

研究报告

## 重组病毒 BoHV-1 gG<sup>-</sup>/tk<sup>-</sup>/gD<sup>+</sup>和 BoHV-1 gG<sup>-</sup>/tk<sup>-</sup>/gD5<sup>+</sup>的兔体内安全性和免疫原性

李汉雄<sup>1,2</sup> 刘瑞宁<sup>1,2</sup> 张芳<sup>1,2</sup> 朱杰<sup>1,2</sup> 侯桂先<sup>1,2</sup> 陈颖钰<sup>1,2</sup> 陈建国<sup>2</sup> 郭爱珍<sup>1,2\*</sup>

(1. 华中农业大学 农业微生物国家重点实验室 湖北 武汉 430070)

(2. 华中农业大学动物医学院 湖北 武汉 430070)

**摘要:** 【目的】牛传染性鼻气管炎由 BoHV-1 感染引起,我国对该病的防控尚缺乏商品化标记疫苗,本实验室前期成功研制了 BoHV-1 gG<sup>-</sup>/tk<sup>-</sup>基因缺失疫苗,并通过将 BoHV-1 和 BoHV-5 的免疫原性最好的糖蛋白 gD 的胞外区序列分别插入 BoHV-1 gG<sup>-</sup>/tk<sup>-</sup>的 tk 位置,构建了重组病毒 BoHV-1 gG<sup>-</sup>/tk<sup>-</sup>/gD<sup>+</sup>和 BoHV-1 gG<sup>-</sup>/tk<sup>-</sup>/gD5<sup>+</sup>。本研究的目的在于评价该重组病毒在兔体内的安全性和免疫原性及对 BoHV-1 保护力和 BoHV-5 的交叉保护力,以期开发出更为有效的牛传染性鼻气管炎标记疫苗。【方法】选用 30 只日本大耳白兔并随机分成 6 组,鼻腔接种和攻毒。通过临床症状观察、体温测量和鼻腔排毒检测进行安全性评估。接种 28 d 后分别使用 wt BoHV-1 和 wt BoHV-5 对兔体进行攻击,并通过临床症状观察、体温测量、鼻腔排毒、病理组织学和组织病毒的分离鉴定进行保护力研究。使用间接 ELISA、中和实验和外周血单核细胞的增殖水平对重组病毒免疫原性进行评估。【结果】接种 BoHV-1 gG<sup>-</sup>/tk<sup>-</sup>/gD<sup>+</sup>和 BoHV-1 gG<sup>-</sup>/tk<sup>-</sup>/gD5<sup>+</sup>后兔体均未出现显著临床症状,无鼻腔排毒现象,并且肺组织未分离到病毒; BoHV-1 gG<sup>-</sup>/tk<sup>-</sup>接种组有一只兔肺组织分离到病毒。攻毒后, BoHV-1 gG<sup>-</sup>/tk<sup>-</sup>/gD<sup>+</sup>和 BoHV-1 gG<sup>-</sup>/tk<sup>-</sup>/gD5<sup>+</sup>可以减少临床症状、鼻腔排毒并维持正常肺组织形态,表现为对 BoHV-1 的保护力以及 BoHV-5 的交叉保护力提高。与 BoHV-1 gG<sup>-</sup>/tk<sup>-</sup>相比, BoHV-1 gG<sup>-</sup>/tk<sup>-</sup>/gD<sup>+</sup>和 BoHV-1 gG<sup>-</sup>/tk<sup>-</sup>/gD5<sup>+</sup>免疫诱导更高水平的中和抗体、ELISA 抗体以及 PBMC 增殖。【结论】 BoHV-1 gG<sup>-</sup>/tk<sup>-</sup>/gD<sup>+</sup>和 BoHV-1 gG<sup>-</sup>/tk<sup>-</sup>/gD5<sup>+</sup>安全性良好,同时,与 BoHV-1 gG<sup>-</sup>/tk<sup>-</sup>相比,免疫原性得到提高。

**关键词:** BoHV-1, BoHV-5, 疫苗, 重组病毒, 糖蛋白 gD, 免疫原性

**Foundation item:** National Key Research and Development Program of China (No. 2017YFNC020006); Special Fund for China Agricultural Research System (Beef Cattle/Yak) (No. CARS-37)

\*Corresponding author: E-mail: aizhen@mail.hzau.edu.cn

**Received:** July 14, 2017; **Accepted:** November 16, 2017; **Published online** (www.cnki.net): November 16, 2017

**基金项目:** 国家重点研发计划项目(No. 2017YFNC020006); 现代农业(肉牛)产业技术体系专项资金项目(No. CARS-37)

\*通讯作者: E-mail: aizhen@mail.hzau.edu.cn

**收稿日期:** 2017-07-14; **接受日期:** 2017-11-16; **优先数字出版日期**(www.cnki.net): 2017-11-16

## Safety, immunogenicity of BoHV-1 gG<sup>-</sup>/tk<sup>-</sup>/gD<sup>+</sup> and BoHV-1 gG<sup>-</sup>/tk<sup>-</sup>/gD5<sup>+</sup> in rabbits

LI Han-Xiong<sup>1,2</sup> LIU Rui-Ning<sup>1,2</sup> ZHANG Fang<sup>1,2</sup> ZHU Jie<sup>1,2</sup> HOU Gui-Xian<sup>1,2</sup>  
CHEN Ying-Yu<sup>1,2</sup> CHEN Jian-Guo<sup>2</sup> GUO Ai-Zhen<sup>1,2\*</sup>

(1. State Key Laboratory of Agricultural Microbiology, Huazhong Agricultural University, Wuhan, Hubei 430070, China)

(2. College of Veterinary Medicine, Huazhong Agricultural University, Wuhan, Hubei 430070, China)

**Abstract: [Objective]** Infectious bovine rhinotracheitis (IBR) is caused by BoHV-1 and there is no commercialized marker vaccine against IBR in China. Based on the previously constructed BoHV-1 gG<sup>-</sup>/tk<sup>-</sup> gene-deleted vaccine in this lab, the glycoprotein gD extracellular region sequence which served as the best immunogenicity in BoHV-1 and BoHV-5 was further inserted into the site where tk is located and recombinant virus strains BoHV-1 gG<sup>-</sup>/tk<sup>-</sup>/gD<sup>+</sup> and BoHV-1 gG<sup>-</sup>/tk<sup>-</sup>/gD5<sup>+</sup> were successfully constructed. This paper aimed to evaluate the immunogenicity and safety of recombinant virus strains in rabbits and protection against both BoHV-1 and BoHV-5 for development of more effective vaccines against BoHV-1 and BoHV-5 infection. **[Methods]** The 30 rabbits were divided into 6 groups and vaccinated and challenged by nasal inoculation. After strains were vaccinated, their safety was evaluated by clinical symptoms, temperature, virus shedding. Then the rabbits were challenged with either wt BoHV-1 or wt BoHV-5 at the 28<sup>th</sup> day after vaccination. The protection was evaluated by clinical signs, temperature, virus shedding, histopathology, isolation and identification of virus. Besides, the immunogenicity was studied by neutralization test, indirect-ELISA and specific PBMC proliferative response. **[Results]** The rabbits vaccinated with BoHV-1 gG<sup>-</sup>/tk<sup>-</sup>/gD<sup>+</sup> and BoHV-1 gG<sup>-</sup>/tk<sup>-</sup>/gD5<sup>+</sup> didn't show clinical signs, nasal virus shedding and viral survival in lung tissues. One rabbit vaccinated with BoHV-1 gG<sup>-</sup>/tk<sup>-</sup> had viral survival in lung tissues. After challenge, both strains BoHV-1 gG<sup>-</sup>/tk<sup>-</sup>/gD<sup>+</sup> and BoHV-1 gG<sup>-</sup>/tk<sup>-</sup>/gD5<sup>+</sup> could diminish the clinical signs and nasal virus shedding and maintain the good structure of lung tissues indicating the protection against BoHV-1 and cross-protection against BoHV-5 were improved. Besides, BoHV-1 gG<sup>-</sup>/tk<sup>-</sup>/gD<sup>+</sup> and BoHV-1 gG<sup>-</sup>/tk<sup>-</sup>/gD5<sup>+</sup> induced stronger neutralization and ELISA antibodies and PBMC proliferation compared with BoHV-1 gG<sup>-</sup>/tk<sup>-</sup>. **[Conclusion]** BoHV-1 gG<sup>-</sup>/tk<sup>-</sup>/gD<sup>+</sup> and BoHV-1 gG<sup>-</sup>/tk<sup>-</sup>/gD5<sup>+</sup> are safe and could induce higher levels of immune response than BoHV-1 gG<sup>-</sup>/tk<sup>-</sup> strain.

**Keywords:** BoHV-1, BoHV-5, Vaccine, Recombinant virus, Glycoprotein gD, Immunogenicity

牛传染性鼻气管炎病毒 (Infectious bovine rhinotracheitis virus, IBRV), 又称牛疱疹病毒 I 型 (Bovine herpesvirus-1, BoHV-1), 只有一种血清型。使用限制性内切酶分析, 该病毒可分为 1.1、1.2a 和 1.2b 等 3 种基因型。BoHV-1 感染牛后可引起牛传染性鼻气管炎 (Infectious bovine rhinotracheitis, IBR), 该病是以高热、上呼吸道黏膜炎症为主要特征的一种急性、接触性传染病<sup>[1]</sup>。同时, BoHV-1 是牛呼吸疾病综合征 (Bovine respiratory disease complex, BRDC) 重要的病原之一, 感染牛后可潜

伏在三叉神经, 不定期激活。1956 年 Madin 等首次从患病牛中分离出 BoHV-1<sup>[2]</sup>, 1964 年 Huck 等确认 BoHV-1 属于疱疹病毒<sup>[3]</sup>。随后, 世界上许多国家和地区从事 BoHV-1 研究的学者均有相关报道, 并从病牛的不同组织如流产胎儿、眼结膜和大脑等分离到了 BoHV-1。BoHV-1 主要对牛群肥育率、产奶量和繁殖带来极大的影响, 给世界养牛业造成巨大的经济损失, 仅美国每年就可造成 30 亿美元的经济损失<sup>[4]</sup>。

牛疱疹病毒 5 型 (Bovine herpesvirus-5, BoHV-5),

曾称 BoHV-1.3, 后更名为 BoHV-5, 感染牛后主要引起脑炎, 初次感染后可建立潜伏感染<sup>[5]</sup>。BoHV-5 具有神经毒性, 神经症状严重时可引起死亡<sup>[6]</sup>。BoHV-1 和 BoHV-5 具有一定的血清学交叉反应, 发生 BoHV-5 感染的国家通常使用 BoHV-1 疫苗进行预防, 但 BoHV-1 疫苗对 BoHV-5 感染的交叉保护力有待提高<sup>[6]</sup>。目前我国尚无 BoHV-5 感染的报道, 但由于近年来进口牛贸易非常活跃, 因此需防患于未然。

目前, 已有奥地利、挪威、丹麦、德国、芬兰和瑞士等几个国家通过禁止疫苗接种、捕杀血清阳性牛、控制移动等综合措施根除了此病, 但采取捕杀血清阳性牛的方法耗资巨大, 只能应用于阳性率较低的国家或地区。因此, 在一些阳性率较高的国家或地区则采用疫苗接种等防控策略<sup>[7]</sup>。基因缺失疫苗具有接种标识, 可区分野毒感染和疫苗接种, 因此已成为 IBR 根除计划中重要的疫苗。缺失标记主要针对病毒的毒力基因和非必需的免疫原性基因。

BoHV-1 能编码产生 12 个包膜蛋白, 其中有 10 种糖蛋白(gB、gC、gD、gE、gG、gH、gI、gL、gM 和 gK), 另外 2 种包膜蛋白 gN 和 Us9 没有被糖基化修饰。这 12 种包膜蛋白中, 仅 gB、gD、gH、gL 和 gK 5 种蛋白为病毒生长所必需的, 其余 7 种蛋白虽然在病毒侵袭、生长和致病方面发挥作用, 但均属于生长非必需蛋白, 成为候选的标记分子<sup>[8-9]</sup>。目前应用较广泛的标识基因有 gE<sup>[10-11]</sup>、gG<sup>[12-13]</sup>、tk<sup>[14]</sup>等。gD 基因为 BoHV-1 体外增殖必需基因, 与其他几种相关糖蛋白相比, 针对糖蛋白 gD 产生的抗体对病毒中和效果最好<sup>[15]</sup>。在牛和鼠上的免疫实验证明, 糖蛋白 gD 能够引起比 gB、gC 更强并且更持久的细胞免疫<sup>[16]</sup>。

本实验室前期通过对 BoHV-1 gG 和 tk 基因进行缺失, 使其致病和潜伏感染的能力减弱, 牛体实验证明, BoHV-1 gG<sup>-</sup>/tk<sup>-</sup>基因缺失株可以产生良好的免疫保护力<sup>[17]</sup>。为进一步提高其免疫原性和对 BoHV-5 的交叉保护力, 分别将两型病毒糖蛋

白 gD 的胞外区序列分别插入 BoHV-1 gG<sup>-</sup>/tk<sup>-</sup>的 tk 位置, 成功构建了重组病毒 BoHV-1 gG<sup>-</sup>/tk<sup>-</sup>/gD<sup>+</sup>和 BoHV-1 gG<sup>-</sup>/tk<sup>-</sup>/gD5<sup>+</sup>。本研究的目的在于评估 BoHV-1 gG<sup>-</sup>/tk<sup>-</sup>/gD<sup>+</sup>和 BoHV-1 gG<sup>-</sup>/tk<sup>-</sup>/gD5<sup>+</sup>在兔体内的安全性和免疫原性, 并确定重组病毒对 BoHV-5 感染的交叉保护力。

## 1 材料与方法

### 1.1 实验材料

**1.1.1 病毒毒株、细胞和实验动物:** 重组病毒 BoHV-1 gG<sup>-</sup>/tk<sup>-</sup>/gD5<sup>+</sup>和 BoHV-1 gG<sup>-</sup>/tk<sup>-</sup>/gD<sup>+</sup>、基因缺失毒株 BoHV-1 gG<sup>-</sup>/tk<sup>-</sup>、wt BoHV-1 (GenBank 登录号: AJ004801)、wt BoHV-5 (GenBank 登录号: AY261359)均由本实验室保存。BoHV-1 gG<sup>-</sup>/tk<sup>-</sup>中 tk 基因为部分缺失, 基因位置为 63 260–64 339 nt (1 080 bp), 其中的缺失区域为 63 441–64 073 nt, 共 633 bp; BoHV-1 gG<sup>-</sup>/tk<sup>-</sup>中 gG 基因为全基因缺失, 基因位置为 117 337–118 671 nt (1 335 bp), 缺失区域为 117 337–118 671 nt, 共 1 335 bp; BoHV-1 gG<sup>-</sup>/tk<sup>-</sup>/gD<sup>+</sup>中 gD 基因为 wt BoHV-1 gD 胞外区序列, 基因位置为 118 896–120 149 nt (1 254 bp), 扩增区域为 118 896–119 975 nt, 共 1 080 bp; BoHV-1 gG<sup>-</sup>/tk<sup>-</sup>/gD5<sup>+</sup>中 gD5 基因为 wt BoHV-5 gD 胞外区序列, 基因位置为 121 129–122 382 nt (1 254 bp), 扩增区域为 121 129–122 208 nt, 共 1 080 bp。BoHV-1 gG<sup>-</sup>/tk<sup>-</sup>/gD<sup>+</sup>和 BoHV-1 gG<sup>-</sup>/tk<sup>-</sup>/gD5<sup>+</sup>中的 gD 基因位于重组病毒的 tk 位置 63 441–64 073 nt。

牛肾细胞系 MDBK, 由本实验室保存。

体重 1.5 kg 左右的雌性 SPF 级日本大耳白兔 30 只, 购自湖北省实验动物研究中心。实验地点为华中农业大学实验动物中心, 华中农业大学伦理道德委员会批准号为 HZAUBO-2015-005。

**1.1.2 主要试剂和仪器:** DNA Marker、PrimeSTAR HS DNA 聚合酶、dNTP Mixture 和 5×PrimeSTAR Buffer, 中国宝生物工程(大连)有限公司;羊抗兔 IgG HRP, 美国 Southern Biotech 公司;牛传染性鼻气管炎标准阴阳性血清, 中国兽医药品监察所;低熔点

琼脂糖, 美国 Amresco 公司; 新生牛血清, 中国杭州四季青生物工程材料有限公司; 胎牛血清和伴刀豆凝集素 A (Concanavalin A, Con A), 美国 Sigma-Aldrich 公司; 病毒 DNA 提取试剂盒, 天根生化科技(北京)有限公司; BCA 蛋白测定试剂盒, 中国南京诺唯赞生物科技有限公司; 人淋巴细胞分离管, 达科为生物技术股份有限公司; XTT 细胞增殖检测试剂盒, Abnova 公司。

超净台、生物安全柜和细胞培养箱, 北京东联哈尔仪器制造有限公司; PCR 扩增仪, 北京东胜创新生物科技有限公司; 超纯水仪, 密理博中国有限公司; 凝胶成像系统, 美国 ProteinSimple 公司; 离心机, 艾本德中国有限公司; 超速离心机, 美国贝克曼库尔特有限公司; 电泳仪, 北京六一生物科技有限公司; 酶标仪, 瑞士 Tecan 公司。

## 1.2 动物实验方法

**1.2.1 接种和攻毒:** 将 30 只日本大耳白兔随机分成 6 组, 其中接种和攻毒途径均是鼻腔接种, 具体方案如表 1 所示。

**1.2.2 重组病毒安全性研究:** 每天上午 9 点测量体温, 观察临床症状, 包括精神状态、饮食、鼻腔分泌物、眼睛分泌物以及神经症状, 并采集鼻拭子, 用直棉签掏两侧鼻腔黏液, 采集后的棉签放置于含有 5% 青链霉素的 DMEM 内, 样品采集后  $-80^{\circ}\text{C}$  保存。

**1.2.3 抵抗同型病毒 wt BoHV-1 的研究:** 接种 28 d 后, 对兔体使用 wt BoHV-1 进行攻击, 攻毒剂量为  $4 \times 10^7$  PFU。攻毒后每天测量体温, 观察临床症状并每天采集鼻拭子, 鼻拭子采集方法同 1.2.2。攻毒 21 d 后对其进行剖杀, 采取心、肝、脾、肺、肾、脑和神经节进行病毒分离和 PCR 鉴定, 对肺组织制备石蜡包埋切片, 进行组织病理学观察(将样品送至武汉谷歌生物科技有限公司)。

**1.2.4 抵抗异型病毒 wt BoHV-5 的研究:** 方法同 1.2.3。

## 1.3 检测方法

**1.3.1 病毒的形态学检测:** 将长满单层的 MDBK 细胞用胰酶消化后按 1:3-1:4 比例传代, 待次日细胞长成 90% 左右为宜。将病毒接入瓶内, 接种的感染复数(Multiplication of infection, MOI)为 0.1, 观察细胞病变(Cytopathogenic effect, CPE)。接种后 3-4 d, 细胞完全病变时收获细胞培养物。将培养物置  $-80^{\circ}\text{C}$  冻融 2 次后,  $4^{\circ}\text{C}$ 、5 000 r/min 离心 5 min, 取上清; 上清液  $4^{\circ}\text{C}$ 、5 000 r/min 离心 10 min, 取上清; 上清液  $4^{\circ}\text{C}$ 、25 000 r/min 超速离心 2 h, 弃上清, 将超速离心管倒置在滤纸上 5-10 min, 沉淀用  $1 \times \text{PBS}$  缓冲液溶解。将  $1 \times \text{PBS}$  缓冲液溶解的病毒粒子送至华中农业大学电镜平台。

表 1 兔体试验方案

Table 1 The rabbit experimental scheme

组别 Groups	接种材料 Inoculative material	数量 Number	剂量 Dose (PFU)	攻毒材料 Challenging material	数量 Number	剂量 Dose (PFU)
1	BoHV-1 gG <sup>-</sup> /tk <sup>-</sup> /gD <sup>+</sup>	6	$4 \times 10^7$	wt BoHV-1	3	$4 \times 10^7$
				wt BoHV-5	3	$4 \times 10^7$
2	BoHV-1 gG <sup>-</sup> /tk <sup>-</sup> /gD5 <sup>+</sup>	6	$4 \times 10^7$	wt BoHV-1	3	$4 \times 10^7$
				wt BoHV-5	3	$4 \times 10^7$
3	BoHV-1 gG <sup>-</sup> /tk <sup>-</sup>	6	$4 \times 10^7$	wt BoHV-1	3	$4 \times 10^7$
				wt BoHV-5	3	$4 \times 10^7$
4	wt BoHV-1	3	$4 \times 10^7$	-	-	-
5	DMEM (阴性对照)	6	-	wt BoHV-1	3	$4 \times 10^7$
				wt BoHV-5	3	$4 \times 10^7$
6	DMEM (空白对照)	3	-	DMEM	3	-

注: 兔子在免疫后 28 d 进行攻毒。

Note: The rabbits were challenged at the 28<sup>th</sup> day after vaccination.

**1.3.2 感染兔组织病毒的分离:** 剪 1 g 左右组织放入研磨仪中, 将含有 1% 新生牛血清和 5% 双抗的 DMEM 3 mL 加入研磨仪内, 研磨均匀后 4 °C、5 000 r/min 离心 5 min。取离心后上清, 使用 0.22 μm 滤器过滤除菌, 分装后 -80 °C 保存。将研磨后的组织液体冻融 2 次后取 200 μL 接种 24 孔板 MDBK 细胞, 每个样接种 2 个孔, 置 37 °C、5% CO<sub>2</sub> 培养箱中孵育, 2 h 后补加生长液 800 μL, 置 37 °C、5% CO<sub>2</sub> 培养箱培养 4 d, 观察细胞病变; 之后盲传两代, 观察细胞病变。

**1.3.3 病毒感染兔组织核酸的 PCR 检测:** 针对重组病毒 *gG* 和 *tk* 两个基因的缺失部位, 设计病毒检测引物。重组病毒 BoHV-1 gG<sup>-</sup>/tk<sup>-</sup>、BoHV-1 gG<sup>-</sup>/tk<sup>-</sup>/gD<sup>+</sup> 和 BoHV-1 gG<sup>-</sup>/tk<sup>-</sup>/gD<sup>5+</sup> 对 *gG* 进行了全基因缺失, 因此上下游鉴定引物位于 *gG* 基因的外侧; *tk* 基因为部分缺失, 上下游鉴定引物位于 *tk* 基因缺失区外侧(表 2)。PCR 扩增产物大小分别如下: BoHV-1 野毒株 *gG* 鉴定 PCR 产物应为 *gG* 全基因(1 335 bp)和基因两侧的扩增片段(524 bp), 合计大小为 1 859 bp; *tk* 基因扩增产物大小为 868 bp。重组病毒 BoHV-1 gG<sup>-</sup>/tk<sup>-</sup>、BoHV-1 gG<sup>-</sup>/tk<sup>-</sup>/gD<sup>+</sup> 和 BoHV-1 gG<sup>-</sup>/tk<sup>-</sup>/gD<sup>5+</sup> 因为 *gG* 基因发生了全基因缺失, PCR 产物大小为 524 bp; 重组病毒 BoHV-1 gG<sup>-</sup>/tk<sup>-</sup> 中 *tk* 基因发生了部分缺失(633 bp), PCR 扩增产物大小为 235 bp; 重组病毒 BoHV-1 gG<sup>-</sup>/tk<sup>-</sup>/gD<sup>+</sup> 和 BoHV-1 gG<sup>-</sup>/tk<sup>-</sup>/gD<sup>5+</sup> 的 *tk* 基因发了部分缺失(633 bp), 同时在基因内部插入了糖蛋白 *gD* 胞外区序列(1 080 bp), PCR 扩增

产物大小为 1 315 bp。

取组织盲传产物, 使用病毒 DNA 提取试剂盒提取 DNA, 操作步骤按照试剂盒说明书进行, DNA 提取后进行 PCR 鉴定。PCR 阳性对照为 BoHV-1 gG<sup>-</sup>/tk<sup>-</sup>; 阴性对照为 ddH<sub>2</sub>O。PCR 反应体系为: 模板 2.0 μL, 5×Prime STAR buffer (Mg<sup>2+</sup> plus) 5 μL, dNTP mixture (各 2.5 mmol/L) 2 μL, 上下游引物 (10 mmol/L) 各 0.5 μL, PrimeSTAR HS DNA Polymerase (2.5 U/μL) 0.25 μL, 加 ddH<sub>2</sub>O 至 25 μL。PCR 反应条件为: 95 °C 5 min; 94 °C 1 min, 60 °C 45 s, 72 °C 3.5 min, 35 个循环; 72 °C 10 min, 16 °C 20 min。PCR 结束后进行 1% 琼脂糖凝胶电泳鉴定。

**1.3.4 兔肺组织石蜡包埋切片制备方法:** 攻毒 21 d 后剖杀兔体取肺, 4% 多聚甲醛固定 24 h 以上。将目的部位组织修平整, 放于脱水盒内, 75% 酒精 4 h, 85% 酒精 2 h, 90% 酒精 2 h, 95% 酒精 1 h, 无水乙醇 I 30 min, 无水乙醇 II 30 min, 醇苯 5–10 min, 二甲苯 I 5–10 min, 二甲苯 II 5–10 min, 蜡 I 1 h, 蜡 II 1 h, 蜡 III 1 h。将融化的蜡放入包埋框, 待蜡凝固之前将组织从脱水盒内取出按照包埋面的要求放入包埋框并贴上对应的标签。于 -20 °C 冷冻台冷却, 蜡凝固后将蜡块从包埋框中取出并修整蜡块。将修整好的蜡块置于石蜡切片机上切片, 片厚 4 μm。切片漂浮于摊片机 40 °C 温水上将组织展平, 用载玻片将组织捞起, 并放进 60 °C 烘箱内烤片。待水烤干、蜡烤化后取出常温保存备用。

表 2 PCR 检测重组病毒所用引物

Table 2 The primers used to identify recombinant viruses in this study

引物名称 Primer	引物序列 来源 Source	引物序列 Sequence (5'→3')	GenBank 登录号 GenBank accession No.	引物在基因 组中的位置 Location of primer (nt)	基因在基因组 中的位置 Location of gene (nt)	缺失区域 Location of deleted gene (nt)
BoHV-1 <i>gG</i> 引物	BoHV-1 <i>gG</i> 上下 游序列	P1: CCGACCGCCTCC TACACCAGATGCT	AJ004801	117 102–117 126	117 337–118 671	117 337–118 671
BoHV-1 <i>gG</i> primer		P2: GGGTGTAGGCAA GCTCACCGCAACG	AJ004801	118 937–118 961		
BoHV-1 <i>tk</i> 引物	BoHV-1 <i>tk</i> 未缺失 部分	P3: ACGGGCTGGGA AAGACAACAACGG	AJ004801	63 315–63 338	63 260–64 339	63 441–64 073
BoHV-1 <i>tk</i> primer		P4: GCGGACACGTC CAGCACGAACA	AJ004801	64 161–64 182		

**1.3.5 鼻腔排毒检测:**从 $-80^{\circ}\text{C}$ 中取出鼻拭子,冻融2次后,5 000 r/min离心3 min取上清,按比例稀释接种至MDBK细胞孵育2 h。弃病毒液,2%低熔点琼脂糖和 $2\times\text{DMEM}$  (1:1)混合液覆盖,待混合液凝固后,在 $\text{CO}_2$ 培养箱中培养48 h,甲醛固定2 h。弃去孔中覆盖物和甲醛,结晶紫染色0.5 h,对病毒空斑进行计数。

**1.3.6 中和抗体的检测:**采用常规微量细胞病变法检测血清中病毒中和抗体<sup>[18]</sup>,其中中和实验所用病毒为wt BoHV-1或wt BoHV-5,细胞为MDBK。优化实验条件,设置细胞对照:每孔加细胞悬液100  $\mu\text{L}$ ,稀释液100  $\mu\text{L}$ ,共4孔;病毒回归对照:配置100、10、1、0  $\text{TCID}_{50}/50$   $\mu\text{L}$ 病毒悬液,每个稀释度接种2孔,每孔加入病毒悬液50  $\mu\text{L}$ ,细胞悬液100  $\mu\text{L}$ ,稀释液50  $\mu\text{L}$ ;阳(阴)性对照:每孔加牛传染性鼻气管炎标准阳(阴)性血清和100  $\text{TCID}_{50}/50$   $\mu\text{L}$ 病毒悬液各50  $\mu\text{L}$ ,细胞悬液100  $\mu\text{L}$ ,共4孔;血清毒性对照:每个梯度的血清设1孔,每孔加同稀释度血清50  $\mu\text{L}$ 、稀释液50  $\mu\text{L}$ 和细胞悬液100  $\mu\text{L}$ 。在各项对照均成立的条件下,按照Reed-Muench法计算被检血清中和抗体效价,以能抑制50%细胞发生病变的血清最高稀释度为该血清的中和抗体效价。

**1.3.7 间接ELISA检测BoHV抗体:**参考间接ELISA建立程序<sup>[19]</sup>,通过条件优化,确定用于本研究的检测条件如下:通过方阵滴定法测得wt BoHV-1和wt BoHV-5最佳包被浓度分别为3.2 ng/孔和1.6 ng/孔,一抗最佳稀释度为1:400,孵育时间为1 h,二抗稀释度为1:20 000;使用包被液稀释病毒粒子,100  $\mu\text{L}/$ 孔,4  $^{\circ}\text{C}$ 过夜,洗涤液洗3次 $\times$ 3 min;加5%脱脂奶封闭,200  $\mu\text{L}/$ 孔,37  $^{\circ}\text{C}$ 封闭1 h,弃封闭液,洗涤同上;加稀释好的待检测血清,同时设空白对照,100  $\mu\text{L}/$ 孔,37  $^{\circ}\text{C}$ 放置1 h,洗涤同上;加入1:20 000倍稀释的二抗,100  $\mu\text{L}/$ 孔,37  $^{\circ}\text{C}$ 温育30 min,洗涤同上;加入TMB底物A和B,每孔各50  $\mu\text{L}$ ,避光显色10 min,加终止液50  $\mu\text{L}/$ 孔,630 nm波长下测定 $OD_{630}$ 值。

**1.3.8 外周血单核细胞增殖水平的检测:**使用人淋巴细胞分离管对全血进行PBMCs分离,按照BCA蛋白测定试剂盒说明书进行灭活wt BoHV-1病毒粒子浓度的测定。将wt BoHV-1病毒粒子加入96孔板进行抗原刺激,使每孔病毒粒子的浓度为20  $\mu\text{L}/\text{mL}$ ,同时设置阳性对照:每孔浓度为1  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的Con A,阴性对照:RPMI-1640培养基,抗原刺激、阳性对照及阴性对照均做2个重复,之后将96孔板放置37  $^{\circ}\text{C}$ 培养箱(5%  $\text{CO}_2$ )培养72 h<sup>[20]</sup>。培养72 h后使用XTT细胞增殖检测试剂盒对刺激后的96孔板PBMCs进行检测。

## 1.4 统计学分析方法

数据统计学分析使用GraphPad prism 5.0软件包中的方差分析程序(Two-Way ANOVA等)分析。其中: $P>0.05$ 表示差异不显著, $P<0.05$ 表示差异显著(\*), $P<0.01$ (\*\*)和 $P<0.001$ (\*\*\*)表示差异极显著。

## 2 结果与分析

### 2.1 重组病毒形态观察

为了研究重组病毒的病毒形态是否正常,将病毒样本进行了负染和电镜观察,结果显示,重组病毒BoHV-1  $\text{gG}^-/\text{tk}^-/\text{gD}^+$ 和BoHV-1  $\text{gG}^-/\text{tk}^-/\text{gD}5^+$ 、亲本病毒BoHV-1  $\text{gG}^-/\text{tk}^-$ 和wt BoHV-1的病毒粒子均呈球形,部分病毒粒子有囊膜,形态不一,被膜和囊膜之间有无定形材料,部分病毒粒子的核衣壳可清晰观察到正六边形结构,病毒粒子的大小均在165 nm左右,均符合BoHV-1病毒粒子的基本特征(图1)。

### 2.2 重组病毒的安全性研究

兔体接种重组病毒后,wt BoHV-1攻毒对照组在第8天体温为38.8  $^{\circ}\text{C}$ ,低于兔群体温平均值0.5  $^{\circ}\text{C}$ 以上,其余各时间点各组兔体体温均在群体平均值0.5  $^{\circ}\text{C}$ 上下限值内,体温波动不显著( $P>0.05$ ) (图2)。接种BoHV-1  $\text{gG}^-/\text{tk}^-/\text{gD}^+$ 和BoHV-1  $\text{gG}^-/\text{tk}^-/\text{gD}5^+$ 后无明显的其他临床症状,采食和饮水正常;接种BoHV-1  $\text{gG}^-/\text{tk}^-$ 后有一只兔体分别在接种后第3天、第5天和第7天鼻腔有白色或淡黄色分泌物,采食和饮水正常,精神状态正常。

接种后对 6 组兔第 1-9 天的鼻拭子进行毒价测定, 6 组兔体鼻拭子样本均未检测到排毒。

### 2.3 重组毒免疫抵抗野毒感染能力研究

**2.3.1 抵抗同型病毒 wt BoHV-1 感染:** 攻击 wt BoHV-1 后, BoHV-1 gG<sup>-</sup>/tk<sup>-</sup>/gD5<sup>+</sup>接种组在第 2、20 和 21 天体温分别为 39.0、39.0 和 38.9 °C, 低于兔群体温平均值 0.5 °C 以上, BoHV-1 gG<sup>-</sup>/tk<sup>-</sup>/gD<sup>+</sup>接种组在第 9 天体温为 40.5 °C, 高于兔群体温平均值 0.5 °C 以上, 其余时间点各组兔体体温均在群体平均值 0.5 °C 上下限值内, 体温波动不显著

( $P>0.05$ ) (图 3)。攻毒后, 各组的临床症状主要包括体温升高、流鼻涕等(表 3)。整体说来, 与未免疫攻毒组相比, 重组病毒免疫攻毒组症状轻微, BoHV-1 gG<sup>-</sup>/tk<sup>-</sup>/gD<sup>+</sup>、BoHV-1 gG<sup>-</sup>/tk<sup>-</sup>/gD5<sup>+</sup> 和 BoHV-1 gG<sup>-</sup>/tk<sup>-</sup> 3 种病毒免疫攻毒后出现临床症状的总时间分别为 4、10 和 8 d, 说明双拷贝同源 gD 的免疫效果高于异源 gD。攻击 wt BoHV-1 后在 6 组兔均未检测到有鼻腔排毒现象。兔体剖杀后 6 组兔的心、肝、脾、肺、肾、脑和三叉神经节进行 PCR 鉴定, 结果均未检测到病毒。

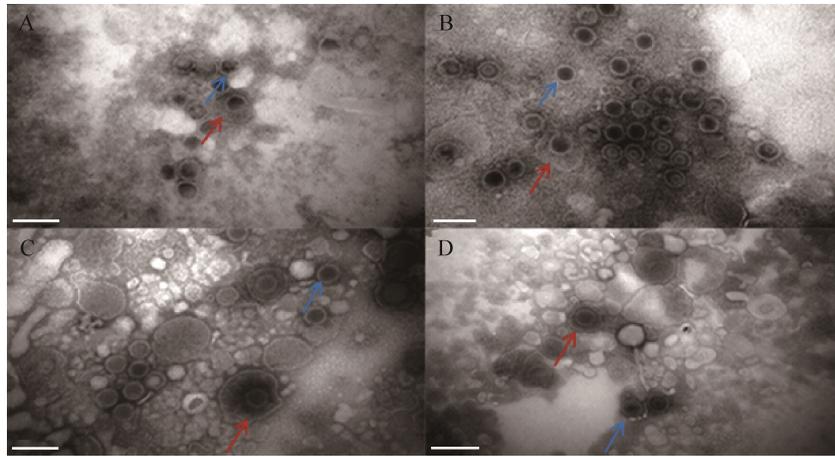


图 1 负染病毒粒子的透射电子显微镜观察

#### Figure 1 Observation of recombinant viral particles with transmission electron microscope after negative staining

注: A: BoHV-1 gG<sup>-</sup>/tk<sup>-</sup>/gD<sup>+</sup>; B: BoHV-1 gG<sup>-</sup>/tk<sup>-</sup>/gD5<sup>+</sup>; C: BoHV-1 gG<sup>-</sup>/tk<sup>-</sup>; D: wt BoHV-1. 其中红色箭头指的是囊膜完整的病毒粒子, 蓝色箭头指的是没有囊膜或是囊膜不完整的病毒粒子. Bar=200 nm.

Note: A: BoHV-1 gG<sup>-</sup>/tk<sup>-</sup>/gD<sup>+</sup>; B: BoHV-1 gG<sup>-</sup>/tk<sup>-</sup>/gD5<sup>+</sup>; C: BoHV-1 gG<sup>-</sup>/tk<sup>-</sup>; D: wt BoHV-1. The red arrow refers to intact envelope of the virus particles; The blue arrow refers to no envelope or incomplete envelope of the virus particles. Bar=200 nm.

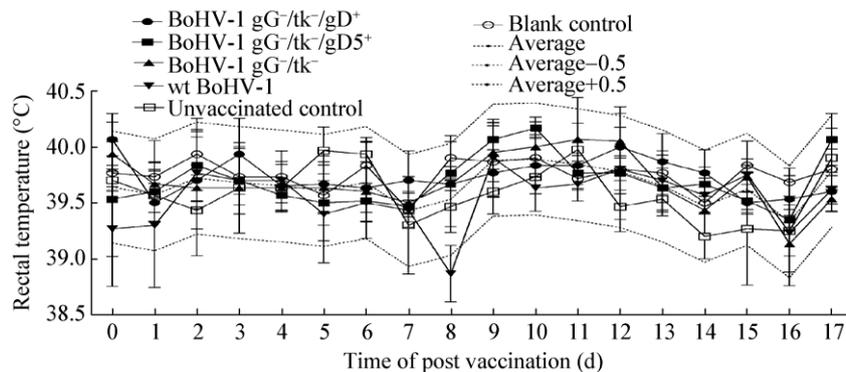


图 2 兔接种后的体温变化

#### Figure 2 Rectal temperature changes in rabbits after infection

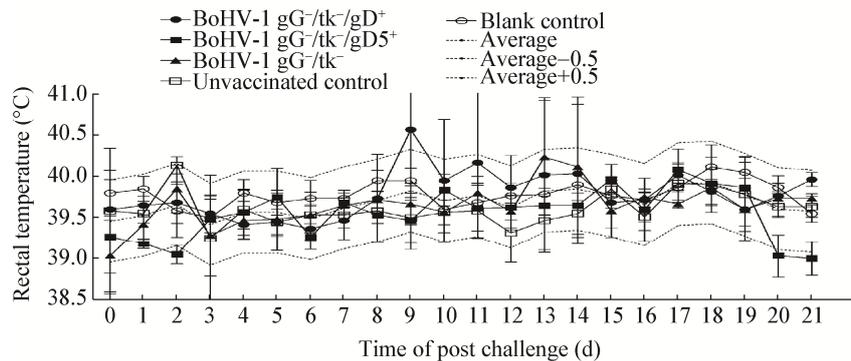


图3 兔体野毒 wt BoHV-1 攻毒后的体温变化曲线

Figure 3 Rectal temperature changes in rabbits after challenge with wt BoHV-1

注：攻毒当天为第0天，结果显示各组体温差异不显著( $P>0.05$ )。

Note: The day of virus challenge was 0 d. The difference of body temperature in each group was not significant ( $P>0.05$ ).

表3 wt BoHV-1 攻毒后的临床症状  
Table 3 The clinical signs after challenge with wt BoHV-1

组别 Groups	编号 Serial number	临床症状出现时间 Time of clinical sign occurrence (d)	临床症状持续时间 Clinical sign duration (d)
BoHV-1 gG <sup>-</sup> /tk <sup>-</sup> /gD <sup>+</sup> 接种组 BoHV-1 gG <sup>-</sup> /tk <sup>-</sup> /gD <sup>+</sup> vaccination group	1	12	4
	2	0	0
	3	0	0
BoHV-1 gG <sup>-</sup> /tk <sup>-</sup> /gD5 <sup>+</sup> 接种组 BoHV-1 gG <sup>-</sup> /tk <sup>-</sup> /gD5 <sup>+</sup> vaccination group	1	5	9
	2	17	1
	3	0	0
BoHV-1 gG <sup>-</sup> /tk <sup>-</sup> 接种组 BoHV-1 gG <sup>-</sup> /tk <sup>-</sup> vaccination group	1	14	4
	2	17	4
	3	0	0
未免疫攻毒组 DMEM gourp	1	2	4
	2	7	3
	3	0	0
空白对照组 Blank control group	1	0	0
	2	0	0
	3	0	0

在 wt BoHV-1 攻毒 21 d 后，将兔体剖杀后取其肺脏组织进行甲醛固定，并作组织病理学观察。结果显示，BoHV-1 gG<sup>-</sup>/tk<sup>-</sup>/gD<sup>+</sup>接种组肺泡结构几乎保持完整，肺泡壁基本没有受到破坏，肺泡无淋巴样细胞(图 4A)。BoHV-1 gG<sup>-</sup>/tk<sup>-</sup>/gD5<sup>+</sup>接种组和

BoHV-1 gG<sup>-</sup>/tk<sup>-</sup>接种组肺泡结构有轻微的破坏，肺泡壁略微增厚(图 4B 和 4C)。未接种重组病毒的攻毒组的正常肺泡结构已经消失，有大量坏死的细胞和炎性细胞在肺泡腔内(图 4D)。正常对照组肺泡结构保持完整，肺泡无淋巴样细胞(图 4E)。

**2.3.2 抵抗异型病毒 wt BoHV-5 感染的研究:** 攻击 wt BoHV-5 后, 各时间点各组兔体体温均在群体平均值 0.5 °C 上下限值内, 体温波动不显著 ( $P>0.05$ ) (图 5)。攻毒后, 各组的临床症状主要包括流鼻涕和打喷嚏等(表 4)。BoHV-1 gG<sup>-</sup>/tk<sup>-</sup>/gD<sup>+</sup>、

BoHV-1 gG<sup>-</sup>/tk<sup>-</sup>/gD5<sup>+</sup>、BoHV-1 gG<sup>-</sup>/tk<sup>-</sup>和未免疫攻毒组 4 种病毒免疫攻毒后出现临床症状的总时间分别为 1、0、14 和 16 d, 说明 BoHV-1 gG<sup>-</sup>/tk<sup>-</sup>/gD5<sup>+</sup> 对 BoHV-5 攻击的免疫保护效果最佳。攻击 wt BoHV-5 后在 6 组兔体均未检测到有鼻腔排毒现象。

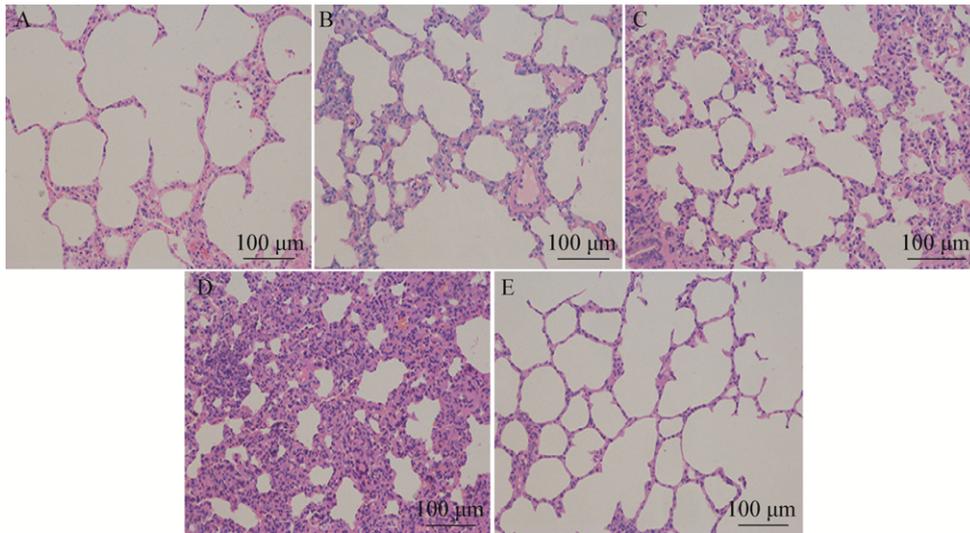


图 4 野毒 wt BoHV-1 攻毒后肺脏组织的病理学观察(苏木素-伊红染色)

Figure 4 Histopathological examination of lungs after challenge with wtBoHV-1 (HE stain)

注: A: BoHV-1 gG<sup>-</sup>/tk<sup>-</sup>/gD<sup>+</sup>接种组; B: BoHV-1 gG<sup>-</sup>/tk<sup>-</sup>/gD5<sup>+</sup>接种组; C: BoHV-1 gG<sup>-</sup>/tk<sup>-</sup>接种组; D: 未接种疫苗的攻毒组; E: 空白对照组。染色结果: 细胞核蓝色, 细胞质红色。

Note: A: BoHV-1 gG<sup>-</sup>/tk<sup>-</sup>/gD<sup>+</sup> vaccination group; B: BoHV-1 gG<sup>-</sup>/tk<sup>-</sup>/gD5<sup>+</sup> vaccination group; C: BoHV-1 gG<sup>-</sup>/tk<sup>-</sup> vaccination group; D: DMEM group; E: Blank control group. Dyeing results: Nucleus was blue, cytoplasm was red.

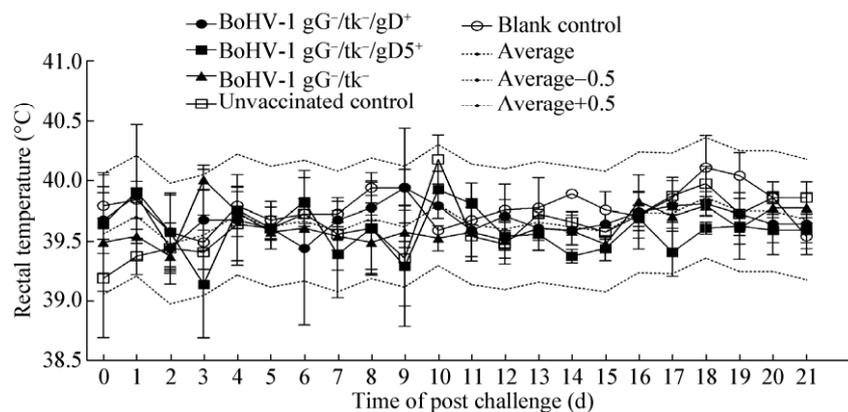


图 5 野毒 wt BoHV-5 攻毒后的体温变化曲线

Figure 5 Rectal temperature changes in rabbits after challenge with wt BoHV-5

注: 攻毒当天为第 0 天, 结果显示各组体温差异不显著 ( $P>0.05$ )。

Note: The day of virus challenge was 0 d. The difference of body temperature in each group was not significant ( $P>0.05$ ).

wt BoHV-5 攻毒 21 d 后, 将兔体剖杀后取其肺脏组织进行甲醛固定, 并做组织病理学观察。结果显示, BoHV-1 gG<sup>-</sup>/tk<sup>-</sup>/gD<sup>+</sup>和 BoHV-1 gG<sup>-</sup>/tk<sup>-</sup>/gD5<sup>+</sup>接种组肺泡结构完整, 肺泡壁略微增厚(图 6A 和 6B)。BoHV-1 gG<sup>-</sup>/tk<sup>-</sup>接种组肺泡结构破坏较为严

重, 肺泡壁较厚, 肺泡融合区较大(图 6B 和 6C)。未接种重组病毒的 wt BoHV-5 攻毒组的正常肺泡壁严重增厚, 肺泡结构破坏明显(图 6D)。空白对照组肺泡结构完整, 肺泡壁薄, 呈单细胞层, 无淋巴样细胞浸润(图 6E)。

表 4 野毒 wt BoHV-5 攻毒后的临床症状  
Table 4 The clinical signs after challenge with wt BoHV-5

组别 Groups	编号 Serial number	临床症状出现时间 Time of clinical sign occurrence (d)	临床症状持续时间 Clinical sign duration (d)
BoHV-1 gG <sup>-</sup> /tk <sup>-</sup> /gD <sup>+</sup> 接种组 BoHV-1 gG <sup>-</sup> /tk <sup>-</sup> /gD <sup>+</sup> vaccination group	1	9	1
	2	0	0
	3	0	0
BoHV-1 gG <sup>-</sup> /tk <sup>-</sup> /gD5 <sup>+</sup> 接种组 BoHV-1 gG <sup>-</sup> /tk <sup>-</sup> /gD5 <sup>+</sup> vaccination group	1	0	0
	2	0	0
	3	0	0
BoHV-1 gG <sup>-</sup> /tk <sup>-</sup> 接种组 BoHV-1 gG <sup>-</sup> /tk <sup>-</sup> vaccination group	1	7	5
	2	7	9
	3	0	0
未免疫攻毒组 DMEM group	1	3	6
	2	1	10
	3	0	0
空白对照组 Blank control group	1	0	0
	2	0	0
	3	0	0

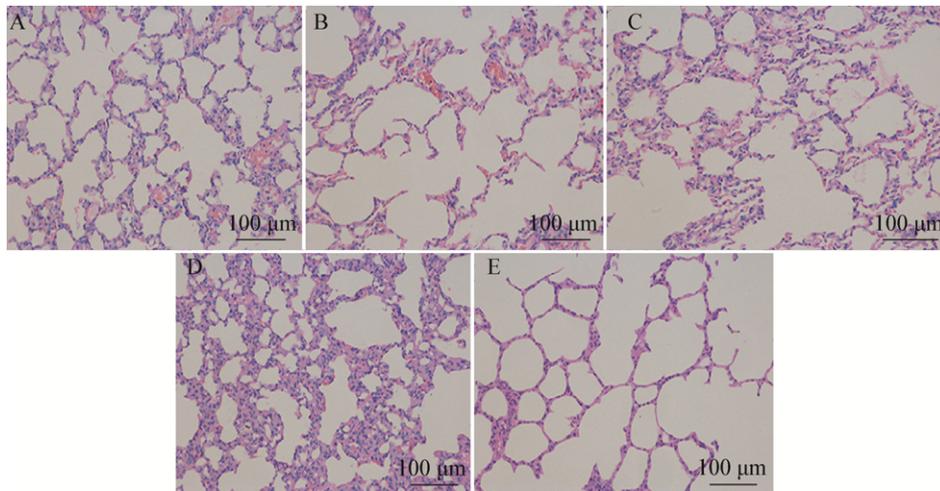


图 6 野毒 wt BoHV-5 攻毒后肺脏组织的病理学观察(苏木素-伊红染色)

Figure 6 Histopathological examination of of lungs after challenge with wtBoHV-5 (HE stain)

注: A: BoHV-1 gG<sup>-</sup>/tk<sup>-</sup>/gD<sup>+</sup>接种组; B: BoHV-1 gG<sup>-</sup>/tk<sup>-</sup>/gD5<sup>+</sup>接种组; C: BoHV-1 gG<sup>-</sup>/tk<sup>-</sup>接种组; D: 未接种疫苗的攻毒组; E: 空白对照组。染色结果: 细胞核蓝色, 细胞质红色。

Note: A: BoHV-1 gG<sup>-</sup>/tk<sup>-</sup>/gD<sup>+</sup> vaccination group; B: BoHV-1 gG<sup>-</sup>/tk<sup>-</sup>/gD5<sup>+</sup> vaccination group; C: BoHV-1 gG<sup>-</sup>/tk<sup>-</sup> vaccination group; D: DMEM group; E: Blank control group. Dyeing results: Nucleus was blue, cytoplasm was red.

将研磨后的组织接种 MDBK, 盲传 2 次, BoHV-1 gG<sup>-</sup>/tk<sup>-</sup>接种组有一只兔体在肺部分离到病毒, 如图 7 泳道 6 所示, 使用 BoHV-1 gG 鉴定引物(P1/P2)对其进行鉴定, 该细胞盲传产物扩增到一条 524 bp 大小的特异性病毒条带, 与阳性对照 BoHV-1 gG<sup>-</sup>/tk<sup>-</sup>结果相符。

## 2.4 重组病毒的免疫原性研究

**2.4.1 中和抗体检测:** 从中和抗体产生的时间而言, BoHV-1 gG<sup>-</sup>/tk<sup>-</sup>/gD<sup>+</sup>和 BoHV-1 gG<sup>-</sup>/tk<sup>-</sup>/gD5<sup>+</sup>接种组分别在接种后第 14 天和第 21 天开始检测到 BoHV-1 中和抗体, 效价为 1:8 和 1:5; 然而本研究中 BoHV-1 gG<sup>-</sup>/tk<sup>-</sup>接种组在接种后 28 d 内未检测到 BoHV-1 中和抗体产生, 与 BoHV-1 gG<sup>-</sup>/tk<sup>-</sup>/gD<sup>+</sup>和 BoHV-1 gG<sup>-</sup>/tk<sup>-</sup>/gD5<sup>+</sup>接种组差异显著( $P < 0.001$ )。攻击 wt BoHV-1 和 wt BoHV-5 后, BoHV-1 gG<sup>-</sup>/tk<sup>-</sup>/gD<sup>+</sup>和 BoHV-1 gG<sup>-</sup>/tk<sup>-</sup>/gD5<sup>+</sup>接种组的 BoHV-1 和 BoHV-5 中和抗体水平均呈急剧上升趋势, 与 BoHV-1 gG<sup>-</sup>/tk<sup>-</sup>接种组差异显著( $P < 0.001$ )。以上

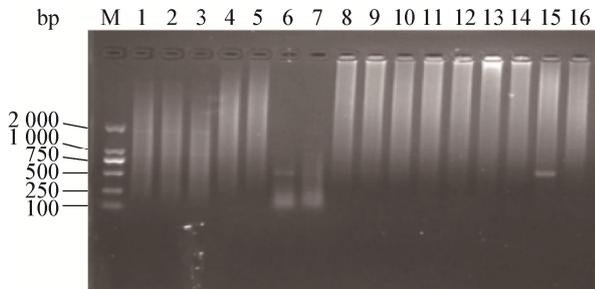


图 7 PCR 检测兔肺组织盲传产物的病毒核酸

### Figure 7 Detection of viral nucleic acid in blind passage culture of rabbit lung tissues with PCR

注: M: DL2000 marker; 1-3: BoHV-1 gG<sup>-</sup>/tk<sup>-</sup>/gD<sup>+</sup>接种组肺组织盲传样本; 4-6: BoHV-1 gG<sup>-</sup>/tk<sup>-</sup>接种组肺组织盲传样本; 7-9: BoHV-1 gG<sup>-</sup>/tk<sup>-</sup>/gD5<sup>+</sup>接种组肺组织盲传样本; 10-12: 未接种疫苗攻毒组肺组织盲传样本; 13-14: 空白对照组肺组织盲传样本; 15: 阳性对照 BoHV-1 gG<sup>-</sup>/tk<sup>-</sup>; 16: ddH<sub>2</sub>O。

Note: M: DL2000 marker; 1-3: BoHV-1 gG<sup>-</sup>/tk<sup>-</sup>/gD<sup>+</sup> vaccination group blind passage culture of lung tissues; 4-6: BoHV-1 gG<sup>-</sup>/tk<sup>-</sup> vaccination group blind passage culture of lung tissues; 7-9: BoHV-1 gG<sup>-</sup>/tk<sup>-</sup>/gD5<sup>+</sup> vaccination group blind passage culture of lung tissues; 10-12: DMEM group blind passage culture of lung tissues; 13-14: Blank control group blind passage culture of lung tissues; 15: Positive control BoHV-1 gG<sup>-</sup>/tk<sup>-</sup>; 16: ddH<sub>2</sub>O.

结果表明, BoHV-1 gG<sup>-</sup>/tk<sup>-</sup>/gD<sup>+</sup>接种组比 BoHV-1 gG<sup>-</sup>/tk<sup>-</sup>/gD5<sup>+</sup>接种组能更早检测到 BoHV-1 中和抗体, 而且 BoHV-1 gG<sup>-</sup>/tk<sup>-</sup>/gD<sup>+</sup>和 BoHV-1 gG<sup>-</sup>/tk<sup>-</sup>/gD5<sup>+</sup>比 BoHV-1 gG<sup>-</sup>/tk<sup>-</sup>能更好地诱导 BoHV-1 和 BoHV-5 中和抗体产生(图 8)。

### 2.4.2 间接 ELISA 检测 BoHV-1 和 BoHV-5 抗体:

将血清进行 1:400 稀释, 采用间接 ELISA 检测 BoHV-1 特异性抗体, 结果显示, 接种后 BoHV-1 gG<sup>-</sup>/tk<sup>-</sup>/gD<sup>+</sup>

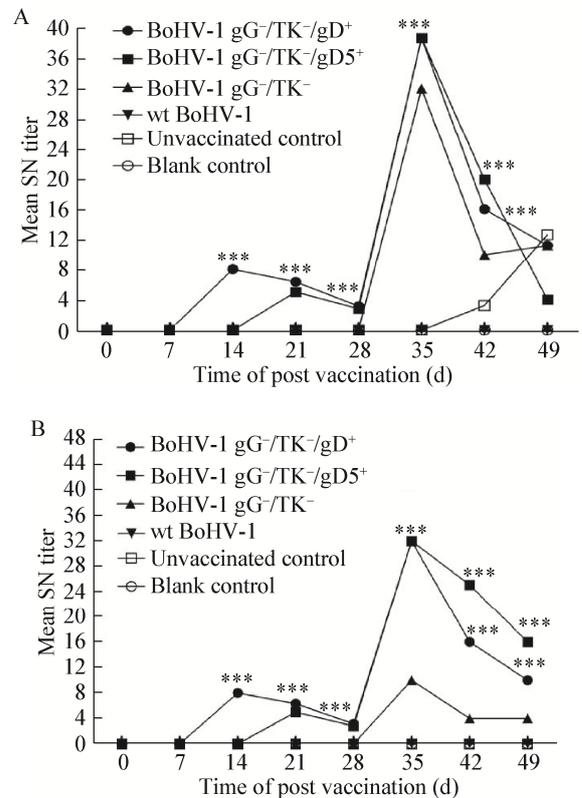


图 8 兔体中和抗体水平

### Figure 8 Neutralization antibody levels in the rabbits

注: A: 兔体接种 28 d 后攻击 wt BoHV-1; B: 兔体接种 28 d 后攻击 wt BoHV-5。接种后, BoHV-1 gG<sup>-</sup>/tk<sup>-</sup>/gD<sup>+</sup>接种组和 BoHV-1 gG<sup>-</sup>/tk<sup>-</sup>/gD5<sup>+</sup>接种组比 BoHV-1 gG<sup>-</sup>/tk<sup>-</sup>接种组可较早地检测到中和抗体, 且差异显著( $P < 0.001$ ); 攻击 BoHV-1 和 BoHV-5 后, 各组中和抗体水平保持差异显著( $P < 0.001$ )。

Note: A: Rabbits were challenged with wt BoHV-1 at the 28<sup>th</sup> day after vaccination; B: Rabbits were challenged with wt BoHV-5 at the 28<sup>th</sup> day after vaccination. Neutralizing antibodies were detected earlier in BoHV-1 gG<sup>-</sup>/tk<sup>-</sup>/gD<sup>+</sup> and BoHV-1 gG<sup>-</sup>/tk<sup>-</sup>/gD5<sup>+</sup> vaccination group than BoHV-1 gG<sup>-</sup>/tk<sup>-</sup> after vaccination ( $P < 0.001$ ). The level of neutralizing antibody in each group remained significantly different after BoHV-1 or BoHV-5 challenge ( $P < 0.001$ ).

和 BoHV-1 gG<sup>-</sup>/tk<sup>-</sup>/gD<sup>+</sup> 接种组的 BoHV-1 特异性抗体平均  $OD_{630}$  值最高分别为 1.14 和 0.96, BoHV-1 gG<sup>-</sup>/tk<sup>-</sup> 接种组为 0.85, 与重组病毒差异显著 ( $P < 0.001$ )。实验结果表明, 接种后 BoHV-1 gG<sup>-</sup>/tk<sup>-</sup>/gD<sup>+</sup> 和 BoHV-1 gG<sup>-</sup>/tk<sup>-</sup>/gD<sup>+</sup> 比 BoHV-1 gG<sup>-</sup>/tk<sup>-</sup> 能更好地诱导 BoHV-1 特异性抗体产生。

攻击 wt BoHV-1 后, BoHV-1 gG<sup>-</sup>/tk<sup>-</sup>/gD<sup>+</sup>、BoHV-1 gG<sup>-</sup>/tk<sup>-</sup>/gD<sup>+</sup> 和 BoHV-1 gG<sup>-</sup>/tk<sup>-</sup> 接种组的 BoHV-1 特异性抗体平均  $OD_{630}$  值最高达到 0.793 5、0.717 8 和 0.697 7, 差异不显著 ( $P > 0.05$ )。攻击 wt BoHV-5 后, BoHV-1 gG<sup>-</sup>/tk<sup>-</sup>/gD<sup>+</sup>、BoHV-1 gG<sup>-</sup>/tk<sup>-</sup>/gD<sup>+</sup> 和 BoHV-1 gG<sup>-</sup>/tk<sup>-</sup> 接种组的 BoHV-5 特异性抗体平均  $OD_{630}$  值最高达到 1.368 0、1.038 0 和 0.949 0。BoHV-1 gG<sup>-</sup>/tk<sup>-</sup>/gD<sup>+</sup> 接种组的 BoHV-5 特异性抗体水平呈上升趋势, 显著高于 BoHV-1 gG<sup>-</sup>/tk<sup>-</sup>/gD<sup>+</sup> 和 BoHV-1 gG<sup>-</sup>/tk<sup>-</sup> 接种组 ( $P < 0.001$ ) (图 9)。

**2.4.3 接种后外周血单核细胞增殖水平的检测:** XTT 试剂盒对外周血单核细胞检测实验结果显示, 接种后第 14 天 BoHV-1 gG<sup>-</sup>/tk<sup>-</sup>/gD<sup>+</sup> 接种组的外周血单核细胞增殖平均水平显著高于 BoHV-1 gG<sup>-</sup>/tk<sup>-</sup>/gD<sup>+</sup> 接种组和 BoHV-1 gG<sup>-</sup>/tk<sup>-</sup> 接种组 ( $P < 0.001$ )。接种后第 21 天 BoHV-1 gG<sup>-</sup>/tk<sup>-</sup>/gD<sup>+</sup>、BoHV-1 gG<sup>-</sup>/tk<sup>-</sup>/gD<sup>+</sup> 和 BoHV-1 gG<sup>-</sup>/tk<sup>-</sup> 接种组的外周血单核细胞增殖水平最高, 平均  $OD_{630}$  值分别为 0.25、0.17 和 0.16。

攻击 wt BoHV-1 后第 14 天, BoHV-1 gG<sup>-</sup>/tk<sup>-</sup>/gD<sup>+</sup>、BoHV-1 gG<sup>-</sup>/tk<sup>-</sup>/gD<sup>+</sup> 和 BoHV-1 gG<sup>-</sup>/tk<sup>-</sup> 接种组的外周血单核细胞增殖水平平均  $OD_{630}$  值分别为 0.67、0.77 和 0.24, BoHV-1 gG<sup>-</sup>/tk<sup>-</sup>/gD<sup>+</sup> 和 BoHV-1 gG<sup>-</sup>/tk<sup>-</sup>/gD<sup>+</sup> 接种组显著高于 BoHV-1 gG<sup>-</sup>/tk<sup>-</sup> 接种组 ( $P < 0.001$ ); 攻击 wt BoHV-5 后 BoHV-1 gG<sup>-</sup>/tk<sup>-</sup>/gD<sup>+</sup>、BoHV-1 gG<sup>-</sup>/tk<sup>-</sup>/gD<sup>+</sup> 和 BoHV-1 gG<sup>-</sup>/tk<sup>-</sup> 接种组的外周血单核细胞增殖水平平均  $OD_{630}$  值最高分别为 0.53、0.60 和 0.12, BoHV-1 gG<sup>-</sup>/tk<sup>-</sup>/gD<sup>+</sup> 和 BoHV-1 gG<sup>-</sup>/tk<sup>-</sup>/gD<sup>+</sup> 在攻毒后第 14 天和第 21 天均显著高于 BoHV-1 gG<sup>-</sup>/tk<sup>-</sup> 接种组 ( $P < 0.001$ ) (图 10)。

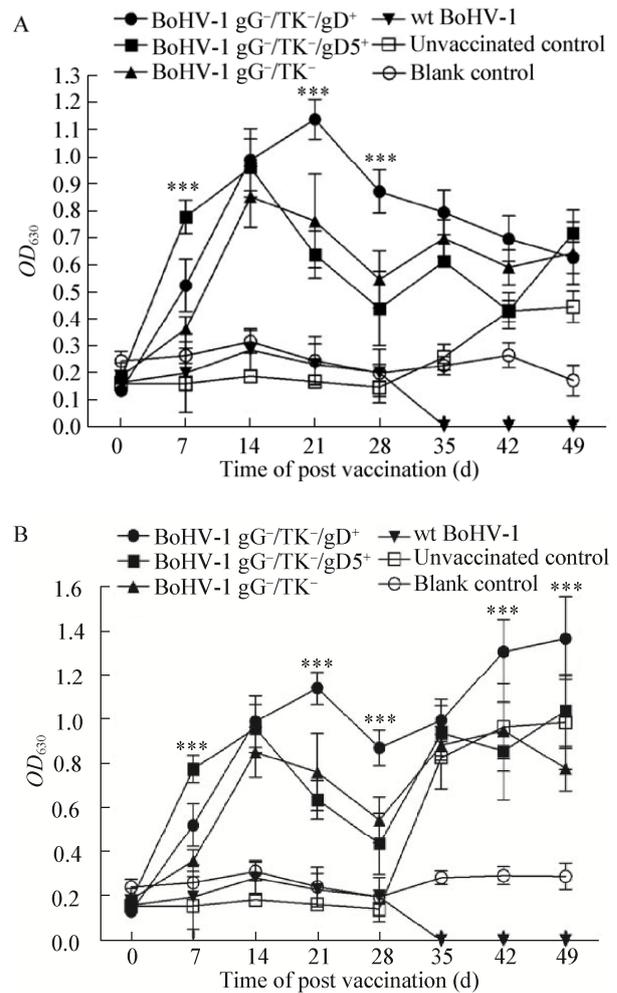


图 9 ELISA 检测兔体抗 BoHV-1 和抗 BoHV-5 抗体水平

Figure 9 Anti-BoHV-1 and Anti-BoHV-5 antibody levels in rabbits detected with ELISA

注: A: 兔体接种 28 d 后攻击 wt BoHV-1; B: 兔体接种 28 d 后攻击 wt BoHV-5。结果显示, 接种后 BoHV-1 gG<sup>-</sup>/tk<sup>-</sup>/gD<sup>+</sup> 接种组和 BoHV-1 gG<sup>-</sup>/tk<sup>-</sup>/gD<sup>+</sup> 接种组产生的 BoHV-1 抗体显著高于 BoHV-1 gG<sup>-</sup>/tk<sup>-</sup> 接种组 ( $P < 0.001$ ); 攻击 BoHV-5 后, BoHV-1 gG<sup>-</sup>/tk<sup>-</sup>/gD<sup>+</sup> 接种组的 BoHV-5 抗体显著高于 BoHV-1 gG<sup>-</sup>/tk<sup>-</sup> 接种组 ( $P < 0.001$ )。

Note: A: Rabbits were challenged with wt BoHV-1 at the 28<sup>th</sup> day after vaccination; B: Rabbits were challenged with wt BoHV-5 at the 28<sup>th</sup> day after vaccination. The result showed that BoHV-1 antibodies produced by BoHV-1 gG<sup>-</sup>/tk<sup>-</sup>/gD<sup>+</sup> and BoHV-1 gG<sup>-</sup>/tk<sup>-</sup>/gD<sup>+</sup> vaccination group were significantly higher than BoHV-1 gG<sup>-</sup>/tk<sup>-</sup> after vaccination ( $P < 0.001$ ). After BoHV-5 challenge, BoHV-5 antibodies in BoHV-1 gG<sup>-</sup>/tk<sup>-</sup>/gD<sup>+</sup> vaccination group were significantly higher than BoHV-1 gG<sup>-</sup>/tk<sup>-</sup> ( $P < 0.001$ ).

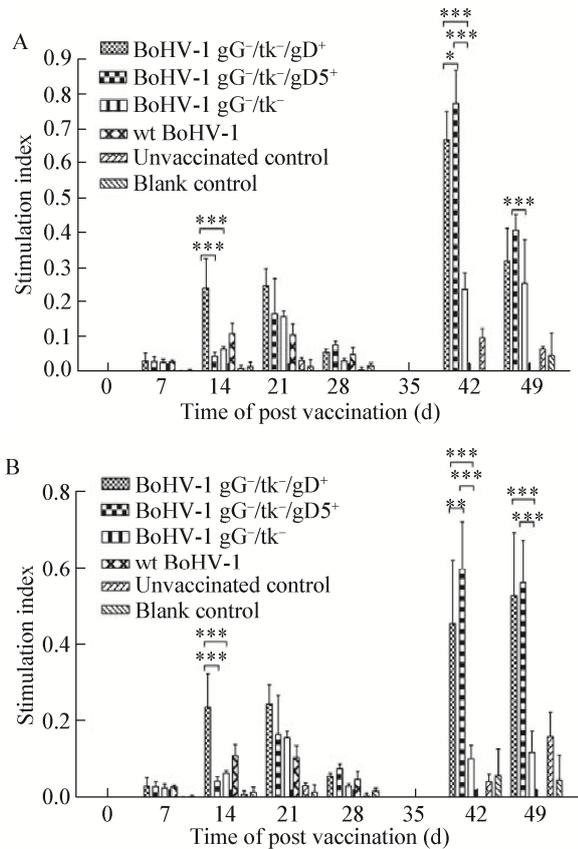


图 10 兔体外周血单核细胞的增殖水平

Figure 10 The stimulation index of PBMCs from rabbits after stimulation

注: A: 兔体接种 28 d 后攻击 wt BoHV-1; B: 兔体接种 28 d 后攻击 wt BoHV-5。结果显示, 接种后 BoHV-1 gG<sup>-</sup>/tk<sup>-</sup>/gD<sup>+</sup>接种组和 BoHV-1 gG<sup>-</sup>/tk<sup>-</sup>/gD5<sup>+</sup>接种组淋巴细胞的增殖水平显著高于 BoHV-1 gG<sup>-</sup>/tk<sup>-</sup>接种组( $P < 0.001$ ); 攻击 BoHV-1 和 BoHV-5 后, 各组淋巴细胞的增殖水平差异显著( $P < 0.001$ )。

Note: A: Rabbits were challenged with wt BoHV-1 at the 28<sup>th</sup> day after vaccination; B: Rabbits were challenged with wt BoHV-5 at the 28<sup>th</sup> day after vaccination. The result showed that the level of lymphocyte proliferation in BoHV-1 gG<sup>-</sup>/tk<sup>-</sup>/gD<sup>+</sup> and BoHV-1 gG<sup>-</sup>/tk<sup>-</sup>/gD5<sup>+</sup> vaccination group was significantly higher than that in BoHV-1 gG<sup>-</sup>/tk<sup>-</sup> ( $P < 0.001$ ). After challenge with BoHV-1 and BoHV-5, the difference of lymphocyte proliferation level in each group was significant ( $P < 0.001$ ).

### 3 讨论

gD 是 BoHV-1 免疫原性最好的蛋白, 能够诱导机体产生体液免疫和细胞免疫<sup>[21]</sup>, 因此许多研究者将其应用于 BoHV-1 疫苗的研究, 其中包括 DNA 疫苗、亚单位疫苗和载体疫苗<sup>[22]</sup>。BoHV-1 糖蛋白 gD 胞外区具有良好的免疫原性, 不仅可为 BoHV-1

感染提供保护力<sup>[23]</sup>, 而且能为 BoHV-5 感染提供交叉保护力<sup>[6]</sup>。本研究基于前期构建的 BoHV-1 gG<sup>-</sup>/tk<sup>-</sup>病毒, 在重组病毒基因组中增加一拷贝 BoHV-1 或 BoHV-5 gD 基因, 希望能提高病毒对同源 1 型和异源 5 型的免疫保护力。兔体试验基本证实了该假设。

#### 3.1 双拷贝糖蛋白 gD 提高了重组病毒的免疫原性

BoHV-1 和 BoHV-5 的糖蛋白 gD 由大约 417 个氨基酸组成, 其一致性为 79.9%<sup>[24]</sup>。本实验结果表明, 将免疫原性最好的糖蛋白 gD 胞外区序列<sup>[25]</sup>插入 BoHV-1 gG<sup>-</sup>/tk<sup>-</sup>的 tk 位置后, BoHV-1 gG<sup>-</sup>/tk<sup>-</sup>/gD<sup>+</sup>和 BoHV-1 gG<sup>-</sup>/tk<sup>-</sup>/gD5<sup>+</sup>的免疫原性提高, 表现为双拷贝 gD 病毒接种后, 能更早检测到中和抗体; 其外周血单核细胞增殖水平, 尤其是攻毒后的增殖水平显著高于其亲本株 BoHV-1 gG<sup>-</sup>/tk<sup>-</sup>; 组织学变化也证实双拷贝 gD 重组病毒接种组对攻毒后的肺组织保护作用最好, 略好于其亲本株 BoHV-1 gG<sup>-</sup>/tk<sup>-</sup>。综上所述, 双拷贝 gD 重组病毒的免疫原性增强。在双拷贝 gD 重组病毒中, 含同源 1 型 gD 的 BoHV-1 重组病毒的免疫原性好于异源 5 型 gD 的 BoHV-1 重组病毒, 而且能为 5 型病毒提供良好的交叉保护。

#### 3.2 双拷贝糖蛋白 gD 重组病毒对兔体的安全性

兔体接种 BoHV-1 gG<sup>-</sup>/tk<sup>-</sup>/gD<sup>+</sup>和 BoHV-1 gG<sup>-</sup>/tk<sup>-</sup>/gD5<sup>+</sup>与亲本株 BoHV-1 gG<sup>-</sup>/tk<sup>-</sup>后, 各时间点兔体体温均在群体平均值 0.5 °C 上下限值内, 没有鼻腔分泌物增多等临床症状, 而且没有排毒现象, 说明 BoHV-1 gG<sup>-</sup>/tk<sup>-</sup>/gD<sup>+</sup>和 BoHV-1 gG<sup>-</sup>/tk<sup>-</sup>/gD5<sup>+</sup>的安全性良好。取接种兔组织进行病毒分离时, 仅一只 BoHV-1 gG<sup>-</sup>/tk<sup>-</sup>接种兔的肺组织在细胞盲传过程中分离到病毒, 其培养物检测到 BoHV-1 gG<sup>-</sup>/tk<sup>-</sup>病毒核酸。说明 gD 双拷贝重组病毒的安全性良好。

综上所述, BoHV-1 gG<sup>-</sup>/tk<sup>-</sup>/gD<sup>+</sup>和 BoHV-1 gG<sup>-</sup>/tk<sup>-</sup>/gD5<sup>+</sup>安全性良好, 与 BoHV-1 gG<sup>-</sup>/tk<sup>-</sup>相比, BoHV-1 gG<sup>-</sup>/tk<sup>-</sup>/gD<sup>+</sup>和 BoHV-1 gG<sup>-</sup>/tk<sup>-</sup>/gD5<sup>+</sup>对兔体的免疫原性显著提高, 同时对 BoHV-5 提供较好的交叉保护力, 从而有望作为 IBR 的新型疫苗候选株, 具有一定的应用前景。

## 参 考 文 献

- [1] Li HT, Miao LG, Zhu YZ, et al. Establishment of a calf infection model of infectious bovine rhinotracheitis virus strain IBRV/JZ06-8[J]. Progress in Veterinary Medicine, 2015, 36(6): 115-118 (in Chinese)  
李海涛, 苗利光, 朱言柱, 等. 牛传染性鼻气管炎病毒 JZ06-8 株犊牛感染模型的建立[J]. 动物医学进展, 2015, 36(6): 115-118
- [2] Madin SH, York CJ, McKergher DG. Isolation of the infectious bovine rhinotracheitis virus[J]. Science, 1956, 124(3225): 721-722
- [3] Huck RA, Cartwright SF. Isolation and classification of viruses from cattle during outbreaks of mucosal or respiratory disease and from herds with reproductive disorders[J]. Journal of Comparative Pathology and Therapeutics, 1964, 74: 346-365
- [4] Jones C, Chowdhury S. A review of the biology of bovine herpesvirus type 1 (BHV-1), its role as a cofactor in the bovine respiratory disease complex and development of improved vaccines[J]. Animal Health Research Reviews, 2007, 8(2): 187-205
- [5] Meyer G, Lemaire M, Ros C, et al. Comparative pathogenesis of acute and latent infections of calves with bovine herpesvirus types 1 and 5[J]. Archives of Virology, 2001, 146(4): 633-652
- [6] Del Médico Zajac MP, Ladelfa MF, Kotsias F, et al. Biology of bovine herpesvirus 5[J]. The Veterinary Journal, 2010, 184(2): 138-145
- [7] Ackermann M, Engels M. Pro and contra IBR-eradication[J]. Veterinary Microbiology, 2006, 113(3/4): 293-302
- [8] Brideau AD, Banfield BW, Enquist LW. The Us9 gene product of pseudorabies virus, an alphaherpesvirus, is a phosphorylated, tail-anchored type II membrane protein[J]. Journal of Virology, 1998, 72(6): 4560-4570
- [9] Butchi NB, Jones C, Perez S, et al. Envelope protein Us9 is required for the anterograde transport of bovine herpesvirus type 1 from trigeminal ganglia to nose and eye upon reactivation[J]. Journal of NeuroVirology, 2007, 13(4): 384-388
- [10] Kaashoek MJ, Moerman A, Madić J, et al. An inactivated vaccine based on a glycoprotein E-negative strain of bovine herpesvirus 1 induces protective immunity and allows serological differentiation[J]. Vaccine, 1995, 13(4): 342-346
- [11] Strube W, Auer S, Block W, et al. A gE deleted infectious bovine rhinotracheitis marker vaccine for use in improved bovine herpesvirus 1 control programs[J]. Veterinary Microbiology, 1996, 53(1/2): 181-189
- [12] Bryant NA, Davis-Poynter N, Vanderplasschen A, et al. Glycoprotein G isoforms from some alphaherpesviruses function as broad-spectrum chemokine binding proteins[J]. The EMBO Journal, 2003, 22(4): 833-846
- [13] Kaashoek MJ, Rijsewijk FAM, van Oirschot JT. Persistence of antibodies against bovine herpesvirus 1 and virus reactivation two to three years after infection[J]. Veterinary Microbiology, 1996, 53(1/2): 103-110
- [14] Kit S, Oavi H, Gaines JD, et al. Thymidine kinase-negative bovine herpesvirus type 1 mutant is stable and highly attenuated in calves[J]. Archives of Virology, 1985, 86(1/2): 63-83
- [15] Hanon E, Keil G, van Drunen Littel-van Den Hurk S, et al. Bovine herpesvirus 1-induced apoptotic cell death: role of glycoprotein D[J]. Virology, 1999, 257(1): 191-197
- [16] Hutchings DL, van Drunen Little-van Den Hurk S, Babiuk LA. Lymphocyte proliferative responses to separated bovine herpesvirus 1 proteins in immune cattle[J]. Journal of Virology, 1990, 64(10): 5114-5122
- [17] Zhang MM, Fu SL, Deng ML, et al. Attenuation of bovine herpesvirus type 1 by deletion of its glycoprotein G and tk genes and protection against virulent viral challenge[J]. Vaccine, 2011, 29(48): 8943-8950
- [18] Wu Y, Zhang P, Zhou LZ, et al. Development of a micro-cytopathic method for determination of neutralizing antibody titer against human cytomegalovirus[J]. Chinese Journal of Blood Transfusion, 2015, 28(9): 1099-1103 (in Chinese)  
吴燕, 张佩, 周兰贞, 等. 微量细胞病变法检测人巨细胞病毒中和抗体效价方法的建立[J]. 中国输血杂志, 2015, 28(9): 1099-1103
- [19] Yan BF. Development of indirect ELISA for detection for specific antibodies against infectious bovine rhinotracheitis virus and application in epidemiological investigation[D]. Wuhan: Master's Thesis of Huazhong Agricultural University, 2007 (in Chinese)  
颜邦芬. 牛传染性鼻气管炎病毒抗体间接 ELISA 的建立及其在流行病学研究中的应用[D]. 武汉: 华中农业大学硕士学位论文, 2007
- [20] Wei H, He J, Paulsen DB, et al. Bovine herpesvirus type 1 (BHV-1) mutant lacking U L 49.5 luminal domain residues 30-32 and cytoplasmic tail residues 80-96 induces more rapid onset of virus neutralizing antibody and cellular immune responses in calves than the wild-type strain Cooper[J]. Veterinary Immunology and Immunopathology, 2012, 147(3/4): 223-229
- [21] Brownlie R, Kumar P, Babiuk LA, et al. Recombinant bovine adenovirus-3 co-expressing bovine respiratory syncytial virus glycoprotein G and truncated glycoprotein gD of bovine herpesvirus-1 induce immune responses in cotton rats[J]. Molecular Biotechnology, 2015, 57(1): 58-64
- [22] Quattrocchi V, Soria I, Langellotti CA, et al. A DNA vaccine formulated with chemical adjuvant provides partial protection against bovine herpes virus infection in cattle[J]. Frontiers in Immunology, 2017, 8: 37
- [23] Khattar SK, Collins PL, Samal SK. Immunization of cattle with recombinant Newcastle disease virus expressing bovine herpesvirus-1 (BHV-1) glycoprotein D induces mucosal and serum antibody responses and provides partial protection against BHV-1[J]. Vaccine, 2010, 28(18): 3159-3170
- [24] Gabev E, Tobler K, Abril C, et al. Glycoprotein D of bovine herpesvirus 5 (BoHV-5) confers an extended host range to BoHV-1 but does not contribute to invasion of the brain[J]. Journal of Virology, 2010, 84(11): 5583-5593
- [25] Alves Dummer L, Pereira Leivas Leite F, van Drunen littel-van den Hurk S. Bovine herpesvirus glycoprotein D: a review of its structural characteristics and applications in vaccinology[J]. Veterinary Research, 2014, 45: 111