

• 动物及兽医生物技术 •

猪 δ 冠状病毒与猪流行性腹泻病毒的受体结合区融合表达及免疫原性分析

全力心¹, 芦延珍¹, 于瑞明¹, 张莉萍², 刘霞¹, 王永录², 杜晓华^{1*}, 刘新生^{2*}

1 甘肃农业大学 动物医学院, 甘肃 兰州 730070

2 中国农业科学院兰州兽医研究所 动物疫病防控全国重点实验室, 甘肃 兰州 730046

全力心, 芦延珍, 于瑞明, 张莉萍, 刘霞, 王永录, 杜晓华, 刘新生. 猪 δ 冠状病毒与猪流行性腹泻病毒的受体结合区融合表达及免疫原性分析[J]. 生物工程学报, 2024, 40(7): 2150-2161.

TONG Lixin, LU Yanzhen, YU Ruiming, ZHANG Liping, LIU Xia, WANG Yonglu, DU Xiaohua, LIU Xinsheng. Fusion expression and immunogenicity of receptor-binding domains of porcine deltacoronavirus and porcine epidemic diarrhea virus[J]. Chinese Journal of Biotechnology, 2024, 40(7): 2150-2161.

摘要: 为了研发出一种可同时预防猪德尔塔冠状病毒(porcine deltacoronavirus, PDCoV)和猪流行性腹泻病毒(porcine epidemic diarrhea virus, PEDV)两种病毒病的有效二联亚单位疫苗, 本研究将PDCoV的受体结合域(receptor binding domain, RBD)与PEDV的RBD基因进行串联, 构建至真核表达载体pCDNA3.1(+)中, 利用哺乳动物细胞ExpiCHOTM表达系统表达纯化出PDCoV-RBD-PEDV-RBD(简称为pdRBD-peRBD)融合蛋白, 以3种不同剂量(10、20和30 μ g)免疫小鼠, 利用ELISA和流式细胞术评估该融合蛋白诱导的体液免疫反应和细胞免疫反应, 利用病毒微量中和试验测定免疫小鼠血清对PDCoV或PEDV的中和效价。结果表明, 3个不同剂量组在加强免疫后均诱发了高水平的IgG抗体, 不同剂量组间抗体水平没有明显差异, 说明10 μ g的免疫剂量即可达到较好免疫效果。流式细胞术检测结果显示, 免疫组的CD₃⁺CD₄⁺T细胞比例显著升高, CD₃⁺CD₈⁺T细胞比例相对较低, 这符合亚单位疫苗主导机体产生体液免疫反应的预期。同时, 对血清中细胞因子白细胞介素-2(interleukin-2, IL-2)、白细胞介素-4(interleukin-4, IL-4)和干扰素- γ (interferon- γ , IFN- γ)的含量进行了检测, 结果表明该融合蛋白诱导了良好的体液免疫效果, 同时还产生了一定的细胞免疫应答。中和试验结果表明, 10 μ g免疫剂量所诱导的抗体即可在体外有效中和PDCoV和PEDV两种病毒, 效价分别为1:179.25和1:141.21。上述研究结果表明, pdRBD-peRBD融合蛋白10 μ g免疫剂量即可诱导高水平的体液免疫反应, 诱导的抗体可同时中和PDCoV和PEDV两种病毒, 说明pdRBD-peRBD融合蛋白有望成为一种能同时预防PDCoV和PEDV的有效二联亚单位疫苗。

关键词: 猪德尔塔冠状病毒; 猪流行性腹泻病毒; 受体结构域; 亚单位疫苗

资助项目: 所级基本科研业务费(1610312021011); 国家生猪技术创新中心(NCTIP-XD/C 03)

This work was supported by the Institute-level Basic Scientific Research Business Expenses (1610312021011) and the National Center of Technology Innovation for Pigs (NCTIP-XD/C 03).

*Corresponding authors. E-mail: DU Xiaohua, duxh@gsau.edu.cn; LIU Xinsheng, liuxinsheng@caas.cn

Received: 2023-12-06; Accepted: 2024-04-07; Published online: 2024-05-17

Fusion expression and immunogenicity of receptor-binding domains of porcine deltacoronavirus and porcine epidemic diarrhea virus

TONG Lixin¹, LU Yanzhen¹, YU Ruiming¹, ZHANG Liping², LIU Xia¹, WANG Yonglu², DU Xiaohua^{1*}, LIU Xinsheng^{2*}

¹ College of Veterinary Medicine, Gansu Agricultural University, Lanzhou 730070, Gansu, China

² State Key Laboratory for Animal Disease Control and Prevention, Lanzhou Veterinary Research Institute, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Lanzhou 730046, Gansu, China

Abstract: This study aims to develop an effective bivalent subunit vaccine that is promising to prevent both porcine deltacoronavirus (PDCoV) and porcine epidemic diarrhea virus (PEDV). The receptor-binding domains (RBDs) of PDCoV and PEDV were fused and cloned into the eukaryotic expression vector pCDNA3.1(+). The fusion protein PDCoV-RBD-PEDV-RBD (pdRBD-peRBD) was expressed by the ExpiCHOTM expression system and purified. Mice were immunized with the fusion protein at three different doses (10, 20, and 30 μ g). The humoral immune response and cellular immune response induced by the fusion protein were evaluated by ELISA and flow cytometry. The neutralization titers of the serum of immunized mice against PDCoV and PEDV were determined by the microneutralization test. The results showed that high levels of IgG antibodies were induced in the three different dose groups after booster immunization, and there was no significant difference in the antibody level between different dose groups, indicating that the immunization dose of 10 μ g could achieve the fine immune effect. The results of flow cytometry showed that the immunization groups demonstrated increased proportion of CD3⁺CD4⁺ T cells and decreased proportion of CD3⁺CD8⁺ T cells, which was consistent with the expectation about the humoral immune response induced by the subunit vaccine. At the same time, the levels of interleukin (IL)-2, IL-4, and interferon (IFN)- γ in the serum were determined. The results showed that the fusion protein induced both humoral immune effect and cellular immune response. The results of the neutralization test showed that the antibody induced by 10 μ g fusion protein neutralized both PDCoV and PEDV *in vitro*, with the titers of 1:179.25 and 1:141.21, respectively. The above results suggested that the pdRBD-peRBD could induce a high level of humoral immune response at a dose of 10 μ g, and the induced antibody could neutralize both PDCoV and PEDV. Therefore, the fusion protein pdRBD-peRBD is expected to be an effective subunit vaccine that can simultaneously prevent PDCoV and PEDV.

Keywords: porcine deltacoronavirus; porcine epidemic diarrhea virus; receptor binding domain; subunit vaccine

猪德尔塔冠状病毒(porcine deltacoronavirus, PDCoV)是一种新发猪肠道冠状病毒,各个年龄段的猪皆可感染,其中哺乳仔猪感染后临床症状最为严重,主要表现为急性呕吐、腹泻、脱水死亡^[1]。PDCoV 感染哺乳仔猪后的临床表现与猪流行性腹泻和传染性胃肠炎一致,致死率一般比两者较低,但 PDCoV 与猪流行性腹泻病毒(porcine epidemic diarrhea virus, PEDV)或猪传染性胃肠炎病毒(swine transmissible gastroenteritis virus, TGEV)的混合感染可导致更加严重的临床症状和更高的致死率,严重危害全球生猪养殖业^[2-3]。2012年, Woo 等^[4]在中国香港分离出一株新型感染猪的冠状病毒 HKU15,被确定为猪德尔塔冠状病毒,这是 PDCoV 被首次报道。紧接着,2014年,美国俄亥俄州暴发由 PDCoV 引起的重大疫情,在猪腹泻样本中 PDCoV 阳性检出率达 90%以上^[5]。随后,美国、加拿大、韩国、中国及其他国家都相继暴发了严重的 PDCoV 疫情, PDCoV 呈现全球蔓延的趋势^[6-9]。

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)引起的一种以腹泻、呕吐、脱水和对哺乳仔猪高致死率为主要特征的急性、高度接触性猪肠道传染病^[10]。自 1971 年英国首次发生 PED 以来,该病在许多欧洲国家,如比利时、捷克、匈牙利、法国、意大利等相继暴发^[11]。1986 年,我国首次报道了 PED,随后 PED 在全国各地扩散,特别是 2010 年末, PEDV 在我国暴发并引起了有史以来最严重的 PED 疫情^[12]。PEDV 发病率高,幼年猪感染率高达 100%,7 日龄以下仔猪感染死亡率为 80%–100%,给世界各国养猪业均造成了严重的经济损失,受到世界猪养殖国家的高度重视。近年来新型 PEDV 流行变异株(2a/2b 亚型)的不断出现,又给 PED 的防控带来了新的挑战^[12-13]。新型 PEDV

变异株相比于以往流行毒株,对仔猪致病性明显增强,且现有多数市售的、以经典毒株 CV777 为基础所研制的商品化疫苗无法有效保护仔猪抵抗新型 2a/2b 亚型变异毒株的攻击^[14-16]。

PDCoV 和 PEDV 都属于冠状病毒属成员,是单股正链 RNA 病毒。基因组长度为 25–28 kb,包含 5'UTR、3'UTR 和 8 个开放阅读框(open reading frame, ORF),分别编码 2 个多聚蛋白 pp1a、pp1b,4 个结构蛋白 S、M、E、N,以及 2 个非结构蛋白 NSP6、NSP7^[17]。S 蛋白为 I 型膜糖蛋白,呈纤突状存在于病毒粒子表面,在识别、结合宿主受体和诱导宿主产生中和抗体方面具有关键性作用。S 蛋白包含 S1 和 S2 两个亚基^[18],S1 亚基通过受体结合域(receptor binding domain, RBD)与细胞受体相结合,触发 S 蛋白构象改变,使 S2 亚基上的膜融合肽暴露,从而引发病毒与细胞膜的融合^[19]。多项研究表明,S1 亚基的 RBD 是冠状病毒主要的中和表位优势区,是宿主体液免疫的主要诱导因子,大多数针对冠状病毒感染的有效中和抗体靶向 RBD^[20-23],因此 RBD 可作为亚单位疫苗研发的靶标抗原。

PDCoV 和 PEDV 是我国当前引起仔猪病毒性腹泻的两个最重要的病原, Zhang 等^[24]研究表明,在河南省腹泻猪中, PEDV 和 PDCoV 的共同感染率可达 60.4%,在临床中 PEDV 和 PDCoV 的混合感染已经成为仔猪病毒性腹泻发生的常态。因此,以 PEDV 新型 2a/2b 亚型变异毒株和 PDCoV 流行毒株为基础,研制新型、高效、安全的疫苗是控制仔猪腹泻疫病发展的最有效、最经济手段,也是目前我国生猪疫病防控中的一项重大实际需求。本研究将 PDCoV RBD 与 PEDV RBD 进行串联,利用哺乳动物细胞 ExpiCHO 表达系统表达纯化出 pdRBD-peRBD 融合蛋白,并免疫小鼠,评价其免疫原性,所得结果将有助于 PDCoV 和 PEDV 二联新型亚单位疫苗的研发。

1 材料与方 法

1.1 主要材料

PDCoV 毒株 CH/XJYN/2016 (GenBank: MN064712)和 PEDV GI1a 毒株 CH/HBXT/2018 (GenBank: MH816969.1)由本实验室分离、传代并保存;大肠杆菌(*Escherichia coli*) DH5 α 感受态细胞购自宝生物工程(大连)有限公司; EndoFree Plasmid Maxi Kit 购于凯杰生物工程(深圳)有限公司;辣根过氧化物酶标记山羊抗小鼠 IgG 购自北京中杉金桥生物技术有限公司;辣根过氧化物酶标记山羊抗猪 IgG 购自 Abcam 公司; ExpiCHO-S 细胞、ExpiCHOTM 表达培养基、ExpiFectamineTM CHO 转染试剂盒和 OptiPROTM SFM 购于赛默飞世尔科技公司;小鼠细胞因子检测试剂盒购于深圳达科为生物技术有限公司; FITC 标记 anti-mouse CD3、PE 标记 anti-mouse CD4 和 APC 标记 anti-mouse CD8 抗体购自 BioLegend 公司。

1.2 方 法

1.2.1 真核表达质粒的构建及大量提取

为了使蛋白能够更好地分泌表达,本研究选择在融合蛋白氨基端添加人源分泌红蛋白家族 1D 成员 1 (secretoglobin family 1D member 1)的信号肽序列(MRLSVCLLLTLALCCYRANA),在羧基端添加 6 \times His 标签序列。将设计的基因序列交由武汉金开瑞生物公司进行优化合成,并构建至 pCDNA3.1(+)真核表达载体中(图 1A)。

将构建的真核表达质粒转化至 *Escherichia coli* DH5 α 感受态细胞中,挑取阳性克隆,接种于含有 50 μ g/mL 氨苄霉素的 200 mL LB 液体培养基中,在 37 $^{\circ}$ C 恒温摇床培养箱中过夜培养。次日用 EndoFree Plasmid Maxi Kit 大量提取重组质粒(具体实验步骤参考试剂盒说明书),并用 NanoDrop 2000 分光光度计测定重组质粒的浓度,稀释至 1 000 ng/ μ L,分装保存。

1.2.2 蛋白的表达纯化

将提取的质粒按照 ExpiCHO 表达系统操作手册转染 ExpiCHO-S 细胞,在 32 $^{\circ}$ C 培养箱

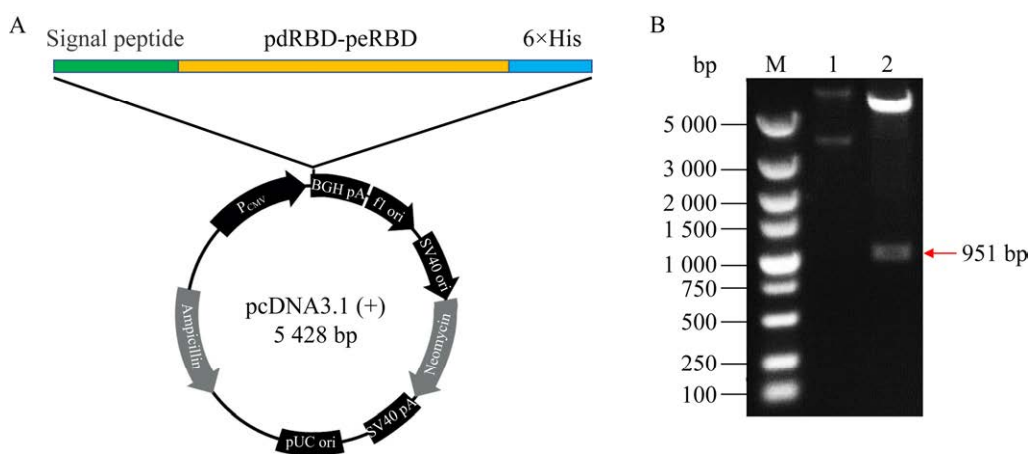


图 1 pCDNA3.1-pdRBD-peRBD 的构建及鉴定

Figure 1 Construction and identification of pCDNA3.1-pdRBD-peRBD. A: Schematic diagram of inserting pdRBD-peRBD gene into eukaryotic expression vector pCDNA3.1 (+). B: The identification of recombinant plasmid pCDNA3.1-pdRBD-peRBD by restriction enzyme digestion (lane M: DL5000 DNA Marker; lane 1: Recombinant plasmid DNA; lane 2: Recombinant plasmid digested by *Bam*H I and *Xho* I).

含 5% CO₂ 的湿化空气条件下振荡培养 10–12 d。随后用冷冻离心机将培养液以 4 000–5 000 r/min 离心 30 min, 上清液用 0.22 μm 过滤器过滤。将过滤后的上清液与用 Buffer A (20 mmol/L Tris, 300 mmol/L NaCl, PH 8.0)处理过的 Ni-NTA Agarose (Qiagen)于 4 °C混匀结合 2 h, 然后用 5% Buffer B (20 mmol/L Tris, 300 mmol/L NaCl, 500 mmol/L 咪唑, pH 8.0)洗脱未结合的目的蛋白和非特异性结合的杂蛋白, 再用 100% Buffer B 洗脱目的蛋白。收集纯度高的蛋白样品用 BCA 蛋白浓度测定试剂盒测定蛋白浓度, 并将其稀释至 1 mg/mL, 装入透析袋中, 置于 100 倍蛋白溶液体积的透析 Buffer (1×PBS, PH 7.2)中缓慢搅拌透析 24 h, 12 h 时更换一次透析液。收集透析好的蛋白溶液, 重新测定蛋白浓度, 用 0.22 μm 过滤器过滤并分装, 短时间于 4 °C保存, 长时间于–80 °C保存备用。

1.2.3 蛋白免疫印迹分析

纯化的蛋白样品进行聚丙烯酰胺凝胶电泳后, 转印硝酸纤维素膜进行免疫印迹分析, 以 PEDV 或 PDCoV 阳性猪血清为一抗(1:1 000 稀释), 辣根过氧化物酶(horseradish peroxidase, HRP)标记山羊抗猪 IgG (1:10 000 稀释)为二抗, 用化学发光底物超敏增强化学发光液(enhanced chemiluminescence, ECL)进行显影。

1.2.4 小鼠免疫试验

40 只 4–6 周龄的无特定病原体雌性 BALB/c 小鼠由中国农业科学院兰州兽医研究所实验动物中心提供, 所有动物试验程序均由兰州兽医研究所的机构动物护理和使用委员会批准(批准号: LVRIAEC-2023-065)。将小鼠随机分为 4 组 (10 只/组), 第一组免疫剂量为 10 μg/只, 第二组免疫剂量为 20 μg/只, 第三组免疫剂量为 30 μg/只, 第四组注射等体积的 PBS 作为对照组; 每组小鼠分别第 0、14 和 28 天各免疫一次, 免疫时

用 PBS 稀释抗原, 并与等体积的佐剂混合, 进行后腿肌肉注射。首免和第一次加强免疫使用完全弗氏佐剂 (Freund's complete adjuvant, FCA), 第二次加强免疫使用不完全弗氏佐剂 (Freund's incomplete adjuvant, FIA) (表 1)。

1.2.5 特异性抗体检测

在首免后第 0、14、28 和 42 天通过小鼠外眦静脉采血, 采集后的血样在 37 °C放置 1 h 后置于 4 °C过夜, 使得血清充分析出。次日, 3 000 r/min 离心 10 min, 分离血清。用间接 ELISA 方法测定血清中特异性抗体水平。具体操作如下: 将纯化的 pdRBD-peRBD 融合蛋白用 50 mmol/L 的碳酸盐缓冲液(PH 9.6)稀释至 2 μg/mL, 包被 96 孔微孔板, 每孔加入 100 μL, 4 °C过夜包被; 弃去包被液, PBST 洗板 3 次, 滤纸上拍干, 加入用 PBST 配制的含 5%脱脂奶粉的封闭液 200 μL/孔, 37 °C孵育 2 h; 弃去封闭液, PBST 洗板 3 次, 滤纸上拍干, 每孔加入 100 μL 从 1:100 开始 2 倍倍比稀释的免疫小鼠血清作为一抗, 37 °C孵育 1 h; 弃去孔中液体, PBST 洗 3 次, 滤纸上拍干, 每孔加入 100 μL HRP 标记山羊抗小鼠 IgG (1:10 000 稀释), 37 °C孵育 1 h; 弃去孔中液体, PBST 洗 3 次, 滤纸上拍干, 每孔加入 100 μL TMB 底物溶液, 37 °C避光反应 10 min; 每孔加入 100 μL 2 mol/L H₂SO₄ 终止反应, 酶标仪测定在波长 450 nm 处的吸光度值 (OD₄₅₀), 以 P/N>2.1 的血清最大稀释倍数为被检血清特异性抗体的效价。

表 1 BALB/c 小鼠免疫方案

Table 1 The immuno-schedules of BALB/c mice

Groups	Primary immunization	Boost immunization	Booster immunization
Group 1	10 μg+FCA	10 μg+FCA	10 μg+FIA
Group 2	20 μg+FCA	20 μg+FCA	20 μg+FIA
Group 3	30 μg+FCA	30 μg+FCA	30 μg+FIA
Group 4	PBS	PBS	PBS

1.2.6 血清中和试验

用固定病毒-稀释血清的方法测定血清的中和抗体滴度。具体操作如下：提前准备铺满 70%–80% LLC-PK 或 Vero-CCL-81 细胞的 96 孔板；将血清置于 56 °C 水浴锅中灭活 30 min，然后在 96 孔微量培养板中将血清进行 2 倍连续倍比稀释(1:2, 1:4, 1:8, 1:16)，每个稀释度设 4 孔重复。在上述各孔内加入等体积的稀释好的病毒液(200 TCID₅₀)，混匀后置于 37 °C、5% CO₂ 培养箱中作用 1 h；同时设病毒对照和正常细胞对照，其中病毒对照设置 200 TCID₅₀ (全部病变)、20 TCID₅₀、2 TCID₅₀、0.2 TCID₅₀ (不病变) 4 个不同浓度的对照；用 PBS 洗涤细胞 3 次，然后在铺满 96 孔板 70%–80% 的细胞中每孔加入 100 μ L 病毒-血清混合液，置于 37 °C、5% CO₂ 培养箱作用 1 h；孵育完成后，弃去孔中液体，PBS 洗涤 3 次，每孔加入 200 μ L 维持培养基(含 20 μ g/mL 胰酶)，逐日观察，连续观察 5–7 d 并记录细胞病变效应(cytopathic effect, CPE)。中和滴度定义为中和病毒感染 50% 所需血清稀释度的倒数。

1.2.7 流式细胞术分析

首次免疫后第 42 天取小鼠脾脏，并用动物淋巴细胞分离液试剂盒分离制备淋巴细胞悬液。吸取 1×10^6 个制备的脾细胞悬液，设空白组、单标组和实验组。离心沉淀细胞，并去除上清。用 100 μ L 稀释的抗体(CD3-FITC、CD4-PE 和 CD8-APC)重悬实验组细胞，用 100 μ L PBS 缓冲液重悬空白组细胞，单标组分别加入 PBS 稀释的 CD3-FITC、CD4-PE 或 CD8-APC 抗体 100 μ L。轻轻混匀，4 °C 避光放置 30 min。用预冷的 PBS 缓冲液洗涤细胞，2 000 r/min 离心 3 min，去除上清，用 PBS 缓冲液重悬细胞后，使用 Beckman CytoFLEX LX 5L19C 进行流式细胞术检测，通过 CytExpert 流式分析软件分析检测结果。

1.2.8 血清中细胞因子水平检测

利用细胞因子 ELISA 试剂盒检测初次免

疫第 42 天后所采集的各免疫组小鼠血清中干扰素- γ (interferon- γ , IFN- γ)、白细胞介素-2 (interleukin-2, IL-2) 和 IL-4 的表达水平(具体实验步骤参考试剂盒说明书)。

1.2.9 统计分析

使用 GraphPad Prism 软件对试验数据进行单因素方差分析(analysis of variance, ANOVA) 确定组间差异。各组保护率采用 Fisher 精确检验或卡方检验进行统计学分析($P > 0.05$ 表示各组间无显著性差异， $*P < 0.05$ 表示为各组间的统计学差异， $**P < 0.01$ 表示各组间有显著性统计学差异，而 $***P < 0.001$ 表示各组间有极显著性统计学差异)。

2 结果与分析

2.1 重组质粒的鉴定

用 BamH I 和 Xho I 限制性核酸内切酶对构建的重组质粒 pCDNA3.1-pdRBD-peRBD 进行双酶切鉴定，通过琼脂糖凝胶电泳分离核酸。结果显示，第二泳道呈现两条清晰的条带，其中较大的条带为载体，大小为 5 372 bp，较小条带为目的 *pdRBD-peRBD* 串联基因，大小为 951 bp，与预期相符(图 1B)。

2.2 重组蛋白的表达纯化和鉴定

重组质粒转染 ExpiCHO-S 细胞，按高滴度实验方案培养 10 d 后，离心收取细胞培养上清液，经镍柱亲和层析纯化获得重组蛋白，进行 SDS-PAGE 分析，考马斯亮蓝染色清晰可见一条纯度较高目的蛋白条带，蛋白分子量大小约为 43 kDa，与预期一致(图 2A)。为了进一步确定重组蛋白的特异性，分别用 PDCoV 阳性猪血清和 PEDV 阳性猪血清对 pdRBD-peRBD 融合蛋白进行免疫印迹鉴定。结果表明，融合蛋白不仅能被 PDCoV 阳性猪血清识别也能被 PEDV 阳性猪血清所识别(图 2B、2C)。

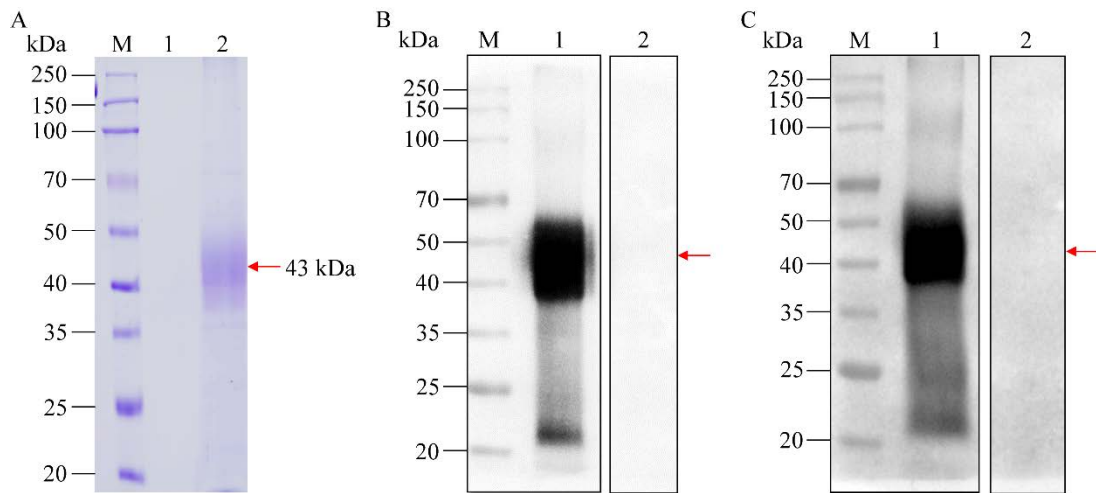


图2 pdRBD-peRBD 融合蛋白的纯化与鉴定

Figure 2 Purification and identification of pdRBD-peRBD fusion protein. A: SDS-PAGE analysis of pdRBD-peRBD fusion protein. B: The pdRBD-peRBD fusion protein could be recognized by PDCoV positive serum (lane 1: PDCoV positive serum; lane 2: Negative control serum). C: The pdRBD-peRBD fusion protein can be recognized by PEDV positive serum (lane 1: PEDV positive serum; lane 2: Negative control serum).

2.3 pdRBD-peRBD 融合蛋白在小鼠体内诱导了高水平特异性抗体

为了评估 pdRBD-peRBD 融合蛋白作为亚单位疫苗的潜力, 对小鼠进行了免疫试验。免疫后, 使用间接 ELISA 方法检测融合蛋白在小鼠体内诱导的特异性抗体水平。结果显示, pdRBD-peRBD 融合蛋白初次免疫后第 14 天即诱导了高水平的特异性 IgG 抗体, 在第一次加强免疫后, 抗体水平有所升高, 与 PBS 对照组相比, 统计学差异极显著($P < 0.001$)。不同剂量组间抗体水平没有明显差异, 说明 10 μg 的免疫剂量即可达到较好的免疫效果(图 3)。

2.4 pdRBD-peRBD 融合蛋白可诱导高水平中和抗体

用固定病毒-稀释血清的方法测定血清中和抗体滴度, 结果显示, pdRBD-peRBD 融合蛋白既诱导了高水平的 PDCoV 中和抗体, 又诱导了高水平的 PEDV 中和抗体。与 PBS 组相比差异显著($P < 0.001$), 但不同剂量组间中和抗体水平没

有明显差异($P > 0.05$)。其中 10 μg 剂量组 PDCoV 中和抗体为 1:179.25, PEDV 中和抗体为 1:141.21, 20 μg 剂量组 PDCoV 和 PEDV 中和抗体分别为 1:255.30 和 1:222.50, 30 μg 剂量组 PDCoV 和 PEDV 中和抗体分别为 1:230.00 和 1:174.13 (图 4)。

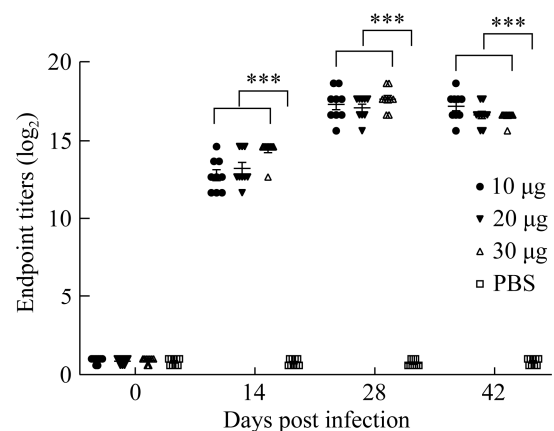


图3 小鼠血清中特异性 IgG 抗体水平

Figure 3 The level of specific IgG antibody in the serum of mice. ***: $P < 0.001$ (extremely significant difference).

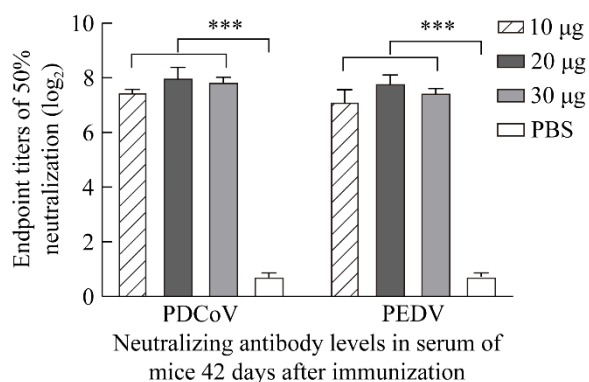


图 4 小鼠血清中和抗体滴度

Figure 4 Neutralizing antibody titer in mouse serum. The results are expressed as the $\bar{x} \pm s$. ***: $P < 0.001$ (extremely significant difference).

2.5 pdRBD-peRBD 融合蛋白诱导产生细胞免疫反应

用流式细胞术检测小鼠脾脏淋巴细胞中的 CD_4^+ 、 CD_8^+ T 细胞百分比，ELISA 试剂盒检测小鼠血清中 IL-2、IL-4 和 IFN- γ 的表达水平，结果显示，pdRBD-peRBD 融合蛋白免疫组中小鼠脾脏淋巴细胞的 CD_4^+ 和 CD_8^+ T 细胞占比均显著高于 PBS 对照组 ($P < 0.05$)，不同剂量组之间差异不显著 ($P > 0.05$)。而在免疫组中 CD_4^+ T 细胞占比显著高于 CD_8^+ T 细胞(图 5A、5B)。pdRBD-peRBD 融合蛋白诱导产生的 IL-2、IL-4 和 IFN- γ 的表达水平均显著高于 PBS 对照组 ($P < 0.01$)，其中 IL-4 的上升水平最高，差异最显著 ($P < 0.001$) (图 5C)，表明 pdRBD-peRBD 融合蛋白诱导了明显的细胞免疫反应。

3 讨论与结论

冠状病毒可引起人和动物的多种疾病，在过去 20 年中，新型冠状病毒不断出现，在人类社会引发了多次传染病大流行，给人类健康造成巨大威胁^[25-26]。对于冠状病毒疫苗的研发策略主要包括传统的灭活疫苗和弱毒疫苗以及新

型的基因工程疫苗，基因工程疫苗主要有亚单位疫苗、核酸疫苗(DNA 疫苗和 RNA 疫苗)、病毒活载体疫苗等^[27-28]。传统的灭活疫苗具有工艺成熟、研发周期短、成本低、使用安全等优点，但其也有免疫剂量大、易出现过敏反应等缺点。此外，灭活疫苗制作过程中需要保持免疫原性颗粒的完整性以保持疫苗的免疫效果，并且对灭活的工艺要求较高，且生产过程中要求的生物安全等级较高^[29]。研究表明，采用化学方法对冠状病毒进行灭活，会改变病毒粒子表面 S 蛋白的结构，使其大部分处于融合后状态，导致其免疫保护效果不佳^[30]。新型基因工程亚单位疫苗具有生产工艺的安全性高、易于大规模生产、疫苗安全性好、稳定性相对较好、易保存和运输等优点^[31]。该疫苗研发技术相对成熟，目前已经上市的亚单位疫苗包括乙型肝炎疫苗、流感亚单位疫苗、重组新型冠状病毒蛋白疫苗(CHO 细胞)等^[32]。然而，蛋白亚单位疫苗的研发仍存在以下两项挑战：一是利用不同表达系统来表达病原体的部分蛋白作为抗原，最终表达的抗原蛋白可能跟病毒蛋白的天然构象存在差异，这有可能在一定程度上影响疫苗的免疫原性；二是由于仅选取病原体的一部分蛋白作为抗原，免疫原性弱，一般需要佐剂增强，而且产生免疫记忆效应可能较弱。

PDCoV 和 PEDV 作为两种重要的猪肠道冠状病毒，在临床实践中经常存在交叉混合感染，为防控带来不便^[3,33]。对于 PDCoV 和 PEDV 的防控，疫苗接种仍是目前最有效的手段，然而，目前尚无针对 PDCoV 和 PEDV 的二联商品化疫苗。我们前期的研究表明，以 GIIa CH/HBXT/2018 毒株为基础的灭活疫苗能有效保护所有仔猪(8/8)抵抗同源强毒(GIIa)和异源强毒(GIIb)的攻击^[34]。因此，本研究基于 PDCoV CH/XJYN/2016 毒株 S 蛋白 RBD 和 PEDV GIIa

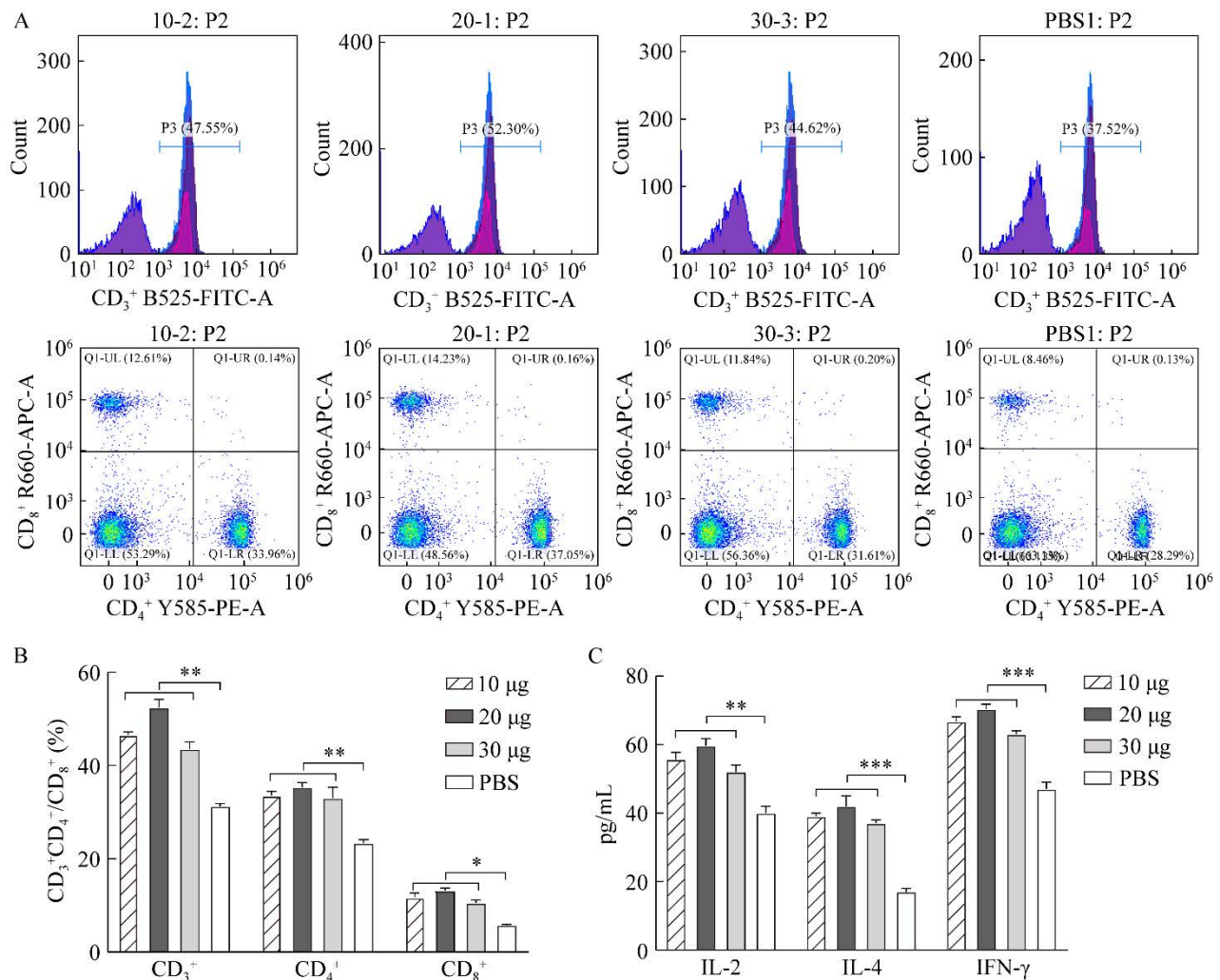


图5 免疫后42 d小鼠细胞免疫应答特征及血清中细胞因子表达水平

Figure 5 The characteristics of cellular immune response and the expression level of cytokines in serum of mice 42 days after immunization. A: Flow cytometry plots showing the distribution of T lymphocyte subsets in the spleen. B: Percentage of CD3⁺CD4⁺/CD8⁺ T lymphocytes. C: Cytokine contents in the serum of mice. The results are expressed as the $\bar{x} \pm s$. NS: $P > 0.05$ (no obvious difference); *: $P < 0.05$ (statistical difference); **: $P < 0.01$ (significant difference); ***: $P < 0.001$ (extremely significant difference).

CH/HBXT/2018 毒株 S 蛋白 RBD, 利用分子生物学技术将其串联表达, 这样既能增加 RBD 的免疫原性, 又能达到免疫一种抗原同时预防两种疾病的效果^[27,35]。由于冠状病毒的 RBD 存在糖基化, 因此本研究选择真核表达系统表达纯化 pDRBD-peRBD 融合蛋白, 使其更符合病毒蛋白的天然结构, 达到更好的免疫效果。在最新的

研究中, Wang 等^[36]利用昆虫杆状病毒表达系统表达纯化出 PDCoV-RBD 蛋白, 然后分别用 CPG2395 佐剂、水佐剂和 Al(OH)₃ 佐剂充分乳化制备疫苗, 对小鼠进行体液和细胞免疫反应评估。结果显示, 免疫组均能诱导小鼠高水平免疫应答, 表明 PDCoV-RBD 蛋白具有良好的抗原性, 可作为 PDCoV 的保护性抗原。Li 等^[37]

在昆虫细胞中分别表达纯化出 PDCoV S 和 RBD 三聚体蛋白, 在小鼠中检测了对 S 蛋白和 RBD 三聚体的免疫应答。中和试验和流式细胞术分析证明 S 蛋白和 RBD 三聚体均能引起较强的中和抗体和细胞免疫应答。伊立超等^[38]利用杆状病毒表达系统制备 PEDV-RBD 蛋白, 免疫周龄仔猪, 免疫后 8 周产生了高水平的特异性抗体和中和抗体, 并诱导了一定的细胞免疫应答。在上述研究中使用的都是昆虫细胞表达系统, 该系统具有一定的优势, 如蛋白翻译后的加工修饰(磷酸化、糖基化、二硫键等), 可容纳大分子的插入片段, 表达水平高, 可达总蛋白量的 50%, 能同时表达多个基因, 对脊椎动物具有安全性等。但哺乳动物细胞表达系统在翻译后修饰、蛋白质正确折叠以及蛋白活性方面远高于其他表达系统, 在生物医学和药学研究中具有不可替代的作用。因此, 本研究选择哺乳动物细胞 ExpiCHO 表达系统表达纯化 pdRBD-peRBD 融合蛋白, 并分为 3 种剂量(10、20 和 30 μg)进行小鼠免疫试验研究, 结果表明, 融合蛋白不仅诱导了高水平体液免疫应答, 还诱导了一定的细胞免疫应答, 这与 Xu 等^[35]的研究结果一致, prototype RBD-Beta RBD 或 Delta RBD-Omicron RBD 融合抗原诱导了更广泛的 SARS-CoV-2 变异体的血清中和, 并在小鼠体内提供了更好的保护, 以抵御 Delta 或 Omicron SARS-CoV-2 的攻击。

综上所述, pdRBD-peRBD 融合蛋白具有良好的免疫原性, 免疫小鼠后产生了高水平的特异性 IgG 抗体, 能同时诱导产生 PDCoV 和 PEDV 中和抗体, 可以作为一种候选 PDCoV 和 PEDV 二联亚单位疫苗。小鼠作为一种模式动物, 可用于 pdRBD-peRBD 融合蛋白的免疫原性初步评价。在后续的研究中, 我们将会选择免疫待产母猪, 利用哺乳仔猪进行攻毒保护实验,

进一步评估 pdRBD-peRBD 融合蛋白的免疫效力, 为 PDCoV 和 PEDV 二联亚单位疫苗的研制提供依据。

REFERENCES

- [1] TANG P, CUI EH, SONG YH, YAN RQ, WANG JY. Porcine deltacoronavirus and its prevalence in China: a review of epidemiology, evolution, and vaccine development[J]. Archives of Virology, 2021, 166(11): 2975-2988.
- [2] SHU XL, HAN FF, HU YT, HAO CL, LI ZY, WEI ZY, ZHANG HL. Co-infection of porcine deltacoronavirus and porcine epidemic diarrhoea virus alters gut microbiota diversity and composition in the colon of piglets[J]. Virus Research, 2022, 322: 198954.
- [3] ZHANG HL, HAN FF, SHU XL, LI QQ, DING QW, HAO CL, YAN XG, XU ML, HU H. Co-infection of porcine epidemic diarrhoea virus and porcine deltacoronavirus enhances the disease severity in piglets[J]. Transboundary and Emerging Diseases, 2022, 69(4): 1715-1726.
- [4] WOO PCY, LAU SKP, LAM CSF, LAU CCY, TSANG AKL, LAU JHN, BAI R, TENG JLL, TSANG CCC, WANG M, ZHENG BJ, CHAN KH, YUEN KY. Discovery of seven novel mammalian and avian coronaviruses in the genus deltacoronavirus supports bat coronaviruses as the gene source of alphacoronavirus and betacoronavirus and avian coronaviruses as the gene source of gammacoronavirus and deltacoronavirus[J]. Journal of Virology, 2012, 86(7): 3995-4008.
- [5] WANG LY, BYRUM B, ZHANG Y. Detection and genetic characterization of deltacoronavirus in pigs, Ohio, USA, 2014[J]. Emerging Infectious Diseases, 2014, 20(7): 1227-1230.
- [6] DONG N, FANG LR, ZENG SL, SUN QQ, CHEN HC, XIAO SB. Porcine deltacoronavirus in China's mainland[J]. Emerging Infectious Diseases, 2015, 21(12): 2254-2255.
- [7] HU H, JUNG K, VLASOVA AN, CHEPNGENO J, LU ZY, WANG QH, SAIF LJ. Isolation and characterization of porcine deltacoronavirus from pigs with diarrhea in the United States[J]. Journal of Clinical Microbiology, 2015, 53(5): 1537-1548.
- [8] LEE JH, CHUNG HC, NGUYEN VG, MOON HJ, KIM HK, PARK SJ, LEE CH, LEE GE, PARK BK.

- Detection and phylogenetic analysis of porcine deltacoronavirus in Korean swine farms, 2015[J]. *Transboundary and Emerging Diseases*, 2016, 63(3): 248-252.
- [9] AJAYI T, DARA R, MISENER M, PASMA T, MOSER L, POLJAK Z. Herd-level prevalence and incidence of porcine epidemic diarrhoea virus (PEDV) and porcine deltacoronavirus (PDCoV) in swine herds in Ontario, Canada[J]. *Transboundary and Emerging Diseases*, 2018, 65(5): 1197-1207.
- [10] SONG D, PARK B. Porcine epidemic diarrhoea virus: a comprehensive review of molecular epidemiology, diagnosis, and vaccines[J]. *Virus Genes*, 2012, 44(2): 167-175.
- [11] LEE C. Porcine epidemic diarrhoea virus: an emerging and re-emerging epizootic swine virus[J]. *Virology Journal*, 2015, 12: 193.
- [12] WANG D, FANG LR, XIAO SB. Porcine epidemic diarrhoea in China[J]. *Virus Research*, 2016, 226: 7-13.
- [13] JUNG K, SAIF LJ, WANG QH. Porcine epidemic diarrhoea virus (PEDV): an update on etiology, transmission, pathogenesis, and prevention and control[J]. *Virus Research*, 2020, 286: 198045.
- [14] LI ZW, MA ZQ, LI Y, GAO S, XIAO SQ. Porcine epidemic diarrhoea virus: molecular mechanisms of attenuation and vaccines[J]. *Microbial Pathogenesis*, 2020, 149: 104553.
- [15] SONG D, ZHOU X, PENG Q, CHEN Y, ZHANG F, HUANG T, ZHANG T, LI A, HUANG D, WU Q, HE H, TANG Y. Newly emerged porcine deltacoronavirus associated with diarrhoea in swine in China: identification, prevalence and full-length genome sequence analysis[J]. *Transboundary and Emerging Diseases*, 2015, 62(6): 575-580.
- [16] SUN DB, WANG XY, WEI S, CHEN JF, FENG L. Epidemiology and vaccine of porcine epidemic diarrhoea virus in China: a mini-review[J]. *The Journal of Veterinary Medical Science*, 2016, 78(3): 355-363.
- [17] LEE S, LEE C. Complete genome characterization of Korean porcine deltacoronavirus strain KOR/KNU14-04/2014[J]. *Genome Announcements*, 2014, 2(6): e01191-14.
- [18] BOSCH BJ, van der ZEE R, de HAAN CAM, ROTTIER PJM. The coronavirus spike protein is a class I virus fusion protein: structural and functional characterization of the fusion core complex[J]. *Journal of Virology*, 2003, 77(16): 8801-8811.
- [19] MA XC, ZOU F, YU F, LI R, YUAN YC, ZHANG YW, ZHANG XT, DENG JY, CHEN T, SONG Z, QIAO YD, ZHAN YK, LIU J, ZHANG JS, ZHANG X, PENG ZL, LI YZ, LIN YT, LIANG LT, WANG GW, et al. Nanoparticle vaccines based on the receptor binding domain (RBD) and heptad repeat (HR) of SARS-CoV-2 elicit robust protective immune responses[J]. *Immunity*, 2020, 53(6): 1315-1330.e9.
- [20] CHEN R, FU JY, HU JF, LI C, ZHAO YJ, QU H, WEN XT, CAO SJ, WEN YP, WU R, ZHAO Q, YAN QG, HUANG Y, MA XP, HAN XF, HUANG XB. Identification of the immunodominant neutralizing regions in the spike glycoprotein of porcine deltacoronavirus[J]. *Virus Research*, 2020, 276: 197834.
- [21] 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 diarrhoea virus spike protein are key targets of neutralizing antibodies[J]. *Journal of Virology*, 2017, 91(12): e00273-17.
- [22] DU LY, KOU ZH, MA CQ, TAO XR, WANG LL, ZHAO GY, CHEN YQ, YU F, TSENG CT K, ZHOU YS, JIANG SB. A truncated receptor-binding domain of MERS-CoV spike protein potently inhibits MERS-CoV infection and induces strong neutralizing antibody responses: implication for developing therapeutics and vaccines[J]. *PLoS One*, 2013, 8(12): e81587.
- [23] HE YX, ZHOU YS, LIU SW, KOU ZH, LI WH, FARZAN M, JIANG SB. Receptor-binding domain of SARS-CoV spike protein induces highly potent neutralizing antibodies: implication for developing subunit vaccine[J]. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 2004, 324(2): 773-781.
- [24] ZHANG HL, LIANG QQ, LI BX, CUI X, WEI XL, DING QW, WANG YB, HU H. Prevalence, phylogenetic and evolutionary analysis of porcine deltacoronavirus in Henan Province, China[J]. *Preventive Veterinary Medicine*, 2019, 166:8-15.
- [25] KAUL R, DEVI S. Coronavirus-a crippling affliction to humans[J]. *Recent Patents on Biotechnology*, 2022, 16(3): 226-242.
- [26] LIN CN, CHAN KR, OOI EE, CHIOU MT, HOANG M, HSUEH PR, OOI PT. Animal coronavirus diseases: parallels with COVID-19 in humans[J]. *Viruses*, 2021, 13(8): 1507.
- [27] DAI LP, ZHENG TY, XU K, HAN YX, XU LL, HUANG EQ, AN YL, CHENG YJ, LI SH, LIU M,

- YANG M, LI Y, CHENG HJ, YUAN Y, ZHANG W, KE CW, WONG G, QI JX, QIN C, YAN JH, et al. A universal design of betacoronavirus vaccines against COVID-19, MERS, and SARS[J]. *Cell*, 2020, 182(3): 722-733.e11.
- [28] GRAHAM BS. Rapid COVID-19 vaccine development[J]. *Science*, 2020, 368(6494): 945-946.
- [29] JIN LR, LI ZP, ZHANG XY, LI JX, ZHU FC. CoronaVac: a review of efficacy, safety, and immunogenicity of the inactivated vaccine against SARS-CoV-2[J]. *Human Vaccines & Immunotherapeutics*, 2022, 18(6): 2096970.
- [30] LIU C, MENDONÇA L, YANG Y, GAO YZ, SHEN CG, LIU JW, NI T, JU B, LIU CC, TANG X, WEI JL, MA XM, ZHU YN, LIU WL, XU SM, LIU YX, YUAN J, WU J, LIU Z, ZHANG Z, et al. The architecture of inactivated SARS-CoV-2 with postfusion spikes revealed by cryo-EM and cryo-ET[J]. *Structure*, 2020, 28(11): 1218-1224.e4.
- [31] FRANCIS MJ. Recent advances in vaccine technologies[J]. *Veterinary Clinics of North America: Small Animal Practice*, 2018, 48(2): 231-241.
- [32] TAN M, JIANG X. Recent advancements in combination subunit vaccine development[J]. *Human Vaccines & Immunotherapeutics*, 2017, 13(1): 180-185.
- [33] LIANG JX, LI Y, YAN ZS, JIAO Z, PENG DP, ZHANG WP. Study of the effect of intestinal immunity in neonatal piglets coinfecting with porcine deltacoronavirus and porcine epidemic diarrhea virus[J]. *Archives of Virology*, 2022, 167(8): 1649-1657.
- [34] 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 GI1a- and GI1b-genotype porcine epidemic diarrhea virus vaccines in suckling piglets[J]. *Veterinary Microbiology*, 2019, 230: 278-282.
- [35] XU K, GAO P, LIU S, LU SY, LEI WW, ZHENG TY, LIU XY, XIE YF, ZHAO ZN, GUO SX, TANG C, YANG Y, YU WH, WANG JB, ZHOU YN, HUANG Q, LIU CY, AN YL, ZHANG R, HAN YX, et al. Protective prototype-beta and delta-omicron chimeric RBD-dimer vaccines against SARS-CoV-2[J]. *Cell*, 2022, 185(13): 2265-2278.e14.
- [36] WANG NX, WANG Z, MA MY, JIA XH, LIU H, QIAN MW, LU SJ, XIANG YQ, WEI ZY, ZHENG LL. Expression of codon-optimized PDCoV-RBD protein in baculovirus expression system and immunogenicity evaluation in mice[J]. *International Journal of Biological Macromolecules*, 2023, 252: 126113.
- [37] LI JZ, ZHAO SQ, ZHANG BT, HUANG J, PENG Q, XIAO L, YUAN XS, GUO RL, ZHOU JZ, FAN BC, XUE T, ZHU XJ, LIU CM, ZHU X, LI B. A novel recombinant S-based subunit vaccine induces protective immunity against porcine deltacoronavirus challenge in piglets[J]. *Journal of Virology*, 2023, 97(11): e0095823.
- [38] 伊立超, 郝嘉翼, 邹万成, 李乐天, 姜宇航, 张爽, 娄安钢, 李昌, 金宁一. 猪流行性腹泻病毒纤突蛋白受体结合区(PEDV-RBD)重组蛋白的免疫原性[J]. *中国兽医学报*, 2023, 43(4): 643-647.
- YI LC, HAO JY, ZOU WC, LI LT, JIANG YH, ZHANG S, LOU AG, LI C, JIN NY. Immunogenicity analysis of PEDV-RBD subunit vaccine[J]. *Chinese Journal of Veterinary Science*, 2023, 43(4): 643-647 (in Chinese).

(本文责编 郝丽芳)