

表达 H₅ 亚型禽流感病毒 HA 基因和鸡 IL-18 基因重组禽痘病毒的构建

陈红英^{1,3}, 黄青云², 崔保安^{1,3*}, 李新生¹, 管倩^{1,3}

(¹河南农业大学牧医工程学院, 郑州 450002)

(²华南农业大学兽医学院, 广州 510642) (³河南省动物性食品安全重点实验室, 郑州 450002)

摘要:【目的】获得共表达 H₅ 亚型 AIV HA 基因和鸡 IL-18 基因的重组禽痘病毒。【方法】将含痘病毒启动子 LP2EP2 的 HA 基因和鸡 IL-18 基因插入到禽痘病毒转移载体 pSY681 中, 获得重组转移载体 pSYHA/IL-18。用脂质体将其转染已感染亲本禽痘病毒 S-FPV-017 株的鸡胚成纤维细胞, 使其在鸡胚成纤维细胞内与禽痘病毒基因组发生同源重组, 产生表达 HA 和 IL-18 的重组禽痘病毒 (rFPV-HA-IL-18)。在含有 X-gal 的营养琼脂培养基上进行蓝斑筛选后, 对重组禽痘病毒又进行了多次蚀斑克隆。【结果】以重组禽痘病毒 DNA 为模板, 利用 HA 基因和鸡 IL-18 基因引物进行 PCR, 分别扩增出 1 条约 1.7 kb 带和 1 条 0.6 kb 左右的带。以间接免疫荧光试验、T 细胞转化试验和 SPF 雏鸡免疫接种证实重组禽痘病毒能表达 HA 和鸡 IL-18, 并初步证明鸡 IL-18 增强 HA 免疫作用。【结论】重组禽痘病毒能表达具有生物学活性的 HA 和鸡 IL-18。

关键词: H₅ 亚型禽流感病毒; HA 基因; 鸡 IL-18; 重组禽痘病毒

中图分类号: R37 **文献标识码:** A **文章编号:** 0001-6209 (2008) 08-1025-06

禽流感(Avian influenza, AI)是由正粘病毒科 A 型流感病毒引起的禽类传染病。高致病力禽流感病毒(Avian influenza virus, AIV)的感染可导致鸡群 75%~100%的死亡率, 我国《家畜家禽防疫条例实施细则》将高致病力禽流感列为第一类传染病。AIV 变异频繁, 血清亚型众多, 给 AI 的防制带来困难。油乳剂灭活苗虽对禽流感的控制发挥了重要作用, 但由于其存在价格高、使用不便, 使用后会干扰免疫监测和流行病学调查, 免疫应激强烈、影响肉品品质等缺陷^[1], 应用受到了一定限制。

禽痘病毒(Fowlpox virus, FPV)作为较为成熟的重组病毒疫苗载体已成功地用于多种病原保护性抗原的表达, 并显示出良好的免疫原性。表达各种亚型 AIV 血凝素(Hemagglutinin, HA)基因的重组禽痘病毒

(Recombinant fowlpox virus, rFPV)疫苗可对同一亚型的不同毒株 AIV 的攻击产生近 100%的免疫保护, 而且不会干扰 AI 疫情的监测, 具有较好的应用前景^[2]。用于构建 rFPV 的 FPV 疫苗株, 虽然毒副作用小、安全性高, 但仍有一定的残留毒性, 表现为对雏鸡生长和免疫应答的抑制作用^[3]。因此, 近年来许多研究者探索了多种途径以求降低载体 FPV 的毒副作用、增强疫苗的免疫保护效果, 其中之一就是在重组 FPV 疫苗中引入 IL-2、IFN- γ 等细胞因子的基因, 构建共表达保护性抗原和细胞因子的 rFPV^[4, 5]。白细胞介素 18 (Interleukin-18, IL-18) 是一种新型的细胞免疫调节因子, 它可显著刺激 Th1 细胞产生 IFN- γ ^[6]。本研究把鸡 IL-18 基因引入禽痘载体, 构建共表达 H₅ 亚型 AIV HA 基因与鸡 IL-18 基因的重组禽痘病毒 rFPV-HA-IL-18, 为研制安全高效

基金项目: 国家“十一五”科技支撑计划专项(2006BAD06A08)

*通讯作者。Tel/Fax: +86-371-63558878; E-mail: baoancui@henau.edu.cn

作者简介: 陈红英(1965-), 女, 四川仁寿人, 副研究员, 博士, 主要从事分子免疫学和分子病毒学研究。E-mail: chhy927@163.com

收稿日期: 2008-01-19; 修回日期: 2008-05-21

的 H₅ 亚型 AI 重组禽痘病毒疫苗奠定了基础。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 病毒、菌种和质粒：禽痘病毒 S-FPV-017, pSY538 含有禽痘病毒早晚期启动子 LP2EP2, pSY681 含有禽痘病毒同源臂和 pSC11 含有痘苗病毒启动子 P11 启动的 LacZ 基因, 均由中国农业科学院哈尔滨兽医研究所惠赠。H₅ 亚型 AIV HA 基因的克隆质粒 pGEMH, 鸡 IL-18 基因的克隆质粒 pGEMIL-18 和表达 H₅ 亚型 AIV HA 基因的 rFPV (rFPV-HA), 均由河南省动物性食品安全重点实验室构建并保存。

1.1.2 鸡胚及试验鸡：9~11 日龄 SPF 鸡胚及 1 日龄 SPF 雏鸡购自梅里亚维通实验动物技术有限公司。60 日龄健康海兰鸡购自河南安阳市某鸡场。

1.1.3 抗体：FITC 标记的兔抗鸡 IgG (二抗) 购自 Sigma 公司; 鸡抗 H₅ 亚型 AIV 阳性血清购自中国农业科学院哈尔滨兽医研究所。

1.1.4 主要试剂：Wizard PureFection Plasmid DNA Purification、碱性磷酸酶、T₄ DNA 连接酶购自 Promega 公司; EX Taq DNA 聚合酶, X-gal, 限制性内切酶 *EcoR*、*BamH*、*Sfi*、*Not* 等购自 TaKaRa 公司; Lipofectamine™ 2000 Reagent 购自 Invitrogen 公司; 低熔点琼脂糖购自 Amresco 公司; DMEM 购自 Gibco 公司; MTT 试剂、淋巴细胞分离液和小牛血清白蛋白 (BSA) 等购自华美生物工程有限公司。

1.2 含 HA 和 IL-18 基因的禽痘病毒转移载体的构建

根据 pGEMH 质粒的 HA 基因序列设计 1 对引物, 上、下游引物的 5' 端均引入 *BamH*I 酶切位点 (下划线部分)。上游引物 5'-CGGGATCCATGGAGAAAAT-AGTGCTT-3'; 下游引物 5'-CCCGGATCCTTAAATG-CAAATTCTGC-3'。该引物扩增长度为 1701 bp, 含 HA 基因全序列。反应条件为: 96 3 min; 94 1 min, 56 30 s, 72 2 min, 36 个循环; 最后 72 延伸 10 min。PCR 产物通过 *BamH*I 酶切位点克隆到含 LP2EP2 启动子的质粒 pSY538 中; 将末端平滑化的 P11 启动下的 LacZ 报告基因片段克隆到转移载体 pSY681 的 *Not*I 位点中; 将用 *Sfi*I 酶切获得的目的基因插入含 LacZ 报告基因的转移载体 pSY681 中, 完成转移载体 pSY681/HA 的构建。

根据 pGEMIL-18 质粒的鸡 IL-18 基因序列设计 1 对引物, 上、下游引物的 5' 端均引入 *EcoR*I 酶切位点

(下划线部分)。上游引物: 5'-CCCGAATTC-ATGAGCTG- TGAAGAGATC-3'; 下游引物: 5'-CGGGGAATTCTC- ATAGGTTGTGCCTTT-3'。该引物扩增长度为 597 bp, 含鸡 IL-18 基因全序列。反应条件为: 94 5 min; 94 30 s, 56 30 s, 72 1 min, 36 个循环; 最后 72 延伸 10 min。PCR 产物通过 *EcoR*I 酶切位点克隆到含有 LP2EP2 启动子的质粒 pSY538 中, 然后将经 *Not*I 酶切重组质粒获得的鸡 IL-18 基因插入到重组转移载体 pSY681/HA 中, 完成转移载体 pSYHA/IL-18 的构建。

1.3 转染

按常规方法制备培养 SPF 鸡胚成纤维细胞。参照 Wizard PureFection Plasmid DNA Purification 使用说明进行转移质粒的纯化。转染时, 先用 DMEM 培养液洗涤已长成 80% 的单层鸡胚成纤维细胞 (Chicken embryo fibroblasts, CEF), 然后感染亲本禽痘病毒 S-FPV-017, 37 感染 1.5 h 后吸掉病毒液, 按 Lipofectamine™ 2000 Reagent 试剂盒的使用说明进行转染。转染后换成全培养液, 在 37 5%CO₂ 的条件下继续培养, 待病变达到 80% 时收获病毒, 反复冻融 3 次后, 用于重组病毒的筛选。

1.4 重组禽痘病毒的筛选及纯化

取上述冻融材料接种 CEF 单层细胞, 37 感作 2 h 后吸弃感染液, 加入含 1% 低熔点琼脂糖的 DMEM 营养琼脂, 培养 72~96 h, 待出现典型的细胞病变, 再覆盖一层含 250 μg/mL X-gal 的 DMEM 营养琼脂, 继续培养 12~24 h 后挑取蓝斑, 放入 1 mL 无血清 DMEM 培养液中, 反复冻融 3 次后, 进行新一轮的蚀斑纯化, 共进行 5 轮蚀斑纯化。筛选纯化的重组禽痘病毒命名为 rFPV-HA-IL-18。

1.5 重组禽痘病毒基因组中 HA 基因和 IL-18 基因的 PCR 鉴定

收获 rFPV-HA-IL-18 感染后产生病变的鸡胚成纤维细胞, 按常规方法提取病毒 DNA。分别按照 1.2.1 扩增鸡 IL-18 基因和 H₅ 亚型 AIV HA 基因的引物和条件进行 PCR 扩增。

1.6 重组禽痘病毒感染 CEF 表达鸡 IL-18 的鸡 T 细胞转化 (MTT) 试验

将 rFPV-HA-IL-18 接种于单层 CEF, 37、5%CO₂ 条件下培养 72 h 后收获细胞上清液, 以 0.22 μm 的微孔滤膜过滤, 除去禽痘病毒粒子; 参照温纳相介绍的方法^[7]取 60 日龄健康海兰鸡脾脏, 制备、培养鸡脾淋巴细胞, 进行鸡 T 细胞转化 (MTT) 试验。

1.7 重组禽痘病毒感染 CEF 表达 HA 的间接免疫荧光试验

将纯化的 rFPV-HA-IL-18 接种单层 CEF, 37、5%CO₂ 培养至 CEF 出现明显病变, 移去培养液, 以 PBS 洗涤、冷甲醇固定细胞, 加 1:200 稀释的鸡抗 H₅ 亚型 AIV 阳性血清和含 1%BSA 的 PBS, 37 作用 1 h, 以含 0.5%吐温-20 的 PBS 洗涤 5 次后, 再加入 1:1000 稀释的兔抗鸡 IgG-FITC 荧光抗体, 37 中作用 30 min, 最后以含 0.5%吐温-20 的 PBS 洗涤 3 次, 置于倒置荧光显微镜下观察。以正常 CEF 和感染禽痘病毒 S-FPV-017 的 CEF 作阴性对照。

1.8 SPF 雏鸡免疫接种试验

7 日龄 SPF 雏鸡随机分为 4 组, 每组 20 只, 接种剂量分别为 10⁶ PFU 的 rFPV-HA、rFPV-HA-IL-18 和 S-FPV-017 以及 Hank's 进行翅下刺种。接种当天采集各组鸡血、分离血清, 测定针对 H₅ 亚型 AIV 的血凝抑制(Hemagglutination inhibition, HI)抗体滴度, 以后分别于免疫后 7、14、21、28、35、42 d 采集血、分离血清并测定 HI 滴度(以 log₂ 表示), 20 只鸡的 HI 抗体滴度的平均数, 绘制 HI 抗体滴度随时间变化的曲线。HI 测定按常规方法进行。

1.9 统计学分析

利用 SPSS 软件包按生物统计学的方差分析法对试验数据进行统计学处理。

2 结果

2.1 构建的 HA 基因和鸡 IL-18 基因重组转移载体 pSYHA/IL-18 的鉴定

经过一系列过程, 构建 HA 基因和鸡 IL-18 基因的重组转移载体 pSYHA/IL-18, 其含有可以与亲本禽痘病毒发生同源重组的同源臂, LP2EP2 启动子控制下的鸡 IL-18 基因, LP2EP2 启动子控制下的 HA 基因和 P11 控制下的 LacZ 报告基因(图 1)。

重组转移载体 pSYHA/IL-18 经 *Not* 酶切, 电泳, 得到约 597 bp(鸡 IL-18 基因)、1.7 kb(HA 基因)和 9.4 kb(pSY 载体)的 3 条带, 与预期的大小相符。

酶切鉴定正确的重组质粒 pSYHA/IL-18 进行序列测定, 结果表明, 重组质粒 pSYHA/IL-18 中含有鸡 IL-18 基因和 HA 基因的核苷酸序列及阅读框均完全正确。

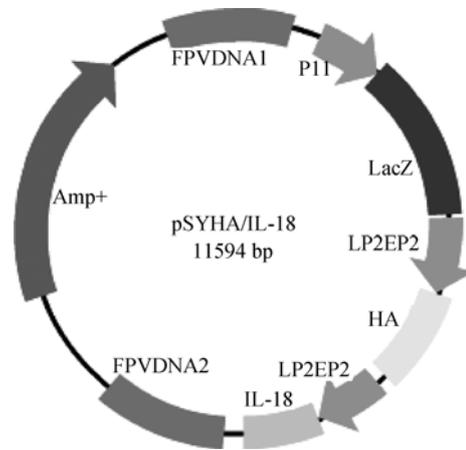


图 1 重组转移质粒 pSYHA/IL-18 的构建示意图

Fig. 1 Construction of recombinant plasmid pSYHA/IL-18.

2.2 重组禽痘病毒 rFPV-HA-IL-18 的筛选与纯化

将 pSYHA/IL-18 转染至已感染 S-FPV-017 的 CEF, pSYHA/IL-18 与 FPV 发生同源重组, 重组禽痘病毒带有 LacZ 基因, 在含 X-gal 的营养琼脂上产生蓝色蚀斑(图 2-B), 对照无蓝色蚀斑(图 2-A); 通过连续 5 轮蓝斑筛选、纯化后的 rFPV-HA-IL-18 形成的蚀斑均为蓝色。

2.3 重组禽痘病毒基因组中 HA 基因和 IL-18 基因的 PCR 鉴定

从 rFPV-HA-IL-18 感染的 CEF 中提取病毒 DNA, 应用鸡 IL-18 基因和 H₅ 亚型 AIV HA 基因的引物进行 PCR, 分别扩增出 1 条约 0.6 kb 和 1 条约 1.7 kb 的带, 证明 H₅ AIV HA 基因和鸡 IL-18 基因已重组到禽痘病毒基因组中。

2.4 重组禽痘病毒感染 CEF 表达鸡 IL-18 的鸡 T 细胞转化(MTT)试验

从表 1 中可以看出 rFPV-HA-IL-18 接种于单层 CEF 后, 表达产物能明显提高鸡 T 淋巴细胞的转化率。表明 rFPV-HA-IL-18 感染单层 CEF 后表达了鸡 IL-18, 并具有明显的生物学活性。

表 1 鸡淋巴细胞转化试验结果(OD)

Table 1 The result of chicken T-lymphocyte transformation experiment

| Group | OD ₅₇₀ value | | | | | | | | | | | | Mean value |
|--------------------------------------|-------------------------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------------|
| | Well | | | | | | No. | | | | | | |
| | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 | 11 | 12 | |
| Leukomonocyte+ expressed products | 0.581 | 0.623 | 0.572 | 0.568 | 0.546 | 0.499 | 0.586 | 0.492 | 0.485 | 0.539 | 0.596 | 0.561 | 0.553±0.112 |
| Negative control | 0.246 | 0.261 | 0.217 | 0.235 | 0.278 | 0.213 | 0.215 | 0.253 | 0.232 | 0.255 | 0.218 | 0.316 | 0.245±0.192 |

A obvious difference between experiment group and negative control group (P<0.01).



图 2 重组禽痘病毒 rFPV-HA-IL-18 感染 CEF 后出现蓝色蚀斑

Fig. 2 The blue plaques of recombinant fowlpox viruses rFPV-HA-IL-18. A: Negative control; B: The blue plaques of recombinant fowlpox virus rFPV-HA-IL-18.

2.5 重组禽痘病毒感染 CEF 表达 HA 的间接免疫荧光
间接免疫荧光试验结果显示, rFPV-HA-IL-18 感染的 CEF 胞浆和胞膜区呈特异性黄绿色荧光(图 3), 接种禽痘病毒 S-FPV-017 的 CEF 和正常 CEF 则不出现黄绿色荧光, 表明重组禽痘病毒感染 CEF 后有效表达 H₅ 亚型禽流感病毒的 HA 抗原。



图 3 感染重组禽痘病毒 rFPV-HA-IL-18 的 CEF 中 AIV HA 表达产物的间接免疫荧光结果

Fig. 3 Immunofluorescence detection of the expressed HA in recombinant fowlpox viruses rFPV-HA-IL-18 infected CEF.

2.6 SPF 雏鸡免疫接种试验

免疫后 7 d, rFPV-HA 和 rFPV-HA-IL-18 已能诱生出可检测的 HI 抗体。在免疫后 14 d, rFPV-HA-IL-18 和 rFPV-HA 免疫组鸡的 HI 效价均到达高峰。在免疫后 7-42 d 内, rFPV-HA 诱生的 HI 效价明显低于 rFPV-HA-IL-18 诱生的效价, 差异显著 ($P < 0.05$)。在整个免疫试验中, S-FPV-017 和 Hank's 免疫组鸡不能诱生出可检测的 HI 抗体。表明重组禽痘病毒能表达鸡 IL-18 和 HA 蛋白, 初步证明鸡 IL-18 增强 HA 免疫作用。SPF 鸡接种 rFPV-HA 和 rFPV-HA-IL-18 后, 其 HI 抗体动态变化过程见图 4。

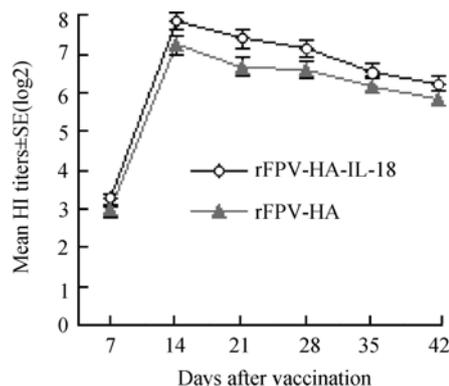


图 4 用 rFPV-HA 或 rFPV-HA-IL-18 免疫 SPF 鸡的 HI 抗体动态变化

Fig. 4 Kinetics of HI antibody titers in chickens vaccinated with rFPV-HA or rFPV-HA-IL-18.

3 讨论

佐剂在提高疫苗的免疫效力方面发挥重要作用。尽管目前在临床上广泛使用的佐剂并非细胞因子, 但已有研究表明它们提高疫苗免疫力的作用很可能是由细胞因子所介导的。因此, 细胞因子从理论上讲可能是效果更好的佐剂。但目前直接运用细胞因子作为佐剂却很难实现。因为要使细胞因子发挥佐剂效应, 就必须使它和抗原几乎在同时到达抗原的应答部位, 而机体转运细胞因子至特定的部位并维持有效的浓度是极其困难的^[8]。

尽管禽痘病毒作为重组疫苗的载体有许多优点, 但它仍存在一些不足。重组疫苗应用的关键性问题是提高诱导机体免疫应答效率, 为增强免疫效果, 现在常采用引入细胞因子作佐剂的方法。细胞因子的免疫佐剂作用已在疫苗的研制中得到了广泛的应用^[9, 10]。常用的细胞因子包括 IL-2、IL-12、IL-6、IL-18、IL-13、GM-CSF 和 IFN- γ 等。这些细胞因子一方面调节机体的特异性抗体反应, 一方面增强机体的非特异性细胞免疫。构建细胞因子与抗原共同表达的重组疫苗, 通过细胞因子的网络作用, 能优化宿主的特异性免疫反应, 并诱导机体产生有效的免疫保护力, 尤其是对免疫力低下和免疫缺陷的个体具有十分重要的意义。研究还发现细胞因子的佐剂作用是受一定条件限制的, Xiang 等 (1995)^[11] 研究发现 GM-CSF 因子的佐剂作用有赖于同编码病毒抗原质粒的共同注射, 如果间隔几小时后分别注射, 则观察不到 GM-CSF 对产生特异抗体数量的增强作用。这说明细胞因子与病毒抗原的共表达对于细胞因子的佐剂发挥至关重

要。重组疫苗, 的与能够确保细胞因子和外源蛋白在同一细胞内合成, 并能一起被 APC 提呈, 加强诱导免疫应答的能力, 增强免疫反应, 从而提高重组疫苗的免疫保护率。本研究选择鸡 IL-18 作为免疫佐剂, 并将鸡 IL-18 基因与禽流感病毒 HA 基因克隆到同一真核表达载体中, 其中它们各自带有禽痘病毒早晚期启动子 LP2EP2, 在同一载体中表达。用 Lipofectamine 法转染单层 CEF 细胞, 经 PCR、MTT 试验、间接免疫荧光试验及 SPF 雏鸡免疫接种证明在重组禽痘病毒中鸡 IL-18 基因和 HA 基因均获得了表达并具有明显的生物学活性。

本研究利用鸡 IL-18 基因与 HA 基因成功构建了共表达鸡 IL-18 和 HA 蛋白的重组禽痘病毒, 初步试验显示表达产物能显著提高鸡 T 淋巴细胞转化, 并具有与鸡抗 H₅ 亚型 AIV 阳性血清发生特异性反应的抗原性, 表明重组禽痘病毒能表达鸡 IL-18 和 HA 蛋白。在 SPF 雏鸡接种试验中, 免疫后 7 d, rFPV-HA 和 rFPV-HA-IL-18 已能诱生出可检测的 HI 抗体。在免疫后 7~42 d 内, rFPV-HA-IL-18 诱生的 HI 效价明显高于 rFPV-HA 诱生的效价, 差异显著 ($P < 0.05$), 进一步证实重组禽痘病毒能表达鸡 IL-18 和 HA 蛋白, 并初步证明鸡 IL-18 增强 HA 免疫作用。它为探讨禽类重组疫苗的构建以及鸡 IL-18 在重组疫苗中的作用奠定了基础, 并有望提高重组禽痘疫苗的免疫效果。共表达保护性抗原和细胞因子的重组病毒的构建方式有两种, 一是将两种基因分别插入同一载体的不同的复制非必需区, 二是将它们插入载体病毒的同复制非必需区。本研究构建 rFPV-HA-IL-18 时, 采用后一种方式。因为, 在同一区域表达两种外源基因具有非必需区使用少、重组过程简单、重组病毒稳定、重组病毒性状改变较少和有利于该系列重组病毒进一步开发等优点。

参 考 文 献

[1] Suarez DL, Schultz-Cherry S. Immunology of influenza virus: a review. *Dev Comp Immunol*, 2000, 24: 269-283.

- [2] Webster RG, Kawaoka Y, Taylor J, *et al*. Efficacy of nucleoprotein and haemagglutinin antigens expressed in fowlpox virus as vaccine for influenza in chickens. *Vaccine*, 1991, 9(5): 303-308.
- [3] Springer WT, Truman RW. Effect of subcutaneous pox vaccination of young chicks on immune responses and weight gains. *Poult Sci*, 198, 160 (6): 1213-1220.
- [4] Leong KH, Ramsay AJ, Boyle DB, *et al*. Selective induction of immune response by cytokines coexpressed in recombinant fowlpox virus. *J Virol*, 1994, 68(12): 8125-8130.
- [5] Shearer GM, Clerici M. Vaccine strategies: selective elicitation of cellular or humoral immunity. *Trends Biotechnol*, 1997, 15(3): 106-109.
- [6] Gobel TW, Schneider K, Schaerer B, *et al*. IL-18 stimulates the proliferation and IFN-gamma release of CD4+ T cells in the chicken: Conservation of a Th1-like system in a nonmammalian species. *J Immunol*, 2003, 171(4): 1809-1815.
- [7] 温纳相, 黄青云, 陈荣光, 等. 鸡 IL-18 基因重组真核表达载体的构建及其表达产物的生物学活性. *中国兽医科技(Chinese Journal of Veterinary Science and Technology)*, 2005, 35(7): 547-550.
- [8] Playfair JH, De Souza JB. Recombinant gamma interferon is a potent adjuvant for a malaria vaccine in mice. *Clin Exp Immunol*, 1987, 67: 5-10.
- [9] Leong KH, Ramsay AJ, Boyle DB, *et al*. Selection induction of immune responses by cytokines co-expressed in recombinant fowlpox virus. *J Virol*, 1994, 68: 8125-8130.
- [10] 曹素芳, 黄青云, 韩先干, 等. 禽巴氏杆菌 C₄₈₋₁ 外膜蛋白 H 基因与鸡 IL-18 基因真核共表达载体的构建及表达. *中国兽医学报(Chinese Journal of Veterinary Science)*, 2006, 26(4): 382-384.
- [11] Xiang ZQ, Ertl HC. Manipulation of the immune response to a plasmid-encoded viral antigen by coinoculation with plasmids expressing cytokines. *Immunity*, 1995, (2): 129-135.

Construction of recombinant fowlpox virus coexpressing HA from subtype H₅ of avian influenza virus and chicken interleukin-18

Hongying Chen^{1,3}, Qingyun Huang², Bao'an Cui^{1,3*}, Xinsheng Li¹, Qian Guan¹

⁽¹⁾ College of Animal Husbandry and Veterinary, Henan Agricultural University, Zhengzhou 450002, China)

⁽²⁾ College of Veterinary Medicine, South China Agricultural University, Guangzhou 510642, China)

⁽³⁾ Animal Food Safety Key Laboratory, Henan Province, Zhengzhou 450002, China)

Abstract: [Objective] We developed recombinant fowlpox viruses (rFPV) coexpressing chicken IL-18 and H₅ AIV HA. [Methods] Recombinant expression plasmid pSYHA/IL-18 was constructed by cloning chicken IL-18 into transfer plasmid containing HA gene and transfected by lipofectamine on the chicken embryo fibroblasts cell (CEF) pre-infected with S-FPV-017. By selecting blue plaques on the CEF overlaid with agar containing X-gal, recombinants fowlpox virus rFPV-HA-IL-18 were obtained, and identified by PCR. [Results] The recombinant fowlpox viruses contained chicken IL-18 and HA gene and had stable genetic properties. The expression of HA was detected in the recombinant virus-infected CEF by indirect immunofluorescence using antibody against AIV. The expression of chicken IL-18 was detected by MTT in the recombinant virus-infected CEF fluid. The chickens vaccinated with recombinant fowlpox virus rFPV-HA-IL-18 and rFPV-HA had detectable hemagglutination inhibition (HI) antibody at 7 days post-vaccination, and HI antibody titers rose to peak at 14 days post-vaccination. No HI antibody was detected in the control or fowlpox virus immunized chickens before or after immunization. The chickens vaccinated with rFPV-HA-IL-18 had higher HI antibody titers than the chickens vaccinated with rFPV-HA. [Conclusion] Development of recombinant fowlpox virus (rFPV-HA-IL-18) had strong biological activity.

Keywords: H₅ avian influenza virus; haemagglutinin gene; chicken interleukin-18; recombinant fowlpox virus

Supported by the Chinese National Science and Technology Programs (2006BAD06A08)

*Corresponding author. Tel/Fax: +86-371-63558878; E-mail: baoancui@henau.edu.cn

Received: 19 January 2008/ Revised: 21 May 2008

1953 年创刊以来所有文章全文上网

2008 年 1 月中旬,《微生物学报》自 1953 年创刊以来的文章全文上网啦!欢迎广大读者登陆本刊主页 (<http://journals.im.ac.cn/actamicrocn>)浏览、查询、免费下载摘要和全文!

建立全文数据库的工作是从 2007 年初开始,经过多方人员的共同努力,历经半年多时间成功完成。由于《微生物学报》历史悠久,其间经历了期刊的变化。将变化情况统计如下,以供读者查阅参考。

另,全文数据库已制作成精美光盘,有意购买者可直接联系中国科学院微生物研究所联合编辑部。售价:100 元;联系电话:010-64807521;联系人:韩力。

《微生物学报》刊、期统计表

(2008 年 8 月统计)

| 时间 | 刊期 | 卷号 | 期号 |
|-----------|---------|-------|-----|
| 1953~1956 | 半年刊 | 1~4 | 1~2 |
| 1957~1958 | 季刊 | 5~6 | 1~4 |
| 1959 | 季刊 | 7 | 1~2 |
| 1959~1962 | 停刊 3 年 | | |
| 1962 | 季刊 | 8 | 3~4 |
| 1963~1965 | 季刊 | 9~11 | 1~4 |
| 1966 | 季刊 | 12 | 1~2 |
| 1966~1972 | 停刊 6 年半 | | |
| 1973~1988 | 季刊 | 13~28 | 1~4 |
| 1989~2007 | 双月刊 | 29~47 | 1~6 |
| 2008 | 月刊 | 48 | 1~8 |