

264-271

10

猪瘟病毒 E2 基因真核表达质粒的  
构建及基因疫苗的研究\*

S852182

余兴龙<sup>1</sup>, 涂长春<sup>1\*\*</sup>, 李红卫<sup>1</sup>, 陈创夫<sup>2</sup>, 李作生<sup>1</sup>  
马正海<sup>1</sup>, 孙明<sup>1</sup>, 殷震<sup>1</sup><sup>1</sup>(解放军农牧大学 军事兽医研究所, 长春 130062)<sup>2</sup>(新疆塔里木农垦大学, 新疆阿拉尔 843300)

**摘要:** 构建了猪瘟病毒(classical swine fever virus, CSFV)主要保护性抗原 E2 基因 4 种不同的真核表达质粒。小鼠免疫试验表明, E2 基因上不同的功能区对基因疫苗的免疫应答有很大影响, 有信号肽序列的 E2 基因可诱导产生特异性免疫反应, 且无跨膜区序列的 E2 基因所诱导的免疫应答反应比有跨膜区序列的强, 而无信号肽序列的 E2 基因则不能诱导产生 CSFV 特异性的免疫反应。攻毒保护试验表明, 免疫家兔最少可抵抗 10 个最小感染剂量(MID)的猪瘟兔化弱毒苗(Hog cholera lap-inized virus, HCLV)的攻击; 免疫猪可抵抗致死剂量的 CSFV 石门株强毒的攻击。

**关键词:** 猪瘟病毒; E2 基因; 真核表达质粒; 基因疫苗

**中图分类号:** Q78, S852.4   **文献标识码:** A   **文章编号:** 1003-5125(2000)03-0264-08

基因免疫(Genetic Immunization)是 90 年代免疫学新出现的一个研究领域<sup>[1]</sup>, 其概念是将编码某种目的抗原蛋白的基因置于真核表达元件的控制之下, 并将其直接导入动物机体内, 通过宿主细胞的转录系统合成抗原蛋白, 从而诱导宿主产生对该抗原蛋白的免疫应答, 以达到预防和治疗疾病的目的。这种能刺激动物机体产生免疫应答反应的构建物, 称为基因疫苗(也称核酸疫苗或裸 DNA 疫苗)。体内基因直接导入法最初用于人体基因治疗试验。人们发现将基因直接在体内转染细胞, 目的基因亦可在机体内表达。据此, 1990 年 Wolff<sup>[1]</sup>认为向机体内直接导入基因以表达抗原蛋白可以作为一种免疫方法。1992 年, Tang 等<sup>[2]</sup>用实验证实了这一设想, 他们将人生长激素基因的质粒 DNA 用基因枪导入小鼠皮肤上皮细胞, 几周后, 88% (30/34)的小鼠产生了抗人生长激素的抗体。由于具有以往形式的疫苗所没有的诸多优点, 基因疫苗一出现就立即引起了许多免疫学家和疫苗生产厂家的巨大兴趣, 被喻为是疫苗发展过程中的又一次革命。在短短的几年时间内, 基因免疫的发展十分迅速, 目前, 其主要研究目标已从前几年证实基因免疫的可行性转入到了研究基因免疫的免疫机理和提高基因免疫应答水平两个方面来。

收稿日期: 1999-03-11, 修回日期: 1999-09-10

\* 基金项目: 国家九五科技攻关计划资助项目(96C010401)

作者简介: 余兴龙(1965 年-), 男, 湖南省平江县人, 助理研究员, 博士, 主要从事动物病毒的防治研究工作。

\*\* 通讯作者: 涂长春(1962 年-), 男, 重庆人, 研究员, 硕士, 主要从事动物病毒的防治研究工作。

猪瘟(CSF)是危害我国养猪业最严重的传染病。尽管 HCLV 的广泛应用及其它综合防制措施的实施,已控制了 CSF 的大规模流行,但该病仍在我国广大养猪地区不断发生和小规模流行。近年来,免疫失败现象频频发生及非典型 CSF 的出现,可能产生了 HCLV 不能完全保护的 CSFV 变异株,引起了人们对 HCLV 的重新审视。因此,有必要研制新型的 CSF 疫苗及建立新的预防手段。本实验构建并筛选得到了免疫效果良好的 CSFV 的基因疫苗质粒,为 CSF 基因疫苗的研制打下了良好的基础。现报告如下。

## 1 材料与方 法

### 1.1 材 料

#### 1.1.1 质粒、细菌与细胞

pcDNA3 购自 Invitrogen 公司, DH5 $\alpha$  和 JM109 宿主菌和 BHK-21 细胞均为本室保存。

#### 1.1.2 生化试剂、免疫学试剂、细胞培养基

辣根过氧化物酶标记的羊抗鼠和兔抗猪 IgG 为 Sigma 公司产品, lipofectin reagent 和 PRMI-1640 培养基为 Gibco 公司产品。

#### 1.1.3 分子生物学试剂

各种内切酶、T<sub>4</sub>DNA 连接酶、Taq DNA 多聚酶、dNTP 分别购自 Promega 公司、Gibco 公司和华美生物工程公司。

#### 1.1.4 实验动物

昆明种小鼠、青紫蓝家兔由长春药检所动物室或本校实验动物中心提供。实验猪购自长春市郊区农户,系自繁自养、未接种过任何疫苗、健康状况良好、间接 ELISA<sup>[6]</sup>检测表明猪血清为 CSFV 抗体阴性。

### 1.2 方 法

#### 1.2.1 CSFV E2 基因真核表达载体的构建

根据 CSFV 石门株 E2 基因的核苷酸序列<sup>[3]</sup>合成以下 4 条 CSFV E2 基因引物:

Ps: 5'-CGGGATCCGCCACCATGGTATTAAGAGGACAGGTCGTGC-3'

Pws: 5'-CGGGATCCGCCACCATGGGCCGGCTAGCCTGCAAG-3'

Pt: 5'-CGGAATTCCTACTGTAGACCAGCGCGAGCTGTTC-3'

Pwt: 5'-CGGAATTCCTAGTCAAACCACTACTGATACTCGCC-3'

划线者为 CSFV 基因组上的序列,其余为便于克隆的酶切位点和与真核基因表达有关的序列。将 4 条引物进行以下 4 种不同的组合,即:Ps-Pt, Ps-Pwt, Pws-Pt 和 Pws-Pwt,以 pHCE2<sup>[3]</sup>为模板,用 PCR 的方法扩增 CSFV E2 基因。它们所扩增的 E2 基因片段分别命名为:ST、SW、WT 和 WW。PCR 扩增按以下两个程序进行,参数如下:程序 1: 95℃ 60 s, 72℃ 60 s, 50℃ 70 s 5 个循环;程序 2: 95℃ 60 s, 72℃ 60 s, 60℃ 70 s 30 个循环。

PCR 扩增完毕,取 5  $\mu$ L 以琼脂糖凝胶电泳进行鉴定,其余置 -20℃ 保存备用。将 4 种 PCR 产物 ST、SW、WT 和 WW 分别用 BamHI 和 EcoRI 双酶切,然后将酶切产物分别克隆入载体 pcDNA3 相应的酶切位点,构建成 4 种不同的 CSFV E2 基因真核表达质粒 pcDST、pcDSW、pcDWT 和 pcDWW。以多种限制性内切酶酶切分析和核苷酸序列测定确定所克隆质粒的正确性。4 种质粒所编码 E2 基因的范围如下:pcDST 有信号肽有跨膜区;pcDSW 有信号肽无跨膜区;pcDWT 无信号肽有跨膜区;pcDWW 无信号肽无跨膜区。

#### 1.2.2 质粒的大量提取与纯化

根据 Wicks<sup>[4]</sup>的方法作适当修改进行,即先用溶菌酶处理细菌,去掉其细胞壁,离心后收集原生质体,再从原生质体中提取和纯化质粒。

#### 1.2.3 疫苗质粒的细胞表达试验

将上述4种疫苗质粒纯化后,各取5 $\mu$ g,分别用10 $\mu$ L lipofectin reagent包裹后转染长成40%~60%满度的BHK-21细胞。12h后,加G418进行加压筛选,待对照细胞死亡而转染细胞长满后,将细胞传代,48h后,分别收集转染细胞的上清和转染细胞,用抗CSFV酶标抗体(本室标记)检测其中的E2抗原。

#### 1.2.4 原位杂交检测肌细胞对疫苗质粒的摄取

按B.M.公司的说明书以地高辛标记纯化的E2基因制成探针,取基因疫苗接种部位的肌肉,用4%的多聚甲醛固定后,按常规法包埋,切片。按文献[5]用地高辛标记的E2基因探针对组织切片进行杂交并显色,在显微镜下观察结果。

#### 1.2.5 动物免疫试验

##### 1.2.5.1 小鼠免疫试验

将纯化的上述4种疫苗质粒及pcDNA3载体,分别溶解于pH7.2的PBS(1mg/mL)中,分别免疫体重约20g左右的昆明雌性小鼠。免疫方法为:两后腿前肌肌肉注射。接种量100 $\mu$ g/鼠。共免疫两次,每月接种一次。

将纯化的pcDST、pcDSW和pcDNA3质粒分别溶解在25%的蔗糖中,使之含量为0.5mg/mL,然后将它们分别免疫小鼠。接种方法如上,接种量50 $\mu$ g/鼠。共免疫三次,每次间隔20d。

##### 1.2.5.2 CSFV E2基因疫苗的动物保护试验

免疫兔:用2~2.5kg的青紫蓝兔6只,试验前观察3d,每天测体温两次,观察体温是否正常。将纯化质粒pcDST、pcDSW和pcDNA3分别溶解于pH7.2的PBS中,含量1mg/mL。每一质粒免疫2只兔。方法是胫前肌肌肉注射(每兔1mg,接种前在接种部位预先注射25%蔗糖溶液0.5mL)和皮内注射(每兔共200 $\mu$ g,分10点注射,每点20 $\mu$ g质粒)。免疫3次,每2次间隔2周。最后一次免疫后2周,按每兔10个MID剂量的HCLV以耳静脉接种进行攻毒试验,连接观察体温反应一周。

免疫猪:2月龄CSFV血清抗体阴性猪8头,试验前亦如上观察3d。将纯化质粒pcDSW和pcDNA3分别溶解于pH7.2的PBS中,含量1mg/mL。将2种质粒溶液分别加入到等量1%甘油、4.5%斯苯的混合液(1%甘油、4.5%斯苯对基因免疫有较强的促进作用,结果见另文)中,用力振荡混匀后,接种四肢肌肉(每肢接种1个部位,每个部位0.5mL)和于耳朵进行皮内接种(分10点接种,每点20 $\mu$ L)。共免疫3次,每次间隔15d。pcDSW免疫6头猪,pcDNA3免疫2头猪。最后一次免疫后15d以致死剂量的CSFV石门强毒以肌肉接种途径进行攻击。并分别于免疫后0、15、30和45d及攻毒后一周采血分离血清,以PBS稀释200倍后以间接ELISA检测血清中的抗CSFV抗体<sup>[6]</sup>。

## 2 结果

### 2.1 CSFV E2基因真核表达载体的构建

将合成的4条引物以4种不同的组合用PCR的方法扩增CSFV E2基因。所扩增的4种PCR产物ST、SW、WT和WW经琼脂糖电泳表明大小均与预计相符(图略),分别为(均包括引物上外加的碱基):ST 1216 bp, SW 1075 bp, WT 1156 bp, WW 1015 bp。ST、SW、WT和WW 4种E2基因PCR产物用BamH I和EcoR I双酶切之后,克隆到真核表达质粒pcDNA3的相应的酶切位点之间。对重组子快速筛选和多种酶切鉴定,筛选到4种真核表达质粒pcDST、pcDSW、pcDWT和pcDWW(图略)。4种质粒经BamH I和EcoR I双酶切鉴定结果如图1。由图可见,4种质粒均可切出预计大小的片段。经ABI 377全自动DNA序列分析仪测定4种质粒的核苷酸序列正确。4种质粒的构建策略如图2。

### 2.2 CSFV基因疫苗质粒的细胞表达试验

4种纯化的疫苗质粒在lipofectin reagent包裹后转染BHK-21细胞,在G418加压下,转染细胞长成单层。单层细胞传代后,48h后用直接ELISA测定其上清及细胞中的E2抗原。结

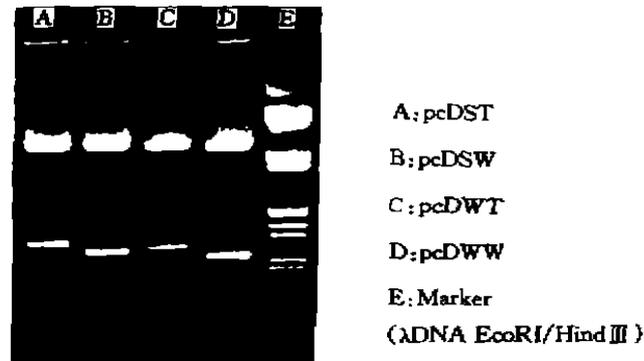


图1 猪瘟病毒 E2 基因真核表达质粒的酶切鉴定

Fig. 1 Restriction enzyme analysis of eukaryotic expression plasmids of CSFV E2 gene

果 pcDWT 和 pcDWW 转染的细胞及上清中均未检测到 E2 蛋白,而 pcDST、pcDSW 转染细胞均可表达 E2 基因,pcDST 转染细胞 E2 仅存在于细胞中,而 pcDSW 的 E2 除细胞有 E2 蛋白外,细胞上清中亦有 E2 蛋白,且含量大于细胞中的含量(见表 1)。说明跨膜区可将 E2 锚定在细胞膜上,没有跨膜区时,E2 可分泌到细胞培养的上清中。

表 1 CSFV 基因疫苗质粒在 BHK-21 细胞中的表达  
(直接 ELISA, OD<sub>490</sub>)

Table 1 The Expression of CSFV DNA vaccine plasmids in BHK-21 (direct ELISA, OD<sub>490</sub>)

	pcDST	pcDSW	正常 BHK-21 细胞 Normal BHK-21
转染细胞上清 The Supernatant of Transfected cell	0.070	0.656	0.014
转染细胞 Transfected cell	0.521	0.500	0.200

表 2 pcDST 和 pcDSW 诱导小鼠免疫反应强度的比较

Table 2 Comparison of immune response of mice vaccinated with pcDSW and pcDST

组别 Groups	OD <sub>490</sub>					均值 Mean values
pcDSW	0.112	0.234	0.250	0.265	0.369	0.246
pcDST	0.091	0.096	0.115	0.145	0.189	0.127
pcDNA3	0.020	0.008	0.015	0.014	0.006	0.012

### 2.3 原位杂交结果

肌注 pcDST 3 h 和 7 d 后在注射部位的部分肌纤维细胞核中可观察到蓝色的阳性颗粒,而注射 pcDNA3 的却没有(图略)。说明疫苗质粒肌注后被肌纤维摄取并穿过核膜进入到细胞核中,在注射后 3 h 肌细胞膜外和细胞浆中没有观察到阳性颗粒,说明没有进入细胞核的质粒绝大部分甚至完全已被降解。3 h 的切片上蓝染细胞核较多,而 7 d 的明显减少,说明进入到细胞核后,多数质粒仍会被降解。

### 2.4 动物免疫试验

#### 2.4.1 4 种疫苗质粒所诱导免疫反应的比较

pcDST、pcDSW、pcDWT 和 pcDWW 4 种质粒免疫小鼠 2 次后,以间接 ELISA<sup>[6]</sup>测定免疫血清,结果阳转率为 pcDST 60% (3/5)、pcDSW 66.6% (4/6)而 pcDWT 和 pcDWW 均为 0% (0/6)。将纯化 pcDST、pcDSW 和 pcDNA 3 溶液分别与等量 50% 蔗糖混合,然后分别免疫小

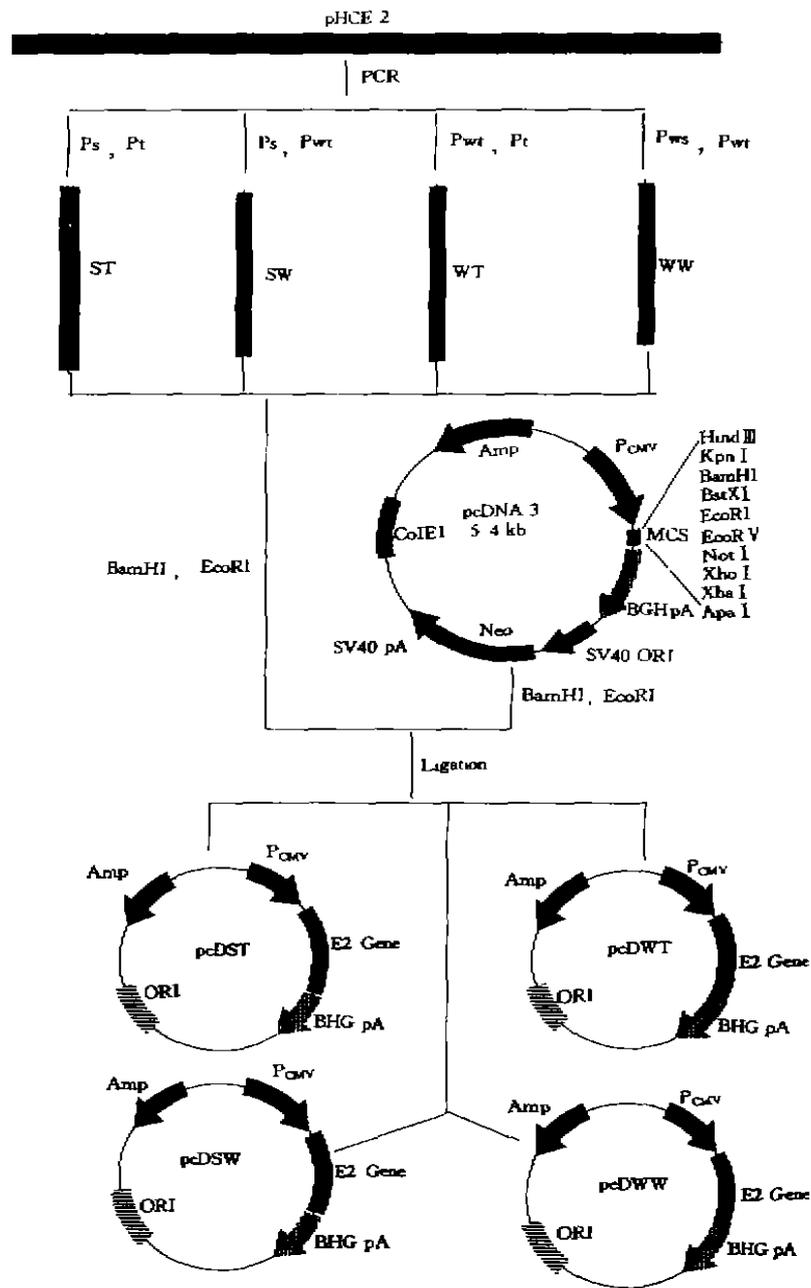


图 2 猪瘟病毒 E2 基因真核表达质粒的构建策略图

Fig.2 The construction of eukaryotic expression plasmids of CSFV E2 gene

鼠, 共免疫 3 次, 最后一次免疫一个月后采集血清, 以 PBS 稀释 200 倍后用间接 ELISA<sup>[6]</sup>测定

其中的抗 CSFV 抗体,结果如表 2。由表可见两组免疫鼠血清的  $OD_{490}$  均远大于对照组鼠血清,都为阳性,且 pcDSW 质粒组的  $OD_{490}$  均值大于 pcDST 组 ( $P \leq 0.05$ )。

### 2.5.2 CSFV E2 基因免疫的动物保护试验

用 pcDST、pcDSW 和 pcDNA3 3 种质粒同时以胫前肌肌肉注射和皮内注射两种方式免疫青紫蓝家兔,共免疫 3 次,每次间隔 2 周。最后一次免疫后 2 周,按每兔 10 MID 剂量的 HCLV 以耳静脉接种进行攻毒试验,连续观察体温反应一周。结果 pcDNA3 免疫兔在接种后 84~96 h 之间发热,持续约 36 h,并呈定型热反应。pcDST 免疫兔在接种 120 h 后有一过性发热反应,持续约 12 h,最高体温较正常高  $0.5^{\circ}\text{C}$ 。pcDSW 免疫兔在攻毒后体温、食欲和精神一切正常。用 pcDSW 和 pcDNA3 溶液分别加入到等量 1% 甘油、4.5% 斯苯混合液,混匀后,如上法免疫猪,第 3 次免疫后 15 d 以致死剂量的 CSFV 石门强毒攻击。结果 2 头对照猪 (pcDNA3 免疫) 均于攻毒后第 2 天发病,其中 1 头于第 9 天临死前扑杀,另一头于第 10 天死亡。2 头猪均呈典型的猪瘟病理变化。而 6 头免疫猪,有 4 头在攻毒后食欲、体温等一切正常,仅 2 头猪有一过性的发热反应,其它一切正常。表 3 是 CSFV 基因疫苗免疫猪的血清抗体变化结果 (间接 ELISA,血清稀释 200 倍后测定,表中数值为组内平均值)。由表可见接种后,免疫猪血清中的抗 CSFV 抗体水平上升较慢,至 30 d 才有较明显的变化,但攻毒一周后,免疫猪血清稀释 200 倍,以间接 ELISA 测定,  $OD_{490}$  值平均上升到  $0.46 \pm 0.03$ ,而对照猪攻毒一周后的特异抗体水平却未见升高 ( $OD_{490}$  为  $0.12 \pm 0.01$ ),可见基因疫苗接种后免疫猪的回忆反应强烈。

表 3 CSFV 基因疫苗免疫猪的血清抗体变化 ( $OD_{490}$ )

Table 3 Antibody responses to CSFV in swine immunized with DNA vaccine ( $OD_{490}$ )

免疫后时间(天) Time after immunization (days)	0	15	30	45
pcDNA3	$0.12 \pm 0.01$	$0.14 \pm 0.01$	$0.13 \pm 0.01$	$0.13 \pm 0.02$
pcDSW	$0.12 \pm 0.01$	$0.13 \pm 0.02$	$0.22 \pm 0.05$	$0.3 \pm 0.03$

## 3 讨论

本实验通过 PCR 技术从 pHCE2 质粒扩增 E2 基因,并将它进行不同的修饰,获得四种不同的 CSFV 真核表达质粒。由于 E2 基因没有起始密码子,因此,在设计引物时必须加入。ATG 及其侧翼序列 CCGCCACCATGG,是按照 Kozak 规则<sup>[7]</sup>的原理,为提高 E2 基因转录后的翻译效率而设计的。Kozak 发现 mRNA 上起始密码子的侧翼序列的结构可影响真核生物核糖体识别 AUG 的效率。哺乳动物细胞高效表达基因的 mRNA 起始部位的序列为 (CCG)CCA/GCCAUGG,具有高度保守性,系统突变分析表明,该序列 +4 位的 G 和 -3 位的 A (或 G) 极为重要,两者中任一碱基发生改变,均可使翻译效率降低 5~10 倍<sup>[8]</sup>。

E2 基因的 5' 端有编码信号肽的序列,3' 端有编码跨膜区的序列<sup>[9]</sup>。有研究表明,信号肽序列的有无对有些基因免疫的应答水平影响不大<sup>[10]</sup>。为弄清楚信号肽序列对 CSFV 基因免疫是否有影响,构建了有信号肽序列的 pcDST 和 pcDSW 2 种质粒与无信号肽序列的 pcDWT 和 pcDWW 两种质粒。动物免疫试验表明,无信号肽的两种质粒不能诱导 CSFV 特异性的免疫应答,这可能与 E2 基因是糖蛋白有关。缺乏信号肽 E2 蛋白不能成熟,从而可能影响了其抗原性。Zijl<sup>[11]</sup> 在研究以伪狂犬病 (PRV) 弱毒苗为载体的 CSFV E2 基因的重组疫苗时发现,

E2 蛋白的跨膜区对所诱导的免疫应答反应强度有很大的影响;无跨膜区的 E2 基因重组疫苗所诱导的中和抗体(NAb)滴度低,免疫猪抵抗 CSFV 强毒株攻击的能力弱;而有跨膜区的 E2 基因重组疫苗可诱导动物产生较高水平的 NAb,并且可使免疫猪在 CSFV 强毒株的攻击下获得完全保护。我们认为在基因免疫所诱导的免疫反应可能与此相反,即 E2 蛋白没有跨膜区可能更有利于 E2 基因免疫诱导高水平的免疫应答,因为,基因疫苗质粒在肌肉接种后,肌肉细胞是表达抗原的主要细胞。因迄今未发现肌细胞具有免疫提呈细胞(APC)的功能,同时肌肉组织中又缺乏专职 APC,因此肌细胞表达的抗原蛋白若有跨膜区,将结合于肌细胞膜上不利用抗原信息的传递;反之,若肌细胞表达无跨膜区的抗原蛋白,则抗原蛋白将分泌到肌细胞周围,然后随组织液、淋巴液甚至血清向四周扩散,有利于将抗原信息传递给免疫系统。我们的动物免疫试验证实了这一点。E2 基因无跨膜区序列的 pcDSW 诱导小鼠产生抗 CSFV 特异性抗体水平,较有跨膜区序列的 pcDST 高,动物保护试验亦表明 pcDSW 较 pcDST 所诱导的保护力强。另一个原因亦可能影响了 pcDST 所诱导的免疫应答,即 pcDST 所表达的蛋白(E2<sub>st</sub>)结合在肌细胞膜上,作为异物,E2<sub>st</sub> 可能影响肌细胞的生理功能,进而影响 E2<sub>st</sub> 的表达水平,而 pcDSW 表达的蛋白(E2<sub>sw</sub>)将分泌到细胞膜外,这对细胞的功能影响较小而有利于 E2<sub>sw</sub> 的表达。体外细胞表达试验亦表明,pcDST 的表达水平较 pcDSW 低。pcDSW 所免疫的 6 头猪在致死剂量的石门株 CSFV 的攻击下全部存活,保护率达 100%,仅两头猪有一过性的发热反应。这说明 pcDSW 疫苗质粒可引起较好的免疫应答反应,为我们成功研制 CSFV 基因疫苗奠定了坚实的基础。

接种 CSFV 基因疫苗后,免疫动物出现特异性免疫应变反应较慢,血清中的抗体水平亦不很高,这与多数疫病的基因疫苗的免疫应答反应类似。一般说基因疫苗可诱发强烈的免疫应答反应,是相对于疫苗质粒接种后在体内的抗原表达量而言的(表达量只是 ng 水平)。因此,提高接种后疫苗质粒在机体中的抗原表达量,是目前基因疫苗研究领域中的重要课题之一<sup>[12]</sup>。而促进疫苗质粒表达后的抗原信息递呈,如将病原的保护性抗原基因与免疫调节因子的基因共表达,提高基因疫苗的免疫应答水平的另一重要途径。本实验室已克隆了猪的 IL-2 和 IL-6 cDNA<sup>[13]</sup>,它们对 CSFV 基因疫苗的免疫促进作用目前正在研究中。

### 参 考 文 献

- [1] Wolff J A, Malone R, Williams P, *et al*. Direct gene transfer into mouse muscle *in vivo* [J]. *Science*, 1990, 247: 1465 - 1468
- [2] Tang D, Devit M, Johnston S A. Genetic immunization is a simple method for eliciting an immune response [J]. *Nature*, 1992, 356: 152 - 154
- [3] 谢庆阁、翟中和主编. 畜禽重大疫病免疫防制研究[M]. 北京: 中国农业科技出版社, 1997, 22 - 26
- [4] Wachs I P, Howell M L, Hancock T, *et al*. Bacterial lipopolysaccharide copurifies with plasmid DNA: implications for animal models and human gene therapy [J]. *Hum Gene Ther*, 1995, 6: 317 - 323
- [5] 苏慧慈, 刘彦仿著. 原位 PCR[M]. 北京: 科学出版社, 1997, 39 - 81
- [6] 余兴龙, 涂长春, 李作生, 等. 以重组 mE2 蛋白为抗原建立检测猪霍乱病毒抗体间接 ELISA 方法的研究[J]. *中国预防兽医学报*, 1999, 21(3): 220 - 222
- [7] Kozak M. The scanning model for translation; an update [J]. *J Cell Biol*, 1989, 108: 229 - 241
- [8] Kozak M. At least six nucleotide preceding the AUG initiator codon enhance translation in mammalian cells [J]. *J Mol Biol*.

1987, 196: 947-950

- [9] Rumenape T, Unger G, Strauss J H, *et al.* Processing of the envelope glycoproteins of pestiviruses [J]. *J Virol*, 1993, 3288-3294
- [10] Haddad D, Liljeqvist S, Stahl S, *et al.* Comparative study of DNA-based immunization vectors: effect of secretion signals on the antibody response [J]. *J Virol*, 1998, 72: 1497-1503
- [11] Zijl M, Wensvoort G, Kluyver E, *et al.* Live attenuated pseudorabies virus expressing envelope glycoprotein E1 of hog cholera virus protects swine against both pseudorabies and hog cholera [J]. *J Virol*, 1991, 65: 2761-2765
- [12] Hariharan M J, Drivet D A, Townsend K, *et al.* DNA immunization against herpes simplex virus: enhanced efficacy using a Sindbis virus-based vector [J]. *J Virol*, 1998, 72: 950-958
- [13] 余兴龙, 徐长春, 李作生, 等. 猪 IL-2 和 IL-6 cDNA 的克隆及序列测定 [J]. *中国兽医学报*, 1999, 19: 39

## Construction of Eukaryotic Expression Plasmids of CSFV E2 Gene and the Study on DNA Vaccine

YU Xing-long, TU Chang-chun, LI Hong-wei, CHEN Chuang-fu,  
LI Zuo-sheng, MA Zheng-hai, YIN Zhen

(*Changchun University of Agricultural and Animal Science, Changchun, 130062, China*)

**Abstract:** Four kinds of eukaryotic expressing plasmids of classical swine fever virus (CSFV) E2 gene, either containing or lacking the signal sequence and transmembrane region sequence, were constructed. The antibodies against CSFV were induced after immunization of mice by intramuscular (IM) injection with the plasmids of E2 gene with a signal sequence, pcDST and pcDSW, but not with the plasmids of E2 gene lacking a signal sequence, pcDWT and pcDWW. The level of antibodies elicited by pcDSW lacking transmembrane region sequence was higher than that elicited by pcDST with transmembrane region sequence. The results indicated the plasmid expressing a secreted antigen may be more efficient for induction of immune response when administered by IM injection than that expressing non-secreted antigen. Immunization with pcDSW could protect rabbits against challenge with at least 10 MID hog cholera lapinized virus (HCLV) and protect pig from the challenge of lethal dose of CSFV strain, Shimenmen.

**Key words:** CSFV; E2 gene; Eukaryotic expression; Plasmid; DNA vaccine