

研究报告

共表达 PRRSV GP5 蛋白和 CSFV E2 蛋白的“自杀性”DNA 疫苗在小鼠体内诱导的免疫应答

孙建富^{1,2}, 赵和平¹, 李娜¹, 孙元¹, 夏照和¹, 周艳君¹, 王煜¹, 祁巧芬¹, 鲁承², 仇华吉¹

1 中国农业科学院哈尔滨兽医研究所 兽医生物技术国家重点实验室猪传染病研究室, 哈尔滨 150001

2 延边大学农学院动物医学系, 龙井 133400

摘要: 为了获得新型双价“自杀性”DNA 疫苗, 将猪繁殖与呼吸综合征病毒(Porcine reproductive and respiratory syndrome virus, PRRSV) GP5 基因克隆于此前构建的表达猪瘟疫病毒(Classical swine fever virus, CSFV)E2 基因的甲病毒复制子载体疫苗 pSFV1CS-E2 中。为了增强免疫效果, 在密码子优化的 GP5 基因中插入了泛 DR 表位(PADRE), 在 CSFV E2 基因后融合伪狂犬病病毒(PrV)UL49 基因, 获得了 6 种重组质粒。间接免疫荧光试验显示, PRRSV GP5 和 CSFV E2 基因在瞬时转染的 293T 细胞中得到同时表达。将 6 种重组质粒和空载体 pSFV1CS 分别免疫 BALB/c 小鼠, 用间接 ELISA 方法检测血清抗体水平, 通过基于 CSFE/WST-8 的淋巴细胞增殖试验和细胞因子 ELISA 评价疫苗诱导的细胞免疫。结果显示, 除 pSFV1CS 组外, 从各疫苗组小鼠血清中均可检测到低水平的针对 GP5 和 E2 蛋白的抗体; 各疫苗组小鼠脾细胞经 CSFV 和 PRRSV 刺激后均能诱导特异性的淋巴细胞增殖; 部分疫苗组小鼠脾细胞经 CSFV 和 PRRSV 刺激后可分泌较高水平的 IFN- γ 和 IL-4; 引入 UL49 的疫苗组细胞免疫应答显著高于其它疫苗组。结果表明, 这些共表达 GP5 和 E2 蛋白的自杀性 DNA 疫苗可以诱导体液免疫和细胞免疫, PrV UL49 可以增强其细胞免疫应答。

关键词: “自杀性”DNA 疫苗, 猪繁殖与呼吸综合征病毒, 猪瘟疫病毒, 泛 DR 表位, VP22 转导蛋白, 共表达

Immune Responses Induced by the Suicidal DNA Vaccines Co-expressing the GP5 Protein of PRRSV and the E2 Protein of CSFV in Mice

Jianfu Sun^{1,2}, Heping Zhao¹, Na Li¹, Yuan Sun¹, Zhaohe Xia¹, Yanjun Zhou¹, Yu Wang¹, Qiaofen Qi¹, Cheng Lu², and Huaji Qiu¹

1 Division of Swine Infectious Diseases, National Key Laboratory of Veterinary Biotechnology, Harbin Veterinary Research Institute, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Harbin 150001, China

2 Department of Veterinary Medicine, Agricultural College of Yanbian University, Longjing 133400, China

Abstract: Six recombinant plasmids co-expressing the wild-type GP5 gene or the codon-optimized GP5 gene (containing pan-DR epitope) of porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV) and the E2 gene of classical swine fever virus (CSFV) or the E2 fused with the UL49 of pseudorabies virus (PrV) were constructed based on the suicidal DNA vaccine pSFV1CS-E2 described previously. Expression of GP5 and E2 was confirmed by indirect immunofluorescence assay. The immunogenicity of six plasmids

Received: March 10, 2008; **Accepted:** April 22, 2008

Supported by: the National High-tech Research and Development Programs of China (863 Program) (No. 2006AA10A204).

Corresponding author: Huaji Qiu. Tel/Fax: +86-451-85935041; E-mail: huajiqiu@hvri.ac.cn

国家高技术研究发展计划 (“863” 计划) 项目(No. 2006AA10A204)资助。

was evaluated in BALB/c mouse model. For the six plasmids, low-level of E2 and GP5 protein specific antibodies could be detected in the sera of the immunized mice. Specific lymphoproliferative responses to the PRRSV or CSFV stimulation were induced in the splenocytes of the immunized mice as demonstrated by CFSE staining assay and WST-8 assay. Antigen specific IFN- γ and IL-4 secretion was detected in the splenocytes of some immunized mice by cytokine ELSIA. Fusion with the PrV *UL49* in the suicidal vaccines induced significantly higher lymphoproliferative responses and cytokine secretion. Taken together, the suicidal DNA vaccines co-expressing GP5 and E2 could induce PRRSV and CSFV specific humoral and cell-mediated immune responses.

Keywords: suicidal DNA vaccine, porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV), classical swine fever virus (CSFV), pan-DR epitope, VP22 transduction protein, co-expression

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)引起的重要传染病, 主要特征是母猪繁殖障碍和所有日龄猪只的呼吸道疾病^[1]。PRRSV 是有囊膜的单股正链 RNA 病毒, 其基因组全长约 15 kb, 包括 9 个开放阅读框(ORF), 即 ORF1(包括 ORF1a 和 ORF1b)编码病毒的复制酶, ORF2a、ORF2b 和 ORF3~7 分别编码病毒的 7 种结构蛋白, 即 GP2a、GP2b、GP3、GP4、GP5、基质蛋白(M)和核衣壳蛋白(N)。GP5 蛋白为主要保护性抗原, 可以诱导中和抗体^[2]。Pirzadeh 和 Dea^[3]用编码 PRRSV GP5 蛋白的 DNA 疫苗接种小鼠和猪只, 均可诱导特异性中和抗体。因此 GP5 基因是研究 PRRSV 基因工程疫苗的首选目标基因。

猪瘟是由猪瘟病毒(Classical swine fever virus, CSFV)引起的一种严重危害养猪业的烈性传染病。世界动物卫生组织(OIE)将其定为须申报动物传染病, 我国将其列为一类传染病, 是目前危害我国养猪业发展的主要疫病之一。CSFV 属于黄病毒科瘟病毒属, 其基因组长约 12.3 kb, 含有唯一的开放读码框架(ORF), 由其编码一个约 4000 个氨基酸残基的多聚蛋白, 在病毒和宿主细胞编码的蛋白酶作用下, 裂解为 4 种结构蛋白(C、E^{ms}、E1 和 E2)和多种非结构蛋白^[4]。囊膜糖蛋白 E2 是诱导机体产生中和抗体及激发保护性免疫应答的主要蛋白^[5]。E2 蛋白具有种属特异性, 是研究 CSFV 抗原变异、诊断技术及基因工程疫苗的主要对象。

单纯疱疹病毒(Herpes simplex virus, HSV)*UL49* 基因编码的 VP22 具有蛋白转导(Protein transduction)功能, 能增强常规 DNA 疫苗、“自主复制型”RNA 疫苗、甲病毒载体疫苗以及重组腺病毒的免疫应答^[6-8]。研究证实, 牛疱疹病毒 1 型(Bovine herpesvirus

1, BHV)VP22 具有细胞间运输功能, 并能显著增强 DNA 疫苗的免疫效力^[9]。伪狂犬病病毒(Pseudorabies virus, PrV) VP22 与 BHV VP22 具有高度同源性。目前 PrV VP22 研究较少, 推测它同样具有蛋白转导功能。泛 DR 表位(Pan-DR epitope, PADRE)是一个含 13 个氨基酸残基的人造通用 Th 表位, 可增强机体的细胞和体液免疫应答^[10]。

“自杀性”DNA 疫苗(Suicidal DNA vaccine)是在常规 DNA 疫苗和“自主复制型”RNA 疫苗(Self-replicating RNA vaccine)基础上发展起来的一种新型疫苗^[11,12]。其原理是, 将甲病毒的全部非结构蛋白编码序列(复制子)置于真核细胞启动子(如人巨细胞病毒立即早期启动子)的下游, 将外源基因插入甲病毒的 26S 启动子下游, 用获得的重组质粒直接转染宿主细胞, 通过宿主细胞核中 RNA 聚合酶的转录, 产生正链 RNA, 转运到细胞浆中, 翻译合成病毒的复制酶; 随后, 在复制酶作用下启动正链 RNA 的复制, 产生新的子代正链 RNA, 同时转录外源基因, 合成外源蛋白。甲病毒复制子不仅具有自主复制功能, 而且具有与完整甲病毒相同的诱导宿主细胞凋亡的特性, 使被转染细胞在短时间内发生凋亡^[13]。自杀性 DNA 疫苗在很大程度上解决了常规 DNA 疫苗整合到宿主染色体上的潜在安全隐患^[11,13,14]。“自杀性”DNA 疫苗不仅具有常规 DNA 疫苗易制备、运输、保存等方面的优点, 而且还有“自主复制型”RNA 疫苗的安全性与有效性, 这使其成为目前核酸疫苗研究的热点。

本研究旨在以前构建的猪瘟甲病毒复制子载体疫苗(“自杀性”DNA 疫苗)pSFV1CS-E2^[15]为基础, 构建一系列共表达 CSFV E2 和 PRRSV GP5 的自杀性疫苗, 在小鼠模型上评价其免疫效力, 明确 PADRE 和 PrV VP22 是否具有免疫增强作用。

1 材料与方法

1.1 毒株、细胞和质粒

PRRSV HuN4 株系从发病猪肺脏中分离的高致病力 PRRSV 株^[16]。293T 细胞用于瞬时转染, 用含 10% 牛血清的 DMEM 进行培养。空载体 pSFV1CS 和“自杀性”DNA 疫苗 pSFV1CS-E2 已见报道^[15]。

1.2 重组质粒的构建

用引物 PUL49S(5'-CGG AAT TCA TGT CCA GCT CGA GAA AGA-3')和 PUL49R(5'-GGT GGA ATT CGC AAC GCC TTT ATT-3')通过 PCR 从 PrV Bartha-K61 株基因组 DNA 中扩增 UL49 基因, 然后将含有终止密码子突变的 CSFV E2 基因的 BamH I-EcoR I 片段^[15]和含有 PrV UL49 基因的 EcoR I 片段共同插入真核表达质粒 pcDNA3.1 中, 得到重组质粒 pcDNA-E2-UL49, 之后将含有 E2-UL49 融合基因的 BamH I-EcoR V 片段亚克隆于 pSFV1CS^[15]的 BamHI 和 Sma I 位点之间, 得到 pSFV1CS-E2-UL49。将下游分别带有 26S 启动子的密码子优化的 GP5 基因 (mGP5) 和 mGP5-PA(插入 PADRE 表位的

mGP5 基因)分别插入到 pSFV1CS-E2 和 pSFV1CS-E2-UL49 载体的 BamH I 位点, 得到 pS-mGP5-E2、pS-mGP5-E2-UL49、pS-mGP5-PA-E2 和 pS-mGP5-PA-E2-UL49。

用引物 PwtGP5S(5'-GGA TCC AGA TCT ATG TTG GGG AAA TGC TTG AC-3')与 PWTGP5R (5'-GGA TCC CGG GCT AGA GAC GAC CCC ATT G-3')通过 RT-PCR 扩增 PRRSV HuN4 株基因组 RNA, 得到野生型 GP5 基因(wtGP5), 用 wtGP5 分别取代 pS-mGP5-E2 和 pS-mGP5-E2-UL49 中的 mGP5, 分别得到 pS-wtGP5-E2 和 pS-wtGP5-E2-UL49。重组质粒结构示意图如图 1 所示。

1.3 瞬时转染

用纯化试剂盒 Wizard[®] Purefection Plasmid DNA Purification System(Promega 公司, 美国)按厂家说明书纯化 6 种重组质粒, 用脂质体转染试剂盒 Lipofectamine[™] 2000 Reagent(Invitrogen 公司, 美国)按说明书将纯化的 6 种重组质粒分别转染长至 80% 左右单层的 293T 细胞, 同时用 pSFV1CS-E2 作为阳性对照, 用空质粒 pSFV1CS 作为阴性对照同时进行转染。

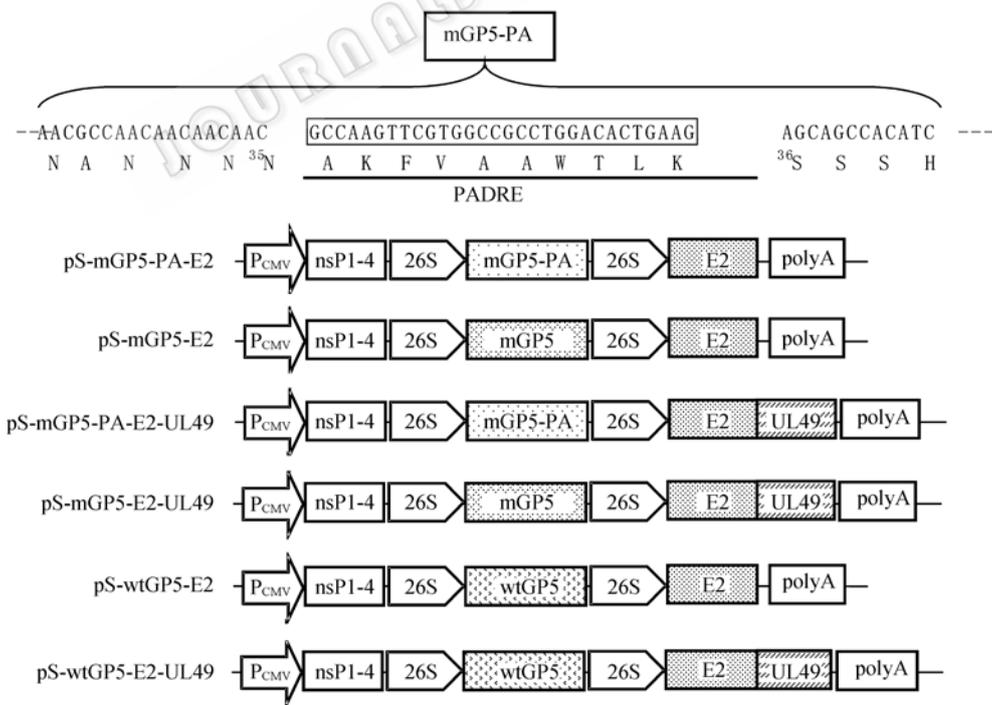


图 1 mGP5-PA 和 6 种重组质粒结构示意图

Fig. 1 Schematic diagram of mGP5-PA and recombinant plasmid constructs

1.4 间接免疫荧光试验(IFA)

转染后 48 h, 收集转染细胞, 用磷酸盐缓冲液(PBS)洗涤 2 次, 将其涂在载玻片上, 风干, 用冷丙酮固定 10 min, 取出风干, 分别滴加抗 PRRSV GP5 蛋白单克隆抗体^[17]和 CSFV E2 蛋白单克隆抗体^[18], 置于湿盒中 37°C 温育 45 min 后, 用 PBS 冲洗 3 次, 每次 5 min, 吹干后, 滴加 FITC 标记的山羊抗小鼠 IgG(Sigma 公司, 美国), 置于湿盒中, 37°C 温育 45 min 后, 同样用 PBS 冲洗 3 次, 每次 5 min, 吹干, 最后滴加缓冲甘油, 盖上盖玻片, 置于倒置荧光显微镜下观察荧光。

1.5 小鼠分组及免疫接种

选取 70 只 7 周龄左右健康雌性 BALB/c 小鼠(由哈尔滨兽医研究所实验动物中心提供), 随机分成 7 组, 每组 10 只, 分别通过后腿肌肉多点注射接种上述 6 种重组质粒和空载体(溶于生理盐水, 1 μg/μL), 每只小鼠注射 100 μL, 以 3 周(w)间隔加强免疫 2 次。

1.6 用间接 ELISA 法检测小鼠血清抗体

免疫后每周断尾采血, 分离血清, 用间接 ELISA 方法测定抗体效价。具体操作如下: 用包被液稀释纯化的 GP5 蛋白^[17]和 E2 蛋白^[19], 每孔 200 ng(100 μL)包被 96 孔微量滴定板, 4°C 包被过夜; 含有 0.5%吐温 20 的 PBS(PBST)洗涤 3 次, 每孔加入 200 μL 5%脱脂乳, 37°C 封闭 2 h; PBST 洗涤 3 次, 每孔加入 40 倍稀释的待检血清 100 μL, 37°C 作用 2 h; 用 PBST 洗涤 3 次, 加入 1:5000 稀释的酶标二抗, 37°C 作用 1 h; 用 PBST 洗涤 3 次, 每孔加入 100 μL 底物显色液, 显色 10 min; 加入 50 μL 2 mol/L H₂SO₄ 终止显色, 然后测定 OD₄₅₀ 值。

1.7 小鼠脾细胞悬液制备

将免疫小鼠脱颈处死, 置 75%乙醇中消毒 5 min, 无菌采取脾脏, 将脾脏置于加有 RPMI-1640 基础培养液的平皿内, 用注射器针芯将脾脏在 200 目的不锈钢网研磨, 然后反复吹打, 制备单个脾细胞; 用红细胞裂解液裂解红细胞后, 洗涤细胞 3 次, 计数细胞, 将细胞用 RPMI 1640 完全培养液调整细胞浓度至 2×10⁶个/mL。

1.8 用 WST-8 试剂检测小鼠脾淋巴细胞增殖

将上述制备的脾细胞悬液混匀加入 96 孔细胞培养板, 每孔加入脾细胞悬液 100 μL。将每只小鼠脾细胞分成 4 组, 分别为 CSFV 刺激组、PRRSV 刺激组、ConA 刺激组和非刺激阴性对照组, 每组设 3 个重复。将细胞置于 37°C, 5%的 CO₂ 培养箱培养 48 h

后, 每孔加入 10 μL WST-8 试剂(日本同仁化学研究所), 混匀后继续培养 4 h, 测定 OD₄₅₀ 值, 计算刺激指数(SI)=OD(试验孔)/OD(空白对照孔)。

1.9 用 CFSE 染色法检测小鼠脾淋巴细胞增殖

将 10 mmol/L 储存浓度的 CFSE 用 RPMI 1640 不完全培养液稀释成 6 μmol/L 溶液, 然后等体积加入上述脾细胞悬液, 使终浓度为 3 μmol/L, 于 37°C 染色 10 min, 其间振荡混匀数次。然后用冰浴的 FBS 淬灭多余的 CFSE。用含 10% FBS 的 RPMI 1640 培养液洗涤细胞 3 次, 用 RPMI 1640 完全培养液调整细胞浓度至 10⁶个/mL。将 CFSE 染色的脾淋巴细胞加入 96 孔细胞培养板, 每孔 200 μL。试验中设 CSFV 刺激组、PRRSV 刺激组、ConA 刺激组、非刺激阴性对照组、PK-15 细胞和 Marc-145 细胞裂解物对照组, 每组设 3 个重复。将细胞放入含 5% CO₂ 的恒温培养箱培养数天。收集细胞, 用 PE 标记的抗鼠 CD8 单抗染色, 用流式细胞术分析不同细胞的增殖。

1.10 用 ELISA 检测免疫小鼠脾细胞分泌的 IFN-γ 和 IL-4 水平

将上述制备的脾淋巴细胞悬液, 分成 4 组(CSFV 刺激组、PRRSV 刺激组、ConA 刺激组和非刺激阴性对照组), 每组 4 个重复, 加入 96 孔圆底细胞培养板, 每孔 200 μL。细胞加入不同抗原后置于含 5% CO₂ 的 37°C 恒温培养箱中培养 72 h 后, 离心收集上清, 用小鼠 IFN-γ 和 IL-4 ELISA 试剂盒(Biosource 公司)进行 IFN-γ 和 IL-4 含量的检测, 具体操作参照试剂盒说明书(夹心 ELISA 法)。

2 结果

2.1 外源基因在瞬时转染细胞中的表达

IFA 结果表明, 这 6 种重组质粒在转染 293T 细胞后 48 h, 无论 GP5 基因还是 E2 基因都得到表达, 而 pSFV1CS 转染细胞对照则未见特异性荧光(图 2)。

2.2 免疫小鼠的抗体产生情况

ELISA 检测结果表明, 在初免后 3 w, 重组质粒与对照组相比没有明显变化, 加强免疫后, 抗 PRRSV GP5 和 CSFV E2 的抗体水平随免疫次数的增加而增加, 在二免后 3 w(初免后 6 w), 重组质粒所产生的抗体水平与空载体免疫组相比具有明显升高, 在三免后 2 w(初免后 8 w)产生的抗体水平显著增加, 且一直持续到试验结束(图 3)。

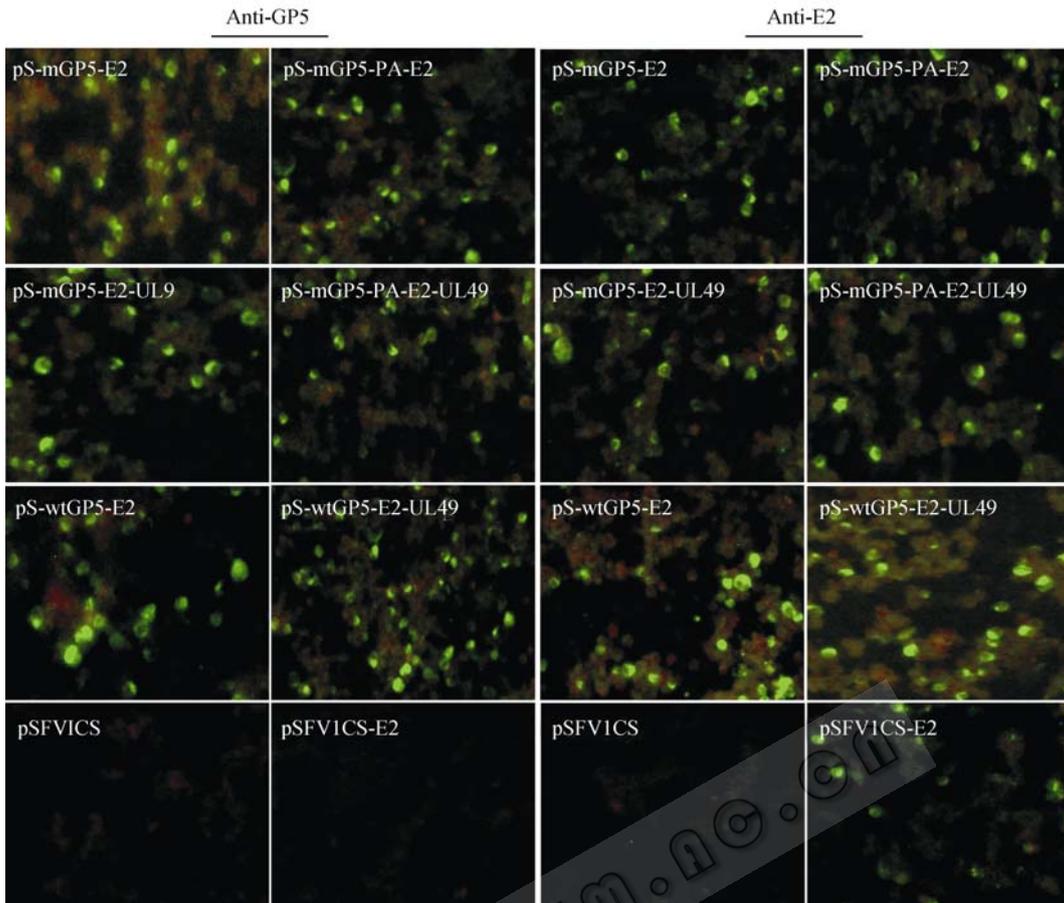


图 2 用间接免疫荧光试验检测 E2 和 GP5 在重组质粒瞬时转染的 293T 细胞中的表达
 Fig. 2 Detection of the expression of GP5 and E2 in 293T cells transiently transfected with the different recombinant plasmids 48 h post-transfection by indirect immunofluorescence assay

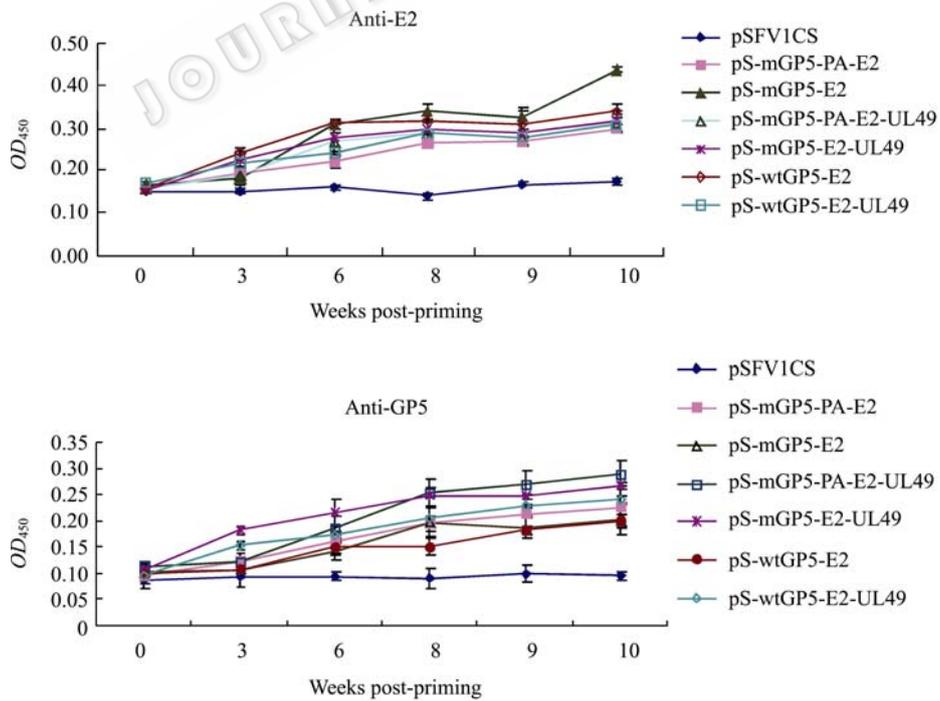


图 3 免疫小鼠血清 E2 和 GP5 抗体动态变化
 Fig. 3 Dynamic changes of serum anti-E2/GP5 antibody levels of the immunized mice (n = 10; mean ± SD)

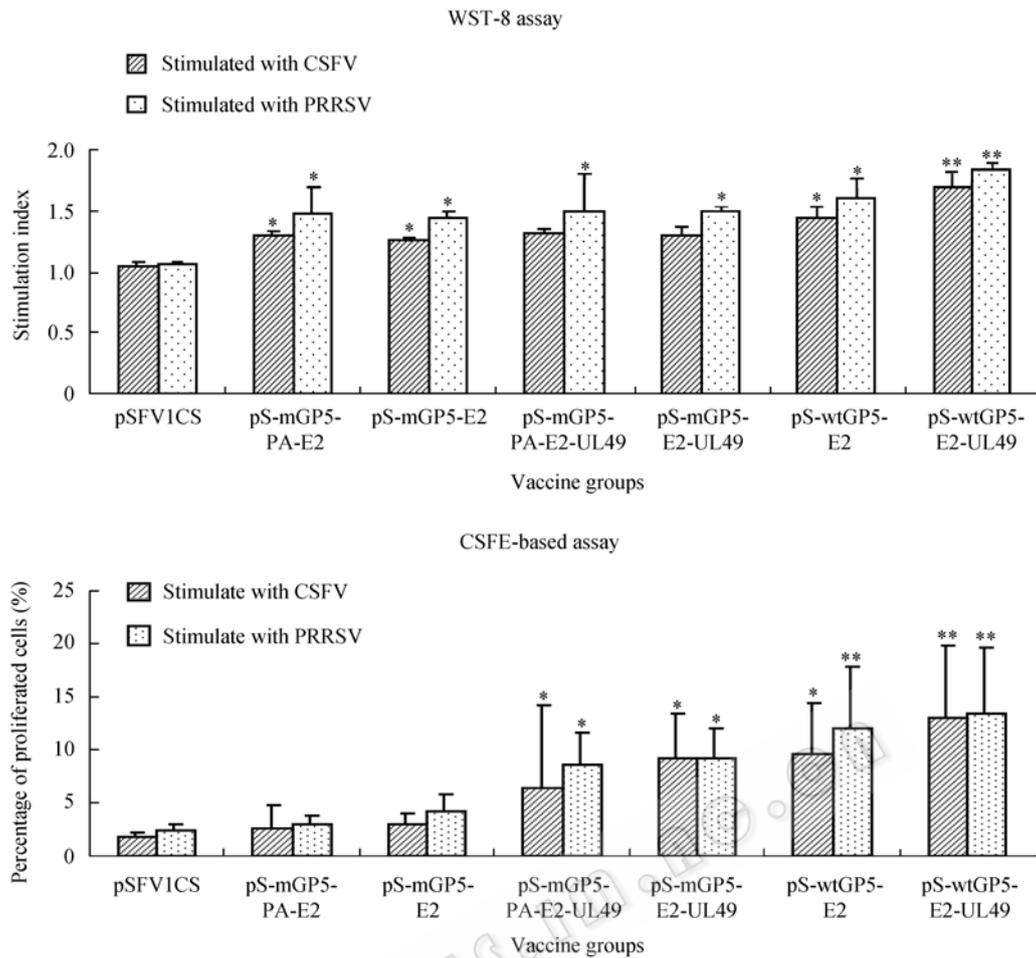


图 4 免疫小鼠脾淋巴细胞对特异性抗原刺激的增殖反应

Fig. 4 Splenocytes proliferation to virus stimulation in the immunized mice

The data represent the means \pm SD of 3 replicates for each stimulation condition for each suicidal DNA vaccine

2.3 免疫小鼠的特异性淋巴细胞增殖水平

WST-8 淋巴细胞增殖试验结果显示, 与对照组相比, 各重组质粒免疫组小鼠脾细胞经 PRRSV 和 CSFV 刺激后均表现显著水平的淋巴细胞增殖 ($P < 0.05$), 其中 pS-wtGP5-E2-UL49 免疫组与对照组相比差异极显著 ($P < 0.01$)。从总体上看, 无论是 CSFV 还是 PRRSV 刺激, pS-wtGP5-E2-UL49 免疫组增殖水平最高, 其次为 pS-wtGP5-E2 免疫组(图 4)。

基于 CFSE 染色的淋巴细胞增殖试验结果表明, 各重组质粒免疫组小鼠脾淋巴细胞经 PRRSV 和 CSFV 刺激后同样表现不同程度的淋巴细胞增殖, 其中 pS-mGP5-PA-E2-UL49 和 pS-mGP5-E2-UL49 免疫组与对照组相比差异显著 ($P < 0.05$), 而 pS-wtGP5-E2 免疫组经 CSFV 刺激后与对照组相比差异显著 ($P < 0.05$), 经 PRRSV 刺激后与对照组相比差异极显著 ($P < 0.01$), pS-wtGP5-E2-UL49 免疫组无论是 CSFV

还是 PRRSV 刺激, 与对照组相比差异极显著 ($P < 0.01$)(图 4)。

2.4 免疫小鼠脾淋巴细胞分泌的 IFN- γ 和 IL-4 水平

细胞因子 ELISA 检测结果表明, 对于 IFN- γ 而言, 除 pS-mGP5-PA-E2-UL49 疫苗组经 CSFV 刺激未检测到 IFN- γ 外, 其余各疫苗组无论是 CSFV 还是 PRRSV 刺激, 都可检测到 IFN- γ 分泌, 其中 pS-mGP5-E2-UL49、pS-wtGP5-E2 和 pS-wtGP5-E2-UL49 免疫组小鼠脾淋巴细胞的 IFN- γ 表达量分别为: 81.94 pg/mL、132.39 pg/mL 和 110.56 pg/mL (CSFV 刺激); 125.83 pg/mL、137.22 pg/mL 和 110.46 pg/mL (PRRSV 刺激), 与对照组相比有极显著差异 ($P < 0.01$), 而其它疫苗组与对照组相比无显著差异。对于 IL-4 来说, pS-mGP5-PA-E2 和 pS-mGP5-PA-E2-UL49 免疫组无论是 CSFV 还是 PRRSV 刺激都未检测到 IL-4, 而其余各疫苗组均可检测到 IL-4, 其中 pS-wtGP5-E2、pS-wtGP5-E2-

UL49 和 pS-mGP5-E2-UL49 免疫组小鼠脾淋巴细胞 IL-4 表达量分别为: 46.44 pg/mL、25.12 pg/mL 和 37.55 pg/mL(CSFV 刺激); 37.15 pg/mL、15.21 pg/mL 和 30.65 pg/mL(PRRSV 刺激); 经 CSFV 刺激后 pS-wtGP5-E2-UL49、pS-wtGP5-E2 和 pS-mGP5-E2-UL49 免疫组与对照组相比差异极显著($P<0.01$), 其它疫苗组与对照组相比无显著差异; 经 PRRSV 刺激后 pS-mGP5-E2-UL49 和 pS-wtGP5-E2-UL49 免疫组与对照组相比差异极显著($P<0.01$), pS-wtGP5-E2 免疫组与对照组相比差异显著($P<0.05$), 而空载体免疫对照组小鼠脾淋巴细胞刺激后未检出 IFN- γ 和 IL-4(图 5)。

3 讨论

目前用于预防 PRRS 和 CSF 的商品化疫苗主要是弱毒苗。尽管弱毒苗能提供较好的免疫保护, 但存在一些问题, 例如 CSF 弱毒疫苗效价不稳定, PRRS 弱毒疫苗有可能出现毒力返强。DNA 疫苗技术是近年发展起来的一种疫苗研制新技术, 它是将

编码目的抗原基因克隆到表达质粒上, 直接注入到动物体内, 借用宿主细胞表达加工合成抗原分子, 从而能高效诱导体液免疫与细胞免疫应答。DNA 疫苗虽然具有很多优点, 但也存在一些缺点, 如接种剂量大、次数多、存在安全隐患等。为了克服这些缺点, 国内外学者一直致力于开发表达水平高、安全性好、能激发较强免疫应答的疫苗载体。

“自杀性”DNA 疫苗是在常规 DNA 疫苗和“自主复制型”RNA 疫苗基础上发展起来的一种新型疫苗^[11,12], 其最大特点是自主复制、高水平表达和诱导细胞凋亡, 大大提高了 DNA 疫苗的免疫效力和安全性。本实验室在甲病毒载体 pSFV1 的基础上构建了表达 CSFV E2 的“自杀性”DNA 疫苗, 通过动物试验证实, 该疫苗可诱导猪瘟疫特异性抗体, 免疫猪能抵抗致死剂量猪瘟疫强毒的攻击^[15]。在此基础上, 我们进一步构建了共表达 GP5 和 E2 双基因的“自杀性”DNA 疫苗。通过体外瞬时转染, 证实“自杀性”DNA 疫苗重组质粒转染细胞后 GP5 和 E2 蛋白可以同时得到表达。

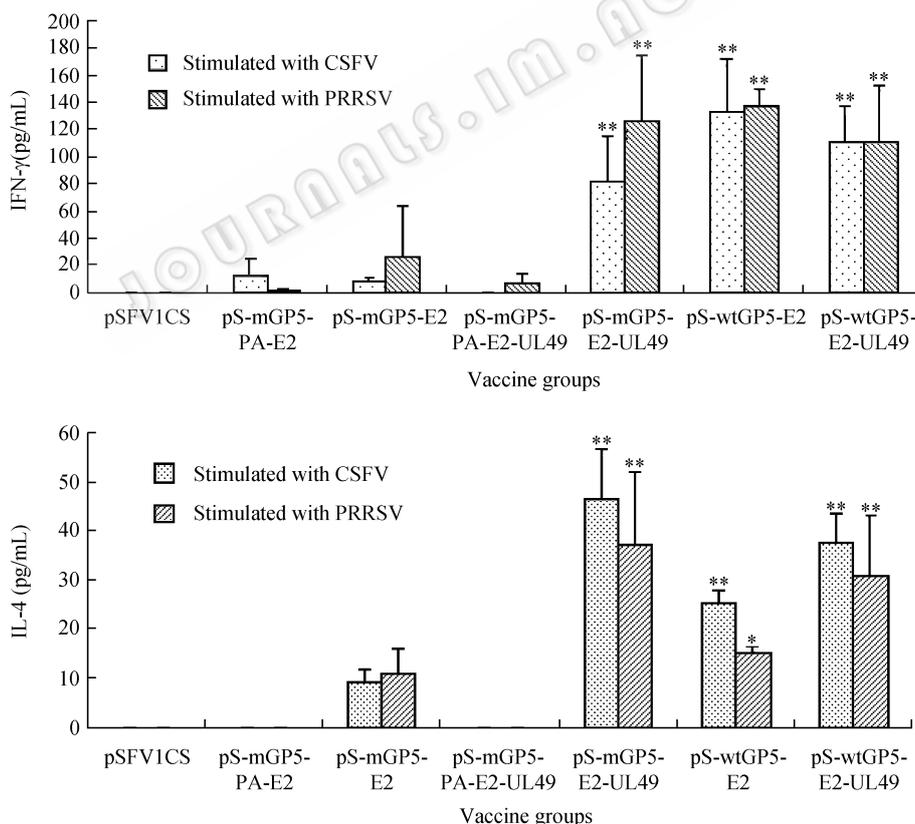


图 5 免疫小鼠脾细胞的 IFN- γ 和 IL-4 分泌水平

Fig. 5 IFN- γ and IL-4 secreted by the splenocytes of the mice immunized with the different plasmids
The data represent the means \pm SD of 4 replicates for each stimulation condition for each suicidal DNA vaccine

通过小鼠免疫试验显示, 初次免疫小鼠产生的抗体水平比较低, 经过加强免疫后抗体水平明显升高, 但总体抗体水平还是较低, 原因可能与甲病毒复制子载体能引起转染细胞凋亡、外源基因表达和抗体应答短暂有关^[20]。今后我们将通过尝试优化免疫程序和采用 Prime-boost 免疫策略^[21]来增强其免疫应答。同时, 本研究用数种方法评价了这几种“自杀性”DNA 疫苗诱导的细胞免疫应答水平, 包括用 CFSE 染色试验和 WST-8 试验检测疫苗诱导的抗原特异性淋巴细胞增殖能力, 用 ELISA 检测抗原刺激后免疫小鼠脾淋巴细胞分泌的 IFN- γ 和 IL-4, 结果显示, 与对照组相比, 经抗原刺激后各疫苗组小鼠的脾细胞均产生不同程度的增殖, 均能检测到不同分泌水平的 IFN- γ 和 IL-4, 并且 IFN- γ 的分泌水平明显高于 IL-4 的分泌水平, 这提示“自杀性”DNA 疫苗主要诱导小鼠产生 Th1 型免疫反应。

为了增强“自杀性”DNA 疫苗的免疫效力, 我们引入了 PADRE 表位和 VP22 转导蛋白。结果表明, 含 PADRE 的疫苗组与不含该表位的疫苗组之间没有显著差异, 这与 Fang 等^[22]报道的泛 DR 表位可以增强体液免疫和细胞免疫反应的结果不一致, 推测这可能与抗原本身的差异有关。而在 E2 基因下游融合了 UL49 基因的疫苗组与未融合的疫苗组相比, 无论是用 CSFV 刺激还是用 PRRSV 刺激, 淋巴细胞增殖反应、IFN- γ 和 IL-4 的分泌都有显著升高, 这与 Cheng 等^[23]证实 VP22 能增强“自主复制型”RNA 疫苗的免疫应答相一致。这为提高“自杀性”DNA 疫苗的免疫效力提供了新的途径。另外, 在本研究中我们还发现经过密码子优化的 GP5 疫苗组的体液免疫略高于野生型 GP5 疫苗组, 而野生型 GP5 疫苗组却在诱导细胞免疫上似乎更强些。

总之, 本研究构建了以甲病毒复制子为载体、共表达 GP5 和 E2 双基因的“自杀性”DNA 疫苗, 经细胞瞬时转染和小鼠接种试验证实, GP5 和 E2 蛋白可在转染细胞中有效表达并能诱发特异性抗体和细胞免疫反应, 这样为研制新型多价基因工程疫苗提供了新的思路和途径。

致谢 感谢本实验室的成丹、金美伶、梁冰冰、王宇飞、王万利、李焱、于墨洋和刘冰等提供的技术协助。

REFERENCES

- [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] Weiland E, Wiezorek-krohmer M, Kohl D, *et al.* Monoclonal antibodies to the GP5 of porcine reproductive and respiratory syndrome virus are more effective in virus neutralization than monoclonal antibodies to the GP4. *Vet Microbiol*, 1999, **66**(3): 171–186.
- [3] 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**(5): 989–999.
- [4] Lin M, Lin F, Mallory M, *et al.* Deletions of structural glycoprotein E2 of classical swine fever virus strain Alfort/187 resolve a linear epitope of monoclonal antibody WH303 and the minimal N-terminal domain essential for binding immunoglobulin G antibodies of a pig hyperimmune serum. *J Virol*, 2000, **74**(24): 11619–11625.
- [5] Van Zijl M, Wensvoort G, de Kluyver E, *et al.* Live attenuated pseudorabies virus expressing envelope glycoprotein E1 of hog cholera virus protects swine against both pseudorabies and hog cholera. *J Virol*, 1991, **65**(5): 2761–2765.
- [6] Michel N, Osen W, Gissmann L, *et al.* Enhanced immunogenicity of HPV 16 E7 fusion proteins in DNA vaccination. *Virology*, 2002, **294**(1): 47–59.
- [7] Cheng WF, Hung CF, Hsu KF, *et al.* Enhancement of Sindbis virus self-replicating RNA vaccine potency by targeting antigen to endosomal/lysosomal compartments. *Hum Gene Ther*, 2001, **12**(3): 235–252.
- [8] Kim TW, Hung CF, Kim JW, *et al.* Vaccination with a DNA vaccine encoding herpes simplex virus type 1 VP22 linked to antigen generates long-term antigen-specific CD8-positive memory T cells and protective immunity. *Hum Gene Ther*, 2004, **15**(2): 167–177.
- [9] Zheng C, Babiuk LA, van Drunen Littel-van den Hurk S. Bovine herpesvirus 1 VP22 enhances the efficacy of a DNA vaccine in cattle. *J Virol*, 2005, **79**(3): 1948–1953.
- [10] Ishioka GY, Fikes J, Hermanson G, *et al.* Utilization of MHC class I transgenic mice for development of minigene DNA vaccines encoding multiple HLA-restricted CTL epitopes. *J Immunol*, 1999, **162**(7): 3915–3925.
- [11] Leitner WW, Ying H, Restifo NP. DNA and RNA-based vaccines: principles, progress and prospects. *Vaccine*, 2000, **18**(9-10): 765–775.
- [12] Tubulekas I, Berglund P, Fleeton M, *et al.* Alphavirus expression vectors and their use as recombinant vaccines: a minireview. *Gene*, 1997, **190**(1): 191–195.
- [13] Fleeton MN, Liljeström P, Sheahan BJ, *et al.* Recombinant semliki forest virus particles expressing louping ill virus antigens induce a better protective response than plasmid-based DNA vaccines or and inactivated whole particle vaccine. *J Gen Virol*, 2000, **81**(3): 749–758.
- [14] Liljeqvist S, Stahi S. Production of recombinant subunit

- vaccines: protein immunogens, live delivery systems and nucleic acid vaccines. *J Biotech*, 1999, **73**(1): 11–33.
- [15] Li N, Qiu HJ, Zhao JJ, *et al.* A semliki forest virus replicon vectored DNA vaccine expressing the E2 glycoprotein of classical swine fever virus protects pigs from lethal challenge. *Vaccine*, 2007, **25**(15): 2907–2912.
- [16] Tong GZ, Zhou YJ, Hao XF, *et al.* Highly pathogenic porcine reproductive and respiratory syndrome, China. *Emerg Infect Dis*, 2007, **13**(9): 1434–1436.
- [17] Zhou YJ, An TQ, Xue Q, *et al.* Expression of GP5 gene of PRRSV CH-1a strain and development of monoclonal antibodies against GP5. *Vet Sci China*, 2005, **35**(11): 859–864.
周艳君, 安同庆, 薛强, 等. 猪生殖与呼吸综合征病毒 CH-1a 株 GP5 蛋白基因的表达及其单克隆抗体的制备. *中国兽医科技*, 2005, **35**(11): 859–864.
- [18] Hou Q, Peng WP, Sun Y, *et al.* Expression of the truncated E2 protein of Classical swine fever virus in *Escherichia coli* and preparation of a monoclonal antibody against the E2 protein. *Vet Sci China*, 2008, **38**(1): 6–10.
侯强, 彭伍平, 孙元, 等. 猪瘟病毒 E2 蛋白主要抗原区编码基因的原核表达及其单克隆抗体的制备. *中国兽医学*, 2008, **38**(1): 6–10.
- [19] Peng WP, Xia ZH, Hou Q, *et al.* Differences in glycosylation of the E2 protein between virulent Shimen strain and a virulent C-strain of classical swine fever virus. *Chin J Virol*, 2007, **23**(5): 389–393.
彭伍平, 夏照和, 侯强, 等. 猪瘟病毒石门强毒株和免疫弱毒疫苗株 E2 蛋白糖基化位点差异分析. *病毒学报*, 2007, **23**(5): 389–393.
- [20] Leitner WW, Ying H, Driver DA, *et al.* Enhancement of tumor-specific immune response with plasmid DNA replicon vectors. *Cancer Res*, 2000, **60**(1): 51–55.
- [21] Berzofsky JA, Ahlers JD, Belyakov IM. Strategies for designing and optimizing new generation vaccines. *Nat Rev Immunol*, 2001, **1**(3): 209–219.
- [22] Fang LR, Jiang YB, Xiao SB, *et al.* Enhanced immunogenicity of the modified GP5 of porcine reproductive and respiratory syndrome virus. *Virus Genes*, 2006, **32**(1): 5–11.
- [23] Cheng WF, Hung CH, Chai CY, *et al.* Enhancement of *Sindbis* virus self-replicating RNA vaccine potency by linkage of herpes simplex virus type 1 VP22 protein to antigen. *J Virol*, 2001, **75**(5): 2368–2376.

《生物工程学报》对摘要的写作要求

1. 研究报告摘要：基本要素包括研究目的、方法、结果和结论（不用单列标题书写）。目的(Purpose)：主要说明作者写此文章的目的，或说明本文主要要解决的问题；方法(Methods)：重点说明作者的主要工作过程及使用的方法。应用性文章如需要，可注明条件、使用的主要设备和仪器。结果(Results)：本文最后得出的结果（实验数据部分）。结论(Conclusions)：如系基础研究，应写明本文的创新之处，及文章在讨论部分表述的观点；如系应用性研究，应尽可能提及本文结果和结论的应用范围和应用情况或应用前景。

2. 综述摘要：包括论述内容的发展水平、自己的评论及展望，尤其要注意结合自己的研究工作。

3. 英文摘要的撰写要点：英文摘要的内容应与中文摘要一致，但比中文摘要更详尽。英文摘要完成后，务必请英文较好、且专业知识强的专家审阅定稿后再返回编辑部。

凡不符合要求的，即使学术上可以达到刊出的水平，本刊也将推迟发表。

(1) 建议使用第一人称，尽量不使用第三人称和被动语态。

(2) 建议用主动语态，被动语态表达拖拉模糊尽量不用，这样可以免好多长句，以求简单清晰。

(3) 尽量使用清晰简练的短句，避免很长的句子。注意正确使用英文写作习惯和语法。

(4) 摘要应当使用过去时态，语法正确，句子通顺。

(5) 摘要中避免使用缩写语，除非是那些人人皆知的（如DNA、ATP等），或者确实是非常长，而且出现多次的短语才允许用缩写语，并且在第一次出现时要写出全称。

(6) 在英语摘要中，不要使用任何汉字字符，包括标点、括号、温度、希腊字母等。

(7) 句子的开头处最好不要使用数字。