

表达 PRRSV M 蛋白重组腺病毒的构建及其免疫特性研究*

汤景元, 姜平**, 蒋文明, 马苏, 李玉峰

(南京农业大学农业部动物疫病诊断与免疫重点开放实验室, 江苏南京 210095)

Construction and Immunogenicity of a Recombinant Adenovirus Expressing the

M Protein of Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome Virus in Mice

TANG Jing-yuan, JIANG Ping**, JIANG Wen-ming, MA Su, LI Yu-feng

(College of Veterinary Medicine, Nanjing Agricultural University, Nanjing 210095, China)

Abstract: To screen out vaccine candidate against PRRSV, adenovirus vector was used to express the M protein of *Porcine reproductive and respiratory syndrome virus* (PRRSV). A recombinant adenovirus was constructed and the expression of the M protein was identified by RT-PCR and indirect immunofluorescence assay (IFA). The purified recombinant adenovirus M (rAd-M) was passaged 25 times in 293A cells. The titer of stocks of rAd-M was stably $10^{7.8}$ TCID₅₀/mL. Furthermore, the recombinant M protein adenovirus could induce PRRSV specific humoral immunity and cell mediated immunity in mice. It indicated that the recombinant adenovirus expressing the main structural proteins of PRRSV is a potentially viable candidate vaccine against PRRSV.

Key words: Recombinant adenovirus; Immunity; PRRSV M protein.

摘要:本研究通过 RT-PCR 方法扩增猪繁殖与呼吸综合征病毒 (PRRSV) S1 株的 M 蛋白基因, 将其克隆重组到入血清 5 型腺病毒载体中, 转染 293 细胞, 制备重组腺病毒 rAd-M。RT-PCR 和 IFA 方法鉴定, 结果表明 rAd-M 可表达 M 基因的 mRNA 和 M 蛋白。纯化的 rAd-M 重组腺病毒经 293 细胞连续传 25 代, 滴度稳定为 $10^{7.8}$ TCID₅₀/mL。动物免疫试验结果表明, 该重组腺病毒 rAd-M 能够刺激机体产生 PRRSV 的特异性抗体免疫和细胞免疫应答反应, 从而为 PRRSV 结构蛋白功能及其基因工程疫苗研究奠定了基础。

关键词: 重组腺病毒; 免疫反应; PRRSV M 蛋白

中图分类号: S852.65

文献标识码: A

文章编号: 1003-5125(2005)06-0618-05

猪繁殖与呼吸综合征病毒 (*Porcine reproductive and respiratory syndrome virus*, PRRSV) 具有高度的传染性, 自 1987 年首先发现于美国^[1]以来, 迅速传遍了欧洲、美洲和亚洲的猪场。该病毒主要引起妊娠母猪流产和仔猪呼吸道疾病, 给世界养猪业造成巨大经济损失。但目前尚无理想的疫苗^[2]。因此, 新的 PRRSV 疫苗的研制已成为该病研究的热点之一。

PRRSV 属动脉炎病毒科、动脉炎病毒属成员, 基因组全长 15kb, 含有 8 个开放式阅读框。ORF1a 和 ORF1b 位于基因组的 3' 端, 约占整个基因组的

75%, ORF2-ORF7 在基因组的 5' 端。PRRSV 包含三个主要结构蛋白, 25kDa 的 GP5 蛋白, 18~19kDa 的非糖基化囊膜蛋白 M 和 15kDa 的核衣壳蛋白 N^[3]。GP5 蛋白还可以通过二硫键与 M 蛋白形成异源二聚体, 在二聚体中含有同病毒相关的免疫重要区。GP5 和 M 蛋白诱导的抗体能在体外中和病毒的感染^[3], 腺病毒载体具有容纳外源基因能力强、介导外源基因的表达水平高、表达产物具有天然蛋白质的活性及使用安全性高等优点^[4-6], 已被广泛用于基因工程疫苗研究。本研究在成功构建 PRRSV GP5 蛋白重组腺病毒的基础上进一步构建

收稿日期: 2005-05-16, 修回日期: 2005-06-14

* 基金项目: 国家自然科学基金 (B0270990); 教育部博士点基金 (20030307012); 浙江省科技攻关项目 (021102529)

作者简介: 汤景元 (1978-), 男, 辽宁省籍, 硕士研究生, 研究方向: 动物传染病防治。

** 通讯作者: 姜平 (1964-), 男, 江苏省籍, 教授, 研究方向: 动物分子病毒学与免疫学。

Corresponding author. Tel: 02584395504, E-mail: jiangp@njau.edu.cn

表达 PRRSV M 蛋白的重组腺病毒,并观察其免疫效果,现报告如下。

1 材料与方 法

1.1 试验动物、细胞株与毒株

18~22g 普通小白鼠购自南京军区总院实验动物中心, Marc-145 细胞本实验室保存, HEK-293A 细胞购自 QbioGene 公司, PRRSV S1 国内分离株由本实验室分离保存, TCID₅₀ 为 10⁻⁶/mL, 表达 PRRSV GP5 蛋白的重组腺病毒(rAd-GP5)和人 5 型腺病毒(rAd-A)由本实验室制备保存。

1.2 主要材料与试剂

M-MLV 反转录酶、TransFast Transfection Reagent 购自 Promega 公司, Oligo(dT)₁₂₋₁₈ 购自 Invitrogen 公司, rTaqDNA 聚合酶、*Kpn* I、*Xho* I 限制性内切酶、*Eco*R I、T4DNA 连接酶购自 TaKaRa 公司, AdM1、AdM2 引物由 TaKaRa 公司合成, DNA 凝胶回收试剂盒购自华舜公司, pShuttle-CMV、pAdEasy-1、BJ5183 购自 QbioGene 公司, *Pme* I、*Pac* I 购自 Biolab 公司, DNA Marker 购自 MBI 公司和华美公司, 小牛血清购自华东理工大学, QIAGEN Plasmid Mini Kit 购自 Invitrogen 公司, ConA 和 MTT, OPTI-MEM、D-MEM 和 RPMI 1640 培养基购自 GIBCO BRL 公司, SPA-FITC, 羊抗小鼠 IgG 购自武汉博士德生物技术有限公司, 淋巴细胞分离液购自上海华精高科技有限公司, 抗 PRRSV 阳性血清、PRRSV 抗原本实验室制备, DH5 α 本实验室保存。

1.3 PRRSV M 基因 RT-PCR 扩增

用 PRRSV-S1 毒株感染 Marc-145 细胞, 参照该试剂盒说明书提取感染 Marc-145 细胞总 RNA。按 M-MLV 鼠源反转录酶和 rTaq DNA 聚合酶的说明书进行 RT-PCR。用感染细胞总 RNA 做模板, Oligo(dT)₁₂₋₁₈ 为引物进行反转录, 然后以 cDNA 为模板进行 PCR 反应。所用 PCR 引物: 上游引物, AdM1: 5'-gtaggtaccaccatggggctgctccttagatgacttc-3'; 下游引物, AdM2: 5'-gacctcgagccgttgatttggcatatt-3' 循环参数为: 94℃ 预变性 5min; 94℃ 变性 45s, 60℃ 退火 45s, 72℃ 延伸 60s, 共进行 35 个循环; 然后 72℃ 延伸 10min。取 PCR 产物进行 2% 琼脂糖凝胶电泳。

1.4 M 蛋白重组穿梭载体的构建与鉴定

利用小量胶回收试剂盒纯化 PCR 产物, 以 pShuttle-CMV 为载体利用 *Kpn* I、*Xho* I 酶切位点, 按分子生物学操作方法构建重组质粒, 用 PCR

与 *Kpn* I、*Xho* I 双酶切鉴定重组质粒并送大连宝生物工程公司测序。

1.5 M 蛋白重组腺病毒载体的构建与鉴定

用 QIAGEN 公司的质粒提取试剂盒对重组质粒 pShuttle-CMV-M 进行纯化。纯化后的 pShuttle-CMV-M 质粒用 *Pme*I 限制性内切酶完全酶切线性化, 经 DNA 凝胶回收试剂盒回收, 双蒸水溶解, 使质粒浓度为 200ng/ μ L 左右。线性化的 pShuttle-CMV-M 与腺病毒骨架载体 pAdEasy-1 在大肠杆菌 BJ5183 内进行同源重组, 于含 50 μ g/mL Kan⁺ 抗性 LB 平板上培养, 并用 *Pac* I 酶切鉴定。

1.6 质粒转染与 rAd-M 重组病毒的纯化

大量提取 pAd-M 质粒, 经 *Pac* I 酶切纯化, 按 TransFast Transfection Reagent 试剂盒说明书转染 HEK-293A 细胞。37℃, 5% 的 CO₂ 温箱培养 5~7d, 待出现细胞病变后, 收获病毒, 并用琼脂糖覆盖法进行噬斑纯化, 连续传代至 25 代。

1.7 RT-PCR 鉴定 M 蛋白重组腺病毒

取出 rAd-M 感染的 293 细胞和未接种腺病毒的正常 293 细胞各一瓶, 沉淀细胞后按 TRIzol 试剂产品说明书提取总 RNA, 并按上述方法进行 RT-PCR 检测 rAd-M 中 M 蛋白的 mRNA。

1.8 间接免疫荧光试验鉴定 M 蛋白重组腺病毒

按常规方法, 在一长满 293 细胞 96 孔板上接种重组腺病毒 rAd-M, 37℃ 培养 48~72h, 冷丙酮 (80% 丙酮, 20% 双蒸水) 4℃ 固定 30min; 室温干燥后, 加入 1:20 稀释的 PRRSV 阳性猪血清, 37℃ 温育 30min; 洗涤后加入 1:100 稀释的荧光标记的 SPA, 37℃ 温育 30min, 于荧光显微镜下观察。

1.9 M 蛋白重组腺病毒 TCID₅₀ 测定

按常规方法, 用 DMEM 维持液将 rAd-M 作 10 倍梯度稀释, 然后分别接种于长满 293 细胞单层的 96 孔细胞培养板, 每个稀释度接种 8 个孔, 每孔接种 100 μ L。同时设定加入维持液的空白对照。37℃ 5% CO₂ 培养, 逐日观察病变, 按 Reed-Muench 法计算 TCID₅₀。

1.10 小鼠免疫试验

将 15~18g 的小鼠分成 4 组, 每组 30 只, 分别接种 rAd-A、rAd-GP5、rAd-M、rAd-GP5 和 rAd-M, 接种剂量分别为 10^{6.0} TCID₅₀/只、10^{4.0} TCID₅₀/只、10^{7.8} TCID₅₀/只、10^{4.0} TCID₅₀/只和 10^{7.8} TCID₅₀/只, 采用背部皮下接种, 首次免疫后 15 天加强免疫一次, 首次免疫后每 15 天采样一次, 包括血清和脾脏, 共计 3 次。

1.11 脾淋巴细胞转化试验

无菌采取小鼠脾脏, 以淋巴细胞分离液分离淋

巴细胞,以 RPMI 1640 培养基(含丙酮酸钠 1mmol/L, β -巯基乙醇 2×10^{-6} mol/L,青霉素 100U/mL,链霉素 100 μ g/mL,小牛血清 10%),将细胞稀释成 2×10^7 个/mL,取 100 μ L 单细胞悬液于 96 孔板内,加入 ConA 终浓度为 29 μ g/mL,并设阴性对照。37 $^{\circ}$ C, 5%CO₂ 培养 68h 后加入 MTT, 20 μ L/孔,继续培养 4h,最后每孔加入 100 μ L DMSO,待溶液成紫色后,测定 OD₅₇₀ 吸光值,计算特异性刺激指数(SI),SI=(ConA 刺激组平均值-正常对照组平均值)/正常对照组平均值。将所得数据进行统计学处理和分析。

1.12 ELISA 试验

按常规方法将 PRRSV 抗原以 1:400 包被,100 μ L/孔,37 $^{\circ}$ C 1h,4 $^{\circ}$ C 过夜,0.15% BSA,200 μ L/孔,37 $^{\circ}$ C 封闭 2h,分别将不同组的小鼠血清以 1:100 开始倍比稀释,100 μ L/孔,37 $^{\circ}$ C 1h,然后加入羊抗小鼠 IgG,100 μ L/孔,37 $^{\circ}$ C 1h,加入底物 100 μ L/孔显色 15min,最后加入 50 μ L/孔 2MH₂SO₄ 终止。在酶标读数仪上测定 OD₄₉₀ 值,将所得数据进行统计学处理,计算抗体效价。

1.13 小鼠血清中和抗体试验

先按常规方法将 S1 株病毒液用含有 2% 的小牛血清的 DMEM 稀释成 200TCID₅₀。将待检小鼠血清 56 $^{\circ}$ C 灭活 30min,用含 2% 小牛血清的 DMEM 将血清做 1:4, 1:8 倍稀释,分别与等体积的病毒液混合,4 $^{\circ}$ C 作用过夜,接种单层 Marc-145 细胞,100 μ L/孔,每个稀释度接种 5 个孔,同时设定阴、阳性血清对照,于 37 $^{\circ}$ C 5%CO₂ 培养 5d,观察结果。

2 结果

2.1 PRRSV 结构蛋白 *m* 基因的扩增

从 PRRSV S1 的 Marc-145 细胞提取的总 RNA,进行 RT-PCR,扩增产物大小 540bp,结果与预计相符(图 1)。

2.2 重组质粒的构建与鉴定

将 PRRSV 的 M 蛋白基因克隆到 pShuttle-CMV 载体中,故将其命名为 pShuttle-CMV-M。经 PCR 和 *Kpn* I、*Xho* I 双酶切鉴定,结果见图 1。测序结果表明,筛选的重组质粒含有 PRRSV 的 M 蛋白全基因序列,并具有正确的阅读框。用 *Pac* I 将 pShuttle-CMV-M 线性化后,与 pAdeasy-1 共转化至 BJ5183 大肠杆菌内进行同源重组,重组质粒命名为 pAd-M,经 *Pac* I 鉴定获得的 pAd-M 正确,见图 2。

2.3 重组腺病毒的鉴定

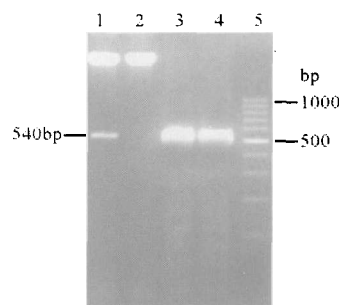


图 1 PRRSV *m* 基因 PCR 产物和重组质粒 pShuttle-CMV-M 的鉴定

Fig. 1 PCR product of *m* gene of PRRSV and the identification of recombinant plasmid pShuttle-CMV-M

1, pShuttle-CMV-M digested with *Kpn* I and *Xho* I; 2, pShuttle-CMV digested with *Kpn* I and *Xho* I; 3, RT-PCR product of *m* gene from PRRSV; 4, PCR product of *m* gene of pShuttle-CMV-M; 5, DNA Ladder.

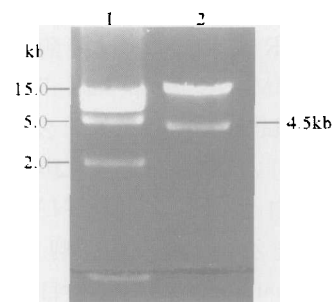


图 2 重组质粒 pAd-M *Pac* I 酶切鉴定

Fig. 2 Digestion of recombinant plasmid pAd-M with *Pac* I

1, Marker; 2, pAd-M digested with *Pac* I restriction enzyme.

将重组质粒 pAd-M 线性化后,转染 293 细胞,培养 10~14d,出现细胞病变,经琼脂糖噬斑纯化获得重组腺病毒,命名为 rAd-M,用 RT-PCR 和 IFA 鉴定,表明该腺病毒能够正确表达 PRRSV M 蛋白,结果见图 3、4。将该病毒在 293 细胞连续传代到 25 代,rAd-M 的滴度稳定,平均 TCID₅₀ 为 $10^{-7.6}$ /mL。

2.4 动物免疫试验结果

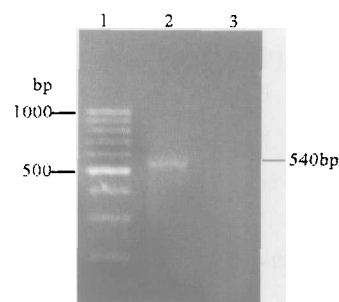


图 3 重组腺病毒 rAd-M RT-PCR 鉴定

Fig. 3 Identification of recombinant adenovirus rAd-M with RT-PCR

1, 100bp DNA Ladder; 2, The product of RT-PCR of total RNA of rAd-M; 3, The Control product of normal HEK-293A.

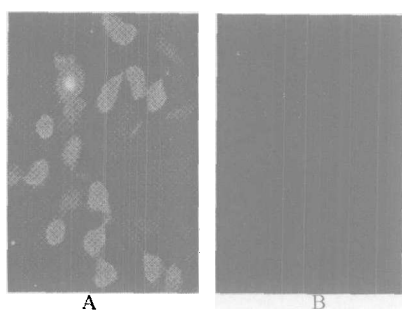


图 4 重组腺病毒 rAd-MIFA 鉴定

Fig. 4 Identification of recombinant adenovirus with rAd-M stained with indirect immunofluorescence assay

A: 293-A cell infected with rAd-M and fluorescence was obvious; B: 293-A cell no infected with rAd-M as control and no fluorescence.

2.4.1 重组腺病毒免疫小鼠脾细胞转化试验检测

rAd-GP5、rAd-M 免疫小鼠,脾细胞转化试验结果(表 1)表明,仅有 rAd-M 第一次免疫后 15d SI 值与 rAd-A 免疫组无显著性差异 ($p > 0.05$),其余各次免疫组 SI 值与 rAd-A 免疫组有显著性差异 ($p < 0.05$)。rAd-GP5 与 rAd-M 联合免疫组 SI 值与 rAd-GP5 和 rAd-M 单独免疫的也有显著差异 ($p < 0.05$),rAd-GP5 与 rAd-M 单独免疫组 SI 值差异不显著 ($p > 0.05$)。免疫次数越多,反应性越高。

表 1 小鼠免疫重组腺病毒后不同时间脾淋巴细胞在 ConA 刺激下的反应(MTT 570nm)

Table 1 Reaction of splenocytes stimulated with ConA from mice at different time post vaccination with recombinant adenovirus vaccines (MTT 570nm)

Group	15d	30d	45d
rAd-GP5/rAd-M	0.278±0.029	0.375±0.042	0.340±0.063
rAd-GP5	0.245±0.039	0.320±0.018	0.319±0.109
rAd-M	0.235±0.037	0.300±0.036	0.300±0.051
rAd-A	0.208±0.010	0.250±0.010	0.240±0.032

2.4.2 重组腺病毒免疫小鼠血清特异性抗体检测

用间接 ELISA 法检测每组小鼠的血清抗体,rAd-GP5、rAd-M 和 rAd-GP5 与 rAd-M 联合免疫的小鼠均能产生较强的 ELISA 抗体,且免疫一次即能产生高效价的抗体(图 5)。小鼠血清的中和抗体均小于 1:4。

3 讨论

目前,用于预防猪繁殖与呼吸综合征病毒的主要是灭活疫苗和减毒疫苗。但减毒疫苗存在毒力返祖的危险,灭活苗的效果不稳定,而且经常导致免疫

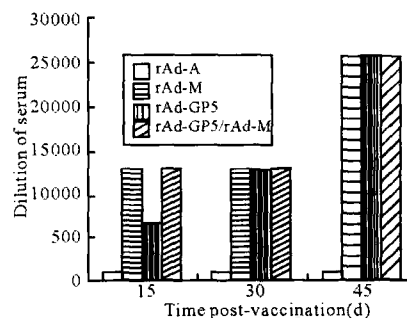


图 5 小鼠免疫重组腺病毒后 ELISA 抗体

Fig. 5 The antibody to PRRSV in mice vaccinated with recombinant adenovirus vaccines

失败,为此各国学者正致力于基因工程疫苗的研究。基因工程疫苗具有疫苗纯度高,成本低,疫苗安全可靠,生产过程比传统技术简单,有利于大规模生产等优点。在基因工程疫苗中,国内、外已报到的表达 PRRSV 相关基因载体有:大肠杆菌表达系统、杆状病毒表达系统、酵母表达系统、冠状病毒表达系统和腺病毒表达系统。本研究则利用人复制缺陷性腺病毒血清 5 型载体,在国内首次构建 PRRSV M 蛋白重组腺病毒,该重组腺病毒在 293 细胞上连续传 25 代,TCID₅₀ 比较稳定,IFA 试验证实能够表达 PRRSV M 蛋白。动物免疫试验证实重组腺病毒可诱导机体产生特异性体液免疫和细胞免疫应答,从而为 PRRSV 结构蛋白功能及其基因工程疫苗的研究奠定了基础。

腺病毒载体系统是真核表达系统,表达的外源蛋白具有天然蛋白的免疫活性;而且,腺病毒正常情况下经呼吸道黏膜感染,PRRSV 也可以通过呼吸道黏膜感染,入侵肺泡巨噬细胞。因此用腺病毒表达 PRRSV M 蛋白,鼻腔接种免疫,与 PRRSV 自然情况下呼吸系统感染途径相似。在 PRRSV 感染中,有 6 种重要结构蛋白能够产生特异性抗体,其中主要有:GP5 蛋白,它是糖基化的膜蛋白,具有中和表位,位于胞外结构域 B 表位上,刺激机体产生中和抗体,在抗 PRRSV 感染中发挥主要作用^[7];GP4 蛋白也是糖基化的膜蛋白,诱导的抗体具有部分中和活性;M 蛋白是非糖基化的膜蛋白,基因序列相对稳定,除诱导产生的抗体具有部分中和活性外,还能够诱导产生特异性细胞免疫应答,并且 M 蛋白与 GP5 蛋白通常以二聚体形式存在;N 蛋白是核衣壳蛋白,该蛋白保守性好,诱导的特异性抗体产生早,但无病毒中和作用,主要用于病毒的早期诊断。有报道用牛分枝杆菌 BCG 表达 GP5 和 M 蛋白,在 60d 检测到中和抗体水平分别达到 1:8 和 1:4^[8]。本研究证实,用重组腺病毒 rAd-GP5 和 rAd-M 分

别刺激和联合刺激均产生很高的特异性血清抗体,并且免疫一次就能使机体产生较高的特异性血清抗体。淋巴细胞转化试验中,rAd-GP5和rAd-M分别及联合免疫后,能够使脾脏淋巴细胞转化增殖,表明用该腺病毒载体表达PRRSV的外源蛋白能够激发机体的细胞免疫应答。本研究中用腺病毒为载体表达GP5蛋白和M蛋白产生的中和抗体较低,这可能与观察的时间短,选择试验小鼠的品系,病毒自身抗原结构有关。关于猪体免疫试验尚在进行中。

参考文献

- [1] Keffaber K K. Reproductive failure of unknown etiology [J]. Am Assoc Swine Pract Newsl, 1989, 1: 1-10.
- [2] Collins JE, Benfield D A, Christianson W T, *et al.* Isolation of swine infertility and respiratory syndrome virus (isolate ATCC VR-2332) in North America and experimental reproduction of the disease in gnotobiotic pigs [J]. Vet Diagn Invest, 1992, 4: 117-126.
- [3] Murtaugh M P, Elan M R, Kakach L T. Comparison of the structural proteins coding sequences of the VR-2332 and Lelystad virus strains of the PRRS virus [J]. Arch Virol, 1995, 140: 1451-1460.
- [4] Imler J L. Adenovirus vector as recombinant viral vaccines [J]. Vaccine, 1995, 13(13): 1142-1151.
- [5] Christine B B, Alan A, Sally A S, *et al.* Replication-deficient recombinant adenoviruses expressing the human immunodeficiency virus Env antigen can induce both humoral and CTL immune responses in mice [J]. J Gen Virol, 1999, 80: 2621-2628.
- [6] Flanagan B, Pringle C R, Lepard K N. A recombinant human adenovirus expressing the simian immunodeficiency virus Gag antigen can induce long-lived immune responses in mice [J]. J Gen Virol, 1997, 78: 991-996.
- [7] Pirzadeh B, S Des. Immune response in pigs vaccinated with plasmid DNA encoding ORF5 of porcine reproductive and respiratory syndrome virus [J]. J Gen Virol, 1998, 79: 989-999.
- [8] Bastos R G, Dellagostink O A, Barletta R G. Construction and immunogenicity of recombinant Mycobacterium bovis BCG expressing GP5 and M protein of porcine reproductive respiratory syndrome virus [J]. Vaccine, 2002, 21: 21-29.