

# 口蹄疫病毒三价复合多表位佐剂 DNA 疫苗构建及其免疫原性

马鸣潇<sup>1</sup>, 金宁一<sup>2</sup>, 尹革芬<sup>3</sup>, 鲁会军<sup>2</sup>, 李昌<sup>2</sup>, 金扩世<sup>2</sup>, 曲祖乙<sup>1</sup>

1 辽宁医学院畜牧兽医学院, 锦州 121001

2 中国人民解放军军事医学科学院 全军基因工程重点实验室, 长春 130062

3 云南农业大学动物科技学院, 昆明 650201

**摘要:** 以 O 型、A 型口蹄疫病毒(FMDV)结构蛋白 VP1 全基因和 AsiaI 型 FMDV 两个基因拓扑型的结构蛋白 VP1 基因上的 5 个抗原表位基因作为主要免疫原基因, 以来源于非结构蛋白 3ABC 和结构蛋白 VP4 上的 3 个 Th2 细胞表位基因作为辅助基因, 构建了 O 型、A 型和 AsiaI 型 FMDV 复合多表位基因工程疫苗表达盒 OAAT, 在此基础上, 以金黄色葡萄球菌肠毒素 A(SEA)为基因佐剂, 通过分子设计构建了 SEA 与 OAAT 融合表达基因。将构建好的表达盒 OAAT 与 SEA 融合表达基因克隆至真核表达载体 PVAX1 PCMV 启动子下游, 构建了口蹄疫三价基因佐剂 DNA 疫苗 pEA。经 Western blotting 和 IFA 检测, 目的蛋白在 Hela 细胞中获得正确表达。小鼠免疫实验表明, pA 和 pEA 免疫组的血清抗体均能分别与 O 型、A 型和 AsiaI 抗原反应, 与对照组相比差异较显著, 且 pEA 免疫组和灭活疫苗免疫组抗体水平均显著高于 pA 免疫组; 同时 pA 和 pEA 免疫小鼠细胞因子 IL-2、IFN- $\gamma$ 、IL-4 和 IL-10 较对照组显著提高, 且 pEA 免疫组的 IL-2、IFN- $\gamma$  和 IL-4 水平明显高于 pA 免疫组。用 O/NY00 和 AsiaI/YNBS/58 株 FMDV 进行豚鼠攻毒免疫保护试验, 结果表明 O 型和 AsiaI 型 FMDV 二联灭活疫苗免疫组均获得完全保护, pA 免疫组均获得 2/4 保护, pEA 免疫组均获得 3/4 保护, 而 pVAX1 和 PBS 免疫组完全没有保护。实验结果表明, SEA 与 OAAT 融合表达蛋白具有较好免疫原性, 且 SEA 可以作为 DNA 疫苗的有效基因佐剂。

**关键词:** 口蹄疫病毒, 金黄色葡萄球菌肠毒素 A(SEA), DNA 疫苗

## Molecular design and immunogenicity of a multiple-epitope foot-and-mouth disease virus antigen, adjuvants, and DNA vaccination

Mingxiao Ma<sup>1</sup>, Ningyi Jin<sup>2</sup>, Gefen Yin<sup>3</sup>, Huijun Lu<sup>2</sup>, Chang Li<sup>2</sup>, Kuoshi Jin<sup>2</sup>, and Zuyi Qu<sup>1</sup>

1 College of Animal Science and Veterinary Medicine, Liaoning Medical University, Jinzhou 121001, China

2 Genetic Engineering Laboratory, Academy of Military Medical Sciences, Changchun 130062, China

3 College of Animal Science and Veterinary Medicine, Yunnan Agricultural University, Kunming 650201, China

**Received:** November 18, 2008; **Accepted:** January 21, 2009

**Supported by:** National High Technology Research and Development Program of China (863 Program) (No. 2006AA10A204), Ph. D Programs Foundation of Liaoning Province (No. 20081099).

**Corresponding author:** Ningyi Jin. Tel: +86-431-86985921; +86-416-4336098; Fax: +86-431-87983322; E-mail: ningyik@126.com  
国家高技术研究发展计划(863 计划) (No. 2006AA10A204), 辽宁省博士启动资金(No. 20081099)资助。

**Abstract:** We designed and constructed a fuse expression gene *OAAT* and staphylococcal enterotoxin A (SEA) on the basis of the *OAAT* designed and constructed which consists of the structural protein VP1 genes from serotypes A and O FMDV, 5 major VP1 immunodominant epitopes from two genotypes of Asia1 serotype, and 3 Th2 epitopes originating from the non-structural protein, 3ABC gene and structural protein VP4 gene. The recombinant plasmids pEA was constructed using *SEA* as a genetic adjuvant. Expressions of target gene from the pEA in Hela cell were verified by IFA and Western blotting. The experiment of BALB/c mice immunized with the DNA vaccines showed that pA and pEA could induce simultaneously specific antibodies against serotypes A, Asia1, and O FMDV, and the highest antibody titres were found in the pEA and inactivated vaccine groups compared to pA vaccinating mice. Compared with the control, the levels of IL-2, IFN- $\gamma$ , IL-4, and IL-10 expression by splenic lymphocytes from mice immunized with pA and pEA were significantly increased. In addition, we found that the levels of IL-2, IFN- $\gamma$  and IL-4 from the mice immunized with pEA was higher than mice immunized with pA did. The results of viral challenge in guinea pigs showed the pA, pEA and inactivated vaccine provided full protection in 2/4, 2/4, 3/4, 3/4 and 4/4, 4/4 guinea pigs from challenge with FMDV O/NY00 and Asia1/YNBS/58, respectively. The results demonstrated fuse protein *OAAT* and *SEA* may be potential immunoge against FMDV, furthermore, *SEA* may be an effective genetic adjuvant for DNA vaccine.

**Keywords:** foot and mouth disease virus, staphylococcal enterotoxin A(SEA), DNA vaccine

口蹄疫(Foot-and-mouth disease, FMD)是由口蹄疫病毒(Foot-and-mouth disease virus, FMDV)感染引起的一种急性、高度接触性偶蹄动物传染病。FMDV 共有 7 个血清型, 每个血清型又分多个亚型, 每个 FMDV 粒子由 60 分子的 4 种结构蛋白 VP1、VP2、VP3、VP4 组成。通过单克隆技术确定了 FMDV 五个 B 细胞表位, 其中表位 1 位于 VP1 上 141~160aa 和 200~213aa 上, 是 2 个主要的抗原表位, 能够产生具有保护作用的中和抗体; 表位 3 位于 VP1 40~60aa, 受表位 1 调控; 而表位 2(位于 VP2 70~78aa 和 131~134aa), 表位 4(位于 VP3 56~58aa)和表位 5(位于 149aa)各自独立执行功能。DiMarchi 等<sup>[1]</sup>曾报道, 将串联有 FMDV VP1 第 140~160 和第 200~213 氨基酸残基的合成肽免疫牛后, 动物能抵抗病毒的感染。但随后的研究证实, 当将此类合成肽疫苗在易感动物群内大规模使用时, 却仅能提供有限的保护<sup>[2]</sup>。究其原因, 缺乏辅助性 T 细胞表位可能是影响该疫苗效果的一个因素。同时携带 B 细胞抗原表位 A 和 T 细胞抗原表位(VP121-140)的串联合成肽已经被证明对牛表现出良好的免疫反应性<sup>[3]</sup>。近年来的研究证实, 在 FMDV 衣壳蛋白上有多个能被牛和猪淋巴细胞识别的 T 细胞表位<sup>[4]</sup>, 但对这些 T 细胞表位的识别明显地受到了宿主 MHC 多态性的限制, 进而也限制了它们在疫苗中的应用。与此相反, FMDV 非结构蛋白上的 T 细胞表位氨基酸序列高度保守, 在易感动物体内, 不同血清型之间能产生交叉反应, 因此, 它为拓宽宿主防御系统对病毒表位的识别提供了可能。通常情况下, 接种 DNA 疫苗所诱导的体

液反应要比接种蛋白疫苗低。而抗体水平是保护动物抵御 FMDV 攻击的一个重要因素, 因此本研究选择了 O 型、A 型 FMDV 结构蛋白 VP1 全基因和 Asia1 型 FMDV 两个基因拓扑型的结构蛋白 VP1 基因上的 5 个抗原表位基因作为主要免疫原基因, 同时为提高所构建 DNA 疫苗的 B 细胞免疫原性, 在比较了 FMDV 非结构蛋白上不同 T 细胞表位序列保守性, 以及对 B 细胞表位的促进作用后, 选择了 3ABC 和 VP4 中 3 个 Th2 细胞表位, 作为辅助基因, 通过 linker 将辅助基因和主要免疫原基因串联, 构建了含辅助性 T 细胞表位、Asia1 型 FMDV 主要抗原表位基因、A 型和 O 型 FMDV 主要结构蛋白 VP1 基因的多表位基因工程疫苗表达盒 *OAAT*, 在此基础上, 辅以基因佐剂 *SEA*, 并通过计算机软件模拟分析构建了 O 型、A 型和 Asia1 三价复合多表位佐剂 DNA 疫苗, 以期研制出适合我国国情的廉价、高效、多价的新型 FMDV 疫苗, 为有效控制, 乃至最终消灭 FMDV 提供物质储备, 也为新型疫苗的研究提供一条新思路。现将研究内容报告如下。

## 1 材料与方法

### 1.1 主要试剂

各种限制性内切酶、ExTaq 以及 RNA 酶、T4 DNA 连接酶等购自 TaKaRa 公司, DNA 回收试剂盒购自杭州维特洁公司, M-MLV 反转录酶购自 Promega 公司, FITC 标记的羊抗兔 IgG 等购自 SBA 公司产品。

合成肽 T(AAIEFFEGMVHFDIK)由美联(西安)

生物科技有限公司合成,采用人工多肽合成仪以固相合成法合成多肽,以高效液相色谱法纯化产物并进行质谱鉴定,纯度大于95%。

## 1.2 质粒和毒株

真核表达载体 pVAX1, O 型和 A 型和 AsiaI 三价复合多表位 DNA 疫苗 pA<sup>[5]</sup>(pAXI-OAAT), 含有超抗原 SEA 重组质粒 pET-SEA, 均由本室保存。

FMDV O/NY00(GenBank Accession No. AY333431)和 AsiaI/YNBS/58(GenBank Accession No. AY390432) 被本室保存, 并通过 BHK21 细胞传代培养, 获得病毒滴度分别是  $1 \times 10^{6.4}$  TCID<sub>50</sub>/0.01 mL 和  $1 \times 10^{5.5}$  TCID<sub>50</sub>/0.01 mL。O 型和 AsiaI 型 FMDV 二价灭活疫苗购自内蒙古金宇集团。

## 1.3 检测试剂盒

Mouse Th1/Th2 ELISA 试剂盒购自 eBioscience Co. Ltd, USA。

## 1.4 实验动物

雌性 BALB/c 小鼠(4~5 周龄) 和豚鼠(400~500 g) 购自长春生物制品研究所。

## 1.5 FMDV 多表位佐剂 DNA 疫苗分子设计及构建

以 pET-SEA 为模板, 用 SEA 特异性引物(sense: 5'-CG GGT ACC ATG AGC GAG AAA AGC GAA G-3'; antisense: 5'-CG GGA TCC AGA CGG CGG TGC GCC ACC ACT TGT ATA TAAA-3')进行 PCR 扩增, 将获得的 SEA 基因克隆至 pMD18-T 载体构建重组质粒 pMD18-T-SEA, 重组质粒 pMD18-T-SEA 用 Kpn I 消化获得 SEA 基因, 将 SEA 基因克隆至重组质粒 pAXI-OAAT 的 Kpn I 位点, 构建 DNA 疫苗 pAXI-SEA-OAAT(简称 p-SEA), 并用 BamH I 和 Kpn I 进行鉴定。同时对 SEA-OAAT 融合表达基因, 通过蛋白质同源建模(Homological modelling), 利用结构和序列的同源性在 PDB 库中搜索同源蛋白模板, 预测未知结构 OAAT-SEA 蛋白的三维构象。

## 1.6 Western blotting 检测

用脂质体法将 pVAX1 和 pEA 质粒转染 HeLa 细胞, 培养 72 h 收集细胞, 进行 SDS-PAGE 电泳。然后转移到硝酸纤维素膜上, 以豚鼠抗 FMDV O 型血清为第一抗体, 碱性磷酸酶标记的羊抗豚鼠 IgG 为第二抗体进行 Western blotting 检测。

## 1.7 间接免疫荧光检测(IFA)

将纯化后的 pVAX1 和 pEA 质粒, 用脂质体法转

染到长有 60%~70% 单层 HeLa 细胞玻片上, 长到 72 h 后, 经冷丙酮固定、用 PBS 洗涤、10% BSA 的 PBS 封闭等操作后, 依次加入一抗(兔抗 FMDV 多克隆血清), FITC 标记羊抗兔的二抗, 分别 37°C 作用 1 h 后; 用 PBS 洗涤风干, 于荧光显微镜下观察和拍照。

## 1.8 小鼠免疫及免疫指标检测

将 60 只小鼠随机分 5 组, 每组 12 只, 分别为: 1 组为 pVAX1 空白质粒对照组, 2 组为 PBS 对照组, 3 组为 pA 免疫组, 4 组为 pEA 免疫组, 5 组为 O 和 AsiaI 型 FMDV 二价灭活苗。每只小鼠采用股四头肌注射, 每次 100  $\mu$ L 重组质粒(质粒浓度为 1  $\mu$ g/ $\mu$ L)或 PBS 溶液或 O 和 AsiaI 型 FMDV 二价灭活苗, 每组动物均免疫 3 次, 每次间隔 2 周, 并分别在一免后 0 d、10 d、21 d、28 d、38 d 采血、收集血清。将小鼠血清 50 倍稀释后, 分别以大肠杆菌表达的 O 型、AsiaI 型和 A 型 FMDV 的 VP1 重组蛋白作抗原, 运用间接 ELISA 方法检测小鼠血清中 O 型、AsiaI 型和 A 型 FMDV 的抗体水平。

其中末次采血通过摘眼球取血并拉颈处死, 进行细胞因子检测。首先制备刺激细胞, 将正常同源小鼠的脾淋巴细胞, 加入终浓度为 20  $\mu$ g/mL 的合成多肽 T 及 10 ng/mL IL-2, 培养 4 h, 经 80  $\mu$ g/mL 丝裂霉素 C 处理 2 h, 用培养液洗 3 次后即刺激细胞。然后取小鼠脾淋巴细胞悬液  $1 \times 10^5$  个/mL 细胞, 按 10:1 的比例加入刺激细胞, 用含 2  $\mu$ g/mL 的 CoA、20 ng/mL IL-2 的 1640 培养液培养 3 d。取细胞上清, 按 Mouse Th1/Th2 ELISA 试剂盒说明书测定各细胞因子浓度。

## 1.9 豚鼠免疫攻毒试验

40 只豚鼠随机分成 5 组, 每组 8 只 ( $n=8$ )。1 组和 2 组分别肌肉接种 200  $\mu$ L PBS 和 pVAX1 (200  $\mu$ g/200  $\mu$ L PBS), 3 组和 4 组分别肌肉接种 1  $\mu$ g/ $\mu$ L 的重组质粒 pA 和 pEA 200  $\mu$ L。5 组肌肉接种 200  $\mu$ L O 型和 AsiaI 型 FMDV 二价灭活疫苗 200  $\mu$ L, 间隔 2 周后进行二免。首免后 2 周、4 周各采血 1 次, 分离血清, 分别用 100 TCID<sub>50</sub> FMDV O/NY00 和 AsiaI/YNBS/58 测定 O 型和 AsiaI 型 FMDV 中和抗体。

二免后 2 周, 每个免疫组再随机分成 2 组, 每组 4 只, 分别用 0.2 mL 的 250 ID<sub>50</sub> O/NY00 和 AsiaI/YNBS/58 的 FMDV 接种豚鼠左后掌, 攻毒后

连续观察 1 周, 左后脚有损伤评为部分保护, 没有损伤评为完全保护。

## 2 结果

### 2.1 分子模拟

OAAT-SEA 表达盒进行同源建模结果如图 1, Asia1 型 FMDV 的主要细胞细胞表位(94~113aa 紫色, 123~142aa 粉红色和 164~176aa 棕色, 分别相当于原 VP1 上的 141~160aa 和 200~213aa)O 型 FMDV 的主要细胞表位(329~348aa 红色, 388~401aa 黄色, 分别相当于原 VP1 上的 141~160aa 和 200~213aa)A 型 FMDV 的主要细胞表位(550~569aa 蓝色, 609~622aa 绿色, 分别相当于原 VP1 上的 141~160aa 和 200~213aa)均位于亲水区, 外显蛋白的表面, 因此表明, 该表达盒 OAAT-SEA 从理论上符合设计要求。

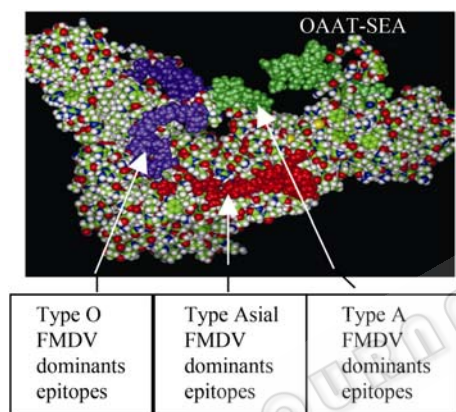


图 1 FMDV 主要抗原表位在 OAAT-SEA 三维结构中的位置

Fig. 1 Spacial position of FMDV dominant epitopes in OAAT-SEA expression box.

### 2.2 目的基因的 Western blotting 检测

收获转染重组质粒后继续培养了 3 d 的 HeLa 细胞, 并用细胞裂解液裂解、SDS-PAGE 后转移到硝酸纤维素膜上, 然后与相应的一抗和碱性磷酸酶标记的二抗进行免疫印迹反应, 结果表明: pEA 表达出 95 kD 的特异带, 与预期目的带相符, 结果见图 2。

### 2.3 目的基因的间接免疫荧光检测(IFA)

IFA 检测结果见图 3, 表明转染重组核酸疫苗质粒的 HeLa 细胞核周围及细胞浆, 出现抗 FMDV 多抗及荧光二抗发生反应的黄绿色荧光, 而对照质粒 pVAX1 没有出现荧光。所构建的质粒 pEA 能够表达目的基因。

### 2.4 ELISA 抗体检测

ELISA 抗体检测结果如图 4~6 所示, 首免后 10 d, pA 免疫组、pEA 免疫组和灭活疫苗免疫组均能产生 O 型、A 型和 Asia1 型 FMDV 抗体, 且在首免后 38 d 抗体水平达到最高, 与 pVAX1 免疫组和 PBS 免疫组相比, 均差异显著( $P < 0.05$ ), 同时 pEA 免疫组抗体水平明显高于 pA 免疫, 且差异显著( $P < 0.05$ ), 但略低于灭活疫苗免疫组(A 型 FMDV 的灭活疫苗组抗体未检测)差异不显著( $P > 0.05$ )。

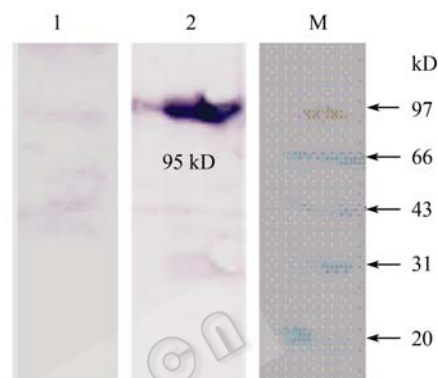


图 2 pEA 表达产物的 Western blotting 检测

Fig. 2 Western blotting of expressed product of pEA. 1: pVAX1; 2: pEA; M: protein marker.

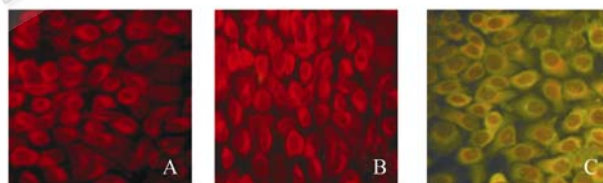


图 3 核酸疫苗质粒转染 HeLa 细胞的荧光图片(伊文斯蓝染色)

Fig. 3 Fluorescent photos of HeLa cells transfected by plasmids DNA(stained by azovan blue). (A) HeLa cell. (B) pVAX1. (C) pEA.

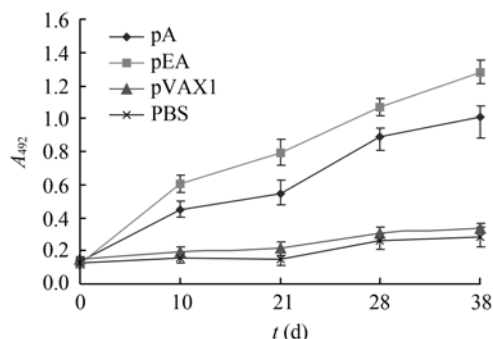


图 4 免疫小鼠抗体检测结果(A 型)

Fig. 4 Specific ELISA antibody to VP1 of type A FMDV after vaccination.

## 2.5 细胞因子检测

免疫组小鼠细胞因子浓度检测结果见图 7, 除 IL-10 变化不明显外, pA 免疫组、pEA 免疫组和灭活疫苗免疫组产生的 IL-2、IL-4 和 IFN- $\gamma$ , 与对照组相比明显升高( $P<0.05$ ), 且 pEA 免疫组 IFN- $\gamma$  水平最高, 与其他免疫组相比均差异显著( $P<0.05$ ), IL-2、IL-4 水平明显高于 pA 免疫组( $P<0.05$ ), 而 pA 免疫组与灭活疫苗免疫组比, 差异不显著( $P>0.05$ )。

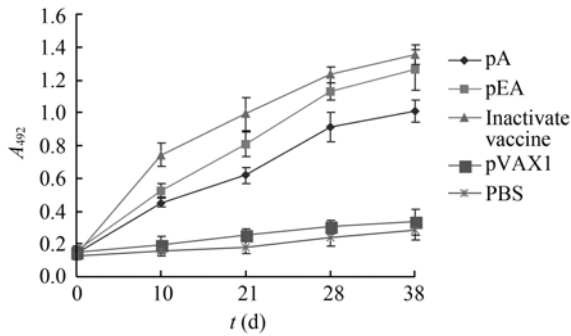


图 5 免疫小鼠 ELISA 抗体检测结果(O 型)

Fig. 5 Specific ELISA antibody to VP1 of type O FMDV after vaccination.

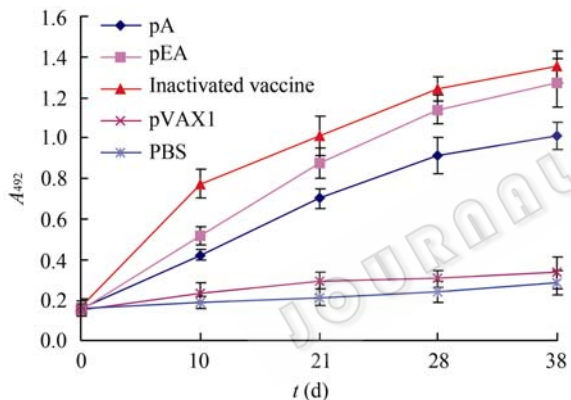


图 6 免疫小鼠抗体检测结果(Asia1 型)

Fig. 6 Specific ELISA antibody to VP1 of type Asia1 FMDV after vaccination.

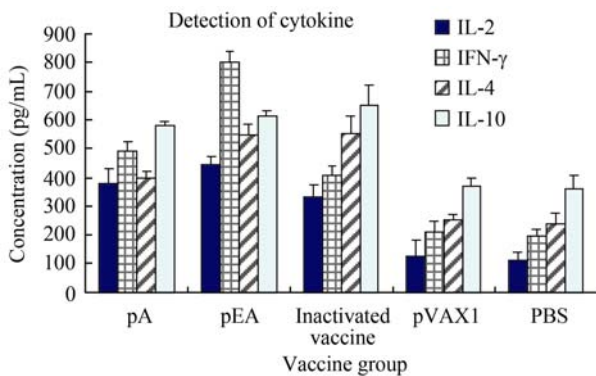


图 7 细胞因子 IFN- $\gamma$ 、IL-2、IL-4 和 IL-10 检测结果

Fig. 7 ELISA results of the cytokines, IFN- $\gamma$ , IL-2, IL-4 and IL-10.

## 2.6 豚鼠免疫攻毒试验

O 型、Asia1 型 FMDV 二联灭活疫苗免疫组产生的中和抗体水平最高, 阴性对照组 1 和 2, 没有中和抗体产生, 用 pEA 和 pA 免疫组产生中和抗体水平低于阳性对照组。

豚鼠免疫后, 用 O/NY00 和 Asia1/YNBS/58 株 FMDV 攻毒, 结果分别如表 1、表 2 所示, O 型、Asia1 型 FMDV 二联灭活疫苗免疫组均获得完全保护, pA 免疫组均获得 2/4 保护, pEA 免疫组均获得 3/4 保护, 而 pVAX1 和 PBS 免疫组完全没有保护。

表 1 O/NY00 株 FMDV 攻毒保护试验结果

Table 1 Protection of guinea pigs from O/NY00 strain FMDV challenge

Guinea pig (No.)	pVAX1	PBS	pA	pEA	Inactive vaccine
1	None	None	Total	Partial	Total
2	None	None	Total	Total	Total
3	None	None	Partial	Total	Total
4	None	None	None	Total	Total
Rate of protection (%)	0 (0/0)	0 (0/0)	50(2/4)	75(3/4)	100 (4/4)

表 2 Asia1/YNBS/58 株 FMDV 攻毒保护试验结果

Table 2 Protection of guinea pigs from Asia1/YNBS/58 strain FMDV challenge

Guinea pig (No.)	pVAX1	PBS	pA	pEA	Inactive vaccine
1	None	None	Total	Total	Total
2	None	None	Total	Partial	Total
3	None	None	Partial	Total	Total
4	None	None	None	Total	Total
Rate of protection (%)	0 (0/0)	0 (0/0)	50(2/4)	75 (3/4)	100 (4/4)

## 3 讨论

O 型、A 型和 Asia1 型 FMDV 在国内都曾经流行过, 为此有针对性的对这 3 个血清型 FMDV 进行研究, 对我国畜牧业的发展具有重要意义。目前, 控制 FMD 流行的主要措施是接种灭活疫苗, 但是灭活疫苗本身存在着安全隐患, 历史上就曾经发生过因接种灭活疫苗而导致 FMD 爆发的事件<sup>[6,7]</sup>。DNA 疫苗和表位疫苗则可以有效地克服灭活疫苗的自身不足, 目前国内外学者已经对 FMDV 的 DNA 疫苗和表位疫苗进行了较为深入的研究<sup>[8-11]</sup>, 为最终新型基因工程疫苗取代灭活疫苗提供了可能。但新型基

因工程疫苗却普遍存在抗原表位少、免疫原性差等缺点, 为了克服基因工程疫苗的局限性, 本研究在详尽了解 FMDV 分子结构及其生物功能, 分析病毒抑制宿主免疫应答的分子成分, 及激活宿主免疫细胞产生保护性免疫应答(中和抗体和 CTL)的分子基础上, 选择 O 型 FMDV、A 型 FMDV 主要免疫原基因 VP1 和 Asia1 型 FMDV 的 2 个基因拓扑型的 VP1 基因上的主要抗原表位基因作为主免疫原基因, 同时以 FMDV 非结构蛋白及结构蛋白上的 Th2 细胞表位基因作为辅助基因, 设计了 FMDV 复合多表位免疫原基因 OAAT。在此基础上, 为了增强 OAAT 的免疫原性, 在 OAAT 上游引入了超抗原金黄色葡萄球菌外毒素 A(Staphylococcus enterotoxin A, SEA) 作为基因佐剂, 构建了融合蛋白 SEA-OAAT。

超抗原 SEA 可不经抗原递呈细胞处理, 以完整蛋白质分子直接结合到主要组织相容性复合体(Major histocompatibility complex, MHC) II 类分子抗原结合槽外侧, 能激活大量带有特异性 V $\beta$ 区的 T 细胞, 通过 CTLs 细胞毒活性和一系列细胞因子的释放, 产生强烈的免疫效应。通过抗体水平检测和攻毒保护表明, 带有基因佐剂 SEA 的重组质粒 pEA 能够诱导机体产生较高的特异性抗体水平和攻毒保护, 说明 SEA 作为免疫佐剂可以增强 DNA 疫苗的免疫原性。

同时本研究还比较了 pEA (SEA-OAAT fusion) 和 pA (OAAT alone) 诱导机体产生的 IL-2、IFN- $\gamma$ 、IL-4 和 IL-10 水平。结果表明, 除 IL-10 外, 其他细胞因子, 特别是 IFN- $\gamma$  水平 pEA 免疫组显著高于 pA 免疫组。普遍认为 Th1 和 Th2 细胞因子间存在互相作用, 比如在小鼠试验表明 IL-4 能够增强 IgG1 的产生, 同时可以抑制 Th1 细胞因子的表达, 包括 IFN- $\gamma$  的表达<sup>[12,13]</sup>。但是在本研究中并没有观察到类似结果。

总之, 研究结果表明 2 个 DNA 疫苗 pA 和 pEA 均能够诱导机体产生体液免疫和细胞免疫, 并且豚鼠对 O 型和 Asia1 型 FMDV 攻毒能够产生保护。同时研究结果表明, SEA 可以作为 DNA 疫苗的有效基因佐剂。当然了, 为了进一步验证 pEA 在未来生产实际运用的可能性和 SEA 作为基因佐剂的有效性, 本实验室将会在 FMDV 自然感染的本体动物猪、牛等作进一步的研究。

## REFERENCES

- [1] Marchi R, Brooke G, Gale C, *et al.* Protection of cattle against foot-and-mouth disease by a synthetic peptide. *Science*, 1986, **232**(4750): 639–641.
- [2] Taboga O, Tami C, Carrillo E. A large-scale evaluation of peptide vaccines against foot-and-mouth disease: Lack of solid protection in cattle and isolation of escape mutants. *J Virol*, 1997, **71**(4): 2606–261.
- [3] Collen T, DiMarchi R, Doel TR. A T cell epitope in VP1 of foot-and-mouth disease virus is immunodominant for vaccinated cattle. *J Immunol*, 1991, **146**(2): 749–755.
- [4] Toja M, Escarmis C, Domingo E. Genomic nucleotide sequence of a foot-and-mouth disease virus clone and its persistent derivatives. Implications for the evolution of viral quasispecies during a persistent infection. *Virus Res*, 1999, **64**(2): 161–171.
- [5] Ma MX, Jin NY, Liu HJ, *et al.* Design and construction of multiple-epitope DNA vaccine against foot-and-mouth disease virus. *Chin J Biologicals*, 2007, **20**(3): 180–184.  
马鸣潇, 金宁一, 刘慧娟, 等. O 型、A 型、Asia1 型口蹄疫病毒三联 DNA 疫苗分子设计及其构建. *中国生物制品学杂志*, 2007, **20**(3): 180–184.
- [6] Beck E, Strohmaier K. Subtyping of European foot-and-mouth disease virus strains by nucleotide sequence determination. *J Virol*, 1987, **61**(5), 1621–1629.
- [7] King AMQ, Underwood BO, McCahon D, *et al.* Biochemical identification of viruses causing the 1981 outbreaks of foot-and-mouth disease in the UK. *Nature*, 1981, **293**, 479–480.
- [8] Wu L, Jiang L, Zhou Z, *et al.* Expression of foot-and-mouth disease virus epitopes in tobacco by a tobacco mosaic virus-based vector. *Vaccine*, 2003, **21**(27-30): 4390–4398.
- [9] Zhang HY, Sun SH, Guo YJ, *et al.* Immune response in mice inoculated with plasmid DNAs containing multiple-epitopes of foot-and-mouth disease virus. *Vaccine*, 2003, **21**(32): 4704–4707.
- [10] Cedillo-Barron L, Foster-Cuevas M, Cook A, *et al.* Immunogenicity of plasmids encoding T and B cell epitopes of foot-and-mouth disease virus (FMDV) in swine. *Vaccine*, 2003, **21**(27-30): 4261–4269.
- [11] Wang QM, Sun SH, Hu ZL, *et al.* Improved immunogenicity of a tuberculosis DNA vaccine encoding ESAT6 by DNA priming and protein boosting. *Vaccine*, 2004, **22**(27-28): 3622–3627.
- [12] Blotta M, Dekruyff R, Umetsu D. Corticosteroids inhibit IL-12 production in human monocytes and enhance their capacity to induce IL-4 synthesis in CD4<sup>+</sup> lymphocytes. *J Immunol*, 1997, **158**(12): 5589–5595.
- [13] Franchimon D, Galon J, Gadina M, *et al.* Inhibition of Th1 immune response by glucocorticoids: dexamethasone selectively inhibits IL-12-induced Stat4 phosphorylation in T lymphocytes. *J Immunol*, 2000, **164**: 1768–1774.