

IL-2 与猪细小病毒 VP₂ 基因双表达载体的构建及免疫原性的研究 Construction of the Eukaryotic Expression Vector with IL-2 Gene and VP₂ Gene of PPV and Research on Immunogenicity

崔保安^{*1}, 魏战勇¹, 王学斌¹, 黄克和², 金喜新¹, 董振杰¹, 郑兰兰¹

CUI Bao-An^{*1}, WEI Zhan-Yong¹, WANG Xue-Bin¹, HUANG Ke-He², JIN Xi-Xin¹, DONG Zhen-Jie¹
and ZHENG Lan-Lan¹

1 河南省动物性食品安全重点实验室, 郑州 450002

2 南京农业大学动物医学院, 南京 210095

1 Henan Key Laboratory for Animal Food Safety, Zhengzhou, Henan 450002, China

2 College of Veterinary Medicine, Nanjing Agricultural University, Nanjing, Jiangsu 210095, China

摘 要 将白细胞介素-2 基因和猪细小病毒 VP₂ 基因主要抗原区克隆至 pCI-neo 真核表达载体中, 构建了 pCIneo-IL₂-VP₂ 重组质粒, 用脂质体将其转染到 PK-15 细胞中, 利用免疫荧光方法检测在体外表达情况。并以小鼠为动物模型, 将 pCIneo-IL₂-VP₂ 重组质粒、对照组 pCI-neo 和猪细小病毒活疫苗通过肌肉注射进行免疫, 检测免疫小鼠的淋巴细胞转化功能, 特异性 CTL 杀伤活性和血清抗体滴度。结果显示, pCIneo-IL₂-VP₂ 在体外能够诱导 PK-15 细胞表达 VP₂ 蛋白, 小鼠注射 pCIneo-IL₂-VP₂ 质粒 1 周后能够诱导机体产生抗体, 4 周时达到峰值, 与活疫苗对照组产生的抗体滴度、诱导 T 淋巴细胞增殖和诱导强的细胞毒性基本一致。试验表明, 构建的 pCIneo-IL₂-VP₂ 能够有效诱导机体产生体液免疫和细胞免疫。

关键词 猪细小病毒, VP₂ 基因, IL-2, 基因疫苗

中图分类号 Q78 **文献标识码** A **文章编号** 1000-3061(2006)03-0425-06

Abstract To construct gene vaccine of PPV and to investigate the effects of interleukin 2 (IL-2) as an adjuvant on immune responses in mouse, the recombinant expression plasmid of pCIneo-IL₂-VP₂ was constructed and transfected into PK-15 cells by lipofectamine, the expressed product was detected by immunofluorescence assay. To study the immune effects of DNA vaccine in vitro and in vivo, mice were used as the animal model. The recombinant plasmid pCIneo-IL₂-VP₂, the control plasmid pCI-neo and the PPV live vaccine were immunized by intramuscular injection. Anti-PPV antibodies were measured by ELISA, lymphocyte proliferation activity was detected using MTT method, and the specific killing activities of CTL were assayed too. The results show that the immunized mice produced PPV antibody after one week, and reached to highest after four weeks. Compared with the control group, the pCIneo-IL₂-VP₂ immunized group produced significant differences in the antibody titers, the lymphocyte proliferation activity and the specific killing activities of CTL. The pCIneo-IL₂-VP₂ induced humoral and cellular immunity

Received: November 21, 2005; Accepted: February 17, 2006.

This work was supported by grants from "15" food safety significant attack project of China (No. 2001BA804A30-11) and significant science and technology attack project of Henan Province (No. 0223013800).

* Corresponding author. Tel: 86-371-63558878; E-mail: baoancui@henan.edu.cn

国家“十五”食品安全重大攻关专项(No. 2001BA804A30-11); 河南省重大科技攻关项目(No. 0223013800)。

responses similarly to that the live vaccine induced. These results manifested that the PPV DNA vaccine successfully induced humoral and cellular immunity response in mice with the IL-2 gene as an adjuvant.

Key words PPV, VP₂ gene, IL-2, DNA vaccine

猪细小病毒病是猪细小病毒(*Porcine parvovirus*, PPV)引起的猪主要繁殖障碍性疾病之一,以初产母猪发生流产、不孕、产死胎、畸形胎、木乃伊胎及弱胎等为特征,同时还可以引起仔猪的皮炎和腹泻,其它类型的猪感染后无明显临床症状。该病最早于1967年在英国报道,目前已遍布世界各地,每年给世界养猪业造成巨大的经济损失^[1,2]。目前对于本病的防治世界各国多采用猪细小病毒灭活疫苗和弱毒疫苗,在控制猪细小病毒病的流行方面取得了显著的效果。但目前该病在许多养猪地区仍有不断的发生和流行,因此研究新型、安全高效的疫苗一直是国内外许多学者努力的方向。

核酸疫苗(nucleic acid vaccine)又称基因疫苗、DNA疫苗,是近年来随着基因治疗技术的发展而产生的一种全新疫苗。它是利用DNA重组技术将保护性抗原蛋白基因克隆到真核表达载体中,并将其直接导入体内,使抗原蛋白内源性表达递呈给免疫系统,诱发机体产生特异性的体液免疫和细胞免疫反应^[3]。近年来分子免疫佐剂的发现,更加吸引了更多科学工作者的关注和研究^[4,5]。细胞因子佐剂中IL-2应用最为广泛,它可作用于多种效应细胞,包括T、B淋巴细胞、巨噬细胞和NK细胞,对免疫应答具有广泛的上调作用^[6]。本试验旨在构建PPV主要保护性抗原VP₂基因与IL-2基因真核双表达载体,观察猪细小病毒VP₂基因疫苗免疫效力及IL-2能否增强基因疫苗的免疫反应,为研制出高效、新型猪细小病毒基因疫苗提供科学依据。

1 材料与方法

1.1 菌株与质粒

大肠杆菌菌株JM109由本室保存。pGEM-T-VP₂载体(含猪细小病毒VP₂基因)和pCI-IL₂载体(含有IL-2基因)均由本室构建保存。

1.2 主要试剂

限制酶(*Nhe* I、*Eco* R I、*Sal* I、*Sma* I)、DNA Marker购自大连宝生物公司,T4 DNA连接酶购自Promega公司,FITC标记的抗PPV多克隆抗体,购自Veterinary Medical Research & Development公司(VMRD, Inc.),重组IL-2购自邦定生物医学公司,

Lipofectin reagent 2000 购自 Invitrogen 公司; RPMI 1640 培养基购自 Gibco 公司;胎牛血清购自 Hyclone 公司;植物血凝素(PHA)、MTT、DMSO 购自 Sigma 公司,PPV-Ab 检测试剂盒,购自 Svanova Biotech AB (Sweden),金黄色葡萄球菌蛋白 A(SPA)购自上海生物制品研究所;肝素钠购自上海伯奥生物公司,淋巴细胞分离液购自上海恒信化学试剂有限公司,其它常规试剂由本实验室提供。

1.3 猪细小病毒 VP₂ 基因与 IL-2 基因真核双表达载体的构建

1.3.1 IL-2 基因真核表达载体 pCIneo-IL₂ 的构建: 将 pCI-IL₂ 用 *Nhe* I、*Eco* R I 双酶切,琼脂糖凝胶电泳后回收小片段即得到 IL-2 基因。该片段与 *Nhe* I 和 *Eco* R I 双酶切 pCIneo 载体连接,得到重组质粒命名为 pCIneo-IL₂,并进行酶切鉴定。

1.3.2 IL₂ 基因与猪细小病毒 VP₂ 基因真核双表达载体 pCIneo-IL₂-VP₂ 的构建: 将 pGEM-T-VP₂ 用 *Sal* I、*Sma* I 双酶切并用琼脂糖回收 VP₂ 片段,并与用 *Sal* I、*Sma* I 双酶切的 pCIneo-IL₂ 连接即是 pCIneo-IL₂-VP₂ 载体,酶切鉴定正确后测序验证。

1.4 重组质粒的转染及表达产物的检测

采用脂质体法将构建的重组质粒体外转染长于盖玻片上的 PK-15 细胞。培养 48h 后,收获玻片和上清液,分别检测猪细小病毒 VP₂ 抗原蛋白和 IL-2 的生物活性。

1.4.1 猪细小病毒 VP₂ 抗原检测: 将收获玻片上的细胞用 0.01mol/L PBS (pH 7.2) 缓冲液冲洗 2 次后,放入纯丙酮中固定 10min,直接免疫荧光法 (immunofluorescence assay, FA) 检测 VP₂ 基因的表达产物,抗体为 FITC 标记的抗 PPV 的抗体,最后置荧光显微镜下观察细胞表面是否有荧光物质。同时设空载体对照。

1.4.2 IL-2 活性检测: 采用小鼠脾细胞检测。无菌取小鼠脾脏,研磨后用 RPMI 1640 洗涤 2 次,调整细胞浓度至 5×10^6 个/mL,加入刀豆蛋白 (ConA) 至终浓度为 $2.5 \mu\text{g/mL}$, 5% CO₂ 37 °C 培养。将培养的细胞悬液置于淋巴细胞分离液上, 2000r/min 离心 5min,取界面层细胞即为 IL-2 反应细胞。向 96 孔细胞培养板加入 10^6 /mL 细胞, 100 μL /孔,再加入转染

过的 pCIneo-IL₂-VP₂ 细胞上清。置 5% CO₂ 37℃ 培养 40~48h, 每孔加入 MTT 30μL (5mg/mL)。继续培养 8h 后, 各孔加入酸化 SDS (0.01mol/L HCl、10% SDS) 0.1mL 作用 4h, 测定 OD₅₇₀ 值。同时用空载体转染的细胞培养上清作为阴性对照。

1.5 pCIneo-IL₂-VP₂ 重组质粒的免疫原性研究

1.5.1 DNA 疫苗免疫小鼠: 30 日龄清洁级昆明小鼠, 60 只 (由郑州大学实验动物中心提供), 将小鼠随机分为 4 组, 每组 15 只。分别为生理盐水对照组、空质粒 pCIneo 对照组、pCIneo-IL₂-VP₂ 质粒免疫组和猪细小病毒活疫苗组。每只小鼠于股四头肌内直接注射总体积为 200μL (1μg/μL) 的质粒 DNA 溶液, 猪细小病毒活疫苗组每只小鼠注射 0.5mL。共免疫 3 次, 每次间隔为 15d。

1.5.2 抗体检测: 免疫小鼠分别在首免后第 0、1、2、4、6、8 和 10 周断尾采血, 分离血清检测血清抗体。按 PPV-Ab 检测试剂盒说明书进行, 待测血清与用过氧化物酶标记的 PPV 抗体竞争包被在酶标板上的 PPV-Ag, 通过测定标记酶的 OD₄₅₀ 值检测抗体的效价, 最后用抑制百分数 (percent inhibition, PI) 表示。计算公式如下:

$$PI = 100 - \frac{\text{样品平均 OD}_{450} \times 100}{\text{阴性 OD}_{450} \text{ 值}}$$

1.5.3 淋巴细胞增殖反应的检测 (MTT 比色法): 小鼠末次免疫后 10d 无菌摘取脾脏 (每组 3 只), 进行细胞免疫功能测定。参考李玉华介绍的方法进行^[12], 取小鼠脾脏磨碎用 RPMI 1640 溶液配成每毫升 1×10^6 单细胞悬液, 然后于 96 孔板中每孔加入

100μL, 每只小鼠为 9 孔, 其中 3 孔为 PHA 刺激组, 加入终浓度 25μg/mL; 3 孔为 SPA 刺激组, 加入终浓度为 300μg/mL; 3 孔为对照。置 5% CO₂ 37℃ 培养箱 (Thermo, 371 型) 中培养 36h 后进行测定。测定前 4h 时每孔加入 MTT 20μL (5mg/mL) 继续培养, 测定时各孔加入 150μL 的 DMSO, 充分震荡 10min 使结晶物溶解, 用酶联免疫检测仪 (Thermo) 测定 OD_{570nm} 值。增殖水平以刺激指数 (Stimulation Index, SI) 表示, $SI = (\text{实验组 cpm} - \text{仪器本底}) / (\text{对照组 cpm} - \text{仪器本底})$ 。

1.5.4 淋巴细胞杀伤效应的检测 (CTL) (采用 MTT 法): 长成单层的 PK-15 细胞经胰酶消化后, 取培养液量 1/10 的病毒液同步接种细小病毒种毒, 接毒 24h 收集细胞, 吹散制成细胞悬液, 用培养液稀释成 10^6 个/mL, 此细胞即为靶细胞, 置 4℃ 备用。

免疫小鼠摘除眼球后采血 1.5mL, 加入 100μL 肝素抗凝后加入 4 倍体积的生理盐水, 混匀后缓慢加入等体积的淋巴细胞分离液 (不能混合), 2500 r/min 离心 30min, 吸取白细胞层转入 1.5mL EP 管, 用 RPMI 1640 培养液洗涤 3 次后, 再用完全培养液悬浮成 10^6 个/mL, 此细胞即为效应细胞, 置 4℃ 备用。

将效应细胞与靶细胞以 20:1 比例混合后加入 96 孔细胞培养板, 100μL/孔, 每个样重复 3 孔, 并同时培养靶细胞和效应细胞各 3 孔做对照。37℃ CO₂ 培养 24h, 每孔加入 MTT 30μL (5mg/mL) 继续培养 4h, 各孔加入酸化 SDS (0.01mol/L HCl、10% SDS) 0.1mL 作用 8h, 测定 OD_{570nm} 值, 计算杀伤效率。杀伤效率按如下求得:

$$\text{细胞毒}(\%) = \frac{\text{靶细胞对照组 OD 值} - (\text{实验组 OD 值} - \text{效应细胞对照组 OD 值})}{\text{靶细胞对照组 OD 值}} \times 100$$

1.6 统计学分析

利用 SPSS 软件包按生物统计学上的方差分析法对抗体抑制百分数 pI 值、细胞增殖反应数据和细胞毒性数据进行统计学处理, 显著水平为 $P < 0.05$ 。其中某一时间的中和抗体效价以 3 只鼠的中和抗体几何平均数 (GMT 值) 表示; 某一时间内的淋巴细胞反应以 3 只鼠的 OD₅₇₀ 平均数表示; 细胞毒性试验以测定 3 只鼠的细胞毒性的平均数表示。

2 结果与分析

2.1 猪细小病毒 VP₂ 和 IL-2 基因双表达质粒的构建及鉴定

pCI-IL₂ 经 *Nhe* I、*Eco*R I 双酶切后得到 IL-2 基

因, 与 *Nhe* I 和 *Eco*R I 双酶切后的 pCIneo 载体连接, 得到 pCIneo-IL₂; 再将 pCIneo-IL₂ 用 *Sal* I、*Sma* I 双酶切后与 pGEM-T-VP₂ 经 *Sal* I、*Sma* I 双酶切后的 VP₂ 连接得到 pCIneo-IL₂-VP₂ 重组质粒 (图略)。

2.2 重组质粒表达抗原的检测

将 pCIneo-IL₂-VP₂ 和 pCIneo 重组质粒转染 PK-15 细胞后, 继续培养 48h 后, 进行免疫荧光试验, 在荧光显微镜下进行观察, 可以看到在转染重组核酸疫苗质粒的 PK-15 细胞有明显的荧光, 而空载体转染未见有 (图 1)。结果说明, 构建的核酸疫苗质粒表达了 VP₂ 蛋白。

将重组质粒用 Lipofectin agent 包裹后转染细胞, 继续培养 48h, 分别收集上清液, 用 MTT 法检测可

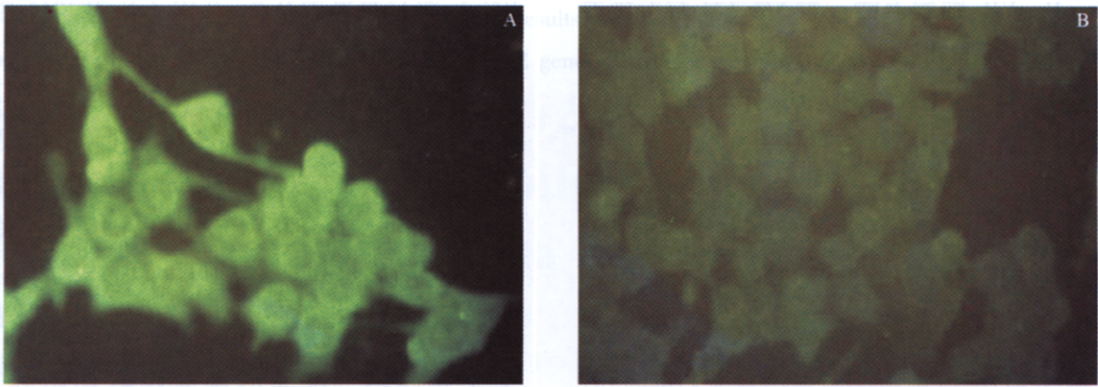


图1 重组核酸疫苗质粒免疫荧光

Fig.1 FA of recombinant plasmids
pCIneo-IL₂-VP₂ recombinant plasmids; B: control plasmids.

表达的 IL-2 活性,同时用人的重组 IL-2 蛋白(rhIL-2)做量化分析,结果见表 1。

表 1 IL-2 在体外表达检测(MTT OD₅₇₀)

Table 1 Detection of IL-2 expression		
Group		OD ₅₇₀ value
I	Cell control	2.735 ± 0.178 ^a
II	pCIneo	2.703 ± 0.307 ^a
III	pCIneo-IL ₂ -VP ₂	3.074 ± 0.157 ^b
IV	10 IU rhIL-2	2.780 ± 0.124 ^a
V	20 IU rhIL-2	3.067 ± 0.200 ^b
VI	40 IU rhIL-2	3.178 ± 0.172 ^b
VII	60 IU rhIL-2	3.781 ± 0.290 ^c
VIII	80 IU rhIL-2	3.687 ± 0.232 ^c

Note: Data with the different superscripts within the same column are significantly different (*P* < 0.05).

从表 1 可以看出,与细胞、pCIneo 对照组相比, pCIneo-IL₂-VP₂ 质粒在细胞能够诱导淋巴细胞增生, OD 值在统计学上比细胞对照组的增加显著,其表达的 IL-2 活性与 40 IU 的重组 IL-2 相当。

2.3 疫苗诱导的体液免疫应答效果观察

用 ELISA 法分别检测每组 3 只小鼠的抗 PPV 抗体,然后按公式计算 pI 值并求其平均值,结果见图 2。由图可知, pCIneo-IL₂-VP₂ 质粒和活疫苗对照组在免疫后第一周开始出现抗体,随着免疫时间的延长,其抗体逐渐增加,免疫后 4 周其抗体的 PI 值达到高峰,一直维持到第 10 周,而 pCIneo 组和空白对照组不引起机体产生抗体。 pCIneo-IL₂-VP₂ 组与对照组 pCIneo 及生理盐水对照组相比,差异显著(*P* < 0.01)。

2.4 DNA 疫苗诱导的淋巴细胞增殖效果观察

在第 3 次免疫后 10d,每一试验组取 3 只小鼠处死,无菌摘取脾脏,制成悬液,分别用 PHA 和 SPA 进行刺激,观察脾细胞的 T 和 B 细胞增殖试验,其结

果见表 2。

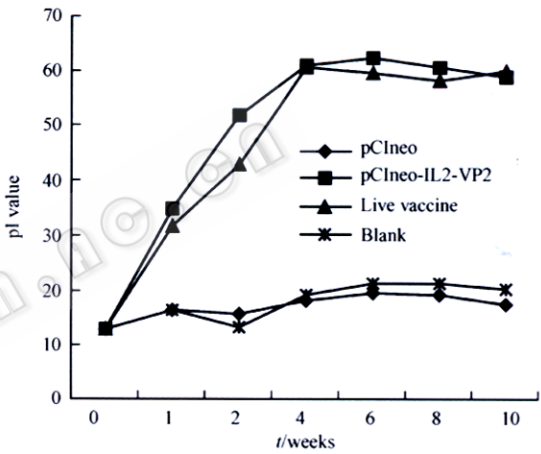


图 2 PPV VP₂ DNA 疫苗免疫后不同时间血清抗体检测

Fig.2 Antibody detection induced by DNA vaccine in immunized mice

表 2 免疫鼠脾细胞增殖试验结果

Table 2 The results of lymphocyte proliferation response in DNA immunized mice

Group		SI(<i>n</i> = 3)	
		PHA	SPA
1	Blank	1.899 ± 0.041 ^a	1.945 ± 0.209
2	pCIneo	1.735 ± 0.284 ^a	1.828 ± 0.137
3	pCIneo-IL ₂ -VP ₂	3.140 ± 0.292	3.359 ± 0.389 ^a
4	Live vaccine	3.208 ± 0.047	3.148 ± 0.095 ^a

Note: Data with the different superscripts within the same column are significantly different (*P* < 0.05).

从表 2 可以看出,所构建的 pCIneo-IL₂-VP₂ 质粒和活疫苗对照组均能够诱导强的 T 和 B 细胞增殖,与空白对照和空载体对照差异显著。

2.5 脾特异性 CTL 杀伤活性检测结果

在第末次免疫后 10d,每组取 3 只小鼠,摘除眼球放血,抗凝后分离淋巴细胞测定细胞毒活性,具体结果见表 3。

表 3 免疫鼠特异性 CTL 杀伤活性

Table 3 The specific CTL activity of DNA immunized mice

	Group	CTL value (n = 3)
1	Blank	36.23 ± 2.49 ^a
2	pCIneo	40.75 ± 12.98 ^a
4	pCIneo-IL ₂ -VP ₂	72.17 ± 6.30
5	Live vaccine	68.88 ± 9.78

Note: Data with the different superscripts within the same column are significantly different ($P < 0.05$).

通过表 3 可以看出,与空白对照组和空白质粒相比,pCIneo-IL₂-VP₂ 和活疫苗对照组小鼠的外周淋巴细胞的细胞毒活性值显著升高,其中 pCIneo-IL₂-VP₂ 略高于活疫苗对照组,但统计学检验结果差异不显著。

3 讨论

随着分子生物学等相关学科的发展,基因疫苗也得以迅速发展,目前已有多种基因疫苗进入临床试验阶段,如预防 HIV、乙肝病毒、流感病毒感染的基因疫苗和用于治疗艾滋病、乳腺癌、结肠癌前列腺癌等疾病的疫苗^[3]。另外尚有多种基因疫苗正在开发研究中。关于猪细小病毒基因疫苗的研究国内外报道较少,2003 年赵俊龙等将猪细小病毒结构蛋白 VP1 和 VP₂ 基因成功地克隆到真核表达载体 pcDNA 3.1(+) 和 pCIneo,构建了 pcDNA VP₂、pCIneo VP1 和 pCIneo VP₂ 3 种真核表达质粒,并将其免疫小鼠,结果发现所有表达质粒均能诱导产生明显的细胞免疫和体液免疫^[8]。VP₂ 是 PPV 主要的保护性抗原,但诱导机体产生高的保护性抗体并非整个 VP₂ 蛋白,而是其中主要的抗原区域,加之真核表达载体对所携带的基因的表达与基因的大小成反比,基因的片段越大表达的蛋白越少,因此产生的抗原越少,诱导机体产生的免疫反应就小。为此,我们对 PPV VP₂ 基因进行了克隆及其免疫原性进行分析,并成功构建了 pCIneo-IL₂-VP₂ 质粒,通过荧光抗体技术检测到该表达质粒在 PK-15 细胞高效的表达 VP₂ 蛋白。

基因疫苗的动物试验研究表明,基因疫苗在小动物获得了较好的免疫效果,可诱导机体产生较高特异性抗体,但在大动物基因疫苗的效果就不尽理想^[4]。随着分子免疫学的发展,发现细胞因子、协同刺激分子、补体以及其它一些分子能调控 DNA 疫苗诱导的免疫应答类型及增强免疫应答强度,起到佐剂的作用。IL-2 具有促进和刺激淋巴细胞增生和增强细胞毒作用的功能,增强活化 T 细胞产生 IFN 和

CSF。Barouch 等比较了单独表达 IL-2 的质粒与 HIV gp120 DNA 疫苗和表达 IL-2/Ig 融合蛋白的质粒对小鼠免疫效果,结果发现只有融合蛋白才能显著增强特异性抗体产生和 T 细胞增殖,而单独表达 IL-2 的质粒则无效果^[9]。于涟等(2001)将利用鸡 IL-2 基因构建了传染性法氏囊病毒多聚蛋白 DNA 疫苗,免疫鸡后发现,IL-2 能明显增强 DNA 疫苗对强毒攻击的保护,显著促进鸡的胸腺、脾脏和外周血液 T 淋巴细胞及法氏囊 B 淋巴细胞增殖反应^[10]。本试验将表达 IL-2 的基因同时构建到真核表达载体,将其转染 PK-15 细胞,并检测其活性,初步证实其在 PK-15 细胞表达的 IL-2 能增强体外诱导培养的鼠淋巴细胞增殖,与 40IU IL-2 活性相当。

试验构建的双表达载体能够较强的诱导机体产生体液免疫和细胞免疫,在试验中可观察到小鼠在注射后 1 周开始出现抗体,随着免疫时间的延长和第二次加强免疫之后,抗体水平明显的增高,在 4、6 周达到高峰;另外,活疫苗对照组的抗体水平也逐渐增强,在免疫之后,与双表达载体出现的抗体的时间和抗体达到高峰所需的时间基本一致,这说明该载体均能够迅速产生抗体,并且达到高峰。该载体诱导的 T 淋巴细胞和 B 细胞增殖反应与活疫苗相似,经统计学检验无显著差异;通过细胞毒性试验证明,该载体具有诱导较强的细胞毒性作用,产生较强的细胞免疫应答。这一结果预示着 PPV 基因免疫具有良好的前景,为以后其它核酸疫苗的研制奠定了基础。

REFERENCES(参考文献)

- [1] Leman AD, Straw B, Calock RD. Diseases of Swine. Sixth Edition. Iowa State University Press, 1986, pp.411 - 424
- [2] Harding MJ, Molitor TW. A monoclonal antibody which recognizes cell surface antigen and inhibits Porcine Parvovirus replication. Arch Virol, 1992, 123:323 - 333
- [3] Dong DX(董德祥). Base of vaccines technology and application (疫苗技术基础与应用). Beijing: Chemistry and Industry Press (化学工业出版社), 2002, pp.196 - 221
- [4] Wei ZY(魏战勇), Cui BA(崔保安), Huang KH(黄克和). Studies on the immunoadjuvants of DNA vaccines. Animal Husbandry Veterinarian Medicine (畜牧与兽医), 2005, 37(4):48 - 51
- [5] Chen CF(陈创夫), Yu XL(余兴龙), Ma ZH(马正海) et al. Studies on construction and immunity enhancer IL-2 and IL-3 of the double expression plasmids of Classical Swine Fever Virus E2. Scientific Agricultural Sinica (中国农业科学), 2002, 35(11): 1406 - 1410

- [6] Bu J, Song Y, Rompato G *et al.* Co-delivery of IL-2 or liposomes augment the responses of mice to a DNA vaccine for pseudorabies virus IE180. *Comp Immunol Microbiol Infect Dis*, 2003, 26(3):175 - 187
- [7] Li YH(李玉华), Wang HB(王洪彬), Li SY(李声友) *et al.* Studies on the method for detecting the specific cytotoxic T lymphocyte induced by live Attenuated JEV vaccine (SA14-14-2). *Progress in Microbiology and Immunology* (微生物学与免疫学进展), 1998, 26(3):33 - 36
- [8] Zhao XL(赵俊龙), Chen HC(陈焕春), Lv JQ(吕建强) *et al.* Study on gene immunity of *Porcine parvovirus* structural protein genes VP₁ and VP₂. *Chinese Journal of Virology* (病毒学报), 2003, 19(1):47 - 51
- [9] Barouch DH, Santra S, Steenbeke TD *et al.* Augmentation and suppression of immune responses to an HIV-1 DNA vaccine by plasmid cytokine/Ig administration. *J Immunol*, 1998, 161:1875 - 1882
- [10] Yu L(于涟), Li JR(李建荣), Huang YW(黄耀伟) *et al.* Enhanced immunogenicity of plasmid encoding poly-protein gene of Infectious Bursal Disease Virus by co-administration of chicken interleukin 2. *Chinese Journal of Biotechnology* (生物工程学报), 2001, 17(6):652 - 657