

• 动物及兽医生物技术 •

马麝出血症病毒 VP60 主要抗原表位区的串联表达及对家兔的免疫保护效力分析

包世俊, 张金燕, 贺健, 张阳阳, 邢小勇, 温峰琴, 伏小平, 武小椿

甘肃农业大学 动物医学院, 甘肃 兰州 730070

包世俊, 张金燕, 贺健, 等. 马麝出血症病毒 VP60 主要抗原表位区的串联表达及对家兔的免疫保护效力分析. 生物工程学报, 2020, 36(8): 1536–1545.

Bao SJ, Zhang JY, He J, et al. Tandem expression of the major epitope domains of the *Moschus chrysogaster* hemorrhagic disease virus VP60 and its protective efficacy to rabbits. Chin J Biotech, 2020, 36(8): 1536–1545.

摘要: 马麝病毒性出血症 (*Moschus chrysogaster* viral hemorrhagic disease, McVHD) 为马麝的一种急性、高度致死性传染病, 其病原马麝出血症病毒 (*Moschus chrysogaster* hemorrhagic disease virus, McHDV) 与兔出血症病毒高度同源。为了筛选 McHDV 保护性抗原, 为 McVHD 疫苗研究奠定基础, 文中通过对 McHDV 主要结构蛋白 VP60 抗原表位的分析, 设计引物, 应用 RT-PCR 技术扩增获得三段 VP60 主要抗原表位区核酸序列, 并采用重叠延伸 PCR 将 3 段产物连接后克隆至原核表达载体 pET-28a(+), 成功构建原核表达质粒 pET-truncated-VP60 后转化大肠杆菌 *Escherichia coli* BL21(DE3), 并经 IPTG 诱导表达。纯化表达产物免疫 3–4 月龄非 RHD 免疫兔, 血凝抑制试验测定抗血清效价。首次免疫后 21 d, 通过攻毒保护试验分析重组蛋白的免疫保护效力。结果表明, McHDV VP60 主要抗原表位蛋白在大肠杆菌中成功表达, 重组蛋白分子质量约为 45 kDa, 且以包涵体形式存在; 重组蛋白纯化后配制疫苗免疫的新西兰白兔, 可 100% 抵抗 McHDV 株的攻击, 表明所筛选的抗原表位串联表达的重组蛋白具有良好的免疫保护效力, 研究结果为 McVHD 新型疫苗的研发奠定了基础。

关键词: 马麝, 马麝出血症病毒, 抗原表位, 原核表达, 免疫效力

Received: December 9, 2019; **Accepted:** March 2, 2020

Supported by: Discipline Construction Fund Project of Gansu Agricultural University (No. GAU-XKJS-2018-062), National Natural Science Foundation of China (No. 31360620).

Corresponding author: Shijun Bao. Tel/Fax: +86-931-7631220; E-mail: bsjdy@126.com

甘肃农业大学学科建设基金项目 (No. GAU-XKJS-2018-062), 国家自然科学基金 (No. 31360620) 资助。

网络出版时间: 2020-06-22

网络出版地址: <https://kns.cnki.net/kcms/detail/11.1998.Q.20200619.1416.001.html>

Tandem expression of the major epitope domains of the *Moschus chrysogaster* hemorrhagic disease virus VP60 and its protective efficacy to rabbits

Shijun Bao, Jinyan Zhang, Jian He, Yangyang Zhang, Xiaoyong Xing, Fengqin Wen, Xiaoping Fu, and Xiaochun Wu

College of Veterinary Medicine, Gansu Agricultural University, Lanzhou 730070, Gansu, China

Abstract: *Moschus chrysogaster* (*sifanicus*) viral hemorrhagic disease (McVHD) is an acute and highly lethal infectious disease caused by *Moschus chrysogaster* hemorrhagic disease virus (McHDV) whose genome sequence is highly homologous with rabbit hemorrhagic disease virus. To screen the protective antigen of McHDV and set the basis for study of McVHD vaccine, the antigen epitope of major structural protein VP60 of McHDV was analyzed, and the specific primers were designed to obtain three amplified DNA sequences encoding the main antigen epitope of VP60 from McHDV by using RT-PCR. Then the three DNA fragments were sequenced and cloned to prokaryotic expression vector with pET-28a(+) by using overlap extension PCR, and finally the prokaryotic expression plasmid pET-truncated-VP60 was constructed. Subsequently, the pET-truncated-VP60 was transformed into *Escherichia coli* BL21(DE3), and the recombinant proteins were expressed by IPTG induction. Finally, the expressed protein was purified and applied to immunize that without immunizing with RHD vaccine, then the antiserum titers were evaluated by the hemagglutination inhibition test, and the immune-protective efficacy of the recombinant proteins was observed and analyzed through animal challenge test. The results showed that the multi-epitope DNA fragments of VP60 of McHDV was successfully expressed in the form of inclusion bodies in *E. coli*, and the relative molecular weight of recombinant proteins is about 45 kDa. After immunized with the recombinant proteins, 100% of New Zealand white rabbits were resistant to attack of McHDV, which indicates efficient immune-protective efficacy of chosen epitope recombinant protein. The study laid a foundation for the development of the new subunit vaccines of McVHD.

Keywords: *Moschus chrysogaster* (*sifanicus*), *Moschus chrysogaster* hemorrhagic disease virus, epitope, prokaryotic expression, immune-protective efficacy

马麝 (*Moschus chrysogaster/sifanicus*, alpine musk deer) 亦称香獐, 是我国特有的一种麝属动物资源, 为国家一级重点保护野生动物, 世界自然保护联盟 (IUCN) “濒危”级野生动物^[1]。其雄麝分泌的麝香被称为世界四大名贵香料之王, 亦是我国多种中药名方如片仔癀、安宫牛黄丸、再造丸、大活络丹、云南白药、小儿回春丹等的组方君药, 因此极具应用价值^[2-5]。马麝主要分布于青藏高原及周边区域, 包括青海省、宁夏回族自治区贺兰山、甘肃省祁连山及肃南裕固族自治县山地、四川省西部地区、云南省北部高山地区及西藏自治区东南部, 其中甘肃省兴隆山马麝种群密度较大^[6]。但由于生境的改变和疾病的暴发, 导致马麝数量急剧下降。多年来, 兴隆山马麝种群中流行一种高致死的出血性

传染病^[7-9], 但真正的病原始终未能确定, 2010 年冬季, 该病在兴隆山自然保护区人工圈养马麝种群中暴发, 导致 100 多头马麝死亡, 经济损失惨重。笔者等通过病原的分离鉴定, 确定其为 McHDV 引起的马麝病毒性出血症 (*Moschus chrysogaster* viral hemorrhagic disease, McVHD)^[10]。近年来, 该病虽未出现大规模发病, 但零散病例却时有发生。基于此, 本研究在成功建立马麝病毒性出血症家兔动物模型的基础上, 通过 McHDV VP60 抗原表位的预测, 设计特异性引物, 采用 RT-PCR 扩增其主要抗原表位编码序列, 并经重叠延伸 PCR 将不同抗原表位序列拼接, 进而在构建原核表达载体及诱导表达的基础上, 对重组蛋白的免疫保护效力进行分析, 为马麝病毒性出血症新型疫苗的研制奠定基础。

1 材料与方法

1.1 毒株、菌种及实验动物

McHDV 由甘肃农业大学兽医传染病学实验室分离保存;非免疫健康易感新西兰白兔购自兰州某个体养兔场; BALB/c 小鼠购自中国农业科学院兰州兽医研究所; 大肠杆菌 Trans5 α 、BL21(DE3)感受态细胞购自北京全式金生物科技有限公司; 原核表达载体 pET-28a(+) 购于 Novagen 公司。

1.2 主要试剂

RNA 抽提试剂 TRIzol 购自 Invitrogen 公司; M-MLV 反转录酶购自 Promega; Recombinant Ribonuclease Inhibitor、2 \times PrimeSTAR[®]Max DNA 聚合酶, 核酸内切酶 *EcoR* I、*Xho* I, T4 DNA 连接酶为 TaKaRa 公司产品; 质粒小提试剂盒、DNA 回收试剂盒购自北京天根生化科技有限公司; 预染蛋白 Marker 购自 Thermo 公司; 兔病毒性出血症灭活疫苗 (兽药生字 (2015)150106004) 购于山东华宏生物工程有限公司; DNA Marker、DAB 显色试剂盒购于北京康为试剂生物科技有限公司; 羊抗鼠 HRP-IgG 购自北京博奥森生物技术有限公司; 二喹啉甲酸 (Bicinchoninic acid, BCA) 蛋白定量试剂盒购于碧云天生物技术有限公司; 其他常规试剂为国产分析纯产品。

1.3 引物设计

应用 DNA Star 软件预测 McHDV (GenBank 登录号 MN478485) VP60 蛋白抗原表位, 其优势

抗原表位主要集中在第 1–100 氨基酸之间 (即 1–300 bp)、第 141–340 氨基酸之间 (即 421–1 020 bp) 和第 441–489 氨基酸之间 (即 1 321–1 467 bp) 3 个区域, 因此, 基于 3 个区域的核苷酸序列, 设计引物对 F1/R1、F2/R2 和 F3/R3 (表 1), 用于扩增相应区域的核苷酸序列, F1/R3 则用于重叠延伸 PCR 以获得 3 个区域的串联序列。引物送由金唯智生物科技有限公司合成。

1.4 McHDV VP60 主要抗原表位序列的扩增

取病死麝肝脏组织匀浆悬液反复冻融 3 次, 12 000 r/min 离心 15 min 后取上清, 采用 TRIzol 法提取总 RNA, 经反转录合成 cDNA (操作参考试剂盒说明书)。应用 PCR 扩增 3 个目标序列片段, 扩增体系为: cDNA 模板 2 μ L, 上下游引物各 0.5 μ L, 2 \times PrimeSTAR[®]Max DNA 聚合酶 10 μ L, ddH₂O 7 μ L。扩增条件: 98 $^{\circ}$ C 5 min; 98 $^{\circ}$ C 30 s, 58 $^{\circ}$ C 30 s, 72 $^{\circ}$ C 30 s, 30 个循环; 72 $^{\circ}$ C 10 min。产物经 1% 琼脂糖凝胶电泳分离, 目的条带回收备用。

重叠延伸 PCR 体系 30 μ L: 上述 PCR 扩增的目的 DNA 片段回收产物各 1 μ L, 2 \times PrimeSTAR[®]Max DNA 聚合酶 15 μ L, F1 1 μ L, R3 1 μ L, ddH₂O 10 μ L。扩增条件: 98 $^{\circ}$ C 5 min; 98 $^{\circ}$ C 30 s, 59.5 $^{\circ}$ C 30 s, 72 $^{\circ}$ C 40 s, 30 个循环; 72 $^{\circ}$ C 10 min。扩增产物分离回收备用。

表 1 VP60 主要抗原表位 PCR 引物序列

Table 1 Primer sequences of major epitope domain of VP60 for PCR amplification

Primer name	Primer sequence (5'–3')	Localization (nt)	Size (bp)
F1	CGGAATTCATGGAGGGCAAAGCCCGCGCAGCG	1	315
R1	CGATGCCGTTGTTTTGTGGAGAATGTTG	300	
F2	AACAACGGCATCGAGATTGGACCAGGG	421	611
R2	CTGTCCGACATGTCAGGAAAGCCGTC	1 020	
F3	TGTCGGACAGAATTGTAACCACACCCG	1 321	163
R3	CCCTCGAGTTAGGAGCCTGTGCCGTACTGGGTCCC	1 467	

Underlying sequences: restriction enzyme sites of *EcoR* I and *Xho* I.

1.5 McHDV VP60 主要抗原表位的原核表达

1.5.1 原核表达载体的构建

将重叠延伸 PCR 回收产物与 pET-28a(+) 分别用 *EcoR* I 和 *Xho* I 双酶切, 酶切产物回收后 16 °C 过夜连接。连接产物转化大肠杆菌 Trans5 α 感受态细胞后涂布于 LB 平板 (卡那霉素 70 mg/L), 37 °C 培养箱培养 12 h, 挑取单菌落接入 5 mL LB 液体培养基 (卡那霉素 70 mg/L), 重组子提取质粒酶切鉴定, 阳性质粒送由金唯智生物科技有限公司测序, 符合预期的重组质粒命名为 pET-truncated-VP60。

1.5.2 McHDV VP60 主要抗原表位重组蛋白的表达

pET-truncated-VP60 转化大肠杆菌 BL21(DE3) 感受态细胞, 涂布 LB 琼脂平板 (卡那霉素 70 mg/L) 后置于 37 °C 培养箱培养, 待长出菌落后挑取单菌落接入适量 LB 液体培养基 (卡那霉素 70 mg/L) 过夜培养后, 按 1:100 比例将过夜培养物转入 2 \times YT 液体培养基 (卡那霉素 70 mg/L), 37 °C、210 r/min 培养至 OD_{600} 为 0.6 左右, 加入终浓度为 1 mmol/L 的 IPTG 诱导 6 h, 离心收集菌体, 经 PBS 洗涤后超声破碎, 4 °C、12 000 r/min 离心 10 min, 分别取上清和沉淀, 制样后应用 SDS-PAGE 分析蛋白表达情况。

1.6 重组蛋白的纯化及抗血清制备

取 200 mL 按上述条件诱导的表达菌液离心收集菌体, 超声破碎后参照肖敏等^[11]所述方法纯化并溶解重组蛋白, 进而应用 BCA 蛋白定量试剂盒定量。取适量纯化的重组蛋白与等体积弗氏完全佐剂混合后, 免疫 BALB/c 小鼠 (首免 80 μ g/只), 14 d 后应用弗氏不完全佐剂进行二次免疫, 之后每隔 7 d 免疫 1 次, 第 4 次免疫后 6 d 采集血液并分离血清, 应用间接 ELISA 方法检测其抗体效价^[11]。

1.7 多克隆抗体的 Western blotting 检测

McVHD 病死马麝肝脏组织匀浆上清、免疫浓度的兔病毒性出血症灭活疫苗 (兽药生字 (2015)150106004) 和纯化的重组蛋白溶解液各

120 μ L, 分别加入 30 μ L 5 \times 蛋白质上样缓冲液后参照说明书制样。进而应用 SDS-PAGE 将蛋白分离后转印至 NC 膜。转印后的 NC 膜用 5% 的脱脂乳 4 °C 封闭过夜后置入 1:1 000 稀释的重组蛋白抗血清中, 37 °C 孵育 1 h 后, PBST 洗涤 3 次, 每次 10 min。随后置于 1:8 000 稀释的羊抗鼠 IgG-HRP, 37 °C 孵育 1 h, PBST 洗涤 3 次, 每次 10 min。最后用 DAB 显色试剂盒显色。

1.8 免疫保护试验

1.8.1 免疫原的制备

将纯化的重组蛋白与等量弗氏佐剂乳化使蛋白终浓度为 400 μ g/mL 制备成重组蛋白疫苗; McVHD 组织灭活疫苗参照文献^[12]但略作调整, 即取血凝试验 (HA)^[13]效价达 1:210 以上的 McHDV 致死兔肝组织匀浆上清加入 0.4% 甲醛灭活后, 与等量弗氏佐剂混匀乳化即为 McVHD 组织灭活苗。pET-28a 空载体标签蛋白纯化后参照重组蛋白疫苗方式制备免疫原。

1.8.2 动物免疫

3-4 月龄非免疫新西兰大白兔 25 只, 随机分为 5 组, 每组 5 只。A 组为重组蛋白免疫组, 参照文献^[14], 分别在第 1 天和第 14 天于颈背部皮下注射免疫, 每只每次 400 μ g (即重组蛋白疫苗 1 mL)。B 组 McVHD 为组织灭活疫苗免疫组, 分别在第 1 天和第 14 天于颈背部皮下注射组织灭活疫苗, 每只每次 1 mL。C 组为空载体标签蛋白免疫组, 免疫同重组蛋白免疫组。D 组为正常对照组, 即未免疫未攻毒对照组。E 组为兔病毒性出血症灭活苗免疫组。所有兔在每次免疫前及攻毒前经耳静脉采血并分离血清, 并参照林治涌^[13]所述血凝抑制试验 (HI) 方法检测抗体效价。

1.8.3 攻毒试验

第 2 次免疫后 7 d, 所有实验兔均于颈部皮下注射 McHDV 致死的马麝肝脏组织匀浆悬液, 每只 1 mL。记录攻毒后各组实验兔的发病死亡情况, 连续观察 10 d, 病死兔及时剖检观察, 10 d 后未死亡兔全部捕杀, 剖检并进行病毒检测和细菌检查。

1.9 病毒检测

取实验病死兔肝脏组织,按 1:10 (W/V) 加入 PBS 后匀浆,反复冻融 3 次后离心取上清,测定 HA 效价。

1.10 细菌检查

用病死兔和扑杀兔的肝脏、脾脏、肾脏组织触(涂)片,分别应用革兰氏染色和碱性美蓝液染色后,显微镜下检查。无菌取上述脏器组织块加入到 LB 细菌培养液,37 °C 振荡培养 72 h,观察细菌生长情况。

2 结果与分析

2.1 McHDV VP60 主要抗原表位的扩增与重组

以 McHDV 基因组 RNA 为模板,通过反转录获得 cDNA,采用 PCR 分别扩增出 3 段主要抗原表位基因片段,进而经重叠延伸 PCR 扩增获得 McHDV VP60 主要抗原表位的串联片段序列为 1 050 bp 的核酸片段,与预期相一致(图 1)。

2.2 原核表达质粒 pET-truncated-VP60 鉴定

McHDV VP60 主要抗原表位串联序列与 pET-28a(+) 质粒双酶切后连接并转化大肠杆菌

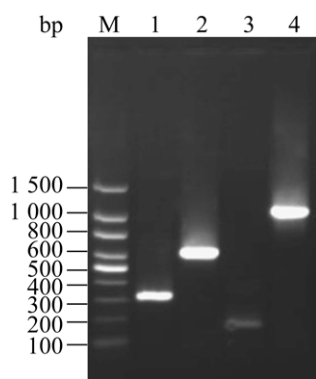


图 1 McHDV VP60 主要抗原表位区 RT-PCR 和重叠延伸 PCR 扩增

Fig. 1 RT-PCR and overlap extension PCR amplification of major epitope domain of McHDV VP60. M: DNA marker (100 bp); 1: the major epitope domain 1 of McHDV VP60; 2: the major epitope domain 2 of McHDV VP60; 3: the major epitope domain 2 of McHDV VP60; 4: tandem of major epitope domain from McHDV VP60.

Trans5 α , 挑取单菌落扩增培养后提取质粒应用 *EcoR* I 和 *Xho* I 双酶切,切出 1 050 bp 左右条带的质粒送由金唯智测序(图 2),结果符合预期的质粒命名为 pET-truncated-VP60。

2.3 McHDV VP60 主要抗原表位串联序列的原核表达

质粒 pET-truncated-VP60 转化大肠杆菌 BL(DE3) 后经 IPTG 诱导,表达产物应用 SDS-PAGE 分析。结果显示,重组蛋白相对分子量约为 45 kDa,与预期基本一致,且检测表明重组蛋白以包涵体形式存在(图 3)。

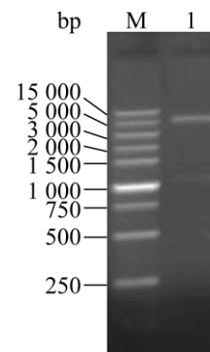


图 2 重组表达质粒 pET-truncated-VP60 的酶切鉴定
Fig. 2 Endonuclease digestion identification of pET-truncated-VP60. M: DNA marker (Super DNA marker); 1: the double digested products of pET-truncated-VP60 by *EcoR* I and *Xho* I.

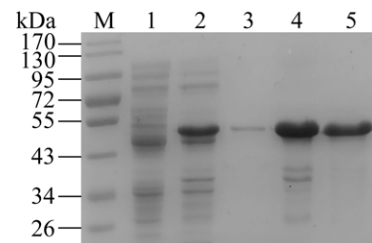


图 3 重组蛋白的 SDS-PAGE 分析

Fig. 3 SDS-PAGE analysis of the expression protein. M: prestained protein molecular weight marker (Thermo 26617); 1: total cellular proteins of *E. coli* BL21(DE3) cells transformed by pET-28a(+); 2: total cellular proteins of *E. coli* BL21(DE3) cells transformed by pET-truncated-VP60; 3: supernatant of lysate of *E. coli* BL21(DE3) cells transformed by pET-truncated-VP60; 4: sediment of lysate of *E. coli* BL21(DE3) cells transformed by pET-truncated-VP60; 5: purified recombinant proteins.

2.4 多克隆抗体的制备及效价测定

纯化重组蛋白免疫 BALB/c 小鼠, 经 4 次免疫后采集血液分离血清, 用间接 ELISA 检测抗体效价 (免疫前血清按 1:1 000 稀释)。结果显示, 4 次免疫后 BALB/c 小鼠血清中重组蛋白抗体效价可达 1:51 200 以上 (表 2), 表明重组蛋白具有良好的免疫原性。

McHDV 悬液、RHDV 疫苗株和纯化的重组蛋白分别制样并经 SDS-PAGE 分离后, 转膜并进行 Western blotting。结果显示, 重组蛋白的 BALB/c 小鼠抗血清能与纯化的重组蛋白、McHDV 蛋白和 RHDV 疫苗株蛋白特异性结合, 且条带分别位于 45 kDa 和 57 kDa 处 (图 4), 与预期基本一致, 表明应用重组蛋白制备的多克隆抗体具有良好的反应原性。

2.5 免疫保护效力

2.5.1 抗体检测

HI 检测结果表明, 所有试验兔免疫前血清的 HI 效价均小于 \log_2 , 经重组蛋白疫苗和组织灭活疫苗免疫的新西兰大白兔血清抗体升高, 但重组蛋白免疫组第一次免疫后兔血清 HI 效价为 $3\log_2-4\log_2$,

而组织灭活苗第一次免疫后兔血清 HI 效价即可达 $5\log_2-6\log_2$; 重组蛋白疫苗第二次免疫后兔血清 HI 效价可达 $4\log_2-5\log_2$, 组织灭活苗第二次免疫后兔血清 HI 效价基本都在 $7\log_2$ 以上; 标签蛋白免疫组免疫前后 HI 效价变化不明显。攻毒后, 标签蛋白免疫组免于 4 d 内全部死亡。攻毒后 7 d, 重组蛋白疫苗组兔血清 HI 效价为 $5\log_2-7\log_2$, 组织灭活苗兔血清 HI 效价为 $8\log_2-10\log_2$ (表 3)。

2.5.2 攻毒实验

攻毒后, 标签蛋白免疫组兔在 40 h 开始死亡, 72 h 全部死亡, 死亡率达 100%; 病兔发病急, 病程短, 常无症状突然死亡, 死前抽搐、痉挛、尖叫, 死后呈角弓反张姿势, 部分死兔鼻孔有泡沫状血样液体; 死亡兔剖检可见全身败血症变化, 肺脏有大小不等的出血斑点, 切面流出多量红色泡沫状液体; 喉头、气管黏膜淤血或弥漫性出血; 肝脏肿胀变性, 淤血呈紫红色, 有出血斑; 脾脏淤血肿大, 呈暗紫色; 肾肿大颜色斑驳, 有的有针尖状出血。重组蛋白免疫兔和组织灭活苗免疫兔攻毒后持续观察 10 d, 所有试验兔均健活, 保护率达 100%, 两组兔捕杀后剖检未见明显病理变化。表明纯化

表 2 免疫鼠多克隆抗体效价的测定

Table 2 Determination of the titer of polyclonal antibodies in immunized mice

Dilution multiple	1:1 600	1:3 200	1:6 400	1:12 800	1:25 600	1:51 200	1:102 400
Post-immune serum	1.294 5	1.054 4	0.891 0	0.661 7	0.542 4	0.415 2	0.305 6
Pre-immune serum	0.153 (1:1 000)						

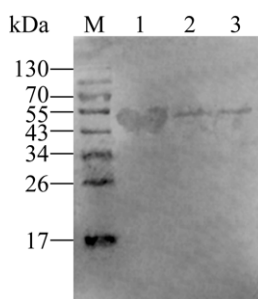


图 4 多克隆抗体的 Western blotting 检测

Fig. 4 Western blotting test for the expression protein. M: prestained protein molecular weight marker (Thermo 26617); 1: purified recombinant proteins; 2: total proteins of McHDV; 3: total proteins of RHDV vaccine strain.

McHDV VP60 主要抗原表位序列串联原核表达产物配苗后免疫的新西兰大白兔可有效抵抗 McHDV 毒株的攻击。这为 MSHD 新型亚单位疫苗或基因工程疫苗的研制提供了新的候选抗原。

2.6 病毒检测

取实验病死兔肝脏组织, 按 1:10 (W/V) 加入 PBS 后匀浆, 反复冻融 3 次后离心取上清进行 HA 试验, 测得 HA 效价达 $10\log_2$, 重组蛋白免疫兔和组织灭活苗免疫兔肝脏组织匀浆上清的 HA 效价均小于 \log_2 (表 4)。

表 3 免疫兔血清抗体 HI 效价 (log₂)

Table 3 The HI titers of the sera of immunized rabbits

Groups	Time (d)			
	0 ^a	7	21	28
Recombinant protein immunization	≤log ₂	3log ₂ –4log ₂	4log ₂ –5log ₂	5log ₂ –7log ₂
Tissue inactivated vaccine immunization	≤log ₂	5log ₂ –6log ₂	7log ₂ –9log ₂	8log ₂ –10log ₂
His protein tag immunization	≤log ₂	≤log ₂	≤log ₂	–
The normal control group	≤log ₂	≤log ₂	≤log ₂	–
RHD inactivated vaccine immunization	≤log ₂	5log ₂ –7log ₂	8log ₂ –9log ₂	8log ₂ –10log ₂

^a: the serum samples were taken at the beginning of immunization and measured with HI at that of 1:2.

表 4 McHDV VP60 串联表位原核表达产物的免疫保护效果

Table 4 The protective efficacy of prokaryotic expression of tandem epitope domains from McHDV VP60

Groups	HI titers of sera at challenging ^a	Surviving rates (%)	HA titers of liver tissue ^a	Bacterial detection
Recombinant protein immunization	4log ₂ –5log ₂	100 (5/5)	<log ₂	– ^b
Tissue inactivated vaccine immunization	7log ₂ –9log ₂	100 (5/5)	<log ₂	–
His protein tag immunization	≤log ₂	0 (0/5)	10log ₂	–
The normal control group	≤log ₂	100	≤log ₂	–
RHD inactivated vaccine immunization	8log ₂ –9log ₂	100 (5/5)	<log ₂	–

^a: the titers of HA/HI was measured at initial of log₂. ^b: the results were negative.

2.7 细菌检查

用病死兔的肝脏、脾脏、肾脏组织触(涂)片,经革兰氏染色和碱性美蓝液染色后,显微镜下均未观察到细菌。肝、脾、肾等组织块接入 LB 培养液中,37 °C 振荡培养 72 h,无细菌生长(表 4)。

3 讨论

马麝作为国家一级重点保护动物,具有极高的经济应用价值。多年来,我国马麝研究多集中于种群的地理分布、生态学、行为学和饲养学等领域^[15-18],而关于马麝疾病的研究资料却相对较少。但随着马麝人工驯养产业的逐步扩大,传染性疾病的危害日益严重^[7-10]。因此,开展马麝传染性疾病的防控措施的研究,将为我国珍贵稀有动物资源的保护,以及相关产业的健康发展提供保障。

马麝出血症是流行于甘肃省兴隆山马麝群中的一种急性、高度致死性传染病,其发病急、致死率高,严重威胁兴隆山马麝种群的安全。但该病的

真正病原始终未能确定。笔者所在研究团队经过反复确证,证实该病原体为一种杯状病毒,其全基因组核苷酸序列(GenBank 登录号 MN478485)与 GenBank 中 RHDV 全基因组核苷酸序列(登录号 KY437668.1, DQ280493.1, EF363035.1, DQ189077.1, EU003579.1, KX844830.1, MH190418.1, EF558575.1, EF558578.1, EF558573.1, EF558576.1, EF558586.1, EF558577.1, EF558579.1, EF558580.1, EF558574.1, Z49271.2, X87607.1, M67473.1, Z29514.1, U54983.1, KM878681.1)的同源性为 85.6%–98.7%^[10]。目前, RHDV 尚无有效的病毒体外培养方法,因此预防用免疫制剂均为组织灭活苗。但此类疫苗的制备需要大量的感染致死动物内脏组织,不仅生产成本高且不符合动物保护和动物伦理相关的法规和制度。因此,研究者将注意力转向病毒的免疫保护性抗原 VP60^[19-20]。杨丽梅等^[21]研究证实, VP60 基因的部分核酸序列具有较好的免疫原性。王永山等^[14]和隋慧等^[22]应用 VP60 基因的大肠杆菌表达产物免疫的易感兔可获得 100% 保护,但 VP60 全蛋白的表达效率较低,因而筛选 VP60 主

要抗原表位区成为相关疾病分子诊断和新型疫苗研究的热点。笔者所在研究团队虽然通过大量的试验,以期获得 McHDV 的体外培养,但迄今未能达到预期目的。因此本研究基于相关研究^[14,22],通过 McHDV VP60 序列的分析,确定其优势抗原表位编码序列主要集中于 1–300 bp、421–1 020 bp 和 1 321–1 467 bp 三个区域,且 3 个区域的核苷酸序列与 RHDV VP60 相应 DNA 片段的同源性分别为 84.3%–98.3%、83.5%–98.7% 和 80.0%–99.3%。3 个区域串联后的核苷酸序列与 RHDV VP60 相应 DNA 片段串联序列的同源性为 83.2%–98.7%,其编码的氨基酸序列与 RHDV VP60 相应 DNA 片段串联编码的氨基酸序列同源性为 90.9%–99.1%,不同毒株之间相关序列存在较大的差异。因此,为确保串联表达产物的免疫保护性,本研究基于 McHDV 三个区域的核苷酸序列,设计特异性引物扩增获得其主要的抗原表位序列,并采用重叠延伸 PCR 将所有表位序列融合在一起,进而构建原核表达载体表达重组蛋白并完成了重组蛋白的免疫原性、反应原性和免疫保护性分析。

由于马麝为“濒危”级野生动物,属于国家一级重点保护物种,禁止用于动物感染试验和攻毒试验,因而本研究以易感兔作为动物模型进行重组蛋白的免疫保护效力分析,为重组蛋白疫苗在马麝养殖产业的应用提供了基础数据资料。

本研究筛选的抗原表位串联序列在大肠杆菌中可有效表达,但以包涵体形式表达,纯化包涵体溶解后免疫动物,间接 ELISA 检测结果显示,抗血清效价可达 1:51 200 以上,表明重组蛋白具有良好的免疫原性。Western blotting 检测结果显示,抗血清可与 McHDV 组织毒和疫苗毒 VP60 蛋白特异性结合,表明制备的血清亦具有良好的反应原性。因此,重组蛋白可作为疫苗候选对象,用于新型亚单位疫苗或基因工程疫苗的研制。免疫保护试验结果显示,重组蛋白免疫 2 次的试验兔 100% 获得保护,且大肠杆菌表达系统及重组蛋

白纯化技术已相当成熟,易于大批量生产,且成本较低,并可避免组织灭活苗生产需要感染并致死大量动物以及真核表达系统成本较高的弊端。尤其随着有效维持蛋白天然构象的表达系统的开发和应用^[23–27],选择有利于重组蛋白可溶性表达和天然构象形成的表达系统,将会有效提高重组蛋白的免疫效果,进一步降低生产成本,提高生产效益。

4 结论

McHDV VP60 抗原表位优势区串联原核表达产物具有良好的免疫原性,重组蛋白免疫的易感新西兰白兔可有效抵抗 McHDV 的攻击,免疫保护率可达 100%。

REFERENCES

- [1] Lv XH, Qiao JY, Wu XM, et al. Investigation on intestinal parasitic infection in *Moschus sifanicus(chrysogaster)* of Qinghai. *Chin J Vet Med*, 2010, 46(12): 56–57 (in Chinese).
吕向辉, 乔继英, 吴晓民, 等. 青海马麝肠道寄生虫感染情况调查. *中国兽医杂志*, 2010, 46(12): 56–57.
- [2] Meng XX, Feng JZ, Zhou YJ, et al. Behavioral patterns of wild-caught and captive-bred male musk deer. *Chin J Appl Ecol*, 2006, 17(11): 2084–2087 (in Chinese).
孟秀祥, 冯金朝, 周宜君, 等. 野捕和圈养繁殖雄性马麝行为格局的比较. *应用生态学报*, 2006, 17(11): 2084–2087.
- [3] Meng XX, Yang QS, Feng ZJ, et al. Comparative studies on the behavioral patterns of female wild-caught and captive-bred Alpine Musk Deer in captivity. *J Jilin Agric Univ*, 2007, 29(6): 647–651 (in Chinese).
孟秀祥, 杨奇森, 冯祚建, 等. 不同来源雌性圈养马麝行为格局的比较研究. *吉林农业大学学报*, 2007, 29(6): 647–651.
- [4] Li M, Sheng HL. Research status of the musk deer in China. *Chin J Zool*, 1996, 31(2): 56–58 (in

- Chinese).
- 李明, 盛和林. 中国麝科动物分类的研究现状. 动物学杂志, 1996, 31(2): 56–58.
- [5] Liu WH, Tong JM. Analysis on protection and utilization of musk deer resources in China. *Rev China Agric Sci Technol*, 2005, 7(4): 28–32 (in Chinese).
- 刘文华, 佟建明. 中国的麝资源及其保护与利用现状分析. 中国农业科技导报, 2005, 7(4): 28–32.
- [6] Tong M, Pan SX, Wang XW, et al. Summer habitat selection of alpine musk deer in Xinglong mountain national Nature Reserve, Northwestern China. *Zool Res*, 2010, 31(6): 610–616 (in Chinese).
- 佟梦, 潘世秀, 王向伟, 等. 甘肃兴隆山自然保护区马麝夏季栖息地特征及生境选择格局. 动物学研究, 2010, 31(6): 610–616.
- [7] Lu H, Jiang YW, Huang YD. Primary epidemiological investigation of respiratory disease of *Moschus sifanicus* in Xinglong mountain of Gansu Province. *Chin J Zool*, 2004, 39(6): 62–64 (in Chinese).
- 路浩, 蒋应文, 黄有德. 甘肃兴隆山马麝呼吸系统疾病流行病学初步调查. 动物学杂志, 2004, 39(6): 62–64.
- [8] Lu H, Huang YD, Liu ZP. Etiologic study on respiratory disease in *Moschus sifanicus*. *Chin J Vet Sci*, 2008, 28(1): 45–47 (in Chinese).
- 路浩, 黄有德, 刘宗平. 马麝呼吸系统疾病病原学研究. 中国兽医学报, 2008, 28(1): 45–47.
- [9] Lu H, Hu JJ, Huang YD, et al. Pathological observation on hemorrhagic pneumonia in *Moschus sifanicus*. *Chin J Vet Med*, 2010, 46(6): 38–39 (in Chinese).
- 路浩, 胡俊杰, 黄有德, 等. 马麝出血性肺炎的病理学观察. 中国兽医杂志, 2010, 46(6): 38–39.
- [10] Bao SJ, Xing XY, Ding XQ, et al. A new animal infectious disease, *Moschus chrysogaster* viral hemorrhagic disease. *Sci Agric Sin*, 2018, 51(5): 1012 (in Chinese).
- 包世俊, 邢小勇, 丁小琴, 等. 一种新的动物传染病——马麝病毒性出血症. 中国农业科学, 2018, 51(5): 1012.
- [11] Xiao M, Bao SJ, Xing XY, et al. Cloning and prokaryotic expression off gene of peste des petits ruminants virus GS strain and preparation of polyclonal antibody. *J Agric Biotechnol*, 2017, 25(3): 477–484 (in Chinese).
- 肖敏, 包世俊, 邢小勇, 等. 小反刍兽疫病毒甘肃株 F 基因的克隆、原核表达及多克隆抗体的制备. 农业生物技术学报, 2017, 25(3): 477–484.
- [12] Jiang P. *Veterinary Biologicology*. 3rd ed. Beijing: China Agricultural Press, 2018: 518–519 (in Chinese).
- 姜平. 兽医生物制品学. 3 版. 北京: 中国农业出版社, 2018: 518–519.
- [13] Lin ZY. Methods of hemagglutination and hemagglutination inhibition test for rabbit haemorrhagic disease. *J Anim Sci Vet Med*, 1995, 14(2): 53–55 (in Chinese).
- 林治涌. 兔瘟血凝及血凝抑制试验操作方法. 畜牧兽医杂志, 1995, 14(2): 53–55.
- [14] Wang YS, Lu CP, Zhou ZA, et al. Protection of rabbit hemorrhagic disease virus by immunization with the recombinant capsid protein expressed in *E. coli*. *Sci Agric Sin*, 2004, 37(11): 1677–1681 (in Chinese).
- 王永山, 陆承平, 周宗安, 等. 原核表达的兔出血症病毒衣壳蛋白对兔的免疫保护效果. 中国农业科学, 2004, 37(11): 1677–1681.
- [15] Xia L, Yang QS, Wei FW, et al. Study on geographical division of alpine musk deer (*Moschus sifanicus*). *Acta Theriol Sin*, 2004, 24(1): 1–5 (in Chinese).
- 夏霖, 杨奇森, 魏辅文, 等. 马麝诸种群地理分化初步探讨. 兽类学报, 2004, 24(1): 1–5.
- [16] Liu ZX, Li Q, Kang FG, et al. Some ecological characteristics of the isolated population of alpine musk deer (*Moschus chrysogaster*) in the Xinglong forest, Gansu Province. *Acta Ecol Sin*, 2001, 21(6): 964–968 (in Chinese).
- 刘志霄, 李强, 康发攻, 等. 甘肃兴隆山林区马麝 (*Moschus chrysogaster*) 隔离种群的生态特征. 生态学报, 2001, 21(6): 964–968.
- [17] Hao ZL, Zhang XY, Guo YL, et al. The nutrients of main wild plants eatable to musk deer in Xinglong mountain national nature reserve. *Pratacult Anim Husbandry*, 2002, 22(4): 41–44 (in Chinese).
- 郝正里, 张学炎, 郭艳丽, 等. 兴隆山自然保护区马麝主要可食野生植物的营养成分. 中国草食动物, 2002, 22(4): 41–44.

- [18] Hao ZL, Wang PM, Jiang YW, et al. Nutritional evaluation of ten plants eaten by *Moschus chrysogaster* from Xinglong mountain in autumn. *China Herbiv*, 2002, 22(6): 40–42 (in Chinese).
郝正里, 王培民, 蒋应文, 等. 兴隆山马麝喜食 10 种植物秋季营养评价. *中国草食动物*. 2002, 22(6): 40–42.
- [19] Kinnear M, Linde CC. Capsid gene divergence in rabbit hemorrhagic disease virus. *J Gen Virol*, 2010, 91(1): 174–181.
- [20] Rohde J, Schirrneier H, Granzow H, et al. A new recombinant Orf virus (ORFV, Parapoxvirus) protects rabbits against lethal infection with rabbit hemorrhagic disease virus (RHDV). *Vaccine*, 2011, 29(49): 9256–9264.
- [21] Yang LM, Ma L, Zhang ZM, et al. Cloning, truncated expression and activity identification of rabbit hemorrhagic disease virus VP60 gene of ZB strain. *Progr Vet Med*, 2013, 34(9): 57–61 (in Chinese).
杨丽梅, 马力, 张志美, 等. 兔出血症病毒 ZB 分离株 VP60 基因克隆、截短表达与活性鉴定. *动物医学进展*, 2013, 34(9): 57–61.
- [22] Sui H, Yang JS. Prokaryotic expression and immunogenicity of major antigen epitope of rabbit haemorrhagic disease virus VP60. *J Anhui Agric Sci*, 2010, 38(28): 15660–15661 (in Chinese).
隋慧, 杨金生. 兔出血症病毒 VP60 主要抗原表位的原核表达及其免疫原性. *安徽农业科学*, 2010, 38(28): 15660–15661.
- [23] Yuan DW, Liu JS, Guo DC, et al. Development of VP60 gene vaccine against RHDV and immunity test in mice. *Chin J Vet Sci*, 2011, 31(11): 1582–1586 (in Chinese).
原冬伟, 刘家森, 郭东春, 等. 兔出血症病毒 VP60 基因真核表达质粒的构建及初步评价. *中国兽医学报*, 2011, 31(11): 1582–1586.
- [24] Lu ZX. Construction and immunogenicity of recombinant eukaryotic plasmid of VP60 gene of rabbit hemorrhagic disease virus[D]. Ya'an: Sichuan Agricultural University, 2015 (in Chinese).
鲁忠祥. 兔瘟病毒 VP60 基因重组真核质粒的构建及其免疫原性[D]. 雅安: 四川农业大学, 2015.
- [25] Farnós O, Rodríguez 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. *Vet Microbiol*, 2006, 114(3/4): 187–195.
- [26] Farnós O, Fernández E, Chiong M, et al. Biochemical and structural characterization of RHDV capsid protein variants produced in *Pichia pastoris*: advantages for immunization strategies and vaccine implementation. *Antiv Res*, 2009, 81(1): 25–36.
- [27] Laurent S, Vautherot JF, Madelaine MF, et al. Recombinant rabbit hemorrhagic disease virus capsid protein expressed in baculovirus self-assembles into viruslike particles and induces protection. *J Virol*, 1994, 68(10): 6794–6798.

(本文责编 郝丽芳)