



密级：无
论文编号：82110-2016-04

中国兽医药品监察所

硕士学位论文

**新城疫病毒 F 蛋白在 293T 细胞系中的
稳定表达及其活性研究**

The stable expression and activity detection of
Newcastle disease virus F protein in 293T cell line

(国家重点研发计划 编号：2017YFD0500704)

研究生：倪志远
指导教师：蒋桃珍 研究员
申请学位类别：农学硕士
学科专业：预防兽医学
研究方向：微生物与免疫学
学位授予单位：中国兽医药品监察所

2019 年 5 月

独创性声明

本人郑重声明：所提交的学位论文，是本人在导师指导下，进行研究工作所取得的成果。除文中已经注明引用的内容外，本学位论文的研究成果不包含任何他人创作的、已公开发表或者没有公开发表的作品的内容，也不包含为获得中国兽医药品监察所或其它教育机构的学位或证书而使用过的材料。对本论文所涉及的研究工作做出贡献的其他个人和集体，均已在文中以明确方式标明。本学位论文原创性声明的法律责任由本人承担。

学位论文作者签名：倪志远

2019年6月5日

关于论文使用授权的说明

本人完全了解中国兽医药品监察所有关保留、使用学位论文的规定，即：中监所有权保留送交论文的复印件和磁盘，允许论文被查阅和借阅，可以采用影印、缩印或扫描等复制手段保存、汇编学位论文。同意中国兽医药品监察所可以用不同方式在不同媒体上发表、传播学位论文的全部或部分内容。

(保密的学位论文在解密后应遵守此协议)

研究生签名：倪志远

时间：2019年6月5日

导师签名：李永刚

时间：2019年6月12日

摘要

新城疫(Newcastle disease, ND)是由新城疫病毒(Newcastle disease virus, NDV)引起的禽类的急性高致病性病毒性传染病,是危害养鸡业最主要的疫病之一。疫苗免疫是世界各主要养禽国家用于预防和控制新城疫流行和发生的最主要措施,也是最经济最有效的技术手段。目前,商品化的疫苗,无论是灭活疫苗还是活疫苗均具有良好的免疫效果,但其生产基质为鸡胚,生产成本低,且鸡胚的无害化处理过程会增加一定的生物安全风险和环保压力。随着分子生物学技术的发展,采用哺乳动物细胞系表达特定蛋白而制备的治疗性活性生物物质或基因工程亚单位疫苗已取得了很大的进展,有许多产品已商品化,因此也成为当前兽用疫苗研究的热点。本研究拟使用 293T 细胞系表达新城疫主要保护性抗原 F 蛋白,探索性研制新城疫亚单位疫苗,为新城疫新型疫苗研发提供一种新的研究路径。

首先,本研究将 NDV LaSota 株 F 基因插入到携带绿色荧光基因的慢病毒载体 pHB 中,构建 pHB-F 转移载体。利用脂质体将包装慢病毒的三种质粒 pHB-F、pX、pG 共同转染 293T 细胞,收获包装成功的慢病毒,然后再利用包装的慢病毒感染 293T 细胞,最后采用有限稀释法筛选出含绿色荧光的单克隆阳性细胞并进行扩大培养,获得 F-293T 细胞系。将构建的 F-293T 细胞进行连续传代,发现不同代次细胞的荧光强度未发现明显差异,同时对不同代次细胞进行 RT-PCR 检测,均能检测到特异性条带,表明 F 基因能在 293T 细胞中稳定遗传;对细胞培养上清进行 SDS-PAGE 和 Western-Blot 验证,能检测到 F 蛋白特异目的条带。上述研究结果表明,已成功构建了能够稳定表达 NDV F 蛋白的 F-293T 细胞系。

其次,为了进一步证实 F-293T 细胞表达的 F 蛋白的免疫活性,将收集的含 F 蛋白的细胞上清经初步浓缩纯化后,用矿物油佐剂乳化制备成疫苗免疫 25 日龄 SPF 鸡。免疫后不同时间采血并分离血清,经鸡胚中和试验评价血清抗体产生情况。试验结果表明,免疫鸡血清能够特异性中和新城疫病毒 LaSota 株,说明表达的 F 蛋白免疫鸡可以产生特异性的新城疫保护性抗体,该免疫试验结果也进一步证明了本研究所构建的表达 NDV F 蛋白的 F-293T 细胞可表达具有免疫活性的 F 蛋白。

因此,通过本论文研究,我们成功构建了稳定表达 NDV F 蛋白的 F-293T 细胞株,为进一步开展 F 蛋白的结构和功能研究,NDV 亚单位疫苗的研究奠定了基础。

关键词: 新城疫病毒, F 蛋白, 慢病毒载体, 反应原性, 免疫原性

ABSTRACT

Newcastle disease (ND) is a highly contagious, acute and potent infectious avian viral disease caused by Newcastle disease virus (NDV), characterized by infections of the respiratory, enteric, nervous and reproductive systems, causing nervous impact on poultry industry because of its substantial morbidity and mortality. The present effective poultry disease control program demands professional vaccination regimen with strict biosecurity measures in the world, and this program will last long in the future. At present, commercial ND vaccines can provide a robust prevention against ND, however most vaccines' production of these are based on the chick embryo, which can influence the bio-safety and environmental protection. Advances in recombinant DNA technology have made it possible to rapidly formulate subunit vaccines produced by mammalian cell lines, which has many advantages such as high security and easily mass production, is the main development direction of new animal vaccines. The F protein is the neutralizing and protective antigen of NDV which is highly related of the virulence of NDV, so it is always considered as the focus of ND subunit vaccine. Lentivirus vector is a eukaryotic expression system which can express foreign gene based on lentivirus, the vector has the same bio-characteristics as lentivirus that can insert genes into the host cell genome and it has been one of the most widely used eukaryotic expression systems. In this research, we established a F-293T cell line expressing the F protein of NDV by lentivirus vector, providing the foundation for ND subunit vaccine which is a new route for ND vaccines.

In order to establish the F-293T cell lines that can stably express the F protein. Firstly, we constructed the transfer vector pHB-F carrying GFP and F gene of NDV LaSota strain, and transfected pHB-F, pX and pG into 293T cells by liposome-mediated way. Secondly, we obtained the lentivirus by ultracentrifugation and then used the virus to infect the 293T cells. Thirdly, we selected the appropriate F-293T cells for subculture by means of gradual dilution to screen high-purity cells. At last, we established the cell lines called F-293T cells. The F gene was detected in different generations of cells by PCR, and the fluorescence intensity has no significant difference. Then, we detected the target band in SDS-PAGE and Western Blot using the medium supernatant of F-293T cells. All the consequences indicate we successfully constructed the F-293T cell lines that could express F protein steadily, and the protein has a good reactogenicity.

we also detected the immunogenicity of the F protein expressed by F-293T cells. Before detecting the immunogenicity, we need to concentrate the F protein and emulsify the protein with oil adjuvant to prepare the subunit vaccine. Then we vaccinated the chicken with the subunit vaccine, and collected the serum samples after 14 days and vaccinated them again. We collected the serum samples after 21 days and 35 days again. Chicken embryo neutralization experiment was performed to detect the immunogenicity, and the results showed the F protein expressed by F-293T cells has a satisfying

immunogenicity. All the consequences indicates that the F-293T cell line could be used to produce the ND subunit vaccines.

Key words: Newcastle disease virus, F protein, lentivirus vector, reactogenicity, immunogenicity

目录

摘要.....	I
ABSTRACT.....	II
缩略词表.....	VIII
第一章 引言.....	10
1.1 新城疫.....	10
1.1.1 研究概述.....	10
1.1.2 流行病学.....	10
1.1.3 临床症状.....	11
1.1.4 病理变化.....	11
1.1.5 诊断方法.....	12
1.1.6 防控手段.....	12
1.1.7 ND 疫苗研究进展.....	12
1.2 新城疫病毒.....	13
1.2.1 分类和形态.....	13
1.2.2 生物学特性.....	14
1.2.3 理化特性.....	14
1.2.4 培养特性.....	14
1.2.5 基因组结构.....	15
1.2.6 NP 蛋白.....	15
1.2.7 P 蛋白.....	15
1.2.8 M 蛋白.....	15
1.2.9 F 蛋白.....	16
1.2.10 HN 蛋白.....	16
1.2.11 L 蛋白.....	17
1.3 慢病毒载体系统.....	17
1.3.1 慢病毒载体系统的建立.....	17

1.3.2 慢病毒载体系统的应用.....	18
1.4 目的和意义.....	19
第二章 稳定表达 F 蛋白的 F-293T 细胞系的构建.....	20
2.1 引言.....	20
2.2 材料.....	20
2.2.1 载体、毒株和细胞.....	20
2.2.2 主要试剂.....	21
2.3 仪器设备.....	22
2.4 方法.....	23
2.4.1 新城疫病毒 RNA 提取.....	23
2.4.2 反转录.....	24
2.4.3 T 载体的构建.....	25
2.4.4 转移载体的构建.....	28
2.4.5 包装质粒、包膜质粒抽提.....	31
2.4.6 293T 细胞的培养、传代及冻存.....	31
2.4.7 细胞转染.....	31
2.4.8 慢病毒感染.....	32
2.4.9 细胞的筛选和扩大培养.....	32
2.4.10 RT-PCR 鉴定.....	32
2.4.11 SDS-PAGE 电泳.....	33
2.4.12 Western Blot.....	33
2.5 结果.....	34
2.5.1 pT-F 载体的构建.....	34
2.5.2 转移载体 pHB-F 的构建.....	36
2.5.3 包装质粒、包膜质粒的提取.....	37
2.5.4 细胞转染.....	38
2.5.5 慢病毒感染.....	39
2.5.6 阳性细胞克隆.....	39

2.5.7 细胞稳定性检测.....	40
2.5.8 SDS-PAGE.....	41
2.5.9 Western Blot 鉴定.....	41
2.6 讨论与小结.....	42
2.6.1 病毒感染的影响因素.....	42
2.6.2 影响蛋白表达量的因素.....	43
2.6.3 F 蛋白反应原性检测.....	44
第三章 F 蛋白免疫原性的检测.....	45
3.1 引言.....	45
3.2 材料.....	45
3.2.1 SPF 鸡(胚)、毒株、血清和细胞.....	45
3.2.2 主要试剂.....	45
3.3 仪器设备.....	46
3.4 方法.....	47
3.4.1 蛋白提取.....	47
3.4.2 免疫接种.....	47
3.4.3 1%鸡红细胞悬液的配置.....	47
3.4.4 NDV EID ₅₀ 的测定.....	47
3.4.5 中和试验.....	48
3.5 结果.....	49
3.5.1 F 蛋白检测.....	49
3.5.2 LaSota 株 EID ₅₀ 的测定.....	49
3.5.3 鸡胚中和试验.....	50
3.6 讨论与小结.....	51
3.6.1 细胞上清中 F 蛋白的浓缩和纯化.....	51
3.6.2 F 蛋白免疫活性检测.....	51
第四章 结论.....	52
第五章 创新点.....	53

参考文献.....	54
附录 溶液及配制方法.....	60
致谢.....	61
作者简介.....	62

缩略词表

缩写	英文名称	中文名称
AEND	Asymptomatic enteric Newcastle disease	无症状肠型新城疫
CEF	Chicken embryo fibroblasts cell	鸡胚成纤维细胞
CEK	Chicken embryo kidney cell	鸡胚肾细胞
CMV	Cytomegalovirus	巨细胞病毒
CPE	Cytopathic effects	细胞病变效应
EID ₅₀	Egg infectious dose 50	鸡胚半数感染量
ELISA	Enzyme-linked immunosorbent assay	酶联免疫吸附试验
F	Fusion protein	融合蛋白
FIV	Felines immunodeficiency virus	猫免疫缺陷病毒
GFP	Green fluorescent protein	绿色荧光蛋白
HA	Hemagglutination	血凝试验
HI	Hemagglutination inhibition	血凝抑制试验
HIV	Human immunodeficiency virus	人类免疫缺陷病毒
HN	Hemagglutinin-neuraminidase protein	糖蛋白血凝素-神经氨酸酶蛋白
ICPI	Intracerebral pathogenicity index	脑内接种致病指数
ICTV	International Committee on Taxonomy of Viruses	国际病毒分类委员会
IFA	Indirect immunofluorescence	间接免疫荧光
IHC	Immunohistochemistry	免疫组化技术
IVPI	Intravenous pathogenicity index	静脉接种致病指数
LND	Lentogenic Newcastle disease	缓发型新城疫
LTR	Long terminal repeat	末端重复序列
LV	Lentivirus vector	慢病毒载体
MDT	Mean death time	致死鸡胚平均时间
MND	Mesogenic Newcastle disease	中发型新城疫

ND	Newcastle disease	新城疫
NDV	Newcastle disease virus	新城疫病毒
RT-PCR	Reverse transcription-polymerase chain reaction	反转录聚合酶链式 反应
SIV	Simian immunodeficiency virus	猿类免疫缺陷病毒
SPF	Specific Pathogen Free	无特定病原体
VNND	Velogenic neurotropic Newcastle disease	嗜神经速发型新城 疫
VSV	Vesicular Stomatitis Virus	水疱性口炎病毒
VVND	Velogenic viscerotropic Newcastle disease	嗜内脏速发型新城 疫

第一章 引言

1.1 新城疫

1.1.1 研究概述

新城疫(Newcastle disease, ND)又称为亚洲鸡瘟,是由新城疫病毒(Newcastle disease virus, NDV)引起的禽类的病毒性传染病,易感禽主要特征是呼吸困难、下痢、神经紊乱、粘膜和浆膜出血^[1]。1926年,印度尼西亚的爪哇最早报道本病^[2];1927年,Doyle根据在英国爆发的地名将本病命名 Newcastle disease^[3]。随后,ND的流行在印度、朝鲜、斯里兰卡、日本、澳大利亚等世界各地相继被报道。ND发现的早期在不同国家曾有不同的名称,在印度发生时被命名为 Ranikhet 病,在朝鲜发生时被称为朝鲜鸡瘟。由于 NDV 不同毒株的毒力差异很大,因此世界动物卫生组织(World Organisation for Animal Health, OIE)对于 ND 有着严格的定义:ND 指毒力标准满足以下两个标准的 NDV 引起的家禽感染,即 NDV 1 日龄雏鸡脑内接种致病指数(intracerebral pathogenicity index, ICPI)大于或等于 0.7;NDV F2 蛋白 C 端有多个碱性氨基酸,F1 蛋白 N 端 117 位为苯丙氨酸。

ND 因其高发病率和死亡率,对养禽业造成了巨大的经济损失,该病在许多以农业为主要经济来源的第三世界国家呈常在性地方流行性发展。在《OIE 陆生动物卫生法典》中,该病与高致病性禽流感都是必须报告的疾病。在我国 ND 被定义为一类动物疾病,被列为优先防治的 5 种一类疾病之一^[4]。国务院在 2012 年颁布的《国家中长期动物疫病防治规划(2012-2020)》中,明确将新城疫列为优先防控的重大动物疫病之一。19 世纪 80 年代以来,由于疫苗的广泛使用和生物安全措施加强,我国新城疫的流行在一定程度上得到了控制,但由于种种原因,免疫失败的现象屡有发生,因此 ND 依然制约着我国养禽业的发展及禽产品的出口^[5]。

1.1.2 流行病学

ND 几乎对所有驯养和野生的禽类都有感染性,包括鸡、鸭、鹅、火鸡、鸽子、鹌鹑、鸵鸟、孔雀等 250 多种禽类。鸡最易感,鸭等水禽对 NDV 有一定的抵抗力。ND 传染源不仅包括病禽和流行间歇期的带毒禽,也包括带毒野鸟^[6]。病鸡在出现症状前 24 小时,病毒从口鼻和粪便排出感染其他禽类传播病毒。痊愈的鸡多数在临床症状消失 5 到 7 天后停止排毒,部分可排毒长达一个月以上。保留这种带毒鸡,是造成 ND 一直流行的原因之一。此外,病死禽的不恰当处理、表面健康的带毒鸡以及肉蛋在市场的销售、野生鸟类的迁徙、观赏鸟类的流动等都在 ND 传播和扩散中起了重要作用^[7]。由于 NDV 在比较宽泛的环境条件下能稳定存活,所以除了与 NDV 的直接接触以外,间接接触也被认为是感染的主要途径。含病毒的分泌物、粪便和尸体甚至是被病毒污

染的饲料、饮水、气溶胶、运输工具等都能传播病毒。

自从首次发现 ND 以来, ND 在世界范围内已经发生四次大流行^[8]。第一次大流行发生于 20 世纪 20 年代后期和 30 年代, 是从东南亚开始流行, 包括朝鲜、印度、菲律宾、日本和中国等很多国家都发生 ND 流行。随后通过 30 多年的传播, ND 在全世界流行, 亚洲毒株多为基因 III 型, 欧洲毒株多为基因 IV 型, 北美毒株为 II 型^[9]。由鸚鵡类禽种引起的第二次新城疫大流行源于中东, 养禽业的集约化和鸚鵡类禽种的贸易是流行的主要原因, 主要流行的基因型是 V 型和 VI 型^[10]。第三次大流行中, 首先被感染的是鸽子, 症状与嗜神经型 ND 相似, 可导致鸽群的大量死亡。流传的 NDV 毒株基因型为 VIb 型, 目前鸽群中爆发的 ND 大多数仍由其引起^[11]。由基因 VII 型 NDV 导致的大流行被称为第四次新城疫大流行, 本次流行与前三次大流行相比, 规模速度和感染的品种以及造成的危害都是最严重的^[12]。中国目前流行的基因型以 VII 型与 VI 型为主, VII 型主要存在于鹅群和鸡群中, 而 VI 型以鸽群为主^[13]。随着新城疫疫苗的广泛使用, 虽然疫情次数逐年下降, 但是病毒在免疫选择压力下, 发生免疫逃避, 导致局部地区出现免疫失败现象^[14]。

1.1.3 临床症状

ND 的自然感染潜伏期为 5-12d, 嗜内脏型毒株的潜伏期平均为 5-6d。依据鸡感染 NDV 后表现的临床症状将 ND 分为 5 个致病型: 以消化道出血为主要特征的嗜内脏速发型 ND(velogenic viscerotropic Newcastle disease, VVND), 高死亡率^[15]; 以神经症状和呼吸道感染为主要特征的嗜神经速发型 ND(velogenic neurotropic Newcastle disease, VNND), 高死亡率^[16]; 以神经症状和呼吸道感染为主要特征的中发型 ND(mesogenic Newcastle disease, MND), 低死亡率^[17]; 以轻度或亚临床性呼吸道感染为主要特征的缓发型 ND(lentogenic Newcastle disease, LND); 以亚临床性肠道感染为主要特征的无症状肠型 ND(asymptomatic enteric Newcastle disease, AEND)^[18]。

VVND 常引起鸡突然死亡, 临床无明显症状, 一般表现为体温急剧升高, 精神沉顿, 食欲下降废绝, 卧地。随着病情加深, 严重下痢, 呼吸困难, 口鼻流出酸臭液体, 衰竭死亡, 死亡率高达 100%^[19]。VNND 常引起禽群严重的咳喘, 一到两天后出现神经症状, 无肠胃症状, 产蛋鸡产蛋下降。发病率高达 100%, 成年鸡死亡率为 50%, 雏鸡为 90%。MND 引起呼吸道疾病, 产蛋下降, 死亡率较低。LND 一般不引起成年鸡发病, 雏鸡可能出现严重呼吸道疾病。

1.1.4 病理变化

与临床症状一样, 感染鸡的大体病变和受侵害的器官与毒株、感染病毒的致病型、宿主及影响疾病的严重程度的其他因素有关。但多数禽类以呼吸系统、消化道系统和免疫系统的病变为主, 雌性禽体的生殖系统亦常出现出血性病变。病毒感染后, 腺胃、盲肠及小肠粘膜有明显的出血、溃疡。脾脏出血坏死, 有少许针尖大白色坏死点^[20]。法氏囊粘膜表面常有胶冻样粘液及小的出血点。呼吸道病变主要表现为粘膜出血和明显的气管充血。非典型 ND 主要病理变化是呼吸道黏膜的充血和炎性渗出, 泄殖腔粘膜出血、坏死以及生殖系统的出血性和炎性病变。鸡在产蛋期感染 NDV 可见腹腔中有卵黄, 卵泡软化变性, 其他生殖器官也可能有出血和颜色变化^[21]。

1.1.5 诊断方法

根据临床症状和剖检病变，一般可以对 ND 进行初步诊断。但是 ND 与一些常见的禽病如禽流感、霍乱等在流行病学、临床症状和病理变化等方面有相似的地方，所以若需确诊 ND 要以实验室诊断为辅助。NDV 的分离鉴定是最经典的诊断方法之一，通常利用拭子采集活鸡泄殖腔和口鼻分泌物或者采集死鸡肠道，肾脏，肝脏等病变部位进行 NDV 分离，接种至 9-10 日龄鸡胚，4-7 天后收集尿囊液利用血凝试验(Hemagglutination, HA)和血凝抑制试验(Hemagglutination inhibition, HI)检测 NDV^[22]。此外，分离病毒也可以用鸡胚成纤维(chicken embryo fibroblasts, CEF)细胞、乳仓鼠肾 (babyhamster Syrian kidney, BHK-21)细胞、鸡胚肾(chicken embryo kidney, CEK)细胞等细胞系进行培养^[23]。酶联免疫吸附试验(Enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA)是目前应用最为广泛的一种血清学检测方法，包括间接 ELISA、夹心 ELISA、竞争 ELISA 的多种 ELISA 方法已经应用于 NDV 抗原和抗体的检测当中^[24]。分子生物学诊断方法中，最常用的是反转录 PCR(Reverse transcription-polymerase chain reaction, RT-PCR),因其快速、灵敏、特异、简便等优点，得到了 OIE 的认可。国内外已经建立了成熟的检测体系，不仅可以利用 RT-PCR 确诊 NDV，还可以区分强弱毒株，在实际应用中取得了显著的成效^[25]。四川农大的向华利用金标银染显色技术，构建了能同时检测 NDV、禽白血病毒、马立克病病毒、传染性法氏囊病毒等六种病毒的可视化基因芯片。该芯片无需借助传统的荧光扫描仪，操作简单、成本低、灵敏度高，常温下能够保存两个月^[26]。除此以外，免疫组化技术(Immunohistochemistry, IHC)、琼脂扩散试验、荧光定量 PCR 等技术手段也被广泛的应用于 ND 的诊断中。

1.1.6 防控手段

由于不同国家的 ND 流行情况不同，全世界范围内 ND 的防控策略可以分为三种：第一种是西欧、北美等无 ND 状态的发达国家，主要采取严格的动物及动物产品的进出口检验检疫措施以防止引入 NDV，如果不慎出现疫情则采取扑杀措施直至恢复无 ND 状态；第二种是 ND 呈地方流行、家禽饲养以生物安全水平较高的规模化企业为主的国家，一般情况下保持免疫无疫状态；第三种是 ND 呈常在性地方流行而家禽饲养以生物安全水平地的中小型农场和庭园养殖为主的国家，很大程度依赖疫苗防控 ND，但经常会爆发流行^[27]。我国目前对于新城疫的基本防控策略是“以免疫为主，免疫和扑杀相结合”的综合防控策略，而且在未来相当长的一段时间都会以这种防控策略为主^[28]。疫苗免疫是防控 ND 的重要措施，可以减轻发病和死亡造成的经济损失，可以降低病毒感染后的排毒量。

1.1.7 ND 疫苗研究进展

新城疫疫苗分为常规疫苗和新型疫苗两大类，临床上常用的是常规疫苗，常规疫苗分为灭活疫苗和弱毒活疫苗；而包括 DNA 疫苗、亚单位疫苗、活载体疫苗等新型疫苗也正在研发和实验中。灭活疫苗是用感染性 NDV 尿囊液，以福尔马林灭活病毒，然后与矿物油(注射用白油)或蜂胶佐剂进行乳化混合而成，目前新城疫灭活疫苗多以 LaSota 株为生产毒株。弱毒活疫苗根据毒力可

分为中等毒力和弱毒力疫苗，中等毒力疫苗应用最普遍的是 I 系，弱毒疫苗包括 II 系和 IV 系 (LaSota 株)^[29]。灭活疫苗不能有效刺激细胞免疫，接种次数多，活疫苗有毒力返强的风险，因此需要研发新型疫苗来更好地控制 ND 流行。

DNA 疫苗具有生产成本低廉，毒性低，易于生存多价多联疫苗，便于保存运输等特点，是新型疫苗研究的热点之一。沙万里将 NDV 的 F 和 HN 基因插入到真核表达载体 pVAX I 中，分别构建了 pVAX I-F、pVAX I-HN、PVAX I-F-HN 三种质粒。与对照质粒一起注入 2 周龄雏鸡体内，免疫后攻毒 NDV LaSota 株。PVAX I-F-HN 免疫组保护率为 93.3%，显著高于其他组，证明该 DNA 疫苗能够诱导机体产生免疫应答和免疫保护作用^[30]。亚单位疫苗是指利用分子生物学技术，将病原的保护性抗原基因克隆表达载体或整合入细胞基因组中，使其在受体细胞中高效表达，然后提取目的蛋白作为抗原，通常再加入佐剂制成的基因工程疫苗。此类疫苗只含有病原的抗原成分，不含有核酸，因此具有较高的安全性。Mori 等利用杆状病毒作为载体表达新城疫病毒 D26 株的 F 基因，将构建的重组病毒感染草地夜蛾细胞，表达的 F 蛋白能正确定位于细胞表面，将产生的亚单位疫苗免疫鸡，可以抵抗 NDV 强毒的攻击^[31]。活载体疫苗通常以弱毒或无毒的病原体作为载体，将抗原性基因插入基因组或插入质粒导入病原体，使病原体能够表达异源蛋白。目前，不仅有以减毒沙门氏菌、禽流感病毒、火鸡疱疹病毒为载体构建活载体疫苗的研究，也有将 NDV 作为病毒活载体构建疫苗的报道。中国农业科学院哈尔滨兽医研究所团队通过基因编辑技术缺失了传染性喉气管炎病毒的复制非必须基因 US9，插入 NDV LaSota 株的 F 蛋白，构建了表达 F 蛋白的传染性喉气管炎重组病毒株，免疫攻毒后发现能够对两种病毒的强毒株都提供有效的免疫保护^[32]。

1.2 新城疫病毒

1.2.1 分类和形态

副黏病毒科由肺病毒亚科(Pneumovirinae)和副黏病毒亚科(Paramyxovirinae)组成，而副黏病毒亚科又包括亨尼病毒属(Henipavirus)、麻疹病毒属(Morbillivirus)、呼吸道病毒属(Respirovirus)、腮腺炎病毒属(Rubulavirus)和禽腮腺炎病毒属(Avulavirus)共五个属。2005 年国际病毒分类委员会(International Committee on Taxonomy of Viruses, ICTV)把 NDV (APMV-1)连同其他禽副黏病毒(APMV-2 至 APMV-10)分划至禽腮腺炎病毒属^[33]。NDV 只有一个血清型^[34]，这意味着毒株之间抗原性虽有差异，但是彼此之间仍有一定的交叉保护^[35]。在遗传学分型上，NDV 可分为 I 类(Class I)和 II 类(Class II)。I 类只有一个基因型，II 类却可将基因型继续细分为 I 到 XVIII^[36]。根据不同毒株的致病性不同，可以将 NDV 分为速发型(强毒株)、中发型(中毒株)和缓发型(弱毒株)，主要是根据最小致死剂量病毒致死鸡胚平均时间(mean death time, MDT)、ICPI、6 周龄 SPF 鸡静脉接种致病指数(intravenous pathogenicity index, IVPI)三个指标进行分类^[37]。

NDV 的病毒粒子有囊膜，球形，直径介于 100-500nm 之间；若囊膜破损则呈多边形。病毒粒子中心有一个与蛋白相连接的单股负链 RNA 形成的呈螺旋形对称的直接为 17-18nm 的核衣壳^[38]。NDV 的核衣壳外是双层脂质膜，囊膜表面覆盖有纤突，纤突是由糖蛋白血凝素-神经氨酸酶

蛋(Hemagglutinin-neuraminidase protein, HN)和融合蛋白(Fusion protein, F)组成, 纤突间距 8-10nm, 长 8-12nm, 宽 2-4nm^[39]。NDV 含有 20%至 25%的脂质, 主要来源于宿主细胞, 还含有 6%的碳水化合物。

1.2.2 生物学特性

组成病毒表面纤突的 HN 蛋白能够与红细胞(red blood cell, RBC)表面受体结合, 所以 NDV 拥有了凝集 RBC 的特性, NDV 血凝特性及抗血清的特异性可以帮助科研人员对 ND 进行临床诊断。Winslow 研究表明, NDV 可凝集人、豚鼠、小鼠、麻雀、鸡的 RBC, 但是对牛、羊的 RBC 凝集能力因毒株而异^[40]。而 HN 的神经氨酸酶又可以将病毒从 RBC 上解离下来, 所以 NDV 在血凝一段时间后, 病毒又与 RBC 脱离, 重新悬浮于液体之中^[41]。

溶瘤病毒由于自身的溶解肿瘤细胞特性, 引起抗肿瘤免疫应答和安全性等优点, 成为肿瘤治疗的研究热点之一。这种概念自从 20 世纪 50 年代被提出后, 包括 NDV、脊髓灰质炎病毒、腺病毒、甲型流感病毒等多种溶瘤病毒都成为科学家们研究的热门候选病毒^[42]。1965 年, Cassel 和 Garrett 首先发现了 NDV 的溶瘤特性, 此后 NDV 被广泛应用于抗肿瘤的临床前试验和临床试验^[43]。NDV 在肿瘤细胞的复制速度比在正常细胞复制快 104 倍, 并且可以刺激生成 TNF、IFN 和 IL-2 等多种细胞因子, 也可以刺激宿主细胞产生抗肿瘤的细胞因子^[44]。NDV 对人无致病性, 在肿瘤治疗时具有良好的安全性, 因此 NDV 作为抗肿瘤治疗的另一种手段具有广阔的应用前景。

1.2.3 理化特性

NDV 在自然环境中相对较稳定, 可以在一定范围的温度和 pH 中生存。研究发现, 物理化学处理均可以破坏 NDV 的感染性。NDV 在 55°C 45min, 60°C 30min, 100°C 1min 下失去活力, 在 37°C 可存活 7-9d, 8°C 可存活数年^[45]。NDV 对紫外的抵抗力较弱, 阳光直射 30min 内病毒全部死亡。NDV 在 pH 大于 10 强碱环境或小于 2 的强酸环境中易被破坏, 在中性环境下很稳定。NDV 对常用的消毒药物如强氧化钠、福尔马林、苯酚等抵抗力不强, 消毒药物在推荐使用浓度下即可灭活 NDV^[46]。NDV 的稳定性不仅与不同毒株的差异有关, 还与所处介质有关, 因此具体的 NDV 消毒方式也因情况而异。

1.2.4 培养特性

NDV 能够在鸡、鸡胚和细胞培养物上进行生长。NDV 能够在多种禽类宿主体内增殖, 鸡是最常用的自然宿主。NDV 对鸡的致病性主要取决于毒株自身的毒力, 但是也和鸡的日龄、感染的途径和剂量、环境条件有关。NDV 进行毒力复壮时, 可以采用鸡感染增殖。所有 NDV 均可在鸡胚中增殖, 大多能引起鸡胚死亡^[47]。NDV 在无特定病原体(Specific Pathogen Free, SPF)鸡胚中增殖可以保持纯净且容易达到高效价, 所以 SPF 鸡胚常用于 NDV 的分离和增殖。NDV 一般在 10-12 日龄鸡胚的绒毛尿囊膜细胞增长, 所以尿囊液病毒滴度很高, 一般使用尿囊腔接种病毒^[48]。NDV 能够在多种原代或传代细胞中增殖, 常用的有 CEF、CEK、BHK-21 细胞等。NDV 生长在

细胞上可以观察到细胞变圆、合胞体形成、细胞死亡之类的细胞病变效应(cytopathic effects, CPE)和蚀斑。NDV 在细胞系上增殖一般比 SPF 鸡胚效果差,所以细胞系一般用于 NDV 的分离培养而不用用于增殖^[49]。

1.2.5 基因组结构

NDV 为单股、负链、不分节段的 RNA。从世界各地分离的 NDV 基因组全长有三种类型:1960 年之前分离的长度为 15186nt 毒株;中国发现的长度为 15192nt 毒株;德国发现的长度为 15198nt 的无致病性的毒株^[50]。新城疫病毒 RNA 包括 6 个结构基因,编码 7 种结构蛋白,分别为核衣壳蛋白(Nucleocapsid protein, NP)、磷酸化蛋白(Phosphate protein, P)、基质蛋白(Matrix protein, M)、融合蛋白(Fusion protein, F)、血凝素-神经氨酸酶蛋白(Haemagglutinin Neuraminidase protein, HN)和 RNA 依赖性 RNA 聚合酶(Large protein, L),基因的排列顺序为 3' — NP — P — M — F — HN — L — 5' ^[51]。根据所在的位置可以将结构蛋白分为内部蛋白和外部蛋白,内部蛋白包括 NP、P、L,负责 RNA 的转录与复制;外部蛋白为 HN、F、M,负责囊膜的保护和支撑^[52]。

1.2.6 NP 蛋白

NP 蛋白也被称为 N 蛋白,由 489 个氨基酸构成,分子质量为 55kDa。NP 蛋白包裹了病毒的 RNA 基因组,保护 RNA 不受核酸酶的降解^[53]。NP 蛋白在病毒粒子内大量存在,与 RNA 结合形成螺旋状的核衣壳,还可以与 P 蛋白、L 蛋白继续组装形成鲑骨状的核糖核蛋白复合物作为 RNA 合成的模板。Errington 和 Emmerson 利用杆状病毒表达 NDV 的 NP 蛋白时发现, NP 蛋白能够自发形成螺旋的核衣壳形状^[54]。NP 的 N 端氨基酸与 RNA 相联系组装核衣壳, C 端介导了 P 蛋白与核衣壳或复合物的结合。若缺少 C 端,则无法启动基因组的复制。此外, NP 蛋白可与 M 蛋白相互作用介导病毒粒子的组装^[55]。

1.2.7 P 蛋白

P 蛋白由 395 (Class II)或者 399(Class I)个氨基酸组成,分析得出的分子质量约为 42kDa。由于 P 蛋白在细胞内有多种磷酸化修饰,磷酸化位点多为丝氨酸和苏氨酸,磷酸化后形成三聚体寡聚体结构,所以 SDS-PAGE 分析得出 P 蛋白分子质量在 50 到 55kDa 不等。P 蛋白在病毒粒子的复制和转录中扮演重要的角色, P 蛋白与 L 蛋白结合形成病毒 RNA 聚合酶对 NDV 基因组的合成起中心调节作用, P 蛋白与 NP 蛋白结合控制 NDV 基因组从转录到复制的转换, P 蛋白、L 蛋白、NP 蛋白也可以一起结合形成复合物参与基因组的复制和转录^[56]。

1.2.8 M 蛋白

M 蛋白由 364 个氨基酸组成,分子质量为 40kDa^[57]。M 蛋白是位于 NDV 囊膜内侧的膜蛋白,具有高度疏水性支撑着病毒囊膜。M 蛋白可以在病毒感染早期抑制宿主细胞基因组的转录和复制,确保 NDV 基因组在细胞装配之前正常进行转录复制。M 蛋白可以在细胞核和细胞质之间进

行穿梭,对病毒粒子进行装配和释放^[58]。在 NDV 的遗传进化分析中发现 M 蛋白是较为保守的蛋白,但不同副黏病毒 M 蛋白氨基酸序列同源性并不高,暗示 M 蛋白发挥功能可能是通过自身的高度碱性和疏水性特性而不是依赖于保守的氨基酸残基^[59]。也有研究表明 M 蛋白可能与维持病毒核衣壳结构有关^[60]。

1.2.9 F 蛋白

F 蛋白由 553 个氨基酸组成,分子质量为 59.6kDa。F 蛋白是 NDV 囊膜外的糖基化蛋白,与 HN 蛋白一起形成了病毒颗粒表面的纤突。F 蛋白主要负责病毒囊膜和宿主细胞质膜之间的融合,确保病毒核衣壳通过细胞膜进入细胞内,是 NDV 感染细胞所必需的。F 蛋白的结构包含有信号肽、裂解位点、融合肽、七肽重复区 A 和 B、跨膜区及胞质尾区等多个结构域^[61]。Toyoda 通过对 NDV F 蛋白的氨基酸序列的分析,表明大多数 NDV 流行毒株 F 蛋白氨基酸序列具有高度的同源性,其同源性高达 89.3%~99.6%^[62]。

F 蛋白首先以惰性前体 F0 的形式存在,经宿主细胞蛋白酶水解后产生由二硫键连接的 F1 和 F2 两个片段,表现出融合活性,进而导致病毒穿入宿主细胞膜。F 蛋白裂解位点的氨基酸序列是决定病毒毒力的关键因子,序列中的保守谷氨酰胺残基对 NDV 的复制和致病性起着重要作用^[63]。在宿主蛋白水解酶的作用下,前体 F0 蛋白将在剪切位点发生剪切生成有活性的 F1 和 F2 两个片段。F1 亚基的 N 端有 20 个残基的疏水区,这一区域的序列在副黏病毒科不同属的病毒中也是高度保守的,其同源性达到 70%~90%。由于该疏水区能插入到膜中,引起病毒包膜和质膜之间以及质膜之间的融合,故称为融合肽^[64]。融合肽是直接负责 F 蛋白的膜融合功能的结构区域,该肽段在 F0 被剪切激活后才具有膜融合功能。研究已经表明,NDV 的 F 蛋白和 HN 蛋白与 NDV 毒力强弱有很大的关联性,并且 F 蛋白表现出比 HN 蛋白更好的抗原性^[65]。

1.2.10 HN 蛋白

HN 蛋白由 570-620 个氨基酸组成,分子质量大约为 63kDa。HN 氨基酸长度不同是由于终止密码子所在位置不同,有的以前体 HN0 形式翻译后再裂解,有的则不形成 HN0 前体。571 个氨基酸组成的 HN 蛋白多见于强毒株,616 个氨基酸组成的 HN 蛋白多见于弱毒株,但是目前氨基酸长短与 NDV 的毒力关系机制尚不清楚^[66]。HN 蛋白根据结构可分为头部、颈部、尾部,由于 HN 蛋白的主要疏水区集中在 N 端,所以尾部也被称为胞质内区^[67]。

研究表明,HN 蛋白与 NDV 侵染宿主细胞、释放病毒粒子、协助 F 蛋白促进融合等功能。HN 蛋白具有 HA 和 NA 两种活性,HA 具有识别宿主细胞膜的唾液酸受体并与之结合的能力,NA 具有破坏这种结合的能力,两种活性受到 pH 和卤离子浓度的调节。两种活性相辅相成,HA 帮助 NDV 感染宿主细胞,NA 则帮助子代病毒粒子从细胞释放^[68]。过去研究认为,HA 与细胞受体结合后可以激发 F 蛋白与细胞膜进行融合^[69],不过现在的模型显示 F 蛋白和 HN 蛋白首先结合形成亚稳定的复合物,随后 HN 蛋白与细胞膜唾液酸受体结合释放 F 蛋白,F 蛋白被剪切成 F0 和 F1 开始融合。HN 颈部保证了 F 蛋白融合的特异性,HN 和 F 蛋白之间的联系由与 F 蛋白结合的 HN 蛋白颈部胞外区氨基酸残基(74-110 氨基酸)介导,这段氨基酸有 2 个七肽重复序列可以使 F

蛋白和 HN 蛋白复合体形式打开, 促进 F 蛋白的融合活性^[70]。

1.2.11 L 蛋白

L 蛋白是 NDV 最大的蛋白, 基因全长约 6.7kb, 由 2204 个氨基酸组成, 分子质量为 220kDa。大部分参与转录和复制的酶都在 L 蛋白上, L 蛋白负责编码 mRNA 和 RNA 的复制, L 蛋白也负责 mRNA 5'端加帽, 3'端加 polyA 尾巴, 甲基化作用^[71]。L 蛋白和 P 蛋白在病毒颗粒内含量很低, 是 RNA 依赖的 RNA 聚合酶的两个亚单位, 两者复合物具有完整的酶活性。聚合酶识别被 NP 蛋白包裹的 RNA 后, NP 蛋白构象发生改变, 核衣壳螺旋舒展, 给聚合酶留下足够空间阅读模板 RNA^[72]。L 蛋白还能使 NP 蛋白和 P 蛋白发生磷酸化作用, 因此也认为 L 蛋白是一种蛋白激酶。

1.3 慢病毒载体系统

1.3.1 慢病毒载体系统的建立

慢病毒属(Lentivirus)属于逆转录病毒科(Retroviridae), 是二倍体 RNA 病毒, 常见的慢病毒包括人类免疫缺陷病毒 (human immunodeficiency virus, HIV), 猫免疫缺陷病毒 (felines immunodeficiency virus, FIV), 猿类免疫缺陷病毒(simian immunodeficiency virus, SIV)等。慢病毒能够表达反转录酶并利用这种酶将病毒 RNA 反转录成 cDNA 再产生双链 DNA;慢病毒还能表达整合酶并利用这种酶将 DNA 稳定的整合到宿主细胞的染色体中表达^[73]。随着基因编辑技术近二十年的快速发展, 科研人员利用慢病毒自身的特性构建了慢病毒载体(lentivirus vector, LV)系统。慢病毒载体是以慢病毒的基因组为基础, 将多个编码病毒活性相关的基因去除, 使其具有安全性, 再在基因组骨架中引入目的外源基因表达框构建的能够表达外源基因的载体系统^[74]。由于慢病毒载体系统拥有慢病毒能够将基因稳定插入宿主细胞的生物学特性, 使其逐渐成为应用最广泛的基因导入工具之一。研究最为广泛深入的慢病毒载体是由 HIV 改装而来, 其中又包括了 HIV-1 型载体系统和 HIV-2 型载体系统。HIV 基因组为双链 RNA, 基因的排列顺序为 5'LTR -gag-pol-vif-vpr-tat-rev-vpu-env-nef-3'LTR。负责慢病毒结构和功能的基因是 gag、pol、env, gag 编码结构蛋白, pol 负责编码复制所需的酶如反转录酶和整合酶, env 负责编码包膜糖蛋白^[75]。Tat 和 rev 基因是调节基因, 负责编码复制需要的反式作用蛋白促进病毒复制。Vif、vpr、vpu、nef 基因是辅助基因, vif 和 vpu 负责病毒释放; vpr 是 LTR 反式激活因子, 促使细胞凋亡; nef 是体内感染不可缺少的部分^[76]。

以 HIV-1 载体系统为例, 慢病毒载体系统的发展经过四个阶段。第一代载体系统属于双质粒表达系统, 转移载体是尽量去除病毒基因组中反式作用蛋白基因序列, 并用目的基因表达框替代; 包装质粒保留或部分保留 LTR 和包装信号以提供病毒所需蛋白。转移质粒和包装质粒共转染细胞后能够产生无复制能力却有感染能力的病毒, 但是组装的病毒产生的滴度低, 并且在共转染时可能有重组成有复制能力的病毒的风险^[77]。第二代和第三代系统都是三质粒系统, 三质粒分别为转移质粒、包膜质粒和包装质粒。包装质粒中 5'LTR 被替换为巨细胞病毒(cytomegalovirus, CMV)启

动子, 3'LTR 被替换为 β globin-polyA。包膜质粒中 HIV-1 中 env 基因编码的包膜蛋白被替换为水疱性口炎病毒(Vesicular Stomatitis Virus,VSV)的 G 蛋白, VSV-G 能够识别细胞表面的低密度脂蛋白受体, 提高了宿主细胞的范围^[78]。三质粒系统保留了病毒的辅助基因, 重组成活病毒的可能性还是较大, 而第三代在此基础上进行调整, 去除辅助基因序列保留 gag、pol、rev 基因, 大大降低了重组活病毒的可能性, 提高了安全性^[79]。近几年来, 第四代质粒系统又在三代基础上发展起来, 在不影响表达效率的前提下进一步提高了安全性。第四代质粒系统包括四个质粒, 第一个质粒负责组装, 编码形成病毒颗粒所需的蛋白, 包括 pol 和 gag 基因; 第二个质粒包含负责反转录、整合和组装的反式作用序列因子, 同时也是放置目的基因的载体; 第三个质粒负责表达 VSV-G; 第四个质粒包含 rev 序列。第四代质粒系统加入了可诱导基因, 可以人为的控制基因表达, 所以也被称为可调控性慢病毒载体^[80]。

1.3.2 慢病毒载体系统的应用

在外源基因导入细胞的方法中, 应用较为广泛的是电穿孔技术、原生质体融合技术、磷酸钙转染技术、病毒表达载体等。病毒表达载体包括腺病毒载体、慢病毒载体等, 慢病毒载体与其他病毒载体比较有以下几个优点: 宿主细胞广泛, 包括分裂细胞和分裂细胞, 也包括干细胞和不分化的细胞等^[81]; 携带的目的基因对宿主细胞的转录沉默有一定抵抗能力; 可以携带 8kb 左右基因片段^[82]; 能兼容或插入多个组织细胞特异性或非特异性启动子和增强子^[83]; 导入宿主细胞的基因能够稳定表达^[84]。慢病毒载体自从 1996 年发展起来后, 被广泛的用于转基因动物模型构建、肿瘤治疗、亚单位疫苗等方面的研究中。

慢病毒载体系统是制备转基因动物的良好手段之一, 利用慢病毒转染体外培养的动物精原细胞导入目的基因后, 再移植到动物的睾丸中, 经过自然交配得到的转基因动物可以稳定遗传突变的动物表型^[85]。突变的动物表型和人类一些疾病的症状相近, 这些突变动物可以成为包括心血管疾病、精神性疾病、遗传病的人类疾病治疗的理想模型。基因治疗作为肿瘤治疗的新的技术手段正在迅速发展, 主要是针对肿瘤细胞中的异常基因, 引入有治疗价值的目的基因, 使其在目的细胞稳定有效长期的表达达到治疗目的, 慢病毒载体的特征和优势使其成为基因治疗的良好工具^[86]。亚单位疫苗是指利用分子生物学技术, 将病原的保护性抗原基因克隆表达载体或整合入宿主细胞基因组中, 使其在受体细胞中高效表达, 然后提取目的蛋白作为抗原, 通常再加入佐剂制成的基因工程疫苗。细胞中表达目的蛋白分为瞬时表达和稳定表达, 瞬时表达系统中外源基因不与细胞基因组进行整合, 蛋白表达时限较短, 制作亚单位疫苗成本较高。稳定表达系统中, 载体 DNA 能长久稳定存在于细胞中, 目的蛋白表达长久稳定, 制作亚单位成本较低。利用慢病毒载体系统能将目的抗原基因转入到特定的宿主细胞中长久稳定的表达, 成为亚单位疫苗制备的一种新的技术手段。慢病毒载体系统在快速发展的同时也有一些问题: 慢病毒基因整合位置的不可控可能会引起基因突变或激活致病基因, 造成不可逆的病变^[87]; 慢病毒滴度仍达不到最佳需求; 不同物种慢病毒载体系统的交叉使用效率不明朗^[88]; 慢病毒载体系统包装出有复制能力的慢病毒风险。在今后的研究中, 科研人员需克服这些问题才能使慢病毒载体系统得到更广泛的应用。

1.4 目的和意义

ND 是由 NDV 引起的禽类的急性高致病性病毒性传染病，是危害养鸡业最主要的疫病之一。因其高发病率和死亡率，ND 对养禽业造成了巨大的经济损失。疫苗免疫是用于预防和控制 ND 发生和流行的最主要措施，也是最经济最有效的技术手段。传统疫苗均使用鸡胚生产，无害化处理压力大，易造成环境污染，因此需要研发新型疫苗来更好地控制 ND 流行。

随着分子生物学技术的发展，采用哺乳动物细胞系表达特定蛋白而制备的基因工程亚单位疫苗已取得了很大地进展，是当前兽用疫苗研究的热点。本研究拟使用慢病毒表达载体构建表达新城疫病毒主要保护性抗原 F 蛋白的 F-293T 细胞系并研究 F 蛋白活性，探索性研制新城疫亚单位疫苗，为新城疫新型疫苗研发提供一种新的研究路径。

第二章 稳定表达 F 蛋白的 F-293T 细胞系的构建

2.1 引言

慢病毒载体是以慢病毒的基因组为基础, 去除编码病毒活性的基因, 再在基因组骨架中引入目的外源基因表达框构建的能够表达外源基因的载体系统。慢病毒载体系统拥有将外源基因稳定插入宿主细胞的生物学特性, 使其逐渐成为应用最广泛的基因导入工具之一。本实验使用的汉恒生物慢病毒载体系统是三质粒系统, 主要用于基因的过表达, 组成为 pspax2、pMD2G、pHBLV-CMVIE-IRES-ZsGreen 质粒。pHBLV-CMVIE-IRES-ZsGreen 质粒简称为 pHB 质粒, 是一种转移质粒, 负责携带外源基因。Pspax2 质粒简称为 pX 质粒, 携带 pol 和 gag 基因, 是包装质粒。pMD2G 质粒简称为 pG 质粒, pG 质粒用 VSV-G 替换了 HIV-1 中的 env 基因, 扩大了宿主细胞的范围, 是包膜质粒。

本研究根据 NDV LaSota 株 F 基因的保守序列设计了一对通用引物 F-F1/R1, 并以 NDV LaSota 株基因组为模板进行 RT-PCR 扩增出 NDV LaSota 株的 F 基因并克隆到 T 载体中。再根据 pHB 多克隆位点序列信息和 F 基因的序列, 设计另一对引物 F-F2/R2 扩增 F 基因序列, 利用同源重组连接法将 F 基因克隆到 pHB 载体中, 构建能表达绿色荧光的 pHB-F 质粒。利用 LipoFiter 脂质体转染试剂盒, 将 pHB-F、pX、pG 三质粒共同转染 293T 细胞包装慢病毒, 经超速离心纯化后, 再次感染 293T 细胞, 筛选稳定整合 F 基因的 293T 细胞。由于转移载体带有绿色荧光标志基因, 所以感染后可以通过荧光强度反应转染效率和表达情况。通过有限稀释法, 获得单个荧光信号强的 293T 细胞进行扩大培养, 并连续传代, RT-PCR 检测传代细胞中目的基因的稳定性, 最终获得一株稳定的表达 F 蛋白的 293T 细胞株。通过 SDS-PAGE 检测 F 蛋白, 并通过 Western Blot 检测 F 蛋白的反应原性。

2.2 材料

2.2.1 载体、毒株和细胞

名称	公司
pGEM-T 载体	普洛麦格(北京)生物技术有限公司
pHB、pX、pG 载体	汉恒(上海)生物技术有限公司
NDV LaSota 毒株	中国兽医药品监察所

293T 细胞	本实验室保存
JM109 细胞	大连宝生物工程有限公司(TAKARA)

2.2.2 主要试剂

名称	公司
病毒 RNA/DNA 快速纯化试剂盒	大连宝生物工程有限公司(TAKARA)
SuperScript™ III First-Strand Synthesis Premix Ex Taq	赛默飞世尔科技公司 大连宝生物工程有限公司(TAKARA)
超薄 DNA 产物纯化试剂盒	天根生化科技(北京)有限公司
DNA Marker2000、5000、15000	大连宝生物工程有限公司(TAKARA)
TAE(50X)	北京索莱宝(Solarbio)科技有限公司
GoldenView 核酸染料	北京赛百盛基因技术有限公司
T4 DNA 连接酶	(NEB)北京有限公司
酵母提取物、胰蛋白胨	英国 Oxoid 公司
Agar Bacteriology grade	艾普利(AppliChem)公司
氯化钠、异丙醇、无水乙醇、甲醇	国药集团化学试剂有限公司
Amp	康为世纪生物科技有限公司
E.Z.N.A Endo-Free Plasmid DNA Midi	OMEGA 公司
Q5 高保真酶	(NEB)北京有限公司
E.Z.N.A. Gel Extraction Kit	OMEGA 公司
同源重组连接试剂盒	南京诺唯赞(Vazyme)生物科技有限公司
Endotoxin-free plasmid DNA purification ...	Nalgene 公司
LipoFiter™ 转染试剂盒	汉恒(上海)生物技术有限公司
DME/F12	HyClone 公司

胰酶(0.25%, EDTA)、胎牛血清、双抗	Gibco 公司
MiniBEST Universal RNA Extraction Kit	大连宝生物工程有限公司(TAKARA)
PBS	北京中海生物科技有限公司
细胞冻存液	ZENQAQ 公司
Freestyle 293 Expression Medium	Gibco 公司
LDS Sample Buffer(4x)	赛默飞世尔科技公司
SDS Running Buffer(20x)	Novex 公司
NuPAGE™ 4-12% Bis-Tris Gel	赛默飞世尔科技公司
考马斯亮兰蛋白胶快速染色液	索莱宝(Solarbio)公司
SuperBlock™ Blocking Buffer	赛默飞世尔科技公司
Transfer Membranes	密理博(MILLIPORE)公司
3MM 滤纸	Whatman 公司
Peroxidase Substrate	Vector 公司
Centrifugal Filter Units	密理博(MILLIPORE)公司
NDV 多抗	本实验室提供
Alexa Fluor350-山羊抗鸡 IgY	北京博奥龙免疫技术有限公司
HRP-羊抗鸡 IgY IgG	北京博奥龙免疫技术有限公司
PBST(10x)	北京康为世纪生物科技有限公司
Centrifugal Filter Units	密理博(MILLIPORE)公司

2.3 仪器设备

名称	公司
生物安全柜	诺爱(NUAIR)公司

二氧化碳培养箱	ASTECC 公司
恒温培养箱	上海森信实验仪器有限公司
全温立式振荡培养箱	德国 IKA 公司
电热恒温水浴锅	南京先欧仪器制造有限公司
干式恒温金属浴锅	艾本森(ABSON)公司
制冰机	三洋(SANYO)公司
台式大容量高速冷冻离心机	海蒂诗(Hettich)公司
台式大容量超速冷冻离心机	海蒂诗(Hettich)公司
PCR 仪	艾本德(Eppendorf)公司
小型 PCR 管离心机	艾本森(ABSON)公司
小型 EP 管离心机	SIGMA 公司
电子天平	赛多利斯科学仪器(北京)有限公司
超微量核酸蛋白浓度分析仪	侨天(Quawell)公司
电泳仪	伯乐(BIO-RAD)公司
超纯水仪	颇尔(PALL)公司
转膜仪	Novex 公司
电泳仪	伯乐(BIO-RAD)公司
台式大容量高速冷冻离心机	海蒂诗(Hettich)公司

2.4 方法

2.4.1 新城疫病毒 RNA 提取

将 NDV LaSota 毒株进行稀释，利用病毒 RNA/DNA 快速纯化试剂盒提取 NDV 基因组。具体步骤参照试剂盒说明书，如下所示：

- 1) 向 EP 管中加入 NDV100 倍稀释病毒液 200 μ l，再加入 1 μ l Carrier RNA、20 μ l Proteinase K 和

200 μ l Buffer VGB。涡旋震荡后,放入 56 $^{\circ}$ C 水浴锅水浴 10min, 然后加入 200 μ l 无水乙醇, 充分混匀。

- 2) 取出 Spin Column, 放置于 Collection Tube 上。将(1)中液体移至 Collection Tube 中, 12000rpm 离心 2min 后弃去滤液。
- 3) 向 Collection Tube 中加入 500 μ l 的 Buffer RWA, 12000rpm 离心 1min 后弃去滤液。
- 4) 向 Collection Tube 中加入 700 μ l 的 Buffer RWB, 12000rpm 离心 1min 后弃去滤液。重复 2 次。
- 5) 12000rpm 空离 2min。
- 6) 弃去 Collection Tube, 将 Spin Column 放置于新的 1.5ml Rnase free collection tube 上。在 Spin Column 膜正上方加入 30 μ l 的 Rnase free ddH₂O, 室温静置 5min。
- 7) 12000rpm 离心 2min 洗脱 RNA 水溶液。

2.4.2 反转录

提取的 RNA 需要反转录成 cDNA 进行保存, 利用反转录试剂盒 SuperScriptTM III First-Strand Synthesis 对 NDV 基因组进行反转录。具体步骤参照试剂盒说明书, 如下所示:

- 1) 取 PCR 管, 加入 8 μ l RNA, 瞬时离心。每管再加入 1 μ l 的 random hexamers, 1 μ l 的 10mM dNTP mix, 瞬时离心。
- 2) 65 $^{\circ}$ C 干浴 5min, 放在冰上至少 1min。
- 3) 准备 mix 缓冲液, 加入管中瞬离, 缓冲液体系体系见表 2.1。瞬离后进行反转录 PCR 反应, 反应条件见表 2.2。

表 2.1 反转录体系

样品	体积
10 \times RT buffer	2 μ l
25mM MgCl ₂	4 μ l
0.1M DTT	2 μ l
Rnase OUT TM (40U/ μ l)	1 μ l
SuperScript III RT	1 μ l

表 2.2 反转录反应条件

温度	时间
25°C	10min
50°C	50min
85°C	5min

冰上冷却，将 cDNA 用于 PCR 或者保存于-80°C冰箱。

2.4.3 T 载体的构建

2.4.3.1 PCR 反应

以上述 NDV cDNA 为模板，根据 GeneBank(序列号:DQ195265.1)中 NDV LaSota 株 F 基因序列，利用引物设计软件 Primer 5.0，设计引物 F-F1 与 F-R1，由中美泰和生物技术(北京)有限公司合成，引物具体序列见表 2.3。

表 2.3 F 引物信息

引物名称	序列
F-F1	5' ATGGGCTCCAGACCTTCTA3'
F-R1	5' TCACATTTTTGTGGCTCTC3'

利用 Premix Ex Taq 对 cDNA 进行 PCR 扩增，PCR 体系见表 2.4。

表 2.4 PCR 体系

样品	体积
上游引物	2 μ l
下游引物	2 μ l
DNA 模板	1 μ l
Ex Taq	25 μ l
ddH ₂ O	20 μ l

PCR 反应条件：预变性 95°C 5min；变性 98°C 30s，退火 59°C 30s，延伸 72°C 1min30s，30 个循环；延伸 72°C 10min。

取 10 μ l PCR 产物，进行琼脂糖凝胶电泳。120V 电泳 20min。

2.4.3.2 F 基因片段的纯化

利用 TIAN quick Mini Purification Kit 试剂盒, 将 F 基因 PCR 产物进行片段纯化, 回收 DNA。具体步骤参照试剂盒说明书, 如下所示:

- 1) 柱平衡步骤: 向吸附柱 CB1 中(吸附柱放入收集管中)加入 500 μ l 平衡液 BL, 12000rpm 离心 1min, 倒掉收集管中废液将吸附柱重新放回收集管中。
- 2) 估计 PCR 反应液或酶切反应体积, 向其中加入 5 倍体积结合液 PB, 充分混匀。
- 3) 将上一步所得溶液加入一个吸附柱 CB1 中(吸附柱放入收集管中), 室温放置 2min, 12000rpm 离心 30-60s, 倒掉收集管中废液, 将吸附柱 CB1 放入收集管中。
- 4) 向吸附柱 CB1 中加入 600 μ l 漂洗液 PW, 12000rpm 离心 30-60s, 倒掉收集管中废液, 将吸附柱 CB1 放入收集管中。重复两次。
- 5) 取出吸附柱 CB1, 放入一个干净离心管中, 向吸附膜中间位置悬空滴加 30 μ l ddH₂O, 室温放置 2min, 12000rpm 离心 2min, 收集 DNA 溶液。

2.4.3.3 连接

利用 NEB 公司的 T4 DNA Ligase 将纯化的 F 片段与 pGEM-T 载体连接, 连接体系见表 2.5。

表 2.5 连接体系

试剂	体积
2 \times Rapid Ligation Buffer	5 μ l
PGEM-T Vector	1 μ l
PCR 胶回收产物	3 μ l
T4 DNA Ligase	1 μ l

4 $^{\circ}$ C 过夜连接。

2.4.3.4 转化

利用热激方法, 将连接产物转化至 JM109 细胞中。具体操作方法如下: 将连接产物和 JM109 感受态细胞置于冰中等待细胞融化。向 10 μ l 样品中加入 50 μ l 感受态细胞轻弹混匀, 冰浴静置 30min。将离心管置于 42 $^{\circ}$ C 水浴锅中 60s, 然后快速将管转移到冰浴中, 使细胞冷却 3min, 该过程不要摇动离心管。向离心管中加入 500 μ l 无菌 SOC(不含抗生素)培养基, 混匀后置于 37 $^{\circ}$ C, 170rpm 摇床震荡培养 45min, 目的是使菌体复苏。将离心管内液体充分吹打混匀后, 吸取 70 μ l 已转化感受态细胞滴加到相应氨苄抗生素的 LB 固体培养基, 用无菌涂布棒轻轻将菌液涂开。将平板置于室温直至晾干后, 温箱内倒置平板, 37 $^{\circ}$ C 培养 10-12h。

2.4.3.5 菌液 PCR

用无菌枪头挑取培养基内单个菌落，放入 2ml 无菌 EP 管内，加入 1ml LB 培养液。摇床 37°C,170rpm 震荡培养 4-6h 后，利用中美泰和公司合成引物 F-F1,F-R1 进行菌液 PCR。PCR 体系见表 2.6。

表 2.6 PCR 体系

样品	体积
上游引物	1 μ l
下游引物	1 μ l
菌液	3 μ l
Ex Taq	10 μ l
ddH ₂ O	10 μ l

PCR 反应条件：预变性 95°C 10min；变性 98°C 30s，退火 59°C 30s，延伸 72°C 1min30s，30 个循环；延伸 72°C 10min。

取 10 μ l PCR 产物，进行琼脂糖凝胶电泳。120V 电泳 20min。

2.4.3.6 质粒提取

选取阳性菌落继续进行扩大培养：将 100-200 μ l 菌液加入 5ml LB 液体培养基中，摇床 37°C,170rpm 震荡培养 10-12h。利用 E.Z.N.A Endo-Free Plasmid DNA Midi Kit 试剂盒提取质粒 pT-F，具体步骤参照试剂盒说明书，如下所示：

- 1) 将菌液 13000rpm 离心 1min,吸出培养液。加入 250 μ l Solution I ,涡旋震荡重新悬浮细胞，细胞悬浮后移至 1.5ml 离心管内。
- 2) 向离心管内加入 250 μ l solution II ,混匀静置 2-3min。再加入 125 μ l N3 Buffer,颠倒直至出现羊毛状沉淀。13000rpm 离心 10min,会出现紧密白色球体，迅速将上清转移至新的 1.5ml 离心管内。
- 3) 测量体积，加入 0.1 体积 ETR solution，轻柔颠倒管子 10 次，使液体均匀混合。将离心管冰浴 10min，冰浴时不断颠倒；随后在水浴锅内 42°C 孵育 5min，液体再次浑浊。
- 4) 13000 rpm 离心 3min,ETR solution 会在底部呈现蓝色。将最上一层转移至新的 1.5ml 离心管中，测量体积，加入 0.5 体积无水乙醇轻柔颠倒 6-7 次，室温静置 1-2min。
- 5) 将 HiBind DNA Mini Column 插入 2ml Collection Tube 中,每次最多转移 700 μ l 液体 DNA Mini Column 里，13000rpm 离心 1min,弃废液。重复直至所有液体都被转移。
- 6) 加入 500 μ l HBC Buffer,13000rpm 离心 1min,弃废液重新使用 Collection Tube。
- 7) 加入 700 μ l Wash Buffer,13000rpm 离心 1min,弃废液重新使用 Collection Tube,重复两次。

- 8) 13000rpm 空离 DNA Mini Column 2min 后,DNA Mini Column 放在干净 1.5ml 离心管中。向 DNA Mini Column 滤膜正上方滴加 30 μ l ddH₂O。静置 2min 后, 13000rpm 离心 1min。
- 9) 利用核酸蛋白浓度分析仪测量质粒浓度和纯度,送至中美泰和公司测序,将质粒命名为 pT-F。

2.4.4 转移载体的构建

2.4.4.1 线性 pHB 载体回收

根据汉恒生物转移载体 pHB 图谱,利用 Xho I 单酶切 pHB,酶切体系见表 2.7。

表 2.7 pHB 酶切体系

样品	体积
Buffer	5 μ l
pHB	5 μ l(1 μ g)
XhoI	1 μ l
ddH ₂ O	39 μ l

37 $^{\circ}$ C 水浴 3h 后,利用 TIAN quick Mini Purification Kit 试剂盒对酶切产物回收纯化,具体步骤见 2.4.3.2。

2.4.4.2 F 基因的回收

以 pT-F 为模板,利用 Vazyme 公司引物设计软件 CE Design V1.04,设计引物 F-F2 与 F-R2,由中美泰和生物技术(北京)有限公司合成,引物具体序列见表 2.8。

表 2.8 F 引物信息

引物	序列
F-F2	5'ATTTCCGGTGAATTCATGGGCTCCAGACCTTCTACCA 3'
F-R2	5'CGCTCTAGAAGTAGTTCACATTTTTGTAGTGGCTCTCATC 3'

利用 NEB 的 Q5 高保真聚合酶对 F 基因进行 PCR 扩增,PCR 体系见表 2.9。

表 2.9 PCR 体系

样品	体积
上游引物	1 μ l
下游引物	1 μ l

DNA 模板	3 μ l
酶	25 μ l
ddH ₂ O	20 μ l

PCR 反应条件：预变性 98°C 30s；变性 98°C 7s，退火 57°C 15s，延伸 72°C 35s，30 个循环；延伸 72°C 2min。

利用 E.Z.N.A. Gel Extraction Kit 试剂盒，将 F 基因 PCR 产物进行切胶回收 DNA。具体步骤参考试剂盒说明书，如下所示：

- 1) 将 PCR 产物进行琼脂糖凝胶电泳，在紫外下小心切出含有目的条带的胶，要注意切的又薄又完整。将胶块切碎，放入 1.5ml 离心管内称重，加入 1ml/g 的 Binding Buffer。
- 2) 涡旋震荡后使用金属浴锅 56°C 孵育 7min，每隔 2-3min 颠倒混匀一次，直至所有胶块溶解。
- 3) 将 HiBind DNA Mini Column 放在 Collection Tube 上，加入不多于 700 μ l DNA solution 到 Mini Column 中，13000rpm 离心 1min，弃去滤液。重复多次直至把所有 solution 离心完毕。
- 4) 加入 300 μ l Binding Buffer,13000rpm 离心 1min，弃去滤液。
- 5) 加入 700 μ l SPW Wash Buffer,13000rpm 离心 1min，弃去滤液。重复两次。
- 6) 13000rpm 空离 2min。
- 7) 将 HiBind Mini Column 转移至新的 1.5ml microcentrifuge tube 上，加入 30 μ l ddH₂O,直接滴到膜中间。室温静置 3-5min。
- 8) 13000rpm 离心 1min 后，利用核酸蛋白浓度分析仪检测浓度。

2.4.4.3 转移载体的构建

利用 Vazyme 公司 One Step Cloning Kit 试剂盒将 F 片段与线性化 pHB 载体连接，连接体系见表 2.10。

表 2.10 连接体系

试剂	体积
F 回收产物	4 μ l
pHB 回收产物	1 μ l
2 \times mix	5 μ l

水浴锅 50°C 孵育 10min 连接后，立刻冰浴。连接后进行转化，将连接产物转化至感受态细胞 JM109,转化步骤见 2.4.3.4。转化后，挑取 LB 培养基内单个菌落，以 F-F2,F-R2 为引物，用 Ex Taq Premix 进行菌液 PCR 鉴定。PCR 体系见表 2.6。

表 2.11 PCR 体系

样品	体积
上游引物	1 μ l
下游引物	1 μ l
菌液	3 μ l
Ex Taq	10 μ l
ddH ₂ O	10 μ l

PCR 反应条件：预变性 95°C 10min；变性 98°C 30s，退火 57°C 30s，延伸 72°C 1min30s，30 个循环；延伸 72°C 10min。

取 10 μ l PCR 产物，进行琼脂糖凝胶电泳挑选阳性菌落。对阳性菌落进行质粒抽提，具体步骤见 2.4.3.6，将质粒送至中美泰和生物技术(北京)有限公司测序。

2.4.4.5 质粒大提

将测序正确的质粒进行扩大培养，向无菌锥形瓶内倒入 150ml LB 培养液，加入 500 μ l 菌液。摇床 37°C,170rpm 震荡培养 10-12h。使用 Endotoxin-free plasmid DNA purification 试剂盒,对菌液进行高纯度高浓度去内毒素的质粒抽提。具体步骤参照试剂盒说明书，如下所示：

- 1) 150ml LB 培养液装入 50ml 离心管内，分三次 6000rpm，4°C 离心 10min,弃去培养液。使用加入 RnaseA 的 Buffer RES-EF 8ml 重新悬浮细胞震荡混匀。
- 2) 继续向离心管内加入 LYS-EF 8ml，轻柔颠倒 5 次混匀液体，不能涡旋，室温静置 5min。如果 LYS-EF 有沉淀，则将其加热至 30~40°C，再降至 18~25°C。
- 3) 提前用 EQU-EF 15ml 平衡过滤柱，沿滤柱外缘小心缓慢加入 EQU-EF，利用重力使 EQU-EF 自然流入收集管内并润湿过滤柱。
- 4) 继续向离心管内加入 NEU-EF 8ml 中和悬浮液，立刻轻微颠倒混匀，直至液体蓝色变为无色，将其置于冰上孵育 5min。冰浴后用移液枪吹打混匀防止阻塞，沿滤柱外缘加入混合液，弃去滤液。
- 5) 沿滤柱外缘加入 FIL-EF 5ml，弃去滤液，把滤柱拿出来。
- 6) 提前将 ELU-EF 放入水浴锅 50°C 孵育。
- 7) 先后加入 ENDO-EF 35ml,WAS-EF 15ml 洗涤吸附柱。
- 8) 将吸附柱置于新的 50ml 离心管中，加入 5ml ELU-EF,再加入无水异丙醇 3.5ml 来沉降 DNA。完全震荡混匀后，6000rpm，4°C 离心 30min,轻轻吸出上清。

- 9) 加入 endotoxin-free EtOH 2ml, 6000rpm, 24°C离心 10min。轻轻吸出 endotoxin-free EtOH,室温干燥。
- 10) 加入 200 μ l ddH₂O,吹打混匀。利用核酸蛋白浓度分析仪测量质粒浓度和纯度,送至中美泰和公司测序,将质粒命名为 pHB-F。

2.4.5 包装质粒、包膜质粒抽提

取 0.1 μ l pX、pG 质粒,转化到 JM109 感受态细胞,转化步骤见 2.4.3.4。提取质粒,步骤见 2.4.3.6。提取的质粒进行琼脂糖凝胶电泳,挑选有目的条带的质粒进行扩大培养,并进行质粒大提,提取高浓度高纯度去内毒素的包装质粒,步骤见 2.4.4.5。

2.4.6 293T 细胞的培养、传代及冻存

从液氮中取出冻存的 293T 细胞,立刻放入 37°C水浴锅,不停晃动冻存管使其尽快融化。将融化后的细胞放入 15ml 离心管中,1500rpm 离心 5min,弃去上清。离心管内加入 1ml 含有 10% FBS 的 DME/F12 培养基,轻轻吹打重悬细胞。将其加入 25cm² 细胞培养瓶中,补足 10ml 含有 10% FBS 的 DME/F12 培养基,再加入 1%双抗。放入 37°C, 5% CO₂ 二氧化碳培养箱中培养。期间操作需要在生物安全柜内,保证无菌环境防止污染。

2d 后,显微镜下观察细胞长满单层,按照一传三的方式传代。轻轻吸出培养基,加入 1ml PBS,放平轻轻晃动后吸出 PBS。加入 1ml 含 EDTA 的胰酶,放平培养瓶消化 30-60s 后,细胞开始脱落,加入 1ml 含有 10% FBS 的 DME/F12 培养基终止消化,并吹打混匀。加到 15ml 离心管后,1500rpm 离心 5min,弃去上清。离心管内加入 1ml 含有 10% FBS 的 DME/F12 培养基,轻轻吹打重悬细胞。将其加入 75cm² 细胞培养瓶中,补足 29ml 含有 10% FBS 的 DME/F12 培养基,再加入 1%双抗。放入 37°C, 5% CO₂ 二氧化碳培养箱中培养至细胞长满单层,进行细胞冻存。轻轻吸出培养基,加入 3ml PBS,放平轻轻晃动后吸出 PBS。加入 3ml 含 EDTA 的胰酶,放平培养瓶消化 30-60s 后,细胞开始脱落,加入 3ml 含有 10% FBS 的 DME/F12 培养基终止消化,并吹打混匀。加到 15ml 离心管后,1500rpm 离心 5min,弃去上清。离心管内加入 3ml 细胞冻存液,轻轻吹打重悬细胞,将其分装至细胞冻存管内,放置在 -80°C 冰箱,隔天保存至液氮罐中。

2.4.7 细胞转染

在 25cm² 细胞培养瓶内培养 293T 细胞,细胞生长汇合度至 50%-70%时准备转染。使用汉恒生物 LipoFiter 转染试剂盒进行转染,具体操作参照说明书,如下所示:

- 1) 待细胞汇合度达到 50%-70%时,将瓶内换成新鲜无血清的 DME/F12。
- 2) 取一只洁净无菌的 2ml 离心管,加入 1ml DME/F12 培养基,再加入 5 μ g pX、5 μ g pG、6 μ g pHB-F,用枪轻轻吹打混匀。
- 3) 取一只洁净无菌的 2ml 离心管,加入 1ml DME/F12 培养基,再加入 40 μ l LipoFiter,用枪轻轻

吹打混匀，室温放置 5 分钟。

- 4) 将步骤 2 与 3 中的 DNA 溶液和 LipoFiter 溶液混合，用枪轻轻吹打混匀。室温孵育 20min，有可能出现絮状沉淀，属正常现象，不影响转染效率。
- 5) 把 2ml LipoFiter-DNA 混合物全部加入细胞瓶中，加入时注意尽量均匀加入到整个瓶内，随后轻轻“8”字形摇晃混匀。
- 6) 细胞培养箱内培养 6-12h 后，去除含有 LipoFiter-DNA 的无血清培养基，加入 10ml 8% FBS 的 DME/F12 继续培养。

2.4.8 慢病毒感染

转染 48h 和 72h 后分别收集含病毒的培养基上清，以 0.45 μ m 滤器过滤，放入超速离心管中，4 $^{\circ}$ C，36000rpm 离心 120 分钟。离心后，500 μ l 新鲜培养液重新悬浮病毒沉淀，以 0.45 μ m 滤器过滤，置于-80 $^{\circ}$ C 保存。

慢病毒感染使用 1/2 小体积感染法。将状态良好的 293T 细胞接种到 6 孔板，使细胞浓度为 1×10^5 /ml 细胞，过夜生长，细胞数以第二天约为 50% 为宜。第二日弃去培养液，加入病毒悬液和新鲜培养基各 500 μ l，37 $^{\circ}$ C 小体积感染 4h，4h 后补齐培养基。感染后第二天，吸去带病毒的培养基，换上新鲜的完全培养基继续培养。在荧光显微镜下观察细胞荧光亮度。

2.4.9 细胞的筛选和扩大培养

慢病毒感染 48h 后，对细胞进行消化，用 10ml 20% FBS 的 DME/F12 培养基进行重悬，以此为基础进行 10 倍稀释至 10^{-6} ，取 10^{-5} 、 10^{-6} 两个稀释度的细胞培养液加入 96 孔细胞培养板中，每孔加 200 μ l，置 37 $^{\circ}$ C，5% CO₂ 二氧化碳培养箱中培养 10d，在荧光显微镜下挑选荧光亮度强的单细胞孔进行扩大培养，并连续传 13 代。

2.4.10 RT-PCR 鉴定

分别收集 293T 细胞和第 1,3,5,9 代筛选的 F-293T 细胞，利用 MiniBEST Universal RNA Extraction Kit 提取细胞 RNA。具体步骤参照试剂盒说明书，如下所示：

- 1) 弃去培养基，用 PBS 洗一次。向细胞中加入适量裂解液 Buffer RL，使裂解液均匀分布所有细胞表面，然后使用移液枪吹打细胞使其脱落。裂解液转移到 1.5ml 离心管中，静置 2min。
- 2) 将 gDNA Eraser Spin Column 放置在 Collection Tube 上，裂解液转移到 gDNA Eraser Spin Column 中。12000rpm 离心 1min，弃去 gDNA Eraser Spin Column，保留 Tube 中的滤液。
- 3) 向 Collection Tube 中加入等体积的 70% 乙醇，使用移液枪吹打混匀。快速将混合液转移到 RNA Spin Column 中。12000rpm 离心 1min，弃去滤液。

- 4) 加入 500 μ l Buffer RWA, 12000rpm 离心 30s, 弃废液重新使用 Collection Tube。
- 5) 加入 600 μ l Buffer RWB, 12000rpm 离心 30s, 弃废液重新使用 Collection Tube。
- 6) 向 RNA Spin Column 膜中央加入 50 μ l Dnase I 反应液, 室温静置 15min。再向 RNA Spin Column 膜中央加入 350 μ l 的 Buffer RWB, 12000rpm 离心 30s, 弃去滤液。
- 7) 重复(5)一次。
- 8) 12000rpm 空离 2min。
- 9) 将 RNA Spin Column 安置于新的 1.5ml RNase Free Collection Tube 上, 在 RNA Spin Column 膜中央加入 30 μ l 的 Rnase Free ddH₂O, 室温静置 5min。12000rpm 离心 2min 洗脱 RNA。

利用反转录试剂盒 SuperScript™ III First-Strand Synthesis 对细胞 RNA 进行反转录, 具体步骤见 2.4.2。反转录后利用 Premix Ex Taq 对 cDNA 进行 PCR 扩增, 具体步骤见 2.4.3.1。

2.4.11 SDS-PAGE 电泳

用 10% FBS 的 DME/F12 培养基培养 F-293T、293T 细胞至细胞长满单层后, 置换成无血清培养基 Freestyle 293 Expression Medium 培养 3d。收集培养基上清, 5000rpm 离心 10min, 取上清分别用 50K 蛋白超滤管浓缩 25 倍, 进行 SDS-PAGE 检测, 具体操作如下:

- 1) 取 30 μ l 样品, 加入 10 μ l LDS Sample Buffer, 吹打混匀后, 70°C 处理 10min。
- 2) 取 20X SDS Running Buffer 50ml, 加入 950ml 纯水, 配置工作浓度电泳液, 再将 Bis-tris Gel 装入电泳槽, 加入配置的 Running Buffer, 小心抽出 Gel 上的梳子。
- 3) 按照每孔 30 μ l 依次点样, 同时加入 10 μ l 预染蛋白 Marker。将电泳装置按照正负极连接电源, 120V 电泳 45min。取出胶, 放入容器中, 加入 50ml 去离子水, 加热至沸腾后停止, 弃去水溶液。
- 4) 配制快速考马斯亮蓝染色工作液: 取 100ml 溶液 B, 加入 2ml 溶液 A 混匀。加入 50ml 快速染色工作液, 加热至沸腾后保持沸腾状态 30-60s, 停止加热后继续在脱色摇床上摇动 5-10min, 弃去染色液。
- 5) 加入 50ml 去离子水, 加热至沸腾后保持沸腾状态 30-60s, 停止加热后继续在脱色摇床上摇动 5-10min, 换水过夜放置。
- 6) 利用蛋白凝胶成像仪观察并记录实验数据。

2.4.12 Western Blot

293T 和 F-293T 长满单层厚, 换用无血清培养基 Freestyle 293 Expression Medium 进行培养,

3d 后分别收集细胞上清，利用 50K 蛋白超滤管浓缩 25 倍后进行 Western Blot 鉴定。具体操作如下所示：

- 1) 上样跑蛋白胶，具体步骤见 2.4.11。配制工作浓度的 Transfer Buffer，向 50ml 20X Transfer Buffer 中加入 100ml 甲醇和 850ml 去离子水，混匀后 4°C 冷藏。
- 2) 转膜：用 Transfer Buffer 将海绵垫完全浸润赶走气泡，同时浸润滤纸。将大小合适的凝胶块放置于铺上滤纸的海绵垫上。用甲醇浸泡 PVDF 膜 30-60s 使其活化，注意不要直接用手触碰膜。再依次铺上 PVDF 膜、滤纸海绵垫，装到转膜装置中，随后倒入预冷的 Transfer Buffer。接通电源，采用恒压电转印法，30V 120min。
- 3) 封闭：取出转印完成的 PVDF 膜，用 PBS 淋洗一次，用 Blocking Buffer 封闭过夜。
- 4) 一抗孵育：取出封闭完成的 PVDF 膜，加入 15ml 用 PBST 进行 1000 倍稀释的 NDV 多抗，室温孵育 2h。
- 5) 洗膜：取出一抗孵育完成的 PVDF 膜，用 PBST 洗膜 3-5 次，15min/次。
- 6) 二抗孵育：取出洗膜完成的 PVDF 膜，加入 15ml 用 PBST 进行 5000 倍稀释的 HRP 标记羊抗鸡二抗，室温孵育 1h。
- 7) 重复步骤(5)。
- 8) 显色：按顺序分别加入 3 滴试剂 1-4 到 15ml PBS 中，配置显色液。放入 PVDF 膜，室温暗处显色 15min 后，观察是否有目的条带。

2.5 结果

2.5.1 pT-F 载体的构建

以 NDV cDNA 为模板，根据 GeneBank 中 NDV LaSota 株 F 基因序列，设计引物 F-F1 与 F-R1 并合成，扩增 F 基因。PCR 产物琼脂糖凝胶电泳结果如图 2.1 所示，条带大小为 1662bp，与理论值相符，结果显示成功获得 F 基因。将片段与 pGEM-T 载体连接，转化至 JM109 细胞，利用菌液 PCR 筛选阳性菌液，菌液 PCR 产物琼脂糖凝胶电泳结果如图 2.2 所示。将菌液送至测序，结果准确后大量扩增携带目的基因的质粒。测得质粒 OD260/OD280 均在 1.7-1.9 之间，浓度为 500ng/μl 左右。测序结果如下所示：

ATGGGCTCCAGACCTTCTACCAAGAACCCAGCACCTATGACGCTGACTATCCGGGTTGCGCT
GGTACTGAGTTGCATCTGTCCGGCAAACCTCATTGATGGCAGGCCTCTTGCAGCTGCAGGAA
TCGTGGTTACAGGAGACAAAGCCGTCAACATATACACCTCATCCAGACAGGATCAATCATA
GTAAAGCTCCTCCC GAATCTGCCCAAGGATAAGGAGGCATGTGCGAAAGCCCCCTTGGATGC
ATACAACAGGACATTGACCACTTTGCTCACCCCCCTTGGTGACTCTATCCGTAGGATACAAG
AGTCTGTGACTACATCTGGAGGGGGGAGACAGGGGGCGCCTTATAGGTGCCATTATTGGCGGT
GTGGCTCTTGGGGTTGCAACTGCCGCACAAATAACAGCGGCCGCAGCTCTGATACAAGCCA
AACAAAATGCTGCCAACATCCTCCGACTTAAAGAGAGCATTGCCGCAACCAATGAGGCTGT
GCATGAGGTCACTGACGGATTATCGCAACTAGCAGTGGCGGTTGGGAAGATGCAGCAGTTT
GTAAATGACCAATTTAATAAAAACAGCTCAGGAATTAGACTGCATCAAAATTGCACAGCAAGT
TGGTGTAGAGCTCAACCTGTACCTAACCGAATTGACTACAGTATTCGGACCACAAATCACTT
CACCTGCTTTAAACAAGCTGACTATTACAGGCACCTTTACAATCTAGCTGGTGAAATATGGATT
ACTTATTGACTAAGTTAGGTGTAGGGAACAATCAACTCAGCTCATTAATCGGTAGCGGCTTAA
TCACCGGTAACCCTATTCTATACGACTCACAGACTCAACTCTTGGGTATACAGGTAACCTCTAC
CTTCAGTCGGGAACCTAAATAATATGCGTGCCACCTACTTGGAACCTTATCCGTAAGCACA
ACCAGGGGATTTGCCTCGGCACTTGTCACAAAAGTGGTGACACAGGTTCGGTTCTGTGATAG
AAGA ACTTGACACCTCATACTGTATAGAACTGACTTAGATTTATATTGTACAAGAATAGTAA
CGTTCCCTATGTCCCCTGGTATTTATTCCTGCTTGAGCGGCAATACGTCGGCCTGTATGTACTC
AAAGACCGAAGGCGCACTTACTACACCATACATGACTATCAAAGGTTTCAGTCATCGCCAACT
GCAAGATGACAACATGTAGATGTGTAAACCCCCGGGTATCATATCGCAAACTATGGAGAA
GCCGTGTCTCTAATAGATAAACAATCATGCAATGTTTTATCCTTAGGCGGGATAACTTTAAGG
CTCAGTGGGGAATTCGATGTA ACTTATCAGAAGAATATCTCAATACAAGATTCTCAAGTAATA
ATAACAGGCAATCTTGATATCTCAACTGAGCTTGGGAATGTCAACA ACTCGATCAGTAATGC
TTTGAATAAGTTAGAGGAAAGCAACAGAAA ACTAGACAAAAGTCAATGTCAA ACTGACTAGC
ACATCTGCTCTCATTACCTATATCGTTTTGACTATCATATCTCTTGTTTTTGGTATACTTAGCCT
GATTCTAGCATGCTACCTAATGTACAAGCAAAAAGGCGCAACAAAAGACCTTATTATGGCTTG
GGAATAACTCTAGATCAGATGAGAGCCACTACAAAATGTGA

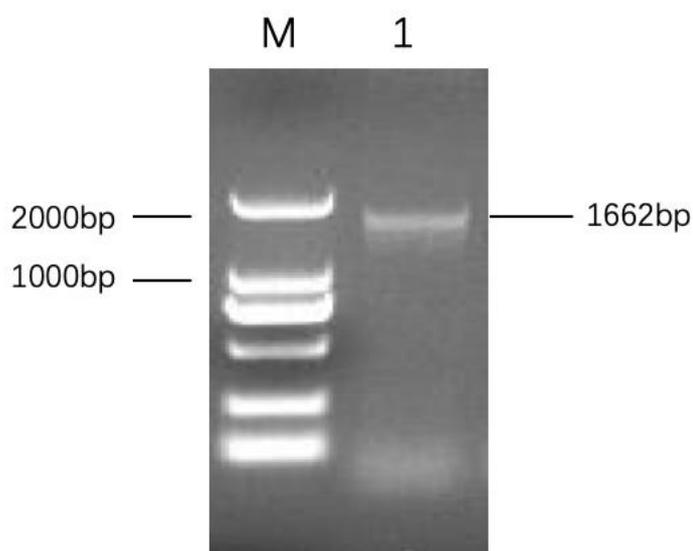


图 2.1 NDV F 基因 PCR 扩增
M:DL2000Marker; 泳道 1:PCR 产物

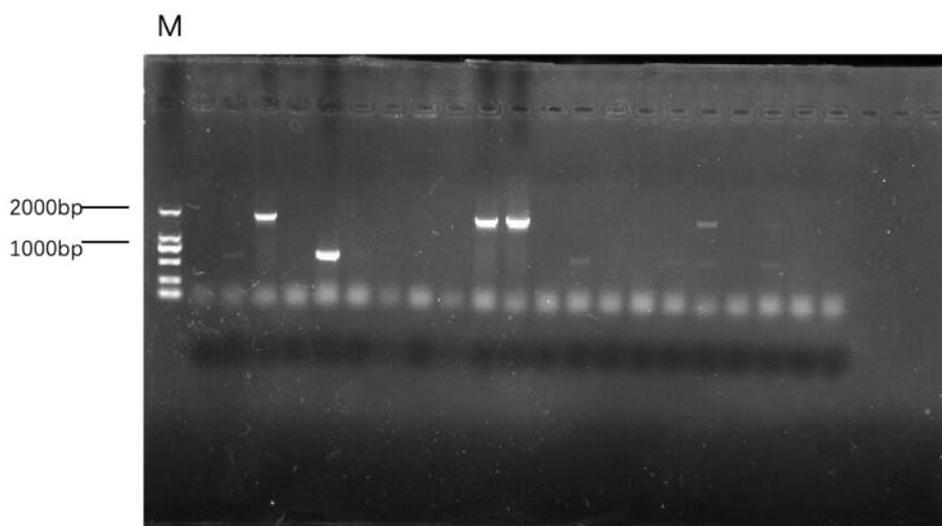


图 2.2 pT-F 菌液 PCR
M:DL2000Marker

2.5.2 转移载体 pHB-F 的构建

以 pT-F 为模板, 根据 GeneBank 中 NDV LaSota 株 F 基因序列和 pHB 酶切位点序列, 设计引物 F-F2 与 F-R2 并合成, 扩增 F 基因。使用 Vazyme 同源重组连接试剂盒连接后, 将连接产物转化至 JM109 细胞, 利用菌液 PCR 筛选阳性菌液, 菌液 PCR 产物琼脂糖凝胶电泳结果如图 2.3 所

示。将菌液送至测序，结果准确后用质粒大提试剂盒提取高浓度高纯度的转移质粒，琼脂糖凝胶电泳结果显示，质粒大小与理论相符。测得质粒 OD260/OD280 均在 1.7-1.9 之间，浓度为 1.5 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ 左右，纯度和浓度符合转染要求。将质粒命名为 pHB-F。电泳结果如图 2.4 所示。

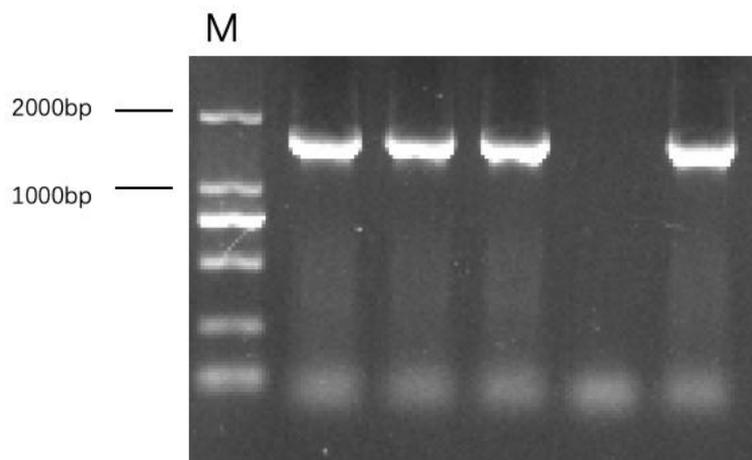


图 2.3 pHB-F 菌液 PCR

M:DL2000Marker

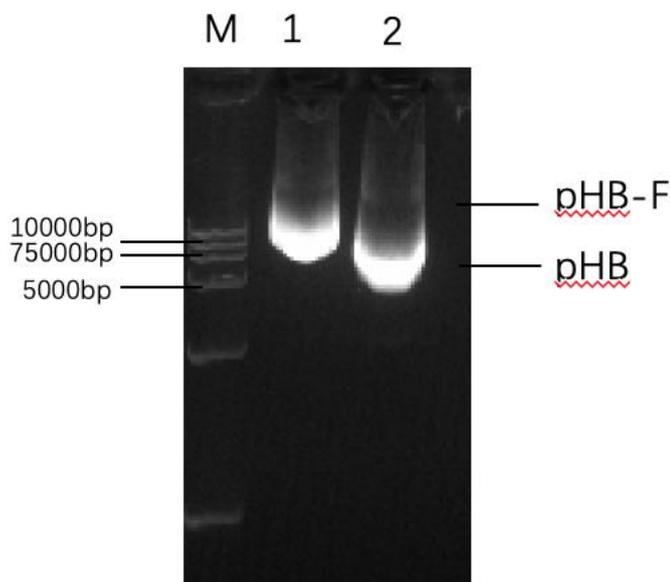


图 2.4 pHB-F 质粒电泳鉴定

M:DL15000Marker; 泳道 1:质粒 pHB-F; 泳道 2:质粒 pHB

2.5.3 包装质粒、包膜质粒的提取

使用质粒大提试剂盒提取高浓度高纯度的质粒 pX、pG，琼脂糖凝胶电泳结果显示，质粒大

小与理论相符。测得质粒 OD260/OD280 均在 1.7-1.9 之间，浓度为 2 μ g/ μ l 左右，纯度和浓度符合转染要求。电泳结果如图 2.5 所示。

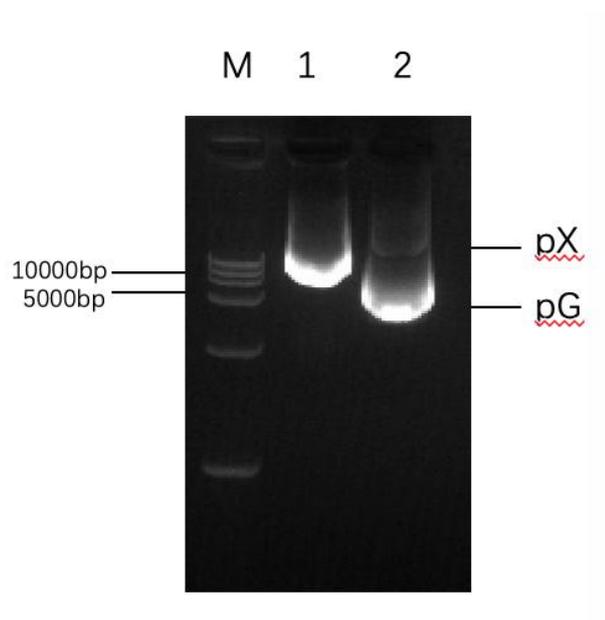


图 2.5 包装、包膜质粒电泳鉴定

M:DL15000 Marker; 泳道 1:质粒 pX; 泳道 2:质粒 pG

2.5.4 细胞转染

利用脂质体转染试剂盒将 pHB-F、pX、pG 以 1:1:1.5 的比例转染 293T 细胞。利用荧光显微镜观察细胞转染 24h,48h 后的状态和荧光亮度，转染 48h 后荧光细胞数量达 80%-90%。具体结果如图 2.6 所示，结果表明质粒转染成功。

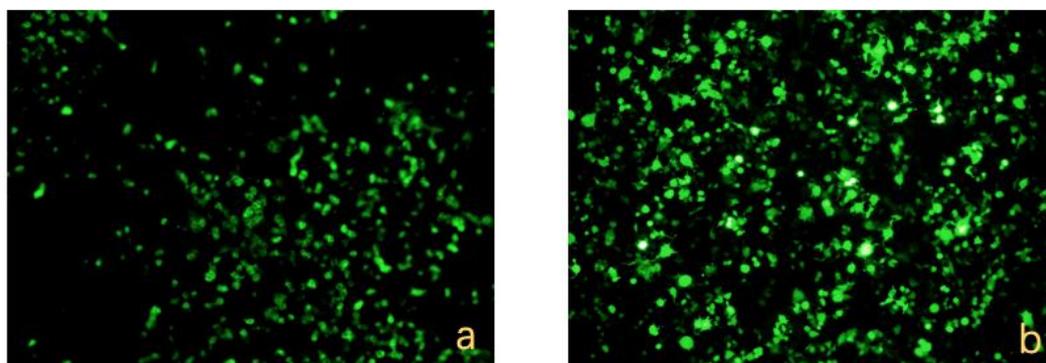


图 2.6 转染后 293T 细胞(10 \times)

a:转染 24h; b:转染 48h

2.5.5 慢病毒感染

分别收集转染后 48h 和 72h 含病毒的培养基上清, 利用超速离心机沉淀病毒, 加入新鲜培养基重悬获得病毒原液。使用 1/2 小体积感染法, 将病毒原液感染新鲜的 293T 细胞, 感染 48h 后使用荧光显微镜观察细胞状态和亮度, 具体结果如图 2.7 所示, 结果表明重组慢病毒成功感染 293T 细胞。

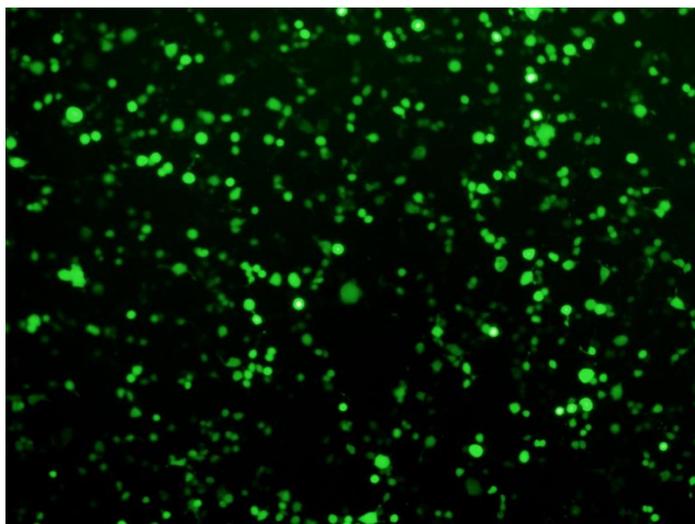


图 2.7 慢病毒感染 48h(10×)

2.5.6 阳性细胞克隆

分别将 10^5 和 10^6 稀释的细胞接种 96 孔细胞培养板, 在荧光显微镜下观察, 选取荧光亮度较强, 细胞状态较好的单个荧光细胞团块继续进行扩大培养。单克隆细胞团块如图 2.8 所示。

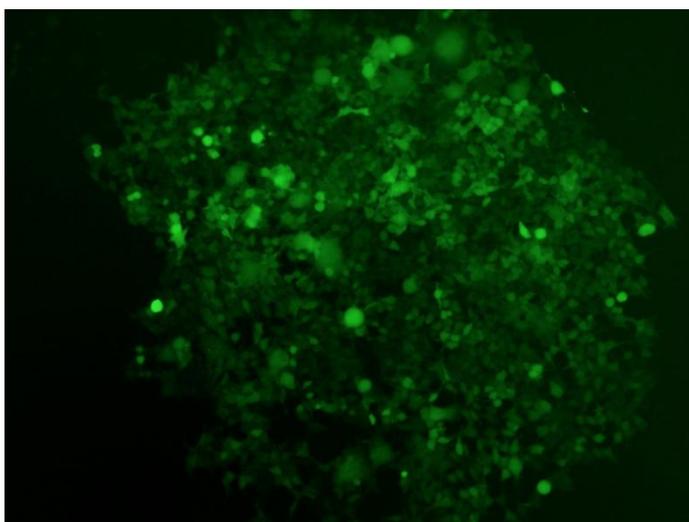


图 2.8 293T 感染细胞株(10×)

2.5.7 细胞稳定性检测

显微镜观察不同代次的 F-293T 细胞发现荧光强度没有明显变化，表明携带荧光基因的 F-293T 细胞系是稳定的，具体结果如图 2.9 所示。提取 293T 和 F-293T 细胞 RNA，进行反转录 PCR。电泳条带显示携带 F 基因的 F-293T 细胞系是稳定的，具体结果如图 2.10 所示。

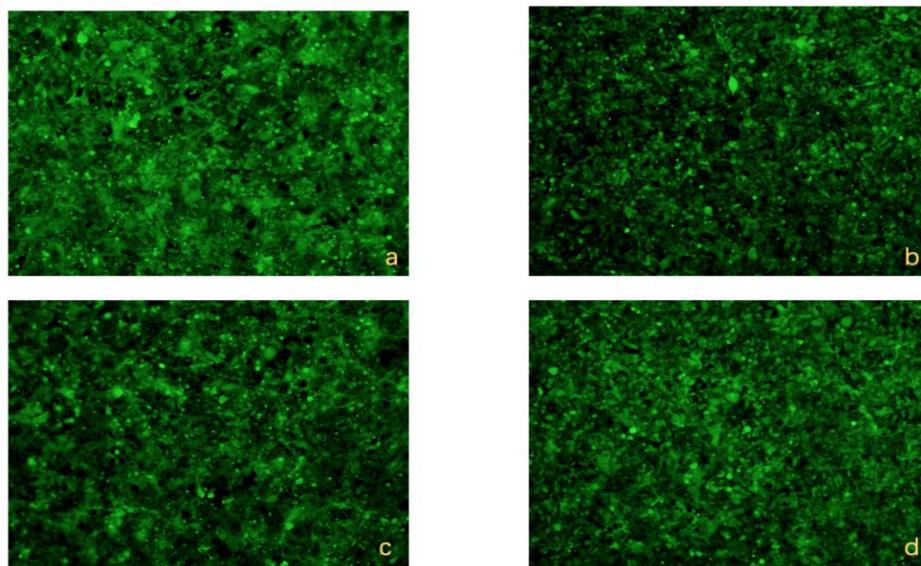


图 2.9 293T 感染细胞株传代(10x)
a:第 1 代; b:第 5 代; c:第 9 代; d:第 13 代

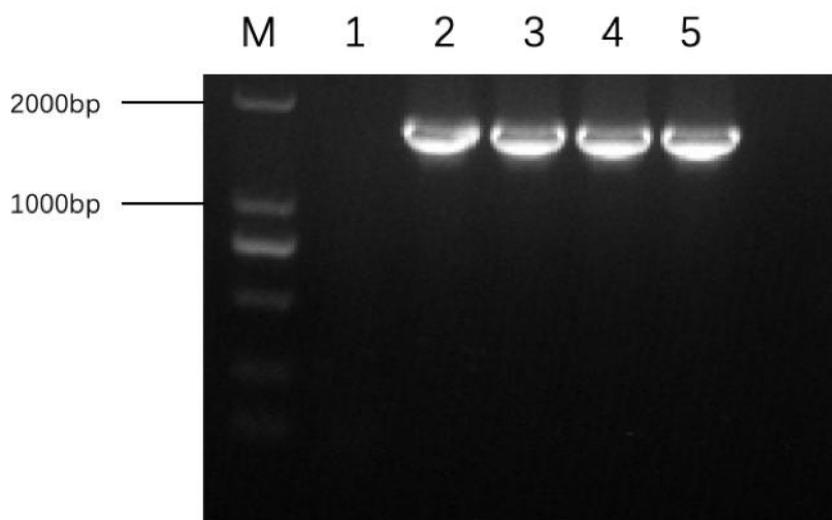


图 2.10 F-293T 细胞 RT-PCR 电泳结果
M:DL2000Marker; 泳道 1:293T 对照; 泳道 2:第 1 代; 泳道 3:第 5 代;
泳道 4:第 9 代; 泳道 5:第 13 代

2.5.8 SDS-PAGE

培养 F-293T、293T 细胞至细胞长满单层后，置换成无血清培养基培养。收集培养基上清浓缩 25 倍后进行 SDS-PAGE 鉴定。SDS-PAGE 具体结果如图 2.11 所示，凝胶成像仪分析得出泳道 2 比泳道 3 多出条带 12 和条带 8，大小分别为 120kD 和 59kD 左右。

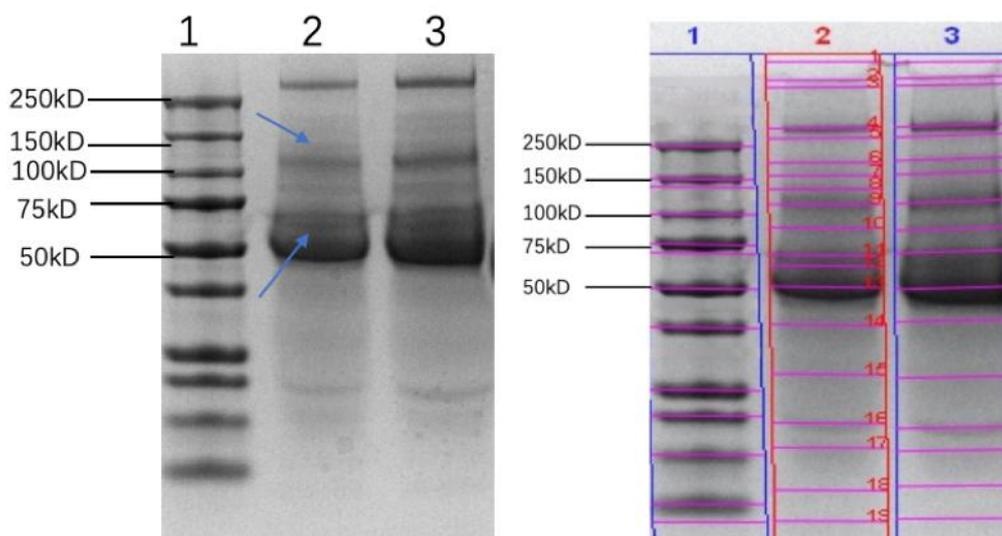


图 2.11 F-293T 上清 SDS-PAGE

泳道 1:250kD Marker; 泳道 2:F-293T 上清; 泳道 3:293T 上清

2.5.9 Western Blot 鉴定

以 NDV 阳性血清为一抗，HRP 标记羊抗鸡抗体为二抗进行 Western Blot 鉴定培养液检测 F 蛋白的反应原性，具体结果如图 2.12 所示。同时利用 50K 蛋白超滤管浓缩 25 培养液倍后进行 Western Blot 鉴定，具体结果如图 2.13 所示。实验中原倍 F-293T 培养液在 59kD 和 120kD 左右有目的条带但是条带较淡，而 25 倍浓缩培养液可以观察到明显的目的条带，结果表明 F 蛋白能够与 NDV 阳性血清反应，表现一定的反应原性。

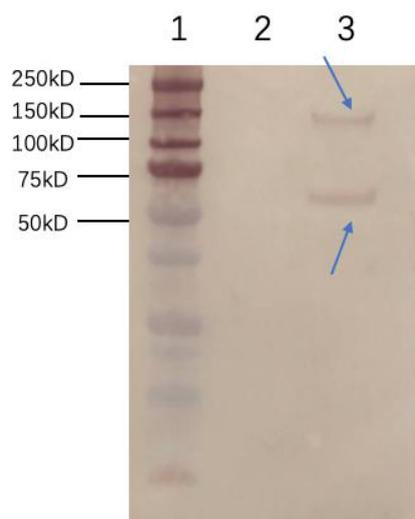


图 2.12 细胞上清 Western Blot
泳道 1:250kD Marker; 泳道 2:293T 上清; 泳道 3:F-293T 上清

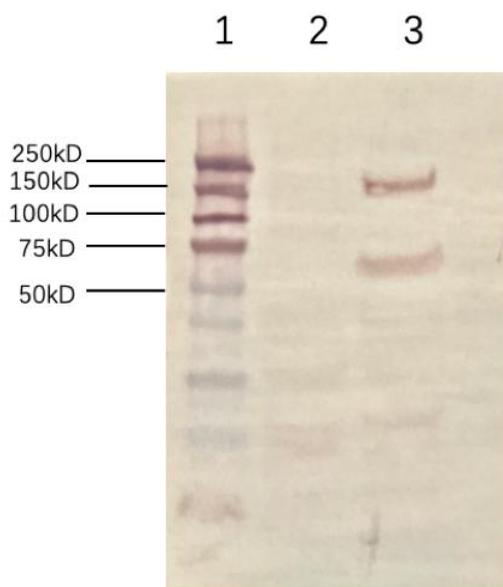


图 2.13 细胞上清 Western Blot(25×)
泳道 1:250kD Marker; 泳道 2:293T 上清; 泳道 3:F-293T 上清

2.6 讨论与小结

2.6.1 病毒感染的影响因素

慢病毒能够利用反转录酶将病毒 RNA 反转录成 cDNA 产生双链 DNA, 再利用整合酶将 DNA

稳定的整合到宿主细胞的染色体中,而利用自身特性进行外源基因稳定表达的前提是感染宿主细胞。慢病毒的感染需要经历两个步骤:病毒的包装和感染。慢病毒的包装中使用的是三质粒病毒载体系统,三质粒共转染 293T 细胞后自主包装出慢病毒,通过回收细胞培养基进行超速离心浓缩即能获得高浓度的病毒原液。本实验中慢病毒载体系统是汉恒生物用于基因过表达的三质粒系统,转染试剂盒是汉恒生物配套的 LipoFiter 脂质体转染试剂盒。在所有转染手段中,脂质体转染操作简单、毒性低,是最为广泛使用的细胞转染方法之一。LipoFiter 脂质体转染试剂盒重复性好、效率高、能够抗血清干扰,在将携带绿色荧光基因 GFP 的转移载体转染到 293T 细胞中 24h 后即可看到荧光,48h 后可以观察到约 80%细胞呈现绿色荧光,且细胞状态良好。实验表明,LipoFiter 转染试剂盒可高效安全的介导质粒与 293T 细胞的转染,完成慢病毒包装。细胞的状态、传代次数、质粒的质量也是影响细胞转染的因素,一般要求用于转染的细胞要在复苏后传 2-3 代且代次不能过高,以保证细胞活力和转染效率。质粒的抽提在超净台进行保证无菌状态,使用的试剂盒为去内毒素大提试剂盒保证质粒的安全性,提取的质粒用核酸蛋白浓度分析仪检测保证纯度。包装后的慢病毒通过超速离心回收培养基获得,为了获得更大量的慢病毒,分别在转染后 48h 和 72h 两次回收细胞上清。由于超速离心机的操作在超净台外进行可能污染病毒原液,所以要求使用 0.45 μm 滤器过滤。

经过三质粒转染时慢病毒的包装后,收集病毒原液感染新的细胞系,可以利用荧光强度检测慢病毒是否成功包装并感染了新的细胞系。慢病毒感染细胞的影响因素很多,主要包括细胞状态、细胞株的选择、细胞最佳感染复数(multiplicity of infection, MOI)。感染的细胞要求复苏后传 2-3 代再进行感染且代次不能过高,接种浓度保证在 $1 \times 10^5/\text{ml}$ 细胞,第二天进行病毒感染时候细胞汇合度在 50%-70%之间。使用的慢病毒载体为 HIV 改造而来,实验中曾使用 BHK-21 细胞尝试进行慢病毒感染,感染三到五天后荧光亮度一直很低甚至难以观察,推测慢病毒的感染可能与细胞的种属有关。在重新选择 293T 细胞进行感染后,可以观察到荧光亮度较高且感染细胞较多,这说明与 BHK-21 相比 293T 细胞是慢病毒感染细胞株较为良好的选择。MOI 是指每个细胞感染的病毒颗粒数,通常 MOI 越高,病毒整合到染色体的数量以及目的蛋白的表达量越高。慢病毒对于不同种类,不同来源的细胞来说,MOI 各有差别,实验中并未检测 MOI 而是直接将回收病毒全部用来感染 293T 细胞以保证感染量。

2.6.2 影响蛋白表达量的因素

收集 F-293T 细胞上清,通过 SDS-PAGE 检测到 59kD 和 120kD 左右有目的条带,59kD 处应为 F 蛋白条带,而 120kD 处猜测应为 F 蛋白二聚体条带,具体结果可能需要更深入的研究确定。但是电泳条带并不是很明显,表达量不高。影响得因素很多,包括外源基因、外源基因插入位点、细胞状态等。一般来说基因分泌表达优于胞内表达,引入 Kozak 序列能够提高表达效率,而 F 基因自身携带信号肽序列,但是未引入 Kozak 序列。其次基因不同位点的整合对蛋白表达的影响很大,实验中仅选取了 5 个单细胞克隆株进行筛选,未进行整合表达位点的研究,是否因插入位点的不同而影响蛋白表达量还需进一步研究;第三,构建的表达细胞进行连续传代后均未能达到最佳生长状态,也可能是蛋白表达量低的原因之一。基于目前可能的原因分析,推测可以通过以下方法优化 F 基因在 293T 细胞内的表达:一是 F 基因引入 Kozak 序列,促进 F 蛋白的分泌表达;

二是单克隆细胞筛选时，选择多个荧光亮度较高生长状态较好的细胞株进行扩大培养以选择表达量最高的细胞株；三是选用代次低生长状态较好的细胞，继续摸索细胞培养和冻存条件。四是尝试驯化 F-293T 细胞或者使用别的悬浮细胞系进行慢病毒感染。

2.6.3 F 蛋白反应原性检测

实验中用无血清培养基 Freestyle 293 Expression Medium 培养铺满单层的 F-293T 细胞三天，将收集的细胞上清进行 Western Blot 鉴定，表达的 F 蛋白与特异性阳性血清能够反应。表明表达的蛋白具有特异的反应活性。同时，实验过程中也发现 Western Blot 的结果与抗体的亲和力，抗体浓度和上样量等多种因素有关。实验中使用的一抗为 NDV 抗鸡血清，没有抗 F 单抗效果好，因此在前期 Western Blot 实验中发现一抗浓度过高会出现杂带，浓度过低条带过暗，同时二抗浓度的变化对结果的影响也很大。在反复多次摸索后，选择了 1:1000 的一抗浓度和 1:5000 的二抗浓度进行 Western Blot，结果显示 293T 对照组无条带，F-293T 实验组在 59kD 和 120kD 左右有目的条带。实验中原倍上清的条带较淡，为了更准确的判断细胞系是否表达了具有反应原性的 F 蛋白，又将 293T 和 F-293T 细胞培养液加入 50K 蛋白超滤管 8000rpm 离心 10min 浓缩 25 倍后进行了 Western Blot 鉴定，结果显示在实验组 59kD 和 120kD 左右存在颜色更深的目的条带，而对照组没有。实验结果表明 F 蛋白具有良好的反应原性。

第三章 F 蛋白免疫原性的检测

3.1 引言

在构建稳定表达 F 蛋白的 F-293T 细胞系并对其加工修饰的 F 蛋白进行了反应原性的检测后，继续对 F-293T 细胞表达的 F 蛋白进行免疫原性的检测。检测免疫原性之前先利用 50K 蛋白超滤管对 F 蛋白进行浓缩，再加以白油佐剂乳化，乳化后的 F 蛋白免疫 25 日龄雏鸡，一免后 14d 后采血分离血清并进行二免，二免后 7d 和 21d 继续采血分离血清，通过测定免疫后不同时间血清的鸡胚中和效价，确定 F 蛋白免疫原性。

3.2 材料

3.2.1 SPF 鸡(胚)、毒株、血清和细胞

名称	公司
SPF 鸡(胚)	勃林格殷格翰维通生物技术有限公司
NDV LaSota 株	中国兽医药品监察所
NDV 阳性血清	中国兽医药品监察所

3.2.2 主要试剂

名称	公司
PBS、生理盐水	北京中海生物科技有限公司
白油佐剂	实验室制备
Freestyle 293 Expression Medium	Gibco 公司
LDS Sample Buffer(4x)	赛默飞世尔科技公司
SDS Running Buffer(20x)	Novex 公司
NuPAGE™ 4-12% Bis-Tris Gel	赛默飞世尔科技公司

考马斯亮蓝蛋白胶快速染色液	索莱宝(Solarbio)公司
SuperBlock™ Blocking Buffer	赛默飞世尔科技公司
Transfer Membranes	密理博(MILLIPORE)公司
3MM 滤纸	Whatman 公司
Peroxidase Substrate	Vector 公司
Centrifugal Filter Units	密理博(MILLIPORE)公司
NDV 多抗	中国兽药药品监察所
HRP-羊抗鸡 IgY IgG	北京博奥龙免疫技术有限公司
PBST(10x)	北京康为世纪生物科技有限公司
Centrifugal Filter Units	密理博(MILLIPORE)公司

3.3 仪器设备

名称	公司
高速分散机	德国 IKA 公司
恒温培养箱	上海森信实验仪器有限公司
正/负压隔离器	津航净化空调工程公司
二氧化碳培养箱	ASTEC 公司
全温立式振荡培养箱	德国 IKA 公司
转膜仪	Novex 公司
电泳仪	伯乐(BIO-RAD)公司
超纯水仪	颇尔(PALL)公司
台式大容量高速冷冻离心机	海蒂诗(Hettich)公司

3.4 方法

3.4.1 蛋白提取

在 175cm² 细胞培养瓶中培养 293T 和 F-293T 细胞，首先用 10% FBS 的 DME/F12 培养基培养两天至细胞长满单层，再换成无血清培养基 Freestyle 293 Expression Medium 培养三天。每天收集 1ml 培养基保存在 -80℃ 冰箱中。收集满五天后，用 293T 有血清和无血清培养基上清作对照，做 Western Blot 检测，具体步骤见 2.4.12，观察条带颜色深浅以判断蛋白表达量的差别。表达量最高的时候收 F-293T 培养基上清，培养液加入 50K 蛋白超滤管 8000rpm 离心 10min 浓缩 25 倍。根据 F 蛋白等电点配制 Tris 缓冲液，缓冲液 pH 在 8.4 左右，使用缓冲液和超滤管洗涤浓缩蛋白三次后回收，用核酸蛋白浓度分析仪检测蛋白浓度。

3.4.2 免疫接种

回收的蛋白 Tris 缓冲液和白油佐剂以 48:52 体积比利用高速匀浆机进行乳化，乳化后于 4℃ 冰箱保存。取 10 只 24 日龄的 SPF 鸡放入隔离器饲养，第二日随机选择 3 只作对照，另外 7 只为试验组。试验组的鸡进行腿部肌肉注射乳化后的 F 蛋白，对照组的鸡进行腿部肌肉注射生理盐水，每只鸡各注射 0.5ml。一免后 14d 进行二免，操作相同。鸡一免后 14d 和二免后 7d,21d 采血，每只鸡利用 2ml 注射剂翅静脉采取 1ml 血，与注射器一同放入 37℃ 温箱静置 2h，静置后放入 4℃ 冰箱观察是否析出血清。将实验组、对照组血清各推入离心管内均匀混合备用。

3.4.3 1%鸡红细胞悬液的配置

- 1) 阿氏液配制：称取氯化钠 0.42g、柠檬酸钠 0.8g、柠檬酸 0.055g、葡萄糖 2.05g，加入去离子水混匀并定容至 100ml，利用 NaOH 溶液调整 pH 至 6.1。121℃ 高压灭菌 15min，4℃ 保存备用。
- 2) 采血：取 2 只 SPF 鸡，用 10ml 注射器采血各约 2-4ml，再吸取 1ml 阿氏液混匀。混匀后放入装有 10ml 阿氏液的离心管中。
- 3) 洗涤红细胞：将离心管 1500rpm 离心 10min，红细胞沉底弃去上清。再加入 PBS 10ml，轻轻混匀后 1500rpm 离心 10min，吸去上清及红细胞上层包细胞薄膜。重复 2 次。
- 4) 1%鸡红细胞悬液：取混合均匀的 10%鸡红细胞悬液 1ml，加入 9ml PBS 缓冲液，混合均匀。

3.4.4 NDV EID₅₀ 的测定

- 1) 病毒稀释：取 NDV LaSota 毒株，使用生理盐水作 10 倍递进稀释，从 10⁻¹ 稀释到 10⁻¹⁰ 梯度。
- 2) 鸡胚接种：取 9-11 日龄 SPF 鸡胚，用检卵灯照视画出气室，在气室上方用打孔器穿一小孔。

将 1ml 注射器沿小孔插入，注入 0.1ml 病毒稀释液，每个稀释梯度使用五枚鸡胚，另取五枚设空白对照接种生理盐水 0.1ml。

- 3) 观察：将鸡胚放入 37°C 温箱培养观察，逐日观察至 120h，48h 内非特异性死亡鸡胚直接弃去，48h 后死亡鸡胚及时放入 4°C 冰箱。第 5d 将所有鸡胚放入 4°C 冰箱过夜，收获每枚鸡胚尿囊液，分别存放。
- 4) HA 检测：先在微量反应板的 1-12 孔均加入 25 μ l PBS，更换移液器枪头后在第一孔加入 25 μ l 尿囊液吹打混匀，吸取 25 μ l 加入第二孔继续吹打混匀，如此依次对尿囊液进行 2 倍比稀释，直至第 11 孔吸取 25 μ l 弃去。更换移液器枪头，每孔均匀加入 25 μ l 1% 鸡红细胞悬液，震荡混匀后室温静置 20-30min 观察结果。
- 5) 计算 EID₅₀：按照 Reed-Muench 法计算 EID₅₀，EID₅₀ 的对数=高于 50% 病毒稀释度的对数+比例距离 \times 稀释系数的对数。

3.4.5 中和试验

将 F 蛋白用白油佐剂乳化后免疫 25 日龄鸡，免疫 14d 后采血制备血清并进行二免，二免 7d 和 21d 采血制备血清。根据所测病毒 EID₅₀ 选择合适稀释度稀释病毒与血清一起中和进行鸡胚中和试验以检测 F 蛋白免疫原性，具体操作如下所示：

- 1) 将 9 日龄鸡胚分为病毒对照组，空白对照组和中和组。病毒对照组将 NDV LaSota 株稀释至 100 EID₅₀ 浓度后与生理盐水等量混合。空白对照组将 NDV LaSota 株稀释至 100 EID₅₀ 浓度后与对照组 SPF 鸡血清等量混合。中和组将 NDV LaSota 株稀释至 100 EID₅₀ 浓度后与稀释或未稀释的免疫血清等量混合。等量混合后置室温作用 60min 后，准备进行鸡胚尿囊腔接种。
- 2) 取 9-11 日龄 SPF 鸡胚 40 枚，用检卵灯照视画出气室，在气室上方用打孔器穿一小孔。将 1ml 注射器沿小孔插入，注入 0.1ml 中和液。第一组 5 枚鸡胚，其他组 10 枚鸡胚。
- 3) 将鸡胚放入 37°C 温箱培养观察，每日照胚观察至 120h，48h 内非特异性死亡鸡胚直接弃去，48h 后死亡鸡胚及时放入 4°C 冰箱。第 5d 将所有鸡胚放入 4°C 冰箱过夜，收获每枚鸡胚尿囊液。
- 4) HA 检测：先在微量反应板的 1-12 孔均加入 25 μ l PBS，更换移液器枪头后在第一孔加入 50 μ l 尿囊液吹打混匀，吸取 50 μ l 加入第二孔继续吹打混匀，如此依次对尿囊液进行 2 倍比稀释，直至第 11 孔吸取 50 μ l 弃去。更换移液器枪头，每孔均匀加入 50 μ l 鸡红细胞悬液，震荡混匀后室温静置 20-30min 观察结果。

3.5 结果

3.5.1 F 蛋白检测

在细胞培养瓶中连续培养 293T 和 F-293T 细胞五天，前两天用 10% FBS 的 DME/F12 培养基培养至细胞长满单层，后三天无血清培养基 Freestyle 293 Expression Medium 培养三天。每天收集 1ml 培养基保存在 -80°C 冰箱中。收集满五天后，用 293T 有血清和无血清培养基上清作对照，利用 Western Blot 检测 F 蛋白表达量，具体结果如图 3.1 所示，结果表明有血清培养基培养 F-293T 时表达较高但是杂蛋白较多，无血清培养基培养 F 蛋白时表达量随培养时间的增长而增长。培养至五天时回收蛋白，缓冲液洗涤后用核酸蛋白浓度分析仪检测浓度为 0.75mg/ml。

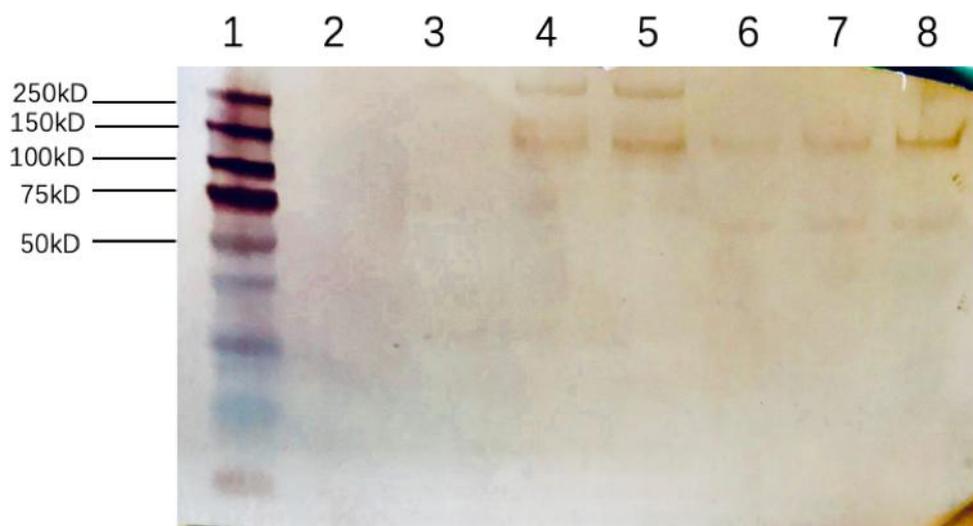


图 3.1 细胞上清 Western Blot

2:293T 无血清培养液；3:293T 有血清培养液；4-8:F-293T 1-5d 培养液

3.5.2 LaSota 株 EID₅₀ 的测定

在用鸡胚中和试验检测 F 蛋白免疫原性之前，应对 NDV LaSota 株的病毒含量进行检测。在 EID₅₀ 检测中以 HA 试验作为标准来确定鸡胚是否感染，按照 Reed-Muench 法计算 EID₅₀：EID₅₀ 的对数=高于 50%病毒稀释度的对数+比例距离×稀释系数的对数，所以 NDV LaSota 病毒含量为 10^{8.6}EID₅₀。具体结果见表 3.1。

表 3.1 EID₅₀ 的测定

病毒稀释度	感染数	无感染数	感染率
10 ⁻⁷	5	0	100%
10 ⁻⁸	5	0	100%

10^{-9}	1	4	20%
10^{-10}	0	5	0%

3.5.3 鸡胚中和试验

F 蛋白二次免疫 25 日龄鸡后, 将一免后 14d 和二免后 7d 及 21d 血清与 LaSota 株进行鸡胚中和试验以检测免疫原性。用生理盐水将一免后 14d 血清进行 2 倍稀释, 分别取原倍及 2 倍稀释血清与等量的病毒混匀后, 置室温孵育 1h, 经尿囊腔接种 10 日龄 SPF 鸡胚, 37℃ 培养 120h。原倍中和组有一枚鸡胚在 24h 内非特异性死亡, 故弃去。具体结果见表 3.2。

表 3.2 一免 14d 血清鸡胚中和试验

组别	感染数	无感染数	感染率
病毒对照组	10	0	100%
阴性血清对照组	10	0	100%
原倍中和组	5	4	56%
二倍稀释中和组	10	0	100%

利用二免后 7d 血清进行的中和试验中, 将原倍及二倍稀释二免血清与病毒进行中和设原倍中和组和二倍稀释中和组。具体结果见表 3.3。

表 3.3 二免 7d 血清鸡胚中和试验

组别	感染数	无感染数	感染率
病毒对照组	10	0	100%
阴性血清对照组	10	0	100%
原倍中和组	0	10	0%
二倍稀释中和组	3	7	30%

利用二免后 21d 血清进行的中和试验中, 将原倍及二倍稀释二免血清与病毒进行中和设原倍中和组和二倍稀释中和组。具体结果见表 3.4。

表 3.4 二免 21d 血清鸡胚中和试验

组别	感染数	无感染数	感染率
病毒对照组	10	0	100%
阴性血清对照组	10	0	100%

原倍中和组	0	10	0%
二倍稀释中和组	0	10	0%

3.6 讨论与小结

3.6.1 细胞上清中 F 蛋白的浓缩和纯化

由于 NDV F 基因自身携带信号肽序列, 所以 F-293T 细胞在表达 F 蛋白的同时可以将其分泌至胞外, 收集 F-293T 细胞培养液即可获得 F 蛋白。将 F-293T 细胞在细胞培养瓶中连续培养五天, 前两天用 10% FBS 的 DME/F12 培养基培养至细胞长满单层, 后三天无血清培养基 Freestyle 293 Expression Medium 培养三天。使用无血清培养基培养时发现, F 蛋白量随着培养时间的增长逐渐增多, 且杂蛋白量不增加, 但使用无血清培养基培养至第五天细胞开始脱落, 因此选择第五天收获 F 蛋白。

由于电泳结果发现, 细胞培养上清中 F 蛋白量较少, 因此蛋白超滤离心管对培养液上清中蛋白进行浓缩, 浓缩后的培养液中 F 蛋白含有部分培养基和 293T 细胞蛋白。为了尽可能去除杂蛋白并且保留 F 蛋白, 在 30K、50K 和 100K 超滤管之中选择了蛋白回收率较高, 过滤蛋白分子量较合适的 50K 超滤管进行离心浓缩蛋白。将培养上清浓缩 25 倍后, 根据 F 蛋白分析所得等电点配制 pH 为 8.4 左右的 Tris 缓冲液, 用来洗涤 F 蛋白三次以清除无血清培养基等杂质最终获得 F 蛋白, 核酸蛋白浓度分析仪检测蛋白浓度为 0.75mg/ml。

3.6.2 F 蛋白免疫活性检测

为了检测 F-293T 细胞系表达的 F 蛋白的免疫原性, 将 F 蛋白免疫 25 日龄 SPF 雏鸡, 免疫后不同时间采血进行检测。由于经检测 F 蛋白免疫后血清无血凝抑制活性, 因此采用鸡胚中和试验检测血清中和抗体效价。鸡胚中和试验结果表明, 一次免疫不能产生有效的中和抗体, 二免后 7d, 原倍血清可以完全中和病毒, 二倍稀释血清感染率为 30%; 二免后 21d 2 倍稀释血清能够完全中和病毒, 该试验结果表明表达的 F 蛋白具有免疫原性, 能够刺激机体产生特异性的免疫反应。

由于本研究构建的 F 蛋白表达量低, 免疫鸡后产生的中和抗体水平较低, 因此需要进一步构建更成熟的表达体系, 以期获得可用于实际生产的新城疫 F 蛋白亚单位疫苗表达系统。

第四章 结论

4.1 本研究首次成功构建了稳定表达新城疫病毒 F 蛋白的哺乳动物细胞系，即 F-293T 细胞系，为新城疫亚单位疫苗研究提供了一种新的技术路径。

4.2 本研究中 F-293T 细胞系表达的 F 蛋白经动物免疫实验，初步结果表明表达的 F 蛋白可以诱导产生有效的中和抗体，具有良好的免疫原性，该研究结果为进一步研究提供了良好的技术支撑。

第五章 创新点

首次成功构建了稳定表达新城疫病毒 F 蛋白的哺乳动物细胞系，即 F-293T 细胞系，为新城疫亚单位疫苗研究提供了一种新的技术路径。

参考文献

- [1] Dimitrov KM, Afonso CL, Qingzhong Yu Patti, et al. Newcastle disease vaccines-A solved problem or a continuous challenge[J]. *Veterinary Microbiology*, 2017, 206: 126-136.
- [2] Kraneveld F. Overeen in Ned-Indie heerschende Ziete onder het pluimves[J]. *Virol*, 1926, 38: 448-450.
- [3] Doyle T. A hitherto unrecorded disease of fowls due to filter passing virus[J]. *Comp Pathol Therap*, 1927:144-169.
- [4] 刘秀梵,王志良.新城疫[M].北京:中国农业出版社,2015:1-2.
- [5] Alders RG. Making Newcastle disease vaccines available at village level[J]. *Vet Rec*, 2014, 174: 502-503.
- [6] Brown VR, Bevins SN. A review of virulent Newcastle disease viruses in the United States and the role of wild birds in viral persistence and spread[J]. *Veterinary Research*, 2017, 48(1):56-58.
- [7] Ayala AJ, Dimitrov KM, Becker CR, et al. Presence of vaccine-derived Newcastle disease viruses in wildbirds[J]. *PLoS ONE*, 2016,11(9):78-91.
- [8] Miller PJ, Haddas R, Simanov L, et al. Identification of new sub-genotypes of virulent Newcastle disease virus with potential panzootic features[J]. *Infect Genet Evol*, 2015,29: 216-229.
- [9] Hanson RP, Brandly CA. Newcastle Disease[J]. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1958,70(3):585-597.
- [10] Pearson GL, McCann MK. The role of indigenous wild, semidomestic, and exotic birds in the epizootiology of velogenic viscerotropic Newcastle disease in Southern California, 1972-1973[J]. *Journal of the American Veterinary Medical Association*, 1975,167(7):610-614.
- [11] Lumeij JT, Stam JW. Paramyxovirus disease in racing pigeons. clinical aspects and immunization.A report from the Netherlands[J]. *Veterinary Quarterly*, 1985,7(1):60-65.
- [12] Tan SW, Ideris AR, Omar K, et al. Sequence and phylogenetic analysis of Newcastle disease virus genotypes isolated in Malaysia between 2004 and 2005[J]. *Archives of Virology*, 2010,155(1): 63-70.
- [13] 刘华雷,王志亮.新城疫的流行历史与现状[J].*流行病学*, 2015, 32(6): 1-4.
- [14] 胡顺林,刘秀梵.新城疫病毒的遗传进化[J].*生命科学*, 2016, 28(3): 295-302.
- [15] Falcon MD. Exotic Newcastle disease[J]. *Seminars in Avian and Exotic Pet Medicine*, 2004,13(4): 873-878.
- [16] Banerjee M, Reed WM, Fitzgerald SD, et al. Neurotropic velogenic velogenic Newcastle disease in cormorants in Michigan: Pathology and virus characterization[J]. *Avian Diseases*, 1994,38(4): 873-878.
- [17] Alexeander DJ, Senne. Newcastle disease virus and other avian paramyxoviruses[J]. *American*

- Association of Avian Pathologists, Jacksonville, 2008,5:1-4.
- [18] Hamid H, Campbell RSF, Lamichhane C. The Pathology of Infection of Chickens With the Lentogenic V4 strain of Newcastle disease Virus[J]. Avian Pathology, 1990,19(4):687-696.
- [19] Brown C, King DJ, Seal BS. Pathogenesis of Newcastle disease in chickens experimentally infected with viruses of different virulence[J]. Veterinary Pathology, 1999,36(2):125-132.
- [20] Gattoli G, Susta L, Terregino C, et al. Newcastle disease: a review of field recognition and current methods of laboratory detection[J]. Journal of Veterinary Diagnostic Investigation, 2011,23(4): 637-656.
- [21] Brown C, King DJ, Seal BS. Pathogenesis of Newcastle disease in chickens experimentally infected with viruses of different virulence[J]. Veterinary Pathology, 1999,36(2):125-132.
- [22] OIE. Newcastle disease(Infection with Newcastle Disease Virus)[M]. Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals:(Mammals, Birds and Bees), 2012,1:554-574.
- [23] McGinnes LW, Pantua H, Reitter J, et al. Newcastle disease virus: propagation, quantification and storage[J]. Current Protocols in Microbiology, 2006,15:1-18.
- [24] Makkay AM, Krell PJ, Nagy E. Antibody detection based differential ELISA for NDV-infected or vaccinated chicken versus NDV HN-subunit vaccinated chickens[J]. Veterinary Microbiology, 1999,3: 209-222.
- [25] Wang Z, Vreede FT, Mitchell JO, et al. Rapid detection and differentiation of Newcastle disease virus isolates by a triple one-step RT-PCR[J]. Onderstepoort Journal of Veterinary Research. 2001,68(2):131-134.
- [26] 向华,杨国淋,曹三杰,等.同时检测禽类六种病毒的金标银染可视化基因芯片的构建及初步应用[J].畜牧兽医学报,2018,49(12):2698-2706.
- [27] 罗薇.鸡新城疫免疫防制探讨[J].西南民族大学学报,2018,44(5):462-466.
- [28] 王慧,程小果,陈申秒.新城疫疫苗的合理使用及常见使用误区[J].黑龙江畜牧兽医,2016,11:156-157.
- [29] 宋亚鹏,刘运超,姬鹏超,等.新城疫疫苗的研究进展[J].中国兽医学报,2017,2(37):376-380.
- [30] 沙万里,宋泰,尹柏双,等.新城疫病毒 F-HN 基因 DNA 疫苗的免疫效果评价[J].吉林农业科技学院学报,2014,23(1):7-9.
- [31] Mori H, Tawara H, Nakazawa, et al. Expression of the Newcastle disease virus fusion glycoprotein and vaccination against NDV challenge with a recombinant baculovirus[J]. Avian Dis, 1994,38: 772-777.
- [32] 邵宇豪,孙俊峰.新城疫和传染性喉气管炎防控的新工具:表达新城疫病毒 F 基因的重组鸡传染性喉气管炎病毒活载体疫苗[J].中国预防兽医学报,2019,41(1):1.
- [33] 张忠信.病毒分类学[M].北京:高等教育出版社. 2006:56-58.
- [34] Kapczynski DR, Afonso CL, Miller PJ. Immune responses of Poultry to Newcastle disease virus[J]. Development and comparative Immunology, 2013,41(3):447-453.
- [35] Perelman D, Goldman WF, Borkow G. Enhancement of antibody titers against Newcastle Disease

- Virus in vaccinated chicks by administration of Phyto V7[J]. *Journal of Vaccines and Vaccination*, 2013,4(7):69-75.
- [36] Dimitrov KM, Afonso CL, Yu Q, et al. Newcastle disease vaccines — A solved problem or a continuous challenge[J]? *Veterinary Microbiology*, 2016,206:126-136.
- [37] Brown C, King DJ, Seal BS. Pathogenesis of Newcastle disease in chickens experimentally infected with viruses of different virulence[J]. *Veterinary Pathology*, 1999,36(2):125-132.
- [38] Czeglédi A, Ujvári D, Somogyi E. Third genome size category of avian paramyxovirus serotype 1(Newcastle disease) and evolutionary implications[J]. *Virus Res*, 2006,120:36-48.
- [39] Lamb R, Parks G. Paramyxoviridae: the viruses and their replication[J]. *Fields Virology*, 2007,6:1449-1496.
- [40] Winslow, Zaitsev V, Groves D. Second sialic acid binding site in Newcastle disease virus hemagglutinin-neuraminidase: implications for fusion[J]. *Virology*, 2004,78:3733-3741.
- [41] Kim LM, King DJ, Curry PE, et al. Roles of the fusion and hemagglutinin-neuraminidase proteins in replication, tropism, and pathogenicity of avian paramyxoviruses[J]. *Virology*, 2011,85(17):8582-8596.
- [42] Elankumaran S. Genetically engineered Newcastle disease virus for prostate cancer: a magic bullet or a misfit[J]. *Virology*, 2013,13(7):769-772.
- [43] Cassel WA, Garrett RE. Newcastle disease virus as an antineoplastic agent[J]. *Cancer*, 1965,18:863-868.
- [44] Lam HY, Yeap SK, Rasoli M, et al. Safety and clinical usage of Newcastle disease virus in cancer therapy[J]. *Biomed Biotechnol*, 2011:718-720.
- [45] Alexander DJ, Manvell RJ. Heat inactivation of Newcastle disease virus (strain Herts 33/56) in artificially infected chicken meat homogenate[J]. *Avian Pathol*, 2004,33:222-225.
- [46] Ganar K, Das M, Sinha S, et al. Newcastle disease virus: Current status and our understanding[J]. *Virology*, 2014,2:1-11.
- [47] Miller PJ, Kim LM, Ip HS, et al. Evolutionary dynamics of Newcastle disease virus[J]. *Virology*, 2009,391:64-72.
- [48] Lumeij JT, Stam JW. Paramyxovirus disease in racing pigeons. Clinical aspects and immunization[J]. *Veterinary Quarterly*, 1985,7(1):60-65.
- [49] Ravindra PV, Tiwari AK, Ratta B, et al. Newcastle disease virus-induced cytopathic effect in infected cells is caused by apoptosis[J]. *Current Protocols in Microbiology*, 2006,15:1-18.
- [50] Huang Y, Wan HQ, Liu HQ, et al. Genomic sequence of an isolate of Newcastle disease virus isolated from an outbreak in geese: a novel six nucleotide insertion in the non-coding region of the nucleoprotein gene[J]. *Brief report Arch Virol*, 2004,149(7):1445-1457.
- [51] Calain P, Roux L. The rule of six, a basic feature for efficient replication of sendai virus defective interfering RNA[J]. *Virology*, 1993,67(8):4822-4830.
- [52] Bello MB, Yusoff K, Ideris A, et al. Diagnostic and Vaccination Approaches for Newcastle Disease

- Virus in Poverty: The Current and Emerging Perspectives[J]. *BioMed Research International*, 2018,10:1-18.
- [53] Dortmans JC, Rottier PJ, Koch G, et al. The viral replication complex is associated with the virulence of Newcastle disease virus[J]. *Virology*, 2010,84(19):100113-10120.
- [54] Errington W, Emmerson PT. Assembly of recombinant Newcastle disease virus nucleocapsid protein into nucleocapsid-like structures is inhibited by the phosphoprotein[J]. *Virology*, 1997,84(8):3835-3844.
- [55] Kho cl, Tan WS, Tey BT, et al. Newcastle disease virus nucleocapsid protein: self-assembly and length-determination domains[J]. *Gen Virology*, 2003,84:2163-2168.
- [56] Jahanshiri F, Eshaghi M, Yusoff K. Identification of phosphoprotein:phosphoprotein and phosphoprotein:nucleocapsid protein interaction domains of the Newcastle disease virus[J]. *Arch Virology*, 2005,150(3):611-618.
- [57] Chambers P, Millar NS, Platt SG, et al. Nucleotide sequence of the gene encoding the matrix protein of Newcastle disease virus[J]. *Nucleic Acids Res*, 1986,14(22):9051-9061.
- [58] Peebles ME, Bratt MA. Mutation in the matrix protein of Newcastle disease virus can result in decreased fusion glycoprotein incorporation into particles and decreased infectivity[J]. *Virology*, 1984,51(1):81-90.
- [59] Seal BS, King DJ, Meinersmann RJ. Molecular evolution of the Newcastle disease virus matrix protein gene and phylogenetic relationships among the paramyxoviridae[J]. *Virus Res*, 2000,66(1):1-11.
- [60] Mebatsion T, Weiland F, Conzelmann KK. Matrix protein of rabies virus is responsible for the assembly and budding of bullet-shaped particles and interacts with the transmembrane spike glycoprotein[J]. *Virology*, 1999,73(1):242-250.
- [61] Kim SH, Subbiah M, Samuel AS, et al. Roles of the fusion and hemagglutinin-neuraminidase proteins in replication, tropism, and pathogenicity of avian paramyxoviruses[J]. *Virology*, 2011,85(17):8582-8596.
- [62] Toyoda T, Sakaguchi T, Hirota H, et al. Newcastle disease virus evolution II Lack of gene recombination in generating virulent and avirulent strains[J]. *Virology*, 1989,169:273-282.
- [63] Samal S, Khattar SK, Paldurai A, et al. Mutations in the cytoplasmic domain of the Newcastle disease virus fusion protein confer hyperfusogenic phenotypes modulating viral replication and pathogenicity[J]. *Virology*, 2013,87(18):10083-10093.
- [64] Glickman RL, Syddall RJ, Iorio RM, et al. Quantitative basic residue requirements in the cleavage-activation site of the fusion glycoprotein as a determinant of virulence for Newcastle disease virus[J]. *Virology*, 1988,62(1):354-356.
- [65] Panda A, Huang Z, Elankumaran S, et al. Role of fusion protein cleavage site in the virulence of Newcastle disease virus[J]. *Microb Pathog*, 2004,36(1):1-10.
- [66] Gorman JJ, Nestorowicz A, Mitchell SJ, et al. Characterization of the sites of proteolytic activation

- site of Newcastle disease virus membrane glycoprotein precursors[J]. *Biol Chem*, 1988,263(25): 12522-12531.
- [67] Sergel T, McGinnes LW, Peeples ME, et al. The attachment function of the Newcastle disease virus hemagglutinin-neuraminidase protein can be separated from fusion promotion by mutation[J]. *Virology*, 1993,193(2):717-726.
- [68] Iorio RM, Mahon PJ. Paramyxoviruses: different receptors- different mechanisms of fusion[J]. *Trends Microbiol*, 2008,16(4):135-137.
- [69] Sergel T, McGinnes LW, Morrison TG. The fusion promotion activity of the NDV HN protein does not correlate with neuraminidase activity[J]. *Virology*, 1993,196(2):831-834.
- [70] Mirza AM, Iorio RM. A mutation in the stalk of the Newcastle disease virus hemagglutinin-neuraminidase(HN) protein prevents triggering of the F protein despite allowing efficient HN-F complex formation[J]. *Virol*, 2013,87(15):8813-8815.
- [71] Dortmans JC, Rottier PJ, Koch G, et al. The viral replication complex is associated with the virulence of Newcastle disease virus[J]. *Virol*, 2010,84(19):10113-10120.
- [72] Rout SN, Samal SK. The large polymerase protein is associated with the virulence of Newcastle disease virus[J]. *Virol*, 2008,82(16):7828-7836.
- [73] Arantzazu A, Campanero MR, Redondo JM, et al. New Methods for Disease Modeling Using Lentiviral Vectors[J]. *Trends in Molecular Medicine*, 2018,8:1-13.
- [74] Sakuma T. Lentiviral vectors: basic to translational[J]. *Biochem*, 2012, 443:603-618.
- [75] Escors D, Breckpot K. Lentiviral vectors in gene therapy: their current status and future potential[J]. *Arch Immunol Ther Exp*, 2010,58:107-119.
- [76] 李跃萍,宋丽萍,邱曙东,等.慢病毒载体在肿瘤基因治疗中的应用[J].*现代肿瘤医学*.2006, 14(1):1615-1617.
- [77] Mautino MR. Lentiviral vectors for gene therapy of HIV-1 infection[J]. *Curr Gene Ther*, 2002,2:23-43.
- [78] Vannucci L, Lai M, Chiappesi F, et al. Viral vectors: a look back and ahead on gene transfer technology[J]. *New Microbiol*, 2013,36:1-22.
- [79] Dull T, Zufferey R, Kelly M, et al. A third-generation lentivirus vector with a conditional packaging system[J]. *J Virol*, 1998,72:8463-8471.
- [80] Fontana JM, Christos PJ, Michelini Z, et al. Mucosal immunization with integrase-defective lentiviral vectors protects against influenza virus challenge in mice[J]. *Plos One*, 2014,9:970-972.
- [81] Poeschla EM. Non-primate lentiviral vectors[J]. *Curr Opin Mol Ther*, 2003,5:529-540.
- [82] Li D, Wang Q, Liu C, et al. Aberrant expression of miR-638 contributes to benzo pyrene-induced human cell transformation[J]. *Toxicol Sci*, 2012,125:382-391.
- [83] Hedges SB, Dudley J, Kumar S. TimeTree: a public knowledge-base of divergence times among organisms[J]. *Bioinformatics*, 2006,22:2971-2972.
- [84] Janecka JE, Miller W, Pringle TH, et al. Molecular and genomic data identify the closest living

- relative of primates[J]. *Science*, 2007,318:792-794.
- [85] Niemann H, Kues WA. Transgenic farm animals: an update[J]. *Reprod Fertil Dev*, 2007,19:762-770.
- [86] Ye MX, Li Y, Yin H, et al. Updated molecular mechanisms and intervention targets in human lung cancer[J]. *IntJ Mol Sci*, 2012,13:3959-3978.
- [87] Hargrove PW, Kepes S, Hanawa H, et al. Globin Lentiviral vector insertion can perturb the expression of endogenous genes in beta-thalassemic hematopoietic cells[J]. *Mol Ther*, 2008,16:525-533.
- [88] Mautino MR. Lentiviral vectors for gene therapy of HIV-1 infection[J]. *Curr Gene Ther*, 2002,560:178-182.

附录 溶液及配制方法

1. 电泳缓冲液

TAE(50x)	20ml
去离子水	980ml

2. 琼脂糖凝胶

向 100ml 电泳缓冲液加入 1g 琼脂，用微波炉加热使其完全融化，冷却 20min 后，加入 7 μ l GoldenView 染色液。

3. TBST

TBST(10x)	100ml
去离子水	1g

4. LB 液体培养基

取 Yeast Extract 5g, Tryptone 10g 和 NaCl 10g，加入去离子水定容到 1000ml，用 NaOH 调节 pH 到 7.0 至 7.2 之间，121°C 高压灭菌 15min。

5. LB 固体培养基

向 LB 液体培养基中加入 1.5% 的琼脂粉，121°C 高压灭菌 20min。待培养基冷却至 70°C 左右，加入 100 μ g/ml 的氨苄青霉素溶液，轻轻混匀后铺制平板，4°C 保存。

6. Tris 缓冲液

0.2mol/L Tris 溶液	25ml
0.1mol/L 盐酸溶液	17.5ml
去离子水定容至 1000ml。	

致谢

文章是在我的导师蒋桃珍研究员的悉心指导和亲切关怀下完成的，从课题设计到论文撰写，蒋老师都以谦虚谨慎的工作作风、一丝不苟的工作态度、勤勤恳恳的工作精神严格要求和激励我。三年来，蒋老师不仅在学业和工作上认真的指导我，还教导我做人办事的方式方法，在生活上给予莫大的关怀，在此谨向导师致以真挚的谢意和崇高的敬意！

衷心感谢中国兽医药品监察所领导对研究生课程和课题工作的大力支持，感谢科技处刘业兵处长、郭晔副处长、王彬老师在学习和生活中给予的关怀和指导。

感谢赵启祖老师、王琴老师、印春生老师、范学政老师、李启红老师、陈小云老师等在课题实验中给予的关怀和帮助，在此表示由衷的感谢。

感谢菌种室杨承槐老师、李伟杰老师、蒋颖老师、岂晓鑫老师、田野老师、张敏老师、张兵老师、宋亚芬老师、王静文老师、王磊老师、刘莹老师、李虹老师、肖睿老师等对我实验室工作的支持和生活上的帮助。

特别感谢陈玲师姐，在我实验遇到困难时，耐心帮助我克服阻碍；在我生活出现挫折时，给予我极大地鼓励。感谢杨宵玥师姐在研究生期间对我实验工作的指导，感谢张勇师弟在生活上的帮助和鼓励。

感谢已毕业的师兄师姐彭永、韩爽、刘元杰、孙俊翔、王申森等；感谢我的同学高强、牛康、何天慈、董令赢、杨方；感谢师弟师妹戴学宇、边增杰、杨飞等。感谢他们在我学习和生活中给予的帮助和支持。

感谢我的母校中国兽医药品监察所三年来对我的栽培，让我能够在科研的道路上勇往直前，满载而归。岁月不居，时节如流，三年的时光短暂而美好，中监所给予我的不仅是这三年学习的积累和沉淀，更是在面对未来人生时拥有的坚忍不拔、谨小慎微、戒骄戒躁等美好的品格。很庆幸在这三年里遇到了如此多的良师益友，无论在学习上、工作上还是生活上，都给予我无私的帮助和热心的照顾，让我学习并且成熟了很多。

感谢我的家人和朋友，对我的支持与关怀。

最后，向所有帮助指导本论文完成的领导、老师、同学、亲人和朋友致以最真挚的谢意！

作者简介

基本情况:

姓 名: 倪志远
性 别: 男
民 族: 汉
出生日期: 1994年5月23日
政治面貌: 共青团员
籍 贯: 江苏省盐城市
专业方向: 预防兽医学

受教育经历:

2012年9月—2016年6月, 扬州大学大学动物检验与检疫专业, 获农学学士学位
2016年9月—今, 中国兽医药品监察所 预防兽医学专业

已发表论文:

[1] 倪志远, 蒋桃珍. 细菌活载体疫苗的研究进展. 中国兽药杂志, 2019, 53(4):72-76.