

串联表达 PRRSV M 与 GP5 蛋白重组腺病毒的构建及其免疫特性研究 Construction and Immunogenicity of Recombinant Adenovirus Tandem Expressing M and GP5 of Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome Virus

蒋文明, 姜平*, 李玉峰, 汤景元, 王先炜, 杜以军

JIANG Wen-Ming, JIANG Ping*, LI Yu-Feng, TANG Jing-Yuan, WANG Xian-Wei and DU Yi-Jun

南京农业大学农业部动物疫病诊断与免疫重点开放实验室 南京 210095

Key Laboratory of Animal Diseases Diagnostic and Immunology, Ministry of Agriculture, College of Veterinary Medicine, Nanjing Agricultural University, Nanjing 210095, China

摘 要 利用 PCR 扩增出猪繁殖与呼吸综合征病毒的 M 基因,按正确的读码框与 GP5 基因串联,成功构建穿梭载体 pShuttle-CMV-M-GP5,经 PCR、测序鉴定正确。*Pme* I 线性化后在 BJ5183 大肠杆菌内与腺病毒骨架载体 pAdEasy-1 同源重组,产生重组腺病毒 DNA。重组腺病毒 DNA 经 *Pac* I 线性化后用脂质体转染 HEK-293A 细胞,在细胞内包装成完整的腺病毒,通过 IFA 可以检测到 M 与 GP5 串联的重组腺病毒构建成功,可以正确地表达目的蛋白。将构建好的重组腺病毒免疫小鼠,结果表明可以诱导产生较强的体液免疫应答(ELISA 抗体和中和抗体)和细胞免疫应答(淋巴细胞增殖和 CTL 反应)。证明该重组腺病毒具有较好的免疫原性,为下一步猪体免疫试验奠定了基础。

关键词 PRRSV, M, GP5, 重组腺病毒, 体液免疫, 细胞免疫

中图分类号 Q786 文献标识码 A 文章编号 1000-3061(2006)04-0555-06

Abstract The M protein gene of porcine reproductive and respiratory syndrome virus amplified by PCR was tandem linked with its GP5 gene in shuttle vector in correct frame, resulting in shuttle vector pShuttle-CMV-M-GP5. The positive clone was identified by PCR and further confirmed by sequencing. The constructed plasmid was linearized with *Pme* I and co-transformed BJ5183 host bacteria with pAdEasy-1 to produce recombinant adenovirus DNA by homologous recombination. Then the adenovirus DNA was linearized with *Pac* I and transfected into HEK-293A cells to obtain recombinant adenovirus. The specific expression of target proteins by the recombinant adenovirus was verified by indirect immuno-fluorescence assay (IFA) with monoclonal antibodies against M and GP5. The results showed that the tandem linked M with GP5 could be co-expressed by adenovirus vector. Mice immunized with the constructed recombinant adenovirus induced strong humoral immunity (ELISA antibody and virus neutralizing antibody) and cellular immunity (lymphocyte proliferation and CTL responses). The results showed that the recombinant adenovirus has strong immunogenicity and provided the basis for the further experiments in pigs.

Key words PRRSV, M, GP5, recombinant adenovirus, humoral immunity, cellular immunity

Received: January 9, 2006; Accepted: March 7, 2006

This work was supported by grants from the National Natural Science Foundation (No. 30270990), Foundation for PhD Students Training Program, Ministry of Education (No. 20030307012) and Program for New Century Excellent Talents in University (NCET-04-0502).

* Corresponding author: Tel 86-25-84395504; Fax 86-25-84396640; E-mail: jiangp@njau.edu.cn

国家自然科学基金项目(No. 30270990), 教育部博士点基金项目(No. 20030307012), 新世纪优秀人才计划资助项目(NCET-04-0502)

© 中国科学院微生物研究所期刊联合编辑部 <http://journals.im.ac.cn>

猪繁殖与呼吸综合征是由猪繁殖与呼吸综合征病毒(Porcine reproductive and respiratory syndrome virus, PRRSV)引起的、以怀孕母猪繁殖障碍和仔猪的呼吸道症状为特征的一种传染病^[1,2]。本病给世界和我国养猪业造成了巨大的经济损失,现已成为危害规模化养猪生产的主要疫病之一。

由 ORF6、ORF5 分别编码的 M、GP5 蛋白是 PRRSV 是病毒的主要结构蛋白,它们在病毒的致病性、病毒复制、病毒装配、病毒变异和保护性反应等方面可能具有重要意义。Reginaldo 等^[3]用 BCG 表达 PRRSV 的 GP5 和 M 蛋白,免疫小鼠和猪后产生特异性中和抗体,并能检测到细胞免疫应答。攻毒保护试验证实用 BCG 表达的 PRRSV GP5、M 蛋白能够提供部分的免疫保护^[4]。Plana 等报道用杆状病毒表达的 GP5 蛋白免疫母猪,对怀孕母猪提供 50% 的保护力^[5]。Pirzadeh 等发现用在巨细胞病毒启动子(CMV)控制下的 GP5 质粒免疫动物后,在猪和小鼠体内均产生抗 GP5 的特异性中和抗体^[6]。Barfoed 等用 ORF1-ORF7 的真核重组质粒分别免疫猪后攻毒,发现用 ORF5 免疫的猪中和抗体滴度最高^[7]。此外,有研究表明 GP5 有可能参与病毒粒子结合病毒受体的过程^[8]。因此,M、GP5 蛋白在 PRRSV 的致病性、预防与控制等方面具有重要意义。

腺病毒被认为是重组病毒疫苗的有效载体之一。重组腺病毒在基因工程疫苗方面具有广阔的应用前景,尤其是复制缺陷型腺病毒载体的研究。本研究利用腺病毒表达系统将 PRRSV 的结构蛋白 M 与 GP5 串联表达,以期更好地发挥 PRRSV M、GP5 的抗原活性以及协同作用,为 PRRSV 的基因工程疫苗的研究开辟新的途径。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 质粒、菌株、病毒与细胞:腺病毒骨架载体 pAdEasy-1、大肠杆菌 BJ5183、HEK-293A 细胞为 QbioGene 公司产品,pShuttle-CMV-GP5、pcDNA3-M 由本实验室构建保存,E. coli DH5 α 由本实验室保存。PRRSV-S1 株为本实验室分离鉴定。wtAd χ (无外源基因表达的野生型腺病毒)由本实验室构建保存。NIH/3T3/M (稳定表达 PRRSV M 蛋白的 NIH/3T3 细胞系)、NIH/3T3/GP5 (稳定表达 PRRSV GP5 蛋白的 NIH/3T3 细胞系)由本实验室培育保存。

1.1.2 主要试剂:rTaq DNA 聚合酶、Kpn I、CIAP、DL2000 为 TaKaRa 公司产品,TransFastTM Transfection

Reagent 为 Promega 公司产品,DNA 胶回收试剂盒为 BIO-TEK 公司产品,QIAGEN Plasmid Mini Kit 为 Invitrogen 公司产品,鼠抗 PRRSV GP5、M 蛋白单克隆抗体由本实验室制备保存,FITC-羊抗鼠 IgG 为博士德公司产品,1kb plus Ladder 为天为时代公司产品,Pme I、Pac I 为 New England Biolabs 公司产品。淋巴细胞分离液为上海华精生物公司产品。

1.2 方法

1.2.1 PRRSV S1 株 M 基因扩增:参照 PRRSV S1 株基因序列,设计一对引物用于扩增 M 基因(PCR 产物不含终止密码子),并使 M、GP5 串联后符合读框规则,于引物的 5'端引入 Kpn I 酶切位点。引物序列如下:

Ad-M1 :5'-GTA GGT ACC ACC ATG GGG TCG TCC TTA GAT GAC TTC-3'

Ad-M2 :5'-GCG GGT ACC TTT GGC ATA TTT GAC AAG GTT T-3'

以 pcDNA3-M 为模板、以上下游引物 Ad-M1 和 Ad-M2 扩增 M 基因。PCR 反应参数为:94 $^{\circ}$ C 预变性 3min,再进行 35 个 PCR 循环(94 $^{\circ}$ C 45 s,62 $^{\circ}$ C 45 s,72 $^{\circ}$ C 60 s),最后 72 $^{\circ}$ C 延伸 10min。1% 琼脂糖凝胶电泳鉴定 PCR 产物。

1.2.2 M 与 GP5 基因串联的腺病毒穿梭质粒的构建及鉴定:均按分子克隆实验指南进行^[9]。利用 M 基因的上游引物与 GP5 基因的下游引物(5'-GCA CTC GAG CTA AGG ACG ACC CCA TTG TTC-3')进行 PCR 鉴定,1% 琼脂糖电泳检查是否插入片段的大小及方向,并对阳性重组质粒 pShuttle-CMV-M-GP5 进行序列测定。

1.2.3 细菌内同源重组获得重组腺病毒 DNA:将 pShuttle-CMV-M-GP5 用 Pme I 线性化、去磷酸化后,电转化(2.5KV、200 Ω 、25 μ F)至 BJ5183 感受态细胞(已转化腺病毒骨架载体 pAdEasy-1 的 BJ5183 细菌)进行同源重组。用卡那霉素筛选获得重组病毒 DNA,Pac I 酶切鉴定。

1.2.4 M 与 GP5 串联表达重组腺病毒的包装:用 QIAGEN Plasmid Mini Kit 提取纯化重组腺病毒 DNA,Pac I 酶切回收后,用 TransFastTM Transfection Reagent 转染 HEK-293A 细胞,培养 10~15d,获得重组腺病毒。

1.2.5 重组病毒的纯化:按动物病毒学方法进行^[10]。

1.2.6 IFA 检测重组腺病毒 rAd5-M5 的表达:重组腺病毒接种 HEK-293A 细胞后 24h,弃去营养液,用

PBS 洗涤细胞,加入 100 μ L 4 $^{\circ}$ C 的冷乙醇,4 $^{\circ}$ C 固定 30min,弃去乙醇,PBS 洗涤;将鼠抗 PRRSV GP5、M 蛋白单克隆抗体(本实验室制备)分别作 1:50 稀释,每孔加入 50 μ L,在湿盒内 37 $^{\circ}$ C 温育 30min,移去稀释血清,用 200 μ L 的 PBS 洗涤 6 次;每孔加入 50 μ L 的 1:100 稀释的 FITC 标记羊抗鼠 IgG,在湿盒内 37 $^{\circ}$ C 温育 30min,移去孔内液体,用 PBS 洗涤 4 次,于荧光显微镜下观察。

1.2.7 重组腺病毒 rAd5-M5 的病毒滴度测定:按常规方法,将病毒裂解液作 10 倍比稀释,接种 96 孔 HEK-293A 细胞板中,37 $^{\circ}$ C 培养 5d,计数每个稀释度的 CPE 数,按 Reed-Muench 法计算病毒滴度。

1.2.8 小鼠免疫试验:取 6 周龄雌性小鼠 54 只,分为 3 组,每组 18 只。第一、二组分别皮下免疫 rAd5-M5、wtAd,剂量为 0.5mL/只,14d 后分别加强免疫 1 次。第三组为 PBS 对照组。加强免疫后分别于 2 周、4 周和 6 周采血测定 ELISA 抗体和中和抗体。取脾脏,分离淋巴细胞,测定淋巴细胞增殖反应和 CTL 反应。

1.2.9 ELISA 抗体测定:参照 Cho 的方法进行^[11]。以超离的 PRRSV 全病毒抗原包被酶标板,免疫鼠血清作 1:100 稀释进行反应。最后以 OPD 显色,测定 OD_{490nm} 的值。以 OD₄₉₀ > 0.3 判为阳性。

1.2.10 病毒中和试验:参照 Jiang 的方法进行^[12]。待检血清 56 $^{\circ}$ C 灭活 30min 后,作 2 的连续倍比稀释,然后与等体积的病毒液(含 200 TCID₅₀/100 μ L)混合,与 37 $^{\circ}$ C 水浴 1h。然后加入到已长满单层 MARC-145 细胞的 96 孔培养板中,100 μ L/孔,37 $^{\circ}$ C 培养 4d。以能完全抑制 CPE 的血清最大稀释度作为该血清的中和滴度。

1.2.11 淋巴细胞增殖试验:参照 Rompato 的方法进行^[13]。无菌取脾脏,研磨并于 200 目铜网过滤,Ficoll 液分离淋巴细胞,用含 10% 胎牛血清的 1640 营养液培养。计数后稀释到 5 \times 10⁶ cell/mL,每孔加入 100 μ L。以 MOI = 1 的 PRRSV-S1 株病毒作为刺激抗原,每孔加入 100 μ L,37 $^{\circ}$ C 下培养 66h。对照孔加入 100 μ L 病毒稀释液。然后每孔加入 40 μ L MTT (5mg/mL),37 $^{\circ}$ C 下继续培养 6h。吸弃培养液,每孔加入 100 μ L DMSO,振荡融解结晶,测定 OD_{570nm} 的值。计算刺激指数 SI = 刺激孔的 OD 值/未刺激孔的 OD 值。

1.2.12 乳酸脱氢酶法测定特异性 CTL:将效应细胞与靶细胞(NIH/3T3/M 和 NIH/3T3/GP5)以 100:1 的比例各 100 μ L 混合于 96 孔培养板中 37 $^{\circ}$ C、5% CO₂

孵育 4h。每孔分别吸出 100 μ L 上清至 ELISA 板中,再加入 100 μ L 预先配好的底物溶液,室温避光显色 30min。最后每孔加入 30 μ L 终止液,于 570nm 波长下测定 OD 值。同时设立自发释放孔(营养液孔)和最大释放孔(裂解液孔)。计算 CTL 杀伤率,杀伤率% = (实验孔 OD 值 - 自发释放孔 OD 值) / (最大释放孔 OD 值 - 自发释放孔 OD 值) \times 100%。

2 结果

2.1 PRRSV S1 M 基因的扩增与穿梭载体 pShuttle-CMV-M-GP5 的构建及鉴定

以 pcDNA3-M 为模板扩增得到不含终止密码子的 M 基因片段。1.0% 琼脂糖凝胶电泳获得了与预期片段大小相符(543bp)的清晰、单一的条带(图 1)。M 基因用 *Kpn* I 酶切后与同样处理的载体 pShuttle-CMV-GP5 进行连接和转化,小量抽提重组质粒,利用 M 的上游引物 Ad-M1 与 GP5 的下游引物 Ad-GP5.2 进行 PCR 鉴定,扩增得到约 1150bp 片段的重组质粒鉴定为阳性重组质粒,命名为 pShuttle-CMV-M-GP5(图 1)。序列测定结果表明 M 与 GP5 基因按正确的读码框连接成功,获得重组穿梭载体。

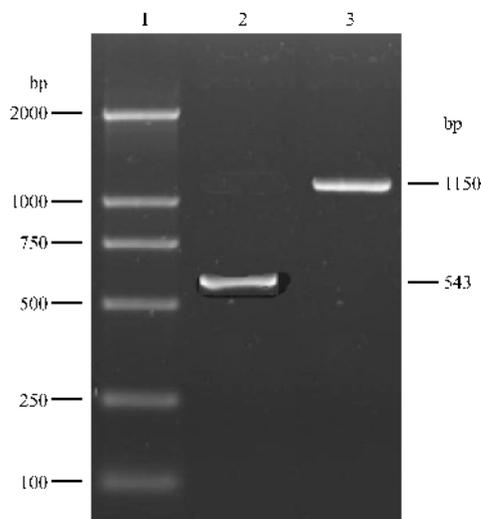


图 1 M 基因的扩增与重组质粒 pShuttle-CMV-M-GP5 的 PCR 鉴定

Fig.1 The amplification of M gene and the identification of recombinant plasmid pShuttle-CMV-M-GP5 by PCR

1:2000 DNA Marker; 2:pcDNA3-M/PCR; 3:pShuttle-CMV-M-GP5/PCR.

2.2 重组腺病毒 DNA 的酶切鉴定

穿梭载体 pShuttle-CMV-M-GP5 与腺病毒骨架载体 pAdEasy-1 在 BJ5183 大肠杆菌内同源重组获得重组腺病毒 DNA, *Pac* I 酶切后经 1.0% 琼脂糖凝胶电

泳得到一条 30kb 的大片段和一条 4.5kb 的小片段 (图 2) 将此重组腺病毒质粒命名为 pAd-M-GP5。

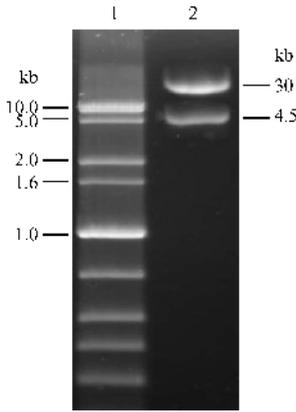


图 2 重组腺病毒 DNA pAd-M-GP5 的酶切鉴定

Fig. 2 Enzyme analysis of recombinant adenoviral DNA pAd-M-GP5
1 : 1kb plus Ladder ; 2 : pAd-M-GP5/Pac I.

2.3 IFA 鉴定重组腺病毒的表达

用针对 PRRSV M 和 GP5 蛋白的单克隆抗体进行 IFA 试验, 结果发现重组腺病毒感染的细胞出现明显的荧光, 而对照组则看不到荧光(图 3)。证明 M 与 GP5 串联后的重组腺病毒可以正确地表达融合蛋白。

2.4 重组腺病毒 rAd5-M5 的 TCID₅₀

Reed-Muench 法计算重组腺病毒的滴度为 10^{14.77} TCID₅₀/mL, 滴度较高。

2.5 体液免疫应答

重组腺病毒 rAd5-M5 免疫小鼠, 于二免后 2 周检测到 ELISA 抗体, 于 4 周达到高峰, 6 周时稍微有些下降(图 4)。说明此重组腺病毒可以诱导小鼠产生体液免疫应答。体外中和试验表明, 重组腺病毒 rAd5-M5 在二免后 2 周即可检测到, 并持续升高(图 5)。

2.6 细胞免疫应答

病毒特异性的淋巴细胞增殖试验表明, 小鼠在第二次接种 rAd5-M5 后 2 周即诱导产生了明显的淋

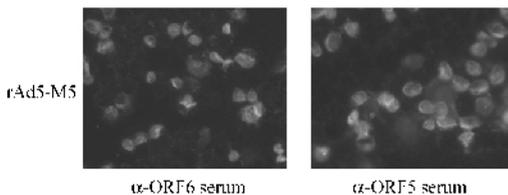


图 3 重组腺病毒表达目的蛋白的间接免疫荧光检测

Fig. 3 The expression of target protein was detected by indirect immunofluorescence assay using monoclonal antibodies against M (α-ORF6 serum) and GP5 proteins (α-ORF5 serum).

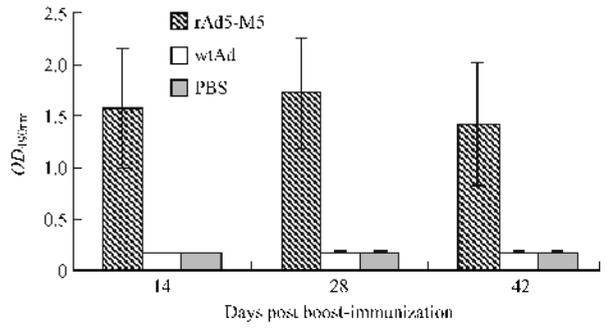


图 4 ELISA 抗体结果

Fig. 4 The results of ELISA using serum from inoculated mice at different days post boost-timmunization(dpb)

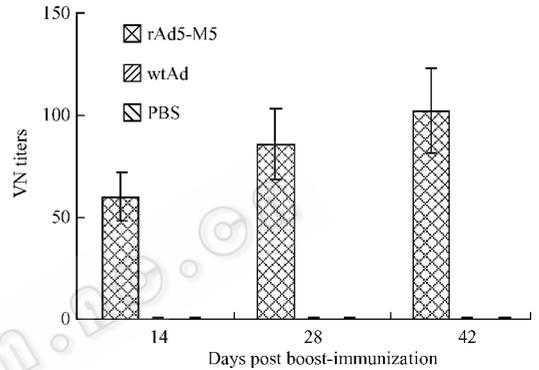


图 5 中和抗体结果

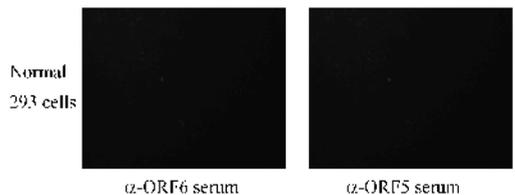
Fig. 5 The results of serum neutralizing assay of inoculated mice at different days post boost-immunization (dpb)

巴细胞增殖应答, 并且在二免后 4 周达到高峰(图 6), 与 wtAd 和 PBS 对照组相比, 差异显著($P < 0.05$)。

小鼠接种 rAd5-M5 后产生了抗原特异性的 CTL 应答。在二免后 4 周试验组小鼠脾淋巴细胞的杀伤率达到 36.2%(图 7), 与 wtAd 和 PBS 对照组相比, 差异极显著($P < 0.01$)。

3 讨论

PRRS 是世界范围内危害养猪业的疾病。目前 PRRS 的防制主要依靠弱毒疫苗和灭活苗, 但其免疫



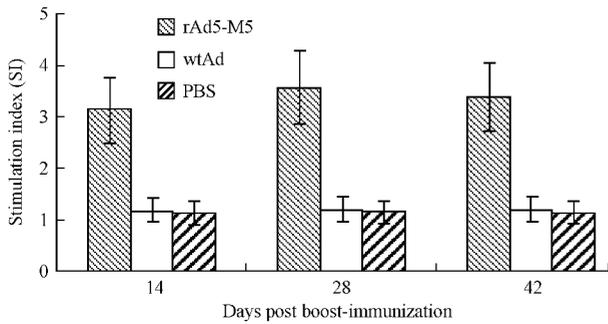


图 6 淋巴细胞增殖试验结果

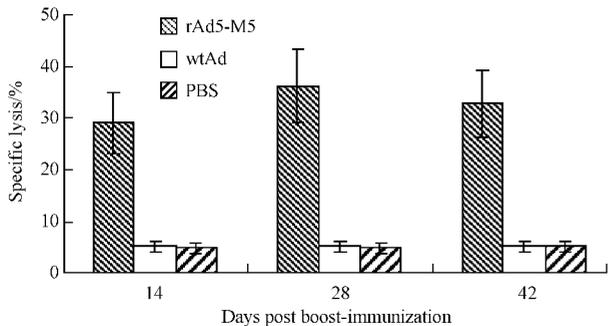
Fig. 6 The results of proliferation of splenocytes after *in vitro* stimulation with PRRSV protein

图 7 CTL 试验结果

Fig. 7 The results of induction of CTL following immunization

效果都不十分理想。活疫苗只能保护同源病毒的攻击,而对异源病毒的保护效果较差。不管是活疫苗还是灭活苗都只能提供部分的保护,而且不能预防感染。另外,活疫苗还可能出现毒力返强的危险。因此有必要发展一种新型有效的疫苗。国内外许多学者都在努力探索各种形式的疫苗,所选的免疫原主要在原核细胞、昆虫细胞内表达,并对表达产物的免疫原性及作为疫苗的可行性进行了研究,如用 BCG 表达 GP5、M 蛋白,杆状病毒表达 GP5,伪狂犬病毒表达 GP5 等^[3,4,14]。本试验将 PRRSV M、GP5 串联后重组入腺病毒表达载体,并在 293 细胞中包装成完整的病毒粒子,小鼠试验表明具有良好的免疫原性。

由 PRRSV 基因组 ORF6 编码的主要结构蛋白 M 是非糖基化蛋白。应用单克隆抗体技术发现 M 蛋白中包含有中和表位,可以诱导机体产生中和抗体并能中和病毒,而且针对 M 的抗体无抗体依赖性增强作用^[15]。研究还发现 M 蛋白能够诱导细胞免疫反应。因此深入研究 PRRSV 的 M 蛋白的免疫特性及其相应功能具有一定的理论意义和实践意义。由 ORF5 编码病毒的 GP5 蛋白是病毒的囊膜糖蛋白,是诱导机体产生中和抗体、产生保护性免疫反应的

主要蛋白之一。用重组 GP5 蛋白制备的单克隆抗体具有中和活性。针对 GP5 的单克隆抗体比针对其它蛋白如 GP4 蛋白的单克隆抗体更加有效。Bastos 等^[3,4]用 BCG 分别表达 GP5 与 M 蛋白,免疫小鼠后发现二者联合免疫产生的中和抗体尽管高于单独免疫的水平,但是其滴度仍然较低。猪体免疫保护试验表明联合免疫缩短了病毒血症持续时间,减少了体内组织的病毒量,但是只能提供部分的免疫保护,效果不十分理想。

腺病毒是重组病毒疫苗的有效载体之一。E1/E3 区缺失复制缺陷型腺病毒载体系统在安全性、高效性和操作性上都有其独特的优势,故受到普遍重视。Kheyar 等^[16]将 GP5 的密码子改造成哺乳动物偏爱的密码子,以腺病毒为载体进行表达,提高了 GP5 的表达量。免疫猪体攻毒后发现可以诱导产生更快更高的抗体,尤其是中和抗体水平比原型 GP5 产生的高。本试验将 PRRSV M 与 GP5 串联后用 E1/E3 缺陷型腺病毒载体进行表达,免疫小鼠后具有良好的免疫原性。以前的试验表明,不管是 GP5 还是 M 蛋白,单独免疫或联合免疫产生的中和抗体滴度较低^[3,4,14]。而本试验中,小鼠在免疫重组 M 与 GP5 串联蛋白后产生的中和抗体滴度较高。我们推测可能是二者串联后翻译成一个整体的蛋白质,改变了空间结构,使二者协同发挥作用。而二者单独表达联合免疫后不能形成这种空间构象,使得中和抗体仍然较低。此外,本试验通过 CTL 试验,进一步证明本研究构建的重组腺病毒可以诱导产生细胞免疫应答。至于该 CTL 应答是针对 GP5 还是 M 蛋白,仍需要进一步的试验验证。

本研究利用该表达系统将 PRRSV 的结构蛋白 M 与 GP5 串联表达,以期更好地发挥 PRRSV M、GP5 的抗原活性以及协同作用。小鼠免疫试验表明该重组病毒具有良好的免疫原性,不仅可以诱导产生体液免疫应答(ELISA 抗体和较高的中和抗体),还可以诱导细胞免疫应答(淋巴细胞增殖和 CTL 反应),为进一步的猪体保护试验和研制 PRRSV 活载体疫苗提供了候选载体疫苗分子。

REFERENCES (参考文献)

- [1] Wensvoort G, Terpstra C, Pol JM *et al.* Mystery swine disease in the Netherlands: the isolation of Lelystad virus. *Vet Q*, 1991, **13** (3): 121-130
- [2] Terpstra C, Wensvoort G, Pol JM. Experimental reproduction of porcine epidemic abortion and respiratory syndrome (mystery swine disease) by infection with Lelystad virus: Koch's postulates

- [3] Bastos RG , Dellagostin OA , Barletta RG *et al.* Construction and immunogenicity of recombinant *Mycobacterium bovis* BCG expressing GP5 and M protein of porcine reproductive and respiratory syndrome virus. *Vaccine* , 2002 , **21** : 21 – 29
- [4] Bastos RG , Dellagostin OA , Barletta RG *et al.* Immune response of pigs inoculated with *Mycobacterium bovis* BCG expressing a truncated form of GP5 and M protein of porcine reproductive and respiratory syndrome virus. *Vaccine* , 2004 , **22** : 467 – 474
- [5] Plana DJ , Climent I , Sarraseca J *et al.* Baculovirus expression of proteins of porcine reproductive and respiratory syndrome virus strain Olot/91. Involvement of ORF3 and ORF5 proteins in protection. *Virus Genes* , 1997 , **14** (1) : 19 – 29
- [6] Pirzadeh , B , Dea S. Immune response in pigs vaccinated with plasmid DNA encoding ORF5 of porcine reproductive and respiratory syndrome virus. *J Gen Virol* , 1998 , **79** : 989 – 999
- [7] Barfoed AM , Blixenkroner M , Jensen MH *et al.* DNA vaccination of pigs with open reading frames 17 of PRRS virus. *Vaccine* , 2004 , **22** : 3628 – 3641
- [8] Sur JH , Doster AR , Osorio FA. Apoptosis induced *in vivo* during acute infection by porcine reproductive and respiratory syndrome virus. *Vet Pathol* , 1998 , **35** (6) : 506 – 514
- [9] Sambrook J , Fritsch EF , Maniatis T. *Molecular Cloning : A Laboratory Manual*. 2nd ed. New York : Cold Spring Harbor Laboratory Press , 1998
- [10] Yin Z (殷震) , Liu JH (刘景华) . *Animal Virology*. 2nd ed. Beijing : Science Press , 1997
- [11] Cho HJ , Deregt D , Joo HS. An ELISA for porcine reproductive and respiratory syndrome ; production of antigen of high quality. *Can J Vet Res* , 1996 **60** (2) : 89 – 93
- [12] Jiang P , Jiang W , Li Y *et al.* Humoral immune response induced by oral administration of *S. typhimurium* containing a DNA vaccine against porcine reproductive and respiratory syndrome virus. *Vet Immunol Immunopathol* , 2004 , **102** : 321 – 328
- [13] Rompato G , Ling E , Chen Z *et al.* Positive inductive effect of IL-2 on virus-specific cellular responses elicited by a PRRSV-ORF7 DNA vaccine in swine. *Veterinary Immunol Immunopathol* , 2005 , **109** : 151 – 160
- [14] Qiu H , Tian Z , Tong G *et al.* Protective immunity induced by a recombinant pseudorabies virus expressing the GP5 of porcine reproductive and respiratory syndrome virus in piglets. *Veterinary Immunol Immunopathol* , 2005 , **106** : 309 – 319
- [15] Cancel-Tiradoa SM , Evans RB , Yoon KJ. Monoclonal antibody analysis of Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome virus epitopes associated with antibody-dependent enhancement and neutralization of virus infection. *Veterinary Immunol Immunopathol* , 2004 , **102** : 249 – 262
- [16] Kheyar A , Jabrane A , Zhu C *et al.* Alternative codon usage of PRRS virus ORF5 gene increases eucaryotic expression of GP5 glycoprotein and improves immune response in challenged pigs. *Vaccine* , 2005 , **23** (31) : 4016 – 4022