

含禽流感病毒 M2e 氨基端抗原表位的重组传染性法氏囊病毒 VP2 蛋白的免疫原性鉴定

唐应华, 宫玉珍, 王永伟, 陆吉虎, 吴培培, 高峰, 陈滔, 何家惠, 侯继波*

江苏省农业科学院, 国家兽用生物制品工程技术研究中心, 南京 210014

摘要: 【目的】构建传染性法氏囊病毒 VP2 蛋白展示禽流感 M2e 抗原表位的重组蛋白, 研发预防 H5 或 H9 亚型禽流感和传染性法氏囊的基因工程疫苗。【方法】根据现有禽流感疫苗株 M2e 的氨基端 12 个氨基酸多肽序列 (nM2e) 序列, 结合 GenBank 中 H5 和 H9 亚型禽流感病毒 nM2e 的比对结果, 确定 nM2e 序列。用融合 PCR 分别将 1 拷贝 H5 或 H9 的 nM2e 序列插入 IBD B87 株 VP2 基因的 P_{BC} 区, 获得 VP2_{BC}nM2e 重组基因。将重组基因克隆至杆状病毒表达系统, 转染 Sf9 细胞进行表达。经间接免疫荧光和 Western blotting 检测 Sf9 细胞表达重组基因后, 扩繁重组病毒, 制备疫苗, 间隔 4 周对非免鸡作 2 次重复免疫, 用间接 ELISA 和鸡胚成纤维细胞中的病毒血清中和试验检测血清中 VP2 和 nM2e 的抗体效价。【结果】成功构建含 H5 或 H9 nM2e 的 VP2_{BC}nM2e 重组基因, 该重组基因在 Sf9 细胞中得到表达。经免疫鸡, 两重组蛋白均能激发针对 VP2 和 nM2e 的抗体, VP2_{BC}nM2e_{H5} 组抗体效价高于 VP2_{BC}nM2e_{H9} 组。【结论】两重组蛋白均具有免疫原性, VP2_{BC}nM2e_{H5} 免疫原性更佳。

关键词: 禽流感病毒, 传染性法氏囊病毒, M2e, VP2

中图分类号: 文献标识码:A 文章编号:0001-6209 (2012) 06-0753-07

禽流感 (Avian Influenza) 和传染性法氏囊病 (Infectious Bursal Disease, IBD) 是严重危害我国养鸡业发展的烈性传染病, 疫苗是防控这两种疾病的主要手段^[1]。由于病毒的进化和变异, 我国针对禽流感已研发了 5 种疫苗, 但疫苗的研发速度仍赶不上病毒的变异速度。禽流感的 M2 蛋白胞外结构域 (M2e) 的 23 个氨基酸序列在不同亚型病毒中均相当保守, 并具有一定的免疫原性, 并能产生对不同亚型或同亚型内不同变异株的广谱性保护^[2]。Wu

等^[3]研究表明 M2e 氨基端的 12 个氨基酸 (nM2e) 与载体蛋白偶联, 免疫小鼠能激发产生保护性抗体, 具有病毒中和活性。

为了防控传染性法氏囊病, 我国目前使用的疫苗包括中等毒力的活疫苗、灭活疫苗, 以及亚单位疫苗, 其中亚单位疫苗以 IBD 病毒的 VP2 结构蛋白作为免疫原^[4]。根据对 IBDV VP2 形成的晶体结构研究表明, VP2 含有 4 个刺突区域 (P_{BC}、P_{DE}、P_{FG} 和 P_{HI})^[5], 其中在其 P_{BC} 区可以插入外源性短序列氨基

基金项目: 江苏省农业科技自主创新项目 [CX (10) 450, CX (11) 4072, CX (10) 216]

* 通信作者。Tel: +86-25-84392008; E-mail: houjibo@jaas.ac.cn

作者简介: 唐应华 (1981 -), 男, 湖南东安人, 助理研究员, 主要从事禽病毒性疾病致病机理和防控。E-mail: tyhlw@yahoo.com.cn

收稿日期: 2012-02-14; 修回日期: 2012-03-15

酸而不影响 VP2 表达和结构的完整性^[6]。

本研究利用 IBD 病毒的 VP2 的 P_{BC} 位氨基酸作为展示位点,将筛选的 H5 和 H9 亚型禽流感的 M2e 氨基端的 1 拷贝 nM2e 多肽插入该区,用 Bac-to-Bac 杆状病毒系统进行表达,以期能构建预防传染性法氏囊和禽流感的双价疫苗。

1 材料和方法

1.1 病毒、细胞、载体、非免疫鸡和主要试剂

传染性法氏囊病毒中等毒力活疫苗 B87 株、B87 CEF 细胞适应株和 BC6/85 强毒参考株,以及 H9 NJ02/01 株为本中心保存。Sf9 细胞和 pFastBac 系列载体由江苏省农业科学院兽医研究所王芳惠赠。限制性内切酶、T4 DNA 连接酶、rTaq DNA 聚合酶、pUC19T 载体均购自宝生物技术有限公司。羊抗鸡酶标抗体购自 Southern Biotech, TPCK 胰酶购自 SIGMA。IBDV 亚单位疫苗、H5 (Re-5) 和 H9 灭活单价疫苗均购自青岛易邦生物技术有限公司。非免疫鸡购自南京某养殖场的海

兰褐鸡,免疫前检测 IBDV、H5 和 H9 亚型禽流感的抗体,抗体效价低于阈值,均可免疫。ELISA 板购自 Corning 酶标板。

1.2 nM2e 序列和抗 nM2e 血清

根据 GenBank 中公开的 H5 和 H9 亚型禽流感的 M2 基因序列,并结合本中心的 H9 疫苗株序列,选定 H5 的 nM2e 氨基酸序列为²SLLTEVETPTRN¹³,核苷酸序列为 AGTCTTCTAACCGAGGTCGAAACGCCTACCAGAAAC。H9 的 nM2e 氨基酸序列为²SLLTEVETHTRN¹³,核苷酸序列为 AGTCTTCTAACC GAGGTCGAAACGCACAC CAGAAAC。鸡抗 nM2e 血清系用合成的 nM2e 多肽与 KLH 载体偶联后制备成疫苗,经 3 次免疫鸡后制得多抗。

1.3 重组 VP2-n-M2e 的构建

将整个 VP2 从 P_{BC} 区分成两段,分别用引物将 H5 或 H9 的 nM2e 序列,经 PCR 融合成嵌合基因,即 VP2_{BC}nM2e_{H5} 和 VP2_{BC}nM2e_{H9}。构建的重组基因克隆至 pUC19T 载体,经测序验证正确后备用。用于构建重组基因的引物详见表 1,构建过程详见图 1。

表 1 构建重组 VP2-n-M2e 的引物

Table 1 Primer for construction of recombinant VP2-nM2e

Name	Nucleotides Sequence (5'→3')	Fragment amplification
VP2-1	ATGGATCCATGACAAACCTGCAAGATCAAACC	Forward primer for VP2
VP2-2	TTGTCGACCTTATGCTCCTGCAATTTTCAGGGG AGA	Reverse primer for VP2
VP2-BC2-H5	<u>GCTAGTGTCTTCTGCTAGGCGTTTCGACCTCGGTTAGAAGACTGCTGGC</u> TTGGTACTGTGATGAGAATTGG	Reverse primer for VP2 fusing with nM2e of H5
VP2-BC1-H5	<u>GCCAGCAGTCTTCTAACCGAGGTCGAAACGCCTACCAGAAACACTAGC</u> GGGGTAACAATCACACTGTTCT	Forward primer for VP2 fusing with nM2e of H5
VP2-BC2-H9	<u>GCTAGTGTCTTCTGCTAGGCGTTTCGACCTCGGTTAGAAGACTGCTGGC</u> TTGGTACTGTGATGAGAATTGG	Reverse primer for VP2 fusing with nM2e of H9
VP2-BC1-H9	<u>GCCAGCAGTCTTCTAACCGAGGTCGAAACGCACACCAGAAACACTAGC</u> GGGGTAACAATCACACTGTTCT	Forward primer for VP2 fusing with nM2e of H9

Italics, restriction endonuclease enzyme sites. Bold, stop codons. Underlined, coding sequences for nM2e.

1.4 构建重组 VP2-nM2e 的杆状病毒及其转染表达

将含重组基因 VP2_{BC}nM2e_{H5} 和 VP2_{BC}nM2e_{H9} 从 pUC19T 载体中经酶切连接至 pFastBac-1 载体,将阳性的 pBac-VP2_{BC}nM2e_{H5} 和 pBac-VP2_{BC}nM2e_{H9} 转化 DH10Bac,经蓝白斑筛选获得相应的 Bacmid DNA,用 PCR 对获得的 Bacmid DNA 进行验证。将验证后正确的 Bacmid DNA 按 Bac-to-Bac[®] Baculovirus Expression System 的操作说明书转染 Sf9 细胞。被转染的细胞经传代 3 次后保留作为后续工作用种

毒。

1.5 重组蛋白的检测

对 Sf9 细胞表达的重组蛋白用间接免疫荧光、SDS-PAGE 和 Western blotting 进行验证。间接免疫荧光操作简介如下:用相应的重组 Bacmid DNA 转染 Sf9 细胞,用冷丙酮固定,与相应的抗血清作用后,用 FITC 标记的兔抗鸡 IgY 抗体孵育后,荧光显微镜观察。SDS-PAGE 操作,系用 12% PAGE 胶电泳,并以考马斯亮蓝 R-250 染色,在经脱色后获得。Western blotting 操作如下:在蛋白条带转膜后,用

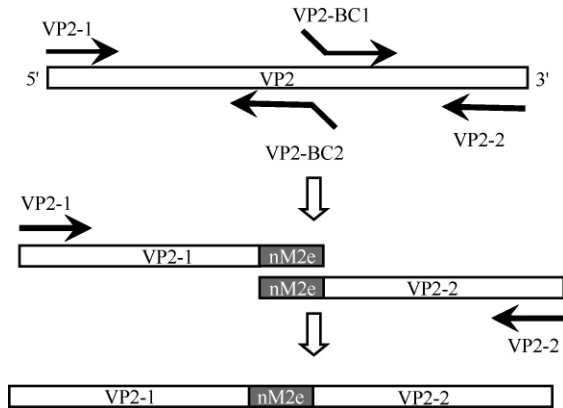


图1 构建嵌合 nM2e 的 VP2 基因

Fig. 1 Construction of chimeric VP2 insertion with nM2e.

5% 的脱脂奶封闭,再用 0.2% 的 PBST 洗涤 3 次,将膜与 100 倍稀释的鸡抗 IBDV 或 nM2e 血清孵育 2h,膜用 0.2% 的 PBST 洗涤 3 次,再与 HRP 标记的羊抗鸡 IgY 作用 1h,显色。

1.6 重组蛋白免疫原性检测

用 Sf9 细胞扩增各重组病毒,将表达的各重组病毒按每羽份免疫含 1.5×10^6 TCID₅₀ 制备油乳剂疫苗,对 10 日龄非免鸡进行首免,4 周后用同种疫苗加强免疫。同时设立 IBDV VP2 亚单位重组疫苗组、H5 和 H9 商品化灭活疫苗组、以及不免疫的空白组,每组 10 只鸡。

1.7 抗体检测

针对 VP2 和 nM2e 的抗体均用间接 ELISA 和鸡胚成纤维细胞 (chicken embryo fibroblast, CEF) 中病毒血清中和试验 (VNT) 进行检测。

1.7.1 间接 ELISA: (a) 针对 VP2 抗体的间接 ELISA 检测简介如下:以 VP2 纯化蛋白以 1:900 稀释作为包被抗原,血清做 1:400 倍稀释,HRP 标记的羊抗鸡二抗做 1:3000 倍稀释,37°C, TMB 底物显色 15 min,以 100 μL 2 mol/L H₂SO₄ 终止反应。检测样品为每个免疫组的血清混合样。(b) 针对 nM2e 抗体的间接 ELISA 检测简介如下:以 5 μg/mL 的人工合成的 2 拷贝 H5 或 H9 的 nM2e 作为包被抗原包被对短肽有高亲和力的 ELISA 板,分别检测对应的 nM2e 抗体,其他条件同检测 VP2 抗体的间接 ELISA。

1.7.2 VNT(a) 检测 VP2 抗体的 VNT 简介如下: 检测样品包括一免后 4 周和二免后 4 周每只鸡的个

体样品和每个免疫组的血清混合样。CEF 细胞按 1×10^8 个/孔接入 96 孔板细胞板培养至单层。待检血清用 2% DMEM 作 2 倍倍比稀释,稀释度从 1:100 - 1:6400 倍稀释。B87 细胞适应毒同样用 2% DMEM 稀释至 200TCID₅₀/100 μL,稀释后的病毒和血清等体积混合,置 37°C CO₂ 细胞培养箱作用 1 h,作用后的混合物按 100 μL/孔接种细胞,每个稀释度设 4 个重复,同时设置细胞对照与病毒对照,放入 CO₂ 细胞培养箱内培养 48 - 120 h 观察细胞病变出现情况,以 3 个孔出现病变的最高稀释度孔记为抗体最高保护效价。(b) 检测 nM2e 的 VNT 抗体。过程类似与 VP2 的抗体检测,作以下修改。仅用一免后 4 周和二免后 4 周每个免疫组的血清混合样经 2 倍倍比稀释后作检测,检测用病毒为 NJ02/01 株,其浓度为 100TCID₅₀,并在培养液中添加 5 μg/mL 的 TPCK 胰酶。

2 结果

2.1 重组蛋白的表达

重组病毒 pBac-VP2_{BC}nM2e_{H5} 和 pBac-VP2_{BC}nM2e_{H9} 的种子毒在 Sf9 细胞中的 TCID₅₀ 分别为 $10^{6.5}/0.1$ mL, $10^{6.2}/0.1$ mL。将重组病毒和空载体以 0.1 M. O. I 感染 Sf9 细胞,经培养 48h 后,固定细胞,用转染空载体的 Sf-9 细胞做对照,结合鸡抗 IBDV 的血清,用间接免疫荧光检测 (IFA) 其表达,感染 pBac-VP2_{BC}nM2e_{H5} 和 pBac-VP2_{BC}nM2e_{H9} 的 Sf9 细胞均可见荧光,而对照的空载体组无荧光,详见图 2-(A, B, C)。分别用鸡抗 H5 的 nM2e 和鸡抗 H9 的 nM2e 血清,经 IFA 检测 nM2e 的表达,结果同 IBDV 抗血清,感染 pBac-VP2_{BC}nM2e_{H5} 和 pBac-VP2_{BC}nM2e_{H9} 的 Sf9 细胞均可见荧光,而对照的空载体组无荧光详见图 2-(D, E, F)。收集感染后 96h 病变细胞,经系列处理后用 SDS-PAGE 检验表达的蛋白。SDS-PAGE 检测显示在 54 kDa 处有目的蛋白条带,这与重组蛋白的预期大小一致,详见图 3。经 Western blotting 进行再次验证,其条带与 SDS-PAGE 一致。图 4-A 显示重组蛋白与鸡抗 IBDV 血清反应,图 4-B 显示重组蛋白与鸡抗 nM2e 血清反应条带。

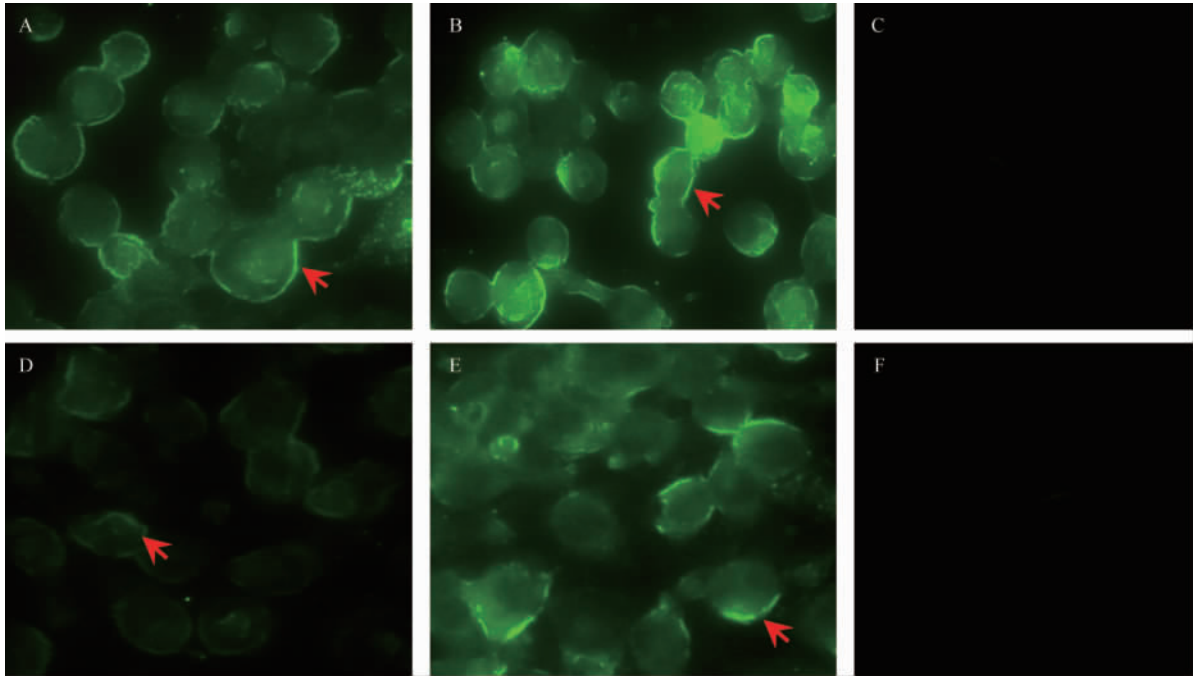


图2 IFA 检测 Sf9 细胞表达的重组蛋白

Fig.2 IFA to detect recombinant proteins expressed by Sf9 cell. A ,B ,C: VP2_{BC}nM2e_{H9} ,VP2_{BC}nM2e_{H5} and cell control incubated with chicken anti-IBDV serum , respectively. D ,E ,F: VP2_{BC}nM2e_{H9} ,VP2_{BC}nM2e_{H5} and cell control incubated with chicken anti-nM2e serum respectively. Fluorescein isothiocyanate-conjugated rabbit anti-chicken IgY was used for detection of bound chicken serum.

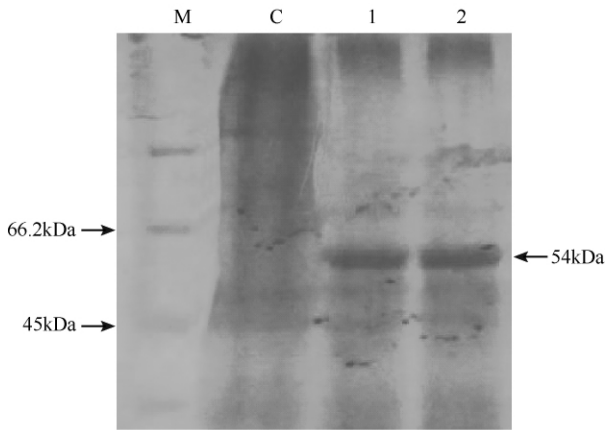


图3 SDS-PAGE 检测表达重组蛋白

Fig.3 Recombinant proteins detected by SDS-PAGE. M , Maker; C , cell control; 1 , VP2BCnM2eH9; 2 , VP2BCnM2eH5.

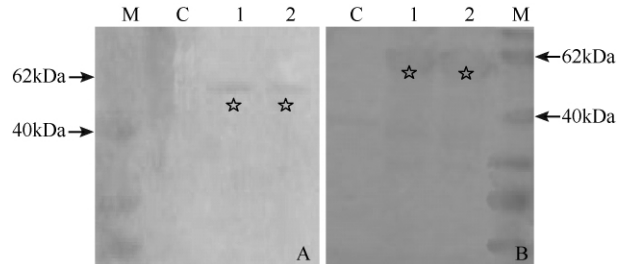


图4 Western Blot 检测表达重组蛋白

Fig.4 Western blot analysis of recombinant proteins. A , Incubation with serum against VP2. B , Incubation with serum against nM2e. M , Maker; C , cell control; 1 , VP2BCnM2eH9; 2 , VP2BCnM2eH5.

表2 各免疫组针对 VP2 的 VN 抗体合格鸡只数

Table 2 Qualification chicken number of VN antibody against VP2 in each vaccination group

Vaccination group	No. Chicken	No. of chickens with VNT antibody qualification/No. total ^a
VP2 _{BC} nM2e _{H9}	10	7/10
VP2 _{BC} nM2e _{H5}	10	8/10
IBDV subunit commercial vaccine	10	7/10
H5 inactivated commercial vaccine	10	— ^b
H9 inactivated commercial vaccine	10	— ^b
Bac	10	0/10
Control	10	0/10

a , No. of chickens with VNT antibody qualification against IBDV 4 week post secondary vaccination / No. total.

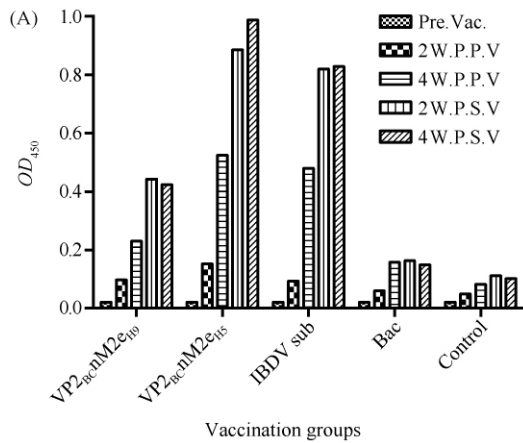
b , not test.

2.2 间接 ELISA 抗体检测

以 VP2 重组蛋白包被 ELISA 板, 检测各免疫组在免疫前以及一免后 2 周、4 周和二免后 2 周、4 周的血清混合样品, 结果见图 5-A。含 VP2 成分的各免疫组在免疫后的针对 VP2 的血清 ELISA 效价逐渐上升, 抗体效价由高到低依次为 VP2_{BC}nM2e_{H5} 组 > IBDV 亚单位商品苗组 > VP2_{BC}nM2e_{H9} 组。ELISA 检测针对 nM2e 抗体, 结果见图 5-B。含 VP2 成分的各免疫组在免疫后的针对 VP2 的血清 ELISA 效价逐渐上升, 抗体效价由高到低依次为 VP2_{BC}nM2e_{H5} 组 > VP2_{BC}nM2e_{H9} 组 > H9 灭活苗组 > H5 灭活苗组。

2.3 VNT 抗体检测

2.3.1 针对 VP2 的 VNT 抗体: 以适应细胞的 B87



疫苗株作为检测用病毒, 检测各免疫组在一免后 4 周和二免后 4 周血清对 IBDV 的中和效价, 结果详见表 2 和图 5-C。各免疫组在二免后的效价显著高于一免后效价, VP2_{BC}nM2e_{H5} 和 IBDV 亚单位商品化疫苗免疫效果相当, 二者均优于 VP2_{BC}nM2e_{H9} 疫苗组。对二免后 4 周每只鸡的血样进行检测, VP2_{BC}nM2e_{H9} 疫苗组的 7 只鸡和 VP2_{BC}nM2e_{H5} 疫苗组的 8 只鸡以及 IBDV 亚单位商品疫苗组的 7 只鸡, VNT 抗体效价均达到 1:6400, 而 VP2_{BC}nM2e_{H9} 疫苗组余下的 3 只鸡的 VNT 效价仅为 1:1600, VP2_{BC}nM2e_{H5} 疫苗组余下的 2 只鸡和 IBDV 亚单位商品疫苗组余下的 3 只鸡其 VNT 效价均为 1:3200。而一免后 4 周各免疫组血清效价均低于 1:1600。

2.3.2 针对 nM2e 的 VNT 抗体: 以 H9 亚型禽流

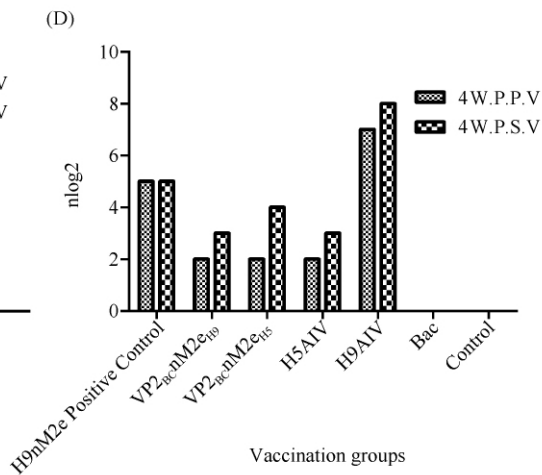
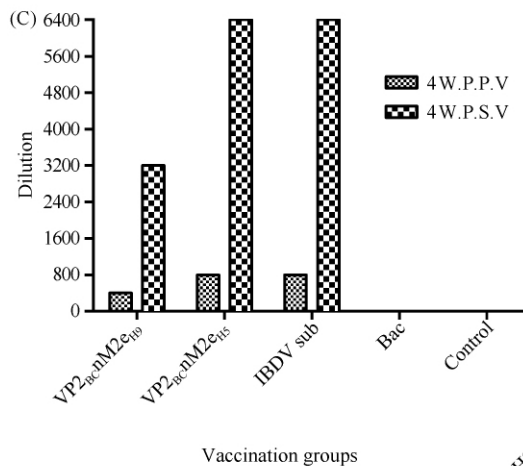
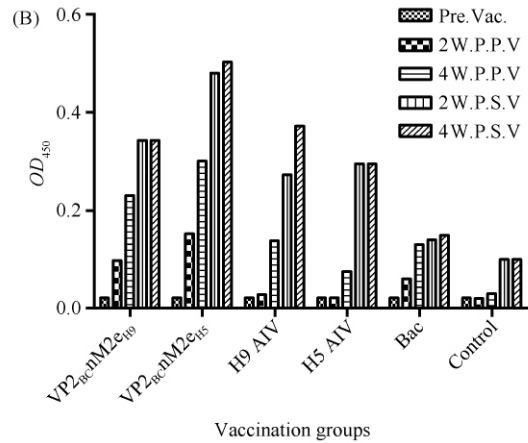


图 5 针对 VP2 和 nM2e 的抗体效价检测

Fig. 5 Detection of antibody against VP2 or nM2e. A, ELISA antibody titer against VP2. B, ELISA antibody titer against nM2e. C, VNT antibody titer against IBDV. D, VNT antibody titer against nM2e. Pre. Vac., pre-vaccination. 2W. P. P. V, 2 weeks post primary vaccination. 4W. P. P. V, 4 weeks post primary vaccination. 2W. P. S. V, 2 weeks post secondary vaccination. 4W. P. S. V, 4 weeks post secondary vaccination.

感 NJ02/01 株作为检测用病毒,检测各免疫组在一免后 4 周和二免后 4 周血清对 nM2e 的中和效价,结果详见图 5-D。二免后抗体比一免显著上升。VP2_{BC}nM2e_{H5} 组和 H5、H9 灭活疫苗组免疫效果相当,二免后第 4 周的抗体效价与阳性高免血清相当,该高免血清以合成的 nM2e 与 KLH 载体蛋白偶联后制备疫苗经三次免疫鸡制备。VP2_{BC}nM2e_{H9} 组免疫效果低于 VP2_{BC}nM2e_{H5} 组。空载体细胞对照组与空白对照组一样均未检测到抗体。

3 讨论

由于我国的养禽量大,且各种养殖模式并存,另外还存在野禽等迁徙涉及面广等不利条件,我国在禽流感防治方面疫苗免疫占有重要地位。但随着病毒的变异,现有的疫苗很难对新出现的变异株提供有效保护^[7]。现有的 Re-4 禽流感疫苗与 Re-5 禽流感的保护谱不具交叉性^[8]。因此,临床亟需具有广谱免疫效果的禽流感疫苗。

本研究利用法氏囊病毒的 VP2 蛋白作为载体,将 H5 或 H9 亚型禽流感的 M2e 蛋白氨基端的 12 个氨基酸插入其纤突区,在杆状病毒表达系统中成功地表达这些融合蛋白。而 H5-nM2e (²SLLTEVETP_{TRN}¹³) 与 H9-nM2e (²SLLTEVETH_{TRN}¹³) 在氨基酸序列上仅第 10 位氨基酸存在差异。H5-nM2e 的 Pro 为疏水性非极性氨基酸,而 H9-nM2e 的 His 为碱性氨基酸。含 VP2_{BC}H5 的重组病毒种子毒的 TCID₅₀ 亦略高于含 VP2_{BC}H9 重组毒。

根据针对 VP2 的抗体而言,疫苗组 VP2_{BC}nM2e_{H5} 优于 VP2_{BC}nM2e_{H9} 组,略高于 IBDV 亚单位疫苗组。IBDV 亚单位疫苗以原核表达的 VP2 蛋白作为抗原。针对 nM2e 的抗体,疫苗组 VP2_{BC}nM2e_{H5} 优于 VP2_{BC}nM2e_{H9} 组和 H5 及 H9 灭活疫苗组。根据对 VP2 的晶体结构研究表明,表达的 VP2 由 20 个 VP2 三聚体构成,即可形成 60 个 P_{BC} 纤突区,能展示 60 个 nM2e 分子^[5]。文献表明,在成熟的流感病毒中 M2e 的表达量少^[9-10],仅在感染的细胞表面有大量 M2e,不利于机体免疫系统识别,激发免疫系统产生相应的抗体。因此, M2e 需与其他载体蛋白展示,提高与机体免疫系统接触的几率。本研究采用 IBDV 病毒的 VP2 作载体蛋白展示 nM2e,以提高其表达量。

综合比较对鸡的免疫结果,可以得知,重组蛋白 VP2_{BC}nM2e_{H5} 的免疫效果优于 VP2_{BC}nM2e_{H9}。利用真核表达系统产生的重组蛋白能获得比较正确修饰和折叠,但该系统表达所需的培养条件和成本均高于原核表达系统及其常规鸡胚生产疫苗。因此,后续研究主要集中于提高表达量和降低表达成本。

参考文献

- [1] Saif YM. 禽病学. 苏敬良, 高福, 索勋等译. 第十一版. 北京: 农业出版社, 2005.
- [2] Fiers W, De Filette M, Bakkouri KE, Schepens B, Roose K, Schotsaert M, Birkett A, Saelens X. M2e-based universal influenza A vaccine. *Vaccine*, 2009, 27(45): 6280-6283.
- [3] Wu F, Huang JH, Yuan XY, Huang, WS Chen, YH. Characterization of immunity induced by M2e of influenza virus. *Vaccine*, 2007, 25(52): 8868-8873.
- [4] Rong J, Jiang T, Cheng T, Shen M, Du Y, Li S, Wang S, Xu B, Fan G. Large-scale manufacture and use of recombinant VP2 vaccine against infectious bursal disease in chickens. *Vaccine*, 2007, 25(46): 7900-7908.
- [5] Coulibaly F, Chevalier C, Gutsche I, Pous J, Navaza J, Bressanelli S, Delmas B, Rey FA. The birnavirus crystal structure reveals structural relationships among icosahedral viruses. *Cell*, 2005, 120(6): 761-772.
- [6] Remond M, Da Costa B, Riffault S, Parida S, Breard E, Lebreton F, Zientara S, Delmas B. Infectious bursal disease subviral particles displaying the foot-and-mouth disease virus major antigenic site. *Vaccine*, 2009, 27(1): 93-98.
- [7] http://www.who.int/influenza/resources/documents/characteristics_virus_vaccines/en/index.html 2012. 2. 14
- [8] 靳月生 姚建军, 见满振, 陈立芝, 张富库, 康晓洁, 王爱玲, 邱海莲, 吕艳秋, 薛勇, 谷瑞平, 于丽娜, 李荣华, 刘杰, 杨新刚, 王岳伟. 蛋鸡重组高致病性禽流感 H5N1 (Re-1 + Re-4) 二价灭活疫苗免疫效果的评价. *中国畜牧兽医 (China Animal Husbandary and Veterinary Medicine)* 2008, 35(7): 92-93.
- [9] Defillette M, Minjou W, Birkett A, Lyons K, Schultz B, Tonkyro A, Resch S, Fiers W. Universal influenza A vaccine: Optimization of M2-based constructs. *Virology*, 2005, 337(1): 149-161.
- [10] Lamb RA, ZS, Richardson CD. Influenza virus M2

protein is an integral membrane protein expressed on the

infected-cell surface. *Cell*, 1985 40(3):627-633.

Characterization the immunogenicity of recombinant VP2 of infectious bursal disease virus containing N-terminal M2e of avian influenza virus

Yinghua Tang , Yuzhen Gong , Yongwei Wang , Jihu Lu , Peipei Wu , Feng Gao ,
Tao Chen , Jiahui He , Jibo Hou*

Jiangsu Academy of Agricultural Sciences , National Research Center of Engineering and Technology for Veterinary Bioproducts , Nanjing 210014 , China

Abstract: [Objective] We developed subunit vaccines against H5 or H9 subtype avian influenza viruses (AIV) and infectious bursal disease viruses (IBDV). Viral protein 2 (VP2) of IBDV was used as cargo protein to display a 12-amino-acid (aa) immunodominant epitope derived from N-terminal M2 extracellular domain (nM2e) of H5 or H9 subtype AIV. [Methods] The aa and nucleotide sequence of nM2e was determined by comparing the available avian influenza vaccine strains and alignment the AIV sequence available in GenBank. One copy of H5 or H9 nM2e was inserted into P_{BC} region of VP2 origin from IBDV B87 vaccine strain by fusion polymerase chain reaction. The VP2_{BC}nM2e recombinants were cloned into Bac-to-Bac expression system and transfected to Sf9 cell. The expressed chimeric protein was characterized by indirect immunofluorescence assay and Western blotting, and subsequently was used as antigen to develop vaccine. The non-immunized chicken was given two injections with the vaccine at a 4-week interval. Serum against VP2 and nM2e was tested by indirect ELISA and virus neutralization in chick embryo fibroblast. [Results] Both VP2_{BC}nM2e recombinants were successfully constructed and expressed in Sf9 cell. Both chimeric proteins elicited antibody against VP2 and nM2e. The antibody level elicited by VP2_{BC}nM2e_{H5} vaccine was higher than that of VP2_{BC}nM2e_{H9}. [Conclusion] Both chimeric proteins were immunogenic, and the efficacy of VP2_{BC}nM2e_{H5} was higher than VP2_{BC}nM2e_{H9} in chicken.

Keywords: avian influenza virus, infectious bursal disease virus, M2e, VP2

(本文责编: 张晓丽)

Supported by the Independent Innovation of Agricultural Sciences Program of Jiangsu Province Grant [CX(10)450, CX(11)4072 and CX(10)216]

* Corresponding author. Tel: +86-25-84392008; Fax: +86-25-84392028; E-mail: houjibo@jaas.ac.cn

Received: 14 February 2012 / Revised: 15 March 2012