

# CpG DNA 对鸡传染性喉气管炎病毒 DNA 疫苗 免疫效果的影响

孟松树, 李曦, 智海东, 王云峰, 王柳, 童光志

(中国农业科学院哈尔滨兽医研究所兽医生物技术国家重点实验室, 哈尔滨 150001)

**摘要:** 将分别构建的含有鸡传染性喉气管炎病毒(ILTV)王岗株 gB、gC 和 gD 基因的重组真核表达质粒及 CpG DNA 佐剂分组肌肉注射 SPF 鸡, 检测了免疫后的抗体水平, 并观测了攻毒后的免疫保护效果。实验结果显示, CpG DNA 佐剂和 DNA 疫苗联合免疫后的抗体水平比单一使用 DNA 疫苗的要高, 而佐剂组的发病率、死亡率均低于非佐剂组, 保护率则高于非佐剂组。这表明 CpG DNA 佐剂增强了 ILTV DNA 疫苗的免疫效果。

**关键词:** 传染性喉气管炎病毒; DNA 疫苗; CpG DNA; 免疫效果

**中图分类号:** S852.4 **文献标识码:** A **文章编号:** 0578-1752(2001)03-0342-03

## Contribution of CpG DNA to the Immune Effect Induced by DNA Vaccines Against Infectious Laryngotracheitis Virus

MENG Song-shu, LI Xi, ZHI Hai-dong, WANG Yun-feng, WANG Liu, TONG Guang-zhi

(National Key Lab of Veterinary Biotechnology, Harbin Veterinary Research Institute, CAAS, Harbin 150001)

**Abstract:** Chickens of different groups were immunized by intramuscular injection of eukaryotic expression recombinant plasmids containing gB, gC and gD genes of infectious laryngotracheitis virus (ILTV) Wanggang strain (DNA vaccines), the above DNA vaccines used in two groups of chickens were mixed with CpG DNA extracted from *E. coli* as adjuvants. Specific antibody was detected after immunization and immune effects were observed after challenge. Results showed that the antibody titer detected in chickens immunized with DNA vaccine and CpG DNA were higher than those of chickens without use of CpG DNA, and both morbidity and mortality of chickens with use of CpG DNA were lower than those of chickens without use of CpG DNA. The above results indicated that the immune effect of DNA vaccine against ILTV was enhanced by CpG DNA as adjuvants.

**Key words:** Infectious laryngotracheitis virus; DNA vaccine; CpG DNA; Immune effect

鸡传染性喉气管炎(ILT)是由传染性喉气管炎病毒(ILTV)引起的鸡急性上呼吸道传染病, 可以造成鸡的死亡及产蛋量下降。目前国内外用于防制ILT的主要措施是接种弱毒疫苗, 但弱毒疫苗存在毒力偏强、致潜伏感染和易于返祖的弊端。因此, 有必要研制可避免上述弊端的新型疫苗, DNA疫苗的问世给ILT的预防带来了新的希望。随着对DNA疫苗研究的深入, 对能够增强DNA疫苗免疫应答

水平的佐剂的研究也已取得不少进展。CpG DNA, 一种含胞嘧啶鸟嘌呤二核苷酸(CpG)的DNA片段, 已经被近几年的研究证明是一种强烈的非特异性免疫刺激剂<sup>[1]</sup>, 将CpG DNA片段与DNA疫苗联合使用可以增强DNA疫苗的免疫原性, 提高抗体水平<sup>[2]</sup>。目前国内外尚未见关于ILTV DNA疫苗及其与CpG DNA佐剂联合免疫的报道, 本研究探讨了CpG DNA对ILTV DNA疫苗免疫效果的影响,

收稿日期: 1999-12-28

基金项目: 中华农业科教人才基金及中国农业科学院跨世纪人才基金

作者简介: 孟松树(1965-), 男, 江苏姜堰人, 博士, 主要从事分子病毒学研究。现在浙江大学动物预防医学研究所工作。童光志为联系人, Tel: 0451-2734181; Fax: 0451-2734181; E-mail: gztong@public.Hr.HI.cn

为ILTV的根除及禽类分子免疫佐剂的研究奠定了基础。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

ILTV减毒疫苗购自英特威公司,ILTV王岗株、1日龄SPF鸡由中国农业科学院哈尔滨兽医研究所提供,真核表达载体质粒pCR3-Uni、大肠杆菌JM109购自INVITROGEN公司,含ILTV王岗株gB、gC、gD基因的重组真核表达质粒(PgB、PgC、PgD)由笔者构建。

### 1.2 DNA疫苗及CpG DNA制备

分别扩增重组质粒PgB、PgC、PgD及空载体质粒,纯化并定量。常规方法培养大肠杆菌(JM109),按文献[3]的方法提取细菌DNA,反复冻融数次,纯化并定量,用前煮沸10min,然后冰水中冷却30min。

### 1.3 DNA疫苗免疫

1.3.1 实验分组 1日龄SPF鸡100只,按如下7组免疫,每组14只鸡。(A)生理盐水;(B)空载体质粒;(C)减毒疫苗;(D)PgB;(E)PgB、CpG DNA混合;(F)PgB、PgC、PgD混合;(G)PgB、PgC、PgD、CpG DNA混合。

1.3.2 免疫程序 质粒组(B、D、E、F、G)鸡3周龄时第1次免疫,剂量100 $\mu$ g/只,4点小腿肌肉注射,5周龄时进行第2次免疫,剂量不变,F、G两组中PgB、PgC、PgD的剂量均为100 $\mu$ g/只,E、G两组中CpG DNA的剂量为100 $\mu$ g/只。生理盐水组免疫周龄同质粒组,减毒疫苗鸡5周龄时滴眼接种。第10周对所有组鸡以致死剂量的ILTV王岗株攻毒。

### 1.4 抗体检测及免疫保护效果观测

免疫后每周翅静脉采血1次,至攻毒后2周止。间接ELISA法测血清抗体OD<sub>405</sub>值。攻毒后统计每组鸡的发病及死亡情况。

## 2 结果与分析

### 2.1 抗体检测结果

免疫后不同周龄血清抗体变化见表1。结果表明,第1次免疫后,佐剂组与非佐剂组的抗体水平差异不大,但第2次免疫后,佐剂明显高于非佐剂组。

### 2.2 免疫保护效果观测

对攻毒后每组鸡的发病、死亡及保护情况统计见表2。结果表明,4个DNA疫苗组的鸡的发病和死亡率均显著低于两个对照组(生理盐水组和空载体质粒组),但高于减毒疫苗组,可见DNA疫苗组的保护率高于对照组而低于减毒疫苗组。

## 3 讨论

近年来发现,细菌DNA本身就是一种免疫佐剂,可以激活各种免疫效应细胞,并刺激其分泌活性因子<sup>[4]</sup>。介导这一作用的是一类短核苷酸序列,称为免疫刺激序列(ISS)或CpG DNA。研究证实,CpG DNA可促进在体内建立Th<sub>1</sub>型占优势的免疫应答,诱导IL-12、IFN- $\gamma$ 等细胞因子的产生。将含CpG序列的质粒与DNA疫苗合用可以增强疫苗的免疫原性,提高抗体水平。本研究首次探讨了CpG DNA(细菌DNA)作为佐剂与ILTV DNA疫苗联合使用的免疫效果,结果表明CpG DNA佐剂确实增强了ILTV DNA疫苗诱导机体产生的免疫应答水平及其免疫保护效果。本研究中ILTV DNA疫苗的保护效果与商品化减毒活苗相比还有一定差距,联合使用CpGDNA佐剂后虽然保护率有所提高,

表1 免疫后不同周龄血清抗体检测结果(OD<sub>405</sub>)

Table 1 Results of ILTV antibodies detected at different weeks of chickens

组别 Groups	免疫后周龄 Bleeding time after immunization (week)							
	1	2	3	4	5	6	7	8
A	0.020	0.023	0.017	0.014	0.016	0.015	0.190	0.186
B	0.015	0.018	0.020	0.017	0.015	0.020	0.187	0.184
C	0.022	0.020	0.198	0.442	0.420	0.375	0.465	0.504
D	0.021	0.173	0.302	0.313	0.305	0.310	0.334	0.386
E	0.010	0.201	0.378	0.385	0.370	0.372	0.389	0.416
F	0.019	0.185	0.305	0.312	0.310	0.307	0.346	0.398
G	0.020	0.213	0.394	0.401	0.392	0.395	0.413	0.453

表 2 攻毒后每组鸡的发病、死亡及保护情况统计

Table 2 The morbidity, mortality and protection rate of chickens in different groups challenged with ILTV Wanggang Strain

组别 Groups	死亡数/患病数 No. of dead chickens/No. of sick chickens						发病率 Morbidity (%)	死亡率 Mortality (%)	保护率 Protection rate (%)
	攻毒后日龄 Time after challenge(d)								
	1	2	3	4	5	6			
A	0/0	0/8	5/14	5/9	2/4	0/2	100	86	14
B	0/0	0/8	5/14	5/9	2/4	0/2	100	86	14
C	0/0	0/0	0/1	0/4	0/4	0/4	29	0	100
D	0/0	0/2	1/4	1/8	1/7	0/6	57	21	79
E	0/0	0/0	0/2	1/6	1/5	0/4	42	14	86
F	0/0	0/1	1/3	1/7	1/7	0/6	50	21	79
G	0/0	0/0	0/2	1/5	1/4	0/3	35	14	86

但仍不及减毒疫苗,这可能与 ILTV DNA 疫苗的免疫途径、DNA 疫苗及 CpG DNA 佐剂的免疫剂量以及两者之间的最适比例等因素有关。CpG DNA 作为一种新型分子免疫佐剂,其对禽病毒 DNA 疫苗免疫效果的影响及其作用机理尚有待进一步研究。

致谢:感谢张绍杰博士和郭鑫博士在实验过程中提供的帮助。

#### References:

- [1] Krieg A M, Yi A, Matson S, et al. CpG motifs in bacterial DNA trigger direct B-cell activation[J]. Nature, 1995, 374: 546-549.
- [2] Sato Y, Roman M, Tighe H, et al. Immunostimulatory DNA sequences necessary for effective intradermal gene immunization[J]. Sciences, 1996, 273:352-354.
- [3] Yan J, Luo H B, Lu D Y. Modern Microbiological Experimental Technology and Its Application [M]. Beijing: People's Hygiene Press, 1997;262. (in Chinese)  
严杰,罗海波,陆德源. 现代微生物学实验技术及其应用[M]. 北京:人民卫生出版社,1997;262.
- [4] Klinman D M, Yamshchikov G, Ishigatsubo Y. Contribution of CpG motifs to the immunogenicity of DNA vaccines[J]. J. Immunol. 1997, 158(8):3635.

## 欢 迎 订 阅

### 《中国农业科学》全文数据库光盘

《中国农业科学》全文数据库光盘收集了本刊自 1960 年创刊以来至 1999 年的全部论文。该数据库全文检索采用光盘影像调阅系统,可准确、迅速、多途径进行检索、打印。原价每套(2 盘)880 元。现以优惠价每套 400 元售给作者。数量有限,请作者从速购买。地址:100081 北京中关村南大街 12 号(原白石桥路 30 号);联系人:赵琪;联系电话:(010)68919808 68976244(兼传真);E-mail:zgnykx@mail.caas.net.cn