

表达鸡白细胞介素 18 重组禽痘病毒的构建及其表达产物生物学活性的检测

陈红英¹, 黄青云², 崔保安¹, 李新生¹, 管 倩¹, 刘金朋¹

(1. 河南农业大学 牧医工程学院, 河南 郑州 450002; 2. 华南农业大学 兽医学院, 广东 广州 510642)

摘要: 为构建表达鸡 IL-18 的重组禽痘病毒, 将含痘病毒启动子 IP2EP2 驱动的鸡 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 pSY681/ChIL-18。将 pSY681/ChIL-18 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, 产生表达鸡 IL-18 的重组禽痘病毒 rFPV-ChIL-18。在含有 X-gal 的营养琼脂培养基上进行蓝斑筛选后, 对重组病毒 rFPV-ChIL-18 又进行了多次蚀斑克隆。以重组禽痘病毒 DNA 为模板, 利用鸡 IL-18 基因特异引物进行 PCR, 扩增出 1 条约 0.6 kb 的带。收集含鸡 IL-18 蛋白的细胞上清液进行 MTT 试验, 表达的产物能明显提高鸡淋巴细胞的转化率。

关键词: 鸡 IL-18 基因; 重组禽痘病毒; 构建; 生物学活性

中图分类号: S852.4; Q786 文献标识码: A 文章编号: 1000-7091(2008)06-0006-05

Construction of Recombinant Fowlpox Virus Expressing Chicken Interleukin-18 and Its Biologic Activity Detection

CHEN Hong-ying¹, HUANG Qing-yun², CUI Bao-an¹, LI Xin-sheng¹, GUAN Qian¹, LIU Jin-peng¹

(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)

Abstract: In order to construct the recombinant fowlpox viruses(rFPV)expressing chicken IL-18, the chicken IL-18 cDNA was cloned into *Eco*R I site of pSY538 plasmid and then subcloned into *Sfi* I site of pSY681 plasmid containing *LacZ* gene to generate the recombinant plasmid pSY681/ChIL-18. The recombinant plasmid was transfected on the chicken embryo fibroblasts cell(CEF)that was pre-infected with S-FPV-017. By screening of blue plaques on the CEF overlaid with agar containing X-gal, the rFPV-ChIL-18 recombinants were obtained and identified by PCR. Recombinant chicken IL-18 induced *in vitro* the proliferation of ConA-stimulated chicken splenocytes in MTT assay.

Key words: Chicken interleukin-18 gene; Recombinant fowlpox virus; Construction; Biologic activity

禽痘病毒是目前所知最大的动物病毒, 至少可容纳 25 kb 的外源基因, 是构建多价疫苗的理想载体。到目前为止, 已经有多种禽类病原的免疫原基因在禽痘病毒载体上被表达, 如马立克氏病毒糖蛋白 *gB* 基因、鸡传染性法氏囊炎病毒 *VP2* 基因和禽流感病毒的 *HA* 基因等^[1-3], 这些重组病毒都可使免疫鸡产生抵抗强毒攻击的免疫力。虽然禽痘病毒疫苗的毒副作用小、安全性高, 但仍有一定的残留毒性, 表现为对雏鸡的体重增长和免疫应答的抑制作

用^[4]。所以, 为了提高禽痘病毒的安全性, 研究者将眼光放在佐剂上, 特别是一些细胞因子的研究上^[5]。

白细胞介素-18(Interleukin-18, IL-18)是 1995 年首次报道的一种新型细胞免疫调节因子^[6], 具有多种生物学功能, 人类医学研究证明, IL-18 在抗微生物感染, 尤其是在抗肿瘤免疫方面具有重要的潜在应用价值^[7,8]。鸡 IL-18(Chicken IL-18, ChIL-18)则于 2000 年首次报道^[9], 由于它具有与人和哺乳动物相似的生物学功能, 因而鸡 IL-18 不仅在比较免疫

收稿日期: 2008-10-04

基金项目: 国家“十一五”科技支撑计划专项(2006BAD06A08)

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。

通讯作者: 崔保安(1948-), 男, 河南荥阳人, 教授, 博士生导师, 主要从事分子病原学及分子免疫学研究。

学研究中具有重要意义, 而且还有望成为一种可以应用于家禽养殖业的新型免疫佐剂和免疫治疗剂^[8-10]。因此, 本研究在以前研究的基础上^[11], 将鸡 *IL-18* 基因插入到禽痘病毒中, 利用鸡 *IL-18* 的免疫佐剂效应降低禽痘病毒的毒副作用和增强疫苗的免疫效力, 为研制安全高效的重组禽痘病毒疫苗寻找一个可行途径, 以及为研制共表达鸡 *IL-18* 和保护性抗原基因的重组禽痘病毒疫苗奠定基础。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 病毒、菌种和质粒 含有禽痘病毒早晚期启动子 LP2EP2 的 pSY538 质粒, 含有禽痘病毒同源臂的 pSY681 质粒和含有痘病毒启动子 P11 启动的 *LacZ* 基因的 pSC11 质粒及禽痘病毒 S-FPV-017 均由中国农业科学院哈尔滨兽医研究所惠赠。鸡 *IL-18* 基因的克隆质粒 pGEM-ChIL-18 由河南省动物性食品安全重点实验室构建并保存。

1.1.2 SPF 鸡胚 9~11 日龄 SPF 鸡胚购自梅里亚维通实验动物技术有限公司。

1.1.3 工具酶及其他试剂 Wizard PureFection Plasmid DNA Purification、碱性磷酸酶、T₄ DNA 连接酶购自 Promega 公司; Lipofectamine™ 2000 Reagent 购自 Invitrogen 公司; Ex Taq DNA 聚合酶, X-gal 和 IPTG, DNA Marker DL2000, 限制性内切酶 *Eco*R I、*Sca* I、*Sfi* I、*Not* I 等均为宝生物工程(大连)有限公司产品; 低熔点琼脂糖购自 Amresco 公司; DMEM 购自 GIBCO 公司; RPMI-1640, MTT 试剂, 淋巴细胞分离液和小牛血清白蛋白(BSA)购自华美生物工程公司。

1.2 鸡 *IL-18* 基因重组禽痘病毒转移载体的构建

1.2.1 鸡 *IL-18* 基因的 PCR 扩增 根据 pGEM-ChIL-18 质粒的鸡 *IL-18* 基因序列设计 1 对引物, 上、下游引物两端均引入 *Eco*R I 酶切位点(下划线部分)。上游引物: 5'-CCCGAATTCATGAGCTGTGAAGAGATC-3'; 下游引物: 5'-CGGGGAATTCTCATAGGTTGTGCCTTT-3'。该引物扩增长度为 597 bp, 含鸡 *IL-18* 基因全序列。以 pGEM-ChIL-18 质粒为模板进行 PCR 扩增, PCR 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。按凝胶回收试剂盒说明书回收目的片段。

1.2.2 鸡 *IL-18* 基因重组禽痘病毒转移载体的构建及鉴定 将回收的 PCR 产物经 *Eco*R I 位点克隆到含有 LP2EP2 启动子的质粒 pSY538 中, 构建重组质粒 pSY538/ChIL-18; 通过 *Eco*R I 和 *Sca* I 酶切鉴定出阳性质粒后, 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 上 *Not* I 位点中; 用 *Sfi* I 切取目的基因插入到含 *LacZ* 报告基因的转移载体 pSY681 中, 构建转移载体 pSY681/ChIL-18。该载体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* 基因以及 P11 控制下的报告基因 *LacZ* (图 1)。

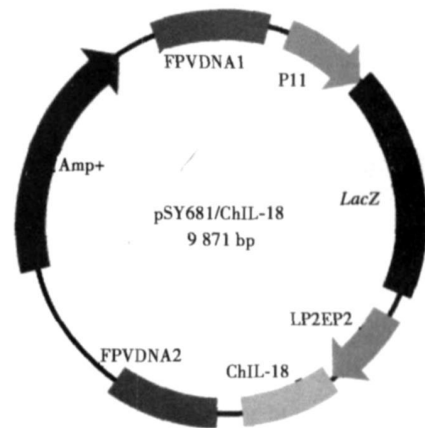


图 1 重组转移质粒 pSY681/ChIL-18 的构建

Fig. 1 Construction of recombinant plasmid pSY681/ChIL-18

1.3 重组禽痘病毒 rFPV-ChIL-18 的获得

质粒 pSY681/ChIL-18 的纯化参照 Wizard PureFection Plasmid DNA Purification 使用说明。鸡胚成纤维细胞 (Chicken embryo fibroblasts, CEF) 单层长满至 80% 培养瓶时, 用 DMEM 培养液洗涤 CEF 单层细胞, 然后感染亲本禽痘病毒 S-FPV-017 株, 37℃ 感染 1.5 h 后吸去病毒液, 进行转染, 转染程序按 Lipofectamine™ 2000 Reagent 试剂盒说明书进行。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% 时收获细胞, 反复冻融 3 次后, 用于重组病毒 rFPV-ChIL-18 的筛选。

1.4 重组禽痘病毒 rFPV-ChIL-18 的筛选及纯化

取上述转染种毒接种 CEF 单层细胞, 37℃ 感染 2 h 后吸去感染液, 加入含 1% 低熔点琼脂糖的 DMEM 营养琼脂, 于细胞培养箱中培养 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 营养琼脂进行染色, 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。

1.5 重组禽痘病毒 rFPV-ChIL-18 基因组中鸡 *IL-18* 基因的 PCR 鉴定

在 LP2EP2 上设计 1 条用于扩增鸡 *IL-18* 基因的上游引物, 序列为 5'-TTG GCA TAT AAA TAGATC TGT ATC-3', 该引物与扩增鸡 *IL-18* 基因的下游引物可以扩增 606 bp 的片段。按常规方法对 rFPV-ChIL-18 感染的 CEF DNA 进行 PCR 扩增。PCR 反应条件

为: 94℃ 5 min; 94℃ 30 s, 55℃ 30 s, 72℃ 1 min, 36 个循环; 最后 72℃ 延伸 10 min。取 5 μL PCR 产物用 10 g/L 琼脂糖凝胶(含 0.5 μg/mL EB)进行电泳检测。

1.6 感染 rFPV-ChIL-18 的 CEF 中表达产物鸡 IL-18 的生物活性试验(MTT 试验)

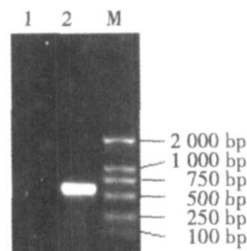
将 rFPV-ChIL-18 接种于单层 CEF, 在 37℃, 5% CO₂ 条件下培养 72 h 后, 收获含鸡 IL-18 的细胞上清液, 以 0.22 μm 的微孔滤膜过滤, 除去禽痘病毒粒子。MTT 试验参照温纳相^[12]介绍的方法进行。

2 结果与分析

2.1 重组质粒 pSY538/ChIL-18 和 pSY681/ChIL-18 的鉴定

重组质粒 pSY538/ChIL-18 进行 PCR、电泳, 出现 1 条长约 600 bp 的特异条带; pSY538/ChIL-18 经 *Eco*RI 酶切、电泳出现 2 条带: 一条约 3.2 kb 的带, 另一条约 0.6 kb 的带; 经 *Sca*I 酶切、电泳出现 2 条带: 一条约 2.4 kb 的带, 另一条约 1.4 kb 的带(图 2), 与预期的结果相一致。将鉴定正确的重组质粒 pSY538/ChIL-18 进行序列测定, 结果表明, 重组质粒 pSY538/ChIL-18 中鸡 *IL-18* 基因的核苷酸序列及阅读框均完全正确, 而且鸡 *IL-18* 基因正向置于禽痘病毒早晚期启动子 LP2EP2 的下游。转移载体 pSY681/ChIL-18 进行 PCR、电泳, 出现 1 条长约 0.6 kb 的特异条带(图 3); 经 *Not*I 酶切, 电泳出现 2 条带: 一条约 0.8 kb 的带, 另一条约 9.17 kb 的带(图 4), 与预期的结果相一致。表明含禽痘病毒早晚期启动子 LP2EP2 驱动的鸡 *IL-18* 基因片段已正确地插入到 pSY681 的 *Sfi*I 位点上。

株同源序列, pSY681/ChIL-18 与 FPV 间发生同源重组。由于所形成的重组病毒带有 *LacZ* 基因, 故其在含 X-gal 的营养琼脂上产生蓝色蚀斑。通过在细胞培养瓶和 96 孔培养板上多次连续蓝斑筛选, 得到纯化的、生长稳定的 rFPV-ChIL-18, 纯化的 rFPV-ChIL-18 形成的蚀斑均为蓝色。

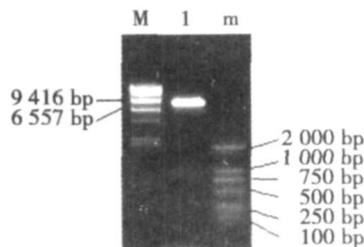


1. 阴性对照; 2. pSY681/ChIL-18 的 PCR 产物; M. DNA Marker DL2000.

1. Negative control; 2. PCR product of pSY681/ChIL-18; M. DNA Marker DL2000.

图 3 转移载体 pSY681/ChIL-18 中鸡 *IL-18* 基因的 PCR 鉴定

Fig. 3 PCR identification of chicken *IL-18* gene in pSY681/ChIL-18



M. DNA Marker λ-*Hind* III Fragment; 1. *Not*I 酶切 pSY681/ChIL-18; m. DNA Marker DL2000.

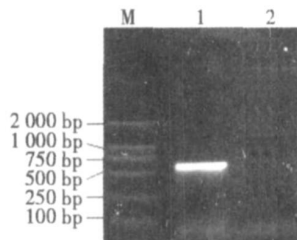
M. DNA Marker λ-*Hind* III Fragment; 1. pSY681/ChIL-18 digested by *Not*I; m. DNA Marker DL2000.

图 4 转移载体 pSY681/ChIL-18 的酶切鉴定

Fig. 4 Identification of pSY681/ChIL-18 by digestion(*Not*I)

2.3 rFPV-ChIL-18 基因组中鸡 *IL-18* 基因的 PCR 鉴定

从 rFPV-ChIL-18 感染的 CEF 中提取 DNA, PCR 扩增出 1 条约为 0.6 kb 的带, 而禽痘病毒 S-FPV-017 株 DNA 进行 PCR 扩增, 未扩增出任何产物(图 5), 证明鸡 *IL-18* 基因已重组到禽痘病毒基因组中。

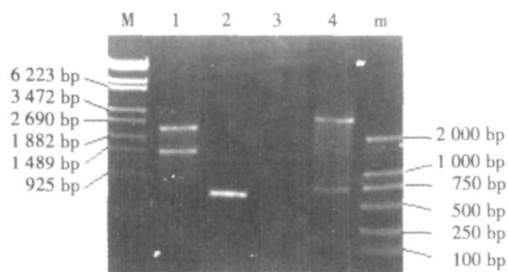


M. DNA Marker DL 2000; 1. 重组禽痘病毒 rFPV-ChIL-18; 2. 禽痘病毒 S-FPV-017.

M. DNA Marker DL 2000; 1. Recombinant virus rFPV-ChIL-18; 2. S-FPV-017.

图 5 重组禽痘病毒 rFPV-ChIL-18 中鸡 *IL-18* 基因的 PCR 鉴定

Fig. 5 PCR identification of chicken *IL-18* gene in recombinant virus rFPV-ChIL-18



M. DNA Marker λ-*Eco*T14 I Fragment; 1. *Sca*I 酶切; 2. PCR 产物; 4. *Eco*RI 酶切; m. DNA Marker DL2000.

M. DNA Marker λ-*Eco*T14 I Fragment; 1. pSY538/ChIL-18 digested by *Sca*I; 2. PCR product; 4. pSY538/ChIL-18 digested by *Eco*RI; m. DNA Marker DL2000.

图 2 重组质粒 pSY538/ChIL-18 的酶切和 PCR 鉴定
Fig. 2 Identification of pSY538/ChIL-18 by digestion(*Eco*RI, *Sca*I) and PCR

2.2 重组病毒 rFPV-ChIL-18 的获得与纯化

用脂质体包裹禽痘病毒转移载体 pSY681/ChIL-18, 然后转染至已用亲本病毒禽痘(S-FPV-017)感染后的 CEF 中。由于 pSY681/ChIL-18 含有 S-FPV-017

2.4 感染 rFPV-ChIL-18 的 CEF 中鸡 IL-18 表达产物的生物活性鉴定

从表 1 可以看出, rFPV-ChIL-18 接种于单层 CEF 后, 鸡 IL-18 基因在 CEF 细胞中的表达产物能明显

提高鸡淋巴细胞的转化率, 说明 rFPV-ChIL-18 感染单层 CEF 后获得的鸡 IL-18 具有一定的生物学活性。

表 1 鸡淋巴细胞转化试验结果(OD₅₇₀)

Tab. 1 The result of chicken T-lymphocyte transformation experiment(OD₅₇₀)

组别 Group	孔号 Well No.												平均值±标准差 Mean value±SE
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	
试验组(淋巴细胞+重组蛋白) Experiment group(Leukomonocyte+ expressed products)	0.571	0.613	0.561	0.567	0.535	0.497	0.586	0.485	0.505	0.559	0.591	0.511	0.548±0.265 **
阴性对照 Negative control	0.149	0.263	0.267	0.265	0.271	0.273	0.260	0.269	0.274	0.259	0.322	0.256	0.261±0.126

注: **. 试验组与阴性对照组的差异极显著($p<0.01$)。
Note: **. A obvious difference between experiment group and negative control group ($p<0.01$).

3 讨论

细胞因子作为佐剂使用可以增强疫苗的免疫效力, 已经在构建基因工程疫苗方面显示出广阔的应用前景。IL-18 是近年来新发现的一种重要的细胞免疫调节因子, 具有多种生物学功能。已有的研究显示, IL-18 除了能够诱导产生 IFN- γ 之外, 在抗肿瘤、抗病原微生物以及抗超敏反应等方面发挥重要的生物学作用^[7,8]。

Schneider 等^[9]于 2000 年首次获得鸡 IL-18 基因, 并发现在结构和功能上与哺乳动物和人的 IL-18 具有相似之处。Degen 等^[13]克隆到鸡 IL-18 基因, 并在原核系统中获得了高效表达。原核表达系统具有表达量高、操作简单等优点而被广泛采用, 但是直接利用大肠杆菌表达的重组 IL-18 作佐剂, 却仍有较大困难。一是由于大肠杆菌为原核表达系统, 该系统表达的蛋白存在非糖基化形式和非天然状态折叠等缺陷, 这使得表达的蛋白分子失去天然结构, 因而对重组蛋白的活性还存在争议^[14];二是要使 IL-18 发挥佐剂效应, 就必须使它到达抗原应答部位, 而体外表达的重组 IL-8 被机体转运至特定部位是极其困难的。真核表达系统则对重组蛋白可进行糖基化、折叠等修饰作用, 重组蛋白在结构和生物学活性等方面更接近于天然蛋白, 因此, 真核表达系统在研究中也广泛使用。韩宗玺等^[15]在昆虫细胞/杆状病毒系统中表达了鸡白细胞介素 18 成熟蛋白, 利用杆状病毒表达的 ChIL-18 蛋白而制备亚单位疫苗, 生产成本相对较高;温纳相等^[12]构建了鸡 IL-18 基因的 DNA 疫苗, 由于基因疫苗的研究还处于起步阶段, 尚有许多问题未能解决, 远未达到在临床应用的阶段。因此, 本研究利用禽痘病毒载体真核表达系统来表达鸡 IL-18 基因, 以期能够获得活性更接近于天然鸡 IL-18 的基因工程蛋白, 研究重组表达

产物在体内、外的生物学活性, 为利用鸡 IL-18 的免疫调节活性, 为开发利用鸡 IL-18 的佐剂效应及构建共表达鸡 IL-18 基因和保护性抗原基因的重组禽痘病毒疫苗奠定基础。

本研究将鸡 IL-18 基因插入到禽痘病毒强启动子 LP2EP2 下, 通过同源重组产生重组禽痘病毒, 经过多次蓝斑筛选, 获得纯化的重组禽痘病毒 rFPV-ChIL-18。以重组禽痘病毒基因组为模板, 用 PCR 能扩增到鸡 IL-18 基因, 表明构建的重组禽痘病毒基因组内已经携带了鸡 IL-18 基因。MTT 试验表明 rFPV-ChIL-18 感染单层 CEF 后获得的鸡 IL-18 具有一定的生物学活性。

参考文献:

[1] Yanagida N, Ogawa R, Li Y, *et al.* Recombinant fowlpox viruses expressing the glycoprotein B homolog and the gp38 gene of Marek's disease virus[J]. J Virol, 1992, 66(3): 1402—1408.

[2] Heine H G, Boyle D B. Infectious bursal disease virus structural protein VP2 expressed by a fowlpox virus recombinant confers protection against disease in chickens[J]. Arch Virol, 1993, 131(3/4): 277—292.

[3] Beard C W, Schnitzlein W M, Tripathy D N. Effect of route of administration on the efficacy of a recombinant fowlpox virus against H5N2 avian influenza[J]. Avian Dis, 1992, 36(4): 1052—1055.

[4] Springer W T, Truman R W. Effect of subcutaneous pox vaccination of young chickens on immune response and weight gain[J]. Poult Sci, 1981, 60(6): 1213—1220.

[5] Karaca K, Sharma J M, Winslow B J, *et al.* Recombinant fowlpox virus coexpressing chicken type I IFN and Newcastle disease virus HN and F genes: Influence of IFN on protective efficacy and humoral response of chicken following in ovo or post-hatch administration of recombinant virus[J]. Vaccine, 1998, 16(16): 1496—1503.

[6] Okamura H, Tsutsi H, Komatsu T, *et al.* Cloning of a new cytokine that induces IFN- γ production by T cells [J]. *Nature*, 1995, 378(6552): 88— 91.

[7] Gracie J A, Robertson S E, McInnes I B. Interleukin-18[J]. *J Leukoc Biol*, 2003, 73(2): 213— 224.

[8] 潘蔚琦, 李广兴, 刘胜旺. 白细胞介素 18 和鸡白细胞介素 18[J]. *东北农业大学学报*, 2004, 35(1): 123— 128.

[9] Schneider K, Puehler F, Baeuerle D *et al.* cDNA cloning of biologically active chicken interleukin-18[J]. *J Interferon Cytokine Res*, 2000, 20(10): 879— 883.

[10] 程相朝, 赵德明, 吴庭才, 等. 鸡 IL-18 真核表达载体的构建及其对新城疫疫苗免疫增强作用的研究[J]. *畜牧兽医学报*, 2005, 36(5): 476— 481.

[11] 陈红英, 崔保安, 黄青云, 等. 海兰鸡白细胞介素-18 全基因的克隆与序列分析[J]. *中国预防兽医学报*, 2006, 28(1): 48— 50.

[12] 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[J]. *中国兽医科技*, 2005, 35(7): 547— 550.

[13] Degen W G, Van Zuilekom H I, Soholtes N C, *et al.* Potentiation of humoral immune responses to vaccine antigens by recombinant chicken *IL-18* (rChIL-18)[J]. *Vaccine*, 2005, 23(33): 4212— 4218.

[14] Lambrecht B, Gonze M, Morales D *et al.* Comparison of biological activities of natural and recombinant chicken interferon-gamma[J]. *Vet Immunol Immunopathol*, 1999, 70(3/4): 257— 267.

[15] 韩宗玺, 刘胜旺, 孔宪刚, 等. 鸡白细胞介素 18 成熟蛋白在昆虫细胞/杆状病毒系统中的表达[J]. *中国生物工程杂志*, 2004, 24(4): 59— 62.