

用小鼠模型分析表达牛结核分枝杆菌 Ag85B 重组腺病毒的细胞免疫特性

周海霞^{1#}, 陈祥^{1#}, 季琰¹, 周卫东², 胡茂志², 黄金林¹, 潘志明¹, 焦新安^{1*}

(¹ 扬州大学 江苏省人兽共患病学重点实验室, 扬州 225009)

(² 扬州大学测试中心, 扬州 225009)

摘要:【目的】构建表达牛结核分枝杆菌抗原 Ag85B 重组腺病毒 rAd-Ag85B, 并用小鼠模型分析其细胞免疫特点。【方法】采用 PCR 方法, 扩增结核分枝杆菌 Ag85B 的编码基因 *fbpB*, 测序后构建 pDC516-Ag85B 重组质粒。利用脂质体将 pDC516-Ag85B 与 pBHGfrtΔE1, 3FLP 共转染 Ad293 细胞包装成重组病毒 rAd-Ag85B。空斑纯化后用电镜负染、目的基因转录和蛋白表达进行 rAd-Ag85B 验证。同时将 rAd-Ag85B 和 rAd(wtAd) 分别经皮下注射免疫 BALB/c 小鼠, 二免二周后取小鼠脾脏细胞, 进行 CD69 表面分子表达、淋巴细胞增殖和 ELISPOT 实验分析。【结果】在电镜下能观察到包装的重组病毒粒子, 且在转录和蛋白水平上验证了 rAd-Ag85B 构建成功。免疫试验结果显示, rAd-Ag85B 能激活 CD4⁺T 和 CD8⁺T 细胞表面分子 CD69 的表达, 并引起淋巴细胞增殖。ELISPOT 表明 rAd-Ag85B 呈现 Th1 免疫特点。【结论】成功构建的 rAd-Ag85B 能引起机体针对 PPD 蛋白或 Ag85B 多肽的 Th1 免疫应答。

关键词: 抗原 Ag85B; 牛结核分枝杆菌; 重组腺病毒; γ 干扰素; CD69

中图分类号: R37 **文献标识码:** A **文章编号:** 0001-6209 (2010) 06-0811-06

牛结核病 (Bovine tuberculosis) 是由牛型分枝杆菌 (*Mycobacterium bovis*) 和结核分枝杆菌 (*Mycobacterium tuberculosis*) 等所引起的一种人兽共患的慢性消耗性传染病, 被国际动物卫生组织列为需通报的动物疫病。近年来不仅人的结核病疫情有明显增加, 而且在动物中流行也比较普遍, 结核病仍然是危害我国人民健康和畜牧业发展的一种重要人兽共患病^[1]。由于卡介苗对成年人的结核预防效果不稳定、临床多耐药菌株流行, 抗生素治疗受到挑战, 因此有效的结核疫苗研制迫在眉睫。在接种卡介苗的基础上, 加强免疫、增强免疫记忆或许是目前预防结核比较有效的方法。Ag85B (Antigen B) 是牛

结核分枝杆菌早期分泌的蛋白, 有研究表明 Ag85B 能诱导特异性 Th1 免疫应答, 是牛结核分枝杆菌基因疫苗的优势抗原。因此, 本研究利用复制缺陷的腺病毒基因治疗载体运送 Ag85B 抗原, 成功包装该病毒, 并证实它具有细胞免疫活性, 为进一步研究该重组病毒的体内免疫效应奠定了基础。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 载体与细胞: *E. coli* DH5 α , Ad293 细胞由本室保存; 卡介苗购自上海生物制品研究所; 腺病毒载体 AdTMMax 质粒 pDC516 和 pBHGfrtΔE1, 3FLP 购自

基金项目: 国家“973 项目” (2006CB504404); 国家科技重大专项 (2008ZX10003-010); 公益性行业科研专项 (200903027); 江苏省科技攻关计划 (BE2007340)

* 通信作者。Tel: +86-514-87971136; E-mail: jiao@yzu.edu.cn

作者简介: # 对本文有同等贡献。周海霞 (1981 -), 女, 江苏南通人, 博士研究生, 主要从事重组腺病毒基因治疗的研究, E-mail: hannah5658zhou@yahoo.com.cn。陈祥 (1978 -), 男, 江苏盐城人, 博士, 副教授, 主要从事病原微生物学研究, E-mail: chenxiang@yzu.edu.cn

收稿日期: 2009-11-23; **修回日期:** 2010-01-24

加拿大 Microbix 公司; pMD18-T 载体购自大连 TaKaRa 公司; 6-8 周龄 BALB/c(H-2^d) 小鼠购自扬州大学比较医学中心。

1.1.2 主要试剂和仪器: 细菌基因组小提试剂盒购自上海华舜生物工程公司; LA Taq DNA 聚合酶、EcoRI、Hind III、T4 DNA 连接酶、Markers 等购自 Takara 公司; PCR 引物合成和产物测序由南京金斯瑞公司完成; 脂质体 lipofectamineTM 2000 购自美国 Invitrogen 公司; AMV、RNA 酶抑制剂和 TRIzol 购自美国 Promega 公司; RPMI 1640、青霉素购自美国 GBICO 公司; 高糖 DMEM、胎牛血清购自美国 Hyclone 公司; 抗小鼠 IFN- γ 单抗 (mAb) R4-6A2、抗小鼠 IL-4 mAb BVD4-1D11、生物素化 IFN- γ mAb XMG1.2、生物素化 IL-4 mAb BVD6-24G2、链亲和素 AKP、CD4PE、CD8APC、CD69FITC 抗体购自美国 BD 公司; 酯纤维素底 96 孔 ELISPOT 板购自美国 Millipore 公司; 多肽 (Ag85B: 262-279aa, H-2^d) 由北京中亚亚光生物科技公司合成; ³H-胸腺嘧啶购自美国 GE Healthcare。其余试剂均为分析纯。

1.2 目的基因的制备以及穿梭载体 pDC516-Ag85B 的构建

利用细菌基因组 DNA 小提试剂盒提取卡介苗基因组 DNA。根据 GenBank 中 *fbpB* 基因序列设计引物。引物序列: P1: 5'-GGGAATTC ATGACA GACGTG AGCCGA A-3' (划线部分为 EcoRI 酶切位点); P2: 5'-ATAAGCTT TCAGCC GCGCC TAACGA-3' (划线部分为 Hind III 酶切位点), 扩增 994 bp 片段。PCR 反应体系为 50 μ L, 退火温度 58 $^{\circ}$ C, 30 个循环。纯化、回收、连接、酶切和转化参照文献进行^[2]。将测序正确的重组质粒命名为 pMD18-T-Ag85B。将阳性克隆质粒和 pDC516 载体分别用 EcoRI 和 Hind III 双酶切、回收、连接, 构建 pDC516-Ag85B 重组质粒。

1.3 重组腺病毒 rAd-Ag85B 的包装和鉴定

用 lipofectamineTM 2000 将测序正确的 pDC516-Ag85B、pDC516 和骨架质粒 pBHGft Δ E1, 3FLP 共转染长至 70% - 80% 的 Ad293 细胞, 3 h 后换含 10% 胎牛血清的高糖 DMEM 培养基。5 - 10 d 后细胞漂浮, 出现葡萄样串珠变化, 约 90% 的细胞出现 CPE 时收集病毒。-20 $^{\circ}$ C、37 $^{\circ}$ C 反复冻融 4 次后收集上清。同法表达不含外源基因的重组病毒 rAd 作为对照。将上清接种长满 Ad293 细胞的 6 孔细胞板, 37 $^{\circ}$ C 吸附 1.0 h, 每孔加入预热的含 1.25% 琼脂/DMEM 2.0 mL, 继续培养约 10 d 后用 tip 挑取空斑

并继续增殖培养。取增殖的病毒液, 按照 TRIzol 试剂盒说明书提取病毒的总 RNA, 用特异性引物扩增 *fbpB* 基因, 设立 rAd 对照。用负染的方法通过透射电镜观察上清液中的病毒粒子^[2]。接种纯化的重组腺病毒 rAd-Ag85B 于长满单层的 Ad293 细胞, 至完全病变后收获病毒液, 进行 SDS-PAGE 分析。将蛋白转移至硝酸纤维素膜上, 与结核病人血清反应 4 h, PBST 洗涤后加入辣根过氧化物酶标记的羊抗人 IgG (1:500), 37 $^{\circ}$ C 孵育 1 h, 洗涤后 DAB 显色。同时设立 rAd 对照。

1.4 小鼠免疫和脾脏细胞制备

将小鼠随机分两组, 每组 6 只, A 组皮下注射 rAd-Ag85B 10⁸ TCID₅₀/100 μ L, B 组皮下注射同样剂量的 rAd (wtAd) 作对照。间隔二周后进行第二次免疫, 二周后取小鼠脾脏, 挤压脾脏后收集细胞, 裂解红细胞并洗涤, 经 200 目铜网过滤洗涤后, 台盼兰染色计数。

1.5 CD69 表达分析

各免疫小鼠分别取两份 2 \times 10⁵ 细胞 PBS 洗涤 2 次, 其中一份细胞加入浓度为 0.2 g/L 的 CD4-PE mAb、CD69-FITC mAb 各 1 μ L, 另一份加入 0.2 g/L 的 CD8-APC mAb、CD69-FITC mAb 各 1 μ L, 样品混匀后, 4 $^{\circ}$ C 避光作用 15 min; 1% BSA-PBS 洗涤 2 次, 用 FACS 检测各组细胞中 CD4⁺T 和 CD8⁺T 细胞表面 CD69 分子的表达情况。

1.6 淋巴细胞增殖试验

将制备的脾脏细胞分装 96 孔, 每孔 5 \times 10⁵/50 μ L, 添加 50 μ L PPD (2 mg/L) 或者 Ag85B 多肽 (10 mg/L), 设立阴性培养基、阳性 (ConA, 2 mg/L) 对照, 每孔设 3 个重复孔。37 $^{\circ}$ C, 5% CO₂ 全湿润培养 48 h。添加 ³H-胸腺嘧啶 (0.5 μ Ci/50 μ L), 继续培养 18 h, 用细胞收集器收集细胞到玻璃纤维滤纸上, 并反复抽洗 3 次。取出滤纸烘干装入塑封袋, 加入 3 mL 闪烁液, 封口后 PerKin Elmer 1450LSC 型液体闪烁分析仪读数, 测定脾脏细胞结合的 ³H-胸腺嘧啶, 结果以 CPM (每分钟脉冲数) 表示, 并计算刺激指数。

1.7 ELISPOT 试验

分别以抗小鼠 IFN- γ mAb R4-6A2 及抗 IL-4 mAb BVD4-1D11 作为捕捉抗体, 2 mg/L, 每孔 100 μ L, 室温过夜。用无菌 PBS 洗涤 5 次, 再加入 200 μ L 完全培养基, 37 $^{\circ}$ C 封闭 1 - 2 h; 将各组脾细胞悬液调至 5 \times 10⁵/50 μ L 分装培养孔, 再加入 50 μ L 工作浓度 Ag85B 多肽或 PPD 进行刺激, 并同时设立

阴性培养基和阳性 ConA 刺激对照。37℃ 培养 48 h; 用含 0.05% Tween 20 去离子水洗涤 2 次, 再用 PBST 洗涤 5 次。用含 10% BSA 的 PBST 稀释生物素化抗鼠 IL-4 mAb BVD6-24G2、生物素化 IFN- γ mAb XMG 1.2 检测抗体至 2 mg/L, 每孔加 100 μ L, 室温作用 3 h。用含 10% FCS 的 PBST(1:1000) 稀释链亲和素 AKP, 100 μ L/孔, 室温作用 3 h; 每孔加入 100 μ L BCIP/NBT 底物, 室温显色, 待出现蓝色斑点时, 用去离子水冲洗, 拍干后室温晾干。在立体显微镜下计数蓝斑数, 每一个斑点代表一个特异性分泌细胞因子的 T 细胞。

1.8 统计分析

对免疫试验的结果采用平均数 \pm 标准差的方法表示, 样本数为 6。免疫组之间差异采用 *t* 检验进行分析, *P* 值小于 0.01 为差异极显著, 采用 SigmaPlot 10.0 软件绘图。

2 结果

2.1 *fbpB* 基因的扩增以及重组质粒的鉴定

以提取的细菌基因组 DNA 为模板利用特异引物扩增 *fbpB* 基因, 经琼脂糖凝胶电泳染色可见约 1 kb 的特异条带, 连接 T 载体后并进行酶切鉴定, 将目的片段与 pDC516 载体连接, 获得 pDC516-Ag85B, 酶切鉴定正确(图略)。基因测序结果表明, 该基因片段大小为 994 bp, 与 GenBank 公布的基因序列号 4698323 核酸序列 100% 同源。

2.2 重组病毒 rAd-Ag85B 的鉴定

在光镜下可见明显的重组病毒的 CPE, 而对照细胞则没有。取病毒的上清在电镜下负染观察可见典型的腺病毒粒子, 如图 1 可见约 80 nm 球形病毒颗粒, 呈 20 面体对称。将重组病毒 rAd、rAd-Ag85B 提取的总 RNA 进行 cDNA 合成, 以 *fbpB* 基因特异性引物为条件进行 PCR 扩增, 结果在约 1 kb 处扩增

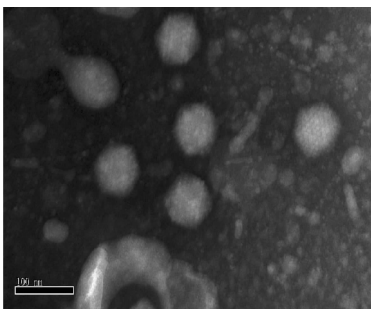


图 1 重组腺病毒粒子的投射电镜图片 (135000 \times)

Fig. 1 The TEM photo graph of recombinant adenovirus amplified 135000.

出特异条带(图略), 而 rAd 则没有, 表明重组病毒 rAd-Ag85B 可以转录目的基因。Western blot 结果显示 rAd-Ag85B 在 35 kDa 大小处出现特异的免疫印迹条带, 对照没有, 表明 Ag85B 蛋白在 rAd-Ag85B 中成功表达(图 2)。

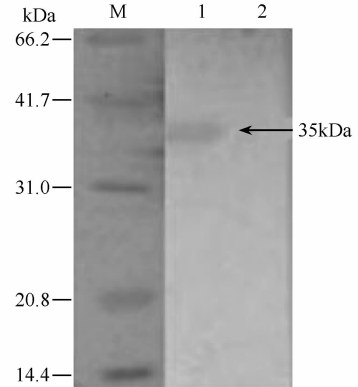


图 2 rAd-Ag85B 免疫印迹分析

Fig. 2 Analysis of rAd-Ag85B by Western-blot. M. protein marker; 1. rAd-Ag85B virus; 2. rAd control.

2.3 T 细胞表面 CD69 分子表达和淋巴细胞增殖结果

在免疫后二周分别取各免疫组小鼠脾脏研磨分离细胞后, 分别用 CD4PE、CD69FITC 抗体和 CD8APC、CD69FITC 抗体进行标记, FACS 结果显示, rAd-Ag85 免疫组的 CD4⁺、CD8⁺ T 细胞表面的 CD69 的表达上调(图 3), 其中 CD4⁺CD69⁺ T 细胞为 15.4% - 21.2%、CD8⁺CD69⁺ T 细胞 3.4% - 5%, 与 rAd 对照组差异极显著(图 4)。在淋巴细胞增殖试验中, rAd-Ag85B 免疫小鼠的淋巴细胞经

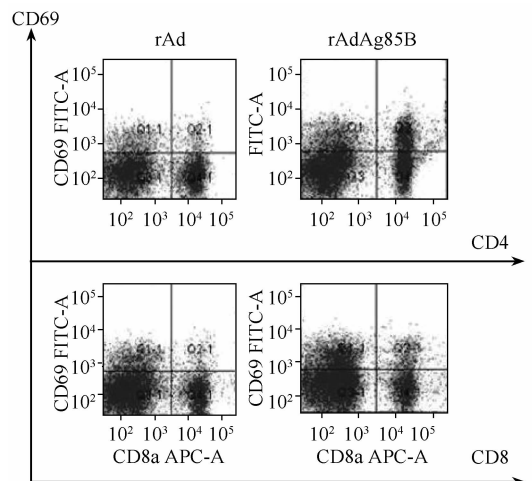


图 3 T 细胞 CD69 表达分析

Fig. 3 CD69 expression analysis of T cells by FACS.

PPD 或者特异 Ag85B 多肽刺激均能不同程度引起细胞特异性增殖, CPM 数值在 6725 - 9814 之间, 各刺激组的刺激指数均大于 2, 与 rAd 对照组显著差异 ($P < 0.01$) (图 5)。

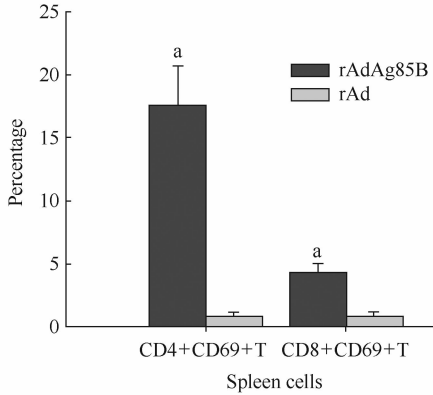


图 4 免疫组 CD69 阳性 T 细胞表达分析比较

Fig. 4 CD69 expression analysis of each immunized group. Each bar represents the sample mean ($N = 6$) \pm S. D. a: $P < 0.01$.

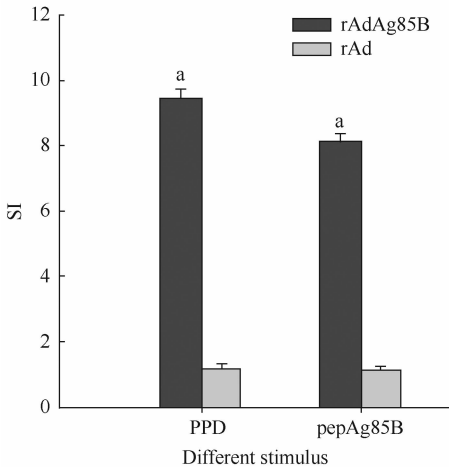


图 5 淋巴细胞增殖试验结果

Fig. 5 Lymphocyte proliferation assay of immunized mice. Each bar represents the sample mean ($N = 6$) \pm S. D. a: $P < 0.01$.

2.4 ELISPOT 实验结果

ELISPOT 结果显示 rAd-Ag85B 能诱导较高水平的针对 PPD 或者特异多肽的细胞免疫应答, 与 rAd 相比差异显著。其中 PPD 刺激的 rAd-Ag85B 中分泌 IFN- γ 的细胞为 $260.0 \pm 24.60/5 \times 10^5$, 多肽刺激的 IFN- γ 分泌细胞为 $237.0 \pm 22.10/5 \times 10^5$; 而同样刺激的 IL-4 分泌细胞为 $30.0 \pm 8.0/5 \times 10^5$ 和 $15.0 \pm 1.80/5 \times 10^5$, 分泌 IFN- γ 细胞数显著高于分泌 IL-4 细胞数 ($P < 0.01$) (图 6), 各免疫组在不同刺激剂之间都显示了同样免疫特点, 呈现 Th1 免疫趋势。

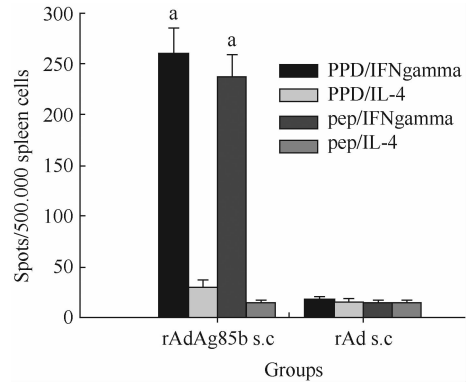


图 6 脾脏细胞 ELISPOT 试验结果

Fig. 6 Number of specific cytokine producing spleen cells. Each bar represents the sample mean ($N = 6$) \pm S. D. a: $P < 0.01$.

3 讨论

Ag85B 是结核分枝杆菌早期培养滤液中分泌蛋白的重要组成部分之一, 与其细胞壁的合成有关^[3]。结核分枝杆菌生长期间分泌的蛋白对结核病的保护性免疫至关重要^[4]。新近研究发现 Ag85B 能诱导体液免疫应答和特异性 Th1 型细胞免疫应答, 具有免疫保护作用^[5-6], 提示 Ag85B 蛋白有望成为结核基因疫苗的候选抗原或作为亚单位疫苗的组分。在对结核病人和鸟胞内分枝杆菌感染病人血液 Ag85 抗体水平检测发现, 在病程的各个阶段前者 Ag85 血清水平比胞内分枝杆菌病人的血清水平高, 显示该蛋白在疾病发生转化中有重要作用^[7]。在 Ag85B 或重组 Ag85B 在内的几种蛋白诱导外周血单核细胞增殖试验中, 发现 Ag85B 或重组 Ag85B 均能够被单核细胞强烈的识别并增殖分泌 IFN- γ , 并能诱导产生良好的免疫记忆^[8]。小鼠肌肉注射 Ag85B DNA 疫苗研究发现, 免疫组小鼠经疫苗刺激后能引起 Th1 反应, 产生高水平的 IFN- γ 和 TNF- α , 其中 IFN- γ 主要由 CD8⁺ T 细胞产生^[9-11]。在 Ag85B DNA 疫苗的基础上增加 Ag85B 的表达量能显著提高 DNA 疫苗的免疫效果^[12-13]。本研究利用复制缺陷的腺病毒载体, 采用 Flp/frt 重组系统, 由 Flp 重组酶及其识别序列 frt 位点实现定点重组将 *fbpB* 基因整合到病毒骨架质粒, 成功构建了 rAd-Ag85B, 并在小鼠模型的免疫试验中, rAd-Ag85B 能显著刺激 T 细胞增殖, ELISPOT 实验进一步发现, 脾脏细胞分泌 IFN- γ 的能力比 IL-4 显著, 呈现 Th1 免疫特征。

CD69 是 T 细胞早期活化的标志, 它的表达是分析 T 细胞效应的指标, 同时也是 T 细胞增殖的共刺激分子。有研究认为 CD4⁺ T 细胞表面 CD69 的表达是结核分枝杆菌感染后的特征之一^[14]。本研

究中将重组病毒 rAd-Ag85B 免疫小鼠后,检测了脾脏 T 细胞表面 CD69 分子的表达情况。结果表明,rAd-Ag85B 能促进 T 细胞表面分子 CD69 的表达从而活化 T 细胞,激活免疫反应。

理想的增强型结核疫苗包括重组蛋白和适当佐剂、复制缺陷病毒载体或衣壳载体运送相关抗原^[15]。腺病毒载体是有潜力的人的转基因载体,有研究发现滴鼻免疫 rAd-Ag85A 能在小鼠肺部和脾脏引起 CD4⁺ 和 CD8⁺ T 细胞免疫反应,而且在 MTB 攻毒以后,滴鼻免疫 rAd-Ag85A 显示了比 BCG 更好的保护力^[16]。本研究构建的 rAd-Ag85B 重组病毒,为研究牛结核基因工程疫苗提供了新材料。

参考文献

- [1] 金宁一, 胡仲明, 冯书章. 新编人兽共患病. 北京: 科学出版社, 2007: 657-676.
- [2] Sambrook J, Russell DW. 分子克隆实验指南. 第三版. 北京: 科学出版社, 2002: 68-71.
- [3] Belisle JT, Vissa VD, Sievert T, et al. Role of the major antigen of *Mycobacterium tuberculosis* in cell wall biogenesis. *Science*, 1997, 276: 1420-1422.
- [4] 刘忠华, 万康林, 陈创夫. 结核分枝杆菌主要分泌蛋白的研究进展. 中国人兽共患病学报(*Chinese Journal of Zoonoses*), 2007, 23 (7): 722-724.
- [5] Sable SB, Kumar R, Kalra M, et al. Peripheral blood and pleural fluid mononuclear cell responses to low-molecular-mass secretory polypeptides of *Mycobacterium tuberculosis* in human models of immunity to tuberculosis. *Infection and Immunity*, 2005, (73): 3547-3558.
- [6] Andersen P, Andersen AB, Sorensen AL, et al. Recall of long-lived immunity to *Mycobacterium tuberculosis* infection in mice. *Journal of Immunology*, 1995, 154 (7): 3359-3372.
- [7] Bentley HS, Quan X, Thomas N, et al. Pathophysiology of antigen 85 in patients with active tuberculosis; antigen 85 circulates as complexes with fibronectin and immunoglobulin G. *Infection and Immunity*, 1999, 67 (2): 581-588.
- [8] Torres M, Herrera T, Villareal H, et al. Cytokine profiles for peripheral blood lymphocytes from patients with active pulmonary tuberculosis and household contacts in response to the 30-kilodalton antigen of *Mycobacterium tuberculosis*. *Infection and Immunity*, 1998, 66: 176-180.
- [9] Teixeira FM, Teixeira HC, Ferreira AP, et al. DNA vaccine using *Mycobacterium bovis* Ag85B antigen induces partial protection against experimental infection in BALB/c mice. *Clinical and Vaccine Immunology*, 2006, 13(8): 930-935.
- [10] Feng CG, Palendra U, Demange C, et al. Priming by DNA immunization augments protective efficacy of *Mycobacterium bovis* bacille Calmette-Guerin against tuberculosis. *Infection and Immunity*, 2001, 69 (6): 4174-4176.
- [11] Zhu DY, Jiang S, Luo XD. Therapeutic effects of Ag85B and MPT64 DNA vaccines in a murine model of *Mycobacterium tuberculosis* infection. *Vaccine*, 2005, (23): 4619-4624.
- [12] Ko HJ, Ko SY, Kim YJ, et al. Optimization of codon usage enhances the immunogenicity of a DNA vaccine encoding mycobacterial antigen Ag85B. *Infection and Immunity*, 2005, 73 (9): 5666-5674.
- [13] Lozes E, Huygen K, Content J. Immunogenicity and efficacy of a tuberculosis DNA vaccine encoding the components of the secreted antigen 85 complex. *Vaccine*, 1997, 15(8): 830-833.
- [14] Bojana A, Vladimir K, Mojca S, et al. CD69 Expression on CD4⁺ T lymphocytes after *in vitro* stimulation with tuberculin is an indicator of immune sensitization against *Mycobacterium tuberculosis* antigens. *Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology*, 2005, 12 (1): 101-106.
- [15] Skeiky YAW, Sadoff JC. Advance in tuberculosis vaccine strategies. *Nature Reviews Microbiology*, 2006, 469-476.
- [16] Wang J, Thorson L, Stokes RW, et al. Single mucosal, but not parenteral, immunization with recombinant adenoviral-based vaccine provides potent protection from pulmonary tuberculosis. *Journal of Immunology*, 2004, 173: 6357-6365.

Construction of recombinant adenovirus expressing Ag85B of *Mycobacterium bovis* and its cellular immunoproperties in mice

Haixia Zhou^{1#}, Xiang Chen^{1#}, Yan Ji¹, Weidong Zhou², Maozhi Hu², Jinlin Huang¹, Zhiming Pan¹, Xin'an Jiao^{1*}

(¹ Jiangsu Key Lab of Zoonosis, Yangzhou University, Yangzhou 225009, China)

(² Test Center of Yangzhou University, Yangzhou 225009, China)

Abstract: [**Objective**] We constructed recombinant adenovirus rAd-Ag85B expressing antigen 85B of *Mycobacterium bovis* and analyzed cellular immune responses after mice immunization. [**Methods**] We amplified the *fbpB* gene from genomic DNA of BCG by PCR and cloned into pMD18-T vector for sequence analysis. Then we constructed pDC516-Ag85B and co-transfected with plasmid pBHGfrtΔE1, 3FLP into Ad293 cells by lipofectamine™ 2000. Then we identified the recombinant Ad-Ag85B virus by RT-PCR, Western blot assay and TEM observation after negative staining. BALB/c mice were subcutaneously immunized with the dose of 10^8 TCID₅₀ rAd-Ag85B or rAd. Two weeks after immunization, CD69 expression, T lymphocyte proliferation and ELISPOT were detected in spleen cells of immunized mice. [**Results**] We obtained the correct recombinant adenovirus rAd-Ag85B expressed Ag85B antigen. The level of both splenic CD69⁺ CD4⁺ T and CD69⁺ CD8⁺ T cells of rAd-Ag85B group were significantly higher than those of rAd control. The SI index of rAd-Ag85B was much higher than rAd. In ELISPOT assay more IFN-γ specific secreting cell spots other than IL-4 were detected in rAd-Ag85B group. [**Conclusion**] The recombinant adenovirus rAd-Ag85B can induce specific Th1 cell immune responses in mice.

Keywords: Ag85B; *Mycobacterium bovis*; recombinant adenovirus; IFN-γ; CD69

(本文责编:王晋芳)

Supported by the Key Project of China National Programs for Fundamental Research and Development (2006CB504404), the Important National Science & Technology Specific Projects (2008ZX10003-010), the National Department Public Benefit Research Foundation (200903027) and the Key Technologies R & D Program of Jiangsu (BE2007340)

* Corresponding author. Tel: +86-514-87971136; E-mail: jiao@yzu.edu.cn

These authors contributed equally to this work.

Received: 23 November 2009/ Revised: 24 January 2010

科学出版社书讯(2010-3,4)

病毒学精要概览(双语版)

(英)T. 斯科恩 著,朱俊萍 李相辉 安静 译

978-7-03-026886-0 ¥50.00 2010年3月出版

内容简介:本书是 Coffee House Notes on Virology 一书的中英双语版本,内容涵盖了病毒学的基本原理、概念以及与病毒学密切联系的学科中各项热点议题,例如:病毒和肿瘤、病毒和免疫系统、病毒进化及新病毒等。书中丰富的病毒实例几乎囊括了医学病毒学中所有重要的类群和相关医学问题。本书语言极其精炼、简单,以解答75个问题的形式阐释了病毒学中最普遍的性质和规律,为庞杂丰富的病毒学世界搭建起一个精要概括的知识框架。

相信该书有助于普通高等学校和医学高等院校相关专业的本科生、研究生、教师以及相关领域的科研人员在最短的时间内学习和掌握病毒学的基本原理和事实。更希望通过对本书的阅读,激发起读者探索病毒学世界的兴趣。

欢迎各界人士邮购科学出版社各类图书(免邮费)

邮购地址:北京东黄城根北街16号 科学出版社 科学出版中心 生命科学分社 邮编:100717

联系人:李韶文(010-64000849) 周文宇(010-64031535)

网上订购: www.dangdang.com www.joy.com www.amazon.cn www.beifabook.com

更多精彩图书请登陆网站 <http://www.lifescience.com.cn>, 欢迎致电索要书目

