



西北农林科技大学

硕士 学位 论文

猪轮状病毒 VP8 截短蛋白纳米颗粒亚单位疫苗
的研制及免疫原性测定

专业学位类别： 兽医硕士
领域名称： 兽医
论文作者： 彭凤巧
指导教师： 周宏超 副教授
论文提交时间： 2024 年 05 月

Thesis Submitted to Northwest A&F University
in Partial Fulfillment of the Requirements
for the Professional Degree of
Master of Veterinary Medicine

Preparation and immunogenicity determination of porcine rotavirus VP8 truncated protein nanoparticle subunit vaccine

Degree Type: Veterinary Medicine

Field: Master of Veterinary Medicine

Candidate: Peng Feng-Qiao

Supervisor: A.P. Zhou Hong-Chao

Date of submission: May,2024

College

Northwest A&F University

分类号：S855.3

学校代码：10712

UDC：636.9

研究生学号：2021055539

密级：公开

西北农林科技大学硕士学位论文

猪轮状病毒 VP8 截短蛋白纳米颗粒亚单位疫苗 的研制及免疫原性测定

论文作者：彭凤巧

指导教师：周宏超 副教授

答辩委员会：

西北农林科技大学食品科学与工程学院 王 新 教 授（主席）

西北农林科技大学动物医学院 萧 飚 教 授（委员）

西北农林科技大学动物医学院 张淑霞 副教授（委员）

西北农林科技大学动物医学院 刘海金 副教授（委员）

西北农林科技大学动物医学院 窦磊娜 副教授（委员）

西北农林科技大学动物医学院 冶冬阳 讲 师（秘书）

答辩日期：2024 年 05 月 24 日

摘要

猪轮状病毒（Porcine rotavirus, PoRV）是引起新生仔猪和断奶仔猪腹泻的流行性疾病。以 1 周龄仔猪最易感，可引起腹泻、呕吐等症状，病情严重的仔猪可引起死亡，对生猪产业造成巨大经济损失。随着疫苗的使用与猪轮状病毒不断变异，市场亟需新型疫苗。PoRV VP4蛋白可在胰蛋白酶作用下裂解成2个亚单位蛋白，VP8（1~231aa）和VP5（248~776aa）。其中VP8 包含了VP4 的主要抗原位点，在VP4 特异性中和反应中起到关键作用，且VP8片段具有很高的基因型特异性，是一种潜在的候选疫苗，对PoRV的诊断、研制亚单位疫苗方面以及抗病毒药物的研究等方面意义相当重要。纳米颗粒因能更好地被机体识别和捕获，已被广泛应用于疫苗开发、药物呈递等领域。本研究通过构建PoRV VP8截短蛋白（65~231aa）重组质粒，制备PoRV VP8*铁蛋白纳米颗粒亚单位疫苗，并对其免疫原性进行研究，相关结果如下：

1. PoRV VP8*重组质粒的构建：筛选PoRV菌株三个流行P基因型的序列P[7]、P[13]和P[23]，通过原核表达系统成功构建了重组质粒pET28a-spt-VP8*P7、pET28a-spt-VP8*P13和 pET28a-spt-VP8*P23。
2. PoRV VP8*重组蛋白的表达与纯化：将构建成功的PoRV重组表达质粒pET28a-spt-VP8*P7、pET28a-spt-VP8*P13、pET28a-spt-VP8*P23与本实验室保存的pET28a-spc-Ferritin质粒一起进行诱导表达，用 Ni-NTA亲和层析成功纯化出了VP8*P7、VP8*P13、VP8*P23和铁蛋白（Ferritin）。
3. PoRV VP8*铁蛋白纳米颗粒的组装与表征分析：通过SpyCatcher/SpyTag系统对纯化出的猪轮状病毒 VP8*P7、VP8*P13、VP8*P23和 Ferritin 进行组装，对组装后的VP8*铁蛋白纳米颗粒通过透射电镜、高效液相色谱、动态光散射等方法进行表征分析，成功组装出了高纯度、结构清晰的VP8*P7-Ferritin、VP8*P13-Ferritin 和VP8*P23-Ferritin纳米颗粒。
4. PoRV VP8*铁蛋白纳米颗粒亚单位疫苗的免疫原性分析：将VP8*P7-Ferritin、VP8*P13-Ferritin、VP8*P23-Ferritin纳米颗粒与VP8*P7、VP8*P13和VP8*P23蛋白分别配伍佐剂免疫小鼠，同时设立Ferritin和生理盐水作为阴性对照。结果显示试验组疫苗免疫后均能产生相应的免疫反应，组装后的VP8*P7-Ferritin、VP8*P13-Ferritin、VP8*P23-Ferritin纳米颗粒免疫组免疫效果强于VP8*P7、VP8*P13和VP8*P23免疫组，将三个VP8*蛋白1:1:1混匀后得到的三价纳米颗粒疫苗免疫原性与其它试验组疫苗相比具有显著优越性。

综上，本试验成功构建了PoRV P[7]、P[13]和P[23] 三个基因型的pET28a-VP8*重组质粒，利用SpyCatcher/SpyTag系统与Ferritin组装得到了高纯度的VP8*P7-Ferritin、VP8*P13-Ferritin和VP8*P23-Ferritin纳米颗粒。将其配伍佐剂免疫小鼠后，能诱导高水平的体液和细胞免疫反应。表明基于Ferritin的猪轮状病毒纳米颗粒疫苗是一种有前途的疫苗，为猪轮状病毒疫苗的研发提供了新的思路和依据。

关键词：猪轮状病毒；VP8蛋白；铁蛋白纳米颗粒；免疫原性

ABSTRACT

Porcine rotavirus (PoRV) is an epidemic disease that causes diarrhea in newborn and weaned piglets. Piglets at the age of 1 week are the most susceptible, which can cause diarrhea, vomiting and other symptoms, and piglets with severe illness can cause death, causing huge economic losses to the pig industry. With the use of vaccines and the continuous mutation of porcine rotavirus, the market is in urgent need of new vaccines. The PoRV VP4 protein can be cleaved by trypsin into two subunit proteins, VP8 (1~231aa) and VP5 (248~776aa). VP8 contains the main antigenic site of VP4, which plays a key role in the specific neutralization reaction of VP4. Moreover, VP8 fragment has high genotype specificity, and is a potential vaccine candidate, which is of great significance for the diagnosis of PoRV, the development of subunit vaccines and the research of antiviral drugs. Because nanoparticles can be better recognized and captured by the body, they have been widely used in vaccine development, drug presentation and other fields. In this study, PoRV VP8 truncated protein (65~231aa) recombinant plasmid was constructed to prepare PoRV VP8* ferritin nanoparticle subunit vaccine, and its immunogenicity was studied. Relevant results are as follows:

1. Construction of PoRV VP8* recombinant plasmid: The sequences P[7], P[13] and P[23] of the three prevalent P genotypes of PoRV strain were screened, and the recombinant plasmids pET28a-spt-VP8*P7, pET28a-spt-VP8*P13 and pET28a-spt-VP8*P23 were successfully constructed by prokaryotic expression system.
2. Expression and purification of PoRV VP8* recombinant protein: The constructed PoRV recombinant expression plasmids pET28a-spt-VP8*P7, pET28a-spt-VP8*P13 and pET28a-spt-VP8*P23 were induced and expressed together with the pET28a-spc-Ferritin plasmid preserved in our laboratory. VP8*P7, VP8*P13, VP8*P23 and Ferritin were successfully purified by Ni-NTA affinity chromatography.
3. Assembly and characterization of PoRV VP8* ferritin nanoparticles: The purified porcine rotavirus VP8*P7, VP8*P13, VP8*P23 and Ferritin were assembled by SpyCatcher/SpyTag system, and the assembled VP8* ferritin nanoparticles were characterized and analyzed by transmission electron microscopy, high performance liquid chromatography, dynamic light scattering and other methods. VP8*P7-Ferritin, VP8*P13-Ferritin and VP8*P23-Ferritin nanoparticles with high purity and clear structure were successfully assembled.

4. Immunogenicity analysis of PoRV VP8* ferritin nanoparticle subunit vaccine: VP8*P7-Ferritin, VP8*P13-Ferritin, VP8*P23-Ferritin nanoparticles and VP8*P7, VP8*P13 and VP8*P23 proteins were combined with adjuvants to immunize mice, and Ferritin and saline were used as negative controls. The results showed that all the experimental groups could produce corresponding immune response after immunization, and the immune effect of assembled VP8*P7-Ferritin, VP8*P13-Ferritin, VP8*P23-Ferritin nanoparticle immune groups was stronger than that of VP8*P7, VP8*P13 and VP8*P23 immune groups. The immunogenicity of the trivalent nanoparticle vaccine obtained by mixing three VP8* proteins 1:1:1 was significantly superior to that of other experimental group vaccines.

In conclusion, pET28a-VP8* recombinant plasmid of PoRV P[7], P[13] and P[23] genotypes was successfully constructed in this experiment. VP8*P7-Ferritin, VP8*P13-Ferritin and VP8*P23-Ferritin nanoparticles with high purity were obtained by using SpyCatcher/SpyTag system and Ferritin. After immunizing mice with adjuvants, it can induce high levels of humoral and cellular immune responses. The results showed that the porcine rotavirus nanoparticle vaccine based on Ferritin was a promising vaccine, which provided a new idea and basis for the research and development of porcine rotavirus vaccine.

KEY WORDS: Porcine rotavirus; VP8* protein; Ferritin nanoparticles; immunogenicity

目 录

文献综述.....	1
第一章 猪轮状病毒及疫苗的研究进展	1
1.1 猪轮状病毒概述.....	1
1.2 猪轮状病毒疫苗的研究进展.....	5
1.3 研究目的及意义.....	8
试验研究.....	10
第二章 猪轮状病毒 VP8*蛋白的原核表达与纯化	10
2.1 材料.....	10
2.2 方法.....	11
2.3 结果.....	15
2.4 讨论.....	19
2.5 小结.....	20
第三章 猪轮状病毒 VP8*铁蛋白纳米颗粒的组装与表征分析	21
3.1 材料.....	21
3.2 方法.....	21
3.3 结果.....	24
3.4 讨论.....	28
3.5 小结.....	28
第四章 猪轮状病毒 VP8*铁蛋白纳米颗粒亚单位疫苗免疫原性分析	30
4.1 材料.....	30
4.2 方法.....	31
4.3 结果.....	35
4.4 讨论.....	38
4.5 小结.....	39
结论.....	40
创新点.....	40
参考文献.....	41
附录.....	47

文献综述

第一章 猪轮状病毒及疫苗的研究进展

1.1 猪轮状病毒概述

猪轮状病毒（Porcine rotavirus, PoRV）属于呼肠孤病毒科（Reovirus family）轮状病毒属（Genus Rotavirus），是引起仔猪腹泻和呕吐的传染性疾病(Marthalier et al. 2013; Molinari et al. 2016)。根据 VP6 蛋白的测序，可将猪轮状病毒分为 A、B、C、H 四个群，我国主要流行的是 A 群和 C 群，其中 A 群猪轮状病毒（PoRVA）的流行率最高 (Matthijssens et al. 2012; 陈建飞 et al. 2023)。PoRV 可感染所有年龄的猪只，尤其是哺乳仔猪和断奶仔猪。自 1974 年，PoRV 首次从猪粪便中分离出来，已成为一种全球性流行病，引起新生仔猪的肠道疾病，对养猪业造成严重经济损失(Homwong et al. 2016)。

PoRV 感染后的临床症状表现和流行病学特点与猪流行性腹泻病毒（PEDV）、猪德尔塔冠状病毒（PDCoV）、猪传染性肠胃炎病毒（TGEV）相似，常表现为混合感染和继发感染，增加仔猪发病率和死亡率，容易被忽视或误诊，对仔猪的诊疗造成阻碍(Zhang et al. 2024; 施开创 et al. 2020; 张婧旭 et al. 2021)。目前国内没有单独针对猪轮状病毒有效的治疗药物和治疗方案，除了加强日常饲养管理外，关键还是通过疫苗免疫对 PoRV 进行预防。因此，亟需新型 PoRV 疫苗对疾病进行防控。

1.1.1 猪轮状病毒的结构特征

PoRV 病毒外观呈球形，是具有二十面体对称的衣壳结构。PoRV 内部中央是高电子密度的病毒髓芯，中间层是病毒的内衣壳，由 60 个~100 个带有球状末端的钉状物辐射排列构成；外层是病毒的外衣壳，由约 20 nm 的膜状结构组成，轮状病毒在电子显微镜下观察成车轮状(Stannard et al. 1977; 王小奎 2022)。RV 壳体由三个同心蛋白质层组成，感染性病毒粒子是一种非包膜、二十面体、三层颗粒（TLP），直径约 100 nm，当通过电子显微镜观察时类似于轮子(Prasad et al. 1988; Settembre et al. 2011)。如图 1-1，内核由 60 个不对称的 VP2 蛋白二聚体（102 kDa）组成的 T=1 衣壳构成的单层颗粒（SLP），包裹 11 个 dsRNA 基因组片段，并在五聚体对称位置与 RNA 依赖的 RNA 聚合酶 VP1（125 kDa）和 RNA 盖帽酶 VP3（88 kDa）相关；SLP 被 260 个梨形 VP6 三聚体（45 kDa）形成的厚 T=13 层包围，形成所谓的双层粒子（DLP）；三层颗粒（TLP）的外层由 60 个三聚体 VP4（88kDa）尖峰和 260 个 VP7（37kDa）三聚体糖蛋白组成(Asensio-Cob et al. 2023)。

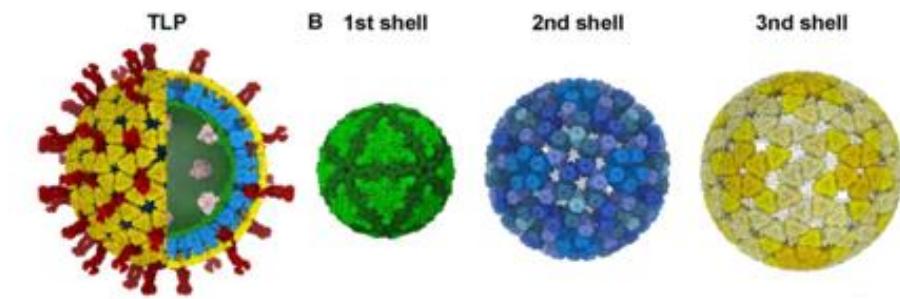


图 1-1 PoRV 颗粒结构示意图(Asensio-Cob et al. 2023)
Fig 1-1 PoRV particle structure diagram(Asensio-Cob et al. 2023)

1.1.2 猪轮状病毒的蛋白组成

猪轮状病毒为无包膜的双链 RNA 病毒 (dsRNA)，基因组有 11 个片段，编码 6 个结构病毒蛋白 (VP1~VP4、VP6 和 VP7) 和 5 个非结构病毒蛋白 (NSP1~NSP5/6) (McNulty 1978; Theil et al. 1985)。

VP1~VP3 是病毒基因转录和复制过程中不可或缺的蛋白，包裹着轮状病毒基因组 RNA(Theuns et al. 2015)。VP4 蛋白为非糖基化蛋白，是一种二聚体结构，它主要形成病毒的刺突，可抵抗病毒入侵与病毒黏附、侵入和血凝性相关，当 VP4 被酶裂解后可增强病毒的感染能力，可以被裂解为 VP5 (60kDa) 和 VP8 (28kDa) (Ludert et al. 2002)。VP5 蛋白可以使细胞膜的渗透性增加，促进病毒进入细胞内，VP8 蛋白可以与聚糖受体相互作用，促进病毒附着，对病毒进入至关重要的 VP4 蛋白可能是疫苗抗原的良好候选者(Pérez Filgueira et al. 2004; Song 2021)。

VP8 蛋白通过一段柔性肽与插入蛋白基座部分的 N 端 α 螺旋相连，以维持 VP4 蛋白结构的稳定；VP8 蛋白结构中的一个特殊的凹槽结构可以与细胞表面的唾液酸受体结合从而介导轮状病毒的吸附，包含了 VP4 蛋白的主要抗原位点(汤学超 2023)。VP8 蛋白在同血清型间高度保守，可激发同型保护，是抗猪轮状病毒的重要靶点(毕艳铎 et al. 2015)。

VP6 为 RV 群抗原，具有抗原特异性；VP7 高度保守，为病毒外膜的重要糖蛋白和主要中和抗原(Du et al. 2022)。非结构蛋白 (NSP1~NSP6) 与病毒的复制、合成、表达有关(Pesavento et al. 2006)。此外，NSP4 会产生肠毒素，从而促进病毒发病机制 (Lorrot et al. 2007)。病毒结构特征如图 1-2，最内层是 RNA 聚合酶 VP1 和加帽酶 VP3；中间层分别为 VP6 和 VP2 蛋白；最外层为 VP7 和 VP4 蛋白(Stannard et al. 1977)。

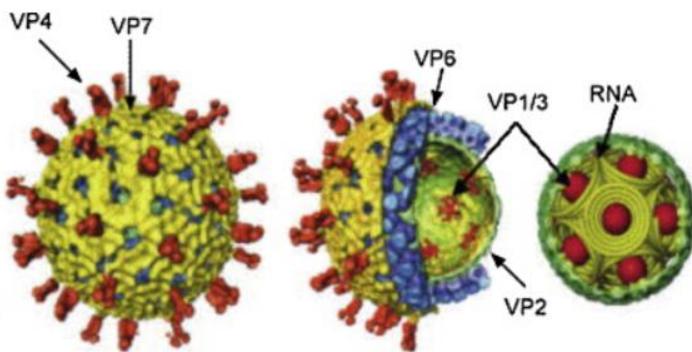


图 1-2 PoRV 蛋白组成(Jayaram et al. 2004)

Fig 1-2 Protein composition of PoRV(Jayaram et al. 2004)

1.1.3 猪轮状病毒流行病学

1974 年, Woode 和 Bridge 首次在英国从猪体内分离出轮状病毒(Ryu et al. 2021)。随后, 在世界各地的猪体内中发现了多种 PoRV 的基因型(J et al. 2008)。A 组轮状病毒是引起仔猪急性脱水性腹泻的最重要的轮状病毒种类, 猪 RVA 因其对养猪业的经济影响而被认为是重要的腹泻病原体(K et al. 2017)。中国于 1982 年首次分离到了猪轮状病毒, 随后在全国范围内开始流行, 现如今猪轮状病毒检出率最高的为东北地区, 其次为西南、华南和华北地区(汤学超 2023)。

PoRV 具有复杂的流行病学、致病性和高度的遗传多样性, 多与其它猪腹泻性病毒如 TGEV、PEDV 和 PDCoV 等发生混合感染, 从而导致仔猪的死亡(左媛媛 et al. 2022)。PoRV 传播的主要途径是通过粪口接触, 且病毒对外界环境有顽强的抵抗力, 使轮状病毒在成猪、仔猪之间反复循环感染; 猪轮状病毒长期扎根猪场, 人和其他动物也可散播传染(Zhang et al. 2024)。PoRV 多发生在秋冬季节, 潮湿、应激和寒冷是导致猪轮状病毒的发生率升高的主要原因, 可导致仔猪和断奶仔猪腹泻, 对母猪和育肥猪的感染多呈隐性感染, 在我国的许多养猪场中普遍存在(毛黎红 2015; 王小奎 2022)。

基于外衣壳 VP4 (P 基因型) 和 VP7 (G 基因型) 编码基因, 建立了猪轮状病毒的二元分类系统(Matthijnssens et al. 2008)。PoRV 的两种外衣壳蛋白 VP7 和 VP4 诱导独立的中和抗体, 并用于将病毒分别分类为不同的 G 和 P 类型(Desselberger 2014)。单一的 P 型猪轮状病毒与多种 G 型猪轮状病毒结合可以诱导交叉中和保护(López et al. 2004)。

迄今为止, 共在人类和动物中鉴定出 36 种不同的 G 基因型和 51 种 P 基因型的 RVA; 在猪中鉴定出 RVA 的 12 个 G 基因型 (G1-G6, G8-G12 和 G26) 和 16 个 P 基因型 (P[1]-P[8], P[13], P[19], P[23], P[26]-P[28], P[32] 和 P[34]) (Vlasova et al. 2017)。P[5]、P[6]、P[7]、P[13]、P[23] 和 P[28] 在历史上被认为是猪中最常见的 P 基因型, 通常与 G3、G4、G5、G9 和 G11 相关(Okitsu et al. 2011; Vlasova et al. 2017)。

2022 年从 23 个省份收集的疑似 PoRVA 阳性样本进行了全国性流行病学调查，结果表明 PoRVA 在中国不同地区广泛存在，其中 P[13] 和 P[23] 以及 P[7] 的比例达 90%，为 PoRVA 的流行毒株(Qiao et al. 2024b)。此外，一些 PoRVA 菌株在 VP7、VP4 和 VP6 基因与人类轮状病毒 (RV) 菌株之间表现出显著的同源性，表明猪存在感染人类 RV、与人来 RV 毒株重组的可能性(Qiao et al. 2024a)。根据 VP4 的遗传相关性，参考菌株的各种 P 基因型的序列来自 GenBank，采用 MEGA-11 软件的邻接法 (N-J)，利用 VP4 基因组序列构建了系统发育树 (图 1-3)，根据 1000 次重复的对齐计算引导值。

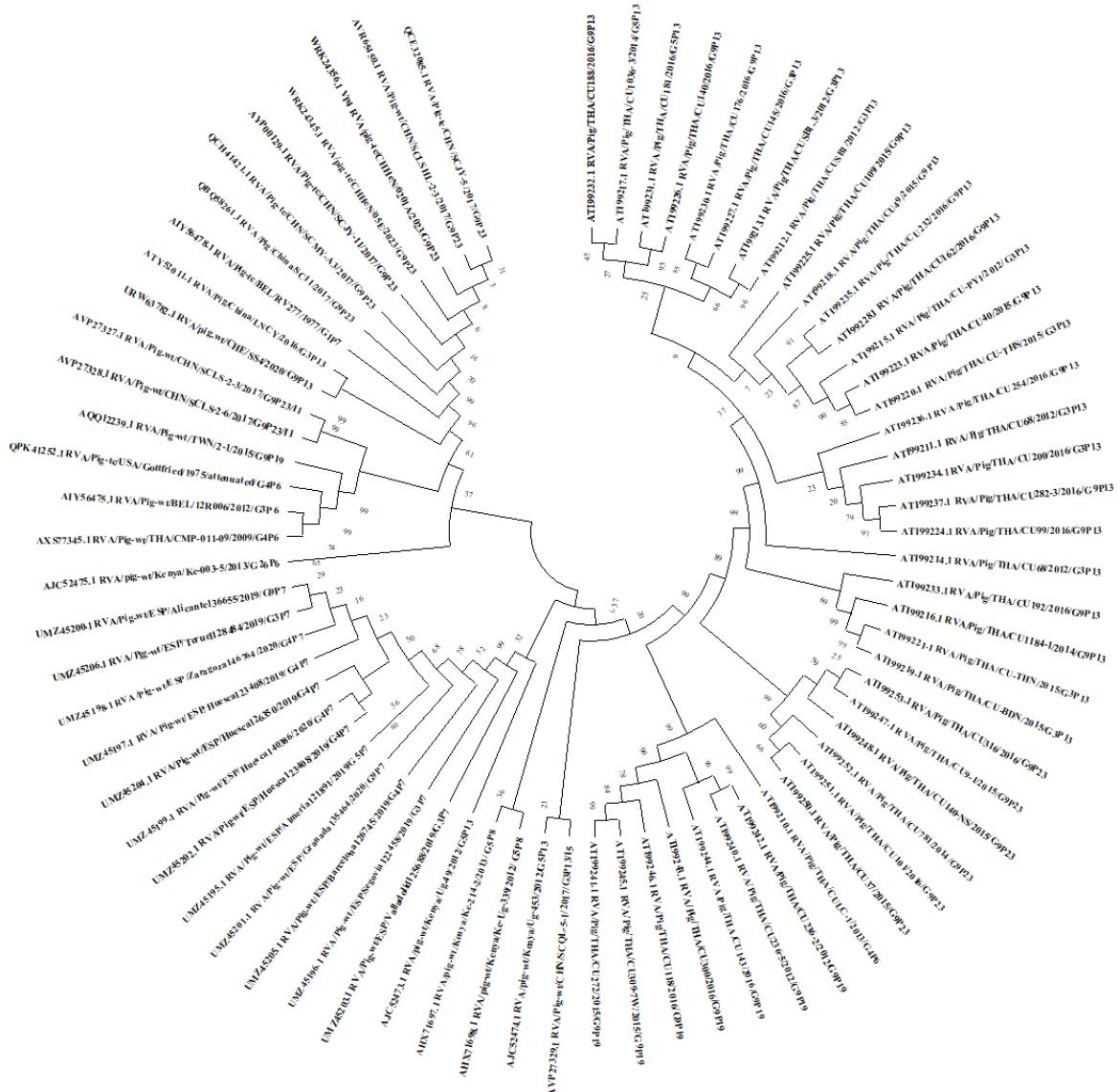


图 1-3 PoRV VP4 遗传进化树

Fig 1-3 PoRV VP4 genetic evolutionary tree

1.1.4 猪轮状病毒致病机制

PoRV 感染哺乳动物小肠绒毛上的肠细胞，主要是小肠绒毛顶部的成熟肠细胞，

其次是盲肠和结肠的成熟上皮细胞，感染后可以观察到空泡化、上皮丢失和隐窝增生。这些细胞的感染会导致营养吸收受损，并引发呕吐、腹泻、体重减轻、食欲不振等症状，甚至可能死亡(Boschuijzen et al. 2003; T et al. 2019; Vlasova et al. 2017)。猪轮状病毒发病机制是：上皮细胞破坏后吸附不良、绒毛局部坏死、病毒性肠毒素 NSP4 的作用以及肠神经系统的激活(Chattopadhyay et al. 2013; Lundgren et al. 2000)。PoRV 可以感染肠道内的肠嗜铬细胞，激活迷走神经传入神经，刺激控制呕吐的脑干结构，引起呕吐(Huang et al. 2012)。

PoRV 介导的损伤表现为肠绒毛缩短，微绒毛稀疏、不规则，固有层单核细胞浸润，包括肠细胞破坏引起的吸收不良、绒毛缺血、受感染上皮细胞释放血管活性物质的神经调节性释放(Estes et al. 2001)。非结构蛋白 4 (NSP4) 通过作为肠毒素和分泌激动剂诱导年龄和剂量依赖性腹泻反应，以刺激细胞膜通透性并改变上皮屏障的完整性(图 1-4)，在临幊上主要表现为水样腹泻，仔猪因为水和电解质的大量流失，水盐平衡受到破坏，进而导致死亡(Theuns et al. 2015; Vlasova et al. 2017)。

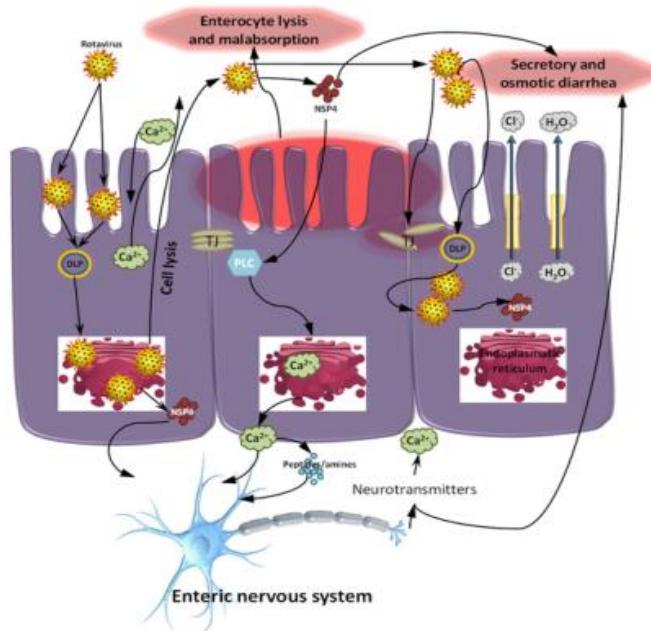


图 1-4 猪轮状病毒发病机制(Vlasova et al. 2017)

Fig 1-4 Mechanisms of porcine rotavirus pathogenesis(Vlasova et al. 2017)

1.2 猪轮状病毒疫苗的研究进展

1.2.1 猪轮状病毒传统疫苗

传统疫苗，包括灭活疫苗及弱毒疫苗等，这些疫苗在猪轮状病毒的防控中起着重要作用。目前国内市场销售的 PoRV 疫苗，是哈尔滨兽医研究所冯力等人以 G5 型的 PoRV NX 毒株为基础研发的 TGEV-PEDV-PoRV 三联活疫苗(陈建飞 et al. 2010)。虽然

我国猪轮状病毒的 G5 型随着疫苗的使用得到了有效控制，但 G9 型轮状毒株却呈现逐年增多的趋势，在 2018 年-2021 年对中南地区的腹泻调查指出 G9 是优势基因型(Li et al. 2022a)。由于不同地区的分离株的基因型不同，现有 G5 疫苗的保护效果变差(梁丹 et al. 2022)。

由于灭活疫苗具有制备过程简捷、安全有效、易于保存运输、大规模生产成本低，在疫情暴发时能及时制备出大量疫苗以控制病毒传播，是我国最先研究开发的疫苗类型。但轮状病毒是消化道病毒，通过灭活疫苗对动物体进行免疫不能很好地诱导黏膜抗体 SIgA 的产生，且由于灭活苗免疫原性差，免疫剂量大，免疫效果不理想，无法区分野毒感染等原因，市场上灭活苗占比较少(Wang et al. 2016)。弱毒疫苗可以很好诱导黏膜免疫，具有免疫剂量小、持续时间长等优点。如韩国使用三种猪轮状病毒主要菌株 G8P[7] 174-1、G9P[23] PRG942 和 G5P[7] K71 在融合的 MA104 细胞中传代 80 次，开发了一种减毒活三价猪 A 组轮状病毒疫苗(Park et al. 2019)。弱毒苗在动物机体中也存在一定的局限，比如存在毒性返强等危险，接种后可能对动物体产生一定的威胁(Johansen et al. 1997)。

1.2.2 猪轮状病毒新型疫苗

目前常见的新型疫苗可分为基因工程疫苗、亚单位疫苗、核酸疫苗和载体疫苗等。相较于传统疫苗，新型疫苗的组成成分更加单一，在体内刺激机体产生的免疫反应更趋向于自然感染状态。

1.2.2.1 核酸疫苗

核酸疫苗因为成本低、制作简易、无毒力反复的风险且能免疫效果较长等优点成为了新型疫苗研发的重要方向，但免疫原性相对较弱，需要配合佐剂来增强免疫效果。核酸疫苗是利用基因工程方法将目的蛋白的外源基因导入机体，并诱导机体产生特异性免疫反应。如构建共表达猪轮状病毒 VP7 蛋白和 PEDV S 蛋白的重组 DNA 疫苗(Yin et al. 2019)。利用鼠伤寒沙门氏菌 χ 4550 减毒菌株，搭载轮状病毒非结构蛋白 4 (NSP4) 和 VP7 基因，构建针对猪轮状病毒的重组质粒 DNA 疫苗(Cui et al. 2013)。

1.2.2.2 基因工程疫苗

猪轮状病毒基因工程疫苗是通过基因工程技术将病毒本身的基因进行敲除或替换。如使用反向遗传系统将减毒 PEDV 菌株 YN150 基因组中的整个开放阅读框 3 (ORF3) 替换为 PoRV VP7 基因来构建重组病毒，开发了一种针对 PEDV 和 PoRV 的基因工程二价疫苗(Li et al. 2022b)。

1.2.2.3 亚单位疫苗

猪轮状病毒的亚单位疫苗是指将诱导猪轮状病毒产生中和抗体的抗原基因利用分子生物学技术插入到可以表达外源基因的载体中来表达目的蛋白(李封赛 2022)。亚单

位疫苗向被免疫个体的免疫系统传递的是病毒的非致病性抗原，并在生产中能够得到大量的目的蛋白，具有安全无副作用、免疫效果持久和免疫效果易区分等特点，但是亚单位疫苗免疫原性低，单独免疫效果不佳，需配伍佐剂使用(汤学超 2023)。亚单位疫苗作为非复制疫苗，是应对可变基因型的一种较好选择(Tang et al. 2024)。猪轮状病毒的 VP4、VP7 蛋白是被认为最有潜力的抗原蛋白，其可刺激机体产生中和抗体是制备亚单位疫苗的首选(马俊飞等 2018)。已有研究人员尝试将猪轮状病毒蛋白与能够增强免疫原性的外源蛋白进行融合表达，如破伤风毒素 T 细胞表位 (P2)、霍乱毒素 B 亚基 (CTB)、大肠杆菌不耐热毒素 B 亚基 (LTB)、布鲁氏杆菌二氢四氢嘧啶合成酶 (BLS) 以及颗粒性蛋白鼠多瘤病毒 VP1 和截短的诺如病毒衣壳蛋白 (可形成 P 颗粒) 等(汤学超 2023)。或在昆虫细胞中表达的轮状病毒的重组外衣壳糖蛋白 (VP7) 并研究其免疫原性，可在家兔中诱导出中和抗体(Khodabandehloo et al. 2012)。表达 P[6] 和 P[8] 基因型轮状病毒的 VP4*蛋白，制备出的基于二价 VP4* 的 (P[8] + P[6]-VP4*) 亚单位疫苗，可以刺激针对各种基因型轮状病毒的中和抗体的产生(Luo et al. 2022)。

1.2.2.4 载体疫苗

载体疫苗是一种通过基因工程技术导入编码病毒有效目的抗原的基因，在宿主体内大量表达，从而诱导机体免疫应答的新型疫苗。活载体疫苗在免疫时效及高效应答等方面显著优于传统疫苗，但临床发现由于减毒或弱毒的病毒或细菌存在毒力复壮、目的片段丢失、免疫副作用等问题。目前常用的载体包括痘病毒、腺病毒、杆状病毒、乳酸菌、减毒沙门氏菌及卡介苗等(Tajnur et al. 2023)。以家蚕幼虫为研究对象，表达猪轮状病毒 A (KS14 株) 内衣壳蛋白 VP6 和外衣壳蛋白 VP7(Kato et al. 2023)。由于 PoRV 是胃肠道病毒，主要感染小肠上皮细胞，因此在局部黏膜免疫中 SIgA 诱导产生的水平对于抗病毒的过程至关重要，而口服免疫方式是刺激机体产生 SIgA 抗体的主要的方式，从而促进了口服疫苗的产生。如用 CRISPR-Cas9D10A 系统构建表达猪轮状病毒 VP4 的营养不良乳杆菌(Zhang et al. 2022)；利用烟草系统表达 PoRV 的 VP4、VP6 和 VP7 基因制备 PoRV 口服疫苗(魏欣 2016)；均可诱导小鼠产生有效的特异性抗体和黏膜免疫反应。

1.2.2.5 纳米颗粒疫苗

基于纳米结构的抗原设计可以增强免疫反应，主要是因为它可以模拟抗原物质的表面结构。与单体疫苗相比，纳米颗粒疫苗引发了更强大的中和抗体和细胞免疫反应(Ma et al. 2020)。如以诺如病毒 P 结构域结合轮状病毒的主要中和抗原部分 VP8*结构域，开发的 P24-VP8*纳米颗粒三价疫苗，在小鼠中引发了三种同源 VP8*类型的高 IgG 滴度(Xia et al. 2021)。

铁蛋白存在于动物、细菌（不包括酵母）和植物中，幽门螺杆菌铁蛋白是一种天然且安全的生物材料，是由 24 个相同的亚基组成的近球形自组装体(Nie et al. 2024)。

自 1937 年捷克科学家 Vilém Laufberger 从马脾脏中发现分离出铁蛋白以来，这种结构保守的蛋白引起了人们的极大关注(Xia et al. 2024)。基于铁蛋白的纳米颗粒疫苗是安全的，可以快速且低成本的生产，它们引发免疫反应的潜力已被证明可以抵抗多种病原体。幽门螺杆菌铁蛋白纳米颗粒已成功应用于流感和新冠，如在用流感病毒血凝素-铁蛋白融合纳米颗粒疫苗免疫后，血凝抑制抗体的滴度比小鼠灭活疫苗引起的滴度高 10 倍以上(Kanekiyo et al. 2013)；将自组装的 24-mer 铁蛋白与严重急性呼吸综合征冠状病毒 2 型 (SARS-CoV-2) 刺突 (S) 蛋白的受体结合域 (RBD) 和/或七肽重复 (HR) 亚基共价组装来开发纳米颗粒疫苗等(Ma et al. 2020)。

SpyTag/SpyCatcher 蛋白连接技术是一种共价连接两种蛋白质的通用方法。SpyTag 是一种由 13 个氨基酸组成的短肽，可与 SpyCatcher 蛋白自发反应，在标签中的天冬氨酸残基和 SpyCatcher 中的赖氨酸残基之间形成异肽键，将两者连接（图 1-5），该反应快速且特异(Zakeri et al. 2012)。之前研究表明，SpyTag/SpyCatcher 蛋白连接技术在许多领域已有不同的应用，如用原核表达系统表达 PDCoV 刺突蛋白 (RBD-二聚体) 的二聚体受体结合域，利用 SpyTag/SpyCatcher 系统构建含有 RBD-二聚体和铁蛋白 (SC-Fe) 的新型纳米颗粒，有效地在小鼠中引发了特定的体液和细胞免疫反应(Wang et al. 2024b)。

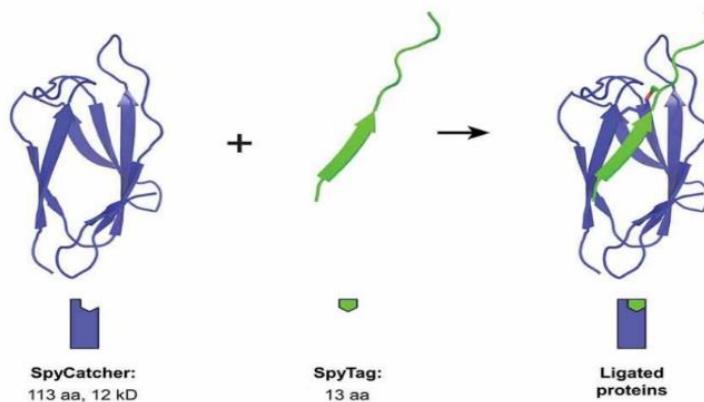


图 1-5 SpyTag/SpyCatcher 结构示意图(SJ et al. 2023)

Fig 1-5 SpyTag/SpyCatcher structure diagram (SJ et al. 2023)

1.3 研究目的及意义

猪轮状病毒可引起仔猪腹泻、呕吐，病情严重的仔猪甚至导致死亡。目前市面上并无单独的 PoRV 商品化疫苗，现有猪轮状病毒的市售疫苗多为灭活苗或弱毒疫苗的联苗，市场亟需新型猪轮状病毒疫苗。

纳米颗粒疫苗因在抗原呈递等方面具有独特优势，被广泛应用于疫苗开发。幽门螺杆菌铁蛋白与哺乳动物铁蛋白有显著差异，基本不会诱导自身抗体。基于铁蛋白纳

纳米颗粒疫苗引发的免疫反应潜力已被证明可以抵抗多种病原体，被应用于多种病毒疫苗的研发，如用流感、新冠和圆环等病毒制备的铁蛋白纳米颗粒疫苗，可以高效刺激机体产生免疫反应。

本研究选取猪轮状病毒流行 P 型基因型 P[7]、P[13]和 P[23]的 VP8*（65~231aa）为免疫原，构建 PoRV VP8*铁蛋白纳米颗粒，配伍佐剂制备纳米颗粒亚单位疫苗探究其免疫原性，为猪轮状病毒亚单位疫苗的研制提供新的思路，对猪轮状病毒的净化具有公共卫生学意义。

试验研究

第二章 猪轮状病毒 VP8*蛋白的原核表达与纯化

猪轮状病毒可引起仔猪腹泻、脱水甚至死亡(Theuns et al. 2015)。目前在猪体内已经鉴定出 12 个 G 型和 16 个 P 型，具有高度的遗传多样性，猪轮状病毒 G/P 基因型组合主要包括 G9P[7]、G3P[13]、G5P[13]、G9P[13]、G9P[23]、G1P[7]和 G9P[6] (Tao et al. 2023; Vlasova et al. 2017)。

猪轮状病毒 VP8 蛋白是 VP4 突刺蛋白的裂解产物，含有 VP4 的主要抗原结构域，在 VP4 蛋白特异性中和反应中起到关键作用，且 VP8 片段具有很高的基因型特异性，是开发猪轮状病毒亚单位疫苗的理想靶点；与全长 VP8 蛋白相比，去掉跨膜区后截短的 VP8* (65~231aa) 蛋白具有更好的可溶性(Larralde et al. 1991; López et al. 2004; Zhou et al. 1994)。原核表达系统相较于其它表达系统，具有操作简捷、可以低成本大规模生产等优点，是目前较为成熟的蛋白表达系统(Khoshnejad et al. 2018; Wang et al. 2019)。

本试验筛选现有猪轮状病毒菌株的三个流行 P 基因型 P[7]、P[13]和 P[23] 的 VP8* (65~231aa) 序列，通过原核表达系统构建 pET28a-spt-VP8*P7、pET28a-spt-VP8*P13、pET28a-spt-VP8*P23 重组质粒，与 pET28a-spc-Ferritin 一起进行诱导表达、纯化，并进行聚丙烯酰胺凝胶电泳（SDS-PAGE）鉴定。

2.1 材料

2.1.1 质粒和菌株

原核表达载体 pET28a-6His、*E.coli* 菌株 DH5α、BL21 (DE3) 由本实验室保存，pET28a-spc-Ferritin 由杨凌凯瑞生物科技有限公司保存，引物合成与测序工作由陕西擎科生物科技有限公司完成。

2.1.2 主要试剂

PrimeSTAR Max、DNA maker，购自 Takara 公司；蛋白 Marker，购自赛默飞公司；核酸染料购自泛博生化；T5 Super MIX 购自擎科生物；Lightening Cloning Master Mix 购自博奥龙生物；Quick Cut *Nde* I/Quick Cut *Xho* I 购自 NEB；通用型 DNA 纯化回收试剂盒、质粒小提试剂盒购自 TIANGEN；Kana 抗生素、IPTG、30% SDS-PAGE 制胶液购自索莱宝；无菌 PBS (PH7.2~7.4) 购自碧云天，Ni-NTA 亲和层析填料购自博格隆生物。

2.1.3 主要仪器

表 2-1 主要仪器

Table 2-1 Principal instrument

仪器名称 Instrument name	厂家 Company
PCR 仪	杭州博日
高压灭菌锅	上海申安
超净工作台	苏州安泰
制冰机	常熟雪科
水浴锅	上海精宏
超声细胞粉碎机	宁波新芝
涡旋混匀仪	德国 IKA
水平电泳仪	北京君意
垂直电泳仪	Bio-Rad
凝胶成像系统	北京君意
脱色摇床	其林贝尔
电热恒温箱	上海申贤
恒温震荡培养箱	上海曼泉
电子天平	德国赛多利斯
PH 计	上海仪电
高速离心机	湖南湘仪
高压均质机	宁波新芝
紫外分光光度计	岛津

2.1.4 主要溶液

具体配置方法见附录 A。

2.2 方法

2.2.1 重组质粒的构建

2.2.1.1 引物设计与合成

参考 GenBank 上已发表的三个猪轮状病毒 VP4 蛋白基因序列（P7: KJ450845.1; P13: QCC26608.1; P23: MH898990.1），并分别截取 P[7]、P[13] 和 P[23] 序列的 VP8* (65~231aa) 并对序列进行大肠埃希氏菌偏嗜性优化，基因片段 N 端都用 linker 与 SpyTag 连接，同时设计三个目的片段的 PCR 扩增引物并在实验室保存的 pET28a-6His 载体上设计两条通用测序引物，用于后续的基因片段扩增、测序与阳性克隆菌的鉴定。

VP8*P7、VP8*P13、VP8*P23三个目的片段与引物送至南京金斯瑞进行合成，引物信息见表2-2。

表 2-2 PCR 引物序列

Table 2-2 PCR sequence of primers

引物名称 Primer name	引物序列（5'-3'） Primer sequence (5'-3')
VP8*P7-F	CTGGTGCCGCGCAGCCATAGGGAGTTCCCCAC
VP8*P7-R	TCAGTGGTGGTGGTGGTGGTGGCTCGAGCCCATTCAAGAACACAAGG
VP8*P13-F	CTGGTGCCGCGCAGCCATAGGGAGTTCCCCAC
VP8*P13-R	TCAGTGGTGGTGGTGGTGGTGGCTCGAGCTCCACCAATGCAGAAC
VP8*P23-F	CTGGTGCCGCGCAGCCATAGGGAGTTCCCCAC
VP8*P23-R	TCAGTGGTGGTGGTGGTGGCTCGAGACCGTGTCTGAATGGG
CX-F	CACAGCAGCGGCCTGGTGCCGCGC
CX-R	CGGGCTTGTTAGCAGCCGGATC

2.2.1.2 目的基因片段 PCR 扩增

使用高保真酶通过 PCR 技术分别扩增出三个猪轮状病毒目的片段 VP8*P7、VP8*P13 和 VP8*P23。以合成的基因片段为模版，PCR 反应体系见表 2-3：

表 2-3 PCR 反应体系

Table 2-3 PCR reaction system

反应组分 Reactive component	体积 Volume
模板	1 μL
上游引物	1 μL
下游引物	1 μL
2×PrimeSTAR Max	25 μL
ddH ₂ O	补足至 50 μL

反应条件为 95°C 预变性 10 min, 94°C 15 s, 60°C 10 s, 72°C 15 s, 重复进行 30 个循环, 72°C 延伸 5 min。PCR 产物经 1.2% 琼脂糖凝胶电泳鉴定，使用通用型 DNA 纯化回收试剂盒说明书对扩增出的三个 VP8*P7、VP8*P13、VP8*P23 目的片段进行回收并送至陕西擎科生物科技有限公司测序。

2.2.1.3 pET28a 载体双酶切

使用限制性内切酶 *Nde* I 和 *Xho* I 对本实验室保存的 pET28a-6His 质粒进行双酶切，37°C 酶切 2 h, 140V、30 min 对酶切产物进行核酸电泳，并根据目的条带大小对电泳产物进行回收。使用分光光度计对回收的线性化载体片段浓度进行测定用于后续片段

与载体的连接，反应体系见表 2-4：

表 2-4 酶切反应体系

Table 2-4 Enzyme digestion reaction system

反应组分 Reactive component	体积 Volume
10×Buffer	5 μL
<i>Nde</i> I	1.5 μL
<i>Xho</i> I	1.5 μL
pET28a-6His 质粒	1.5 ug
ddH2O	补足至 50 μL

2.2.1.4 目的基因片段与载体连接

将回收后的三个 VP8*P7、VP8*P13、VP8*P23 目的片段与双酶切后的线性化载体 pET28a-6His 通过闪电克隆酶进行同源重组，50°C 连接 30 min 后冰浴 5 min，连接体系见表 2-5：

表 2-5 连接反应体系

Table 2-5 Connect reaction system

反应组分 Reactive component	体积 Volume
2×Lightening Cloning Master Mix	5 μL
目的片段	4 μL
双酶切载体	1 μL

2.2.1.5 重组质粒的转化

- (1) 将重连接产物全部转入到自然解冻的 *E.coli* 感受态细菌中，热激法 42°C 水浴 60 s 后置于冰上冰浴 5 min。
- (2) 加入无抗的 LB 液体培养基 600 μL，置于 37°C，220 rpm 摆床振荡培养 1 h。
- (3) 复苏后的感受态细菌，5000 rpm 离心 5 min，重悬于 100 μL LB 液体培养基中，涂布于含 Kana 抗性的固体 LB 平板上，37°C 恒温培养箱过夜。
- (4) 无菌枪头挑选平板上的单克隆，置于含 Kana 抗性的 5 mL LB 液体培养基内，37°C，220 rpm 摆床过夜振荡培养。
- (5) 吸 500 μL 菌液与等体积的 50% 甘油混匀，-80°C 冰箱进行菌种保存。
- (6) 余下菌液按质粒小提试剂盒说明书进行质粒提取，将提取后的质粒送至陕西擎科生物科技有限公司测序，比对测序结果。

2.2.2 重组质粒的诱导表达与纯化

2.2.2.1 重组质粒的诱导表达

(1) 将测序正确的三个猪轮状病毒重组质粒 pET28a-spt-VP8*P7、pET28a-spt-VP8*P13、pET28a-spt-VP8*P23 和本实验室保存的 pET28a-spc-Ferritin 质粒分别转化至表达感受态 BL21 (DE3) 当中，操作方法与 2.2.1.5 中的转化步骤相同。

(2) 挑取平板上的单克隆菌落于 5 mL 含 Kana 抗性的液体 LB 培养基中，37°C 水平摇床中振荡培养。每隔一小时可取出少量菌液检测 OD₆₀₀ 值，待菌液 OD₆₀₀ 达 0.4~0.6 之间时取出。

(3) 取 500 μL 菌液作为诱导前样品。然后向培养基中添加终浓度为 0.5mmol/L 的 IPTG，设置不同诱导温度，分别在 37°C 和 16°C 水平摇床中振荡培养 4 h 和 20 h。

(4) 对诱导后不同培养温度的菌液进行离心，12000 rpm 离心 5 min，收集菌体沉淀。在沉淀中加入 500 μL PBS 后使用超声破碎仪对沉淀进行超声破碎，超声时间 1.5 s，间隔 2 s，总时长 5 min。破碎后溶液置于 4°C，12000 rpm 离心 10 min。

(5) 收集破碎后的上清和沉淀，然后在沉淀中加入 500 μL PBS 缓冲液，用振荡器充分悬浮沉淀。将诱导前、诱导后破碎上清、诱导后破碎沉淀样品各取 40 μL，然后加入 10 μL 的 5x 蛋白上样缓冲液，混匀后沸水浴变性 10 min。

(6) SDS-PAGE 检测表达样品诱导前菌液、诱导后破碎上清和沉淀中的蛋白表达情况。

2.2.2.2 诱导表达后样品的鉴定

(1) SDS-PAGE 蛋白胶配制，首先需制备分离胶浓度为 15%，浓缩胶浓度为 5% 的 SDS-PAGE 凝胶。以 10 mL 为例具体配制方法见表 2-6：

表 2-6 SDS-PAGE 凝胶配制

Table 2-6 SDS-PAGE gel preparation

分离胶(15%)名称	分离胶(15%)	浓缩胶(5%)名称	浓缩胶(5%)
30%丙烯酰胺	2.3 mL	30%丙烯酰胺	1.7 mL
ddH ₂ O	5.0 mL	ddH ₂ O	6.8 mL
1.5mol/L Tris-HCl(PH8.8)	2.5 mL	1.0mol/L Tris-HCl(PH6.8)	1.25 mL
10%SDS	0.1 mL	10%SDS	0.1 mL
10%过硫酸铵	0.1 mL	10%过硫酸铵	0.1 mL
TEMED	0.004 mL	TEMED	0.01 mL

(2) 将配置好的 15% 浓度的分离胶 5.5 mL 均匀灌入制胶板，分离胶灌好后在其上方缓慢加入 20% 乙醇压平灌注的分离胶胶面，室温静置 20 min。

(3) 待分离胶凝固后倒掉 20% 乙醇并用超纯水轻轻冲洗干净并吸干多余液体；接着在凝固的分离胶上方按每块 2.5 mL 上方灌入 5% 浓度的浓缩胶，插好梳齿，室温静置 20 min。

(4) 待浓缩胶凝固后拔出梳齿，可见凝固后的凝胶孔。在凝胶孔中加入需要检测的样品各 10 μ L 和蛋白 Marker 3 μ L，75 V 恒压电泳 20 min 后改电压为 140 V 至溴酚蓝到达蛋白胶底部后停止电泳。

(5) 电泳完毕，取出蛋白胶用考马斯亮蓝染色液浸没胶块，染色 1 h 后换脱色液不断脱色直至看见目的条带。

2.2.3 重组蛋白的纯化与鉴定

(1) 将 pET28a-spt-VP8*P7、pET28a-spt-VP8*P13、pET28a-spt-VP8*P23 和本实验室保存的 pET28a-spc-Ferritin 重组质粒诱导表达后的菌液按 1:100 接进 Kana 抗性液体 LB 培养基中，进行大量表达。

(2) 收集菌泥，用 Ni 柱亲和 A 液重悬菌泥后用高压均质机 1200 Bar 对其进行均质，反复 3 次后 12000 rpm 离心 30 min 收集上清液，上清液样品上机前需使用 0.45 μ m 滤膜进行过滤。

(3) 将 Ni 亲和柱安装至苏州赛普层析系统，亲和 A、B 液（20 mmol/L Tris，150 mmol/L NaCl，50 mmol/L 咪唑，pH8.0；20 mmol/L Tris，150 mmol/L NaCl，500 mmol/L 咪唑，pH8.0）分别冲洗 A、B 管路，使用 A 液过 Ni 亲和柱，进行柱平衡，待 UV280 基线平衡后即可开始上样。

(4) 样品流速设置为 2 mL/min，待上样完成后换亲和 A 液继续平衡，直至 UV280 基线平衡后开始换亲和 B 液洗脱，分别按照 10% B 液，30% B 液，60% B 液，100% B 液进行洗脱，收集各梯度洗脱液。

(5) 使用 0.5M NaCl 冲洗 Ni 柱 5 个~10 个柱体积，20% 乙醇封柱后将 Ni 柱拆下，置于 4°C 保存。

(6) 对上机纯化后收集的不同梯度样品洗脱液进行 SDS-PAGE 检测。具体操作方法见 2.2.2。

2.3 结果

通过 Snapgene 软件设计含有酶切位点的引物，上、下游引物分别插入有 *Nde* I 和 *Xho* I 酶切位点，pET28a-spt-VP8*载体设计示意图见图 2-1。

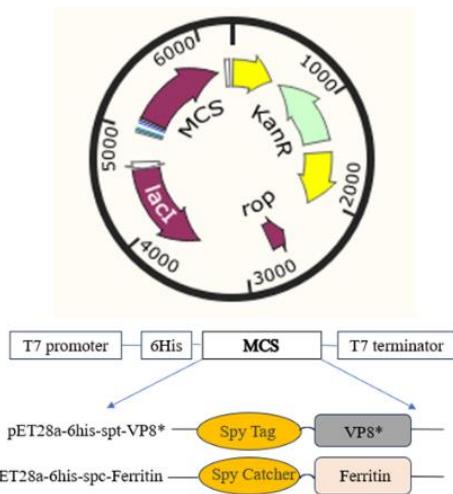


图 2-1 重组载体设计示意图

Fig. 2-1 Schematic diagram of recombinant carrier design

2.3.1 VP8*重组质粒的构建

对合成的三个 spt-VP8（65~231aa）基因片段进行 PCR 扩增，与双酶切后的 pET28a-6His 线性化载体上通过同源重组进行连接，将连接产物转入 *E.coli* DH5 α 感受态中，挑选单克隆菌落使用 CX-F, CX-R 引物进行 PCR 鉴定，并用限制性内切酶 *Nde* I 和 *Xho* I 对重组质粒进行双酶切鉴定。结果与预期大小一致，均为 591bp（图 2-2、2-3），表明成功构建出了 pET28a-spt-VP8*P7、pET28a-spt-VP8*P13、pET28a-spt-VP8*P23 重组质粒。

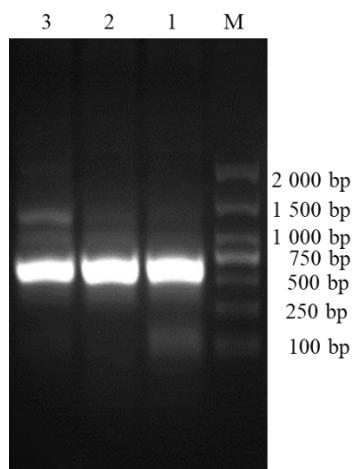


图 2-2 pET28a-spt-VP8* PCR 鉴定

Fig 2-2 PCR identification of pET28a-spt-VP8*

M. DL2000 DNA Marker; 1. pET28a-spt-VP8*P7 PCR 鉴定；2. pET28a-spt-VP8*P13 PCR 鉴定；
3. pET28a-spt-VP8*P23 PCR 鉴定。

M. DL2000 DNA Marker; 1. PCR identification of pET28a-spt-VP8*P7; 2. PCR identification of pET28a-spt-VP8*P13; 3. PCR identification of pET28a-spt-VP8*P23.

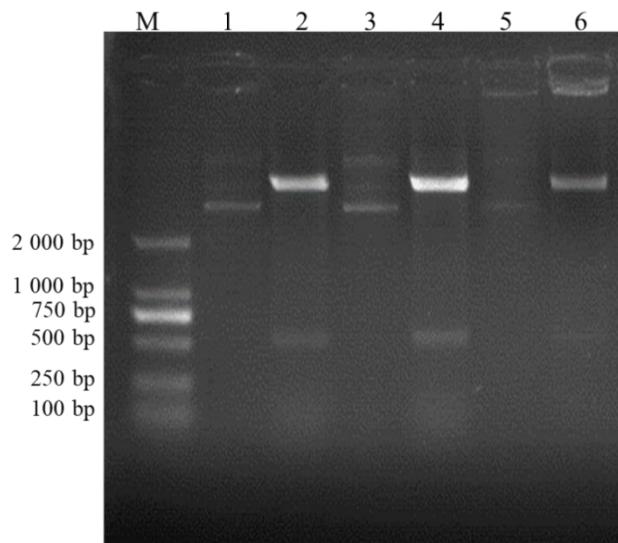


图 2-3 pET28a-spt-VP8*质粒双酶切鉴定

Fig.2-3 Identification of pET28a-spt-VP8* plasmid by double digestion

- M. DL2000 DNA Marker; 1. pET28a-spt-VP8*P7 质粒; 2. pET28a-spt-VP8*P7 质粒双酶切;
3. pET28a-spt-VP8*P13 质粒; 4. pET28a-spt-VP8*P13 质粒双酶切; 5. pET28a-spt-VP8*P23 质粒;
6. pET28a-spt-VP8*P23 质粒双酶切。
M. DL2000 DNA Marker; 1. pET28a-spt-VP8*P7 plasmid; 2. Digestion of pET28a-spt-VP8*P7 plasmid;
3. pET28a-spt-VP8*P13 plasmid; 4. Digestion of pET28a-spt-VP8*P13 plasmid; 5. pET28a-spt-VP8*P23
plasmid; 6. Digestion of pET28a-spt-VP8*P23 plasmid.

2.3.2 VP8*蛋白的原核表达

将构建好的 PoRV VP8* 重组质粒: pET28a-spt-VP8*P7、pET28a-spt-VP8*P13、pET28a-spt-VP8*P23 和本实验室保存的 pET28a-spc-Ferritin 重组质粒转入 BL21 (DE3) 表达菌株, 使用 0.5 mmol/L IPTG 诱导重组菌株的表达, 结果表明 (图 2-4) 在温度为 16°C 时诱导 20 h, 目的蛋白都可在上清中大量表达, 其中 VP8*三个重组蛋白表达大小相似, 约为 24 ku; Ferritin 重组蛋白表达大小约为 37 ku。

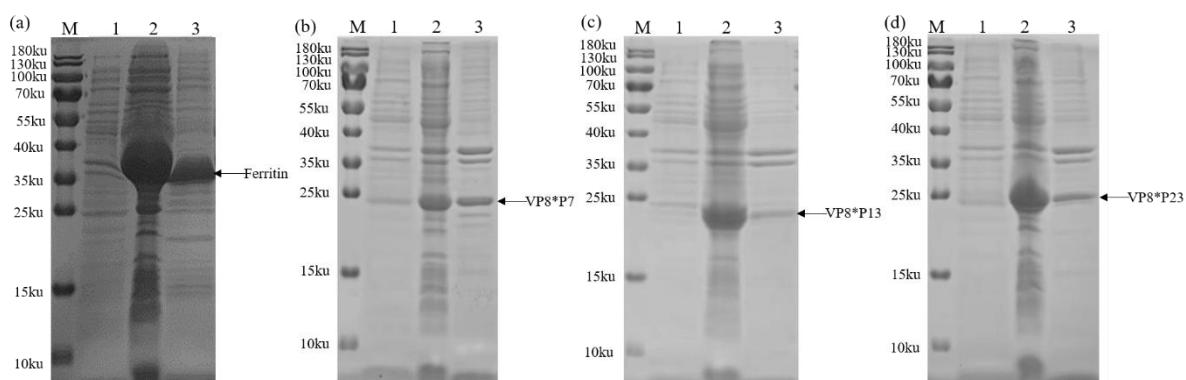


图 2-4 SDS-PAGE 检测重组蛋白的表达

Fig.2-4 SDS-PAGE was used to detect the expression of recombinant protein

(a) Ferritin 表达; (b) VP8*P7 表达; (c) VP8*P13 表达; (d) VP8*P23 表达。

(a) Expression of Ferritin; (b) Expression of VP8*P7; (c) Expression of VP8*P13;
(d) Expression of VP8*P23.

M. 蛋白分子质量标准; 1. 诱导前; 2. 16°C, 20 h 诱导上清; 3. 16°C, 20 h 诱导沉淀;

M. Protein marker; 1. Preinduction; 2. 16°C, 20 h induced supernatant; 3. 16°C, 20 h induced precipitation.

2.3.3 VP8*蛋白的纯化

对纯化收集各梯度的洗脱液进行 SDS-PAGE 检测, 结果如图 2-5、2-6, 重组蛋白 VP8*P7、VP8*P13、VP8*P23 和 Ferritin 均能在 60%亲和 B 液浓度下洗脱成较为单一的峰, 且几乎无杂带, 通过 Image J 对纯化出的重组蛋白 VP8*P7、VP8*P13、VP8*P23 和 Ferritin 进行灰度分析, 结果显示纯化出的目的蛋白纯度可达 85% 以上。

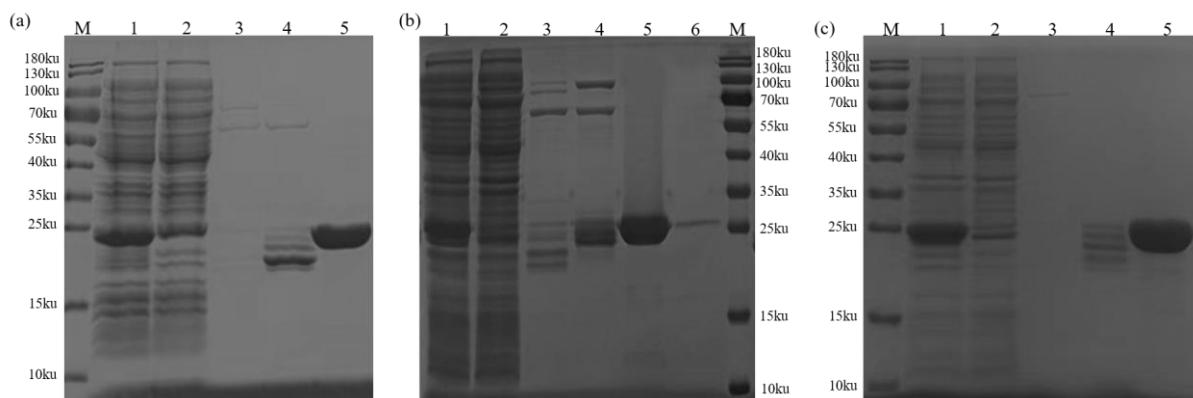


图 2-5 SDS-PAGE 检测 VP8* 重组蛋白纯化效果

Fig2-5 The purification effect of VP8* recombinant protein was determined by SDS-PAGE

(a) VP8*P7 纯化; (b) VP8*P13 纯化; (c) VP8*P23 纯化。

(a) Purification of VP8*P7; (b) Purification of VP8*P13; (c) Purification of VP8*P23.

M. 蛋白分子质量标准; 1. 16°C, 20 h 诱导上清; 2. Ni-NTA 流穿样; 3. 10% B 洗杂样;
4. 30% B 洗杂样; 5. 60% B 洗杂样; 6. 100% B 洗杂样。

M. Protein marker; 1. 16°C, 20 h induced supernatant; 2. Ni-NTA flow sample; 3. 10% B scrubbing solution sample; 4. 30% B scrubbing solution sample; 5. 60% B scrubbing solution sample; 6. 100% B scrubbing solution sample.

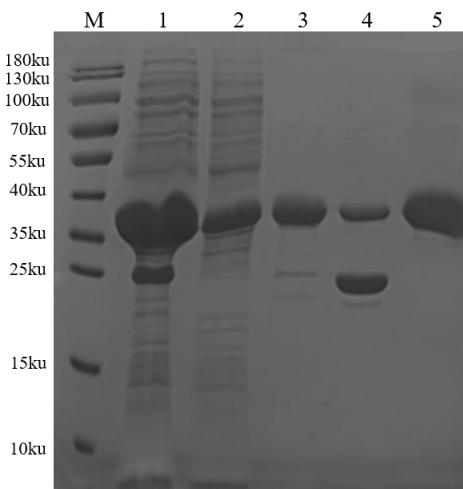


图 2-6 SDS-PAGE 检测重组 Ferritin 纯化效果

Fig2-6 The purification effect of recombinant Ferritin was determined by SDS-PAGE

M. 蛋白分子质量标准; 1. 16°C, 20 h 诱导上清; 2. Ni-NTA 流穿样; 3. 10% B 洗杂样; 4. 30% B 洗杂样; 5. 60% B 洗杂样。

M. Protein marker; 1. 16°C, 20 h induced supernatant; 2. Ni-NTA flow sample; 3. 10% B scrubbing solution sample; 4. 30% B scrubbing solution sample; 5. 60% B scrubbing solution sample.

2.4 讨论

纳米颗粒被证明能更好的被机体识别与捕获，可作为免疫细胞刺激剂发挥作用，增加抗原生物利用度并减少不良反应(Priyanka et al. 2023)。铁蛋白等天然蛋白质支架是自然界中已经存在的具有内在自组装特性的纳米颗粒结构，几乎存在于所有生物体中(Bhaskar et al. 2017)。近年来基于铁蛋白纳米颗粒疫苗的研究取得了非常显著的成果，如针对流感高度保守的 HA 结构域开发了一种基于铁蛋白纳米颗粒的一种通用流感疫苗，具有良好的免疫原性(Houser et al. 2022)。

PoRV VP4 蛋白可诱导独立的中和抗体，是制备亚单位疫苗的首选(HB et al. 2009)。通过对近年来 PoRV VP4 蛋白构建遗传进化树，可以发现在 PoRV 种类众多的 VP4 (P 型) 基因型中，P[7]、P[13]和 P[23]的出现比例较高，是近年来的 PoRV 流行毒株。

本试验通过构建重组质粒 pET28a-spt-VP8*P7、pET28a-spt-VP8*P13、pET28a-spt-VP8*P23，并与本实验室保存的 pET28a-spc-Ferritin 重组质粒一起进行原核表达和 Ni 柱纯化，分别纯化出了 VP8*的三个抗原与铁蛋白骨架，为后期纳米颗粒的组装和免疫效果评价提供材料。

对试验结果及过程进行分析及反思，发现初期试验方案中存在以下问题：(1) 使用的是 PoRV VP8 截短蛋白，但由于截短后 VP8*蛋白基因序列过短，可能造成抗原的免疫原性降低，后续试验可对 VP8*基因添加一些小分子表位，提高 VP8*蛋白的免

疫原性。（2）通过原核表达系统生产 PoRV VP8*蛋白，蛋白无法进行翻译后的修饰，后续可尝试使用其他表达系统来进行 VP8 蛋白的表达。

2.5 小结

1. 选取 PoRV 的三个流行 P 基因型 P[7]、P[13]和 P[23]的 VP8（65~231aa）序列，成功构建重组质粒 pET28a-6his-spt-VP8*P7、pET28a-6his-spt-VP8*P13 和 pET28a-6his-spt-VP8*P23。
2. 将构建好的重组质粒与本实验室保存的 pET28a-spc-Ferritin 质粒转化 BL21 (DE3)，使用 Ni-NTA 亲和层析柱纯化，成功纯化出了 PoRV VP8*重组蛋白 VP8*P7、VP8*P13、VP8*P23 和 Ferritin。

第三章 猪轮状病毒 VP8*铁蛋白纳米颗粒的组装与表征分析

SpyCatcher/SpyTag 系统来源于化脓性链球菌，可通过自发形成的分子内异肽键将靶抗原连接到预组装的支架上，近年来已成功用于各种纳米颗粒疫苗的设计，并被证实可以提高疫苗的有效性(Veggiani et al. 2014)。SpyCatcher 嵌入铁蛋白纳米颗粒表面，而 SpyTag 与目的蛋白连接。当 SpyTag 连接的蛋白质与 SpyCatcher 修饰的铁蛋白纳米颗粒接触时，它们很容易相互结合，使目标蛋白质能够毫不费力地附着在纳米粒子表面(Krishnan et al. 2023)。

本章利用 SpyCatcher/SpyTag 系统将纯化后的与 SpyTag 连接的猪轮状病毒重组蛋白 VP8*P7、VP8*P13、VP8*P23 和 SpyCatcher 连接的 Ferritin 作为骨架，按摩尔比进行组装后，成功获得了三个铁蛋白纳米颗粒：VP8*P7-Ferritin、VP8*P13-Ferritin、VP8*P23-Ferritin。通过透射电镜（TEM）、高效液相色谱（HPLC）和动态光散射（DLS）等方式对组装后的 PoRV VP8*P7-Ferritin、VP8*P13-Ferritin、VP8*P23-Ferritin 进行表征分析，验证纳米颗粒的组装效果。

3.1 材料

3.1.1 主要试剂

BCA 蛋白定量试剂盒购自碧云天，Triton X-114 溶液、磷钨酸购自索莱宝，鲎试剂购自康博生物，蛋白预染 Marker、脱脂奶粉购自赛默飞，PVDF 膜购自密理博生物，鼠源 His-tag、羊抗鼠 IgG-HRP 购自三鹰生物。

3.1.2 主要仪器

透射电子显微镜、纳米激光粒度分析仪和高效液相色谱仪均由西北农林科技大学大型公共平台提供，凝胶成像仪购自北京君意，酶标仪购自北京普朗，电热恒温箱购自上海申贤。

3.1.3 主要缓冲液

见附录 A

3.2 方法

3.2.1 纳米颗粒的组装

3.2.1.1 纯化蛋白的透析与浓缩

(1) 透析袋置于 NaHCO₃ 溶液 (10 mmol/L) 中煮 15 min，用超纯水清洗干净。

(2) 置于 EDTA 溶液 (10mmol/L) 中煮 15 min, 更换 EDTA 溶液继续煮 5 min, 用超纯水清洗干净。

(3) 将纯化后的 Ferritin、VP8*P7、VP8*P13、VP8*P23 蛋白样品加入透析袋中, 封口, 4°C, 置于 1 L 透析缓冲液 (20 mM Tris-HCl, 50 mM NaCl, pH 8.0) 中过夜透析。

(4) 将透析后的 Ferritin、VP8*P7、VP8*P13、VP8*P23 蛋白样品加入 100kDa 超滤管内, 4°C, 4000 rpm 离心, 30 min。

(5) 向超滤管内加入离心后的蛋白样品, 4°C, 4000 rpm 离心 30 min, 重复上述步骤 2-3 次, 直至超滤管内最终只剩 3 ml 浓缩蛋白液。

3.2.1.2 内毒素去除与 BCA 定量

因原核表达的蛋白含有大量内毒素, 影响蛋白后续免疫效果, 将纯化后的蛋白 Ferritin、VP8*P7、VP8*P13、VP8*P23 使用 Triton X-114 去除内毒素, 具体操作如下:

(1) 在纯化出的蛋白样品 Ferritin、VP8*P7、VP8*P13、VP8*P23 中分别加入终浓度为 1% 的 Triton X-114, 充分混匀, 冰浴 5 min 后 4°C 搅拌混匀过夜。

(2) 37°C 孵育 30 min, 观察分层现象, 待溶液中出现明显分层后, 室温下 12000 rpm 离心 5 min, 吸取上清液即为内毒素去除后的蛋白。

(3) 为达到较好的内毒素去除效果, 重复上述步骤 2-3 次。

利用鲎试剂对内毒素去除后的蛋白进行检测, 步骤如下:

(1) 待测样品使用检查用水按不同浓度稀释, 如 1:50、1:100、1:500、1:1000、1:5000、1:10000。

(2) 阳性对照、阴性对照准备, 阳性对照: 标准品加检查用水 1.0 mL 混合 15 min 后备用。阴性对照: 取葡萄糖注射液原液 0.25 mL, 加检查用水 0.25 mL, 混合均匀, 和 0.50 EU/mL 的内毒素溶液 0.5 mL 混合。

(3) 取阳性对照、阴性对照、待测样品各取 100 μL 分别加入到含鲎试剂的安瓶瓶中, 鲎试剂粉末溶解后使用封口膜封口, 37°C 水浴 1 h 后观察凝固情况, 当阴性对照无凝固、阳性对照全部凝固说明实验有效, 根据样品不同的稀释倍数观察凝固情况, 判断内毒素污染情况。

利用 BCA 蛋白浓度测定试剂盒对内毒素去除后的蛋白进行定量, 步骤如下:

(1) 配制标准液, 取标准液使用 PBS 稀释至 2 mg/mL, 体积 100 μL, 再准备 5 个干净的 1.5 mL ep 管, 每管中加入 50 μL PBS, 取 2 mg/mL 标准液 50 μL 按 2 倍倍比稀释至 0.0625 mg/mL, 得到 2 mg/mL、1 mg/mL、0.5 mg/mL、0.25 mg/mL、0.125 mg/mL、0.0625 mg/mL 标准液备用。

(2) 按 50:1 的比例配制 BCA 工作液备用。

(3) 取标准液以及待测样品 20 μL 分别加入到干净的 96 孔板中, 每孔再加入 200

μL BCA 工作液， 37°C 孵育 30 min。

(4) 使用酶标仪检测 OD_{595} 处的吸光值，绘制蛋白浓度标准曲线，根据得到的曲线方程计算出待测样品浓度。

3.2.1.3 抗原与铁蛋白骨架的组装

将经过蛋白定量后的重组 PoRV VP8*截短蛋白 VP8*P7、VP8*P13、VP8*P23 与 Ferritin 利用 SpyCatcher/SpyTag 系统，按照 1:1.5 的摩尔比混匀后置于 4°C 过夜组装， 12000 r/min 离心 5 min 后取上清，进行免疫印迹试验（Western Blot）检测组装效果，因为 Western Blot 检测灵敏度较高，所以将组装后样品稀释 20 倍再检测。具体方法如下：

(1) SDS-PAGE 蛋白胶操作方法如 2.2.2.2

(2) 将转膜液 4°C 预冷，随后将转膜夹黑面朝下放置在托盘中，将滤纸浸湿后放在转膜海绵上，随后将电泳完成的蛋白胶轻轻铺在滤纸上，保证滤纸与蛋白胶之间没有气泡。在蛋白胶上轻轻把裁剪好的 PVDF 膜盖上，保证 PVDF 膜与胶之间没有气泡。随后再盖浸湿的滤纸与转膜海绵，最后夹紧转膜夹放入转膜槽中，同时放入冰袋，加满转膜液。

(3) 将转膜槽放于冰水混合物中，电压调整至 100 V，转膜 100 min。

(4) 转膜完成后，取出 PVDF 膜，使用 5% 脱脂牛奶 37°C 封闭 2 h。

(5) 倒掉封闭液，使用 TBST 洗涤膜 3 次，每次 10 min，洗膜完毕后用 5% 脱脂奶粉对 His-Tag 标签一抗 1:10000 进行稀释，将 PVDF 膜放于抗体稀释液中，放置于 4°C 冰箱中孵育过夜。

(6) 将 4°C 过夜孵育后的膜取出，使用 TBST 洗涤膜三次，每次 10 min。使用 5% 脱脂奶粉稀释 HRP 标记的羊抗鼠 IgG 二抗，按照 1:5000 稀释，将 PVDF 膜放置于二抗当中，室温下 60 r/min 低速摇床孵育 2 h。二抗孵育完毕，使用 TBST 洗膜 3 次，每次 10 min。

(7) 添加 ECL 显色液，打开 Western Blot 成像系统对 PVDF 膜进行曝光显色。

3.2.2 纳米颗粒表征分析

通过 TEM、HPLC 及 DLS 对组装后的 VP8*P7-Ferritin、VP8*P13-Ferritin、VP8*P23-Ferritin 和 Ferritin 进行纳米颗粒形态学观察。

3.2.2.1 透射电镜观察

将组装好后纳米颗粒样品使用透析缓冲液中将样品浓度稀释至 0.05 mg/mL 。在西北农林科技大学大型仪器共享平台进行透射电镜的观察，电镜样品制备具体步骤如下：

(1) 取待测样品 $50 \mu\text{L}$ ，轻轻夹取铜网，正面朝上浸入样品液滴中吸附 5 min，后夹出铜网将多余的液体吸走晾 2 min。

(2) 取 3%磷钨酸染液 50 μL , 将吸附待测样品的铜网正面朝上浸入磷钨酸染液中浸染 3 min, 夹出铜网将多余的液体吸走, 自然晾干后即可使用 80 kV 的透射电镜观察纳米颗粒结构。

3.2.2.2 高效液相色谱分析

将组装好后纳米颗粒样品在西北农林科技大学大型仪器共享平台使用高效液相色谱仪进行分析, 具体步骤如下: 取样品 500 μL , 首先用 5 柱体积 (CV) 的流动相平衡色谱柱, 将待测样品溶液注入进样阀收集 A280 处的峰图分析 VP8*P7-Ferritin、VP8*P13-Ferritin、VP8*P23-Ferritin 蛋白纯度。

3.2.2.3 动态光散射观察

将纳米颗粒 VP8*P7-Ferritin、VP8*P13-Ferritin、VP8*P23-Ferritin 和 Ferritin 在西北农林科技大学大型仪器共享平台通过动态光散射对其粒径大小进行分析, 具体步骤如下: 取样品 1.5 mL, 首先进行衰减值 (Attn) 测试, 确保待测样品的 Attn 在 5~10, 然后将蛋白样品加入石英比色皿中, 于 90°固定散射角, 使用纳米激光粒度分析仪检测 Ferritin、VP8*P7-Ferritin、VP8*P13-Ferritin、VP8*P23-Ferritin 纳米颗粒的尺寸是否符合理论, 每个样品的测量重复三次取平均值。

3.3 结果

3.3.1 重组蛋白内毒素去除与 BCA 定量

在进行下一步重组蛋白表征验证与动物试验免疫评估之前, 需要将纯化后得到的蛋白通过透析去除所含有的咪唑, 并使用鲎试剂对蛋白原核表达所产生的内毒素去除。内毒素取出后使用 BCA 蛋白定量试剂盒对蛋白浓度进行测定, 结果见图 3-1、表 3-1。

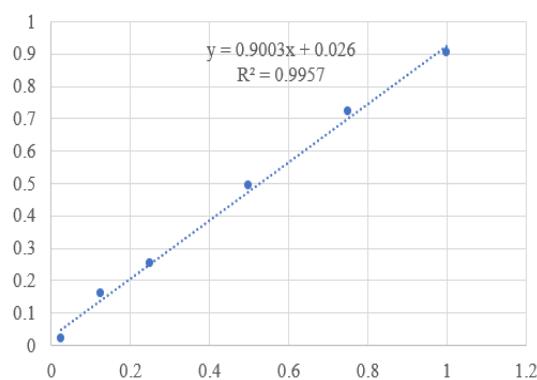


图 3-1 BCA 定量的标准曲线

Fig 3-1 Standard curve of BCA

表 3-1 蛋白浓度测定结果

Table 3-1 Results of protein concentration determination

名称 Name	浓度 (mg/mL) Concentration (mg/mL)
VP8*P7	1.24
VP8*P13	0.58
VP8*P23	0.61
Ferritin	0.86

3.3.2 重组蛋白纳米颗粒的组装鉴定

为了验证最终透析浓缩后得到的蛋白是否能组装形成纳米结构，将抗原与骨架按摩尔比 1:1.5 混匀后 4°C 过夜组装，进行 Western Blot 检测(图 3-2)。结果显示组装出了三个纳米颗粒：VP8*P7-Ferritin、VP8*P13-Ferritin、VP8*P23-Ferritin，仅有一条明显杂带，表明有部分纳米颗粒未组装完全，可能是由于 SpyCatcher/SpyTag 系统组装效率有一定限度。

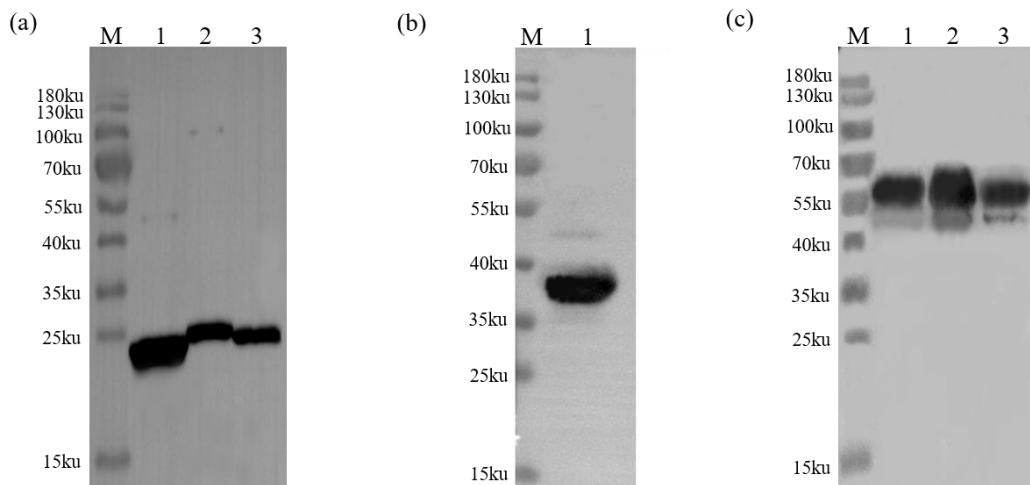


图 3-2 VP8*-Ferritin 纳米颗粒组装鉴定

Fig 3-2 Identification of nanoparticle assembly

(a) M. 蛋白分子质量标准; 1. VP8*P7; 2. VP8*P13; 3. VP8*P23; (b) M. 蛋白分子质量标准;

1. Ferritin; (c) M. 蛋白分子质量标准; 1. VP8*P7-Ferritin; 2. VP8*P13-Ferritin;

3. VP8*P23-Ferritin。

(a) M. Protein marker; 1. VP8*P7; 2. VP8*P13; 3. VP8*P23; (b) M. Protein marker; 1. Ferritin; (c) M. Protein marker; 1. VP8*P7-Ferritin; 2. VP8*P13-Ferritin; 3. VP8*P23-Ferritin.

3.3.3 纳米颗粒表征分析结果

3.3.3.1 透射电镜结果

使用透射电子显微镜对组装后的三个 VP8*P7-Ferritin、VP8*P13-Ferritin、VP8*P23-Ferritin 纳米颗粒和 Ferritin 进行观察。结果如图 3-3，Ferritin 呈均匀球状中空的纳米颗粒，且纳米颗粒外表光滑。而与 PoRV VP8*抗原组装后的 VP8*P7-Ferritin、VP8*P13-Ferritin、VP8*P23-Ferritin 纳米颗粒则外表粗糙，具有从球形核心突出的尖峰。

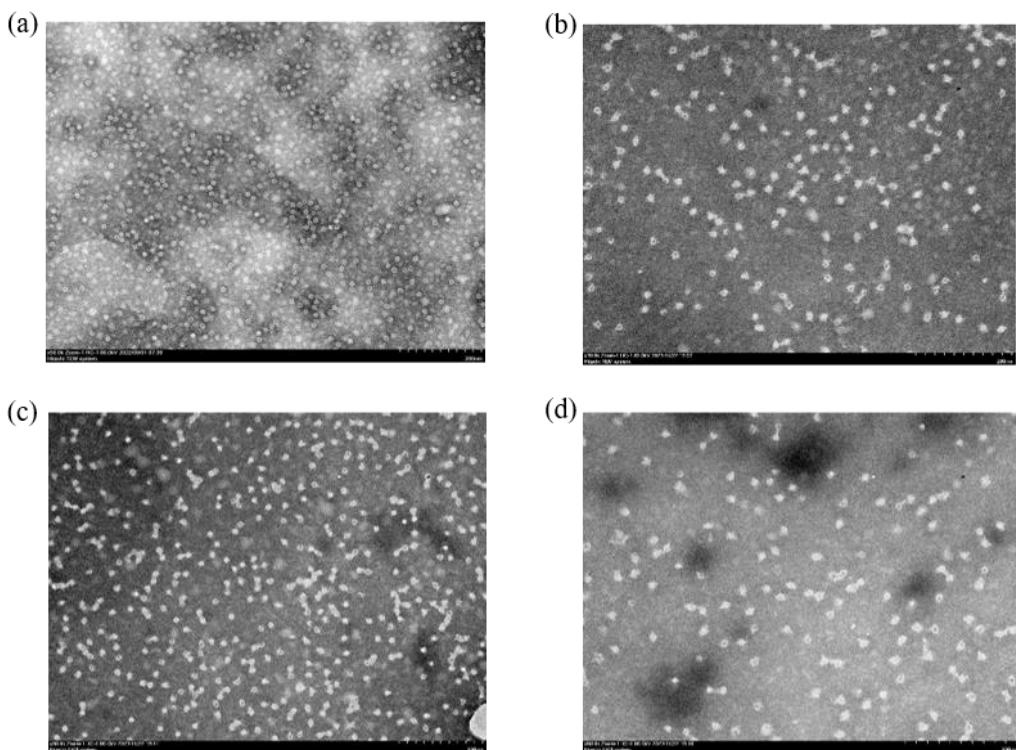


图 3-3 TEM 观察

Fig 3-3 TEM observation

- (a) Ferritin TEM 观察; (b) VP8*P7-Ferritin TEM 观察;
- (c) VP8*P13-Ferritin TEM 观察; (d) VP8*P23-Ferritin TEM 观察。
- (a) TEM observation of Ferritin; (b) TEM observation of VP8*P7-Ferritin;
- (c) TEM observation of VP8*P13-Ferritin; (d) TEM observation of VP8*P23-Ferritin.

3.3.3.2 高效液相色谱结果

取组装好的 PoRV VP8*纳米颗粒 VP8*P7-Ferritin、VP8*P13-Ferritin、VP8*P23-Ferritin 各 500 μL 进行 HPLC 分析。结果显示如图 3-4，组装前的 Ferritin 主要在 8.4 min 左右集中出峰，组装后三个 VP8*纳米颗粒比组装前的 Ferritin 大，均在色谱柱的 8 min 左右集中出峰，且最大峰面积分别达 91%、88% 和 94%。表明组装后的纳米颗粒纯度较高，达到了预期的组装效果。

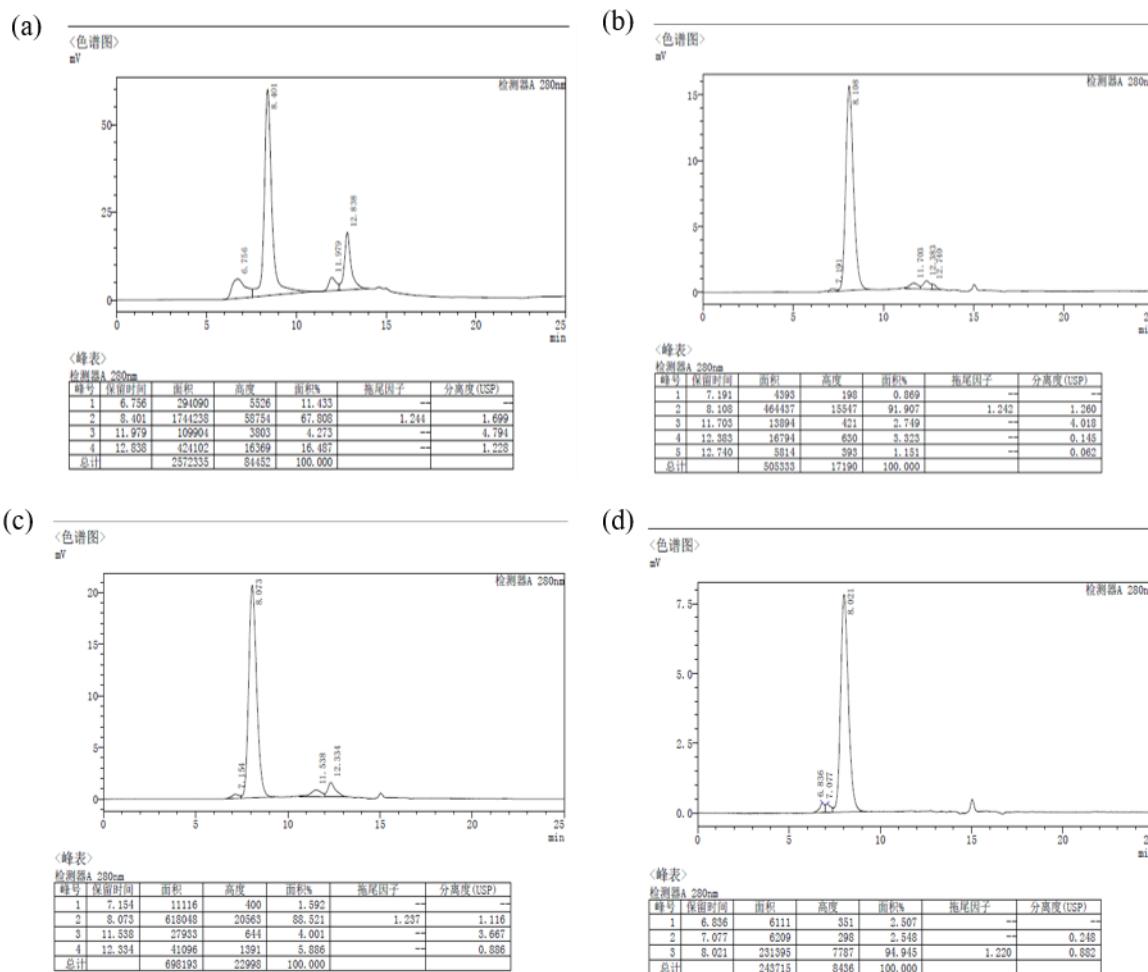


图 3-4 HPLC 分析

Fig 3-4 HPLC analysis

(a) Ferritin HPLC 分析; (b) VP8*P7-Ferritin HPLC 分析;
 (c) VP8*P13-Ferritin HPLC 分析; (d) VP8*P23-Ferritin HPLC 分析。

(a) Ferritin HPLC analysis; (b) VP8*P7-Ferritin HPLC analysis;

(c) VP8*P13-Ferritin HPLC analysis; (d) VP8*P23-Ferritin HPLC analysis.

3.3.3.3 动态光散射结果

使用 DLS 用于检测组装后 PoRV VP8*纳米颗粒的流体动力学半径，结果如图 3-5。Ferritin、VP8*P7-Ferritin、VP8*P13-Ferritin、VP8*P23-Ferritin 的平均目的直径分别约为 13.12nm、15.56 nm、15.88 nm、15.31 nm。组装后的纳米颗粒均一性较 Ferritin 低，可能是组装后纳米颗粒分散性不好或液体不稳定所致。

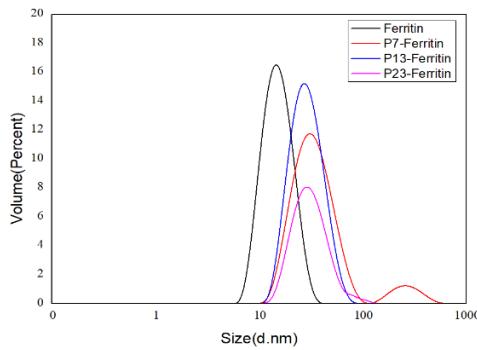


图 3-5 DLS 观察
Fig 3-5 DLS observation

3.4 讨论

幽门螺杆菌铁蛋白是可以体外高效组装的纳米颗粒，既能与抗原进行融合表达，也能利用 SpyCatcher/SpyTag 蛋白连接系统，与抗原分别表达组装后(Zhang et al. 2020)。本研究利用 SpyCatcher/SpyTag 将 PoRV VP8*抗原与铁蛋白纳米颗粒表达后组装，而不是直接与铁蛋白纳米颗粒融合表达，是因为 SpyCatcher/SpyTag 系统易于大规模纯化合成，并能大大提高 PoRV VP8*抗原的免疫原性(Wang et al. 2024b)。如利用 SpyCatcher/SpyTag 系统在铁蛋白纳米颗粒表面上展示呼吸道合胞病毒（RSV）融合糖蛋白、人流感病毒 3 型（PIV3）融合糖蛋白和新冠 2 型（SARS-CoV-2）刺突糖蛋白，表达来自哺乳动物表达系统产生的大量可溶性蛋白质，纳米颗粒形式的三聚体对顶端表位表现出更好的抗原性(Zhang et al. 2020)。总体而言，蛋白质抗原和纳米颗粒支架独立产生，加快了原本繁琐的制造并排除遗传融合到自组装纳米颗粒亚基免疫原的过程。这种模块化纳米颗粒组装平台可能是筛选免疫原的有用工具，为增加纳米颗粒展示的 PoRV VP8*蛋白的免疫原性提供了原理验证。

本试验对纯化出来的重组 PoRV 蛋白 VP8*P7、VP8*P13、VP8*P23 和 Ferritin，利用 SpyCatcher/SpyTag 系统进行组装，通过 TEM、DLS、HPLC 进行表征观察，可以发现 VP8*P7、VP8*P13、VP8*P13 均可与 Ferritin 良好组装。

对试验结果及过程进行分析及反思，发现还存在以下问题：组装后 VP8*P7-Ferritin、VP8*P13-Ferritin、VP8*P23-Ferritin 纳米颗粒在测量流体动力学半径时，分布与 Ferritin 相比，目的粒径值占比较低，可能是样品分散性不太好或不太稳定出现了降解，后续试验在条件允许时可对组装后 VP8*P7-Ferritin、VP8*P13-Ferritin、VP8*P23-Ferritin 蛋白进行稳定性试验，使用不同缓冲液测量。

3.5 小结

- 利用 SpyCatcher/SpyTag 系统，纯化后的重组蛋白 VP8*P7、VP8*P13、

VP8*P23 抗原与铁蛋白骨架可组装后形成猪轮状病毒 VP8*P7-Ferritin、VP8*P13-Ferritin、VP8*P23-Ferritin 纳米颗粒。

2. 通过 TEM、HPLC、DLS 进行表征分析，表明成功组装出了高纯度、结构清晰的 PoRV VP8* 铁蛋白纳米颗粒，组装后的 VP8*P7-Ferritin、VP8*P13-Ferritin、VP8*P23-Ferritin 纯度可达 85% 以上；单一的铁蛋白骨架形成光滑的球形 24-mer 纳米颗粒，而组装后的 VP8*-Ferritin 显示出从球形核心突出的尖峰。

第四章 猪轮状病毒 VP8*铁蛋白纳米颗粒亚单位疫苗免疫原性分析

猪轮状病毒作为引起仔猪急性胃肠炎的最重要病原体之一，其感染后对生猪养殖业造成的经济影响不容忽视(Vlasova et al. 2017)。

目前市面上并无针对 P 基因型的猪轮状病毒商品化疫苗，如哈尔滨兽医研究所研制的猪流行性腹泻病毒、猪轮状病毒、猪传染性肠胃炎病毒三联活疫苗，采用 PoRV G5 型(陈建飞 et al. 2010)。由于猪轮状病毒的不断变异与重组，现有疫苗无法对流行毒株产生有效的保护效果，市场亟需新型疫苗(Zhang Y et al. 2020)。使用铁蛋白纳米颗粒作为抗原的支架可以提高亚单位疫苗的免疫原性并提供更广泛的保护，如重组轮状病毒 VP6-铁蛋白 (rVP6-ferritin) 纳米颗粒疫苗，在大肠埃希氏菌中表达并自组装成均匀的球形结构，可在小鼠中诱导有效的体液和粘膜免疫原性(Li et al. 2019)。MF59 佐剂在引发体液反应方面优于氢氧化铝(Kang et al. 2021)。已有研究表明 MF59 佐剂和 CpG5 的组合可表现出协同作用，导致 PEDV 亚单位疫苗出现更早、更强烈和更持久的免疫反应(Wang et al. 2024a)。

对上一章组装好的 VP8*P7-Ferritin、VP8*P13-Ferritin、VP8*P23-Ferritin 纳米颗粒，本章将其与 MF59+CPG 的复合佐剂配伍制备纳米颗粒亚单位疫苗，并通过小鼠免疫试验对其免疫原性进行分析。

4.1 材料

4.1.1 毒株、细胞及试验动物

PoRV HN2019 株、MA-104 细胞由本实验室保存、4~6 周龄 SPF 级 BALB/c 雌性小鼠，购自辽宁长生生物技术股份有限公司，饲养于生物安全三级实验室（杨凌凯瑞生物科技有限公司）。

4.1.2 主要试剂

胎牛血清 (FBS)、细胞培养用双抗 (10000 U/mL 青霉素+10000 μ g/mL 硫酸盐链霉素)、0.25 %Trypsin-EDTA、DMSO、无菌 PBS 购自 Gibco；台盼蓝细胞染色液购自碧云天；DMEM/HIGH 培养基，购自 HyClone；MF59、CpG 由杨凌凯瑞生物科技有限公司制备并提供。

4.1.3 仪器耗材

表 4-1 主要仪器

Table 4-1 Main instruments

仪器名称	生产厂家
医用洁净工作台	BIOBAS
电热恒温培养箱	上海申贤
酶标仪	北京普朗
掌上离心机	索莱宝
生物安全柜	海尔
自动细胞计数仪	上海睿钰
倒置显微镜	宁波舜宇
CO ₂ 培养箱	ESCO
IVC 独立送风隔离鼠笼	苏州冯氏
涡旋仪	德国 IKA

4.1.4 主要缓冲液

见附录 A。

4.2 方法

4.2.1 SPF 小鼠免疫试验

4.2.1.1 纳米颗粒亚单位疫苗配制

取组装后的猪轮状病毒纳米颗粒抗原 VP8*P7-Ferritin、VP8*P13-Ferritin、VP8*P23-Ferritin 和不带铁蛋白的单价抗原 VP8*P7、VP8*P13、VP8*P23，使用 BCA 蛋白检测试剂盒测量蛋白浓度后用生理盐水稀释至免疫浓度，0.45 um 滤膜进行无菌过滤，同时选用 Ferritin、生理盐水做对照。使用 MF59+CpG 复合佐剂，将各组分抗原分别与 MF59 佐剂按 1:1 的体积充分混匀后，再加 CpG 20 ug/只，混匀 4°C 保存备用。

4.2.1.2 试验分组

将 80 只健康的 4 周龄~6 周龄 SPF 级雌性 BALB/ c 小鼠分为 10 组，每组 8 只，通过小鼠颈部多点皮下注射进行免疫。每间隔 2 周免疫 1 次，一共免疫 3 次。小鼠免疫后分别在 0 d、14 d、28 d、35 d、42 d、56 d 不同时间点进行眼眶静脉丛采血，分离血清。具体免疫方案见表 4-1。

表 4-1 小鼠免疫方案
Table 4-1 Mouse immunization regimen

接种种类 Vaccination type	剂量 Vaccination dose	抗原含量 Antigen content	小鼠数量 Number of mice	佐剂 Adjuvant
VP8*P7	200 μL	5 ug	8 只	MF59+CpG
VP8*P7-Ferritin	200 μL	5 ug	8 只	MF59+CpG
VP8*P13	200 μL	5 ug	8 只	MF59+CpG
VP8*P13-Ferritin	200 μL	5 ug	8 只	MF59+CpG
VP8*P23	200 μL	5 ug	8 只	MF59+CpG
VP8*P23-Ferritin	200 μL	5 ug	8 只	MF59+CpG
P7+P13+P23	200 μL	15 ug	8 只	MF59+CpG
P7+P13+P23-Ferritin	200 μL	15 ug	8 只	MF59+CpG
Ferritin	200 μL	5 ug	8 只	MF59+CpG
生理盐水	200 μL	5 ug	8 只	MF59+CpG

4.2.2 血清特异性抗体检测

4.2.2.1 特异性 IgG 抗体检测

(1) 抗原包被：将不带铁蛋白的 VP8*P7、VP8*P13、VP8*P23 抗原用包被液（pH 9.6 的碳酸盐缓冲液）稀释至 400 μg/mL，按 200 μL/孔加入酶标板中，封口膜封口，4°C过夜孵育；第二天弃掉孔中液体，用 PBST 溶液洗涤 3 次，每次 5 min 并拍掉孔内多余液体。

(2)封闭：向孔中加入 200 μL 封闭液（5 %脱脂奶粉），封口后放入 37°C温箱孵育 2 h，弃掉孔中液体，用 PBST 溶液洗涤 3 次，每次 5 min 并拍掉孔内多余液体。

(3) 将待检血清用 PBST 溶液按 1:100 进行稀释，将稀释后的血清作为一抗，每孔 100 μL 加入酶标板，封口后放入 37°C 温箱孵育 2 h，弃掉孔中液体，用 PBST 溶液洗涤 3 次，每次 5 min 并拍掉孔内多余液体。

(4) 将羊抗鼠酶标抗体 IgG-HRP 用 PBST 溶液按 1:5000 进行稀释作为二抗，每孔 100 μL 加入酶标板，封口后放入 37°C 温箱孵育 1 h，弃掉孔中液体，用 PBST 溶液洗涤 3 次，每次 5 min 并拍掉孔内多余液体。

(5) 显色：每孔加入 100 μL TMB 底物溶液，37°C 温箱避光显色 15 min。

(6) 终止：每孔加入 100 μL 终止液（0.2 mol/L HCl），混匀显色后在酶标仪读取 OD₄₅₀ 的值。

4.2.2.2 特异性抗体分型检测

对 35 d 的小鼠免疫后血清进行 IgG2a 和 IgG1 的分型检测，IgG2a/IgG1 的比率也是 Th1（细胞免疫）或 Th2（体液免疫）极化的指标，在小鼠体内，Th1 细胞促进 B 细

胞产生 IgG2a 抗体偏向细胞免疫；Th2 细胞促进 IgG1 的合成，偏向体液免疫(Kang et al. 2021)。

4.2.3 中和抗体检测

4.2.3.1 MA-104 细胞的复苏与培养

将冻存的 MA-104 细胞取出放入提前打开的 37°C 水浴锅中，轻柔摇晃加速细胞融化，融化后 300 g 离心 5 min，在超净工作台中弃掉液体并加入 5 mL 37°C 预热的培养基（DMEM+10% 胎牛血清+2% 青链霉素），转移入 T25 方瓶，细胞密度达 90% 左右进行传代培养。弃去旧培养上清，用等体积的 PBS 润洗细胞 3 次洗去旧培养基，加入 1.5 mL 0.25% Trypsin-0.53 mM EDTA 于培养瓶中，37°C 培养箱中消化 3 min 左右，在显微镜下观察细胞消化情况，若细胞大部分变圆并脱落，迅速拿回操作台，若无脱落现象可适当延长消化时间，轻敲几下培养瓶后加 3 mL（37°C 预热）终止消化，300 g 离心 5 min 去除胰酶后补加培养基（DMEM+10% 胎牛血清+2% 青链霉素）吹打均匀后，将细胞悬液按 1:3 的比例分到新的 T25 方瓶中。

4.2.3.2 病毒 TCID₅₀ 测定

对病毒液进行滴度测定，将 MA-104 细胞接于 96 孔细胞培养板中，在 37°C 恒温培养箱中培养，至其长至 85% 左右后即可开始。先将 PoRV 病毒液从 -80°C 解冻，取出所需病毒液置于 EP 管中，加入 40 μg/ml 的胰酶 37°C 孵育 1 h 备用。将铺好 MA-104 细胞的 96 孔板用 PBS 洗涤 3 次，加入孵育好的 PoRV 病毒液，每孔 100 μL，吸附一小时后，弃掉吸附液用无血清培养基洗涤，补加含 3 μg/ml 的胰酶的 DMEM 培养基，每孔 200 μL，37°C、5% CO₂ 温箱中培养 72 h，观察并记录 CPE 现象，按 Reed-Muench 法计算结果。

4.2.3.3 血清中和试验

(1) 取小鼠 42 d 待检血清在 56°C 水浴条件下灭活 30 min，以去除补体等不耐热的非特异性反应因素。

(2) 灭活后的血清使用无血清 DMEM 进行八个梯度的倍比稀释，使其稀释度为 1:2、1:4、1:8、1:16、1:32、1:64、1:128、1:256、1:512、1:1024。

(3) 取出冻存于 -80°C 的 PoRV 病毒液，加入 40 μg/ml 的胰酶 37°C 孵育 1 h 后，使用无血清 DMEM 将病毒液稀释为 200 TCID₅₀。

(4) 将稀释好的血清与等量 200 TCID₅₀ 混合，37 °C 温箱孵育 1 h。

(5) 消化 MA-104 细胞，使用不含血清的 DMEM 培养基稀释至 3×10^5 /mL，100 μL/孔铺至孵育结束的 96 孔板中，将病毒与血清的混合液加入其中，每孔 100 μL，同时设阴性血清对照、阳性血清对照、未中和病毒对照和正常细胞对照，置 37°C、5% CO₂ 的培养箱中培养 5 天，37°C、5% CO₂ 温箱中培养，观察并记录 CPE。

4.2.4 淋巴细胞增殖检测

4.2.4.1 小鼠脾淋巴细胞分离

(1) 取免疫 35 d 后的 3 只小鼠进行眼球采血后处死，在无菌条件下取出小鼠脾脏，尽量将周围的其它组织去除。将脾脏放置于 70 μm 细胞滤器上，用 5 mL 注射器内塞研磨小鼠脾脏，研磨过程中使用 3 mL RPMI 1640 培养基不断冲洗纱网，转移至 50 mL 离心管中，收集细胞悬液。

(2) 将收集的细胞悬液 2000 rpm 离心 5 min 弃上清，加 2 mL 红细胞裂解液，轻轻重悬细胞以裂解红细胞 5 min，2000 rpm 离心 5 min。

(3) 离心后，弃上清，用 3 mL RPMI 1640 培养基，轻轻重悬起脾细胞，250 g 离心 10 min。

(4) 弃上清，用 2 mL 含 10% FBS RPMI 1640 重悬，250 g 离心 10 min；重复一次之前步骤，弃去上清即获得小鼠脾淋巴细胞。

4.2.4.2 淋巴细胞增殖检测

(1) 对上述分离出来的小鼠脾细胞计数，用含 10% FBS 的 RPMI 1640 重悬，铺于 96 孔板， 5×10^5 个细胞/孔，每孔加 100 μL 。每只小鼠脾细胞重复 3 孔，另设一孔为空白对照组，仅含有培养基，无细胞。

(2) 刀豆球蛋白 (ConA) 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 刺激脾淋巴细胞，取 1 孔不处理为对照。37°C、5% CO₂ 温箱中培养培养 48h，刺激组每孔轻柔吸出 50 μL ，用于后续细胞因子检测。

(3) 每孔加入 10 μL CCK8 试剂，避光，37°C 培养 4h。

(4) 使用酶标仪读取 OD₄₅₀。根据公式计算脾淋巴细胞刺激指数：

$$\text{Stimulation index} = (A - C) / (B - C) \times 100\%$$

A：刺激后的 OD₄₅₀；B：对照未刺激的 OD₄₅₀；C：空白对照仅含培养基的 OD₄₅₀

4.2.5 细胞因子 IL-4 和 IFN- γ 检测

(1) 按照细胞因子检测试剂盒说明书，将酶标板提前取出，在室温平衡 30 min 后备用。

(2) 以 4.2.4.2 中 ConA 刺激后的 50 μL 小鼠脾淋巴细胞上清液体为待测样品，样品孔中加入各待测样本 50 μL ；标准品孔中各加入 50 μL 不同浓度的标准品；然后加入 100 μL HRP 标记的酶标试剂，轻敲酶标板边缘混匀，空白孔中不加样品及酶标试剂，封口后放入 37°C 温箱孵育 1 h，弃掉孔中液体，用洗涤液洗涤 5 次，并拍干液体。

(3) 显色：每孔加入显色液 A、B 各 50 μL ，轻敲酶标板边缘使其混匀，封口后放入 37°C 温箱避光孵育 15 min。

(4) 终止：每孔加入 50 μL 终止液终止反应，酶标仪读取 OD₄₅₀ 的值。

4.3 结果

4.3.1 血清特异性抗体检测结果

小鼠皮下注射抗原后，在免疫后第 14 d、28 d、35 d、42 d 和 56 d 采血并收集血清检测 IgG 抗体水平，如图 4-1 所示。VP8*P7-Ferritin、VP8*P13-Ferritin、VP8*P23-Ferritin 纳米颗粒免疫组在第 14 d 时能够明显看到诱导出了较高的特异性 IgG 抗体，且 IgG 抗体水平明显高于不带铁蛋白的 VP8*P7、VP8*P13、VP8*P23 的免疫组。在整个免疫期间，VP8*-Ferritin 组诱导的特异性 IgG 抗体水平一直稳定的高于 VP8*抗原组；除了 VP8*混合三价疫苗免疫组特异性抗体水平在 35 d 后开始下降外，其余免疫组总体 IgG 抗体水平均在免疫后第 42 d 达到峰值，然后开始下降（不包括 Ferritin 和生理盐水对照组）。在注射三价 VP8*混合纳米颗粒与三价 VP8*混合单体的对照组中，三价 VP8*纳米颗粒疫苗产生的 IgG 抗体在整个免疫组最高，高于三价单体疫苗的免疫效果，单独 Ferritin IgG 抗体水平与阴性对照生理盐水组差别不大。

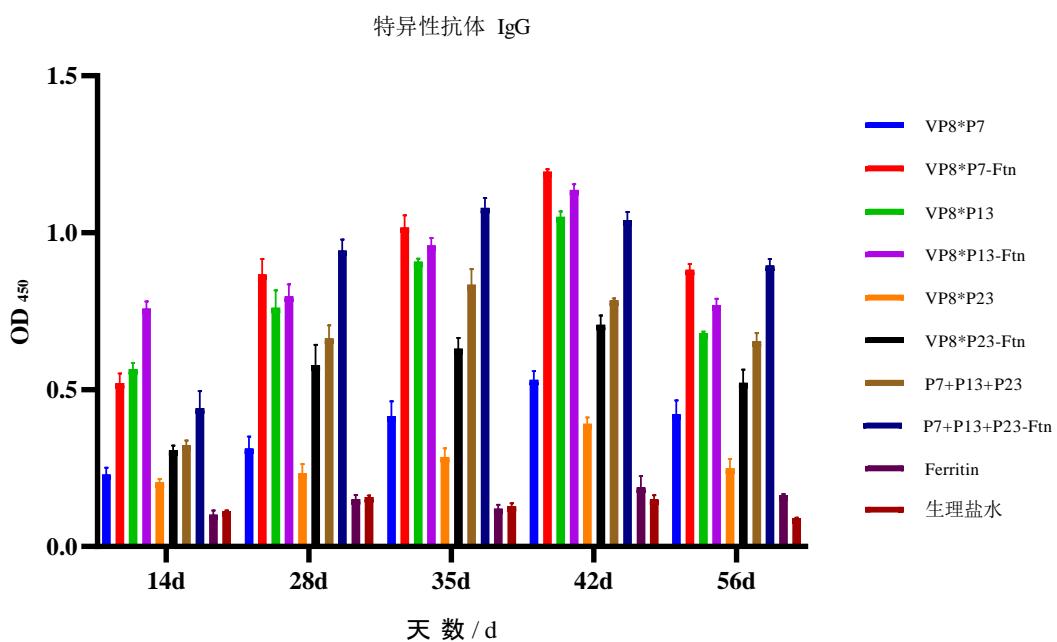


图 4-1 血清特异性 IgG 检测结果

Fig 4-1 Results of specific IgG detection in serum

对免疫后 35 d 的小鼠血清进行 IgG2a 和 IgG1 抗体分型检测，结果如图 4-2，试验组免疫反应均表现出偏向 Th1 型细胞免疫反应，其中 VP8*P7-Ferritin、VP8*P13-Ferritin、VP8*P23-Ferritin 纳米颗粒的 Th1 型细胞免疫反应且明显高于不带铁蛋白的 VP8*P7、VP8*P13、VP8*P23 单价抗原。单独 Ferritin 与阴性对照生理盐水组差别不大，免疫反应表现出 Th1/Th2 平衡。

35d IgG2a/IgG1

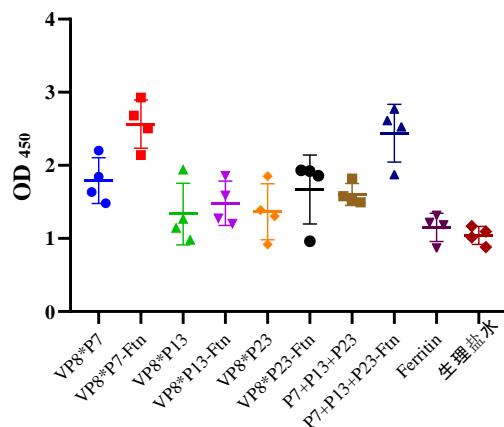


图 4-2 特异性抗体分型检测结果

Fig 4-2 Specific antibody typing test results

4.3.2 淋巴细胞增殖检测结果

小鼠免疫后 35 d，使用 CCK8 法对淋巴细胞增殖率进行检测，以空白组为 100% 计。结果如图 4-3，VP8*P7-Ferritin、VP8*P13-Ferritin、VP8*P23-Ferritin 纳米颗粒免疫组与不带铁蛋白的 VP8*P7、VP8*P13、VP8*P23 免疫组淋巴细胞增殖率有极显著差异 ($P<0.01$)，单独 Ferritin 与阴性对照生理盐水组差别不大。在所有免疫组中，三价 VP8*P7-Ferritin、VP8*P13-Ferritin、VP8*P23-Ferritin 纳米颗粒混合免疫的淋巴细胞增殖效果最好。

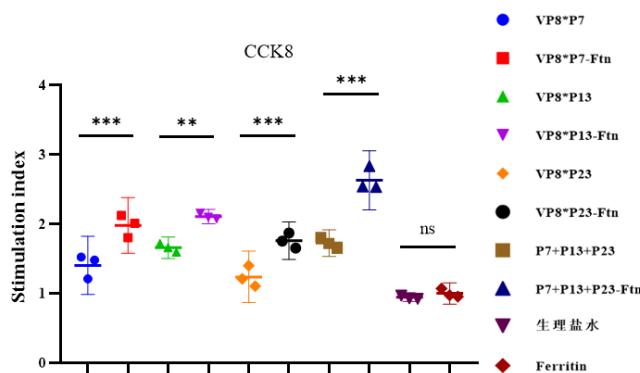


图 4-3 CCK8 检测结果

Fig 4-3 Results of CCK8

4.3.3 中和抗体检测结果

对特异性水平最高的 42 d 小鼠血清进行中和抗体检测，将待测血清从 1:2 稀释至 1:1024，与实验室保存的猪轮状病毒进行中和，使用前用无血清 DMEM 将病毒液稀释至 200TCID₅₀。中和抗体检测结果见表 4-2，结果显示，VP8*P7-Ferritin、VP8*P13-

Ferritin、VP8*P23-Ferritin 纳米颗粒免疫组的中和抗体水平且明显高于不带铁蛋白的 VP8*P7、VP8*P13、VP8*P23 免疫组，VP8*P7-Ferritin、VP8*P13-Ferritin、VP8*P23-Ferritin 纳米颗粒免疫组的中和抗体水平最高可达 1:128，而不带铁蛋白的 VP8*P7、VP8*P13、VP8*P23 免疫组最高为 1:64。其中 VP8*P7-Ferritin、VP8*P13-Ferritin、VP8*P23-Ferritin 混合三价纳米颗粒免疫组的中和抗体水平最高，可达到 1:512。单独 Ferritin 与阴性对照生理盐水组小鼠血清中均未检测到中和抗体。

表 4-2 中和抗体检测结果

Table 4-2 Neutralization antibody test results

免疫组 Immune group	42 天 42 Days
VP8*P7	1:32
VP8*P7-Ferritin	1:128
VP8*P13	1:64
VP8*P13-Ferritin	1:128
VP8*P23	1:16
VP8*P23-Ferritin	1:64
P7+P13+P23	1:128
P7+P13+P23-Ferritin	1:512
Ferritin	无
生理盐水	无

4.3.4 细胞因子 IL-4 和 IFN- γ 检测结果

对免疫后第 35 天，经 ConA 刺激后的小鼠脾淋巴细胞上清通过 ELISA 检测试剂盒进行细胞因子检测。IFN- γ 是 Th1 细胞诱导分泌的，以细胞免疫反应为主。IL-4 是 Th2 细胞诱导分泌的，以体液免疫反应为主。细胞因子检测结果如图 4-4 所示，单独 Ferritin 与阴性对照生理盐水组细胞因子水平无明显差异；与阴性对照生理盐水组相比，试验组都有 IFN- γ 、IL-4 细胞因子的分泌，VP8*P7-Ferritin、VP8*P13-Ferritin、VP8*P23-Ferritin 组的 IFN- γ 、IL-4 细胞因子水平显著高于不带铁蛋白的 VP8*P7、VP8*P13、VP8*P23 抗原组 ($P<0.05$)。其中三价 VP8*P7-Ferritin、VP8*P13-Ferritin、VP8*P23-Ferritin 纳米颗粒混合免疫组的诱导的 IFN- γ 、IL-4 细胞因子水平极显著高于其他免疫组（不包括 Ferritin 和阴性对照生理盐水）($P<0.01$)。

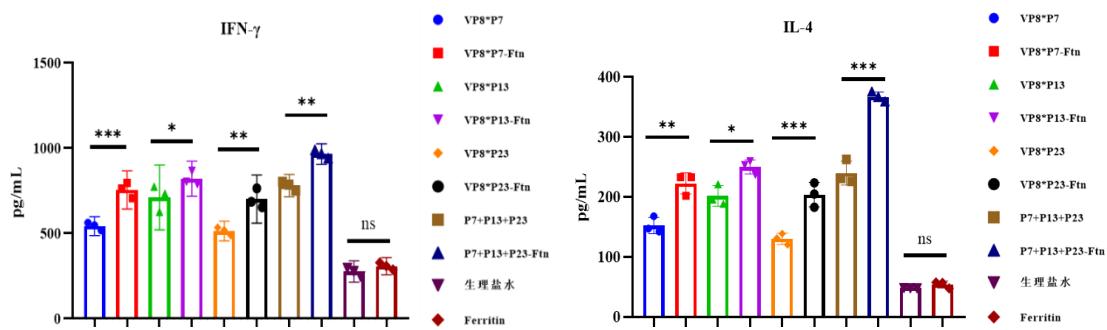


图 4-4 细胞因子检测结果

Fig 4-4 Results of cytokine

4.4 讨论

随着 PoRV 的不断流行与变异，一些 PoRV 菌株在 VP7、VP4 和 VP6 基因与人类 RV 菌株之间表现出显著的同源性，表明猪轮状病毒存在与人轮状病毒重组的可能性，这也提醒我们猪轮状病毒净化的重要性(Qiao et al. 2024a)

与单体疫苗相比，纳米颗粒疫苗引发了更强的中和抗体和细胞免疫反应(Ma et al. 2020)。除了递送能力外，纳米载体还被证明具有内在的佐剂特性，可作为免疫细胞刺激剂发挥作用。因此，纳米疫苗有可能促进快速和持久的体液和细胞免疫。纳米疫苗有几个可能的好处，包括位点特异性抗原递送、增加抗原生物利用度和减少不良反应(Priyanka et al. 2023)。

近年来基于铁蛋白纳米颗粒疫苗的研究（新冠和流感等）取得了非常显著的成果，如将流感病毒 HA 与自组装的铁蛋白纳米颗粒融合表达，设计了一种通用流感 DNA 疫苗，可引发显著的 HA 特异性体液免疫和 T 细胞免疫反应，为小鼠提供保护(Qiao et al. 2022)。通过将自组装的 24-mer 铁蛋白与严重急性呼吸综合征冠状病毒 2 型（SARS-CoV-2）刺突 S 蛋白的受体结合域（RBD）或七肽重复（HR）亚基共价偶联来开发纳米颗粒疫苗，能够诱导产生持续、强烈的细胞免疫和体液免疫(Ma et al. 2020)。

本试验对 PoRV 三个流行 P 基因型的 VP8 抗原构建的铁蛋白纳米颗粒，配伍 MF59 佐剂和 CPG 组合制备纳米颗粒疫苗并对疫苗免疫原性进行评估。免疫结果表明，所有免疫组（不包括 Ferritin 和阴性对照生理盐水）都具有免疫原性，且 VP8*P7-Ferritin、VP8*P13-Ferritin、VP8*P23-Ferritin 纳米颗粒疫苗免疫后产生的特异性 IgG 抗体水平、中和抗体水平和细胞因子水平高于不带铁蛋白的 VP8*P7、VP8*P13、VP8*P23 单价抗原组，具有显著差异 ($P<0.05$)；且 VP8*P7-Ferritin、VP8*P13-Ferritin、VP8*P23-Ferritin 混合三价纳米颗粒免疫组的中和抗体水平和 IFN- γ 、IL-4 细胞因子水平在整个免疫组中显示出了其优越性。

对试验结果及过程进行分析及反思，发现免疫方案中存在以下问题：本试验仅选

择了 MF59 和 CpG 作为疫苗佐剂，而不同佐剂的选择和配伍对疫苗的免疫效果也不同，后续试验可筛选一些不同的佐剂与 PoRV VP8*铁蛋白纳米颗粒配伍，增强 PoRV VP8*铁蛋白纳米颗粒亚单位疫苗的免疫效果和时间。

综上所述，VP8*P7-Ferritin、VP8*P13-Ferritin、VP8*P23-Ferritin 纳米颗粒疫苗激发了明显的体液免疫和细胞免疫应答，且明显优于 VP8*P7、VP8*P13 和 VP8*P23 疫苗。由于猪轮状病毒的 VP4 (P 型) 蛋白对机体免疫力有重要作用，可诱导交叉性中和抗体，不同型之间具有不完全的交叉保护作用，将 PoRV VP8*抗原混合后免疫的三价疫苗相对单价疫苗产生的免疫效果更好。本试验为猪轮状病毒亚单位疫苗的研究奠定了基础，是一种很有前途的猪轮状病毒候选疫苗研发途径。

4.5 小结

1. 使用 PoRV VP8*截短蛋白配伍复合佐剂 MF59+CPG 制备成亚单位疫苗，皮下注射免疫小鼠。与 VP8*P7、VP8*P13 和 VP8*P23 疫苗组相比，VP8*P7-Ferritin、VP8*P13-Ferritin、VP8*P23-Ferritin 纳米颗粒疫苗组能够诱导小鼠产生更高水平的体液免疫和细胞免疫应答。
2. PoRV VP8*铁蛋白纳米颗粒按一定比例混合后制备的三价铁蛋白纳米颗粒亚单位疫苗在整个免疫组中具有极显著优越性 ($P<0.01$)。

结论

1. 成功构建重组质粒 pET28a-spt-VP8*P7、pET28a-spt-VP8*P13、pET28a-spt-VP8*P23 并进行原核表达。
2. 利用 SpyCatcher/SpyTag 系统组装纳米颗粒，通过 TEM、HPLC、DLS 进行表征分析，成功组装出了高纯度、结构清晰的 PoRV VP8*铁蛋白纳米颗粒，纯度可达 85%。
3. 配伍 MF59+CpG 复合佐剂制备亚单位疫苗免疫小鼠，所有免疫组（不包括 Ferritin 和阴性对照生理盐水）均能引起免疫反应，PoRV VP8*铁蛋白纳米颗粒亚单位疫苗的免疫效果在整个免疫组中具有显著优越性 ($P<0.05$)。将三个抗原按不同比例混合免疫后具有协同作用，效果优于单独使用。

创新点

1. 选用猪轮状病毒流行 P 基因型菌株 P[7]、P[13] 和 P[23] 的 VP8 (65~231 aa) 为免疫原，利用 SpyTag/SpyCatcher 系统，构建了基于铁蛋白的 PoRV VP8*纳米颗粒。
2. 将 PoRV VP8*铁蛋白纳米颗粒制备亚单位疫苗免疫小鼠后，与未组装铁蛋白的 PoRV VP8*亚单位疫苗相比能诱导小鼠产生更早、更强烈的体液和细胞免疫反应，表明基于铁蛋白纳米平台的抗原递送具有潜在的临床适用性。
3. 将铁蛋白纳米颗粒用于猪轮状病毒疫苗研发，为猪轮状病毒疫苗的研制以及病毒的净化提供新的思路。

参考文献

- 毕艳铎, 魏晓曼, 冉旭华, 曹思, 张峣, 张玲玲, 苗艳, 闻晓波. 2015. 猪轮状病毒重组VP8*蛋白的原核表达及免疫原性分析. 黑龙江八一农垦大学学报, 27(06):28-32.
- 陈建飞, 冯力, 时洪艳, 崔尚金. 2010. 猪流行性腹泻疫苗的研究. 猪业科学, 27(12):50-51.
- 陈建飞, 石达, 时洪艳, 佟有恩, 张鑫, 冯力. 2023. 猪主要病毒性腹泻防控技术与应用. 中国科学: 生命科学, 53(12):1754-1766.
- 李封赛. 2022. 表达猪轮状病毒VP4营养缺陷型乳杆菌的构建及其诱导免疫应答的研究. [博士学位论文]: 黑龙江: 东北农业大学.
- 梁丹, 李安安, 洪文珊, 柯碧霞, 苏娟, 肖红, 柯昌文. 2022. 2019年广东省部分地区感染性腹泻病原学及人轮状病毒分子流行病学特征. 现代预防医学, 49(21):3841-3847+3863.
- 毛黎红. 2015. 贵州省仔猪病毒性腹泻流行病学调查及相关基因分析. [硕士学位论文]. 贵州: 贵州大学.
- 施开创, 尹彦文, 王孝德, 谢守玉, 石永胜, 刘宏梅, 陆文俊, 屈素洁, 冯淑萍, 粟艳琼. 2020. 2018年广西重要猪源病毒性疫病流行病学调查. 中国畜牧兽医, 47(01):174-181.
- 汤学超. 2023. 猪轮状病毒VP4蛋白截短体的原核表达及免疫原性研究. [硕士学位论文]. 湖北: 长江大学.
- 王小奎. 2022. 猪轮状病毒VP4亚单位疫苗的制备及免疫原性分析. [硕士学位论文]. 新疆: 石河子大学.
- 张婧旭, 徐松平. 2021. 猪轮状病毒病原学研究进展. 北方牧业, (08):21.
- 左媛媛, 徐天刚, 戈胜强, 路皓东, 吴晓东. 2022. 我国猪流行性腹泻病毒流行现状及分子遗传演化特征. 中国动物检疫, 39(09):9-17.
- Asensio-Cob, D., Rodríguez, J. M., Luque, D. 2023. Rotavirus Particle Disassembly and Assembly In Vivo and In Vitro. Viruses, 15(8).
- Bhaskar, S., Lim, S. 2017. Engineering protein nanocages as carriers for biomedical applications. NPG Asia Mater, 9(4):e371.
- Boshuizen, J. A., Reimerink, J. H., Korteland-van Male, A. M., van Ham, V. J., Koopmans, M. P., Büller, H. A., Dekker, J., Einerhand, A. W. 2003. Changes in small intestinal homeostasis, morphology, and gene expression during rotavirus infection of infant mice. J Virol, 77(24):13005-16.
- Chattopadhyay, S., Basak, T., Nayak, M. K., Bhardwaj, G., Mukherjee, A., Bhowmick, R., Sengupta, S., Chakrabarti, O., Chatterjee, N. S., Chawla-Sarkar, M. 2013. Identification of cellular calcium binding protein calmodulin as a regulator of rotavirus A infection during comparative proteomic study. PLoS One, 8(2):e56655.
- Cui, T., Xiong, J., Wang, Y., Wen, X., Huang, X., Huang, Y., Ma, X., Hu, Z., Zhao, Q., Cao, S. 2013. Construction of an artificial recombinant bicistronic plasmid DNA vaccine against porcine rotavirus. Onderstepoort J Vet Res, 80(1):498.

- Desselberger, U. 2014. Rotaviruses. *Virus Res.*, 190:75-96.
- Du, Y., Chen, C., Zhang, X., Yan, D., Jiang, D., Liu, X., Yang, M., Ding, C., Lan, L., Hecht, R., Zhu, C., Yang, S. 2022. Global burden and trends of rotavirus infection-associated deaths from 1990 to 2019: an observational trend study. *Virol J.*, 19(1):166.
- Estes, M. K., Kang, G., Zeng, C. Q., Crawford, S. E., Ciarlet, M. 2001. Pathogenesis of rotavirus gastroenteritis. *Novartis Found Symp.*, 238:82-96; discussion 96-100.
- HB, G., MK, E. 2009. Rotaviruses: from pathogenesis to vaccination. *Gastroenterology*, 136(6):1939-51.
- Homwong, N., Diaz, A., Rossow, S., Ciarlet, M., Marthaler, D. 2016. Three-Level Mixed-Effects Logistic Regression Analysis Reveals Complex Epidemiology of Swine Rotaviruses in Diagnostic Samples from North America. *PLoS One*, 11(5):e0154734.
- Houser, K. V., Chen, G. L., Carter, C., Crank, M. C., Nguyen, T. A., Burgos Florez, M. C., Berkowitz, N. M., Mendoza, F., Hendel, C. S., Gordon, I. J., Coates, E. E., Vazquez, S., Stein, J., Case, C. L., Lawlor, H., Carlton, K., Gaudinski, M. R., Strom, L., Hofstetter, A. R., Liang, C. J., Narpala, S., Hatcher, C., Gillespie, R. A., Creanga, A., Kanekiyo, M., Raab, J. E., Andrews, S. F., Zhang, Y., Yang, E. S., Wang, L., Leung, K., Kong, W.-P., Freyn, A. W., Nachbagauer, R., Palese, P., Bailer, R. T., McDermott, A. B., Koup, R. A., Gall, J. G., Arnold, F., Mascola, J. R., Graham, B. S., Ledgerwood, J. E., Casazza, J., Holman, L., Ola, A. O., Costner, P., Cunningham, J., Larkin, B., Novik, L., Saunders, J., Whalen, W., Wang, X., Eshun, A. M., Taylor, A., Cheng, K. C., Laurencot, C., Cox, J. H., Sitar, S., Le, L., Pittman, I., Vasilenko, O., Rothwell, R. S., Yamshchikov, G., Burch, E., Hickman, S., Trofymenko, O., Boyd, C., Apte, P., Cartagena, C. T., Hicks, R., Williams, P., Blaku, Z., Tran, C., the, V. R. C. S. T. 2022. Safety and immunogenicity of a ferritin nanoparticle H2 influenza vaccine in healthy adults: a phase 1 trial. *Nature Medicine*, 28(2):383-391.
- Huang, P., Xia, M., Tan, M., Zhong, W., Wei, C., Wang, L., Morrow, A., Jiang, X. 2012. Spike protein VP8* of human rotavirus recognizes histo-blood group antigens in a type-specific manner. *J Virol*, 86(9):4833-43.
- J, M., M, C., M, R., H, A., K, B., MK, E., JR, G., M, I.-G., CD, K., V, M., PP, M., O, N., JT, P., FM, R., LJ, S., N, S., A, S., K, T., U, D., M, V. R. 2008. Recommendations for the classification of group A rotaviruses using all 11 genomic RNA segments. *Arch Virol*, 153(8):1621-9.
- Jayaram, H., Estes, M. K., Prasad, B. V. V. 2004. Emerging themes in rotavirus cell entry, genome organization, transcription and replication. *Virus Res.*, 101(1):67-81.
- Johansen, K., Svensson, L. 1997. Neutralization of rotavirus and recognition of immunologically important epitopes on VP4 and VP7 by human IgA. *Arch Virol*, 142(7):1491-8.
- K, B., G, K., I, B., F, F., B, Z., S, M., R, V.-K., M, O., K, K., F, J. 2017. Candidate new rotavirus species in Schreiber's bats, Serbia. *molecular epidemiology*, 48:19-26.
- Kanekiyo, M., Wei, C.-J., Yassine, H. M., McTamney, P. M., Boyington, J. C., Whittle, J. R. R., Rao, S. S., Kong, W.-P., Wang, L., Nabel, G. J. 2013. Self-assembling influenza nanoparticle vaccines elicit broadly neutralizing H1N1 antibodies. *Nature*, 499(7456):102-106.
- Kang, Y.-F., Zhang, X., Yu, X.-H., Zheng, Q., Liu, Z., Li, J.-P., Sun, C., Kong, X.-W., Zhu, Q.-Y., Chen, H.-W., Huang, Y., Xu, M., Zhong, Q., Zeng, Y.-X., Zeng, M.-S. 2021. Immunization with a Self-Assembled Nanoparticle Vaccine Elicits Potent Neutralizing Antibody Responses against EBV

- Infection. Nano Letters, 21(6):2476-2486.
- Kato, T., Kakuta, T., Yonezuka, A., Sekiguchi, T., Machida, Y., Xu, J., Suzuki, T., Park, E. Y. 2023. Expression and Purification of Porcine Rotavirus Structural Proteins in Silkworm Larvae as a Vaccine Candidate. *Mol Biotechnol*, 65(3):401-409.
- Khodabandehloo, M., Shahrabadi, M. S., Keyvani, H., Bambai, B., Sadigh, Z. 2012. Recombinant outer capsid glycoprotein (VP7) of rotavirus expressed in insect cells induces neutralizing antibodies in rabbits. *Iran J Public Health*, 41(5):73-84.
- Khoshnejad, M., Parhiz, H., Shuvaev, V. V., Dmochowski, I. J., Muzykantov, V. R. 2018. Ferritin-based drug delivery systems: Hybrid nanocarriers for vascular immunotargeting. *J Control Release*, 282:13-24.
- Krishnan, N., Jiang, Y., Zhou, J., Mohapatra, A., Peng, F.-X., Duan, Y., Holay, M., Chekuri, S., Guo, Z., Gao, W., Fang, R. H., Zhang, L. 2023. A modular approach to enhancing cell membrane-coated nanoparticle functionality using genetic engineering. *Nature Nanotechnology*.
- Larralde, G., Li, B. G., Kapikian, A. Z., Gorziglia, M. 1991. Serotype-specific epitope(s) present on the VP8 subunit of rotavirus VP4 protein. *J Virol*, 65(6):3213-8.
- Li, C., Lu, H., Geng, C., Yang, K., Liu, W., Liu, Z., Yuan, F., Gao, T., Wang, S., Wen, P., Song, H., Tian, Y., Zhou, D. 2022a. Epidemic and Evolutionary Characteristics of Swine Enteric Viruses in South-Central China from 2018 to 2021. *Viruses*, 14(7).
- Li, W., Lei, M., Li, Z., Li, H., Liu, Z., He, Q., Luo, R. 2022b. Development of a Genetically Engineered Bivalent Vaccine against Porcine Epidemic Diarrhea Virus and Porcine Rotavirus. *Viruses*, 14(8).
- Li, Z., Cui, K., Wang, H., Liu, F., Huang, K., Duan, Z., Wang, F., Shi, D., Liu, Q. 2019. A milk-based self-assemble rotavirus VP6-ferritin nanoparticle vaccine elicited protection against the viral infection. *Journal of Nanobiotechnology*, 17(1):13.
- López, S., Arias, C. F. 2004. Multistep entry of rotavirus into cells: a Versaillesque dance. *Trends Microbiol*, 12(6):271-8.
- Lorrot, M., Vasseur, M. 2007. How do the rotavirus NSP4 and bacterial enterotoxins lead differently to diarrhea? *Virol J*, 431.
- Ludert, J. E., Ruiz, M. C., Hidalgo, C., Liprandi, F. 2002. Antibodies to rotavirus outer capsid glycoprotein VP7 neutralize infectivity by inhibiting virion decapsidation. *J Virol*, 76(13):6643-51.
- Lundgren, O., Peregrin, A. T., Persson, K., Kordasti, S., Uhnoo, I., Svensson, L. 2000. Role of the enteric nervous system in the fluid and electrolyte secretion of rotavirus diarrhea. *Science*, 287(5452):491-5.
- Luo, G., Zeng, Y., Yang, H., Li, Y., Yang, L., Li, C., Song, F., Zhang, S., Li, T., Ge, S., Zhang, J., Xia, N. 2022. Bivalent rotavirus VP4* stimulates protective antibodies against common genotypes of human rotaviruses. *iScience*, 25(10):105099.
- Ma, X., Zou, F., Yu, F., Li, R., Yuan, Y., Zhang, Y., Zhang, X., Deng, J., Chen, T., Song, Z., Qiao, Y., Zhan, Y., Liu, J., Zhang, J., Zhang, X., Peng, Z., Li, Y., Lin, Y., Liang, L., Wang, G., Chen, Y., Chen, Q., Pan, T., He, X., Zhang, H. 2020. Nanoparticle Vaccines Based on the Receptor Binding Domain (RBD) and Heptad Repeat (HR) of SARS-CoV-2 Elicit Robust Protective Immune Responses. *Immunity*, 53(6):1315-1330.e9.
- Marthaler, D., Rossow, K., Culhane, M., Collins, J., Goyal, S., Ciarlet, M., Matthijnssens, J. 2013.

- Identification, phylogenetic analysis and classification of porcine group C rotavirus VP7 sequences from the United States and Canada. *Virology*, 446(1-2):189-98.
- Matthijnssens, J., Ciarlet, M., Rahman, M., Attoui, H., Bányai, K., Estes, M. K., Gentsch, J. R., Iturriaga-Gómara, M., Kirkwood, C. D., Martella, V., Mertens, P. P., Nakagomi, O., Patton, J. T., Ruggeri, F. M., Saif, L. J., Santos, N., Steyer, A., Taniguchi, K., Desselberger, U., Van Ranst, M. 2008. Recommendations for the classification of group A rotaviruses using all 11 genomic RNA segments. *Arch Virol*, 153(8):1621-9.
- Matthijnssens, J., Otto, P. H., Ciarlet, M., Desselberger, U., Van Ranst, M., Johne, R. 2012. VP6-sequence-based cutoff values as a criterion for rotavirus species demarcation. *Arch Virol*, 157(6):1177-82.
- McNulty, M. S. 1978. Rotaviruses. *J Gen Virol*, 40(1):1-18.
- Molinari, B. L., Possatti, F., Lorenzetti, E., Alfieri, A. F., Alfieri, A. A. 2016. Unusual outbreak of post-weaning porcine diarrhea caused by single and mixed infections of rotavirus groups A, B, C, and H. *Vet Microbiol*, 193:125-32.
- Nie, J., Zhou, Y., Ding, F., Liu, X., Yao, X., Xu, L., Chang, Y., Li, Z., Wang, Q., Zhan, L., Zhu, L., Xie, K., Li, C., Shi, Y., Zhao, Q., Shan, Y. 2024. Self-adjuvant multiepitope nanovaccine based on ferritin induced long-lasting and effective mucosal immunity against H3N2 and H1N1 viruses in mice. *International Journal of Biological Macromolecules*, 259:129259.
- Okitsu, S., Khamrin, P., Thongprachum, A., Maneekarn, N., Mizuguchi, M., Ushijima, H. 2011. Predominance of porcine P[23] genotype rotaviruses in piglets with diarrhea in northern Thailand. *J Clin Microbiol*, 49(1):442-5.
- Park, J. G., Alfajaro, M. M., Cho, E. H., Kim, J. Y., Soliman, M., Baek, Y. B., Park, C. H., Lee, J. H., Son, K. Y., Cho, K. O., Kang, M. I. 2019. Development of a live attenuated trivalent porcine rotavirus A vaccine against disease caused by recent strains most prevalent in South Korea. *Vet Res*, 50(1):2.
- Pérez Filgueira, D. M., Mozgovoj, M., Wigdorovitz, A., Dus Santos, M. J., Parreño, V., Trono, K., Fernandez, F. M., Carrillo, C., Babiuk, L. A., Morris, T. J., Borca, M. V. 2004. Passive protection to bovine rotavirus (BRV) infection induced by a BRV VP8* produced in plants using a TMV-based vector. *Arch Virol*, 149(12):2337-48.
- Pesavento, J. B., Crawford, S. E., Estes, M. K., Prasad, B. V. 2006. Rotavirus proteins: structure and assembly. *Curr Top Microbiol Immunol*, 309:189-219.
- Prasad, B. V., Wang, G. J., Clerx, J. P., Chiu, W. 1988. Three-dimensional structure of rotavirus. *J Mol Biol*, 199(2):269-75.
- Priyanka, Abusalah, M. A. H., Chopra, H., Sharma, A., Mustafa, S. A., Choudhary, O. P., Sharma, M., Dhawan, M., Khosla, R., Loshali, A., Sundriyal, A., Saini, J. 2023. Nanovaccines: A game changing approach in the fight against infectious diseases. *Biomed Pharmacother*, 167:115597.
- Qiao, M., Li, M., Li, Y., Wang, Z., Hu, Z., Qing, J., Huang, J., Jiang, J., Jiang, Y., Zhang, J., Gao, C., Yang, C., Li, X., Zhou, B. 2024a. Recent Molecular Characterization of Porcine Rotaviruses Detected in China and Their Phylogenetic Relationships with Human Rotaviruses. *Viruses*, 16(3).
- Qiao, M., Li, M., Li, Y., Wang, Z., Hu, Z., Qing, J., Huang, J., Jiang, J., Jiang, Y., Zhang, J., Gao, C., Yang, C., Li, X., Zhou, B. 2024b. Recent Molecular Characterization of Porcine Rotaviruses Detected in China and Their Phylogenetic Relationships with Human Rotaviruses. 16(3):453.

参考文献

- Qiao, Y., Jin, S., Nie, J., Chang, Y., Wang, B., Guan, S., Li, Q., Shi, Y., Kong, W., Shan, Y. 2022. Hemagglutinin-based DNA vaccines containing trimeric self-assembling nanoparticles confer protection against influenza. *J Leukoc Biol*, 112(3):547-556.
- Ryu, J., Kang, G. J., Kim, O., Park, J. Y., Shin, H. J. 2021. Transplacental Transmission of Porcine Epidemic Diarrhea Virus. *Front Vet Sci*, 8802816.
- Settembre, E. C., Chen, J. Z., Dormitzer, P. R., Grigorieff, N., Harrison, S. C. 2011. Atomic model of an infectious rotavirus particle. *Embo j*, 30(2):408-16.
- SJ, K., C, H., M, P., H, H., M, C., A, K., mAbs, Y. F. J. 2023. SpyDisplay: A versatile phage display selection system using SpyTag/SpyCatcher technology. *15(1):2177978*.
- Song, J. M. 2021. Parenteral, non-live rotavirus vaccine: recent history and future perspective. *Clin Exp Vaccine Res*, 10(3):203-210.
- Stannard, L. M., Schoub, B. D. 1977. Observations on the morphology of two rotaviruses. *J Gen Virol*, 37(2):435-9.
- T, C., S, T., J, X., research, N. H. J. V. 2019. Porcine rotavirus mainly infects primary porcine enterocytes at the basolateral surface. *50(1):110*.
- Tajnur, R., Rezwan, R., Aziz, A., Islam, M. S. 2023. An update on vaccine status and the role of nanomedicine against SARS-CoV-2: A narrative review. *Health Sci Rep*, 6(7):e1377.
- Tang, X., Li, S., Zhou, J., Bian, X., Wang, J., Han, N., Zhu, X., Tao, R., Wang, W., Sun, M., Li, P., Zhang, X., Li, B. 2024. Recombinant bivalent subunit vaccine combining truncated VP4 from P[7] and P[23] induces protective immunity against prevalent porcine rotaviruses. *J Virol*, 98(5):e0021224.
- Tao, R., Chang, X., Zhou, J., Zhu, X., Yang, S., Li, K., Gu, L., Zhang, X., Li, B. 2023. Molecular epidemiological investigation of group A porcine rotavirus in East China. 10.
- Theil, K. W., Saif, L. J., Moorhead, P. D., Whitmoyer, R. E. 1985. Porcine rotavirus-like virus (group B rotavirus): characterization and pathogenicity for gnotobiotic pigs. *J Clin Microbiol*, 21(3):340-5.
- Theuns, S., Heylen, E., Zeller, M., Roukaerts, I. D., Desmarests, L. M., Van Ranst, M., Nauwynck, H. J., Matthijnssens, J. 2015. Complete genome characterization of recent and ancient Belgian pig group A rotaviruses and assessment of their evolutionary relationship with human rotaviruses. *J Virol*, 89(2):1043-57.
- Veggiani, G., Zakeri, B., Howarth, M. 2014. Super glue from bacteria: unbreakable bridges for protein nanotechnology. *Trends in Biotechnology*, 32(10):506-512.
- Vlasova, A. N., Amimo, J. O., Saif, L. J. 2017. Porcine Rotaviruses: Epidemiology, Immune Responses and Control Strategies. *Viruses*, 9(3).
- Wang, J., Guo, R., Qiao, Y., Xu, M., Wang, Z., Liu, Y., Gu, Y., Liu, C., Hou, J. 2016. An inactivated gE-deleted pseudorabies vaccine provides complete clinical protection and reduces virus shedding against challenge by a Chinese pseudorabies variant. *BMC Vet Res*, 12(1):277.
- Wang, Y., Liu, S., Li, B., Sun, X., Pan, Q., Zheng, Y., Liu, J., Zhao, Y., Wang, J., Liu, L., Du, E. 2024a. A novel CpG ODN compound adjuvant enhances immune response to spike subunit vaccines of porcine epidemic diarrhea virus. *Front Immunol*, 151336239.
- Wang, Y., Song, J., Deng, X., Wang, J., Zhang, M., Liu, Y., Tang, P., Liu, H., Zhou, Y., Tong, G., Li, G.,

- Yu, L. 2024b. Nanoparticle vaccines based on the receptor binding domain of porcine deltacoronavirus elicit robust protective immune responses in mice. *Front Immunol*, 15:1328266.
- Wang, Z., Xu, L., Yu, H., Lv, P., Lei, Z., Zeng, Y., Liu, G., Cheng, T. 2019. Ferritin nanocage-based antigen delivery nanoplatforms: epitope engineering for peptide vaccine design. *Biomater Sci*, 7(5):1794-1800.
- Xia, M., Huang, P., Jiang, X., Tan, M. 2021. A Nanoparticle-Based Trivalent Vaccine Targeting the Glycan Binding VP8* Domains of Rotaviruses. *Viruses*, 13(1).
- Xia, X., Li, H., Zang, J., Cheng, S., Du, M. 2024. Advancements of the Molecular Directed Design and Structure-Activity Relationship of Ferritin Nanocage. *J Agric Food Chem*, 72(14):7629-7654.
- Yin, Y., Zhu, L., Liu, P., Zhao, J., Fan, Y., Sun, X., Xu, Z. 2019. Evaluation on the efficacy and immunogenicity of recombinant DNA plasmids expressing S gene from porcine epidemic diarrhea virus and VP7 gene from porcine rotavirus. *Braz J Microbiol*, 50(1):279-286.
- Zakeri, B., Fierer, J. O., Celik, E., Chittcock, E. C., Schwarz-Linek, U., Moy, V. T., Howarth, M. 2012. Peptide tag forming a rapid covalent bond to a protein, through engineering a bacterial adhesin. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 109(12):E690-7.
- Zhang, B., Chao, C. W., Tsybovsky, Y., Abiona, O. M., Hutchinson, G. B., Moliva, J. I., Olia, A. S., Pegu, A., Phung, E., Stewart-Jones, G. B. E., Verardi, R., Wang, L., Wang, S., Werner, A., Yang, E. S., Yap, C., Zhou, T., Mascola, J. R., Sullivan, N. J., Graham, B. S., Corbett, K. S., Kwong, P. D. 2020. A platform incorporating trimeric antigens into self-assembling nanoparticles reveals SARS-CoV-2-spike nanoparticles to elicit substantially higher neutralizing responses than spike alone. *Sci Rep*, 10(1):18149.
- Zhang, F., Luo, Y., Lin, C., Tan, M., Wan, P., Xie, B., Xiong, L., Ji, H. 2024. Epidemiological monitoring and genetic variation analysis of pathogens associated with porcine viral diarrhea in southern China from 2021 to 2023. *Front Microbiol*, 15.
- Zhang, H., Zhao, H., Zhao, Y., Sui, L., Li, F., Zhang, H., Li, J., Jiang, Y., Cui, W., Ding, G., Zhou, H., Wang, L., Qiao, X., Tang, L., Wang, X., Li, Y. 2022. Auxotrophic Lactobacillus Expressing Porcine Rotavirus VP4 Constructed Using CRISPR-Cas9D10A System Induces Effective Immunity in Mice. *Vaccines (Basel)*, 10(9).
- Zhou, Y. J., Burns, J. W., Morita, Y., Tanaka, T., Estes, M. K. 1994. Localization of rotavirus VP4 neutralization epitopes involved in antibody-induced conformational changes of virus structure. *J Virol*, 68(6):3955-64.

附录

附录 A 主要试验缓冲液配置方法

a. SDS-PAGE

SDS-PAGE 电泳缓冲液：称取 Tris 15.1 g、Glycine 94 g、SDS 5 g 于洁净的烧杯中，用 800 mL 的超纯水搅拌至充分溶解定容至 1 L，室温备用。

考马斯亮蓝染色剂：称取 1 g 的考马斯亮蓝 R-250 置于洁净的烧杯中，缓慢的加入 250 mL 的冰醋酸，搅拌至充分溶解混匀，加入 100 mL 的冰醋酸搅拌均匀后定容至 1 L，如果有较多杂质可以通过滤纸过滤去除，室温保存。

考马斯亮蓝脱色剂：量取 100 mL 的醋酸和 50 mL 的乙醇，混匀后定容至 1 L。室温保存。

b. Western blot

转膜缓冲液：48 mmol/L Tris-Cl (pH 8.3)，39 mmol/L 甘氨酸，0.037% SDS，20 甲醇，溶解后定容至 1 L。

TBS 洗液：10 mmol/L Tris-Cl (pH 7.5)，0.15 mmol/L NaCl，0.05% Tween-20。

封闭液：10 mmol/L Tris-Cl (pH 7.5)，0.15 mmol/L NaCl，3% BSA (5% 脱脂奶)，0.01% 的 Tween-20。

抗体稀释液：10 mmol/L Tris-HCl (pH 7.5)，0.15 mmol/L NaCl，0.05% Tween-20，5% 脱脂奶粉。

c. 细菌培养

LB 培养基：称取 NaCl 10 g、Tryptone 10 g、Yeast Extract 5 g 于洁净的烧杯中，用 800 mL 的超纯水充分溶解，加入适量的 NaOH 调节 PH 值至 7.0 后将培养基定容至 1 L。121 °C 高压灭菌 30 min，4°C 保存备用。

LB 固体平板培养基：称取 NaCl 1 g、Tryptone 1 g、Yeast Extract 0.5 g 于洁净的烧杯中，用 80 mL 的超纯水充分溶解，加入适量的 NaOH 调节 PH 值至 7.0 后，加入 1.5 g Agar 后将培养基定容至 100 mL，121°C 高压灭菌 30 min，4°C 保存备用。

卡那霉素抗性储液：取卡那霉素粉末 0.25 g，溶解于足量水中，定容到 50 mL，分装到小管中，冻存于-20 °C，用前融化解冻，用时添加于 LB 培养基中，终浓度一般为 50 μg/mL。

IPTG 储液：取 IPTG 粉末 1.25 g，溶解至 40 mL 无菌水中，定容到 50 mL，分装到小管中，冻存于-20 °C。

PBS 缓冲液：称取 8.006 g NaCl，0.201 g KCl，3.581 g Na₂PO₄ • 12H₂O，0.240 g

KH_2PO_4 , 溶于 800 mL 蒸馏水中, 调节溶液的 pH 值至 7.4, 最后定容到 1 L。

纯化相关试剂

d. 核酸电泳

50×TAE 电泳缓冲液: 称取 Tris 15.1 g、Glycine 94 g、SDS 5 g 于洁净的烧杯中, 用 800 mL 的超纯水搅拌至充分溶解定容至 1 L, 室温备用, 使用时用超纯水稀释成 1 × TAE 缓冲液。

1 %琼脂糖核酸胶: 称取琼脂糖粉末 1.0 g 于洁净的烧杯中, 用 100 mL 的 1×TAE 缓冲液加热溶解, 待温度降至 60 °C左右时 5 μL SYBR Green I 混合均匀后倒入制胶槽中制胶。

e. 纯化相关

Ni 亲和 A 液: 称取 2.42 g Tris、8.766 g NaCl、3.4 g 咪唑加入 800 mL 超纯水后搅拌溶解后调整至 pH8.0, 0.45 μm 过滤后 4°C保存。

Ni 亲和 B 液: 称取 2.42 g Tris、8.766 g NaCl、34 g 咪唑加入 800 mL 超纯水后搅拌溶解后调整至 pH8.0, 0.45 μm 过滤后 4°C保存。

分子筛缓冲液: 称取 2.42 g Tris、8.766 g NaCl 加入 800 mL 超纯水后搅拌溶解后调整至 pH8.0, 0.45 μm 过滤后 4°C保存。

f. Elisa 相关

抗原包被液: 称取 Na_2CO_3 1.59 g、 NaHCO_3 2.93 g 于洁净容器中, 加入 800 mL 超纯水充分溶解定容至 1 L, 0.45 μm 膜过滤后室温保存备用。

封闭液: 称取 15 g 脱脂奶粉, 加入 300 mL PBST 充分溶解后 4°C保存备用。

10×PBS 缓冲液: 称取 KH_2PO_4 2.7 g、 $\text{Na}_2\text{PO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ 14.2 g、KCl 2 g、NaCl 80g 于洁净容器中, 加入 800 mL 超纯水搅拌溶解, pH 调整至 7.4 后定容至 1 L, 0.45 μm 膜过滤后室温保存。

PBST: 量取 200 mL 10×PBS 缓冲液, 加入 2 mL 吐温 20, 充分混匀后加入 1.8 L 超纯水搅拌均匀后 0.45 μm 膜过滤, 室温保存。

附录 B 主要仪器

表 1 主要仪器

Table 1 Main instruments

仪器名称	型号	生产厂家
基因扩增仪	TL-XP-G	杭州博日生物科技有限公司
荧光定量聚合酶链（PCR）仪	FQD-96A	杭州博日生物科技有限公司
恒温摇床	TS-80C/TS-180C	上海天吴试验仪器制造有限公司
医用洁净工作台	BBS-SDC	BIOBAS
电热恒温培养箱	DHP-9272	上海申贤
超微量型紫外可见分光光度计	II	上海美谱达
掌上离心机	TD4	索莱宝
医用离心机	SC-108	湖南湘仪
迷你金属浴	MINIB-100F	杭州米欧
电泳仪	JY300HC	北京君意东方电泳设备
脱色摇床	TS-2000A	其林贝尔
PH 仪	2013C004-31-PHS-3C	仪电科学
电热恒温水浴箱	DK-S26	上海精宏
振荡培养箱	MQD-Acell	曼文
生物安全柜	HR40-11I2	海尔
自动细胞计数仪	IC10000	上海睿钰生物科技有限公司
倒置显微镜	XD20	宁波舜宇
二氧化碳培养箱	CCL-17OB-8	ESCO
独立送风隔离鼠笼	ZJ-4	苏州冯氏试验动物设备有限公司
凝胶成像仪	JY04S-3C	北京君意东方电泳设备