

• 动物及兽医生物技术 •

乙型脑炎病毒 DNA 初免-蛋白加强策略在小鼠模型上的免疫效应评价

于瑞明¹, 田占成¹, 高闪电¹, 独军政¹, 关贵全¹, 殷宏^{1,2}

1 中国农业科学院兰州兽医研究所 家畜疫病病原生物学国家重点实验室, 甘肃 兰州 730046

2 江苏省动物重要疫病与人兽共患病防控协同创新中心, 江苏 扬州 225009

于瑞明, 田占成, 高闪电, 独军政, 关贵全, 殷宏. 乙型脑炎病毒 DNA 初免-蛋白加强策略在小鼠模型上的免疫效应评价. 生物工程学报, 2022, 38(8): 2902-2911.

YU RM, TIAN ZC, GAO SD, DU JZ, GUAN GQ, YIN H. Using mouse model to evaluate the immune effect of DNA prime-protein boost strategies targeting Japanese encephalitis virus. Chin J Biotech, 2022, 38(8): 2902-2911.

摘要: 为了评价基因 I 型乙型脑炎病毒 prM-E DNA 疫苗与 prM 和 EIII 融合抗原亚单位疫苗采用 DNA 初免-蛋白加强免疫策略对小鼠的免疫效果, 本研究将 prM-E 融合基因插入到 pVAX1 真核表达载体中, 构建重组表达载体 prM-E-pVAX1 作为 DNA 疫苗进行初免, 利用原核表达系统获得的 prM 和 EIII 融合抗原作为亚单位疫苗进行加强免疫。将 32 只 4-6 周龄雌性 BALB/c 小鼠随机分成 4 组, 设置 prM-E-pVAX1 DNA 疫苗组、DNA 初免-蛋白加强免疫组、prM 和 EIII 融合抗原亚单位疫苗组及 pVAX1 载体对照组, 通过 ELISA 检测血清中特异性抗体水平; 通过噬斑减少中和试验滴定中和抗体滴度; 通过细胞因子表达丰度和淋巴细胞增殖试验分析不同疫苗免疫组诱导产生的细胞免疫反应。结果表明, 用 DNA 初免-蛋白加强策略免疫的小鼠诱导产生的中和抗体滴度略高于 prM 和 EIII 融合抗原亚单位疫苗免疫组, 显著高于 prM-E-pVAX1 DNA 疫苗免疫组。DNA 初免-蛋白加强策略在小鼠模型中诱导产生了有效的 Th1/Th2 型免疫反应, 特别是显著诱导了 Th1 型细胞免疫反应。本研究为预防流行性乙型脑炎提供了新的免疫策略和理论参考依据。

关键词: 流行性乙型脑炎; DNA 疫苗; prM 和 EIII 融合抗原; DNA 初免-蛋白加强

Received: March 3, 2022; **Accepted:** May 30, 2022; **Published online:** June 15, 2022

Supported by: National Natural Science Foundation of China (31201899); Agricultural Science and Technology Innovation Engineering Project (CAAS-ASTIP-2016-LVRI)

Corresponding author: TIAN Zhancheng. Tel: +86-931-8342681; E-mail: tianzhancheng@caas.cn

基金项目: 国家自然科学基金 (31201899); 中国农业科学院农业科技创新工程 (CAAS-ASTIP-2016-LVRI)

Using mouse model to evaluate the immune effect of DNA prime-protein boost strategies targeting Japanese encephalitis virus

YU Ruiming¹, TIAN Zhancheng¹, GAO Shandian¹, DU Junzheng¹, GUAN Guiquan¹, YIN Hong^{1,2}

1 State Key Laboratory of Veterinary Etiological Biology, Lanzhou Veterinary Research Institute, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Lanzhou 730046, Gansu, China

2 Jiangsu Co-innovation Center for Prevention and Control of Important Animal Infectious Diseases and Zoonoses, Yangzhou 225009, Jiangsu, China

Abstract: In order to evaluate the immune effect of the genotype I Japanese encephalitis virus prM-E DNA vaccine and the prM-EIII fusion protein subunit vaccine on mice using DNA prime-protein boost strategy, the prM-E gene was inserted into the pVAX1 eukaryotic expression vector. The recombinant expression vector prM-E-pVAX1 was constructed as a DNA vaccine for initial immunity, and the recombinant prM-EIII fusion protein was obtained using a prokaryotic expression system as a subunit vaccine for enhanced immunity. Thirty two female BALB/c mice aged 4-6 weeks were randomly divided into four groups, and a prM-E-pVAX1 DNA vaccine group, a DNA prime-protein boost immune group, a prM-EIII subunit vaccine group, and a pVAX1 vector control group were set up. The specific antibody level in serum was monitored by ELISA, the neutralizing antibody titer was detected by plaque reduction neutralization, and the cellular immune responses induced by different vaccine immune groups were analyzed by cytokine expression abundance and lymphocyte proliferation experiments. The results showed that the neutralizing antibody titers induced by mice immunized with the DNA prime-protein boost strategy were close to that of the group immunized with the single prM-EIII subunit vaccine, but significantly higher than that of the group immunized with the single prM-E-pVAX1 DNA vaccine. DNA prime-protein boost strategies induced effective Th1/Th2 immune responses in mouse models, in particular the Th1 cell-mediated immune responses. This study provides a new immune strategy that may facilitate the prevention of Japanese encephalitis.

Keywords: Japanese encephalitis; DNA vaccine; prM-EIII immunogenicity; DNA prime-protein boost

流行性乙型脑炎 (Japanese encephalitis, JE) 简称乙脑, 是由乙型脑炎病毒 (Japanese encephalitis virus, JEV) 感染引起的虫媒传播的人兽共患病, 其传播媒介主要是三带喙库蚊 (*Culex tritaeniorhynchus*), 该病毒宿主范围广泛, 可造成人的不可逆性神经性脑炎, 甚至死

亡^[1]。目前无特效药用于治疗流行性乙型脑炎。猪是该病毒的主要扩增宿主, JEV 感染猪可引起较高的病毒血症, 可致母猪流产、死胎, 公猪睾丸炎等临床症状^[2-4]。遵循人兽共患病“人病兽防”的指导思想, 降低养殖场猪群中该病的发生率是预防乙脑在人群中流行的重要环节。

传统疫苗主要是灭活疫苗和减毒疫苗,在预防乙脑方面取得了显著成效,但仍然存在生物安全风险,不良免疫副反应和获取有效抗原难的问题。在保证乙脑疫苗免疫效率和安全的前提下,降低疫苗生产成本,提高养猪场的疫苗接种率是预防乙脑急需解决的问题。新型疫苗如亚单位疫苗只含有病原体抗原,不含核酸,生物安全性好、抗原稳定,免疫效果好,但工业化生产要求较高的蛋白纯化工艺,重组蛋白亚单位疫苗因纯化过程中含有表达菌体或细胞的成分可能引起宿主的不良免疫副反应;DNA疫苗是将编码某种抗原的外源基因质粒导入宿主细胞后表达抗原,诱导宿主产生针对该抗原的特异性免疫应答^[5]。DNA疫苗因其制备简单、生物安全性好、便于运输且能产生持久的细胞免疫应答而成为一种具有较好发展前景的疫苗制剂,但单一的DNA疫苗免疫存在表达抗原量低,诱导产生的特异性抗体水平不高的弊端^[6]。加强疫策略是用一种疫苗进行初始免疫,再用同源异种疫苗进行加强免疫,比同种疫苗多次免疫能诱导更强的体液免疫和细胞免疫,尤其是细胞免疫应答,可增强4-10倍^[7-8]。

本研究选取编码乙脑病毒样颗粒主要抗原成分的prM-E基因表达盒构建的prM-E-pVAX1重组质粒作为DNA疫苗进行首免,选用以往研究中免疫效果类似于商品化SA-14-14-2减毒疫苗的prM和EIII融合抗原^[9]作为亚单位疫苗进行加强免疫,与设置的免疫对照组进行比较,评估prM-E-pVAX1 DNA初免-prM和EIII融合抗原加强免疫方案免疫小鼠产生的免疫保护效应。

1 材料与方法

1.1 试验材料

基因I型乙脑病毒GS株^[10]、幼年仓鼠肾

(baby hamster kidney, BHK)细胞、真核表达载体pVAX1均由中国农业科学院兰州兽医研究所家畜疫病病原生物学国家重点实验室保存;大肠杆菌(*Escherichia coli*)JM109菌株购于宝生物工程(大连)有限公司。prM和EIII融合抗原、兔抗EIII蛋白多克隆抗体、兔抗prM和EIII融合抗原多克隆抗体由本实验室制备并保存;Alexa Fluor 568标记的山羊抗兔IgG购自Abcam公司;Hoechst 33342购于赛默飞公司。4-6周龄雌性BALB/c小鼠由兰州兽医研究所实验动物中心提供。

1.2 方法

1.2.1 PCR引物设计

参照GenBank中乙脑病毒DH10M978序列(登录号:KT229573),利用Primer Premier 5.0生物学软件设计用于扩增prM-E基因的引物,并分别在上下游引物中插入EcoR I和Xba I酶切位点,引物序列如下:prM-E-F:5'-GCGGAA TTCATGAGAGGAGGGAATGAGAGCTCGA-3'(下划线为EcoR I酶切位点);prM-E-R:5'-GCGT CTAGATTAGTCGGCATGCACATTGGTCGCT-3'(下划线为Xba I酶切位点),委托生工生物工程(上海)股份有限公司合成。

1.2.2 真核表达载体的构建和鉴定

TRIzol法提取病毒RNA,以RT-PCR反应得到的一链cDNA为模板,用引物prM-E-F和prM-E-R扩增基因I型乙脑病毒GS株的prM-E基因。将扩增得到的prM-E基因及真核表达载体pVAX1分别用EcoR I和Xba I进行双酶切处理。将酶切处理后的prM-E基因与pVAX1载体用T4 DNA Ligase于16℃过夜连接。将上述连接产物转化*Escherichia coli* JM109感受态细胞。随机挑取LB固体培养基上单个菌落,接种于含有50 μg/mL卡那霉素的LB液体培养基中,37℃、220 r/min过夜培养后进行PCR

检测, 鉴定为阳性的菌液用 OMEGA 公司的质粒抽提试剂盒抽提质粒^[10], 用 *EcoR* I 和 *Xba* I 进行双酶切鉴定。将双酶切鉴定阳性的重组质粒委托南京金斯瑞生物科技有限公司进行测序。

1.2.3 Western blotting 检测重组质粒 prM-E-pVAX1 的表达

用 Invitrogen 公司的 PureLink HiPure Plasmid Midiprep Kit 大量提取重组质粒 prM-E-pVAX1 (具体实验步骤参考自带说明书), 并用 NanoDrop 2 000 分光光度计测定重组质粒的浓度, 并分装稀释至 1 000 ng/ μ L。将 BHK-21 细胞接种于 12 孔细胞培养板, 放置于 37 $^{\circ}$ C、5% CO₂ 细胞培养箱中培养, 待 12 h 后细胞密度达到 70%–80%时, 用 Lipofectamine™ 2 000 转染重组质粒 prM-E-pVAX1, 在转染 48 h 后, 收集上清液, 用超滤管浓缩。细胞沉淀用 PBS 洗两遍, 胰酶消化, 收取细胞样品, Western blotting 检测重组质粒在 BHK-21 细胞中的表达情况, 一抗为小鼠抗 prM 和 EIII 融合抗原多克隆抗体 (1 : 500), 二抗为碱性磷酸酶标记的山羊抗小鼠 IgG (1 : 5 000)。

1.2.4 IFA 验证重组质粒在 BHK-21 细胞中的表达

将 BHK-21 细胞传代于放置细胞爬片的 12 孔板内, 放置于 37 $^{\circ}$ C、5% CO₂ 细胞培养箱中培养, 待细胞铺满 60%–70%后, 转染重组质粒 prME-pVAX1。24 h 后吸弃孔中旧液, PBS 洗 3 次, 每次 3–5 min, 每孔加 500 μ L 4%多聚甲醛, 室温固定 20 min; 弃去孔中液体, PBS 洗 3 次, 每次 3–5 min, 每孔加入 500 μ L 0.5% Triton X-100, 室温孵育 20 min; 弃去孔中液体, PBS 洗 3 次, 每次 3–5 min, 每孔加 500 μ L 3% BSA, 封闭 1 h; 弃去孔中液体, PBS 洗 3 次, 每次 3–5 min, 每孔加入 500 μ L 用 1% BSA 稀

释的家兔抗 EIII 多克隆抗体 (1 : 100), 室温孵育 1 h; 弃去孔中液体, PBS 洗 3 次, 每次 3–5 min, 取一张封口膜, 做好标记, 吸取 25 μ L 用 1% BSA 稀释的 Hoechst 33342 (1 : 2 000) 和 Alexa Fluor 568 标记的山羊抗家兔 IgG (1 : 1 000) 于封口膜上, 用镊子从孔中小心夹取细胞爬片, 将有细胞的一面朝下小心反扣在二抗液滴上, 室温避光孵育 1 h; 弃去孔中液体, PBS 洗 3 次, 每次 3–5 min, 用吸水纸将细胞爬片上的水吸干, 在载玻片上滴一滴抗荧光淬灭剂, 然后将细胞爬片封片于载玻片上, 用荧光显微镜观察并采集图像^[10]。

1.2.5 动物免疫试验方案

小鼠免疫试验程序经兰州兽医研究所动物管理及伦理委员会批准 (LVRIAEC2013-010)。将 32 只 4–6 周龄雌性 BALB/c 小鼠随机分成 4 组, 设置 prM-E-pVAX1 DNA 疫苗组、prM-E-pVAX1 DNA 初免-prM 和 EIII 融合抗原加强免疫组、prM 和 EIII 融合抗原亚单位疫苗组及 pVAX1 载体对照组, 开展动物免疫试验 (表 1)。小鼠每隔 2 周接种一次疫苗, 共接种 3 次。DNA 疫苗组小鼠每只每次肌肉注射 100 μ g prM-E-pVAX1 质粒。对 prM 和 EIII 融合抗原亚单位疫苗组小鼠皮下多点注射完全弗氏佐剂乳化的 50 μ g prM 和 EIII 融合抗原进行第一次免疫, 不完全弗氏佐剂乳化的 50 μ g prM 和 EIII 融合抗原进行第 2 次免疫, 第 3 次免疫: 对小鼠进行腹腔注射 50 μ g 不加佐剂的 prM 和 EIII 融合抗原。DNA 初免-蛋白加强免疫组小鼠一免时进行肌肉注射 100 μ g prM-E-pVAX1 质粒, 二免时皮下多点注射 50 μ g 经不完全弗氏佐剂乳化的 prM 和 EIII 融合抗原, 三免时对小鼠腹腔注射 50 μ g 无佐剂的 prM 和 EIII 融合抗原。对照组小鼠每次每只接种 100 μ g pVAX1。在第 0、7、14、21、28、35 和 42 天, 通过小鼠尾尖采血制备血清,

表 1 BALB/c 小鼠免疫方案

Table 1 The immuno-schedules of BALB/c mice

Groups	Primary immunization	Boost immunization	Booster immunization
prM-E-pVAX1 DNA	prM-E-pVAX1	prM-E-pVAX1	prM-E-pVAX1
prM-EIII protein	prM-EIII+FCA	prM-EIII+FIA	prM-EIII
DNA Prime-protein boost	prM-E-pVAX1	prM-EIII+FIA	prM-EIII
pVAX1	pVAX1	pVAX1	pVAX1

-20 °C 冻存备用, 第 42 天各免疫组随机取 3 只小鼠眼球采血制备血清用于细胞因子表达丰度和中和抗体滴度测定, 断颈处死后, 采集脾脏制备淋巴细胞用于淋巴细胞增殖实验^[9]。

1.2.6 ELISA 检测小鼠血清中特异性抗体水平

应用间接 ELISA 方法测定免疫小鼠血清中特异性抗体水平, 将镍柱亲和层析纯化的 EIII 蛋白^[10] 0.5 μg/孔包被板子, 5%脱脂奶粉封闭, 每孔加入从 1:100 开始 2 倍倍比稀释的免疫小鼠血清作为一抗, HRP 标记山羊抗小鼠 IgG (1:2 500) 作为二抗, 酶标仪测定 450 nm 波长吸光度值, 以 P/N>2.1 的血清最大稀释倍数为被检血清特异性抗体效价^[9]。

1.2.7 噬斑减少中和试验

噬斑减少中和试验测定初免后第 42 天采集的各免疫组小鼠血清中和抗体滴度, 将各免疫组小鼠血清 56 °C 灭活 30 min, 从 1:10 开始进行 2 倍倍比稀释, 将稀释的血清与含有 100 PFU 的病毒液等体积混合, 设 PBS 免疫小鼠血清处理病毒组作为对照组, 以能减少对照组 50%空斑数的血清最高稀释度为该血清的中和抗体效价^[9]。

1.2.8 ELISA 检测小鼠血清中细胞因子表达丰度

应用达优[®]小鼠细胞因子 ELISA 试剂盒检测初免后第 42 天采集的各免疫组小鼠血清中 IFN-γ、IL-2 和 IL-4 的表达水平^[9]。

1.2.9 淋巴细胞增殖试验

将制备的 2×10⁶/mL 的淋巴细胞悬液加入

到 96 孔细胞培养板中, 100 μL/孔, 加入终浓度为 5 μg/mL 的免疫抗原刺激淋巴细胞, 每个样品重复 3 孔, 并设 ConA (终浓度为 5 μg/mL) 刺激细胞阳性对照和空白细胞阴性对照, 将 96 孔板放置于细胞培养箱中培养 72 h。每孔加入 10 μL WST-1 溶液, 继续培养 3-4 h, 酶标仪测定 OD₄₅₀ 值, 计算刺激指数 (stimulation index, SI)= $\frac{OD_{450, \text{试验}} - OD_{450, \text{对照}}}{OD_{450, \text{对照}} - OD_{450, \text{空白}}}$ ^[9]。

1.2.10 统计学分析

使用 GraphPad Prism 5.0 软件进行实验数据的统计学分析。利用单因素方差分析或 *t* 检验分析各免疫组间实验数据的差异 ($P < 0.05$ 差异显著, $P < 0.01$ 差异极显著)。

2 结果与分析

2.1 prM-E 基因的 PCR 扩增及 prM-E-pVAX1 重组质粒的酶切鉴定

以反转录得到的基因 I 型乙脑病毒 GS 株一链 cDNA 为模板, 分别用 prM-E-F 和 prM-E-R 为引物进行 PCR 扩增得到基因 I 型乙脑病毒 GS 株的 prM-E 基因, 获得了 2 079 bp 的片段, 片段大小与预期一致 (图 1A)。将扩增获得的目的基因插入到 pVAX1 载体中, 用 *EcoR* I 和 *Xba* I 进行双酶切鉴定, 并送测序。双酶切鉴定结果显示, 可见两条特异性条带 (图 1B), 测序结果显示, 插入的片段为一个 2 079 bp 完整开放阅读框, 与预期一致, 表明 prM-E 基因正确地插入了 pVAX1 载体中。

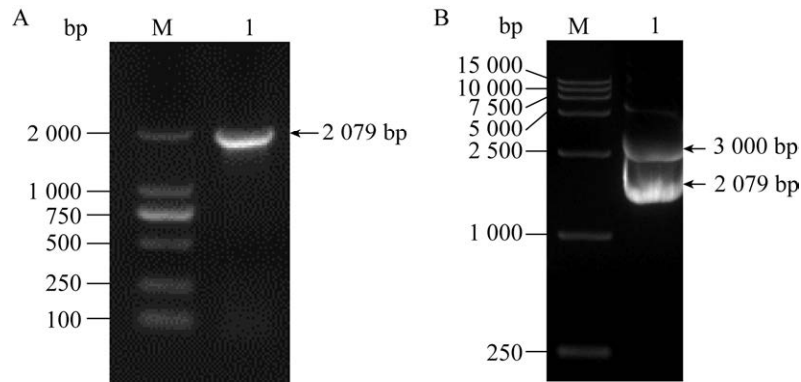


图1 prM-E-pVAX1 的构建及鉴定

Figure 1 Construction and identification of prM-E-pVAX1. (A) PCR amplification of prM-E gene from genotype I JEV GS strain. (B) The identification of recombinant plasmid prM-E-pVAX1 by restriction enzyme digestion.

2.2 prM-E-pVAX1 在 BHK-21 细胞中瞬时表达

免疫印迹结果显示,与空载体 pVAX1 转染的 BHK-21 细胞相比,重组质粒 prM-E-pVAX1 转染 BHK-21 细胞的浓缩后细胞培养上清作为抗原,与 prM 和 EIII 融合抗原免疫小鼠产生的血清反应,出现了两条特异性条带(图 2),一条蛋白分子量为 53 kDa,与 JEV 天然 E 蛋白分子量大一致,一条分子量为 8 kDa,与 JEV M 蛋白分子量大一致。表明 prM-E-pVAX1 重组质粒在 BHK-21 细胞中能够正确表达,且目的蛋白能够被 BHK-21 细胞中的宿主蛋白酶切割为 E 和 M 两个蛋白,而这两个结构蛋白包装后可形成乙脑病毒病毒样颗粒,因此,可推测重组质粒 prM-E-pVAX1 转染 BHK-21 细胞后,表达出的目的蛋白经宿主细胞蛋白酶加工处理后可组装形成病毒样颗粒。

间接免疫荧光实验结果显示,与转染了空载体 pVAX1 的 BHK-21 细胞对照组相比,转染了 prM-E-pVAX1 重组质粒的 BHK-21 细胞可观察到特异的红色荧光,表明重组质粒 prM-E-pVAX1 转染 BHK-21 细胞后,能够正确表达目

的蛋白(图 3)。

2.3 免疫后诱导小鼠产生高水平的特异性抗体

将第 0、7、14、21、28、35、42 天所收集小鼠血清,通过间接 ELISA 测定其特异性抗体

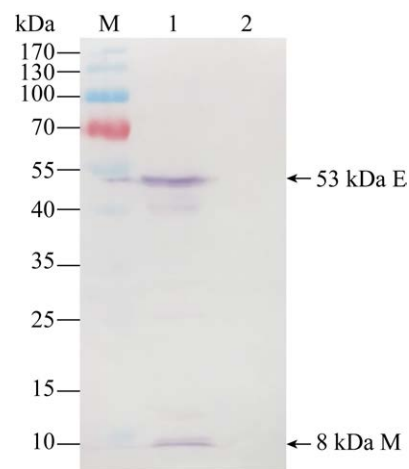


图2 重组质粒 prM-E-pVAX1 表达产物的 Western blotting 鉴定

Figure 2 Identification of expression products of recombinant plasmids prM-E-pVAX1 by Western blotting. M: protein marker; concentrated culture supernatant of BHK-21 cells transfected with recombinant plasmid prM-E-pVAX1 (lane 1) or plasmid pVAX1 (lane 2) for 48 h.

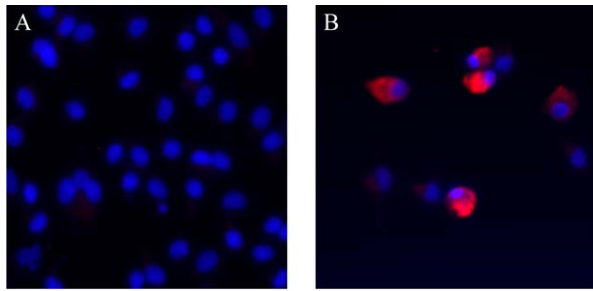


图3 间接免疫荧光验证重组质粒 prM-E-pVAX1 在 BHK-21 细胞中的表达

Figure 3 Expression of recombinant plasmid prM-E-pVAX1 in BHK-21 cells verified by indirect immunofluorescence assay. BHK-21 cells transfected with the plasmid pVAX1 (A) and prM-E-pVAX1 (B).

效价。结果表明,与 pVAX1 对照组相比,prM-E-pVAX1 DNA 疫苗免疫组、prM 和 EIII 融合抗原免疫组、DNA 初免-蛋白加强免疫策略组小鼠都可诱导特异性抗体产生。DNA 初免-蛋白加强免疫组小鼠的特异性抗体水平呈现持续上升的趋势,且在第 35 天时特异性抗体水平与 prM 和 EIII 融合抗原免疫组持平 (图 4)。

2.4 免疫后诱导小鼠产生高水平的中和抗体

初免后第 42 天所采集的免疫小鼠血清,利用噬斑减少中和试验测定其中和抗体效价,结果表明,prM-E-pVAX1 DNA 疫苗免疫组小鼠血

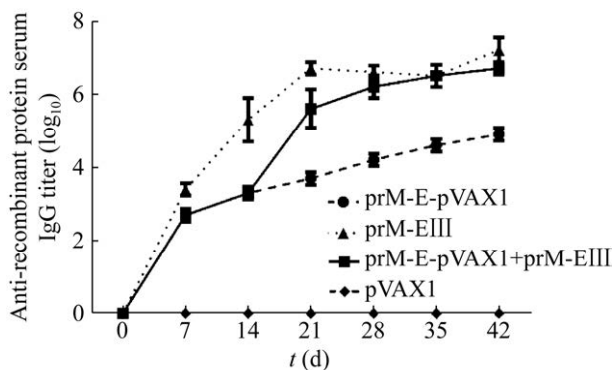


图4 小鼠血清特异性抗体动态曲线

Figure 4 The dynamic curve of specific antibody titers produced by immunized mice.

清平均中和抗体滴度为 1:100, prM 和 EIII 融合抗原免疫组小鼠血清平均中和抗体滴度为 1:200, DNA 初免-蛋白加强免疫组小鼠血清中和抗体滴度为 1:280。DNA 初免-蛋白加强免疫组小鼠中和抗体滴度最高,略高于 prM 和 EIII 融合抗原免疫组,极显著高于 prM-E-pVAX1 DNA 疫苗免疫组 ($P<0.01$) (图 5)。

2.5 免疫后诱导小鼠表达细胞因子水平上升

首免后第 42 天,采集免疫小鼠血清后,利用细胞因子 ELISA 检测试剂盒检测血清中的细胞因子 IFN- γ 、IL-2 和 IL-4。结果显示 DNA 初免-蛋白加强免疫组的 IFN- γ 和 IL-2 的表达水平极显著高于 prM 和 EIII 融合抗原免疫组和 prM-E-pVAX1 DNA 疫苗免疫组 ($P<0.01$)。prM 和 EIII 融合抗原免疫组 IL-4 的表达水平最高,极显著高于 prM-E-pVAX1 DNA 疫苗免疫组 ($P<0.01$) 和 DNA 初免-蛋白加强免疫组 ($P<0.01$) (图 6)。

2.6 免疫后诱导小鼠特异性淋巴细胞增殖

WST 法测定免疫小鼠脾脏淋巴细胞增殖能力,评价免疫小鼠后诱导的细胞免疫水平。结果

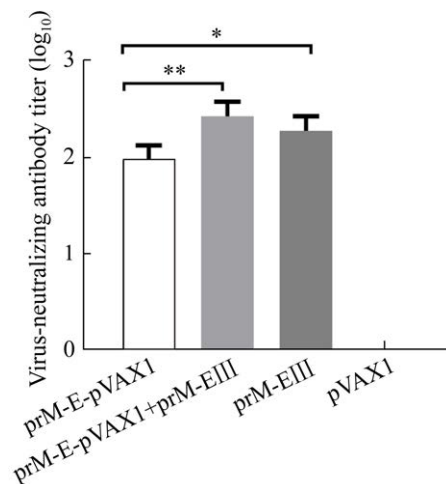


图5 第 42 天采集的免疫小鼠血清抗乙脑病毒 GS 株中和抗体滴度

Figure 5 Virus-neutralizing antibody titers against JEV GS strain for the antisera collected on day 42nd. *: $P<0.05$; **: $P<0.01$.

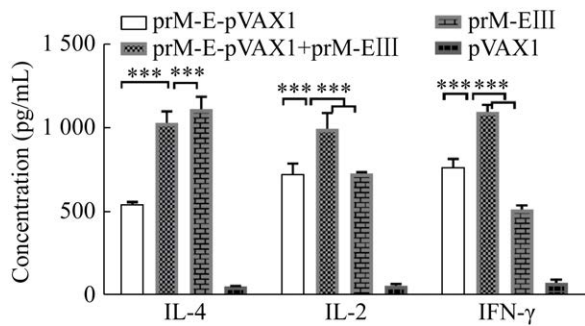


图6 小鼠血清中细胞因子表达水平检测
Figure 6 Detection of cytokine expression levels in serum of the immunized mice. ***: $P < 0.001$.

显示, prM-E-pVAX1 DNA 疫苗免疫组 SI 值为 1.42 ± 0.10 , DNA 初免-蛋白加强免疫组 SI 值为 1.89 ± 0.21 , prM 和 EIII 融合抗原免疫组的 SI 值为 1.87 ± 0.31 。DNA 初免-蛋白加强免疫组的 SI 值显著高于 prM-E-pVAX1 DNA 疫苗免疫组 ($P < 0.05$), DNA 初免-蛋白加强免疫组和 prM 和 EIII 融合抗原免疫组的刺激指数相当, 统计学分析差异不显著 ($P > 0.05$) (图 7)。

3 讨论

流行性乙型脑炎是一种危害养猪业的重要人兽共患传染病。现有的商品化乙型脑炎病毒疫苗是以基因 III 型乙型脑炎病毒为基础的灭活疫苗和弱毒疫苗^[11-12]。灭活疫苗免疫保护效果不理想和减毒乙脑疫苗对于怀孕母猪的安全性存在争议的问题驱使科研人员不断完善乙脑疫苗的不足, 优化免疫抗原组合和免疫方案, 将疫苗生产成本降到最低且达到最佳的免疫保护效果。本研究以基因 I 型乙脑病毒毒株为生物材料, 通过 DNA 初免-蛋白加强策略免疫小鼠, 提供一种诱导产生最佳免疫保护效果、生物安全性好、成本低和副作用小的预防流行性乙型脑炎的疫苗免疫方案, 以促进养猪业的健康发展。

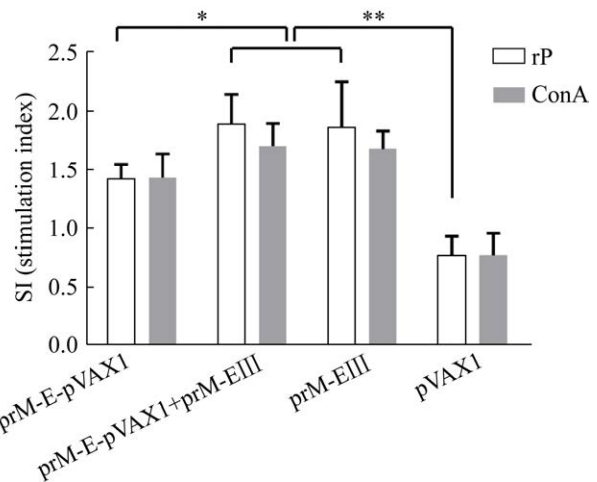


图7 免疫小鼠淋巴细胞增殖水平检测
Figure 7 Detection of lymphocyte proliferation of the immunized mice. *: $P < 0.05$; **: $P < 0.01$. rP: prM-EIII recombinant protein.

以前的研究表明: 采用同样的免疫策略, 选取的靶标基因不同, 产生的免疫保护效应也不同, 因此优化抗原组合是获得良好免疫保护效应的前提条件^[13]。乙脑病毒 E 蛋白是病毒表面的主要结构蛋白, 主要与病毒的吸附、入侵、膜融合以及病毒的毒力密切相关。E 蛋白的 EDIII 结构域含有中和表位和宿主细胞受体结合位点, 是乙脑病毒编码的主要免疫原性结构蛋白, 其诱导的中和抗体能够有效阻止乙脑病毒感染宿主细胞^[10,14-15]。因此, EDIII 可作为乙脑病毒亚单位疫苗研制的主要候选抗原^[10]。prM 蛋白是 M 蛋白的前体蛋白, 是诱发机体保护性免疫的重要协同成分^[16-17]。研究表明将含有 prM 和 E 基因的重组质粒导入到小鼠和猪体内, 重组质粒编码表达的 prM 和 E 蛋白可以诱导机体产生包括乙脑病毒特异性 B 细胞和细胞毒性 T 淋巴细胞等一系列的保护性免疫反应^[18]。为了提高乙脑病毒 DNA 疫苗的免疫反应性, 研究者们进行了很多尝试, 诸如 DNA 疫苗组成成分的构成、胞内表达、膜上表达、E 蛋白的分泌

表达及有无 prM 蛋白的共表达等。结果显示, prM-E 诱导机体产生的免疫保护反应最强^[19-21]。本研究中, 我们选择的靶标基因表达的蛋白是组成乙脑病毒病毒样颗粒的主要抗原成分, 通过将构建的 prM-E-pVAX1 重组质粒转染 BHK-21 细胞, 收获的细胞培养上清浓缩后作为抗原的免疫印迹结果显示, 转染细胞培养上清中可检测到分泌表达的 M 蛋白 (8 kDa) 和 E 蛋白 (53 kDa), 具备了在转染细胞培养上清中形成乙脑病毒病毒样颗粒的潜力 (图 2)。由此推测, prM-E DNA 疫苗免疫动物后, 在宿主动物细胞内可能以病毒样颗粒的形式诱导机体产生类似于天然病毒颗粒感染机体后诱导的免疫反应。此外, 我们以往的研究结果表明, prM 和 EIII 融合抗原免疫小鼠诱导产生的中和抗体水平接近于 SA14-14-2 商品化减毒疫苗^[9]。因此本研究以基因 I 型乙脑病毒毒株为生物材料, 构建了 prM-E-pVAX1 DNA 疫苗, 以原核表达获得的 prM 和 EIII 融合抗原作为亚单位疫苗, 利用 DNA 初免-蛋白加强策略免疫 BALB/c 小鼠。结果显示, 利用 DNA 初免-蛋白加强策略免疫小鼠制备的血清中细胞因子 IFN- γ 和 IL-2 的表达水平显著高于 prM-E DNA 疫苗免疫组和 prM-EIII 蛋白疫苗免疫组 ($P < 0.01$)。DNA 初免-蛋白加强免疫组中和抗体水平极显著高于 prM-E DNA 疫苗免疫组 ($P < 0.01$), 略高于 prM-EIII 融合蛋白疫苗免疫组诱导产生的中和抗体水平。尽管在以往的乙脑疫苗研究方面, 用乙脑病毒病毒样颗粒作为亚单位疫苗进行免疫产生了很强的免疫保护效应^[22-24], 但病毒样颗粒在规模化工业生产过程中的弊端如表达量不高、纯化难度大、表达系统或细胞株不稳定等问题限制了病毒样颗粒作为亚单位疫苗的商品化使用。本研究中, 我们采用编码病毒样颗粒主要抗原成分的 prM-E DNA 疫苗初免, 原核表达系统获得的 prM 和 EIII 融合抗原作为亚单

位疫苗进行加强免疫, 该免疫策略在提高免疫保护效果的同时, 很好地解决了工业化生产过程中获取有效免疫保护抗原难的问题。

综上所述, 本研究采用 DNA 初免-蛋白加强免疫方案免疫小鼠诱导产生了较强的体液免疫和细胞免疫反应, 诱导产生的中和抗体水平略高于单一 prM 和 EIII 融合抗原免疫水平, 该研究为预防流行性乙型脑炎免疫方案提供了新的思路。未来还需要尝试采用基因枪注射或者以其他免疫佐剂及纳米颗粒的方式优化免疫方案等进一步提高该免疫方案的免疫保护效应。

REFERENCES

- [1] Dhanda V, Mourya DT, Mishra AC, et al. Japanese encephalitis virus infection in mosquitoes reared from field-collected immatures and in wild-caught males. *Am J Trop Med Hyg*, 1989, 41(6): 732-736.
- [2] Van Gessel Y, Klade CS, Putnak R, et al. Correlation of protection against Japanese encephalitis virus and JE vaccine (IXIARO®) induced neutralizing antibody titers. *Vaccine*, 2011, 29(35): 5925-5931.
- [3] Sheng ZY, Gao N, Cui XY, et al. Electroporation enhances protective immune response of a DNA vaccine against Japanese encephalitis in mice and pigs. *Vaccine*, 2016, 34(47): 5751-5757.
- [4] Pierson TC, Kielian M. Flaviviruses: braking the entering. *Curr Opin Virol*, 2013, 3(1): 3-12.
- [5] Li L, Petrovsky N. Molecular mechanisms for enhanced DNA vaccine immunogenicity. *Expert Rev Vaccines*, 2016, 15(3): 313-329.
- [6] Cui ZR. DNA vaccine. *Adv Genet*, 2005, 54: 257-289.
- [7] Kardani K, Bolhassani A, Shahbazi S. Prime-boost vaccine strategy against viral infections: mechanisms and benefits. *Vaccine*, 2016, 34(4): 413-423.
- [8] 吴鹏. 乙型脑炎病毒 NS1 蛋白的新型 prime-boost 免疫策略研究[D]. 南京: 南京农业大学, 2009. Wu P. DNA prime/protein boost of Japanese encephalitis virus NS₁ protein to improve immune response in mice[D]. Nanjing: Nanjing Agricultural University, 2009 (in Chinese).
- [9] 于瑞明, 田占成, 高闪电, 等. 基因 I 型乙型脑炎病毒亚单位疫苗候选抗原的免疫原性比较. 生物工程

- 学报, 2020, 36(7): 1314-1322.
- Yu RM, Tian ZC, Gao SD, et al. Comparison of the immunogenicity of genotype I Japanese encephalitis virus subunit vaccine candidate antigens. *Chin J Biotech*, 2020, 36(7): 1314-1322 (in Chinese).
- [10] 于瑞明, 田占成, 独军政, 等. 基因 I 型乙脑病毒 EDIII 结构域蛋白的原核表达及其抗体制备与鉴定. *中国兽医科学*, 2017, 47(12): 1475-1480.
- Yu RM, Tian ZC, Du JZ, et al. Identification of EDIII protein from the genotype I Japanese encephalitis virus. *Chin Vet Sci*, 2017, 47(12): 1475-1480 (in Chinese).
- [11] Huang JH, Lin TH, Teng HJ, et al. Molecular epidemiology of Japanese encephalitis virus, Taiwan. *Emerg Infect Dis*, 2010, 16(5): 876-878.
- [12] Ma SP, Yoshida Y, Makino Y, et al. Short report: a major genotype of Japanese encephalitis virus currently circulating in Japan. *Am J Trop Med Hyg*, 2003, 69(2): 151-154.
- [13] Wu HH, Chen CT, Lin YL, et al. Sub-fragments of the envelope gene are highly protective against the Japanese encephalitis virus lethal infection in DNA priming — protein boosting immunization strategies. *Vaccine*, 2004, 22(5/6): 793-800.
- [14] Lai CY, Tsai WY, Lin SR, et al. Antibodies to envelope glycoprotein of dengue virus during the natural course of infection are predominantly cross-reactive and recognize epitopes containing highly conserved residues at the fusion loop of domain II. *J Virol*, 2008, 82(13): 6631-6643.
- [15] Wu KP, Wu CW, Tsao YP, et al. Structural basis of a *Flavivirus* recognized by its neutralizing antibody: solution structure of the domain III of the Japanese encephalitis virus envelope protein. *J Biol Chem*, 2003, 278(46): 46007-46013.
- [16] Konishi E, Pincus S, Paoletti E, et al. A highly attenuated host range-restricted vaccinia virus strain, NYVAC, encoding the prM, E, and NS₁ genes of Japanese encephalitis virus prevents JEV viremia in swine. *Virology*, 1992, 190(1): 454-458.
- [17] Nam JH, Wyatt LS, Chae SL, et al. Protection against lethal Japanese encephalitis virus infection of mice by immunization with the highly attenuated MVA strain of vaccinia virus expressing JEV prM and E genes. *Vaccine*, 1999, 17(3): 261-268.
- [18] Zheng XY, Yu XZ, Wang Y, et al. Immune responses and protective effects against Japanese encephalitis induced by a DNA vaccine encoding the prM/E proteins of the attenuated SA14-14-2 strain. *Infect Genet Evol*, 2020, 85: 104443.
- [19] Ashok MS, Rangarajan PN. Immunization with plasmid DNA encoding the envelope glycoprotein of Japanese Encephalitis virus confers significant protection against intracerebral viral challenge without inducing detectable antiviral antibodies. *Vaccine*, 1999, 18(1/2): 68-75.
- [20] Jan LR, Yang CS, Trent DW, et al. Processing of Japanese encephalitis virus non-structural proteins: NS2B-NS₃ complex and heterologous proteases. *J Gen Virol*, 1995, 76(Pt 3): 573-580.
- [21] Kaur R, Sachdeva G, Vrati S. Plasmid DNA immunization against Japanese encephalitis virus: immunogenicity of membrane-anchored and secretory envelope protein. *J Infect Dis*, 2002, 185(1): 1-12.
- [22] Hua RH, Liu LK, Chen ZS, et al. Comprehensive mapping antigenic epitopes of NS₁ protein of Japanese encephalitis virus with monoclonal antibodies. *PLoS One*, 2013, 8(6): e67553.
- [23] Saini M, Vrati S. A Japanese encephalitis virus peptide present on *Johnson grass* mosaic virus-like particles induces virus-neutralizing antibodies and protects mice against lethal challenge. *J Virol*, 2003, 77(6): 3487-3494.
- [24] Yamaji H, Nakamura M, Kuwahara M, et al. Efficient production of Japanese encephalitis virus-like particles by recombinant lepidopteran insect cells. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2013, 97(3): 1071-1079.

(本文责编 郝丽芳)