

• 论 著 •

嗜肺军团菌 *momp* 基因疫苗的制备及其免疫原性研究*窦娇莹^{1,2}, 杨志伟²

(1. 甘肃省中医院检验科, 兰州 730050; 2. 宁夏医科大学基础医学院病原生物学与免疫学系, 银川 750004)

摘要:目的 构建真核重组质粒 GFP-*momp* 作为核酸疫苗, 已构建的原核重组质粒 pET-*momp* 表达的蛋白作为蛋白疫苗, 二者联合免疫 BALB/c 雌性小鼠, 观察其免疫原性。方法 (1) 以嗜肺军团菌 DNA 作为模板, 扩增得到 *momp* 基因, 并克隆至 pEGFP-C1 载体获得重组质粒 GFP-*momp*。鉴定正确后, 将其转染到 NIH3T3 细胞, 利用荧光显微镜观察 GFP-*momp* 的表达。(2) 选取 BALB/c 雌性小鼠 60 只, 平均分为 4 组, 即磷酸盐缓冲液 (PBS) 组 (A 组)、空质粒 pEGFP-C1 组 (B 组)、DNA 疫苗组 (C 组)、联合疫苗组 (D 组)。以重组质粒 GFP-*momp* 作为 DNA 疫苗, 重组质粒 GFP-*momp* 和 MOMP 蛋白作为联合疫苗, 第 1 天 A 组肌肉注射 PBS 50 μ L, B 组注射 pEGFP-C1 50 μ g, C、D 组各注射 GFP-*momp* 50 μ g; 第 14 天各组以相同剂量追加免疫 1 次; 第 21 天 A、B、C 组用相同剂量再追加免疫 1 次, D 组注射 10 μ g 纯化的 MOMP 蛋白。借助对各试验组小鼠的抗体水平、脾淋巴细胞增殖活性、细胞毒性 T 淋巴细胞 (CTL) 杀伤活性等指标的动态检测, 来评价 DNA 疫苗与蛋白疫苗的免疫原性。结果 扩增出 831 bp 的 *momp* 基因, 构建重组质粒 GFP-*momp*, 转染入 NIH3T3 细胞并在细胞内表达出绿色荧光蛋白。在淋巴细胞增殖试验中: A 组和 B 组比较差异无统计学意义 ($P > 0.05$); C 组和 D 组淋巴细胞增殖活性均高于 B 组, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$); C 组高于 D 组, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。间接 ELISA 测定血清中抗原特异性抗体水平结果显示, A、B 两组比较差异无统计学意义 ($P > 0.05$); C、D 两组均高于 B 组, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$); D 组抗体滴度高于 C 组, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。CTL 杀伤活性试验结果显示, A、B 两组比较差异无统计学意义 ($P > 0.05$); C、D 两组均高于 B 组, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$); D 组杀伤活性高于 C 组, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。结论 成功构建 *momp* 基因的真核表达载体并在 NIH3T3 细胞中得到表达, 并进一步得出嗜肺军团菌 *momp* 基因诱导产生的 DNA 疫苗和 DNA-蛋白疫苗均能产生细胞免疫和体液免疫, 具有免疫原性。

关键词: 嗜肺军团菌; *momp* 基因; 疫苗

DOI: 10.3969/j.issn.1673-4130.2016.11.001

文献标识码: A

文章编号: 1673-4130(2016)11-1449-04

Preparation and immunogenicity of *momp* gene vaccine of Legionella Pneumophila*DOU Jiaoying^{1,2}, YANG Zhiwei²

(1. Department of Clinical Laboratory, Chinese Traditional Chinese Medicine of Gansu, Lanzhou 730050, China; 2. Department of Pathogenic Biology and Immunology, School of Basic Medicine, Ningxia Medical University, Yinchuan 750004, China)

Abstract: Objective To observe the immunogenicity of the DNA vaccine induced by eukaryotic recombinant plasmid GFP-*momp* combined with protein vaccine induced by prokaryotic recombinant plasmid pET-*momp* in BALB/c female mice immunized intramuscularly. **Methods** The MOMP gene amplified from DNA of Legionella pneumophila by PCR were cloned into pEGFP-C1 vector, which produced the recombinant plasmid named as GFP-*momp*. GFP-*momp* was analyzed with restriction endonuclease digestion, PCR and DNA sequencing techniques. The NIH3T3 cell was transfected by recombinant plasmid GFP-*momp* through lipofection. The stable expression products of MOMP were observed by the fluorescent microscope. Sixty BALB/c female mice were divided into 4 groups averagely, the PBS control group (A group), the plasmid pEGFP-C1 control group (B group), DNA vaccine experimental group (C group) and the combination vaccine experimental group (D group). By recombinant plasmid the GFP-*momp* combined with MOMP protein, mice of group A were given intramuscular injection PBS 50 μ L and mice of group B were injected with pEGFP-C1 50 μ g. In addition, mice of group C and D were injected GFP-*momp* 50 μ g in the first day. Each group injected the same dose immunization once in the fourteenth day. Then mice of group A, B and C were injected with the same dose of an additional immunization and in the twenty-first day and that of the group D were injected with 10 μ g purified MOMP protein. Then antibody levels, lymphocyte proliferation activity and CTL killing activity were tested to evaluate the immunogenicity of DNA vaccines and combined vaccine. **Results** 831 bp *momp* gene was amplified. Under the fluorescent microscope, green fluorescent was observed in the cell cytoplasm. In the lymphocyte proliferation test, there was no significant difference between group A and B ($P > 0.05$). Proliferative activity of group C and D were significantly higher than that of group B ($P < 0.05$). And proliferative activity of group C was significantly higher than that of group D ($P < 0.05$). The indirect ELISA results showed that antigen-specific levels of serum

* 基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (30860264)。

作者简介: 窦娇莹, 女, 技师, 主要从事微生物与免疫学检验研究。

antibody in A Group and B Group had no significant difference ($P < 0.05$). And the levels of serum antigen-specific antibody of group C and D were significantly higher than that of group B ($P < 0.05$). Antibody titer of group D was significantly higher than that of group C ($P < 0.05$). CTL killing activity experiments showed that there was no significant difference between group A and B ($P > 0.05$). The activity of group C and D were significantly higher than that of group B ($P < 0.05$) and the activity of group D was also significantly than that of group C ($P < 0.05$). **Conclusion** The recombinant plasmid GFP-*momp* is constructed and expressed successfully in the NIH3T3 cells. DNA vaccine and DNA protein vaccine induced by *Legionella pneumophila* bacteria *momp* gene have immunogenicity which can generate cellular and humoral immune responses.

Key words: *Legionella pneumophila*; *momp* gene; vaccine

军团菌是存在于天然水和土壤中的胞内寄生菌,广泛存在于潮湿含铁的管道,如空调、淋浴器等与人类生活密切相关的地方,大大增加了人类与该菌的接触概率^[1]。人畜可因吸入含军团菌的气溶胶而感染。作为胞内寄生菌,军团菌可借助侵入宿主的巨噬细胞来逃避吞噬体和溶酶体的杀伤作用,并在宿主细胞中生长繁殖。目前已知的军团菌以嗜肺军团菌(Lp)1型最为常见,它是引起社区获得性肺炎和院内感染肺炎的重要病原菌^[2]。军团菌感染目前没有有效的特异性预防措施,因此,研究高效的疫苗已成为现阶段临床的迫切需求。本研究利用生物及免疫信息学方法进行比对分析后发现,主要外膜蛋白(MOMP)是基因表达的相对分子质量为 30×10^3 的外膜蛋白,具有良好的免疫原性。本研究拟构建重组质粒 GFP-*momp* 作为 DNA 疫苗对小鼠进行免疫,已构建的重组质粒 pET-*momp* 诱导表达的重组蛋白 MOMP 作为蛋白疫苗,观察该基因的免疫原性,为疫苗方面的研究奠定基础,现报道如下。

1 材料与方 法

1.1 菌株和质粒 Lp 1 型菌株由四川大学陈建平教授惠赠;重组 MOMP 蛋白由作者前期构建。EcoR I 和 Hind III 限制性内切酶购自 fermentas 公司;DNA 提取及纯化试剂盒购于北京天根公司;质粒提取试剂盒购自 Omega 公司。试验动物: BALB/c 雌性小鼠,6~8 周龄,SPF 级,体质量约 18 g,购自北京维通利华实验动物有限公司,动物合格证号:0239997。

1.2 方 法

1.2.1 Lp 基因组 DNA 的提取 参考 DNA 提取试剂盒操作步骤进行。

1.2.2 Lp *momp* 基因的 PCR 扩增 根据 Pub Med 相关文献的 *momp* 基因序列,设计并合成引物,分别在 5'端加上 EcoR I 和 Hind III 内切酶位点。上游 5'-ATA ATA TAG GAA TTC GGT ACG ATG GGT CCA GTA TG-3',下游 5'-CCC AAG CTT TTA GAC ATT GCC AAC ATA TTT TAA GC-3'。PCR 扩增体系:基因组 DNA 1 μ L,上、下游引物各 1 μ L, Taq mix 25 μ L,无 RNA 酶水 22 μ L。扩增条件:95 $^{\circ}$ C 预变性 5 min;95 $^{\circ}$ C 变性 30 s;48 $^{\circ}$ C 退火 45 s;72 $^{\circ}$ C 延伸 1.5 min;30 个循环;72 $^{\circ}$ C 总延伸 7 min。

1.2.3 提取质粒 pEGFP-C1 按照质粒提取试剂盒操作步骤提取质粒 pEGFP-C1。

1.2.4 *momp* 重组质粒的构建 用 EcoR I 和 Hind III 对扩增的 *momp* 基因和载体 pEGFP-C1 进行双酶切,在 16 $^{\circ}$ C 下进行连接,转化于制备好的感受态细胞,均匀涂布于含卡那霉素的 LB 固体培养基,37 $^{\circ}$ C 培养 12 h。

1.2.5 阳性重组克隆的筛选、鉴定 将单个菌落接种于含有卡那霉素的 LB 培养液中,培养并提取质粒,用 Hind III 和 EcoR I 进行单、双酶切鉴定。以酶切鉴定阳性的重组质粒为

模板,扩增后电泳观察。

1.2.6 重组质粒序列测定 取鉴定阳性的重组质粒菌体,送上海生工生物技术公司进行测序。

1.2.7 转染 将鉴定正确的含重组 GFP-*momp*、空质粒 pEGFP-C1 的单个菌落增菌,按试剂盒说明书提取无内毒素质粒用于转染。同时将处于对数期的 NIH3T3 细胞种于 24 孔细胞培养板,每孔约 1×10^6 个,培养至细胞达板底面积 80% 时用于转染。试验分正常 NIH3T3 细胞组、空质粒 PEGFP-C1 组、重组 GFP-*momp* 组。

1.2.8 重组质粒在细胞中的筛选及表达 转染 48 h 后用 300 μ g/mL 的 G418 进行筛选,并于 72 h 后检测 GFP-*momp* 在细胞中的瞬时表达。

1.2.9 动物免疫 取 BALB/c 雌性小鼠 60 只,平均分为 4 组,即 PBS 组(A 组)、空质粒 pEGFP-C1 组(B 组)、DNA 疫苗组(C 组)、联合疫苗组(D 组)。采用肌肉注射法进行免疫接种。第 1 周 A 组每只小鼠注射 PBS 50 μ L, B 组每只注射空质粒 pEGFP-C1 50 μ g, C 组注射重组质粒 GFP-*momp* 50 μ g, D 组注射重组质粒 GFP-*momp* 50 μ g;第 14 天各组相同剂量追加免疫一次;第 21 天 A、B、C 组用相同剂量追加免疫 1 次, D 组注射 10 μ g 纯化的 MOMP 蛋白。

1.2.10 用间接 ELISA 检测血清中特异性抗体 取免疫后第 14、21、28 天每组各 5 只小鼠,眼部采血,以纯化后 MOMP 蛋白作为包被抗原。测定血清中抗原特异性抗体水平,并设阴性对照孔。若阳性对照孔平均 OD 值/阴性对照孔平均 OD 值大于 2.1 则判断为阳性,出现阳性反应的待测血清最高稀释度即为抗体滴度。

1.2.11 检测细胞免疫反应 开始免疫后第 14、21、28 天,每组分别取 5 只小鼠,无菌条件下取出脾脏,制成细胞悬液。细胞活性大于 95% 以上备用。

1.2.12 检测淋巴细胞增殖活性(MTS 法) 调整脾淋巴细胞浓度至 1×10^6 /mL,100 μ L/孔加到 96 孔板,分别加 ConA(终浓度 5 μ g/mL),并设对照孔(不加 ConA)。每只小鼠 3 个复孔,在 37 $^{\circ}$ C,5% CO₂ 孵箱中培养 72 h。吸取 20 μ L 的 CellTiter 96[®] Aqueous 试剂到含有 100 μ L 培养液的细胞中培养 4 h。测量 OD 值。计算刺激指数(SI)作为淋巴细胞增殖程度的指标。SI=试验孔 OD 值/对照孔 OD 值的均值

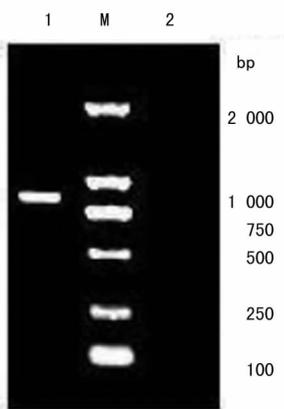
1.2.13 细胞毒性 T 淋巴细胞(CTL)杀伤活性检测(LDH 法) 以重组 GFP-*momp* 转染出的阳性细胞作为检测 CTL 杀伤活性的靶细胞。PBS 组、空质粒组、重组 GFP-*momp* 组、GFP-*momp*/MOMP 蛋白组小鼠脾淋巴细胞作为效应细胞。调整效应细胞与靶细胞的细胞数之比为 10:1,并设效应细胞、靶细胞对照孔及空白对照孔,均设 3 个平行孔。同时设靶细胞 LDH 自然释放孔,靶细胞+100 μ L RPMI1640;靶细胞 LDH

差异最大释放孔,靶细胞+90 μL RPMI1640+10 μL 裂解液;效应细胞 LDH 自然释放孔,100 μLRPMI1640 的效应细胞。37 °C 孵育 4 h。加入相应底物 50 μL,避光孵育 30 min。加 50 μL 终止液,测量 490 nm 处的 OD 值。

1.3 统计学处理 采用 SPSS18.0 软件进行统计分析,计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,各组间差异比较采用单因素方差分析,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

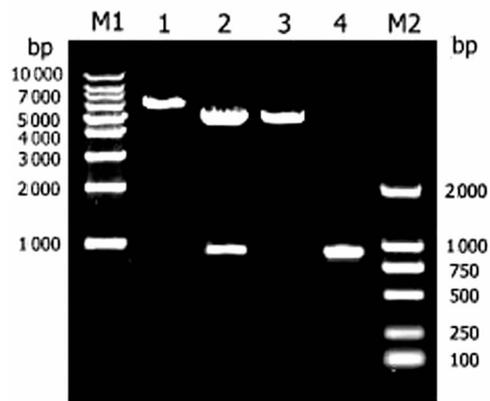
2.1 重组质粒 GFP-momp 的 PCR 扩增结果 用引物对重组 GFP-momp 进行扩增,得到约 800 bp 大小的产物(图 1)。



注:M 为 DL2000 marker;1 为 PCR 产物;2 为阴性对照。

图 1 GFP-momp 基因的 PCR 扩增产物

2.2 GFP-momp 的酶切鉴定 用 HindIII 对质粒单酶切,得到 5 500 bp 左右的产物;用 BamHI 和 HindIII 进行双酶切,同一泳道出现 4 700 bp 和 800 bp 两种产物,并与 pEGFP-C1 空质粒及 momp 基因位置相一致(图 2)。



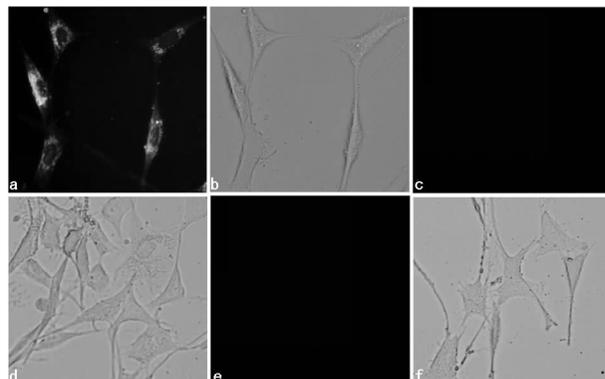
注:M1 为 1kb marker;1 为 HindIII 单酶切 GFP-momp 产物;2 为 HindIII 和 EcoRI 双酶切 GFP-momp 产物;3 为 HindIII 单酶切 pEGFP-C1 产物;4 为 PCR 产物;M2 为 DL2000 marker。

图 2 重组质粒 GFP-momp 的酶切结果

2.3 荧光显微镜下观察结果 在荧光显微镜下发现被重组质粒 GFP-momp 转染的 NIH3T3 胞浆中有较强的绿色荧光,同一视野下可见清晰的细胞形态,证实重组质粒 GFP-momp 转染成功。同时空质粒 pEGFP-C1 转染的细胞和正常细胞对照组均未见绿色荧光(图 3)。

2.4 小鼠体内抗原特异性抗体滴度检测 见表 1。开始免疫后第 14、21、28 天小鼠内眦采血分离血清,采用 ELISA 测定血清中抗原特异性抗体水平。检测结果显示,A 组和 B 组比较

差异无统计学意义($P > 0.05$),且 A、B 两组组内分析后差异也无统计学意义($P > 0.05$)。C 组和 D 组滴度大于 B 组,差异有统计学意义($P < 0.05$);D 组比 C 组抗体水平高,差异有统计学意义($P < 0.05$),且 C 组和 D 组组内分析显示,随免疫时间延长,抗体滴度也随之增大,差异有统计学意义($P < 0.05$)。



注:a 为重组质粒 GFP-momp 转染的 NIH3T3 细胞的表达(荧光);b 为重组质粒 GFP-momp 转染的 NIH3T3 细胞的表达(普光);c 为空质粒 pEGFP-C1 转染的 NIH3T3 细胞(荧光);d 为空质粒 pEGFP-C1 转染的 NIH3T3 细胞(普光);e 为正常细胞对照组(荧光);f 为正常细胞对照组(普光)。

图 3 荧光显微镜检测重组质粒 GFP-momp 在 NIH3T3 细胞中的表达

表 1 4 组开始免疫后第 14、21、28 天小鼠特异性抗体滴度检测结果($\bar{x} \pm s, n=3$)

组别	第 14 天	第 21 天	第 28 天
A 组	0.32 ± 0.01	0.36 ± 0.03	0.42 ± 0.04
B 组	0.44 ± 0.04	0.48 ± 0.02	0.52 ± 0.02
C 组	1.23 ± 0.12*	1.53 ± 0.20*	1.82 ± 0.10*
D 组	1.52 ± 0.05*#	1.97 ± 0.06*#	2.13 ± 0.02*#

注:与 B 组比较,* $P < 0.05$;与 C 组比较,# $P < 0.05$ 。

2.5 用 MTS 法检测淋巴细胞增殖活性 SI 值 见表 2。开始免疫后第 14、21、28 天动态检测结果显示,A 组和 B 组淋巴细胞增殖活性 SI 值比较,差异无统计学意义($P > 0.05$),且 A、B 两组组内分析后差异也无统计学意义($P > 0.05$)。C 组和 D 组均高于 B 组,差异有统计学意义($P < 0.05$);D 组比 C 组活性高,差异有统计学意义($P < 0.05$),且 C 组和 D 组组内分析显示,随免疫时间延长,增殖活性 SI 值随之增大,差异有统计学意义($P < 0.05$)。

表 2 4 组开始免疫后第 14、21、28 天小鼠淋巴细胞增殖活性($\bar{x} \pm s, n=3$)

组别	第 14 天	第 21 天	第 28 天
A 组	1.49 ± 0.01	1.52 ± 0.01	1.54 ± 0.01
B 组	1.52 ± 0.01	1.56 ± 0.05	1.55 ± 0.07
C 组	1.87 ± 0.01*	1.75 ± 0.03*	2.03 ± 0.01*
D 组	2.14 ± 0.04*#	2.46 ± 0.02*#	2.67 ± 0.08*#

注:与 B 组比较,* $P < 0.05$;与 C 组比较,# $P < 0.05$ 。

2.6 CTL 杀伤活性检测 见表 3。开始免疫后第 14、21、28 天,检测 CTL 杀伤活性,检测结果显示,A 组和 B 组比较,差异

无统计学意义($P>0.05$),且 A、B 两组组内分析后差异也无统计学意义($P>0.05$)。C 组和 D 组杀伤活性大于 B 组,差异有统计学意义($P<0.05$);D 组比 C 组杀伤活性高,差异有统计学意义($P<0.05$),且 C 组和 D 组组内分析显示,随免疫时间延长,杀伤活性也随之增大,差异有统计学意义($P<0.05$)。

表 3 4 组开始免疫后第 14、21、28 天小鼠 CTL 杀伤活性($\bar{x}\pm s, n=3, \%$)

组别	第 14 天	第 21 天	第 28 天
A 组	5.23±0.02	5.52±0.05	6.05±0.06
B 组	6.45±0.04	6.78±0.04	7.15±0.06
C 组	67.58±0.03*	69.74±0.04*	73.91±0.03*
D 组	71.12±0.05*#	75.32±0.04*#	79.51±0.03*#

注:与 B 组比较,* $P<0.05$;与 C 组比较,# $P<0.05$ 。

3 讨 论

细菌的外膜蛋白(OMP)在细菌致病过程中起重要作用,因为其不仅可刺激体液免疫,也可刺激细胞免疫,显示了良好的免疫原性^[3]。目前,军团菌疫苗中的 DNA 疫苗作为第 3 代疫苗已引起人们的广泛关注,且 DNA 疫苗具有容易获取,使用安全,保存容易等优点,还可以用其他疫苗来加强免疫效果。目前美国食品药品监督管理局批准 HIV、埃博拉病毒、疟疾等多种 DNA 疫苗进入临床试验^[4]。核酸疫苗引发的免疫应答相对较弱,尤其在大动物及人体内不足以引起足够的免疫保护效果^[5]。所以研究发现了多种提高核酸疫苗免疫效果的方法,其中用一种疫苗进行初始免疫,再用另一种或多种不同类型的疫苗进行加强免疫,即 Prime-Boost 免疫策略通常会比单一疫苗更强的免疫反应,特别是能产生更强的细胞免疫应答^[6]。在诱导细胞免疫应答方面有比较好的作用,并显示了很好的应用前景。本研究将所构建的重组质粒 GFP-*momp* 作 DNA 疫苗及重组质粒 pET-*momp* 表达的蛋白作为蛋白疫苗,对小鼠进行免疫,检测其体内细胞免疫、体液免疫的相关性指标,结果初步分析表明,使用不同的免疫策略,产生的免疫应答方式和强度有所不同。C、D 两组抗体滴度水平均高于 A、B 两组,说明 C、D 两组均能产生较好的特异性抗体;但 D 组抗体水平只略高于 C 组,这可能是由于 D 组与 C 组相比只进行了一次蛋白免疫;C、D 两组在动态监测抗体水平的情况下,组内也有差异,推测该值随时间增加抗体也会增加,这与 Ferraz 等^[7]所得结果一致。然而,细胞免疫应答方面的结果却有所不同,C、D 两组细胞免疫水平均高于 A、B 两组,说明 C、D 两组均能产生较好的细胞免疫;但是与 C 组相比较,D 组细胞免疫水平明显高于 C 组,分析其原因可能是因为二者采用了不同的免疫方法,前者为单一的 DNA 免疫,后者为 Prime-Boost 免疫策略;且 C、D 两组组内同一时间点的数据水平也随免疫时间增加而相应提高。以上结果与 Prime-Boost 策略的基本原理相符,且与 Ferraz 等^[7]采用表达结核杆菌 Apa(富含丙氨酸-脯氨酸的抗原)、Hsp 65 和 Hsp 70 的 DNA 疫苗初次免疫、卡介苗加强的策略免疫小鼠及 Belyakov 等^[8]用 DNA 疫苗初次免疫、重组 MVA 病毒加强免疫研究初次免疫-加强免疫策略结果一致。同时,张璐等^[9]在 DNA 疫苗和蛋白疫苗联合免疫对 HIV 包膜蛋白 gp120 体液免疫的影响中证实, DNA 和蛋白疫苗共

同免疫有利于提高艾滋病疫苗诱导的抗体反应水平。另外,其他一些研究小组结果也显示 Prime-Boost 策略可以明显提高疫苗的保护效果^[10-11]。Lp 作为一种胞内寄生菌,其感染机体后产生的免疫应答主要是细胞免疫,结果显示 Prime-Boost 策略能产生较好的细胞免疫应答,有助于胞内菌的预防。

本研究结果表明,以 Prime-Boost 免疫策略为依据的 DNA 疫苗初次免疫,蛋白疫苗加强免疫的方法使 Lp 感染后的抗体水平有所提高,对淋巴细胞增殖活性和 CTL 杀伤活性也明显提高。

因此,*momp* 基因制备的 DNA 疫苗对小鼠有免疫原性,为 Lp 有效疫苗的研究提供了理论依据及应用价值。

参 考 文 献

- [1] 叶丹,刘凡,张宝莹,等.综合医院肺炎病人血清中嗜肺军团菌抗体调查[J].环境卫生学杂志,2015,4(4):331-335.
- [2] Lau R, Maqsood S, Harte D, et al. Prevalence of legionella strains in cooling towers and legionellosis cases in New Zealand[J]. J Environ Health, 2013, 75(6):82-89.
- [3] Shin S. Innate immunity to intracellular pathogens: lessons learned from legionella pneumophila[J]. Adv Appl Microbiol, 2012, 79(1):43-71.
- [4] 郭瑞敏.犬传染性肝炎 DNA 疫苗安全性研究[D].石家庄:河北医科大学,2008.
- [5] 王琳. NAD 与氢氧化铝/锌复合佐剂对 HBsAg 免疫效果的影响[D].北京:北京协和医学院,2012.
- [6] Garrone P, Fluckiger AC, Mangeot PE, et al. A prime-boost strategy using virus-like particles pseudotyped for HCV proteins triggers broadly neutralizing antibodies in macaques[J]. Sci Transl Med, 2011, 3(94):94ra71.
- [7] Ferraz JC, Stavropoulos E, Yang M, et al. A heterologous DNA priming-Mycobacterium bovis BCG boosting immunization strategy using mycobacterial Hsp70, Hsp65, and Apa antigens improves protection against tuberculosis in mice[J]. Infect Immun, 2004, 72(12):6945-6950.
- [8] Belyakov IM, Berzofsky JA. Immunobiology of mucosal HIV infection and the basis for development of a new Generation of mucosal AIDS vaccines [J]. Immunity, 2004, 20(3):247-253.
- [9] 张璐,刘源,张冬月,等. DNA 疫苗和蛋白疫苗联合免疫对 HIV 包膜蛋白 gp120 体液免疫的影响[J].江苏医药, 2015, 41(17):1987-1990.
- [10] 黄恋,彭波,李小曼,等. H9N2 禽流感病毒 M2DNA 疫苗初免-蛋白加强免疫的保护效果研究[J].激光生物学报, 2012, 21(5):441-445.
- [11] 刘秉春,崔新洁,罗新松,等.核酸疫苗初免-蛋白疫苗加强的免疫策略提高日本血吸虫核酸疫苗免疫效果[J].生物工程学报, 2013, 29(6):814-822.

(收稿日期:2016-01-28 修回日期:2016-03-22)