生 物 工 程 学 报
journals.im.ac.cn
cjb@im.ac.cn

Chin J Biotech 2008, February 25; 24(2): 226-231
Chinese Journal of Biotechnology ISSN 1000-3061
© 2008 *Institute of Microbiology, CAS & CSM*, All rights reserved

研究报告

基因修饰对鸡新城疫病毒 $F_{48}E_9$ 株 HN 基因 DNA 疫苗表达效力的影响

贺 笋[1,2], 石星明[1], 王云峰[1], 王 玫[1], 冉多良[2], 童光志[1]

1 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禽传染病研究室, 哈尔滨 150001
2 新疆农业大学动物医学学院, 乌鲁木齐 830052

摘 要: DNA 疫苗的免疫效果与抗原基因的表达量和免疫原性有直接关系, 为了提高目的基因的表达量, 本研究对 NDV $F_{48}E_9$ 株的 HN 基因进行了修饰, 对修饰前后 HN 基因表达水平进行了比较。利用分子生物学软件将 NDV $F_{48}E_9$ 株的 HN 基因的密码子全部替换为鸡体内偏嗜性密码子, 同时在 HN 基因的 5 端加上同样已替换密码子的禽流感病毒 HA 蛋白信号肽序列以期望提高目的蛋白在细胞中的表达。修饰后 HN 基因命名为 SoptiHN, 剔除信号肽的 HN 基因命名为 optiHN。将 SoptiHN、optiHN 和 $F_{48}E_9$ 株的 HN 基因分别克隆到真核表达载体 pVAX1 和含有多个鸡体内最适免疫刺激序列 CpG-ODN 的载体 pVAX1-CpG 中, 将他们分别命名为 pV-SoptiHN、pVC-SoptiHN、pV-optiHN、pVC-optiHN 和 pV-HN、 pVC-HN, 用这些质粒转染 293T 细胞, 48 小时后间接免疫荧光和 Western blotting 检测细胞中瞬时表达的 HN 蛋白。结果显示, 与未经修饰的 HN 基因相比, 修饰后的 HN 基因体外瞬时表达水平明显提高, 并且密码子优化与添加信号肽序列这两种途径都可以提高 HN 基因的体外表达量.

关键词: NDV, DNA 疫苗, 密码子优化, 信号肽, 间接免疫荧光, 免疫印迹

JOURNALS.IM.AC.CN

Effect of Modified NDV $F_{48}E_9$ Strain HN Gene and *in vitro* Expression of Its DNA Vaccine

Sun He[1,2], Xingming Shi[1], Yunfeng Wang[1], Mei Wang[1], Duoliang Ran[2], and Guangzhi Tong[1]

1 *Division of Avian infections diseases*, *National Key Laboratory of Veterinary Biotechnology*, *Harbin Veterinary Research Institute*, *The Chinese Academy of Agricultural Science*, *Harbin* 150001, *China*
2 *College of Veterinary Medicine*, *Xinjiang Agricultural University*, *Urumchi* 830052, *China*

Abstract: Improving expression of antigen is critical to the immunogenicity of DNA vaccines. To achieve this goal, we modified the NDV $F_{48}E_9$ strain HN gene by optimizing the condon usage and inserting the secretary leader sequence [A/Goose/Guangdong/1/96 (H5N1) HA gene, Accession No. AF144305]. The HN gene modified and knocked the signal peptide off were named SoptiHN and optiHN. The three sequence: SoptiHN, optiHN and the NDV $F_{48}E_9$ strain HN gene were inserted into the vector pVAX1 and vector pVAX1-CpG including CpG-ODN sequence respectively. Then we got six recombinant plasmids: pV-SoptiHN, pVC-SoptiHN, pV-optiHN, pVC-optiHN, pV-HN and pVC-HN. By optimizing condon usage in transiently transfected 293T cells, expression levels of HN gene were higher from the codon-optimized gene than the counterpart. Moreover, both optimization of condon usage and addition of signal peptide could improve expression of HN gene *in vitro*.

Received: May 24, 2007; **Accepted:** July 31, 2007
Corresponding author: Yunfeng Wang. Tel: +86-451-85935004, 85935058; Fax: +86-451-82734181; E-mail: yfwang@hvri. ac.cn
Guangzhi Tong. E-mail: gztong@hvri.ac.cn

Keywords: NDV, DNA vaccine, codon optimization, signal peptide, indirect immunofluorescence, Western blotting

新城疫病毒(Newcastle disease virus, NDV)属于副黏病毒科腮腺炎病毒属, 是一种高致病性病毒。对禽类危害较大, 是世界公认的两大重要禽病之一[1]。新城疫于 1926 年首次暴发于印度尼西亚爪哇[2]和英国新城[3], 在此之前, 中欧亦有类似报道[4]。本病的死亡率极高, 强毒力毒株可以引起的感染常达 100%, 已经遍布世界各地。目前, 防控新城疫的有效方法仍是疫苗接种, 其中应用最为广泛的是新城疫弱毒活疫苗, 但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[5]。因此采用传统的方法很难控制和消灭该病, 迫切的需要一种新型的防控手段。

新城疫病毒含有一条单股, 负链 RNA, 基因组全长 15186 个核苷酸(bp), 可编码 6 种结构蛋白, 即核衣壳蛋白(NP)、磷蛋白(P)、基质蛋白(M)、融合蛋白(F)、血凝素-神经氨酸酶(HN)及大蛋白(L)。HN 糖蛋白位于病毒囊膜表面, 与病毒的毒力及致病性密切相关, 能够特异地与红细胞表面唾液酸受体结合, 因此在病毒的感染中起重要的作用[6], 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。

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, 同时兼备安全、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[7]。但是, DNA 疫苗也存在其自身的局限性, 目的基因的免疫原性较弱以及其蛋白表达水平不高严重制约了它的发展。为了探索解决这一问题的新途径, 提高 HN 蛋白在细胞中的表达量, 本研究将 HN 基因的密码子全部替换为鸡体内偏嗜性密码子, 并在 HN 基因的 5 端加上也替换了密码子的禽流感病毒 HA 蛋白信号肽序列, 希望通过对重组蛋白的修饰, 提高目的蛋白在细胞中的表达, 为开展进一步的动物试验奠定基础。

1 材料

真核表达载体 pVAX1(pVAX1 载体是在 pcDNA3.1 基础上开发出来的新一代用于 DNA 疫苗研制的真核表达载体, 具有在许多哺乳动物细胞中高水平瞬时表达蛋白的特性, 图 1)由本实验室保存; pVAX1-CpG 为实验室自行构建, 其中的 CpG-ODN 序列为鸡体内最适刺激序列, 由三个连续的“TTGCTT”序列构成, 全链硫代磷酸化, 插入 *Nhe* Ⅰ和 *Kpn* Ⅰ酶切位点之间; 含有 $NDVF_{48}E_9$ 株 HN 基因重组质粒 T-HN 由孙惠玲博士构建。限制性内切酶 *Eco*R Ⅰ、*Bam*H Ⅰ、*Kpn* Ⅰ和 *Hin*dⅢ、DNA 分子质量标准(DL 2000、DL 15000)、DNA 快速连接试剂盒、高保真 Taq DNA 聚合酶等均为宝生物工程(大连)有限公司产品; Wizard Purification Plasmid 质粒纯化试剂盒购自 Promega 公司; 脂质体 Lipofectamine2000 转染试剂盒购自 Invitrogen 公司; OptiMEM、DMEM 和灭活过滤除菌的胎牛血清购自 GIBCO 公司。NDV HN 基因单克隆抗体由扬州大学刘秀梵教授惠赠; NDV $F_{48}E_9$ 株阳性血清由孙惠玲博士制备本室保存; FITC 标记兔抗鸡 IgG、HRP 标记羊抗鼠 IgG 购自 Sigma 公司; 蛋白质分子质量标准 PageRulerTM Protein Ladder 为 Fragments 公司产品。

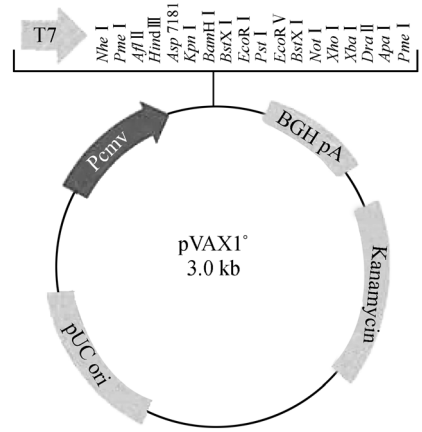

图 1 pVAX1 真核表达载体

Fig. 1 Eukaryotic expression vector of pVAX1

CpG-ODN sequence was inserted between *Nhe* Ⅰ and *Kpn* Ⅰ

2 方法

2.1 HN 基因的优化

利用密码子使用频率表, 将 NDV 病毒 $F_{48}E_9$ 株的 HN 基因的密码子全部替换为鸡体内偏嗜的密码子, 参照禽流感病毒 A/Goose/Guangdong/1/96 (H5N1) HA 基因全序列(Genbank 登录号: AF144305),

将其信号肽密码子替换为鸡体内偏嗜的密码子，加到 HN 基因的 5 最前端，并分别在其 5 端和 3 端加入 *Bam*H Ⅰ和 *Eco*R Ⅰ酶切位点，提交上海英俊公司进行基因合成，插入 pMD18-T 载体，命名为 T-SoptiHN。

2.2 表达 $F_{48}E_9$ 株 HN、SoptiHN 和 optiHN 蛋白真核载体的构建

使用 *Bam*H Ⅰ酶切 T-HN 质粒，回收大小约 1700 bp 的 DNA 片段，并将其分别连接到 pVAX1 和 pVAX1-CpG 中，转化 DH5α感受态细胞，挑选单个菌落提取质粒 DNA 后 *Kpn* Ⅰ酶切鉴定大小，*Eco*R Ⅰ酶切鉴定片段连入的方向，选取大小和片段连入方向都正确的阳性克隆送上海英俊公司测序鉴定，将阳性克隆分别命名为 pV-HN 和 pVC-HN。使用 *Eco*R Ⅰ和 *Bam*H Ⅰ双酶切 T-SoptiHN 质粒，同样回收大小约 1700bp 的 DNA 片段，按上述办法克隆、酶切、测序构建了阳性克隆 pV-SoptiHN 和 pVC-SoptiHN。根据 pV-SoptiHN 的序列，采用 Oligo 6.0 软件设计引物去除 SoptiHN 中的信号肽序列，NPF: 5′-TAAGGATCCGAAATGGACCGCGTGGTGAGCCA-G-3′，NPR: 5′-CGGCC GCCACTGTGC TGGATA-3′，上游引物中加入 *Bam*H Ⅰ酶切位点(下划线处)及相应的保护性碱基，而下游引物扩增的区域内包括了 *Eco*R Ⅰ酶切位点，将上下游引物扩增的产物用 *Bam*H Ⅰ和 *Eco*R Ⅰ双酶切回收后，将其分别连接到 pVAX1 和 pVAX1-CpG 中，挑取阳性克隆测序鉴定后命名为 pV-optiHN 和 pVC-optiHN。

2.3 转染用重组质粒 DNA 的制备

将 6 种阳性克隆 pV-HN、pVC-HN、pV-SoptiHN、pVC-SoptiHN 和 pV-optiHN、pVC-optiHN 及空载体 pVAX1 和 pVAX1-CpG 的菌种按 1/100 比例接种于 500 mL 含 50 μg/mL 卡那霉素的液体 LB 培养基中，37°C 振荡培养 12~16 h。收菌后按质粒纯化试剂盒 Wizard Purification Plasmid 操作说明进行纯化，最后转到生物安全柜无菌操作，将沉淀用 70%乙醇洗涤 1 次，干燥后溶解于适量灭菌去离子水中，取少量 1∶100 稀释后于紫外分光光度计上测质粒浓度，–20°C 保存备用。

2.4 质粒 DNA 转染 293T 细胞

将对数生长期的 293T 细胞按一定密度分别移种到 6 孔细胞培养板中，37°C 培养至细胞覆盖率达 75%~85%。用 Opti-DMEM 培养液洗涤，按脂质体 Lipofectamine2000TMReagent 使用说明进行转染：质粒 DNA 用 Opti-DMEM 稀释混匀后室温作用 5 min，将脂质体加人另一管 Opti-DMEM 培养基中混匀后室温作用 5 min，将稀释质粒 DNA 和脂质体培养液混匀，室温作用 15 min 后将混合物缓慢加入细胞中，37°C 放置 5 h，吸出转染液，换成 100 mL/L 胎牛血清的 DMEM 完全培养液，继续培养 48 h，收获细胞用于间接免疫荧光试验和 Western-blotting 检测。

2.5 间接免疫荧光检测 HN 蛋白的瞬时表达

将转染 48 h 后的 6 孔细胞培养板细胞的培养液吸出，用 PBS 洗涤 1 次后自然干燥，用预冷的 700 mL/L 乙醇 4°C 固定 30 min，自然干燥。用 PBS 洗涤，取 NDV F48E9 株阳性血清用 PBS 做 1∶50 倍稀释，每孔加入 500 μL 血清稀释液，置湿盒内 37°C 作用 45 min。用 PBS 洗涤 3 次，每次 5 min，自然干燥。将 FITC 标记兔抗鸡 IgG 按 1∶200 倍稀释至含伊文斯蓝(1/104)的 PBS 中，置黑暗湿盒内 37°C 作用 45 min。用 PBS 洗涤 3 次，去离子水洗涤脱盐后，加入碱性甘油(pH 9.8)后荧光显微镜下观察。

2.6 Western-blotting 鉴定

收获转染 48 h 的细胞，用 PBS 离心洗涤 3 次，将细胞重悬于 1 mL PBS 中，超声波破碎细胞，离心取上清加等量蛋白质电泳上样缓冲液，进行 SDS-PAGE，浓缩胶浓度为 30 g/L，分离胶浓度为 150 g/L，电泳完毕后将凝胶上的条带转至硝酸纤维滤膜上，用封闭液(PBS, pH 7.4，含 10 g/L 牛血清白蛋白和 0.5 mL/L Tween-20)37°C 振荡封闭 2 h，加入以封闭液 1∶200 稀释的 NDV HN 单克隆抗体，37°C 温育 2 h，洗膜后加 1:5000 稀释的 HRP-羊抗鼠 IgG 37°C 温育 1.5 h，洗膜后用 DAB 显色。

3 结果

3.1 真核表达载体的构建和酶切鉴定

分别将纯化的 8 种质粒 pVAX1、pVAX1-CpG、pV-HN、pVC-HN、pV-optiHN、pVC-optiHN、pV-SoptiHN 和 pVC-SoptiHN 用 *Kpn* Ⅰ酶切鉴定大小，结果得到了我们预期大小的相应条带(图 2)。pVAX1 和 pVAX1-CpG 约为 3 kb，而 pV-HN、pVC-HN、pV-optiHN、pVC-optiHN、pV-SoptiHN 和 pVC-SoptiHN 约为 4.8 kb。再将 pV-HN 和 pVC-HN 两种质粒用 *Bam*H Ⅰ酶切，都可以得到一条约 3 kb 和一条约 1.8 kb 的条带，而使用 *Bam*H Ⅰ和 *Eco*R Ⅰ双酶切 pV- optiHN、pVC-optiHN、pV-SoptiHN 和 pVC-SoptiHN 质粒同样也都得到了一条约 3 kb 和一条约 1.8 kb 的条带(图 3)。

3.2 目的蛋白在 293T 细胞中的表达

用脂质体法将已经纯化完毕, 鉴定正确的重组质粒分别转染 293T 细胞, 48 h 后检测免疫荧光。结果显示, 在重组质粒 pV-HN、pVC-HN、pV-optiHN、pVC-optiHN、pV-SoptiHN 和 pVC-SoptiHN 转染的细胞中均可以观察到荧光, 而正常细胞对照以及转染 pVAX1 和 pVAX1-CpG 质粒的细胞均没有监测到荧光信号。从图片中我们可以明显的观察到, SoptiHN 和 optiHN 转染的细胞视野中阳性细胞数量多于 $F_{48}E_9$ 株的 HN 基因转染的细胞, CpG 序列的插入对阳性细胞的数量影响不大(图 4)。

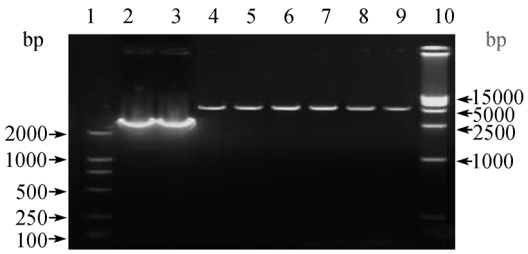

图 2 已纯化 8 种质粒 *Kpn* Ⅰ酶切鉴定

Fig. 2 Identification of eight purified plasmids by enzyme digestion

1,10: DL2000 and DL15000 DNA Marker; 2–9: pVAX1、pVAX1-CpG、pV-HN、pVC-HN、pV-optiHN、pVC-optiHN、pV-SoptiHN and pVC-SoptiHN plasmids were digested by *Kpn* Ⅰ

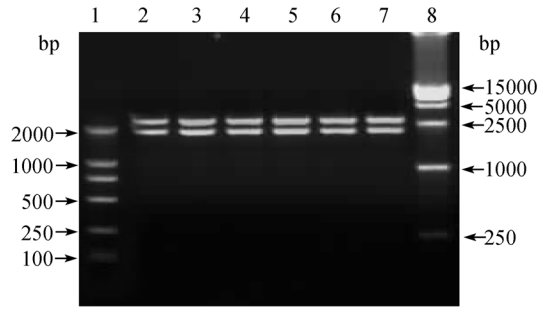

图 3 pV-HN、pVC-HN、pV-optiHN 和 pVC-optiHN、pV-SoptiHN 和 pVC-SoptiHN 的酶切鉴定

Fig. 3 Identification of pV-HN、pVC-HN、pV-optiHN、pVC-optiHN、pV-SoptiHN and pVC-SoptiHN by enzyme digestion

1,8: DL2000 and DL15000 DNA Marker; 2,3: pV-HN and pVC-HN were digested by *Bam*H Ⅰ; 4~7: pV-optiHN、pVC-optiHN、pV-SoptiHN and pVC-SoptiHN were digested by *Bam*H Ⅰ and *Eco*R Ⅰ

3.3 West-blotting 分析结果

6 种重组质粒都检测到了分子量约为 63 kD 的表达蛋白(图 5), SoptiHN 和 optiHN 的基因表达量要高于 $F_{48}E_9$ 株的 HN 基因; 而未转染的 293T 细胞、转染 pVAX1 和 pVAX1-CpG 的 293T 细胞均没有检

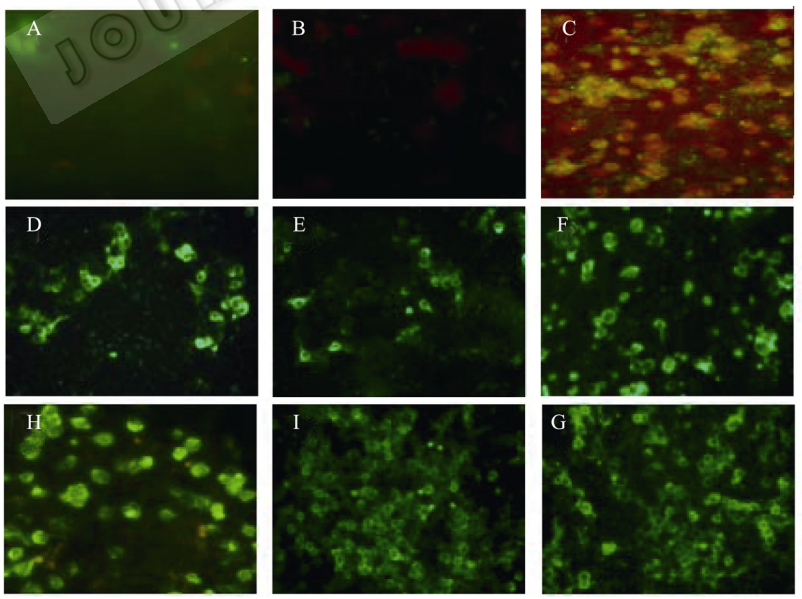

图 4 间接免疫荧光检测 SoptiHN、optiHN 和 HN 基因在 293T 细胞中的表达(40×)

Fig. 4 Expression of SoptiHN、optiHN and F48E9 strain HN genes in 293T cell line detected by the indirect immunofluorescence (40×)

A: control of 293T cells; B: pVAX1; C: pVAX1-CpG; D: pV-HN; E: pVC-HN; F: pV-optiHN; G: pVC-optiHN; H: pV-SoptiHN; I: pVC-SoptiHN

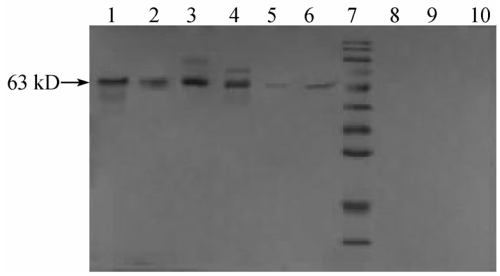

图 5 SoptiHN、optiHN 和 HN 基因在 293T 细胞中瞬时表达的蛋白印迹检测

Fig. 5 Transient expression SoptiHN、optiHN and F48E9 strain HN in 293T cell line decteced by West-blotting

1~6: pV-optiHN, pVC-optiHN, pV-SoptiHN, pVC-SoptiHN, pV-HN, pVC-HN; 7: PageRule^{TM} Protein Ladder; 8 and 9: Negative control of 293T cells transfected with pVAX1 or pVAX1-CpG; 10: control of 293T cells

测到目的蛋白的表达。

4 讨论

对于DNA疫苗而言，抗原蛋白的表达水平对其免疫原性起着十分关键的作用[8]。在当前的研究中，大多数试验的研究热点都集中在如何提高抗原蛋白的表达量这一问题之中。

有相当多的文献报道，免疫原基因密码子的优化可以显著的改善蛋白的表达效率。Leder 等对 HPV16L1、L2 的密码子进行了优化，分别用哺乳动物细胞及植物细胞偏爱密码子取代原有基因的相应密码子。用合成基因转染哺乳动物细胞后，使用哺乳动物细胞偏爱密码子合成的基因蛋白表达水平较原野生型病毒基因增加了 104~105 倍，而用植物细胞偏爱密码合成的基因蛋白表达水平也至少提高了 100 倍[9]。姜永萍[10,11]、姜涛[12]等人分别采用替换病毒密码子为宿主密码子的手段优化了禽流感的 HA 基因和 SARS-CoV N 基因，并且优化后的基因表达水平及诱导抗体产生的水平都要显著的高于野生型的基因。但 H.C.J.埃特尔[13]认为设计抗病毒疫苗时，不需要考虑进行密码子优化，因为病毒已经进化出能够利用真核生物的翻译系统的机制。但不同的真核基因所使用的密码子使用频率不尽相同，这可能是一种更为精细的调节蛋白表达的手段。所以，我们也不能认为所有的病毒基因适合于真核生物的翻译系统。例如，更换 HIV gp120 的密码子能够使其 DNA 疫苗发挥效应剂量缩小 100 倍，而 HIV gp160 的密码子更换后不会对结果有太大的影响。因此，通过试验验证是检验优化结果的唯一途径。本试验中，分析比较了新城疫 $F_{48}E_9$ 株的 HN 基因与鸡的密码子使用的频率，发现两者有明显差异，这可能会影响 HN 基因在鸡体内的表达效力，进而可能会导致 HN 基因 DNA 疫苗的免疫原性降低。因此，本研究将 $F_{48}E_9$ 株的 HN 基因的密码子全部替换成鸡体内偏嗜的密码子，避免了使用稀有 tRNAs，并可能提高翻译的效率。

美国洛克菲勒大学细胞生物学教授 Gunter Blobel 于 20 世纪 70 年代初提出了“信号假说(Signal Hypotheis)”，用以解决蛋白质合成后的去向问题。他认为蛋白质的合成是在核糖体上进行的，信号肽(signal peptide)是蛋白质的一个片段，信号肽引导核糖体并定位于内质网上的一个通道上，使核糖体附着在内质网上，并将不断伸长的蛋白质链穿透通过通道，随后信号肽被切割下来，合成完成的蛋白质被释放进内质网腔，蛋白最后被转运到胞外[14]。由于信号肽具有的这一功能，很多学者将多种外源基因连上信号肽序列后，广泛地运用到原核和真核表达系统中提高了蛋白质的表达量[15]。本试验中，通过软件预测发现 $F_{48}E_9$ 株的 HN 基因 1~26 位氨基酸是亲水的，提示HN无信号肽的切除，这可能会对其在细胞内的合成造成影响。因此，我们将使用由鸡体内偏嗜性密码子构成的禽流感病毒(A/Goose/Guangdong/1/96 H5N1) HA 蛋白的信号肽序连入已优化的 HN 基因中，期望可以提高其在核糖体中翻译效率。

另外，现在也不清楚外源基因密码子优化后是否需要和载体上的一些元件相互协同才能增强目的基因的有效表达[8]。本试验分别将 SoptiHN、optiHN 和 F48E9 株的原始 HN 基因分别都插入 pVAX1 和 pVAX1-CpG 载体中，发现这两个载体在表达同一外源基因时差别微小。这可能是由于 CpG-ODN 只是免疫刺激序列，并不能够对蛋白的表达产生影响。从试验结果中我们可以看出，修饰后的 SoptiHN 基因比只进行密码子优化的 optiHN 基因和 $F_{48}E_9$ 株的 HN 基因在体外的表达水平要高。由于 Li 等人的工作提示含有较的阳性氨基酸多的信号肽可能不利于蛋白质的分泌表达[16]，而本实验所选用的禽流感病毒(A/Goose/Guangdong/1/96H5N1) HA 蛋白的信号肽具有较少的阳性氨基酸，可能对提高 HN 基因的

表达量起到了一定的作用。

就本试验而言, 我们成功构建了修饰的 NDV $F_{48}E_9$ 株 HN 基因的真核表达载体, 从间接免疫荧光和 West-blotting 结果分析(见图 4, 5), 我们可以发现, 3 种基因转染 293T 细胞后所观察到的阳性细胞数量的关系是: SoptiHN＞optiHN＞$F_{48}E_9$ 株 HN 基因; 同样的, 从 West-blotting 结果我们看出, 3 种基因蛋白表达量的关系仍然是: SoptiHN＞optiHN＞$F_{48}E_9$ 株 HN 基因。因此, 我们可以得出以下结论: 同时使用密码子优化和添加信号肽序列这两种途径可以明显提高 HN 基因的体外表达水平, 且高于这两种途径中任何一种单独使用的结果, 这符合了我们最初实验的设想, 为开展后续的动物免疫试验提供了可靠的试验依据。

致谢 感谢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的彭金美老师提供的 pVAX1 载体, 张强博士提供的 293T 细胞!

REFERENCES

[1] Aldous EW, Alexander DJ. Detection and differentiation of Newcastle disease virus (avian paramyxo virus type 1). *Avain Pathlol*, 2001, **30**(2): 117–128.

[2] Kraneveld FC. A poultry disease in the Dutch East Indies. *Nde Indisch B1 Diergeneeskd*, 1926, **38**: 448–450.

[3] Doyle T M. A hitherto unrecorded disease of fowls dueto a filter-passing virus. *J Comp-Pathlol Therap*, 1927. **40**: 144–169.

[4] Alexander DJ. Newcastle disease in countries of the European Union. *Avian Pathlol*, 1995, **24**: 545–551.

[5] Wang XJ, Bai YD, Zhang GZ, Zhao JX, Wang M, Gao GF. Structure and function study of paramyxovirus fusion protein heptad repeat peptides. *Arch BiochemBiophys*. 2005, **436**(2): 316–32.

[6] Yin Z, Liu JL. Virology of Animals(The second edition), Bei Jing; Science Press, 1997, 710.
殷震, 刘景华主编. 动物病毒学(第二版), 北京; 科学出版社, 1997.

[7] Mori H, Tawara H, Nakazawa H, Sumida M, Matsubara F, Aoyama S, Iritani Y, Hayashi Y, Kamogawa K. Expression of the Newcastle disease virus (NDV) fusion glycoprotein and vaccination against NDV challenge with a recombinant baculovirus. *Avian Dis*, 1994, **38**: 772–777.

[8] Wang S, Farfan-Arribas DJ, Shen S, Chou TH, Hirsch A, He F, Lu S. Relative contributions of codon usage promoter efficiency and leader sequence to the antigen expression and immunogenicity of HIV-1 Env DNA vaccine. *Vaccine*, 2006, **24**(21): 4531–4540.

[9] Šmahel Michal, Šíma Pavel, Ludvíková Viera, Vonka V. Modified HPV16 E7 Genes as DNA Vaccine against E7-Containing Oncogenic Cells. *Virology*, 2001, **281**(2): 231–238.

[10] Jiang YP, Li CJ, Zhang HB. Construction of codon optimized H5 avian influenza HA gene with chicken bias codons and *in vitro* expression of its DNA vaccine. *Chinese Journal of Preventive Veterinary Medicine*, 2005, **27**(6): 441–444.
姜永萍, 李呈军, 张洪波等. 含有鸡体偏嗜性密码子的 H5 亚型禽流感病毒 HA 基因的优化构建及其 DNA 疫苗体外瞬时表达研究, 国预防兽医学报, 2005, **27**(6): 441–444.

[11] Jiang YP. Enhanced Protective Efficacy of H5 Subtype avian influenza DNA vaccine with Condon optimized HA Gene and Chicken β-actin Promoter Expressive vocter. Beijing: Graduate School of Chinese Academy of Agricultural Science, 2004.
姜永萍. 抗原基因密码子及其表达载体的优化增强 H5 亚禽流感 DNA 疫苗的免疫保护效果. 中国农业科学院哈尔滨兽医研究所研究生论文, 2004.

[12] Jiang T, Chen SP, Yu M . Effect of codon-optimization and DNA priming-protein boosting on immunogenicity of recombinant plasmid containing SARS-CoV N gene. *Publication of Academy of Military Medical Sciences*, 2005, **19**(1): 4–7.
姜涛, 陈水平, 于曼, 等. 密码子优化和蛋白加强免疫对 SARS-CoVN 基因重组质粒免疫原性的影响,军事医学院院刊, 2005, **19**(1): 4–7.

[13] Alert HCJ. DNA Vaccine. Beijing: Chemical Industry Press, 2005, 84.
埃特尔 HCJ 主编. 李琦涵, 刘龙丁, 车艳春, 主译. DNA V 疫苗. 北京: 化学工业出版社, 2005, 84.

[14] Ye FY. Raise and Confirmation of signal peptide Hypothesis. *Foreign Medical Sciences* (*Journal of Medical Molecular Biology*), 1999, **21**(6): 377.
叶方寅. 信号肽假说的提出及证实. 国外医学分子生物学分册, 1999, **21**(6): 377.

[15] Zhen B, Zhan XM. Signal Peptide Sequence and its Application to Protein Expression. *Letters Biotechnology*, 2005, **16**(3): 296–298.

[16] Li Y, Luo L, Rasool N, Wagner R, Kang CY. Viral liopsomes released from insert cells infected with recombinant baculovirus expressing the matrix protein of vesicular stomatitis virus. *J Virol*, 1993, **7**: 584–588.

Journals.im.ac.cn