

# 大肠杆菌 LTB 亚基基因表达载体对犬细小病毒 VP2 DNA 疫苗免疫应答的增强作用

韩冬梅<sup>1</sup>, 仲飞<sup>1\*</sup>, 李秀锦<sup>2</sup>, 王微<sup>1</sup>, 王幸兴<sup>1</sup>, 潘素敏<sup>1</sup>

<sup>1</sup>河北农业大学动物科技学院基础兽医系, 保定 071001

<sup>2</sup>燕山大学环境与化学过程学院生物工程系, 秦皇岛 066004

**摘要:**【目的】通过融合基因表达载体和共免疫基因表达载体研究大肠杆菌不耐热肠毒素(LT)B亚基基因对犬细小病毒VP2 DNA疫苗免疫应答的影响。【方法】提取大肠杆菌44815菌株基因组DNA,通过PCR方法从基因组DNA中扩增LTB基因,同时采用PCR方法从含有犬细小病毒VP2基因的质粒中扩增VP2的主要抗原表位基因(VP2-70,编码70个氨基酸)。将上述基因分别连接到含有人CD5信号肽序列的载体pcDNA-CD5sp上,分别构建成它们的分泌型真核表达载体,pcDNA-CD5sp-LTB和pcDNA-CD5sp-VP2-70。再利用酶切连接的方法构建LTB与VP2-70融合的真核表达载体pcDNACD5sp-LTB-VP2-70。然后用pcDNACD5sp-VP2-70(VP2-70组)、pcDNACD5sp-LTB-VP2-70(VP2-LTB融合组)、pcDNA-CD5sp-LTB/pcDNACD5sp-VP2-70(VP2-LTB共免疫组)和pcDNA3.1A(空载体对照组)分别免疫小鼠。免疫后用间接ELISA检测不同时间小鼠血清的抗体水平,用MTT方法检测小鼠免疫5周后脾脏淋巴细胞的增殖活性。【结果】经过测序表明本研究扩增的LTB和VP2基因序列和构建的相关表达载体结构正确。通过Western-blot检测证明构建的表达载体均能介导相应基因在真核细胞进行分泌表达。ELISA检测结果表明,3组实验组小鼠接受VP2 DNA疫苗免疫后均能产生特异的体液免疫应答反应,特别是VP2-LTB基因融合组小鼠的抗体水平在第5周时高达1:5120,明显高于其它两组( $P < 0.01$ )。3组免疫小鼠抗体的亚型均表现IgG1抗体水平明显高于IgG2a抗体水平( $P < 0.01$ )。淋巴细胞增殖实验结果表明,在Con A的刺激下,3组免疫小鼠的淋巴细胞刺激指数均明显高于对照组( $P < 0.01$ ),说明VP2 DNA疫苗能够引起淋巴细胞的增殖。但3组免疫小鼠之间的刺激指数没有明显差异( $P > 0.05$ )。【结论】在小鼠体内,LTB基因表达载体可明显提高CPV VP2 DNA疫苗的体液免疫应答水平。

**关键词:** *E. coli* 不耐热肠毒素B亚基, 细小病毒, VP2基因, DNA疫苗

**中图分类号:** R37 **文献标识码:** A **文章编号:** 0001-6209 (2011)01-0091-07

犬细小病毒病是由犬细小病毒(Canine parvovirus, CPV)引起的一种急性传染病。临床上主

要表现为急性胃肠炎、心肌炎和白细胞减少症<sup>[1]</sup>。目前对该病控制主要通过接种弱毒疫苗进行预防,但使

**基金项目:**国家自然科学基金(30771586);河北省自然科学基金(C2008000244);河北省人事厅留学人员科技活动择优资助项目(20080808)

\*通信作者。Tel: +86-312-7528473; E-mail: feizhong2000@yahoo.com

**作者简介:**韩冬梅(1979-),女,河北保定人,博士研究生,主要从事动物基因工程方面的研究。E-mail: dongmeiyuqi@yahoo.com.cn

**收稿日期:**2010-06-11; **修回日期:**2010-09-07

用弱毒苗存在潜在的感染性和毒副反应。DNA 疫苗由于具有既可诱导体液免疫应答又可诱导细胞免疫应答的特点而受到人们的广泛关注,为此国内外学者在 CPV DNA 疫苗方面进行了多方面的研究,Gupta 用含 CPV VP2 DNA 质粒表达载体免疫家犬获得了较好的保护性免疫反应<sup>[2]</sup>。谢之景等<sup>[3]</sup>曾对犬细小病毒 DNA 疫苗进行较为深入地研究,比较了 CPV DNA 疫苗与重组活载体疫苗和弱毒疫苗免疫效果,结果表明 DNA 疫苗与其它两种疫苗一样,均能使免疫犬产生特异的免疫应答反应,但 DNA 疫苗的抗体滴度小于重组活载体疫苗与弱毒疫苗。为提高 DNA 疫苗的免疫水平,DNA 疫苗的生物佐剂受到人们的重视,如 CpG、热激蛋白(HSP)、白细胞介素-2(IL-2)、霍乱毒素(CT)及大肠杆菌不耐热肠毒素(LT)等<sup>[4]</sup>。研究证明 LT 的 B 亚基(LTB)具有较强的免疫佐剂活性且无毒性,是目前人们研究较多的粘膜免疫佐剂,将 LTB 与疫苗联合应用可提高动物的粘膜免疫水平<sup>[5]</sup>。但有关 LTB 基因作为 DNA 疫苗免疫佐剂的研究报道的却很少,Joshua 等用含 LTB 基因的真核表达载体作为 DNA 疫苗的免疫佐剂来提高 HIV 病毒 GP120 基因疫苗和乙肝表面抗原基因疫苗的免疫水平获得了较好效果<sup>[6]</sup>。LTB 基因对 CPV VP2 基因疫苗有无免疫佐剂作用尚未见报导。为此本研究通过构建 VP2 抗原表位基因和 LTB 基因真核表达载体,然后免疫小鼠分析了 LTB 基因对 CPV VP2 基因疫苗的生物佐剂作用。实验结果表明,LTB 可显著提高 CPV VP2 基因疫苗的体液免疫应答水平,这为 CPV VP2 DNA 疫苗的进一步研究和应用提供了重要实验依据。

## 1 材料和方法

### 1.1 材料

**1.1.1 质粒、菌株、细胞株及实验动物:** pcDNA3.1A 质粒为真核表达载体,购自美国 Invitrogen 公司;pcDNA-CD5sp 质粒为含有人 CD5 信号肽序列的真核表达载

体,由本实验室构建<sup>[7]</sup>;大肠杆菌 (*Escherichia coli*) DH5 $\alpha$  为本实验室保存菌种;大肠杆菌 44815 菌株为产不耐热肠毒素菌株,购自中国药品生物制品鉴定所;猫肾 F81 细胞为扩增 CPV 细胞系,人胚胎肾细胞 HEK293 为基因瞬时分泌表达细胞系,均为本实验室保存细胞株;含犬细小病毒 VP2 基因(GenBank AB120727)的质粒由中国农业大学贺英博士惠赠;BALB/c 雌性小鼠(6-8 周龄)购自河北省实验动物中心。

**1.1.2 主要试剂和仪器** QuikChange<sup>®</sup> Site-Directed Mutagenesis Kit 定点突变试剂盒为 Stratagene 公司产品;限制性内切酶、T4 DNA 连接酶、质粒小量提取试剂盒均购自美国 Promega 公司;琼脂糖凝胶 DNA 回收试剂盒购自天根生化科技(北京)有限公司;DNA marker DL 2,000 购自大连宝生物公司;鼠抗 His 单克隆抗体,碱性磷酸酶标记羊抗鼠 IgG,羊抗鼠 IgG1-HRP、IgG2a-HRP 均购自 Santa Cruz Biotechnology, Inc;其它试剂均为国产分析纯。ATC201 型 PCR 仪为美国阿波罗公司产品;550 型酶标仪为美国伯乐公司产品;超净工作台为北京东联哈尔仪器制造有限公司产品;MCO-15AC 型 CO<sub>2</sub> 恒温培养箱为日本三洋公司产品;3K15 型高速台式离心机为美国 SIGMA 公司产品。

### 1.2 LTB 基因的扩增及表达载体构建

根据 GenBank 中大肠杆菌不耐热肠毒素的序列(No. AB011677),设计 2 对用于扩增大肠杆菌不耐热肠毒素 B 亚基的引物(表 1)。

利用 Murray 方法<sup>[8]</sup>从产肠毒素的 *E. coli* 44815 菌株中提取基因组 DNA,利用 LTB-F 和 LTB-R 引物通过 PCR 从基因组 DNA 中扩增 LTB 全长编码基因;用 LTB-F 和 LTB/MH-R 引物扩增没有终止密码子的 LTB 编码基因。热循环条件均为:94 $^{\circ}$ C 预变性 4 min;94 $^{\circ}$ C 变性 1 min,66 $^{\circ}$ C 退火 1 min,72 $^{\circ}$ C 延伸 1 min,共循环 30 次;72 $^{\circ}$ C 延伸 10 min。用胶回收试剂盒回收 LTB 基因片段。

表 1 扩增 LTB 亚基编码基因的引物

Table 1 Primers used for amplification of LT B gene

Primers	Sequence of primers (5'→3')	Sizes / bp	Restriction sites
LTB-F:	GGAGCTAGCCGCTCCCGACTATTACAGAACTATGTTCC	331	<i>Nhe</i> I
LTB-R:	CCTGGATCCCTAGTTTTTCATACTGATTGCCGAATAGAATTG		<i>Bam</i> HI
LTB-F:	GGAGCTAGCCGCTCCCGACTATTACAGAACTATGTTCC	331	<i>Nhe</i> I
LTB/MH-R:	CCTGGCCCGGAGTTTTTCATACTGATTGCC	<i>Apa</i> I	

The sizes of the amplified PCR products include the corresponding primers. The italic, bold and underlined letters indicate restriction sites. The shadowed letters represent the complementary sequences against the template DNA.

扩增的 LTB 全长编码基因片段通过 *NheI* 和 *BamHI* 位点插入到 pcDNA-CD5sp 质粒的 CD5 信号肽下游,并与其融合,构建成 LTB 基因的真核分泌型表达载体 pcDNACD5sp-LTB;扩增的无终止密码子的 LTB 编码基因通过 *NheI* 和 *ApaI* 位点插入到 pcDNA-CD5sp 质粒的 CD5 信号肽下游,并与其融合,构建成与 Myc/His 标签融合的 LTB 基因真核分

泌型表达载体 pcDNACD5sp-LTB/MH。

### 1.3 犬细小病毒 VP2 抗原表位基因 (VP2-70) 表达载体的构建

根据犬细小病毒 VP2 基因 (AB120727) 和编码的氨基酸序列,利用 DNASTAR 软件确定 VP2 蛋白抗原表位基因 (VP2 蛋白第 490-559 位氨基酸) 如图 1。

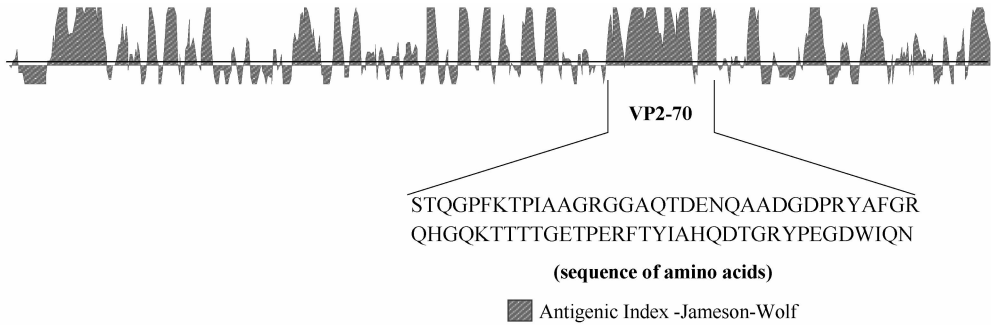


图 1 VP2 蛋白抗原表位的位置

Fig. 1 The position of the epitope of VP2 protein.

然后依据其序列,设计 3 条用于扩增 VP2 抗原表位基因 (编码 70 个氨基酸) VP2-70 基因的引物: VP2-70-F: 5'-CTGCCG ATCC (*BamHI*) TCTACACA AGGGCCATTTAAAAC-3'; VP2-70-R: 5'-CCGGGGCCC (*ApaI*) TCAATTTTGAATCCAATCT CTTTCTG-3'; VP2-70/MH-R: 5'-CCGGGGCCC (*ApaI*) GCAATTTTGAATC-CAATCTCCTTCTG-3'。

用引物 VP2-70-F 和 VP2-70-R 通过 PCR 从含 VP2 基因的质粒中扩增 VP2-70 基因 (3'端设计 1 个终止密码子);用引物 VP2-70-F 和 VP2-70/MH-R 扩增不带有终止密码子的 VP2-70 基因。热循环条件为:94℃ 预变性 4 min; 94℃ 变性 1 min, 60℃ 退火 1 min, 72℃ 延伸 30 s, 共循环 30 次;再在 72℃ 延伸 10 min。用胶回收试剂盒回收 VP2-70 基因片段。通过与上述同样的方法将 VP2-70 基因片段分别插入到 pcDNA-CD5sp 质粒中,构建成未融合 Myc/His 标签和融合 Myc/His 标签的 VP2-70 基因的真核分泌型表达载体,即 pcDNACD5sp-VP2-70 和 pcDNACD5sp-VP2-70/MH。

### 1.4 LTB 与 VP2-70 融合基因表达载体构建

用 *BamHI* 和 *ApaI* 双酶切 pcDNACD5sp-VP2-70 和 pcDNACD5sp-VP2-70/MH 质粒,分别回收和纯化 VP2-70 DNA 片段,然后通过这两个酶切位点分别将 VP2-70 片段插入到 pcDNACD5sp-LTB 质粒的

LTB 基因下游,构建成 LTB 与 VP2-70 基因连接的重组质粒 pcDNACD5sp-LTB/VP2-70 和 pcDNACD5sp-LTB/VP2-70/MH。然后采用 QuikChange Site-Directed Mutagenesis Kit 定点突变试剂盒,利用 1 对突变引物: LTBm-VP2-70-F: 5'-GGCAATCAGTATGAAAAACGGGGATCCTCTACACAAGG-3' 和 LTBm-VP2-70-R: 5' CCTTGTGTAGAGGATCCCC CGTTTTTCATACTGATTGCC-3',分别将上述重组质粒中 LTB 基因的终止密码子 TAG 突变为 GGG,使 LTB 基因与 VP2-70 基因进行融合,从而分别构建成 LTB 基因与 VP2-70 基因融合的真核分泌型表达载体,即 pcDNACD5sp-LTB-VP2-70 和 pcDNACD5sp-LTB-VP2-70/MH。

### 1.5 细胞转染与表达产物鉴定

用质粒抽提试剂盒分别制备与 Myc/His 标签融合的重组质粒表达载体: pcDNACD5sp-LTB/MH, pcDNACD5sp-VP2-70/MH 和 pcDNACD5sp-LTB-VP2-70/MH,采用磷酸钙转染法<sup>[9]</sup>将各 30 μg 重组质粒分别转染 T75 细胞瓶培养的 HEK293T 细胞,48 h 后收集培养基,用 Ni-NTA 琼脂糖凝胶颗粒吸附法纯化重组蛋白。与此同时,用空载体 pcDNA3.1A-CD5 转染 HEK293T 细胞作为阴性对照。

表达产物的鉴定采用 Western blot 法,首先将蛋白样品经 SDS-PAGE 凝胶电泳,再印迹到硝酸纤维

膜上,利用鼠抗-His 单克隆抗体(一抗)和碱性磷酸酶标记羊抗小鼠抗体(二抗)先后分别杂交,最后通过碱性磷酸酶底物(NBT/BCIP)显色,鉴定表达的重组蛋白。

### 1.6 动物分组及免疫

将 24 只 BALB/c 雌性小鼠(6-8 周龄)随机分为 4 组(每组 6 只)。对照组免疫 pcDNA3.1 质粒,VP2 组免疫 pcDNACD5sp-VP2-70 质粒,LTB 与 VP2 共注射组免疫 pcDNACD5sp-LTB 质粒和 pcDNACD5sp-VP2-70 质粒,LTB-VP2 融合组免疫 pcDNACD5sp-LTB-VP2-70 质粒。每只小鼠后腿肌肉注射每种质粒为 100  $\mu\text{g}$  /只。连续免疫 2 次,间隔 3 周。每次在免疫前 2d 和免疫后 14d 尾尖采血,分离血清, -20 $^{\circ}\text{C}$  保存备用。

### 1.7 特异抗体滴度检测

小鼠血清特异抗体测定采用 ELISA 方法。

### 1.8 淋巴细胞增殖实验

小鼠脾脏淋巴细胞增殖实验采用 MTT 测定法。

## 2 结果

### 2.1 LTB、VP2-70 及 LTB-VP2-70 基因真核分泌型表达载体的构建

通过 PCR 方法从 *E. coli* 44815 基因组 DNA 和含 VP2 基因的质粒中分别扩增 LTB 基因(331bp)和 VP2-70 基因(207bp),利用适当的酶切位点将扩增的基因片段插入到 pcDNA-CD5sp 质粒的 CD5 信号肽下游,分别构建成 LTB 和 VP2-70 这两个基因的与 Myc/His 融合和不融合的真核分泌型表达载体(图 2): pcDNACD5sp-LTB/MH 和 pcDNACD5sp-LTB; pcDNACD5sp-VP2-70/MH 和 pcDNACD5sp-VP2-70。在上述重组质粒的基础上,采用酶切连接和定点突变等方法构建出 LTB 与 VP2-70 基因融合的表达载体(图 2): pcDNACD5sp-LTB-VP2-70/MH 和 pcDNACD5sp-LTB-VP2-70。扩增的 LTB 和 VP2-70 基因序列及其载体结构经测序证明结构正确。

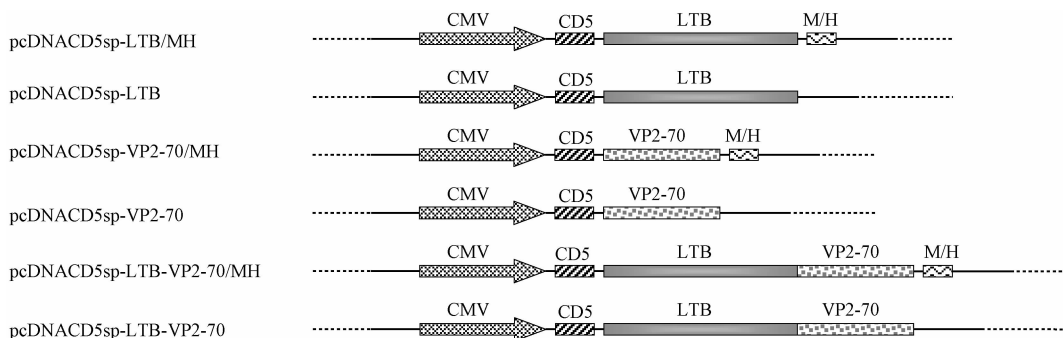


图 2 LTB 和 VP2-70 基因表达载体结构

Fig. 2 Structures of the expression vectors of LTB gene and VP2-70 gene. CMV, Human cytomegalovirus (CMV) promoter; CD5, Signal peptide of human CD5 gene; LTB, Escherichia coli heat-labile enterotoxin B subunit; VP2-70, Epitope of canine parvovirus VP2 including 70 amino acids; M/H, Myc and 6-histidine tag.

### 2.2 LTB、VP2-70 及 LTB-VP2-70 在 HEK293T 中的表达

为证明构建的 LTB、VP2-70 及 LTB-VP2-70 基因表达载体能否在培养的真核细胞中进行分泌性表达,本实验采用磷酸钙转染法,将 pcDNACD5sp-LTB/MH、pcDNACD5sp-VP2-70/MH、pcDNACD5sp-LTB-VP2-70/MH 及 pcDNA3.1A-CD5 (对照) 分别转染 HEK293T 细胞,转染后 48 h 收集细胞培养基,用三氯乙酸沉淀法浓缩培养基中的蛋白质,利用鼠抗 His 单克隆抗体和碱性磷酸酶标记的羊抗鼠 IgG,通过 Western-blot 检测培养基中重组蛋白的表达。Western-blot 检测结果(图 3)显示,在上述转染 3 种

质粒的细胞培养基中均能检测出目的蛋白的杂交带。由此可见本研究构建的 3 种基因结构(LTB、VP2-70 和 LTB-VP2-70)的表达载体均能介导目的基因在真核细胞中的分泌性表达。

### 2.3 犬细小病毒 VP2 DNA 疫苗免疫小鼠试验

用 pcDNA3.1、pcDNACD5sp-VP2-70、pcDNACD5sp-VP2-70/pcDNACD5sp-LTB 和 pcDNACD5sp-LTB-VP2-70 质粒分别免疫 4 组小鼠。3 周后加强免疫 1 次。在不同时间分析免疫小鼠的体液免疫和细胞免疫的应答反应。

2.2.1 体液免疫应答反应:分别采集每次免疫前第 2d 及免疫后第 14 天的小鼠血清,利用包被的犬细

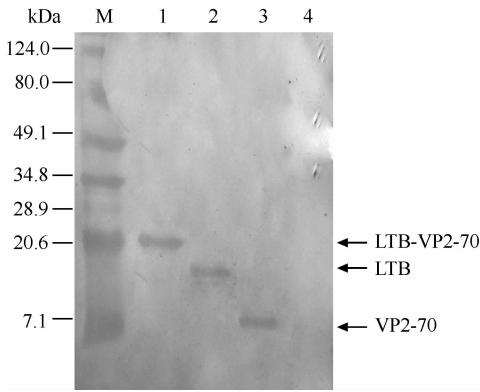


图 3 重组蛋白 Western-blot 鉴定

Fig. 3 Identification of LTB-VP2-70, LTB and VP2-70 expression with Western blot. M, prestained protein molecular weight marker; 1, Transfected with pcDNACD5sp-LTB-VP2-70/MH; 2, Transfected with pcDNACD5sp-LTB/MH; 3, Transfected with pcDNACD5sp-VP2-70/MH; 4, Transfected with pcDNACD5sp.

小病毒和羊抗鼠 IgG2a-HRP 和羊抗鼠 IgG1-HRP, 通过 ELISA 方法分别检测抗 VP2 特异的 IgG2a 型和 IgG1 型的抗体滴度 (图 4)。

由图 4-A 检测结果可见, 免疫第 14 天后 4 组小鼠血清抗 VP2 特异的 IgG2a 型抗体滴度均很低, 但免疫第 35 天时, 3 个实验组小鼠的抗体滴度均明显升高。但以 LTB-VP2 融合组抗体滴度最高, 明显高于 LTB 与 VP2 共注射组和 VP2 组 ( $P < 0.01$ )。但 VP2 组和 LTB 与 VP2 共注射组之间没有明显的差异 ( $P > 0.05$ )

图 4-B 检测结果显示, 免疫第 14 天后实验组小鼠血清的 IgG1 型抗体滴度均有所升高, 明显高于同时期的 IgG2a 型抗体滴度 ( $P < 0.01$ )。与 IgG2a 型抗体一样, IgG1 型抗体水平仍以 LTB-VP2 融合组最高, 明显高于其它两个实验组 ( $P < 0.01$ ), 免疫第 35 天时, 各组小鼠的抗体滴度均继续大幅上升。图 4-D 显示不同免疫组抗体型 IgG1/IgG2a 的比值, 数据显示 VP2 组的 IgG1/IgG2a 比值最高, 其次为 VP2 与 LTB 共注射组和 LTB-VP2 融合组。

上述实验结果表明, 本研究构建的 VP2 DNA 疫苗能够刺激小鼠产生特异的抗体, 抗体类型以 IgG1 为主。实验证实 LTB 通过基因融合可以明显提高

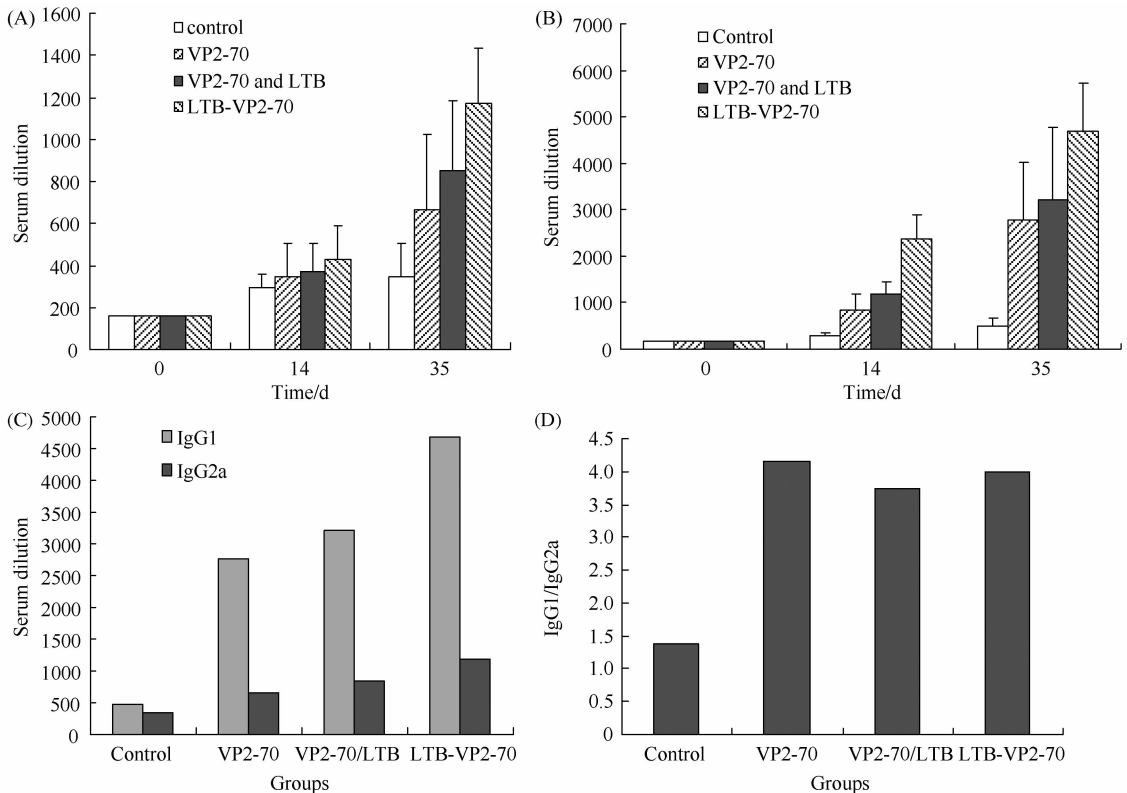


图 4 VP2 蛋白特异性的抗体 (IgG2a 和 IgG1) 滴度

Fig. 4 VP2-specific antibody titers (IgG1 and IgG2a isotypes). A: IgG2a antibody isotype titers against VP2 in different group; B: IgG1 antibody isotype titers against VP2 in different group; C: Comparison between IgG1 antibody isotype and IgG2a antibody isotype at 35 d post-immunization; D: The ratio of VP2-specific IgG1 and IgG2a antibodies at 35 d post-immunization.

小鼠对 VP2 基因疫苗的体液免疫应答水平。

**2.2.2 细胞免疫应答反应:**应用 MTT 法检测不同免疫组小鼠淋巴细胞的增殖情况(图 5),图 5 实验数据显示,3 个实验免疫组小鼠的淋巴细胞增殖反应均明显高于对照组,LTB 融合组和 LTB 共注射组的淋巴细胞增殖反应略高于 VP2-70 组,但没有达到显著水平( $P > 0.05$ )。这一实验结果说明 LTB 对 VP2 基因疫苗免疫小鼠体内淋巴细胞的增殖反应没有明显促进作用。至于 LTB 是否促进 VP2 DNA 疫苗在小鼠体内的细胞免疫水平,包括 CD4 + T 辅助细胞细胞因子的释放和 CD8 + T 细胞介导的细胞毒性反应(CTL 反应)有待于进一步研究。

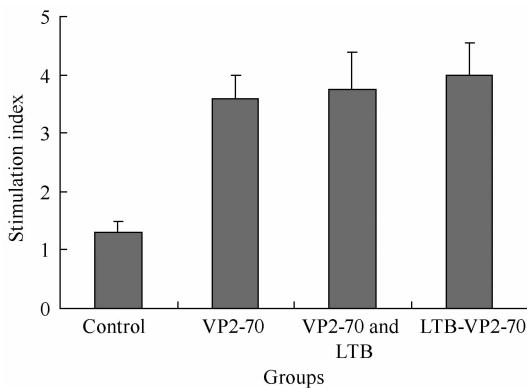


图 5 淋巴细胞增殖试验

Fig. 5 The results of lymphocyte proliferation assay.

### 3 讨论

本实验研究证明,无论通过 LTB 基因表达载体与 VP2 抗原表达载体共免疫小鼠或利用 LTB 与抗原融合基因表达载体免疫小鼠,LTB 基因均可明显提高小鼠的对 VP2 基因疫苗的体液免疫应答水平,但以 LTB 与 VP2 融合基因免疫效果明显。

为获得满意的免疫应答效果,人们在制备抗原基因表达载体时常制备真核分泌型表达载体,使表达的抗原蛋白能够分泌到细胞外,以刺激机体的免疫反应。编码犬细小病毒 VP2 蛋白的基因缺乏信号肽序列,所以我们在构建 VP2 真核表达载体时,在该基因的上游融合了人 CD5 信号肽序列以实现 VP2 蛋白的分泌性表达。人 CD5 信号肽是人们在真核细胞分泌表达外源基因常用的信号肽序列,可以有效地介导外源基因在真核细胞中分泌表达。为此我们利用人的 CD5 信号肽序列分别构建了 VP2 基因和 LTB 基因的真核分泌型表达载体,通过在体外转染 HEK29T 细胞证明 CD5 信号肽能够介导

VP2 基因和 LTB 基因进行分泌表达,这为 VP2 基因疫苗的体内免疫试验创造了必要条件。

已知动物的 Th1 淋巴细胞主要分泌 IL-2 和 IFN- $\gamma$ ,促进 IgG2a 亚类抗体的产生;而 Th2 淋巴细胞则分泌 IL-4、IL-5、IL-6 和 IL-10,促进 IgG1 亚类抗体的合成。因此检测免疫动物抗体亚类 IgG2a 和 IgG1 的变化,不仅可以监测机体抗体变化及免疫反应类型的变化<sup>[12]</sup>,也可以间接了解细胞免疫(如辅助 T 淋巴细胞)的应答情况。从图 3 可以看出,在免疫后 35d 除对照组以外,其余各组小鼠 IgG1 的抗体滴度显著高于 IgG2a 的抗体滴度,IgG1/IgG2a 比值为 3—4。这一结果表明犬细小病毒 DNA 疫苗免疫小鼠后产生以 Th2 为主的体液免疫应答反应。人们研究证明体液免疫对犬获得保护性免疫占重要地位,母源抗体在幼犬出生 7 周内可以保护幼犬免受 CPV 的感染。本项研究表明 VP2 DNA 疫苗可有效地刺激小鼠产生特异的抗体,LTB 基因表达载体可明显提高 VP2 DNA 疫苗的体液免疫应答水平,这为将来临床应用提供了重要实验依据。

### 参考文献

- [ 1 ] Langeveld JP, Casal JI, Vela C, Dalsgaard K, Smale SH, Puijk WC, Melen RH. B-cell epitopes of canine parvovirus: Distribution on the primary structure and exposure on the viral surface. *Journal of Virology*, 1993, 67 (2): 765-772.
- [ 2 ] Gupta PK, Rai A, Rai N, Raut AA, Chauhan S. Cloning of canine parvovirus VP2 gene and its use as DNA vaccine in dogs. *Current Science*, 2005, 88 (5): 778-782.
- [ 3 ] 谢之景,杨松涛,夏咸柱,闫芳,赵忠鹏,高玉伟,邹啸环,黄耕. 犬细小病毒核酸疫苗、重组活载体疫苗与弱毒疫苗免疫犬实验研究. *畜牧兽医学报 (Acta Veterinaria et Zootechnica Sinica)*, 2008, 39 (11): 1562-1566.
- [ 4 ] 张悦,戚晓红,冯振卿. 免疫佐剂的研究进展. *中国血吸虫病防治杂志 (Chinese Journal of Schistosomiasis Control)*, 2004, 16 (3): 236-238.
- [ 5 ] de Haan L, Verweij W, Agsteribbe E, Wilschut J. The role of ADP-ribosylation and GM1-binding activity in the mucosal immunogenicity and adjuvanticity of the *Escherichia coli* heat-labile enterotoxin and *Vibrio cholerae* cholera toxin. *Immunology and Cell Biology*, 1998, 76 (3): 270-279.
- [ 6 ] Arrington J, Braun RP, Dong L, Fuller DH, Macklin MD, Umlauf SW, Wagner SJ, Wu MS, Payne LG, Haynes JR.

Plasmid vectors encoding cholera toxin or the heat-labile enterotoxin from *Escherichia coli* are strong adjuvants for DNA vaccines. *Journal of Virology*, 2002, 76 (9): 4536-4546.

- [ 7 ] 王微,李秀锦,仲飞,王幸兴,韩冬梅,靳慧君,潘素敏,李巍. 犬细小病毒 VP2 蛋白在真核细胞中的分泌表达及特性. *微生物学报 (Acta Microbiologica Sinica)*, 2009, 49 (5): 648-652.
- [ 8 ] Murray MG, Thompson WF. Rapid isolation of high molecular weight plant DNA. *Nucleic Acids Research*, 1980, 8: 4321-4325.
- [ 9 ] Frederick MA, Roger B, Robert EK. 精编分子生物学实

验指南. 颜子颖,王海林译. 第三版. 北京: 科学出版社, 1998: 310-311.

- [ 10 ] 王海燕,王启会,李玉清,刘法彬,王高芳. 重组质粒 pRSET DNA 纯化方法的比较. *襄樊学院学报 (Journal of Xiangfan University)*, 2008, 29 (8): 24-27.
- [ 11 ] 张朵,李博,兰风华. 以 Triton X-114 液相分离法去除质粒溶液中的内毒素. *生物技术通讯 (Letter in Biotechnology)*, 2007, 6 (18): 971-972.
- [ 12 ] Snapper CM, Mond JJ. Towards a comprehensive view of immunoglobulin class switching. *Immunol Today*, 1993, 14 (11): 5-17.

## *Escherichia coli* heat-labile enterotoxin B subunit enhances the immune response against canine parvovirus VP2 in mice immunized by VP2 DNA vaccine

Dongmei Han<sup>1</sup>, Fei Zhong<sup>1\*</sup>, Xiujin Li<sup>2</sup>, Wei Wang<sup>1</sup>, Xingxing Wang<sup>1</sup>, Sumin Pan<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Department of Basic Veterinary Medicine, College of Animal Science and Technology, Agricultural University of Hebei, Baoding 071001, China

<sup>2</sup>Department of Biotechnology, College of Environmental and Chemical Engineering, Yanshan University, Qinhuangdao 066004, China

**Abstract:** [ **Objective** ] To investigate the effect of *Escherichia coli* heat-labile enterotoxin (LT) B subunit (LTB) gene on canine parvovirus (CPV) VP2 gene vaccine. [ **Methods** ] The LTB gene was amplified by PCR from genomic DNA of *E. coli* 44815 strain. The VP2-70 fragment (210 bp) encoding major epitope of VP2 (70 amino acids) was amplified by PCR from a plasmid encoding VP2 gene. VP2-70 and LTB genes were inserted into the eukaryotic vector to construct VP2-70 gene, LTB gene and VP2-70-LTB fused gene vectors. The mice were immunized with VP2-70 vector, VP2-70-LTB fused vector, or VP2-70 vector plus LTB vector, respectively. The antibody titers at the different time were measured by using ELISA method. The spleen lymphocyte proliferation activity was analyzed by 3-(4, 5-Dimethylthiazol-2-yl)-2, 5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) assay. [ **Results** ] The sequence of VP2-70 and LTB genes was identified. The recombinant VP2-70 and LTB proteins could be expressed in HEK293T cells in a secretory manner. The mice immunized with VP2-70 vector, VP2-70-LTB vector or VP2-70 vector plus LTB vector could generate the specific antibody against VP2 protein. The antibody titer immunized with VP2-70-LTB vector reached 1:5120 at 35 d post immunization, significantly higher than that of other two groups ( $P < 0.01$ ). For antibody isotype analysis, the IgG1 isotype antibody titers in all test groups were significantly higher than of IgG2a ( $P < 0.01$ ). The high-level spleen lymphocyte stimulation index was observed in the three test groups under the stimulation with Con A, higher than that in control groups ( $P < 0.01$ ). [ **Conclusion** ] LTB gene could enhance the humoral immune response of CPV VP2 gene vaccine in mice.

**Keywords:** *Escherichia coli* heat-labile enterotoxin B subunit, Canine parvovirus, VP2 gene, DNA vaccine

(本文责编:王晋芳)

Supported by the National Natural Science Foundation of China (30771586) and by the Natural Science Foundation of Shandong Province (C2008000244)

\* Corresponding author. Tel: +86-312-7528473; E-mail: feizhong2000@yahoo.com

Received: 11 June 2010/ Revised: 7 September 2010