

中国畜牧兽医学会 2016 学术年会论文集

中国畜牧兽医学会编

(上册)

中国农业出版社

中国畜牧兽医学会 2006 学术年会

论 文 集

(上册)

中国畜牧兽医学会编

2006 年 10 月 28—31 日 北京

中国农业出版社

编辑主任：阎汉平

责任编辑：郭永立 刘博浩

编 辑：石 娟 刘海霞 申 凌

封面设计：张 艺

中国畜牧兽医学会 2006 年学术年会
中国畜牧兽医学会奖(优秀论文)
评审委员会名单

主任:吴常信 中国科学院院士、中国畜牧兽医学会理事长、
中国农业大学教授

副主任:夏咸柱 中国工程院院士
军事医学科学院军事兽医研究所研究员

蒋金书 中国畜牧兽医学会副理事长
中国农业大学教授

委员:(以姓氏笔画为序)

文心田 四川农业大学教授

文杰 中国农业科学院北京畜牧兽医研究所研究员

王林云 南京农业大学教授

王金洛 北京市农林科学院研究员

许尚忠 中国农业科学院北京畜牧兽医研究所研究员

吕于明 中国农业大学教授

杨汉春 中国农业大学教授

金梅林 华中农业大学教授

胡明信 北京农学院教授

钟秀会 河北农业大学教授

崔保安 河南农业大学教授

焦新安 扬州大学教授

致 谢

中国畜牧兽医学会感谢各事业、企事业单位对 2006 年学术年会的支持

(排名不分先后)

中国牧工商(集团)总公司
中国兽医药品监察所
湖南正虹科技发展股份有限公司
通威股份有限公司
大连韩伟集团
中国农业科学院兰州兽医研究所
北京康牧兽医药械中心

全国畜牧总站
海口农工贸(罗牛山)股份有限公司
金宇集团·内蒙古生物药品厂
正大集团农牧企业(中国区)
中国农业科学院哈尔滨兽医研究所
中国农业科学院北京畜牧兽医研究所
北京德佳牧业科技有限公司

齐鲁动物保健品有限公司
大连三仪动物药品有限公司
比利美英伟营养饲料(深圳)有限公司
山东信得药业有限公司
石家庄华牧牧业有限责任公司
北京克劳沃集团
重庆正通动物药业有限公司
天津中敖生物科技有限公司(中敖集团)
广东养宝生物制药有限公司
山东省济宁原种猪场
黑龙江生物制品一厂
北京市华都峪口禽业有限责任公司
杭州汇能生物技术有限公司
安徽省阜阳市瑞祥农业科技有限公司
四川华蜀动物药业有限公司
佛山市兴牧有限公司
山东新发药业有限公司

天津瑞普集团
正邦集团民星药业
四川维尔康动物药业集团
广东天宝生物制药有限公司
北京太克会展中心
广东广牧动物保健品公司
山西新世纪动物保健品有限公司
山东绿都安特生物科技有限公司
湖北武当动物药业有限责任公司
山东金太阳制药有限公司
山东金铸基药业有限公司
河南正阳种猪场
广东万士达动物药业有限公司
哈尔滨市和平兽药有限公司
新加坡艺思高科技有限公司
北京华都肉鸡公司

(注:上述支持单位为印制日期 2006 年 10 月 16 日前)

前 言

自从2001年12月中国畜牧兽医学会换届以来,本届(第十一届)已先后召开了4次学术年会(2003,2004,2005,2006)。现对论文的一些基本情况作一分析:

1 论文数量

表1 4次学术年会收录论文的数量(篇)

	2003	2004	2005	2006
畜牧	70	126	60	74
兽医	82	193	100	177
特邀	7	26	18	8

如不计特邀报告,历年提交的论文数量差异较大,这可能和各分会、各单位的宣传动员工作有关,但一个总的趋势是兽医学科的论文每年都比畜牧学科的多。这一方面说明兽医学科发展迅速,做出了大量成绩;另一方面是近年来动物疫病发生较多,国家在这方面加大了投入力度,促进了学科发展。

2 提交论文的单位

表2 不同性质单位提交论文的数量(篇)

	2003	2004	2005	2006
科研院所	43	90	39	67
高校	78	191	98	145
基层(县以下)	8	10	5	13
企业	8	12	9	4
其他	15	16	9	22

明显看出,科研院所和高校的论文多,占总数的85.15%;基层单位和企业的论文少,只占7.82%。作为一个全国性的一级学会,不同于行业协会,会员多数来自科研、教学单位,当然提交的论文也多,这是无可非议的。不过我们也应当鼓励在生产第一线工作的基层单位和企事业单位,把他们在实践中证明是行之有效的技术总结成文字材料加以推广。

这里特别要提一下有条件的企业,他们有雄厚的资金和高层次的科技人员,有的已经发展为中国畜牧兽医学会的团体会员。建议这些企业要加大对技术创新投入的力度,为我国畜牧兽医事业做出新的贡献。科研单位和高校中的科技人员也要和企业结合,理论联系实际,从解决生产问题中找研究课题,启发创新的灵感。

3 关于优秀论文的评选


2003~2006的4次学术年会,每次都评选出10篇优秀论文。这些论文都在大会作了交流并给予物质奖励。从普遍的反映来看,“评优”得到了充分肯定,是我们学会的一种表彰和鼓励优秀的做法。学会对评选程序也做了一些改进,如一开始只规定了有评委署名的论文不参评,后来改为不固定评委,每次评委都有适当调整。为了进一步做到公平、公正,从2005年起对参评的所有论文都隐去了作者、单位、通讯地址和致谢等部分,进行“盲评”。

今年在评选优秀论文时,畜牧和兽医两组事先没有统一。兽医组对评出的论文在最后决定前,先了解分布在哪些单位,原则是每个单位最多只能评上一篇。畜牧组在评选时没有考虑单位问题,认为既然是“盲评”,评上谁就是谁。结果畜牧组评出的三篇优秀论文有两篇是同一个单位的。另一篇第一作者虽然是不同单位,但论文的内容还是在读研究生期间和另两篇一样是在同一单位做的。究竟优秀论文要不要考虑单位分布,还需要下次评选时做出统一的规定。

中国科学院院士
中国畜牧兽医学会理事长

吴常信

2006.9.15



获奖论文





口蹄疫三价重组鸡痘病毒疫苗分子设计及其构建*

马鸣潇^{1,2**} 金宁一^{1***} 刘慧娟¹ 金明兰¹ 郑敏¹ 贾雷立¹ 金扩世¹

(1. 中国人民解放军军事医学科学院军事兽医研究所 全军基因工程重点实验室 长春 130062;

2. 锦州医学院畜牧兽医学院 121001)

摘要:本研究针对我国口蹄疫(foot-and-mouth disease, FMD)流行情况,利用计算机软件模拟分析,构建了口蹄疫病毒(foot-and-mouth disease virus, FMDV)复合多表位基因工程疫苗表达盒 OAAT。该表达盒以 O 型、A 型 FMDV 结构蛋白 VP1 全基因和 Asia I 型 FMDV 两个基因拓扑型的结构蛋白 VP1 基因上的 5 个抗原表位基因(其中 2 个抗原表位来源于 FMDVIND63/7 株,该毒株与我国新疆分离株属于同一基因拓扑型,其余 3 个抗原表位来源于 FMDVYNBS/58 株)作为主要免疫原基因,以非结构蛋白上的 2 个 Th2 细胞表位基因及结构蛋白上的 1 个 Th2 细胞表位基因作为辅助基因。将构建好的表达盒 OAAT 和猪 IL-18 基因分别插入到鸡痘病毒表达载体 pUTA-16-LacZ 复合启动子(ATI-P7.5×20)和单一启动子(P7.5)下游,构建了携带 OAAT 表达盒和猪 IL-18 基因的重组鸡痘病毒转移载体质粒 pUTAL-OAAT-IL18。应用脂质体转染法,将重组鸡痘病毒转移载体质粒与 282E4 株鸡痘病毒共转染鸡胚成纤维细胞(CEF),经 BrdU 进行三次加压蚀斑筛选后,以不同代次的细胞 mRNA 为模板,利用 FMDV VP1 基因和猪 IL-18 基因特异引物进行 RT-PCR 和 IFA 检测,筛选出 OAAT 和猪 IL-18 基因共表达的重组鸡痘病毒 rFPV-OAAT-IL18,该重组鸡痘病毒的构建为新型 FMDV 活载体疫苗的研究奠定了基础。

关键词:复合多表位抗原;表达盒;OAAT;口蹄疫病毒;鸡痘病毒。

引言

口蹄疫(foot-and-mouth disease, FMD)是由口蹄疫病毒(foot-and-mouth disease virus, FMDV)感染引起的一种急性、高度接触性人畜共患传染病。本病传播速度快,感染率高,是危害养殖业的烈性传染病之一。世界各国都十分重视。虽然口蹄疫在世界许多个国家已经被消灭或很好地被控制了,然而在近几年内,口蹄疫再度给养殖业带来巨大的经济损失。如 1997 年我国台湾省的一次大暴发,殃及 600 多个猪场,2000 年在俄罗斯、韩国的暴发也造成了巨大的经济损失,特别是 2001 年 2 月开始在英国的那次暴发和流行,给英国养殖业造成了继疯牛病和猪瘟两大疫情损害后的又一次沉重打击,其影响甚至于扩展到整个欧洲。我国也未能幸免,特别是 Asia I 型 FMDV 在历史上仅局限于我国云南边境地区流行,但在 2005-2006 先后在我国新疆、甘肃、北京等地暴发了 Asia I 型 FMD,而且与云南曾经发生的 Asia I 型 FMDV 相比,属于不同的基因型。

本研究针对我国 FMD 流行情况,利用计算机软件模拟,加入修饰成分,进行疫苗分子设计,构建了 O 型、A 型和 Asia I 三价重组鸡痘病毒重组活载体疫苗。以期研制出适合我国国情的廉价、高效、多联的新型 FMDV 疫苗,为有效控制,乃至最终消灭 FMDV 提供物质储备。现将研究内容报告如下:

* 863 计划(2001AA213071)资助项目。

** 马鸣潇(1973-),男,博士,内蒙古赤峰翁牛特旗,从事动物病毒分子生物学研究。

*** 联系作者:金宁一, Tel: 0431-6985921。



1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 主要试剂

各种限制性内切酶、*ExTaq* 以及 RNA 酶、T4DNA 连接酶等购自 TAKARA 公司, DNA 回收试剂盒购自杭州维特洁公司, M-MLV 反转录酶购自 Promega 公司, FITC 标记的羊抗兔 IgG 等购自 SBA 公司产品。

1.1.2 质粒和毒株

鸡痘病毒表达载体 pUTA-16-LacZ, 含有 O 型 FMDV 和 A 型 FMDV VP1 基因串联体的重组质粒 pVAXI-OA^[1], 由本室保存。

人工合成含有非结构蛋白 3ABC 及结构蛋白 VP4 上的 Th2 细胞表位基因重组质粒 pMD18-Th, 人工合成含有 AsiaI 型 FMDV 主要抗原表位基因重组质粒 CKS-A。均由宝生物工程(大连)有限公司合成。

FPV 282E4 株(wt-FPV)由中国兽药监察所提供, TCID₅₀ 为 $1 \times 10^7/0.1\text{mL}$ 。

1.1.3 引物

Th 细胞表位引物

上游 Th1: 5' - CCCGGGATGGCAGCA ATT GAG TTC - 3' (加 *Sma*I 位点)

下游 Th2: 5' - ACT AGTGCTCGGCCG GTC CAT AGA GTT TTG - 3' (加 *lik*er 与 *spe*I 位点)

FMDV VP1 引物

Y1: 5' - ACCACCTCCACAGGTGAGTCGGCT - 3'

Y2: 5' - CAAAAGCTGTTTCACAGGCCG - 3'

IL-18 引物

Y3: 5' - tgggatccatgTACTTTGGCAAGC - 3'

Y4: 5' - CTAGTTTTTGYYTTTGAACAGTCAA - 3'

1.2 方法

1.2.1 FMDV 多表位基因工程疫苗表达盒分子设计

随着对抗原分子的一级结构、空间构象的深入研究及分子免疫学的快速发展, 人们逐渐认识到并不是蛋白质的所有成分都能刺激机体产生有效的免疫反应, 全蛋白基因中包含有多种不同抗原表位、调控序列、免疫抑制序列和免疫病理序列。为增强疫苗的免疫效果, 同时减少免疫抑制序列及免疫病理序列的负面作用, 在详尽了解 FMDV 分子结构及其生物功能, 分析病毒抑制宿主免疫应答的分子成分, 及激活宿主免疫细胞产生保护性免疫应答(中和抗体和 CTL)的分子基础上, 本研究选择 O 型 FMDV、A 型 FMDV 线性中和表位 VP1 基因和 AsiaI 型 FMDV 的两个基因拓扑型的 VP1 基因上的主要抗原表位基因为主免疫原基因, 同时以 FMDV 非结构蛋白及结构蛋白上的 Th2 细胞表位作为辅助基因, 进行 FMDV 基因工程疫苗多表位复合抗原基因设计。且 O 型和 A 型 FMDV 结构蛋白 VP1 基因间及所有各抗原表位基因间均用 Linker 连接, 形成一个人工多肽基因序列 OAAT; 通过蛋白质同源建模(Homological modelling), 利用结构和序列的同源性在 PDB 库中搜索同源蛋白模板, 预测未知结构 OAAT 蛋白的三维构象。

1.2.2 FMDV 多表位基因工程疫苗表达盒的构建

用 Th 细胞表位引物对 pMD18-Th 重组质粒进行 PCR, 获得上游带有 *Sma*I 酶切位点, 下游带有 linker 与 *spe*I 位点的 PCR 产物, 将该产物克隆到 pMD18-T 载体上, 构建含有 Th 细胞表位的重组质粒 pMD18-Th1。用 *spe*I 和 *xba*I 分别消化 pMD18-Th1 和 CKS-A, 将 AsiaI 主要抗原表位基因定向亚克隆到 pMD18-T 载体上 Th 细胞表位下游, 获得重组质粒 T-A, 用 *spe*I 和 *xba*I 酶切鉴定。接着将 T-A 载体用 *xba*I 线性



化,补平、去磷;用 *Bam*HI 将 pVAXI-OA 上的 OA 切下,补平,将二者平端连接,构建表达盒 T-OAAT。分别用 *pst*I 单切, *Sal*I 和 *xho*I 双切, *Eco*RI 和 *xho*I 双切,对 T-OAAT 进行正反向鉴定。

1.2.3 猪 IL-18 基因重组鸡痘病毒转移载体的构建

首先用 *Bam*I 消化 pUCm-IL18 质粒补平后,再用 *xho*I 消化回收 IL-18 片段。同样用 *Hind*III 消化 pUTA-16-LacZ 质粒补平后,再用 *Sal*I 消化回收鸡痘病毒表达载体。最后把 IL-18 片段定向克隆于鸡痘病毒表达载体单一启动子下游,构建 pUTAL-IL18 重组质粒。用 *Nco*I 进行酶切鉴定。

1.2.4 猪 IL-18 基因和 FMDV 多表位基因共表达重组鸡痘病毒转移载体的构建

用 *Sma*I 分别消化 T-OAAT 和 pUTAL-IL18,回收 OAAT 表达盒和 pUTAL-IL18 载体,并对 pUTAL-IL18 去磷,把 OAAT 表达盒克隆到线性化的 pUTAL-IL18 质粒载体复合启动子下游,构建 pUTAL-OAAT-IL18 重组质粒,用 *Sma*I 单切, *pst*I 和 *Hind*III 双切, *Nco*I 和 *Xho*I 双切, *Xho*I 单切,进行正反向鉴定。

1.2.5 鸡痘病毒细胞内同源重组方法

取 70%~80% 融合单层 CEF 细胞,吸去培养上清,然后按 0.1mol 接种 FPV 282E4 株,37℃ 5% CO₂ 吸附 1.5~3h,每 30min 摇动一次培养板。在鸡痘病毒吸附培养的同时,向 85μL MEM 中加入 15μL DOTAP Liposomal,轻轻混匀,另取 50mL MEM 加入 10~20μg 重组质粒混匀,然后将后者滴加于前一液体中轻轻吹打混匀,室温下作用 30min 以上。待病毒吸附 1.5~3h 后,将质粒与转染试剂的混合液加到上述单层细胞上,并用无血清 MEM 将每孔中的液体补足至 1mL,37℃ 5% CO₂ 培养 12~18h,然后每孔补加 MEM 完全培养液,继续培养 72~120h (一般在第四天出现病变) 收毒, -70℃ 保存。

1.2.6 TK-鸡痘病毒的筛选

取 6 孔板培养的融合单层细胞,在接毒前 12 h 向 MEM 细胞培养液中加入 BrdU,使其终浓度为 40 μg/mL。经 BrdU 预处理后,吸去培养液,接种共转染后收获的病毒(每孔中液体体积为 1mL),37℃ 吸附 1.5h 后,再用含 BrdU 的培养液将每孔的液体补足至 3 mL,继续培养和观察病变,接毒后 120h 收获细胞。将收获的细胞冻融 3 次后,再接种于 BrdU 预处理后的 CEF 单层细胞上,继续培养 120h,收获细胞。经过 3 次 BrdU 加压筛选后,将收获的细胞再接种 CEF,在无 BrdU 的条件下培养,挑选单个病毒蚀斑,并进行 3 次蚀斑纯化,扩增,进一步通过 RT-PCR、IFA 方法筛选鉴定重组病毒。

1.2.7 重组病毒的 RT-PCR 鉴定

收集重组病毒感染的 CEF,用 TRIZOL LS Reagent 按说明书指示提取细胞总 RNA,用猪 IL-18 特异性引物 Y1 和 Y2, FMDV VP1 基因特异性引物 Y3 和 Y4 进行 RT-PCR。

1.2.8 IFA 鉴定重组病毒

取适量初步筛选并纯化的重组病毒接种于玻片上的 CEF 细胞单层细胞上,同时设 FPV 282 E4 株亲本和空白细胞对照,在 37℃, 5% CO₂ 条件下吸附培养 2h,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(pH7.2)或 TBS 洗涤缓冲液洗一次,100% 丙酮固定 10~15min,以 3% BSA 为封闭液,与兔抗 FMDV 多克隆抗体 37℃ 反应 2h,用 PBS 洗涤 3 次。然后与 FITC 标记的羊抗兔 IgG (1:200) 37℃ 反应 30min,用 PBS 洗涤 3 次,再用 TBS 洗涤缓冲液和蒸馏水各洗一次,载玻片上加一滴甘油缓冲液(50% 甘油 PBS),将载有细胞的玻片反扣于载玻片上(保持细胞不至于干燥),于荧光显微镜下观察和拍照。

1.2.9 重组病毒的 Western blotting 检测

将挑斑纯化、扩增后的重组鸡痘病毒,以 10mol 分别接种于 10mL 培养瓶 1 × 10⁶/mL CEF 细胞中,同时设 FPV 对照和细胞对照,至细胞出现明显病变时(或感染后 36h),弃培养液,用 1mL 37℃ 预热的 TEN (40mmol/L Tris·Cl pH7.5, 1mmol/L EDTA, 150mmol/L NaCl)洗脱细胞,收集于 Eppendorf 管中,3000r/min 离心 5min,弃上清,细胞沉淀用 TEN 洗一次,加 30μL 细胞裂解液(20μg/mL Dnase I, 10mmol/L Tris·Cl, pH7.4 ~



8.0, 1mmol/L $MgCl_2$, 0.5% ~ 1% NP-40) 裂解, 加等量 $2 \times$ 样品缓冲液 (0.2% 溴酚蓝, 100mmol/L Tris·Cl, pH6.8, 20% 甘油, 4% SDS, 使用前加入 2.5% β 巯基乙醇) 混合, 冰浴 30min, 100℃ 煮沸 3min, 再加入适量蔗糖, 5000r/min 离心 5min, 取上清进行 SDS-PAGE 电泳, 进行聚丙烯酰胺凝胶电泳后转移到硝酸纤维膜上, 以免抗 FMDV 多克隆抗体为第一抗体, 辣根过氧化酶酶标记的羊抗兔 IgG 为第二抗体, 检测重组鸡痘病毒 rFPV-OAAT-IL18 表达产物与兔抗 FMDV 多克隆抗体是否具有反应性。

2 结果

2.1 分子模拟

在详尽了解 FMDV 分子结构、生物功能及其产生免疫应答(中和抗体和 CTL)特点的的基础上, 确定以 O 型、A 型 FMDV 结构蛋白 VP1 全基因和 Asia I 型 FMDV 两个基因拓扑型的结构蛋白 VP1 基因上的 5 个抗原表位基因(其中 2 个抗原表位来源于 FMDV IND63/7 株, 该毒株与我国新疆分离株属于同一基因拓扑型, 其余 3 个抗原表位来源 FMDV YNBS/58 株)作为主要免疫原基因, 以非结构蛋白上的 2 个 Th2 细胞表位及结构蛋白上的 1 个 Th2 细胞表位作为辅助基因, 进行 FMDV 复合多表位基因工程疫苗表达盒 OAAT 分子设计。

对 OAAT 表达盒进行同源建模和抗原表位分析结果如图 1, 2, 3, Asia I 型 FMDV 的主要细胞表位(红色)O 型 FMDV 的主要细胞表位(紫色)A 型 FMDV 的主要细胞表位(绿色)均位于亲水区, 外显蛋白的表面, 因此表明, 该表达盒 OAAT 从理论上符合设计要求。

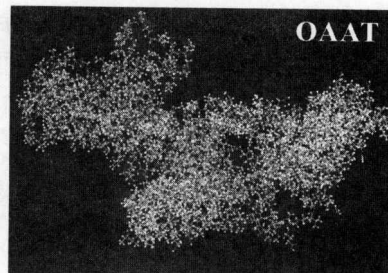


图 1 计算机模拟人工设计表达盒 OAAT 的三维结构

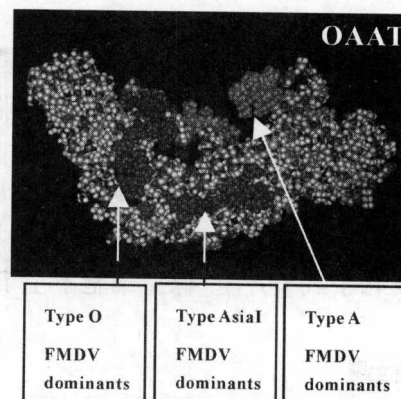


图 2 FMDV 主要抗原表位在 OAAT 三维结构中的位置



2.2 FMDV 多表位基因工程疫苗表达盒的构建

用 Th 细胞表位引物对 pMD18 - Th 重组质粒进行 PCR, 将该产物克隆到 pMD18 - T 载体上, 构建含有 Th 细胞表位的重组质粒 pMD18 - Th1 并用 *speI* 和 *xbaI* 酶切鉴定获得特异性目的带 150bp。用 *speI* 和 *xbaI* 分别消化 pMD18 - Th1 和 CKS - A。将 *AsiaI* 主要抗原表位基因亚克隆到 pMD18 - T 载体上 T 细胞表位下游, 获得重组质粒 T - A, 用 *speI* 和 *xbaI* 酶切鉴定如(图略), 获得目的片段 380bp。将 OA 克隆 T - A 下游, 构建表达盒 T - OAAT 分别用 *pstI* 鉴定获得特异目的带 1200bp, *SalI* 和 *xhoI* 鉴定获得 1800bp 特异目的带, *EcoRI* 和 *xhoI* 酶切鉴定线性化(图略)。

2.3 猪 IL - 18 基因重组鸡痘病毒转移载体的构建

IL - 18 片段定向克隆于鸡痘病毒表达载体单一启动子下游, 构建 pUTAL - IL18 重组质粒, 用 *NcoI* 酶切鉴定获得 950bp 和 1880bp 两条特异目的带(图略)。

2.4 猪 IL - 18 基因和 FMDV 多表位基因共表达重组鸡痘病毒转移载体的构建

具体构建过程是将 OAAT 表达盒克隆到线性化 pUTAL - IL18 载体复合启动子下游, 构建 pUTAL - OAAT - IL18 重组质粒, 用 *SmaI* 酶切鉴定获得特异性目的带 1800bp, *pstI* 和 *HindIII* 酶切鉴定获得特异性目的带 3900bp, *NcoI* 和 *XhoI* 酶切鉴定获得特异性目的带 1880bp 和 2600bp, *XhoI* 酶切鉴定线性化(图略)。

2.5 重组病毒的 RT - PCR 鉴定

对 rFPV - OAAT - IL18 感染的细胞培养物提取 RNA, 用 IL - 18 基因引物和 FMDV VP1 基因进行 RT - PCR 扩增, 分别扩增出约 480bp 的 IL - 18 基因片段(图 4)和 VP1 基因(图 5), 均与预期大小相符, 表明 IL - 18 基因片段和 OAAT 表达盒已经分别整合进入 rFPV - OAAT - IL18 重组病毒基因组, 并在 CEF 细胞中得到转录。在以上的 RT - PCR 同步扩增中都使用了 wt - FPV 做对照, 对样品均未扩增出条带。

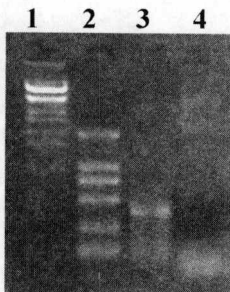


图 4 通过 RT - PCR 鉴定 rFPV - OAAT - IL18 中 IL - 18 基因

1. λ - EcoR T 14 I DNA Marker
2. DL2000 DNA Marker
3. production of IL - 18
4. wt - FPV

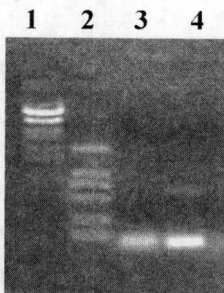


图 4 通过 RT - PCR 鉴定 rFPV - OAAT - IL18 中 VP1 基因

1. λ - EcoR T 14 I DNA Marker
2. DL2000 DNA Marker
3. wt - FPV
4. production of VP1

2.6 IFA 检测

用重组病毒感染玻片上的单层 CEF 细胞, 经丙酮固定, 先后与兔抗 FMDV 抗体、FITC 标记的羊抗兔抗体进行结合反应, 荧光显微镜下观察。结果显示, 从病毒噬斑中筛选出的重组鸡痘病毒病毒感染细胞表现出明显强荧光, 阳性细胞主要为圆缩的病毒感染细胞, 其周围未病变的 CEF 细胞为阴性(见图 6)。结果表明在 rFPV - OAAT - IL18 中的表达盒 OAAT 能够在 CEF 内表达。

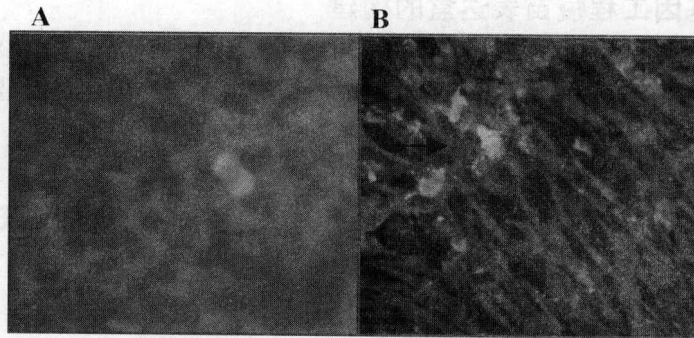


图6 间接免疫荧光法检测表达 VP1 基因的重组病毒
箭头所指为荧光阳性细胞,表现为细胞变圆,着染强荧光。
A 为正常 CEF 细胞,B 为 Rfpv-OAAT-IL18

2.7 重组病毒的 Western blotting 检测

将获得的 rFPV-OAAT-IL18 重组鸡痘病毒进行 Western blotting 检测,rFPV-OAAT-IL18 感染细胞与兔抗 FMDV 多克隆抗体出现预期大小的反应条带(图 7)。结果表明 rFPV-OAAT-IL18 能够在 CEF 内表达 OAAT。

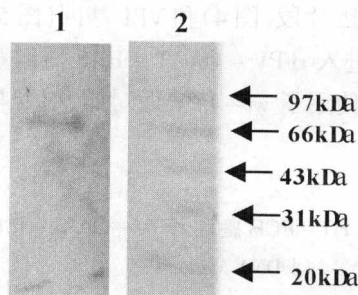


图7 Western blot 检测
1. rFPV-OAAT-IL18 2. Protein Marker

3 讨论

FMDV 共有 O 型,A 型,C 型,SAT1 型,SAT2 型,SAT3 型和 Asia I 型 7 个血清型,各血清型间不存在交叉免疫,且病毒易于发生变异,这就为 FMD 的防治造成了很大困难。目前在 FMD 的防治中,主要使用灭活疫苗,但灭活却存在许多隐患:如疫苗生产过程中由于不慎易引起病毒的逃逸以及灭活不完全而导致 FMD 的再度暴发,不同型的毒株间不能提供有效保护等。为了克服灭活疫苗的自身不足,FMD 各种基因工程疫苗如亚单位疫苗、可饲疫苗、合成肽疫苗、蛋白质载体疫苗、基因缺失疫苗、活载体疫苗、核酸疫苗等不断涌现,为 FMD 的防治带来新的希望。特别是以病毒为载体的基因工程疫苗被视为减毒活疫苗和亚单位蛋白质疫苗的结合,它既可以避免亚单位疫苗需要佐剂和多次接种注射的缺点,又可以诱导全面而持久的免疫反应,而成为新型疫苗的研究热点。但基因工程疫苗仍存在许多问题,如主要保护性抗原基因的表达量较低;表达产物所含有的抗原表位(包括 T 细胞和 B 细胞抗原表位)的数量不足以及免疫原性差等缺点。

为此本研究在详尽了解 FMDV 分子结构及其生物功能,分析病毒抑制宿主免疫应答的分子成分,及激活宿主免疫细胞产生保护性免疫应答(中和抗体和 CTL)的分子基础上,以 O 型、A 型 FMDV 主要结构蛋



白 VP1 基因和 Asia I 型 FMDV 主要抗原表位基因为基础,以非结构蛋白及结构蛋白上的 Th2 细胞表位为辅助基因,对抗原基因进行人工分子设计并辅以计算机模拟构建了 FMDV 多表位基因工程疫苗表达盒 OAAT,并以鸡痘病毒载体为载体分子共表达 OAAT 表达盒和猪 IL-18 基因,以期获得针对不同血清型和不同流行株的安全高效的新型基因工程疫苗,为研制新型 FMDV 基因工程疫苗的新思路。

VP1 是 FMDV 的主要结构蛋白,其上含有 FMDV 主要抗原结合位点能诱导机体产生中和抗体,研究表明,位于 VP1 第 134~158 氨基酸之间的 G-H 环,C'端第 200~213 氨基酸残基是诱导中和抗体的主要免疫抗原位点。在本研究中,选择了 O 型、A 型 FMDV 结构蛋白 VP1 和 Asia I 型 FMDV 两个基因拓扑型的结构蛋白 VP1 基因上的 5 个抗原表位(其中 2 个抗原表位来源于 IND63/72 与我国新疆分离株属于同一基因拓扑型,其余 3 个抗原表位来源 YNBS/58)作为主要免疫原基因。同时由于口蹄疫主要以体液免疫为主,有效的疫苗应该能诱导以 Th2 为主导的免疫反应。DiMarchi 等曾报道^[2],将串联有 FMDV VP1 第 140~160 和第 200~213 氨基酸残基的合成肽免疫牛后,动物能抵抗病毒的感染。但随后的研究证实,当将此类合成肽疫苗在易感动物群内大规模使用时,却仅能提供有限的保护^[3]。究其原因,缺乏辅助性 T 细胞表位可能是影响该疫苗效果的一个因素。同时携带 B 细胞抗原表位 A 和 T 细胞抗原表位(VPI21~140)的串联合成肽已经被证明对牛表现出良好的免疫反应性。近年来的研究证实,在 FMDV 衣壳蛋白上有多个能被牛和猪淋巴细胞识别的 T 细胞表位,但对这些 T 细胞表位的识别明显地受到了宿主 MHC 多态性的限制,进而也限制了它们在疫苗中的应用。与此相反,FMDV 非结构蛋白上的 T 细胞表位氨基酸序列高度保守,在易感动物体内,不同血清型之间能产生交叉反应,因此,它为拓宽宿主防御系统对病毒表位的识别提供了可能。通常情况下,接种 DNA 疫苗所诱导的体液反应要比接种蛋白疫苗低。而抗体水平是保护动物抵御 FMDV 攻击的一个重要因素,为提高所构建二价核酸疫苗的 B 细胞免疫原性,在比较了 FMDV 非结构蛋白上不同 T 细胞表位序列保守性,以及对 B 细胞表位的促进作用后,我们选择了 3ABC 和 VP4 中三个 Th2 细胞表位,作为辅助基因,通过 linker 将辅助基因和主要免疫原基因串联,构建了含辅助性 T 细胞表位、Asia I 型 FMDV 主要抗原表位基因、A 型和 O 型 FMDV 主要结构蛋白 VP1 基因的多表位基因工程疫苗表达盒 OAAT,并通过计算机模拟完全符合设计要求。为 FMDV 多表位基因工程疫苗研究提供了理论支持。

为了提高基因疫苗的免疫应答水平,许多研究者将免疫调节因子与含有病原保护性抗原的质粒共同免疫,或者将二者克隆到同一载体之中,取得了较好的实验结果^[4]。正常情况下,细胞因子的生物学活性很难得到保持,因而也限制了它的应用。基因操作技术使这一问题得到了根本性的改变。可以通过方便的构建含有细胞因子基因和抗原特异性基因的共表达获得预期的免疫效果^[5]。在本次实验中,我们所使用的细胞因子是 IL-18 与 OAAT 在重组鸡痘中共表达,实现其作为免疫佐剂的作用。同时本研究使用的鸡痘病毒表达载体具有安全、高效、外源基因容量大等优点,已经成功用于 HIV、AIV、NDV 等重组疫苗的研究。

基于以上理论依据,本研究成功地筛选到了一株携有 FMDV 多表位基因的重组鸡痘病毒 rFPV-OAAT-IL18,通过 RT-PCR 和 IFA 检测表明,相应的目的基因在重组毒中获得了表达,这为新型 FMDV 疫苗研究提供了新思路。下一步本研究将对该重组毒的免疫原性进行研究。

参考文献

- [1] 尹革芬,金宁一,张洪勇等.口蹄疫病毒二价 DNA 疫苗的构建及实验免疫研究.[J]高技术通讯,2004,19~22
- [2] DiMarchi, R., G. Brooke, C. Gale.. Protection of cattle against foot-and-mouth disease by a synthetic peptide. Science,1986,(232):639~641
- [3] Taboga, O., C. Tami, E. Carrillo. A large-scale evaluation of peptide vaccines against foot-and-mouth disease: lack of solid protection in cattle and isolation of escape mutants. J. Virol. 1997.71(4):2606~261
- [4] Kim JJ, Yang JS, Dentchev T, Dang K, Weiner DB. Chemokine gene adjuvants can modulate immune responses induced by DNA vaccines. J Interferon Cytokine Res 2000,20(5):487~98
- [5] Al-Ramadi BK, Al-Dhaheeri MH, Mustafa N, Abouhaida M, Xu D, Liew FY. Influence of vector-encoded cytokines on anti-Salmonella immunity: divergent effects of interleukin-2 and tumor necrosis factor alpha. Infect Immunol 2001;69(6):3980~8



复方中药成分与 IL-2 的免疫协同作用 及对鸡细胞因子表达的影响*

王德云^{1**} 李祥瑞¹ 徐立新¹ 王玉英² 胡元亮^{1***}

(1. 南京农业大学动物医学院 江苏南京 210095; 2. 中国农业出版社 北京 100026)

摘要:以淫羊藿多糖加蜂胶黄酮(方1)、人参皂苷加黄芪多糖(方2)组成2个复方,各加 IL-2 配合新城疫苗免疫雏鸡,分别于免疫后第7、14、21、28d 用微量法检测血清抗体效价的动态变化;同时将2个复方各分3种剂量加入到培养的鸡外周血 T 淋巴细胞中,分别培养7h 和24h 后用半定量 RT-PCR 方法检测淋巴细胞 IL-2 和 IFN- γ 的 mRNA 表达的变化。结果表明,2个复方单用或与 IL-2 合用均能显著提高抗体效价,而复方与 IL-2 的免疫协同作用不明显;方1的3个剂量和方2的高剂量能显著促进 IL-2, 2个复方的3个剂量能显著促进 IFN- γ 的基因表达,解释了复方中药成分与 IL-2 免疫协同作用不明显的原因。

关键词:复方中药成分;抗体效价;IL-2 mRNA;IFN- γ mRNA; 表达。

在以前的研究中,笔者通过系列试验探讨了中药成分的免疫增强作用和机理,筛选出几种作用较好的中药成分和2个复方,并发现复方的作用强于单味、单味中药成分与 IL-2 合用有较好的免疫协同作用^[1,2]。本研究以淫羊藿多糖(epimedium polysaccharide, EPS)加蜂胶黄酮(propolis flavone, PF)、人参皂苷(ginsenoside, GS)加黄芪多糖(astragalus polysaccharide, APS)组成2个复方(compound Chinese herbal medicinal ingredients, cCHMI),各加 IL-2, 配合新城疫苗免疫雏鸡,检测血清抗体效价的动态变化;同时将2个复方各分3种剂量加入到培养的鸡外周血 T 淋巴细胞中,用半定量 RT-PCR 方法检测淋巴细胞 IL-2 和 IFN- γ 的 mRNA 表达的变化,旨在探讨复方中药成分的免疫增强作用和机理,为研制新型免疫增强剂提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 试验药物

EPS、PF、GS 和 APS,由本校中兽医学研究室提供。根据以前的研究结果,按净含量用去离子水稀释(APS 为 4 mg/mL、EPS、PF 和 GS 为 0.5 mg/mL),再取 PF 和 EPS 溶液按一定比例混合制成方1(cCHMI₁),GS 和 APS 制成方2(cCHMI₂),高压消毒后用于免疫试验;同时用不含小牛血清的 RPMI1640 稀释,并按相同的配比组成方1和方2,104℃灭菌30min,4℃保存,根据以前的试验结果,基因表达试验临用前再用含10%小牛血清的 RPMI1640 营养液稀释成系列浓度(μ g/mL):方1为30、15和7.5,方2为600、300和150,PF 为15, EPS 为15, GS 为300, APS 为150。IL-2(10.0mg/mL),由南京农业大学预防兽医学寄生虫组提供。

1.2 主要试剂

Trizol 试剂,Invitrogen 公司;DEPC 水,南京赛吉生物技术有限公司;Oligod(t)18、RNasin(RNA 酶抑制

* 基金项目:国家自然科学基金资助项目(30070566),本文已被南京农业大学学报录用。

** 作者简介:王德云(1979.1-),女,安徽广德人,讲师,博士,主要从事中药免疫学研究。

*** 通讯作者,025-84395203, E-mail: yllu@njau.edu.cn。