

李文良, 毛立, 杨蕾蕾, 等. 猪瘟病毒糖基化 E2 蛋白和 E0 蛋白的协同免疫保护作用[J]. 江苏农业学报, 2015, 31(2): 357-361.
doi:10.3969/j.issn.1000-4440.2015.02.021

猪瘟病毒糖基化 E2 蛋白和 E0 蛋白的协同免疫保护作用

李文良, 毛立, 杨蕾蕾, 张纹纹, 江杰元

(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)

摘要: 为了研究杆状病毒表达的糖基化亚单位疫苗的协同免疫保护作用, 将重组杆状病毒感染 Sf9 细胞制备猪瘟 E2、E0 重组蛋白, Western blot 检测蛋白表达和糖基化情况。用重组蛋白单独或联合免疫家兔, 检测血清中抗体水平变化。在首免后 4 周用猪瘟兔化弱毒疫苗 C 株攻毒家兔, 监测其体温变化, 并运用 RT-PCR 检测家兔脾脏中病毒 RNA。结果表明, E2、E2+E0 免疫组兔均可诱导产生高水平的抗体和中和抗体, 但两组间差异不显著。攻毒后 E2 免疫组 2/5 兔出现轻热症状, 1/5 兔脾脏病毒阳性; E2+E0 组兔均未出现发热症状, 也未检测到 C 株病毒 RNA。E0 组不能诱导兔产生中和抗体, 但也能提供部分保护(2/5)。可见, 基于 E2、E0 的亚单位疫苗具有良好的免疫原性, 且两者联合使用具有协同作用, 有望成为新型亚单位疫苗的候选抗原。

关键词: 猪瘟; 亚单位疫苗; E2 蛋白; E0 蛋白; 协同作用

中图分类号: S858.285.3 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-4440(2015)02-0357-05

Synergistic effect of glycosylated E2- and E0-based subunit vaccine of classical swine fever

LI Wen-liang, MAO Li, YANG Lei-lei, ZHANG Wen-wen, JIANG Jie-yuan

(*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*)

Abstract: Classical swine fever is one of the devastating diseases for pig industry and vaccination is critical for disease control. To study the synergistic effect of glycosylated E2 and E0 subunit vaccine, recombinant glycosylated E2 and E0 proteins were expressed with the recombinant baculoviruses infecting Sf9 cells, and identified by Western blot and de-glycosylation tests (PNGase F treatment). Rabbits were vaccinated with E2, E0 and E2+E0 proteins and boosted two weeks later. Antibody and neutralizing antibody in serum samples were determined by blocking ELISA and viral neutralization test. Four weeks post primary vaccination, rabbits were challenged with CSFV C-strain and body temperature was monitored. Spleens were collected from all rabbits to determine the viral RNA by RT-PCR. Results showed that the rabbits immunized with E2 and E2+E0 developed high-level CSFV-specific antibodies and neutralizing antibody. Two fifth of rabbits in E2 group exhibited mild fever and one fifth was positive for viral RNA in spleen. All rabbits in group E2+E0 were normal and

free of virus RNA. Although E0 vaccination did not induce detectable antibody, it gave partial protection (2/5). The results indicate that the recombinant E2 and E0 proteins possess good immunogenicities and have synergistic effect, and can be a candidate vaccine against CSF.

Key words: classical swine fever; subunit vaccine; E2 protein; E0 protein; synergistic effect

收稿日期: 2014-08-19

基金项目: 江苏省农业科技自主创新基金项目[CX(12)5049]

作者简介: 李文良(1984-), 男, 河南开封人, 博士, 助理研究员, 主要从事动物传染病防治和诊断技术研究。(Tel) 025-84391135; (E-mail) kfliwenliang@163.com

通讯作者: 江杰元, (Tel) 025-84391135, (E-mail) jieyuanj57@gmail.com

猪瘟(Classical swine fever, CSF)是由猪瘟病毒(Classical swine fever virus, CSFV)引起的一种猪的高度接触性传染病,对世界养猪业造成了严重危害^[1-3]。CSFV 属于黄病毒科(Flaviviridae)瘟病毒属(Pestivirus),基因组为单股正链 RNA,长约12 300 nt,编码1个由3 900个氨基酸组成的多聚蛋白^[4]。该蛋白在宿主和病毒蛋白酶作用下裂解成为4个结构蛋白[C、E0(E^{ms})、E1、E2]和8个非结构蛋白(N^{pro}、p7、NS2、NS3、NS4A、NS4B、NS5A、NS5B)^[4]。其中囊膜糖蛋白E2、E0介导病毒的感染入胞,还可以诱导产生保护性免疫反应,是重要的保护性抗原^[5-7]。最近有研究表明,E2、E0的糖基化对其免疫保护作用起决定作用,未糖基化的蛋白不具有免疫保护作用^[8]。

杆状病毒表达系统具有表达水平高,表达产物可进行翻译后加工,其抗原性、免疫原性和功能等生物活性与天然蛋白相似等特点。国内外许多学者采用该系统对E2蛋白进行了表达。目前国外已有商品化疫苗上市,这些疫苗还有配合使用的ELISA抗体鉴别检测方法^[4]。国内许多单位都利用杆状病毒表达系统进行E2、E0蛋白表达鉴定工作^[9-11],但多为单独表达蛋白,没有考虑重组蛋白糖基化水平的检测,也没有研究其免疫保护效果以及两者协同免疫的作用。

本研究利用杆状病毒表达系统表达猪瘟病毒糖基化E2、E0蛋白,将单独的E2以及E2与E0混合蛋白制备疫苗,通过兔体免疫保护试验检验两种重组蛋白的协同免疫保护作用,为CSFV亚单位疫苗的研究奠定基础。

1 材料与方法

1.1 病毒与试剂

重组杆状病毒 rAc-gE2 和 rAc-gE0 由本实验室构建、保存^[12-13]。Transzol UP 试剂、一步法 RT-PCR 试剂盒、His 单抗购自北京全式金生物技术有限公司;HRP 标记的羊抗兔 IgG 和羊抗小鼠 IgG 购自北京博奥森生物技术有限公司;DAB 显色试剂盒购自武汉博士德生物工程有限公司;ISA206 佐剂购自 SEPPIC 公司;猪瘟单抗 WH303 购自 VLA 公司;FITC-羊抗小鼠 IgG 购自武汉博士德生物工程有限公司;糖苷酶 PNGase F 购自 New England BioLabs 公司;猪瘟兔化弱毒(C株)由南京天邦生物科技有

限公司提供。

1.2 重组蛋白的制备与鉴定

将经过蚀斑纯化的第5代重组杆状病毒 rAc-gE2 和 rAc-gE0 分别感染 Sf9 细胞($MOI=5$),72 h 后收取细胞培养物,2 000 r/min 离心 10 min 后弃细胞培养上清,加入预冷的 0.01 mol/L pH 7.2 PBS,反复冻融 3 次,超声裂解细胞,4℃ 12 000 r/min 离心 15 min,吸取上清,测定其浓度后 -20℃ 保存。

采用 PNGase F 处理蛋白^[8],用 Western blot 鉴定 E2 和 E0 重组蛋白的表达与糖基化情况,具体操作方法参照试剂说明和文献^[12]。

1.3 兔体免疫攻毒试验

25 只新西兰大耳白兔平均分为 5 组,分别为 E2 免疫组(E2)、E2/E0 混合免疫组(E2+E0)、E0 免疫组(E0)、攻毒对照组(CC)和空白对照组(NC)。将重组蛋白 E2、E0 按每只兔子 200 μ g 与 ISA206 佐剂等体积混合乳化,E2+E0 组两种蛋白各 200 μ g 与 ISA206 佐剂等体积混合乳化,每只兔背部皮下注射 0.5 ml。间隔 2 周加强免疫一次。免疫 0 d、14 d、28 d 天分别采血,分离血清,-20℃ 保存备用。在第 28 d E2、E2+E0、E0 和 CC 组试验兔经耳缘静脉注射 100 RID_{50} 的 CSFV C 株,攻毒 0 h、12 h、24 h、36 h、42 h、48 h、54 h、60 h、66 h、72 h 测定直肠温度,绘制体温变化曲线,判断是否出现定型热与轻热反应。攻毒后 72 h,剖杀所有试验兔,采集脾脏,-20℃ 保存备用。

1.4 抗体检测

采用 IDEXX 阻断 ELISA 试剂盒检测血清中猪瘟特异性抗体水平变化,操作按照试剂盒说明书进行,阻断率小于 30% 的为阴性,大于 40% 为阳性,之间为可疑。采用中和试验^[14]检测血清中和抗体滴度。将血清 56℃ 灭活 30 min,用含 2% 小牛血清的 DMEM 营养液从 1/4 开始连续 2 倍倍比稀释至 1/1 024 后分别与等体积的 200 $TCID_{50}$ CSFV 混合,37℃ 孵育 1 h,加入 96 孔板培养的 PK-15 细胞,每个样品做 2 个重复。37℃ 培养 48 h 后,弃营养液,无水乙醇固定,采用 WH303 单抗进行间接免疫荧光检测,统计各孔病毒感染情况,计算中和抗体效价。

1.5 RT-PCR

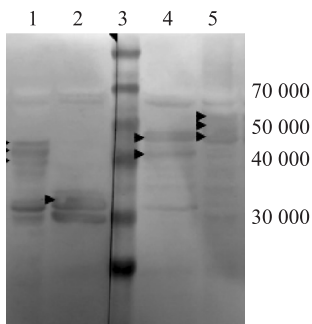
采用 RT-PCR 检测脾脏中 C 株病毒存在情况。取 0.2 g 脾脏样品,加入 1.0 ml 无菌 PBS,匀浆处理

后反复冻融 3 次,2 000 r/min 离心 5 min,取 200.0 μ l 上清加入 1.0 ml Transzol UP,提取总 RNA,最终溶于 20.0 μ l 无 RNase 水中。RT-PCR 体系为:RNA 4.0 μ l,酶 *E-Mix* 0.5 μ l,反应缓冲液 2 \times R-Mix 10.0 μ l,上下游引物各 0.5 μ l (F:5'-GTCACAGCACTTA-ATGTGGTC-3'; R: 5'-CACTTACCTATGGGGTAGT-GTG-3'),无 RNase 水补足至 20.0 μ l。反应程序为 45 $^{\circ}$ C 40 min,94 $^{\circ}$ C 预变性 5 min;以 94 $^{\circ}$ C 30 s,54 $^{\circ}$ C 30 s,72 $^{\circ}$ C 40 s 进行 35 次循环;最后 72 $^{\circ}$ C 延伸 10 min。琼脂糖凝胶电泳检测目的条带。

2 结果

2.1 重组蛋白制备与鉴定

将第 5 代重组杆状病毒 rAc-gE2 和 rAc-gE0 分别感染 Sf9 细胞,制备重组蛋白。用 PNGase F 分别处理两种蛋白,与未处理的蛋白同时进行 Western blot 检测,E0 蛋白采用 His 单抗,E2 蛋白采用 WH303 单抗。如图 1 所示,两种蛋白均获得高效表达,经糖苷酶处理后分子量明显减少(箭头所示),证实其为糖基化蛋白。目的蛋白含量约占总蛋白的 10%。



1:未处理的 E0;2:处理后的 E0;3:蛋白 marker;4:处理后的 E2;5:未处理的 E2。

图 1 重组蛋白的 Western blot 鉴定

Fig. 1 Western blot analysis of recombinant E2 and E0 proteins

2.2 抗体水平检测

免疫前,各组兔抗体均为阴性。E2 和 E2+E0 免疫组兔于免疫后 2 周开始产生猪瘟特异性抗体,加强免疫后抗体水平进一步升高,4 周时抗体达到较高水平,但两组间没有显著差异($P>0.05$)。而 E0 组和对照组兔均未检测到特异性抗体(图 2)。

通过检测免疫 4 周时血清中和抗体滴度,发现 E2、E2+E0 免疫组兔中和抗体效价在 1/64 左右,最高达 1/256,两组间差异不显著($P>0.05$)。而 E0 组和对照组兔中和抗体效价均低于 1/8(图 3)。

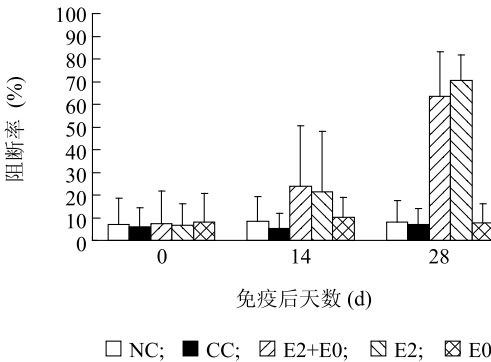


图 2 免疫后各组 ELISA 抗体滴度变化

Fig. 2 Detection of serum antibody titers in rabbits using blocking ELISA

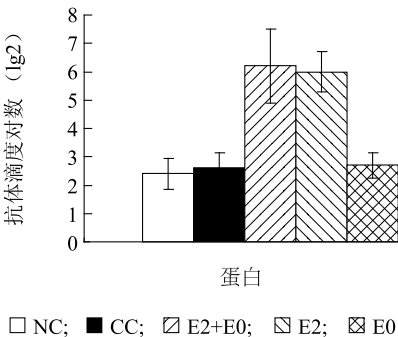


图 3 免疫 28 d 中和抗体滴度

Fig. 3 Detection of neutralizing antibody titers in rabbits at 28 d post vaccination

2.3 兔体免疫保护作用

攻毒后 CC 组 5 只试验兔在 36 h 后均先后出现定型热反应,体温最高达 41.9 $^{\circ}$ C。E0 组有 2 只出现定型热,1 只为轻热;E2 组 2 只出现轻热反应;E2+E0 组未出现发热(图 4,表 1)。RT-PCR 检测结果表明,E2+E0 免疫兔脾脏中均没有检测到 C 株病毒 RNA,而从 E2 和 E0 单独免疫兔脾脏中分别有 1 只和 2 只检出病毒 RNA,CC 组有 4 只样品检出(表 1)。以上结果表明,E0、E2 蛋白单独免疫均能诱导兔体产生 CSFV 特异的免疫反应,此反应对猪瘟病毒攻击具有保护作用,两种蛋白联合使用能产生更好的效果。

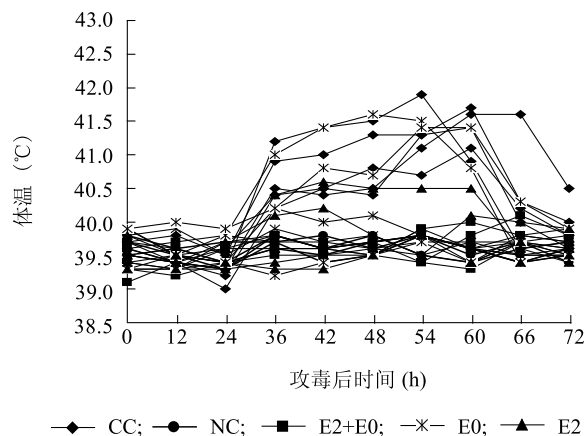


图4 C株病毒攻毒后兔体温变化

Fig. 4 Fever reactions of the rabbits following challenge with CSFV C-strain

表1 试验兔热型与脾脏病毒检测结果统计

Table 1 Summary of the fever reactions and viral load in rabbit spleen

组别	热型	RT-PCR	组别	热型	RT-PCR
NC	不发热	-	E2+E0	不发热	-
	不发热	-		不发热	-
	不发热	-		不发热	-
	不发热	-	E2	不发热	-
	不发热	-		轻热	-
CC	定型热	+		不发热	-
	定型热	-	E0	轻热	+
	定型热	+		不发热	-
	定型热	+		定型热	+
	定型热	+		定型热	+
E2+E0	不发热	-		不发热	-
	不发热	-		轻热	-
	不发热	-			

+:存在C株病毒;-:无C株病毒。

状病毒表达系统具有与动物细胞相似的转录翻译及翻译后加工等功能,包括糖基化、磷酸化、酰基化、信号肽切除等,外源蛋白在细胞内可以进行正确的折叠而基本保持原有的生物活性。因此,杆状病毒表达系统经常用来表达具有特定结构功能的糖蛋白。糖苷酶 PNGase F 能够切除天冬酰胺(N-糖基化位点)上的寡糖链,使蛋白分子量减少,因此可用来鉴定糖基化蛋白。

在前期研究中,我们分别构建了表达糖基化 E2、E0 蛋白的重组杆状病毒。随后对病毒进行了蚀斑纯化,提高了病毒的滴度和蛋白的表达量。为了分析两者是否具有免疫保护作用,在兔体上进行了免疫攻毒试验。C 株是在家兔上反复传代致弱而得到的,对猪只有良好的安全性和免疫效力,没有致病性,但对家兔有一定的致病性,可以使其产生发热反应,并且病毒在脾脏等淋巴组织内广泛复制^[15]。因此,本研究以家兔作为模型评价了重组蛋白的免疫效力。试验结果显示,E2 和 E2+E0 免疫组免疫后 2 周即可检测到猪瘟特异性抗体的产生,加强免疫后抗体滴度进一步升高(大部分抗体阻断率达到 60% 以上),中和抗体检测亦得到相似的结果,但两组间无显著差异,这说明 E2 蛋白具有良好的免疫原性。攻毒后 CC 组全部出现定型热;E2 组有 2 只兔出现轻热反应,而 E2+E0 组均未出现发热,RT-PCR 检测 E2 组 1 份脾脏样品为阳性,E2+E0 组均为阴性,表明 E2 能提供保护性免疫应答,且与 E0 联合使用具有更好的效果。本实验中 E0 免疫组没有检测到 ELISA 抗体和中和抗体,但仍能提供一定的免疫保护(2 只无发热),这与 Gavrillov 等的报道^[8]相似:糖基化的 E0 蛋白能够提供猪体免疫保护,但在免疫 3 次后均不能检测到中和抗体的存在。这提示 E0 蛋白可能主要通过激活细胞免疫等方式提供免疫保护效果。

总之,本研究通过兔体免疫攻毒试验验证基于糖基化 E2、E0 蛋白的亚单位疫苗能够诱导保护性免疫反应,且两者具有协同效果,这将为猪瘟新型亚单位疫苗的研究提供新的思路 and 方向。

参考文献:

- [1] 李文良,毛立,张纹纹,等. 猪瘟病毒糖基化 E2 蛋白在重组杆状病毒中的表达与鉴定[J]. 江苏农业学报,2013,29(2): 341-345.

3 讨论

对于病毒的糖蛋白来说,糖基化会影响蛋白的构象和中和抗体的产生。CSFV 的囊膜蛋白 E2、E0 是重要的保护性抗原,其糖基化对免疫保护效果起关键作用,因此,获得正确糖基化的蛋白对于 CSFV 新型疫苗的研制至关重要。杆状病毒表达系统是目前常用的真核表达系统之一,其表达外源蛋白具有产量高、抗原性好、操作简便快速等优点。此外,杆

- [2] 华利忠,吴文开,邵国青. 发酵床与传统水冲圈模式下猪瘟、蓝耳病及口蹄疫血清抗体差异调查[J]. 江苏农业科学,2014,42(9):178-180.
- [3] 王风云,林 峰,陈玉霞,等. 猪瘟与猪链球菌病混合感染的诊断与防治[J]. 江苏农业科学,2014,42(9):183-185.
- [4] DONG X N, CHEN Y H. Marker vaccine strategies and candidate CSFV marker vaccines[J]. *Vaccine*, 2007, 25(2):205-230.
- [5] WEILAND E, STARK R, HAAS B, et al. Pestivirus glycoprotein which induces neutralizing antibodies forms part of a disulfide-linked heterodimer[J]. *J Virol*, 1990, 64(8):3563-3569.
- [6] WANG Z, NIE Y, WANG P, et al. Characterization of classical swine fever virus entry by using pseudotyped viruses: E1 and E2 are sufficient to mediate viral entry[J]. *Virology*, 2004, 330(1):332-341.
- [7] DONG X N, CHEN Y H. Candidate peptide-vaccines induced immunity against CSFV and identified sequential neutralizing determinants in antigenic domain A of glycoprotein E2[J]. *Vaccine*, 2006, 24(11):1906-1913.
- [8] GAVRILOV B K, ROGERS K, FERNANDEZ-SAINZ I J, et al. Effects of glycosylation on antigenicity and immunogenicity of classical swine fever virus envelope proteins [J]. *Virology*, 2011, 420(2):135-145.
- [9] 查云峰,徐兴然,肖 昌,等. 猪瘟病毒 E2 基因在昆虫细胞中的分泌表达及活性检测[J]. 畜牧兽医学报,2005,36(10):1100-1105.
- [10] 范学政,徐 璐,王 琴,等. 猪瘟病毒 E2 基因密码子优化后在昆虫细胞中的表达[J]. 中国兽医杂志,2011,43(5):560-568.
- [11] 韩建强,信爱国. 猪瘟病毒 E^{ms} 和 E2 基因在昆虫细胞中的表达研究[J]. 西南大学学报:自然科学版,2011,33(2):23-27.
- [12] 李文良,毛 立,张纹纹,等. 猪瘟病毒糖基化 E2 蛋白在重组杆状病毒中的表达与鉴定[J]. 江苏农业学报,2013,29(2):341-345.
- [13] 李文良,毛 立,张纹纹,等. 应用重组杆状病毒表达猪瘟病毒糖基化 E0 (E^{ms}) 蛋白[J]. 畜牧与兽医,2013,45(3):50-53.
- [14] LI W L, MAO L, YANG L L, et al. Development and partial validation of a recombinant E2-based indirect ELISA for detection of specific IgM antibody responses against classical swine fever virus [J]. *J Virol Methods*, 2013, 191(1):63-68.
- [15] 孙 元,祁巧芬,梁冰冰,等. 表达猪瘟病毒 E2 蛋白的重组腺病毒的构建及其在兔体内的免疫原性分析[J]. 生物工程学报,2008,24(10):1734-1739.

(责任编辑:孙 宁)