

携带口蹄疫病毒 B 细胞表位的兔出血症病毒样颗粒的表达及其免疫原性研究

盛 蓉^{1,2}, 宋艳华¹, 胡 波¹, 范志宇¹, 姜 平², 薛家宾¹, 魏后军¹, 王 芳¹

(1. 江苏省农业科学院 兽医研究所, 农业部兽用生物制品工程技术重点实验室, 国家兽用生物制品工程技术研究中心, 江苏 南京 210014; 2. 南京农业大学 动物医学院, 江苏 南京 210095)

摘要: 为了研究 RHDV 病毒样粒子作为载体提呈外源 B 细胞表位的能力, 以兔出血症病毒 (RHDV) 衣壳蛋白 VP60 为载体, 构建携带 FMDV B 细胞表位 (FMDV VP1 B 细胞表位 200~213aa) 的 VP60 嵌合蛋白, 研究外源基因对 VP60 蛋白的表达、病毒样颗粒 (VLPs) 的装配及免疫原性的影响。分别在 RHDV 衣壳蛋白的 C 端、N 端、306 和 307 位氨基酸之间插入外源 B 细胞表位 (FMDV VP1 B 细胞表位 200~213aa), 得到嵌合 VP60 基因。利用杆状病毒表达系统表达嵌合蛋白, 分别命名为 VP60-2F、VP60-306F 和 VP60-578F。经 IFA、SDS-PAGE 和 Western Blot 方法鉴定嵌合蛋白的表达, 通过电镜观察嵌合蛋白自聚为病毒样颗粒的能力, 通过动物试验研究其免疫原性。结果显示, 嵌合 VP60 蛋白在杆状病毒表达系统中得到高效表达, 可自聚形成病毒样颗粒, 免疫小鼠后可以产生针对 VP60 和 B 细胞表位特异的免疫应答。该研究为嵌合 VP60 VLPs 的形成及结构功能的研究奠定基础, 同时为 RHDV-VLPs 作为外源 B 细胞表位展示载体的可行性提供依据。

关键词: 兔出血症病毒; 病毒样颗粒; 口蹄疫病毒; B 细胞表位; 载体

中图分类号: S858.2912.65; Q78 文献标识码: A 文章编号: 1000-7091(2015)01-0142-08

doi: 10.7668/hbxb.2015.01.023

Study on the Expression and Immunogenicity of Chimeric Rabbit Hemorrhagic Disease Virus-like Particles as Carriers for B-cell Epitope of Foot-and-mouth Disease Virus

SHENG Rong^{1,2}, SONG Yan-hua¹, HU Bo¹, FAN Zhi-yu¹, JIANG Ping²,
XUE Jia-bin¹, WEI Hou-jun¹, WANG Fang¹

(1. Institute of Veterinary Medicine, Jiangsu Academy of Agricultural Sciences, Key Laboratory of Veterinary Biological Engineering and Technology, Ministry of Agriculture, National Center for Engineering Research of Veterinary Bio-products, Nanjing 210014, China; 2. College of Veterinary Medicine of Nanjing Agricultural University, Nanjing 210095, China)

Abstract: To explore the capacity of antigen presentation of the foreign B-cell epitopes by virus-like particles (VLPs) of rabbit hemorrhagic (RHDV), the VLPs of RHDV displaying B-cell epitope of foot-and-mouth disease virus (FMDV) were constructed. The sequences of a FMDV B-cell epitope were fused to the N-terminal, C-terminal and inserted between 306th and 307th aa of capsid protein of RHDV. The fused genes were cloned into the donor vector pFastBacTM HTA and three recombinant baculoviruses (rAc-VP60-2F, rAc-VP60-306F, rAc-VP60-578F) were constructed using Bac-to-Bac baculovirus expression system. These recombinant proteins were expressed effectively in insect cells as confirmed by IFA, SDS-PAGE and Western Blot. The immunogenicity of all chimeric VLPs was examined in mice. The results indicated the recombinant proteins could react with both anti-VP60 monoclonal

收稿日期: 2014-11-08

基金项目: 国家自然科学基金项目 (31070140)

作者简介: 盛 蓉 (1986-), 女, 湖北安陆人, 硕士, 主要从事畜禽传染病防控研究。盛蓉、宋艳华为同等贡献作者。

通讯作者: 王 芳 (1972-), 女, 新疆伊宁人, 研究员, 博士, 主要从事畜禽传染病免疫机理及防控技术研究。

antibody and anti-FMDV polyclonal antibody. And all recombinant proteins could self-assemble into VLPs by electron microscopy analysis. Furthermore, all chimeric VLPs were able to induce strong VP60-specific antibodies responses. In addition, there were significant differences of peptide-specific IgG antibodies induced by chimeric proteins, compared to that of VP60 group. The significant levels of serum antibodies against B-cell epitopes of FMDV demonstrated the feasibility of RHDV-VLP serving as a presentation carrier for foreign B-cell epitopes.

Key words: RHDV; Virus-like particles; FMDV; B-cell epitope; Vector

兔出血症(RHD)是家兔和野兔的一种高度传染性疾病,主要发生于2月龄以上成年兔,发病率和死亡率极高^[1-2]。RHD在1984年爆发于中国,后在全世界范围传播^[3]。其病原兔出血症病毒(RHDV)属于杯状病毒科,兔病毒属^[4-6],直径为35~40 nm,其表面有规则排列的杯状凹陷。病毒粒子的衣壳由一种60 kDa的主要结构蛋白(VP60)多重拷贝组成。目前RHDV VP60已被表达于多种异源系统,如杆状病毒-昆虫细胞系统^[7-9],酵母表达系统^[10-11]和植物^[12-13]等。通过这些系统表达获得的重组蛋白,免疫兔体后均可完全保护RHDV的攻击。

VLPs具有较强的免疫原性和反应原性,可诱导机体产生中和抗体和细胞免疫反应^[6],且不含遗传物质,因而作为候选疫苗抗原更加安全稳定。电子低温显微技术显示出RHDV VLPs的三维立体结构^[14],它由90个二聚体组成,其周围围绕32个大的凹陷。RHDV VP60蛋白可分为以下几个区域:NTA区(N端臂,1~65aa)、S区(外壳,66~229aa)、P区(突起,238~579aa)、连接S和P的短绞链(230~237aa)^[15]。N末端S结构域负责衣壳蛋白的形成,而C端P区形成于壳体延伸的拱状结构^[15-16]。P区还可以进一步划分为P1和P2区,P2区位于衣壳的表面。目前,VP60 VLPs作为表位载体和基因转移载体的相关研究表明,可在VP60 N、C末端区域以及306~307aa位插入外源片段,而不破坏病毒样颗粒的形成,为其发展成为携带多表位的载体疫苗提供依据^[6,16-19]。

研究表明,口蹄疫病毒复合多表位可诱导强烈的免疫反应^[20-26],其中包含口蹄疫病毒衣壳蛋白VP1 C末端的表位200~213aa^[20-27]。本研究将FMDV VP1 B细胞表位(200~213aa)插入VP60以下位点:C末端,其被预测位于VLPs的表面;N末端,其被预测在VLPs的内部;306~307aa。通过IFA、SDS-PAGE和Western Blot鉴定,所有的嵌合蛋白均得到有效的表达,且具有自聚能力。嵌合病毒样颗粒免疫小鼠后能够诱导机体产生分别针对VP60和FMDV表位的特异性体液免疫应答,本研究通过嵌

合体的构建,分析VLPs的形成,并对其免疫特性进行评估,为嵌合RHDV VLPs作为携带外源表位的载体效应研究奠定基础。

1 材料和方法

1.1 质粒、菌株、细胞和试验动物

供体质粒 pFastBac1-VP60 由江苏省农业科学院兽医所免病与生物技术实验室构建并保存,表达载体 pFastBacTMHTA 和 pFastBac1 购自 Invitrogen 公司;大肠杆菌 DH5 α 感受态购自北京全式金生物技术有限公司,大肠杆菌 DH10 Bac 感受态由本实验室保存;Sf9 昆虫细胞由本实验室培养;7~8周龄 ICR 雌性小鼠,购自扬州大学比较医学中心。

1.2 主要试剂与工具酶

限制性内切酶 *EcoR* I、*Sal* I、*Xba* I、*Hind* III、T4 DNA 连接酶、DNA Marker DL2000 及 DL15000、凝胶回收纯化试剂盒等购自大连宝生物工程有限公司;柱式质粒 DNAout 试剂盒、柱式动物 RNAout 购自北京天恩泽基因科技有限公司;PfxDNA 聚合酶、*Taq* 高保真酶、脂质体 LipofectamineTM2000 和 Grace's 不完全培养基购自 Invitrogen 公司;胎牛血清购自 GIBCO 公司;酶标兔抗小鼠 IgG (FITC-IgG) 购自北京鼎国昌盛生物技术有限公司;DAB 显色试剂盒购自武汉博士德生物工程有限公司;其他试剂均为国产分析纯级。小鼠抗 VP60 单抗 A3C 为本实验室制备保存^[28-29]。病毒样颗粒的电镜观察在 H-7650 型透射电镜上操作完成。

1.3 引物设计

1.3.1 设计合成引物 根据 GenBank 数据库 RHDV 皖阜株 VP60 基因序列(FJ794180)和 FMDV B 细胞表位(VP1 200~213aa)碱基序列,用 Primer 5.0 软件设计引物(由 Invitrogen 公司合成)(表1)。

1.3.2 合成 FMDV B 细胞表位 FMDV VP1 B 细胞表位(200~213aa: RHKQEIVAPVKQKL,其对应的基因序列:5'-CGTCACAAACAGGAAATCGTAGCTCCAGTAAAACAGAAGTTG-3')由 Invitrogen 公司合成(表2)。

表 1 本试验中所用引物序列
Tab.1 The sequences of primers used in the study

引物 Primer	序列 Sequence	限制性酶切位点 Restriction site
VP60-F	5'-TTTGAATTCATGGAGGGCAAAGCCCGCAC-3'	EcoR I
VP60-1R	5'-GCCGTCGACGACATAAGAAAAGCCATTGG-3'	Sal I
VP60-2R	5'-TTTGTGACCCCAGAATAACTTGCCTGCCTC-3'	Sal I
VP60-2F	5'-CACTCTAGAAACAACCTCCACCAACGTGCT-3'	Xba I
VP60-3R	5'-GCCAAGCTTTCAGACATAAGAAAAGCC-3'	Hind III
VP60-NF	5'-TTTCTAGAGAGGGCAAAGCCCGCAC-3'	Xba I

注:下划线标出的是酶切位点。表 2 同。

Note: The restrict enzyme sites were underlined. The same as Tab. 2.

表 2 本试验中合成的寡核苷酸序列
Tab.2 The sequences of synthesized soligonucleotides used in the study

序列 Sequence	限制性酶切位点 Restriction site
FMDV-F: 5'-CTAGACGTCACAAACAGGAAATCGTAGCTCCAGTAAAACAGAAAGTTGTGAA-3'	Xba I
FMDV-R: 3'-TGCAGTGTTTGTCCTTTCAGCATCGAGGTCAATTTGTCTTCAACACTTTCGA-5'	Hind III

1.4 重组穿梭载体的构建

1.4.1 重组转移载体的构建 为获得 3 种嵌合质粒 进行以下 PCR、酶切和连接操作: 以质粒 pFast-Bac1-VP60 为模板, VP60-F 和 VP60-1R 为引物扩增目的片段, PCR 产物经 EcoR I 和 Sal I 酶切后克隆至 pFastBac™ HTA 中, 酶切鉴定后, 得到重组转移载体, 命名为 pFastBac™ HTA-1。采用相同的方法, 以 VP60-NF 和 VP60-3R 为引物, 扩增含有 Xba I 和 Hind III 酶切位点的 PCR 产物, 并克隆至 pFastBac™ HTA 中, 得到重组转移载体, 命名为 pFastBac™ HTA-2。

以质粒 pFastBac1-VP60 为模板, VP60-F 和 VP60-2R 为引物, 扩增获得 VP60 1~918 bp 片段, 经 EcoR I 和 Sal I 酶切后克隆至 pFastBac™ HTA 中, 得到重组转移载体, 命名为 pFastBac™ HTA-3。同时, 以 VP60-2F 和 VP60-3R 为引物, 扩增获得 VP60 918~1740 bp 片段, 经 Xba I 和 Hind III 酶切后克隆至重组载体 pFastBac™ HTA-3 中, 得到重组转移载体, 命名为 pFastBac™ HTA-4。

FMDV(O/China/5/99 strain) B 细胞表位(F: 200~213aa) 的基因由人工合成(表 2), FMDV-F/FMDV-R 经退火处理后形成双链(Sal I/Xba I), 用 T4 DNA 连接酶将 Sal I/Xba I 酶切消化的重组载体 pFastBac™ HTA-1、pFastBac™ HTA-2 和 pFastBac™ HTA-4 分别与退火磷酸化处理的 FMDV VP1 B 细胞表位双链 DNA 连接, 最终获得 3 种重组转移载体 pFastBac™ HTA-VP60-578F、pFastBac™ HTA-VP60-2F 和 pFastBac™ HTA-VP60-306F。嵌合体氨基酸结构如图 1 所示。

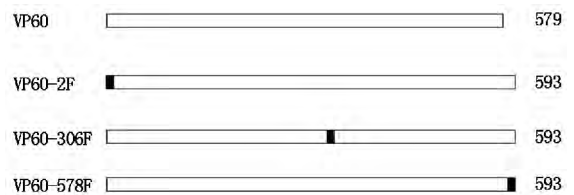


图 1 嵌合体 VP60-2F、VP60-306F 和 VP60-578F 示意图

Fig.1 The schematic diagram of the chimeric constructs (VP60-2F, VP60-306F and VP60-578F)

1.4.2 重组穿梭载体的构建 3 种重组转移载体分别转化含有穿梭载体 Bacmid 的 E. coli DH10 Bac 感受态细胞, 转化产物涂于含有 3 种抗生素(50 μg/mL 卡那霉素、7 μg/mL 庆大霉素、10 μg/mL 四环素)、X-gal(100 μg/mL) 和 IPTG(20 μg/mL) 的 LB 平板, 37 °C 培养 48 h 后, 挑选白色菌落培养并提取重组穿梭质粒, 以通用引物 pUC/M13 与特异性引物进行 PCR 鉴定并测序, 证明转座成功后, 将阳性重组质粒分别命名为 Bacmid-VP60-578F、Bacmid-VP60-2F 和 Bacmid-VP60-306F。

1.5 RHDV-VLPs 的表达和鉴定

1.5.1 细胞转染 以 Lipofectamin™2000 为共转染试剂, 按照说明, 将重组穿梭载体分别转染 Sf9 单层细胞。转染后每 12 h 观察一次, 细胞病变明显时收集细胞及上清液, 作为重组杆状病毒原液 4 °C 保存。将含目的基因的重组杆状病毒分别命名为 rAcV-Bac-578F、rAcV-Bac-306F 和 rAcV-Bac-2F。将第 1 代病毒液冻融 2 次后以 1% 体积比接种 Sf9 细胞传代, 得到第 2 代重组病毒。

1.5.2 间接免疫荧光检测 3 种重组病毒分别感染 Sf9 细胞, 同时以野生型杆状病毒感染的细胞作为阴性对照, 正常 Sf9 细胞作为空白对照, 实验室保

存的 rAcV-Bac-VP60 作为阳性对照。在感染 Sf9 细胞 24 h 后,以 1:200 稀释的 RHDV 单抗 A3C 为一抗,1:200 稀释的 FITC 标记的兔抗鼠 IgG 为二抗,进行间接免疫荧光检测嵌合 VP60 蛋白的表达。

3 种重组病毒分别感染 Sf9 细胞,同时以野生型杆状病毒感染的细胞作为阴性对照,正常 Sf9 细胞作为空白对照,实验室保存的 rAcV-Bac-VP60 作为阳性对照。在感染 Sf9 细胞 24 h 后,以 1:100 稀释的牛“O”型 FMDV 多抗血清为一抗,1:5 000 稀释的 FITC 标记的羊抗牛 IgG 为二抗,进行间接免疫荧光检测 FMDV B 细胞表位的表达。

1.5.3 SDS-PAGE 和 Western Blot 分析 收集感染重组病毒的细胞培养物,冻融处理后加入上样缓冲液进行蛋白质电泳(SDS-PAGE);以 1:200 稀释的 VP60 单抗 A3C 为一抗,1:5 000 稀释的 HRP 标记的兔抗鼠 IgG 为二抗,进行 Western Blot 检测嵌合 VP60 的表达。

收集感染重组病毒的细胞培养物,冻融处理后加入上样缓冲液进行蛋白质电泳(SDS-PAGE);以 1:100 稀释的牛源“O”型 FMDV 多抗血清为一抗,1:5 000 稀释的 HRP 标记的羊抗牛 IgG 为二抗,进行 Western Blot 检测 FMDV B 细胞表位的表达。

1.6 电镜观察

收集感染重组杆状病毒细胞培养物,反复冻融,离心去除细胞碎片,取上清经超滤管进行浓缩,每次 6 000 r/min 离心 7 min,浓缩 10 倍后备用,将待检嵌合蛋白样品滴于载样铜网上,吸附 2 min,用滤纸吸去多余样品,然后将 2% 的磷钨酸染液滴于铜网上,固定 2 min,最后除去多余的磷钨酸染液,室温干燥 5 min,于 H-7650 型透射电镜上进行观察。

1.7 嵌合蛋白免疫特性研究

1.7.1 抗原的制备 培养 Sf9 细胞至对数生长期,分别接种 3 种重组杆状病毒,6~7 d 后细胞出现明显病变,用灭菌磷酸盐缓冲溶液(PBS,pH 值 7.4)重悬细胞,反复冻融 3 次,离心去除细胞碎片,上清经超滤管纯化获得嵌合蛋白,用无菌 PBS 稀释为 400 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 。按抗原、弗氏佐剂 1:1 体积比混合。

1.7.2 动物免疫 将 36 只 7~8 周龄雌性 ICR 小鼠随机分成 6 组,分别腹腔注射 VP60-2F、VP60-306F、VP60-578F、VP60、FMDV 和 PBS,200 $\mu\text{L}/\text{只}$ (蛋白免疫量为 40 $\mu\text{g}/\text{只}$),共免疫 3 次,每次间隔 2 周,其中 PBS 组为阴性对照组,VP60 组为检测 VP60 特异性抗体效价的阳性对照组,FMDV 作为检测外源 B 细胞表位应答的阳性对照组。分别于首免后第 0、1、2、3、4、5、6 周采集小鼠血清。采用本实验室

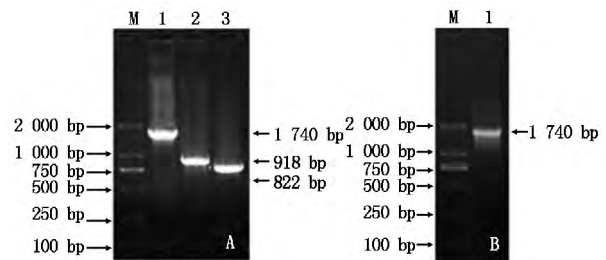
建立的间接 ELISA 方法^[30]检测各组免疫小鼠诱导产生 VP60 蛋白特异性抗体的水平;间接 ELISA (“O”型 FMDV ELISA 检测试剂盒购自武汉科前生物制品有限责任公司)检测 FMDV VP1 B 细胞表位特异性抗体水平。

1.7.3 数据处理 应用 Graph Pad PRISM CV5.02, www.graphpad.com) 软件,对数据统计分析,比较各组差异, $P < 0.05$ 表示差异显著。

2 结果与分析

2.1 目的基因的获得及其鉴定

以本实验室保存的 pFastBac1-VP60 为模板,利用 Primer 5.0 设计引物,进行 PCR 扩增,产物经 1% 琼脂糖凝胶电泳,获得符合目的片段大小的条带(图 2)。



A. PCR1 结果图; M. DNA 分子质量标准(DL2000); 1. VP60-EcoR I/Sal I (含有 EcoR I/Sal I 酶切位点的 VP60 基因); 2. VP60-(1~918 bp); 3. VP60-(918~1 740 bp); B. PCR2 结果图; M. DNA 分子质量标准(DL2000); 1. VP60-Xba I/Hind III (含有 Xba I/Hind III 酶切位点的 VP60 基因)。

A. Result of PCR1; M. DNA Marker (DL2000); 1. VP60-EcoR I/Sal I; 2. VP60-(1-918 bp); 3. VP60-(918-1 740 bp); B. Result of PCR2; M. DNA Marker (DL2000); 1. VP60-Xba I/Hind III.

图 2 重组 VP60 基因 PCR 结果

Fig. 2 PCR results of recombinant VP60 gene

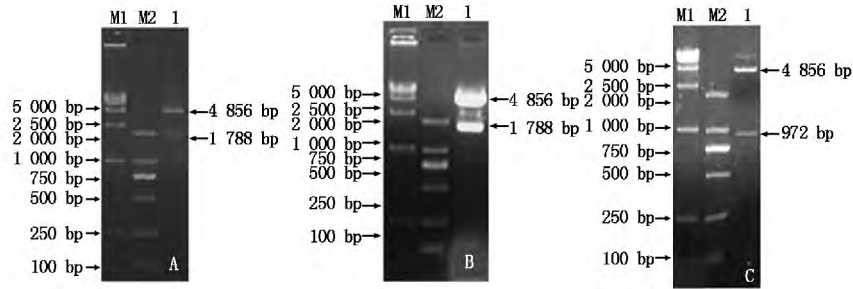
2.2 重组转移载体的鉴定

目的基因与 pFastBacTMHTA 连接转化 DH5 α 感受态细胞,挑菌提质粒进行双酶切鉴定,用限制性内切酶 EcoR I/Xba I、Sal I/Hind III 和 EcoR I/Xba I 分别对 3 种重组阳性质粒进行双酶切,经琼脂糖凝胶电泳可见 2 条大小分别为 4 856、1 788 bp 左右的条带(图 3-A、B),以及 4 856、972 bp(图 3-C)的条带,证明基因片段已克隆至真核表达载体 pFast-BacTMHTA。

2.3 重组穿梭载体的鉴定

用碱裂法提取 Bacmid,经 PCR 鉴定目的基因是否插入到 Bacmid 质粒中。以 pUC/M13 上、下游引物对重组质粒进行扩增,产物大小约为 4 000 bp,而以同样引物对未插入外源基因片段的穿梭载体 Bacmid 质粒进行扩增,产物大小约为 300 bp;pUC/M13 上游引物和目的基因下游引物扩增获得大小为 3 000 bp 的产物;以目的基因上、下游引物扩增获得

相应大小的目的基因,分别为 1 788, 1 794, 1 788 bp, 证明转座成功,重组杆状病毒基因构建完成(图 4)。

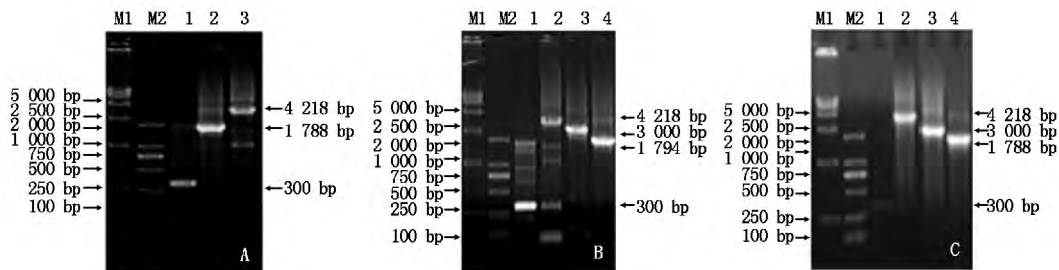


M1. DNA 分子质量标准(DL15000); M2. DNA 分子质量标准(DL2000); A. pFastBac™ HTA-VP60-578F-酶切鉴定: 1. pFastBac™ HTA-VP60-578F 酶切结果; B. pFastBac™ HTA-VP60-2F 酶切鉴定: 1. pFastBac™ HTA-VP60-2F 酶切结果; C. pFastBac™ HTA-VP60-306F 酶切鉴定: 1. pFastBac™ HTA-VP60-306F 酶切结果。

M1. DNA Marker DL15000; M2. DNA Marker DL2000; A. Identification of pFastBac™ HTA-VP60-578F: 1. Digestion of pFastBac™ HTA-VP60-578F; B. Identification of pFastBac™ HTA-VP60-2F: 1. Digestion of pFastBac™ HTA-VP60-2F; C. Identification of pFastBac™ HTA-VP60-306F: 1. Digestion of pFastBac™ HTA-VP60-306F.

图 3 重组质粒的酶切鉴定

Fig. 3 Identification of the recombinant plasmids

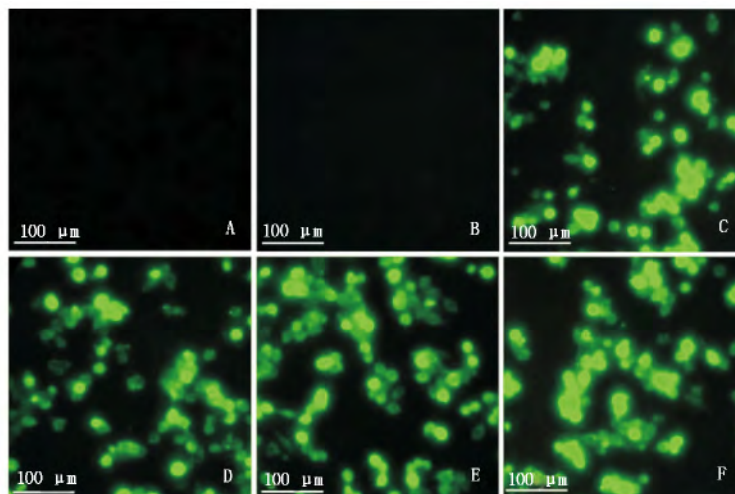


M1. DNA 分子质量标准(DL15000); M2. DNA 分子质量标准(DL2000); A. 重组质粒 PCR 鉴定: 1. 穿梭载体 Bacmid; 2, 3. 重组穿梭载体 Bacmid-VP60-2F 鉴定结果; B. 重组质粒 PCR 鉴定: 1. 穿梭载体 Bacmid; 2~4. 重组穿梭载体 Bacmid-VP60-306F 鉴定结果; C. 重组质粒 PCR 鉴定: 1. 穿梭载体 Bacmid; 2~4. 重组穿梭载体 Bacmid-VP60-578F 鉴定结果。

M1. DNA Marker (DL15000); M2. DNA Marker (DL2000); A. Identification of the recombinant Bacmid-VP60-2F: 1. Bacmid; 2, 3. Identification of Bacmid-VP60-2F; B. Identification of the recombinant Bacmid-VP60-306F: 1. Bacmid; 2~4. Identification of the Bacmid-VP60-306F; C. Identification of the recombinant Bacmid-VP60-578F: 1. Bacmid; 2~4. Identification of the Bacmid-VP60-578F.

图 4 重组 Bacmid 质粒的 PCR 鉴定

Fig. 4 Identification of the recombinant bacmid plasmids by PCR



A. 感染野生毒株(WT) 的细胞(阴性对照); B. 正常细胞(空白对照); C. 感染 rAcV-Bac-VP60 的细胞;

D. 感染 rAcV-Bac-2F 的细胞; E. 感染 rAcV-Bac-306F 的细胞; F. 感染 rAcV-Bac-578F 的细胞。

A. Cells infected with rAcV-WT (negative control); B. Normal cells blank control; C. Cells infected with rAcV-Bac-VP60;

D. Cells infected with rAcV-Bac-2F; E. Cells infected with rAcV-Bac-306F; F. Cells infected with rAcV-Bac-578F.

图 5 IFA 检测 3 种嵌合 VP60 蛋白的表达

Fig. 5 IFA analysis of the expression of the chimeric VP60 proteins

2.4 嵌合蛋白的表达和鉴定

Sf9 细胞 24 h 后,以 RHDV 单抗 A3C 为一抗, FITC

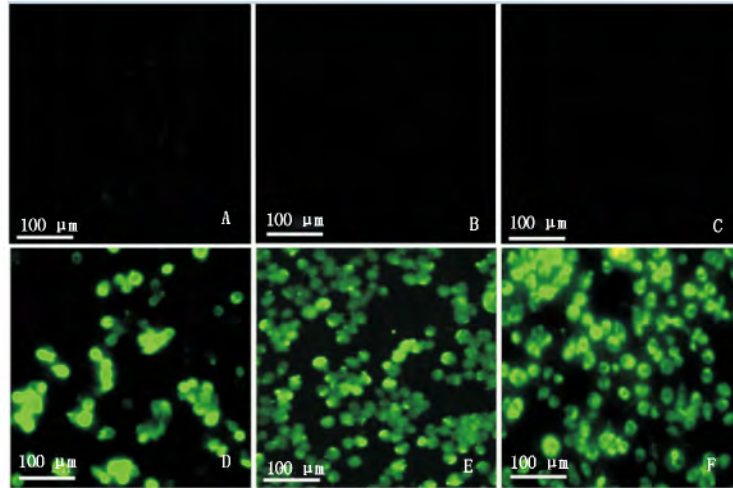
2.4.1 间接免疫荧光试验(IFA) 重组病毒感染

标记兔抗鼠 IgG 为二抗,进行间接免疫荧光染色。

结果表明, 感染野生型杆状病毒的 Sf9 细胞(图 5-A) 和空白对照细胞(图 5-B) 无特异荧光, 感染 rAcV-Bac-VP60、rAcV-Bac-2F、rAcV-Bac-306F、rAcV-Bac-578F 的 Sf9 细胞(图 5C~F) 具有很强的特异性荧光, 说明嵌合蛋白得到有效表达。

重组病毒感染 Sf9 细胞 24 h 后, 以牛多抗血清为一抗, 1:5 000 稀释的 FITC 标记羊抗牛 IgG 为二

抗, 进行间接免疫荧光染色。结果表明, 感染 rAcV-Bac-VP60(图 6-A)、野生型杆状病毒的 Sf9 细胞(图 6-B) 和空白对照细胞(图 6-C) 无特异荧光, 感染 rAcV-Bac-578F、rAcV-Bac-306F 和 rAcV-Bac-2F 的 Sf9 细胞(图 6-D~F) 具有很强的特异性荧光, 说明嵌合蛋白中的 VP1 B 细胞表位也得到了有效的表达。

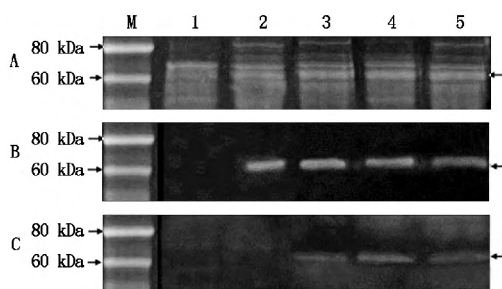


A. 感染野生毒株(WT)的细胞(阴性对照); B. 正常细胞(空白对照); C. 感染 rAcV-Bac-VP60 的细胞;
D. 感染 rAcV-Bac-2F 的细胞; E. 感染 rAcV-Bac-306F 的细胞 Blank control; F. 感染 rAcV-Bac-578F 的细胞。
A. Cells infected with rAcV-WT(Negative control); B. Normal cells(Blank control); C. Cells infected with rAcV-Bac-VP60;
D. Cells infected with rAcV-Bac-2F; E. Cells infected with rAcV-Bac-306F; F. Cells infected with rAcV-Bac-578F.

图 6 IFA 检测 3 种嵌合蛋白中 B 细胞表位的表达

Fig. 6 IFA analysis of the expression of B-cell epitope in chimeric proteins

2.4.2 SDS-PAGE 和 Western Blot 以 VP60 单抗 A3C 为一抗, HPR 标记兔抗鼠 IgG 为二抗, 检测嵌合蛋白的表达。以 FMDV 牛多抗血清为一抗, HPR 标记羊抗牛 IgG 为二抗, 检测 FMDV B 细胞表位的表达情况。结果显示: 目的基因在昆虫细胞中表达了大小约为 60 kDa 的特异性条带。免疫印迹与电泳的目的条带位置相符(图 7-A), 说明嵌合 VP60 蛋白得到表达(图 7-B), 且 FMDV B 细胞表位也得到了有效的表达(图 7-C)。

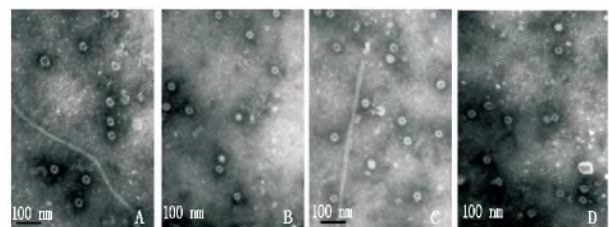


A. SDS-10% PAGE: 1. WT; 2. VP60; 3. VP60-2F; 4. VP60-306F; 5. VP60-578F. B. C. Western Blot: 1. WT; 2. VP60; 3. VP60-2F; 4. VP60-306F; 5. VP60-578F.

图 7 三种嵌合蛋白的 SDS-PAGE 和 Western Blot 分析结果
Fig. 7 Analysis result of SDS-PAGE and Western Blot of the chimeric proteins fused with epitope

2.5 电镜观察

经初步纯化的 3 种嵌合蛋白样品在透射电镜下均可观察到类似于天然 RHDV VLPs 的粒子, 大小约 40 nm, 证明了所表达的 3 种嵌合蛋白能够正确装配成 VLPs(图 8-B~D)。



比例尺为 100 nm; A. RHDV VP60 病毒样颗粒(阳性对照); B. VP60-2F 病毒样颗粒; C. VP60-306F 病毒样颗粒; D. VP60-578F 病毒样颗粒。

Scale bar. 100 nm. A. RHDV-VLPs(Positive control);
B. VP60-2F-VLPs; C. VP60-306F-VLPs; D. VP60-578F-VLPs.

图 8 RHDV VP60 蛋白和 3 种嵌合蛋白病毒样粒子的电镜观察结果

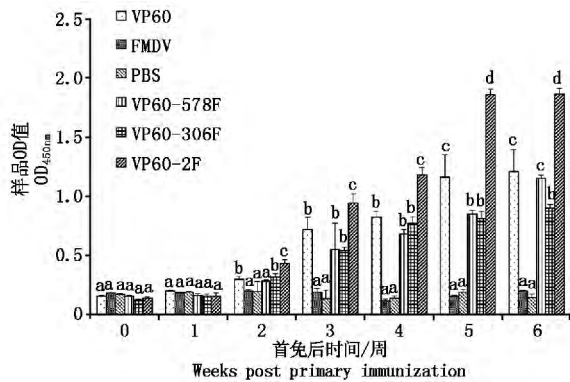
Fig. 8 Analysis result of RHDV VP60 and three chimeric VP60 VLPs by electron microscopy

2.6 嵌合蛋白诱导小鼠体液应答

将表达获得的 3 种嵌合蛋白与佐剂按体积比 1:1 混合免疫小鼠, 同时以 RHDV-VLPs 和 FMDV 灭活疫苗作为阳性对照, PBS 作为阴性对照。分别于

首免后 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6 周对各组小鼠进行尾静脉采血, 使用间接 ELISA 检测 VP60 特异性 IgG 和表位特异性 IgG 抗体水平。

IgG 抗体变化分析显示 3 种嵌合蛋白在首免后 4~6 周均可产生较强的 VP60 特异性抗体, 与 PBS 组比较差异显著 ($P < 0.05$) (图 9); 3 种嵌合蛋白刺激机体产生的表位特异性 IgG 抗体与 VP60 组相比差异显著 ($P < 0.05$), VP60 组未产生表位特异性抗体应答, 3 种嵌合蛋白均可诱导产生较强的表位特异性抗体应答 (图 10)。VP60-2F 蛋白诱导的 VP60 特异性 IgG 和表位特异性 IgG 水平与其他 2 种嵌合蛋白组存在显著差异 ($P < 0.05$), 明显高于其他 2 组 (图 9, 10)。此外, 作为阳性对照的 FMDV 商品化灭活苗组诱导产生最高水平的表位特异性 IgG 抗体 (图 10) ($P < 0.05$)。



不同字母 (a, b, c, d) 代表显著性差异 $P < 0.05$ 。图 10 同。

The different letters (a, b, c, d) indicated the significant difference ($P < 0.05$). The same as Fig. 10.

图 9 间接 ELISA 检测小鼠血清中 VP60 特异性抗体水平

Fig. 9 Detection of anti-VP60 antibody in serum of mice by indirect ELISA

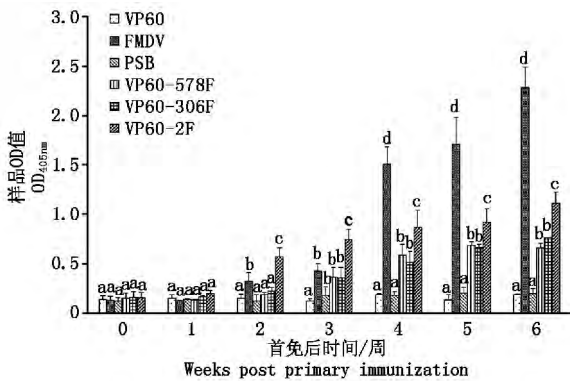


图 10 间接 ELISA 检测 FMDV B 细胞表位抗体水平

Fig. 10 Detection of anti-FMDV B-cell epitope antibody in serum of mice by indirect ELISA

3 讨论

病毒样颗粒 (VLPs) 是由一个或数个重组表达的病毒蛋白自发组装成的超分子结构, 与具有感染

性的病毒或亚病毒的颗粒相似。杯状病毒属的诺瓦克病毒^[31-34]和兔出血症病毒^[8, 10, 18]的衣壳蛋白均能够自我组装成病毒样颗粒^[8, 35], 且表现出较强的免疫原性。RHDV 的宿主特异性强, 只感染兔, 不威胁人类和其他动物。因此, RHDV 病毒样颗粒可以作为动物疾病甚至人类疾病的一种非常有效的疫苗载体。但 RHDV-VLPs 的可行性及作用效果尚需进一步研究。

本研究的主要目的是分析插入外源表位 (FM-DV VP1 B 细胞表位) 的嵌合蛋白能否形成病毒样颗粒, 评价 VP60 作为外源表位展示系统的可行性。结果表明, 所有的嵌合蛋白均可高水平表达并形成 VLPs, 说明在 VP60 蛋白的第 306~307aa 之间、C 端和 N 端插入外源片段均不影响 VLPs 的形成。具备自我装配的能力可能是 VLPs 作为疫苗候选物的重要特性, 正确组装的 VLPs 可形成高密度、高对称性的颗粒, 保证插入外源序列的正确定位, 确保 VLPs 的免疫原性。

嵌合 RHDV 病毒样颗粒包含口蹄疫病毒一个重要的 B 细胞表位: 200~213aa, 其片段经证实可诱导产生中和抗体。本试验通过 IFA 和 Western Blot 研究了 RHDV 嵌合 VLPs 的 VP60 特异性抗原反应和 FMDV 表位特异性。嵌合 VLPs 接种小鼠后发现经 3 种嵌合蛋白免疫的小鼠均能够诱导强烈的 VP60 特异性和表位特异性体液免疫应答。上述结果表明, RHDV VLPs 可作为携带 B 细胞表位的载体, 刺激机体对外源 B 细胞表位产生体液免疫应答, 也可作为异源抗原的展示载体。

参考文献:

- [1] Ferreira P G, Costa-e-Silva A, Monteiro E *et al.* Transient decrease in blood heterophils and sustained liver damage caused by calicivirus infection of young rabbits that are naturally resistant to rabbit haemorrhagic disease [J]. *Res Vet Sci* 2004, 76 (1): 83-94.
- [2] Xu Z J, Chen W X. Viral haemorrhagic disease in rabbits: a review [J]. *Vet Res Commun* 1989, 13 (3): 205-212.
- [3] Abrantes J, Van Der Loo W, Le Pendu J *et al.* Rabbit haemorrhagic disease (RHD) and rabbit haemorrhagic disease virus (RHDV): a review [J]. *Vet Res* 2012 (43): 12.
- [4] Cooke B D. Rabbit haemorrhagic disease: field epidemiology and the management of wild rabbit populations [J]. 2002, 21 (2): 347-358.
- [5] Parra F, Prieto M. Purification and characterization of a calicivirus as the causative agent of a lethal hemorrhagic disease in rabbits [J]. *J Virol*, 1990, 64 (8): 4013-4015.
- [6] Crisci E, Almanza H, Mena I *et al.* Chimeric calicivirus-like particles elicit protective anti-viral cytotoxic responses without adjuvant [J]. *Virology* 2009, 387 (2): 303-312.

- [7] Plana-Duran J ,Bastons M ,Rodríguez M J *et al.* Oral immunization of rabbits with VP60 particles confers protection against rabbit hemorrhagic disease [J]. *Arch Virol* 1996 ,141(8) : 1423 - 1436.
- [8] Laurent S ,Vautherot J F ,Madelaine M F *et al.* Recombinant rabbit hemorrhagic disease virus capsid protein expressed in baculovirus self-assembles into viruslike particles and induces protection [J]. *J Virol* 1994 ,68(10) : 6794 - 6798.
- [9] Nagesha H S ,Wang L F ,Hyatt A D *et al.* Self-assembly , antigenicity ,and immunogenicity of the rabbit haemorrhagic disease virus (Czechoslovakian strain V-351) capsid protein expressed in baculovirus [J]. *Arch Virol* 1995 ,140(6) : 1095 - 1108.
- [10] Boga J A ,Martín A J ,Casais R *et al.* A single dose immunization with rabbit haemorrhagic disease virus major capsid protein produced in *Saccharomyces cerevisiae* induces protection [J]. *Journal of General Virology* ,1997 (78) : 2315 - 2318.
- [11] Farnós O ,Rodríguez M ,Chiong M *et al.* The recombinant rabbit hemorrhagic disease virus VP60 protein obtained from *Pichia pastoris* induces a strong humoral and cell-mediated immune response following intranasal immunization in mice [J]. *Vet Microbiol* 2006 ,114(314) : 187 - 195.
- [12] Castañón S ,Marín M S ,Martín-Alonso J M *et al.* Immunization with potato plants expressing VP60 protein protects against rabbit hemorrhagic disease virus [J]. *J Virol* 1999 ,73(5) : 4452 - 4455.
- [13] Fernández-Fernández M R ,Mouriño M ,Rivera J *et al.* Protection of rabbits against rabbit hemorrhagic disease virus by immunization with the VP60 protein expressed in plants with a potyvirus-based vector [J]. *Virology* , 2001 280(2) : 283 - 291.
- [14] Thouvenin E ,Laurent S ,Madelaine M F *et al.* Bivalent binding of a neutralising antibody to a calicivirus involves the torsional flexibility of the antibody hinge [J]. *J Mol Biol* ,1997 270(2) : 238 - 246.
- [15] Wang X ,Xu F T ,Liu J S *et al.* Atomic model of rabbit hemorrhagic disease virus by cryo-electron microscopy and crystallography [J]. *PLOS Pathog* ,2013 ,9(1) : e1003132.
- [16] Laurent S ,Kut E ,Remy-Delaunay S *et al.* Folding of the rabbit hemorrhagic disease virus capsid protein and delineation of N-terminal domains dispensable for assembly [J]. *Arch Virol* 2002 ,147(8) : 1559 - 1571.
- [17] Bárcena J ,Morales M ,Vázquez B *et al.* Horizontal transmissible protection against myxomatosis and rabbit hemorrhagic disease by using a recombinant myxoma virus [J]. *Viro* 2000 ,74(3) : 1114 - 1123.
- [18] Nagesha H S ,Wang L F ,Hyatt A D. Virus-like particles of calicivirus as epitope carriers [J]. *Arch Virol* ,1999 , 144(12) : 2429 - 2439.
- [19] Bárcena J ,Verdaguer N ,Roca R *et al.* The coat protein of rabbit hemorrhagic disease virus contains a molecular switch at the N-terminal region facing the inner surface of the capsid [J]. *Virology* 2004 ,322(1) : 118 - 134.
- [20] DiMarchi R ,Brooke G ,Gale C *et al.* Protection of cattle against foot-and-mouth disease by a synthetic peptide [J]. *Science* ,1986 232: 639 - 641.
- [21] Francis M J ,Fry C M ,Rowlands D J *et al.* Immune response to uncoupled peptides of foot-and-mouth disease virus [J]. *Immunology* 1987 61(1) : 1 - 6.
- [22] Zamorano P I ,Wigdorovitz A ,Pérez Filgueira D M *et al.* Induction of anti foot and mouth disease virus T and B cell responses in cattle immunized with a peptide representing ten amino acids of VP1 [J]. *Vaccine* ,1998 ,16(6) : 558 - 563.
- [23] Baxter R ,Craigmile S C ,Haley C *et al.* BoLA-DR peptide binding pockets are fundamental for foot-and-mouth disease virus vaccine design in cattle [J]. *Vaccine* , 2009 28(1) : 28 - 37.
- [24] Zhang H Y ,Sun S H ,Guo Y J *et al.* Immune response in mice inoculated with plasmid DNAs containing multiple-epitopes of foot-and-mouth disease virus [J]. *Vaccine* , 2003 21(32) : 4704 - 4707.
- [25] Morgan D O ,Moore D M. Protection of cattle and swine against foot-and-mouth disease ,using biosynthetic peptide vaccines [J]. *Am J Vet Res* ,1990 51(1) : 40 - 45.
- [26] Briand J P ,Benkirane N ,Guichard G *et al.* A retro-inverso peptide corresponding to the GH loop of foot-and-mouth disease virus elicits high levels of long-lasting protective neutralizing antibodies [J]. *Proc Natl Acad of Sci USA* ,1997 94(23) : 12545 - 12550.
- [27] Wong H T ,Cheng S C ,Chan E W *et al.* Plasmids encoding foot-and-mouth disease virus VP1 epitopes elicited immune responses in mice and swine and protected swine against viral infection [J]. *Virology* ,2000 ,278(1) : 27 - 35.
- [28] 蔡少平 ,王 芳 ,贾华敏 ,等. 兔出血症病毒胶体金免疫层析试纸条诊断方法的建立及初步应用 [J]. *畜牧兽医学报* 2012 43(11) : 1795 - 1801.
- [29] 杨廷亚 ,王 芳 ,姜 平 ,等. 应用噬菌体展示技术筛选兔出血症病毒抗原模拟表位 [J]. *畜牧兽医学报* , 2012 43(8) : 1281 - 1286.
- [30] 李超美 ,王 芳 ,蔡少平 ,等. 检测兔出血症病毒抗体间接 ELISA 方法的建立 [J]. *江苏农业学报* 2010 26(3) : 546 - 550.
- [31] Di Martino B ,Marsilio F ,Roy P. Assembly of feline calicivirus-like particle and its immunogenicity [J]. *Vet Microbiol* 2007 ,120(1/2) : 173 - 178.
- [32] Nicollier-Jamot B ,Ogier A ,Piroth L *et al.* Recombinant virus-like particles of a norovirus (genogroup II strain) administered intranasally and orally with mucosal adjuvants LT and LT(R192G) in BALB/c mice induce specific humoral and cellular Th1/Th2-like immune responses [J]. *Vaccine* 2004 22(9110) : 1079 - 1086.
- [33] Han M G ,Cheetham S ,Azevedo M S *et al.* Immune responses to bovine norovirus-like particles with various adjuvants and analysis of protection in gnotobiotic calves [J]. *Vaccine* 2006 24(3) : 317 - 326.
- [34] Souza M ,Costantini V ,Azevedo M S *et al.* Human norovirus-like particle vaccine adjuvanted with ISCOM or mLIT induces cytokine and antibody responses and protection to the homologous GII. 4 human norovirus in a gnotobiotic pig disease model [J]. *Vaccine* ,2007 ,25(50) : 8448 - 8459.
- [35] Pérez-Filgueira D M ,Resino-Talaván P ,Cubillos C *et al.* Development of a low-cost ,insect larvae-derived recombinant subunit vaccine against RHDV [J]. *Virology* , 2007 364(2) : 422 - 430.