

## 牛疱疹病毒 I 型 VP22 和猪繁殖与呼吸综合征病毒 GP5 融合基因 DNA 疫苗的免疫效应

# Immunogenicity of DNA Vaccine Expressing GP5 of Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome Virus Fused with VP22 of Bovine Herpesvirus 1

赵 武<sup>1,2</sup>, 肖少波<sup>1</sup>, 方六荣<sup>1</sup>, 江云波<sup>1</sup>, 宋云峰<sup>1</sup>,  
严 琳<sup>1</sup>, 余晓岚<sup>1</sup>, 陈焕春<sup>1\*</sup>

ZHAO Wu<sup>1,2</sup>, XIAO Shao-Bo<sup>1</sup>, FANG Liu-Rong<sup>1</sup>, JIANG Yun-Bo<sup>1</sup>,  
SONG Yun-Feng<sup>1</sup>, YAN Lin<sup>1</sup>, YU Xiao-Lan<sup>1</sup> and CHEN Huan-Chun<sup>1\*</sup>

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

1. Laboratory of Animal Virology, College of Animal Medicine, Huazhong Agricultural University, Wuhan 430070, China

2. Guangxi Veterinary Research Institute, Nanning 530001, China

**摘 要** 为了提高表达 GP5 的猪繁殖与呼吸综合征病毒( PRRSV )DNA 疫苗的免疫效应, 将具有蛋白转导功能的牛疱疹病毒 1 型( BHV-1 )VP22 基因插入到经过修饰具有更好免疫原性的 PRRSV 修饰型 ORF5 基因( ORF5M )上游, 构建 VP22 和 ORF5M 融合表达的真核表达质粒 pCI-VP22-ORF5M。经间接免疫荧光试验( IFA )和 Western-blot 检测证实体外表达后, 免疫 BALB/c 小鼠, 检测小鼠免疫后的 GP5 特异性 ELISA 抗体、抗 PRRSV 中和抗体和脾淋巴细胞增殖反应, 并与非融合的真核表达质粒 pCI-ORF5M 进行比较。结果显示, 融合表达 VP22-GP5 的 DNA 疫苗 pCI-VP22-ORF5M 诱导的体液免疫和细胞免疫反应均明显高于非融合表达的 DNA 疫苗 pCI-ORF5M, 表明蛋白转导相关蛋白 BHV-1 VP22 能显著增强表达 GP5 的 PRRSV DNA 疫苗的免疫效应, 有效发挥了基因免疫佐剂效应, 这为研制 PRRSV 高效 DNA 疫苗奠定了基础, 同时也为其它疾病的高效新型疫苗研究提供了思路。

**关键词** 牛疱疹病毒 1 型 VP22, 猪繁殖与呼吸综合征病毒, ORF5M 基因, 蛋白转导, DNA 疫苗

中图分类号 S852.4 文献标识码 A 文章编号 1000-3061( 2005 )05-0725-06

**Abstract** To enhance the immunogenicity of DNA vaccines expressing the GP5 protein of Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome Virus ( PRRSV ), the tegument protein VP22 ( encoded by VP22 gene ) of Bovine Herpesvirus 1 ( BHV-1 ) which has been demonstrated to exhibit the unusual protein transduction property, was fused to N-terminus of GP5 of DNA vaccine construct pCI-ORF5M, resulting in pCI-VP22-ORF5M expressing VP22-GP5 fusion protein. The expression of VP22-GP5 fusion protein was confirmed by both indirect immunofluorescence assay ( IFA ) and Western blot. To investigate its immunogenicity, BALB/c mice were immunized with the fusion expression plasmid pCI-VP22-ORF5M and non-fusion expression plasmid pCI-ORF5M,

Received: April 28, 2005; Accepted: June 20, 2005.

This work was supported by grants from the National Natural Science Foundation of China ( No. 30300257; No. 30400322 ) and the Fok Ying Tung Education Foundation ( No. 91029 ).

\* Corresponding author. Tel: 86-27-87282608; E-mail: hzauvet@public.wh.hb.cn

国家自然科学基金( No. 30300257; No. 30400322 )和霍英东青年教师基金( No. 91029 )资助项目 中国科学院微生物研究所期刊联合编辑部 <http://journals.im.ac.cn>

respectively. The GP5-specific ELISA antibodies, neutralizing antibodies and lymphocyte proliferative responses were evaluated at various time points after primary immunization. The results showed that GP5-specific ELISA antibodies, neutralizing antibodies and lymphocyte proliferative responses induced by DNA vaccine pCI-VP22-ORF5M were higher significantly than those of DNA vaccine pCI-ORF5M, indicating that fusion expression with BHV-1 VP22 significantly enhances the immunogenicity of DNA vaccine expressing the PRRSV GP5 protein, and that this strategy may also be useful to develop more efficient DNA vaccines against other pathogens.

**Key words** bovine herpesvirus 1 VP22, porcine reproductive and respiratory syndrome virus, ORF5M gene, protein transduction, DNA vaccines

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)引起的一种严重危害养猪业的新传染病<sup>[1]</sup>。目前对 PRRS 的防制以免疫接种为主。但目前使用的 PRRS 商用常规疫苗弱毒苗及灭活苗因存在安全隐患及免疫效果差的缺陷而不能提供理想的安全有效的免疫保护<sup>[2,3]</sup>,故急需研制安全、有效、廉价的新型疫苗来防制该病的发生与流行。

ORF5 基因编码的囊膜糖蛋白 GP5(E 蛋白)是 PRRSV 最主要的结构蛋白及免疫原性蛋白,参与体液免疫与细胞免疫反应,因而是设计 PRRS 新型疫苗的首选目标基因<sup>[4]</sup>。而在目前所报道的 PRRS 新型疫苗(包括 DNA 疫苗、亚单位疫苗及活病毒载体疫苗等)中,DNA 疫苗以其优于其它两种疫苗的免疫效果而成为 PRRS 新型疫苗研究的重点,并已展示出潜在的应用前景。但单独基于 ORF5 基因构建的 DNA 疫苗难以诱发较早及较高的抗体水平<sup>[5,6]</sup>。而经修饰的 ORF5 基因(ORF5M,即在 ORF5 基因 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)较 ORF5 基因具有更好的免疫原性<sup>[7]</sup>。当前在 DNA 疫苗的设计中引入合适的基因免疫增强佐剂,是克服 DNA 疫苗免疫原性较弱的缺陷以及增强 DNA 疫苗免疫效应的重要手段。牛痘疹病毒 1 型(Bovine Herpesvirus 1, BHV-1)披膜蛋白 VP22 具有独特的蛋白转导功能<sup>[8]</sup>,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<sup>[9,10,11]</sup>。目前有多篇研究报道证实将 VP22 与靶抗原基因融合表达显著增强 DNA 疫苗的免疫效应<sup>[12,13]</sup>。因此将目的基因与 VP22 融合表达是 DNA 疫苗设计中的一条新思路。

基于此,本研究构建了 BHV-1 VP22 基因与 PRRSV 修饰型 ORF5 基因(ORF5M)融合表达的 DNA

疫苗,并评价了其诱导 BALB/c 小鼠产生的体液与细胞免疫反应的效果。

## 1 材料与方法

### 1.1 病毒、质粒、细胞和菌株

PRRSV YA 株以及含该毒株完整 ORF5 基因的原核表达质粒 pKG-53 由本实验室方六荣博士分离、构建并提供<sup>[14]</sup>。含 BHV-1 VP22 全基因的质粒 pMD-VP22 由本实验室余晓岚博士构建并提供<sup>[15]</sup>。含 PRRSV YA 株 ORF5M 基因的质粒 pMD-ORF5M 及其真核表达质粒 pCI-ORF5M 由本实验室江云波博士构建并提供<sup>[7]</sup>。真核表达质粒 pCI-neo 为 Promega 产品。pMD18-T 载体为 TaKaRa 产品。Hela 细胞、Marc-145 细胞和大肠杆菌 DH5 $\alpha$  均由本实验室保存。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。

### 1.2 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 LipofectAMINE<sup>TM</sup> 2000 为 Invitrogen 产品。HRP 标记的羊抗鼠/兔 IgG、FITC 标记的羊抗兔 IgG 均为 SBA 产品。非放射性细胞增殖 MTS 检测试剂盒为 Promega 产品。

### 1.3 引物设计与 PCR 扩增

根据 BHV-1 VP22 基因的 DNA 序列和 PRRSV YA 株 ORF5M 基因的 DNA 序列,设计 2 对引物。引物 VP22P1 和 VP22P2 可扩增 VP22 基因完整编码区(下游引物不含终止密码子);引物 5MP1 和 5MP2 可扩增 ORF5M 基因完整编码区。同时,为便于 VP22 基因和 ORF5M 基因的连接以及确保两个基因的读码框(ORF)吻合,在引物 VP22P1 和 VP22P2 两端分别引入 *Eco*R I 酶切位点,引物 5MP1 和 5MP2 两端分别引入 *Xho* I 和 *Xba* I 酶切位点。上述引物均由上海生工生物工程有限公司合成。引物序列如下:

VP22P1: 5'-TTT GAA TTC GCC ATG GCC CGG TTC CAC AG-3'

VP22P2: 5'-TTT GAA TTC CGG CCG GGC CCG CTC GCC-3'

5MP1: 5'-GAA CTC GAG AGT ATG TTG GGG AAA TGC TTG ACC-3'

5MP2: 5'-TTT TCT AGA GAC GAC CCC ATT GTT CCG C-3'

VP22 扩增条件为: 95℃ 5min 变性后进入循环, 循环参数为: 95℃ 1min, 60℃ 1min, 72℃ 1min, 35 个循环后 72℃ 延伸 10min。

ORF5M 扩增条件为: 95℃ 5min 变性后进入循环, 循环参数为: 95℃ 1min, 57℃ 1min, 72℃ 1min, 35 个循环后 72℃ 延伸 10min。

#### 1.4 VP22-ORF5M 融合基因表达质粒的构建

将 VP22 和 ORF5M 基因的 PCR 扩增产物纯化后分别连接到 pMD18-T 载体中, 获得质粒 pT-VP22 和 pT-ORF5M。pT-VP22 经 *Eco*R I 酶切回收 780bp 左右 VP22 目的片段, 定向插入经 *Eco*R I 酶切的真核表达质粒 pCI-neo 中, 得到 pCI-VP22。*Xba*I 酶切 pT-ORF5M, 回收 650bp 左右的 ORF5M 目的片段, 与经 *Xba*I 酶切的 pCI-VP22 连接, 经酶切、PCR 鉴定后得到 VP22-ORF5M 融合基因表达质粒 pCI-VP22-ORF5M。DNA 片段的 PCR 扩增、酶切、纯化回收、去磷酸化、连接、质粒制备、转化大肠杆菌 DH5 $\alpha$  等方法均按常规方法<sup>[16]</sup>及试剂盒说明书进行。

#### 1.5 VP22-GP5 融合蛋白的体外表达检测

以碱裂解法大量制备并经 PEG8000 纯化表达质粒 pCI-VP22-ORF5M、pCI-ORF5M、pCI-VP22 及 pCI-neo。利用间接免疫荧光(IFA)<sup>[7]</sup>和 Western-blot<sup>[16]</sup>检测 VP22-GP5 融合蛋白的体外表达。

待 Hela 细胞单层长至 60% ~ 70% 时, 按脂质体转染试剂盒 LipofectaMINE™ 2000 说明书以脂质体介导法将纯化的表达质粒转染细胞。转染后 48h, 用 PBS(pH7.4) 洗涤, 甲醇室温固定 10 min, PBS 洗涤后于转染孔中加入适当稀释的一抗(抗 GP5 的多克隆兔血清), 37℃ 作用 1h, PBS 洗涤后加入二抗(FITC 标记的羊抗兔 IgG), 37℃ 作用 45min, PBS 洗涤后在荧光显微镜下观察荧光反应。

另转染 48h 后, 收获细胞, 用 pH7.4 PBS 洗涤 1 次后, 加适量 2 × SDS-PAGE 样品缓冲液重悬裂解细胞, 95℃ 水浴 5min, 12% SDS-PAGE 电泳分离后转移到硝酸纤维素膜上, 以抗 GP5 的多克隆兔血清为一

抗, HRP 标记的羊抗兔 IgG 为二抗, DAB 显色, 进行 Western-blot 分析。

#### 1.6 动物免疫及免疫小鼠血清抗体的检测

将 5 ~ 6 周龄的雌性 BALB/c 小鼠随机分成 pCI-VP22-ORF5M、pCI-ORF5M、pCI-VP22 及 pCI-neo 4 个免疫组, 每组 6 只。以每只 100 $\mu$ g (100 $\mu$ L 体积) 的量经后腿肌肉注射免疫小鼠, 共免疫 2 次, 间隔 2 周。于首免后第 2、4、6 周尾部负压采血分离血清。

用本室建立的 GP5-ELISA 方法<sup>[12]</sup>检测血清中 GP5 特异性 ELISA 抗体。其中以 pKG-53 原核表达的 GP5 蛋白作抗原包被酶标板, 一抗为待检血清, 二抗为 HRP 标记的羊抗鼠 IgG。

用微量中和试验<sup>[17]</sup>检测血清中针对 PRRSV 的中和抗体。其中将被检血清于 56℃ 灭活 30min 后, 在 96 孔细胞培养板中将血清作连续 2 倍的倍比稀释, 从 1:2 至 1:64, 每孔 50 $\mu$ L; PRRSV 病毒液为 100TCID<sub>50</sub>, 于 37℃, 5% CO<sub>2</sub> 培养箱中作用 1h, 再于每孔中滴加 2 × 10<sup>5</sup> 个/mL 的 Marc-145 细胞悬液 100 $\mu$ L, 继续培养 5d, 观察细胞病变情况并记录中和效价, 以能完全保护细胞不发生病变的血清最高稀释倍数为其中和效价。

#### 1.7 免疫小鼠淋巴细胞增殖反应试验

参照文献<sup>[18]</sup>介绍的方法及非放射性细胞增殖 MTS 检测试剂盒说明书进行, 略有改进。小鼠首免后 6 周, 无菌取脾脏制备脾淋巴细胞悬液, 用含 10% 小牛血清(FCS) 的 1640 培养基调整细胞浓度为 2 × 10<sup>6</sup> 个/mL。于 96 孔细胞培养板各孔中加入 20 $\mu$ L 含 10% FCS 的 1640 或纯化的经紫外线照射灭活的 PRRSV 病毒液(作刺激原), 各加 4 孔。然后将调整好浓度的脾细胞加入各孔内, 100 $\mu$ L/孔。将培养板置 37℃、5% CO<sub>2</sub> 培养箱培养 72h 后, 每孔加入 MTS 20 $\mu$ L, 混匀后继续培养 4 ~ 6h, 用酶标仪测 OD<sub>492nm</sub> 值。以刺激指数(Stimulation Index, SI)判断淋巴细胞增殖滴度。SI 值 = 试验孔 OD 均值/对照孔 OD 均值。

#### 1.8 统计学方法

实验所得数据均采用双样本等方差 *t* 检验进行处理, *P* < 0.05 为差异显著, *P* < 0.01 为差异极显著。

## 2 结果与讨论

#### 2.1 VP22-ORF5M 融合基因表达质粒的构建

以 VP22P1、VP22P2 和 5MP1、5MP2 为引物分别

扩增到约 780bp 左右的 VP22 基因及约 650bp 左右 ORF5M 基因(图略)。再将 VP22 基因和 ORF5M 基因 PCR 扩增产物各克隆到 pMD18-T 载体中,经测序分析证实两者皆无碱基错配。利用 *Eco*R I 酶切位点将 VP22 基因正向插入 pCI-neo 得到质粒 pCI-VP22 (图略),再利用 *Xba*I 酶切位点将 ORF5M 基因插入 pCI-VP22 的 VP22 基因的下游并与之融合,使 VP22

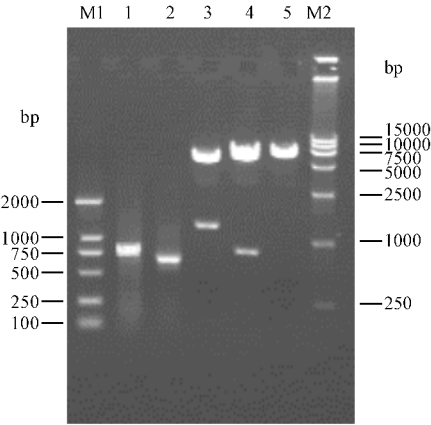


图 1 重组表达质粒 pCI-VP22-ORF5M 的酶切与 PCR 鉴定

Fig. 1 Identification of the recombinant expression plasmid pCI-VP22-ORF5M by restriction analysis and PCR

M1, M2 :DNA marker ;1 :PCR product of VP22 gene from pCI-VP22-ORF5M ;

2 :PCR product of ORF5M gene from pCI-VP22-ORF5M ;

3 :pCI-VP22-ORF5M /*Pst*I ; 4 :pCI-VP22-ORF5M/*Eco*R I ; 5 :pCI-VP22-ORF5M/*Sal*I .

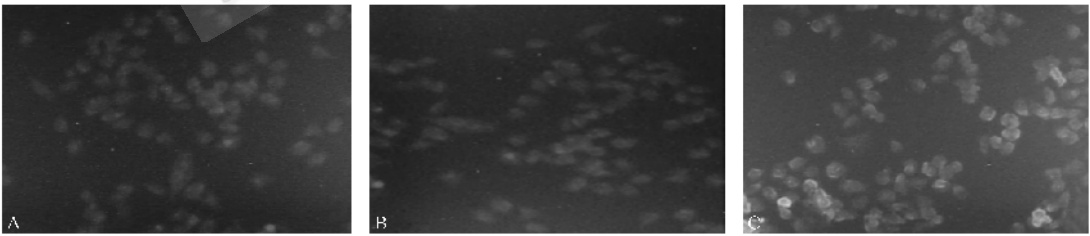


图 3 IFA 检测表达质粒 pCI-VP22-ORF5M 在 HeLa 细胞中 VP22-GP5 融合蛋白的表达(20 × )

Fig. 3 Indirect immunofluorescence analysis of expression of VP22-GP5 fusion protein in HeLa Cells (20 × objective)

A : cells transfected with pCI-neo ;B :cells transfected with pCI-VP22 ; C :cells transfected with pCI-VP22-ORF5M.

将表达质粒 pCI-VP22-ORF5M、pCI-neo 与 pCI-VP22 转染的 HeLa 细胞处理后,进行 SDS-PAGE 电泳及转膜后,以抗 GP5 的多克隆兔血清为一抗进行 Western-blot 分析。结果发现,表达质粒 pCI-VP22-ORF5M 在大小约为 60kD 处出现特异性条带,与预期的 VP22-GP5 融合蛋白分子量相当,而对照表达质粒 pCI-VP22 与 pCI-neo 没有任何特异性条带出现(图 4)。证实 VP22-ORF5M 融合基因表达质粒 pCI-VP22-ORF5M 能够表达 VP22-GP5 融合蛋白,并具有

基因位于 ORF5M 基因上游并与 ORF5M 基因读码框吻合,获得 VP22 和 ORF5M 基因融合的真核表达质粒 pCI-VP22-ORF5M,经酶切、PCR 鉴定证实构建正确(图 1)。结构示意图如图 2 CMV 为 hCMV 启动子和增强子序列,polyA 为 SV40 polyA 转录终止信号序列,ORF5M 为 PRRSV ORF5 基因,VP22 为 BHV-1 VP22 基因)。

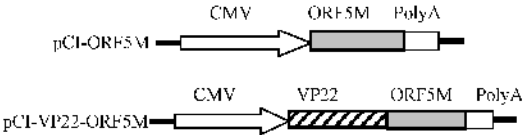


图 2 与 VP22 融合或非融合的 ORF5M 表达质粒的结构模式图

Fig. 2 Schematic diagrams of plasmids expressing ORF5M fused with or without VP22

pCI-ORF5M : the plasmid expressing ORF5M alone ;

pCI-VP22-ORF5M : the plasmid expressing VP22-ORF5M fusion gene.

2.2 VP22-GP5 融合蛋白体外表达的检测

利用脂质体法将 pCI-VP22-ORF5M 以及对照载体 pCI-neo、pCI-VP22 转染 HeLa 细胞,转染后 48h 进行 IFA 检测 VP22-GP5 融合蛋白在 HeLa 细胞中的表达。结果 pCI-neo 与 pCI-VP22 为阴性,pCI-VP22-ORF5M 则呈较强荧光着色(图 3),说明 VP22-ORF5M 基因融合的表达质粒 pCI-VP22-ORF5M 能较好地在体外表达 VP22-GP5 融合蛋白。

生物学活性。

2.3 GP5 特异性 ELISA 抗体水平检测

利用本实验室建立的 GP5-ELISA 方法<sup>[14]</sup>对小鼠免疫后第 2、4、6 周血清中 GP5 特异性 ELISA 抗体水平进行了检测。结果显示,首免后第 6 周,与 VP22 融合的 DNA 疫苗 pCI-VP22-ORF5M 免疫组诱导的 GP5 特异性 ELISA 抗体显著高于非融合的 DNA 疫苗 pCI-ORF5M 免疫组( $P < 0.05$ ),对照免疫组 pCI-VP22、pCI-neo 结果为阴性(图 5)。表明 VP22

能增强与之融合的 GP5 蛋白所激发的抗体反应。

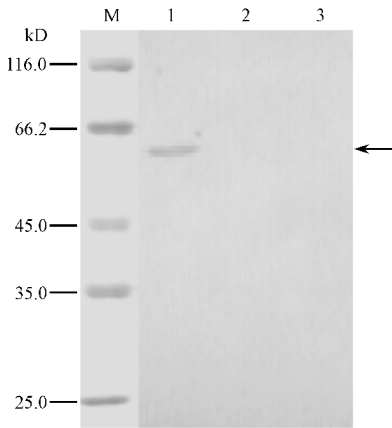


图 4 Western-blot 检测表达质粒 pCI-VP22-ORF5M 在 Hela 细胞中 VP22-GP5 融合蛋白的表达

Fig. 4 Western blot analysis of expression of VP22-GP5 fusion protein in Hela cells

M :protein marker ; 1 : pCI-VP22-ORF5M ; 2 : pCI-neo ; 3 : pCI-VP22.

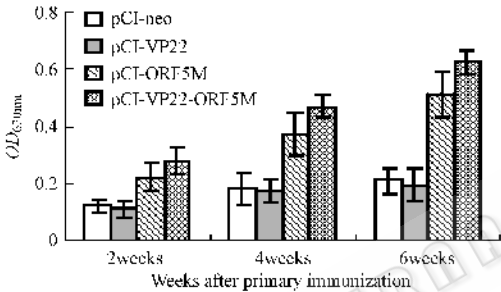


图 5 小鼠免疫后不同时间诱导的 GP5 特异性 ELISA 抗体水平

Fig. 5 The GP5-specific ELISA antibody levels at 2 4 6 weeks after primary immunization in mice

2.4 抗 PRRSV 中和抗体水平检测

在检测 GP5 特异性 ELISA 抗体水平基础上 ,以微量中和试验检测小鼠首次免疫后第 2、4 和 6 周血清中抗 PRRSV 中和抗体水平 ,结果与 ELISA 抗体检测结果基本一致 (图 6)。首免后第 6 周 ,与 VP22 融

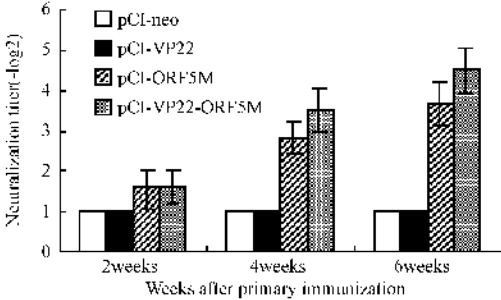


图 6 小鼠免疫后不同时间诱导的抗 PRRSV 中和抗体水平

Fig. 6 The anti-PRRSV neutralization antibody titers at 2 4 6 weeks after primary immunization in mice

合的 DNA 疫苗 pCI-VP22-ORF5M 免疫组诱导的中和抗体水平高于非融合的 DNA 疫苗 pCI-ORF5M 免疫组 ( $P < 0.05$ )。提示 VP22 蛋白亦可增强 DNA 疫苗 pCI-VP22-ORF5M 的中和抗体水平。

2.5 免疫小鼠脾淋巴细胞增殖反应

为了了解 VP22 蛋白能否增强 DNA 疫苗 pCI-VP22-ORF5M 所诱导的细胞免疫反应 ,以纯化的经紫外线照射灭活的 PRRSV 病毒作刺激原 ,采用 MTS 法检测免疫小鼠脾淋巴细胞增殖反应。结果显示 (见图 7),DNA 疫苗 pCI-VP22-ORF5M 和 pCI-ORF5M 免疫组均表现出明显的淋巴细胞增殖反应 ,而且与 VP22 融合的 DNA 疫苗 pCI-VP22-ORF5M 免疫组的细胞增殖反应高于非融合的 DNA 疫苗 pCI-ORF5M 免疫组 ( $P < 0.05$ )。pCI-neo 和 pCI-VP22 对照免疫组的小鼠脾细胞无增殖反应。提示 VP22 可增强 DNA 疫苗 pCI-VP22-ORF5M 所诱导的细胞免疫反应。

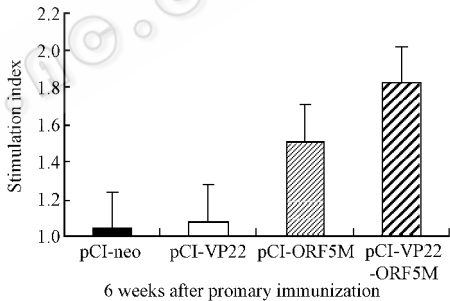


图 7 小鼠免疫后 6 周的脾淋巴细胞增殖反应

Fig. 7 Lymphocyte proliferative responses at 6 weeks after primary immunization in mice

从动物试验结果来看 ,VP22-GP5 融合表达的 DNA 疫苗 pCI-VP22-ORF5M 所诱发的体液和细胞免疫反应均明显强于单表达 GP5 的 DNA 疫苗 pCI-ORF5M ,说明与 VP22 融合表达的 GP5 具有更好的免疫原性 ,VP22 发挥了免疫佐剂效应。

BHV-1 VP22 是蛋白转导相关蛋白<sup>[8]</sup> ,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而直接发挥作用<sup>[9,10,11]</sup>。因此其能显著提高外源蛋白的提呈效率进而提高其免疫原性。尽管迄今对于蛋白转导的跨膜机理仍未得以完全阐释 ,但关于 VP22 蛋白转导特性应用基础研究仍得到广泛开展 ,并取得令人鼓舞的研究成果。目前已有多篇文献报道证实将 VP22 与靶抗原基因融合表达显著增强 DNA 疫苗的免疫效应<sup>[12,13]</sup>。作为一种新的富有生命力的技

术,蛋白转导为进一步提高 DNA 疫苗的免疫效应提供了一条新的有效途径。本研究在 ORF5M 基因 DNA 疫苗中引入 BHV-1 VP22,目的就是利用 VP22 独特的蛋白转导功能来提高疫苗的免疫效应。动物试验结果表明,VP22-ORF5M 融合基因可诱发机体产生更强的体液和细胞免疫应答,提示 BHV-1 VP22 有效地发挥了基因免疫佐剂效应,这为研制 PRRSV 高效 DNA 疫苗奠定了基础,同时也为其它疾病的高效新型疫苗研究提供了思路 and 有效途径。

## REFERENCES(参考文献)

- [ 1 ] Meulenberg JJ. PRRSV, the virus. *Vet Res*, 2000 **31**( 1 ):11 – 21
- [ 2 ] Madsen KG, Hansen CM, Madsen ES *et al.* Sequence analysis of porcine reproductive and respiratory syndrome virus of the american type collected from danish swine herds. *Arch Virol*, 1998, **143**:1683 – 1700
- [ 3 ] Nielson TL, Nielson 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. *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. *Vet Microbio*, 1999, **66**:171 – 186
- [ 5 ] Pirzadeh B, Dea S. Immune response in pigs vaccinated with plasmid DNA encoding ORF5 of porcine reproductive and respiratory syndrome virus. *J Gen Virol*, 1998, **58**:989 – 999
- [ 6 ] Kwang J, Zuckermann F, Ross G *et al.* Antibody and cellular immune responses of swine following immunization with plasmid DNA encoding the PRRS virus ORFs4, 5 and 7. *Vet Sci*, 1999, **67**:199 – 201
- [ 7 ] Jiang YB(江云波), Fang LR(方六荣), Xiao SB(肖少波) *et al.* Enhanced humoral immune response of DNA vaccine composing a modified ORF5 gene of porcine reproductive and respiratory syndrome virus. *Chinese Journal of Veterinary Science*(中国兽医学报), 2005, **25**( 1 ):1 – 3
- [ 8 ] Harms JS, Ren X, Oliveira SC *et al.* Distinctions between bovine herpesvirus 1 and herpes simplex virus type 1 VP22 tegument protein subcellular associations. *J Virol*, 2000, **74**:3301 – 3312
- [ 9 ] Elliott G, O'Hare P. Intercellular trafficking and protein delivery by a herpesvirus structural protein. *Cell*, 1997, **88**( 2 ):223 – 233
- [ 10 ] Wills KN, Atencio IA, Avanzini JB *et al.* Intratumoral spread and increased efficacy of a p53-VP22 fusion protein expressed by a recombinant adenovirus. *J Virol*, 2001, **75**:8733 – 8741
- [ 11 ] Kretz A, Wybranietz WA, Hermening S *et al.* HSV-1 VP22 augments adenoviral gene transfer to CNS neurons in the retina and striatum *in vivo*. *Mol Ther*, 2003, **7**:659 – 669
- [ 12 ] Oliveira SC, Harms JS, Afonso RR *et al.* A genetic immunization adjuvant system based on BVP22-antigen fusion. *Hum Gene Ther*, 2001, **12**:1353 – 1359
- [ 13 ] Kim TV, Hung CF, Kim JW *et al.* Vaccination with a DNA vaccine encoding herpes simplex virus type 1 VP22 linked to antigen generates long-term antigen-specific CD8-positive memory T cells and protective immunity. *Hum Gene Ther*, 2004, **15**:167 – 177
- [ 14 ] Fang LR(方六荣). Study on suicidal DNA vaccine and virus veter vaccine of porcine reproductive and respiratory. [ Doctoral thesis ], Huazhong Agricultural University, 2003
- [ 15 ] Yu XI(余晓岚), Xiao SB(肖少波), Fang LR(方六荣) *et al.* The sequence analysis and expression of UL49 gene of Bovine herpesvirus 1. *Virologica Sinica*(中国病毒学), 2003, **18**( 2 ):104 – 107
- [ 16 ] Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. 2nd ed, New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1996
- [ 17 ] Yin Z(殷震), Liu JH(刘景华). *Animal Virology(动物病毒学)*, 2<sup>nd</sup> ed(第二版). Beijing(北京): Science Press(科学出版社), 1997, pp. 336 – 340
- [ 18 ] Xiao SB, Chen HC, Fang LR *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. *Vaccine*, 2004, **22**:345 – 351