

表达小反刍兽疫 H 蛋白的重组山羊痘病毒疫苗

陈伟业¹, 曲林茂², 胡森¹, 胡倩倩², 张倩¹, 支海兵³, 黄克和², 步志高¹

1 中国农业科学院哈尔滨兽医研究所 兽医生物技术国家重点实验室 农业部兽医公共卫生重点开放实验室, 哈尔滨 150001

2 南京农业大学动物医学院, 南京 210095

3 中国兽医药品监察所, 北京 100081

摘要: 本研究旨在构建表达小反刍兽疫 H 蛋白的重组山羊痘病毒, 并评价其免疫效力。利用筛选基因 *gpt* 和 *eGFP* 并结合空斑技术, 纯化筛选了重组小反刍兽疫 H 基因的重组山羊痘病毒(rGPV-PPRV-H), 经过 PCR 鉴定重组病毒已纯化。免疫荧光和蛋白印迹都表明重组病毒能够感染绵羊睾丸细胞表达小反刍兽疫 H 蛋白。以 2×10^6 PFU 的 rGPV-PPRV-H 皮内注射免疫山羊 6 只, 并于首次免疫后 28 d 以相同剂量进行二次免疫。免疫后采血分离血清进行病毒中和试验, 结果表明, 一次免疫后 21 d, 山羊痘病毒中和抗体效价依次为 40、80、 ≥ 80 、 ≥ 80 、40、 ≥ 80 , 和小反刍兽疫病毒中和抗体效价全部转阳依次为 80、80、80、80、40、40、10; 二次免疫后 14 d, 山羊痘病毒中和抗体效价抗体全部大于或等于 80, 小反刍兽疫病毒中和抗体效价依次为 ≥ 80 、80、 ≥ 80 、80、80、40, 应该具有对山羊痘病毒和小反刍兽疫病毒强毒攻击的完全免疫保护作用。本研究为小反刍兽疫重组山羊痘疫苗的产业化提供了参考。

关键词: 重组疫苗, 小反刍兽疫, 山羊痘病毒载体, 中和抗体

Recombinant goat pox virus expressing PPRV H protein

Weiye Chen¹, Linmao Qu², Sen Hu¹, Qianqian Hu², Qian Zhang¹, Haibing Zhi³, Kehe Huang², and Zhigao Bu¹

1 State Key Laboratory of Veterinary Biotechnology, Key Laboratory of Veterinary Public Health Ministry of Agriculture, Harbin Veterinary Research Institute of Chinese Academy of Agricultural Sciences, Harbin 150001, China

2 College of Veterinary Medicine, Nanjing Agricultural University, Nanjing 210095, China

3 China Institute of Veterinary Drug Control, Beijing 100081, China

Abstract: The purpose of the study is to construct recombinant goat pox virus (GPV) expressing Peste des petits ruminants virus (PPRV) H protein, and to evaluate the immunization effect. Recombinant GPV containing PPRV H gene (rGPV-PPRV-H) was selected and purified by *gpt* and *eGFP* utilizing plaque purification, and the final selected recombinant GPV was proved to be purified by PCR. Immunofluorescence and Western blotting showed that the recombinant virus could express H protein of PPRV while infecting lamb testis cells. Six goats were immunized with 2×10^6 PFU rGPV-PPRV-H through intradermal injection, and were immunized for the second time at 28 days with the same dose recombinant virus after first immunization. Serum was collected after immunization, and was analyzed for the neutralization antibodies. 21 days after first immunization, the neutralization antibodies of GPV were 40, 80, ≥ 80 , ≥ 80 , 40, ≥ 80 in turn, and neutralization antibodies of PPRV were 80, 80, 80, 80, 40, 40, 10 in turn; 14 days after second immunization, the neutralization antibodies of GPV were all 80, and the neutralization antibodies of PPRV were

Received: November 14, 2008; **Accepted:** January 15, 2009

Supported by: National High Technology Research and Development Program of China ("863" Program) (No. 20060102Z449).

Corresponding author: Zhigao Bu. Tel: +86-451-85935063; Fax: +86-451-82733132; E-mail: zgb@hvri.ac.cn

国家高技术研究发展计划(863 计划) (No. 20060102Z449)资助。

>80, 80, >80, 80, 80 and 40 in turn. This study established a foundation for the industrialization of the PPRV recombinant GPV vaccine.

Keywords: recombinant vaccine, Peste des petits of ruminants (PPR), goat pox virus vector, neutralization antibodies

小反刍兽疫(Peste des petits of ruminants, PPR)和山羊痘 Goat pox, GP)为分别由小反刍兽疫病毒(Peste des petits of ruminants virus, PPRV)和山羊痘病毒(Goat pox virus, GPV)引起的危害山羊、绵羊等小反刍动物的 2 种重大疫病, 均为世界动物卫生组织(The World Organisation for Animal Health, OIE)发布的 A 类烈性传染病(World Organisation for Animal Health. Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals, 2004)。PPR 长期以来一直在非洲、中东、中亚、南亚及东南亚地区危害流行, 2007 年传入我国西部边境地区, 导致局部疫情, 对我国的畜牧养殖业形成严重威胁。GP 多年来在我国局部地区表现为地方流行性, 给我国养羊业造成一定危害。我国山羊和绵羊的饲养量数以亿计, PPR 和 GP 这 2 种烈性传染病的防控意义重大。

PPRV 属副粘病毒科麻疹病毒属成员, 与牛瘟病毒(Rinderpest virus, RPV)同属, 基因组进化与抗原性关系密切, 具有共同的中和抗体表位。病毒囊膜表面的融合蛋白(F)和血凝素蛋白(H)为 PPRV 诱导中和抗体形成的主要免疫原。GPV 为正痘病毒科 GPV 属成员。GPV 弱毒疫苗预防 GP 安全有效。采用 GP 弱毒疫苗为载体构建 PPR-GP 重组二联活疫苗, 可同时预防 GP、绵羊痘和 PPR, 实现一种活毒疫苗预防多种烈性传染病, 具有极为突出的优点。

山羊痘病毒基因组约 150 kb, 遗传稳定, 其胸苷激酶(TK)基因编码区为复制非必需区, 可允许大容量的外源基因插入和表达; GPV 感染宿主谱狭窄, 仅局限于牛羊等反刍兽; GP 弱毒疫苗生产成本低廉, 储运无需冷冻、使用方便; 尤其重要的是, 以非重组至山羊痘病毒载体的蛋白为抗原, 可以区别小反刍兽疫重组山羊痘病毒免疫和 PPRV 野毒感染, 不干扰血清学监测, 克服了现有 PPR 弱毒疫苗的重大缺陷, 对我国广大内地非疫区极为重要。

目前已利用山羊痘病毒作为载体分别重组了蓝舌病毒蛋白基因^[1]、牛瘟病毒融合蛋白和血凝素蛋白基因^[2-4]、小反刍兽疫病毒融合蛋白和血凝素蛋白基因^[5,6], 并作为疫苗免疫相应的动物, 显示了良好的免疫效果和应用前景。本研究室曾成功构建表达

了绿色荧光蛋白的重组山羊痘病毒^[7], 为构建小反刍兽疫重组山羊痘病毒奠定了良好的基础。本研究利用我国自行培育并得到广泛应用的 GPV 弱毒株, 构建了表达 PPRV 囊膜蛋白 H 的重组山羊痘病毒, 并对其免疫原性进行了评估。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 病毒与细胞

GPV 温度敏感弱毒疫苗株(CVCC AV41)及 PPRV 弱毒疫苗株(Nigeria/75/1)均由中国兽医兽药监察所提供。原代羔羊睾丸细胞(LT)采用 1 月龄公绵羊睾丸经常规方法制备, 采用含 10%胎牛血清 MEM 培养或继代; Vero 细胞(ATCC NO. CCL-81)用含有 10%胎牛血清 MEM 培养。亲本毒或重组 GPV 及 PPRV 弱毒株的扩增与滴定均采用含 2%胎牛血清的 MEM, 分别在 LT 细胞和 Vero 细胞进行。

1.1.2 主要试剂与仪器

各种限制性内切酶、预染蛋白 marker、Taq DNA 聚合酶、高保真 DNA 聚合酶都购自 MBI 公司, DL2000 DNA marker 购自 TaKaRa 公司, 质粒 pBluescript II KS(+)购自 Stratagene 公司, 质粒 pIRES2-eGFP 购自 Clontech 公司, 荧光倒置显微镜为 Zeiss 公司产品, DMEM、MEM 细胞培养基和胎牛血清都购自 Gibco 公司, TRITC 标记的羊抗鼠 IgG、辣根过氧化物酶标记的羊抗鼠 IgG、霉酚酸(MPA)、黄嘌呤(Xanthine)、次黄嘌呤(Hypoxanthine)都购自 Sigma 公司。

1.2 方法

1.2.1 基因扩增与质粒构建

以高保真 Taq DNA 聚合酶扩增质粒 pIRES2-eGFP 上 666~1973 bp 的 ires-eGFP 序列。上游引物 ir-f: 5'-aaactgcagggccctctccctccccc-3', 下游引物 ir-r: 5'-aaactgcaggttactgtacagctcgtc-3', 均引入 Pst I 位点(下划线标识)。将 PCR 产物克隆至 pBluescript II(KS+)的 EcoR V 位点, 经序列测定准确无误后命名为 pBlue-ires-eGFP。用 Pst I 从 pBlue-ires-eGFP 上切下 ires-eGFP 基因, 插入 pTK-gpt-GFP^[7]上的 Pst I 位点,

鉴定插入方向正确, 命名为 pTK-gpt-ires-eGFP-GFP。再用 *Sal* I 切下 pTK-gpt-ires-eGFP-GFP 上的一个 GFP 后使其自连, 构建成 pTK-gpt-ires-eGFP(图 1)。

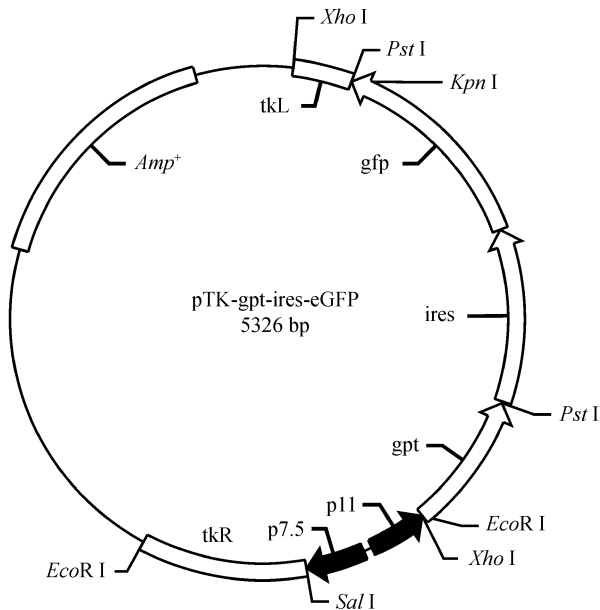


图 1 表达绿色荧光蛋白重组 GPV 构建的同源重组质粒 pTK-gpt-ires-eGFP 示意图

Fig. 1 Map of plasmid pTK-gpt-ires-eGFP for construction of recombinant GPV expressing eGFP.

PPRV 疫苗株(Nigeria/75/1)感染 Vero 细胞上清经 Trizol(Invitrogen)处理提取 PPRV 基因组 RNA, 根据 GenBank 上的序列(Accession No. X74443)设计上、下游引物 5'-GGTTTAAACGCCGCCACCATG TCCGCACAAAG 和 5'-TGCGTTTAAACTCAGAC TGGA TTACATG(下划线部分为 *Pme* I 酶切位点), 常规 RT-PCR 扩增约 1.85 kb 的 PPRV 血凝素蛋白(H)基因, 扩增的 H 基因阅读框架(ORF)在起始密码 ATG 前引入 kozak 序列(GCCGCCACC)。扩增的 H 基因 PCR 产物克隆到 pBluescript II(KS+)的 *EcoR* V 位点, 为 pB-PPRV-H, 序列测定无误后, 用 *Pme* I 切下 pB-PPRV-H 上 H 基因 ORF, 插入到 *Sal* I 酶切并末端补平的 pTK-gpt-ires-eGFP 中, 鉴定正反向, 命名为 pTk-gig-PPRV-H(图 2)。

1.2.2 病毒重组及重组病毒纯化、鉴定

LT 细胞生长于在 35 mm 孔培养板板(Nunc)中, 至密度约 80%时, 按 0.05 的感染复数(M.O.I.)值接种 GPV 病毒液 100 μ L, 感作 1 h 后, 再采用钙转染试剂盒(Invitrogen)按操作说明书转染 pTk-gig-PPRV-H, 12 h 后 10% DMSO(PBS 溶解, pH 7.2)休克 2.5 min,

24 h 后, 在倒置荧光显微镜下观察是否有绿色荧光出现。待 90%的细胞出现细胞病变(Cytopathic effect, CPE)并出现绿色荧光时, 收取 LT 细胞及培养上清, 反复冻融 3 次, 超声裂解 3 次, 每次 30 s, 低速离心弃去细胞碎片, 上清作 10 倍连续梯度稀释, 接种于 35 mm 孔培养板中培养的 LT 细胞, 培养液添加霉酚酸(MPA, 25 μ g/mL), 黄嘌呤(Xanthine, 250 μ g/mL), 次黄嘌呤(Hypoxanthine, 15 μ g/mL), 37 $^{\circ}$ C 培养 10 d 后, 收获出现细胞病变高稀释倍数细胞及上清, 反复冻融 3 次, 超声裂解 3 次, 每次 30 s。离心弃去细胞碎片, 上清作 10 倍连续梯度稀释, 继续接种 35 mm 培养孔内 LT 细胞, 每孔 100 μ L, 感作 1 h 后覆盖含 1%低熔点琼脂糖培养液, 进行常规病毒蚀斑纯化克隆。通过连续多代次克隆纯化, 挑取表达绿色荧光并形成面积较大蚀斑的重组病毒克隆, 接种 LT 细胞上扩增, 待细胞病变或绿色荧光阳性细胞达 90%以上时, 收获接种培养上清液, 采用 SDS-蛋白酶 K 消化方法提取重组病毒 DNA, 利用分别位于 TK 基因同源臂两侧的特异引物(TK 上游引物: 5'-ctt ctc gag gaa tca cca gag ccg ata ac-3', TK 下游引物: 5'-acc gaa ttc aac tcg tgt ctg ata ccc-3', 延伸时间为 40 s, 退火温度为 58 $^{\circ}$ C)^[7], 通过 PCR 鉴定确认克隆病毒是否为纯化的重组病毒。同时用 PPRV H 基因引物(上游引物: 5'-AATGGCACAGGAATAGGC-3', 下游引物: 5'-GAGCGACCCGTGTCATAG-3', 延伸时间为 40 s, 退火温度为 58 $^{\circ}$ C)鉴定 H 基因的整合。以上 PCR 鉴定都设亲本病毒 GPV 为对照。PPRV 的 H 基因重组山羊痘病毒命名为 rGPV-PPRV-H。

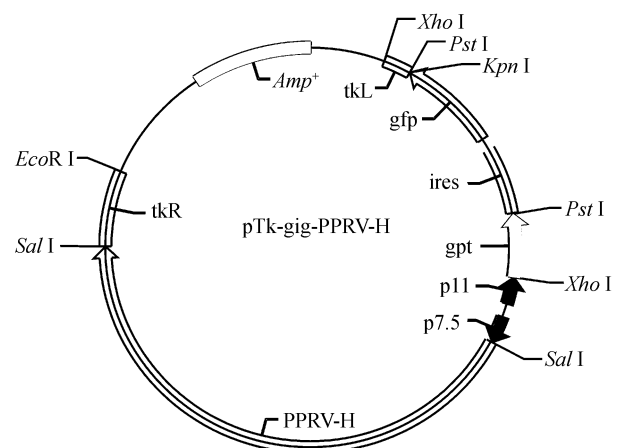


图 2 用于构建表达 PPRV H 蛋白重组 GPV 的同源重组质粒 pTk-gig-PPRV-H 示意图

Fig. 2 Map of plasmid pTk-gig-PPRV-H for construction of recombinant GPV expressing PPRV H protein.

1.2.3 免疫荧光检测

以最后克隆获得重组病毒按 M.O.I. 0.05 感染培养于 24 孔板的初代 LT 细胞, 待绿色荧光阳性 LT 细胞接近 80% 时, 弃去上清, PBST(含 0.05% Tween20 的 PBS)洗涤 3 遍。3% 多聚甲醛室温下固定 20 min, 吸去固定液, PBST 洗涤 3 遍。设 1 个亲本毒 GPV 感染细胞孔和 1 个未感染细胞孔为对照。加入用 PBST(含 0.5% 牛血清白蛋白)稀释 50 倍的鼠抗 PPRV 病毒高免血清(PPRV Nigeria/75/1 弱毒疫苗株免疫 BALB/C 小鼠制备)100 μ L, 室温下作用 30 min 后, PBST 洗涤 3 遍。加入以 PBST 按 200 倍稀释红色荧光素(TRITC)标记的羊抗鼠 IgG 100 μ L, 室温作用 30 min, PBST 洗涤 3 遍, 荧光倒置显微镜下观察结果。

1.2.4 蛋白印迹试验

以最后克隆获得重组病毒按 M.O.I. 为 0.05 感染培养于 24 孔板的初代 LT 细胞, 待绿色荧光阳性 LT 细胞接近 80% 时, 刮下细胞, 2000 r/min 离心收集细胞沉淀。细胞用 SDS-PAGE 上样缓冲液重悬裂解之后进行 SDS-PAGE 电泳, 再转印至硝酸纤维素膜。硝酸纤维素膜用于 4°C 以 3% BSA(PBST 配置)封闭过夜, PBST 洗 3 遍, 分别加入用 1% BSA(PBST 配置)稀释 50 倍的鼠抗 PPRV 病毒高免血清。室温下作用 1 h 后, PBST 洗涤 3 遍, 加入以 PBST 按 5000 倍稀释辣根过氧化物酶标记的羊抗鼠 IgG(Sigma), 室温下作用 1 h。PBST 洗涤 3 遍, DAB 显色试剂盒进行显色, 最后用去离子水冲洗终止显色。

1.2.5 免疫试验

免疫试验动物选用 9 只 0.5~2 岁的山羊, 随机平均分为 2 组并编号。其中, 第 1 组(1~6 号)接种表达 H 蛋白免疫原的重组山羊痘病毒, 第 2 组(7~9 号)为接种亲本毒 GPV 疫苗株。免疫接种方法如下, 每只羊接种剂量为无血清 MEM 稀释病毒液 0.5 mL, 含 2×10^6 PFU 病毒量, 左右腹股沟内侧皮内途径各一注射点, 每点 250 μ L。免疫后每天观察注射部位的反应和精神状态并测量体温。首次免疫后 28 d 以相同剂量和相同免疫途径进行二次免疫。分别于免疫前、一次免疫后第 21 天及二次免疫后 14 d 采集静脉血分离血清, 56°C、30 min 灭活, -20°C 冻存用于血清 GPV 及 PPRV 特异中和抗体效价的检测。

1.2.6 中和抗体检测

血清 GPV 及 PPRV 特异中和抗体效价的检测分别采用 GPV 疫苗株和 PPRV 疫苗株, 按固定病毒量, 血清连续梯度稀释方法在 96 孔微量培养板进行, 具体操作术式及结果判断, 按 O.I.E. 推荐方法进行(World Organisation for Animal Health. Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals, 2004)。

2 结果

2.1 重组病毒的克隆、筛选与鉴定

利用 *gpt* 作为筛选基因, 通过连续多代蚀斑克隆, 选取表达 *eGFP* 阳性噬斑克隆病毒在 LT 细胞上扩增, 提取重组 GPV 核酸 DNA, 利用分别位于 TK 基因同源臂两侧的特异引物^[7]进行 PCR 扩增鉴定 TK 基因, 用特异扩增 PPRV-H 基因的引物鉴定目的基因的插入, 用亲本毒 GPV 作为对照。结果, 用 TK 引物鉴定, 亲本毒 GPV 扩增出 754 bp 条带, 而重组毒中的同源臂之间插入了约 2200 bp 的基因(P7.5、P11、eGFP、*gpt*、IRES 等), 因此在延伸时间只有 40 s 的情况下, 未扩增出 2200 bp 的条带, 同时也未扩增出 740 bp 条带(图 3); 而以 PPRV-H 特异引物鉴定, 重组病毒扩增出 461 bp 条带, 而亲本毒为扩增出相同条带(图 3)。结果表明已成功构建并获得了纯化的 H 基因重组 GPV, 克隆病毒中不含亲本毒 GPV, 已经为纯化的重组病毒。PPRV 的 H 基因重组病毒命名为 rGPV-PPRV-H。

分别以 GPV、rGPV-PPRV-H 感染初代 LT 细胞, 结果 rGPV-PPRV-H 重组病毒在荧光倒置显微镜下观察到自发绿色荧光反应, 而亲本毒 GPV 则为阴性(图 4)。

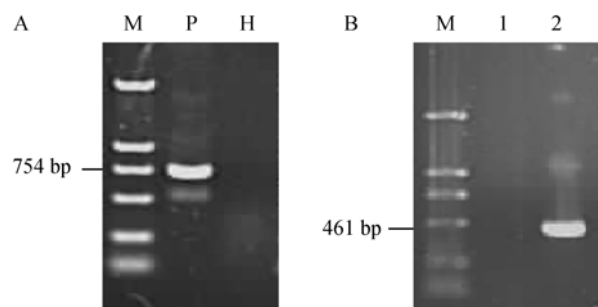


图 3 重组 GPV 的纯化鉴定

Fig. 3 PCR assay of the purification of recombinant GPV. (A) M: DL2000 marker; P: PCR results of GPV with primers for TK gene; H: PCR results of rGPV-PPRV-H with primers for TK gene. (B) 1: PCR results of GPV with primers for PPRV H gene; 2: PCR results of rGPV-PPRV-H with primers for PPRV H gene.

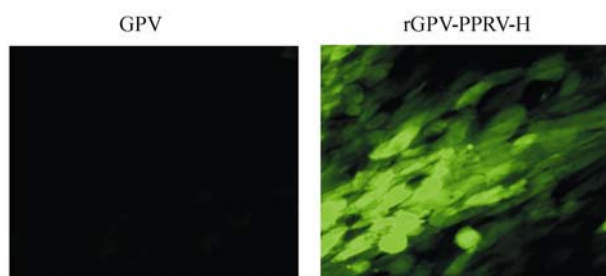


图4 荧光显微镜下观察 rGPV-PPRV-H 感染 LT 细胞表达 eGFP (100 ×)

Fig. 4 Observation of expression of eGFP by rGPV-PPRV-H infecting LT cells using fluorescence microscope (100 ×).

2.2 免疫荧光和蛋白印迹试验

以鼠抗 PPRV 的 H 蛋白高免血清为一抗, 以红色荧光素(TRITC)标记的羊抗鼠 IgG 为二抗进行免疫荧光检测, 结果重组病毒 rGPV-PPRV-H 显示特异的红色免疫荧光阳性反应, 而亲本毒 GPV 则表现为红色荧光阴性反应(图 5)。

图6表明, 用 PPRV-H 蛋白的单因子血清进行蛋

白印迹试验检测感染 rGPV-PPRV-H 的 LT 细胞, 显示了约 67 kD 的条带, 与预期理论值相符合, 表明 rGPV-PPRV-H 能够表达 PPRV 的 H 蛋白。

2.3 免疫试验

亲本毒 GPV 和重组病毒 rGPV-PPRV-H 分别以 2×10^6 PFU 剂量, 间隔 4 周 2 次接种 GPV 中和抗体阴性山羊。免疫前 GPV 及 PPRV 特异中和抗体均为阴性($<1:10$)。免疫 rGPV-PPRV-H 的实验组, 第 1 次免疫后 21 d, 所有免疫羊 GPV 中和抗体效价依次为 40、80、80、80、40、80, 第 2 次免疫后 14 d, 中和抗体效价全部大于或等于 80; 同时, 一次免疫后第 21 天, PPRV 中和抗体效价转阳率为 6/6, 效价分别为 80、80、80、80、40、40、10, 二次免疫后第 14 天, PPRV 中和抗体效价转阳率为 6/6, 效价分别为 80、80、80、80、80、80、40(表 1)。而亲本毒 GPV 免疫山羊所有时间点检测 PPRV 特异中和抗体效价均为阴性($<1:10$)(表 1)。



图5 免疫荧光检测 rGPV-PPRV-H 感染 LT 细胞表达 PPRV H 蛋白(100 ×)

Fig. 5 Analysis of the expression of PPRV F protein by rGPV-PPRV-H infecting LT cells using immunofluorescence test (100 ×).

表 1 重组病毒免疫后 GPV 和 PPRV 特异中和抗体检测结果

Table 1 Neutralization antibodies against GPV and PPRV of goats immunized with recombinant virus

Virus	Serial number of goats	Neutralization antibodies at 21 d after first immunization		Neutralization antibodies at 14 d after second immunization	
		GPV	PPRV	GPV	PPRV
rGPV-PPRV-H	1	40	80	80	80
	2	80	80	80	80
	3	80	80	80	80
	4	80	40	80	80
	5	40	40	80	80
	6	80	10	80	40
	7	80	<10	80	<10
GPV	8	80	<10	80	<10
	9	80	<10	80	<10

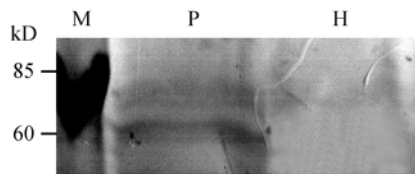


图6 蛋白印迹检测 rGPV-PPRV-H 感染 LT 细胞表达 H 蛋白
Fig. 6 Analysis of the expression of PPRV H protein by rGPV-PPRV-H infecting LT cells using Western blotting. M: prestained protein marker; P: GPV; H: rGPV-PPRV-H.

3 讨论

GPV 弱毒免疫株在 LT 细胞上复制产生的细胞病变出现较慢, 重组病毒在 TK 缺失后细胞病变效应进一步较削弱。同时, 山羊痘病毒具有较明显的细胞结合特性, 反复冻融数次及超声仍难于分散, 使得亲本毒与重组型病毒紧密相伴。由于亲本毒的复制生长较重组毒具有相对优势, 给重组病毒的克隆纯化带来极大困难。因此本研究通过 IRES 序列串联作用, p11 启动子同时转录表达筛选基因 *gpt* 和绿色荧光报告基因 *eGFP*, 重组病毒带有绿色荧光标签, 使得重组病毒的克隆纯化、传代生产过程中遗传稳定性观察、毒价滴定等变得极为方便、快捷。

由于 PPRV 为 O.I.E. 规定 A 类烈性传染病, 强毒病原操作需要严格的生物安全实施, 一般难以进行攻毒试验。同时, 由于中和抗体反应能够较为客观地反映弱毒疫苗的免疫保护效果, 因此 O.I.E. 推荐采用中和抗体检测为 PPRV 弱毒疫苗保护效力评估指标(中和抗体效价 10)。目前我国同样无法采用攻毒试验对 PPRV 疫苗效力进行评估, 本研究研制的重组山羊痘病毒候选疫苗株能够诱导显著的中和抗体反应, 从而能够参照 PPRV 弱毒疫苗的办法, 直接采用中和抗体检测进行重组痘病毒免疫效力评估, 确保该重组疫苗在未来疫苗生产质量控制及现地生产应用评估中具有充分的技术可行性。

按 O.I.E. 标准, PPRV 弱毒疫苗效力检验合格要求为免疫后中和抗体 100% 转阳(>1:10)。本研究构建的表达 H 抗原蛋白重组山羊痘病毒一次免疫山羊, 4 周 PPRV 中和抗体转阳率即可达 100%(6/6)。法国、英国 2 个实验室联合发表的一份研究报告^[5, 6], 其构建的表达 PPRV 的 F 抗原重组山羊痘病毒分别以 1~10000 个 PFU 剂量免疫羊, 免疫后未检测到明显的 PPRV 抗体反应, 但对 PPRV 强毒攻击均具有免疫

保护作用, 即使 0.1 个 PFU 剂量也可形成完全的免疫保护, 这种保护机制可能与重组山羊痘病毒疫苗在接种后可诱导强烈的特异性细胞免疫反应有关。另外, 其构建的表达 PPRV 的 H 抗原重组山羊痘病毒以 1000 个 PFU 或更多病毒量免疫山羊, 抗体能够 100% 转阳性(10), 并且能够产生清除病毒的保护性抗体; 甚至以 10 个 PFU 剂量进行免疫, 部分没有检测到中和抗体的山羊也能够抵抗 PPRV 强毒的攻击。本研究研制的重组山羊痘病毒候选疫苗株一次免疫即可诱导显著的中和抗体反应, 抗体水平较高, 虽然没有条件进行攻毒试验, 但根据前述文献的报道推测, 应该具有对 PPRV 强毒攻击的完全免疫保护作用。

很多情况下, 副粘病毒的受体识别囊膜蛋白 H、HN 或 G 蛋白往往诱导更为显著的中和抗体反应^[8]。因此本研究在构建表达 F 蛋白重组 GPV(另文发表)的同时, 构建了表达 H 蛋白重组 GPV, 结果证明二者均诱导显著的中和抗体反应; 并且, 表达 H 和 F 蛋白重组痘病毒联合免疫, 能诱导更加显著的、同时针对 H 和 F 抗原表面多种中和表位的中和抗体, 因而提高更加全面、持续的免疫保护, 这一点在针对存在一定程度基因变异的流行野毒株时, 更加具有意义。

另外, 本疫苗还具有的其他优点: 山羊痘病毒疫苗株(CVCC AV41)是由我国分离驯化的, 符合中国的山羊痘病毒流行情况, 能够提供针对国内流行的痘病毒更有效的免疫保护; 重组弱毒疫苗可预防山羊或绵羊痘斑毒和小反刍兽疫病毒的感染, 一苗两防, 在生产上和使用上大大优于使用山羊痘病毒疫苗和 PPRV 弱毒疫苗联合免疫的方法^[9]。

REFERENCES

- [1] Perrin A, Albina E, Breard E, *et al.* Recombinant capripoxviruses expressing proteins of bluetongue virus: Evaluation of immune responses and protection in small ruminants. *Vaccine*, 2007, **25**(37-38): 6774-6783.
- [2] Romero CH, Barrett T, Kitching RP, *et al.* Protection of cattle against rinderpest and lumpy skin disease with a recombinant capripoxvirus expressing the fusion protein gene of rinderpest virus. *Vet Rec*, 1994, **135**(7): 152-154.
- [3] Romero CH, Barrett T, Evans SA, *et al.* Single capripoxvirus recombinant vaccine for the protection of cattle against rinderpest and lumpy skin disease. *Vaccine*, 1993, **11**(7): 737-742.

- [4] Romero CH, Barrett T, Chamberlain RW, *et al.* Recombinant capripoxvirus expressing the hemagglutinin protein gene of rinderpest virus: Protection of cattle against rinderpest and lumpy skin disease viruses. *Virology*, 1994, **204**(1): 425-429.
- [5] Berhe G, Minet C, Goff C Le, *et al.* Development of a dual recombinant vaccine to protect small ruminants against peste-des-petits-ruminants virus and capripoxvirus infections. *J Virol*, 2003, **77**(2): 1571-1577.
- [6] Diallo A, Minet C, Berhe G, *et al.* Goat immune response to capripox vaccine expressing the hemagglutinin protein of peste des petits ruminants. *Ann N Y Acad Sci*, 2002, **969**: 88-91.
- [7] Cheng XW, Hu S, Wang XJ, *et al.* Construction and purification of recombinant goatpox virus expressing exotic green fluorescence protein. *J Agric Biotech*, 2006, **14**(5): 798-802.
- 程小文, 胡森, 王喜军, 等. 表达外源绿荧光蛋白重组山羊痘病毒的构建及纯化. *农业生物技术学报*, 2006, **14**(5): 798-802.
- [8] Wang XJ, Wang QH, Ge JY, *et al.* Generation of recombinant vaccinia virus expressing attachment glycoprotein of Nipah virus. *Acta Microbiol Sin*, 2006, **46**(4): 644-648.
- 王喜军, 王清华, 葛金英, 等. 表达尼帕病毒 G 囊膜糖蛋白重组牛痘病毒的研究. *微生物学报*, 2006, **46**(4): 644-648.
- [9] Hosamani M, Singh SK, Mondal B, *et al.* A bivalent vaccine against goat pox and Peste des Petits ruminants induces protective immune response in goats. *Vaccine*, 2006, **24**(35/36): 6058-6064.

2009 年中国微生物学会及各专业委员会学术活动计划表

序号	会议名称	主办单位	时间	人数	地点	联系人
1	致病菌微进化论坛	中国微生物学会分析微生物学专业委员会	1 月	80	北京	杨瑞馥 yangrf@nic.bmi.ac.cn
2	第十五届国际神经免疫、病毒及药物学会 (SNIP) 年会	中国微生物学会病毒学专业委员会	4 月	待定	湖北武汉	www.whcdc.org
3	2009 国际医学真菌大会北京卫星会	中国微生物学会真菌学专业委员会	5 月 29-31 日	400	北京	www.fungalinfection.cn /isham2009 何苗苗: 010-65041809
4	第十二届全国微生物学教学科研研讨会	中国微生物学会基础、农业微生物学专业委员会	7 月	100	湖北武汉	孙明 027-87283455
5	食品微生物监测技术与实验室质量管理	中国微生物学会分析微生物学专业委员会	8 月	100	山东青岛	杨瑞馥 yangrf@nic.bmi.ac.cn
6	第八届全国病毒学学术研讨会	中国微生物学会病毒学专业委员会	8 月 17-19 日	150	北京	王健伟 bdhy2009@163.com
7	全国第六届感染与免疫和生物制品学术研讨会	中国微生物学会医学微生物学与免疫学专业委员会	8 月	100	吉林延吉	孟繁平
8	第三届病毒学国际学术会议	中国微生物学会病毒学专业委员会	9 月	200	湖北武汉	刘芳 027-68754592
9	第十五届国际放线菌生物学大会	中国微生物学会	8 月 20-25 日	600	上海	白林泉: 021-62932418
10	全国酶工程会议	中国微生物学会酶工程专业委员会	待定	待定	待定	金城 010-64807425
11	2009 年生物过程模型化与控制学术会议	中国微生物学会生化过程模型化与控制专业委员会	9 月	100	上海	袁景淇 021-34204055
12	重要人兽共患病研究新进展学术研讨会	中国微生物学会人兽共患病病原学专业委员会	10 月 14-18 日	200	湖南衡阳	万康林 010-61739466
13	第七届全国微生物毒素学术会议	中国微生物学会微生物毒素专业委员会	10 月	180	重庆	梁华平 023-68757404
14	第三届全国资源生物技术与糖工程学术研讨会	中国微生物学会基础微生物学专业委员会	10 月	150	山东济南	李越中 0531-88564288
15	首届全国生物固氮学术研讨会	中国微生物学会农业微生物学专业委员会	10 月	100	湖北武汉	李友国, 张忠明 027 - 87281685 027 - 87281687
16	2009 年中国微生物学会学术年会	中国微生物学会	11 月	400	待定	王旭: 010-64807200
17	第十二次全国环境微生物学术研讨会	中国微生物学会环境微生物学专业委员会	11 月	250	湖北武汉	蒋建东 025-84396348
18	植物线虫的微生物防治研讨会	中国微生物学会农业微生物学专业委员会	12 月	60	昆明	张克勤 0871-5033790