

IL-2真核质粒对乳酸杆菌载体口蹄疫 VP1 DNA 疫苗 猪体免疫反应的分子佐剂效应

李云岗^{1,2} 田夫林² 周开锋² 高凤山¹ 李新生¹ 马慧玲² 夏春¹

(1. 中国农业大学 动物医学院, 北京 100094; 2. 山东省畜牧兽医总站, 济南 250022)

摘要 为研究猪 IL-2 真核表达质粒对乳酸杆菌载体口蹄疫 VP1 DNA 疫苗 (*Lactobacillus acidophilus* SFMD-1) 猪体免疫的分子佐剂效应,通过 RT-PCR 方法从猪的肠系膜淋巴结克隆猪 IL-2 基因,基于 pRc/CMV2 载体,构建编码猪 IL-2 的真核表达质粒 pCSIL2,以 RT-PCR 方法分析了该质粒转染 PK15 细胞以后的 mRNA 表达。结果显示预期的 429 bp IL-2 带仅出现在 pCSIL2 转染细胞。试验猪单独免疫 *L. acidophilus* SFMD-1 或者联合免疫 pCSIL2 质粒,后者能够增强 FMDV-VP1 特异的 T 细胞和 B 细胞反应,免疫后 5 周,单独免疫组和联合免疫组的抗体水平分别为 1.50 和 1.66;免疫后 6 周,抗体水平分别上升到 1.83 和 2.28;在 T 细胞增殖试验中,*L. acidophilus* SFMD-1 单独免疫组和 pCSIL2 联合免疫组的刺激指数(SI)分别为 2.00 和 2.70。结果表明,联合应用 IL-2 真核表达质粒是改进乳酸杆菌载体口蹄疫 VP1 DNA 疫苗免疫原性和效能的有效方法。

关键词 DNA 疫苗; 口蹄疫; 乳酸杆菌; 质粒 IL-2; 基因; 猪; 分子佐剂

中图分类号 S 852.4

文章编号 1007-4333(2006)06-0073-06

文献标识码 A

Lactobacillus as a carrier in DNA vaccination against FMDV VP1 induce immune responses in swine which is enhanced by co-administration with swine IL-2

Li Yungang^{1,2}, Tian Fulin², Zhou Kaifeng², Gao Fengshan¹, Li Xinsheng¹, Ma Huiling², Xia Chun¹

(1. College of Veterinary Medicine, China Agricultural University, Beijing 100094, China;

2. Shandong Provincial Husbandry & Veterinary Service Station, Jinan 250022, China)

Abstract In this paper, we studied the molecular adjuvant effect of IL-2 on DNA vaccine against FMDV VP1 (*Lactobacillus acidophilus* SFMD-1) in swine. Swine IL-2 gene was cloned from mesentery lymph node by RT-PCR method, then it was ligated to eukaryotic expression plasmid pRc/CMV2 to produce pCSIL2. The expression of mRNA was analyzed in transfected PK15 cells by RT-PCR with specific primers. The predicted 429 bp band of IL-2 gene was appeared only in cells transfected with the pCSIL2. Swine were immunized with *L. acidophilus* SFMD-1 or co-administration with pCSIL2. Anti-FMDV-VP1-specific antibody titers were measured by the indirect ELISA method. Co-delivery with pCSIL2 plasmid was able to enhance both VP1-specific T cell and B cell response. Three weeks post primary immunization, swine vaccinated with *L. acidophilus* SFMD-1 alone and co-delivery with pCSIL2 groups reached 1.50 and 1.66, and then rose to 1.83 and 2.28 on three weeks of booster, respectively. In the MTT assay, the stimulation index (SI) of *L. acidophilus* SFMD-1 immunization alone and co-delivery group reached 2.00 and 2.70, respectively. Results clearly demonstrate that co-administration of IL-2 eukaryotic plasmid is a promising strategy for improving immunogenicity and efficacy of FMDV-VP1 DNA vaccine based on *Lactobacillus* as a carrier.

Key words foot-and-mouth disease; DNA immunization; *Lactobacillus*; plasmid IL-2; gene; swine; molecular adjuvant

口蹄疫(FMD)是哺乳动物最严重的传染病之一,以疫苗接种常规方法预防 FMD 应用广泛^[1]。以编码病原结构基因的 DNA 疫苗进行免疫是预防

包括 FMD 在内诸多传染病的新方法^[2-3],其主要限制因素是免疫反应相对较弱。应用细菌作为 DNA 疫苗的载体更高效地将抗原靶向免疫系统^[4],不需

收稿日期: 2006-05-25

作者简介: 李云岗,博士,高级兽医师, E-mail: yungangli@163.com; 夏春,教授,通讯作者,主要从事分子免疫学研究, E-mail: xiachun@cau.edu.cn

要免疫大量的质粒,可以刺激天然免疫系统提供足够的细胞因子小环境和适量表达的共刺激分子^[5],减少DNA的降解等,因而可以部分地克服裸DNA疫苗的劣势。侵入性的致弱菌株,如福氏志贺菌(*Shigella flexneri*),产单核细胞李氏杆菌(*Listeria monocytogenes*),大肠杆菌(*Escherichia coli*),鼠伤寒沙门氏菌(*Salmonella typhimurium*)和伤寒沙门氏菌(*Salmonella typhi*)等均被用作发送外源DNA质粒的载体^[6-8],另外,为了避免这些致弱毒株可能存在的毒力返强风险,以非病原的、食品级的共生乳酸杆菌作为黏膜免疫载体成为新的研究方向。多种乳酸杆菌表达系统业已构建,借以在菌体内表达外源性抗原,如破伤风毒素C片断、HIV gp41E和轮状病毒表面蛋白等^[9-11]。为弥补由于乳酸杆菌原核表达外源抗原蛋白而存在的不能适当进行翻译后修饰等缺点、拓展DNA疫苗载体菌种范围,本课题组建立了以乳酸杆菌为载体的DNA疫苗实验系统^[12]。

此外,应用免疫佐剂和DNA疫苗共同免疫是增强和优化DNA免疫的有效途径。诸多研究表明,DNA疫苗的抗原特异性免疫可以通过共同发送细胞因子得到加强^[13-14]。IL-2是15.5 ku的糖蛋白,它由活化的辅助性T细胞分泌,可发动、调节和维持抗原特异免疫反应等^[2]。已有实验数据表明,与特定的抗原共同发送编码IL-2的真核质粒能够增强抗原的体液和细胞免疫反应,但主要支持Th1型细胞分化^[13]。研究表明与IL-2质粒共同免疫具有免疫增强作用的病原主要包括FMDV、HIV^[13]、HBV^[15]、IBDV^[16]、PRRSV^[17]和BVDV等。

建立乳酸杆菌为载体的口蹄疫VP1 DNA疫苗(*L. acidophilus* SFMD-1)能够在小鼠和猪体内刺激FMDV-VP1特异的B细胞和T细胞反应^[12,18]。本研究旨在评价猪IL-2真核表达质粒在猪体免疫中是否具有针对*L. acidophilus* SFMD-1的分子佐剂的效能。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 质粒,细菌和培养条件 pMD18-VP1质粒带有O型FMDV分离株(O/XJ1)的VP1基因(A Y373583),由中国农业大学生物学院王宾教授馈赠。pEM68质粒,带有*L. plantarum* ATCC 8014复制子基因Rep. 8014,由西班牙Asturias乳产品研究所(CSIC) Miguel A. Alvarez博士惠赠。pRc/

CMV2真核表达质粒购自Invitrogen。*E. coli* JM109菌株购自Promega公司。

Lactobacillus acidophilus SW1 (*L. acidophilus* SW1)分离自健康的2月龄长白仔猪。该分离株经API 50 CHL培养基鉴定(bioMerieux, Inc, 法国)。

L. acidophilus SFMD-1是个重组的*L. acidophilus* SW1菌株,含有pRc/CMV2-VP1-Rep. 8014真核表达质粒,以pRc/CMV2真核表达质粒为骨架,带有FMDV的VP1基因和来源于*L. plantarum* ATCC 8014株的Rep. 8014复制子基因,本实验室构建。

L. acidophilus SFMD-1过夜培养物以1:50接种于MRS培养基,在37℃和50 mL/L CO₂条件下培养至D₆₆₀为0.6~0.8。6 000 g 5 min离心收获细菌培养物,并以0.01 mol/L PBS (pH7.4)洗涤1次,用无菌PBS制备成5×10¹⁰个/mL菌液备用。

1.1.2 主要试剂 O型FMDV标准抗原,购自中国农业科学院兰州兽医研究所;O型FMDV-VP1 EIA猪试剂盒,购自美国UBI公司;O型口蹄疫正向间接血凝抗原(IHA),购自中国农业科学院兰州兽医研究所,批号060118;限制性内切酶Hind^{III}、Not^I, T4 DNA连接酶, Ex TaqTM聚合酶, dNTP, AMV反转录酶, DNase^I均为TaKaRa公司产品;TRIZOL Reagent, Invitrogen产品;Vigofect转染试剂购自威格拉斯生物技术(北京)有限公司;DNA Marker购自鼎国生物技术公司;质粒大提试剂盒购自TIANGEN生物技术公司。IL-2基因克隆用引物合成及相关序列测定由上海生工生物工程技术公司进行。

1.1.3 试验动物 猪IL-2克隆用组织材料采自北京某屠宰场长白杂交猪肠系膜淋巴结。免疫试验用长白杂交猪共9头,每只40~50 kg,购自山东省某猪场,经FMDV-VP1 EIA猪试剂盒检测,FMDV抗体阴性。

1.2 猪IL-2基因克隆

1.2.1 猪肠系膜淋巴结总RNA的提取和反转录 称取100 mg左右肠系膜淋巴组织,加入1 mL Trizol试剂,按照说明书提取总RNA。在65℃下作用10 min后立即放于0℃左右,利用Oligo dT反转录引物进行反转录。反应体系如下:模板RNA 1 μL(约1 μg)、5×反转录酶缓冲液4 μL、dNTP混合物(2.5 mmol/L) 8 μL、RNase抑制剂(40 U/μL) 0.5 μL、Oligo dT(15T)反转录引物(100 pmol) 1 μL、

AMV (5 U/ μ L) 1 μ L,加 DEPC 处理水至 20 μ L,室温 10 min,42 1 h 后,冰浴作用 20 min。

1.2.2 RT-PCR 扩增 IL-2 基因 根据 GenBank (NM. 213861)中猪 IL-2^[19]的 mRNA 序列,设计引物对 set 1[#],即 5'-CGGGA TCCGCACCTACTTCA-AGCTCTAC-3 和 5'-AGTAA GCTTTCAA GTCA G-TGTTGAGTAG-3,并在其上下游分别引入 *Bam*H 和 *Hind* 酶标位点,以便于克隆。建立如下总体积为 50 μ L 的 PCR 反应体系:10 \times PCR 缓冲液 5 μ L、dNTP (2.5 mmol/L) 4 μ L、模板 cDNA (约 0.5 μ g) 5 μ L、上游引物和下游引物 (100 pmol/ μ L) 各 0.5 μ L,加蒸馏水至 49.5 μ L。瞬时离心混匀,加入 50 μ L 石蜡油。96 热变性 5 min,取出立即加入 0.5 μ L Ex Taq 酶,混匀,然后进入 PCR 循环:94 50 s,57 50 s,72 50 s,5 个循环;94 50 s,54 50 s,72 50 s,5 个循环;94 50 s,53 50 s,72 50 s,26 个循环;72 10 min 1 个循环。

1.2.3 IL-2 基因阳性克隆鉴定及序列分析 回收以上 PCR 扩增产物。然后用 T4 DNA 连接酶与 pGEM-T easy 载体连接,转化 *E. coli* JM109,提取质粒,用 *Bam*H 和 *Hind* 双酶切和 PCR 扩增鉴定阳性克隆,筛选带有猪 IL-2 基因的重组质粒 pGEM-TIL2,随后进行序列测定。采用 GENETYX 软件对所测序列进行与参考序列进行同源性分析,确定克隆的 IL-2 序列的正确性。应用 SAKURA 系统将克隆的基因登录入 DDBJ 基因库。

1.3 真核质粒 pCSIL2 构建

pGEM-TIL2 和 pRc/CMV2 载体用于 pCSIL2 质粒的构建。步骤如下:首先,设计新的引物对 set # 2,即 5'-TCGAAGCTTATGGCACCTACTTCAAGCTCTAC-3 和 5'-TATAGCGGCCGCTCAAAGTCA GTGTTGAGTAGATG-3。其正向和反向引物分别包括了 *Hind* 和 *Not* 限制性位点,以 PCR 方法自 pGEM-TIL2 亚克隆 IL-2。PCR 产物用 *Hind* 和 *Not* 双酶切,429 bp 的 IL-2 回收片段插入 pRc/CMV2 载体的相应位点,然后通过酶切、PCR 分析和 DNA 序列测定证实序列和插入方向的正确性,即构建了猪 IL-2 基因真核表达质粒,命名为 pCSIL2。所有的构建体均转化 *E. coli* JM109 菌。

1.4 pCSIL2 在 PK15 细胞的表达

PK15 细胞系和 Vigofect 转染试剂用于 pCSIL2 的体外转染试验,转染方法根据说明进行。以 MEM 培养液将 PK15 细胞培养传代于细胞瓶,在

37 和 50 mL/L CO₂ 条件下培养约 24 h,至细胞密度达到 40%~60%。此后转染 5 μ g pCSIL2 质粒和 2 μ L Vigofect 的混合物,对照细胞转染 pRc/CMV2 质粒或者不转染,转染 48 h 后收获细胞,以 RT-PCR 方法分析 mRNA 的表达情况;倒掉细胞培养上清液,收集细胞,用 Trizol 提取总 RNA,随后加入 *DNase* 排除可能存在的残留 pCSIL2 质粒污染模板。反转录合成 cDNA 后,以 IL-2 特异性引物检测 IL-2 mRNA 转录表达情况。

1.5 免疫

猪的免疫根据 Shaw 和 Wong 等方法进行^[2,10]:应用质粒大量提取试剂盒,从 *E. coli* JM109 提取 pCSIL2 质粒,溶解于 PBS 液中,质量浓度调节为 100 μ g/mL。免疫用 *L. acidophilus* SFMD-1 重组菌按 1.1.1 节方法制备。9 头猪分成 3 组,常规圈养,随意采食和饮水,试验前隔离观察 1 周,整个试验阶段处于可控制的隔离环境之中。试验处理:前 2 组通过颈部肌肉注射分别给予 *L. acidophilus* SFMD-1 以及 *L. acidophilus* SFMD-1 + pCSIL2 (100 μ g),设定野生型 *L. acidophilus* SW1 为空白免疫组。免疫剂量为每头猪 5 $\times 10^{10}$ 个菌。初次免疫后 3 周时加强免疫 1 次。在免疫后 0、3、5 和 6 周自猪耳静脉采血收集血清。

1.6 FMDV-VP1 抗体的检测

应用 FMDV-VP1 EIA 猪间接 ELISA 试剂盒检测 FMDV-VP1 特异性抗体,试验步骤按照说明进行。FMDV-VP1 特异性抗体水平 = 测定的样品 OD 值 (Sample, S) / 阴性对照血清 OD 值 (Negative, N)。

1.7 T 细胞增殖试验

试验根据 MTT 方法并进行适当调整^[20],即加强免疫后 14 d,前腔静脉采血,以淋巴细胞分离液 (密度 1.077 g/mL) 通过密度梯度离心分离猪外周血单核细胞 (PBMC),重悬于含有 5% (体积分数) 胎牛血清的 RPMI 1640 液中,细胞计数,调整为 5 $\times 10^5$ 个细胞/mL 的悬液。培养 24 h 后,以终质量浓度为 5 μ g/mL 的 Con A,3 μ g/mL 的 FMDV 抗原、2 μ g/mL 的 BSA 以及培养基分别刺激 48 h。每孔加入 5 mg/mL 的 MTT 5 μ L,作用 4 h,其后加入 150 μ L 二甲基亚砷 (DMSO),在黑暗环境反应过夜。结果数值以刺激指数 (SI) 表示,即 3 孔的平均 OD 值除以培养基刺激的对照细胞 OD 值。

2 结果

2.1 猪 IL-2 基因的克隆

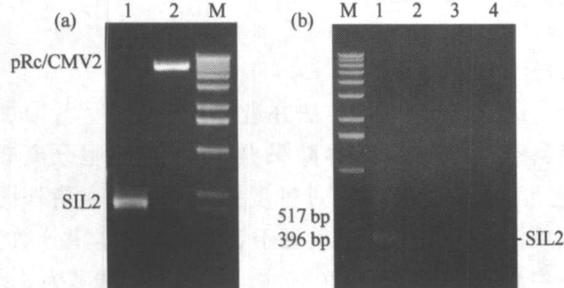
应用特异性引物,以 RT-PCR 方法,从猪肠系膜淋巴结中扩增出了大小约 420 bp 的片段,与预期大小基本一致。回收 PCR 产物,将其插入 pGEM-T easy 载体,转化并筛选阳性克隆,经 *Bam*H 和 *Hind* 双酶切和 PCR 鉴定,初步确定了插入序列的正确性,对该质粒命名为 pGEM-TIL2。对重组质粒进行测序,表明克隆的猪 IL-2 基因长度为 405 bp,与参照序列同源性 99%。有 2 处碱基突变,289 位 C 突变为 G,355 位 C 变 A;97 位氨基酸突变为缬氨酸,119 位亮氨酸突变为蛋氨酸。将获得的猪 IL-2 基因登录入 DDBJ 数据库(登录号:AB194099)。

2.2 真核质粒 pCSIL2 的构建

如图 1(a) 所示,以引物 set2 # 扩增 pGEM-TIL2,产生了含有 *Hind* 和 *Not* 限制性位点的 IL-2 基因新片段。*Hind* 和 *Not* 双酶切 PCR 产物并回收目标片段,将其插入 pRc/CMV2 载体相应的限制性位点,转化 *E. coli* JM109,筛选阳性克隆。随后对其进行了酶切和 PCR 鉴定。以 *Hind* 和 *Not* 双酶切阳性质粒,分别得到了 429 bp 的 IL-2 小片段,以及 5.5 kb 的载体大片段;以特异性 PCR 引物扩增阳性质粒,得到了 429 bp 的 IL-2 片段(图 1(a)),并进一步通过测序证实了其序列和方向的正确性。结果表明,已成功构建了 pCSIL2 真核质粒。

2.3 pCSIL2 在 PK15 细胞的表达

提取细胞总 RNA,以 RT-PCR 方法对 IL-2 的



(a) pCSIL2 质粒的酶切和 PCR 鉴定。M 为分子量标准;1 为以 IL-2 特异性引物对 pCSIL2 质粒进行 PCR 鉴定的结果;2 为 pCSIL2 经 *Hind* 和 *Not* 双酶切后的结果。(b) RT-PCR 分析 pCSIL2 在 PK15 细胞的表达情况。M 为分子量标准;1 为 pCSIL2 转染细胞;2 为 pRc/CMV2 转染细胞;3 为非转染细胞;4 为 pCSIL2 转染细胞非反转录 RNA 提取物模板。

图 1 pCSIL2 质粒鉴定及其在 PK15 细胞的表达分析

Fig. 1 Identification of pCSIL2 plasmid and RT-PCR analysis of IL-2 gene expression in PK15 cells

mRNA 进行分析。预期的 429 bp IL-2 条带仅出现在 pCSIL2 转染细胞(图 1(b)),而没有相似大小的条带出现在非转染细胞或 pRc/CMV2 转染细胞。此外,为了排除可能的质粒 DNA 污染,以 pCSIL2 转染细胞的非反转录总 RNA 提取物为模板,用 IL-2 特异性引物进行 PCR 分析,无任何条带显现。结果表明,pCSIL2 质粒可以在真核细胞有效地转录和表达 IL-2 基因。

2.4 FMDV-VP1 抗体检测

为评价 pCSIL2 对 *L. acidophilus* SFMD-1 的分子佐剂作用,检测了 FMDV-VP1 抗体动态变化(图 2)。在免疫后 3 周,*L. acidophilus* SFMD-1 单独免疫组和 pCSIL2 联合免疫组抗体水平分别为 1.50 和 1.66;免疫后 5 周,2 组抗体水平都出现下降,在免疫后 6 周分别上升到 1.83(*L. acidophilus* SFMD-1)和 2.28(*L. acidophilus* SFMD-1 + pCSIL2)。应用 SPSS12.0 生物统计软件分析表明,在免疫后 6 周,pCSIL2 共同免疫组特异性抗体水平高于 *L. acidophilus* SFMD-1 单独免疫组,且有显著性差异($P < 0.05$)。结果显示,联合免疫 pCSIL2 能够增加 *L. acidophilus* SFMD-1 的特异性体液免疫反应。

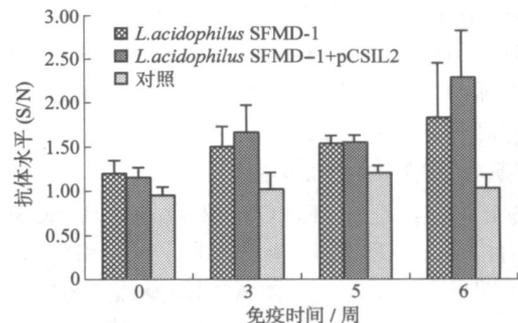


图 2 猪 IL-2 对 *L. acidophilus* SFMD-1 抗体反应的分子佐剂效应

Fig. 2 Molecular adjuvant effect of swine IL-2 on antibody responses of *L. acidophilus* SFMD-1 vaccination

2.5 T 细胞增殖试验

加强免疫后 2 周,分离 PBMC 细胞,以 MTT 方法测定了免疫猪的 T 细胞增殖反应。对野生型 *L. acidophilus* SW1 株免疫猪进行了同样的检测表明,经特异性 FMDV 抗原刺激,pCSIL2 共同免疫组较 *L. acidophilus* SFMD-1 单独免疫组诱导了更高的 T 细胞免疫反应,刺激指数(SI)分别为 2.70 和 2.00(图 3),有显著性差异($P < 0.05$)。2 个免疫组 SI 值均高于野生型对照组,差异显著($P < 0.05$)。另

外, 2 个免疫组分别受 FMDV 抗原刺激后的刺激指数均高于 BSA 刺激组, 且差异极显著 ($P < 0.01$)。结果表明 pCSIL2 联合免疫能够增强 *L. acidophilus* SFMD-1 的特异性细胞免疫反应。

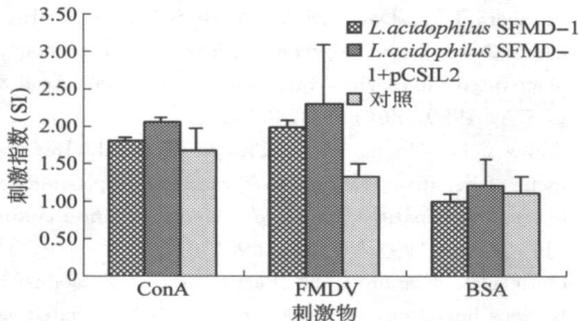


图 3 pCSIL2 对 *L. acidophilus* SFMD-1 诱导的 T 细胞增殖反应的影响

Fig. 3 Effect of pCSIL2 on T cell proliferation response to *L. acidophilus* SFMD-1 in swine

3 结论与讨论

尽管 DNA 疫苗在小鼠作用效果非常好, 但是在体格较大的杂交动物还没有发现特别有效的报道^[22]。本研究证实, 在猪体联合免疫猪 IL-2 真核表达质粒能够增强乳酸杆菌为载体的口蹄疫 VP1 DNA 疫苗诱导的特异性 T 细胞和 B 细胞免疫水平。

1) 乳酸杆菌为载体的 DNA 疫苗的优势。以减毒细菌作为 DNA 疫苗载体已有广泛研究, 但除本研究建立的实验系统外, 迄今尚没有建立其他以乳酸杆菌为载体的 DNA 疫苗系统。以乳酸杆菌为载体的 DNA 疫苗结合了非病原的、安全的、共生的乳酸杆菌益生性能和 DNA 免疫的优势, 如对免疫动物安全, 健康的促进作用, 免疫佐剂能力, 低廉的生产成本, 可预见的编码抗原在真核宿主内精确的蛋白翻译后修饰^[22-23], 简化的生产程序等, 达到了益生和免疫预防相结合的双重功效。本研究评价了联合免疫猪 IL-2 基因真核表达质粒对其免疫效能的影响, 表明这种方法对改进乳酸杆菌为载体的 DNA 疫苗的免疫效能具有潜在应用价值。

2) IL-2 的免疫促进作用。通过合理的疫苗设计以及对共同发送免疫佐剂等方式不断进行改进增加了 DNA 疫苗的效能。应用细胞因子作为潜在的免疫佐剂的研究主要集中在 IL-2, 这不仅因为它能够增强细胞介导的免疫, 如产生 CTL, 活化自然杀伤细胞 (NK) 及淋巴因子激活的杀伤细胞 (LAK),

诱导 T 细胞产生其他细胞因子, 而且能够刺激活化 B 淋巴细胞增殖并诱导免疫球蛋白的分泌^[24]。一些研究显示共同发送猪 IL-2 真核质粒对提高口蹄疫 DNA 疫苗免疫效力具有显著作用^[2]。在本研究中, 编码猪 IL-2 基因的真核质粒与 *L. acidophilus* SFMD-1 联合免疫, 在初次免疫后 3 和 6 周产生了较 *L. acidophilus* SFMD-1 单独免疫更高的抗体水平和刺激指数。尤其在免疫后 6 周, pCSIL2 联合免疫组抗体水平和刺激指数分别达到了 2.28 和 2.70, 而 *L. acidophilus* SFMD-1 单独免疫组为 1.83 和 2.00, 两者差异显著。根据 UBI FMDV-VP1 检测试剂盒提供的有效免疫标准和计算所得的临界值, 加强免疫后 3 周, 所有 3 头试验猪均达到了有效免疫的标准, 这与以前报道的 IL-2 疫苗佐剂效果一致^[13]。抗体反应在 FMDV、HIV、狂犬病病毒以及 A 型流感病毒免疫保护中是一个重要因素^[2, 7]。已有数据显示, pCSIL2 联合免疫对改进猪体免疫水平方面是有效的, 另外, pCSIL2 联合免疫组较 *L. acidophilus* SFMD-1 单独免疫组诱导了更高的 T 细胞增殖反应。FMDV DNA 疫苗刺激的 T 细胞免疫反应可能与 FMDV 的保护性反应有关, 这些反应可能通过 Th 细胞, 或者 CTL, 或者两者均发挥作用^[2]。这个结果表明, 联合免疫 pCSIL2 能够增加 VP1 特异的 T 细胞和 B 细胞免疫。尽管 *L. acidophilus* SFMD-1 免疫组、pCSIL2 联合免疫组在初次免疫后抗体水平明显的上升, 但是在加强免疫后 2 周却出现了下降, 随后持续上升。这可能与 DNA 疫苗接种动物后需要吸收、进入、翻译和表达的过程有关, 它需要足够时间再次刺激免疫系统。传统的油佐剂疫苗可以缓慢地持续释放抗原以刺激免疫系统^[25]。

3) IL-2 的克隆方法。传统的 IL-2 克隆需要细胞培养, 而且需要有丝分裂原 Con A 的刺激。在本研究中, 直接以肠系膜淋巴结为材料, 提取总 RNA, 成功地克隆了 1 个细胞因子。

DNA 疫苗免疫过程和诱导免疫的效能受许多因素的影响, 如对疫苗反应性上存在的个体差异, 病原性质, 疫苗给予的途径, 以及所使用的免疫刺激分子等。本研究仅完成了猪体免疫试验的阶段性工作, 试验应用的免疫剂量、免疫间隔期、免疫途径等涉及免疫程序的合理性还需要进一步探讨。

本研究将已有的乳酸杆菌载体 *L. acidophilus* SFMD-1 运用于猪, 与猪 IL-2 真核质粒共同免疫,

增加 VP1 特异的 T 细胞和 B 细胞免疫反应,表明共同发送 IL-2 真核表达质粒是改进乳酸杆菌载体口蹄疫 VP1 DNA 疫苗免疫原性和效能的有效方法。

参 考 文 献

- [1] Anon. Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals[M]. 5th ed. Paris: Office International des Epizooties, 2004
- [2] Wong H T, Cheng S C, Sin F W, et al. A DNA vaccine against foot-and-mouth disease elicits an immune response in swine which is enhanced by co-administration with interleukin-2 [J]. *Vaccine*, 2002, 20(21-22):2641-2647
- [3] Cedillo-Barron L, Foster-Cuevas M, Belsham GJ, et al. Induction of a protective response in swine vaccinated with DNA encoding foot-and-mouth disease virus empty capsid proteins and the 3D RNA polymerase[J]. *J Gen Virol*, 2001, 82(Pt 7):1713-1724
- [4] Storni T, Kundig T M, Senti G, et al. Immunity in response to particulate antigen-delivery systems [J]. *Adv Drug Deliv Rev*, 2005, 57(3):333-355
- [5] Lowenberger C A, Smartt C T, Bulet P, et al. Insect immunity: molecular cloning, expression, and characterization of cDNAs and genomic DNA encoding three isoforms of insect defensin in *Aedes aegypti*[J]. *Insect Mol Biol*, 1999, 8(1):107-118
- [6] Dietrich G, Bubert A, Gentschev I, et al. Delivery of antigenencoding plasmid DNA into the cytosol of macrophages by attenuated suicide *Listeria monocytogenes* [J]. *Nat Biotechnol*, 1998, 16(2):181-185
- [7] Garmory H S, Perkins S D, Phillpotts R J, et al. DNA vaccines for biodefence[J]. *Adv Drug Deliv Rev*, 2005, 57(9):1343-1361
- [8] Sizemore D R, Branstrom A A, Sadoff J C. Attenuated *Shigella* as a DNA delivery vehicle for DNA-mediated immunization[J]. *Science*, 1995, 270:299-302
- [9] Martin M C, Alonso J C, Suarez J E, et al. Generation of food-grade recombinant lactic acid bacterium strains by site-specific recombination[J]. *Appl Environ Microbiol*, 2000, 66(6):2599-2604
- [10] Shaw D M, Gaerthe B, Leer R J, et al. Engineering the microflora to vaccinate the mucosa: serum immunoglobulin G responses and activated draining cervical lymph nodes following mucosal application of tetanus toxin fragment C-expressing lactobacilli[J]. *Immunology*, 2000, 100(4):510-518
- [11] Thole J E, van Dalen P J, Havenith C E, et al. Live bacterial delivery systems for development of mucosal vaccines[J]. *Curr Opin Mol Ther*, 2000, 2(1):94-99
- [12] 李云岗. 乳酸杆菌为载体口蹄疫病毒 VP1 DNA 疫苗的研究[D];北京:中国农业大学,2006
- [13] Aggarwal P, Kumar S, Vajpayee M, et al. Adjuvant action of murine IL-2/Ig plasmid after intramuscular immunization with Indian HIV-1 subtype C recombinant env. gp 120 construct[J]. *Viral Immunol*, 2005, 18(4):649-656
- [14] Nunberg J H, Doyle M V, York S M, et al. Interleukin 2 acts as an adjuvant to increase the potency of inactivated rabies virus vaccine[J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1989, 86(11):4240-4243
- [15] Chow Y H, Huang W L, Chi W K, et al. Improvement of hepatitis B virus DNA vaccines by plasmids co-expressing hepatitis B surface antigen and interleukin-2 [J]. *J Virol* 1997, 71(1):169-178
- [16] Hulse D J, Romero C H. Partial protection against infectious bursal disease virus through DNA-mediated vaccination with the VP2 capsid protein and chicken IL-2 genes[J]. *Vaccine*, 2004, 22(9-10):1249-1259
- [17] Rompato G, Ling E, Chen Z, et al. Positive inductive effect of IL-2 on virus-specific cellular responses elicited by a PRRSV-ORF7 DNA vaccine in swine[J]. *Vet Immunol Immunopathol*, 2006, 109(1-2):151-160
- [18] 李云岗, 田夫林, 王会波, 等. 以乳酸杆菌为载体的口蹄疫病毒 VP1 基因 DNA 疫苗猪体免疫试验[J]. *中国兽医科学*, 2006, 36(8):601-605
- [19] Godall J C, Emery D C, Bailey M, et al. cDNA cloning of porcine interleukin 2 by polymerase chain reaction[J]. *Biochim Biophys Acta*, 1991, 1089(2):257-258
- [20] Jin H, Kang Y, Zheng G, et al. Induction of active immune suppression by co-immunization with DNA- and protein-based vaccines [J]. *Virology*, 2005, 337(1):183-191
- [21] Verfaillie T, Cox E, Goddeeris B M. Immunostimulatory capacity of DNA vaccine vectors in porcine PBMC: a specific role for CpG motifs [J]. *Vet Immunol Immunopathol*, 2005, 103(1-2):141-151
- [22] Schoen C, Stritzker J, Goebel W, et al. Bacteria as DNA vaccine carriers for genetic immunization [J]. *Int J Med Microbiol*, 2004, 294(5):319-335
- [23] Guimaraes V D, Gabriel J E, Lefevre F, et al. Interleukin-expressing *Lactococcus lactis* is able to invade small intestine of guinea pigs and deliver DNA into mammalian epithelial cells [J]. *Microbes Infect*, 2005, 7(5-6):836-844
- [24] Lin Y, Qigai H, Xiaolan Y, Weicheng B, et al. The co-administrating of recombinant porcine IL-2 could enhance protective immune responses to PRV inactivated vaccine in pigs [J]. *Vaccine*, 2005, 23(35):4436-4441
- [25] Guo H, Liu Z, Sun S, et al. Immune response in guinea pigs vaccinated with DNA vaccine of foot-and-mouth disease virus O/China99 [J]. *Vaccine*, 2005, 23(25):3236-3242