

表达NDV F48E9株F基因的MDV CV I988株 转移质粒载体的构建*

苏春霞¹, 张彦明¹, 张雪莲², 徐学清², 陈溥言²

(1 西北农林科技大学 动物科技学院, 陕西 杨凌 712100;

2 南京农业大学 农业部畜禽疫病诊断与免疫重点开放实验室, 江苏 南京 210095)

[摘 要] 将新城疫病毒(NDV) F48E9株融合蛋白(F)基因1 700 bp克隆到真核表达载体p RES中, 构建成表达F基因的载体p RESF, 然后将包含F基因及其上游的内含子和下游的polyA的2 900 bp DNA片段再克隆入包含gB启动子的SK载体中, 并使其克隆到gB启动子600 bp的下游, 最后将包含gB启动子和F基因表达盒3 500 bp克隆到包含MDV CV I988非必需片段US10的载体SK中。该研究为进一步在细胞中转染并获得表达F基因的MDV CV I988重组病毒奠定了基础。

[关键词] 新城疫病毒; F基因; 马立克氏病病毒CV I988转移质粒载体

[中图分类号] S852.65+9.5; S852.65+9.1 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1671-9387(2005)01-0001-04

新城疫(New castle disease, ND)是由新城疫病毒(New castle disease virus, NDV)引起的一种主要侵害鸡的急性传染病, 会给养禽业造成极大危害。新城疫病毒(NDV)属于副黏病毒科, 副黏病毒亚科的腮腺炎病毒属, 是一种有囊膜的病毒, 基因组为单分子负股单股RNA, 全长15~16 kb, 含有6个基因, 分别编码核衣壳蛋白(NP)、磷蛋白(P)、基质蛋白(M)、融合蛋白(F)、血凝素-神经氨酸蛋白(HN)和大分子蛋白(L)^[1]。其中F和HN 2种糖蛋白与NDV的致病性密切相关, 并且有良好的免疫原性, 在致病和免疫应答过程中起着关键作用。F蛋白主要参与病毒穿入、细胞融合和溶血, 而病毒的吸附是以融合为前提, 然后才能进入细胞^[2]。

马立克氏病病毒(Marek's Disease Virus, MDV)主要侵害鸡的性腺、神经、肌肉、皮肤、虹膜及各内脏器官, 引起单个或多个组织器官的淋巴细胞增生和单核细胞浸润, 是对养鸡业危害最为严重的传染病病原之一。本病还是目前唯一可通过接种疫苗控制的肿瘤病^[3]。

Margan等^[4]于1992年构建了1株在US10基因内插入新城疫F蛋白基因的重组HVT, 用该毒株接种的鸡, 可同时抵抗新城疫病毒和MDV的双重攻击。研究表明, US10的缺失对病毒生长无不良影响, 而且不改变HVT的免疫原性。但是这些重组疫

苗尚不能产生比常规病毒更好的免疫效果^[4]。

目前, MDV疫苗株被认为是最有潜力的病毒载体之一, 通过构建表达外源基因抗原的多价活疫苗来诱导免疫, 从而达到预防禽病的目的。就这些疫苗病毒而言, HVT作为活疫苗和多价疫苗载体应用较为广泛, 但致弱的MDV 1型, 如CV I988c/R6和R2/R3明显优于HVT, 同时又因为疫苗株MDV 1型与vMDV 1的抗原具有较高的同源性, 理论上可以比其他血清型更能诱导足够的免疫应答^[5, 6]。并且已有研究^[7]表明, MDV血清1型可以稳定地表达外源基因, 并可构建多价重组病毒来有效地预防禽病。

为进一步提高重组病毒的表达水平, 作者成功地构建了含有MDV的gB启动子及含NDV F基因的基因表达盒, 并将其克隆入含有MDV CV I988的US10非必需区的SK载体中, 从而获得了MDV CV I988转移质粒载体, 为获得重组病毒奠定了基础。

1 材料与方法

1.1 质粒与宿主菌

含有MDV CV I988gB启动子的T载体, 含有NDV F48E9株F基因开放阅读框质粒Fz1/z2, 质粒SK及含有MDV CV I988 US10非必需区的质粒SK, 质粒p RES, 宿主菌DH5 α , 均由南京农业大学

* [收稿日期] 2003-12-03

[作者简介] 苏春霞(1977-), 女, 宁夏盐池人, 在读硕士, 主要从事分子病毒学研究。

[通讯作者] 陈溥言(1942-), 男, 江苏南京人, 教授, 博士生导师, 主要从事畜禽传染病学研究。

农业部畜禽疫病诊断与免疫重点开放实验室保存。

1.2 工具酶及试剂

Taq 酶, 限制性内切酶, T₄DNA 聚合酶, T₄DNA 连接酶及磷酸化酶(CIP), 均购自TaKaRa公司; 其他试剂为国产分析纯。

1.3 引物设计

参照已发表的F基因序列及PRES序列, 设计了2对引物。

1.4 gB启动子的亚克隆及限制性内切酶分析

用限制性内切酶EcoR I和Sac I消化TgB, 通过琼脂糖凝胶电泳鉴定酶切产物, 并回收580 bp的目的片段, 用该片段连接上述2种酶消化的SK质粒, 作用过夜, 转化感受态细胞DH5 α , 接种于含氨苄青霉素的琼脂平板上, 在37℃培养16~20 h后, 挑取琼脂平板上的单个菌落, 用常规碱裂解法提取质粒, 用EcoR I和Sac I消化, 电泳鉴定, 以含有580 bp大小片段的质粒为阳性质粒。

1.5 NDV F基因的扩增、亚克隆及限制性内切酶分析

以Fz1/z2为模板, 通过PCR扩增目的片段, 并用琼脂糖凝胶电泳鉴定PCR产物, 回收1 678 bp的目的片段, 并用Nhe I和Mlu I消化回收的片段, 用该片段连接上述2种酶消化的pRES质粒, 同样通过上述方法筛选出阳性克隆。

1.6 含NDV F基因表达盒转移质粒载体的构建

以含有F基因的pRES质粒为模板, 通过PCR扩增含有F基因及上游的内含子和下游的polyA, 并用琼脂糖电泳鉴定PCR产物, 回收2 900 bp的目的片段, 用EcoR I和Xho I消化回收的片段, 然后用该片段连接上述2种酶消化的含有gB启动子的SK质粒。再用Sac I和EcoR I消化筛选到的阳性质粒, 然后补平, 回收含有gB启动子和F基因及内含子和polyA约3 500 bp的基因表达盒, 插入SKU10中的Msc I位点。由于在F基因表达盒与U10中各有一个EcoR I酶切位点, 可用此酶鉴定阳性质粒。

2 结果与分析

2.1 gB启动子的亚克隆及限制性内切酶分析结果

用EcoR I和Sac I消化gB启动子和SK载体的连接产物转化细菌后所提的质粒, 经琼脂糖凝胶电泳, 可见有约580 bp的目的条带, 可将此阳性质粒命名为SKgB(图1)。

2.2 NDV F基因的扩增、亚克隆及限制性内切酶分析结果

以Fz1/z2质粒为模板进行PCR扩增的产物经琼脂糖凝胶电泳, 可见有约1 700 bp的目的条带(图2)。用Nhe I和Mlu I消化F基因和pRES质粒的连接产物转化细菌后所提的质粒, 经琼脂糖凝胶电泳, 可见有约1 700和6 100 bp的目的条带, 将此阳性质粒命名为pRESF(图3)。

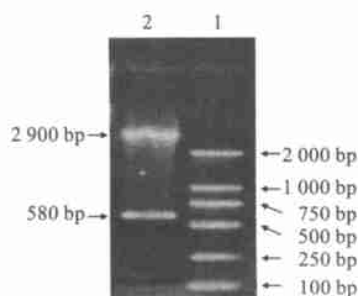


图1 质粒SKgB的酶切分析

1 DL 2 000 标准对照;

2 EcoR I和Sac I消化的SKgB

Fig 1 Restriction enzymes analysis of SKgB

1 M marker DL 2 000;

2 SKgB digested with EcoR I and Sac I

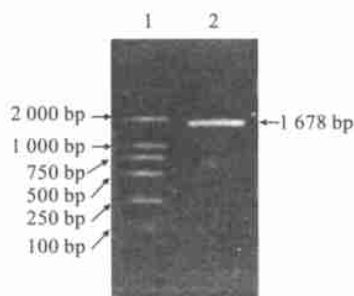


图2 F基因的PCR结果

1 DL 2 000 标准对照;

2 F基因的PCR结果

Fig 2 The PCR result of gene

1 M marker DL 2 000;

2 The PCR result of gene

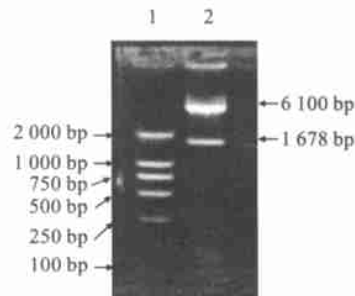


图3 质粒pRESF的酶切分析

1 DL 2 000 标准对照;

2 Mlu I和Nhe I消化的pRESF

Fig 3 Restriction enzymes analysis of pRESF

1 M marker DL 2 000;

2 pRESF digested with Mlu I and Nhe I

2.3 含有NDV F基因表达盒转移质粒载体的构建结果

以含有F基因的pRES的质粒为模板, 经PCR

扩增含有F基因及上游内含子和下游polyA的产物, 经琼脂糖凝胶电泳, 可见有约2 900 bp的目的条带(图4), 用EcoR I和Xho I消化该片段和含有gB

启动子的SK质粒的连接产物转化细菌后所提的质粒,经琼脂糖凝胶电泳,可见有约3 500和2 900 bp的目的条带,并将此质粒命名为SKgBF(图5)。最后通过EcoR I酶切鉴定插入到SKU S10中的表达盒,

经琼脂糖凝胶电泳可见有约4 000和5 000 bp的目的条带,将此阳性质粒命名为p IRESF,并将此质粒命名为SKU S10F(图6)。

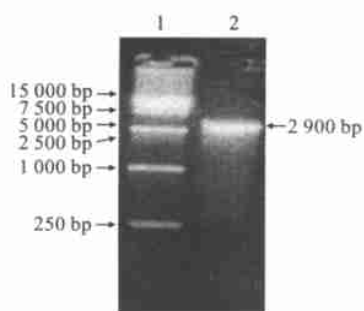


图4 含有F基因及上游内含子和下游polyA的PCR结果

1 DL 1 500 标准对照; 2 含有F基因及上游内含子和下游polyA的PCR结果

Fig 4 The PCR result of gene

with IVS and polyA

1 Marker DL 1 500;

2 The PCR result of gene with IVS and polyA

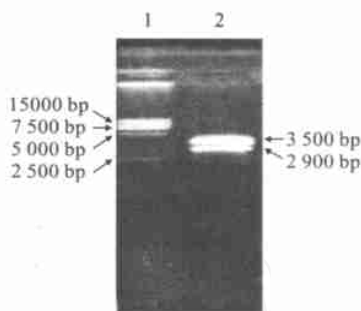


图5 F基因的PCR结果

1 DL 1 500 标准对照;

2 EcoR I和Xho I消化的SKgBF

Fig 5 Restriction enzymes

analysis of SKgBF

1 Marker DL 1 500;

2 SKgBF digested with EcoR I and Xho I

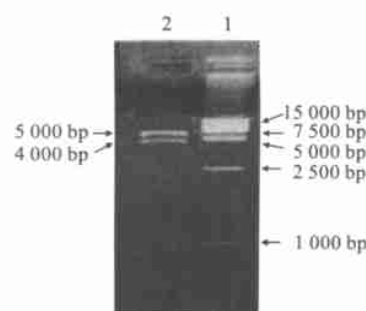


图6 质粒p IRESF的酶切分析

1 DL 1 500 标准对照;

2 EcoR I消化的SKU S10F

Fig 6 Restriction enzymes

analysis of p IRESF

1 Marker DL 1 500;

2 SKU S10F digested with EcoR I

3 讨论

MDV疫苗株被认为是最有潜力的病毒载体之一,用MD疫苗免疫1日龄鸡群1次即可诱导终身免疫,能防止MD的发生;此外,MDV具有自然的宿主范围,因此作为病毒载体对家畜养殖人员是安全的。就这些疫苗病毒而言,HVT作为活疫苗和多价疫苗载体应用较为广泛,但致弱的MDV 1型明显优于HVT,因此,致弱的MDV 1疫苗株作为构建预防禽病重组病毒的载体,具有很大的应用价值和重要的研究意义。

外源基因插入到MDV 1基因组中是否会影响疫苗的免疫保护作用,这一点对于构建重组疫苗来说很重要。Sakaguchi等^[7]利用在病毒基因组内插入LacZ基因的方法,确定了位于US区的US10基因因为病毒生长非必需区,并经过一系列的研究发现,在所有短独特区的病毒生长非必需区基因中,US10基因是构建重组病毒插入外源基因最稳定的区域,且在该区插入外源基因后对病毒的免疫原性不会产生影响。

NDV的F蛋白在病毒致病过程中起重要作用,且F蛋白为NDV的主要抗原。Margan等^[4]报道,用真核表达系统表达的F蛋白和HN蛋白免疫动物后再用强毒攻击,能显示出良好的保护作用。本试验先将F基因插入到p IRES质粒中,然后将其中的内含子和polyA一起扩增下来,内含子的剪切是基因表达及其调控所必需的,polyA可保护mRNA不被细胞内的核酸酶攻击而降解。

本试验利用MDV的gB启动子控制NDV F基因的表达来构建重组MDV,使其能有效预防ND和超强毒株引起的MD。因为在以往的ND重组病毒中,F基因都由异源启动子控制,如SV40,RSV LTR启动子,这些重组病毒在抗ND方面,对SPF鸡群的保护率很高,而对带有母源抗体的商品鸡群,由于受到母源抗体的影响,保护力明显下降。有研究表明,在MD的基因重组疫苗中,利用gB启动子控制F基因的表达,既可避免病毒对外源启动子的排斥作用,又可提高疫苗对商品鸡的免疫保护作用而避免母源抗体的影响。

[参考文献]

- [1] Millar N S, Chambers P, Emmerson P T, et al Nucleotide sequence analysis of the Hemagglutinin-Neuraminidase gene of Newcastle disease virus[J]. Journal of General Virology, 1986, 67: 1917- 1927.

- [2] Nagai Y, Klenk H D. Proteolytic cleavage of the virolyglycoprotein and its significance for the virulence of New castle disease[J]. Virology, 1976, 72: 494- 508
- [3] 殷 震, 刘景华. 动物病毒学[M]. 第2版. 北京: 科学出版社, 1997. 1051- 1066
- [4] Margan R W, Gelb J. Protection of chickens from New castle disease and Marek's disease with arecombinant herpesvirus of turkeys vaccine expressing the new castle disease virus fusion protein[J]. Avian Diseases, 1992, 36: 858- 870
- [5] de Boer G F, Pol J M A, Jeurissen S H M. Marek's disease vaccination strategies using vaccine made from three avian herpesvirus serotype[A]. Japanese association on Marek's disease Advances in Marek's disease research[C]. Japan: Osaka, 1988. 405- 413
- [6] Witter R L. Attenuated revertant serotype1 Marek's disease virus: safety and protective efficacy[J]. Avian Diseases, 35: 877- 891
- [7] Sakaguchi M, Hirayama Y, Maeda H, et al Construction of recombinant Marek's disease virus type 1 (MDV1) expressing the *E. coli* LacZ gene as a possible live vaccine vector: the US10 gene of MDV1 as a stable insertion site[J]. Vaccine, 1994, 12: 953- 957.

Construction of recombinant Marek's disease virus CV I 988 strain transferring plasmid vector expressing F gene of NDV F48E9 strain

SU Chun-xia¹, ZHANG Yan-ming¹, ZHANG Xue-lan², XU Xue-qing², CHENG PU-yan²

(1 College of Animal Science and Technology, Northwest A & F University, Yangling, Shaanxi 712100, China;

2 Key Laboratory of Animal Disease Diagnosis and Immunology, Ministry of Agriculture, Nanjing Agricultural University, Nanjing, Jiangsu 210095, China)

Abstract: The NDV F48E9 strain fusion protein gene was cloned into the multi clone site of eukaryotic expression vector pIRES to form pIRESF. Then 2 900 bp DNA fragment of F gene with IVS and polyA was cloned into multi clone site of vector SK with gB promoter of MDV. Finally, 3 500 bp DNA fragment of F gene with gB promoter of MDV was cloned into vector SK containing US10, the nonessential fragment of MDV CV I 988. The research lays a foundation of obtaining recombinant MDV CV I 988 expressing NDV F gene.

Key words: NDV; F gene; MDV CV I 988 transferring plasmid vector

· 简 讯 ·

《西北农林科技大学(自然科学版)》再获 第四届全国优秀农业期刊一等奖

为了不断提高我国农业期刊的办刊水平,在全国行业树立起质量意识和品牌意识,促进农业期刊从数量规模型向质量规模型转变,中国农学会和中国期刊协会农业期刊分会组织的“第四届全国优秀农业期刊和优秀期刊工作者暨首届全国农业期刊主编金犁奖评选活动”结果已经揭晓,本刊在前几届获奖的基础上,再次获得“第四届全国优秀农业期刊一等奖”,这次共有124种期刊获奖,其中获得“一等奖”的期刊有15家。同时本刊编辑部温晓平、屈李纯和窦春蕊3位编辑获“优秀农业期刊工作者”。

(申云霞 供稿)