

胡 波, 盛 蓉, 宋艳华, 等. RHDV VLPs 对口蹄疫病毒 B 细胞表位的展示效果[J]. 江苏农业学报, 2015, 31(6): 1362-1370.
doi: 10.3969/j.issn.1000-4440.2015.06.026

RHDV VLPs 对口蹄疫病毒 B 细胞表位的展示效果

胡 波¹, 盛 蓉^{1,2}, 宋艳华¹, 范志宇¹, 魏后军¹, 薛家宾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: 为研究兔出血症病毒(RHDV)病毒样颗粒(VLPs)携带外源表位的能力及其免疫原性, 以兔出血症病毒(RHDV)衣壳蛋白 VP60 为载体, 分别在 RHDV VP60 蛋白质的 C 端、N 端和 306 位插入 FMDV VP1 双串联 B 细胞表位[GS-(200~213 aa)-GS-(141~160 aa)], 得到嵌合蛋白质, 分别命名为 VP60-2FB、VP60-306FB 和 VP60-578FB。经 IFA、SDS-PAGE 和 Western blot 鉴定, 嵌合 VP60 蛋白质在杆状病毒表达系统中均得到有效表达; 通过电镜观察发现嵌合蛋白质可自聚成病毒样颗粒。将嵌合蛋白质免疫小鼠, 检测产生的免疫应答情况, 结果显示, 嵌合蛋白质可以产生针对 VP60 特异的免疫应答, 且在插入长度为 42 aa 外源氨基酸片段的情况下, 嵌合蛋白质免疫的小鼠仍能诱导产生较高水平的针对外源表位的特异性应答。在进一步扩展了载体的容纳性后, 序列的增加不影响 VLPs 的形成以及对外源表位的递呈效果, 说明 VP60-VLPs 作为外源 B 细胞表位展示载体是可行性的。

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: Q78 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-4440(2015)06-1362-09

Presentation of B-cell epitope of foot-and-mouth disease virus in rabbit hemorrhagic disease virus-like particles

HU Bo¹, SHENG Rong^{1,2}, SONG Yan-hua¹, FAN Zhi-yu¹, WEI Hou-jun¹, XUE Jia-bin¹, 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, 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 disease virus (RHDV), the sequences of multi-copy B-cell epitopes of foot-and-mouth disease virus (FMDV) [FMDV VP1 GS-(200-213 aa)-GS-(141-160 aa)] were fused to N-terminal and C-terminal and inserted between 306th and 307th amino acid of capsid protein of RHDV. The fused genes were cloned into the donor vector pFastBacTM HTA and three recombinant baculoviruses (rAc-VP60-2FB, rAc-VP60-306FB, rAc-VP60-578FB) were

obtained using Bac-to-Bac baculovirus expression system. These chimeric proteins were expressed effectively in insect cells as confirmed by IFA, SDS-PAGE and Western blot. The immunogenicity of all chimeric proteins was evaluated in mice. The results showed that the chimeric proteins could react with both anti-VP60 monoclonal antibody and anti-FMDV polyclonal antibody. And all recombinant proteins could self-assemble into VLPs under

收稿日期: 2015-03-23

基金项目: 国家自然科学基金项目(31070140); 现代农业产业技术体系建设专项基金项目(CARS-44)

作者简介: 胡 波(1982-), 男, 江苏南京人, 硕士, 助理研究员, 主要从事畜禽疫病防控与兽医生物技术研究。(Tel) 025-84390337; (E-mail) hadisi2002@163.com

通讯作者: 王 芳, (E-mail) rwangfang@126.com

electron microscopy, and were able to induce VP60-specific antibodies responses. The peptide-specific antibody maintained a high level when the inserted foreign fragments were up to 126 bp. The length of the foreign genes carried by VP60-VLPs was extended in this study, which demonstrated the feasibility of VP60-VLPs serving as a presentation carrier for foreign B-cell epitope.

Key words: RHDV; virus-like particle; foot-and-mouth disease virus; B cell epitope; vector

兔出血症(Rabbit hemorrhagic disease, RHD)是由兔出血症病毒(Rabbit hemorrhagic disease virus, RHDV)引起的一种具有高度传染性、高发病率、高致死性的疾病,主要发生于2月龄以上成年兔^[1-2]。兔出血症病毒属于杯状病毒属,无囊膜,直径为35~40 nm^[3-6]。病毒衣壳由180个衣壳蛋白组成,表面有32个高5~6 nm的圆柱状壳粒,具有嵌杯样病毒典型的杯状结构形态^[7]。RHDV衣壳蛋白VP60由579个氨基酸组成,是病毒衣壳组成的最基本单位。

衣壳蛋白VP60是病毒的免疫保护性抗原,与诱导机体抗感染免疫直接相关^[8],单独表达VP60蛋白能够自聚成病毒样颗粒(VLPs)。目前研究学者已采用多种异源系统对VP60进行表达,如杆状病毒-昆虫细胞系统^[9-10]、酵母表达系统^[11]和植物^[12]等。通过这些系统表达获得的重组VP60蛋白免疫动物后能够抵抗病毒的感染,提供完全的免疫保护。目前VP60 VLPs作为表位载体和基因转移载体的相关研究结果表明,可在VP60 N、C末端区域以及306~307 aa位插入外源片段,且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了依据^[6,13-14]。

口蹄疫病毒(Foot-and-mouth disease virus, FMDV)复合多表位可诱导强烈的免疫反应^[15-17],O型FMDV至少有5个B细胞表位,其中包括VP1的141~160位(G-H环)和C端200~213位氨基酸残基线性表位,这2个表位是FMDV最重要的抗原位点^[18]。本研究将FMDV VP1 2个B细胞表位串联后[GS-(200~213 aa)-GS-(141~160 aa)]插入VP60的C末端(位于VLPs的表面)、N末端(位于VLPs的内部)和306~307 aa之间,构建一系列嵌合VP60蛋白,并将嵌合病毒样颗粒免疫小鼠,检测机体诱导产生针对VP60和FMDV表位的特异性免疫应答,分析VLPs对外源表位的递呈能力,以及外源片段对VLPs的形成及其自身免疫特性的影响,为VP60 VLPs作为外源表位载体展示系统的研究奠定基础。

1 材料与方法

1.1 质粒、菌株、细胞和实验动物

载体pFastBacTMHTA购自Invitrogen公司,质粒pFastBac1-VP60由本实验室构建并保存^[8]; *E. coli* DH5 α 感受态购买自北京全式金生物技术有限公司; *E. coli* 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

DNA Marker DL2000及DL15000、限制性内切酶(*Eco*R I、*Sal* I、*Xba* I、*Hind* III)、T4 DNA连接酶、凝胶回收纯化试剂盒等购自大连宝生物工程有限公司; 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,柱式质粒DNAout试剂盒、柱式动物RNAout试剂盒购自北京天恩泽基因科技有限公司,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,弗氏完全佐剂和不完全佐剂购自Sigma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^[19-20]。

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序列(FJ794180),利用Primer 5.0软件设计引物,由Invitrogen公司合成,引物序列见表1。

1.3.2 合成FMDV B细胞表位序列 FMDV VP1 B细胞表位的双串联序列[GS-(411~1 060 aa)-GS-(200~213 aa)-GS],简称FB,由Invitrogen公司合成。序列为: GTCGACGCGCAGCGTACCAAACCTGCGTGGTGACCTGCAGGTACTTGCTCAGAAAGTTGCTCGTACTCTGCCAGGCAGCCGTCACAAACAGGAAATCGTAGCTCAGTAAACAGAAAGTTGGGCAGCTCTAGA(下划线部分是GS linker,斜体部分是酶切位点)。

表 1 试验中所用引物序列

Table 1 The sequences of primers used in the study

引物	序列	酶切位点(下划线部分)
VP60-F	5'-TTTGAATTCATGGAGGGCAAAGCCCGCAC-3'	<i>EcoR</i> I
VP60-1R	5'-GCCGTCGACGACATAAGAAAAGCCATTGG-3'	<i>Sal</i> I
VP60-2R	5'-TTTGTCCGACCCAGAATAACTTGCCTGCCTC-3'	<i>Sal</i> I
VP60-2F	5'-CACTCTAGAAACAACCTCCACCAACGTGCT-3'	<i>Xba</i> I
VP60-3R	5'-GCCAAGCTTTCAGACATAAGAAAAGCC-3'	<i>Hind</i> III
VP60-NF	5'-TTTCTAGAGAGGGCAAAGCCCGCAC-3'	<i>Xba</i> I

1.4 重组穿梭载体的构建

1.4.1 重组转移载体的构建 以 VP60-F 和 VP60-1R 为引物,质粒 pFastBac1-VP60 为模板,扩增目的片段,PCR 产物经 *EcoR* I 和 *Sal* I 酶切后克隆至 pFastBacTM HTA 中,酶切鉴定后获得重组转移载体,命名为 pFastBacTM HTA-1;以 VP60-NF 和 VP60-3R 为引物,以质粒 pFastBac1-VP60 为模板,扩增含有 *Xba* I 和 *Hind* III 酶切位点的 PCR 产物,并克隆至 pFastBacTM HTA 中,得到的重组转移载体命名为 pFastBacTM HTA-2。以 VP60-F 和 VP60-2R 为引物,质粒 pFastBac1-VP60 为模板,扩增 VP60 1~918 bp 片段,经 *EcoR* I 和 *Sal* I 酶切后克隆至 pFastBacTM HTA 中,得到重组转移载体 pFastBacTM HTA-3。此外,以 VP60-2F 和 VP60-3R 为引物,扩增获得 VP60 918~1 740 bp 片段,经 *Xba* I 和 *Hind* III 酶切后克隆至 pFastBacTM HTA-3 中,得到重组转移载体,命名为 pFastBacTM HTA-4。FMDV (O/China/5/99 strain) B 细胞表位[FB (GS-(141-160 aa)-GS-(200-213 aa)-GS)]由人工合成,FMDV-F/FMDV-R 经退火处理后形成双链(*Sal* I/*Xba* I),用 T4 DNA Ligase 将 *Sal* I/*Xba* I 酶切消化后的载体(pFastBacTM HTA-1、pFastBacTM HTA-2 和 pFastBacTM HTA-4)与退火磷酸化处理的 FMDV VP1 B 细胞表位双链 DNA 连接,形成 3 种重组转移载体 pFastBacTM HTA-VP60-2FB、pFastBacTM HTA-VP60-578FB 和 pFastBacTM HTA-VP60-306FB。嵌合体结构示意图见图 1。

1.4.2 重组穿梭载体的构建 制备 *E.coli* DH10 Bac 感受态细胞,分别转化 3 种重组转移载体,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)、100 μg/ml X-gal 和 20 μg/ml IPTG 的 LB 平板,37 ℃ 培养 48 h 后,挑选白色菌落培养后提取质粒。用 M13/PUC 通用上下游

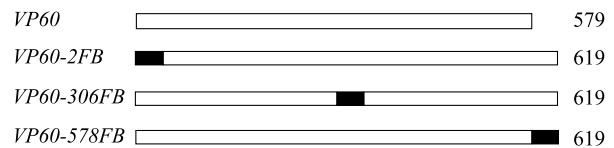


图 1 嵌合体 VP60-2FB、VP60-306FB 和 VP60-578FB 示意图

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

引物对提取的重组穿梭载体进行 PCR 鉴定,并进行测序,重组穿梭质粒分别命名为 Bacmid-VP60-578FB、Bacmid-VP60-2FB 和 Bacmid-VP60-306FB。

1.5 VP60-VLPs 的表达和鉴定

1.5.1 细胞转染 将鉴定为阳性的重组穿梭载体(Bacmid-VP60-578FB、Bacmid-VP60-2FB 和 Bacmid-VP60-306FB)用脂质体 LipofectaminTM 2000 转染至对数生长期的 Sf9 昆虫细胞。转染后每 12 h 观察 1 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 ℃ 保存。将获得的重组杆状病毒分别命名为 rAcV-Bac-578FB、rAcV-Bac-306FB 和 rAcV-Bac-2FB。将第 1 代病毒液反复冻融 3 次后以 1% 体积比接种 Sf9 细胞,进行传代,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 24 孔细胞培养板上对数生长期的 Sf9 细胞,同时设置空白对照(正常细胞)和阴性对照(感染野生型杆状病毒),本实验室构建的 rAcV-Bac-VP60 作为阳性对照。在感染 Sf9 细胞 24 h 后,加入预冷的乙醇固定液,4 ℃ 作用 1 h;PBS 洗涤 3 次,分别以 1:200 稀释的 RHDV 单抗 A3C 和 1:100 稀释的牛“O”型 FMDV 多抗血清为一抗,37 ℃ 孵育细胞 1 h;随后用 PBS 反复洗涤 3 次,分别对应加入 FITC 标记的羊抗鼠 IgG 和 FITC 标记的羊抗牛 IgG 为二抗,37 ℃ 作用 1 h。多次充分洗涤,防止留有非特异性荧光,在荧光显微镜下观察。

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),电泳结束后,将凝胶转印 NC 膜,封闭后,分别以 1:200 稀释的 RHDV 单抗 A3C 和 1:100 稀释的牛源“O”型 FMDV 多抗血清为一抗,分别对应以 HRP 标记的兔抗鼠 IgG 和 HRP 标记的羊抗牛 IgG 为二抗,最后 DAB 显色。

1.6 电镜观察

分别将重组病毒接种 Sf9 细胞,细胞明显病变后收集细胞培养物,反复冻融后离心取上清,经超滤管浓缩,6 000 r/min 离心 7 min,浓缩 10 倍后备用。将待检样品滴于载样铜网上,吸附作用 2 min;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

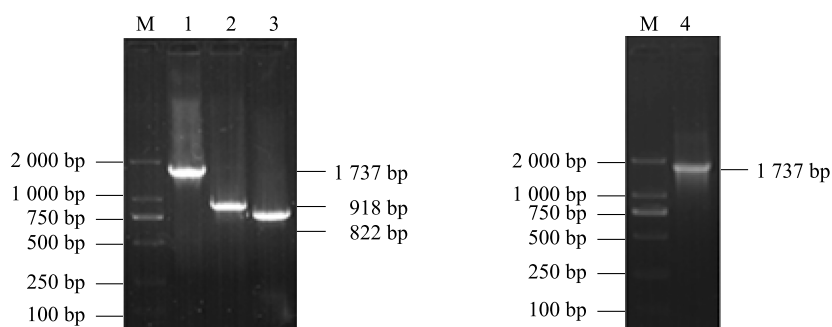
1.7.1 抗原的制备 3 种重组杆状病毒分别接种对数生长期的 Sf9 细胞,出现明显病变后,用灭菌 PBS (pH 7.4) 重悬细胞。反复冻融 3 次,离心去除细胞碎片,取上清经超滤管纯化浓缩,用无菌 PBS 将嵌合蛋白稀释为 400 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 。按抗原、弗氏佐剂 1:1 体积比混合,乳化后备用。

1.7.2 动物免疫 7~8 周龄雌性 ICR 小鼠共 36 只,随机分成 6 组,分别经腹腔注射乳化后的嵌合蛋白 VP60-2FB、VP60-306FB、VP60-578FB、VP60、FMDV 灭活疫苗和 PBS,每只 200 μl (40 μg)。共免疫 3 次,每次免疫间隔 2 周,首次免疫采用弗氏完全佐剂,加强免疫采用弗氏不完全佐剂。其中 PBS 组为阴性对照,VP60 组为检测 VP60 特异性抗体的阳性对照,FMDV 组为检测外源 B 细胞表位应答的阳性对照。于首免后第 0、1、2、3、4、5 和 6 周对小鼠进行断尾采血,分离血清,采用本实验室建立的检测 VP60 特异性抗体水平的间接 ELISA 方法^[21],检测各组免疫小鼠诱导产生 VP60 特异性抗体的水平;利用 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。

2 结果

2.1 目的基因的获得及其鉴定

根据 GenBank 数据库 RHDV 皖阜株 VP60 序列 (FJ794180),设计引物,以 pFastBac1-VP60 为模板,进行 PCR 扩增,PCR 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)。



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);4: VP60-Xba I/Hind III (含有 Xba I/Hind III 酶切位点的 VP60 基因)。

图 2 重组 VP60 基因 PCR 扩增结果

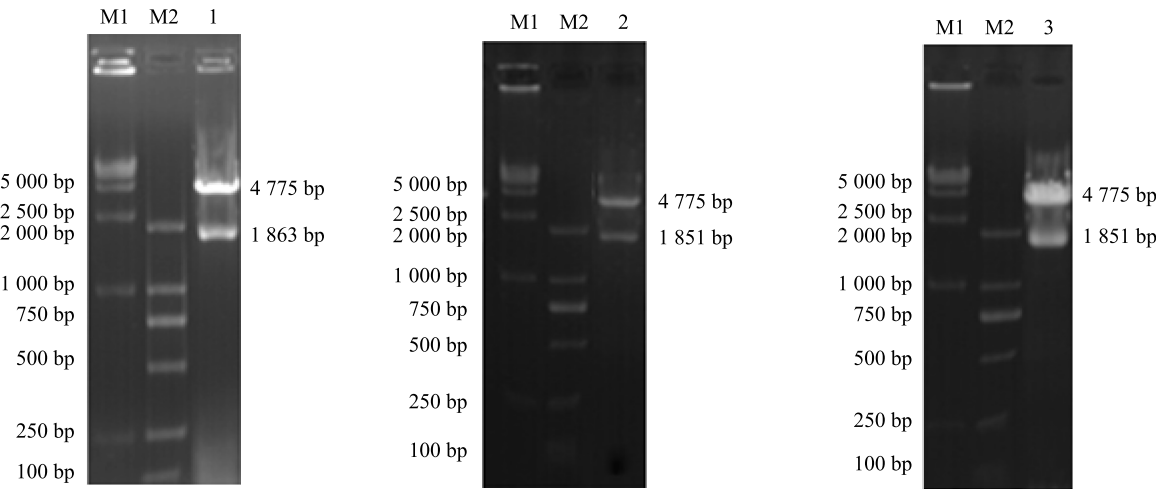
Fig.2 PCR amplification of recombinant VP60 gene

2.2 重组转移载体的鉴定

将酶切处理的目的基因与 pFastBacTM HTA 进行连接,转化 DH5 α 感受态细胞,提取重组质粒。分别利用限制性内切酶对 3 种重组阳性质粒进行酶切鉴定,经琼脂糖凝胶电泳可见 2 条大小分别为 4 775 bp 和 1 800 bp 左右的条带(图 3),证明目的片段已成功克隆至载体 pFastBacTM HTA 中。

2.3 重组穿梭载体的鉴定

利用 pUC/M13 上、下游引物对重组 Bacmid 质粒进行 PCR 扩增,产物大小约为 4 000 bp,而以同样引物对空 Bacmid 质粒进行扩增,产物大小约为 300 bp;以目的基因上、下游引物对重组 Bacmid 质粒进行 PCR 扩增,获得大小为 1 800 bp 左右的条带,证明转座成功。



M1;DNA 分子质量标准 (DL15000);M2;DNA 分子质量标准 (DL2000);1;pFastBacTM HTA-VP60-306FB 酶切结果;2;pFastBacTM HTA-VP60-2FB 酶切结果;3;pFastBacTM HTA-VP60-578FB 酶切结果。

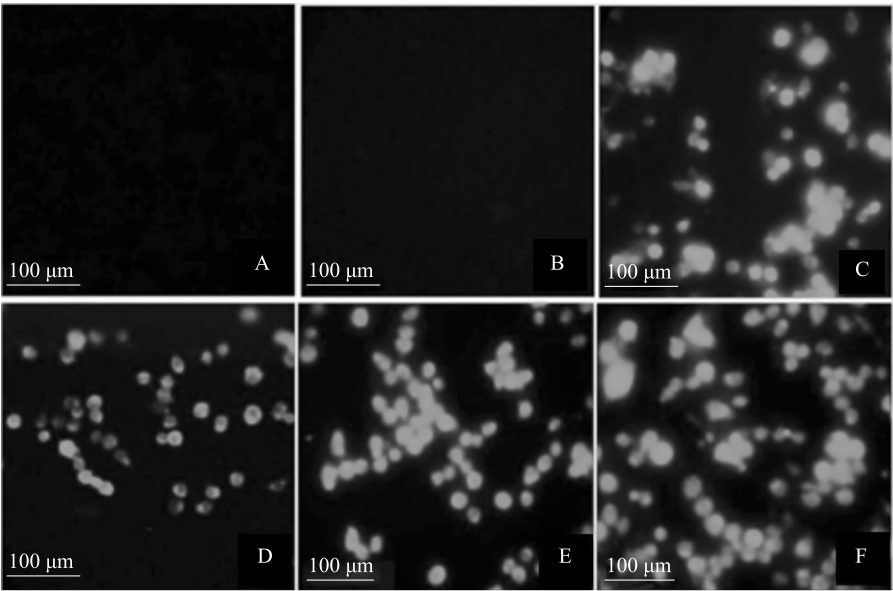
图 3 重组质粒的酶切鉴定

Fig.3 Identification of the recombinant plasmid by restriction endonuclease digestion

2.4 嵌合蛋白的表达和鉴定

将重组病毒 rAcV-Bac-578FB、rAcV-Bac-306FB、rAcV-Bac-2FB 和 rAcV-Bac-VP60 分别感染 Sf9 细胞,其中 rAcV-Bac-VP60 为阳性对照。感染 24 h 后,以 RHDV 单抗 A3C 为一抗,FITC 标记兔抗

鼠 IgG 为二抗,进行荧光染色。结果(图 4)表明,感染重组杆状病毒的 Sf9 细胞具有很强的特异性荧光,而感染野生型杆状病毒的 Sf9 细胞和空白对照细胞无荧光,说明嵌合蛋白得到有效表达。



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 AcV-Bac-VP60 的细胞;D;感染 rAcV-Bac-2FB 的细胞;E;感染 rAcV-Bac-306FB 的细胞;F;感染 AcV-Bac-578FB 的细胞。

图 4 间接免疫荧光试验 (IFA) 检测 3 种嵌合 VP60 蛋白的表达

Fig.4 Indirect immunofluorescence assay (IFA) analysis of the expression of chimeric VP60 proteins

将重组病毒 rAcV-Bac-578FB、rAcV-Bac-306FB、rAcV-Bac-2FB 和 rAcV-Bac-VP60 分别感染 Sf9 细胞,其中 rAcV-Bac-VP60 为阳性对照。感染 24 h 后,以牛 FMDV 多抗血清为一抗,FITC 标记羊抗牛 IgG 为二抗,进行荧光染色。结果(图 5)表明,分别感染 rAcV-Bac-578FB、rAcV-Bac-306FB 和 rAcV-Bac-2FB 的 Sf9 细胞具有很强的特异性荧光,而感染 AcV-Bac-VP60、野生型杆状病毒的 Sf9 细胞和空白对照细胞无荧光,说明嵌合蛋白携带的 VP1

B 细胞表位获得有效的表达。

SDS-PAGE 和 Western blot 结果(图 6)显示:以 VP60 单抗 A3C 为一抗的 NC 膜在约 6.0×10^4 处出现目的条带,与预期大小一致,说明嵌合蛋白得到有效表达;以 FMDV 牛多抗血清为一抗的 NC 膜同样在 6.0×10^4 处出现目的条带,与预期大小一致,说明 FMDV B 细胞表位得到有效表达,且免疫印迹与电泳的目的条带位置相符。

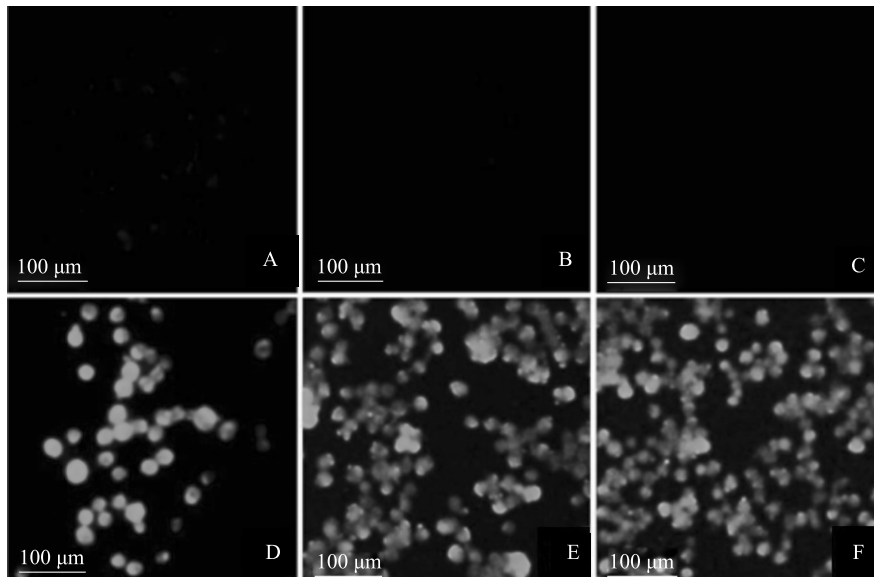
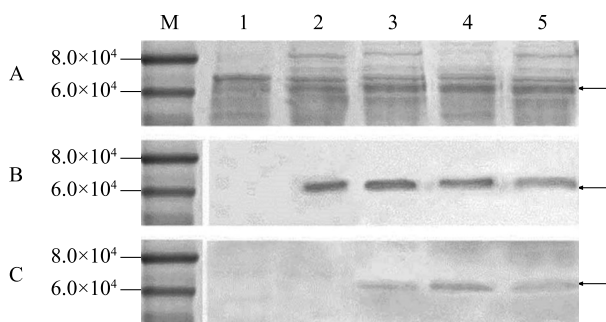


图 5 IFA 检测 3 种嵌合蛋白中 B 细胞表位的表达
A:感染野生毒株(WT)的细胞(阴性对照);B:正常细胞(空白对照);C:感染 AcV-Bac-VP60 的细胞;D:感染 rAcV-Bac-2F 的细胞;E:感染 rAcV-Bac-306FB 的细胞;F:感染 AcV-Bac-578FB 的细胞。

图 5 IFA 检测 3 种嵌合蛋白中 B 细胞表位的表达

Fig.5 IFA analysis of the expression of B cell epitope in chimeric proteins



A:SDS-10% PAGE; B: Western blot,以 VP60 单抗 A3C 为一抗; C: Western blot,以 FMDV 牛多抗血清为一抗。M:蛋白质分子质量标准;1:WT;2:VP60;3:VP60-2FB;4:VP60-306FB;5:VP60-578FB。

图 6 3 种嵌合蛋白的 SDS-PAGE 和 Western blot 分析

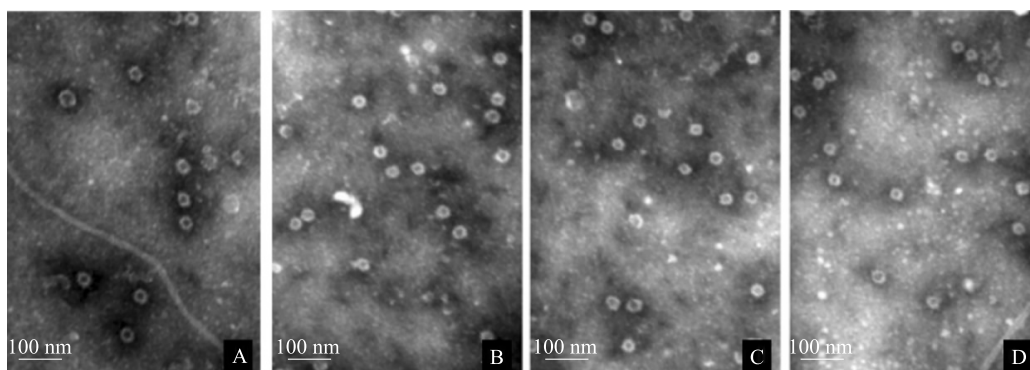
Fig.6 SDS-PAGE and Western blot analysis of the chimeric proteins

2.5 电镜观察结果

电镜观察结果(图 7)显示,本试验构建并表达的 3 种嵌合蛋白均可形成大小约为 40 nm 的 VLPs,形态和大小均与天然 RHDV VLPs 的粒子(阳性对照)相似,说明外源表位的插入未影响 VP60 自身 VLPs 的组装。

2.6 嵌合蛋白诱导小鼠的体液免疫应答

为检测嵌合蛋白 VP60 刺激免疫系统产生的体液免疫反应,本研究用间接 ELISA 检测方法测定小鼠血清中抗载体 VP60 的特异性抗体水平和抗外源 FMDV B 细胞表位的特异性抗体水平。实验小鼠分为 VP60-2FB 组、VP60-306FB 组和 VP60-578FB 组,同时设立 VP60 组和 FMDV 灭活疫苗组作为阳性对



A: RHDV VP60 病毒样颗粒; B: VP60-2FB 病毒样颗粒; C: VP60-306FB 病毒样颗粒; D: VP60-578FB 病毒样颗粒。

图 7 RHDV VP60 蛋白和 3 种嵌合蛋白病毒样粒子的电镜观察结果

Fig.7 RHDV VP60 protein and chimeric VP60 VLPs under electron microscopy

照, PBS 组作为阴性对照。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, 分离血清进行检测。结果显示: 首免后 4~6 周, 3 种嵌合蛋白均可产生较强的 VP60 特异性抗体, 与 PBS 组比较差异显著 ($P < 0.05$) (图 8); 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水平 (图 9)。此外, 与嵌合 VP60 组相比, 作为阳性对照的 FMDV 商品化灭活苗组诱导产生的表位特异性 IgG 抗体水平显著高于嵌合 VP60 组 ($P < 0.05$) (图 9)。

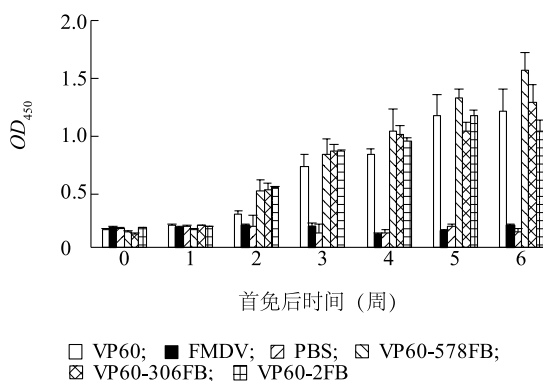


图 8 间接 ELISA 检测小鼠血清中 VP60 特异性抗体水平

Fig.8 The detection of anti-VP60 antibody level in the serum of mice by indirect ELISA

3 讨论

杯状病毒成球形或近球形, 无囊膜, 核衣壳呈二

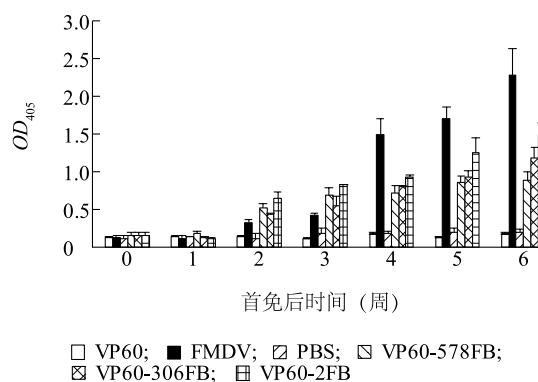


图 9 间接 ELISA 检测 FMDV B 细胞表位抗体水平

Fig.9 The detection of anti-FMDV B cell epitope antibody level in the serum of mice by indirect ELISA

十面体对称, 由 180 个单一结构蛋白组成, 病毒核酸为单股、正链线性 RNA (ssRNA) [22-26]。杯状病毒的 VLPs 结构简单, 由单一衣壳蛋白自行装配而成, 是一种研究 VLPs 的理想模型。很多病毒的宿主范围很广, 不仅可以感染人类, 而且可以感染多种动物, 这就为 VLPs 作为疫苗和药物的应用带来了机遇。开发一种多功能的 VLPs 展示平台, 从而可以避免体内预先的中和抗体反应对 VLPs 所介导的免疫应答的限制, 具有重要的意义。RHDV 宿主专一性较强, 只对兔易感, 对人和其他动物不存在安全威胁; RHDV 作为杯状病毒的成员之一, 其 VP60 可自行装配形成 VLPs, 使 RHDV VP60 作为研究其他动物疾病甚至是人类疾病 VLPs 疫苗的研究模型成为可能, 但其作为展示系统的可行性、效果及其适用范围还需要进一步研究。

本研究通过插入外源表位(FMDV VP1 B 细胞表位)构建 VP60 嵌合蛋白,研究 VP60 作为载体递呈外源表位的能力,分析外源表位的插入是否影响其自身病毒样颗粒的形成,评价 VP60 作为外源表位展示系统的可行性。研究结果表明,3 种嵌合蛋白均能够有效表达并形成 VLPs,说明在 VP60 蛋白的第 306~307 aa、C 端和 N 端插入 42 aa 外源片段均不影响 VLPs 的组装,具备自我装配能力是 VLPs 疫苗候选物的基本特性。

选择口蹄疫病毒两个重要的 B 细胞表位 GS-(200~213 aa)-GS-(141-160 aa)作为外源插入表位,构建 VP60 嵌合 VLPs。通过 IFA 和 Western blot 试验发现 VP60 嵌合 VLPs 获得有效表达,并具有 VP60 特异性和 FMDV 表位特异性抗原反应。动物试验结果显示,3 种嵌合蛋白免疫的小鼠均能够诱导产生强烈的 VP60 特异性和表位特异性体液免疫应答。综上所述,VP60 VLPs 能够有效递呈外源表位,刺激机体对外源 B 细胞表位产生体液免疫应答,可作为异源抗原的展示载体。此外,我们在前期研究的基础上,将单串联的 B 细胞表位增加成双串联的 B 细胞表位,外源片段大小增加至 126 bp,序列的增加不影响 VLPs 的形成和免疫原性,可见 VP60-VLPs 作为递呈外源抗原的展示载体的容耐性较大,可容纳至少 42 aa 的外源片段。

本研究以 VP60-VLPs 为基础,通过在 VP60 N 端、C 端和 306~307 aa 位插入双串联 FMDV B 细胞表位序列构建嵌合 VLPs,研究结果表明 VP60 的 N 端、C 端和 306~307 aa 位置均适合外源氨基酸片段插入,嵌合 VLPs 均能够进行自我组装,且能够有效展示长度为 42 aa 的外源片段。此外,VP60 作为载体所能容纳的最长外源氨基酸片段长度仍需进一步研究。

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, 10(43): 12.
- [4] COOKE B D. Rabbit haemorrhagic disease; field epidemiology and the management of wild rabbit populations [J]. *Rev Sci Tech*, 2002, 21(2): 347-358.
- [5] CHEN M, SONG Y, FAN Z, et al. Immunogenicity of different recombinant rabbit hemorrhagic disease virus-like particles carrying CD8+T cell epitope from chicken ovalbumin (OVA) [J]. *Virus Res*, 2014, 183: 15-22.
- [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] VALICEK L, SMID B, RODAK L, et al. Electron and immunoelectron microscopy of rabbit haemorrhagic disease virus (RHDV) [J]. *Arch Virol*, 1990, 112(3-4): 271-275.
- [8] 金明兰, 侯继波, 郑其升, 等. 兔出血症病毒 VP60 蛋白 T 细胞表位优势区的筛选 [J]. *江苏农业科学*, 2013, 41(4): 186-188.
- [9] 王 芳, 胡 波, 任雪枫, 等. 兔出血症病毒衣壳蛋白在昆虫细胞中的表达及对家兔的免疫保护效果 [J]. *畜牧兽医学报*, 2008, 39(10): 1382-1387.
- [10] PLANA-DURAN J, BASTONS M, RODRIGUEZ 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.
- [11] FARNOS O, RODRIGUEZ 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(3-4): 187-195.
- [12] FERNANDEZ-FERNANDEZ M R, MOURINO 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.
- [13] 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.
- [14] BARCENA 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.
- [15] DIMARCHI R, BROOKE G, GALE C, et al. Protection of cattle against foot-and-mouth disease by a synthetic peptide [J]. *Science*, 1986, 232(4750): 639-641.
- [16] 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.
- [17] 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.

- [18] 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.
- [19] 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.
- [20] 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.
- [21] 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.
- [22] 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.
- [23] 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(9-10): 1079-1086.
- [24] HAN M G, CHEETHAM S, AZEVEDO M, 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.
- [25] SOUZA M, COSTANTINI V, AZEVEDO M S, et al. A human norovirus-like particle vaccine adjuvanted with ISCOM or mLT 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.
- [26] PEREZ-FILGUEIRA D M, RESINO-TALAVAN 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.

(责任编辑: 张震林)