

宋艳华,胡 波,范志宇,等. 兔出血症病毒 2 型 SC 株 VP60 基因工程疫苗研制及其与传统兔出血症病毒疫苗的交叉保护作用[J]. 江苏农业科学,2022,50(16):50-54.

doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2022.16.008

兔出血症病毒 2 型 SC 株 VP60 基因工程疫苗研制及其与传统兔出血症病毒疫苗的交叉保护作用

宋艳华,胡 波,范志宇,魏后军,陈萌萌,仇汝龙,徐为中,王 芳

(江苏省农业科学院兽医研究所/农业农村部兽用生物制品工程重点实验室,江苏南京 210014)

摘要:兔出血症病毒 2 型毒株于 2020 年在我国首次发现并报道,目前尚无有效的疫苗可用于对该毒株的防控。针对我国兔出血症病毒 2 型 SC 毒株 VP60 蛋白,构建获得表达该毒株 VP60 蛋白的重组杆状病毒 rBAC-RHDV2-VP60。以 rBAC-RHDV2-VP60 为疫苗毒种,接种昆虫细胞,表达获得重组 VP60 蛋白。以氢氧化铝胶为佐剂制成 RHDV2 SC 株 VP60 基因工程疫苗,结合前期制备的传统 RHDV 型 WF 株 VP60 基因工程疫苗,分别免疫 2~3 月龄健康易感兔,1.0 mL/只;免疫后 21 d,检测 2 种疫苗分别对国内 RHDV2 流行株和传统 RHDV 毒株的免疫保护力。结果显示,用 SC 株攻毒,免疫 RHDV2 SC 株 VP60 基因工程疫苗的家兔,免疫组无死亡,而免疫生理盐水的对照组全部死亡;免疫传统 RHDV WF 株 VP60 基因工程疫苗的家兔,免疫兔 6/10 死亡,对照组兔全部死亡;用 WF 株攻毒,免疫 RHDV2 SC 株 VP60 基因工程疫苗的家兔,免疫组死亡 7/10,而免疫生理盐水的对照组全部死亡;免疫传统 RHDV WF 株 VP60 基因工程疫苗的家兔,免疫兔无死亡,对照组兔全部死亡;提示传统 RHDV 型 WF 株疫苗不能对国内流行毒株 RHDV2 SC 毒株产生有效的免疫保护,RHDV2 SC 株 VP60 基因工程疫苗也不能对国内传统 RHDV 毒株产生有效的免疫保护,两型毒株间交叉保护作用较低。本研究针对我国流行 RHDV2 SC 毒株研制的基因工程疫苗对有效预防和控制国内流行的 RHDV2 将发挥重大作用。

关键词:兔出血症病毒 2 型;杆状病毒表达;基因工程疫苗;免疫效力;交叉保护

中图分类号: S852.4 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002-1302(2022)16-0050-04

兔出血症病毒(rabbit hemorrhagic disease virus, RHDV)属于杯状病毒科兔病毒属。该病毒引起的兔出血症以高感染率和死亡率为特征,严重阻碍养兔业发展,并对公共卫生安全存在潜在威胁^[1-2]。RHDV 分为经典毒株 GI.1(RHDV1)和变异毒株 GI.2(RHDV2)2 种基因型,GI.1 又分为 GI.1a、GI.1b、GI.1c 和 GI.1d 等 4 种亚型^[3]。2010 年 GI.2 首先在法国暴发,随后在欧洲、非洲、澳大利亚和美洲流行^[4-7],且 RHDV2 有逐渐替代经典 RHDV 毒株成为主要流行毒株的趋势^[8]。OIE 认定 RHDV2 型毒株为兔出血症病毒的第二个血清型。

2020 年笔者所在团队首先发现并报道了 GI.2(RHDV2)在我国暴发^[9-10],该毒株与中国 GI.1 型 RHDV 毒株的同源性低于 85%^[11],在致病性方面,与 RHDV1 相比,RHDV2 更具危害性,不仅能够感染不同日龄的家兔,还能感染不同品种的野兔,感染兔病死率可达 90%。在遗传特性及抗原性方面,RHDV2 与 RHDV1 也存在较大差异,传统毒株的疫苗对新型 RHDV2 毒株的交叉保护作用较弱,自 2020 年至今,RHDV2 已在我国广泛流行,严重危害养兔业。本研究获得表达我国 RHDV2 SC 毒株 VP60 蛋白的重组杆状病毒,并以该毒种为疫苗毒种研制获得 RHDV2 SC 株 VP60 基因工程疫苗。

1 材料与方法

1.1 菌毒种

兔出血症病毒 2 型 SC 株(GenBank No. MT383749)和兔出血症病毒 1 型 WF 株,由笔者所在实验室鉴定、保存;大肠杆菌 DH10Bac、Sf9 昆虫细胞由笔者所在实验室保存。

收稿日期:2022-05-31

基金项目:江苏省农业科技自主创新资金[编号:CX(20)3158];现代农业产业技术体系建设专项(编号:CARS-43-C-1)。

作者简介:宋艳华(1985—),女,山东聊城人,博士,副研究员,主要从事动物病毒学研究。E-mail:songyanhua8507@126.com。胡波和范志宇为共同第一作者。

通信作者:王 芳,博士,研究员,主要从事家兔重要疫病致病机制及防控技术。E-mail:rwangfang@126.com。

1.2 主要试剂

总 RNA 提取试剂 RNAiso Regent、AMV 反转录酶、*EcoR* I 酶、*Hind* III 酶购自大连宝生物工程有限公

1.3 RHDV2 VP60 基因的扩增

根据兔出血症病毒 2 型 SC 株 (GenBank No. MT383749) 的 VP60 基因序列, 设计引物序列: 设计合成上游引物 P1: 5′-ATAGAATTCATGGAGGGCA AAGCCCGC-3′; 下游引物 P2: 5′-GCAAGCTTTCA GACATAAGAAAAAC-3′。上游引物引入 *EcoR* I 酶切位点, 下游引物引入 *Hind* III 酶切位点。抽提 RHDV2 的病毒 RNA, 经反转录获得 cDNA, 并以 cDNA 为模板, 利用上述引物进行 PCR 扩增目的基因, 最终利用核酸电泳鉴定目的条带。

1.4 重组转移载体 pFastBac™1 - RHDV2 - VP60 的构建及鉴定

利用 *EcoR* I 和 *Hind* III 分别酶切 pFastBac™1 和目的基因, *T*₄ 连接酶将载体与目的基因进行连接, 连接后产物转化 DH5 α , 涂布平板, 挑取单菌落, 抽提重组质粒, 并对其进行双酶切鉴定, 最终获得含有目的基因的重组转移载体, 命名为: pFastBac™1 - RHDV2 - VP60。

1.5 重组穿梭质粒的构建及鉴定

将上述获得的重组转移载体转化至 *E. coli* DH10Bac 中, 取适量培养菌液涂于含有卡那霉素、庆大霉素、四环素以及 *X-gal* 和 IPTG 的平板上, 培养 2 d 后, 挑取白色的单菌落, 再次接种相同条件平板上进行菌落纯化, 再次挑取白色单菌落, 接种于含卡那霉素、庆大霉素和四环素的液体培养基中, 37℃ 振荡培养 24 h, 抽提重组杆状病毒穿梭质粒, 并以通用 pUC/M13 上、下游引物对质粒进行 PCR 鉴定, 命名为 Bacmid - RHDV2 - VP60。

1.6 重组 RHDV2 VP60 杆状病毒的获得

利用转染试剂将 Bacmid - RHDV2 - VP60 转染生长状态约 80% 的单层昆虫细胞, 培养 3 d, 逐日观察病变情况, 待细胞出现典型病变后, 收获细胞培养物, 获得重组杆状病毒原液。

1.7 重组 RHDV2 VP60 蛋白的表达及鉴定

1.7.1 Western blot 鉴定 对制备获得的重组蛋白表达产物进行电泳、转印和免疫印迹分析, 并以接种野生型杆状病毒的细胞培养物为空白对照, 利用抗 RHDV2 特异性单抗 6B3 为一抗, 羊抗鼠 HRP -

IgG 为二抗, 对表达的重组蛋白进行 Western blot 鉴定。

1.7.2 血凝效价检测 对制备获得的重组蛋白表达产物进行血凝效价检测, 按照红细胞凝集试验 96 孔试验操作测定重组蛋白的血凝效价。

1.7.3 电镜观察 对制备获得的重组蛋白表达产物进行纯化, 将样品置于铜网静置 2 min, 再加入 2% 磷钨酸染液进行固定, 最后利用透射电镜观察和拍照。

1.8 RHDV2 SC 株 VP60 基因工程疫苗的制备

利用悬浮培养的昆虫细胞, 待细胞生长为对数生长期时, 接种重组杆状病毒, 观察细胞生长状态和病变进程, 病变细胞数量达约 85% 时取样, 利用凝集试验和 Western blot 方法对重组蛋白进行鉴定。根据血凝效价水平, 取适量重组蛋白, 并按照抗原: 氢氧化铝胶质量比 9:1 配制疫苗, 最终获得 RHDV2 SC 株 VP60 基因工程疫苗。用同样的方法制备抗原含量相同的传统 RHDV WF 株 VP60 基因工程疫苗^[12], 用于评价交叉保护作用。

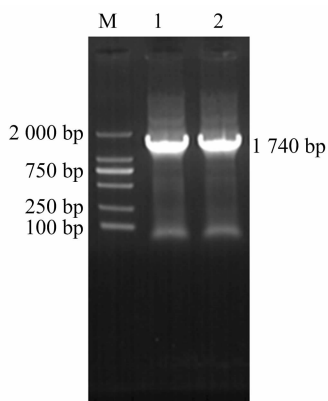
1.9 疫苗的免疫效力评价

选用兔出血症病毒抗原、抗体均为阴性的 2~3 月龄家兔 60 只, 设置免疫 4 组, 对照 2 组, 10 只/组。取免疫组 2 组, 对照组 1 组, 分别接种 RHDV2 SC 株 VP60 基因工程疫苗 1.0 mL/只, 传统 RHDV WF 株 VP60 基因工程疫苗 1.0 mL/只, 对照接种生理盐水 1.0 mL/只, 分别于免疫后 21 d, 颈部皮下注射兔出血症病毒 2 型 SC 株 1.0 mL (含病毒 1 000 LD₅₀), 观察 7 d。另取免疫组 2 组, 对照组 1 组, 分别接种 RHDV2 SC 株 VP60 基因工程疫苗 1.0 mL/只, 传统 RHDV WF 株 VP60 基因工程疫苗 1.0 mL/只, 对照接种生理盐水 1.0 mL/只, 分别于免疫后 21 d, 颈部皮下注射兔出血症病毒 1 型 WF 株 1.0 mL (含病毒 1 000 LD₅₀), 观察 7 d。

2 结果与分析

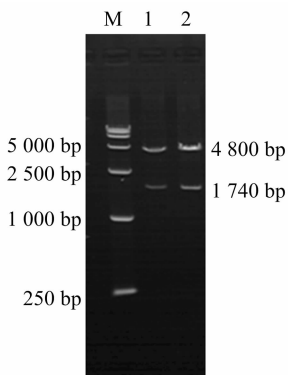
2.1 重组转移载体的酶切鉴定

利用 PCR 扩增获得 RHDV2 - VP60 基因 (图 1), 并成功克隆至 pFastBac™1 质粒中。构建成功重组质粒 pFastBac™1 - SC - VP60, 双酶切鉴定结果显示, 分别以 *EcoR* I 和 *Hind* III 进行酶切, 结果显示, 酶切后出现 4 800 bp 和 1 740 bp 左右的 2 个片段 (图 2), 说明重组转移载体构建成功。



M—DNA 分子质量标准(DL2000); 1、2—VP60 基因 PCR 样品

图1 RHDV2 SC 株 VP60 基因扩增

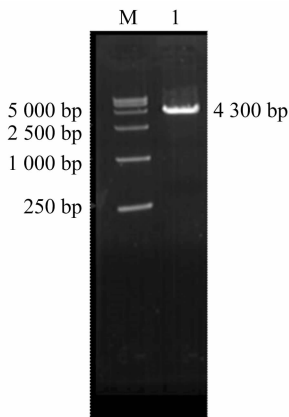


M—DNA 分子质量标准(DL15000);
1、2—Bacmid-RHDV2-VP60 酶切样品

图2 重组转移载体的鉴定

2.2 重组穿梭质粒的 PCR 鉴定

利用重组 Bacmid DNA 为模板,利用 pUC/M13 上、下游引物对重组质粒进行 PCR 扩增,结果显示扩增产物大小约为 4 300 bp (阳性大小为 2 560 bp + 目的基因),证明转座成功,重组穿梭质粒 Bacmid - SC - VP60 构建成功(图 3)。



1—DNA 分子量标准(DL15 000);
2—重组 Bacmid-SC-VP60 PCR 鉴定

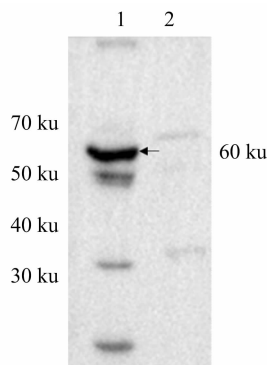
图3 重组穿梭质粒 Bacmid-SC-VP60 分析

2.3 重组兔出血症病毒 2 型 VP60 杆病毒的获得

将重组穿梭质粒 Bacmid - SC - VP60 转染昆虫细胞,培养 3 d 后,逐日观察病变情况,直至细胞出现典型变大变圆的病变特征,同时对照细胞正常生长时,收获重组兔出血症病毒 2 型 VP60 杆状病毒,命名为 rBAC - RHDV2 - VP60 株。

2.4 重组兔出血症病毒 2 型 VP60 杆状病毒的鉴定

2.4.1 Western blot 鉴定 以抗 RHDV2 特异性单抗 6B3 为一抗,结果提示重组杆状病毒接种昆虫细胞后,表达获得了特异性重组蛋白 VP60,大小为 60 ku(图 4)。同时,接种野生型杆状病毒的细胞产物无特异性条带,结果提示 VP60 蛋白获得有效表达。



1—接种重组 rBAC-RHDV2-VP60 的细胞培养物;
2—接种野生杆状病毒的细胞培养物

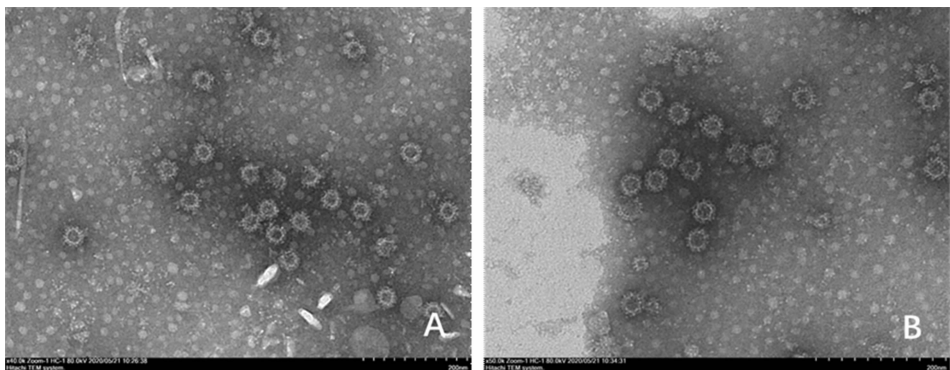
图4 RHDV2 重组 VP60 蛋白免疫印迹检测结果

2.4.2 红细胞凝集效价测定 接种重组兔出血症病毒 2 型 VP60 杆状病毒后收获细胞培养物,测定红细胞凝集效价,结果显示,表达获得的重组蛋白对人的红细胞凝集效价结果为 1 : 4 096。

2.4.3 电镜观察 重组杆状病毒接种昆虫细胞后,表达获得高水平的重组蛋白,该蛋白可形成大小约 36 nm、形态和结构类似天然病毒 RHDV2 的病毒样颗粒(图 5)。

2.5 RHDV2 SC 株 VP60 基因工程疫苗的免疫效力检测

利用 RHDV2 SC 株 VP60 基因工程疫苗和传统 RHDV WF 株 VP60 基因工程疫苗分别免疫实验兔,免疫后 21 d,攻毒兔出血症病毒 2 型 SC 株 1.0 mL (含病毒 1 000 LD₅₀),结果(表 1)显示,对照组兔全部死亡,免疫 RHDV2 SC 株 VP60 基因工程疫苗兔全部健康存活,免疫传统 RHDV WF 株 VP60 基因工程疫苗兔死亡 6 只,保护率仅为 40%。



A—RHDV2 天然病毒样本；B—重组 VP60 蛋白样本
图5 电镜分析 RHDV2 病毒及重组 VP60 蛋白

表 1 疫苗免疫保护效果检测(SC 株攻毒)

免疫组	死亡数/攻毒数 (只)
RHDV2 SC 株 VP60 基因工程疫苗	0/10
传统 RHDV WF 株 VP60 基因工程疫苗	6/10
生理盐水	10/10

免疫后 21 d, 攻毒兔出血症病毒 1 型 WF 株 1.0 mL(含病毒 1 000 LD₅₀), 结果(表 2)显示, 免疫传统 RHDV WF 株 VP60 基因工程疫苗兔全部健康存活, 对照组兔全部死亡; 免疫 RHDV2 SC 株 VP60 基因工程疫苗兔死亡 7 只, 保护率仅为 30%。结果说明 RHDV2 SC 株 VP60 基因工程疫苗能够有效保护兔出血症病毒 2 型 SC 株的攻击, 而传统 RHDV 型 WF 株疫苗不能对国内流行毒株 RHDV2 SC 毒株产生有效的免疫保护, RHDV2 SC 株 VP60 基因工程疫苗也不能对国内传统 RHDV 毒株产生有效的免疫保护, 两型毒株间交叉保护作用较低。

表 2 疫苗免疫保护效果检测(WF 株攻毒)

免疫组	死亡数/攻毒数 (只)
RHDV2 SC 株 VP60 基因工程疫苗	0/10
传统 RHDV WF 株 VP60 基因工程疫苗	7/10
生理盐水	10/10

3 讨论与结论

当前新型 RHDV2 毒株已经在全国多地流行和暴发, 变异毒株与 RHDV 传统毒株在遗传特性、免疫保护相关基因、对宿主的易感性等方面均发生了高度的变异^[13], 新型毒株能够逃逸传统毒株诱导的宿主免疫应答, 且与 RHDV 传统毒株相比, 新型毒株感染宿主谱更广, 并出现了跨宿主传播的现象。

RHDV 具有高度变异的特点, 同时也具有毒株间高频的基因重组特性, 因此, 该病毒对公共卫生安全存在重大的潜在威胁, 加强病毒的监测对维护养兔生产和公共卫生安全具有重要的意义。

兔出血症以高发病率高死亡率为特征, 死亡率高达 90%^[14-15]。自 2010 年 RHDV2 首次在法国报道后, 研究已证实经典型 RHDV 的疫苗不能够对 RHDV2 毒株提供有效的交叉保护作用, 因此急需研制高效的针对我国流行毒株 RHDV2 型的疫苗。研究构建重组 RHDV2 SC 毒株 VP60 杆状病毒, 并以此重组杆状病毒为疫苗毒种, 制备获得了兔 RHDV2 SC 株 VP60 基因工程疫苗。疫苗的免疫效力实验结果显示, RHDV2 SC 株 VP60 基因工程疫苗对 RHDV2 的保护效力为 100%, 具有良好的免疫效力。然而免疫传统 RHDV WF 株 VP60 基因工程疫苗的保护率仅为 40%, 本研究研制的基因工程疫苗对防控我国目前流行的 RHDV2 型毒株方面具有重要的意义, 能够保证我国兔产业的健康发展。

参考文献:

[1] Abrantes J, vander Loo W, le Pendu J, et al. Rabbit haemorrhagic disease (RHD) and rabbit haemorrhagic disease virus (RHDV): a review[J]. Vet Res, 2012, 43: 12.

[2] Meyers G, Wirblich C, Thiel H J. Genomic and subgenomic RNAs of rabbit hemorrhagic disease virus are both protein - linked and packaged into particles[J]. Virology, 1991, 184(2): 677 - 686.

[3] le Pendu J, Abrantes J, Bertagnoli S, et al. Proposal for a unified classification system and nomenclature of lagoviruses[J]. J Gen Virol, 2017, 98(7): 1658 - 1666.

[4] Dalton K P, Podadera A, Granda V, et al. ELISA for detection of variant rabbit haemorrhagic disease virus RHDV2 antigen in liver extracts[J]. J Virol Methods, 2018, 251: 38 - 42.

[5] le Gall - Recule G, Lavazza A, Marchandau S, et al. Emergence of a new lagovirus related to rabbit haemorrhagic disease virus[J]. Vet Res, 2013, 44: 81.

胡玉婷,凌俊,江河,等. 中华绒螯蟹 4 个养殖群体遗传多样性与遗传结构分析[J]. 江苏农业科学,2022,50(16):54-59.
doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2022.16.009

中华绒螯蟹 4 个养殖群体遗传多样性与遗传结构分析

胡玉婷,凌俊,江河,汪焕,潘庭双,周华兴

(安徽省农业科学院水产研究所/水产增养殖安徽省重点实验室,安徽合肥 230031)

摘要:分析中华绒螯蟹养殖群体的遗传多样性和遗传结构,可为中华绒螯蟹的遗传改良及新品种培育提供科学依据。研究采用微卫星标记对偶数年江苏、安徽 4 个主要养殖群体的遗传特征进行分析。10 个微卫星位点在 4 个群体中均表现出高度的遗传多样性,有效等位基因数(N_e)为 9.810~11.660、预期杂合度(H_e)为 0.904~0.918、多态信息含量(PIC)为 0.874~0.891。综合遗传多样性大小为无为群体>张家港群体>高淳群体>宜兴群体;成对群体间的遗传距离较小(<0.3)、遗传分化指数(<0.05)均较低,分子变异分析中高达 99.58% 遗传变异来自群体内;结构分析显示,所有个体可分为 4 个遗传组,但每个养殖群体中均包含 4 个遗传组。群体系统进化树显示,高淳和张家港群体最先聚类为一支,互为姊妹群,然后依次与无为群体、宜兴群体聚类。中华绒螯蟹 4 个养殖群体遗传多样性水平高,群体间无显著遗传分化,群体间可能存在种质混杂。

关键词:中华绒螯蟹;遗传多样性;微卫星;养殖群体;遗传结构

中图分类号: S917;S966.16 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002-1302(2022)16-0054-06

中华绒螯蟹(*Eriocheir sinensis*)别称河蟹,俗称大闸蟹,是我国久负盛名的名贵水产品,自然分布于我国长江、黄河、辽河和瓯江等河川及附近地区^[1-4]。20 世纪 80 年代初,随着河蟹育苗技术的

突破和养殖技术的开发和推广,我国河蟹养殖进入前所未有的崭新阶段,产量逐年增加,已成为世界首个产蟹大国,同时从蟹苗一直到成蟹培育,全部采用人工方法,这在世界上也是绝无仅有的^[1]。目前,中华绒螯蟹养殖已遍布我国从辽宁至浙江的各沿海省份及广大内陆地区,是我国最重要的经济养殖蟹类,2020 年全国养殖总产量为 77.6 万 t^[5]。但随着中华绒螯蟹养殖产业的规模化发展,跨流域引种和增殖放流等生产活动,造成不同水系中华绒螯蟹种质资源严重混杂和养殖性能退化,尤其受利益

收稿日期:2021-08-28

基金项目:国家现代农业产业技术体系建设专项(编号:CARS-48);安徽省水产产业技术体系项目(编号:AHCYJSTX-08);安徽省农业科学院团队项目(编号:2020YI038)。

作者简介:胡玉婷(1986—),女,河南商丘人,博士,副研究员,主要从事水产动物遗传育种研究。E-mail:huyuting1021@126.com。

[6] Ben C F, Lopes A M, Corte - Real J V, et al. Multiple introductions of rabbit hemorrhagic disease virus Lagovirus europaeus/GI. 2 in Africa[J]. Biology (Basel), 2021, 10(9).

[7] Ambagala A, Schwantje H, Laurendeau S, et al. Incursions of rabbit haemorrhagic disease virus 2 in Canada - Clinical, molecular and epidemiological investigation[J]. Transbound Emerg Dis, 2021, 68(4):1711-1720.

[8] Mahar J E, Hall R N, Peacock D, et al. Rabbit hemorrhagic disease virus 2 (RHDV2; GI. 2) is replacing endemic strains of RHDV in the Australian Landscape within 18 Months of its arrival[J]. J Virol, 2018, 92(2).

[9] Hu B, Wei H, Fan Z, et al. Emergence of rabbit haemorrhagic disease virus 2 in China in 2020[J]. Vet Med Sci, 2021, 7(1):236-239.

[10] 魏后军,胡波,范志宇,等. 兔出血症病毒 2 型的分离鉴定与序列分析[J]. 江苏农业学报, 2020, 36(2):404-409.

[11] Chen M, Fan Z, Hu B, et al. Pathogenicity of the newly emerged

Lagovirus europaeus GI. 2 strain in China in experimentally infected rabbits[J]. Vet Microbiol, 2022, 265:109311.

[12] Song Y, Fan Z, Zuo Y, et al. Binding of rabbit hemorrhagic disease virus - like particles to host histo - blood group antigens is blocked by antisera from experimentally vaccinated rabbits[J]. Arch Virol, 2017, 162(11):3425-3430.

[13] Abrantes J, Droillard C, Lopes A M, et al. Recombination at the emergence of the pathogenic rabbit haemorrhagic disease virus Lagovirus europaeus/GI. 2[J]. Sci Rep, 2020, 10(1):14502.

[14] Capucci L, Cavadini P, Schiavitto M, et al. Increased pathogenicity in rabbit haemorrhagic disease virus type 2 (RHDV2) [J]. Vet Rec, 2017, 180(17):426.

[15] Elsworth P, Cooke B D, Kovaliski J, et al. Increased virulence of rabbit haemorrhagic disease virus associated with genetic resistance in wild Australian rabbits (*Oryctolagus cuniculus*) [J]. Virology, 2014, 464/465:415-423.