

传染性法氏囊病病毒 AH1 株 vp2 基因在昆虫细胞中的表达与应用

欧阳伟^{1,2}, 王永山¹, 周宇^{1,2}, 张海彬², 唐雨德³

1 江苏省农业科学院兽医研究所 农业部动物疫病诊断与免疫重点开放实验室 国家兽用生物制品工程技术研究中心, 南京 210014
2 南京农业大学动物医学院, 南京 210095
3 南京军区军事医学研究所, 南京 210002

摘要: 将近期引起传染性法氏囊病 (IBD) 免疫预防失败的传染性法氏囊病病毒 (IBDV) vp2 基因, 定向克隆入杆状病毒表达系统的供体质粒 pFastBacHTA 中, 构建重组供体质粒 pFastBacHTA-VP2, 转化 *Escherichia coli* DH10Bac 感受态, 筛选重组杆状病毒表达质粒 pBac-VP2。用 pBac-VP2 转染 Sf9 昆虫细胞, 获得重组杆状病毒 vBac-VP2。对重组杆状病毒 vBac-VP2 感染的 Sf9 细胞, 用间接免疫荧光试验 (IFA) 检测, 具有特异性荧光; 用 IBDV 抗体夹心 ELISA 检测, 呈阳性反应, 抗原效价达到 1.6×10^3 ; 用 Western blotting 分析, 在 53 kDa 处出现一条特异蛋白条带; 电镜观察, 重组 Vp2 蛋白能够自组装成病毒样颗粒, 在感染细胞中发现了“包涵体样”结构。用 HisTrap HP 亲和层析柱纯化的重组 Vp2 蛋白作为包被抗原, 建立的 IBDV 抗体间接 ELISA 检测方法具有良好的特异性。用重组杆状病毒感染的 Sf9 昆虫细胞裂解物, 免疫 2 周龄 SPF 鸡, 一次免疫 14 d 后, ELISA 检测抗体效价为 8×10^2 , 中和抗体效价为 1106, 攻毒实验的存活率为 30%; 二次免疫 14 d 后, ELISA 抗体效价为 3.2×10^3 , 中和抗体效价为 2536, 存活率为 100%。在实验观察 7 d 内, 重组 Vp2 蛋白免疫保护鸡未显任何临床症状和病理变化, 法氏囊/体重比高于对照组 ($P < 0.05$)。本实验制备的病毒样颗粒重组 Vp2 蛋白在研制新型 IBD 基因工程疫苗和检测试剂方面显示出了应用前景。

关键词: 传染性法氏囊病病毒, vp2 基因, 病毒样颗粒, 包涵体样结构, 间接 ELISA, 免疫实验

Recombinant Vp2 protein of infectious bursal disease virus AH1 strain expressed in insect cells: a vaccine candidate

Wei Ouyang^{1,2}, Yongshan Wang¹, Yu Zhou^{1,2}, Haibin Zhang², and Yude Tang³

1 Key Laboratory of Animal Diseases and Immunology, Ministry of Agriculture National Center for Engineering Research of Veterinary Bio-products, Institute of Veterinary Medicine, Jiangsu Academy of Sciences, Nanjing 210014, China
2 College of Veterinary Medicine, Nanjing Agricultural University, Nanjing 210095, China
3 Huadong Research Institute of Medical Biotechnics, Nanjing 210002, China

Abstract: Protective immune response of the available IBD vaccine is insufficient to fully protect against the prevailing strain of the infectious bursal disease virus (IBDV). Such a vaccination escape IBDV field isolate identified from Anhui province of China in

Received: December 4, 2009; **Accepted:** March 26, 2010

Supported by: National Natural Science Foundation of China (No. 30571371), Natural Science Foundation of Jiangsu Province (Nos. BK2008352, BK2009041), Agriculture Science and Technology Innovation Foundation of Jiangsu Province (No. CX(08)106).

Corresponding author: Yongshan Wang. Tel: +86-25-84390339; E-mail: wangyongshan2001@yahoo.com.cn; wangys63@126.com

国家自然科学基金 (No. 30571371), 江苏省自然科学基金 (Nos. BK2008352, BK2009041), 江苏省农业科技创新基金 (No. CX(08)106) 资助。

December 2007, where IBD broke out at 2 weeks post vaccination. The IBDV *vp2* gene was cloned into pFastBacHTA donor plasmid, followed by generation of the recombinant bacmid DNA pBac-VP2. The latter was used to transfect insect cell Sf9 with Lipofectamine to produce recombinant baculovirus vBac-VP2. The Sf9 cells infected with vBac-VP2 were stained positive against IBDV antibody using the indirect immunofluorescence assay (IFA), which was also confirmed by the detection of IBDV Vp2 protein in the infected Sf9 cells by IBDV sandwich ELISA. Western blotting revealed that the calculated protein of approximately 53 kDa was in the expressed in the insect cells. Moreover, virus-like particles (VLPs) and “inclusion body-like” structure in the infected Sf9 cells were observed under electron microscopy. We further developed an indirect ELISA for the detection of the IBDV antibodies, which was specific and sensitive. In addition, the lysates of vBac-VP2 infected cells was used to immunize 2-week-old SPF chickens, followed by challenging with the virulent IBDV, the survival rate was 30% at 14 days post primary immunization, however, the survival rate was 100% at 14 d after the booster vaccination. The ELISA antibody titers was up to 3.2×10^3 and neutralization antibody titer was 2536, significantly higher than those of one-shot vaccination, 8×10^2 and 1106, respectively. The immunized chickens did not show any clinical signs and histopathological changes of infection in 7-days trial time. The bursa/body-weight ratios were higher than those of the unimmunized control ($P < 0.05$). The virus-like-particle recombinant Vp2 protein expressed in insect cells promises to be a novel subunit vaccine and diagnostic reagent candidate for IBDV.

Keywords: infectious bursal disease virus, *vp2* gene, virus-like particles (VLPs), inclusion body-like structure, indirect ELISA, protection test

传染性法氏囊病 (Infectious bursal disease, IBD) 是引起我国及世界养禽业经济损失严重的主要传染病之一。接种疫苗是预防该病最有效的方法, 在上世纪 80 年代的中后期, 在世界范围内爆发了在抗原性和致病性等方面与经典毒株有很大差异的 IBDV 变异毒株, 使养鸡业遭受重创^[1-5]。变异株和超强毒株 (vvIBDV) 的出现使该病的防控难度加大, IBD 免疫预防失败已成为禽病防控中的重要问题^[4,6-8]。目前, 使用的常规弱毒疫苗和灭活疫苗, 其安全性和制造工艺仍存在不足: 为预防变异毒株而采用中强毒力活疫苗存在着较大的生物安全问题, 因为在不同 IBDV 毒株之间潜在着基因重配的可能, 给该病的防控带来隐患; 灭活疫苗存在着抗原制备的困难; 因此, 在当前 IBD 防控实际工作中, 亟需免疫效力强、生物安全性高、并且针对当前流行毒株的新型 IBD 基因工程疫苗的问世。IBDV 属双 RNA 病毒科双 RNA 病毒属, 基因组包括大 (A) 小 (B) 2 个片段, 有 5 种病毒蛋白: Vp1、Vp2、Vp3、Vp4 和 Vp5。Vp2 占病毒蛋白的 51%, 既是 IBDV 的主要结构蛋白, 又是病毒的主要保护性抗原, 与病毒中和抗体的诱导、抗原和毒力的变异以及细胞凋亡的诱导等有关^[1-2,9-10]。Vp2 的高变区是病毒中和性单抗的结合必需区, 该区的点突变是 IBDV 抗原漂移、毒力变异进而造成经典疫苗株免疫失败的主要原因。迄今, IBD 基因工程疫苗研究均以 *vp2* 为

靶基因, 采用的表达系统包括: 大肠杆菌^[11]、酵母^[12]、鸡痘病毒载体^[13]、杆状病毒表达载体^[14]、核酸疫苗^[15]以及近期报道的多表位疫苗^[16]等。目前 IBD 基因工程疫苗研究中的主要问题: 或者是重组 IBDV 蛋白的表达量不够高, 或者是重组 IBDV 蛋白复性难度大, 或者是源于一种毒株的重组蛋白不适用于其他变异毒株。因此, 在 *vp2* 基因选择、表达系统以及表达策略方面进一步探索新的技术路线是十分必要的。近期, 笔者对安徽省在 2007 年 12 月发生的两起免疫失败的 IBDV 野外毒株的 *vp2* 基因的分子特征进行了分析, 其 *vp2* 基因与当时预防使用的疫苗毒株 (B87 株) 的 *vp2* 基因序列有较大差异^[17], 再次佐证了 IBDV 变异株的危害。鉴于此, 本实验针对 IBD 基因工程疫苗研究中的主要问题, 选用该 *vp2* 基因, 运用杆状病毒表达系统将其在昆虫细胞中表达, 制备病毒样颗粒重组 Vp2 蛋白, 研制新型高效 IBD 病毒样颗粒基因工程疫苗和检测试剂。

1 材料与amp;方法

1.1 质粒、菌种与细胞

含有 *vp2* 基因的克隆质粒 pUC-VP2 (AH1) 系本实验室用 RT-PCR 方法从 2007 年 12 月在安徽境内发生的 IBD 免疫预防失败的病鸡法氏囊组织中扩增的 *vp2* 基因构建^[17]。含有 6×His 标签的供体质粒 pFastBacHTA、含有 Bacmid 和 Helper plasmid 的 *E.*

coli DH10Bac、Sf9 昆虫细胞、*E. coli* TOP10 均购自 Invitrogen 公司。IBDV 疫苗毒株 B87 鸡胚成纤维细胞 (CEF) 适应毒和 9~10 日龄 SPF 鸡胚均由南京天邦生物科技有限公司提供。

1.2 主要试剂

鸡抗 IBDV 高免血清系用 IBD 弱毒疫苗 (B87) 多次免疫 SPF 鸡获得, 用 DEAE 纤维素 (DE32) 纯化; 兔抗鸡 IgG 抗体和 HRP 标记的兔抗鸡 IgG 抗体由本实验室制备。MiniBEST 质粒纯化试剂盒、DNA 凝胶回收试剂盒、X-gal、IPTG 均购自 TaKaRa 公司; BAC/PAC DNA Isolation Kit 购自 Omega 公司; Lipofectamine2000 转染试剂购自 Invitrogen 公司; 胎牛血清、Grace's 昆虫细胞培养基购自 Gibco 公司。FITC 标记的羊抗兔 IgG 抗体、DAB 显色液购自武汉博士德生物工程有限公司。

1.3 引物的设计与合成

根据 vp2 基因序列和供体质粒 pFastBacHTA 表达阅读框设计 vp2 基因扩增引物:

vp2F(36): 5'-CAGATCTGAATTCATGGCGAAC CTGCAAGATCAAAC-3'; vp2R(34): 5'-CTACTACCT CCTTATGGCCCGATTATGTCTTTG-3';

重组杆状病毒表达质粒鉴定引物:

M13F(17): 5'-GTTTTCCCAGTCACGAC-3'; M13R(17): 5'-CAGGAAACAGCTATGAC-3'。

以上引物由 Invitrogen 公司合成。

1.4 Vp2 基因重组供体质粒的构建

将克隆质粒 pUC-VP2 (AH1) 和供体质粒 pFastBacHTA 分别用 *EcoR* I 和 *Hind* III 双酶切, 经 1% 琼脂糖凝胶电泳, 分别回收 vp2 和载体 DNA 片段, DNA 胶回收试剂盒纯化, T4 DNA 连接酶连接, 转化 *E. coli* TOP10 感受态细菌, 涂布在用 LB 配制的 1.5% 琼脂皿上 (含氨苄青霉素 100 mg/L), 37°C 培养 14 h。挑单菌落接种入 LB (含氨苄青霉素 100 mg/L), 振荡培养 12 h, 用 MiniBEST 质粒纯化试剂盒提取质粒, *EcoR* I 和 *Hind* III 双酶切鉴定, 获得含 vp2 基因的重组供体质粒 pFastBacHTA-VP2。

1.5 Vp2 基因重组杆状病毒表达质粒的构建

用重组供体质粒 pFastBacHTA-VP2 转化 *E. coli* DH10Bac 感受态细胞 (含 Bacmid DNA 和 Helper plasmid), 在 LB 培养基中 37°C, 220 r/min, 4 h, 用

LB 做一系列稀释 (10^{-1} 、 10^{-2} 、 10^{-3}), 涂布于 LB 配制的 1.5% 琼脂皿上 (含有 50 mg/L 卡那霉素、7 mg/L 庆大霉素、10 mg/L 四环素以及 100 mg/L X-gal 和 40 mg/L IPTG), 37°C 培养 16 h, 挑白色单菌落, 接种于含有 3 种抗生素 (50 mg/L 卡那霉素、7 mg/L 庆大霉素、10 mg/L 四环素) 的 LB 中, 37°C 振荡培养 16 h, 用 BAC/PAC DNA Isolation Kit 提取重组 Bacmid DNA, 用 vp2 基因正向引物 vp2F(36) 和 M13/pUC 通用下游引物 PCR 鉴定重组 Bacmid DNA, 获得含 vp2 基因的重组杆状病毒表达质粒 pBac-VP2。

1.6 Vp2 基因重组杆状病毒的获得

在转染前 1 天, 用对数生长期的 Sf9 昆虫细胞在 6 孔细胞培养板中制备单层细胞。转染时, 弃去旧培养基, 并用无血清无抗生素的 Grace's 液洗涤细胞, 然后用孵育好的 pBac-VP2-Lipofectamine2000 混合物平铺 Sf9 细胞单层, 27°C 培养 5 h, 弃去 pBac-VP2-Lipofectamine2000 混合物, 每孔加入含 10% 血清及抗生素的 Grace's 完全培养液, 置 27°C 继续培养; 实验同步设立用未插入外源基因片段的 Bacmid 质粒和单用转染试剂转染 Sf9 细胞为对照; 每日观察, 直到细胞病变达 90% 时, 收集细胞及上清液, 在 Sf9 昆虫细胞上继续传代 2 次, 获得第 3 代重组杆状病毒 (P3 代), 进行鉴定。

1.7 Vp2 基因重组杆状病毒的鉴定

1.7.1 IFA 检测

实验在 24 孔细胞培养板中进行。将重组杆状病毒 (P3 代) 接种到 Sf9 细胞, 培养 72 h 后, 吸弃细胞培养液, 用无血清的培养液洗 2 次, 然后向细胞培养孔中加入 -20°C 预冷的无水乙醇 1 mL/孔, 4°C 固定 30 min, 用 PBS 洗 3 次, 拍干; 加入 40 倍稀释的鸡抗 IBDV 高免血清, 200 μ L/孔, 37°C 孵育 2 h, PBS 洗涤 5 次, 拍干; 加入 100 倍稀释的兔抗鸡 IgG 抗体, 200 μ L/孔, 37°C 孵育 1 h, PBS 洗涤 5 次, 拍干; 加入 50 倍稀释的 FITC 标记的羊抗兔 IgG 抗体工作液, 200 μ L/孔, 37°C 孵育 1 h, PBS 洗涤 5 次, 置于荧光显微镜下观察。同步设立无 vp2 基因的杆状病毒 (Baculovirus) 感染 Sf9 细胞和正常细胞为对照。

1.7.2 夹心 ELISA 检测

用包被液稀释鸡抗 IBDV IgG 至 5 mg/L, 然后包被酶标板, 100 μ L/孔, 4 $^{\circ}$ C 过夜, PBST 洗涤 3 次, 每次 5 min, 拍干; 用封闭液 (含 10% FBS 的 PBST) 满孔封闭, 37 $^{\circ}$ C, 2 h, PBST 洗涤 3 次, 每次 5 min, 拍干; 加入超声破碎好的 P4 代细胞, 100 μ L/孔, 37 $^{\circ}$ C, 2 h, PBST 洗涤 3 次, 每次 5 min, 拍干; 加入 1:1 000 稀释的 HRP 标记的鸡抗 IBDV IgG, 100 μ L/孔, 37 $^{\circ}$ C, 1 h, PBST 洗涤 3 次, 每次 5 min, 拍干; 显色。实验同步设立阴性和空白对照。

1.7.3 Western blotting 分析

将 P3 代 vBac-VP2 感染的 Sf9 细胞、Bacmid 转染产生的野生杆状病毒感染的 Sf9 细胞和正常的 Sf9 细胞用 0.01 mol/L PBS (pH 7.2) 离心洗涤 2 次后, 按原体积 1% 加入 PBS 重悬, 3 次冻融后, 加入 5 \times SDS-Loading Buffer, 按常规方法进行 12% 分离胶和 5% 浓缩胶的 SDS-PAGE 电泳分析, 转印到硝酸纤维素膜上, 转印完毕后, 将硝酸纤维素膜用 5% 脱脂奶粉 4 $^{\circ}$ C 封闭过夜, 然后用一抗 (鸡的 IBDV 高免血清)、二抗 (HRP 标记的兔抗鸡 IgG 抗体) 分别与之作用, DAB 底物显色, 观察特异蛋白条带。

1.7.4 电镜观察

用 P3 代 vBac-VP2 感染 Sf9 昆虫细胞, 待细胞完全病变之后, 收集细胞, 冻融 3 次, 3 000 r/min 离心 30 min, 取上清使用电镜负染技术制片观察。用同样方法收集病变细胞, 不冻融, 3 000 r/min 离心 30 min 沉淀细胞, 2% 戊二醛固定液固定, 超薄切片, 电镜观察, 同时设立正常 Sf9 昆虫细胞作空白对照。

1.8 重组 Vp2 蛋白的纯化

取 300 mL vBac-VP2 感染的细胞培养物, 离心收集细胞, 用 12 mL 结合缓冲液重悬, 并加入 20 μ L 100 mmol/L PMSF, 冰浴条件下超声破碎至细胞悬液清亮, 4 $^{\circ}$ C、10 000 r/min 离心 30 min 去除细胞碎片, 取上清用 0.45 μ m 孔径滤膜过滤, 然后按照 HisTrap HP 说明书纯化重组 Vp2 蛋白。

1.9 重组 Vp2 蛋白的应用

1.9.1 IBDV 抗体间接 ELISA 检测方法的建立

用 pH 9.6 的碳酸盐缓冲液将纯化的重组 Vp2 蛋白稀释至 5 mg/L, 包被 ELISA 板, 100 μ L/孔, 4 $^{\circ}$ C

过夜; 用 PBST 洗涤 3 次, 每次 2 min, 拍干; 每孔加入封闭液 (含 10% FBS 的 PBST) 300 μ L, 37 $^{\circ}$ C, 2 h; 用 PBST 洗涤 3 次, 每次 2 min, 拍干; 加入待检血清样品, 37 $^{\circ}$ C, 1 h; 用 PBST 洗涤 3 次, 每次 2 min, 拍干; 加入 HRP-标记的兔抗鸡 IgG (1:2 000) 100 μ L, 37 $^{\circ}$ C, 1 h; 用 PBST 洗涤 3 次, 每次 2 min, 拍干; 加入显色剂 A 液 (四甲基联苯胺溶液)、B 液 (过氧化氢脲溶液) 液各 1 滴, 暗盒显色; 2 mol/L H₂SO₄ 终止, 测 A₄₅₀ 值, 判定结果。

1.9.2 重组 Vp2 蛋白的免疫攻毒试验

将 100 只 2 周龄 SPF 鸡 (购自南京天邦生物科技有限公司) 随机分成 3 组, 隔离饲养: 重组 Vp2 蛋白加免疫佐剂组 60 只, 将重组杆状病毒感染的 Sf9 昆虫细胞培养物 (ELISA 效价为 1 600) 与等体积的免疫佐剂 (法国 SEPPIC 公司 Montainde ISA 206 VG) 混合乳化, 经胸部肌肉注射, 0.4 mL/只/次, 第 1 次免疫 14 d 后进行第 2 次免疫; 单用免疫佐剂组 20 只, 免疫程序与前者相同, 只注射免疫佐剂, 0.4 mL/只/次; 空白对照组 20 只, 不注射, 只是与其他 2 个实验组在同样条件下饲养。全部的实验鸡均在免疫实验时经翅静脉采血, 并在免疫后每间隔 7 d 采血 1 次, 分别测定抗体效价。

将采集的实验鸡血清从 1:100 开始进行 2 倍比连续稀释, 用 IBDV 抗体间接 ELISA 检测方法 (见 1.9.1) 测定抗体效价。

将实验鸡血清从 1:100 开始进行 10 倍比连续稀释, 各取 100 μ L, 分别与等体积的 IBDV B87 细胞适应毒稀释物 (病毒含量 200 TCID₅₀/0.1 mL) 混合, 置 37 $^{\circ}$ C 反应 1 h, 接种于含有 CEF 单层的 96 孔培养板中, 100 μ L/孔 (病毒含量 100 TCID₅₀/孔), 每份待检血清设 4 个重复; 同时设立病毒对照、阳性血清对照、阴性血清对照、细胞对照。置 37 $^{\circ}$ C、5% CO₂ 培养, 每天观察病变, 记录结果, 按 Reed-Muench 法计算出每个血清样品的病毒中和抗体效价, 计算几何均数 (GMT), 为该血清的病毒中和抗体效价。

第 1 次免疫 14 d 后, 从 3 个实验组中各取半数鸡 (重组 Vp2 蛋白加免疫佐剂组 30 只、单用免疫佐剂组 10 只、空白对照组 10 只), 同时采用点眼、滴鼻、擦肛 3 种途径人工感染 IBDV 强毒^[16], 0.2 mL/只

(病毒含量 100 LD₅₀), 攻毒后每日观察试验鸡的生长和发病情况, 连续观察 7 d, 记录死亡数, 及时解剖检查病死鸡法氏囊组织病变并取少许置于 10% 中性甲醛溶液中固定, 石蜡包埋, 切片, HE 染色, 观察组织学变化。第 7 天捕杀存活鸡, 称体重, 检查法氏囊病理变化并称重; 按以下公式分别计算各组试验鸡的法氏囊/体重比 (BB 比值), 并进行统计学分析 (*F* 检验)。对 3 个实验组的另半数鸡进行第 2 次免疫, 14 d 后同法攻毒。

法氏囊/体重比(BB 比值) = 法氏囊重(g) × 1 000 / 试验鸡体重(g)

2 结果与分析

2.1 Vp2 基因重组供体质粒的鉴定

将构建的供体质粒 pFastBacHTA-VP2 用 *EcoR* I 和 *Hind* III 双酶切鉴定, 1% 琼脂糖凝胶电泳可见两条带, 分别约为 1.4 kb 与 5.0 kb, 与预期大小相符 (图 1)。

2.2 Vp2 基因重组杆状病毒表达质粒的鉴定

用重组供体质粒 pFastBacHTA-VP2 转化 *E. coli* DH10Bac 感受态细胞, 蓝白斑与三抗筛选, 挑白色菌落克隆, 用 BAC/PAC DNA Isolation Kit 提取重组 Bacmid DNA, 重组 Bacmid DNA 经 PCR 鉴定 (引物为 *vp2* 基因正向引物 *vp2*F(36) 和 M13/pUC 通用下游引物), 1% 琼脂糖凝胶电泳可见一条大小约为 2 100 bp 的条带, 与理论值 2 092 bp 相符, 说明 *vp2* 基因已成功转座入 Bacmid DNA 中 (图 2)。

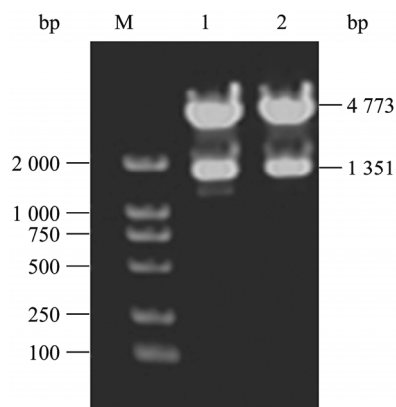


图 1 pFastBacHTA-VP2 的酶切图谱

Fig. 1 Digestion map of pFastBacHTA-VP2. M: DNA marker; 1, 2: pFastBacHTA-VP2 digested by *EcoR* I and *Hind* III.

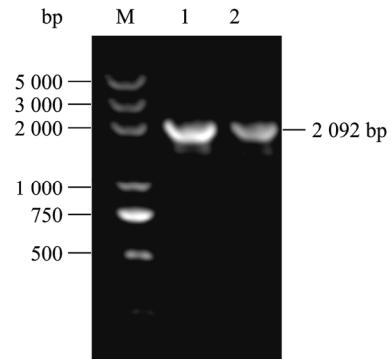


图 2 pBac-VP2 的 PCR 分析图谱

Fig. 2 PCR analysis of pBac-VP2. M: DNA marker; 1, 2: plasmid pBac-VP2.

2.3 Vp2 基因重组杆状病毒的获得

将鉴定好的 pBac-VP2 按 Lipofectamine2000 使用说明转染 Sf9 细胞, 每天观察病变, 5 d 后, 转染孔可见部分细胞变圆变大, 第 6 天细胞病变达 90% 以上, 收集病变细胞及上清, 1 500 r/min 离心 10 min, 上清液即为含 *vp2* 基因的重组杆状病毒 vBac-VP2 原液 (P1 代), 继续传代 2 次, 获得高效价的重组杆状病毒 vBac-VP2 (P3 代)。

2.4 Vp2 基因重组杆状病毒的鉴定

2.4.1 IFA 检测

在荧光显微镜下, 可以看见感染 P3 代 vBac-VP2 病毒的 Sf9 昆虫细胞呈现较强的荧光, 而感染野生型杆状病毒的细胞与正常的细胞则无荧光 (图 3)。表明 *vp2* 基因在昆虫细胞中表达。

2.4.2 夹心 ELISA 检测

用夹心 ELISA 检测 P4 代 vBac-VP2 病毒细胞超声裂解物, 加入 P4 代样品的孔, 显示阳性, 抗原效价达到 1.6×10^3 , 表明 *vp2* 基因在昆虫细胞中得到了高效表达。正常昆虫细胞和 PBST 对照孔则均为阴性。

2.4.3 Western blotting 分析

对 P3 代 vBac-VP2 病毒细胞培养物进行 SDS-PAGE, 用 Western blotting 分析, 在 53 kDa 附近可见一条特异蛋白带, 表明重组 Vp2 蛋白具有 IBVD 抗原反应性 (图 4)。

2.4.4 电镜观察

用电镜负染技术观察, 在 P3 代 vBac-VP2 病毒感染昆虫细胞中可发现病毒样颗粒, 直径约 60 nm (图 5A); 用 vBac-VP2 病毒感染的病变细胞制备超

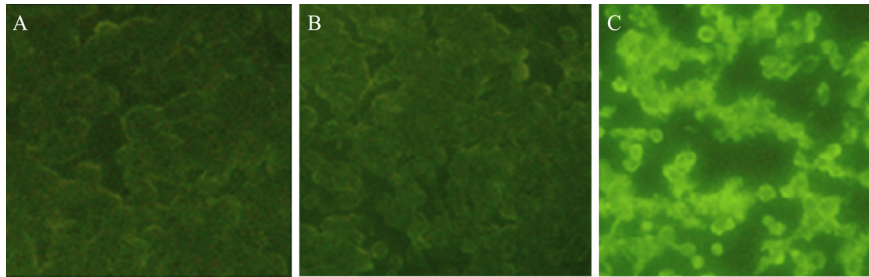


图3 感染 vBac-VP2 的 Sf9 昆虫细胞 IFA 检测结果 (100×)

Fig. 3 Detection of Sf9 cells infected with vBac-VP2 by IFA (100×). (A) Normal Sf9 cells. (B) Sf9 cells infected with Baculovirus. (C) Sf9 cells infected with vBac-VP2.

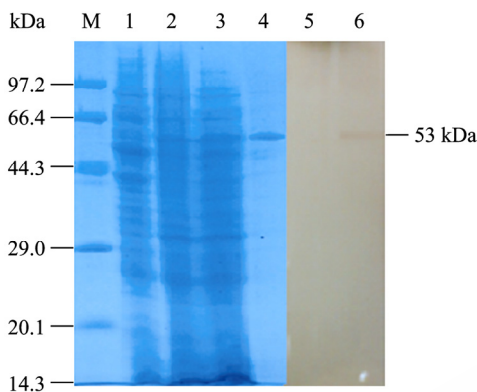


图4 感染 vBac-VP2 的 Sf9 细胞 SDS-PAGE 和 Western blotting 分析结果

Fig. 4 Analysis of vBac-VP2 infected Sf9 cells by SDS-PAGE and Western blotting. M: protein marker; 1: normal Sf9 cells (in SDS-PAGE); 2: Sf9 cells infected with vBac-VP2 (in SDS-PAGE); 3: Sf9 cells infected with vBac-VP2 after ultrasonication (in SDS-PAGE); 4: purified Vp2 protein expressed in Sf9 cells (in SDS-PAGE); 5: normal Sf9 cells (in Western blotting); 6: Sf9 cells infected with vBac-VP2 (in Western blotting).

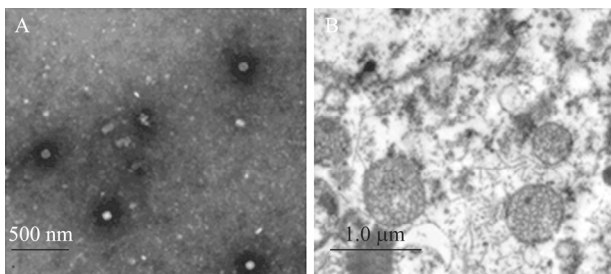


图5 感染 vBac-VP2 的 Sf9 细胞电镜检查结果

Fig. 5 Observation of Sf9 cells infected with vBac-VP2 by electron microscopy. (A) Virus-like particles (VLPs) were observed in the Sf9 cells infected with vBac-VP2 by negative staining of electron microscopy. (B) "Inclusion body-like" structure were observed in the Sf9 cells infected with vBac-VP2 by ultra-section of electron microscopy.

薄切片, 可发现由病毒样颗粒在细胞中形成的“包涵体样”结构 (图 5B)。

2.5 重组 Vp2 蛋白的纯化

Sf9 细胞表达的 Vp2 蛋白经 HisTrap HP 亲和层析柱纯化后, 进行 SDS-PAGE, 用凝胶图像分析软件 BandScan5.0 分析, 重组 Vp2 蛋白的纯度达 80% (图 4)。

2.6 重组 Vp2 蛋白的应用

2.6.1 IBDV 抗体间接 ELISA 检测方法的建立

用纯化的重组 Vp2 蛋白做包被抗原建立的 IBDV 抗体间接 ELISA 检测, IBD 疫苗 (B87 株) 免疫 20 d 后的鸡血清 (阳性血清) 检测孔 A_{450} 值 ≥ 0.90 , 而 SPF 鸡血清、牛血清以及 PBST 对照孔的 A_{450} 值均为 0.00, 表明该 ELISA 抗体检测方法具有良好的特异性 (表 1)。

2.6.2 重组 Vp2 蛋白的免疫攻毒试验

重组 Vp2 蛋白加免疫佐剂组, 随着免疫时间和免疫次数的增加, 免疫鸡血清中 IBDV 的 ELISA 抗体与病毒中和抗体不断上升 (图 6)。第 1 次免疫 14 d 后, 重组 Vp2 蛋白加免疫佐剂组的 ELISA 抗体效价为 800, 病毒中和抗体效价为 1 106, 此时用 IBDV 强毒攻击, 在攻毒后的第 2 天开始有死亡, 第 3 天死亡较多, 至第 7 天攻毒鸡的存活率为 30% (9/30); 而单用免疫佐剂组与空白对照组 ELISA 抗体效价和中和效价均小于 100, 用 IBDV 强毒攻击, 在攻毒后的第 4 天全部死亡。解剖检查死亡鸡的法氏囊肿大、出血、表面有胶冻样分泌物 (图 7); 病理组织学检查可见法氏囊淋巴滤泡呈不同程度的萎缩、坏死, 滤泡内细胞数量明显减少, 细胞破碎常见, 滤泡间质增宽, 有较明显的间质水肿 (图 8A)。

表 1 IBDV 抗体间接 ELISA 检测结果

Table 1 Detection of anti-IBDV antibodies by indirect ELISA

	Positive serum (1:100)				Serum of SPF chickens (1:100)				Fetal bovine serum (1:100)	PBST	-----
	1	2	3	4	1	2	3	4			
Vp2 protein*	0.91	0.90	0.93	0.91	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
Blank control**	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00

*: The wells of ELISA plate were coated with recombinant Vp2 (concentration 5 mg/L, 100 μL/well); **: The wells of ELISA plate weren't coated with recombinant Vp2.

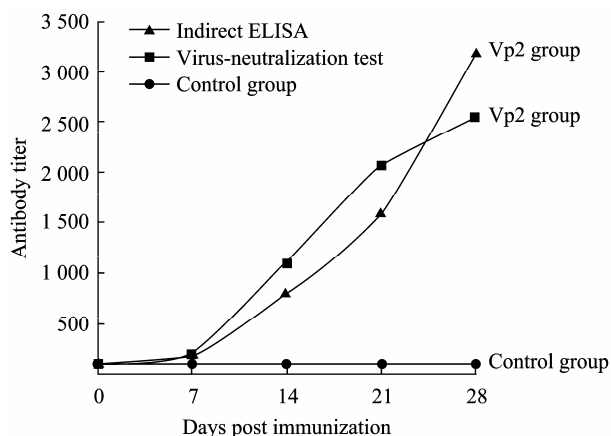


图 6 重组 Vp2 蛋白免疫鸡 IBDV 抗体动态

Fig. 6 Pattern of IBDV-antibody in chickens immunized with recombinant Vp2.



图 7 攻毒死亡鸡法氏囊解剖检查结果

Fig. 7 Bursa of dead chickens challenged with vIBDV.

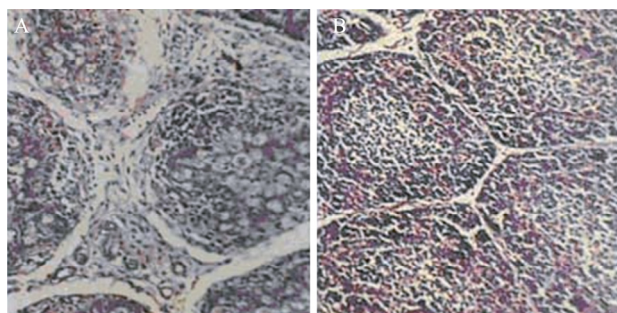


图 8 实验鸡法氏囊病理组织学检查结果 (HE, 200×)

Fig. 8 Tissue slices of bursas (HE, 200×). (A) Dead chicken. (B) Normal control.

同期正常饲养的对照鸡生长正常, 法氏囊组织也未见病理变化 (图 8 B)。第 7 天捕杀存活鸡, 各试验组的法氏囊/体重比 (BB 值) 平均值分别为: 重组 Vp2 免疫组 3.68、单用免疫佐剂组 2.51、空白对照组 2.35。经 *F* 检验, 重组 Vp2 免疫组与两个对照组间均有显著差异 ($P < 0.05$), 而两个对照组之间差异不显著 ($P > 0.05$)。

第 2 次免疫 14 d 后 (从第 1 次免疫起 28 d), 重组 Vp2 蛋白加免疫佐剂组 ELISA 抗体效价上升到 3 200, 病毒中和抗体效价为 2 536, 此时用 IBDV 强毒攻击, 存活率为 100% (30/30); 单用免疫佐剂组与空白对照组 ELISA 抗体和中和抗体效价始终小于 100, 攻毒鸡全部死亡。死亡鸡的法氏囊均呈现以上病理变化。重组 Vp2 免疫组的法氏囊/体重比 (4.25) 与单用免疫佐剂组 (2.24) 和空白对照组 (2.29) 均差异显著 ($P < 0.05$), 而单用免疫佐剂组和空白对照组之间差异不显著 ($P > 0.05$) (表 2)。表明重组病毒样颗粒 Vp2 蛋白免疫鸡可以抵抗 IBDV 强毒攻击。

3 讨论

长期以来, 对 IBD 采取了以疫苗免疫接种为主的综合性防控措施, 该病的大规模流行或爆发已得到了有效控制, 但难以消除, 其主要原因是 IBDV 具有抵抗力强、抗原与毒力容易变异以及非鸡禽鸟类可成为病毒携带者或贮存宿主等特点, 使该病极易呈地方性流行, 已成为禽病防控中的重要问题, 由此造成的经济损失巨大、无法准确统计^[17-20]。

病毒样颗粒疫苗作为预防性疫苗具有以下几个方面的优势: 不含病毒 DNA, 无感染性^[21]; 免疫原性强, 可刺激机体产生特异性体液免疫和细胞免疫; 稳定性好, 不易失活。颗粒疫苗作为一种新型的疫

表 2 重组 Vp2 蛋白的免疫攻毒试验

Table 2 The protection test of chickens immunized with recombinant Vp2

Groups	14 d post first immunization			14 d post second immunization		
	Vp2 protein +Adjuvant	Adjuvant control	Blank control	Vp2 protein +Adjuvant	Adjuvant control	Blank control
Number of chickens	30	10	10	30	10	10
ELISA antibody titers ^A	800	< 100	< 100	3 200	< 100	< 100
Neutralization antibody titers ^A	1 106	< 100	< 100	2 536	< 100	< 100
BB ratio ^B	3.68	2.51	2.35	4.25	2.24	2.29
Survival rate (%)	30 (9/30 ^C)	0 (0/10)	0 (0/10)	100 (30/30)	0 (0/10)	0 (0/10)

A: geometric means of antibody titers; B: BB ratio was calculated by bursal weight (g) × 1 000/total body weight (g); C: the number of survivals / total chickens in the group.

苗, 不仅克服了传统的弱毒疫苗和灭活疫苗的不足, 也弥补了基因疫苗的不足, 在许多传染病的防控上显示出了良好应用前景。Antonis 等^[22]用在昆虫细胞中表达的猪细小病毒 *vp2* 基因产物制备的病毒样颗粒疫苗, 在免疫佐剂的作用下, 能在猪体内产生高滴度的血清抗体。

本研究针对目前 IBD 基因工程疫苗研究中存在的主要问题, 在目的基因选择上, 采用近期引起免疫失败并具有完全的 IBDV 强毒分子特征的 *vp2* 基因, 在表达系统上, 利用杆状病毒表达系统具有与高等细胞类似的翻译后修饰系统, 可使外源基因表达产物具有天然的活性形式、表达产物可自组装成病毒样颗粒 (VLPs)、以及表达量高等优点, 将 IBDV 近期流行毒株的 *vp2* 基因在昆虫细胞中进行了表达。检测证明, 重组 Vp2 蛋白能够自组装成病毒样颗粒, 在感染细胞中形成“包涵体样”结构, 细胞培养物的 ELISA 效价达到 1.6×10^3 , 得到了高效表达。

为了评估该病毒样颗粒重组 Vp2 蛋白的应用前景, 用重组 Vp2 蛋白作为 IBDV 抗体检测抗原, 建立了 IBDV 抗体间接 ELISA 检测方法, 检测结果表明, 该方法具有良好的特异性。由于鸡体内不可能存在抗昆虫细胞抗体, 因此使用在昆虫细胞中表达的病毒样颗粒重组 Vp2 蛋白作为 IBDV 抗体检测抗原研制 IBD 抗体检测试剂盒可以有效地保证检测方法的特异性。已有的研究表明, 免疫效果和生产成本是影响兽用基因工程疫苗推广应用的主要因素, 鉴于此, 本实验简化疫苗制备工艺, 用重组杆状病毒感染的 Sf9 昆虫细胞裂解物免疫 SPF 鸡, 可诱导机体产生高效价的抗 IBDV 的 ELISA 抗体与中和抗

体, 抵抗 IBDV 强毒攻击, 免疫保护鸡未显任何临床症状和病理变化, 法氏囊/体重比高于对照组, 具有成为新型 IBD 病毒样颗粒基因工程疫苗的潜力。由于目前缺乏 IBDV 病毒样颗粒重组 Vp2 蛋白免疫攻毒试验参考资料, 本试验的免疫剂量和免疫途径、IBDV 攻毒时机和剂量都是根据作者自己的工作经验初步确定的, 因此, 在免疫攻毒试验结果中, 两次免疫比一次免疫注射的保护率高, 这表明对 IBDV 病毒样颗粒重组 Vp2 蛋白的免疫剂量和免疫佐剂进行优化是必不可少的, 该项工作正在进行中。以上结果表明, 本实验制备的病毒样颗粒重组 Vp2 蛋白在研制新型 IBD 基因工程疫苗和检测试剂方面显示了应用前景。

REFERENCES

- [1] Calnek BW, Gao F, Su JL, translation. Diseases of Poultry. 10th ed. Beijing: China Agriculture Press, 1999: 914–937. 卡尔尼克 BW 主编. 高福, 苏敬良, 主译. 禽病学. 10 版. 北京: 中国农业出版社, 1999: 914–937.
- [2] Muller H, Islam MR, Raue R. Research on infectious bursal disease—the past, the present and the future. *Vet Microbiol*, 2003, **97**(1/2): 153–165.
- [3] Cao YC, Yeung WS, Law M, et al. Molecular characterization of seven Chinese isolates of infectious bursal disease virus: classical, very virulent and variant strains. *Avian Dis*, 1998, **42**(2): 340–351.
- [4] Brown MD, Green P, Skinner MA. *Vp2* sequences of recent European “very virulent” isolates of infectious bursal disease virus are closely related to each other but are distinct from those of “classical” strains. *J Gen Virol*, 1994, **75**(Pt3): 675–680.
- [5] Yamaguchi T, Ogawa M, Miyoshi M, et al. Sequence and

- phylogenetic analyses of highly virulent infectious bursal disease virus. *Arch Virol*, 1997, **142**(7): 1441–1458.
- [6] Mardassi H, Khabouchi N, Ghram A, *et al.* A very virulent genotype of infectious bursal disease virus predominantly associated with recurrent infectious bursal disease outbreaks in Tunisian vaccinated flocks. *Avian Dis*, 2004, **48**(4): 829–840.
- [7] Yamaguchi T, Kasanga CJ, Terasaki K, *et al.* Nucleotide sequence analysis of Vp2 hypervariable domain of infectious bursal disease virus detected in Japan from 1993 to 2004. *J Vet Med Sci*, 2007, **69**(7): 733–738.
- [8] Dolz R, Majo N, Ordonez G, *et al.* Viral genotyping of infectious bursal disease virus isolated from the 2002 acute outbreak in Spain and comparison with previous isolates. *Avian Dis*, 2005, **49**(3): 332–339.
- [9] Qi XL, Wang XM, Gao YL, *et al.* Progress in research about Vp2 protein of infectious bursal disease virus. *Chin J Pre Vet Med*, 2008, **30**(8): 656–660.
 祁小乐, 王笑梅, 高玉龙, 等. 鸡传染性法氏囊病病毒 Vp2 蛋白研究进展. *中国预防兽医学报*, 2008, **30**(8): 656–660.
- [10] Liu HM, Qin AJ, Xu XQ, *et al.* Construction of vp2 eukaryotic expression vector of infectious bursal disease virus and its application. *Chin J Pre Vet Med*, 2006, **28**(4): 461–465.
 刘红梅, 秦爱建, 许小琴, 等. 传染性法氏囊病病毒 JS 株 vp2 基因真核表达载体的构建及其应用. *中国预防兽医学报*, 2006, **28**(4): 461–465.
- [11] Azad AA, Fahey KJ, Barrett SA, *et al.* Expression in *Escherichia coli* of cDNA fragments encoding the gene for the host-protective antigen of infectious bursal disease virus. *Virology*, 1986, **149**(2): 190–198.
- [12] Macreadie IG, Vaughan PR, Chapman AJ, *et al.* Passive protection against infectious bursal disease virus by viral Vp2 expressed in yeast. *Vaccine*, 1990, **8**(6): 549–552.
- [13] Shaw I, Davison TF. Protection from IBDV-induced bursal damage by a recombinant fowlpox vaccine, fpIBD1, is dependent on the titre of challenge virus and chicken genotype. *Vaccine*, 2000, **18**(28): 3230–3241.
- [14] Snyder DB, Vakharia VN, Mengel-Whereat SA, *et al.* Active cross-protection induced by a recombinant baculovirus expressing chimeric infectious bursal disease virus structural proteins. *Avian Dis*, 1994, **38**(4): 701–707.
- [15] Fodor I, Horvath E, Fodor N, *et al.* Induction of protective immunity in chickens immunised with plasmid DNA encoding infectious bursal disease virus antigens. *Acta Vet Hung*, 1999, **47**(4): 481–492.
- [16] Wang YS, Fan HJ, Li Y, *et al.* Development of a multi-mimotope peptide as a vaccine immunogen for infectious bursal disease virus. *Vaccine*, 2007, **25**(22): 4447–4455.
- [17] Wang YS, Ouyang W, Pan QX, *et al.* Molecular characteristics of vp2 gene of infectious bursal disease virus from immunophylaxis defeat's chickens in 2007. *Chin Vet Sci*, 2008, **38**(12): 919–925.
 王永山, 欧阳伟, 潘群兴, 等. 近期引起免疫失败的传染性法氏囊病病毒 vp2 基因的分子特征. *中国兽医科学*, 2008, **38**(12): 919–925.
- [18] Zhou ZA, Wang YS, Deng XZ, *et al.* Survey on the ecology and epidemiology of infectious bursal disease virus. *Chin J Vet Sci*, 1998, **18**(5): 430–433.
 周宗安, 王永山, 邓小昭, 等. 传染性法氏囊病病毒的生态学与流行病学研究. *中国兽医学报*, 1998, **18**(5): 430–433.
- [19] Wang ZC, Wang YS, Tang YD, *et al.* Development of the detection system for infectious bursal disease virus. *Chin J Vet Sci*, 2008, **28**(9): 1015–1019.
 王忠灿, 王永山, 唐雨德, 等. 传染性法氏囊病病毒检测系统的建立. *中国兽医学报*, 2008, **28**(9): 1015–1019.
- [20] Wang YS, Wang ZC, Tang YD, *et al.* Comparison of four infectious bursal disease virus isolated from different bird species. *Arch Virol*, 2007, **152**(10): 1787–1797.
- [21] Karpenko LI, Ilyichev AA, Eroshkin AM, *et al.* Combined virus-like particle-based polypeptide DNA/protein HIV21 vaccine design immunogenicity and toxicity studies. *Vaccine*, 2007, **25**(21): 4312–4323.
- [22] Antonis AF, Brusckhe CJ, Rueda P, *et al.* A novel recombinant virus-like particle vaccine for prevention of porcine parvovirus-induced reproductive failure. *Vaccine*, 2006, **24**(26): 5481–5490.