

共表达与牛疱疹病毒 1 型 VP22 融合的猪繁殖与呼吸综合征病毒 E 及 M 蛋白的重组伪狂犬病毒的构建及其免疫原性观察

赵 武^{1,2}, 肖少波¹, 方六荣¹, 江云波¹, 宋云峰¹, 严 琳¹, 余晓岚¹, 陈焕春^{1*}

(1. 华中农业大学动物医学院动物病毒室, 武汉 430070; 2. 广西兽医研究所, 南宁 530001)

摘 要: 为了研制猪繁殖与呼吸综合征病毒(PRRSV)基因工程疫苗, 以伪狂犬病毒(PRV)gE 基因缺失标志疫苗株 TK⁻/gE⁻/LacZ⁺ 为病毒载体, 通过同源重组, 构建了共表达与牛疱疹病毒 1 型 VP22(BHV-1 VP22)融合的 PRRSV E 及 M 蛋白的重组伪狂犬病毒(rPRV)TK⁻/gE⁻/VP22E⁺/VP22M⁺。经 PCR、Southern blot、Western blot 证实 rPRV 构建正确, 并能表达与 BHV-1 VP22 融合的 PRRSV E 及 M 蛋白。rPRV 在 IBRS-2、PK-15 细胞中的增殖滴度与 PRV 亲本株相比无显著差异, 表明外源基因的插入不影响 rPRV 增殖。用该 rPRV 免疫 BALB/c 小鼠, 检测免疫小鼠抗 PRRSV 中和抗体及脾淋巴细胞增殖反应, 并与未融合 VP22 的单表达 PRRSV E 蛋白及共表达 E 及 M 蛋白的 rPRV TK⁻/gE⁻/E⁺ 与 TK⁻/gE⁻/E⁺/M⁺ 进行比较。结果显示 TK⁻/gE⁻/VP22E⁺/VP22M⁺ 可诱导小鼠产生更好的体液与细胞免疫反应, BHV-1 VP22 发挥了佐剂效应。本研究为研制安全、有效的猪繁殖与呼吸综合征—伪狂犬病二价基因工程疫苗奠定了基础。

关键词: 牛疱疹病毒 1 型 VP22; 猪繁殖与呼吸综合征病毒; 修饰型 ORF5 基因; ORF6 基因; 重组伪狂犬病毒
中图分类号: S858. 285. 3; Q784 文献标识码: A 文章编号: 0366-6964(2006)04-0401-07

Construction of Recombinant Pseudorabies Virus Coexpressing E and M Protein of Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome Virus Fused with VP22 Protein of Bovine Herpesvirus 1 and Its Immunogenicity in Mice

ZHAO Wu^{1,2}, XIAO Shao-bo¹, FANG Liu-rong¹, JIANG Yun-bo¹,
SONG Yun-feng¹, YAN Lin¹, YU Xiao-lan¹, CHEN Huan-chun^{1*}

(1. Laboratory of Animal Virology, College of Veterinary Medicine, Huazhong Agricultural University, Wuhan 430070, China; 2. Guangxi Veterinary Research Institute, Nanning 530001, China)

Abstract: In the present study, the ORF5M gene (the modified ORF5 gene) and ORF6 gene, the two major immunogenicity genes of PRRSV, were used as the target genes, and bovine herpesvirus 1 (BHV-1) VP22 possessing protein transduction property was chosen as the immunoadjuvant. Based on homologous recombination, a recombinant PRV (rPRV) TK⁻/gE⁻/VP22E⁺/VP22M⁺ coexpressing PRRSV E and M protein fused with BHV-1 VP22 protein was constructed by using PRV TK⁻/gE⁻/LacZ⁺ as parent strain. The rPRV was confirmed by PCR, Southern blot and Western blot. The results of TCID₅₀ tests showed that the insertion of the foreign genes had no influence on the propagation of rPRV in IBRS-2 or PK-15 cells. BALB/c mice were immunized with rPRV TK⁻/gE⁻/VP22E⁺/VP22M⁺, and compared with rPRV TK⁻/gE⁻/E⁺ expressing

收稿日期: 2005-05-20

基金项目: 国家自然科学基金(30300257); 武汉市青年科技晨光计划(20025001041)

作者简介: 赵 武(1965-), 男, 壮族, 广西人, 副研究员, 博士生, 主要从事动物病毒分子生物学与基因工程疫苗研究

* 通讯作者: 陈焕春, Tel: 027-87282608; Fax: 027-87281795; E-mail: hzauvet@public.wh.hb.cn

ORF5M gene and TK⁻/gE⁻/E⁺/M⁺ coexpressing ORF5M and ORF6 genes respectively. Neutralizing antibodies and lymphocyte proliferative responses were evaluated at 10 weeks after primary immunization. Among three rPRVs, TK⁻/gE⁻/VP22E⁺/VP22M⁺ had the best effect on enhancing PRRSV-specific humoral and cellular immune responses, and VP22 showed adjuvant efficiencies on rPRV vaccine to a certain degree. In conclusion, the study established a base for the research of bivalent genetic engineering vaccines against PRRSV and PRV.

Key words: bovine herpesvirus 1 VP22; porcine reproductive and respiratory syndrome virus; modified ORF5 gene; ORF6 gene; recombinant pseudorabies virus

猪繁殖与呼吸综合征 (Porcine reproductive and respiratory syndrome, PRRS) 是猪繁殖与呼吸综合征病毒 (PRRSV) 引起的严重危害养猪业而又极难防制的猪重要传染病^[1]。但目前使用的 PRRS 商用常规疫苗 (弱毒疫苗及灭活疫苗) 因存在安全隐患或免疫效果差的缺陷而不能提供理想的免疫保护^[2,3], 因此急需研制更安全有效的新型疫苗。猪伪狂犬病 (Pseudorabies, PR) 是伪狂犬病毒 (Pseudorabies virus, PRV) 引起的又一危害严重的猪重要传染病。PRV 已被公认为一个优良的活病毒载体, 将 PRRSV 的保护性抗原基因插入 PRV 基因缺失标志疫苗株基因组中构建重组伪狂犬病毒 (rPRV) 二价基因工程疫苗具有可行性和必要性。

PRRSV 的 ORF5 基因编码的囊膜蛋白 E (GP5) 具有较强的诱导机体产生中和抗体的能力^[4], 而经修饰的 ORF5 基因 (ORF5M, 即在其 N 端的覆盖表位与中和表位间插入通用型辅助性 T 淋巴细胞表位 PADRE) 编码的 E 蛋白具有更好的免疫原性^[5]。ORF6 基因编码的基质蛋白 M 具有较强的诱导机体细胞免疫的能力^[6]。ORF5M 及 ORF6 基因是研制 PRRSV 基因工程疫苗的良好靶基因。牛疱疹病毒 1 型 (Bovine Herpesvirus 1, BHV-1) VP22 蛋白具有独特的蛋白转导功能^[7,8], 能显著提高与之融合的外源蛋白的递呈效率进而提高其免疫原性。本研究以 PRV gE 基因缺失标志疫苗株 TK⁻/gE⁻/LacZ⁺ 为病毒载体, 构建了共表达与 BHV-1 VP22 基因融合的 PRRSV ORF5M 及 ORF6 基因的 rPRV, 并评价其诱导小鼠产生的体液与细胞免疫反应的效果, 为研制有效防制 PRRS 和 PR 的二价基因工程疫苗奠定基础。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 毒株、细胞和菌株 PRV Ea 株 TK⁻/gE⁻/

LacZ⁺ gE 基因缺失疫苗株^[9], 由刘正飞博士构建并提供。单独表达 PRRSV ORF5M 的 rPRV TK⁻/gE⁻/E⁺ 及共表达 PRRSV ORF5M 与 ORF6 基因的 rPRV TK⁻/gE⁻/E⁺/M⁺ 由江云波博士构建并提供。IBRS-2 细胞、PK-15 细胞、大肠杆菌 DH5 α 等由本实验室保存。5~6 周龄 BALB/c 雌性小鼠购自湖北省预防医学科学院实验动物中心。

1.1.2 载体与质粒 含 PRRSV ORF5M^[5] 的转移质粒 pIECMV-ORF5M, 系将 ORF5M 基因插入由人巨细胞病毒立即早期启动子/增强子 (hCMV) 驱动的 gE/gI 双缺失的 PRV 通用转移载体 pIECMV^[10] 而得, 由江云波博士构建并提供。含 PRRSV ORF6 基因表达盒的质粒 pCMVPA-ORF6 亦由江云波博士构建并提供。含 BHV-1 VP22 基因 (不含终止密码子) 的质粒 pMD-VP22 由余晓岚博士构建并提供^[11]。

1.1.3 酶与试剂 各种工具酶均为 TaKaRa 产品。DNA 快速回收试剂盒购自上海生工生物工程公司。脂质体转染试剂盒 LipofectAMINETM 2000 为 Invitrogen 产品。地高辛 DNA 标记与检测试剂盒 (DIG High Prime DNA Labeling and Detection Starter Kit) 为 Roche 产品。HRP 标记的羊抗猪 IgG 为 SBA 产品。抗 PRRSV 猪高免阳性血清为本实验室制备。

1.1.4 引物设计与 PCR 扩增 引物 VP22P1、VP22P2 根据 BHV-1 VP22 基因序列设计, 可扩增 VP22 基因; 引物 ORF5MP1、ORF5MP2 以及引物 ORF6P1、ORF6P2 根据 PRRSV ORF5M 与 ORF6 基因序列设计, 可扩增 ORF5M 及 ORF6 基因; 引物 LacZP1、LacZP2 可扩增源于大肠杆菌的 LacZ 基因部分片段。上述引物用于对重组病毒的 PCR 扩增鉴定。引物均由上海生工生物工程有限公司合成。引物序列见表 1。

表 1 寡核苷酸引物序列
Table 1 Oligonucleotide primers

引物编号 Prime	序列 (5' → 3') Sequence	目的基因 Target gene	产物大小 Product/bp
VP22P1	TTTGAATTGCCATGGCCCGTTCCACAG	VP22 基因	约 780
VP22P2	TTTGAATTCCGGCCGGGCCGCTCGCC		
ORF5MP1	GAACTCGAGAGTATGTTGGGGAAATGCTTGACC	ORF5M 基因	约 650
ORF5MP2	TTTTCTAGAGACGACCCATTGTTCCGC		
ORF6P1	TTTCTCGAGATGGGGTCGTCTCTAG	ORF6 基因	约 550
ORF6P2	GCCAAGCTTTTATTTGGCATATTTG		
LacZP1	GAACTGCCTGAACTACC	LacZ 基因部分片段	约 430
LacZP2	ACTGCAACAACGCTGC		

PCR 扩增条件:95 °C 变性 5 min 后进入循环,循环参数:95 °C 1 min,退火温度(VP22 为 60 °C, ORF5M 与 ORF6 均为 57 °C, LacZ 为 50 °C)1 min, 72 °C 1 min, 35 个循环后, 72 °C 延伸 10 min。

1.2 方法

1.2.1 含 VP22-ORF5M 及 VP22-ORF6 融合基因转移质粒的构建 用 *Bgl* II、*Bam*HI 酶切质粒 pMD-VP22(VP22 两端各含 *Bgl* II、*Bam*HI 位点), 回收 VP22 基因片段并插入到含 PRRSV ORF5M 基因的经 *Bam*HI 酶切并去磷酸化处理的转移质粒 pIECMV-ORF5M 中 ORF5M 的上游并与 ORF5M 基因读码框吻合, 获得转移质粒 pIECMV-VP22ORF5M。用 *Eco*RI 酶切质粒 pMD-VP22 (VP22 两端各含 *Eco*RI 位点), 回收 VP22 基因片段并插入到含 PRRSV ORF6 基因的经 *Eco*RI 酶切并去磷酸化处理的质粒 pCMVPA-ORF6, 使 VP22 位于 ORF6 基因上游并与 ORF6 基因读码框吻合, 获得含 VP22-ORF6 融合基因质粒 pCMVPA-VP22ORF6。用 *Bgl* II、*Bam*HI 酶切质粒 pCMV-PA-VP22ORF6, 回收并补平 VP22-ORF6 融合基因表达盒, 再将其插入经 *Stu* I 平端酶切并去磷酸化处理的转移质粒 pIECMV-VP22ORF5M 中 VP22-ORF5M 融合基因表达盒下游, 获得共表达与 VP22 融合的 ORF5M 及 ORF6 转移质粒 pIECMV-VP22ORF5M-VP22ORF6。以上操作均按常规方法进行^[12]。

1.2.2 共转染与蚀斑筛选纯化 按脂质体转染试剂盒说明书介绍的方法, 将经过 *Eco*RI 消化的线性化的载体病毒 PRV TK⁻/gE⁻/LacZ⁺ 基因组与纯化的转移质粒 pIECMV-VP22ORF5M-VP22ORF6 采用脂质体法共转染 IBRS-2 细胞, 通过同源重组

产生重组病毒。待细胞出现病变后收毒, 然后按文献[13]的方法, 在 PK-15 细胞上利用蚀斑试验结合 PCR 扩增来筛选和纯化重组病毒。对 VP22、ORF5M 及 ORF6 基因 PCR 扩增均为阳性的重组子, 再重复进行 3 轮蚀斑纯化。

1.2.3 重组病毒 TK⁻/gE⁻/VP22E⁺/VP22M⁺ 的鉴定

1.2.3.1 PCR 鉴定: 对经过 3 轮蚀斑纯化后的重组病毒再作一轮蚀斑, 随机挑取蚀斑, 接种 24 孔板, 待细胞产生病变后, 提取重组病毒基因组作为模板, 对 VP22、ORF5M、ORF6 及 LacZ 基因进行 PCR 扩增验证重组病毒。当所有蚀斑均能扩增到约 780bp 的 VP22 基因、约 650bp 的 ORF5M 基因、约 550bp 的 ORF6 基因, 而扩增不到约 430bp 的 LacZ 基因片段, 则为无载体病毒 PRV TK⁻/gE⁻/LacZ⁺ 污染的纯化的目的重组病毒, 命名为 rPRV TK⁻/gE⁻/VP22E⁺/VP22M⁺。

1.2.3.2 Southern blot 检测: 提取并纯化 rPRV TK⁻/gE⁻/VP22E⁺/VP22M⁺ 基因组, 分别用 *Kpn* I 和 *Sal* I 酶切消化后电泳, 再以地高辛标记的 ORF5M 基因作探针进行 Southern blot 杂交检测, 具体操作按地高辛标记与检测试剂盒说明书进行。

1.2.3.3 Western blot 检测: 分别将 rPRV TK⁻/gE⁻/VP22E⁺/VP22M⁺ 和载体病毒 PRV TK⁻/gE⁻/LacZ⁺ 接种 PK-15 细胞, 待 80% 细胞发生病变后, 回收病变细胞, 参照文献[12]制备样品, 经 12% SDS-PAGE 电泳及转膜后, 以抗 PRRSV 的猪高免阳性血清为一抗, HRP 标记的羊抗猪 IgG 为二抗, 进行 Western blot 检测。

1.2.4 重组病毒的体外增殖试验 在 IBRS-2 及 PK-15 细胞上接种 rPRV TK⁻/gE⁻/VP22E⁺/

VP22M⁺和载体病毒 PRV TK⁻/gE⁻/LacZ⁺, 细胞出现病变后收毒, 测定 TCID₅₀ 值, 比较两种病毒在 IBRS-2 及 PK-15 细胞上的增殖滴度^[14]。

1.2.5 动物试验 将 5~6 周龄的雌性 BALB/c 小鼠随机分成 5 组, 每组 8 只小鼠, 分别按每只 10⁵ TCID₅₀/100 μL 的剂量后腿肌肉注射 rPRV TK⁻/gE⁻/VP22E⁺/VP22M⁺、rPRV TK⁻/gE⁻/E⁺/M⁺、rPRV TK⁻/gE⁻/E⁺、PRV TK⁻/gE⁻/LacZ⁺ 以及 DMEM 培养液。共免疫 2 次, 间隔 4 周。首免后第 10 周眼球摘除术采血分离血清, 并无菌操作制备脾淋巴细胞悬液, 按常规方法检测抗 PRRSV 中和抗体及脾淋巴细胞增殖反应^[14,15]。

1.2.6 数据处理 试验所测数据均采用双样本等方差 *t*-检验进行统计分析。

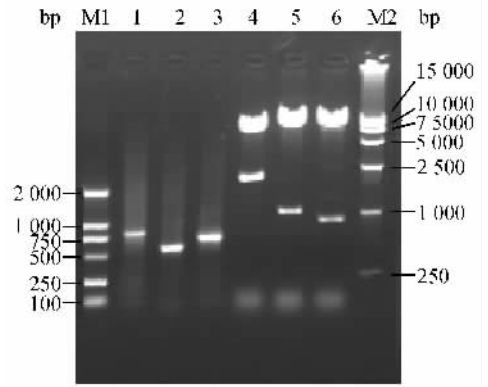
2 结果

2.1 含 VP22-ORF5M 及 VP22-ORF6 融合基因转移质粒的构建

对构建的转移质粒 pIECMV-VP22ORF5M-VP22ORF6 进行 PCR 与酶切鉴定。经 PCR 扩增, 可从该转移质粒扩增到约 780 bp 的 VP22 基因, 约 550bp 的 ORF6 基因, 以及约 650bp 的 ORF5M 基因; 根据该转移质粒上相关的酶切位点, 利用 *Bam*H I 酶切得到约 2.3 kb 及 9.3 kb 的 2 条带, *Xba* I 酶切可得到约 1.0 kb 及 10.6 kb 的 2 条带, *Bgl* II 酶切可得到约 0.8 kb 及 10.8 kb 的 2 条带, 结果均与预期相符(见图 1), 证实构建正确。其结构示意图见图 2 (pBSK 为质粒 pBluescript II SK (+), gD、gI 和 gE 为 PRV 的 gD、gI 和 gE 基因, CMV 为 hCMV 启动子和增强子序列, ORF5M、ORF6 各为 PRRSV ORF5M 及 ORF6 基因, VP22 为 BHV-1 VP22 基因, polyA 为 poly(A) 转录终止信号序列)。

2.2 重组病毒 TK⁻/gE⁻/VP22E⁺/VP22M⁺ 的筛选与纯化

对重组病毒利用蚀斑试验结合 PCR 扩增来筛选及纯化, 结果第 1 代蚀斑阳性率较低, 经过 3 轮蚀斑纯化后, 则获得 100% 阳性重组病毒。再进行一轮蚀斑试验, 随机挑取蚀斑, 采用扩增 VP22、ORF5M、ORF6 及 LacZ 基因的 4 对引物进行 PCR 扩增鉴定。结果所有蚀斑均能扩增到约 780bp 的 VP22 基因、约 650bp 的 ORF5M 基因及约 550 bp 的 ORF6 基因, 但扩增不到约 430bp 的 LacZ 基因



M1. DNA Marker (DL2000); M2. DNA Marker (DL15000); 1. PCR product of VP22 gene from pIECMV-VP22ORF5M-VP22ORF6; 2. PCR product of ORF6 gene from pIECMV-VP22ORF5M-VP22ORF6; 3. PCR product of ORF5M gene from pIECMV-VP22ORF5M-VP22ORF6; 4. pIECMV-VP22ORF5M-VP22ORF6/*Bam*H I; 5. pIECMV-VP22ORF5M-VP22ORF6/*Xba* I; 6. pIECMV-VP22ORF5M-VP22ORF6/*Bgl* II

图 1 转移质粒 pIECMV-VP22ORF5M-VP22ORF6 的鉴定

Fig. 1 Identification of the transfer plasmid pIECMV-VP22ORF5M-VP22ORF6

片段, 而载体病毒 PRV TK⁻/gE⁻/LacZ⁺ 则能扩增出约 430bp 的 LacZ 基因片段(图略)。表明获得了整合有 VP22、ORF5M 及 ORF6 基因, 并且无载体病毒 PRV TK⁻/gE⁻/LacZ⁺ 污染的 rPRV TK⁻/gE⁻/VP22E⁺/VP22M⁺。

2.3 重组病毒 TK⁻/gE⁻/VP22E⁺/VP22M⁺ 的 Southern blot 鉴定

进一步以地高辛标记的 PRRSV ORF5M 基因为探针, 与分别用 *Kpn* I、*Sal* I 酶切的 rPRV TK⁻/gE⁻/VP22E⁺/VP22M⁺ 基因组以及载体病毒 PRV TK⁻/gE⁻/LacZ⁺ 基因组进行 Southern blot 杂交。结果 *Kpn* I、*Sal* I 酶切的 rPRV TK⁻/gE⁻/VP22E⁺/VP22M⁺ 基因组分别在约 5.5 kb 和 7.9 kb 处出现一条特异性的杂交带(图 3), 大小与预期相符。而 PRV TK⁻/gE⁻/LacZ⁺ 基因组无论是用 *Kpn* I 酶切还是用 *Sal* I 酶切均无任何杂交带出现。表明 VP22、ORF5M、ORF6 基因已正确整合到载体病毒的基因组中。

2.4 重组病毒 TK⁻/gE⁻/VP22E⁺/VP22M⁺ 的 Western blot 鉴定

为了检测 VP22 与 ORF5M 及 ORF6 的融合基

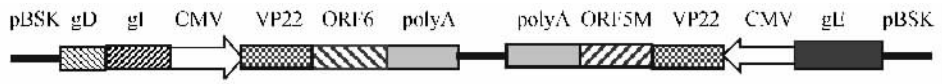
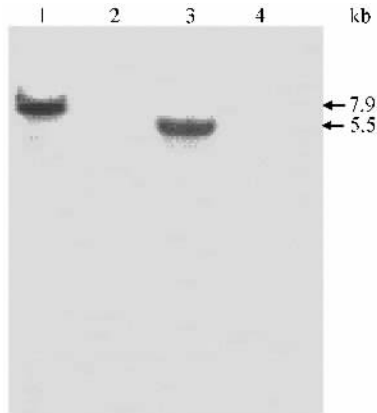


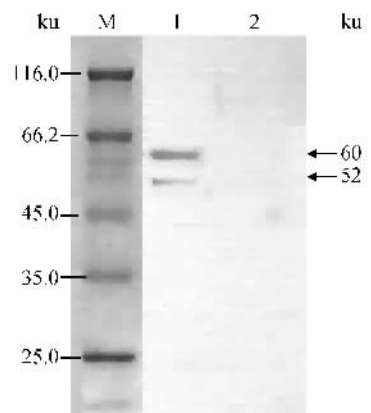
图 2 转移质粒 pIECMV-VP22ORF5M-VP22ORF6 的结构

Fig. 2 Structural mode of the transfer plasmid pIECMV-VP22ORF5M-VP22ORF6



1. $TK^-/gE^-/VP22E^+/VP22M^+/SalI$; 2. $TK^-/gE^-/LacZ^+/SalI$; 3. $TK^-/gE^-/VP22E^+/VP22M^+/KpnI$; 4. $TK^-/gE^-/LacZ^+/KpnI$

图 3 重组病毒的 Southern blot 鉴定

Fig. 3 Identification of rPRV $TK^-/gE^-/VP22E^+/VP22M^+$ by Southern blot

M. Protein marker; 1. $TK^-/gE^-/VP22E^+/VP22M^+$; 2. $TK^-/gE^-/LacZ^+$

图 4 重组病毒的 Western blot 检测

Fig. 4 Identification of rPRV $TK^-/gE^-/VP22E^+/VP22M^+$ by Western blot

因在重组病毒中的表达,将 rPRV $TK^-/gE^-/VP22E^+/VP22M^+$ 及 PRV $TK^-/gE^-/LacZ^+$ 分别接种 PK-15 细胞,产生病变后收集细胞进行处理,以抗 PRRSV 的猪高免阳性血清为一抗,进行 Western blot 检测。结果发现 rPRV $TK^-/gE^-/VP22E^+/VP22M^+$ 在大小约 60ku 及 52ku 处出现特异性条带,与预期的 VP22-E 及 VP22-M 融合蛋白的相对分子质量相当。而 PRV $TK^-/gE^-/LacZ^+$ 没有任何特异性条带出现。证实该 rPRV 能够表达 VP22-E 及 VP22-M 融合蛋白(图 4)。

2.5 重组病毒 $TK^-/gE^-/VP22E^+/VP22M^+$ 在 IBRS-2 及 PK-15 细胞上增殖

在 IBRS-2 细胞上, rPRV $TK^-/gE^-/VP22E^+/VP22M^+$ 及 PRV $TK^-/gE^-/LacZ^+$ 的 $TCID_{50}$ 分别为 $10^{-6.9}/0.1$ mL 及 $10^{-7.2}/0.1$ mL; 在 PK-15 细胞上,则分别为 $10^{-6.5}/0.1$ mL 与 $10^{-6.8}/0.1$ mL,两种病毒在两种细胞中的增殖滴度无显著性差异($P>0.05$)。表明外源基因 VP22、ORF5M 以及 ORF6 的插入不影响重组病毒在体外培养细胞中的增殖。

2.6 重组病毒 $TK^-/gE^-/VP22E^+/VP22M^+$ 诱导的抗 PRRSV 中和抗体水平

利用微量中和试验检测免疫小鼠的抗 PRRSV 中和抗体水平,结果显示 rPRV $TK^-/gE^-/E^+/TK^-/gE^-/E^+/M^+$ 与 $TK^-/gE^-/VP22E^+/VP22M^+$ 免疫组均诱发产生了抗 PRRSV 中和抗体,其中和抗体滴度依次为 $1:(10 \pm 4.897)$ 、 $1:(16 \pm 8.764)$ 、 $1:(20 \pm 9.798)$,其中 $TK^-/gE^-/E^+/M^+$ 诱发的抗 PRRSV 中和抗体滴度与 $TK^-/gE^-/E^+$ 相比差异不显著($P>0.05$),而 $TK^-/gE^-/VP22E^+/VP22M^+$ 诱发的抗 PRRSV 中和抗体滴度与 $TK^-/gE^-/E^+$ 相比差异显著($0.01<P<0.05$)。表明 rPRV $TK^-/gE^-/VP22E^+/VP22M^+$ 具有更好的诱导抗 PRRSV 中和抗体的能力,VP22 可在一定程度上增强 rPRV 的体液免疫反应。亲本毒株 PRV $TK^-/gE^-/LacZ^+$ 以及 DMEM 培养液免疫组均不诱发产生抗 PRRSV 中和抗体。

而检测抗 PRV 的中和抗体,3 种 rPRV 与亲本毒株免疫组间无显著性差异($P>0.05$),中和抗体滴度可达 $1:32 \sim 1:64$ 。

2.7 重组病毒 TK⁻/gE⁻/VP22E⁺/VP22M⁺ 诱导的淋巴细胞增殖反应

淋巴细胞增殖反应试验结果显示, rPRV TK⁻/gE⁻/E⁺、TK⁻/gE⁻/E⁺/M⁺、TK⁻/gE⁻/VP22E⁺/VP22M⁺ 免疫组均表现出明显的淋巴细胞增殖反应, 其刺激指数(SI)依次为 1.425±0.024、1.718±0.070、1.829±0.017, 其中 TK⁻/gE⁻/E⁺/M⁺ 的 SI 值与 TK⁻/gE⁻/E⁺ 免疫组相比差异显著(0.01 < P < 0.05), 而 TK⁻/gE⁻/VP22E⁺/VP22M⁺ 的 SI 值与 TK⁻/gE⁻/E⁺ 免疫组相比差异极显著(P < 0.01)。表明 rPRV TK⁻/gE⁻/VP22E⁺/VP22M⁺ 具有更好的诱导细胞免疫反应的能力, VP22 可在一定程度上增强 rPRV 的细胞免疫反应。亲本毒株 PRV TK⁻/gE⁻/LacZ⁺ 以及 DMEM 培养液免疫组无细胞增殖反应。

3 讨论

ORF5 和 ORF6 是 PRRSV 两个主要的保护性抗原基因^[4, 6]。但基于单独表达 ORF5 基因的 rPRV 诱导的免疫反应低下, 检测不到中和抗体^[16]。根据 PRRSV 与 PRV 分子免疫学及新型高效的免疫增强剂等方面的一些最新研究进展, 通过调整及优化 ORF5 基因结构及在重组病毒设计中引入新型高效的免疫增强剂, 采用 ORF5 及 ORF6 共表达有望增强其构建的 rPRV 的免疫效应。Ostrowski 等^[17]研究发现由于 PRRSV ORF5 基因中和表位紧邻的上游存在一个对中和表位产生覆盖效应的覆盖表位而不能诱导产生较早及较强的中和抗体。江云波等^[5]据此对 ORF5 基因进行了修饰, 获得了结构优化的具有更好免疫原性的修饰型 ORF5 基因(ORF5M)。PRRSV ORF6 编码的 M 蛋白与由 ORF5 编码的 E 蛋白形成 E/M 异源二聚体^[18], 而与 PRRSV 同属动脉炎病毒并在基因组结构与功能都非常相似的马动脉炎病毒(EAV)的 ORF5 与 ORF6 编码的相应蛋白也形成 E/M 异源二聚体, 它可极大地促进 E 蛋白短肽的 MHC 复合体从内质网向高尔基体转运而增强机体的免疫反应, 同时共表达 EAV 的 E 与 M 蛋白的重组病毒疫苗能诱发很强的体液与细胞免疫反应, 并能提供强毒攻击的保护^[19]。蛋白转导的发现为进一步增强重组病毒表达的外源蛋白的免疫原性提供了一条新的途径。BHV-1 VP22 是蛋白转导相关蛋白^[7], 它能将与之融合的外源蛋白在无任何辅助条件介导下从表达细

胞直接通过细胞膜进入邻近的非表达细胞, 并可在周围细胞之间传递, 而且被转导进入细胞内的外源蛋白仍保留其原有的生物学活性与功能, 同时这种蛋白转导具有快速、高效、负载能力大、不损伤细胞等特点^[8, 20, 21]。因此, BHV-1 VP22 较之其它免疫佐剂有着更加有效的增强免疫抗原递呈的途径。已有报道证实将 VP22 与靶抗原基因融合表达可增强活病毒载体疫苗的免疫效果^[21, 22]。并已证实 BHV-1 VP22 是具有蛋白转导功能的 a 疱疹病毒 VP22 同源物中极具开发潜力的蛋白转导疫苗免疫增强剂^[23]。由于目前国际上通用 gE 缺失(gE⁻)表型的 PRV 基因缺失标志疫苗, 为便于进行配套的区别 PRV 野毒感染或疫苗免疫的强弱毒鉴别诊断, 本研究所用的载体病毒是 gE⁻表型的 PRV TK⁻/gE⁻/LacZ⁺ 疫苗株^[9]及与之配套的由 hCMV 驱动的 gE/gI 双缺失的 PRV 通用转移载体 pIEC-MV^[10]。可利用载体病毒 gE 基因中插入的 LacZ 基因单一 EcoRI 酶切位点来消化载体病毒基因组以提高重组效率。同时利用了目前公认为最强的病毒启动子 hCMV 以保证插入的外源基因能在 rPRV 中更有效地转录和翻译。

本研究构建了共表达与 BHV-1 VP22 融合的 PRRSV ORF5M 与 ORF6 基因的 rPRV TK⁻/gE⁻/VP22E⁺/VP22M⁺。Western blot 检测证实与 VP22 融合的 E 及 M 蛋白获得表达, 而且外源基因 VP22、ORF5M 及 ORF6 的插入不影响病毒的增殖。动物试验结果显示, 该 rPRV 可诱导免疫小鼠产生特异性体液与细胞免疫反应, 而且 rPRV TK⁻/gE⁻/VP22E⁺/VP22M⁺ 比 rPRV TK⁻/gE⁻/E⁺/M⁺ 和 rPRV TK⁻/gE⁻/E⁺ 诱导免疫小鼠产生更强的特异性体液与细胞免疫反应, VP22 可在一定程度上增强 rPRV 的免疫反应, 提示 BHV-1 VP22 发挥了佐剂效应。本研究为研制有效的 PRRS 和 PR 二价基因工程疫苗奠定了基础, 同时也为其它疾病的基因工程疫苗研究提供了思路。

参考文献:

- [1] 仇华吉, 童光志. PRRS 免疫防制面临的困惑与未来[J]. 中国兽医学报, 2000, 20(1): 100~103.
- [2] Madsen K G, Hansen C M, Madsen E S, et al. Sequence analysis of porcine reproductive and respiratory syndrome virus of the American type collected from Danish swine herds[J]. Arch Virol, 1998, 143: 1 683

~1 700.

- [3] Nielson T L, Nielsom J, Have P, *et al.* Examination of virus shedding in semen from vaccinated and from previously infected boars after experimental challenge with porcine reproductive and respiratory syndrome virus [J]. *Vet Microbio*, 1997, 54: 101~112.
- [4] Weiland E, Wiczorek-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[J]. *Vet Microbio*, 1999, 66: 171~186.
- [5] 江云波, 方六荣, 肖少波, 等. 修饰的 ORF5 基因增强猪繁殖与呼吸综合征 DNA 疫苗的体液免疫[J]. *中国兽医学报*, 2005, 25(1):1~3.
- [6] Bautista E M, Suarez P, Molitor T W. T cell responses to the structural polypeptides of porcine reproductive and respiratory syndrome virus[J]. *Arch Virol*, 1999, 144:117~134.
- [7] Harms J S, Ren X, Oliveira S C, *et al.* Distinctions between bovine herpesvirus 1 and herpes simplex virus type1 VP22 tegument protein subcellular associations [J]. *J Virol*, 2000, 74: 3 301~3 312.
- [8] Elliott G, O' Hare P. Intercellular trafficking and protein delivery by a herpesvirus structural protein[J]. *Cell*, 1997, 88(2): 223~233.
- [9] 刘正飞, 陈焕春, 何启盖, 等. 伪狂犬病病毒 Ea 株 TK⁻/gE⁻/gp63⁻突变株的构建及其生物学特性研究 [J]. *微生物学报*, 2002, 42(3): 370~374.
- [10] 方六荣. 猪繁殖与呼吸综合征“自杀性”DNA 疫苗与活病毒载体疫苗研究 [D]. 武汉: 华中农业大学, 2003.
- [11] 余晓岚, 肖少波, 方六荣, 等. 牛疱疹病毒 I 型 UL49 (VP22) 基因的序列分析及其表达[J]. *中国病毒学*, 2003, 18(2): 104~107.
- [12] 萨姆布鲁克 J, 弗里奇 E F, 曼尼阿蒂斯 T, 著. 分子克隆实验指南[M]. 金冬雁, 黎孟枫, 等译. 第 2 版. 北京: 科学出版社, 1996.
- [13] Mettenleiter T C. Pseudorabies (Aujeszky's disease) virus; State of the art[J]. *Vet Res*, 2000, 33(1): 99~115.
- [14] 殷 震, 刘景华. 动物病毒学[M]. 第 2 版. 北京: 科学出版社, 1997.
- [15] Xiao S B, Chen H C, Fang L R, *et al.* Comparison of immune responses and protective efficacy of suicidal DNA vaccine and conventional DNA vaccine encoding glycoprotein C of pseudorabies virus in mice[J]. *Vaccine*, 2004, 22: 345~351.
- [16] 方六荣, 肖少波, 江云波, 等. 表达猪繁殖与呼吸综合征病毒 (PRRSV) GP5 的重组伪狂犬病毒 TK⁻/gG⁻/GP5⁺ 的构建及其生物学特性初步探讨[J]. *病毒学报*, 2004, 20(3): 250~254.
- [17] Ostrowski M, Galeota J A, Jar A M, *et al.* Identification of neutralizing and nonneutralizing epitopes in the porcine reproductive and respiratory syndrome virus GP5 ectodomain[J]. *J Virol*, 2002, 76: 4 241~4 250.
- [18] Mardassi H, Massie B, Dea S. Intracellular synthesis, processing and transport of proteins encoded by ORFs 5 to 7 of porcine reproductive and respiratory syndrome virus[J]. *Virology*, 1996, 221(1): 98~112.
- [19] Balasuriya U B, Heidner H W, Davis N L, *et al.* Alphavirus replicon particles expressing the two major envelope proteins of equine arteritis virus induce high level protection against challenge with virulent virus in vaccinated horses [J]. *Vaccine*, 2002, 20:1 609~1 617.
- [20] Kretz A, Wybranietz W A, Hermening S, *et al.* HSV-1 VP22 augments adenoviral gene transfer to CNS neurons in the retina and striatum *in vivo* [J]. *Mol Ther*, 2003, 7: 659~669.
- [21] Wills K N, Atencio I A, Avanzini J B, *et al.* Intratumoral spread and increased efficacy of a p53-VP22 fusion protein expressed by a recombinant adenovirus [J]. *J Virol*, 2001, 75: 8 733~8 741.
- [22] Chen W F, Hung C F, Hsu K F, *et al.* Cancer immunotherapy using Sindbis virus replicon particles encoding a VP22-antigen fusion [J]. *Hum Gene Ther*, 2002, 13: 553~568.
- [23] 宋云峰, 肖少波, 金梅林, 等. 猪 2 型圆环毒核酸疫苗免疫效应研究 [J]. *畜牧兽医学报*, 2005, 36 (10): 1 049~1 054.