

含 NDV F48E9 株 F 基因的 MDV CVI988 株 转移质粒载体的真核表达

苏春霞¹, 苏鑫铭¹, 张彦明², 曹瑞兵¹, 周 斌¹, 陈溥言¹

(1 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;

2 西北农林科技大学 动物科技学院, 陕西 杨凌 712100)

[摘 要] 为进一步提高重组病毒的表达水平, 用构建的含 gB 启动子和 NDV F48E9 株 F 基因的 MDV CVI988 株转移质粒载体 pUS10F 转染 293 T 细胞, 通过 PCR 和接免疫荧光(IFA)法研究了其在真核中的表达, 并确定最佳的转染条件。结果表明, 真核细胞中带有 F 基因, 转移质粒载体已经进入细胞 DNA; 转染转移质粒载体 pUS10F 后的 293 T 细胞所表达的 NDV F 基因产物抗原性较好, 能够与抗 NDV 的标准血清反应。确定的最佳转染条件为: DNA 3 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 转染后 48 h 外源基因在细胞中的表达量最高, 在 6 孔板和 96 孔板中细胞数量分别以 $2 \times 10^5/\text{孔}$ 和 $1 \times 10^4/\text{孔}$ 的转染效果最好。

[关键词] 畜禽疫病; 新城疫病毒; F 基因; 马立克氏病病毒 CVI988 转移质粒载体

[中图分类号] S858.312.65+9.5; S858.312.65+9.1 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1671-9387(2006)05-0059-04

新城疫(Newcastle disease, ND)是由新城疫病毒(Newcastle disease virus, NDV)引起的主要侵害鸡和火鸡的一种高度接触性传染病。该病自 1926 年首次发现以来, 很快传遍世界各地, 成为威胁养鸡业的主要传染病, 被国际兽疫防治局(Office International des Epizooties, OIE)列为 A 类传染病-严重烈性传染病^[1-2]。自新城疫(ND)发现以来, 世界各国的禽病工作者对其进行了大量的研究^[3-4], 在疫苗研发和免疫方面取得了显著的研究成果。但至今该病并未得到根本控制, 其仍是威胁养鸡业的主要疾病之一。免疫失败是该病未能根本控制的主要原因, 而造成免疫失败的原因主要有母源抗体干扰、疫苗保存和使用方法不当、免疫程序不合理等^[5-6]。

马立克氏病(Marek's disease, MD)是由马立克氏病病毒(Marek's disease virus, MDV)引起的一种鸡高度接触性传染性肿瘤病, 以外周神经、性腺、虹膜、各种器官、肌肉和皮肤发生淋巴细胞增生和单核细胞浸润为特征, 是危害世界养禽业最严重的传染病之一, 给养禽业造成巨大的经济损失。自 20 世纪 70 年代 MD 疫苗问世以来, 预防接种是控制该病的主要手段。虽然活疫苗的广泛使用使 MD 的发病率有所降低, 但其发病率仍比较高, 特别是近年来

随着马立克氏病病毒(MDV)毒力的不断增强, 疫苗的免疫效果大大降低。随着分子生物学的广泛使用, 人们一直很看好基因重组疫苗的前景, 许多实验室和疫苗公司对防治 MD 的重组疫苗极为关注^[7-9]。

考虑多价重组疫苗的诸多优点, 本试验对前期构建的含 NDV F48E9 株 F 基因的 MDV CVI988 株转移质粒载体进行了真核表达研究, 试图利用马立克氏病病毒的 gB 启动子控制新城疫病毒 F 基因的表达, 从而构建基因工程多价重组疫苗, 以期能有效地预防新城疫和超强 MDV 毒株引起的马立克氏病, 并为抗 ND 和 MD 的基因工程多价重组疫苗的研制奠定基础。

1 材料与方法

1.1 材 料

1.1.1 细胞及培养基 293T 传代细胞由南京农业大学动物医学院传染病教研组保存; DMEM 培养基为 GIBICO BRL 公司产品; 胰酶为美国 Difco 公司产品; 犊牛血清购自杭州四季青生物工程公司。

1.1.2 质粒与宿主菌 含 NDV F48E9 株 F 基因的 MDV CVI988 株转移质粒载体 pUS10F 由作者构建^[10]; 宿主菌 DH5a 由南京农业大学动物医学院

[收稿日期] 2005-08-31

[作者简介] 苏春霞(1977—), 女, 宁夏盐池人, 在读博士生, 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研究。

传染病教研组保存。

1.1.3 工具酶及试剂 *Taq* DNA 聚合酶为宝生物(大连)公司产品;转染试剂 BES 和 CaCl_2 购自上海生物工程有限公司;兔抗鸡 IgY 荧光标记二抗购自 Promeg 公司;鸡抗 NDV 标准血清购自南京药监所;其他试剂为国产分析纯。

1.1.4 引物 根据 GenBank 上公布的 NDV F48E9 株 F 基因的序列设计 1 对引物,由宝生物(大连)公司合成,其序列分别为:

P1 5'-cag cta gca tgg gac cca aat ctt ct-3'

P2 5'-cga cgc gtt cag atc ctt gta gtg-3'

1.2 方法

1.2.1 293T 细胞的转染 按文献[11]介绍的方法,大量提取、纯化 pUS10F 质粒。转染前 24 h,将处于对数生长后期的 293 T 细胞用胰酶消化后接种到 6 孔板,接种量分别为 2×10^5 , 6×10^5 和 9.6×10^5 /孔,每孔加入 2 mL 含体积分数 10% 血清的 DMEM,37 °C、5% CO_2 培养箱中培养,待细胞生长至铺满细胞板的 80%~90% 时开始进行转染。为了确定最佳质粒转染量,分别取 1,2,3,4 和 5 μg 纯化好的 pUS10F,加入到含有 0.5 mL 0.25 mol/L CaCl_2 溶液的 EP 管中,混匀,然后再缓缓加入 0.5 mL $2 \times \text{BES}$ 缓冲液,混匀,室温放置 20 min,即为 CaCl_2 -DNA-BES 溶液。滴加 CaCl_2 -DNA-BES 溶液 200 μL /孔于细胞培养液中,轻轻混匀,在 37 °C、体积分数 5% CO_2 培养箱中孵育细胞。转染 24 h 后吸去培养液,用 100 g/L DMEM 洗 2 次,每孔加新鲜生长液 2 mL。

1.2.2 表达结果检测 (1)间接免疫荧光(IFA)检测。为了确定最佳转染时间,分别取转染 24,48 和 72 h 后的 293 T 细胞进行消化,并分别以 1×10^4 , 2×10^4 和 5×10^4 /孔接种到 96 孔板。待细胞长成单层后,倾去培养液,用 PBS 洗 1 次,每孔加 100 μL 预冷的体积分数 95% 乙醇和丙酮($V_{\text{乙醇}}:V_{\text{丙酮}}=4:6$)混合液固定细胞,室温放置 5 min。用 PBS 充分洗涤 96 孔板,每次 5 min,至少洗 3 次;加入用 PBS 进行 1:10,1:20,1:40,1:80,1:120 和 1:160 倍稀释的鸡抗 NDV 血清,湿盒中 37 °C 反应 30 min 后,弃去抗血清,用 PBS 充分洗涤 96 孔板,每次 5 min,至少洗 3 次。加入经 PBS 1:200 倍稀释的荧光标记兔抗鸡 IgY,湿盒中于 37 °C 反应 30 min。再用 PBS 充分洗涤 96 孔板,每次 5 min,至少洗 3 次,甩干。加入 0.1 mL 甘油+PBS($V_{\text{甘油}}:V_{\text{PBS}}=9:1$)混合液,在荧光显微镜下观察结果。同时,以正常 293T 细胞

做阴性对照。

(2)PCR 检测。按文献[9]提取转染细胞及正常对照细胞的 DNA 作模板,反应体系为 50 μL ,其中模板 DNA 1 μL ,20 pmol/L 上、下游引物各 1 μL ,2.5 mmol/L dNTP 4 μL ,25 mmol/L MgCl_2 4 μL ,10 $\times$ PCR 反应缓冲液 5 μL ,5 U/ μL *Taq* DNA 酶 0.5 μL 、超纯水 33.5 μL 。PCR 反应条件:95 °C 变性 5 min;95 °C 变性 1 min,52 °C 退火 1 min,72 °C 延伸 2 min,30 个循环;72 °C 延伸 10 min,4 °C 保存。

扩增产物通过含有溴化乙锭(Ethidium Bromide,EB)的 10 g/L 琼脂糖凝胶电泳检测,紫外灯下观察结果。

2 结果与分析

2.1 转染重组转移质粒 293 T 细胞的 IFA 鉴定

IFA 结果显示,转染重组转移质粒 293T 细胞可以和鸡抗 NDV 血清发生特异性反应,使细胞呈现黄绿色特异性的荧光(图 1),而正常 293T 细胞未出现特异性荧光,呈阴性反应。

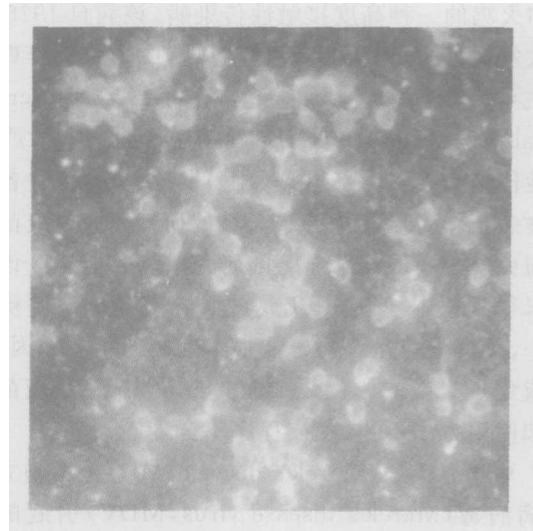


图1 转染重组转移质粒 293T 细胞的 IFA 检测结果

Fig.1 Result of IFA in 293T cells

2.2 转染重组转移质粒 293T 细胞的 PCR 鉴定

以转染重组转移质粒 293T 细胞的 DNA 作模板,按照扩增 NDV F 基因的条件进行 PCR 扩增,可扩增出 1 678 bp 特异性片段,而以正常 293T 细胞 DNA 为模板,则未扩增出特异性片段(图 2)。

2.3 最佳转染条件的确定

为了提高转染效率,对转染时间、细胞数量及转染条件进行了摸索,最终确定了最佳的转染质粒浓度,发现转染 DNA 的营养液以 3 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 最为理想,

转染后 48 h 外源基因在细胞中的表达量最高。在 6 孔板和 96 孔板中,细胞数量分别以 2×10^5 /孔和 1×10^4 /孔时的效果最好。

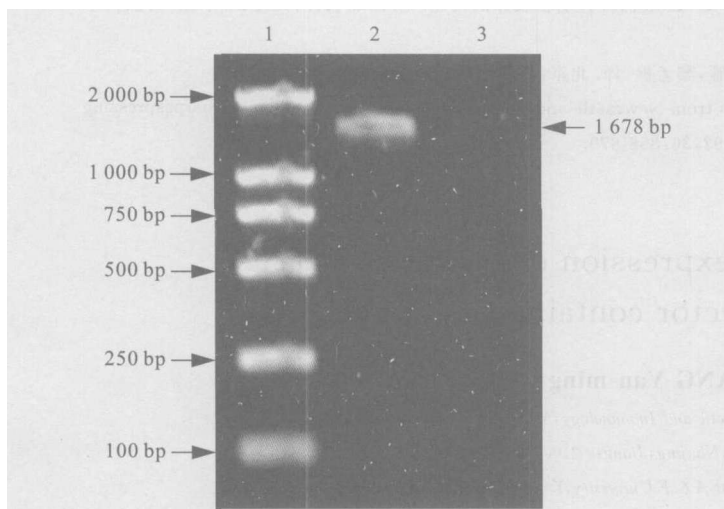


图2 转染重组转移质粒 293T 细胞的 PCR 鉴定

1. DL 2000 标准对照;2. 以转染重组转移质粒

293T 细胞 DNA 为模板的 PCR 产物;

3. 以 293T 细胞 DNA 为模板的 PCR 扩增产物

Fig. 2 PCR detection of 293T cells transfected with recombinant plasmid

1. Marker DL 2000;2. The PCR product of 293T cells transfected with recombinant plasmid as template;

3. The PCR product of 293T cells DNA as template

3 讨论

随着分子生物学技术的广泛使用,人们一直很看好基因重组疫苗的前景,但重组疫苗的安全性也是人们极其关注的方面。本试验选择 MDV CVI988 疫苗株作为病毒载体来构建重组病毒有两个原因:一是因为致弱 MDV1 型疫苗(如 CVI988 和 R2/R3)的免疫效果明显优于 HVT 疫苗,同时疫苗株 MDV1 型与 vvMDV 的抗原具有较高的同源性,理论

上可以较其他血清型更能诱导具有针对性的免疫应答反应,特别是针对 vvMDV 和 vv+MDV 的应答反应。其次,由于 CVI988 是养禽业的常用疫苗,其不但不会出现病毒毒力返强,而且在其作为疫苗应用的历史上,尚未有被免疫动物感染发病或将其传播给其他任何动物和人类的报道,并且也无在昆虫体内能够复制的证据。由此可见,以 CVI988 作为载体,不会对其他动物及人类构成威胁。

磷酸钙转染、电穿孔及脂质体介导的转染是几种常用的将 DNA 导入各种哺乳动物细胞的方法,本试验采用的是磷酸钙转染法,因为该方法具有简单、价廉等特点。影响转染效率的因素有很多,当转染试剂稳定下来以后,细胞的生长状态也是很重要的影响因素。鉴于此,本研究在进行转染之前,首先对细胞的生长情况进行观察记录,并确定其在各种细胞培养皿中的细胞接种量,以维持细胞在转染过程的良好生长状态,并保证试验的可重复性。本研究对转染条件进行了摸索,最终确定的最佳转染质粒浓度为 $3 \mu\text{g/mL}$ 。

人们一直在努力提高构建抗 ND、MD 等禽病重组疫苗的技术,但大部分保护试验还是在 SPF 鸡体内进行的。考虑多价重组疫苗的诸多优点,迫切需要构建一种设计合理,且能有效预防多种禽病、抵抗超强毒株感染及不受母源抗体影响的多价重组疫苗。有研究^[7,12]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,既可以避免病毒对外源启动子的排斥作用,又可以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。本研究试图利用 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。本研究结果表明,转移质粒载体中的基因表达盒可以在细胞中有效地表达,这为进一步开发新型的抗 ND 和 MD 疫苗研究奠定了基础。

[参考文献]

- [1] 殷震,刘景华. 动物病毒学[M]. 2 版. 北京:科学出版社,1997:743-750.
- [2] 杨瑛,张长印,严建刚. 鸽新城疫病毒株的分离及生物学特性研究[J]. 畜牧与兽医,1998,30(5):198-200.
- [3] Werner O, Oberdorfer A, Kollner B, et al. Characterization of avian paramyxovirus type 1 strains isolated in Germany during 1992 to 1996 [J]. Avian Pathology, 1999, 28: 79-88.
- [4] Cheng-yao Yang, Happy K Shieh, Yeou-liang Lin. Newcastle disease virus isolated from recent outbreaks in Taiwan phylogenetically related to viruses (genotype VII) from recent outbreaks in western Europe [J]. Avian Diseases, 1999, 43: 125-130.
- [5] 胡祥璧. 中华人民共和国国家禽类疾病预防与控制[J]. 中国兽医科技, 1985, 23(8): 24-26.
- [6] 蔡捷炫. 鸡新城疫防治浅析[J]. 广东畜牧科技, 1995, 22(1): 39-40.
- [7] Sonoda K, Sakaguchi M, Okamura H, et al. 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]. *Virol*, 2000, 74: 3217-3226.
- [8] 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: 352-362.
- [9] 张雪莲, 陈博言. 预防禽病的多价重组马立克氏病疫苗研究进展[J]. *畜牧与兽医*, 2003, 35(3): 38-41.
- [10] 苏春霞, 张彦明, 张雪莲, 等. 表达 NDV F48E9 株 F 基因的 MDV CVI988 株转移质粒载体的构建[J]. *西北农林科技大学学报: 自然科学版*, 2005, 33(1): 1-4.
- [11] 萨姆布鲁克 J, 弗里奇 E F. 分子克隆实验指南 [M]. 2 版. 金冬雁, 黎孟枫, 译. 北京: 科学出版社, 1996.
- [12] Morgan R W, Gelb J J, Schreurs S S, et al. Protection of chickens from Newcastle and Marek's diseases with recombinant herpesvirus expressing the Newcastle disease virus fusion protein[J]. *Avian Diseases*, 1992, 36: 858-870.

Construction and eukaryote expression of marek's disease virus CVI988 transferring vector containing NDV F gene

SU Chun-xia¹, SU Xin-ming¹, ZHANG Yan-ming², Y CHEN Pu-yan¹

(1 Key Laboratory of Animal Disease Diagnostic and Immunology, Ministry of Agriculture,
Nanjing Agricultural University, Nanjing, Jiangsu 210095, China;

2 College of Animal Science and Technology, Northwest A & F University, Yangling, Shaanxi 712100, China)

Abstract: In order to improve expression level of recombinant virus, the transferring vector pUS10F with gB promoter of MDV and F gene of NDV was transfected in 293T cells. Expression of the gene expression cassette in the cells was detected by PCR and IFA, and the transferring condition was optimized. The result shows that gene cassette was integrated in the DNA of cells. Expression products present good antigenicity because it can react with anti-NDV standard serum. The best transferring condition is: DNA 3 $\mu\text{g}/\text{mL}$; the highest expression level was testified 48 h after gene was transfected 293T cell; the best transfected effect was proved in 6-wells micro titer plate, at 2×10^5 cells/well and in 96-wells micro titer plate, at 1×10^4 cells/well.

Key words: livestock and avian disease; NDV; F gene; MDV CVI988 transferring plasmid vector