

转移因子对猪圆环病毒亚单位疫苗免疫效果的影响

屈泰龙, 李润成, 钱幸, 杨宇, 余兴龙*

(湖南农业大学动物医学院, 湖南 长沙 410128)

摘要:为探寻转移因子(TF)对猪圆环病毒亚单位疫苗免疫效果的影响,将猪脾脏研磨,并反复冻融研磨液,离心获取冻融上清,用超滤法从上清液中提取转移因子。TF 经理化检验合格后,以添加剂的形式与猪圆环病毒亚单位疫苗(Cap 疫苗)混合,制成 TF-Cap 疫苗,并和未添加 TF 的 Cap 疫苗同时进行小鼠免疫试验。TF-Cap 疫苗和 Cap 疫苗免疫的小鼠都设一免组和二免组,首次免疫后每隔 10 d 对实验鼠进行尾静脉采血,并用间接 ELISA 方法测定血清中猪圆环病毒 2 型(PCV2)的抗体水平。结果表明:用超滤法制得的 TF,多肽含量为 1.83 mg/mL;抗体检测数据显示,4 个免疫组与对照组(注射生理盐水)的抗体检测值有极显著差异($P<0.01$),而 4 个免疫组之间无显著差异($P>0.05$),TF-Cap 疫苗一免组的抗体水平与 Cap 疫苗二免组的抗体水平相当,表明在圆环病毒基因工程疫苗中添加 TF 可一定程度的提高免疫动物的抗体水平。

关键词:转移因子;猪圆环病毒;亚单位疫苗;免疫增强

中图分类号:S855.3

文献标志码:A

文章编号:1007-1032(2013)04-0409-04

Effect of transfer factor on immune efficacy of PCV2 subunit vaccine

QU Tai-long, LI Run-cheng, QIAN Xing, YANG Yu, YU Xing-long*

(College of Veterinary Medicine, Hunan Agricultural University, Changsha 410128, China)

Abstract: To investigate the effect of transfer factor (TF) on the immune efficacy of porcine circovirus type 2 (PCV2) subunit vaccine, spleen from healthy porcine was grinded and the homogenate was frozen-thawed six times. TF was obtained after the homogenate was centrifuged and ultrafiltered. After physical and chemical inspection, TF was added to PCV2 subunit vaccine (Cap vaccine), named TF-Cap vaccine. TF-Cap vaccine and Cap vaccine were used to immunize mice with physiological saline as control. The mice were separated into two groups: one-time vaccination and two-time vaccination. Blood was collected at 10-d interval through caudal vein after the first vaccination and PCV2 antibody was tested using indirect enzyme-linked immuno-sorbent assay. The result showed that the concentration of the ultrafiltered TF is 1.83 mg/mL. Detection of PCV2 specific antibody showed that there are significant differences ($P<0.01$) between vaccine group and control group while there is no significant differences ($P>0.05$) among vaccine groups. However, PCV2 antibody titer in mice immunized TF-Cap vaccine only once was comparable to mice immunized Cap-vaccine twice, indicating PCV2 subunit vaccine with TF can enhance the antibody production.

Key words: transfer factor; porcine circovirus (PCV); subunit vaccine; immune enhancement

猪圆环病毒病是由圆环病毒 2 型(PCV2)引起的疾病,主要为猪断奶后多系统综合征。该病于 1991 年首次在加拿大西部猪群暴发^[1];随后在其他养猪国家开始报道^[2-4];中国于 2000 年首次报道了猪群中存

在 PCV2 感染^[5],其流行范围波及全国。疫苗免疫是预防猪圆环病毒病的一个有效途径。目前,应用较多的圆环病毒疫苗多为灭活苗,且多是通过 ELISA 方法检测抗 Cap 蛋白特异性的抗体^[6]来检测疫苗的免疫

收稿日期:2013-02-05

基金项目:湖南省教育厅项目(11CY026)

作者简介:屈泰龙(1986—),男,河南开封人,硕士研究生,主要从事动物病原分子学与免疫学研究, qutalong@126.com; *通信作者, xlyu999@126.com

效果。PCV2 全病毒灭活苗免疫动物所产生的抗体,不能与自然感染 PCV2 后产生的抗体相区分。使用 PCV2 Cap 蛋白的亚单位疫苗,则能够通过现有 ELISA 检测方法区分抗体来源是疫苗免疫还是野毒感染。但亚单位疫苗的抗原分子较小,产生的抗体水平往往有限。在疫苗中添加不影响疫苗理化性质及抗原性能,同时又能够调节机体的生理机能,增强机体的免疫力的分子,从而提高机体防御疾病的能力,是当前乃至未来疫苗发展的一个方向。

转移因子(TF)是一种可溶、不耐热的小分子肽。TF 无毒性、无过敏性、无热原性、无抗原性且无种属特异性,低温保存数年活性不消失^[7],可从致敏淋巴细胞中提取。TF 具有多种免疫学功能,如传递免疫信息、激发免疫细胞活性、增强淋巴细胞转化、提高机体免疫功能、解除免疫抑制及免疫增强作用^[8]等,在与灭活疫苗同时免疫实验动物后,能够不同程度的提高免疫动物特异性抗体的产生^[9-14]。

鉴于 TF 的免疫增强作用,笔者将 TF 添加至 PCV2 亚单位疫苗,进行小鼠免疫试验,并用未添加 TF 的 PCV2 亚单位疫苗同时免疫小鼠作对比,探讨 TF 对猪圆环病毒亚单位疫苗刺激机体产生特异性抗体的影响,以便有效的控制或减少猪圆环病毒病的发生。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 供试动物及脾脏

昆明小鼠,30只,雌性,体重22~23g,购自湖南斯莱克景达实验动物中心。健康猪脾脏采集于某屠宰场。

1.1.2 主要试剂与仪器

0.9%生理盐水购自湖南金箭药业有限责任公司;氢氧化铝凝胶购自 Brenntag Biosector (Danmark);BCA 蛋白浓度检测试剂盒购自 Thermo 公司;PCV2 抗体检测 ELISA 试剂盒为湖南农业大学动物分子与免疫学实验室自主研发(专利号:200910043875.9)^[15],MW10000 超滤管为 Merck MILLIPORE 产品;MULTISKAN MK3 酶标仪购自

Thermo 公司。

1.2 方法

1.2.1 TF 的制备

参照张立武等^[16]的方法制备 TF 将冻存的 PCV2 抗体阳性猪的脾脏取出融化,去脂肪、被膜,充分洗净。用组织捣碎机绞碎,加适量生理盐水后,用高速匀浆机(12 000g)匀浆 2 次,每次 1 min。将匀浆液反复冻融 6 次,最后一次融化后以 3 000g 离心 30 min,取上清,将上清转移至超滤管内,10 000g 离心 15 min,无菌条件下将超滤液收集至无菌离心管中,-20℃保存,备用。

1.2.2 TF 的理化性质及安全性测定

用 pH 试纸检测 TF 的 pH 值;用 BCA 法^[9]测定 TF 的多肽含量(操作见试剂盒说明书);将 TF 接种到普通琼脂培养基,进行无菌检验;用不同剂量(100、200、500 μL)TF 分别腹腔接种 6 只小鼠,进行安全性试验。

1.2.3 疫苗的制备

在无菌条件下,将-20℃保存的 Cap 蛋白纯化液^[17]按照所需蛋白浓度以一定比例与生理盐水和稳定剂混合均匀,在搅拌条件下缓慢的向其中添加氢氧化铝凝胶佐剂,使 Cap 蛋白均匀的吸附于氢氧化铝凝胶佐剂,此为 Cap 疫苗。取配置好的 Cap 疫苗,5 000g 离心 5 min,用移液器将上清液移去,添加 TF 制备液,5 000g 离心 5 min,将沉淀用生理盐水悬浮,使 TF 终浓度为 2 mg/mL,并振荡混匀,即得含有 TF 的 Cap 疫苗,命名为 TF-Cap 疫苗。

1.2.4 动物免疫试验

将 30 只昆明小鼠随机分为 5 组,每组 6 只。A 组为 Cap 疫苗一免组;B 组为 TF-Cap 疫苗一免组;C 组为 Cap 疫苗二免组;D 组为 TF-cap 疫苗二免组;E 组为生理盐水对照组,具体见表 1。通过皮下注射对小鼠进行免疫,免疫组每只小鼠注射疫苗 100 μL,对照组每只注射生理盐水 100 μL。首次免疫后的第 21 天,对二免组的小鼠加强免疫 1 次。

表1 供试小鼠免疫情况

| 组别 | 多肽含量/ (mg·mL ⁻¹) | 抗原含量/ (μg·mL ⁻¹) | 免疫剂量/ μL | 免疫 次数 | 二免时间 |
|----|---------------------------------|---------------------------------|-------------|----------|---------|
| A | | 500 | 100 | 1 | |
| B | 2 | 500 | 100 | 1 | |
| C | | 500 | 100 | 2 | 一免后第21天 |
| D | 2 | 500 | 100 | 2 | 一免后第21天 |
| E | | | 100 | 2 | 一免后第21天 |

1.2.5 抗体检测

首次免疫后第21天,对所有小鼠进行尾静脉采血,并分离血清,以后每隔10d进行采血。将血清保存于-20℃,于第4次采血结束时统一进行PCV2抗体检测。检测采用PCV2-Cap特异性IgG抗体检测试剂盒,具体操作按照说明进行。

2 结果与分析

2.1 TF对小鼠的安全性

所制备的TF为透明液体,略呈淡黄色,质量浓度为1.83mg/mL,用广谱pH试纸测得其pH值接近7.0,用窄谱pH试纸测得pH值为6.5~7.0;接种普通琼脂培养基,未见有细菌生长;按不同剂量接种小鼠,48h内未见小鼠有异常反应。

2.2 抗体检测结果

抗体检测值列于表2。用*t*检验对4个免疫组以及对对照组的抗体检测数据进行显著性差异分析,结果显示,试验组与对照组差异极显著($P<0.01$),4个免疫组之间差异没有统计学意义($P>0.05$)。Cap疫苗2次免疫组抗体水平高于Cap疫苗一免组。一免组中TF-Cap疫苗试验组小鼠的平均抗体水平比Cap疫苗试验组小鼠的平均抗体水平高,且TF-Cap疫苗组小鼠产生抗体比Cap疫苗组小鼠产生抗体快。

表2 首次免疫后各组小鼠的PCV2抗体水平($OD_{450\text{ nm}}$)

| 组别 | $OD_{450\text{ nm}}$ | | | |
|----|----------------------|--------|--------|--------|
| | 第21天 | 第31天 | 第41天 | 第51天 |
| A | 0.41 | 0.90 | 0.93 | 1.03 |
| B | 0.66 | 1.37 | 1.57 | 1.61 |
| C | 0.37 | 1.37 | 1.54 | 1.55 |
| D | 0.57 | 1.24 | 1.21 | 1.42 |
| E | 0.06** | 0.06** | 0.06** | 0.07** |

TF-Cap疫苗一免组小鼠抗体检测值与Cap疫苗二免组、TF-Cap疫苗二免组小鼠抗体检测值经*t*检验,三者之间差异没有统计学意义($P>0.05$)。

3 讨论

笔者将含有PCV2抗体阳性猪的脾脏匀浆液离心后,采用超滤法提取上清中特异性TF,获得的TF多肽质量浓度为1.83mg/mL,优于用传统透析法制备的TF(质量浓度约为1.2mg/mL),且该方法方便快捷,没有透析时间过长以及需反复更换透析液的问题。特异性TF可将供体的免疫状态传输给受体,从而调动受体的相关免疫系统。因为TF有特异性和非特异性之分,本试验中免疫效果的增强不能完全确定是特异性还是非特异性TF引起的,在后期的研究中,可进行特异性和非特异性TF对比试验,以观察和对比两者免疫增强能力的大小。

将所制得TF添加到PCV2亚单位疫苗免疫动物,并用间接ELISA测定免疫小鼠血清中的PCV2抗体水平,发现TF能够刺激机体较快的产生抗体,且维持高抗体水平的时间较长。TF-Cap疫苗一免组在整个试验组中抗体水平最高,表明在添加了TF后,免疫一次即可获得与原疫苗免疫二次相当的抗体水平,这不仅降低了疫苗用量,同时减少了对动物的免疫刺激。TF-Cap疫苗二免组的抗体水平比TF-Cap疫苗一免组和Cap疫苗二免组的低,可能是由于二免后TF增强了体内免疫刺激因子的释放,过多的免疫因子反而导致抗体产生减缓。不含TF的2个疫苗组,免疫2次的抗体水平比只免疫1次的抗体水平高;因此,加强免疫可促进小鼠产生针对Cap蛋白的特异性IgG抗体。

目前,国产猪圆环病毒疫苗主要是灭活苗,因其难以区分免疫抗体和感染抗体而无法对猪群进行正常的抗体监测。进口疫苗虽可进行区分,但价格太高。笔者在PCV2亚单位疫苗中添加TF,在提高疫苗效力的同时,又能降低疫苗的使用量,这为加速国内研制更有效的猪圆环病毒基因工程疫苗提供了一个思路。此外,中国每年要屠宰大量的生猪,而以往脾脏往往被废弃,如果将脾脏中的TF进行提取,则可变废为宝。

参考文献:

- [1] Allan G M, Ellis J A . Porcine circovirus : A review[J] . J Vet Diagn Invest , 2000 , 12(1) : 3-14 .
- [2] Daft B . Interstitial pneumonia and lymphadenopathy associated with circoviral infection in a six-week-old pig[J] . Proc Am Assoc Vet Lab Diag , 1996(39) : 32 .
- [3] Allan G M . Isolation of porcine circovirus-like viruses from pigs with a wasting disease in the USA and Europe[J] . Journal of Veterinary Diagnostic Investigation, 1998 , 10(1) : 3-10 .
- [4] Choi C , Chae C , Clark E G . Porcine postweaning multisyst- Emic wasting syndrome in Korean pig : Detection of porcine circovirus 2 infection by immunohistochemistry and poly-merase chain reaction [J] . Journal of Veterinary Diagnostic Investigation , 2000 , 12(2) : 151-153 .
- [5] 郎洪武,王力,张广川,等.猪圆环病毒分离鉴定及猪断奶多系统衰弱综合征的诊断[J].中国兽医科技,2001,31(3):3-5.
- [6] 吴华伟,高金源,邓永,等.国内5种猪圆环病毒 PCV2 抗体检测试剂盒的比较试验[J].中国兽药杂志,2011,45(6):11-12.
- [7] 孙卫民,王惠琴.细胞因子研究方法学[M].北京:人民卫生出版社,2001:762-763.
- [8] Pineda B ,Estrada S ,Pedraza B .Interstitial transfer factor as adjuvant immunotherapy for experimental glioma[J]. Journal of Experimental and Clinical Cancer Research , 2005 , 24(4) : 575-583 .
- [9] 乔宏兴,白静.猪脾脏转移因子的制备及临床应用[J].中国畜牧兽医,2011,38(7):203-205.
- [10] 李犹平,房春林,陈元坤,等.转移因子对猪瘟和猪蓝耳病疫苗免疫增强效果试验[J].兽医导刊,2010(2):47-48.
- [11] 高迎春,李相安,徐恩民,等.鸡脾转移因子对体液免疫影响的研究[J].山东畜牧兽医,2001(4):8-9.
- [12] 史秀山.转移因子增强狂犬病疫苗免疫效果的研究[J].中国人兽共患病杂志,2005,20(11):987-988.
- [13] 姚德法,孙鏊国,马云.猪用转移因子对猪瘟免疫效果观察[J].上海畜牧兽医通讯,2009(1):41-43.
- [14] Flores S G , Gomez V J , Orea S M , et al . Transfer factor as specific immunomodulator in the treatment of moderate severe atopic dermatitis[J] .Revista Alergia Mexico ,2005 , 52(6) : 215-220 .
- [15] 葛猛,屈泰龙,罗维,等.利用圆环病毒2结构蛋白建立检测其抗体的间接 ELISA 方法[J].湖南农业大学学报:自然科学版,2013,39(1):63-68.
- [16] 张立武,万星,孔建平,等.猪脾转移因子的规模化生产工艺研究[J].畜牧与兽医,2011,43(5):61-63.
- [17] 葛猛.猪圆环病毒2结构蛋白 Cap 的高效可溶性表达及应用[D].长沙:湖南农业大学动物医学院,2009.

责任编辑:罗维

英文编辑:罗维