

# 鸡 IL-18 真核表达载体的构建及其对新城疫疫苗免疫增强作用的研究

程相朝<sup>1</sup>, 赵德明<sup>2</sup>, 吴庭才<sup>1</sup>, 李银聚<sup>1</sup>, 张春杰<sup>1</sup>

(1. 河南科技大学动物科技学院, 洛阳 471003; 2. 中国农业大学动物医学院, 北京 100094)

**摘要:** 利用首次从鸡新城疫疫苗接种的鸡胚脾细胞中扩增出的鸡 IL-18 全基因, 构建 IL-18 真核表达载体 (pcDNA<sub>3</sub>-IL18), 并观察其对新城疫疫苗的免疫增强作用。结果表明, 同时接种 pcDNA<sub>3</sub>-IL18 质粒和活疫苗的免疫鸡在接种后 35 d 内, 特别是 15 d 之后所产生的 HI 抗体效价和 T、B 淋巴细胞增殖反应均高于单纯疫苗免疫组及 pcDNA<sub>3</sub> 空白质粒和疫苗联合免疫组。其中, HI 抗体效价在 15 d 时差异显著 ( $P < 0.05$ ), 在 30 和 35 d 时差异极显著 ( $P < 0.01$ ); T 淋巴细胞增殖反应在 15 d 后均表现为差异显著 ( $P < 0.05$ ) 或极显著 ( $P < 0.01$ ); 而单纯疫苗组与空白质粒和疫苗联合免疫组之间的各测定指标则无明显的差异 ( $P > 0.05$ )。在 35 d 时进行攻毒, pcDNA<sub>3</sub>-IL18 和疫苗联合免疫组的保护率为 83.3%, 而单纯疫苗免疫组、空白质粒和疫苗联合免疫组鸡的保护率则分别只有 61.5% 和 66.7%。说明该 pcDNA<sub>3</sub>-IL18 真核表达质粒在鸡体内得到了表达, 表达产物不仅能够显著增强新城疫疫苗所诱导的细胞免疫和体液免疫反应, 而且还可以明显提高疫苗的保护率。

**关键词:** 鸡; IL-18; 真核表达载体; 新城疫疫苗; 免疫增强作用

中图分类号: S852.65<sup>+</sup>9.4

文献标识码: A

文章编号: 0366-6964(2005)05-0476-06

1995 年, Okamura 等<sup>[1]</sup>首次从中毒性休克小鼠的肝脏中分离并克隆出白细胞介素 18 (Interleukin-18, IL-18), 由于它具有诱导 T 细胞和 NK 细胞产生 IFN- $\gamma$ <sup>[2]</sup>, 促进 T 细胞增殖, 增强 Th1 细胞及 NK 细胞的细胞毒活性等多种生物学功能<sup>[3,4]</sup> 及在增强免疫、抗肿瘤等方面所具有的极大的潜在应用价值<sup>[5]</sup>, 已成为近年来人们在细胞因子方面研究的一个热点。但国内对 IL-18 的研究则主要集中于人和鼠方面, 在家禽方面, 仅潘蔚琦等<sup>[6]</sup>于 2003 年从 ConA 刺激活化的白来航鸡脾细胞中克隆到了长约 500 bp 的编码鸡 IL-18 成熟蛋白基因, 更深入的研究目前尚未见有报道。为进一步对 IL-18 基因的结构和功能进行研究, 笔者根据国外发表的鸡 IL-18 的全基因序列设计了 1 对特异性引物, 利用 RT-PCR 技术, 在成功地从鸡新城疫 I 系疫苗接种的鸡胚脾细胞中扩增出 IL-18 全基因的基础上, 进行了 IL-18 真核表达载体的构建, 并观察了该表达载体对鸡新城疫疫苗的免疫增强作用。从而在国内首次完成了鸡 IL-18 全基因的克隆、真核表达载体的构建及对疫苗免疫增强作用的研究。

## 1 材料与方 法

### 1.1 材 料

1.1.1 试验鸡胚 SPF 种蛋购于北京实验动物研究中心, 自孵至所需日龄。

1.1.2 试验用鸡 为洛阳市新安县现代化鸡场提供的 1 日龄健康罗曼雏公鸡, 饲养至所需日龄。

1.1.3 种毒与抗原 新城疫标准强毒 F<sub>48</sub>E<sub>9</sub> 购自中国兽医药品监察所; Lasota 抗原由本研究室自制; 鸡新城疫 I 系疫苗和 IV 系疫苗, 为辽宁益康生物制品厂产品, 批号分别为 2002313 和 2002125。

1.1.4 主要试剂 刀豆蛋白 A (ConA)、乙酸豆蔻佛波醇 (PMA)、四甲基偶氮唑盐 (MTT) 购于郑州宝信生物工程公司; RPMI1640 培养基由洛阳华美生物工程公司提供。ConA、PMA 以 RPMI1640 培养液配制成 1 mg/mL 的溶液, MTT 以 RPMI1640 培养液配制成 5 mg/mL 的溶液, 过滤除菌, -20℃ 保存备用。

1.1.5 载体与受体菌 质粒载体 pMD18-T 购自大连宝生物工程公司; 表达载体 pcDNA<sub>3</sub> 由本室保存; JM109 受体菌购自洛阳华美生物工程公司。

1.1.6 工具酶与主要试剂盒  $\lambda$ DNA/Hind III+ EcoR I Marker/Hind III/Xba I 及 RNA 提取试剂盒均为华美生物工程公司产品; 一步法 RT-PCR 扩

收稿日期: 2003-10-29

基金项目: 河南省中青年骨干教师资助项目(2001193)

作者简介: 程相朝(1966), 男, 河南汝州人, 博士, 教授, 主要从事动物免疫学的教学科研工作

增试剂盒, dNTP、T4DNA 连接酶均购自大连宝生物工程公司。

1.1.7 引物 根据 Schneider 等<sup>[7]</sup>发表的鸡 IL-18 cDNA 基因序列设计了 1 对特异性引物: 上游 5'-AAGCTT ATGAGCTGTGAAGAGATCGCA-3'; 下游 5'-TCATAGGTTGTGCCTTTCATTATGACT-3', 上游引物 5' 端含一 *Hind* III 酶切位点, 由大连宝生物工程公司合成。

## 1.2 方法

1.2.1 鸡胚脾细胞 RNA 的提取 将新城疫 I 系疫苗行 50 倍稀释后, 经尿囊腔途径接种于 11 日龄鸡胚, 0.2 mL/胚, 接种后于 37 °C 孵化箱内继续孵化, 每天照蛋观察, 随时弃去死亡胚。并于接种后 48 h 左右, 取出活胚剖检, 取其脾脏于 1.5 mL 离心管中, 将其轻轻捣碎, 按照 RNA 提取试剂盒的要求进行 RNA 的提取, 以供 RT-PCR 扩增。

1.2.2 IL-18 基因的扩增、克隆与鉴定 按照一步法 RT-PCR 扩增试剂盒的要求, 在 50  $\mu$ L 反应体系中, 加入 10  $\times$  Buffer 5  $\mu$ L, MgCl<sub>2</sub> 10  $\mu$ L, dNTP 混合物 5  $\mu$ L, RNA 酶抑制剂 1  $\mu$ L, 反转录酶 1  $\mu$ L, *Taq* 酶 1  $\mu$ L, 上、下游引物各 2  $\mu$ L, 模板 5  $\mu$ L, ddH<sub>2</sub>O 18  $\mu$ L。经 50 °C 30 min, 94 °C 2 min 后, 以 94 °C 45 s  $\rightarrow$  54 °C 45 s  $\rightarrow$  72 °C 100 s 的参数, 循环 33 次; 再在 72 °C 下延伸 10 min。扩增产物通过 1.5% 琼脂糖凝胶电泳进行检测。回收目的条带进行抽提纯化后, 克隆至 pMD18-T Vector 中, 应用 *Hind* III+*Xba*I 双酶切进行初步鉴定。经筛选的阳性重组质粒(命名为 pMD18-T-IL18) 由大连宝生物工程公司进行序列测定。

1.2.3 IL-18 真核表达载体的构建与鉴定 将筛选的 pMD18-T-IL18 阳性重组质粒和真核表达质粒 pcDNA<sub>3</sub> 分别用 *Hind* III+*Xba*I 双酶切, 分别回收 0.6 kb 的 IL-18 和 5.4 kb 的 pcDNA<sub>3</sub> 片段, 核酸蛋白分析仪定量后按 4:1 混合, 在 T4 DNA 连接酶作用下 16 °C 过夜进行定向连接。按常规方法<sup>[8]</sup>转化至 JM109 感受态菌中。然后应用 *Hind* III+*Xba*I 双酶切进行鉴定, 以筛选阳性重组质粒 pcDNA<sub>3</sub>-IL18。

取酶切鉴定为阳性的 pcDNA<sub>3</sub>-IL18 真核表达质粒, 由大连宝生物工程公司进行测序, 以确定插入片段的核苷酸序列和阅读框架的正确性。

1.2.4 pcDNA<sub>3</sub>-IL18 真核表达质粒对新城疫疫苗免疫增强作用的研究 将 20 日龄的健康雏鸡(其平均 HI 抗体效价为 1.5Log<sub>2</sub>) 150 只随机分成 3 组, 50 只/组。其中, 第 1 组为单纯疫苗免疫组, 将稀

好的新城疫 IV 系疫苗通过滴鼻、点眼的途径接种于试验鸡, 2 头份/只; 第 2 组为联合免疫组, 按第 1 组的方法首先进行疫苗的免疫, 然后将构建的 IL-18 真核表达质粒应用适量生理盐水进行稀释, 多点注射接种(250  $\mu$ g/只)于试验鸡胸部肌肉; 第 3 组为空白质粒对照组, 在应用 2 头份疫苗进行滴鼻、点眼的同时, 将未插入 IL-18 的空白 pcDNA<sub>3</sub> 质粒按同样量于试验鸡胸部肌肉多点注射。3 组鸡均于接种后第 5、10、15、20、25、30、35 天时随机抽取 5 只心脏采血, 分离血清进行 HI 抗体检测, 以观察 HI 抗体的动态变化; 同时, 无菌采取各试验鸡的胸腺、法氏囊制成单细胞悬液, 以 MTT 法进行淋巴细胞增殖试验。并于最后 1 次采血后, 对各组试验鸡应用 F<sub>48</sub>E<sub>9</sub> 标准强毒进行攻击(1000 ELD<sub>50</sub>/只), 攻毒后连续观察 7 d, 记录各组试验鸡的发病、死亡情况。

1.2.5 血清 HI 抗体的检测 应用  $\beta$  微量法对各血清样品进行 HI 抗体的检测。

1.2.6 淋巴细胞增殖试验 按文献[9]介绍的 MTT 法进行。

1.2.6.1 胸腺 T 淋巴细胞增殖试验: 在 96 孔微量培养板上, 取 50  $\mu$ L 胸腺淋巴细胞液于反应孔中(对照孔只加 RPMI1640 培养液), 每个样品加 2 孔, 再加入 50  $\mu$ L ConA 溶液(40  $\mu$ g/mL), 5% CO<sub>2</sub> 培养箱 40 °C 培养 48 h 后, 加入 10  $\mu$ L MTT(5 mg/mL) 继续培养 3 h, 再加入 10% SDS-0.01 mol/L HCl 溶液 100  $\mu$ L, 吹打混匀, 继续培养 2 h 后, 以对照孔调零, 在酶标仪上测定 570 nm 时各孔的 OD 值。

1.2.6.2 法氏囊 B 淋巴细胞增殖试验: 在 96 孔微量培养板上, 取 50  $\mu$ L 胸腺淋巴细胞液于反应孔中(对照孔只加 RPMI1640 培养液), 每个样品加 2 孔, 再加入 50  $\mu$ L PMA(1  $\mu$ g/mL), 5% CO<sub>2</sub> 培养箱 40 °C 培养 21 h 后, 加入 10  $\mu$ L MTT(5 mg/mL) 继续培养 3 h, 再加入 10% SDS-0.01 mol/L HCl 溶液 100  $\mu$ L, 吹打混匀, 继续培养 2 h 后, 以对照孔调零, 在酶标仪上测定 570 nm 时各孔的 OD 值。

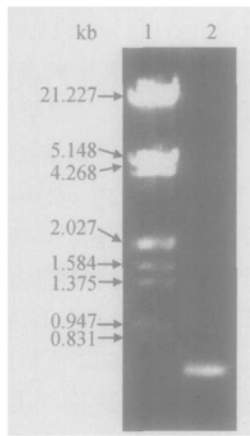
1.2.7 数据处理 应用 SPSS 软件包按方差分析法对不同时间的平均 HI 抗体效价、平均 OD<sub>570</sub> 值进行统计学处理。

## 2 结果

### 2.1 目的基因的 RT-PCR 扩增

应用所设计的特异性引物, 对应用 I 系疫苗接种培养 48 h 左右的活胚脾细胞 RNA 提取物进行

RT-PCR 扩增。扩增出 1 条长约 0.6 kb 的目的片段,与设计大小完全相符(图 1)。



1. 参照 Marker; 2. IL-18 基因扩增产物

1. Marker  $\lambda$ DNA/*Eco*R I + *Hind* III

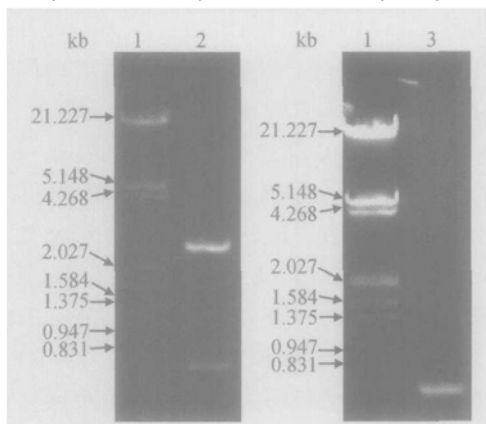
2. PCR products of IL-18 gene

图 1 鸡 IL-18 基因 PCR 扩增产物

Fig. 1 PCR products of IL-18 gene

## 2.2 重组质粒的酶切鉴定

筛选的阳性重组质粒 pMD18-T-IL18 经 *Hind* III 和 *Xba* I 双酶切后,分别切出 1 条长约 2.69 kb 和 1 条与目的基因大小(0.6 kb)基本相符的片段;同时应用相同的引物,从阳性重组质粒中扩增出了与设计结果大小一致(0.6 kb 左右)的特异性片段(图 2)。



1. 参照 Marker; 2. 酶切鉴定; 3. PCR 鉴定

1. Marker  $\lambda$ DNA/*Eco*R I + *Hind* III

2. Identified by digested with *Hind* III 和 *Xba* I ;

3. Identified by PCR

图 2 重组质粒的酶切鉴定和 PCR 鉴定

Fig. 2 Identification of recombinant plasmid

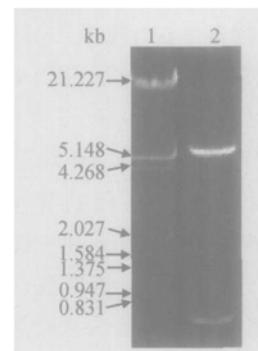
## 2.3 IL-18 基因的序列测定结果及由其推导的氨基酸序列

经鉴定为阳性的克隆,经大连宝生物工程公司

测序,结果片段大小为 594 bp,共编码 198 个氨基酸,其中含有表达完整鸡 IL-18 前体蛋白所必需的起始密码子和终止密码子。其与 Schneider<sup>[7]</sup>报道的鸡 IL-18 全基因序列基本相同,仅有 1 个碱基发生了变化(同源性的 99.8%),但并未导致氨基酸发生变异(同源性的 100%);该序列中编码鸡 IL-18 成熟蛋白的基因序列(从 88 位到 594 位,共编码 169 个氨基酸)与国内潘蔚琦<sup>[6]</sup>报道的成熟蛋白基因序列有一处不同(同源性的 99.8%),即 557 位由 C 变为 T,且此位核苷酸的变化导致了对应的氨基酸也发生了变化,二者同源性的 99.4%。

## 2.4 pcDNA<sub>3</sub>-IL18 重组表达载体的构建与鉴定

将经 *Hind* III 和 *Xba* I 双酶切后的 IL-18 片段与 pcDNA<sub>3</sub> 片段定向连接后,构建成的约 6 kb 的 pcDNA<sub>3</sub>-IL18 重组质粒,经 *Hind* III 和 *Xba* I 双酶切后,可切出大小为 5.4 kb 和 0.6 kb 的 2 条带(图 3),与理论设计完全相符。所筛选的阳性重组质粒经进一步测序后证明所插入片段的核苷酸序列与 pMD18-T-IL18 质粒相应基因的序列完全一致,阅读框架也正确无误。



1. 参照 Marker; 2. 酶切鉴定

1. Marker  $\lambda$ DNA/*Eco*R I + *Hind* III

2. Identified by digested with *Hind* III 和 *Xba* I

图 3 pcDNA<sub>3</sub>-IL18 重组质粒的酶切鉴定

Fig. 3 Identification of pcDNA<sub>3</sub>-IL18

recombinant plasmid

## 2.5 pcDNA<sub>3</sub>-IL18 重组表达质粒对新城疫疫苗免疫增强作用的研究

2.5.1 鸡 IL-18 表达质粒对 HI 抗体的影响 各组试验鸡在免疫接种后的不同时期,其 HI 抗体效价如图 4。由图 4 可见,3 个免疫组的 HI 抗体效价均呈现逐渐上升而后又逐渐下降的过程。其中,IL-18 表达质粒和 IV 系疫苗联合免疫的鸡,其 HI 抗体效价除在接种后第 10 天以前与另 2 组基本相同外,其

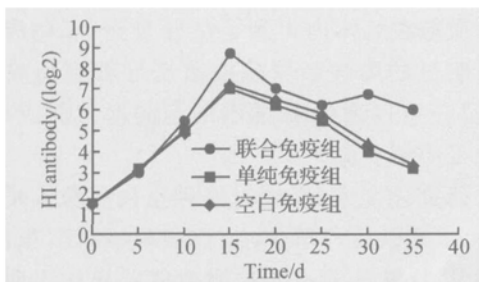


图 4 免疫接种后 HI 抗体动态变化

Fig. 4 The kinetic changes of HI antibody of chicken post-inoculation

它各时期均高于单纯疫苗免疫组和 pcDNA<sub>3</sub> 空白质粒与疫苗联合免疫组, 且在第 15 天时差异显著 ( $P < 0.05$ )、第 30 和 35 天时差异极显著 ( $P < 0.01$ )。而 pcDNA<sub>3</sub> 空白质粒与疫苗联合免疫组在 15 d 以后和单纯疫苗免疫组相比虽也处于稍高的水平, 但这种差异并无明显的统计学意义 ( $P > 0.05$ )。综合说明, IL-18 表达质粒能显著增强新城疫疫苗所诱导的 HI 抗体水平。

2.5.2 鸡 IL-18 表达质粒对胸腺 T 淋巴细胞增殖反应的影响 各试验组鸡在免疫接种后的不同时期 T 淋巴细胞增殖动态见图 5。联合接种 IL-18 质粒组的试验鸡 T 淋巴细胞增殖反应在接种 10 d 后均强于单纯疫苗免疫组和 pcDNA<sub>3</sub> 空白质粒与疫苗联合免疫组, 并在第 15、20 天时差异极显著 ( $P < 0.01$ ); 在第 25、30 和 35 天时差异显著 ( $P < 0.05$ ); 而 pcDNA<sub>3</sub> 空白质粒与疫苗联合免疫组在 15 d 以后和单纯疫苗免疫组相比虽也处于稍高的水平, 但这种差异并无明显的统计学意义 ( $P > 0.05$ )。综合说明 IL-18 表达质粒能明显促进新城疫疫苗诱导 T 淋巴细胞的增殖反应。

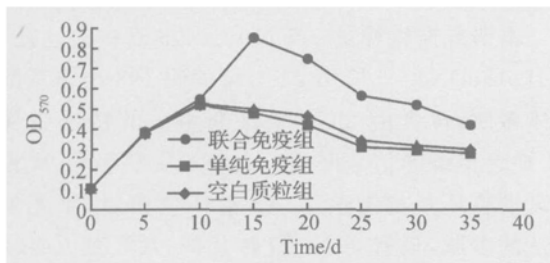


图 5 免疫接种后 T 淋巴细胞增殖动态

Fig. 5 The kinetic changes of T lymphocyte proliferative response of chickens post-inoculation

2.5.3 鸡 IL-18 表达质粒对法氏囊 B 淋巴细胞增殖反应的影响 各组试验鸡在免疫后的不同时期 B 淋巴细胞增殖动态见图 6。各组试验鸡 B 淋巴细胞

增殖反应与 T 淋巴细胞增殖反应规律基本相似。其中, 联合接种 IL-18 质粒组的试验鸡 B 淋巴细胞增殖反应虽然在各时期均高于单纯疫苗免疫组和 pcDNA<sub>3</sub> 空白质粒与疫苗联合免疫组, 但仅在接种后第 15 天时差异显著 ( $P < 0.05$ )。说明 IL-18 质粒也能协同促进新城疫疫苗诱导 B 淋巴细胞的增殖, 但这种作用要弱于对 T 淋巴细胞的作用。而 pcDNA<sub>3</sub> 空白质粒与疫苗联合免疫组所诱导的 B 淋巴细胞增殖反应和 T 淋巴细胞增殖反应一样在 15 d 以后和单纯疫苗免疫组相比虽处于稍高的水平, 但也无明显的统计学意义 ( $P > 0.05$ )。

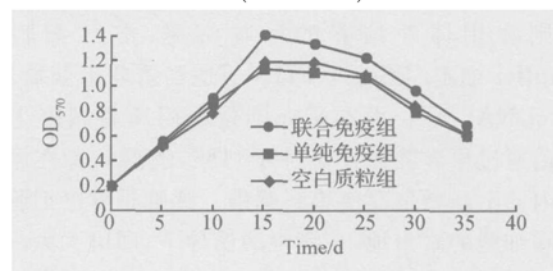


图 6 免疫接种后 B 淋巴细胞增殖动态

Fig. 6 The kinetic changes of B lymphocyte proliferative response of chickens post-inoculation

2.5.4 攻毒试验结果 在免疫接种后第 35 天对各组剩余鸡用 F<sub>48</sub>E<sub>9</sub> 强毒攻击。结果, 疫苗免疫组 13 只试验鸡有 5 只发病, 保护率为 61.5%, 其中 4 只死亡; pcDNA<sub>3</sub> 空白质粒与疫苗免疫接种组 12 只试验鸡在 7 d 观察期内有 4 只发病, 保护率仅为 66.7%, 且有 3 只死亡; 而联合接种 IL-18 质粒和疫苗组的 12 只鸡试验鸡, 仅发病 2 只, 保护率为 83.3%。

### 3 讨论

本研究成功地从新城疫 I 系疫苗接种的罗曼鸡胚脾细胞中扩增出 IL-18 完整基因。酶切鉴定、PCR 鉴定和测序结果均表明所扩增片段的正确性, 该片段长 594 bp, 编码由 198 个氨基酸组成的鸡 IL-18 前体蛋白, 其中含有表达完整 IL-18 前体蛋白所必需的起始密码子和终止密码子, 其与 Schneider<sup>[7]</sup> 报道的鸡 IL-18 全基因序列基本相同, 二者核苷酸和氨基酸的同源性分别为 99.8%、100%; 该序列中编码鸡 IL-18 成熟蛋白的基因序列与国内潘蔚琦<sup>[6]</sup> 报道的源于白来航鸡的成熟蛋白基因序列仅有一处不同(核苷酸同源性为 99.8%), 即 557 位由 C

变为 T, 且此位核苷酸的变化导致了对应的氨基酸也发生了变化(由 S 变化为 F, 二者氨基酸同源率为 99.4%)。导致该处碱基及氨基酸发生变化的原因究竟是鸡 IL-18cDNA 本身存在着多态性, 还是 PCR 过程中的碱基错配, 尚待进一步研究。但根据目前国内外所报道的序列可以说明, 在不同品种的鸡, 其 IL-18 cDNA 的变异并不是很大。

诱导 IL-18 的早期研究主要集中在肝脏, Okamura 等用丙酸菌和 LPS 诱导小鼠并制备内毒素休克小鼠的肝 cDNA 文库, 再从此文库中筛选出 IL-18 cDNA<sup>[11]</sup>, 这就是最早的 IL-18 克隆。后来的研究则多用体外培养的巨噬细胞、淋巴细胞或 Kupffer 细胞经 ConA、PHA 等适当诱导来获取 IL-18 cDNA<sup>[10, 11]</sup>。而本研究则是应用鸡新城疫 I 系疫苗通过尿囊腔途径接种于鸡胚, 随着病毒在尿囊液内的不断增殖而使鸡胚感染。脾脏是淋巴细胞及巨噬细胞的聚集地, 在病毒的诱导下, 即可大大提高鸡胚脾细胞中 IL-18 mRNA 的表达。该方法与体外培养细胞诱导法相比, 具有简便、易行且成本低廉的优点, 从而为鸡 IL-18 cDNA 的扩增及其它细胞因子 cDNA 的扩增提供了一条更为简便、快速、切实可行的新方法。

本研究应用上游引物所设计的 *Hind* III 酶切位点和 pMD18-T 载体上的 *Xba* I 酶切位点, 将 IL-18 基因片段定向连接到 pcDNA<sub>3</sub> 的相应位点, 在国内首次成功地构建了鸡 IL-18 真核表达质粒, 并首次观察了其对新城疫弱毒疫苗的免疫增强作用。结果表明, IL-18 表达质粒与疫苗联合接种试验鸡所产生的 HI 抗体在接种 10 d 后一直高于单纯疫苗免疫组, 且在第 15、30 和 35 天时差异显著 ( $P < 0.05$ ) 或极显著 ( $P < 0.01$ ); 同时, MTT 法检测试验鸡 T、B 淋巴细胞增殖试验表明, 接种 IL-18 质粒的试验鸡胸腺 T 淋巴细胞对 ConA、法氏囊 B 淋巴细胞对 PMA 的反应均强于单纯疫苗免疫组。其中, T 淋巴细胞的增殖反应从接种后第 5 天开始一直高于单免组, 且从第 15 天后, 两组之间均表现为差异显著 ( $P < 0.05$ ) 或极显著 ( $P < 0.01$ ); B 淋巴细胞对 PMA 的增殖反应在接种后也一直高于单纯疫苗免疫组, 但差异较小, 仅在接种后第 15 天时与单免组差异显著 ( $P < 0.05$ ); 攻毒试验表明, 在免疫后第 35 天时应用新城疫强毒 F<sub>48</sub>E<sub>9</sub> 攻击, 单免组的保护率仅为 61.5%, 而同时注射 IL-18 质粒组的保护率为 83.3%, 明显高于单免组。这些足以证明, IL-18 真

核表达质粒在鸡体内得到了良好表达, 表达产物不但具有明显的增强新城疫疫苗诱导细胞免疫的作用, 而且还可以增强 B 淋巴细胞的增殖反应, 提高体液免疫应答反应。

本研究还观察到, 同时接种空白质粒和疫苗组在接种 15 d 以后与单纯疫苗免疫组相比, 虽然 HI 抗体和 T、B 淋巴细胞的检测数值差异均无明显的统计学意义 ( $P > 0.05$ ), 但基本上都处于稍高的水平, 特别是在攻毒试验中, pcDNA<sub>3</sub> 空白质粒与活疫苗联合免疫组的免疫保护率高于单纯活疫苗免疫组, 分别为 66.7 和 61.5%。这和有关资料<sup>[12]</sup>报道的质粒载体不仅只编码特异性的抗原, 载体本身还可发挥免疫佐剂作用的观点相一致。Snato 等<sup>[13]</sup>发现携带细菌氨基青霉素抗性基因的质粒 DNA 诱发的免疫效应远远高于携带卡那霉素抗性基因的质粒 DNA。这是因为氨基青霉素抗性选择基因中含有未甲基化的 CPG 核心的回文结构 5'-AACGTT-3', 该结构可诱导机体单核细胞产生 IL-12, 从而刺激 Th1 等细胞分泌 IFN- $\gamma$ 、IFN- $\alpha$ 、IFN- $\beta$  等, 并可增强自身杀伤细胞的活力。本研究应用的 pcDNA<sub>3</sub> 质粒即含有氨基青霉素抗性基因, 从试验结果可以看出, 它不仅用来编码 IL-18, 而且其本身还具有一定的免疫佐剂作用, 但这种佐剂作用是比较微弱的。

另外, 从 HI 抗体的动态变化和 T、B 淋巴细胞增殖试验的结果还可以看出, IL-18 表达质粒的这种作用在接种后的 10 d 内较弱, 仅在 15 d 后方呈现出明显的免疫增强作用, 说明质粒通过肌肉进入机体后, 需经 10~15 d 以上的时间方可得到良好的表达, 这与资料报道的关于 DNA 疫苗进入机体后诱导机体产生免疫应答反应的时间基本一致<sup>[14]</sup>。

本研究所构建的 pcDNA<sub>3</sub>-IL18 真核表达质粒, 其 IL-18cDNA 全长 594 bp, 可编码 198 个氨基酸的前体多肽, 包含由 29 个氨基酸组成的特殊引导序列, 缺乏传统的信号序列。大量的资料表明, 无论是哺乳动物还是禽类的 IL-18 前体蛋白, 均是无生物活性的多肽, 只有当 IL-1 $\beta$  转化酶 (ICE 或 Caspase 1) 在第 29 位氨基酸 (天冬氨酸 ASP) 位点上水解, 去除含 29 个氨基酸组成的前导序列才能转化为具生物活性的、由 169 个氨基酸组成的鸡 IL-18 成熟肽。这一点, 在哺乳动物 IL-18 的体外研究中已得到了证实<sup>[15]</sup>, 也是本研究未能对该表达质粒在体外进行真核表达并进行活性检测的主要原因。但关于无生物活性的 IL-18 前体蛋白在体内转化为具有生

物活性的成熟肽的具体机制, 目前尚不太清楚, 有待更深层的研究。

### 参考文献:

- [1] Okamura H, Nagata K, Komatsu T, et al. A novel costimulatory factor for gamma interferon induction found in the livers of mice causes endotoxic shock[J]. *Infect Immun*, 1995, 63(10): 3 966~ 3 972.
- [2] Kohno K J, Kataoka T, Ohtsuki Y, et al. IFN-gamma-inducing factor (IGIF) is a costimulatory factor on the activation of Th1 but not Th2 cells and exerts its effect independently of IL-12 [J]. *J Immunol*, 1997, 158: 1 541~ 1 550.
- [3] Micallef M J, Ohtsuki K, Kohno F, et al. Interferon gamma-inducing factor enhances T helper 1 cytokine production by stimulated human T cells: synergism with interleukin 12 for interferon gamma production [J]. *J Eur Immunol*, 1996, 26(7): 1 647~ 1 651.
- [4] Okamura H, Tsutsui H, Komatsu T, et al. Cloning of a new cytokine that induces IFN- $\gamma$  production by T cell [J]. *Nature*, 1995, 378: 88~ 91.
- [5] 蒋定文, 李楚芳, 郭明秋. 白细胞介素 18 及其生物活性 [J]. *国外医学免疫学分册*, 1999, 22(3): 130~ 133.
- [6] 潘蔚琦, 刘胜旺, 孔宪刚, 等. 编码鸡 IL-18 成熟蛋白基因的分子克隆与序列测定 [J]. *中国预防兽医学报*, 2003, 25(2): 114~ 117.
- [7] Schneider K, Puehler F, Baeubler D, et al. cDNA cloning of biologically active chicken interleukin 18 [J]. *J Interferon Cytokine Res*, 2000, 20: 879~ 883.
- [8] 萨姆布鲁克 J, 弗里奇 E F, 曼尼阿蒂斯 T, 等. 分子克隆实验指南 [M]. 第 2 版. 金冬雁, 黎孟枫, 侯云德, 译. 北京: 科学出版社, 1992. 19~ 22.
- [9] 于 莲, 李建荣, 黄耀伟. 鸡白细胞介素 2 增强传染性法氏囊病病毒多聚蛋白疫苗免疫原性的研究 [J]. *生物工程学报*, 2001, 17(6): 652~ 657.
- [10] 张国荣, 赵建增, 陈 涛, 等. 人 IL-18 cDNA 的克隆及其真核表达质粒的构建 [J]. *生物技术通讯*, 1999, 10(4): 254~ 258.
- [11] 傅 奕, 赵惠仁, 裴冬生. 中国人 IL-18 结合蛋白 cDNA 的克隆和序列分析 [J]. *免疫学杂志*, 2000, 16(4): 254~ 257.
- [12] Krieg A M, Yi A K, Matson S, et al. CpG motifs in bacterial DNA trigger direct B-cell activation [J]. *Nature*, 1995, 374: 546~ 549.
- [13] Santo Y, Mark R, Helen T, et al. Immunostimulatory DNA sequences necessary for effective intradermal gene immunization [J]. *Science*, 1996, 272: 352~ 354.
- [14] 张继东, 李淑芳, 杨润德, 等. 中药免疫增强剂对鸡 ILT 疫苗免疫和强毒攻击的影响 [J]. *畜牧兽医学报*, 2003, 34(2): 168~ 171.
- [15] Gu Y, Kuida K, Tsutsui H, et al. Activation of interferon  $\gamma$ , inducing factor mediated by interleukin 1 $\beta$  converting enzyme [J]. *Science*, 1997, 275: 206~ 209.

## Construction of Eukaryotic Expression Plasmids Encoding Chicken IL-18 Gene and Study on Its Immunoenhancement on Newcastle Disease Vaccine

CHENG Xiang-chao<sup>1</sup>, ZHAO De-ming<sup>2</sup>, WU Ting-cai<sup>1</sup>, LI Yi-ran<sup>1</sup>, ZHANG Chun-jie<sup>1</sup>

(1. Animal Science and Technology College, Henan University of Science and Technology, Luoyang 471003, China; 2. College of Veterinary Medicine, China Agricultural University, Beijing 100094, China)

**Abstract:** Complete chicken IL-18 gene were amplified firstly by RT-PCR from spleen cells of chicken embryo inoculated with Newcastle disease virus. The gene were inserted into pcDNA<sub>3</sub> vector, resulting in the construction of pcDNA<sub>3</sub>-IL18 plasmid. Immunoenhancement effects of the pcDNA<sub>3</sub>-IL18 plasmids on Newcastle disease vaccine were observed by the test of HI antibody, proliferation response of the T lymphocytes from thymus and the B lymphocytes from bursa of Fabricius. The results indicated that chicken IL-18 have obvious immunoenhancement effect on Newcastle disease vaccine. It can not only enhance the cell mediated immune response obviously, but also enhance the humoral response, thus improve the protective rate of ND vaccine.

**Key words:** chicken; IL-18; eukaryotic expression plasmids; immunoenhancement; Newcastle disease vaccine