

基因枪轰击不同剂量小鹅瘟病毒 VP3 基因疫苗在雏鹅体内的动态分布

黎敏¹, 程安春^{1,2*}, 汪铭书^{1,2*}, 韩新锋¹, 刘晓东¹, 卢菲¹, 车茜¹, 陈孝跃^{1,2}

(1. 四川农业大学动物医学院禽病防治中心, 雅安 625014; 2. 动物疫病与人类健康四川省重点实验室, 雅安 625014)

摘要: 本文开展了检测小鹅瘟病毒(GPV)VP3 基因的实时荧光定量 PCR(FQ-PCR)方法的建立和基因枪轰击不同剂量(1, 3 和 6 μg)GPV-VP3 基因疫苗(pcDNA-GPV-VP3)在 30 日龄四川白鹅体内(心、肝、脾、肺、肾、法氏囊、胸腺、哈氏腺、十二指肠、空肠、回肠、直肠、盲肠、胰腺、血液、脑及注射部位皮肤)分布规律的研究。结果表明:①建立的 FQ-PCR 特异性强、灵敏度高、重复性好, 核酸模板数与 FQ-PCR 测定的 Ct 值相关系数达到 0.999, 具有很好的直线相关性;②pcDNA-GPV-VP3 各剂量免疫雏鹅 1 h 即可在各组织中检测到, 其中注射部位含量最高, 肝、肾、淋巴器官(脾、法氏囊、胸腺、哈氏腺)含量较高;③到免疫后 217 d 时, 1 μg 组免疫雏鹅各个组织器官内仍检测到 pcDNA-GPV-VP3 的存在, 但多数组织器官中的含量比 1 h 时约少了 4 个数量级, 其中免疫部位减少了 7 个数量级;④血液中 pcDNA-GPV-VP3 的含量较少, 且免疫后 1 h~217 d 各时间点的差异不显著($P \geq 0.05$);⑤不同剂量 pcDNA-GPV-VP3 免疫雏鹅各组织中的含量呈现的总体规律为 6 μg 组 > 3 μg 组 > 1 μg 组, 但差异不显著($P \geq 0.05$)。因此, FQ-PCR 是定量检测 pcDNA-GPV-VP3 在免疫雏鹅体内含量的可靠方法, pcDNA-GPV-VP3 免疫雏鹅后 1 h 时可分布至雏鹅体内各组织器官中并持续存在 217 d 以上。

关键词: FQ-PCR; pcDNA-GPV-VP3; 基因枪; 雏鹅; 动态分布

中图分类号: S858.335.3

文献标识码: A

文章编号: 0366-6964(2007)11-1204-07

Dynamic Distribution of GPV-VP3 Gene Vaccine in Geese Vaccinated with Gene-gun Bombardment

LI Min¹, CHENG An-chun^{1,2*}, WANG Ming-shu^{1,2*}, HAN Xin-feng¹,

LIU Xiao-dong¹, LU Fei¹, CHE Qian¹, CHEN Xiao-yue^{1,2}

(1. Avian Disease Research Center, College of Veterinary Medicine, Sichuan Agricultural University, Yaan 625014, China; 2. Key Laboratory of Animal Disease and Human Health of Sichuan Province, Yaan 625014, China)

Abstract: This paper concentrates on developing the Real-time PCR method for detecting GPV-VP3 gene and studying the dynamic distribution of GPV-VP3 gene vaccine (pcDNA-GPV-VP3) in geese (duodenum, liver, spleen, kidney, bursa of Fabricius, thymus, ileum, cecum, pancreas, heart, blood, jejunum, lung, gland of Harder, skin of injected spot, rectum and brain). Ninety 30-day-old geese were divided into 5 groups. Animals in pcDNA-GPV-VP3 inoculation groups were injected via gene-gun with different doses (1, 3, 6 μg), respectively. Results showed that: ① This assay was specific, highly sensitive and rapid for detecting pcDNA-GPV-VP3. The standard curve showed a good linear relationship between Ct and template concentrations, and the correlation coefficient was 0.999. ② The pcDNA-GPV-VP3 could be detected in all tissues and pe-

收稿日期: 2006-11-30

基金项目: 国家科技攻关重大项目(2004BA901A03); 教育部“新世纪优秀人才支持计划”项目(NCET-04-0906); 四川省重大基础研究项目(05JY029-109); 四川省重点建设学科项目(SZD0418)

作者简介: 黎敏(1982-), 女, 四川成都人, 硕士生, 主要从事禽病学研究工作, 韩新锋对本文贡献相同, 并列第一作者

* 通讯作者: 程安春、汪铭书, TEL/FAX: 0835-2885774, E-mail: chenganchun@vip.163.com

ripheral blood 1 h post immunization. The copy numbers were most at the skin of injected spots, then liver, kidney, lymphoid organ (spleen, bursa of Fabricius, thymus, gland of Harder). ③ After 217 d post-administration, pcDNA-GPV-VP3 could still be detected in tissues of 1 μg dose group. But the copy numbers decreased about 10^4 copies in the most tissues than that at 1 h post administration, the obvious decrease of pcDNA-GPV-VP3 was found at the injection sites (it dropped about 10^7 copies). ④ The copy numbers in the serum were always little and changed not obvious with the time ($P \geq 0.05$). ⑤ Different dosage groups of pcDNA-GPV-VP3 distributed in the geese tissues did not significantly differ from each other ($P \geq 0.05$), the 6 μg group had the highest copy numbers, then the 3 μg group, and the 1 μg group had the lowest. The results demonstrated that FQ-PCR was a reliable method for detecting dynamic distribution of pcDNA-GPV-VP3, and pcDNA-GPV-VP3 could distribute in all tissues of geese 1 h post immunization, and exist in those at least 217 days post immunization.

Key words: FQ-PCR; pcDNA-GPV-VP3; gene-gun; geese; dynamic distribution

小鹅瘟病毒(Goose parvovirus, GPV)感染是危害养鹅业的主要传染病之一,目前免疫预防小鹅瘟主要是使用弱毒疫苗免疫种鹅,使下一代雏鹅获得被动免疫保护,或直接对雏鹅注射特异血清提供被动免疫保护^[1],这种免疫手段无法区别 GPV 自然感染和人工免疫产生的特异抗体,为预防乃至消灭小鹅瘟的危害造成一定的困难,而基因疫苗技术为解决此难题提供了可行途径^[2,3]。基因疫苗是将编码某种抗原蛋白的外源基因直接导入机体细胞内,通过宿主细胞的转录系统合成抗原蛋白,转录合成的抗原蛋白可诱发机体产生保护性中和抗体,达到预防和治疗疾病的目的,具有制作简单、价格低廉^[4]等优点。VP3 是 GPV 主要的免疫原性蛋白,是用于构建 GPV 基因疫苗的理想基因^[5],本实验室以 VP3 基因为目的基因构建了小鹅瘟病毒 VP3 基因疫苗(pcDNA-GPV-VP3)并建立了能够特异检测 pcDNA-GPV-VP3 的 TaqMan 探针实时荧光定量 PCR (FQ-PCR)。本文用 FQ-PCR 方法检测 pcDNA-GPV-VP3 以不同剂量通过基因枪轰击 30 日龄四川白鹅后在鹅体内的动态分布规律,以期为进一步研究和阐明 pcDNA-GPV-VP3 免疫发生机理、免疫持续期提供基础数据。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 质粒与菌株 pcDNA3.1(+)质粒,Invitrogen 产品;大肠杆菌 JM109 由本实验室保存;pcDNA-GPV-VP3,为 GPV 的 VP3 基因正向插入 pcDNA3.1(+)多克隆位点中的真核表达质粒,由

本实验室构建。pcDNA-GPV-VP3 按常规方法转化 JM109 得到重组菌株,参照文献[6]采用碱裂解法大量制备并经聚乙二醇-MgCl₂法纯化。

1.1.2 实验动物 30 日龄健康四川白鹅,由四川农业大学家禽繁殖育种实验场提供,免疫扩散反应检测 GPV 抗体为阴性。

1.1.3 仪器设备和试剂 荧光实时定量 PCR 仪(Bio-Rad, iCycler iQ),基因枪(PDS 1000/He System 型, Bio-Rad),台式高速冷冻离心机(Beckman Coulter Allegra 21R),定量 PCR 热启动酶(TaKa-Ra Ex TaqTM R-PCR Version 2.1)、蛋白酶 K、SDS、Tris 饱和酚等均购自大连宝生物公司,硅胶膜型质粒 DNA 抽提试剂盒购自北京赛百盛基因技术有限公司。

1.2 方法

1.2.1 引物、探针设计与合成 根据 Zadori 等 1995 年发布的 GPV B 株基因组全序列的 VP3 基因片段作为扩增靶区,用 Primer express 2.0 软件设计引物和 TaqMan 探针。上游引物:5'-GTGC-CGATGGAGTGGGTAAT-3';下游引物:5'-ACT-GTGTTCATCCATTGG-3';TaqMan 探针:5'-FTCGCAATGCCAATTTCCCGAGGP-3'。

扩增目的片段为 60 bp,引物、探针由上海基康生物有限公司合成。

1.2.2 TaqMan 探针荧光定量 PCR 检测 pcDNA-GPV-VP3 方法的建立

1.2.2.1 标准阳性模板的制备:将培养过夜含 pcDNA-GPV-VP3 的 JM109 使用硅胶膜型质粒 DNA 抽提试剂盒抽提 pcDNA-GPV-VP3。经核酸

蛋白检测仪测定和按文献[7]方法计算,提取质粒的 $OD_{260}/OD_{280} > 1.8$,浓度为 $2 \mu\text{g}/\mu\text{L}$ (2.76×10^{11} 拷贝/ μL), -20°C 保存备用。

1.2.2.2 反应条件的优化:对荧光定量 PCR 反应的探针浓度、酶量和 Mg^{2+} 浓度进行筛选优化,以得到最佳的反应条件。

1.2.2.3 特异性、灵敏性和重复性检测:特异性,对本实验室保存的鸭瘟病毒(DPV-SC1 株)、鹅细小病毒(GPV-SCv 株)、空载体、正常鹅组织 DNA 和标准阳性模板进行荧光定量 PCR;灵敏性,将已计算出拷贝数的标准品按 10 倍梯度稀释,荧光定量 PCR 检测,计算出荧光定量 PCR 所能检出的最低模板拷贝数;重复性,对同一份标准品分别进行 5 次检测,对检测结果进行统计学分析。

1.2.2.4 标准曲线的建立:以 10 倍梯度稀释已知拷贝数的标准样品为模板,以优化好的反应条件进行定量 PCR 检测,由 iCycler IQ Optical Detection System Software9(Version 3.1)计算得到绝对定量标准曲线。

1.2.3 动物的免疫接种及组织样品的采集 将 90 只四川白鹅随机分为 5 组,18 只/组。第 1 组为大剂量免疫组,每只基因枪注射 $6 \mu\text{g}$ pcDNA-GPV-VP3;第 2 组为中剂量免疫组,每只基因枪注射 $3 \mu\text{g}$ pcDNA-GPV-VP3;第 3 组为小剂量免疫组,每只基因枪注射 $1 \mu\text{g}$ pcDNA-GPV-VP3;第 4 组为空载体对照组,每只注射 $100 \mu\text{g}$ 空载体 pcDNA3.1(+);第 5 组为空白对照组,每只注射 $100 \mu\text{L}$ 生理盐水。

在免疫后 1 h、12 h、1 d、3 d、7 d、21 d、35 d、63 d、105 d 和 217 d 每组分别随机宰杀 2 只鹅,取心、肝、脾、肺、肾、法氏囊、胸腺、哈氏腺、十二指肠、空肠、回肠、直肠、盲肠、胰腺、血液、脑及注射部位皮肤放入灭菌离心管中, -20°C 保存备用。

1.2.4 模板 DNA 的提取 参照文献[6]报道的方法进行血液和组织总 DNA 的提取:(1)组织样品:取 0.5 g 样品放入离心管中,机械法捣碎,加入 TE 稀释,反复冻融 3 次, 4°C $10\ 000$ r/min 离心 5 min,取上清加入 1/10 体积 10% SDS、1/100 体积蛋白酶 K(10 mg/mL),于 56°C 消化过夜;酚-氯仿抽提, $20 \mu\text{L}$ TE 溶解核酸, -20°C 保存备用。(2)血液样品:取 $100 \mu\text{L}$ 抗凝全血与 0.9 mL TE 混合; $14\ 000$ r/min 离心 50 s,去上清,沉淀用 0.9 mL TE 悬浮,离心洗涤 3 次;用 $500 \mu\text{L}$ TE 悬浮沉淀,其余步骤同组织样品中模板 DNA 的提取。

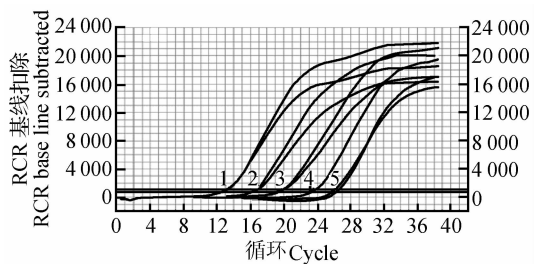
1.2.5 pcDNA-GPV-VP3 在雏鹅体内各组织器官中分布规律的检测 取 1.2.4 中提取的各组织 DNA 模板 $2 \mu\text{L}$ 进行定量 PCR 检测,每次 PCR 反应均设阴性对照。获得模板的 Ct 值,通过标准曲线换算出 pcDNA-GPV-VP3 拷贝数的平均对数值(\log 拷贝/ 0.5 g)。血液的检测结果为每 $100 \mu\text{L}$ 中含 pcDNA-GPV-VP3 拷贝数的平均对数值(\log 拷贝/ $100 \mu\text{L}$)。所得数据用 SPSS12.0 进行统计学分析。

2 结果

2.1 TaqMan 探针荧光定量 PCR 检测 pcDNA-GPV-VP3 方法的建立

2.1.1 反应条件 经优化和筛选,得到荧光定量 PCR 的最佳条件: $5 \times \text{PCR Buffer}$ $5 \mu\text{L}$,dNTPs(10 mmol/L) $0.75 \mu\text{L}$, MgCl_2 (250 mmol/L) $1 \mu\text{L}$,上、下游引物($10 \mu\text{mol/L}$)各 $0.5 \mu\text{L}$,TaqMan 探针($10 \mu\text{mol/L}$) $0.4 \mu\text{L}$,Taq 酶($5 \text{ U}/\mu\text{L}$) $0.25 \mu\text{L}$,模板 $2 \mu\text{L}$,补灭菌超纯水至 $25 \mu\text{L}$ 。 95°C 预变性 3 min; 94°C 变性 30 s, 60°C 退火延伸 30 s,共进行 40 个循环。

2.1.2 标准曲线 以 10 倍梯度稀释已知拷贝数的标准模板进行定量 PCR 检测,结果见图 1。标准品 10 倍稀释定量 PCR 扩增曲线的 Ct 值之间的差异为 3.3 左右,能够满足定量 PCR 反应的要求。经计算,标准曲线如图 2 所示,表达式为 $Y = -3.353X + 41.084$,相关系数为 0.999。



1. 10^{-3} Ct: 12.7; 2. 10^{-4} Ct: 16.2; 3. 10^{-5} Ct: 19.4; 4. 10^{-6} Ct: 22.9; 5. 10^{-7} Ct: 26.1

图 1 实时荧光定量 PCR 法对 10 倍系列稀释标准品质粒的检测

Fig. 1 Detection results of the plasmid with 10 fold serial dilutions by the real-time PCR assay

2.1.3 方法的特异性、灵敏性和重复性 经检测,该方法特异性、灵敏度和重复性均较好。

特异性:鹅细小病毒样品和标准阳性模板中出

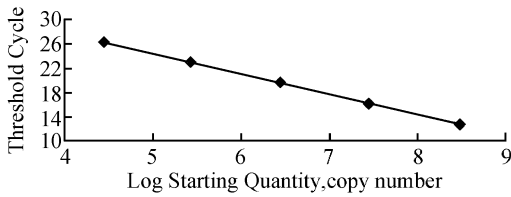


图 2 实时荧光定量 PCR 标准曲线

Fig. 2 Standard curve of real-time FQ-PCR generated by the iCycler software

现特异性扩增,而在鸭瘟病毒、空载体和正常鹅组织对照组中均未出现扩增。

灵敏性:能检测出 pcDNA-GPV-VP3 的最低拷贝数为 100。

重复性:对同一份标准品分别进行 5 次检测,变异系数(CV)为 0.01。

2.2 pcDNA-GPV-VP3 免疫后雏鹅的临床表现

雏鹅基因枪注射 pcDNA-GPV-VP3 后,行为、精神、食欲未见异常。对免疫后不同时间各组雏鹅

进行剖解,各器官无眼观病变。

2.3 pcDNA-GPV-VP3 在雏鹅体内的分布

pcDNA-GPV-VP3 以不同剂量通过基因枪注射 30 日龄四川白鹅后在雏鹅体内的分布见表 1。免疫后 1 h~217 d,各剂量免疫雏鹅的各组织器官中均检测到 pcDNA-GPV-VP3,而空白对照组和空载体对照组的各组织器官所有时间点未能检测到。

2.3.1 pcDNA-GPV-VP3 的组织分布规律 免疫后 1 h 时各剂量组各个组织器官内分布情况见表 1。1 h 各剂量免疫组雏鹅各组织器官中 pcDNA-GPV-VP3 含量最多的组织依次为免疫部位、肝、肾和各淋巴器官;其中免疫部位中 pcDNA-GPV-VP3 的拷贝数比其它组织器官多 1~2 个数量级;各肠段中 pcDNA-GPV-VP3 的含量无明显的差异 ($P \geq 0.05$);血液含量最少,脑次之。12 h~217 d,各组织中 pcDNA-GPV-VP3 含量随时间推移差距越来越小。

表 1 pcDNA-GPV-VP3 不同剂量免疫鹅后在各组织中含量的动态分布

Table 1 The distribution and quantity of pcDNA-GPV-VP3 in different tissues of geese

组织 Tissues	免疫剂量 Inoculated doses	时间 Time										
		1 h	12 h	1 d	3 d	7 d	21 d	35 d	63 d	105 d	217 d	
心 Heart	6 μ g	7.528 184	7.408 888	6.901 879	6.0369 82	5.858 038	5.858 038	5.500 149	5.380 853	4.844 02	4.545 78	
	3 μ g	7.021 175	6.365 046	6.096 63	6.066 806	5.858 038	5.649 269	5.201 909	4.873 844	4.635 252	4.426 484	
	1 μ g	6.633 463	6.305 398	5.917 686	5.619 445	5.529 973	5.291 381	4.993 14	4.963 316	4.694 9	4.247 54	
肝 Liver	6 μ g	8.601 849	7.408 888	6.961 527	6.484 342	6.036 982	5.947 51	5.9176 86	5.679 093	5.470 325	5.380 853	
	3 μ g	8.005 368	7.349 239	7.021 175	6.365 046	5.828 214	5.679 093	5.529 973	5.201 909	5.082 613	4.635 252	
	1 μ g	7.349 239	6.722 935	6.186 102	5.887 862	5.649 269	5.589 621	5.172 085	5.022 965	4.933 492	4.635 252	
脾 Spleen	6 μ g	7.617 656	6.693 111	6.424 694	6.305 398	6.066 806	5.738 741	5.708 917	5.380 853	4.933 492	4.784 372	
	3 μ g	7.517 344	6.514 166	6.186 102	6.126 454	5.858 038	5.619 445	5.291 381	5.172 085	4.933 492	4.814 196	
	1 μ g	7.349 239	6.245 75	6.156 278	6.036 982	5.440 501	5.291 381	4.963 316	5.291 381	4.903 668	4.694 9	
肺 Lung	6 μ g	7.408 888	6.901 879	6.484 342	6.305 398	6.096 63	5.9176 86	5.500 149	5.380 853	4.873 844	4.605 428	
	3 μ g	7.080 823	6.633 463	6.454 518	6.215 926	6.036 982	5.828 214	5.291 381	5.112 437	5.112 437	4.337 012	
	1 μ g	6.752 759	6.156 278	6.036 982	5.828 214	5.708 917	5.470 325	5.142 261	4.873 844	4.784 372	3.859 827	
肾 Kidney	6 μ g	7.945 723	7.050 999	6.722 935	6.514 166	6.036 982	5.917 686	5.649 269	5.231 733	4.635 252	4.426 484	
	3 μ g	7.826 424	6.842 231	6.424 694	6.156 278	5.887 862	5.410 677	5.410 677	4.426 484	4.247 54	4.366 836	
	1 μ g	7.289 591	6.722 935	6.573 814	6.275 574	6.215 926	5.768 565	5.231 733	4.635 252	4.217 715	3.979 123	
胸腺 Thymus	6 μ g	7.975 544	6.394 87	6.365 046	6.215 926	6.215 926	5.858 038	5.470 325	4.963 316	4.784 372	4.575 604	
	3 μ g	7.349 239	6.365 046	5.917 686	5.887 862	5.887 862	5.470 325	5.291 381	4.844 02	4.665 076	4.635 252	
	1 μ g	6.991 351	6.573 814	5.947 51	5.738 741	5.619 445	5.500 149	5.291 381	4.694 9	4.635 252	4.247 54	
十二指肠 Duodenn	6 μ g	7.080 823	6.663 287	6.663 287	6.245 75	6.186 102	5.440 501	4.873 844	4.545 78	4.486 132	4.366 836	
	3 μ g	6.901 879	5.977 334	5.977 334	5.917 686	5.380 853	5.291 381	5.082 613	4.694 9	4.366 836	3.949 299	
	1 μ g	6.454 518	6.186 102	5.738 741	5.738 741	5.440 501	5.261 557	4.515 956	4.277 364	4.158 067	3.710 707	

上接表 3

空肠 Jejunum	6 μg	6.931 703	6.633 463	6.573 814	6.454 518	6.156 278	5.738 741	5.052 789	4.545 78	4.396 66	4.307 188
	3 μg	6.693 111	6.514 166	6.066 806	6.036 982	5.887 862	5.559 797	5.142 261	4.605 428	4.396 66	4.277 364
	1 μg	6.484 342	6.394 87	6.007 158	5.858 038	5.589 621	5.172 085	4.993 14	4.366 836	4.128 243	4.098 419
回肠 Ileum	6 μg	6.961 527	6.633 463	6.454 518	6.156 278	6.036 982	5.231 733	5.112 437	4.635 252	4.396 66	4.337 012
	3 μg	6.901 879	6.514 166	6.275 574	6.036 982	5.858 038	5.231 733	5.142 261	4.933 492	4.694 9	4.277 364
	1 μg	6.663 287	6.394 87	6.156 278	5.887 862	5.708 917	5.351 029	5.052 789	4.724 724	4.486 132	4.098 419
盲肠 Cecum	6 μg	6.901 879	6.335 222	6.036 982	5.947 51	5.947 51	5.589 621	5.321 205	5.142 261	4.933 492	4.545 78
	3 μg	6.752 759	6.275 574	6.126 454	6.036 982	5.679 093	5.500 149	5.172 085	4.933 492	4.545 78	4.396 66
	1 μg	6.663 287	6.156 278	5.887 862	5.589 621	5.589 621	5.351 029	4.873 844	4.694 9	4.366 836	4.158 067
直肠 Rectum	6 μg	7.229 943	7.080 823	6.7229 35	6.394 87	6.096 63	5.887 862	5.321 205	5.321 205	4.545 78	3.889 651
	3 μg	6.842 231	6.693 111	6.394 87	6.186 102	5.768 565	5.529 973	5.201 909	4.963 316	4.396 66	3.830 003
	1 μg	6.812 407	6.573 814	6.186 102	5.559 797	5.231 733	5.619 445	4.635 252	4.396 66	4.068 595	3.800 179
法氏囊 Bursa of Fabricius	6 μg	7.617 656	6.901 879	6.484 342	6.036 982	6.007 158	5.917 686	5.231 733	5.022 965	4.665 076	4.128 243
	3 μg	7.349 239	6.573 814	6.543 99	6.305 398	6.096 63	5.708 917	5.351 029	4.694 9	4.635 252	4.366 836
	1 μg	7.319 415	6.454 518	6.215 926	5.917 686	5.887 862	5.351 029	5.082 613	4.486 132	4.366 836	4.098 419
免疫部位 Skin of injection	6 μg	7.915 896	7.289 591	6.633 463	6.394 87	6.275 574	6.066 806	5.947 51	4.873 844	4.724 724	4.426 484
	3 μg	7.677 304	6.663 287	6.424 694	6.275 574	6.036 982	5.887 862	5.589 621	4.635 252	4.396 66	4.098 419
	1 μg	7.528 184	6.543 99	6.275 574	5.798 39	5.589 621	5.679 093	5.380 853	4.366 836	3.830 003	3.621 235
胰腺 Pancreas	6 μg	7.050 999	6.722 935	6.573 814	6.186 102	5.887 862	5.708 917	5.649 269	5.112 437	4.665 076	4.337 012
	3 μg	6.901 879	6.484 342	6.126 454	5.858 038	5.619 445	5.619 445	5.589 621	4.903 668	4.605 428	4.307 188
	1 μg	6.961 527	6.424 694	6.186 102	5.828 214	5.619 445	5.291 381	5.142 261	4.784 372	4.545 78	3.800 179
脑 Brain	6 μg	6.693 111	7.736 952	6.782 583	6.693 111	6.543 99	6.305 398	6.096 63	5.440 501	5.231 733	4.724 724
	3 μg	6.424 694	7.289 591	6.603 639	6.663 287	6.126 454	5.828 214	5.768 565	5.440 501	5.022 965	4.605 428
	1 μg	6.305 398	6.901 879	6.365 046	6.305 398	5.798 39	5.768 565	5.589 621	5.291 381	4.694 9	4.426 484
哈氏腺 Gland of Harder	6 μg	7.528 184	6.782 583	6.693 111	6.365 046	6.275 574	6.036 982	5.917 686	5.470 325	5.380 853	4.694 987
	3 μg	7.379 064	6.752 759	6.693 111	6.305 398	6.186 102	5.917 686	5.172 085	4.933 492	4.665 076	4.426 484
	1 μg	7.140 471	6.663 287	6.484 342	6.215 926	6.096 63	5.768 565	5.619 445	4.635 252	4.426 484	4.038 771
血 Blood	6 μg	6.215 926	5.261 557	5.142 261	5.142 261	4.754 548	4.635 252	4.635 252	4.575 604	4.396 66	4.187 891
	3 μg	6.007 158	5.082 613	5.022 965	4.993 14	4.515 956	4.515 956	4.486 132	4.366 836	4.038 771	3.770 355
	1 μg	5.947 51	5.679 093	4.575 604	4.515 956	4.456 308	4.456 308	4.426 484	4.277 364	4.008 947	3.889 651

组织中数值以“平均对数值 log copies/0.5 g”表示;血液中数据以“平均对数值 log copies/100 μL ”表示

In tissues the data is given as “log copies/0.5 g”; in blood, the data is given as “log copies/100 μL ”

2.3.2 pcDNA-GPV-VP3 的时间分布规律 3 个剂量免疫组雏鹅除脑和血液外的所有组织器官在免疫后 1 h 时 pcDNA-GPV-VP3 含量最高,脑在 12 h 时 pcDNA-GPV-VP3 含量才达到最大值。随后的时间段里所有组织中的 pcDNA-GPV-VP3 拷贝数逐渐降低,到 217 d 时 1 μg 组免疫组雏鹅的各个组织器官内仍检测到 pcDNA-GPV-VP3 的存在,但含量比 1 h 时约少了 4 个数量级;其中以 3-7 d 期间下降的速度较快,约下降了 1 个数量级;pcDNA-GPV-VP3 在免疫部位拷贝数下降得最多,1 h-217 d 期间下降了约 7 个数量级,105 d 时免疫部位中的含量是各组织器官中最低的。血液中 pcDNA-GPV-VP3

的含量一直较少,且数量降低不明显,差异不显著 ($P \geq 0.05$)。

2.3.3 不同免疫剂量的 pcDNA-GPV-VP3 在组织器官中的含量 不同剂量免疫组各组织器官的含量呈现的总体规律为 6 μg 组 > 3 μg 组 > 1 μg 组,但差异不显著 ($P \geq 0.05$)。

3 讨论和小结

3.1 FQ-PCR 检测基因疫苗在体内动态分布的优势

FQ-PCR 检测技术是在常规 PCR 基础上发展起来的核酸定量技术,被认为是目前对 DNA 模板

进行准确定量重复性最好的方法,具有特异性强、有效解决 PCR 污染问题、自动化程度高、灵敏度高等优点^[7,8]。目前常用检测基因疫苗分布的方法主要有原位杂交、免疫组化、常规 PCR、放射性或荧光标记检测技术等,这些方法各有优势,但共同的不足是不能对核酸进行准确定量。本试验数据表明此次建立的 FQ-PCR 具有特异性强、灵敏度高、重复性好等特点,为定量检测 pcDNA-GPV-VP3 在雏鹅体内的动态分布规律提供了有效的实验手段。

3.2 pcDNA-GPV-VP3 在雏鹅体内的分布规律及其意义

基因疫苗接种动物机体部位的组织结构和接种途径对基因疫苗在动物体内的分布速度具有重要影响,由于皮肤中富含能加强免疫反应的免疫活性细胞,这类细胞可以进行高效抗原递呈加工和分泌细胞因子,所以基因疫苗通过皮肤免疫后能迅速引起较强的体液和细胞免疫应答,如 Kang 等^[9]将质粒 DNA 局部直接涂抹皮肤和静脉注射免疫小鼠,结果皮肤涂抹组各组织中的含量比静脉注射组高,质粒 DNA 能长时间表达蛋白而引起免疫反应,证明皮肤是优于静脉的安全、高效、可靠的免疫部位。基因枪是将基因疫苗导入动物机体的有效方法之一,基因枪将吸附了 DNA 疫苗的金微粒直接轰击皮肤,简单快捷,3 min 后 DNA 就可以从金微粒上解离转入到树突状细胞等细胞中^[10],能克服皮内组织细胞转染效率低的缺点,如 Fynan 等^[11]等将含有甲型流感病毒血凝素(HA)基因的基因疫苗免疫小鼠,比较几种免疫途径的免疫保护效果,结果基因枪介导的 DNA 导入方法效率最高,是肌肉注射的 500 倍。本研究发现,pcDNA-GPV-VP3 免疫后 1 h 可分布至雏鹅体内各组织器官,进一步证明基因枪轰击途径用于免疫基因疫苗是有效的。

基因疫苗在接种动物机体内的降解速度对疫苗免疫力的产生有直接影响,许多报道指出,不同的免疫途径进入动物体内的质粒 DNA 会迅速大幅度降解^[12,13],其原因可能是质粒 DNA 被体内的 DNA 酶降解并被肝脏摄取,如 Nishikawa 等^[14]通过静脉注射³²P 标记的质粒 DNA 后放射性迅速从血浆中消除,短时间后即检测不到,前 3 min 50% 以上的放射性集中在肝;Walther 等^[15]通过基因枪注入 pCMV β 质粒 DNA,5 min 时在肿瘤细胞内有质粒的存在,30~60 min 含量达到最大,但其降解很快。本研究用基因枪轰击 pcDNA-GPV-VP3 免疫雏鹅,在肝、

肾、脾、淋巴器官等血流量高的器官和淋巴器官中所含质粒的拷贝数比其它组织多,说明其分布可能和淋巴、血液循环都有一定关系;在免疫初期,pcDNA-GPV-VP3 下降的速度较快,特别在免疫部位表现较为明显,这可能是由于皮肤具有的快速增殖和分化特点导致外源基因丢失较多造成的。

基因疫苗不易通过血脑屏障^[16,17],本试验中,pcDNA-GPV-VP3 免疫雏鹅后 1 h 在脑内的含量较少,到 12 h 时才达到最大值,较其它组织器官出现晚,而 12 h 后脑中的含量一直较高,说明血脑屏障能阻止 DNA 疫苗的分布,但一段时间后,被激活并含有核酸疫苗的 T 淋巴细胞能迁移到脑淋巴结并穿过血脑屏障而导致脑中的含量较高^[18]。

基因疫苗在机体内相当于一个“抗原库”,不断地表达,不断刺激免疫系统分泌抗体,产生长期的免疫记忆,因此基因疫苗在体内的存在时间将决定其免疫持续期的长短,这方面有不少资料可以借鉴,如 Morris-Dowus 等的研究^[18]表明肌注 SFV 真核表达质粒可在血中存在达 3 个月,在免疫部位中存在达 8 个月;Coelho-Castelo 等^[19]将 pcDNA-Hcp65 注射入小鼠体内后其至少存在了 6 个月,并认为 pcDNA-Hcp65 在体内不进行复制;Raz 等^[20]通过皮内接种流感病毒核蛋白(NP)的 DNA 疫苗,发现产生的免疫反应可持续 17 个月。本试验中,免疫 217 d 后仍能在体内各个组织器官中检测到 pcDNA-GPV-VP3 的存在,且数量和 35 d 时差别不大,推测 pcDNA-GPV-VP3 将会有较长的免疫持续期。

基因疫苗的免疫剂量对疫苗的分布部位和含量有一定的影响,如豆文波等^[21]将 pcDNA-PRRSV-ORF5 肌肉注射 BALB/c 小鼠,用 PCR 方法检测到基因疫苗在注射部位肌肉中存在的时间为 200 μ g 组 200 d,100 μ g 组 150 d,50 μ g 组 120 d;Coelho-Castelo 等^[19]的试验中也证明质粒的分布部位与接种剂量有关。本试验中 1、3、6 μ g 3 个剂量组 pcDNA-GPV-VP3 在雏鹅体内分布的速度和部位相似,拷贝数在各时段各组织中的分布呈现出 6 μ g 组 > 3 μ g 组 > 1 μ g 组的规律。疫苗注射 1 h 后各个剂量组的所有器官中都能检测到 pcDNA-GPV-VP3,其中脑、直肠、回肠、免疫部位、哈氏腺等器官差异较显著($P \leq 0.05$),6 μ g 组所含 pcDNA-GPV-VP3 的拷贝数比 1 μ g 组约大 1 个数量级;其它器官差异不显著($P \geq 0.05$),说明基因疫苗的接种剂量与基因疫苗在组织中存在的量有一定相关性,但非等比递增。

参考文献:

- [1] Richard E G. Diseases of Poultry [M]. 11th edition. Ames: Iowa State University Press, 2003. 367~374.
- [2] Kweon C H, Ko Y J, Kim W, *et al.* Development of a foot-and-mouth disease NSP ELISA and its comparison with differential diagnostic methods[J]. Vaccine, 2003, 21:1 409~1 414.
- [3] Kowalczyk D W, Ertl H C. Immune responses to DNA vaccines[J]. Cell Mol Life Sci, 1999, 55: 751~770.
- [4] Hartikka J, Sawdey M, Jensen F C, *et al.* An improved plasmid DNA expression vector for direct infection into skeletal muscle [J]. Human Gene Therapy, 1996, 7: 1 205~1 209.
- [5] Zadori Z, Stefancsik R, Rauch T, *et al.* Analysis of the complete nucleotide sequences of goose and muscovy duck parvoviruses indicates common ancestral origin with adeno-associated virus 2 [J]. Virology, 1995, 212(2): 562~573.
- [6] Sambrook J, Russell D W. Molecular Cloning: A Laboratory Manual [M]. 3rd edition. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2001.
- [7] Weidmann M, Meyer K U, Hufert F T. Rapid detection of herpes simplex virus and Varicella-Zoster virus infections by real-time PCR [J]. Journal of Clinical Microbiology, 2003, 41(4): 1 565~1 568.
- [8] Ginzinger G. Gene quantification using real-time quantitative PCR. An emerging technology hits the mainstream [J]. Experimental Hematology, 2002, 30: 503~512.
- [9] Kang M J, Kim C K, Kim M Y, *et al.* Skin permeation, biodistribution, and expression of topically applied plasmid DNA [J]. Gene Med, 2004, 6: 1 238~1 246.
- [10] Tang D C, DeVit M, Johnston S A, *et al.* Genetic immunization in a single method for eliciting an immune response [J]. Nature, 1992, 365: 152~154.
- [11] Fynan E F, Webster R G, Fuller D H, *et al.* DNA vaccines, protective immunizations by parenteral, mucosal and gene-gun inoculations [J]. Proc Natl Acad Sci USA, 1993, 9: 11 478~11 482.
- [12] Li A F, Esher A. Intradermal or oral delivery of GAD-Encoding genetic vaccines suppresses type 1 diabetes [J]. DNA Cell Boil, 2003, 22, (4): 227~232.
- [13] Koshkina N V, Agoulnik S L, Densmore C L, *et al.* Biodistribution and pharmacokinetics of Aerosol and intravenously administered DNA-polyethyleneimine complexes: Optimization of pulmonary delivery and retention [J]. Mol Ther, 2003, 8: 249~254.
- [14] Nishikawa M, Takemura S, Takakura Y, *et al.* Targeted delivery of plasmid DNA to hepatocytes *in vivo*; optimization of the pharmacokinetics of plasmid DNA/galactosylated poly (L-lysine) complexes by controlling their physicochemical properties [J]. Pharm Exp Ther, 1998, 287(1): 408~415.
- [15] Walther W, Minow T, Martin R, *et al.* Uptake, biodistribution, and time course of naked plasmid DNA trafficking after intratumoral *in vivo* jet injection [J]. Hum Gene Ther, 2006, 17(6): 611~624.
- [16] Tuomela M, Malm M, Wallen M, *et al.* Biodistribution and general safety of a naked DNA plasmid, GTU-MultiHIV, in a rat, using a quantitative PCR method [J]. Vaccine, 2005, 23: 890~896.
- [17] Klinman D M, Takeno M, Ichino M, *et al.* DNA vaccine: safety and efficacy issues [J]. Springer Semin Immunopathol, 1997, 19(2): 245~256.
- [18] Morris-Downes M M, Phenix K V, Smyth J, *et al.* Semliki Forest virus-based vaccines: persistence, distribution and pathological analysis in two animal systems [J]. Vaccine, 2001, 19(15-16): 1 978~1 988.
- [19] Coelho-Castelo A A, Trombone A P, Rosada R S, *et al.* Tissue distribution of a plasmid DNA encoding Hsp65 gene is dependent on the dose administered through intramuscular delivery [J]. Genet Vaccines Ther, 2006, 4: 1.
- [20] Raz E, Watanse A, Baird S M, *et al.* Systemic immunological effects of cytokine genes injected into skeletal muscle [J]. Proc Natl Acad Sci USA, 1993, 90(10): 4 523~4 527.
- [21] 豆文波. 猪繁殖与呼吸综合征病毒 ORF5 基因疫苗在小鼠体内动态分布与表达 [D]. 雅安: 四川农业大学, 2005.