

猪繁殖与呼吸综合征病毒 GP5 和 M 蛋白共表达的自杀性 DNA 疫苗的构建及其免疫应答

江云波, 方六荣, 肖少波, 张 辉, 陈焕春

(华中农业大学动物医学院动物病毒室 武汉 430070)

摘要:【目的】探讨猪繁殖与呼吸综合征病毒 (PRRSV) 自杀性 DNA 疫苗的免疫效果。【方法】将 ORF5 和 ORF6 基因分别插入可以同时表达两个外源基因的表达载体 pSCA2 的 26S 启动子下游, 获得 ORF5 和 ORF6 双基因共表达自杀性 DNA 疫苗 pSFV-56。【结果】Western blot 检测证实 ORF5 和 ORF6 基因获得正确表达, 并且所表达的 GP5 和 M 蛋白可以形成异源二聚体。将 pSFV-56 免疫 Balb/c 小鼠, 首免后 4 周可检测到特异性 PRRSV 中和抗体, 首免后 8 周的中和抗体最高可达 1:32, 同时还可检测到较高的特异性细胞免疫应答。进一步将 pSFV-56 免疫断奶仔猪, 二免后 4 周即可产生 1:8~1:16 的中和抗体, 直到二免后 6 周仍维持这种高水平的中和抗体, 而且也可检测到较高的特异性细胞免疫应答。【结论】上述研究结果表明 pSFV-56 具有良好的免疫原性和诱发免疫动物产生较高免疫应答的能力。

关键词:“自杀性”DNA 疫苗; 猪繁殖与呼吸综合征病毒; GP5 和 M 蛋白共表达

Construction and Immune Responses of the Suicidal DNA Vaccine Co-Expressing GP5 and M of Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome Virus

JIANG Yun-bo, FANG Liu-rong, XIAO Shao-bo, ZHNAG Hui, CHEN Huan-chun

(Laboratory of Animal Medicine, Huazhong Agricultural University, Wuhan 430070)

Abstract:【Objective】To investigate the immune efficiency of the suicidal DNA vaccines of porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV). 【Method】The ORF5 and ORF6 genes were subcloned into the downstream of two independent subgenomic promoter 26S of a suicidal DNA vaccine expression vector pSCA2 resulting in the plasmid pSFV-56 co-expressing GP5 and M proteins. 【Result】The result of Western blot showed that the GP5 and M proteins were expressed and formed disulfided-linked heterodimer. The suicidal DNA vaccine pSFV-56 was injected Balb/c mice and piglets to evaluate the induced immunological responses *in vivo*. The specific detectable anti-PRRSV neutralizing antibodies were produced in the vaccinated mice at 4 weeks post primary vaccination (PPV) and reached a peak 1:32 at 8 weeks PPV. The specific stronger cell-immunity responses were also observed. In addition, it was observed that the 1:8-1:16 neutralizing antibodies of the vaccinated piglets and the specific cell-immunity responses were produced. 【Conclusion】The results of the present study indicated that the suicidal DNA vaccine pSFV-56 has well immunity and the capability inducing higher immune responses in the animals.

Key words: Suicidal DNA vaccine; Porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV); Co-expressing GP5 and M

0 引言

【本研究的重要意义】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) 引起的母猪繁殖障碍 (主要以怀孕母猪早产, 后期流产、死胎、木乃伊胎及弱仔为特征) 和所有日龄猪的呼吸障碍^[1]。目前用于预防 PRRSV 的主要有灭活苗和弱毒苗, 但存

收稿日期: 2005-09-27; 接受日期: 2006-03-03

基金项目: 国家自然科学基金项目 (30300257); 国家“973”基础研究项目 (2005CB523200)

作者简介: 江云波 (1980-), 男, 安徽安庆人, 博士研究生, 研究方向为动物病毒分子生物学和基因工程疫苗。E-mail: jiangvet@webmail.hzau.edu.cn。
通讯作者陈焕春 (1953-), 男, 湖北恩施人, 教授, 博士, 中国工程院院士, 研究方向为动物传染病学。Tel: 027-87282608; E-mail: hzauvet@public.wh.hb.cn

在免疫保护效果不好或散毒等危险^[2], 迫切需要更安全、更有效的新型疫苗。【前人研究进展】自杀性 DNA 疫苗 (suicidal DNA vaccine) 是基于常规 DNA 疫苗和自主复制型 RNA 疫苗发展起来的一种新的疫苗设计^[3,4]。同常规 DNA 疫苗不同, 自杀性 DNA 疫苗是以甲病毒复制子为载体, 用外源基因取代甲病毒的结构蛋白基因, 同时非结构蛋白基因上游插入强启动子元件[如人巨细胞病毒 (CMV) 的早期启动子/增强子], 直接在体内启动全长基因组的转录, 一旦由强启动子驱动的甲病毒非结构蛋白编码的复制酶复合物合成, 便可介导细胞浆内重组 RNA 的大量复制, 从而导致外源基因编码的 mRNA 的高水平表达, 激发很强的免疫反应^[5]。同时, 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 (一般为 2~5 d)^[6], 因此, 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的潜在隐患^[3,5,6]。此外, 最近的研究还证实自杀性 DNA 疫苗能克服免疫耐受^[7]。Hariharan 等^[8]曾以辛德毕斯 (Sindbis) 病毒复制子为载体, 以人单纯疱疹病毒 I 型 (HSV-1) gB 基因为目标基因, 开展了自杀性 DNA 疫苗的研究, 动物试验结果相当理想, 构建的 pSIN2.5-gB 的免疫剂量较常规 DNA 疫苗的免疫剂量低 100~1 000 倍, 展示了自杀性 DNA 疫苗巨大的开发潜力与良好的应用前景。

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, 即 ORF1 (包括 ORF1a 和 ORF1b) 编码病毒的复制酶, ORF2-6 分别编码病毒的 GP2a、GP2b、GP3、GP4、GP5 囊膜糖蛋白和非糖基化膜蛋白 M, ORF7 则编码高度保守的核衣壳蛋白 N^[9]。而由 ORF5 编码的 GP5 蛋白为主要保护性抗原, GP5 蛋白具有最强的中和病毒能力^[10]。由 ORF6 编码的 M 蛋白也具有诱导细胞免疫的能力^[11], 并可以与 GP5 蛋白形成以二硫键相连的异源二聚体存在于 PRRSV 病毒粒子表面, 是 PRRSV 病毒侵入靶向组织和细胞的必要条件^[12,13]。

【本研究切入点】本研究基于当前核酸疫苗的发展趋势和国际上 PRRSV 分子生物学、分子免疫学研究的新进展, 以及针对目前自杀性 DNA 疫苗的优点和发展, 构建了 PRRSV ORF5 和 ORF6 双基因共表达的自杀性 DNA 疫苗。【拟解决的关键问题】在实验动物小鼠和自然宿主猪中充分评价构建的自杀性 DNA 疫苗免疫反应, 为进一步研制能有效预防和控制

PRRSV 的新型疫苗奠定基础。

1 材料与方法

1.1 病毒、细胞和质粒

PRRSV YA1 株系华中农业大学动物医学院动物病毒实验室从发病猪中分离的高致病力野毒株, 由该实验室保存。pMT-ORF5 (GenBank DQ120518)、pMT-ORF6 (GenBank DQ120519) 由方六荣博士构建并提供^[14]。基于西门利克森林病毒 (SFV) 复制子的双 26s 亚基因组启动子自杀性 DNA 疫苗表达载体 pSCA2 由谢京国硕士构建并提供^[15]。pMD 18-T 载体购自 Takara 公司。MARC-145 细胞由德国巴伐利亚洲动物保健中心 Chezcy 博士赠送, BHK-21 细胞购自中国典型培养物中心。大肠杆菌 DH5 α 由华中农业大学动物医学院动物病毒室保存。

1.2 引物设计和 PCR 扩增

引物 P5sfv1 与 P5sfv2 可扩增 ORF5 基因的完整编码区, 上下游引物中引入 *Bam*HI 酶切位点, 引物 P6sfv1 和 P6sfv2 可扩增 ORF6 基因的完整编码区, 上下游引物中引入 *Eco*RV 酶切位点。上述引物由上海生物工程技术有限公司合成, 引物序列为:

P5sfv1: 5'-TTTGGATCCGCAATGTTGGGGAAA TGCTTGAC-3';

P5sfv2: 5'-TTTGATATCCTAGAGAGACCCATT GTTGTC-3';

P6sfv1: 5'-TTTGATATCGCCATGGGGTCGTCTC TAG-3';

P6sfv2: 5'-TTTGATATCTTATTTGGCATATTTG-3'。

ORF5、ORF6 基因的扩增条件均为: 95°C 4 min 变性后进入循环, 循环参数为 95°C 1 min, 57°C 1 min, 72°C 1 min, 35 个循环后 72°C 延伸 10 min。

1.3 自杀性 DNA 疫苗表达质粒的构建

以 pMT-ORF5 为模板, pORF5Bs、pORF5Br 为引物, 扩增 ORF5 全长基因, 将该片段用 *Bam*HI 进行酶切回收后插入自杀性 DNA 疫苗双表达载体 pSCA2 的 *Bam*HI 位点, 构建 pSCA-ORF5。以 pMT-ORF6 为模板, pORF6Es、pORF6Er 为引物, 扩增 ORF6 全长基因, 将该片段用 *Sma*I 进行酶切回收后插入 pSCA-ORF5 的 *Sma*I 位点, 使 ORF5 和 ORF6 基因位于两个独立的 SFV 亚基因组启动子 26s 下游, 重组质粒命名为 pSFV-56。

1.4 Western blot 分析

大量制备 pSFV-56 和空白载体 pSCA2 并经 PEG8000 纯化。按 1.2×10^4 个细胞/孔接种 BHK-21 细胞于 24 孔板, 待细胞长至 50%~80% 融合时, 在脂质体介导下 *LipofectAMINE™2000, GIBCO) 将纯化的表达质粒 (1~2 μg /孔) 转染 BHK-21 细胞, 具体操作按试剂盒说明书进行。转染后 36~48 h 收集转染细胞, PBS (pH 7.4) 洗涤 1 次, 加入 100 μl 裂解缓冲液, 冰上作用 30 min, 再与等量的 2 \times SDS-PAGE 上样缓冲液混匀, 煮沸 5 min, 分别进行含 50 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ DTT (DTT+) 变性和不含 DTT (DTT-) 非变性的 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, TBST 封闭 1 h, 以与空白载体转染细胞碎片 4 $^{\circ}\text{C}$ 作用过夜的 PRRSV 阳性猪血清为一抗, 辣根过氧化物酶标记的羊抗猪 IgG 为二抗 (SBA), 增强型化学发光底物 (Pierce Co.) 作用后转印 X 光片。

1.5 小鼠和猪免疫程序

6~8 周龄雌性 Balb/c 小鼠购自湖北省医学科学院实验动物中心。设 pSFV-56、空白载体 pSCA2 两个免疫组免疫小鼠, 每组 6 只, 100 μg /只, 于后腿肌肉注射, 共免疫 2 次, 每次间隔 2 周。

检测 PRRSV 阴性的 4~5 周龄雌性断奶仔猪 (湖北地方品系通城猪) 作为免疫用猪。设 pSFV-56、空白载体 pSCA2 两个免疫组, 每组 5 头, 100 μg /头, 于颈部肌肉注射, 共免疫 2 次, 每次间隔 4 周。

1.6 中和抗体检测

被检血清 56 $^{\circ}\text{C}$ 灭活 30 min, 倍比稀释后 (1:2~1:256) 加入 96 孔细胞培养板中, 每孔 50 μl 。然后每孔加入用 DMEM (GIBCO) 稀释为 100 TCID₅₀ 的 PRRSV 50 μl , 37 $^{\circ}\text{C}$ 5% CO₂ 培养箱中作用 1 h, 再于每孔中滴加 $2 \times 10^5 \sim 5 \times 10^5$ 个细胞/ml 的 MARC-145 细胞悬液 100 μl , 轻轻混匀后, 继续培养 4~5 d, 逐日观察细胞病变情况, 记录被检血清中抗 PRRSV 的特异性中和抗体效价, 即被检血清样品能够完全保护细胞不发生病变的最高稀释倍数。

1.7 T 细胞增殖反应检测

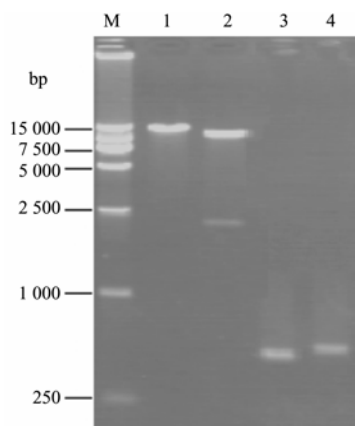
无菌取首免后第 8 周免疫小鼠脾脏分离脾细胞, 红细胞裂解液除去红细胞, 用含 5% FBS 和 50 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 2-ME 的 RPMI-1640 完全培养基调整细胞浓度为 5×10^6 个细胞/ml。另外, 利用淋巴细胞分离液 (密度 1.077) 无菌分离免疫猪首免后第 6、8 周外周血单个核细胞 (PBMC), 调整细胞浓度至 5×10^6 个细胞/ml。分离出的鼠脾淋巴细胞或猪 PBMC 接种至 96 孔细胞培养板,

同时加入空白 1640 培养液或有丝分裂原 (经紫外线照射灭活的 PRRSV) 各 4 复孔, 置 37 $^{\circ}\text{C}$ 、5% CO₂ 培养箱中培养。72 h 后, 于每孔加入 MTS (Promega) 20 μl , 充分混匀, 继续培养 4 h 后终止培养, 于 1 h 内测定 OD 值 (490 nm), 计算刺激指数 (SI), $SI=A/B$ (A: 刺激值; B: 非刺激值)。

2 结果与分析

2.1 重组质粒的构建

PCR 扩增的 ORF5 全长基因大小约为 620 bp 片段用 *Bam*HI 进行酶切回收后插入自杀性 DNA 疫苗双表达载体 pSCA2 的 *Bam*HI 位点, 鉴定方向构建重组质粒 pSCA-ORF5 (图略)。另将 PCR 扩增的 ORF6 全长基因大小约为 530 bp 片段用 *Sma*I 进行酶切回收后插入 pSCA-ORF5 的 *Sma*I 位点, 鉴定方向, 使 ORF5 和 ORF6 基因位于两个独立的 SFV 亚基因组启动子 26s 下游, 构建 ORF5 和 ORF6 双基因共表达重组质粒 pSFV-56。经 PCR 和酶切鉴定正确 (图 1)。



M. DNA 标准分子量 (DL15000); 1. pSFV-56/*Bgl*II; 2. pSFV-56/*Bgl*II+*Sma*I; 3. pSFV-56 质粒中 ORF6 的 PCR 扩增产物; 4. pSFV-56 质粒中 ORF5 的 PCR 扩增产物
M. DNA marker (DL 15000); 1. pSFV-56/*Bgl*II; 2. pSFV-56/*Bgl*II+*Sma*I; 3. PCR product of ORF6 from the plasmid pSFV-56; 4. PCR product of ORF5 from the plasmid pSFV-56

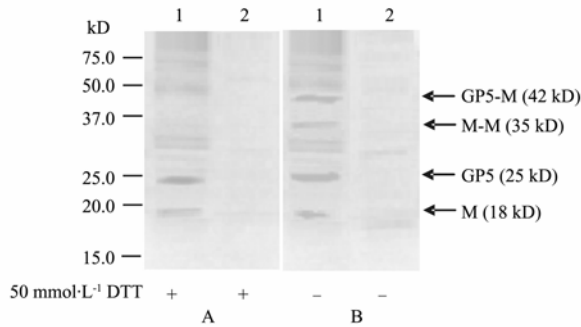
图 1 SFV-56 重组质粒的鉴定

Fig.1 Identification of the recombinant plasmid pSFV-56

2.2 Western blot 分析

为了研究所构建的自杀性 DNA 疫苗所表达的 GP5 和 M 蛋白生物学活性, 将 pSFV-56 和空白载体 pSCA2 分别转染 BHK-21 细胞, 转染 24 h 后收集细胞进行裂解处理, 作为 Western blotting 抗原。将处理好

的细胞碎片分别进行含 50 mmol·L⁻¹ DTT (DTT+) 变性和不含 DTT (DTT-) 非变性的 12% SDS-PAGE, 转膜后进行 Western blot 分析, 一抗为与空白载体转染细胞碎片 4℃作用过夜的 PRRSV 阳性猪血清。结果发现, 在变性胶中 pSFV-56 转染的细胞能够同时表达约为 25 kD 的 GP5 蛋白和约为 18 kD 的 M 蛋白。而在非变性胶中 pSFV-56 转染的细胞不仅展示了大小约为 18 kD 和 35 kD 两条特异性条带, 还有约为 35 kD 和 42 kD 的特异性条带 (图 2)。而空白载体无论在变性胶还是在非变性胶中均为阴性。结果表明, 自杀性 DNA 疫苗 pSFV-56 能够同时表达 GP5 蛋白和 M 蛋白, 并很好地保持了天然蛋白的生物学活性, 能够形成大小约为 42 kD 的 GP5-M 异源二聚体和大小约为 35 kD 的 M-M 同源二聚体。



A. 含有 50 mmol·L⁻¹ DTT 的变性胶; B. 不含 50 mmol·L⁻¹ DTT 的非变性胶; 1. pSFV-56 转染细胞的裂解产物; 2. pSCA2 转染细胞的裂解产物
A. Reducing condition with 50 mmol·L⁻¹ DTT; B. Nonreducing condition without 50 mmol·L⁻¹ DTT. 1. Cell lysates of pSFV-56. 2. Cell lysates of pSCA2

图 2 pSFV-56 重组质粒转染 BHK-21 细胞的 Western blot 分析

Fig. 2 Western blot analysis of the cell lysates transfected with DNA constructs pSFV-56

2.3 免疫小鼠特异性抗 PRRSV 的免疫应答

采用微量中和抗体检测方法, 检测首免后第 2、4、6 和 8 周免疫小鼠特异性针对 PRRSV 的中和抗体水平, 结果表达自杀性 DNA 疫苗 pSFV-56 于首免后第 4 周就有 1 只小鼠产生可检测的中和抗体 (1:8), 随后快速上升于第 8 周达到最高, 有 2 只达到了 1:32 (表 1)。空白载体 pSCA2 阴性对照组在整个试验过程中均未检测到特异性针对 PRRSV 的中和抗体。说明自杀性 DNA 疫苗 pSFV-56 能够很好地诱发免疫小鼠产生

表 1 pSFV-56 免疫小鼠产生特异性针对 PRRSV 的中和抗体检测

Table 1 The PRRSV-specific neutralizing antibodies of mice vaccinated with pSFV-56

	初免后时间 (周) Time after primary vaccination (W)	中和抗体滴度			
		<1:8	1:8	1:16	1:32
pSFV-56	4	5 ¹⁾	1	0	0
	6	0	3	3	0
	8	0	2	2	2
pSCA2	4	6	0	0	0
	6	6	0	0	0
	8	6	0	0	0

¹⁾小鼠数量,下同

The numbers of the vaccinated mice. The same as below

较高的中和抗体。

为了探讨构建的自杀性 DNA 疫苗在免疫小鼠体内诱发特异性针对 PRRSV 的细胞免疫水平, 笔者检测了免疫小鼠首免后 8 周的特异性脾淋巴细胞增殖。从图 3 中可以看出, 利用经紫外线照射灭活的 PRRSV 作为刺激原, pSFV-56 免疫小鼠获得了强的特异性淋巴细胞增殖, 其增殖指数达到 2.89±0.12。暗示着自杀性 DNA 疫苗 pSFV-56 免疫小鼠后能够诱发较强的细胞免疫应答。

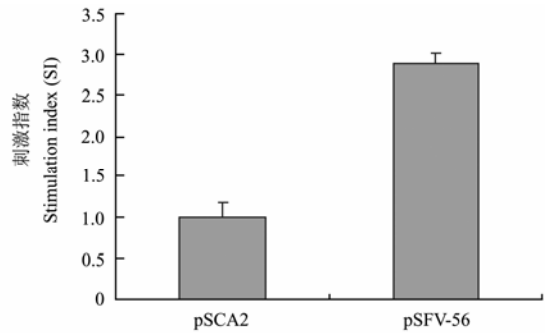


图 3 pSFV-56 免疫小鼠诱发特异性针对 PRRSV 的淋巴细胞增殖反应

Fig. 3 The PRRSV-specific lymphocyte proliferative responses of mice vaccinated with the suicidal DNA vaccines pSFV-56

2.4 免疫猪特异性抗 PRRSV 的免疫应答

为了检测构建的自杀性 DNA 疫苗 pSFV-56 在本体动物猪体内的免疫效果, 将自杀性 DNA 疫苗 pSFV-56 免疫 PRRSV 阴性仔猪, 分别检测首免后第 4、6、8 和 10 周免疫猪中和抗体水平和首免后第 6 和 8

周免疫猪特异性 PBMC 淋巴细胞增殖。从表 2 中可以看出, 表达自杀性 DNA 疫苗 pSFV-56 免疫猪于首免后第 6 周开始产生可检测的中和抗体 (1:8), 于第 10 周达到最高, 有 2 头达到了 1:16。空白载体 pSCA2 阴性对照组在整个试验过程中均未检测到特异性针对 PRRSV 的中和抗体。说明这种共表达 GP5 和 M 的自杀性 DNA 疫苗 pSFV-56 具有诱发免疫猪产生较高的中和抗体的能力。

表 2 pSFV-56 免疫猪产生特异性针对 PRRSV 的中和抗体检测

Table 2 The PRRSV-specific neutralizing antibodies of piglets vaccinated with pSFV-56

	初免后时间 (周) Time after primary vaccination (W)	中和抗体滴度		
		<1:8	1:8	1:16
pSFV-56	6	3	2	0
	8	0	4	1
	10	0	3	2
pSCA2	6	6	0	0
	8	6	0	0
	10	6	0	0

检测了免疫猪首免后第 6 和 8 周的特异性 PBMC 淋巴细胞增殖。从图 4 中可以看出, pSFV-56 免疫猪于首免后第 6 周即获得了较强的特异性淋巴细胞增殖, 随后上升至第 8 周达到 2.78 ± 0.07 。暗示自杀性 DNA 疫苗 pSFV-56 能够诱发较强的细胞免疫应答。

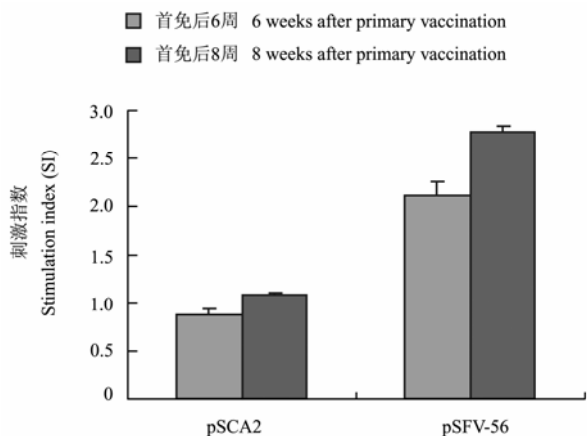


图 4 pSFV-56 免疫小鼠诱发特异性针对 PRRSV 的淋巴细胞增殖反应

Fig.4 The PRRSV-specific lymphocyte proliferative responses of piglets vaccinated with the suicidal DNA vaccines pSFV-56

3 讨论

PRRSV 感染已成为当前养猪业面临的最棘手的问题, 不仅给全球养猪业造成了巨大的直接经济损失, 而且由其引起的继发感染、混合感染、免疫抑制等问题使疫病更加复杂、更加难以控制。同时, PRRSV 感染也对现行的免疫策略和疫苗研制手段提出了严峻的挑战。目前用于预防 PRRS 的两种商品化疫苗主要是弱毒苗和灭活疫苗。尽管弱毒苗能提供较好的免疫保护, 但存在毒力返强的危险, 并且返强的机率相当高, 这一点已在几年前丹麦等国因广泛使用弱毒苗而导致该病大暴发中得以证实^[2]。灭活苗不仅需多次重复接种, 而且效果不稳定, 还经常导致免疫失败。为了发展更安全、有效的新型疫苗, 许多学者先后构建了以 PRRSV 中最主要的保护性抗原——GP5 为基础的 DNA 疫苗、亚单位疫苗和腺病毒载体疫苗^[16,17], 笔者所在实验室还构建了以伪狂犬病毒为载体表达 PRRSV GP5 的重组疫苗^[14]。

同以往总是表达 PRRSV 单一保护性抗原的疫苗设计不同, 考虑到 PRRSV ORF5 和 ORF6 编码的 GP5 和 M 蛋白在病毒感染过程形成异源二聚体的特性, 本研究构建了 ORF5、ORF6 双基因共表达的自杀性 DNA 疫苗 pSFV-56。通过体外瞬时转染和 Western blot 检测, 证实自杀性 DNA 疫苗重组质粒 pSFV-56 转染细胞后 GP5 和 M 蛋白可以同时共表达, 而且表达的这两种蛋白可以通过二硫键相连形成异源二聚体。这是首次报道基于自主复制型 DNA 疫苗载体系统表达 PRRSV 的 GP5 和 M 蛋白相互作用形成异源二聚体, 表明在没有病毒编码的其它蛋白的参与下, GP5 和 M 蛋白共表达也同样能形成异源二聚体。这一研究事实或许正是本研究构建的 pSFV-56 之所以具有良好免疫原性的分子基础。事实上, Balasuriya 等最近在研究与 PRRSV 同属的马动脉炎病毒 (EAV) 的甲病毒 RNA 复制子疫苗的过程中发现^[18], 当 GP5 和 M 蛋白共表达时, 能够形成 GP5-M 异源二聚体, 而这种异源二聚体的存在也极大地促进了 GP5 蛋白有效地从内质网向高尔基体的转运, 获得正确的翻译后修饰, 从而诱发免疫实验动物特异性中和抗体的产生, 而单独表达 GP5 的该 RNA 复制子疫苗并不能诱发免疫实验动物特异性中和抗体的产生。PRRSV GP5 和 M 蛋白异源二聚体的形成是否对 GP5 的转运、定位以及随后的免疫反应产生影响, 是值得深入研究的问题。相信对这一问题的阐明将会对今后 PRRSV 新型疫苗的设计产生深远

的影响。

在证实 pSFV-56 表达的 GP5 和 M 蛋白可以形成异源二聚体后,本研究进一步在实验动物以及 PRRSV 的自然宿主——猪中评价了这种新型疫苗的体液免疫反应和细胞免疫反应,其结果都是令人鼓舞的。pSFV-56 免疫小鼠或猪均可诱导高水平中和抗体的产生。目前的研究已证实高滴度的中和效价在抵抗 PRRSV 感染和清除过程中具有重要作用并呈正相关性^[19,20]。同时, pSFV-56 免疫小鼠或猪还可诱导高水平细胞免疫应答。尽管目前对细胞免疫在抗 PRRSV 感染中的作用尚不清楚,能同时激发很强的体液免疫与细胞免疫,表明 pSFV-56 是一种很有希望 PRRSV 新型候选疫苗。

分析 pSFV-56 能同时诱导高水平的体液免疫与细胞免疫反应,推测可能与以下几方面的因素有关:(1) GP5-M 自异源二聚体的形成促进 GP5 蛋白翻译后的修饰、转运,也有可能 GP5 蛋白某些中和表位的展现需要二聚体的存在。(2) 本研究采用的是基于 SFV 复制子的载体,该载体能够高效表达外源基因^[5],而且在复制过程中形成的双链 RNA 中间体具有良好的免疫促进作用。此外,自杀性 DNA 疫苗还具有诱导细胞凋亡的能力,凋亡的细胞更容易被树突状细胞摄取,促进抗原提呈和随后的免疫应答^[6]。(3) GP5 蛋白本身具有诱发中和抗体的能力^[10],M 蛋白也具有诱发特异性细胞免疫的能力^[11],GP5 和 M 蛋白的共表达会产生协同作用。

作为一种新的 PRRSV 疫苗设计载体和 GP5/M 共表达策略,自杀性 DNA 疫苗 pSFV-56 的有效性免疫保护还需大量的试验进行验证。由于本研究的本动物试验是在商品化猪场进行的,因此没有开展攻毒保护试验。目前,笔者已着手进行猪体免疫保护试验,并与常规弱毒疫苗以及灭活苗进行比较,全面、系统地评价这一新型疫苗的免疫效果。

4 结 论

本研究构建了共表达 PRRSV GP5 和 M 蛋白的自杀性 DNA 疫苗 pSFV-56,证实表达的 GP5 和 M 蛋白可以形成 GP5/M 异源二聚体,能够较好的诱发小鼠和猪产生较高的特异性针对 PRRSV 的中和抗体和细胞免疫应答,为获得能够较好地防制 PRRSV 的新型疫苗提供了新的思路和途径。

References

- [1] Wensvoort G, Terpstra C, Pol J M. Mystery swine disease in the Netherlands: the isolation of Lelystad virus. *Veterinary Quarterly*, 1991, 13: 121-130.
- [2] Dea S, Gagnon C A, Mardassi H. Current knowledge on the structural proteins of porcine reproductive and respiratory syndrome (PRRS) virus: comparison of the North American and European isolates. *Archive of Virology*, 2000, 145: 659-688.
- [3] Leitner W W, Ying H, Restifo N P. DNA and RNA-based vaccines: principles, progress and prospects. *Vaccine*, 2000, 18: 765-775.
- [4] Tubulekas I, Berglund P, Fleeton M, Liljeström P. Alphavirus expression vectors and their use as recombinant vaccines: a minireview. *Gene*, 1997, 190: 191-195.
- [5] Liljeqvist S, Stahl S. Production of recombinant subunit vaccines: protein immunogens, live delivery systems and nucleic acid vaccines. *Journal of Biotechnology*, 1999, 73: 11-33.
- [6] Fleeton M N, Liljeström P, Sheahan B J, Atkins G J. 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. *Journal of General Virology*, 2000, 81: 749-758.
- [7] Herweijer H, Wolff J A. Self-amplifying vectors for gene delivery. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 1997, 27: 5-16.
- [8] Hariharan M J, Driver D A, Townsend K, Brumm D, Polo J M, Belli B A, Catton D J, Hsu D, Mittelstaedt D, McCormack J E, Karavodin L, Dubensky T W, Chang S M, Banks T A. DNA immunization against herpes simplex virus: enhanced efficacy using a Sindbis virus-based vector. *Journal of Virology*, 1998, 72: 950-958.
- [9] Meulenber J J, Hulst M M, De Meifer E J, Moonen P L, Den Bestern A, De Kluyver E P, Wensvoort G, Moormann R J. Lelystad virus, the causative agent of porcine epidemic abortion and respiratory syndrome (PEDRS), is related to LDV and EAV. *Virology*, 1993, 192: 62-72.
- [10] Weiland E M, Wiezorek-krohmer M, Kohl D. Monoclonal antibodies to the GP5 of porcine reproductive and respiratory syndrome virus are more effective in virus neutralization than monoclonal antibodies to the GP4. *Veterinary Microbiology*, 1999, 66: 171-186.
- [11] Yang L, Frey M L, Yoon K J, Zimmerman J J, Platt K B. Categorization of north American porcine reproductive and respiratory syndrome virus: Epitopic profiles of the N, M, GP5, and GP3 proteins and susceptibility to neutralization. *Archive of Virology*, 2000, 145: 1599-1619.
- [12] Mardassi H, Massie B, Dea S. Intracellular synthesis, processing and transport of proteins encoded by ORFs5 to 7 of porcine reproductive

- and respiratory syndrome virus. *Virology*, 1996, 221: 98-112.
- [13] Verheije M H, Welting T J, Jansen H J, Rottier P J, Meulenber J J. Chimeric arteiviruses generated by swapping the M protein ectodomain rule out a role of this domain in viral targeting. *Virology*, 2002, 303: 364-373.
- [14] 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. 华中农业大学博士学位论文, 2003.
- Fang L R. Study on the suicidal DNA vaccine and recombinant pseudorabies virus vaccine expressing GP5 of porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV). Doctoral Thesis of Huazhong Agricultural University, 2003. (in Chinese)
- [15] 谢京国, 方六荣, 肖少波, 姚林, 潘永飞, 陈焕春. 双基因共表达“自杀性”DNA 疫苗通用载体的构建及其体外表达特性. 中国兽医学报, 2006, 26: 467-472.
- Xie J G, Fang L R, Xiao S B, Yao L, Pan Y F, Chen H C. Construction and property *in vitro* of a suicidal DNA vaccine vector co-expressing two genes. *Chinese Journal of Veterinary Science*, 2006, 26: 467-472. (in Chinese)
- [16] Barfoed A M, Blixenkroner-Møller M, Jensen M H, Bøtner A, Kamstrup S. DNA vaccination of pigs with open reading frame 1-7 of PRRS virus. *Vaccine*, 2004, 22: 3628-3641.
- [17] Gagnon C A, Lachapelle G, Langelier Y, Massie B, Dea S. 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. *Archive of Virology*, 2003, 148: 951-972.
- [18] Balasuriya B R, Heidner H W, Hedges J F, Williams A C, Davis N L, Johnston R E, Maclachlan N J. Expression of the two major envelope proteins of equine arteritis virus as a heterodimer is necessary for induction of neutralizing antibodies in Mice immunized with recombinant venezuelan equine encephalitis virus replicon particles. *Journal of Virology*, 2000, 74: 10623-10630.
- [19] Osorio F A, Galeota J A, Nelson E, Brodersen B, Doster A, Wills R, Zuckermann F, Laegreid W W. Passive transfer of virus-specific antibodies confers protection against reproductive failure induced by a virulent strain of porcine reproductive and respiratory syndrome virus and establishes sterilizing immunity. *Virology*, 2002, 302: 9-20.
- [20] Yoon K J, Wu L L, Zimmerman J J, Platt K B. Field isolates of porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV) vary in their susceptibility to antibody dependent enhancement (ADE) of infection. *Veterinary Microbiology*, 1997, 55: 277-287.

(责任编辑 林鉴非)