

以减毒鼠伤寒沙门菌为载体的人呼吸道合胞病毒 F 蛋白 DNA 疫苗滴鼻免疫抗体分析

程明^{1,2}, 何金生^{2*}, 付远辉², 乔伟¹, 焦月盈²

¹安徽医科大学免疫学教研室, 合肥 230032

²北京交通大学生命科学与生物工程研究院, 北京 100044

摘要:【目的】以减毒鼠伤寒沙门菌 (*Salmonella typhimurium* aroA strain SL7207, SL7207) 为载体携带可表达呼吸道合胞病毒 (Human respiratory syncytial virus, RSV) 密码子优化的融合蛋白 (Fusion glycoprotein, F) 的真核表达质粒, 探讨不同黏膜免疫途径及密码子优化对免疫效果的影响。【方法】通过对 RSV 野生型 F 基因 (Fwt) 进行密码子优化, 获得密码子优化的 F 基因 (Fsyn), 并构建可表达 Fsyn 的真核表达质粒 pcDNA3.1/Fsyn, 转化 SL7207 得到 SL7207/pcDNA3.1/Fsyn。分别经滴鼻和灌胃途径, 免疫 BALB/c 小鼠, 采用间接 ELISA 方法比较免疫效果。【结果】与灌胃组相比, 滴鼻组诱导小鼠产生了更高水平的血清 IgG 和黏膜 SIgA, 获得了更好的免疫效果 ($P < 0.05$)。与野生型相比, 密码子优化的 F 蛋白具有更好的免疫原性 ($P < 0.05$)。【结论】经滴鼻途径免疫和密码子优化能够提高以 SL7207 为载体的 RSV DNA 疫苗免疫效果。

关键词: 人呼吸道合胞病毒, F 蛋白密码子优化, 黏膜免疫, 减毒鼠伤寒沙门氏菌 SL7207

中图分类号: R392 文献标识码: A 文章编号: 0001-6209 (2011)07-0965-07

人呼吸道合胞病毒 (Human respiratory syncytial virus, RSV) 广泛分布于世界各地, 是引起婴幼儿下呼吸道感染最重要的病毒性病原体, 发病高峰期在出生后的 6 周至 6 个月^[1]。鉴于 RSV 危害严重, 病毒感染机体后的免疫保护机制尚未明确, 也无有效的预防疫苗。世界卫生组织有关 21 世纪疫苗报告中将开发 RSV 疫苗列为最优先发展的疫苗项目之一。

减毒伤寒沙门菌作为 DNA 疫苗的载体, 通过口服途径已被成功用于多种传染性疾病的预防研究。我们的前期研究结果表明, 采用减毒鼠伤寒沙门菌 SL7207 (*Salmonella typhimurium* aroA strain SL7207, SL7207) 携带真核表达质粒 pcDNA3.1/F (SL7207/

pcDNA3.1/F) 经灌胃途径免疫能够获得较好的免疫效果和免疫保护作用, 但同时也发现该疫苗形式诱导产生的呼吸道黏膜分泌型 IgA (Secretory IgA, SIgA) 和血清 IgG 滴度较低^[2-3]。我们分析产生这种结果的原因可能与免疫途径和免疫原性有关。

有研究报道以减毒伤寒沙门菌为载体的疫苗, 经滴鼻途径免疫能诱导产生比口服免疫更好的效果^[4]。另外, RSV 主要保护性抗原 F 蛋白在同义密码子的使用上, 采用的是与人基因组完全不同的富含 A + T 的稀有密码子^[5]。研究表明, 通过对野生型 F 基因进行密码子优化, 选用人类偏好的具有高 G + C 含量、以 G 或 C 结尾的密码子, 同时采用可增加翻译效率的 Kozak 序列及双终止密码子等方法可

基金项目: 北京市自然科学基金 (7092053)

* 通信作者。Tel: +86-10-51684080; Fax: +86-10-51683887; E-mail: jshhe@bjtu.edu.cn

作者简介: 程明 (1981 -) 男, 安徽安庆人, 硕士研究生, 从事呼吸道合胞病毒疫苗研究。E-mail: chengminggy@yahoo.com.cn

收稿日期: 2010-12-20; 修回日期: 2010-04-04

提高 F 蛋白的表达水平,并增强其免疫原性和免疫保护作用^[6-7]。

鉴于以上考虑,我们设想首先通过优化 F 基因密码子、添加可增强翻译效率的 Kozak 序列及双终止密码子等方法提高 F 蛋白的真核细胞表达水平,然后用 SL7207 携带真核表达质粒,经滴鼻途径免疫,以期获得理想的免疫效果。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 质粒、菌株、细胞:减毒鼠伤寒沙门菌 SL7207 由上海第二军医大学戚中田教授馈赠,*E. coli* DH5 α 、质粒 pcDNA3.1、HEp-2 细胞、HEK293 细胞和纯化的 RSV 为本室保存。pcDNA3.1/Fwt 质粒为本实验室构建。

1.1.2 主要试剂:HRP 标记的羊抗小鼠 IgG 抗体、HRP 标记的羊抗小鼠 IgA 抗体、HRP 标记的兔抗山羊 IgG 抗体购自北京中杉金桥生物有限公司。质粒小提试剂盒购自 TaKaRa 公司。脂质体转染试剂盒 Lipofectamine 2000 购自 Invitrogen 公司。ECL 检测的鲁米诺试剂盒氧化剂钩子 Pierce 公司,硝酸纤维膜购自 Amersham 公司。NCL-RSV3 为 Novocastra 公司产品,羊抗 RSV (AB1128) 多抗购自 Chemicon 公司。小鼠淋巴细胞分离液为深圳达科为生物技术有限公司产品。RPMI 1640 为 Gibco 产品,BSA 为四季青产品。TMB 为美国 Promega 公司产品。其它主要生化试剂均为进口或者国产分析纯。

1.1.3 实验动物:6-8 周龄雌性 BALB/c 小鼠购于维通利华公司,饲养于军事医学科学院动物中心。

1.2 pcDNA3.1/Fsyn 构建

根据国外文献报道的方法^[7-8],全基因合成密码子优化并含 Kozak 序列及双终止密码子的 RSV F 基因(Fsyn),采用 Hind III 和 EcoR V 双酶切后,与 Hind III 和 EcoR V 双酶切 pcDNA3.1 以 T4 DNA 连接酶连接,转化,酶切鉴定正确后,送测序公司测序鉴定,获得 pcDNA3.1/Fsyn。

1.3 Western blot 分析重组质粒中 F 蛋白的表达

pcDNA3.1/Fwt 和 pcDNA3.1/Fsyn 转染 HEK293 细胞转染 48 h 后收集细胞于 10 mL 离心管中,2700 \times g 离心 5 min。取细胞沉淀与 100 μ L 细胞裂解液混匀,反复冻融 3 次,13000 \times g 离心 30 min。取上清液与 loading buffer (不含 DDT) 煮样,行 SDS-PAGE 电泳、转膜、封闭,用羊抗 RSV 多

抗为一抗孵育 2 h,洗涤 4 次;鼠抗羊-HRP 为二抗孵育 2 h,洗涤 4 次;在暗室中按每平方厘米 0.125 mL 的用量标准及膜的大小,等体积混合用于 ECL 检测的鲁米诺试剂和氧化剂,可见到膜上出现绿色荧光条带。对 X 光片曝光 30 s,经显影定影处理后晾干保存。

1.4 SL7207/pcDNA3.1/Fwt 和 SL7207/pcDNA3.1/Fsyn 的制备及鉴定:采用电转化的方法将 pcDNA3.1/Fwt 和 pcDNA3.1/Fsyn 转化进 SL7207 感受态菌,挑选重组子,摇菌,以碱裂解法小量提取质粒,并使用 Hind III 和 EcoR V 双酶切鉴定,经电泳鉴定条带大小正确后,送测序公司测序,比对序列正确后,获得 SL7207/pcDNA3.1/Fwt 和 SL7207/pcDNA3.1/Fsyn。

1.5 重组减毒沙门氏菌的体外稳定性实验

为了检测重组质粒 pcDNA3.1/Fsyn 电转入减毒沙门氏菌 SL7207 后在细菌内的稳定传代情况,将携带质粒 pcDNA3.1/Fsyn 的重组减毒沙门氏菌(重组菌)分别在含有或不含有氨苄培养基中培养 5 天,每隔 12 h 取等体积菌液铺板计数,通过计数在两种培养基中的菌落数量来计数稳定性^[9]。即用含氨苄的培养基中生长的菌落数量除以不含氨苄的培养基中生长的菌落数量,再换算成百分比。从含有氨苄的平板上随机挑取 10 个单菌落,提质粒进行 Hind III 和 EcoR V 双酶切鉴定。

1.6 动物分组与免疫

24 只 6-8 周龄雌性 BALB/c 小鼠随机分为 SL7207/pcDNA3.1/Fwt 和 SL7207/pcDNA3.1/Fsyn 滴鼻组以及 SL7207/pcDNA3.1/Fwt 和 SL7207/pcDNA3.1/Fsyn 灌胃组 6 只/组。取 1×10^8 CFU 重组菌稀释至 50 μ L PBS 中滴鼻免疫小鼠。经滴鼻免疫前,先用 0.4% 戊巴比妥钠经腹腔注射麻醉(40 mg/kg 体重)。取 1×10^8 CFU 重组菌稀释至 100 μ L PBS 中灌胃免疫小鼠。于灌胃前 4 h 禁水禁食,灌胃前 30 min 给予 100 μ L 10% NaHCO₃ 中和胃酸。

1.7 血清抗体检测

24 只小鼠(6 只/组,共 4 组)分别在免疫后 2、3、4、5、6 周采集小鼠血,5000 \times g 离心 15 min 分离血清,-20 $^{\circ}$ C 保存备用。采用间接 ELISA 检测小鼠血清 IgG^[2],用 1:5000 稀释纯化的 RSV 抗原 100 μ L/孔包被酶标板,4 $^{\circ}$ C 过夜;用含 10% 胎牛血清的 PBS-T 作为 37 $^{\circ}$ C 封闭 1 h;加入经适当稀释的免疫小鼠血清,100 μ L/孔,于 37 $^{\circ}$ C 孵育 1 h 后;HRP 标记的羊抗小鼠 IgG 做为第二抗体每孔 100 μ L,

37℃ 孵育 1 h;每孔加入 100 μL TMB 底物,37℃ 避光孵育 15 min,每孔加入 50 μL H₂SO₄ (浓度为 2 mol/L) 终止显色反应,在酶标仪上读取 A₄₅₀ 值,以 P > 0.2, P/N ≥ 2.1 为阳性(P 为实验组标本所测 A₄₅₀ 值,N 为对应的小鼠未免疫前的血清标本所测 A₄₅₀ 值)。

1.8 以免疫后血清作为一抗和 Western blot 分析方法证实重组菌 SL7207/pcDNA3.1/Fsyn 的体内表达

具体方法参见 1.2.2 抗原为纯化 RSV,一抗为经滴鼻途径免疫后小鼠按 1:50 稀释的免疫后血清,其余步骤同 1.2.2。

1.9 支气管肺泡灌洗液 (Bronchoalveolar lavage, BAL) 中 RSV 特异性 SIgA 间接 ELISA 测定

24 只小鼠(6 只/组,共 4 组)分别在免疫后第 6 周,脱臼处死小鼠,切开颈部皮肤与肌肉层,在气管的上部用眼科剪做一 V 字型切口,注意勿切断气管,将一医用连接软管向下插入气管,软管的另一端连上内含 1 mL PBS 的 2.5 mL 注射器,并将 PBS 推入小鼠肺部,反复冲洗小鼠肺部 3-5 次,获得小鼠肺腔内的分泌物,10000 × g 离心 5 min,收集上清,检测 SIgA^[2]。用碳酸盐缓冲液(0.01 mol/L, pH9.6)按 1:5000 稀释纯化的 RSV 包被 96 孔酶标板,100 μL/孔,4℃ 过夜,用含 0.05% Tween 的 PBS (PBS-T, pH 7.4)洗涤 3 次后,用含 10% 胎牛血清的 PBS-T 作为封闭液,200 μL/孔,37℃ 孵育 1 h, PBS-T 洗涤 3 次后,加入经 1:1,1:10,1:50 稀释的支气管肺泡灌洗液,100 μL/孔,于 37℃ 孵育 1 h 后, PBS-T 洗涤 3 次。然后加入 1:2000 稀释的 HRP 标记的羊抗小鼠 IgA,于 37℃ 孵育 1 h 后,洗板 6 次,每次 5 min。每孔加入 100 μL TMB 底物(浓度为 100 μg/mL),置 37℃ 避光孵育 15 min,每孔加入 50 μL H₂SO₄ (浓度为 2 mol/L) 终止显色反应,在酶标仪上读取 A₄₅₀ 值。以 PBS 作为空白对照组。

1.10 RSV 中和抗体检测

24 只小鼠(6 只/组,共 4 组)分别在免疫后第 6 周,在无菌条件下分离小鼠血清,用病毒维持液以 2 倍倍比稀释后,每个稀释度的血清与 RSV 病毒(50 pfu/孔)混合后,铺在生长 HEp-2 细胞的 96 孔板上,100 μL/孔,每个样设 3 个复孔,并设立对照孔^[7]。于室温孵育 1 h 后,弃培养液;各孔加 200 μL 用完全培养液 DMEM 配制的 1% 甲基纤维素,在 37℃ 孵育 4 d 后,甩去培养液;95% 的冰乙醇 4℃ 固定 30 min;含 5% 脱脂牛奶的 PBS(pH 7.4) 37℃

封闭 30 min;加 NCL-RSV3 单抗(1:500 稀释),100 μL/孔,37℃ 孵育 1 h;加 HRP 标记的羊抗小鼠 IgG 第二抗体,100 μL/孔,37℃ 孵育 1 h;加底物显色液,每个孔加 100 μL TMB,室温暗处 10-15 min,用水冲洗掉显色液,干燥后在倒置显微镜下计数每孔蚀斑数。中和抗体效价以计数的斑点数比未加抗体的病毒一半减少的血清最高稀释度表示。

1.11 统计分析

实验数据的统计学分析正态分布使用 t 检验,非正态分布使用 t' 检验,P < 0.05 判断为差异显著性。

2 结果

2.1 pcDNA3.1/Fwt 和 pcDNA3.1/Fsyn 体外表达水平

pcDNA3.1/Fwt 和 pcDNA3.1/Fsyn 转染 HEK-293 细胞 48 h 后,裂解细胞。通过 BCA 测定蛋白质含量,保持所有泳道的上样量一致(为 34 μg/孔)。用不含 DDT 的 loading buffer 煮样,行 SDS-PAGE、转膜,分别用羊抗人 RSV 多克隆抗体和 HRP-鼠抗山羊 IgG 单克隆抗体进行 Western blot 分析,以检测表达产物。同时取 HEK293 细胞裂解液,作为阴性对照。3-4 泳道观察到约为 140 kDa 和 175 kDa 的目的蛋白(图 1)。

2.2 重组菌 SL7207 的增殖培养特性

质粒 pcDNA3.1/Fwt 和 pcDNA3.1/Fsyn 分别转化 SL7207 感受态菌,涂布含氨苄抗生素 50 g/mL LB 平板,37℃,18 h,转化菌 SL7207 的平板上菌落

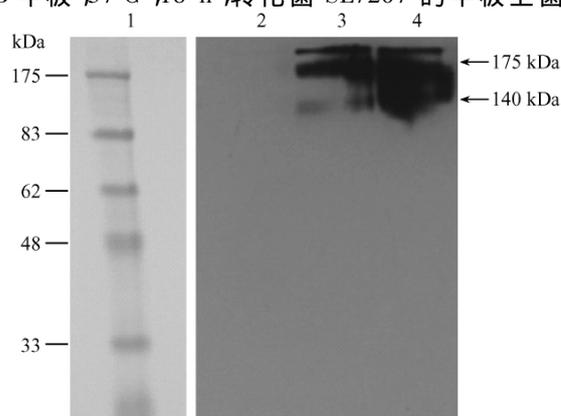


图 1 Western blot 分析真核质粒表达的 RSV F 融合蛋白

Fig. 1 Expression of RSV F gene in HEK293 cells analyzed by Western blot. 1: Marker7708; 2: HEK293; 3: pcDNA3.1/Fwt; 4: pcDNA3.1/Fsyn.

界限清楚,周围没有卫星菌落。

2.3 两种质粒转化 SL7207 后的酶切鉴定

挑选转化了 pcDNA3.1/Fwt 和 pcDNA3.1/Fsyn 的 SL7207,摇菌后提取质粒, *Hind* III 和 *Eco*R V 双酶切获得目的条带,测序鉴定正确,图 2。

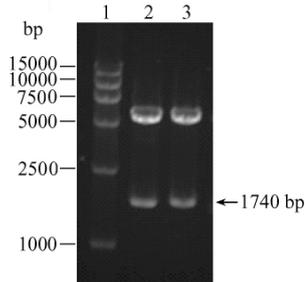


图 2 两种质粒转化 SL7207 后的酶切鉴定

Fig. 2 Identification of recombinant plasmids from *S. typhimurium* aroA strain SL7207. 1: DL15000 DNA marker; 2: pcDNA3.1/Fwt; 3: pcDNA3.1/Fsyn.

2.4 重组菌的体外稳定性实验

连续培养 120 h 后,重组菌的体外稳定性实验结果显示,有 89% 以上的质粒仍稳定存在于重组菌内(图 3)。从含有氨苄的平板上随机挑取 10 个单菌落,提质粒进行 *Hind* III 和 *Eco*R V 双酶切鉴定。酶切后电泳结果显示 10 个质粒均可切下和 Fsyn 片段大小一致的片段,证明重组菌培养 120 h 后仍可稳定携带质粒(图 4)。

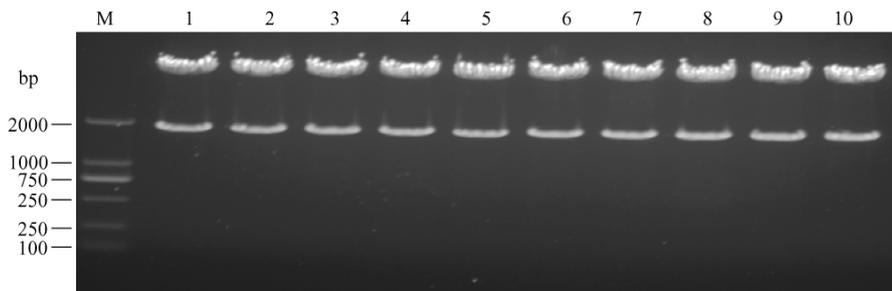


图 4 减毒沙门氏菌携带的重组质粒酶切鉴定结果

Fig. 4 Identification of the recombinant plasmids by restriction endonucleases of *Hind* III and *Eco*R V. M: DL2000 DNA marker; 1-10: The recombinant plasmids extracted from 10 randomly picked SL7207/pcDNA3.1/Fsyn colonies survived on Ampicillin plate for 120 h.

抗,并通过 Western blot 方法分析予以证实。将纯化 RSV 加入不含 DDT 的 loading buffer,行 SDS-PAGE、转膜,使用小鼠单次免疫五周的血清为一抗(1:50 倍稀释),HRP-山羊抗小鼠 IgG 单克隆抗体为二抗进行 Western blot 分析。同时取 HEp-2 细胞裂解液,作为阴性对照(第 2 泳道)。结果显示在第 3 泳

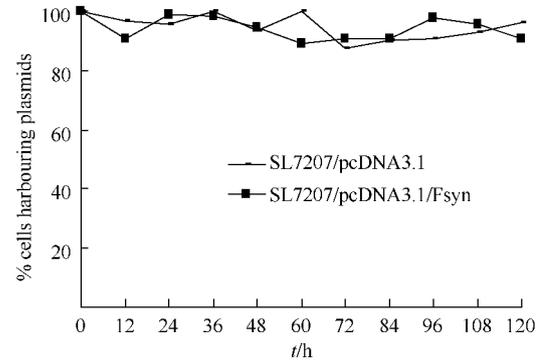


图 3 重组减毒沙门氏菌的体外稳定性实验结果

Fig. 3 Stability of pcDNA3.1/Fsyn and pcDNA3.1 in SL7207 cultured for 120 h with antibiotic or antibiotic-free medium.

2.5 间接 ELISA 测定血清 RSV 特异性 IgG

采用间接 ELISA 方法检测血清 IgG,结果显示,同灌胃组相比较,随着免疫后时间的持续,SL7207/pcDNA3.1/Fsyn 滴鼻组血清 RSV 特异性 IgG 水平均明显提高($P < 0.05$),如图 5;在滴鼻免疫组,与 SL7207/pcDNA3.1/Fwt 相比较,SL7207/pcDNA3.1/Fsyn 诱导更强的 RSV 特异性 IgG 水平($P < 0.05$)如图 6。

2.6 重组菌 SL7207/pcDNA3.1/Fsyn 体内表达分析

为了解 Fsyn 在体内的表达情况,我们使用重组菌 SL7207/pcDNA3.1/Fsyn 免疫后的血清作为一

道观察到约为 140 kD 的目的蛋白(图 7),同时说明 SL7207/pcDNA3.1/Fsyn 在免疫的小鼠体内成功实现了表达。

2.7 间接 ELISA 分析 BAL 中 RSV 特异性 SIgA 的间接 ELISA 测定

于免疫后第 6 周处死小鼠,获取小鼠 BAL,间接

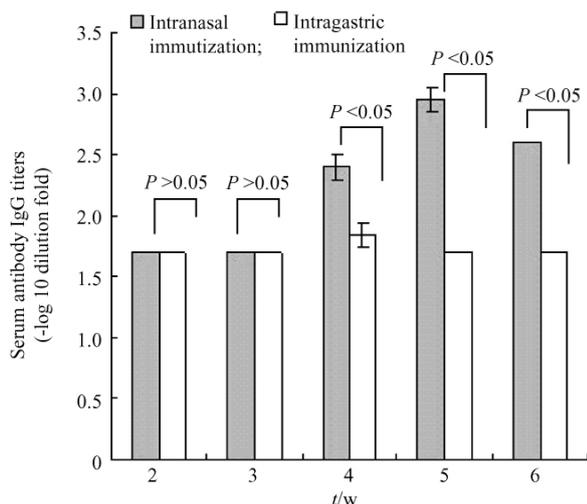


图5 SL7207/pcDNA3.1/Fsyn 分别经不同免疫途径诱导 RSV 特异性 IgG 水平比较 (图中数据为均值 \pm 标准误, $n=6$ 只小鼠/组)

Fig. 5 Comparison of serum RSV-specific IgG levels induced via intranasal or intragastric route with SL7207/pcDNA3.1/Fsyn. data are average \pm SEM, $n=6$ mice per group.

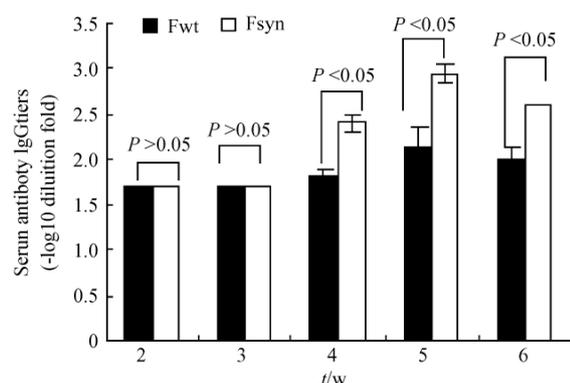


图6 两种含不同质粒的重组 SL7207 经滴鼻免疫小鼠诱导血清 RSV 特异性 IgG 水平比较 (图中数据为均值 \pm 标准误, $n=6$ 只小鼠/组)

Fig. 6 Comparison of serum RSV-specific IgG levels induced by two strains of recombinant SL7207 immunized intranasally. Data are average \pm SEM, $n=6$ mice per group.

ELISA 检测 BAL 中 RSV 特异性 SIgA。结果显示,各实验组均产生了 RSV 特异性的 SIgA,同灌胃组相比较,SL7207/pcDNA3.1/Fsyn 滴鼻组的 RSV 特异性抗体 SIgA 水平显著提高 ($P < 0.05$)。与 SL7207/pcDNA3.1/Fwt 相比较,SL7207/pcDNA3.1/Fsyn 滴鼻免疫能诱导机体产生更强的 RSV 特异性 SIgA 水平 ($P < 0.05$) 如图 8。

2.8 中和抗体测定

免疫后第 6 周分离小鼠血清,检测中和抗体。检测结果显示,SL7207/pcDNA3.1/Fsyn 滴鼻组的中

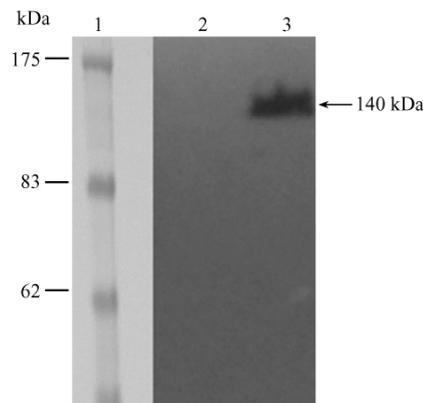


图7 以免疫后血清为基础的 Western blot 分析证实 Fsyn 的体内表达

Fig. 7 The *in vivo* expressed Fsyn confirmed by Western blot based on the sera from the immunized mice. 1: Marker7708; 2: HEp-2; 3: purified RSV.

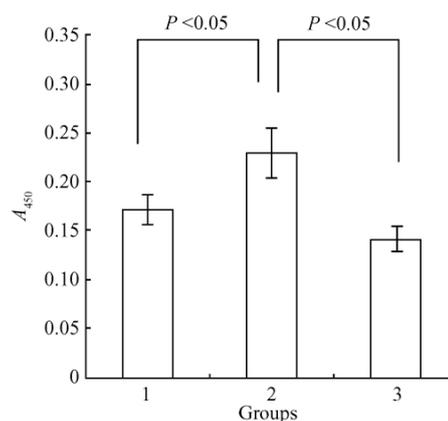


图8 间接 ELISA 分析 BAL 中 RSV 特异性 SIgA (图中数据为均值 \pm 标准误, $n=6$ 只小鼠/组)

Fig. 8 RSV-specific SIgA in BAL analyzed by indirect-ELISA (data are average \pm SEM, $n=6$ mice per group).

1: SL7207/pcDNA3.1/Fwt administered intranasally; 2: SL7207/pcDNA3.1/Fsyn administered intranasally; 3: SL7207/pcDNA3.1/Fsyn administered intragastrically.

和抗体效价为 1:10,SL7207/pcDNA3.1/Fwt 滴鼻组、SL7207/pcDNA3.1/Fwt 灌胃组和 SL7207/pcDNA3.1/Fsyn 灌胃组均未能产生可检测的中和抗体,各组均为 6 只小鼠。

3 讨论

以 SL7207 等细菌为载体的 DNA 疫苗经黏膜途径可诱导机体产生有效的系统免疫和黏膜免疫应答,其主要机制是减毒沙门氏菌具有强大的免疫佐

剂作用(LPS、鞭毛及 CpG 序列等),可直接活化并将抗原携带至抗原呈递细胞(antigen presenting cells, APCs),诱导产生强大的 Th1 型免疫应答。常用的两种黏膜免疫途径是口服及鼻内免疫,多数研究认为鼻内免疫优于口服免疫,但也有不同的报道^[4,10]。口服免疫和伤寒沙门菌的自然感染方式是一样的,也是最友好、最安全的一种接种方法,但消化道内含有的成分复杂,胃酸和各种消化酶可能会影响肠道 APCs 对减毒伤寒沙门菌的摄取。由于滴鼻免疫的微环境中干扰因素比口服免疫少,激发的免疫作用也比口服免疫强。但是菌体成分对机体有一定毒性,限制了重组菌的鼻内接种量,对免疫效果会有一定影响,以 SL7207 为递送载体、经滴鼻途径开展 RSV DNA 疫苗研究至今未见报道,另外,作为 RSV 主要的保护性抗原,RSV F 蛋白的免疫原性一直不是十分理想,通过对 F 蛋白的密码子进行优化提高 F 蛋白的表达量,是增强其免疫原性的有效方法^[7-8]。我们的研究结果显示,以 SL7207 为递送载体经滴鼻途径免疫可表达密码子优化的 RSV F 蛋白的 DNA 疫苗能有效提高疫苗的免疫效果。

BALB/c 小鼠体内实验结果表明,与灌胃途径相比,以 SL7207 为递送载体的可表达密码子优化的 RSV F DNA 疫苗鼻内免疫能诱导机体产生更好的体液及黏膜免疫,该发现尚未见文献报道。我们也将野生型 RSV F DNA 疫苗进行了鼻内免疫和灌胃免疫比较,尽管没有产生显著差异($P > 0.05$),但是滴鼻组比灌胃组还是产生了较高滴度的血清 IgG 抗体,我们分析原因可能有 2 个:一是野生型 F 蛋白的免疫原性较弱;二是仅进行了一次免疫,存在一定的操作误差和随机性。实验中我们也发现以 1×10^8 CFU 重组沙门菌滴鼻免疫小鼠时没有出现小鼠死亡现象,但更高剂量滴鼻免疫小鼠时会产生安全性问题(结果未附),因此,我们的结果说明通过选择适当的剂量,滴鼻免疫不仅是安全的,而且可产生比灌胃免疫更好的免疫效果;同时我们的结果也显示,密码子优化的 RSV F 蛋白免疫学效果优于野生型 RSV F 蛋白,密码子优化是提高 RSV F 蛋白免疫原性的有效方法,该结果与已有的报道一致^[7-8]。

值得说明的是,除了小鼠体内实验外,我们也开展了重组菌培养特性及体外稳定性实验,发现重组菌有较好的增殖培养特异性,经 120 h 后仍可稳定携带质粒,与已有的报道基本一致^[9]。但是,在该重组菌体外转基因表达实验中,经过体外感染多种真核细胞系,通过 Western blot 分析等,我们未能发

现转基因的体外表达。分析原因可能是重组菌感染真核细胞的效率较低及分析方法不够灵敏。为证实该重组菌诱导机体产生的免疫应答确为转基因体内有效表达引起,因此,我们取免疫后小鼠血清作为一抗,用于 Western blot 分析纯化的 RSV,结果显示,该免疫血清能特异性识别 F 蛋白,说明重组菌在体内能有效表达,并足以诱导机体产生抗体应答。

单次滴鼻免疫后,在密码子优化的 F 蛋白实验组,发现免疫后第六周的血清中仍能检测出中和抗体,推测该组小鼠产生了具有中和作用的 IgG 抗体,对 RSV 感染可能具有更好的免疫保护作用。而野生型滴鼻组、野生型灌胃组和密码子优化灌胃组免疫后第六周的血清中均未能检测出中和抗体。

总之,我们的研究结果表明,以 SL7207 为递送载体的 RSV DNA 疫苗,滴鼻途径比灌胃途径能诱导更好的体液及黏膜免疫应答,通过对 RSV F 蛋白进行密码子优化可增强其免疫效果,并能诱导产生中和抗体,我们认为滴鼻途径免疫以 SL7207 为递送载体的人呼吸道和胞病毒 F 蛋白 DNA 疫苗能诱导产生较好的免疫效果,为进一步研究其免疫保护作用奠定了坚实的基础。

参考文献

- [1] Brandenburg AH, Neijens HJ, Osterhaus AD. Pathogenesis of RSV lower respiratory tract infection: implications for vaccine development. *Vaccine*, 2001, 19 (20-22): 2769-2782.
- [2] Xie C, He JS, Zhang M, Xue SL, Wu Q, Ding XD, Song W, Yuan Y, Li DL, Zheng XX, Lu YY, Shang Z. Oral Respiratory Syncytial Virus (RSV) DNA vaccine expressing RSV F protein delivered by attenuated *Salmonella typhimurium*. *Human gene therapy*. 2007, 18 (8): 746-752.
- [3] Fu YH, He JS, Wang XB, Zheng XX, Wu Q, Xie C, Zhang M, Wei W, Tang Q, Song JD, Qu JG, Hong T. A prime-boost vaccination strategy using attenuated *Salmonella typhimurium* and a replication-deficient recombinant adenovirus vector elicits protective immunity against human respiratory syncytial virus. *Biochemical and biophysical research communications*, 2010, 395 (1): 87-92.
- [4] Liu WT, Hsu HL, Liang CC, Chuang CC, Lin HC, Liu YT. A comparison of immunogenicity and protective immunity against experimental plague by intranasal and/or combined with oral immunization of mice with attenuated *Salmonella* serovar Typhimurium expressing secreted *Yersinia pestis* F1 and V antigen. *FEMS*

- immunology and medical microbiology*, 2007, 51 (1): 58-69.
- [5] Wada K, Aota S, Tsuchiya R, Ishibashi F, Gojobori T, Ikemura T. Codon usage tabulated from the GenBank genetic sequence data. *Nucleic acids research*, 1990, 18 (supple): 2367-2403.
- [6] Garmory HS, Brown KA, Titball RW. DNA vaccine: improving expression of antigens. *Genetic vaccines and therapy*, 2003, 1 (2): 1-5.
- [7] Ternette N, Tippler B, Uberla K, Grunwald T. Immunogenicity and efficacy of codon optimized DNA vaccines encoding the F-protein of respiratory syncytial virus. *Vaccine*, 2007, 25 (41): 7271-7279.
- [8] Kohlmann R, Schwannecke S, Tippler B, Ternette N, Temchura VV, Tenbusch M, Uberla K, Grunwald T. Protective efficacy and immunogenicity of an Adenoviral Vector vaccine encoding the codon-optimized F protein of Respiratory Syncytial Virus. *Journal of virology*, 2009, 23 (83): 12601-12610.
- [9] Qu DF, Wang SH, Cai WM, Du AF. Protective effect of a DNA vaccine delivered in attenuated *Salmonella typhimurium* against *Toxoplasma gondii* infection in mice. *Vaccine*, 2008, 26 (35): 4541-4548.
- [10] Ryan EJ, Daly LM, Mills KH. Immunomodulators and delivery systems for vaccination by mucosal routes. *Trends in biotechnology*, 2001, 19 (8): 293-304.

Antibody responses induced by mucosal DNA vaccine encoding the codon-optimized F protein of human respiratory syncytial virus (RSV) delivered with attenuated *Salmonella typhimurium*

Ming Cheng^{1, 2}, Jinsheng He^{2*}, Yuanhui Fu², Wei Qiao¹, Yueying Jiao²

¹Department of Immunology, Anhui Medical University, Hefei 230032, China

²College of Life Sciences & Bioengineering, Beijing Jiaotong University, Beijing 100044, China

Abstract: [Objective] In order to investigate antibody responses by mucosal DNA vaccines encoding the codon-optimized F protein of human respiratory syncytial virus (RSV) delivered with attenuated *Salmonella typhimurium* aroA strain SL7207 (SL7207) via intranasal or intragastric routes. [Methods] After the codon-optimized F gene was synthesized, we constructed eukaryotic expression plasmid pcDNA3.1/Fsyn and transformed it into SL7207 to get recombinant SL7207 of SL7207/pcDNA3.1/Fsyn. Then, SL7207/pcDNA3.1/Fsyn was exploited to evaluate its immunogenicity in BALB/c mice administered intranasally or intragastrically. The resultant serum and mucosal antibody responses were analyzed by indirect ELISA. [Results] Compared with intragastric immunization group, intranasal immunization group achieved higher level of RSV specific serum IgG and secretion IgA (SIgA) ($P < 0.05$). Moreover, F protein expressed by the codon-optimized F gene of Fsyn was of elevated immunogenicity, compared with wild type F (Fwt) ($P < 0.05$). [Conclusion] Intranasal immunization and codon optimization approaches can improve antibody responses of RSV DNA vaccine delivered by attenuated *Salmonella typhimurium* aroA strain SL7207.

Keywords: human respiratory syncytial virus, codon-optimized F gene, mucosal administration, attenuated *Salmonella typhimurium* aroA strain SL7207

(本文责编:张晓丽)

Supported by the Beijing Natural Science Foundation of China (7092053)

* Corresponding author. Tel: +86-10-51684080; Fax: +86-10-51683887; Email: jshhe@bjtu.edu.cn

Received: 20 December 2010/ Revised: 4 April 2011