

## PRRSV NJ-a 株 ORF5 基因 A 表位的修饰与糖基化位点的突变对其 DNA 疫苗免疫效力的影响

# Influence of Epitope A Modification and N-linked Glycosylated Site Mutation of PRRSV NJ-a Strain ORF5 Gene on the Ability to Induce Neutralizing Antibodies and T Cell Proliferation Response

郑其升<sup>1</sup>, 李 鹏<sup>1</sup>, 毕志香<sup>2</sup>, 牛明福<sup>1</sup>, 曹瑞兵<sup>1</sup>, 周 斌<sup>1</sup>, 陈德胜<sup>1</sup>, 陈溥言<sup>1\*</sup>

ZHENG Qi-Sheng<sup>1</sup>, LI Peng<sup>1</sup>, BI Zhi-Xiang<sup>2</sup>, NIU Ming-Fu<sup>1</sup>, CAO Rui-Bing<sup>1</sup>, ZHOU Bin<sup>1</sup>, CHEN De-Sheng<sup>1</sup> and CHEN Pu-Yan<sup>1\*</sup>

1 南京农业大学农业部动物疫病诊断与免疫重点实验室 南京 210095

2 山东省畜牧兽医职业技术学院 潍坊 262101

1 Key Laboratory of Animal Disease Diagnosis and Immunology, Ministry of Agriculture, Nanjing Agricultural University, Nanjing 210095, China

2 Shandong Vocational Animal Science and Veterinary College, Weifang 262101, China

**摘 要** 为了提高 PRRSV ORF5 基因的免疫效力,对 ORF5 基因进行了改造,将 CpG 序列和通用型辅助性 T 淋巴细胞表位插入 A 表位与 B 表位之间,并对 N33 与 N51 位糖基化位点进行了点突变,获得改造的 ORF5 基因。在此基础上构建了由两个 CMV 启动子调控的共表达改造的 ORF5 (MORF5) 与 ORF6 基因的真核表达质粒 pcDNA-M5A-6A。经 Western-blot 与 IFA 验证真核质粒的体外表达后,免疫 6 周龄 Balb/c 小鼠,利用微量中和试验检测免疫后的中和抗体,利用 MTT 法检测免疫后淋巴细胞的增殖情况,并与未改造 ORF5 基因真核表达质粒 pcDNA-5A-6A、弱毒疫苗以及灭活疫苗的免疫效果进行比较。结果表明,pcDNA-M5A-6A 不但能够刺激免疫小鼠在较短的时间内产生更高水平的中和抗体,而且可以诱导产生更强烈的 T 淋巴细胞增殖反应。所构建的共表达 PRRSV 改造的 ORF5 基因与 ORF6 基因的 DNA 疫苗 pcDNA-M5A-6A,能够较好的诱发小鼠产生较高的特异性针对 PRRSV 的中和抗体和细胞免疫应答,为研究能够更好地防制 PRRSV 的新型疫苗提供了新的思路。

**关键词** 猪繁殖与呼吸综合征病毒, ORF5 基因, 基因改造, DNA 疫苗

中图分类号 Q754 文献标识码 A 文章编号 1000-3061(2007)01-0033-07

**Abstract** To enhance the DNA immunogenicity of PRRSV ORF5 gene, CpG sequence and the universal helper T cell antigen epitope (PADRE) sequence were inserted between the decoy epitope and the neutralizing epitope. At the same time, site-mutations were introduced at N33 and N51 to diminish the coverage effect to epitope B from the polysaccharides. Subsequently, the modified ORF5 gene (MORF5) and PRRSV ORF6 gene were cloned into the eukaryotic expression vector pcDNA3.0 under the control of two CMV promoters, respectively. With indirect immunofluorescence assay and Western-blot the expression in vitro of the two genes was confirmed, then six-week-old Balb/C mouse were immunized with the modified expression plasmid pcDNA-M5A-6A. The non-modified expression plasmid pcDNA-5A-6A, the blank eukaryotic expression plasmid pcDNA3.0, living

attenuated vaccine and inactivated vaccine were used as controls. The PRRSV specific neutralizing antibodies and the T cell proliferation response were elevated with virus neutralization assay and MTT method. Results indicate that the modified plasmid pcDNA-M5A-6A can elicit not only higher titer of neutralizing antibodies in a rapid time, but also more vigorous T cell proliferation response compared with the non-modified plasmid pcDNA-5A-6A and commercial vaccines, indicating that DNA vaccine pcDNA-M5A-6A maybe a promising candidate for PRRS prevention.

**Key words** Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome Virus (PRRSV); ORF5 gene; Gene Modification; DNA Vaccine

猪繁殖与呼吸综合征(PRRS)是由猪繁殖与呼吸综合征病毒(Porcine reproductive and respiratory syndrome virus, PRRSV)引起的一种严重危害养猪业的传染病<sup>[1]</sup>。该病于1987年在美国首次报道。1996年哈尔滨兽医研究所在国内首次分离到PRRSV,证实本病在国内存在<sup>[2]</sup>。健康猪与病猪接触、排泄物与分泌物污染的饲料等是本病传播的主要途径。该病临床主要表现为母猪繁殖障碍,呈现流产、死胎、木乃伊胎及弱仔等症状,仔猪及育成猪则表现为呼吸系统症状。由于PRRSV具有抗原变异性,并且其主要靶细胞是具有重要免疫功能的肺泡巨噬细胞,因此,PRRSV的感染常引发其它病原的继发感染,尤其是呼吸道感染,给养猪业造成重大损失。目前用于预防PRRSV的主要有灭活苗和弱毒苗,但存在免疫保护效果差或散毒、易返强等危险<sup>[4]</sup>。在临床上迫切需要更安全、更有效的新型疫苗。由ORF5基因编码的糖基化囊膜蛋白GP5是PRRSV的主要免疫原性蛋白,参与体液免疫与细胞免疫。GP5蛋白N-端胞外域具有3个N-糖基化位点,并与由ORF6编码的M蛋白形成异源二聚体<sup>[5]</sup>。最近,Ostrouski等<sup>[6]</sup>在利用噬菌体表面展示技术研究GP5中和表位时,发现与中和表位紧邻的上游存在一个非中和表位,此表位具有类似HIV中覆盖表位的覆盖效应。另外,研究表明,在PRRSV感染后数周,GP5蛋白胞外域处于免疫显性的核心位置,而不只是A位点,很可能是A位点与胞外域的糖基化抑制了B淋巴细胞特异位点上的IgM识别B位点<sup>[7]</sup>。本研究基于PRRSV分子生物学与分子免疫学研究进展,对PRRSV NJ-a株GP5蛋白的覆盖表位(A位点)进行了修饰,并对GP5胞外域的N33与N51位糖基化位点进行了点突变,构建了共表达PRRSV改造的ORF5基因(MORF5)与ORF6基因的DNA疫苗pcDNA-M5A/6A。利用Balb/c小鼠初步评价了构建的DNA疫苗的免疫效力,为进一步研制能有效防制PRRSV的新型疫苗奠定基础。

## 1 材料与方法

### 1.1 病毒、细胞及载体

PRRSV NJ-a株为本实验室从南京某急性发病猪群中分离的PRRSV强毒,由农业部动物疫病诊断与免疫重点开放实验室鉴定、保存;Marc-145细胞与CHO细胞购自中国典型培养物中心;宿主菌DH5 $\alpha$ 与真核表达质粒pcDNA3.0购自Promega公司;6周龄的雌性Balb/c小鼠购自南京市军区总院实验动物中心;重组质粒pcDNA-ORF5、pcDNA-ORF6由本室构建、保存,系将PRRSV NJ-a株完整的ORF5、ORF6基因分别克隆入pcDNA3.0 Hind III与Xba I位点之间。

### 1.2 主要试剂及工具酶

限制性内切酶Hind III、BamH I、EcoR I、Xho I、Not I、Xba I与ExTaq酶、T4DNA连接酶等工具酶以及点突变试剂盒均购自TaKaRa公司;胶回收试剂盒购自上海华舜生物技术公司;RPMI-1640、DMEM培养基为GIBCO公司产品;新生牛血清购自兰州民海生物工程有限公司;脂质体转染试剂盒Lipofectamine 2000为Invitrogen公司产品;兔抗PRRSV NJ-a株高免血清由本室制备,系用纯化的PRRSV NJ-a株多次免疫家兔制备,兔抗PRRSV NJ-a株GP5与M蛋白的特异性多抗由本室制备,系将PRRSV NJ-a株ORF5与ORF6基因分别原核表达后,用纯化的表达产物免疫家兔后分离血清获得;HRP标记的羊抗兔IgG、FITC标记的羊抗兔IgG均为晶美生物技术有限公司产品;淋巴细胞分离液为上海华精生物高科技发展公司产品。

### 1.3 引物设计

根据登录于GenBank(登录号:AY737282)的PRRSV NJ-a株ORF5基因与ORF6基因的核苷酸序列,利用Primer Primer5.0软件,设计一系列引物(表1),用于真核表达质粒的构建。

### 1.4 GP5A位点的修饰与胞外域N-糖基化位点的突变

以重组质粒pcDNA-ORF5为模板,利用P<sub>mORF5-1</sub>、为引物,扩增含有A-C-G序列和通用辅助性T

细胞表位序列的 GP5 基因的前端共 153bp 的目的片段,序列测定正确后,经 *Hind* III 与 *Not* I 双酶切,克隆入 pcDNA3.0 载体 *Hind* III 与 *Not* I 之间,命名为 pcDNA-F1,利用引物 P<sub>mORF5-3</sub>、P<sub>mORF5-4</sub>,扩增 GP5 基因后端 507bp 的片段,序列测定正确后,经 *Not* I 与 *Xba* I 双酶切后,克隆入 pcDNA-F1 *Not* I 与 *Xba* I

位点之间,获得修饰 A 位点的 PRRSV ORF5 基因,命名为 pcDNA-mORF5。以鉴定好的 pcDNA-mORF5 为模板,利用引物 P<sub>N33-1</sub>、P<sub>N33-3</sub> 与 P<sub>N51-1</sub>、P<sub>N51-2</sub>,按照 TaKaLa 点突变试剂盒方法对 mORF5 第 33 位与 51 位的 N-糖基化位点进行点突变,经测序验证突变正确后,将此重组质粒命名为 pcDNA-MORF5。

表 1 PCR 反应所用引物

Table 1 Primers used for gene PCR amplification in the study

Name	5' Enzyme Site	Primer Sequence(5'→3')	Purpose
P <sub>ORF5-1</sub>	<i>Hind</i> III	<i>aagctt</i> gttaaacaatgttgagaaatgcttgac	Upstream primer for ORF5-polyA
P <sub>polyA-1</sub>	<i>Bam</i> HI	<i>ggatcc</i> caccaccacccccagaatag	Downstream primer for ORF5-polyA
P <sub>CMV-1</sub>	<i>Eco</i> RI	<i>gaattc</i> ttgtgtgttgaggatcgctg	Upstream primer for PCMV-ORF6-polyA
P <sub>polyA-2</sub>	<i>Xho</i> I	<i>ctcgag</i> ggcgcgcgcgatgcctgtattgtcttc	Downstream primer for P <sub>CMV</sub> -ORF6-polyA
P <sub>mORF5-1</sub>	<i>Hind</i> III	<i>aagctt</i> gttaaacaatgttgagaaatgcttgac	Primers for GP5 "A" epitope gene reconstruction
P <sub>mORF5-2</sub>	<i>Not</i> I	<i>gcggcgcgcgcgcgatgccttcagggtccaggcaccacga</i> <i>acttggcgaacgttgcctggcgttggcgcgcgcgcga</i>	
P <sub>mORF5-3</sub>	<i>Not</i> I	<i>gcggcgcgcgcgcgcgatgccttcagggtccaggcaccacga</i>	
P <sub>mORF5-4</sub>	<i>Xba</i> I	<i>ggtacc</i> ctacacccatgttccgcgtgaaactc	
P <sub>N33-1</sub>	×	<i>gcgccgacagcagctcccat</i>	Upstream primer for GP5 N33mutation
P <sub>N33-2</sub>	×	<i>tggcgttggcgcgcgcga</i>	Downstream primer for GP5 N33 mutation
P <sub>N51-1</sub>	×	<i>tggctggcacagattggcta</i>	Upstream primer for GP5 N51 mutation
P <sub>N51-2</sub>	×	<i>gctcacatagagtcaagttg</i>	Downstream primer for GP5 N51 mutation

### 1.5 共表达 MORF5 基因与 ORF6 基因的真核表达载体的构建

以 P<sub>ORF5-1</sub> 与 P<sub>polyA-1</sub> 为引物,以 pcDNA-MORF5 为模板,扩增 MORF5 + polyA 基因,PCR 产物经序列测定后克隆入 pcDNA3.0 的 *Hind* III 与 *Bam* HI 位点之间,重组质粒命名为 pcDNA-M5A。以 P<sub>CMV-1</sub> 与 P<sub>polyA-2</sub> 为引物,以 pcDNA-ORF6 为模板,扩增 ORF6 基因的表达盒(P<sub>CMV</sub> + ORF6 + PloyA),序列测定后,经 *Eco* RI 与 *Xho* I 双酶切,克隆入 pcDNA-MORF5 的 *Eco* RI 与 *Xho* I 位点之间,获得共表达 MORF5 与 ORF6 基因的真核表达质粒,命名为 pcDNA-M5A-6A。利用相似的方法构建了未改造 ORF5 基因与 ORF6 基因的双表达真核载体,命名为 pcDNA-5A-6A。

### 1.6 真核质粒的体外表达与鉴定

按分子克隆介绍方法大量制备 pcDNA-M5A-6A、pcDNA-5A-6A 与空白载体 pcDNA3.0,并经 10% PEG8000-MgCl<sub>2</sub> 纯化。按 2 × 10<sup>5</sup> 个细胞/孔接种 CHO 细胞于 24 孔板,待细胞长至 80% ~ 90% 融合时,在脂质体(Lipofectamine2000,Invitrogen)介导下将纯化的表达质粒(4μg/孔)转染 CHO 细胞,具体操作按试剂盒说明书进行。

在转染后 48h,每孔用 PBS(pH7.4)洗涤 3 次,甲醇室温固定 5min,进行间接免疫荧光染色。于转染孔中加入 1:100 稀释的兔抗 PRRSV NJ-a 株 GP5 或

M 蛋白的阳性血清,37℃作用 45min,PBS 洗涤 3 次,每次 5min,然后加入 FITC 标记的羊抗兔 IgG 抗体,37℃作用 45min 后,PBS 洗涤,风干后直接观察荧光。

转染后 36 ~ 48h 收集转染细胞,PBS(pH7.4)洗涤 1 次,在细胞沉淀中加入 100μL 1 × SDS-PAGE 上样缓冲液混匀,煮沸 5min,利用 12% 的 SDS-PAGE 胶电泳分离蛋白,采用半干转移(Bio-Rad)转印硝酸纤维素膜,5% 的 PBS 脱脂乳封闭 2h,将兔抗 PRRSV NJ-a 高免疫血清与 pcDNA3.0 转染细胞超声波裂解物(V/V = 1:5)于 37℃作用 45min,离心取上清作 1:20 稀释后作为一抗,洗涤 3 次后,加入 HRP 标记的羊抗兔 IgG 为二抗,作用 45min,与增强型化学发光底物作用后转印 X 光片。

### 1.7 动物分组及免疫程序

将 6 周龄的雌性 Balb/c 小鼠随机分 5 组,每组 20 只,设 pcDNA-M5A-6A、pcDNA-5A-6A 2 个重组质粒免疫组,同时设立 pcDNA3.0 空载体对照组、弱毒疫苗与灭活疫苗对照组。后腿肌肉注射免疫 2 次,3 周后进行加强免疫。DNA 疫苗每只每次免疫 100μg,商品化疫苗对照组按照使用说明免疫。

### 1.8 中和抗体检测

于首免后每周断尾采血分离血清,56℃灭活 30min,采用固定病毒稀释血清法进行微量中和试验检测,其中血清无菌处理后作 2<sup>-1</sup>、2<sup>-2</sup>、2<sup>-3</sup> 系

列倍比稀释,接种于长满 Marc-145 细胞单层的 96 孔板中,每孔 50 $\mu$ L。然后每孔加入用 DMEM (GIBCO) 稀释为 200 TCID<sub>50</sub> 的 PRRSV NJ-a 株 50 $\mu$ L,同时设细胞对照和病毒对照孔,37 $^{\circ}$ C,5% CO<sub>2</sub> 培养箱中培养 7d,逐日观察并记录细胞病变结果,被检血清中抗 PRRSV 的特异性中和抗体效价,即被检血清样品能够完全保护细胞不产生病变的最高稀释倍数。

### 1.9 MTT 法检测 T 淋巴细胞的增殖反应

于首免后 3 周和二免后 3 周每组宰杀 5 只小鼠。小鼠眼球放血后脱颈椎处死,无菌取脾脏,用淋巴细胞分离液分离淋巴细胞,以含 10%(V/V) 犊牛血清的 RPMI-1640 完全培养液调整细胞浓度约为 2 $\times$ 10<sup>7</sup>/mL,加入 96 孔细胞板内,100 $\mu$ L/孔,每个样品做 3 个重复,向各孔内加入 200 TCID<sub>50</sub> 经紫外线灭活的 PRRSV NJ-a,置 37 $^{\circ}$ C、5% CO<sub>2</sub> 培养箱中培养 60h,再每孔加入 5 $\mu$ g/mL MTS 10 $\mu$ L,继续培养 4h。测定 OD<sub>490</sub> 值,取平均值计算刺激指数(SI),试验设不加 PRRSV 的营养液对照。以刺激指数(SI)作为判断淋巴细胞转化程度的参数,SI = 刺激孔 OD<sub>490</sub>nm 值/培养液对照孔 OD<sub>490</sub>nm 值。

### 1.10 数据统计与分析

所有数据用 SPSS11.5 统计分析,作图。

## 2 结果

### 2.1 重组质粒的构建

MORF5-polyA 全长基因为 876bp 片段用 *Hind*III 与 *Bam*H I 进行双酶切回收后插入真核表达载体 pcDNA3.0 的 *Hind*III 与 *Bam*H I 位点,构建重组质粒 pcDNA-MORF5。另将全长基因为 1609bp 的 P<sub>CMV</sub>-ORF6-polyA 表达盒用 *Eco*R I 与 *Xho* I 进行酶切回收后插入 pcDNA-M5A 的 *Eco*R I 与 *Xho* I 位点之间,使 MORF5 基因和 ORF6 基因位于两个独立的 CMV 立即早期启动子下游,构建 ORF5 基因和 ORF6 双基因共表达重组质粒 pcDNA-M5A-6A,利用相似方法构建重组质粒 pcDNA-5A-6A (图 1)。

### 2.2 Western-blot 分析结果

将 pcDNA-5A-6A、pcDNA-M5A-6A 与空载体 pcDNA3.0 分别转染 CHO 细胞。转染 48h 后收集细胞进行裂解处理作为抗原,进行 Western-blot 分析。由图 2 可见,真核重组质粒 pcDNA-M5A-6A 转染的细胞能够同时表达约为 25kD 的 GP5 蛋白和约为 19kD 的 M 蛋白。结果表明,构建的 DNA 疫苗能够

同时表达 GP5 蛋白和 M 蛋白,但是 pcDNA-5A-6A 中未改造的 GP5 的表达量比 pcDNA-M5A-6A 中改造的 GP5 (mGP5) 的表达量低。

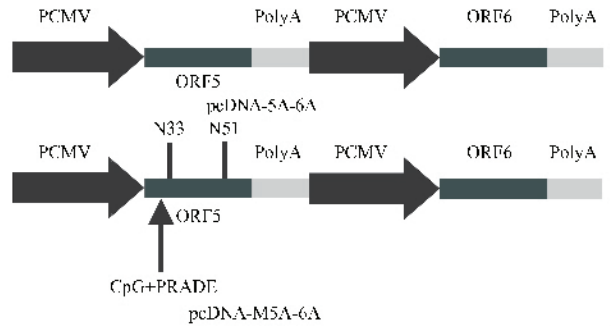


图 1 DNA 疫苗重组质粒的构建

Fig.1 Construction of the two recombinant plasmid DNA vaccine

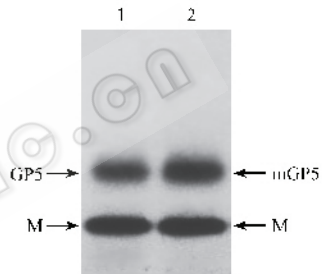


图 2 重组真核质粒体外表达产物的 Western-blot 鉴定

Fig.2 The Western-blotting analysis for products expressed by the recombinant plasmids

- 1 :Expressed product of pcDNA-5A-6A reacts with PRRSV positive serum ;
- 2 :Expressed product of pcDNA-M5A-6A reacts with PRRSV positive serum.

### 2.3 IFA 鉴定结果

pcDNA-5A-6A、pcDNA-M5A-6A 以及空载体 pcDNA3.0 分别转染 CHO 细胞,转染后 48h 进行间接免疫荧光染色,结果 pcDNA3.0 为阴性,重组质粒 pcDNA-5A-6A、pcDNA-M5-A-6-A 呈很强的荧光着色(图 3),而 pcDNA3.0 转染孔没有荧光。说明构建的重组真核表达质粒均能较好地在体外表达 GP5 (MGP5)与 M 蛋白。

### 2.4 免疫动物中和抗体的检测

采用中和试验检测免疫小鼠特异性针对 PRRSV 的中和抗体水平(图 4),结果重组质粒 pcDNA-5A-6A 免疫组的中和抗体水平低,并且产生晚,而 pcDNA-M5A-6A 免疫组的中和抗体产生早,上升快。首免后第 3 周就有 2 只小鼠产生可检测的中和抗体(1:8),随后快速上升于第 9 周达到最高,有 6 只达到了 1:32,中和抗体滴度的平均值达到(1:20.2),高于弱毒活疫苗产生的中和抗体水平。说明

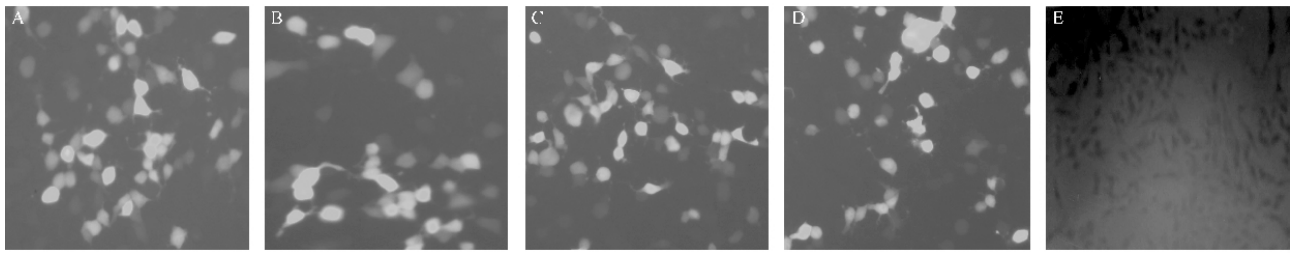


图3 IFA 检测真核表达质粒在 CHO 细胞上的表达

Fig.3 Expression of the eukaryotic plasmids on CHO cell line detected with IFA

A, B :pcDNA-M5A-6A and pcDNA-5A-6A detected with GP5 positive serum ; C, D :pcDNA-M5A-6A and pcDNA-5A-6A detected with M positive serum ; E :pcDNA3.0 detected with PRRSV positive serum.

对 PRRSV GP5 蛋白 A 表位基因进行修饰,并将胞外域 33 位、55 位的糖基化位点进行点突变后与 ORF6 基因在两个 CMV 启动子的控制下共表达构建的 DNA 疫苗能够更好地刺激免疫小鼠产生更高的中和抗体。未经改造的 DNA 疫苗 pcDNA-5A-6A 免疫组的中和抗体水平不高(与灭活苗产生的中和抗体水平差异不显著),并且上升缓慢。空载体 pcDNA3.0 对照组在整个试验过程中均未检测到特异性针对 PRRSV 的中和抗体。

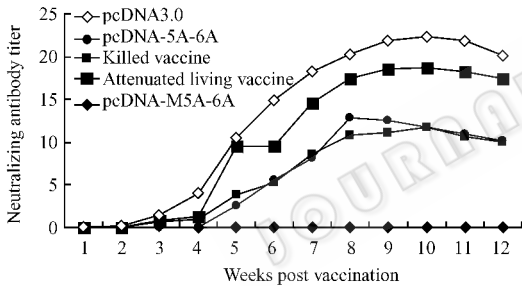


图4 免疫小鼠 PRRSV 特异性中和抗体水平检测

Fig.4 PRRSV specific neutralizing antibodies generated by the immunized mouse

## 2.5 免疫小鼠 T 细胞增殖反应检测结果

为了探讨构建的 DNA 疫苗在免疫小鼠体内诱发特异性针对 PRRSV 的淋巴细胞增殖反应,笔者检测了首免后第 3 周与第 8 周免疫小鼠的特异性脾淋巴细胞增殖情况。从图 5 中可以看出,以经紫外线照射灭活的 PRRSV 作为刺激原,pcDNA-M5A-6A 免疫小鼠获得了强的特异性淋巴细胞增殖,其在第 9 周增殖指数达到  $2.79 \pm 0.09$ ,明显高于 pcDNA-5A-6A 免疫组,统计学分析结果显示,pcDNA-M5A-6A 免疫组与商品化的 PRRSV 弱毒疫苗所引发的 T 细胞增殖反应强度差异明显( $P < 0.05$ )。灭活疫苗及 pcDNA-5A-6A 免疫组只能刺激免疫小鼠产生非常弱的 T 细胞增殖反应。此结果表明,DNA 疫苗 pcDNA-M5A-6A 免疫小鼠后能够诱发较强的淋巴细胞增

殖。

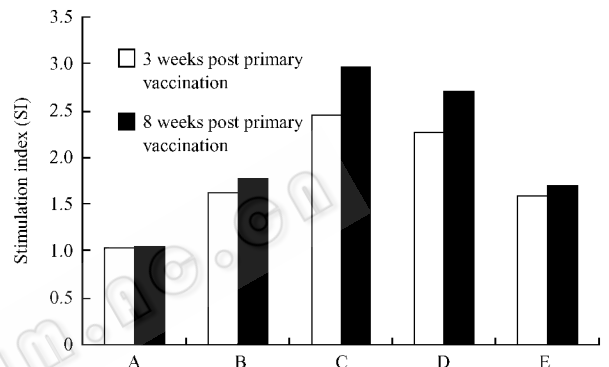


图5 免疫小鼠的特异性 T 淋巴细胞增殖反应

Fig.5 Specific lymphocyte proliferation responses for the vaccinated mice

A : pcDNA3.0 ; B : pcDNA-5A-6A ; C : pcDNA-M5A-6A ; D : Attenuated living vaccine ; E : Inactivated vaccine.

## 3 讨论

PRRS 是目前养猪业中一种危害严重的病毒性传染病,引起猪的繁殖障碍和呼吸道疾病。PRRSV 感染已成为当前养猪业面临的棘手问题,该病不仅造成了巨大的经济损失,而且引起继发感染、混合感染、免疫抑制等一系列问题。PRRSV 感染对现行的疫苗研制和免疫策略提出了严峻的挑战。为了发展更安全、有效的新型疫苗,许多学者先后构建了以 PRRSV 中最主要的保护性抗原-GP5 为基础的 DNA 疫苗、亚单位疫苗和腺病毒载体疫苗<sup>[8,9]</sup>,笔者所在实验室也构建了以改良的安卡拉株痘病毒为载体表达 PRRSV GP5 的重组活载体疫苗。

众所周知,PRRSV 的主要中和位点位于 GP5 蛋白,用反向免疫法和其它涉及重叠蛋白的研究确证 GP5 主要中和位点与中和抗体的活动相关,这个表位的最小抗原区在 37 位~45 位氨基酸,已被确认是中和表位的核心区域。这个核心区域被称做 B

位点, B 位点可被单克隆抗体所识别, 并且可诱导产生用于被动免疫保护试验的抗体。GP5 的另一个显性表位被称作 A 位点, 在 PRRSV 感染后表位 A 迅速诱导产生非中和抗体, A 位点位于 B 位点上游 7 个氨基酸, GP5 的氨基端, 它的特征与 HIV 的 Decoy 表位功能相似。

GP5 蛋白氨基端胞外域高度糖基化, 推测具有 3 个 N-糖基化位点(N33、N45、N51)。为了研究糖基化在 PRRSV 中和抗体反应中的功能, Israrul H. Ansari<sup>[10]</sup>等利用 PRRSV 的反向遗传系统构建了一系列 PRRSV GP5 蛋白糖基化位点发生点突变的突变株, 研究表明, 第 45 位 N-糖基化位点的突变将导致不能产生具有感染力的子代病毒, 说明 PRRSV GP5 蛋白第 45 位的天冬酰胺的糖基化对于维持病毒的感染力是必须的, N33 位和/或 N51 位 N-糖基化位点的突变将导致病毒滴度的降低, 但在中和实验中对 PRRSV 野毒的特异性抗体表现出更高的敏感性, 更令人鼓舞的是, 与野毒株相比, 用这些突变株免疫猪能产生针对于 PRRSV 野毒的更高水平的中和抗体, 这表明在 N33 与 N51 位的糖基化的突变既提高了病毒在中和试验中的敏感性, 也增强了糖基化位点附近的抗原表位的免疫原性。

正是基于上述研究结果, 我们对 PRRSV NJ-a 株的 ORF5 基因进行了以下两个方面的改造。首先, 为了提高 ORF5 基因 DNA 疫苗的免疫效力, 将通用型辅助性 T 淋巴细胞表位(PADRE)与 CpG 序列克隆入 ORF5 基因覆盖表位和中和表位之间, PADRE 是 A lexander 等<sup>[11]</sup>在多聚丙氨酸骨架导入 HLADR 分子锚定序列构建的一种通用性 Th 细胞表位, 其诱导 Th 细胞反应的能力比自然源性 Th 表位高 1000 倍。PADRE 可为 B 细胞、CTL 细胞表位以及多糖抗原提供强有力的辅助作用, 诱导高效的 Th 反应。CpG-DNA 是一些具有免疫激活功能的以未甲基化的 CpG 基序(CpG motif)为核心的 DNA 序列, 它能在体内诱导强烈的免疫反应, 主要包括激活 B 细胞增殖、分化、分泌白细胞介素 2(IL-2)及其他细胞因子, 激活自然杀伤细胞(NK)的裂解活性, 分泌干扰素, 诱导细胞免疫反应, 表现为强烈的 Th1 型免疫反应。近来研究表明“GTCGTT”对刺激多种动物的淋巴细胞是最好的, 包括牛、绵羊、山羊、马、猪、狗、猫、鸡等动物。本研究在改造 ORF5 基因时, 将 CpG 基序与 PADRE 引入, 其目的方面是使 GP5 的 B 表位充分展示, 另一方面是进一步增强体液免疫和细胞免疫。另外, 本研究将能够增强 DNA 疫苗免疫

效力的 CpG 序列插入 PADRE 序列的上游, 以期能够进一步改善 PRRSV GP5 的免疫原性。在对 ORF5 A 位点进行改造的基础上, 我们对 GP5 胞外域 N33 位与 N51 位 N-糖基化位点进行了点突变。

Balasuriya<sup>[13]</sup>等最近在研究与 PRRSV 同属的马动脉炎病毒(EAV)的甲病毒 RNA 复制子疫苗的过程中发现, 当 GL(相当于 PRRSV 的 GP5 蛋白)和 M 蛋白共表达时, 能够形成 GL-M 异源二聚体, 而这种异源二聚体的存在也极大地促进了 GL 蛋白有效地从内质网向高尔基体的转运, 获得正确的翻译后修饰, 从而诱发免疫实验动物特异性中和抗体的产生, 而单独表达 GL 的 RNA 复制子疫苗并不能诱发免疫实验动物特异性中和抗体的产生。作为与 EAV 同科的病毒, PRRSV GP5 和 M 蛋白进行共表达时可能也对 GP5 的转运、定位以及随后的免疫反应产生影响。因此, 本研究构建了由两个 CMV 启动子调控, 共表达改造的 ORF5 与 ORF6 基因的真核表达质粒 pcDNA-M5A-6A。

本研究利用实验动物-Balb/c 小鼠评价了 DNA 疫苗引发的体液免疫反应和淋巴细胞增殖反应, 其结果都是令人振奋的。pcDNA-M5A-6A 免疫小鼠可诱导产生高水平中和抗体及强烈的 T 淋巴细胞增殖反应。目前的研究已证实高滴度的中和抗体在抵抗 PRRSV 感染过程中具有重要作用, 并与病毒的清除呈正相关性<sup>[13]</sup>。尽管目前对细胞免疫在抗 PRRSV 感染中的作用尚不清楚, 但 pcDNA-M5A-6A 能同时激发很强的体液免疫与细胞免疫, 表明它很有希望成为一种 PRRSV 新型候选疫苗, 同时也说明我们对 PRRSV ORF5 基因的改造是成功的, 这将对 PRRSV 的各种新型疫苗研究过程中目标基因的选择具有重要的指导意义。

pcDNA-M5A-6A 能同时诱导高水平的体液免疫与细胞免疫反应, 可能与以下几点因素相关 (1) GP5-M 蛋白异源二聚体的形成促进 GP5 蛋白从内质网往高尔基体的转运, 在此过程中 GP5 蛋白获得修饰, 使某些中和表位获得展现。(2) GP5 蛋白本身具有诱发中和抗体的能力, M 蛋白具有诱发特异性细胞免疫的能力, GP5 和 M 蛋白共表达时会产生协同作用。(3) CpG 基序与通用型辅助性 T 淋巴细胞表位的插入消除或减弱了“A”表位的覆盖作用, 使 GP5 的 B 表位获得充分的展示, 增强了 GP5 蛋白的免疫原性。(4) GP5 胞外域 N33 与 N51 位 N-糖基化位点的突变消除了多糖侧链对 B 表位的覆盖作用, 增强了 GP5 蛋白的免疫原性。

理想的 PRRS 疫苗应该在短时间诱导高水平的中和抗体和特异性细胞免疫反应,本研究构建的共表达 PRRSV 改造的 ORF5 和 ORF6 基因的 DNA 疫苗 pcDNA-M5A-6A,证实能够较好的诱发小鼠产生较高的特异性针对 PRRSV 的中和抗体和细胞免疫应答,为研究能够更好地防制 PRRSV 感染的新型疫苗提供了新的思路和途径。但是作为一种新的 PRRSV 疫苗设计和共表达 GP5/M 的策略,DNA 疫苗 pcDNA-M5A-6A 的有效性免疫保护还需大量的试验进行验证。目前,笔者已着手进行猪体免疫保护试验,以全面、系统地评价这一新型疫苗的免疫效果。

## REFERENCES(参考文献)

- [ 1 ] Baustista EM, Meulenberg JJ, Choi CS, *et al.* Structural polypeptides of the American (VR2332) strain of porcine epidemic abortion and respiratory virus. *Arch Virol*, 1996, **141**:1357 - 1365.
- [ 2 ] Guo BQ(郭宝清), Chen ZS(陈章水), Liu WX(刘文兴), *et al.* Studies on PRRSV isolation from PRRSV like infection abolish fetus. *Chinese Animal Infectious Disease*, 1996, **18**(2):1 - 4.
- [ 3 ] Benfield D, Harris L, Nelson E, *et al.* Properties of SIRS virus isolate ATCC VR2332 in the United states and preliminary characterization of a monoantibody to this virus. *Am Assoc Swine Pract Newsletter*, 1992, **4**(4):19 - 21.
- [ 4 ] Meng XJ. Heterogeneity of Porcine reproductive and respiratory syndrome virus: Implications for current vaccine efficacy and future vaccine development. *Veterinary Microbiology*, 2000, **74**: 309 - 329.
- [ 5 ] Pirzadeh B, Dea S. Monoclonal antibodies to the ORF5 product of porcine reproductive and respiratory syndrome virus define linear neutralizing determinants. *Gen Virol*, 1997, **78**(8):1867 - 1873.
- [ 6 ] Ostrowski M, Galeota JA, Jar AM, *et al.* Identification of neutralizing and non-neutralizing epitopes in the porcine reproductive and respiratory syndrome virus GP5 ectodomain. *Virology*, 2002, **76**: 4241 - 4250.
- [ 7 ] Domenech N, Alvarez B, Ezquerro A, *et al.* Analysis of cellular immune response in pigs recovered from porcine respiratory and reproductive syndrome infection. *Virus Res*, 1999, **64**:33 - 42.
- [ 8 ] Barfoed AM, Blixenkrone-Møller M, Jensen M H, Botner A, Kamstrup S. DNA vaccination of pigs with open reading frame 1-7 of PRRS virus. *Vaccine*, 2004, **22**: 3628 - 3641.
- [ 9 ] Gagnon CA, Lachapelle G, Langelier Y, Massie B, Dea S. Adenoviral-expressed GP5 of porcine reproductive and respiratory syndrome virus differs in its cellular maturation from the authentic viral protein but maintains known biological functions. *Archive of Virology*, 2003, **148**: 951 - 972.
- [ 10 ] Israrul H, Ansari, Byungjoon Kwon, Fernando A, *et al.* Influence of N-Linked glycosylation of porcine reproductive and respiratory syndrome virus GP5 on virus infectivity, antigenicity, and ability To induce neutralizing antibodies. *Journal of Virology* 2006, **80**:3994 - 4004.
- [ 11 ] Alexander J, Fikes J, Hoffman S, *et al.* The optimization of helper T lymphocyte (HTL) function in vaccine development. *Immunol Res*, 1998, **18**:79 - 92.
- [ 12 ] Balasuriya BR, Heidner HW, Hedges JF, *et al.* Expression of the two major envelope proteins of equine arteritis virus as a heterodimer is necessary for induction of neutralizing antibodies in Mice immunized with recombinant venezuelan equine encephalitis virus replicon particles. *Journal of Virology*, 2000, **74**:10623 - 10630.
- [ 13 ] Osorio FA, Galeota JA, Nelson E, *et al.* Passive transfer of virus-specific antibodies confers protection against reproductive failure induced by a virulent strain of porcine reproductive and respiratory syndrome virus and establishes sterilizing immunity. *Virology*, 2002, **302**:9 - 20.