

人 tPA 信号肽和 *Yersinia pestis* 保护性抗原 F1-V 融合基因的构建及其免疫效果观察

韩岳^{1)*}, 王希良²⁾, 董梅²⁾, 邢丽²⁾, 赵光宇²⁾, 刘秀华¹⁾

(¹⁾ 解放军总医院病理生理学研究室, 北京 100853; ²⁾ 军事医学科学院微生物流行病学研究所, 北京 100071)

摘要 为获得含有鼠疫 F1 和 V 抗原编码基因, 以及人 tPA 信号肽基因的重组质粒 *tPA*-pVAX1/F1-V, 测定其诱导特异性免疫应答的能力, 用 PCR 扩增鼠疫菌 F1 和 V 编码基因, 分别与 pGEM-T 连接测序. 构建 pVAX1/F1-V 融合重组质粒, PCR 扩增 tPA 信号肽片段, 并将其插入到 F1-V 的上游, 构建 *tPA*-pVAX1/F1-V 融合重组质粒; 转染 COS-7 细胞, Western 印迹法鉴定目的蛋白的表达, 重组质粒 *tPA*-pVAX1/F1-V 加 GM-CSF 佐剂免疫 BALB/c 小鼠, 观察免疫效果. 400 个 LD₅₀ 强毒鼠疫菌皮下攻毒观察保护率. 结果表明, *tPA*-pVAX1/F1-V 在 COS-7 细胞中表达; 免疫鼠体内产生特异性抗体; 抗体亚型分析、细胞因子等指标的测定表明, 所构建 DNA 疫苗以诱发 Th1 型免疫为主; (攻毒保护率达 90 %). 结果提示, 已成功构建 F1-V 融合蛋白真核表达载体 *tPA*-pVAX1/F1-V, 它具有诱导特异性细胞免疫和体液免疫应答的能力, 对强毒鼠疫菌皮下攻毒有一定的保护效力, 为鼠疫菌新型疫苗研制奠定了基础.

关键词 鼠疫杆菌; F1-V 抗原; 基因融合双价疫苗; tPA 信号肽

中图分类号 R378.9

Construction and Immunogenicity of Fused Gene Containing Protective Antigen F1-V of *Yersinia pestis* and Signal Peptide of Human tPA

HAN Yue^{1)*}, WANG Xi-Liang²⁾, DONG Mei²⁾, XING Li²⁾, ZHAO Guang-Yu²⁾, LIU Xiu-Hua¹⁾

(¹⁾ Department of Pathophysiology, Chinese PLA General Hospital, Beijing 100853, China;

²⁾ Institute of Microbiology and Epidemiology, Academy of Military Medical Sciences, Beijing 100071, China)

Abstract To construct recombinant eukaryotic expression vector *tPA*-pVAX1/F1-V based on the coding-gene of F1-V antigen and signal of tPA and then study its immunogenicity, *Yersinia pestis* F1-V gene was amplified from EV76 line by PCR. They were inserted into the eukaryotic expression vector pVAX1, tPA signal encoding sequence was amplified by PCR and then inserted to the 5'-terminus of F1-V to construct secretion eukaryotic expression vector *tPA*-pVAX1/F1-V. Then the recombinant plasmid was injected into BALB/c mice via an intramuscular route together with plasmid DNA carrying GM-CSF gene. Mice were challenged via subcutaneous injection of virulent *Yersinia pestis* 10 days after the fourth immunization and observed twice daily for morbidity and mortality. *tPA*-pVAX1/F1-V recombinant plasmid was successfully constructed. Western blot analysis indicated that F1-V fusion protein was expressed in COS-7 cells. Animals immunized with the recombinant plasmid induced antigen specific antibody. Furthermore, the recombinant plasmid induced typical Thelper 1-dominated immune response as determined by immunoglobulin G isotype and cytokine analysis. It was able to induce a effective immuno-protection against subcutaneous challenge of virulent *Yersinia pestis* with 400 LD₅₀, the survival rate was 90 %. *tPA*-pVAX1/F1-V can induce both humoral and cellular immune response, it could be used as potential candidate vaccine for the control of *Yersinia Pestis*.

收稿日期: 2006-03-21, 接受日期: 2006-07-25

* 联系人 Tel: 010-66939774; E-mail: hanyizhe@sina.com

Received: March 21, 2006; Accepted: July 25, 2006

* Corresponding author Tel: 010-66939774; E-mail: hanyizhe@sina.com

Key words *Yersinia pestis*; F1-V antigen; bivalent genetic fusion vaccine; tPA signal

鼠疫杆菌 (*Yersinia pestis*) 是腺鼠疫、败血症鼠疫和肺鼠疫的自然疫源性病原, 曾经以“瘟疫”的形式给人类的健康造成了极大的危害. WHO 公布的数据显示, 现在每年全球有 2 000 多例鼠疫病例报告^[1], 国内也时有鼠疫病例报道. 由于生物恐怖袭击事件的发生, 世界各国对鼠疫都已高度警惕. 恐怖袭击常采用气溶胶感染, 可直接引起原发性肺鼠疫流行, 因而更需要研究安全有效的鼠疫疫苗. 传统的鼠疫疫苗包括灭活疫苗、减毒活疫苗^[2]. 虽然灭活疫苗在预防腺型鼠疫有一定效果, 但对肺型鼠疫无效; 减毒活疫苗又具有潜在的毒性. 近年来, 由于 DNA 疫苗能够诱导出较好的体液免疫和细胞免疫, 而日益受到重视^[3]. 本研究选取鼠疫的鼠疫荚膜抗原 F1 蛋白和表面抗原 V 蛋白的编码基因, 以及人 tPA 信号肽为研究对象, 构建了分泌型融合双价真核表达质粒 *tPA*-pVAX1/F1-V, 在 COS-7 细胞中进行了表达, 并以 pUMC1-mGM-CSF 为佐剂制备 F1-V 融合双价基因疫苗, 免疫 BALB/c 小鼠, 测定其诱导的体液免疫和细胞免疫水平, 鼠疫菌标准强毒株攻毒测定保护效力, 获得阶段性结果.

1 材料与方法

1.1 试剂

各种限制性内切酶等均购自大连宝生物公司; Lipofectamine™ 2000 等购自 Invitrogen 公司; 测抗体亚型的 ELISA 试剂盒购自美国 BETHYL 公司; ELISPOT 试剂盒购自 DIACLONE 公司.

1.2 质粒, 细菌, 细胞及动物

鼠疫 EV76 株 cDNA 为本室保存; 真核表达载体 pVAX1 购自 Invitrogen 公司; 鼠疫菌标准强毒株 (141 株) 为青海省地方病预防控制所保藏; 重组蛋白 pET32a/F1-V 为本室表达; pUMC1-mGM-CSF 重组质粒由第三军医大学免疫学研究所倪兵博士惠赠; COS-7 细胞为本室保存; 6 周龄雌性 BALBc 小鼠由军事医学科学院动物中心提供 (动物合格证号: 0006036).

1.3 PCR 扩增目的片段及重组载体的构建

1.3.1 引物 根据 GenBank 登录的 F1、V 蛋白编码基因序列, 利用 Primer3 在线设计引物, F1 引物为 P1: 5'-GCAAGCTTATGAAAAAATCAGTTC-3', P2: 5'-CGGAA TTCTTGTTAGATACGGT-3', 酶切位点分别为 Hind 和 EcoR. V 的引物为 P3: 5'-CGGAA TTC

ATTAGAGCCTACGAA-3', P4: 5'-ATTT GCGGCCGCTCA TTTACCA GACGTGICA-3'. 酶切位点斜体分别为 EcoR 和 Not, F1 的下游去掉终止密码子 TAA. 由于 tPA 信号肽基因只有 69 bp, 所以采用 PCR 方法直接扩增, 上下游两条引物互为模板. 引物分别为 P5: ACTGA GCTA GCATGGATGCAATGAA GAGAGGGCT CTGCTGTGTGCTGCTGCTGTGTGG, P6: TGA GCAAGCTT GCTGGGCGAAACGAA GACTGCTCCACACAGCAGCAGC ACACAGCAGAG. 酶切位点斜体分别为 Nhe 和 Hind.

1.3.2 目的基因扩增及序列测定 以鼠疫菌 EV76 株 cDNA 为模板进行 PCR. 反应条件为 94 预变性 5 min, 94 1 min, 53 1 min, 72 45 s, 30 个循环, 72 延伸 10 min 后结束, 琼脂糖凝胶电泳纯化回收后与 pGEM-T 载体连接, 常规转化, 蓝白斑筛选, 菌落 PCR 及提质粒双酶切鉴定, 将含目的片段的质粒 DNA 送 TaKaRa 公司测序. tPA 信号肽上下游两条引物互为模板直接 PCR 扩增, 反应条件为 94 5 min, 94 30 s, 68 30 s, 72 45 s, 循环 20 次, 72 延伸 10 min 结束.

1.3.3 重组质粒 *tPA*-pVAX1/F1-V 的构建 将测序正确的 F1 片段双酶切后分别与同样经过双酶切的 pVAX1 载体连接, 构建重组质粒 pVAX1/F1, 然后在 F1 下游插入 V 片段构建融合重组质粒 pVAX1/F1-V, 然后把扩增的 tPA 信号肽片段插入 F1 片段的上游, 构建分泌型双价真核表达质粒 *tPA*-pVAX1/F1-V, 重组质粒转化 DH5, 挑克隆经菌落 PCR, 双酶切鉴定为阳性克隆, 保种待用.

1.4 重组质粒转染 COS-7 细胞

重组质粒 pVAX1/F1-V 和 *tPA*-pVAX1/F1-V 过滤除菌, 将处于指数生长期的 COS-7 细胞接种于 6 孔细胞培养板中 (孔内预先放置无菌盖玻片), 细胞生长至 80% 铺满盖玻片, 加入用无双抗无血清的 DMEM 配制的脂质体-重组质粒混合物 (2.5, 质粒终浓度为 4 mg/L), 37, CO₂ 温箱中培养 6 h, 弃细胞上清液, 加入含 10% 胎牛血清的 DMEM, CO₂ 温箱中继续培养 48 h.

1.5 WB 免疫印迹法测定重组质粒在细胞中的表达

转染细胞培养 48 h 后, 收集细胞, PBS 洗 2 遍后加入 100 μl 裂解液反复冻融后离心取上清, SDS-PAGE, 切胶转膜, 0.65 mA/cm² 电转 1.5 h, 以鼠疫杆

菌免疫血清为一抗,HRP 标记羊抗兔 IgG 为二抗,DAB 显色。

1.6 重组质粒免疫动物

大量提取重组质粒调其浓度为 2 mg/ml,6 周龄雌性 BALB/c 小鼠随机分为 PBS 对照组、pVAX1/F1-V 和 tPA-pVAX1/F1-V 实验组,每组 10 只。小鼠后腿股四头肌注射 25% 蔗糖溶液 100 μ l,15 min 后于实验组注射部位注射重组质粒和佐剂 GM-CSF 混合物(重组质粒:GM-CSF 为 1:1)100 μ l/只,对照组注射 100 μ l PBS,14 d 后加强免疫 1 次,共 4 次。

1.7 重组质粒免疫动物后的免疫学评价

1.7.1 ELISA 检测血清抗体水平 每次免疫后第 10 d 断尾取血,收集血清,F1-V 重组融合蛋白包被酶联板,1:100 倍比稀释血清,37 $^{\circ}$ C 温育 1 h 后洗涤,加 HRP 标记的酶标二抗,37 $^{\circ}$ C 温育 40 min 后洗涤,TMB 显色,酶标仪 450 nm 波长处测 A 值。

1.7.2 抗体亚型分类 重组蛋白 pET32a/F1-V 包被酶联板,末次加强免疫后血清为一抗,其余按试剂盒操作说明书测特异性 IgG1 和 IgG2a,450 nm 波长处测 A 值。

1.7.3 ELISPOT 法检测小鼠脾淋巴细胞分泌 IFN- γ 的能力 末次免疫后 10 d 处死小鼠,无菌取脾,常规制备免疫小鼠脾淋巴细胞,调整细胞浓度为 2×10^6 ,接种至 96 孔板中,100 μ l/孔,设阴性对照组及纯化的鼠疫重组蛋白的实验孔(10 μ l/孔,终浓度 10 μ g/ml),每组 3 个复孔。实验过程按试剂盒操作说明进行,美国 CTL 公司 Immunospot Analyze Series 2 斑点记数仪记数斑点,分析结果。

1.8 攻毒实验

6 周龄雌性 BALB/c 小鼠随机分为 PBS 对照组、pVAX1 空载体组、pVAX1/F1-V 和 tPA-pVAX1/F1-V 实验组,每组 10 只。动物末次免疫后 10 d,进行攻毒实验,实验组和空载体对照组用 400 个 LD_{50} 强毒鼠疫菌进行小鼠腹股沟皮下注射,PBS 对照组用 2 个 LD_{50} 强毒鼠疫菌相同部位注射。观察记录 25 d 内的动物死亡情况。死亡动物取心、肝、脾、肺、肾、淋巴结等器官,进行细菌分离检测。

1.9 统计学分析

用 SPSS11.0 软件进行统计分析,数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,各组间差异用方差分析。

2 结果

2.1 tPA 信号肽编码序列和 F1、V 蛋白编码基因片段的扩增及重组表达载体的构建

PCR 产物经电泳证实扩增的 F1 片段约为 510 bp,V 片段约为 981 bp,tPA 信号肽约 69 bp,与预期的产物大小相同。F1、V 片段与 T 载体连接后转化,阳性克隆测序结果和 GenBank 公布的序列完全一致。将测序正确的目的片段分别与真核表达载体 pVAX1 连接,转化后双酶切鉴定,切下相应的目的片段,证实目的片段正确插入,成功构建 tPA-pVAX1/F1-V。

2.2 Western 免疫印迹检测重组蛋白的表达

结果显示,重组质粒转染 COS-7 细胞所表达蛋白与鼠疫杆菌免疫血清特异性结合,而转染空载体 pVAX1 的 COS-7 细胞蛋白不与鼠疫杆菌免疫血清结合(Fig. 1)。

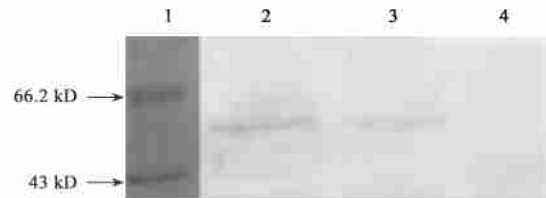


Fig. 1 Western blot analysis of the pVAX1/F1-V and tPA-pVAX1/F1-V antigen expression

1. Protein molecular marker; 2. pVAX1/F1-V;
3. tPA-pVAX1/F1-V; 4. pVAX1 control

2.3 小鼠血清总 IgG 水平的测定

免疫鼠血清用间接 ELISA 法测定抗体水平。结果显示,初次免疫后 10 d 实验组小鼠血清可检测到特异性抗体产生,加强免疫 3 次后抗体水平均明显升高。tPA-pVAX1/F1-V 和 pVAX1/F1-V 实验组抗体水平显著高于 PBS 对照组($P < 0.001$)(Fig. 2);tPA-pVAX1/F1-V 组和 pVAX1/F1-V 相比,抗体水平均有升高,尤其初次免疫后 tPA-pVAX1/F1-V 组抗体水平显著高于 pVAX1/F1-V 组($P < 0.05$)(Fig. 3)。

2.5 抗体亚型分类

抗体亚类分析结果显示 pVAX1/F1-V 组和 tPA-pVAX1/F1-V 组 IgG1 水平均高于 IgG2a 水平,但 tPA-pVAX1/F1-V 组 IgG2a 的水平比 pVAX1/F1-V 组有了显著提高(Fig. 4)。

2.6 ELISPOT 检测可分泌 IFN- γ CD8 $^{+}$ T 淋巴细胞

结果显示实验组形成的斑点数(SFC)显著多于 PBS 对照组($P < 0.01$),其中 tPA-pVAX1/F1-V 组形成的 SFC 为 268 ± 22 个,明显多于 pVAX1/F1-V 组的 162 ± 18 个($P < 0.01$)(Fig. 5)。

2.7 保护率测定

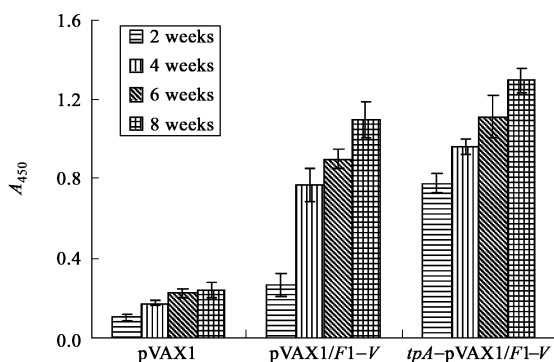


Fig. 2 *Y. pestis* antigen-specific IgG responses in sera of DNA vaccines immunized BALB/c mice as measured by ELISA

Temporal mouse sera anti-F1-V IgG responses measured by ELISA A_{450} value 10 days following each DNA immunization

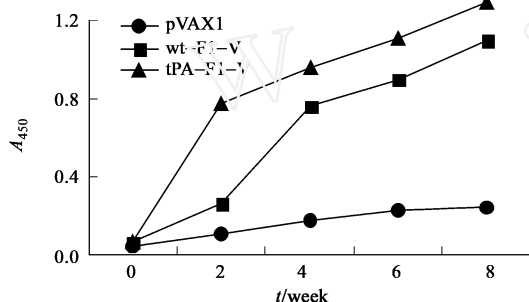


Fig. 3 Solid triangle: mouse group immunized with the tPA-pVAX1 /F1- V DNA vaccine

Solid square: mouse group immunized with the pVAX1 /F1-V DNA vaccine; Solid circle: mouse group received empty vector DNA

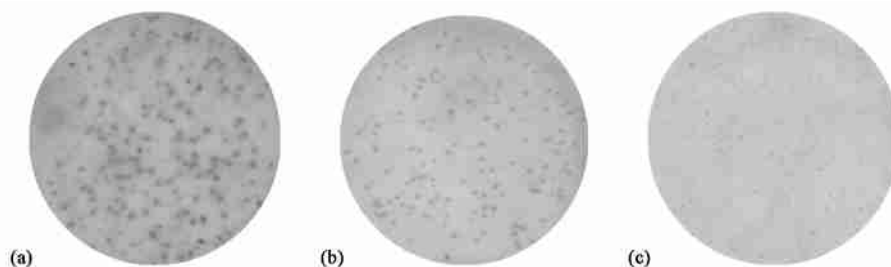


Fig. 5 Specific cytokine-secreting cells were determined by ELISPOT analysis

tPA-pVAX1 /F1-V group (a) induced more spots than pVAX1 /F1-V group (b) and pVAX1 control (c) ($P < 0.01$)

3 讨论

近年来的研究表明,鼠疫耶尔森氏菌的免疫保护性抗原主要由两种成分决定,一是鼠疫菌的荚膜蛋白抗原(Fraction1, F1)编码分子量约为15.5 kD的多肽。F1分子的毒性弱而抗原性强,并含有多个抗原决定簇,在体内具有抗细胞吞噬作用,可诱导机体产生荚膜抗体^[4]。有研究证明,当动物或人感染鼠疫

菌后,经3次加强免疫后,小鼠状况良好,体重正常增加,注射部位无脱毛、硬结等异常表现。强毒菌攻击后,PBS对照组和pVAX1空载体组攻毒后很快就可以观察到症状,如被毛直立,背部弓起,蜷缩,颤抖,呼吸困难无力,3~5 d内全部死亡。pVAX1/F1-V组有60%的动物存活,这些组别的动物在短期内出现的轻微症状并持续3~5 d。而tPA-pVAX1/F1-V组90%的动物存活,攻毒期间未见明显症状(Table 1)。所有死亡小鼠取脏器分离检测,从心、肝、脾、肺、肾、淋巴结等器官均分离到鼠疫菌毒素,说明为特异性死亡。

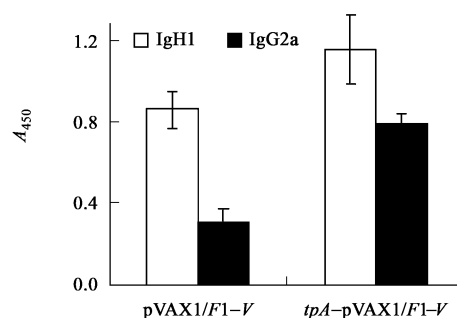


Fig. 4 Subtypes of anti-F1-V IgG in mouse sera raised by the pVAX1/F1-V or tPA-pVAX1/F1-V DNA vaccine as measured by the ELISA

The assay similar to the regular ELISA as in Fig. 4 except the second antibody used in this assay were purified anti-IgG1 or anti-IgG2a antibodies

菌后,F1可以在体内大量表达,起保护性抗原的作用^[5]。另一个是表面抗原V分子,编码分子量约38 kD的多肽。V抗原是鼠疫菌在低 Ca^{2+} 环境下分泌的蛋白^[6]。同样,V抗原具有毒性弱而抗原性强的特点,并合并有多个抗原决定簇,它除具有抗吞噬作用以外,还能促进鼠疫菌在单核细胞内繁殖,在分泌系统中起着重要的调节作用^[7]。由于F1和V是鼠疫菌的重要保护性抗原以及二者之间具有属间的保

守性,已成为鼠疫新型疫苗研制的首选保护性抗原分子.

Table 1 Survival of mice immunized with the recombinant plasmids or PBS control

DNA vaccine	Challenge dose (cfu)	Number of survived	Total number of animal	Survival (%)
Vector	10 000	0	10	0
PBS	100	0	10	0
pVAX1 / F1-V	10 000	6	10	60
tPA-pVAX1 / F1-V	10 000	9	10	90

2003 年, Grosfeld 等^[8]利用 F1 及其衍生物构建了核酸疫苗. 2004 年, Garmory 等^[9]利用 V 构建了核酸疫苗并对其进行优化后进行了免疫保护性研究. 我们也成功构建了 pVAX1/ F1、pVAX1/V 并对其免疫保护性进行了初步研究^[10]. Heath 等^[11]研究证明, F1-V 融合重组蛋白疫苗的效果至少和单独的 F1 和 V 蛋白混合在一起的效果是相同的, 说明这两种蛋白融合在一起并没有破坏各自的保护性抗原表位. 本课题组对我们成功构建的双价真核表达载体 pVAX1/ F1-V 和 pcDNATE/ F1-V 的研究也证实了这一点^[12,13].

DNA 疫苗虽然在许多动物模型中已证实可诱导针对多种病毒、细菌和寄生虫等的体液和细胞免疫应答, 但一个不争的事实是, DNA 疫苗所诱导的免疫应答不够理想. 因此如何进行优化以提高质粒 DNA 的免疫原性就成为当前 DNA 疫苗研究中的热点. 本研究主要从两方面对免疫方案和重组质粒的构建进行了优化. 其一是将含有 GM-CSF 的质粒作为分子佐剂与重组质粒混合进行共免疫, 二是在目的基因前插入 tPA 信号肽, 构建分泌型重组质粒. tPA 是一种分泌型的蛋白, 其成熟肽的上游有一长 23 氨基酸的信号肽, 研究证明, tPA 的信号肽序列可以有效促进异种蛋白的分泌^[14]. Lu 等^[15]研究证明, 一段适当的信号肽序列在哺乳动物细胞中可以通过增强可溶性抗原的表达而大大提高其抗体应答的水平. 他们把人组织纤溶酶原激活剂的信号肽序列构建到 HIV- gp120 蛋白的 N 末端, 从而大大增强了 gp120 的可溶性表达以及免疫原性. 我们通过重叠 PCR 方法扩增得到 tPA 的信号肽序列, 并将其分别构建到 pVAX1/ F1-V 的目的片段的上游, 从而得到分泌型重组质粒 tPA-pVAX1/F1-V.

本文中所构建的重组质粒在转染 COS-7 细胞后, 利用 Western 印迹方法可检测到具有免疫原性的

F1-V 融合蛋白的表达, 提示我们构建的重组质粒可有效的表达插入的外源蛋白. 考虑到基因疫苗的免疫原性较弱, 本研究选用了既能诱导细胞免疫又能激发体液免疫的小鼠集落刺激因子 (GM-CSF) 为佐剂, 共同免疫 BALB/c 小鼠, 初次免疫 10 d 后血清中就可以检测到特异性抗体, 加强免疫 3 次后总 IgG 水平明显升高, tPA-pVAX1/ F1-V 组抗体水平比同期的 pVAX1/ F1-V 组相对较高. 进一步的研究发现, tPA-pVAX1/ F1-V 组初次免疫的抗体水平就比较高, 达到 pVAX1/ F1-V 组 2 次甚至 2 次以上免疫的抗体水平, 说明 tPA 信号肽确实可以促进鼠疫保护性抗原的分泌性表达, 诱导表达的目的蛋白分泌到胞外, 引起较强的体液免疫应答.

抗体亚型分类结果显示, 免疫组小鼠 IgG1 与 IgG2a 之比 > 1, 说明 DNA 免疫组小鼠的特异性抗体是以 IgG1 为主^[16]. 但我们发现, tPA-pVAX1/ F1-V 组的 IgG2a 水平与其相应的 pVAX1/ F1-V 相比有了显著提高 ($P < 0.01$), 表明分泌型 tPA-pVAX1/ F1-V 疫苗免疫在机体内成功地增强了 Th1 型细胞免疫为主的免疫应答, 当然 GM-CSF 作为 Th1 型基因佐剂也促进了细胞免疫应答的产生. ELISPOT 方法由于可以定量检测对特异性抗原的 CTL 免疫应答而日益受到重视, 较传统的 ⁵¹Cr 释放法更为敏感^[17]. 本研究通过 ELISPOT 法检测了特异性活化的可以分泌 IFN- γ 的 CD8⁺ T 淋巴细胞数, 实验组小鼠形成的斑点数显著多于对照组 ($P < 0.01$), 体现了 DNA 疫苗的优势在于能够诱导出特异性细胞毒 T 细胞免疫应答. 本研究经攻毒试验证明, 重组质粒 tPA-pVAX1/ F1-V 确实有较好的免疫保护力, 4 次肌肉注射免疫后对 400 LD₅₀ P141 强毒株鼠疫菌皮下注射攻击产生 90% 的保护, 高于 pVAX1/ F1-V 组的 60%, 作为鼠疫核酸疫苗具有一定的应用前景, 但在疫苗的用量、投递系统、联合免疫以及安全性等方面还需要进一步摸索, 以期最大限度的激发免疫应答, 深入的研究正在进行之中.

参考文献 (References)

- [1] Titball R W, Williamson E D. Vaccination against bubonic and pneumonic plague[J]. Vaccine, 2001, 19(30): 4175-4184
- [2] Titball R W, Hill J, Lawton D G, et al. Yersinia pestis and plague[J]. Biochem Soc Trans, 2003, 31(P1): 104-107
- [3] Liu M A. DNA vaccine: a review[J]. J Intern Med, 2003, 253(4): 402-410
- [4] Du Y, Rosqvist R, Forskery A. Role of fraction 1 antigen of Yersinia pestis in inhibition of phagocytosis[J]. Infect Immun, 2002, 70(3):

- 1453-1460
- [5] Andrews G P, Heath D G, Andron GW, et al. Fraction 1 capsular antigen (F1) purification from *Yersinia pestis* CO92 and from an *Escherichia coli* recombinant strain and efficacy against total plague challenge[J]. *Infect Immun*, 1996, **64**(6) :2180-2187
- [6] Price SB, Leung KY, Barve SS, et al. Molecular analysis of *lcrGVH*, the V antigen operon of *Yersinia pestis*[J]. *J Bacteriol*, 1989, **171**(10) :5646-5653
- [7] Pettersson J, Holmstrom A, Hill J, et al. The V-antigen of *Yersinia* is surface exposed before target cell contact and involved in virulence protein translocation[J]. *Mol Microbiol*, 1999, **32**(5) :961-976
- [8] Grosfeld H, Cohen S, Bino T, et al. Effective protective immunity to *Yersinia pestis* infection conferred by DNA vaccine coding for derivatives of the F1 capsular antigen[J]. *Infect Immun*, 2003, **71**(1) : 374-383
- [9] Garmory H S, Freema D, Brown KA, et al. Protection against plague afforded by immunisation with DNA vaccines optimised for expression of the *Yersinia pestis* V antigen[J]. *Vaccine*, 2004, **22**(8) :947-957
- [10] 韩岳,王希良,何凤田,等. 鼠疫耶尔森氏菌核酸疫苗的构建及其免疫学评价. 免疫学杂志 (Han Yue, Wang Xi-Liang, He Feng-Tian, et al. Construction and immunological evaluation of DNA vaccine carrying *Yersinia Pestis* F1 and V gene in vaccinated mice [J]. *Immunol J*), 2005, **21**(6) :474-477
- [11] Heath D G, Anderson G W Jr, Mauro J M, et al. Protection against experimental bubonic and pneumonic plague by a recombinant capsular F1-V antigen fusion protein vaccine[J]. *Vaccine*, 1998, **16**(11-12) :1131-1137
- [12] 韩岳,王希良,董梅,等. 鼠疫菌重组质粒 pcDNATE/F1-V 的构建及其免疫效果的研究. 免疫学杂志 (Han Yue, Wang Xi-Liang, Dong Mei, et al. Construction of DNA vaccine carrying *Yersinia Pestis* F1-V gene and its immune response in vaccinated mice[J]. *Immunol J*), 2005, **21**(3) :208-211
- [13] 韩岳,王希良,何凤田,等. 鼠疫耶尔森菌重组质粒 pVAX1/F1-V 的构建及其免疫效果的研究. 中华微生物学和免疫学杂志 (Han Yue, Wang Xi-Liang, He Feng-Tian, et al. Construction and immunogenic study of recombinant plasmid pVAX1/F1-V of *Yersinia pestis*. *Chin J Microbiol Immunol*), 2005, **25**(10) :808-812
- [14] Ashok M S, Rangarajan P N. Protective efficacy of a plasmid DNA encoding Japanese encephalitis virus envelope protein fused to tissue plasminogen activator signal sequences: studies in a murine intracerebral virus challenge model[J]. *Vaccine*, 2002, **20**(11-12) : 1563-1570
- [15] Lu S, Manning S, Arthos J. Antigen Engineering in DNA Immunization. In: Lowrie D B, Whalen R G, R. Eds. *Methods in Molecular Medicine*, Vol 29. Totowa, NJ: Human Press Inc. 1998, 355-374
- [16] Fomsgaard A, Nielsen H V, Nielsen C, et al. Comparisons of DNA-mediated immunization procedures directed against surface glycoproteins of human immunodeficiency virus type- and hepatitis B virus[J]. *APMIS*, 1998, **106**(6) :636-646
- [17] Schnittel A, Keiholz U, Thiel E, et al. Quantification of tumor-specific T lymphocytes with the ELISPOT assay[J]. *J Immunother*, 2000, **23**(3) :289-295