

# IBV S1 基因和 IL-2 基因双顺反子 DNA 疫苗的免疫原性研究

唐梦君<sup>1</sup>, 王红宁<sup>2,1\*</sup>, 周生<sup>1</sup>, 黄勇<sup>1</sup>, 柳萍<sup>1</sup>

(<sup>1</sup> 四川农业大学动物科技学院动物预防医学生物工程实验室 雅安 625014)

(<sup>2</sup> 四川大学生命科学学院 成都 610064)

**摘要:** 为了研制更加有效的 IBV DNA 疫苗, 将 IBV 的 S1 基因和禽白介素  $\alpha$  (IL-2) 基因插入双顺反子表达载体 pIRES-EGFP/DsRed 中, 构建能分别或同时表达 S1 基因和 IL-2 基因的 pIRES-S1、pIRES-IL2、pIRES-S1/IL-2 质粒。通过脂质体转染 Vero 细胞, 利用 RT-PCR 及间接免疫荧光检测表达。将构建的质粒用脂质体包裹后, 通过腿部肌肉多点注射免疫 7 日龄雏鸡, 二免后两周用 IBV 肾型强毒进行攻毒。结果表明, pIRES-S1/IL-2 在体外能够诱导 Vero 细胞表达 S1 蛋白和 IL-2, pIRES-S1/IL-2 和 pIRES-S1 + pIRES-IL2 免疫雏鸡后均能促进外周血 T 淋巴细胞亚群数量和血清中特异性抗体水平的增加, 能明显增强 IBV DNA 疫苗对同型强毒的攻击保护, 但 pIRES-S1/IL-2 免疫组要优于 pIRES-S1 + pIRES-IL2 混合免疫组及其它对照组, 差异显著或极显著。以上结果表明禽 IL-2 能同时加强 DNA 疫苗的细胞免疫和体液免疫应答, 但抗原基因和 IL-2 共表达 DNA 疫苗的免疫效果明显要优于混合注射的 DNA 疫苗。

**关键词:** 禽传染性支气管炎病毒, S1 基因, IL-2, 双顺反子, DNA 疫苗

中图分类号: Q786.R392 文献标识码: A 文章编号: D001-6209(2007)06-1055-05

禽传染性支气管炎是由冠状病毒引起家禽的一种急性、高度接触性传染病, 以呼吸道症状、产蛋下降、肾脏病变等为主要特征。禽传染性支气管炎病毒 (infectious bronchitis virus, IBV) 不同分离毒株在毒力、致病性和组织嗜性上存在着很大差异, 不同血清型毒株之间交叉保护力弱, 常规疫苗 H120、H52、Ma5 等单一毒株疫苗常有免疫失败的报道。灭活疫苗能激发良好的体液免疫反应, 其不足之处是使用剂量大, 不能诱发机体产生细胞免疫, 而一系列的研究证实, 在 IBV 的免疫保护中, 体液免疫和细胞免疫均占有重要地位<sup>[1]</sup>。

DNA 疫苗的出现给 IBV 的免疫预防带来了新的希望。对 IBV DNA 疫苗的研究发现, 单一抗原的 DNA 疫苗攻毒保护力较低<sup>[2]</sup>。因此, 如何增强 DNA 疫苗的免疫效果成为目前该疫苗研究的关键。随着对细胞因子研究的不断深入, IL-2 等许多细胞因子被发现具有明显的分子佐剂效应, 能特异性增强抗原的免疫原性或增强机体对抗原的反应性。但是不同细胞因子的佐剂效应是否随着与抗原基因在表达时间或位置上的变化而有差异, 仍然需要进一步的研究。本研究分别构建了 IBV S1 基因、IL-2 基因的真核表达质粒以及它们的双顺反子表达质粒, 并对

它们的免疫原性进行了比较, 为研制出高效、新型的 IBV 基因工程疫苗提供科学依据。

## 1 材料和方法

### 1.1 材料

**1.1.1 毒株、质粒和实验动物:** IBV 致肾病变型野外分离株 SAIBk 株 ( $10^7$  EID<sub>50</sub>/0.2mL), 由本实验室鉴定并保存。能同时表达绿色和红色荧光蛋白的双顺反子表达质粒 pIRES-EGFP/DsRed, S1 基因的真核表达质粒 pIBVS1 及禽源白细胞介素  $\alpha$  (IL-2) 真核表达质粒 pDNAIL-2 均为本实验室构建并保存。1 日龄雏鸡: SPF 鸡胚购自中国农科院, 自行孵化。

**1.1.2 主要试剂和仪器:** 限制性内切酶、T4 连接酶、RNA PCR Kit、EX Taq 等购自 TaKaRa 公司; 少量质粒抽提试剂盒、胶回收试剂盒等为 Omega 公司产品; 转染试剂 lipofectamine 2000 购自美国 Invitrogen 公司; FITC 标记的羊抗兔 IgG 购自 Gibco 公司; 酶标兔抗鸡抗体购自 Sigma 公司; FITC 标记的 CD4、PE 标记的 CD8 和 SPRD 标记的 CD3 均购自美国 SouthernBiotech 公司。PCR 仪为德国 BIOMETRA 产品; 酶标仪、电泳槽和凝胶成像系统为 BIO-RAD 公司产品; 荧光倒置显微镜为日本 Nikon 产品; 流式细

基金项目: 国家 863 计划 (2003AA241120)

\* 通讯作者。Tel/Fax 86-28-85471599, E-mail: whongning@163.com

作者简介: 唐梦君 (1980-), 女, 重庆市合川人, 博士研究生, 主要从事动物传染病研究。E-mail: tangmengjun1980@163.com

其他作者: 胡慧琼<sup>1</sup>, 廖娟<sup>1</sup>

收稿日期: 2007-03-30; 接受日期: 2007-04-30; 修回日期: 2007-07-17

胞仪为 BD Biosciences 公司产品。

## 1.2 真核表达质粒的构建

### 1.2.1 S1 基因和 IL-2 双顺反子表达质粒的构建

将 pBVSI、pIRES-EGFP/DsRed 质粒用 *Sac* I 和 *Xho* I 双酶切后,胶回收 S1 基因和载体片段进行连接,构建真核表达质粒 pIRES-S1/DsRed。以 pDNAIL-2 质粒为模板,PCR 获取禽源 IL-2 基因。将 IL-2、pIRES-S1/DsRed 质粒用 *Bam*H I 和 *Not* I 双酶切后,胶回收 IL-2 基因和载体片段进行连接,构建质粒 pIRES-S1/IL2。将 pIRES-S1/IL2 质粒的阳性克隆送上海博亚生物工程有限公司进行测序。

### 1.2.2 S1 基因和 IL-2 表达质粒的构建

将 pIRES-S1/DsRed 质粒用 *Bam*H I 和 *Not* I 双酶切后胶回收载体片段,将片段用 T4 DNA Polymerase 进行末端补平后连接,构建 S1 基因的真核表达质粒 pIRES-S1。pIRES-IL2 是在 pIRES-S1/IL2 质粒的基础上构建,方法同 pIRES-S1。空载体 pIRESK<sup>+</sup> 是在 pIRES-S1 质粒的基础上构建,方法同 pIRES-S1。筛选质粒的阳性克隆送上海博亚生物工程有限公司进行测序。

## 1.3 真核表达质粒的转染和表达产物的检测

用小量质粒抽提试剂盒制备 pIRES-S1/IL2、pIRES-S1 经 PEG8000 纯化后,转染生长密度达到 90% 以上的 Vero 细胞。具体操作按照脂质体试剂盒说明书进行。转染细胞经 37℃ 培养 36h ~ 48h 后,对其表达产物进行检测。

### 1.3.1 RT-PCR 检测

以 Trizol Reagent 提取转染 36h 后的 Vero 细胞总 RNA。在总 RNA 中加入无 RNA 酶的 DNase I,终浓度为 2μg/mL,37℃ 保温 60min 以除去少量残留的质粒 DNA。随后采用常规的方法进行逆转录反应和 PCR。

### 1.3.2 间接免疫荧光检测

待细胞转染 48h 后,用 100% 冷丙酮固定 5min,用 PBST 洗涤 3 次后,用含有 10% BSA 的 PBS 封闭 30min,再加入阳性血清 37℃ 作用 1h。用 PBST 洗涤 3 次,加入 FITC 标记的羊抗兔二抗(含 0.01% 伊文斯蓝),37℃ 作用 30min;用 PBST 洗涤和碱性甘油封片,于荧光显微镜下观察。

## 1.4 脂质体介导的真核表达质粒的免疫原性研究

### 1.4.1 脂质体的制备

参照本实验室建立的方法制备脂质体,将脂质体与 pIRES-EGFP/DsRed 按比例混合转染鸡胚成纤维细胞,通过观察转染效率筛选脂质体/DNA 的最佳混合比例。

### 1.4.2 注射用质粒的大量制备

用本实验室建立的质粒纯化方法(国家发明专利申请号:200410081443.4)大量制备纯化质粒 DNA,紫外分光

光度法测定核酸样品的纯度和浓度。

### 1.4.3 实验动物免疫

将 120 只 7 日龄健康 SPF 鸡随机分成 6 个组,每组 20 只。分别设立 PBS、空质粒 pIRESK<sup>+</sup> 对照组,灭活疫苗免疫组,pIRES-S1 + pIRES-IL2 混合、pIRES-S1、pIRES-S1/IL2 质粒免疫组。将质粒 DNA 与脂质体按 1:10 比例混合,置室温 15-30min 后,直接腿部肌肉多点注射。其中 pIRESK<sup>+</sup>、pIRES-S1、pIRES-S1/IL2 组每只鸡的免疫剂量为 150μg/500μL,质粒混合组每只鸡的免疫剂量为 pIRES-S1 和 pIRES-IL2 各 150μg,总体积为 500μL,PBS 和灭活疫苗的注射剂量为 0.5mL/羽。7 日龄首免,28 日龄加强免疫 1 次。

### 1.4.4 T 淋巴细胞亚类检测

从各试验组中随机抽取 4 只鸡用来跟踪检测其 T 淋巴细胞亚类的变化,分别在首免前、首免后 7、14、21、28 日龄从翅静脉采集 1mL 肝素抗凝血,按常规方法制备单细胞悬液,调整细胞浓度为  $1 \times 10^5$  个/mL,加入 CD4<sup>+</sup>、CD8<sup>+</sup>、CD3<sup>+</sup> 单克隆抗体,用流式细胞仪进行检测,所得数据用 SPSS 和 Microsoft Excel 进行统计学处理。

### 1.4.5 抗 IBV 血清 ELISA 抗体效价的测定

试验鸡于首免前、首免后 7、14、21、28、35 日龄进行翅静脉采血。每组取 5 只鸡的血液分离血清,56℃ 灭活 30min,-20℃ 保存备用。抗 IBV 血清 ELISA 抗体效价的测定采用间接 ELISA 方法按常规步骤进行。

### 1.4.6 攻毒保护实验

免疫后 42d 用 EID<sub>50</sub> 为  $10^7$  SIBK 强毒株进行攻毒,剂量为 100 个 EID<sub>50</sub>/羽滴鼻和点眼。连续观察 14d 后全部扑杀,取肾脏组织进行病毒的 RT-PCR 检测,并计算攻毒保护率。感染数 = 死亡数 + 病毒 RT-PCR 检测阳性数,保护率 (%) = 未感染数/每组鸡的总数 × 100。

## 2 结果

### 2.1 共表达质粒 pIRES-S1/IL2 的构建

将构建的中间质粒 pIRES-S1/DsRed 用 *Sac* I 和 *Xho* I 双酶切后,形成约 1.8kb 和 5.3kb 的条带(图略)表明 S1 基因已经替换了 pIRES-EGFP/DsRed 质粒中的绿色荧光基因(EGFP)。将 pIRES-S1/IL2 质粒用 *Bam*H I 和 *Not* I 进行双酶切后,形成约 0.6kb 和 6.3kb 的条带,表明 IL-2 基因已经替换了 pIRES-S1/DsRed 质粒中的红色荧光基因(DsRed)。测序结果证明构建了正确的 S1 和 IL-2 基因的双顺反子表达质粒 pIRES-S1/IL2。

### 2.2 S1 基因和 IL-2 表达质粒的构建

将构建的 pIRES-IL2 用 *Nhe* I 和 *Xho* I 双酶切

后形成约 5.1kb 左右的单一条带(图略); pIRES-S1 用 *Bam*H I 和 *Not* I 双酶切后, 形成约 6.4kb 左右的单一条带; pIRESK<sup>+</sup> 用 *Sac* I 和 *Xho* I 双酶切后, 形成约 4.6kb 左右的单一条带。测序结果证明构建了正确的 S1 和 IL-2 基因的真核表达质粒及空载体 pIRESK<sup>+</sup>。

### 2.3 质粒转染后转录产物的 RT-PCR 检测

RT-PCR 检测的结果表明, 转染 pIRES-S1/IL2、pIRES-S1 及 pIRES-IL2 的细胞中均能扩增出特异的

S1 和(或)IL2 片段, 而以转染了 pIRES-S1/IL2 细胞的总 RNA 为模板进行的 PCR 扩增时没有相应片段(图略)。

### 2.4 质粒转染后产物的间接免疫荧光检测

结果表明(图 1) 转染了 pIRES-S1、pIRES-S1/IL2 的 Vero 细胞的胞浆和胞核区显示出黄绿色荧光, 而转染 pIRESK<sup>+</sup> 的细胞没有显示出任何特异荧光, 表明构建的真核表达质粒 pIRES-S1、pIRES-S1/IL2 能在 Vero 细胞中表达 IBV S1 蛋白。

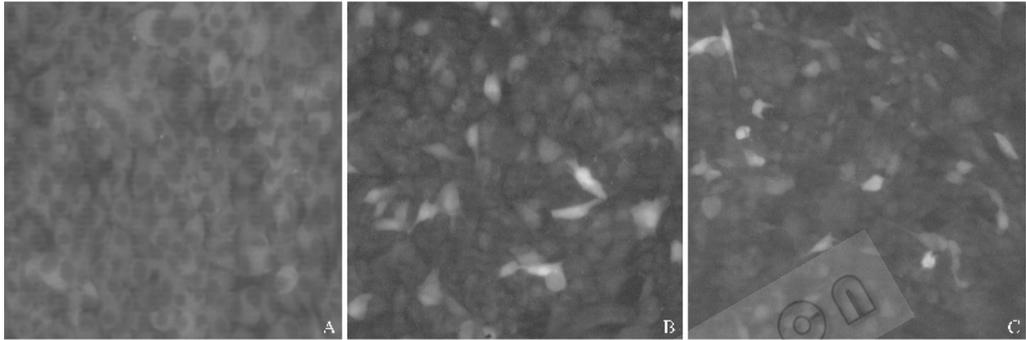


图 1 间接免疫荧光检测 S1 在细胞中的表达

Fig.1 Indirect-immunofluorescence detection of the expressed S1 in Vero cell. A. Cells transfected with the pIRESK<sup>+</sup> plasmid showed negative results; B. Cells transfected with the pIRES-S1 plasmid showed positive results; C. Cells transfected with the pIRES-S1/IL2 plasmid showed positive results.

### 2.5 外周血中 T 淋巴细胞动态分布检测

如图 2 所示: 所有疫苗组的外周血 CD3 + T、CD4 + T、CD8 + T 淋巴细胞从首免后 7d 起就高于空载体和 PBS 组, 差异显著 ( $P < 0.05$ ) 或极显著 ( $P < 0.01$ ); 所有疫苗组的 CD3 +、CD4 +、CD8 + T 淋巴细胞数量在二免前均有一个下降趋势, 其中 CD3 +、CD4 + T 淋巴细胞数量在二免后又迅速上升, 而 CD8 + T 淋巴细胞数量在二免后没有显著的回升。在所有疫苗组中, 以 pIRES-S1/IL2 组和 pIRES-S1 + pIRES-IL2 组

刺激外周血中 CD3 +、CD4 +、CD8 + T 淋巴细胞数量的增加最为显著, 效果要优于 pIRES-S1 组; 而 pIRES-S1/IL2 组的效果又明显的优于 pIRES-S1 + pIRES-IL2 混合免疫组。

### 2.6 抗 IBV 血清 ELISA 抗体效价的测定

结果表明(图 3) 各试验组在免疫后 7d 开始出现抗体, 随着免疫时间的延长, 其抗体水平逐渐提高, 其中以灭活疫苗组的抗体水平增加最为显著。pIRES-S1/IL2 组产生的抗体效价高于 pIRES-S1 +

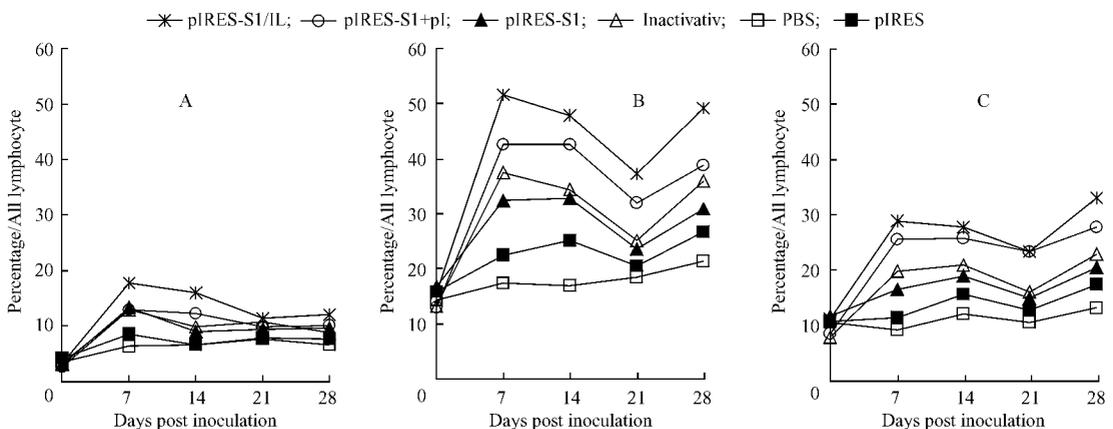


图 2 免疫后鸡外周血中 CD8 + T (A)、CD3 + T (B)、CD4 + T (C) 淋巴细胞的动态变化

Fig.2 Dynamic of CD8 + T (A), CD3 + T (B) and CD4 + T (C) lymphocytes in peripheral blood of immunized chickens

pIRES-IL2 组。各疫苗组在免疫后各时期与 PBS 组及空载体组相比差异显著 ( $P < 0.05$ )。

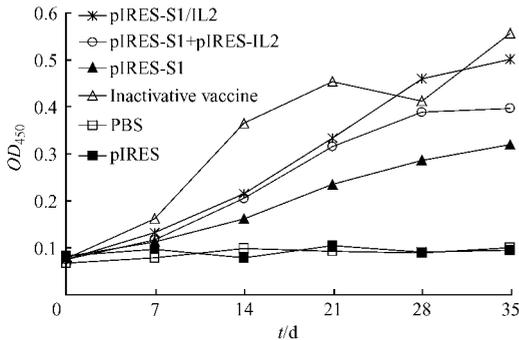


图3 免疫后各试验组鸡外周血抗 IBV 血清 ELISA 抗体效价的动态变化

Fig.3 Peripheral blood anti-IBV ELISA antibody levels of immunized chickens.

## 2.7 攻毒保护结果

结果显示(表1)除 pIRES-S1/IL2 和灭活疫苗组没有鸡只出现死亡外,其它组均有不同程度的鸡只死亡,解剖后均具有典型的肾型传支的病变,死亡率介于 10% ~ 65% 之间。攻毒 14d 后扑杀的鸡只,取肾脏组织进行病毒的 RT-PCR 检测,所有实验组均有不同数量的鸡只在肾脏组织中检测到 IBV 病毒。其中 pIRES-S1/IL2 免疫组保护率为 85%,要高于 pIRES-S1 + pIRES-IL2 组,也优于灭活疫苗组。

表1 攻毒后每组鸡死亡率和保护率的统计

Table 1 The mortality and protection rate of different groups challenged by virulent strain SAIBk

Groups	The number of death	The number of infection*	Mortality	Rate of protection
pIRES-S1/IL2	0	3	0	85
pIRES-S1 + pIRES-IL2	2	6	10	70
pIRES-S1	5	11	25	45
Inactivated vaccine	0	5	0	75
pIRESK'	11	20	55	0
PBS	13	20	65	0

Marked with \* means: The infected chickens equals to the number of deaths plus the number of positive in the RT-PCR.

## 3 讨论

由于 S1 蛋白是 IBV 最主要的免疫原蛋白,它有诱导产生病毒中和活性、血凝抑制活性及血清特异性抗体的抗原表位<sup>[3]</sup>。目前对 S1 基因 DNA 疫苗的研究表明<sup>[2,4]</sup>:S1 基因可以在小鼠或鸡上诱导机体淋巴细胞增殖活性升高、产生一定程度的中和抗体,并对病毒的攻击产生一定程度的保护力。本试验构建的 pIRES-S1 免疫鸡后,外周血 T 淋巴细胞数和特异性 IgG 均高于对照组,且对 IBV 同型强毒攻击具

有 45% 的保护率。以上结果表明, S1 基因可以作为免疫原基因构建 DNA 疫苗,但仍需要改进,包括选择合适的免疫佐剂、载体和免疫策略等。

许多细胞因子已被证实能增强免疫应答的强度,发挥佐剂的作用。其中 IL-2 应用最为广泛<sup>[5,6]</sup>,它可作用于多种效应细胞,包括 T、B 淋巴细胞、巨噬细胞和 NK 细胞,能同时加强细胞免疫和体液免疫。Henke 等<sup>[7]</sup>构建了表达甲型流感病毒基因与 IL-2 基因的共表达载体,免疫小鼠后能够有效地阻止流感病毒的感染。Barouch 等<sup>[8]</sup>比较了单独表达 IL-2 的质粒与 HIV gp120 DNA 疫苗和表达 IL-2/Ig 融合蛋白的质粒对小鼠免疫效果,结果发现只有融合蛋白才能显著增强特异性抗体产生和 T 细胞增殖。研究发现,与 DNA 疫苗注射相关的编码细胞因子的质粒,它的注射时间很重要。当编码 GM-CSF 质粒在 DNA 疫苗注射前 3d 或同时注射,且必须在同一位点注射,方能诱导最强的 CTL 应答。但如果将分别构建的 DNA 疫苗与 GM-CSF 编码质粒混合注射,将会对基因免疫有干扰作用<sup>[9,10]</sup>。Barouch 等<sup>[11]</sup>构建了 HIV gp120 与 GM-CSF 以双顺反子形式的共表达质粒,仅用 1 $\mu$ g 双顺反子质粒 PV1J-gp120/GM-CSF 就能诱导产生与 100 $\mu$ g 仅表达外壳蛋白质粒相当的抗体滴度、TH 细胞应答及 T 细胞增殖。Wang 等<sup>[12]</sup>构建了 WHV 抗原基因与 IFN- $\gamma$  共表达的核酸疫苗质粒,免疫动物后,能够有效地干扰病毒的复制。

在以上研究的基础上,本研究构建了双顺反子表达载体 pIRES-S1/IL2,它是在 S1 和 IL-2 之间插入一段来源于脑心肌炎病毒的 IRES 序列,具有内部核糖体进入位点的功能,可以将非相关基因连接,转录时在上游启动子控制下,两个基因及 IRES 同时转录成一条单链 mRNA,但两个基因的翻译又是独立的,从而保证用 IRES 序列的连接的非相关基因各自独立的表达。从而避免两种质粒混合免疫时可能存在的细胞摄取不成比例,影响免疫应答效率。

动物试验结果表明,pIRES-S1/IL2 免疫组、pIRES-S1 + pIRES-IL2 混合免疫组的效果在诱导外周血 T 淋巴细胞亚群数量和血清中特异性抗体上,都要优于 pIRES-S1 免疫组。但在诱导 T 淋巴细胞亚群数量和特异性抗体上,pIRES-S1/IL2 免疫组都要明显优于 pIRES-S1、pIRES-IL2 质粒混合免疫组,表明 S1 基因和 IL-2 共表达能更加有效的刺激机体产生全面的免疫应答。IL-2 与抗原基因共表达而对免疫效果的加强作用,可能是由于共表达可以使 IL-2 和抗原基因存在于同一个微环境中,从而对免疫

应答反应起了促进作用。攻毒试验结果表明, pIRES-S1/IL2 免疫组的保护率最高, 要优于常规的灭活疫苗组, 但仍然不能完全阻止病毒感染肾脏组织, 因此还有待进一步完善。

### 参 考 文 献

- [ 1 ] 王红宁. 禽传染性支气管炎综合防治. 北京: 中国农业出版社. 2000.
- [ 2 ] 刘兆球, 姜世金, 常维山, 等. 传染性支气管炎病毒 S1 基因的真核表达及免疫原性检测. 中国兽医学报, 2005, 25(3): 241 - 243.
- [ 3 ] Kwon HM, Jackwood MW. Molecular cloning and sequence comparison of the S1 glycoprotein of the Gray and JMK strains of avian infectious bronchitis virus. *Virus Genes*, 1995, 9(3): 219 - 229.
- [ 4 ] 焦红梅, 焦新安, 殷月兰, 等. 鸡传染性支气管炎病毒 S1 基因的真核表达及其产物的免疫原性. 扬州大学学报(农业与生命科学版) 2006, 27(2): 44 - 47.
- [ 5 ] 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. *Vet Immunol Immunopathol*, 2006, 109: 151 - 160.
- [ 6 ] 刘晓娟, 朱明昭, 宋国兴, 等. 白介素 2 基因协同单纯疱疹病

毒 1 型糖蛋白 D 核酸疫苗免疫诱导的特异性免疫应答. 中国医学科学院学报, 2005, 27: 67 - 72.

- [ 7 ] Henke A, Rohland N, Zell R, *et al.* Co-expression of interleukin-2 by a bicistronic plasmid increases the efficacy of DNA immunization to prevent influenza virus infections. *Intervirology*, 2006, 49: 249 - 252.
- [ 8 ] Barouch DH, Santra S, Steenbeke TD, *et al.* Augmentation and suppression of immune response to an HIV-1 DNA vaccine by plasmid cytokine/Ig administration. *Immunol*, 1998, 161: 1875 - 1882.
- [ 9 ] Kamath AT, Hanke T, Briscoe H, *et al.* Co-immunization with DNA vaccines expressing granulocyte-macrophage colony-stimulating factor and mycobacterial secreted proteins enhances T-cell immunity, but not protective efficacy against *Mycobacterium tuberculosis*. *Immunology*, 1999, 96: 511.
- [ 10 ] 洪晓武, 袁 骏, 陈国兵, 等. mGM-CSF 协同抗肿瘤作用研究进展. 实用肿瘤杂志, 2003, 18: 154.
- [ 11 ] Barouch D H, Santra S, Racz P, *et al.* Potent CD4 + T cell response elicited by a bicistronic HIV-1 DNA vaccine expressing gp120 and GM-CSF. *Immunology*, 2002, 168: 562 - 568.
- [ 12 ] Wang J, Gujar SA, Cova L, *et al.* Bicistronic woodchuck hepatitis virus core and gamma interferon DNA vaccine can protect from hepatitis but does not elicit sterilizing antiviral immunity. *J Virol*, 2007, 81: 903 - 16.

## Potent immune responses elicited by a bicistronic IBV DNA vaccine expressing S1 and IL-2 gene

TANG Meng-jun<sup>1</sup>, WANG Hong-ning<sup>2,1\*</sup>, ZHOU Sheng<sup>1</sup>, HUANG Yong<sup>1</sup>, LIU Ping<sup>1</sup>

(<sup>1</sup> College of Animal Science & Technology, Sichuan Agricultural University, Yaan 625014, China)

(<sup>2</sup> College of Life Science, Sichuan University, Chengdu 610064, China)

**Abstract:** Candidate IBV vaccines should elicit cellular responses as well as humoral responses. S1 gene of avian infectious bronchitis virus and interleukin-2 (IL-2) gene from chicken were inserted into the bicistronic pIRES-EGFP/DsRed plasmid. The pIRES-S1, pIRES-IL2 and pIRES-S1/IL-2 plasmid expressing or co-expressing S1 and IL-2 gene were constructed. Plasmids were transfected into the Vero cells by lipofectamine, and the expressed products were detected by RT-PCR and indirect immunofluorescence assay. The 7-day-old chickens were immunized intramuscularly with plasmids encapsulated by liposome and boosted three weeks later. Two weeks after boosting, chickens were challenged by virulent IBV strain. The results showed that coadministration of a plasmid expressing IL-2 with the S1 DNA vaccine led to only a marginal increase in humoral and T cell responses. However, immunization with the bicistronic plasmid pIRES-S1/IL-2 that co-expressing S1 and IL-2 under control of a single promoter led to a dramatic augmentation of humoral and T cell responses. The protective efficacy could be significantly enhanced after injection with plasmids pIRES-S1/IL-2 or pIRES-S1 + pIRES-IL2. These results demonstrate that bicistronic DNA vaccine containing IL-2 elicit remarkably immune responses and suggest that optimal humoral and cellular responses priming requires the precise temporal and spatial codelivery of Ag and IL-2.

**Keywords:** Infectious bronchitis virus (IBV); S1 gene; IL-2; bicistronic; DNA vaccine

Foundation item: National Programs for High Technology Research and Development of China (2003AA241120)

\* Corresponding author. Tel/Fax 86-28-85471599; E-mail: whongning@163.com

Other authors: HU Hui-qiong<sup>1</sup>, LIAO Juan<sup>1</sup>

Received: 30 March 2007/ Accepted: 30 April 2007/ Revised: 17 July 2007