

徐超, 谢泉, 武佳妍, 等. 表达 J 亚群禽白血病病毒 Env 蛋白的重组血清 4 型禽腺病毒的构建 [J]. 畜牧与兽医, 2025, 57 (3): 66-73.
XU C, XIE Q, WU J Y, et al. Construction of a recombinant serotype 4 fowl adenovirus expressing the Env protein of subgroup J avian leukosis virus [J]. Animal Husbandry & Veterinary Medicine, 2025, 57 (3): 66-73.

表达 J 亚群禽白血病病毒 Env 蛋白的重组血清 4 型禽腺病毒的构建

徐超¹, 谢泉^{1,2}, 武佳妍¹, 王胜男^{1,2}, 万志敏^{1,2}, 邵红霞^{1,2},
秦爱建^{1,2}, 叶建强^{1,2}, 李拓凡^{1,2*}

(1. 扬州大学兽医学院/禽类预防医学教育部重点实验室/江苏省动物预防医学重点实验室, 江苏 扬州 225009;
2. 江苏高校动物重要疫病与人兽共患病防控协同创新中心, 江苏 扬州 225009)

摘要: 旨在为解决国内禽白血病净化周期长以及净化鸡群 J 亚群禽白血病病毒 (ALV-J) 感染频发等问题提供新型抗 ALV-J 策略。本研究利用前期构建好的增强型绿色荧光蛋白 (EGFP) 与血清 4 型禽腺病毒 (FAdV-4) 纤突蛋白 Fiber-2 融合的重组 FAdV-4 为载体, 并使用 CRISPR/Cas9 和 Cre-LoxP 技术构建表达 ALV-J 囊膜蛋白 (Env) 的重组 FAdV-4, 通过间接免疫荧光试验和 Western blot 验证重组病毒表达的 Env 蛋白, 测定重组病毒在鸡肝癌细胞系 (LMH) 细胞中的增殖特性。结果: 成功拯救了能表达 ALV-J Env 蛋白的重组病毒 FAdV-4-ALV-J-env, 该重组病毒在 LMH 细胞中的复制效率远低于野生型 FAdV-4。本研究构建的重组病毒 FAdV-4-ALV-J-env 为 ALV-J 和 FAdV-4 感染的联防联控提供了二联候选疫苗株。

关键词: J 亚群禽白血病病毒; Env 蛋白; 血清 4 型禽腺病毒; 重组病毒

中图分类号: S855 文献标志码: A 文章编号: 0529-5130(2025)03-0066-08

Construction of a recombinant serotype 4 fowl adenovirus expressing the Env protein of subgroup J avian leukosis virus

XU Chao¹, XIE Quan^{1,2}, WU Jiayan¹, WANG Shengnan^{1,2}, WAN Zhimin^{1,2}, SHAO Hongxia^{1,2},
QIN Aijian^{1,2}, YE Jianqiang^{1,2}, LI Tuofan^{1,2*}

(1. College of Veterinary Medicine Yangzhou University/Ministry of Education Key Laboratory for Avian Preventive Medicine/Key Laboratory of Jiangsu Preventive Veterinary Medicine, Yangzhou 225009, China;
2. Jiangsu Co-innovation Center for Prevention and Control of Important Animal Infectious Diseases and Zoonoses, Yangzhou 225009, China)

Abstract: A novel anti-ALV-J strategy is urgently needed to help to solve the long eradication time-course and frequent re-emerging of ALV-J infection in eradicated chickens. This study utilized a previously constructed Enhanced green fluorescent protein (EGFP) and partially used Fiber-2 recombinant serotype 4 (FAdV-4) avian adenovirus (FAdV-4) as vector, and further constructed a recombinant FAdV-4 expressing ALV-J Env protein using CRISPR/Cas9 and Cre-LoxP techniques. The Env protein expressed by the recombinant virus was detected through indirect immunofluorescence and Western blot, and the proliferation characteristics of the recombinant virus were evaluated in LMH cells. Our results showed that the recombinant virus FAdV-4-ALV-J-env expressing ALV-J Env protein was successfully rescued and the replication efficiency of this recombinant virus in LMH cells was much lower than that of the wild-type FAdV-4. All these indicated that the FAdV-4-ALV-J-env constructed here provided a bivalent vaccine candidate for the prevention and control of ALV-J and FAdV-4.

Keywords: subgroup J avian leukosis virus; Env protein; serotype 4 fowl adenovirus; recombinant virus

收稿日期: 2024-03-22; 修回日期: 2025-01-31

基金项目: 国家自然科学基金青年项目 (32302839); 江苏省自然科学基金青年项目 (BK20220579); 江苏省农业科技自主创新资金项目 (CX (23) 3075)。

第一作者: 徐超, 男, 硕士

* 通信作者: 李拓凡, 教授, 主要从事家禽病毒性免疫致病机理及免疫防控研究, E-mail: tfli@yzu.edu.cn。

禽白血病病毒 (avian leukosis viruses, ALV) 是甲型反转录病毒属的重要成员, 是一类肿瘤性免疫抑制病原^[1]。当前 ALV 被分为 A~K 共 11 个亚群, 其中 A~E/J/K 共 7 个亚群为感染鸡的 ALV, 不同亚群 ALV 在国内的流行情况差异较大。国内多个地区的 ALV 流行病学调查显示, J 亚群禽白血病病毒 (ALV-J) 在国内鸡群依旧流行^[2]。ALV-J 感染主要引起造血细胞恶性增生、免疫抑制, 诱导髓细胞瘤等, 较其他亚群 ALV 具有更强的传播性与致病力^[3]。ALV-J 独特的致病特性与其 *env* 基因编码的病毒囊膜糖蛋白 Env 密切相关, 该蛋白又分为表面单位 Gp85 与穿膜单位 Gp37。Gp85 在病毒表面组成球状结构, 负责与受体结合, 它在不同毒株中变异最大, 决定着 ALV 的亚群、宿主、毒力以及免疫原性等; Gp37 则负责病毒囊膜与细胞膜的融合过程^[4-5]。目前关于 ALV-J 独特的致病致瘤机制知之甚少, 且尚无 ALV-J 特异性疫苗及抗病毒药物, 核心种群执行严格的净化仍是当前有效防控 ALV-J 的策略。然而, 近年来 ALV-J 变异加速, 多亚群共感染现象普遍^[6-9], 使得国内 ALV-J 感染更为复杂, 严重影响家禽业的健康发展及国家中长期动物疫病防治规划中 ALV 净化宏伟目标的实现。因此, 开发新型抗 ALV-J 策略以加速疾病净化进程已然迫在眉睫。疫苗免疫一直是畜禽疫病防控的重要手段。然而, 反转录病毒疫苗研发是世界性难题, 目前仅有的成功案例是我国的马传染性贫血弱毒疫苗。当前针对 ALV 开展的疫苗研究均未获得成功, 可见针对主要免疫保护性抗原 Env, 同时启动宿主体液和细胞免疫, 才有可能实现反转录病毒的免疫防控。

肝炎-心包积液综合征 (HHS) 是一种主要由血清 4 型禽腺病毒 (FAdV-4) 引起的新发病^[10-11]。2015 年 7 月, 我国华东地区首次暴发了由高致病性 FAdV-4 感染肉鸡引起的 HHS 疫情, 给国内养禽业带来了巨大的威胁^[10,12]。尽管近年来随着 FAdV-4 灭活疫苗的上市使 HHS 疫情得到了有力防控, 但其远未能满足当前的市场需求。本课题组利用 CRISPR/Cas9 技术编辑 FAdV-4 编码纤突蛋白 Fiber-2 的 *fiber-2* 基因, 构建了增强型绿色荧光蛋白 (EGFP) 与完整 Fiber-2 蛋白融合的重组 FAdV-4 (FA4-EGFP), 该重组病毒不仅在鸡肝癌细胞系 (LMH) 中表现出与野生型 FAdV-4 相似的复制能力, 而且在 SPF 鸡体内高度致弱^[13]。基于 FA4-EGFP, 课题组已研制出了针对血清 8 型禽腺病毒、鸭 3 型腺病毒等多种病原的二价或二联重组疫苗候选株^[14-15]。

当前, FAdV-4 与 ALV-J 在我国鸡群中依旧流

行, 共感染事件也时有发生^[16], 两种疫病的防控形势严峻。开发针对 ALV-J 和 FAdV-4 的二联重组活载体疫苗, 不仅能实现 FAdV-4 感染的有效防控, 其作为活病毒载体能够激发细胞免疫的特性也为 ALV-J 实现免疫防控提供了可能。然而, 目前尚无针对 ALV-J 和 FAdV-4 的二联重组疫苗构建的报道。因此, 本研究以 FA4-EGFP 为模板病毒, 利用 CRISPR/Cas9 技术和 Cre-LoxP 系统, 将 FA4-EGFP 中 *EGFP* 基因与部分 *fiber-2* 基因序列替换为 ALV-J 的囊膜蛋白基因 *env*, 构建了表达 ALV-J Env 蛋白的新型重组病毒 FAdV-4-ALV-J-*env*, 该重组病毒的成功构建为 FAdV-4 和 ALV-J 感染的防控提供了重要候选。

1 材料与方法

1.1 细胞、病毒、抗体和质粒

LMH 来源于美国菌种保藏中心, 培养基为 DMEM/F12 (购自 Gibco 公司), 以含有 5% 胎牛血清作为细胞生长培养基, 1% 胎牛血清作为感染病毒后维持细胞生长培养基。携带 ALV-J GY03 株 *env* 基因的 pcDNA3.1-*env* 质粒^[13] 和表达绿荧光蛋白的重组病毒 FA4-EGFP^[17] 均由本实验室构建和保存; 抗 ALV-J Env 蛋白的单克隆抗体 JE9^[18], 抗 FAdV-4 Hexon 蛋白的单克隆抗体 6F11 以及抗 FAdV-4 Fiber-2 蛋白的单克隆抗体 1C9 均由本实验室保存; 携带红色荧光蛋白 (RFP) 表达盒的质粒 pMD19T-HAL-RFP-HAR 和表达环化重组酶 (Cre) 的质粒 pcDNA3.1-Cre 均由本实验室构建和保存^[19]。

1.2 主要试剂

质粒小提试剂盒、核酸胶回收试剂盒、基因组提取试剂盒购自天根生化科技 (北京) 有限公司; 2× *Taq* Master Mix、Phanta Super-Fidelity DNA 聚合酶、EXnase™ II 重组试剂盒、T4 连接酶均购自南京诺唯赞生物科技股份有限公司; *Bsm*B I 限制性内切酶购自美国 NEB 公司; TA 克隆试剂盒购自擎科生物科技有限公司; 大肠杆菌 *Stbl3* 感受态细胞购自上海唯地生物技术有限公司; DMEM/F12 培养基、Opti-MEM 培养基购自赛默飞世尔科技有限公司; 转染试剂 Mirus-LT1 购自 MIRUSBIO 公司; DNA Super Marker、RIPA 裂解液和 ECL 超敏发光液均购自康为世纪生物科技有限公司; 甘油醛-3-磷酸脱氢酶 (GAPDH) 单克隆抗体购自武汉艾博抗有限公司; 羊抗鼠 IgG-HRP 购自 Jackson Immuno Research 公司; 羊抗鼠 IgG-FITC 购自 KPL 公司。

1.3 小向导 RNA (sgRNA) 和供体质粒的构建

根据 FAdV-4 的 *fiber-2* 基因序列, 利用 sgRNA

在线设计网站 (<http://zlab.bio/guide-design-resources>) 进行 sgRNA 的设计。然后利用 *BsmB I* 限制性内切酶将 lentiCRISPR-v2 质粒线性化, 用 T4 连接酶将其与 sgRNA 连接, 连接产物转化至 *Stb13* 感受态细胞, 挑取单菌落进行扩大培养, 提取质粒送生物公司测序验证。sgRNA 序列见表 1, 均由南京擎科生物科技有限公司合成。

为构建外源基因替代部分 *fiber-2* 基因的重组 FAdV-4, 首先需要构建携带外源基因的供体质粒, 为被剪切的模板病毒提供修复模板。因此, 以 pcDNA3.1-*env* 为模板扩增 ALV-J 的 *env* 基因, 并扩增

线性化 pMD19T-HAL-RFP-HAR, 具体引物序列见表 2。利用 ClonExpress II One Step Cloning Kit 通过同源重组技术构建供体质粒 pMD19T-HAL-ALV-J-*env*-RFP-HAR。

表 1 针对 *fiber-2* 基因的 sgRNA 引物

名称	序列 (5'→3')	片段大小/bp
sgRNA-F:	CACCGAAGGGTGTATCGCTCTCCGG	25
sgRNA-R:	<u>AAACCCGGAGAGCGGATACACCCTC</u>	

注: 下划线表示 *BsmB I* 酶切位点。

表 2 构建供体质粒所用的 PCR 引物

用途	序列 (5'→3')	片段大小/bp
扩增线性化 pMD19T-HAL-RFP-HAR	F: TAACTCGAGTCTAGAAAGCTTGGATC	8 400
	R: GCTGCCACCGCCACCGACCACGGTTAAAGCGCCCG	
扩增 <i>env</i> 基因	F: TCGGTGGCGGTGGCAGCGCATTCTGACTGGGCACC	1 700
	R: CTTTCTAGACTCGAGTTACAGTTGCTCCCTAATTC	

注: 下划线表示同源臂序列。

1.4 重组 FAdV-4-ALV-J-*env*-RFP 的拯救

取状态良好的 LMH 细胞铺 6 孔板, 次日细胞密度生长至约 70%~80% 转染。在 200 μ L 的 Opti-MEM 中依次加入 3 μ g sgRNA、3 μ g 的供体质粒以及 12 μ L 的转染试剂 Mirus, 室温孵育 45 min。孵育结束后将转染体系滴加到预先使用 Opti-MEM 覆盖的细胞中, 转染 6 h 后换成细胞生长液。转染 24 h 后, 弃去细胞生长液, 感染 0.01 个感染复数 (MOI) 的 FA4-EGFP, 2 h 后换成细胞维持液。感染 4 d 后, 将上清液盲传至新鲜 LMH 细胞, 使用荧光显微镜观察细胞中是否出现红色荧光簇, 红色荧光的成簇出现即初步表明重组病毒构建成功。

1.5 重组 FAdV-4-ALV-J-*env*-RFP 的纯化及 RFP 表达盒的切除

将拯救的红色荧光重组病毒进行空斑纯化和有限稀释法纯化, 最终获得纯化的红色荧光重组病毒。随后, 使用转染试剂 Mirus 将 4 μ g pcDNA3.1-Cre 转染 LMH 细胞, 24 h 后感染 0.01 个 MOI 的红色荧光重组病毒感染, 2 h 后换成细胞维持液, 每天观察红色荧光病毒的数量, 挑取无 RFP 表达且存在病变的 LMH 细胞, 用有限稀释法或病毒空斑试验进行多轮纯化, 直至红色荧光病毒完全消失, 最终获得去除 RFP 表达盒的重组病毒 FAdV-4-ALV-J-*env*, 使用 FAdV-4 鉴定引物 (见表 3) PCR 检测病毒纯化效果。重组病毒构建策略见图 1, 其中野生型 FAdV-4 的 *fiber-2* 基

因 CDS 全长为 1 440 bp, 缺失后的 *fiber-2* 保留其 1~837 bp 核苷酸序列。

FAdV-4-ALV-J-*env* 完全纯化后, 对其进行连续传代的稳定性评价。取含病毒的细胞培养上清液感染 LMH 细胞, 48 h 后收取上清液再次接种新鲜的 LMH 细胞, 并收集感染后的细胞, 离心后提取细胞基因组, DNA 提取的具体操作步骤参见试剂盒说明书, 重复以上步骤 10 次以上, 选取第 2、4、6、8、10 代的基因组提取物为模板, 进行 PCR 扩增鉴定。

表 3 FAdV-4 鉴定通用引物

名称	序列 (5'→3')
FAdV-4-F:	GTTACGTCTACTCCCCCAAC
FAdV-4-R:	CGTTCATGACTCTTTATTGACACGCGGC

1.6 重组病毒 FAdV-4-ALV-J-*env* 的间接免疫荧光试验 (IFA) 鉴定

利用 -20 $^{\circ}$ C 预冷的丙酮:乙醇 (3:2) 固定液将感染重组病毒的 LMH 细胞固定 5 min, 然后分别使用抗 ALV-J Env 蛋白的单克隆抗体 JE9 和抗 FAdV-4 Hexon 蛋白的单克隆抗体 6F11 作为一抗, 将 FITC 标记的羊抗鼠 IgG 用 PBS 按 1:150 稀释后作为二抗, 进行 IFA 分析。

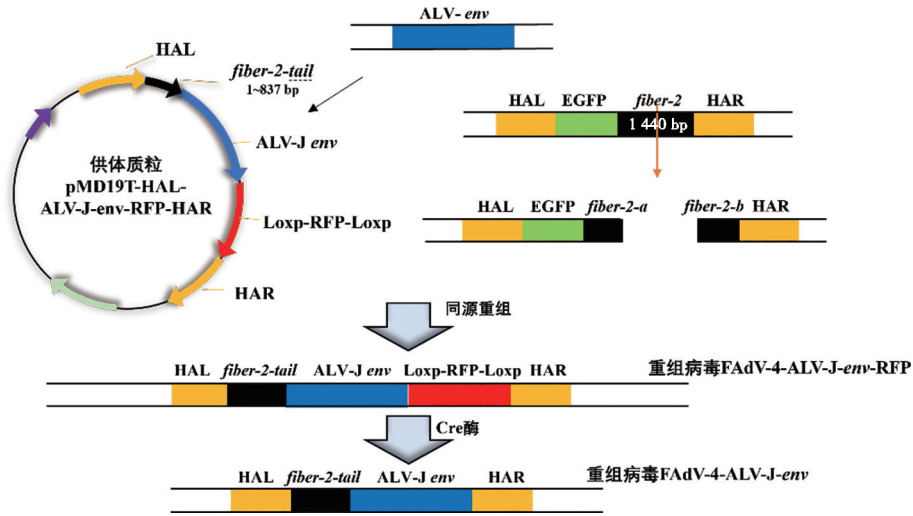


图1 重组病毒 FAdV-4-ALV-J-env 构建策略示意

1.7 重组病毒 FAdV-4-ALV-J-env 的 Western blot 鉴定

将感染重组病毒的 LMH 细胞加入含有蛋白酶抑制剂的 RIPA 裂解液中裂解，30 min 后离心取上清液加入 loading buffer，98 °C 煮样 10 min 后，12 000 r/min 离心 5 min 备用。分别使用抗 FAdV-4 Fiber-2 的单克隆抗体 1C9、抗 ALV-J Env 蛋白的单克隆抗体 JE9、抗 FAdV-4 Hexon 的单克隆抗体 6F11 及抗 GAPDH 单克隆抗体作为一抗，使用 HRP 标记的山羊抗小鼠 IgG (1 : 10 000 稀释) 作为二抗，进行 Western blot 分析^[20]。

1.8 重组病毒 FAdV-4-ALV-J-env 的生长曲线测定

将构建的重组病毒 FAdV-4-ALV-J-env 和野生型 FAdV-4 分别以 0.01 个 MOI 剂量感染 LMH 细胞。2 h 后换成 1% 维持液，分别在感染后 24、48、72、96 和 120 h 收取含病毒的细胞上清液，利用单克隆抗体 6F11 进行 IFA，测定病毒效价。采用 Reed-Muench 法计算病毒的半数组织细胞感染量 (TCID₅₀)，将计算所得各时间点的病毒滴度在 GraphPad Prism 软件进行统计学分析，并绘制生长曲线。

1.9 数据统计与分析

利用 GraphPad Prism 8 软件进行统计分析，采用 *t* 检验进行显著性分析，*P* < 0.05 表示差异显著，*P* < 0.01 表示差异极显著。

2 结果与分析

2.1 重组 FAdV-4-ALV-J-env 的拯救

将针对 FAdV-4 的 *fiber-2* 基因的 sgRNA 与 lentiCRISPR-v2 质粒连接；以 pcDNA3.1-*env* 为模板扩增

ALV-J 的 *env* 基因，并用同源重组方法连接至线性化的 pMD19T-HAL-RFP-HAR，PCR 扩增结果如图 2A、B 所示。将转染了 lentiCRISPR-v2-sgRNA 和供体质粒的 LMH 细胞感染模板病毒 FA4-EGFP，通过空斑纯化和有限稀释法，得到只表达红色荧光而没有绿色荧光的重组病毒 FAdV-4-ALV-J-env-RFP (图 3)。如图 4 所示，使用 FAdV-4 鉴定引物 PCR 检测病毒纯化效果，扩增结果大小符合预期，且测序结果完全正确，说明外源基因 *env* 成功替换了 FAdV-4 的部分 *fiber-2* 基因。

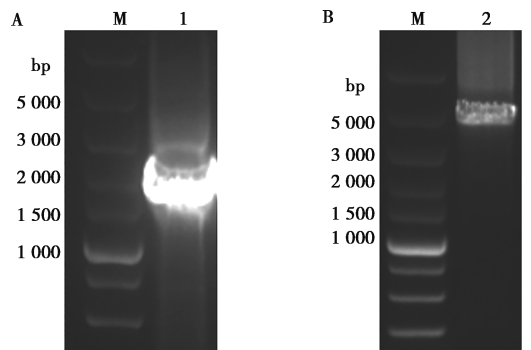


图2 供体质粒 pMD19T-HAL-ALV-J-env-RFP-HAR 的构建

为避免荧光标记基因对重组病毒复制的影响，利用 Cre 酶对两个 Loxp 位点之间的 RFP 表达盒进行剪切删除，如图 5 所示，重组病毒的特异性条带大小符合预期，且测序结果完全正确，即成功获得了重组病毒 FAdV-4-ALV-J-env。将重组病毒在 LMH 细胞上连续传代 10 次后，PCR 鉴定条带大小不变，并进行

测序比对结果一致，说明该重组病毒可稳定复制 (图6)。

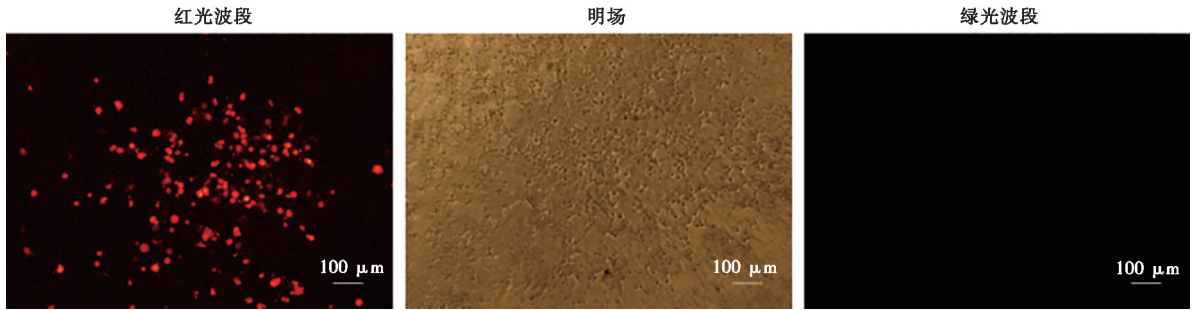
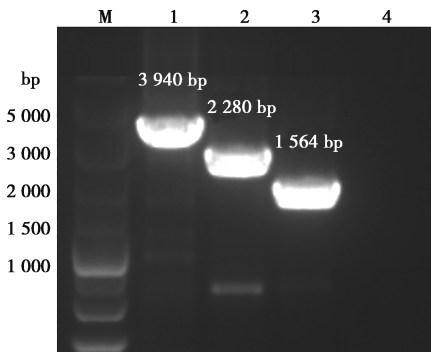
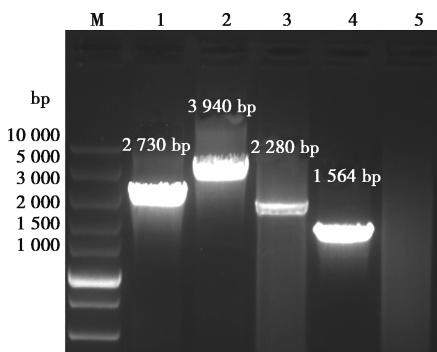


图3 重组病毒 FAdV-4-ALV-J-env-RFP 的拯救



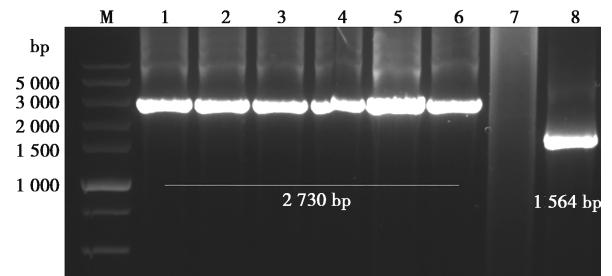
M. Super DNA Marker; 1. FAdV-4-ALV-J-env-RFP 扩增产物; 2. FA4-EGFP 扩增产物; 3. 野生型 FAdV-4 扩增产物; 4. 阴性 LMH 细胞扩增产物。

图4 PCR 检测 FAdV-4-ALV-J-env-RFP 纯化效果



M. Super DNA Marker; 1. FAdV-4-ALV-J-env 扩增产物; 2. FAdV-4-ALV-J-env-RFP 扩增产物; 3. FA4-EGFP 扩增产物; 4. 野生型 FAdV-4 扩增产物; 5. 阴性 LMH 细胞扩增产物。

图5 PCR 检测 FAdV-4-ALV-J-env 纯化效果



M. Super DNA Marker; 1~5. 第 2、4、6、8、10 代 FAdV-4-ALV-J-env 扩增产物; 6. 第 0 代 FAdV-4-ALV-J-env 扩增产物; 7. 阴性 LMH 细胞扩增产物; 8. 野生型 FAdV-4 扩增产物。

图6 PCR 检测 FAdV-4-ALV-J-env 遗传稳定性

2.2 重组病毒 FAdV-4-ALV-J-env 的鉴定

为鉴定 Env 蛋白在重组病毒 FAdV-4-ALV-J-env 中的表达情况，将其感染 LMH 细胞后进行 IFA 和 Western blot 检测。IFA 结果显示，抗 FAdV-4 Hexon 蛋白的单克隆抗体 6F11 能与感染 FAdV-4-ALV-J-env 的 LMH 细胞发生特异性反应，同时，抗 ALV-J Env 蛋白的单克隆抗体 JE9 亦能特异性地与感染重组病毒的 LMH 细胞发生反应，而未感染的细胞均无荧光 (图7)。Western blot 结果如图8所示，针对 ALV-J Env 蛋白的 JE9 单抗能识别感染 FAdV-4-ALV-J-env 的 LMH 细胞中表达的 Env 蛋白，条带大小约 97 kDa；针对 Hexon 蛋白的单抗 6F11 则能与 Hexon 蛋白发生特异性反应，大小约 120 kDa；使用针对 Fiber-2 蛋白的单克隆抗体 1C9 作为一抗进行孵育，因重组病毒 FAdV-4-ALV-J-env 的 Fiber-2 存在缺失，且缺失部分包括 1C9 抗体识别的抗原表位，故

未能产生任何大小的特异性条带，而重组病毒 FAdV-4-ALV-J-EGFP 则出现了 Fiber-2 蛋白（约 60 kDa）和 EGFP-Fiber-2 融合蛋白（约 90 kDa）两条带^[19]。上述结

果皆与预期相符，表明重组病毒 FAdV-4-ALV-J-*env* 能够有效表达 ALV-J 的 Env 蛋白。

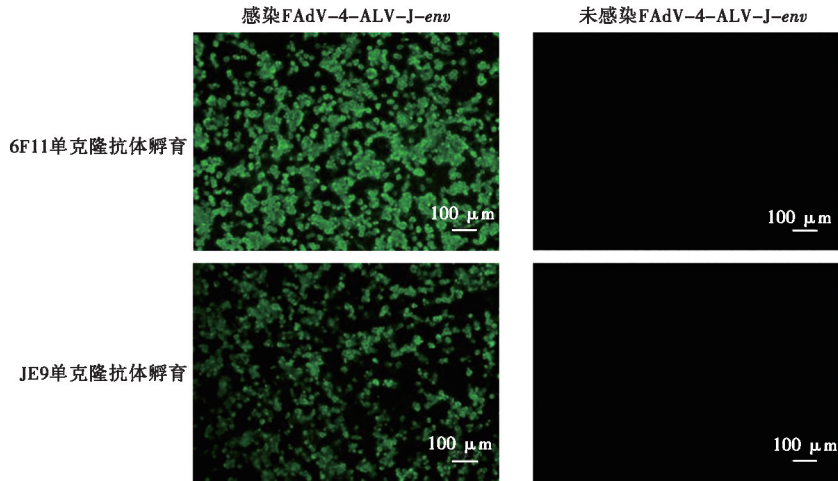
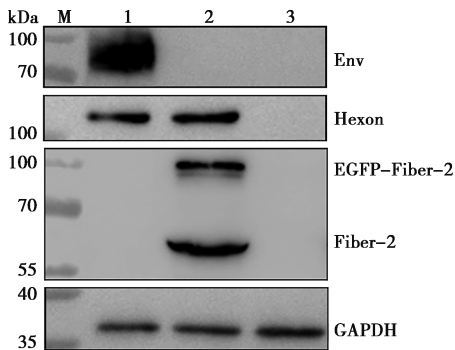


图7 IFA 鉴定 FAdV-4-ALV-J-*env*



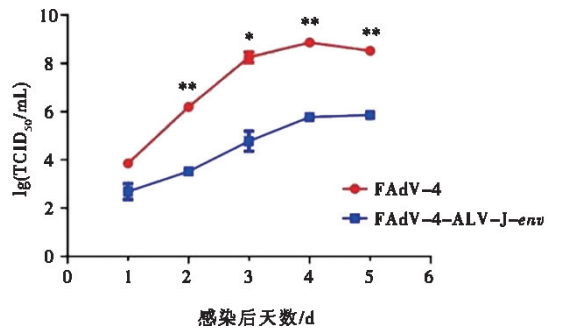
1. 感染 FAdV-4-ALV-J-*env* 的 LMH 细胞; 2. 感染 FA4-EGFP 的 LMH 细胞; 3. 阴性 LMH 细胞。

图8 Western blot 鉴定 FAdV-4-ALV-J-*env*

2.3 重组病毒 FAdV-4-ALV-J-*env* 的生长曲线测定

为了探究重组病毒 FAdV-4-ALV-J-*env* 在体外的复制能力，在 LMH 细胞中测定了 FAdV-4-ALV-

J-*env* 的复制动力学，结果表明重组病毒 FAdV-4-ALV-J-*env* 的复制能力明显弱于野生型病毒 FAdV-4，在感染 5 d 内的病毒峰值滴度仅能达到 10^6 TCID₅₀/mL（图 9），且重组病毒引起的细胞病变比野生型病毒 FAdV-4 明显减轻（图 10）。



同一时间点 2 个毒株比较，* 表示 $P < 0.05$ ，** 表示 $P < 0.01$ 。

图9 重组病毒 FAdV-4-ALV-J-*env* 的复制动力学

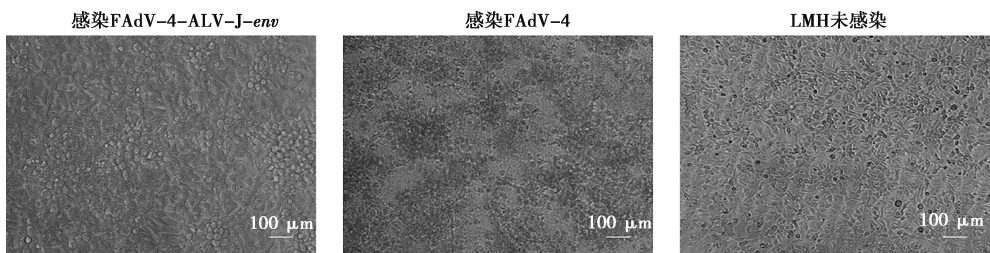


图10 FAdV-4-ALV-J-*env* 和 FAdV-4 感染 5 d 后 LMH 的病变情况

3 讨论

自 1988 年首个 ALV-J 毒株 HPRS103 于英国的商业肉鸡中被分离以来^[21], ALV-J 迅速在全球范围广泛传播, 世界养禽业因此遭受了巨大的打击。杜岩等^[22]在山东和江苏的肉鸡中分离到 4 株 ALV-J, 标志着 ALV-J 疫情开始波及中国养禽业。自 2006 年起, 国内多地蛋鸡相继出现髓细胞瘤、血管瘤等临床症状, 经检测确诊为 ALV-J 感染^[23]。2008—2009 年间, ALV-J 席卷全国各地鸡场, 间接促使全国范围内净化措施的有力推进, 禽白血病疫情暂时得到良好的控制。然而, 近年来全国各地鸡场均有 ALV-J 感染的报道, 净化场 ALV-J 再现事件也时有发生^[3,24]。因此, 将净化措施作为防控禽白血病的唯一策略, 不仅周期长、成本高, 而且存在防控不彻底的风险, 难以满足我国养禽业依旧持续高速发展的现状。ALV-J 主要的免疫保护性抗原是 Env 蛋白的 Gp85, 由于该蛋白高度的变异性以及 ALV 感染后具有将前病毒基因组整合于宿主的特性, 传统的灭活疫苗和亚单位疫苗并不能提供有效保护^[5]。开发新型抗 ALV-J 策略, 提高净化效率, 降低疫病净化成本是我国亟待攻克的瓶颈问题。

疫苗接种是一直以来都是防控畜禽病毒性疫病的重要手段, 然而由于 ALV 的高度变异性, 其在禽白血病上的应用举步维艰。Dou 等^[25]制备了一种含有 ALV-J Gp85 蛋白的亚单位疫苗并接种种鸡, 其刺激产生的母体抗体对孵化鸡的早期 ALV-J 感染似有帮助; 也有学者尝试将多表位疫苗应用于 ALV-J 的防控, 但其局限性仍旧明显^[26]。值得注意的是, 目前唯一获得成功的反转录病毒疫苗——马传染性贫血弱毒活疫苗是一株能够提供细胞免疫和体液免疫的活疫苗^[27]。因此, 离开细胞免疫而仅依靠体液免疫, 可能不足以与 ALV 以及其他反转录病毒对抗^[26]。

2015 年以来, 由新型 FAdV-4 感染引起的 HHS 在我国大规模暴发流行, 死亡率高达 30%~100%, 同样给我国家禽养殖行业造成了严重的经济损失^[12]。尽管近年来相继有 FAdV-4 的灭活疫苗上市, 但远未能满足市场需求。FAdV-4 的基因组大, 许多位点或基因均可作为设计表达外源抗原的位点, 是极具潜力的二联或多联疫苗载体^[14]。Pan 等^[28]利用低致病性 FAdV-4 (rHN20) 的 Fosmid 系统鉴定了 FAdV-4 中多个非必需的 ORF, 并成功构建表达超强毒力传染性法氏囊病毒 (vvIBDV) VP2 蛋白的重组 FAdV-4 (rHN20-vvIBDV-VP2), 该重组病毒对 FAdV-4 和 vvIBDV 攻毒具有完全保护作用。需要注意的是, 基于非结构蛋白位点插入的外源基因, 往往不能将抗原

表达于病毒表面, 这类方案诱导免疫效果往往不及将抗原表达于病毒粒子表面。FAdV-4 的病毒粒子表面有两个结构蛋白 Fiber-1 和 Fiber-2, Fiber-1 直接介导病毒感染, Fiber-2 则是重要毒力因子, 直接影响高致病性 FAdV-4 的致病力^[29-32]。课题组前期研究发现 Fiber-2 并非病毒组装所必需的^[33], 故 *fiber-2* 基因可以作为靶向替换插入外源基因的位点, 构建重组 FAdV-4, 实现 FAdV-4 与其他重要疫病的联合免疫防控。基于此, 本课题组前期创制了一系列针对血清 8 型禽腺病毒、鸭 3 型腺病毒等病原的致弱的重组 FAdV-4, 且对 FAdV-4 和上述病原均具有良好的免疫保护效果^[14-15]。然而, 对 FAdV-4 的 *fiber-2* 基因进行大段或全部缺失构建的重组病毒所表达的外源蛋白往往也不能表达于病毒粒子表面。故本研究构建的新型重组病毒则保留了更多 Fiber-2 蛋白基底部序列, 力图将 Env 蛋白展示于重组病毒粒子表面, 以期刺激机体产生更好的免疫效果。按照上述策略, 本研究利用 CRISPR/Cas9 基因编辑技术, 将 FAdV-4 中的部分 *fiber-2* 基因替换为 ALV-J 的囊膜蛋白基因 *env*, 成功拯救了表达 ALV-J Env 蛋白的新型重组病毒 FAdV-4-ALV-J-*env*。该重组病毒不仅具有良好的 FAdV-4 抗原反应性, 且可以高效表达 ALV-J 的 Env 蛋白。值得注意的是, 本研究借助了 RFP 示踪以及 Cre-LoxP 系统, 该体系中初始的重组病毒因表达 RFP 可以直观了解重组病毒拯救是否成功及其生长情况; 转染 Cre 环化重组酶可以直接敲除重组 FAdV-4-ALV-J-*env*-RFP 中的两侧含有 LoxP 的 RFP 基因表达盒, 结合有限稀释和病毒空斑纯化提高了重组病毒 FAdV-4-ALV-J-*env* 的纯化效率。同时表达 FAdV-4 和 ALV-J 保护性抗原的重组 FAdV-4-ALV-J-*env* 活病毒能有效诱导体液免疫和细胞免疫, 可以一定程度上弥补因抗原变异导致的体液免疫效果降低的问题。

综上, 本研究基于 CRISPR/Cas9 基因编辑技术, 成功构建了表达 ALV-J Env 蛋白的重组血清 4 型禽腺病毒 FAdV-4-ALV-J-*env*, 其在易感细胞 LMH 中的复制能力显著低于野生型 FAdV-4, 为 FAdV-4 与 ALV-J 重组二联疫苗的研制打下了基础, 为 ALV-J 以及其他病原的免疫防控提供了新的策略与思路。

参考文献:

- [1] 秦爱建. 禽白血病的流行与防控 [J]. 兽医导刊, 2011 (12): 37-38.
- [2] DENG Q, LI M, HE C, et al. Genetic diversity of avian leukosis virus subgroup J (ALV-J): toward a unified phylogenetic classification and nomenclature system [J]. Virus Evol, 2021, 7

- (1): veab037.
- [3] FANDIÑO S, GOMEZ-LUCIA E, BENÍTEZ L, et al. Avian leukosis: will we be able to get rid of it? [J]. *Animals (Basel)*, 2023, 13 (14): 2358.
- [4] LI T, YAO X, LI C, et al. Gp37 regulates the pathogenesis of avian leukosis virus subgroup J via its C terminus [J]. *J Virol*, 2020, 94 (11): e02180-19.
- [5] ZHANG Y, YU M, XING L, et al. The bipartite sequence motif in the N and C termini of gp85 of subgroup J avian leukosis virus plays a crucial role in receptor binding and viral entry [J]. *J Virol*, 2020, 94 (22): e01232-20.
- [6] CHEN W, CHEN S, NIE Y, et al. Synergistic immunosuppression of avian leukosis virus subgroup J and infectious bursal disease virus is responsible for enhanced pathogenicity [J]. *Viruses*, 2022, 14 (10): 2312.
- [7] ZHANG J, MA L, LI T, et al. Synergistic pathogenesis of chicken infectious anemia virus and J subgroup of avian leukosis virus [J]. *Poult Sci*, 2021, 100 (11): 101468.
- [8] WANG P, SHI M, HE C, et al. A novel recombinant avian leukosis virus isolated from gamecocks induced pathogenicity in Three-Yellow chickens; a potential infection source of avian leukosis virus to the commercial chickens [J]. *Poult Sci*, 2019, 98 (12): 6497-6504.
- [9] LIU H, MA K, LIU M, et al. Histologic findings and viral antigen distribution in natural coinfection of layer hens with subgroup J avian leukosis virus, Marek's disease virus, and reticuloendotheliosis virus [J]. *J Vet Diagn Invest*, 2019, 31 (5): 761-765.
- [10] SUN J, ZHANG Y, GAO S, et al. Pathogenicity of fowl adenovirus serotype 4 (FAdV-4) in chickens [J]. *Infect Genet Evol*, 2019, 75: 104017.
- [11] XIE Q, WANG W, LI L, et al. Domain in Fiber-2 interacted with KPNA3/4 significantly affects the replication and pathogenicity of the highly pathogenic FAdV-4 [J]. *Virulence*, 12 (1): 754-765.
- [12] YE J, LIANG G, ZHANG J, et al. Outbreaks of serotype 4 fowl adenovirus with novel genotype, China [J]. *Emerg Microbes Infect*, 2016, 5 (5): e50.
- [13] XIE Q, CAO S, ZHANG W, et al. A novel fiber-2-edited live attenuated vaccine candidate against the highly pathogenic serotype 4 fowl adenovirus [J]. *Vet Res*, 2021, 52 (1): 35.
- [14] LU H, XIE Q, ZHANG W, et al. A novel recombinant FAdV-4 virus with fiber of FAdV-8b provides efficient protection against both FAdV-4 and FAdV-8b [J]. *Viruses*, 2022, 14 (2): 376.
- [15] GUO Y, LIN Y, XIE Q, et al. A novel recombinant serotype 4 fowl adenovirus expressing fiber-2 protein of duck adenovirus 3 [J]. *Front Cell Infect Microbiol*, 2023, 13: 1177866.
- [16] 张小波, 温贵兰, 张喜懿, 等. 麻黄鸡 ALV-J、FAdV-4、FWPV 混合感染的诊断 [J]. *中国兽医杂志*, 2022, 58 (3): 82-87.
- [17] 李拓凡. Env 蛋白对 J 亚群禽白血病病毒致病性的影响及其分子机制研究 [D]. 扬州: 扬州大学, 2021.
- [18] 秦爱建, 崔治中, LEE L, 等. 抗 J 亚群禽白血病病毒囊膜糖蛋白特异性单克隆抗体的研制及其特性 [J]. *畜牧兽医学报*, 2001, 32 (6): 556-562.
- [19] 谢泉. 血清 4 型禽腺病毒 Fiber-2 蛋白致病分子机制研究 [D]. 扬州: 扬州大学, 2022.
- [20] LI T, XIE J, YAO X, et al. The tyrosine phosphatase SHP-2 dephosphorylated by ALV-J via its Env efficiently promotes ALV-J replication [J]. *Virulence*, 2021, 12 (1): 1721-1731.
- [21] PAYNE L N, BROWN S R, BUMSTEAD N, et al. A novel subgroup of exogenous avian leukosis virus in chickens [J]. *J Gen Virol*, 1991, 72 (Pt 4): 801-807.
- [22] 杜岩, 崔治中, 秦爱建, 等. 鸡的 J 亚群白血病病毒的分离及部分序列比较 [J]. *病毒学报*, 2000 (4): 341-346.
- [23] CHENG Z, LIU J, CUI Z, et al. Tumors associated with avian leukosis virus subgroup J in layer hens during 2007 to 2009 in China [J]. *J Vet Med Sci*, 2010, 72 (8): 1027-1033.
- [24] ZHANG Y, SU Q, ZHANG Z, et al. Molecular characteristics of the re-emerged avian leukosis virus in China, 2018-2019 [J]. *Transbound Emerg Dis*, 2020, 67 (3): 1141-1151.
- [25] DOU W, LI H, CHENG Z, et al. Maternal antibody induced by recombinant gp85 protein vaccine adjuvanted with CpG-ODN protects against ALV-J early infection in chickens [J]. *Vaccine*, 2013, 31 (51): 6144-6149.
- [26] FENG M, ZHANG X. Immunity to avian leukosis virus: where are we now and what should we do? [J]. *Front Immunol*, 2016, 7: 624.
- [27] WANG H, RAO D, FU X, et al. Equine infectious anemia virus in China [J]. *Oncotarget*, 2017, 9 (1): 1356-1364.
- [28] PAN Q, ZHANG Y, LIU A, et al. Development of a novel avian vaccine vector derived from the emerging fowl adenovirus 4 [J]. *Front Microbiol*, 2021, 12: 780978.
- [29] ZHANG Y, LIU R, TIAN K, et al. Fiber2 and hexon genes are closely associated with the virulence of the emerging and highly pathogenic fowl adenovirus 4 [J]. *Emerg Microbes Infect*, 2018, 7 (1): 199.
- [30] LIU R, ZHANG Y, GUO H, et al. The increased virulence of hypervirulent fowl adenovirus 4 is independent of fiber-1 and penton [J]. *Res Vet Sci*, 2020, 131: 31-37.
- [31] WANG X, TANG Q, CHU Z, et al. Immune protection efficacy of FAdV-4 surface proteins fiber-1, fiber-2, hexon and penton base [J]. *Virus Res*, 2018, 245: 1-6.
- [32] XIE Q, WANG W, LI L, et al. Domain in Fiber-2 interacted with KPNA3/4 significantly affects the replication and pathogenicity of the highly pathogenic FAdV-4 [J]. *Virulence*, 2021, 12 (1): 754-765.
- [33] XIE Q, WANG W, KAN Q, et al. FAdV-4 without fiber-2 is a highly attenuated and protective vaccine candidate [J]. *Microbiol Spectr*, 2022, 10 (1): e0143621.