

猪 IL-2 真核表达质粒构建及对 PRRSV-ORF 5 基因疫苗免疫佐剂作用的研究

希尼尼根^{2,3}, 程安春^{1,2*}, 汪铭书^{1,2*}, 陈希文^{1,2}, 豆文波^{1,2},

李雪梅^{1,2}, 刘伍梅^{1,2}, 张平英^{1,2}, 刘菲¹, 陈孝跃^{1,2}

(1. 动物疫病与人类健康四川省重点实验室, 雅安 625014; 2. 四川农业大学动物科技学院禽病研究中心, 雅安 625014; 3. 内蒙古农业大学动物科学与医学学院, 呼和浩特 010018)

摘要: 本研究应用真核表达载体 pcDNA3.1(+)和猪白细胞介素 2(IL-2)基因成功构建了 IL-2 的真核表达质粒 (pcDNA-IL-2), 探讨了 pcDNA-IL-2 作为分子免疫佐剂对猪繁殖与呼吸综合征 (PRRS) ORF5 基因疫苗 (pcDNA-PRRSV-SC2-ORF5) 免疫猪的增强作用。经间接 ELISA 法、MTT 比色法及流式细胞仪分别对 pcDNA-IL-2 与 pcDNA-PRRSV-SC2-ORF5 共同免疫猪、pcDNA-PRRSV-SC2-ORF5 单独免疫猪、pcDNA3.1(+)空载体和灭菌水免疫对照猪的血清抗 PRRSV 抗体 IgG、外周血 T 淋巴细胞的增殖活性、CD₄⁺ 和 CD₈⁺ 细胞比例进行检测, 结果表明 pcDNA-IL-2 与 pcDNA-PRRSV-SC2-ORF5 共同免疫猪的 IgG 含量、外周血 T 淋巴细胞的增殖活性、CD₄⁺ 和 CD₈⁺ 细胞比例与 pcDNA-PRRSV-SC2-ORF5 单独免疫猪相比有显著差异 ($P < 0.05$)。说明 pcDNA-IL-2 能显著增强 pcDNA-PRRSV-SC2-ORF5 基因疫苗免疫猪的体液和细胞免疫应答, 可作为 PRRSV 基因疫苗的良好佐剂。

关键词: IL-2; pcDNA-PRRSV-SC2-ORF5 基因疫苗; 免疫

中图分类号: S852.4; Q789

文献标识码: A

文章编号: 0366-6964(2007)09-1003-06

Construction of Pig IL-2 Eukaryotic Expression Plasmid pcDNA-IL-2 and Its Adjuvant Effect on pcDNA-PRRSV-SC2-ORF5 Gene Vaccine

Xininigen^{2,3}, CHENG An-chun^{1,2*}, WANG Ming-shu^{1,2*}, CHEN Xi-wen^{1,2}, DOU Wen-bo^{1,2}, LI Xue-mei^{1,2}, LIU Wu-mei^{1,2}, ZHANG Ping-ying^{1,2}, LIU Fei¹, CHEN Xiao-yue^{1,2}

(1. Sichuan Key Laboratory of Animal Disease and Human Health, Ya'an 625014, China;

2. Research Center of Avian Disease, College of Animal Science and Technology,

Sichuan Agricultural University, Ya'an 625014, China; 3. College of Animal Science

and Veterinary Medicine, Inner Mongolian Agricultural University, Huhhot 010018, China)

Abstract: In this study, pig IL-2 eukaryotic expression plasmid pcDNA-IL-2 was constructed and its adjuvant effect was investigated. Four groups of pigs were immunized with sterilized water, empty vector pcDNA3.1(+), PRRSV-SC2-ORF5 gene eukaryotic expression plasmid pcDNA-PRRSV-SC2-ORF5 and a mixed solution of pcDNA-IL-2 and pcDNA-PRRSV-SC2-ORF5 respectively. Serum of pig in each group was collected at different time post inoculation, and antibody to PRRSV was measured by ELISA. Peripheral T lymphocytes were acquired from a small quantity of blood of each pig, and the activity of lymphocyte proliferation was detected by MTT methods after being cultured with RPMI1640 culture medium. Content of CD₄⁺ and CD₈⁺ of peripheral T lymphocytes in each groups of pigs were tested by cytospectrometry. Results showed that the

收稿日期: 2006-03-02

基金项目: 教育部“新世纪优秀人才支持计划项目 (NCET-04-0906); 四川省基础研究重大项目 (05JY029-109); 四川省“十一五”生物技术重大项目 (2006Z05-03-01); 四川省重点建设学科项目 (SZD0418)

作者简介: 希尼尼根 (1971-), 男, 内蒙古赤峰人, 博士, 主要从事动物传染病病原研究, E-mail: xnng@163.com

* 通讯作者: 程安春、汪铭书, E-mail: chenganchun@vip.163.com, TeL&Fax: 0835-2885774

antibody and peripheral T lymphocytes level, content of CD_4^+ , CD_8^+ cell of the pigs immunized with both pcDNA-IL-2 and pcDNA-PRRSV-SC2-ORF5 were significantly higher than that of the pigs immunized with pcDNA-PRRSV-SC2-ORF5 alone, indicate that plasmid pcDNA-IL-2 can be used as a adjuvant to enhance PRRS gene vaccine.

Key words: IL-2; ORF5 gene vaccine; immunization

猪繁殖与呼吸综合征 (PRRS) 是由猪繁殖与呼吸综合征病毒 (PRRSV) 引起的一种重要传染性疾病。该病发病率高、传播快, 严重危害养猪业的发展。如何有效控制和预防该病的发生一直是科技工作者和养猪业面临的难题。预防 PRRS 的传统疫苗 (如灭活疫苗、弱毒疫苗等) 由于存在免疫效果差或毒力返强等不足, 不能有效预防和彻底根除 PRRS。基因疫苗作为一种崭新的疫苗没有毒力返强作用, 同时因制备简单、稳定性好、贮存和运输方便等优点正引起国内外学者的广泛关注。如何增强基因疫苗的免疫应答并达到全面的免疫保护作用是目前研究的热点。大量研究表明, 细胞因子作为佐剂可提高基因疫苗的免疫应答能力^[1~5]。猪 IL-2 是目前研究较多的细胞因子佐剂, 其良好的免疫增强作用在一些基因疫苗的研究中得到证实^[6~9]。本试验利用 pcDNA3.1(+) 真核表达载体构建猪 IL-2 真核表达质粒, 研究其与 pcDNA-PRRSV-SC2-ORF5 基因疫苗共同免疫猪的影响来探讨其作为基因疫苗佐剂的可能性。

1 材料与方 法

1.1 材 料

1.1.1 21 日龄长白猪, 经 ELISA 检测 PRRS 抗体阴性, 由四川隆生集团种猪场提供。

1.1.2 大肠杆菌 JM109、真核表达质粒 pcDNA3.1(+) 均由动物疫病与人类健康四川省重点实验室保存。

1.1.3 重组质粒 pGEM-T-IL-2 为 pGEM-T 载体中含猪白介素 2 基因完整序列的重组质粒, 由动物疫病与人类健康四川省重点实验室构建; PRRSV 基因疫苗 pcDNA-PRRSV-SC2-ORF5 重组质粒由笔者构建并保存。

1.1.4 *Xba* I、*Bam*H I、T4 连接酶和碱性磷酸酶均购自成都天泰公司; DNA 纯化树脂, 购自北京赛百盛公司; 兔抗猪酶标抗体, 为 USBIO 产品; 二氨基联苯胺 (DAB), 为 Sino-American Biotech 产品。

1.2 猪 IL-2 真核表达质粒的构建

1.2.1 IL-2 基因的酶切 用 *Bam*H I、*Xba* I 对 pGEM-T-IL-2 质粒进行双酶切, 切出 IL-2 基因, 反应体系 20 μ L: 5.0 μ L pGEM-T-IL-2, 2.0 μ L buffer K, 1.0 μ L *Bam*H I (15 U/ μ L), 1.0 μ L *Xba* I (15 U/ μ L), 11.0 μ L 灭菌水, 充分混匀后, 37 $^{\circ}$ C 温育 2 h, 凝胶电泳分离目的基因并用 DNA 纯化树脂进行纯化。

1.2.2 真核表达质粒 pcDNA3.1(+) 的线性化及去磷酸化 用 *Bam*H I、*Xba* I 对 pGEM-T-IL-2 质粒进行双酶切 (方法同上)。用碱性磷酸酶对双酶切的 pcDNA3.1(+) 进行去磷酸化。

1.2.3 pcDNA3.1(+) 和 IL-2 的连接反应 取 1 支 PCR 管, 按顺序加入以下试剂: 2.0 μ L (90 pmol) 纯化的 IL-2, 1.0 μ L (30 pmol) 去磷酸化的 pcDNA3.1(+) , 1.0 μ L 10 \times T4 DNA 连接酶缓冲液, 1.0 μ L T4 连接酶 (8 U/ μ L), 5.0 μ L 灭菌去离子水, 混匀, 24 $^{\circ}$ C 放置 2 h, 转化大肠杆菌 JM109, 涂布于含有 X-gal、IPTG 和 Amp 的平板上, 挑取阳性菌落并扩大培养, 抽提质粒并进行双酶切鉴定。将已构建的真核表达质粒命名为 pcDNA-IL-2。技术路线如图 1。

1.3 真核表达质粒的大量制备

用碱裂解法, 大量提取质粒 pcDNA-IL-2 和 pcDNA-SC2-PRRSV-ORF5, 并用聚乙二醇 (PEG-8000) 沉淀法纯化。

1.4 免疫接种

将 12 头仔猪随机分为 4 组, 每组 3 只, 联合免疫组 (佐剂 + 疫苗) 肌注 pcDNA-IL-2 和 pcDNA-SC2-PRRSV-ORF5 各 100 μ g, 疫苗组肌注 pcDNA-SC2-PRRSV-ORF5 100 μ g, 空载体组肌注 pcDNA3.1(+) 空载体 100 μ g, 空白对照组肌注灭菌水 100 μ L, 间隔 2 周加强免疫 1 次。

1.5 免疫检测

1.5.1 猪血清中抗 PRRSV 抗体的检测 参照文献 [10] 进行间接 ELISA 法检测。免疫后第 7、15、30、45、60、75、90、105、135 天采集血液, 分离血清, 以提纯 PRRSV 作包被抗原、含 10% 马血清的 PBST (含 0.3% Tween20 的 PBS, pH7.4) 作封闭

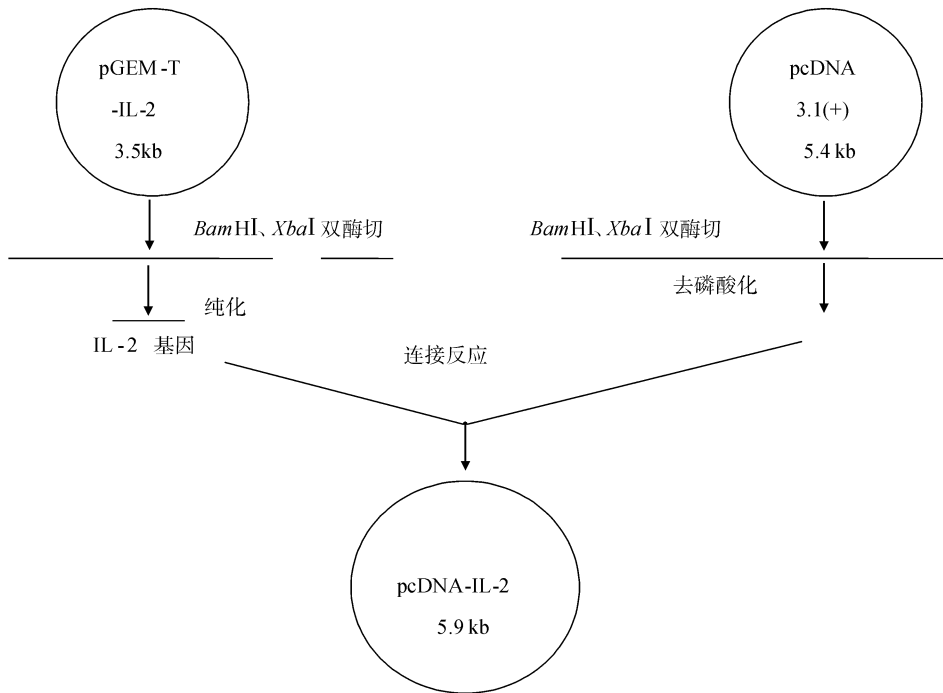


图 1 构建猪 IL-2 真核表达质粒的技术路线

Fig. 1 Construction of pig IL-2 eukaryotic expression plasmid

液、兔抗猪酶标抗体作二抗,二氨基联苯胺作显色底物,用 2 mol/L H_2SO_4 终止反应,测定其吸收值并对其进行 t 检验。

1.5.2 猪外周血淋巴细胞增殖活性的检测 用 MTT 比色法,参照文献[11]进行。免疫后第 7、15、30、45、60、75 天分别采取 2 mL 抗凝血,分离淋巴细胞,用 RPMI1640 在 37 °C 下培养 68 min 后加入 MTT(5 mg/mL),继续培养 4 h。在波长 490 nm 下测定其吸收值,进行 t 检验。

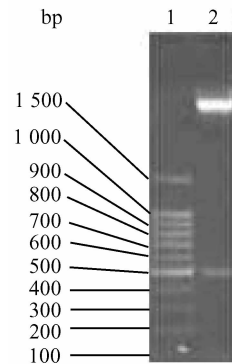
1.5.3 外周血 CD_4^+ 和 CD_8^+ 细胞含量的检测 免疫后第 7、15、30、45、60、75 天分别采集 0.1 mL 抗凝血,加 8 mL 红细胞裂解液处理,再用 5 mL PBS 缓冲液悬浮沉淀(1 500 r/min,离心 10 min),收集细胞;取 0.5 mL 细胞悬液,加入 10 μ L(0.1 μ g) FITC 标记兔抗猪单抗,4 °C 下作用 1 h。加 1 mL PBS 缓冲液,混匀,离心 5 min,用 1 mL PBS 缓冲液悬浮沉淀,用 FACS 检测 3 000 个细胞,取所得数据进行 t 检验。

2 结果

2.1 pcDNA-IL-2 酶切鉴定结果

pcDNA-IL-2 真核表达质粒经 *Bam*H I、*Xba* I 双酶切后进行 1% 琼脂糖凝胶电泳,出现 2 条带。

其中小片段约为 500 bp,与预期片段大小一致(见图 2)。



1. 100 bp Ladder marker; 2. pcDNA-IL-2/*Bam*H I, *Xba* I

图 2 pcDNA-IL-2 酶切鉴定结果

Fig. 2 Digestion of pcDNA-IL-2 with *Bam*H I and *Xba* I

2.2 猪血清中抗 PRRSV 抗体 IgG 的含量

血清中 IgG 含量的检测结果见表 1。联合免疫组猪血清的 IgG 含量高于疫苗组的 IgG, t 检验结果显示,免疫后 30—135 天者血清 OD 值间存在显著 ($P < 0.05$) 或极显著 ($P < 0.01$) 差异。联合免疫组和疫苗组均极显著 ($P < 0.01$) 高于空载体组和空白对照组。

表 1 猪免疫 pcDNA-PRRSV-SC2-ORF5 后血清 IgG 的动态变化(OD 值)

Table 1 Changes of serum IgG of pig immunized with pcDNA-PRRSV-SC2-ORF5

组别 Groups	第 7 天	第 15 天	第 30 天	第 45 天	第 60 天	第 75 天	第 90 天	第 105 天	第 135 天
联合免疫组 Combined group	0.315 ^{AB} ±0.010	0.454 ^{AB} ±0.016	0.675 ^{ABC} ±0.015	0.754 ^{ABC} ±0.016	0.764 ^{ABC} ±0.009	0.706 ^{ABc} ±0.014	0.551 ^{ABc} ±0.017	0.455 ^{ABc} ±0.020	0.428 ^{ABc} ±0.016
疫苗组 Vaccine group	0.316 ^{EF} ±0.008	0.436 ^{EF} ±0.011	0.526 ^{EF} ±0.014	0.636 ^{EF} ±0.009	0.633 ^{EF} ±0.015	0.632 ^{EF} ±0.012	0.412 ^{EF} ±0.018	0.410 ^{EF} ±0.006	0.337 ^{EF} ±0.011
空载体组 Vector group	0.057 ±0.004	0.053 ±0.007	0.065 ±0.004	0.058 ±0.007	0.053 ±0.008	0.057 ±0.004	0.056 ±0.005	0.059 ±0.006	0.064 ±0.009
空白对照组 Control	0.068 ±0.010	0.059 ±0.007	0.051 ±0.007	0.062 ±0.005	0.063 ±0.008	0.067 ±0.006	0.050 ±0.010	0.067 ±0.011	0.056 ±0.006

A. 表示联合免疫组与空白对照组间在 0.01 水平上差异极显著; B. 表示联合免疫组与空载体组间在 0.01 水平上差异极显著; C. 表示联合免疫组与疫苗组间在 0.01 水平上差异极显著, c. 表示在 0.05 水平上差异显著; E. 表示疫苗组与空白对照组间在 0.01 水平上差异极显著; F. 表示疫苗组与空载体组间在 0.01 水平上差异极显著, 下表同

A. Stands for test at 0.01 level ($P < 0.01$) between combined group and control group; B. Stands for test at 0.01 level ($P < 0.01$) between combined group and vector group; C and c. Stands for test at 0.01 level ($P < 0.01$) and at 0.05 level ($P < 0.05$) between combined group and vaccine group, respectively; E. stands for test at 0.01 Level ($P < 0.01$) between vaccine group and control group; F. Stands for test at 0.01 level ($P < 0.01$) between vaccine group and vector group; as is determined with Duncan's multiple-range test, the same as below

2.3 猪 IL-2 真核表达质粒免疫猪对外周血 T 淋巴细胞增殖活性的影响

从表 2 可知,联合免疫组猪的外周血 T 淋巴细

胞 OD 值高于疫苗组, t 检验结果显示,两者间差异达到显著水平($P < 0.05$)。佐剂组和疫苗组均极显著($P < 0.01$)高于空载体组和空白对照组。

表 2 佐剂对猪外周血 T 淋巴细胞增殖的影响(OD 值)

Table 2 Influence of adjuvant on proliferation of peripheral T lymphocytes of pig

组别 Groups	第 7 天	第 15 天	第 30 天	第 45 天	第 60 天	第 75 天
联合免疫组 Combined group	0.193±0.015 ^{ABc}	0.230±0.009 ^{ABc}	0.317±0.032 ^{ABc}	0.353±0.015 ^{ABc}	0.330±0.040 ^{ABc}	0.287±0.007 ^{ABc}
疫苗组 Vaccine group	0.164±0.015 ^{EF}	0.196±0.012 ^{EF}	0.243±0.018 ^{EF}	0.303±0.018 ^{EF}	0.263±0.067 ^{EF}	0.250±0.015 ^{EF}
空载体组 Vector group	0.123±0.021	0.118±0.013	0.130±0.008	0.193±0.088	0.190±0.012	0.177±0.015
空白对照组 Control	0.107±0.015	0.108±0.017	0.110±0.006	0.130±0.006	0.140±0.011	0.123±0.009

2.4 猪 IL-2 真核表达质粒免疫猪对猪外周血 CD₄⁺ 细胞含量的影响

从表 3 可知,联合免疫组猪的外周血 CD₄⁺ 含量均高于疫苗组, t 检验结果显示,免疫后 7—60 天两者间存在显著差异($P < 0.05$),免疫后第 75 天,差异达到极显著水平($P < 0.01$)。联合免疫组和疫苗组猪的外周血 CD₄⁺ 含量均极显著($P < 0.01$)高于空载体组和空白对照组。

2.5 猪 IL-2 真核表达质粒免疫猪对猪外周血 CD₈⁺

细胞含量的影响

从表 4 可知,联合免疫组猪的外周血 CD₈⁺ 细胞含量高于疫苗组,免疫后第 30、75 天,联合免疫组猪的外周血 CD₈⁺ 细胞含量与疫苗组间存在显著差异($P < 0.05$);并在第 45、60 天后达到差异极显著水平($P < 0.01$)。联合免疫组和疫苗组猪的外周血 CD₈⁺ 细胞含量均极显著($P < 0.01$)高于空载体组和空白对照组。

表 3 佐剂对猪外周血 CD4⁺ 含量的影响Table 3 Influence of adjuvant on content of CD4⁺ in peripheral lymphocytes of pig

%

组别 Groups	第 7 天	第 15 天	第 30 天	第 45 天	第 60 天	第 75 天
联合免疫组 Combined group	36.15±0.87 ^{ABc}	37.81±2.78 ^{ABc}	37.01±0.77 ^{ABc}	31.94±1.56 ^{ABc}	28.67±0.82 ^{ABc}	33.20±0.58 ^{ABc}
疫苗组 Vaccine group	28.60±2.27 ^{EF}	32.24±0.52 ^{EF}	29.54±1.18 ^{EF}	26.45±1.10 ^{EF}	24.52±0.73 ^{EF}	27.52±1.68 ^{EF}
空载体组 Vector group	15.99±2.02	21.52±2.12	20.57±1.52	18.21±1.61	19.21±0.51	20.52±0.74
空白对照组 Control	13.33±0.49	18.24±1.71	20.29±2.69	14.58±2.05	16.15±1.33	17.65±3.63

表 4 佐剂对猪外周血 CD8⁺ 含量的影响Table 4 Influence of adjuvant on content of CD8⁺ in peripheral lymphocytes of pig

%

组别 Groups	第 7 天	第 15 天	第 30 天	第 45 天	第 60 天	第 75 天
联合免疫组 Adjuvant group	21.34±1.70 ^{AB}	21.15±1.02 ^{AB}	31.64±1.83 ^{ABc}	35.65±1.42 ^{ABC}	29.43±1.64 ^{ABC}	23.69±0.98 ^{ABc}
疫苗组 Vaccine group	20.41±0.62 ^{EF}	19.47±1.07 ^{EF}	25.46±1.02 ^{EF}	30.26±0.74 ^{EF}	24.63±0.64 ^{EF}	19.77±1.15 ^{EF}
空载体组 Vector group	20.39±0.82	15.41±1.51	18.61±1.46	21.68±0.63	22.47±1.15	20.55±1.01
空白对照组 Control	18.24±0.64	15.89±0.89	17.26±0.49	21.18±0.71	21.71±0.79	18.61±0.55

3 讨论

3.1 猪 IL-2 真核表达质粒的构建

本试验利用 *Bam*H I、*Xba* I 酶切位点,构建了猪 IL-2 基因 pcDNA3.1(+)质粒重组体。从图 2 可以看出,猪 IL-2 真核表达重组质粒经 *Bam*H I、*Xba* I 双酶切后得到 1 个约 500 bp 的片段,符合预期片段大小,证明本试验成功构建了猪 IL-2 基因真核表达质粒。

3.2 pGEM-T-IL-2 对仔猪接种 pcDNA-PRRSV-ORF5 基因疫苗后血清抗体 IgG 的动态变化影响分析

从表 1 可知,pcDNA-IL-2 与 pcDNA-PRRSV-SC2-ORF5 都能诱导仔猪产生病毒特异性抗体,与空载体和空白对照组相比,联合免疫组和疫苗组猪的抗体水平差异极显著($P < 0.01$),其中佐剂组诱导产生抗体的速度最快,且抗体水平最高。接种后 30—135 天的 *t* 检验结果显示,联合免疫组猪的抗体水平显著($P < 0.05$)高于疫苗组。这说明 pcDNA-IL-2 具有增强 pcDNA-PRRSV-SC2-ORF5 基因疫苗体液免疫应答的作用。这基本符合 Xue

等^[12]的研究结果,为 PRRS 基因疫苗提供了一种良好的免疫增强剂,其可能的体液免疫增强机理有待进一步研究。

3.3 pGEM-T-IL-2 对仔猪接种 pcDNA-PRRSV-ORF5 基因疫苗后外周血 T 淋巴细胞的增殖活性、CD4⁺ 和 CD8⁺ 细胞比例动态变化影响的分析

机体细胞免疫应答的效果与 T、B 淋巴细胞的免疫应答以及多种免疫活性细胞的相互作用密切相关^[13]。在抗原及有丝分裂原 ConA 和 LPS 的刺激下,淋巴细胞转化为淋巴母细胞的效率是考察机体免疫功能状态的重要指标之一^[14],ConA 诱导 T 淋巴细胞增殖,LPS 诱导 B 淋巴细胞增殖。由表 2 可以看出,本研究用 pcDNA-PRRSV-ORF5 基因疫苗免疫仔猪后,发现不同时间仔猪外周血淋巴细胞对 ConA 刺激反应明显,由表 2~4 可以看出,仔猪在接种基因疫苗后,外周血 CD4⁺、CD8⁺ T 淋巴细胞数明显高于对照组,说明基因疫苗能诱导机体产生良好的细胞免疫。从表 2 还可以看出,联合免疫组外周 T 淋巴细胞水平显著高于疫苗组($P < 0.05$),这基本符合 Wong 等^[15]的研究结果,进一步证实了猪 IL-2 的细胞免疫增强作用,为 PRRSV 基因疫苗的

临床应用提供科学依据。

3.4 猪 IL-2 真核表达质粒作为基因疫苗佐剂的前景

近年来随着分子生物学的发展,白细胞介素在免疫学方面的应用逐步深入。如一些白细胞介素可作为免疫佐剂提高疫苗的免疫效果,以及用于构建新型基因工程苗。本试验通过构建猪白细胞介素 2 真核表达质粒 pcDNA-IL-2, 研究其作为佐剂对 pcDNA-PRRSV-SC2-ORF5 基因疫苗的免疫增强作用,结果表明联合免疫组,无论是抗 PRRSV 抗体 IgG,还是 T 淋巴细胞亚群数量、T 淋巴细胞的转化功能,从整体上显著高于单独注射疫苗组 ($P < 0.05$),表明猪 pcDNA-IL-2 在仔猪体内得到了表达,并对基因免疫仔猪的体液免疫和细胞免疫功能有显著的促进作用,也表明猪 pcDNA-IL-2 可作为佐剂与 pcDNA-PRRSV-ORF5 基因疫苗共同作用来提高 DNA 疫苗的免疫效果。这对于解决现有疫苗免疫力不强或效果不稳定以及亚临床感染等问题具有十分重要的意义。深入开展这方面的研究,将会对 PRRS 的免疫预防产生深远的影响。

参考文献:

- [1] Masashi U A. Novel dicistronic AAV vector using a short IRES segment derived from hepatitis C virus genome[J]. *Gene*, 1997, 200: 157~162.
- [2] Chow Y H, Hong W L, Chi W K, *et al.* Improvement of hepatitis B virus DNA vaccines by plasmids co-expressing hepatitis B surface antigen and interleukin-2 [J]. *J Virol*, 1997, 71: 169~178.
- [3] Chow Y H, Chiang B L, Lee Y L, *et al.* Development of Th1 and Th2 populations and the nature of immune responses to hepatitis B virus DNA vaccines be modulated by codelivery of various cytokine genes[J]. *J Immunol*, 1998, 160: 1 332~1 329.
- [4] 杜德伟,刘清泉,陈红梅,等. IL-2 的真核表达载体对乙型肝炎病毒基因疫苗的免疫佐剂效应[J]. *上海免疫学*

杂志, 2001, 21(2): 77~79.

- [5] 刘劲松,陆虹,李燕. 狂犬疫苗与白细胞介素 2 联合免疫小鼠的实验研究[J]. *免疫学杂志*, 1997, 13(1): 23~25.
- [6] Feltquate D M, Heaney S, Webster R G, *et al.* Different T helper cell types and antibody isotypes generated by saline and gene gun DNA immunization[J]. *J Immunol*, 1997, 158(5): 2 278~2 284.
- [7] Grabstein K H, Eisenman J, Shanebeck K, *et al.* Cloning of a T cell growth factor that interacts with the beta chain of the interLeukin-2 receptor[J]. *Science*, 1994, (264): 965~968.
- [8] 于康震,郑永辉,王永录,等. 白细胞介素-2 免疫增强作用的研究[J]. *中国畜禽传染病*, 1991, 6: 41~43.
- [9] 李郁英,李玉兰,安云庆,等. 重组(人)白细胞介素-2 对伤寒 Vi 荚膜多糖菌苗的免疫佐剂效应的实验研究[J]. *中国免疫学杂志*, 1996, (12): 75~77.
- [10] 蔡雪晖,郭宝清,柴文君. 检测猪繁殖与呼吸综合征病毒抗体 ELISA 方法的建立[J]. *中国预防兽医学报*, 2000, 22(2): 122~125.
- [11] 李秀森. MTT 比色法检测细胞存活和淋巴因子[J]. *免疫学杂志*, 1992, 8(1): 67.
- [12] Xue Q, Zhao Y G, Zhou Y J. Immune responses of swine following DNA immunization with plasmids encoding porcine reproductive and respiratory syndrome virus ORFs 5 and 7, and porcine IL-2 and IFN γ [J]. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 2004, 102(3): 291~298.
- [13] 余传林. 结核病的免疫病理学[J]. *国外医学微生物学分册*, 1997, 204: 26~29.
- [14] 刘玉斌. 动物免疫学实验技术[M]. 长春: 吉林科学技术出版社, 1989. 226~330.
- [15] Wong H T, Cheng S C, Sin F W, *et al.* A DNA vaccine against foot-and-mouth disease elicits an immune response in swine which is enhanced by co-administration with interleukin-2[J]. *Vaccine*, 2002, 20(21-22): 2 641~2 647.