

柔嫩艾美耳球虫重组鸡痘病毒的构建与免疫保护研究*

杨桂连^{1,2)} 李建华¹⁾ 张西臣^{1)**} 赵 权²⁾ 尹继刚¹⁾

(¹⁾吉林大学畜牧兽医学院, 长春 130062; ²⁾吉林农业大学动物科学技术学院, 长春 130118)

摘要 以鸡柔嫩艾美耳球虫 (*E. tenella*) 杂交株 F2 的 RNA 为模板, 应用反转录聚合酶链式反应 (RT-PCR) 技术扩增了杂交株 F2 的 Rhomboid 蛋白家族相关基因, 将 PCR 产物克隆至 pMD18-T 载体中, 构建出克隆质粒 pMD-Rhomboid. 以 *Kpn* I、*Pst* I 双酶切重组质粒 pMD-Rhomboid 和鸡痘病毒载体质粒 pUTA2, 并将纯化的 Rhomboid 基因亚克隆至鸡痘病毒载体 pUTA2 复合启动子下游, 构建出真核表达重组质粒 pUTA-Rhomboid. 采用脂质体转染技术, 将该质粒转染 FPV 282E4 株感染的鸡胚成纤维细胞 (CEF) 中, 通过 BrdU 药物加压筛选, 并通过 RT-PCR 和蛋白质印迹等方法检测, 筛选出一株球虫鸡痘重组病毒 rFPV-Rhomboid. 进一步经 CEF 扩增病毒后, 免疫雏鸡, 监测免疫指标. 结果表明: 重组病毒接种鸡外周血中的 CD4⁺、CD8⁺ 含量显著高于非免疫对照组 ($P < 0.05$); 与对照组相比, 重组病毒对鸡的增重效果差异显著 ($P < 0.05$), 对 *E. tenella* 的攻击具有一定的保护作用, 显示出较好的应用前景.

关键词 柔嫩艾美耳球虫, 重组鸡痘病毒, 构建, 表达, 免疫保护

学科分类号 S852.72

鸡球虫病是由艾美耳属球虫引起的以肠道病变为主的细胞内寄生虫病, 是危害现代化养鸡业的重大的疾病^[1]. 目前控制球虫病主要依赖抗球虫药物, 但近年来抗药性虫株的不断涌现大大降低了药物的效力, 而且此问题日趋严重. 同时, 抗球虫药物的残留问题大大限制了它们的使用范围^[2]. 因此, 人们把目光放在用免疫学的方法来预防球虫病. 应用球虫活苗控制鸡球虫病已有多年历史. 但由于活苗自身存在的一些缺陷, 使其未被广泛地开发应用. 所以研制新型、安全的球虫基因工程疫苗对于球虫病的防治具有重要意义.

鸡痘病毒 (fowlpox virus, FPV) 是继痘苗病毒 (vaccinia virus, VV) 之后又一种重要的动物病毒表达载体, 它具有严格的宿主特异性和生物安全性, 从而使它成为禽类病原基因工程活载体疫苗研制过程中的一种应用极为广泛的工具. 同时它在其他哺乳动物乃至人类病原基因的表达方面也显示了独特的优越性及广阔的开发和应用前景. 到目前为止, 已有多种外源基因在鸡痘病毒中获得了表达, 用携带有外源基因的重组鸡痘病毒免疫动物取得了良好的免疫效果^[3~8]. 但还未见利用鸡痘病毒作为载体表

达球虫保护性抗原基因的报道.

我们在构建 *E. tenella* cDNA 表达文库和制备子孢子阶段特异性单抗的基础上, 用免疫学方法筛选出一个新基因, 蛋白质结构域预测显示它是 Rhomboid 蛋白家族的新成员, 命名为 Rhomboid 蛋白家族相关基因 (以下简称 Rhomboid 基因), 并登录 GenBank (DQ323509)^[9]. Rhomboid 家族成员在表皮生长因子受体 (epidermal growth factor receptor, EGFR) 的信号传递网络调节过程中起着非常重要的作用^[10~13]. 而 Rhomboid 蛋白家族功能及其信号转导机制的研究是国际研究的前沿, 并且在寄生虫方面的研究也刚刚起步^[14,15]. 因此, 将该基因进行表达, 对下一步研究该基因的结构以及在球虫侵入机制具有重要的意义.

本试验选用鸡痘病毒 pUTA2 作为表达载体, 将 RT-PCR 扩增得到的 *E. tenella* 杂交株 F2 Rhomboid 基因完整开放阅读框架 (ORF) 插入 pUTA2 的复合启动子 (ATI-P7.5 × 20) 下游, 构建

*国家自然科学基金资助项目 (30170696)

** 通讯联系人. Tel: 0431-7836155, Fax: 0431-7981351

E-mail: zhangxic@public.cc.jl.cn

收稿日期: 2006-05-12, 接受日期: 2006-07-04

重组鸡痘病毒载体转移质粒 pUTA-Rhomboid, 并与鸡痘病毒 282E4 株共转染 CEF, 通过药物 5-溴-2-脱氧尿苷 (BrdU) 加压筛选、进一步采用 RT-PCR、间接免疫荧光 (IFA) 以及蛋白质印迹等方法检测筛选出鸡痘重组病毒. 最后将筛选出的球虫鸡痘重组病毒 (rFPV-Rhomboid) 免疫雏鸡, 进行免疫指标的检测. 结果表明, 与对照组相比, rFPV-Rhomboid 对 *E. tenella* 有较好的保护效果. 从而为应用球虫重组鸡痘病毒防治鸡球虫病做出了有益的探索.

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 虫株、质粒、病毒. *E. tenella* 杂交株 F2 纯种孢子化卵囊为吉林大学畜牧兽医学院培育并保存; 鸡痘病毒载体质粒 pUTA2 和 FPV 282E4 野生毒株由中国军事医学科学院十一所基因工程重点实验室提供.

1.1.2 主要试剂. ExTaq DNA 聚合酶、pMD18-T 载体、*Kpn* I、*Pst* I 限制性内切酶购自 TaKaRa 公司; Oligo(dT)、AMV 反转录酶、IPTG 和 X-gal 均购自 Promega 公司; Trizol 试剂、MEM、BSA、脱脂乳、TEMED、过硫酸胺等购自 GIBCO 公司; 琼脂糖凝胶回收试剂盒为杭州维特洁公司产品; 脂质体 Lipofectamine 2000 购自 Invitrogen 公司; BrdU 购自 Boehringer Mannheim 公司; 辣根过氧化物酶标记鼠抗鸡 IgG 购自华美生物工程公司; 醋酸纤维素膜为 Whatman 公司产品; PE 标记的鼠抗鸡 CD4⁺ 单抗、FITC 标记的鼠抗鸡 CD8⁺ 单抗购自 Southern Biotech Associates, Inc; 其他试剂为分析纯试剂.

1.1.3 试验动物. 刚孵出的 AA 肉鸡, 饲养于无球虫环境中, 自由采食和饮水.

1.2 方法

1.2.1 Rhomboid 基因扩增与克隆. 根据 GenBank 中 *E. tenella* Rhomboid 基因(DQ323509)的核酸序列设计 PCR 引物(由大连 TaKaRa 公司合成). P1: 5' CGGTACCATGTCGGACATCGAATCCCAGAGAG 3'; P2: 5' CTGCAGTTATGCGCATCCCATGGGCAAAGG 3'(划线序列分别为 *Kpn* I、*Pst* I 酶切位点). 扩增并纯化 *E. tenella* 杂交株 F2 卵囊, 按 Trizol 试剂盒方法提取卵囊总 RNA. 以总 RNA 为模板, P1、P2 为引物, 对 Rhomboid 相关基因进行 RT-PCR 扩增. 50 μ l 反转录反应体系及反应条件

如下: 取 10 μ l mRNA, 75 $^{\circ}$ C 加热 5 min, 使双链 RNA 变性, 迅速置于冰上冷却后, 再加入 5 $\times$ AMV 缓冲液 10.0 μ l, dNTPs 4.0 μ l, RNasin 1.0 μ l, 下游引物 0.5 μ l, AMV (5 U/ μ l) 0.5 μ l; Olig(dT) 1.0 μ l, MgCl₂ (25 mmol/L) 4.0 μ l, 加 DEPC 处理的水 19.0 μ l. 42 $^{\circ}$ C 反转录 1 h, 95 $^{\circ}$ C 煮沸 5 min 灭活 AMV 反转录酶. 50 μ l PCR 反应体系如下: 取 10 $\times$ PCR 缓冲液 5.0 μ l, dNTPs 3.0 μ l, 上游引物 1.0 μ l, 下游引物 1.0 μ l, cDNA 5.0 μ l, RNasin 1.0 μ l, MgCl₂ 2.0 μ l, EX Taq DNA 聚合酶 0.5 μ l, 补 DEPC 处理水至 50 μ l. 反应条件为: 94 $^{\circ}$ C 预变性 5 min, 94 $^{\circ}$ C 变性 1 min, 57 $^{\circ}$ C 退火 45 s, 72 $^{\circ}$ C 延伸 1 min, 30 个循环后, 72 $^{\circ}$ C 再延伸 10 min. PCR 产物经纯化后, 与 pMD18-T 载体连接, 转化至感受态 *E. coli* DH5 α 中. 通过 α -互补法、酶切分析及 PCR 扩增鉴定重组克隆, 获得重组质粒 pMD-Rhomboid. 并送至大连 TaKaRa 公司进行测序, 并应用 DNASTAR 软件进行分析.

1.2.2 重组鸡痘病毒载体的构建与 Rhomboid 基因的表达.

a. 重组鸡痘病毒载体的构建. 对 pMD-Rhomboid 和鸡痘病毒载体质粒 pUTA2 均以 *Kpn* I、*Pst* I 双酶切(具体构建过程见图 1), 切胶纯化后, 以 T4 DNA 连接酶连接. 连接产物转化至感受态 *E. coli* DH5 α , 挑取单个转化菌落接种于 5 ml LB (含 50 mg/L AMP) 培养基中, 碱裂解法小量提取质粒 DNA. 最后通过酶切鉴定筛选重组病毒载体质粒 pUTA-Rhomboid.

b. 鸡痘病毒细胞内同源重组. 用 10 日龄 SPF 鸡胚制备鸡胚成纤维细胞(CEF)^[16], 置 37 $^{\circ}$ C, 5% CO₂ 培养箱中培养. 取 70%~80%融合单层 CEF 细胞, 按 0.1 感染复数(MOI) 接种 FPV 282E4 株, 37 $^{\circ}$ C, 5% CO₂ 吸附 2 h. 同时, 向 85 μ l MEM 中加入 15 μ l lipofectamine2000, 轻轻混匀, 另取 50 ml MEM 加入 20 μ g 重组质粒混匀, 并将其滴加于前一液体中轻轻吹打混匀, 室温下作用 30 min 以上. 待病毒吸附后, 将上述混合液加到单层细胞上, 37 $^{\circ}$ C, 5% CO₂ 培养 12 h, 然后每孔补加 MEM 完全培养液, 继续培养 120 h, CEF 75%出现病变收获病毒, -70 $^{\circ}$ C 保存^[17].

c. 重组鸡痘病毒的筛选. 在接种病毒前向单层 CEF 的 MEM 培养液中加入 BrdU, 使其终浓度为 40 mg/L. 12 h 后吸去培养液, 接种共转染后收获的病毒, 用含 BrdU 的 MEM 培养液 37 $^{\circ}$ C 吸附 1.5 h,

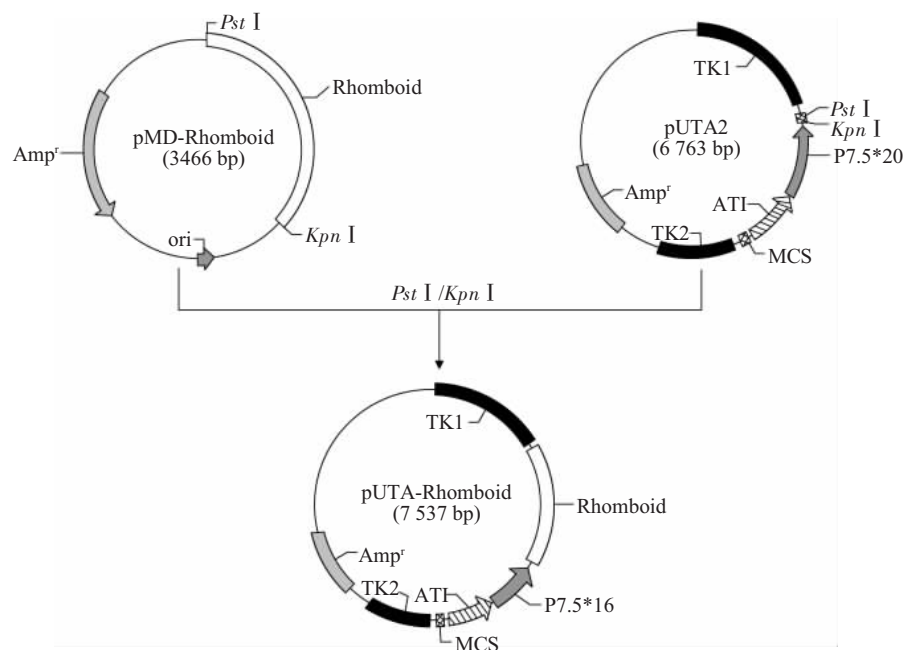


Fig. 1 Construction of recombinant fowlpox virus vector pUTA-Rhomboid

观察出现细胞病变收获细胞. 经过 3 次 BrdU 加压筛选后, 将收获的重组病毒再接种 CEF, 在无 BrdU 的 MEM 培养, 挑选单个病毒蚀斑, 并进行 3 次蚀斑纯化、扩增^[17].

d. 重组鸡痘病毒的 RT-PCR 鉴定. 提取细胞总 RNA, 利用特异引物(P1、P2)进行 RT-PCR 扩增, 进行琼脂糖凝胶电泳, 观察出现的条带是否与目的条带大小一致.

e. 间接免疫荧光(IFA)鉴定重组病毒. 将初步筛选并纯化的重组病毒接种于玻片的融合单层 CEF 上, 同时设 FPV 野生毒株感染细胞和正常细胞对照. 在 37℃, 5% CO₂ 条件下吸附培养 2 h, 继续培养至细胞出现明显病变后, 取出玻片, 将玻片置于玻璃器皿中, 用 PBS (pH 7.2) 或 PBS 洗涤缓冲液洗 1 次, 100%丙酮固定 15 min, 再用 PBS 冲洗 3

次后, 以鸡抗 *E. tenella* 多克隆抗体为第一抗体, FITC 标记的鼠抗鸡 IgG 为第二抗体, 用 PBS 100 倍稀释. 室温干燥后滴加碳酸缓冲甘油封片, 荧光显微镜下观察和拍照.

f. 蛋白质印迹检测. 表达产物经 SDS-PAGE 后, 用 BIO-RAD 电转移系统转移至硝酸纤维素膜上, 经 BSA 封闭后, 依次加入鸡抗 *E. tenella* 多克隆抗体、辣根过氧化物酶标记鼠抗鸡 IgG, 最后在联苯胺溶液中显色并观察结果.

1.2.3 重组病毒的免疫保护效果检测. 所有 AA 肉鸡试验前进行粪便检验,确认无球虫感染. 7 日龄时, 将其随机分为 7 组(免疫 I ~ V 组, 阳性对照即红对照组, 阴性对照即白对照组), 每组 20 只. 免疫剂量和程序详见表 1. 于第二次免疫后攻虫前, 每组鸡逐只翅静脉采血, 1 ml 血样加 100 μl 2% Na₂

Table 1 Experimental design and immune programme

Group	Treatment	7 days old (each chicken)	14 days old (each chicken)	21 days old (oocysts each chicken)
I	rFPV-Rhomboid	10 ² PFU	10 ² PFU	5×10 ⁴
II	rFPV-Rhomboid	10 ³ PFU	10 ³ PFU	5×10 ⁴
III	rFPV-Rhomboid	10 ⁴ PFU	10 ⁴ PFU	5×10 ⁴
IV	FPV 282E4	10 ³ PFU	10 ³ PFU	5×10 ⁴
V	pUTA2	100 μg	100 μg	5×10 ⁴
VI	Positive control(red control)	PBS	PBS	5×10 ⁴
VII	Negative control (white control)	PBS	PBS	PBS

Positive control: the chickens were challenged with *E. tenella* but not immuned. Negative control: the chickens were not challenged with *E. tenella* and not immuned.

EDTA制成抗凝血,混匀后,每20 μl 加入2 μl FITC 标记的抗 CD8⁺ 单抗和2 μl PE 标记的抗 CD4⁺ 单抗,置4℃30 min,取出后经荧光洗液洗2遍后,加入0.5 ml 荧光保存液,用流式细胞仪检测 CD4⁺、CD8⁺ 淋巴细胞的水平.所有免疫组和红对照组在21日龄以 5×10^4 个/只剂量口服纯种 *E. tenella* 杂交株 F2 孢子化卵囊.攻虫后第7天宰杀.整个试验过程中进行每克粪便卵囊计数(OPG)、盲肠病变记分^[18]、增重测定,并计算免疫保护率=(红对照组攻虫 OPG-免疫组攻虫 OPG)/红对照组攻虫 OPG $\times 100\%$.

2 结 果

2.1 RT-PCR 产物电泳和 Rhomboid 基因 ORF 核苷酸序列测定及分析

PCR 产物经0.8%琼脂糖凝胶电泳鉴定,获得特异性的目的条带,片段大小与预期大小(774 bp)一致.表明从 *E. tenella* F2 杂交株成功扩增完整的 Rhomboid 基因 ORF. DNASTAR 软件表明,ORF 含774个核苷酸,(C+G)% = 50.13%,编码257个氨基酸.推测分子质量(M)为28.4 ku.含有19个强碱性氨基酸(K, R),16个强酸性氨基酸(D, E),117个疏水性氨基酸(A, I, L, F, W, V),54个极性氨基酸(N, C, Q, S, T, Y).与吉林大学畜牧兽医学院研究人员先前发表的核苷酸序列(DQ323509)完全相同,同源率为100%.

2.2 重组质粒 pMD-Rhomboid 的鉴定

用 *Kpn* I、*Pst* I 对重组质粒 pMD-Rhomboid 进行双酶切鉴定,所获得的酶切片段大小与理论值相符.

2.3 重组鸡痘病毒载体 pUTA-Rhomboid 的酶切鉴定

重组质粒 pUTA-Rhomboid 经 *Kpn* I 和 *Pst* I 双酶切后,分别得到6.7 kb和0.7 kb左右的片段,如图2所示.酶切鉴定结果表明成功构建了重组鸡痘病毒表达载体 pUTA-Rhomboid.

2.4 重组病毒 rFPV-Rhomboid 的 IFA 检测

荧光显微镜下可见重组病毒感染细胞表面有绿色荧光物质存在,而对照组 FPV 野生毒株感染细胞和正常细胞表面未见荧光物质.结果见图3.

2.5 重组病毒 rFPV-Rhomboid 的蛋白质印迹检测

检测结果见图4.从图4的A中可以看出,在28 ku处可见一特异性显色带,表明 Rhomboid 基因在重组鸡痘病毒 rFPV-Rhomboid 里得到正确

表达.

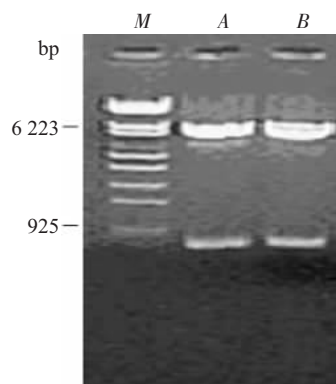


Fig. 2 Identification of recombinant fowlpox virus vector pUTA-Rhomboid by restriction enzyme digestion

M: λ -EcoT14 I digest marker; A,B: pUTA-Rhomboid (*Kpn* I、*Pst* I).

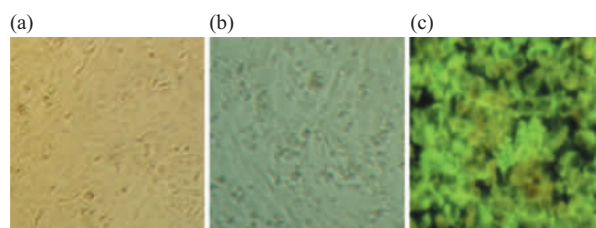


Fig. 3 Detection of recombinant fowlpox virus by indirect immunofluorescence assay

(a) CEF was cultured in MEM. (b) CEF was cultured in MEM with FPV. (c) CEF was cultured in MEM with rFPV-Rhomboid.

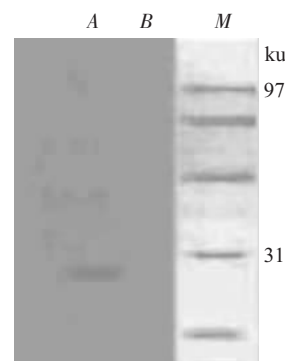


Fig. 4 Western blotting analysis of recombinant FPV rFPV-Rhomboid

A: rFPV-Rhomboid; B: FPV(negative control); M: Low molecular mass protein marker.

2.6 重组病毒 rFPV-Rhomboid 的免疫保护效果

2.6.1 攻虫后临床症状观察及每克粪便卵囊数(OPG)计数 -OPG 值.在攻虫后第5天,红对照组和免疫组Ⅳ、Ⅴ出现血便,并且精神萎靡,食欲下降,出现球虫感染症状.而免疫组Ⅰ、Ⅱ、Ⅲ精神状态较好,无便血现象.与红对照组和免疫组Ⅳ、

V 相比, 免疫组每天排出卵囊数量较少, 排卵囊持续时间较短. OPG 值随免疫剂量的增大而降低, 免疫 I、II 组之间差异显著($P < 0.05$)但免疫 II、III 组之间差异并不显著($P > 0.05$). 详细数值见表 2.

Table 2 Protective effectiveness of recombinant FPV against challenge with *E. tenella*

Groups	Average body weight gains $\Delta W1/g$	Average body weight gains $\Delta W2/g$	Average body weight gains $\Delta W/g$	Lesion scores	OPG (10^5 oocysts each chicken)	Protection ratio /%
I	115.9 $\pm$ 2.3 ^A	267.4 $\pm$ 6.9 ^A	410.4 $\pm$ 6.5 ^A	1.24 $\pm$ 0.08 ^A	6.34 $\pm$ 0.36 ^A	67.5
II	129.8 $\pm$ 2.0 ^B	270.8 $\pm$ 6.7 ^{AB}	421.1 $\pm$ 8.9 ^B	1.10 $\pm$ 0.06 ^B	5.63 $\pm$ 0.28 ^B	71.1
III	127.8 $\pm$ 3.1 ^B	271.2 $\pm$ 6.3 ^{AB}	418.7 $\pm$ 8.5 ^B	1.11 $\pm$ 0.07 ^B	5.61 $\pm$ 0.36 ^B	71.2
IV	32.2 $\pm$ 2.4 ^C	135.9 $\pm$ 5.7 ^D	190.7 $\pm$ 3.6 ^C	3.95 $\pm$ 0.08 ^C	22.47 $\pm$ 0.77 ^C	—
V	46.5 $\pm$ 1.2 ^D	266.4 $\pm$ 7.9 ^A	320.6 $\pm$ 4.4 ^D	3.57 $\pm$ 0.09 ^D	19.61 $\pm$ 0.36 ^D	—
VI	47.2 $\pm$ 0.8 ^D	277.4 $\pm$ 4.7 ^{BC}	321.4 $\pm$ 4.4 ^D	3.56 $\pm$ 0.09 ^D	19.52 $\pm$ 0.35 ^D	—
VII	139.3 $\pm$ 0.9 ^E	283.4 $\pm$ 2.7 ^C	425.4 $\pm$ 2.8 ^B	—	—	—

Mean gain weight ΔW represent difference between the weight of chicken killed and the weight of chicken immuned first time. Mean gain weight $\Delta W1$ represent difference between the weight of chicken killed and the weight of chicken challenge by *E. tenella*. Mean gain weight $\Delta W2$ represent difference between the weight of chicken challenged by *E. tenella* and the weight of chicken immuned first time. Relative oocyst production represent proportion between the number of immunity group and the number of positive control group. All datas were analyzed by SPSS software. A, B, C, D, E represent the results that data statistics, it was different significantly among the data that different letter represented.

2.6.2 增重效果与盲肠病变记分. 在攻虫前后称重, 检测免疫前后的体重增长情况, 可以间接地检测重组病毒的免疫效果. 由表 2 可见, 对平均增重 $\Delta W2$ 而言, 免疫组 I、II、III 均无显著差异 ($P > 0.05$), 说明重组病毒免疫不会影响鸡的正常增重; 对平均增重 $\Delta W1$ 而言, 红、白对照差异极显著 ($P < 0.01$), 说明试验虫种正常, 有较强的感染力; 对于平均增重 ΔW , 免疫组 I、II、III 鸡的增重效果与红对照组相比差异极显著 ($P < 0.01$), 免疫组 II、III 与免疫组 I 相比差异显著 ($P < 0.05$), 但免疫组 II、III 之间差异不显著 ($P > 0.05$). 对于盲肠病变记分, 免

疫组 I、II、III 组与红对照组比较, 差异较显著 ($P < 0.05$), 免疫组 II、III 之间差异不显著 ($P > 0.05$); 免疫组 IV 病变记分显著高于红对照组 ($P < 0.05$).

2.6.3 细胞免疫水平——CD4⁺、CD8⁺ T 淋巴细胞数量变化. 通过流式细胞仪检测鸡外周血液中 CD4⁺、CD8⁺ T 细胞水平, 结果见图 5. 结果表明, 免疫组 I、II、III CD4⁺ 和 CD8⁺ 在血液中的含量均显著高于红白对照组 ($P < 0.01$), 其中免疫组 I 与免疫组 II、III 差异较显著 ($P < 0.05$), 免疫组 II、III 之间差异不显著 ($P > 0.05$).

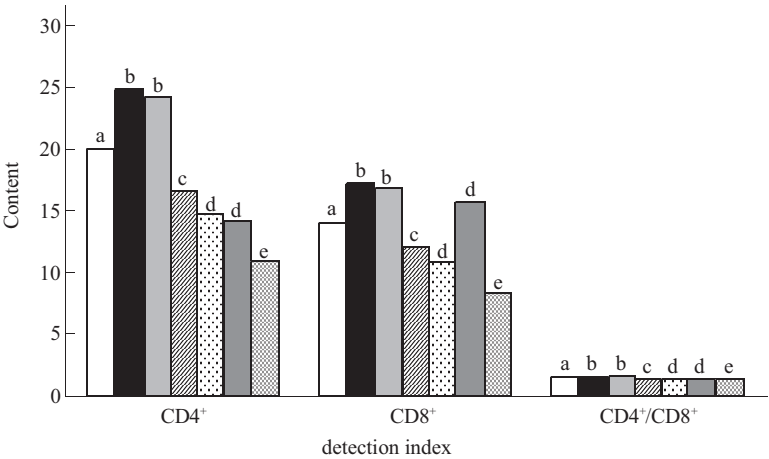


Fig. 5 Changes of CD4⁺, CD8⁺ T Lymphatic cell in peripheral blood of chicken

□: Immunity group I; ■: Immunity group II; ▒: Immunity group III; ▨: Immunity group IV; ▩: Immunity group V; ■: Positive control(red control); □: Negative control(white control). a, b, c, d, e represent the results that data statistics, it was different significantly among the data that different letter represented.

3 讨 论

1989年 Danforth 等^[19]首次用大肠杆菌表达 *E. tenella* 的 5401 基因, 证明其对 *E. tenella* 的攻击有部分免疫保护作用, 表现为增重和饲料转化率明显提高, 掀起了用分子生物学手段预防鸡球虫病的先河. 但到目前为止, 通过基因重组技术产生的鸡球虫重组抗原种类并不多, 仅有 10 余种, 其中经免疫保护试验检测, 效果较为显著的仅有 CheYSO7、GX3262、Mzp5-7、TA4、P250 5 种. 究其原因是因为以往所采用的表达载体表达效率不高以及表达的抗原蛋白不能如实地修饰等原因所致.

鸡痘病毒载体作为表达载体具有其他载体无可比拟的优势, 如: 基因组较为庞大, 能容纳较大的外源基因^[20]; 外源蛋白可被正确地表达, 并在感染细胞中得到如实地修饰(糖基化、羧基化等); 外源基因表达产物具有良好的免疫原性, 可诱导机体产生持续时间较长的细胞免疫和体液免疫; 严格的胞浆内复制, 避免了病毒基因重组入宿主细胞染色体的可能性, 消除了重组病毒应用后对人畜的潜在威胁^[21,22]. 此外, 本研究以人工合成的痘苗病毒突变型 p7.5 启动子和牛痘病毒 A 型包涵体(ATI)启动子, 串联成的启动子为外源基因的启动子, 大大提高了外源基因的表达量.

本研究将 Rhomboid 蛋白家族相关基因插入到鸡痘病毒载体复合启动子下游, 在 CEF 内与 282E4 株病毒进行同源重组, 将筛选获得的重组病毒免疫雏鸡来评价重组鸡痘病毒疫苗的免疫效果, 以期获得安全、有效的重组鸡痘疫苗. 结果表明: 3 个剂量组的重组病毒均能较好地抵御 *E. tenella* 引起的球虫病, 经重组病毒免疫鸡盲肠病变记分均小于 1.5, 同时具有良好的增重效果. 通过检测细胞免疫水平——CD4⁺、CD8⁺T 淋巴细胞数量变化, 免疫组 CD4⁺ 和 CD8⁺ 在血液中的含量均显著高于红、白对照组. 但 10³ PFU/ 只和 10⁴ PFU/ 只剂量组对抵抗 *E. tenella* 的作用差异不显著 ($P > 0.05$), 这可能与剂量的加大引起的免疫耐受有关. 以 10² PFU/ 只的剂量免疫雏鸡, 就可以保护试验鸡免受 *E. tenella* 的攻击, 说明此重组疫苗具有免疫剂量低的特点. 在上述免疫保护试验中, rFPV-Rhomboid 的免疫接种剂量和免疫途径参考国内外有关资料及本研究室已有经验确定^[23]. 有关重组病毒的最佳免疫剂量和免疫途径、免疫保护期以及野

生型鸡痘病毒的感染, 是否会对重组病毒的免疫效力产生干扰等方面的研究正在深入进行中. 但上述结果已初步表明: 本研究所筛选的球虫鸡痘重组病毒可以很好地激活鸡体的细胞免疫, 对球虫感染具有较好的保护效果. 为进一步研究 Rhomboid 蛋白家族相关基因的免疫原性和功能奠定了基础, 在应用鸡痘病毒表达载体表达球虫保护性抗原基因、构建多价球虫重组病毒方面做了一个尝试, 从而也为将来应用球虫鸡痘重组病毒预防鸡球虫病做出了有益的探索.

参 考 文 献

- 1 索 勋, 李国清. 鸡球虫病学. 北京: 中国农业大学出版社, 1998. 8~9
Suo X, Li G Q. Coccidia and Coccidiosis of Domestic Fowl. Beijing: China Agricultural University Publishing House, 1998. 8~9
- 2 McDougald L R. Anti-coccidia drug resistance in the southeastern United States. Avian Dis, 1981, **25** (6): 600~609
- 3 Britton P, Green P, Kottier S, et al. Expression of bacteriophage T7 RNA polymerase in avian and mammalian cells by a recombinant fowlpox virus. General Virology, **77** (Pt5): 963~967
- 4 Rautenschlein S, Sharma J M, Winslow B J. Embryo vaccination of turkeys against Newcastle disease infection with recombinant fowlpox virus constructs containing interferons as adjuvants. Vaccine, 1999, **18** (5~6): 426~433
- 5 Qiao C L, Yu K Z, Jiang Y P, et al. Protection of chickens against highly lethal H5N1 and H7N1 avian influenza viruses with a recombinant fowlpox virus co-expressing H5 haemagglutinin and N1 neuraminidase genes. Avian Pathology, 2005, **32** (1): 25~31
- 6 Heine H G, Boyle D B. Infectious bursal disease virus structural protein VP2 expressed by fowlpox virus recombinant confers protection against diseases in chickens. Arch Virol, 1993, **131** (3~4): 277~292
- 7 Swayne D E, Garcian M, Beck J R, et al. Protection against diverse highly pathogenic H5 avian influenza viruses in chickens immunized with recombinant fowlpox vaccine containing an H5 avian influenza hemagglutinin gene insert. Vaccine, 2000, **18**: 1088~1095
- 8 Cardona C J, Reed W M, Witter R L, et al. Protection of turkeys from hemorrhagic enteritis with a recombinant fowlpox virus expressing the native hexon of hemorrhagic enteritis virus. Avian Dis, 1999, **13** (2): 234~244
- 9 李建华. *E. tenella* Rhomboid 蛋白家族相关基因的筛选及其原核表达载体的构建: [博士论文]. 2004
Li J H. Construction of prokaryotic expressive vector and screening of the related gene Rhomboid protein family: [D]. 2004
- 10 Guichard A, Roark M, Ronshaugen M, et al. Brother of rhomboid, a rhomboid-related gene expressed during early *Drosophila oogenesis*,

- promotes EGF-R/MAPK signaling. *Dev Biol*, 2000, **226** (2): 255~66
- 11 Tsuya R, Schlesinger A, Reich A, *et al.* Intracellular trafficking by Star regulates cleavage of the *Drosophila* EGF receptor ligand Spitz. *Genes Dev*, 2002, **16** (2): 222~234
 - 12 Wasserman J D, Urban S, Freeman M. A family of rhomboid-like genes: *Drosophila* rhomboid-1 and roughoid/rhomboid-3 cooperate to activate EGF receptor signaling. *Genes Dev*, 2000, **14** (13): 1651~1663
 - 13 Urban S, Freeman M. Substrate specificity of rhomboid intramembrane proteases is governed by helix-breaking residues in the substrate transmembrane domain. *Mol Cell*, 2003, **11** (6): 1425~1434
 - 14 Hide G. Mammalian epidermal growth factor stimulates G-protein activity in *Trypanosoma brucei*. *Parasitol Res*, 1998, **84** (2): 143~146
 - 15 Ming M, Ewen M E, Pereira M E, *et al.* Trypanosome invasion of mammalian cells requires activation of the TGF beta signaling pathway. *Cell*, 1995, **82** (2): 287~96
 - 16 殷震, 刘景华. 动物病毒学. 第2版. 北京: 科学出版社, 1997. 479~499
 - Yin Z, Liu J H. *Animal Virology*. 2nd. Beijing: Science Press, 1997. 479~499
 - 17 张洪勇. 口蹄疫重组鸡痘病毒疫苗与核酸疫苗构建及实验免疫研究: [博士学位论文]. 吉林: 吉林大学畜牧兽医学院, 2004
 - Zhang H Y. Study on immunity and construction of the recombinant fowlpox virus and nucleic acid vaccine: [D]. Jilin: College of Animal Science and Veterinary Medicine, Jilin University, 2004
 - 18 Johnson J, Reid W M. Anticoccidial drugs: lesion scoring techniques in battery and floorpen experiments with chickens. *Exp Parasitol*, 1970, **28**: 30~36
 - 19 Danforth H D, Angustine P C, Ruff M D. Genetically engineered antigen confers partial protection against avian coccidial parasites. *Poul Sci*, 1989, **68** (12): 1643~1652
 - 20 Afonso C L, Tulman E R, Lu Z, *et al.* The genome of fowlpox virus. *Journal of Virology*, **74** (8): 3815~3831
 - 21 Taylor J, Paoletti E. Fowlpox virus as a vector in non-avian species. *Vaccine*, 1988, **6** (6): 466~468
 - 22 Boyle D B, Heine H G. Recombinant fowlpox virus vaccines for poultry. *Immunol Cell Biol*, 1993, **71** (Pt5): 391~397
 - 23 徐正军, 陈昌海, 程雷, 等. 鸡痘弱毒苗几种免疫途径的安全性及免疫效果. *中国家禽*, 2001, **23** (12): 15~16
 - Xu Z J, Chen C H, Cheng L, *et al.* *China Poultry*, 2001, **23** (12): 15~16

Construction of *E. tenella* Fowlpox Recombinant Virus and Immunity Protection*

YANG Gui-Lian^{1,2)}, LI Jian-Hua¹⁾, ZHANG Xi-Chen^{1)**}, ZHAO Quan²⁾, YIN Ji-Gang¹⁾

¹⁾College of Animal Science and Veterinary Medicine, Jilin University, Changchun 130062, China;

²⁾College of Animal Science and Technology, Jilin Agricultural University, Changchun 130118, China)

Abstract In order to construct an efficient and safe engineering vaccine against *E. tenella*, the relative gene of Rhomboid protein family of *E. tenella* F2 hybrid strain was amplified by RT-PCR technology and subcloned into the downstream of complex promoter of fowlpox virus vector pUTA2, recombinant fowlpox virus transfer vector was constructed successfully. Plasmid of fowlpox recombinant virus and fowlpox virus were co-transfected into chicken embryo fibroblast (CEF) and identified by BrdU drug, RT-PCR and Western blotting respectively. The result showed that the *E. tenella* fowlpox recombinant virus (rFPV-Rhomboid) was obtained. Furthermore, rFPV-Rhomboid was amplified in CEF, then chicken was immuned with rFPV-Rhomboid and the indication of immunity was detected. The result indicated that the contents of CD4⁺ and CD8⁺ in peripheral blood were significantly higher than that in control group ($P < 0.05$). The weight gained of chicken vaccinated rFPV-Rhomboid was different from the chickens of control group significantly ($P < 0.05$). The recombinant protein had immunogenicity and could induced strong immune response and immune protection ability.

Key words *Eimeria tenella*, recombinant fowlpox virus, Rhomboid protein family relative gene, immunity protection

*This work was supported by a grant from The National Natural Science Foundation of China (30170696).

**Corresponding author. Tel: 86-431-7836155, Fax: 86-431-7981351, E-mail: zhangxic@public.cc.jl.cn

Received: May 12, 2006 Accepted: July 4, 2006