

# 牛病毒性腹泻病毒 E<sup>rns</sup> 蛋白的中华仓鼠卵巢巢细胞表达及免疫原性分析

李亚军<sup>1,2</sup>, 茹毅<sup>1</sup>, 郝荣增<sup>1</sup>, 秦晓东<sup>1</sup>, 卢炳州<sup>1</sup>, 杨洋<sup>1</sup>, 刘华南<sup>1</sup>, 张越<sup>1</sup>, 龚真莉<sup>1</sup>, 刘艳红<sup>1</sup>, 余四九<sup>2\*</sup>, 郑海学<sup>1\*</sup>

1 中国农业科学院兰州兽医研究所/兰州大学 动物医学与生物安全学院 动物疫病防控全国重点实验室, 甘肃 兰州 730046

2 甘肃农业大学动物医学院, 甘肃 兰州 730070

李亚军, 茹毅, 郝荣增, 秦晓东, 卢炳州, 杨洋, 刘华南, 张越, 龚真莉, 刘艳红, 余四九, 郑海学. 牛病毒性腹泻病毒 E<sup>rns</sup> 蛋白的中华仓鼠卵巢巢细胞表达及免疫原性分析[J]. 生物工程学报, 2023, 39(12): 4861-4873.

LI Yajun, RU Yi, HAO Rongzeng, QIN Xiaodong, LU Bingzhou, YANG Yang, LIU Huanan, ZHANG Yue, GONG Zhenli, LIU Yanhong, YU Sijiu, ZHENG Haixue. Bovine viral diarrhea virus E<sup>rns</sup> protein expressed in Chinese hamster ovary cells and its immunogenicity analysis[J]. Chinese Journal of Biotechnology, 2023, 39(12): 4861-4873.

**摘要:** 本研究利用中华仓鼠卵巢巢(Chinese hamster ovary, CHO)细胞表达系统制备牛病毒性腹泻病毒(bovine viral diarrhea virus, BVDV) E<sup>rns</sup> 蛋白, 并分析其免疫原性。以 BVDV-1 NADL 标准毒株基因序列为基础, 构建 BVDV E<sup>rns</sup> 蛋白重组真核表达质粒 pcDNA3.1-BVDV-E<sup>rns</sup>, 转染悬浮培养的 CHO 细胞, 进行上清分泌表达。SDS-PAGE 分析 E<sup>rns</sup> 蛋白的表达和纯化, 并用抗 His 单克隆抗体和 BVDV 阳性血清进行 Western blotting 鉴定纯化蛋白; 进一步使用纯化的 E<sup>rns</sup> 蛋白免疫新西兰大白兔, 通过间接酶联免疫吸附试验(enzyme linked immunosorbent assay, ELISA)和细胞间接免疫荧光(indirect immunofluorescence, IFA)实验检测血清抗体水平及其免疫反应活性, 用病毒中和实验测定免疫兔血清的中和抗体滴度。BCA 蛋白定量试剂盒检测纯化的 E<sup>rns</sup> 蛋白浓度为 0.886 mg/mL, Western blotting 结果显示, 抗 His 单克隆抗体和 BVDV 阳性血清均能够与纯化的 E<sup>rns</sup> 蛋白发生特异性免疫反应。间接 ELISA 和 IFA 实验结果显示, 一免后第 7 天血清抗体呈阳性, 并持续至免疫后第 28 天, 血清抗体效价水平可达 1:128 000, 且该血清抗体可以与 MDBK 细胞中感染的 BVDV 病毒发生特异性免疫反应。重组 E<sup>rns</sup> 蛋白免疫兔可诱导动物机体产生病毒中和抗体, 中和效价为 log<sub>10</sub>=2.71。

资助项目: 中国农业科学院兰州兽医研究所所级基本科研业务费(110231160042036, 1610312021013, 1610312022009); 甘肃省自然科学基金(22JR5RA030); “十四五”广东省农业科技创新十大主攻方向“揭榜挂帅”项目(2022SDZG02)

This work was supported by the Basic Scientific Research Business Expenses Budget Incremental Projects of Lanzhou Veterinary Research Institute, the Chinese Academy of Agricultural Sciences (110231160042036, 1610312021013, 1610312022009), the Natural Science Foundation of Gansu Province (22JR5RA030), and the Open Competition Program of Top Ten Critical Priorities of Agricultural Science and Technology Innovation for the 14th Five-Year Plan of Guangdong Province (2022SDZG02).

\*Corresponding authors. E-mail: ZHENG Haixue, zhenghaixue@caas.cn; YU Sijiu, sjyu@163.com

Received: 2023-02-08; Accepted: 2023-05-31; Published online: 2023-06-26

本研究利用 CHO 细胞表达系统成功制备了纯化的 BVDV E<sup>rns</sup> 蛋白, 并通过体内和体外实验证明, 该重组蛋白具有良好的免疫原性, 为牛病毒性腹泻(bovine viral diarrhea, BVD)诊断及新型亚单位疫苗的研制奠定了基础。

关键词: 牛病毒性腹泻病毒; E<sup>rns</sup> 蛋白; 真核表达; 中华仓鼠卵巢(CHO)细胞悬浮培养; 免疫原性

## Bovine viral diarrhea virus E<sup>rns</sup> protein expressed in Chinese hamster ovary cells and its immunogenicity analysis

LI Yajun<sup>1,2</sup>, RU Yi<sup>1</sup>, HAO Rongzeng<sup>1</sup>, QIN Xiaodong<sup>1</sup>, LU Bingzhou<sup>1</sup>, YANG Yang<sup>1</sup>, LIU Huanan<sup>1</sup>, ZHANG Yue<sup>1</sup>, GONG Zhenli<sup>1</sup>, LIU Yanhong<sup>1</sup>, YU Sijiu<sup>2\*</sup>, ZHENG Haixue<sup>1\*</sup>

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

2 College of Animal Science and Technology, Gansu Agricultural University, Lanzhou 730070, Gansu, China

**Abstract:** The aim of this study was to produce E<sup>rns</sup> protein of bovine viral diarrhea virus (BVDV) by using suspensively cultured CHO cells expression system and to analyze the immunogenicity of the purified E<sup>rns</sup> protein. In this study, the recombinant eukaryotic expression plasmid pcDNA3.1-BVDV-E<sup>rns</sup> was constructed based on the gene sequence of BVDV-1 NADL strain. The E<sup>rns</sup> protein was secreted and expressed in cells supernatant after transfecting the recombinant expression plasmid pcDNA3.1-BVDV-E<sup>rns</sup> into CHO cells. The expression and purification of the E<sup>rns</sup> protein was analyzed by SDS-PAGE, the reactivity was determined with anti-His monoclonal antibodies and BVDV positive serum with Western blotting. Immunogenicity analysis of the E<sup>rns</sup> protein was determined after immunizing New Zealand white rabbits, and the serum antibodies were tested by indirect ELISA (iELISA) and indirect immunofluorescence (IFA). The serum neutralizing titer of the immunized rabbits was determined by virus neutralization test. The concentration of the purified E<sup>rns</sup> protein was up to 0.886 mg/mL by BCA protein quantification kit. The results showed that the E<sup>rns</sup> protein could be detected with anti-His monoclonal antibodies and anti-BVDV sera. Serum antibodies could be detected by iELISA on the 7th day post-prime immunization, and the antibody level was maintained at a high titer until the 28th day post-immunization. The antibody titer was 1:128 000. Furthermore, the expression of the E<sup>rns</sup> protein in BVDV-infected MDBK cells could be detected with immunized rabbits sera by IFA. Moreover, antigen-specific neutralizing antibodies of 2.71 log<sub>10</sub> was induced in rabbits. In this study, purified BVDV E<sup>rns</sup> protein was successfully produced using CHO suspension culture system, and the recombinant protein was proved to have a good immunogenicity, which may facilitate the development of BVD diagnosis method and novel subunit vaccine.

**Keywords:** bovine viral diarrhea virus; E<sup>rns</sup> protein; eukaryotic expression; Chinese hamster ovary (CHO) cell suspension culture; immunogenicity

牛病毒性腹泻(bovine viral diarrhea, BVD)是由牛病毒性腹泻病毒(bovine viral diarrhea virus, BVDV)引起的一种急性、热性、高度接触性传染病,临床症状主要以腹泻、繁殖障碍、免疫机能障碍等为主要特征<sup>[1]</sup>。BVDV 是单股正链 RNA 病毒,属于黄病毒科(Flaviviridae)瘟病毒属(Pestivirus)<sup>[2]</sup>,其基因组含有 4 种结构蛋白基因,分别是 p14(编码衣壳 C 蛋白)、gp48(编码囊膜 E<sup>ms</sup> 蛋白,又称 E0 蛋白)、gp25(编码囊膜 E1 蛋白)和 gp53(编码囊膜 E2 蛋白),其余为非结构蛋白基因<sup>[3]</sup>。其中 E<sup>ms</sup>、E1、E2 组成了病毒的囊膜结构,位于病毒表面<sup>[4]</sup>。BVD 是一种具有多种临床表现的复杂疾病,被认为是世界范围内对养牛业的主要威胁之一<sup>[5]</sup>,BVDV 主要感染牛,近年来,BVDV 的宿主范围一直在扩大,涉及绵羊、山羊、猪、鹿和其他反刍动物<sup>[6]</sup>。由于目前 BVD 没有特定的治疗方法,因此寻找新的措施来预防和阻断该病发生与传播尤为重要。BVDV 的 E<sup>ms</sup> 和 E2 为保护性抗原,且 E2 蛋白的免疫原性高于 E<sup>ms</sup> 蛋白<sup>[7]</sup>,但 E2 基因的变异率较高,容易发生免疫逃逸,是导致疫苗免疫失败和牛持续性感染的主要原因<sup>[8]</sup>。E<sup>ms</sup> 是 BVDV 编码蛋白中保守性较高且存在中和表位的蛋白,其诱导的抗体具有中和 BVDV 活性的能力<sup>[9]</sup>。严伟行<sup>[10]</sup>利用原核表达系统制备 BVDV E<sup>ms</sup> 蛋白,结果目的蛋白以包涵体形式存在,其仅通过 Western blotting 分析证明该蛋白的反应原性。于吉锋等<sup>[11]</sup>进行了 BVDV 牦牛株 E<sup>ms</sup> 基因生物信息学分析和原核表达,结果显示目的蛋白同样以包涵体的形式存在,并具有一定的抗原性。陈颖彬等<sup>[12]</sup>构建了 BVDV E0 基因重组嗜酸乳杆菌 pMG36e-E0-LA-5,并评价了其对犊牛的免疫保护作用,结果证实可以有效抵抗 BVDV 的感染。高闪电等<sup>[13]</sup>以昆虫细胞表达系统制备了 BVDV 病毒样颗粒并在豚鼠身

上评价其免疫原性,证明其制备的病毒样颗粒免疫诱导豚鼠产生较高滴度的中和抗体并激活细胞免疫。以上研究表明,BVDV E<sup>ms</sup> 蛋白已成为 BVD 基因工程疫苗和诊断试剂的热门结构蛋白,但原核表达该抗原可能存在蛋白可溶性不佳、缺乏正确的折叠或翻译后修饰、不能真实展示目标蛋白结构等问题,影响产物抗原性。因此,探索利用中华仓鼠卵巢(Chinese hamster ovary, CHO)细胞真核表达系统制备 BVDV E<sup>ms</sup> 蛋白作为候选抗原的可能性,可以为 BVD 新型基因工程亚单位疫苗的研究奠定基础。本研究以研制安全、有效和免疫效果好的 BVD 基因工程亚单位疫苗为目标,分别在体内和体外评价已经制备的 BVDV 结构蛋白 E<sup>ms</sup> 的免疫原性。

## 1 材料与方法

### 1.1 主要材料和试剂

#### 1.1.1 实验动物

新西兰大白兔购自中国农业科学院兰州兽医研究所实验动物中心,经中国农业科学院兰州兽医研究所实验动物伦理委员会批准(批准号:LVRIAEC-2021-045)。

#### 1.1.2 主要试剂

BVDV-1 标准毒株 NADL 株(购自中国兽药药品监察所-中国兽医微生物菌种保藏管理中心)、真核表达载体 pcDNA3.1(+),BVDV 阳性血清由本实验室保存;ExpiCHO 表达系统试剂盒、Unstained protein MW marker (26610)、RT-PCR 扩增试剂盒、6×His Tag Monoclonal Antibody (HIS.H8)、Prestained protein MW marker (26616)及 BCA 蛋白定量试剂盒、Alexa Fluor<sup>®</sup> 488 标记的羊抗兔二抗均购自 Thermo Fisher Scientific 公司;亲和层析镍柱购自 GE 公司。RNA 提取试剂盒和 DNA 凝胶纯化回收试剂盒均

购自 OMEGA 生物试剂有限公司; *Xho* I、*Hind* III、*Sca* I 和 *Xho* I 限制性内切酶购自 New England Biolabs (NEB) 公司; 大肠杆菌 (*Escherichia coli*) DH5 $\alpha$  感受态细胞购自北京全式金生物技术股份有限公司; 质粒大量提取试剂盒购自 MACHEREY-NAGEL 生物试剂有限公司; ECL 显色试剂盒购自上海碧云天生物技术有限公司; 截流分子量为 8 000–10 000 Da 的 MD44 透析袋购自北京索莱宝科技有限公司<sup>[14]</sup>。

### 1.1.3 主要仪器

细胞计数仪(Bio-Rad)、二氧化碳细胞培养箱(Thermo-Fisher)、台式超速冷冻离心机(Thermo-Fisher)、超净工作台(Thermo-Fisher)、恒温培养箱(上海一恒)、PCR 扩增仪(Thermo-Fisher)、紫外凝胶成像仪(GE)、电子天平(METTLER-TOLEDO)、纯化仪(AKTA PURE 150)、超微量分光光度计(Thermo-Fisher)、悬浮细胞培养瓶(Corning)、激光共聚焦显微镜(Leica)和 PVDF 膜(Millipore)。

### 1.2 蛋白生物信息学分析和表达设计

参考 BVDV-1 标准毒株 NADL 株基因序列 (GenBank 登录号: M31182.1), 利用 SignalP 4.1 Server 和 TMHMM Server v.2.0 软件分析 E<sup>ms</sup> 蛋白序列的跨膜区域和信号肽, 利用 NetNGlyc-1.0 软件分析 E<sup>ms</sup> 蛋白序列的糖基化位点。根据分析结果, 设计 E<sup>ms</sup> 蛋白重组真核表达质粒。

### 1.3 基因引物及扩增

参考 BVDV-1 标准毒株 NADL 株基因序列

(GenBank 登录号: M31182.1), 设计扩增目的基因引物(表 1), 提取病毒 RNA, 以其为模板, 利用一步法 RT-PCR 扩增 E<sup>ms</sup> 蛋白的基因片段, 扩增条件为: 50 °C 30 min; 94 °C 2 min; 94 °C 30 s, 60 °C 30 s, 72 °C (1 min/kb), 共 30 个循环; 72 °C 5 min。PCR 扩增产物使用 1% 琼脂糖凝胶电泳进行鉴定, 回收纯化 DNA<sup>[14]</sup>。

### 1.4 重组表达质粒的构建和鉴定

用限制性内切酶 *Xho* I 和 *Hind* III 对 pcDNA3.1 载体进行双酶切, 切胶回收纯化载体片段; 同时用限制性内切酶 *Xho* I 和 *Hind* III 将回收纯化的 E<sup>ms</sup> 基因片段进行双酶切, 然后回收纯化 DNA 片段, 将纯化回收的 E<sup>ms</sup> 片段与纯化的 pcDNA3.1 载体片段, 使用 T4 DNA 连接酶将其连接, 条件为 16 °C 12 h, 将连接产物使用大肠杆菌 DH5 $\alpha$  感受态细胞进行转化, 转化成功后, 挑取单克隆菌培养, 然后提取重组质粒, 提取的重组质粒命名为 pcDNA3.1-BVDV-E<sup>ms</sup>; 用 *Sca* I 和 *Xho* I 对重组质粒进行双酶切鉴定, 鉴定正确后送生工生物工程(上海)股份有限公司再次测序鉴定, 保证目的基因序列的正确插入, 确保阅读框完全正确<sup>[14]</sup>。

### 1.5 蛋白的表达和纯化

根据 ExpiCHO 表达系统试剂盒操作说明书, 将重组质粒 pcDNA3.1-BVDV-E<sup>ms</sup> 转染 ExpiCHO 悬浮细胞, 转染细胞的培养条件为: 180 r/min、32 °C、5% CO<sub>2</sub> 和湿度 90%, 悬浮培养 12 d 后, 使用离心机对培养细胞进行离心, 离

表 1 引物信息

Table 1 Primer information

Gene amplification	The name of the primer	Primer sequence (5'→3')	Segment length (bp)
E <sup>ms</sup>	E <sup>ms</sup> -F	<b>CTTAAGCTT</b> <b>TATGGAGACAGACACACTCCTGCTAT</b> GGGTA <b>CTGCTGCTCTGGTTCCAGTTCCACTGG</b> TGACGGTGGAGAAAACATAACACAG	516
	E <sup>ms</sup> -R	<b>AGACTCGAGTCAATGGTGATGGTGATGTAAT</b> ACATCA <b>CTTGCAGCTA</b>	

The sequence with bold font is the cleavage site sequence.

心条件为: 4 000×g 10 min, 然后细胞培养上清使用 SDS-PAGE 鉴定表达情况。对离心后的细胞上清, 经 0.22 μm 滤膜过滤, 按照 GE 公司亲和层析镍柱的说明书操作方法纯化回收目标蛋白。再次使用 SDS-PAGE 鉴定纯化的目标蛋白, 并通过 BCA 蛋白定量试剂盒测定目标蛋白浓度<sup>[14]</sup>。

### 1.6 Western blotting

将纯化好的目标蛋白使用质量分数为 12% 的分离胶 SDS-PAGE 电泳分离, 然后使用半干式电转膜法将目标蛋白抗原转至硝酸纤维素薄膜上, 使用小鼠抗 His-Tag 标签单克隆抗体和兔抗 BVDV 血清为一抗, 辣根过氧化物酶(horseradish peroxidase, HRP)标记的山羊抗小鼠和山羊抗兔 IgG 为二抗, 对纯化的 BVDV E<sup>ms</sup> 蛋白进行 Western blotting 分析, 孵育后用 ECL 化学发光显色, 最后使用高分辨率凝胶成像系统观察并拍照<sup>[14]</sup>。

### 1.7 间接免疫荧光试验 (indirect immunofluorescence, IFA)

按照试验要求分别设置了试验组和对照组; 在激光共聚焦细胞培养皿中接种 MDBK 细胞进行培养, 当细胞的生长密度达到试验要求时接种病毒, 在感染病毒 48 h 后, 将细胞使用 PBS 洗涤; 然后用 4% 多聚甲醛在室温条件下固定 10 min, PBS 洗涤 3 次, 每次 5 min, 一抗稀释液稀释免疫血清抗体, 稀释度为 1:100, 在 4 °C 条件下孵育 12 h; 孵育后, 再次使用 PBS 洗涤 3 次, 每次 5 min, 第二抗体使用 PBS 稀释 Alexa Fluor<sup>®</sup> 488 标记的山羊抗兔 IgG 抗体, 稀释度为 1:1 000, 37 °C, 孵育 1 h; PBS 洗涤 3 次, 每次 5 min, 最后使用激光共聚焦荧光显微镜观察细胞内荧光并拍照<sup>[14]</sup>。

### 1.8 抗原配制和动物免疫

为评价 E<sup>ms</sup> 蛋白的免疫原性, 选取 8–10 周龄雌性健康新西兰大白兔 6 只, 体重 2.0–2.5 kg,

分 2 组, 每组 3 只, A 组为实验组, 免疫纯化的 E<sup>ms</sup> 蛋白, B 组为对照组, 免疫 PBS。将纯化后的 E<sup>ms</sup> 蛋白与等体积的弗式完全佐剂乳化制备疫苗, 然后进行首次免疫。首次免疫剂量为 300 μg/只, 免疫方式为背部多点注射免疫; 首次免疫后第 14 天, 进行二次免疫, 免疫方式和免疫剂量首次免疫的相一致。分别采集首次免疫后 0、7、14、21、28 d 的全血, 血液经离心处理后分离血清以用于抗体检测。

### 1.9 间接 ELISA

采用间接酶联免疫吸附试验(enzyme linked immunosorbent assay, ELISA)的方法对实验组和对照组免疫血清进行检测, 通过数据分析 E<sup>ms</sup> 蛋白的免疫原性。用 50 mmol/L 碳酸盐缓冲液将纯化的 BVDV-E<sup>ms</sup> 蛋白(50 ng/孔)包被于 ELISA 酶标板中, 4 °C 孵育过夜。然后使用 1% 牛血清白蛋白(bovine serum albumin, BSA) 37 °C, 封闭 2 h。用血清稀释液按 1:2 000 稀释待检血清后加入反应孔中, 100 μL/孔, 每个样品设置 3 个复孔, 37 °C 条件下孵育 1 h; 再用血清稀释液按 1:5 000 稀释 HRP 标记的山羊抗兔 IgG 抗体后加入反应孔中, 100 μL/孔, 37 °C 条件下孵育 1 h。TMB 显色, 每孔 50 μL, 显色 10 min 后, 加入 50 μL 终止液终止反应, 读取 OD<sub>450</sub> 值<sup>[14]</sup>。

### 1.10 病毒中和试验

将血清于 56 °C 的水浴锅中灭活 30 min。取一 96 孔板, 用不含 FBS 的 DMEM 培养基稀释血清, 首先在每孔加入 70 μL 不含 FBS 的 DMEM, 在第一行孔中分别加入 70 μL 灭活的待检血清, 混匀后取 70 μL 依次加入下一孔, 分别进行 2 倍梯度稀释, 直到最后一孔, 混匀后每孔弃掉 70 μL, 每个血清样品做 3 个重复孔, 同时设置仅接种病毒的阳性对照组和仅接种细胞的阴性对照组; 使用病毒稀释液将病毒稀释至 200 TCID<sub>50</sub>,



## 2.2 E<sup>rns</sup> 基因的扩增

RT-PCR 扩增结果经核酸凝胶电泳鉴定显示, 基因扩增片段大小为 500 bp 左右, 与预期的目的条带大小相符(图 2)。

## 2.3 重组表达质粒的鉴定

构建的重组表达质粒 pcDNA3.1-BVDV-E<sup>rns</sup> 用 *Sca* I 和 *Xho* I 进行双酶切鉴定, E<sup>rns</sup> 基因片段大小约为 500 bp, *Sca* I 和 *Hind* III 酶切位点之间的载体片段大小约 1 400 bp, 因此双酶切后产生了大小约 1 900 bp 和 4 000 bp 的 2 条特异性条带, 产物大小与理论值相符, 表明扩增的 E<sup>rns</sup> 片段正确与载体连接, 而基因测序结果也显示目的片段成功插入表达载体中(图 3)。

## 2.4 E<sup>rns</sup> 蛋白的表达、纯化及鉴定

对培养的细胞分别离心收取转染了 pcDNA3.1-BVDV-E<sup>rns</sup> 和 pcDNA3.1 空载体的细胞培养上清液, 并以未转染任何质粒的细胞为空白对照, 进行 SDS-PAGE 鉴定, 转染 pcDNA3.1-BVDV-E<sup>rns</sup> 质粒的细胞培养上清在 30 kDa 左右(图中红色箭头所示)位置处观察到特异性蛋白条带, 蛋白大小与理论值相符(图 4A)。使用亲

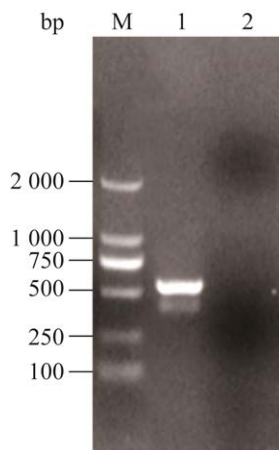


图 2 RT-PCR 扩增基因片段鉴定

Figure 2 Identification of gene fragments amplified by RT-PCR. M: DL2000 DNA marker; Lane 1: PCR product of E<sup>rns</sup> gene; Lane 2: Negative control.

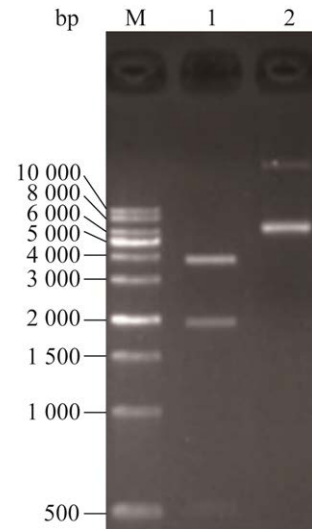


图 3 重组表达质粒的双酶切鉴定

Figure 3 Identification of recombinant expression plasmid by double enzyme digestion. M: DL10000 DNA marker; Lane 1: Enzyme digestion products of E<sup>rns</sup> expression plasmid; Lane 2: Undigested product by enzyme of E<sup>rns</sup> expression plasmid.

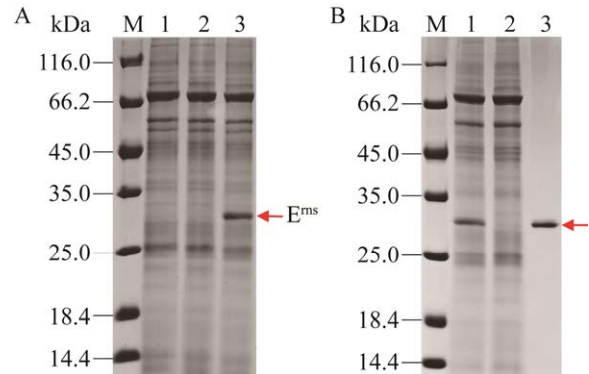


图 4 E<sup>rns</sup> 蛋白表达、纯化的 SDS-PAGE 分析

Figure 4 SDS-PAGE analysis of the expression and purification of E<sup>rns</sup> protein. A: SDS-PAGE analysis of the expression of E<sup>rns</sup> protein. M: Protein molecular weight marker; Lane 1: Blank control; Lane 2: Transfection with plasmid pcDNA3.1; Lane 3: Transfection with plasmid pcDNA3.1-BVDV-E<sup>rns</sup>. B: SDS-PAGE analysis of E<sup>rns</sup> protein after purification. M: Protein molecular weight marker; Lane 1: CHO cell supernatant before binding with affinity chromatography column; Lane 2: CHO cell supernatant after binding with affinity chromatography column; Lane 3: Elution sample.

和层析镍柱对表达的 BVDV-E<sup>rns</sup> 蛋白进行纯化, 表达蛋白上清经过滤后上样, 洗脱样品经 SDS-PAGE 鉴定, 在 30 kDa 左右(红色箭头所示) 位置处观察到特异性蛋白条带, 与细胞上清鉴定结果相符, BCA 蛋白定量试剂盒测定纯化后 E<sup>rns</sup> 蛋白的浓度为 0.886 mg/mL (图 4B)。

## 2.5 Western blotting 鉴定

经镍柱纯化后的 BVDV-E<sup>rns</sup> 目标蛋白能够与 His-Tag 标签抗体(图 5, 泳道 2)和 BVDV 阳性血清发生反应(图 5, 泳道 4), 约在 30 kDa 位置处显示一条特异性条带。

## 2.6 细胞免疫荧光试验(IFA)

结果显示, E<sup>rns</sup> 蛋白免疫血清可以特异性地检测到 BVDV 感染 MDBK 细胞中的病毒蛋白表达, 显微镜下能明显观察到细胞内的绿色荧光, 而对照组未检测到绿色荧光(图 6)。该结果显示本研究制备的 E<sup>rns</sup> 蛋白免疫血清能特异性地与 BVDV 感染细胞内表达的病毒 E<sup>rns</sup> 蛋白发生反应, 说明 E<sup>rns</sup> 蛋白具有良好的抗原性、免疫原性和特异性。

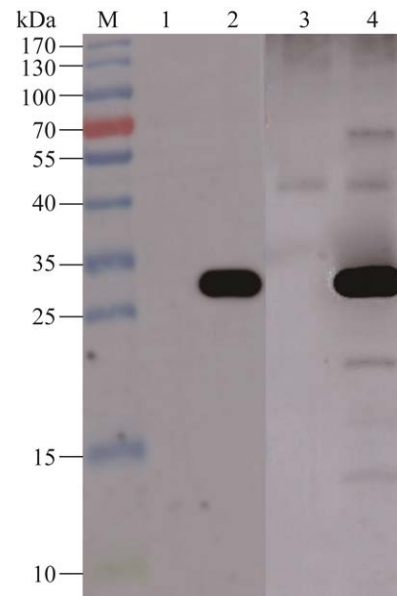


图 5 纯化后 E<sup>rns</sup> 蛋白的免疫印迹分析

Figure 5 Analysis of the E<sup>rns</sup> protein after purification by Western blotting. M: Prestained protein molecular weight marker; Lane 1 and lane 3: Transfection with plasmid pcDNA3.1; Lane 2: Identification of the purified E<sup>rns</sup> with anti-His-Tag monoclonal antibody by Western blotting; Lane 4: Identification of purified E<sup>rns</sup> with anti-BVDV serum by Western blotting.

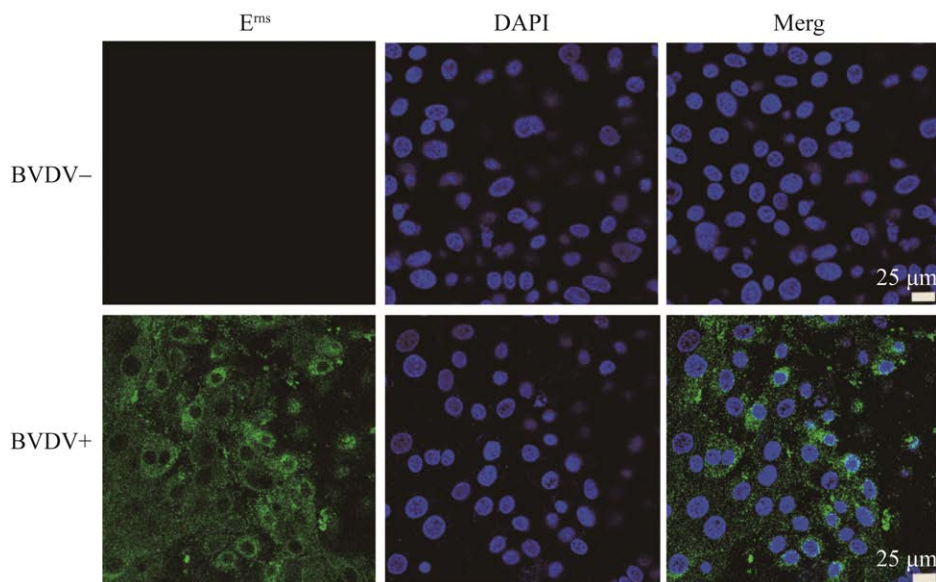


图 6 IFA 鉴定结果

Figure 6 Identification of immunized serum by IFA.



## 2.7 血清抗体水平

间接 ELISA 结果显示, 免疫后 7 d, 即可检测到针对 E<sup>ms</sup> 蛋白的血清抗体阳性, 二免后 7 d 抗体水平显著升高, 抗体水平持续至免疫后 28 d (图 7A)。表明 CHO 细胞表达的 E<sup>ms</sup> 蛋白具有良好的免疫原性。进一步对免疫后 14 d 和 28 d 的血清经过一系列 2 倍梯度稀释检测血清抗体的效价, 结果显示, 免疫后 28 d 的血清效价可达 1:128 000 (图 7B)。

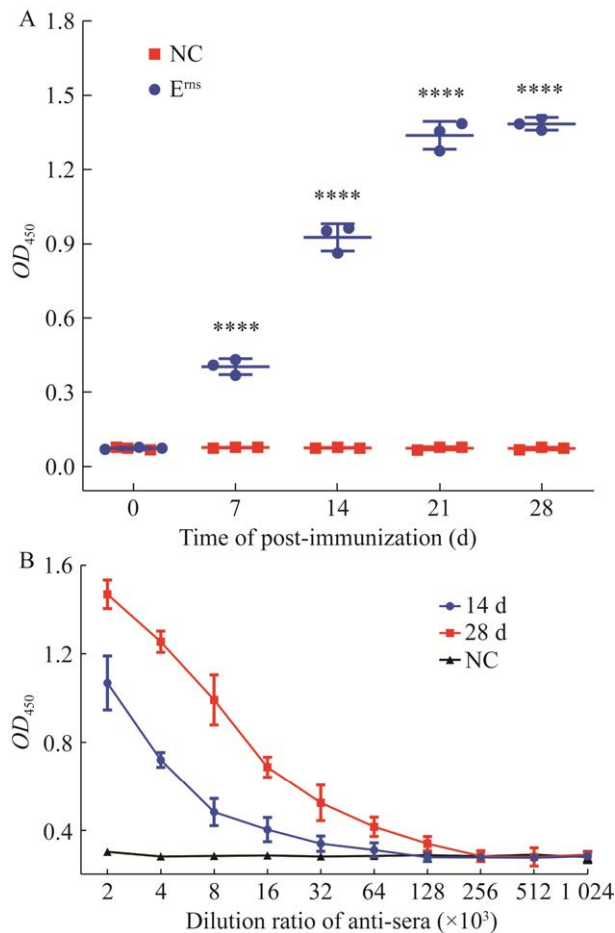


图 7 间接 ELISA 分析血清抗体

Figure 7 Analysis of serum antibodies by iELISA. A: Analysis of serum antibodies by indirect iELISA. B: The detection of immunized serum titer by iELISA. NC: The group of immunized by PBS. E<sup>ms</sup>: The group immunized with the purified E<sup>ms</sup> protein. \*\*\*\*:  $P < 0.0001$ .

## 2.8 中和抗体检测

将免疫后 28 d 的新西兰大白兔血清灭活后, 测定血清的中和效价, 结果表明在动物免疫后产生了针对 BVDV 病毒的中和抗体, 初次免疫后 14 d, 新西兰大白兔血清中和抗体效价为  $\log_{10}=1.48$ ; 在加强免疫后, 血清中和抗体效价显著升高, 加强免疫后的 14 d, 平均血清中和抗体效价为  $\log_{10}=2.71$  (图 8)。

## 3 讨论

BVDV 的发病率高、变异性高、分布范围广、宿主动物多和死亡率低, 防治的主要难点在于病毒在进入机体后, 可以对动物机体造成持续性感染和免疫抑制, 降低动物机体的免疫力, 也诱发其他致病原的继发感染或混合感染, 是目前导致牛生产性能快速下降的主要疫病之一, 每年都给国内外的养牛业造成了巨大的经济损失<sup>[15]</sup>, 另一方面, BVDV 也严重影响牛群的生产情况和健康状态, 能够引起持续性的经济损失, 是全球最重要的牛传染病之一<sup>[16]</sup>。世界动物卫生组织(World Organisation for Animal Health,

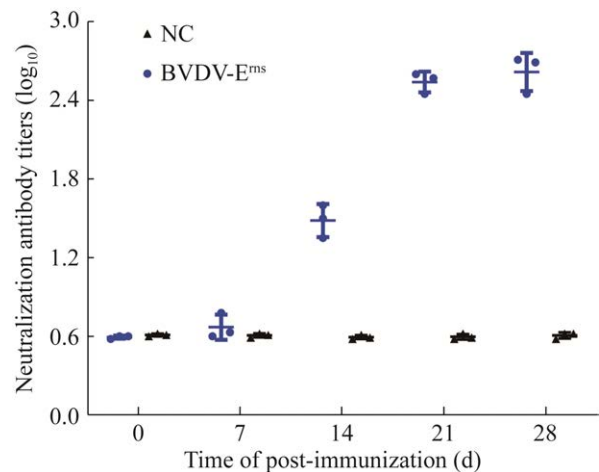


图 8 免疫后新西兰大白兔血清中和效价

Figure 8 Neutralizing antibody titers produced by the immunized New Zealand white rabbits.

WOAH)也将其认定为 B 类的传染病,而我国把它定为三类动物传染病,这都能够显示出国内外人们对该病毒的重视。

近些年,我国养牛业飞快发展导致 BVDV 发生遍及全国各个省区。相关研究表明,我国的 BVDV 血清阳性率很高,关于 BVD 基因工程疫苗的研究在不断的进行,其抗原性较差,还不能达到传统弱毒疫苗的免疫保护效果<sup>[17]</sup>。E<sup>ms</sup> 蛋白是 BVDV 的主要结构蛋白,在诱导抗 BVDV 免疫中起重要作用<sup>[18]</sup>。E<sup>ms</sup> 蛋白大小约为 21 kDa (天然构象),编码 227 个氨基酸,是病毒的囊膜糖蛋白<sup>[19]</sup>。但是 E<sup>ms</sup> 蛋白没有跨膜区,缺少疏水序列,并且其上含有中和表位,主要与病毒囊膜的形成有关<sup>[20]</sup>;E<sup>ms</sup> 是 BVDV 结构蛋白中最保守的,与其结构域有关系<sup>[21]</sup>;E<sup>ms</sup> 蛋白可以产生抗体;免疫原性强,能够被直接分泌到胞外,在诊断病原方面发挥很大的作用<sup>[22]</sup>。E<sup>ms</sup> 具有核糖核酸酶活性,在抵抗宿主的固有免疫反应中发挥作用,E<sup>ms</sup> 是糖胺聚糖结合蛋白,可以使 BVDV 吸附到细胞表面而自己并不参与病毒入侵的过程<sup>[23]</sup>。

据报道,将编码 E<sup>ms</sup> 基因的质粒 DNA 直接注入动物体内,可直接诱导机体产生免疫保护<sup>[24]</sup>。E<sup>ms</sup> 是 BVDV 病毒粒子表面的主要囊膜糖蛋白,可刺激动物机体产生保护性中和抗体,是主要的免疫保护性抗原,也是基因工程疫苗研究的必需抗原<sup>[25]</sup>。E<sup>ms</sup> 有 9 个糖基化位点,E<sup>ms</sup> 蛋白在病毒增殖过程中和病毒粒子的释放有关,不仅具有中和表位,可诱导机体产生保护反应<sup>[26]</sup>,而且具有高度保守结构域,具有较高的保守性,其产生的中和抗体具有中和 BVDV 的能力<sup>[27]</sup>。通过对 E<sup>ms</sup> 蛋白氨基酸序列的分析得知,E<sup>ms</sup> 蛋白具有高度的保守性,因此 E<sup>ms</sup> 蛋白既可以作为研究基因工程亚单位疫苗的候选蛋白,而且 E<sup>ms</sup> 蛋白在 C-末端还存在与猪瘟病毒相似的抗

原表位,所以也可以作为基因工程的诊断抗原。因此,国内外学者将该基因表达用于新型疫苗研制和疾病诊断。

在 BVDV E<sup>ms</sup> 蛋白表达的相关研究中,大多数采用原核表达系统来研究疫苗或者诊断方法的建立<sup>[28]</sup>。而通过真核表达系统表达 E<sup>ms</sup> 蛋白的报道较为少见<sup>[29]</sup>。BVDV E<sup>ms</sup> 蛋白为囊膜糖蛋白,且含有多个糖基化位点,适合 CHO 悬浮细胞的真核表达,但其翻译后修饰较为复杂<sup>[30]</sup>。而原核表达系统表达这种抗原蛋白时存在一定的困难或缺陷,且原核表达产物一般抗原性较差<sup>[31]</sup>,并且原核表达系统表达的产物大多数以包涵体的形式存在,蛋白结构和翻译后修饰与真核表达存在较大差异<sup>[32]</sup>。李岩等<sup>[33]</sup>构建的重组质粒转化大肠杆菌 Rosetta,在异丙基- $\beta$ -D-硫代半乳糖苷(isopropyl- $\beta$ -D-thiogalactoside, IPTG)诱导下表达的蛋白也都以包涵体的形式存在。通过真核表达系统表达的目的蛋白具有天然蛋白的构象和活性,与昆虫细胞杆状病毒表达系统相比,CHO 细胞表达系统表达产量相对比较高,很少分泌自身内源性蛋白,利于外源产物的分离纯化<sup>[13,34]</sup>;与原核表达系统相比,CHO 细胞表达系统可对蛋白进行翻译后加工,可胞外分泌表达,下游纯化工艺简单<sup>[35]</sup>;与酵母表达系统相比,CHO 细胞表达系统产物的免疫原性等生物活性与天然蛋白更相似,能够有效减少非特异性结合<sup>[14,36]</sup>。此外,CHO 细胞中,pcDNA3.1 载体不仅支持瞬时表达,而且转染效率和表达量都很高。随着无血清悬浮培养技术、基因工程技术和大规模培养技术的应用和不断发展,CHO 细胞表达系统产物表达量得到大幅提升,生产成本不断降低,在兽用产品领域的应用也显现出良好前景<sup>[14,37]</sup>。

目前用于防控 BVD 的传统弱毒疫苗免疫动物后无法进行鉴别诊断,且存在毒力返强的

可能性,具有一定的缺陷,因此针对我国的流行毒株研究出一种安全、有效的疫苗对我国的 BVD 防控具有重要的意义。

本研究为了获得免疫原性良好的 BVDV E<sup>ms</sup> 抗原蛋白,使用 CHO 悬浮细胞对目标抗原进行分泌表达,并通过亲和层析法进行纯化,通过一步亲和纯化即可获得较高纯度和浓度高的抗原蛋白,并且该重组蛋白在体内和体外都具有良好的免疫原性和免疫反应性,本研究结果为 CHO 细胞表达系统在兽用生物制品领域的应用提供了新的范例,也为下一步 BVD 的诊断制剂和新型亚单位疫苗的研制提供了材料和数据。

## 4 结论

本研究利用 CHO 细胞表达系统成功表达并制备了 BVDV E<sup>ms</sup> 蛋白,重组 E<sup>ms</sup> 蛋白具有良好的免疫反应性,免疫动物可诱导机体产生高滴度中和抗体,抗体水平最少可持续至免疫后第 28 天。且本研究采用的重组蛋白制备工艺易于扩大,适合工业化制备,这为 BVD 新型诊断方法和亚单位疫苗的研制奠定了基础。

## REFERENCES

- [1] STORINO GY, MECHLER-DREIBI ML, XAVIER EB, FIOROTO AS, OLIVEIRA MEF, PITUCO EM, de OLIVEIRA LG. Artificial insemination of gilts with bovine viral diarrhea virus-contaminated semen[J]. *The Canadian Veterinary Journal*, 2021, 62(1): 59-61.
- [2] NEILL JD. Molecular biology of bovine viral diarrhea virus[J]. *Biologicals*, 2013, 41(1): 2-7.
- [3] BAXI MK, DEREGT D, ROBERTSON J, BABIUK LA, SCHLAPP T, TIKOO SK. Recombinant bovine adenovirus type 3 expressing bovine viral diarrhea virus glycoprotein E2 induces an immune response in cotton rats[J]. *Virology*, 2000, 278(1): 234-243.
- [4] KLEMENS O, DUBRAU D, TAUTZ N. Characterization of the determinants of NS2-3-independent virion morphogenesis of pestiviruses[J]. *Journal of Virology*, 2015, 89(22): 11668-11680.
- [5] de OLIVEIRA PSB, SILVA JVJ Jr, WEIBLEN R, FLORES EF. Subtyping bovine viral diarrhea virus (BVDV): which viral gene to choose?[J]. *Infection, Genetics and Evolution*, 2021, 92: 104891.
- [6] BIANCHI MV, SILVEIRA S, MÓSENA ACS, SOUZA SO, KONRADT G, CANAL CW, DRIEMEIER D, PAVARINI SP. Pathological and virological features of skin lesions caused by BVDV in cattle[J]. *Brazilian Journal of Microbiology*, 2019, 50(1): 271-277.
- [7] JELSMA H, LOEFFEN WL, van BEUNINGEN A, van RIJN PA. Preliminary mapping of non-conserved epitopes on envelope glycoprotein E2 of bovine viral diarrhea virus type 1 and 2[J]. *Veterinary Microbiology*, 2013, 166(1/2): 195-199.
- [8] FULTON RW, COOK BJ, PAYTON ME, BURGE LJ, STEP DL. Immune response to bovine viral diarrhea virus (BVDV) vaccines detecting antibodies to BVDV subtypes 1a, 1b, 2a, and 2c[J]. *Vaccine*, 2020, 38(24): 4032-4037.
- [9] 项勋, 段纲, 李志敏. 牛病毒性腹泻-粘膜病病毒 (BVDV) 的分子生物学研究进展[J]. *家畜生态*, 2004, 25(4): 202-204.
- [10] XIANG X, DUAN G, LI ZM. The advance of molecular biology research of BVDV[J]. *Ecology of Domestic Animal*, 2004, 25(4): 202-204 (in Chinese).
- [10] 严伟行. 牛病毒性腹泻病毒 E0 基因的原核表达与活性检测[J]. *中国畜牧兽医*, 2013, 40(1): 54-56.
- [10] YAN WH. Expression and characterization of E0 protein of bovine viral diarrhea virus[J]. *China Animal Husbandry & Veterinary Medicine*, 2013, 40(1): 54-56 (in Chinese).
- [11] 于吉锋, 刘亚刚, 杨小艳, 于晓东, 冯英阳, 王文伯, 胡炳峰, 刘晓钢, 骆勇, 刘斌. 牛病毒性腹泻病毒牦牛株 E0 基因生物信息学分析及原核表达与抗原性检测[J]. *西南民族大学学报(自然科学版)*, 2009, 35(3): 504-508.
- [11] YU JF, LIU YG, YANG XY, YU XD, FENG YY, WANG WB, HU BF, LIU XG, LUO Y, LIU B. Bioinformatics analysis and prokaryotic expression in E0 gene of bovine viral diarrhea virus and antigenic detection of the expressed protein[J]. *Journal of Southwest University for Nationalities (Natural Science Edition)*, 2009, 35(3): 504-508 (in Chinese).
- [12] 陈颖彬, 李林, 夏颖, 王紫嫣, 刘义磊, 蒋禄峰, 包永占, 秦建华, 赵月兰. 牛病毒性腹泻病毒 E0 基因

- 重组嗜酸乳杆菌 pMG36e-E0-LA-5 对犊牛的免疫保护作用[J]. 中国兽医学报, 2019, 39(6): 1080-1084.
- CHEN YB, LI L, XIA Y, WANG ZY, LIU YL, JIANG LF, BAO YZ, QIN JH, ZHAO YL. Protective efficacy of recombinant *Lactobacillus acidophilus* pMG36e-E0-LA-5 against bovine viral diarrhea virus in calves[J]. Chinese Journal of Veterinary Science, 2019, 39(6): 1080-1084 (in Chinese).
- [13] 高闪电, 张忠辉, 田占成, 王锦明, 独军政, 关贵全, 殷宏. 牛病毒性腹泻病毒 1 型病毒样颗粒的制备及其对豚鼠的免疫原性分析[J]. 生物工程学报, 2022, 38(1): 130-138.
- GAO SD, ZHANG ZH, TIAN ZC, WANG JM, DU JZ, GUAN GQ, YIN H. Preparation of bovine viral diarrhea disease virus 1 virus-like particles and evaluation of its immunogenicity in a Guinea pig model[J]. Chinese Journal of Biotechnology, 2022, 38(1): 130-138 (in Chinese).
- [14] 李亚军, 茹毅, 郝荣增, 蒋成辉, 王伟, 张越, 张贵才, 刘华南, 卢炳州, 杨洋, 陶世宇, 杨锐, 宋向东, 陈娇, 余四九, 郑海学. CHO 细胞表达牛病毒性腹泻病毒 E2 蛋白及免疫原性分析[J]. 畜牧兽医学报, 2022, 53(12): 4315-4324.
- LI YJ, RU Y, HAO RZ, JIANG CH, WANG W, ZHANG Y, ZHANG GC, LIU HN, LU BZ, YANG Y, TAO SY, YANG R, SONG XD, CHEN J, YU SJ, ZHENG HX. Expression of bovine viral diarrhea virus E2 protein in CHO cells and immunogenicity analysis[J]. Acta Veterinaria et Zootechnica Sinica, 2022, 53(12): 4315-4324 (in Chinese).
- [15] WANGLN, WU XM, WANG CB, SONG CX, BAO JP, DU JQ. Origin and transmission of bovine viral diarrhea virus type 1 in China revealed by phylodynamic analysis[J]. Research in Veterinary Science, 2020, 128: 162-169.
- [16] CIONCA N, HASHIM D, MOMBELLI A. Zirconia dental implants: where are we now, and where are we heading?[J]. Periodontology 2000, 2017, 73(1): 241-258.
- [17] GAO XW, NIU C, WANG Z, JIA S, HAN MJ, MA YY, GUAN XT, WANG L, QIAO XY, XU YG. Comprehensive analysis of lncRNA expression profiles in cytopathic biotype BVDV-infected MDBK cells provides an insight into biological contexts of host-BVDV interactions[J]. Virulence, 2021, 12(1): 20-34.
- [18] JOKAR M, RAHMANIAN V, FARHOODI M, ABDOS A, SHAMS F, KARAMI N. Seroprevalence of bovine viral diarrhea virus (BVDV) infection in cattle population in Iran: a systematic review and meta-analysis[J]. Tropical Animal Health and Production, 2021, 53(5): 1-12.
- [19] SHAH PT, NAWAL BAHOUSSI A, AHMAD A, SIKANDAR M, XING L. Bovine viral diarrhea virus in China: a comparative genomic and phylogenetic analysis with complete genome sequences[J]. Frontiers in Veterinary Science, 2022, 9: 992678.
- [20] HAUSE BM, PILLATZKI A, CLEMENT T, BRAGG T, RIDPATH J, CHASE CCL. Persistent infection of American *Bison* (*Bison bison*) with bovine viral diarrhea virus and bosavirus[J]. Veterinary Microbiology, 2021, 252: 108949.
- [21] FALKENBERG SM, DASSANAYAKE RP, NEILL JD, RIDPATH JF. Evaluation of bovine viral diarrhea virus transmission potential to naïve calves by direct and indirect exposure routes[J]. Veterinary Microbiology, 2018, 217: 144-148.
- [22] CHAMORRO MF, WALZ PH, PASSLER T, PALOMARES R, NEWCOMER BW, RIDDELL KP, GARD J, ZHANG YJ, GALIK P. Efficacy of four commercially available multivalent modified-live virus vaccines against clinical disease, viremia, and viral shedding in early-weaned beef calves exposed simultaneously to cattle persistently infected with bovine viral diarrhea virus and cattle acutely infected with bovine herpesvirus 1[J]. American Journal of Veterinary Research, 2016, 77(1): 88-97.
- [23] BELLIDO D, BAZTARRICA J, ROCHA L, PECORA A, ACOSTA M, ESCRIBANO JM, PARREÑO V, WIGDOROVITZ A. A novel MHC-II targeted BVDV subunit vaccine induces a neutralizing immunological response in Guinea pigs and cattle[J]. Transboundary and Emerging Diseases, 2021, 68(6): 3474-3481.
- [24] CHEN HW, HUBER V, SZAKMARY-BRAENDLE K, SEITZ K, MOETZ M, RUEMENAPF T, RIEDEL C. Viral traits and cellular knock-out genotype affect dependence of BVDV on bovine CD46[J]. Pathogens, 2021, 10(12): 1620.
- [25] WANG YX, FENG BH, NIU C, JIA S, SUN C, WANG Z, JIANG YP, CUI W, WANG L, XU YG. Dendritic cell targeting of bovine viral diarrhea virus E2 protein expressed by *Lactobacillus casei* effectively induces antigen-specific immune responses via oral vaccination[J]. Viruses, 2019, 11(6): 575.
- [26] REN X, ZHANG S, GAO XT, GUO XY, XIN T, ZHU HF, JIA H, HOU SH. Experimental immunization of mice with a recombinant bovine enterovirus vaccine

- expressing BVDV E0 protein elicits a long-lasting serologic response[J]. *Virology Journal*, 2020, 17(1): 1-10.
- [27] PASSLER T, DITCHKOFF SS, WALZ PH. Bovine viral diarrhea virus (BVDV) in white-tailed deer (*Odocoileus virginianus*)[J]. *Frontiers in Microbiology*, 2016, 7: 945.
- [28] ZHOU B, LIU K, JIANG Y, WEI JC, CHEN PY. Multiple linear B-cell epitopes of classical swine fever virus glycoprotein E2 expressed in *E. coli* as multiple epitope vaccine induces a protective immune response[J]. *Virology Journal*, 2011, 8(1): 1-7.
- [29] van DUIJN L, VELDHUIS AMB, MARS MH, de ROO B, LAM TJGM. Efficacy of a voluntary BVDV control programme: experiences from the Netherlands[J]. *The Veterinary Journal*, 2019, 245: 55-60.
- [30] ARAGAW K, SIBHAT B, AYELET G, SKJERVE E, GEBREMEDHIN EZ, ASMARE K. Seroprevalence and factors associated with bovine viral diarrhea virus (BVDV) infection in dairy cattle in three milksheds in Ethiopia[J]. *Tropical Animal Health and Production*, 2018, 50(8): 1821-1827.
- [31] MCGOWAN M, MCCOSKER K, FORDYCE G, KIRKLAND P. Epidemiology and management of BVDV in rangeland beef breeding herds in northern Australia[J]. *Viruses*, 2020, 12(10): 1063.
- [32] YUE XM, STEENEVELD W, van der VOORT M, van SCHAIK G, VERNOOIJ JCM, van DUIJN L, VELDHUIS AMB, HOGEVEEN H. The effect of bovine viral diarrhea virus introduction on milk production of Dutch dairy herds[J]. *Journal of Dairy Science*, 2021, 104(2): 2074-2086.
- [33] 李岩, 聂明非, 魏伟, 温凯, 贾莹, 霍慧, 王君伟. 牛病毒性腹泻病毒 NS3 基因的序列分析、表达与抗原性鉴定[J]. *生物工程学报*, 2010, 26(3): 311-316.
- LI Y, NIE MF, WEI W, WEN K, JIA Y, HUO H, WANG JW. Sequence analysis, expression and antigenicity detection of bovine viral diarrhea virus NS3 gene[J]. *Chinese Journal of Biotechnology*, 2010, 26(3): 311-316 (in Chinese).
- [34] 杨露露, 张淼, 张玺, 王小引, 王天云, 贾岩龙. 中国仓鼠卵巢细胞表观遗传调控研究进展[J]. *生物工程学报*, 2023, 39(1): 149-158.
- YANG LL, ZHANG M, ZHANG X, WANG XY, WANG TY, JIA YL. Advances in epigenetic regulation of Chinese hamster ovary cells[J]. *Chinese Journal of Biotechnology*, 2023, 39(1): 149-158 (in Chinese).
- [35] 冯莹莹, 肖梦珂, 路江涛, 王小引, 柴玉荣, 王天云, 贾岩龙. APRT 缺陷型 CHO 细胞系的建立及其重组蛋白表达能力评价[J]. *生物工程学报*, 2022, 38(9): 3453-3465.
- FENG YY, XIAO MK, LU JT, WANG XY, CHAI YR, WANG TY, JIA YL. Development of an APRT-deficient CHO cell line and its ability of expressing recombinant protein[J]. *Chinese Journal of Biotechnology*, 2022, 38(9): 3453-3465 (in Chinese).
- [36] WANG SH, YANG GH, NIE JW, YANG RJ, DU MZ, SU JH, WANG J, WANG JF, ZHU YH. Recombinant Erns-E2 protein vaccine formulated with MF59 and CPG-ODN promotes T cell immunity against bovine viral diarrhea virus infection[J]. *Vaccine*, 2020, 38(22): 3881-3891.
- [37] SANGWAR N, HASSAN W, LOKHANDWALA S, BRAY J, REITH R, MARKLAND M, SANG H, YAO JX, FRITZ B, WAGHELA SD, ABDELSALAM KW, CHASE CCL, MWANGI W. Mosaic bovine viral diarrhea virus antigens elicit cross-protective immunity in calves[J]. *Frontiers in Immunology*, 2020, 11: 589537.

(本文责编 郝丽芳)