



共表达PCV2 ORF2和猪IL-18基因的重组猪伪狂犬病毒对小鼠的免疫原性

郭晓庆¹, 朱前磊², 潘鑫龙¹, 杨兴武¹, 乔涵¹, 王淑娟², 陈红英^{1*}

¹ 河南农业大学郑州市猪重大疫病防控重点实验室, 河南 郑州 450002

² 河南省动物疫病预防控制中心, 河南 郑州 450008

摘要: 【目的】研制猪伪狂犬病毒(PRV)和猪圆环病毒2型(PCV2)的二联活疫苗, 并用猪IL-18作为免疫佐剂。【方法】将猪IL-18基因插入到质粒pGO中, 获得的重组转移质粒pGO18与猪PRV弱毒HB98株DNA共转染ST细胞, 并进行空斑筛选和纯化; RT-PCR和Western blot分别从转录和蛋白水平鉴定其表达情况。将重组病毒PGO18和PGO、PRV弱毒株HB98、PCV2灭活商品苗和1640细胞培养基分别免疫6周龄雌性昆明小鼠, 4周后二次免疫, 二免后4周用PCV2 DF强毒和PRV Min/A强毒接种小鼠。通过ELISA、血清中和试验和流式细胞术及攻毒保护试验评价重组病毒的免疫原性。【结果】获得了重组病毒PGO18, 并且可在ST细胞内表达; PGO18可诱导小鼠机体产生PCV2的ELISA和PRV的中和抗体水平, 刺激CD3⁺、CD4⁺、CD8⁺ T细胞亚群的增殖, 且能有效抵抗PCV2和PRV强毒攻击。【结论】IL-18基因可增强重组病毒的免疫效果, 使重组病毒具有良好的免疫原性, 有望成为防治PCV2和PRV的候选疫苗株。

关键词: PCV2, ORF2, IL-18, 重组伪狂犬病毒, 免疫效力

断奶仔猪多系统衰竭综合征(PMWS)主要由猪圆环病毒2型(PCV2)引起, PCV2还与多种疾病相关, 统称为猪圆环病毒病。主要感染猪的皮肤和粘膜组织, 导致相应部位上皮组织发生增生性病变, 还可加重猪呼吸和繁殖障碍综合征病毒和猪细小病毒等感染。现已确认猪圆环病毒病在

全世界都有发生, 对养猪业造成了巨大的经济损失。

伪狂犬病毒(PRV)基因组大小约150 kb, 含有多个非必需基因, 可供外源基因的插入。目前, 以无致病性或弱毒病原疫苗株作活载体, 将其它病原的主要抗原性基因插入载体基因组后并不影

基金项目: 河南省产学研项目(132107000002); 河南省基础与前沿技术研究计划项目(142300410156); 河南省教育厅科学技术研究重点项目(14A230002)

*通信作者。Tel: +86-371-63554361; Fax: +86-371-63558180; E-mail: chhy927@163.com

收稿日期: 2015-05-07; 修回日期: 2015-06-18; 网络出版时间: 2015-07-05

响疫苗株的增殖,且可诱导产生体液免疫,避免了许多重组亚单位疫苗的缺点。用重组活载体疫苗免疫动物后,实现了所插入的外源基因的表达,产生了针对该病原的抗原物质,进而刺激机体产生相应的免疫应答,从而实现了一针多防。重组病毒活载体疫苗的研究已成为当今疫苗研究领域的又一大热点。

中国作为世界养猪数量较多国家之一,PCV2感染和PR的发生均相当严重^[1-5]。IL-18表达的基因是诱导T、B和NK细胞反应的强有力佐剂,而且IL-18无免疫原性,不会引起自身免疫疾病,克服了传统佐剂的一大缺点^[6]。另外,将IL-18基因克隆到载体中,可实现标准化生产,大大提高实用价值。因此,在前期构建的重组质粒pGO基础上,插入猪IL-18基因,构成重组质粒pGO18,可保证外源基因的高效表达,不仅可用于治疗疾病,还有望成为一种安全、经济、高效的新型免疫佐剂,在畜禽养殖业中具有广泛的应用前景。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 质粒、细胞及毒株:携带PCV2 ORF2基因的重组猪伪狂犬病毒转移质粒pGO^[7]和重组质粒pGEMT-IL18^[8]由河南省动物性食品安全重点实验室构建并保存;ST(猪睾丸)细胞、PRV Min/A株均购自中国兽药监察所;表达PCV2 ORF2基因的重组猪伪狂犬病毒PGO由钞安军构建^[7]。PCV2 DF强毒由河南省动物性食品安全重点实验室分离并保存;猪伪狂犬弱毒HB98株购自武汉科前生物制品公司。

1.1.2 疫苗及试验动物:PCV2灭活疫苗购自武汉科前生物制品公司。6周龄SPF雌性昆明小鼠,体重为16~20 g/只,购自河南省实验动物中心。

1.1.3 主要试剂:Premix Taq DNA聚合酶, *Bam*H I、*Bgl* II等限制性内切酶, T4 DNA连接酶, 碱性

磷酸酶(CIAP)购自TaKaRa公司;脂质体转染试剂LipofectamineTM 2000 Reagent购自Invitrogen公司;BIOMIGA无内毒素质粒提取试剂盒、RPMI 1640细胞培养液、四季青胎牛血清购自郑州天驰生物科技有限公司;PCV2抗体ELISA检测试剂盒购自武汉科前生物制品公司、辣根过氧化物酶(HRP)标记的羊抗鼠IgG抗体购于北京博奥森生物技术发展公司;兔源PCV2阳性抗体购自博奥森生物技术有限公司,山羊抗兔IgG购自博士德生物。

1.2 重组猪伪狂犬病毒转移质粒pGO18的构建

根据重组质粒pGEMT-IL18中的猪IL-18基因片段设计1对引物,上、下游引物的5'端均包含有*Bgl* II酶切位点(下划线部分),上游引物序列为:5'-GAAGATCTATGACGTATC CAAGG-3',下游引物序列为:5'-GCTCTAGACATTCATTAAG GGTTA-3';反应条件:94 °C 5 min; 95 °C 1 min, 55 °C 1 min, 72 °C 1 min, 30个循环; 72 °C 10 min。经*Bgl* II酶切处理后的IL-18基因克隆到经同样处理并磷酸化的pGO质粒中,最终得到重组转移质粒pGO18(图1)。

1.3 转染与重组病毒的纯化

按照OMIGA无内毒素质粒提取试剂盒的要求进行重组质粒的提取。转染前24 h将ST细胞悬液转至6孔板中,待细胞长至90%左右时,参照脂质体LipofectamineTM 2000试剂盒转染说明书,采用脂质体介导法将重组质粒pGO18与猪PRV弱毒HB98株基因组DNA进行共转染,待约80%细胞发生病变时收获病毒。在倒置荧光显微镜下采用空斑纯化技术,同时结合PCR扩增的方法进行筛选,直至所有空斑均显示绿色荧光且从中随机挑取20个空斑,PCR扩增的ORF2和IL-18目的基因阳性率达到100%,表明已纯化完全。

1.4 重组病毒PGO18株的鉴定

1.4.1 mRNA检测:按照RNA快速提取试剂盒的要求进行细胞总RNA的抽提,用Oligo (dT)引物反

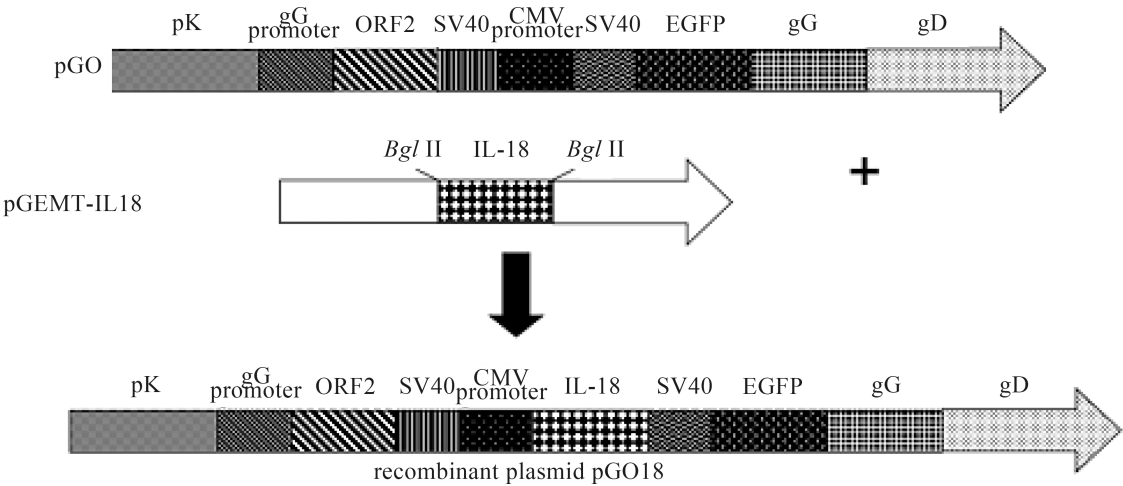


图 1. 重组质粒pGO18的构建

Figure 1. Construction of recombinant plasmid pGO18.

转录后分别使用1.2中的ORF2基因与IL-18基因的特异性引物进行PCR扩增，并进行琼脂糖凝胶电泳检测。

1.4.2 Western blot检测：参照Bio-Rad公司电泳仪使用说明书进行操作，制备好分离胶和浓缩胶后，加入SDS-PAGE电泳缓冲液，每孔上样20 μL。SDS-PAGE电泳结束后，转膜，封闭，加入兔源PCV2一抗4 ℃孵育过夜；TBST洗3次，再加入HRP标记的山羊抗兔IgG二抗，室温孵育2 h；TBST洗3次，最后在DAB显色液中显色。

1.5 小鼠免疫试验及ELISA抗体检测

将100只6周龄雌性SPF级昆明小鼠随机分成5组，每组20只。免疫方案如表1所示。

1.6 PCV2和PRV的抗体水平检测

从首免后第3周开始，每周从每组随机挑选

5只小鼠进行尾静脉采血，分离血清后检测血清中的PCV2 ORF2蛋白的ELISA抗体水平和PRV的中和抗体水平^[9-10]。

1.7 小鼠外周血T淋巴细胞亚群数量的测定

首免后第8周，采用眼球摘除术采集抗凝血通过流式细胞仪检测T淋巴细胞亚群的数量。取专用上样管，标记后，取各组抗凝血各100 μL，分别加入1 μL荧光标记的CD3⁺/CD4⁺/CD8⁺抗原的单克隆抗体，轻轻混匀后，室温下避光孵育20 min；随后每管加入2 mL溶血素混匀，室温作用15 min后，3000 r/min，离心5 min；按2 mL/管加入2% FBS-PBS，3000 r/min，离心5 min，重复3次；最后用400 μL PBS定容，振荡15 s使其充分混匀；避光保存，采用流式细胞仪检测CD3⁺、

表1. 小鼠分组及免疫情况
Table 1. Grouping and vaccination of mice

Groups	Immunization number of mice/group	Dose/mouse boost immunization/μL	Vaccination route
Recombinant virus PGO18	20	500	subcutaneous injection
Recombinant virus PGO	20	500	subcutaneous injection
PRV attenuated HB98	20	500	subcutaneous injection
PCV2 inactivated vaccine	20	500	subcutaneous injection
1640 medium	20	500	subcutaneous injection

CD4⁺和CD8⁺ T淋巴细胞亚群的数量, 所得数据用Excel和SPSS软件进行统计学分析。

1.8 攻毒保护试验

首次免疫后8周, 将每组中的10只小鼠一分为二, 分别用 10^7 TCID₅₀的PCV2 DF强毒和PRV Min/A强毒腹腔接种小鼠。对用PRV Min/A株攻毒的小鼠连续观察2周, 每隔12 h观察并记录小鼠的发病及死亡情况。用PCV2 DF株攻毒的小鼠, 于攻毒后3周处死, 解剖取其心脏、肝脏、脾脏、肺脏、肾脏提取DNA并通过荧光定量PCR的方法进行PCV2病毒含量的检测。

2 结果和分析

2.1 重组病毒PGO18的构建

将重组质粒pGO18与猪PRV弱毒HB98株采用脂质体介导法发生同源重组后, 用收获的转染液在倒置荧光镜下进行空斑纯化, 至所有空斑均显示如图2所示的绿色荧光(A为正常细胞对照, B、C分别为普通倒置显微镜和荧光倒置显微镜下观察到的细胞病变)。从中随机挑取出20个空斑, 通过PCR均可扩增出ORF2和IL-18基因(图3), 表明已构建出纯化的、生长稳定的重组病毒PGO18。

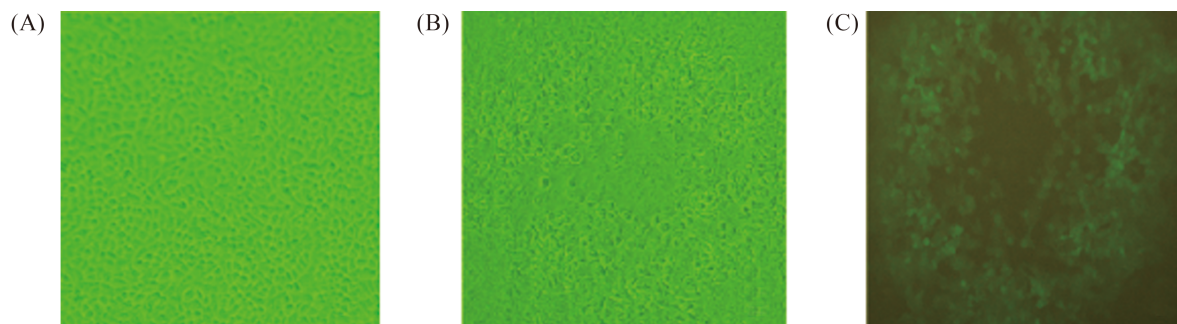


图 2. 空斑筛选后不同亮度下观察到的荧光照片

Figure 2. Illustration of green fluorescence after plaque assay with different brightness. A: Control; B: under inverted microscope; C: under fluorescence inverted microscope.

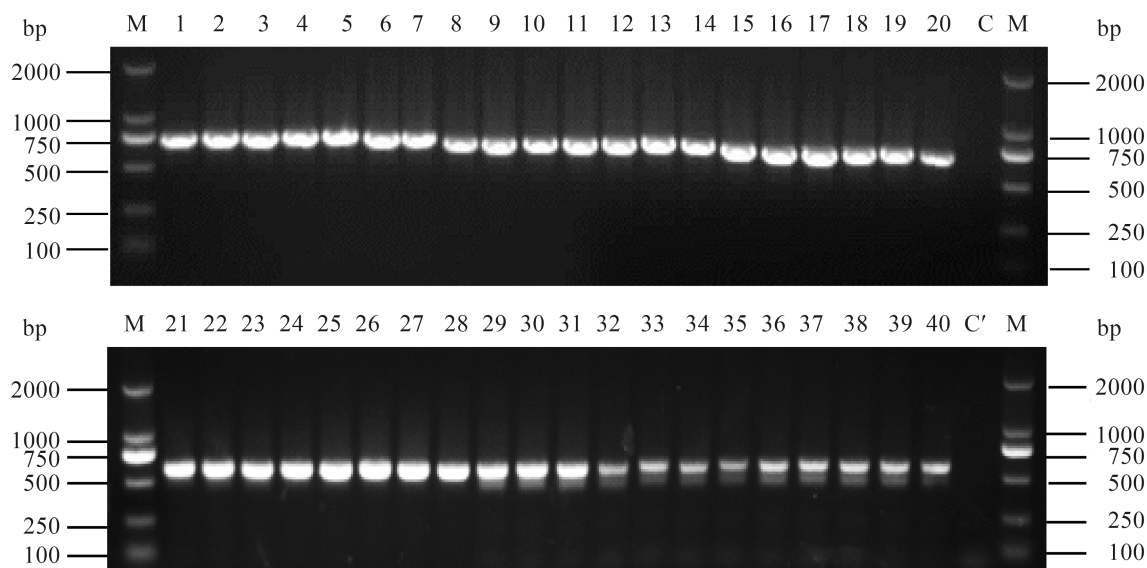


图 3. 20个空斑的ORF2基因和IL-18基因的PCR检测结果

Figure 3. PCR results of ORF2 gene and IL-18 gene from 20 plaques. M: DNA marker DL2000; 1-20: ORF2 gene; C: Negative control of ORF2 gene; 21-40: IL-18 gene; C': Negative control of IL-18 gene.

2.2 mRNA检测

提取重组病毒PGO18感染的ST细胞总RNA，经RT-PCR扩增后，电泳检测分别出现长约700 bp和600 bp的片段(图4)，而阴性对照却无此条带。表明ORF2基因和IL-18基因在ST细胞中进行了转录。

2.3 重组病毒PGO18的Western blot鉴定

重组病毒PGO18经SDS-PAGE电泳及Western blot检测后，分别在27.8 kDa和22 kDa的位置处出现特异性条带，与预期大小一致，而阴性对照组并无此条带，从蛋白水平上证明该重组病毒能表达PCV2 ORF2蛋白和IL-18蛋白(图5)。

2.4 PCV2的ELISA抗体检测

对小鼠血清处理后，采用间接ELISA的方法测定PCV2抗体水平的动力学变化。仅把试剂盒中的羊抗猪酶标二抗用羊抗鼠辣根过氧化物酶标二抗替代，测定630 nm波长处的吸光度(OD)值，从而确定各样品的抗体水平。结果如表2和图6所示，表明PCV2灭活疫苗组、重组病毒PGO组和

PGO18组在一免后14 d抗体水平与1640细胞培养液组基本一致，均处于较低水平；一免后28 d PCV2灭活疫苗组及重组病毒PGO组和PGO18免疫组抗体水平基本一致，相比一免后14 d均有所升高，随后继续升高，到一免后56 d达到最高，且重组病毒PGO18免疫组明显高于其它3组，差异显著($P < 0.05$)，1640培养液对照组在整个免疫期内的抗体水平变化不大。

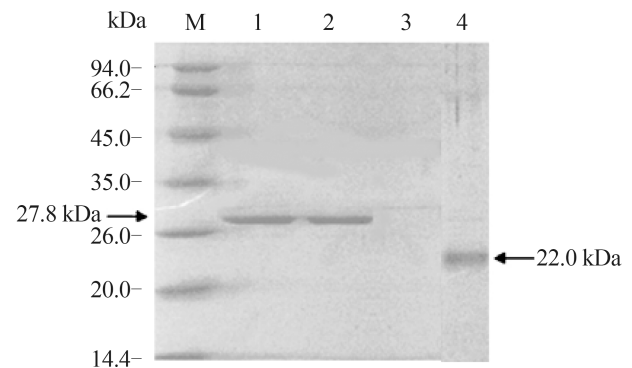


图 5. 重组病毒PGO18的Western blot鉴定
Figure 5. Identification of recombinant virus PGO18 by Western blot. M: Protein marker; 1: PGO18 ORF2 protein; 2: PGO ORF2 protein; 3: pG vector; 4: PGO18 IL-18 protein.

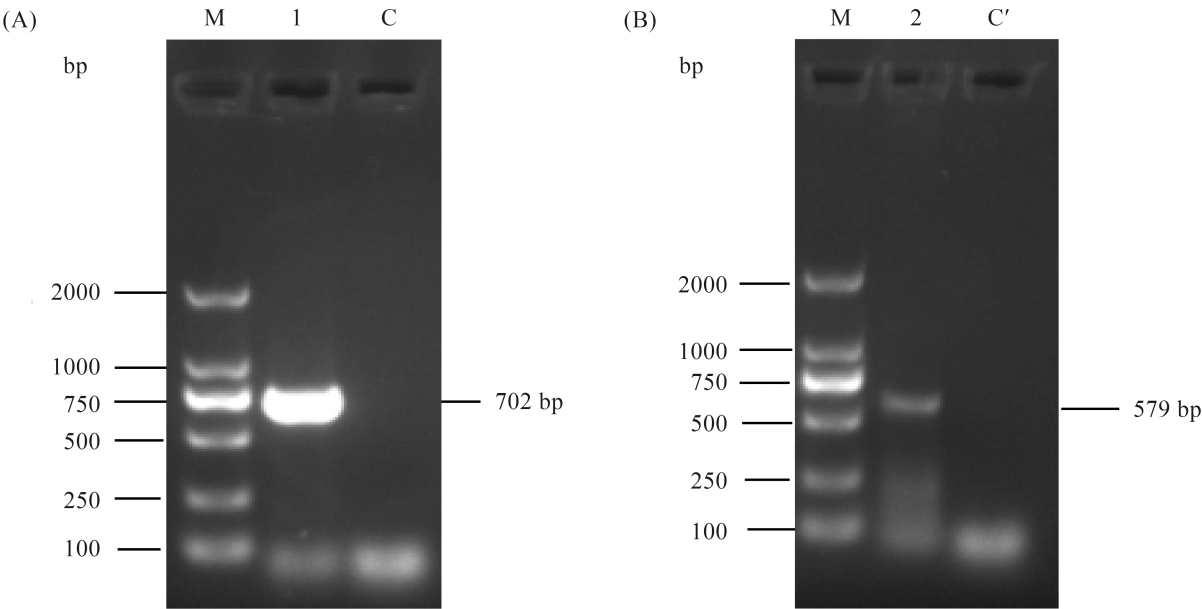


图 4. ORF2基因和IL-18基因的扩增图

Figure 4. Amplification of ORF2 gene and IL-18 gene. M: DNA marker DL2000; 1: ORF2 gene; C: Negative control of ORF2 gene; 2: IL-18gene; C': Negative control of IL-18 gene.

表2. 血清中PCV2 ELISA抗体水平
Table 2. The PCV2 antibody level in serum detected by ELISA (OD_{630} value)

Groups	PCV2 antibody level (Time after the first immunization/day)			
	14 d	28 d	42 d	56 d
PGO18	0.46±0.06	0.69±0.04	1.95±0.16	2.27±0.35
PGO	0.47±0.05	0.62±0.07	1.41±0.39	1.84±0.08
PCV2 vaccine	0.49±0.02	0.67±0.09	1.05±0.13	1.33±0.19
1640 medium	0.31±0.01	0.30±0.01	0.30±0.01	0.31±0.01

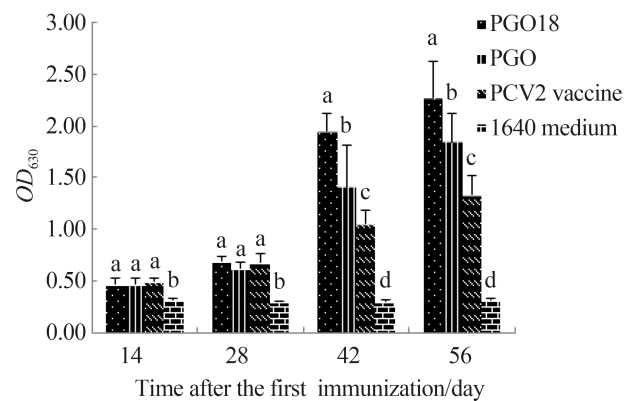


图 6. 血清中PCV2 ELISA抗体动态
Figure 6. The dynamic variation of PCV2 antibody in serum detected by ELISA (OD value).

2.5 PRV的血清中和试验

对小鼠血清处理后，采用血清中和试验的方法检测PRV的抗体水平。结果如表3和图7所示，表明HB98组、重组病毒PGO组和PGO18组在一免后14 d均产生了PRV中和抗体，且均处于较低水平；一免后28 d，3组的抗体水平都有所升高，随后逐渐升高，到一免后56 d抗体水平达到高峰，

其中重组病毒PGO18组显著高于重组病毒PGO组和1640对照组。而1640对照组无论是首次免疫还是加强免疫，其PRV的抗体水平均变化不大，且处于较低水平。

2.6 小鼠外周血T淋巴细胞亚群的测定

用流式细胞仪检测小鼠外周血T淋巴细胞亚群的变化情况，结果如表4和图8所示，与1640细

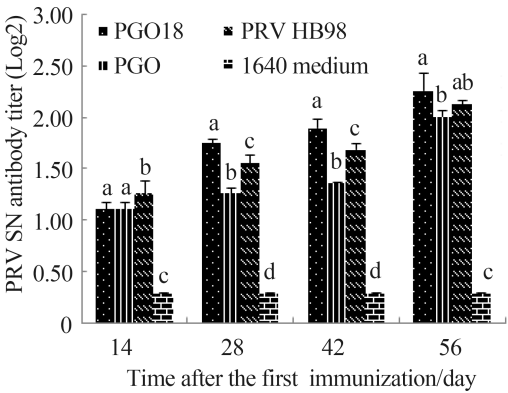


图 7. 血清中的PRV中和抗体动态
Figure 7. The dynamic variation of PRV antibody in serum detected by neutralization assay.

表3. 血清中的PRV中和抗体水平
Table 3. The PRV SN antibody titer

Groups	PRV SN antibody titer (Time after the first immunization/day)			
	14 d	28 d	42 d	56 d
PGO18	1.11±0.06	1.76±0.04	1.90±0.08	2.26±0.18
PGO	1.11±0.07	1.26±0.05	1.37±0.02	2.01±0.06
PRV HB98	1.27±0.13	1.56±0.08	1.69±0.06	2.13±0.04
1640 medium	0.29±0.01	0.29±0.01	0.29±0.01	0.29±0.01

表4. 小鼠外周血中CD3⁺、CD4⁺、CD8⁺ T淋巴细胞亚群的数量

Table 4. The amount of CD3⁺, CD4⁺ and CD8⁺ T lymphocyte in peripheral blood of mice

Groups	CD3 ⁺	CD4 ⁺	CD8 ⁺
PRV HB98	57.92±3.14	46.44±5.25	24.84±1.38
PCV2 vaccine	48.90±4.78	42.56±1.69	22.30±1.16
PGO	51.54±0.22	43.24±1.35	22.68±0.78
PGO18	65.00±5.22	55.00±2.19	33.00±1.54
1640 medium	41.12±3.78	37.52±2.05	19.90±0.96

胞培养基对照组相比，用重组病毒PGO18、重组病毒PGO、PRV弱毒株HB98和PCV2灭活商品苗免疫的试验组小鼠的T淋巴细胞亚类CD3⁺、CD4⁺和CD8⁺的数量显著提高，且重组病毒PGO18免疫组的脾T淋巴细胞亚类的数量最多。

2.7 攻毒保护试验结果

首次免疫后第8周进行攻毒保护试验，用PRV Min/A株攻毒后各组的保护率如表5所示。

用PCV2 DF株攻毒的小鼠，对各脏器进行荧光定量PCR检测PCV2病毒含量。其结果如表6和图9所示，可见1640培养液对照组病毒含量处于较高水平，而其它各组均较低，且重组病毒PGO18免疫组最低。

3 讨论

在本研究中，将重组病毒PGO18、PGO、

表5. PRV Min/A株攻毒后各组的保护率

Table 5. The protection rates of each group after challenged with PRV Min/A strain

Groups	Protection rate/%
PGO18	80 (4/5)
PGO	60 (3/5)
PRV HB98	80 (4/5)
1640 medium	0 (0/5)

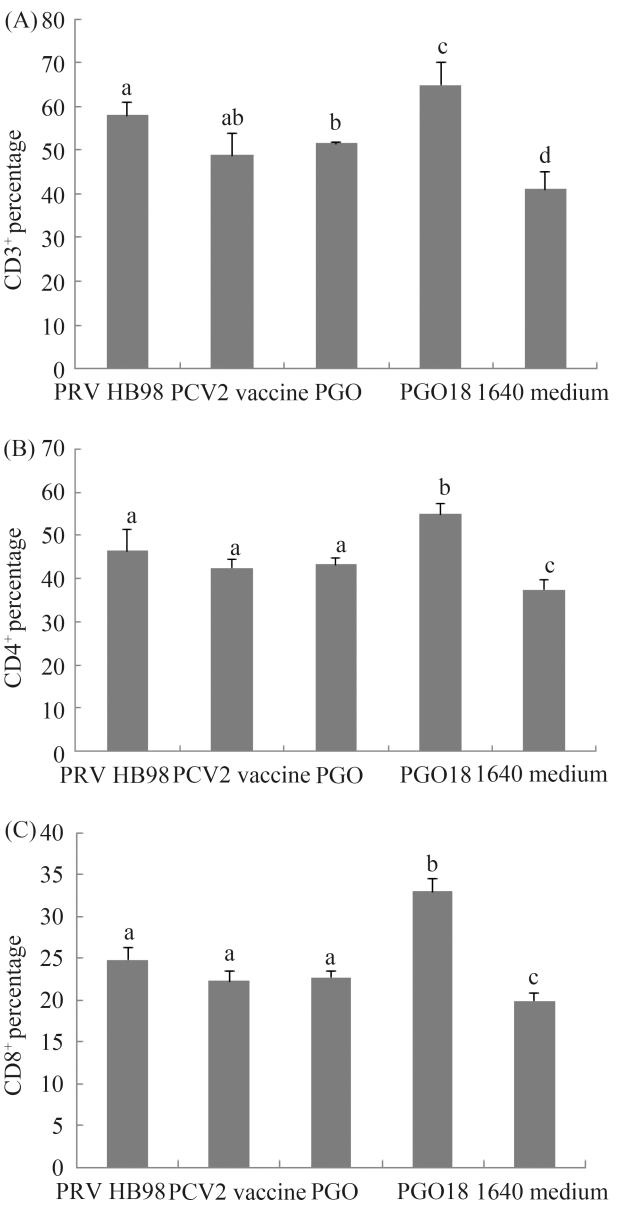


图 8. 小鼠外周血中T淋巴细胞亚类CD3⁺ (A)、CD4⁺ (B)、CD8⁺ (C)的测定

Figure 8. Determination of CD3⁺ (A), CD4⁺ (B), CD8⁺ (C) T lymphocyte subgroup in peripheral blood of mice.

PRV弱毒株HB98、PCV2灭活商品苗、1640培养液同时免疫小鼠，分别采用间接ELISA法和血清中和试验检测小鼠血清PCV2和PRV抗体效价，结果表明用PGO18免疫可提高机体对PCV2和PRV的抗体水平，但起效较慢，需二次免疫才可见抗体水平有明显的升高，且PGO18诱导产生的抗体水平高于PGO同期诱导的抗体水平。

表6. PCV2 DF株攻毒后小鼠体内各脏器PCV2 DNA含量

Table 6. The amount of PCV2 DNA in tissues from mice after challenged with PCV2 DF strain

Groups	Lg PCV2 DNA				
	Heart	Liver	Spleen	Lung	Kidney
PGO	0.07±0.07	0.12±0.13	0.73±0.17	0.35±0.15	0.21±0.16
PGO18	0.17±0.12	0.09±0.11	0.07±0.07	0.12±0.13	0.24±0.23
PCV2 vaccine	0.33±0.28	0.21±0.07	0.53±0.10	0.54±0.12	0.26±0.15
1640 medium	8.21±0.52	7.51±0.33	8.65±0.33	9.00±0.41	7.61±0.33

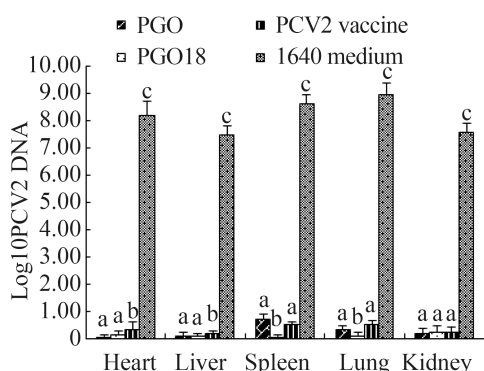


图9. 小鼠体内各脏器PCV2病毒含量的检测

Figure 9. Detection of PCV2 virus load from each organ of mice after challenged with PCV2 strong strain.

CD3⁺、CD4⁺和CD8⁺ T细胞的变化趋势可以间接反映机体细胞免疫的功能。流式细胞仪检测结果显示, 重组病毒PGO18组中脾T淋巴细胞亚类的数量明显高于同等条件下的重组病毒PGO组、PRV弱毒株HB98和PCV2灭活商品苗, 提示PGO18能提高机体产生较强的细胞免疫功能, 也许是IL-18作为免疫佐剂发挥了作用。

攻毒试验显示重组病毒PGO18对PRV强毒株的保护效果与疫苗株HB98相同, 均达到了80%, 说明两者效力相当; 通过荧光定量PCR检测各脏器PCV2病毒含量, PGO18免疫组最低, 表明其对PCV2强毒的保护效果较好。但可能由于免疫剂量、免疫途径和免疫时机等因素导致其未达到100%的保护, 还需进一步优化。

综上所述, 重组病毒PGO18、PGO、HB98和PCV2灭活商品苗接种小鼠后, 均能诱导机体产生

不同程度的体液免疫和细胞免疫。研究表明^[11-14], 同时携带细胞因子和保护性抗原的疫苗明显地比单独含有抗原的疫苗诱导产生更强的免疫。在此也进一步证实了这一结论, 重组病毒PGO18比无IL-18参与的PGO免疫组显著较高, 说明IL-18基因的表达对重组病毒的免疫效果有一定的增强作用。但本试验中使用的是猪的IL-18基因, 由于试验成本及其它相关原因, 却用不同种属动物(小白鼠)进行免疫原性的研究, 小鼠并不是PCV2和PRV感染的模型动物, 其作为免疫佐剂的效果是否会有所限制, 目前还不能定论。因此进一步开展重组病毒PGO18对本属动物(猪)的免疫原性、安全性及保护力试验是十分迫切且必要的。此外, IL-18对PRV疫苗保护没有影响, 但对PCV2有一些影响, 这可能是PRV和PCV2属于两种不同的病毒, 具有不同免疫保护机制, 因此IL-18对PRV和PCV2疫苗的免疫增强作用效果也需要进一步进行验证。本研究以猪IL-18基因作为免疫佐剂, 为研制防控PCV2和PRV的新型疫苗开辟了新的途径。

参考文献

- [1] Yang XY, Dai AL, Li XH. Serological survey of infection by swine wild PRV in western Fujian Province. *Journal of Anhui Agricultural University*, 2008, 35(4): 540-543. (in Chinese)
杨小燕, 戴爱玲, 李晓华. 闽西地区猪伪狂犬野毒株感染的血清学调查. *安徽农业大学学报*, 2008, 35(4): 540-543.
- [2] Liu DX, Tan ZX, Qiu LX, Qiu BG, Lu XH, Ren FM, Deng GQ.

- Serology investigation of swine fever, porcine pseudorabies, porcine circovirus virus type 2 infection in large-scale pig farms. *Chinese Journal of Veterinary Medicine*, 2004, 40(7): 18-19. (in Chinese)
- 刘道新, 谈志祥, 邱立新, 邱伯根, 鲁杏华, 任凤梅, 邓国强. 规模化猪场猪瘟 猪伪狂犬病 猪圆环病毒2型感染的血清学调查. *中国兽医杂志*, 2004, 40(7): 18-19.
- [3] Xu LH, Wang L, Lu YH, Chen PY. Molecular biological investigation of coinfections among PRRSV, PRV and PCV2. *Chinese Journal of Veterinary Science and Technology*, 2004, 34(7): 40-43. (in Chinese)
- 许立华, 王玲, 芦银华, 陈溥言. 三种猪繁殖障碍性病毒混合感染的分子生物学调查. *中国兽医科技*, 2004, 34(7): 40-43.
- [4] Lu YH, Xu LH, Hua XG, Tan GL, Huang WJ, Chen DS, Chen PY. Rapid detection of porcine circovirus type 2 and porcine reproductive and respiratory syndrome virus. *Virologica Sinica*, 2003, 18(2): 184-186. (in Chinese)
- 芦银华, 许立华, 华修国, 谈国蕾, 黄伟坚, 陈德胜, 陈溥言. 猪圆环病毒2型及猪繁殖与呼吸综合症病毒的快速检测. *中国病毒学*, 2003, 18(2): 184-186.
- [5] Bai AQ, Wang XQ, Zhen JS, Wang SM. Serological survey of wild pseudorabies virus infected porcine in some intensive pig farms of Guangdong. *China Animal Husbandry and Veterinary Medicine*, 2005, 32(3): 55-57. (in Chinese)
- 白挨泉, 王晓清, 甄劲松, 王淑敏. 广东部分集约化猪场猪伪狂犬病毒野毒感染的血清学调查. *中国畜牧兽医*, 2005, 32(3): 55-57.
- [6] Zhao L, Cui BA, Chen HY. Research survey of interleukin 18. *Progress in Veterinary Medicine*, 2006, 27(10): 108-111. (in Chinese)
- 赵丽, 崔保安, 陈红英. 白细胞介素18研究概况. *动物医学进展*, 2006, 27(10): 108-111.
- [7] Chao AJ, Fu PF, Guo XQ, Gao XY, Cui BA, Chen HY. Immune efficacy in mice by recombinant pseudorabies virus PGO expressing ORF2 gene of porcine circovirus type 2. *Acta Microbiologica Sinica*, 2014, 54(2): 211-217. (in Chinese)
- 钞安军, 付朋飞, 郭晓庆, 高晓云, 崔保安, 陈红英. 表达猪圆环病毒II型ORF2基因的重组猪伪狂犬病病毒的免疫原性. *微生物学报*, 2014, 54(2): 211-217.
- [8] Zheng LL, Jia YF, Cui BA, Chen HY, Wei ZY, Chen RL. Gene cloning, expression and activity detection of porcine interleukin-18 mature protein in *Escherichia coli*. *Journal of Biotechnology*, 2008, 24(2): 214-219. (in Chinese)
- 郑兰兰, 贾云飞, 崔保安, 陈红英, 魏战勇, 陈瑞亮. 猪白细胞介素18基因的克隆、表达及生物学活性检测. *生物工程学报*, 2008, 24(2): 214-219.
- [9] Ju CM, Chen HC, Liu ZF, Cao SB, He QG. The establishment of an ELISA assay with the ORF2 protein of porcine circovirus type 2 expressed in *E. coli*. *Acta Veterinaria et Zootechnica Sinica*, 2004, 35(6): 689-693. (in Chinese)
- 琚春梅, 陈焕春, 刘正飞, 曹胜波, 何启盖. 应用在大肠杆菌中表达的猪2型圆环病毒ORF2蛋白建立一种ELISA诊断方法. *畜牧兽医学报*, 2004, 35(6): 689-693.
- [10] Ju CM, Fan HY, Tan YD, Liu ZF, Xi X, Cao SB, Wu B, Chen HC. Immunogenicity of a recombinant pseudorabies virus expressing ORF1-ORF2 fusion protein of porcine circovirus type 2. *Veterinary Microbiology*, 2005, 109(3/4): 179-190.
- [11] Dong B, Feng J, Lin H, Li LX, Su DD, Tu D, Zhu WJ, Yang Q, Ren XF. Immune responses of mice immunized by DNA plasmids encoding PCV2 ORF2 gene, porcine IL-15 or the both. *Vaccine*, 2013, 31(48): 5736-5744.
- [12] Liu GM, Luo ML, Chen RA, Huang HL, Pei DS. Construction and immunogenicity of recombinant adenovirus expressing ORF2 of PCV2 and porcine IFN gamma. *Vaccine*, 2011, 29(47): 8677-8682.
- [13] Wang YP, Liu D, Guo LJ, Tang QH, Wei YW, Wu HL, Liu JB, Li SB, Huang LP, Liu CM. Enhanced protective immune response to PCV2 subunit vaccine by co-administration of recombinant porcine IFN- γ in mice. *Vaccine*, 2013, 31(5): 833-838.
- [14] Zhang XD, Li GJ, Gao L, Mu LZ, Zhang LC, Cong YL, Ding Z. Positive inductive effect of IL-18 on virus-specific immune responses induced by PRRSV-GP5 DNA vaccine in swine. *Research in Veterinary Science*, 2013, 94(2): 346-353.

Immunogenicity of a recombinant pseudorabies virus coexpressing ORF2 gene of PCV2 and porcine IL-18 gene in mice

Xiaoqing Guo¹, Qianlei Zhu², Xinlong Pan¹, Xingwu Yang¹, Han Qiao¹, Shujuan Wang², Hongying Chen^{1*}

¹ Zhengzhou Major Pig Disease Prevention and Control Laboratory, Henan Agricultural University, Zhengzhou 450002, Henan Province, China

² Henan Province Center for Animal Diseases Control and Prevention, Zhengzhou 450008, Henan Province, China

Abstract: [Objective] To develop a bivalent vaccine against pseudorabies virus (PRV) and porcine circovirus (PCV2), IL-18 was used as immunologic adjuvant. [Methods] Porcine IL-18 gene was inserted into vector pGO. The obtained recombinant transfer plasmid pGO18 was transfected into ST cells with PRV attenuated vaccine HB98 strain. Then plaque selection and purification were performed to obtain purified recombinant virus PGO18. RT-PCR and Western blot were used to demonstrate the expression of PGO18 from transcription and protein levels, respectively. Six-week-old female Kunming mice were immunized with recombinant virus PGO18 and PGO, commercial PCV2 inactivated vaccine, PRV attenuated vaccine HB98 strain, 1640 medium. Mice were vaccinated twice 4 weeks later and then challenged with the virulent PCV2 DF strain and PRV Min/A strain 4 weeks after the second immunization. ELISA, serum neutralization assay, flow cytometry and protect experiment were used to demonstrate the immunity of mice. [Results] The recombinant virus PGO18 was obtained, and it could express on ST cells. Mice vaccinated with PGO18 elicited high levels of humoral and cell immune response, and could also be protected against PCV2 and PRV challenge. [Conclusion] The recombinant virus possessed high safety and good immunogenicity. It may be a candidate vaccine strain against PCV2 and PRV infection.

Keywords: PCV2, ORF2, IL-18, recombinant pseudorabies virus, immunogenicity

(本文责编: 李磊)

Supported by the Henan Province Production Project (132107000002), by the Henan Province Foundation & Forefront Technology Research Project (142300410156) and by the Important Henan Province Science & Technology Research Project (14A230002)

*Corresponding author. Tel: +86-371-63554361; Fax: +86-371-63558180; E-mail: chhy927@163.com

Received: 7 May 2015; Revised: 18 June 2015; Published online: 5 July 2015