

表达禽流感 *HA* 基因的重组马立克氏病病毒的构建

周雪媚^{1,2}, 霍惠玲², 余锐萍¹, 李永清³, 冯国民⁴, 章振华³, 王宏俊³

(1. 中国农业大学 动物医学院, 北京 100094; 2. 河北省兽药监察所, 河北 石家庄 050051;
3. 北京市农林科学院畜牧兽医研究所, 北京 100089; 4. 江西农业大学 动物医学院, 江西 南昌 330045)

摘要: 本试验首先用 RT-PCR 方法扩增出 H9N2 亚型禽流感病的 *HA* 基因, 大小约 1 700 bp, 将其克隆到真核表达载体 pcDNA 中, 并将该真核表达载体上的 CMV 启动子控制的含 *LacZ* 和 *HA* 基因表达盒克隆入马立克氏病病毒 *US2* 基因中, 成功的构建了马立克氏病病毒的转移载体。然后, 通过脂质体方法转染已感染马立克氏病病毒的鸡胚成纤维细胞 (CEF) 中, 通过蓝斑筛选获得重组病毒。该重组病毒通过 PCR 方法鉴定证实其基因组中含有完整的 *HA* 基因。免疫酶反应和 Western-blot 证实重组病毒表达了禽流感 *HA* 蛋白, 表达的 *HA* 蛋白具有血凝活性。

关键词: 禽流感病毒; *HA* 基因; 重组马立克氏病病毒

中图分类号: S852.65 文献标识码: A 文章编号: 1000-7091(2007)04-0168-04

Construction of Recombinant Marek's Disease Virus Expressing Avian Influenza Virus *HA* Gene

ZHOU Xue-mei^{1,2}, HUO Hui-ling², SHE Rui-ping¹, LI Yong-qing³, FENG Guo-min⁴,
ZHANG Zhen-hua³, WANG Hong-jun³

(1. Department of Veterinary Medicine, China Agricultural University, Beijing 100094, China; 2. Hebei Province Institute of Veterinary Drug Control, Shijiazhuang 050051, China; 3. Institute of Animal Husbandry and Veterinary Medicine, Beijing Academy of Agriculture and Forestry Sciences, Beijing 100089, China; 4. Department of Veterinary Medicine, Jiangxi Agricultural University, Nanchang 330045, China)

Abstract: In this study, a 1.7 kb DNA fragment encoding the *HA* gene of Avian influenza virus H9N2 was obtained by RT-PCR and the sequence was cloned into the vector of pcDNA; Then the expression cassette including the *HA* gene of AIV and *LacZ* gene of *E. coli* controlled by CMV promoter, were inserted into *US2* gene of MDV to give a transfer vector. The complex of pUS2 *HA* and DOTAP was transfected into CEF infected MDV. The recombinant MDV were selected and purified by blue plaque. The complete *HA* gene inserted into MDV was detected by PCR. Western-blot and immunostaining result demonstrated that *HA* protein of AIV was expressed by recombinant MDV.

Key words: Avian influenza virus; *HA* gene; Recombinant marek's disease virus

禽流感 (Avian Influenza, AI) 是由 A 型流感病毒引起的一种接触性传染病, 导致家禽生产性能下降及大批死亡, 造成巨大的经济损失。尤其高致病力的禽流感, 不仅严重威胁着世界养禽业, 而且对人类的生命健康带来潜在的威胁, 在我国和东南亚其他的一些国家人因感染高致病力禽流感而死亡的报道, 更加引起人类的警惕^[1-3]。

禽流感病毒 (Avian Influenza Virus, AIV) 为正粘

病毒科流感病毒属 A 型流感病毒, 其基因组由 8 个分节段的单股负链 RNA 组成, 全长约 13.6 kb, 编码 10 个多肽^[4]。其中禽流感病毒的血凝素 (HA) 蛋白是病毒囊膜纤突的主要成分之一, 在病毒吸附和穿膜过程中起关键作用, 刺激机体产生的中和抗体可中和病毒的感染力, 是宿主的主要抗原^[5,6]。

鸡马立克氏病 (Marek's Disease, MD) 是由鸡马立克氏病病毒 (Marek's Disease Virus, MDV) 引起的鸡

收稿日期: 2007-04-12

基金项目: 河北省自然科学基金 (C2005000654)

作者简介: 周雪媚 (1975-), 女, 湖北蕲春人, 博士, 主要从事动物病毒学和免疫学方面的研究

通讯作者: 霍惠玲 (1966-), 女, 河北石家庄人, 硕士, 研究员, 主要从事动物病毒学和免疫学方面的研究

余锐萍 (1957-), 女, 湖北宜城人, 博士, 教授, 主要从事兽医病理学和黏膜免疫学方面的研究。

的一种高度接触传染性肿瘤病,也是严重危害着养禽业健康发展的重要疫病之一。目前,MDV 变异株不断出现,且毒力不断增强^[7],而血清 I 型马立克氏病毒株 CVI988/Rispens 是世界上公认的免疫效果最好、应用范围最广泛的疫苗株,可以用于抵抗 vMDV 和 vvMDV 的攻击。随着对 MDV 分子生物学研究的逐步深入,MDV 的毒力或致病性致肿瘤性相关的基因或分子位点和结构被逐步搞清楚,人们开始转向 MDV 基因工程疫苗的研究,选用 MDV 作为活病毒载体,来表达其他病原的保护性抗原基因,如以 MDV 为载体表达 NDV F 基因及 IBDV 的 VP2 基因^[8-10]。

本试验首次将 H9N2 亚型禽流感病毒的 HA 基因插入到 MDV CVI988 的非必需区基因片段 US2 中,构建了重组质粒;然后通过同源重组的方法,获得了表达禽流感 HA 基因的重组 MDV 病毒。以期该重组病毒能有效抵抗禽流感病毒和马立克氏病病毒的攻击,为开发具有广泛防制禽流感活载体疫苗打下基础。

1 材料和方法

1.1 病毒株和细胞

禽流感病毒毒株为: AIV A/chicken/Guangdong/2000(H9N2),鸡胚尿囊液的 HA 为 1×2^9 ,由国家流感中心提供。马立克氏病病毒 MDV CVI988/Rispens 株,北京市农林科学院畜牧兽医研究所翎羽公司提供;9~10 d 的 SPF 鸡胚,购自北京市实验动物中心;抗禽流感 H9N2 的 SPF 血清由北京市农林科学院畜牧兽医研究所制备保存。

1.2 载体质粒

MDV US2 区基因与 pUC18 的重组载体,是将 MDV 的 US2 基因区 6.5 kb 的片段通过 *Sal* I 和 *Bam* HI 酶切位点和克隆载体 pUC18 连接而成,命名为 pUS2,由日本国家动物疾病防治研究所 Tsukamoto 教授赠送;真核表达载体 pcDNA4.0/His/LacZ 含有人巨细胞病毒主要早期启动子(CMV),LacZ 报告基因及多克隆位点,为 INVITROGEN 公司产品。

1.3 试剂

工具酶及限制性内切酶均为 New England Biolabs 产品;PCR 反应试剂、DL2000 和 *M*Hind III DNA Maker 购自 Takara 生物工程公司;质粒提取试剂盒购自 QIAGEN 公司;DMEM、MEM、转染级营养液 opti-MEM、脂质体 Lipofectamine 为 INVITROGEN 公司产品。

1.4 引物的设计与合成

根据 GENBANK 发表的 AIV 基因的序列,及表

达载体的多克隆位点的分析,设计了 1 对引物,上游引物: 5'-GCGGCCGCAATGGAGAGAATAGTGCTT-3' 下游为 5'-TGGGCCCCTACAATCTGAACTCAATA-3'。并分别在上游引物和下游引物 5' 端引入 *Apa* IV 和 *Not* IV;上述引物由博亚生物工程公司合成,预期扩增片段长度为 1 700 bp。

1.5 病毒的扩增及 RNA 的提取

将种毒经尿囊腔接种 10 日龄 SPF 鸡胚,培养 24~48 h 后收毒,用 Trizol 试剂进行尿囊液总 RNA 提取。具体操作按试剂说明书进行,然后将 RT-PCR 扩增出的 1.7 kb 的片段,再克隆到 T 载体中^[11,12],通过酶切分析和 PCR 鉴定出含 HA 基因的阳性重组质粒。

1.6 含 HA 基因的真核表达载体的构建

将 HA 基因通过 *Apa* IV 和 *Not* IV 位点克隆到 pcDNA 载体中,并命名为 pcDNA-HA。

1.7 含 HA 基因的马立克氏病毒转移载体的构建

pcDNA-HA 用内切酶 *Bgl* II 和 *Avr* II 酶切后,获得 6.8 kb 含 CMV 立即早期启动子、LacZ 基因、HA 基因及 SV40p01yA 尾的表达盒片段,并将该片段亚克隆到 pUS2 中,获得转移质粒载体,并命名为 pUS2-HA。

1.8 重组马立克氏病毒的构建和筛选

按常规方法制备鸡胚成纤维细胞(CEF),待其长成 80% 单层后,接种 MDV,剂量为 24 孔板中每孔 50PFU,37℃作用 4 h 后,按照 Lipofectamine™2000 说明书,将转移载体质粒转染细胞,作用 2 h 后,倒掉转染液,加入含 5% 牛血清的 MEM 培养液于 37℃CO₂ 培养箱中培养 4~5 d 后,待出现典型的细胞病变,加入含有 X-gal(200 μg/mL)营养液,观察蓝色蚀斑,将 24 孔中感染的 CEF 细胞用 0.25% 胰酶消化,接种到有新鲜 CEF 细胞单层的 96 孔培养板上。观察蓝斑,将有蓝色孔的细胞消化并接到新的细胞上,如此重复多个循环,直至确信所有的蚀斑都是蓝色,通过蓝斑筛选获得纯化的重组病毒。

1.9 重组病毒的鉴定

首先用常规方法提取重组病毒的总 DNA,根据前面设计的 HA 基因引物进行 HA 基因片段的扩增。

1.10 重组病毒表达 HA 蛋白的鉴定

1.10.1 间接免疫酶反应 将重组病毒(rMDV)感染 96 孔中的 CEF 细胞,4~5 d 后,倒掉培养液,用预冷的 95% 的乙醇和丙酮(4:6)混合液固定细胞;用 SPF 鸡抗 H9N2 血清和 HRP 标记兔抗鸡 IgY 进行免疫酶反应。

1.10.2 Western blot 检测 将重组病毒(rMDV)感染

CEF 细胞, 4~ 5 d 后, 收集的细胞, 进行 12% SDS-PAGE 电泳, 再转移到膜上, 用 SPF 鸡抗 H9N2 血清和 HRP 标记兔抗鸡 IgY 进行 Western blot 分析。

1.11 重组病毒生长曲线的测定

将 rMDV 和 MDV CVI988 分别接种到 24 孔板培养的长满单层的 CEF(3 PFU/ 孔)。分别在接种后 1, 2, 3, 4, 5, 6 和 7 d 收集细胞, 并接到新鲜的细胞单层上, 每天收集的细胞分别做 4 个重复; 6 d 后, 计算各孔的蚀斑数, 并计算出各天的平均蚀斑数。

1.12 重组病毒血凝活性的鉴定

将重组病毒(rMDV) 感染 CEF 细胞, 4~ 5 d 后, 收集 24 孔细胞, 溶于 0. 2 mL 的生理盐水中超声波破碎后, 经微量离心机 8 000 r/min, 2 min, 收集上清液, 并生理盐水作配比稀释后, 加入等体积 0. 5% 的鸡红细胞, 室温作用 30 min, 观察结果, 同时以 MDV 感染的 CEF 细胞作为阴性对照。

2 结果与分析

2.1 含 HA 基因的马立克病毒转移质粒的构建

首先将 1. 7 kb 的 HA 基因克隆到 pcDNA 载体中, 获得了 pcDNA-HA, 然后将 pcDNA-HA 用内切酶酶切后, 获得的片段亚克隆到 pUS2 中, 获得转移质粒载体, 即为 pUS2-HA。该转移重组质粒含有 LacZ 报告基因及用于体内同源重组的同源臂, 上下游同源臂的大小分别为 3. 5 和 0. 85 kb。

2.2 重组马立克病病毒的构建及克隆

将转移质粒 pUS2-HA 用质脂体包裹转 MDV 感染的 CEF 细胞, 如材料和方法所述, 转染后 3~ 4 d, 开始加底物 X-gal, 观察到有蓝斑的出现, 通过传 8 代试验证明该重组病毒是稳定的(图 1)。

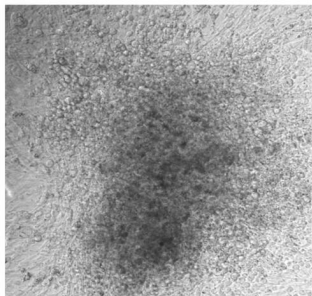
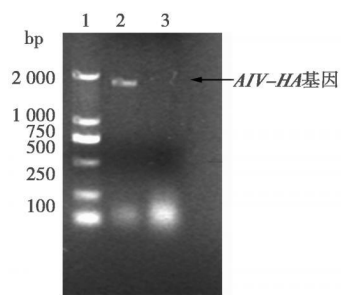


图 1 含 LacZ 基因和禽流感 HA 基因的重组病毒在鸡胚成纤维细胞(CEF)

Fig. 1 Blue-plaque of CEF infected with rMDV expressing LacZ gene and AIV HA gene

2.3 重组病毒的鉴定

提取纯化获得的稳定的重组病毒 DNA, 用禽流感 HA 基因的特异性引物扩增出大小约 1. 7 kb 的 PCR 产物(图 2)。



1. DL2000 标准分子量; 2. 重组病毒感染的 CEF 细胞的 PCR 鉴定结果; 3. 阴性对照
1. DL2000 Maker; 2. PCR result from the CEF infected with rMDV;
3. PCR result from the CEF infected with MDV

图 2 重组病毒 PCR 鉴定
Fig. 2 Identification of recombinant MDV by PCR

2.4 免疫酶反应结果

含重组病毒的 CEF 细胞经 X-gal 染色后, 空斑呈蓝色。免疫酶反应结果表明, 重组病毒形成的蓝斑能与 H9N2 血清发生特异性反应(图 3)。

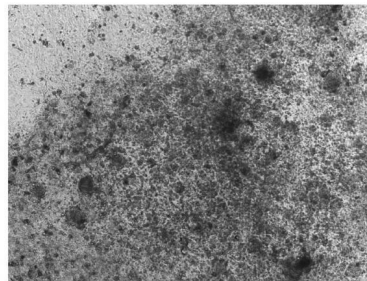
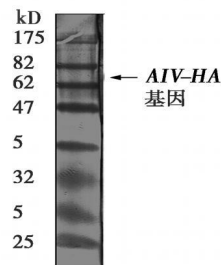


图 3 疫酶反应检测到表达禽流感 HA 基因的重组病毒的空斑

Fig. 3 Paques expressing the HA gene were detected by staining with anti-AIV antibody



1. 标准蛋白分子量; 2. 重组病毒感染的 CEF 细胞的检测结果; 3. 阴性对照
1. Maker; 2. Westernblot result from the CEF infected with rMDV; 3. Negative control

图 4 Western-blot 检测重组病毒中禽流感 HA 基因的表达
Fig. 4 Western-blot analysis of HA(AIV) expressed in CEF

2.5 Western-Blot 结果

含有重组病毒的细胞裂解物的 Western-blot 分析表明, 在分子量大约 70 KD 处有特异的反应条带, 进一步说明 HA 蛋白在重组病毒中表达(图 4)。

2.6 重组病毒在 CEF 上的生长曲线测定

根据 CEF 上的 rMDV 和 MDV 的空斑数, 结果显

示, mDA 与亲本病毒有相似的生长曲线, 说明 VP₂ 基因和标记基因已经稳定的插入到 MDV 的预期位点中。

2.7 重组蛋白血凝活性鉴定

重组病毒用生理盐水稀释后与红细胞作用。结果显示重组病毒表达的 HA 具有凝集红细胞活性, 血凝效价为 1: 16, 而对照的 MDV 感染的 CEF 细胞的裂解液没有凝集红细胞活性。

3 结论与讨论

当前, MD 和 AI 是危害养鸡业的重要疾病, 给养鸡业造成巨大的经济损失。目前, 用于防治高致病性禽流感所用的疫苗多为灭活疫苗, 灭活疫苗存在着灭活不全而导致散毒的危险, 此外, 灭活疫苗对高致病性禽流感病毒的感染不能提供完全有效的保护。在本研究中, 将禽流感 H9N2 的保护性抗原 HA 基因插入到细胞结合型的 MDV 的非必需区 US 中, 这样随着重组病毒在 CEF 细胞上的繁殖与复制, HA 蛋白也将得到不断表达。本试验结果表明: 在 CMV 启动子控制下的禽流感 HA 基因和大肠杆菌 LacZ 报告基因能够在重组马立克氏病病毒中表达而且表达的产物具有凝集活细胞的功能。因此有望该重组疫苗在进一步的动物试验中, 能在有效抵抗 MDV 强毒攻击的同时, 也能诱导机体产生足以抵抗高致病性禽流感攻击的体液免疫和细胞免疫反应。

参考文献:

- [1] Rott R. The pathogenic determinant of influenza virus [J]. *Veterinary Microbiology*, 1992, 33: 303– 310.
- [2] Trampuz A, Prabhu R M, Smith T F, *et al.* Avian influenza: a new pandemic threat? [J]. *Mayo Clin Proc*, 2004, 79(4): 523– 530.
- [3] 于康震, 崔尚金, 付朝阳, 等. 禽流感与养禽业发展和人类健康[J]. *中国预防兽医学报*, 2000, 22(4): 312– 313.
- [4] 刘红旗, 刘秀梵, 张如宽. A 型流感病毒蛋白研究进展[J]. *动物医学进展*, 2002, 23(2): 6– 9.
- [5] Brugh M, Stone H D. Immunization of chickens against influenza with hemagglutinin specific(H5) oil emulsion vaccine [C]//*Proceedings of the Second International Symposium on Avian Influenza*. U S Animal Health Association: Richmond, VA. 1987: 283– 292.
- [6] Mitnaul L J, Matrosovich M, Castrucci M R. Balanced hemagglutinin and neuraminidase activities are critical for efficient replication of influenza A virus [J]. *J Virol*, 2000, 74: 6015– 6020.
- [7] 韩凌霄. 鸡马立克氏病病毒毒力变异及疫苗的发展状况[J]. *中国家禽*, 2000, 22(12): 35– 37.
- [8] Sonoda K, Sakaguchi M, Okamura H. Development of an effective polyvalent vaccine against both Marek's and Newcastle diseases based on recombinant Marek's disease virus type 1 in commercial chickens with maternal antibodies[J]. *J Virol*, 2000, 74(7): 3217– 3226.
- [9] Tsukamoto K, Kojima C, Komori Y, *et al.* Protection of chickens against very virulent infectious bursal disease virus (IBDV) and Marek's disease virus (MDV) with a recombinant MDV expressing IBDV VP2 [J]. *Virology*, 1999, 257(2): 352– 362.
- [10] 周雪媚, 李永清, 余锐萍, 等. 表达传染性法氏囊 (IBDV) VP2 基因的重组马立克氏病病毒的构建[J]. *病毒学报*, 2005, 21(6): 474– 477.
- [11] 黄冬艳, 杨兵, 齐欣, 等. 鸡贫血病毒 VP1 基因的克隆及其在大肠杆菌中的表达[J]. *华北农学报*, 2006, 21(5): 50– 53.
- [12] 杨兵, 徐福洲, 王金洛, 等. 应用 PCR 方法检测鸡传染性贫血病毒[J]. *华北农学报*, 2003, 18(3): 90– 92.