

结核分枝杆菌四价 DNA 疫苗免疫原性和保护效率研究*

顾田园²⁾ 蔡宏^{1)**} 田霞¹⁾ 余大海¹⁾ 朱玉贤¹⁾

(¹⁾北京大学蛋白质工程及植物基因工程国家重点实验室, 北京 100871;

²⁾北京科技大学土木与环境工程学院, 北京 100083)

摘要 对结核杆菌四价 DNA 疫苗的免疫应答和保护效果进行了评价. 用编码结核分枝杆菌 Ag85B、MPT64、MPT70 和 PstS-3 等 4 种抗原蛋白的基因分别构建的单价 DNA 疫苗混合成四价苗免疫小鼠. 3 次免疫后 21 天, 四种抗原特异性抗体滴度分别达到 1:6 400、1:51 200、1:6 400、1:6 400. 四种蛋白质均能诱导脾脏细胞产生较高水平的抗原特异性 IFN- γ , 浓度分别为 10 582.14 ng/L、13 635.97 ng/L、14 213.15 ng/L 和 9 657.35 ng/L. 三次免疫后经静脉强毒攻击, 四价苗组小鼠肺脏和脾脏的载菌数分别减少到阴性组的 1/650 和 1/130. 对肺组织的病理形态特征观察表明, 空载体免疫的小鼠肺部严重损伤, 肺实质干酪样坏死, 坏死结节占肺实质的 70%~80%, 而四价苗免疫的小鼠, 肺组织结构正常, 肺泡轮廓清晰. 研究首次证实, Ag85B、MPT64、MPT70 和 PstS-3 4 种结核杆菌抗原蛋白编码基因组成的四价 DNA 疫苗, 具有很高的免疫应答水平和保护效率.

关键词 结核分枝杆菌, 抗原蛋白, 四价 DNA 疫苗, 免疫原性, 保护效率

学科分类号 S852

结核病是人类古老的疾病, 据统计, 世界范围内每年有 300 万人死于结核, 有 1 000 万新病例出现. 人类目前使用的卡介苗 (BCG) 保护效率不一致, 一般为 0%~85%. 因此, 研制更全面有效的新疫苗是控制结核病的重要途径. 研究表明, 结核分枝杆菌分泌蛋白能刺激机体产生保护性免疫反应, 诱导抗体产生并诱导 CD4⁺ 和 CD8⁺T 细胞介导的免疫应答. 在结核病感染实验过程中, 病人淋巴细胞早期识别的主要是一些分泌性蛋白, 如 Ag85 复合体分布于大部分分枝杆菌中, 其中 Ag85B 具有分枝酸转移酶性, 与分枝杆菌细胞壁的合成有关, 并与人纤维连接蛋白结合后参与致病过程, 在分枝杆菌分泌蛋白中含量居首位, 在一系列纯化抗原试验中, 该抗原的抗原性最强^[1-6]. MPT64 也是一种分泌性蛋白, 被结核病人的阳性血清识别, 同时可产生 CTL 应答(杀伤性 T 淋巴细胞应答)^[7-9]. MPT70 属于结核分枝杆菌分泌蛋白, 它能刺激小鼠产生体液应答和细胞应答, 具有很好的保护效率^[10]. PstS-3 是结核杆菌膜蛋白, 属于磷酸盐特异性转运系统之一, 能刺激产生高水平的抗原特异性抗体和 Th1 型细胞因子 IL-2、IFN- γ , 并有较强的保护效率^[11].

近期研究中, 联合 DNA 疫苗已显示出极好的前景. 有人用疟疾抗原的二价 DNA 疫苗免疫小鼠后发现, 试验组小鼠表现出较强的抗病能力^[12].

Morris 等^[13]在研究了单价和多价结核分枝杆菌 DNA 疫苗的免疫应答后指出, 多价联合 DNA 疫苗比活苗 BCG 诱导的保护更为强烈. 本研究构建出编码 Ag85B、MPT64、MPT70 和 PstS-3 4 种蛋白基因的结核分枝杆菌 DNA 疫苗, 通过联合免疫模型鼠研究该四价 DNA 疫苗的免疫原性和保护效率, 为研制结核病核酸疫苗提供依据.

1 材料与方法

1.1 材料

真核表达载体 pJW4303 由斯坦福大学 Mullins 提供, 人结核分枝杆菌 (*M.tuberculosis*) H37Rv 由解放军 309 医院结核病研究中心提供. pET22b 原核表达载体为本实验室保存. 6~8 周龄 C57BL/6 小鼠饲养于北京市结核病胸部肿瘤研究所 P3 实验室. QIAquick Gel Extraction Kit 购自 QIA Gene 公司. 内切酶类均购自美国 Promega 公司.

1.2 方法

1.2.1 结核杆菌重组蛋白的表达和纯化. 用 pET22b 表达载体分别克隆和表达. 分别用 pET22b 构建

*国家高技术“863”计划资助项目(2002AA206411).

** 通讯联系人.

Tel: 010-62756077, E-mail: Hcai@pku.edu.cn

收稿日期: 2004-11-12, 接受日期: 2004-12-30

Ag85B、MPT64、MPT70 和 PstS-3 重组质粒并转入 BL21(DE3) PlysS 中. 挑单菌落接入含氨苄的 LB 中培养至 A_{600} 值为 0.8 左右时, 加入 IPTG 至终浓度为 1 mmol/L 培养 6 h. 取样进行 12% SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳 (SDS-PAGE) 观察表达结果. 根据多聚组氨酸尾重组蛋白的特性, 在变性条件下用镍亲和和柱层析法分别纯化这 4 种重组蛋白.

1.2.2 目的基因 Ag85B、MPT64、MPT70 和 PstS-3 真核表达质粒的构建和 DNA 纯化. 分别用 *Nhe* I 和 *Bam*H I 双酶切经凝胶纯化的目的基因产物及载体 pJW4303, 在 10 μ l 体系中, 用 T4 DNA 连接酶进行连接(图 1), 16 $^{\circ}$ C 连接 16 h, 将连接产物转化感受态大肠杆菌 DH5 α 菌株. 挑取转化菌单菌落抽提质粒, *Nhe* I 和 *Bam*H I 双酶切鉴定后进行序列分析以证实插入片段序列是否正确. 用 QIAGEN Plasmid Maxi Kit 和 Mega Kit 大量制备质粒 DNA, 用灭菌生理盐水稀释至浓度为 1 g/L, 紫外分光光度计定量.

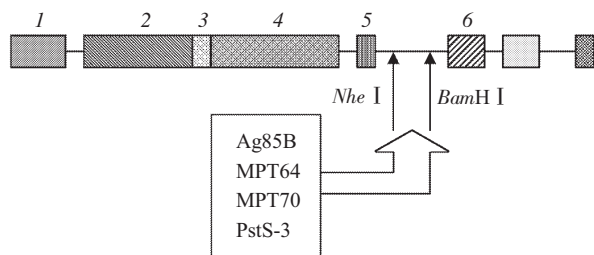


Fig.1 The construction of DNA vaccines

1: SV40 early promoter; 2: CMV enhancer; 3: CMV promoter; 4: CMV intron; 5: TPA; 6: BGH polyA.

1.2.3 四价 DNA 疫苗对小鼠的联合免疫. 将 4 种单价 DNA 疫苗混合成四价苗对 12 只 C57BL/6 小鼠免疫, 免疫 3 次, 间隔 3 周, 注射剂量每种 DNA 100 μ g, 注射部位为大腿内侧肌肉. 阳性对照组的 12 只小鼠皮内注射 1×10^6 CFU BCG. 阴性对照组 12 只肌肉注射 400 μ g 空载体 pJW4303. 另 9 只健康小鼠不注射, 同时饲养.

1.2.4 酶联免疫试验(ELISA) 检测免疫小鼠的特异性抗体水平. 小鼠首次免疫、2 次免疫和 3 次免疫后 21 天分别在眼球采血, 分离血清. 详细方法见参考文献[14].

1.2.5 双抗体夹心酶联免疫试验(ELISA)检测小鼠脾细胞产生 IFN- γ 水平. 第 3 次免疫 21 天后 3 组免疫组每组取 3 只鼠处死, 无菌条件下取出脾脏进行诱导培养. 细胞因子 IFN- γ 的诱导和测定方法见参

考文献[14].

1.2.6 免疫小鼠的攻毒保护性实验. 对每组剩下 9 只 C57BL/6 鼠免疫 3 次后 8 周攻毒, 攻毒注射部位为小鼠尾静脉, 注射剂量为 1×10^6 CFU, 攻毒株为 H37Rv. 攻毒后 8 周杀死小鼠, 将肺脏、脾脏匀浆稀释接种到固体罗氏培养基上, 4 周后活菌计数.

1.2.7 病理组织学分析. 取部分肺脏组织用 10% 福尔马林中性缓冲液固定, 用苏木素和四溴荧光素染色. 按如下参数对病理切片进行评价: 严重程度(肺实质损伤程度)、肉芽肿大小、干酪样坏死程度、中性细胞和淋巴细胞的相对数量、肉芽肿内淋巴细胞的数量和肉芽肿与周边组织界限清晰程度.

2 结 果

2.1 4 种重组蛋白的表达与纯化

经 IPTG 诱导、破菌及离心后, 取上清经 SDS-PAGE 后发现, 分别有约 30 ku (Ag85B)、23.5 ku (MPT64)、22 ku (MPT70) 和 40 ku (PstS-3) 的蛋白质条带出现, 并且 4 种蛋白质都位于包涵体中. 用镍亲和和柱层析法提纯这 4 种重组蛋白后经 SDS-PAGE 检测, 证明 4 种重组蛋白均表达纯化成功(图 2).

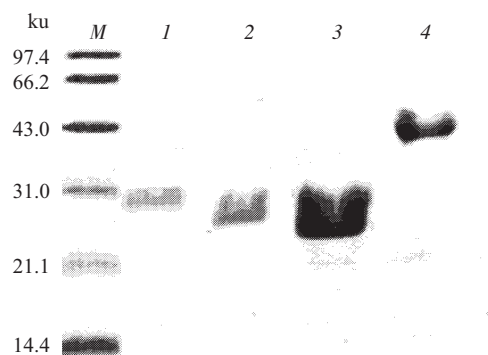


Fig.2 Identification of recombinant protein by SDS-PAGE

1, 2, 3, 4: The purified recombinant proteins of Ag85B、MPT64、MPT70 and PstS-3; M: Protein molecular mass marker.

2.2 4 种单价 DNA 疫苗的构建鉴定

将编码 Ag85B、MPT64、MPT70 和 PstS-3 蛋白抗原的基因 PCR 扩增产物经琼脂糖凝胶电泳分离纯化, 用 *Nhe* I 和 *Bam*H I 限制性内切酶消化后与经相同内切酶消化的质粒 pJW4303DNA 连接, 将重组质粒导入大肠杆菌 DH5 α 菌株, 提质粒 DNA, 分别以 *Nhe* I、*Bam*H I 双酶切鉴定, 证明

插入片段的大小是正确的. 测序结果与所报道的完全一致 (结果未显示), 表明 4 种 DNA 单价疫苗均构建成功.

2.3 免疫小鼠血清中特异性抗体水平分析

四价 DNA 疫苗首次免疫后 21 天, 4 种蛋白特异性抗体滴度均未检测到. 第二次免疫后 21 天, 4 种蛋白特异性抗体滴度明显提高, Ag85B 和 PstS-3

均达到 1:1 600, MPT70 为 1:6 400, MPT64 高达 1:12 800. 三次免疫后 21 天 Ag85B、MPT70 和 PstS-3 滴度均达到 1:6 400, MPT64 则高达 1:51 200 (表 1). 三次免疫 21 天后 BCG 抗体滴度均为 1:800. 从结果中看出, 四价 DNA 疫苗诱导产生的特异性抗体滴度随免疫次数的增加而呈现上升趋势, 而阴性对照组未检测到抗体滴度.

Table 1 Antibody titer analysis in mice immunized with combination DNA vaccines

Antigens	Antibody titer		
	21days after first vaccination	21days after second vaccination	21days after third vaccination
Ag85B	0	1:1 600	1:6 400
MPT64	0	1:12 800	1:51 200
MPT70	0	1:6 400	1:6 400
PstS-3	0	1:1 600	1:6 400
BCG	1:800	1:800	1:800
Negative	—	—	—

2.4 免疫小鼠血清中特异性细胞因子 IFN-γ 水平分析

三免后 21 天, 纯化的 4 种蛋白质均能诱导小鼠的混合脾脏细胞产生较高水平的细胞应答. 双抗

体夹心酶联免疫试验表明, 4 种蛋白质诱导产生的 IFN-γ 浓度分别为 (10 582.14 ±657.23) ng/L、(13 635.97±868.42) ng/L、(14 213.15±874.34) ng/L 和(9 657.35±580.54) ng/L. 阳性对照 BCG 疫苗组诱导产生 IFN-γ 浓度为(8 878.58±531.68) ng/L. 阴性对照组诱导产生 IFN-γ 浓度为(1 030.00±50) ng/L (图 3).

2.5 四价 DNA 疫苗对小鼠的保护效果分析

以静脉攻毒 8 周后小鼠的肺脏和脾脏为实验材料, 研究四价 DNA 疫苗的保护效率. 实验表明, 用该四价苗免疫后, 小鼠肺脏和脾脏的载菌数分别降低到对照空载体组的 1/650 和 1/130. 其保护水平明显优于 BCG 对照组(表 2).

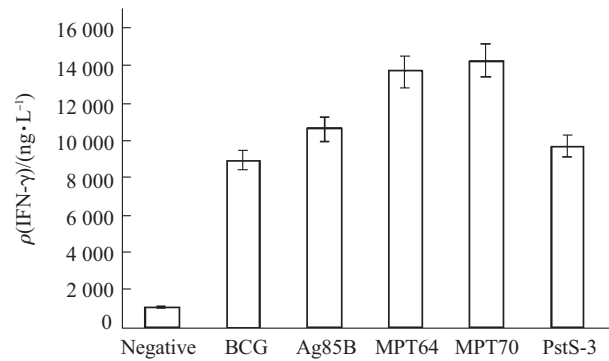


Fig.3 IFN-γ concentration of mixed spleen cell culture from varied groups

Table 2 Protective efficacy induced by combination DNA vaccines

Vaccines	Bacterial counts		Protective efficacy ¹⁾	
	Lung	Spleen	Lung	Spleen
BCG	(4.06±0.28)×10 ⁵	(3.38±0.23)×10 ⁴	2.4	2.1
Combined DNA vaccine	(1.91±0.47)×10 ⁵	(3.55±0.36)×10 ⁴	2.8	2.1
Empty vector	(1.23±0.39)×10 ⁸	(4.57±2.26)×10 ⁶	—	—

¹⁾Protective efficacy was evaluated according to method from Morris^[13], which was the logarithm difference of bacterial counts between negative group and immune group. The higher value, the better protective efficacy.

2.6 免疫小鼠和对照小鼠肺组织的病理形态特征比较

分析静脉攻毒 8 周后各组小鼠肺组织的病理形态发现, 注射空载体 pJW4303 的对照小鼠, 肺部损伤主要是肺实质干酪样坏死, 坏死结节占肺实质的 70%~80% 且与周边界限不明显, 周边有较大量

的淋巴细胞产生(图 4a). 经 BCG 免疫的小鼠, 肺部病变不明显, 肺部有轻度实质化现象, 间质有中度淋巴细胞浸润(图 4b). 经 DNA 四联苗免疫的小鼠, 肺组织结构正常, 实质无肉芽肿, 肺泡轮廓清晰, 间质仅有少量的淋巴细胞(图 4c).

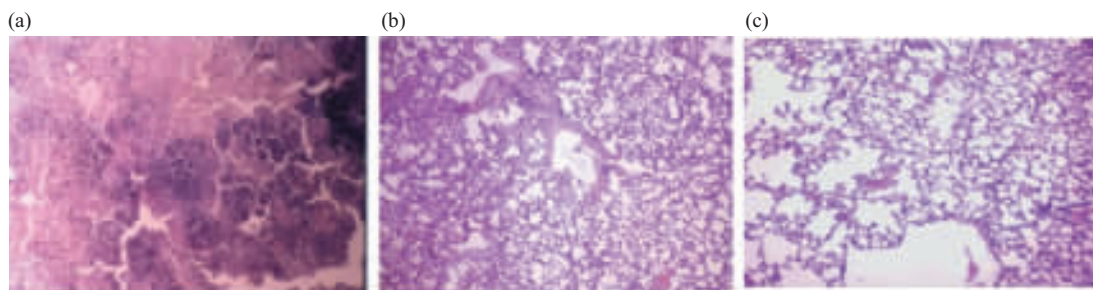


Fig.4 Photomicrographs of lung tissues following intravenous H37Rv challenge (10×10)

(a) Photomicrographs of lung tissue vaccinated with empty vector; (b) Photomicrographs of lung tissue vaccinated with BCG; (c) Photomicrographs of lung tissue vaccinated with the combination DNA vaccines.

3 讨 论

用真核表达质粒作为载体制备成结核杆菌 DNA 疫苗, 能在免疫动物机体中有效地表达出蛋白质, 且诱导体液和细胞介导的免疫应答. 此外, 动物模型不同, 抵抗疾病如流感、爱滋病、疱疹、疟疾、狂犬病等的保护效率也不一样^[15,16]. 因此, DNA 疫苗在对传染性疾病的免疫保护方面的应用是非常广泛的. DNA 疫苗易于生产和储存, 它不需要蛋白质纯化的复杂技术, 也不需要一系列的冷藏系统, 能以干固体的形态保存^[16]. 关键是, 结核杆菌是一种胞内寄生菌, 要清除体内结核杆菌, 有效的细胞免疫应答起主要作用, 这一点对结核病疫苗来说非常重要, DNA 疫苗能诱导较强的细胞应答, 并产生高水平的 IFN- γ , 刺激巨噬细胞吞噬裂解被感染的宿主细胞中的结核杆菌.

有研究表明, 结核杆菌具有保护性的抗原蛋白主要存在于其分泌蛋白与细胞壁蛋白之中, 而结核杆菌早期的培养滤液蛋白 (CF) 是这些胞外抗原蛋白的主要来源. 本文所选择的 Ag85B、MPT64、MPT70 和 PstS-3 蛋白抗原分别是分泌蛋白和膜蛋白, 我们通过试验证实四价 DNA 疫苗能诱导产生较高的特异性抗体(表 1). 3 次免疫后 21 天, MPT64 抗体滴度高达 1:51 200, 其余 3 种特异性抗体滴度均为 1:6 400.

因为 IFN- γ 在抵御分枝杆菌感染过程中发挥着

重要的作用, 所以 IFN- γ 产生水平是评价 DNA 疫苗保护效果的关键指标^[17]. 本研究发现, 用四价 DNA 疫苗免疫小鼠后能诱导产生较高的特异性 IFN- γ (图 3), 其中 Ag85B 诱导的特异性 IFN- γ 水平比 Tanghe 等^[18]所报道的提高了 3 倍多, 与 Delogu 等^[19]报道的 DNA 四联苗的试验结果相比较, Ag85B 和 MPT64 诱导的特异性 IFN- γ 水平高出 6 倍以上, PstS-3 诱导的特异性 IFN- γ 要比 Audrey 等^[11]报道的高出 3 倍多. 4 种特异性 IFN- γ 水平均高于 BCG 组, 其中 MPT70 诱导的特异性 IFN- γ 水平高出 60%. 表明我们所选择的 DNA 四价疫苗能有效提高细胞免疫应答.

活菌计数试验结果表明, 四价 DNA 疫苗具有高保护效率(表 2). 对脾脏的保护联苗与 BCG 相当, 保护率达 2.1. 对肺脏的保护, 联苗的保护率为 2.8, 高于 BCG. 此外, 不同组合疫苗免疫后效果也不尽相同. Morris 等^[13]用 MPT-64、ESAT-6、MPT-63 和 KatG 四联苗以及不同的单价苗免疫小鼠后, 发现 ESAT-6 只能诱导产生很低的抗体水平和细胞因子水平, 却产生了较强的保护性应答. MPT-32 和 PstS-1 诱导产生了较高水平的 IFN- γ , 却只产生较弱的保护性应答反应. 虽然他们的四价苗产生了高于本文的抗体应答水平, 但对于肺脏的保护效率却低于本文, 仅为 0.83. 我们认为, 不同的疫苗组合在小鼠体内产生不同的应答反应, 而同一抗原在不同组合中的作用也不完全相同.

最新的资料表明,淋巴细胞渗出程度可能反映了不同组织抗结核病免疫应答的差异^[20]. 本实验中, DNA 四价苗在强化细胞和体液免疫应答、减少肺部载菌数的同时减少了淋巴细胞的渗出,极大地缓解了病菌对肺部的损伤(图 3),证实淋巴细胞的渗出程度与动物组织对病原的抗性有关. 结核分枝杆菌 4 种蛋白在真核表达载体中的正确构建、表达及联合免疫,可能为全面提高结核病 DNA 疫苗的免疫效率提供了新材料和新思路.

参 考 文 献

- Wiker H G, Harboe M. The antigen 85 complex: a major secretion product of *Mycobacterium tuberculosis*. Microbiological Reviews, 1992, **56** (4) : 648~661
- Tobias F, Wit R D, Bekelie S, *et al.* The *Mycobacterium leprae* antigen 85 complex gene family: identification of the genes for the 85A, 85C, and related MPT51 proteins. Infect Immun, 1993, **61** (9) : 3642~3647
- Roche P W, Peake P W, Jacobe H B, *et al.* T-Cell determinants and antibody binding sites on the major *Mycobacterial* secretory protein MPB59 of *Mycobacterium bovis*. Infect Immun, 1994, **62**(12) : 5319~5326
- Harth G, Lee B Y, Wang J, *et al.* Novel insight into the genetics, biochemistry, and immunocytochemistry of the 30-kilodalton major extracellular protein of *Mycobacterium tuberculosis*. Infect Immun, 1996, **64** (8) : 3038~3047
- Ulmer J B, Liu M A, Montgomery D L, *et al.* Expression and immunogenicity of *Mycobacterium tuberculosis* antigen 85 by DNA vaccination. Vaccine, 1997, **15** (8) : 792~794
- Denis O, Tanghe A, Palfliet K, *et al.* Vaccination with plasmid DNA encoding *Mycobacterial* antigen 85A stimulates a CD4⁺ and CD8⁺ T-cell epitopic repertoire broader than that stimulated by *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv infection. Infect Immun, 1998, **66** (7) : 1527~1533
- Yamaguchi R, Matsuo K, Yamazaki A, *et al.* Cloning characterization of the gene for immunogenic protein MPB64 of *Mycobacterium bovis* BCG. Infect Immun, 1989, **57** (9) : 283~288
- Oettinger T, Andersen A B. Cloning and B-cell-epitope mapping of MPT64 from *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv. Infect Immun, 1994, **62** (5) : 2058~2064
- Oettinger T, Holm A, Mtoni I M, *et al.* Mapping of the delayed-type hypersensitivity-inducing epitope of secreted protein MPT64 from *Mycobacterium tuberculosis*. Infect Immun, 1995, **63** (12): 4613~4618
- Al-Attayah R, Shaban F, Wiker H, *et al.* Synthetic peptides identify promiscuous human Th1 cell epitopes of the secreted *Mycobacterial* antigen MPB70. Infect Immun, 2003, **71**(4): 1953~1960
- Tanghe A, Lefevre P, *et al.* Immunogenicity and protective efficacy of *Tuberculosis* DNA vaccines encoding putative phosphate transport receptors. J Immunology, 1999, **162**(2): 1113~1119
- Doolan D L, Hoffman S L. Multi-gene vaccination against malaria: a multistage, multi-immune response approach. Parasitol Today, 1997, **13** (5) : 171~178
- Morris S, Kelley C, Howard A, *et al.* The immunogenicity of single and combination DNA vaccines against tuberculosis. Vaccine, 2000, **18** (20) : 2155~2163
- 蔡 宏, 潘 怡, 朱玉贤. 结核分枝杆菌多价核酸疫苗的构建及免疫原性. 科学通报, 2002, **47**(13): 966~971
Cai H, Pan Y, Zhu Y X. Sci Bull, 2002, **47**(13) : 966~971
- Donnelly J J, Ulmer J B, Shiver J W. DNA vaccines. Annu Rev Immunol, 1997, **15**(1) : 617~648
- Tighe H, Corr M, Roman M, *et al.* Gene vaccination: plasmid DNA is more than just a blueprint. Immunol Today, 1998, **19**(2) : 89~97
- Agger E M, Andersen P. Tuberculosis subunit vaccine development: on the role of interferon- γ . Vaccine, 2001, **19** (18) : 2298~2302
- Tanghe A, Denis O, Lambrecht B, *et al.* Tuberculosis DNA vaccine encoding Ag85 is immunogenic and protection when administered by intramuscular needle injection but not by epidermal gene gun bombardment. Infect Immun, 2000, **68** (7) : 3854~3860
- Delogu G, Li A, Repique C, *et al.* DNA vaccine combinations expressing either tissue plasminogen activator signal sequence fusion proteins or ubiquitin-conjugated antigens induce sustained protective immunity in a mouse model of pulmonary tuberculosis. Infect Immun, 2002, **70**(1) : 292~302
- Mark A C, Ann W, Graham H, *et al.* Vaccination of guinea pigs with DNA encoding the *Mycobacterial* antigen MPB83 influences pulmonary pathology but not hematogenous spread following aerogenic infection with *Mycobacterium bovis*. Infect Immun, 2002, **70** (4) : 2159~2165

Study on Immunogenicity and Protective Efficacy of Tetraivalent Combination *M.tuberculosis* DNA Vaccine*

GU Tian-Yuan²⁾, CAI Hong^{1)**}, TIAN Xia¹⁾, YU Da-Hai¹⁾, ZHU Yu-Xian¹⁾

(¹⁾The National Laboratory of Protein Engineering and Plant Genetic Engineering, Peking University, Beijing 100871, China;

²⁾School of Civil and Environmental Engineering, University of Science and Technology Beijing, Beijing 100083, China)

Abstract In order to evaluate the immunogenicity and protective efficacy of tetraivalent combination *M.tuberculosis* DNA vaccine, DNA vaccines encoding Ag85B, MPT64, MPT70 and PstS-3 protein were constructed with eukaryotic expression vector pJW4303. Combination DNA vaccines were inoculated intramuscularly into C57BL/6 mice three times at 3 weeks interval. After 21 days of the third injection, the specific antibody titers against the four antigens were 1:6 400, 1:51 200, 1:6 400 and 1:6 400. Meanwhile the mixed spleen cells could produce the high antigen-specific IFN- γ level in response to the four antigen proteins, IFN- γ level of Ag85B, MPT64, MPT70 and PstS-3 reached 10 582.14 ng/L, 13 635.97 ng/L, 14 213.15 ng/L and 9 657.35 ng/L respectively. After the last injection, mice were challenged with *M.tuberculosis* H37Rv. When compared to negative group, the bacterial counts of lung and spleen from the mice vaccinated with tetraivalent combination vaccine were reduced about 650 and 130 folds. Microphotographs showed clearly that lungs of mice vaccinated with combination vaccine were much better protected against *Mycobacterium tuberculosis* challenge than negative mice. The results showed that tetraivalent combination *M.tuberculosis* DNA vaccine elicited both T-cell and humoral immune response, and protected against tuberculosis effectively.

Key words *M.tuberculosis*, combination DNA vaccine, four proteins of Ag85B, MPT64, MPT70 and PstS-3, cell and humoral response, protective efficacy

*This work was supported by a grant from State 863 High Technology R&D Project of China (2002AA206411).

**Corresponding author . Tel: 86-10-62756077, E-mail: Hcai@pku.edu.cn

Received: November 12, 2004 Accepted: December 30, 2004