

禽腺病毒 QU 株一个复制非必需区的鉴定

孙锦¹, 李秋艳², 李云龙¹, 黄兵³, 宋敏训³, 李新华³

1 山东师范大学生命科学学院动物抗性省级重点实验室, 济南 250014

2 青岛农业大学, 青岛 266109

3 山东省农业科学院家禽研究所, 济南 250023

摘要: 禽腺病毒 QU 弱毒株属于鸭腺病毒 1 型病毒, 可作为潜在的重组疫苗载体。为确定 QU 株的复制非必需区, 参照鸭腺病毒 1 型病毒基因组右侧 E4 区附近序列设计引物, 扩增 QU 株基因组的一段 3.4 kb 片段, 插入来自 pEGFP-C1 质粒的增强型绿色荧光蛋白(EGFP)基因表达盒片段, 构建了含 EGFP 基因的重组质粒 pADGFP。采用脂质体介导法, 将重组质粒 pADGFP 与 QU 株共转染 CEF 细胞, 用 96 孔板稀释法筛选纯化表达绿色荧光蛋白的重组 QU 病毒株 rQUGFP。该重组毒的生长曲线与亲本毒一致, 连续传代后病毒滴度稳定。结果表明, QU 株基因组右侧 E4 区附近一段包括 ORF1、ORF8 和 ORF9 三个开放阅读框的区域为病毒的复制非必需区, 且插入的 EGFP 基因可以稳定表达。为进一步以禽腺病毒 QU 株为载体构建重组疫苗的研究打下基础。

关键词: 禽腺病毒, 鸭腺病毒 1 型, 复制非必需区, 增强型绿色荧光蛋白, 重组病毒

Identification of a Non-essential Region for Replication of Fowl Adenovirus QU Strain

Jin Sun¹, Qiuyan Li², Yunlong Li¹, Bing Huang³, Minxun Song³, and Xinhua Li³

1 Key Laboratory of Animal Resistance, College of Life Science, Shandong Normal University, Ji'nan 250014, China

2 Qingdao Agricultural University, Qingdao 266109, China

3 Institute of Poultry Science, Shandong Academy of Agricultural Sciences, Ji'nan 250023, China

Abstract: The avirulent QU strain of fowl adenovirus, a member of duck adenovirus type 1, could be a potential vector in recombinant vaccine development. To identify a non-essential region for replication of QU virus, a 3.4 kb fragment near the E4 region of QU virus genome was amplified by PCR to construct a plasmid pADGFP, in which ORF1, ORF8 and ORF9 was replaced with a system expressing enhanced green fluorescence protein. Further, a recombinant virus rQUGFP was constructed by homologous recombination after pADGFP and QU virus were co-transfected into chick embryo fibroblast. The one step growth curve of the rQUGFP was found to be identical with that of parent QU virus and the TCID₅₀ titers of different generation recombinants maintained stable. These findings suggest that the region including ORF1, ORF8 and ORF9 of QU virus genome is dispensable for virus replication, and the foreign gene inserted into virus genome can be efficiently and stably expressed. The work lays the foundation for further studies of developing this virus as a vector of recombinant vaccine.

Keywords: fowl adenovirus, duck adenovirus type 1, non-essential region for replication, enhanced green fluorescence protein, recombinant virus

Received: November 13, 2007; **Accepted:** January 16, 2008

Supported by: the Foundation for Outstanding Young Scientist in Shandong Province (No. 2006BS06006) and the Doctor Foundation of Shandong Academy of Agricultural Sciences (No. 2006YBS018).

Corresponding author: Bing Huang. Tel: +86-531-85990248; E-mail: hbind@163.com

山东省优秀中青年科学家科研奖励基金资助(No. 2006BS06006); 山东省农业科学院博士基金资助(No. 2006YBS018)。

禽腺病毒(Fowl adenovirus, FAdv)作为一种新型的基因转移载体,具有感染细胞谱广、不整合到染色体、可刺激机体产生强烈的粘膜免疫等优点,在构建重组疫苗方面具有广阔的应用前景。以禽腺病毒 I 群(CELO)病毒作为载体已成功构建了 IBDV VP2、IBV-S1 等重组体^[1-3]。但是 I 群禽腺病毒在细胞培养及生产工艺上存在一些困难,而且多数商业鸡群都存在 CELO 病毒隐性感染,以此构建的病毒载体疫苗的免疫效力会受到一些干扰。鸭腺病毒 1 型(Duck adenovirus type 1, DAV1)病毒是包含产蛋下降综合症病毒(Egg drop syndrome virus, EDSV)或类似 EDSV 的一种无囊膜的双股 DNA 禽腺病毒,属于腺胸腺病毒属(Atadenovirus)^[4],与 I 群禽腺病毒存在很小的共同抗原。以其作为载体构建重组病毒可以避免上述缺点。目前以 AV127 株为代表的 EDSV 的基因组全序列及其转录物组成已确定^[5],但其复制非必需区仍不清楚,严重阻碍了将其作为病毒载体的应用。我们推测其基因组右侧 E4 区附近的几个小的开放阅读框(Open reading frame, ORF)ORF1、ORF 8 和 ORF 9 可能不影响病毒复制。为确定该区域是否为病毒复制非必需区,我们构建了表达增强型绿色荧光蛋白(Enhanced green fluorescent protein, EGFP)的重组禽腺病毒,为完全复制型禽腺病毒载体的构建创造条件。

1 材料与方法

1.1 病毒、细胞和质粒

禽腺病毒 QU 弱毒株来源于鹤鹑,质粒 pEGFP-C1、宿主菌 DH5 α 由山东省农业科学院家禽研究所禽病诊断与免疫省级重点实验室保存;SPF 鸡胚成纤维细胞(CEF)按常规制备;pMD18-T vector 购自宝生物工程(大连)有限公司。

1.2 工具酶与试剂

限制性内切酶, T4 DNA Polymerase, T4 DNA Ligase, 牛小肠碱性磷酸酶(CIAP), dNTP 和 ExTaqTM 均购自宝生物工程(大连)有限公司;质粒小提试剂盒和 UniQ-10 柱式胶回收试剂盒购自生工生物工程(上海)有限公司;LipofectamineTM 2000 脂质体购自 Invitrogen 公司;DMEM 培养基购自 GIBICO BRL 公司;胰酶购自美国 SIGMA 公司。

1.3 重组臂的扩增、克隆及序列测定

根据 GenBank 中发表的 DAV1 基因组右侧序列设计一对引物,上游引物 L 为 5'-GCAAAGAGCTCTTTTAATTGTGAGT-3',下游引物 R 为 5'-GTGCGGATCCAGGCATTCGTATTT-3'。参照文献[6]方法从收集的 QU 株接种鸭胚尿囊液中提取病毒 DNA,以其为模板,用引物 L 和 R 进行 PCR 扩增。将 PCR 产物用试剂盒纯化并连接到 pMD18-T 载体中,转化 DH5 α 感受态细胞。通过 PCR 鉴定,筛选出阳性质粒,命名为 pAD20 并测序分析。

1.4 质粒 pADGFP 的构建

用 *Mlu* I 和 *Ase* I 对 pEGFP-C1 双酶切,凝胶电泳回收含有 GFP 表达盒的目的片段,补平;用 *Bgl* II 和 *Sna* B I 对 pAD20 双酶切,回收大片段,补平并去磷酸化;将含有 GFP 表达盒的目的片段克隆到 pAD20 载体中,通过 PCR 鉴定,筛选出阳性重组质粒,命名为 pADGFP(图 1)。

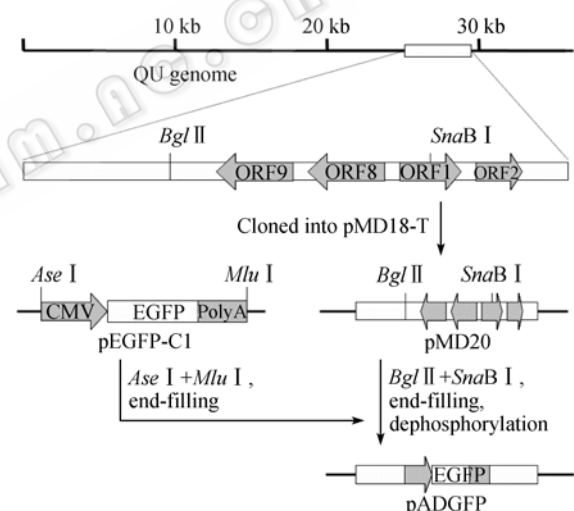


图 1 重组质粒 pADGFP 的构建
Fig. 1 Construction of plasmid pADGFP

1.5 细胞转染

在 CEF 单层上按 0.1 TCID₅₀ 的 MOI(Multiplicity of infection, 感染复数)量接种 QU 株鸭胚尿囊液, 37°C 吸附 1 h。再按脂质体(LipofectamineTM 2000)使用说明书的方法用 pADGFP 转染 CEF。

1.6 重组病毒的筛选纯化

转染后 12 h, 开始观察荧光的出现情况。转染后第 4 天, 收集 24 孔板中有细胞病变的 CEF, 接种到新的 96 孔板 CEF 上。将出现强烈绿色荧光的孔的细胞取出, 5 倍梯度稀释后接种到新的 96 孔板

CEF 上, 如此重复 6 个循环。

1.7 重组病毒一步生长曲线的测定

参照文献[7]方法稍加改进, 将第 5 代次重组病毒和亲本毒各接种 24 孔板 CEF(10^4 TCID₅₀/孔), 分别在接种后 1、4、8、12、24、36、48、60、72、84、96、120 和 144 h 时, 将细胞吹打下来, 分别用 CEF 进行病毒滴定。

1.8 重组病毒的遗传稳定性

将纯化的重组病毒以 1:100 稀释, 在 CEF 上连续传 12 代, 观察荧光信号并测定病毒滴度。

2 结果

2.1 重组臂基因的扩增、克隆及测序

PCR 扩增的片段大小为 3.4 kb, 克隆入 pMD18-T 载体得到重组质粒 pAD20(图 2), 测序分析结果表明它与 DAV1 病毒的同源性极高, 包含 ORF1、ORF8 和 ORF9 等完整 ORFs(这段碱基序列的 GenBank 登陆号为 EU 247929)。

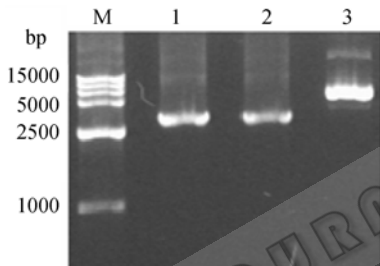


图 2 重组臂基因的扩增

Fig. 2 Amplification of recombinant arm gene

M: DL15000; 1: amplicon (3.4 kb); 2: identification of pAD20 by PCR; 3: pAD20 (6.1 kb)

2.2 质粒 pADGFP 的 PCR 鉴定

用引物 L/R 分别 PCR 扩增 pADGFP 和 pAD20, 得到大小为 3.8 kb 和 3.4 kb 的片段, 与预期大小一致, 表明质粒 pADGFP 构建正确(图 3)。

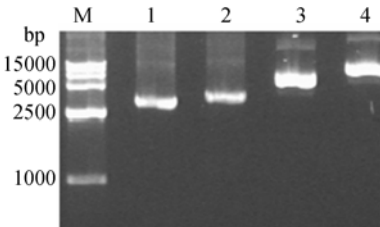


图 3 质粒 pADGFP 的 PCR 鉴定

Fig. 3 Identification of pADGFP by PCR

M: DL-15000; 1: pAD20 by PCR (3.4 kb); 2: pADGFP by PCR (3.8 kb); 3: pAD20; 4: pADGFP

2.3 重组病毒的构建

用质粒 pADGFP 和 QU 株病毒共转染 CEF 细胞 48 h 后, 转染细胞中出现许多荧光强度深浅不一的梭形细胞(图 4)。质粒 pADGFP 和 QU 株病毒同源重组产生重组病毒, 将筛选纯化的重组病毒命名为 rQUGFP。

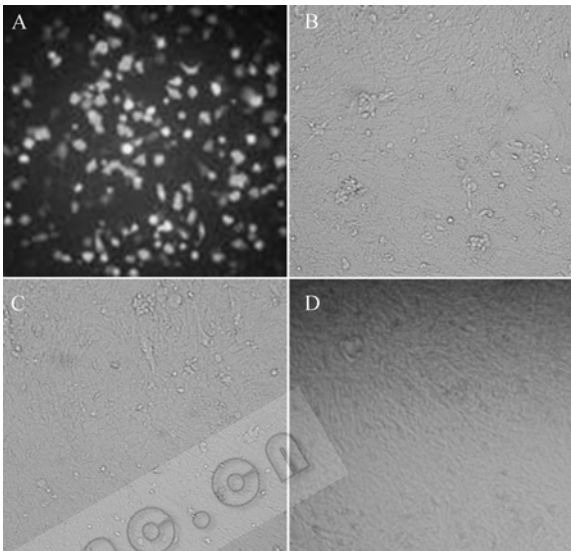


图 4 rQUGFP 在 CEF 上表达 GFP 的情况

Fig. 4 GFP expressed by rQUGFP virus in chicken embryo fibroblast cell(48 h)

A: CEF infected with rQUGFP virus observed with fluorescent microscope; B: the same field with A under white light; C and D were cells observed with optical microscope. C: CEF infected with parent QU virus; D: normal CEF

2.4 重组病毒的一步生长曲线

结果显示, 第 5 代次重组病毒与亲本毒的生长曲线一致, 病毒经过 12 h 的隐蔽期开始复制, 96 h 时病毒增殖量达到高峰(图 5)。

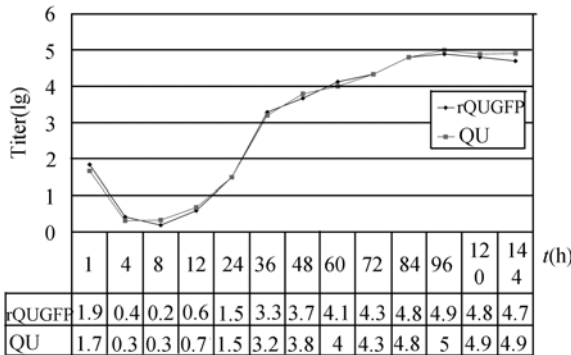


图 5 rQUGFP 的一步生长曲线

Fig. 5 One step growth curve of recombinant virus rQUGFP in chicken embryo fibroblast

2.5 重组病毒的遗传稳定性

重组病毒在 CEF 上连续传 12 代后, GFP 基因仍然得到表达, 病毒滴度亦未发生变化(表 1)。

表 1 不同代次重组病毒的 TCID₅₀ 测定
Table 1 Titration of TCID₅₀ of different generation recombinant virus

Strain	lg(TCID ₅₀)/0.1 mL			
	F1	F5	F8	F12
rQUGFP	4.7	4.8	4.8	4.9
QU	4.9	4.8	4.88	4.9

3 讨论

以腺病毒为载体的基因工程疫苗是近年来的研究热点, 应用腺病毒作为载体已经成功地表达了多种病毒蛋白。DAV1 病毒宿主范围广泛, 毒株间毒力差异大, 许多毒株对鸡和水禽都不致病, 且可在机体内长期增殖, 是理想的重组疫苗载体。以 DAV1 病毒构建载体时必须首先确定病毒的复制非必需区, 但是目前对其复制非必需区的了解不多, 外源基因的插入位点及插入容量都不清楚。因此, 本研究将 DAV1 QU 株病毒基因组右侧 E4 区附近的一段包括 ORF1、ORF8 和 ORF9 的碱基序列缺失, 插入 EGFP 表达盒构建了重组病毒 rQUGFP。比较 rQUGFP 与亲本毒(QU)的感染和增殖规律, 并将 rQUGFP 在鸡胚成纤维细胞上连续传代培养, 结果表明本研究所选区域的缺失对病毒 QU 的复制没有影响。

EDSV 的 E4 区下游存在 10 个 ORFs, 其中 ORF10 编码一种 34.4 kD 的蛋白质, 与人及其他腺病毒的 E4 区 34 kD 蛋白有显著的同源性, 其余 ORFs 的功能还不清楚^[5]。该区域在各种腺病毒中的差异较大, 与病毒的降解和致病性有关^[8,9]。Hess M 等通过对比 EDSV 与其他腺病毒的基因组序列发现, EDSV 可能是乳腺病毒和禽腺病毒的中间进化类型^[5]。目前已知人腺病毒 2 型和 5 型的 E3、E4 区是病毒的复制非必需区, 而且已成功的用于基因插入或缺失^[10,11]。Francois A 等也发现 CELO E4 区附近几个未知功能的 ORFs(如 ORF1 和 ORF9)的改变不影响病毒的复制^[12]。因此可以推测 EDSV E4 区附近的几个 ORFs 可能是病毒的复制非必需区。本研究的结果证明这个推测是正确的。

本研究通过同源重组将 EGFP 基因插入禽腺

病毒基因组。EGFP 是一系列新的 GFP 突变体的一种^[13,14], 具有细胞毒性小、荧光信号可以直观的用显微镜观察等优点, 可在各种动物细胞中高效表达。这大大方便了重组病毒的筛选和检测。此次表达 EGFP 的重组禽腺病毒的成功构建, 为以禽腺病毒构建载体的研究创造了良好的条件。以禽腺病毒作为载体构建的重组疫苗不仅在禽类疾病防治中应用广泛, 在哺乳动物的疾病控制上也有较大的应用价值。自然条件下, 禽腺病毒不能在人体中正常复制, 因此与人腺病毒相比, 在人类疾病的防治中以禽腺病毒作载体具有更高的安全性^[15]。

禽腺病毒 QU 株是分离自鹌鹑的低毒力 DAV1 毒株, 有望成为优良的重组疫苗载体。在后续工作中, 将进一步研究其重组毒的生物学特性, 寻找其他的复制非必需区并探讨可插入外源基因的容量。

REFERENCES

- [1] Francois A, Chevalier C, Delmas B, *et al.* Avian adenovirus CELO recombinants expressing VP2 of infectious bursal disease virus induce protection against bursal disease in chickens. *Vaccine*, 2004, **22**(17-18): 2351-2360.
- [2] Cherenova LV, Logunov DY, Shashkova EV, *et al.* Recombinant avian adenovirus CELO expressing the human interleukin-2: characterization *in vitro*, *in ovo* and *in vivo*. *Virus Res*, 2004, **100**(2): 257-261.
- [3] Johnson MA, 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. *Vaccine*, 2003, **21**(21-22): 2730-2736.
- [4] Fauquet CM, Mayo MA, Maniloff J, *et al.* Virus Taxonomy, 8th Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses. California: Virology Division International Union of Microbiological Societies. Elsevier Academic Press, 2005.
- [5] Hess M, Blocker H, Brandt P. The complete nucleotide sequence of the egg drop syndrome virus: an intermediate between mastadenoviruses and aviadenoviruses. *Virology*, 1997, **238**(1): 145-156.
- [6] Fingerut E, Gutter B, Gallili G, *et al.* A subunit vaccine against the adenovirus egg-drop syndrome using part of its fiber protein. *Vaccine*, 2003, **21**(21-22): 2761-2766.
- [7] Alexander HS, Huber P, Cao J, *et al.* Growth characteristics of fowl adenovirus type 8 in a chicken hepatoma cell line. *J Virol Methods*, 1998, **74**(1): 9-14.
- [8] Baker A, Rohleder KJ, Hanakahi LA, *et al.* Adenovirus E4 34 k and E1b 55 k oncoproteins target host DNA ligase IV for proteasomal degradation. *J Virol*, 2007, **81**(13): 7034-7040.

- [9] Ullman AJ, Reich NC, Hearing P. Adenovirus E4 ORF3 protein inhibits the interferon-mediated antiviral response. *J Virol*, 2007, **81**(9): 4744–4752.
- [10] Dix I, Leppard KN. Expression of adenovirus type 5 E4 Orf2 protein during lytic infection. *J Gen Virol*, 1995, **76**(1995): 1051–1055.
- [11] Xiong F, Zhang C, Xiao SB, *et al.* Construction of recombinant adenovirus including microdystrophin and expression in the mesenchymal cells of *mdx* mice. *Chinese Journal of Biotechnology*, 2007, **23**(1): 27–32.
熊符, 张成, 肖少波, 等. Microdystrophin 基因重组腺病毒的构建及转染 *mdx* 骨髓间充质干细胞的表达. *生物工程学报*, 2007, **23**(1): 27–32.
- [12] François A, Etteradossi N, Delmas B, *et al.* Construction of avian adenovirus CELO recombinants in cosmid. *J Virol*, 2001, **75**(11): 5288–5301.
- [13] Cormack BP, Valdivia RH, Falkow S. FACS-optimized mutants of the green fluorescent protein (GFP). *Gene*, 1996, **173**(1): 33–38.
- [14] Cubitt AB, Heim R, Adams SR, *et al.* Understanding, improving and using green fluorescent proteins. *Trends Biochem Sci*, 1995, **20**(11): 448–455.
- [15] Cotton M., Wagner E., Zatloukal K, *et al.* Chicken adenovirus (CELO virus) particles augment receptor-mediated DNA delivery to mammalian cells and yield exceptional levels of stable transformants. *J Virol*, 1993, **67**(7): 3777–3785.

《生物工程学报》英文版简介

为了加快期刊的国际化进程, 扩大国际交流, 本刊与国际知名的爱思唯尔出版公司(Elsevier)达成协议, 合作出版英文电子版《Chinese Journal of Biotechnology》, 该刊与中文版同步, 月刊。出版后置于爱思唯尔庞大的 ScienceDirect 网络出版平台上, 我刊网址: <http://www.sciencedirect.com/science/journal/18722075>。

爱思唯尔是国际著名的出版公司, 《Cell》等知名杂志便出自该公司。ScienceDirect 是爱思唯尔建立的世界上最全面的服务于多学科研究型图书馆的电子数据库。研究人员通过它能在线访问超过 1800 种期刊和 400 万篇电子版全文。《生物工程学报》英文版借助这个庞大而成熟的平台, 将可以大大地提高文章的浏览量, 扩大期刊及作者在国内外的影响, 提高文章的被引频次。同时, 出版英文电子版将可克服与国外文字沟通的障碍, 使作者的科研成果能在第一时间为国际同行所了解。

我刊的栏目有综述、研究报告、研究简报和技术与方法等, 范围包括基因工程、细胞工程、酶工程、蛋白质工程、发酵工程、生化工程、代谢工程、组织工程、生物制药、生物芯片、生物反应器及生物信息学等, 涉及生物技术各个领域, 非常欢迎广大科研人员踊跃投稿。直接投英文稿件而被录用的, 也将同时发表在中文印刷版上。我刊将增加英文稿件的刊出量, 并邀请国外专家对录用英文稿件进行英文润色, 部分优质稿件将参考专家意见予以优先发表。英文版不再另收版面费。

具体做法是: 每期从中文版中精选出 5~10 篇稿件译成英文, 凡具备以下条件之一者即可入选: 1. 在理论方面有新发现或新见解。2. 在应用方面取得新进展, 达到新水平。3. 在技术方面建立新方法或改进已有的方法。选中后通知作者译成英文, 经编辑部审核送爱思唯尔出版公司进行文字加工, 再返回作者进行内容确证。

投稿时请注意以下事项: 1. 稿件撰写时, 应力求叙述清楚, 避免语法错误和用词不当。2. 突出创新点, 用具体材料、数据加以说明与论证。3. 加强图表注释, 使读者在不读正文的情况下能正确理解图表的涵义。

欲了解更详细的信息, 请关注我们网页的更新或联络编辑部:

电话: 010-64807509; 传真: 010-64807327 E-mail: cjb@im.ac.cn