

• 论著 •

## 电击介导新型结核分枝杆菌 DNA 疫苗的免疫效果初探

梁姗姗<sup>1,2</sup>, 裴杰灵<sup>3</sup>, 杨恩卓<sup>2</sup>, 王洪海<sup>4</sup>, 沈洪波<sup>2</sup>

1. 上海大学生命科学学院, 上海 200444; 2. 中国科学院上海巴斯德研究所, 上海 200031; 3. 日照第二实验中学, 日照 276800; 4. 复旦大学生命科学学院, 上海 200438

**摘要:**为提高 DNA 疫苗的体内转化效率,增强抗原的体内表达,本研究选用慢病毒来源的表达载体 pFUW 构建新型重组 DNA 质粒 pFUW-Ag85B-Rv3425。用重组质粒 DNA 对 C57BL/6 小鼠进行肌内免疫后,立即利用电脉冲核酸药物导入仪在 DNA 免疫部位施以电压的免疫策略,于第 3 次免疫 2 周后检测免疫效果。结果显示,新型重组 DNA 质粒 pFUW-Ag85B-Rv3425 在电击介导下能刺激机体产生更强烈的体液免疫反应,细胞免疫倾向于 Th1 型,显著增强 CD8<sup>+</sup> T 细胞和 CD27<sup>+</sup> B 细胞增殖。研究表明,电击介导重组 DNA 质粒 pFUW-Ag85B-Rv3425 免疫小鼠能增强免疫效果,有望成为新型的结核分枝杆菌疫苗免疫策略。

**关键词:**结核分枝杆菌;电穿孔;DNA 疫苗

### Effect of electroporation on immune response of pFUW-Ag85B-Rv3425 in C57BL/6 mice

LIANG Shan-Shan<sup>1,2</sup>, PEI Jie-Ling<sup>3</sup>, YANG En-Zhuo<sup>2</sup>, WANG Hong-Hai<sup>4</sup>, SHEN Hong-Bo<sup>2</sup>

1. School of Life Sciences, Shanghai University, Shanghai 200444, China; 2. Institut Pasteur of Shanghai, Chinese Academy of Sciences, Shanghai 200031, China; 3. Rizhao No. 2 Experimental Middle School, Rizhao 276800, China; 4. School of Life Sciences, Fudan University, Shanghai 200438, China

**Abstract:** A novel DNA vaccine pFUW-Ag85B-Rv3425 based on lentiviral vector pFUW was constructed to improve the transfection efficiency *in vivo*. The DNA injection combined with electroporation in C57BL/6 mice three times with two-week interval was conducted. After the last immunization, the mice were sacrificed. The spleen lymphocytes were isolated and analyzed by flow cytometry. The expression levels of IgG, IgG1, IgG2a, and interleukin 2 (IL-2) in serum were measured by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). The results showed that DNA injection in combination with electroporation could significantly improve humoral immunity, Th1-type immune response and CD8<sup>+</sup> T cell and CD27<sup>+</sup> B cell proliferation. The results indicated that DNA vaccine provided by a combination of injection with electroporation can be taken as a new therapy strategy against tuberculosis.

**Key words:** *Mycobacterium tuberculosis*; Electroporation; DNA vaccine

基金项目:国家自然科学基金(30901378),上海市自然科学基金(14ZR1444300)

通信作者:沈洪波

Corresponding author. SHEN Hong-Bo, E-mail: hbshen@ips.ac.cn

结核病是结核分枝杆菌 (*Mycobacterium tuberculosis*, *M. tuberculosis*)引起的重大传染病,严重危害人类健康。由于近 20 年来艾滋病的流行及人口流动性的增加,结核病流行重新加剧。据世界卫生组织 (World Health Organization, WHO) 估计,2014 年全球约有 900 万结核病患者,死亡 130 万例。中国是世界上 22 个结核病高负担国家之一,结核病患者数量位居世界第 2。因此,发展新型结核病防治措施及新型治疗方案迫在眉睫。

DNA 疫苗作为治疗型疫苗引起广泛关注<sup>[1,2]</sup>。大量研究表明,分泌性抗原 Ag85B 被认为具有较好的免疫保护效果。Ag85B 是结核分枝杆菌主要分泌蛋白,在所有结核分枝杆菌中均有表达,可有效激活体液免疫和细胞免疫<sup>[3,4]</sup>。同时,Ag85 蛋白家族还被广泛应用于治疗型疫苗的研究。Rv3425 是脯氨酸-脯氨酸-谷氨酸(Pro-Pro-Glu, PPE)蛋白家族一员,而 PPE 蛋白家族具有较好的免疫原性,能诱导高水平的 B 细胞反应<sup>[5]</sup>。Rv3425 在卡介苗 (*bacillus Calmette-Guérin*, BCG) 菌株中缺失,但在人结核分枝杆菌、牛结核分枝杆菌中均表达,被认为与抗原变异有关,有很好的免疫原性,能激发  $\gamma$  干扰素(interferon  $\gamma$ , IFN- $\gamma$ ) 高水平表达<sup>[6]</sup>。

DNA 疫苗作为新型治疗型疫苗具有安全性高等特点,但也存在体内转化效率低等缺陷。近年来以腺病毒为载体的治疗型疫苗因在体内有较高的转化效率而获得青睐<sup>[7,8]</sup>,但对其安全性仍有争议。DNA 疫苗免疫配合电击转化可使转化效率大大提高,加上 DNA 疫苗固有的安全性,该治疗方案具有良好的应用前景。

本研究中 DNA 疫苗采用慢病毒来源的质粒 pFUW 为载体,在小鼠中注射表达 Ag85B-Rv3425 融合抗原的重组 DNA 质粒并配合药物导入仪进行电击转化。免疫后取外周血及脾脏淋巴细胞行酶联免疫吸附试验 (enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA) 及流式细胞术,检测抗原特异性

IgG、IgG1、IgG2a、白细胞介素 2(interleukin 2, IL-2) 表达水平,以及 CD4 $^{+}$  T、CD8 $^{+}$  T 和 CD27 $^{+}$  B 细胞的增殖情况,评估其在小鼠体内引起的特异性免疫效果。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

慢病毒表达载体 pFUW 由复旦大学朱焕章教授惠赠。pFUW 质粒的主要结构:DNA 元件 Flap-1, 来自人类免疫缺陷病毒 1 型(human immunodeficiency virus type 1, HIV-1) 基因组, 可提高病毒滴度和整合率; 转录后调控元件 WRE, 来自 Wooduck virus 基因组, 可提高基因表达水平; 泛素基因启动子序列 Ubiquitin promoter, 是广泛性表达的非特异性启动子。菌株 Top10 感受态和 TranStart Fast PfuDNA Polymerase 购自北京全式金生物技术公司。T4 连接酶及 *Xba* I、*Sal* I、*Eco* R I 和 *Bam* H I 限制性内切酶购自 New England Biolabs。质粒大量抽提试剂盒购自美国 Qiagen 公司。小鼠 IL-2 ELISA 试剂盒购自上海达科为生物技术有限公司。辣根过氧化物酶(horseradish peroxidase, HRP) 标记山羊抗小鼠 IgG、IgG1 和 IgG2a 购自北京鼎国生物技术有限公司。Ag85B 蛋白为本实验室自制。淋巴细胞分离液购自美国 Cedarlane 公司。RPMI 1640 培养基和胎牛血清购自 Gibco 公司。琼脂糖购自西班牙 Biowest 公司。

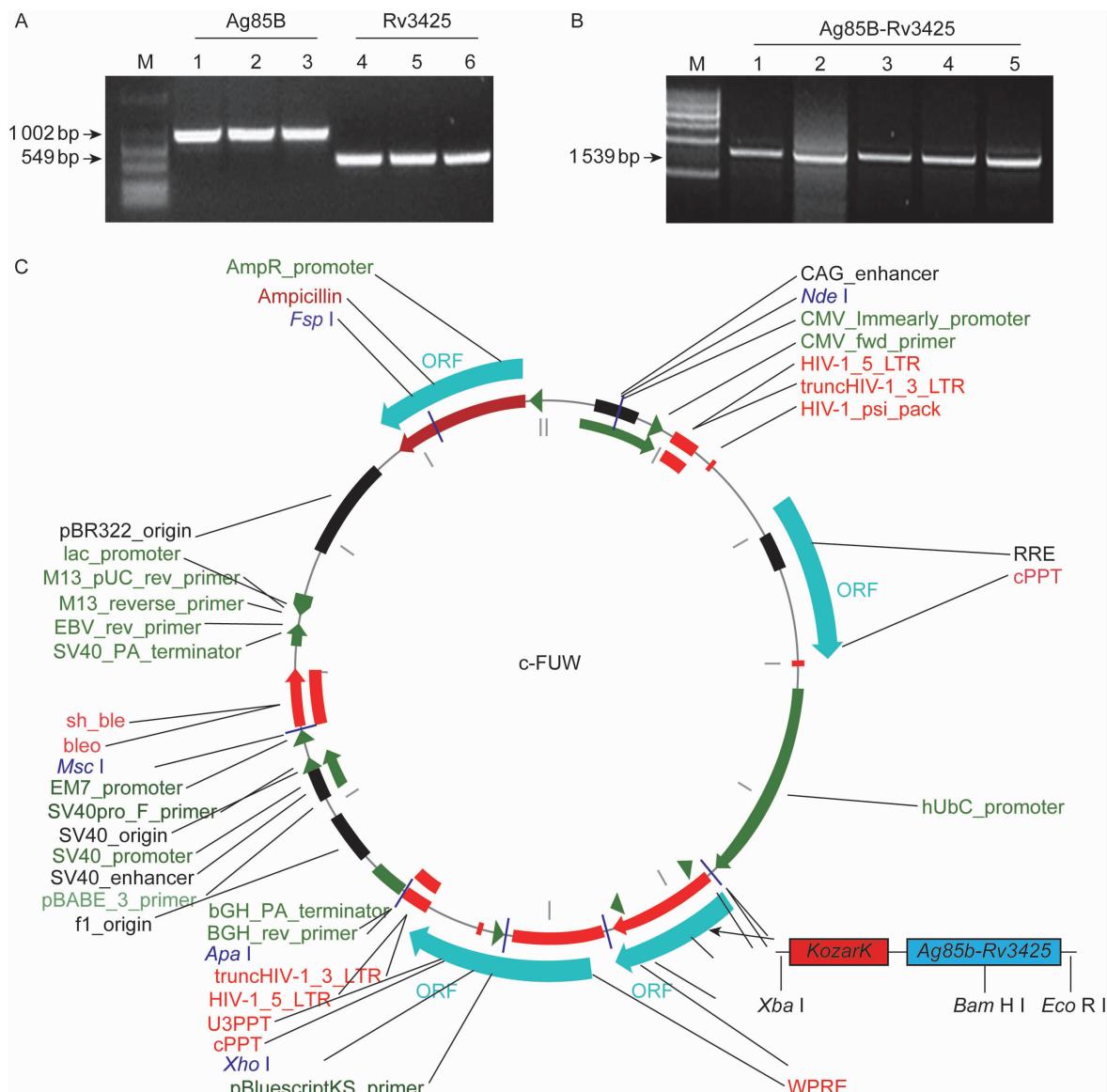
### 1.2 方法

**1.2.1 Ag85B-Rv3425 融合蛋白的慢病毒表达载体构建** 根据 GenBank 中公布的结核分枝杆菌 *Ag85B* 和 *Rv3425* 基因序列分别设计引物, 引物由上海生工生物工程技术服务有限公司合成(表 1)。用聚合酶链反应(polymerase chain reaction, PCR) 扩增 *Ag85B* 和 *Rv3425* 基因, 酶切后分别与 pFUW (图 1) 连接, 转化大肠埃希菌 Top10 感受态细菌。经氨苄西林抗性筛选出阳性克隆后, 提取质粒 DNA,

表 1 实验所用引物

Tab. 1 Primers used in construction of pFUW-Ag85B-Rv3425

Target gene	Primer (5'-3')
<i>Ag85B</i>	F: ATATCTAGAGCCGCCACCATGACAGACGTGACCGAAAGATTG (Xba I)
	R: CCGGGATCCGCCGGCGCCTAACGAAC (Bam H I)
<i>Rv3425</i>	F: CCGGGATCCATGCATCCAATGATAACCAG (Bam H I)
	R: AATGAATTCTACCCGCCCTGTAGATCTGCGG (Eco R I)



A: PCR products of Ag85B and Rv3425. M, 2 000 bp DNA marker. B: PCR products of Ag85B-Rv3425. M, 10 kb DNA marker. C: Lentiviral vector pFLW.

图 1 重组质粒 pFUW-Ag85B-Rv3425 的构建

**Fig. 1** Construction of pFUW-Ag85B-Rv3425

PCR 扩增 *Ag85B* 和 *Rv3425* 基因,用琼脂糖凝胶电泳鉴定,对筛选出的阳性克隆进行测序。序列正确的阳性克隆命名为 pFUW-*Ag85B-Rv3425* (简称 FUWA3)。

**1.2.2 小鼠免疫** 将 50 只 6~8 周龄雌性 C57BL/6 小鼠随机分成 5 组, 每组 10 只。磷酸盐缓冲液(phosphate buffered saline, PBS)组: 肌内注射 PBS 为对照; FUW(50) + EP 组: 肌内注射 50  $\mu\text{g}$  pFUW 空质粒并进行电击; FUWA3(50)组: 肌内注射 50  $\mu\text{g}$  pFUW-Ag85B-Rv3425 质粒; FUWA3(10) + EP 组: 肌内注射 10  $\mu\text{g}$  pFUW-Ag85B-

Rv3425 质粒并进行电击; FUWA3(50) + EP 组: 肌内注射 50  $\mu$ g pFUW-Ag85B-Rv3425 质粒并进行电击。小鼠于第 0、2、4 周免疫, 大腿四头肌缓缓注射质粒并配合或不配合电导仪电击。电击组在注射质粒后, 立即于注射位点两侧插入 5 mm 宽的 2 针电极, 用 Teresa-EPT I 型药物导入仪(上海塔瑞莎健康科技有限公司)进行电击, 条件为双向 6 次脉冲, 每次电压均采用 60 V, 持续 50 ms。

**1.2.3 血清中特异性抗体的检测** 最后一次免疫 2 周后, 从小鼠眼眶静脉采血, 离心分离血清,  $-20^{\circ}\text{C}$  冻存。用 ELISA 检测体内 Ag85B 特异性

抗体水平。每只小鼠血清做 3 个复孔。操作方法如下:抗原 Ag85B 为 100  $\mu\text{l}$ /孔,浓度 10  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ,37 °C 包被 96 孔 ELISA 酶标板 4 h;用含吐温 20 的 PBS (PBS with Tween-20, PBST) 洗板 3 次,1% 牛血清白蛋白(bovine serum albumin, BSA)封闭液 4 °C 封闭过夜;弃封闭液,用 PBST 洗 3 次,在已包被好抗原板中加 100  $\mu\text{l}$  稀释后的小鼠血清,37 °C 孵育 1 h;用 PBST 洗 3 次,加入酶标二抗(1:3 000 稀释的 HRP 偶联羊抗鼠 IgG、1:1 000 稀释的羊抗鼠 IgG1 和 IgG2a),每孔 100  $\mu\text{l}$ ,37 °C 孵育 1 h;弃二抗,用 PBST 洗 3 次,加入临时配制的 TMB-H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 底物液,每孔 100  $\mu\text{l}$ ,37 °C 或室温避光显色 10~30 min,至显色稳定;每孔加入 50  $\mu\text{l}$  2 mol/L 硫酸,终止显色,15 min 内酶标仪测定光密度(optical density, OD),于 450 nm 处读数,空白对照孔调零后测各孔 OD 值。

**1.2.4 小鼠脾脏淋巴细胞分离** 取小鼠脾脏研磨, PBS 淋洗后将收集到的细胞液置于 15 ml 离心管中,定容至 4 ml;在 15 ml 离心管中预先加入 4 ml 淋巴细胞分离液,将收集到的脾淋巴细胞液缓缓加至淋巴细胞分离液上层,1 000 g 离心 20 min;吸取分离后的中间层细胞,转移至新的 15 ml 离心管中;加 PBS 至 6 ml,800 g 离心 10 min,洗 3 次;最后用 1 ml RPMI 1640 细胞完全培养液重悬,取少许用血细胞计数板计数。

**1.2.5 培养上清液中细胞因子的检测** 收集 Ag85B 蛋白刺激 3 d 的脾淋巴细胞上清液,行 ELISA。每只小鼠做 3 个复孔。标准品孔中每孔加入 100  $\mu\text{l}$  稀释后的细胞因子标准液,样品孔中每孔加入 100  $\mu\text{l}$  样品(含 20  $\mu\text{l}$  细胞培养上清液),用 1×Dilution Buffer 代替样本和标准品作为空白孔,每孔加入 50  $\mu\text{l}$  稀释后的生物素偶联 IL-2 抗体,混匀后盖上封板膜,37 °C 温育 90 min;弃孔内液体,1×Washing Buffer 洗 4 次,每次在滤纸上扣干;每孔加入 100  $\mu\text{l}$  稀释后的链霉亲和素偶联 HRP,盖上封板膜,37 °C 温育 30 min;洗板 4 次,加入临时配制的 TMB-H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 底物液,每孔 100  $\mu\text{l}$ ,37 °C 或室温避光显色 10~30 min,至显色稳定。其余操作步骤同 1.2.3 部分。

**1.2.6 流式细胞术检测 CD4<sup>+</sup>、CD8<sup>+</sup> 和 CD27<sup>+</sup> 淋巴细胞** 将脾淋巴细胞于 24 孔板孵育,每孔加入 200  $\mu\text{l}$  1 × 10<sup>7</sup>/ml 细胞液,加入终浓度为 10  $\mu\text{g}/\text{ml}$  的 Ag85B 蛋白进行刺激,于细胞培养箱孵育 96 h。离心,洗涤细胞,每孔加入 2  $\mu\text{g}$  别藻蓝蛋白

(allophycocyanin, APC) 标记的 CD3、2  $\mu\text{g}$  异硫氰酸荧光素(fluorescein isothiocyanate isomer, FITC) 标记的 CD4、2  $\mu\text{g}$  藻红蛋白(phycoerythrin, PE) 标记的 CD8a 和 2  $\mu\text{g}$  多甲藻黄素-叶绿素-蛋白质复合物(peridinin-chlorophyll-protein complex, Percp) 标记的 CD27 荧光抗体,4 °C 避光孵育 30 min;洗细胞 2 次,重悬于 300  $\mu\text{l}$  PBS 中;细胞悬液经 200 目滤膜过滤后上机检测(用于分析的细胞数目 >10 000),用 FlowJo7.6 软件分析结果。

### 1.3 统计学处理

所有样品同一批次重复检测 2 次,结果以 mean ± SD 表示,对照 t 检验,  $P < 0.05$  为有显著性差异。

## 2 结果

### 2.1 重组质粒 pFUW-Ag85B-Rv3425 的构建

琼脂糖凝胶电泳显示,Ag85B 基因的 PCR 产物为 1 002 bp 左右(含 9 bp 的 KozaK 序列),Rv3425 基因的 PCR 产物为 549 bp 左右,与预期相符。重组质粒的 PCR 产物经琼脂糖凝胶电泳,检测到 1 539 bp 左右的片段,证明 pFUW-Ag85B-Rv3425 构建成功(图 1)。测序结果与 GenBank 数据库收录的 Ag85B 和 Rv3425 基因一致。

### 2.2 电击转化增强 DNA 疫苗 pFUW-Ag85B-Rv3425 在小鼠体内的体液免疫反应

为检测体内电击转化对重组质粒 pFUW-Ag85B-Rv3425 在小鼠体内诱导体液免疫反应的影响,用 ELISA 分别检测小鼠血清 Ag85B 特异性抗体 IgG(图 2) 和 IgG2a(图 3) 的表达水平。结果显示,50  $\mu\text{g}$  重组 DNA 疫苗免疫组血清 IgG 表达水平高于 PBS 和 50  $\mu\text{g}$  空载体质粒配合电击转化组;10  $\mu\text{g}$  重组 DNA 疫苗免疫配合电击组血清 IgG 表达水平与 50  $\mu\text{g}$  重组 DNA 疫苗组相当,而 50  $\mu\text{g}$  重组

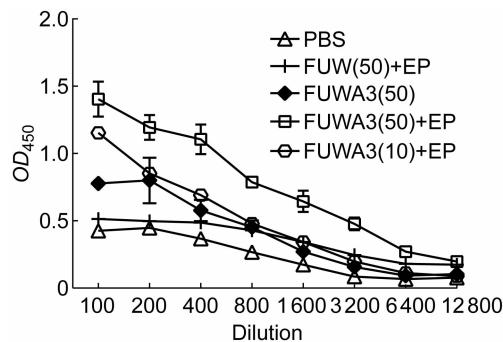


图 2 小鼠免疫后血清中 IgG 的水平

Fig. 2 Expression of Ag85B-specific serum IgG in immunized mice

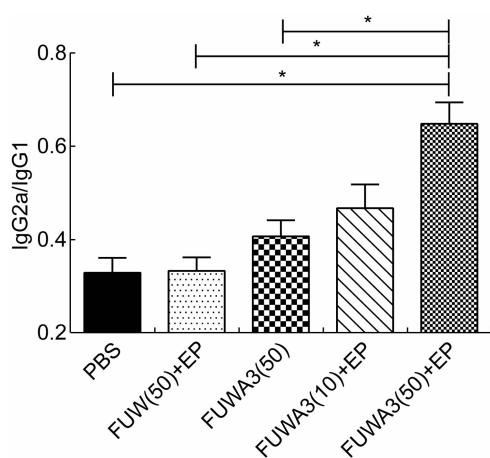


图 3 小鼠免疫后血清中 IgG2a/IgG1 比值

Fig. 3 Ratio of Ag85B-specific serum IgG2a to IgG1 in immunized mice

DNA 疫苗免疫配合电击转化组 IgG 的表达水平显著高于其他组。结果表明,电击转化可提高特异性结核分枝杆菌抗原的免疫效果,使其在低剂量时即可引起足够的 IgG 反应,在高剂量时可引起更强的体液免疫反应。比较 IgG2a/IgG1 比值,发现 50  $\mu\text{g}$  重组 DNA 疫苗免疫配合电击转化组 IgG2a/IgG1 比值显著高于未经电击处理组,表明电击介导的 DNA 疫苗接种比单一注射 DNA 疫苗产生的免疫反应更倾向于 Th1 型,有更好的免疫保护效果。

### 2.3 电击转化介导的 pFUW-Ag85B-Rv3425 DNA 疫苗接种诱导小鼠体内产生更多 IL-2

收集 Ag85B 刺激过的脾淋巴细胞上清液,用 ELISA 检测 IL-2。实验中使用标准化试剂盒,因此对标准化样品进行复孔实验后取 OD 值和浓度双对数值进行回归分析,获得 IL-2 的 OD 值对浓度的计算公式:  $\lg C = 1.193 \lg A + 1.778$ 。其中 C 代表 IL-2 浓度,A 代表 OD 值。

对回归所得的 IL-2 浓度作柱状图(图 4)。结果显示,相对于对照组,单独注射 50  $\mu\text{g}$  重组 DNA 疫苗并没有诱导产生更多的 IL-2。而 10  $\mu\text{g}$  重组 DNA 疫苗免疫配合电击就能诱导产生较多的 IL-2;当将质粒剂量增大至 50  $\mu\text{g}$ ,IL-2 的产量进一步提高。结果表明,电击转化能显著提高 DNA 疫苗的免疫反应能力,促进 Th1 型免疫反应。

### 2.4 电击转化介导的 pFUW-Ag85B-Rv3425 DNA 疫苗接种增强细胞毒性 T 细胞扩增

用流式细胞术检测不同免疫组小鼠脾淋巴细胞经 Ag85B 刺激后 CD8<sup>+</sup> T 细胞和 CD4<sup>+</sup> T 细胞的

比例。结果如图 5 所示,CD8<sup>+</sup> T 与 CD4<sup>+</sup> T 细胞比值在电击转化介导下随接种 DNA 疫苗量的增加而上升,其中 50  $\mu\text{g}$  重组 DNA 疫苗免疫配合电击转化组比值最高。结果表明,小鼠在接种 DNA 疫苗配合电击转化时能诱导宿主产生更多的细胞毒性 T 细胞。

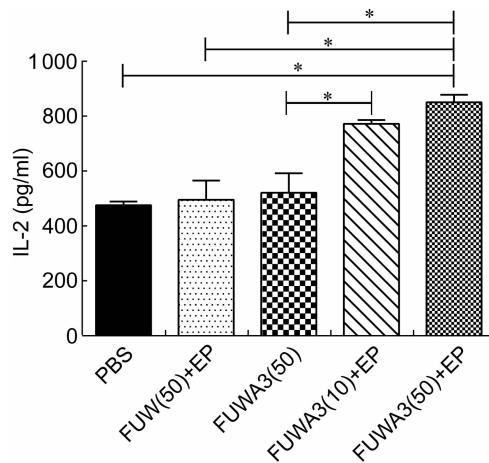


图 4 小鼠免疫后脾淋巴细胞培养上清液中 IL-2 含量

Fig. 4 Concentration of IL-2 in culture supernatants of splenocytes in immunized mice

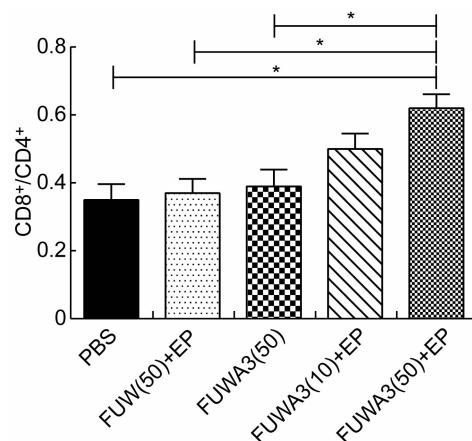


图 5 小鼠免疫后脾淋巴细胞中 CD8<sup>+</sup>/CD4<sup>+</sup> T 细胞比例

Fig. 5 Ratio of CD8<sup>+</sup>/CD4<sup>+</sup> T cells in immunized mice

### 2.5 电击转化介导的 pFUW-Ag85B-Rv3425 DNA 疫苗接种促进 CD27<sup>+</sup> 淋巴细胞产生

流式细胞术检测发现,在 50  $\mu\text{g}$  DNA 疫苗免疫配合电击转化的小鼠脾淋巴细胞中,Ag85B 刺激后 CD27<sup>+</sup> 淋巴细胞比例显著提高,表明接种 DNA 疫苗配合电击后体液免疫水平显著上升。使用药物导入仪的 2 组中,接种不同剂量 DNA 疫苗的小鼠之间 CD27<sup>+</sup> 淋巴细胞数量没有显著差异,表明 DNA 疫苗免疫配合电击转化在低剂量时即发挥一定的免

疫保护作用,有望在实际应用时减少疫苗注射量(图 6)。

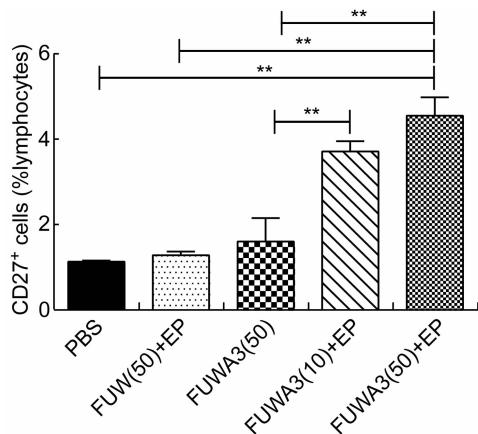


图 6 小鼠免疫后脾淋巴细胞中 CD27<sup>+</sup> 细胞百分比

Fig. 6 Percentage of CD27<sup>+</sup> cells in immunized mice

### 3 讨论

BCG 是目前唯一的也是使用最久的结核分枝杆菌疫苗,但其对结核病,尤其是结核病中最危重的成人肺结核病的免疫效果在不同人群中有很大差异。对于非洲等结核病流行区域,BCG 不能产生足够、长久的免疫反应,从而使免疫效果下降。因此,人们急需寻找新型、高效的结核分枝杆菌疫苗或免疫策略。在新型结核分枝杆菌疫苗研发中,抗原的选择非常重要。Ag85B 和 Rv3425 蛋白均被证明有良好的免疫原性。本研究采用 Ag85B-Rv3425 融合基因质粒,期望获得一种新型、高效的 DNA 疫苗。用安全性较高的第 3 代慢病毒载体 pFUW 表达融合抗原,是因为该慢病毒载体能感染分裂和非分裂期细胞,容纳较大外源性目的基因片段并进行持续基因表达,载体本身免疫反应小。

有研究认为,注射 DNA 疫苗后配合电穿孔能引起高效的细胞免疫应答<sup>[9]</sup>。还有研究表明,骨骼肌注射 DNA 疫苗后加以一定电场,可使细胞膜孔通道打开,提高转染效率;此外,受电场损伤的骨骼肌细胞在修复时本身就可提高机体整体免疫应答水平,活化卫星细胞而修复受损的骨骼肌细胞,提高转染效率。骨骼肌细胞本身也具备长期稳定表达目的基因的能力,因此骨骼肌注射疫苗并配合电穿孔可有效提高、延长免疫应答水平<sup>[10,11]</sup>。

本研究结果显示,使用以慢病毒表达载体 pFUW 为基础的 Ag85B-Rv3425 融合抗原 DNA 疫

苗,且在注射后对注射区域加以一定电场(如应用 Teresa 药物导入仪)可有效提高 DNA 疫苗在动物细胞中的转染效率,高效诱导抗原特异性细胞免疫及体液免疫。在细胞免疫方面,提高了与细胞毒性相关的 CD8<sup>+</sup> T 细胞比例及 IL-2 分泌水平,有助于刺激体内 Th1 型细胞分化增殖,激活细胞毒性 T 细胞,活化巨噬细胞清除胞内病原。本研究中, IgG2a/IgG1 比值升高,进一步证实诱导的免疫反应倾向于 Th1 型。在体液免疫方面,有效提高了血清 IgG 水平,高水平 IgG 可激活补体反应,中和多种毒素,有助于清除体内病原。在以后研究中,将评价慢病毒载体的 Ag85B-Rv3425 DNA 疫苗联合电击转化用于治疗结核病的效果,期望得到一种缩短结核病药物治疗时间的新型治疗方案。

### 参考文献

- [1] Lowrie DB, Tascon RE, Bonato VL, Lima VM, Faccioli LH, Stavropoulos E, Colston MJ, Hewinson RG, Moelling K, Silva CL. Therapy of tuberculosis in mice by DNA vaccination [J]. Nature, 1999, 400(6741): 269-271.
- [2] Tascon RE, Colston MJ, Ragno S, Stavropoulos E, Gregory D, Lowrie DB. Vaccination against tuberculosis by DNA injection [J]. Nat Med, 1996, 2(8): 888-892.
- [3] Doherty TM, Demissie A, Olobo J, Wolday D, Britton S, Eguale T, Ravn P, Andersen P. Immune responses to the Mycobacterium tuberculosis-specific antigen ESAT-6 signal subclinical infection among contacts of tuberculosis patients [J]. J Clin Microbiol, 2002, 40(2): 704-706.
- [4] 吴雪琼,张俊仙,李洪敏,史迎昌,张灵霞,梁建琴,金关甫,由昆.结核分枝杆菌 Ag85A DNA 疫苗免疫治疗作用的研究 [J].中国免疫学杂志,2002,18(1):17-19, 22.
- [5] Choudhary RK, Mukhopadhyay S, Chakhaiyar P, Sharma N, Murthy KJ, Katoch VM, Hasnain SE. PPE antigen Rv2430c of Mycobacterium tuberculosis induces a strong B-cell response [J]. Infect Immun, 2003, 71(11): 6338-6343.
- [6] Wang JL, Qie YQ, Zhu BD, Zhang HM, Xu Y, Wang QZ, Chen JZ, Liu W, Wang HH. Evaluation of a recombinant BCG expressing antigen Ag85B and PPE protein Rv3425 from DNA segment RD11 of Mycobacterium tuberculosis in C57BL/6 mice [J]. Med Microbiol Immunol, 2009, 198(1): 5-11.
- [7] Schiedner G, Morral N, Parks RJ, Wu Y, Koopmans SC, Langston C, Graham FL, Beaudet AL, Kochanek S. Genomic DNA transfer with a high-capacity adenovirus vector results in improved in vivo gene expression and decreased toxicity [J]. Nat Genet, 1998, 18(2): 180-183.
- [8] Le Gal La Salle G1, Robert JJ, Berrard S, Ridoux V,

- Stratford-Perricaudet LD, Perricaudet M, Mallet J. An adenovirus vector for gene transfer into neurons and glia in the brain [J]. *Science*, 1993, 259(5097): 988-990.
- [9] Tollefsen S, Tjelle T, Schneider J, Harboe M, Wiker H, Hewinson G, Huygen K, Mathiesen I. Improved cellular and humoral immune responses against *Mycobacterium tuberculosis* antigens after intramuscular DNA immunisation combined with muscle electroporation [J]. *Vaccine*, 2002, 20(27-28): 3370-3378.
- [10] Saade F, Petrovsky N. Technologies for enhanced efficacy of DNA vaccines [J]. *Expert Rev Vaccines*, 2012, 11(2): 189-209.
- [11] Peng B, Zhao Y, Lu H, Pang W, Xu Y. In vivo plasmid DNA electroporation resulted in transfection of satellite cells and lasting transgene expression in regenerated muscle fibers [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2005, 338 (3): 1490-1498.

(收稿日期:2015-04-01)