

DOI:10.13350/j. cjpb. 220110

• 论著 •

BVDV-1 VLPs 的构建及免疫原性研究^{*}

杨霞¹, 李雅茹¹, 丛佳南², 李一权², 李善智², 韩继成², 房金波², 白冰², 宋高杰², 修智儒², 程成³,
葛晨晨¹, 孙福亮^{1**}, 朱羿龙^{2**}

(1. 延边大学农学院, 吉林延吉 136200; 2. 长春中医药大学; 3. 吉林农业大学)

【摘要】 目的 利用 C、E0、E1 和 E2 蛋白构建 BVDV 病毒样颗粒, 并评价 BVDV-1 VLPs 的免疫原性。方法 以 BVDV-BA 株为模板通过反转录得到 C、E0、E1 和 E2 基因, 再将 C、E0、E1 和 E2 基因分别克隆至 PEASY-Blunt Simple 克隆载体上。提取质粒摇菌扩大培养, 将得到的 C、E0、E1 和 E2 基因克隆至杆状病毒穿梭载体 pFast Bac HTA 中, 采用热激法将重组穿梭质粒转化至 DH10. Bac 大肠埃希菌感受态细胞, 通过蓝白斑筛选技术获得重组杆粒 rB-C、rB-E0、rB-E1 和 rB-E2。将重组杆粒转染至 SF9 细胞, 获得重组杆状病毒; 再用构建的 4 种重组杆状病毒同时感染 SF9 悬浮细胞, 72 h 后收集细胞沉淀进行超声破碎, 利用蔗糖垫超速离心和蔗糖密度梯度离心进行纯化, 通过 Western blot 和透射电镜进行鉴定。将获得的 BVDV-1 VLPs 联合氢氧化铝佐剂免疫 BALB/c 小鼠, 通过 ELISA 检测免疫小鼠的特异性抗体水平评价 VLPs 的免疫原性。结果 成功克隆出 C、E0、E1 和 E2 基因, 并构建 C、E0、E1 和 E2 蛋白的杆状病毒。通过纯化和鉴定, 在 20%~30% 蔗糖层获得由 C、E0、E1 和 E2 蛋白组成结构完整的病毒样颗粒 BVDV-1 VLPs。BVDV-1 VLPs 能够显著增加免疫小鼠的特异性抗体表达水平。结论 构建并获得了由 C、E0、E1 和 E2 蛋白组成, 并具备良好免疫原性的病毒样颗粒 BVDV-1 VLPs。

【关键词】 VLP; C、E0、E1 和 E2 蛋白; BVDV-1 VLPs; 免疫原性

【中图分类号】 R373

【文献标识码】 A

【文章编号】 1673-5234(2022)01-0043-06

[*Journal of Pathogen Biology*. 2022 Jan; 17(1): 43-48.]

Construction, identification, and determination of the immunogenicity of BVDV-1 VLPs

YANG Xia¹, LI Ya-ru¹, LI Yi-quan², LI Shan-zhi², HAN Ji-cheng², FANG Jin-bo², BAI Bing², SONG Gao-jie², XIU Zhi-ru², CHENG Cheng³, GE Chen-chen¹, SUN Fu-liang², ZHU Yi-long² (1. College of Agriculture, Yanbian University, Yanji, Jilin 136200, China; 2. Changchun University of Chinese Medicine; 3. Jilin Agricultural University)^{**}

【Abstract】 **Objective** To construct BVDV virus-like particles using the C, E0, E1, and E2 proteins and to evaluate the immunogenicity of BVDV-1 VLPs. **Methods** The BA strain of BVDV was used as template, and the C, E0, E1, and E2 genes were obtained using RT-PCR. The C, E0, E1, and E2 genes were then cloned into a PEASY-Blunt simple cloning vector, and a plasmid was extracted and expanded for culture. Then the obtained C, E0, E1 and E2 genes were cloned into the baculovirus shuttle vector pFast Bac HTA. Recombinant bacmid rB-C, rB-E0, rB-E1, and rB-E2 were obtained using blue-white screening. The recombinant bacmids were transfected into SF9 cells to obtain recombinant baculoviruses, and then SF9 cells in suspension were infected with four recombinant baculoviruses. After 72 hours, the cells were collected for ultrasonic fragmentation. BVDV-1 VLPs were purified using sucrose ultracentrifugation and sucrose density gradient centrifugation, and they were identified using transmission electron microscopy and Western blotting. BALB/c mice were immunized with BVDV-1 VLPs and aluminum hydroxide adjuvant. The immunogenicity of BVDV-1 VLPs was evaluated by detecting the level of specific antibodies. **Results** In this experiment, the C (306 bp), E0 (585 bp), E1 (681 bp), and E2 (1 122 bp) genes were successfully cloned, and baculoviruses that successfully express C (14 ku), E0 (21 ku), E1 (25-33 ku), and E2 (42 ku) proteins were constructed. After purification and identification, BVDV-1 VLPs that contained the C, E0, E1, and E2 proteins were obtained from the 20-30% sucrose layer, and the size of the VLP was around 50 nm according to transmission electron microscopy. BVDV-1 VLPs significantly increased the level of expression of specific antibodies in immunized mice. At the sixth week, the level of specific antibodies produced by the aluminum hydroxide-VLP group was almost 1.5 times that in the VLP group, and the level of specific antibodies

^{*} **【基金项目】** 吉林省青年科技人才托举工程项目(No. QT202111); 2021年长春市科技发展计划项目创新平台与人才计划青年科技人才创新创业专项; 靖宇平贝母新功能开发与应用(No. 21QC01)。

^{**} **【通讯作者】** 孙福亮, E-mail: flsun@ybu.edu.cn; 朱羿龙, E-mail: zhuyl@ccucm.edu.cn

【作者简介】 杨霞(1991-)女, 河南周口人, 硕士研究生。主要研究方向: 病毒学。E-mail: 1669554669@qq.com

produced by the aluminum hydroxide-VLP group was almost 4 times that in the PBS group. **Conclusion** BVDV-1 VLPs that consist of the C, E0, E1, and E2 proteins with a good immunogenicity were successfully constructed and obtained.

【Key words】 VLP; C, E0, E1 and E2 proteins; BVDV-1 VLPs; immunogenicity

牛病毒性腹泻是由牛病毒性腹泻病毒(bovine viral diarrhea virus, BVDV)引起的一种传染病。BVDV属于黄病毒科瘟病毒属的单股正链RNA病毒,呈二十面体球形结构,病毒粒子直径40~60 nm,有囊膜,囊膜表面有10~20 nm的环形亚单位^[1-2]。BVDV的基因序列分析表明,CP型分离株基因组约为12.5 kb,而NCP型则为12.3 kb^[3],该基因组编码生成至少11种成熟的蛋白质,5'UTR区域可对病毒的复制、转录和翻译过程进行调控^[4]。BVDV由脂质囊膜包裹病毒囊膜糖蛋白组合而成,现已知^[5]其蔗糖密度梯度的悬浮密度为1.13~1.14 g/cm³。

BVDV的结构蛋白包括C、E0、E1和E2^[6],其中C基因位于阅读框(ORF)505~810 nt区域,由270个碱基组成,共编码90个氨基酸,大小约为14 ku^[7]。Elahi等^[8]通过试验证明C基因具有一定的免疫原性和中和活性。Erns基因又称E0,位于阅读框811~1491 nt,由681个碱基组成,共编码227个氨基酸,大小约为21 ku^[9]。E0蛋白属于囊膜蛋白,无跨膜区,且有信号肽,含有中和表位,免疫原性强,可诱导机体产生抗体^[10-11]。E1基因位于阅读框1492~2076 nt,由585个碱基组成,共编码195个氨基酸^[12],大小为25~33 ku^[13],属囊膜蛋白,有跨膜区^[14]。研究表明,E1蛋白可协助Erns蛋白在BVDV病毒组装成熟过程中定位^[15],但无法诱导集体产生抗体^[16]。E2基因位于阅读框693~1130 nt,由1137碱基组成,编码379个氨基酸。E2蛋白高度可变且富含BVDV重要的抗原表位^[17],具有很强的免疫原性,可诱发机体产生中和反应^[18]。E2通过二硫键和E1形成的同源或者异源二聚体可与受体结合,是中和抗体的主要靶^[19]。E2蛋白非糖基化蛋白大小约为42 ku,根据蛋白糖基化不同,E2蛋白分子质量大小同样存在一定差异^[20]。病毒样颗粒(virus-like particles, VLPs)由病毒的单分子结构蛋白高度有序地组装在一起形成,能够有效激活B细胞产生免疫应答^[21]。VLPs具有特殊的微粒结构,易被抗原递呈细胞所摄取,且VLPs自身具备良好的佐剂功能,可以更加有效地激活固有免疫和适应性免疫应答^[22],具有广阔的应用前景。

本研究以BVDV-BA株为模板,通过特异性扩增获得C、E0、E1和E2基因,再将C、E0、E1和E2基因分别克隆入杆状病毒穿梭载体pFast Bac HTA中,采用热激法将重组穿梭质粒转化至DH10. Bac大肠埃希

菌感受态细胞,使用蓝白斑筛选技术获得重组杆粒rB-C、rB-E0、rB-E1和rB-E2,利用转染试剂将重组杆粒转染至SF9细胞,获得重组杆状病毒,再将重组病毒共同转染至SF9悬浮细胞。通过Western blot检测C、E0、E1和E2蛋白的表达情况。使用无血清表达系统大量制备BVDV-1 VLPs,收集细胞沉淀,超声破碎,利用蔗糖垫超速离心和蔗糖密度梯度离心进行纯化,利用Western blot和透射电镜进行鉴定。将VLPs联合氢氧化铝佐剂通过免疫BALB/c小鼠确定其免疫原性。

材料与方法

1 材料

1.1 细胞、菌株与质粒 MBDK牛肾细胞和SF9昆虫细胞由本实验室保存;BVDV-BA株由黑龙江八一农垦大学提供;Bac-to-Bac[®]杆状病毒表达系统购自美国Invitrogen公司;Trans 5a大肠埃希菌感受态细胞购自北京全式金生物技术有限公司;克隆载体PEASY-Blunt Simple购自日本TAKARA公司。

1.2 主要试剂 ExTaq购自日本TAKARA公司;Anti-His购自北京全式金生物技术有限公司;山羊抗鼠二抗、ELISA包被液、TMB显色液和终止液均购自碧云天生物技术;杆粒提取试剂盒购自上海尚宝生物科技有限公司。

1.3 实验动物 5周龄雌性BALB/c小鼠购自斯贝福(北京)生物技术有限公司。

2 方法

2.1 目的基因的扩增与重组杆粒的构建 参考NCBI收录的BVDV-BA株(GenBank ID: KC695814.1) C、E0、E1和E2基因全序列,利用DNASTar 7.0设计引物用于扩增C、E0、E1和E2基因全长,引物序列如表1。利用上海生工UNIQ-10柱式Trizol总RNA抽提试剂盒提取BVDV-BA株病毒液中总RNA并反转录为cDNA,以此为模板PCR扩增C、E0、E1和E2基因,再将C、E0、E1和E2基因分别克隆入PEASY-Blunt Simple克隆载体上,经纯化、连接、酶切后,C、E0基因N端和C端分别添加Bam H I和Not I酶切位点,并将其克隆至pFastBac[™] HTA穿梭载体,使其N端含有6xHis标签,便于纯化和检测蛋白的表达情况。E1、E2基因N端和C端分别添加BamH I和Not II酶切位点,并将其克隆至pFastBac[™] HTA穿

梭载体,使其 N 端含有 6xHis 标签,便于纯化和检测蛋白的表达情况。TSS 法制备 DH10Bac 大肠埃希菌感受态细胞,热激法转化 DH10Bac 大肠埃希菌感受态细胞,获得 4 种重组杆粒 rB-C、rB-E0、rB-E1 和 rB-E2。菌液 PCR 分析重组杆粒,用杆粒提取试剂盒提取重组杆粒,进行菌液 PCR 鉴定。

表 1 PCR 引物
Table 1 The primers of PCR

| 引物 Primer | 序列(5'-3') Sequence (5'-3') | 酶切位点 Restriction enzyme cutting site |
|--------------|--|--|
| C-F: | <u>GGATCC</u> GATGTCTGATACAAAGGGGAAGCAG | BamHI |
| C-R: | GCGGCCGCTTATCCCGTGTAACCTGAAAAA | NotI |
| E0-F: | <u>GGATCC</u> GATGGAGAACAATAACAAATGGAAAC | BamHI |
| E0-R: | GCGGCCGCTTATGCGTATGCCCGAACCAT | NotI |
| E1-F: | <u>GGATCC</u> GATGGCTTCCCCTACTGTAAAG | BamHI |
| E1-R: | GCGGCCGCTTACCCTTGTGCACCTGTATCAG | NotI |
| E2-F: | <u>GGATCC</u> GATGTATCCAGACTGCAAGCCCGATT | BamHI |
| E2-R: | GCGGCCGCTTAAACCAGAGGCCTTTTGCTCTGA | NotI |

注(Note): * 斜体加下划线部分为酶切位点(The part that is both italics and underlined is the restriction Enzyme cutting site)。

2.2 重组杆状病毒的构建与鉴定 将 SF9 贴壁细胞以 8×10^5 cell/ml 传代至 6 孔板,培养 24 h,利用转染试剂将重组杆粒 rB-C、rB-E0、rB-E1 和 rB-E2 分别转染至 SF9 细胞,72 h 后收集细胞培养上清液,4 °C、3 500 r/min(离心半径 5 cm)离心 5 min,即为第一代重组杆状病毒 P1,-80 °C 保存。按照 1% 体积比将 P1 代重组杆状病毒接种在 SF9 贴壁细胞中,27 °C 静止培养,72 h 收获上清,即为第二代重组杆状病毒 P2。同样方法将重组杆状病毒扩增至 P3 代。采用 Western blot 鉴定这 4 种重组杆状病毒相应蛋白 C、E0、E1 和 E2 的表达情况。

2.3 BVDV-1 VLPs 的构建与纯化 将重组杆状病毒 rB-C、rB-E0、rB-E1 和 rB-E2 混合共感染 SF9 悬浮细胞包装 BVDV-1 VLPs。72 h 后收集细胞悬液,4 °C、3 000 r/min(离心半径 8 cm)离心 30 min;取沉淀用 PBS 重悬进行超声破碎,4 °C、4 000 r/min(离心半径 5 cm)离心 30 min;取上清进行超速离心(10%蔗糖垫,30 000 r/min(离心半径 8 cm)、4 °C、2 h);收集沉淀,使用适量 PBS 重悬后缓慢加入到梯度蔗糖 20%、30%、60%、(W/V)液面上,4 °C、30 000 r/min(离心半径 8 cm),离心 2 h;收集蔗糖液面间的白色条带,用 PBS 重悬,4 °C、30 000 r/min(离心半径 4 cm),离心 2 h,获得 BVDV-1 VLPs。

2.4 BVDV-1 VLPs 鉴定 收集到的白色条带部分制成蛋白样品采用 Western blot 检测 C、E0、E1 和 E2 的表达情况;部分加入适量的 PBS 稀释,与透射电镜专用铜网共孵育 5 min,1%磷钨酸负染 3 min,滤纸吸

去多余染液,用于电镜观察 VLP 结构。

2.5 BVDV-1 VLPs 的制备 根据 BVDV-1 VLPs 表达条件优化数据制备纯化 BVDV-1 VLPs,通过 BCA 法测定蛋白浓度。将氢氧化铝佐剂与纯化得到的 BVDV-1 VLPs 按体积比 1:8 的比例混合。

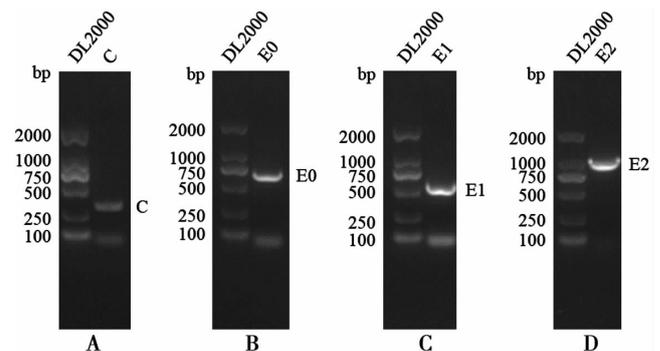
2.6 动物免疫 将 24 只 5 周龄雌性 BALB/c 小鼠随机分成 3 组,即 BVDV-1 VLPs 组、BVDV-1 VLPs+佐剂组和 PBS 对照组,每组 8 只。适应性饲养 1 周后进行免疫。每只小鼠的免疫剂量为 50 μg/100 μl,免疫方式为肌肉注射,在首次免疫后 3 周进行 2 次免疫,PBS 对照组注射等量 PBS。免疫期间每天称量小鼠体重,每周固定时间通过尾静脉采血分离血清用于特异性抗体水平检测。

2.7 特异性抗体检测 利用 ELISA 检测免疫小鼠的特异性抗体水平。包被抗原 BVDV-BA 终浓度为 6×10^6 TCID₅₀,按照间接 ELISA 步骤进行操作。

结果

1 BVDV C、E0、E1 和 E2 基因扩增与鉴定

以 BVDV-BA 株 cDNA 为模板,利用对应引物进行 PCR 扩增目的基因,结果显示,扩增出相应的目的 C 基因(306 bp)、E0 基因(585 bp)、E1 基因(681 bp)和 E2 基因(1 122 bp)片段(图 1)。



A BVDV BA 株 C 基因的扩增结果 B BVDV BA 株 E0 基因的扩增结果 C BVDV BA 株 E1 基因的扩增结果 D BVDV BA 株 E2 基因的扩增结果

图 1 BVDV BA 株 C、E0、E1、E2 基因的 PCR 扩增

A PCR amplification of the C gene of the BVDV BA strain B PCR amplification of the E0 gene of the BVDV BA strain C PCR amplification of the E1 gene of the BVDV BA strain D PCR amplification of the E2 gene of the BVDV BA strain.

Fig. 1 PCR amplification of the C、E0、E1、E2 genes of BVDV-BA strain

2 重组杆粒的鉴定

碱裂解法提取重组杆粒,以 pUC/M13F 和 pUC/M13R 为引物,分别以纯化的重组杆粒 rB-C、rB-E0、rB-E1 和 rB-E2 为模板进行 PCR 扩增。扩增片段为 3 000 bp,表明 C、E0、E1、E2d 基因分别与杆状病毒基因组重组成功(图 2)。

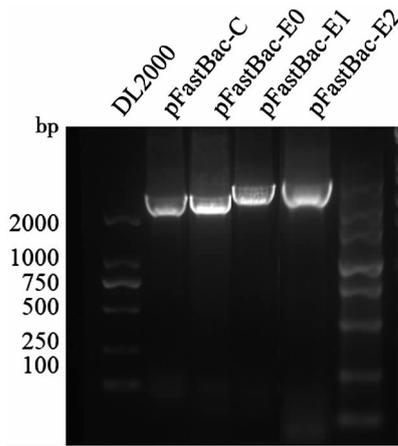
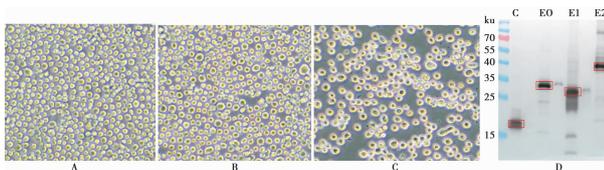


图2 重组杆粒 rB-C、rB-E0、rB-E1 和 rB-E2 PCR 鉴定
Fig. 2 Identification of the recombinant bacmaids rB-C、rB-E0、rB-E1 and rB-E2 by PCR

3 4 种重组杆状病毒的复制与 Western blot 鉴定

将重组杆粒 rB-C、rB-E0、rB-E1 和 rB-E2 分别转染 SF9 贴壁细胞后 27 °C 继续培养,持续观察细胞变化。如图 3 所示,在第 1 d 时(图 3 A)细胞出现变圆、变大,并停止生长的现象;第 2 d 时细胞开始出现漂浮(图 3 B);第 3 d 时(图 3 C)漂浮细胞增多,并开始大量裂解。Western blot 结果(图 3D)。使用重组杆状病毒 BV-C、BV-E0、BV-E1 和 BV-E2 分别感染 SF9 贴壁细胞后进行 Western blot 检测,4 条反应条带(图 3D)分别位于 15~25 ku(C)、25~35 ku(E0)、25~35 ku(E1)、40~55 ku(E2),与理论值相一致,表明 SF9 细胞表达的 C、E0、E1 和 E2 蛋白结构完整。



A 转染重组杆状病毒 24 h 时 SF9 细胞的形态 B 转染重组杆状病毒 48 h 时 SF9 细胞的形态 C 转染重组杆状病毒 72 h 时 SF9 细胞的形态 D 转染重组杆状病毒 72 h 后四种蛋白的表达。

图3 重组杆状病毒的拯救和 C、E0、E1、E2 蛋白的表达鉴定

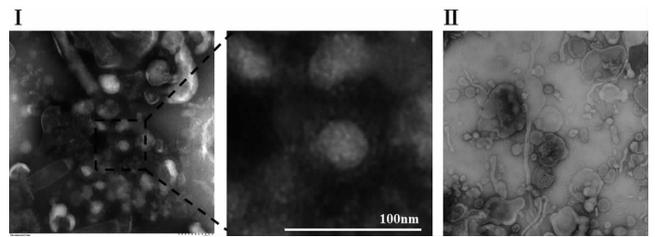
A The morphology of SF9 cells transfected with recombinant baculovirus for 24 h B The morphology of SF9 cells transfected with recombinant baculovirus for 48 h C The morphology of SF9 cells transfected with recombinant baculovirus for 72 h D Expression of four proteins after 72 h of transfection of recombinant baculovirus.

Fig. 3 Cytopathic effect of virally-infected SF9 insect cell and Identification of the C protein, E0 protein, E1 protein and E2 protein expression

4 BVDV-1 VLPs 纯化与鉴定

将 4 种重组杆状病毒 rBV-C、rBV-E0、rBV-E1 和 rBV-E2 共同接种于悬浮 SF9 细胞中,72 h 后收集细胞悬液,经超速离心后进行蔗糖密度梯度离心,在 20%~30%蔗糖层出现乳白色环状结构(图 5A)吸取各层,分别稀释后进行超速离心以去掉蔗糖,然后用

PBS 重悬沉淀,用于 Western blot 与电镜鉴定。电镜观察在 I 区内存在大量环状结构,且 I 区存在直径为 50~80 nm,表面有 10 nm 左右的纤突,基本符合 BVDV 的基本形态特征(图 4 I),II 区存在一些大小不一的圆环结构(图 4 II),与 BVDV 基本形态不符,可能为细胞碎片或不相关蛋白。同时,该球形颗粒所在的蔗糖层与 BVDV 在蔗糖中的浮密度基本相符(图 5 A),Western blot 检测(图 5B)表明, I 层乳白色环状结构可以检测到 C、E0、E1 和 E2 蛋白的表达。图 4 和图 5 说明在乳白色环状结构层中存在着大量由 C、E0、E1 和 E2 蛋白组成的病毒样颗粒。

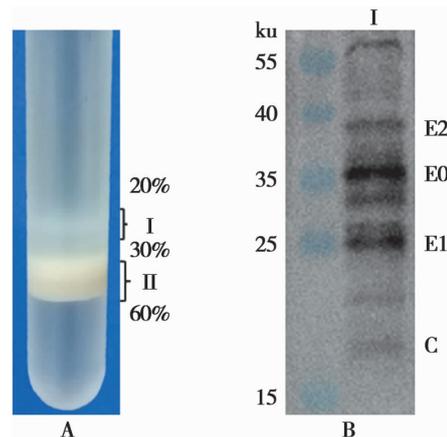


I 20%~30%蔗糖层纯化物质电镜图片 II 30%~60%蔗糖层纯化物质电镜图片。

图4 BVDV-1 VLPs 透射电镜观察

I Electron microscopy of purification substance that was in the 20~30% sucrose layer II Electron microscopy of purification substance that was in the 30~60% sucrose layer.

Fig. 4 Electron microscopy of BVDV-1 VLPs



A 蔗糖梯度离心纯化结果 B 纯化后 I 环物质 WB 验证结果。

图5 BVDV-1 VLPs 纯化与鉴定

A The result of purify B The result of WB verification of the substance in the first ring(I) after purification.

Fig. 5 Purification and identification of the BVDV-1 VLPs

5 BVDV-1 VLPs 与氢氧化铝佐剂最适配比

将氢氧化铝佐剂与 VLP 以不同比例进行混合,离心取上清,将上清制成蛋白样品进行 SDS-PAGE 电泳(图 6),当佐剂与 VLP 的体积比为 1 : 8 时为佐剂能将抗原完全吸附的最低用量。

6 疫苗的安全性评估

免疫小鼠体重检测结果(图 7A)显示,PBS 对照组

第二周与第一周相比斜率变大,表明小鼠体第二周重的增长速率增加,第二周后体重趋于平稳,整个实验过程中,实验组小鼠体重均呈现逐渐增长的趋势,表明无论是VLPs还是VLPs加氢氧化铝佐剂均不影响小鼠的正常生长。免疫小鼠脏器形态变化观察结果如图7B。与PBS组(图7B I)相比VLP(图7B II)组和VLP+佐剂组(图7B III)的心、肝、脾、肺、肾等脏器均无显著变化,表明无论是VLPs还是VLPs加氢氧化铝佐剂免疫均不会对小鼠的脏器产生不良影响。

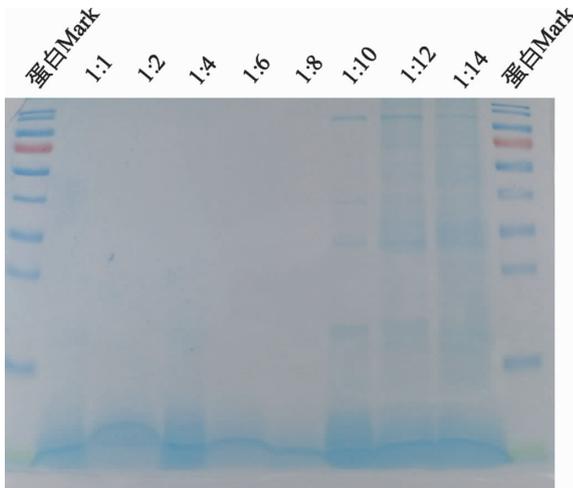
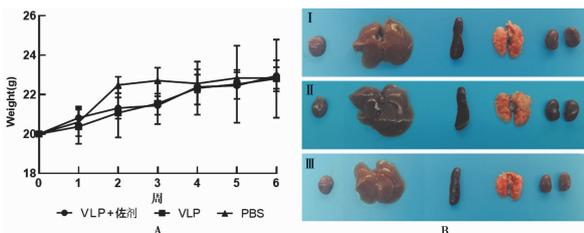


图6 佐剂与抗原的最适配比
Fig. 6 Optimal adaptation of adjuvant to an antigen



A 免疫期间小鼠体重变化情况 B 免疫六周后 PBS 组(I)、VLP 组(II)和 VLP+氢氧化铝组(III)小鼠心、肝、脾、肺、肾的表观形态图。

图7 小鼠体重变化和脏器形态变化

A Weight change of mice during immunization B Morphological changes of heart, liver, spleen, lung and kidney of mice (I: PBS group; II: VLP group; III: VLP + Aluminum hydroxide group) after six weeks of immunization.

Fig. 7 Weight change of mice and Morphological changes of mice viscera

7 特异性抗体水平

ELISA 检测首次免疫后第 1 周小鼠血清中的特异性抗体水平无显著变化,第 2 周 VLP 组特异性抗体水平上升速度明显增加,第 3 周抗体水平下降,且 VLP 组的下降幅度大于 VLP+佐剂组。此时进行加强免疫,之后 VLP+佐剂组抗体水平持续上升。加强免疫后第 3 周,VLP+佐剂组小鼠血清中特异性抗体水平高于 VLP 组(图 8)。

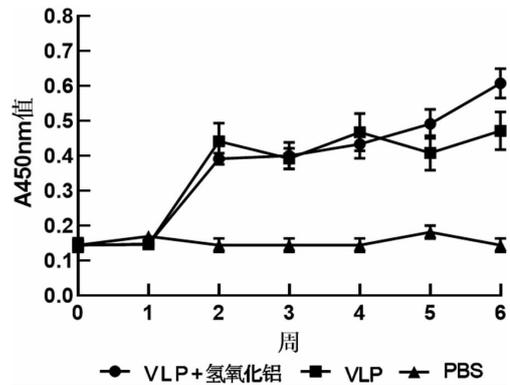


图8 小鼠特异性抗体水平变化
Fig. 8 Antibody level changes of mice

讨论

VLP 由一种或几种结构蛋白自主装配形成,在大小、形态和组成上模拟天然病毒粒子。由于 VLP 不含病毒基因组,所以其不具备感染性,在安全性、免疫原性和抗原稳定性上都具有优势。因此,VLP 成为一种重要的新型疫苗平台。本研究构建了能表达 C、E0、E1、和 E2 基因的质粒,并将获得的目的基因成功导入到穿梭质粒,构建了能表达 C、E0、E1、E2 蛋白的杆状病毒,使用 Bac-to-Bac[®] 表达系统成功构建了由 C、E0、E1 和 E2 蛋白自动组装成的 BVDV-1 VLPs。裂解、粗提、浓缩和精制是 VLP 纯化的基本步骤^[23]。本实验采用超声裂解,低速离心粗提,蔗糖密度离心的方法对病毒样颗粒进行浓缩,若要得到临床级别 BVDV-1 VLPs 抗原可进行精制。电镜结果和 Western blot 结果表明,BVDV-1 VLPs 存在于 I 层(20%~30%蔗糖密度层),II 层(30%~60%蔗糖密度层)含有大量的细胞成分,无明显 BVDV-1 VLPs 结构特征。VLP 技术的发展对现代疫苗学产生了巨大的影响,为了进一步优化 VLP 疫苗的安全性和免疫原性,都会向大多数疫苗中添加合适的佐剂。目前,获得许可的 VLP 疫苗所使用的佐剂是经典的铝佐剂组合物。铝佐剂主要包括氢氧化铝、磷酸铝和明矾,其中氢氧化铝应用较多,现已被广泛应用于多种疫苗中,如百白破疫苗(diphtheria tetanus, DPT)、乙型肝炎疫苗(hepatitis B, HepB)和甲型肝炎疫苗(inactivated hepatitis A, Hep A-I)等^[24]。铝佐剂可增加抗原的表面积,并且改变活性基因的构型,促进 T 细胞免疫力,加强 T 细胞与 B 细胞的协同作用;另一方面,氢氧化铝佐剂还可导致局部注射部位芽肿,这样可以使抗原在局部组织内贮存,达到持续缓慢释放抗原的目的,从而提高机体的免疫应答,增强免疫反应^[25]。

本研究将佐剂与 BVDV-1 VLPs 以不同比例混合,结果表明氢氧化铝佐剂与 BVDV-1 VLPs 体积比

为1:8时,是佐剂与BVDV-1 VLPs的最适配比,此时是佐剂能将BVDV-1 VLPs完全吸附的最小用量。通过肌肉注射免疫BALB/C小鼠,整个试验过程中小鼠的体重呈现逐渐上升趋势,没有因使用疫苗导致的小鼠死亡。解剖结果证明疫苗对免疫小鼠的心、肝、脾、肺、肾等脏器均无明显的病理反应,表明BVDV-1 VLPs候选疫苗具有一定的安全性。肌肉免疫小鼠后,小鼠血清中的特异性抗体水平出现了一定程度的升高,表明BVDV-1 VLPs可诱导小鼠产生特异性免疫反应。单独免疫VLPs后第2周血清中的特异性抗体达到最高水平,随后有所下降,而VLP+氢氧化铝组小鼠血清中的特异性抗体水平一直呈现上升趋势,可能是氢氧化铝递送系统能够缓慢的释放所装载的VLPs。加强免疫后小鼠血清中特异性抗体水平均有所上升,加强免疫后1周单独免疫VLPs组的特异性抗体水平变化趋势有所下降并趋于平稳,而VLP+氢氧化铝组在首免后第2周起小鼠血清中特异性抗体水平一直稳定上升,且在加强免疫第1周后产生的特异性抗体水平开始高于VLP组,第6周时VLP+氢氧化铝组产生的抗体水平几乎是VLP组的1.5倍,这些结果表明氢氧化铝佐剂可能通过持续缓慢释放BVDV-1 VLPs提升其免疫原性。关于VLP最佳免疫用量,以及3次免疫后BVDV-1 VLPs对BALB/C小鼠体液免疫和细胞免疫的影响有待进一步研究。

【参考文献】

- [1] 殷震,刘景华. 动物病毒学[M]. 2版. 北京:科学出版社,1997:631-645.
- [2] Gray Ew, Nettleton PF. The ultrastructure of cell culture infected with border disease and bovine viral diarrhoea viruses[J]. J Gen Virol, 1987, 68:2339-2346.
- [3] Collett MS, Larson R, Belzer SK, et al. Proteins encoded by bovine viral diarrhoea virus: the genomic organization of pestiviruses[J]. Virology, 1988, 165:200-208.
- [4] Li Y, Wang J, Kanai R, et al. Crystal structure of glycoprotein E2 from bovine viral diarrhoea virus[J]. Proc Nat Acad Sci USA, 2013, 110(1):6805-6810.
- [5] 赵月兰,左玉柱,范京惠,等. 牛病毒性腹泻/黏膜病病毒河北分离株的生物学特性[J]. 中国农学通报, 2006, (12):1-4.
- [6] Thiel HJ, Stark R, Weiland E, et al. Hog cholera virus: molecular composition of virions from a pestivirus[J]. Virology, 1991, 65:4705-4712.
- [7] 才冬杰. 牛病毒性腹泻病毒基因组分析及 LDLR 敲除对其感染牛肾细胞的影响[D]. 北京:中国农业大学, 2018.
- [8] Elahi SM, Shen SH, Talbot BG, et al. Induction of humoral and cellular immune responses against the nucleocapsid promoter of bovine viral diarrhoea virus by an adenovirus vector with an inducible[J]. Virology, 1999, 261(1):1-7.
- [9] 邵红,倪宏波. 牛病毒性腹泻病毒研究进展[J]. 黑龙江八一农垦大学学报, 2017, 29(6):20-23.
- [10] 陈为宏,周玉龙,尹辉,等. 牛病毒性腹泻病毒 E0 和 E2 蛋白的融合表达及纯化[J]. 中国生物制品学杂志, 2014, 27(10):1268-1271.
- [11] 马莉莉,常敬伟,王宇婷,等. 牛病毒性腹泻黏膜病疫苗的研究进展[J]. 现代畜牧兽医 2016(12):48-50.
- [12] 张子琪. 稳定表达牛病毒性腹泻病毒衣壳蛋白牛肾细胞株构建[D]. 天津:天津科技大学, 2017.
- [13] 王银. 表达牛病毒性腹泻病毒 E2 基因的重组 I 型牛疱疹病毒的构建[D]. 扬州:扬州大学, 2013.
- [14] 马鹏,李林杰,常秋燕,等. 一株白牦牛源牛病毒性腹泻病毒 Erns 基因的原核表达与序列分析[J]. 西南农业学报, 2018, 31(9):203-210.
- [15] Passler T, Ridden KP, Edmondson MA, et al. Experimental infection of pregnant goats with bovine viral diarrhoea virus (BVDV) 1 or 2 [J]. Vet Res, 2014, 45(1):38-38.
- [16] Chernick A, Ambagala A, Orsel K, et al. Bovine viral diarrhoea virus genomic variation within persistently infected cattle [J]. Infect Genet Evol, 2018, 58:218-223.
- [17] 聂明非,李岩,温凯,等. 牛病毒性腹泻病毒 E2 蛋白单克隆抗体的制备及鉴定[J]. 中国预防兽医学报, 2010, 32(7):570-573.
- [18] Ronecker S, Zimmer G, Healer G, et al. Formation of bovine viral diarrhoea virus E1-E2 heterodimers is essential for virus entry and depends on charged residues in the transmembrane domains [J]. J Gen Virol, 2008, 89(9):2114-2121.
- [19] Deregts D, Bolin SR, van den Hurk J, et al. Mapping of a type 1-specific and a type-common epitope on the E2 (gp53) protein of bovine viral diarrhoea virus with neutralization escape mutants [J]. Virus Res, 1998, 53:81-90.
- [20] 邢思毅. BVDV 重组 E2 蛋白间接 ELISA 检测方法的建立及初步应用[D]. 大庆:黑龙江八一农垦大学, 2015.
- [21] Bachmann MF, Rohrer UH, Kundig TM, et al. The influence of antigen organization on B cell responsiveness[J]. Science, 1993, 262(5138):1448-1451.
- [22] Keller S A, Bauer M, Manolova V, et al. Cutting edge: limited specialization of dendritic cell subsets for MHC class II-associated presentation of viral particles[J]. J Immunol, 2010, 184(1):26-29.
- [23] Zeltins A. Construction and characterization of virus-like particles: a review[J]. Mol Biotechnol, 2013, 53(1):92-107.
- [24] Wen Y, Shi Y. Alum: an old dog with new tricks[J]. Emerg Microb Infect, 2016, 5(3):e25.
- [25] 徐爱平,黎晓敏. 纳米氢氧化铝吸附禽流感病毒灭活疫苗的研制及其对肉鸡抗体效价的影响[J]. 中国兽医学报, 2012, 32(2):189-195.

【收稿日期】 2021-08-30 【修回日期】 2021-11-17