维普资讯 http://www.cqvip.com

参 考 文 献

1 卡尔尼卡主编. 高福,刘文军主译. 禽病学. 第九版. 北京:北京农业大学出版社,1991. 407～418

2 宋延华,刘福安. 含有鸡传染性支气管炎病毒 S1 基因的昆虫杆状病毒表达载体的构建. 华南农业大学学报(已接受)

3 王珣章,谢伟东,龙策新等. 形成多角体的杆状病毒载体系统的建立. 病毒学报,1991,7(3):253～261

4 Summers M D, Smith G E. A manual of methods for baculovirus vectors and insect cell culture. Agricultural Experiment Station Bulletin and Texas A&M University Publishers Bulletin, 1987. No. 1555

5 Sambrook J, Fritsch E F, Maniatis T. Molecular cloning. 2nd ed. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press. 1989. 6. 30～6. 31

6 Cavanagh D Coronavirus IBV glycopolypeptides: size of their polypeptide moieties and nature of their oligosaccharides. J Gen Virol, 1983, 64:1187～1191

7 O'Reilly D R, Miller L K, Luckow V A. Baculovirus expression vectors—A laboratory manual. New York: W H. Freeman and company. 1992:98～106

8 Kozak M. Comparison and analysis of sequence upstream from the translational start site in eukaryotic mRNAs. Nucleic Acids Res, 1984a, 12:857～872

9 Kozak M. Selection of initiation sites by eukaryotic ribosomes: effect of inserting AUG triplets upstream from the coding sequences for proeprininsulin. Nucleic Acids Res, 1984b, 12:3873～3893

10 Kozak M. Point mutations define a sequence flanking the AUG initiator codon that modulates translation by eukaryotic ribosomes. Cell, 1986, 44:283～292

11 Kozak M. An analysis of 5'-noncoding sequences from 699 vertebrate messenger RNAs. Nucleic Acids Res, 1987, 15:8125～8148

12 Kozak M. The scanning model for translation: An update. J cell Biol, 1989, 108(2): 229～241

Preliminary Study on Expression Level of the S1 Gene of Avian Infectious Bronchitis Virus in a Baculovirus System

Song Yanhua Liu Fuan

(*Department of Veterinary Medicine, South China Agricultural University, Guangzhou* 510642)

Abstract The recombinant transfer plasmids pSXIVVI$^+$X3-S1. Holte and pSXIVVI$^+$X3/4-S1. Holte containing S1 gene cDNA of avian infectious bronchitis virus and the parent virus (TnNPV-SVI$^-$G) DNA were used to co-transfect *Spodotera frugiperda* (Sf) cells. The recombinant viruses TnNPV-(X3)S1. Holte-OCC$^+$ and TnNPV-(X3/4)S1. Holte-OCC$^+$, which included the S1 gene and could form polyhedra, were plaque-purified. The expression products of S1 gene were detected by SDS-PAGE and Western blotting in Tn-5B1 cells infected with the recombinant viruses. The S1 protein with a molecular weight of 100 kD was expressed in the cells infected with TnNPV-(X3/4)S1. Holte-OCC$^+$ at high efficiency, the expression level in Tn-5B1 cells 72 h postinfection being 35.8% by SDS-PAGE gel thin-layer chromatography. No expression product was detected by SDS-PAGE and Western-blotting in Tn-5B1 cells infected with TnNPV-(X3) S1. Holte-OCC$^+$. The expression level depends mainly upon the translational start site of the S1 gene and its flanking sequences.

Key words Avian infectious bronchitis virus (IBV), S1gene, Baculovirus expression vector, Expression

维普资讯 http://www.cqvip.com

第14卷第3期 中国病毒学 Vol.14 No 3
1999年9月 VIROLOGICA SINICA Sep. 1999

表达新城疫病毒HN基因的重组火鸡疱疹病毒的构建*

赵 军** 张秀根*** 陈溥言 蔡宝祥

(南京农业大学动物医学院,南京 210095)

摘 要 应用聚合酶链反应技术,用设计带有限制性酶切位点的引物,特异地扩增从起始密码子开始的1.8 kb新城疫病毒(NDV)血凝素-神经氨酸酶(HN)基因开放式阅读框,然后插入pTK_2B的Nhe Ⅰ位点,构建了含NDV HN基因的插入载体$pTKHN_1$和$pTKHN_2$,再与感染火鸡疱疹病毒(HVT)细胞的总DNA共转染鸡胚成纤维细胞(CEF),经有限稀释法和Dot-blot筛选,得到含有HN基因的重组体$rHVT_1$和$rHVT_2$。经组织培养传代和Western blot分析,表明重组体在感染细胞中表达了HN蛋白。重组体在CEF上的生长特性与亲本病毒相同,且在连续传代过程中保持稳定。为国内新城疫基因工程疫苗研制奠定了基础。

关键词 新城疫病毒,血凝素-神经氨酸酶(HN)基因,重组HVT

新城疫病毒(NDV)是目前世界养禽业最重要的病原之一,给养禽业造成极大危害。该病毒引起一种主要侵害鸡和火鸡的急性、高度传播性疾病,导致鸡的严重呼吸困难和高死亡率。NDV是副粘病毒科腮腺炎病毒属成员,是一种具有囊膜、负链、不分节段的RNA病毒。病毒粒子包含两种囊膜蛋白:融合(F)蛋白和血凝素-神经氨酸酶(HN)蛋白。HN蛋白兼有血凝性和神经氨酸酶活性,它们分别负责病毒粒子与其细胞受体的起始吸附和受体破坏活性[1]。F蛋白参与病毒穿入、细胞融合和溶血等[2],它们在决定病毒的毒力和免疫应答等方面起着极其重要的作用[3,4],已相继在痘病毒[5]、禽痘病毒[6]、火鸡疱疹病毒[7]及杆状病毒[8]中得到表达,免疫学试验均显示良好的免疫原性。

HVT是最近发展起来的新型载体,由于对鸡及其它动物均无致病性,使用安全,接种鸡体后病毒在鸡体内形成长达数周的病毒血症,且终生潜伏感染,可刺激机体产生较高的抗体水平并维持终生,接种一次即可获得终生免疫,同时HVT是预防马立克氏病(MD)的常规疫苗,因此,HVT作为构建禽用基因工程苗的载体,具有其它载体不可比拟的优点。目前,HVT已成为国内外研究病毒载体的热点,国外已成功地表达了多种禽病保护性抗原基因,国内在这方面的研究尚未见报道。本研究利用PCR技术对NDV强毒株Miyadera株HN基因进行人工修饰,利用HVT自身启动子成功地在我们新构建的HVT载体中(HVT载体的构建将另文报道)得到有效表达,为国内ND基因工程疫苗的研究奠定了基础。

收稿日期:1998-06-23,修回日期:1998-10-18
* 国家自然科学基金重点课题
** 现在通讯地址:中国预防医学科学院病毒所基因室 北京 100052
*** 通讯作者

维普资讯 http://www.cqvip.com

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 病毒和细胞

HVT FC126株，按常规方法在SPF鸡胚成纤维细胞(CEF)上增殖，并从感染细胞中提取基因组总DNA，用于共转染实验。

1.1.2 质粒与宿主菌

含NDV Miyadera株HN基因开放式阅读框的质粒M_6B_{12}，由中国农科院哈尔滨兽医研究所曹殿军博士惠赠；插入载体pTK_2B由作者构建；pUC19和宿主菌JM109为本室保存。

1.1.3 工具酶及试剂

工具酶与兔抗鸡IgY-HRP结合物购自Promega公司，地高辛试剂盒购自宝灵曼公司。

1.1.4 PCR引物由中国科学院上海植物生理所合成。

1.2 方法

1.2.1 NDV HN基因的PCR扩增与克隆

1.2.1.1 PCR扩增 根据检索到的Miyadera株HN基因序列，利用Goldkey软件设计一对引物，恰能覆盖HN基因开放式阅读框，并分别在5′端加酶切位点 Primer 1(32 mer)：5′GGCAAAGCTTATCATGGATCG-CACAGTTAACC3′；Primer 2(28 mer)：5′TGAAGTCGACCCAGTTTGATTCTTGGCG3′。P_1划线部分为HindⅢ酶切位点，P_2划线部分为SalⅠ酶切位点，前面为保护碱基。按常规方法进行PCR扩增。

1.2.1.2 PCR扩增片段的克隆及鉴定 取适量PCR产物分别用HindⅢ和SalⅠ在相应buffer中进行双酶切，1%琼脂糖电泳，分离纯化1.8 kb的条带。按常规方法克隆入pUC19中，将插入HN基因的重组体质粒命名为pHN。

1.2.2 表达NDV HN基因转移载体的构建

取适量pTK_2B重组质粒用NheⅠ消化、加入dNTP和由pHN中分离、纯化的HN开放式阅读框、补平连接，转化于JM109中。挑取单个菌落，碱裂解法快速提取质粒，酶切后电泳鉴定HN基因是否插入及插入方向，符合要求者命名为pTKHN。

1.2.3 表达NDV HN基因的重组HVT的筛选与纯化

1.2.3.1 NDV HN基因探针的制备 取10～20 μg含NDV HN基因的质粒pHN，用HindⅢ和SalⅠ充分消化，经低熔点琼脂糖回收1.8 kb片段溶于适量水中，按试剂盒说明用地高辛标记。

1.2.3.2 共转染和重组体HVT的筛选[9] 用磷酸钙沉淀法，将3 μg BamHI线性化的pTKHN质粒DNA与20 μg HVT总DNA一起转染新鲜制备的CEF细胞，37℃ 5%CO_2培养6～7 d，当出现大量细胞病变时，收获细胞，－20℃冻融3次、低速离心除去细胞碎片，上清作为检查重组病毒的材料，10倍递增稀释、分别感染于24孔培养板上已长成单层的CEF。当出现单个分散的病毒蚀斑时、覆盖营养琼脂，凝固后、翻转培养至出现大量单个病毒蚀斑。挑取单个蚀斑，于24孔培养板上扩大培养，当出现大量病变时，收获细胞，－20℃冻融3次，离心取上清、按常规方法进行斑点杂交试验。

1.2.4 SDS-PAGE电泳及Western blot分析

将杂交阳性的重组体分别感染CEF扩大培养。收获的感染细胞用裂解缓冲液裂解后，与等体积2×SDS凝胶加样缓冲液混合，煮沸10 min、在10%SDS-聚丙烯酰胺凝胶上电泳，电泳后用考马斯亮蓝染色观察。

将SDS-PAGE分离的蛋白转印到硝酸纤维素(NC)膜上，用1%BSA缓冲液(0.15 mol/L NaCl，0.05 mol/L Tris-HCl pH7.5)封闭2 h，然后分别用鸡抗NDV高免血清(1:100稀释)和HRP标记的兔抗鸡IgY(1:2000稀释)室温作用2 h。充分洗涤后，用DAB(二氨基联苯胺)和H_2O_2显色。

维普资讯 http://www.cqvip.com

1.2.5　表达 NDV HN 蛋白的重组体 HVT 的生长特性

将重组体 HVT 在 CEF 中连续传代 10 代以上,观察重组体 HVT 在 CEF 上的病变形态,并与亲本 HVT 病毒进行比较。

2　结果

2.1　PCR 特异性扩增 HN 基因

采用 1% 琼脂糖电泳分析 PCR 产物,可见扩增产物在 1.9 kb 和 1.58 kb 之间出现单一的条带(图 1),表明我们的 PCR 方法特异地扩增了预定大小的靶片段。为了检查扩增片段两端所加酶切位点是否有效,我们对扩增片段进行了克隆。通过酶切和电泳分析表明所加酶切位点有效,对 HN 基因的人工修饰是成功的(图 2)。对克隆阳性的重组质粒,用 HindⅢ和 SalⅠ酶切,能切出 1.8 kb 的 HN 基因和 2.69 kb 的 pUC19 载体两个片段,SalⅠ可将 pHN 线性化为 4.49 kb 的片段。

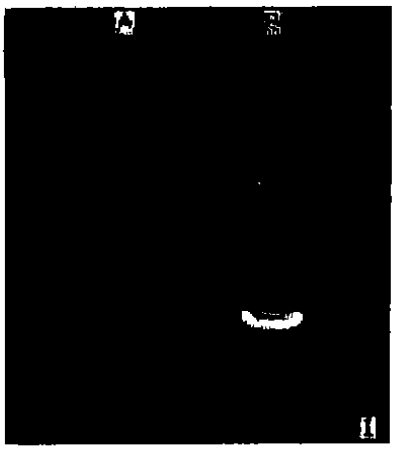

图 1　PCR 扩增产物琼脂糖凝胶电泳

Fig.1　PCR amplified products eletrophoresed with 1% agarose gel

A: λDNA/EcoRI + HindⅢ Markers

B: PCR amplified products

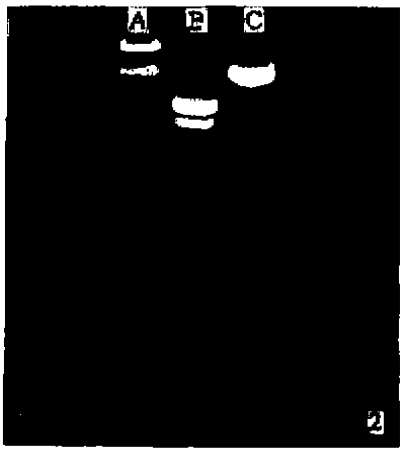

图 2　pHN 的酶切分析

Fig.2　Restriction pattern of pHN

A: λDNA/EcoRI + HindⅢ Markers

B: Digested with HindⅢ + SalⅠ

C: Digested with SalⅠ

2.2　含 NDV HN 基因转移载体的构建

将修饰过的 HN 基因平端插入 pTK_2B 中的 NheⅠ位点,通过筛选,获得两个重组质粒 $pTKHN_1$ 和 $pTKHN_2$。在 $pTKHN_1$ 中,HN 基因的插入方向与 TK 基因转录方向相同;而在 $pTKHN_2$ 中,HN 基因的插入方向与 TK 基因的相反。由于 TK 基因和 HN 基因中均各有一个 EcoRI 位点,故选择用 HindⅢ、EcoRI 双酶切鉴定 HN 的插入方向。当 HN 与 TK 同向时,可切出 857 bp、1.842 kb、2.248 kb 及 2.69 kb 四条带;当 HN 与 TK 反向时,可切出 857 bp、2.69 kb 和 3.616 kb 和 474 bp 四条带,在电泳时 474 bp 条带看不出,故只呈现三条带(图 3)。

维普资讯 http://www.cqvip.com

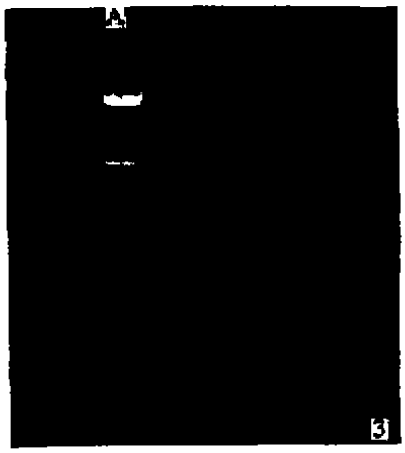

图3 pTKHN的酶切分析

Fig.3 Restriction pattern of pTKHN

A: λDNA/EcoRI + Hind Ⅲ Markers B: pTKHN$_1$/EcoRI + Hind Ⅲ C: pTKHN$_2$/EcoRI + Hind Ⅲ

2.3 斑点杂交筛选重组病毒

将重组转移载体与HVT总DNA共同转染CEF，等出现病变后，收获感染细胞，冻融后的上清进行有限稀释，再感染CEF，挑取单个蚀斑扩大培养。用病变CEF冻融后的上清进行斑点杂交筛选阳性重组体。结果表明用pTKHN$_1$和pTKHN$_2$转染的CEF中均分离到阳性重组体，分别命名为rHVT$_1$和rHVT$_2$(图4)。

2.4 HN蛋白的SDS-PAGE电泳和Western blot表达检测

将rHVT$_1$和rHVT$_2$及HVT的CEF接种物裂解后进行SDS-PAGE电泳，对比重组病毒和野生型病毒的电泳条带，差异不甚明显，但在Western blot分析中，重组病毒呈现特异性条带，分子量也与预计相符，约为66 kD左右(图5)。

图4 斑点杂交筛选阳性重组体结果

Fig.4 Dot-blot hybridization for the screening of recombinant

A: rHVT$_1$ hybridization B: Result of rHVT$_2$ hybridization

2.5 表达NDV HN蛋白的重组体HVT的生长特性

将rHVT$_1$和rHVT$_2$在CEF上连续传代，观察重组体在CEF上的病变形态，发现重组体HVT与亲本HVT在CEF上的病变形态相同，均表现折光性增强的细胞增多，相互聚集成葡萄串状。

3 讨论

3.1 新城疫病毒(NDV)血凝素-神经氨酸酶(HN)蛋白，在NDV的致病过程中起重要作用。

维普资讯 http://www.cqvip.com

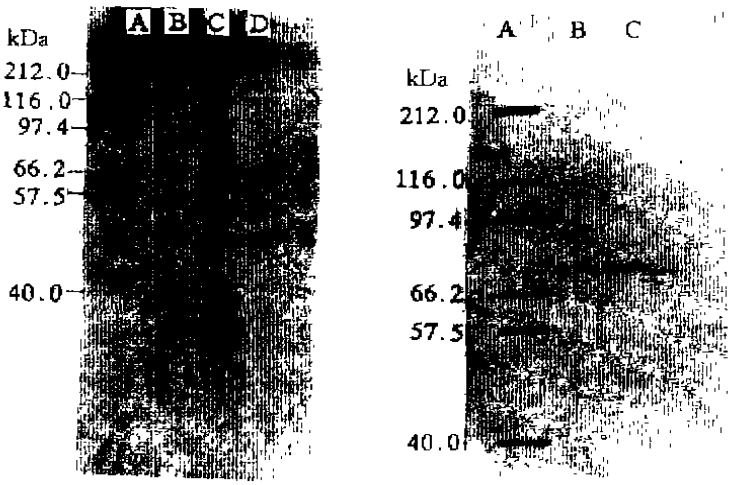

图5　HN基因表达产物的SDS-PAGE和Western blot

Fig.5　SDS-PAGE and Western blot analysis of expression product of HN gene

A:High range protein molecular weight markers　B:CEF cells infected with $rHVT_1$;

C:CEF cells infected with $rHVT_2$;　D:CEF cells infected with HVT Fc126 strains

已有的资料表明,HN基因的表达产物能诱导机体产生对NDV的抵抗力,因而HN蛋白和另一种融合(F)蛋白被作为重组疫苗中外源基因的首选对象。国外在这方面已有多篇报道,我国在这方面尚无报道。为了弥补这方面的不足和进一步考查我们所构建的HVT插入载体表达外源基因的能力,我们引进含有NDV强毒Miyadera株HN基因的重组质粒M_6B_{12},以期在HVT系统中进行表达。由于重组质粒M_6B_{12}中的HN基因两端均存在非编码序列,我们利用Goldkey软件设计两个特异引物,通过聚合酶链反应(PCR)技术,扩增了1.8 kb的HN基因开放阅读框架,成功地在HN基因起始密码子前和终止密码子后分别添加了一个HindⅢ和SalⅠ位点,从而为今后HN基因调出,尤其为构建HVT转移载体质粒提供了方便。

3.2　将扩增的NDV HN基因插入到pTK_2B的NheⅠ位点,得到两个重组转移载体质粒$pTKHN_1$和$pTKHN_2$。在$pTKHN_1$中,HN基因的方向与TK基因的转录方向相同;而在$pTKHN_2$中情况恰好相反。将$pTKHN_1$和$pTKHN_2$分别与HVT总DNA共转染CEF,利用斑点杂交方法,各筛选到一阳性重组体$rHVT_1$和$rHVT_2$。对两个重组体HVT进行Western blot分析,$rHVT_1$和$rHVT_2$均显示一条约66 kD的蛋白带,表明二者均表达了NDV HN蛋白。这更进一步说明了HVT TK基因中的NheⅠ位点适于外源基因插入,同时从另一侧面也反映了HVT自身启动子能够启动外源基因表达。

3.3　将重组体$rHVT_1$和$rHVT_2$分别在CEF中连续传代,观察二者在CEF上的病变形态,发现与亲本HVT在CEF上的病变完全相同,说明插入外源HN基因后HVT自身生长特性没有变化。有关重组体在鸡体内的复制情况和所表达的HN蛋白的免疫原性研究均在进行中。

参　考　文　献

1　Scheid A, Choppin P W　Isolation and purification of the envelope proteins of Newcastle disease virus. J Gen Virol, 1973, 11:

维普资讯 http://www.cqvip.com

263～271

2 Nagai Y, Klenk H-D. Proteolytic cleavage of the viral glycoprotein and its significance for the virulence of Newcastle disease virus. Virology, 1976, 72:494～508

3 Nagai Y, Shimokata K, Yoshida T *et al*. The spread of a pathogenic and an apathogenic strain of Newcastle disease virus in the chick embryo as depending on the protease sensitivity of the virus glycoproteins. J Gen Virol, 1979, 45:263～272

4 Umino Y, Kohama T, Kohase M *et al*. Protective effect of antibodies to two viral envelope glycoproteins on lethal infection with Newcastle disease virus. Arch Virology, 1987, 94:97～107

5 Meulemans G, Letellier C, Gonze M *et al*. Newcastle disease virus glycoprotein expressed from a recombinant vaccinia virus vector protect chickens against live virus challenge. Avian Pathol, 1988, 17:821～827

6 Boursnell M E G, Green P F, Samson A C R *et al*. A recombinant fowl pox virus expressing the hemagglutinin-neuraminidase gene of Newcastle disease virus (NDV) protects chickens against challenge by NDV. Virology, 1990, 178:296～300

7 Heckert R A, Riva J, Cook S *et al*. Onset of protective immunity in chicks after vaccination with a recombinant herpesvirus of turkeys vaccine expressing Newcastle disease virus fusion and hemagglutinin-neuraminidase antigens. Avian Dis, 1996, 40:770～777

8 Nagy E, Derbyshire J B, Dobos P *et al*. Cloning and expression of NDV hemagglutinin-neuraminidase cDNA in a baculovirus expression vector system. Virology, 1990, 176:426～438

9 Morgan R W, Cantello J L, McDermott C H. Transfection of chicken embryo fibroblasts with Marek's disease virus DNA. Avian Dis, 1990, 34:345～351

Construction of a Recombinant Herpesvirus of Turkey Expressing the Haemagglutinin-Neuraminidase Gene of Newcastle Disease Virus

Zhao Jun Zhang Xiugen Chen Puyan Cai Baoxiang

(*College of Animal Medicine, Nanjing Agricultural University, Nanjing* 210095)

Abstract A 1.8 kb fragment of Newcastle disease virus (NDV) haemagglutinin-neuraminidase (HN) gene was amplified by polymerase chain reaction (PCR) with primers containing enzyme cleavage sites, and inserted into a nonessential gene of herpesvirus of turkey (HVT). Recombinant viruses were screened by Dot-blot hybridization with digoxigenin labelled probe and purified by plaque-formation technique. The expression of NDV HN gene can be detected by Western blotting in CEF cells infected with recombinant virus. Recombinant HVT strains were replicated stably in cell cultures.

Key words NDV, HN gene, Recombinant HVT