

表达猪2型圆环病毒 ORF2 蛋白的重组 伪狂犬病毒的生物学特性研究

琚春梅¹, 樊惠英², 刘正飞², 陈焕春²

(1 华南农业大学 兽医学院, 广东 广州 510642; 2 华中农业大学 动物医学院, 湖北 武汉 430070)

摘要:为了探讨重组伪狂犬病毒 TK⁻/gG⁻/ORF2⁺ 作为疫苗候选株的潜在价值, 对该病毒的增殖特性、遗传稳定性、安全性、免疫原性及保护力进行了研究。结果表明: 重组病毒的增殖滴度与亲本株相当, 遗传稳定性良好, 以 100 倍的免疫剂量接种小鼠时对小鼠是安全的; 重组病毒在免疫小鼠后可诱导小鼠产生针对 PRV 和 PCV2 的特异性免疫应答, 并且对致死剂量(100LD₅₀) PRV Ea 株强毒的攻击具有 100% 的免疫保护效果。

关键词: 重组伪狂犬病毒; 增殖特性; 遗传稳定性; 安全性; 免疫原性; 保护力

中图分类号: S852.65

文献标识码: A

文章编号: 1001-411X(2007)03-0097-04

Biological Characteristics of Recombinant Pseudorabies Virus Expressing ORF2 Protein of Porcine Circovirus Type 2

JU Chun-mei¹, FAN Hui-ying², LIU Zheng-fei², CHEN Huan-chun²

(1 College of Veterinary Medicine, South China Agric. Univ., Guangzhou 510642, China

2 College of Veterinary Medicine, Huazhong Agricultural University, Wuhan 430070, China;)

Abstract: To study the potential value of a recombinant pseudorabies virus TK⁻/gG⁻/ORF2⁺ as candidate vaccine, the biological characteristics of this virus were examined, including growth properties, genetic stability, security, immunogenicity and protective capacity. The growth properties of the recombinant virus in cells were similar to that of the parent vector virus. In animal experiments, TK⁻/gG⁻/ORF2⁺ was safe to mice with dose of 100LD₅₀ and elicited specific immune response against PRV and PCV2 in mice. Immunization with TK⁻/gG⁻/ORF2⁺ protected mice against a lethal challenge (100LD₅₀) with a virulent PRV Ea strain.

Key words: recombinant pseudorabies virus; growth properties; genetic stability; security; immunogenicity; protective capacity

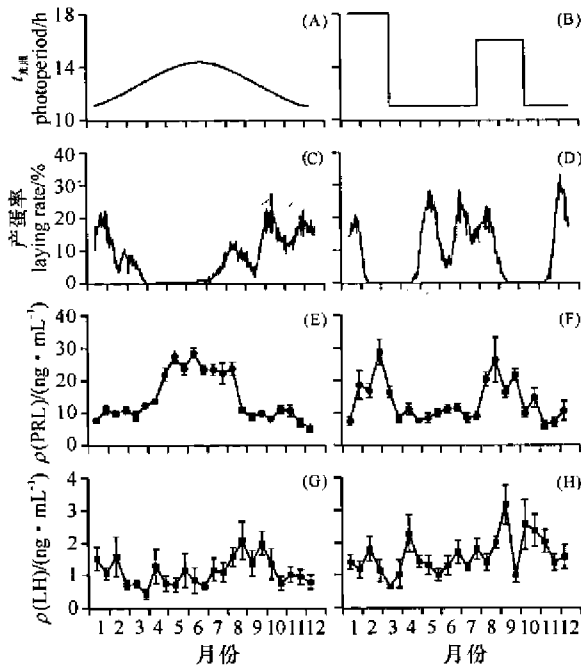
猪 2 型圆环病毒 (porcine circovirus type 2, PCV2) 是近年来兽医界广泛关注的病毒之一。该病毒与猪的多种疾病综合征有关, 特别是断奶仔猪多系统衰竭综合征 (post-weaning multisystemic wasting syndrome, PMWS), 给养猪业造成了巨大的经济损失。PCV2 疫苗的研究始于近几年, 目前已有 PCV2

DNA 疫苗、亚单位疫苗和嵌合病毒疫苗的报道^[1-3], 但有关病毒活载体疫苗的报道相对较少。伪狂犬病毒 (pseudorabies virus, PRV) 属疱疹病毒科、 α 疱疹病毒亚科, 是引起猪繁殖障碍的主要病原之一。该病毒基因组庞大, 含有多个可缺失的病毒增殖非必需的基因, 可供外源基因插入, 插入外源基因的重组

收稿日期: 2006-12-29

作者简介: 琚春梅 (1976—), 女, 讲师, 博士; 通讯作者: 陈焕春 (1953—), 男, 教授, 博士, 院士, E-mail: hzauvet@public.wh.hb.cn

基金项目: 国家“863”高技术研究发展计划 (2001AA213051)



A: 对照组光照时间; B: 处理组光照时间;
C: 对照组产蛋率; D: 处理组产蛋率;
E: 对照组 PRL 质量浓度; F: 处理组 PRL 质量浓度;
G: 对照组 LH 质量浓度; H: 处理组 LH 质量浓度
A: photoperiod for control geese; B: photoperiod for treated geese; C: laying rate of control geese; D: laying rate of treated geese;
E: serum PRL of control geese; F: serum PRL of treated geese; G: serum LH of control geese; H: serum LH of treated geese

图1 光周期对马岗鹅日产蛋率、血浆 PRL 与 LH 质量浓度的影响

Fig 1 Effect of photoperiod on laying percentage, plasma concentrations of PRL and LH of Magang geese

2.3.2 LH 冬季对照组血浆 LH 质量浓度处于较高水平(1~2 ng/mL), 鹅群产蛋; 春季则下降(<1 ng/mL), 鹅群进入休产期; 夏末秋初又重新升高, 鹅群恢复产蛋, 并在产蛋率上升之前呈现一个季节性峰值(约 2 ng/mL), 之后则又下降处于低水平(图 1G)。长光下处理组的血浆 LH 质量浓度均在出现暂时的上升(2~3 ng/mL)后快速下降(<1 ng/mL), 鹅群进入休产期, 短光下则均显著上升(>2 ng/mL) ($P<0.05$), 之后稍下降并保持稳定(1~2 ng/mL) (图 1H)。

3 讨论

鸟(禽)类光信号主要是通过下丘脑感受器将电磁信号转换为内分泌信号来实现对季节性繁殖活动的调控^[1]。在下丘脑-垂体-性腺轴对鸟(禽)类繁殖活动的内分泌调控中, 垂体 FSH 和 LH 是卵泡发育的调控因子, 两者的分泌受下丘脑 GnRH 调控, 垂体 PRL 也是重要的调控因子之一^[10]。PRL 除了是禽

类就巢发生和维持的关键激素外, 还与季节性繁殖活动紧密相关。大量研究表明, 光照能促进 PRL 分泌, 并且在季节性繁殖鸟(禽)类上, PRL 的分泌随日照呈现季节性变化^[5-6]。PRL 除了通过下丘脑 GnRH 抑制禽类垂体促性腺激素的分泌外, 还直接抑制卵泡的发育^[6,11-12]。在本研究中, 对照组的血浆 PRL 和 LH 质量浓度均随全年日照呈现出季节性变化, 光照延长明显促进 PRL 分泌和降低 LH 水平, 这种光效应在处理组中更加明显, 与在其他鸟(禽)类和哺乳动物上的研究结果也一致^[3,5]。在处理组的 2 次长-短光处理中, 当长光照导致 PRL 快速上升, LH 下降时, 鹅群均出现停产和换羽; 在对照组中, 光照延长导致 PRL 上升和 LH 下降时, 鹅群也出现停产和换羽, 光照缩短引起 PRL 下降和 LH 上升时, 鹅群恢复产蛋。2 组鹅群的 LH 季节性分泌呈现出与 PRL 分泌相反的变化, 这与在马岗鹅公鹅和匈牙利白鹅上的研究结果相一致^[13-14], 并且在 PRL 和 VIP 基因表达的检测中, 光照延长也能明显促进下丘脑 VIP 和垂体 PRL 的 mRNA 水平上升^[14]。

通常认为, 在许多鸟(禽)类上, PRL 分泌的季节性上升会抑制动物的繁殖活动和导致换羽^[5]。这个结论也得到本研究结果的支持。由本试验结果可见, 在光周期对马岗鹅繁殖活动的季节性调控中, PRL 是一个重要的介导因子或调控因子。马岗鹅的季节性繁殖由日照调控, 光照通过信号转换调控 PRL 或其释放因子 VIP 的分泌。春夏日照延长所引起的 PRL 上升通过抑制下丘脑 GnRH 分泌和直接抑制卵泡发育 2 个方面来抑制鹅繁殖活动使鹅群进入休产期和换羽; 秋冬季日照的缩短导致 PRL 分泌下降, 这使 GnRH 分泌增加, PRL 直接对卵泡发育的抑制作用也相应减弱, 鹅群恢复繁殖活性和开始产蛋。如此, 光周期就实现了对马岗鹅季节性繁殖活动的调控, 即长短光照分别抑制和促进其繁殖活动的效应, 使以马岗鹅为代表的广东灰鹅呈现出春夏停产换羽和秋冬产蛋的独特繁殖特性^[14]。

另外, 由于光对动物的影响受时间和强度的影响, 试验中根据冬夏季日照差异, 2 次长光照处理分别为 18 和 16 h, 试验结果证明对鹅群的影响相同; 同时由于人工短光照处理能使鹅群立即进入相当于自然条件下冬季的日照环境, 而自然条件下要在开产后经过秋季才能进入冬季, 这导致整个试验阶段处理组产蛋比对照组高 16.74%, 并且这种影响在 2 组开产后的产蛋率上升上明显表现出来。这些结果进一步说明光周期对马岗鹅繁殖性能的重要调控作用。

(下转第 104 页)

功能退化时达到峰值^[5-6]。根据繁殖期的日照特点,鸟(禽)类的繁殖活动上有长日照繁殖和短日照繁殖2类,其中对前者的研究较多,对后者的研究相对较少,以马岗鹅为代表的广东灰鹅均属于后者。研究发现,短光照促进马岗鹅的生殖功能,长光照则抑制^[7]。本研究通过人工光照控制研究了光周期对马岗鹅季节性繁殖活动的内分泌机制。

1 材料与方法

1.1 动物试验

选健康马岗鹅成年种鹅650只(♂:♀=1:6),平均分为对照组和处理组。对照组在整个试验阶段(2004年1月13日—12月18日)接受自然光照(东经113.01°,北纬23.70°,图1A),处理组接受2次长-短光照处理(图1B):1月13日—3月14日接受18 h/d光照(18 L:6 D),即在白天日照的基础上进行晚间人工补光(30~50 lx),3月15日—7月27日将光照缩短为11 h/d(11 L:13 D);7月28日—10月9日重新将每天鹅群接受的光照增加至16 h/d(16 L:8 D),10月10日再次缩短为11 h/d(11 L:13 D),并一直到试验结束。试验中的短光照处理主要是通过将鹅群限制在通风良好的棚内蔽光来实现。从试验第1 d开始每隔15 d各组翅下静脉采血1次($n=12$),肝素钠抗凝,在3 h内分离血浆(2 000 r/min × 20 min, 4℃),存于-20℃。试验阶段除了接受限制性光照处理时被围在鹅舍内以外,白天鹅群均可自由活动、采食、饮水和配种,经常补充适量的青草或水草。每天定时收集各组产蛋,记录各组每天总产蛋数并计算产蛋率。每3~4 d检查1次就巢情况,并时常观察换羽情况,被确认就巢的母鹅要被隔离并限制饲喂7~10 d以强制终止就巢,然后重新放归鹅群。

1.2 激素测定

血浆PRL由鸡PRL放射免疫法(radioimmunoassay,RIA)测定^[8]。鸡PRL参照标准(AFP-10328B)、同位素碘标记chPRL(AFP-4444B)和兔抗chPRL抗血清(AFP-151040789)均购于美国国家卫生研究院(NIH)。血浆LH由鸡LH放射免疫法测定^[9]。鸡LH参照标准(USDA-cLH-K-3)、同位素碘标记LH(USDA-cLH-I-3)和兔抗鸡LH抗血清(USDA-AcLH-5)均由美国农业部 Germplasm and Gamete Physiology Laboratory 的 J. A. Proudman 博士赠送。第二抗体驴抗兔抗血清购自北京北方生物技术研究所。PRL和LH碘化标记所用同位素 Na^{125}I 为成都中核高通同位素股份有限公司产品,氯胺T为Sigma公司产品。PRL放射免疫法灵敏度为0.34 ng/mL,标准曲线的ED75、ED50和ED25分别为

1.30、3.71和40.60 ng/mL,LH放射免疫法灵敏度为0.02 ng/mL,两方法的批内批间变异均小于15%,样品连续稀释所得抑制曲线均与标准曲线平行。

1.3 数据分析

产蛋曲线为日产蛋率曲线,日产蛋率=日产蛋总数/母鹅总数(包括就巢鹅)×100%。对各组的血浆PRL和LH质量浓度变化作单因子方差分析,对各时间点上的组间差异作 t -检验。除注明外,各数值均用平均值±标准误表示。所有数据分析均用SAS software version 8.01完成。

2 结果

2.1 产蛋

对照组在长光下(18 L:6 D)继续产蛋,但产蛋逐步下降,于3月28日停产(图1C);处理组产蛋在长光下(18 L:6 D)则快速下降并于2月10日停产(图1D)。处理组在第1次短光照处理后于4月18日重新开产,日产蛋数快速增加,并在30 d内就升至约30%;对照组则于6月18日重新开产,日产蛋数增加缓慢,至7月30日才达15%。当7月28日再次接受长光照后,处理组产蛋再次快速下降并于9月13日停产;在10月10日接受短光照后于11月11日重新开产。整个试验阶段处理组出现2个体产期,分别约70和60 d,对照组则只有1个约3个月的体产期。在产蛋期,2组的产蛋率均保持高低峰交替出现。整个试验期间对照组和处理组平均每只母鹅产蛋26.3和30.8枚,前者比后者低16.74%。

2.2 换羽

2组鹅群均是在停产后7~10 d开始换羽,在重新开产前完成换羽,公鹅一般比母鹅滞后约1周。首先是胸部、腹部和尾部等部位的小羽毛大量脱落,后是翅膀和尾部的主翼毛出现脱落,变得残缺不齐,之后新的羽毛慢慢长出。开产前长出的新羽整齐而富有光泽,在开产后很长一段时间保持光泽。随着产蛋的继续,羽毛慢慢褪去光泽并变得粗糙,但依然紧凑和牢固;当鹅群慢慢地再次进入休产期时,羽毛开始变得凌乱和松动,并在停产后不久开始新一轮换羽。

2.3 激素水平

2.3.1 PRL 对照组血浆PRL质量浓度在秋冬季处在低水平(约10 ng/mL),鹅群处在产蛋期,在春夏季显著升高(20~30 ng/mL)($P<0.01$)(图1E),鹅群停产。处理组血浆PRL质量浓度在短光照下均处于低水平(约10 ng/mL),在长光照下均显著上升(20~30 ng/mL)($P<0.01$)(图1F),分别与对照组在产蛋期和休产期的结果相似。