

刘维龙, 胡波, 范志宇, 等. N端B细胞表位缺失的兔出血症病毒VP60蛋白的表达及其免疫原性[J]. 江苏农业学报, 2024, 40(3): 508-513.

doi: 10.3969/j.issn.1000-4440.2024.03.013

N端B细胞表位缺失的兔出血症病毒VP60蛋白的表达及其免疫原性

刘维龙^{1,2}, 胡波^{1,3}, 范志宇^{1,2,3}, 魏后军^{1,3}, 仇汝龙^{1,3}, 宋艳华^{1,3}, 陈萌萌^{1,3}, 葛雷^{1,3}, 熊富强^{3,4}, 王芳^{1,2,3,4}

(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重点实验室, 江苏 南京 210014; 2.西藏农牧学院, 西藏 林芝 860000; 3.兽用生物制品<泰州>国泰技术创新中心, 江苏 泰州 225300; 4.南京农业大学动物医学院, 江苏 南京 210095)

摘要: 本研究将A3C单抗识别的VP60蛋白NTA区域作为识别标记, 设计一系列编码VP60 NTA区域重叠多肽的基因序列并连接于pGEX-4T-1载体, 确定A3C单抗识别的精确表位。然后构建重组质粒Bacmid-VP60 Δ A3C, 将Bacmid-VP60 Δ A3C转染Sf9昆虫细胞, 得到重组杆状病毒rBac-VP60 Δ A3C。RT-PCR、HA、IFA和Western Blot鉴定结果表明, 重组蛋白VP60 Δ A3C在Sf9细胞中高效表达, 电镜观察显示其形态和结构与兔出血症病毒VP60蛋白类似。将重组蛋白VP60 Δ A3C以每只200 μ g免疫2月龄RHDV血清阴性的新西兰兔, 免疫后14 d, 以兔出血症病毒WF株攻毒新西兰兔。结果表明, 免疫组无死亡, 而对照组全部死亡。本研究结果为制备表位缺失的兔出血症亚单位疫苗奠定了基础。

关键词: 兔出血症病毒; VP60蛋白; B细胞表位; 免疫原性

中图分类号: S855.3 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-4440(2024)03-0508-06

Expression of rabbit hemorrhagic disease virus VP60 protein with B cell epitope deletion in N terminus and its immunogenicity in rabbit

LIU Wei-long^{1,2}, HU Bo^{1,3}, FAN Zhi-yu^{1,2,3}, WEI Hou-jun^{1,3}, QIU Ru-long^{1,3}, SONG Yan-hua^{1,3}, CHEN Meng-meng^{1,3}, GE Lei^{1,3}, XIONG Fu-qiang^{3,4}, WANG Fang^{1,2,3,4}

(1. Institute of Veterinary Medicine, Jiangsu Academy of Agricultural Sciences/Key Laboratory for Veterinary Bio-Product Engineering, Ministry of Agriculture, Nanjing 210014, China; 2. Xizang Agricultural and Animal Husbandry University, Linzhi 860000, China; 3. GuoTai (Taizhou) Center of Technology Innovation for Veterinary Biologicals, Taizhou 225300, China; 4. College of Veterinary Medicine, Nanjing Agricultural University, Nanjing 210095, China)

Abstract: This study used the NTA region of the VP60 protein recognized by A3C monoclonal antibody as a recognition

收稿日期: 2023-02-22

基金项目: 现代农业产业技术体系建设专项资金资助项目(CARS-43-C-1)

作者简介: 刘维龙(1999-), 男, 新疆奎屯人, 硕士研究生, 主要从事动物疫病防控研究。(E-mail) liuweilong1999@126.com。胡波为共同第一作者。

通讯作者: 王芳, (E-mail) rwangfang@126.com; 熊富强, (E-mail) xiongfuyang@njau.edu.cn

marker, designed a series of gene sequences encoding overlapping peptides in the VP60 NTA region, and connected them to the pGEX-4T-1 vector to determine the precise epitopes recognized by A3C monoclonal antibody. Then recombinant plasmid Bacmid-VP60 Δ A3C was constructed. Bacmid-VP60 Δ A3C was transfected into Sf9 insect cells, and recombinant baculovirus rBac-VP60 Δ A3C was obtained. The identification results of RT-PCR, HA,

IFA, and Western blot showed that the recombinant protein VP60 Δ A3C was highly expressed in Sf9 cells. Electron microscopy observation showed that its morphology and structure were similar to those of rabbit hemorrhagic disease virus VP60 protein. The 2-month-old RHDV serum negative New Zealand rabbits were immunized with recombinant protein VP60 Δ A3C at a rate of 200 μ g per rabbit, and New Zealand rabbits were challenged with rabbit hemorrhagic disease virus WF strain after 14 days. The results showed that there were no deaths in the immune group, while all deaths occurred in the control group. The results of this study lay the foundation for the development of epitope-deleted subunit vaccine of rabbit hemorrhagic disease.

Key words: rabbit hemorrhagic disease virus (RHDV); VP60 protein; B cell epitope; immunogenicity

兔出血症(Rabbit hemorrhagic disease, RHD)是由兔出血症病毒(Rabbit hemorrhagic disease virus, RHDV)引起的高发病率和死亡率的烈性传染病^[1]。RHDV分为GL1(RHDV1)和GL2(RHDV2)2种基因型,分别引起兔出血症1型和兔出血症2型,2种基因型病毒之间交叉保护性低^[2-4]。自2020年GL2型RHDV在中国出现以来^[5],2种基因型RHDV在中国处于共同流行态势。GL1型RHDV主要感染2月龄以上兔,幼兔感染后不发病,但可带毒,并在群体传播中发挥重要作用^[6],表明感染幼兔是该病重要的传染源之一。

RHDV的衣壳蛋白(VP60)可以自组装形成35~40 nm的病毒样颗粒(VLPs)。同时,VP60可在机体内诱导产生中和抗体,是RHDV的主要免疫保护性抗原,也是宿主免疫防御RHDV的主要靶标,在病毒诊断和国内外疫苗设计中起重要作用^[1],但现有疫苗和抗体检测方法均无法鉴别疫苗免疫和病毒感染。鉴于GL1型RHDV感染幼兔的带毒和病毒传播特点,因此构建一种基于VP60蛋白的表位标记疫苗并配套相应的表位抗体检测技术用于感染兔群的检测,是区分疫苗免疫和病毒感染的可行方案。前期我们发现A3C单抗识别的VP60蛋白N端B细胞表位具有强免疫原性但不具有中和活性,因此将该表位位点作为一种识别标记,构建一种A3C识别表位缺失的VP60蛋白,在昆虫细胞中表达并研究其VLPs形成能力,可为构建兔出血症表位缺失的标记疫苗奠定基础。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 质粒、菌种和细胞 重组质粒pFastbac1-VP60(GL1型VP60)、Sf9昆虫细胞、大肠杆菌DH10Bac由本实验室保存;BL21(DE3)感受态购自北京全式金生物技术有限公司。

1.1.2 主要试剂 DNA Marker DL 2 000、ClonExpress II One Step Cloning Kit试剂盒、ECL显色试剂盒、1.1 \times PCR mix 购自南京诺唯赞生物科技有限公司,FBS购自GIBCO公司,山羊抗小鼠FITC-IgG、山羊抗小鼠HRP-IgG购自Biosharp生物科技有限公司,VP60单克隆抗体A3C、1D4由本实验室制备,Taq高保真酶、转染试剂Lipofectamine 3000和Grace培养基购自Invitrogen公司,其他试剂均为国产分析纯。

1.2 方法

1.2.1 表达质粒的合成 在前期模糊定位非中和单抗A3C识别VP60 NTA区域的基础^[7]上,设计一系列VP60 NTA区域重叠多肽的基因序列并连接于pGEX-4T-1载体(表1)。

表1 基因序列及对应氨基酸序列

Table 1 Gene sequences and the corresponding amino acid sequences

基因名称	基因序列(5'→3')	氨基酸序列
VP60 NTA1	GGAACACGACCGACGGCATGGATC-CTGGT	GTTTDGMDPG
VP60 NTA2	ACCGACGGCATGGATCCTGCTGTACTGGCC	TDGMDPGVVA
VP60 NTA3	GGAACACGACCGACGGCATGGATCCT	GTTTDGMDP
VP60 NTA4	GACGGCATGGATCCTGCTGTACTGGCC	DGMDPGVVA

1.2.2 单抗A3C识别表位的鉴定 将合成的重组表达质粒pGEX-4T-1-VP60 NTA1、pGEX-4T-1-VP60 NTA2、pGEX-4T-1-VP60 NTA3、pGEX-4T-1-VP60 NTA4分别转化大肠杆菌BL21(DE3)感受态,阳性菌经0.5 mmol/L IPTG诱导表达后获得重组蛋白pGEX-4T-1-VP60 NTA1、pGEX-4T-1-VP60 NTA2、pGEX-4T-1-VP60 NTA3、pGEX-4T-1-VP60 NTA4,经SDS-PAGE电泳后,转印至PVDF膜上,经5%脱脂乳封闭后,以识别VP60 NTA区的单抗A3C为一

抗,羊抗鼠 HRP-IgG (1:10 000) 为二抗,进行 Western Blot 鉴定,确定 A3C 单抗识别的精确表位。

1.2.3 引物合成 A3C 识别表位缺失株构建引物及一系列鉴定引物由北京擎科生物科技有限公司合成(表 2)。

表 2 扩增和鉴定的特异性引物

Table 2 Specific primers for amplification and identification

引物名称	引物序列(5'→3')
VP60 Δ A3C-F	GTACTGGCCGCACTACTGTGCTCACTGCAGAA
VP60 Δ A3C-R	ACTAGTTGCGGCCACTACGGTCGTGTTCCGGGAAC
PFastBac-F	TATTCGCGATTATTCATACC
PFastBac-R	ACAAATGTGCTATGGCTGA
M13-F	GTTTTCCCACTCAGCAG
M13-R	CAGGAAACAGCTATGAC
VP60-F	ATGGAGGGCAAAAGCCCG
VP60-R	TCAGACATAAGAAAAGCCATT

1.2.4 缺失 A3C 识别表位的重组转移载体的构建
以本实验室保存的重组质粒 pFastbac1-VP60 为模板,以 VP60 Δ A3C-F/VP60 Δ A3C-R 引物进行 PCR 反应,扩增缺失 A3C 识别表位的 VP60 基因。PCR 反应程序为:95 ℃ 30 s;95 ℃ 15 s,65 ℃ 15 s,72 ℃ 7 min,30 个循环;72 ℃ 5 min。将 PCR 反应产物于 1.2% 琼脂糖凝胶进行鉴定,120 V 电泳 30 min 后,回收 PCR 阳性产物,使用 ClonExpress II One Step Cloning Kit 试剂盒对 PCR 产物进行连接、转化,用 pFastBac-F/pFastBac-R 引物进行扩增及测序鉴定,获得正确缺失 A3C 识别表位的杆状病毒重组转移载体 pFastbac1-VP60 Δ A3C。

1.2.5 缺失 A3C 识别表位的重组穿梭载体的构建
将重组转移载体 pFastbac1-VP60 Δ A3C 转化含有穿梭载体大肠杆菌 DH10Bac,使用蓝白斑筛选法,将大肠杆菌 DH10Bac 涂布于含 3 种抗性的平板上(含 50 μ g/ml Kanamycin、7 μ g/ml Gentamicin、10 μ g/ml Tetracycline、100 μ g/ml X-gal 和 40 μ g/ml IPTG),37 ℃ 恒温培养 2 d 后,挑取白色阳性单菌落纯化培养后提取质粒。以 M13-F/M13-R 进行 PCR 反应,获得重组穿梭载体 Bacmid-VP60 Δ A3C。

1.2.6 细胞转染 使用转染试剂 Lipofectamine 3000 将重组穿梭载体 Bacmid-VP60 Δ A3C 转染 Sf9 昆虫细胞,结束后每 12 h 观察细胞状态,待细胞出

现间隙增大、折光性增强、形态变圆等病变特征时收集细胞及其培养物,以 1 000 r/min 离心 5 min 收获上清液即为 rBac-VP60 Δ A3C 原液(F_1 代病毒)。

1.2.7 mRNA 的检测 收集接种 rBac-VP60 Δ A3C 的 Sf9 昆虫细胞样品,采用 Trizol 法提取感染细胞内总 RNA,反转录为 cDNA 后,以 VP60-F/VP60-R 引物进行 RT-PCR 扩增,鉴定 mRNA 的存在。PCR 程序为:95 ℃ 5 min,然后进入循环 95 ℃ 30 s,55 ℃ 30 s,72 ℃ 1 min,35 个循环;72 ℃ 5 min。将 PCR 反应产物于 1.2% 琼脂糖凝胶 120 V 电泳 30 min 后,紫外灯下观察结果并拍照。

1.2.8 间接免疫荧光试验(IFA) 预先将 Sf9 细胞在 24 孔细胞板上培养至密度为 85%~90%,每孔接种等量的重组杆状病毒 rBac-VP60 Δ A3C,同时以野生型毒株感染 Sf9 细胞作阴性对照。在感染 Sf9 细胞 24 h 后,弃去培养液,PBS 洗涤 2 次,加入提前-20 ℃ 冷藏的甲醇和丙酮混合成的固定液,4 ℃ 作用 1 h;PBS 洗涤 3 次,加入 PBS 稀释的 1D4 单抗(1:200),37 ℃ 孵育 90 min,PBS 洗涤 3 次后,加入 PBS 1:50 倍稀释的山羊抗小鼠 FITC-IgG,黑暗条件下 37 ℃ 孵育 1 h,PBS 洗涤 3 次,荧光显微镜观察并拍照。

1.2.9 SDS-PAGE 和 Western Blot 检测 将重组杆状病毒 rBac-VP60 Δ A3C 接种 Sf9 细胞,72 h 后收获细胞培养物,反复冻融 3 次后,取上清液,等比例加入 Loading buffer 处理后进行蛋白质电泳,结束后将凝胶半干转印至 PVDF 膜上,5% 脱脂乳 37 ℃ 封闭 2 h,PBST 洗涤 3 次后,以 1D4 单抗(1:1 000)为一抗,羊抗鼠 HRP-IgG (1:10 000) 为二抗,进行 Western Blot 鉴定。

1.2.10 血凝效价测定 参照中华人民共和国农业行业标准 NY/T 572-2016 兔病毒性出血病血凝与血凝抑制试验方法^[8]进行。

1.2.11 电镜观察 对获得的重组蛋白表达产物以红细胞吸附释放法^[9]进行纯化并超速离心,蛋白质样品 VP60 Δ A3C 经生理盐水重悬后取少量置于铜网静置 2 min,加入 2% 磷钨酸染液,利用透射电镜观察重组蛋白样品并拍照。

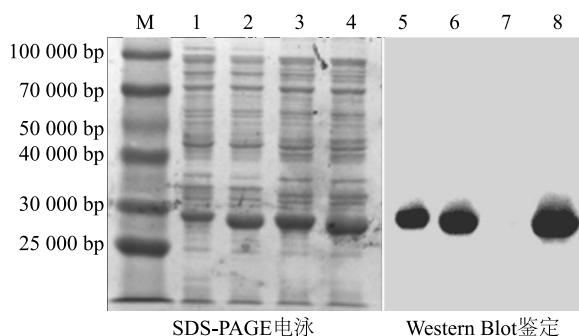
1.2.12 免疫保护性研究 将纯化的 VP60 Δ A3C 蛋白稀释至 200 μ g/ml,免疫兔出血症病毒抗原和抗体均阴性的 2 月龄新西兰兔 5 只,每只颈部皮下注射 1 ml,同时以 5 只接种生理盐水的新西兰兔作为对照组。免疫后 14 d,分别颈部皮下注射 1 000

LD_{50} 的兔出血症病毒,攻毒后 7 d 内每 12 h 观察试验兔并记录。

2 结果与分析

2.1 A3C 单抗识别表位的鉴定

对 VP60 NTA1、VP60 NTA2、VP60 NTA3、VP60 NTA4 4 个蛋白进行 SDS-PAGE 电泳,转印 PVDF 膜后,以单抗 A3C 为一抗,羊抗鼠 HRP-IgG 为二抗进行 Western Blot 鉴定,结果显示,VP60 NTA1、VP60 NTA2 和 VP60 NTA4 3 个蛋白有阳性条带,而 VP60 NTA3 无条带(图 1),由此确定单抗 A3C 识别的精确氨基酸位点为 DGMDPG,对应的核苷酸序列为 GACGGCATGGATCCTGGT。



M: 蛋白质 Marker; 1~4: VP60 NTA1、VP60 NTA2、VP60 NTA3、VP60 NTA4; 5~8: VP60 NTA1、VP60 NTA2、VP60 NTA3、VP60 NTA4。

图 1 VP60 NTA1、VP60 NTA2、VP60 NTA3、VP60 NTA4 蛋白的 SDS-PAGE 电泳及 Western Blot 鉴定

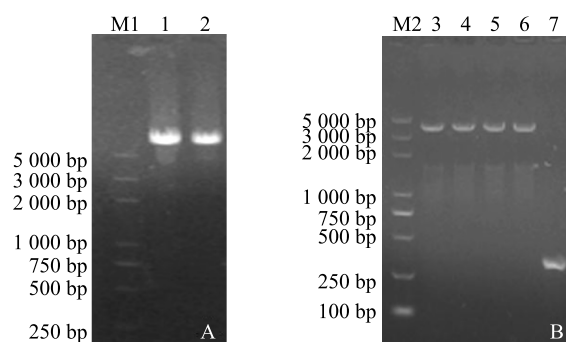
Fig. 1 Identification of VP60 NTA1, VP60 NTA2, VP60 NTA3, VP60 NTA4 proteins by SDS-PAGE and Western blot

2.2 重组转移载体和重组穿梭载体的鉴定

以重组质粒 pFastbac1-VP60 为模板扩增得到缺失 A3C 识别表位的杆状病毒重组转移载体 pFastbac1-VP60 Δ A3C, 大小约 6 000 bp (图 2A)。经测序验证后将 pFastbac1-VP60 Δ A3C 转化大肠杆菌 DH10Bac, 提取阳性质粒用引物 M13-F/M13-R 进行 PCR 鉴定, 扩增产物大小约为 4 000 bp, 而阴性对照扩增产物大小约为 300 bp, 表明成功获得重组穿梭载体 Bacmid-VP60 Δ A3C (图 2B)。

2.3 RT-PCR 鉴定重组病毒的表达

按 Trizol 法提取接种 rBac-VP60 Δ A3C 的 Sf9 细胞总 RNA, 以 VP60-F/VP60-R 为引物进行 RT-PCR 扩增, 鉴定 mRNA。结果显示, 出现大小约为 1 800

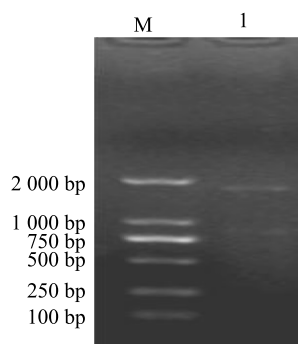


M1 和 M2: DL5 000 DNA Marker; 1: pFastbac1-VP60; 2: pFastbac1-VP60 Δ A3C; 3~6: pFastbac1-VP60 Δ A3C; 7: 阴性对照。

图 2 杆状病毒重组质粒 pFastbac1-VP60 Δ A3C 和 Bacmid-VP60 Δ A3C 的鉴定

Fig. 2 Identification of the recombinant plasmid pFastbac1-VP60 Δ A3C and Bacmid-VP60 Δ A3C

bp 的电泳条带(图 3), 大小与目的基因近似, 表明 VP60 Δ A3C 基因得到表达。



M: DL2 000 DNA Marker; 1: 重组杆状病毒感染的 Sf9 细胞。

图 3 VP60 Δ A3C 基因在 Sf9 细胞中的表达

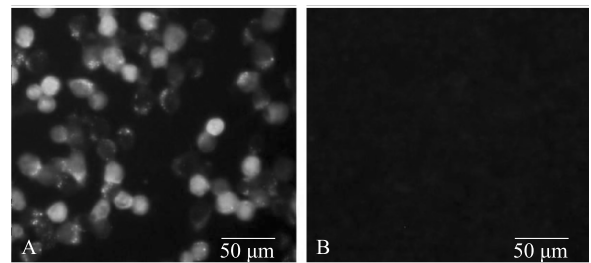
Fig. 3 Expression of VP60 Δ A3C gene in Sf9 cells

2.4 间接免疫荧光检测 (IFA)

将 rBac-VP60 Δ A3C 感染 Sf9 细胞 24 h 后, 以 1D4 单抗 (1:200) 为一抗, 羊抗鼠 FITC-IgG (1:50) 为二抗进行 IFA 检测。结果显示, 感染 rBac-VP60 Δ A3C 的 Sf9 细胞可见很强的特异性荧光, 而阴性对照无特异性荧光出现 (图 4), 说明 VP60 Δ A3C 蛋白有效表达。

2.5 SDS-PAGE 和 Western-Blot 鉴定

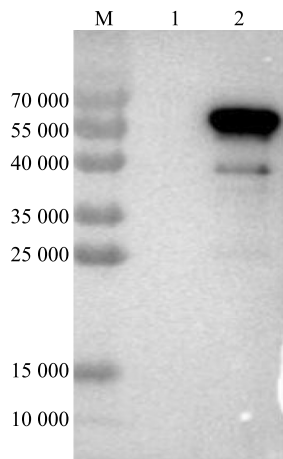
将 rBac-VP60 Δ A3C 感染 Sf9 细胞 72 h 后, 以 1D4 单抗 (1:1 000) 为一抗, 羊抗鼠 HRP-IgG (1:10 000) 为二抗, 进行 Western Blot 鉴定。PVDF 膜经显色后出现相对分子质量为 6×10^4 的条带 (图 5), 与预期一致, 结果表明 VP60 Δ A3C 蛋白有效表达。



A:感染 rBac-VP60 Δ A3C 的 Sf9 细胞;B:感染野生型毒株的 Sf9 细胞。

图 4 间接免疫荧光检测 VP60 Δ A3C 蛋白的表达

Fig.4 Identification of expression of VP60 Δ A3C protein by indirect immunofluorescence detection



M:蛋白质 Marker;1:感染野生型毒株的 Sf9 细胞;2:感染 rBac-VP60 Δ A3C 的 Sf9 细胞。

图 5 Western Blot 检测 VP60 Δ A3C 蛋白的表达

Fig.5 Identification of expression of VP60 Δ A3C protein by Western blot

2.6 表达蛋白的血凝效价测定

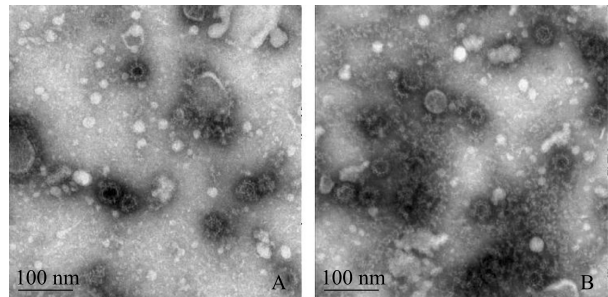
将 rBac-VP60 Δ A3C 感染 Sf9 细胞 4 d 后,以 96 孔“U”形血凝板对表达产物进行血凝效价测定。结果表明,VP60 Δ A3C 蛋白能凝集人 1% O 型红细胞悬液,血凝效价为 1 : 4 096,表明 VP60 Δ A3C 蛋白高效表达。

2.7 电镜观察

电镜观察结果表明,VP60 Δ A3C 蛋白可形成大小为 35~40 nm、形态和结构与兔出血症病毒 VP60 蛋白类似的 VLPs,说明缺失 A3C 识别表位不影响 VP60 蛋白病毒样颗粒的组装(图 6)。

2.8 免疫原性检测

将 VP60 Δ A3C 蛋白进行纯化后免疫 RHDV 血



A:RHDV VP60 病毒样颗粒;B:VP60 Δ A3C 病毒样颗粒。

图 6 RHDV VP60 蛋白和 VP60 Δ A3C 蛋白病毒样颗粒的电镜观察

Fig.6 RHDV VP60 protein and VP60 Δ A3C protein virus-like particles under electron microscopy

清阴性的新西兰兔,14 d 后进行攻毒,检验重组蛋白对家兔的免疫保护作用。结果显示,以红细胞吸附释放法获得纯化的 VP60 Δ A3C 蛋白,经蛋白质定量后以每只 200 μ g 的剂量免疫新西兰兔,然后以 RHDV WF 株攻毒,免疫组家兔获得 100% 保护,而注射生理盐水的对照组家兔全部死亡(表 3),表明 VP60 Δ A3C 蛋白具有良好的免疫原性。

表 3 VP60 Δ A3C 蛋白的免疫原性

Table 3 Immunogenicity of the VP60 Δ A3C protein

项目	存活数/攻毒数	保护率(%)
免疫组	5/5	100
对照组	0/5	0

3 讨论

目前尚未建立天然 RHDV 的体外培养系统,病毒难以在体外稳定增殖,因此国内外新型疫苗的研究主要将 VP60 蛋白作为 RHDV 的免疫保护性抗原分子。目前 VP60 已在杆状病毒、酵母、大肠杆菌、乳酸杆菌、痘病毒等多种系统中表达并开展免疫原性研究^[10-15],且以杆状病毒表达系统研究较多。另外也有利用杆状病毒表达系统进行以 VP60 为载体研究外源表位免疫原性的报道^[16]。该系统表达效率较高,可以实现外源蛋白的全悬浮细胞培养表达,且已有商品化疫苗产品上市。

现有研究结果表明 VP60 蛋白可分为 NTA 区、S 区和 P 区,NTA 区位于 VP60 蛋白的 N 端^[17]。VP60 蛋白形成的 VLPs 结构中,N 端位于 VLPs 内

部,而C端位于外表面,是受体结合区域和中和表位所在区域^[17],且VP60氨基酸的一些改变并不影响VLPs的形成^[16,18]。本实验室在前期研究中发现了VP60 N端存在一个免疫原性强但不具有中和活性的B细胞表位,由单抗A3C识别,并已进行了模糊定位^[7]。本研究在此基础上首先精确定位了单抗A3C识别的B细胞表位,构建了该表位缺失的重组杆状病毒rBac-VP60 Δ A3C,其感染Sf9细胞后表达的缺失A3C识别表位的VP60蛋白可自组装成VLPs,表明该表位的缺失不影响病毒样颗粒的形成。将表达蛋白纯化后免疫新西兰兔,可以完全保护家兔免受GL1型强毒株的感染,表明表位缺失的VP60蛋白依然具有良好的免疫原性,是一种优良的兔出血症候选疫苗分子。

感染幼兔是GL1型兔出血症重要的传染源之一,由于目前无法区分GL1型疫苗免疫和病毒感染,因此难以在养殖兔群中完全清除被RHDV感染的幼兔。本研究构建了基于表位缺失的VP60蛋白,可用于制备一种基于表位缺失的兔出血症标记疫苗,后续建立检测该表位抗体的ELISA检测技术,有望实现GL1型兔出血症疫苗免疫和病毒感染的鉴别,为兔出血症的防控提供新的技术产品。

参考文献:

- [1] ABRANTES J, VAN-DER-LOO W, LE-PENDU J, et al. Rabbit haemorrhagic disease (RHD) and rabbit haemorrhagic disease virus (RHDV): a review[J]. Veterinary Research, 2012, 43(1): 12.
- [2] PATEL K K, STRIVE T, HALL R N, et al. Cross-protection, infection and case fatality rates in wild European rabbits experimentally challenged with different rabbit haemorrhagic disease viruses[J]. Transboundary and Emerging Diseases, 2022, 69(5): e1959-e1971.
- [3] O'CONNOR T W, READ A J, HALL R N, et al. Immunological cross-protection between different rabbit hemorrhagic disease viruses-implications for rabbit biocontrol and vaccine development[J]. Vaccines (Basel), 2022, 10(5): 666.
- [4] 宋艳华,胡波,范志宇,等.兔出血症病毒2型SC株VP60基因工程疫苗研制及其与传统兔出血症病毒疫苗的交叉保护作用[J].江苏农业科学,2022,50(16):50-54.
- [5] HU B, WEI H, FAN Z, et al. Emergence of rabbit haemorrhagic disease virus 2 in China in 2020[J]. Journal of Veterinary Medical Science, 2021, 7(1): 236-239.
- [6] MATTHAEI M, KERR P J, READ A J, et al. Comparative quantitative monitoring of rabbit haemorrhagic disease viruses in rabbit kittens[J]. Virology Journal, 2014, 11: 109.
- [7] 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.
- [8] 中华人民共和国农业部.兔病毒性出血病血凝和血凝抑制试验方法:NY/T 572-2016[S].北京:中国农业出版社,2016.
- [9] 左园园.兔出血症病毒衣壳蛋白与组织血型抗原结合域的筛选与鉴定[D].南京:南京农业大学,2017.
- [10] GUO H, ZHU J, TAN Y, et al. Self-assembly of virus-like particles of rabbit hemorrhagic disease virus capsid protein expressed in Escherichia coli and their immunogenicity in rabbits[J]. Antiviral Research, 2016, 131: 85-91.
- [11] WANG L, XIA T, GUO T, et al. Recombinant lactobacillus casei expressing capsid protein VP60 can serve as vaccine against rabbit hemorrhagic disease virus in rabbits[J]. Vaccines (Basel), 2019, 7(4): 172.
- [12] LIU C, LIN M, HU H, et al. Rabbit hemorrhagic disease virus VP60 protein expressed in recombinant swinepox virus self-assembles into virus-like particles with strong immunogenicity in rabbits[J]. Frontiers in Microbiology, 2022, 13: 960374.
- [13] DALTON K P, ALVARADO C, REYTOR E, et al. Chimeric VLPs bearing VP60 from two serotypes of rabbit haemorrhagic disease virus are protective against both viruses[J]. Vaccines (Basel), 2021, 9(9): 1005.
- [14] MULLER C, ULRICH R, SCHINKOTHE J, et al. Characterization of protective humoral and cellular immune responses against RHDV2 induced by a new vaccine based on recombinant baculovirus[J]. Vaccine, 2019, 37(30): 4195-4203.
- [15] QI R, MIAO Q, ZHU J, et al. Construction and immunogenicity of novel bivalent virus-like particles bearing VP60 genes of classic RHDV(GL1) and RHDV2(GL2)[J]. Veterinary Microbiology, 2020, 240: 108529.
- [16] ZAMORA-CEBALLOS M, MORENO N, GIL-CANTERO D, et al. Immunogenicity of multi-target chimeric RHDV virus-like particles delivering foreign B-cell epitopes[J]. Vaccines (Basel), 2022, 10(2): 229.
- [17] WANG X, XU F, LIU J, et al. Atomic model of rabbit hemorrhagic disease virus by cryo-electron microscopy and crystallography[J]. PLoS Pathogens, 2013, 9(1): e1003132.
- [18] 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 Research, 2014, 183: 15-22.

(责任编辑:成纾寒)