

猪肺炎支原体 *p97* C 末端基因重组腺病毒的构建及其免疫效果

陈超[#], 李媛[#], 郭丹, 曹培丽, 张美晶, 姜海芳, 乔祖建, 王亮, 辛九庆^{*}

(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 动物细菌病研究室, 哈尔滨 150001)

摘要 【目的】构建携猪肺炎支原体(*Mycoplasma hyopneumoniae*, Mhp)黏附因子 *p97* C 末端基因的重组腺病毒并研究其诱导小鼠产生的免疫反应, 为研制新型 Mhp 疫苗奠定基础。【方法】从 Mhp 基因组中扩增 *p97* C 末端基因, 并将其克隆到穿梭载体 pShuttle-CMV 中, 该重组穿梭质粒经 *Pme* I 线性化后电转化到 BJ5183-AD-1 细胞中进行同源重组获得重组腺病毒 DNA, 纯化后的重组腺病毒质粒经 *Pac* I 酶切线性化后转染 AD293 细胞以获得重组腺病毒。对该重组腺病毒进行 RT-PCR、间接免疫荧光和 Western blot 鉴定, 用氯化铯密度梯度离心纯化试剂盒对该重组腺病毒进行纯化并确定其滴度。重组病毒经肌注、滴鼻两种途径免疫小鼠并从体液免疫、粘膜免疫和细胞免疫 3 个方面对其免疫结果进行分析。【结果】*Pac* I 酶切证实同源重组成功, RT-PCR、间接免疫荧光和 Western blot 鉴定证明了该重组腺病毒成功转录并表达了 *p97* C 末端蛋白, 将该重组病毒进行纯化后滴度可达到 5×10^{11} TCID₅₀/mL, 重组病毒可诱导小鼠产生血清、肺匀浆液特异性 IgG, 通过滴鼻免疫方式还可诱导肺匀浆液 SIgA 的产生, 但不能诱导特异的淋巴细胞增值。【结论】成功构建了表达 *p97* 末端基因的重组腺病毒, 该病毒可诱发小鼠产生特异的体液免疫和粘膜免疫, 但不产生细胞免疫应答。

关键词: 猪肺炎支原体; 猪支原体肺炎; *p97* 基因; 重组腺病毒; 免疫效果

中图分类号: Q933 文献标识码: A 文章编号: 0001-6209(2009)04-0465-05

猪支原体肺炎(*Mycoplasma pneumoniae* of swine, Mps)是一种高接触性、高传染性, 并以高发病率和低死亡率为特点的慢性呼吸道传染病^[1], 在世界范围内对猪的养殖业造成了巨大的经济损失^[2], 其病原猪肺炎支原体(*Mycoplasma hyopneumoniae*, Mhp)也是全球公认的最难净化的病原菌之一^[3]。

Mhp 表面的黏附因子在 Mhp 致病中起关键作用^[4-6], 其对猪呼吸道上皮细胞的粘附能够引起纤毛活性的下降甚至折断脱落, 呼吸系统防御能力下降, 气源性病菌长驱直入, 极易引起呼吸道感染并且容易引发继发感染。目前研究最为深入的粘附因子是 *P97* 蛋白, 1995 年张启敬利用单克隆抗体 *F2G5*

发现粘附因子 *P97*^[7], Hsu 等发现 *P97* C 末端包括 2 个重复区域 R1 和 R2 区, 纤毛结合位点位于 R1 区, 并且需要至少 7 个 AAKPV/E 重复单元才能进行有功能的结合, R2 区位于 R1 区的下游, 可能与 Mhp 粘附在宿主细胞外的基质有关^[8-9]。*P97* 在不同株的 Mhp 中序列比较保守, 经证实 Mhp 的细胞粘附作用的缺失与其 *P97* 的缺失相关^[10], 1990 年 Young 等就发现, Mhp 感染时 *P97* 蛋白引发的免疫反应远远早于其它抗原^[11], 因此 *p97* 可以作为研制 Mhp 新型疫苗的候选基因。本实验利用扩增出的 *p97* 末端基因构建了表达 *P97* C 末端蛋白的复制缺陷型腺病毒并对其免疫效果进行研究, 为研制新型 Mhp 疫苗

基金项目: 农业部院所所长基金(NKLVP200814)

* 通信作者。Tel: +86-451-85935091 Fax: +86-451-82733132 E-mail: xinjiuqing2001@sohu.com

作者简介: [#] 并列第一作者。陈超(1983-)男, 山东蓬莱人, 硕士研究生, 研究方向为动物支原体基因工程疫苗研究, E-mail: chenchaosqx@yahoo.com.cn; 李媛(1972-)山东海阳人, 助研, 硕士, 研究方向为动物分子流行病学与诊断学, E-mail: yuanlee72@126.com

收稿日期: 2008-10-15 修回日期: 2009-01-01

奠定了基础。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 菌株、质粒、细胞猪肺炎支原 *Yin-1* 株是本实验室于 2005 年分离并鉴定的; *E. coli* DH5 α 为 Novagen 公司产品;腺病毒表达载体系统(AdEasy™ XL Adenoviral Vector System)包括穿梭载体 pShuttle-CMV、电转化感受态细胞 BJ5183-AD-1、包装细胞 AD-293 和超级感受态细胞 XL-10 购自 Stratagene 公司。

1.1.2 主要试剂 组织/细胞 DNA 提取试剂盒、小量质粒提取试剂盒和胶回收试剂盒均为上海华舜公司产品;大量质粒提取试剂盒购自 Promega 公司;蛋白质分子量标准、限制性内切酶 *Sal* I、*Kpn* I 和 Pyrobest™ DNA 聚合酶为 Fermentas、MBI 公司产品;兔抗鼠 IgG 酶标二抗、羊抗鼠 FITC 标记二抗为 Sigma 公司产品;转染试剂 lipofectamine™ 2000 购自 Invitrogen 公司;DNA 分子量标准为宝生物工程(大连)有限公司产品,小量腺病毒氯化铯纯化试剂盒购自上海 GenMed 公司,针对 P97 蛋白的单克隆抗体 A3C9(McAb A3C9)由本实验室研制。

1.2 菌株的复苏与 PCR 扩增

以改良 hayflick 培养基复苏 *Yin-1* 株菌种,用组织/细胞 DNA 提取试剂盒提取其基因组 DNA。参照 Mhp 国际标准株 232 株的全基因序列,设计扩增 *p97* C 末端基因的引物:P1: CAGGGTACCATGCCAGCAGCAAAACCA(下划线为 *Kpn* I 位点),P2: CGCGGCTCGACTTACTCAGGAAGGTAATT(下划线为 *Sal* I 位点)。以 *Yin-1* 株基因组 DNA 为模板扩增 *p97* C 末端基因。PCR 反应条件为 95℃ 5 min,94℃ 30 s,52℃ 45 s,72℃ 45 s,35 个循环后,72℃ 10 min。

1.3 插入 *p97* C 末端基因的穿梭质粒 pShuttle-CMV-P97 C 的构建

将 PCR 产物回收后用 *Kpn* I 和 *Sal* I 酶切与穿梭质粒 pShuttle-CMV 连接后,转化到 DH5 α 感受态细胞中。利用 Kan 抗性筛选重组转化子 pShuttle-CMV-P97 C,并经酶切、PCR 鉴定后送上海生工公司测序。

1.4 重组腺病毒 rAd-P97 C 的获得

将用 *Pme* I 酶切线性化的 pShuttle-CMV-P97 C 质粒电转到含有腺病毒骨架载体 pAdEasy-1 的 BJ5183-AD-1 感受态细胞中获得重组腺病毒质粒 pAd-P97 C,*Pac* I 线性化后用 lipofectamine™ 2000 将其转染 AD293 细胞中,待细胞完全病变后反复冻融获取重组腺病毒 rAd-P97 C。

1.5 *p97* C 末端基因在重组腺病毒中转录、表达的鉴定

在长满 AD293 细胞的 96 孔板上接种重组腺病毒 rAd-P97 C,以 P97 单抗(McAb A3C9)为一抗,FITC 标记羊抗小鼠 IgG 为二抗进行间接免疫荧光试验;收取病变细胞提取 RNA,进行 RT-PCR 检测目的基因的转录;用 RIPA 裂解病变的细胞,离心后取上清按常规方法以 P97 单抗为一抗进行 SDS-PAGE 和 Western blot 分析,均以野生型腺病毒感染的细胞作对照。

1.6 重组腺病毒的纯化及滴度测定

将病毒原液 5 倍稀释再次感染 293 细胞,并用琼脂覆盖法进行 3 轮噬斑筛选,每次都经过 Western blot 检测,将最后鉴定为阳性的克隆传代 10 次并大量扩增病毒,用小量腺病毒氯化铯纯化试剂盒纯化重组病毒。将纯化后的病毒进行倍比稀释,用 TCID50 的方法测定其滴度。

1.7 动物实验

以肌注和滴鼻两种途径免疫 6~8 周龄雌性 Balb/c 小鼠,每组 5 只,剂量均为 5×10^7 TCID50/只,以接种野生型腺病毒组为对照,在首免 2 周后加强免疫一次并在首免后 2、4、6、8 周后采集血清,并在第 8 周制备肺匀浆液,以 pET-30a 为载体表达的 P97 C 末端蛋白(P97 C-30a)为抗原,以抗小鼠 IgG,IgA 为二抗进行间接 ELISA;8 周后小鼠处死后取脾以 P97 C-30a、ConA 为刺激物用 MTT 法进行淋巴细胞增值试验。

2 结果

2.1 *p97* C 末端基因的扩增与穿梭质粒 pShuttle-CMV-P97 C 的鉴定

以 *Yin-1* 株基因组为模板扩增 *p97* C 末端基因,得到大小为 670 bp 左右的条带与预期相符。将扩增片段插入到 pShuttle-CMV 穿梭载体中,获得正确的穿梭质粒 pShuttle-CMV-P97 C,经 *Kpn* I + *Sal* I 酶切后电泳显示出预期大小的两条带,即 670 bp 大小的 *p97* C 末端基因条带和 7.5 kb 的 pShuttle-CMV 条带(图略),序列测定结果表明 *p97* C 末端基因插入的位置、大小和读码框架均正确。

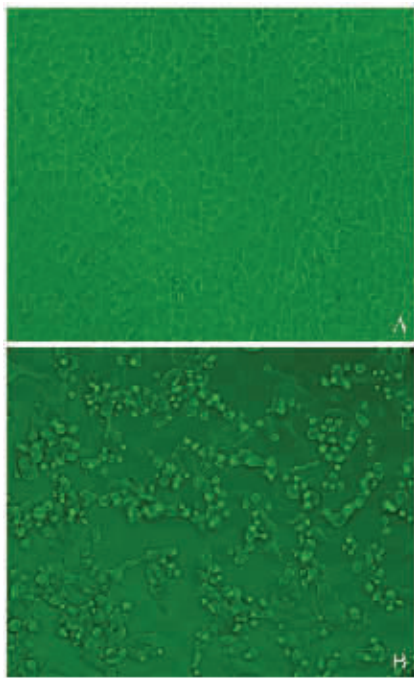
2.2 在大肠杆菌 BJ5183-AD-1 细胞中获得同源重组腺病毒质粒 pAd-P97 C

Pme I 线性化的穿梭载体 pShuttle-CMV-P97 C 与腺病毒骨架载体 pAdEasy-1 在 BJ5183 大肠杆菌内同源重组获得重组腺病毒 DNA,*Pac* I 酶切后经电

泳得到一条 30 kb 的大片段和一条 4.5 kb 的小片段 (图略),获得了重组腺病毒质粒。

2.3 rAd-P97 C 末端腺病毒的制备

鉴定正确的 pAd-P97 C 末端经 *Pac* I 线性化后转染 AD293 细胞,7~10 d 后细胞出现肿胀、圆缩等典型的细胞病变,待 14 d 后细胞完全病变脱壁,收获病变细胞反复冻融后取上清得到重组腺病毒原液,将原液感染 293 细胞可产生明显病变 (图 1)。

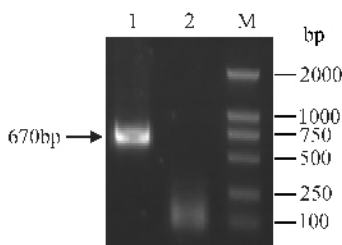


1 AD293 细胞感染重组腺病毒的病变(100 ×)

Fig.1 Cytopathic change of AD293 cells infected by recombinant adenovirus(100 ×). A :normal AD293 cells ;B :cytopathic AD293 cells infected by rAd-P97 C.

2.4 重组腺病毒中 *p97* 基因转录、表达的鉴定

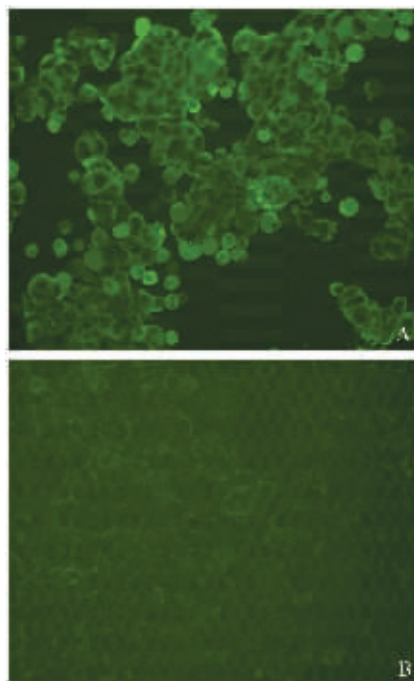
RT-PCR 结果显示 *p97* 基因可以较好的在 AD293 细胞中进行转录(图 2),将重组病毒接种 AD293 细胞进行间接免疫荧光试验,可以发现该重组病毒可以在细胞中表达 P97 C 末端蛋白(图 3);收取接种后病变的细胞进行 SDS-PAGE、Western blot 分析,该重组病毒能在 293 细胞中表达大小约为



2 重组腺病毒 rAd-P97 C 的 RT-PCR 鉴定

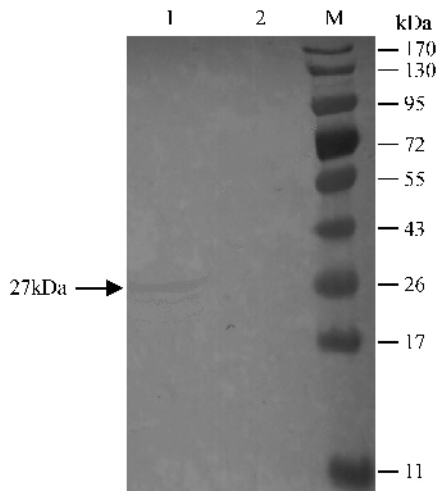
Fig.2 RT-PCR detection of the recombinant adenovirus rAd-P97 C. 1. rAd-P97 C 2. wild type adenovirus ;M. 2000 bp DNA ladder.

27 kDa 的 P97 C 末端蛋白(图 4)。



3 重组腺病毒 P97 C 末端蛋白表达的间接免疫荧光鉴定

Fig.3 Detection of the expression of the P97 C in the recombinant adenovirus by using indirect immunofluorescence assay. A :AD293 cells infected by rAd-P97 C ;B :AD293 cells infected by wild type adenovir.



4 重组腺病毒 P97 C 末端蛋白表达的 Western blot 分析

Fig.4 Detection of the expression of the P97 C in the recombinant adenovirus by Western blot. 1. rAd-P97 C 2. wild type adenovirus ;M. 11-170 kDa prestained protein ladder.

2.5 重组腺病毒的纯化及滴度测定

将原代病毒液感染 293 细胞后用琼脂覆盖,待 4 d 后可以看到明显的噬斑。经氯化铯纯化试剂盒纯化后,可以得到滴度为 5×10^{11} TCID₅₀/mL 的腺病毒。

2.6 重组腺病毒免疫小鼠可产生特异性的 IgG 抗体
重组腺病毒经肌注、滴鼻两种途径免疫小鼠均

可以刺激小鼠产生 P97 C 的特异性血清 IgG 抗体, 首免 2 周后即可检出并在加强免疫后 2 周达到高峰, 在加强免疫 4 周后开始下降(图 5), 并且在加强免疫 6 周后制备的肺匀浆液中, 也都可以检出特异性的 IgG 抗体 ($P < 0.05$) (图 6-A)。

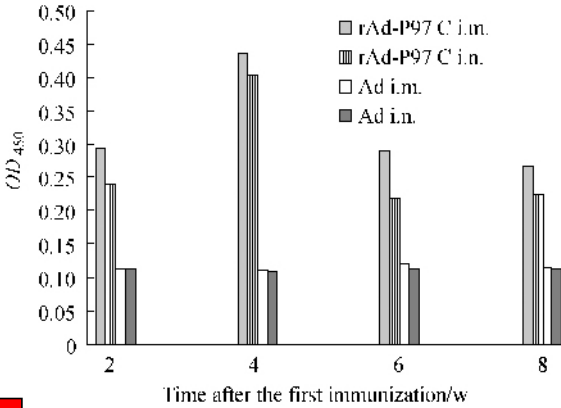


图 5 rAd-P97 C 免疫小鼠后的血清 IgG 的测定

Fig. 5 Determination of Serum IgG induced by rAd-P97 C after immunization in mice.

2.7 滴鼻免疫可刺激小鼠产生特异性的粘膜免疫

将各组小鼠在首免 8 周后将其处死制备肺匀浆液以分析其呼吸道粘膜免疫情况。其中滴鼻免疫组相对于对照组能产生特异性 SIgA ($P < 0.05$), 而肌注组则不能产生特异性 SIgA ($P > 0.05$)。SIgA 的检测能够反映粘膜免疫的状况, 所以滴鼻组能刺激小

鼠产生特异性的粘膜免疫(图 6-B)。

2.8 重组腺病毒不刺激小鼠产生特异的细胞免疫

淋巴细胞增值实验结果显示, ConA 可非特异的诱导各组小鼠产生明显的淋巴细胞增值反应, $5.9 < SI < 10.5$, 平均为 7.2, 而 P97 C-30a 则不诱导任何实验组和对照组产生小鼠淋巴细胞增值, $0.95 < SI < 1.06$, 差异不显著 ($P > 0.05$)。这表明 rAd-P97 C 重组腺病毒以滴鼻和肌注两种方式免疫小鼠都不能产生特异的细胞免疫应答。

3 讨论

Mps 是由 Mhp 引起的世界范围内危害养猪业的疾病, 针对该病的药物治疗效果不够理想, 停药后容易复发, 该病一旦在猪场流行, 就很难根除^[12], 因此疫苗预防对该病的防控起着关键性作用。目前国内研究应用的 Mhp 疫苗以灭活苗和弱毒苗为主, 但这些疫苗存在着产量低、成本高、反应较大、免疫途径不易被一般用户接受等缺陷, 迫切需要研制一种高效、安全、廉价的新型疫苗来控制该病的流行。

近年各国学者在研制 Mhp 亚单位疫苗和活载体疫苗方面取得了令人鼓舞的进展, 其中 P97 是研究比较深入的一种 Mhp 纤毛结合蛋白, 它的单克隆抗体能够阻止 Mhp 在猪纤毛上的粘附^[7], 但利用原核表达系统研制的 P97 重组亚单位疫苗不能阻止 Mhp 对猪的感染也不能降低其对猪肺部造成的损害^[14]。另外将 P97 R1 区基因无论插入到沙门氏杆菌还是丹毒丝菌表达载体内, 免疫动物后在血清中均检测不到针对 P97 的特异性抗体, 但均产生细胞免疫应答并可以降低 Mhp 对猪肺部的损害^[15-16], 这可能是用原核表达载体表达的 P97 蛋白不能进行正确的折叠和修饰以至于降低了它的免疫原性。而 E1/E3 区缺失的复制缺陷型腺病毒载体则具有这方面的优势, 并且它的宿主细胞广泛, 转导效率高, 表达水平高, 易繁殖和纯化, 病毒滴度高。复制缺陷型腺病毒在体内对细胞只发生一次性感染, 不整合到宿主细胞基因组中, 不会导致环境污染, 能够很好地将目的抗原递呈给递呈细胞从而产生免疫应答^[17], 更重要的是其经黏膜接种可非侵入性地高效诱导机体粘膜免疫应答^[18], 而粘膜免疫对于阻止 Mhp 在呼吸道的黏附具有重要意义。

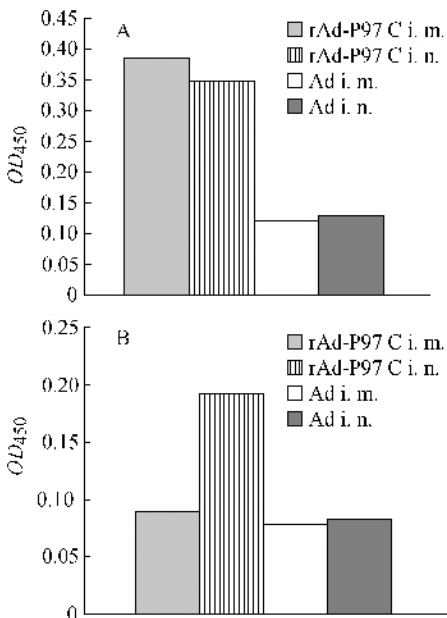


图 6 小鼠肺匀浆液 IgG 和 IgA 的测定

Fig. 6 Determination of lung homogenate IgG and IgA of the mice. A: Determination of lung homogenate IgG of the mice; B: Determination of lung homogenate IgA of the mice.

AdEasy 是国内外应用最广泛的构建重组腺病毒的系统, 该系统可在原核细胞 *E. coli* BJ5183 中完成穿梭载体与骨架载体之间的同源重组, 极大简化了载体构建过程。我们选用的 AdEasy^{XL}是 AdEasy

系统的改良换代产品,原来的 AdEasy 系统要求用两个载体共转化到 BJ5183 细胞,而 AdEasy^{XL}只需将穿梭载体转化到含有骨架载体的 BJ5183-AD-1 感受态细胞里就可以了,可明显地提高重组成功率和目的基因在重组腺病毒载体的表达能力。本实验两个载体的重组率可达到 90% 并且 Western blot 和间接免疫荧光能鉴定出目的蛋白的表达。此外,该系统携带的 AD293 细胞相比于传统使用的 HEK293 细胞具有更好的贴壁性能和生产病毒的能力。扩增收获的病毒液中含有大量的缺损颗粒、细胞毒素、培养基、血清及细胞碎片等杂质,免疫动物会引起强烈的免疫反应,因此需要病毒纯化,传统的氯化铯密度梯度离心虽行之有效,但技术要求高,花费时间长,而基于离子交换层析技术的纯化试剂盒虽然可以快速简便地纯化腺病毒,但是价格昂贵,因此本实验选择了 GenMed 公司的腺病毒氯化铯纯化试剂盒进行纯化,只进行一次高速离心大大简化了纯化步骤,纯化一次后可获得滴度为 5×10^{11} TCID₅₀/mL 的重组腺病毒 2 mL,可以满足少量动物免疫试验的要求。

动物试验结果表明该重组病毒能够刺激小鼠产生针对 P97C 末端蛋白的体液免疫反应,并且通过滴鼻途径还能够刺激小鼠产生呼吸道粘膜免疫反应,但不能产生特异的细胞免疫应答,并且从总体上看其产生的体液免疫反应水平也不高,这可能是由于以下原因造成:一是可能因为该猪肺炎支原体基因存在较多的不适宜在哺乳细胞体内翻译的密码子,以至于其表达量不够而不能引起动物体高水平的免疫应答,这可以通过优化其阅读框的密码子来增加其表达量;再可能是因为该系统表达的 P97C 末端蛋白仍存在免疫原性过低的问题,这可以通过其串联 LTB^[19]、DnaK^[20]等基因来增加其抗原性,并且可以探索构建其他猪肺炎支原保护性抗原的重组腺病毒如 p102 基因^[21]、p159^[22]基因等。

本试验在国内首次成功构建了高滴度高纯度的表达 P97 C 末端基因的重组腺病毒,并通过动物实验证明其可以产生低水平的特异性体液免疫应答反应,但不诱导产生细胞免疫应答反应,为下一步的猪肺炎支原体新型疫苗的研制提供了一些启示。

参考文献

[1] Clark LK , Armstrong CH , Freeman MJ. Investigating the transmission of *Mycoplasma hyopneumoniae* in a swine herd with enzootic pneumoniae. *Veterinary Medicine* ,1998 ,86 : 543.

[2] Leman AD ,Stein BS ,Hilley HD. Pneumoniae of Swine :It's cost and value of control. *Modern Veterinary Practice* ,1982 , 63 :195.

[3] 曹玉璞 ,叶元康.支原体与支原体病.北京:人民卫生出版社,2000,175-180.

[4] Beachey RH. Bacterial adherence: adhesion-receptor interactions mediating the attachment of bacteria to mucosal surface. *Infectious Diseases* ,1981 ,143 :325-345.

[5] 张启敬.猪肺炎霉形体免疫弱毒株的超微结构及致病性的关系.电子显微学报(*Electron Microscopy*),1990,9(1):5-9.

[6] Blanchard B , Cavaler A , Kobisch M , et al. Electron microscopic observation of the respiratory tract of SPF piglets inoculated with *Mycoplasma hyopneumoniae*. *Veterinary Microbiology* ,1992 ,3(4) :329-341.

[7] Zhang Qi-jing ,Young TF ,Ross RF ,et al. Identification and characterization of a *Mycoplasma hyopneumoniae* adhesion. *Infection and Immunity* ,1995 ,63(3) :1013-1019.

[8] Hsu T , Artiushin S , Minion FC. Cloning and functional analysis of the P97 swine cilium adhesion gene of *Mycoplasma hyopneumoniae*. *Journal of Bacteriology* ,1997 , 179(4) :1317-1323.

[9] Hsu T , Minion FC. Identification of the cilium binding epitope of the *Mycoplasma hyopneumoniae* P97 adhesin. *Infection and Immunity* ,1998 ,66(10) :4762-4766.

[10] Wilton JL , Scarman MJ , Walker , et al. Reiterated repeat region variability in the ciliary adhesion gene of *Mycoplasma hyopneumoniae*. *Microbiology* ,1998 ,144 :1931-1943.

[11] Thacker EL ,Thacker BJ ,Kuhn M ,et al. Evaluation of local and systemic immune responses induced by intramuscular injection of a *Mycoplasma hyopneumoniae* bacterin to pigs. *American Journal of Veterinary Research* ,2000 ,61(11) :1384-1389.

[12] Haesebrouck P ,Pasmans ,Chiers D ,et al. Efficacy of Vaccines against bacterial diseases in swine ,what can we expect? *Microbiology* ,2004 ,100 :255-268.

[13] Kobisch M ,Friis. Swine Mycoplasmaoses. *Revue scientifique et technique (International Office of Epizootics)* ,1996 ,15 : 1569-1605.

[14] King KW ,Faulds DH ,Rosey EL ,et al. Characterization of the gene encoding Mhp1 from *Mycoplasma hyopneumoniae* and examination of Mhp1's Vaccine potential. *Vaccine* , 1997 ,15 :25-35.

[15] Chen YA , Fry RS , Faulkner FJ. Evaluation of the immunogenicity of the P97R1 adhesin of *Mycoplasma hyopneumoniae* as a mucosal vaccine in mice. *Journal of Medical Microbiology* ,2006 ,55 :923-929.

- [16] Yoshihiro S ,Eijio ,Yoshihiro M ,et al. Vaccine efficacy of the attenuated *Erysipelothrix rhusiopathiae* YS-19 expressing a recombinant protein of *Mycoplasma hyopneumoniae* P97 adhesin against mycoplasmal pneumonia of swine. *Vaccine* , 2003 21(6) 532 – 537.
- [17] Tatsis N , Ertl HC. Adenovirus as vectors. *Molecular Therapy : the Journal of the American Society of Gene Therapy* 2004 ,10 616 – 629.
- [18] 于龙等. 重组腺病毒载体疫苗黏膜免疫机制与途径研究. *微生物学免疫学进展(Progress in Microbiology and Immunology)* 2007 35(3) 69 – 73.
- [19] Fabricio RC ,Angela NM ,Odir AD. A recombinant chimera composed of R1 repeat region of *Mycoplasma hyopneumoniae* P97 adhesin with *Escherichia coli* heat-labile enterotoxin B subunit elicits immune response in mice. *Vaccine* 2006 24 : 5734 – 5743.
- [20] Chou SY ,Chung TL ,Chen RJ ,et al. . Molecular cloning and analysis of a HSP(heat shock protein)-like 42 kDa antigen gene of *Mycoplasma hyopneumoniae* *Biochem. Biochemistry and Molecular Biology International* ,1997 ,41(4) :821 – 831.
- [21] Cary A ,Joshua P ,F. Chris Minion. In vivo expression analysis of the P97 and P102 paralog families of *Mycoplasma hyopneumoniae*. *Infection and Immunity* ,2005 ,73(11) : 7784 – 7787.
- [22] Tracey AB ,Katrin D , et al. P159 is a proteolytically processed surface adhesion of *Mycoplasma hyopneumoniae* : defined domains of P159 bind heparin and promote adherence to eukaryote cells. *Molecular Microbiology* ,2006 ,50(3) : 669 – 686.

Construction of the recombinant adenovirus expressing the C-Terminal of the *Mycoplasma hyopneumoniae* p97 gene and its immune response

Chao Chen[#] ,Yuan Li[#] ,Dan Guo ,Peili Cao ,Meijing Zhang ,Haifang Jiang ,Zujian Qiao ,Liang Wang ,Jiuqing Xin^{*}
(Division of Bacterial Disease ,State Key Laboratory of Veterinary Biotechnology ,Harbin Veterinary Research Institute of Chinese Academy of Agricultural Sciences ,Harbin 150001 ,China)

Abstract [Objective] To construct recombinant adenovirus carrying C-Terminal of the adhesion factor gene p97 of *Mycoplasma hyopneumoniae* (Mhp) so as to provide basis for further studying new type Mhp vaccine. **[Methods]** We amplified p97 gene from the genome of Mhp and cloned into pShuttle-CMV plasmid. The correctly identified recombinant plasmid was linearized with *Pme* I and transformed into *E. coli* BJ5183-AD-1 competent cells containing adenovirus backbone vector to produce recombinant adenovirus DNA by homologous recombination. Purified recombinant adenovirus plasmid was linearized with *Pac* I , and transfected into AD293 cells to obtain recombinant adenovirus. The recombinant adenovirus was identified by RT-PCR , indirect immunofluorescence assay and Western blot and purified by cesium chloride density centrifugation kit ,then its titer was determined. Balb/c mice were immunized with recombinant adenovirus via intramuscular and intranasal routes and analysis the immunity results through humoral immunity ,mucosal immunity and cell-mediated immunity aspect. **[Results]** Digestion by *Pac* I proved successful homologous recombination. RT-PCR ,Indirect immunofluorescence assay and Western Blot showed that the recombinant adenovirus transcribed and expressed P97 C-terminal protein successfully ,the titer could achieve to 5×10^{11} TCID50/mL after purification. Inoculation with the recombinant adenovirus by each route elicited P97 C-terminal protein specific serum and lung homogenate IgG and SIgA was induced by intranasal route ,but the special lymphocyte proliferation was not induced by each route. **[Conclusion]** The recombinant adenovirus expressing p97-Terminal gene was successfully constructed and it induced special humoral and mucosal immunity but no cell-mediated immunity.

Keywords : *Mycoplasma hyopneumoniae* ; mycoplasma pneumoniae of swine ; p97 gene ; recombinant adenovirus ; immune response

(本文责编 :张晓丽)

Supported by the Dean and Director Foundation of Ministry of Agriculture Superintendent (NKLVB200814)

* Corresponding author. Tel : + 86-451-85935091 ;Fax : + 86-451-82733132 ;E-mail :xinjiuqing2001@sohu.com

Those authors contributed equally to this work

Received :15 October 2008/ Revised :1 January 2009