

猪繁殖与呼吸综合征病毒 GP5 和 M 蛋白的真核表达及免疫原性评价

娄慧聪^{1,2}, 林润山^{2,3}, 李亚波^{1,2}, 赵雨娜^{1,2}, 焦鹏涛², 罗廷荣¹, 刘文军^{1,2,3*}

1 广西大学动物科学技术学院, 广西 南宁 530004

2 中国科学院微生物研究所 病原微生物与免疫学重点实验室, 北京 100101

3 中国科学院大学, 北京 100049

娄慧聪, 林润山, 李亚波, 赵雨娜, 焦鹏涛, 罗廷荣, 刘文军. 猪繁殖与呼吸综合征病毒 GP5 和 M 蛋白的真核表达及免疫原性评价[J]. 生物工程学报, 2023, 39(12): 4809-4823.

LOU Huicong, LIN Runshan, LI Yabo, ZHAO Yuna, JIAO Pengtao, LUO Tingrong, LIU Wenjun. Eukaryotic expression of GP5 and M protein of porcine reproductive and respiratory syndrome virus and immunogenicity evaluation[J]. Chinese Journal of Biotechnology, 2023, 39(12): 4809-4823.

摘要: 为了解我国猪繁殖与呼吸综合征病毒(porcine reproductive and respiratory syndrome virus, PRRSV)的流行及进化情况并开发针对流行谱系的亚单位疫苗, 对 2001–2021 年间分离于我国的 PRRSV 毒株进行遗传进化分析, 选用优势流行谱系代表毒株, 优化其 GP5 和 M 蛋白的基因序列, 与干扰素(interferon, IFN)和免疫球蛋白的 Fc 区串联后, 构建真核表达质粒 pCDNA3.4-IFN α -GP5-Fc 和 pCDNA3.4-IFN α -M-Fc, 并使用 HEK293T 真核表达系统表达重组蛋白 IFN α -GP5-Fc 和 IFN α -M-Fc。将 2 种重组蛋白与 ISA206VG 佐剂混匀, 免疫断奶仔猪, 通过酶联免疫吸附试验(enzyme linked immunosorbent assay, ELISA)及中和试验评价体液免疫水平, 酶联免疫斑点试验(enzyme-linked immunospot assay, ELISPOT)评价细胞免疫水平。试验结果表明, NADC30-like 谱系为近年我国主要流行的谱系, IFN α -GP5-Fc 和 IFN α -M-Fc 组合免疫仔猪能诱导高水平的抗体和细胞免疫, 该研究为制备更为安全有效的新型 PRRSV 亚单位疫苗奠定基础。

关键词: 猪繁殖与呼吸综合征(PRRS); 遗传进化分析; GP5 重组蛋白; M 重组蛋白; 免疫原性评价

资助项目: 国家重点研发计划(2021YFD1801202); 国家自然科学基金(31941015); 内蒙古自治区科技计划项目(2021ZD0010-04)

This work was supported by the National Key Research and Development Program of China (2021YFD1801202), the National Natural Science Foundation of China (31941015), and the Science and Technology Program of Inner Mongolia Autonomous Region (2021ZD0010-04).

*Corresponding author. E-mail: liuwj@im.ac.cn

Received: 2023-03-13; Accepted: 2023-05-22; Published online: 2023-11-23

Eukaryotic expression of GP5 and M protein of porcine reproductive and respiratory syndrome virus and immunogenicity evaluation

LOU Huicong^{1,2}, LIN Runshan^{2,3}, LI Yabo^{1,2}, ZHAO Yuna^{1,2}, JIAO Pengtao², LUO Tingrong¹, LIU Wenjun^{1,2,3*}

1 Animal Science and Technology College, Guangxi University, Nanning 530004, Guangxi, China

2 Key Laboratory of Pathogenic Microbiology and Immunology, Institute of Microbiology, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100101, China

3 University of Chinese Academy of Sciences, Beijing 100049, China

Abstract: In order to understand the prevalence and evolution of porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV) in China and to develop subunit vaccine against the epidemic lineage, the genetic evolution analysis of PRRSV strains isolated in China from 2001 to 2021 was performed. The representative strains of the dominant epidemic lineage were selected to optimize the membrane protein GP5 and M nucleotide sequences, which were used, with the interferon and the Fc region of immunoglobulin, to construct the eukaryotic expression plasmids pCDNA3.4-IFN α -GP5-Fc and pCDNA3.4-IFN α -M-Fc. Subsequently, the recombinant proteins IFN α -GP5-Fc and IFN α -M-Fc were expressed by HEK293T eukaryotic expression system. The two recombinant proteins were mixed with ISA206VG adjuvant to immunize weaned piglets. The humoral immunity level was evaluated by ELISA and neutralization test, and the cellular immunity level was detected by ELISPOT test. The results showed that the NADC30-like lineage was the main epidemic lineage in China in recent years, and the combination of IFN α -GP5-Fc and IFN α -M-Fc could induce high levels of antibody and cellular immunity in piglets. This study may facilitate the preparation of a safer and more effective new PRRSV subunit vaccine.

Keywords: porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRS); genetic evolution analysis; GP5 recombinant protein; M recombinant protein; immunogenicity evaluation

猪繁殖与呼吸综合征(porcine reproductive and respiratory syndrome, PRRS)是由猪繁殖和呼吸障碍综合症病毒(porcine reproductive and respiratory syndrome virus, PRRSV)引起的一种以母猪的繁殖障碍和不同年龄病猪呼吸困难为主要特征的高度传染性疾病^[1], 由于感染后的母猪和仔猪具有特征性的蓝耳, 该疾病又称“猪蓝耳病”^[2-3]。PRRSV 根据其基因型的不同, 分为欧洲型(EU 型)和美洲型(NA 型)两种亚型^[4], 其基

因组全长约为 15 kb, 含有 10 个开放阅读框(open reading frames, ORFs): ORF1a-ORF1b-ORF2a-ORF2b-ORF3-ORF4-ORF5-ORF5a-ORF6-ORF7, 其中 ORF1a 和 ORF1b 编码 2 种多肽, 它们通过病毒酶裂解产生 14 种非结构蛋白, ORF2-ORF7 编码 8 种结构蛋白, 包括较小的膜蛋白(GP2a、GP3、GP4、E 和 ORF5a)、主要膜蛋白(GP5 和 M)和核衣壳蛋白(N)^[5-6], 其中 GP5 是糖基化的囊膜蛋白, 能诱导中和抗体产生,

是新型亚单位疫苗设计的主要靶蛋白^[7]。由于 GP5 有较高的变异性,因此持续监测 PRRSV 的流行情况,分析 GP5 遗传变异规律,对开发新型 PRRSV 疫苗,控制病毒传染具有重要作用^[8]。ORF6 编码的非糖基化的囊膜蛋白 M 在病毒结构蛋白中最保守,其具有较强的免疫原性,能增强细胞免疫,也是 PRRSV 亚单位疫苗制备的备选抗原^[9],此外, M 蛋白可与 GP5 蛋白在病毒中通过二硫键形成异源二聚体,能够增强 GP5 的免疫原性^[10], GP5 和 M 蛋白被认为是开发 PRRSV 疫苗的首选蛋白。PRRSV 全基因组都可能发生碱基突变、缺失和基因重组,其中以 ORF5 基因突变最为频繁^[11],因此以 ORF5 基因变异为基础的序列分析也成为研究 PRRSV 基因分型、突变特征、遗传演化规律的热点。

抗原的聚合形式比单体更具有免疫原性,抗原与免疫球蛋白的 Fc 片段融合可表达为二聚体形式的重组蛋白,具有更长的半衰期和免疫原性,近年来,多种疫苗研发应用了 Fc 融合蛋白策略^[12-13]。Chen 等^[14]研究发现,猪免疫球蛋白 Fc 片段融合 P30/P54 蛋白诱导 P30/P54 特异性抗体产生,猪粘膜免疫能力升高。Luo 等^[15]将猪圆环病毒 2 型(porcine circovirus type 2, PCV2)截短衣壳蛋白和猪免疫球蛋白 G (immunoglobulin G, IgG) Fc 片段融合,该融合蛋白免疫小鼠后显著提高了血清中 PCV2 衣壳蛋白抗体的水平。Diamos 等^[16]表达寨卡病毒(zika virus, ZIKV)包膜结构域 III (envelop domain III, ZE3)与人 IgG1 Fc 融合蛋白并免疫小鼠,仅接种两剂且不加佐剂,即可产生高滴度的 IgG,抗血清具有中和 ZIKV 的能力。

干扰素 α (interferon α , IFN α)通过与细胞表面受体结合,激活 JAK-STAT 信号通路,产生降解 mRNA 的酶,阻止病毒蛋白合成,从而抑

制病毒的复制,成为固有免疫中机体抵抗病毒感染的第一道天然免疫防线^[17-20]。此外,浆细胞样树突状细胞(plasmacytoid dendritic cell, pDC)受到特定 Toll 样受体刺激后,产生的 IFN α 可直接使已被活化的 B 淋巴细胞和 T 淋巴细胞产生免疫应答,也可以刺激树突状细胞成熟后,激活初始 B 淋巴细胞和初始 T 淋巴细胞,在连接先天性和适应性免疫方面具有重要作用,因此 IFN α 作为佐剂越来越多的应用于疫苗开发中^[21]。Cheng 等^[22]研究发现,猪 IFN α 是针对猪口蹄疫病毒的重组蛋白疫苗的适用型佐剂,可以诱导该病毒中和抗体的产生,并且出现显著的 T 细胞介导的免疫反应。Sun 等^[23]在严重急性呼吸综合征冠状病毒 2 (severe acute respiratory syndrome coronavirus 2, SARS-CoV-2)的受体结合域 (receptor-binding domain, RBD)的 N 末端配备 IFN α ,免疫小鼠后,诱导 CD8⁺ T 细胞反应。Zhao 等^[24]的研究中,IFN α 与重组乙型肝炎病毒(hepatitis B virus, HBV)疫苗共同使用,IFN α 作为有效的治疗性疫苗佐剂清除小鼠模型中乙型肝炎 e 抗原(hepatitis B e antigen, HBeAg)和乙型肝炎病毒表面抗原(hepatitis B surface antigen, HBsAg),且肝脏中出现大量 CD8⁺ T 细胞浸润。

本研究选取 GenBank 数据库中分离于我国的 PRRSV 毒株,基于 ORF5 基因进行遗传进化分析,明确近年流行于我国的优势分型毒株,基于该优势毒株 GP5 蛋白和 M 蛋白的胞外区域构建融合蛋白表达质粒 pCDNA3.4-IFN α -GP5-Fc 和 pCDNA3.4-IFN α -M-Fc,利用 HEK293T 真核表达系统表达重组蛋白,免疫仔猪并采用酶联免疫吸附试验(enzyme linked immunosorbent assay, ELISA)、中和试验及酶联免疫斑点试验(enzyme-linked immunospot assay, ELISPOT)评价其免疫效果,为制备针对 PRRSV 流行毒株的重组亚单位疫苗奠定工作基础。

1 材料与amp;方法

1.1 材料

1.1.1 病毒和细胞

NADC30-like PRRSV 由中国农业大学封文海教授惠赠, 其在猪原代肺泡巨噬细胞 (porcine alveolar macrophages, PAM) 上的滴度为 $10^{7.5}$ TCID₅₀/mL。水疱性口炎病毒 (vesicular stomatitis virus, VSV), PK15 细胞和 PAM 细胞 (分离于 SPF 猪) 由本实验室保存。

1.1.2 主要试剂

Rabbit Anti pig IgG κ light chain antibody/HRP 由本实验室制备并保存。Anti-PRRSV-N protein antibody (浓度为 1 mg/mL) 和 Goat Anti-Rabbit IgG H&L/FITC antibody (浓度为 2 mg/mL) 购自北京博奥森生物技术有限公司。ELISPOT 试剂盒购自北京元唐盛兴科技有限公司。

1.1.3 实验动物

10 头 4 周龄三元杂交断奶仔猪经 PCR 检测未含 PRRSV、PCV2、猪流感病毒 (swine influenza virus, SIV) 及猪伪狂犬病毒 (porcine pseudorabies virus, PRV), ELISA 检测未含 PRRSV 抗体。动物实验经中国农业科学院北京畜牧兽医研究所实验动物福利伦理审查委员会批准 (批准号: IAS2022-158)。

1.2 方法

1.2.1 PRRSV 遗传进化分析

从 GenBank 数据库下载 2001–2021 年分离自中国的 PRRSV 毒株 (共 231 株), 通过 MEGA-X 软件对 ORF5 基因进行序列比对构建系统发育树, 并按年份对各谱系占比进行统计。从各谱系中选取代表毒株, 用 MEGA-X 软件对 GP5 蛋白和 M 蛋白的胞外域进行氨基酸序列比对, 分析氨基酸差异。

1.2.2 重组蛋白 IFN α -GP5-Fc 和 IFN α -M-Fc 的表达及纯化

将 PRRSV 流行谱系 NADC30-like 中 SD17-38

毒株 (GenBank 登录号: MH068878) GP5 蛋白和 M 蛋白胞外域基因序列根据哺乳动物细胞 HEK293T 表达密码子偏好性进行优化, 并构建到真核表达载体 pCDNA3.4 中, 自 N 端至 C 端的元件排列顺序如下: 人 IL-10 分泌信号肽、猪 IFN α 、柔性 linker、GP5 或 M 蛋白胞外域和猪 IgG Fc, 将上述 DNA 片段插入到 *BsmB* I 和 *Xba* I 识别位点之间, 构建真核表达质粒 pCDNA3.4-IFN α -GP5-Fc (图 1A) 和 pCDNA3.4-IFN α -M-Fc (图 1B), 质粒由南京金斯瑞生物科技有限公司合成。将真核表达质粒 pCDNA3.4-IFN α -GP5-Fc 和 pCDNA3.4-IFN α -M-Fc 分别转染至 HEK293T 细胞中, 37 °C、5% CO₂ 表达 24 h, 收集上清并使用 Protein A 柱子进行纯化, 重组蛋白 IFN α -GP5-Fc 和 IFN α -M-Fc 的表达和纯化由上海百英生物科技有限公司完成。

1.2.3 干扰素活性的检测

采用细胞病变抑制法在 PK-15 细胞上用 VSV 测定重组蛋白 IFN α -GP5-Fc 和 IFN α -M-Fc 的干扰素抗病毒活性。将生长状态良好的 PK-15 细胞接种至 96 孔板中, 待细胞长至单层后使用。将重组蛋白用含 10% 胎牛血清 (fetal bovine serum, FBS) DMEM 培养基进行 4 倍梯度稀释, 共稀释 12 个梯度。弃掉 96 孔板中的培养液, 加入上述 4 倍倍比稀释的重组蛋白, 100 μ L/孔, 每个稀释度设置 5 孔重复, 同时设置阴性对照孔 (不加重组蛋白, 不加病毒, 仅加入含 10% FBS 的 DMEM) 和阳性对照孔 (不加重组蛋白, 仅加入无血清 DMEM 稀释的 VSV)。培养 18 h 后, 弃掉细胞培养基上清, 使用无血清培养基将 VSV 病毒液稀释至 100 TCID₅₀/100 μ L, 在阳性对照孔和重组蛋白处理孔加入稀释好的 VSV, 100 μ L/孔, 阴性对照孔加入无血清培养基, 100 μ L/孔, 培养 24 h 后观察细胞病变。以能抑制 50% 细胞病变的干扰素含量定义为一个活性单位, 运用 Reed-Muench 法计算干扰素效价。

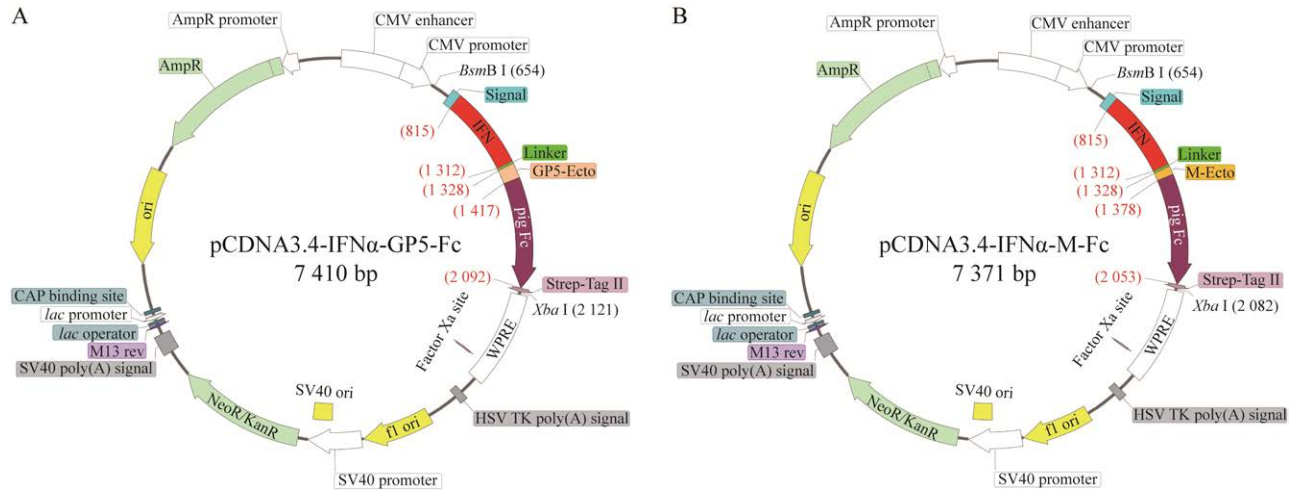


图 1 真核表达质粒图谱

Figure 1 Eukaryotic expression plasmid map. A: pCDNA3.4-IFN α -GP5-Fc. B: pCDNA3.4-IFN α -M-Fc.

1.2.4 动物试验分组及免疫

亚单位疫苗的制备：将 ISA206VG 佐剂预热后，与重组蛋白混合液(IFN α -GP5-Fc 蛋白和 IFN α -M-Fc 蛋白等量)按体积比 1:1 配制成亚单位疫苗，分装后于 2-8 °C 保存。

试验分组及免疫：10 头 4 周龄三元杂交断奶仔猪随机分为 2 组,即免疫组和对照组各 5 头，免疫组初次免疫 2 mL/头份的重组蛋白混合液 (IFN α -GP5-Fc 和 IFN α -M-Fc 均为 200 μ g/头份)，初次免疫 3 周后进行第二次免疫，免疫剂量和途径与初次免疫相同，对照组注射等体积 PBS。初免前，初免后 3 周及二免后 3 周无菌采血并分离血清，ELISA 检测 GP5 蛋白和 M 蛋白特异性 IgG 抗体效价，用间接免疫荧光试验 (immunofluorescence assay, IFA)检测中和抗体滴度。在二免后 3 周无菌分离外周血单个核细胞(peripheral blood mononuclear cell, PBMC)，进行 ELISPOT 检测。

1.2.5 ELISA 检测抗体水平

将重组蛋白 IFN α -GP5-Fc 和 IFN α -M-Fc 用 pH 9.6 的碳酸盐缓冲液分别包被在 96 孔板中，浓度为 1 μ g/mL，4 °C 包被过夜。弃去包被液，

用 PBST (含有 0.05% Tween-20 的 PBS 缓冲液) 洗 1 次后,加入封闭液(含有 3% BSA 的 PBST)，4 °C 封闭过夜。使用 PBST 将分离的血清稀释 40 倍后，进行 4 倍倍比稀释，稀释 11 个梯度，每个稀释度设置 5 个重复。弃去封闭液，用 0.05% PBST 洗 1 次后，加入稀释好的血清，37 °C 孵育 90 min。0.05% PBST 洗 5 次后，加入用 PBST 按照 1:5 000 稀释的二抗(Rabbit Anti pig IgG κ light chain antibody/HRP)，37 °C 孵育 45 min。PBST 洗 5 次后，加入 TMB 显色液，37 °C 孵育 15 min，加入 2 mol/L H₂SO₄ 终止显色，使用酶标仪在 450 nm 波长处测 OD 值。

1.2.6 中和试验

将分离的血清置于 56 °C 水浴锅灭活 30 min，在超净工作台中使用无 FBS RPMI 1640 培养基连续稀释 2、4、8、16、32、64、128、256 倍后，加入 96 孔板中，100 μ L/孔，每个稀释度设置 6 个重复；加入 200 TCID₅₀ 的 NADC30-like PRRSV 病毒液 100 μ L/孔，充分混匀 37 °C 作用 1 h。弃掉细胞培养基上清，加入上述血清病毒混合液。37 °C、5% CO₂ 培养箱中作用 1 h 后，弃血清病毒混合液，用无菌 PBS 洗涤 96 孔板，加

入 10% FBS RPMI 1640 培养基, 100 μ L/孔。每 24 h 观察细胞状态, 培养约 48 h 后, 待细胞出现 CPE 弃掉细胞培养基上清, 用多聚甲醛固定 15 min, PBS 洗涤 2 次后, 加入 0.05% Triton X-100 透膜 15 min; PBS 洗涤 2 次, 用 5% BSA 封闭 30 min 后, 弃去封闭液, 加入一抗(Anti-PRRSV-N protein antibody) 4 $^{\circ}$ C 孵育过夜; PBST 洗涤 3 次后, 加入二抗(Goat Anti-Rabbit IgG H&L/FITC antibody) 室温孵育 1 h, PBST 洗涤 3 次后, 在荧光倒置显微镜下观察结果, 按照 Spearman-Kärber 法计算中和抗体滴度。

1.2.7 PBMC 的分离及 ELISPOT 检测

无菌采集免疫组和对照组仔猪新鲜抗凝全血, 加入等体积 PBS 稀释备用。在离心管中加入 5 mL 淋巴细胞分离液, 用巴氏管吸取稀释好的抗凝全血 5 mL 小心铺在分离液上面, 室温, 水平转子 500 \times g 离心 25 min。离心后, 弃去上层血浆层, 取新离心管, 加入 10 mL PBS, 小心吸取外周血淋巴细胞层至管中, 250 \times g 离心 10 min, 洗涤细胞。弃离心后上清, 加入 5 mL 的 PBS 重悬细胞, 250 \times g 离心 10 min, 重复该步骤一次。弃上清, 重悬并冻存细胞。ELISPOT 检测时, 使用重组蛋白 IFN α -GP5-Fc 和 IFN α -M-Fc 分别刺激仔猪 PBMC, 并设置 ConA 刺激作为阳性对照。其余步骤按照 ELISPOT 试剂盒说明书检测细胞分泌 IFN- γ 的情况。

1.2.8 数据处理

两组之间的比较采用双尾学生 *t*-test 检验 (unpaired, two-tailed Student's *t*-test) 分析差异显著性。*: $P < 0.05$, **: $P < 0.01$, ***: $P < 0.001$, ****: $P < 0.0001$ 。GraphPad Prism 8 软件用于制图。

2 结果与分析

2.1 PRRSV 的系统发育分析

从 GenBank 数据库下载 2001–2021 年分离

自中国的 PRRSV 毒株 231 株, 通过对 ORF5 基因序列比对, 采用 N-J 法在 MEGA-X 中构建基于 ORF5 基因的系统发育树。231 株毒株中, Sublineage 8.7 (HP PRRSV-like) 谱系有 86 株, Sublineage 1.8 (NADC30-like) 谱系有 72 株, 两谱系占比分别为 37.2% 和 31.2% (图 2A), 且 Sublineage 1.8 (NADC30-like) 谱系占比逐渐增加, 2001–2007 年占比为 0, 2008–2014 年占比 15.4%, 2015–2021 年占比 39.5%, Sublineage 1.8 (NADC30-like) 谱系成为 2015 年后我国流行的优势谱系(图 2B)。

GP5 蛋白的胞外区域包括高变区 1 (hypervariable regions 1, HVR1) (32–36 aa)、中和表位区域(primary neutralizing epitope, PNE) (37–45 aa) 和高变区 2 (hypervariable regions 2, HVR2) (57–62 aa) 三个主要区域^[25], 通过对 PRRSV 不同谱系 GP5 蛋白的胞外域氨基酸序列进行比对, 发现其主要变异发生在 2 个高变区, 而中和表位区域相对保守。Sublineage 1.8 (NADC30-like) 谱系与 Sublineage 8.7 (HP PRRSV-like) 谱系毒株 GP5 蛋白胞外域氨基酸序列比对发现, NADC30-like PRRSV 主要的氨基酸突变位点为 S32N、N35S、I39L、L47I、A57K、Q58K 和 K59Q, 在 GP5 蛋白第 33 位发生天冬酰胺的缺失, 在第 60 位发生天冬酰胺的插入(图 2C)。M 蛋白的胞外区域主要为 1–17 aa, 氨基酸序列相对保守, Sublineage 1.8 (NADC30-like) 谱系与 Sublineage 8.7 (HP PRRSV-like) 谱系 M 蛋白胞外域氨基酸序列比对发现, 主要氨基酸突变位点存在于 M 蛋白第 5 位和第 15 位, 分别为 L5I 和 P15A (图 2D)。

因此选取 NADC30-like 谱系毒株 SD17-38 (GenBank 登录号: MH068878), 优化其 GP5 和 M 核苷酸序列, 构建真核表达载体。

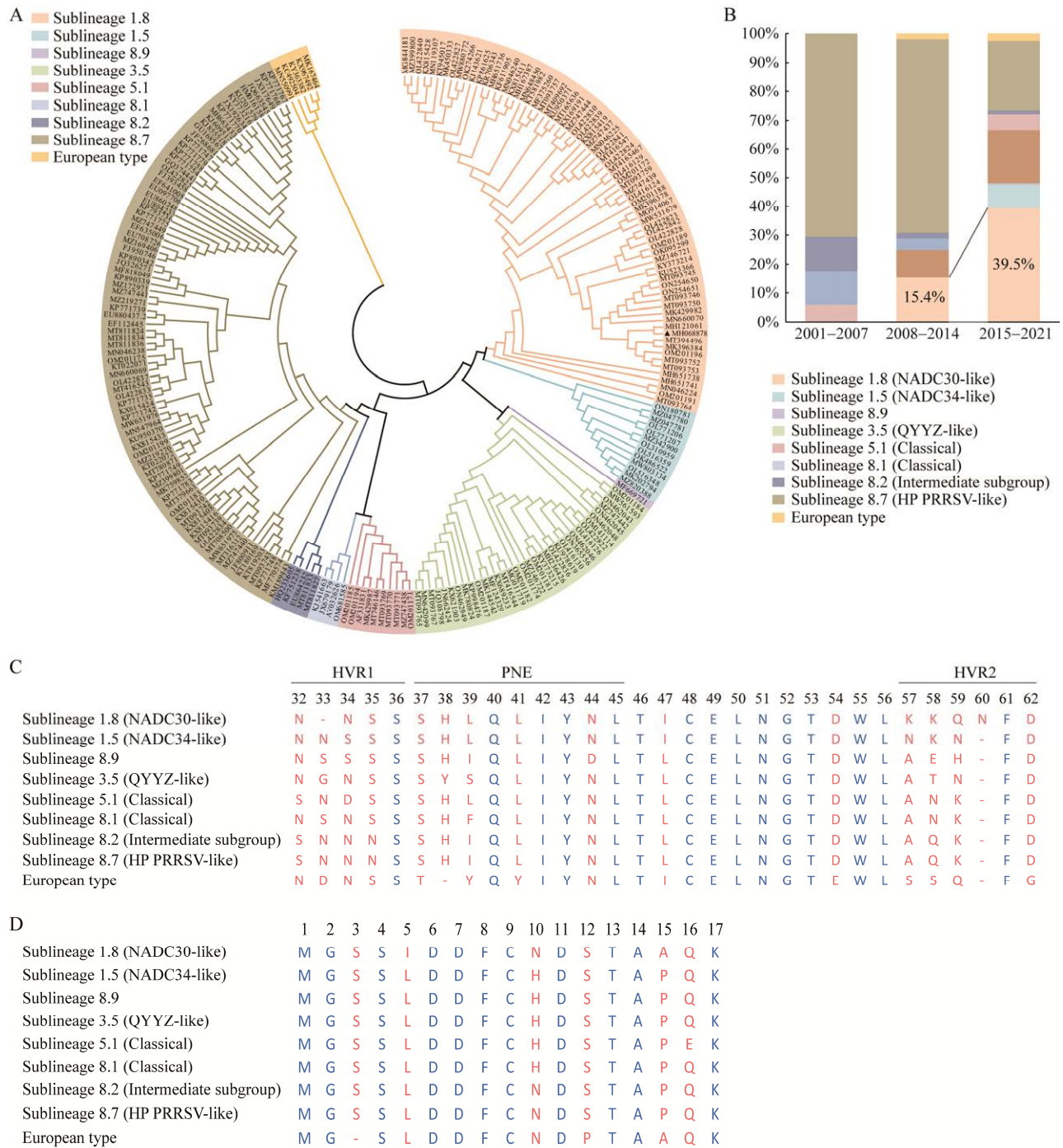


图 2 PRRSV 系统发育分析

Figure 2 Phylogenetic analysis of PRRSV. A: Genetic evolutionary tree based on PRRSV ORF5 gene, with the black triangle representing the vaccine reference strains in this study. B: Statistics of PRRSV strain accumulation percentage in different years. C: Amino acid sequence alignment was performed in the extracellular regions of GP5 proteins of PRRSV strains of different lineages. HVR1: Hypervariable region 1; HVR2: Hypervariable region 2; PNE: Primary neutralizing epitope. D: Amino acid sequence alignment of the extracellular domain of M protein of PRRSV strains of different lineages.

2.2 重组蛋白 IFN α -GP5-Fc 和 IFN α -M-Fc 的表达和纯化

为增强蛋白的免疫原性和稳定性,将猪 IFN α 、猪 IgG Fc 分别与 NADC30-like PRRSV 谱系 GP5 和 M 蛋白的胞外域进行融合表达,载体构建示意图如图 3A 所示,并通过 AlphaFold v2.2.0 对融合蛋白的结构进行模拟^[26],结果显示 IFN α -GP5-Fc 蛋白和 IFN α -M-Fc 蛋白均可形成二聚体结构(图 3B、3C)。将质粒 pCDNA3.4-IFN α -GP5-Fc 和 pCDNA3.4-IFN α -M-Fc 转染至 HEK293T 细胞中进行大量表达,SDS-PAGE 检测纯化结果,IFN α -GP5-Fc 蛋白二聚体大小约为 112 kDa,IFN α -M-Fc 蛋白二聚体大小约为 108 kDa,均符合预期大小(图 3D、3E)。使用分光光度计测定 IFN α -GP5-Fc 蛋白的浓度为 4.86 mg/mL,IFN α -M-Fc 蛋白的浓度为 6.38 mg/mL。通过 PK-15/VSV 系统检测,IFN α -GP5-Fc 蛋白的干扰素活性为 1.30×10^4 U/mL,IFN α -M-Fc 蛋白的干扰素活性为 3.25×10^4 U/mL。

2.3 体液免疫应答

2.3.1 针对两种蛋白的抗体滴度检测

重组蛋白 IFN α -GP5-Fc 和 IFN α -M-Fc 与 ISA206VG 佐剂混合后,采用颈后肌肉注射接种仔猪,初次免疫 3 周后进行加强免疫(图 4A)。采用 ELISA 检测初次免疫 3 周后(21 d)和加强免疫 3 周后(42 d)的血清中 IgG 抗体水平。结果表明,IFN α -GP5-Fc 和 IFN α -M-Fc 重组蛋白诱导产生了针对 GP5 和 M 蛋白的特异性 IgG 抗体,仔猪在初次免疫和加强免疫产生的 GP5 特异性 IgG 抗体分别达到 1:3 712 和 1:8 704 (图 4B);初次免疫和加强免疫产生的 M 蛋白特异性 IgG 抗体分别达到 1:3 712 和 1:5 632 (图 4C),初次免疫和加强免疫产生的特异性 IgG 抗体无显著性差异(ns),可见免疫一次即可产生较高的抗体水平。

2.3.2 病毒中和试验

初次免疫和加强免疫后检测仔猪血清中和抗体滴度,结果表明初免后仔猪中和 NADC30-like PRRSV 毒株的抗体滴度可达到 1:12,加强免疫后仔猪中和 NADC30-like PRRSV 毒株的抗体滴度可达到 1:51,与对照组相比,初免后 3 周和加强免疫后 3 周仔猪中和抗体滴度均有极显著差异($P < 0.001$)。初免后 3 周和加强免疫后 3 周仔猪的中和抗体滴度相比,具有统计学差异($P < 0.05$) (图 4D),可见加强免疫能增强血清抗体的中和能力。

2.4 细胞免疫应答

在加强免疫 3 周后(42 d)采血并分离 PBMC 细胞,用 ELISPOT 检测 PBMC 分泌 IFN- γ 的能力。IFN α -GP5-Fc 蛋白和 IFN α -M-Fc 蛋白刺激分离后 PBMC,仔猪 PBMC 分泌的 IFN- γ 斑点数量与安慰剂对照组相比均显著增加($P < 0.000 1$),产生较强的 T 细胞免疫应答(图 5A、5B)。

3 讨论与结论

在本研究中,基于 ORF5 基因的 PRRSV 遗传进化分析,结果表明 2015–2021 年我国流行的 PRRSV 的主要谱系为美洲型的 Sublineage 1.8 (NADC30-like),且与 2008–2014 年、2001–2007 年流行毒株比较发现,NADC30-like PRRSV 所占比例呈现增加趋势,这与 Li 等和 Guo 等^[11,27]研究结果一致。选取流行谱系 NADC30-like PRRSV 作为参考毒株,优化膜蛋白 GP5 和 M 蛋白胞外区域序列,使用 HEK293T 真核表达系统表达 IFN α -GP5-Fc 和 IFN α -M-Fc 重组蛋白,免疫评价结果显示,该蛋白能诱导较高水平的体液免疫和细胞免疫。

本研究中,NADC30-like 与 HP PRRSV-like 谱系的 GP5 蛋白胞外区域比对,显示突变主要发生在高变区,Liang 等^[28-30]的研究中也存在相

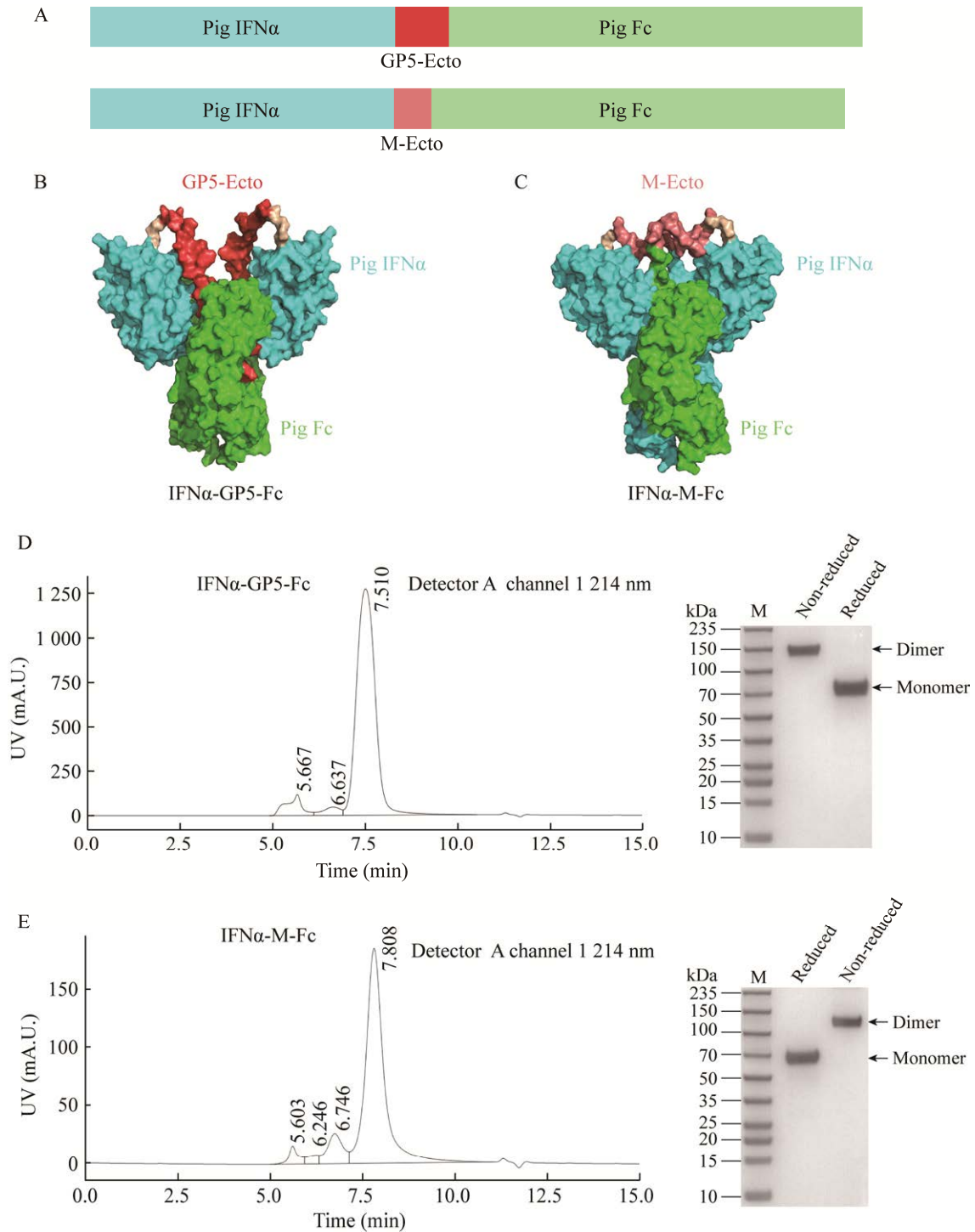


图 3 IFN α -GP5-Fc 和 IFN α -M-Fc 的结构模拟及表达

Figure 3 Structural simulation and expression of IFN α -GP5-Fc and IFN α -M-Fc. A: The construction pattern of IFN α -GP5-Fc and IFN α -M-Fc recombinant proteins. B: Structure simulation diagram of IFN α -GP5-Fc dimer. C: Structure simulation diagram of IFN α -M-Fc dimer. D: Expression and purification of IFN α -GP5-Fc protein. M: Protein marker. E: Expression and purification of IFN α -M-Fc protein. M: Protein marker.

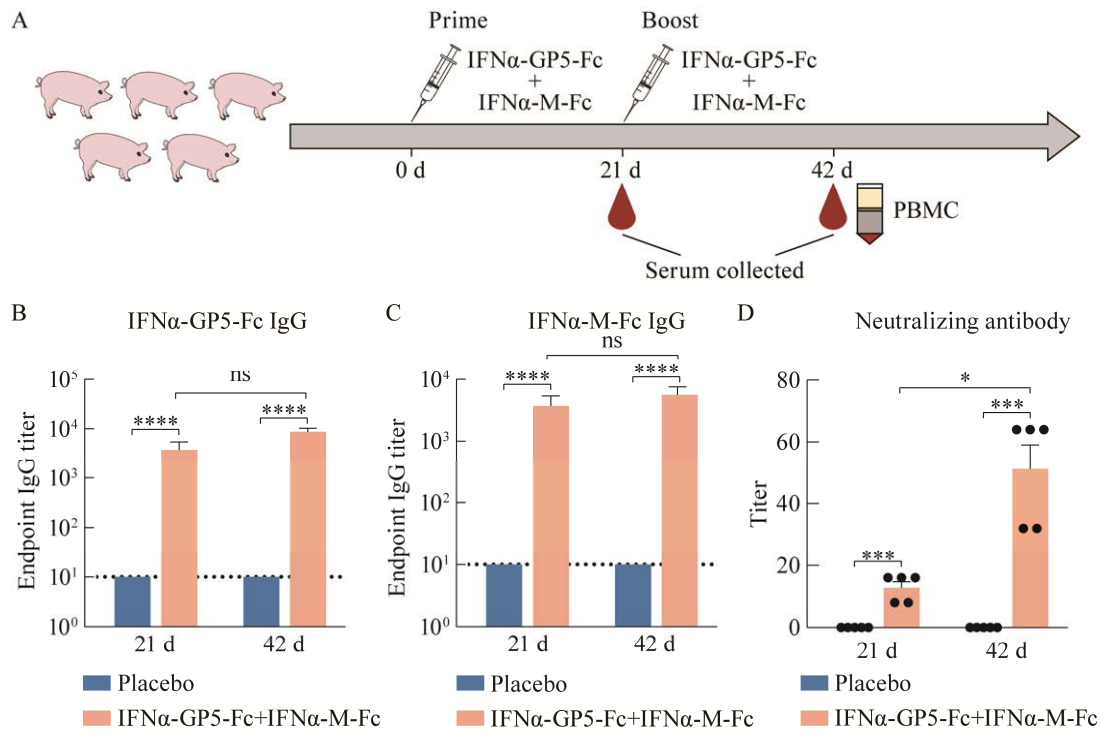


图 4 体液免疫应答

Figure 4 Humoral immune response. A: Immunization program diagram of piglets ($n=5$). The blood drop indicated the time point of blood collection, and the tube indicated the time point of PBMC isolation. B: The IgG antibody level of GP5 protein was detected by ELISA. C: The IgG antibody level of M protein was detected by ELISA. D: Neutralizing antibody detection. The data were presented by mean \pm SEM. P values were determined by Student's t -test. ns: No significant differences; *: $P < 0.05$; ***: $P < 0.001$; ****: $P < 0.0001$.

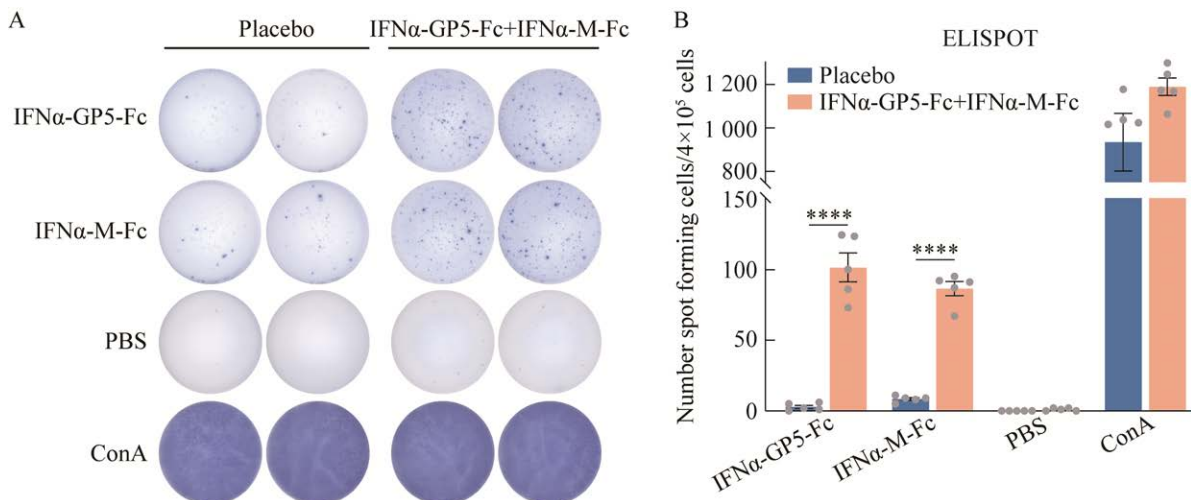


图 5 细胞免疫应答

Figure 5 Cellular immune response. A: ELISPOT representative count images of piglets PBMC at 21 days after booster immunization (42 d). B: ELISPOT test results for piglet PBMC 21 days after booster immunization (42 d). The data were presented by mean \pm SEM. P values were determined by Student's t -test. ****: $P < 0.0001$.

同的结果,这些突变可能加速 PRRSV 的进化及免疫逃逸。GP5 蛋白是 PRRSV 的主要结构蛋白,包含信号肽、跨膜区、胞外域和胞内域,其 N 端具有 2 个表位,其中表位 A (27-30 aa) 为诱饵表位,感染 PRRSV 后,此表位会诱导机体产生非中和抗体,并推迟中和抗体的产生;表位 B (37-45 aa) 为主要的中和表位,诱导机体产生中和抗体。在 GP5 的主要中和表位中, H38、I42、Y43 和 N44 为识别位点, L39/F39、Q40 和 L41 为结合位点^[25]。本研究发现 NADC30-like 谱系发生了 GP5 蛋白的 I39L 突变,这可能对抗体的中和能力产生影响,从而影响 PRRSV 的免疫逃逸能力; L47I 的突变在 Fang 等^[31-32]的研究中也有相同的发现,但突变的具体意义仍然未知。GP5 蛋白包含多个潜在的糖基化位点,包括 N30、N33、N34、N44 和 N51 等^[33-34],本研究中选取的 NADC30-like 毒株在 GP5 第 33 位出现天冬酰胺的缺失,第 60 位出现天冬酰胺的插入,Zhou 等^[35-38]研究表明,GP5 的 N33 缺失可能会影响病毒的复制能力及对中和抗体的敏感性,第 60 位天冬酰胺的插入是否会影响 GP5 蛋白的特性尚不清楚,需要未来进一步研究^[39-40]。M 蛋白 N 末端的残基 3-6 是 M 蛋白的 B 细胞表位,NADC30-like 谱系 M 蛋白发生了 L5I 和 P15A 突变,提示 PRRSV 的变异具有新特点。

新型 PRRSV 疫苗的研发有多种技术平台和表达体系,在 Wu 等^[41]的研究中,使用昆虫杆状病毒真核表达 GP5 蛋白的抗血清中和病毒的能力略高于使用大肠杆菌原核表达 GP5 的抗血清,表明通过聚糖修饰的蛋白质的适当折叠可能有助于将中和表位有效地展现。Zhao 等^[42]研制了带有 GP3 和 GP5 基因的 DNA 疫苗 pVAX-GP35,攻毒保护实验表明,接种该 DNA 疫苗的猪机体病毒载量有所降低,症状减轻。

Roques 等^[43]使用重组腺病毒系统制备了能够表达 GP5 蛋白和 M 蛋白的疫苗,攻毒保护实验表明仅提供部分保护。An 等^[44]使用植物源产生的 GP4D 蛋白和 GP5D 蛋白免疫猪,产生了特异性 IgG,但未产生中和抗体。真核表达系统,如哺乳动物表达系统,通常可以产生天然折叠蛋白,具有复杂的翻译后修饰^[45],本研究采用 HEK293T 真核表达系统表达重组蛋白 IFN α -GP5-Fc 和 IFN α -M-Fc,使蛋白的翻译后修饰更准确,免疫后产生较高水平的特异性抗体,也产生了较高的中和抗体。此外,Fc 融合蛋白通过较链区的二硫键连接,促进蛋白质形成二聚体,从而增加蛋白的稳定性和半衰期^[46-49],本研究中融合了猪 IgG Fc,重组蛋白 IFN α -GP5-Fc 和 IFN α -M-Fc 均形成了二聚体结构也与猪机体产生较强的体液免疫应答有关。Fc γ R 摄取病毒-抗体复合物是引起病毒抗体依赖性增强 (antibody-dependent enhancement, ADE) 的主要原因之一^[50],PRRSV 的 ADE 效应与 GP5 蛋白诱饵表位产生的非中和抗体有关^[51],而本研究优化 GP5 蛋白的核苷酸序列,删除产生非中和抗体的诱饵表位,保留产生中和抗体的主要中和表位,免疫仔猪后产生的抗体在体外可有效中和 NADC30-like PRRSV,并未出现 ADE 效应。ELISPOT 已成为评估疫苗细胞免疫效果中最常用的免疫测定方法之一,IFN- γ 是由 Th1 细胞产生较多的细胞因子,经常用于跟踪特定的 CD8⁺ T 细胞反应^[52]。大多数灭活病毒疫苗诱导的保护性免疫应答由中和抗体应答介导^[53],然而 PRRSV 灭活病毒疫苗产生中和抗体的水平较低,且未能产生细胞免疫^[54],亚单位疫苗通常缺乏诱导 CD8⁺ T 细胞免疫反应的能力^[55]。本研究中的亚单位疫苗融合了猪 IFN α ,接种此亚单位疫苗组与安慰剂组对比,IFN- γ 分泌水平具有显著性差异,表明猪产生较强细胞免疫应

答。ISA206 佐剂是水包油包水型双相佐剂，乳滴内包裹的抗原可缓慢释放，延长其与机体的作用时间，实现短期免疫和长期免疫^[56]，Wang 等^[57]研究发现，ISA206 作为 PRRSV 灭活疫苗的佐剂，并未引起显著的细胞免疫应答，而 Royae 等^[58-59]研究表明，IFN α 联合 PRRSV MLV 疫苗使用，分泌 IFN- γ 的猪 PBMC 数量显著增加，因此，本研究中亚单位疫苗诱导的细胞免疫应答主要与融合猪 IFN α 有关。此外，在后期研究中，可尝试使用其他佐剂进行对比，对该重组蛋白的使用剂量进一步优化，设置不同免疫剂量组，延长抗体监测时间和增加攻毒保护试验，更好地说明该亚单位疫苗的作用效果，以期为 PRRS 的防控提供科技支撑。

REFERENCES

- [1] ALBINA E. Epidemiology of porcine reproductive and respiratory syndrome (PRRS): an overview[J]. *Veterinary Microbiology*, 1997, 55(1/2/3/4): 309-316.
- [2] SHA HY, ZHANG H, CHEN Y, HUANG LZ, ZHAO MM, WANG NN. Research progress on the NSP9 protein of porcine reproductive and respiratory syndrome virus[J]. *Frontiers in Veterinary Science*, 2022, 9: 872205.
- [3] PEJSAK Z, STADEJEK T, MARKOWSKA-DANIEL I. Clinical signs and economic losses caused by porcine reproductive and respiratory syndrome virus in a large breeding farm[J]. *Veterinary Microbiology*, 1997, 55(1/2/3/4): 317-322.
- [4] FANG Y, TREFFERS EE, LI YH, TAS A, SUN Z, van der MEER Y, de RU AH, van VEELLEN PA, ATKINS JF, SNIJDER EJ, FIRTH AE. Efficient-2 frameshifting by mammalian ribosomes to synthesize an additional arterivirus protein[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2012, 109(43): E2920- E2928.
- [5] CONZELMANN KK, VISSER N, van WOENSEL P, THIEL HJ. Molecular characterization of porcine reproductive and respiratory syndrome virus, a member of the arterivirus group[J]. *Virology*, 1993, 193(1): 329-339.
- [6] GUO ZH, CHEN XX, LI R, QIAO SL, ZHANG GP. The prevalent status and genetic diversity of porcine reproductive and respiratory syndrome virus in China: a molecular epidemiological perspective[J]. *Virology Journal*, 2018, 15(1): 1-14.
- [7] PIRZADEH B, DEA S. Monoclonal antibodies to the ORF5 product of porcine reproductive and respiratory syndrome virus define linear neutralizing determinants[J]. *Journal of General Virology*, 1997, 78(8): 1867-1873.
- [8] CHEN NH, CHEN XZ, HU DM, YU XL, WANG LL, HAN W, WU JJ, CAO Z, WANG CB, ZHANG Q, WANG BY, TIAN KG. Rapid differential detection of classical and highly pathogenic north American *Porcine* reproductive and respiratory syndrome virus in China by a duplex real-time RT-PCR[J]. *Journal of Virological Methods*, 2009, 161(2): 192-198.
- [9] BAUTISTA EM, SUÁREZ P, MOLITOR TW. T cell responses to the structural polypeptides of porcine reproductive and respiratory syndrome virus[J]. *Archives of Virology*, 1999, 144(1): 117-134.
- [10] LOEMBA HD, MOUNIR S, MARDASSI H, ARCHAMBAULT D, DEA S. Kinetics of humoral immune response to the major structural proteins of the porcine reproductive and respiratory syndrome virus[J]. *Archives of Virology*, 1996, 141(3/4): 751-761.
- [11] LI PX, SHEN YS, WANG TL, LI J, LI Y, ZHAO YR, LIU SD, LI BQ, LIU MD, MENG FL. Epidemiological survey of PRRS and genetic variation analysis of the ORF5 gene in Shandong Province, 2020–2021[J]. *Frontiers in Veterinary Science*, 2022, 9: 987667.
- [12] ZHANG YJ, ZHOU Z, ZHU SL, ZU XY, WANG ZL, ZHANG LK, WANG W, XIAO GF. A novel RSV F-Fc fusion protein vaccine reduces lung injury induced by respiratory syncytial virus infection[J]. *Antiviral Research*, 2019, 165: 11-22.
- [13] CZAJKOWSKY DM, HU J, SHAO ZF, PLEASS RJ. Fc-fusion proteins: new developments and future perspectives[J]. *EMBO Molecular Medicine*, 2012, 4(10): 1015-1028.
- [14] CHEN C, HUA DP, SHI JX, TAN Z, ZHU M, TAN K, ZHANG LL, HUANG JH. *Porcine* immunoglobulin fc fused P30/P54 protein of African swine fever virus displaying on surface of *S. cerevisiae* elicit strong antibody production in swine[J]. *Virologica Sinica*, 2021, 36(2): 207-219.
- [15] LUO QP, AHMED W, DAI YC, MOHSIN A, HANG HF, ZHUANG YP, GUO MJ. Evaluation of a virus-like nanoparticle *Porcine circovirus* type-2

- (PCV₂) capsid protein fused with the pig immunoglobulin fc fragment as a novel vaccine candidate against PCV₂ in mice[J]. *Vaccines*, 2021, 9(10): 1128.
- [16] DIAMOS AG, PARDHE MD, SUN HY, HUNTER JGL, KILBOURNE J, CHEN Q, MASON HS. A highly expressing, soluble, and stable plant-made IgG fusion vaccine strategy enhances antigen immunogenicity in mice without adjuvant[J]. *Frontiers in Immunology*, 2020, 11: 576012.
- [17] YANG L, WANG JH, HUI P, YAROVINSKY TO, BADETI S, PHAM K, LIU C. Potential role of IFN- α in COVID-19 patients and its underlying treatment options[J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2021, 105(10): 4005-4015.
- [18] BANDURSKA K, KRÓL I, MYGA-NOWAK M. Interferons: between structure and function[J]. *Postępy Higieny i Medycyny Doświadczalnej*, 2014, 68: 428-440.
- [19] LAZEAR HM, SCHOGGINS JW, DIAMOND MS. Shared and distinct functions of type I and type III interferons[J]. *Immunity*, 2019, 50(4): 907-923.
- [20] SAMUEL CE. Antiviral actions of interferons[J]. *Clinical Microbiology Reviews*, 2001, 14(4): 778-809.
- [21] RIZZA P, CAPONE I, MORETTI F, PROIETTI E, BELARDELLI F. IFN- α as a vaccine adjuvant: recent insights into the mechanisms and perspectives for its clinical use[J]. *Expert Review of Vaccines*, 2011, 10(4): 487-498.
- [22] CHENG G, ZHAO X, YAN WY, WANG WF, ZUO XP, HUANG K, LIU Y, CHEN J, WANG JL, CONG W, LIU MQ, GAO HH, CHEN JL, LU YG, ZHENG ZX. Alpha interferon is a powerful adjuvant for a recombinant protein vaccine against foot-and-mouth disease virus in swine, and an effective stimulus of *in vivo* immune response[J]. *Vaccine*, 2007, 25(28): 5199-5208.
- [23] SUN SY, CAI YQ, SONG TZ, PU Y, CHENG L, XU HR, SUN J, MENG CY, LIN YF, HUANG HB, ZHAO F, ZHANG SL, GAO Y, HAN JB, FENG XL, YU DD, ZHU YL, GAO P, TANG HD, ZHAO JC, et al. Interferon-armed RBD dimer enhances the immunogenicity of RBD for sterilizing immunity against SARS-CoV-2[J]. *Cell Research*, 2021, 31(9): 1011-1023.
- [24] ZHAO WD, ZHAO G, ZHANG SR, WANG XZ, YU XP, WANG B. Clearance of HBeAg and HBsAg of HBV in mice model by a recombinant HBV vaccine combined with GM-CSF and IFN- α as an effective therapeutic vaccine adjuvant[J]. *Oncotarget*, 2018, 9(76): 34213-34228.
- [25] OSTROWSKI M, GALEOTA JA, JAR AM, PLATT KB, OSORIO FA, LOPEZ OJ. Identification of neutralizing and nonneutralizing epitopes in the *Porcine* reproductive and respiratory syndrome virus GP5 ectodomain[J]. *Journal of Virology*, 2002, 76(9): 4241-4250.
- [26] JUMPER J, EVANS R, PRITZEL A, GREEN T, FIGURNOV M, RONNEBERGER O, TUNYASUVUNAKOOL K, BATES R, ŽÍDEK A, POTAPENKO A, BRIDGLAND A, MEYER C, KOHL SAA, BALLARD AJ, COWIE A, ROMERA-PAREDES B, NIKOLOV S, JAIN R, ADLER J, BACK T, et al. Highly accurate protein structure prediction with AlphaFold[J]. *Nature*, 2021, 596(7873): 583-589.
- [27] GUO ZH, CHEN XX, LI X, QIAO SL, DENG RG, ZHANG GP. Prevalence and genetic characteristics of porcine reproductive and respiratory syndrome virus in central China during 2016–2017: NADC30-like PRRSVs are predominant[J]. *Microbial Pathogenesis*, 2019, 135: 103657.
- [28] LIANG W, ZHAO TT, PENG Z, SUN Y, STRATTON CW, ZHOU D, TANG XB, TIAN YX, CHEN HC, WU B. Epidemiological and genetic characteristics of porcine reproductive and respiratory syndrome virus circulating in central and south China in 2016[J]. *Acta Tropica*, 2019, 190: 83-91.
- [29] XIE JX, ZHU WJ, CHEN Y, WEI CY, ZHOU P, ZHANG MZ, HUANG Z, SUN L, SU S, ZHANG GH. Molecular epidemiology of PRRSV in south China from 2007 to 2011 based on the genetic analysis of ORF5[J]. *Microbial Pathogenesis*, 2013, 63: 30-36.
- [30] ZHAO K, YE C, CHANG XB, JIANG CG, WANG SJ, CAI XH, TONG GZ, TIAN ZJ, SHI M, AN TQ. Importation and recombination are responsible for the latest emergence of highly pathogenic *Porcine* reproductive and respiratory syndrome virus in China[J]. *Journal of Virology*, 2015, 89(20): 10712-10716.
- [31] FANG K, LIU SD, LI XM, CHEN HC, QIAN P. Epidemiological and genetic characteristics of *Porcine* reproductive and respiratory syndrome virus in south China between 2017 and 2021[J]. *Frontiers in Veterinary Science*, 2022, 9: 853044.
- [32] XIE SS, LIANG W, WANG XY, CHEN HJ, FAN J,

- SONG WB, HUA L, TANG XB, CHEN HC, PENG Z, WU B. Epidemiological and genetic characteristics of porcine reproduction and respiratory syndrome virus 2 in mainland China, 2017–2018[J]. Archives of Virology, 2020, 165(7): 1621-1632.
- [33] AKTER F, ROYCHOUDHURY P, DUTTA TK, SUBUDHI PK, KUMAR S, GALI JM, BEHERA P, DAMODAR SINGH Y. Isolation and molecular characterization of GP5 glycoprotein gene of *Betaarterivirus suis* 2 from Mizoram, India[J]. VirusDisease, 2021, 32(4): 748-756.
- [34] JIANG WM, JIANG P, WANG XL, LI YF, WANG XW, DU YJ. Influence of porcine reproductive and respiratory syndrome virus GP5 glycoprotein N-linked glycans on immune responses in mice[J]. Virus Genes, 2007, 35(3): 663-671.
- [35] ZHOU L, KANG RM, XIE B, TIAN YM, WU X, LV XB, YANG X, WANG HN. Identification of a novel recombinant type 2 *Porcine* reproductive and respiratory syndrome virus in China[J]. Viruses, 2018, 10(4): 151.
- [36] ZHOU L, YANG XR, TIAN Y, YIN SY, GENG G, GE XN, GUO X, YANG HC. Genetic diversity analysis of genotype 2 *Porcine* reproductive and respiratory syndrome viruses emerging in recent years in China[J]. BioMed Research International, 2014, 2014: 1-13.
- [37] WEI ZZ, LIN T, SUN LC, LI YH, WANG XM, GAO F, LIU RX, CHEN CY, TONG GZ, YUAN SS. N-linked glycosylation of GP5 of *Porcine* reproductive and respiratory syndrome virus is critically important for virus replication *in vivo*[J]. Journal of Virology, 2012, 86(18): 9941-9951.
- [38] VU HLX, KWON B, YOON KJ, LAEGREID WW, PATTNAIK AK, OSORIO FA. Immune evasion of *Porcine* reproductive and respiratory syndrome virus through glycan shielding involves both glycoprotein 5 as well as glycoprotein 3[J]. Journal of Virology, 2011, 85(11): 5555-5564.
- [39] SONG ZB, ZHANG QY, CHEN Y, SHEN HY, YANG G, JIANG P, CHEN JL, LIN L. The emergence of a novel recombinant porcine reproductive and respiratory syndrome virus with an amino acid insertion in GP5 protein[J]. Microbial Pathogenesis, 2020, 149: 104573.
- [40] CHEN NH, YE MX, LI S, HUANG YC, ZHOU RY, YU XL, TIAN KG, ZHU JZ. Emergence of a novel highly pathogenic recombinant virus from three lineages of porcine reproductive and respiratory syndrome virus 2 in China 2017[J]. Transboundary and Emerging Diseases, 2018, 65(6): 1775-1785.
- [41] WU F, PENG KF, TIAN J, XU XD, ZHOU EM, CHEN HY. Immune response to fc tagged GP5 glycoproteins of *Porcine* reproductive and respiratory syndrome virus[J]. Viral Immunology, 2014, 27(7): 343-349.
- [42] ZHAO GY, ZHANG JQ, SUN WC, XIE CZ, ZHANG H, GAO Y, WEN SB, HA Z, NAN FL, ZHU XY, FENG S, CAO XY, ZHANG Y, ZHU YZ, JIN NY, LU HJ. Immunological evaluation of recombination PRRSV GP3 and GP5 DNA vaccines *in vivo*[J]. Frontiers in Cellular and Infection Microbiology, 2022, 12: 1016897.
- [43] ROQUES E, GIRARD A, ST-LOUIS MC, MASSIE B, GAGNON CA, LESSARD M, ARCHAMBAULT D. Immunogenic and protective properties of GP5 and M structural proteins of porcine reproductive and respiratory syndrome virus expressed from replicating but nondisseminating adenovectors[J]. Veterinary Research, 2013, 44(1): 1-13.
- [44] AN CH, NAZKI S, PARK SC, JEONG YJ, LEE JH, PARK SJ, KHATUN A, KIM WI, PARK YI, JEONG JC, KIM CY. Plant synthetic GP4 and GP5 proteins from porcine reproductive and respiratory syndrome virus elicit immune responses in pigs[J]. Planta, 2018, 247(4): 973-985.
- [45] NIGI I, FAIRALL L, SCHWABE JWR. Expression and purification of protein complexes suitable for structural studies using mammalian HEK 293F cells[J]. Current Protocols in Protein Science, 2017, 90(1): 5.28.1-5.28.16.
- [46] MACKNESS BC, JAWORSKI JA, BOUDANOVA E, PARK A, VALENTE D, MAURIAC C, PASQUIER O, SCHMIDT T, KABIRI M, KANDIRA A, RADOŠEVIĆ K, QIU HW. Antibody Fc engineering for enhanced neonatal Fc receptor binding and prolonged circulation half-life[J]. mAbs, 2019, 11(7): 1276-1288.
- [47] YING TL, CHEN WZ, FENG Y, WANG YP, GONG R, DIMITROV DS. Engineered soluble monomeric IgG1 CH₃ domain[J]. Journal of Biological Chemistry, 2013, 288(35): 25154-25164.
- [48] YING TL, CHEN WZ, GONG R, FENG Y, DIMITROV DS. Soluble monomeric IgG1 fc[J]. Journal of Biological Chemistry, 2012, 287(23): 19399-19408.
- [49] WANG Y, TIAN ZH, THIRUMALAI D, ZHANG XY. Neonatal Fc receptor (FcRn): a novel target for

- therapeutic antibodies and antibody engineering[J]. *Journal of Drug Targeting*, 2014, 22(4): 269-278.
- [50] QIAO SL, JIANG ZZ, TIAN XH, WANG R, XING GX, WAN B, BAO DK, LIU YH, HAO HF, GUO JQ, ZHANG GP. *Porcine* FcγRIIb mediates enhancement of *Porcine* reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV) infection[J]. *PLoS One*, 2011, 6(12): e28721.
- [51] CANCEL-TIRADO SM, EVANS RB, YOON KJ. Monoclonal antibody analysis of *Porcine* reproductive and respiratory syndrome virus epitopes associated with antibody-dependent enhancement and neutralization of virus infection[J]. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 2004, 102(3): 249-262.
- [52] SLOTA M, LIM JB, DANG YS, DISIS ML. ELISpot for measuring human immune responses to vaccines[J]. *Expert Review of Vaccines*, 2011, 10(3): 299-306.
- [53] ZINKERNAGEL RM, LAMARRE A, CIUREA A, HUNZIKER L, OCHSENBEIN AF, MCCOY KD, FEHR T, BACHMANN MF, KALINKE U, HENGARTNER H. Neutralizing antiviral antibody responses[J]. *Advances in Immunology*. Amsterdam: Elsevier, 2001, 79: 1-53.
- [54] ZUCKERMANN FA, GARCIA EA, LUQUE LD, CHRISTOPHER-HENNINGS J, DOSTER A, BRITO M, OSORIO F. Assessment of the efficacy of commercial *Porcine reproductive and respiratory syndrome virus* (PRRSV) vaccines based on measurement of serologic response, frequency of gamma-IFN-producing cells and virological parameters of protection upon challenge[J]. *Veterinary Microbiology*, 2007, 123(1/2/3): 69-85.
- [55] CAO Y, ZHU XY, HOSSEN MN, KAKAR P, ZHAO YW, CHEN XY. Augmentation of vaccine-induced humoral and cellular immunity by a physical radiofrequency adjuvant[J]. *Nature Communications*, 2018, 9(1): 3695.
- [56] AUCOUTURIER J, DUPUIS L, GANNE V. Adjuvants designed for veterinary and human vaccines[J]. *Vaccine*, 2001, 19(17/18/19): 2666-2672.
- [57] WANG YQ, LIU Y, WANG YX. The potential adjuvanticity of quaternized chitosan hydrogel based microparticles for porcine reproductive and respiratory syndrome virus inactivated vaccine[J]. *International Immunopharmacology*, 2016, 39: 84-91.
- [58] ROYAEE AR, HUSMANN RJ, DAWSON HD, CALZADA-NOVA G, SCHNITZLEIN WM, ZUCKERMANN FA, LUNNEY JK. Deciphering the involvement of innate immune factors in the development of the host response to PRRSV vaccination[J]. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 2004, 102(3): 199-216.
- [59] MEIER WA, HUSMANN RJ, SCHNITZLEIN WM, OSORIO FA, LUNNEY JK, ZUCKERMANN FA. Cytokines and synthetic double-stranded RNA augment the T helper 1 immune response of swine to porcine reproductive and respiratory syndrome virus[J]. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 2004, 102(3): 299-314.

(本文责编 郝丽芳)