

李玲, 祝博森, 朱婷, 等. 双靶向融合蛋白用于新城疫病毒 La Sota 株对鸭的免疫效率的提高作用[J]. 江苏农业学报, 2024, 40(12): 2317-2323.

doi: 10.3969/j.issn.1000-4440.2024.12.015

双靶向融合蛋白用于新城疫病毒 La Sota 株对鸭的免疫效率的提高作用

李玲¹, 祝博森¹, 朱婷¹, 商璐^{2,3}, 邓碧华^{3,4}, 卢宇^{3,4}, 徐海^{2,3}

(1. 江苏农牧科技职业学院, 江苏 泰州 225300; 2. 江苏省农业科学院泰州农科所, 江苏 泰州 225300; 3. 兽用生物制品<泰州> 国泰技术创新中心, 江苏 泰州 225300; 4. 江苏省农业科学院动物免疫工程研究所, 江苏 南京 210014)

摘要: 本研究旨在探究双靶向融合蛋白用于新城疫病毒(NDV) La Sota 毒株对鸭的免疫效率的提高作用, 为提升鸭新城疫免疫防控能力做有益探索。将特异性结合囊膜病毒表面糖蛋白的红藻凝集素(GRFT)与靶向结合禽树突状细胞的纳米抗体分子(VHH)的编码基因进行串联表达, 经大肠杆菌表达系统制备双靶向融合蛋白。利用组氨酸(His)标签纯化 GRFT-VHH 融合蛋白, 采用有限稀释法定量评价融合蛋白与 La Sota 病毒的结合能力。用饱和结合融合蛋白的 La Sota 病毒制备疫苗, 分组免疫无特定病原体(SPF)雏鸭, 监测免疫后血凝抑制(HI)抗体效价以及 IL-4、IFN- γ 细胞因子水平。结果显示, 构建的重组大肠杆菌能够高效表达融合蛋白, 经 Ni 柱纯化回收的 GRFT-VHH54、GRFT-VHH74 蛋白质量浓度分别为 230 $\mu\text{g/mL}$ 、1 350 $\mu\text{g/mL}$, 仅需 100 ng 融合蛋白即可完全结合 1×10^8 半数感染量(EID_{50})病毒; NDV+GRFT-VHH54 组免疫后 21 d HI 抗体效价达到 $7 \log_2$ 以上, 血清中 IL-4 和 IFN- γ 含量分别为 80.0 pg/mL、8.8 pg/mL, 显著高于 NDV 单独免疫组($P < 0.05$)。双靶向融合蛋白 GRFT-VHH54 能够提高新城疫病毒 La Sota 株对鸭的免疫效率, 可作为免疫增强剂做进一步的开发与应用。

关键词: 新城疫病毒; 融合蛋白; 靶向; 免疫效率

中图分类号: S831.7 文献标识码: A 文章编号: 1000-4440(2024)12-2317-07

Immunoenhancement of Newcastle disease virus La Sota strain in ducks by dual-targeting fusion protein

LI Ling¹, ZHU Bosen¹, ZHU Ting¹, SHANG Lu^{2,3}, DENG Bihua^{3,4}, LU Yu^{3,4}, XU Hai^{2,3}

(1. Jiangsu Agri-animal Husbandry Vocational College, Taizhou 225300, China; 2. Taizhou Institute of Agricultural Sciences, Jiangsu Academy of Agricultural Sciences, Taizhou 225300, China; 3. GuoTai (Taizhou) Center of Technology Innovation for Veterinary Biologicals, Taizhou 225300, China; 4. Institute of Veterinary Immunology & Engineering, Jiangsu Academy of Agricultural Sciences, Nanjing 210014, China)

Abstract: This study aimed to explore the enhanced immunogenicity of the Newcastle disease virus (NDV) La Sota strain in ducks through a dual-targeting fusion protein, providing valuable insights for improving NDV immune prevention and control capabilities. The genes encoding Griffithsin (GRFT) that specifically binds to the surface glycoprotein of enveloped viruses and nanoantibody molecules (VHH) targeting avian dendritic cells were co-expressed in tandem using the *Escherichia coli* system and purified via a His-tag. The binding capacity of the GRFT-VHH fusion protein to the La Sota virus was quantitatively assessed using a limited dilution method. Vaccines were prepared with La Sota virus saturated with the fusion protein and administered to groups of specific pathogen free (SPF) ducklings. After immunization, the hemagglutination inhibition (HI) antibody titer and levels of cytokines IL-4 and IFN- γ were e-

收稿日期: 2024-06-30

基金项目: 江苏农牧科技职业学院院级课题(NSF2023ZR13)

作者简介: 李玲(1981-), 女, 江苏盐城人, 硕士, 讲师, 主要从事动物疾病防控研究。(E-mail) ll20220215@163.com

通讯作者: 徐海, (E-mail) hai_x@126.com

rus was quantitatively assessed using a limited dilution method. Vaccines were prepared with La Sota virus saturated with the fusion protein and administered to groups of specific pathogen free (SPF) ducklings. After immunization, the hemagglutination inhibition (HI) antibody titer and levels of cytokines IL-4 and IFN- γ were e-

valuated. Results indicated that the constructed recombinant *E. coli* efficiently expressed the fusion protein. The concentrations of GRFT-VHH54 and GRFT-VHH74 purified by Ni column were 230 $\mu\text{g/mL}$ and 1 350 $\mu\text{g/mL}$, respectively. Only 100 ng of the fusion protein was required to fully bind 1×10^8 median infective dose (EID_{50}) virus. The HI antibody titer in the NDV+GRFT-VHH54 group reached more than $7 \log_2$, and the levels of IL-4 and IFN- γ in serum were 80.0 pg/mL and 8.8 pg/mL respectively at 21 d post-immunization, which were significantly higher than those in the NDV group ($P < 0.05$). The dual-targeting fusion protein GRFT-VHH54 can enhance the immunogenicity of the NDV La Sota strain in ducks, and can be used as an immunopotentiator for further development and application.

Key words: Newcastle disease virus; fusion protein; targeting; immune efficiency

新城疫病毒(Newcastle disease virus, NDV)是一种有囊膜的线性单股负链 RNA 病毒,属于副黏病毒科(Paramyxoviridae)禽腮腺炎病毒亚科(Avulavirinae)正禽腮腺炎病毒属(*Orthoavulavirus*)正禽腮腺炎病毒 1 型(*Avina orthoavulavirus 1*)的成员^[1]。自 1926 年首次被报道以来,经历了 4 次世界范围内的大流行,其宿主范围不断扩大,能感染的禽类超过 250 种,对家禽养殖业造成严重危害,而水禽被认为是 NDV 的天然储存宿主,一般无临床症状或仅表现轻微症状^[2-3]。中国自 1997 年报道了水禽群因感染 NDV 出现高发病率和死亡率后,鸭、鹅自然感染发病的情况时有发生^[4]。近年来,随着养鸭产业的集约化与规模化,鸭群感染强毒 NDV 而造成严重损失的情况时有发生报道,感染范围涵盖了番鸭、半番鸭、麻鸭以及野鸭等诸多品种^[5]。

接种疫苗是预防和控制传染病的有效手段之一。当前,新城疫(ND)载体疫苗、灭活疫苗以及减毒活疫苗在临床上应用广泛,有效控制了鸡新城疫的发生与流行^[6-7]。但国内市场尚未有商品化的鸭源 ND 疫苗,鸭场防疫主要依靠传统的鸡 ND 疫苗作为替代,其免疫效果在学界一直存在争议。Nishizawa 等^[8]利用新城疫 La Sota 株活疫苗免疫北京鸭,在异源 NDV 毒株攻击后未能分离到病毒,说明疫苗接种对减少 NDV 的传播具有重要意义。石跃^[9]采用新城疫 La Sota 株活疫苗接种绍兴鸭和绿头鸭,结果发现病毒在 2 种鸭体内未能高效复制,刺激机体产生的中和抗体水平较为低下,并不能提供有效的免疫保护。胡焱等^[10]对比了新城疫病毒 I 系活疫苗(CS2 株)、IV 系灭活疫苗(La Sota 株)以及重组基因 VII 型灭活疫苗(A-VII 株)对贵州三穗麻鸭的免疫效果,结果发现 3 种疫苗均能诱导产生较高的抗体滴度,且 A-VII 株诱发的抗体滴度最高,持续时间最长,能有效抑制免疫鸭排毒。因此,基于前人的临床研究结果,笔者认为在没有专属鸭用 ND 疫

苗的情况下,加强现有 ND 疫苗对鸭的免疫应答水平,进而提高交叉保护能力,仍是目前防控鸭 NDV 的关键所在。

本研究拟开发一种新型双靶向融合蛋白用作 ND 疫苗的免疫增强剂。该融合蛋白由特异性结合囊膜病毒表面糖蛋白的红藻凝集素(GRFT)^[11]与靶向结合禽树突状细胞的纳米抗体分子(VHH)^[12]2 个亚基组成。GRFT 亚基负责与 NDV 表面囊膜结合,而游离的 VHH 亚基则负责引导病毒主动结合树突状细胞,加速抗原的捕获与加工递呈,促进机体产生更为广泛和强烈的免疫应答。为此,采用大肠杆菌表达系统制备双靶向融合蛋白,饱和结合 La Sota 毒株后制备油乳剂灭活疫苗,分组免疫无特定病原体(SPF)雏鸭,检测抗体效价和细胞因子水平,旨在为提升 ND 疫苗免疫效率做有益探索。

1 材料与方法

1.1 试验材料

大肠杆菌 BL21-DE3、DH5 α 、pET-32a(+)质粒均由江苏农牧科技职业学院保存;新城疫病毒 La Sota 株由江苏省农业科学院国家兽用生物制品工程技术研究中心提供。限制性内切酶、*Taq* DNA 聚合酶、T4 DNA 连接酶均为大连宝生物公司产品;胶回收试剂盒为德国凯杰公司产品;鸭 IFN- γ 、IL-4 酶联免疫吸附测定(ELISA)检测试剂盒购自上海酶联生物科技有限公司;其余试剂均为分析纯。台式离心机购自美国 Beck-man 公司;PCR 仪购自大连宝生物公司;Geldoc-It Imaging System 购自美国 UVP 公司,酶标仪购自美国 Bio-rad 公司。

1.2 双靶向融合蛋白重组表达载体构建

将特异性结合囊膜病毒表面糖蛋白的 GRFT 与特异性结合禽树突状细胞的纳米抗体分子 VHH54、VHH74 进行串联,其原理如图 1 所示。根据大肠杆菌表达系统进行密码子优化,将 GRFT-VHH54、

GRFT-VHH74 基因序列送金唯智生物有限公司合成,并根据 pET-32a(+)载体多克隆位点在基因上下游分别添加 *Nde* I 和 *Bam* H I 酶切位点。双酶切合成的基因与 pET-32a(+)载体,用 1%琼脂糖凝胶电泳回收、纯化目的基因与载体,并以摩尔比 3:1 进行连接,转化大肠杆菌 BL21-DE3 感受态细胞。将转化产物涂布在含有氨苄青霉素 (Amp^+) 固体培养基的平皿,37 °C 过夜培养,次日挑选单菌落培养,提取质粒,筛选重组子,鉴定正确的重组表达载体并命名为 pET-GRFT-VHH54、pET-GRFT-VHH74。

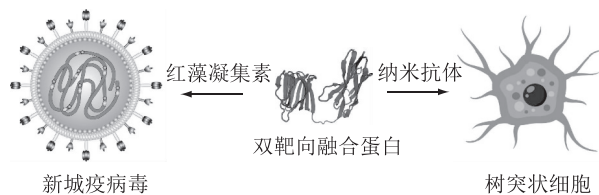


图1 双靶向融合蛋白工作原理

Fig.1 Working principle of dual-targeting fusion protein

1.3 双靶向融合蛋白表达与鉴定

过夜培养 pET-GRFT-VHH54、pET-GRFT-VHH74 重组菌,次日按 1:100(体积比)转接,37 °C 振荡培养 2.5 h (OD_{600} 为 0.4~0.6),加入异丙基- β -D-硫代半乳糖苷 (IPTG) 至浓度为 0.5 mmol/L,继续诱导培养 5.0 h,收获细菌。使用 SDS-PAGE、Western-blot 鉴定融合蛋白的表达,根据 His 标签层析柱 (HisTrap HP) 操作说明纯化蛋白质,使用微量分光光度计 (Nanodrop) 定量后保存备用。

1.4 融合蛋白与新城疫病毒的互作关系

将新城疫 La Sota 病毒调整滴度至 $1\text{ mL } 1 \times 10^9$ 半数感染量 (EID_{50}),然后做连续 2 倍比稀释,每个

稀释度取 10 μL 点样于硝酸纤维素膜,同时设置磷酸盐缓冲液 (PBS) 作为阴性对照,融合蛋白作为阳性对照。待完全干燥后将膜转移至 1%脱脂乳中,4 °C 过夜封闭。次日,用含 0.5%吐温-20 的磷酸盐缓冲液 (PBST) 洗膜 3 次,转入质量浓度为 2 $\mu\text{g/mL}$ 的融合蛋白中孵育 45 min,用 PBST 洗膜 3 次,再转入 1:5 000 稀释的辣根过氧化物酶标记的抗组氨酸标签 (HRP Anti-6X His Tag) 的抗体中孵育 45 min,用 PBST 洗涤 3 次,用二氨基联苯胺 (DAB) 底物显色,观察反应情况。将 1 mL $1 \times 10^9 EID_{50}$ 的新城疫 La Sota 病毒包被于 96 孔 ELISA 板,在 1%脱脂乳中,4 °C 过夜封闭。调整融合蛋白质量浓度至 2 $\mu\text{g/mL}$,然后做 2 倍比梯度稀释,加入 1 孔 100 μL 包被了病毒的 ELISA 板中,每个稀释度做 3 个重复,37 °C 孵育 45 min。用 PBST 洗涤 5 次,每孔加入 1:10 000 稀释的抗 Histag-HRP 抗体,37 °C 孵育 45 min。用 PBST 洗涤 5 次,加入 3,3',5,5'-四甲基联苯胺 (TMB) 底物显色 10 min,每孔加入 50 μL 2 mol/L H_2SO_4 终止反应,读取 OD_{450} 值。

1.5 疫苗制备与分组免疫

取 10 mL 滴度为 $1\text{ mL } 4 \times 10^8 EID_{50}$ 新城疫 La Sota 病毒,加入 0.1%二乙烯亚胺 (BEI) 进行灭活。取其中 5 mL 灭活病毒与质量浓度为 2 $\mu\text{g/mL}$ 融合蛋白等体积混合,37 °C 孵育 1 h;剩余 5 mL 灭活病毒与等体积 PBS 混合。以体积比 54:46 将抗原与 ISA206 佐剂进行混合,充分乳化后制备成疫苗。选取 10 日龄 SPF 鸭分成 7 组,每组 10 羽,接种制备的灭活疫苗,于接种后 7 d、21 d、35 d 采血评价免疫效率。疫苗配比及分组情况见表 1。

表1 疫苗制备及免疫分组

Table 1 Vaccine preparation and immunization grouping

分组	抗原含量 (EID_{50} , 1 mL)	融合蛋白含量 (ng, $1 \times 10^8 EID_{50}$)	免疫剂量 (mL, 1 羽)	动物数量 (羽)
1/2 NDV	1×10^8	/	0.2	10
NDV	1×10^8	/	0.4	10
1/2 NDV+GRFT-VHH54	1×10^8	200	0.2	10
NDV+GRFT-VHH54	1×10^8	200	0.4	10
1/2 NDV+GRFT-VHH74	1×10^8	200	0.2	10
NDV+GRFT-VHH74	1×10^8	200	0.4	10
Control	/	/	0.4	10

NDV:新城疫病毒;GRFT:红藻凝集素;VHH54、VHH74:纳米抗体分子; EID_{50} :半数感染量。1/2 NDV、NDV:La Sota 病毒组;1/2 NDV+GRFT-VHH54、NDV+GRFT-VHH54:嵌合 GRFT-VHH54 融合蛋白的 La Sota 病毒组;1/2 NDV+GRFT-VHH74、NDV+GRFT-VHH74:嵌合 GRFT-VHH74 融合蛋白的 La Sota 病毒组;Control:空白对照组。其中,“1/2”代表该组免疫剂量减半。

1.6 免疫效率的评价

在免疫后 7 d、21 d、35 d 采血并分离出血清,血凝抑制(HI)抗体效价测定按照中华人民共和国出入境检验检疫行业标准《新城疫检疫技术规程》(SN/T 0764-2011)进行。根据 ELISA 检测试剂盒操作说明,测定免疫后第 21 d 血清样品中 IFN- γ 、IL-4 含量。

1.7 数据统计与分析

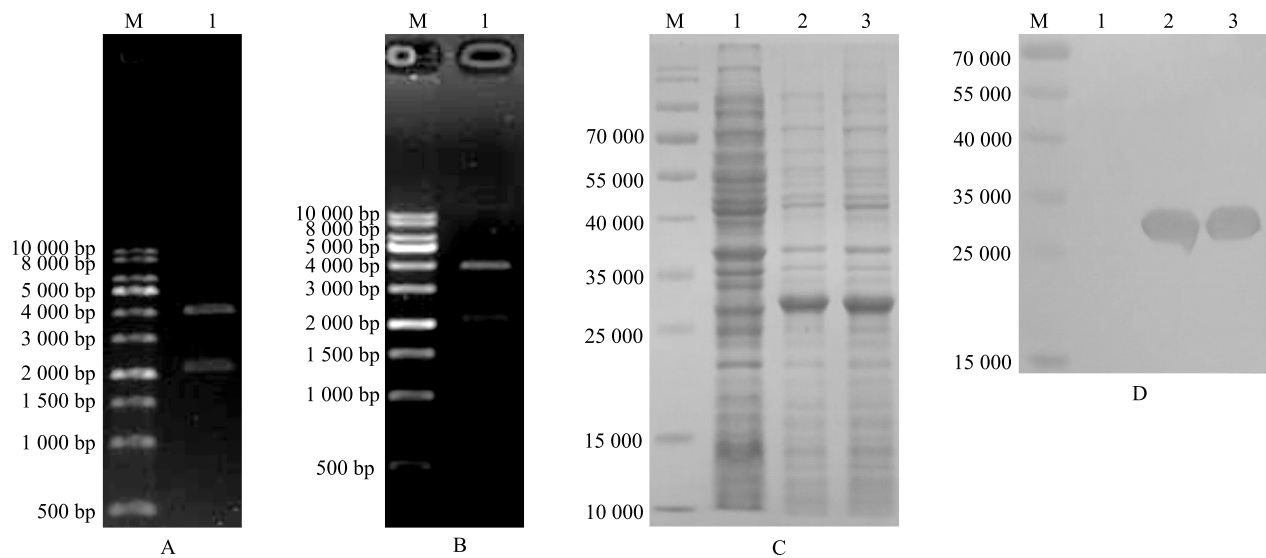
运用 SPSS Statistics 19 软件对抗体水平和细胞因子含量数据进行统计分析,采用单因素方差分析和 Tukey 事后检验,不同字母标记表示组间的差异

显著($P<0.05$)。

2 结果与分析

2.1 重组质粒载体构建与融合蛋白表达

提取重组质粒载体 pET-GRFT-VHH54、pET-GRFT-VHH74,经 *Bam* H I、*Hap* I 双酶切后得到约 2 100 bp 的目的基因片段,大小符合预期(图 2A、图 2B),测序分析发现,基因序列正确、阅读框无移码。重组菌经 IPTG 诱导后表达出约 27 000 目标蛋白(图 2C),Western-blot 检测结果显示,该蛋白质与抗 His 标签特异性抗体有较好的反应活性(图 2D)。



A:重组质粒载体 pET-GRFT-VHH54 双酶切鉴定,其中,M:1 kb DNA Marker;1:pET-GRFT-VHH54 的酶切产物。B:重组质粒载体 pET-GRFT-VHH74 双酶切鉴定,其中,M:1 kb DNA Marker,1:pET-GRFT-VHH74 的酶切产物。C:目的蛋白诱导表达,其中,M:蛋白质相对分子量标准;1:大肠杆菌 BL21-DE3 菌液;2:诱导后的重组大肠杆菌 pET-GRFT-VHH54 菌液;3:诱导后的重组大肠杆菌 pET-GRFT-VHH74 菌液。D:辣根过氧化物酶标记的抗组氨酸标签二抗(HRP Anti-6X His Tag)鉴定融合蛋白,其中,M:蛋白质相对分子量标准;1:大肠杆菌 BL21-DE 菌液;2:融合蛋白 GRFT-VHH54;3:融合蛋白 GRFT-VHH74。

图 2 重组表达质粒载体构建与蛋白质诱导表达鉴定

Fig.2 Construction of recombinant expression vectors and identification of protein induced expression

2.2 融合蛋白与 La Sota 毒株结合能力的定量分析

利用融合蛋白上的 His 标签,经 Ni 柱亲和纯化,收获目的蛋白,经 SDS-PAGE 检测,GRFT-VHH54、GRFT-VHH74 融合蛋白的条带较为单一(图 3A);Nanodrop 测定结果显示,GRFT-VHH54、GRFT-VHH74 蛋白质量浓度分别为 230 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、1 350 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 。通过固定病毒稀释融合蛋白的方式测定二者的结合能力,结果(图 3B)显示,当投入的融合蛋白大于 100 ng 时即可完全结合 1×10^8 EID₅₀病毒,继续增加融合蛋白的量至 200 ng,OD₄₅₀值未能

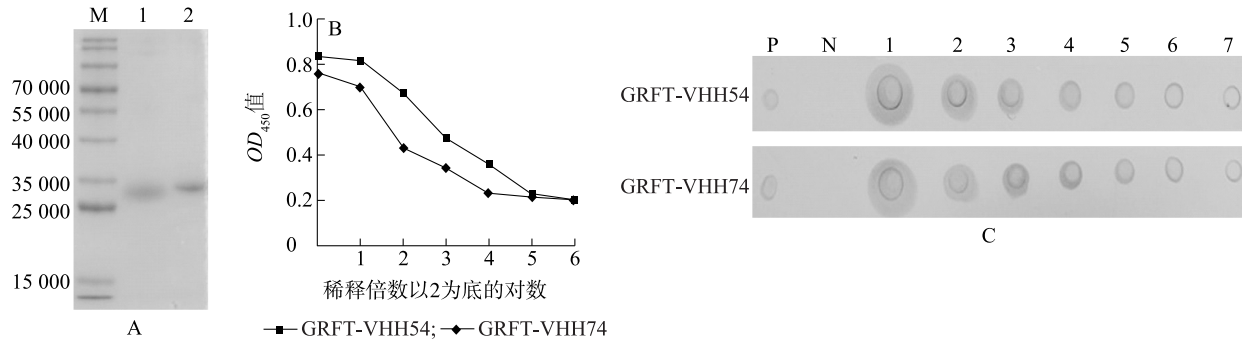
继续升高。融合蛋白投入量下降,其结合在病毒表面的融合蛋白含量也随之减少,表现为 OD₄₅₀值的降低。通过固定融合蛋白稀释病毒的方式测定二者的结合能力,结果(图 3C)显示,随着吸附在硝酸纤维素膜上的病毒量减少,显色反应逐渐减弱,表现为显色圈的缩小以及颜色变淡。

2.3 HI 抗体水平的检测

各组鸭只 HI 抗体效价如图 4 所示:免疫后 7 d 至 21 d,各免疫组抗体整体呈上升趋势,且第 21 d 时 NDV+GRFT-VHH54 组抗体效价显著高于其他组

($P < 0.05$), NDV+GRFT-VHH74 组与 NDV 组差异不显著($P > 0.05$)。免疫后 21 d 至 35 d, 各免疫组抗体效价未能持续上升, 且 NDV、1/2NDV + GRFT-

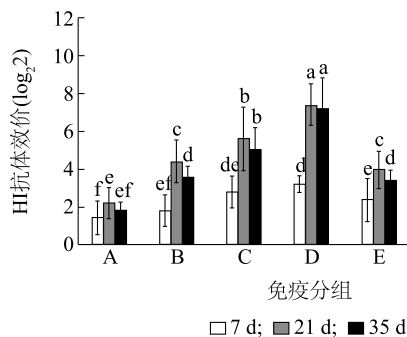
VHH74 和 NDV+GRFT-VHH74 组抗体效价显著下降, 仅 NDV + GRFT-VHH54 组抗体效价仍达到 $7 \log_2$ 以上。



A: Ni 柱纯化后的融合蛋白, 其中, M: 蛋白质相对分子量标准; 1: 融合蛋白 GRFT-VHH54; 2: 融合蛋白 GRFT-VHH74。B: 质量浓度梯度稀释的融合蛋白与 1.000×10^8 半数感染量 (EID_{50}) La Sota 毒株结合能力的测定, 融合蛋白从起始质量浓度 $2 \mu\text{g/mL}$ 做连续 2 倍比稀释, 每个稀释度取 $100 \mu\text{L}$ 用于检测。C: 质量浓度梯度稀释的 La Sota 毒株与 $2 \mu\text{g/mL}$ 融合蛋白结合能力的测定, 其中, P: 融合蛋白阳性对照; N: 磷酸盐缓冲液 (PBS) 阴性对照; 1~7: 分别取 $10 \mu\text{L}$ 滴度为 $1 \text{ mL } 1.000 \times 10^9 EID_{50}$ 、 $5.000 \times 10^8 EID_{50}$ 、 $2.500 \times 10^8 EID_{50}$ 、 $1.250 \times 10^8 EID_{50}$ 、 $6.250 \times 10^7 EID_{50}$ 、 $3.125 \times 10^7 EID_{50}$ 、 $1.562 \times 10^7 EID_{50}$ 的 La Sota 病毒固定于硝酸纤维素膜。

图 3 融合蛋白与 La Sota 毒株结合能力的测定

Fig.3 Detection of the binding ability of fusion protein to La Sota strain



A: 1/2 NDV; B: NDV; C: 1/2 NDV+GRFT-VHH54; D: NDV+GRFT-VHH54; E: 1/2 NDV+GRFT-VHH74; F: NDV+GRFT-VHH74; G: Control。图中不同小写字母表示抗体水平差异显著 ($P < 0.05$)。NDV: 新城疫病毒; GRFT: 红藻凝集素; VHH54、VHH74: 纳米抗体分子; 1/2 NDV、NDV: La Sota 病毒组; 1/2 NDV + GRFT-VHH54、NDV+GRFT-VHH54: 嵌合 GRFT-VHH54 融合蛋白的 La Sota 病毒组; 1/2 NDV+GRFT-VHH74、NDV+GRFT-VHH74: 嵌合 GRFT-VHH74 融合蛋白的 La Sota 病毒组; Control: 空白对照组。其中, “1/2”代表该组免疫剂量减半。

图 4 血凝抑制 (HI) 抗体效价

Fig.4 Hemagglutination inhibition (HI) antibody titer

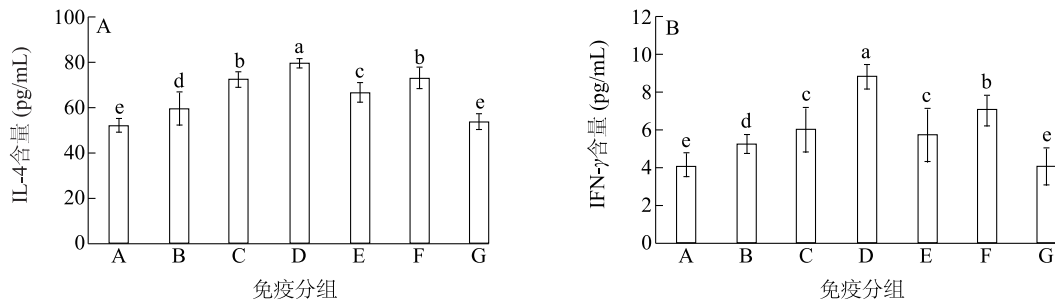
2.4 细胞因子水平的检测

免疫后 21 d, 各试验组每羽鸭血清中 IL-4 和 INF- γ 含量如图 5A 所示: NDV+GRFT-VHH54 免疫组鸭只血清中 IL-4 含量最高, 达到 80.0 pg/mL , 且

显著高于 1/2NDV、NDV、1/2NDV + GRFT-VHH54、1/2NDV+GRFT-VHH74 以及 NDV+GRFT-VHH74 免疫组 ($P < 0.05$)。同样, NDV+GRFT-VHH54 免疫组鸭只血清中 INF- γ 含量最高, 达到 8.8 pg/mL , 显著高于其他试验组 ($P < 0.05$)。

3 讨论

一直以来, 鸭、鹅等水禽被认为对 NDV 具有较强的抵抗力, 被感染带毒但不表现临床症状。2000 年以来, 张训海等^[13]、李建军等^[14]陆续报道了家鸭感染新城疫病毒导致死亡的病例, 这些研究结果对传统认知提出了挑战。此外, 在广东、江苏、安徽、福建以及浙江等多个省份的鸭群中发生一种新型传染病, 临床表现为采食量下降、腹泻、消瘦以及呼吸道、消化道、胰腺和脾脏出现溃疡、出血等典型病变, 最终被证实该病的病原是 NDV 强毒株^[15]。经过病毒分离和基因序列分析发现, 鸭源强毒 NDV 以基因 VII 型为主, 与鸡源 NDV 毒株在基因序列、感染宿主范围以及体外培养特性等方面存在一定差异^[16-17]。虽然新城疫病毒有多个基因型, 但只有 1 个血清型, 不同毒株之间存在抗原性和基因特性的差异, 却仍然保持一定的交叉保护性。当前中国新城疫疫苗使用较为广泛的是 B1、La Sota、N79、N88 和 C30 毒株,



A: 1/2 NDV; B: NDV; C: 1/2 NDV+GRFT-VHH54; D: NDV+GRFT-VHH54; E: 1/2 NDV+GRFT-VHH74; F: NDV+GRFT-VHH74; G: Control。图中不同小写字母表示各组之间细胞因子水平差异显著 ($P < 0.05$)。NDV: 新城疫病毒; GRFT: 红藻凝集素; VHH54、VHH74: 纳米抗体分子; 1/2 NDV、NDV、La Sota 病毒组; 1/2 NDV+GRFT-VHH54、NDV+GRFT-VHH54: 嵌合 GRFT-VHH54 融合蛋白的 La Sota 病毒组; 1/2 NDV+GRFT-VHH74、NDV+GRFT-VHH74: 嵌合 GRFT-VHH74 融合蛋白的 La Sota 病毒组; Control: 空白对照组。其中, “1/2”代表该组免疫剂量减半。

图 5 鸭血清中 IL-4、IFN- γ 水平的检测

Fig.5 Detection of IL-4 and IFN- γ levels in duck serum

尚没有专属于鸭、鹅以及鸽子等禽类的 ND 疫苗产品,在此背景下,通过提高现有 ND 疫苗免疫效率,进而达到更好的交叉保护效率仍是其他禽类防控新城疫的备选方案之一。

唐思静等^[18]将大肠杆菌热敏感性肠毒素突变体蛋白与 NDV La Sota 毒株共同免疫,能诱导高水平的黏膜免疫球蛋白 A (IgA) 和血清抗体。徐磊等^[19]发现猪脾脏转移因子能够提高 NDV La Sota 株免疫后 IL-6、IL-10 以及 IL-21 介导的免疫应答和 ND HI 抗体效价,还能降低强毒 NDV 攻击后介导的炎症反应和病毒血症,进而提高 La Sota 株的免疫保护效率。因此,开发新型佐剂及免疫增强剂来提高 ND 疫苗的免疫效率对该病的防控仍有现实意义。本研究通过原核表达系统制备了 GRFT-VHH 双靶向融合蛋白作为免疫增强剂,病毒粒子在融合蛋白的引导下,主动靶向结合抗原递呈细胞,促进了抗原的加工递呈,提升了免疫效率。

GRFT 是一种广谱的抗病毒蛋白,在病毒性疾病的预防与治疗领域有着良好的应用前景,能够与一切具有类似外壳糖蛋白结构的膜病毒非可逆的结合。体外试验结果表明,100 ng 的融合蛋白即可饱和结合 1.000×10^8 EID_{50} 的 La Sota 病毒,而 1.562×10^5 EID_{50} 的病毒也能被融合蛋白吸附,说明二者的结合具有较好的亲和性和灵敏性。VHH54、VHH74 是从 T7 噬菌体表面展示的羊驼源纳米抗体文库中筛选得到能结合鸡、鸭、鹅等家禽骨髓源树突状细胞的纳米抗体分子,本团队前期已对该纳米抗体分子的氨基酸组成、空间构象以及结合树突状细胞的选择性与特异性等指标进行了检测。

结合了融合蛋白的 La Sota 病毒能够更快、更高地激发免疫反应,对比试验结果显示:对同等抗原含量的 NDV 进行免疫,NDV+GRFT-VHH54 组产生的 HI 抗体水平显著高于 NDV 组 ($P < 0.05$),而 1/2 抗原含量的 NDV 结合 GRFT-VHH54 后所激发 HI 抗体效价均值在免疫后的 21~35 d 亦高于全剂量 NDV 免疫组。虽然 GRFT-VHH74 蛋白具备结合 La Sota 病毒和树突状细胞的能力,但未能发挥免疫增强效果,NDV+GRFT-VHH74 组与 NDV 组激发的 HI 抗体水平没有显著差异。此外,在免疫应答和抗感染免疫反应过程中细胞因子也发挥着重要作用。IL-4 属于 Th2 型细胞因子,具有促进 B 细胞增殖和分化的能力,是 IgG1 类抗体产生的关键因子;IFN- γ 属于 Th1 型细胞因子,是活化巨噬细胞的关键因子,能增强其吞噬和杀伤病原体的能力^[20]。与单独免疫 NDV 相比,NDV+GRFT-VHH54 组显著上调了 IL-4 和 IFN- γ 表达水平,一方面解释了该组为何能激发较高的 HI 抗体水平,另一方面可以预见该免疫组具备更强的抗病毒感染能力。由于受到试验条件的限制,未能进行攻毒保护试验,但抗体和细胞因子水平的比较能够证明 GRFT-VHH54 具备免疫增强能力。此外,该研究也为提升家禽其他囊膜病毒疫苗的免疫效率提供很好的借鉴。

综上所述,本研究成功构建双靶向融合蛋白原核表达载体,制备的融合蛋白能够高亲和力、高灵敏度的结合 NDV La Sota 毒株,其中 GRFT-VHH54 融合蛋白能够显著提高 La Sota 疫苗免疫效率,激发更高水平的 HI 抗体以及上调 IL-4 和 IFN- γ 表达水平。

参考文献:

- [1] 连 聪,温肖会,吕殿红,等. 我国新城疫分子流行病学研究进展[J]. 广东农业科学,2023,50(2):115-124.
- [2] UL-RAHMAN A, ISHAQ H M, RAZA M A, et al. Zoonotic potential of Newcastle disease virus; old and novel perspectives related to public health [J]. Reviews in Medical Virology, 2022, 32(1):e2246.
- [3] MAO Q, MA S M, SCHRICKEL P L, et al. Review detection of Newcastle disease virus [J]. Frontiers in Veterinary Science, 2022, 9:936251.
- [4] 刘华雷,郑东霞,孙承英,等. 1997-2005 年中国水禽新城疫分子流行病学特点分析[J]. 畜牧兽医学报,2009,40(1):145-148.
- [5] LYU H C, CHENG X G, WANG H, et al. Research advances on epidemic characteristics and control strategy of duck Newcastle disease [J]. China Poultry, 2018, 40(2):40-42.
- [6] 刘秀梵,胡顺林. 我国新城疫病毒的分子流行病学及新疫苗研制[J]. 中国家禽,2010,32(21):1-4.
- [7] 王蒙蒙,金 鑫. 鸡新城疫商业化疫苗研究进展[J]. 动物医学进展,2024,45(5):103-108.
- [8] NISHIZAWA M, PAULILLO A C, NAKAGHI L S O, et al. Newcastle disease in white Pekin ducks; response to experimental vaccination and challenge [J]. Revista Brasileira de Ciência Avícola, 2007, 9(2):123-125.
- [9] 石 跃. 新城疫病毒对鸭致病性研究[D]. 北京:中国农业科学院,2011.
- [10] 胡 焱,嵇辛勤,阮 涌,等. 不同新城疫疫苗对贵州三穗麻鸭的免疫效果比较[J]. 中国兽药杂志,2017,51(5):1-6.
- [11] CAI Y X, XU W, GU C J, et al. Griffithsin with a broad-spectrum antiviral activity by binding glycans in viral glycoprotein exhibits strong synergistic effect in combination with a pan-coronavirus fusion inhibitor targeting SARS-CoV-2 spike S2 subunit [J]. Virologica Sinica, 2020, 35(6):857-860.
- [12] XU H, LI L, DENG B H, et al. Construction of a T7 phage display nanobody library for bio-panning and identification of chicken dendritic cell-specific binding nanobodies [J]. Scientific Reports, 2022, 12(1):12122.
- [13] 张训海,朱鸿飞,陈溥言,等. 鸭副粘病毒强毒株的分离和鉴定[J]. 中国动物检疫,2001,18(10):24-26.
- [14] 李建军,丁巧玲,袁 生,等. 鸭副粘病毒的分离与鉴定[J]. 中国家禽,2006,28(24):135-136,139.
- [15] 陈少莺,胡奇林,陈仕龙,等. 鸭副粘病毒的分离与初步鉴定[J]. 中国预防兽医学报,2004,26(2):118-120.
- [16] ZHANG S P, WANG X T, ZHAO C G, et al. Phylogenetic and pathotypic analysis of two virulent Newcastle disease viruses isolated from domestic ducks in China [J]. PLoS One, 2011, 6(9):e25000.
- [17] XIANG B, CHEN L B, CAI J C, et al. Insights into genomic epidemiology, evolution, and transmission dynamics of genotype VII of class II Newcastle disease virus in China [J]. Pathogens, 2020, 9(10):837.
- [18] 唐思静,哈 卓,赵艳敏,等. LT 粘膜佐剂对鸡新城疫疫苗的免疫增强作用研究[J]. 中国动物传染病学报,2013,21(1):8-11.
- [19] 徐 磊,杨 慧,刘毅发,等. 猪脾转移因子对 La Sota 株鸡新城疫弱毒疫苗的免疫增强作用[J]. 微生物学报,2022,62(2):727-741.
- [20] ABRAHA R. Review on the role and biology of cytokines in adaptive and innate immune system [J]. Archives of Veterinary and Animal Sciences, 2020 (2):2.

(责任编辑:陈海霞)