

# 鸡传染性支气管炎病毒 S1 基因和鸡 II 型干扰素基因在重组鸡痘病毒中的共表达

孙永科<sup>1,2</sup>, 田占成<sup>1</sup>, 王云峰<sup>1\*</sup>, 童光志<sup>1\*</sup>, 智海东<sup>1</sup>, 刘胜旺<sup>1</sup>, 王 玫<sup>1</sup>, 杨增岐<sup>2</sup>

(1. 中国农业科学院哈尔滨兽医研究所兽医生物技术国家重点实验室, 哈尔滨 150001;

2. 西北农林科技大学动物科技学院, 杨凌 712100)

**摘要:** 将鸡 II 型干扰素(ChIFN $\gamma$ ) 基因和鸡传染性支气管炎病毒 S1 基因同时插入到鸡痘病毒转移载体中, 构建含有这 2 个基因的鸡痘病毒转移载体 pSY-ChIFN $\gamma$ S1。采用脂质体法将该质粒转染鸡痘病毒感染的鸡胚成纤维细胞(CEF), 经过 8 轮蓝斑筛选, 得到纯化的能够同时表达鸡 II 型干扰素和鸡传染性支气管炎病毒 S1 基因的重组鸡痘病毒 rFPV-ChIFN $\gamma$ S1。rFPV-ChIFN $\gamma$ S1 接种 28 日龄的 SPF 鸡 1 周后, 可以检测到针对传染性支气管炎病毒 S1 基因的 ELISA 抗体, 重组病毒接种鸡的 CD4<sup>+</sup>、CD8<sup>+</sup> 和  $\gamma$ TCR 阳性 T 淋巴细胞的百分比含量显著高于非免疫对照鸡( $P < 0.05$ ); 免疫 4 周后用传染性支气管炎 LX4 强毒株攻击, rFPV-ChIFN $\gamma$ S1 免疫组仅有 1 只出现轻微的呼吸道症状(1/16), 而非免疫对照组则有 16 只发病(16/16), 并有 2 只出现死亡(2/16), 表明 rFPV-ChIFN $\gamma$ S1 对接种鸡可以产生良好的保护效果。

**关键词:** 传染性支气管炎病毒; 鸡 II 型干扰素; 重组鸡痘病毒

**中图分类号:** S852.65; Q784

**文献标识码:** A

**文章编号:** 0366-6964(2005)08-0800-07

鸡传染性支气管炎(Avian infectious bronchitis, IB)是鸡的一种急性、高度接触性、病毒性呼吸道疾病,死亡率一般为 20%~30%,有时高达 40%~90%,是威胁养禽业的重大疫病之一<sup>[1]</sup>。以完整的 IBV 为基础制备的灭活疫苗和弱毒疫苗在该病的预防中起到了重要作用。但 IB 弱毒疫苗可在感染机体中引起持续的潜伏感染,并有可能成为 IBV 突变的主体和重组变异的供体<sup>[2]</sup>,疫苗接种过程中还容易引起严重的上呼吸道支气管反应,特别是对于 1 日龄鸡。毒力返强是弱毒苗使用过程中的另一大隐患;灭活疫苗可以弥补上述不足,但免疫接种时费时费力、成本高。所以,人们一直在寻找更为高效、安全的疫苗,并竞相开展了 IB 亚单位疫苗<sup>[3]</sup>、核酸疫苗<sup>[4]</sup>、重组活病毒载体疫苗<sup>[5]</sup>等的研究工作。目前,研制中的重组疫苗的免疫效力与常规疫苗接近或相当,但还无法完全替代传统疫苗,如何提高基因工程疫苗的免疫效力成为当今研究的另一

热点。

细胞因子能够调节许多生物学功能,具有免疫佐剂效应,在基因工程疫苗构建中得到了广泛应用<sup>[6]</sup>,其中包括鸡 II 型干扰素。鸡 II 型干扰素(又称  $\gamma$  干扰素, ChIFN $\gamma$ )是由抗原或有丝分裂原激活的 T 细胞所合成、分泌的一种细胞因子,具有促进 MHC II 类抗原表达、增强 APC 细胞与 T 细胞的相互作用、增强 T 细胞辅助抗体产生和细胞毒性 T 细胞产生的能力等诸多免疫调节活性<sup>[7]</sup>,是十分重要的免疫调节因子,具有较强的佐剂效应<sup>[8]</sup>。

本研究构建了共表达 IBV S1 基因和 ChIFN $\gamma$  基因的重组鸡痘病毒,探索其对传染性支气管炎免疫效果。

## 1 材料

### 1.1 种毒和载体

S-FPV-017 株鸡痘病毒、转移载体 pSY681、含有 LacZ 报告基因的质粒 pSC11 和含有痘病毒早期启动子 LP<sub>2</sub>EP<sub>2</sub> 的质粒 pSY538,均由美国 California 大学的 Yilma 教授惠赠。IBV LX4 株 S1 基因和含有鸡 ChIFN $\gamma$  基因的 pBlueBacHiscChIFN $\gamma$  质粒由刘胜旺研究员构建。水泡性口炎病毒(VSV)由孙成群博士惠赠。

### 1.2 工具酶和其它材料

限制性内切酶和工具酶等为大连宝生物工程有

收稿日期: 2005-01-07

基金项目: 国家“863”计划资助项目(2003AA213020)

作者简介: 孙永科(1977-),江苏盐城人,硕士,主要从事病毒活载体疫苗的研究

\* 通讯作者: 童光志,王云峰, Tel: 0451-82725786-204; Fax: 0451-82734181; E-mail: gztong@public.hr.hl.cn; yfwang@public.hr.hl.cn

限公司产品; FITC 标记的兔抗鸡 IgG 和碱性磷酸酶标记的兔抗鸡 IgG 购自 Sigma 公司; 质粒纯化试剂盒 Wizard(r) Purification Plasmid 购自 Promega 公司; Lipofectamine Plus™ 试剂盒和 DMEM 细胞培养试剂购自 GIBCO 公司; 灭活过滤除菌的胎牛血清购自上海塞达生物有限公司(批号 150102)。

### 1.3 鸡胚及 SPF 鸡

SPF 鸡及 9~10 日龄 SPF 鸡胚由中国农业科学院哈尔滨兽医研究所实验动物中心提供。

## 2 方法

### 2.1 含 IBV S1 基因和 ChIFN $\gamma$ 基因的重组鸡痘病毒的构建

根据 S1 基因序列设计引物, 上游引物: 5'-ATA TGGATC CCA TGT TGG GGA AGT CAC TGT -3', 下游引物: 5'-TAT GGA TCC AAT GCC AAC TAT ATT GCC ACC -3', 在引物的两端引入 BamH I 位点(斜体字母表示), 该引物可以扩增 S1 基因的全部序列。PCR 条件: 95 °C 5 min; 94 °C 1 min, 55 °C 50 s, 72 °C 2 min, 30 个循环; 最后 72 °C 延伸 10 min。PCR 扩增后, 将目的片段克隆到 pSY538 质粒 LP<sub>2</sub>EP<sub>2</sub> 启动子下游的 BamH I 位点处, 然后通过 Not I 酶切位点将 LP<sub>2</sub>EP<sub>2</sub>+ S1 片段连接到 pSY681 中, 构建出 pSY-IBVS1 质粒。

ChIFN $\gamma$  基因扩增上游引物: 5'-GGT GAA TTC CAT GAC TTG CCA GAC TTA C -3', 下游引物: 5'-TCT GAA TTC TTT GCA ATT GCA TCT CCT C -3', 在引物的两端引入 EcoR I 位点(斜体字母表示), 该引物可以扩增 ChIFN $\gamma$  基因的全部序列。PCR 反应条件为: 95 °C 5 min; 94 °C 1 min, 55 °C 50 s, 72 °C 50 s, 35 个循环; 最后 72 °C 延伸 10 min。经 PCR 扩增后, 通过 EcoR I 位点将目的片段克隆到含有 LP<sub>2</sub>EP<sub>2</sub> 启动子的质粒 pSY538 上, 称为 pSY638; 然后将 Not I 酶切 pSC11 后获得的 P<sub>11</sub> 启动子控制下的 LacZ 报告基因通过 Sma I 酶切位点克隆到 pSY638 上, 构建出 pSY738 质粒。

用 Pst I 酶切 pSY738 质粒, 获得含 LP<sub>2</sub>EP<sub>2</sub>+ ChIFN $\gamma$  以及 LacZ 报告基因的片段, 补平后连接到用 Not I 部分酶切的 pSY-IBVS1 质粒的 Not I 位点处, 完成转移载体 pSY-ChIFN $\gamma$ S1 的构建。

将 80% 融合生长的鸡胚成纤维细胞(CEF) 用 DMEM 培养液洗涤一次, 用鸡痘病毒 S-FPV-017 株病毒稀释后 37 °C 感染鸡胚成纤维细胞 1.5 h 后

弃掉病毒液, 按 Lipofectamine Plus™ Reagent 提供的使用说明进行 pSY-ChIFN $\gamma$ S1 的转染。37 °C, 5% CO<sub>2</sub> 的条件下作用 2 h 后换成维持液, 继续培养, 待细胞病变达到 80% 时收获病毒。冻融 3 次后, 接种 CEF 进行蚀斑的筛选和纯化。经过连续 8 次的纯化之后, 用 PCR 方法进行鉴定, 获得含有 IBV S1 基因和 ChIFN $\gamma$  基因的重组鸡痘病毒, 命名为 rFPV-ChIFN $\gamma$ S1。

### 2.2 rFPV-ChIFN $\gamma$ S1 表达外源基因情况的检测

#### 2.2.1 重组 ChIFN $\gamma$ 蛋白的间接免疫荧光检测

在 24 孔细胞培养板上制备单层 CEF, 接种重组病毒 rFPV-ChIFN $\gamma$ S1, 待产生细胞病变后, 弃去培养液, 用 PBS(0.01 mol/L, pH7.4) 洗涤细胞 1 次, 自然干燥, 冷丙酮固定 5~10 min 后晾干。分别加入用 PBS(0.01 mol/L, pH7.4) 作 100 倍稀释的兔抗 ChIFN $\gamma$  阳性血清<sup>[9]</sup>, 37 °C 作用 45 min 后用 PBS 洗涤 3 次, 每次 5 min, 自然干燥。取异硫氰荧光素(FITC) 标记的羊抗兔 IgG (Sigma 公司) 用含 0.01% 伊文斯蓝的 PBS(0.01 mol/L, pH7.4) 稀释到工作浓度, 滴加在 24 孔板上, 37 °C 作用 45 min, 然后用 PBS(0.01 mol/L, pH7.4) 洗涤 3 次, 去离子水脱盐后, 自然干燥。滴加碱性甘油(pH9.8), 加盖玻片, 于荧光显微镜下观察。

#### 2.2.2 重组 ChIFN $\gamma$ 蛋白的抗病毒活性的检测

将 rFPV-ChIFN $\gamma$ S1 接种 CEF, 在 37 °C, 5% CO<sub>2</sub> 条件下生长 72 h 后收获上清, 用 0.22  $\mu$ m 的微孔滤膜过滤除去重组鸡痘病毒粒子。参照 Sekellick<sup>[10]</sup> 的方法测定干扰素效价, 待病毒对照孔 50% 以上细胞出现病变时, 判定结果。将能完全抑制 VSV 诱导细胞病变的样品稀释度定为 1 个单位。

#### 2.2.3 重组 IBV S1 蛋白的间接免疫荧光检测

具体操作过程同 2.2.1, 不同之处在于一抗使用的是鸡传染性支气管炎阳性血清<sup>[11]</sup>, 二抗使用的是 FITC 标记的羊抗鸡 IgG。

#### 2.2.4 重组 IBV S1 蛋白的 Western-blot 检测

用 rFPV-ChIFN $\gamma$ S1 感染鸡胚成纤维细胞, 待细胞病变达 100% 后, 倒掉培养液, 用 PBS(pH7.4) 洗细胞 2 次, 刮取细胞作为检测样品。制备 10% 分离胶, 进行 PAGE 电泳, 并将蛋白转印到硝酸纤维素膜上, 5% 脱脂乳封闭; 然后, 依次加入传染性支气管炎阳性血清(1:100), 碱性磷酸酶标记的羊抗鸡 IgG(1:5000), 每一步骤反应 45 min; 最后, 在 NBT/BCIP 溶液中显色 10 min。

### 2.3 动物试验与重组鸡痘病毒免疫效果评价

**2.3.1 IBV LX4 株病毒攻击试验** 将 32 只 28 日龄的 SPF 鸡分为 2 组, 每组 16 只, 分别饲养在中国农业科学院哈尔滨兽医研究所实验动物中心禽病感染室的 2 个负压隔离器中, 一组接种 rFPV-ChIFN $\gamma$ S1, 接种剂量为  $5 \times 10^6$  PFU, 另一组接种生理盐水。4 周后用  $10^3$  EID<sub>50</sub> 的 IBV LX4 强毒株点眼、滴鼻攻击, 从攻毒后第二天观察记录发病和死亡情况。发病鸡的判定标准为: (1) 喘气或呼吸困难; (2) 甩头; (3) 羽毛倒立, 精神沉郁, 出现上述症状之一即判为发病。根据 rFPV-ChIFN $\gamma$ S1 的保护效果评价其免疫效力。

**2.3.2 抗 IBV 抗体间接 ELISA** 免疫前静脉采血 1 次, 免疫后每周静脉采血 1 次, 至攻毒后 2 周止。以 IBV LX4 株的纯化病毒为包被抗原, 被检血清为一抗, 碱性磷酸酶标记的兔抗鸡 IgG 为二抗, 用间接 ELISA 法测定血清抗体的 OD<sub>405</sub> 值。

**2.3.3 外周血 CD4<sup>+</sup>、CD8<sup>+</sup> 和  $\gamma$ TCR<sup>+</sup> 淋巴细胞百分比含量的检测** 免疫和攻毒后, 每周从 2 个试验组中随机取 4 只鸡, 翅静脉采集 1 mL 抗凝血, 制备淋巴细胞, 分成 3 等份, 分别加入适量的 CD4<sup>+</sup>、CD8<sup>+</sup> 和  $\gamma$ TCR<sup>+</sup> 单克隆抗体 (Southern biotech, 美国), 同时设阴性对照, 用 FACScan<sup>TM</sup> Flow Cytometer (BDIS, San Jose, CA) 检测 3 种细胞标记的 T 淋巴细胞百分含量。应用 STATISTICA 软件 Anova 方法比较数据间的差异。

## 3 结果

### 3.1 含鸡 ChIFN $\gamma$ 基因和 IBV S1 基因的鸡痘病毒转移质粒的构建

经过一系列的克隆过程, 完成了转移载体 pSY-ChIFN $\gamma$ S1 (图 1) 的构建。该载体含有用于同源重组的鸡痘病毒同源臂、LP<sub>2</sub>EP<sub>2</sub> 启动子控制下的 ChIFN $\gamma$  基因、LP<sub>2</sub>EP<sub>2</sub> 启动子控制下的 S1 基因, 以及 P<sub>11</sub> 启动子控制下的报告基因 LacZ。

### 3.2 重组鸡痘病毒的筛选及 PCR 鉴定

以第 8 代的重组鸡痘病毒接种已长成单层的鸡胚成纤维细胞, 37 °C 培养。待 90% 以上细胞出现病变时收获细胞, 采用蛋白酶 K 法提取 DNA 作为模板进行 PCR 扩增。上游引物位于 LP<sub>2</sub>EP<sub>2</sub> 启动子序列中, 序列为 5'-TTG GCA TAT AAA TAG ATC TGT ATC-3', 下游引物分别为扩增 ChIFN $\gamma$  和 IBV S1 基因的下游引物, 退火温度为 52 °C。这

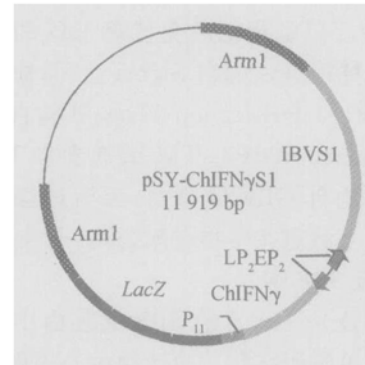
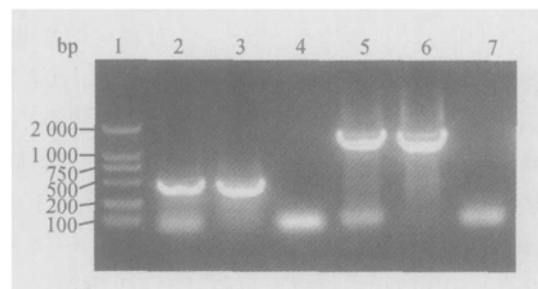


图 1 转移载体 pSY-ChIFN $\gamma$ S1 的结构  
Fig 1 Map of transfer plasmid pSY-ChIFN $\gamma$ S1

两对引物可以扩增出 S1 基因和 ChIFN $\gamma$  基因的全长。图 2 显示, 重组鸡痘病毒的 DNA 和阳性对照均能扩增出预计的 0.5 kb ChIFN $\gamma$  基因和 1.7 kb S1 基因, 而 S-FPV-017 DNA 未能扩增出任何产物, 说明重组鸡痘病毒中含有 ChIFN $\gamma$  和 S1 基因。



1. DL 2000; 2, 5. rFPV-ChIFN $\gamma$ S1;  
3. ChIFN $\gamma$  positive control;  
4, 7. S-FPV-017; 6. S1 positive control  
图 2 rFPV-ChIFN $\gamma$ S1 DNA 中 ChIFN $\gamma$  和 S1 基因的 PCR 鉴定

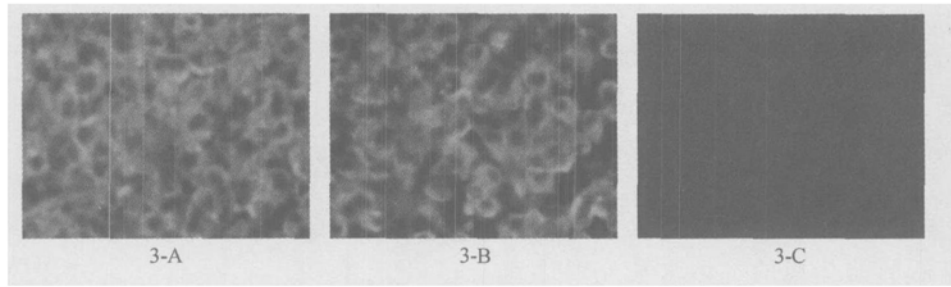
Fig. 2 PCR detection of ChIFN $\gamma$  and S1 gene in rFPV-ChIFN $\gamma$ S1 DNA

### 3.3 ChIFN $\gamma$ 蛋白和 S1 蛋白的体外表达

间接免疫荧光检测时, 感染 rFPV-ChIFN $\gamma$ S1 的细胞的胞浆和胞膜区显示亮绿色荧光, 而感染亲本病毒 (S-FPV-017) 的细胞未见荧光, 表明感染重组病毒的 CEF 正确表达了 ChIFN $\gamma$  蛋白和 S1 蛋白 (见图 3)。

### 3.4 重组 ChIFN $\gamma$ 抗病毒活性

当病毒对照孔的细胞病变达到 50% 时, 接种经  $2^{11}$  倍稀释的干扰素的细胞能完全抑制细胞病变, 即 rFPV-ChIFN $\gamma$ S1 所表达的干扰素的抗病毒效价为 2 048 U/mL, 从而说明 rFPV-ChIFN $\gamma$ S1 表达的重组 ChIFN $\gamma$  具有抗病毒活性。



3-A. ChIFN $\gamma$  的表达产物; 3-B. S1 的表达产物; 3-C. 感染 S-FPV-017 的对照  
3-A. Expression of ChIFN $\gamma$ ; 3-B. Expression of S1; 3-C. Negative control

图 3 CEF 中 ChIFN $\gamma$  和 S1 表达的间接免疫荧光检测

Fig 3 Immunofluorescence detection of the expressed ChIFN $\gamma$  and S1 in rFPV-ChIFN $\gamma$ S1 infected CEF

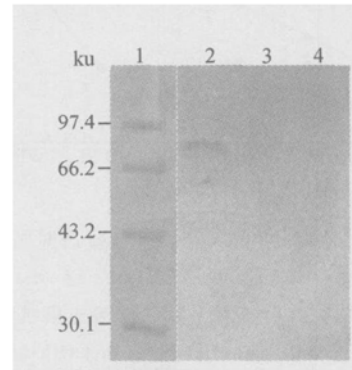
3.5 重组 S1 蛋白的 Western-blot 分析

感染 rFPV-ChIFN $\gamma$ S1 的细胞裂解物, PAGE 电泳后, 进行 Western-Blot 分析, rFPV-ChIFN $\gamma$ S1 感染的 CEF 细胞样品在 90 ku 处有 1 条独有的反应带, 而 S-FPV-017 感染的 CEF 细胞及未感染病毒的 CEF 细胞的样品没有相应的反应条带(见图 4), 说明 rFPV-ChIFN $\gamma$ S1 能表达具有免疫反应性的传染性支气管炎病毒糖蛋白 S1。

3.6 重组鸡痘病毒对 SPF 鸡的免疫保护作用

攻毒后鸡的发病和死亡情况如表 1 所示。IBV 攻击后的 2~ 5 d 内可以观察到鸡群的发病和死亡, 此后再没有鸡发病, 而且所有的发病鸡都全部康复。rFPV-ChIFN $\gamma$ S1 免疫组试验鸡只有 1/16 发病, 病程为 1 d, 没有死亡; 而非免疫对照组鸡有 16/16 鸡发病, 病程为 4 d, 有 2/16 鸡死亡, 两者发病率差异极显著( $P < 0.01$ )。死亡鸡剖检都呈现急性 IB 典型病理变化, 而且病变仅限于上呼吸道和肾脏, 具体

表现为上呼吸道充满黏液, 喉头肿胀, 气管有出血点, 肾肿大, 颜色呈土灰色, 类似花斑肾。



1. Protein Marker; 2. CEF Cells infected with rFPV-ChIFN $\gamma$ S1;  
3. CEF Cells infected with S-FPV-017; 4. CEF cells  
图 4 表达 S1 蛋白的 Western blot 分析

Fig 4 Identification of recombinant S1 glycoprotein with Western blot

表 1 不同疫苗免疫组 IBV 强毒攻击后发病和死亡情况

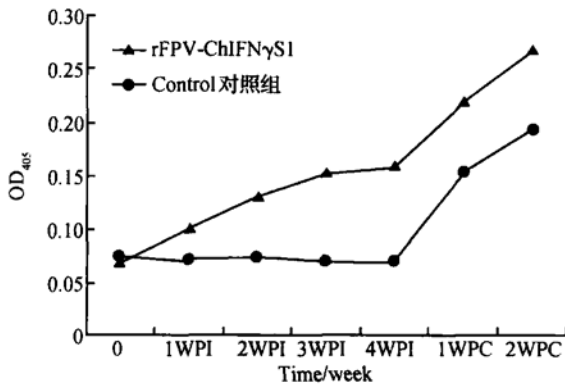
Table 1 Morbidity and mortality of different group after IBV challenge

组别 Group	统计指标 Parameter	攻毒后时间/d Days post-challenge								
		1	2	3	4	5	6	7	1-7	
rFPV-ChIFN $\gamma$ S1	发病数/ 攻毒数 No. diseased/ No. challenged	0 <sup>A</sup> /16 <sup>B</sup>	0/16	0/16	1/16	0/16	0/16	0/16	0/16	1/16
	(死亡数/ 攻毒数) (No. died/ No. challenged)	(0 <sup>C</sup> /16 <sup>B</sup> )	(0/16)	(0/16)	(0/16)	(0/16)	(0/16)	(0/16)	(0/16)	(0/16)
对照 Mock	发病数/ 攻毒数 No. diseased/ No. challenged	0/16	1/16	7/15	6/14	2/14	0/14	0/14	0/14	16/16 <sup>*</sup>
	(死亡数/ 攻毒数) (No. died/ No. challenged)	(0/16)	(0/16)	(1/16)	(1/15)	(0/14)	(0/14)	(0/14)	(0/14)	(2/16) <sup>**</sup>

A. 鸡总数 Total; B. 发病鸡 Morbidity; C. 死亡鸡 Mortality

### 3.7 抗 IBV 抗体的变化

IBV 抗体检测结果如图 5 所示。重组病毒接种以后, 抗体水平上升缓慢, 并且一直偏低, 到攻毒前其最高 OD 值仅为 0.159, 但是在攻毒以后, 免疫组抗体水平明显上升, 攻毒后第 1 周和第 2 周免疫组的抗体水平分别达到 0.218 和 0.267。对照组的抗体水平在攻毒后的前 2 周的抗体水平分别达到 0.154 和 0.193。统计学分析, 两者差异不显著 ( $P > 0.05$ )。



WPI. 免疫后时间; WPC. 攻毒后时间

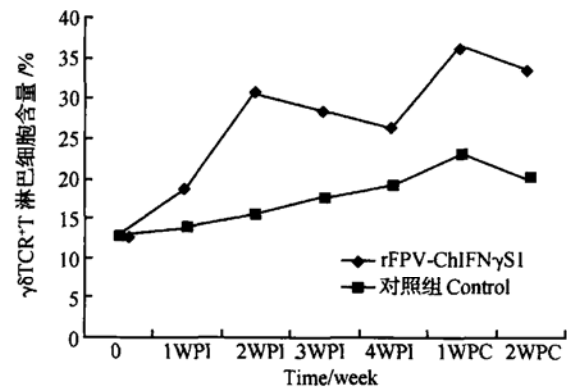
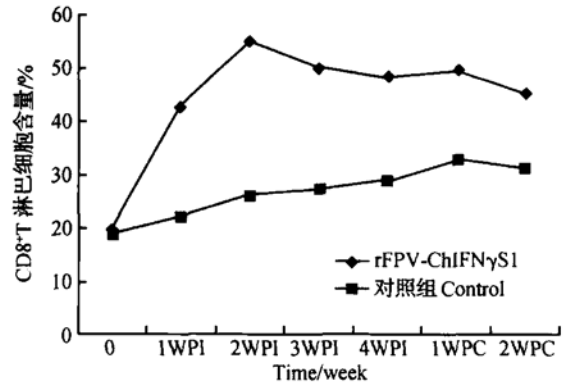
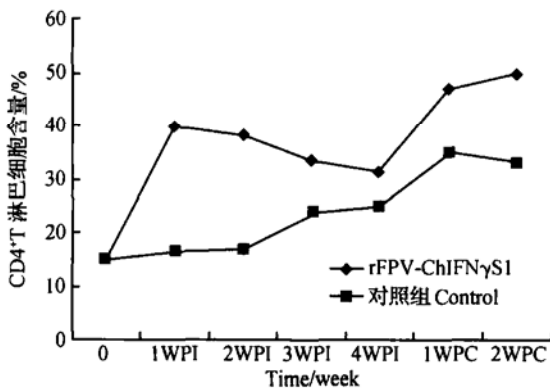
WPI. Weeks post inoculation; WPC. Weeks post challenge

图 5 重组病毒免疫后和 IBV LX4 株攻击后抗体的变化

Fig. 5 Trends for antibody against IBV after inoculation and challenge

### 3.8 外周血免疫细胞的检测

两组试验鸡在接种以后, 外周血 CD4<sup>+</sup>、CD8<sup>+</sup> 和  $\gamma\delta$ TCR<sup>+</sup> 淋巴细胞百分比含量都有不同程度的上升, 在攻毒前有一下降的过程, 在攻毒后 3 种 T 淋巴细胞的百分比含量再次出现上升过程。rFPV-ChIFN $\gamma$ S1 免疫 1 周后, 外周血 CD4<sup>+</sup>、CD8<sup>+</sup> 和  $\gamma\delta$ TCR<sup>+</sup> T 淋巴细胞百分比含量显著 ( $P < 0.05$ ) 高于对照组。如图 6 所示。



WPI. 免疫后时间; WPC. 攻毒后时间

WPI. Weeks post inoculation; WPC. Weeks post challenge

图 6 外周血 CD4<sup>+</sup>、CD8<sup>+</sup> 和  $\gamma\delta$ TCR<sup>+</sup> T

淋巴细胞百分比含量变化

Fig. 6 Alteration of CD4<sup>+</sup>, CD8<sup>+</sup> and  $\gamma\delta$ TCR<sup>+</sup> T lymphocytes in chickens peripheral blood

## 3 讨论

在活载体疫苗的构建过程中, 选择病原体的主要免疫原基因是至关重要的。S1 蛋白是 IBV 最主要的免疫原蛋白, 约为 90 ku, 由 520~ 538 个氨基酸组成, 有 28~ 29 个糖基化位点。在 S1 蛋白上有诱导产生病毒中和活性、血凝抑制性及血清特异性抗体的抗原表位<sup>[12]</sup>, 其 N 端在病毒的组织嗜性和毒力上具有重要作用<sup>[13]</sup>。此外, S1 蛋白可使病毒吸附到细胞膜上, 通过细胞间的融合传播病毒。因此, S1 蛋白在 IBV 疫病防治, 遗传进化方面具有重要意义, 是重组疫苗研究的主要研究对象。1987 年 Tomely<sup>[14]</sup> 用 IBV Beaudette 株的纤突蛋白基因和痘苗病毒 WR 株重组得到了能感染细胞产生 S1 和 S2 亚基糖基化的 180 ku 的多肽前体重组病毒, 该多肽免疫小鼠可产生针对纤突蛋白的抗体, 可中和 IBV 的感染。Binns 等<sup>[15]</sup> 利用痘苗病毒作载体表达

S1 蛋白研制出 IBV 基因工程疫苗, 获得了较高的免疫保护性, 此疫苗在鸡体内复制是无害的, 同时可激发保护性免疫应答。Johnson 等<sup>[16]</sup>将 IBV Vic S 株的 S1 基因插入到禽腺病毒中, 将此重组腺病毒接种 6 日龄的小鸡, 30 d 后攻毒的结果表明, 90% ~ 100% 接种鸡的气管得到保护。上述研究成果, 让人们看到了 IB 基因工程苗的希望。

在禽痘病毒载体疫苗研制过程中人们发现, 干扰素所具有的免疫调节作用具有开发为免疫佐剂的广阔前景。在体外干扰素既可以单独应用于疾病的防治, 又可以与基因工程疫苗联合使用, 增强和改善基因工程疫苗的免疫效果<sup>[7]</sup>。鸡痘病毒基因组中 016 基因编码一种结合并中和鸡 ChIFN $\gamma$  的蛋白, 和以前知道的所有包含纤维结合素 III 型结构域的细胞和痘病毒 ChIFN $\gamma$  受体不一样的是, 鸡痘病毒 ChIFN $\gamma$  结合蛋白包含一个免疫球蛋白结构域, 它和哺乳动物的 ChIFN $\gamma$  受体完全不一样, 它能够逃避宿主的免疫反应<sup>[17]</sup>, 这样就可以利用鸡痘病毒作载体实现干扰素的表达, 而不影响鸡痘病毒本身的复制。而且, 鸡痘病毒基因组结构庞大, 能真实地修饰(如糖基化、磷酸化等)被表达的外源蛋白, 非常适合于外源蛋白的表达。

本研究将鸡 ChIFN $\gamma$  基因和鸡传染性支气管炎病毒 S1 基因同时插入到鸡痘病毒中表达, 通过蓝斑筛选得到纯化的、表达鸡 ChIFN $\gamma$  和 IBV S1 基因的重组鸡痘病毒。用免疫荧光能很好地检测到表达的干扰素蛋白和 S1 蛋白, 这就说明笔者构建的这一重组病毒表达外源基因具有良好的反应原性; 病毒抑制试验的结果证明重组鸡痘病毒表达的鸡 ChIFN $\gamma$  具有抗病毒活性。Western blot 检测 S1 蛋白约为 90 ku, 与其完全糖基化后的理论预期值基本相符。廖明<sup>[18]</sup>, 黄亚东<sup>[19]</sup>等分别在毕赤酵母和昆虫细胞中表达了 IBV 的 S1 基因, 可能是由于 S1 糖蛋白 N-糖基化不完全的问题, 所表达蛋白的相对分子质量小于天然蛋白。在蚀斑纯化重组病毒过程中, 发现重组病毒形成蚀斑的时间和蓝斑出现的时间越来越长, 说明尽管鸡痘病毒编码了一类中和鸡 II 型干扰素的 FPV016 蛋白, 但是 ChIFN $\gamma$  还是在某种程度上对鸡痘病毒产生了影响, 出现这一种作用的确切机制尚待进一步研究。

在动物试验中, 笔者构建的表达 IBV S1 基因和 ChIFN $\gamma$  基因的重组鸡痘病毒疫苗在对鸡体的免疫应答中发挥了一定的作用。虽然在攻毒前, 免疫

组的抗体水平非常低, 但在用 IBV 强毒攻击后可以从鸡的血清中检测到高滴度的 ELISA 抗体。根据这一现象, 推测有两种可能: 一是重组鸡痘病毒疫苗免疫后虽然未能诱导产生高滴度的抗 IBV 抗体, 但起到了诱发基础免疫的作用, 使得鸡体在受到强毒攻击时由于免疫记忆效应, 迅速产生高滴度的抗体从而抵抗了强毒的攻击; 二是该重组鸡痘病毒疫苗免疫诱导产生的细胞免疫应答在抵抗强毒攻击中发挥了一定的作用。重组鸡痘病毒免疫组试验鸡后, 外周血中 CD4<sup>+</sup>、CD8<sup>+</sup>、 $\gamma$ TCR<sup>+</sup> T 淋巴细胞占外周血总淋巴细胞的比例均高于空白对照组, 说明该重组鸡痘病毒在一定程度上激活了机体的细胞免疫系统。

总之, 通过本研究为进一步探索鸡传染性支气管炎基因工程疫苗的免疫效力研究奠定了基础。

致谢: 本研究在设计、实施过程中得到了仇华吉研究员的帮助和指导, 在此表示感谢!

#### 参考文献:

- [1] 许金俊, 朱国强, 许益民, 等. 鸡传染性腺胃炎腺胃病的初步调查[J]. 中国兽医杂志, 1997, 23: 11~ 12.
- [2] Jia W, Karaca K, Parrish C R, et al. A novel variant of avian infectious bronchitis virus resulting from recombination among three different strain [J]. Arch Virol, 1995, 140: 259~ 270.
- [3] Song C S, Lee Y J, Lee C W, et al. Induction of protective immunity in chickens vaccinated with infectious bronchitis virus S1 glycoprotein expressed by a recombinant baculovirus [J]. Journal of General Virology, 1998, 79: 719~ 723.
- [4] Zhou M, Collisson E W. The amino and carboxyl domains of the infectious bronchitis virus nucleocapsid protein interact with 3' genomic RNA [J]. Virus Research, 2000, 67(1): 31~ 39.
- [5] Johnson M A, Pooley C, Ignjatovic J, et al. A recombinant fowl adenovirus expressing the S1 gene of infectious bronchitis virus protects against challenge with infectious bronchitis virus [J]. Vaccine, 2003, 21: 2 730~ 2 736.
- [6] Karaca K, Sharma J M, Winslow B J, et al. Recombinant fowlpox virus coexpressing chicken type I interferon and Newcastle disease virus HN and F genes: influence of IFN on protective efficacy and humoral response of chicken following in ovo or posthatch administration of recombinant virus [J]. Vaccine, 1998, 16 (16): 1 496~ 1 503.

- [7] 周光炎. 免疫学原理[M]. 上海: 上海科学技术文献出版社, 2000. 82~ 120.
- [8] Takehara K, Kobayashi K, Ruttanapumma R, et al. Adjuvant effect of chicken interferon gamma for inactivated *Salmonella* Enteritidis antigen[J]. *Journal of Veterinary Medical Science*, 2003, 65(12): 1337~ 1341.
- [9] 丁忠庆, 刘胜旺, 孔宪刚, 等. 鸡 $\gamma$ 干扰素多克隆抗体的制备[J]. *中国预防兽医学报*, 2002, 24: 104~ 107.
- [10] Sekellick M J, Marcus P I. Induction of high titer chicken interferon[J]. *Method Enzymology*, 1986, 119: 115~ 125.
- [11] Liu S W, Kong X G. A new genotype of nephropathogenic infectious bronchitis virus circulated in vaccinated and non-vaccinated flocks in China[J]. *Avian Pathology*, 2004, 33(3): 321~ 327.
- [12] Kant A, Koch G, Van R D J. Location of antigenic sites defined by neutralizing monoclonal antibodies on the S1 avian infectious bronchitis virus glycopolyptide[J]. *Journal of General Virology*, 1992, 73(3): 591~ 596.
- [13] Kwon H M, Jackwood M W. Molecular cloning and sequence comparison of the S1 glycoprotein of the Gray and JMK strains of avian infectious bronchitis virus[J]. *Virus Genes*, 1995, 9: 219~ 229.
- [14] Tomely F M, Mockett A P A, Bournnell M E G, et al. Expression of the infectious bronchitis virus spike protein by recombinant vaccinia virus and induction of neutralizing antibodies in vaccinated mice[J]. *J Gen Virol*, 1987, 68: 2291~ 2298.
- [15] Binns M M, Bournnell M E G, Tonley F M, et al. Comparison of the spike precursor sequences of coronavirus IBV strain M41 and 6/82 with that of Baudette[J]. *J Gen Virol*, 1986, 67: 2825~ 2831.
- [16] Johnson M A, Pooley C, Ignjatovic J, et al. A recombinant fowl adenovirus expressing the S1 gene of infectious bronchitis virus protects against challenge with infectious bronchitis virus[J]. *Vaccine*, 2003, 21: 2730~ 2736.
- [17] Puehler F, Schwarz H, Waidner B, et al. An interferon-binding protein of novel structure encoded by the fowlpox virus[J]. *The Journal of Biological Chemistry*, 2003, 278(9): 6905~ 6911.
- [18] 廖明, 辛朝安, 王林川. 鸡传染性支气管炎病毒S1基因在昆虫细胞中的表达[J]. *中国兽医学报*, 1997, 17(6): 540~ 543.
- [19] 黄亚东, 郑青, 李校堃, 等. 鸡传染性支气管炎病毒H株纤突蛋白S1基因的克隆及其在毕赤酵母中表达[J]. *病毒学报*, 2003, 19(2): 144~ 148.

## Co-expression of S1 Gene of Infectious Bronchitis Virus and Chicken Type II Interferon Gene in Recombinant Fowlpox Virus

SUN Yong-ke<sup>1,2</sup>, TIAN Zhan-cheng<sup>1</sup>, WANG Yun-feng<sup>1\*</sup>, TONG Guang-zhi<sup>1\*</sup>, ZHI Hai-dong<sup>1</sup>,  
LIU Sheng-wang<sup>1</sup>, WANG Mei<sup>1</sup>, YANG Zeng-qi<sup>2</sup>

(1. *National Key Laboratory of Veterinary Biotechnology, Harbin Veterinary Research Institute, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Harbin 150001, China;*

2. *Northwest Sci-Tech University of Agriculture & Forestry, Yangling 712100, China)*

**Abstract:** In this study, the chicken type II interferon gene (ChIFN $\gamma$ ) and infectious bronchitis virus (IBV) S1 gene were inserted into fowlpox virus transferring vector, for constructing pSY-ChIFN $\gamma$ S1 which contained these two genes. Then by lipofectin, the pSY-ChIFN $\gamma$ S1 was transfected into the chicken embryo fibroblasts (CEF) which was pre-infected with wide type fowlpox virus. After eight times selections of blue plaques on the CEF overlaid using X-gal as substrate, we obtained the purified rFPV-ChIFN $\gamma$ S1 which could express the S1 and ChIFN $\gamma$  protein at the same time. Special antibody to IBV S1 protein can be identified by ELISA about one week after immunization of 28 days SPF chickens with rFPV-ChIFN $\gamma$ S1. The percentages of CD4<sup>+</sup>, CD8<sup>+</sup> and  $\gamma\delta$ TCR positive T lymphocyte in peripheral blood of immune group are remarkably higher than that of Mock. Four weeks after immunization, the two groups were challenged with violent IBV LX4 strain, and only 1/16 chicken appeared light respiratory symptom in rFPV-ChIFN $\gamma$ S1 immunized group, but 16/16 chickens appeared in Mock, and 2/16 chickens died. The result of animal trail showed, rFPV-ChIFN $\gamma$ S1 can protect immunized chickens well.

**Key words:** infectious bronchitis virus; chicken type II interferon; recombinant fowlpox virus

\* Corresponding author