸡新城疫病毒的 F^[16]和 HN^[17]基因,马立克氏病毒糖蛋白 gB^[18]和 PP38^[19]基因,鸡传染性法氏囊炎病毒的 VP2 基因^[20-21],禽流感病毒的 HA 基因^[22-23],禽网状内皮细胞增生症病毒的 env 基因^[24],这些重组病毒都可使免疫鸡产生抵抗强毒攻击的免疫力。以上都是表达一种病原体免疫原基因的重组禽痘病毒,有关表达多个病原体免疫原基因的重组病毒目前还没有报道。本试验构建了表达新城疫 F、HN 基因和传染性喉气管炎 gB 基因的重组禽痘病毒 rFPV-F/HN/gB/LacZ,以此为基础,可以开发三价疫苗,以便应用于生产实践。

REFERENCES (参考文献)

- [1] Bagust TJ. Laryngotracheitis Herpesvirus infection in the chicken 4. Latency establishment by wild and vaccine strains of ILT virus. *Avian Path* , 1986 , **15** :581 – 595
- [2] Bagust TJ , MA Johnson. Avian infectious laryngotracheitis : virus-host interaction in relation to prospect for eradication. *Avian Pathol* , 1995 **24** :373 – 391
- [3] Guy JS , HJ Barnes , Smith LG. Increased virulence of modified live infectious laryngotracheitis vaccine virus following bird-to-bird passage. *Avian Dis* , 1991 **35** :348 – 355
- [4] York JJ , S Sonza , Fahey KJ , Immunogenic glycoprotein of infectious laryngotracheitis Herpesvirus. *Virology* , 1987 , **161** :340 – 347
- [5] York JJ , Sonza S , Brandon MR *et al.* Antigens of infectious laryngotracheitis herpesvirus defined by monoclonal antibodies. *Arch Virol* , 1990 , **115** (3-4) :147 – 162
- [6] York JF , Fahey KJ. Vaccination with affinity-purified glycoproteins protects chickens against infectious laryngotracheitis herpesvirus. *Avian Pathology* ,1991 **20** :693 – 704
- [7] Tong GZ(童光志) ,Zhang SX(孟松树) ,Meng SX(张绍杰) *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
- [8] Zhi HD(智海东) ,Wang YF(王云峰) *et al.* Co-expression of Glycoprotein B (gB) of Infectious Laryngotracheitis Virus and Fusion Protein of Newcastle Disease Virus in a Recombinant Fowlpox Virus. *Chinese Journal of Biotechnology* (生物工程学报) ,2004 , **20** (6) :963 – 966
- [9] Zhang SX(张绍杰) ,Tong GZ(童光志) ,Wang L(王柳) *et al.* Construction of Recombinant Fowlpox Virus Expressing Glycoprotein B of Infectious Laryngotracheitis Virus. *Chinese Journal Preventive Veterinary Medicine* (中国预防兽医学报) ,2000 , **22** (3) :205 – 208
- [10] Coupar BEH , Teo T , Boyle DB. Restriction endonuclease mapping of the fowlpox virus genome. *Virology* , 1990 , **179** :159 – 167
- [11] Taylor J , Weinberg R , Languet B *et al.* Recombinant fowlpox virus inducing protective immunity in non-avian species. *Vaccine* , 1988 , **6** :497 – 503
- [12] Nagai Y , Klenk HD , Rott R. Proteolytic cleavage of the viral glycoproteins and its significance for the virulence of Newcastle disease virus. *Virology* ,1976 **72** :494 – 508
- [13] Poulsen DJ , Keeler CL. Characterization of the assembly and processing of infectious laryngotracheitis virus glycoprotein B. *J Gen Virol* , 1997 **78** (11) :2945 – 2951
- [14] Qiao CL , Yu KZ , Jiang YP *et al.* Protection of chickens against highly lethal H5N1 and H7N1 avian influenza viruses with a recombinant fowlpox virus co-expressing H5 haemagglutinin and N1 neuraminidase genes. *Avian Pathology* 2003 **32** :25 – 31
- [15] Wild F , Giraudon P , Spehner D *et al.* Fowlpox virus recombinant encoding the measles virus fusion protein : protection of mice against fatal measles encephalitis. *Vaccine* ,1990 **8** (5) :441 – 442
- [16] Taylor J , Edbauer C , Rey-Senelongue *et al.* Newcastle disease virus fusion protein expressed in a fowlpox virus recombinant confers protection in chickens. *J Virol* , 1990 **64** :1441 – 1450
- [17] Boursnell ME , Green PF , Samson AC *et al.* A recombinant fowlpox virus expressing the hemagglutinin-neuraminidase gene of Newcastle disease virus (NDV) protects chickens against challenge by NDV. *Virology* , 1990 , **178** :297 – 300
- [18] Nazerian K , Lee LF , Yanagida N *et al.* Protection against Marek ' s disease by a fowlpox virus recombinant expressing the glycoprotein B of Marek ' s disease virus. *J Virol* ,1992 **66** :1409 – 1413
- [19] Yanagida N , Ogawa R , Li Y *et al.* Recombinant fowlpox viruses expressing the glycoprotein B homolog and the pp38 gene of Marek ' s disease virus. *J Virol* ,1992 **66** :1402 – 1408
- [20] Bayliss CD , Peters RW , Cook JK *et al.* A recombinant fowlpox virus that expresses the VP2 antigen of infectious bursal disease virus induces protection against mortality caused by the virus. *Arch Virol* , 1991 **120** :193 – 205
- [21] Heine HG , Boyle DB. Infectious bursal disease virus structural protein VP2 expressed by a fowlpox virus recombinant confers protection against disease in chickens. *Arch Virol* ,1993 **131** :77 – 92
- [22] Beard CW , Schnitzlein WM , Tripathy DN. Protection of chickens against highly pathogenic avian influenza virus (H5N2) by recombinant fowlpox viruses. *Avian Dis* ,1991 **35** :356 – 359
- [23] Tripathy DN , Schnitzlein WM. Expression of avian influenza virus hemagglutinin by recombinant fowlpox virus. *Avian Dis* , 1991 **35** :186 – 191
- [24] Keyvan N , Yanagida N. A recombinant fowlpox virus expressing the envelope antigen of subgroup A Avian leukosis/Sarcoma virus. *Avian Dis* ,1995 **39** :514 – 520