

表达猪圆环病毒 2 型 Cap 和猪繁殖与呼吸综合征病毒 GP5 融合蛋白重组腺病毒的构建和免疫原性测定

王先炜, 李玉峰, 姜平

南京农业大学 农业部动物疫病诊断与免疫重点开放实验室, 南京 210095

摘要: 断奶后多系统衰弱综合征(PMWS)是目前规模化猪场常见的传染病, 由 PCV2 感染引起。临床上 PCV2 与 PRRSV 混合感染较常见, 死亡率和发病率很高, 但目前尚无能有效预防该病的商品化疫苗。本研究利用基因克隆方法, 构建融合表达 PCV2-Cap 蛋白与 PRRSV-GP5 蛋白的重组腺病毒 rAd-Cap-GP5, 经 IPMA、IFA 和 Western blotting 验证了 Cap 蛋白和 GP5 蛋白在该重组病毒中获得表达。将该重组腺病毒免疫小鼠测定其抗体、中和抗体, 结果显示小鼠免疫后出现两种病毒的抗体和中和抗体, 诱导小鼠产生明显的体液免疫应答, 可以作为预防 PCV2-PRRSV 混合感染的基因工程疫苗候选毒株, 为 PCV2 和 PRRSV 二联重组亚单位疫苗的研究奠定了基础。

关键词: 猪圆环病毒 2 型, 猪繁殖与呼吸综合征病毒, 重组腺病毒, 免疫原性

Construction and immunogenicity of recombinant adenoviruses expressing Cap protein of PCV2 and GP5 protein of PRRSV in mice

Xianwei Wang, Yufeng Li, and Ping Jiang

Key Laboratory of Animal Diseases Diagnostic and Immunology, Ministry of Agriculture, Nanjing Agricultural University, Nanjing 210095, China

Abstract: Porcine circovirus 2 (PCV2) has been implicated as the etiological agent of postweaning multisystemic wasting syndrome (PMWS). Co-infection of PCV2 and porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV) can result in severe economic losses to the swine industry. In this study, we constructed the recombinant adenovirus rAd-Cap-GP5 expressing Cap of PCV2 and GP5 of PRRSV. And the expression of Cap and GP5 protein in the HEK-293 cells inoculated with rAd-Cap-GP5 were confirmed by immunoperoxidase monolayer assay (IPMA), indirect immunofluorescence assay (IFA) and Western blotting, respectively. The immunogenicity of recombinant adenoviruses rAd-Cap-GP5 was examined in mice by vaccination with the recombinant adenovirus. The results showed that the mice could produce anti-PCV2 and PRRSV antibodies detected by indirect ELISA and virus neutralization assay. It indicated that rAd-Cap-GP5 could provide humoral immunity responses in mice. The recombinant adenovirus rAd-Cap-GP5 might be an attractive candidate vaccine for preventing the disease associated with PCV2 and PRRSV infection.

Received: June 30, 2009; **Accepted:** September 28, 2009

Supported by: National Natural Science Foundation of China (No. 30871868), National Key Technology Research and Development Program (Nos. 2007BAD86B02-3, 2006BAD06A04), Key Technology Research and Development Program of Jiangsu Province (No. BE2007342), Ph.D Programs Foundation of Ministry of Education of China (No. 20060307007).

Corresponding author: Ping Jiang. Tel: +86-25-84395504; Fax: +86-25-84396640; E-mail: jiangp@njau.edu.cn

国家自然科学基金(No. 30871868), 国家科技支撑计划(Nos. 2007BAD86B02-3, 2006BAD06A04), 江苏省科技攻关项目(No. BE2007342), 教育部博士点基金项目(No. 20060307007)资助。

Keywords: PCV2, porcine reproductive and respiratory syndrome virus, recombinant adenovirus, immunogenicity

猪圆环病毒 2 型(Porcine circovirus 2, PCV2)和猪繁殖与呼吸道综合征病毒(PRRSV)是目前危害养猪业的两种主要病原。PCV2 单独感染致病性低, 其他病原或免疫刺激因子的存在会诱发 PMWS。在临床上, 尤其与 PRRSV 混合感染更为常见, 加拿大、美国、西班牙等国家报道称 20%~60%的猪自然感染 PCV2 和 PRRSV 而引起发病^[1], 在我国的华东地区也出现两种病毒的混合感染^[2]。它们混合感染可以引起明显的仔猪多系统衰弱综合征(PMWS), 给世界养猪业带来很大的损失。

PCV2 含有 2 个主要的开放式阅读框(Open reading frames, ORFs), 其中 ORF2 编码核衣壳蛋白(Cap 蛋白), 是病毒的主要结构蛋白。研究表明 Cap 蛋白可以诱导机体产生一定水平的抗体, 对机体产生免疫保护作用^[3-4]。GP5 蛋白, 又称 E 蛋白, 是 PRRSV 的结构蛋白之一, 具有一个中和表位, 可以诱导产生中和抗体, 在体外具有中和活性^[5-8]。

AdEasyTM 表达系统, 是缺失了 E1 和 E3 基因的人腺病毒血清 5 型(Ad5), 具有无致病性、复制效率高(可达到 10^{10} ~ 10^{11} VP/mL)、克隆空间大(可容纳 7.5 kb 的外源片段)、能在大多数哺乳动物细胞和组织中表达重组蛋白、在同种细胞和组织中可同时表达多个基因等特点, 可对外源基因进行正确的翻译和修饰, 使表达的蛋白具有与天然蛋白相同的生物活性, 可以用来基因治疗各种疾病。国外已经有人用该载体成功表达了人丙肝病毒的 NS 蛋白^[9]、口蹄疫病毒的核衣壳蛋白^[10-11]和各种细胞因子^[12]等, 并证明有较好的免疫原性, 能够诱导机体产生免疫反应, 对机体产生保护作用。

本研究将 Cap 蛋白和 GP5 蛋白基因克隆入 AdEasyTM 表达系统, 并构建重组病毒免疫小鼠, 旨在研究能预防两种病毒感染的有效疫苗。结果显示, 构建的重组病毒能表达 Cap 蛋白和 GP5 蛋白, 免疫小鼠后, 可以引起小鼠明显的体液免疫反应。说明该重组病毒具有较好的免疫原性, 可以作为预防 PCV2-PRRSV 混合感染的基因工程疫苗候选毒株。

1 材料与方法

1.1 细胞与病毒

HEK-293A 细胞(本实验室保存); PCV2 分离株

SH(本实验室分离保存, GenBank Accession No. AY68676)。

1.2 重组病毒的构建

1.2.1 Cap 蛋白基因的扩增

以 GenBank 中 PCV2-SH(No. AY686763)毒株基因序列为模板, 用软件 Primer Premier 5.0 设计一对引物, 在两条引物的 5'端都引入 *Kpn* I 酶切位点。

PCV2.1: 5'-TTC GGT ACC AGC TAT GAC GTA TCC AAG-3';

PCV2.5: 5'-GCA GGT ACC GTT AAG TGG GGG GTC TTT-3'。该引物扩增基因片段大小为 718 bp。

将 PCV2-PK15 细胞培养物反复冻融 3 次后提取 DNA^[2], 以此为模板进行 PCR 扩增, 取 PCR 产物进行 1%琼脂糖凝胶电泳。

1.2.2 重组质粒 rAd-ORF2-ORF5 的构建与鉴定

按照 pAdEasyTM 载体系统操作说明, 利用单酶切位点(*Kpn* I)将外源片段克隆至含有 PRRSV GP5 基因的转移载体 pShuttle-ORF5(实验室保存)中; 用 PCR、*Kpn* I 单酶切及测序分析进行鉴定, 阳性重组质粒命名为 rShuttle-ORF2-ORF5; 用 *Pme* I 酶切该重组质粒, 使其线性化, 然后与 pAdEasyTM Vector 在 2.5 kV、25 μ F 和 200 Ω 条件下电转化至大肠杆菌 BJ5183 感受态细胞, 使 rShuttle-ORF2-ORF5 与 pAdEasyTM Vector 发生同源重组, 转化至 DH5 α 宿主菌, 挑选出阳性克隆, 用 PCR 和 *Pac* I 酶切鉴定重组是否正确, 构建成重组质粒, 命名为 rAd-ORF2-ORF5。

1.2.3 重组质粒 rAd-ORF2-ORF5 转染

按照脂质体转染试剂操作方法, 将预先用 *Pac* I 线性化的重组质粒 rAd-ORF2-ORF5 转染 HEK-293A 细胞, 5% CO₂、37°C 静置培养 10 d 以上, 显微镜观察有无病变。

1.2.4 重组病毒的纯化

采用有限稀释法纯化病毒。将重组腺病毒 10 倍系列稀释后, 接种已长满单层的 HEK-293A 细胞, 每个稀释度接种 5 孔, 5% CO₂、37°C 静置培养 3 d, 挑选只有一个细胞病变的孔, 反复冻融 2 次后, 重复上述操作。如此纯化 3 次, 获得的重组病毒命名为 rAd-Cap-GP5。

1.3 重组腺病毒 rAd-Cap-GP5 蛋白表达的鉴定

1.3.1 Western blotting 分析

将 100 mL 重组病毒液和空的腺病毒液(本实验室构建、保存)用 PEG-6000 和 NaCl 浓缩, 将浓缩蛋白进行 SDS-PAGE 电泳, 转印到硝纤膜上后, 10% 脱脂乳封闭过夜; 分别加入 1:100 稀释的 rAd-Cap 和 rAd-GP5 免疫的小鼠血清室温作用 2 h; 洗涤 3 次, 加入 1:2000 稀释的羊抗小鼠 IgG-HRP, 室温作用 1.5 h; 充分洗涤后, 使用 SuperSignal West Pico Trial Kit 显色后进行 X 光显影, 观察特异蛋白条带。

1.3.2 免疫辣根过氧化物酶单层试验(IPMA)

将重组腺病毒 1:100 和 1:1000 稀释后接种于长满单层的 HEK-293A 细胞, 4% CO₂ 37°C 培养约 24 h, 弃去上清, 固定后, 以猪抗 PCV2 血清和猪抗 PRRSV 血清为抗体, 进行 IPMA 检测^[12], 显色后, 于显微镜下观察。

1.3.3 间接免疫荧光试验(IFA)

接种重组腺病毒的 HEK-293A 细胞固定后, 在不同孔各加入特异性 PCV2 或 PRRSV 抗体和相应的抗体^[13], 显色后, 荧光显微镜下观察。

1.4 重组病毒的 TCID₅₀ 的测定

用 DMEM 维持液将纯化后的病毒做 10 倍梯度稀释, 然后接种于长满 HEK-293A 细胞单层的 96 孔细胞培养板, 每个稀释度重复 5 孔, 每孔 100 μ L。同时设定对照孔。5% CO₂、37°C 静置培养 4 d, 观察病变, 按 Read-Muenels 法, 计算病毒 TCID₅₀。

1.5 小鼠免疫试验

1.5.1 试验动物和免疫程序

6~8 周龄的清洁级雄性小鼠 40 只(购于南京医科大学), 随机分为 2 组, 每组 20 只。第一组背部皮下多点注射 $2.5 \times 10^{9.0}$ TCID₅₀ 重组腺病毒 rAd-Cap-GP5, 2 周后进行相同的免疫。第二组每只小鼠皮下注射 10^8 TCID₅₀ 空的腺病毒作为阴性对照。分别在二免、二免后 2、4、6 和 8 周, 采集血清测定 PCV2 和 PRRSV 的抗体和中和抗体。

1.5.2 ELISA 抗体的检测

PCV2 抗体的检测: 将 GST-Cap 融合蛋白包被酶标板, 检测小鼠血清抗体^[13]。检测孔与阴性对照孔 OD 比值大于或等于 2.1 的最高稀释度的倒数为该血清的抗体滴度。

PRRSV 抗体的检测: 将用 PEG-6000 浓缩的 PRRSV 蛋白用包被液(pH 9.6)稀释至 2 μ g/mL, 按上述方法包被、封闭、检测; 检测孔与阴性对照孔 OD 比值大于或等于 2.1 的最高稀释度的倒数为该血清的抗体滴度。

1.5.3 中和抗体的检测

用 IFA 检测 PCV2 的中和抗体^[13], 以减少 70% 或更多荧光的血清最高稀释度的倒数为中和抗体滴度。

用嗜斑减少试验测定 PRRSV 的中和抗体^[14], 以 100% 抑制病变的血清最高稀释度的倒数为中和抗体滴度。

2 结果

2.1 重组病毒的构建

2.1.1 Cap 蛋白基因的扩增

PCR 产物经 1% 琼脂糖电泳鉴定, 可见有大小约为 700 bp 左右的条带。

2.1.2 重组质粒 rShuttle-ORF2-ORF5 鉴定

将候选阳性重组质粒 1:100 稀释作 PCR 反应, 分别扩增 ORF2、ORF5 和 ORF2+ORF5 片段, PCR 产物经 1% 琼脂糖电泳, 扩增片段分别为 718 bp、624 bp 和 1340 bp, 与预计片段大小一致(图 1), 表明 Cap 蛋白基因已正向克隆入穿梭载体。Kpn I 酶切重组质粒, 可见切出有与 ORF2 片段大小一致的条带(图 1)。测序分析结果显示, Cap 蛋白基因成功地正向克隆入穿梭载体 rShuttle-ORF5 中, 并符合原阅读框, Cap 蛋白与 GP5 蛋白连接点氨基酸序列为 Gly、Thr 和 Asn。将该阳性重组质粒命名为 rShuttle-ORF2-ORF5。

2.1.3 重组质粒 rAd-ORF2-ORF5 鉴定

将疑似阳性重组质粒 1:100 稀释作 PCR 反应, 分别扩增 ORF2、ORF5 和 ORF2+ORF5 片段, PCR 产物 1% 琼脂糖电泳, 扩增片段与预计片段大小一致(图 2)。Pac I 酶切重组质粒, 可见切出 35 kb 和 4.5 kb 的片段(图 2)。将该阳性重组质粒命名为 rAd-ORF2-ORF5。

2.1.4 质粒转染与病毒收获

转染线性化 rAd-ORF2-ORF5 质粒 DNA 第 10 天后镜检, 可以观察到部分细胞孔出现病变, 12 d 收获。经空斑试验, 连续克隆 3 次, 获得一株重组腺病毒, 命名为 rAd-Cap-GP5。

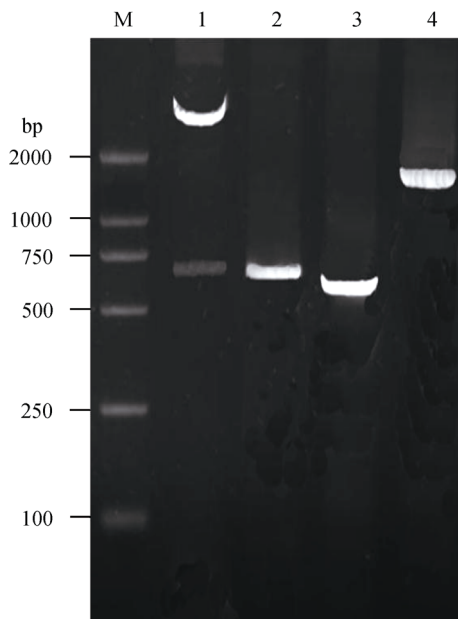


图1 rShuttle-ORF2-ORF5 *Kpn* I 酶切和 PCR 鉴定

Fig. 1 Identification of recombinant adenovirus plasmid rShuttle-ORF2-ORF5 by PCR and digestion with *Kpn* I in 1% agarose gel. M: DNA marker DL2000; 1: digestion of rShuttle-ORF2-ORF5 with *Kpn* I; 2: PCR products of ORF2 in the rShuttle-ORF2-ORF5 capsid; 3: PCR products of ORF5 in the rShuttle-ORF2-ORF5 capsid; 4: PCR products of ORF2-ORF5 in the rShuttle-ORF2-ORF5 capsid.

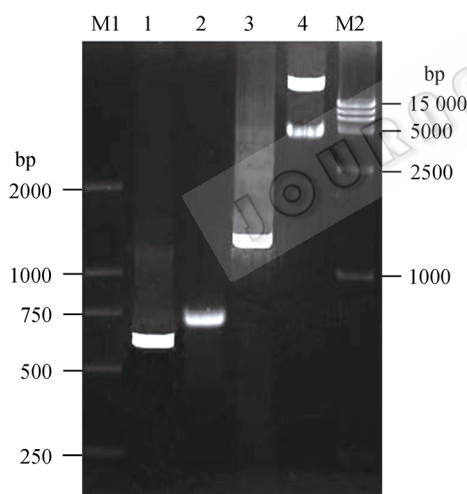


图2 rAd-ORF2-ORF5 *Pac* I 酶切和 PCR 鉴定

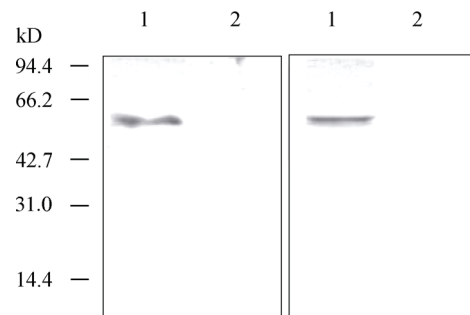
Fig. 2 Identification of recombinant adenovirus plasmid rAd-ORF2-ORF5 by PCR and digestion with *Pac* I. M1: DNA marker DL2000; 1: PCR product for GP5 gene; 2: PCR product for Cap gene; 3: PCR product for GP5-Cap gene; 4: digestion with *Pac* I; M2: DNA marker DL15000.

2.2 重组腺病毒 rAd-Cap-GP5 蛋白表达鉴定

2.2.1 Western blotting 分析

Western blotting 试验结果显示转印后的硝纤膜

与鼠抗 rAd-Cap 和 rAd-GP5 血清作用, 再与羊抗小鼠 IgG-HRP 孵育后, 经 X 光显影后, 浓缩后的重组病毒在约 55 kD 处有一明显的条带, 与预计大小一致, 而对照空的腺病毒没有任何条带(图 3)。



(A) Antibody to PRRSV (B) Antibody to PCV2

图3 病毒 rAd-Cap-GP5 浓缩后分别用 PRRSV 抗体(A)和 PCV2 抗体(B)进行 Western blotting 检测

Fig. 3 Western blotting analysis of cell lysates infected with recombinant adenoviruses with pig anti-PRRSV serum (A) and pig anti-PCV2 serum (B). 1: cell lysates of rAd-Cap-GP5; 2: cell lysates of wtAd. Proteins standards are showed on left side of panel.

2.2.2 Cap 蛋白表达的鉴定

接种重组腺病毒的细胞与抗 PCV2 猪血清后, 用 AEC 和 SPA-FITC 染色后, 多数细胞呈现红褐色和明显的荧光, 而对照细胞只在细胞之间呈现较淡的红褐色或未见荧光(图 4)。说明 Cap 蛋白在该重组病毒中获得了表达。

2.2.3 GP5 蛋白表达的鉴定

感染重组病毒的细胞与抗 PRRSV 猪血清孵育后, 再用 AEC 和 SPA-FITC 染色后, 大部分细胞被染成红褐色或出现明显荧光, 对照细胞没有被染色(图 5)。说明该重组病毒表达了 GP5 蛋白。

2.3 稳定性试验

第 5、10、15 和 20 代重组病毒的 TCID₅₀ 分别为 $10^{9.5}$ /mL、 $10^{11.9}$ /mL、 $10^{9.7}$ /mL 和 $10^{12.7}$ /mL。将它们接种细胞后进行 IFA 和 IPMA, 都能观察到有荧光的细胞和被染成红褐色的阳性细胞, 且数量基本一致。说明该病毒能一直稳定的表达 Cap 蛋白和 GP5 蛋白, 具有较好的稳定性。

2.4 小鼠免疫试验

2.4.1 PCV2 特异性抗体的测定

间接 ELISA 证明免疫重组腺病毒 rAd-Cap-GP5

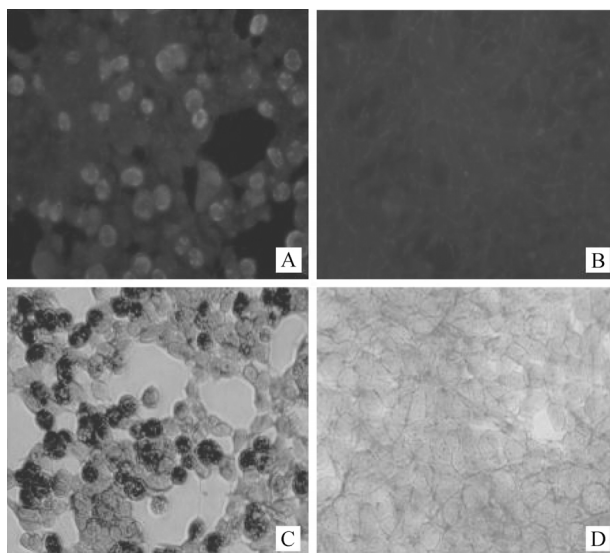


图 4 用 IFA(A、B)和 IPMA(C、D)检测 rAd-Cap-GP5 感染 293A 细胞中的 Cap 蛋白表达

Fig. 4 Identification of the expression of Cap protein in 293A cells infected with rAd-Cap-GP5 with IFA (A, B) and IPMA(C, D). 293A cells were infected with rAd-Cap-GP5 at 20 MOIs for 24–48 h, and then were incubated with swine antibody to PCV2(A, C). No-infected 293A cells were used as negative control (B, D).

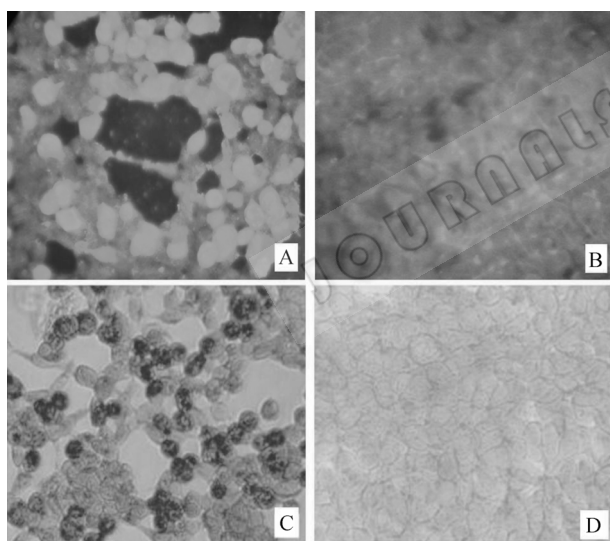


图 5 用 IFA (A、B)和 IPMA(C、D)检测 rAd-Cap-GP5 感染 293A 细胞中的 GP5 蛋白表达

Fig. 5 Identification of the expression of GP5 protein in 293A cells infected with rAd-Cap-GP5 with IFA (A, B) and IPMA(C, D). 293A cells were infected with rAd-Cap-GP5 at 20 MOIs for 24–48 h, and then were incubated with swine antibody to PRRSV(A, C). No-infected 293A cells were used as negative control (B, D).

的小鼠在首免后第 14 天均检测到 PCV2 特异性抗体, 抗体的平均滴度为 1:400, 到二免后 2 周, PCV2 抗体

达到 1:2400, 一直持续到试验结束(图 6A)。

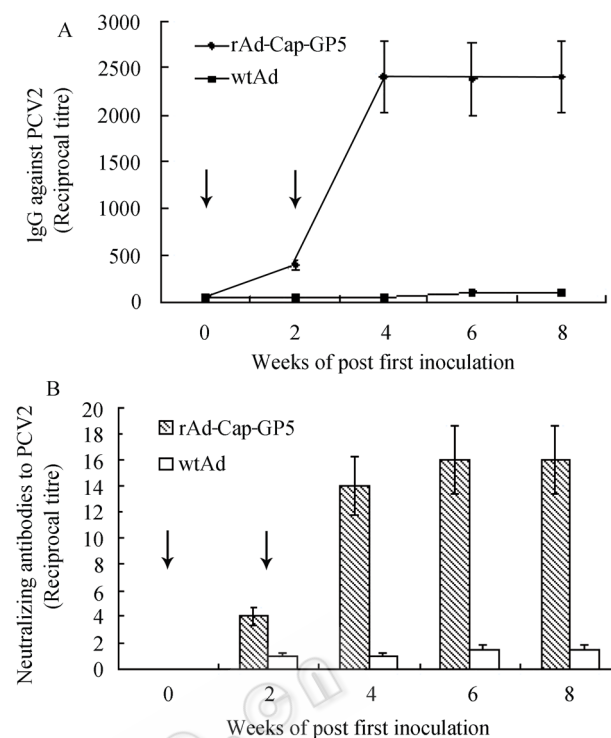


图 6 免疫小鼠 PCV2 特异性 ELISA 抗体(A)和中和抗体检测(B)结果(↓表示免疫时间)

Fig. 6 ELISA assay for PCV2 specific antibodies (A) and analysis of neutralization activity (B) of sera from mice immunized with rAd-Cap-GP5. Arrows (↓) indicate time of initial immunization and boost. WtAd means wild-type adenovirus.

IFA 测定 PCV2 特异性中和抗体的结果表明, 小鼠免疫后不同时间的中和抗体滴度不同, 首免后 14 d 所有小鼠中和抗体滴度均较低, 到二免后 2 周免疫组的中和抗体平均滴度达到 1:14, 4 周和 6 周时均达到 1:16(图 6B)。对照组没有检测到 PCV2 特异性抗体。

2.4.2 PRRSV 特异性抗体的测定

间接 ELISA 结果表明, 免疫小鼠在首免后 2 周即出现 PRRSV 特异性抗体, 滴度可达 1:2200, 二免后 2 周达到 1:3800, 4 周上升到 1:6400(图 7A)。

空斑减少试验表明, PRRSV 特异性中和抗体出现较晚, 首免后 2 周采集的小鼠血清没有检测到 PRRSV 特异性中和抗体, 直到二免后 2 周, 中和抗体滴度仅达到 1:4, 到二免后 4 周和 6 周中和抗体滴度分别达到 1:10 和 1:12(图 7B)。对照组没有检测到

PRRSV 特异性抗体。

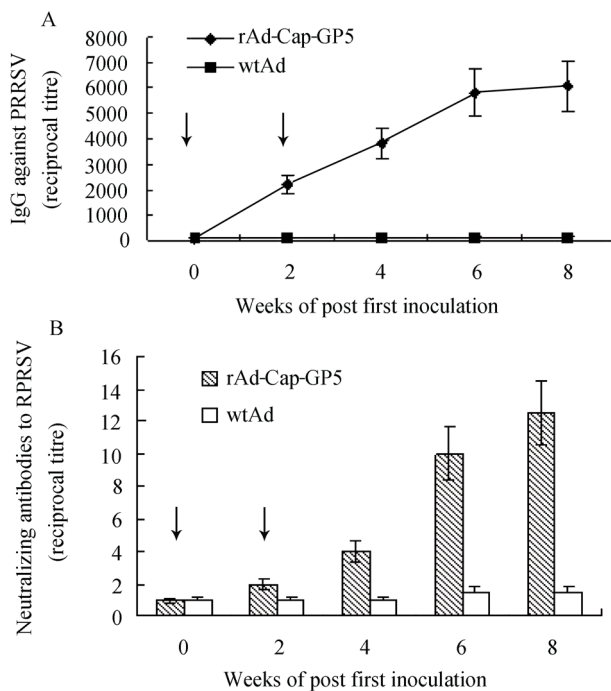


图7 免疫小鼠 PRRSV 特异性 ELISA 抗体(A)和中和抗体检测(B)结果(↓表示免疫时间)

Fig. 7 ELISA assay for PRRSV specific antibodies (A) and analysis of neutralization activity (B) of sera from the mouse immunized with rAd-Cap-GP5. Arrows (↓) indicate time of initial immunization and boost. WtAd means wild-type adenovirus.

3 讨论

目前,有关预防和治疗 PCV2 感染的疫苗研究主要集中在全病毒灭活疫苗、Cap 蛋白基因工程亚单位疫苗^[4]、DNA 疫苗^[3]及 PCV1-PCV2 重组疫苗^[16]和基因缺失疫苗^[17],并取得了重要研究进展。Blanchard 等证明了 ORF2 的亚单位疫苗的免疫效果优于 DNA 疫苗。本实验室也曾构建了表达 Cap 蛋白的重组腺病毒^[13,15],通过小鼠免疫试验和猪体免疫攻毒保护试验证明该重组病毒具有较好的免疫保护效果。对于 PRRSV 的研究较多,国外许多学者研究证明,用大肠杆菌、重组杆状病毒、酵母表达系统、重组冠装病毒、重组腺病毒等表达系统表达的 GP5 蛋白免疫动物后能诱导机体产生中和抗体,对病毒具有中和活性,对机体产生保护性免疫反应^[6-8],本实验室李玉峰等^[14]构建的表达 PRRSV

GP5 蛋白的重组腺病毒,猪体免疫试验证明可诱导产生较好的免疫应答。因此,本研究构建了表达 Cap 和 GP5 蛋白的重组腺病毒,并对其免疫原性进行了评价,旨在筛选可以作为预防 PCV2 和 PRRSV 感染的基因工程疫苗候选毒株。

首先利用克隆入 GP5 基因的重组质粒 rShuttle-ORF5 作为穿梭载体,通过 *Kpn*I 单酶切位点将 Cap 蛋白基因克隆入重组质粒 rShuttle-ORF5 中。由于 Cap 蛋白基因克隆入 rShuttle-ORF5 后,可能正向克隆,也可能反向克隆,因此采用 Cap 蛋白基因的上游引物和 GP5 蛋白基因的下游引物进行 PCR 扩增,来鉴定克隆方向的正确性。如果 Cap 基因是正向克隆入载体 rShuttle-ORF5 中,扩增的片段为 Cap 基因和 GP5 基因,即 1300 bp 左右的片段。通过 PCR 扩增和序列测定证明克隆基因完全正确,且符合原阅读框。获得的重组腺病毒纯化后连续传代至 20 代,病毒的 TCID₅₀ 始终保持在 10^{10.0} 左右,在第 15 代时病毒的 TCID₅₀ 有所下降,可能与病毒的保存时间有关。以上提到本实验室构建的表达 PCV2 的 Cap 蛋白(rAd-Cap)重组腺病毒^[13]和 PRRSV 的 GP5 蛋白(rAd-GP5)的重组腺病毒^[14],其中 rAd-Cap 的 TCID₅₀ 较高, rAd-GP5 的 TCID₅₀ 较低,而 rAd-Cap-GP5 的 TCID₅₀ 居于两者之间,这可能与蛋白的基因组成和空间结构有关,确切机理还有待于进一步研究。

将重组病毒经接种细胞后用猪阳性血清孵育后,经 IPMA 和 IFA 方法检测蛋白的表达情况,显微镜观察可见细胞中出现明显的染色和荧光;将野生型和重组病毒进行 Western blotting 试验,结果表明野生型的腺病毒没有条带出现,而重组病毒出现了大小为 55 kD 的融合蛋白,与预期大小一致,这些结果说明该病毒能正确表达 Cap 和 GP5 融合蛋白。TCID₅₀、IPMA 和 IFA 证明了 GP5 蛋白和 Cap 蛋白在传代后的重组病毒中稳定表达,表明该病毒具有较好的稳定性和抗原性。

抗体和中和抗体对猪体抵抗病毒感染起重要作用,有报道^[9-11]表达不同病原蛋白的重组腺病毒免疫动物后可产生一定水平的抗体和中和抗体,对动物提供保护作用。本研究将重组腺病毒 rAd-Cap-GP5

免疫小鼠, 免疫 2 周后产生针对 PCV2 和 PRRSV 的抗体和中和抗体, PCV2 的抗体和中和抗体均在一免后 4 周达到较高水平, 抗 PRRSV 的抗体和中和抗体的产生时间相对 PCV2 的抗体较晚, 在一免后 6 周达到较高水平, 其后上升缓慢。从试验结果看, 针对同一种病毒的抗体和中和抗体的变化趋势一致。但免疫猪体后是否能引起同样的体液免疫反应, 需要进一步的研究。

将 Cap 和 GP5 蛋白同时在人腺病毒中表达, 在国内外尚属首次。将两种蛋白同时在一载体中表达, 不仅可以一次完成免疫, 还可以降低生产成本, 既避免反复免疫注射的麻烦又能降低猪的免疫耐受。试验证明, 该重组病毒可诱导小鼠产生体液免疫, 可以作为预防 PCV2 和 PRRSV 感染的候选疫苗, 但对猪体的保护作用还需做进一步的试验。

REFERENCES

- [1] Rovira A, Balasch M, Segales J, *et al.* Experimental inoculation of conventional pigs with porcine reproductive and respiratory syndrome virus and porcine circovirus 2. *J Virol*, 2002, **76**: 3232–3239.
- [2] Zhao HJ, Wang XW, Jiang P, *et al.* Detection of PCV2, CSFV, PPV and PRRSV in pigs infected with PMWS. *Animal Hus Vet Med*, 2007, **39**(3): 32–35.
赵浩军, 王先炜, 姜平, 等. PMWS 患病猪群中 PCV2 与 CSFV、PPV、PRRSV 混合感染的调查. *畜牧与兽医*, 2007, **39**(3): 32–35.
- [3] Kamstrup S, Barfoed AM, Frimann TH, *et al.* Immunisation against PCV2 structural protein by DNA vaccination of mice. *Vaccine*, 2004, **22**: 1358–1361.
- [4] Blanchard P, Mahe D, Cariolet R, *et al.* Protection of swine against post-weaning multisystemic wasting syndrome (PMWS) by porcine circovirus type 2 (PCV2) proteins. *Vaccine*, 2003, **21**(31): 4565–4575.
- [5] Bastos RG, Ddilagostin OA, Barletta RG, *et al.* Construction and immunogenicity of recombinant Mycobacterium bovis BCG expressing GP5 and M protein of porcine reproductive respiratory syndrome virus. *Vaccine*, 2002, **21**: 21–29.
- [6] Ostrowski M, Galeota JA, Jar AM, *et al.* Identification of neutralizing and nonneutralizing epitopes in the porcine reproductive and respiratory syndrome virus GP5 ectomain. *J Virol*, 2002, **76**: 4241–4250.
- [7] Plagemann PGW, Rowland RRR, Faaberg KS. The primary neutralization epitope of porcine reproductive and respiratory syndrome virus strain VR-2332 is located in the middle of the GP5 ectodomain. *Arch Virol*, 2002, **147**: 2327–2347.
- [8] Yang L, Frey ML, Yoon KJ, *et al.* Categorization of North American porcine reproductive and respiratory syndrome viruses: epitopic profiles of the N,M,GP5 and GP3 proteins and susceptibility to neutralization. *Arch Virol*, 2000, **145**: 1599–1619.
- [9] Arribillaga L, Diaz de Cerio AL, Sarobe P, *et al.* Vaccination with an adenoviral vector encoding hepatitis C virus (HCV) NS protein protects against infection with HCV-recombinant vaccinia virus. *Vaccine*, 2002, **21**: 202–210.
- [10] Wu Q, Moraes MP, Grubman MJ. Recombinant adenovirus co-expressing capsid protein of two serotypes of foot-and-mouth disease virus (FMDV) *in vitro* characterization and induction of neutralizing antibody against FMDV in swine. *Virus Res*, 2003, **93**: 211–219.
- [11] Moraes M P, Chinsangaram J, Brum MCS, *et al.* Immediate protection of swine from foot-and-mouth disease: a combination of adenoviruses expressing interferon alpha and a foot-and-mouth disease virus subunit vaccine. *Vaccine*, 2003, **22**: 268–279.
- [12] Chinsangaram J, Moraes MP, Koster M, *et al.* A novel viral disease control strategy: adenovirus expressing interferon alpha rapidly protects swine from foot-and-mouth disease. *J Virol*, 2003, **77**: 1621–1625.
- [13] Wang XW, Jiang WM, Jiang P, *et al.* Construction and immunogenicity of recombinant adenovirus expressing the capsid protein of porcine circovirus 2 (PCV2) in mice. *Vaccine*, 2006, **24**: 3374–3380.
- [14] Li YF, Jiang P, Jiang WM, *et al.* Construction and immunogenicity of GP5 recombinant adenovirus of porcine reproductive and respiratory syndrome virus. *Virol China*, 2006, **21**(4): 364–367.
李玉锋, 姜平, 蒋文明, 等. 猪繁殖与呼吸综合征病毒 GP5 蛋白重组腺病毒构建与免疫原性测定. *中国病毒学*, 2006, **21**(4): 364–367.
- [15] Wang XW, Jiang P, Li YF, *et al.* Protection of pigs against post-weaning multisystemic wasting syndrome by a recombinant adenovirus expressing the capsid protein of porcine circovirus type 2. *Vet Microbiol*, 2007, **121**: 215–224.
- [16] Fenaux M, Opriessnig T, Halbur PG, *et al.* Immunogenicity and pathogenicity of chimeric infectious DNA clones of pathogenic porcine circovirus type 2 (PCV 2) and nonpathogenic PCV1 in weanling pigs. *J Virol*, 2003, **77**(20): 11232–11243.
- [17] Karupppannan AK, Jong MH, Lee SH, *et al.* Attenuation of porcine circovirus 2 in SPF piglets by abrogation of ORF3 function. *Virology*, 2009, **83**: 338–347.