

基于甲病毒复制子的 PRRSV DNA 疫苗在 小鼠体内诱导的免疫应答

梁欠欠, 侯绍华, 贾红, 袁维峰, 郭晓宇, 朱鸿飞*

(中国农业科学院北京畜牧兽医研究所动物医学研究室, 北京 100193)

摘要: 本研究旨在构建含 PRRSV FZ06A 株 GP3、GP5、M 蛋白修饰后基因的复制子疫苗 pSCA-Km5、pSCA-VPm3、pSCA-VPm5、pSCA-VP6 和 pSCA-V56, 研究其特异性表达目的蛋白的能力和在小鼠体内诱导免疫应答的能力。将构建的复制子质粒和空载体以 $100 \mu\text{g} \cdot \text{只}^{-1}$ 的剂量免疫小鼠, 免疫 3 次, 监测血清中特异性抗体和中和抗体水平及淋巴细胞经特异性抗原刺激后的增殖情况和释放 IFN- γ 、IL-4 的水平。结果显示, 各疫苗均能在转染细胞中高效表达目的蛋白。免疫小鼠, pSCA-VPm3、pSCA-VP6 能引起较好的细胞免疫应答, 但血清中未检测到特异性抗体。pSCA-Km5、pSCA-VPm5 血清中能检测到低水平特异性抗体, 但引起的细胞免疫较 pSCA-VPm3、pSCA-VP6 低。pSCA-V56 和 pSCA-VPm5-PEI 均能诱导细胞免疫反应和体液免疫反应, 但体液免疫水平低于 pSCA-VPm5。pSCA-VPm5-PEI 抗体水平在首免后 7 周突然降低, 至首免后 10 周, 无特异性抗体再次产生。所有免疫小鼠中未能检测到中和抗体。结果表明, 构建的基于甲病毒复制子的 PRRS DNA 疫苗能诱导动物机体产生一定水平的细胞免疫和体液免疫, 有望成为具有开发价值的 PRRS 标记疫苗。但各目的基因所能诱导机体产生体液免疫和细胞免疫的能力不同。

关键词: 甲病毒复制子; PRRSV; 小鼠; 免疫应答

中图分类号: S852.659.6

文献标志码: A

文章编号: 0366-6964(2013)11-1805-07

Immune Responses Induced by the DNA Vaccines Based on the Alphavirus Replicon against Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome in Mice

LIANG Qian-qian, HOU Shao-hua, JIA Hong, YUAN Wei-feng, GUO Xiao-yu, ZHU Hong-fei*
(Institute of Animal Science, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Beijing 100193, China)

Abstract: We have constructed five recombinant plasmids contain modified GP3, GP5 and M genes of PRRSV based on the alphavirus replicon vector, pSCA1, named pSCA-Km5, pSCA-VPm3, pSCA-VPm5, pSCA-VP6 and pSCA-V56. And we studied the expression characteristics *in vitro*. Expression of proteins was confirmed by western-blotting. In order to evaluate the immunogenicity of the five plasmids in BALB/c mouse model, we detected the antibody, IL-4 and IFN- γ level by ILISA, valued the lymphocyte proliferation activity by MTS staining assay. For the group of pSCA-VPm3, pSCA-VP6, specific lymphoproliferative responses to the PRRSV stimulation were induced in the splenocytes of the immunized mice as demonstrated by MTS staining assay, and antigen specific IFN- γ was detected in the splenocytes by cytokine ELSIA. For the group of pSCA-Km5, pSCA-VPm5 and pSCA-VPm5-PEI, low-level of specific antibody was

收稿日期: 2013-04-22

基金项目: 国家高技术研究发展计划(863)项目(2012AA101302); 农业部动物疫情监测与防治项目; 国家科技支撑计划重点项目(2010BAD04B02); 公益性行业(农业)科研专项经费项目(200903027)

作者简介: 梁欠欠(1987-), 女, 江苏沛县人, 硕士, 主要从事动物疫苗及分子免疫学方面的研究, E-mail: qianqian2844@126.com; 侯绍华(1976-), 男, 河北昌黎人, 副研究员, 博士, 主要从事动物传染病及分子免疫学研究。二人共为第一作者

* 通信作者: 朱鸿飞(1965-), 男, 研究员, E-mail: bioclub@vip.sina.com.cn, Tel: 010-62819061

detected by ELSIA, and antigen specific IL-4 was detected in the splenocytes by cytokine ELSIA. While, the antibody and IL-4 level of the pSCA-Km5 is lower than that of the pSCA-VPm5, which indicated that VP22 gene have transduction capability. The antibody level of pSCA-VPm5-PEI was reduced after 7 weeks, which may because of its toxicity to cells. No neutralizing antibody was detected in the mice. Analysis of the data suggests that the recombinated plasmids have well immunity and the capability inducing humoral and cellular immune responses in the mice, indicating that alphavirus replicon-vectored DNA-based vaccine can be potential marker vaccine against PRRS. And the statistics indicate the genes have different ability in inducing immune response.

Key words: alphavirus replicon; PRRSV; mice; immune responses

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)引起的一种高度接触性的烈性传染病,常导致母猪的繁殖障碍、仔猪出现严重的呼吸道症状及断奶仔猪迅速死亡^[1],临床上常表现为耳部皮肤发绀,因此该病又俗称为“蓝耳病”。中国2006年暴发的由 PRRSV 变异株引起的高致病性蓝耳病,给养猪业造成严重的经济损失。目前世界上普遍应用于预防 PRRS 的灭活苗和弱毒苗都存在一定问题,如对病毒感染不能提供完全的保护,或存在毒力返强和散毒等风险。因此,迫切需要安全有效的新型疫苗用于高致病性猪繁殖与呼吸综合征的防控。相比之下,复制子疫苗可高效诱导机体产生细胞免疫和体液免疫,诱导转染细胞凋亡,比常规的 DNA 疫苗具有更好的免疫效果和更高的生物安全性。

RNA 复制子载体是以甲病毒属几种正链 RNA 病毒为基础的一种真核表达载体,用外源基因取代病毒的结构蛋白基因,保留非结构蛋白基因,以非结构蛋白控制载体高水平自我复制和所表达外源基因的表达^[2]。近年来,复制子载体 pSFV 经过改造,将 RNA 反转录为 cDNA,加入高效的真核启动子(如 CMV 立即早期启动子)和多腺苷化信号 SV40 PolyA,从而使其能高效、安全地表达外源基因^[3]。和常规疫苗相比,复制子疫苗具以下几个特点:第一,免疫效果显著。RNA 复制在 RNA 复制/转录酶的作用下大量地复制并高效地表达外源基因。可诱导较高水平的体液免疫和细胞免疫应答。第二,安全性好。复制子不进入细胞核,在胞质中复制转录和表达后便在 dsRNA 激活的抗病毒信号下,使细胞发生凋亡而清除。因此不会致癌致畸或长期在体内存在。第三,应用范围广。复制子可以应用到

多种病原的疫苗研究中,如流感病毒、HIV、人乳头瘤病毒(HPV)、呼吸道合胞病毒、马传染性动脉炎病毒和某些原虫等。

在 PRRSV 蛋白研究中,GP5、GP3 和 M 蛋白研究较深入。GP5 蛋白能诱导机体产生特异性抗体和中和抗体,且在病毒所有的结构蛋白中产生的抗体水平最高^[4]。GP5 还能诱导细胞免疫,其对 T 淋巴细胞增殖反应的刺激作用仅次于 M 蛋白^[5]。由于 GP5 在 PRRSV 疾病诊断、致病性、疾病预防与控制等方面具有重要意义,其常成为设计 PRRSV 新型疫苗时的候选蛋白^[6]。M 蛋白可以诱导机体产生中和抗体,也是引起细胞免疫应答最强的蛋白^[7]。M 蛋白在 PRRSV 疫苗设计中常被选择作为目的蛋白^[8]。虽然 GP3 不能诱导产生中和抗体,但将其免疫仔猪和妊娠母猪后能够提供一定的保护效力^[9],目前对 GP3 的研究越来越多。本研究选择 PRRSV 研究中最常用的 GP5、GP3 和 M 为目的蛋白,修饰后连接 HSV I VP22 基因,插入复制子载体 pSCA1,构建复制子疫苗 pSCA-VPm5、pSCA-VPm3、pSCA-VP6,同时构建以 FMDV 2A 自我剪切肽连接修饰后 GP5 和 M 的双基因疫苗 pSCA-V56。为研究 HSV I VP22 的蛋白转导功能,选择研究最透彻和最具有疫苗开发潜力的 GP5 为目的蛋白,构建了未连接 VP22 基因的 pSCA-Km5。同时,在动物试验中,加入了聚乙烯亚胺(polyethylenimine, PEI)处理的 pSCA-VPm5-PEI 组,初步探索免疫增强佐剂 PEI 的作用。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 菌株、质粒、细胞、蛋白 DH5 α 感受态购自于北京全氏金生物技术有限公司,BHK-21 细胞、

pSCA1 载体、PRRSV FZ06A cDNA、GP3、GP5、M 蛋白均由本实验室保存。

1.1.2 试剂 DNA 聚合酶、T4 连接酶、限制性内切酶等购自于 TaKaRa 公司,质粒大提试剂盒购自于 QIAGEN 公司,转染试剂 Lipofectamine™ 2000 购自 Invitrogen 公司,化学发光试剂购自天根生化科技,小鼠 IFN- γ 检测试剂盒与小鼠 IL-4 检测试剂盒购自上海依科赛生物制品有限公司。

1.1.3 实验动物 70 只 6 周龄 SPF 级 BABL/c 雌性小鼠购自于北京维通利华实验动物技术有限公司。

1.2 方法

1.2.1 复制子疫苗的构建 PCR 扩增出 PRRSV FZ06A 株的 ORF3、ORF5 和 ORF6 基因,分别进行修饰:将 ORF5 上非中和表位 A 去除,同时突变 N34、N43 和 N51 糖基化位点,添加 Kozak 序列后得到 Km5 基因;删除 ORF3 的信号肽序列得到 m3 基因;在 m3、Km5 和 ORF6 基因前连接 HSV I VP22 蛋白转导基因(带有 Kozak 序列)得到 VPm3、VPm5 和 VP6 基因;通过 FMDV 2A 自我剪切肽序列连接 VPm5 和 VP6 得到 V56 基因。然后将得到的 Km5、VPm3、VPm5、VP6 和 V56 基因插入复制子载体 pSCA1 中,经过酶切和测序鉴定构建的重组复制子质粒。

1.2.2 Western blot 检测转染细胞中目的蛋白的表达 大量提取构建的复制子疫苗,用 Lipofectamine™ 2000 转染 BHK-21 细胞,40 h 后收获细胞破碎物进行 Western blot。Pro-light HRP 化学发光检测试剂显色 5~30 min, LAS-4000mini 下呈像。

1.2.3 实验动物分组及免疫 将 70 只小鼠随机分成 7 组,每组 10 只。分别为空载体对照组、pSCA-Km5 组、pSCA-VPm3 组、pSCA-VPm5 组、pSCA-VP6 组、pSCA-V56 组和 pSCA-VPm5-PEI 组。小鼠免疫前,在双侧股四头肌多点注射 $2.5 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 盐酸普鲁卡因 $100 \mu\text{L}$,诱导骨骼肌变性、再生,以促进肌细胞摄取和表达复制子疫苗。1 d 后在相同部位注射 $100 \mu\text{g}$ 复制子质粒。pSCA-VPm5-PEI 组以 $N/P=8$ 计算将 PEI 与 $100 \mu\text{g}$ pSCA-VPm5 作用后,免疫小鼠。以相同方法免疫 3 次,每 2 次间隔 3 周。

1.2.4 免疫小鼠 T 淋巴细胞增殖试验 首免后 3、6、9 周无菌取小鼠淋巴细胞,以 $1 \times 10^5 \cdot \text{孔}^{-1}$ 加入 96 孔细胞板中,设置阳性对照组、试验组和空白对照组,分别加入 $100 \mu\text{L}$ 有丝分裂原 ConA(终浓

度 $10 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$)、紫外灭活 PRRSV、RPMI 1640 完全培养基,每组设置 3 个复孔。轻微振荡后,于 5% CO_2 、37 $^\circ\text{C}$ 环境下培养 48 h 后,加入 MTS($5 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$) $20 \mu\text{L}$,继续培养 4 h 后,酶标仪测定各孔 $\text{OD}_{490 \text{ nm}}$ 。以刺激指数(stimulation index, SI) 作为判断淋巴细胞增殖程度的指标。SI=试验孔平均值/对照孔平均值。

1.2.5 免疫小鼠 IFN- γ 水平监测 首免后 3、6、9 周无菌取小鼠淋巴细胞, $1 \times 10^5 \cdot \text{孔}^{-1}$ 加入 96 孔细胞板中,加入 $100 \mu\text{L}$ 紫外灭活 PRRSV 和 RPMI 1640 完全培养基,设置 3 个复孔。5% CO_2 、37 $^\circ\text{C}$ 环境下培养 48 h 后,收集细胞培养上清。应用上海依科赛小鼠 IFN- γ ELISA 试剂盒检测 IFN- γ 水平。

1.2.6 免疫小鼠 IL-4 水平监测 同上收集细胞培养上清,应用上海依科赛小鼠 IL-4 ELISA 试剂盒检测 IL-4 水平。

1.2.7 免疫小鼠特异性抗体水平监测 首次免疫后 0、3、5、7、9、10 周于小鼠的眼眶静脉丛采血,分离血清。将纯化的原核表达的各蛋白以 $0.1 \mu\text{g} \cdot \text{孔}^{-1}$ 包被板子,间接 ELISA 法检测小鼠血清中特异性抗体水平。

1.2.8 免疫小鼠中和抗体水平监测 首免后 0、3、5、7、9、10 周,无菌采取免疫小鼠的血清,灭活后,用于血清中和试验。将 Marc-145 细胞以 $2 \times 10^5 \cdot \text{mL}^{-1}$ 接种于 96 孔板,培养至长成单层细胞。将稀释度为 100 TCID₅₀ 的 PRRSV 分别与 1:10、1:20、1:40、1:80 稀释的血清 37 $^\circ\text{C}$ 作用 1 h,将混合物接种于细胞上 37 $^\circ\text{C}$ 、5% CO_2 条件下孵育 1 h,弃去上清,继续培养 48 h,观察 CPE。用减数噬斑法计算病毒抑制率。以能够保护 50% 细胞不发生细胞病变的血清最高稀释倍数作为被检血清中和抗体效价,按 Reed-Muench 法计算。病毒抑制率=(病毒对照孔 CPE-样品孔 CPE)/(病毒对照孔 CPE-细胞对照孔 CPE) $\times 100\%$ 。

2 结果

2.1 复制子质粒的构建

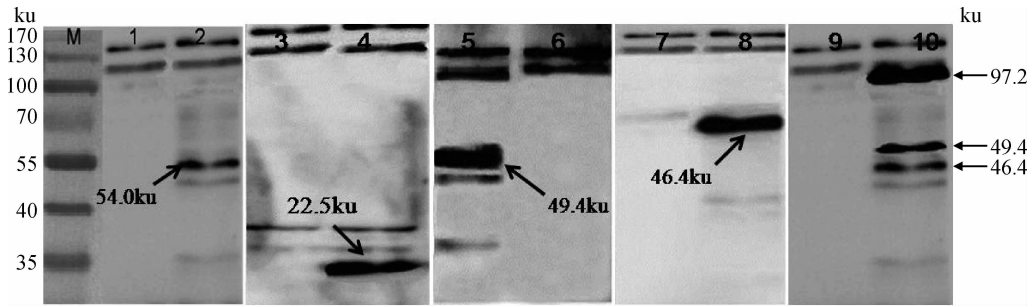
酶切和测序表明(图略),成功构建了含 PRRSV 强毒株 FZ06A GP3、GP5、M 蛋白修饰后基因的复制子疫苗 pSCA-Km5、pSCA-VPm3、pSCA-VPm5、pSCA-VP6 和 pSCA-V56。

2.2 Western blot 检测目的蛋白表达

将复制子质粒转染 BHK-21 细胞,40 h 后将细

胞裂解物进行 Western blot,经 Pro-light HRP 化学发光检测试剂显色,可见大小分别为 54.0 ku 的 VPm3 蛋白、22.5 ku 的 Km5 蛋白、49.4 ku 的 VPm5 蛋白、46.4 ku 的 VP6 蛋白。在转染 pSCA-

V56 的细胞裂解物中可见有 97.2 ku 的 V56 蛋白及经 FMDV 2A 剪切肽剪切的 49.4 ku 的 VPm5 蛋白和 46.4 ku 的 VP6 蛋白(图 1)。



M. 蛋白质相对分子质量标准; 1、3、6、7、9. 空载体 pSCA1; 2. pSCA-VPm3; 4. pSCA-Km5; 5. pSCA-VPm5; 8. pSCA-VP6; 10. pSCA-V56

M. Protein maker; 1, 3, 6, 7, 9. pSCA1; 2: pSCA-VPm3; 4. pSCA-Km5; 5. pSCA-VPm5; 8. pSCA-VP6; 10. pSCA-V56

图 1 Western blotting 检测目的蛋白

Fig. 1 Western immunoblotting of BHK-21 cell transfected with the recombinated plasmids

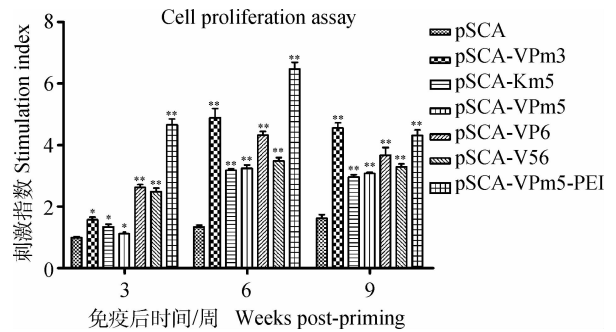
2.3 T 淋巴细胞增殖试验

小鼠首免后 3、6、9 周,无菌取脾脏淋巴细胞,经特异性抗原刺激,继续培养 48 h,加入 MTS,培养 4 h 后测量 OD_{490 nm},计算细胞刺激指数。从结果(图 2)可以看出,小鼠免疫 3 周,脾脏淋巴细胞经特异性抗原刺激后 pSCA-VPm3、pSCA-Km5、pSCA-VPm5、pSCA-VP6、pSCA-V56、pSCA-VPm5-PEI 组增殖阳性,与对照组进行比较,pSCA-VPm3、pSCA-Km5、pSCA-VPm5 组差异显著 ($P < 0.05$),pSCA-VP6、pSCA-V56、pSCA-VPm5-PEI 组差异极显著 ($P < 0.01$);免疫 6、9 周时,各免疫组与对照组差异均为极显著 ($P < 0.01$)。组内比较,可以看出,首免 6 周,SI 增加到较高值,至 9 周 SI 有所降低。组间比较,pSCA-VPm3、pSCA-VP6、pSCA-V56、pSCA-VPm5-PEI 组与 pSCA-Km5 组、pSCA-VPm5 组 SI 差异显著 ($P < 0.05$),pSCA-Km5 组和 pSCA-VPm5 组之间差异不显著 ($P > 0.05$)。pSCA-VPm5 组和 pSCA-VPm5-PEI 组之间差异极显著 ($P < 0.01$)。

2.4 IFN- γ 水平

收集脾脏淋巴细胞经特异性抗原刺激后的培养上清,采用 ELISA 方法检测上清中的 IFN- γ 含量(图 3)。从图中可以看出,小鼠免疫后 3 周有 IFN- γ 分泌,持续至第 10 周,部分试验组仍有 IFN- γ 分泌。组内比较,免疫 3 周后 IFN- γ 含量较高,6 周

时,含量降低。组间比较,pSCA-VPm3、pSCA-VP6、pSCA-V56、pSCA-VPm5-PEI 组较 pSCA-Km5 组、pSCA-VPm5 组 IFN- γ 分泌量增高显著 ($P < 0.05$);pSCA-Km5、pSCA-VPm5 组有 IFN- γ 分泌,但分泌量不高,且此两组间无差异 ($P > 0.05$)。pSCA-VPm5 组与 pSCA-VPm5-PEI 组的 IFN- γ 分泌量差异显著 ($P < 0.05$)。



与对照组相比,*. $P < 0.05$; **. $P < 0.01$,下图同 Compared with control group, *. $P < 0.05$; **. $P < 0.01$. The same as below

图 2 免疫小鼠脾淋巴细胞对特异性抗原刺激的增殖反应

Fig. 2 Splenocytes proliferation to virus stimulation in the immunized mice

2.5 IL-4 水平

收集脾脏淋巴细胞经特异性抗原刺激后的培养上清,利用 ELISA 方法检测上清中的 IL-4 含量(图 4)。从图中可以看出,小鼠免疫后 3 周 pSCA-

Km5、pSCA-VPm5、pSCA-VPm5-PEI 组 IL-4 分泌量均增加 ($P < 0.05$), 免疫 6、9 周时 pSCA-Km5、pSCA-VPm5、pSCA-VPm5-PEI 组及 pSCA-V56 组 IL-4 分泌量增加极显著 ($P < 0.01$), 而 pSCA-VPm3、pSCA-VP6 组 IL-4 分泌量降低 ($P > 0.05$), 9 周时, pSCA-VP6 组 IL-4 分泌量显著降低 ($P < 0.05$)。

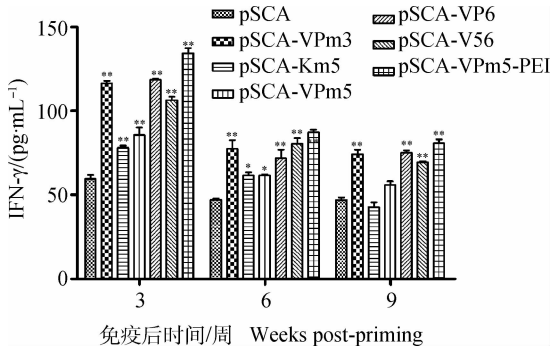


图 3 免疫小鼠脾淋巴细胞经特异性抗原刺激后 IFN- γ 分泌水平

Fig. 3 IFN- γ secreted by the splenocytes of the mice immunized with the different plasmids

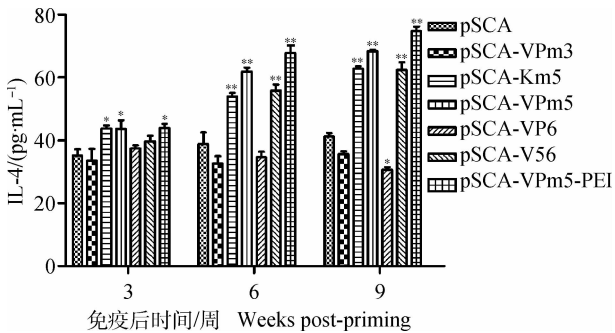


图 4 免疫小鼠脾淋巴细胞经特异性抗原刺激后 IL-4 分泌水平

Fig. 4 IL-4 secreted by the splenocytes of the mice immunized with the different plasmids

2.6 抗体水平

ELISA 方法检测收集血清中抗体水平, 结果如图 5 所示。首免后 3 周, 各组抗体水平升高不明显, 免疫 5 周起, pSCA-VPm5-PEI、pSCA-Km5、pSCA-VPm5、pSCA-V56 组抗体水平明显升高。pSCA-VPm5-PEI 组抗体水平在 5~7 周抗体水平比其他组高, 但之后抗体水平迅速降低。pSCA-VPm5 组 3 周后抗体水平迅速提高, 至首免后 10 周仍处于增加中。pSCA-VPm3 和 pSCA-VP6 组免疫后几乎检测不出抗体。

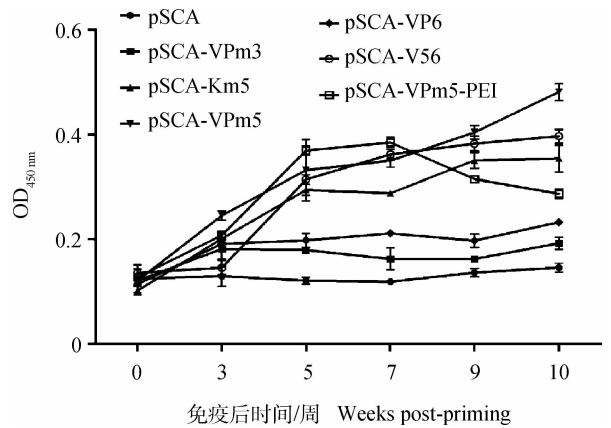


图 5 免疫小鼠血清中抗体水平动态变化

Fig. 5 Dynamic changes of antibody level in the serum of the immunized mice

2.7 免疫小鼠中和抗体检测

免疫小鼠血清中无中和抗体被检测出。

3 讨论

1991 年 P. Liljestrom 把 SFV 的 cDNA 克隆 pSP6-SFV4 结构基因和非结构基因分开, 构建了 SFV 表达载体系统^[10]。在传统表达载体中, 细胞 RNA 聚合酶 II 直接介导外源基因 mRNA 的转录。而在此类载体中, 首先利用 CMV 即刻早期增强子作为启动子控制具有自身复制能力的甲病毒 RNA 复制子的表达。甲病毒 RNA 的翻译产生甲病毒复制酶复合物, 继而介导胞质内重组 RNA 的自身大量复制, 从而使外源基因编码的 mRNAs 的高水平翻译, 高水平表达外源蛋白。甲病毒复制子作为一种新型的真核表达载体已被广泛地应用于外源基因的表达和复制子疫苗的构建。

口蹄疫病毒(FMDV)2A 自我剪切肽(self-cleaving 2A peptide) 常用于多顺反子的构建之中。能够在其 Gly 和 Pro 之间自我剪切, 剪切效率高达 85%~95%^[11]。且 2A 序列的插入不影响蛋白的功能^[12]及细胞定位^[13]。本试验中可见 2A 序列在双基因疫苗 pSCA-V56 中有明显的剪切效果, 但剪切效率远远低于报道。单纯疱疹病毒 I 型(HSV-1)的 VP22 蛋白具有非常强的蛋白转导功能, 能将与之融合的外源蛋白在无任何辅助条件介导下直接跨膜转运进入细胞, 并可在细胞间传递, 而且被转导进入细胞内的外源蛋白仍保留其原有的生物活性^[14]。

构建的甲病毒复制子疫苗 pSCA-VPm3、pSCA-VPm5、pSCA-VP6、pSCA-Km5 和 pSCA-

V56,均能在转染细胞中高效表达外源基因。小鼠免疫试验显示,pSCA-VPm3和pSCA-VP6组能有较好的淋巴细胞增殖反应,特异性抗原刺激后淋巴细胞能释放出一定水平的IFN- γ ,但血清中却难以检测出抗体,这说明其主要诱导细胞免疫,和之前的研究结果是一致的^[15],这进一步验证了Duran J. Plana等认为GP3与细胞免疫有关的观点^[9]。而pSCA-Km5、pSCA-VPm5免疫组在体液免疫方面有较好的效果,血清中能检测出特异性抗体,IL-4分泌水平也较高,但免疫早期,却难以诱导细胞免疫反应,这和江云波等^[16]构建表达PRRSV GP5蛋白的重组伪狂犬病毒免疫小鼠4周后,能产生低水平GP5特异性抗体的结果是一致的。A. M. Barfoed等将Danish株的所有ORFs克隆至DNA载体经多次免疫后发现,ORF5免疫后产生的抗体滴度最高^[17],这进一步表明GP5是产生抗体的主要蛋白。pSCA-V56组在诱导体液免疫和细胞免疫方面都能有较好的效果,淋巴细胞增殖比较明显,二免后血清中能检测到恒定水平的抗体存在,但其抗体水平较pSCA-VPm5低。这和W. Jiang等构建的同时表达GP5和M蛋白的重组腺病毒免疫小鼠试验中M蛋白可通过增强细胞免疫反应和提高中和抗体来增强抗GP5的免疫反应^[18]的结果相悖。但邓瑶等认为重组质粒的转染效率和质粒本身的大小密切相关^[19],这可能也解释了本试验的结果。

PEI能将DNA包裹形成50~200 nm的PEI/DNA复合物,电荷接近中性时,可增强对细胞膜的穿透作用而提高转染效率^[20],但PEI具有较高的毒性。PEI介导的基因转染效率受多方面因素影响,其中N/P值影响最大,N/P值为7~10时可获得较好的细胞转染效果^[21]。本研究中将N/P值设为8,结果显示,PEI在增强复制子疫苗诱导体液免疫和细胞免疫中均能起到一定作用,但诱导的特异性抗体在首免后7周突然降低,至首免后10周,仍没有特异性抗体再产生,这可能和PEI的细胞毒性有关。

在复制子疫苗研究中,人们发现,和传统DNA疫苗相比较,复制子疫苗仅需要很少的量就可以诱导较高的免疫水平。有研究显示,肌肉注射0.1 μg 复制子即可诱导抗原特异性抗体和CD8⁺ T细胞反应。单次免疫后,复制子疫苗在1 μg 时能诱导释放大量的IFN- γ ,且免疫1 μg 时释放的IFN- γ 多于免疫10 μg 剂量的小鼠,而常规DNA疫苗在<10 μg

时都没有免疫应答的产生。国内试验也证实,低剂量免疫组的免疫效果一般优于高剂量组免疫效果^[22]。也有研究中免疫小鼠用10^[23]、20^[24]、100 μg ^[16]等剂量,均能得到较好的免疫效果。

4 结论

构建的基于甲病毒复制子的PRRS DNA疫苗pSCA-VPm3、pSCA-VPm5、pSCA-VP6、pSCA-Km5和pSCA-V56,均能在转染细胞中高效表达外源基因;能诱导动物机体产生一定水平的细胞免疫和体液免疫,但各目的基因所能诱导机体产生体液免疫和细胞免疫的能力不同。它们有望成为具有开发价值的PRRS标记疫苗。

参考文献:

- [1] CHO J G, DEE S A. Porcine reproductive and respiratory syndrome virus[J]. *Theriogenology*, 2006, 66(3):655-662.
- [2] RHEME C, EHRENGRUBER M U, GRANDGIRARD D. Alphaviral cytotoxicity and its implication in vector development [J]. *Exp Physiol*, 2005, 90(1): 45-52.
- [3] BERGLUND P, SMERDOU C, FLEETON M N, et al. Enhancing immune responses using suicidal DNA vaccines [J]. *Nat Biotechnol*, 1998, 16(6):562-565.
- [4] PLAGEMANN P G. The primary GP5 neutralization epitope of North American isolates of porcine reproductive and respiratory syndrome virus[J]. *Vet Immunol Immunopathol*, 2004, 102(3):263-275.
- [5] 杨汉春,管山红,尹晓敏,等. 繁殖与呼吸综合征病毒的分离与初步鉴定[J]. *中国兽医杂志*, 1997, 23(10):9-10.
- [6] KHEYAR A, JABRANE, ZHU A, et al. Alternative codon usage of PRRS virus ORF5 gene increases eucaryotic expression of GP(5) glycoprotein and improves immune response in challenged pigs[J]. *Vaccine*, 2005, 23(31):4016-4022.
- [7] BATISTA E M, SUAREZ P, MOOYOR T W. T cell responses to the structural polypeptides of porcine reproductive and respiratory syndrome virus[J]. *Arch Virol*, 1999, 144(1):117-134.
- [8] REN X, SUO S, JANG Y S. Development of a porcine epidemic diarrhea virus M protein-based ELISA for virus detection[J]. *Biotechnol Lett*, 2011, 33(2): 215-220.

- [9] PLANA DURAN J, CLIMENT I, SARRASECA J, et al. Baculovirus expression of proteins of porcine reproductive and respiratory syndrome virus strain Olot/91. Involvement of ORF3 and ORF5 proteins in protection[J]. *Virus Genes*, 1997, 14(1):19-29.
- [10] LILJESTROM P, GAROFF H. A new generation of animal cell expression vectors based on the Semliki Forest virus replicon [J]. *Biotechnology (N Y)*, 1991, 9(12): 1356-1361.
- [11] MATTION N M, HARNISH E C, CROWLEY J C, et al. Foot-and-mouth disease virus 2A protease mediates cleavage in attenuated Sabin 3 poliovirus vectors engineered for delivery of foreign antigens [J]. *J Virol*, 1996, 70(11): 8124-8127.
- [12] FUELER S, PATERNA J C, WEIBEL M, et al. Bueler Recombinant AAV vectors containing the foot and mouth disease virus 2A sequence confer efficient bicistronic gene expression in cultured cells and rat substantia nigra neurons [J]. *Gene Ther*, 2001, 8(11):864-873.
- [13] EI AMRANI A, BARAKATE A, ASKARI B M, et al. Coordinate expression and independent subcellular targeting of multiple proteins from a single transgene [J]. *Plant Physiol*, 2004, 135(1):16-24.
- [14] HARMS J S, REN X, OLIVEIRA S C, et al. Distinctions between bovine herpesvirus 1 and herpes simplex virus type 1 VP22 tegument protein subcellular associations [J]. *J Virol*, 2000, 74(7): 3301-3312.
- [15] DUAN X, NAUWYNCK H J, PENSAERT M B. Effects of origin and state of differentiation and activation of monocytes/macrophages on their susceptibility to porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV) [J]. *Arch Virol*, 1997, 142(12): 2483-2497.
- [16] 江云波, 方六荣, 肖少波, 等. 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 [J]. *中国农业科学*, 2006, 39(5): 1011-1016.
- [17] BARFOED A M, BLIXENKRONE-MOLLER, JENSEN M H, et al. DNA vaccination of pigs with open reading frame 1-7 of PRRS virus [J]. *Vaccine*, 2004, 22(27-28): 3628-3641.
- [18] JIANG W, JIANG P, LI Y, 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 [J]. *Vet Immunol Immunopathol*, 2006, 113(1-2): 169-180.
- [19] 邓 瑶, 孟 昕, 许洪林, 等. Semliki 森林病毒衍生的 DNA 疫苗与常规 DNA 疫苗的比较 [J]. *病毒学报*, 2002, 18(4):326-331.
- [20] KAKIZAWA Y, KATAOKA K. Block copolymer micelles for delivery of gene and related compounds [J]. *Adv Drug Deliv Rev*, 2002, 54(2):203-222.
- [21] 嵇晓利, 刘劲松, 徐海红, 等. 氮磷比对 PEI 介导 BMP-7 基因转染骨髓间充质干细胞的影响 [J]. *温州医学院学报*, 2012, 42(2):136-139.
- [22] 曹锦艳, 杨 东, 任林柱, 等. 乙肝病毒 RNA 复制子疫苗与 DNA 疫苗对小鼠免疫效率的比较 [J]. *基因组学与应用生物学*, 2011, 30(4): 300-304.
- [23] 郭抗抗, 温肖会, 汤智慧, 等. 猪瘟疫病毒 E2 基因自杀性 DNA 疫苗的构建及动物免疫试验 [J]. *中国兽医学报*, 2011, 31(5): 625-629.
- [24] 田厚文, 韩立群, 任 皎, 等. HPV16 型 E7 复制型 DNA 疫苗诱发的抗肿瘤免疫反应 [J]. *病毒学报*, 2003, 19(1):6-10.

(编辑 白永平)