

猪 IL-2 与 IL-6 的原核表达及其对伪狂犬病 基因缺失疫苗的佐剂效应研究

严琳, 何启盖, 陈焕春, 肖少波, 吴美洲, 吕建强, 韩丽

(华中农业大学畜牧兽医学院动物病毒室, 武汉 430070)

摘要: 将猪白细胞介素 α (pIL-2) 与猪白细胞介素 β (pIL-6) 的 cDNA 序列克隆到大肠杆菌表达载体 pET-28a 及 pGEX-KG 上, 转化 BL21(DE3) 表达菌, 经 IPTG 诱导产生重组蛋白 pIL-2 与 pIL-6, 表达量分别占菌株总蛋白的 43.45% 和 28.37%, 经提纯后含量可分别达到 97.06% 和 86.37%。将提纯后不同剂量的两种重组蛋白以单独或组合的方式, 加入伪狂犬病 (Ea 株) TK⁻/gG⁻ 双基因缺失疫苗中, 使每头份疫苗分别含 2、5 和 10 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ 的 pIL-2 (或和) pIL-6, 用此疫苗免疫伪狂犬病抗体阴性猪。同时设试验对照组。初次免疫 30 d 后加强免疫, 测定中和抗体, 观察试验猪的日增重情况, 进行统计分析。发现各试验组的抗体水平均高于不含重组蛋白的基因缺失疫苗组, 其中含 2 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ pIL-2 试验组与含 10 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ pIL-2/pIL-6 试验组抗体水平和基因缺失疫苗对照组之间呈显著差异 ($P=0.019$) 与极显著差异 ($P=0.009$)。结果表明, 大肠杆菌表达的 pIL-2、pIL-6 对伪狂犬病鄂 A 株基因缺失疫苗 (TK⁻/gG⁻/LacZ⁺) 有较强的佐剂效应, 且呈剂量相关性。不同试验组日增重比较结果表明, 免疫效果高低与猪的生长速度呈正相关。本试验为重组 pIL-2 与 pIL-6 作为新型疫苗佐剂应用提供了重要的试验依据。

关键词: 猪白细胞介素 2; 猪白细胞介素 6; 表达; 伪狂犬病鄂 A 株基因缺失疫苗; 佐剂

Expression of Porcine Interleukin-2 and Porcine Interleukin-6 and their Adjuvant Effects on Gene Deleted Vaccine of Pseudorabies Virus (TK⁻/gG⁻/LacZ⁺)

YAN Lin, HE Qi-gai, CHEN Huan-chun, XIAO Shao-bo, WU Mei-zhou, LÜ Jian-qiang, HAN Li

(Laboratory of Virology, College of Animal Science and Veterinary Medicine, Huazhong Agriculture University, Wuhan 430070)

Abstract: Porcine interleukin-2 and porcine interleukin-6 cDNA sequences were cloned into the expressing plasmid vectors pET-28a and pGEX-KG, respectively; and expressed in *E. coli* BL21(DE3) with high-level production. The gene deleted vaccine of pseudorabies virus Ea strain (TK⁻/gG⁻/LacZ⁺) as mixed with the two different purified recombinant proteins each, or both, with the doses of 2, 5 and 10 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$. Ten groups of pseudorabies negative antibody swines were immunized twice with tested vaccines at different doses, or control vaccine, respectively. The antibody titers of the test groups were detected by neutralization test, and the daily weight gains of swines were calculated and analyzed statistically. It was found that all the neutralizing antibody titers in test groups were higher than the control group, and the recombinant proteins appeared a dose dependent adjuvant effect. A significant and extremely significant differences, were observed in tested vaccines containing 2 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ pIL-2 and with 10 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ pIL-2/pIL-6, and the vaccines without pILs. The difference of the daily weight gain indicated the potential positive influence of pIL-2 and pIL-6 on immune protection.

Key words: Porcine interleukin-2; Porcine interleukin-6; Expression; Gene deleted vaccine of pseudorabies virus (TK⁻/gG⁻/LacZ⁺); Adjuvant effect

收稿日期: 2002-09-03

基金项目: 国家“863”计划资助项目(2001AA213051)

作者简介: 严琳(1980-), 女, 浙江东阳人, 博士研究生, 主要从事病毒分子生物学研究。Tel: 027-87282608; E-mail: yanlinalin@yahoo.com.cn, 陈焕春为通讯作者, Tel/Fax: 027-87282608; E-mail: hzauvet@public.wh.hb.cn

白细胞介素(interleukin, IL)是由各种白细胞产生,能介导细胞之间相互作用的细胞因子。至今已发现有 23 种白细胞介素,其中大多数成员在氨基酸序列、结构、理化特点及生物学活性等方面均存在较大差别^[1]。白细胞介素- α (IL-2)和白细胞介素- α (IL-6)分别由 Morgan 和 Nordan 等首次报道^[2]。经过近年来各国学者对其理化性质及生物学活性的不懈研究,发现 IL-2 与 IL-6 能针对性地刺激 T-淋巴细胞增殖分化及诱导 B-淋巴细胞合成与分化,进而提高动物机体的细胞免疫与体液免疫能力,因而又分别被称为 T 细胞生长因子(TCGF)与 B 细胞分化因子(BCDF-2)。IL-2 与 IL-6 的这种免疫调节作用,促使人们将目光投向将 IL-2 与 IL-6 作为新型疫苗佐剂应用的研究上^[3,4]。但目前国内外报道较多的是人与其它模式动物的细胞因子研究,相关猪细胞因子佐剂效应研究的报道很少。同时,由于天然动物体内细胞因子本身含量低,且机体组织与体液成分错综复杂,分离纯化过程烦琐、费时。因此,本试验采用基因工程方法,构建了原核表达载体,在 BL21(DE3)表达菌中诱导表达猪 IL-2 与 IL-6,并且以提纯的重组蛋白 pIL-2 与 pIL-6 作为佐剂,研究其在伪狂犬病基因缺失疫苗(TK⁻/gG⁻/LacZ⁺)中的免疫增强效果,为制备更高效的新型疫苗奠定基础。

1 材料与方法

1.1 质粒与菌株

pET-28a-IL-2 表达质粒由本室肖少波博士构建;SK⁺-IL-6 克隆质粒为解放军农牧大学军事兽医研究所余兴龙博士惠赠;表达载体 pGEX-KG,受体菌 *E. coli* DH_{5 α} 及表达菌 *E. coli* BL21(DE3)均为华中农业大学畜牧兽医学院动物病毒室保存。

1.2 生化试剂

各种限制性内切酶及 T4-DNA 连接酶、PCR 试剂、DNA Marker 均为 TakaRa 产品,UNIT-10 柱式 DNA 胶回收试剂盒购于上海生工,IPTG 为 Promega 产品,SKI(N-Lanrayl sarcosine Na Salt,十二烷基肌氨酸钠)为 Sigma 产品,溶菌酶以及氧化型、还原型谷胱甘肽购于北京原平皓生物技术有限公司。

1.3 试验动物及毒株

70~80 日龄伪狂犬病抗体阴性猪由湖北省畜牧良种场(荆州)提供,为大约克猪与长白猪的杂交品种。伪狂犬病(鄂 A 株)基因缺失弱毒株(TK⁻/gG⁻/LacZ⁺)由本室按该疫苗的“试行规程”研制。

1.4 原核表达质粒 pGEX-IL-6' 的构建

1.4.1 目的基因的 PCR 扩增 根据 GenBank M80258(*Sus scrofa* interleukin 6 mRNA)序列,设计 1 对引物用于扩增大小约 570 bp,去掉信号肽序列的成熟 IL-6 cDNA。由上海生工合成引物序列如下,其中上下游引物序列分别含有酶切位点 EcoR I 与 Xho I:

引物 1(上游引物):5'-GCTACT GAATTC CC-TACC-OH 3'

引物 2(下游引物):5'-TTTCTCGAGTGGCCCAGC-TAC-OH 3'

以含 IL-6 全基因序列的 SK⁺-IL-6 质粒为模板,用高保真 Taq 酶进行扩增,PCR 扩增程序为:95℃ 5 min 后 95℃ 50 s→55℃ 60 s→72℃ 35 s 进行 40 次循环,最后 72℃ 延伸 10 min,终止反应。扩增产物经 0.8% 琼脂糖凝胶电泳,确定大小后用 UNIT-10 柱式 DNA 胶回收试剂盒回收。

1.4.2 克隆质粒 SK⁺-IL-6' 的构建 将回收的 PCR 扩增产物与 SK⁺载体进行 EcoR I 与 Xho I 双酶消化后,按常规方法进行电泳,回收,连接,转化入受体菌 DH_{5 α} 。再挑取单菌落抽提质粒,酶切鉴定得阳性克隆子。该载体的构建目的在于提供一个较方便的甲醇酵母、昆虫细胞等表达系统过渡的条件。

1.4.3 原核表达质粒 pGEX-IL-6' 的构建 根据 IL-6' 正确的开放读码框,选择 SK⁺-IL-6' 与 pGEX-KG 的 BamHI 与 XhoI 酶切位点进行消化,进行琼脂电泳及胶回收试剂盒回收目的片段,用 T4 连接酶 16℃ 连接过夜。连接产物转入受体菌 DH_{5 α} ,抽提质粒酶切鉴定。取阳性克隆再转化入表达菌 BL21(DE3)。

1.5 重组质粒的诱导表达

挑取单菌落接种于 3 ml LB 培养基中(其中 pET-IL-2 质粒为卡那抗性,pGEX-IL-6' 为氨苄抗性),37℃ 摇床培养,4℃ 静置过夜。第 2 天取 50 μ l 进行 50~100 倍扩大培养,3 h 后加 IPTG(终浓度为 1.0 mmol·L⁻¹)37℃ 诱导培养,3 h 后离心收集菌体。样品经煮沸处理后进行浓度为 12% 的 SDS-PAGE 胶电泳,考马斯亮蓝 R250 染色^[5]。

1.6 重组蛋白包涵体的提取

以上所述大量诱导表达菌(100 ml),3 h 后离心收集菌体。用 10 mmol·L⁻¹ TE(pH 8.0)洗菌体 1 次,除去残留培养基成分,再用 10 mmol·L⁻¹ TE(pH 8.0)内含 200 μ g·ml⁻¹溶菌酶重悬菌体,置 37℃ 温浴 1 h 后,加 DTT 与 Triton X-100 至终浓度分别达 5 mmol·L⁻¹ 与 1%。然后进行高频短时超声波处理数次。再 4℃,10×10³ r/min,离心 15 min 后,分别收集上清与沉淀,取样进行浓度为 12% 的 SDS-PAGE 胶电泳,

鉴定重组蛋白是以可溶形式还是以包涵体形式存在。

1.7 包涵体的变性及复性

依据 SDS-PAGE 结果,将重组蛋白所在的包涵体溶解于含 0.6% SKI(十二烷基肌氨酸钠)的生理盐水中,室温静置过夜。用紫外分光光度计测出溶解的蛋白质浓度,用生理盐水稀释至 $1 \text{ mg} \cdot \text{ml}^{-1}$ 左右,装入透析袋,内加 $1 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 氧化型:还原型谷胱甘肽(比例为 1:4)帮助变性的肽键依天然构象复性。用 20 倍体积的生理盐水进行 4°C 搅拌透析复性,每 2 h 换液 1 次。经 6 次换液后收集蛋白液,用 Bradford 方法测出精确蛋白浓度。

1.8 试验疫苗的制备

将重组蛋白 pIL-2、pIL-6 及 pIL-2/pIL-6 组合分别以 $2, 5, 10 \mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$ 浓度加入伪狂犬病基因缺失($\text{TK}^-/\text{gG}^-/\text{LacZ}^+$)疫苗毒悬液中,按常规冻干苗制备方法制备出试验疫苗。共制备出 9 种试验疫苗,以不含重组蛋白的伪狂犬病基因缺失疫苗($\text{TK}^-/\text{gG}^-/\text{LacZ}^+$)作为疫苗对照。

1.9 动物试验方案

将 70~80 日龄的试验猪 55 头随机分成 11 组,每组 5 头,隔离饲养。经中和试验检测确证为伪狂犬病抗体阴性后,采用肌肉注射方法进行免疫,免疫剂量为每头 1 ml。间隔 30 d 后加强 1 次免疫。其中 1、2、3 组分别免疫含 $2, 5, 10 \mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$ 浓度的重组 pIL-2 的试验疫苗;4、5、6 组免疫含 3 种浓度的重组 pIL-6 试验疫苗;7、8、9 组免疫含 3 种浓度的重组 pIL-2/pIL-6 组合试验疫苗;第 10 组作为疫苗对照组;第 11 组作为空白对照组。

在首免 30 d 后及加强免疫 15 d 后分别对所有组通过前腔静脉采血,分离血清, 56°C 灭活 30 min 后用于中和试验,检测试验猪抗体水平。分别在试验开始及结束后对试验猪进行称重,比较日平均增重差异。所得试验数据均用 SPSS10.0 软件中的 one way ANOVA 程序进行方差分析。

2 结果与分析

2.1 重组表达质粒 pGEX-KG-IL-6' 的构建及鉴定

2.1.1 PCR 扩增结果 PCR 扩增产物经 0.8% 琼脂糖凝胶电泳后,在凝胶成像系统下观察,可见 570 bp 左右大小的清晰条带,与预期的 DNA 片段大小相符(图略)。

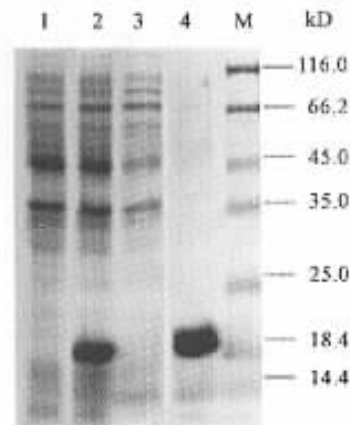
2.1.2 中间转移质粒 SK⁺-IL-6' 的构建 回收的 PCR 产物与 SK⁺ 载体经 EcoR I 与 Xho I 双酶切后,进行连接,转化,次日挑取单个菌落进行小量制备质粒 DNA,然后利用酶切,电泳筛选出正确插入目的

基因的重组质粒。

2.1.3 表达质粒 pGEX-IL-6' 的构建 将筛选出的 SK⁺-IL-6' 与 pGEX-KG 经 BamH I 与 Xho I 双酶切,连接,转化,抽提质粒酶切鉴定。经 0.8% 琼脂糖凝胶电泳后,观察到 570 bp 与 5 000 bp 左右 2 条带。命名为 pGEX-IL-6'。

2.2 重组蛋白 pET-IL-2 与 pGEX-IL-6' 的表达及包涵体的 SDS-PAGE

pIL-2 与 pIL-6 在大肠杆菌表达体系中均大量表达,以致以不可溶的包涵体形式存在。从图 1 分析,重组质粒 pET-IL-2 表达菌在诱导前(泳道 1)与诱导后(泳道 2)比较,诱导后的菌体多出 1 条约 19 kD 的特异性蛋白带,与 pIL-2 分子量相符;对表达菌进行进一步提纯,发现均以包涵体形式存在(泳道 4)。经计算机 GelExpert 软件分析,泳道 2 与泳道 4 中该特异性蛋白带分别占整泳道蛋白量的 43.45% 和 97.06%。从图 2 分析, pGEX-KG 表达菌表达出 1 条 29 kD 左右的 GST 蛋白带(泳道 2),而相应 pGEX-IL-6' 表达菌经诱导后在 48 kD 左右处出现一特异性蛋白带(泳道 3),这是目的蛋白与 GST 的融合表达蛋白带。这结果与去除信号肽的 pIL-6 蛋白为 19 kD 大小相符。同样对表达菌进行进一步提纯,发现该融合蛋白也以包涵体形式存在。经 GelExpert 分析,其泳道 3 与泳道 5 中该特异性蛋白带分别占整泳道蛋白量的 28.37% 和 86.37%。

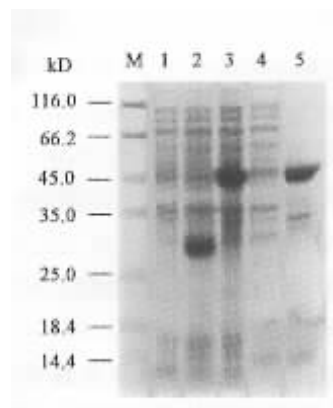


1. 未诱导的重组质粒 pET-IL-2 表达菌; 2. 诱导后的重组质粒 pET-IL-2 表达菌; 3. pET-IL-2 表达菌包涵体提取后上清; 4. pET-IL-2 表达菌的包涵体; M. 低分子量标准蛋白质

1. Uninduced expressing *E. coli* strain with pET-IL-2; 2. Induced expressing *E. coli* strain with pET-IL-2; 3. Supernatant of purified expressing *E. coli* strain; 4. Purified inclusion body of *E. coli* strain; M. Protein marker with low molecular weight

图 1 pET-IL-2 表达菌的 SDS-PAGE

Fig. 1 SDS-PAGE of expressing *E. coli* strain with pET-IL-2



1. 未诱导的重组质粒 pGEX-IL-6'表达菌 ; 2. 诱导后的质粒 pGEX 表达菌 ; 3. 诱导后的重组质粒 pGEX-IL-6'表达菌 ; 4. pGEX-IL-6'表达菌包涵体提取后上清 ; 5. pGEX-IL-6'表达菌的包涵体 ; M. 低分子量标准蛋白质

1. Uninduced expressing *E. coli* strain with pGEX-IL-6' ; 2. Induced expressing *E. coli* strain with pGEX ; 3. Induced expressing *E. coli* strain with pGEX-IL-6' ; 4. Supernatant of purified expressing *E. coli* strain with pGEX-IL-6' ; 5. Purified inclusion body of *E. coli* strain with pGEX-IL-6' ; M. Protein marker with low molecular weight

图 2 pGEX-IL-6' 表达菌的 SDS-PAGE

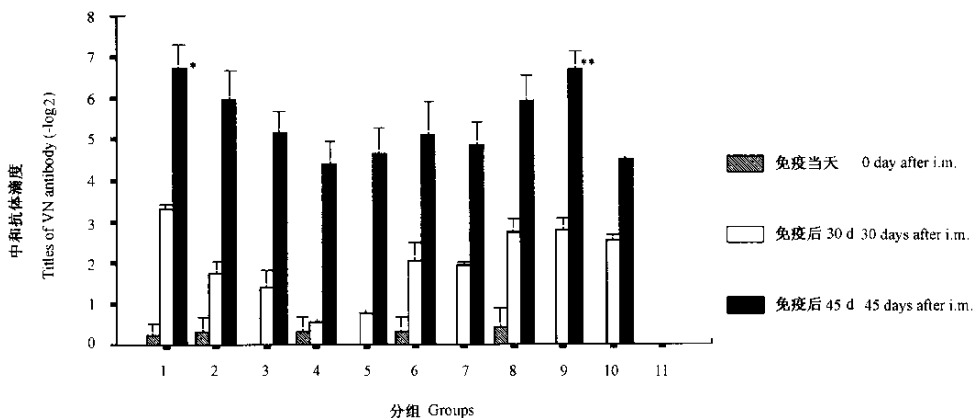
Fig.2 SDS-PAGE of expressing *E. coli* strain with pGEX-IL-6'

2.3 中和试验

所有试验猪在第 1 次免疫 30 d 后通过前腔静脉抽取血样 ,中和试验结果采用 SPSS 软件包分析发现接种疫苗的 10 组试验猪抗体阳转率达到 100%。其中含 $2 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ pIL-2 的试验组(组 1)与含 $10 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ pIL-2/pIL-6 的试验组(组 9)的抗体滴度高于疫苗对照组(组 10) ;加强免疫 15 d 后采血检测 ,发现除组 4 外 ,其它含白细胞介素佐剂的试验组的中和抗体滴度均高于不含白细胞介素佐剂的疫苗对照组 ,尤其是含 $2 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ pIL-2 的试验组(组 1)与含 $10 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ pIL-2/pIL-6 的试验组(组 9) ,与伪狂犬病毒基因缺失疫苗对照组(组 10)相比较 ,中和抗体滴度分别呈现显著差异 ($P = 0.019$)与极显著差异 ($P = 0.009$)。而空白对照组(组 11)一直呈抗 PrV 抗体阴性(图 3)。

2.4 不同试验组猪平均日增重比较

通过 SPSS 软件包对试验猪试验前后的体重进行比较 ,发现在相同的饲养条件下 ,免疫前疫苗对照组(组 10)体重略高于试验组 ,而免疫 45 d 后有 2 组试验组(组 1 与组 2)体重却高于疫苗对照组(组



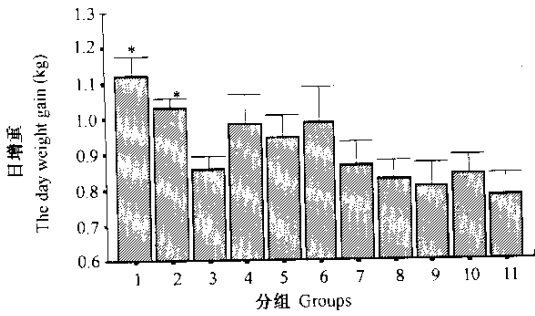
抗体滴度(-log₂)小于 0.5 的为阴性 ; * $P < 0.05$ 为显著差异 ; ** $P < 0.01$ 为极显著差异
Negative : NV antibody < 0.5 ; * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ vs vaccine control group(group 10)

图 3 免疫前、首免与加强免疫后中和试验结果

Fig.3 The result of neutralization tests in pre-immune , first immune and booster immune

10)。平均日增重分析比较发现 ,未免疫的空白对照组(组 11)的平均日增重均低于其它免疫组 ;而试验组与疫苗对照组之间 ,除组 8 与组 9 外 ,其它试验组的日平均增重均高于疫苗对照组的日平均增重 ,其

中含 $2 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ pIL-2 的试验组(组 1)与含 $5 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ pIL-2 的试验组(组 2)达到了显著差异 ($P = 0.02$ 、 $P = 0.04$)。组 8 与组 9 的平均日增重可能受起始体重较低的影响而相对偏低(图 4)。



* $P < 0.05$ 为显著差异

* $P < 0.05$ vs vaccine control group (group 10)

图4 试验猪日增重比较

Fig.4 Comparison of the daily weight gain of test swines

3 讨论

IL-2 与 IL-6 的免疫增强作用,在许多模式动物中均已被证实。Reddy 等曾报道^[6]将低剂量(0.25 ~ 2.5 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}\cdot\text{kg}^{-1}$)重组牛 IL-2 与牛疱疹病毒 1 型活苗(BHV-1)一起免疫,血清中和抗体效价比单独使用疫苗组提高了 6 倍。Weinberg 等^[7]也报道将重组 IL-2 作为佐剂与 Herpes 亚单位疫苗共免疫豚鼠,试验结果显示了重组 IL-2 与疫苗合用可显著提高特异的细胞毒性反应,在主动免疫程序中发挥重要的佐剂效应。同样,IL-6 作为 B 细胞刺激因子,能促进 B 细胞增殖分化,并刺激活化后期的 B 细胞大量合成分泌型 Ig 的 mRNA,从而增加 Ig (IgM、IgG 和 IgA) 的分泌,促进体液免疫。Ramsay 等^[8]利用基因工程技术,将鼠 IL-6 重组入痘病毒载体,该疫苗能极大地提高粘膜内抗体水平以至整个免疫机体抗体水平。洪文洲等将 pIL-2 和 pIL-6cDNA 分别与 PrV(Ea 株)gD 基因一起构建双顺反子结构的真核表达质粒免疫断奶仔猪,其首免与加强免疫所产生的抗体效价均显著高于单独 gD 基因疫苗免疫组,而 CTL 细胞活性也在加强免疫之后得到显著增强。本试验在前人的研究基础上,着重研究以蛋白形式存在的 pIL-2 和 pIL-6 对 PrV(Ea 株)基因缺失疫苗(TK⁻/gG⁻/LacZ⁺)的体液免疫增强效应。

本试验采用基因工程方法,构建大肠杆菌表达质粒 pET-IL-2 与 pGEX-IL-6',在 BL21(DE3)表达菌中诱导表达重组 pIL-2 与 pIL-6,经 SDS-PAGE 胶鉴定均表达出高浓度,以包涵体形式存在的重组蛋白 pIL-2、pIL-6。其中 pIL-2 为包括信号肽的完整蛋白,而 pIL-6 因为其信号肽前源序列中含几个连续的疏

水氨基酸,影响其在外源生物中的表达,因此,笔者通过 PCR 方法去除 pIL-6 的信号肽序列,构建了与 GST(谷胱甘肽 S-转移酶)融合表达的 pGEX-IL-6'重组质粒,经 IPTG 诱导,证实获得了高表达量的融合蛋白。2 种重组菌株的目的蛋白表达量均很高,经计算机 GelExpert 软件分析,目的蛋白分别占总菌体蛋白的 43.45%(pIL-2)与 28.37%(pIL-6),经后续的包涵体提取处理,纯度更提高到 97.06%(pIL-2)与 86.37%(pIL-6),达到了常规的层析分离纯化的效果。重组蛋白以包涵体形式存在虽然方便了提取纯化步骤,但也存在蛋白质变性及复性问题。笔者参考相关文献[9~11],曾选用尿素与盐酸胍溶解包涵体,但不是变性效果不好就是后续的透析复性过程烦琐,极易重新恢复为沉淀状态。后改用人工合成的烷基阴离子去垢剂 SKL(十二烷基肌氨酸钠),仅 0.6% 浓度就可使 50 ml 菌液诱导出的包涵体完全溶解,对后续的透析复性效果也较便利,不需进行梯度透析。

据报道^[12],IL-2 与 IL-6 在动物机体中的免疫调节功能存在一个剂量相关性,各种动物机体对 IL-2 与 IL-6 都有不同的最适耐受剂量,超过这一耐受剂量则会引起疾病,免疫失调等负效应影响。因此,笔者在前人研究基础之上对每种试验疫苗均设置了 2、5、10 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ 的梯度剂量。试验结果证明,以 pIL-2 作为疫苗佐剂的试验组中,2 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ 浓度已足够促进动物机体的免疫保护力,与不含白细胞介素的伪狂犬病基因缺失疫苗对照组比较,呈现显著差异($P = 0.019$),而剂量的增加反而引起抗体水平的下降,而 pIL-6 试验组的佐剂效果不明显,试验组抗体水平只随着 pIL-6 剂量的增加呈现微弱的上升,与疫苗对照组没有显著差异。这可能和 pIL-6 与 GST(谷胱甘肽 S-转移酶)的融合蛋白形式影响了 pIL-6 的生物学活性发挥有关,而 pIL-2/pIL-6 联合试验疫苗组相对于单独的 pIL-6 试验组,产生的佐剂效应要好些,其中含 10 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ pIL-2/pIL-6 的试验组,与疫苗对照组相比较,呈现出极显著差异($P = 0.009$)。这说明重组蛋白 IL-2 与 IL-6 对 PrV(Ea 株)基因缺失疫苗(TK⁻/gG⁻/LacZ⁺)均有不同程度的佐剂增强效应,而关于这 2 种重组蛋白的最佳剂量及最佳剂量组合还有待进一步试验确定。

从试验猪体重变化结果分析,在相同的饲养条件下,免疫组日增重普遍高于未免疫组,而大多数试验组的日增重水平又高于疫苗对照组(除组 8、组 9 由于受初始体重影响而日增重较低外),其中组 1、

组 2 还达到显著差异($P = 0.02$, $P = 0.04$)。这是否表明这两 2 重组细胞因子在发挥其固有的免疫增强作用外,对动物的生长还具有正向效应?这有待进一步的研究探索。本试验为提高常规疫苗以及新一代基因工程疫苗的免疫效果提供了试验依据。

References

- [1] 马大龙. 新一轮的白细胞介素克隆化高潮——兼论计算机克隆的重要贡献. 中国免疫学杂志, 2001, 17 : 113 - 114.
Ma D L. A new high tide of cloning interleukin —— and the splendid contribution of computer on it. *Chinese Journal of Immunology*, 2001, 17 : 113 - 114. (in Chinese)
- [2] Richard P N, Janet G P, Stuart R. Purification and NH₂-terminal sequence of a plasmacytoma growth factor derived from the murine macrophage cell line P388D1. *The Journal of Immunology*, 1987, 139 : 813 - 817.
- [3] Nunberg J H, Doyle M V, York S M. Interleukin-2 acts as an adjuvant to increase the potency of inactivated rabies virus vaccine. *Proceeding of the National Academy of Sciences*, 1989, 86(11) : 4 240 - 4 243.
- [4] Liu Z Q, Richard J S, Christina C. Role of interleukin-6 in T-cell activation during primary and secondary infection with *Listeria monocytogenes*. *Infection and Immunity*, 1995, 63(7) : 2 790 - 2 792.
- [5] Sambrook J, Fritsch E F, Maniatis T. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. 2nd ed. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989.
- [6] Reddy P G. Bovine Recombinant interleukin-2 augments immunity and resistance to bovine Herpesvirus infection. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 1989, 23 : 61 - 74.
- [7] Weinberg A, Konard M, Merigan T. Regulation by recombinant interleukin-2 of protective immunity against recurrent Herpes Simplex Virus Type 2 Genital infection in Guinea pigs. *The Journal of Virology*, 1987, 61(7) : 2 120 - 2 127.
- [8] Ramsay A J, Husdand A J, Ramshaw I A, Bao S, Matthaei K I, Koehler G, Kopt M. The role of interleukin-6 in mucosal IgA antibody responses *in vivo*. *Science*, 1994, 264 : 561 - 563.
- [9] 马歇克 D R, 门永 J T, 布格斯 R R 等著(朱厚础等译). 蛋白质纯化与鉴定实验指南. 北京: 科学出版社, 1999 : 141 - 151.
Marshak D R, Kadonaga J T, Burgess R R, Knuth M W (translated by Zhu H C). *Strategies for Protein Purification and Characterization: A Laboratory Course Manual*. Beijing: Science Press, 1999 : 141 - 151. (in Chinese)
- [10] 卢圣栋. 现代分子生物学实验技术(第二版). 北京: 中国协和医科大学出版社, 1999 : 417 - 420.
Lu S D. *Current Experiment Technology of Molecular Biology*. 2nd ed. Beijing: Peking Union Medical University Press, 1999 : 417 - 420. (in Chinese)
- [11] 宁云山, 李 妍, 王小宁. 包涵体蛋白质的复性研究进展. 生物技术通讯, 2001, 12(3) : 237 - 240.
Ning Y S, Li Y, Wang X N. Advance in vitro folding of inclusion body protein. *Letters of Biotechnology*, 2001, 12(3) : 237 - 240. (in Chinese)
- [12] 孙为民, 王惠琴编著. 细胞因子研究方法学. 北京: 人民卫生出版社, 1999 : 387 - 405, 443 - 458.
Sun W M, Wang H Q. *The Research Methodology of Cytokine*. Beijing: People's Health Press. 1999 : 387 - 405, 443 - 458. (in Chinese)

(责任编辑 林鉴非)