

共表达猪呼吸与繁殖障碍综合征病毒 NJ-a 株 ORF4、ORF5 与 ORF6 基因重组改良型痘苗病毒安卡拉株的构建

郑其升¹, 毕志香², 李 鹏¹, 陈德胜¹, 陈溥言^{1*}

(¹南京农业大学农业部动物疫病诊断与免疫重点实验室 南京 210095)

(²山东省畜牧兽医职业技术学院 潍坊 262101)

摘 要:为探讨共表达猪繁殖与呼吸综合征病毒(*Porcine reproductive and respiratory syndrome Virus*, PRRSV)保护性抗原基因的重组改良型痘苗病毒安卡拉株(*Modified Vaccinia Virus Ankara*, MVA)的免疫效力,将 PRRSV NJ-a 株 ORF4、ORF5 和 ORF6 基因插入转移载体 p \parallel LR 中,获得了三基因共表达的转移载体 p \parallel LR-ORF5/ORF6/ORF4,通过同源重组的方法获得重组病毒 rMVA-GP5/M/GP4。以 lacZ 为报告基因进行噬斑筛选和重组病毒纯化后,PCR 方法证明 ORF4、ORF5 和 ORF6 成功的插入 MVA 基因组中;经 Western blot 检测与间接免疫荧光试验证实,重组病毒感染细胞能正确表达 PRRSV GP4、GP5 与 M 蛋白。用 rMVA-GP5/M/GP4 免疫 6 周龄 Balb/c 小鼠,首免后 3 周可检测到特异性 PRRSV 中和抗体,8 周后中和抗体效价可达 2⁵,并能继续维持 4 周;淋巴细胞增殖试验结果表明,重组病毒免疫小鼠产生强烈的特异性细胞增殖反应。上述研究结果表明 rMVA-GP5/M/GP4 具有良好的免疫原性,可作为预防 PRRS 的候选疫苗进一步研究。

关键词:猪繁殖与呼吸综合征病毒;修饰的痘苗病毒安卡拉株;GP4、GP5 与 M 蛋白;共表达

中图分类号 S852.65 文献标识码 A 文章编号 1001-6209(2007)02-0345-05

猪繁殖与呼吸综合征(*Porcine reproductive and respiratory syndrome*, PRRS)是由 PRRSV 引起的一种严重危害养猪业的传染病^[1]。该病于 1987 年在美国首次报道。郭宝清等于 1996 年在国内首次分离到 PRRSV,证实本病在国内存在^[2]。由于 PRRSV 具有抗原变异特性,且主要靶细胞是具有重要免疫作用的猪肺泡巨噬细胞,所以 PRRSV 感染常引发其他病原的继发感染,尤其是呼吸道病原的继发感染,给养猪业造成重大经济损失。目前用于 PRRSV 预防的疫苗主要有灭活苗和弱毒苗,但存在免疫保护效果差或散毒等危险^[4],因此迫切需要研制更加安全、有效的新型疫苗。

改良型痘苗病毒安卡拉株(MVA)是痘苗病毒亲本安卡拉株经鸡胚成纤维细胞(CEF)连续传代 570 次以上所获得的高度减毒的复制缺陷型痘苗病毒(VV)株。与传统的复制型 VV 相比,MVA 基因组发生了大量的缺失(15%)和突变,导致多个与宿主范围和致病性相关功能基因的丧失,除 CEF 和极少数哺乳动物细胞(BHK-21)以外,MVA 在多数哺乳动物细胞中不能有效增殖。尽管如此,MVA 在非许可细胞中仍然可以高效地表达外源基因,并可诱导宿主产生特异的免疫应答^[5-8]。由于 MVA 突出的安全性和免疫原性,近年来通过基因重组构建的 rMVA 已被广泛应用于多种重要传染病及肿瘤的疫

苗研制中,并已取得良好的效果^[9]。本研究构建了在共表达 PRRSV NJ-a 株 GP4、GP5 和 M 蛋白的重组病毒 rMVA-GP5/M/GP4,利用 Balb/c 小鼠初步评价重组病毒的免疫效果,为进一步研制有效防制 PRRS 的新型疫苗奠定基础。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 病毒、细胞及载体:PRRSV NJ-a 株为本实验室从南京某急性发病猪群中分离的 PRRSV 强毒,由农业部动物疫病诊断与免疫重点开放实验室鉴定、保存;Mac-145 细胞与 BHK-21 细胞购自中国典型培养物中心;宿主大肠杆菌 DH5 α 购自 Promega 公司;6 周龄的雌性 Balb/c 小鼠购自南京市军区总院实验动物中心;MVA 由农业部动物疫病诊断与免疫重点开放实验室保存,利用含 10% CSF 的 DMEM 培养的 BHK-21 细胞扩增,按文献方法^[10]进行纯化并测定 TCID₅₀ 滴度;转移载体 pEF-gpt12S 由本室保存,含有一个双向的痘病毒复合启动子;转移载体 p \parallel LR 由本室构建,在多克隆位点上游有一人工合成的痘苗病毒早晚期启动子(P_{syn}),在多克隆位点的下游有 LacZ 筛选标记基因,左右重组臂与 MVA Deletion II 区域两侧基因序列同源。

1.1.2 主要试剂及仪器:限制性内切酶 *Hind* III、

* 通讯作者。Tel: 86-25-84396028; Fax: 86-25-84396335; E-mail: aid@njau.edu.cn

作者简介:郑其升(1979-),男,山东安丘人,博士研究生,研究方向为动物分子病毒学与免疫学。E-mail: zhengqisheng2004@yahoo.com.cn

收稿日期:2006-09-04 接受日期:2006-11-24 修回日期:2006-12-26

*Bam*H I、*Eco*R I、*Xho* I、*Not* I、*Xba* I 与 *Ex*Taq DNA 聚合酶、T4DNA 连接酶等工具酶购自 TaKaRa 公司;限制性内切酶 *Pme* I、*Asc* I 为基因公司产品;胶回收试剂盒购自上海华舜生物技术公司;RPMI-1640、DMEM 培养基为 GIBCO 公司产品;胎牛血清购为杭州四季青生物公司产品;脂质体转染试剂 Lipofectamine 2000 为 Invitrogen 公司产品;猪抗 PRRSVNJ-a 株高免血清由本室制备,系用纯化的 PRRSV NJ-a 株多次免疫猪制备;兔抗 PRRSV NJ-a 株 GP4、GP5、M 蛋白的特异性多抗由本室制备,系分别

用纯化的原核表达的重组 PRSSV NJ-a 株 GP4、GP5 与 M 蛋白多次免疫家兔制备;HRP 标记的羊抗猪 IgG、FITC 标记的羊抗兔 IgG 均为购自晶美生物公司;淋巴细胞分离液为上海华精生物高科技发展公司产品。

1.1.3 引物设计:根据登录于 GenBank (登录号:AY737282)的 PRRSV NJ-a 株 ORF4、ORF5 与 ORF6 基因的核苷酸序列,利用 Primer Primer5.0 软件,设计一系列引物(表 1),用于重组转移质粒的构建。

表 1 PCR 反应所用引物

Table 1 Primers used for PCR amplification of PRRSV genes in the study

Name	Enzyme site at 5' terminal	Sequence(5'→3')	Note
P _{ORF5-1}	<i>Xho</i> I + <i>Pme</i> I	AGACTCGAGGTTTAAACATGTTGGAGAAATGCTTGACC	ORF5 upstream primer
P _{ORF5-2}	<i>Hind</i> III	GCGAAGCTTCTAAGGACGACCCCATTTGTTTC	ORF5 downstream primer
P _{ORF6-1}	<i>Sal</i> I + <i>Pst</i> I	ACGCTCGACCTGCAGATGGGGTCGTCCTTAGATGAC	ORF6 upstream primer
P _{ORF6-2}	<i>Eco</i> R I	GGGAATTCTTATTTGGAATATTGACAAG	ORF6 downstream primer
P _{ORF4-1}	<i>Kpn</i> I	ATAGGTACCATGGCTTCGTCCTTCTTTTC	ORF4 upstream primer
P _{ORF4-2}	<i>Eco</i> R V + <i>Bam</i> H I + <i>Asc</i> I	CACGATATCGGATCCGGCGCGCCTCAAATTGCCAACAGAATGGC	ORF4 downstream primer
P _L	x	ATGTTGGAGAAATGCTTGACC	PCR detection primer
P _R	x	TCAAATTGCCAACAGAATGGC	PCR detection primer

1.2 共表达 PRRSV ORF4、ORF5 与 ORF6 基因的转移载体的构建与鉴定

以引物 P_{ORF5-1} 与 P_{ORF5-2} 为组合,以 pCDNA-ORF5 为模板,扩增 PRRSV NJ-a 株 ORF5,PCR 产物经序列测定后克隆入 pSK(+)的 *Xho* I 与 *Hind*III 位点之间,重组质粒命名为 pSK-ORF5。以引物 P_{orf6-1} 与 P_{orf6-2} 为组合,以 pCDNA-ORF6 为模板,扩增 PRRSV NJ-a 株 ORF6 序列测定后克隆入 pEFgpt-12S 的 *Sal* I 与 *Eco*R I 位点之间,重组质粒命名为 pEF-ORF6。以引物 P_{orf4-1} 与 P_{orf4-2} 为组合,以 pCDNA-ORF4 为模板,扩增 PRRSV NJ-a 株 ORF4,序列测定后克隆入 pEF-ORF6 的 *Kpn* I 与 *Eco*R V 位点之间,重组质粒命名为 pEF-ORF6/ORF4。利用 *Pst* I 与 *Bam*H I 对 pEF-ORF6/ORF4 双酶切,回收目的片段(ORF6/ORF4),克隆入重组质粒 pSK-ORF5 *Pst* I 与 *Bam*H I 位点之间,重组质粒命名为 pSK-ORF5/ORF6/ORF4。以 *Pme* I 与 *Asc* I 双酶切 pSK-ORF5/ORF6/ORF4,回收目的片段,克隆入转移载体 p \parallel LR *Pme* I 与 *Asc* I 位点之间,获得了由 3 个痘病毒启动子(P_{syn}、VP7.5 与 P_s)控制,共表达 PRRSV ORF4、ORF5、ORF6 的重组转移载体 p \parallel LR-ORF5/ORF6/ORF4。

1.3 重组病毒的获得及纯化

按分子克隆介绍方法大量制备 p \parallel LR-ORF5/ORF6/ORF4,并经 10% PEG8000-MgCl₂ 纯化^[17]。按 2×10⁵ 个细胞/孔接种 BHK-21 细胞于 6 孔板,待细胞长至 80%~90% 融合时,在脂质体介导下将纯化的重组转移载体(4 μ g/孔)与亲本 MVA 共转染 BHK-

21 细胞,具体操作按文献[7]介绍方法进行。待细胞病变明显时收获细胞,反复冻融 3 次,重新感染 BHK-21 细胞,在 X-gal 存在的条件下,利用软琼脂覆盖细胞层法,挑取蓝色噬斑,重复 6 次,获得纯化的重组病毒。

1.4 重组病毒的鉴定

1.4.1 重组病毒 rMVA-GP5/M/GP4 的 PCR 鉴定:利用蛋白酶 K-酚-氯仿法^[17]提取纯化后的重组病毒的基因组作为模板,以 P_L、P_R 为引物进行目的基因的扩增,以鉴定目的基因在 MVA 基因组中的插入。

1.4.2 重组病毒感染细胞的 Western blot 检测:将纯化后的 rMVA-GP5/M/GP4 按 2.0 MOI 接种长成单层的 BHK-21 细胞,72h 后离心、收集并裂解细胞,离心后取上清进行 SDS-PAGE 分离、转膜后以猪抗 PRRSV NJ-a 株多克隆抗体为一抗、辣根过氧化物酶标记的羊抗猪 IgG 为二抗进行显色反应,显色后观察是否存在与预期蛋白大小一致的蛋白反应条带。

1.4.3 重组病毒感染细胞的 IFA:将纯化后的 rMVA-GP5/M/GP4 按 2.0 MOI 接种长成单层的 BHK-21 细胞,在感染后 48h,每孔用 PBS(pH7.4)洗涤 3 次,甲醇室温固定 5min 后,进行间接免疫荧光染色。于转染细胞孔中加入 1:100 稀释的兔抗 PRRSV NJ-a 高免血清,37℃作用 45min 后,PBS 洗涤 3 次,每次 5min,然后加入 FITC 标记的羊抗兔二抗,37℃作用 45min 后,PBS 洗涤,风干后直接观察荧光。

1.5 动物分组及免疫程序

将 6 周龄的雌性 Balb/c 小鼠随机分 4 组,每组

20 只,设 rMVA-GP5/M/GP4、弱毒疫苗与灭活疫苗 3 个免疫组,同时设立 MVA 亲本毒接种对照组。后腿肌肉注射免疫 2 次,3 周后进行加强免疫。重组病毒免疫组与亲本毒对照组每只小鼠免疫剂量为 5×10^5 TCID₅₀,弱毒苗及灭活苗免疫组的免疫剂量根据病毒的 TCID₅₀ 进行调整。

1.6 中和抗体检测

免疫后每周断尾采血,分离血清,56℃ 灭活 30min,采用固定病毒稀释血清法进行微量中和试验[文献]检测。血清无菌处理后作 2^{-1} 、 2^{-2} 、 2^{-3} 2^{-12} 系列倍比稀释,接种于长满 Marc-145 细胞单层的 96 孔板中,每孔 50μL。然后每孔加入用 DMEM 稀释含 $200 \times$ TCID₅₀ 的 PRRSV NJ-a 株 50μL,同时设空白细胞对照和病毒对照孔(只接种病毒,不加抗体),37℃,5% CO₂ 培养箱中培养 7d,逐日观察并记录细胞病变结果,以能完全保护细胞不发生病变的最高稀释倍数为被检血清中抗 PRRSV 特异性中和抗体的效价。

1.7 MTT 法检测 T 淋巴细胞的增殖反应

分别于首免后 3 周和二免后 5 周每组取 5 只小鼠,眼球放血后脱颈椎处死,无菌取脾脏,用淋巴细胞分离液分离淋巴细胞,以含 10%(V/V)犊牛血清的 RPMI-1640 完全培养液调整细胞浓度约为 2×10^7 /mL,加入 96 孔细胞板内,100μL/孔,每个样品做 3 个重复,向各孔内加入 $200 \times$ TCID₅₀ 经紫外线灭活的 PRRSV NJ-a,置 37℃、5% CO₂ 培养箱中培养 60h,再每孔加入 5μg/mL MTS 10μL,继续培养 4h。测定 OD₄₉₀ 值,取 3 个平均值计算刺激指数(SI),试验设不加 PRRSV 的营养液对照。以刺激指数(SI)作为判断淋巴细胞转化程度的参数,SI = 刺激孔 OD₄₉₀ 值/培养液对照孔 OD₄₉₀ 值。

2 结果

2.1 重组转移载体的鉴定

重组转移载体双酶切产物电泳后,在紫外光灯下出现 7200bp 和 1725bp 两个片段,分别与目的基因和载体大小一致,表明重组质粒构建正确。

2.2 重组病毒的 PCR 鉴定结果

以从重组病毒感染的 BHK-21 细胞中提取的基因组 DNA 作为模板,以 PL 与 PR 为引物进行 PCR 扩增,电泳分析可见 1725bp 的目的基因在 MVA 基因组中的插入。

2.3 Western blot 分析

将经噬斑纯化的 rMVA-GP5/M/GP4 与亲本毒 MVA 分别感染 BHK-21 细胞 48h 后收集细胞进行裂解处理作为抗原,进行 Western blot 分析。由图 1 可见 rMVA-GP5/M/GP4 感染的细胞能够出现 25kDa 和 19kDa 的免疫印迹条带,而亲本野毒没有任何条带。

结果表明,构建的重组病毒能够同时表达 GP4、GP5 和 M 蛋白(糖基化的 GP4 与 M 大小难以明显区分,故 Western blot 中只有两条条带,需其他试验证实,如 IFA)。

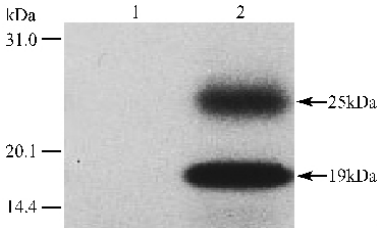


图 1 重组病毒的 Western-blot 检测
Fig.1 Western blot analysis of the recombinant virus rMVA-GP4/GP5/GP6. 1.MVA-infected cell lysate reacted with PRRSV specific antiserum ; 2.rMVA-GP4/GP5/GP6-infected cell lysate reacted with PRRSV specific antiserum.

2.4 IFA 鉴定

将纯化的 rMVA-GP5/M/GP4 和亲本毒 MVA 分别感染 BHK-21 细胞 48h 后进行间接免疫荧光染色,结果 rMVA-GP5/M/GP4 感染细胞与兔抗 GP4、GP5、M 特异性多抗反应后均呈现很强的绿色荧光(图 2),而亲本毒 MVA 感染细胞没有荧光,进一步证明获得重组病毒能同时表达 GP4、GP5 和 M 蛋白。

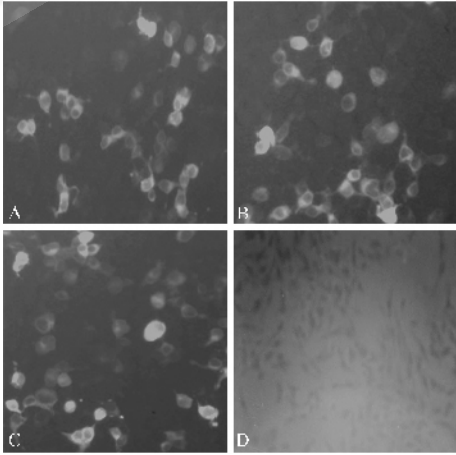


图 2 IFA 检测重组病毒感染 BHK-21 细胞中 PRRSV 蛋白的表达
Fig. 2 Immunofluorescence of rMVA-GP5/M/GP4-infected BHK-21 cells. A.rMVA-GP5/M/GP4-infected BHK-21 cells reacted with GP4-specific antiserum ; B.rMVA-GP5/M/GP4-infected BHK-21 cells reacted with GP5-specific antiserum ; C.rMVA-GP5/M/GP4-infected BHK-21 cells reacted with GP6-specific ant-serum ; D.MVA-infected BHK-21 cells as the negative control.

2.5 免疫小鼠抗 PRRSV 中和抗体的测定

采用微量中和试验检测免疫小鼠 PRRSV 中和抗体水平(图 3),结果在首免后第 3 周就可检测到中和抗体,首免后第 8 周中和抗体平均滴度达到 2^5 ,并且一直保持到第 12 周(实验结束),高于弱毒活疫苗和灭活疫苗产生的中和抗体水平,亲本毒 MVA 免疫对照组在整个试验过程中均未检测到 PRRSV 的

中和抗体。

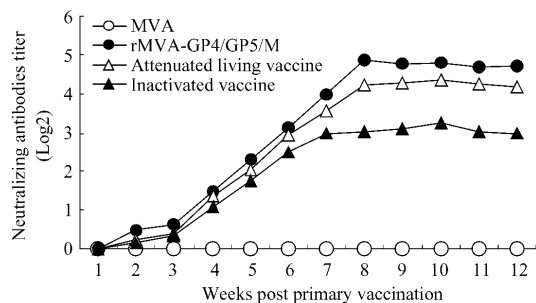


图3 免疫小鼠血清中中和抗体水平的变化

Fig.3 Neutralizing antibody response for the immunized mice.

2.6 免疫小鼠 T 细胞增殖反应检测

为了探讨重组病毒免疫小鼠针对 PRRSV 的 T 细胞免疫应答,取首免后第 3 周和第 8 周小鼠脾淋巴细胞进行增殖反应。从图 4 中可以看出,利用紫外线照射灭活的 PRRSV 作为刺激原,rMVA-GP5/M/GP4 免疫组小鼠表现较强的特异性淋巴细胞增殖,第 8 周增殖指数达到 2.79 ± 0.09 ,统计学分析结果显示,与商品化的 PRRSV 弱毒疫苗所引发的 T 细胞增殖反应差异明显 ($P < 0.05$),与灭活疫苗免疫组差异极显著 ($P < 0.01$)。此结果表明,rMVA-GP5/M/GP4 免疫能使小鼠诱发较强的细胞免疫应答。

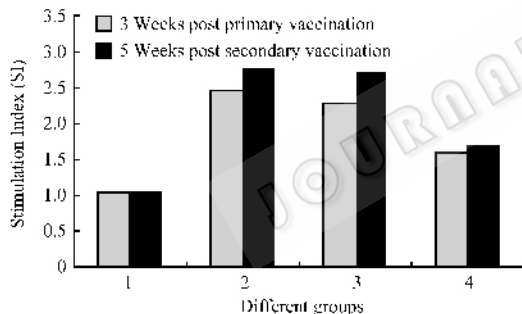


图4 免疫小鼠初免与加强免疫后 PRRSV 特异的 T 淋巴细胞增殖反应

Fig.4 Specific T-cell proliferation responses of the recombinant virus-vaccinated mice after primary and strengthen immunization. 1. Wild type MVA-immunized mice; 2. rMVA-GP5/M/GP4-immunized mice; 3. Attenuated PRRSV vaccine-immunized mice; 4. Inactivated PRRSV vaccine-immunized mice.

3 讨论

PRRS 是一种以母猪繁殖障碍和新生仔猪呼吸道症状及高死亡率为主要特征的传染病,已几乎遍及世界所有养猪国家,在中国的流行和分布也日益广泛,危害日益严重。本病的传播不仅给全球养猪业造成巨大的直接经济损失,而且易导致其他病原的继发感染、混合感染和免疫抑制,对现行的免疫策略和疫苗研制提出严峻的挑战。

由 ORF5 编码的囊膜糖蛋白 GP5 是 PRRSV 的主要免疫保护抗原蛋白,该蛋白含有 6 个抗原决定

簇,能诱导机体产生特异性中和抗体和细胞免疫^[10]。M 蛋白由 ORF6 编码,经用感染猪康复血清进行的免疫印迹试验证明具有很强的免疫原性,感染后 10d 就可以检测特异抗体,体外表达的重组 M 蛋白可作为检测早期感染的血清学实验的抗原^[11];在体外,ORF6 产物诱导的 T 细胞增生反应比其他结构蛋白更强烈,表明 M 蛋白在细胞介导的免疫反应中可能起主要作用^[11,12]。GP5 蛋白与 M 蛋白在病毒囊膜内通过二硫键结合成复合物,含有与病毒感染有关的免疫重要区,在病毒附着和侵染猪肺泡巨噬细胞中起重要作用(主要是与肺泡巨噬细胞表面的肝磷脂受体结合)^[13]。GP4 蛋白是 PRRSV 的主要结构蛋白之一,其胞外区第 40 位~第 79 位氨基酸之间有一个可与特异单抗发生中和反应的抗原决定簇^[16]。

基于以上研究成果,本研究构建了在 3 个痘病毒启动子调控下共表达 PRRSV GP4、GP5 与 M 蛋白的复制缺陷型重组痘苗病毒 rMVA-GP5/M/GP4。通过 Western-blot 与 IFA 检测证实,重组痘苗病毒可以同时表达 GP4、GP5 与 M 蛋白。小鼠免疫试验结果显示,重组病毒 rMVA-GP5/M/GP4 能引发较强的中和抗体应答和细胞免疫应答。目前的研究资料已证实高滴度的中和效价在抵抗 PRRSV 感染和清除病毒过程中具有重要作用,并与病毒的清除呈正相关性^[14,15],而目前对细胞免疫在抗 PRRSV 感染中的作用尚不清楚。rMVA-GP5/M/GP4 能同时激发很强的体液免疫与细胞免疫,表明该重组病毒是一种很有希望的 PRRSV 新型候选疫苗。

rMVA-GP5/M/GP4 同时诱导高水平的体液免疫与细胞免疫反应可能与以下几点相关(1)GP5 蛋白具有诱发中和抗体的能力,M 蛋白具有诱发特异性细胞免疫的能力,GP5 和 M 蛋白的共表达可能产生协同刺激作用(2)GP4 含有一个线性中和抗原表位(3)GP5-M 蛋白复合物的形成可促进 GP5 蛋白从内质网往高尔基体的转运,在此过程中 GP5 蛋白获得修饰,使某些中和表位获得展现(4)GP4、GP5 与 M 基因分别在 3 个启动子控制下表达,而不是单纯的串联表达,保持了 3 个蛋白的天然构象和免疫原性(5)本研究使用的重组痘苗病毒虽然不能在动物体内复制,但却可以高效的表达外源基因,而其本身的免疫原性非常弱^[5]。

理想的 PRRS 疫苗应该在短时间诱导高水平的中和抗体和特异性细胞免疫反应,本研究构建的共表达 PRRSV ORF4、ORF5 与 ORF6 的改良型重组痘苗病毒 rMVA-GP5/M/GP4,能够较好地诱发小鼠产生 PRRSV 特异的中和抗体和细胞免疫应答,虽然对猪的免疫保护性还需大量的试验验证,但为 PRRS 的新型疫苗的研制提供了新的思路。

参 考 文 献

- [1] Baustista EM, Meulenber JJ, Choi CS, *et al.* Structural polypeptides of the American (VR2332) strain of porcine epidemic abortion and respiratory virus. *Arch Virol*, 1996, **141**: 1357 – 1365.
- [2] 郭宝清, 陈章水, 刘文兴, 等. 从疑似 PRRS 流产胎儿分离 PRRSV 的研究. 中国预防兽医学报, 1996, **18**(2): 1 – 4.
- [3] Benfield D, Harris L, Nelson E, *et al.* Properties of SIRS virus isolate ATCC VR2332 in the united state and preliminary characterization of a monoantibody to this virus. *Am Assoc Swine Pract Newsletter*, 1992, **4**(4): 19 – 21.
- [4] Meng XJ. Heterogeneity of Porcine reproductive and respiratory syndrome virus: Implications for current vaccine efficacy and future vaccine development. *Veterinary Microbiology*, 2000, **74**: 309 – 329.
- [5] Meyer H, Sutter G, Mayr A. Mapping of deletions in the genome of the highly attenuated vaccinia virus MVA and their influence on virulence. *J Gen Virol*, 1991, **72**: 1031 – 1038.
- [6] Antoine G, Scheifflinger F, Dörner F, *et al.* The complete genomic sequence of the modified vaccinia Ankara strain: comparison with other orthopoxviruses. *Virology*, 1998, **244**: 365 – 396.
- [7] Carroll MW, Moss B. Host range and cytopathogenicity of the highly attenuated MVA strain of vaccinia virus: propagation and generation of recombinant viruses in a nonhuman mammalian cell line. *Virology*, 1997, **238**: 198 – 211.
- [8] Sutter G, Moss B. Nonreplicating vaccinia vector efficiently expresses recombinant genes. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1992, **89**: 10847 – 10851.
- [9] Espenschied J, Lamont J, Longmate J, *et al.* CTLA24 blockade enhances the therapeutic effect of an attenuated poxvirus vaccine targeting p53 in an established murine tumor model. *J Immunol*, 2003, **170**: 3401 – 3407.
- [10] Pirzadeh B, Dea S. Monoclonal antibodies to the ORF5 product of porcine reproductive and respiratory syndrome virus define linear neutralizing determinants. *Gen Virol*, 1997, **78**: 1867 – 1873.
- [11] Lopez Fuerees L, Domentch N, Alvarez B, *et al.* Analysis of cellular immune response in pigs recovered from porcine respiratory and reproductive syndrome infection. *Virus Res*, 1999, **64**: 38 – 42.
- [12] Dea S, Gargron CA, Mardassi H, *et al.* Antigenic variability among North American and European strains of porcine reproductive and respiratory syndrome as defined by monoclonal antibodies to the matrix protein. *Clin Microbiol*, 1996, **34**: 1488 – 1493.
- [13] Pirzadeh B, Dea S. Monoclonal antibodies to the ORF5 product of porcine reproductive and respiratory syndrome virus define linear neutralizing determinants. *Gen Virol*, 1997, **78**(8): 1867 – 1873.
- [14] 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.
- [15] Yoon KJ, Wu LL, Zimmerman JJ, *et al.* Field isolates of porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV) vary in their susceptibility to antibody dependent enhancement (ADE) of infection. *Veterinary Microbiology*, 1997, **55**: 277 – 287.
- [16] Meulenber JJ, Essen-Zanbergen A, Langeveld JP, Post-translational processing and identification of a neutralization domain of the GP4 protein encoded by ORF4 of Lelystad virus. *Virol*, 1997, **71**: 6061 – 6067.
- [17] Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T. Molecular Cloning: A Laboratory Manual. 2nd ed. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989, 2084 – 2095.

**Construction and the immunogenicity of the recombinant Modified Vaccinia Virus
Ankara co-expressing ORF4, ORF5 and ORF6 genes of Porcine Reproductive
and Respiratory Syndrome Virus NJ-a strain**

ZHENG Qi-sheng¹, BI Zhi-xiang², LI Peng¹, CHEN De-sheng¹, CHEN Pu-yan^{1*}

(¹ Key Laboratory of Animal Disease Diagnosis and Immunology, Ministry of Agriculture, Nanjing Agricultural University, Nanjing 210095, China)

(² Shandong Vocational Animal Science and Veterinary College, Weifang 261061, China)

Abstract :To develop investigate the recombinant MVA (rMVA) vaccines against PRRSV infection, the ORF4, ORF5 and ORF6 of PRRSV NJ-a strain were subcloned into the MVA transfer vector p Ψ LR and the resultant recombinant vector was called p Ψ LR-ORF4/ORF5/ORF6. The rMVA was generated by transfecting MVA-infected BHK-21 cells with the recombinant vector and screened by plaque purification after X-gal staining. After six rounds of purification, insertion of PRRSV GP4, GP5 and M genes into the MVA genome was confirmed by PCR analysis and expression of the three proteins was identified by Western-blot and IFA. Each of the tested mice was inoculated with 5×10^5 TCID₅₀/mouse of the rMVA-GP4/GP5/M and boosted 3 weeks later. Neutralization assay showed that PRRSV-specific neutralizing antibodies were detectable at 3 weeks and reached the highest titer(2^5) by 8 weeks after the primary vaccination, which maintained stable until the end of the experiment. The significant lymphocyte proliferation responses were also observed in mice immunized with rMVA-GP4/GP5/M. These results indicate the rMVA co-expressing PRRSV ORF4, ORF5 and ORF6 genes may be an attractive candidate vaccine for preventing PRRSV infection.

Keywords : PRRSV; MVA; GP4, GP5 and M proteins; co-expression

* Corresponding author. Tel: 86-25-84396028; Fax: 86-25-84396335; E-mail: aid@njau.edu.cn

Received: 4 September 2006/ Accepted: 21 November 2006/ Revised: 26 December 2006