

# 表达猪繁殖与呼吸综合征病毒 GP5 和 M 融合蛋白的重组腺病毒的构建及其对小鼠的免疫原性

云涛<sup>1,2</sup>, 倪征<sup>1</sup>, 余斌<sup>1</sup>, 陈柳<sup>1</sup>, 华炯钢<sup>1</sup>, 王根荣<sup>3</sup>, 刘光清<sup>1</sup>

1 浙江省农业科学院 病毒学与生物技术研究所, 杭州 310021

2 西北农林科技大学 动物医学学院 杨凌 712100

3 嘉兴市秀城区畜牧兽医站 嘉兴 314005

**摘要:** 利用口蹄疫病毒(FMDV)2A 蛋白具有自我裂解的功能, 将其作为连接肽将猪繁殖与呼吸综合征病毒(PRRSV)的 GP5 和 M 蛋白编码基因串联, 置于复制缺陷型腺病毒载体的表达盒中, 通过一次转录和翻译, 可以同时实现 2 个蛋白的表达, 以发挥 GP5 蛋白的病毒中和优势和 M 蛋白的细胞免疫优势作用。分别利用 RT-PCR、间接免疫荧光和 Western blotting 等方法, 对获得的重组腺病毒(rAd-GP5-2A-M)进行检测, 结果均证明 GP5-2A-M 蛋白不仅获得了正确表达, 而且能自我裂解为 GP5 和 M 蛋白。以单独表达 GP5(rAd-GP5)、M(rAd-M)和融合表达 GP5-M(rAd-GP5-M)的重组腺病毒为对照, 研究该重组腺病毒在小鼠体内诱导免疫应答情况, 结果表明, 虽然 4 种重组腺病毒均能诱导小鼠产生特异性抗体和细胞免疫反应, 但重组腺病毒 rAd-GP5-2A-M 所诱导产生的体液免疫和细胞免疫应答水平最高。本研究结果提示, 利用具有自动裂解功能的 FMDV 2A 多肽构建 PRRSV 复合基因工程疫苗是一种切实可行的新策略, 也为构建其他动物病毒病的基因工程疫苗提供了新思路。

**关键词:** 猪繁殖与呼吸综合征病毒, 口蹄疫病毒, 2A 多肽, 重组腺病毒

## Construction and immunogenicity of recombinant adenovirus co-expressing the GP5 and M protein of porcine reproduction and respiratory syndrome virus in mice

Tao Yun<sup>1,2</sup>, Zheng Ni<sup>1</sup>, Bin Yu<sup>1</sup>, Liu Chen<sup>1</sup>, Jionggang Hua<sup>1</sup>, Genrong Wang<sup>3</sup>, and Guangqing Liu<sup>1</sup>

1 Research Institute of Virology & Biotechnology, Zhejiang Academy of Agricultural Sciences, Hangzhou 310021, China

2 College of Veterinary Medicine, Northwest Agriculture & Forest University, Yangling 712100, China

3 Jiaxing Husbandry and Veterinary Station, Jiaxing 314005, China

**Abstract:** FMDV 2A peptide was introduced as a linker between GP5 and M protein of porcine reproduction and respiratory syndrome virus (PRRSV) to allow automatic self-cleavage the polypeptides. This strategy simultaneously displayed the neutralizing action of GP5 protein and cell-mediated immunity of M protein. We put them into the expression cassette of adenovirus vector. The

**Received:** July 31, 2008; **Accepted:** December 9, 2008

**Supported by:** Natural Science Foundation of Zhejiang Province (No. Y305031), Key Program of Science and Technology Department of Zhejiang Province (No. 2006C22047), The Major Scientific and Technological Special Grand of Zhejiang Province (No. 2007C12010), The Science and Technology Bureau Program of Jiaxing City (No. 2008AY1001).

**Corresponding author:** Guangqing Liu. Tel: +86-571-86404241; E-mail: liuguangqing@hotmail.com

浙江省自然科学基金项目(No. Y305031), 浙江省科技厅重点项目(No. 2006C22047), 浙江省重大科技专项(No. 2007C12010), 嘉兴科技局项目(No. 2008AY1001)资助。



results of RT-PCR, IFA and Western blotting showed that GP5 and M protein were not only expressed correctly, but also self-cleaved and assemble heterodimers formation. To detect the advantages of rAd-GP5-2A-M, we also constructed some other recombinant adenoviruses (rAd-GP5, rAd-M and rAd-GP5-M) as control. After inoculated subcutaneously into BALB/c mice, the four recombinant adenoviruses can induce PRRSV-specific antibodies and cell-mediated immune response, but the level of humoral and cell-mediated immune response against PRRSV induced by rAd-GP5-2A-M is the strongest among the four recombinant adenoviruses. All of these suggested that it is possible to develop one multi-gene engineering vaccine utilizing FMDV 2A peptide, and also provided a novel strategy for developing other viral disease vaccine.

**Keywords:** porcine reproduction and respiratory syndrome virus, foot-and-mouth disease virus, 2A peptide, recombinant adenovirus

猪繁殖与呼吸综合征(Porcine reproductive and respiratory syndrome, PRRS)是由猪繁殖与呼吸综合征病毒(PRRSV)引起的,以妊娠母猪流产、死胎、弱仔等繁殖障碍及仔猪的呼吸道症状和高死亡率为特征的传染病<sup>[1]</sup>。自 1987 年在北美首次报道以来,至今几乎扩散到全球所有养猪业发达的国家和地区,给养猪业及其产品贸易造成了巨大的经济损失,已成为养猪业的主要病毒性疾病之一。我国于 1995 年底爆发该病,随后迅速蔓延到全国大部分省份。近年来 PRRS 疫情又有加重趋势,且混合感染和持续性感染状况严重。目前用于预防 PRRS 的疫苗主要是传统疫苗——弱毒苗和灭活疫苗。尽管弱毒苗能提供较好的免疫保护但存在毒力返强和散毒的危险<sup>[2]</sup>。而灭活苗诱导产生的抗体水平很低且极不稳定。因此研制更安全、更有效的疫苗来预防和控制该病的发生与流行已迫在眉睫。

PRRSV 是一种单股正链的 RNA 病毒,属于套式病毒目(Nidovirales)动脉炎病毒科 (Arteriviridae),动脉炎病毒属(Arterivirus)同属的还有马动脉炎病毒(EAV)、小鼠乳酸脱氢酶增高症病毒(LDV)和猴出血热病毒(SHFV)<sup>[2-4]</sup>。其基因组大小约 15 kb,具有 9 个开放阅读框架(ORF),且彼此相互嵌套。ORF1(包括 ORF1a 和 ORF1b)编码病毒的复制酶,其大小约占全基因组的 3/4; ORF2~4 分别编码病毒的 GP2a、GP2b、GP3 和 GP4 四种次要结构蛋白, ORF5~7 编码 3 种主要结构蛋白 GP5、M 和 N。GP5 为囊膜糖蛋白,是一种多功能蛋白,参与细胞免疫与体液免疫,尤其是中和抗体的产生,是基因工程疫苗设计的主要靶抗原<sup>[2,5,6]</sup>。M 蛋白是非糖基化膜蛋白,具有较强的免疫原性,可诱导产生一定的中和抗体和特异性细胞免疫应答,在介导病毒的吸附和诱导细胞免疫中具有重要作用<sup>[7,8]</sup>,而 GP5 与 M 蛋白可通过二硫键形成 GP5/M 异源二聚体,对病毒装配起重要作用

用,并介导病毒吸附宿主细胞过程<sup>[9]</sup>。

目前,大多数研究者为了发挥 GP5 的病毒中和优势作用和 M 蛋白的细胞免疫作用及两者所形成的二聚体对病毒进入靶组织和细胞的作用,通过不同的表达系统共表达和融合表达此二者,即在同一表达系统中使用双启动子;或在 GP5 和 M 蛋白基因之间引入内部核糖体进入位点(IRES);或通过一柔性多肽 Linker 序列将 GP5 和 M 蛋白基因连接一起的表达策略<sup>[10-13]</sup>。但这些策略存在一些缺陷,比如被表达的基因起始效率低;上游基因与下游基因的表达严重不平衡;启动子之间相互干扰;被表达蛋白性质与其天然蛋白的性质不尽相同等。为了在一个表达系统中表达此二者蛋白基因,并克服以上缺陷,本研究使用一种全新的构建策略,在 GP5 和 M 蛋白基因之间引入口蹄疫病毒(Foot-and-mouth disease virus, FMDV)的具有自剪切功能的多肽 2A 序列(Self-cleaving 2A peptide)。而腺病毒被认为是重组病毒疫苗的有效载体之一。本研究利用腺病毒表达系统和以自剪切多肽 2A 连接策略表达 GP5 和 M 蛋白,以期更好地发挥 PRRSV GP5、M 的抗原活性以及协同作用,为 PRRSV 基因工程疫苗的研究开辟新的途径。

## 1 材料与方法

### 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 和 XL-Gold 细胞为 Stratagene 公司产品。pMD18-T-ORF2-7 由本实验室构建保存<sup>[14]</sup>。E. coli DH5 $\alpha$ 由本实验室保存。Marc-145 细胞, PRRSV-NB/04 株均由本实验室分离保存<sup>[14]</sup>。wtAd (无外源基因表达的野生型腺病毒)由本实验室构建保存。

### 1.2 主要试剂

Ex Taq DNA 聚合酶、Kpn I、Not I、CIAP、



DL2000、DL15000、T4 DNA 连接酶、Mini 质粒纯化试剂盒和 DNA 胶回收试剂盒为 TaKaRa 公司产品; Wizard® PureFection Maxi Plasmid DNA Purification System 为 Promega 公司产品; *Pme* I、*Pac* I 为 New England Biolabs 公司产品; Lipofectamie™2000 Transfection Reagent 为 Invitrogen 公司产品; 鼠抗 PRRSV GP5 和 M 蛋白单克隆抗体由哈尔滨兽医研究所周艳君博士赠送; FITC-羊抗鼠 IgG 为博士德公司产品; 1 kb plus Ladder 为天为时代公司产品; 淋巴细胞分离液为上海华精生物公司产品。

1.3 引物设计和 PCR 扩增

参照 PRRSV VR2332 株(GenBank Accession No. PRU87392)和 FMDV China/99 O 型毒株(GenBank Accession No. EF432729)2A 基因的序列, 设计扩增 NB/04 株 ORF5、ORF6、ORF5-ORF6 和 ORF5-2A-ORF6 的引物, 引物由大连宝生物生物工程有限公司合成, 引物序列见表 1。

GP5、M、GP5-2A 和 2A-M 基因的扩增条件均为: 94℃ 5 min; 94℃ 1 min, 57℃ 1 min, 72℃ 45 s, 30 个循环; 72℃ 延伸 10 min。GP5-M 和 GP5-2A-M 融合基因的扩增条件为: 94℃ 5 min; 94℃ 1 min, 55℃ 1 min, 72℃ 90 s, 30 个循环; 72℃ 延伸 10 min。

1.4 构建重组腺病毒的构建

以 pMT-ORF2-7 质粒为模板, AdGP5 和 AdGP5-2A 为引物, 扩增 GP5-2A 基因, 胶回收获得不含终

止子的 GP5-2A 片段; 以 pMT-ORF2-7 为模板, 以 AdGP6-2A 和 AdGP6 为引物, 扩增 2A-ORF6 基因, 胶回收获得 2A-M 片段; 以 GP5-2A、2A-M 两片段为模板, AdGP5、AdM 为引物, 通过融合 PCR, 扩增得到 GP5-2A-M 融合基因, 胶回收获得 GP5-2A-M 融合片段; 用 *Kpn*I、*Not*I 双酶切 GP5-2A-M, 胶回收后将其插入 pShuttle-CMV 质粒 *Kpn* I 和 *Not* I 位点之间, 获得重组穿梭质粒, 命名为 pShuttle-CMV-GP5-2A-M。

将 pShuttle-CMV-GP5-2A-M 用 *Pme*I 线性化、去磷酸化后电转化(215 kV、200Ω、25 μF)入 BJ5183 感受态细胞(已转化腺病毒骨架载体 pAdEasy-1 的 BJ5183 细菌), 进行菌内同源重组。用卡那霉素筛选获得重组病毒 DNA, *Pac* I 酶切鉴定。将正确的重组病毒 DNA 再转化 XL10-Gold 超级感受态细胞, 纯化重组腺病毒 DNA。同时构建以柔性多肽 Linker 序列(GGGS)连接的融合蛋白 GP5-M 以及单独表达 GP5 和 M 的重组腺病毒 DNA。

1.5 重组腺病毒的包装及纯化

用 Wizard® PureFection Maxi Plasmid DNA Purification System 提取纯化重组腺病毒 DNA, *Pac* I 酶切回收后用 Lipofectamie™2000 Transfection Reagent 转染 HEK-293A 细胞培养 7~10 d, 获得重组腺病毒 rAd-GP5-2A-M、rAd-GP5-M、rAd-GP5 和 rAd-M。重组病毒的纯化按动物病毒学方法进行<sup>[15]</sup>。

表 1 用于 PCR 扩增的引物  
Table 1 Primers used for PCR amplification

ORFs	Primer sequences (5'-3')	Purposes
ORF5 (AdGP5)	CGCGGTACCATGG TGGGGA AATGCTTG	ORF5 gene with stop codon
	TATGCGGCCGCTAGAGACGACCCCATTG	
ORF6 (AdM)	CGCGGTACCATGGGGTCGTCTCTAGAC	ORF6 gene with stop condon
	TATGCGGCCGCT TATTTGGCATATTTA AC	
ORF5-ORF6 (AdGP5-Linker, AdM-Linker)	CGCGGTACCCACCATGGTGGGGA AATGCTTG	ORF5-linker gene without stop codon
	CATACTACCACCACCTAGAGACGACCCCA	
	TAGGTGGTGGTAGTATGGGGTCGTCT CTA	ORF6 gene with stop codon
	TATGCGGCCGCTTATTTGGCATATTTAAC	
ORF5-2A-ORF6 (AdGP5-2A, AdM-2A)	CGCGGTACCCACCATGGTGGGGA AATGCTTG	ORF5-2A gene without stop codon
	AACGTCTCCTGCTAACTTCAA AAGATCAAAGTTCGTGAGACGACCCCA	
	TTAGCAGGAGACGTTGAGTCCAACCCCGGACCCATGGGGTCGTCT CTA	2A-ORF6 gene
	TATGCGGCCGCTTATTTGGCATATTTAAC	



## 1.6 RT-PCR 鉴定重组腺病毒 GP5-2A-M 基因的转录

取 rAd-GP5-2A-M 感染的 HEK-293A 细胞和未接种腺病毒的 HEK-293A 对照细胞各一瓶, 刮取细胞后按 RNA 提取说明书提取总 RNA, 然后进行 RT-PCR 检测 rAd-GP5-2A-M 中 GP5-2A-M 蛋白基因的转录情况。

## 1.7 IFA 检测重组腺病毒 rAd-GP5-2A-M 的表达

重组腺病毒 rAd-GP5-2A-M 接种 HEK-293A 细胞 24 h 后, 弃去培养基, 用 PBS 洗涤细胞 3 次, 冷丙酮 4°C 固定 30 min, 室温干燥后用 PBS 洗涤 3 次; 将鼠抗 PRRSV GP5、M 蛋白单克隆抗体分别作 1:50 稀释每孔加入 50  $\mu$ L, 在湿盒内 37°C 温育 1 h; 移去稀释血清用 PBS 洗涤 3 次; 每孔加入 50  $\mu$ L 的 1:100 稀释的 FITC 标记羊抗鼠 IgG, 在湿盒内 37°C 温育 1 h; 移去孔内液体, 用 PBS 洗涤 3 次; 滴加碱性甘油于每孔, 置荧光显微镜下观察。

## 1.8 重组腺病毒 rAd-GP5-2A-M 的病毒滴度测定

按常规方法用 DMEM 维持液将病毒裂解液作 10 倍比稀释接种 96 孔 HEK-293A 细胞板中, 每个稀释度接种 8 个孔, 每孔接种 100  $\mu$ L。同时设定只加维持液的空白对照孔。37°C、5% CO<sub>2</sub> 培养, 逐日观察病变, 计数每个稀释度的 CPE 数, 按 Reed-Muench 法计算 TCID<sub>50</sub>。

## 1.9 Western blotting 检测

将感染重组腺病毒的细胞裂解液通过 12% SDS-PAGE 电泳分离蛋白, 采用半干转移(Bio-Rad)转印硝酸纤维素膜, 并设细胞裂解液作为空白对照。用含 5% 脱脂乳的 PBST 封闭过夜, 分别以 GP5 和 M 蛋白的单克隆抗体为一抗, 1:1000 稀释, 室温孵育 1 h; 辣根过氧化物酶标记的兔抗鼠 IgG 为二抗, 1:100 000 稀释, 室温孵育 1 h。用增强型化学发光底物(SuperSignal<sup>®</sup> West Pico Kit, PIERCE)作用后转印 X 光片。

## 1.10 小鼠免疫试验

取 6 周龄雌性 BALB/c 小鼠 108 只, 分为 6 组, 每组 18 只。每组分别皮下免疫 rAd-GP5-2A-M、rAd-GP5-M、rAd-GP5、rAd-M、wtAd 和 PBS, 滴度 10<sup>10</sup> TCID<sub>50</sub>/mL, 剂量为 0.5 mL/只, 共免疫 3 次, 每次间隔 2 周。加强免疫后分别于 2 周、4 周和 6 周采血测定中和抗体。

## 1.11 中和抗体检测

将待检血清于 56°C 灭活 30 min, 2 倍比稀释后(1:2~1:256)加入 96 孔细胞培养板中, 每孔 50  $\mu$ L。然后加入等体积的病毒液 PRRSV NB/04 (200 TCID<sub>50</sub>/100  $\mu$ L)混合, 于 37°C 孵育 1 h。然后接种已长满单层 Marc-145 细胞的 96 孔培养板中, 每个稀释度 4 孔, 同时设细胞对照和病毒对照孔, 37°C、5% CO<sub>2</sub> 培养 4~5 d, 逐日观察 CPE 情况, 当病毒对照孔均出现 CPE, 以抑制 50% CPE 的最高血清稀释度作为中和抗体滴度。

## 1.12 T 细胞增殖反应检测

参照 Rompato 的方法<sup>[16]</sup>进行。无菌取首免后第 14、28 和 42 天各组小鼠脾脏, 研磨后用 Ficoll 淋巴细胞分离液分离淋巴细胞, 用含 10% FCS 的 RPMI-1640 完全培养基悬浮细胞, 使细胞浓度为 5×10<sup>6</sup> 个细胞/mL。分离出的鼠脾淋巴细胞接种至 96 孔细胞培养板中, 100  $\mu$ L/孔。以纯化灭活的 20  $\mu$ g/mL PRRSV NB/04 作为刺激抗原, 100  $\mu$ L/孔, 各 3 复孔。以加未感染 PRRSV NB/04 的 Marc-145 细胞裂解液为阴性对照孔, 而以加 10  $\mu$ g/mL 的 PHA 作为阳性对照孔, 置 37°C、5% CO<sub>2</sub> 培养箱中培养, 72 h 后, 于每孔加入 MTT(Sigma), 充分混匀, 继续培养 4 h 后终止培养, 于 1 h 内测定 OD<sub>570</sub> 值, 计算刺激指数(SI), SI=A/B(A: 刺激孔值; B: 非刺激孔值)。

# 2 结果

## 2.1 表达 GP5-2A-M 蛋白的重组腺病毒的构建与鉴定

以 pMT-ORF2-7 质粒为模板, 通过 PCR 扩增得到了 ORF5-2A(不含终止密码子)和 2A-ORF6 基因, 再通过融合 PCR 扩增得到 ORF5-2A-ORF6 基因, 将其克隆入转移载体 pShuttle-CMV, 获得重组质粒 pShuttle-CMV-ORF5-2A-ORF6。通过测序表明该重组质粒的读码框正确。该二聚蛋白由图 1 可知, GP5-2A-M 蛋白基因之间通过 FMDV 的 17 AA(51 bp)的 2A 连接在一起。该重组质粒通过 *Pme* I 线性化后转化 BJ-5183(含 AdEasy-1 载体)感受态, 获得 rAd-ORF5-2A-ORF6。然后用 *Pac* I 将其 DNA 线性化, 转染 HEK-293A 细胞, 7 d 后 80% 以上的细胞出现 CPE, 收获病毒液。通过 3 轮的蚀斑纯化获得单一的重组病毒, 即 rAd-GP5-2A-M。经 PCR 和 RT-PCR



鉴定表明(图 2), 重组病毒 DNA 含有 GP5-2A-M 蛋白基因。将该病毒在 HEK-293A 细胞连续传代到 30 代, rAd-GP5-2A-M 的滴度稳定, 平均 TCID<sub>50</sub> 为  $10^{-10.43}$ /mL。而表达以柔性多肽 Linker 序列连接的融合蛋白 GP5-M, 单独表达 GP5 和 M 的重组腺病毒 rAd-GP5-M、rAd-GP5 和 rAd-M 以同上方法获得。

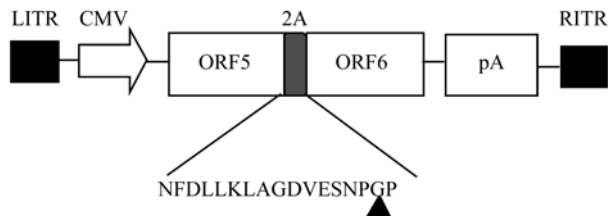


图 1 表达 ORF5-2A-ORF6 重组腺病毒 DNA 结构模式图  
Fig. 1 Schematic diagram of recombinant adenovirus DNA expressing ORF5-2A-ORF6.

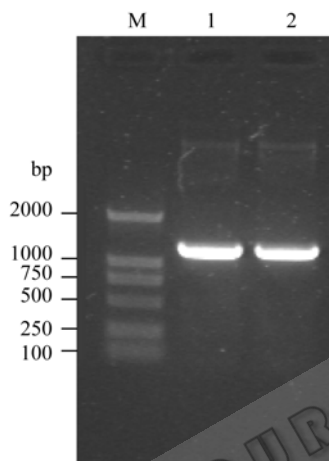


图 2 重组腺病毒 rAd-GP5-2A-M 在 HEK-293A 细胞中的 PCR 和 RT-PCR 鉴定

Fig. 2 Identification of recombinant adenovirus in HEK-293A cells by PCR and RT-PCR. M: DL2000 DNA marker; 1: PCR product; 2: RT-PCR product.

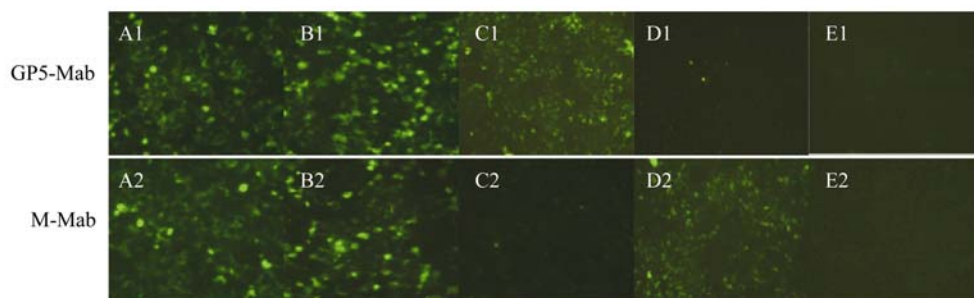


图 3 重组腺病毒(rAd-GP5-2A-M、rAd-GP5-M、rAd-GP5 和 rAd-M)表达目的蛋白的间接免疫荧光检测

Fig. 3 IFA identification of the GP5 and M expression in HEK-293A cells were infected with rAd-GP5-2A-M, rAd-GP5-M, rAd-GP5 and rAd-M, respectively. A1-D1: IFA identification of the cells infected with rAdGP5-2A-M, rAd-GP5-M, rAd-GP5 and rAd-M using GP5-specific monoclonal antibody (GP5-Mab), respectively. A2-D2: IFA identification of the cells infected with rAdGP5-2A-M, rAd-GP5-M, rAd-GP5 and rAd-M using M-specific monoclonal antibody (M-Mab), respectively. E1, E2: IFA of negative control that was infected with wtAd.

## 2.2 IFA 鉴定重组腺病毒的表达

用针对 PRRSV GP5 和 M 蛋白的单克隆抗体进行 IFA 试验, 结果发现各重组腺病毒感染的细胞出现明显的荧光, 而对照组则检测不到荧光(图 2)。表明 rAd-GP5-2A-M、rAd-GP5-M、rAd-GP5 和 rAd-M 都能正确地表达各自蛋白。

## 2.3 Western blotting 检测

由图 4 可知, rAd-GP5、rAd-M 和 rAd-GP5-M 分别可表达出约为 25 kD 的 GP5 蛋白、18 kD 的 M 蛋白和 43 kD 的 GP5-M 融合蛋白, 与报道的 GP5 和 M 蛋白的分子量相当。而 rAd-GP5-2A-M 表达出 3 个大小分别约为 45 kD、27 kD 和 18 kD 特异性蛋白。根据分子量大小可知, 27 kD 和 18 kD 的蛋白是表达的二聚蛋白 GP5-2A-M 自我裂解的 GP5-A 和 M 蛋白。而 45 kD 的蛋白可能是裂解的 GP5 和 M 所形成的异源二聚体, 或者是没有完全裂解的 GP5-2A-M 二聚蛋白。

## 2.4 小鼠体液免疫应答

由图 5 可知, PRRSV 的中和抗体在小鼠首免重组病毒 rAd-GP5-2A-M 后 14 d 就可检测到, 在 2 免后抗体水平显著升高。该组小鼠的中和抗体滴度在接种重组腺病毒的各组中最高, 三免后第 14 天达到最高(1:128), 2 倍于接种表达单基因的 rAd-GP5 和 rAd-M 的小鼠组( $P<0.01$ )。而接种表达融合蛋白的 rAd-GP5-M 组小鼠的中和抗体低度比接种 rAd-GP5-2A-M 的小鼠组中和抗体滴度显著低( $P<0.05$ ), 但比 rAd-GP5 和 rAd-M 的小鼠组显著高( $P<0.05$ )。而接种表达单基因的 rAd-GP5 和 rAd-M 的小鼠组, 接种 rAd-GP5 组的中和抗体滴度比 rAd-M 组高, 且二免后 rAd-M 组才能检测中和抗体。



接种 wtAd 和 PBS 的小鼠组始终未检测到中和抗体。结果表明, 自我裂解的 GP5-2A-M 二聚蛋白能诱导小鼠产生最高的中和抗体。比融合蛋白 GP5-M 诱导小鼠产生中和抗体高。诱导产生中和抗体由高到低的顺序为 rAd5-GP5-2A-M、rAd-GP5-M、rAd-GP5 和 rAd-M。而 2 个对照组 wtAd 和 PBS, 刺激指数基本无变化。

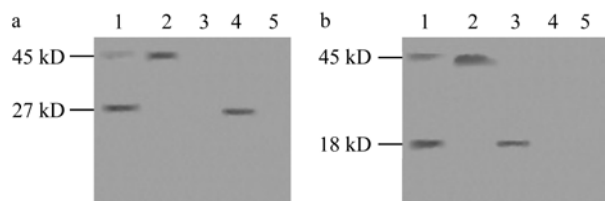


图 4 各重组腺病毒感染 HEK-293A 细胞的 Western blotting 分析

Fig. 4 Western blotting analysis of the lysates of HEK-293A cells infected with rAds using GP5-specific monoclonal antibody (GP5-Mab) (a) or using M-specific monoclonal antibody (M-Mab) (b). 1: cell lysates of rAd-GP5-2A-M; 2: cell lysates of rAd-GP5-M; 3: cell lysates of rAd-M; 4: cell lysates of rAd-GP5; 5: cell lysates of wtAd.

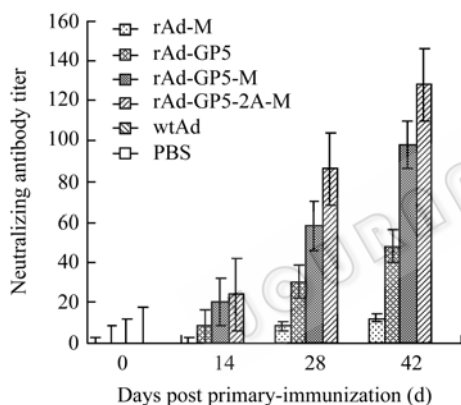


图 5 小鼠抗特异性 PRRSV 的血清中和抗体结果

Fig. 5 Results of PRRSV-specific serum neutralizing assay in mice, immunized with different recombinant adenovirus vaccines. The data represent the means  $\pm$  SD of 4 replicates for each recombinant adenovirus vaccine.

## 2.5 小鼠细胞免疫应答

病毒特异性的淋巴细胞增殖试验表明, 小鼠在第 2 次接种自我可裂解的 rAd5-GP5-2A-M 后 14 d 就可诱导小鼠产生明显的淋巴细胞增殖应答, 并且在二免后 2 周达到高峰, 与 wtAd 和 PBS 对照组相比, 刺激指数差异极显著 ( $P < 0.01$ )。比免疫表达融合蛋白的 rAd-GP5-M 小鼠组, 其刺激指数差异显著 ( $P < 0.05$ )。比免疫表达单基因的 rAd-GP5 和 rAd-M 小鼠组, 其刺激指数差异显著 ( $P < 0.05$ )。结果表明,

对于 PRRSV 的细胞免疫, 表达自我裂解的 GP5-2A-M 效果最好, 且由高到低的顺序为 rAd5-GP5-2A-M、rAd-GP5-M、rAd-M 和 rAd-GP5。而 2 个对照组 wtAd 和 PBS, 刺激指数基本无变化。

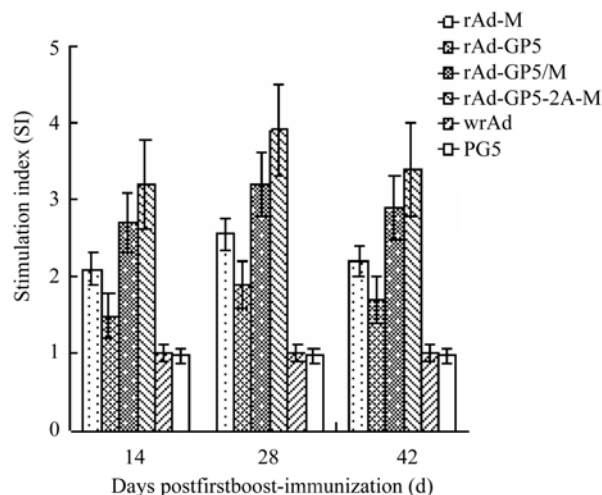


图 6 小鼠淋巴细胞增殖试验结果

Fig. 6 Results of proliferation of immunized mice lymphocyte. The data represent the means  $\pm$  SD of 3 replicates for each stimulation condition for each recombinant adenovirus vaccine.

## 3 讨论

目前 PRRS 的防制主要依靠传统疫苗, 即弱毒疫苗和灭活苗, 但由于这些疫苗均存在不同程度的缺陷, 主要是免疫效果不理想。此外, 活疫苗还存在毒力返强和散毒的危险等。因此国内外许多研究者都在努力探索各种形式的基因工程疫苗, 所选的免疫原主要是 PRRSV 的 GP5 和 M 蛋白基因及一些细胞因子。而主要的策略就是将 GP5 和 M 蛋白基因共表达, 或融合表达, 即将两者分别克隆在 2 个启动子下游, 或将两者之间通过 IRES 或一个柔性多肽 Linker 序列连接起来表达。如 DNA 疫苗共表达 GP5 和 M 蛋白, 杆状病毒、腺病毒串联表达 GP5 和 M 蛋白等。而本实验利用一种全新的策略表达 GP5 和 M 蛋白, 使两者表达量一致, 且蛋白质性质基本不发生改变。该策略就是在 PRRSV GP5 和 M 蛋白基因之间通过 FMDV 的具有自剪切功能的多肽 2A 序列连接, 然后重组入腺病毒表达载体, 并在 HEK-293A 细胞中包装成完整的病毒粒子, 经免疫印迹证明表达的二聚蛋白 GP5-2A-M 能自我裂解为 GP5 和 M 蛋白。



重组的 Ad-GP5-2A-M 能同时诱导小鼠产生高水平的体液免疫与细胞免疫反应, 经分析可能是由于 GP5 蛋白本身具有诱发中和抗体的能力<sup>[5]</sup>, M 蛋白也具有诱发特异性细胞免疫的能力<sup>[7,8]</sup>, 表达的聚合蛋白 GP5-2A-M, 在 2A 多肽自我裂解后, 分解为 GP5 和 M 蛋白。而裂解后 GP5 和 M 可形成 GP5/M 异源二聚体。此二聚体对病毒装配起重要作用, 并介导病毒吸附宿主细胞过程<sup>[9]</sup>。另外, GP5/M 异源二聚体的形成可促进 GP5 蛋白翻译后的修饰、转运。并且也有可能 GP5 蛋白某些中和表位的展现也需要二聚体的存在。

口蹄疫病毒 (Food-and-mouth virus disease, FMDV) 2A 是自剪切多肽的典型。由于 FMDV 2A 具有剪切效率高, 上下游基因表达平衡性好, 以及结构短小的优点, 使其成为构建单载体表达多蛋白的理想工具之一。而对于 IRES 多顺反子系统, 上下游基因的选择和顺序往往能够显著影响多基因的共表达, 通常下游基因的表达量仅是上游的 20%~50%。基于病毒源的 IRES 多顺反子系统, 上下游基因的选择和顺序往往能够显著影响多基因的共表达并且 IRES 多顺反子系统具有明显的组织特异性。FMDV 2A 则与之不同: 基因的选择与上下游顺序对其剪切活性基本没有影响。此外, IRES 自身结构较大, 其应用常受到载体容量的限制。研究表明 2A 和 2B 总是在 Gly 和 Pro 之间“切开”, 动力学和结构模型分析表明, Gly 和 Pro 之间的肽键实际上并未形成<sup>[17]</sup>。而序列分析发现, FMDV 2A 的序列高度保守, 最后 3 个氨基酸(-NPG-)则完全保守, 并且 2B 蛋白 N 端第 1 个氨基酸 Pro 也完全保守。推测 2A 保守的结构可能在阻止肽键形成和继续合成下游多肽的过程中起作用, 同时也是高剪切活力的保证。

由于 FMDV 2A 独特的“剪切”机制决定了 2A 只有在真核翻译系统中有活性, 而在原核翻译系统中无活性。腺病毒表达系统是重组病毒疫苗的有效真核表达系统之一。因此, 本实验用 17AA 的 2A 将 PRRSV GP5 与 M 连接后用 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。不仅诱导产生的中和抗体水平在各组小鼠中最高, 而且淋巴细胞增殖应答也最显著。

总之, 具有自我剪切功能的 FMDV 2A 使腺病毒表达的 PRRSV GP5-2A-M 聚合蛋白的成功裂解,

表明 2A 策略切实可行, 并为 PRRSV 多价基因工程疫苗的研制奠定了基础, 也为其他病毒的基因工程疫苗研制提供了全新的思路。此外, 重组腺病毒 rAd-GP5-2A-M 对小鼠显示了很好的免疫效力, 但对猪的确切免疫保护效果有待于进一步验证。目前, 猪体免疫效果试验正在进行中。

## 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**: 121-130.
- [2] Dea S, Gagono CA, Mardassi H. Current knowledge on the structural proteins of porcine reproductive and respiratory syndrome (PRRS) virus comparison of the North American and European isolates. *Arch Virol*, 2000, **145**: 659-688.
- [3] Meulenber JJ, Hulst MM, de Meijer EJ, *et al.* Lelystad virus, the causative agent of porcine epidemic abortion and respiratory syndrome (PEARS), is related to LDV and EAV. *Virology*, 1993, **192**: 62-72.
- [4] Snijder EJ, Meulenber JJ. The molecular biology of arteriviruses. *J Virol*, 1998, **79**: 961-979.
- [5] Gagnon CA, Lachapelle G, Langelier Y, *et al.* 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. *Arch Virol*, 2003, **148**: 951-972.
- [6] Weiland E, Wieczorek-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**: 171-186.
- [7] Zhang Y, Sharma RD, Paul PS. Monoclonal antibodies against conformationally dependent epitopes on Porcine reproductive and respiratory syndrome virus. *Vet Microbiol*, 1998, **63**: 125-136.
- [8] Bautista EM, Suarez P, Molitor TW. T cell responses to the structural polypeptides of porcine reproductive and respiratory syndrome virus. *Arch Virol*, 1999, **144**(1): 117-134.
- [9] Delputte PL, Vanderheijden N, Nauwynck HJ, *et al.* Involvement of the matrix protein in attachment of porcine reproductive and respiratory syndrome virus to a heparin-like receptor on porcine alveolar macrophages. *J Virol*, 2002, **76**: 4312-4320.
- [10] Zheng QS, Chen DS, Li P, *et al.* Co-expressing GP5 and M proteins under different promoters in recombinant modified vaccinia virus ankara (rMVA)-based vaccine vector enhanced the humoral and cellular immune responses of porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV). *Virus Genes*, 2007, **35**: 585-595.



- [11] Wang SP, Fang LR, Fan HY, *et al.* Construction and immunogenicity of pseudotype baculovirus expressing GP5 and M protein of porcine reproductive and respiratory syndrome virus. *Vaccine*, 2007, **25**: 8220–8227.
- [12] Jiang YB, Xiao SB, Fang LR, *et al.* DNA vaccines co-expressing GP5 and M proteins of porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV) display enhanced immunogenicity. *Vaccine*, 2006, **24**: 2869–2879.
- [13] Jiang WM, Jiang P, Li YF, *et al.* Recombinant adenovirus expressing GP5 and M fusion proteins of porcine reproductive and respiratory syndrome virus induce both humoral and cell-mediated immune responses in mice. *Vet Immunol Immunopathol*, 2006, **113**: 169–180.
- [14] Yun T, Liu GQ, Wang GR *et al.* Molecular characteristics genome of a porcine reproductive and respiratory syndrome virus NB/04 strain. *J Agri Biotechnol*, 2008, **16**(2): 357–358.
- [15] Yin Z, Liu JH. *Animal Virology*. 2nd Ed. Beijing: Science Press, 1997.
- 殷震, 刘景华. *动物病毒学*. 第2版. 北京: 北京科学出版社, 1997.
- [16] 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. *Vet Immunol Immunopathol*, 2005, **109**: 151–160.
- [17] Ryan MD, Donnelly M, Lewis A, *et al.* A model for nonstoichiometric, cotranslational protein scission in eukaryotic ribosomes. *Bioorganic Chem*, 1999, **27**: 55–79.

## 2009 年《生物工程学报》栏目设置

栏目中文名称	栏目英文名称	具体涵盖内容
综述	Reviews	内容要求新颖丰富, 观点明确, 论述恰当, 必须包含作者自己的工作内容和见解
小综述	Mini-review	能尽快反映生物学领域的最新进展的小型综述
科学进展/名家论坛	Perspective	邀请生物领域专家对最新生物技术科研成果进行评述
动物及兽医生物技术	Animal and Veterinary Biotechnology	转基因动物; 动物生物反应器; 动物疾病控制、免疫生物技术
海洋生物技术	Marine Biotechnology	海洋生物资源; 海洋生物基因组学、蛋白质组学和代谢组学; 海水养殖生物技术; 藻类生物技术; 海洋天然产物; 海洋生物产品、生物材料和生物能源
环境生物技术	Environmental Biotechnology	微生物多样性; 分子生物学方法及应用; 环境过程的生物监测; 污染控制新工艺; 生物修复
工业生物技术	Industrial Biotechnology	工业酶和微生物; 代谢工程与应用; 生物催化剂与生物转化; 工业生物原料、生物燃料、生物能源和生物基化学品; 生物过程工程; 生物工程控制及优化
农业生物技术	Agricultural Biotechnology	农业功能基因组; 植物生物反应器; 转基因作物; 转基因产品的生物安全及转化; 农业重组微生物
食品生物技术	Food Biotechnology	食品微生物及功能性食品; 转基因食品; 食品安全及公众健康
系统生物技术	Systems Biotechnology	系统生物学理论在工业、医药、环境、农业生物技术领域的应用
医学与免疫生物技术	Medical and Immunological Biotechnology	基因治疗和干细胞治疗 RNAi 技术及应用; 生物标记与诊断; 单克隆抗体; 工程蛋白和疫苗
组织工程与细胞培养	Tissue Engineering and Cell Cultivation	细胞发育与生物材料; 干细胞工程; 细胞培养工程
生物技术与方法	Methods in Biotechnology	生物技术各个领域中的方法学