

范志宇,魏后军,胡 波,等. 兔出血症病毒杆状病毒载体灭活疫苗安全性及效力试验[J]. 江苏农业科学,2015,43(11):272-275.
doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2015.11.083

兔出血症病毒杆状病毒载体灭活疫苗安全性及效力试验

范志宇,魏后军,胡 波,宋艳华,王 芳,薛家宾

(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,江苏南京 210014)

摘要:本研究旨在对实验室制备的兔出血症病毒杆状病毒载体灭活疫苗的安全性和效力进行全面系统的研究。实验室制备了 5 批次兔出血症病毒杆状病毒载体灭活疫苗,按照现行《中国兽药典》附录对疫苗进行了性状、无菌检验、甲醛残留量、安全及效力试验。结果显示,5 批次疫苗无菌检验、甲醛残留量均合格;疫苗对肉兔、獭兔、毛兔 3 个品种家兔均安全,接种疫苗后 30、60 d,剖检注射部位未见炎症反应,疫苗吸收良好,并且疫苗对怀孕母兔、未断奶仔兔、断奶幼兔也安全;对肉兔各项生产性能也没有影响,说明该疫苗具有较好的安全性。疫苗免疫 21 d 后,易感家兔和母兔均能抵抗兔出血症强毒攻击,说明该疫苗免疫原性良好。

关键词:兔出血症病毒杆状病毒;灭活疫苗;安全性试验;效力试验

中图分类号: S852.65;S858.291.53 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002-1302(2015)11-0272-03

兔出血症,又称兔瘟,是由兔出血症病毒(rabbit haemorrhagic disease virus,RHDV)引起的一种以急性、高度传染性、大面积死亡为特征的兔传染病,主要临床特征为呼吸系统出血、肝变性、实质器官瘀血及出血性变化^[1-3]。本病常呈暴发性流行,发病率和病死率极高,感染兔通常于 48~72 h 死亡,给养兔业造成极大的经济损失。该病自然感染只发生于兔,主要危害 40 日龄以上幼兔、育成兔和成年兔,40 日龄以下幼兔和部分老龄兔不易感,哺乳仔兔不发病^[2-4]。带毒兔及病死兔的内脏器官、肌肉、毛、血液、分泌物、排泄物是主要的传染源,带毒兔和被病毒污染的饲料、饮水、用具也是重要的传染源或传播媒介。目前该病的主要预防措施是使用组织灭活疫苗免疫,然而传统组织灭活苗的制备存在诸多的缺陷和不足,因此,需要探索新的生产疫苗的途径^[5-6]。

RHDV 是杯状病毒科成员,结构简单,仅有 1 个主要结构蛋白 VP60,在诱导抗病毒感染的免疫反应中起重要作用,是病毒免疫保护性抗原,用杆状病毒系统表达 RHDV 的 VP60 能够自发地组装成病毒样粒子(VLPs),其在形态和抗原性上都与天然的病毒粒子无异但不包含病毒 RNA 基因组。研究发现 RHDV VLPs 在兔体内可以诱导机体产生很强的体液免疫应答、细胞免疫应答和黏膜免疫应答。此外,RHDV VLPs 具有成本低、获取方便等优势,已经成为应用性预防治疗中可靠的分子工具^[3-7]。在前期研究的基础上,于实验室用 RHDV 重组 VP60 制备了 5 批次疫苗,并对疫苗开展了系统的研究。

收稿日期:2015-07-02

基金资助:现代农业产业技术体系建设兔体系病病毒预防与控制岗位(编号:CARs-44-C-1);公益性行业(农业)科研专项(编号:201303046);江苏省农业科技自主创新资金[编号:CX(14)4048]。
作者简介:范志宇(1982—),男,山西太谷人,博士,助理研究员,主要从事家兔疾病防治与兽医生物技术研究。Tel:(025)84390337;E-mail:fanzhiyu2007@163.com。

通信作者:王 芳,博士,研究员,主要从事家兔重要疫病的病原学、快速诊断、流行病学、致病机理、疫苗研制、综合防控技术等方面的研究。Tel:(025)84390337;E-mail:rwangfang@126.com。

1 材料与方法

1.1 种毒

重组兔出血症病毒 VP60 杆状病毒,由江苏省农业科学院兽医研究所构建并保存^[5]。攻毒用毒种为兔出血症病毒皖阜株肝毒。Sf9 昆虫细胞,由江苏省农业科学院兽医研究所保存。

1.2 试验兔

2~3 月龄健康易感肉兔、獭兔、毛兔(兔出血症病毒抗体 HI 效价不高于 1:2),健康怀孕 20~25 d 母兔,20~30 日龄未断奶仔兔、35 日龄已断奶幼兔(未免疫兔出血症及相关疫苗),均由金陵种兔场提供。

1.3 试剂

Sf-900TM II SFM 培养基,购自 GIBCO 公司。硫乙醇酸盐培养基(TG)、酪酪琼脂(GA)、葡萄糖蛋白胨培养基(GP)、氢氧化铝胶溶液由南京天邦生物科技有限公司制备并检验。

1.4 抗原制备及红细胞凝集效价的测定

将重组兔出血症病毒 VP60 杆状病毒接种 Sf9 昆虫细胞,于 27~28℃ 培养,连续观察,待细胞病变达 85% 以上时,收获细胞培养物。将收获接种种毒的细胞培养物反复冻融 3 次,取 50 μL 于 50 孔板,用 PBS 作 2 倍比稀释,加入等体积 1% 人 O 型红细胞悬液,振荡均匀,置于 2~8℃ 作用 45 min,观察结果,检测表达蛋白的 HA 效价^[8-9]。

1.5 灭活及灭活检验^[9]

向细胞培养物中加入甲醛溶液(终浓度为 0.2%),37℃ 灭活 24 h。取灭活细胞培养物,接种生长良好的 Sf9 细胞,于 27~28℃ 条件下培养,同时设立未灭活的细胞培养物为阳性对照,按上述方法接种 Sf9 细胞,连续 5 d 观察细胞病变,收获细胞培养物,置 -20℃ 以下反复冻融 3 次,接种生长良好的 Sf9 细胞盲传 1 代,培养 5 d,观察细胞病变,并测定其血凝性。

1.6 疫苗制备

将检验合格的细胞培养物和氢氧化铝胶按 9:1 充分均匀振荡,定量分装,加盖密封,贴签。

1.7 成品检验

1.7.1 性状 取疫苗瓶上下颠倒混匀,观察外观及颜色,然后将疫苗瓶于 2~8℃ 静置 24 h,再次观察外观及颜色。

1.7.2 无菌检验 按 2010 版《中国兽药典》附录进行检验。

1.7.3 甲醛残留量测定 按 2010 版《中国兽药典》附录进行检验。

1.8 安全试验^[10]

1.8.1 单剂量安全试验

1.8.1.1 单剂量安全试验 实验室制备的 5 批次疫苗(批号:101、102、103、104、105)各用 2~3 月龄健康易感家兔 5 只,分别皮下注射 1 mL/只,同时以相同条件家兔作为对照,不接种疫苗,观察家兔精神状态、饮食、粪便、局部及全身反应等,连续观察 14 d。

1.8.1.2 单剂量重复安全试验 5 批次疫苗各用 2~3 月龄健康易感家兔 5 只,分别皮下注射 1 mL/只,14 d 后,重复皮下注射相同剂量的灭活疫苗,以相同条件家兔作为对照,不接种疫苗,观察家兔精神状态、饮食、粪便、局部及全身反应等,连续观察 14 d。

1.8.2 超剂量安全试验

1.8.2.1 不同品种家兔安全试验 实验室制备的 5 批次疫苗各用 2~3 月龄健康易感肉兔、獭兔、毛兔各 5 只,分别皮下注射 2 mL/只,同时以相同条件家兔作为对照,不接种疫苗,观察家兔精神状态、饮食、粪便、局部及全身反应等,连续观察 60 d,并于 30 d 每组取 2 只,60 d 每组取 3 只安乐死后进行剖检,观察疫苗注射部位局部组织疫苗吸收和炎症反应情况。

1.8.2.2 怀孕母兔安全试验 5 批次疫苗各用怀孕 20~25 d 母兔 5 只,分别皮下注射 2 mL/只,以相同条件不接种疫苗家兔作为对照,观察精神状态、饮食、粪便、局部及全身反应等,并观察怀孕母兔妊娠、分娩及胎儿健康状况,观察期 14 d。

1.8.2.3 其他日龄家兔安全试验 5 批次疫苗各用 35 日龄断奶未免疫兔出血症疫苗的幼兔 5 只,并各用 20~30 日龄未断奶未免疫兔出血症疫苗的仔兔 5 只进行安全试验,处理方法同“1.8.2.2”节。

1.8.2.4 对肉兔生产性能的影响 5 批次疫苗各用 35~40 日龄的健康肉兔 5 只,分别皮下注射 2 mL/只,以相同条件家兔作为对照,不接种疫苗,每日 10:00 测量并记录 14 d 内家兔的体温,观察 45 d 内家兔生长发育情况,记录注射疫苗时和观察期结束时家兔的体质量,观察期内饲料消耗的重量,观察期结束时出栏家兔数量,并计算家兔增重、饲料报酬(料肉比)、出栏率等。

1.9 效力试验

1.9.1 易感家兔效力试验 实验室制备的 5 批次疫苗各用 2~3 月龄健康易感家兔 5 只,分别皮下注射 1 mL/只,21 d 后,连同相同条件对照兔 5 只,各皮下注射兔出血症病毒皖阜株肝毒 1 mL,连续观察 7 d,记录死亡与保护的动物数量,对死亡兔剖检观察并取肝脏进行人“O”型红细胞凝集试验。

1.9.2 怀孕母兔效力试验 实验室制备的 5 批次疫苗各用健康怀孕母兔 5 只,处理方法同“1.9.1”节。

2 结果与分析

2.1 抗原红细胞凝集效价

经测定,5 批次细胞培养物红细胞凝集效价在 1:512~1:1 024 之间,分别为 1:1 024、1:512、1:512、1:1 024、1:512。

2.2 灭活检验

用甲醛溶液对细胞培养物进行灭活,结果显示,接种灭活细胞培养物的 S9 昆虫细胞及正常 S9 昆虫细胞生长状况良好,细胞分裂正常。收获接毒细胞培养物,于 -20℃ 以下反复冻融 3 次,取适量再次接种生长良好的 S9 细胞,于 27~28℃ 培养 5 d,结果显示,接种灭活细胞培养物的 S9 昆虫细胞及正常 S9 昆虫细胞生长状况良好,细胞分裂正常;而加入未灭活细胞培养物的细胞病变明显,细胞培养物具有血凝性。说明接毒细胞培养物灭活完全。

2.3 疫苗配制

按“1.6”节的方法制备试验用疫苗 5 批次,约 4 000 mL/批次,批号为 101、102、103、104、105。

2.4 性状、无菌检验、甲醛残留量测定

对 5 批次疫苗进行性状、无菌检验、甲醛残留量测定,结果显示,5 批次疫苗(101、102、103、104、105)外观为浅黄色均匀混悬液,静置后上层为浅黄色的澄清液体,下层有少量沉淀。TG 小管、GA 斜面在 37℃ 培养 7 d, TG 小管、GA 斜面、GP 小管在 25℃ 培养 7 d 均无菌生长,无菌检验合格。经检验,疫苗甲醛残留量在 0.042%~0.087% 之间,符合质量标准。

2.5 安全试验

2.5.1 单剂量安全试验 用 5 批次疫苗对家兔进行单剂量安全试验,连续观察 14 d,结果显示,免疫兔和对照兔的精神状态、饮食、粪便等均正常,免疫兔未见疫苗接种引起的异常临床症状,说明疫苗对 2~3 月龄健康易感家兔单剂量接种及单剂量重复接种均是安全的。

2.5.2 超剂量安全试验

2.5.2.1 不同品种家兔安全试验 用 5 批次疫苗进行不同品种家兔安全试验,结果显示,观察期 60 d,2~3 月龄肉兔、獭兔、毛兔 3 个品种家兔的精神状态、饮食、粪便等均正常;免疫兔未见疫苗接种引起的异常临床症状,疫苗接种后 30 d 及 60 d,剖检注射部位未见炎症反应,疫苗吸收良好,说明疫苗对不同品种的家兔是安全的。

2.5.2.2 怀孕母兔安全试验 用 5 批次疫苗进行怀孕母兔安全试验,结果显示,观察期 14 d,免疫兔和对照兔的精神状态、饮食、粪便等均正常;免疫兔未见疫苗接种引起的异常临床症状,母兔均正常妊娠、分娩,免疫兔和对照兔生产的仔兔数量没有差异,胎儿健康,未见异常,说明疫苗对怀孕母兔是安全的。

2.5.2.3 其他日龄家兔安全试验 用 5 批次疫苗对其他日龄家兔进行安全试验,结果显示,观察期 14 d,未断奶仔兔、已断奶幼兔的免疫兔和对照兔精神状态、饮食、粪便等均正常,仔兔正常断奶,并且生长良好;免疫兔未见疫苗接种引起的异常临床症状,说明该疫苗对未断奶仔兔和已断奶幼兔均是安全的。

2.5.2.4 对肉兔生产性能的影响 用 5 批次疫苗进行肉兔生产性能影响试验,结果显示,观察期 14 d,免疫兔和对照兔体温处于 38.5~39.5℃ 的正常范围内,免疫兔与对照兔相比

较,体温没有明显差异(图 1)。观察期 45 d,免疫兔和对照兔生长发育均良好,免疫组各 5 只家兔共增加体质量分别为 6 207、6 367、6 314、5 960、6 068 g,对照组 5 只家兔共增加体质量 6 108 g,由此计算饲料报酬(料肉比),免疫组与对照组相比较,差异不显著($P>0.05$);出栏率均为 100%(表 1)。结果说明该疫苗对肉兔生产性能没有影响。

2.6 效力试验

用 5 批次疫苗进行效力试验,结果(表 2)显示,5 批疫苗免疫易感家兔全部健康存活,对照兔死亡 5 只,死亡兔出现兔出血症典型的病理变化,对死亡兔肝脏悬液作人“O”型红细胞凝集试验,均为 RHDV 阳性。另一组攻毒结果显示,5 批疫苗免疫母兔全部健康存活,对照兔死亡 4 只,死亡兔出现兔出血症典型的病理变化,对死亡兔肝脏悬液作人“O”型红细胞

凝集试验,均为阳性。结果说明该疫苗可以对母兔和易感家兔提供完全保护。

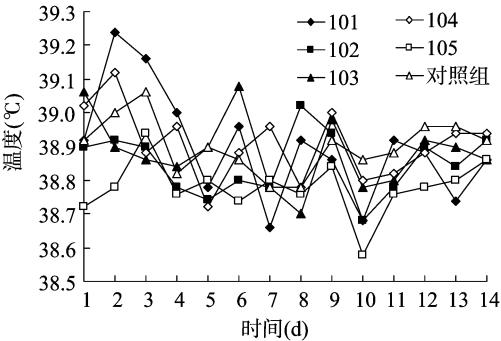


图1 体温变化测定结果

表 1 饲料报酬与出栏率试验结果

组别	数量 (只)	注射剂量 (mL/只)	接种途径	饲喂饲料重量 (g)	体质量共增加 (g)	饲料报酬 (料肉比)	出栏率 (%)
101	5	2	皮下注射	19 550	6 207	3.15	100
102	5	2	皮下注射	19 970	6 367	3.14	100
103	5	2	皮下注射	19 760	6 314	3.13	100
104	5	2	皮下注射	19 600	5 960	3.29	100
105	5	2	皮下注射	19 450	6 068	3.21	100
对照组	5			19 840	6 108	3.25	100

表 2 效力试验结果

组别	死亡数/攻毒数(只)	
	母兔	易感家兔
101	0/5	0/5
102	0/5	0/5
103	0/5	0/5
104	0/5	0/5
105	0/5	0/5
对照组	4/5	5/5

3 讨论

目前,由于兔出血症病毒不能在兔体以外的组织或细胞上增殖,因此,只能通过用强毒接种易感兔,收获含毒组织制成乳剂,用甲醛灭活后制成疫苗^[6,11]。这种生产方式主要存在以下缺陷和不足:易感兔来源少、生产成本低、污染物安全处理困难且易造成散毒、动物福利难以保障等。利用基因工程技术开发新疫苗是解决当前传统疫苗问题的有效途径,国内外已经用大肠杆菌、酵母、昆虫细胞等多种表达系统对 RHDV 的免疫蛋白 VP60 进行了表达,并且多数表达系统都表现出良好的免疫原性^[3,12]。杆状病毒系统表达的 RHDV 重组衣壳蛋白能够很好地自聚形成能够凝集人“O”型红细胞的病毒样颗粒(VLPs),由于 VLPs 结构与成熟病毒相似,但不含病毒核酸,不具有感染性,所以在体内这种空壳结构 VLPs 不会引发感染,因此作为疫苗非常安全^[13]。而且 VLPs 能够在很低剂量的抗体情况下引发有效的保护性反应,这将大大降低疫苗的成本,同时该表达系统具有低成本、高表达和易于规模生产等特点^[14,15]。

本研究在完成重组兔出血症病毒 VP60 杆状病毒毒种的构建及特性研究的基础上,实验室试制了 5 批次疫苗(批号 101、102、103、104、105),共计约 20 000 mL。按照现行《中国兽药典》附录对 5 批次疫苗进行性状、无菌、甲醛残留量检验及安全、效力试验,结果显示,5 批次疫苗无菌检验、甲醛残留量均合格。安全性结果表明,该疫苗可以用于怀孕母兔,优于目前市售组织灭活疫苗,并且对 20~30 日龄未断奶仔兔、35 日龄已断奶幼兔都非常安全,对肉兔的各项生产性能也没有影响。本研究的安全性试验是使用 5 批次疫苗免疫 3 个品种家兔的多次试验完成的,试验结果说明该疫苗对各个年龄段的家兔均是安全的。疫苗免疫 21 d 后 2~3 月龄家兔和母兔用致死剂量的兔出血症病毒攻击保护率都达 100%,说明该疫苗免疫原性良好。该疫苗具有较高的安全性和良好的免疫原性,市场前景乐观。

参考文献:

[1] 陆承平. 兽医微生物学[M]. 北京:中国农业出版社,2007:457-458.
[2] 谷子林,秦应和,任克良. 中国养兔学[M]. 北京:中国农业出版社,2013:509-511.
[3] Abrantes J, van der Loo W, le Pendu J A. Rabbit haemorrhagic disease (RHD) and rabbit haemorrhagic disease virus (RHDV): a review[J]. Veterinary Research,2012,43:12-21.
[4] Marques R M, Teixeira L, Águas A P, et al. Immunosuppression abrogates resistance of young rabbits to Rabbit Haemorrhagic Disease (RHD)[J]. Veterinary Research,2014,45(1):1-6.
[5] 王芳,胡波,任雪枫,等. 兔出血症病毒衣壳蛋白在昆虫细胞中的表达及对家兔的免疫保护效果[J]. 畜牧兽医学报,2008,39(10):1382-1387.

董亚青,朱文斗,王琳琳,等. 鸡 α -干扰素在毕赤酵母中的表达及其表达条件优化[J]. 江苏农业科学,2015,43(11):275-277.
doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2015.11.084

鸡 α -干扰素在毕赤酵母中的表达及其表达条件优化

董亚青¹,朱文斗²,王琳琳¹,王永娟¹

(1. 江苏农牧科技职业学院,江苏泰州 225300;2. 江苏省兴化市新垛镇兽医站,江苏兴化 225747)

摘要:选择毕赤酵母表达系统,根据酵母密码子偏爱性合成 ChIFN- α 成熟肽的基因序列,连接至载体 pPIC9K 中,构建重组质粒 pPIC9K- α ,将重组载体酶切线性后克隆至毕赤酵母 GS115,筛选高拷贝转化子及其甲醇利用型,对其表达条件进行优化。结果表明:鸡 α -干扰素在毕赤酵母中成功表达,在含 2% 酸水解酪蛋白,经 0.5% 甲醇在 28 °C 诱导表达 72 h 后,重组蛋白表达量最多,抗病活性最高。

关键词:鸡; α -干扰素;毕赤酵母;基因表达;表达条件

中图分类号:S858.31 **文献标志码:**A **文章编号:**1002-1302(2015)11-0275-03

干扰素 (IFN) 是 1 种具有抗病毒、调节免疫等作用的细胞因子,由英国科学家 Isaacs 和 Lindemann 于 1957 年首次发现^[1]。Lamp 等于 1963 年纯化了这种细胞因子,并证明其为蛋白质^[2]。干扰素具有一定的特异性,只有同种的生物细胞产生的干扰素才能起到保护作用,对异种生物细胞则无作用^[3]。根据细胞来源、生化特性及生物学活性可将其分为两大类:Ⅰ类、Ⅱ类^[4]。鸡 α -干扰素 (ChIFN- α) 全基因为 582 个碱基,编码 193 个氨基酸,包含 31 个氨基酸的信号肽、162 个氨基酸的成熟蛋白^[5]。ChIFN- α 属于Ⅰ类干扰素,是禽类主要干扰素,具有抑制病毒复制、加强 NK 细胞杀伤力的能力^[6]。本试验根据酵母密码子偏爱性合成 ChIFN- α 成熟

肽的基因序列,克隆至毕赤酵母分泌表达型载体 pPIC9K 中,构建重组质粒 pPIC9K- α ,电转化至毕赤酵母 GS115,筛选并鉴定其甲醇利用型,优化其表达条件,以期获得表达量多、抗病活性高的重组蛋白,旨在为干扰素应用研究提供基础。

1 材料与方法

1.1 材料

ChIFN- α 序列合成由生工生物工程上海 (股份) 有限公司完成;毕赤酵母 GS115 由笔者所在实验室保存;限制性内切酶、连接酶、Pretained Protein 分子量 marker 均购自 Fermentas 公司;Wizard DNA Clean-up System 均购自美国 Promega 公司;质粒提取试剂盒、胶回收试剂盒、培养基等均购自北京康为世纪生物科技有限公司。

1.2 重组质粒 pPIC9K- α 的构建

根据酵母密码子偏爱性合成 ChIFN- α 成熟肽的基因序列,在其末端加入设计好的酶切位点,经过酶切、连接将 ChIFN- α 的基因序列克隆至毕赤酵母分泌表达型载体 pPIC9K 中,转化至大肠杆菌 DH5 α 中进行扩增,提取质粒进

收稿日期:2014-11-27

基金项目:江苏省科技支撑计划 (编号:BE2014380);江苏农牧科技职业学院 2014 年度重点支持项目 (编号:NSFZD1405);扬州朝天歌农牧科技有限公司横向合作课题 (编号:00010114012)。

作者简介:董亚青 (1980—),女,江苏兴化人,硕士,讲师,主要从事预防兽医学研究。E-mail:156815306@qq.com。

通信作者:王永娟,博士,副教授,主要从事生物工程技术研究。E-mail:43088591@qq.com。

[6] Huang H B. Vaccination against and immune response to viral haemorrhagic disease of rabbits: a review of research in the People's Republic of China [J]. Revue Scientifique et Technique, 1991, 10 (2): 481-498.

[7] Marín M S, Martín A J, Pérez O G L, et al. Immunogenic properties of rabbit haemorrhagic disease virus structural protein VP60 expressed by a recombinant baculovirus: an efficient vaccine [J]. Virus Research, 1995, 39 (2/3): 119-128.

[8] 王启明,董亚芳. NY/T 572—2002 兔出血病血凝和血凝抑制试验方法[S].

[9] 中国兽药典委员会. 中华人民共和国兽药典:三部[M]. 北京:中国农业出版社,2011.

[10] 唐应华,陆吉虎,吴培培,等. 免疫增强剂对禽流感疫苗免疫持续期、安全性和鸡淋巴细胞转化的影响[J]. 江苏农业学报, 2014, 30 (4): 821-825.

[11] 宁宜宝. 兽用疫苗学[M]. 北京:中国农业出版社,2008:390-

391.

[12] Mikschofsky H, Schirmer H, Keil G M, et al. Pea-derived vaccines demonstrate high immunogenicity and protection in rabbits against rabbit haemorrhagic disease virus [J]. Plant Biotechnology Journal, 2009, 7 (6): 537-549.

[13] Ludwig C, Wagner R. Virus-like particles - universal molecular toolboxes [J]. Current Opinion in Biotechnology, 2007, 18 (6): 537-545.

[14] Perez - Filgueira D M, Resino - Talavan P, Cubillos C, et al. Development of a low-cost, insect larvae-derived recombinant subunit vaccine against RHDV [J]. Virology, 2007, 364 (2): 422-430.

[15] Fernández E, Toledo J R, Chiong M, et al. Single dose adenovirus vectored vaccine induces a potent and long-lasting immune response against rabbit hemorrhagic disease virus after parenteral or mucosal administration [J]. Veterinary Immunology and Immunopathology, 2011, 142 (3/4): 179-188.