

通用分子佐剂与 IBDV 亚单位联合的疫苗免疫效果

王永娟¹,崔平福²,朱善元¹,左伟勇^{1*}

(1. 江苏农牧科技职业学院/江苏省兽用生物制药高技术研究重点实验室,江苏 泰州 225300;
2. 泰州出入境检验检疫局,江苏 泰州 225300)

摘要:为评价通用载体 pET-mLTA-CTLA-4 表达的蛋白质与传染性法氏囊病毒 (IBDV) 亚单位联合疫苗的免疫效果,表达重组蛋白 mLTA-CTLA-4,以家兔毒性试验确定其安全性;同时 RT-PCR 法扩增鸡 IBDV 的 VP2 基因,构建表达载体 pET-VP2;选择 10 日龄非免疫健康鸡进行分组试验,包括 IBDV 活疫苗免疫组、不同剂量 VP2+mLTA-CTLA-4 免疫组及空白对照组,免疫后定期检测鸡血清抗体 IgG 及小肠黏膜抗体 IgA 的 ELISA 效价;在加强免疫后用 IBDV 野生毒株攻击,连续观察 2 周并计算保护率。结果显示,重组蛋白 mLTA-CTLA-4 安全无毒性,IBDV 活疫苗免疫组产生的抗体 IgG、IgA 水平均高于重组蛋白免疫组,重组蛋白免疫组与活疫苗免疫组对鸡的保护率均为 100%。表明重组蛋白 mLTA-CTLA-4 可与 IBDV 亚单位疫苗联合应用,保护鸡只免受 IBDV 感染。

关键词:佐剂;传染性法氏囊病毒;疫苗;亚单位疫苗

中图分类号: S855.3 **文献标志码:** A **文章编号:** 1004-3268(2015)11-0129-05

Immune Effect of Combination of Universal Molecular Adjuvant with IBDV Subunits

WANG Yongjuan¹, CUI Pingfu², ZHU Shanyuan¹, ZUO Weiyong^{1*}

(1. Jiangsu Agri-animal Husbandry Vocational College/Jiangsu Provincial
Key Laboratory of Veterinary Bio-pharmaceutical High-tech Research, Taizhou 225300, China;
2. Taizhou Entry-exit Inspection and Quarantine Bureau, Taizhou 225300, China)

Abstract: In order to evaluate the effect of chicken universal adjuvant for DNA vaccines, the fusion protein mLTA-CTLA-4 was expressed and purified based on the vector pET-mLTA-CTLA-4. Protein toxicity tests were carried out on rabbits. VP2 gene of infectious bursal virus was amplified by RT-PCR, and lately used for pET-VP2 construction. Ten-day-old free healthy chickens were chosed for animal grouping test, including different doses of mLTA-CTLA-4 plus VP2 group, IBD live vaccine group and control group. Serum and mucosal samples were collected regularly and the neutralization titers of IgG and IgA were assayed, while animal protection test was taken to determine the protection rate. The results showed that protein mLTA-CTLA-4 was non-toxic and its protection rate was 100%. IgG or IgA levels in IBDV vaccine groups were slightly higher than that in recombinant protein groups. These results indicated that recombinant proteins mLTA-CTLA-4 could be applied with IBDV subunit vaccine protecting chickens from infection.

Key words: ajuvant; infectious bursal disease; DNA vaccine; subunit vaccine

收稿日期:2015-04-22
基金项目:江苏省博士后科研计划项目(1401077B);江苏省兽用生物制药高技术研究重点实验室开放课题(JSKLKF1403);江苏农牧科技学院“凤凰人才工程”项目;江苏农牧科技职业学院重点支持项目(NSFZD1405);扬州朝天歌农牧科技有限公司横向合作课题(00010114012,NSFPT201510);江苏华能汇医疗器械细胞毒性试验专项(NSFPT201512)
作者简介:王永娟(1980-),女,江苏海门人,博士,副教授,主要从事生物工程技术研究。E-mail:43088591@qq.com
* 通讯作者:左伟勇(1978-),男,山东泰安人,博士,教授,主要从事生物工程技术研究。E-mail:979490023@qq.com

LT 是产毒性大肠埃希菌产生的一种不耐热肠毒素,具有很强的黏膜免疫佐剂活性^[1],经过基因定点突变后的 LT 不仅没有毒性而且仍然保持了良好的黏膜免疫佐剂活性^[2-3]。细胞毒性 T 淋巴细胞相关抗原 4 (cytotoxic T lymphocyte-associated antigen-4,CTLA - 4)属于免疫球蛋白超家族成员,是活化 T 细胞表面的一种跨膜糖蛋白分子,而 CTLA - 4 胞外区能与抗原提呈细胞上的 B7 配体结合^[4]。因此,用 CTLA - 4 胞外区融合抗原免疫动物,作为抗原提呈细胞的靶向导入分子和新型免疫佐剂,不仅能诱导有效的体液免疫应答,还能诱导细胞免疫应答^[5-6]。将 LT 与 CTLA - 4 联合已在禽流感等一些易变病原的“通用疫苗”研究中取得很大进展^[7-8]。

传染性法氏囊病(infectious bursal disease,IBD)是由传染性法氏囊病毒(IBDV)引起的能导致鸡不同程度的病理变化、死亡和免疫抑制的高度接触性传染病^[9-14]。VP2 蛋白是其主要结构蛋白,主要暴露核衣壳的外面,能诱导宿主产生针对 IBDV 的中和性抗体^[15],保护易感鸡免受 IBDV 感染^[16]。目前,免疫接种是预防 IBD 的主要措施,但普遍使用的中等毒力活疫苗存在诱发法氏囊细胞凋亡和免疫抑制等缺点,加之变异毒株的出现使其预防效果有逐渐下降的趋势,迫切需要开展 IBD 防治新策略的研究。本研究将 LT 去毒突变体(mLT)与鸡 CTLA - 4 胞外区融合表达的重组蛋白作为通用分子佐剂,探索了其诱导的黏膜免疫抗体及体液免疫抗体的水平变化,研究了其与 IBDV 亚单位疫苗联合使用的免疫效果,为 IBD 防治奠定基础。

1 材料和方法

1.1 供试动物

1 日龄雌雄随机的非免疫健康雏鸡购自江苏省家禽科学研究所,2 月龄健康家兔购自扬州大学比较医学中心。

1.2 菌株与试剂

IBDV 中等毒力活疫苗(NF8 株)购自扬州威克生物工程有限公司;IBDV 野生毒株(LYG)、重组菌 pET - mLTA - CTLA - 4(BL21)、鸡抗 VP2 血清由本实验室保存;纯化的肠毒素 LT 蛋白、抗 LT 血清由扬州大学孙怀昌教授惠赠。

异丙基硫代 - β - D - 半乳糖苷(IPTG)、氨苄青霉素、卡那霉素、甘油购自美国 Sigma 公司;尿素购自生工生物工程(上海)股份有限公司;双甲酰丙

烯酰胺购自美国 Promega 公司;过硫酸铵购自美国 AMRESCO 公司;Plasmid Mini Kit、SDS - PAGE Gel Kit 购自康为世纪生物科技有限公司;兔抗鸡 IgG 和 IgA 酶标抗体为英国 Abcam 公司产品;其他试剂为国产分析纯。

1.3 mLTA - CTLA - 4 重组蛋白安全性评价

将重组菌 pET - mLTA - CTLA - 4 按文献[17]的方法诱导培养后大量制备重组蛋白。选取 3 月龄家兔,参考文献[18]的方法在家兔禁食 24 h 后无菌选择回肠祥,沿回盲部向上行走 4 ~ 6 cm 开始结扎,共结扎 7 段,每段 5 cm,每 2 段之间间隔 5 cm,每段肠管均注入 0.5 mL 样品,并标记顺序,样品注射量见表 1。继续禁食 24 h 后处死观察回肠祥外观,抽取每段肠管内的液体,进行计量比较。

表 1 注入样品种类及数量

编号	样品种类	蛋白质/ μ g	总量/mL
1	生理盐水	0	0.5
2	LT	0.1	0.5
3	LT	1.0	0.5
4	LT	5.0	0.5
5	mLTA - CTLA - 4	5.0	0.5
6	mLTA - CTLA - 4	10.0	0.5
7	mLTA - CTLA - 4	50.0	0.5

1.4 VP2 基因扩增与克隆

据 IBDV Lukert 株(AY918948)的 VP2 序列设计正反向引物:5' - CGAAGCTTATGACAAACCTGACAGATCAAAC - 3', 5' - GCGTCGACCTCCTTATG-GCCCGGATTATG - 3',其两端分别为 *Kpn* I 和 *Not* I 酶切位点。参照陈溥言等^[19]的方法提取 IBDV 基因组 RNA,通过 RT - PCR 方法获得 VP2 基因。将 VP2 PCR 产物进行普通琼脂糖凝胶电泳,按照 Wizard DNA Clean-up System 回收试剂盒说明书回收 VP2 基因片段。将 VP2 基因片段与 pET32a 载体按常规方法连接、转化并筛选,经 *Kpn* I 和 *Xho* I 双酶切鉴定以获得重组载体 pET - VP2。

1.5 VP2 原核表达与鉴定

在 28 $^{\circ}$ C、30 $^{\circ}$ C 或 37 $^{\circ}$ C 时,以 0.1 mmol/L、1 mmol/L 或 1 mmol/L IPTG 诱导培养含 pET - VP2 载体菌液并收获细菌,超声裂解后将上清和沉淀分别于 12% SDS - PAGE 胶中分析鉴定,同时设 pET32a 空载体为阴性对照,确定最佳诱导剂浓度与诱导温度。将电泳产物初步纯化后进行 Western blot 分析,一抗为鸡抗 VP2 血清,二抗为酶标兔抗鸡

IgG,DAB 显色分析结果。

1.6 动物免疫试验

将 250 只 1 日龄非免疫健康雏鸡饲养于清洁环境中 10 d,随机分成 5 组(50 只/组),IBD 中等毒力活疫苗(第 1 组),VP2 + mLTA - CTLA - 4 免疫组(第 2—4 组),生理盐水免疫组(第 5 组)。重组蛋白的免疫剂量分别为 10、50、100 μg /只(第 2—4 组),免疫途径为肌肉注射,IBD 中等毒力活疫苗的免疫途径为口服。动物每 2 周免疫 1 次,共免疫 3 次,3 免后相同剂量加强免疫 1 次。

每次免疫后第 3 天,从分组动物中随机选择 10 只断食不断水,24 h 后处死并采集血液和小肠样品,参考文献[20]的方法分别制备血清及小肠黏膜样品。同时分别设免疫前样品为阴性对照。

1.7 抗体的 ELISA 效价测定及分析

通过多次预试验确定抗原抗体的最佳作用浓度,并以确定的抗原浓度包被 ELISA 反应板,以 1:10 000 稀释的 HRP 标记的鸡 IgG 或 IgA 为二抗,按间接 ELISA 操作步骤,测定血清 IgG 及小肠黏膜 IgA 效价。以 1:128 倍稀释的 IBD 病毒尿囊液为包被抗原,分别将血清样品进行 200 倍稀释、小肠黏膜样品进行 400 倍稀释,分别以免疫次数为横坐标,各免疫组 IgG、IgA 的 A_{450} 值为纵坐标绘制折线图,比较不同免疫组的 IgG 和 IgA 变化规律。

1.8 动物保护性试验

在最后 1 次免疫后 3 d,用 100LD₅₀ 的 IBDV 野生毒株分别感染第 1、4、5 组中剩余的 10 只鸡,单独饲养观察 2 周后全部扑杀。以观察到鸡精神沉郁、反应迟钝、眼睛呈全闭或半闭状态、羽毛杂乱、腹泻、颤抖、虚弱,解剖见法氏囊、肾脏病变、腿肌和胸肌出血、腺胃和肌胃交界处条状出血为标准,判断鸡只的发病情况。

2 结果与分析

2.1 VP2 基因克隆与鉴定

以成功提取的 IBDV 基因组 RNA 为模板,RT - PCR 法成功获得了 VP2 基因片段,电泳可见 1.4 kb 左右的条带(图 1)。序列测定结果表明,所克隆的 VP2 基因序列与已发表的 IBDV Lukert 株 VP2 序列同源率为 100%。将 VP2 与 pET32a 载体相连,获得了经 *Kpn* I 和 *Xho* I 双酶切鉴定正确的重组载体 pET - VP2(图 2)。

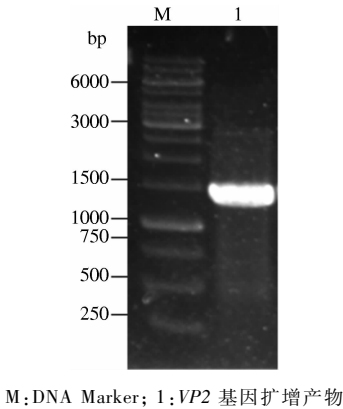


图 1 IBDV VP2 基因扩增产物

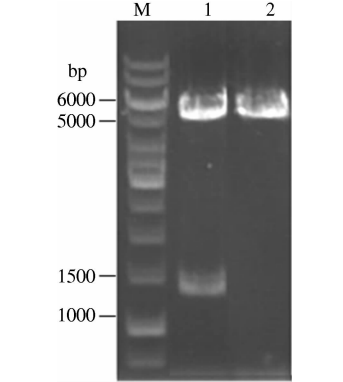


图 2 pET - VP2 酶切鉴定

2.2 VP2 蛋白的原核表达与鉴定

重组菌 pET - VP2 在不同条件下诱导培养后,选取 37 $^{\circ}\text{C}$ 、1 mmol/L IPTG 诱导 4 h 为最佳诱导条件。诱导产物经超声裂解进行 SDS - PAGE 电泳,表达产物经初步纯化后进行 Western blot 分析。结果显示(图 3),在 68 ku 处有特异性杂交条带存在,证明成功表达了有免疫原性的蛋白 VP2。

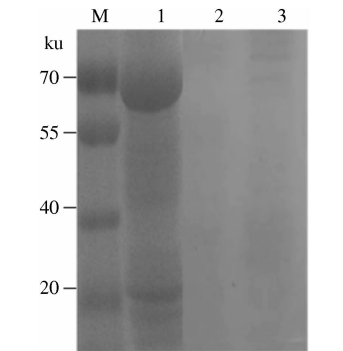


图 3 VP2 重组蛋白的 Western blot 分析

2.3 mLTA - CTLA - 4 重组蛋白安全性评价

家兔安全性评价试验显示:标记的第 1 段肠腔外观无异常,肠腔内几乎无液体,第 2、3、4 段肠腔均

充血水肿,肠腔内约有 8~9 mL 积液;第 5、6、7 段肠腔外观无异常,肠腔内几乎无液体;对照组和试验组动物在试验期内,均未观察到精神、行为、采食和生产性能的变化,亦未发生传染性法氏囊病。表明重组蛋白 mLTA-CTLA-4 安全无毒性。

2.4 各免疫组血清中 IgG 的检测及其变化规律

由图 4 可见,疫苗单独免疫组产生的平均 IgG 抗体水平高于 VP2 + mLTA-CTLA-4 免疫组;不同剂量的重组蛋白免疫时,以 10 μg/只的效果最佳,且免疫效果在短期内呈逐渐增强的趋势。

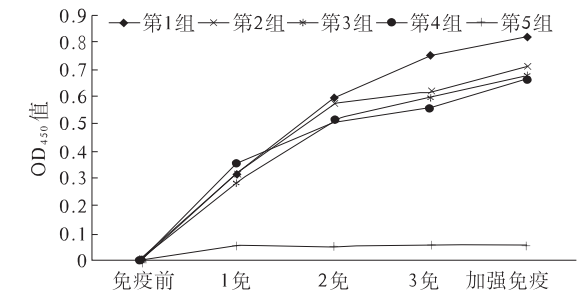


图 4 各免疫组血清 IgG 效价

2.5 各免疫组肠黏膜抗体 IgA 检测及其变化规律

由图 5 可见,疫苗单独免疫组产生的平均 IgA 抗体水平也略高于 VP2 + mLTA-CTLA-4 免疫组,免疫剂量也以 10 μg/只为最佳,免疫效果在短期内呈逐渐增强的趋势。

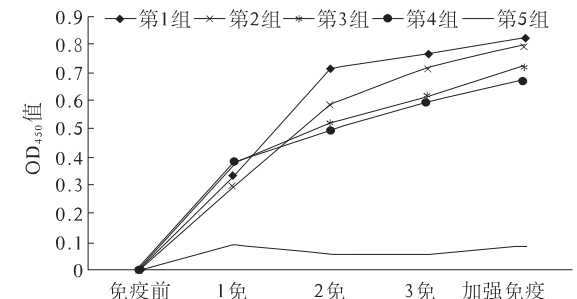


图 5 各免疫组小肠黏膜 IgA 效价

2.6 动物攻毒保护效果

动物保护性试验结果显示,VP2 + mLTA-CTLA-4 免疫组、疫苗单独免疫组鸡只均未见发病与死亡,对鸡只保护率为 100%;空白对照组发病 10 例、死亡 1 例。

3 结论与讨论

CTLA-4 作为抗原递呈细胞上 B7 配体的结合位点,能够特异性地提呈免疫原,发挥抗原浓缩和靶向导入的作用。因此,以 CTLA-4 作为免疫佐剂

时,B 细胞仅需很小剂量的抗原刺激就能完成识别、活化、增殖、分化的过程,最后产生并分泌特异性抗体 IgG,从而发挥抗病毒的作用^[21]。从 IgG 变化规律看,以低剂量 10 μg/只免疫组的免疫效果为最佳,证实了 CTLA-4 抗原提呈的有效性与高效性。

在进行安全性评价时,mLTA-CTLA-4 的注射量换算成 mLTA 单体后亦远远大于 LT 的注射量,而且即使 mLTA-CTLA-4 剂量增加数倍,也仍未表现出毒性作用,这说明 LT 的无毒突变取得成功,且安全范围较广^[22-23]。

本研究将 mLTA 与鸡 CTLA-4 胞外区结合,表达了安全无毒性的融合蛋白 mLTA-CTLA-4,与 IBDV VP2 重组蛋白共同免疫鸡只,根据鸡体内 IgG 及 IgA 的变化规律判断融合蛋白作为通用分子佐剂的可行性。从试验结果看,疫苗单独免疫组产生的 IgA 和 IgG 抗体水平高于 VP2 + mLTA-CTLA-4 免疫组,这可能是由于与亚单位疫苗相比,活疫苗接种类似于机体产生 1 次轻型的自然发病过程,病毒在体内的作用时间较长所致。但各组对鸡的保护力均为 100%,表明我们所制备的佐剂蛋白与 IBDV VP2 重组蛋白共同免疫可诱导鸡产生特异性 IgG 和 IgA,并产生特异性保护力,可以为研制新型 IBD 亚单位疫苗奠定基础,有望开发为 IBD 防治的新方法,解决病毒毒力变异带来的免疫效力低下问题。同时,研究结果也表明重组蛋白 mLTA-CTLA-4 可作为通用分子佐剂,为研究禽基因工程亚单位疫苗创造条件。

参考文献:

[1] Sack R B. Enterotoxigenic *Escherichia coli*: Identification and characterization[J]. Infect Dis, 1980, 142(2): 279-286.

[2] Sixma T K, Kalk K H, Zanten B A, et al. Refined structure of *Escherichia coli* heat-labile enterotoxin, a close relative of cholera toxin[J]. Mol Biol, 1993, 230(3): 890-918.

[3] Gill D M, Rappaport R S. Origin of the enzymatically active A1 fragment of cholera toxin[J]. Infect Dis, 1979, 139(6): 674-680.

[4] Brunet J F, Denizot F, Luciani M F, et al. A new member of the immuno-globulin superfamily CTLA-4[J]. Nature, 1987, 328: 267.

[5] Schnitzler D, Bernstein F, Müller H, et al. The genetic basis for the antigenicity of the VP2 protein of the infectious bursal disease virus [J]. J Gen Virol, 1993, 74: 1563-1571.

- [17] 许涛,祁娟,蒲小鹏,等. 甘南玛曲七种主要饲草营养价值比较[J]. 中国草地学报,2012,34(3):113-116.
- [18] 朱新书,王宏博,包鹏甲,等. 甘南亚高山草原牧草产量及其营养成分变化研究[J]. 中国草食动物科学,2014,34(6):41-42,55.
- [19] 任继周. 草业科学研究方法[M]. 北京:中国农业出版社,1998:201-213.
- [20] 张均. 西藏那曲地区不同月份草地牧草营养价值评定及绒山羊营养补饲研究[D]. 雅安:四川农业大学,2005.
- [21] 红敏. 不同生长阶段天然牧草品质评定比较研究[J]. 饲料研究,2012(12):79-81.
- [22] 郝力壮,王万邦,王迅,等. 三江源区嵩草草地枯草期牧草营养价值评定及载畜量研究[J]. 草地学报,2013,21(1):56-64.
- [23] Murphy J, Kennelly J. Effect of protein concentration and protein source on the degradability of dry matter and protein in situ[J]. Journal of Dairy Science, 1987, 70(9): 1841-1849.
- [24] 冯仰廉. 反刍动物营养学[M]. 北京:科学出版社,2004:33-39.
- [25] 林莉. 兴海同德两县天然牧草营养价值综合评定及草地载畜量确定[D]. 西宁:青海大学,2010.
- [26] 洪金锁. 三江源区玉树州主要草地类型天然牧草营养价值的综合评定[D]. 西宁:青海大学,2009.
- [27] 郝力壮. 三江源区果洛州主要草地类型天然牧草营养价值的综合评定[D]. 西宁:青海大学,2009.

(上接第 132 页)

- [6] Boot H J, Huurne A A, Hoekman A J, *et al.* Rescue of very virulent and mosaic infectious bursal disease virus from cloned cDNA: VP2 is not the sole determinant of the very virulent phenotype[J]. J Virol, 2000, 74(15): 6701-6711.
- [7] Boot H J, ter Huurne A H, Peeters B P. Generation of full-length cDNA of the two genomic dsRNA segments of infectious bursal disease virus[J]. Journal of Virological Methods, 2000, 84(1): 49-58.
- [8] Azad A A, Fahey K J, Barrett S A, *et al.* Expression in *Escherichia coli* of cDNA fragments encoding the gene for the host-protective antigen of infectious bursal disease virus[J]. Virology, 1986, 149: 190-198.
- [9] Berg T P. Acute infectious bursal disease in poultry: A review[J]. Avian Pathol, 2000, 29(3): 175-194.
- [10] 李潭清,宋勤叶,杨润得,等. 鸡传染性法氏囊病的研究进展[J]. 安徽农业科学, 2008, 36(35): 81-84.
- [11] 雷变兰,周玉武. 复方黄芪颗粒防治鸡传染性法氏囊病的疗效试验[J]. 山西农业科学, 2007, 35(1): 70-72.
- [12] 王松山. 一例鸡传染性法氏囊炎的诊治[J]. 现代农业科技, 2014(6): 286.
- [13] 常凯,朱绍伟,单娇,等. 鸡 α -干扰素抗传染性法氏囊炎感染试验研究[J]. 现代农业科技, 2013(15): 277-278.
- [14] 詹丽娥,陆冰洋,刘华栋,等. 鸡传染性法氏囊病超强毒株的分子鉴定[J]. 华北农学报, 2013, 28(3): 234-238.
- [15] Kato T, Nariuchi H. Polarization of naive CD4+ T cells toward the Th1 subset by CTLA-4 costimulation[J]. J Immunol, 2000, 164(3): 554-559.
- [16] Nayak B P, Sailaja G, Jabbar A M. Enhancement of gp120-specific immune responses by genetic vaccination with the human immunodeficiency virus type 1 envelope gene fused to the gene coding for soluble CTLA-4[J]. J Virol, 2003, 77: 10850-10861.
- [17] 韩小英,成大荣,王永娟,等. IBD 分子佐剂靶向提呈亚单位疫苗重组载体的构建与表达[J]. 扬州大学学报:农业与生命科学版, 2013, 32(2): 11-15.
- [18] 白雪飞,郭静玉,雷万军,等. 大肠杆菌不耐热肠毒素无毒突变体 mLT63 毒性检测及佐剂效果研究[J]. 中国人兽共患病学, 2010, 26(1): 69-71.
- [19] 陈溥言,卢春. 传染性法氏囊病毒 dsRNA 核酸提取[J]. 南京农业大学学报, 1996, 19(4): 73-76.
- [20] 黄佳佳. 大肠杆菌不耐热肠毒素突变蛋白的表达及其对粘膜免疫效果的影响[D]. 扬州:扬州大学, 2012.
- [21] 张钰,孙怀昌,黄燕燕,等. 鸡 CTLA-4 胞外区的原核表达与免疫佐剂作用[J]. 中国兽医科学, 2012(6): 611-616.
- [22] 赵艳敏,刘惠莉. 大肠埃希菌不耐热肠毒素作为粘膜免疫佐剂的研究进展[J]. 动物医学进展, 2007(3): 46-50.
- [23] 唐思静,吕转平,马博,等. 大肠杆菌不耐热肠毒素突变体作为佐剂的研究进展[J]. 上海畜牧兽医通讯, 2013(5): 16-18.