

鸡白细胞介素 2 增强传染性法氏囊病病毒多聚蛋白 DNA 疫苗免疫原性的研究

于 涟* 李建荣 黄耀伟 梁雪芽 孟松树

(浙江大学动物预防医学研究所 杭州 310029)

摘 要 鸡白细胞介素 2(IL-2)基因是新近被确定的非哺乳类 IL-2 基因。将鸡白细胞介素 2(IL-2)基因和传染性法氏囊病病毒(IBDV)多聚蛋白基因(VP2/VP4/VP3)分别插入真核表达载体 pCI 的 CMV 启动子下游,制备 DNA 疫苗,免疫 14 日龄 SPF 鸡,14 d 后二免,二免后 3 d 攻击标准强毒株。结果表明共注射鸡 IL-2 质粒能明显增强 DNA 疫苗对强毒攻击,保护率达 80%;能增强 DNA 疫苗诱导的中和抗体效价($P < 0.05$);能显著促进鸡胸腺、脾脏和外周血液 T 淋巴细胞及法氏囊 B 淋巴细胞增殖反应($P < 0.05$)。这些结果提示鸡 IL-2 能明显增强 IBDV 多聚蛋白 DNA 疫苗的免疫原性,是一种优良的禽类 DNA 疫苗佐剂。

关键词 鸡白细胞介素 2(IL-2), 传染性法氏囊病病毒(IBDV), 多聚蛋白基因, DNA 疫苗, 免疫原性

中图分类号 Q78 **文献标识码** A **文章编号** 1000-3061(2001)06-0652-06

白细胞介素 2(IL-2)是一种极为重要的淋巴因子,自从 1983 年 Taniguchi 首次克隆了人 IL-2 cDNA 以来,迄今为止至少已克隆了 30 种哺乳动物的 IL-2 基因,并已被广泛应用于 DNA 疫苗的免疫试验中,研究发现 IL-2 能通过不同作用环节调节和增强 DNA 疫苗的免疫效果,发挥其佐剂效应。但对禽类 IL-2 的分子生物学研究远远滞后于哺乳动物^[1,2]。主要原因是长期以来对鸡细胞因子和调节基因结构知之甚少,而且鸡 IL-2 与哺乳动物 IL-2 差异较大,使得在哺乳动物中使用的成功技术都无法应用于鸡 IL-2 的研究。直至 1999 年,鸡 IL-2 基因才正式被定序,最近研究发现重组鸡 IL-2 分子有类似于哺乳动物 IL-2 的活性^[3,4],但是否对禽类 DNA 疫苗具有广泛的调节和增强作用尚不十分清楚。

传染性法氏囊病(IBD)是目前危害世界养禽业的三大主要传染病之一,该病的病原传染性法氏囊病病毒(IBDV)主要侵害雏鸡的中枢免疫器官法氏囊,造成免疫抑制和其它疫苗的免疫失败。IBDV 为双股双节段 RNA 病毒,其基因组由 A、B 两个节段组成,其中 A 节段包括两个部分重叠的开放阅读框架(ORF1 和 ORF2)。ORF2 编码与病毒致病性有关的 VP5 蛋白^[5];ORF1 编码多聚蛋白(VP0),经加工剪切

成 3 个成熟的蛋白 VP2、VP4 和 VP3^[6]。VP2 是病毒的主要宿主保护性抗原^[7,8],VP3 是群特异性抗原^[9],VP4 是病毒的蛋白酶^[10]。B 节段编码 VP1 蛋白,VP1 具有 RNA 依赖的 RNA 聚合酶活性,并且是 A、B 节段之间的连接蛋白^[8,10],A、B 节段两端均存在非编码区(NCRs),NCRs 虽与病毒毒力无关,但是病毒繁殖复制所必须的序列^[5,10]。DNA 疫苗预防传染性法氏囊病的研究尚处于起步阶段,Fordor 等^[11](1999)初步证明 IBDV 多聚蛋白基因免疫能产生保护性反应,但效果不及常规的弱毒疫苗。因此,如何提高诱导机体免疫应答效率是今后 IBDV DNA 疫苗重点研究方向。本研究旨在克隆我国地方品种鸡(萧山鸡)的 IL-2 基因,构建了真核表达载体,并探讨其对 IBDV DNA 疫苗免疫效果的影响。

1 材料与方法

1.1 实验用鸡、病毒株及疫苗

SPF 鸡和 SPF 鸡胚购自山东家禽研究所 SPF 鸡试验场;萧山鸡购自萧山市某鸡场。传染性法氏囊病病毒 ZJ2000 株是本所从杭州某鸡场新近分离到的强毒株。IBDV 标准强毒株 BC6/85 株购自中国兽药监察所。

收稿日期:2001-05-30,修回日期:2001-08-13。

基金项目:国家“863”高科技计划资助(101-j99-02)和国家重点科技项目资助(96-920-34-02)。

* 通讯作者。 Tel:86-0571-86971092; Fax:86-571-85158548; E-mail: yulian@zju.edu.cn

1.2 质粒和菌株

E. coli DH5 α 菌株由本室保存,克隆载体 pGEM-T Easy Vector、真核表达载体 pCI 均购自 Promega 公司。

1.3 工具酶和试剂

SuperscriptTM Preamplification System 反转录试剂盒、RNA 抽提 Trizol 试剂盒、RPMI 1640 培养基、MEM 培养基、Hank's 等购自 Gibco 公司;Expand High Fidelity PCR System 购自 Boehringer Mannheim 公司;限制酶、dNTP、T4DNA 连接酶均购自大连宝生物工程公司;ConA、PMA、MTT 为 Sigma 产品;Sephadex 2B 柱由本校生化所提供。RPMI 1640 培养液和 Hank's 液按说明书配制,过滤除菌,4℃ 保存备用。ConA、PMA 以 RPMI 1640 培养液配制成 1mg/mL 的溶液,MTT 以 RPMI 1640 培养液配制成 5mg/mL 的溶液,过滤除菌,-20℃ 保存。

1.4 鸡白细胞介素 2 基因的克隆

鸡脾淋巴细胞悬液的制备按 Sundick 等^[1]报道的方法进行。无菌分离萧山鸡的脾脏,捣碎置于无 Ca²⁺、Mg²⁺ PBS (pH7.2) 中,300g 离心 10min,取上清液 500g 离心 30min 收集淋巴细胞,PBS 洗涤 3 次,再以 RPMI 1640 培养液洗涤 1 次,用 RPMI 1640 培养液将细胞稀释成 8×10^6 个/mL,加入终浓度为 10 μ g/mL 的 ConA,5% CO₂ 培养箱 40℃ 培养 6~12h,Trizol 试剂盒一步法提取淋巴细胞总 RNA,根据 Sundick 等^[1]和 Kaiser 等^[2]发表的鸡 IL-2 基因 cDNA 序列,设计 1 对引物(由上海生物工程公司合成)。P1 (5'-TGG-GACACTGCCATGATG-3'),P2 (5'-AATTTATTAAATGTCATCTAGAAG-3')。预期扩增 737bp 片段,循环条件为 94℃ 变性 45s,48℃ 退火 1min,72℃ 延伸 1min,共 30 个循环,72℃ 延伸 10min。回收目的片段克隆入 T 载体并测序。

1.5 传染性法氏囊病毒 ZJ2000 株多聚蛋白基因的克隆

根据已发表的 IBDV-CEF94 株基因组 A 节段序列设计 1 对引物,P3 (5' CGGAATTCATGACAAACCTGCAAGATCAA3'),P4 (5'TAGGTACCTCACTCAAGTCTCATCAGAGAC3')。IBDV 基因组 dsRNA 的抽提按 Boot 等^[5]和 Akin 等^[12]报道的方法进行,反转录按 Gibco BRL 的 SuperscriptTM Preamplification System 试剂盒进行,PCR 按 Expand High Fidelity PCR System 的操作指南进行。优化后的循环反应参数为 94℃ 预变性 2min,94℃ 变性 15s,61℃ 退火 30s,68℃ 延伸 3min,最后 72℃ 保温 3min,共 30 个循环。分别回收目的片段,克隆入 T 载体并测序。

1.6 鸡 IL-2 和 IBDV 多聚蛋白基因真核表达载体的构建和 DNA 疫苗的制备

按常规方法进行,EcoRI 和 KpnI 分别从 T 载体中切下 IL-2 和 VP0 基因,插入真核表达载体 pCI 的 CMV 启动子下游,构建成 pCI-IL-2 和 pCI-VP0,进行 PCR 鉴定和酶切鉴定。质粒大规模制备按常规的碱裂解法,并经 Sephadex 2B 柱纯化后制成 DNA 疫苗。

1.7 动物攻毒保护试验

14 日龄 SPF 鸡 120 只,共分成 6 组,即 pCI-VP0 + pCI-IL-2 组、pCI-VP0 组、pCI-IL-2 组、pCI 组、正常对照组和攻毒对照组,每组 20 只。所有免疫组于 14 日龄首次免疫,14d 后,进行二次免疫,免疫途径均为肌肉注射和皮内注射结合法,剂量为 200 μ g/只。二次免疫后 14d,每组各取 15 只鸡分别攻击中国标准强毒株 BC6/85 株,攻击后 3d 人工扑杀,称取鸡体重、法氏囊重和脾重,计算平均囊体比和脾体比,检查鸡的法氏囊、脾脏等器官的眼观病变,所有法氏囊用 10% 甲醛固定。

1.8 血清中和抗体动态规律的测定

随机翅静脉定期采集各天组 5 只鸡的血液,分离血清,56℃ 灭活 30min。常规法制备鸡胚成纤维细胞,采用固定病毒稀释血清法测定鸡群的中和抗体效价。

1.9 淋巴细胞增殖反应的测定

各组鸡在首免后 1、2 周,二免后 1、2、3、4、5、6 周随机剖杀 5 只鸡,无菌采集外周血液、脾脏、胸腺、法氏囊等制成单淋巴细胞悬液。MTT 法分别测定法氏囊 B 淋巴细胞、胸腺、脾脏、外周血液 T 淋巴细胞、脾脏 T 和 B 细胞的增殖反应。取 50 μ L 法氏囊淋巴细胞和 50 μ L 脾淋巴细胞分别加入 50 μ L PMA 溶液 (1 μ g/mL),5% CO₂ 培养箱 40℃ 培养 21h;取 50 μ L 胸腺淋巴细胞和 50 μ L 脾淋巴细胞分别加入 50 μ L ConA 溶液 (40 μ L/mL),5% CO₂ 培养箱 40℃ 培养 48h;上述培养物均加入 10 μ L MTT (5mg/mL),继续培养 3h 后加入 10% SDS-0.01mol/L HCl 溶液 100 μ L,混匀,培养 2h 后,以对照孔调零,测定 OD_{570nm} 值,每个样品设 5 个重复孔。

1.10 统计学分析

利用 SPSS 软件包按生物统计学上的方差分析法对平均囊体比、平均脾体比、中和抗体数据、细胞增殖反应数据进行统计学处理,显著水平为 $P < 0.05$ 。某个时间的中和抗体效价以 5 只鸡的中和抗体的几何平均数 (GMT 值) 表示;某个时间内的淋巴细胞增殖反应以 5 只鸡的 OD₅₇₀ 平均数表示。

1.11 法氏囊病理组织学观察

所有试验组雏鸡的法氏囊用 10% 甲醛固定,常规法石蜡包埋,切片,苏木精-伊红染色,镜检,观察法氏囊的病理组织学变化。

2 结 果

2.1 鸡 IL-2 cDNA 的序列特征

克隆的萧山鸡 IL-2 cDNA 全长共 737 个核苷酸,编码 143 个氨基酸的前体蛋白,还包括 12 个核苷酸的 5'非编码区和 293 个核苷酸的 3'非编码区(GenBank 收录号为 AY029588)。在 3'-UTR 序列中包含 5 个重复的不稳定基序“ATTTA”,这可能与 mRNA 的快速降解有关,此外在 3'非编码区还含有一个多聚腺苷酸信号。序列同源性比较发现,克隆的鸡 IL-2 基因与 GenBank 中收录的另外两条鸡 IL-2 基因序列(AF000631 和 AF033563)仅有 1~3 个氨基酸的差异,同源性高达 96.6%~99.3%。与同为非哺乳类的火鸡 IL-2 的同源性高达 69.4%,与人 IL-2 同源性高达 29.4%,与其它哺乳动物的同源性在 21.2%~27.6%左右。二级结构预测表明鸡 IL-2 分子 N 端存在一个长 22 个氨基酸的前导肽,4 个半胱氨酸形成两个链内二硫键,并存在类似人 IL-2 的 4 个 α 螺旋,这些结构在维持 IL-2 生物学活性中起到重要作用(图 1)。



图 1 萧山鸡 IL-2 cDNA 及编码的氨基酸序列
Fig.1 Xiaoshan chicken IL-2 cDNA and predicted amino acid sequence

The cDNA is 737bp in length and is entered in GenBank (accession No. AY029588); the precursor chicken IL-2 protein is 143 amino acids. The start code and stop code are underlined. ATTTA repeats, which reduce mRNA half-life, are boxed. The polyadenylation signal is shown by a shallow.

2.2 ZJ2000 株多聚蛋白基因的序列特征

克隆的 IBDV-ZJ2000 株多聚蛋白基因 (VP2/

VP4/VP3) 全长 3036 个核苷酸 (GenBank 收录号为 AF321056), 编码完整的多聚蛋白。与其它毒株相比, ZJ2000 株共有 14~38 个氨基酸的替代, 其中特有氨基酸 6 个, 变异大多数集中在 VP2 高变区, 突变率达 2.9%~11%, 第二个小亲水区 280 位氨基酸由 S 替代了 N, 290 位 M 替代了 L, 这两个突变可能与 IBDV 的抗原性有关。VP2-VP4 剪切位点附近 511 和 540 位氨基酸的变异可能是导致 ZJ2000 毒力增强的关键。系统进化树分析表明 ZJ2000 株与德国强毒株 Cu-1 的亲缘关系最近。

2.3 鸡 IL-2 增强 IBDV 多聚蛋白 DNA 疫苗对强毒的攻击保护效果观察

DNA 疫苗于 14 日龄首免, 2 周后二免, 二免后 2 周攻击中国标准强毒株, 结果表明 (表 1) pCI-VP0 组的攻击保护率仅达 60%, 而 pCI-VP0 + pCI-IL-2 组的攻击保护率达 80%, 说明鸡 IL-2 能明显增强 IBDV DNA 疫苗对强毒的攻击保护。pCI-IL-2 对照组、pCI 对照组、攻毒对照组均出现 IBD 典型的临床症状、病理变化和组织学病变。病鸡主要表现为精神萎靡、羽毛蓬松、拉白色粪便, 并出现鸡只的死亡, 剖检发现法氏囊水肿 ($P < 0.05$)、内有大量干酪样物质、法氏囊粘膜有点状出血, 脾脏肿大 ($P < 0.05$)。组织病理学变化表现为法氏囊淋巴细胞减少、萎缩、坏死, 淋巴滤泡消失, 呈空泡状, 结缔组织大量增生。

2.4 鸡 IL-2 增强 DNA 疫苗诱导的体液免疫应答效果观察

各组质粒免疫 SPF 鸡后的中和抗体动态变化规律见图 2。pCI-VP0 组首次免疫后 10d 内基本检测不到抗体, 免疫后 2 周开始上升, 至二免后 14d 的抗体效价达 2599, 免疫后 49d 开始下降。pCI-VP0 + pCI-IL-2 组在首次免疫后 10d 便可检出中和抗体, 至二免后 14d 可达 3057.4, 至二免后 56d 还呈上升趋势, 整个检测过程中的抗体效价显著高于 pCI-VP0 组 ($P < 0.05$) (图 2), 说明共注射鸡 IL-2 质粒能显著增强 DNA 疫苗诱导的中和抗体水平。在整个试验过程中, pCI 对照组、pCI-IL-2 对照组和正常对照组均未检测到特异性的 IBDV 抗体。

2.5 鸡 IL-2 增强 DNA 疫苗诱导的 B 淋巴细胞增殖效果观察

各组质粒 DNA 免疫后每隔 1 周剖取法氏囊, 分离 B 淋巴细胞, 经 PMA 刺激后, MTT 法测定 B 淋巴细胞的增殖动态, 结果见图 3。共注射 IL-2 质粒组法氏囊 B 细胞的增殖反应显著地高于单注射 pCI-VP0 组 ($P < 0.05$), 而 pCI 对照组均无明显反应, 说

表1 鸡 IL-2 增强 IBDV DNA 疫苗对强毒株的攻击保护率

Table 1 Enhanced protective immune response of DNA vaccine by co-administration of plasmid encoding chicken IL-2

Groups	No. chickens bursa lesions score ^A				Average organ/BW ratio ^B		Dead	Protection ratio
	0	1	2	3	Bursa/BW	Spleen/BW		
pCI-VP0 + pCI-IL-2	12	1	2	0	5.43 ^a	2.45 ^a	0	12/15(80%)
pCI-VP0	9	2	3	1	5.72 ^a	2.61 ^a	0	9/15(60%)
pCI-IL-2 control	0	0	1	14	6.56 ^b	3.79 ^b	3	0
pCI control	0	1	2	12	6.35 ^b	3.75 ^b	4	0
Challenge control	0	0	3	12	6.83 ^b	3.29 ^b	4	0
Normal control	15	0	0	0	5.21 ^a	2.31 ^a	0	/

^A Bursal lesion scores: 0 = no lesions; 1 = mild cell depletion in a few follicles; 2 = moderate atrophy or cell depletion in 1/3 to 1/2 of the follicles; 3 = severe necrosis and atrophy in all follicles. ^B Values show averages for 15 chickens. Average organ/BW = average organ in grams/total body weight in grams. a indicates values are not significantly different with normal control ($P > 0.05$). b indicates values are significantly different with normal control ($P < 0.05$).

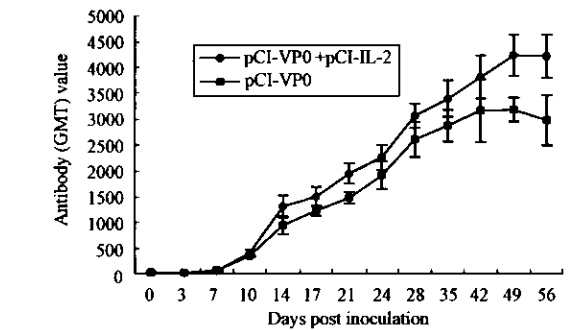


图2 IL-2 增强 IBDV DNA 疫苗诱导的中和抗体反应

Fig.2 Enhanced antibody response of DNA vaccine by co-administration of plasmid encoding chicken IL-2

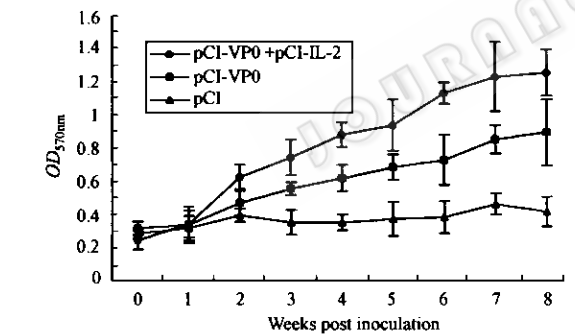


图3 IL-2 增强法氏囊 B 淋巴细胞的增殖反应动态

Fig.3 Enhanced B lymphocyte proliferation response of bursa by co-administration of plasmid encoding chicken IL-2

明鸡 IL-2 能促进 DNA 疫苗诱导的 B 细胞的生长、发育和成熟。

2.6 鸡 IL-2 增强 DNA 疫苗诱导的 T 淋巴细胞增殖效果观察

各组质粒 DNA 免疫后每隔 1 周分别分离外周血液、胸腺和脾脏 T 淋巴细胞,经 ConA 刺激后,MTT 法测定 T 淋巴细胞的增殖动态,结果分别见图 4、图 5 和图 6。共注射 IL-2 质粒组的外周血液、胸腺和脾脏 T 细胞的增殖反应显著地高于单注射 pCI-VP0 组 ($P < 0.05$),而 pCI 对照组均无明显反应,说明 IL-2

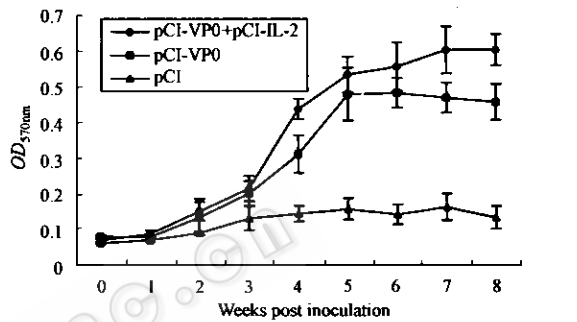


图4 鸡 IL-2 增强外周血液 T 淋巴细胞增殖反应动态

Fig.4 Enhanced T lymphocyte proliferation response of peripheral blood by co-administration of plasmid encoding chicken IL-2

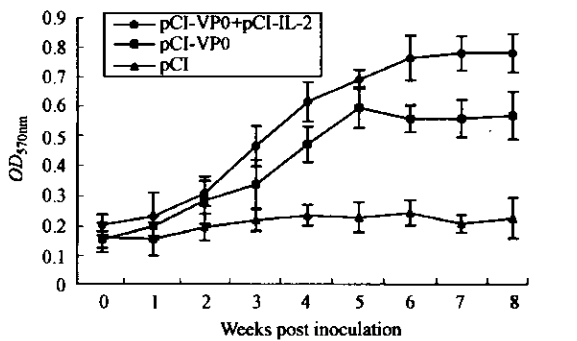


图5 IL-2 增强胸腺 T 淋巴细胞的增殖反应动态

Fig.5 Enhanced T lymphocyte proliferation response of thymus by co-administration of plasmid encoding chicken IL-2

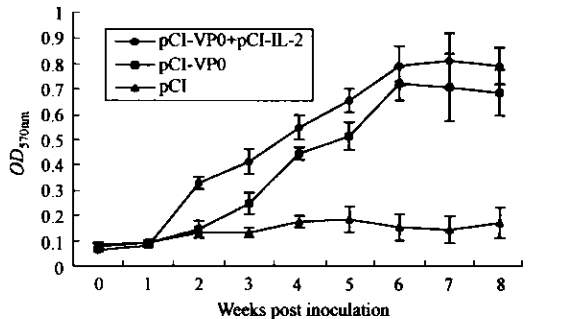


图6 IL-2 增强脾脏 T 淋巴细胞的增殖反应动态

Fig.6 Enhanced T lymphocyte proliferation response of spleen by co-administration of plasmid encoding chicken IL-2

能促进 DNA 疫苗诱导的 T 细胞生长、发育和成熟。

3 讨论

传染性法氏囊病病毒主要侵害雏鸡中枢免疫器官法氏囊中的 B 淋巴细胞,导致免疫抑制。近年来,由于变异株和超强毒株的流行,经常导致免疫失败^[8,10,13]。基因免疫的发现为传染性法氏囊病的防治提供了一条新思路。以多聚蛋白基因构建的真核表达载体可在细胞中表达形成病毒性颗粒,并可正确剪切成天然构象下的主要宿主保护性抗原 VP2 蛋白^[9~11]。Fordor 等^[11] (1999) 发现多聚蛋白基因 DNA 疫苗虽能产生免疫保护,但效果不及常规疫苗,这可能与质粒 DNA 的给予途径、吸收、抗原表达和提呈等诸多因素有关,另外一个重要的原因是至今还未发现一种有效的佐剂作为禽类 DNA 疫苗免疫增强剂。目前常用将抗原基因与细胞因子质粒联合注射或融合共表达的方法来增强 DNA 疫苗的免疫效果,其中以 IL-2 的应用最为广泛,哺乳动物 IL-2 已被广泛用作 DNA 疫苗的免疫增强剂^[14~17]。但对鸡 IL-2 的研究正处于起步阶段,虽然研究表明鸡 IL-2 能增强体外诱导培养的鸡 T 淋巴细胞增殖,但在体内是否也和哺乳动物 IL-2 一样对 DNA 疫苗具有广泛的调节作用尚未清楚。

从研究结果来看,鸡 IL-2 增强了 IBDV 多聚蛋白 DNA 疫苗的免疫原性。其一是鸡 IL-2 提高了 IBDV DNA 疫苗诱导的 T 淋巴细胞增殖反应的强度,pCI-IL-2 和 pCI-VP0 联合免疫组的脾脏、胸腺、外周淋巴血液的 T 淋巴细胞增殖强度均显著地高于单注射 pCI-VP0 组 ($P < 0.05$),而 T 淋巴细胞的增殖强度与细胞毒 T 细胞 (CTL) 的杀伤活性成正相关,最终提高了鸡体的细胞免疫功能。其二是鸡 IL-2 增强了 IBDV DNA 疫苗诱导的 B 淋巴细胞增殖反应的强度,联合免疫组的法氏囊 B 淋巴细胞增殖强度显著高于单注射 DNA 疫苗组 ($P < 0.05$),而 B 淋巴细胞增殖强度反应了鸡体的体液免疫功能,具体表现为提高诱导中和抗体的能力,其结果恰与中和抗体的检测结果相吻合,联合免疫组诱导的中和抗体水平显著高于单注射 DNA 疫苗组 ($P < 0.05$)。其三是鸡 IL-2 增强了 IBDV DNA 疫苗对强毒的免疫保护,减缓了 IBDV 症状,其根本是鸡 IL-2 增强了体液免疫和细胞免疫功能,当然也并不排除鸡 IL-2 对 IBDV 的感染具有免疫治疗作用的可能性。

总结本研究,我们得出 3 个主要结论:1. 从经 ConA 活化的鸡脾淋巴细胞中克隆到了鸡 IL-2

cDNA,其基因结构和特征与国外报道的一致;2. 传染性法氏囊病病毒多聚蛋白基因免疫可诱导 SPF 鸡对强毒株的免疫保护作用;3. 克隆的鸡 IL-2 能明显增强 IBDV 多聚蛋白 DNA 疫苗的免疫原性,包括 T 细胞和 B 细胞的增殖、特异性的抗体反应和对强毒的攻击保护率。这为研制新一代禽类疫苗免疫增强剂奠定了基础。

致谢:衷心感谢浙江省农业科学院顾亚仙研究员和夏文英饲养员在动物试验中给予大力支持;感谢宋厚辉硕士、谢荣辉硕士、陈吉刚硕士、张德勇硕士、张晓峰硕士、卢觅佳硕士在抗体检测和淋巴细胞增殖试验中给予大量无私的帮助;感谢杨启秀教授、鲍英实验师在病理切片制作中给予的指导和帮助。

REFERENCES (参考文献)

- [1] Sundick R S, Gill-Dixon C. A cloned chicken lymphokine homologous to both mammalian IL-2 and IL-15. *J Immunol*, 1997, 159(2): 720 ~ 725
- [2] Kaiser P, Mariani P. Promoter sequence, exon: intron structure, and synteny of genetic location show that a chicken with T-cell proliferative activity is IL-2 and not IL-15. *Immunogenetics*, 1999, 49: 26 ~ 35
- [3] Chio K D, Lillehoj H S. Role of chicken IL-2 on gammadelta T-cells and Eimeria acervulina-induced changes in intestinal IL-2 mRNA expression and gammadelta T-cells. *Vet Immunol Immunopathol*, 2000, 73(3): 309 ~ 321
- [4] Lawson S, Rothwell L, Kaiser P. Turkey and chicken interleukin-2 cross-react in vitro proliferation assays despite limited amino acid sequence identity. *J Interferon Cytokine Res*, 2000, 20(2): 161 ~ 170
- [5] Boot H J, Huurne A A H M, Hoekman A J W H *et al*. Rescue of very virulent and mosaic infectious bursal disease virus from cloned cDNA: VP2 is not the sole determinant of the very virulent phenotype. *J Virol*, 2000, 74(15): 6701 ~ 6711
- [6] Tacken M G J, Rottier P J M, Gielkens A L J *et al*. Interactions in vivo between the proteins of infectious bursal disease virus: capsid protein VP3 interacts with the RNA-dependent RNA polymerase, VP1. *J Gen Virol*, 2000, 81: 209 ~ 218
- [7] Dybing J K, Jackwood D J. Antigenic and immunogenic properties of baculovirus-expressed infectious bursal disease viral proteins. *Avian Dis*, 1998, 42: 80 ~ 91
- [8] Lejal N, Costa B D, Huet J C. Role of Ser-652 and Lys-692 in the protease activity of infectious bursal disease virus VP4 and identification of its substrate cleavage sites. *J Gen Virol*, 2000, 81: 983 ~ 992
- [9] Fernandez-arias A, Risco C, Martinez S *et al*. Expression of ORF1 of infectious bursal disease virus results in the formation of virus-like particles. *J Virol*, 1998, 79: 1047 ~ 1054
- [10] Schroder A, van Loon A A, Goovaerts D *et al*. Chimeras in noncoding regions between serotype I and II of segment A of infectious bursal disease virus are viable and show pathogenic phenotype in chickens. *J*

- Virol*, 2000, **81**: 533 ~ 540
- [11] Fordor I, Horvath E, Fordor N *et al*. Induction of protective immunity in chickens immunized with plasmid DNA encoding infectious bursal disease virus antigens. *Acta Veterinaria Hungarica*, 1999, **47**(4): 481 ~ 492
- [12] Akin A, Wu C C, Lin T L *et al*. Amplification and cloning of infectious bursal disease virus genomic RNA segments by long and accurate PCR. *Journal of Virological Methods*, 1999, **82**: 55 ~ 61
- [13] Yu L, Song K, Zhang Y *et al*. Cloning and expression of the VP2 gene of an infectious bursal disease virus. *Avian Dis*, 2000, **44**(1): 170 ~ 178
- [14] Kim J J, Trivedi N N, Nottingham L K *et al*. Modulation of amplitude and direction of *in vivo* immune responses by co-administration of cytokine gene expression cassettes with DNA immunogens. *Eur J Immunol*, 1998, **28**: 1089 ~ 1093
- [15] Chow Y H, Huang W L, Chi W K *et al*. Improvement of hepatitis B virus DNA vaccines by plasmids coexpressing hepatitis B surface antigen and interleukin-2. *J Virol*, 1997, **71**: 169 ~ 178
- [16] Chow Y H, Chiang B L, Lee Y L *et al*. Development of Th1 and Th2 population and the nature of immune responses to hepatitis B virus DNA vaccines can be modulated by codelivery of various cytokine genes. *J Immunol*, 1998, **160**: 1320 ~ 1329
- [17] Geissler M, Gesien A, Tokushige K *et al*. Enhancement of cellular and humoral immune responses to hepatitis C virus core protein using DNA-based vaccines augmented with cytokine-expressing plasmids. *J Immunol*, 1997, **158**: 1231 ~ 1237

Enhanced Immunogenicity of Plasmid Encoding Polyprotein Gene of Infectious Bursal Disease Virus by Co-administration of Chicken Interleukin 2 (IL-2)

YU Lian* LI Jian-Rong HUANG Yao-Wei LIANG Xue-Ya MENG Song-Shu

(Institute of Preventive Veterinary Medicine, Zhejiang University, Hangzhou 310029, China)

Abstract Chicken interleukin 2 (IL-2) is one of important nonmammalian cytokines isolated recently. The influencing of IL-2 on immunogenicity of DNA vaccine was examined using infectious bursal disease virus as a model. The IL-2 cDNA of Xiaoshan chicken and the polyprotein gene of IBDV-ZJ2000 were amplified by RT-PCR, cloned, sequenced and inserted into the control of CMV promoter and enhancer of pCI vector. 14-day-old chickens were vaccinated intramuscularly with DNA vaccine, two weeks later, they were boosted with DNA, and two weeks post boost, they were challenged with virulent IBDV. The results showed that protective responses and neutralization antibody responses of DNA vaccine co-administrated with chicken IL-2 were much higher than those of injected with DNA vaccine alone. Furthermore, the T lymphocyte proliferation response of peripheral blood, thymus and spleen, and the B lymphocyte proliferation response of bursa induced by DNA vaccine can be significantly enhanced by chicken IL-2. These results obviously indicated that chicken IL-2 was a strong adjuvant which can significantly enhance the immunogenicity of IBDV DNA vaccine.

Key words chicken interleukin 2 (IL-2), infectious bursal disease virus (IBDV), polyprotein gene, DNA vaccine, immunogenicity

Received: May 30, 2001

This work was supported by grant from the National "863" High-Tech Program (101-j99-02) and National Science and Technology Key Program (96-920-34-02).

* Corresponding author. Tel: 86-571-86971092; Fax: 86-571-85158548; E-mail: yulian@zju.edu.cn