

• 动物及兽医生物技术 •

# 牛病毒性腹泻病毒 1 型病毒样颗粒的制备及其对豚鼠的免疫原性分析

高闪电<sup>1</sup>, 张忠辉<sup>1</sup>, 田占成<sup>1</sup>, 王锦明<sup>1</sup>, 独军政<sup>1</sup>, 关贵全<sup>1</sup>, 殷宏<sup>1,2</sup>

1 中国农业科学院兰州兽医研究所 家畜疫病病原生物学国家重点实验室, 甘肃 兰州 730046

2 江苏省动物重要疫病与人兽共患病防控协同创新中心, 江苏 扬州 225009

高闪电, 张忠辉, 田占成, 王锦明, 独军政, 关贵全, 殷宏. 牛病毒性腹泻病毒 1 型病毒样颗粒的制备及其对豚鼠的免疫原性分析. 生物工程学报, 2022, 38(1): 130-138.

GAO SD, ZHANG ZH, TIAN ZC, WANG JM, DU JZ, GUAN GQ, YIN H. Preparation of bovine viral diarrhea disease virus 1 virus-like particles and evaluation of its immunogenicity in a guinea pig model. Chin J Biotech, 2022, 38(1): 130-138.

**摘要:** 为了获得预防牛病毒性腹泻病毒 1 型 (bovine viral diarrhea virus 1, BVDV-1) 感染的病毒样颗粒, 扩增 C-E<sup>ms</sup>-E1-E2 编码区段并克隆至 pFastBacDaul 载体, 转化大肠杆菌 DH10Bac 感受态细胞与 Bacmid 重组获得 Bacmid-BVDV-1, 转染至 Sf9 细胞, 获得重组杆状病毒 Baculo-BVDV-1。利用免疫荧光试验、免疫印记、电镜观察确定目的蛋白表达和病毒样颗粒的组装。制备病毒样颗粒灭活抗原并辅以 Montanide ISA-201 佐剂免疫豚鼠, 分别用中和抗体滴度测定和淋巴细胞增殖试验分析体液免疫和细胞免疫应答, 然后用 10<sup>6</sup> TCID<sub>50</sub> BVDV-1 型 AV69 株攻毒, 评价病毒样颗粒的免疫保护效果。结果表明, 构建的重组杆状病毒 Baculo-BVDV-1 感染 Sf9 细胞可高效表达 BVDV 结构蛋白并形成病毒样颗粒。病毒样颗粒免疫诱导豚鼠产生较高滴度 (1:144) 的中和抗体并激活细胞免疫, 降低了 BVDV 感染豚鼠血液中的病毒 RNA 水平。文中以昆虫细胞表达系统制备 BVDV 病毒样颗粒并评价其免疫原性, 为进一步研制 BVD 病毒样颗粒疫苗奠定了基础。

**关键词:** 牛病毒性腹泻病毒; 杆状病毒; 病毒样颗粒; 免疫原性

**Received:** March 10, 2021; **Accepted:** July 1, 2021

**Supported by:** National Key Research and Development Program of China (2017YFD0500904); China Agriculture Research System of the Ministry of Finance, and the Ministry of Agriculture and Rural Affairs (CARS-37); Agricultural Science and Technology Innovation Program of Chinese Academy of Agricultural Sciences (ASTIP)

**Corresponding authors:** GAO Shandian. Tel: +86-931-8342681; E-mail: gaoshandian@caas.cn

YIN Hong. Tel: +86-931-8342515; E-mail: yinhong@caas.cn

**基金项目:** 国家重点研发计划 (2017YFD0500904); 国家现代农业产业技术体系 (CARS-37); 农业科技创新工程 (ASTIP)

# Preparation of bovine viral diarrhea disease virus 1 virus-like particles and evaluation of its immunogenicity in a guinea pig model

GAO Shandian<sup>1</sup>, ZHANG Zhonghui<sup>1</sup>, TIAN Zhancheng<sup>1</sup>, WANG Jinming<sup>1</sup>, DU Junzheng<sup>1</sup>, GUAN Guiquan<sup>1</sup>, YIN Hong<sup>1,2</sup>

1 State Key Laboratory of Veterinary Etiological Biology, Lanzhou Veterinary Research Institute, Chinese Academy of Agricultural Science, Lanzhou 730046, Gansu, China

2 Jiangsu Co-innovation Center for Prevention and Control of Important Animal Infectious Diseases and Zoonoses, Yangzhou 225009, Jiangsu, China

**Abstract:** In order to obtain virus-like particles (VLPs) for prevention of bovine viral diarrhea virus 1 (BVDV-1), the C-E<sup>ms</sup>-E1-E2 region was cloned into a pFastBacDaul vector for generating the recombinant Bacmid-BVDV-1 in DH10Bac *Escherichia coli*. The recombinant baculovirus Baculo-BVDV-1 was produced by transfecting the Sf9 cells with Bacmid-BVDV-1. The expressed protein and the assembled VLPs were determined by immunofluorescence, Western blotting and electron microscopy. Guinea pigs were immunized with inactivated VLPs coupled with the Montanide ISA-201 adjuvant. The immunogenicity of VLPs was evaluated by monitoring the humoral immune response with neutralizing antibody titer determination, as well as by analyzing the cell-mediated immune response with lymphocyte proliferation assay. The protective efficacy of VLPs was evaluated by challenging with 10<sup>6</sup> TCID<sub>50</sub> virulent BVDV-1 strain AV69. The results showed that the recombinant Baculo-BVDV-1 efficiently expressed BVDV structural protein and form VLPs in infected Sf9 cells. The immunization of guinea pigs with VLPs resulted in a high titer (1:144) of neutralizing antibody, indicating an activated cellular immunity. Significantly lower viral RNA in the blood of the post-challenged immunized guinea pigs was observed. The successful preparation of BVDV VLPs with insect cell expression system and the observation of the associated immunogenicity may facilitate further development of a VLPs-based vaccine against BVD.

**Keywords:** bovine viral diarrhea virus; baculovirus; virus-like particles; immunogenicity

牛病毒性腹泻 (bovine viral diarrhea, BVD) 是由牛病毒性腹泻病毒 (bovine viral diarrhea virus, BVDV) 引起的一种危害严重的牛传染性疾病, 主要表现为患病牛高热、腹泻、黏膜溃疡、怀孕母牛流产或产出畸形胎等症状, 目前在世界各地养牛业发达国家均有报道<sup>[1]</sup>。除了感染牛, BVDV 还可感染羊、猪、牦牛等家畜和多种野生偶蹄动物, 造成较大经济损失<sup>[2]</sup>。

BVDV 属于黄病毒科瘟病毒属, 病毒粒子由衣壳蛋白 C、囊膜蛋白 E<sup>ms</sup>、E1 和 E2 以及基因组 RNA 组成<sup>[3]</sup>。根据毒株是否可引起细胞病变将 BVDV 分为非细胞病变型和细胞病变型, 也可根据分离株抗原性或基因组差异分为 BVDV-1-BVDV-3 3 个基因型以及 BVDV-1a-1w、BVDV-2a-2d 等基因亚型<sup>[4-5]</sup>。

目前, 只有挪威、瑞典等国家通过淘汰持

续感染动物实现了 BVD 净化,而在 BVD 普遍流行地区利用疫苗免疫提高动物抵抗力、减少持续感染牛排毒风险,是现实可行的措施<sup>[6]</sup>。弱毒活疫苗在北美地区广泛应用但存在通过胎盘屏障感染胎儿的风险,而灭活疫苗相对安全但存在免疫活性较低和免疫持续期短的问题,而且这两种疫苗都存在由于流行毒株与疫苗株基因亚型的差异导致疫苗免疫失败的可能<sup>[7]</sup>。在 BVD 新型疫苗方面,E2 亚单位疫苗<sup>[8-10]</sup>、DNA 疫苗<sup>[11]</sup>、DNA 初免联合亚单位疫苗加强免疫<sup>[12-13]</sup>、抗原递呈细胞靶向性多价亚单位疫苗<sup>[14]</sup>、树突状细胞靶向口服亚单位疫苗<sup>[15]</sup>和活载体疫苗<sup>[16]</sup>也在研发中。

病毒样颗粒 (virus-like particles, VLPs) 是由病毒结构蛋白装配形成的不含病毒核酸的新型亚单位疫苗,与天然病毒相似,体液免疫和细胞免疫应答及安全性良好,成为新型疫苗研究热点<sup>[17]</sup>。本研究选择我国流行较为普遍的 BVDV-1b 基因亚型毒株结构蛋白编码基因,利用杆状病毒和昆虫细胞系统表达制备 BVDV VLPs,并以豚鼠模型初步评价了其免疫原性。

## 1 材料与方法

### 1.1 主要试验材料

表达载体 pFastBacDaul (pFBD)、感受态细胞 DH10Bac、质粒中量提取试剂盒、Grace's 昆虫培养基、Sf-900II 培养基和 Cellfectin II,均购自赛默飞世尔科技(中国)有限公司; BVDV-1b 亚型株 GS4 结构蛋白编码质粒 TOPO-NE2 和 Sf9 细胞 (ATCC CRL-1711),由本实验室保存;牛病毒性腹泻/黏膜病灭活疫苗(1 型)(批号:201902005),购自国内某生物科技公司;BVDV-1 AV69 株购自中国兽医药品监察所;兔抗 BVDV C 蛋白多克隆抗体、兔抗 BVDV E1 蛋白多克隆抗体和兔抗 BVDV E<sup>ms</sup> 多

克隆抗体由本实验室制备<sup>[18-19]</sup>;FITC 标记的猪抗 BVDV 多克隆抗体和抗 BVDV-1 E2 蛋白单克隆抗体购自 VMRD 公司;辣根过氧化物酶标记山羊抗鼠 IgG 购自西格玛奥德里奇(上海)贸易有限公司;Taq DNA 聚合酶、限制性核酸内切酶、T4 DNA 连接酶为宝日医生物技术(北京)有限公司(TaKaRa 中国)产品;SuperSignal West Pico 底物购自 Thermo Fisher Scientific 有限公司;辣根过氧化物酶标记山羊抗小鼠 IgG 和 CCK-8 试剂盒购自上海碧云天生物技术有限公司;豚鼠外周血淋巴细胞分离液购自天津市灏洋生物制品科技有限责任公司;2 月龄豚鼠由本所实验动物中心提供。

### 1.2 引物设计

根据 GS4 株 BVDV 结构蛋白编码基因序列,设计引物 BVDV-VLPF: 5'-GCCGGATCC<sub>BamH I</sub>ATGTCCGACACAAATACAGAAGG-3' 和 BVDV-VLPR: 5'-CTCAAGCTT<sub>Hind III</sub>CTAACCCGAGGTCATTTGTTCTG-3',用于扩增 BVDV 结构蛋白 C-E<sup>ms</sup>-E1-E2 编码区段,大小为 2 718 bp。

### 1.3 重组杆状病毒 Baculo-BVDV-1 的制备

以 TOPO-NE2 质粒为模板,利用 BVDV-VLPF 和 BVDV-VLPR 引物进行 PCR 扩增并回收目的片段,经 *BamH I* 和 *Hind III* 双酶切后与同样酶切处理的 pFBD 载体连接,转化大肠杆菌 DH5 $\alpha$  感受态细胞,提取重组质粒 pFBD-BVDV-1,测序鉴定后转化 DH10Bac 感受态细胞,在三抗高盐固体培养基(含 50  $\mu$ g/mL 卡那霉素、7  $\mu$ g/mL 庆大霉素、10  $\mu$ g/mL 四环素、100  $\mu$ g/mL Bluo-gal 和 40  $\mu$ g/mL IPTG)经蓝白斑筛选获得阳性克隆,提取重组杆状病毒载体 Bacmid-BVDV-1,利用 pUC/M13F (5'-CCCAGTCACGACGTTGTAAAACG-3') 和 pUC/M13R (5'-AGCGGATAACAATTCACACAGG-3') 引物进行 PCR 鉴定,之

后中量提取 Bacmid-BVDV-1, 利用 Cellfectin II 转染 Sf9 细胞, 28 °C 培养 72 h, 收集重组杆状病毒 Baculo-BVDV-1, 继续扩大培养至第 3 代测定毒价后保存于 -80 °C。

#### 1.4 蛋白表达鉴定

利用 Baculo-BVDV-1 种毒接种 6 孔板中培养的 Sf9 细胞 (感染复数为 1), 28 °C 培养 48 h, 根据 FITC 标记的猪抗 BVDV 多克隆抗体操作说明, 进行免疫荧光检测。培养 72 h 收集病变细胞和正常 Sf9 细胞, 制样进行免疫印迹 (Western blotting) 检测目的蛋白的表达。检测 E<sup>ms</sup>、E1、C 蛋白时, 一抗为 1:500 倍稀释的兔抗 E<sup>ms</sup> 多克隆抗体、1:1 000 倍稀释的兔抗 E1 蛋白多克隆抗体和 1:1 000 倍稀释的兔抗 C 蛋白多克隆抗体, 二抗为 1:6 000 倍稀释的辣根过氧化物酶标记山羊抗兔 IgG; 检测 E2 蛋白时, 一抗为 1:2 000 倍稀释的抗 BVDV-1 E2 单克隆抗体, 二抗为 1:1 500 倍稀释的辣根过氧化物酶标记山羊抗小鼠 IgG。用一抗、二抗分别孵育 1 h, 用 TBST 洗膜 3 次, 然后加入 SuperSignal West Pico 底物, 室温避光作用 5 min 并拍照保存。

#### 1.5 BVDV VLPs 电镜观察

将 Baculo-BVDV-1 种毒接种 75 cm<sup>2</sup> 细胞培养瓶中的单层 Sf9 细胞, 72 h 时收集上清和细胞超声裂解, 4 °C、4 000×g 离心 30 min 除去细胞碎片, 利用 10%–50% 蔗糖密度梯度离心纯化, 稀释后吸附于铜网, 磷钨酸染色并利用 FEI Tecnai G2 F20 透射电子显微镜观察。

#### 1.6 动物免疫

利用饱和硫酸铵沉淀方法制备病毒样颗粒并利用 Triton X-100 和 TBP-磷酸三丁酯灭活<sup>[20]</sup>, 与 Montanide ISA-201 佐剂充分乳化后皮下注射免疫豚鼠, 每只豚鼠蛋白免疫剂量为 50 μg。

将 15 只 2 月龄豚鼠随机分为 3 组, 每组 5 只, 设野生型杆状病毒感染 Sf9 蛋白提取物对照组、商品化疫苗对照组和病毒样颗粒免疫组。各组豚鼠在首免 21 d 后进行二免, 每次免疫前以及二免后 20 d 通过心脏采集血液并制备血清或淋巴细胞备用。在二免后 20 d 利用 AV69 标准毒, 以 10<sup>6</sup> TCID<sub>50</sub>/只剂量皮下注射, 采集感染后 3、4、5、6 和 9 d 的抗凝全血 1 mL, 提取总 RNA, 利用荧光定量 RT-PCR 检测病毒核酸, 同时以 GAPDH 基因为内参, 合成 GAPDHF (5'-AACATCATCCCCGCATC-3') 和 GAPDHR (5'-CCTCGGTGTAGCCCAAG-3') 进行荧光定量 RT-PCR 测定样品 GAPDH mRNA 丰度, 以 2<sup>-ΔC<sub>t</sub></sup> 方法进行数据分析<sup>[21]</sup>, 利用 GraphPad Prism 6.0 软件中的方差分析判断组间数据差异。

#### 1.7 中和抗体及淋巴细胞增殖试验

利用微量中和试验测定免疫豚鼠抗体滴度。将豚鼠血清 56 °C 灭活 30 min, 从 1:2 开始倍比稀释至 1:512, 取 50 μL 与等体积的含 100 TCID<sub>50</sub> 的 AV69 标准毒混匀, 37 °C 作用 1 h, 之后接种至 96 孔板中的 MDBK 单层细胞, 每份待检血清设 2 个重复。培养 3 d 并观察细胞病变, 统计未出现细胞病变孔并以 Reed-Muench 法计算免疫豚鼠抗 BVDV 中和抗体滴度几何平局值。利用豚鼠外周血淋巴细胞分离液从第 41 天采集的抗凝全血分离淋巴细胞, 利用 1 640 完全培养基稀释, 加入 96 孔细胞培养板中, 每孔 100 μL (约含 100 000 个细胞), 以 5 μg/mL 刀豆凝集素 A (Con A) 为阳性对照, PBS (phosphate buffer saline) 为阴性对照, 利用 10<sup>4</sup> TCID<sub>50</sub> AV69 株 BVDV 灭活抗原刺激淋巴细胞 72 h, 利用 CCK-8 试剂盒检测, 以刺激指数 SI=(刺激孔 OD<sub>450</sub> 值-空白孔 OD<sub>450</sub> 值)/(PBS 对照 OD<sub>450</sub> 值-空白孔 OD<sub>450</sub> 值) 判定淋巴细胞增殖情况。

## 2 结果与分析

### 2.1 重组杆状病毒 Baculo-BVDV-1 的制备

以 TOPO-NE2 质粒为模板, 利用特异引物扩增获得含 C-E<sup>ms</sup>-E1-E2 编码区的 2 718 bp 的 DNA 片段 (图 1), 酶切处理后插入 pFBD 载体中, 测序表明重组载体 pFBD-BVDV-1 读码框正确。转化 DH10Bac 感受态细胞获得重组杆状病毒载体 Bacmid-BVDV-1, 利用载体引物 pUC/M13F 和 pUC/M13R 鉴定获得约 5.2 kb 的条带, 与预期大小一致 (图 1), 表明 Bacmid-BVDV-1 构建成功。将 Bacmid-BVDV-1 转染 Sf9 细胞, 培养 72 h 可见明显的细胞病变 (图 2); 收集重组杆状病毒 Baculo-BVDV-1, 培养至第 3 代, 送中国典型培养物保藏中心保藏 (CCTCC No. V201803)。

### 2.2 蛋白表达鉴定

重组杆状病毒 Baculo-BVDV-1 感染 Sf9 细胞以免疫荧光鉴定可观察到特异的绿色荧光, 而 Sf9 对照细胞和野生型杆状病毒感染细胞无特异荧光出现 (图 3)。Western blotting 检测结果显示, Baculo-BVDV-1 感染 Sf9 细胞裂解液和 E2 单克隆抗体作用, 分别出现约 15 kDa、24 kDa、35kDa 以及 60 kDa 的目的条带, 主要与兔抗 C 蛋白、E1 蛋白、E<sup>ms</sup> 蛋白多克隆抗体

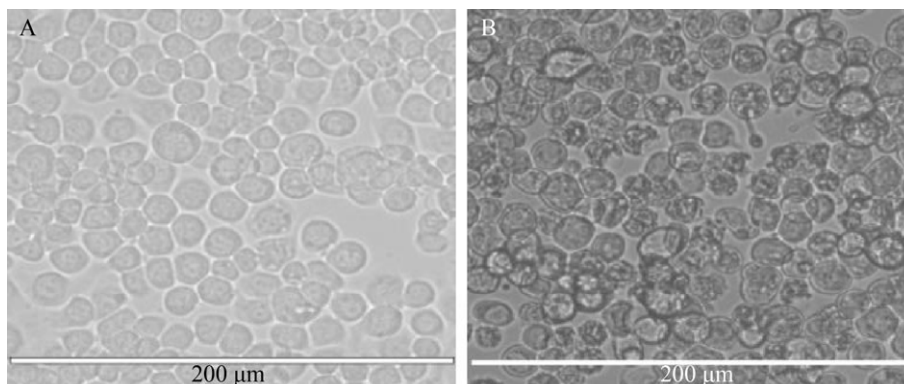


图 2 Bacmid-BVDV-1 转染导致 Sf9 细胞病变

Figure 2 The cytopathic effect in Bacmid-BVDV-1 transfected Sf9 cells. (A) Control Sf9 cells. (B) Sf9 cells transfected with Bacmid-BVDV-1.

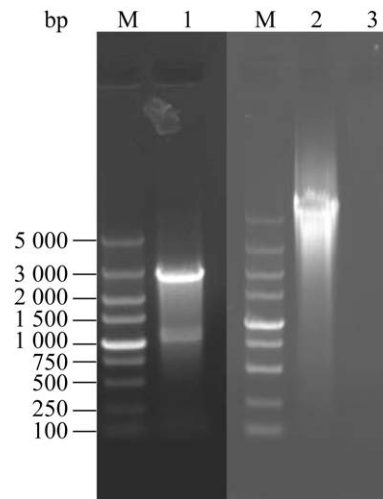


图 1 C-E<sup>ms</sup>-E1-E2 编码区扩增及 Bacmid-BVDV-1 鉴定

Figure 1 Amplification of C-E<sup>ms</sup>-E1-E2 coding region and identification of Bacmid-BVDV-1. M: DL-5000 marker; 1: PCR product of C-E<sup>ms</sup>-E1-E2; 2: PCR product of Bacmid-BVDV-1; 3: negative control.

存在于细胞裂解上清中 (图 4), 说明重组杆状病毒 Baculo-BVDV-1 可在 Sf9 细胞中实现 BVDV 4 种结构蛋白的表达。

### 2.3 BVDV VLPs 电镜观察

Baculo-BVDV-1 种毒接种 Sf9 细胞制样浓缩后, 以磷钨酸负染, 电镜观察可见直径约 30–50 nm 的球形颗粒 (图 5), 形态较为均一, 说明 BVDV 病毒样颗粒组装成功。

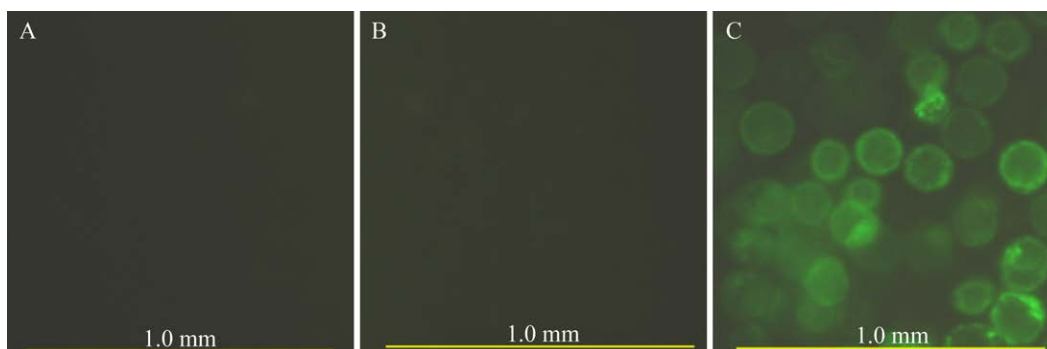


图 3 Baculo-BVDV-1 表达蛋白的免疫荧光鉴定

Figure 3 Identification of the protein expression of the Baculo-BVDV-1 by immunofluorescence assay. (A) Normal Sf9 cells. (B) Sf9 cells infected with wild-type baculovirus. (C) Sf9 cells infected with Baculo-BVDV-1.

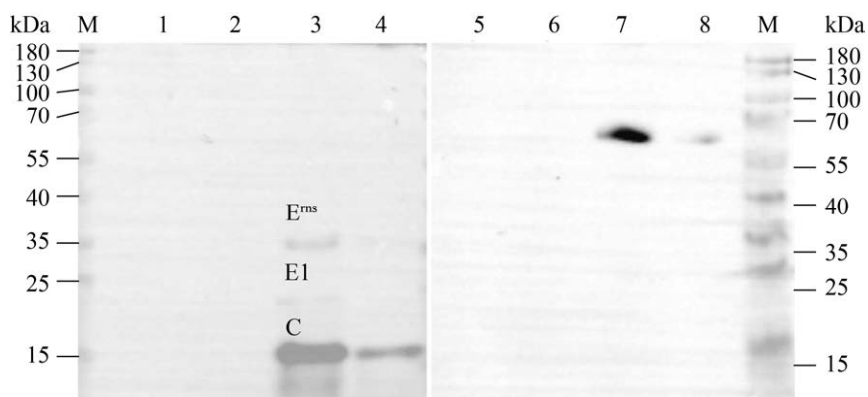


图 4 Baculo-BVDV-1 感染 Sf9 细胞表达蛋白的免疫印迹分析

Figure 4 Western blotting analysis of protein expression of cells infected by Baculo-BVDV-1. M: prestained protein ladder; 1, 2: the supernatant and pellet of control Sf9 cells probed by antibodies against C, Erns and E1; 3, 4: the supernatant and pellet of Baculo-BVDV-1 infected Sf9 cells probed by antibodies against C, E<sup>Erns</sup> and E1; 5, 6: the supernatant and pellet of control Sf9 cells probed by antibody against E2; 7, 8: the supernatant and pellet of Baculo-BVDV-1 infected Sf9 cells probed by antibody against E2.

## 2.4 BVDV VLPs 免疫原性评价

利用杆状病毒 Sf9 蛋白提取物、制备的病毒样颗粒抗原以及商品化疫苗接种豚鼠，未见豚鼠精神、食欲和排便等指标异常。微量中和试验测定免疫豚鼠抗体滴度，结果显示，VLPs 组豚鼠首免后平均中和抗体滴度为 1:56，与对照组豚鼠中和抗体滴度 (<1:4) 差异显著，在二免后平均抗体中和滴度为 1:144，与对照组豚鼠以及 VLPs 组首免中和抗体滴度差异显著 ( $P < 0.05$ )。商品化疫苗免疫组豚鼠首免后平均

中和抗体滴度为 45，二免后平均中和抗体滴度为 1:143，均与对照组豚鼠抗体中和滴度差异显著。VLPs 免疫组和商品化疫苗免疫组豚鼠首免、二免抗体中和滴度未见组间显著差异 (图 6)。淋巴细胞增殖试验表明，Con A 可较高水平刺激 3 组豚鼠淋巴细胞增殖，经灭活 BVDV 刺激时，VLPs 免疫组豚鼠的淋巴细胞增殖水平高于商品化疫苗免疫组豚鼠 (图 7)。攻毒后，AV69 株 BVDV 可较低水平在豚鼠体内复制，第 6 天血液病毒核酸达到峰值，但血液病毒核酸经荧光



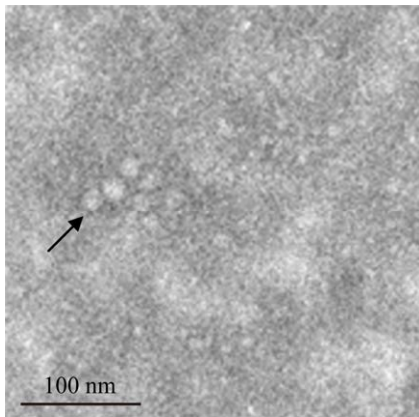


图5 BVDV VLPs 透射电镜图像

Figure 5 The TEM image of BVDV VLPs.

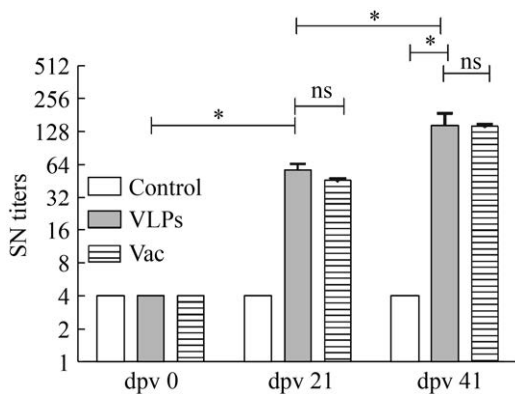


图6 BVDV VLPs 免疫豚鼠产生的中和抗体滴度

Figure 6 Neutralizing antibody titer in guinea pigs immunized with BVDV VLPs. \*: differences were significant ( $P < 0.05$ ); ns: non-significant; dpv: days post vaccination.

定量 RT-PCR 检测循环数 ( $C_t$  值) 约为 32, 表现为较低的核酸水平。VLPs 免疫组和商品疫苗免疫组豚鼠虽检出病毒核酸, 但与对照组相比病毒核酸降低趋势明显, 尤其 VLPs 免疫组在攻毒第 6 天血液 BVDV 核酸水平显著低于对照组, 但与商品疫苗免疫组豚鼠未见显著差异。在攻毒后 9 d, 对照组、VLPs 免疫组、商品疫苗组豚鼠大部分血液中 BVDV 核酸未能检出, 但 VLPs 免疫组、商品疫苗组豚鼠核酸仍表现为低于对照组的趋势 (图 8)。

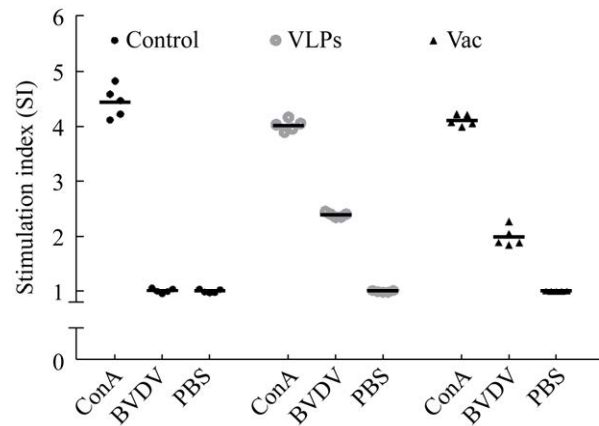


图7 免疫豚鼠淋巴细胞增殖

Figure 7 Lymphocytes proliferation in immunized guinea pigs.

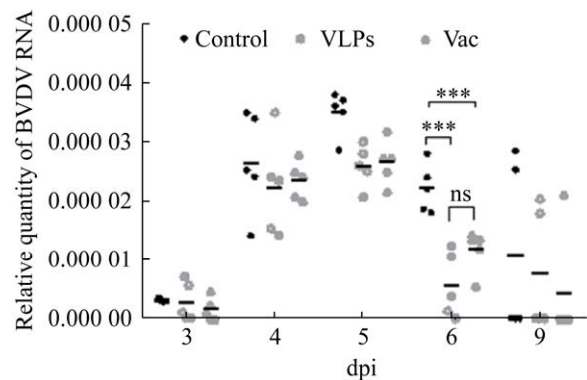


图8 BVDV 接种后豚鼠血液病毒核酸水平

Figure 8 Viral nucleic acid level in blood samples of guinea pigs challenged with BVDV-1. dpi: days post infection.

### 3 讨论

本研究利用杆状病毒和昆虫细胞表达系统制备 BVDV 病毒样颗粒, 利用豚鼠模型评价了其免疫原性。流行病学表明, BVDV-1 株在世界各地普遍流行, 在我国存在有 BVDV-1a-1d、BVDV-1m-1q、BVDV-1u-BVDV-1w 等亚型<sup>[4-5]</sup>, 其中 BVDV-1b 基因亚型是在我国西北区牛流行的主导亚型之一<sup>[22]</sup>。因此, 本研究选用 1b 亚型流行株 GS4 抗原编码基因, 以期能够

较好地与田间流行病毒亚型匹配。由于 BVDV 基因组编码多聚蛋白的结构蛋白成分由细胞蛋白酶切割加工,而且研究表明,糖基化在维持 BVDV 抗原蛋白免疫原性中具有重要作用<sup>[23]</sup>,因此,本研究选用可模拟哺乳动物细胞进行重组蛋白翻译后修饰的昆虫细胞表达系统,以多聚蛋白形式表达 BVDV 结构蛋白,在细胞内实现多聚蛋白切割形成 4 种结构蛋白并自动组装,避免病毒结构蛋白纯化和细胞外组装的繁琐过程。

研究表明,免疫豚鼠中和抗体测定可作为 BVD 商品灭活疫苗效力的评价方法<sup>[14]</sup>。现有 BVD 灭活疫苗含有较高水平的病毒抗原含量,免疫动物可产生较高水平的中和抗体,但对不同基因亚型 BVDV 株的抗体水平可表现出一定差异<sup>[24-25]</sup>。本研究选用 BVDV-1b 亚型流行株的抗原基因表达制备 VLPs,由于与中和试验所用参考毒株亚型一致,测定 VLPs 免疫组豚鼠中和抗体水平可达到商品灭活疫苗水平或略高于灭活疫苗,滴度已达到牛体完全保护的<sup>[26]</sup>。淋巴细胞刺激增殖试验结果表明,VLPs 是一种特殊的亚单位疫苗,本研究发现其细胞免疫激活效果优于前期报道的亚单位疫苗<sup>[14]</sup>,但低于可发生内源性抗原递呈的 DNA 疫苗<sup>[11]</sup>、活载体疫苗<sup>[27]</sup>以及弱毒活疫苗<sup>[28]</sup>。此外,由于本研究中 BVDV VLPs 不表达 BVDV 非结构蛋白,与现有 NS3 蛋白抗体检测试剂盒兼容,在鉴别自然感染与疫苗免疫 (DIVA) 存在优势,但在 NS3 蛋白存在 T 细胞表位且已用于 BVD 疫苗研究<sup>[10,25]</sup>,因此后续还需通过分子设计,在保留 DIVA 优势的同时增加 T 细胞表位展示以提升细胞免疫效力。

目前 BVD 疫苗免疫保护大多通过测定攻毒动物淋巴细胞、分离病毒或外周病毒核酸检测来进行评价<sup>[11,13,24,29]</sup>。目前无 BVDV 感染豚鼠的文献可供参考,我们曾对豚鼠进行 BVDV 接种,但发现非细胞病变型 BVDV 株

cell-con-1 (GenBank 登录号:KC695816) 和 camel-6 (GenBank 登录号:KC695810) 接种豚鼠血液只能检出微量核酸,且持续时间不足 3 d,而细胞病变型毒株 AV69 在接种后病毒核酸存在时间较长,但水平较低同样不利于分离病毒。因此,本研究利用豚鼠 *GAPDH* 基因为内参来消除样品核酸提取误差以增加 BVDV-1 RNA 相对定量的精度,发现 VLPs 接种降低豚鼠病毒血症趋势明显,与灭活疫苗效果类似。

综上所述,本研究首次制备了 BVD 病毒样颗粒,接种豚鼠诱导产生较强的体液免疫和细胞免疫反应,可有效抵抗 BVDV 强毒株的攻击,从而为 BVD 病毒样颗粒疫苗研制奠定了基础。

## REFERENCES

- [1] Ridpath JF. Bovine viral diarrhea virus: global status. *Vet Clin North Am Food Anim Pract*, 2010, 26(1): 105-121.
- [2] Passler T, Walz PH. Bovine viral diarrhea virus infections in heterologous species. *Anim Health Res Rev*, 2010, 11(2): 191-205.
- [3] Wang FI, Deng MC, Huang YL, et al. Structures and functions of pestivirus glycoproteins: not simply surface matters. *Viruses*, 2015, 7(7): 3506-3529.
- [4] Yesilbag K, Alpay G, Becher P. Variability and global distribution of subgenotypes of bovine viral diarrhea virus. *Viruses*, 2017, 9(6): 128.
- [5] Deng M, Chen N, Guidarini C, et al. Prevalence and genetic diversity of bovine viral diarrhea virus in dairy herds of China. *Vet Microbiol*, 2020, 242(1): 108565.
- [6] Lindberg AL. Bovine viral diarrhoea virus infections and its control. A review. *Vet Q*, 2003, 25(1): 1-16.
- [7] Fulton RW. Impact of species and subgenotypes of bovine viral diarrhea virus on control by vaccination. *Anim Health Res Rev*, 2015, 16(1): 40-54.
- [8] Bolin SR, Ridpath JF. Glycoprotein E2 of bovine viral diarrhea virus expressed in insect cells provides calves limited protection from systemic infection and disease. *Arch Virol*, 1996, 141(8): 1463-1477.
- [9] Thomas C, Young NJ, Heaney J, et al. Evaluation of efficacy of mammalian and baculovirus expressed E2 subunit vaccine candidates to bovine viral diarrhoea



- virus. *Vaccine*, 2009, 27(17): 2387-2393.
- [10] Sangewar N, Hassan W, Lokhandwala S, et al. Mosaic bovine viral diarrhoea virus antigens elicit cross-protective immunity in calves. *Front Immunol*, 2020, 11: 589537.
- [11] Nobiron I, Thompson I, Brownlie J, et al. DNA vaccination against bovine viral diarrhoea virus induces humoral and cellular responses in cattle with evidence for protection against viral challenge. *Vaccine*, 2003, 21(17/18): 2082-2092.
- [12] Liang R, van den Hurk JV, Landi A, et al. DNA prime protein boost strategies protect cattle from bovine viral diarrhoea virus type 2 challenge. *J Gen Virol*, 2008, 89(2): 453-466.
- [13] Cai D, Song Q, Duan C, et al. Enhanced immune responses to E2 protein and DNA formulated with ISA 61 vg administered as a DNA prime-protein boost regimen against bovine viral diarrhoea virus. *Vaccine*, 2018, 36(37): 5591-5599.
- [14] Pecora A, Malacari DA, Perez Aguirreburualde MS, et al. Development of an APC-targeted multivalent E2-based vaccine against bovine viral diarrhoea virus types 1 and 2. *Vaccine*, 2015, 33(39): 5163-5171.
- [15] Wang Y, Feng B, Niu C, et al. Dendritic cell targeting of bovine viral diarrhoea virus E2 protein expressed by *Lactobacillus casei* effectively induces antigen-specific immune responses via oral vaccination. *Viruses*, 2019, 11(6): 575.
- [16] Chowdhury SI, Pannhorst K, Sangewar N, et al. BoHV-1-vectored BVDV-2 subunit vaccine induces BVDV cross-reactive cellular immune responses and protects against BVDV-2 challenge. *Vaccines (Basel)*, 2021, 9(1): 46.
- [17] Donaldson B, Lateef Z, Walker GF, et al. Virus-like particle vaccines: immunology and formulation for clinical translation. *Expert Rev Vaccines*, 2018, 17(9): 833-849.
- [18] 康彪, 高闪电, 独军政, 等. 牛病毒性腹泻病毒 E1 蛋白的原核表达及多克隆抗体的制备. *动物医学进展*, 2018, 39(11): 30-34.  
Kang B, Gao SD, Du JZ, et al. Prokaryotic expression and polyclonal antibody preparation of bovine viral diarrhoea virus. *Prog Vet Med*, 2018, 39(11): 30-34 (in Chinese).
- [19] 张忠辉, 高闪电, 独军政, 等. 牛病毒性腹泻病毒衣壳蛋白原核表达及多克隆抗体的制备. *畜牧与兽医*, 2020, 52(7): 78-82.  
Zhang ZH, Gao SD, Du JZ, et al. Prokaryotic expression of capsid protein of bovine viral diarrhoea virus and polyclonal antibody preparation. *Anim Hus Vet Med*, 2020, 52(7): 78-82 (in Chinese).
- [20] 张雪花, 郑其升, 陈瑾, 等. 展示生长抑素的猪细小病毒样颗粒构建及其免疫原性. *生物工程学报*, 2010, 26(8): 1057-1067.  
Zhang XH, Zheng QS, Chen J, et al. Construction and immunogenicity of recombinant porcine parvovirus-like particles with somatostatin. *Chin J Biotech*, 2010, 26(8): 1057-1067 (in Chinese).
- [21] Schmittgen TD, Livak KJ. Analyzing real-time PCR data by the comparative CT method. *Nat Protocols*, 2008, 3(6): 1101-1108
- [22] Gong X, Liu L, Zheng F, et al. Molecular investigation of bovine viral diarrhoea virus infection in yaks (*Bos grunniens*) from Qinghai, China. *Virol J*, 2014, 11: 29.
- [23] Pande A, Carr BV, Wong SY, et al. The glycosylation pattern of baculovirus expressed envelope protein E2 affects its ability to prevent infection with bovine viral diarrhoea virus. *Virus Res*, 2005, 114(1/2): 54-62.
- [24] Wang W, Shi X, Wu Y, et al. Immunogenicity of an inactivated Chinese bovine viral diarrhoea virus 1a (BVDV 1a) vaccine cross protects from BVDV 1b infection in young calves. *Vet Immunol Immunopathol*, 2014, 160(3/4): 288-292.
- [25] Fulton RW, Cook BJ, Payton ME, et al. Immune response to bovine viral diarrhoea virus (BVDV) vaccines detecting antibodies to BVDV subtypes 1a, 1b, 2a, and 2c. *Vaccine*, 2020, 38(24): 4032-4037.
- [26] 张淑琴, 郭利, 武华. 牛病毒性腹泻弱毒疫苗免疫抗体水平与攻毒保护关系的研究. *中国奶牛*, 2012, 23: 37-38.  
Zhang SQ, Guo L, Wu H. A study on the relationship between protection against challenge and immune antibody level induced by attenuated bovine viral diarrhoea virus vaccine. *Dairy Health*, 2012, 23: 37-38 (in Chinese).
- [27] Lokhandwala S, Fang X, Waghela SD, et al. Priming cross-protective bovine viral diarrhoea virus-specific immunity using live-vectored mosaic antigens. *PLoS One*, 2017, 12(1): e0170425.
- [28] Reber AJ, Tanner M, Okinaga T, et al. Evaluation of multiple immune parameters after vaccination with modified live or killed bovine viral diarrhoea virus vaccines. *Comp Immunol Microbiol Infect Dis*, 2006, 29(1): 61-77.
- [29] Chung YC, Cheng LT, Zhang JY, et al. Recombinant E2 protein enhances protective efficacy of inactivated bovine viral diarrhoea virus 2 vaccine in a goat model. *BMC Vet Res*, 2018, 14(1): 194.

(本文责编 郝丽芳)