

泛素基因介导下的猪繁殖与呼吸综合征病毒 M 基因对小鼠的免疫试验

张维军¹, 童铁钢¹, 白宇¹, 王群¹, 徐树兰¹, 孙庆歌¹, 田野¹, 杨涛¹, 童光志², 吴东来¹

(¹ 中国农业科学院哈尔滨兽医研究所, 兽医生物技术国家重点实验室, 农业部兽医公共卫生重点开放实验室, 哈尔滨 150001)

(² 中国农业科学院上海兽医研究所, 上海 200241)

摘要:【目的】获得猪繁殖与呼吸综合征病毒(Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome virus, PRRSV)M 蛋白基因及其与泛素(Ubiquitin, Ub)基因融合的真核表达质粒, 并进一步研究 Ub 对 M 基因免疫效果的影响。【方法】利用 RT-PCR 技术以 PRRSV CH-1a 株和 BALB/c 小鼠脾脏组织总 RNA 为模板, 分别扩增出 PRRSV M 蛋白基因与小鼠的 Ub 基因, 利用 SOE 技术将 PRRSV M 基因与小鼠 Ub 基因进行融合, 最终构建真核表达质粒 pVAX1-M 与 pVAX1-U-M。以两种真核表达质粒 DNA 肌肉免疫 BALB/c 小鼠后, 分别检测体液免疫反应与细胞免疫反应, 比较 M 单基因与 Ub-M 融合基因 DNA 免疫所诱生的免疫应答强度【结果】IFA 试验表明, pVAX1-M 与 pVAX1-U-M 均能在 BHK-21 细胞内成功表达目的基因; 两种重组质粒免疫小鼠后均可诱生 PRRSV ELISA 抗体与细胞免疫反应, 但是 pVAX1-U-M 诱导的细胞免疫反应明显高于 pVAX1-M, 差异显著($P < 0.05$); 而其诱导的抗体水平明显低于 pVAX1-M, 二者差异也显著($P < 0.05$)。【结论】泛素在一定程度上可以促进 PRRSV M 基因诱导细胞免疫反应, 但对体液免疫未见同样作用。

关键词: 猪繁殖与呼吸综合征病毒; M 基因; 泛素; 体液免疫; 细胞免疫; DNA 疫苗

中图分类号: S852; Q933 **文献标识码:** A **文章编号:** 0001-6209(2009)06-0799-08

猪繁殖与呼吸综合征(Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome, PRRS)是由 PRRSV 引起猪的一种高度传染性疾病, 临床上以母猪发热、厌食和流产、死胎、木乃伊胎、弱仔等繁殖障碍以及仔猪的呼吸道症状和高死亡率为特征。目前, 根据基因型和抗原型差异将其分为两个亚型: 北美洲型(VR-2332 为代表株)和欧洲型(LV 为代表株)^[1-3]。20 世纪 90 年代以来, PRRSV 几乎已传播到世界上所有养猪的国家, 严重阻碍了世界养猪业的发展。目前使用的灭活苗和弱毒苗存在不足, 如弱毒疫苗有可能出现返祖, 而灭活苗虽安全性较高但其效果远不如弱毒苗等^[4]。为有效的预防和控制该病, 各国学者都致

力于获得一种更安全、高效、廉价的新型疫苗。DNA 疫苗是 20 世纪 90 年代开始研发的一种新型疫苗, 与传统的疫苗相比较有其独特的优势。它不仅可诱导机体产生体液免疫, 而且可诱导细胞免疫, 并可避免机体向外界排毒, 其安全性是传统疫苗所达不到的。该技术问世不久就在感染性疾病及肿瘤防治方面显示出巨大的潜力。

泛素(Ubiquitin, Ub)是一个由 76 个氨基酸残基组成的蛋白质小分子, Ub 依赖性的蛋白质降解途径是目前了解最精细的、有高度选择性的蛋白质降解途径之一。近年来的一些研究表明, Ub 与靶抗原基因的融合表达, 可以使泛素化的靶抗原经蛋白酶体

基金项目: 国家“863 计划”(2006AA10A203); 黑龙江省自然科学基金重点项目(ZJN-0602-01)

* 通信作者。Tel: +86-451-82838446; E-mail: dlwu@hvri.ac.cn

作者简介: 张维军(1978-), 男, 山东临沂人, 博士研究生, 研究方向为分子病毒学与分子免疫学。E-mail: zwj-216@163.com

收稿日期: 2008-12-09; 修回日期: 2009-03-02

降解为 8~10 个氨基酸的小肽,这些短肽被迅速、加工、处理和递呈,并刺激机体 MHC I 分子限制的特异性的 CD8⁺ T 淋巴细胞增殖、分化^[5-7],从而诱发特异性的 CTL 反应,达到增强 DNA 疫苗免疫效果的目的,但同时降低抗体水平^[7-8]。

M 蛋白是 PRRSV 的膜基质蛋白,也是北美洲和欧洲株结构蛋白中最为保守的蛋白。M 蛋白具有较强的免疫原性,可诱导产生一定的中和抗体和特异性细胞免疫应答^[9-11],因而是 DNA 疫苗重要的候选基因。由于 PRRSV M 蛋白具有跨膜的特殊性,利用动物模型来研究 PRRSV M 基因免疫效果的相关报道很少。

本研究用构建的 pVAX1-M、pVAX1-U-M 重组质粒 DNA 免疫小鼠,探讨 PRRSV M 蛋白在免疫中的作用、泛素的功能,为 PRRS 新型疫苗的研究提供基础数据。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 实验材料: PRRSV CH-1a 株、PRRSV 阳性血清、PRRSV 阴性血清、抗 PRRSV M 蛋白单抗由童光志研究员惠赠; AKAV OBE-1 株种毒由日本农林水产省动物卫生研究所惠赠; JM109、DH5 α 、BL21(DE3)感受态细胞、BHK-21 细胞均由本实验室保存; 6-8 周

龄 BALB/c 小鼠购自北京大学医学部实验动物实验中心。

1.1.2 主要试剂和仪器: pVAX1 质粒、LipofectamineTM 2000 Reagent 为 Invitrogen 公司产品; pGEX-6p-1 质粒为 Pharmacia 公司产品。各种限制性内切酶、连接酶、反转录酶、Taq 酶、Pyrobest 酶、pMD18-T Vector、DNA Marker 均为 TaKaRa 公司产品; 质粒小量抽提试剂盒、胶回收小量试剂盒购自上海华舜公司; RNeasy[®] Mini Kit、QIAquick PCR Purification Kit、EndoFree Plasmid Maxi Kit 购自 QIAGEN 公司; 蛋白 Marker 购自 Fermentas 公司; EZ-SepTM Mouse 1 \times Lymphocyte Separation medium 购自达科为生物技术有限公司; 刀豆球蛋白(ConA)、FITC 标记的兔抗猪 IgG 抗体、辣根过氧化物酶标记山羊抗小鼠 IgG 抗体、辣根过氧化物酶标记兔抗猪 IgG 抗体购自 SIGMA 公司; 胎牛血清购自 GIBCOBRL 公司; PE 标记的大鼠抗小鼠 CD8a 抗体、PerCP 标记的土拨鼠抗小鼠 CD3e 抗体购自 Gene Company Limited。

1.1.3 引物: 根据 GenBank 登录的 PRRSV CH-1a 株 M 基因(登录号 AY032626)与小鼠 Ub 基因(登录号 X51703)的序列分别设计引物 RRSV-M-F、PRRSV-M-R、Ub-F、Ub-R(表 1),为保证 PRRSV-M 与 Ub 融合表达后能在 Ub 的介导下进入降解途径,在设计引物时将 Ub 第 76 位的甘氨酸残基 G₇₆ 置换为丙氨酸残基 A₇₆。

表 1 PCR 扩增引物设计

Table 1 Primers designed for PCR

Primes	Sequence(5'→3')	Restriction site and linker
PRRSV-M-F	CCC AAGCTT AGCATGGGGTCGTCTCTAGA	<i>Hind</i> III
PRRSV-M-R	CCG CTCGAGCT ATTT GGCATATTTGACA'	<i>Xho</i> R I
Ub-F	TCA GGATCC GCCGCCG CCATGCAGATTTTCGTG-	<i>Bam</i> H I
Ub-R	<i>GGAGCCTGGAGA</i> AGCACCTCTCAGGCGAAGGAC	
PRRSV-M-Ub -F	<i>TCTCCAGGCTCC</i> ATGGGGTCGTCTCTA	
PRRSV-M-Ub -R	CCC GAATTC CTATTTGGCATAATTTGACAAGGTT	<i>Eco</i> R I
PRRSV-M-JD-F	CCG GAATTC ATGGGAGTGTACTCGGCC ATAG'	<i>Eco</i> R I
PRRSV-M-JD-R	CCG CTCGAGCT ATTTGGCATAATTTGAC	<i>Xho</i> I

The bold letter of primer Ub-F is Kozak sequence; the under line of primer Ub-R represents the designed mutant and the italics letter is the linker sequence.

1.2 PRRSV M 基因与小鼠 Ub 基因的克隆

用 RNeasy[®] Mini Kit 提取 PRRSV CH-1a 株与小鼠脾脏的总 RNA,用随机引物进行逆转录反应后,进行 PCR 扩增,两目的片段的扩增条件均为: 95 $^{\circ}$ C 5 min; 94 $^{\circ}$ C 30 s, 55 $^{\circ}$ C 45 s, 72 $^{\circ}$ C 1 min, 35 个循环; 72 $^{\circ}$ C 延伸 10 min。扩增产物经琼脂糖凝胶电泳、胶回收后与 pMD18-T Vector 连接,连接产物转化至感受态细胞 JM109。经质粒抽提、PCR 鉴定正确后送 Invitrogen 公司测序,鉴定正确的重组质粒分别命名为 pMD-M、pMD-U。

1.3 RRSV-M 蛋白的截短表达、纯化及 Western blot 分析

由于 M 蛋白在体外表达系统中难以表达,在设计引物(表 1)PRRSV-M-JD-F、PRRSV-M-JD-R 时将氨基端疏水性较强氨基酸残基去掉。以重组质粒 pMD-M 为模板 PCR 扩增截短后的 M 基因,扩增产物经纯化、酶切、胶回收后与经同样处理的 pGEX-6P-1 载体连接,连接产物转化感受态细胞 DH5 α ,经质粒抽提、PCR、酶切鉴定正确后送 Invitrogen 公司测序,鉴定正确的重组质粒命名 pGEX-M。将 pGEX-M

转化大肠杆菌 BL21(DE3)感受态细胞, IPTG(终浓度为 0.8 mmol/L)诱导培养 4-6 h, 收集菌体沉淀进行超声破碎。包涵体用含 0.6% 十二烷基肌氨酸钠盐 (SKL) 缓冲液进行缓慢溶解后, 加入终浓度为 0.2% 的 PEG 4000 与终浓度为 1.0 mmol/L 氧化型谷胱甘肽及还原型谷胱甘肽进行复性。然后利用 GST 纯化试剂盒进行纯化。将纯化后的蛋白进行 Western blot 与 SDS-PAGE 分析, 以同样条件处理的 pGEX-6P-1 空载体为对照。

1.4 Ub 基因与 PRRSV M 的融合

利用 SOE 技术将 Ub 基因与 M 基因进行融合, 根据融合原理针对 PRRSV-M 设计上下游引物: PRRSV-M-Ub-F、PRRSV-M-Ub-R(表 1)。以上述构建好的重组质粒 pMD-M 与 pMD-U 为模板进行 PCR 扩增, 对 PRRSV-M 与 Ub 的扩增产物分别进行胶回收, 以回收产物为模板, 以 Ub 基因的上游引物与 PRRSV-M 基因的下游引物进行 PCR, 反应条件为: 95℃ 5 min; 94℃ 30 s; 63.5℃ 45 s; 72℃ 1 min, 35 个循环; 72℃ 延伸 10 min。融合产物经琼脂糖凝胶电泳、胶回收后与 pMD18-T Vector 连接, 连接产物转化至感受态细胞 JM109。经质粒抽提、PCR 鉴定正确后送 Invitrogen 公司测序, 鉴定正确的重组质粒命名为 pMD-U-M。

1.5 真核表达质粒 pVAX1-M 与 pVAX1-U-M 的构建

以重组质粒 pMD-M、pMD-U-M 为模板, 分别以引物(见表 1) PRRSV-M-F、PRRSV-M-R 与 PRRSV-M-Ub-F、PRRSV-M-Ub-R 亚克隆 M 基因与 Ub-M 融合基因, 对其产物进行纯化、酶切、胶回收后与经同样处理的 pVAX1 载体连接, 连接产物转化感受态细胞 DH5 α , 经质粒抽提, PCR、酶切鉴定正确后送 Invitrogen 公司测序, 鉴定正确的重组质粒分别命名为 pVAX1-M、pVAX1-U-M。

1.6 表达产物的间接免疫荧光 (IFA) 实验

按照 Lipofectamine™ 2000 说明书进行操作, 即在转染前一天将 BHK-21 细胞用无抗生素的 DMEM 培养液以每孔 0.5 ~ 2 × 10⁵ cells 接种 24 孔细胞培养板; 次日, 将纯化的阳性重组质粒 pVAX1-M、pVAX1-U-M 与空质粒 pVAX1 在脂质体的介导下转染到长成 80% ~ 90% 的单层 BHK-21 细胞上(质粒转染量为 0.8 μ g)。48 h 后冷丙酮固定 30 min, PBST 洗涤 3 次, 用含有 1% BSA 的 PBS 封闭 2h; PBST 洗涤三次, 加入一抗(抗 PRRSV 阳性血清), 37℃ 作用 2 h; PBST 洗涤 3 次, 接着加入 FITC 标记的兔抗猪的二抗, 37℃ 作用 2 h; PBST 洗涤 3 次, 于荧光显微镜下观察

和拍照。

1.7 小鼠免疫

将 6-8 周龄的 BALB/c 小鼠随机分成 3 组(每组 10 只)。分别肌肉注射免疫 pVAX1、pVAX1-M、pVAX1-U-M, 免疫量为 100 μ g/只, 共免疫 4 次, 每次间隔 3 周。分别在二免、三免、四免后一周(即一免疫后第 49d、70d、91d)分离血清进行 ELISA 抗体水平检测。

1.8 ELISA 抗体水平的检测与分析

以上述原核截短表达、纯化的 PRRSV M 蛋白为检测抗原, 阳性对照的检测抗原为紫外灭活后的全病毒(紫外线照射 25 分钟)。按常规方法建立间接 ELISA 法, 首先通过方阵滴定实验来确定抗原包被浓度与血清稀释浓度, 并在此基础上进一步确定酶标二抗的稀释度, 以确定最佳工作浓度, 建立 ELISA 方法, 同时对试验结果进行统计学分析。

1.9 淋巴细胞增殖试验

根据文献报道^[12-14]的方法进行, 无菌取脾脏分离淋巴细胞, 用含有 10% 的 FBS 的 1640 培养液将细胞计数稀释到 5 × 10⁶ cells/mL, 每孔 100 μ L 加入到 96 孔细胞培养板。以 MOI = 1 的 PRRSV CH-1a 的病毒作为刺激抗原(刺激前病毒经紫外照射 25 min), 每孔加入 100 μ L, 阴性对照孔加入等量的病毒稀释液, 终浓度为 10 μ g/mL 的 ConA 为阳性对照孔。37℃ 下培养 66 h。然后, 每孔加入 5 μ g/mL MTT 22 μ L, 继续培养 6 h。再每孔加入 100 μ L 的 DMSO 溶解结晶, 测定 OD₅₇₀ 的数值。刺激指数的计算方法: 以刺激指数 (SI) 作为判断淋巴细胞转化程度的参数, SI = 质粒 DNA 免疫组 OD 值/空载体组 OD 值, 同时对试验结果进行统计学分析。

1.10 T 淋巴细胞亚群的检测

对实验组小鼠进行安乐死后, 分离脾淋巴细胞, 加入荧光抗体(PE 标记的大鼠抗小鼠 CD8 α 抗体、PerCP 标记的土拨鼠抗小鼠 CD3e 抗体), 4℃ 避光作用 30 min, PBS 洗 2 遍, 加入 500 μ L 荧光保存液, 用 BD FACSCalibur™ 流式细胞仪进行检测, CELLQuest 软件进行分析。

1.11 统计学分析

用方差分析 F 检验-双样本方差分析试验结果, P < 0.05 为差异显著。

2 结果

2.1 PRRSV M 基因及小鼠 Ub 基因的克隆

应用 RT-PCR 方法从 PRRSV CH-1a 株与小鼠脾

脏的总 RNA 分别扩增出了大小为 546bp 与 258bp 的特异性片段,与预期大小相符。

2.2 原核表达重组质粒 pGEX-M 的诱导表达与免疫活性检测

将重组质粒转化大肠杆菌 BL21(DE3)感受态细胞,以终浓度为 0.8 mmol/L IPTG 进行诱导表达,菌体诱导培养物经超声波破碎后进行 SDS-PAGE,结果获得了截短后的大小为 35 kDa 的 PRRSV-M 蛋白(图 1-A),Western blot 实验结果显示在 35 kDa 处出现了反应条带(图 1-B),表达的目的蛋白具有较强的免疫原性。

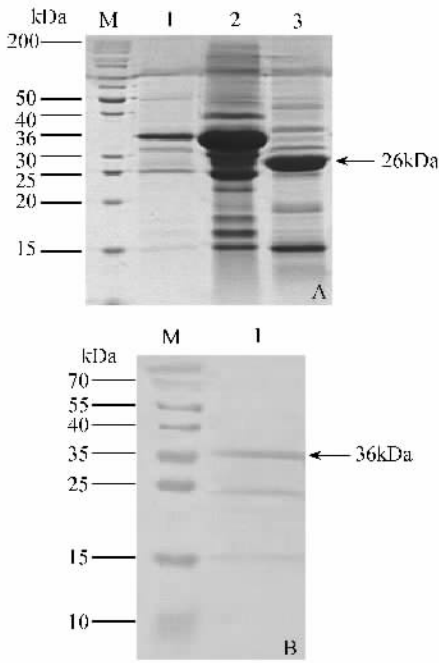


图 1 PRRSV-M 蛋白的 SDS-PAGE(A)和 Western blot (B)实验结果

Fig.1 Analysis of the recombinant protein PRRSV-M by SDS-PAGE (A) and by Western blot (B). A: M. protein mass marker; 1. purified recombinant PRRSV M; 2. unpurified recombinant PRRSV M; 3. pGEX-6P1 expressed in BL21 (DE3). B: M. protein mass marker; 2. recombinant PRRSV M.

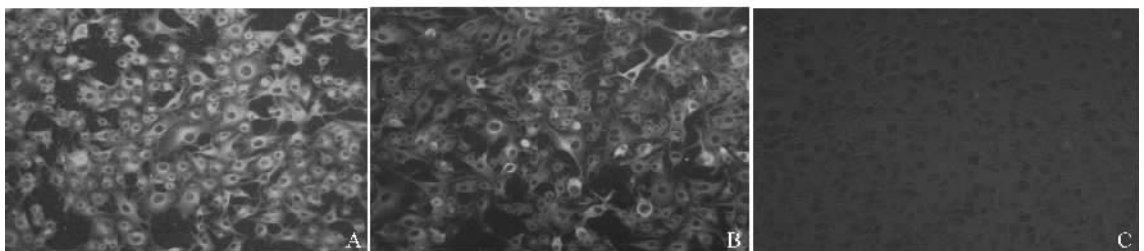


图 2 pVAXI-M 和 pVAXI-U-M 转染 BHK-21 细胞后 IFA 鉴定

Fig.2 IFA result of BHK-21 cells transfected by pVAXI-M and pVAXI-U-M. A: pVAXI-M; B: pVAXI-U-M; C: pVAXI.

2.3 真核重组质粒 pVAXI-M、pVAXI-U-M 的构建

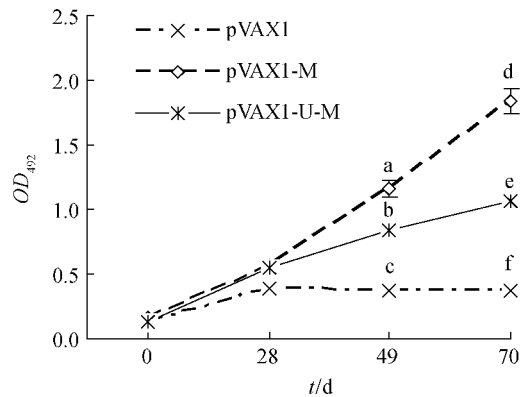
阳性重组质粒 pVAXI-M 经 *Xba* I 酶切后获得了大小分别约为 3000 bp、534 bp 的两条带; pVAXI-U-M 分别经 *Bam*H I 与 *Eco*R I 酶切后获得了大小约为 765 bp、3000 bp 的两条带。条带大小均与预期相符。

2.4 表达产物的间接免疫荧光(IFA)实验 IFA 实验

将重组质粒转染 BHK-21 细胞后,IFA 实验表明 pVAXI-M、pVAXI-U-M 在真核细胞能进行有效的转录,并表达目的蛋白(图 2)。

2.5 免疫后 ELISA 抗体水平的检测

方阵滴定实验的结果表明,抗原包被浓度为 0.5 μ g/mL,血清稀释度为 1:100 时,ELISA 结果的 P/N 值最高,将上述抗原包被浓度和血清稀释度定为本实验的工作浓度。二次免疫之后,重组质粒 pVAXI-M、pVAXI-U-M 均能诱导机体产生抗体(图 3),但是抗体水平较低,并且两免疫组之间未见差异。三免之后小鼠产生的抗体水平明显升高,且两免疫组之间差异显著($P < 0.05$),四免之后的抗体水平继续升高,两免疫组之间差异极显著($P < 0.01$)。



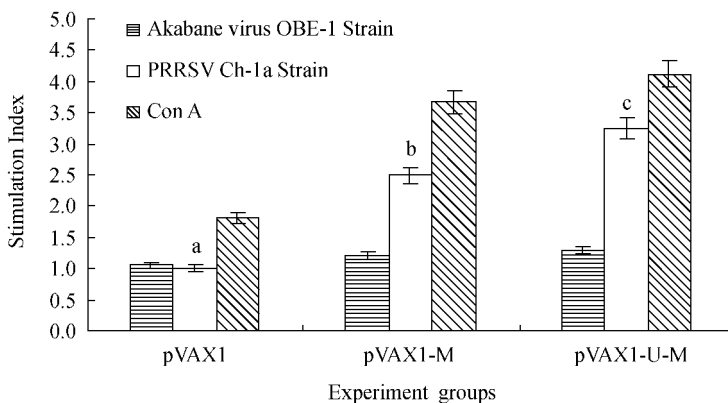
2.3 真核表达质粒 pVAXI-M、pVAXI-U-M 免疫小鼠后,ELISA 抗体水平检测

Fig.3 ELISA antibody responses in mice immunized with pVAXI-M, pVAXI-U-M at different days. The data with different letters are significantly different ($P < 0.05$).

2.6 重组质粒免疫小鼠的淋巴细胞增殖反应

小鼠第一次免疫后 91 天,取脾淋巴细胞进行病毒特异性的淋巴细胞增殖试验,结果表明 pVAX1-

M、pVAX1-U-M 免疫组产生了明显的淋巴细胞增殖应答(图 4),并且两免疫组之间的淋巴细胞增殖程度差异显著($P < 0.05$)。

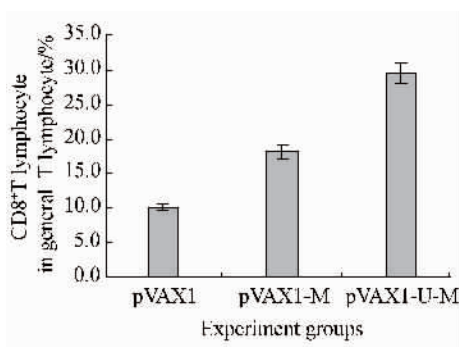


4 pVAX1-M 和 pVAX1-U-M 免疫小鼠后脾淋巴细胞增殖试验

Fig.4 The proliferation of splenocytes from mice immunized with pVAX1-M and pVAX1-U-M. The data with different letters are significantly different ($P < 0.05$).

2.7 CD3⁺ CD8⁺ T 淋巴细胞的阳性率

从第一次免疫后第 91 天,对小鼠实施安乐死,分离脾淋巴细胞,以 CD3⁺ T 淋巴细胞设门,检测 CD8⁺ T 淋巴细胞的阳性率(见图 5,图中只是 CD8⁺ T 在总 T 淋巴细胞的百分数)。结果表明,四次免疫之后两质粒免疫组小鼠脾淋巴细胞中 CD8⁺ T 淋巴细胞的阳性率均明显升高;而且 Ub-M 融合基因所诱导的 CD8⁺ T 淋巴细胞的阳性率明显高于 M 单基因($P < 0.05$)。



5 pVAX1-M 和 pVAX1-U-M 免疫小鼠后脾 CD8⁺ T 淋巴细胞阳性率

Fig.5 The percentages of CD8 + T lymphocyte of mice spleens immunized with pVAX1-M and pVAX1-U-M. The data with different letters are significantly different($P < 0.05$).

3 讨论

1987 年 PRRS 在美国暴发以来,为了防止该病的传播,先后研制出灭活苗和弱毒苗进行了广泛的

预防接种,但是由于传统疫苗存在的安全性和免疫效果等问题^[2],未能控制该病的蔓延,给世界养猪业造成严重影响。同样,PRRS 也严重阻碍了我国养猪业的发展,特别是 2006 年 5 月以来,我国由高致病性 PRRSV 所引起的 PRRS 爆发造成了重大经济损失。

为控制该病的蔓延,各国学者致力于新型疫苗的研发。研究发现该病毒具有 3 个重要的结构蛋白:E 蛋白、M 蛋白和 N 蛋白,这 3 个蛋白分别由病毒基因 ORF5、ORF6 和 ORF7 编码^[9-12],其中 M 蛋白是膜基质蛋白,无糖基化位点。它是北美洲和欧洲株结构蛋白中最为保守的,并具有较强的免疫原性,可诱导产生中和抗体和特异性细胞免疫应答^[10-11],而且其与 GP5 蛋白诱导的免疫反应可能与感染猪清除体内 PRRSV 有关^[15]。张治涛等人研究表明,重组腺病毒表达的 M 蛋白、GP5 及其二者的融合蛋白对猪具有较强的免疫效力^[16]。这些资料均表明,PRRSV M 蛋白在 PRRSV 与机体相互作用的过程中扮演着十分重要的角色。

DNA 疫苗是在上一世纪末开始研发的一种新型疫苗,有巨大的应用潜力,但是其在细胞免疫方面的研究亟需深入。试验证明,进入胞内的抗原分子降解的速度越快,DNA 疫苗诱发的 CTL 活性越高,而 Ub 正好适应了这一需要。蛋白质泛素化降解途径(Ubiquitin proteasome pathway, UUP)发现,引起了研究者的广泛关注。研究表明,26 S 蛋白酶体与主

要组织相容性复合物(MHC)限制性类抗原的处理有密切关系, UPP 是 MHC I 限制性类抗原提呈所必需的环节^[17]。抗原分子泛素化后被 26 S 蛋白酶体降解为多肽, 该多肽与内质网中合成的 MHC I 类分子结合, 高尔基体将所形成的多肽-MHC I 类分子复合物转运至细胞表面, 被 CD8⁺ T 细胞的 TCR 识别, 使之激活。近年来, 很多学者利用 Ub 这一功能来提高 DNA 疫苗的免疫效果, Delogu 等^[18] 构建了融合表达 Ub 与结核分枝杆菌抗原的 DNA 疫苗, 并进行了小鼠免疫试验, 结果发现 DNA 疫苗免疫组小鼠肺部细菌负荷明显低于未免疫组。Rodriguez 等^[19] 构建的真核重组表达质粒可融合表达 Ub 与淋巴细胞性脉络丛脑膜炎病毒的 N 蛋白, 免疫小鼠后虽然没有刺激产生特异性抗体, 却增强了 CTL 功能, 并且攻毒试验证实这种质粒具有很好的保护作用。这种应用在 PRRSV 的其它结构蛋白中也有报道, 蒋文明、任慧英等^[13-14], 构建了 Ub 与 GP5 结构蛋白融合 DNA 疫苗, 并进行了小鼠免疫试验, 结果表明融合质粒 DNA 能够诱生较强的细胞免疫反应。

为提高 M 蛋白的细胞免疫反应, 本研究在构建融合基因 Ub-M 时, 将质粒添加 linker 的方法将两段基因连接成一个大片段, 这样能使两个蛋白的功能彼此不受影响, 以保证 Ub 更好的发挥作用。而且, 为保证 M 蛋白与 Ub 融合表达后能在 Ub 的带领下进入 Ub 降解途径, 从而有效激发机体的细胞免疫功能, 本实验将 Ub 最后一个氨基酸由 Gly 突变为 Ala, 从而避免了去泛素化酶的作用, 确保目的蛋白是以融合体的形式进入细胞内。

考虑到用全病毒检测抗体的敏感性较低, 我们用截短表达的 M 蛋白作为检测抗原建立了 ELISA 方法, 用全病毒与 PRRSV 的阳性血清作为阳性控制, 这样使检测结果更加可靠, 更有利于对 M 蛋白的抗原性进行探讨。经分析发现该蛋白含有大量的疏水性氨基酸完整蛋白很难表达, 我们也做过很多表达试验, 但均未成功。周艳君等研究表明, 体外表达系统难以获得完整的 M 蛋白^[20]。Kreutz LC 等^[21] 利用杆状病毒转移载体 pVL1393 将 VR2332 分离株的 ORF6 基因插入到多角体蛋白启动子下游, 以很低的水平表达了 M 蛋白。而 Plana-Duran 等^[22] 利用杆状病毒表达系统表达西班牙 Olot/91 分离株的 ORF6 基因, 却没有获得成功。所以我们采取截短后

表达的措施, 结果该蛋白以包涵体形式表达。我们通过使用 SKL 缓冲液对蛋白进行了溶解、纯化和复性后获得了该蛋白, 并且保持了很好的免疫原性。

IFA 试验表明, 构建的真核质粒均能在 BHK-21 细胞内表达, 但是 Ub-M 融合基因所产生的荧光强度比 M 单基因的弱, 分析认为是由于目的蛋白在胞内的降解速度加快所导致。淋巴细胞增殖试验与 CD3⁺ CD8⁺ T 检测结果均表明, 两种质粒在小鼠体内均诱生了较高的抗体水平与 T 淋巴细胞增殖, 但是两种质粒诱生的免疫应答强度又有所不同, Ub-M 融合基因所诱生的抗体水平低于 M 单基因, 但是诱导的细胞免疫应答水平却明显高于 M 单基因, 这说明 Ub 在免疫过程中的确加速了蛋白的降解速度, 增强了细胞免疫反应水平。本研究的抗体检测结果与 Barfoed AM 报道^[21] 的不完全一致, 其原因可能是抗体水平的检测方法所导致的, 无论是用全病毒作为检测抗原还是用 IPMA 方法检测抗体, 其敏感性要低于 PRRSV M 重组蛋白作为检测抗原。Ub-M 的免疫结果与 Rodriguez F^[19] 所报道的部分结果趋势相一致, 为 Ub 作为免疫增强剂在临床上的应用提供了依据。当然, 一个外源蛋白在动物机体的免疫效果最终还是要根据本体动物的免疫保护试验来评价。我们将在进一步的工作中开展这方面的研究, 探讨 Ub-M 对本动物的免疫保护效果, 为研究预防 PRRS 的新型疫苗奠定基础。

参考文献

- [1] Mortensen S, Stryhn H, Sogaard R, et al. Christensen J, Willeberg P: Risk factors for infection of sow herds with porcine reproductive and respiratory syndrome (PRRS) virus. *Preventive Veterinary Medicine*, 2002, 53: 83 - 101.
- [2] 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.
- [3] Magar R, Larochelle R, Nelson EA, et al. Differential reactivity of a monoclonal antibody directed to the membrane protein of porcine reproductive and respiratory syndrome virus. *Canadian Journal of Veterinary Research*, 1997, 61: 69 - 71.
- [4] Gurunathan S, Klinman DM, Seder RA. DNA vaccines: immunology, application, and optimization. *Annual Review*

- [5] Michalek MT, Grant EP, Gramm C, et al. A role for the ubiquitin-dependent proteolytic pathway in MHC class I-restricted antigen presentation. *Nature*, 1993, 363: 552 – 554.
- [6] Rock KL, Goldberg AL. Degradation of cell proteins and the generation of MHC class I-presented peptides. *Annual Review of Immunology*, 1999, 17: 739 – 779.
- [7] Tellam J, Connolly G, Webb N, et al. Proteasomal targeting of a viral oncogene abrogates oncogenic phenotype and enhances immunogenicity. *Blood*, 2003, 102: 4535 – 4540.
- [8] Grant EP, Michalek MT, Goldberg AL, et al. Rate of antigen degradation by the ubiquitin-proteasome pathway influences MHC class I presentation. *The Journal of Immunology*, 1995, 155: 3750 – 3758.
- [9] Zhang Y, Sharma RD, Paul PS. Monoclonal antibodies against conformationally dependent epitopes on porcine reproductive and respiratory syndrome virus. *Veterinary Microbiology*, 1998, 63: 125 – 136.
- [10] Bautista EM, Suarez P, Molitor TW. T cell responses to the structural polypeptides of porcine reproductive and respiratory syndrome virus. *Archives of Virology*, 1999, 144: 117 – 134.
- [11] Dea S, Gagnon CA, Mardassi H, et al. Current knowledge on the structural proteins of porcine reproductive and respiratory syndrome (PRRS) virus: comparison of the North American and European isolates. *Archives of Virology*, 2000, 145: 659 – 688.
- [12] 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. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 2006, 109: 151 – 160.
- [13] 蒋文明, 汤玉瑜, 李玉峰, 等. Ubiquitin 基因介导下的 PRRSV GP5 基因免疫特性研究. 中国科技论文在线 (*Sciencepaper Online*), 2007, 2: 83 – 87.
- [14] 任慧英, 杨汉春, 郭鑫, 等. 猪生殖与呼吸综合征病毒 GP5 基因对小鼠的 DNA 免疫. 中国兽医科学 (*Veterinary Science in China*), 2006, 36 (02): 107 – 111.
- [15] Gonin P, Pirzadeh B, Gagnon CA, et al. Sero-neutralization of porcine reproductive and respiratory syndrome virus correlates with antibody response to the GP5 major envelope glycoprotein. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*, 1999, 11: 20 – 26.
- [16] 张治涛, 李玉峰, 姜平, 等. PRRSV GP5 和 M 蛋白重组腺病毒对猪的安全性和免疫效力. 农业生物技术学报 (*Chinese Journal of Agricultural Biotechnology*), 2006, 14 (3): 312 – 318.
- [17] 吕会增. 泛素-蛋白酶体途径在恶性肿瘤中的研究进展. 中国肿瘤 (*China cancer*), 2003, 12(2): 97 – 100.
- [18] Delogu G, Howard A, Collins FM, et al. DNA vaccination against tuberculosis: expression of a ubiquitin-conjugated tuberculosis protein enhances antimycobacterial immunity. *Infection and Immunity*, 2000, 68: 3097 – 3102.
- [19] Rodriguez F, Zhang J, Whitton JL. DNA immunization: ubiquitination of a viral protein enhances cytotoxic T-lymphocyte induction and antiviral protection but abrogates antibody induction. *The Journal of Virology*, 1997, 71: 8497 – 8503.
- [20] 周艳君. 猪繁殖与呼吸综合征病毒结构蛋白单克隆抗体的制备及其抗原表位的鉴定. 东北农业大学博士论文, 2005.
- [21] Kreutz LC, Mengeling WL. Baculovirus expression and immunological detection of the major structural proteins of porcine reproductive and respiratory syndrome virus. *Veterinary Microbiology*, 1997, 59: 1 – 13.
- [22] Plana Duran J, Climent I, Sarraseca J, et al. Baculovirus expression of proteins of porcine reproductive and respiratory syndrome virus strain Olot/91. Involvement of ORF3 and ORF5 proteins in protection. *Virus Genes*, 1997, 14: 19 – 29.
- [21] Barfoed AM, Blixenkron-Moller M, Jensen MH, et al. DNA vaccination of pigs with open reading frame 1-7 of PRRS virus. *Vaccine*, 2004, 22: 3628 – 3641.

Effects of fusion gene of ubiquitin and Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome virus M gene on the immune response in inoculated mice

Weijun Zhang¹, Tiegang Tong¹, Yu Bai¹, Qun Wang¹, Shulan Xu¹, Qingge Sun¹, Ye Tian¹, Tao Yang¹, Guangzhi Tong², Donglai Wu^{1*}

(¹ State Key Laboratory of Veterinary Biotechnology, The Key Laboratory of Veterinary Public Health, Ministry of Agriculture, Harbin Veterinary Research Institute, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Harbin 150001, China)

(² Shanghai Veterinary Research Institute, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Shanghai 200241, China)

Abstract: [Objective] To evaluate the effects of the fusion gene of ubiquitin (Ub) and Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome virus (PRRSV) M gene on the immune response in inoculated mice. [Methods] Mouse Ub gene and PRRSV M gene were amplified by RT-PCR from BALB/c mice spleen cells and PRRSV Ch-1a strain, respectively, and the M and Ub gene (U-M) was fused by SOE PCR. Therefore, pVAX1-U-M and pVAX1-M recombinant plasmid were constructed for eukaryotic expression. [Results] The fusion U-M and M protein expressions were verified in transfected BHK-21 cells by indirect fluorescence assay. Furthermore, both pVAX1-M and pVAX1-U-M induced specific humoral and cellular immune responses against PRRSV in the recombinant plasmid injected mice. However, pVAX1-U-M was able to induce higher level of T cell response than that of pVAX1-M ($P < 0.05$), but lower level of antibody ($P < 0.05$). [Conclusion] Expression of U-M fusion gene had ability to enhance specific T cell response against PRRSV, but no effect on stimulation of humoral response in inoculated mice.

Keywords: PRRSV; M gene; ubiquitin; humoral immunity; cellular immunity; DNA vaccine

(本文责编:王晋芳)

Supported by the National Programs for High Technology Research and Development of China (2006AA10A203) and the Key Project of National Natural Science Foundation of Heilongjiang Province (ZJN-0602-01)

* Corresponding author. Tel: +86-451-82838446; E-mail: dlwu@hvri.ac.cn

Received: 9 December 2008/Revised: 2 March 2009

《微生物学报》答作者问——关于投稿

问: 投稿时都需要哪些手续? 是否还需要纸稿?

答: 从 2006 年起, 本刊开始采用“稿件远程处理系统”。投稿时需要提供:

- (1) 论文研究内容所属单位的介绍信(请注意: 在此强调的是研究内容所属单位, 通常是第一单位), 介绍信主要应证明该文的作者署名无误, 未一稿两投及不涉及保密问题。介绍信模板可从本刊主页“下载专区”或“远程投稿”下载。
- (2) 在接到经过编辑部内审后 E-mail 发出的“稿件受理通知”后, 需要及时补寄纸样的 1 份稿件和介绍信, 并缴纳 100 元稿件受理费。

问: 审稿费需邮局汇款还是转帐?

答: 邮局汇款! 中科院微生物所共有 4 个期刊编辑部, 因此提醒您在办理汇款时一定要注意以下几点, 否则在登记汇款、办理发票时会造成混乱! 编辑部在收到汇款之后, 将以挂号信形式及时寄回发票。

- (1) 切忌在邮寄来的纸样材料中加入 100 元现金!
- (2) 在收款人一栏填写“微生物学报编辑部”;
- (3) 在备注栏中注明“稿件编号”+“第一作者姓名”;
- (4) 通过邮局汇 100 元审稿费, 汇款后请登陆本刊网站, 填写“汇款时间”、“发票单位”和收“发票地址”等信息。编辑部会在收到后及时登记“收款时间”和“寄发票时间”, 作者可随时查询不必打电话来询问。