

表达猪繁殖与呼吸综合征病毒修饰型 GP5m 蛋白的重组伪狂犬病毒的构建及其在小鼠的免疫反应

# Construction and Immunogenicity of Recombinant Pseudorabies Virus Expressing the Modified GP5m Protein of Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome Virus

江云波, 方六荣, 肖少波, 张辉, 陈焕春\*

JIANG Yun-Bo, FANG Liu-Rong, XIAO Shao-Bo, ZHANG Hui and CHEN Huan-Chun\*

华中农业大学动物医学院动物病毒研究室, 武汉 430070

Laboratory of Animal Virology, College of Animal Science and Veterinary Medicine, Huazhong Agriculture University, Wuhan 430070, China

**摘 要** 猪伪狂犬病毒(PRV)是一种良好的兽用活病毒疫苗载体。但以 PRV 基因缺失疫苗株 TK<sup>-</sup>/gE<sup>-</sup>/LacZ<sup>+</sup> 为载体表达 PRRSV GP5 的重组病毒 TK<sup>-</sup>/gE<sup>-</sup>/GP5<sup>+</sup> 免疫实验动物后难以激发抗 PRRSV 的中和抗体。为了进一步增强这种重组病毒的免疫效力,用具有更好免疫原性的修饰的 ORF5 基因(ORF5m)代替天然 ORF5 基因,构建了表达 PRRSV 的修饰型 GP5m 蛋白的重组伪狂犬病毒 TK<sup>-</sup>/gE<sup>-</sup>/GP5m<sup>+</sup>。经 PCR、Southern blot、Western blot 证实构建正确,并能表达具有活性的 GP5m 蛋白。将 TK<sup>-</sup>/gE<sup>-</sup>/GP5m<sup>+</sup> 与 TK<sup>-</sup>/gE<sup>-</sup>/GP5<sup>+</sup> 分别免疫 Balb/c 小鼠,结果 TK<sup>-</sup>/gE<sup>-</sup>/GP5m<sup>+</sup> 免疫小鼠不仅产生了较高水平的抗 PRRSV 的中和抗体(3/6 只达到了 1:16),而且在诱导 PRRSV 特异性细胞免疫方面也显著优于 TK<sup>-</sup>/gE<sup>-</sup>/GP5<sup>+</sup>,表明 TK<sup>-</sup>/gE<sup>-</sup>/GP5m<sup>+</sup> 是一种极有希望的 PRRSV 和 PRV 二价基因工程候选疫苗。

**关键词** 猪繁殖与呼吸综合征病毒, GP5m 蛋白, 重组伪狂犬病毒

中图分类号 Q78 文献标识码 A 文章编号 1000-3061(2005)06-0858-07

**Abstract** Pseudorabies virus (PRV), an alpha-herpesvirus, has been used as a vector for live-viral animal vaccines. The recombinant PRV TK<sup>-</sup>/gE<sup>-</sup>/GP5<sup>+</sup>, which expressing GP5 of PRRSV, is developed based on the PRV genetic-depleting vaccine-virus strain, TK<sup>-</sup>/gE<sup>-</sup>/LacZ<sup>+</sup>. However, this strain stimulated poorly the vaccinated animals to produce neutralizing antibodies against PRRSV. In order to develop a booster specific immunized response of the PRV recombinant, the ORF5 gene of PRRSV TK<sup>-</sup>/gE<sup>-</sup>/LacZ<sup>+</sup> was substituted by a modified ORF5 gene, ORF5m. The resultant recombinant PRV, TK<sup>-</sup>/gE<sup>-</sup>/GP5m<sup>+</sup>, was verified by PCR, Southern blotting and Western blotting. TK<sup>-</sup>/gE<sup>-</sup>/GP5m<sup>+</sup> and TK<sup>-</sup>/gE<sup>-</sup>/GP5<sup>+</sup> expressed GP5 proteins were inoculated into balb/c mice to evaluate their immunogenicity. The results demonstrated that the amount of neutralization antibodies and cell-immunity responses induced by TK<sup>-</sup>/gE<sup>-</sup>/GP5m<sup>+</sup> against PRRSV were higher than that of TK<sup>-</sup>/gE<sup>-</sup>/GP5<sup>+</sup>. This study indicated that the new recombinant PRV expressing the modified GP5m protein is a candidate for the development of bivalent genetic engineering vaccines against PRRSV and PRV.

**Key words** porcine reproductive and respiratory syndrome virus, GP5m, recombinant Pseudorabies virus

Received July 19, 2005; Accepted: August 31, 2005.

This work was supported by grants from the National Natural Sciences Foundation of China (No.30300257), the National Basic Research Program (973) of China (No.2005CB523200), and the Youth Scientist Project of Wuhan City (No.20025001041).

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

国家自然科学基金(No.30300257) 国家基础研究 973 计划(No.2005CB523200) 和武汉市青年科技晨光计划(No.20025001041)资助项目。

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) 引起的一种严重危害养猪业的新传染病<sup>[1]</sup>。临床上以妊娠母猪流产、死胎、木乃伊胎、弱仔等繁殖障碍以及仔猪的呼吸道症状和高死亡率其特征。最初由于不知其病原被称为“神秘病”。该病自 1987 年首次在美国发现以来,随后的 2、3 年间,加拿大和欧洲一些国家也相继报道了该病的发生,几年之内便席卷了北美洲和欧洲大陆,现已蔓延至许多亚太国家和地区。尽管我国 1995 年才首次暴发此病<sup>[2]</sup>,但根据临床和血清学调查,该病在我国普遍存在,而且近年来还呈流行态势。同其它许多病毒病的防制一样,该病的防制也主要是免疫预防。目前用于预防 PRRS 的主要疫苗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,这一点已在 2 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<sup>[3]</sup>。而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。因此,迫切需要更加安全、有效的疫苗来预防和控制该病的发生与流行。

目前的研究已经证实由 ORF5 基因编码的 GP5 蛋白是 PRRSV 的主要免疫原性蛋白,主要诱发具有保护性的中和抗体,在诱导机体抵抗 PRRSV 感染特异性防御过程中具有十分重要的作用<sup>[4,5]</sup>,是研制 PRRS 新型疫苗的良好靶蛋白<sup>[6]</sup>。

为了研制更安全、有效的 PRRS 新型疫苗,本实验室方六荣等曾以伪狂犬病毒基因缺失标志疫苗为载体,构建了 2 株表达 PRRSV GP5 蛋白的重组伪狂犬病毒 TK<sup>-</sup>/gG<sup>-</sup>/GP5<sup>+</sup> 和 TK<sup>-</sup>/gE<sup>-</sup>/GP5<sup>+</sup>,并检测了这两种重组病毒免疫 BALB/c 小鼠和猪后产生的抗体水平,但均未能检测到抗 PRRSV 的特异性中和抗体<sup>[7,8]</sup>。最近,江云波等<sup>[9]</sup>对 PRRSV 的天然 ORF5 基因进行了修饰,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),并通过 DNA 疫苗的形式证实这种修饰的 ORF5 基因 (ORF5m) 编码的 GP5m 蛋白具有更好的免疫原性,能够诱发更强的免疫应答,展示了潜在的应用价值。基于上述研究结果,本研究采用修饰的 ORF5m 基因作为目标基因,采用同源重组进一步构建了表达 GP5m 蛋白的重组伪狂犬病毒 TK<sup>-</sup>/gE<sup>-</sup>/GP5m<sup>+</sup> (RV5m),并以 Balb/c 小鼠为实验动物模型,与表达天然的 GP5 蛋白的重组伪狂犬病毒 TK<sup>-</sup>/gE<sup>-</sup>/GP5<sup>+</sup> 进行了免疫原性比较,初步评价了这种新型疫苗候选株的潜在应用价值,为获得有效能够预

防和控制猪繁殖与呼吸综合征和伪狂犬病的重组伪狂犬病毒疫苗奠定了基础。

# 1 材料和方法

## 1.1 毒株、质粒与细胞

PRV Ea 株 TK<sup>-</sup>/gE<sup>-</sup>/LacZ + 突变株,系将 PRV Ea 株 TK 基因缺失 205bp,并在 gE 编码区插入 LacZ 表达盒,导致 gE 失活的突变株,由本室刘正飞博士等构建<sup>[10]</sup>。含由 hCMV 启动子驱动的 gE 缺失的 PRV 转移质粒 pIECMV,表达 PRRSV YA 分离株的 ORF5 基因的重组病毒 TK<sup>-</sup>/gE<sup>-</sup>/GP5<sup>+</sup> (RV5) 均由本室方六荣博士构建并保存<sup>[7]</sup>。含修饰的 ORF5m 全基因的质粒 pMD-ORF5m 由作者构建并保存<sup>[9]</sup>。PRV 强毒 Ea 株、IBRS-2 细胞、大肠杆菌 DH5α 均由本室保存。

## 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 公司产品。地高辛标记与检测试剂盒为 Roch 公司产品。

## 1.3 引物设计与 PCR 扩增

引物 ORF5A 和 ORF5B 可扩增 ORF5m 基因,大小约为 650bp,并于上下游引物引入 BamH I 和 Xba I 酶切位点。引物 LacZP1 和 LacZP2 可扩增 LacZ 表达盒基因的部分片段,大小约 430bp<sup>[10]</sup>。上述引物均由上海生工生物工程有限公司合成,引物序列为:

ORF5A 5'-GGAGGATCC AGTATGTTGGGGAAATGC -3'

ORF5B 5'-TTTTCTAGA GACGACCCCAATTGTTCCG -3'

LacZP1 5'-GAACTGCCTGAACACTACC-3'

LacZP2 5'-ACTGCAACAACGCTGC-3'

ORF5m 和 LacZ 扩增条件均为:95℃预变性 5min 后进入循环,循环参数为:95℃变性 1min,退火(退火温度:ORF5/ORF5m 为 57℃,LacZ 为 50℃)1min,72℃延伸 1min,30 个循环后 72℃延伸 10min。

## 1.4 转移质粒的构建

用 BamH I 和 Xba I 酶切 pMD-ORF5m,回收大小约 650bp 的 ORF5m 片段,克隆到含由 hCMV 启动子驱动的 gE 缺失的 PRV 转移质粒 pIECMV 的相应位点,构建 pIECMV-ORF5m。

## 1.5 共转染与蚀斑筛选纯化

取 PRV Ea 株 TK<sup>-</sup>/gE<sup>-</sup>/LacZ<sup>+</sup> 突变株基因组 DNA 用 EcoR I 消化过夜后,采用脂质体法与转移质粒共转染 IBRS-2 细胞,待细胞出现病变后收毒。

按文献 [11] 方法在 IBRS-2 细胞上通过蚀斑法筛选纯化重组病毒,对 PCR 扩增外源目的基因为阳性的重组子共做 3 轮蚀斑纯化。

1.6 重组病毒 TK<sup>-</sup>/gE<sup>-</sup>/GP5m<sup>+</sup>(RV5m)的鉴定

1.6.1 PCR 鉴定 对经过 3 轮蚀斑纯化后的病毒再作一轮蚀斑,随机挑取若干蚀斑,接种 24 孔板,待细胞病变后,将细胞处理作模板,对外源目的基因 ORF5m 基因进行 PCR 扩增验证重组病毒,并对 LacZ 基因进行 PCR 扩增以验证有无亲本株的污染。

1.6.2 Southern blot 检测:提取并纯化的重组病毒基因组 DNA,具体操作按文献 [11] 进行。利用适宜的限制酶消化后电泳,再以地高辛标记的 ORF5 基因片段作探针进行 Southern 杂交检测,具体操作按地高辛标记与检测试剂盒说明书进行。

1.6.3 Western blot 检测:纯化的重组病毒接种 IBRS-2 细胞,待细胞发生 80% 病变时,用 PBS (PH7.4)洗涤 2~3 次,加适量体积的细胞裂解液裂解细胞,作为 Western 检测样品抗原。加入等体积的 2×SDS-PAGE 样品缓冲液,95℃水浴 5min,15% SDS-PAGE 电泳分离后转移到硝酸纤维素膜上,以抗 PRRSV GP5 蛋白的多克隆兔血清为一抗,辣根过氧化物酶(HRP)标记的羊抗兔 IgG 为二抗,DAB 显色,进行 Western blot 分析。

1.7 重组病毒动物试验

1.7.1 免疫和攻毒方案:将重组病毒 RV5m 和 RV5 分别按 10<sup>5</sup>TCID<sub>50</sub>免疫 5~6 周龄 Balb/c 小鼠后腿肌肉 100μL,并同时设亲本株 TK<sup>-</sup>/gE<sup>-</sup>/LacZ<sup>+</sup> 和阴性对照,每组 6 只。于首免后 4 周按第一次免疫相同剂量加强免疫一次,并于首免后 10 周利用 PRV 强毒 Ea 株进行攻毒,观察免疫小鼠死亡情况,观察 10 天以评价重组病毒保护实验动物免受 PRV 强毒攻击的能力。

1.7.2 特异性针对 PRV 的抗体水平检测:分别于首免后第 3,6,8,10 周采集免疫小鼠血清,进行 PRV 特异性全病毒 ELISA 抗体和中和抗体水平的检测 [11]。

1.7.3 特异性针对 PRRSV 的免疫应答检测:分别采集免疫小鼠首免后第 3,6,8,10 周血清,进行 PRRSV 特异性中和抗体水平的检测 [9],即免疫血清于 56℃灭活 30min,进行微量中和实验检测。其中血清作 2<sup>-1</sup>,2<sup>-2</sup>.....2<sup>-6</sup> 倍比稀释,病毒液为 100TCID<sub>50</sub>,于 37℃,5%CO<sub>2</sub> 培养 5d,逐日观察并记录被检血清样品中和效价结果,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。

并于首免后第 10 周处死 4 只小鼠无菌分离免

疫小鼠的脾淋巴细胞,进行特异性针对 PRRSV 的淋巴细胞增殖检测 [8],即无菌分离免疫小鼠脾脏并研磨,利用 0.85% 的 Tris-NH<sub>4</sub>Cl (pH 7.4)裂解其中的红细胞,PBS (pH 7.4)洗涤 2 次后用含 20% 牛血清的完全 1640 调整细胞浓度至(2×10<sup>6</sup>)mL。于 96 孔细胞培养板中每孔加入 20μL 的 1640 培养液或有丝分裂原(经紫外线照射灭活的 PRRSV),再加入稀释为(2×10<sup>6</sup>)mL 的脾细胞 100μL,37℃,5% CO<sub>2</sub> 培养 72h。然后每孔加入 20μL MTS,混匀后继续培养 1~4h,于 492nm 测定 OD 值。以刺激指数(Stimulation Index,SI)判断淋巴细胞增殖滴度。SI 值的计算:实验孔 OD 均值/对照孔 OD 均值。

2 结 果

2.1 转移质粒的构建

用 BamHI 和 Xba I 酶切 pMD-ORF5m,回收大小约 650bp 的 ORF5m 片段,克隆到含由 hCMV 启动子驱动的 gE 缺失的 PRV 转移质粒 pIECMV 的相应位点,构建 pIECMV-ORF5m,经酶切、PCR 鉴定证实构建正确(图 1)。

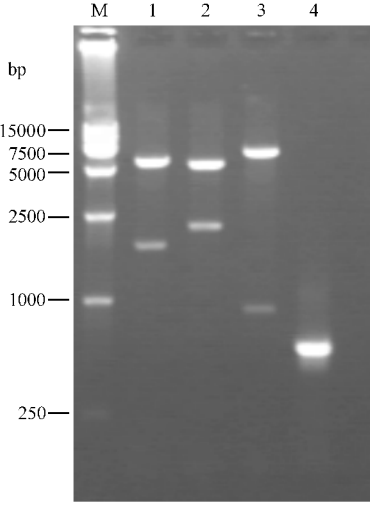


图 1 转移质粒 pIECMV-ORF5m 的鉴定

Fig. 1 Identification of the transfer plasmid pIECMV-ORF5m 1: pIECMV-ORF5m/Kpn I; 2: pIECMV-ORF5m/Bgl II; 3: pIECMV-ORF5m/Stu I + BamH I; 4: PCR product of ORF5m from the plasmid pIECMV-ORF5m.

2.2 重组病毒的筛选与纯化

重组病毒的结构模式图如图 2 所示。对通过同源重组获得的阳性重组子进行蚀斑纯化并利用 PCR 进行筛选,经过 3 轮蚀斑纯化后,获得 100% 阳性重组子。再进行一轮蚀斑试验,随机挑取噬斑,采用 ORF5A/ORF5B 和 LacZP1/LacZP2 二套引物进行 PCR 扩增鉴定。结果所有重组病毒蚀斑均能扩增到特异

约 650bp 的 ORF5m 基因(图 3),扩增不到约 430bp 的 LacZ 片段(图略),而亲本株 TK<sup>-</sup>/gE<sup>-</sup>/LacZ<sup>+</sup> 则能扩增出 430bp 的 LacZ 片段。证实所获得的重组病毒含有特异的外源整合基因并且无亲本株污染。

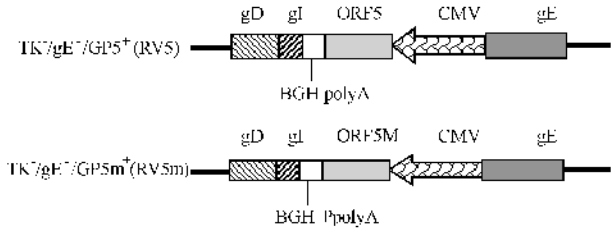


图 2 重组病毒的结构模式图

Fig. 2 The structure of the recombinant virus

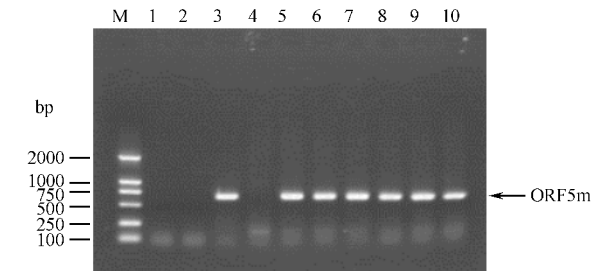


图 3 重组病毒 TK<sup>-</sup>/gE<sup>-</sup>/GP5m<sup>+</sup> 的 PCR 鉴定

Fig. 3 Identification of the recombinant virus TK<sup>-</sup>/gE<sup>-</sup>/GP5m<sup>+</sup> by PCR

M : DNA marker (DL 2000) ; 1 : negative control (TK<sup>-</sup>/gE<sup>-</sup>/LacZ<sup>+</sup>) ; 2 : IBRS-2 cell control ; 3 : positive plasmid pIECMV-ORF5m control ; 4 : H<sub>2</sub>O control ; 5 ~ 10 : the recombinant virus RV5m.

2.3 重组病毒的 Southern blotting 鉴定

进一步以地高辛标记的 PRRSV ORF5 基因为探针,与分别用 Bgl II、Sal I 限制性酶酶切的重组病毒基因组 RV5m DNA 以及亲本株 TK<sup>-</sup>/gE<sup>-</sup>/LacZ<sup>+</sup> 基因组 DNA 进行 Southern blot 杂交。结果 Bgl II、Sal I 酶切的 RV5m 基因组 DNA 分别在约 4.2kb 和 3.0kb 处出现特异性的杂交带(图 4),大小与预期的相符。而 TK<sup>-</sup>/gE<sup>-</sup>/LacZ<sup>+</sup> 基因组 DNA 无任何杂交带出现。表明所构建的重组病毒外源基因已特异性整合到 PRV 的 gE 与 gI 基因位点之间。

2.4 重组病毒的 Western blotting 鉴定

为了检测外源整合基因在重组病毒中的表达,将重组病毒 RV5m 和亲本株 TK<sup>-</sup>/gE<sup>-</sup>/LacZ<sup>+</sup> 分别接种 IBRS-2 细胞,产生病变后收集细胞进行处理,12% SDS-PAGE 变性胶电泳后进行 Western blot 检测。结果发现,重组病毒 RV5m 在大小约为 26 ~ 27kD 处都出现特异性条带,这与预期的表达分子量相当。而亲本株 TK<sup>-</sup>/gE<sup>-</sup>/LacZ<sup>+</sup> 没有任何特异性条带出现,证实所构建的重组病毒能正确表达修饰型的 GP5m 外源蛋白(图 5)。

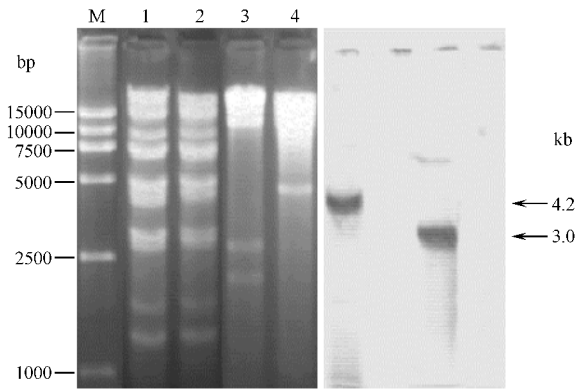


图 4 重组病毒的 Southern blotting 鉴定

Fig. 4 Identification of the recombinat virus by Southern blotting

M : DNA marker (DL15000) ; 1 : RV5m/ Bgl II ; 2 : TK<sup>-</sup>/gE<sup>-</sup>/LacZ<sup>+</sup> genome/ Bgl II ; 3 : RV5m genome/ Sal I ; 4 : TK<sup>-</sup>/gE<sup>-</sup>/LacZ<sup>+</sup> genome/ Sal I .



图 5 重组病毒的 Western blot 鉴定

Fig. 5 Western blot analysis of cell lysate infected with the recombinant virus

1 RV5 2 RV5m 3 TK<sup>-</sup>/gE<sup>-</sup>/LacZ<sup>+</sup> .

2.5 免疫小鼠特异性针对 PRV 的抗体和攻毒保护

将表达修饰型 GP5m 蛋白的重组病毒 RV5m、表达天然 GP5 蛋白的重组病毒 RV5 分别免疫 Balb/c 小鼠,并设立亲本株 TK<sup>-</sup>/gE<sup>-</sup>/LacZ<sup>+</sup> 和阴性对照组。采集分离首免后第 3、6、8、10 周血清进行特异性针对 PRV 的 ELISA 抗体和中和抗体检测。结果亲本株、重组病毒 RV5 和 RV5m 免疫组均于首免后第 3 周即检测特异性针对 PRV 的 ELISA 和中和抗体,并于首免后 6 周达到峰值,且三组之间没有显著差异(表 1),而阴性对照组于整个实验过程中都未检测到针对 PRV 的抗体。

于首免后第 10 周所有免疫小鼠用 PRV 强毒 Ea 株进行攻毒,攻毒剂量为 10<sup>6</sup> TCID<sub>50</sub>。结果阴性对照组于攻毒后第 5 天开始出现死亡,第 9 天时全部死亡,而重组病毒 RV5m 和 RV5 以及亲本株 TK<sup>-</sup>/gE<sup>-</sup>/LacZ<sup>+</sup> 在观察的 10d 时间内均未出现死亡(图 6)。上述结果说明所构建的重组病毒中外源基因的引入并不影响 PRV 抗体的诱发,也不影响保护实验动物

免受 PRV 强毒的攻击。

表 1 重组病毒免疫小鼠诱发特异性针对 PRV 的抗体水平检测  
Table 1 The PRV-specific antibodies of mice inoculated with the recombinant virus

		3W	6W	8W	10W
Tk <sup>-</sup> /gE <sup>-</sup> /LacZ <sup>+</sup>	SN <sup>a</sup>	1/6 <sup>c</sup>	31.3 ± 18.4	35.6 ± 17.5	34.6 ± 19.7
	ELISA <sup>b</sup>	160	20480	20480	20480
RV5	SN	1/6	28.8 ± 20.9	35.2 ± 17.5	34.8 ± 17.8
	ELISA	160	20480	20480	20480
RV5m	SN	2/6	38.4 ± 24.3	33.6 ± 17.6	35.2 ± 16.5
	ELISA	160	20480	20480	20480
Negative control	SN	-	-	-	-
	ELISA	-	-	-	-

a : SN are seroneutralization antibodies ;  
b : PRV ELISA antibodies titers are based on PRV virions ;  
c : ratio of vaccinated mice shown the minimum level of PRV-seroneutralization antibodies at 1:2.

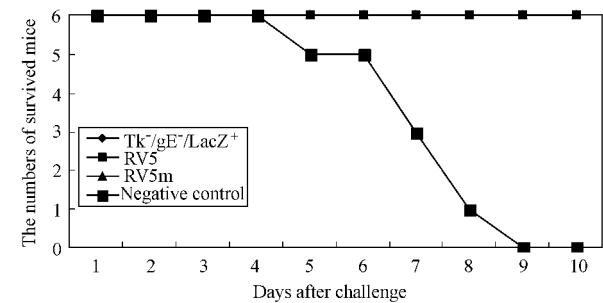


图 6 重组病毒免疫小鼠 PRV 攻毒保护  
Fig. 6 The protection of mice inoculated with the recombinant virus against PRV challenge

### 2.6 免疫小鼠特异性针对 PRRSV 的中和抗体

采用微量中和抗体检测方法,检测免疫后第 3、6、8 和 10 周免疫小鼠特异性针对 PRRSV 的中和抗体水平。结果表达天然 GP5 蛋白的重组病毒 RV5 仅仅于首免后第 10 周有一只小鼠产生可检测的中和抗体(≥1:8),而表达修饰型 GP5<sub>m</sub> 蛋白的重组病毒 RV5<sub>m</sub> 免疫组于首免后第 6 周即可产生可检测的中和抗体,并于第 10 周达到最高,有 3/6 只达到了 1:16,较 RV5 免疫组差异极显著(P < 0.01, t-test)(表 2)。说明这种表达修饰型 GP5<sub>m</sub> 蛋白在以 PRV 为载体构建的重组病毒中具有更高的诱发中和抗体的能力。亲本株 Tk<sup>-</sup>/gE<sup>-</sup>/LacZ<sup>+</sup> 和阴性对照组在整个实验过程中均未出现特异性针对 PRRSV 的中和抗体。

### 2.7 免疫小鼠特异性针对 PRRSV 的淋巴细胞增殖反应

为了探讨构建的重组病毒所表达的 GP5<sub>m</sub> 蛋白在机体内诱发特异性针对 PRRSV 的细胞免疫水平,我们检测了免疫后小鼠的特异性淋巴细胞增殖。从图 7 中可以看出,利用经紫外线照射灭活的 PRRSV 作为刺激原,表达修饰型 GP5<sub>m</sub> 蛋白的重组病毒 RV5<sub>m</sub> 免疫组淋巴细胞增殖指数要明显高于 RV5 免

疫组(P < 0.05),暗示着以 PRV 为载体构建的重组病毒中表达的修饰型 GP5<sub>m</sub> 蛋白所诱发的特异性 PRRSV 的细胞免疫应答要明显强于天然的 GP5 蛋白。

表 2 重组病毒免疫小鼠产生特异性针对 PRRSV 的中和抗体检测  
Table 2 The PRRSV-specific neutralizing antibodies of mice inoculated with the recombinant virus

		< 1:8	1:8	1:16	1:32
Tk <sup>-</sup> /gE <sup>-</sup> /LacZ <sup>+</sup>	6W <sup>a</sup>	6 <sup>b</sup>	0	0	0
	8W	6	0	0	0
	10W	6	0	0	0
	6W	6	0	0	0
RV5	8W	6	0	0	0
	10W	5	1	0	0
	6W	5	1	0	0
RV5m	8W	1	3	2	0
	10W	0	3	3	0
	6W	6	0	0	0
Negative Control	8W	6	0	0	0
	10W	6	0	0	0

a : time after primary vaccination ; b : numbers of vaccinated mice.

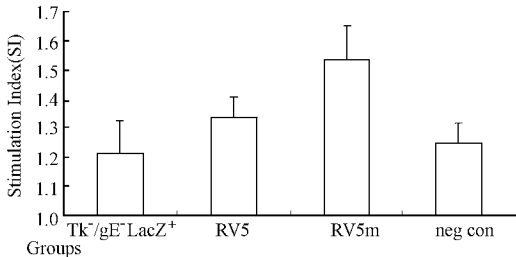


图 7 重组病毒免疫小鼠诱发特异性针对 PRRSV 的淋巴细胞增殖反应  
Fig. 7 The PRRSV-specific lymphocyte proliferative responses of mice vaccinated with the recombinant virus

## 3 讨论

伪狂犬病毒是一种极具开发潜力的活病毒疫苗,尤其是随着伪狂犬病毒基因缺失标志疫苗在伪狂犬病根除计划中取得了巨大成功,将危害养殖业

的其它一种或多种病原微生物的保护性抗原基因插入伪狂犬病毒基因组,构建二价或多价基因工程疫苗,在开展伪狂犬病根除计划的同时,也对其它疫病进行了免疫,达到一针同时预防两种或多种疾病的目的。本研究以伪狂犬病毒基因缺失标志疫苗株  $TK^-/gE^-/LacZ^+$  为亲本株,利用强启动子 CMV 驱动表达 PRRSV 的修饰型 ORF5m 基因,构建了表达修饰型 GP5m 重组伪狂犬病毒 RV5m,免疫小鼠后的体液免疫和细胞免疫结果表明:RV5m 能诱导 PRRSV 特异性的中和抗体和淋巴细胞增殖反应,是一种具有开发潜力的 PRRS 新型候选疫苗。

尽管 PRRSV 感染后的免疫学机制尚不是十分清楚,但现有的研究表明,中和抗体在抗 PRRSV 感染中具有十分重要的作用。Osorio 等曾用中和抗体为 1:16 的高免血清对怀孕母猪进行被动免疫,被免疫猪能抵抗 PRRSV 强毒的攻击,未表现流产、死胎等繁殖障碍<sup>[13]</sup>。Yoon 等的研究也表明采用高滴度中和抗体的高免血清进行被动免疫,能有效阻止病毒血症的发生<sup>[14]</sup>。甚至在 PRRSV DNA 疫苗的研究中也发现保护效力与中和抗体水平呈显著相关性<sup>[15]</sup>。因此,能否产生高水平的中和抗体应作为评价 PRRSV 新型疫苗的一个重要指标。同我们以前构建的表达天然 GP5 蛋白的重组伪狂犬病毒 RV5 相比,RV5m 免疫小鼠于首免后 6 周即有一只产生可检测的中和抗体,到第 10 周时所有免疫小鼠均产生了可检测的中和抗体,并有 3 只达到了 1:16。而表达天然 GP5 蛋白的重组伪狂犬病毒 RV5 在整个实验过程中均检测不到保护性的中和抗体,这与先前的研究和报道是一致的<sup>[7,8,11]</sup>,表明表达修饰型 GP5m 蛋白的重组病毒在诱导 PRRSV 中和抗体方面具有明显的优势。同时,同亲本株  $TK^-/gE^-/LacZ^+$  相比,在诱导 PRV 特异性抗体和抗 PRV 强毒攻击方面没有差异,表明 ORF5m 的插入并未影响 PRV 的抗体产生。

除了能诱导 PRRSV 特异性中和抗体外,RV5m 在诱导 PRRSV 特异性细胞免疫方面也明显优于 RV5。修饰的 ORF5m 基因是在天然 ORF5 基因的诱骗表位和中和表位间插入了一个通用性 Th 细胞表位 PADRE。我们最初的目的是利用插入的 PADRE 消除覆盖表位的覆盖效应,从而让中和表位充分展示。根据以前 DNA 免疫的结果和本研究的中和抗体,修饰的 GP5m 蛋白确实在诱导中和抗体方面优于天然的 GP5 蛋白。RV5m 增强的细胞免疫反应,可能得益于 PADRE 的作用。PADRE 是 Alexander 等

在多聚丙氨酸骨架导入 HLA-DR 分子锚定序列构建的一种通用性 Th 细胞表位,其诱导 Th 细胞反应的能力比自然源性 Th 表位高 1000 倍<sup>[16]</sup>。PADRE 可为 B 细胞、CTL 细胞表位以及碳水化合物抗原提供强有力的辅助作用,诱导高效的 Th 反应。RV5m 所具有的细胞免疫反应方面的优势,也为其作为一种有希望的 PRRS 新型候选疫苗提供了理论依据。

总之,表达修饰的 GP5m 蛋白的重组伪狂犬病毒能同时诱导针对 PRV 和 PRRSV 的免疫反应,是一种极具开发潜力的 PRRS 和 PRV 的二价基因工程候选疫苗。下一步,我们将在本动物(猪)中对该疫苗的免疫保护效力进行更深入、更全面的评价,促进其早日进入临床应用。

## REFERENCES(参考文献)

- [1] Meulenbergh JJ. PRRSV, the Virus. *Vet Res*, 2000, **31**: 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] Qiu HJ(仇华吉), Tong GZ(童光志). The perplexity and future of PRRS. *Chinese Journal of Veterinary Science*(中国兽医学报). 2000, **20**: 100–103
- [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] Dea S, Gagnon CA, Mardassi H. Current knowledge on the structural proteins of porcine reproductive and respiratory syndrome (PRRS) virus: comparison of the North American and European isolates. *Arch Virol*, 2000, **145**: 659–688
- [6] Gagnon CA, Lachapelle G, Langelier Y *et al.* 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. *Arch Virol*, 2003, **148**: 951–972
- [7] Fang LR(方六荣). Study on suicidal DNA vaccine and virus vector vaccine of porcine reproductive and respiratory syndrome. [Doctoral thesis], Huazhong Agriculture University(华中农业大学) 2003
- [8] Fang LR(方六荣), Xiao SB(肖少波), Jiang YB(江云波) *et al.* Construction of the recombinant pseudorabies virus  $TK^-/gG^-/GP5^+$  expressing GP5 of Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome Virus (PRRSV) and the preliminary study on its biological characterization. *Chinese Journal of Virology*(病毒学报), 2004, **20**(3): 250–254

- [ 9 ] 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 – 3
- [ 10 ] Liu ZF( 刘正飞 ), Chen HC( 陈焕春 ), He QG( 何启盖 ) *et al.* Construction of pseudorabies virus Ea TK<sup>-</sup>/gE<sup>-</sup>/gp63<sup>-</sup> mutant strain and the study on its biological property. *Acta Microbiologica Sinica*( 微生物学报 ), 2002 , **42** : 370 – 374
- [ 11 ] Qiu HJ , Tian ZJ , Tong GZ *et al.* Protective immunity induced by a recombinant pseudorabies virus expressing the GP5 of porcine reproductive and respiratory syndrome virus in piglets. *Vet Immunol and Immunopathol* , 2005 , **106** : 309 – 319
- [ 12 ] Hooft van Iddekinge BJ , de Wind N , Wensvoort G *et al.* Comparison of the protective efficacy of recombinant pseudorabies viruses against pseudorabies and classical swine fever in pigs ; influence of different promoters on gene expression and on protection. *Vaccine* , 1996 , **14** : 6 – 12
- [ 13 ] Osorio FA , Galeota JA , Nelson E *et al.* 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
- [ 14 ] Yoon KJ , Wu LL , Zimmerman JJ *et al.* Antibody-dependent enhancement ( ADE ) of porcine reproductive and respiratory syndrome virus ( PRRSV ) infection in pigs. *Viral Immunol* , 1996 , **9** : 51 – 63
- [ 15 ] Barfoed AM , Blixenkrone-Moller M , Jensen MH *et al.* DNA vaccination of pigs with open reading frame 1-7 of PRRS virus. *Vaccine* , 2004 , **22** : 3628 – 3641
- [ 16 ] Alexander J , Fikes J , Hoffman S *et al.* The optimization of helper T lymphocyte ( HTL ) function in vaccine development. *Immunol Res* , 1998 , **18** : 79 – 92
- © 中国科学院微生物研究所期刊联合编辑部 <http://journals.im.ac.cn>