

## 肾型 IBV S1 基因重组 BCG 菌株的构建及其免疫原性研究

柏佳宁 边艳青 赵宝华\*

(河北师范大学生命科学学院 石家庄 050016)

**摘 要** S1 基因是传染性支气管炎病毒( IBV )的主要保护性抗原基因 ,应用 RT-PCR 技术特异地扩增嗜肾型传染性支气管炎病毒 X 株的 S1 基因 ,经序列分析证实为 S1 基因 ,将其连接到含有人结核分枝杆菌启动子 hsp70 基因和堪萨斯分枝杆菌  $\alpha$  信号肽基因的表达式载体 pRR3 上 ,从而构建了大肠杆菌-分枝杆菌穿梭表达质粒 pR- $\alpha$ -S1 ,再电转化至 BCG 中 ,形成重组菌株 rBCG-S1。热激后 S1 蛋白在耻垢分枝杆菌 *M. smegmatis* mc<sup>2</sup> 155 中高效表达 ,并且通过 ELISA 和 Western blot 检测能够被抗 IBV S1 蛋白的单克隆抗体识别。将 10<sup>6</sup> CFU 的重组菌株 rBCG-S1 皮下注射免疫 6 周龄的 SPF 鸡 ,动物保护试验结果表明重组菌株 rBCG-S1 对鸡具有一定的免疫保护效果 ,能够保护 SPF 鸡抵抗 IBV X 毒株强毒攻击。血凝抑制试验表明血凝抑制抗体滴度能够显著增加。构建的重组菌株为今后开发新型鸡传染性支气管炎基因工程弱毒疫苗奠定了基础。

**关键词** :鸡传染性支气管炎 ;S1 糖蛋白基因 ;rBCG ;保护性反应

中图分类号 :Q939.91 文献标识码 :A 文章编号 :1001-6209(2007)02-0324-05

鸡传染性支气管炎( Avian infectious bronchitis , IB )是由传染性支气管炎病毒( IBV )引起的鸡的一种急性、高度接触性传染的病毒性疾病 ,是危害养鸡业的主要疫病之一<sup>[1]</sup>。在河北省发现的病毒株主要为肾型传染性支气管炎病毒株<sup>[2]</sup>。病鸡食欲减退 ,渴欲增加 ,精神不振 ,羽毛粗乱 ,该病能导致鸡的死亡和产蛋率的下降 ,给养鸡业造成巨大的经济损失。现今 ,在中国和世界的许多国家 ,鸡传染性支气管炎仍旧是一种重要的禽类疾病<sup>[3]</sup>。由于弱毒疫苗和灭活疫苗的效果不明显 ,因此 ,在这种情况下 ,研究一种高效的鸡传染性支气管炎疫苗显得很重要。

IBV 为套式病毒目( Nidovirales ) ,冠状病毒科( Coronaviridae )的代表病毒 ,主要由 3 种蛋白质组成 ,即纤突蛋白( spike protein ,S 蛋白 )、膜基质蛋白( membrane protein ,M 蛋白 )和与病毒核酸相结合的核衣壳蛋白( nucleocapsid protein ,N 蛋白 )。S 蛋白翻译后经过裂解产生 N 端的 S1 糖多肽和 C 端的 S2 糖多肽 ,S1 蛋白可使病毒吸附到细胞上 ,通过细胞间的融合传播病毒 ,同时 S1 蛋白能诱导机体产生中和抗体和血凝抑制抗体 ,它还与 IBV 毒株的组织亲和性及毒力有关<sup>[4]</sup>。将 IBV 用尿素处理去除 S1 亚单位后进行免疫 ,结果不能产生保护性及中和抗体

( VN )和血凝抑制( HI )抗体 ,而用单价的 S1 亚单位免疫鸡则可产生 VN 及 HI 抗体 ,这个结果说明 VN 及 HI 抗体主要由 S1 蛋白激发产生<sup>[5]</sup>。这些都揭示了 S1 糖多肽亚单位与 IBV 的免疫原性关系最密切 ,是 IBV 的免疫原基因 ,血凝抑制抗体和多种病毒中和抗体均由 S1 诱发 ,血清型特异性抗体也主要是针对 S1 糖多肽。

许多种新型的 IBV 疫苗 ,包括亚单位疫苗、减毒疫苗、基因疫苗、重组痘病毒疫苗等被用于研究预防鸡传染性支气管炎病。卡介苗( *Bacillus calmette-guerin* ,BCG)是牛型分枝杆菌的减毒株 ,也是一种活的减毒性结核菌苗 ,具有低毒性、免疫力持久和对热稳定等特点 ,在全世界已经广泛用于预防结核病 ,证明有高度的安全性和极少的严重并发症。重组卡介苗( rBCG )是将外源基因导入卡介苗基因组上的一种遗传载体 ,能够依赖卡介苗生长 ,并能够表达外源基因 ,诱导体液和细胞免疫应答反应。因此 ,重组卡介苗既能行使结核疫苗的功效 ,又能行使外源基因载体的功效 ,一次注射即可产生强的持续性免疫应答反应<sup>[6]</sup>。发达的分子生物学手段和针对细菌的研究方法为研究一种新型的 IB 疫苗提供了重要的方法。

基金项目 :河北省自然科学基金( 2004000154 )

\* 通讯作者。Tel :86-311-86268434 ;Fax :86-311-86268313 ;E-mail :zhaobaohua86178@sohu.com

作者简介 :柏佳宁( 1981 - ) ,女 ,河北藁城人 ,博士研究生 ,主要从事病原微生物分子生物学研究。E-mail :cathy1981@126.com

收稿日期 :2006-06-28 ;接受日期 :2006-08-28 ;修回日期 :2006-11-03

## 1 材料和方法

### 1.1 材料

**1.1.1 病毒、菌株和质粒** 嗜肾型传染性支气管炎病毒株是在 2002 年到 2003 年按照标准的方法用 SPF (specific pathogen free) 鸡胚从患病鸡的肾脏中分离得到的,将分离到的 IBV 毒株接种 10 日龄的 SPF 鸡胚进行病毒的繁殖,通过 IBV 特异的 RT-PCR 方法对病毒进行鉴定,收获的鸡胚尿囊液用于制备病毒 RNA。 *E. coli* DH5 $\alpha$  质粒 pUC19、pMT-70 和 pIJK-1 pRR3 由本实验室保存。 pGEM-T 载体购于 TaKaRa 公司;耻垢分枝杆菌 (*Mycobacterium smegmatis* mc2) 155 由大连大学许崇波博士惠赠。

**1.1.2 鸡和鸡胚** SPF 鸡、SPF 鸡胚由辽宁省益康生物制品厂提供。

**1.1.3 酶和试剂** 限制性内切酶 *Eco*R I、*Pst* I 和 *Sal* I, AMV Rnasin, T4 DNA 连接酶, dNTPs 以及 *Taq* 聚合酶, DNA marker DL2000 均购自 TaKaRa 公司。

### 1.2 IBV S1 基因的扩增

以嗜肾型 IBV M 毒株基因组为模板,引物为在 5'端包含一段 18bp 的补充序列的 5'端引物 P1: 5'-CGGAATCCATGTTGCTAACACCTCTT-3' 和 3'端引物 P2: 5'-GCGAGCTCCTAACGTCTAAAACGAC-3', 在引物的 5'端分别含有 *Eco*R I 和 *Sac* I 酶切位点,引物由大连 TaKaRa 公司合成。病毒 RNA 的制备和 RT-PCR 的方法参考文献 [7]。

### 1.3 IBV S1 基因的扩增和序列分析

按照说明书,将扩增的 S1 基因用 Promega 公司提供的试剂盒连接到 pGEM-T 载体上,转化至受体菌 *E. coli* DH5 $\alpha$ , 筛选重组子进行双酶切鉴定,将含有完整的 S1 序列的重组质粒命名为 pZT-S1,进行序列分析,方法参考文献 [7]。

### 1.4 中间质粒 pY- $\alpha$ -S1 的构建

将 S1 基因和质粒 pY- $\alpha$  用 *Eco*R I 和 *Sac* I 粘性末端连接,构建一个含有人结核分枝杆菌启动子 hsp70 基因、一个堪萨斯分枝杆菌  $\alpha$  信号肽基因和 S1 基因的中间质粒。

### 1.5 hsp- $\alpha$ -S1 片段的扩增与序列分析

以重组质粒 pY- $\alpha$ -S1 为模板,引物 P3、P4 都含有 *Eco*R I 酶切位点。 P3: 5'-CTGAATTCGAATTCGACCCGCACG-3' (*Eco*R I); P4: 5'-GCCAATCTTATTCGTCTTCGCTTTC-3' (*Eco*R I)。模板 (1.4mmol/L)

1 $\mu$ L, P3 (1.2mmol/L) 1 $\mu$ L, P4 (1.2mmol/L) 1 $\mu$ L, 10 $\times$  Buffer 5 $\mu$ L, dNTP (25mmol/L) 4 $\mu$ L, LA *Taq* 酶 (3U/L) 1 $\mu$ L, ddH<sub>2</sub>O 37 $\mu$ L, 反应条件: 94 $^{\circ}$ C 5min; 94 $^{\circ}$ C 1min, 46 $^{\circ}$ C 1min, 72 $^{\circ}$ C 3min, 30 个循环; 72 $^{\circ}$ C 10min。回收 hsp- $\alpha$ -S1 片段与 pGEM-T 载体连接、转化,筛选重组子进行酶切鉴定和序列分析,序列分析由 TaKaRa 公司 ABI 377 自动测序仪完成。

### 1.6 重组穿梭表达质粒 pR- $\alpha$ -S1 的构建

参考文献 [4], 将回收的 hsp- $\alpha$ -S1 片段用限制性内切酶 *Eco*R I 消化,再经过补平、回收、*Sac* I 消化和去磷酸化等,与 pRR3 质粒连接,构建重组表达质粒 pR- $\alpha$ -S1。由于穿梭质粒载体 pRR3 为 Amp 和 Kan 双抗性,经限制性内切酶 *Sca* I 位点插入外源基因后破坏 Amp 抗性。所以筛选出 Kan 阳性菌落后,再用 Amp 筛选, Kan 阳性菌落而 Amp 为阴性者即为所需克隆。

### 1.7 耻垢分枝杆菌的培养及转化

参考文献 [6], 利用 Bio Rad 基因脉冲仪对分枝杆菌进行电穿孔转化。电转化条件: 电压 2.5kV, 电流 25 $\mu$ F, 电阻 1000 $\Omega$ , 电击时间 15~25ms。电转后加入 1mL M7H9 培养基,轻混匀,转移至试管中, 37 $^{\circ}$ C 培养,取 0.1mL 涂于含 25 $\mu$ g/mL 卡那霉素的 M7H9 培养基平板上, 37 $^{\circ}$ C 培养 3~4d 后筛选转化子。

### 1.8 表达产物 S1 蛋白的检测

取阳性克隆 BCG-S1 菌体至 M7H9 液体培养基中, 37 $^{\circ}$ C 以 150r/min 振荡培养 48~72h, 热激 (45 $^{\circ}$ C 振荡培养 30min) 后 5000r/min 离心 5min 收集菌体, 加入细菌裂解液 100 $\mu$ L, 37 $^{\circ}$ C 作用 1h 裂解细胞。50 $\mu$ L 收集起来用以检验蛋白含量,其余的加入 2 $\times$  SDS 电泳缓冲液,煮沸 4min,取 20 $\mu$ L 作为样品进行 SDS-PAGE 分析。将表达的特异蛋白用抗 IBV 血清进行 ELISA 和 Western blot 检测。蛋白含量在 560nm 处用薄层凝胶扫描分析系统进行扫描分析。

### 1.9 重组菌株的鸡胚中和试验和血凝抑制试验

将 IBV X 病毒原液稀释至 1 个 EID<sub>50</sub> 单位,分装到 3 列无菌试管中,第一列加等量活疫苗免疫 SPF 鸡的血清 (阳性对照组),第二列加待检血清 (试验组),第三列加等量 BCG (pRR3) 免疫 SPF 鸡的血清 (阴性对照组),混合后 37 $^{\circ}$ C 放置 1h,各接种 11 日龄 SPF 鸡胚 10 枚,每胚绒毛尿囊膜接种 0.2mL,培养 5d 解剖观察病变。血凝抑制试验参考文献 [8] 报道的方法测定重组菌株诱导机体产生血凝抑制抗体

的能力。

### 1.10 重组菌株的动物保护试验

取 120 只 6 周龄的 SPF 鸡 ,随机分为 3 大组 ,每大组分为 4 小组 ,每组 10 只 SPF 鸡 ,以相同的环境单独饲养。每个大组中的第一组免疫 IBV X93 毒株的减毒活疫苗 ,第二组免疫 BCG( pRR3 ) ,第三组免疫 BCG( 10<sup>6</sup> CFU ) ,第四组免疫 rBCG-S1( 10<sup>6</sup> CFU ) ,每只鸡以相同的计量免疫。第一大组免疫 1 次 ,第二大组免疫 2 次 ,第三大组免疫 3 次 ,每次免疫间隔 3 周 ,每个大组在免疫完毕后的 3 周后 ,以 IBV X 强毒株攻击动物 ,5d 后剖检气管和肾组织。

## 2 结果

### 2.1 IBV S1 基因的 PCR 扩增与同源性分析

以 IBV X 菌株基因组为模板 ,PCR 特异扩增出 S1 基因 ,琼脂糖凝胶电泳在 1620bp 处可见一条清晰的 DNA 亮带 ,与预期大小一致。回收 PCR 扩增产物克隆到 pGEM-T 载体中 ,筛选出阳性重组子 ,命名为 pZT-S1 ,酶切鉴定含有预计大小的目的片段。进行序列测定 ,结果表明该片段为完整阅读框( 长度 1620bp ) ,编码 540 个氨基酸 ,在 GenBank 中申请的 S1 基因的接受号为 :AY427819。该基因与 H52 , M41 ,H120 和 BEAU 菌株 S1 基因的核苷酸同源性分别为 75.8%、76.1%、75.5% 和 76.9%。嗜肾型 IBV X 毒株和其它类型的 IBV 毒株的核苷酸差异显著。

### 2.2 重组中间质粒 pY-α-S1 的构建

回收 PCR 扩增的 S1 基因片段 ,将其与 pY-α 载体连接、转化 ,提取质粒进行 *Eco*R I 酶切鉴定 ,表明获得了阳性重组质粒 pY-α-S1。

### 2.3 穿梭表达质粒 pR-α-S1 的构建

将 hsp-α-S1 基因从中间质粒 pY-α-S1 中扩增出来 ,连接到表达载体 pRR3 上 ,重组质粒经 *Sal* I , *Xho* I , *Xba* I 和 *Hind* III 酶切鉴定 ,分别得到预计大小的目的片段 ,表明获得了阳性重组质粒 pR-α-S1。

### 2.4 S1 蛋白表达的检测

将 rBCG-S1 菌体 45℃ 热激 30min 后收集进行 SDS-PAGE 和 Western blot ,检测到目的蛋白( 图 1 )。目的蛋白的分子量约为 61kDa ,与天然的 S1 蛋白大小一致 ,目的蛋白约占总蛋白含量的 20%。ELISA 检测表明 S1 基因在分枝杆菌表达的重组蛋白具有很好的反应原性 ,能够被抗 IBV 血清特异性识别。

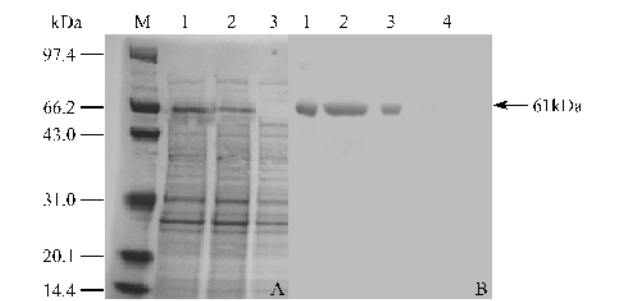


图 1 重组菌株 rBCG-S1 SDS-PAGE 和 Western blot  
Fig.1 SDS-PAGE and Western blot analysis of expressed secretory products. M.Low molecular weight protein markers ; A1 ,A2.SDS-PAGE of rBCG-S1 culture supernatants ; A3.SDS-PAGE of control ( pRR3 ) culture supernatants ; B1 ~ B3.Western blot of rBCG-gB culture supernatants ; B4.Western blot of control ( pRR3 ) culture supernatants .

### 2.5 重组菌株的鸡胚中和试验

采用固定血清稀释病毒法检测重组菌株 rBCG-S1 的保护效果 ,同时做阳性对照和阴性对照( 表 1 )。结果表明用活疫苗免疫 SPF 鸡的血清能够完全中和 IBV ,接种的 10 枚鸡胚都没产生病变 ;用含空质粒 pRR3 的 BCG 免疫 SPF 鸡的血清不能将 IBV 病毒中和 ,接种的 10 枚鸡胚全部产生病变 ,试验组仅 1 枚鸡胚产生病变。

表 1 重组菌株的 SPF 鸡胚中和试验			
Table 1 The neutralization of SPF chick embryo assay for the recombinant bacteria stain			
Groups	Number of chick embryos	Observationnal time/d	Attacked embryos number/ Survived embryos number
Sera inoculated with attenuated live-virus vaccines	10	10	0/10
Sera inoculated with rBCG-S1	10	10	1/10
Sera inoculated with BCG( pRR3 )	10	10	10/10

### 2.6 重组菌株的动物保护试验和血凝抑制试验

免疫 3 次 rBCG-S1 后 ,在肾脏水平达到 80% 的保护效果 ,而同样的免疫 3 次减毒活疫苗后在肾脏水平的保护效果达到 100%( 表 2 )。这些数据表明尽管减毒活疫苗的免疫效果强于重组菌株 ,但是重组菌株对 IBV X 强毒株的攻击也能起到一定的保护效果。同时 ,重组菌株和减毒活疫苗对肾脏的保护效果均强于对气管的保护效果。本试验还研究了重组菌株诱导机体产生血凝抑制抗体的能力 ,血凝抑制试验表明 ,2 次 rBCG-S1 免疫后诱导的血凝抑制

抗体比接种 BCG( pRR3 )和 BCG 诱导产生的略高 ,血凝抑制抗体滴度在 rBCG-S1 免疫 3 次后显著增加 (  $P < 0.05$  ;表 3 ) ,明显高于 BCG( pRR3 )和 BCG 免疫的对照组 (  $P < 0.01$  ,表 3 ) ,由减毒活疫苗免疫诱导的血凝抑制抗体滴度在 2 次免疫和 3 次免疫后都显著高于 rBCG-S1、BCG( pRR3 )和 BCG 诱导的 (  $P < 0.01$  ,表 3 )。

表 2 重组菌株 rBCG-S1 的动物保护试验

Table 2 Protective effect in chickens immunized with rBCG-S1 against challenge with the nephropathogenic X strain of IBV using SPF chickens							
Groups	Antigen immunization	No. of chickens from which the challenge virus was re-isolated/ No. of chickens challenged ( % protected )					
		1st immunization		2nd immunization		3rd immunization	
		Kidney	Trachea	Kidney	Trachea	Kidney	Trachea
1	Vaccine X93	4/10( 60 )	5/10( 50 )	2/10( 80 )	3/10( 70 )	0/10( 100 )	1/10( 90 )
2	BCG( pRR3 )	10/10( 0 )	10/10( 0 )	10/10( 0 )	10/10( 0 )	10/10( 0 )	10/10( 0 )
3	BCG	10/10( 0 )	10/10( 0 )	10/10( 0 )	10/10( 0 )	10/10( 0 )	10/10( 0 )
4	rBCG-S1	6/10( 40 )	8/10( 20 )	5/10( 50 )	6/10( 40 )	2/10( 80 )	4/10( 60 )

表 3 重组菌株 rBCG-S1 的血凝抑制试验

Table 3 HI antibody response in chickens after immunization with rBCG-S1 and post- challenge with the nephropathogenic X strain of IBV using SPF chickens							
Groups	Antigen immunization	Geometric mean HI titre( log2 ± SD )					
		1st immunization		2nd immunization		3rd immunization	
		Pre-challenge	Post-challenge	Pre-challenge	Post-challenge	Post-challenge	Post-challenge
1	Vaccine X93	5.9 ± 1.64	6.4 ± 1.78	9.0 ± 1.77	8.4 ± 1.30	9.5 ± 1.41	9.9 ± 1.55
2	BCG( pRR3 )	2.3 ± 0.46	1.9 ± 0.86	2.4 ± 0.74	1.4 ± 0.98	2.1 ± 1.13	3.0 ± 0.58
3	BCG	1.4 ± 0.74	1.5 ± 0.89	1.6 ± 1.06	1.9 ± 1.25	1.8 ± 0.71	2.1 ± 0.99
4	rBCG-S1	3.0 ± 1.40	3.5 ± 1.74	3.1 ± 1.29	3.7 ± 2.14	4.1 ± 1.89	6.9 ± 2.03

3 讨论

分枝杆菌作为疫苗载体有一定的优势 ,如 :生产工艺简单、不需纯化及后期处理 ,性能稳定易保存 ;同时它还是一种很好的免疫佐剂。外源基因在分枝杆菌中的有效表达是基因工程分枝杆菌多价疫苗发挥作用的基础。Stover 等<sup>[9]</sup>发现破伤风毒素 (Tox C)在 BCG 中的表达量低 ,不能激发机体产生免疫保护反应 ,可见提高外源基因在分枝杆菌的表达效率是制约分枝杆菌的因素之一。重组的分枝杆菌疫苗能够对各种病毒、细菌和寄生虫等引起的刺激形成免疫应答反应 ,证明了分枝杆菌是强的细胞免疫佐剂的同时也是一种疫苗载体 ,可以刺激机体产生抗体 ,并帮助抗体进入免疫体系。耻垢分枝杆菌( *M. smegmatis* mc2 155 )是一种生长相对较快 ,电转化效率较高的突变株 ,它是同 BCG 一样 ,也是一种非致病菌和强的细胞免疫佐剂 ,已经成为一种疫苗载体。我们将外源基因导入分枝杆菌 ,诱导表达融合蛋白 ,刺激机体产生的抗体 ,比起用纯化的内部抗原和野生的分枝杆菌联合诱导的抗体更经济有效。卡介苗 ,这种被广泛应用的疫苗载体 ,能够在巨噬细胞中增殖 ,不仅可以诱导持续的免疫应答反应 ,而且可以通过分子生物学手段将外源基因导入 ,发挥最大的免疫保护效用<sup>[10]</sup>。

本试验将 S1 基因应用 RT-PCR 的方法从嗜肾型 IBV X 毒株基因组中扩增出来 ,通过分子生物学手段将人结核分枝杆菌启动子 hsp70 基因和堪萨斯分枝杆菌  $\alpha$  信号肽基因与 S1 基因连接在一起 ,形成一个融合基因。将该融合基因连接到穿梭表达载体 pRR3 上 ,从而构建了大肠杆菌-分枝杆菌穿梭表达质粒 pR- $\alpha$ -S1 ,再电转化至 BCG 中 ,形成重组菌株 rBCG-S1。热激后在培养基上清检测到重组菌株 rBCG-S1 分泌表达的 S1 蛋白。最后 ,通过动物保护性试验表明重组菌株 rBCG-S1 对鸡具有一定的免疫保护效果 ,能够保护 SPF 鸡抵抗强毒攻击。在本试验中 ,我们为外源基因在分枝杆菌中 ,在 HSP70 启动子启动下表达和分枝杆菌作为多价基因疫苗载体提供了科学的证据。

我们用人结核分枝杆菌 HSP70 启动子来控制 IBV S1 基因在分枝杆菌中的表达 ,HSP70 启动子在加热或过氧化物等应激条件下被活化 ,属于高效启动子 ,增加载体在分枝杆菌中的稳定性 ,减少外源蛋白表达对宿主细胞生长产生的影响以及减少宿主细胞蛋白酶对所表达蛋白的降解作用 ,使得通过穿梭载体表达外源基因更方便和容易。程继忠等<sup>[6]</sup>利用 HSP70 启动子在耻垢分枝杆菌表达了日本血吸虫 26kDa 抗原( Sj26GST )基因 ,还利用 HSP70 启动子在 BCG 中表达了日本血吸虫中国大陆株谷胱甘肽 S-

转移酶(GST)抗原基因。我们还用堪萨斯分枝杆菌 $\alpha$ 抗原信号肽来引导外源基因的分泌表达,从而有利于抗原递呈细胞的吞噬与处理,更有效地刺激机体产生针对外来抗原的保护性免疫反应。

### 参 考 文 献

- [ 1 ] Afanador G, Roberts JR. Effect of nephropathogenic infectious bronchitis viruses on renal function in young male broiler chickens. *J Gen Virol*, 1996, **77**(3): 413–418.
- [ 2 ] 崔 岩, 马兴树, 杨国庆等. 鸡肾型传染性支气管炎病原分离及治疗试验. *中国畜禽传染病*, 1998, **20**(2): 122–124.
- [ 3 ] Ziegler AF, Ladman BS, Dunn PA, *et al.* Nephropathogenic infectious bronchitis in Pennsylvania chickens 1997–2000. *Avian Dis*, 2002, **46**(4): 938–944.
- [ 4 ] Himani B, Anjeanette R, Leatrice V, *et al.* Severe acute respiratory syndrome coronavirus spike protein expressed by attenuated vaccinia virus protectively immunizes mice. *PNAS*, 2004, **101**(17): 6641–6646.
- [ 5 ] 周继勇, 沈行燕, 程丽琴, 等. 新变异的禽传染性支气管炎病毒 ZJ971 毒株 S 基因克隆及序列分析. *中国农业科学*, 2001, **34**(4): 445–450.
- [ 6 ] 戴五星, 程继忠, 皇甫永穆, 等. 大肠杆菌-分枝杆菌分泌型穿梭表达质粒 pBCG-SP-HSP65 的构建及人结核杆菌 HSP65 的表达. *生物工程学报*, 2004, **20**(2): 170–174.
- [ 7 ] 赵宝华, 李尚波, 许崇波, 等. 肾型鸡传染性支气管炎病毒 X 株 S1 基因序列的测定及同源性分析. *中国兽医学报*, 2002, **22**(5): 445–447.
- [ 8 ] Chang SS, Youn JL, Chang WL, *et al.* Induction of protective immunity in chickens vaccinated with infectious bronchitis virus S1 glycoprotein expressed by a recombinant baculovirus. *J of General Virology*, 1998, **79**(6): 719–723.
- [ 9 ] Stover R, Clavel-Seres S, David HL, *et al.* Conjugative transfer of a shuttle plasmid from *Escherichia coli* to *Mycobacterium smegmatis*. *FEMS Microbiol Lett*, 2000, **57**(1–2): 135–138.
- [ 10 ] Dai WX, Huangpu YQ, Zheng B, *et al.* Construction of recombinant BCG bearing schistosoma japonicum 26Ku antigen gene and study on its immunogenicity on mice. *Natl Med J China*, 2000, **80**(6): 407–410.

## Construction of recombinant BCG bearing S1 glycoprotein of nephropathogenic IBV and study on its immunogenicity on chickens

BAI Jia-ning, BIAN Yan-qing, ZHAO Bao-hua\*

(College of Life Science, Hebei Normal University, Shijiazhuang 050016, China)

**Abstract** Glycoprotein S1 was the major protein to determine infection and immunogenicity of *Infectious bronchitis virus* (IBV). The S1 glycoprotein gene of IBV isolates were amplified by reverse transcriptase-polymerase chain reaction (RT-PCR) and proved to be S1 gene by sequencing. The *E. coli-mycobacterium* expression shuttle plasmid pR- $\alpha$ -S1 was constructed by inserting the S1 gene to the pRR3 with human mycobacterium tuberculosis HSP70 promoter and  $\alpha$  signal peptide. Then the plasmid pR- $\alpha$ -S1 was introduced into mycobacterium bovis BCG by electroporation to construct a recombinant strain rBCG-S1. The S1 protein could be highly expressed in *M. smegmatis* mc<sup>2</sup> 155 when induced by heating and was detected by ELISA and Western blot assays using monoclonal antibody against S1 glycoprotein of IBV. 6 week-old SPF chicken were subcutaneously immunized with 10<sup>6</sup> cfu rBCG-S1 and each chick was immunized three times at 3 week intervals with the same antigen used for the primary immunization. The protective immunity of rBCG-S1 was identified in vaccinated chickens. Results from the protection test showed the two immunizations with rBCG-S1 could provide protection for chickens from the challenge with virulent nephropathogenic IBV strain X. Haemagglutination inhibition titers were also increased in chickens immunized with the expressed rBCG-S1, and significantly higher titers were detected after challenge. These data indicate that the rBCG-S1 could be used as candidate of a live vector vaccine for NIBV.

**Keywords** : *Infectious bronchitis virus* (IBV); S1 glycoprotein gene; rBCG; protective immunity