

许梦微, 王志胜, 乔永峰, 等. 表达禽流感病毒 H5 亚型基因重组鸭瘟病毒的构建[J]. 江苏农业学报, 2015, 31(6): 1371-1377.
doi: 10.3969/j.issn.1000-4440.2015.06.027

表达禽流感病毒 H5 亚型基因重组鸭瘟病毒的构建

许梦微^{1,2}, 王志胜¹, 乔永峰¹, 顾一奇^{1,2}, 柳畅^{1,2}, 侯继波¹, 姜平², 王继春¹
(1.江苏省农业科学院国家兽用生物制品工程技术研究中心, 江苏 南京 210014; 2.南京农业大学动物医学院, 江苏 南京 210095)

摘要: 为了应用和发展鸭肠炎病毒(DEV)载体疫苗, 基于细菌人工染色体(BAC)人工合成带有 pMCMV IE 启动子和 HA 基因序列的表达盒, 将其插入到 UL55 和 LORF11 之间的非编码区, 从而构建出 DEV 载体疫苗。RFLP 分析结果显示 DEV BAC 及其突变体条带与预期结果存在轻微的差异, 将 BAC 及其突变体拯救后发现其生长性能与亲本病毒没有显著差异。间接免疫荧光和 Western blot 结果显示, 载体疫苗在感染鸡胚成纤维细胞(CEF)后大量表达了 HA 蛋白质。表明成功构建了能稳定表达禽流感病毒 H5 亚型基因重组鸭瘟病毒。

关键词: 重组鸭瘟病毒; 细菌人工染色体; 高致病禽流感病毒; HA 基因

中图分类号: S858.32 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-4440(2015)06-1371-07

Construction of a vectored duck enteritis virus (DEV) expressing hemagglutinin of H5N1 avian influenza virus

XU Meng-wei^{1,2}, WANG Zhi-sheng¹, QIAO Yong-feng¹, GU Yi-qi^{1,2}, LIU Chang^{1,2}, HOU Ji-bo¹,
JIANG Ping², WANG Ji-chun¹

(1. National Research Center of Veterinary Biologicals Engineering and Technology, Jiangsu Academy of Agricultural Sciences, Nanjing 210014, China;
2. College of Veterinary Medicine, Nanjing Agricultural University, Nanjing 210095, China)

Abstract: To facilitate the generation and further improvement of duck enteritis virus(DEV) vectored HA(H5) vaccine, based on the bacterial artificial chromosome (BAC), a synthesized HA(H5) expression cassette with pMCMV IE promoter and a consensus HA sequences were inserted into the non-coding area between the UL55 and LORF11. Restriction fragment length polymorphism (RFLP) of DEV BAC and its mutants showed slight differences with expected result. Recovered virus from the BAC or mutants exhibited similar growth kinetics as parental virus. The results of indirect immunofluorescence and Western blotting revealed the robust expression of HA infected by the vectored vaccine in chicken embryo fibroblasts(CEFs). It was indicated that a vectored duck enteritis virus (DEV) stably expressing hemagglutinin of H5N1 avian influenza virus were successfully constructed based on an infectious clone of DEV vaccine strain.

Key words: recombination duck enteritis virus; bacterial artificial chromosome; avian influenza virus; HA gene

收稿日期: 2015-03-17

基金项目: 公益性行业(农业)科研专项(201303046); 江苏省农业科技自主创新基金项目[CX(14)2048]; 江苏省自然科学基金项目(BK20131334)

作者简介: 许梦微(1988-), 女, 江西抚州人, 硕士研究生, 主要从事病毒载体活疫苗的研究。(Tel) 18151689053; (E-mail) xumengwei1746109@aliyun.com

通讯作者: 王继春, (E-mail) jcwang@263.net

鸭肠炎病毒(DEV)是引起鸭瘟(DP)或鸭肠炎(DVE)的病原, 具有高致病性和传染性, 主要感染鸭、鹅和一些野生水禽, 致死率高达 100%^[1]。DVE 在美国和中国等许多国家都有报道^[2], 2013 年国际病毒分类学委员会报告中提到 DEV, 即鸭疱疹病毒 1 型, 属于疱疹病毒目、疱疹病毒家族甲型疱疹病毒亚科。DEV 弱毒株和强毒株的全基因组已测通, 其全长约 158 kb, 包含 78 个开放阅读框^[3]。

近年来已经进行了一些关于疱疹病毒的细菌人工染色体(BAC)的研究^[4-7],应用 BAC 诱变技术可以构建多种病毒突变体与载体疫苗,用以研究其病理学并开发其作为载体的潜能^[8]。第一个 DEV 的 BAC 来自鸭瘟强毒株(V2085),该毒株是从死亡的鸭体内分离得到的。在 BAC 的基础上,构建了载有高致病性禽流感病毒 H5N1 HA 基因的 DEV 载体疫苗,能够在感染细胞中高度表达 HA 蛋白质^[4]。

禽流感 H5N1 能够感染人和动物,其极高的致死率以及高度突变的能力对于人类来说极具威胁,在世界范围内备受关注^[9]。鸟类是禽流感病毒的主要宿主,而候鸟的迁徙则被认为是禽流感传播与暴发的罪魁祸首^[10]。鸭作为 H5N1 的主要携带者,对于鸡和其他家禽来说是一个稳定的传染源^[11]。因此,控制禽流感 H5N1 对鸭的感染是预防禽流感在禽类和人群中传播的关键。

疱疹病毒的活病毒载体疫苗经历数十年的发展,已经证实其能同时激发黏膜免疫和体液免疫^[12-13]。迄今为止,一些疱疹病毒载体疫苗已经获得专利并在一些国家中广泛应用^[14-15]。除了 DEV V2085 株的早期研究,最近应用 DEV 全基因组的 4 种重叠 DNAs 在 Fosmid 系统中还构建了另外一种以 DEV 疫苗株作为骨架的载体疫苗(rDEV-us78HA)^[16-17]。本研究试图将 DEV 疫苗株 C-KCE 感染性克隆,通过 En Passant 方法构建了以 BAC 为基础的 DEV 禽流感载体疫苗。该载体疫苗的构建是将禽流感病毒 H5N1 株的保守序列 HA 通过人工合成后插入到 DEV^{C-KCE} BAC Sa 克隆的 UL55 和 LORF11 之间的非编码区,获得表达 HA 的载体 pDEV^{C-KCE}-H5(UL55);再通过将带有相同同源臂和 gC 基因的片段和 pDEV^{C-KCE}-H5(UL55) DNA 共转染鸡胚成纤维细胞进行重组,获得重组病毒 DEV-H5(UL55),为进一步开发应用 DEV 载体疫苗以及促进 DEV 病毒学的研究奠定基础。

1 材料与方法

1.1 病毒与质粒

DEV 弱毒株 DEV^{C-KCE},通过在 SPF 鸡胚上连续传代致弱,是广泛应用的商品化疫苗株。所有的 DEV 病毒和突变体都在第一代或第二代 CEF 细胞上增殖,以感染复数(MOI)为 0.01 的剂量接种 CEF 从而构建病毒库。感染的细胞及其上清液经过 3 次冻融(-70 ℃ 和 37 ℃)以释放病毒并保存在-70 ℃,通过病毒滴定的标

准方法测定其在 CEF 细胞上的 TCID₅₀。BAC 转移载体质粒 pDEV_{gc}-pHA2 由柏林自由大学的 Niklaus Osterrieder 教授惠赠。HA 表达盒 pDEV-H5(UL55)包括 pMCMV IE 启动子以及修饰过的 HA 基因。HA 基因是基于禽流感支系 2.3.2.1 的 HA 共有序列人工合成,并在裂解位点敲除了 12 个核苷酸系列。启动子 pMCMV IE 来自于 MCMV 基因组第 184336 到 182946 位点的互补序列,并带有 Kozak 序列。质粒 pDEV-H5(UL55) KAN^r 包含 1 个 HA 表达盒。卡那霉素抗性基因以及 Sac I 酶切位点,可用于进一步的重组试验。

1.2 细胞、病毒 DNA 的提取与转染

CEF 细胞的培养环境为 37 ℃、5% CO₂,培养基为添加了 10% 胎牛血清、100 U/ml 青霉素以及 100 μg/ml 链霉素的 DMEM 培养基。pDEV^{C-KCE} 与 pDEV^{C-KCE}-H5(UL55) DNA 通过 SDS-蛋白酶 K 方法从感染细胞中萃取纯化。本研究中通过磷酸钙沉淀法转染。具体来说,是向含有 200 ng DNA 水中加入 62 μl 2 mol/L CaCl₂,补水至总体积为 500 μl 后 4 ℃ 过夜,然后再加入 500 μl 预冷的 2×HBS 溶液混匀即为转染液。将每孔的原代 CEF 培养基更换为 500 μl 新鲜的不含胎牛血清及抗生素的 DMEM,然后混入之前配好的转染液 37 ℃ 培养 3~4 h 后,倒掉培养基,并用 PBS 洗涤 2 次,在每孔中加入 1.5 ml 含有 15% 甘油的 HBS 溶液静置 2 min,最后再用 PBS 洗涤 2 次后,加入含有 10% 胎牛血清及抗生素的 DMEM,置于 37 ℃、5% CO₂ 环境中培养。

1.3 多步生长曲线的绘制

在 CEF 细胞上以 MOI 为 0.01 的剂量接种病毒,绘制其生长曲线。具体而言,在接种病毒后第 0 h、6 h、12 h、24 h、36 h、48 h 和 72 h 分别取样测定上清液以及细胞冻融后的病毒滴度。在每个时间点取样后将感染细胞用 PBS 洗涤 2 次并重悬于 2 ml DMEM,反复冻融 3 次。500 g 离心 10 min 后,取上清液,参照标准中 TCID₅₀ 方法测定其病毒滴度。在相同的时间点取细胞上清液离心后,测定上清液中的病毒滴度。试验重复 3 次,绘制生长曲线。

1.4 细菌培养

电转化感受态细胞 *E. Coli* DH10B 购自 Invitrogen 公司。所用菌种 GS1783 由 Nikolaus Osterrieder 教授惠赠。电转化方法参考文献[18]。应用感受态细胞 DH5α 进行质粒 DNA 的电转化^[4]。BAC 及质粒 DNA 的提取参照试剂盒说明书进行。

1.5 聚合酶链反应 (PCR)、酶切分析及测序

设计了 1 对特异性引物 [Kan ins' H5 (HA) F 和 Kan ins' H5 (HA) R] (表 1), 在该引物的两端各有 1 个 *Sac* I 酶切位点, PCR 扩增后的卡那霉素抗性基因插入到质粒 pDEV-H5 (UL55) 中。另 1 对引物 [DEV ins H5 casse UL55 F 和 DEV ins H5 casse UL55 R] (表 1) 用于将 HA 表达盒插入到 DEV BAC

克隆中。为了拯救 *gC* 缺失病毒, 设计了 1 对引物 (DEV *gC* flanking F 和 DEV *gC* flanking R) (表 1) 用于 PCR 扩增含有 *gC* 基因并在其两侧各有一段同源序列的片段, 长约 1 000 bp。10 对特异性测序引物 (表 1) 用来验证 HA 表达盒的正确插入, 且 BAC 及其突变体经 *Eco*R I 或 *Bam*H I 酶切后进行限制性片段长度多态性分析 (RFLP)。

表 1 聚合酶链反应 (PCR) 引物

Table 1 Primers for PCR

引物	序列
Kan ins' H5 (HA) F	5'-TTAgagctcCTCGCTGCAGGCGCCGCTCTAGAActCGTCGATCGCAGCGGATGACGACGATAAGTAGGGATAAC-3'
Kan ins' H5 (HA) R	5'-CGCgagctcGGGTAATGCCAGTGTACAAACCA-3'
DEV ins H5 casse UL55 F	5'-CGACGGACTGCCAGTGAACGCTGAACAAGCTAGGACAATTCTAGTGGATCCCCCAACTCC-3'
DEV ins H5 casse UL55 R	5'-AAGTAAAGACCCAAGCTACTAACAGGGTATTTGGTAATATTGTCGACTCTAGAGGATCCG-3'
DEV <i>gC</i> flanking F	5'-TTCGCCGTTTACCAAATG-3'
DEV <i>gC</i> flanking R	5'-TGATTCCTTTTGTTCCGATA-3'
DEV H5 (UL55) casse seq F1	5'-CTAGTGGATCCCCCAACTCC-3'
DEV H5 (UL55) casse seq F2	5'-GTACATTGGGTCAATGGGAG-3'
DEV H5 (UL55) casse seq F3	5'-AAGTACACTGCGTCAATAGG-3'
DEV H5 (UL55) casse seq F4	5'-ACTTCCAATGGGTTTTGCC-3'
DEV H5 (UL55) casse seq F5	5'-GCTGATTAATGGGAAAGTAC-3'
DEV H5 (UL55) casse seq F6	5'-CGATCATATTTGCATTGGTT-3'
DEV H5 (UL55) casse seq F7	5'-TTGAAACACCTATTGAGCAG-3'
DEV H5 (UL55) casse seq F8	5'-GGACATCAACACTAAACCAG-3'
DEV H5 (UL55) casse seq F9	5'-GAATGTCCCAAAATATGTGAA-3'
DEV H5 (UL55) casse seq F10	5'-CTTAGAGAGGAGAATAGAGAAT-3'
DEV H5 (UL55) casse seq R1	5'-TTGTCGACTCTAGAGGATCC-3'
DEV H5 (UL55) casse seq R2	5'-CATCCATAAAGATAGACCAG-3'
DEV H5 (UL55) casse seq R3	5'-ATGGAAGTCTAGAGTTCTCTC-3'
DEV H5 (UL55) casse seq R4	5'-TAAAACCTGCTATAGCTCCA-3'
DEV H5 (UL55) casse seq R5	5'-CGGTTTTAAAAATTGTCCAGA-3'
DEV H5 (UL55) casse seq R6	5'-TGGACATGCTGCACTCACCC-3'
DEV H5 (UL55) casse seq R7	5'-TTTCCAGTATGTTGGGCA-3'
DEV H5 (UL55) casse seq R8	5'-ATATGGAATTTCCAGGGAA-3'
DEV H5 (UL55) casse seq R9	5'-CCCAATGGAAAGTCCCTATT-3'
DEV H5 (UL55) casse seq R10	5'-TCAGTGTACTTGGCTCCAAT-3'

小写字母序列表示加入到引物的限制性酶位点; 斜体序列表示不存在于原始 DEV 基因组中的额外碱基。

1.6 DEVC-KCE 感染性克隆的构建

在 DEV2085 株 BAC 构建方法的基础上稍作改动, 用于 DEV^{C-KCE} 感染性克隆的构建^[4]。首先, DEV^{C-KCE} 的 DNA 与 pDEVgc-pHA2 在原生代 CEF 上共转染, 重组后 *mini-F* 基因替代了 *gC* 基因。在 488 nm 波长的荧光显微镜下观察到绿色噬斑后, 在 CEF 上进行 3 轮筛选以纯化 DEV^{C-KCE}-*mini-F*。然后通过电转化将 DEV^{C-KCE}-*mini-F* 导入 DH10B 感受态细胞中,

根据氯霉素抗性筛选阳性克隆, 并进行 RFLP 分析。DEV^{C-KCE} 感染性克隆的 DNA 通过电转化导入大肠杆菌 GS1783 中, 用于 DEV 基因组的进一步操作分析。

1.7 表达 HA 的重组载体 DEV-H5 (UL55) 的构建

基于 DEV BAC 克隆 pDEV^{C-KCE}, 将 HA 表达盒插入到 1 个非编码区。将先前公布的 En Passant 方法稍作修改, 在 DEV 基因组的 ORF UL55 和 LORF11 之间从位点 263 至 291 替换核苷酸片段^[19]。也就是以

pDEV-H5(UL55) KANⁱⁿ DNA 为模板,用引物(DEV ins H5 casse UL55 F 和 DEV ins H5 casse UL55 R)扩增两端都带 40 bp 同源序列的 HA 表达盒,再用 *Dpn* I 酶消化,除去可能的质粒污染,将 PCR 产物电转至 pDEV^{C-KCE} 感受态细胞进行第一次重组,然后进行第二次重组敲除卡那霉素抗性基因,获得最终的重组 HA 载体克隆 pDEV^{C-KCE}-H5(UL55)。敲除卡那霉素后的选择性克隆用 *Eco*R I 和 *Bam*H I 酶切后进行 RFLP 进一步验证。最终,通过与 DEV^{C-KCE} gC^R 相似的方法进行 gC 恢复,得到表达 HA 的载体 DEV^{C-KCE} 称作 DEV-H5(UL55)。用引物(DEV ins H5 casse UL55 F 和 DEV ins H5 casse UL55 R) PCR 扩增 DEV-H5(UL55) HA 表达盒,然后连续用 10 对特异性引物(表 1)进行测序来验证 HA 的插入是否正确。

1.8 间接免疫荧光和 Western blot 分析

间接免疫荧光:DEV-H5(UL55)重组病毒 F₂₀ 代按 50-100PFU 比例在 6 孔板上接种鸡胚成纤维细胞(CEF)原代细胞,在 37 °C 5% CO₂ 恒温培养箱孵育 48 h,用固定液(96%乙醇/丙酮=3:1)固定细胞,并在-20 °C 放置 30 min。倒掉固定液,用 PBS 洗 1 次,吸出液体,加上 PBS(0.1% Triton X-100)进行通透处理 5 min。加入封闭液(PBS+3%BSA)过夜处理。加入抗 AI(H5N1)HA 单克隆抗体室温包被 1 h,用 PBS 洗 3 次,加入二抗羊抗鼠-Alexa488 (1:2 000)包被 1 h。最终在 488 nm 紫外光激发下观察。

Western blot 分析:DEV-H5(UL55)病毒 F₅ 和 F₂₀ 代以 MOI 为 0.01 的剂量感染 CEF 细胞,感染后的细胞经裂解液 95 °C 10 min 变性处理,经 SDS-PAGE 后将 PAGE 胶上的蛋白质条带转移到硝酸纤维素膜上。与间接免疫荧光试验来源相似的 H5 单克隆抗体作为一抗,1:10 000 稀释的羊抗鼠 IgG 用作二抗。DEV-C-KCE 感染的细胞作为对照。

2 结果

2.1 带 mini-F 基因的重组弱毒鸭瘟病毒的构建

DEV^{C-KCE} 和 pDEVgc-pHA2 DNA 共转染后 3 d,产生带有 mini-F 的重组质粒 DEV^{C-KCE},在 488 nm 波长的紫外光激发下观察到绿色荧光。随后,经过三轮挑斑纯化,获得 mini-F 重组 DEV^{C-KCE},称作 DEV^{C-KCE}-mini-F。

2.2 DEV^{C-KCE} 感染性克隆的构建

DEV^{C-KCE}-mini-F DNA 电转入 DH10B 感受态细胞后,获得数个带有氯霉素抗性的克隆,我们选择其

中 1 个克隆,称之为 pDEV^{C-KCE}。pDEV^{C-KCE} 经过 *Bam*H I 和 *Eco*R I 酶切后进行 RFLP 分析,结果与预期有轻微的差别(图 1),可能是 DEV^{C-KCE} 与参考 DEV(VAC) 基因组序列相比有轻微地变异。将 pDEV^{C-KCE} DNA 电转入 *Escherichia coli* GS1783 电感受态细胞获得感染性克隆 Sa,并通过 En Passant 方法进一步构建突变体。Sa 经 *Bam*H I 和 *Eco*R I 酶消化后进行 RFLP 分析,图像与 pDEV^{C-KCE} 完全一样。

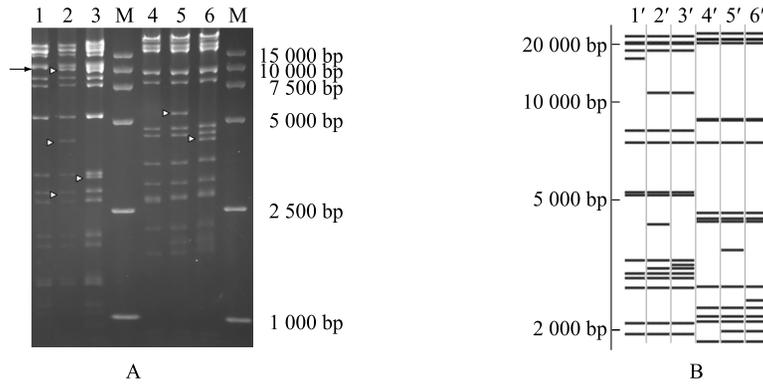
2.3 pDEV^{C-KCE}-H5(UL55) 的构建

依照 En Passant 规程,将带有卡那霉素抗性基因的 HA 表达盒通过第一步重组插入到 DEV^{C-KCE} BAC Sa 克隆,得到具有氯霉素和卡那霉素双抗性的重组 BAC 克隆 pDEV^{C-KCE}-H5(UL55)KAN。通过第二步重组将 HA 表达盒中的卡那霉素抗性基因敲除,获得 DEV 重组 BAC,称作 pDEV^{C-KCE}-H5(UL55),其 HA 表达盒插入在 UL55 和 LORF11 间的无编码区。RFLP 分析结果显示,用 *Bam*H I 酶消化后,pDEV^{C-KCE}-H5(UL55)KAN 出现 3 个条带,大小约为 10 000 bp、4 800 bp、2 700 bp,缺失 1 条约 13 000 bp 的条带(图 1A),这些结果与预期条带是一致的(图 1B)。*Eco*R I 酶消化后,pDEV^{C-KCE}-H5(UL55)^{KAN} 出现 1 条约 5 500 bp 新条带,取代了 pDEV^{C-KCE}-H5(UL55) 约 4 500 bp 条带(图 2A);与预期(图 2B)进行比较,电泳图不完全一样,可能是由 DEV^{C-KCE} 和参考 DEV 基因序列之间的差异导致。

2.4 重组 DEV 的拯救及 DEV-H5(UL55) 的获得

以 DEV^{C-KCE} DNA 作为模板,DEV-HOMO1-for 和 DEV HOMO2-rev 为引物 PCR 扩增的片段,与 pDEV^{C-KCE} DNA 进行共转染,在 488 nm 波长的紫外光激发下观察到白斑。经过三轮挑斑纯化,分离出纯种毒。用引物 DEV gC flanking F 与 DEV gC flanking R 进行 PCR 扩增出约 1 750~1 850 bp 的目的条带,序列分析显示 DEV 病毒的 gC 基因完全恢复到亲代病毒的同位置。结果表明已获得 gC 基因恢复毒,命名为 DEV^{C-KCE} gC^R。

表达 HA 的载体 pDEV^{C-KCE}-H5(UL55) 通过与 DEV^{C-KCE} gC^R 相似的方法进行 gC 基因恢复,得到 DEV-H5(UL55)。用引物 DEV ins H5 casse UL55 F 和 DEV ins H5 casse UL55 R 进行 PCR 扩增 DEV^{C-KCE}-H5(UL55) HA 表达盒,然后连续用 10 对特异性测序引物(表 1)来验证 HA 的正确插入。测序结果与预期完全一致,表明成功获得了重组毒 DEV-H5(UL55)。



A: pDEV^{C-KCE}、pDEV^{C-KCE}-H5(UL55) KAN 和 pDEV^{C-KCE}-H5(UL55) DNA 分别经 BamH I 和 EcoR I 酶切消化后的 RFLP 条带; B: pDEV^{C-KCE}-H5(UL55) KAN、pDEV^{C-KCE}-H5(UL55) 与 pDEV^{C-KCE} RFLP 预期条带。M: DL 15 000 DNA marker; 1~3: pDEV^{C-KCE}、pDEV^{C-KCE}-H5(UL55) KAN 和 pDEV^{C-KCE}-H5(UL55) 经 BamH I 消化后的条带; 4~6: pDEV^{C-KCE}、pDEV^{C-KCE}-H5(UL55) KAN 和 pDEV^{C-KCE}-H5(UL55) 经 EcoR I 消化后的条带。1'~3': pDEV^{C-KCE}、pDEV^{C-KCE}-H5(UL55) KAN 和 pDEV^{C-KCE}-H5(UL55) 经 BamH I 消化后的预测条带; 4'~6': pDEV^{C-KCE}、pDEV^{C-KCE}-H5(UL55) KAN 和 pDEV^{C-KCE}-H5(UL55) 经 EcoR I 消化后的预测条带。

图 1 pDEV^{C-KCE}、pDEV^{C-KCE}-H5(UL55) KAN 和 pDEV^{C-KCE}-H5(UL55) 的限制性片段长度多态性图

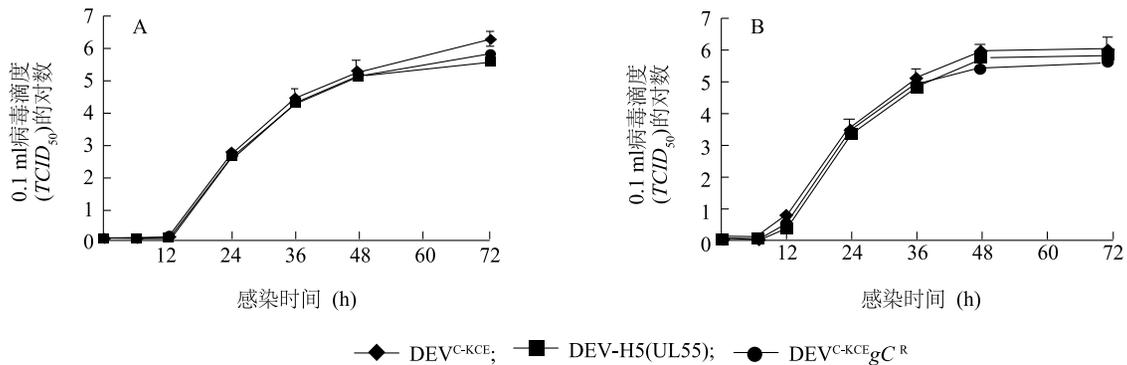
Fig.1 Restriction fragment length polymorphism (RFLP) of pDEV^{C-KCE}, pDEV^{C-KCE}-H5(UL55) KAN and pDEV^{C-KCE}-H5(UL55)

2.5 重组毒 DEV-H5(UL55) 稳定性与生长动力学

DEV-H5(UL55) 在 CEF 上连续复制传至 F₂₀ 代, 以 F₂₀ 代 DNA 为模板, DEV ins H5 casse UL55 F 和 DEV ins H5 casse UL55 R 为引物, 扩增出约 3 360~3 390 bp 片段。测序结果显示 HA 表达盒的序列与预期完全一样, 表明 HA 表达盒至少能稳定表达 20 代。

通过 3 个独立试验, 比较 2 种 gC 恢复毒 DEV^{C-KCE} gC^R 和 DEV-H5(UL55) 与亲代病毒 DEV^{C-KCE} 的多步生长曲线。测定感染细胞上清液的滴度, 感染 12 h 内均检测不出毒价, 所有病毒株在

感染细胞后 72 h 内滴度约为 0.1 ml 1×10⁶ TCID₅₀。DEV-H5(UL55) 与 DEV^{C-KCE}、DEV^{C-KCE} gC^R 在感染 48 h、72 h 的毒价差异均不显著(图 2A)。比较冻融 3 次后的细胞毒价, gC 基因恢复毒 DEV^{C-KCE} gC^R 和 DEV-H5(UL55) 比亲代病毒 DEV^{C-KCE} 效价稍低, 但是 DEV-H5(UL55) 与 DEV^{C-KCE}、DEV^{C-KCE} gC^R 在感染 48 h、72 h 时毒价差异均不显著(图 2B)。这些结果进一步证明 DEV^{C-KCE} BAC 克隆是亲代毒的完全克隆, UL55 和 LORF11 非编码区外源表达盒的插入不会影响病毒的增殖性能和稳定性, 体现了 DEV-H5(UL55) 作为有前景的活载体候选疫苗的优势。



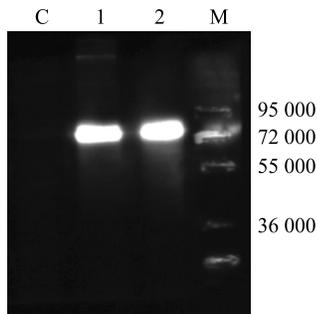
A: 病毒感染细胞上清液中病毒滴度; B: 冻融 3 次后病毒滴度。

图 2 DEV^{C-KCE} gC^R、DEV-H5(UL55) 与 DEV^{C-KCE} 在 CEF 细胞上的多步生长动力学图

Fig.2 Multi-step growth kinetics of DEV^{C-KCE} gC^R, DEV-H5(UL55) and DEV^{C-KCE} on CEFs

2.6 重组毒 DEV-H5(UL55) HA 的表达

间接免疫荧光试验中,DEV-H5(UL55) F₂₀代蚀斑能与单克隆抗体很好地反应,在488 nm紫外光激发下观察到很强的信号,而对照 DEV^{C-KCE} 蚀斑不显示信号。蛋白质免疫印迹分析,在感染 DEV-H5(UL55) F₅ 和 F₂₀代细胞裂解液中观察到分子量约80 000的蛋白质,而在感染 DEV^{C-KCE} 的细胞裂解液中没有此蛋白质(图3)。DEV-H5(UL55) F₅ 和 F₂₀代检测到的蛋白质条带大小要比最初合成的 HA 氨基酸序列(分子量约为68 000)要稍微大些。这种现象早期也出现在 DEV v2085_H5 的 HA 表达中,后被证实是由于 HA 蛋白质的 N-联聚糖导致。表明依托 DEV BAC 构建好的带有 HA 表达盒的 DEV-H5(UL55) 能够有效稳定地表达 HA,且能稳定表达至少20代以上。



M:蛋白标准 Marker; C:感染 DEV^{C-KCE} 的细胞裂解液样品(对照); 1~2:感染 F₅ 和 F₂₀代 DEV-H5(UL55) 的细胞裂解液。

图3 DEV-H5(UL55) HA 表达的蛋白质免疫印迹分析

Fig. 3 Western blot analysis for HA expression of DEV-H5(UL55)

3 讨论

禽流感不仅对养殖业造成巨大的损失,而且威胁着人类的健康,所以,对其有效的防治具有重要的公共卫生意义。此病难控制的主要原因有两个:禽流感病毒的毒力在逐渐增强,新的致病型和毒力型在不断出现;至今没有一种疫苗能真正有效地保护禽类免于禽流感病毒的感染。HA 是构成禽流感病毒囊膜纤突的主要蛋白质之一,与病毒的变异、毒力和宿主特异性有关;同时,HA 是病毒的主要保护性抗原,可以刺激机体产生中和抗体,表达 HA 蛋白质可刺激家禽产生对多种亚型禽流感病毒攻击的保护

能力,因此成为研发疫苗的主要研究对象^[20-21]。

随着 DNA 重组技术的发展和利用,基因工程疫苗的研究取得了快速发展,其中重组病毒活载体疫苗成为当前新型疫苗的研究热点。与传统疫苗相比,重组病毒活载体疫苗具有使用安全,免疫力持久等优点,还可以达到一针预防多病的目的。应用疱疹病毒作为活病毒载体构建表达外源基因的载体疫苗成为近些年来国内外研究的热点^[22-23]。鸭肠炎病毒(DEV)是典型的疱疹病毒,其基因组有多个非必需基因和非编码区,具有多个插入位点,应该能够容许插入多个外源基因而不对自身的复制和生物学特性产生严重影响,是一个值得研究的重要病毒载体材料。研究发现,在很多疱疹病毒中,gC 基因为非必需基因,主要作用是介导病毒的成熟和释放,敲除这段基因虽然对病毒侵蚀力产生影响,但病毒仍能繁殖^[24]。

本研究中,通过同源重组将 BAC 载体功能序列 mini-F 插入到 DEV(atten)基因组中的 gC 区,成功构建了 DEV 感染性克隆 C-KCE。重组病毒采用 GFP 作为报告基因,转染后 24~48 h,在波长为 488 nm 紫外光激发下可以观察到重组病毒形成的绿色蚀斑,与 LacZ 作为报告基因相比^[25-26],重组病毒筛选和蚀斑纯化操作简便。生长动力学和 RFLP 试验结果表明该克隆包含了 C-KCE 株的整个基因组。在此感染性克隆基础上,通过 En Passant 方法构建了在 UL55 与 LORF11 开放阅读框间插入 HA 表达盒的载体疫苗。运用磷酸钙转染的方法将重组载体质粒 pDEV^{C-KCE}-H5(UL55) 与 gC 基因共同转染 CEF,经过多次挑斑筛选和传代,经间接免疫荧光试验和蛋白质免疫印迹分析证实得到了表达禽流感 HA 基因的重组鸭瘟病毒,且能稳定表达至少 20 代以上。重组毒 DEV-H5(UL55) 稳定性与生长动力学研究结果表明 UL55 和 LORF11 非编码区外源表达盒的插入不会影响病毒的增殖性能和稳定性。

参考文献:

- [1] JANSEN J R, WEMMENHOVE. Duck plague in domesticated geese (*Anser anser*) [J]. Tijdschr Diergeneesk, 1965, 90: 811-815.
- [2] JANSEN J, KUNST H. The reported incidence of duck plague in Europe and Asia[J]. Tijdschr Diergeneesk, 1964, 89: 765-769.
- [3] LI Y F, HUANG B, MA X L, et al. Molecular characterization of the genome of duck enteritis virus[J]. Virology, 2009, 391(2):

- 151-161.
- [4] WANG J, OSTERRIEDER N. Generation of an infectious clone of duck enteritis virus and generation of a vectored DEV expressing hemagglutinin of H5N1 avian influenza virus [J]. *Virus Res*, 2011, 159(1): 23-31.
- [5] HALL R N, MEER S. Back to BAC: The use of infectious clone technologies for viral mutagenesis [J]. *Viruses*, 2012, 4(2): 211-235.
- [6] ADLER H, MESSER L E. Cloning of herpesviral genomes as bacterial artificial chromosomes[J]. *Rev Med Virol*, 2003, 13(2): 111-121.
- [7] 张传健,许梦微,王志胜,等. 鸭瘟鸡胚化弱毒株细菌人工染色体的构建与鉴定[J]. *江苏农业学报*, 2014, 30(5): 1064-1070.
- [8] GUA Z Q, JING D G, WANG J C, et al. A novel inactivated gE/gI deleted pseudorabies virus (PRV) vaccine completely protects pigs from an emerged variant PRV challenge[J]. *Virus Res*, 2014(14): 371-372.
- [9] NEUMANN G. H5N1 influenza viruses: outbreaks and biological properties[J]. *Cell Res*, 2010, 20(1): 51-61.
- [10] SHI J, GAO L, ZHU Y, et al. Investigation of avian influenza infections in wild birds, poultry and humans in Eastern Dongting Lake, China[J]. *PLoS One*, 2014, 9(4): e95685.
- [11] KIM J, NEGOVETICH K. Ducks: the "Trojan horses" of H5N1 influenza[J]. *Influenza Other Respi Viruses*, 2009, 3(4): 121-128.
- [12] CHEN P C, LIU J X, JIANG Y P, et al. The vaccine efficacy of recombinant duck enteritis virus expressing secreted E with or without PrM proteins of duck tembusu virus[J]. *Vaccine*, 2014, 32(41): 5271-5277.
- [13] KIM S H, JIANG X. Newcastle disease virus vector producing human norovirus-like particles induces serum, cellular, and mucosal immune responses in mice [J]. *J Virol*, 2014, 88(17): 9718-9727.
- [14] ELS N T, MEEUSEN, JOHN W, et al. Current status of veterinary vaccines [J]. *Clin Microbiol Rev*, 2007, 20(3): 489-510.
- [15] RAHAUS M. Application of a new bivalent Marek's disease vaccine does not interfere with infectious bronchitis or Newcastle disease vaccinations and proves efficacious[J]. *Avian Dis*, 2013, 57(2): 498-502.
- [16] LIU J, CHEN P, JIANG Y, et al. A duck enteritis virus-vectored bivalent live vaccine provides fast and complete protection against H5N1 avian influenza virus in ducks[J]. *J Virol*, 2011, 85(21): 10989-10998.
- [17] LIU J, CHEN P, JIANG Y, et al. Recombinant duck enteritis virus works as a single-dose vaccine in broilers providing rapid protection against H5N1 influenza infection[J]. *Antiviral Res*, 2013, 97(3): 329-333.
- [18] SCHUMACHER D. Reconstitution of Marek's disease virus serotype 1 (MDV-1) from DNA cloned as a bacterial artificial chromosome and characterization of a glycoprotein B-negative MDV-1 mutant[J]. *J Virol*, 2000, 74(23): 11088-11098.
- [19] TISCHER B, VON EINEM J, KAUFER B, et al. En passant mutagenesis: a two step markerless red recombination system [J]. *Methods Mol Biol*, 2010, 634: 421-430.
- [20] QIAO C, YU K, JIANG Y, et al. Development of a recombinant fowlpox virus vector-based vaccine of H5N1 subtype avian influenza[J]. *Devel Biol*, 2006, 124: 127-132.
- [21] COX M M. Pandemic influenza: Overview of vaccines and antiviral drugs [J]. *Yale J Biol Medicine*, 2006, 79: 317-324.
- [22] LIU J, CHEN P, JIANG Y, et al. A duck enteritis virus-vectored bivalent live vaccine provides fast and complete protection against H5N1 avian influenza virus infection in ducks[J]. *Journal of Virology*, 2011, 85(21): 10989-10998.
- [23] CUI H, WANG Y, SHI X, et al. Construction of an infectious Marek's disease virus bacterial artificial chromosome and characterization of protection induced in chickens[J]. *Journal of Virological Methods*, 2009, 156(1): 66-72.
- [24] BRUNE W, MESSERLE M, KOSZINOWSKI U H. Forward with BACs: new tools for herpesvirus genomics [J]. *Trends in Genetics*, 2000, 16(6): 254-259.
- [25] SMITH G A, ENQUIST L W. A self-recombining bacterial artificial chromosome and its application for analysis of herpesvirus pathogenesis [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2000, 97: 4873-4878.
- [26] SMITH G A, ENQUIST L W. Construction and transposon mutagenesis in *Escherichia coli* of a full-length infectious clone of pseudorabies virus, an alphaherpesvirus [J]. *Journal of Virology*, 1999, 73(8): 6405-6414.

(责任编辑:袁 伟)