

• 动物及兽医生物技术 •

猪流行性腹泻 mRNA 疫苗的制备与免疫原性评价

杨利敏^{1,2*}, 王俊虹³, 徐明国¹, 王虎⁴, 张晓娟⁵, 刘文军², 陈创夫^{1*}

1 石河子大学动物科技学院 人兽共患病重点实验室, 新疆 石河子 832000

2 中国科学院微生物研究所 病原微生物与免疫学重点实验室, 北京 100101

3 天津中医药大学, 天津 301617

4 辽宁省农业发展服务中心, 辽宁 沈阳 110003

5 盘锦市现代农业发展中心, 辽宁 盘锦 124000

杨利敏, 王俊虹, 徐明国, 王虎, 张晓娟, 刘文军, 陈创夫. 猪流行性腹泻 mRNA 疫苗的制备与免疫原性评价[J]. 生物工程学报, 2023, 39(7): 2624-2633.

YANG Limin, WANG Junhong, XU Mingguo, WANG Hu, ZHANG Xiaojuan, LIU Wenjun, CHEN Chuangfu. Preparation and immunogenicity evaluation of mRNA vaccine against porcine epidemic diarrhea[J]. Chinese Journal of Biotechnology, 2023, 39(7): 2624-2633.

摘 要: 猪流行性腹泻(porcine epidemic diarrhea, PED)是一种可引起仔猪高致死率的传染性疾病, 尽管已有灭活疫苗和减毒活疫苗上市, 但由于病毒变异频繁导致保护效力欠佳, 发病率依然居高不下。本研究首次制备了 PED mRNA 候选疫苗, 并在小鼠和妊娠母猪上评价了其免疫原性, 证明了基于病毒受体结合区异源二聚体的 mRNA 候选疫苗具有良好的免疫原性, 可在小鼠上高效诱导体液和细胞免疫应答, 单次免疫血清中和抗体滴度达到 1:300 以上, 并在妊娠母猪上诱导了与灭活疫苗相近的中和抗体水平, 实现了 100%抗体转阳。本研究为 PED mRNA 疫苗的进一步产业化奠定了基础。

关键词: 猪流行性腹泻; mRNA 疫苗; 受体结合区; 体液免疫; 细胞免疫

资助项目: 国家重点研发计划(2018YFC1200602, 2018YFC1200502)

This work was supported by the National Key Research and Development Program of China (2018YFC1200602, 2018YFC1200502).

*Corresponding authors. E-mail: YANG Limin, lmyang@im.ac.cn; CHEN Chuangfu, ccf-xb@163.com

Received: 2022-10-25; Accepted: 2022-11-28; Published online: 2022-12-01

Preparation and immunogenicity evaluation of mRNA vaccine against porcine epidemic diarrhea

YANG Limin^{1,2*}, WANG Junhong³, XU Mingguo¹, WANG Hu⁴, ZHANG Xiaojuan⁵,
LIU Wenjun², CHEN Chuangfu^{1*}

1 Key Laboratory of Zoonoses, College of Animal Science and Technology, Shihezi University, Shihezi 832000, Xinjiang, China

2 Key Laboratory of Pathogenic Microbiology and Immunology, Institute of Microbiology, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100101, China

3 Tianjin University of Traditional Chinese Medicine, Tianjin 301617, China

4 Liaoning Agricultural Development Service Center, Shenyang 110003, Liaoning, China

5 Panjin Modern Agriculture Development Center, Panjin 124000, Liaoning, China

Abstract: Porcine epidemic diarrhea (PED) is a highly contagious disease that causes high mortality in suckling piglets. Although several licensed inactivated and live attenuated vaccines were widely used, the infection rate remains high due to unsatisfactory protective efficacy. In this study, mRNA vaccine candidates against PED were prepared, and their immunogenicity was evaluated in mice and pregnant sows. The mRNA PED vaccine based on heterodimer of viral receptor binding region (RBD) showed good immunogenicity. It elicited robust humoral and cellular immune responses in mice, and the neutralizing antibody titer reached 1:300 after a single vaccination. Furthermore, it induced neutralizing antibody level similar to that of the inactivated vaccine in pregnant sows. This study developed a new design of PED vaccine based on the mRNA-RBD strategy and demonstrated the potential for clinical application.

Keywords: porcine epidemic diarrhea; mRNA vaccine; receptor-binding region; humoral immune response; cellular immune response

猪流行性腹泻(porcine epidemic diarrhea, PED)是由猪流行性腹泻病毒(porcine epidemic diarrhea virus, PEDV)感染引起的一种可造成新生仔猪高死亡率的重要传染病。该病于 20 世纪 70 年代首次发现于欧洲,后传入亚洲,并从 2010 年起在我国引发多起大规模暴发,造成感染仔猪 90%以上死亡^[1],而且还会导致感染母猪的死胎、流产。PED 已成为世界上最具破坏性的猪病毒性疾病之一,每年给我国养猪业造成巨额损失。

PEDV 是单股正链 RNA 病毒,属于冠状病毒科 α 冠状病毒属。通过系统进化树分析可将 PEDV 划分为 GI 和 GII 两种基因型,两种基因型

又各自分为 a、b 两种基因亚型^[2]。经典毒株 CV777 和 DR13 属于 GIa 亚型,细胞适应株属于 GIb 亚型^[3]。我国现在的流行毒株主要是 GII 基因型,II 型比 I 型致病性更强,而且 IIb 亚型会导致仔猪高死亡率^[4]。PEDV 包含 4 个结构蛋白,分别是刺突蛋白(spike, S)、囊膜蛋白(envelope, E)、膜蛋白(membrane, M)和核衣壳蛋白(nucleocapsid, N)。S 蛋白是 PEDV 进入细胞的关键,因此是中和抗体的主要靶点。S 蛋白分为 S1 和 S2 两个亚基,位于 S1 亚基 C 端的受体结合区(receptor-binding domain, RBD)介导了病毒与细胞受体的结合。阻断 RBD 与受体结合即可有效防止病毒感染,因此 RBD 也是多个冠状病毒

毒重要的疫苗靶抗原^[5-7]。

疫苗接种是防控疫病传播的最主要手段,我国已上市的 PED 疫苗包括灭活和减毒活疫苗两种。但大部分是基于经典毒株制备,缺乏对当前流行毒株的交叉保护力,导致发病率依然居高不下。而且,疫苗接种主要采用交叉剂型两针免疫策略,即先减毒活疫苗初免再灭活疫苗加强免疫或先灭活疫苗初免再减毒活疫苗加强免疫,从而增加了接种成本和母猪应激风险。美国已获批的 PED 疫苗除灭活疫苗外,还有一种基于甲病毒技术的 RNA 颗粒疫苗,该疫苗被证明可促进母猪初乳和常乳中 IgG 和 IgA 的生成^[8-9]。多种疫苗策略被用于新型 PED 疫苗的开发,包括亚单位疫苗^[10-11]、病毒载体疫苗^[12-14]、细菌/真菌载体疫苗^[15-17]、核酸疫苗^[18-19]和转基因植物疫苗^[20-21]。多个新型疫苗展示了良好的保护效力,具有进一步临床应用的潜力。

本研究选择 PEDV RBD 作为疫苗靶抗原,制备了基于 RBD 单体和二聚体的 mRNA 疫苗,并在小鼠和妊娠母猪上评价了候选疫苗的免疫原性,证明单次免疫即可诱导良好的免疫应答,而且与活疫苗配合用作加强免疫,可使妊娠母猪获得高水平中和抗体,为 PED mRNA 疫苗的进一步临床开发应用奠定了基础。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 病毒和细胞

PEDV NB-F71 病毒分离自腹泻仔猪,经测序鉴定为流行毒株 GIIa 基因型。非洲绿猴肾细胞(Vero)、人胚肾细胞(HEK293T)由本实验室保存。

1.1.2 主要试剂

体外转录试剂盒 HiScribe T7 High Yield RNA Synthesis Kit、RNA 纯化试剂盒 Monarch

RNA Cleanup Kit 和 DNase I 酶购自 NEB 公司; RNA 加帽试剂盒 Cap 1 Capping System 购自近岸蛋白公司; RNA 定量试剂盒 Quant-iT RiboGreen RNA Assay Kit 和转染试剂 Lip2000 购自 Invitrogen 公司; 小鼠 IFN- γ ELISpot 试剂盒购自 Mabtech 公司; 可电离脂质(Dlin-MC3-DMA)、二硬脂酰磷脂酰胆碱(DSPC)、胆固醇和 PEG-脂质(PEG2000-DMG)购自上海艾伟拓公司; HRP 标记山羊抗兔 IgG、HRP 标记山羊抗小鼠 IgG、HRP 标记山羊抗猪 IgG 购自达科为生物技术有限公司; PED 减毒活疫苗购自齐鲁动物保健品公司; PED 灭活疫苗购自安徽东方帝维生物制品公司。

1.1.3 实验动物

6 周龄无特定病原体(specific pathogen free, SPF)级雌性 BALB/c 小鼠购自北京维通利华实验动物有限公司。动物实验经中国科学院微生物研究所实验动物伦理委员会批准(批准号: SQIMCAS2022002)。

1.2 实验方法

1.2.1 转录载体的构建

对 PEDV 流行毒株 GIIa (GenBank 登录号: MH816969)和 GIIb (GenBank 登录号: MF152604)的 RBD 区编码序列(Phe₄₇₈-Asp₆₄₀)进行哺乳动物源密码子优化。分别设计一个 RBD 单体(RBD-monomer, RBD-M)和一个 GIIa/GIIb RBD 异源二聚体(RBD-dimer, RBD-D),二聚体两个 RBD 间隔一个甘氨酸/丝氨酸柔性链接;在单体和二聚体的 5'端融合组织纤溶酶原激活因子(tissue plasminogen activator, tPA)信号肽以实现 RBD 的分泌表达,然后两端分别添加 β -珠蛋白(β -globin)的 5'非编码区(5'-untranslated region, 5'-UTR)和 3'-UTR, 3'-UTR 后连接长度为 110 bp 的 polyA 尾。将设计的两个基因序列交由南京金斯瑞生物科技有限公司合成,并将目标基因序列

通过 *Kpn* I 和 *Eco*R I 双酶切克隆入 pBluescript II-SK(+)载体, 分别获得 pBluescript II-SK(+)-RBD-M 和 pBluescript II-SK(+)-RBD-D 两个质粒。

1.2.2 制备 mRNA

分别将两个质粒用 *Bam*H I 单酶切, 然后琼脂糖凝胶电泳鉴定并回收纯化, 获得线性化质粒。采用 T7 High Yield RNA Synthesis 试剂盒对线性化质粒进行体外转录, 配制体系时将 UTP 替换为假尿嘧啶核苷酸, 37 °C 反应 1 h 后, 体系中加入 1 μ L DNase I 酶再反应 15 min, 以去除体系中的线性质粒模板。将反应产物用 Monarch RNA Cleanup Kit 进行 RNA 纯化。将转录获得的 mRNA 继续进行加帽反应, 采用 Cap 1 Capping System 试剂盒在 RNA 的 5'末端添加 7-甲基鸟苷帽结构(m⁷Gppp), 并对加帽 RNA 进行纯化。所有操作参照试剂盒说明书进行。

1.2.3 制备 LNPs

将可电离阳离子脂质(Dlin-MC3-DMA)、胆固醇、二硬脂酰磷脂酰胆碱(distearylphosphatidylcholine, DSPC)和 PEG-脂质(PEG2000-DMG)以摩尔比 50:38.5:10:1.5 溶解于乙醇中, 与溶于 50 mmol/L 柠檬酸缓冲液(pH 4.0)的 mRNA 溶液按照 1:3 的体积比通过微流体纳米混合器(NanoAssemblr), 组装成脂质纳米颗粒(lipid nanoparticles, LNPs)。将组装的 LNPs 进一步用磷酸盐缓冲液(pH 7.4)透析, 超滤浓缩, 0.22 μ m 滤膜过滤除菌, 保存于含有 2%蔗糖的 PBS 中。

1.2.4 鉴定 LNPs

采用透射电镜(JEM-1400, JEDL)和粒径仪对制备的 LNPs 进行粒径和均一度分析。使用 1% 终浓度的 Triton-100 对获得的 LNPs 进行破乳处理, 可使 LNPs 包裹的 mRNA 释放到溶液中, 采用 Quant-iT RiboGreen RNA Assay Kit 对溶液中的 mRNA 进行精确定量。通过计算破乳前后

mRNA 量的差值, 除以总核酸量即得到 LNPs 包封率。

1.2.5 Western blotting 分析

将 2 μ g mRNA 和 4 μ L Lip2000 脂质体分别溶于 100 μ L Opti-MEM 培养基并混合, 转染汇合度达 90%的 HEK293T 细胞, 24 h 后收集细胞上清进行 SDS-PAGE, 转膜到 PVDF 膜上, 5% 脱脂奶粉封闭, 一抗用 PEDV 特异兔多抗, 二抗用 HRP 标记羊抗兔 IgG 抗体, 加显色液后用化学发光仪拍照。

1.2.6 小鼠免疫

25 只雌性 BALB/c 小鼠随机分为 5 组, 每组 5 只, 其中 4 组免疫组, 一组 PBS 对照组。将制备的 RBD 单体和二聚体 mRNA 候选疫苗分别免疫小鼠(肌肉注射), 采用 5 μ g 和 15 μ g 2 个免疫剂量, 共免疫 2 次, 间隔 4 周, 分别于 0、2、4、5 周采集尾血分离血清, 检测抗体水平。免疫后 5 周, 小鼠断颈处死取脾脏, 分离脾细胞进行酶联免疫斑点法(enzyme-linked immunospot assay, ELISpot)鉴定。

1.2.7 妊娠母猪免疫

选取辽宁某种猪场妊娠母猪 10 只, 分为 2 组, 每组 5 只。于产前 7 周接种 PEDV 流行毒株减毒活疫苗(LW/L 株), 于产前 3 周分别接种 RBD 二聚体 mRNA 候选疫苗(50 μ g)或流行毒株灭活疫苗(AJ1102 株)。分别于产前 3 周和 1 周采血分离血清, 检测抗体水平。

1.2.8 间接 ELISA

用包被液稀释原核表达的 PEDV RBD 重组蛋白至终浓度 2 μ g/mL, 100 μ L/孔, 4 °C, 包被过夜; PBST 洗涤 3 次; 3% BSA, 37 °C 封闭 2 h; PBST 洗涤 3 次; 加入 100 μ L/孔梯度稀释的小鼠或猪血清, 37 °C 反应 1 h; PBST 洗涤 3 次; HRP 标记山羊抗鼠 IgG 或 HRP 标记羊抗猪 IgG 作为二抗, 100 μ L/孔, 37 °C 反应 1 h; PBST 洗涤

3次;加入显色液 TMB 显色 10 min,加入终止液终止反应。酶标仪读取 450 nm 处吸收值。将阳性孔(≥ 2.1 倍阴性平均读值)最大稀释倍数倒数定为 ELISA 抗体滴度。

1.2.9 中和抗体测定

将采集的小鼠或猪血清 56 °C 灭活 30 min,用无血清 DMEM 培养基 2 倍梯度稀释至 1:2 048,与含 200 TCID₅₀ 的 PEDV NB-F71 病毒等体积混合,并在 37 °C 孵育 1 h。将混合物转移到含有 Vero 单层细胞的 96 孔板中,置于二氧化碳培养箱中,37 °C 孵育 5 d,观察细胞病变(cytopathic effect, CPE)。记录能抑制 50% 以上细胞出现 CPE 的血清最高稀释度,按 Reed-Muench 法计算中和抗体滴度(NT₅₀)。

1.2.10 IFN- γ ELISpot

由南京金斯瑞生物科技有限公司合成覆盖 PEDV RBD 蛋白序列的重叠 15 短肽(重叠 11 个氨基酸)。将分离的小鼠脾细胞用含 10% 胎牛血清的 1640 完全培养基稀释至 2×10^5 cell/mL,然后加入预包被有小鼠 IFN- γ 抗体的 96 孔 ELISpot 板中;继续加入 0.1 mL 重叠短肽(10 μ g/mL),37 °C 孵育 36 h。用 PBS 洗涤 5 遍。加入 0.1 mL 生物素化抗鼠 IFN- γ 抗体(1 μ g/mL),室温孵育 2 h。用 PBS 洗涤 5 遍。加入 0.1 mL 链霉亲和

素-HRP,室温孵育 1 h, PBS 洗涤 5 遍。加入 TMB 底物溶液显影,至出现明显斑点,用纯水冲洗终止反应。用 ELISpot 分析仪读取斑点数量,计算每 10^6 个细胞的斑点形成细胞数。

2 结果与分析

2.1 PED mRNA 候选疫苗的制备和鉴定

通过体外转录和封装,制备了两种包载有编码 PEDV RBD mRNA 的 LNPs,分别为 RBD 单体(RBD-M)和 RBD 异源二聚体(RBD-D)。为了实现所表达蛋白分泌到细胞外,编码基因 5' 端融合了 tPA 信号肽,另外为增加 mRNA 稳定性,在编码基因两端还增加了帽子结构、UTR 和一个长 110 bp 的 polyA 尾(图 1)。通过透射电镜检测制备的两种 LNPs,可观察到 LNPs 呈球形颗粒形态(图 2A、2D);粒径仪分析显示,RBD-M 和 RBD-D LNPs 平均粒径分别为 101 nm 和 106 nm,聚合物分散性指数(polymer dispersity index, PDI)为 0.11 (图 2B、2E)。两者包封率均达到 90% 以上。mRNA 转染 Vero 细胞后可实现 RBD 单体和二聚体表达并高效分泌至培养基上清液中,分子量比预期略大,应为 RBD 蛋白糖基化所致(图 2C、2F)。

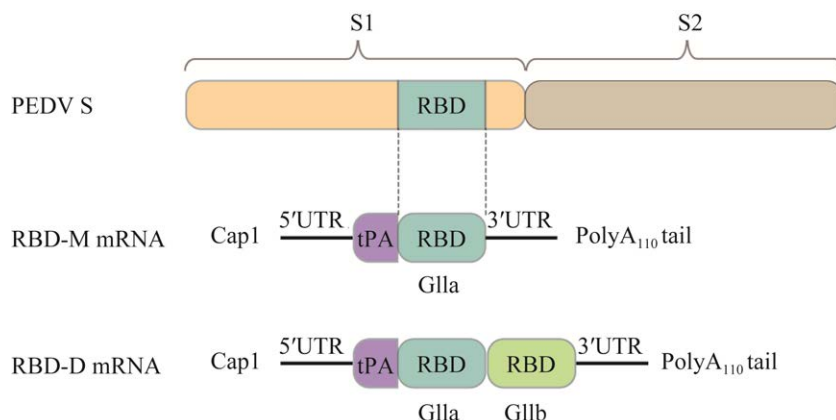


图 1 PED mRNA 候选疫苗设计示意图

Figure 1 Schematic design of PED mRNA vaccine candidates.

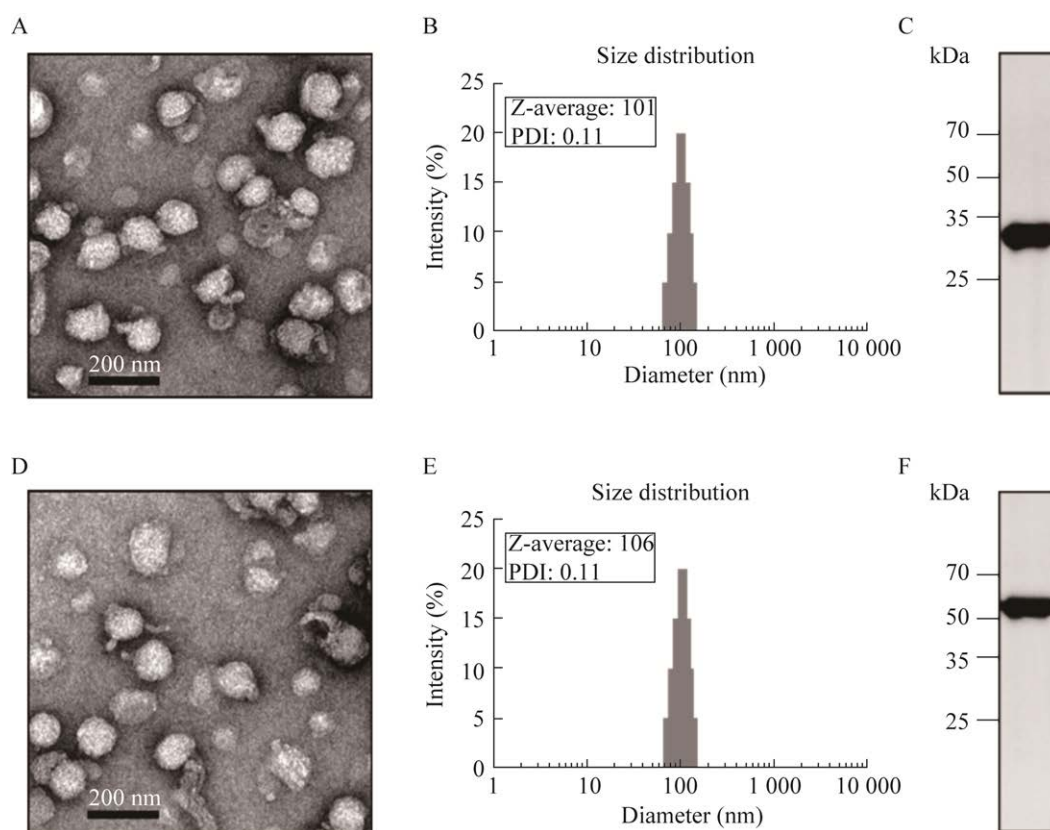


图2 PED mRNA 候选疫苗的鉴定

Figure 2 Characterization of PED mRNA vaccine candidates. A, D: Representative transmission negative staining electron microscopy image of PEDV RBD-M and RBD-D mRNA-LNPs. B, E: Particle size of RBD-M and RBD-D mRNA-LNPs were determined by dynamic light scattering. C, F: Analysis of antigen expression by Western blotting.

2.2 mRNA 疫苗在小鼠上的免疫原性

将 RBD 单体和二聚体 mRNA 候选疫苗分别采用 5 μg 和 15 μg 两个剂量免疫 BALB/c 小鼠,并检测血清中结合抗体和中和抗体水平(图 3A)。免疫后,观察期内注射部位未出现局部炎症反应或其他不良反应。小鼠免疫后 2 周即可检测到 RBD 特异结合抗体(ELISA)和中和抗体(NT_{50}),免疫后 4 周抗体水平进一步升高,中和抗体滴度平均值分别达到 113.2 (RBD-M, 5 μg)、255.2 (RBD-M, 15 μg)、344.4 (RBD-D, 5 μg)和 429.2 (RBD-D, 15 μg)。加强免疫后抗体水平进一步提升,中和抗体滴度平均值分别

达到 220.2 (RBD-M, 5 μg)、431.4 (RBD-M, 15 μg)、552.8 (RBD-D, 5 μg)和 836.0 (RBD-D, 15 μg)。相比 RBD-D 免疫原,相同剂量 RBD-M 诱导的抗体水平偏低,而且接种 15 μg RBD-M 诱导的抗体水平与接种 5 μg RBD-D 相当($P>0.05$),提示 RBD-D 具有更好的免疫原性,需要的接种剂量更低(图 3B、3C)。结合抗体与中和抗体结果具有较好的相关性。另外,结果显示,只需单次免疫 RBD-D mRNA 候选疫苗即可在小鼠上获得较高水平的中和抗体,提示该候选疫苗有望开发成为一种单针免疫疫苗。为了评价疫苗诱导细胞免疫应答的能力,小鼠

加强免疫后 1 周采集脾脏分离脾细胞,用 RBD 重叠多肽刺激后检测分泌 IFN- γ 的细胞数量,从而确认候选疫苗诱导产生的 PEDV 特异记忆性 T 淋巴细胞的数量。结果显示,4 个免疫组小鼠均产生了 PEDV 特异细胞免疫应答,RBD-M (5 μ g) 组偏低,其他 3 组无显著性差异,不过 RBD-D 组分泌 IFN- γ 的细胞数量总体要比 RBD-M 组更高,结果与抗体反应相似(图 3D),证明了 mRNA 候选疫苗可以在小鼠上诱导细胞免疫反应。

2.3 mRNA 疫苗在妊娠母猪上的免疫原性

为进一步评价 mRNA 疫苗在猪上的免疫原性,在妊娠母猪产前 7 周先免疫减毒活疫苗,

4 周后分别免疫 RBD-D mRNA 候选疫苗或灭活疫苗,对两种疫苗诱导的抗体水平进行比较(图 4A)。mRNA 疫苗免疫后,观察期内注射部位未出现局部炎症反应或其他不良反应。结果显示,初免后 4 周,所有母猪可检测到结合抗体,80% 的母猪中和抗体转阳,中和抗体平均滴度达到 90.4。加强免疫后 2 周所有母猪中和抗体转阳,加强免疫前后抗体水平存在显著性差异。mRNA 和灭活疫苗诱导的中和抗体平均滴度分别达到 531.8 和 464.8,两个免疫组抗体水平无显著性差异(图 4B、4C),提示 mRNA 可诱导与灭活疫苗相近的抗体水平。

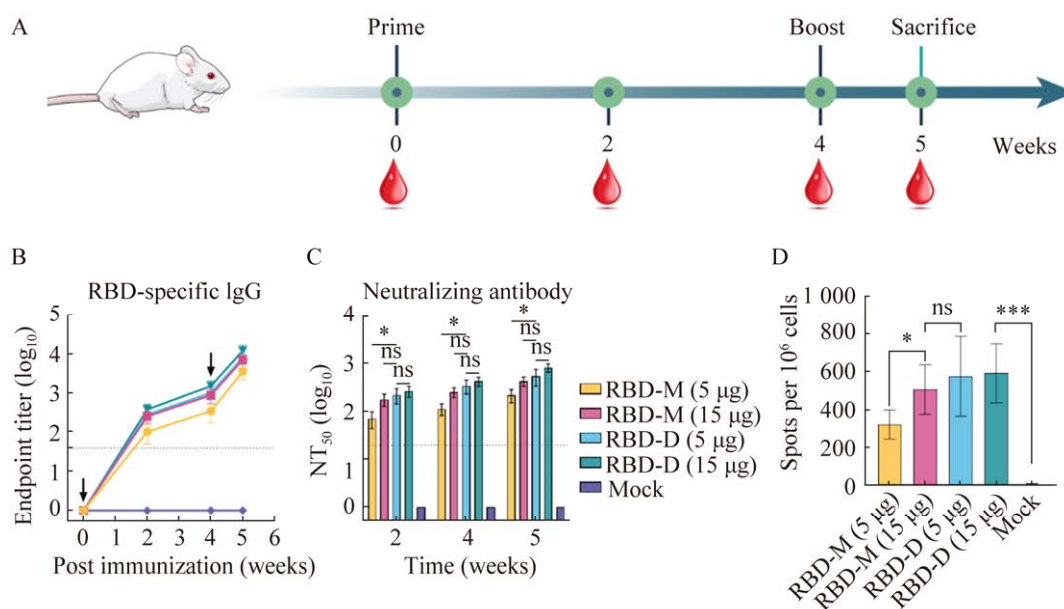


图 3 PED mRNA 候选疫苗在小鼠体内免疫原性评价

Figure 3 PED mRNA vaccine candidates testing in BALB/c mice. A: Scheme of prime-boost immunization of BALB/c mice with doses of 5 or 15 μ g of RBD-M or RBD-D mRNA vaccine candidates. Blood drops indicate blood sampling time points. B: PEDV-specific binding antibodies were assessed by ELISA. Dotted lines indicate detection limit. C: Neutralizing antibodies against the PEDV NB-F71 strain were measured. Dotted lines indicate detection limit. D: Spleens and splenocytes were collected at weeks 5 for IFN- γ detection by ELISpot after stimulation with PEDV RBD peptide pools. Data are shown as $\bar{x} \pm s$ (standard errors of means). *P* values were analyzed by Student's *t* test (ns: $P > 0.05$; *: $P < 0.05$; ***: $P < 0.001$).

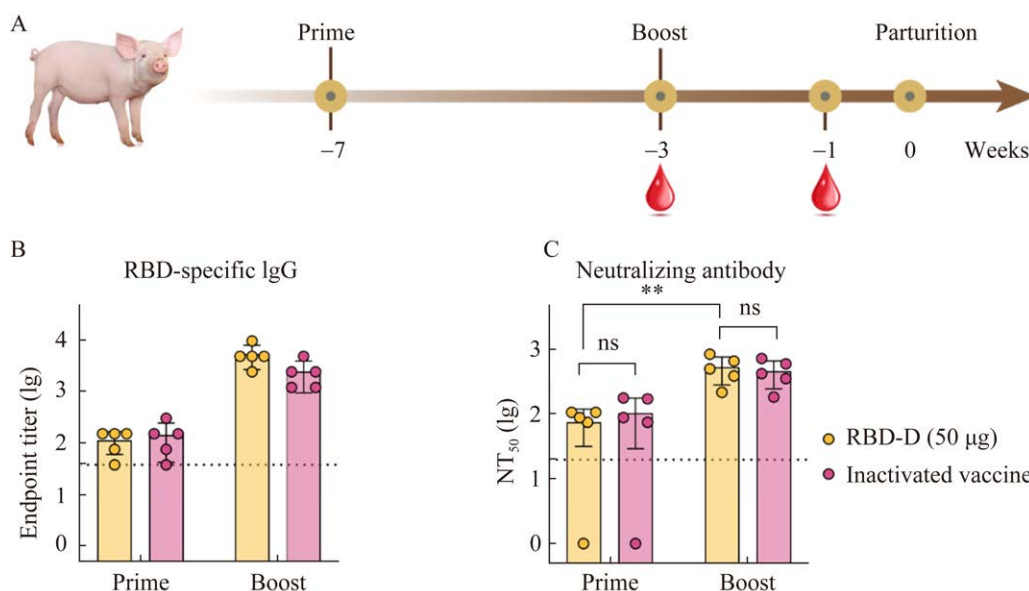


图4 PED mRNA 候选疫苗在妊娠母猪体内免疫原性评价

Figure 4 PED mRNA vaccine candidates testing in pregnant sows. A: Flow chart of PED mRNA vaccines immunogenicity evaluation. B: PEDV specific binding antibodies were assessed by ELISA. Dotted lines indicate detection limit. C: Neutralizing antibodies against PEDV NB-F71 strain were measured. Dotted lines indicate detection limit. Data are shown as $\bar{x} \pm s$. *P* values were analyzed by Student's *t* test (ns: *P* > 0.05; **: *P* < 0.01).

3 讨论

PEDV 可感染各生长阶段的猪,引起严重肠道疾病,初生仔猪会导致 80%–100% 的死亡,断奶猪和育肥猪则会持续腹泻 5–7 d,母猪会出现死胎、流产。因此控制 PEDV 感染具有重要意义。尽管减毒活疫苗和灭活疫苗已被广泛使用,但发病率依然居高不下。最主要的原因是已上市的大部分疫苗基于原始经典毒株(GI基因型)开发,对于当前流行毒株(GII基因型)缺乏交叉保护,另外,即使针对流行毒株开发的疫苗,也仅是针对其中一个亚型,而我国的 PEDV 流行毒株分为 GIIa 和 GIIb 两个亚型,它们之间也无法实现完全交叉保护^[22]。其次,减毒活疫苗可诱导细胞免疫应答,但诱导的抗体水平偏低;灭活疫苗尽管能够诱导较高的抗体水平,但不能诱导细胞免疫应答,因此两种疫苗策略均存在一定的

技术局限性。尽管中和抗体在阻止冠状病毒感染方面起到关键作用,细胞免疫在清除病毒感染细胞,延长免疫保护期方面也具有不可或缺的价值,一种优秀的 PED 疫苗应能够平衡体液和细胞免疫应答,使其相互协助达到最佳免疫保护效果^[23]。

mRNA 疫苗是近些年兴起的一种新型核酸疫苗,已有针对病毒的 mRNA 疫苗获批上市,目前还有多个病原的 mRNA 候选疫苗处于临床试验阶段^[24]。相较传统疫苗,它具有多个优势,包括:(1)易于设计,可随时根据需要调整疫苗 mRNA 序列以适应病毒变异;(2)mRNA 在细胞质中完成靶抗原的翻译,不进入细胞核,因此相比 DNA 疫苗安全性更佳;(3)生产过程不涉及病毒,主要通过体外酶促反应获得,对生产环境的生物安全要求不高;(4)接种后涉及内源性抗原表达,因此可诱导类似活疫苗的强体液和细胞免疫应答^[25]。本研究首次将 mRNA 疫苗研发策略用

于 PED 疫苗的开发,并证明了其良好的免疫效果。

为了增加 PED 疫苗的交叉保护能力,考虑到国内目前流行毒株为 GII 基因型^[22],本研究设计了一种 RBD 异源二聚体 mRNA 疫苗,它包含当前流行毒株 GIIa 和 GIIb 的核心抗原,因此有望实现对不同 PEDV 毒株感染的广谱免疫保护。另外,本研究发现相比 RBD 单体,RBD 二聚体诱导的抗体水平更高、所需免疫剂量更低,而且同等剂量下诱导的细胞免疫应答也更强,分析认为应该是二聚体的分子量更大,免疫原性更强所致。目前 PED 疫苗接种多采用两针免疫策略,包括同剂型接种和交叉剂型接种,而交叉剂型接种又分为先用减毒活疫苗初免再用灭活疫苗加强,和先用灭活疫苗初免再用减毒活疫苗加强两种方式。本研究发现,经 mRNA 单次免疫,小鼠中和抗体平均滴度就可以达到 300 以上,提示 PED mRNA 疫苗有望开发成为一种单针疫苗,这将大幅降低疫苗接种成本和免疫强度,而且可有效避免母猪产前接种导致的应激、流产现象。另外,其也可以用于加强免疫,以获得更高水平的中和抗体,因此具有良好的实际应用价值。

综上所述,本研究共制备了 2 种 PED mRNA 候选疫苗,证明了 RBD 二聚体 mRNA 疫苗具有良好的免疫原性,可诱导小鼠产生高滴度中和抗体和针对 PEDV 特异细胞免疫应答,而且单针免疫即可获得良好的免疫效果。作为加强针免疫母猪,可获得与灭活疫苗相近的中和抗体水平。本研究为 PED mRNA 疫苗的进一步临床评价奠定了基础。

REFERENCES

- [1] SUN RQ, CAI RJ, CHEN YQ, LIANG PS, CHEN DK, SONG CX. Outbreak of porcine epidemic diarrhea in suckling piglets, China[J]. *Emerging Infectious Diseases*, 2012, 18(1): 161-163.
- [2] WANG XB, CHEN JF, SHI D, SHI HY, ZHANG X, YUAN J, JIANG SB, FENG L. Immunogenicity and antigenic relationships among spike proteins of porcine epidemic diarrhea virus subtypes G1 and G2[J]. *Archives of Virology*, 2016, 161(3): 537-547.
- [3] 董世娟, 谢春芳, 司伏生, 陈冰清, 于瑞嵩, 李震. 猪流行性腹泻病毒免疫及疫苗研制[J]. *生物工程学报*, 2021, 37(8): 2603-2613.
DONG SJ, XIE CF, SI FS, CHEN BQ, YU RS, LI Z. Immunization against porcine epidemic diarrhea virus and vaccine development[J]. *Chinese Journal of Biotechnology*, 2021, 37(8): 2603-2613 (in Chinese).
- [4] LIU XS, ZHANG QL, ZHANG LP, ZHOU P, YANG J, FANG YZ, DONG ZL, ZHAO DH, LI WY, FENG JX, CUI BF, ZHANG YG, WANG YL. A newly isolated Chinese virulent genotype GIIb porcine epidemic diarrhea virus strain: biological characteristics, pathogenicity and immune protective effects as an inactivated vaccine candidate[J]. *Virus Research*, 2019, 259: 18-27.
- [5] LI CH, LI WT, LUCIO de ESESARTE E, GUO HB, van den ELZEN P, AARTS E, van den BORN E, ROTTIER PJM, BOSCH BJ. Cell attachment domains of the porcine epidemic diarrhea virus spike protein are key targets of neutralizing antibodies[J]. *Journal of Virology*, 2017, 91(12): e00273-e00217.
- [6] MAKADIYA N, BROWNLIE R, van den HURK J, BERUBE N, ALLAN B, GERDTS V, ZAKHARTCHOUK A. S1 domain of the porcine epidemic diarrhea virus spike protein as a vaccine antigen[J]. *Virology Journal*, 2016, 13: 57.
- [7] YANG LM, TIAN DY, HAN JB, FAN WH, ZHANG Y, LI YL, SUN WQ, WEI YQ, TIAN XD, YU DD, FENG XL, CHENG G, BI YH, ZHENG YT, LIU WJ. A recombinant receptor-binding domain in trimeric form generates protective immunity against SARS-CoV-2 infection in nonhuman primates[J]. *The Innovation*, 2021, 2(3): 100140.
- [8] GERDTS V, ZAKHARTCHOUK A. Vaccines for porcine epidemic diarrhea virus and other swine coronaviruses[J]. *Veterinary Microbiology*, 2017, 206: 45-51.
- [9] KIM H, LEE YK, KANG SC, HAN BK, CHOI KM. Recent vaccine technology in industrial animals[J]. *Clinical and Experimental Vaccine Research*, 2016, 5(1): 12-18.
- [10] SHI DY, FAN BC, SUN B, ZHOU JZ, ZHAO YX, GUO RL, MA ZJ, SONG T, FAN HY, LI JZ, LI L, LI B. LDH nanoparticle adjuvant subunit vaccine induces an effective immune response for porcine epidemic diarrhea virus[J]. *Virology*, 2022, 565: 58-64.
- [11] YU JS, SREENIVASAN C, UPRETY T, GAO RY,

- HUANG C, LEE EJ, LAWSON S, NELSON J, CHRISTOPHER-HENNINGS J, KAUSHIK RS, NELSON E, DIEL DG, HAUSE BM, LI F, WANG D. Piglet immunization with a spike subunit vaccine enhances disease by porcine epidemic diarrhea virus[J]. *Npj Vaccines*, 2021, 6: 22.
- [12] do VT, JANG J, PARK J, DAO HT, KIM K, HAHN TW. Recombinant adenovirus carrying a core neutralizing epitope of porcine epidemic diarrhea virus and heat-labile enterotoxin B of *Escherichia coli* as a mucosal vaccine[J]. *Archives of Virology*, 2020, 165(3): 609-618.
- [13] KE Y, YU D, ZHANG FQ, GAO J, WANG XY, FANG XK, WANG HG, SUN T. Recombinant vesicular stomatitis virus expressing the spike protein of genotype 2b porcine epidemic diarrhea virus: a platform for vaccine development against emerging epidemic isolates[J]. *Virology*, 2019, 533: 77-85.
- [14] YUAN XM, LIN HX, LI B, HE KW, FAN HJ. Efficacy and immunogenicity of recombinant swinepox virus expressing the truncated S protein of a novel isolate of porcine epidemic diarrhea virus[J]. *Archives of Virology*, 2017, 162(12): 3779-3789.
- [15] MA ST, WANG L, HUANG XW, WANG XN, CHEN S, SHI W, QIAO XY, JIANG YP, TANG LJ, XU YG, LI YJ. Oral recombinant *Lactobacillus* vaccine targeting the intestinal microfold cells and dendritic cells for delivering the core neutralizing epitope of porcine epidemic diarrhea virus[J]. *Microbial Cell Factories*, 2018, 17(1): 20.
- [16] WANG XN, WANG L, HUANG XW, MA ST, YU ML, SHI W, QIAO XY, TANG LJ, XU YG, LI YJ. Oral delivery of probiotics expressing dendritic cell-targeting peptide fused with porcine epidemic diarrhea virus COE antigen: a promising vaccine strategy against PEDV[J]. *Viruses*, 2017, 9(11): 312.
- [17] WANG XL, WANG ZB, XU HY, XIANG B, DANG RY, YANG ZQ. Orally administrated whole yeast vaccine against porcine epidemic diarrhea virus induced high levels of IgA response in mice and piglets[J]. *Viral Immunology*, 2016, 29(9): 526-531.
- [18] YIN Y, ZHU L, LIU PJ, ZHAO J, FAN Y, SUN XG, XU ZW. Evaluation on the efficacy and immunogenicity of recombinant DNA plasmids expressing S gene from porcine epidemic diarrhea virus and VP7 gene from porcine rotavirus[J]. *Brazilian Journal of Microbiology*, 2019, 50(1): 279-286.
- [19] ZHANG YD, ZHANG XH, LIAO XD, HUANG XB, CAO SJ, WEN XT, WEN YP, WU R, LIU WM. Construction of a bivalent DNA vaccine co-expressing S genes of transmissible gastroenteritis virus and porcine epidemic diarrhea virus delivered by attenuated *Salmonella typhimurium*[J]. *Virus Genes*, 2016, 52(3): 354-364.
- [20] HUY NX, KIM SH, YANG MS, KIM TG. Immunogenicity of a neutralizing epitope from porcine epidemic diarrhea virus: M cell targeting ligand fusion protein expressed in transgenic rice calli[J]. *Plant Cell Reports*, 2012, 31(10): 1933-1942.
- [21] HUY NX, YANG MS, KIM TG. Expression of a cholera toxin B subunit-neutralizing epitope of the porcine epidemic diarrhea virus fusion gene in transgenic lettuce (*Lactuca sativa* L.)[J]. *Molecular Biotechnology*, 2011, 48(3): 201-209.
- [22] LIU XS, ZHANG LP, ZHANG QL, ZHOU P, FANG YZ, ZHAO DH, FENG JX, LI WY, ZHANG YG, WANG YL. Evaluation and comparison of immunogenicity and cross-protective efficacy of two inactivated cell culture-derived GIIa- and GIIb-genotype porcine epidemic diarrhea virus vaccines in suckling piglets[J]. *Veterinary Microbiology*, 2019, 230: 278-282.
- [23] 杨利敏, 田德雨, 刘文军. 新型冠状病毒疫苗研究策略分析[J]. *生物工程学报*, 2020, 36(4): 593-604.
- YANG LM, TIAN DY, LIU WJ. Strategies for vaccine development of COVID-19[J]. *Chinese Journal of Biotechnology*, 2020, 36(4): 593-604 (in Chinese).
- [24] 王戡, 白岳丘, 田易晓, 王新月, 黄庆生. mRNA 疫苗在疾病预防与治疗中的研究进展与展望[J]. *中国生物工程杂志*, 2022, 1-17.
- WANG Y, BAI YQ, TIAN YX, WANG XY, HUANG QS. Prospects and outlook of mRNA vaccines used in the prevention and therapies of diseases[J]. *China Biotechnology*, 2022, 1-17 (in Chinese).
- [25] 马宁, 年悬悬, 刘京, 邓涛, 张国梅, 吕传硕, 乐洋, 周蓉, 龚铮, 张家友, 杨晓明. 甲型 H1N1 流感病毒 mRNA 疫苗的制备及其免疫原性评价[J]. *中国生物制品学杂志*, 2022, 35(8): 907-911, 917.
- MA N, NIAN XX, LIU J, DENG T, ZHANG GM, LV CS, LE Y, ZHOU R, GONG Z, ZHANG JY, YANG XM. Preparation and immunogenicity evaluation of mRNA vaccine against influenza a (H1N1) virus[J]. *Chinese Journal of Biologicals*, 2022, 35(8): 907-911, 917 (in Chinese).

(本文责编 陈宏宇)