

小反刍兽疫病毒 *H* 基因在杆状病毒中的表达及其免疫原性研究

隋修锐, 金红岩, 李文超, 史利军, 赵占中, 梁琳, 李刚*

(中国农业科学院北京畜牧兽医研究所 动物营养学国家重点实验室/农业部兽药药物与兽医生物技术北京科学观测实验站, 北京 100193)

摘要: 为表达小反刍兽疫病毒(PPRV)*H* 蛋白, 并探讨其免疫原性, 通过 RT-PCR 克隆 PPRV Nigeria75/1 毒株 *H* 基因, 将其克隆至供体质粒 pFB-LIC-Bse 中, 测序验证后将重组质粒 pFB-LIC-Bse-PPRV-*H* 转化至 DH10Bac 感受态细胞中, 经同源重组获得重组杆状病毒穿梭质粒 bacmid-PPRV-*H*, 将其转染昆虫细胞 sf21 获得含有 PPRV *H* 基因的重组杆状病毒。采用 SDS-PAGE、Western blot、IFA 及小鼠免疫试验鉴定表达产物的反应原性及免疫原性。结果表明, 在杆状病毒表达系统中表达的 PPRV *H* 蛋白能与 His-tag 单克隆抗体及 PPRV 阳性血清发生特异性反应, 其相对分子质量为 68 ku; 表达产物接种小鼠可诱导其产生特异性抗体和抗小反刍兽疫病毒中和抗体, 淋巴细胞增殖试验检测结果表明重组杆状病毒 rBacmid-*H* 能与相应抗体和致敏的效应淋巴细胞发生较强的特异性反应。本试验获得的重组杆状病毒表达的 PPRV *H* 蛋白具有良好的免疫原性及反应原性, 可诱导小鼠产生保护性中和抗体, 该试验为进一步开发小反刍兽疫亚单位疫苗奠定了基础。

关键词: 小反刍兽疫病毒; *H* 蛋白; 杆状病毒表达系统; 免疫性检测

中图分类号: S852.659.5

文献标志码: A

文章编号: 0366-6964(2014)06-0974-07

Expression of *H* Gene of Peste des Petits Ruminants Virus in Baculovirus and Its Immunogenicity Study

SUI Xiu-kun, JIN Hong-yan, LI Wen-chao, SHI Li-jun, ZHAO Zhan-zhong, LIANG Lin, LI Gang*

(State Key Laboratory of Animal Nutrition/Beijing Scientific Observation and Experiment Station for Veterinary Drug and Veterinary Biotechnology of Ministry of Agriculture, Institute of Animal Science, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Beijing 100193, China)

Abstract: The aim of this study was to study the expression and immunogenicity of *H* protein of peste des petits ruminants virus (PPRV). The *H* gene of PPRV Nigeria75/1 strain was amplified by RT-PCR, and cloned into the donor plasmid pFB-LIC-Bse. After being sequenced, the recombinant plasmid pFB-LIC-Bse-PPRV-*H* was transformed into competent cells of *E. coli* DH10Bac to get recombinant shuttle plasmid. The recombinant shuttle plasmid was then transfected into sf21 cells to get recombinant baculovirus. Western blot, IFA and immunity tests in mice were performed to identify the immunoreactivity and immunogenicity of the expression products. The recombinant *H* protein with molecular mass of approximately 68 kDa was detected with His tag monoclonal antibody and PPRV positive serum. The expression products possessed a favorable immunogenicity and fall immunized mice could produce anti-PPRV neutralizing antibody. The cell

收稿日期: 2013-12-27

基金项目: 国家自然科学基金(31172342); 国家科技支撑计划(2013BAD12B05); 国际合作项目(D32025/17453); 国家公益行业项目(200903037-2); 中央级公益性科研院所基本科研业务费专项基金(2014ywf-yb-6)

作者简介: 隋修锐(1987-), 男, 山东烟台人, 硕士生, 主要从事重大动物疫病的诊断与防控研究, E-mail: 7suixiukun@163.com

* 通信作者: 李刚, 教授, Tel: 010-62813876, E-mail: gli358@gmail.com

immune responses were examined by lymphocyte proliferative assay using MTS method. The results showed that the rBacmid-H was able to express H proteins in Vero cells. Furthermore, specific antibodies were induced in the second week after primary vaccination. In conclusion, the recombinant H protein had good immunogenicity and immunoreactivity, which laid a foundation of developing a new vaccine against PPR.

Key words: peste des petits ruminants virus; H protein; baculovirus expression system; immunogenicity detecting

小反刍兽疫是由小反刍兽疫病毒(pestes des petits ruminants virus, PPRV)引起的一种急性、热性、高度接触性传染病,该病主要的临床特征为发热、坏死性口炎、流涎、胃肠炎及支气管肺炎,大肠出现特异性斑马条痕^[1-2]。山羊与绵羊被认为是 PPR 的唯一天然宿主,而山羊比绵羊更加易感,临床症状也更加严重,发病率高达 100%^[3]。该病最早于 1942 年在西非的象牙海岸发生^[4],因其传播广泛,被世界动物卫生组织(OIE)规定为必须上报的传染病,在中国列为一类动物疫病。2007 年 7 月中国西藏阿里地区首次报道该病疫情,2008 年和 2010 年又在西藏地区先后发生过 2 次小规模疫情^[5],2013 年 12 月在新疆伊犁发生 1 起小反刍兽疫^[6]疫情。

PPRV 属于副黏病毒科(Paramyxoviridae)麻疹病毒属(Morbolivirus)^[7],是该属中最长的病毒。H 基因全长 1 852 bp,开放阅读框(open reading frame, ORF)大小为 1 830 bp,编码的 H 糖蛋白含有 609 个氨基酸残基, H 糖蛋白具有神经氨酸酶活性和血凝素活性,其主要作用是作为受体连接病毒和宿主细胞,调节病毒吸附并侵入宿主细胞^[8]是引起细胞病变的决定因素。已有研究表明将 PPRV H 基因在动植物细胞中表达都有生物活性^[9-10]。因此,利用 H 蛋白研制基因工程疫苗将在控制小反刍兽疫中发挥重要的作用。本研究以已发表的 PPRV Nigeria75/1 株全长 cDNA 为模板,设计引物扩增 H 基因,并将目的基因克隆到表达载体 pFB-LIC-Bse 进行真核表达。构建表达 PPRV H 蛋白的重组杆状病毒,并对其表达产物对小鼠免疫效果进行初步研究。

1 材料与方 法

1.1 材料

PPRV Nigeria75/1 弱毒疫苗株及全长 cDNA 文库、DH10Bac、鼠抗 PPRV Nigeria75/1 株多克隆抗体为本实验室保存。质粒 pFB-LIC-Bse 由北京

农林科学院李永清博士惠赠。

1.2 细胞与培养基

昆虫传代细胞系 sf21 为本实验室保存, Sf-900 II 昆虫培养基购自 Gibco 公司。

1.3 酶和试剂

限制性内切酶 *Bse*R I 购自纽英伦生物技术(北京)有限公司; RTase M-MLV(RNase H-)、dGTP、dCTP、T4 DNA 聚合酶均购自宝生物工程(大连)有限公司; Lipofectamine2000 转染试剂盒、Platinum *Pfx* DNA 聚合酶购自 Invitrogen 公司; DNA Marker 和 PCR 产物纯化试剂盒购自北京全式金生物技术有限公司; 抗 His-Tag 单克隆抗体、HRP 标记的山羊抗小鼠 IgG 购自北京中山金桥生物技术有限公司; 增强型 HRP-DAB 底物显色试剂盒购自北京天根生物技术公司; 淋巴细胞分离液购自天津市灏洋生物制品科技有限责任公司。

1.4 目的基因的扩增及纯化

根据已发表的 PPRV Nigeria75/1 毒株全基因组序列,并结合表达载体 pFB-LIC-Bse 同源臂序列设计用于扩增全长 H 基因的 PCR 引物。引物序列: PPRV H For: 5'-TACTTCCAATCCATGTC-CGCACAAAGGGA-3'; PPRV H Rev: 5'-TATC-CACCTTTACTGT CAGACTGGATTACATGTT-ACCT-3'。

同时参照 Bac-to-Bac 杆状病毒表达系统使用手册,设计鉴定 DH10Bac 杆粒的通用引物 M13, M13 F: 5'-GTTTTTCCCCTCAGAC-3'; M13 R: 5'-CAGGAAACAGCTATGAC-3'。引物由上海生工生物工程有限公司合成。PCR 反应程序: 95 °C 5 min; 94 °C 15 s; 54 °C 30 s; 68 °C 2 min, 30 个循环; 72 °C 10 min。扩增片段胶回收纯化后于 4 °C 保存。

1.5 重组供体质粒 pFB-LIC-Bse-PPRV-H 的构建

用 *Bse*R I 处理 pFB-LIC-Bse 载体于 37 °C 作用 2 h; 纯化后的 PPRV H 基因 PCR 扩增片段和载体经 T4 DNA 聚合酶处理,反应条件: 22 °C 30

min; 75 °C 20 min。将处理的 *H* 基因与载体产物连接, 转化至 DH5a 感受态细胞, 涂板后培养 12 h, 鉴定阳性质粒, 对其进行 PCR 鉴定并送上海生工生物工程股份有限公司测序。

1.6 重组穿梭质粒的构建

参考 Invitrogen 公司 Bac-to-Bac 操作手册, 将测序正确的重组质粒转化至含杆状病毒穿梭载体的 DH10Bac 中, 均匀涂布于含有卡那霉素 ($50 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$)、四环素 ($7 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$)、庆大霉素 ($10 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$)、20% X-gal 和 2% IPTG 的 LB 平板上, 37 °C 倒置培养。

1.7 重组质粒的鉴定

从平板上挑取白色单菌落接种于含有卡那霉素 ($50 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$)、四环素 ($7 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$) 和庆大霉素 ($10 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$) 的 LB 液体培养基中, 37 °C 培养过夜, 抽提杆状病毒质粒, 使用 M13 引物及 PPRV HF/PPRV HR 同时进行 PCR 鉴定, 将鉴定为阳性的质粒命名为 bacmid-PPRV-H。

1.8 重组质粒转染昆虫细胞

将生长状态良好的 sf21 细胞均匀铺于 6 孔板中, 每孔细胞密度为 $1 \times 10^6 \text{ mL}^{-1}$, 置于 28 °C 培养 1 h 待细胞贴壁。将 $3 \mu\text{g}$ bacmid-PPRV-H 和 $6 \mu\text{L}$ Lipofectamine2000 加入 $150 \mu\text{L}$ Sf900 II SFM 培养基中室温孵育 5 min, 将稀释后的重组质粒加至 Lipofectamine2000 中, 室温静置 30 min, 期间用 Sf900 II SFM 培养基清洗细胞。将上述质粒与脂质体混合物逐滴加至六孔板中, 28 °C 5 h。弃上清, 每孔加入 2 mL Sf900 II SFM 培养基, 28 °C 培养 5 d, 观察细胞病变, 取上清即为 P1 毒。如此传代 2~3 次获得高效价的重组杆状病毒。

1.9 间接免疫荧光 (IFA) 观察

将 rBacmid-H P2 代病毒感染正常 sf21 细胞 48 h 后, 用多聚甲醛将细胞室温固定 30 min, 用 PBS 充分洗涤; 用 Triton X-100 室温处理约 10 min; 用 BSA 于 37 °C 封闭 2 h; 加入工作浓度的 PPRV 阳、阴性血清 (1:1 000 倍稀释) 于 37 °C 孵育 1 h, PBS 充分洗涤; 加入 FITC 标记的兔抗山羊 IgG (1:100 倍稀释), 37 °C 避光孵育 1 h 后, PBS 充分洗涤后, 荧光显微镜下观察。同时设置野生杆状病毒感染的 sf21 细胞作为阴性对照。

1.10 重组病毒的 SDS-PAGE 鉴定和 Western blot 分析

取适量 P2 代重组杆状病毒感染 sf21 细胞, 收

集细胞沉淀, 进行 SDS-PAGE。将 SDS-PAGE 凝胶转移到硝酸纤维素膜上, 用鼠抗 PPRV 阳性血清 (1:500 倍稀释) 和抗 His 标签的鼠源单克隆抗体 (1:1 000 倍稀释) 进行鉴定, 二抗使用 HRP 标记的山羊抗小鼠 IgG (1:1 000 倍稀释), 37 °C 孵育 1 h, 加入增强型 HRP-DAB 底物显色。

1.11 免疫原的制备

将 rBacmid-H 重组杆状病毒及野生型杆状病毒均以 MOI=5 接种 sf21 细胞, 培养 72 h 后收集细胞, $12 000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心弃上清, 用原培养液 5% 体积的 PBS 重悬细胞, 反复冻融 3 次, -80 °C 保存备用。

1.12 动物试验

取 30 只清洁级 6 周龄 BALB/c 雌鼠, 随机分成 3 组, 每组 10 只, 按组进行剪趾编号, 免疫前进行眼眶采血, 分离血清, -20 °C 保存备用。以 2 周为免疫间隔共免疫 3 次, 免疫方式为小鼠后腿肌肉注射。分组情况和免疫情况: 第 1 组为重组杆状病毒 (rBacmid-H) 组, 每只 $100 \mu\text{L}$; 第 2 组为野生杆状病毒对照组, 免疫剂量为 $100 \mu\text{L} \cdot \text{只}^{-1}$; 第 3 组为空白对照组 PBS, 免疫剂量为 $100 \mu\text{L} \cdot \text{只}^{-1}$ 。首次免疫后 0、2、4、6 周眼眶采血, 分离血清, 检测血清特异性抗体和中和抗体水平。

1.13 抗体的效价测定

使用原核表达载体 pET-22b 表达 PPRV-H 蛋白, 以纯化的蛋白为包被抗原建立间接 ELISA 检测方法, 按常规操作程序分别检测三免后试验组、对照组及空白组收集的鼠血清的效价。

1.14 病毒中和试验

采用病毒微量中和试验检测血清中抗小反刍兽疫病毒的中和抗体水平: 取上述待测血清和标准阳性血清于 56 °C 水浴中处理 30 min, 然后用无血清 DMEM 培养基按 1:5 稀释, 然后进行 $2 \times$ 系列倍比稀释。与 100 TCID₅₀ 病毒混合, 37 °C 孵育 1 h, 重组杆状病毒免疫的鼠血清设为试验组, 野生杆状病毒免疫的鼠血清设为免疫对照组, 未免疫的鼠血清做阴性对照组。每孔加入 1×10^5 个 Vero 细胞混合均匀, 37 °C 5% CO₂ 培养箱中培养, 观察细胞病变情况, 计算中和抗体, 中和抗体滴度大于 10 被认为是血清学阳性转换。

1.15 淋巴细胞增殖试验

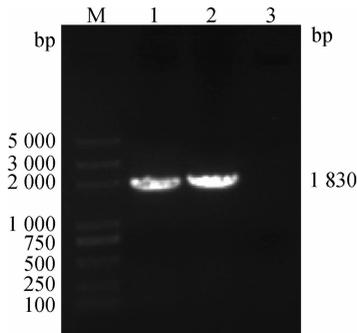
于 3 免后 2 周分离实验小鼠脾脏淋巴细胞, 进行淋巴细胞增殖试验。具体步骤如下: 颈椎脱臼处死小鼠, 置于 75% 酒精中浸泡 10 min; 无菌取脾, 并

用不含血清的 RPMI 1640 培养液清洗;将脾置于 200 目的尼龙网上,碾碎,使用鼠淋巴细胞分离液分离淋巴细胞;调整细胞密度为 2×10^6 个 \cdot mL⁻¹,按 $100 \mu\text{L} \cdot \text{孔}^{-1}$ 将细胞加入 96 孔板中,共 3 组,每组 3 个重复:A 组为 PPRV 刺激组, $100 \mu\text{L}$ 淋巴细胞及 $100 \mu\text{L}$ PPRV;B 组为 ConA 阳性刺激对照组, $100 \mu\text{L}$ 淋巴细胞及 $100 \mu\text{L}$ ConA ($5 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$);C 组为阴性对照组, $100 \mu\text{L}$ 淋巴细胞及 $100 \mu\text{L}$ RPMI 1640 完全培养基;将细胞板置于 37°C 5% CO₂ 培养箱中培养 72 h;每孔加入 $20 \mu\text{L}$ MTS 后再置于 37°C 5% CO₂ 培养箱中继续培养 4 h,测 OD_{490 nm}。根据公式:SI = 刺激组 OD_{490 nm} 平均值/非刺激组 OD_{490 nm} 平均值来判断淋巴细胞增殖程度。

2 结果

2.1 小反刍兽疫病毒 H 基因的扩增

小反刍兽疫病毒 H 基因的 RT-PCR 产物经 1% 琼脂糖凝胶电泳分析,在 1 830 bp 处出现单一一条带(图 1),大小与预期相符。



M. DNA 相对分子质量标准;1、2. H 基因的 RT-PCR 扩增;3. 阴性对照

M. DNA marker;1,2. Amplification of PPRV H gene by RT-PCR;3. Negative control

图 1 PPRV H 基因的 RT-PCR 扩增结果

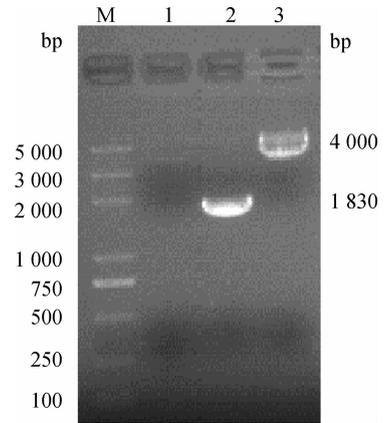
Fig. 1 Amplification of PPRV H gene by RT-PCR

2.2 含目的基因的重组 Bacmid 的筛选与鉴定

将重组质粒 pFB-LIC-Bse-H 转化至 DH10Bac 感受态细胞后,经含卡那霉素、四环素和庆大霉素的平皿筛选,抽提质粒分别以 M13F 和 M13R、PPRV-HF 和 PPRV-HR 为引物进行 PCR,鉴定重组 Bacmid-PPRV-H,获得约为 4 000 bp 和 1 830 bp 的条带,与理论值相符(图 2),证明 pFB-LIC-Bse-H 与 Bacmid 已发生正确重组。

2.3 重组蛋白在昆虫细胞中的表达

将重组杆状病毒在 sf21 细胞上连续传 3 代,表



M. DNA 相对分子质量标准;1. 阴性对照;2. 特异性引物鉴定重组质粒;3. M13 引物鉴定重组质粒

M. DNA marker;1. Control;2. PCR product from recombinant bacmid with PPRV HF/ HR;3. PCR product from bacmid with M13F/M13R

图 2 重组 bacmid-PPRV-H 的 PCR 鉴定

Fig. 2 Identification of bacmid-PPRV-H by PCR

达 H 蛋白的重组杆状病毒于感染 48 h 后出现明显的细胞增大,变圆,停止生长等细胞病变(图 3)。

2.4 IFA

重组杆状病毒感染 sf21 细胞 48 h 后,进行间接免疫荧光试验。结果表明,重组杆状病毒 rBacmid-H 感染的 sf21 细胞能产生特异性荧光,而野生杆状病毒感染的 sf21 细胞未见任何特异荧光,表明重组杆状病毒能在细胞中高效表达 H 蛋白(图 4)。

2.5 重组蛋白的 SDS-PAGE 和 Western blot 鉴定

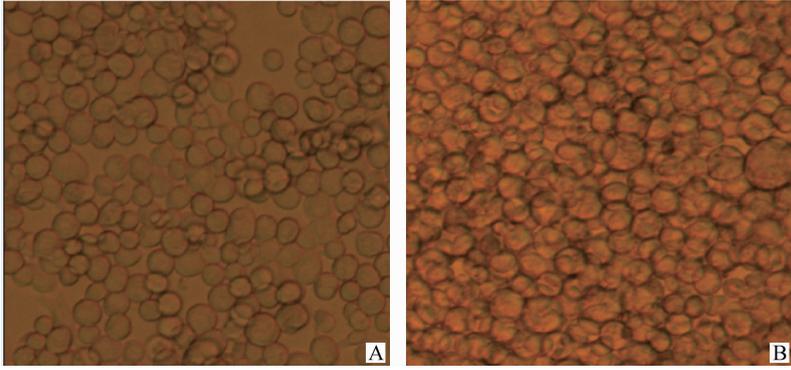
收集感染重组杆状病毒的 sf21 细胞沉淀进行 SDS-PAGE,结果在约 68 ku 左右可见表达产物,和预期大小一致(图 5)。Western blot 检测杆状病毒表达的 H 蛋白与 His 单克隆抗体和 PPRV 血清抗体的反应性,结果显示在 68 ku 左右有清晰的反应条带(图 6),表明该重组蛋白具有良好的反应原性。

2.6 抗体效价测定

用已建立的以纯化的 PPRV-H 重组蛋白为包被抗原的间接 ELISA 方法对免疫小鼠的血清进行检测,用 PBS 将血清从 1:50 倍比稀释至 1:1 600 作为一抗,免疫对照组血清、阴性对照组血清,分别做 3 个平行。以 $P/N \geq 2.1$ 为阳性, $P/N < 2.1$ 为阴性的判断标准,结果发现抗体效价可达 1:1 600 以上(图 7)。

2.7 血清中和抗体效价

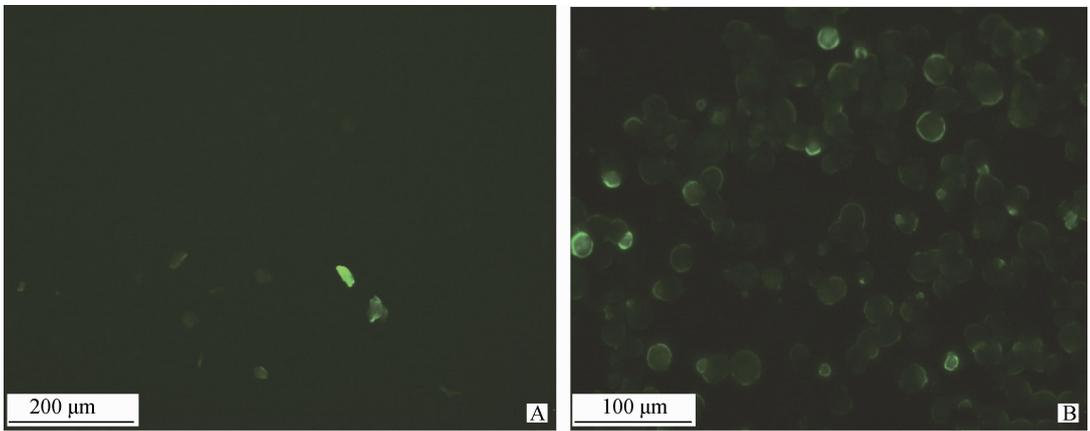
血清中和抗体检测结果表明,重组杆状病毒 rBacmid-H 免疫组能对小鼠诱导明显的中和抗体,野生杆状病毒对照组及空白对照组在整个试验过程



A. 正常培养 48 h sf21 细胞;B. 重组杆状病毒感染 sf21 细胞 48 h 细胞病变
A. sf21 cell control;B. Cytopathic effect (CPE) of sf21 cell

图 3 H 基因重组杆状病毒的细胞病变效应

Fig. 3 Cytopathic effect (CPE) of H gene recombinant bacmid

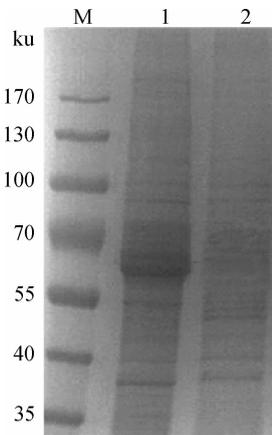


A. 野生杆状病毒感染 48 h 的 sf21 细胞;B. 重组杆状病毒接种 48 h 的 sf21 细胞

A. sf21 cell infected by wild baculovirus;B. sf21 cells infected by recombinant baculovirus

图 4 间接免疫荧光检测小反刍兽疫病毒 H 蛋白的表达

Fig. 4 Identification of expressed recombinant PPRV-H by IFA



M. 蛋白质相对分子质量标准;1. 重组杆状病毒感染的 sf21 细胞;2. 野生型杆状病毒感染的 sf21 细胞

M. Protein molecular weight marker;1. Recombinant baculovirus infected sf21 cell;2. Wild baculovirus infected sf21 cell

图 5 重组 PPRV H 蛋白的 SDS-PAGE 检测

Fig. 5 SDS-PAGE analysis of recombinant protein

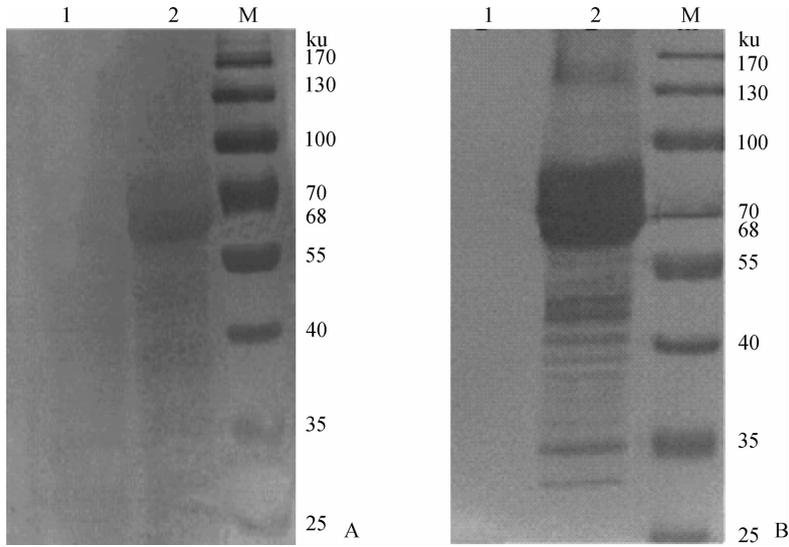
中没有检测到中和抗体,见表 1,以中和抗体水平大于 10 为阳性转换值,首免后 4 周重组杆状病毒免疫的试验组有 50% 出现中和抗体,6 周中和抗体达到保护水平比例的 100%,而对照组整个试验过程均未检测到中和抗体。

2.8 淋巴细胞增殖反应

3 免后 2 周分离免疫小鼠的脾淋巴细胞,检测淋巴细胞增殖能力。结果显示:经过 PPRV 刺激后,与野生杆状病毒对照组及空白对照组相比,重组杆状病毒 rBacmid-H 免疫组孔内的淋巴细胞增殖明显,SI 值明显高于对照组(图 8)。说明用重组杆状病毒作为特异性刺激原刺激淋巴细胞,能使细胞发生明显的分裂增殖,具有良好的免疫原性。

3 讨论

PPRV H 蛋白是病毒和宿主细胞膜结合过程



1. 正常 sf21 细胞上清;2. 重组杆状病毒与 PPRV 阳性血清(A)或抗 His 标签抗体(B);M. 蛋白质相对分子质量标准
1. Product from sf21 cells;2. Product from sf21 cells infected by recombinant baculovirus with PPRV positive serum (A) or anti-His tag monoclonal antibody (B);M. Protein molecular weight marker

图 6 重组 PPRV H 蛋白的 Western blot 检测

Fig. 6 Western blot detection of the recombinant PPRV H protein

表 1 重组杆状病毒免疫诱导产生 PPRV 中和抗体

Table 1 PPRV neutralizing antibodies in mice induced by recombinant baculovirus

组别 Groups	首免后周数 Weeks after the primary immunization			
	0	2	4	6
重组杆状病毒 Recombinant baculovirus	0(10/10)	1 : 5(7/10), 0(3/10)	1 : 5(5/10), 1 : 10(5/10)	1 : 10(4/10), 1 : 20(6/10)
野毒 Wild baculovirus	0(10/10)	0(10/10)	0(10/10)	0(10/10)
PBS	0(10/10)	0(10/10)	0(10/10)	0(10/10)

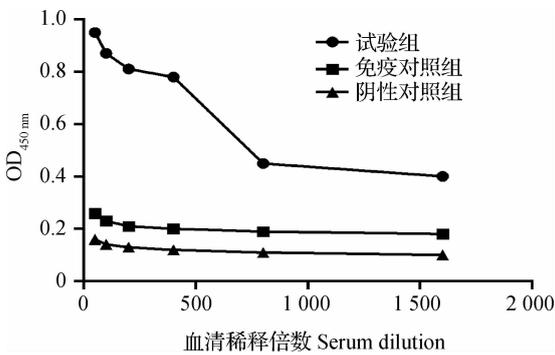


图 7 小鼠血清抗体效价

Fig. 7 Determination of serum antibody titers of mice

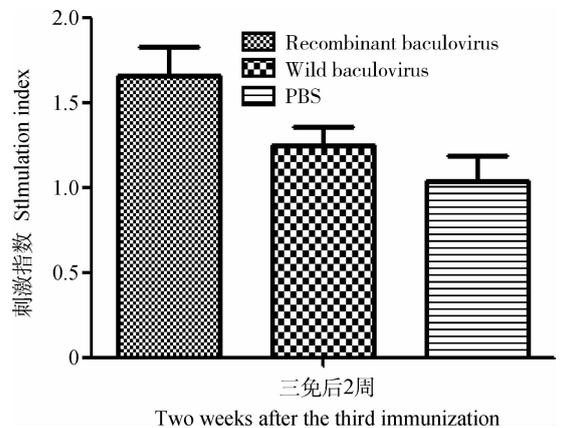


图 8 小鼠淋巴细胞增殖反应

Fig. 8 Lymphocyte proliferative responses in mice

中的受体结合蛋白,能够诱导机体产生中和抗体^[11],参与体液保护性免疫,并且含有 T 细胞决定簇,是机体主要的保护性抗原,因此,对 H 蛋白的研究极其重要。

杆状病毒表达系统是一个以昆虫杆状病毒为外源基因载体,以昆虫细胞或昆虫为受体的表达系

统^[12],外源蛋白的表达水平高,表达产物可进行翻译后加工修饰,包括糖基化、磷酸化、酰基化、正确的信号肽切割、蛋白水解以及适当的折叠,并且可将重组蛋白定位于与天然蛋白相同的细胞器上,还能进行适当的寡聚化装配,其抗原性、结构与功能等生物活性均与天然蛋白相似。目前,已有多种利用该系统表达制备的亚单位疫苗通过批准上市,如抗猪瘟、猪霍乱等亚单位疫苗^[13]。

本研究应用杆状病毒表达系统成功构建了含有 PPRV H 基因且具有感染力的重组杆状病毒。将重组杆状病毒转染至昆虫细胞即可获得重组 H 蛋白,通过 Western blot 分析表明,重组 H 蛋白能与 PPRV 阳性血清及标签抗体发生特异性的免疫反应,具有良好的反应原性。以小鼠为动物模型进行动物免疫试验,检测免疫后小鼠特异性抗体、中和抗体水平,结果显示试验组小鼠血清特异性抗体水平达到 1:1 600,中和抗体效价达到 1:20。此外,通过免疫后小鼠淋巴细胞增殖试验发现 rBacmid-H 能够与相应抗体和致敏的效应淋巴细胞发生较强的特异性反应,表明 rBacmid-H 具有良好的免疫性,能有效保护机体。以上结果表明,通过杆状病毒所表达的小反刍兽疫病毒 H 蛋白具有良好的免疫原性及反应原性,能诱导小鼠产生保护性中和抗体,证明利用该系统作为 PPR 亚单位疫苗研究具有潜在的应用前景。

由于病毒活载体所表达外源蛋白的纯化较为复杂,而且不同的蛋白具有其自身特性,本研究在尚未确定最佳蛋白纯化条件前,仅对其免疫效果做了初步研究。结果表明,所获得的重组蛋白具有良好的免疫原性,能诱导小鼠产生保护性中和抗体,因此有必要对该蛋白的表达量、纯化方法以及适宜的免疫剂量做进一步的研究。

4 结 论

通过 RT-PCR 克隆小反刍兽疫病毒 Nigeria75/1 毒株 H 基因,克隆至供体质粒 pFB-LIC-Bse 中,获得重组质粒 pFB-LIC-Bse-PPRV-H,将其转化至 DH10Bac 感受态细胞中,经同源重组获得重组杆状病毒穿梭质粒 bacmid-PPRV-H。杆状病毒表达系统中表达的 PPRV H 蛋白其相对分子质量为 68 ku,能与 His-tag 单克隆抗体及 PPRV 阳性血清发生特异性反应;表达蛋白接种小鼠可诱导其产生特异性抗体和抗小反刍兽疫病毒中和抗体,淋巴细胞增殖试验表明重组杆状病毒 rBacmid-H 能与相应抗体和致敏的效应淋巴细胞发生较强的特异性反应。

参考文献:

- [1] AMJAD H, QAMAR-UL-ISLAM, FORSYTH M, et al. Peste des petits ruminants in goats in Pakistan [J]. *Vet Rec*, 1996, 139(5):118-119.
- [2] 殷震,刘景华. 动物病毒学 [M]. 2 版. 北京:科学出版社,1997.
- [3] 李伟,李刚,吴晓东,等. 小反刍兽疫病毒 N 基因重组杆状病毒的构建及间接 ELISA 抗体检测方法的建立 [J]. 畜牧兽医学报, 2010, 41(9):1147-1153.
- [4] 邱文英,李刚,田康乐,等. 小反刍兽疫病毒 N 蛋白主要抗原区域的原核表达及间接 ELISA 检测方法的建立 [J]. 中国兽医科学, 2012, 42(5):483-487.
- [5] 王志亮,包静月,吴晓东,等. 我国首例小反刍兽疫诊断报告 [J]. 中国动物检疫, 2007, 24(8):24-26.
- [6] 农业部新闻办公室. 新疆伊犁州霍城县发生一起小反刍兽疫疫情 [EB]. [2013-12-05]. http://www.moa.gov.cn/zwllm/yjgl/yqfb/201312/t20131205_3699251.htm.
- [7] SINNATHAMBY G, RENUKARADHYA G J, RAJASEKHAR M, et al. Immune responses in goats to recombinant hemagglutinin in neuraminidase glycoprotein of peste des petits ruminants virus; identification of a T cell determinant [J]. *Vaccine*, 2001, 19(32):4816-4823.
- [8] MEYER G, DIALLO A. The nucleotide sequence of the fusion protein gene of the peste des petits ruminants virus; The long untranslated region in the 5' end of the F-protein gene of morbilliviruses seems to be specific to each virus [J]. *Virus Res*, 1995, 37(1):23-35.
- [9] COUACY HYMANN E, BODJO C, DANHO T, et al. Evaluation of the virulence of some strains of peste des petits ruminants virus (PPRV) in experimentally infected West African dwarf goats [J]. *J Vet*, 2007, 173(1):178-183.
- [10] SATYAVATHI V V, PRASAD V, KHANDELWAL A, et al. Expression of hemagglutinin protein of Rinderpest virus in transgenic pigeon pea [*Cajanus cajan* (L.) Millsp.] plants [J]. *Plant Cell Rep*, 2003, 21(7):651-658.
- [11] DIALLO A, MINET C, LE GOFF C, et al. The threat of peste des petits ruminants; progress in vaccine development for disease control [J]. *Vaccine*, 2007, 25(30):5591-5597.
- [12] 刘永平,王方海,苏志坚,等. 昆虫杆状病毒表达载体系统的研究及应用 [J]. 昆虫知识, 2006, 43(1):1-5.
- [13] BOUMA A, DE SMIT A J, DE KLUIJVER E P, et al. Efficacy and stability of a subunit vaccine based on glycoprotein E2 of classical swine fever virus [J]. *Vet Microbiol*, 1999, 66(2):101-114.