

石晓玉, 张元鹏, 乔绪稳, 等. 重组脑膜炎球菌 PorB 蛋白对猪伪狂犬弱毒疫苗的免疫增强效力[J]. 江苏农业学报, 2017, 33(2): 353-360.

doi: 10.3969/j.issn.1000-4440.2017.02.018

重组脑膜炎球菌 PorB 蛋白对猪伪狂犬弱毒疫苗的免疫增强效力

石晓玉^{1,2}, 张元鹏², 乔绪稳², 于晓明², 陈瑾², 姜平¹, 郑其升², 侯继波²

(1. 南京农业大学动物医学院, 江苏 南京 210095; 2. 国家兽用生物制品工程技术研究中心, 江苏 南京 210014)

摘要: 探讨原核表达的重组脑膜炎球菌外膜蛋白 PorB 对猪伪狂犬弱毒活疫苗免疫的增强效果。将 GenBank 公布的脑膜炎球菌外膜蛋白 PorB 基因克隆到原核表达载体 pQZ III 中, 命名为 pQZ-PorB 质粒, 转入大肠杆菌 BL21 中表达重组蛋白。采用 SDS-PAGE、Western-blot 技术和 Ni²⁺-NTA 柱鉴定并纯化重组蛋白。将每份含 100 μg 剂量的重组 PorB 蛋白与猪伪狂犬弱毒疫苗混合后分别滴鼻免疫 3 日龄仔猪和肌肉注射免疫 50 日龄猪, 同时设 PBS 对照组和免疫前对照组。免疫 28 d 后测定 IgG 和 IgA 抗体水平、猪外周血淋巴细胞增殖情况以及细胞因子 (IFN-γ、IL-10、IL-6) 的表达水平。SDS-PAGE 和 Western-blot 结果表明, PorB 基因在大肠杆菌中表达, 表达的重组 PorB 蛋白是可溶性的, Ni²⁺-NTA 柱能够有效纯化重组蛋白。重组 PorB 蛋白不但能够刺激免疫猪在较短时间内产生的较高血清 IgG 抗体、黏膜 IgA 抗体和中和抗体, 而且可以通过诱导机体产生 IFN-γ 和 IL-6 来促进细胞免疫反应。在猪伪狂犬弱毒疫苗免疫中, 重组 PorB 蛋白可以作为一种优良的免疫增强剂。

关键词: 脑膜炎球菌 PorB 蛋白; 猪伪狂犬弱毒疫苗; 免疫增强

中图分类号: S852.4 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-4440(2017)02-0353-08

Immune enhancement to porcine pseudorabies virus (PRV) vaccine of recombinant *Neisseria meningitidis* PorB protein

SHI Xiao-yu^{1,2}, ZHANG Yuan-peng², QIAO Xu-wen², YU Xiao-ming², CHEN Jin², JIANG Ping¹, ZHENG Qi-sheng², HOU Ji-bo²

(1. College of Veterinary Medicine, Nanjing Agricultural University, Nanjing 210095, China; 2. National Veterinary Biological Medicine Engineering Research Center, Nanjing 210014, China)

Abstract: In order to explore the immune-enhancing activity to swine pseudorabies virus (PRV) attenuated vaccine of *Neisseria meningitidis* PorB, *Escherichia coli* codon-optimized mature *PorB* gene was synthesized and cloned into the prokaryotic expression vector pQZ III. The recombinant PorB protein was expressed in *E. coli* BL21 (DE3). The recombinant

protein was confirmed and purified by SDS-PAGE, Western blot and Ni-NTA affinity chromatography. The PorB protein (100 μg) was mixed with live attenuated PRV vaccine, and used to immunize intranasally 3-day-aged piglets and intramuscularly 50-day-aged pig, respectively. PBS and pre-immune control group were set. The levels of IgG, IgA, peripheral blood lymphocyte proliferation and cytokines were detected at 28 d postimmunization. The recombinant protein PorB not only stimulated swines to

收稿日期: 2016-07-25

基金项目: 公益性行业 (农业) 科研专项 (201303046); 江苏省农业自主创新专项 [CX(14)2089]

作者简介: 石晓玉 (1990-), 女, 河南濮阳人, 硕士研究生, 主要从事新型猪用疫苗研究。(Tel) 15951979330; (E-mail) 1334318532@qq.com

通讯作者: 姜平, (Tel) 025-84395504; (E-mail) jiangp@njau.edu.cn。郑其升, (Tel) 025-84392088; (E-mail) njcvc1302@163.com

produce high levels of serum IgG antibody, mucosal IgA antibody and neutralizing antibody in a relatively short period of time, but also facilitated immune responses by inducing the production of IFN- γ and IL-6. Results indicate that recombinant PorB may be effective as an adjuvant with PRV attenuated vaccines.

Key words: recombinant PorB; pseudorabies virus (PRV) attenuated vaccine; immune-enhancing activity

蛋白体是脑膜炎奈瑟氏双球菌的外膜蛋白,是多个孔道蛋白形成的大小不同的囊泡样毫微粒结构体,具有疫苗投递载体和免疫增强剂的特征。蛋白体作为免疫增强剂主要表现在 4 个方面,第一,有助于黏膜表面疫苗的摄取,可加速 M 细胞对微粒的上皮转运,并诱导树突状细胞向滤泡相关上皮迁移,使上皮树突状细胞捕获抗原和蛋白体,并将其呈递给其他免疫细胞。第二,能激活 B 细胞和其他抗原提呈细胞,上调抗原提呈细胞表面的共刺激分子 B7-2 (CD86) 表达量,作用于 TLR2,发挥天然免疫应答和适应性免疫应答作用。第三,刺激 B 细胞的分化和成熟,产生抗体。第四,蛋白体-抗原复合物可诱导外周单核巨噬细胞系分泌 IFN- γ 和 IL-6^[1]。

蛋白体主要由 PorA、PorB 和 4 类孔道膜蛋白 3 种成分组成。PorA (I 类外膜蛋白) 是分子质量为 41 000~46 000 的热稳定蛋白,是脑膜炎奈瑟菌的保护性抗原,是血清亚型分型指标或保护性抗原^[2]。PorB (II 类外膜蛋白) 是分子质量为 38 000~41 000 的热稳定蛋白,是所有蛋白体共有的成分,约占其组成的 60%,在体内体外都能提高抗原呈递细胞中 T 细胞协同刺激分子的活性,也是蛋白体免疫增强剂中最有效的免疫增强剂蛋白^[3]。4 类孔道膜蛋白 (III 类外膜蛋白) 是分子质量为 34 000~36 000 的热稳定蛋白,很少有研究报道其功能和应用^[4]。PorB 是脑膜炎球菌外膜蛋白体的主要成分,也是蛋白体中最有效的免疫增强剂成分。近几年,国内外把蛋白体和从蛋白体中提取 PorB 蛋白作为黏膜免疫增强剂,应用在很多疫苗的研制中^[5],主要用于鼻内接种疫苗,并且具有实质性进展,但还未见关于利用基因工程方法表达 PorB 来免疫增强弱毒疫苗的相关报道。

猪伪狂犬病 (Pseudorabies, PR) 是由伪狂犬病病毒 (Pseudorabies Virus, PRV) 引起的一种急性传染病^[6-7],是《国际动物卫生法典》中 OIE 法定报告的 B 类动物疫病,也是中国法定的二类动物疫病。猪伪狂犬病的防治主要以疫苗免疫为主,中国大部分猪伪狂犬活疫苗是 Bartha-K61 株,为 gE 自然基

因缺失株^[8]。由于近些年猪伪狂犬病毒发生变异,Bartha-K61 株已不能起到保护作用。因此,不仅要有优秀的伪狂犬疫苗,还要有优秀免疫增强剂。目前,关于猪伪狂犬病活疫苗免疫增强剂的报道并不多,严琳等^[9]以 rIL-2 为免疫增强剂在小鼠模型中免疫伪狂犬病毒弱毒活疫苗,认为 rIL-2 在小鼠模型中对猪伪狂犬活疫苗具有一定的免疫增强效果。张玲华等^[10]将人工合成的 CpG DNA 作为伪狂犬病活疫苗的免疫增强剂直接滴鼻接种初生仔猪,结果表明 CpG DNA 可促进猪对伪狂犬病活疫苗的体液和细胞免疫应答。由于毒力返强、持续感染、隐性感染、带毒综合症共存等原因,造成免疫失败,而且伪狂犬病毒发生变异,现有的疫苗毒株已起不到保护作用。传统的免疫方式 (如肌肉、皮下及皮内注射) 在诱发全身免疫应答的同时却不能产生有效的黏膜局部免疫应答,不能有效控制黏膜感染。因此,开发新的免疫途径和免疫增强剂来增强疫苗免疫效果是未来预防猪伪狂犬病的重要研究方向。基因工程方法表达的重组 PorB 蛋白作为猪伪狂犬弱毒疫苗的稀释液^[11],可以增强疫苗免疫效力,对于猪伪狂犬病的预防和净化具有重要的意义。本研究拟实现 PorB 蛋白在 *E.coli* 中的可溶性表达并增强猪伪狂犬弱毒疫苗的免疫效果。

1 材料与方法

1.1 试验材料

表达载体 pQZ III 为本实验室保存,胶回收试剂盒、限制性内切酶、T4 连接酶和 PCR 试剂均购于 TaKaRa 公司,质粒提取试剂盒购于 Generay 公司, *E.coli* DH5 α 、BL21 (DE3) 感受态细胞购于 BioMed 公司,高压破碎仪购于美国 ATS 公司,HRP 标记的羊抗鼠酶标抗体购于生兴公司,DAB 显色试剂盒购于武汉博士德公司,BCA 蛋白定量试剂盒购于 Vazyme 公司,Ni²⁺-NTA 镍离子亲和树脂购于 Novagen 公司,猪伪狂犬弱毒疫苗购于海博莱公司,细胞因子检测试剂盒购于晶美生物工程 (深圳) 有限公司,猪伪狂犬病毒 gB 抗体的 ELISA 抗体检测试剂

盒(阻断法)购于武汉科前公司,PRV 强毒株由本实验室分离鉴定。

1.2 重组表达质粒的构建

将含有密码子优化的 *PorB* 基因重组质粒 pUC-*PorB* 和表达载体 pQZ III 分别用 *Nde* I 和 *Xho* I 双酶切,酶切产物经 1% 琼脂糖电泳鉴定后胶回收,回收产物于 16 °C 下经 T4 连接酶连接过夜,将连接产物转入 *E.coli* DH5 α 感受态细胞中,涂氨苄 LB 平板,37 °C 恒温箱培养 12~16 h。挑取单菌落接种于含氨苄的液体 LB 中培养,提取质粒酶切鉴定,阳性质粒命名为 pQZ-*PorB*。

1.3 重组表达质粒的表达

1.3.1 重组菌的构建 将质粒 pQZ-*PorB* 和空质粒 pQZ III 转入大肠杆菌 BL21 中,分别涂氨苄氯霉素和氯霉素的 LB 平板,得到重组菌 pQZ-*PorB*/BL21 和对照菌 pQZ III/BL21。

1.3.2 重组 PorB 蛋白的表达与鉴定 挑取重组菌 pQZ-*PorB*/BL21 和对照菌 pQZ III/BL21 单菌落,接种于含氨苄青霉素的 5 ml LB 液体培养基中,37 °C 振荡培养过夜(12.0~16.0 h),作为母液(OD_{600} = 8.0~10.0)。将母液按 1:50 比例转接含新的氨苄青霉素的 LB 液体培养基,37 °C、220 r/min 振荡培养 1.5~2.0 h(OD_{600} = 0.6~0.8),取 1 ml 作为诱导前对照,加入终浓度为 1 mmol/L 的异丙基硫代半乳糖苷(IPTG),15 °C 诱导 24 h,收获菌液,利用 SDS-PAGE 和 Western-blot 分析目的蛋白表达情况。

1.4 重组 PorB 蛋白的可溶性分析

取 10 ml 诱导后菌液,4 °C、12 000 r/min 离心 10 min,收集菌体,用 5 ml 50 mmol/L Tri-HCl (pH7.5) 缓冲液重悬,于冰水浴中超声波破碎细菌。破碎后 4 °C、12 000 r/min 离心 10 min,分离上清与沉淀,沉淀用 5 ml 50 mmol/L Tris-Cl (pH7.5) 缓冲液重悬,5 \times Loading buffer、100 °C 下煮样 10 min,SDS-PAGE 鉴定重组 PorB 蛋白的可溶性。

1.5 重组 PorB 蛋白的纯化和定量

按照 Ni²⁺-NTA 柱纯化说明书纯化,按照 BCA 蛋白浓度测定试剂盒(Vazyme)说明书测定标准蛋白的 OD_{570} 值,制备出标准曲线,根据标准曲线计算重组 PorB 蛋白的浓度。

1.6 重组 PorB 蛋白对 PRV 弱毒疫苗免疫增强效力鉴定

1.6.1 动物免疫 调整纯化后的重组 PorB 蛋白浓

度为 1 mg/ml,按照每份含 100 μ g 的剂量添加到伪狂犬疫苗稀释液中。滴鼻免疫 3 日龄的 PRV 抗原抗体阴性猪和肌肉注射免疫 50 日龄的 PRV 抗原抗体阴性猪(表 1)。

表 1 试验动物分组与免疫

Table 1 Grouping and immunity of experimental animals

分组	免疫增强剂	剂量(μ g)	疫苗	免疫途径	动物数量(头)
G1	-	-	PRV 弱毒疫苗	滴鼻	8
G2	PorB	100	PRV 弱毒疫苗	滴鼻	12
G3	-	-	PBS	滴鼻	9
G4	-	-	PRV 弱毒疫苗	肌注	20
G5	PorB	100	PRV 弱毒疫苗	肌注	20
G6	-	-	PBS	肌注	20

1.6.2 试验猪血清 IgG 水平检测 免疫 28 d 后采集所有试验猪的血样,利用科前生物科技有限公司的 PRV gB 抗体阻断 ELISA 试剂盒检测免疫猪血清中 PRV 抗体水平。

1.6.3 试验猪黏膜抗体水平检测 利用棉绳收集 3 日龄滴鼻免疫 28 d 后试验猪的唾液,利用科前生物科技有限公司的 PRV gB 抗体阻断 ELISA 试剂盒检测猪唾液中 PRV 抗体水平。

1.6.4 中和抗体检测 根据参考文献[12],采用固定病毒稀释血清法进行检测。

1.6.5 细胞免疫反应测定 免疫 28 d 后采集所有试验猪的血样,用淋巴细胞分离液分离淋巴细胞,每个样品 3 次重复,试验组:细胞+抗原+RPMI-19640,细胞对照组:细胞+RPMI-1640,空白对照组:细胞+免疫前+RPMI-1640。37 °C、5% CO₂ 培养箱中培养 44 h,每孔加入 5 μ g/ml MTT 10 μ l,继续培养 4 h。除去上清,每孔加入 100 μ l 的 DMSO,充分振荡 10 min,测定 OD_{570} ,取 3 个值的平均值计算刺激指数(SI)。以刺激指数(SI)作为判断淋巴细胞转化程度的参数, $SI = \text{刺激孔 } OD_{570} \text{ 值} / \text{培养液对照孔 } OD_{570} \text{ 值}$ 。

细胞因子检测采用双抗体夹心 ELISA 方法,按照 ELISA 试剂盒说明书检测。

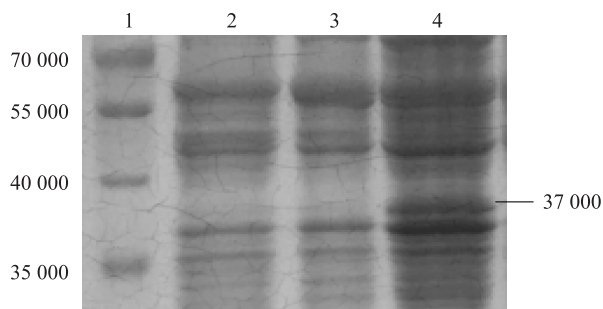
1.7 数据统计与分析

所有数据用 SPSS18 软件统计分析、作图。

2 结果

2.1 重组 PorB 蛋白 SDS-PAGE 结果

经 SDS-PAGE 电泳分析,与对照菌 pQZ III/BL21 和未诱导的重组菌相比,在约 37 000 处 1 条蛋白条带明显变粗,与预期结果相符(图 1)。利用重组蛋白末端携带的 His 标签进行 Western-blot 鉴定,说明重组菌 pQZ-*PorB*/BL21 在 IPTG 诱导下成功获得表达。



1:蛋白质分子量标准;2:对照菌 pQZ III/BL21 IPTG 诱导后全菌;3:重组菌 pQZ-*PorB*/BL21 IPTG 诱导前全菌;4:重组菌 pQZ-*PorB*/BL21 IPTG 诱导后全菌。

图 1 重组 PorB 蛋白的 SDS-PAGE 鉴定

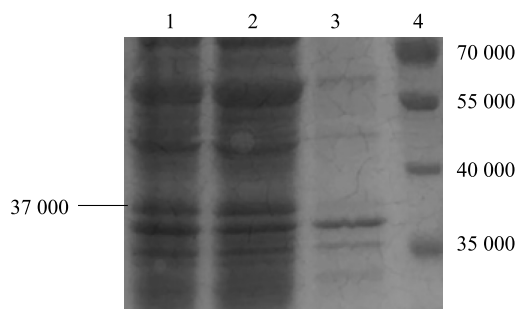
Fig.1 SDS-PAGE identification of recombinant PorB protein

2.2 重组 PorB 蛋白的可溶性鉴定和纯化

收获诱导菌体后用超声/高压破碎,对破碎后上清和破碎后沉淀进行 SDS-PAGE(图 2)。重组菌 pQZ-*PorB*/BL21 破碎后取上清,用 6His Ni-NTA 亲和层析法进行纯化,用不同浓度的咪唑洗涤杂蛋白并洗脱目的蛋白,收集洗脱产物进行 SDS-PAGE(图 3)和 Western Blot(图 4)鉴定,这些结果表明,重组菌 pQZ-*PorB*/BL21 诱导表达产物在上清中,目的蛋白以可溶的形式存在。

2.3 重组 PorB 对 PRV 疫苗滴鼻免疫的免疫增强效果

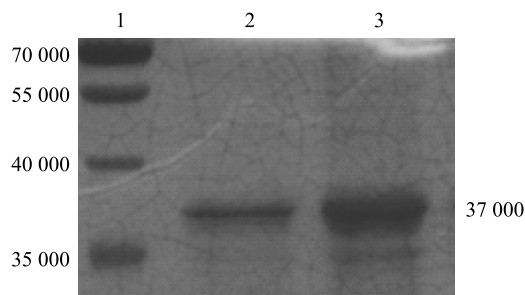
图 5 显示,纯化的重组 PorB 蛋白经脱盐、脱内毒素^[13]后作为疫苗稀释液与商品疫苗混合后,滴鼻免疫 3 日龄阴性仔猪,免疫 28 d 后,在存在较高的母源抗体的前提下,疫苗+100 μ g PorB 组产生了 85% 的 IgG 抗体阻断率,可以保障仔猪血清中 PRV gB 抗体阻断率不下降,与阴性对照组差异显著($P < 0.05$),但是没有免疫前的 IgG 抗体水平高,而单独免疫疫苗的试验组抗体阻断率较低,仅 55%,与对



1:重组菌 pQZ-*PorB*/BL21 IPTG 诱导后全菌;2:重组菌 pQZ-*PorB*/BL21 IPTG 诱导后上清;3:重组菌 pQZ-*PorB*/BL21 IPTG 诱导后沉淀;4:蛋白质分子量标准。

图 2 重组 PorB 蛋白的可溶性鉴定

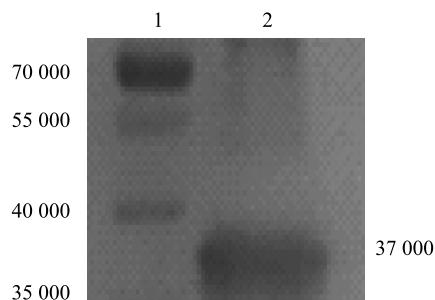
Fig.2 Solubility of recombinant PorB protein identified by SDS-PAGE analysis



1:蛋白质分子量标准;2~3:纯化的重组 PorB 蛋白。

图 3 纯化重组 PorB 蛋白的 SDS-PAGE 分析

Fig.3 SDS-PAGE analysis of purified recombinant PorB protein



1:蛋白质分子量标准;2:纯化的重组 PorB 蛋白。

图 4 纯化重组 PorB 蛋白的 Western-blot 分析

Fig.4 Western-blot analysis of recombinant PorB protein

照组差异不明显($P > 0.05$)。

图 6 显示,滴鼻免疫 3 日龄阴性仔猪 28 d 后,含 100 μ g PorB 蛋白的疫苗组产生了 89% 的 IgA 抗

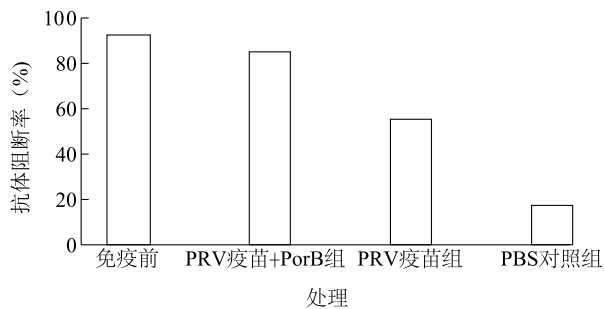


图5 3日龄仔猪滴鼻免疫后血清 PRV IgG 抗体阻断率

Fig.5 PRV IgG antibody blocking rate in serum for swine immunized with PRV attenuated vaccine

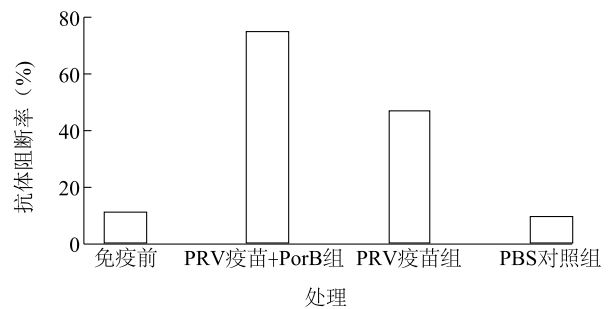


图7 50日龄仔猪注射免疫后 IgG 抗体阻断率

Fig.7 IgG antibody blocking rate for swine immunized with PRV attenuated vaccine

体阻断率,与阴性对照组和免疫前差异显著($P < 0.05$)。而单独免疫疫苗的试验组,抗体阻断率较低,仅 50%,与对照组差异不明显($P > 0.05$)。

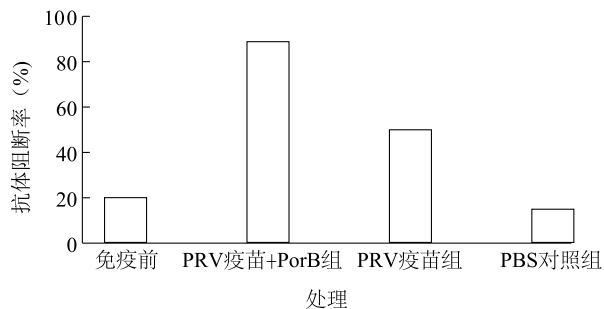


图6 3日龄仔猪滴鼻免疫后 IgA ELISA 抗体阻断率

Fig.6 IgA antibody blocking rate in saliva for swine nasally immunized with PRV attenuated vaccine

相符,表明 PorB 作为免疫增强剂能刺激试验猪中和抗体。

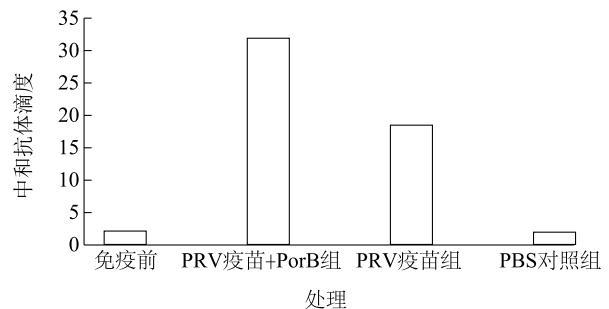


图8 50日龄仔猪注射免疫后特异性中和抗体水平

Fig.8 PRV specific neutralizing antibody level for swine immunized with PRV attenuated vaccine

2.4 重组 PorB 蛋白对 PRV 疫苗注射免疫的免疫增强效果

2.4.1 IgG 抗体 50 日龄 PRV 抗体阴性仔猪肌肉注射含有 PorB 蛋白的 PRV 弱毒疫苗,免疫 28 d 后,图 7 显示,疫苗+100 μg PorB 免疫组 IgG 抗体阻断率为 75%,单独免疫疫苗组的阻断率为 47%,差异显著($P < 0.05$),表明利用大肠杆菌表达的 PorB 蛋白具有良好的免疫增强性。

2.4.2 中和抗体 采用微量中和试验检测 50 日龄 PRV 抗体阴性仔猪肌肉注射含有 PorB 蛋白的 PRV 弱毒疫苗 28 d 后血清中特异性针对 PRV 的中和抗体水平,结果(图 8)表明,疫苗+100 μg PorB 免疫组产生较高的中和抗体,中和抗体滴度的平均值为 1:32,明显高于 PRV 疫苗免疫对照组产生的中和抗体滴度。该试验结果与用 gB 阻断法 ELISA 检测结果

2.4.3 细胞免疫水平

2.4.3.1 淋巴细胞增殖水平 为了探讨重组 PorB 蛋白配合 PRV 弱毒疫苗免疫仔猪后诱导特异性针对 PRV 的细胞免疫水平,本试验检测了肌肉注射免疫仔猪的特异性外周血淋巴细胞增殖情况。由图 9 可知,含有 PorB 蛋白 PRV 弱毒疫苗免疫组获得了较强的特异性淋巴细胞增殖反应,其刺激指数达到 2.50 ± 0.12 ,高于单独疫苗对照组的刺激指数 (1.30 ± 0.06),明显高于 PBS 组的刺激指数 (0.80 ± 0.03)。统计学分析结果显示,疫苗+100 μg PorB 免疫组与 PBS 组所引发的 T 细胞增殖反应强度差异明显($P < 0.05$),单独免疫疫苗的 T 细胞增殖反应与 PBS 组所引发的 T 细胞增殖反应强度差异不明显($P > 0.05$),此结果表明, PorB 作为免疫增强剂免疫猪后能够诱发较强的细胞免疫应答。

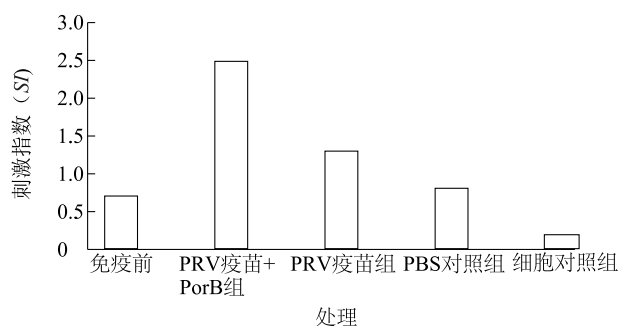


图 9 50 日龄仔猪注射免疫后淋巴细胞增殖反应

Fig.9 Specific lymphocyte proliferation responses for swine immunized with PRV attenuated vaccine

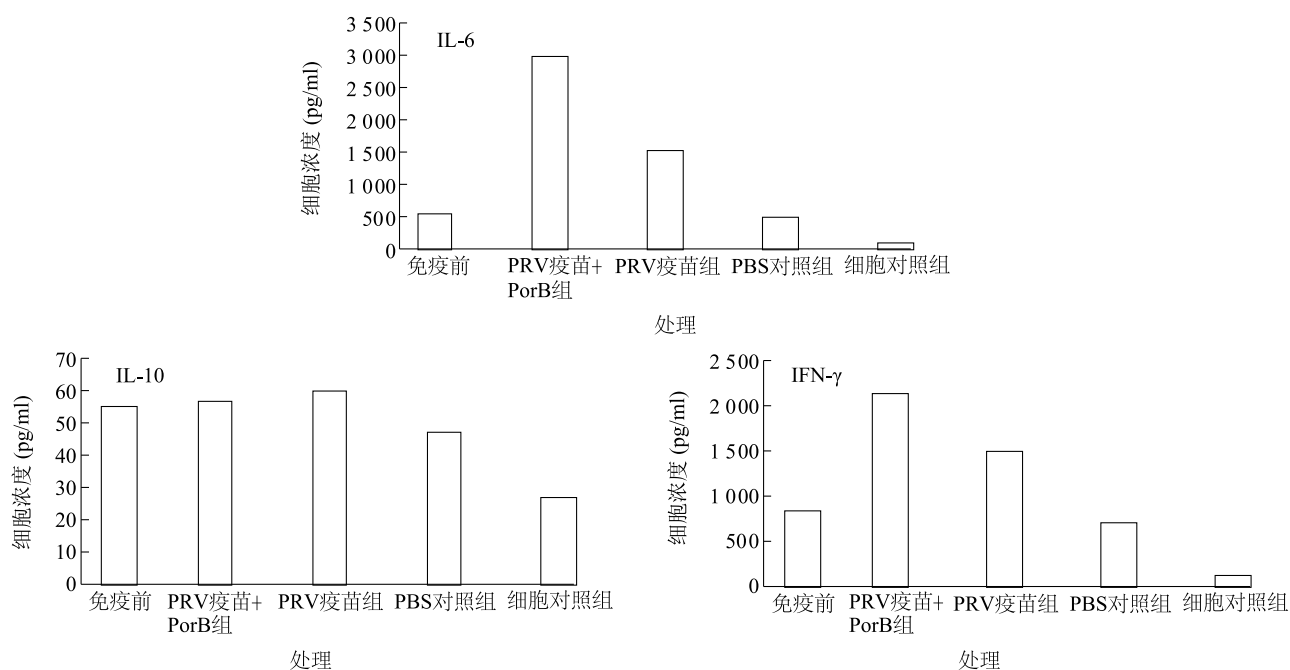


图 10 50 日龄免疫猪特异性细胞因子检测结果

Fig.10 Specific lymphocyte cytokine levels for swine immunized with PRV attenuated vaccine

3 讨论

猪伪狂犬病是目前危害规模化养殖猪健康生长的主要传染病之一,给养猪业带来巨大的经济损失,免疫接种是防治伪狂犬病的主要策略^[14]。为了更好地了解免疫增强剂对活疫苗的影响,用目前市场上相对成熟的伪狂犬弱毒活疫苗来做试验,评价重组 PorB 蛋白对猪伪狂犬弱毒疫苗免疫增强效果。

黏膜免疫有别于其他免疫反应,最大的特点是产生特异的分泌型 IgA (sIgA)^[15]。目前研究发现

2.4.3.2 细胞因子 为了更好地了解 PorB 免疫增强剂诱发体内产生细胞免疫类型,本文以 Th1 和 Th2 型细胞因子为靶点,比较试验猪免疫后 Th1 型细胞因子(IFN-γ)、Th2 细胞因子(IL-6)及抑制性 T 细胞因子(IL-10)的分泌水平。结果(图 10)显示,与单独免疫疫苗对照组相比,疫苗+PorB 蛋白组增加了淋巴细胞中 IFN-γ 和 IL-6 细胞因子的含量。但是对 IL-10 细胞因子的产量没有明显影响,表明重组 PorB 蛋白作为 PRV 弱毒疫苗稀释液,肌肉注射免疫动物,没有产生抑制免疫应答的 IL-10 细胞因子,但增强了 IFN-γ 和 IL-6 细胞因子的产量,即诱导体内产生强烈的 Th1 和 Th2 混合型细胞免疫。

sIgA 仅在黏膜区域表达,在黏膜反应中起着非常重要的作用。当黏膜淋巴细胞受到微生物和毒素分子刺激时,则产生相应的 sIgA 阻止相关的有害微生物和毒素分子对黏膜的攻击。因此,黏膜免疫是保护机体免于病原体侵犯的第一道屏障。本研究对重组 PorB 蛋白作为黏膜免疫增强剂的可行性进行初步研究。由 ELISA 抗体检测结果可知,重组 PorB 蛋白作为猪伪狂犬弱毒疫苗的稀释液滴鼻免疫 3 日龄初生仔猪,可以诱导较强的黏膜免疫和体液免疫应答,能够非常明显地增强局部黏膜免疫反应,提高 sIgA

的产量,这与 PorB 蛋白在人用疫苗中的相关报道结论^[16-18]一致。

重组 PorB 蛋白作为猪伪狂犬弱毒疫苗的稀释液肌肉注射免疫 50 日龄的保育仔猪,能够明显增强 PRV 弱毒疫苗诱导的体液免疫与细胞免疫应答。诱导机体内产生 Th1 和 Th2 混合型细胞免疫,与已有研究结果^[19-20]一致。疫苗+PorB 免疫组没有增加 IL-10 细胞因子的含量,说明没有产生抑制型细胞免疫反应,因为有研究表明 IL-10 抑制 APC 的成熟,可直接作用于初始 CD4⁺T 细胞,通过抑制 Th1 细胞亚群分泌 IFN- γ 和 IL-2 来影响 T 细胞亚群的分化与成熟^[21-22]。

PorB 蛋白能够诱导体内产生较强的体液免疫和细胞免疫,这可能和以下因素有关,1) PorB 蛋白是外膜孔道蛋白形成分子在细菌膜上的一个孔道,外膜孔道蛋白分子在哺乳动物的膜上可以通过其形成的离子通道激活免疫细胞。2) PorB 蛋白主要通过 MyD88、TLR-2 的相互作用,向上调节 B 细胞上的 T 细胞共刺激分子 B7-2 (CD86) 和其他 APCs 分子的表达。3) PorB 蛋白还通过刺激专职抗原提呈细胞,使其分泌细胞因子,刺激 B 细胞的增殖和免疫球蛋白的产生^[23-24]。4) *PorB-CTA* 基因融合不仅被 DC、巨噬细胞有效摄取,还被原始 B 淋巴细胞摄取,刺激 B 细胞的分化和成熟,产生抗体,使抗体在血液和黏膜表面发挥中和微生物毒力的作用^[25]。

本试验结果显示,重组 PorB 蛋白作为弱毒疫苗的稀释剂肌肉注射免疫 50 日龄的伪狂犬阴性猪,能刺激机体产生较强的系统免疫应答,滴鼻免疫 3 日龄的仔猪,不但刺激机体产生系统免疫,而且产生了较高的黏膜免疫水平,这说明 PorB 重组蛋白能够有效增强抗原的免疫原性,为 PorB 重组蛋白作为黏膜免疫增强剂使用奠定了基础。本试验目前处于鉴定 PorB 重组蛋白对疫苗免疫增强作用的初步阶段,而免疫的最佳使用剂量、免疫持续期、攻毒保护期等还需要后续的试验摸索。本研究利用的重组 PorB 蛋白对 PRV 弱毒疫苗具有良好的免疫增强效果,可以诱导体内产生强烈的体液免疫和细胞免疫,说明重组 PorB 蛋白是一个具有良好发展前景的疫苗免疫增强剂。

参考文献:

[1] 崔 萍,于三科. 黏膜免疫佐剂及免疫途径研究进展[J]. 动物

医学进展, 2007, 28(2):81-84.

- [2] HUMPHRIES H E, WILLIAMS J N, CHRISTODOULIDES M, et al. Recombinant meningococcal PorA protein, expressed using a vector system with potential for human vaccination, induces a bactericidal immune response [J]. Vaccine, 2004, 22 (11/12): 1564-1569.
- [3] BURKE J M, GANLEY-LEAL L M, KHATRI A, et al. *Neisseria meningitidis* PorB, a TLR2 ligand, induces an antigen-specific eosinophil recall response: potential adjuvant for helminth vaccines [J]. The Journal of Immunology, 2007, 179(5): 3222-3230.
- [4] 崔 萍. 蛋白体黏膜佐剂的研究进展[J]. 中国微生态学杂志, 2013, 25(11):1353-1355.
- [5] 袁 源,王 栋,邢 丽,等. 不同佐剂与鼠疫 F1-V 融合重组蛋白抗原滴鼻免疫效果的研究[J]. 免疫学杂志, 2009, 25(2):183-186.
- [6] 朱 玲,郭万柱,徐志文. 猪伪狂犬病基因缺失活疫苗 (SA215) 免疫母猪后仔猪母源抗体消长规律及首免日龄[J]. 中国兽医学报, 2004, 24(4):320-322.
- [7] 郭广富,曹军平,朱爱萍,等. 猪伪狂犬病毒泰州株的分离鉴定[J]. 江苏农业科学, 2015, 43(3):200-202.
- [8] 贺卫洁. 猪瘟和猪伪狂犬病二联苗免疫干扰现象的研究[D]. 保定:河北农业大学, 2010.
- [9] 严 琳. 猪白细胞介素 2 (pIL-2) 与猪白细胞介素 6 (pIL-6) 的基因表达及作为疫苗佐剂的研究[D]. 武汉:华中农业大学, 2005.
- [10] 张玲华,田兴山,邝哲师,等. CpG 序列对猪伪狂犬疫苗免疫效果的影响[J]. 中国畜牧兽医, 2004, 31(3):37-39.
- [11] 赖庆光. 不同佐剂对伪狂犬活疫苗免疫效果的比较研究[D]. 南昌:江西农业大学, 2011.
- [12] 徐金生,吴时清,黄宝春,等. 应用微量中和试验检测进口奶牛血清中牛流行热病毒抗体[J]. 中国兽医科学, 1989(2):22-23.
- [13] 黄秋香,毕湖冰,张新文,等. Triton X-114 液相分离法去除流感单价病毒原液中内毒素的实验研究[J]. 重庆医学, 2010, 39(4):385-387.
- [14] STOKHOLM N M, PERMIN A, BISGAARD M, et al. Causes of mortality in commercial organic layers in Denmark[J]. Avian Diseases, 2010, 54(4):1241-1250.
- [15] OGRA P L, FADEN H, WELLIVER R C. Vaccination strategies for mucosal immune responses[J]. Clinical Microbiology Reviews, 2001, 14(2):430-445.
- [16] WRIGHT J C, WILLIAMS J N, CHRISTODOULIDES M, et al. Immunization with the recombinant PorB outer membrane protein induces a bactericidal immune response against *Neisseria meningitidis*[J]. Infection & Immunity, 2002, 70(8):4028-4034.
- [17] PLATT A, MACLEOD H, MASSARI P, et al. *In vivo* and *in vitro* characterization of the immune stimulating activity of the *Neisserial* porin PorB[J]. Plos One, 2013, 8(12):e82171.
- [18] CHIAVOLINI D, WEIR S, MURPHY J R, et al. *Neisseria meningitidis* PorB, a Toll-like receptor 2 ligand, improves the capacity

- of *Francisella tularensis* lipopolysaccharide to protect mice against experimental tularemia[J]. *Clinical and Vaccine Immunology*, 2008, 15(9): 1322-1329.
- [19] ZHU W, THOMAS C E, SPARLING P F. DNA immunization of mice with a plasmid encoding *Neisseria gonorrhea* PorB protein by intramuscular injection and epidermal particle bombardment[J]. *Vaccine*, 2004, 22(5/6): 660-669.
- [20] PLANTE M, JONES T, ALLARD F, et al. Nasal immunization with subunit proteosome influenza vaccines induces serum HAI, mucosal IgA and protection against influenza challenge[J]. *Vaccine*, 2001, 20(1/2): 218-225.
- [21] WILKE C M, WEI S, WANG L, et al. Dual biological effects of the cytokines interleukin-10 and interferon- γ [J]. *Cancer Immunology, Immunotherapy*, 2011, 60(11): 1529-1541.
- [22] MOORE K W, DE WAAL MALEFYT R, COFFMAN R L, et al. Interleukin-10 and the interleukin-10 receptor[J]. *Annual Review of Immunology*, 2001, 19(1): 683-765.
- [23] MASSARI P, KING C A, MACLEOD H, et al. Improved purification of native meningococcal porin PorB and studies on its structure/function[J]. *Protein Expression and Purification*, 2005, 44(2): 136-146.
- [24] SINGLETON T E, MASSARI P, WETZLER L M. *Neisserial* porin-induced dendritic cell activation is MyD88 and TLR2 dependent[J]. *Journal of Immunology*, 2005, 174(6): 3545-3550.
- [25] 李彦伸,戴建君,庾庆华. 黏膜免疫佐剂的研究进展[J]. *中国畜牧兽医*, 2007, 34(12): 86-90.

(责任编辑:王 妮)