

## 2种鸡柔嫩艾美耳球虫DNA疫苗的构建 及在鸡体内的表达

格日勒图,徐立新,严若峰,李祥瑞

(南京农业大学 动物医学院,江苏 南京 210095)

**[摘要]** 利用DNA重组技术,将柔嫩艾美耳球虫(*Eimeria tenella*)第2代裂殖子抗原基因MZ5-7的完整阅读框(ORF,945 bp)克隆到真核表达质粒pcDNA4.0中,构建了DNA疫苗pcDNA4.0-MZ。用同样方法,将鸡成熟白细胞介素-17(IL-17)基因的完整阅读框(507 bp)与MZ5-7基因串连,使MZ5-7基因位于IL-17基因的上游,将串连基因克隆到pcDNA4.0中,构建成免疫调节型DNA疫苗pcDNA4.0-MZ-IL-17。2种DNA疫苗纯化后,胸部肌肉注射免疫1周龄雏鸡(50  $\mu$ g/鸡),在免疫后3,5,7,15和20 d取注射和非注射部位肌肉组织,分别用RT-PCR和Western blot方法检测抗原基因转录和表达情况。结果表明,在2种疫苗免疫后5,7和15 d,用RT-PCR方法在注射部位均可检测到MZ5-7基因的转录产物,大小约950 bp,但在免疫第3天和20天的肌肉组织中未检测到表达产物。相同时间用Western blot方法进行检测,结果在免疫5和7 d的鸡肌肉组织中检测到表达产物,pcDNA4.0-MZ表达产物大小约36 ku,与理论推测值一致,pcDNA4.0-MZ-IL-17表达产物大小约64 ku,较MZ5-7和IL-17基因之和的理论推测值58 ku略大。但在非注射部位,两种方法均未检测到转录或表达产物。上述结果表明,通过肌肉注射后,两种DNA疫苗均可在鸡肌肉组织中得到有效表达。

**[关键词]** 柔嫩艾美耳球虫;MZ5-7基因;IL-17;DNA疫苗;鸡

**[中图分类号]** S858.312.72<sup>+</sup>3

**[文献标识码]** A

**[文章编号]** 1671-9387(2005)12-0034-05

鸡柔嫩艾美耳球虫(*Eimeria tenella*)是危害最严重的鸡球虫虫种之一,可造成严重的经济损失。该虫株的毒力强、生活史复杂,与其他球虫种间几乎无交叉反应<sup>[1]</sup>。目前,抗球虫药仍是防治鸡球虫病的主要手段,但由于耐药性虫株的产生和化学药物的残留问题,使抗球虫药的使用受到限制<sup>[1~3]</sup>。因此,使用疫苗来防治鸡球虫病迫在眉睫。

现在国际上市售的球虫疫苗均为活虫苗,如属于强毒苗的Coccivac(美国)和Immucox(加拿大),以及属于弱毒苗的Paracox(英国)和Livacox(捷克斯洛伐克)等<sup>[1,4]</sup>。然而,由于安全问题以及弱毒的“返强”现象,致使这些疫苗并未能在临床上得到广泛应用。近年来,研究新型疫苗用来防治球虫病的前景令人鼓舞,尤其是使用细胞因子作为基因佐剂的DNA疫苗,是国内外研究的热点之一<sup>[5~8]</sup>。Min等<sup>[9]</sup>将含有细胞因子(IL-1 $\beta$ ,IL-2,IL-8,IL-15,IFN- $\alpha$ ,IFN- $\gamma$ ,TGF- $\beta$ 和淋巴毒素)的真核表达质粒与艾美耳球虫DNA疫苗pcDNA3-1E联合免疫鸡,结果

发现,在免疫1周后试鸡感染堆型艾美耳球虫*E. acervulina*,与单独免疫3-1E质粒组相比,联合免疫组的球虫卵囊排出量明显减少,体重下降减缓。鸡白细胞介素-17(IL-17)是鸡遭受感染后肠上皮淋巴细胞表达的一种炎性细胞因子,对免疫应答有重要调节作用。Min等<sup>[10]</sup>用鸡IL-17重组蛋白刺激鸡胚成纤维细胞可诱导表达IL-6。

在*E. tenella*的生活周期中,裂殖子阶段对宿主的病理损害最为严重,且该阶段虫体的免疫原性最强<sup>[1,11]</sup>。因此,本试验选择*E. tenella*第2代裂殖子表面抗原MZ5-7基因作为目的基因,将其单独或与IL-17基因串联克隆到pcDNA4真核表达载体中,构建了2种DNA疫苗并进行了免疫效果试验,以期国内抗球虫DNA疫苗的研制提供理论依据。

### 1 材料与方法

#### 1.1 试验材料

1.1.1 质粒与菌种 pMD18-T载体为大连宝生物(TaKaRa)工程有限公司产品;pET28a载体和

**[收稿日期]** 2005-04-25

**[基金项目]** 国家“863”计划项目“禽用抗球虫基因工程疫苗的研制”(2002AA245061)

**[作者简介]** 格日勒图(1972—),男,蒙古族,内蒙古呼和浩特人,在读博士,主要从事寄生虫免疫研究。

E-mail:geriletunjaou@yahoo.com.cn

**[通讯作者]** 李祥瑞(1958—),男,汉族,河南新乡人,教授,博士,博士生导师,主要从事动物细胞因子与寄生虫分子免疫研究。

E-mail:lixiangrui@njau.edu.cn

pcDNA4.0载体为 Invitrogen 公司产品;宿主菌 *E. coli* DH5 $\alpha$  由本课题组保存。

1.1.2 工具酶与试剂 Trizol 试剂为 Promega 公司产品;DEPC 为 Amresco 公司产品; $\beta$ -巯基乙醇为 Fluka 公司产品;*rTaq* 酶、dNTP、DNA 分子量标准物 DL2000 和  $\lambda$ /*Eco*T14 digest、反转录酶 M-MLV、oligo(dT)<sub>18</sub> 引物及限制性内切酶 *Eco*R I, *Bam*H I, *Not* I, *Sal* I 均为大连宝生物(TaKaRa)工程有限公司产品;水饱和酚、琼脂糖胶回收试剂盒为大连宝生物(TaKaRa)工程有限公司产品。其余试剂为国产分析纯。

1.1.3 试验动物 健康罗德曼 1 日龄雏鸡 15 只,购自南京某种鸡场,置于用高锰酸钾和甲醛熏蒸消毒 2 次的鸡舍饲养。所用饲料中不含抗球虫药物,饮用水为煮沸的凉开水。饲养至 1 周龄备用;2 只雄性 SD 大鼠,购自东南大学实验动物中心,用于制备高免血清。

1.1.4 MZ5-7 基因和 IL-17 基因 两种基因均为本实验室自己克隆,经序列测定证明为 MZ5-7 基因和 IL-17 基因。MZ5-7 基因上游含有 *Bam*H I 酶切位点,下游含有 *Eco*R I 酶切位点;IL-17 基因上游含有 *Eco*R I 酶切位点,下游含有 *Sal* I 酶切位点。

1.1.5 MZ5-7 基因 PCR 引物 根据 GenBank 中发表的已知序列,用 Primer premier 5.0 软件在该基因上、下游各设计 1 个引物,引物包含基因完整阅读框序列,由 TAKARA 上海浩嘉公司合成。其序列为

P<sub>MZ</sub>上游引物:

5'-TACCAAGGATCCATGGCTAAGTCTA-3', 含 *Bam*H I 酶切位点;

P<sub>MZ</sub>下游引物:

5'-TTACTGAATTCCTCATCGTCCTCGT-3', 含 *Eco*R I 酶切位点。

## 1.2 试验方法

1.2.1 雏鸡分组及免疫程序 1 周龄鸡随机分成 3 组,每组 5 只,其中第 1,2 组为试验组,第 3 组为对照组。第 1,2 组鸡在左侧胸部分别肌肉注射重组疫苗 pcDNA4.0-MZ 和 pcDNA4.0-MZ-IL-17 (50  $\mu$ g/鸡);第 3 组鸡注射 100  $\mu$ L PBS 溶液。分别在免疫后第 3,5,7,15 和 20 d 扑杀试鸡,取注射部位肌肉组织置 -35  $^{\circ}$ C 冻存备用。

1.2.2 DNA 疫苗载体的构建 MZ5-7 基因内部本身已经含有 *Sal* I 酶切位点,为此在构建重组质粒 pcDNA4.0-MZ-IL-17 时,先把 IL-17 基因克隆

到经 *Eco*R I 和 *Sal* I 酶处理的 pET28a 载体上,再用 *Bam*H I 和 *Eco*R I 处理。用 *Bam*H I 和 *Eco*R I 把 MZ5-7 基因从载体上切下后,与前者相连,构建重组质粒 pET28a-MZ-IL-17,使 MZ5-7 基因与 IL-17 基因串连,MZ5-7 基因位于 IL-17 基因的上游。再用 *Bam*H I 和 *Not* I 内切酶从重组质粒 pET28a-MZ-IL-17 中把串联的目的基因 MZ-IL-17 切下,克隆到经 *Bam*H I 和 *Not* I 处理的 pcDNA 4.0 载体中,构建重组 DNA 疫苗载体 pcDNA 4.0-MZ-IL-17。用 *Bam*H I 和 *Eco*R I 把 MZ5-7 基因从载体上切下,直接与经 *Bam*H I 和 *Eco*R I 处理的 pcDNA4.0 质粒相连,构建重组 DNA 疫苗载体 pcDNA4.0-MZ。

1.2.3 孢子蛋白的提取及阳性血清的制备 人工感染 *E. tenella* 的鸡于感染后第 8 天剖杀,用常规方法从盲肠内容物中收集卵囊,于 25~27  $^{\circ}$ C 通气摇动使其完全孢子化。收集孢子化卵囊,重悬于 100 mL PBS 溶液中(含有适量胃蛋白酶),用浓盐酸调 pH 值为 2.5,37  $^{\circ}$ C 作用约 2 h,当孢子完全游离出来后,加 5 mol/L 的 NaOH 至 pH 值为 7.4,终止酶消化反应。8 000 r/min 离心 20 min 收集孢子,重悬于一定体积的 PBS 溶液中(含 0.1 mol/L 蛋白酶抑制剂苯甲基磺酰氟)进行匀浆,12 000 r/min 离心,收集上清液,用 Sepherdex 200 纯化可溶性蛋白 PEG20000 (聚乙二醇),浓缩使其终浓度约为 5 mg/mL。用弗氏佐剂乳化孢子可溶性蛋白,在 SD 大鼠背部皮下注射免疫(200  $\mu$ g/只),首次免疫和二次免疫相隔 15 d,每 7~8 d 加强免疫 1 次。当琼脂扩散反应呈现阳性时,扑杀大鼠,收集高免血清,置 -20  $^{\circ}$ C 保存备用。

## 1.3 免疫效果检测

1.3.1 MZ5-7 基因转录产物的 RT-PCR 检测 试验组和对照组的鸡分别在第 3,5,7,15 和 20 天扑杀后,采取注射部位和非注射部位的肌肉组织(约 100 mg)于 -40  $^{\circ}$ C 冷冻后捣碎,加 1 mL Trizol 裂解液进行匀浆,参考文献[12]的方法,提取总 RNA。总 RNA 沉淀物(约 4  $\mu$ g)中加 DNase I (RNase-free) 10 U,置 37  $^{\circ}$ C 消化反应 30 min,再用等体积的苯酚/氯仿抽提灭活 DNase I 活性。加入 1/10 量的 3 mol/L NaOAc(pH 为 5.2)和 2.5 倍量的冷无水乙醇沉淀重新回收总 RNA,用于反转录。反转录反应体系为:5 $\times$ 反转录 Buffer 4  $\mu$ L,25 mmol/L MgCl<sub>2</sub> 1.5  $\mu$ L,2 mmol/L dNTP 2.5  $\mu$ L,RNase 抑制剂 1  $\mu$ L,反转录酶 10 U,oligo(dT)1  $\mu$ L,总 RNA 9  $\mu$ L。

反转录反应条件为:75 °C 预变性 5 min、42 °C 反转录 1 h、95 °C 5 min 灭活反转录酶活性,用于 PCR 反应。PCR 反应体系为:模板 cDNA 2.5  $\mu$ L,25 mmol/L  $MgCl_2$  1.5  $\mu$ L,10 $\times$ 缓冲液 2.5  $\mu$ L, $P_{MZ}$ 上下游引物各 1.25  $\mu$ L,*Taq* 酶 2.5 U,10 mmol/L dNTP 0.5  $\mu$ L,加 ddH<sub>2</sub>O 至 25  $\mu$ L。PCR 反应条件:94 °C 预变性 3 min,94 °C 45 s,56 °C 45 s,72 °C 1 min,30 循环,72 °C 延伸 15 min。

1.3.2 MZ5-7 蛋白的检测 采取注射部位、非注射部位和对照组鸡的肌肉组织,分别剪碎后加入含 0.1 mol/L PMSF 的 RIPA 裂解液(150 mmol/L NaCl<sub>2</sub>,1.0% NP-40,0.5% 脱氧胆酸钠,0.1% SDS,50 mmol/L Tris,pH 8.0)进行匀浆。匀浆物以 12 000 r/min、4 °C 离心 15 min,取上清与 5 $\times$ 加样缓冲液充分混匀后,依次加样进行 SDS-PAGE 电泳。电泳完毕后,取出分离胶,把硝酸纤维素膜粗糙面向胶面铺在胶上,装入转印槽内,在转印缓冲液(20% 甲醇,25 mmol/L Tris,192 mmol/L 甘氨酸)中 100 V 转印 1 h。转印结束后,将膜放入 5% 脱脂乳溶液中,置于室温轻摇封闭 2 h。取出膜用 200 mL PBS 溶液漂洗 3 次,放入 20 mL 一抗(1:1 000 稀释的大鼠高免血清)溶液中,4 °C 作用 2 h。膜用 200 mL PBS 漂洗 3 次,再用 200 mL Tris·Cl 缓冲液

(150 mmol/L NaCl,50 mmol/L Tris·Cl,pH 7.5)洗 15 min,放入含二抗溶液的平皿中(1:1 000 稀释的过氧化物酶标记的兔抗大鼠 IgG),室温作用 1 h 后,用 Tris·Cl 缓冲液(pH 为 7.5)漂洗 3 次,进行显色反应。显色反应过程为:将 12 mg 的二甲基联苯胺溶解在 18 mL 的 0.01 mol/L Tris·Cl(pH 为 7.6)溶液中,加入 20  $\mu$ L 30% 的 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>,再将硝酸纤维素膜移入此溶液中进行显色。水洗终止反应。

## 2 结果与分析

### 2.1 重组质粒的酶切鉴定

由图 1 可知,重组质粒 pET28a-MZ-IL-17 经内切酶 *Bam*H I 和 *Not* I 双酶切,切下大小约为 1 400 bp 的片段,与 MZ-IL-17 串联基因大小相符。由图 2 可见,用 *Bam*H I 和 *Eco*R I 双酶切质粒 pET28a-MZ-IL-17,可切下大小约 950 bp 的片段,与 MZ5-7 基因大小相符。图 3 表明,对重组质粒 pcDNA4.0-MZ 用 *Bam*H I 和 *Eco*R I 进行酶切,切下大小约 950 bp 的片段,与 MZ5-7 基因大小相符。对 pcDNA4.0-MZ-IL-17 质粒用内切酶 *Bam*H I 和 *Not* I 酶切,结果切出 1 400 bp 的片段,与 MZ-IL-17 串联基因大小相符。

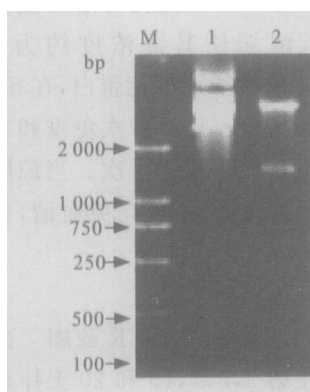


图 1 pET28a-MZ-IL-17 质粒 *Bam*H I, *Not* I 酶切鉴定结果

M. DL2000 maker;

1. 未酶切质粒对照;

2. 酶切的 pET28a-MZ-IL-17 质粒  
Fig. 1 Identification of the recombinant pET28a-MZ-IL-17 plasmids with *Bam*H I and *Not* I digestion

M. DL2000 maker;

1. Recombinant plasmids without digestion;

2. Digested pET28a-MZ-IL-17 plasmids

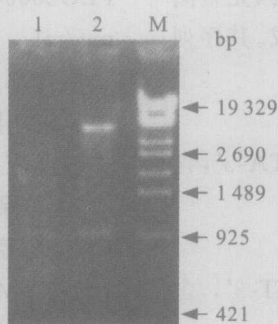


图 2 pET28a-MZ-IL-17 质粒 *Bam*H I, *Eco*R I 酶切鉴定结果

M. EcoT14 maker;

1. 未酶切质粒对照;

2. 酶切的 pET28a-MZ-IL-17 质粒  
Fig. 2 Identification of the recombinant pET28a-MZ-IL-17 plasmids with *Bam*H I and *Eco*R I digestion

M. EcoT14 maker;

1. Recombinant plasmids without digestion;

2. Digested pET28a-MZ-IL-17 plasmids

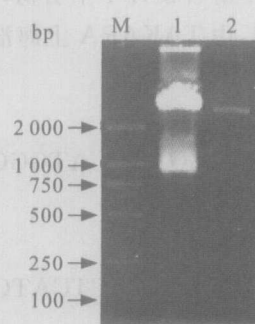


图 3 pcDNA4.0-MZ 和 pcDNA4.0-MZ-IL-17 质粒酶切鉴定结果

M. DL2000 maker;

1. pcDNA4-MZ 质粒 *Bam*H I 和 *Eco*R I 酶切;

2. pcDNA4-MZ-IL-17 质粒 *Bam*H I 和 *Not* I 酶切

Fig. 3 Identification of the recombinant pcDNA4.0-MZ and

pcDNA4.0-MZ-IL-17 plasmids with Enzyme digestion

M. DL2000 maker;

1. pcDNA4-MZ plasmids

*Bam*H I and *Eco*R I;

2. pcDNA4-MZ-IL-17 plasmids

digested with *Bam*H I and *Not* I

## 2.2 RT-PCR 检测结果

由图 4 可知,用  $P_{MZ}$  特异引物进行 RT-PCR 检测,免疫后第 5,7 和 15 天,在两种疫苗注射部位的肌肉样中均可检测到约 950 bp 大小的片段,与 MZ5-7 基因大小完全相符,但是在免疫后第 3 和 20 天以及所有检测时间点的非注射部位均未检测出任何片段(图 4)。

## 2.3 Western blot 结果

由图 5 和图 6 可知,免疫后的第 5 天和第 7 天,在 pcDNA4.0-MZ 疫苗注射部位的肌肉组织中,检测出约 36 ku 的条带,在 pcDNA4.0-MZ-IL-17 疫苗注射部位的肌肉组织中,检测出约 64 ku 的条带。在免疫后第 3,15 和 20 天各点均未检测到任何条带。

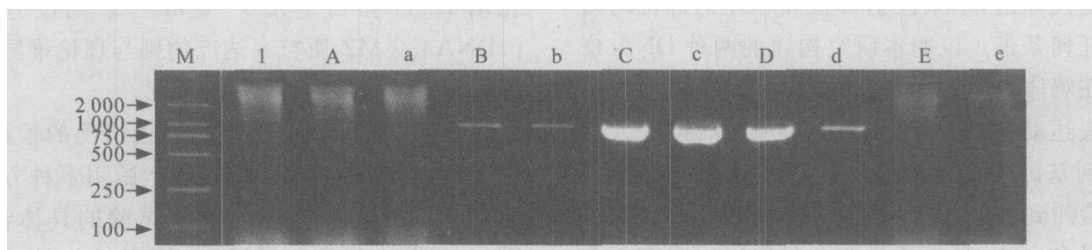


图 4 免疫后 DNA 疫苗在肌肉中转录情况的 RT-PCR 检测结果

M. DL2000 maker; 1. 对照(第 7 天,非注射部位)

A,B,C,D,E 分别为 pcDNA4.0-MZ 注射后第 3,5,7,15 和 20 天的检测结果;

a,b,c,d,e 分别为 pcDNA4-MZ-IL-7 注射后第 3,5,7,15 和 20 天的检测结果

Fig. 4 RT-PCR detection result of the transcriptions of the gene in DNA vaccines in the muscles post immunization

M. DL2000 maker; 1. Control (7 day post, injection uninjected site muscles)

A,B,C,D,E injected site muscles with pcDNA4-MZ vaccine post 3,5,7 15 and 20 d;

a,b,c,d,e injected site muscles with pcDNA4-MZ-IL-7 vaccine post 3,5,7,15, and 20 d

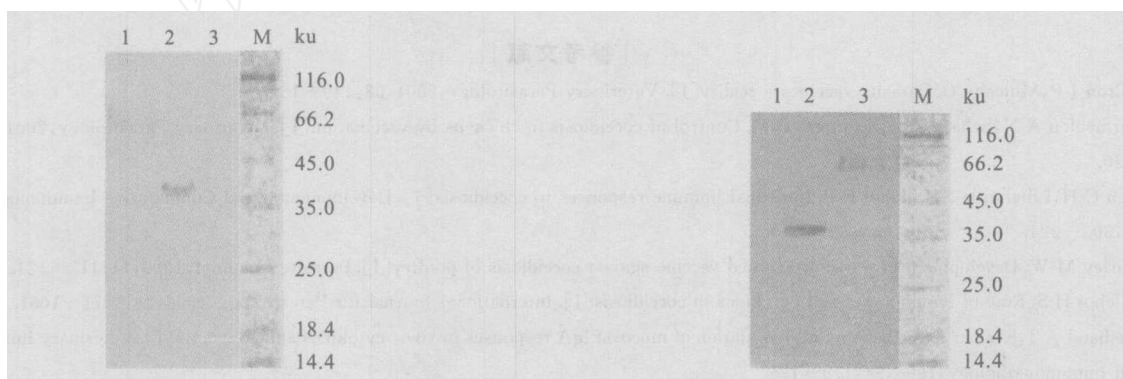


图 5 免疫后第 5 天 DNA 疫苗在肌肉中表达情况的 Western blot 检测

1. pcDNA4.0-MZ-IL-17 注射部位;

2. pcDNA4.0-MZ 注射部位; 3. 非注射部位

Fig. 5 Western blotting detection of the expressions of the DNA vaccines in the muscles 5 d post immunization

1. Muscles injected with pcDNA4.0-MZ-IL-17; 2. Muscles injected with pcDNA4.0-MZ; 3. Uninjected site muscles

图 6 免疫后第 5 天 DNA 疫苗在肌肉中表达情况的 Western blot 检测

1. 非注射部位; 2. pcDNA4.0-MZ 注射部位;

3. pcDNA4.0-MZ-IL-17 注射部位

Fig. 6 Western blotting detection of the expressions of the DNA vaccines in the muscles 7 d post immunization

1. Uninjected site muscles; 2. Muscles injected with pcDNA4.0-MZ; 3. Muscles injected with pcDNA4.0-MZ-IL-17

## 3 讨论

pcDNA4 载体是高效的动物细胞表达载体,其特点是载体上含有 QBI SP163 转录增强子,使其表达水平要较单个启动子高出 5 倍。载体具有约 6 kD 的融合蛋白,利于提高目的蛋白的稳定性,还具有连续 6×His *Taq*,利于分离和纯化表达产物。笔者经

过酶切鉴定和基因测序,正确构建了 DNA 疫苗 pcDNA4.0-MZ 和 pcDNA4.0-MZ-IL-17。肌肉注射免疫之后第 3,5,7,15 和 20 天,用 RT-PCR 方法检测注射部位和非注射部位肌肉组织中目的基因的转录情况,本试验结果表明,于免疫后第 5,7,15 天,在试验组雏鸡胸部注射部位肌肉组织中检测到了 MZ5-7 基因转录产物,但是在免疫后第 3,20 天和

所有时间点的非注射部位均未检测该转录产物。肌肉组织总 RNA 在反转录合成 cDNA 之前用 DNase 进行处理,避免了注射部位质粒 DNA 所造成的假阳性。Western blot 试验结果表明,免疫后第 5 天和第 7 天,注射部位肌肉可以检测到相应的目的条带,而其他时间点以及非注射部位肌肉无目的条带检出。此外,用 SD 大鼠血清作为阴性对照,同样条件下进行免疫印迹,结果注射部位和非注射部位均未检测到任何条带。说明本研究构建的两种 DNA 疫苗可以在鸡体内得到有效表达。

从表达动态来看,RT-PCR 在注射后第 5 天即可检测到基因的转录产物,而 Western blot 在第 5 天可以检测到表达蛋白。说明疫苗基因在体内很快得到转录和表达,且表达蛋白在肌肉组织中有一个积累过程。RT-PCR 在第 20 天检测不到疫苗基因转录产物,Western blot 在第 15 天检测不到表达蛋白。这说明,疫苗基因的表达在一段时间后受到抑制或者疫苗 DNA 被清除。这种阶段表达现象,具有有利的一面,也具有不利的一面。有利的一面是可以防

止因基因无限制表达而产生免疫耐受或过敏反应;不利的一面是由于表达时间的限制而不能诱导足够强度的免疫应答。

Western blot 试验中,pcDNA4.0-MZ-IL-17 表达产物大小约为 64 kD,要较理论推测的 58 kD 大,这可能是由于表达产物糖基化所致,因为天然 IL-17 是一种糖蛋白,人的 IL-17 糖基化蛋白较未糖基化的 IL-17 蛋白大了 6~8 kD<sup>[13]</sup>。而没有串联的 pcDNA4.0-MZ 质粒表达产物则与理论推测值基本相符,产生了 36~37 kD 的条带。

有关 DNA 疫苗构建后表达情况的检测,传统的方法是转染哺乳动物细胞,然后用多种方法检测表达情况<sup>[14]</sup>。而笔者根据本试验的具体情况,将 DNA 疫苗直接注射到目的动物体内以检测其表达状况,这种方法更能反应疫苗在目的动物体内的真实表达情况,更有利于疫苗的进一步研究和开发。

有关将 IL-17 和抗原基因联合后表达是否能够提高免疫效果以及其免疫应答机理,尚需更为深入的研究。

#### [参考文献]

- [1] Dalton J P, Mulcahy G. Parasite vaccines-a reality[J]. *Veterinary Parasitology*, 2001, 98: 149-167.
- [2] Vermeulen A N, Schaap D C, Schetters P M. Control of coccidiosis in chickens by vaccination[J]. *Veterinary Parasitology*, 2001, 100: 13-20.
- [3] Yun C H, Lillehoj H S, Lillehoj E P. Intestinal immune responses to coccidiosis[J]. *Developmental and Comparative Immunology*, 2000, 24: 303-324.
- [4] Shirley M W. Development of a live attenuated vaccine against coccidiosis of poultry[J]. *Parasite Immunol*, 1989, 11: 117-124.
- [5] Lillehoj H S. Role of lymphocytes and cytokines in coccidiosis[J]. *International Journal for Parasitology*, 1998, 28: 1071-1081.
- [6] Husband A J, Kramer D R, Bao S, et al. Regulation of mucosal IgA responses in vivo: cytokines and adjuvants[J]. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 1996, 54: 179-186.
- [7] Donnelly J, Berry K, Ulmer J B. Technical and regulatory hurdles for DNA vaccine[J]. *International Journal for Parasitology*, 2003, 33: 157-167.
- [8] Michael A, Egan P D. The use cytokines and chemokines as genetic adjuvants for plasmid DNA vaccines[J]. *Clinical and Applied Immunology Reviews*, 2002, 2: 255-287.
- [9] Wongi Min, Lillehoj H S, Burnside J, et al. Adjuvant effects of IL-1, IL-2, IL-8, IL-15, IFN- $\alpha$ , IFN- $\gamma$ , TGF- $\beta$ 4 and lymphotactin on DNA vaccination against *Eimeria acervulina* [J]. *Vaccine*, 2002, 20: 267-274.
- [10] Wongi Min, Lillehoj H S. Isolation and Characterization of Chicken Interleukin-17 cDNA [J]. *Journal of Interferon (Cytokine Reseach)*, 2002, 22: 1123-1128.
- [11] Binger M H, Hug D, Weber G. Cloning and characterization of a surface antigen of *Eimeria tenella* merozoites and expression using a recombinant vaccinia virus[J]. *Molecular and Biochemical Parasitology*, 1993, 61: 179-188.
- [12] 金伯泉. 细胞和分子免疫学[M]. 第 2 版. 北京: 科学出版社, 2001.
- [13] Sambrook J, Russell D W. Molecular cloning: A laboratory manual[M]. 3rd ed. New York, USA: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2001. 522-525.
- [14] Moreno S, Lopez-Fuertes L, Vila-Coro A J, et al. DNA immunization with mimimalistic expression constructs [J]. *Vaccine*, 2004, 22: 1709-1716.

(下转第 42 页)

- [11] 刘国琴, 阎隆飞. 花粉管微丝骨架的研究[J]. 实验生物学报, 1987, 20(3): 267-273.  
[12] 阎隆飞, 刘国琴, 肖兴国. 从花粉肌动蛋白到作物雄性不育[J]. 科学通报, 1999, 44(23): 1-6.

## Preliminary studies on relationship between the cytoskeleton and the male sterile lines of wheat

YAO Ya-Qin, LI Bei, ZHANG Ying-li, ZHANG Gai-sheng

(College of life Sciences, Northwest A & F, Yangling, Shaanxi 712100, China)

**Abstract:** The structural characteristics of the microfilaments were revealed in sterile pollens of CMS, CHA and mature fertile on wheat by Coomassie brilliant blue R250. The results indicated that mature fertile pollens were full of the reticular structure compositing by polymerized microfilaments, and that the reticular structure of microfilaments were disrupted and broke in two sterile pollens of CMS and CHA, then centralized in the middle part of the pollens, no distribution near outmargin of pollens. The microfilaments in pollen of CMS(T-type) were lower than those of CHA. The study provided new method and thoughts for research mechanism of pollen abortion on CMS and the function of cytoskeleton and the relationship between them in wheat pollens.

**Key words:** cytoskeleton; wheat; CMS; CHA

(上接第 38 页)

Abstract ID: 1671-9387(2005)12-0039-EA

## Constructions of two DNA vaccines against chicken *E. tenella* and their expressions in chicken muscles

Gerileru, XU Li-xin, YAN Ruo-feng, LI Xiang-rui

(College of Veterinary Medicine, Nanjing Agricultural University, Nanjing, Jiangsu 210095, China)

**Abstract:** The open reading frame of MZ5-7 gene, an antigen of *Eimeria tenella* second generation merozoites, was cloned into plasmid pcDNA4. 0 to construct DNA vaccine pcDNA4. 0-MZ. With the same methods, the mature interleukin 17 gene of chicken was cloned into downstream of the MZ5-7 gene to construct an immune regulatory DNA vaccine pcDNA4. 0-MZ-IL-17 co-expressive of MZ5-7 antigen and IL-17. After being purified, 50  $\mu$ g of these two DNA vaccines were used to immunize one-week-old chickens with breast muscle injection respectively. The transcriptions and expressions of the target genes were determined by RT-PCR and Western-blot respectively on the day 3, 5, 7, 15 and 20 post immunization. The results showed that the transcribed products of MZ5-7 gene was detectable from all injection site muscles immunized with two DNA vaccines respectively on day 5, 7 and 15 post immunization using RT-PCR. The expression proteins of two plasmids were respectively identified by Western-blot from all injection sites on day 5 and 7 post immunization. The molecular weight of expressive protein of pcDNA4. 0-MZ was 36 ku coincident with the predicted protein of the MZ5-7 gene while the molecular weight of expressive product of pcDNA4. 0-MZ-IL-17 was about 64 ku, slightly larger than that of predicted product of MZ5-7 gene plus IL-17 gene. No target products were detected in the no-injection sites immunized with any of the two DNA vaccines. The results indicated that these two DNA vaccines could be effectively expressed in chicken muscles when immunized by muscle injection.

**Key words:** *Eimeria tenella*; MZ5-7 gene; IL-17; DNA vaccine; chicken