

新城疫 C3d-P29 分子佐剂 F 基因疫苗的构建

褚新星, 彭军, 翁立雪, 朱瑞良, 牛钟相*

(山东农业大学动物科技学院, 泰安 271018)

摘要: C3d 是补体 C3 的裂解产物之一, 与抗原相连时可以明显提高抗原分子的免疫原性。CR2/CD21 在其功能发挥过程中起到重要作用, P29 为编码 C3d 与 CR2 结合区域的基因。从健康 AA 肉鸡肝脏中 RT-PCR 克隆 C3d cDNA, 设计引物克隆 P29 至 pUC19 载体, 利用同裂酶 BamH I 和 Bgl II 构建 pUC-P29.n。酶切获得 P29.n, 将其克隆至真核表达载体 pCDNA3.1(+). 最后 RT-PCR 扩增新城疫 F 基因, 定向克隆至真核表达载体 pCDNA-P29.n 中 P29.n 的上游, 构建完成新城疫 F 基因疫苗。3 周龄 SPF 鸡进行基因免疫, 结果 pCDNA-F-P29.4、pCDNA-F-P29.6 较 pCDNA-F 都能够提高 HI 抗体水平及保护力, 虽然 HI 抗体水平不及灭活苗, 但是能够抵抗致死量病毒的攻击, 并且 pCDNA-F-P29.6 效果更好。目前发表的关于 C3d 的佐剂作用的文章多是关于鼠 C3d, 相应的抗原不能够自然感染鼠类, 关于鸡 C3d 的报道较少。研究结果为进一步开发和利用鸡 C3d 奠定了基础。

关键词: 鸡 C3d; pUC-P29.n; HI; F 基因疫苗

中图分类号: R392 文献标识码: A 文章编号: 0001-6209 (2008) 02-0234-05

补体 C3 成分是补体激活的经典途径、替代途径以及甘露聚糖结合凝集素(MBL)途径的交汇点, 是宿主防御机能的一个中心分子。C3 的裂解片段具有广泛的免疫学功能^[1]。C3d 片段是补体 C3 的裂解片段之一, 被认为是 C3 分子 α 链不能被蛋白酶再裂解并仍保持与抗原共价连接的最小片段。其可以直接与抗原递呈细胞(APC)上的 CR2 受体结合, 从而降低淋巴细胞的活化阈, 提高抗原分子的免疫原性。因此, C3d 被认为是新型的分子佐剂^[2]。近年来有报道, 当小鼠 C3d cDNA 与流感病毒或者是麻疹病毒的血凝素基因^[3]或变形虫 *yoelii* 裂殖子膜抗原 MSP1.19^[4] 或肺炎链球菌的肽聚糖抗原等相连之后, 免疫动物后可明显提高抗体的亲和力、抗体水平和抗体维持时间^[5]。但是, 现有的报道多是关于小鼠 C3d, 关于鸡 C3d 的报道较少。P29 基因编码鸡 C3d 与 CR2 结合区域^[6], 本文在克隆了 AA 肉鸡 C3d cDNA 和新城疫 La Sota 株

F 基因 cDNA 的基础上, 构建了新城疫 F 基因疫苗 pCDNA-F-P29.4、pCDNA-F-P29.6 及 pCDNA-F, 为探讨鸡 C3d-P29 的免疫增强功能和研制新城疫新型疫苗奠定了基础。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 试材、毒株和菌株: AA 肉鸡, 新城疫 La Sota 株弱毒苗, 购自山东省畜禽疾病防治中心; 大肠杆菌 (*Escherichia coli*, *E. coli*) DH5 α , 本实验室保存。

1.1.2 试剂和仪器: pMD18-T 载体、pUC19 载体、限制性内切酶、T4 DNA 连接酶、AMV 反转录试剂盒、Taq 酶、dNTP 等 PCR 相关试剂, 购自 TaKaRa 公司; TRIzol Reagent、pCDNA3.1(+) 载体, 购自 Invitrogen 公司; 凝胶回收试剂盒, 购自 OMEGA 公司; 质粒小提试剂盒, 无内毒素质粒大提试剂盒, 购

基金项目: 山东省财政支持项目(SDGP2004-54-O)

*通讯作者。Tel: +86-538-8248113; E-mail: zxniu@sdau.edu.cn

作者简介: 褚新星(1983-), 男, 山东安丘人, 硕士研究生, 主要从事动物微生物与免疫学研究。E-mail: xxchu@sdau.edu.cn

收稿日期: 2007-05-24; 修回日期: 2007-09-20

自 TIANGEN 公司。

1.2 RT-PCR 扩增 C3d cDNA

取 AA 肉鸡肝脏 60mg, 按照 TRIzol 使用说明提取总 RNA。根据 GenBank 上发表的莱航鸡 C3d 基因 (GenBank No.DQ291160), 采用 Primer 5 软件设计 1 对引物。P1: 5'-ACCAAAGTCAGCATTCA-3', P2: 5'-TGCGGTAGGTGATGGC-3'参照 AMV 反转录试剂盒使用说明进行两步法 RT-PCR。RT 反应: 42℃ 90min, 99℃ 5min, 5℃ 5min。PCR 反应: 94℃ 5min; 94℃ 30s, 48℃ 30s, 72℃ 1min, 30 个循环; 72℃ 10min。PCR 产物经 0.8%凝胶电泳后, 回收试剂盒回收纯化 1kb 左右的 PCR 产物, 克隆至 pMD18-T 载体, 然后转化感受态细胞 *E.coli* DH5 α , 涂布在含有 Amp、IPTG、X-Gal 平板上, 经蓝白斑筛选后, 酶切鉴定阳性克隆。阳性菌送 Invitrogen 公司测序。

1.3 P29 串联体的构建

根据 C3d 测序结果(GenBank No. EF632299)设计 1 对引物, 上游引物含 *Hind* 和 *Bam*H 酶切位点, 下游引物含和 *Kpn* 和 *Bgl* 酶切位点, 酶切位点用下划线标出。具体序列如下: 上游引物 F1: 5'-GGCAAGCTTGGATCCAAAGTCCTGATGAAG-TTC-3', 下游引物 R1: 5'-TGGTACCTTAAGATCTAGCGTAGGACGTCCCCTC-3'。两端的 *Hind* 和 *Kpn* 用于将片段连接到 pUC19 载体上, 内侧的 *Bam*H 和 *Bgl* 用于构建多聚体。下游引物 *Kpn* 和 *Bgl* 之间为终止密码子 TAA。以含 C3d 基因的 pMD18-T-C3d 重组质粒为模板, 用新合成的引物进行 PCR 扩增, 反应总体积为 25 μ L 反应条件: 94℃ 3 min; 94℃ 45 s, 58℃ 45 s, 72℃ 40s, 30 个循环, 72℃ 10min。2%琼脂糖凝胶电泳后回收目的条带。PCR 产物经 *Hind*、*Kpn* 双酶切定向克隆至 pUC19, 转化 *E.coli* DH5 α 。阳性菌送 invitrogen 公司测序。

将含有单拷贝 P29 的 pUC-P29.1 质粒用 *Eco*R 加 *Bgl* 双酶切后回收大片段(含单拷贝 P29), 用 *Eco*R 加 *Bam*H 双酶切后回收小片段(含单拷贝 P29), 将大、小片段用 T4 连接酶连接后即可得双拷贝的 P29 重组质粒(pUC-P29.2)重组质粒。如此重复, 可构建含 2、3、4、6 个拷贝重组体。

*Eco*R 加 *Hind* 双酶切 pUC-P29.n, 回收目的基因 P29.n, 连接线性化的真核表达载体 pCDNA 3.1(+). 构建重组真核表达载体 pCDNA-P29.n。

1.4 RT-PCR 扩增新城疫 F 基因

将 La Sota 种毒按 1:1000 倍稀释, 接种 9 日龄 SPF 鸡胚, 37℃ 孵育 120 h, 收取尿囊液。取尿囊液以 200 μ L/mL TRIzol 的比例按 TRIzol 试剂说明书操作提取病毒总 RNA。参照 GenBank 已发表的 NDV La Sota 基因序列(GenBank No.AF077761), 自行设计一对引物。a: 5'-GC ATGGGCTCCAGACCTT -3', b: 5'-GC TCACATTTTTGTAG -3'。RT-PCR 反转录引物为下游引物 b, 按 Takara 公司的 AMV 反转录酶说明书进行操作。RT 反应条件同上。PCR 反应条件为: 94℃ 5 min; 94℃ 45s, 52℃ 45 s, 72℃ 2 min, 30 个循环; 72℃ 10 min。0.8%琼脂糖凝胶电泳, 回收试剂盒回收 RT-PCR 产物, 克隆至 pMD18-T 载体, 然后转化感受态细胞 *E.coli* DH5 α , PCR 鉴定, 阳性菌送 Invitrogen 公司测序。

1.5 插入抗原基因

设计引物从 pMD18-T-F 重组质粒中亚克隆去除信号肽和胞质区的 112-1300 位碱基, 其中包含了 F 基因的 72、161、343 位 AA 抗原位点。上游引物含有 *Nhe* 酶切位点和起始密码子 ATG (分别用下划线和黑体表示)下游引物带有 *Hind* 酶切位点。引物序列如下:

A:5'-TATGCTAGCATGGCAGCTGCAGGAATTG-3', B: 5'-TATAAGCTTAAGTTATCCCGCCTA -3'。*Nhe* 和 *Hind* 双酶切回收 PCR 产物, 克隆至 pCDNA-P29.n 的上游相应位点。*Nhe* 加 *Eco*R 双酶切鉴定阳性质粒。

1.6 新城疫 C3d-P29 分子佐剂 F 基因疫苗效力检测

大量提取重组质粒, PBS 稀释至 100 μ g/100 μ L。4 组 3 周龄 SPF 鸡, 每组 10 只, 分别注射 pCDNA-F, pCDNA-F-P29.4, pCDNA-F-P29.6, 以及新城疫油乳剂灭活苗。基因疫苗免疫前 24h 腿部肌肉注射预先注射 100 μ L 0.25%丁呱卡因, 24h 后同一部位肌肉注射 100 μ L(100 μ g)基因疫苗, 初免后 7d 相同剂量加强免疫一次。灭活苗胸部肌肉注射 0.5mL。同时设 pCDNA3.1 空载体和空白对照组, pCDNA3.1 空载体组免疫同基因疫苗组, 空白对照组注射 PBS。分别在免疫后 1~4 周采血, H 试验检测抗体变化。免疫后第 4 周新城疫标准强毒株 F₄₈E₉ 0.1mL/只(1000LD₅₀)滴鼻攻毒, 每天观察记录 SPF 鸡发病以及死亡情况, 结果见表 1。

表 1 不同 F 基因疫苗的保护效果比较
Table 1 Protective efficacy of the different plasmids in chickens against F_{48E9} virus challenge

Groups	Total	Survival	Survival/total
pCDNA-F	10	1	1/10
pCDNA-F-P29.4	10	7	7/10
pCDNA-F-P29.6	10	10	10/10
Inactive vaccine group	10	9	9/10
Control	10	0	0/10
pCDNA3.1 (+) only	10	0	0/10

2 结果

2.1 RT-PCR 扩增 C3d cDNA

PCR 产物用 0.8% 琼脂糖凝胶电泳, 可见在 1.0 kb 左右有单一条带。PCR 产物直接克隆至 pMD18-T, 转化 *E.coli* DH5 α 。摇菌过夜, 小量抽提质粒后, *EcoR*, *Hind* 双酶切鉴定。琼脂糖凝胶电泳后可见有 1.0 kb 左右的 C3d 插入片段和 2.7 kb 的载体片段, 结果见图 1。

测序结果(GenBank No.EF632299)经 DNASTAR 软件分析, 推导氨基酸序列, 结果见图 2。测序结果与

TKVSIQGNPVSILVEKATDGTCLKHLIVTPSGCGEQNMIGMTPTVIKVHYLDSTMQWETFGINRRTEAIELIKKGYTQQ
LAYRKEDGSFAAFTTRPSSTWLTAYVAKVFAMAINMVDIKPEVVC GAIKWLILEKQQPDGLFQEDAPVIHKEMVGGYHG
AEPSVSLTAFVLSALQESQKICKNYVKSLDGSIAKASDYL SRKYQSLTRPYTVALTSYALALTGKLNSEK VLMKFSKDG
THWAERNAHTYNIEGTSYALLALLQMEKAELTG PVVRWLAQQNYFGGGYGSTQATILVFQALAQYPVALPRQLELNLYV
SVLLPRRANAITYR

图 2 AA 肉鸡 C3d 基因氨基酸序列

Fig. 2 Protein sequence of AA chicken C3d. CR2 binding area is underlined.

		Percent Identity							
		1	2	3	4	5	6	7	
Divergence	1	100.0	35.7	35.7	39.3	35.7	32.1	1	AA chicken
	2	0.0	100.0	35.7	35.7	39.3	35.7	2	LaiHang chicken
	3	101.3	101.3	100.0	78.6	67.9	71.4	3	Human
	4	101.3	101.3	0.0	78.6	67.9	71.4	4	Monkey
	5	89.9	89.9	25.3	25.3	100.0	78.6	5	Mouse
	6	114.2	114.2	41.9	41.9	25.3	78.6	6	Pig
	7	101.3	101.3	36.0	36.0	30.4	25.3	7	Rabbit
		1	2	3	4	5	6	7	

图 3 与其他动物 CR2 受体结合区同源性分析

Fig. 3 Comparing with other animals' CR2 binding area of C3d.

2.2 构建 P29 串联体

2.2.1 单拷贝 P29 基因克隆: 从 pMD18-T-C3d 中亚克隆 P29 基因, PCR 产物经 2% 的琼脂糖电泳, 在 114 bp 左右出现很亮的目的条带, 与预期大小一致。回收目的条带, *Hind*、*Kpn* 双酶切后克隆至 pUC19 相应位点, 转化 *E.coli* DH5 α 。经测序证实 P29 正确插入 pUC19 载体, 与 C3d-P29 基因的同源性为 100%, 重组质粒命名为 pUC-P29.1。

2.2.2 P29 串联体的构建: 利用同裂酶 *Bam*H 和 *Bgl* 构建含多个拷贝重组体。 *Eco*R 加 *Bgl* 双酶

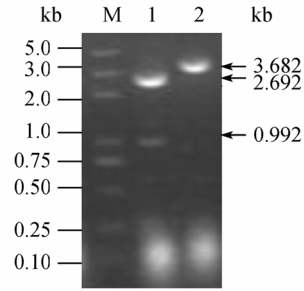


图 1 C3d-pMD18-T 质粒的酶切鉴定

Fig. 1 Restriction maps of C3d-pMD18-T. M. Marker D2000; 1. C3d-pMD18-T/ *Eco*R ; 2. C3d-pMD18-T/ *Eco*R + *Hind*

莱航鸡 C3d 基因(GenBank No.DQ291160)同源性为 99.5%, 氨基酸同源性为 98.8%, 证明获得了 C3d 基因。与其他动物的 CR2 受体结合区域进行比较显示, 鸡与哺乳动物该区氨基酸同源性低, 不到 40%。而猪、鼠、猴及人之间该区的同源性较高, 近 80%。这种种属的差异性可能意味着鸡 C3d 只能应用于鸡的相关生物制品, 结果见图 3。

切 pUC- P29.1, 回收大片段(含单拷贝 P29), 用 *Eco*R 加 *Bam*H 双酶切 pUC- P29.1, 回收小片段(含单拷贝 P29), 将大、小片段用 T4 连接酶连接后即可得双拷贝的 P29 重组质粒(pUC- P29.2)重组质粒。按此方法依次构建含 3、4、6 个拷贝的串联体。 *Hind* 加 *Eco*R 双酶切鉴定阳性克隆, 切出了大小分别为 114、207、300、393、579bp 的插入片段和 2.6kb 左右的 pUC19 载体, 结果见图 4。

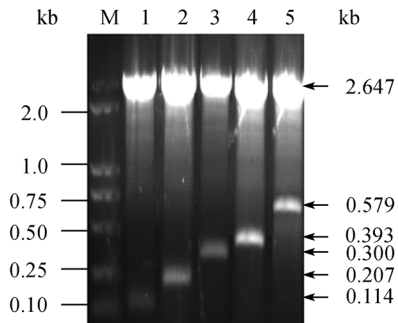


图 4 pUC19-P29.n 重组质粒的酶切鉴定

Fig. 4 Restriction maps of pUC19- P29.n. 1-5. pUC19- P29.1, pUC19- P29.2, pUC19- P29.3, pUC19- P29.4, pUC19- P29.5; M. Marker DL2000.

2.3 RT-PCR 扩增新城疫 *La Sota* 株 F 基因

PCR 产物经 0.8% 琼脂糖电泳, 在 1700bp 左右出现较暗的目的条带。回收目的片段, 克隆至 pMD18-T, 转化 *E.coli* DH5 α 。PCR 鉴定阳性克隆后测序, 测序结果与 AF077761 基因的同源性为 99.9%。证明得到了 *La Sota* 株 F 基因。

2.4 抗原基因的插入

从 pMD18-T-F 重组质粒中亚克隆 F 基因, *Nhe* 和 *Hind* 双酶切 PCR 产物, 克隆入 pCDNA-P29.n, *Nhe* 加 *EcoR* 双酶切重组质粒, 产物电泳后出现了 1399、1492、1585、1771bp 的插入片段以及 5363bp 的载体片段, 大小与预期一致, 结果见图 5。

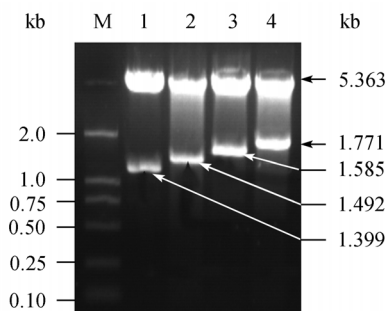


图 5 新城疫 F 基因疫苗酶切鉴定

Fig. 5 Restriction maps of DNA Vaccines of NDV F gene. 1-4. pCDNA-F, pCDNA-F-P29.2, pCDNA-F-P29.4, pCDNA-F-P29.6; M. Marker DL2000.

2.5 血凝抑制抗体变化

血凝抑制抗体是检测新城疫的主要指标之一。在初免后第 7 天、14 天、21 天、28 天分别采血分离血清, 结果取平均值。pCDNA3.1 空载体和空白对照组 HI 抗体未测, 见图 6。

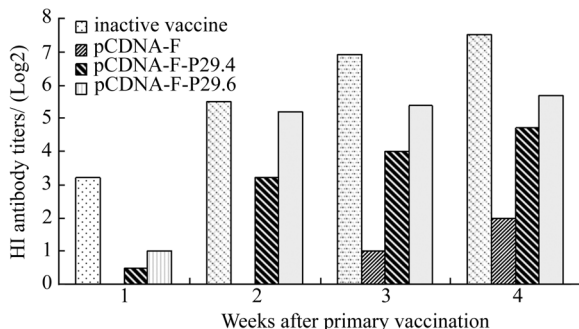


图 6 不同 F 基因疫苗的 HI 抗体变化

Fig. 6 Antibody titers of chickens induced by different plasmids

2.6 攻毒保护试验结果

初免后四周每组以 F_{48E_9} 1000LD₅₀ /只攻毒, 攻毒后每日观察各组的死亡情况以及健康状况, 空载体和空白对照组在 3 天内全部死亡, 其他组有不同程度的死亡和临床症状。攻毒后 2 周统计各组存活数, 结果见表 1。

3 讨论

国内外对于 C3d 的研究主要集中在小鼠及人的 C3d, 试验动物主要是小鼠, 相关的抗原不能自然感染鼠类。对鸡 C3d 的报道较少。理论上一种动物的 C3d 对异种动物也可能具有免疫增强作用, 但是同种动物的 C3d 可以发挥更高的生物活性^[7]。以异种动物的 C3d 为免疫佐剂, 可能产生针对异种动物 C3d 的抗体, 从而在再次免疫时降低免疫效果, 甚至可能引发自身免疫性疾病^[8]。(因为针对异种动物 C3d 的抗体可能和自身 C3d 发生交叉反应)本研究在克隆 AA 肉鸡 C3d cDNA 的基础上, 进一步将鸡 C3d-P29 基因应用于鸡新城疫基因疫苗, 并将此疫苗免疫鸡。证明鸡 C3d-P29 同样具有免疫佐剂效应, 间接验证了 CR2 在 C3d 发挥佐剂效应中的重要作用。

C3d 只有与抗原分子相连时才能够发挥佐剂作用^[9]。国内外研究发现 C3d 的免疫佐剂效应主要与 CR2/CD21 有关。C3d 可以与 B 淋巴细胞或者是抗原递呈细胞(APC)上的 CD21 结合, CD21 与 CD19 一起参与信号传导。其中 CD21 主要起到桥梁作用, 将 C3d 与 B 淋巴细胞或者 APC 连接, CD19 主要功能是将抗原信息传递到细胞内部。APC 与 C3d - 抗原复合物结合后, 增强了捕获以及加工抗原的能力; B 淋巴细胞与 C3d - 抗原复合物结合后, B 细胞表面受体(BCR)与 CD19 共同传递抗原信息, 降低了 B 淋巴细胞的活化阈, 促进 B 淋巴的分化成熟, 增加了抗原特异性 B 淋巴细胞的数量, 从而提高了水平以及抗体维持时间^[10-12]。鉴于 CD21 的重要作用以及鸡 CR2 结合区的特殊性, 我们模拟 C3d 的作用过程, 将 C3d-P29 串联体与 F 基因通过基因工程的方法相连免疫动物。利用同裂酶 *Bam*H I (识别序列为 G↓GATCC) 和 *Bgl* II (识别序列为 A↓GATCT) 切割靶序列后可形成相同粘性末端的特性, 构建了不同拷贝数的 P29 基因串联体, 作为 P29 分子佐剂。另据报道, C3d 发挥免疫佐剂效应必须有两个以上的 C3d 基因串联^[1]。因此我们构建了基因疫苗 pCDNA-F-P29.4、pCDNA-F-P29.6。免疫动物后发现 pCDNA-F-P29.6 的 HI 抗体高出 pCDNA-F-P29.4 0.5-2 个滴度, 连接 P29 串联体的基因疫苗比单纯的 F 基因疫苗抗体的出现时间缩短, 抗体滴度升高。连接 P29 串联体的基因疫苗第 1 周便能够检测到 HI 抗体, 单纯的 F 基因疫苗直到第 3 周才能检测到, 并且其最高的 HI 抗体滴度只有 2 Log₂, 而 pCDNA-F-P29.6 的最高滴度达 5.7 Log₂。虽然 pCDNA-F-P29.6 的 HI 抗体滴度没有灭活苗的滴度高, 但是其可以完全抵抗致死量病毒

的攻击, 这可能与 pCDNA-F-P29.6 能够诱导更强的细胞免疫有关。

新城疫是由新城疫病毒引起的侵害禽类的急性高度接触性传染病。该病造成的损失巨大, 被国际兽疫局确定为 I 类传染病^[13]。本项研究以新城疫为疾病模型, 主要是因为强毒新城疫具有死亡率高、症状容易观察、抗体容易检测等优点, 从而容易进行效果评价。F 蛋白在病毒致病性和免疫原性中具有重要意义, 因此该蛋白成为基因疫苗的首选抗原^[14]。由于信号肽、胞质区对细胞表达的干扰^[15], 我们对 F 基因进行了优化, 去除了信号肽和胞质区。

参 考 文 献

- [1] Dempsey PW, Allison ME, Akkaraju S, *et al.* C3d of complement as molecular adjuvant: bridging innate and acquired immunity. *Science*, 1996, 271: 348–350.
- [2] Green TD, Newton BR, Rota PA, *et al.* C3d enhancement of neutralizing antibodies to measles hemagglutinin. *Vaccine*, 2002, 20: 242–248.
- [3] Ross TM, Xu Y, Bright RA, *et al.* C3d enhancement of antibodies to hemagglutinin accelerates protection against influenza virus challenge. *Nat Immunol*, 2000, 1: 127–131.
- [4] Haas KM, Hasegawa M, Steeber DA, *et al.* Complement receptors CD21/35 link innate and protective immunity during *Streptococcus pneumoniae* infection by regulating IgG3 antibody responses. *Immunity*, 2002, 17: 713–723.
- [5] Test ST, Mitsuyoshi J, Connolly CC, *et al.* Increased immunogenicity and induction of class switching by conjugation of complement C3d to pneumococcal serotype 14 capsular polysaccharide. *Infect Immun*, 2001, 69: 3031–3040.
- [6] 章振华, 周雪娟, 谌南辉. 鸡补体基因 C3d 的基因克隆及结构分析. *生物技术通讯*(*Letters in Biotechnology*), 2006, 17: 567–570.
- [7] Green TD, Montefiori DC, Ross TM. Enhancement of antibodies to the human immunodeficiency virus type 1 envelope by using the molecular adjuvant C3d. *Virology*, 2003, 77: 2046–2055.
- [8] Matthew AFirth, D. Prando Moore, Douglas CHodgins, *et al.* Cloning of a gene fragment encoding bovine complement component C3d with expression and characterization of derived fusion proteins. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 2006, 114: 61–71.
- [9] Hess MW, Schwendinger MG, Eskelinen EL, *et al.* Tracing uptake of C3dg-conjugated antigen into B cells via complement receptor type 2 (CR2, CD21). *J Blood*, 2000, 95: 2617–2623.
- [10] Aydar Y, Sukumar S, Szakal AK, Tew JG. The influence of immune complex-bearing follicular dendritic cells on the IgM response, Ig class switching and production of high affinity IgG. *J Immunol*, 2005, 174: 5358–5366.
- [11] Lyubchenko T, Dal Porto J, Cambier JC, *et al.* Coligation of the B cell receptor with complement receptor type 2(CR2/ CD21) using its natural ligand C3dg: activation without engagement of an inhibitory signaling pathway. *J Immunol*, 2005, 174: 3264–3272.
- [12] Cherukuri A, Cheng PC, Pierce SK. The role of the CD19/CD21 complex in B cell processing and presentation of complement-tagged antigens. *J Immunol*, 2001, 167: 163–172.
- [13] 殷震, 刘景华. *动物病毒学*. 第二版. 北京: 科学出版社, 1997.
- [14] 不同时期 NDV 地方株 F 基因的克隆及序列分析与基因型研究. *中国兽医学报*(*Chinese Journal of Veterinary Science*), 2006, 26(5): 491–495.
- [15] Fangjun Liu, Innocent Mboudjeka, Shan Lu, *et al.* Independent but not synergistic Enhancement to the immunogenicity of DNA vaccine expressing HIV-1 gp120 glycoprotein by codon optimization and C3d fusion in a mouse model. *Vaccine*, 2004, 22: 1764–1772.

Construction of DNA Vaccines Containing C3d-P29 against Newcastle Disease

Xinxing Chu, Jun Peng, Lixue Weng, Ruiliang Zhu, Zhongxiang Niu*

(College of Animal Science and Veterinary Medicine, Shandong Agricultural University, Taian 271018, China)

Abstract: After cloning the C3d cDNA of AA broilers using the liver mRNA source, a pair of primers were designed to subclone the P29 gene to the pUC19 plasmid. Several tandems of P29 were constructed in the pUC19 plasmid using a pair of isoschizomers-BamH I and Bgl II. The pUC-P29.n was digested to get the gene of P29.n that was then cloned to pCDNA3.1 (+) plasmid. After this, the F Gene of Newcastle Disease Virus was cloned through RT-PCR and inserted into the upstream of the P29.n that was in the pCDNA-P29.n, and the DNA vaccines containing F gene against NDV with C3d-P29 as molecular adjuvant were constructed. Several groups of Specific Pathogen Free chickens were injected with these recombinant plasmids. The pCDNA-F-P29.4 and pCDNA-F-P29.6 group had higher HI antibody titers than the pCDNA-F group. The pCDNA-F-P29.4 and pCDNA-F-P29.6 group's HI antibody titers did not achieve titers as high as the inactive vaccine group. However, they all provided protection against the lethal F_{48E9} virus challenge.

Keywords: C3d; pUC-P29.n; HI; F DNA Vaccine

*Supported by the Shandong Provincial Finance Department(SDGP2004-54-0)

Corresponding author. Tel: +86-538-8248113; E-mail: zxniu@sdau.edu.cn

Received: 24 May 2007/ Revised: 10 September 2007