

共表达新城疫病毒 F 基因和 H9 亚型禽流感病毒 HA 基因的重组鸡痘病毒

韦栋平 刘玉良 邵卫星 卢建红 刘秀梵*

(扬州大学农业部畜禽传染病学重点开放实验室 扬州 225009)

摘 要 应用 RT-PCR 扩增出新城疫病毒 F48E8 株融合蛋白(F)基因,将其克隆入 pGEM-T easy vector 构建重组质粒 pGEM-TF 并进行测序确证。分别从 pGEM-T 和 pUCHA 切下 F 基因和 H9 亚型禽流感病毒 F 株(A/chicken/china/F/1998)血凝素(HA)基因,通过一系列分子生物学操作步骤插入到质粒 pFPV7S 中的鸡痘病毒基因组复制非必需片段构建重组质粒 p7SHF,其中 F 基因和 HA 基因分别由鸡痘病毒启动子 $P_{E/L}$ 和合成启动子 PS 调控。最后将 P11-LacZ 报告基因表达盒插入质粒 p7SHF 获得转移载体 pFPVHF,用以转染已预先感染鸡痘病毒 282E4 疫苗株的鸡胚成纤维细胞(CEF)。通过在含有 X-Gal 的营养琼脂上连续挑选蓝色病毒蚀斑获得并纯化重组病毒。PCR 和 Southern blot 检测证实了 F 基因和 HA 基因已插入鸡痘病毒的基因组,间接免疫荧光试验结果表明重组病毒能够同时正确表达 HA 和 F 蛋白。

关键词 新城疫病毒, H9 亚型禽流感病毒, 重组鸡痘病毒, 融合蛋白, 血凝素

中图分类号 Q786 **文献标识码** A **文章编号** 1001-6209(2004)03-0286-05

新城疫(Newcastle disease, ND)是由副粘病毒科的新城疫病毒(Newcastle disease virus, NDV)引起的一种烈性家禽传染病,它对我国养禽业的危害最严重。我国在防治 ND 实践中一直依赖于常规疫苗包括弱毒疫苗、中等毒力疫苗和油乳剂灭活疫苗的免疫接种。低致病性的 H9 亚型禽流感病毒(Avian Influenza virus, AIV)是目前影响我国养禽业的主要禽流感病毒亚型^[1],它对养禽业的危害是以严重程度不同的形式存在,但是该亚型 AIV 的传播效率很高,在国内鸡群复合感染比较普遍的情况下,可起到协同致病的作用,导致更高的发病率和死亡率^[2]。而且该亚型病毒一旦侵入鸡群后可形成持续感染,不会自动消失,因此它所造成的经济损失不可忽视。当前我国对 H9 亚型禽流感的控制主要应用相同亚型的油乳剂灭活疫苗。但是作为我国目前控制 ND 和 H9 亚型 AI 的重要手段,常规疫苗的免疫接种会干扰现有技术条件下的免疫监测和流行病学调查,给 ND 和 H9 亚型 AI 的诊断和清群增加难度。其中,油乳剂灭活疫苗使用后会引发严重应激、存在易散毒等安全性问题,而且生产成本偏高。因此,目前迫切需要研制能够取代常规疫苗的新型疫苗。应用

鸡痘病毒作为载体开发的基因工程活载体疫苗可以克服常规疫苗的诸多缺陷,是近年来禽类基因工程疫苗研究的热点。本研究拟用鸡痘病毒作为表达载体,构建能够同时表达 NDV 融合蛋白(Fusion protein, F)基因和 H9 亚型 AIV 血凝素(Hemagglutinin, HA)基因的重组鸡痘病毒,旨在为 ND 和 H9 亚型 AI 的控制提供一种新型疫苗候选株。

1 材料

1.1 病毒和鸡胚

鸡痘病毒 282E4 疫苗株(wt-FPV)和 NDV F48E8 株购自中国兽医药品监察所,9~11 日龄 SPF 鸡胚购自山东家禽研究所。单表达 NDV F48E8 株 F 基因的重组鸡痘病毒(rFPV-F)由吴艳涛等^[3]构建;单表达 H9 亚型 AIV F 株 HA 基因的重组鸡痘病毒(rFPV-HA)由本室陈平构建。

1.2 质粒和菌株

含 H9 亚型 AIV F 株 HA 基因的 pUCHA 和含鸡痘病毒早晚期启动子 $P_{E/L}$ 的 SKIFN 由程坚等^[4]构建;含人工合成强启动子 P_S 的质粒 pS 由朱爱华等^[5]构建;含鸡痘病毒复制非必需片段的质粒 pF-

基金项目 国家 863 计划(2001AA213041)

* 通讯作者。Tel: 86-514-7979386; Fax: 86-514-7323112; E-mail: xfliu@mail.yzu.edu.cn

作者简介: 韦栋平(1975-),男(壮族)广西人,博士研究生,主要从事分子病毒学与病毒基因工程疫苗的研究。E-mail: weidongping2001@sohu.com

收稿日期 2003-07-08, 修回日期 2003-12-16

PV7S 和含 P11-*LacZ* 标记基因盒的质粒 pppG18 由彭大新等^[6]构建;质粒 pBluescriptSK 和 pGEM-T easy vector 购自 Promega 公司;大肠杆菌 DH5 α 购自华美生物工程有限公司。

1.3 主要试剂

各种分子克隆用工具酶购自 Promega 公司;Agarose Gel DNA Extraction kit、Expand High Fidelity PCR system、转染试剂 FuGENETM6、DIG DNA Labeling and Detection Kit 购自 Roche 公司;羊抗鼠 IgG-FITC 荧光抗体和羊抗鸡 IgG-FITC 荧光抗体购自 Sigma 公司;鼠抗 H9 亚型 AIV F 株的单克隆抗体腹水和鸡抗 NDV F48E8 株的多克隆血清由本实验室制备。

2 方法

2.1 引物设计和合成

根据本室前期研究结果^[3,4],设计分别扩增 H9 亚型 AIV F 株 HA 基因和 NDV F48E8 株 F 基因引物。HA 基因上游引物 PHA1:5'-CCCAAGCTTATG-GAAACATATCAC-3';下游引物 PHA2:5'-CCCGTCGACGGAACAAAGATG-3',引物跨幅约为 1.7kb,覆盖整个 HA 基因编码框。F 基因上游引物 PF1:5'-GCA-GGATCCGCATTCAAAGTGCAAGAT-3',引入 *Bam*H I 限制酶切位点;下游引物 PF2:5'-GGGTCTAGAAAAGTCTGCATTACATTCATGTA-3',引入 *Xba*I 限制酶切位点和痘病毒基因组早期基因的转录终止信号。引物跨幅约为 1.7kb,覆盖整个 F 基因编码框。引物由 TaKaRa 公司合成。

2.2 NDV F 基因的 RT-PCR 扩增和克隆

参照文献[7]的方法提取 NDV F48E8 株基因组 RNA 为模板,首先以引物 PF2 为反转录引物合成 cDNA,然后以引物 PF1 和 PF2 为扩增引物,用 Expand High Fidelity PCR system 扩增 F 基因。反应条件为 94℃ 5min,94℃ 45s,57℃ 45s,72℃ 2min,30 个循环,72℃ 8min。PCR 产物经电泳鉴定后,回收 1.7kb 大小的片段与 pGEM-T easy vector 连接,构建重组质粒 pGEM-TF,并对目的片段进行测序确证。

2.3 含 F 基因表达盒重组质粒的构建

用 *Bam*H I 和 *Sac*I 双酶切质粒 pGEM-TF,回收约 1.7kb 的 F 基因片段;*Bam*H I 和 *Sac*I 双酶切质粒 SKIFN,回收含启动子 $P_{E/L}$ 的线性载体片段与 F 基因片段连接,使 F 基因置于启动子 $P_{E/L}$ 的下游,限制性内切酶法筛选阳性重组质粒命名为 SKPELF。

2.4 含 HA 基因表达盒重组质粒的构建

首先以 *Hind*III 酶切 pUCHA,以 *Bam*H I 酶切 pS

质粒,然后分别用 Klenow 酶补平末端,再以 *Kpn*I 酶切两种质粒,分别回收约 1.7kb 的 HA 片段和线性化 pS 质粒并进行连接,筛选 HA 片段正确插入人工合成启动子 P_S 下游的阳性质粒并命名为 pPSHA。

2.5 F 基因和 HA 基因双表达盒重组质粒的构建

用 *Hind*III 和 *Sal*I 双酶切质粒 pPSHA,回收 1.7kb 的 HA 表达盒与同样经 *Hind*III 和 *Sal*I 双酶切质粒 pBluescriptSK 连接,筛选重组质粒并命名为 SKPSHA。

用 *Sal*I 酶切质粒 SKPELF、*Hind*III 酶切质粒 SKPSHA,然后分别用 Klenow 酶补平末端,再以 *Xba*I 分别酶切,回收 1.8kb 的 F 基因表达盒和线性化质粒 SKPSHA 进行连接,使启动子 $P_{E/L}$ 和合成启动子 P_S 串联并背向分别调控 F 基因和 HA 基因的转录,筛选阳性重组质粒并命名为 SKHF3。

2.6 含 F 基因和 HA 基因双表达盒鸡痘病毒转移载体的构建

以 *Sac*I 酶切 SKHF3,*Bam*H I 酶切 pFPV7S,然后分别用 T4 DNA 聚合酶修平末端,再用 *Kpn*I 酶切,回收约 3.7kb 的 F 基因和 HA 基因双表达盒与线性化的 pFPV7S 并进行连接,构建转移载体 p7SHF。为方便筛选重组病毒,用 *Bam*H I 和 *Xba*I 双酶切 pppG18,再以 T4 DNA 聚合酶修平末端,回收 P11-*LacZ* 标记基因盒与经 *Xba*I 酶切、T4 DNA 聚合酶修平末端并用小牛肠碱性磷酸酶去磷酸化处理的 p7SHF 进行连接反应,用限制性内切酶法筛选 P11-*LacZ* 标记基因盒顺向插入 F 基因下游的阳性质粒,并通过序列测定对 F 基因和 HA 基因编码框进行确证,获得转移载体,命名为 pFPVHF。

2.7 表达 NDV F 基因和 H9 亚型 AIV HA 基因重组病毒(rFPV-HA-F)获得和纯化

转移载体的转染以及重组病毒的筛选和纯化方法按文献[5]进行。

2.8 共表达 NDV F 基因和 H9 亚型 AIV HA 基因重组病毒的鉴定

2.8.1 重组病毒的 PCR 扩增和 Southern blot 检测:
(1) HA 基因和 F 基因探针标记:分别从质粒 pUCHA 和 pGEM-TF 回收 HA 和 F 基因完整片段,参照 DIG DNA Labeling and Detection Kit 说明书进行标记。
(2) 重组病毒目的基因的 PCR 扩增和 Southern blot 鉴定:病毒和 CEF 基因组 DNA 的抽提参照文献[5],分别用 F 基因和 HA 基因的扩增引物对 rFPV-HA-F 基因组 DNA 进行 PCR 扩增,同时分别以质粒 pGEM-TF 和 pUCHA 作为阳性对照组,以 CEF 和 wt-FPV 基

基因组 DNA 为阴性对照组分别进行扩增。PCR 产物经电泳初步鉴定后转移到尼龙膜上,再用 F 基因和 HA 基因探针进行杂交并免疫测定。

2.8.2 重组病毒的间接免疫荧光鉴定 (1) HA 基因表达产物的鉴定:用 rFPV-HA-F 感染已经长成单层的 CEF,并分别设 rFPV-HA 和 wt-FPV 为阳性和阴性对照。待单层 CEF 出现典型蚀斑后用甲醇固定,先后用鼠抗 H9N2 亚型 AIV F 株的单克隆抗体和羊抗鼠 IgG-FITC 荧光抗体相结合,充分洗涤后置荧光显微镜下观察。(2) F 基因表达产物的鉴定:用 rFPV-HA-F 感染已经长成单层的 CEF,并分别设 rFPV-F 和 wt-FPV 为阳性和阴性对照。待单层 CEF 出现典型蚀斑后用甲醇固定,先后用鸡抗 NDV F48E8 株的多克隆血清和羊抗鸡 IgG-FITC 荧光抗体相结合,充分洗涤后置荧光显微镜下观察。

3 结果

3.1 NDV F 基因的克隆和鉴定

通过 RT-PCR 方法从 NDV F48E8 株的基因组扩增出 1.7kb 大小的片段,与预期相符。回收目的片段插入 pEGM-T 载体,测序结果显示,编码框序列与所发表的 F 基因序列完全相符,终止密码子后含有痘病毒转录终止信号序列 TTTTTT。

3.2 含 NDV F 基因表达盒重组质粒的构建和鉴定

用 *Bam*H I 和 *Sac* I 双酶切质粒 SKIFN 的线性载体片段(含启动子 $P_{E/L}$)与 F 基因相连接后的重组质粒,经电泳可见 1.7kb 的目的片段及 3.1kb 大小的含启动子 $P_{E/L}$ 载体片段。说明 F 基因已成功插入质粒 SKIFN 启动子 $P_{E/L}$ 的下游。

3.3 含 HA 基因表达盒重组质粒的构建和鉴定

重组质粒 pPSHA 经 *Hind*III 和 *Kpn* I 双酶切后,得到 1.9kb 的片段与 HA 基因片段(约 1.7kb)加上人工合成启动子 P_S (约 200bp)之和相一致,表明 HA 基因已成功插入质粒 pS 并置启动子 P_S 的下游。

3.4 含 F 基因和 HA 基因双表达盒重组质粒的构建和鉴定

用 *Hind*III 和 *Sal* I 双酶切 pPSHA,回收 1.9kb 大小的 HA 基因表达盒,插入经同样双酶切的 pBluescriptSK 质粒。重组质粒用 *Hind*III 和 *Sal* I 双酶切后获得 1.9kb 大小的片段和 3.0kb 大小的载体片段,表明 HA 基因表达盒已插入 pBluescriptSK 质粒,重组质粒命名为 SKPSHA。经过一系列步骤,从 SKPELF 切下 F 基因表达盒定向插入 SKPSHA。所得

重组质粒用 *Hind*III 和 *Xba* I 双酶切可切出约 1.8kb 大小的目的片段,与 F 基因片段加上启动子 $P_{E/L}$ (约 100bp)大小之和相一致,表明 F 基因表达盒已成功插入质粒 SKPSHA,命名为 SKHF3。

3.5 重组鸡痘病毒转移载体的构建和鉴定

将 3.7kb 的 F 基因和 HA 基因表达盒插入质粒 pFPV7S。重组质粒用 *Kpn* I + *Xba* I 双酶切,可切出 3.7kb 大小的片段,与 F 基因和 HA 基因双表达盒的预期大小一致;用 *Kpn* I + *Bam*H I 双酶切,可切出 1.7kb 和 2.0kb 的片段,分别与 F 基因片段、HA 基因表达盒加上启动子 $P_{E/L}$ 大小相一致,证明 F 基因和 HA 基因双表达盒成功插入 pFPV7S 的鸡痘病毒复制必需片段,命名为 p7SHF;从 pppG18 切下 P11-*LacZ* 基因表达盒经 T4 DNA 聚合酶修平末端后,插入 *Xba* I 酶切和 T4 DNA 聚合酶修平末端的 p7SHF 重组质粒用 *Bam*H I 酶切可切出 5.6kb 大小的片段,与 P11-*LacZ* 基因表达盒加上 F 基因之和相一致,证明 P11-*LacZ* 基因表达盒成功插入 p7SHF;用 *Kpn* I 酶切重组质粒,结果切出 4.0kb 大小的片段,与 F 基因、HA 基因表达盒和 P11-*LacZ* 基因表达盒 5'端约 300bp 大小片段之和相一致,表明 P11-*LacZ* 基因表达盒顺向插入 F 基因的下游。阳性质粒经序列测定显示 F 基因和 HA 基因编码框序列正确,未发生移码。转移载体命名为 pFPVHF。

3.6 重组病毒的 PCR 和 Southern blot 鉴定结果

分别用 F 基因和 HA 基因的扩增引物均可以从 rFPV-HA-F 基因组中 PCR 扩增出约 1.7kb 大小的目的片段,与阳性对照组结果一致,而阴性对照组未能扩增出任何条带。PCR 产物经 Southern blot 进一步鉴定,结果显示,在尼龙膜上与 rFPV-HA-F 基因组扩增目的条带相应的位置出现明显的杂交带,与阳性对照组结果一致,而阴性对照组则未有任何杂交信号(图 1 和图 2),从而证明 F 基因和 HA 基因均已成功整合入鸡痘病毒的基因组。

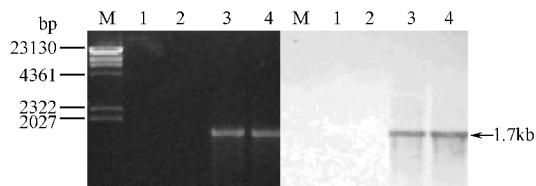


图 1 rFPV-HA-F 基因组中 HA 基因的 PCR 和 Southern blot 鉴定

Fig. 1 Identification of HA gene in the genome of rFPV-HA-F by PCR and Southern blot

M. DNA marker (λ DNA/*Hind* III); 1, 2. Negative control; 3. PCR product from pUCHA; 4. PCR product from the DNA of CEF infected with rFPV-HA-F

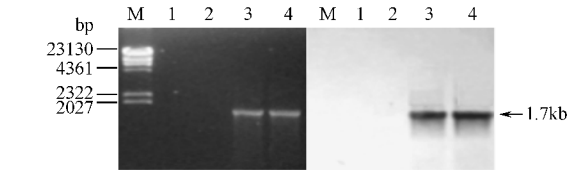


图2 rFPV-HA-F 基因组中 F 基因的 PCR 和 Southern blot 鉴定

Fig.2 Identification of F gene in the genome of rFPV-HA-F by PCR and Southern blot
M. DNA marker (λDNA/Hind III); 1. Negative control; 3. PCR product from pGEM-TF; 4. PCR product from the DNA of CEF infected with rFPV-HA-F.

3.7 基因表达产物的鉴定

3.7.1 HA 基因表达产物的鉴定 :感染 rFPV-HA-F 和 rFPV-HA 的 CEF 胞浆和胞膜区呈特异性黄绿色荧光(图 3-A 和图 3-B);而感染 wt-FPV 的 CEF 则未呈现特异性荧光着色(图 3-C),表明 HA 基因获得正确表达。

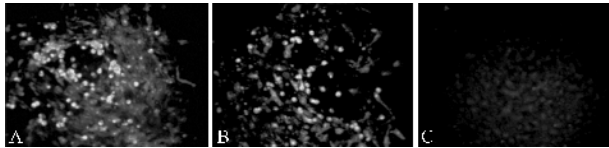


图3 感染 rFPV-HA-F 的 CEF 中 HA 表达产物的间接免疫荧光鉴定结果

Fig.3 Immunofluorescence detection of the expressed HA in rFPV-infected CEF
A. CEF infected with rFPV-HA-F; B. CEF infected with rFPV-HA; C. CEF infected with wt-FPV.

3.7.2 F 基因表达产物的鉴定 :感染 rFPV-HA-F 和 rFPV-F 的 CEF 胞浆和胞膜区呈特异性黄绿色荧光(图 4-A 和图 4-B);而感染 wt-FPV 的 CEF 则未呈现特异性荧光着色(图 4-C),表明 F 基因获得正确表达。

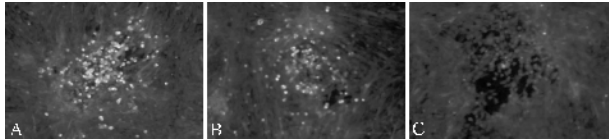


图4 感染 rFPV-HA-F 的 CEF 中 F 表达产物的间接免疫荧光鉴定结果

Fig.4 Immunofluorescence detection of the expressed F in rFPV-infected CEF
A. CEF infected with rFPV-HA-F; B. CEF infected with rFPV-F; C. CEF infected with wt-FPV.

4 讨论

新城疫病毒 F 蛋白和禽流感病毒 HA 均是病毒相应宿主的主要保护性抗原^[8,9]。本实验室前期工作^[10,11]中,发现新城疫病毒 F48E8 株和近几年国内流行的野外分离株之间,F 蛋白表现 90% 以上的同

源性,主要功能区保守;而 H9 亚型 AIV F 株 HA 基因则与近几年从我国不同省份分离的大部分 H9 亚型 AIV 毒株的 HA 基因序列的同源性达 96% 以上。因此,NDV F48E8 株 F 基因和 H9AIV F 株 HA 基因均适合作为基因工程疫苗的目的基因。吴艳涛等^[3]和程 坚等^[4]应用本实验室自主开发的鸡痘病毒表达系统构建了分别表达 NDVF48E8 株 F 基因和 H9AIV F 株 HA 基因的重组痘病毒,其免疫效力与常规疫苗相当,并具有良好的遗传稳定性。本研究在以上的工作基础上,利用同源重组的方法首次将新城疫病毒 F48E8 株 F 基因和 H9AIV F 株 HA 基因同时插入鸡痘病毒基因组复制非必需区,成功构建了能够同时表达 F 基因和 HA 基因的重组鸡痘病毒。这为开发基因工程活载体多联苗来取代 ND 和 H9 亚型 AI 常规疫苗的使用,以克服后者干扰免疫监测的缺点奠定了基础。并且,多联苗的免疫策略可以达到一针多免,简化免疫程序,减少应激和节约成本的目的,在禽业生产与疫病控制中具有重要的现实意义。

为方便筛选重组病毒,将大肠杆菌的 β-半乳糖苷酶(*LacZ*)基因与 F 基因和 HA 基因同时插入鸡痘病毒基因组复制非必需区内,重组病毒在细胞内表达的 β-半乳糖苷酶可与外加底物 X-Gal 发生化学反应,生成蓝色产物,使重组病毒蚀斑呈蓝色而易于筛选和纯化。由于带有各自独立启动子的 3 个基因表达盒同时插入鸡痘病毒的一个非必需区内,为克服多个启动子之间可能存在的干扰现象^[12,13],在构建转移载体时,使分别调控 F 基因和 HA 基因的早晚期启动子 $P_{E/L}$ 和 P_S 串联连接但背向启动转录;在 F 基因终止密码子(TGA)后引入痘病毒早期启动子所能识别的转录终止信号(TTTTTT)^[14],以屏蔽顺向插在 F 基因下游的 *LacZ* 报告基因转录时受上游基因转录的干扰。通过对所插入基因转录方向的调整,以 *LacZ* 基因为筛选标记获取的重组病毒经间接免疫荧光试验检测,结果显示,F 基因和 HA 基因均能够在重组病毒中得到正确表达。这为利用鸡痘病毒同时表达多个外源基因来生产多价或多联重组活载体疫苗的研究做了有益的探索。

外源基因能否在鸡痘病毒中高效表达很大程度上取决于上游启动子的强弱。本实验构建的重组鸡痘病毒基因组中,调控 F 基因转录的早晚期启动子 $P_{E/L}$ 是目前所有禽痘病毒自身启动子中表达效率较高的启动子,而调控 HA 基因的启动子 P_S 是由本实验室人工合成,其表达效率是目前在构建重组痘病

毒中广泛使用的痘苗病毒早晚期启动子 P7.5 的 3 倍以上^[5]。通过使用强启动子调控抗原基因来增加表达量,在提高疫苗免疫效果的同时,可以减少重组病毒的使用剂量以降低基因工程活载体疫苗的生产成本,促进重组鸡痘病毒疫苗在禽病控制中的推广运用。在后续研究中我们将对重组病毒的免疫效力进行评价。

参 考 文 献

- [1] 于康震,付朝阳,崔尚金,等.我国禽流感防控研究进展. 中国兽医学报, 2001, **21**(1):103 - 106.
- [2] Liu H Q, Liu X F, Cheng J, *et al.* Phylogenetic analysis of the hemagglutinin genes of twenty-six avian influenza viruses of subtype H9N2 isolated from chickens in China during 1996 - 2001. *Avian Dis*, 2003 **47**:116 - 127.
- [3] 吴艳涛,彭大新,刘秀梵,等.表达新城疫病毒 F48E8 株融合蛋白基因的重组鸡痘病毒及其免疫效力. 生物工程学报, 2000, **16**(5):591 - 594.
- [4] 程 坚,刘秀梵,彭大新,等.表达 H9 亚型禽流感病毒血凝素基因的重组鸡痘病毒及其免疫效力. 微生物学报, 2002, **42**(4):442 - 447.
- [5] 朱爱华,彭大新,吴艳涛,等.鸡痘病毒启动子的优化. 病毒学报, 2000, **16**(4):347 - 351.

- [6] 彭大新,王志亮,刘秀梵,等.鸡痘病毒基因组 DNA 复制非必需片段的鉴定. 江苏农学院学报, 1995, **16**(4):13 - 17.
- [7] 吴艳涛,刘秀梵,张如宽,等.应用酚-SDS 法提纯新城疫病毒基因组 RNA. 江苏农学院学报, 1996, **17**(4):73 - 74.
- [8] Taylor J, Edlbauer C, Senelonge A, *et al.* Newcastle disease fusion protein expressed in a fowlpox virus recombinant confers protection in chickens. *J Virol*, 1990, **64**(4):1441 - 1450.
- [9] Wiley D C, Skehel J J. The structure and function of the hemagglutinin membrane glycoprotein of influenza virus. *Annu Rev Biochem*, 1987, **56**:365 - 394.
- [10] 吴艳涛,刘秀梵,张如宽,等.新城疫病毒 F48E8 株融合蛋白基因序列分析. 病毒学报, 1999, **15**(2):143 - 146.
- [11] 刘红旗,黄 勇,程 坚,等.我国部分地区 H9 亚型禽流感病毒血凝素基因序列比较与遗传发生关系. 微生物学报, 2002, **42**(3):591 - 594.
- [12] 曹慧青,金 凤.多基因共表达载体的构建策略. 国外医学分子生物学分册, 2002, **24**(1):1 - 4.
- [13] Wild T F, Bernard A, Spohner D, *et al.* Construction of vaccinia virus recombinants expressing several measles of their efficacy in vaccination of mice. *J Gen Virol*, 1992, **73**:359 - 367.
- [14] 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**(3):1402 - 1408.

Recombinant Fowlpox Virus Expressing F of Newcastle Disease Virus and HA of Subtype H9N2 of Avian Influenza Virus

WEI Dong-Ping LIU Yu-Liang SHAO Wei-Xing LU Jian-Hong LIU Xiu-Fan*

(Animal Infectious Disease laboratory, Yangzhou University, Yangzhou 225009, China)

Abstract : The fusion protein (F) gene of *Newcastle disease virus* strain F48E8 was obtained by PCR and its sequence was determined. To form recombinant plasmid p7SHF, the F gene in pGEM-TF and the hemagglutinin (HA) gene of AIV, A/Chicken/China/F/1998 (H9N2) in pUCHA were cut and inserted into the randomly selected nonessential regions of the fowlpox virus (FPV) under the control of fowlpox virus promoter P_{EVL} and the synthetic promoter P_s respectively. Then the P11-LacZ reporter gene from pppG18 was cloned into p7SHF resulting in recombinant transferring vector pF-PVHF, which was transfected into chicken embryo fibroblast (CEF) monolayers pre-infected with Chinese vaccine strain 282E4 of FPV to generate recombinant fowlpox virus co-expressing HA and F (rFPV-HA-F). By selection of blue plaques on the CEF overlaid with agar containing X-gal, rFPV-HF-F was screened and purified. PCR and southern blot assays indicated that the F and HA genes had been inserted into the genomic DNA of FPV. Subsequently expression of F and HA in CEF infected with rFPV-HA-F was confirmed by indirect immunofluorescence assay.

Key words : *Newcastle disease virus* strain F48E8, H9 subtype *avian influenza virus*, Recombinant *fowlpox virus*, Fusion protein, Hemagglutinin

Foundation item : Chinese National Programs for High Technology Research and Development (2001AA213041)

* Corresponding author. Tel : 86-514-7979386 ; Fax : 86-514-7323112 ; E-mail : xfliu@mail. yzu. edu. cn

Received date : 07-08-2003