

鸡痘病毒复制非必需区的选择对重组鸡痘病毒免疫效力的影响

孙 蕾 刘武杰 陈素娟 石火英 刘秀梵*

(扬州大学 农业部畜禽传染病重点开放实验室 扬州 225009)

摘 要 :母源抗体的干扰是重组鸡痘病毒(FPV)活载体疫苗至今未能得到大规模推广应用的主要原因,而选择适当的 FPV 复制非必需区可能是解决这一问题的方法之一。根据已发表的美国致病株 FPV 的基因组设计两对引物,用 PCR 方法扩增 FPV 假定复制非必需区的两个侧翼区 FPV1 和 FPV2,利用此假定复制非必需区构建 FPV 表达载体 pP12LS 及表达 ZJ1 株新城疫病毒(NDV)F 基因的转移载体 pP12LSF。pP12LSF 与 282E4 株 FPV 共转染鸡胚成纤维细胞(CEF)经数轮蓝斑筛选得到纯化的重组病毒 rFPV-FSC。重组 FPV 在 CEF 上连续传 20 代仍具有良好的遗传稳定性。对重组 FPV 进行免疫效力试验,在 SPF 鸡上,重组病毒 rFPV-FSC 和与之仅有复制非必需区差异的 rFPV-FSB 均能抵抗 NDV 强毒的攻击,提供 100% 的保护。但在有母源抗体的商品鸡上,rFPV-FSC 与 rFPV-FSB 的免疫效力却有显著差异,保护率分别为 100% 和 61.54%,rFPV-FSC 的免疫效力与 NDV 常规油苗相当。试验结果表明,母源抗体对重组 FPV 的免疫效力有一定的影响,而选择合适的 FPV 复制非必需区是克服母源抗体并提高重组 FPV 免疫效力的有效策略之一。

关键词 :鸡痘病毒,复制非必需区,免疫效力

中图分类号 :Q933 文献标识码 :A 文章编号 :1001-6209(2005)03-0359-04

鸡痘病毒(Fowlpox Virus,FPV)是一种具有独特优越性和广阔应用前景的动物病毒表达载体。FPV 基因组庞大,长约 300kb,包括约 250 个开放阅读框(ORF),存在大量的复制非必需区(Nonessential region,NER)可以做为外源基因的插入部位。然而,虽然某些基因被证实是病毒在体外复制非必需的,但它们若被缺失或因插入外源基因而失活,可能导致病毒在体内的复制能力或免疫逃避能力下降,使重组 FPV 很容易被机体清除,无法在宿主体内发挥持久而有效的免疫效力。研究表明,这些基因大多是与病毒毒力、病毒免疫逃避或宿主范围相关的基因^[1~3]。因此,有必要选择严格的复制非必需区,使外源基因的插入尽量减少对 FPV 原始性状的变化,从而提高重组 FPV 的免疫效力。

尽管 FPV 载体疫苗的研究在近十几年来取得了巨大进展,已有 NDV、IBDV、IBV、AIV、MDV 等病原的保护性抗原基因在 FPV 中得以成功表达,但到目前为止仍未得到大规模的推广应用。究其原因,主要是重组 FPV 疫苗的免疫效力在很大程度上受到商品鸡所携带的母源抗体的干扰^[4,5]。

本文是在我们前期构建的重组病毒 rFPV-FSB

的基础上,重新筛选了一个 FPV 复制非必需区,用以构建新的重组病毒 rFPV-FSC,rFPV-FSC 与 rFPV-FSB 的差别仅在于外源基因新城疫病毒(NDV)F 基因所插入的 FPV 复制非必需区不同,然后通过动物试验来探讨 FPV 复制非必需区的选择对重组 FPV 免疫效力的影响。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 毒株和质粒 :282E4 株 FPV(疫苗株)和 F48E8 株 NDV(中国标准强毒株)购自中国兽药监察所,ZJ1 株鹅源 NDV 由本室分离纯化(2000 年),鉴定为 NDV 基因 VIIId 型流行强毒株^[6];克隆载体 pBluescript SK(-)购自 Stratagene 公司;含 ZJ1 株 NDV F 基因的质粒 pTF、含 Ps 启动子和多克隆位点(MCS)的质粒 pN11S^[7]、重组鸡痘病毒 rFPV-FSB、rFPV-FSB 所用的复制非必需区以及含 P11-LacZ 标记基因表达框的质粒 pFG1175-1^[8]均为本室构建。

1.1.2 细胞和实验动物 :SPF 种蛋购自山东家禽所 SPF 鸡场,鸡胚成纤维细胞(CEF)按常规方法制备。SPF 鸡自行孵化,商品蛋鸡购自无锡市某种鸡场。

基金项目 :国家 863 计划(2001AA213041)

* 通讯作者。Tel 86-514-7971416;Fax 86-514-7972591;E-mail xliu@mail.yzu.edu.cn

作者简介 :孙 蕾(1978-),女,山东莱州人,博士研究生,主要从事鸡痘病毒活载体基因工程疫苗的研究。E-mail :sunlei362@126.com

其他作者 :吴艳涛,张体银

收稿日期 2004-10-08,修回日期 :2004-12-21

1.1.3 主要试剂 :High Pure PCR Template Preparation Kit 为宝灵曼公司产品 ,Expand High Fidelity PCR System、T4 DNA Ligase、Agarose Gel DNA Extraction Kit、FuGENE™ 6 Transfection Reagent 、X-gal、IPTG 等为 Roche 公司产品 ,限制性内切酶主要为华美公司产品 细胞培养用培养基 F10、M199 及 FITC 标记的兔抗鸡 IgG 为 Sigma 公司产品。

1.2 PCR 扩增假定 FPV 复制非必需区的侧翼区

根据已发表的美国致病株 FPV 的基因组全序列设计两对引物 ,用于扩增 FPV 假定复制非必需区的侧翼区 FPV1 和 FPV2。P1 和 P2 跨幅约为 1880bp ,即 FPV1 ; P3 和 P4 跨幅约为 1570bp ,即 FPV2。282E4 株 FPV 基因组 DNA 的提取参照 High Pure PCR Template Preparation Kit 说明书进行 ,以其为模板按常规方法进行 PCR ,扩增 FPV1 和 FPV2。引物合成由 TaKaRa 公司完成 ,测序工作由联合基因上海联众基因科技研究院完成。

1.3 载体的构建

1.3.1 FPV 表达载体的构建 :首先将 FPV1、FPV2 克隆入载体 pBluescript SK(-) 酶切位点有 *Hind* III、*Xho* I、*Bgl* II、*Bam* H I、*Sac* I) ,然后在 FPV1、FPV2 之间按一定方向插入标记基因表达框 P11-LacZ(所用酶切位点为 *Nhe* I、*Xba* I) ,最后在 Lac Z 下游插入末端带有 MCS 的启动子 Ps(所用酶切位点为 *Hind* III、*Sma* I) ,所得 FPV 表达载体命名为 pP12LS (图 1)

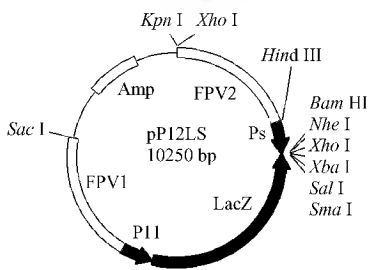


图 1 载体 pP12LS
Fig.1 The vector pP12LS

1.3.2 含 ZJI 株 NDV F 基因的 FPV 转移载体的构建 :pTF 用 *Bgl* II 和 *Sal* I 双酶切 ,F 基因用 *Bam* H I 和 *Sal* I 双酶切的 pP12LS 连接 构建含 ZJI 株 NDV F 基因的 FPV 转移载体 pP12LSK(图 2)。

1.4 重组 FPV 的筛选和纯化

将质粒 pP12LSF 与 282E4 株 FPV 共转染 CEF ,转染试剂为 FuGENE™ 6 Transfection Reagent ,转染及重组病毒的筛选纯化按照转染试剂说明书和文献 [7] 进行 ,重组 FPV 命名为 rFPV-FSC。

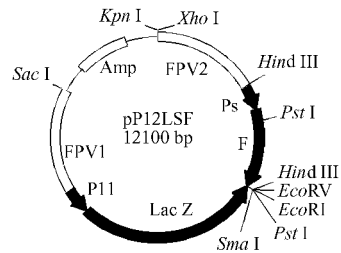


图 2 载体 pP12LSF
Fig.2 The vector pP12LSF

1.5 重组 FPV 表达的 F 蛋白的鉴定

1.5.1 PCR 鉴定 :为了验证 F 基因是否已经插入 FPV 的基因组 ,将在 CEF 上扩增的重组病毒收获 ,按照 High Pure PCR Template Preparation Kit 说明书提取重组 FPV 的基因组 DNA ,然后按照常规方法进行 PCR。

1.5.2 间接免疫荧光鉴定 将纯化的重组 FPV 感染次代 CEF 单层 ,待出现单个病毒蚀斑后用冷甲醇固定 ,与 NDV 多抗血清及 FITC 标记的兔抗鸡 IgG 进行免疫学反应。

1.6 重组 FPV 的遗传稳定性测定

将 rFPV-FSC 在 CEF 上连续传 20 代 ,取 0 代、10 代、20 代的重组病毒进行蓝斑检测和间接免疫荧光检测。提取这 3 个代次重组 FPV 的基因组 DNA ,按常规方法针对 NDV F 基因进行 PCR 并测序 ,检测外源基因在重组 FPV 传代过程中是否发生变异。

1.7 重组 FPV 的免疫效力试验

1.7.1 SPF 鸡 将 1 日龄 SPF 鸡随机分为 4 组 ,每组 10 只 ,5 日龄时分别颈部皮下接种 rFPV-FSB ,rFPV-FSC 及 282E4 株 FPV ,免疫剂量为 10⁴ PFU/羽 ,同时设 NDV 油苗组。免疫后 21d 用 10⁵ ELD₅₀ 的 F48E8 株 NDV 进行滴鼻攻毒 ,连续观察 14d ,统计发病和死亡情况。

1.7.2 商品鸡 将 1 日龄商品鸡(NDV 母源 HI 抗体滴度平均为 8log₂)随机分为 4 组 ,每组 25 只 ,于 14 日龄(NDV HI 抗体滴度平均为 4log₂)接种重组 FPV 及 282E4 株 FPV ,同时设油苗组 ,攻毒同 SPF 鸡。

2 结果

2.1 PCR 扩增假定 FPV 复制非必需区的侧翼区

PCR 产物经琼脂糖电泳 ,得到预期大小的 DNA 片段(图略)。测序结果进一步证明所得 DNA 片段即为目的片段 FPV1 和 FPV2 ,且测序部分的序列与美国致病株 FPV 相应序列的同源性在 99% 以上。

2.2 FPV 载体 pP12LS 和 pP12LSF 的鉴定

在 FPV 转移载体的构建过程中,每一个所得中间载体和最终转移载体均经过酶切鉴定,最终获得 FPV 载体 pP12LS 和 pP12LSF(图 1,图 2)。

2.3 重组 FPV 的筛选与纯化

将转染收获的病毒利用蓝斑筛选的方法在 CEF 上进行数轮纯化,最终得到纯化的重组病毒 rFPV-FSC。同时表明外源基因的插入并未影响 FPV 的复制,证明我们假定的 FPV 复制非必需区即为 FPV 的复制非必需区。

2.4 重组 FPV 的鉴定

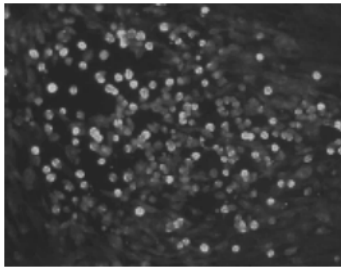


图 3 重组 FPV 的间接免疫荧光试验

Fig.3 Immunofluorescence detection of the expressed F gene in rFPV-FSC

PCR 试验(图略)及间接免疫荧光试验(图 3)表明 ZJ1 株 NDV 的 F 基因已经成功插入 FPV 的基因组,并且获得了很好的表达。

2.5 重组 FPV 的遗传稳定性测定

0 代、10 代、20 代的重组病毒 rFPV-FSC 感染次代 CEF 后进行蓝斑检测和间接免疫荧光检测,可见病毒蚀斑均呈蓝色或呈特异性荧光(图略)。测序结果经 MegAlign 软件分析后证实,3 个代次的 NDV F 基因在重组 FPV 传代过程中未发生任何变化,以上试验均表明该重组 FPV 具有良好的遗传稳定性。

2.6 重组 FPV 的免疫效力试验

2.6.1 SPF 鸡 重组 FPV 对 SPF 鸡的保护性试验结果见表 1,rFPV-FSB,rFPV-FSC 及 NDV 油苗免疫的 SPF 鸡均能抵抗 NDV 强毒攻击,提供 100% 的保护率,而接种野生 FPV(282E4 株)的 SPF 鸡全部死亡,保护率为 0。

表 1 重组 FPV 对 SPF 鸡的免疫效力试验

Table 1 Protective efficacy of rFPV in SPF chickens

Vaccine	Day at inoculation/d	Dose	Day at challenge/d	Dose of challenge	Morbidity	Mortality	Protection ^a %
rFPV-FSB	5	10 ⁴ PFU	26	10 ⁵ ELD ₅₀	0/10	0/10	100
rFPV-FSC	5	10 ⁴ PFU	26	10 ⁵ ELD ₅₀	0/10	0/10	100
killed vaccine of NDV	5	0.2mL	26	10 ⁵ ELD ₅₀	0/10	0/10	100
282E4 strain FPV	5	10 ⁴ PFU	26	10 ⁵ ELD ₅₀	10/10	10/10	—

^aProtection = (Mortality of the control group-Mortality of the group in which chickens were inoculated vaccine)/Mortality of the control group x 100%

2.6.2 商品鸡 表 2 为商品鸡的保护性试验结果,攻毒后 rFPV-FSC 和 NDV 油苗组无鸡只死亡,保护率达 100%,而与 rFPV-FSC 仅有复制非必需区差异

的 rFPV-FSB 组保护率为 61.54%。无论从发病率还是死亡率来看,rFPV-FSB 与 rFPV-FSC 组的保护率存在显著差异。

表 2 重组 FPV 对商品鸡的免疫效力试验

Table 2 Protective efficacy of rFPV in commercial chickens

Vaccine	Day at inoculation/d	Dose	Day at challenge/d	Dose of challenge	Morbidity ^b	Mortality	Protection ^a %
rFPV-FSB	14	10 ⁵ PFU	35	10 ⁵ ELD ₅₀	8/25 ^A	5/25 ^A	61.54 ^A
rFPV-FSC	14	10 ⁵ PFU	35	10 ⁵ ELD ₅₀	1/25 ^B	0/25 ^B	100 ^B
killed vaccine of NDV	14	0.2mL	35	10 ⁵ ELD ₅₀	0/25	0/25	100
282E4 strain FPV	14	10 ⁵ PFU	35	10 ⁵ ELD ₅₀	25/25	13/25	—

^aProtection = (Mortality of the control group-Mortality of the group in which chickens were inoculated vaccine)/Mortality of the control group x 100%;^bDifferent superscript uppercase letters indicate significant difference (P<0.05)。

3 讨论

在本次动物试验中,接种 rFPV-FSB 和 rFPV-FSC 的无母源抗体的 SPF 鸡均能抵抗 NDV 强毒的攻击,提供 100% 的保护。而在 NDV 母源抗体降到 4log2 的商品鸡上,两种重组病毒的免疫效力却呈现出显

著差异。rFPV-FSC 明显比与之仅有复制非必需区差异的 rFPV-FSB 保护率高得多,前者保护率为 100%,与 NDV 油苗相当,后者仅为 61.54%。试验结果表明,FPV 复制非必需区的选择对重组 FPV 的免疫效力有一定的影响,尤其是在有母源抗体的商品鸡上。因此,选择适当的 FPV 复制非必需区是克

服母源抗体并提高重组 FPV 免疫效力的有效策略之一。

母源抗体的干扰是重组 FPV 研究领域中亟待解决的问题之一。重组 FPV 不仅受 FPV 母源抗体的干扰,而且针对外源蛋白的母源抗体也会干扰其免疫效力。二者的干扰作用孰大孰小,或者只有其一,还有待进一步研究。本试验中,rFPV-FSB 在 SPF 鸡和母源抗体阳性的商品鸡上免疫保护率有显著差异,证实了母源抗体对重组 FPV 的免疫效力确实有一定的影响。

本研究从选择适当的 FPV 复制非必需区的角度出发,构建了 rFPV-FSC,其在 SPF 鸡和有母源抗体的商品鸡上都获得了与常规油苗相当的免疫效果,且具有良好的遗传稳定性,从而加快了重组 FPV 基因工程疫苗替代常规疫苗的进程。如何克服母源抗体的干扰以提高重组 FPV 的免疫效力将是今后研究的重点。

参 考 文 献

[1] Afonso C L, Tulman E R, Lu Z, *et al.* The genome of fowlpox virus. *J Virus*, 2000, **74**(8): 3815 – 3831.

[2] Boulanger D, Baier R, Erfle V, *et al.* Generation of recombinant fowlpox virus using the non-essential F11L orthologue as insertion site and a rapid transient selection strategy. *Journal of Virological Methods*, 2002, **106**: 141 – 151.

[3] Boulanger D, Green P, Smith T, *et al.* The 131-amino-acid region of the essential 39-kilodalton core protein of fowlpox virus A4L protein, is nonessential and highly immunogenic. *J Virol*, 1998, **72**(1): 170 – 179.

[4] Paoletti E. Applications of poxvirus vectors to vaccination: An update. *Proc Natl Acad Sci*, 1996, **93**: 11349 – 11353.

[5] Swayne D E, Beck J R, Kinney N. Failure of a recombinant fowl poxvirus vaccine containing an avian influenza hemagglutinin gene to provide consistent protection against influenza in chickens preimmunized with a fowl pox vaccine. *Avian Dis*, 2000, **44**(1): 132 – 137.

[6] Liu X, Wan H, Ni X, *et al.* Pathotypical and genotypical characterization of Newcastle disease viruses isolated from outbreaks in chicken and goose flocks in some regions of China during 1985-2001. *Arch Virol*, 2003, **148**(7): 1387 – 1403.

[7] 孙 蕾, 吴艳涛, 张体银, 等. 鸡痘病毒通用高效表达载体的构建及其初步应用. *中国兽医学报*, 2004, **24**(5): 429 – 432.

[8] 王志亮, 彭大新, 刘秀梵. 中国疫苗株鸡痘病毒转移载体的构建与 MDV 糖蛋白 B 的表达. *病毒学报*, 1996, **12**(1): 48 – 54.

Influence of nonessential region on protective efficacy of recombinant Fowlpox viruses

SUN Lei LIU Wu-jie CHEN Su-juan SHI Huo-ying LIU Xiu-fan*

(Animal Infectious Disease laboratory, Ministry of Agriculture, Yangzhou University, Yangzhou 225009, China)

Abstract: Because of the interference of maternal antibodies, the recombinant fowlpox virus (rFPV) vaccine has not been used widely. The selection of a well-defined FPV nonessential region might be a desirable way to solve this problem. Two pairs of primers were designed according to the genome of a pathogenic FPV to amplify two flanking regions (FPV1 and FPV2) of the supposed nonessential region by PCR, and then a series of plasmid vectors were constructed to generate the expression vector pP12LS, which containing FPV1, FPV2, the expression cassette of P11-LacZ reporter gene and the promoter Ps. To obtain the vector pP12LSF, the F gene of ZJ1 strain Newcastle Disease Virus (NDV) was inserted into pP12LS, in which the F gene was located downstream of the promoter Ps. pP12LSF was transfected into chicken embryo fibroblast (CEF) pre-infected with 282E4 strain FPV. The recombinant FPV, rFPV-FSC, was purified by blue plaque selection. The LacZ and F genes could be expressed by rFPV-FSC after 20 successive passages in CEF. The FPV nonessential region was the only difference between rFPV-FSC and rFPV-FSB. These two rFPVs could induce completely protection in SPF chickens against lethal challenge with F48E8 strain NDV. However, the protective efficacy showed a significant difference in commercial chickens with maternal antibodies. The protective efficacy of rFPV-FSC was 100% and rFPV-FSB was 61.54%. The results indicate that the selection of a well-defined FPV nonessential region is an effective way to increase the protective efficacy of rFPVs, especially in chickens with maternal antibodies.

Key words: Fowlpox virus, Nonessential region, Protective efficacy

Foundation item: National Programmes for High Technology Research and Development of China (2001AA213041)

* Corresponding author. Tel 86-514-7979376 Fax 86-514-7972591 E-mail xliu@mail.yzu.edu.cn

Received date: 10-08-2004

© 中国科学院微生物研究所期刊联合编辑部 <http://journals.im.ac.cn>