

PRRSV GP5 蛋白和 CSFV E2 蛋白在杆状病毒囊膜表面的共展示及展示蛋白的免疫原性分析

许信刚, 王志昇, 李兆才, 张 琪, 童德文*

(西北农林科技大学动物医学院, 杨凌 712100)

摘要: 本试验旨在构建以杆状病毒表面展示系统为基础的猪繁殖与呼吸综合征和猪瘟双价基因工程亚单位疫苗候选株。利用杆状病毒表面展示技术构建展示猪繁殖与呼吸综合征病毒 (PRRSV) GP5 蛋白和猪瘟病毒 (CSFV) E2 蛋白的重组杆状病毒 BacSC-Dual-ORF5-E2。该重组病毒带有 His6 标签, 且胞质区域 (CTD) 和跨膜区域 (TM) 均来源于杆状病毒囊膜蛋白 gp64 的 CTD 和 TM。对重组病毒进行 Western blot 分析、激光共聚焦显微镜观察、免疫金电子显微镜检测、动物免疫试验以及淋巴细胞增殖试验。Western blot 分析结果表明, 重组杆状病毒中表达了重组 GP5 和 E2 蛋白; 激光共聚焦显微镜检测表明, 重组杆状病毒感染昆虫细胞 Sf-9 后在细胞膜上展示了重组 GP5 和 E2 蛋白; 免疫金电子显微镜观察表明, 重组 GP5 和 E2 蛋白展示在杆状病毒囊膜上; 动物免疫试验表明, 重组杆状病毒免疫小鼠后产生了抗 PRRSV 和抗 CSFV 的特异性抗体; 淋巴细胞增殖试验表明, 重组杆状病毒能诱发较强的细胞免疫应答。本试验成功构建表面展示 PRRSV GP5 蛋白和 CSFV E2 蛋白的重组杆状病毒, 为下一步应用该重组杆状病毒作为双价亚单位疫苗预防 PRRSV 和 CSFV 的混合感染奠定基础。

关键词: 杆状病毒表面展示系统; PRRSV; CSFV; GP5 蛋白; E2 蛋白

中图分类号: S852. 65

文献标识码: A

文章编号: 0366-6964(2011)06-0892-07

Baculovirus Surface Display of GP5 Envelope Glycoprotein of PRRSV and E2 Envelope Glycoprotein of CSFV and Immunogenicity Analysis of the Displayed Proteins

XU Xin-gang, WANG Zhi-sheng, LI Zhao-cai, ZHANG Qi, TONG De-wen*

(College of Veterinary Medicine, Northwest A&F University, Yangling 712100, China)

Abstract: The aim of this study was to develop porcine reproductive and respiratory syndrome (PRRS) and classical swine fever (CSF) divalent genetic engineering subunit vaccine based on baculovirus surface display system. One recombinant baculoviruses BacSC-Dual-GP5-E2 expressing histidine-tagged PRRSV GP5 protein and CSFV E2 protein with the CTD and TM derived from baculovirus envelope protein gp64 were constructed. The recombinant baculoviruses were analyzed by Western blot, immunofluorescence confocal microscopy, immunogold electron microscopy, animal vaccine tests and lymphocyte proliferative responses. After infection, GP5 and E2 protein was expressed and anchored on the plasma membrane of Sf-9 cells, as revealed by confocal microscopy. Immunogold electron microscopy demonstrated that the BacSC-Dual-ORF5-E2 was displayed GP5 and E2 proteins on the viral surface. Animal vaccine tests showed that BacSC-Dual-ORF5-E2 elicited significantly higher anti-PRRSV and anti-CSFV antibody titers in the treated mouse model. Lymphocyte proliferative responses results indicated that recombinant BacSC-Dual-ORF5-E2 also induced an obvious cellular immune response. The recombinant baculoviruses BacSC-Dual-ORF5-E2 that surface display GP5 and E2 protein were successfully constructed. The

收稿日期: 2010-10-25

基金项目: 西北农林科技大学青年学术骨干项目 (E111020901); 教育部新世纪优秀人才支持计划 (NCET-07-0701)

作者简介: 许信刚 (1974-), 男, 陕西咸阳人, 副教授, 博士, 主要从事分子病毒学研究, E-mail: xuxingangzhangqi@yahoo. com. cn

* 通讯作者: 童德文, Tel: 029-87091622, E-mail: dwtong@nwsuaf. edu. cn

present results demonstrate that the recombinant baculoviruses can be a potential bivalent genetic engineering vaccine against PRRSV and CSFV mixed infections.

Key words: baculovirus surface display; PRRSV; CSFV; GP5 protein; E2 protein

猪繁殖与呼吸综合征 (Porcine reproductive and respiratory syndrome, PRRS) 是由猪繁殖与呼吸综合征病毒 (Porcine reproductive and respiratory syndrome virus, PRRSV) 引起的以母猪晚期流产、早产、死胎、木乃伊胎等繁殖障碍和仔猪严重的呼吸道症状及高死亡率为特征的传染病^[1-2]。该病毒主要侵害宿主免疫系统,可产生混合感染和继发感染,具有抗体依赖性增强作用,且易发生变异重组,对世界养猪业造成了极大的经济损失^[3-4]。PRRSV 为有囊膜的单股正链 RNA 病毒,其核酸大小约为 15 kb,含 9 个开放阅读框 (ORFs)。ORF5 基因是其中一个开放阅读框,编码 GP5 蛋白,该蛋白是 PRRSV 的重要结构蛋白和免疫保护性蛋白之一,且能诱导机体产生中和抗体,对于研究基因工程疫苗和诊断抗原具有重要意义^[5]。猪瘟 (Classical swine fever, CSF) 是由猪瘟病毒 (Classical swine fever virus, CSFV) 引起的猪的急性高度接触性传染病,被世界动物卫生组织 (OIE) 列为 A 类传染病^[6]。CSFV 为黄病毒科 (Flaviridae) 瘟病毒属 (Pestivirus) 成员,基因组为单股正链 RNA,长约 12.3 kb,仅含 1 个大的开放阅读框架,编码 11~12 种成熟的病毒蛋白 (N^{pro}、C、E^{ms}、E1、E2、P7、NS2、NS3、NS4A、NS4B、NS5A、NS5B)。E^{ms} (E0)、E1 和 E2 为病毒的囊膜糖蛋白,其中 E2 (gp55) 蛋白是 CSFV 的主要保护性抗原,能诱发机体产生具有中和活性的抗体,是研制猪瘟基因工程疫苗的首选基因^[7]。

杆状病毒吸附和侵入昆虫细胞与病毒的囊膜糖蛋白 gp64 有重要关系。gp64 由 N-末端信号肽和成熟蛋白 (跨膜区 TM 和胞质区 CTD) 组成^[8]。gp64 被开发成杆状病毒表面展示系统来展示不同的目的蛋白。外源基因片段插入到病毒囊膜蛋白的信号肽与成熟蛋白之间,加工后信号肽被切除形成的 N 端融合蛋白借助杆状病毒稳定地表达并展示于感染细胞或病毒粒子的表面,筛选得到表达有目的蛋白的重组杆状病毒。目前,杆状病毒表面展示系统已经被开发用于进行基因工程亚单位疫苗的研制^[9-10]。由于 E2 蛋白是 CSFV 的主要免疫原,而 GP5 蛋白是 PRRSV 主要免疫原,以杆状病毒表面

展示系统为基础,构建表达 CSFV E2 蛋白和 PRRSV GP5 蛋白的重组杆状病毒 BaSC-Dual-ORF5-E2,经过激光共聚焦显微镜和免疫金电子显微镜检测重组 E2 蛋白和 GP5 蛋白在 Sf-9 细胞膜上和杆状病毒的囊膜上进行了共展示。将重组杆状病毒免疫小鼠进行免疫效果评价,为进一步研究猪瘟和猪繁殖与呼吸综合征双价基因工程亚单位疫苗奠定基础。

1 材料与方法

1.1 质粒、菌株和细胞

猪瘟病毒免化弱毒株 (C 株)、PRRSV Shaanxi 株、含有 CSFV E2 基因的质粒 pGEM-E2 以及含有 PRRSV ORF5 基因的质粒 pGEM-ORF5 由西北农林科技大学动物医学院兽医病理学实验室保存;pGEM-T 购自 Promega 公司;表面双展示转座载体 pBacSC-Dual (含有 gp64 CTD、gp64 TM、His6、gp64 SP)、Sf-9 细胞、PK-15 细胞、Marck-145 细胞、大肠杆菌 DH10Bac (Gibco-BRL) 以及大肠杆菌 DH5 α 由西北农林科技大学动物医学院兽医病理学实验室构建/保存并提供。

1.2 主要试剂

CSFV 阳性血清和 PRRSV 阳性血清 (含有 GP5 抗体) 由中国动物卫生与流行病学中心惠赠;鼠抗 His 单克隆抗体、HRP 标记兔抗猪 IgG、FITC 标记兔抗猪 IgG 均购自 Invitrogen 公司;胶体金标记的兔抗猪 IgG 购自 Sigma 公司;各种内切酶、T4 DNA 连接酶、*Taq* DNA 多聚酶、dNTP 分别购自 Promega 公司;昆虫细胞培养基 TNM-FH、Cellfectin 转染试剂购自美国 Invitrogen 公司;DMEM 培养基、胎牛血清购自 GIBCOBRL 公司。检测小鼠血清用的 PRRSV 全病毒抗原包被板和 CSFV 全病毒抗原包被板购自深圳绿诗源生物技术有限公司。

1.3 实验动物

6 周龄雌性 BALB/c 小鼠,购自于第四军医大学实验动物研究中心。

1.4 重组转座质粒 pBacSC-Dual-ORF5-E2 的构建和筛选

转座载体 pBacSC-Dual 结构如图 1 所示,该载体

有 2 个启动子。本研究小组在 polh 启动子下游插入 gp64 SS-His6-多克隆位点 I-gp64 TM-gp64 CTD 序列。在 p10 启动子下游插入 gp64 SS-His6-多克隆位点 II-gp64 TM-gp64 CTD 序列。外源基因插入多克隆位点,借助于 gp64 信号肽(SP)、跨膜区(TM)和胞质区(CTD)就可以展示在重组杆状病毒表面。

以 pGEM-ORF5 为模板,PCR 扩增 PRRSV 囊膜蛋白 GP5 基因 ORF5。上游引物 P1: 5'-GCTCTCGAGAGCAACAACAGCAG-3' (下划线为 *Xho* I 酶切位点) 下游引物 P2: 5'-GATCTG-CAGGAGACGACCCCATGTT-3' (下划线为 *Pst* I 酶切位点)。扩增片段为 510 bp, 扩增的片段不含有 ORF5 基因 N-末端的大约 31 个氨基酸的跨膜区(TM), 这是因为载体已经提供了 gp64 的跨膜

区基因。以 pGEM-E2 为模板,PCR 扩增 CSFV E2 基因,上游引物 P1: 5'-GCT GCGCGCATGGCA-CAAGGCCGCTAGCCAA-3' (下划线为 *Bss*H II 酶切位点) 下游引物 P2: 5'-GCT GCATGCAAAT-TCTGCGAAGTAATC-3' (下划线为 *Sph* I 酶切位点)。扩增片段为 1 035 bp, 扩增的片段不含有 E2 基因 C-末端的大约 40 个氨基酸的跨膜区, 这是因为载体已经提供了 gp64 的跨膜区基因。PCR 产物双酶切回收后定向插入转座载体 pBacSC-Dual 的限制性酶切位点处, 得到重组转座载体 pBacSC-Dual-ORF5-E2(图 1)。将此质粒转化大肠杆菌 DH5 α 工程菌, 进行筛选鉴定, 并对重组质粒中的 ORF5 和 E2 基因进行序列测定。

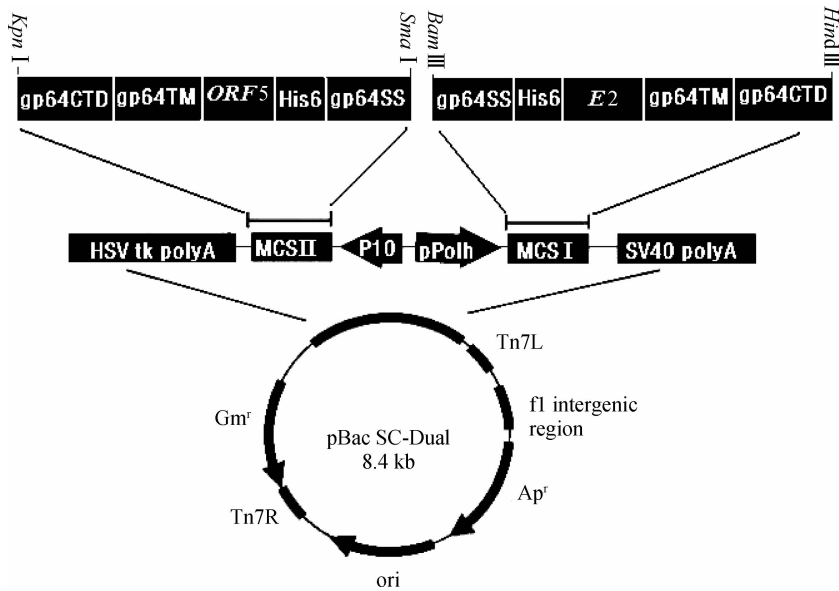


图 1 重组转座质粒 pBacSC-Dual-ORF5-E2 的构建

Fig. 1 Construction of recombinant donor plasmid pBacSC-Dual-ORF5-E2

1.5 重组杆状病毒的获得

重组质粒 pBacSC-Dual-ORF5-E2 的转座、DH10Bac 目的菌落的筛选与纯化、穿梭质粒 Bacmid DNA 的提取、转染、PCR 模板的制备、重组病毒的扩增、病毒滴度测定均按照 Invitrogen 公司 Bac-to-Bac 表达系统操作手册进行。以上过程均以转座质粒 pBacSC-Dual 作为阴性对照。将重组杆状病毒命名为 BacSC-Dual-ORF5-E2, 阴性对照 pBacSC-Dual 得到的重组杆状病毒命名为 BacSC-Dual。

1.6 表达产物的 Western blot 分析

将重组病毒感染 Sf-9 细胞, 进行常规 SDS-PAGE 和 Western blot 分析, 第一抗体分别是鼠抗

His 单克隆抗体(1 : 1 000 倍稀释), 猪抗 PRRSV 阳性血清(1 : 500 倍稀释)和猪抗 CSFV 阳性血清(1 : 500 倍稀释); 第二抗体是 HRP 标记羊抗鼠 IgG(1 : 4 000 倍稀释)和 HRP 标记兔抗猪 IgG(1 : 4 000 倍稀释)。最后暗房进行底物化学发光(ECL)法反应, 胶片显影分析。

1.7 激光共聚焦显微镜分析重组蛋白在 Sf-9 细胞膜上的展示

按照参考文献[10]方法进行, 第一抗体为猪抗 PRRSV 阳性血清(1 : 100)和猪抗 CSFV 阳性血清(1 : 100), 第二抗体为 FITC 标记兔抗猪 IgG(1 : 100)。

1.8 免疫电镜分析重组蛋白在杆状病毒囊膜上的展示

重组杆状病毒的纯化用蔗糖密度梯度超速离心法进行,纯化后的病毒进行 SDS-PAGE 和 Western blot 分析。纯化病毒的免疫电镜分析按照参考文献 [10] 的方法进行,第一抗体为猪抗 PRRSV 阳性血清(1:50)和猪抗 CSFV 阳性血清(1:50)组成的混合血清,第二抗体为胶体金标记的兔抗猪 IgG(1:100)。

1.9 重组杆状病毒免疫小鼠抗体的 ELISA 检测

取 6 周龄的雌性 Balb/c 小鼠 15 只,随机分为 3 组,第 1 组腹腔注射重组杆状病毒 BacSC-Dual-ORF5-E2(1×10^9 pfu),第 2 组腹腔注射重组杆状病毒 BacSC-Dual(1×10^9 pfu)作为阴性对照,第 3 组注射 PBS。共免疫 2 次,间隔 2 周。二免后 2 周,毛细管眼球采血分离血清。试验以购买的检测试剂盒中提供的 PRRSV 全病毒包被的抗原检测板和 CSFV 全病毒包被的抗原检测板为基础,以待检鼠血清为第一抗体,HRP 标记的羊抗鼠 IgG 作为第二抗体,优化间接 ELISA 检测条件。最后确定第二抗体最佳稀释倍数为 1:3 000,阴性未免疫小鼠血清最佳稀释倍数为 1:200,酶标仪 490 nm 下测定各个反应孔中的 OD 值,样品 OD 值/阴性对照 OD 值(P/N)>2.1 判为阳性。建立了免疫鼠血清 GP5 和 E2 抗体间接 ELISA 检测方法,测定免疫鼠血清抗体水平。

1.10 淋巴细胞增殖试验

传统法分离各个试验组免疫小鼠脾淋巴细胞,调整细胞浓度为 5×10^6 cells \cdot mL⁻¹,按 100 μ L 每孔加入 96 孔细胞培养板,每孔加入 100 μ L 含有 PRRSV(20μ g \cdot mL⁻¹)和 CSFV(20μ g \cdot mL⁻¹)的刺激原。阳性对照孔加入 ConA (5μ g \cdot mL⁻¹),每组设 3 个重复孔,37 $^{\circ}$ C 5% CO₂ 孵箱中孵育 72 h;加入 MTT(终质量浓度为 5 mg \cdot mL⁻¹),37 $^{\circ}$ C 孵育 4 h 后加入 100 μ L 二甲基亚砷,酶标仪测定吸光度 A_{490 nm} 值,以刺激组 A 值/未刺激组 A 值表示各组的刺激指数(SI)。

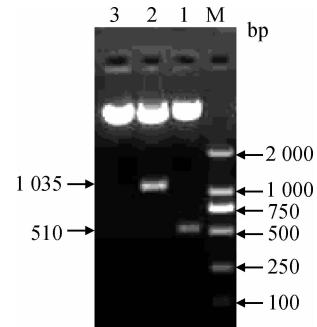
1.11 统计学分析

用 SPSS 软件进行统计分析。数据以“ $\bar{x} \pm s$ ”表示,各组间差异用方差分析。

2 结果

2.1 重组转座质粒 pBacSC-Dual-ORF5-E2 的构建和筛选

pBacSC-Dual-ORF5-E2 经双酶切后得到约 8.4 kb、510 bp 和 1 035 bp 的 3 个片段,分别与载体和 ORF5、E2 基因长度一致(图 2)。测序结果表明,载体 pBacSC-Dual 和 ORF5、E2 基因接头连接处正确,大小和读码框架正确完整。



M. DL2000 DNA 相对分子质量标准;1. pBacSC-Dual-ORF5-E2 的 *Xho* I 和 *Pst* I 双酶切产物;2. pBacSC-Dual-ORF5-E2 的 *Bss*H II 和 *Sph* I 双酶切产物;3. pBacSC-Dual-ORF5-E2 的 *Xho* I 单酶切对照

M. DL2000 DNA marker; 1. Restriction analysis of pBacSC-Dual-ORF5-E2 with *Xho* I and *Pst* I; 2. Restriction analysis of pBacSC-Dual-ORF5-E2 with *Bss*H II and *Sph* I; 3. Restriction analysis of pBacSC-Dual-ORF5-E2 with *Xho* I

图 2 重组转座质粒 pBacSC-Dual-ORF5-E2 的双酶切鉴定

Fig. 2 Double enzyme digestion identification of recombinant plasmid pBacSC-Dual-ORF5-E2

2.2 Western blot 分析 GP5 和 E2 蛋白在 Sf-9 细胞中的表达

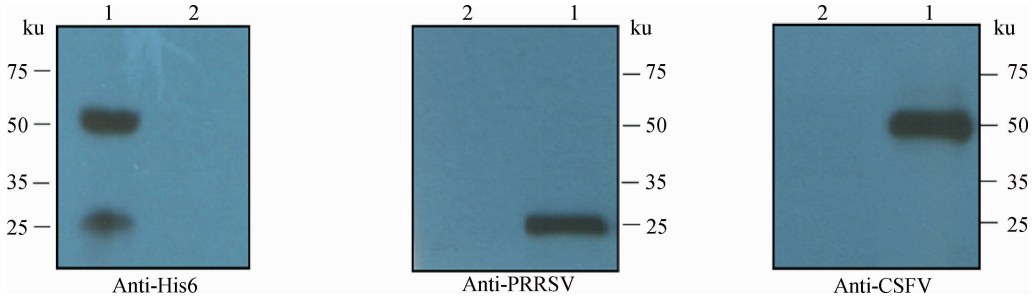
重组病毒感染 Sf-9 细胞,Western blot 分析结果见图 3。用抗 His6 单克隆抗体、抗 PRRSV 阳性血清以及抗 CSFV 阳性血清检测到相对分子质量约 25 ku 的 GP5 蛋白和 50 ku 的 E2 特异蛋白条带,与理论上设计结果完全相符,证实融合有 His6 的 GP5 和 E2 重组蛋白在 Sf-9 细胞中表达成功。

2.3 激光共聚焦显微镜分析重组蛋白在细胞膜上的展示

为了证明融合蛋白 GP5 和 E2 展示在 Sf-9 细胞的细胞膜上,进行激光共聚焦显微镜分析,结果见图 4。由图 4 可见,用一抗为抗 PRRSV 血清鉴定时,重组病毒 BacSC-Dual-ORF5-E2 感染的 Sf-9 细胞膜检测到一圈绿色荧光,而对照组重组病毒 Bac-

SC-Dual 感染的 Sf-9 细胞膜检测不到绿色荧光,证明 GP5 蛋白展示在 Sf-9 细胞膜表面。同样方法,用一抗为抗 CSFV 血清鉴定时,重组病毒 BacSC-Dual-ORF5-E2 感染的 Sf-9 细胞膜检测到一圈绿色荧光

光,而对照组重组病毒 BacSC-Dual 感染的 Sf-9 细胞膜检测不到绿色荧光,证明 E2 蛋白展示在 Sf-9 细胞膜表面。



1. BacSC-Dual-GP5-E2; 2. BacSC-Dual

图 3 在 Sf-9 细胞中表达重组 GP5 和 E2 蛋白的 Western blot 分析

Fig. 3 Western blot analysis of GP5 and E2 proteins expressed in Sf-9 cells

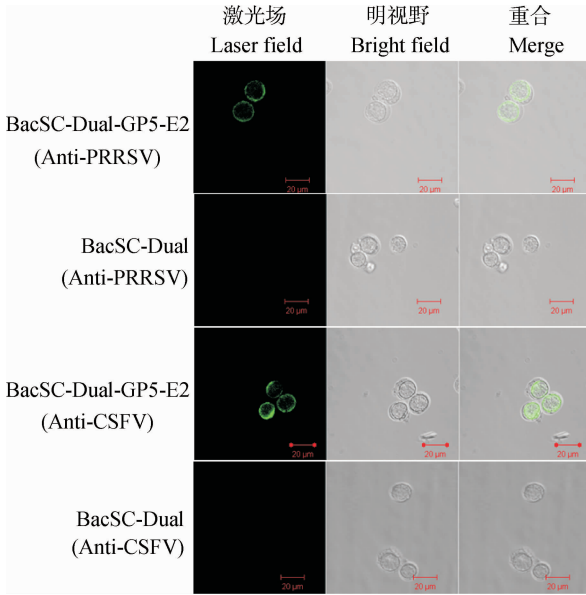
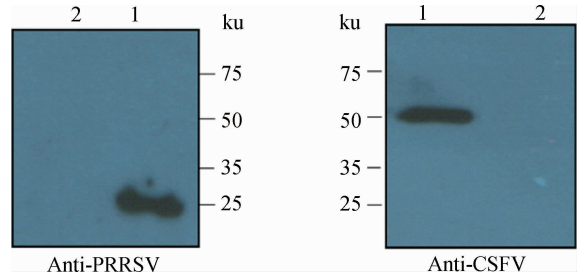


图 4 重组 GP5 和 E2 蛋白在 Sf-9 细胞膜上展示的激光共聚焦显微镜分析

Fig. 4 Confocal microscopy analysis of GP5 and E2 proteins anchoring on the plasma membrane of Sf-9 cells

2.4 重组杆状病毒的 Western blot 分析

重组杆状病毒纯化后进行 Western blot 检测,结果见图 5。抗 PRRSV 阳性血清和抗 CSFV 阳性血清分别检测到相对分子质量约 25 ku 的 GP5 蛋白和 50 ku 的 E2 蛋白条带,证实融合有 His6 的 GP5 和 E2 重组蛋白在杆状病毒中表达成功。



1. BacSC-Dual-GP5-E2; 2. BacSC-Dual

图 5 Western blot 分析纯化重组杆状病毒

Fig. 5 Western blot analyses of purified baculoviruses

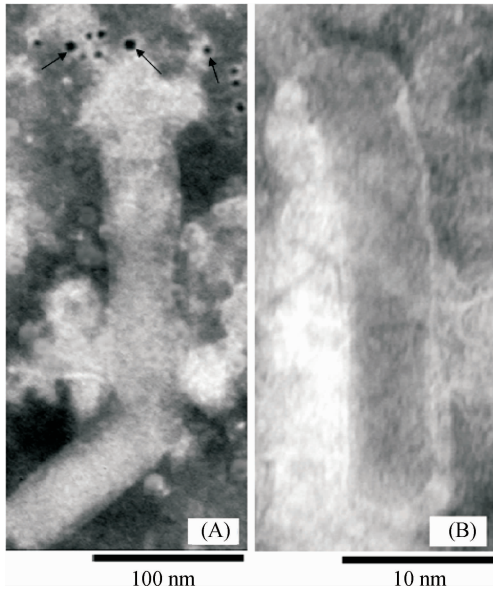
2.5 免疫电镜分析重组蛋白在杆状病毒囊膜上的展示

免疫电镜检测结果见图 6。结果显示金粒子结合到重组杆状病毒一端膨大的囊膜上,而阴性对照组重组杆状病毒囊膜上没有检测到金粒子的存在(图 6),说明 GP5 和 E2 蛋白展示重组杆状病毒囊膜上。

2.6 免疫小鼠血清抗体的检测

免疫小鼠血清 ELISA 检测结果见表 1。重组杆状病毒 BacSC-Dual-ORF5-E2 免疫鼠血清中 PRRSV GP5 平均抗体滴度为 1 : 2 600,CSFV E2 平均抗体滴度为 1 : 3 100。重组杆状病毒 BacSC-Dual 阴性对照组和空白 PBS 对照组免疫小鼠血清没有检测出抗 PRRSV 和抗 CSFV 特异性抗体。经过统计分析,重组病毒 BacSC-Dual-ORF5-E2 免疫小鼠血清抗 PRRSV 抗体和抗 CSFV 抗体滴度值与

阴性重组杆状病毒 BacSC-Dual 组和空白对照 PBS 组抗体滴度差异显著 ($P < 0.05$)。



A. 重组杆状病毒 BacSC-Dual-ORF5-E2; B. 阴性对照重组杆状病毒 BacSC-Dual

A. Purified baculoviruses BacSC-Dual-ORF5-E2; B. The negative control purified baculoviruses BacSC-Dual

图 6 免疫电镜分析 GP5 和 E2 蛋白在重组杆状病毒囊膜上的展示

Fig. 6 Immunogold electron microscopy analyze GP5 and E2 proteins displayed into the baculoviral envelope

表 1 免疫小鼠血清 ELISA 抗体滴度

Table 1 The results of ELISA antibody titers in immunized Balb/c mice

免疫血清 Immune serum	ELISA 抗体滴度 ELISA antibody titer	
	PRRSV GP5	CSFV E2
BacSC-Dual-ORF5-E2	2 600 ± 223.6	3 100 ± 547.7
BacSC-Dual	<25	<25
PBS	<25	<25

2.7 淋巴细胞增殖试验

以刺激组 A 值/未刺激组 A 值表示各组的刺激指数 (SI), 淋巴增殖试验结果见图 7。重组杆状病毒 BacSC-Dual-ORF5-E2 免疫组小鼠的淋巴细胞 SI 值为 3.57 ± 0.13 , BacSC-Dual 阴性组淋巴细胞 SI 值为 1.34 ± 0.08 , PBS 空白组淋巴细胞 SI 值为 1.23 ± 0.07 。阳性对照组 ConA 刺激值 SI 为 3.98, 阳性对照数据成立。重组杆状病毒 BacSC-Dual-ORF5-E2 免疫组小鼠的淋巴细胞 SI 值与阴性对照组和空白对照组

SI 值比较均有显著性差异 ($P < 0.05$)。

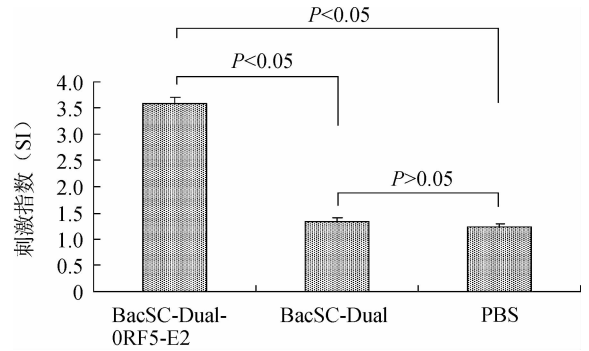


图 7 免疫小鼠淋巴细胞增殖试验

Fig. 7 Lymphocyte proliferative responses of Balb/c mice immunized with various immunogens

3 讨论

杆状病毒-昆虫细胞表达系统是目前较好的真核表达系统, 此系统能提高外源蛋白产量, 并且表达的蛋白能够经过正确的翻译后修饰加工, 更接近天然蛋白的构象和活性。但是, 传统的杆状病毒-昆虫细胞表达系统产生的目的蛋白质只能分泌到培养基上清中, 目的蛋白的纯化非常费时费力, 纯化费用昂贵, 不能规模化生产。如何提高该系统的表达效率, 简化目的蛋白纯化程序, 是目前研究急需亟待解决的问题。目前国外正在研究杆状病毒表面展示系统来解决目的蛋白纯化代价昂贵、程序复杂的问题^[9]。杆状病毒自然感染昆虫细胞, 病毒吸附和侵入细胞与囊膜糖蛋白 gp64 有重要关系。利用囊膜蛋白 gp64 的 TM 和 gp64 的 CTD 进行杆状病毒表面展示技术已经被开发为表达载体, 用来进行基因工程亚单位疫苗的研制^[9-10]。囊膜表面展示目的蛋白的杆状病毒作为疫苗有以下优点^[10]: (1) 和其他灭活疫苗和以病毒为载体的疫苗不同, 杆状病毒对人类和哺乳动物不引起致病, 能在一般的生物实验室进行操作; (2) 能在生物反应器内进行感染昆虫细胞而大量的展示目的蛋白, 加速生产过程; (3) 相对于灭活病毒, 杆状病毒疫苗能区别是疫苗免疫产生的抗体还是感染病毒产生的抗体, 可作为标记疫苗; (4) 与一般亚单位疫苗比较, 表达的蛋白展示在重组病毒表面, 理论上能很好的刺激细胞免疫; (5) 使用杆状病毒可以减少佐剂生物用量, 因为杆状病毒本身就可以作为佐剂刺激机体反应; (6) 用杆状病毒表面展示系统生产目的蛋白, 纯化过程特别简单, 只需

要超速离心得到重组杆状病毒即可同时获得目的蛋白,纯化费用低、操作简单、可以规模化生产,解决目前蛋白纯化费时费力,代价昂贵的现状。杆状病毒表面展示系统作为一个展示外源蛋白的平台,用来研制基因工程亚单位疫苗,为预防动物病毒病感染提供一个可供选择的疫苗策略。

本试验将 PRRSV 的 ORF5 基因和 CSFV 的 E2 基因分别插入到 gp64 信号肽序列和 gp64 的跨膜区(TM)序列之间,构建重组杆状病毒。融合蛋白 GP5 和 E2 经过真核细胞内质网加工后,信号肽被切除,形成的融合蛋白借助杆状病毒稳定表达并展示于感染细胞或病毒粒子的表面,筛选得到表达有 GP5 和 E2 蛋白的重组杆状病毒粒子。试验结果表明,用重组病毒 BacSC-Dual-ORF5-E2 感染 Sf-9 细胞后,收获感染的细胞,进行 Western blot 检测,能够在细胞中检测到融合有 His6 的 GP5 和 E2 蛋白的表达。激光共聚焦试验显示,在 Sf-9 的细胞膜上能够清楚地看到一圈绿色的特异性荧光,证明 GP5 蛋白和 E2 蛋白展示在 Sf-9 的细胞膜表面;免疫胶体金检测更直接的观察到金粒子展示在重组杆状病毒的囊膜上,这说明 His6-GP5 和 His6-E2 膜融合蛋白最终是定位在被感染 Sf-9 细胞膜上,随着病毒粒子出芽过程中整合到病毒粒子囊膜上。动物免疫试验表明,重组杆状病毒免疫小鼠后血清中抗 PRRSV 平均抗体滴度达到 1:2 600,抗 CSFV 平均抗体滴度为 1:3 100,说明重组蛋白能够引发小鼠较强的体液免疫反应。另外,小鼠淋巴细胞增殖试验表明,重组杆状病毒也能有效地激发动物机体的细胞免疫。本试验首次将 PRRSV GP5 蛋白和 CSFV E2 蛋白共展示在杆状病毒囊膜表面,为下一步应用重组杆状病毒作为 PRRSV 和 CSFV 基因工程双价亚单位疫苗奠定基础,关于重组杆状病毒对本属动物猪的免疫和攻毒保护效果还有待于进一步研究。

参考文献:

[1] WENSVOORT G, TERPSTRA C, POL J M A, et al.

Mystery swine disease in the Netherlands: the isolation of Lelystad virus[J]. *Vet Q*, 1991, 13: 121-130.

[2] MENGELINGW L, LAGER K M, VORWALD A C. Clinical effects of porcine reproductive and respiratory syndrome virus on pigs during the early postnatal interval[J]. *Am J Vet Res*, 1998, 59 (1): 52-55.

[3] 乔传玲, 郑厚旌, 甘孟侯, 等. 反转录-聚合酶反应检测猪繁殖与呼吸综合征病毒的研究[J]. *畜牧兽医学报*, 2000, 31(3): 262-266.

[4] 杨汉春, 管山红, 尹晓敏, 等. 猪繁殖与呼吸综合征病毒的分离与鉴定[J]. *中国兽医杂志*, 1997, 23 (11): 325.

[5] HAMEL A L, LIN L L, NAYAR G P. Nucleotide sequence of porcine circovirus associated with postweaning multisystemic wasting syndrome in pigs[J]. *J Virol*, 1998, 72: 5262-5267.

[6] MOENNIG V, FLOEGEL-NIESMANN G, GREISER-WILKE I. Clinical signs and epidemiology of classical swine fever: a review of new knowledge [J]. *Vet J*, 2003, 165(1): 1-2.

[7] KÖNIG M, LENGSELD T, PAULY T, et al. Classical swine fever virus: independent induction of protective immunity by two structural glycoproteins [J]. *J Virol*, 1995, 69(10): 6479-6486.

[8] RUMENAPF T, STARK R, MEYERS G, et al. Structural proteins of hog cholera virus expressed by vaccinia virus: further characterization and induction of protective immunity[J]. *J Virol*, 1991, 65(2): 589-597.

[9] KÖNIG M, LENGSELD T, PAULY T, et al. Classical swine fever virus: independent induction of protective immunity by two structural glycoproteins [J]. *J Virol*, 1995, 69(10): 6479-6486.

[10] YANG D G, CHUNG Y C, LAI Y K, et al. Avian influenza virus hemagglutinin display on baculovirus envelope: cytoplasmic domain affects virus properties and vaccine potential [J]. *Mol Ther*, 2007, 15 (5): 989-996.

(编辑 白永平)