

共表达 MDV 糖蛋白 B 和鸡 γ 干扰素基因的重组 鸡痘病毒的构建*

彭大新 刘秀梵** 程 坚 周春红 陈素娟

(扬州大学畜牧兽医学院 扬州 225009)

关键词: 马立克氏病病毒, 糖蛋白 B, 鸡 γ 干扰素基因, 鸡痘病毒

中图分类号: S852.65 文献标识码: A 文章编号: 0001-6209(2002)05-0611-05

鸡马立克氏病(MD)是鸡的常见的淋巴组织增生性疾病,由 α -疱疹病毒引起。由于该病既能引起免疫抑制作用,又能导致较高的病死率,一直是危害养鸡业发展的重要疾病之一^[1]。现使用的疫苗有马立克氏病病毒(MDV)血清 1、2、3 型单价苗和混合多价苗,在疾病的预防中起重要作用。但 MD 冻干疫苗免疫保护力低而液氮疫苗保存运输不方便,并常因此造成免疫失败。为了研制免疫保护率高、使用方便新一代疫苗,国内外许多实验室开展了 MD 重组基因工程疫苗的研究,如 MD 亚单位疫苗、重组活病毒载体疫苗、基因疫苗等。目前研制成功的重组疫苗的免疫效力与常规疫苗接近或相当,并不能充分发挥基因工程疫苗的优势,还无法替代常规疫苗,如何提高基因工程疫苗的免疫效力成为当今研究的一个热点。

细胞因子是功能很强的蛋白质,能够调节许多生物学功能,参与机体由细胞因子组成的信息网络功能传导,具有免疫佐剂功能,是比较有希望的免疫增强剂,已在构建基因工程疫苗方面显示出广阔的应用前景^[2-4]。本研究在鸡痘病毒载体中共表达了 MDVgB 和鸡 γ 干扰素基因,为探索 γ 干扰素的免疫佐剂作用,提高 MD 基因工程疫苗的免疫效力打下基础。

1 材料和方法

1.1 病毒

鸡痘病毒(FPV)282E4 疫苗株购自中国兽药监察所,增殖适应于含 4% 犊牛血清 F10-199 培养基中鸡胚纤维细胞(CEF)上。水泡性口炎病毒(VSV)由南京医科大学惠赠。SPF 鸡胚购于南京药械厂实验动物房。

1.2 质粒和宿主菌

含鸡痘病毒复制非必需片段的 pFPV7s₈ 及含 P7.5-P11-LacZ 标记基因盒的 pppG18 由彭大新等^[5]构建,含人工合成强启动子的 P_s 由朱爱华等构建^[6],含 MDV 疫苗株 CVI988 gB 基因的 PMGB 由邢力等^[7]构建,鸡 γ 干扰素基因由程坚等^[8]克隆鉴定并在 PE/L 启动子调控下表达。宿主菌 DH5 α 购自华美生物工程有限公司。

1.3 酶及其他试剂

限制性内切酶、T4 DNA 连接酶、Klenow 酶、DNA 快速连接试剂盒、DNA 琼脂凝胶抽提试剂盒、Fu-

* 国家 863 计划(960332025);上海市科技兴农重点攻关项目(农科攻字(2000)第 5-3 号);江苏省自然科学基金项目(BK2001415)

** 通讯作者

作者简介 彭大新(1966-)男,博士,副教授,主要从事细胞和病毒分子生物学研究。

收稿日期 2001-10-29,修回日期 2002-02-10

Gene™6 转染试剂购自 Roche 公司或 Promega 公司;F10、199 培养基、细胞培养覆盖用琼脂、羊抗鼠 IgG-FITC 荧光抗体购自 Sigma 公司;化学试剂均为国产分析纯;抗 MDV gB 单抗由崔治中教授惠赠。

1.4 复制非必需片段的克隆位点的加工和高效表达插入载体的构建

人工合成多克隆位点(*Hind*Ⅲ、*Sph* I、*Pst* I、*Sal* I、*Xba* I、*Bam*H I、*Sma* I、*Kpn* I、*Sca* I、*Eco*R I, 并于两端各加 2 个保护碱基,宝生物工程公司合成)经退火、磷酸化^[6]后与 *Eco*RV 酶切的 pFPV7s 相连,命名为 FPV7s。将 pppG18 *Bam*H I 酶切经 Klenow 酶补平,电泳回收 P7.5-P11-LacZ 基因盒后与 *Eco*R I 酶切补平 Ps 连接,命名为 pGS。将 pGS 和 FPV7s 分别用 *Xba* I 和 *Kpn* I 酶切补平,再用 *Hind*Ⅲ 酶切电泳回收目的片段连接构建成插入载体 pFGS11,结构为 FPV-Ps→MCS-LacZ-P11-FPV。所有的连接均用 T4 DNA 连接酶于 16℃ 连接 4h,连接产物转化感受态大肠杆菌 DH5 α ,涂布含氨苄青霉素、X-Gal 和 IPTG 的 LB 平板,37℃ 培养 16~18 h 挑取蓝色菌落,少量抽提,酶切鉴定^[9]。

1.5 表达 MDV gB 和鸡 γ 干扰素基因的转移载体的构建

将 PMGB 中的 gB 基因插入到 pFGS11 的 MCS 中,使 gB 的起始密码子置于 Ps 下游构建成 pFGBS;将 PE/L-IFN 基因盒插入到 pFGBS 中,构建成转移载体 pFGBSI。连接使用快速连接试剂盒,于 18℃ 作用 5 min,后转化,酶切图谱分析鉴定阳性质粒。

1.6 共表达 MDV gB 和鸡 γ 干扰素基因的重组鸡痘病毒(rFPV-gB-IFN)的转染和纯化

转染按 FuGene™6 转染试剂的说明进行。在 60mm 培养皿中培养 SPF CEF 至形成单层,以 0.1 MOI 的 FPV 282E4 株感染 CEF,37℃ 培养 3~4 h,倒去上清用 DMEM 基础培养基洗涤两次后加 4mL 备用;将 2~4 μ g pFGBSI 溶于 30 μ L 的 TE,按 1:3 将 FuGene 稀释到 100 μ L DMEM 基础培养基,两者混匀后置室温作用 15min,将上述混合物缓慢滴加至 CEF 的 DMEM 基础培养基中,轻轻混匀,37℃ 培养 6 h 后换维持液。待细胞完全病变后收获病毒,反复冻融 3 次,低速离心去除细胞碎片,上清用于重组病毒的筛选。筛选和纯化方法见文献 [6]。

1.7 表达 MDV gB 和鸡 γ 干扰素基因的重组鸡痘病毒的鉴定

MDV gB 的表达以间接免疫荧光试验检测^[7],并以 Ps 启动子单表达 MDV gB 的重组鸡痘病毒(rFPV-gB)和野生型鸡痘病毒为对照。鸡 γ 干扰素的表达用水泡性口炎病毒(VSV)病毒病变抑制法测定^[4],即将重组病毒按 0.01 MOI 接种 CEF,72 h 培养上清,倍比稀释加到 96 孔次代 CEF 上,100 μ L/孔,37℃ 培养过夜,去上清,接种含 10⁴ TID₅₀ VSV 的维持液 10 μ L/孔,吸附 30 min 后加维持液,37℃ 培养 24~48 h 观察空斑形成。上清能完全抑制 VSV 产生细胞病变的最大稀释度 \times 10,即为每毫升上清中所含的 γ 干扰素量。

1.8 重组病毒在 CEF 上的繁殖及形态学观察

将双表达的重组病毒和单表达 MDV gB 基因的重组病毒及野生型 FPV 冻融三次后低速离心去细胞,以 1:10 和 1:20 稀释接种次代 CEF,37℃ 吸附 30min,加维持液培养 96h,测微尺测定 12 个病毒空斑大小。以上述三种病毒按 0.1 MOI 感染 CEF,37℃ 培养 72h,收获后计数空斑。

2 结果

2.1 鸡痘病毒插入载体及共表达 MDV gB 和鸡 γ 干扰素基因转移载体的构建

经一系列操作将 Ps 和 P11-LacZ 相向插入到复制非必需片段 FPV7s 中形成插入载体 pFGS11,将 MDV gB 基因正向置于 Ps 下游,PE/L-IFN 相同或相向置于 gB 下游(图 1),构建转移载体 pFGBSI。酶切分析证实了阳性重组质粒 pFGS11(图 2)和 pFGBSI(图 3),PE/L-IFN 与 Ps-gB 相同方向的 pFGBSI *Eco*RV 酶切条带分别为 7.9kb、2.5kb 和 2.4kb,相对方向的 pFGBSI2 *Eco*RV 酶切条带分别为 7.9kb、2.6kb 和 2.3kb。

2.2 共表达 MDV gB 和鸡 γ 干扰素基因的重组鸡痘病毒的筛选与鉴定

选择 pFGBSI2 转染已感染 FPV 282E4 株的 CEF,经蓝斑筛选,得到稳定纯化的重组病毒 rFPV-gB-IFN。间接荧光试验可见 rFPV-gB-IFN 感染的 CEF 的胞浆和胞膜上的黄绿色荧光(图 4)。VSV 病毒病变抑制法测定 rFPV-gB-IFN 的 72h 上清的 γ 干扰素量为 640~1280 单位/mL。

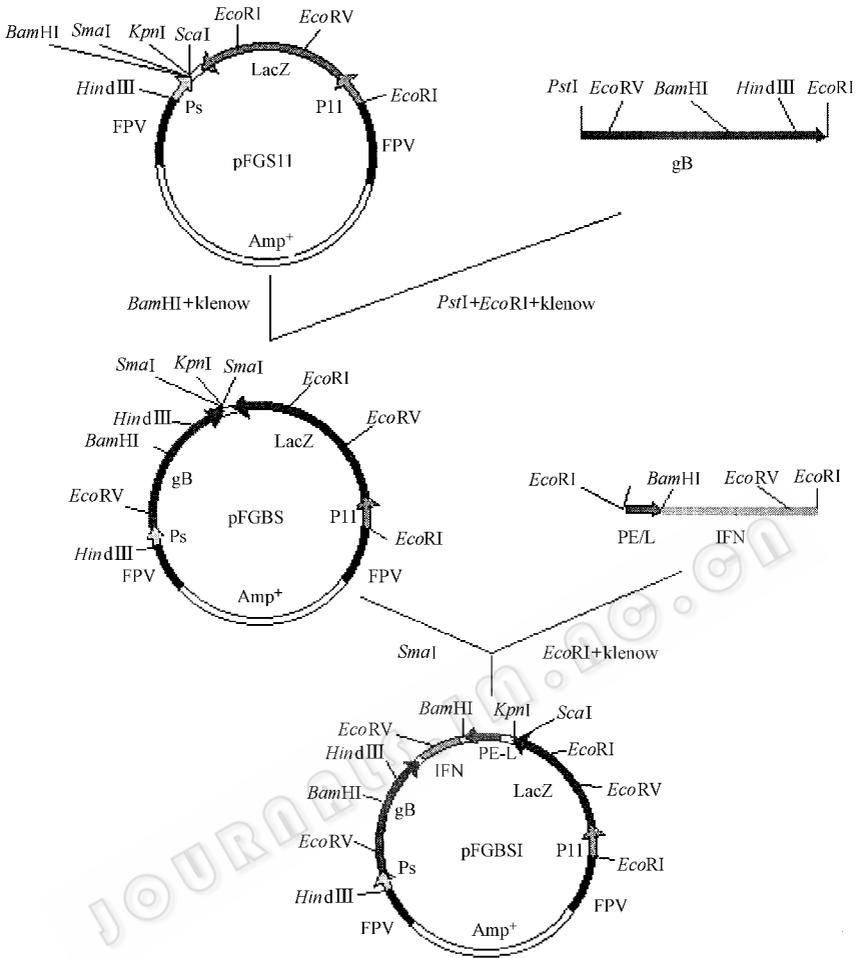


图 1 共表达 MDV gB 和鸡 γ 干扰素基因的鸡痘病毒转移载体的构建

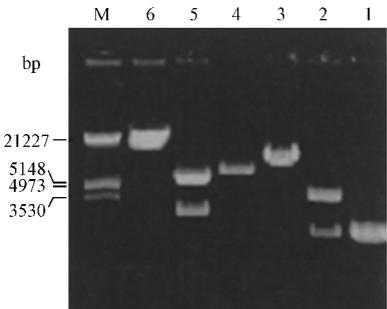


图 2 pEGS11 的酶切鉴定

M. λ DNA/EcoR I + Hind III ; 1. Ps + EcoR I ; 2. pppG18 + BamH I ; 3. pGS + Hind III ; 4. FPV7s + EcoR I ; 5. pFGS11 + Hind III + EcoR I ; 6. pFGS11 + BamH I .

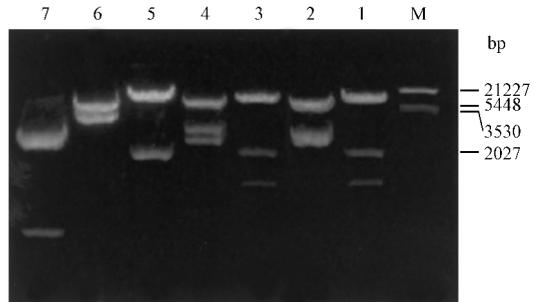


图 3 pFGBSI 的酶切鉴定

M. λ DNA/EcoR I + Hind III ; 1. pGBS11 + BamH I ; 2. pGBS11 + EcoRV ; 3. pGBS12 + BamH I ; 4. pGBS12 + EcoRV ; 5. pFGBS + BamH I ; 6. pFGBS + EcoRV ; 7. PE/L-IFN + EcoR I .

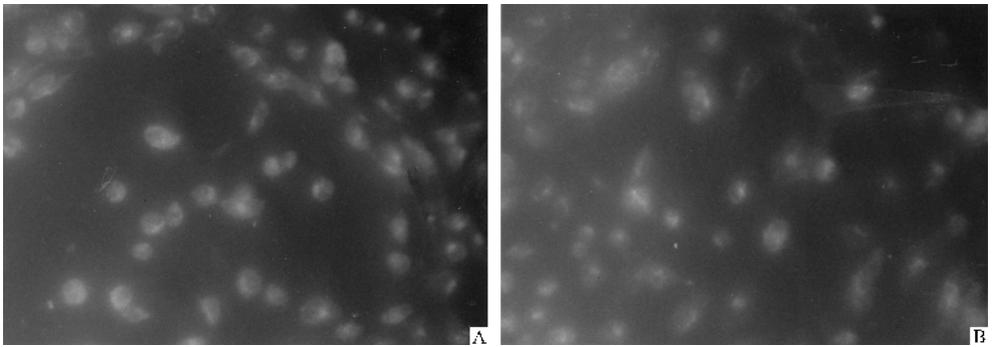


图4 间接免疫荧光试验检测重组病毒中 MDV gB 基因的表达

A: rFPV-gB; B: rFPV-gB-IFN.

2.3 rFPV-gB-IFN 在 CEF 上的繁殖及形态学观察

结果见表 1。γFPV-gB 和野生型 FPV 的空斑大小无显著差异,但均显著大于 γFPV-gB-IFN 的空斑。γFPV-gB-IFN 经过一次扩增后的空斑数明显少于 γFPV-gB 和野生型 FPV。

表 1 重组鸡痘病毒空斑大小及空斑数的测定

组别	平均大小/ μm	空斑数/(PFU/mL)
γFPV-gB-IFN	(538 ± 71)(413 ± 61) ^{b*}	1.5 × 10 ⁷
γFPV-gB	(771 ± 114)(654 ± 89) ^{a*}	6.1 × 10 ⁷
WT-FPV	(791 ± 114)(663 ± 121) ^{a*}	5.6 × 10 ⁷

* 字母不同代表差异显著($P < 0.05$)

3 讨论

γ 干扰素是非常重要的细胞因子,可通过诱导多种细胞表达 MHC I 类和 II 类分子增强免疫应答,促进 Th0 向 Th1 的分化,促进 CD8 CTL 细胞的成熟^[10] 因此可作为免疫佐剂。Karaca 等^[3] 用鸡痘病毒载体共表达 NDV F 或 HN 和 I 型干扰素,免疫鸡发现 I 型干扰素可显著降低鸡痘病毒减轻体重的副反应; Rautenschlein 等^[4] 共表达 NDV F、HN 和 I、II 型干扰素,免疫火鸡发现 rFPV-NDV-IFN-II 的免疫保护力最高。本研究以鸡痘病毒载体共表达 MDV gB 和鸡 γ 干扰素基因,希望能增强重组病毒的免疫保护率和降低 FPV 减轻体重的副反应。从 rFPV-gB-IFN 在细胞上形成空斑比 FPV 的小且数量比 FPV 少来看,减轻体重的副反应可能与抑制病毒繁殖有关。

Levy 等^[11] 测定天然的 I 型和 II 型干扰素对 MDV 病毒复制影响时发现,用 IFN I 次处理后 3~4d 内可抑制 CVI988 和 HVT gB 的表达,5~7d 后恢复到未处理组的表达水平,但 7d 后 MDV 病毒的空斑数量少且体积小。IFN 的多次处理会一直抑制 MDV 的复制,但不会完全清除病毒。比较 γFPV-gB-IFN、rFPV-gB 和野生型 FPV 在 CEF 上生长状态时可见, rFPV-gB 与 FPV 的空斑大小及数量一致,证明 MDV gB 基因在鸡痘病毒中的表达,并不影响 FPV 的复制和繁殖的速度,而共表达 MDV gB 和 γ 干扰素基因的 rFPV-gB-IFN 的空斑明显比 rFPV-gB 和 FPV 小且数量少,说明干扰素的表达可干扰鸡痘病毒的复制。γ 干扰素对重组病毒的表达产物的作用要通过动物试验来验证。

参 考 文 献

[1] 卡尔尼克 B W 主编(高福等译). 禽病学. 第 10 版. 北京: 北京农业出版社, 1999. 465~529.

[2] Hazama M, Mayumi A, Asakawa N, et al. Vaccine, 1993, 11(6): 629~636.

- [3] Karaca K ,Sharma J M ,Winslow B J ,*et al* . *Vaccine* ,1998 ,**16** (16) :1496 ~ 1503 .
- [4] Rauten S ,Sharma J M ,Winslow B J ,*et al* . *Vaccine* ,1999 ,**18** (5 ~ 6) :426 ~ 433 .
- [5] 彭大新 ,王志亮 ,刘秀梵 ,等 . 江苏农学院学报 ,1995 ,**16** (4) :13 ~ 17 .
- [6] 朱爱华 ,彭大新 ,吴艳涛 ,等 . 扬州大学学报 ,1999 ,**2** (2) :25 ~ 28 .
- [7] 邢 力 ,彭大新 ,朱爱华 ,等 . 微生物学报 ,1999 ,**39** (2) :164 ~ 167 .
- [8] 程 坚 ,吴艳涛 ,彭大新 ,等 . 农业生物技术学报 ,2000 ,**8** (3) :236 ~ 239 .
- [9] 萨姆布鲁克 J ,弗里奇 E F ,曼尼阿蒂斯 T . (金冬雁等译) . 分子克隆实验指南 . 第二版 . 北京 : 科学出版社 ,1998 .
- [10] 周光炎 . 免疫学原理 . 上海 : 上海科学技术文献出版社 ,2000 . 82 ~ 120 .
- [11] Levy A M ,Heller E D ,Leitner G . *Acta Virologica* ,1999 ,**43** (2 ~ 3) :121 ~ 127 .

Construction of Recombinant Fowlpox Virus Coexpressing Marek 's Disease Virus gB and Chicken Type II Interferon Genes*

Peng Daxin Liu Xiufan** Cheng Jian Zhou Chunhong Chen Sujuan

(College of Animal Husbandry and Veterinary Science ,Yangzhou University ,Yangzhou ,Jiangsu 225009 ,China)

Abstract : Recombinant fowlpox viruses(rFPVs) coexpressing MDV gB and chicken type II interferon(IFN- II) gene were constructed by using different promoters of Ps and PE/L. rFPVs were selected and purified by blue plaque expressing β -galactosidase. The expression of MDV gB gene was confirmed by indirect immunofluorescence assay. The levels of MDV gB expressed in rFPV-gB-IFN under the control of the synthetic promoter Ps was same as that in rFPV-gB. The expression of IFN- II was examined in chicken embryo fibroblas(CEF) by protection against vesicular stomatitis virus-induced cytopathic effect. The levels of IFN expressed in CEF was 640 ~ 1280 units/mL. When rFPVs were propagated in CEF ,the plaque sizes of rFPV-gB were larger than those of rFPV-gB-IFN ,the plaque formation units of rFPV-gB were also more than those of rFPV-gB-IFN.

Key words : Marek 's disease virus , gB , Chicken type II interferon , Fowlpox virus

* Project of Chinese National Programs for High Technology Research and Development (960332025) ; Shanghai Key Program Gran(2000-5-3) and Jiangsu Nature Science Fund Gran(BK2001415)

** Author for correspondence