

猪瘟病毒囊膜蛋白在杆状病毒表面的展示及展示蛋白的免疫原性试验

许信刚¹, 童德文¹, 刘宏仁²

(1 西北农林科技大学 动物医学院, 陕西 杨凌 712100; 2 屏东科技大学 兽医学系, 台湾 屏东 912)

[摘要] 【目的】研制以杆状病毒表面展示系统为基础的猪瘟基因工程亚单位疫苗。【方法】利用杆状病毒表面展示(Baculovirus display)技术,构建展示猪瘟病毒(CSFV)囊膜蛋白的重组杆状病毒 BacSC-E0E1E2,该重组杆状病毒带有 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。对重组杆状病毒进行 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、血清中和试验。【结果】Western blot 分析结果表明,重组杆状病毒中表达了重组 E0E1E2 蛋白;激光共聚焦显微镜检测结果表明,重组杆状病毒感染昆虫细胞 Sf9 后在昆虫细胞膜上表达了重组 E0E1E2 蛋白;免疫金电子显微镜观察表明,重组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血清 OD_{450} 值达到 1.82;血清中和试验表明,免疫小鼠的血清 50% 中和效价(PD50)达到 512。【结论】成功构建了表面展示猪瘟囊膜蛋白的重组杆状病毒。

[关键词] 杆状病毒表面展示系统;猪瘟病毒;囊膜蛋白;动物免疫试验

[中图分类号] S852.65⁺1

[文献标识码] A

[文章编号] 1671-9387(2009)12-0073-07

Baculovirus surface display of E0E1E2 envelope glycoprotein of CSFV and immunogenicity of the displayed proteins in mouse model

XU Xin-gang¹, TONG De-wen¹, LIU Hung-jen²

(1 College of Veterinary Medicine, Northwest A&F University, Yangling, Shaanxi 712100, China;

2 Department of Veterinary Medicine, National Pingtung University of Science and Technology, Pingtung, Taiwan 912, China)

Abstract: 【Objective】The study developed classical swine fever genetic engineering subunit vaccine based on baculovirus surface display system. 【Method】One recombinant baculoviruses BacSC-E0E1E2 expressing histidine-tagged E0E1E2 with 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 serum neutralization test. 【Result】After infection, E0E1E2 was expressed and anchored on the plasma membrane of Sf9 cells, as revealed by confocal microscopy. Immunogold electron microscopy demonstrated that the BacSC-E0E1E2 displayed E0E1E2 glycoprotein on the viral surface. Animal vaccine tests showed that BacSC-E0E1E2 elicited significantly higher antibody titers ($OD_{450}=1.82$) in the treated mouse models. Virus neutralization test showed that serum from the BacSC-E0E1E2 treated models had significant levels of virus neutralization activities (PD50 = 512). 【Conclusion】The recombinant baculoviruses BacSC-E0E1E2 that surface display CSFV membrane protein were successfully built.

Key words: baculovirus surface display; CSFV; envelope protein; animal immune test

* [收稿日期] 2009-03-27

[基金项目] 陕西省农业攻关项目(2009K02-01);教育部新世纪优秀人才支持计划项目(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。

[通信作者] 童德文(1967-),男,安徽太湖人,教授,博士,博士生导师,主要从事动物病理学研究。E-mail: dwtong@nwsuaf.edu.cn
刘宏仁(1965-),男,台湾屏东人,教授,博士,博士生导师,主要从事分子病毒学研究。E-mail: hjliu@mail.npust.edu.tw

猪瘟(Classical swine fever, CSF)是由猪瘟病毒(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^[1]。CSFV 为黄病毒科(Flaviridae)瘟病毒属(*Pestivirus*)成员,其基因组为单股正链 RNA,长约 12.3 kb,仅含 1 个大的开读框架,编码 11~12 种成熟的病毒蛋白(N^{pro}、C、E^{ms}(E0)、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 E0(gp44)和 E2(gp55)蛋白是猪瘟病毒的主要保护性抗原,能诱发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。目前,猪瘟基因工程疫苗的研制已经有许多报道^[2-5],但均存在一定的局限性,如产量不高、生产成本昂贵、免疫效果不理想等^[6],因此在猪瘟基因工程疫苗的研究中还需要继续探索新型的表达系统。

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。gp64 由 N-末端信号肽和成熟蛋白(跨膜区 TM 和胞质区 CTD)组成^[7]。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,筛选得到表达有特异肽或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基因工程亚单位疫苗的研制^[5,8]。

本研究基于 E0 和 E2 是 CSFV 囊膜上的主要免疫原,以 Baculovirus display 平台构建表达 CSFV 囊膜蛋白的重组杆状病毒 BacSC-E0E1E2,经过激光共聚焦显微镜和免疫金电子显微镜检测,重组蛋白在 Sf9 细胞膜和杆状病毒囊膜上进行了展示,动物免疫试验证实重组蛋白具有免疫原性,中和试验表明重组杆状病毒免疫的动物血清具有 CSFV 中和活性,以期为进一步研究重组杆状病毒作为新的亚单位疫苗奠定基础。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 质粒、菌株、病毒和细胞 猪瘟兔化弱毒株全长 cDNA 克隆质粒 pGEM-CSFV、转座载体 pBacSC(含有 gp64 CTD、gp64 TM、His6、gp64 SP 及绿色荧光蛋白 eGFP)、Sf9 细胞、大肠杆菌 DH10Bac(Gibco-BRL)、大肠杆菌 DH5 α 、CSFV 兔

化弱毒株,均由屏东科技大学兽医学系分子病毒室提供。

1.1.2 主要试剂 猪瘟阳性血清,由台南家畜疾病防治所提供;鼠抗 His6 单克隆抗体、HRP 标记羊抗猪 IgG、HRP 标记兔抗鼠 IgG、胶体金标记的羊抗猪 IgG,均购自 Invitrogen 公司;各种内切酶、T4 DNA 连接酶、*Taq* DNA 多聚酶、dNTP,均购自 Promega 公司;昆虫细胞培养基 TNM-FH,购自 Sigma 公司;Cellfectin 转染试剂,购自 Invitrogen 公司;胎牛血清,购自 GIBCOBRL 公司。

1.1.3 试验动物 6 周龄雌性 Balb/c 小鼠,购自高雄市实验动物研究中心。

1.2 重组转座质粒 pBacSC-E0E1E2 的构建和筛选

转座载体 pBacSC 结构如图 1 所示,该载体有 2 个启动子。在 polh 启动子下游插入 CMV 启动子与 eGFP 2 段基因,通过检测 eGFP 蛋白荧光的产生来准确检测重组病毒的滴度。在 p10 启动子下游插入 gp64 SP-His6-多克隆位点-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)可以展示在重组杆状病毒表面。

以 pGEM-CSFV 为模板,PCR 扩增 CSFV 全长囊膜蛋白基因 E0E1E2。上游引物 P1:5'-TTGAA-CTCGAGGCCGAAAATATAACTCAA-3'(下划线为 *Xho* I 酶切位点);下游引物 P2:5'-CCA-A GAATTCAAAATTCTGCGAAGTAA TC-3'(下划线为 *Eco*R I 酶切位点)。扩增片断为 2 262 bp,扩增的片段不含 E2 基因 C-末端的大约 40 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(TM)基因。PCR 产物双酶切回收后定向插入转座载体 pBacSC 的限制性酶切位点处,得到重组转座载体 pBacSC-E0E1E2(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 E0E1E2 囊膜蛋白基因进行序列测定。

1.3 重组杆状病毒的获得与鉴定

重组质粒的转座、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。以上过程均以非转座质粒 pBacSC 作为阴性对照。重组猪瘟囊膜蛋白杆状病毒命名为 BacSC-E0E1E2,而非转座质粒 pBacSC 得到的重组杆状病毒命名为 BacSC。

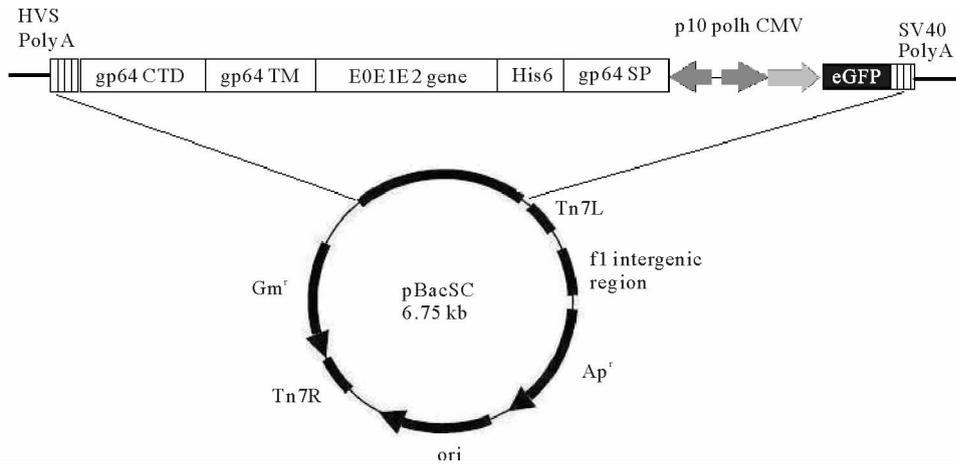


图 1 重组转座质粒 pBacSC-E0E1E2 的构建

Fig. 1 Construction of recombinant donor plasmid pBacSC-E0E1E2

1.4 表达产物的 Western blot 分析

将重组病毒感染新鲜的 Sf9 细胞,经过洗涤、裂解后进行常规 SDS-PAGE 电泳和 Western blot 分析,第一抗体分别是鼠抗 His6 单克隆抗体(1:1 000 倍稀释)和猪瘟疫血清(1:1 000 倍稀释);第二抗体是 HRP 标记兔抗鼠 IgG(1:4 000 倍稀释)和 HRP 标记羊抗猪 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。

1.5 重组蛋白在 Sf9 细胞膜上表现的激光共聚焦显微镜分析

按照参考文献[9]的方法进行,第一抗体为鼠抗 His6 单克隆抗体(1:100)和猪瘟疫血清(1:100),第二抗体为 FITC 标记的兔抗鼠 IgG(1:100)和 FITC 标记的羊抗猪 IgG(1:100)。

1.6 重组蛋白在杆状病毒囊膜上展示的免疫电镜(IEM)分析

重组杆状病毒的纯化用蔗糖密度梯度超速离心法,具体参考文献[9]的方法进行。对纯化后的病毒进行 SDS-PAGE 和 Western blot 检测分析。纯化病毒的免疫电镜分析按照参考文献[9]的方法进行,第一抗体为猪瘟疫血清(1:100),第二抗体为胶体金标记的羊抗猪 IgG(1:100)。

1.7 重组杆状病毒免疫效果的检测

取 6 周龄的雌性 Balb/c 小鼠 20 只,随机分为 4 组,第 1 组注射 BacSC-E0E1E2 重组杆状病毒,第 2 组注射猪瘟疫弱毒疫苗(含有猪瘟疫病毒数量为 1×10^4 pfu/mL),第 3 组注射 BacSC 重组杆状病毒作为阴性对照,第 4 组注射 PBS。共免疫 2 次,首次免疫,用 0.5 mL PBS 液(含有 1.5×10^8 pfu 纯化的重组杆状病毒)加等体积弗氏完全佐剂;第 2 次免疫,0.5

mL PBS 液(含有 1.5×10^8 pfu 纯化的重组杆状病毒)加等体积弗氏不完全佐剂,间隔 2 周。2 免后 2 周,毛细管眼球采血分离血清,用 IDEXX 公司猪瘟疫病毒抗体检测 ELISA 试剂盒进行抗体检测。

1.8 血清中和试验

参考文献[10],采用固定病毒-稀释血清法(β 法)中和试验方法进行。

2 结果与分析

2.1 重组转座质粒 pBacSC-E0E1E2 的构建和筛选

pBacSC-E0E1E2 经双酶切后得到大约 6.8 和 2.2 kb 2 个片段,分别与载体和 E0E1E2 囊膜蛋白基因长度一致(图 2)。测序结果表明,载体 pBacSC 和 E0E1E2 基因接头连接处正确,大小和读码框架正确完整。

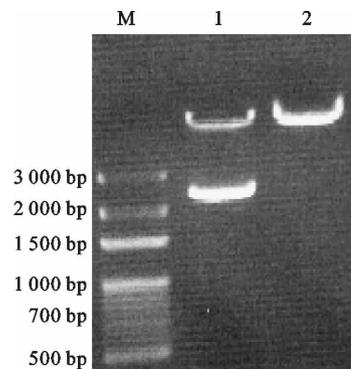


图 2 重组转座质粒 pBacSC-E0E1E2 的酶切鉴定

M. DNA 分子量标准(Bio-100);1. pBacSC-E0E1E2 的 *Xho*I 和 *Eco*R I 双酶切产物;2. pBacSC 的 *Xho*I 和 *Eco*R I 双酶切产物

Fig. 2 Identification of pBacSC-E0E1E2

M. DNA Marker(Bio-100);1. Restriction analysis of pBacSC-E0E1E2;2. Restriction analysis of pBacSC

2.2 穿梭质粒 BacmidSC-E0E1E2 的构建、筛选和鉴定

重组转座质粒 pBacSC-E0E1E2 转化大肠杆菌 DH10Bac, 48 h 后可见“三抗”平板上有大量蓝、白斑单菌落生长, 挑取白色菌落, 再次接种于含“三抗”的平板上, 如此连续培养 3 次, 仍为白色菌落, 表明获得了整合外源基因的质粒 DNA。将其接种于含“三抗”的 LB 培养液中, 按照 Invitrogen 公司 Bacto-Bac 表达系统操作手册提取大分子量重组质粒

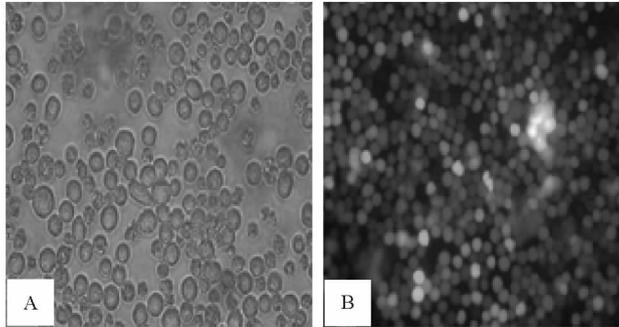


图 3 重组杆状病毒 BacSC-E0E1E2 转染 Sf9 细胞 3 d 后细胞的生长及绿色荧光蛋白的表达

A. 转染 3 d 后的 Sf9 细胞; B. 出现荧光的转染细胞

Fig. 3 Cells grow form after infection of recombinant baculoviruses BacSC-E0E1E2 and eGFP protein was expressed after transfection 3 days

A. Sf9 cells after transfection 3 days; B. eGFP protein was expressed and fluorescence appears in Sf9 cells

2.4 重组杆状病毒 BacSC-E0E1E2 的 PCR 鉴定及病毒滴度测定

用重组杆状病毒感染 Sf9 细胞, 取培养上清, 提取病毒 DNA 进行 PCR 鉴定。PCR 鉴定结果表明, 从重组杆状病毒中扩增出预计大小的外源基因片段, 而阴性对照重组病毒 BacSC 不能扩增出外源基

DNA。

2.3 BacmidSC-E0E1E2 DNA 的转染及杆状病毒的产生

转染 3 d 后, Sf9 细胞出现明显的 CPE 变化, 细胞直径明显增大, 部分细胞裂解、死亡(图 3A)。由于 BacmidSC-E0E1E2 上带有 eGFP 基因, 转染细胞出现荧光, 且荧光越来越强(图 3B)。这说明重组 BacmidSC-E0E1E2 通过脂质体介导, 在昆虫细胞内产生了具有感染活性的重组杆状病毒。

因片段(图 4)。表明重组杆状病毒构建成功。按照荧光的有无, 用终点稀释法测定病毒滴度为 1.47×10^8 pfu/mL。

2.5 囊膜蛋白 E0E1E2 在昆虫细胞中的表达

重组杆状病毒感染新鲜的 Sf9 细胞, Western blot 分析结果见图 5。

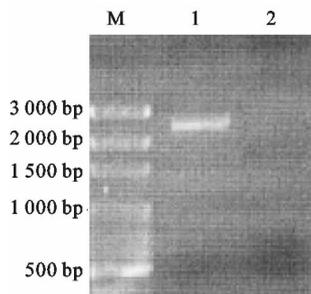


图 4 重组杆状病毒 BacSC-E0E1E2 的 PCR 鉴定结果

M. DNA 分子量标准(Bio-100);

1. 重组杆状病毒 BacSC-E0E1E2; 2. 重组杆状病毒 BacSC

Fig. 4 Identification of recombinants baculovirus

BacSC-E0E1E2

M. DNA Marker (Bio-100);

1. Recombinants baculovirus BacSC-E0E1E2;

2. Recombinants baculovirus BacSC

用鼠抗 His6 单克隆抗体和猪抗 CSFV 阳性血清均检测到相对分子质量约 130 ku 的 E0E1E2 特

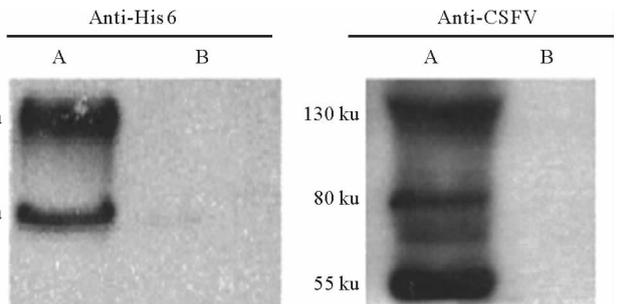


图 5 在 Sf9 细胞中表达重组 E0E1E2 蛋白的

Western blot 分析

A. 重组杆状病毒 BacSC-E0E1E2; B. 重组杆状病毒 BacSC

Fig. 5 Western blot analysis of E0E1E2 proteins

expressed in insect cells

A. Recombinant virus BacSC-E0E1E2;

B. Negative recombinant virus BacSC

异蛋白条带, 与理论上设计结果完全相符, 证实融合有 His6 的 E0E1E2 重组蛋白在昆虫细胞中表达成

功。

2.6 重组杆状病毒在细胞膜上表现的激光共聚焦显微镜分析

为了证明带有组氨酸 His6 的融合蛋白

E0E1E2 表现在昆虫细胞的细胞膜上,进行激光共聚焦显微镜分析,结果见图 6。从图 6 可以看出,融合 His6 的 E0E1E2 蛋白展示在昆虫细胞的表面。

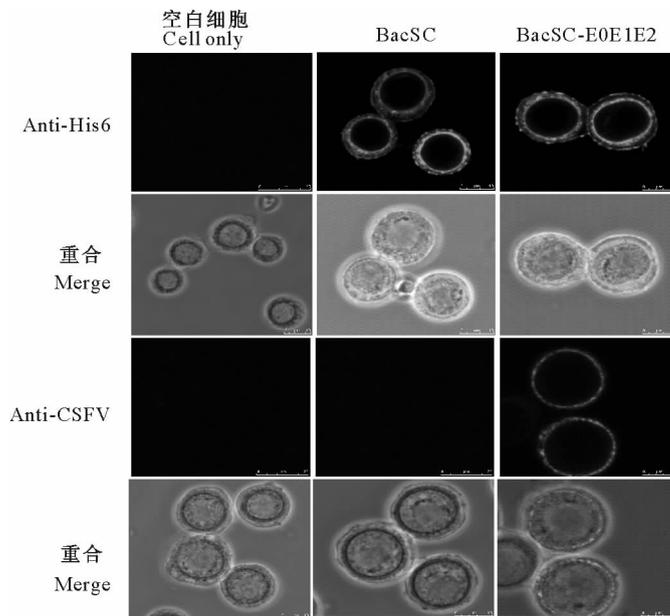


图 6 重组 E0E1E2 蛋白在 Sf9 细胞膜上表现的激光共聚焦显微镜分析

Fig. 6 Confocal microscopy analysis of E0E1E2 proteins anchoring on the plasma membrane of Sf9 cells

2.7 重组杆状病毒的 Western blot 检测

对重组杆状病毒纯化后进行 Western blot 检测,结果见图 7。由图 7 可以看出,用抗 His6 单克

隆抗体和抗 CSFV 阳性血清均检测到 E0E1E2 蛋白大小约为 130 ku,证实融合有 His6 的 E0E1E2 重组蛋白在杆状病毒中表达成功。

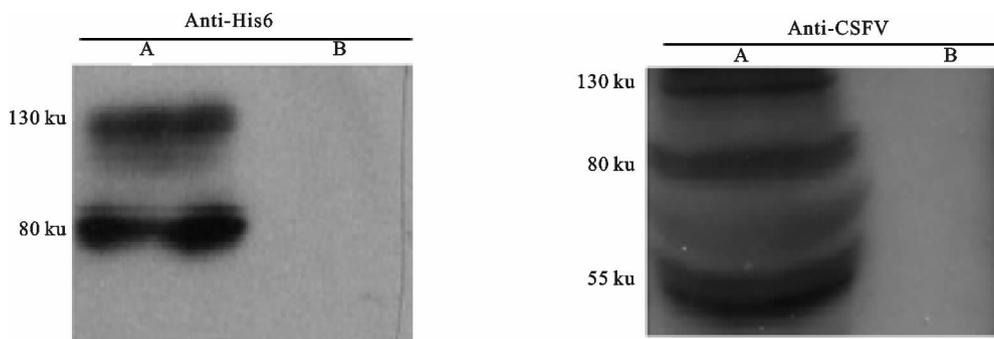


图 7 纯化重组杆状病毒的 Western blot 分析

A. 重组杆状病毒 BacSC-E0E1E2; B. 重组杆状病毒 BacSC

Fig. 7 Western blot analyses of purified baculoviruses

A. Recombinant virus BacSC-E0E1E2; B. Negative recombinant virus BacSC

2.8 重组蛋白在杆状病毒囊膜上展示的免疫电镜分析

免疫电镜分析结果显示,金粒子结合到重组杆状病毒的囊膜上,而阴性重组杆状病毒对照组没有金粒子结合到病毒的囊膜上(图 8),说明在重组杆状病毒囊膜上表达了 E0E1E2 蛋白。

2.9 重组杆状病毒免疫小鼠血清抗体的 ELISA 检测

由图 9 可知,重组杆状病毒 BacSC-E0E1E2、阴性重组杆状病毒 BacSC、猪瘟疫苗和空白对照 PBS 免疫小鼠血清 OD_{450} 值分别为 1.82, 0.312, 0.81 和 0.33。经统计分析, BacSC-E0E1E2 免疫小鼠血清 OD_{450} 值与猪瘟疫苗免疫组和 BacSC 免疫组差异显

著($P < 0.05$)。猪瘟疫苗免疫小鼠血清 OD_{450} 值与 BacSC 免疫组和 PBS 空白对照组差异显著($P <$

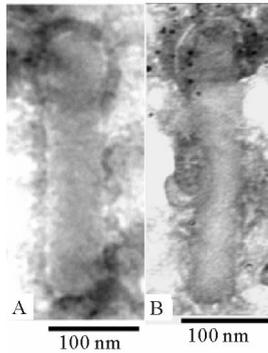


图 8 E0E1E2 蛋白在重组杆状病毒囊膜上展示的免疫电镜分析

- A. 重组杆状病毒 BacSC;
B. 重组杆状病毒 BacSC-E0E1E2

Fig. 8 Immunogold electron microscopy analyze E0E1E2 proteins displayed into the baculoviral envelope

- A. Purified baculoviruses BacSC;
B. Purified baculoviruses BacSC-E0E1E2

2.10 免疫小鼠血清中和试验

经间接免疫荧光测定,重组杆状病毒 BacSC-E0E1E2、猪瘟疫苗、阴性重组杆状病毒 BacSC 和空白对照 PBS 免疫小鼠血清 50% 中和效价(PD50)也分别为 512, 256, 0 和 0。结果表明,重组杆状病毒 BacSC-E0E1E2 免疫小鼠的血清有着显著的中和活性。

3 讨论

3.1 杆状病毒及其表面展示系统

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 gp64 的 TM 和 gp64 的 CTD 进行杆状病毒表面展示技术,已经被开发用于进行基因工程亚单位疫苗的研制^[11-14]。Xu 等^[15-16]以杆状病毒表面展示平台构建了 CSFV 的重组杆状病毒 Bac-E0 和 Bac-E2,可有效展示重组的 VSFV E0、E2 蛋白。本研究构建的 BacSC-E0E1E2 (带有 His6 标签,且胞质区域 CTD 为 gp64 的 CTD,跨膜区域 TM 为 gp64 的跨膜区),经激光共聚焦显微镜观察,重组病毒在感染 Sf9 细胞后,E0E1E2 蛋白可有效地展示在 Sf9 细胞膜上;而由免疫胶体金电子显微镜观察,E0E1E2 重组蛋白也都可以表现在病毒囊膜上;动物免疫试验表明,重组蛋白能引发较强的免疫反应;中和试验表明,重

0.05)。

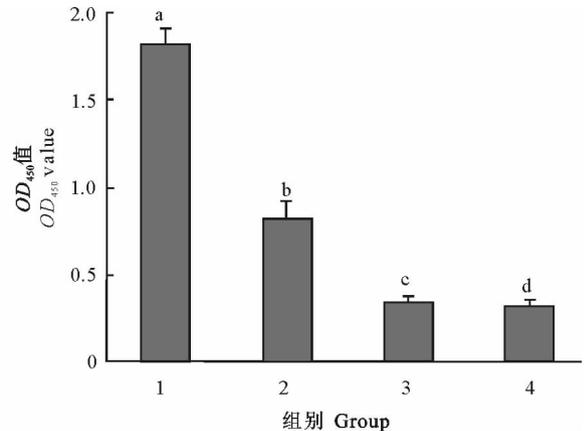


图 9 重组杆状病毒免疫小鼠血清抗体的 ELISA 效价(OD_{450} 值)

- a. 重组杆状病毒 BacSC-E0E1E2; b. 猪瘟疫苗;
c. 阴性重组杆状病毒 BacSC; d. 空白对照 PBS

Fig. 9 OD_{450} value in Balb/c mice immunized with various immunogens

- a. BacSC-E0E1E2; b. CSFV vaccine;
c. Negative BacSC; d. PBS

组杆状病毒免疫小鼠血清具有较高的 CSFV 中和活性,为下一步重组杆状病毒作为亚单位疫苗奠定了基础。

3.2 融合蛋白在昆虫细胞表面和杆状病毒囊膜上的展示

用重组杆状病毒 BacE0E1E2 感染 Sf9 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报告基因 His 蛋白和目的蛋白 E0E1E2 的表达。但是值得注意的是,用 His6 抗体进行 Western blot 分析时,检测到 2 条蛋白条带(130 和 80 ku),其中 130 ku 的蛋白条带就是 His-E0E1E2 融合蛋白的大小,而 80 ku 的蛋白可能是 His-E0E1 融合蛋白。E2 蛋白与 His-E0E1 蛋白从中间断裂,由于 E2 蛋白不带有 His 标签,所以用 His 抗体捕捉不到该蛋白。当 Western blot 分析,第一抗体用猪瘟疫苗血清时,检测到 3 条蛋白条带(130, 80 和 55 ku),其中 130 ku 的蛋白条带就是 His-E0E1E2 融合蛋白的大小,而 80 ku 的蛋白是 His-E0E1 融合蛋白,55 ku 大小符合 E2 蛋白,它能与猪瘟疫苗血清结合而显示出来。这可能是由于大片段 E0E1E2 蛋白融合表达时,各个蛋白之间结构的差异相互影响,导致 His-E0E1 和 E2 蛋白之间结合不紧密,在进行 SDS-PAGE 电泳时,部分 E2 蛋白与 His-E0E1 蛋白从中间断裂,所以出现了不同的条带。笔者单

独表达 E0、E2 蛋白时都只得到 45 和 55 ku 的特异性蛋白条带^[15-16]。重组纯化病毒 BacSC-E0E1E2 Western blot 分析时也得到相似的结果。

用重组病毒 BacSC-E0E1E2 感染 Sf9 细胞后进行共轭聚焦免疫荧光染色分析,在感染细胞的细胞膜上能够清楚地看到 1 圈绿色的特异性荧光;免疫胶体金检测更直接地观察到金粒子存在于重组杆状病毒的囊膜上。这说明 His-E0E1E2 融合蛋白最终是定位在被感染 Sf9 细胞的膜上,随后病毒粒子出芽过程中整合到病毒粒子囊膜上。由上可知,笔者发展了一类新的基于杆状病毒 gp64 蛋白的真核表面展示系统,为猪瘟基因工程亚单位疫苗的应用奠定了基础。

3.3 重组杆状病毒作为基因工程亚单位疫苗的潜在性

杆状病毒假病毒作为疫苗有以下优点:(1)与其他灭活疫苗和以病毒为载体的疫苗不同,杆状病毒假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)能在生物反应器内感染昆虫细胞而大量地表现目的蛋白,加速生产过程;(3)相对于灭活病毒,假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)与亚单位疫苗比较,表达的蛋白在病毒表面,理论上能很好地刺激细胞免疫;(5)使用纯化的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。本试验结果显示,用重组杆状病毒假病毒 BacSC-E0E1E2 免疫小鼠后,能诱导小鼠产生明显的体液免疫反应,产生的抗体具有较高的中和活性。杆状病毒表面展示系统作为一个展示外源蛋白的平台,可以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。

[参考文献]

[1] 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.

[2] Terpstra C. Hog cholera: an update of present knowledge [J]. *Br Vet J*, 1991, 147(5): 397-406.

[3] Van Regenmortel M H V, Fauquet C M, Bishop D H L, et al. Virus taxonomy: the classification and nomenclature of viruses [C]. Report of international committee on taxonomy of viruses. San Diego: Academic Press, 2000.

[4] Rumenapf T, Unger G, Strauss J H, et al. Processing of the en-

velope glycoproteins of pestiviruses [J]. *J Virol*, 1993, 67(6): 3288-3294.

[5] König M, Lengsfeld 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.

[6] Weiland E, Ahl R, Stark R, et al. A second envelope glycoprotein mediates neutralization of a Pestivirus, hog cholera virus [J]. *J Virol*, 1992, 66(6): 3677-3682.

[7] 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.

[8] Van Zijl M, Wensvoort G, de Kluyver E, et al. Live attenuated pseudorabies virus expressing envelope glycoprotein E1 of hog cholera virus protects swine against both pseudorabies and hog cholera [J]. *J Virol*, 1991, 65(5): 2761-2765.

[9] 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.

[10] 刘振轩, 钟明华, 潘铭正. 动植物疫病害虫鉴定作业流程: 病毒篇 [M]. 台湾: 艺轩出版社, 2007.

Liu Z X, Zhong M H, Pan M Z. Animal and plant epidemics pests identification work flow; viruses [M]. Taiwan: Xuan Yi Publishing House, 2007. (in Chinese)

[11] Boublik Y, Di Bonito P, Jones I M. Eukaryotic virus display: engineering the major surface glycoprotein of the autographa californica nuclear polyhedrosis virus (AcNPV) for the presentation of foreign proteins on the virus surface [J]. *Biotechnology*, 1995, 13: 1079-1084.

[12] Mottershead D, van der Linden I, von Bonsdorff C H, et al. Baculoviral display of the green fluorescent protein and rubella virus envelope proteins [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 1997, 238(3): 717-722.

[13] Mottershead D G, Alfthan K, Ojala K, et al. Baculoviral display of functional scFv and synthetic IgG-binding domains [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2000, 275(1): 84-90.

[14] Rahman M M, Shalia M S, Gopinathan K P. Baculovirus display of fusion protein of peste des petits ruminants virus and hemagglutination protein of rinderpest virus and immunogenicity of the displayed proteins in mouse model [J]. *Virology*, 2003, 317(1): 36-49.

[15] Xu X G, Chiou M T, Zhang Y M, et al. Baculovirus surface display of E(rns) envelope glycoprotein of classical swine fever virus [J]. *Journal of Virological Methods*, 2008, 15(2): 149-155.

[16] Xu X G, Liu H J. Baculovirus surface display of E2 envelope glycoprotein of classical swine fever virus and immunogenicity of the displayed proteins in a mouse model [J]. *Vaccine*, 2008, 43(26): 5455-5460.