

表达传染性法氏囊病毒 VP2 蛋白的重组马立克氏病毒的构建*

刘红梅, 秦爱建**, 叶建强, 陈鸿军, 邵红霞, 金文杰, 刘岳龙

(扬州大学 江苏省动物预防医学重点实验室, 江苏扬州 225009)

Construction of Recombinant Marek's Disease Virus Vaccine Strain

CVI988/Rispens Expressing the VP2 Protein of IBDV

LIU Hong-mei, QIN Ai-jian**, YE Jian-qiang, CHEN Hong-jun, SHAO Hong-xia,
JIN Wen-jie, LIU Yue-long

(Key Lab of Jiangsu preventive veterinary medicine, Yangzhou University, Yangzhou 225009, China)

Abstract: An expression cassette containing the VP2 gene of infectious bursal disease virus (IBDV) strain JS under the control of the CMV promoter and an enhancer in pcDNA3.1-VP2 was amplified by PCR and cloned into pUC18-US10 plasmid to yield the transferring vector pUC18-US10-VP2. The recombinant virus, designated rCVI988-VP2, was generated by co-transfection of CEF with pUC18-US10-VP2 and the Marek's disease virus (MDV) vaccine CVI988/Rispens virus. PCR analysis and immunofluorescence assays indicated that the recombinant virus was stable over 8 passages and that VP2 was expressed in CEF infected with the rCVI988-VP2. The data showed that the recombinant MDV expressing the VP2 gene of IBDV was successfully constructed and could prove to be a good strategy for IBD control.

Key words: Marek's disease virus, VP2, Transferring vector, Recombinant virus

摘要: 用聚合酶链式反应 (PCR) 方法从真核表达载体 pcDNA3.1-VP₂ 中扩增出包含 CMV 和 polyA 的 VP₂ 表达盒基因片段, 经琼脂糖凝胶电泳大小为 2.4kb; 将该基因片段插入马立克氏病病毒 (MDV) CVI988/Rispens 的非必需区 US10 片段中, 经 *Sph*I 酶切分析获得大小为 6.0 和 2.4kb 两个片段, 表明成功构建出表达 VP₂ 基因的 MDV CVI988 转移载体 pUC18-US10-VP₂ 质粒。将质粒与 CVI988/Rispens 疫苗毒共转染鸡胚成纤维细胞 (CEF), 通过免疫荧光方法筛选, 结果获得了表达 VP₂ 基因的重组 MDV (rMDV-VP₂)。用 IBDV 特异性单克隆抗体进行间接免疫荧光试验 (IFA) 证实, rMDV-VP₂ 病毒传至第 8 代仍能稳定表达 VP₂ 蛋白, 这为进一步研究其免疫学特性奠定了基础。

关键词: 马立克氏病毒 (Marek's disease virus, MDV); 转移载体; 重组病毒; VP₂

中图分类号: S852.65

文献标识码: A

文章编号: 1003-5125(2006)03-0257-04

传染性法氏囊病 (*Infectious bursal disease, IBD*) 是由鸡传染性法氏囊病毒 (*Infectious bursal disease virus, IBDV*) 引起的鸡和火鸡的一种高度接触性传染病。该病主要侵害 3~12 周龄的雏鸡与青年鸡, 破坏法氏囊中的 B 淋巴细胞, 导致不同程度的免疫抑制, 从而使病鸡增加对并发和继发性病毒和细菌感染的易感性。

目前主要使用弱毒、中等毒力疫苗以及灭活疫苗用于防制 IBD。然而, 弱毒苗存在着潜伏感染以及毒力返强的危险; 中等毒力疫苗存在损伤法氏囊, 抗原性或致病性不稳定; 而灭活苗虽然安全, 但不能对超强毒的感染提供有效的保护, 而且这几种疫苗都无法进行疫苗和野毒感染的鉴别诊断。因此发展广谱、高效、实用的新型疫苗成为迫切需要。

收稿日期: 2005-11-10, 修回日期: 2006-01-20

* 基金项目: 国家 863 高技术项目 (863-2002AA245051); 全国博士学位论文作者专项资金 (200256)

作者简介: 刘红梅 (1968-), 女, 河北保定籍, 目前在安徽农业大学动物科技学院工作。

** 通讯作者. Corresponding author. E-mail: aijian@yzu.edu.cn

VP2作为IBDV的主要宿主保护性抗原,已经在大肠杆菌、酵母、昆虫杆状病毒、禽痘病毒、腺病毒、火鸡疱疹病毒等活病毒载体中得到表达^[1-3]。但在许多表达系统中,存在不能诱导中和抗体或不能兼顾高保护力和避免法氏囊损伤的缺陷。因此,VP2基因表达系统的选择对诱导中和抗体的产生尤为重要。

以马立克氏病毒(MDV)疫苗毒作载体构建活病毒载体疫苗是近年来禽病毒基因工程研究中比较活跃的领域^[4,5]。而 CVI988/Rispens 疫苗是目前预防 MDV 感染的常规疫苗,对野外强毒、超强毒和特超强毒的攻击具有较高的免疫保护效力,使用安全,对鸡及其他动物均无致病性。鉴于此作者选择 CVI988/Rispens 做活病毒载体以表达 VP2 蛋白。

本试验利用 PCR 以质粒 pcDNA3.1-VP2 为模板扩增 IBDV-JS 株的 VP2 基因表达盒,插入 pUC18-US10 转移载体中,与 MDV 活病毒同源重组,获得了表达 VP2 蛋白的重组 MDV(Recombinant Marek's disease virus, rMDV),这为进一步研究表达 VP2 蛋白的 rMDV 的免疫学特性奠定了基础。

1 材料与方法

1.1 实验材料

9~10 日龄的 SPF 鸡胚(购自山东 SPF 实验种鸡场),疫苗毒 CVI988/Rispens 株购自北京农林科学院畜牧兽医研究所北京翎羽禽病防治技术开发有限公司,液氮保存。pUC18-US10 质粒,pcDNA3.1-VP₂ 质粒,大肠杆菌 DH5 α 由江苏省动物预防医学重点实验室保存。各种限制性内切酶、Taq 酶购自上海生工, T₄ DNA 连接酶购自 Promega, DNA 胶回收试剂盒购自 Qiagen, Lipfectin Reagent 购自 Gibco BRL。

1.2 含 VP2 基因表达盒的 PCR 扩增

根据 pcDNA3.1 载体序列,设计 1 对引物,扩增跨幅为 2.42kb,包含 CMV 和 ployA 的 VP2 基因表达盒,引物由宝生物公司合成,引物序列如下。P1:TTTGCATGCTTCGCGATGTACGGGCCA;P2:GTTGCATGCCATCCCAGCTTGCCTGCTATTGTCTTCCCA。以 pcDNA3.1-VP₂ 质粒为模板,反应体系 25 μ L。具体如下: 10 \times PCR buffer 2.5 μ L, MgCl₂ (25mmol/L) 2.5 μ L, 上下游引物 (25pmol) 各 1 μ L, dNTP (10mmol/each) 1 μ L, MDV 的 DNA (5ng/ μ L) 1 μ L, Taq 酶 (2.5U) 0.5 μ L, 补充水至 25 μ L。反应程序: 94 $^{\circ}$ C 5min \rightarrow (94 $^{\circ}$ C 1min \rightarrow 55 $^{\circ}$ C 1min \rightarrow 72 $^{\circ}$ C 2min) \times 30 个循环, 72 $^{\circ}$ C 10min。PCR 产物 4 $^{\circ}$ C 保存, 1%

琼脂糖电泳鉴定。

1.3 含 VP2 基因表达盒转移载体的构建

含 VP2 基因表达盒转移载体的构建策略(图 1)。即将含 CMV 和 ployA 的 VP2 基因表达盒插入 pUC18-US10 中,用 BamH I 和 Sph I 酶切鉴定,阳性质粒命名为 pUC18-US10-VP₂, 碱裂解法提取、PEG 沉淀法纯化质粒,并定量, -20 $^{\circ}$ C 保存。

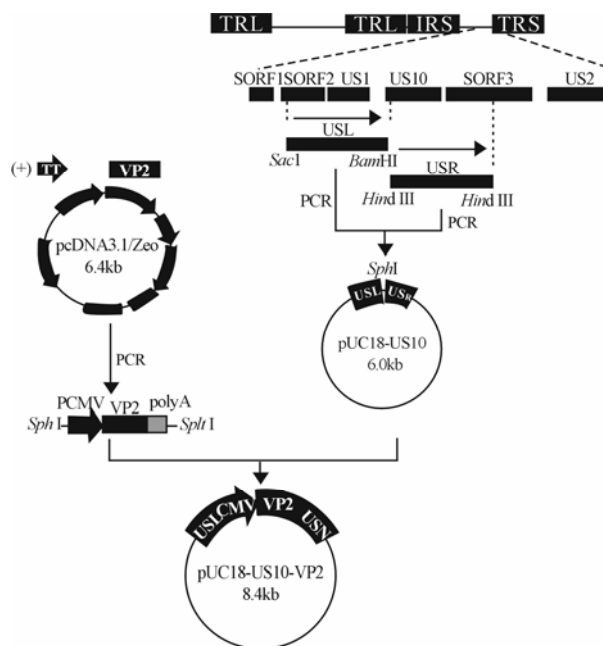


图 1 含 VP2 基因表达盒转移载体的构建示意图
Fig.1 Scheme for construction of transfer plasmid vector

1.4 CEF 细胞的转染

取生长良好的原代 CEF 单层细胞用胰酶消化,以 6~8 \times 10⁶ 接种到 35mm 的平皿,待细胞长至 80%~90%左右时即可感染和转染。感染病毒量为 200PFU,同时使用 2.5 μ g 纯化质粒载体 DNA, 6 μ L Lipofectin 进行同步转染。具体操作按 Lipofectin reagent 使用说明书进行,病毒同步感染和转染 12h 后换上完全培养基, 24h 换上维持液进行培养。

1.5 重组病毒的筛选与鉴定

待培养至第 4 天,出现 CVI988/Rispens 病毒蚀斑,用 0.05%胰酶消化细胞,同时接种到新鲜制备 2 块 35mm 的 dish 上。参照文献^[6, 7]取其中一块进行间接免疫荧光法鉴定,如果出现带荧光的病毒蚀斑,另一块接种到新鲜制备 96 孔板继续培养,培养 3-4d,再孔对孔稀释到两块新鲜制备 96 孔板继续培养, 3-4d 后取一块固定进行间接免疫荧光法鉴定,另一块作为筛选阳性克隆的储备板。在 96 孔板中挑选独立的经 IFA 检测阳性的蚀斑继续用 96 孔板筛选,如此重复下去直到筛选出表达 VP2 蛋白

的较为纯化的重组病毒。纯化至第八代时将数十孔阳性斑汇集起来抽提基因组 DNA, 用 VP2 引物进行 PCR 鉴定。

2 结果

2.1 含 VP2 基因表达盒的 PCR 扩增鉴定

利用 pcDNA3.1-VP2 质粒为模板进行 PCR 反应, 扩增出与预期大小相一致的片段 2.42kb, 即含 VP2 基因的表达盒, 该片段包含 CMV 和 polyA 阅读框 (1.05kb), VP2 基因为 1.37kb, 说明扩增的目的片段正确。

2.2 含 VP2 基因表达盒转移载体的构建

将上述 PCR 产物通过电泳纯化, 与经相应酶切的 pUC18-US10 质粒 DNA 进行连接, 构建出含 VP2 基因表达盒的转移载体 pUC18-US10-VP2 质粒, *Sph*I 酶切可切出 6.0kb 和 2.4kb; 用 *Bam*HI 酶切可切出 7.7kb 和 0.7kb, 表明 VP2 基因表达盒已插入 pUC18-US10 中, 插入方向为正向 (图 2) 序列分析进一步证明 VP2 基因表达盒转移载体构建成功。

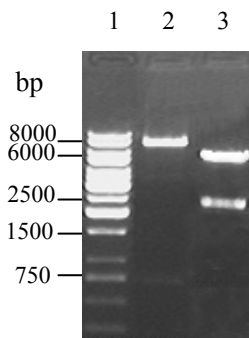


图 2 pUC18-US10-VP2 的酶切鉴定
Fig.2 Analysis of pUC18-US10-VP2 by RE
1:1kb marker; 2:by *Bam*HI; 3: by *Sph*I.

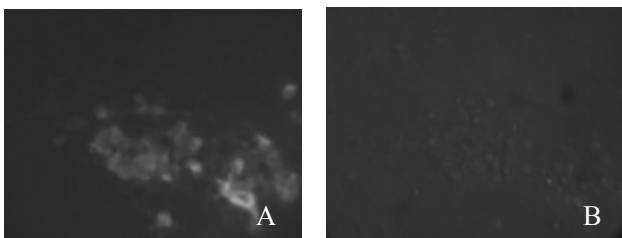


图 3 rCVI988-VP2 的 IFA 筛选与鉴定
Fig.3 Screen of rCVI988-VP2 by IFA

A: IFA of rCVI988-VP2 on CEF with mAb HNF1 against-IBDV; B: Plaque of rCVI988-VP₂ on CEF.

2.3 重组病毒能表达外源基因 VP2 蛋白

经 96 孔板反复筛选阳性克隆, 用 HNF1 IBDV 单抗为一抗, 经间接免疫荧光试验检测, 出现发荧

光的呈葡萄串状的 MDV 蚀斑 (图 3) 将第八代阳性孔的空斑汇集起来抽提基因组 DNA, 用 VP2 引物经 PCR 扩增出预期大小的 1.37kb 的 VP2 条带, 而感染野生病毒的细胞基因组 DNA 未扩增出条带 (图 4), 表明 VP2 基因成功插入 MDV, 并获得了表达。

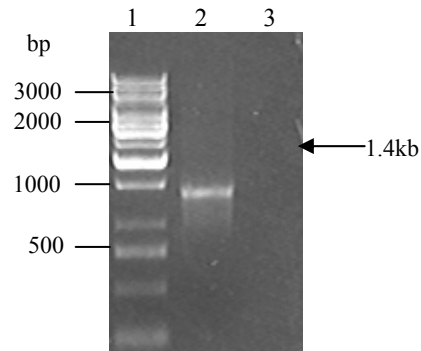


图 4 rCVI988-VP2 的 PCR 鉴定
Fig.4 Identification result of rCVI988-VP2 by PCR
1, 1kb Marker; 2, rCVI988-VP2-P8 DNA; 3, MDV CVI988 DNA

3 讨论

当前, 在完善动物生物安全体系的理念下, IBD 疫苗研究正朝着限制弱毒苗使用-优先发展灭活苗、亚单位疫苗-采用基因工程技术开发无感染性的新型疫苗方向发展。以 MDV 作为活病毒载体构建表达 IBDV-VP2 的载体疫苗是近几年来国内外研究的热点^[8]。尽管构建的这种活病毒载体疫苗可能在相当长的一段时间里还无法取代传统疫苗, 但它们是今后的发展方向。

IBDV 的 VP2 蛋白能诱导鸡体产生中和性抗体, 该蛋白表面上至少存在两种病毒中和表位, 作为主要病毒抗原可诱导较强的免疫原性。Chang 等^[9]报道用真核表达系统表达的 VP2 蛋白免疫动物具有良好的保护作用^[9]。Darteil 等 (1995) 在 HVT 的 gI 区构建了表达 IBDV VP2 的 rHVT, 当免疫剂量为 10^4 和 10^5 PFU 时鸡体获得了 60% 和 100% 的保护^[2]; 日本学者 Tsukamoto 等 (1999 年) 用 MDV CVI988 株的 US2 区表达 IBDV VP2 基因, 接种的鸡在攻 vvIBDV 后保护达 55%^[5]。这些研究结果证明: 以鸡疱疹病毒为基础的 IBD 疫苗能够安全有效地表达 VP2 抗原。Tsukamoto 等 (2002) 还用两种 HVT 重组体 rHVT-cmvVP2 和 rHVT-pecVP2 免疫鸡。后者在体外表达的 VP2 抗原约为前者的 4 倍, 可诱导对致死 IBDV 毒株的完全保护; 而前者只能诱导 58% 保护力^[10]。此外, 表达 VP2 的 rMDV 不会接触传播, 而 IBDV 活病毒疫苗却能通过接触传

播^[11]。

本试验将编码 IBDV 的主要保护性抗原基因 VP2 插入到细胞结合型的 MDV 载体中, 筛选表达 VP2 的重组病毒, 依靠 MDV 感染的形式呈递 IBDV VP2 抗原, 在有效抵抗 MDV 强毒攻击的同时, 激发鸡体免疫系统产生抵抗 IBDV 强毒攻击的反应包括体液免疫和细胞免疫。由于报告基因的表达可能会干扰重组病毒的免疫效果, 因此本试验构建的 rMDV 没有标记基因, 直接采用间接免疫荧光的方法进行筛选。试验表明经过转染后传代已检测到了表达 VP2 的荧光蚀斑, 得到了表达 VP2 基因的重组病毒, 为进一步研究表达 VP2 基因的重组病毒的免疫学特性奠定了基础。

References

- [1] Heine H G, Boyle D B. Infectious bursal disease virus structural protein VP2 expressed by a fowlpox virus recombinant confers protection against disease in chickens [J]. Arch Virol, 1993, 131: 277-292.
- [2] Dartail R, Bublot M, Laplace E, *et al.* Herpesvirus of turkey recombinant viruses expressing infectious bursal disease virus (IBDV) VP2 immunogen induces protection against an IBDV virulent challenge in chickens [J]. Virology, 1995, 211:481-490.
- [3] Sheppard M, Werner W, Tsatas E, *et al.* Fowl adenovirus recombinant expressing VP2 of infectious bursal disease virus induces protective immunity against bursal disease [J]. Arch Virol 1998, 143: 915-930.
- [4] Sakaguchi M, Nakamura H, Sonoda K, *et al.* Protection of chickens with or without maternal antibodies against both Marek's and Newcastle diseases by one-time vaccination with recombinant vaccine of Marek's disease virus type 1 [J]. Vaccine. 1998, 16 : 472-479.
- [5] 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.
- [6] Cui Z Z, Qin A J, Lee L F, (崔治中, 秦爱建, Lee L F), Construction of a double-amino acid mutant in 38kD phosphorylated protein of Marek's disease virus vaccine strain CVI988 [J]. J Shandong Agric Univ (山东农业大学学报—自然科学版), 2000, 31 (3): 231-235.
- [7] Cui Z Z (崔治中), Lee L F. Construction and characterization of point-mutated Marek's disease virus vaccine strain CVI988 expressing the virulent epitope on its 38kD phosphorylated protein [J]. Chin J Virol (病毒学报), 1999, 15 (2): 147-153.
- [8] Liu Yi (刘毅). A review—Current option of gene engineered vaccine with avian virus vectors [J]. Oversea veterinary medicine—animal husbandry and poultry infectious disease (国外兽医学—畜禽传染病) 1998, (18) 4: 13-18.
- [9] Chang H C, Lin T L, Wu C C. DNA vaccination with plasmids containing various fragments of large segment genome of infectious bursal disease virus [J]. Vaccine, 2003, 21: 507-513.
- [10] Tsukamoto K, Saito S, Saeki S, *et al.* Complete, long-Lasting protection against lethal infectious bursal disease virus challenge by a single vaccination with an avian herpesvirus vector expressing VP2 antigens [J]. J Virol, 2002, 7: 5637-5645
- [11] Okamura H, Sakaguchi M, Yokogawa K, *et al.* Lack of contact transmission of recombinant Marek's disease virus type I expressing the fusion protein of Newcastle disease virus [J]. Vaccine, 2002, 20: 483-489.