

# 猪瘟 DNA 疫苗在猪体及环境的生物安全性研究

程从升<sup>1</sup> 王文成<sup>2</sup> 李 素<sup>1,2</sup> 扈荣良<sup>1</sup> 涂长春<sup>1\*</sup>

(<sup>1</sup> 军事医学科学院军事兽医研究所 长春 130062)

(<sup>2</sup> 辽宁省益康生物制品厂 辽阳 111000)

**摘 要** :DNA 疫苗生物安全性是其走向临床所须解决的关键问题之一。以猪瘟 DNA 疫苗为研究对象,探讨了其两个方面的生物安全性问题。一方面,将两种不同的猪瘟 DNA 疫苗质粒免疫猪后,利用 PCR 技术分析了其与猪细胞基因组整合的可能性,结果在灵敏度为 30 拷贝的检测条件下,未发现猪瘟 DNA 疫苗整合到细胞基因组;另一方面,以 PCR 技术检测了免疫现场环境样品,以分析猪瘟 DNA 疫苗上的 E2 基因、CMV 启动子基因和抗性基因是否在环境细菌中发生转移和扩散。结果未发现 DNA 疫苗转化环境细菌的直接证据。因此认为 DNA 疫苗对猪体和环境是安全的。

**关键词** :DNA 疫苗,生物安全性,基因组整合,转移和扩散

中图分类号 :Q789 文献标识码 :A 文章编号 :0001-6209(2005)02-0292-06

DNA 疫苗从实验室走向临床所需要解决的一个关键性问题,就是要弄清其生物安全性背景。目前国内外有关 DNA 疫苗生物安全性研究的报道不多。已有的分析 DNA 疫苗与动物基因组整合可能性研究,也多在动物模型(如实验鼠)上进行<sup>[1~5]</sup>。另外,还未见 DNA 疫苗使用后在环境是否转移和扩散进行研究的报道。为此,本文以本实验室构建的猪瘟 DNA 疫苗为对象,就 DNA 疫苗两个最引起关注的生物安全性问题进行了探索,即 DNA 疫苗上的基因是否会整合到宿主基因组 DNA 中,以及是否会转移和扩散到环境中其它细菌,以期能为猪瘟 DNA 疫苗进入临床应用提供必要的安全性数据。

## 1 材料和方法

### 1.1 材料

#### 1.1.1 质粒和菌株:猪瘟 DNA 疫苗质粒由本实验

室构建;pVAXE2IL2(含卡那霉素抗性基因,以下简称卡那抗性基因);pIRE2IL2(含氨苄青霉素抗性基因,以下简称氨苄抗性基因),两者均含 CMV 启动子基因和猪瘟病毒的主要抗原 E2 基因)。大肠杆菌(*Escherichia coli*)DH5 $\alpha$  菌株,由本室保存。

**1.1.2 引物、试剂和仪器**:氨苄抗性基因扩增引物,卡那抗性基因扩增引物由上海博亚生物公司协助合成;E2 基因扩增引物、CMV 启动子基因扩增引物由上海 Sangon 公司协助合成(表 1);Taq plus 聚合酶、动物基因组提取试剂盒购于上海 Sangon 公司;凝胶纯化回收试剂盒购自 Roche 公司。GeneAmp PCR system 2400 为 Perkin Elmer 公司产品;核酸浓度测量仪(Genequant)为 Pharmacia Biotech 产品。卡那霉素(Kanamycin,10mg/mL)和氨苄青霉素(Ampicillin,100mg/mL)购自 Sigma 公司。

表 1 用于生物安全性研究的基因及其引物

Table 1 Genes and their primers used for biosafety study

Target genes	Primer sequences (5'-3')	Product sizes/bp
Kanamycin resistance gene	TTGAACAAGATGGATTGCACGCCAG AAGAACTCGTCAAGAAGGCCATAG	787
Ampicillin resistance gene	ACCAATGCTTAATCAGTGAGGCAC GAGTATTC AACATTCCGGTCCG	857
E2 gene	TCCGAATCAACCAA(TC)GAGATAGGG CACACCTCCAGAA(TC)AAGTCATC	271
CMV promotor gene	CATAGTAACGCCAATAGGGAC GCCCATTGATGTACTGCCAAAA	485

基金项目:国家 863 计划(2004AA213101)

\* 通讯作者。Tel:86-431-6985257; Fax:86-431-7960009; E-mail:changchun\_tu@hotmail.com

作者简介:程从升(1973-),男,安徽人,硕士研究生,研究方向为分子病毒学。E-mail:csqu2001@hotmail.com

其他作者:刘建文<sup>1</sup>,江禹<sup>1</sup>,徐兴然<sup>1</sup>

收稿日期:2004-07-23,修回日期:2004-12-06

**1.1.3 试验动物:**实验用猪品种为长白,均为 4 月龄,经 ELISA 检测猪瘟抗体为阴性,数量为 18 头,将其随机分成 6 组,每组 3 头,由辽宁省益康生物制品厂提供。免疫试验在该厂实验猪舍进行。

## 1.2 疫苗的制备和动物免疫

质粒 pVAXE2IL2 及质粒 pIRE2IL2 以层析方法<sup>[6]</sup>制备并用包裹剂包裹<sup>△</sup>。免疫猪随机分为 6 组,其中,1~4 号猪舍为 pVAXE2IL2 不同组方免疫猪,4 号猪舍同时还有 pIRE2IL2 免疫猪,5 号猪舍为免化弱毒苗免疫猪,6 号猪舍为生理盐水对照免疫猪。所有实验猪都于后肢胫前肌注射免疫。

## 1.3 样品采集和处理

免疫共进行 3 次,每次间隔 14d。分别于免疫前、第一次免疫后和第二次免疫后,在猪舍内分 3 点采集粪便和土壤样品,无菌密封包装好后带回实验室。加入去离子水溶解,然后将样品按文献 7 方法处理:2000r/min 离心 5min,取上层液体转到另一管,6000r/min 离心 5min,弃上清。以去离子水溶解菌体沉淀。随后用于检测环境细菌中是否转化有猪瘟 DNA 疫苗上的基因。

最后一次免疫后 14d 扑杀所有猪。采集注射部位的肌肉组织,并将同一种质粒免疫猪的肌肉混合到一起,分别无菌密封包装好带回。参考文献 8 的方法,将肌肉样品以磷酸盐冲洗干净后放在冻存管中,置于液氮速冻。取出并用塑料袋密封好,放在 -80℃ 冻存,用于提取猪的基因组。

## 1.4 猪瘟 DNA 疫苗与宿主细胞基因组的整合可能性研究

取上述冻存的肌肉组织,以动物基因组提取试剂盒制备基因组 DNA。为防止染色体游离的质粒 DNA 污染,取制备好的免疫组猪基因组 DNA,以 0.75% 琼脂糖凝胶电泳纯化回收基因组 DNA 片段。

为评价用于检测的 PCR 系统的灵敏度,在对照组猪的基因组 DNA 中分别加入 10、20、30、40、50 拷贝的免疫质粒(pVAXE2IL2 或 pIRE2IL2)<sup>\*</sup>,然后扩增猪瘟病毒 E2 基因。扩增体系为 25 $\mu$ L, pIRE2IL2 扩增反应中模板的用量均为 6.5 $\mu$ L(浓度分别为  $1 \times 10^{-11}$ 、 $2 \times 10^{-11}$ 、 $3 \times 10^{-11}$ 、 $4 \times 10^{-11}$ 、 $5 \times 10^{-11}$  mg/mL,

分别含有 10、20、30、40、50copies pIRE2IL2),上、下游引物(均为 0.5 $\mu$ mol/L)各 0.5 $\mu$ L, dNTP(2.5mmol/L) 2 $\mu$ L, Taq DNA 聚合酶(5U/ $\mu$ L) 0.5 $\mu$ L, 10 倍 PCR 缓冲液 5 $\mu$ L,加入 ddH<sub>2</sub>O 至 25 $\mu$ L; pVAXE2IL2 扩增反应体系中模板的用量均为 6.8 $\mu$ L(浓度分别为  $1 \times 10^{-11}$ 、 $2 \times 10^{-11}$ 、 $3 \times 10^{-11}$ 、 $4 \times 10^{-11}$ 、 $5 \times 10^{-11}$  mg/mL,分别含有 10、20、30、40、50copies pVAXE2IL2),上游引物(0.5 $\mu$ mol/L) 0.5 $\mu$ L,下游引物(0.5 $\mu$ mol/L) 0.5 $\mu$ L, dNTP(2.5mmol/L) 2 $\mu$ L, Taq DNA 聚合酶(5U/ $\mu$ L) 0.5 $\mu$ L, 10 倍 PCR 缓冲液 5 $\mu$ L,加入 ddH<sub>2</sub>O 至 25 $\mu$ L。引物见表 1,PCR 反应条件:92℃ 2min;92℃ 30s,56℃ 45s,72℃ 50s,进行 40 个循环;72℃ 2min。将 25 $\mu$ L 体系全部上样,以 1% 琼脂糖电泳测试该扩增系统的灵敏度。再取纯化好的两个免疫组的猪基因组 DNA 各 1 $\mu$ g,分别进行 PCR 扩增。引物及扩增条件同上。1.0% 琼脂糖凝胶电泳检测在上述灵敏度下猪瘟 DNA 疫苗是否整合到猪的细胞基因组。

## 1.5 猪瘟 DNA 疫苗环境转移和扩散的可能性分析

为分析猪瘟 DNA 疫苗免疫后是否转移和扩散到环境其它细菌,将上述处理好的环境样品接种于 LB 中,加入相应的抗生素进行培养。另设不加任何物质的空白 LB 对照组。另外,从另一省的生猪交易市场采集了 18 份环境样品,按同样方法处理后也进行培养。各组同时在 37℃ 振荡培养 24h,离心。收集到菌体按文献 7 的方法提取质粒,以其作为模板扩增 DNA 疫苗上 E2 基因、CMV 启动子基因、卡那抗性基因或氨苄抗性基因。扩增体系均为 25 $\mu$ L:模板 5 $\mu$ L,上游引物(0.5 $\mu$ mol/L) 0.5 $\mu$ L,下游引物(0.5 $\mu$ mol/L) 0.5 $\mu$ L, dNTP(2.5mmol/L) 2 $\mu$ L, Taq DNA 聚合酶(5U/ $\mu$ L) 0.5 $\mu$ L, 10 倍 PCR 缓冲液 5 $\mu$ L,加入 ddH<sub>2</sub>O 至 25 $\mu$ L。引物见表 1,卡那抗性基因 PCR 反应条件:92℃ 2min;92℃ 30s,58℃ 30s,72℃ 40s,40 个循环;72℃ 3min。氨苄抗性基因 PCR 反应条件:92℃ 2min;92℃ 30s,58℃ 45s,72℃ 50s,40 个循环;72℃ 3min。CMV 启动子基因 PCR 反应条件:92℃ 2min;92℃ 30s,57℃ 40s,72℃ 50s,40 个循环;72℃ 2min。

<sup>△</sup> 专利申请受理通知书,申请名称:一种新型体内核酸转染试剂,申请号 02109353.9,申请人:中国人民解放军军需大学军事兽医研究所。

\* Plasmid 的拷贝数的计算:以质粒 pIRE2IL2 为例计算,pIRE2IL2 大小为 5984bp,那么  $5984 \text{ bp} \times 649 \text{ g/mol/bp}$  (每个碱基的平均分子量) =  $3.88 \times 10^6 \text{ g/mol}$ ,  $3.88 \times 10^6 \text{ g/mol} / 6.02 \times 10^{23} \text{ copies/mol} = 6.45 \times 10^{-18} \text{ g/copy}$ ,也就是:  $1.55 \times 10^{11} \text{ copies}/\mu\text{g plasmid}$ 。将质粒 pIRE2IL2 稀释为浓度为 1.00mg/mL,可计算得到 10copies 的质粒为  $6.45 \times 10^{-11} \mu\text{L}$ 。同理,根据 pVAXE2IL2 的质粒大小(6300bp)和浓度(稀释至 1.00mg/mL),可以计算得到 10copies 的质粒为  $6.81 \times 10^{-11} \mu\text{L}$ 。

### 1.6 序列分析

上述抗性基因的扩增结果为阳性者再进行测序。并将前述免疫地点及生猪交易市场扩增到的抗性基因分别与 DNA 疫苗上相应抗性基因作同源性比较。

## 2 结果

### 2.1 猪瘟 DNA 疫苗与猪的细胞基因组整合可能性分析

对 PCR 检测系统的灵敏度进行分析(图 1)。可见检测猪瘟 DNA 疫苗 pVAXE2IL2 和 pIRE2IL2 的两个 PCR 系统,在加入 10 和 20 个拷贝的质粒时,未见到 271bp 的 E2 片段,而加入 30、40、50 拷贝的质粒时,则 PCR 系统可检测到 E2 片段。因此,这两个系统的灵敏度都是 30 拷贝。

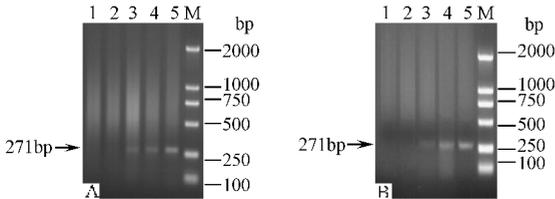


图 1 PCR 检测系统灵敏度分析

Fig.1 Test of sensitivity grade of PCR detection system  
A PCR system detecting plasmid pVAXE2IL2 ; B :PCR system detecting plasmid pIRE2IL2. Numbers marked in lanes represent different copies of plasmid DNA in PCR system. M :DL2000 Marker. 1 ~ 5. Target plasmid of 10, 20, 30, 40, 50 copies were added into 1μg control swine genome.

在此灵敏度下,利用同样的扩增条件考察了猪瘟 DNA 疫苗与猪的细胞基因发生整合的情况。由图 2 可见,自免疫组的猪基因组中均未扩增出 271bp 的 E2 基因片段。故认为在 30 拷贝的灵敏度下没有发现整合情况发生。

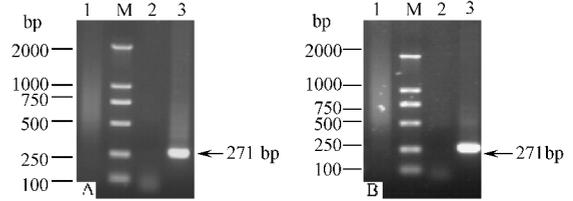


图 2 重组质粒与基因组 DNA 整合的可能性分析

Fig.2 Risk analysis of recombinant plasmid DNA integrating into host genomic DNA

A PCR system detecting plasmid pVAXE2IL2 ; B :PCR system detecting plasmid pIRE2IL2.1.Genomic DNA from immunized pigs ; 2. Distilled H<sub>2</sub>O ; 3. Two plasmid in A ,B respectively ; M: DL2000 Marker.

### 2.2 猪瘟 DNA 疫苗在环境的转移和扩散分析

#### 2.2.1 猪瘟 DNA 疫苗环境转移和扩散的可能性分析

为分析 DNA 疫苗上的基因是否会转化到环境中的细菌,从 pVAXE2IL2 免疫的猪舍以及对照组猪舍采集的环境样品提取到的抗性质粒作为模板,用来扩增卡那抗性基因、CMV 启动子基因和 CSFV 的 E2 基因。在 6 个猪舍中,自 18 份免疫前的样品扩增出卡那抗性基因比例为 88.89%(16/18);自 12/18 份(66.7%)一免后样品和 11/18 份(61.1%)的二免后样品中能检测到卡那抗性基因(表 2)。

表 2 猪瘟 DNA 疫苗环境转移和扩散的可能性分析

Table 2 Analysis of transfer and distribution of CSFV in surrounding environment

Detecting target	pVAXE2IL2 groups ( Kanamycin resistance gene )												pIRE2IL2 groups ( Ampicillin resistance gene )																										
	1			2			3			4			5			6			4			5			6														
	a	b	c	a	b	c	a	b	c	a	b	c	a	b	c	a	b	c	a	b	c	a	b	c	a	b	c	a	b	c	a	b	c	a	b	c	a	b	c
Extraction of resistance plasmid	3/3	2/3	3/3	2/3	3/3	3/3	3/3	2/3	3/3	3/3	2/3	3/3	2/3	3/3	3/3	2/3	3/3	3/3	2/3	3/3	3/3	2/3	3/3	3/3	2/3	3/3	3/3	2/3	3/3	3/3	2/3	3/3	3/3	2/3	3/3	3/3			
Resistance gene	3/3	2/3	1/3	2/3	2/3	2/3	3/3	2/3	3/3	3/3	2/3	2/3	2/3	2/3	2/3	3/3	2/3	2/3	1/3	2/3	2/3	1/3	3/3	2/3	3/3	2/3	3/3	3/3	3/3	2/3	3/3	2/3	2/3	2/3	2/3	2/3			
E2 gene	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3			
CMV promotor gene	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3			

a. Represents the pre-immunization ; b. Represents the 1<sup>st</sup> immunization ; c. Represents the 2<sup>nd</sup> immunization .

以自 pIRE2IL2 免疫的猪舍以及对照组猪舍采集的环境样品提取到的抗性质粒作为模板,用来扩增氨苄抗性基因,CMV 启动子基因和 CSFV 的 E2 基因。由表 2 可见,在 4、5、6 号这 3 个猪舍中,自 8/9 份(88.9%)免疫前样品中扩增出氨苄抗性基因;自

6/9 份(66.7%)一免后样品和 6/9 份(66.7%)二免后样品中也能检测到氨苄抗性基因。但是,从所有猪舍的免疫前后环境样品中均未检出 E2 基因和 CMV 启动子基因。

#### 2.2.2 生猪交易市场的抗性检测和同源性比较

PCR 技术,从 18 份生猪交易市场采集样品中分别扩增氨苄抗性基因和卡那抗性基因,结果检出了 17/18 份(94.4%)卡那抗性基因和 18/18 份(100%)氨苄抗性基因。对免疫地点和生猪交易市场扩增到的抗性基因与 DNA 疫苗上相应的抗性基因作同源性比较

(表 3)。可见猪舍环境样品的卡那抗性基因与 DNA 疫苗上卡那抗性基因的核苷酸序列同源性(70.5%~81.7%)明显低于集贸市场环境样品卡那抗性基因与后者的核苷酸序列同源性(95.3%~97.8%)。

表 3 猪舍和生猪交易市场与 pVAXE2IL2 上卡那抗性基因同源性比较

Table 3 Phylogenetic comparison of resistance gene from swine stool market and eukaryotic gene expression vector

Detection locale	Immunization locale					Pig market						
Sample code	K1	K2	K3	K4	K5	K6	FV1	FV2	FV3	FV4	FV5	FV6
Homology/%	70.5	76.2	81.7	77.9	75.9	75.6	97.1	96.4	95.9	95.3	96.2	97.8

K1 to K6 respectively presents the Kanamycin resistance sample which it was gathered from the No. 1 to 6 pigsty after the second immunized, FV1-FV6 presents 6 pieces of Kanamycin resistance sample which it was gathered from pig market.

对于氨苄抗性基因,该基因在免疫地点与 DNA 疫苗上的核苷酸序列同源性为 95.5%~99.3%,且第一次免疫后和第二次免疫后同源性未增加;在生猪交易市场与 DNA 疫苗上的核苷酸序列同源性为

93.0%~99.4%,两者差异不显著(表 4)。由此说明,抗性基因的检出是因为自然界存在很高的抗性本底的缘故,而非由于使用了 DNA 疫苗。

表 4 猪舍和生猪交易市场与 pIRE2IL2 上卡那抗性基因同源性比较

Table 4 Phylogenetic comparison of resistance gene from swine stool market and eukaryotic gene expression vector

Detection locale	Immunization locale					Pig market						
Sample code	A4	A5	A6	A44	A55	A66	FR1	FR2	FR3	FR4	FR5	FR6
Homology/%	97.4	99.3	97.5	97.1	99.3	95.5	99.4	99.3	93.0	99.4	96.5	90.5

A4 to A6 respectively presents the Ampicillin resistance sample which it was gathered from the No. 4 to 6 pigsty after the first immunized, A44 to A66 presents respectively the Ampicillin resistance sample which it was gathered from the No. 4 to 6 pigsty after the second immunized, FR1 to FR6 presents respectively 6 pieces of Ampicillin resistance sample which it was gathered from pig market.

## 3 讨论

### 3.1 猪瘟 DNA 疫苗与猪细胞基因组整合的可能性分析

DNA 疫苗走向临床实践面临的一个关键问题是质粒 DNA 免疫人或动物后是否会整合到宿主细胞基因组<sup>[9]</sup>。DNA 疫苗经肌肉注射后,在注射部位存在的时间最久,存在的浓度也最高<sup>[10]</sup>。本研究只选择了注射部位的肌肉基因组 DNA 作为研究对象,在 1 $\mu$ g 基因组 DNA 中检测的灵敏度为 30 拷贝的条件下,分析了质粒 DNA 整合于其中的可能性。

哺乳动物染色体组中的基因在不断地发生自发突变,只要其发生的频率对于每个基因来说不超过  $1 \times 10^{-6}$ ,就不会对动物的健康造成影响<sup>[8]</sup>。依本实验的 30 个拷贝的情况计算,每个基因的突变频率为  $3.9 \times 10^{-9}$ ,这也比基因失活造成的突变频率( $2 \times 10^{-6}$ )低 1950 倍,由此可见,即便 DNA 疫苗有可能和细胞基因组 DNA 发生随机的整合,其频率也远远低于自发突变的几率。因此可认为猪瘟 DNA 疫苗不可能整合入宿主细胞的基因组中,即使发生整合,整

合的几率也是非常低的,这也和国外此方面研究结果一致<sup>[1-5]</sup>。

近来有证据表明,存在于组织的质粒 DNA 是以染色体外附加子的形式存在,而不是整合到宿主染色体 DNA<sup>[8]</sup>。尤其是注射了质粒的肌肉组织在很长一段时间内仍能检测到游离的质粒存在<sup>[10]</sup>。在实验中,将细胞壁破碎之后提取基因组 DNA,然后用长时间低电压电泳分离胞浆中游离的质粒 DNA,然后又用 DNA 回收试剂盒对基因组回收,避免了质粒 DNA 的污染,保证了实验准确性。

### 3.2 猪瘟 DNA 疫苗在环境的转移和扩散

本研究利用 PCR 技术初步分析了真核表达质粒在环境中转移和扩散的可能性。结果显示:虽有不同比例的抗性质粒及抗性基因检出,但免疫前后阳性样品检出比例未增加;以免疫前后的环境样品中提取的质粒为模板进行特异性扩增,没有检测到目的抗原基因和 CMV 启动子基因。

从序列分析结果来看,生猪交易市场中存在的卡那抗性基因和氨苄抗性基因与 DNA 疫苗上的相应抗性基因有高达 99% 的同源性,而且免疫现场的

卡那抗性基因与 DNA 疫苗上的抗性基因同源性,明显低于市场样品采集粪便的卡那抗性基因和目的质粒上该基因的同源性;免疫地点的氨苄抗性基因同源性在一免和二免后没有增加。因此认为免疫现场的抗性基因与 DNA 疫苗上的抗性基因高度同源性,可能是由于自然界很高的抗性本底缘故。据此可以推测,免疫地点采集样品扩增出的抗性基因可能与 DNA 疫苗使用没有直接关系。

从另一个角度说,同为结构稳定性良好的质粒上的序列,既然 *E2* 基因和 *CMV* 启动子基因在注射部位和免疫现场中均未检测到,那么卡那抗性基因和氨苄抗性基因转化肠道中的菌群或以原型的形式从猪体排出的几率也极低。从 DNA 分子的物理稳定性来说,同为一个 DNA 分子上的基因片段,既然前者没有从其上断裂并转移,可以推测后者也未从质粒上断裂并转移<sup>[11]</sup>。因此可认为免疫的质粒没有以原型的形式从猪体排出,从而不会造成基因污染;也可认为免疫的质粒也没有转化肠道中的菌群,从而自免疫现场不能检测到质粒上的基因。

实际上, DNA 疫苗免疫动物后发生基因扩散和转移的可能性非常小<sup>[12]</sup>。转基因植物源性食品安全性研究也证明,被摄入体内的转基因食品中外源基因发生水平转移并进行表达的可能性极小<sup>[13]</sup>。而 FDA(1994)更是认为转基因番茄中 *Kan* 基因既不可能在消化道转至微生物,也不会引起安全性问题\*。

本实验对 6 组基因疫苗免疫后的猪进行了生物安全性检测,针对每组中实验动物的数量 3 头是少了些,但是总计有 6 组试验,共计 18 头,而实际上只是检测 2 种基因疫苗的安全性,这 6 组中均未检测到 *E2* 基因和 *CMV* 基因,而且两个系统的灵敏度都是 30 拷贝。假设有 1 头实验动物检测到了外界环境排放和整合的直接证据,那么其它组的实验动物也可能会出现相应或类似的情况,而事实却并非如此。这些实验动物应该是可以说明问题了。但从生物统计学角度来看,为进一步确证其生物安全性,有必要进一步提高样本数量。

目前有关 DNA 疫苗的抗性安全性的报道极少。但从转基因植株的研究来看,即使抗性基因真的扩散到环境中,其在数量上所占的比例也只占自然界

天然存在的抗性基因的极少部分,从而不会增加抗性细菌的数量<sup>[14]</sup>。结合本实验的结果,未发现 DNA 疫苗整合到基因组 DNA 中去,也未发现真核表达载体上的基因扩散到环境中引起基因污染的直接证据,因此可认为 DNA 疫苗具有较高的安全性。

## 参 考 文 献

- [1] Nichols W W, Ledwith B J, Manam S V, et al. Potential DNA vaccine integration into host cell genome. *Ann N Y Acad Sci*, 1995, **772**: 30 - 39.
- [2] Martin T, Parker S E, Hedstrom R, et al. Plasmid DNA malaria vaccine: the potential for genomic integration after intramuscular injection. *Hum Gene Ther*, 1999, **10**(5): 759 - 768.
- [3] Ledwith B J, Manam S, Troilo P J, et al. Plasmid DNA vaccines: investigation of integration into host cellular DNA following intramuscular injection in mice. *Intervirology*, 2000, **43**(4-6): 258 - 272.
- [4] Manam S, Ledwith B J, Barnum A B, et al. Plasmid DNA vaccines: tissue distribution and effects of DNA sequence, adjuvants and delivery method on integration into host DNA. *Intervirology*, 2000, **43**(4-6): 273 - 281.
- [5] Kang K K, Choi S M, Choi J H, et al. Safety evaluation of GX-12, a new HIV therapeutic vaccine: investigation of integration into the host genome and expression in the reproductive organs. *Intervirology*, 2003, **46**(5): 270 - 276.
- [6] 程从升, 李作生, 余兴龙, 等. 猪瘟 DNA 疫苗制备工艺研究. *中国生物工程杂志*, 2004, **24**(10): 63 - 69.
- [7] Stewart D S, Tortorello M L, Gendel S M. Evaluation of DNA preparation techniques for detection of the SLT-1 gene of *Escherichia coli* O157:H7 in bovine faeces using the polymerase chain reaction. *Letters in Applied Microbiology*, 1998, **26**: 93 - 97.
- [8] Haworth R, Pilling A M. The PCR assay in the preclinical safety evaluation of nucleic acid medicines. *Human & Experimental Technology*, 2000, **19**: 267 - 276.
- [9] Kurth R. Risk potential of the chromosome insertion of foreign DNA. *Annals of The New York Academy of Science*, 1995, **772**: 140 - 151.
- [10] 龚焱宏, 刘秀文. 核酸疫苗药代动力学的研究进展. *国外医学·药学分册*, 2002, **29**(1): 28 - 30.
- [11] 陈忠义, 吴限, 管宇, 等. 荧光假单胞菌(*Pseudomonas fluorescens*)工程菌株田间残留和扩散的追踪检测. *应用与环境生物学报*, 2002, **8**(1): 83 - 86.
- [12] 杨丽琛. 转基因食品中标记基因的生物安全性研究进展及对策. *卫生研究*, 2003, **33**(3): 239 - 245.
- [13] 贾士荣. 转基因食品中标记基因的安全性评价. *中国农业科学*, 1997, **30**(2): 1 - 15.
- [14] 程志强, 陈旭君, 郭泽建, 等. 转基因植物中抗生素抗性基因的安全性评价. *生命科学*, 2002, **14**(1): 23 - 26.

\* FDA. Secondary direct food additives permitted in food for human consumption; food additives permitted in feed and drinking water of animals; aminoglycoside 3-2'-phosphotransferase II. *Federal Register*, 1994, **59**: 26700 - 26711.

## Evaluation on the biosafety of classical swine fever DNA vaccine

CHENG Cong-sheng<sup>1</sup> WANG Wen-cheng<sup>2</sup> LI Su<sup>1,2</sup> HU Rong-liang<sup>1</sup> TU Chang-chun<sup>1\*</sup>

(<sup>1</sup> Military Veterinary Research Institute of the Academy of Military Medical sciences ,Changchun 130062 ,China )

(<sup>2</sup> The Yikang Bio-product Factory of Liaoning Province ,Liaoyang 111000 ,China )

**Abstract :** The biosafety of DNA vaccine is one of the key questions which should be solved before it is used in the clinical trail. In order to evaluate the biosafety of DNA vaccine , the CSFV DNA vaccine was used in the studying target , two main aspects of the vaccine were explored in the study. Firstly , the possibility of integration of two kinds of DNA vaccine plasmids into pig genome was analyzed by PCR technology after the different vaccines were injected through the intramuscular introduction. The results showed that both plasmids DNA were detected as the form were not integrated into pig genome , it can be detected 30 copies plasmid DNA in 1 $\mu$ g total genomic DNA as the sensibility of PCR , indicated the safety of the DNA vaccine. Afterward the environmental fecal and soil samples in the experimental pens were picked up. Then the antibiotic resistant bacteria were isolated and its resistant genes were analyzed by PCR and gene sequencing. The results demonstrated that the transfer and spreading of two DNA vaccine plasmids studied into environmental bacteria from receptor pigs were not found. The results showed that the CSFV DNA vaccine is safe to both pigs and the surrounding environment.

**Key words :** DNA vaccine , Biosafety , Genomic integration , Transfer and spreading

Foundation item :Chinese National Programs for High Technology Research and Development ( 2004AA213101 )

\* Corresponding author. Tel 86-431-6985257 ;Fax : 86-431-7960009 ;E-mail :changchun-tu@hotmail.com

Received date 07-23-2004

### 常见基金项目的英文译名

#### 1. 国家自然科学基金

National Natural Science Foundation of China

#### 2. 国家“863 计划”, 又名 国家高技术研究发展计划项目

National Programs for High Technology Research and Development of China

#### 3. 国家“973 项目”, 又名 国家基础研究发展规划项目( 有两种资助方式 )

( 1 ) 国家重点基础研究发展规划( 973 计划 ) 项目

Key Project of National Programs for Fundamental Research and Development of China

( 2 ) 国家重大基础研究发展规划( 973 计划 ) 项目

Major Project of National Programs for Fundamental Research and Development of China

#### 4. 国家科技公关项目

National Programs for Science and Technology Development of China

#### 5. 国家“十五”重点科技攻关项目

The 10<sup>th</sup> Five Years Key Programs for Science and Technology Development of China

#### 6. 国家杰出青年科学基金

National Science Foundation for Distinguished Young Scholars of China

#### 7. 国家杰出人才科学基金

National Science Foundation for Outstanding Scholarship of China

#### 8. 农业部农业微生物重点实验室项目

Key Laboratory Project on Agromicrobiology of Agriculture Ministry of China

#### 9. 中澳科技合作项目

Science and Technology Cooperation Project of China and Australia