

分类号: S827
UDC: 577

密 级: 公开
学 号: 2112004085



广东海洋大学

GUANGDONG OCEAN UNIVERSITY

硕士学位论文

(专业学位)

鸭坦布苏病毒 E 蛋白抗体的制备和重组乳 酸乳球菌载体的构建

温锦芳

指 导 教 师: 葛叶 副教授

校 外 导 师: 李作生 教授

申 请 学 位 类 别: 农业硕士

领 域 名 称: 畜牧

学 院 名 称: 滨海农业学院

中国·湛江

2023 年 6 月

鸭坦布苏病毒 E 蛋白抗体的制备和重组乳酸乳球菌载体的构建

摘要

鸭坦布苏病毒病是由鸭坦布苏病毒（Duck Tembusu virus, DTMUV）感染引起鸭的致病性传染病，引起感染的肉鸭和蛋鸭饲料吸收率降低、产蛋量下降，以及一系列的输卵管疾病和神经功能障碍等症状。该病毒可在不同日龄的鸭群中广泛传播，更重要的是其宿主不断扩大，相继在其他禽类如鹅、鸡、鸽子、麻雀中发现。目前市场上的商品化疫苗均需经肌肉注射进行免疫，容易引起应激，且免疫程序繁琐。因此，研制出一种安全性高且能口服的抗病毒疫苗十分必要。

乳酸乳球菌具有调节机体免疫的功能，还能表达细菌和病毒抗原以进行疫苗安全接种。本研究首先制备了鸭坦布苏病毒 E 蛋白多克隆抗体和单克隆抗体，以此为基础，建立了表达 DTMUV E 蛋白 domainI/II 结构域蛋白的重组乳酸乳球菌 NZ3900-pNZ8149-domainI-II，经 Nisin 诱导剂诱导获得高表达的目的蛋白，为后期制备鸭坦布苏病毒的口服免疫疫苗奠定坚实的实验基础。具体研究如下：

（1）鸭坦布苏病毒 E 蛋白多克隆抗体和单克隆抗体的制备。

构建原核表达重组质粒 pET28a-E 并成功表达 E 蛋白，经 IPTG 诱导，SDS-PAGE 实验结果显示 E 蛋白以包涵体蛋白形式表达，分子量大小为 40 KDa 左右。将重组蛋白免疫新西兰耳大白兔制备多克隆抗体，经 Western blot 检测证明多克隆抗体能特异性识别 E 蛋白；将重组蛋白免疫 BALB/c 小鼠，达到融合效价的小鼠进行细胞融合和亚克隆筛选，最终得到一株能稳定分泌抗体的杂交瘤细胞株，命名为 2G10。收获 2G10 的细胞上清和制备的腹水，经过 western blot 检测证明上清和腹水能够特异性识别 E 蛋白。

（2）鸭坦布苏病毒 E 蛋白重组乳酸乳球菌载体的构建。

将优化后的 E 基因和 domainI/II 结构域基因、domainIII 结构域基因，截短 E 基因片段分别与线性化的 pNZ8149 构建重组质粒，制备乳酸乳球菌 NZ3900 感受态，将 pNZ8149-E、pNZ8149-domainI-II、pNZ8149-domainIII、pNZ8149-E（截短）重组质粒分别转入 NZ3900 感受态获得重组乳酸乳球菌载体，Nisin 诱导目的蛋白表达，超声波破碎获取蛋白，以自行制备的抗体作一抗，western

blot 检测结果可知，domainI/II 结构域蛋白表达量高，其余片段蛋白表达未能经制备的抗体识别或没表达。三因素三水平验证 domainI/II 结构域蛋白最大表达量条件为 Nisin: 1 ng/mL、OD₆₀₀=0.5，时间=5 h，蛋白表达位置检测为上清和沉淀都有表达，本研究成功构建鸭坦布苏病毒 E 蛋白及其不同结构域蛋白的重组乳酸乳球菌，并以自行制备的抗体检测出 domainI/II 结构域蛋白蛋白的表达，为后续继续研究新型 DTMUV 口服疫苗提供参考。

关键词：鸭坦布苏病毒；E 蛋白；多克隆抗体；单克隆抗体；重组乳酸乳球菌

Preparation of Duck Tembusu Virus E Protein Antibody and Construction of Recombinant Lactic Acid Lactococcal Vector

Abstract

Duck Tembusu virus disease is a pathogenic infection of ducks caused by Duck Tembusu virus (DTMUV), causing reduced feed absorption and egg production in infected meat and laying ducks, as well as a series of symptoms such as tubal disease and neurological dysfunction. The virus can spread widely among ducks of different ages and, more importantly, its hosts are expanding and are successively found in other birds such as geese, chickens, pigeons and sparrows. The commercial vaccines currently on the market all require intramuscular injection for immunization, which can easily cause stress and cumbersome immunization procedures. Therefore, it is necessary to develop a targeted vaccine that is safe and can be administered orally.

Lactococcus lactis has the function of regulating the immunity of the body and can also express bacterial and viral antigens for safe vaccination. In this study, we first prepared polyclonal antibodies and monoclonal antibodies to the E protein of duck Tembusu virus, based on which we established recombinant *Lactococcus lactis* NZ3900-pNZ8149-domainI-II expressing the domain I/II structural domain protein of DTMUV E protein, and obtained highly expressed target proteins by Nisin induction agent, which was used to prepare an oral vaccine for duck Tembusu virus at a later stage. A solid experimental foundation was laid for the preparation of oral immunization vaccine for duck Tembusu virus. The specific studies are as follows:

(1) Preparation of polyclonal antibodies and monoclonal antibodies to duck Tembusu virus E protein.

The recombinant plasmid pET28a-E was constructed and successfully expressed by IPTG induction and SDS-PAGE showed that the E protein was expressed as an inclusion body protein with a molecular weight of about 40 KDa. The recombinant protein was immunized to New Zealand Eared rabbits to prepare polyclonal antibodies, and the polyclonal antibodies were shown to specifically recognize the E protein by Western blot; the recombinant protein was immunized to BALB/c mice, and the mice that reached the fusion potency were subjected to cell fusion and subclonal screening,

and finally a hybridoma cell line, named 2G10, was obtained that could stably secrete antibodies. The supernatant and the prepared ascites were tested by western blot to demonstrate that the supernatant and ascites could specifically recognize the E protein.

(2) Construction of recombinant lactic acid lactococcal vector for duck Tembusu virus E protein.

The optimized E gene, domainI/II structural domain gene, domainIII structural domain gene, truncated E gene fragment and linearized pNZ8149 were used to construct recombinant plasmids to prepare *Lactococcus lactis* NZ3900 receptor state. pNZ8149-E, pNZ8149-domainI-II, pNZ8149- The recombinant plasmids pNZ8149-E, pNZ8149-domainI-II, pNZ8149-E (truncated) and pNZ8149-E (truncated) were transferred into NZ3900 receptor state to obtain recombinant *Lactococcus lactis* vector, Nisin induced the expression of the target protein, and the protein was obtained by ultrasonic fragmentation, and the antibody was prepared as primary antibody. The remaining fragments were not recognized or expressed by the prepared antibodies. The maximum expression of domainI/II structural domain protein was verified by three factors and three levels: Nisin: 1ng/mL, OD600=0.5, time=5h, and the protein expression position was detected as both supernatant and precipitate. The expression of domain I/II structural domain protein was detected by our own antibody, which provides a reference for further research on the novel DTMUV oral vaccine.

Keywords: Duck Tembusu virus; E protein; Polyclonal antibody; Monoclonal antibody; Recombinant lactic acid lactococcus

目 录

1. 文献综述.....	1
1.1 鸭坦布苏病毒概况.....	1
1.2 鸭坦布苏病毒生物学特性	1
1.3 鸭坦布苏病毒蛋白结构及功能	1
1.3.1 核衣壳蛋白 C 的结构及功能.....	1
1.3.2 膜蛋白前体(prM)和囊膜蛋白(E)的结构及功能.....	1
1.4 鸭坦布苏病毒疫苗的研究进展	3
1.4.1 弱毒疫苗.....	3
1.4.2 灭活疫苗.....	4
1.4.3 DNA 疫苗	4
1.4.4 亚单位疫苗.....	5
1.4.5 活载体疫苗及其他疫苗.....	6
1.5 乳酸乳球菌重组载体疫苗的研究进展和应用	6
1.6 本研究的目的是与意义.....	7
2. 鸭坦布苏病毒 E 蛋白多克隆抗体和单克隆的制备.....	9
2.1 材料.....	9
2.1.1 病毒毒株、菌株及载体质粒.....	9
2.1.2 实验动物及细胞.....	9
2.1.3 相关试剂盒、抗体和酶.....	9
2.1.4 主要试剂.....	9
2.1.5 溶液配置.....	10
2.1.6 试验仪器.....	10
2.2 方法.....	11
2.2.1 病毒 RNA 提取及反转录	11
2.2.2 PCR 扩增	11
2.2.3 目的基因与载体的连接.....	12
2.2.4 重组质粒转化和筛选.....	13
2.2.5 重组质粒的鉴定.....	14
2.2.6 E 蛋白的原核表达及表达条件优化	14
2.2.7 表达产物的 SDS-PAGE 电泳鉴定.....	15
2.2.8 重组蛋白的大量制备并纯化.....	15
2.2.9 重组蛋白的透析浓缩.....	16
2.2.10 多克隆抗体的制备.....	16
2.2.11 多克隆抗体的 western blot 鉴定	17

2.2.12 间接 ELISA 方法的建立	17
2.2.13 多克隆抗体的效价测定	18
2.2.14 单克隆抗体制备前准备	18
2.2.15 杂交瘤细胞株的建立	18
2.2.16 杂交瘤细胞的培养及单克隆抗体的筛选检测	20
2.2.17 融合细胞亚克隆	20
2.2.18 杂交瘤细胞的冻存与复苏	21
2.2.19 单克隆抗体的大量制备	21
2.2.20 腹水和杂交瘤细胞培养上清的效价测定	21
2.2.21 上清及腹水 western blot 鉴定	21
2.3 结果与分析	21
2.3.1 目的基因 RT-PCR 扩增结果	21
2.3.2 重组质粒的克隆与鉴定	21
2.3.3 阳性质粒的酶切鉴定	22
2.3.4 蛋白表达形式鉴定	22
2.3.5 蛋白表达条件的优化	23
2.3.6 蛋白纯化	24
2.3.7 多克隆抗体 Western blot 鉴定	24
2.3.8 抗原最佳包被浓度测定	25
2.3.9 多克隆抗体效价的检测	26
2.3.10 免疫小鼠血清效价	26
2.3.11 细胞融合与筛选	27
2.3.12 杂交瘤细胞上清及腹水效价测定	27
2.3.13 上清及腹水 western blot 鉴定	27
2.4 讨论	28
2.4.1 E 蛋白的原核表达	28
2.4.2 细胞融合	29
2.5 小结	30
3. 鸭坦布苏病毒 E 蛋白重组乳酸乳球菌载体的构建	31
3.1 材料	31
3.1.1 病毒毒株、菌株及载体质粒	31
3.1.2 实验动物及抗体	31
3.1.3 相关试剂盒、抗体和酶	31
3.1.4 主要试剂	31
3.1.5 仪器与耗材	31
3.1.6 培养基和试剂的配置	31
3.2 方法	33
3.2.1 E 基因的优化	33

3.2.2 截短基因的获取.....	33
3.2.3 NZ3900 感受态细菌的制备	34
3.2.4 pNZ8149 质粒的双酶切	35
3.2.5 同源臂重组反应.....	35
3.2.6 全长 E 基因重组质粒的构建	35
3.2.7 重组乳酸乳球菌的构建.....	35
3.2.8 目的蛋白的诱导表达及蛋白提取.....	36
3.2.9 Western blot 检测外源目的蛋白	36
3.2.10 目的蛋白表达条件的优化和位置检测	36
3.3 结果与分析.....	37
3.3.1 pUC57-E 重组质粒鉴定结果	37
3.3.2 目的片段 PCR 扩增结果	37
3.3.3 重组质粒电转化结果.....	38
3.3.4 重组质粒的鉴定结果.....	38
3.3.5 Western blot 检测重组蛋白表达	38
3.3.6 重组乳酸乳球菌 <i>L.lactis</i> /pNZ8149-domain I-II 蛋白表达条件的优化	40
3.3.7 重组乳酸乳球菌 <i>L.lactis</i> /pNZ8149-domain I-II 蛋白表达位置检测	40
3.4 讨论.....	40
3.5 小结.....	42
4. 结论.....	43
参考文献.....	44

中英文缩略词对照

英文缩写	英文全称	中文全称
DTMUV	Duck Tembusu virus	鸭坦布苏病毒
PBS	Phosphate buffer saline	磷酸盐缓冲液
HT	Hypoxanthine thymidine	次黄嘌呤、胸腺嘧啶核苷
HAT	Hypoxanthine aminopterin thymidine	次黄嘌呤、氨基蝶呤、胸苷
bp	Base pair	碱基对
PEG	Polyethylene glycol	聚乙二醇
mL	Milliliter	毫升
DMEM	Dulbecco's modified Eagle's medimum	改良 Eagle 培养基
ORF	open reading frame	开放阅读框
NS	Nonstructural protein	非结构蛋白
IPTG	Isopropyl- β -D-thiogalactoside	异丙基- β -D-硫代吡喃半乳糖苷
His	Histone	组氨酸
ELISA	Enzyme-linked immunosorbent	联免疫吸附试验
CEF	chick embryo fibroblast-like cell	鸡胚成纤维细胞
BHK-21	Baby hamster kidney cell 21	乳鼠肾细胞
DEV	Duck enteritis virus	鸭瘟病毒
IFN- γ	Interferon- γ	γ 干扰素
KDa	Kilodalton	千道尔顿
IgG	immunoglobulin G	IgG 抗体
IL-4	interleukin 4	白细胞介素-4
sIgA	secretory immunoglobulin A	分泌型免疫球蛋白 A

1. 文献综述

1.1 鸭坦布苏病毒概况

2010年4月,中国境内主要的养鸭区爆发了一场鸭病毒病,导致该地区的肉鸭和蛋鸭饲料吸收率降低、产蛋量急剧下降、食欲减退、生长迟缓和神经功能障碍以及一系列的输卵管疾病^[1]。后经证实导致该病毒病的病原体是一种新的黄病毒,称为鸭坦布苏病毒(Duck Tembusu virus, DTMUV),该病称为鸭坦布苏病毒病^[2]。目前中国多地均有鸭坦布苏病毒传染病相关报道^[3,4],给水禽养殖业造成巨大经济损失,严重威胁我国养禽业的健康发展^[5]。

鸭坦布苏病毒(DTMUV)主要感染肉鸭和蛋鸭,感染肉鸭主要表现为食欲减退、生长迟缓和神经系统方面的症状如站立不稳、颤抖和共济失调,个别鸭子会出现眼泪、喙出血等症状,严重的还可因采食困难而衰竭死亡^[6]。感染蛋鸭表现为产蛋量急剧下降20%-60%不等,死亡率在10%-30%之间,病理剖检病变为卵巢出血、充血、卵泡出血、破裂、萎缩,另外DTMUV还会感染鹅、鸡、鸽子和麻雀^[7-10],以及对包括人类在内的哺乳动物构成潜在的健康威胁^[11,12]。因此该传染病的爆发会给家禽业造成巨大的经济损失,需要有效的疫苗来预防DTMUV感染。

1.2 鸭坦布苏病毒生物学特性

鸭坦布苏病毒(DTMUV)与其他黄病毒一样,其基因组为正链RNA,长度约为11 kb,包含1个大的开放阅读框(ORF),编码长度为3425个氨基酸的多聚蛋白前体^[13]。DTMUV病毒粒子的结构成分有3种结构蛋白:核衣壳蛋白(C)、膜蛋白前体(prM)、囊膜蛋白(E)和7种非结构蛋白(NS1、NS2A、NS2B、NS3、NS4A、NS4B、NS5)^[14,15]。结构蛋白形成病毒颗粒,非结构蛋白参与病毒组装、复制过程和免疫逃逸^[16]。

1.3 鸭坦布苏病毒蛋白结构及功能

1.3.1 核衣壳蛋白C的结构及功能

核衣壳蛋白C是黄病毒的主要结构蛋白,位于氨基酸末端,相对分子质量为11.8 kDa。黄病毒衣壳蛋白的主要功能是基因组包装,此外,可以在感染性病毒粒子的产生过程中增强病毒基因组的复制和翻译^[17]。还可通过影响先天免疫在调节宿主细胞信号网络中的作用,这有利于黄病毒的复制^[18]。

1.3.2 膜蛋白前体(prM)和囊膜蛋白(E)的结构及功能

E蛋白是三个结构蛋白中相对分子质量最大的蛋白,约为54.2 kDa,由501

个氨基酸残基组成。E 蛋白嵌入病毒表面，包含有三个部分：外结构域、茎区域和跨膜结构域，这些部分均含有丰富的中和抗体靶向表位，因此 E 蛋白是黄病毒的主要免疫原，是中和抗体的主要靶标^[19-21]。E 蛋白属于 I 型膜蛋白，分为三个结构域 domainI、domainII 和 domainIII 区，研究表明，三个区均存在可诱导产生全身性中和抗体的抗原决定簇^[22-25]，是研究 DTMUV 基因工程疫苗的首选抗原蛋白。prM 蛋白帮助 E 蛋白参与病毒的复制，维持空间结构，诱导机体产生保护性免疫应答^[26]。如下图 1-1 和图 1-2 展现了 E 蛋白在病毒粒子中的位置及 E 蛋白的结构域模型。

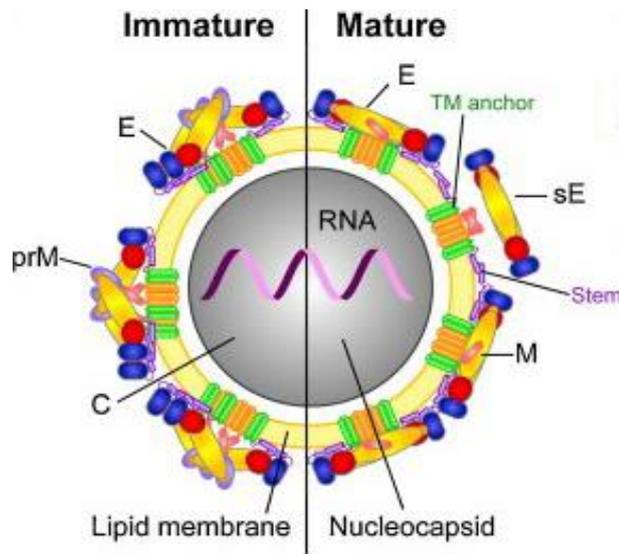


图 1-1 坦布苏病毒粒子结构图 (Heinz 和 Stiasn, 2012)

Fig.1-1 Structure diagram of Tembusu virions (Heinz and Stiasn, 2012)

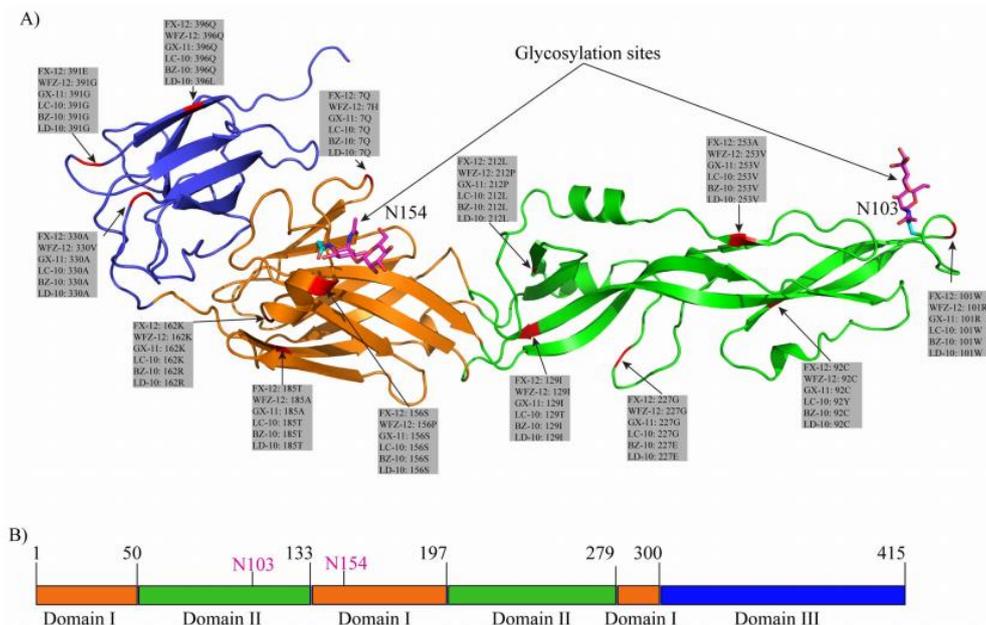


图 1-2 囊膜 E 蛋白结构和结构域模型 (Yu 等, 2013)

Fig.1-2 Structure and domain model of enveloped E protein (Yu et al., 2013)

1.4 鸭坦布病毒疫苗的研究进展

1.4.1 弱毒疫苗

弱毒疫苗就是病毒株经过毒力减弱，对生物体不造成毒力伤害，却能保留其全面且强大的免疫原性，诱导机体产生对抗此种病毒的免疫力的一种弱毒株。在实际生产操作中，弱毒疫苗致弱方法主要有传统上的在细胞或鸡胚鸭胚上进行连续传代多次获得的弱毒株，但此种方法耗费的人力物力大，且存在毒力返强的风险。另一种致弱方法是直接改造病毒，通过人为的删减某些致病基因，或者改造病毒基因组使毒株保留免疫原性得到的弱毒株。传统弱毒苗有农业农村部审核的商品化弱毒苗，如 Li 等^[27]研制的 FX2010-180P 弱毒株，是 FX2010 DTMUV 病毒株在 CEF 细胞上连续传代 180 次而获得。齐鲁动物保健品有限公司利用 DTMUV WF100 病毒株研制的弱毒活疫苗已于 2016 年获批生产上市，经不同研究人员研究证明此弱毒株疫苗能诱导机体产生抗体，具有较强的免疫保护力^[28]。目前这两株弱毒疫苗已经商品化生产并应用，取得良好效果。黄建飞等^[29,30]将其实验室分离的番鸭源 ZJSBL01 强毒株在 BHK-21 细胞上传 40-50 代时可作为候选毒株，经过动物试验表明 F50-40 代的安全性和免疫保护力更高且无毒力返强现象，与市场上的鸭坦布苏弱毒苗进行对比评估，相同免疫剂量下，F50-40 具有更好的免疫保护力。另外还有多株在实验室分离的毒株，经过同样的方法，最终获得弱毒疫苗并且动物实验表明能产生有效抗体，为实验动物提供免疫保护，为进一步研制鸭坦布苏弱毒疫苗候选毒株奠定基础^[31-34]。基因改造病毒研制弱毒坦布苏病毒疫苗也进行了诸多研究，Chen 等^[26]利用一种鸭肠炎病毒减毒活疫苗载体通过重叠的 fosmid DNA 构建了两个重组 DEV，一种能表达截短 E 蛋白，另一种同时表达膜前蛋白 PrM 和截短的 E 蛋白，动物试验表明这两种重组活疫苗都能诱导鸭子产生抗 DTMUV 的中和抗体，可作为候选弱毒株。Wang 等^[35]基于日本脑炎活疫苗株 SA14-14-2，替换相应的 DTMUV 病毒的 prM 和 E 基因（名为 ChinDTMUV）在小鼠中引发强大的 IgG 和中和抗体反应，但 DTMUV E 蛋白存在神经毒性作用，阻碍该疫苗的应用。目前最新的有关弱毒疫苗构建的方法是基于碱基缺失和结构蛋白异位表达减弱病毒毒力，He 等^[16]通过反向遗传学方法，针对衣壳蛋白内部碱基的缺失的方法开发了候选弱毒疫苗 Δ C20-43 和 Δ C64-96，实验结果表明注射单剂量 Δ C20-43 病毒和 Δ C64-96 病毒诱导动物保护性免疫，为 TMUV 减毒活疫苗的开发提供了一个有前途的平台。同样的，He 等^[36]还以 TMUV 病毒为模型，利用反向遗传学技术用双歧基因组 RNA 生成了两种重组病毒（CQW1-IRES-mC 和 CQW1-MINI-mC），该方法是基于破坏空间和时间调节的 C-prM 裂解以干扰病毒组装过程的黄病毒减毒株的生成方法，称为异位表达，可在几天内就能生产出减毒毒株，该研究重组的两

种病毒 CQW1-IRES-mC 或 CQW1-MINI-mC 进行单次免疫就足以使鸭子承受病毒挑战，表明诱导了高效的保护性免疫。

1.4.2 灭活疫苗

目前生产鸭坦布苏灭活苗主要依托于鸡胚传代培养生产的鸭坦布苏病毒的鸡胚尿囊液，通过病毒提纯后，采用病毒灭活剂灭活病毒，然后用乳化剂乳化或佐剂联合使用的一类疫苗。主要优点是其病原性已被杀灭，不具备复制再生能力但保留了免疫原性，生产过程简便、有效、安全、生产工艺相对简单且能刺激机体产生有效的保护性抗体。该类疫苗已取得较为成熟的研究及应用进展。最早由北京市农林科学院畜牧医学研究所等单位研制的 DTMUV HB 株，后经韩春华、段会娟、何平有等^[37-39]对樱桃谷鸭母源抗体消长规律、免疫产生期和持续期试验、安全和效力临床评价可知该疫苗首次免疫时间以 7~10 日龄为最佳，免疫后 28d、60d、90d、120d 和 135d 的阳性率均不低于 90%，免疫持续期可以达免疫后 135d，对 16 日龄北京鸭通过两次免疫便可获得良好的免疫保护效果，且胸部肌肉注射免疫效果优于皮下注射免疫效果，目前已经通过农业农村部审核并广泛推广使用。其次还有聂睿等^[40]将其实验室分离的 DTMUV 毒株（AH-F10 株）制备成的油乳剂灭活疫苗，经过动物免疫试验，该疫苗能刺激雏鸭机体产生较高水平的抗体并保护雏鸭免受 DTMUV 的侵害。高旭元等^[41]将 DTMUV 弱毒株（FX2010-180P）用 β -丙内酯和甲醛作为灭活剂灭活后免疫雏鸭能产生较高水平的抗体以及使免疫鸭获得 100% 的保护。

但鸡胚生产的疫苗通常存在一些缺点，如成本高、耗时、潜在污染和批次之间存在差异和难于扩大规模生产，当病毒发生大规模的传染时，鸡胚生产将不能满足大量的疫苗需求，于是细胞培养病毒成为最新研究。Zhang 等^[42]在 BHK-21 细胞系成功繁殖 TMUV-JXSP 毒株，Yang 等^[43]在 EB66 细胞系成功繁殖 DTMUV，灭活后制备成疫苗，可以为蛋鸭和肉鸭提供高水平的保护，使免疫鸭免受同类病毒的侵害，同时研究发现免疫鸭还会产生更持久的高 HI 抗体滴度。配合灭活苗使用的佐剂也能提高免疫效果，研究发现佐剂胞嘧啶-磷酸-鸟嘌呤寡脱氧核苷酸（CpG ODN）可用作改善动物的体液免疫和细胞免疫力。Xiao 等^[44]将外源性 CpG 基序插入空质粒载体（puC-18），然后经过肌肉注射 puC18-CpG 作为灭活 DTMUV（HB 菌株）疫苗的佐剂，研究表明该方法能对 DTMUV 的保护功效产生积极作用，Gao 等^[45]利用白细胞介素-2（IL-2）用作坦布苏病毒灭活疫苗的佐剂，试验研究发现 IL-2 使疫苗的作用增强，同时减少了疫苗接种的剂量，突出了 IL-2 的高佐剂性，与没有 IL-2 的灭活疫苗相比，可诱导更高水平的抗体和更高的病毒抑制值。

1.4.3 DNA 疫苗

DNA 疫苗又称核酸疫苗, 将目的基因片段与真核表达载体进行连接构建新的重组表达质粒, 通过肌肉注射方法将该质粒直接导入动物体内, 使目的抗原蛋白在宿主细胞内表达, 直接刺激机体的免疫系统, 实现免疫保护。Tang 等^[46]研发的能表达 DTMUV 的 E 蛋白的自噬 DNA 疫苗, 自噬性 DNA 疫苗基于甲型病毒复制子载体系统, 也就是 Semliki Forest 病毒 (SFV), 该载体系统在先前的研究中也成功地利用来靶向各种病毒, 且被证明自噬 DNA 疫苗作为抗病毒疫苗开发具有诸多不可替代的优势, 用该系统构建 E 基因自噬 DNA 疫苗, 肌注试验表明 pSCA1-E 疫苗诱导增强鸭子的 Th1 型反应以及引起 IL-4 水平, 这些反应说明 pSCA1-E 自杀 DNA 疫苗诱导了强烈的体液和细胞免疫反应, 帮助鸭子抵抗 DTMUV 病毒。Sun 等^[47]表达了 DTMUV 病毒的包膜 E 蛋白和前膜 prM 蛋白的重组新城疫病毒疫苗, 接种重组 aGM/prM + E 疫苗可诱导对 NDV 和 DTMUV 的强烈体液免疫反应, 提供针对毒性 NDV 的全面保护, 并在增强后提供 80% 的 DTMUV 保护。Zou 等^[2]采用 CRISPR/Cas9 基因编辑技术构建了包含鸭肠炎、鸭坦布苏病毒和 H5N1 禽流感病毒关键蛋白的三联疫苗, 经过试验结果表明该疫苗能同时提供高 H5N1 和 DTMUV 的体液和细胞介导的免疫反应, 且能预防鸭子中的 H5N1、DTMUV 和 DEV 感染。Liu 等^[48]利用鸭肠炎病毒株 pDEV-EF1 的传染性细菌人工染色体 (BAC) 克隆, 获得了一种重组鸭肠炎病毒 (DEV) 递送鸭 Tembusu 病毒 (DTMUV) 的密码子优化 E 基因 (称为 E-ch), 研究者通过对比不同的 E 基因, 包括 E 基因是否全长, 是否具有前缀信号肽以及是否优化密码子, 最后结果表明没有前缀信号肽的 E 基因序列表现出最佳表达量, 该研究是针对重组 DEV 和 DTMUV 的潜在二价疫苗。Tang 等^[49]利用腺病毒载体构建了能表达 DTMUV 病毒 E 蛋白重组腺病毒载体 rAd-E, 免疫试验结果表明对鸭子进行肌肉注射该重组腺病毒载体 rAd-E, 与对照组相比, 试验组显示出更强的细胞和体液免疫反应, 且能诱导特异性中和抗体。异源素原增强方案可以协同增效地对抗原产生更强的反应和更大的保护, Pan 等^[50]开发了减毒沙门氏菌呈递的 TMUV prM-E 和重组腺病毒包装的 TMUV E 基因的疫苗株, 与同源素数增强策略相比, 异源素数增强方案产生更高水平的针对 TMUV 的中和抗体和 IgG 抗体。此外, 在后期阶段, 它可以诱导更高水平的 IFN- γ 。

1.4.4 亚单位疫苗

亚单位疫苗是指利用蛋白表达载体质粒在细菌或者真核细胞里面大量表达出目的基因的蛋白, 然后将表达的目的蛋白经过蛋白纯化得到纯化的目的蛋白再来制作成亚单位疫苗。Ma 等^[51]利用原核表达载体插入目的 E 基因的方法制备了 DTMUV 病毒 E 蛋白, 然后通过反相蒸发使 E 蛋白被脂质体纯化和包裹后制备成脂质体蛋白, 通过鸭子肌注免疫实验表明脂质体疫苗血清抗体水平高于弗

氏佐剂疫苗，能给鸭子提供全面的针对 DTMUV 的保护。Li 等^[52]利用杆状病毒表达系统分别表达了 C 末端截短的 E 蛋白、prM-E 和 E 蛋白，从上清中收集并纯化目标蛋白后作为亚单位疫苗分别免疫鸭子，结果显示三种蛋白免疫后都能为鸭子提供免疫保护，但截短的 E 蛋白表达量更高，因此可作为预防 DTMUV 感染的有前途和实用的候选疫苗。

1.4.5 活载体疫苗及其他疫苗

活载体疫苗是将可口服的细菌作为载体，将构建带有目的基因的载体转入细菌载体，然后将活菌进行口服而引发黏膜和肠道免疫的一种方法。Huang 等^[17,53]开发了一款可以口服的基因工程疫苗，利用沙门菌 SL7207 制备 DNA 口服疫苗 SL7207 (pVAX1-C)、SL7207 (pVAX1-SME)，该疫苗主要是基于构建的核衣壳蛋白 C 重组载体 pVAX1-C 和 DTMUV 包膜蛋白 (prM 和 E) 重组载体 pVAX1-SME，通过转化的方式使沙门氏菌 SL7207 携带重组载体，分别经过雏鸭口服实验验证该口服疫苗可以有效的保护鸭子免受 DTMUV 的感染，为临床上大规模使用该疫苗提供了一种经济、快速的疫苗免疫策略。其他的还有病毒样颗粒疫苗，如 Li 等^[54]构建了嵌合体 VLP E-HA2 病毒样颗粒疫苗，将 E 蛋白截去 N 端的信号肽和 C 端的跨膜螺旋区域后，窃取 H5N1 病毒的血凝素 HA 的信号肽序列 HA2，将此两个片段连接构建成嵌合病毒样颗粒 (VLP)，与对照组相比，经过注射免疫后的鸭子病毒载量显著降低，在小鼠和鸭子中诱导针对 DTMUV E 蛋白的抗体，保护动物免受同源病毒的侵害。

1.5 乳酸乳球菌重组载体疫苗的研究进展和应用

乳酸菌是一种非致病菌，主要包括乳球菌、乳杆菌、链球菌、小球菌属、明串珠菌属、双歧杆菌属等^[55]，乳酸乳球菌是目前认为最安全的公认的绿色安全级 (generally regarded as Safe, GRAS) 细菌，并广泛用于食品工业。乳酸菌被认为是开发新型基因工程黏膜免疫疫苗，表达外源蛋白并传递外源蛋白最优希望的一种候选菌株。大量研究表明乳酸菌具有调节细胞免疫的功能，且口服乳酸菌能加强动物肠道抵御多种病原微生物的粘附和入侵。乳酸菌的细胞壁成分、菌体细胞、代谢产物、分解产物等能够促进巨噬细胞分化并提高活性。乳酸菌在越过胃酸屏障后，通过粘附肠道、竞争占位、生成代谢产物等方式，保证优势菌群，并刺激机体免疫细胞增生，当病原微生物入侵机体后，能迅速产生 sIgA，激发免疫应答^[56]。

在研究乳酸菌作为黏膜免疫疫苗递送载体时，有两种形式乳酸菌载体细菌，第一是分离自动物胃肠道的乳酸菌，通过电转化的方法导入表达外源抗原蛋白的质粒，口服饲喂，使该乳酸菌重新定植于胃肠道或口腔内，这样在遇到相应病原微生物时可快速诱导机体黏膜产生抗体，进而抵抗病原微生物的入侵。如

王等^[57]从商品鸡盲肠黏膜分离一株唾液乳杆菌，经实验证明具有强耐酸性和高定植力，经过构建重组质粒转入该菌，口服免疫小鼠后能引发小鼠黏膜免疫和全身免疫反应，提高 IgA 抗体水禽和血清 IgG 水平，并通过增加 IL-4 的表达反应脾淋巴细胞增殖，但此种免疫模式却存在免疫耐受风险^[58]。第二是不能长期定植肠道的乳酸菌。与动物机体肠道定植的乳酸菌相比，乳酸乳球菌仅在胃肠道内存活 5~7 天，不具有肠道长期定植能力^[59]。研究证明活的或杀死的乳酸乳球菌疫苗通过鼻内途径和口服途径可以有效的引发黏膜和全身免疫反应，需要在数周内重复免疫，完全可以将抗原完全释放到机体内引发免疫，而且还不会引起免疫耐受问题^[58-60]。因此许多研究学者依托乳酸菌对动物抵抗疾病方面展开诸多研究，并取得许多发展。如采用植物乳杆菌 NC8 锚定表达表面展示 H9N2 亚型禽流感 NP 和 M1 蛋白，口服免疫与鼻饲免疫发现，鼻饲免疫能诱导更强的免疫反应，有效的免受 H9N2 病毒的攻击^[61]。NC8 锚定表达表面展示 H1N9 亚型 NP 和 M2 蛋白融合表达，口服免疫小鼠后用 H9N2 亚型病毒攻击发现对小鼠具有保护作用，还能起到交叉保护作用^[62]。H9N2 亚型 HA2 蛋白融合表达聚 γ -谷氨酸合成酶 A (pgsA) 蛋白，口服免疫雏鸡后都可有效保护鸡抵抗 H9N2 亚型流感病毒并降低肺脏中的病毒滴度，并介导 T 细胞免疫反应诱导分泌性 IgA 和 IgG 分泌^[63]。采用乳酸乳球菌锚定表达 HA 蛋白茎结构域 HA_{sd} 蛋白和 pgsA 蛋白，口服免疫小鼠后产生强烈的体液免疫和黏膜免疫，并提供对 H3N2 和 H1N1 亚型病毒的交叉保护^[64]。乳酸乳球菌 pNZ8150 锚定表达 H5N1 HA 蛋白和 SpaX 蛋白，口服免疫雏鸡后同样产生显著体液免疫和黏膜免疫，并具有交叉保护作用^[65]。

同时，乳酸菌作为活载体疫苗在动物的其他疾病方面还有诸多研究，王等^[66]将猪圆环病毒 (PCV2) 的抗原 Cap 蛋白导入乳酸乳球菌中诱导胞内表达，口服免疫小鼠后与对照组相比，测定小鼠 sIgA, IgG 及 IL-4 和 IFN- γ 分泌均比对照组高，并且免疫后经过对小鼠攻毒测试发现可产生针对 PCV2 感染的粘膜免疫反应。Zang 等^[67]将携带猪流行性腹泻病毒 (PEDV) 的 S1 和 S2 (S 蛋白的抗原位点) 表位的质粒转移至猪嗜酸乳杆菌中，口服免疫小鼠后发现，与表达 S2 的乳杆菌相比，口服表达 S1 乳杆菌的小鼠检测到更高水平的抗 PEDV 特异性 IgG 和 sIgA 抗体，且将其口服接种怀孕的母猪可引起特异性的全身粘膜免疫应答。

1.6 本研究的目的是与意义

鸭坦布苏病毒近年来广泛流行，且在中国建立了稳定的谱系。该病毒可导致鸭出现精神萎靡、产蛋下降、神经症状甚至死亡，给养鸭业带来巨大的经济损失。由于传统灭活疫苗免疫方式多采用肌肉注射，注射量大且过程繁琐，极

易给鸭带来应激反应。而乳酸菌口服疫苗具有载体递送功能和调节肠道微生态的双重优势，乳酸菌本身就具有佐剂的功能，刺激黏膜免疫系统产生抗体，可弥补细胞免疫和体液免疫的不足，近年来乳酸菌口服疫苗制剂在家禽疾病预防应用研究领域备受关注。因此，本研究将 E 基因与 E 基因不同结构域转入乳酸菌体内并诱导其表达并进行鉴定，为后续继续研究新型 DTMUV 口服疫苗的研究和制备提供第一手材料。

2. 鸭坦布苏病毒 E 蛋白多克隆抗体和单克隆的制备

鸭坦布苏病毒病是由鸭坦布苏病毒 (Duck Tembusu Virus, DTMUV) 感染不同日龄的鸭和其他禽类如鹅、鸡、麻雀的一种传染性疾病。其主要感染蛋鸭和肉鸭并导致产蛋下降、精神沉郁、饲料吸收率低、神经系统紊乱等症状。E 蛋白是重要的免疫原性蛋白, 其结构域可分为 domainI、domainII 和 domainIII 区, 研究表明, 三个区均存在可诱导产生全身性中和抗体的抗原决定簇。本章以截去 E 基因 N 端信号肽序列及 C 端的跨膜结构域序列的截短 E 基因为载体, 仍然包括了三个结构域区, 构建原核表达质粒, 导入大肠杆菌表达出重组 E 蛋白并进行纯化, 以纯化蛋白为免疫原制备多克隆抗体和单克隆抗体, 为后期验证重组乳酸乳球菌外源蛋白的表达等实验奠定了基础。

2.1 材料

2.1.1 病毒毒株、菌株及载体质粒

本研究所用的鸭坦布苏病毒 JM 株 (登录号: JN811559) 毒株来自广东省农科院动物卫生监督所孙敏华博士惠赠; DH5a、BL21 (DE3) 感受态细胞购自北京全式金生物技术有限公司; pET28a 由本实验室保存; pET28a-E 质粒由本研究自行构建。

2.1.2 实验动物及细胞

本研究所用的 6~8 周龄雌性 BALB/c 小鼠、5 周龄新西兰耳大白兔购自珠海百试通实验动物有限公司; SP2/0 小鼠骨髓瘤细胞和小鼠阴性血清由本实验室自主保存。

2.1.3 相关试剂盒、抗体和酶

限制性内切酶 BamH I、Xho I、溶菌酶、HIS 标签耐变性剂型蛋白纯化试剂盒、小提质粒试剂盒、T₄DNA 连接酶、BCA 蛋白定量试剂盒、DNA 胶回收试剂盒购自上海碧云天生物技术有限公司; KODfx 高保真酶购自 TOYOBO 公司, HRP-IgG 二抗 (羊抗兔、羊抗鼠) 购自 Abbkine Scientific Co. Ltd。

2.1.4 主要试剂

HAT、HT 选择培养基购自北京博奥龙免疫技术有限公司; 快速封闭液、通用型抗体稀释液、TMB 显色液、显色终止液、无血清细胞冻存液购自广州新赛美生物技术有限公司; 聚乙二醇 (PEG) (WM1450)、弗氏完全佐剂、弗氏不完全佐剂、DMEM 高糖培养基和胎牛血清购自 Sigma 公司; PVDF 膜购自 Bio-Rad 公司; Trizol 试剂、180 KDa 预染蛋白 Marker、DNA 分子质量标准试剂购自北京全式金生物技术有限公司; NaCl、吐温-20 购自北京索莱宝生物技术有限公司。

2.1.5 溶液配置

(1) LB 液体培养基: 酵母提取物 5 g, 蛋白胨 10 g, NaCl 10 g, 加蒸馏水至 1 L, 120 °C 高压灭菌 20 min 后冷却至室温, 加入 1: 1000 比例的卡那霉素 (K^+) 4 °C 保存备用;

(2) LB 固体培养基: 上述液体 LB 加入 15 g 琼脂粉, 倒平板后冷却至 4 °C 保存备用;

(3) 卡那霉素 (K^+) 贮存液: 50mg/mL 卡那霉素, -20 °C 贮存;

(4) 包被缓冲液 (PH 9.6 0.05 M 碳酸盐缓冲液): Na_2CO_3 1.5 g, $NaHCO_3$ 2.93 g, 加蒸馏水至 1000 mL, 高压灭菌 20 min;

(5) 磷酸盐缓冲液 (PBS): $NaCl$ 8 g、 NaH_2PO_4 1.42 g、 KH_2PO_4 0.27 g、 KCl 0.2 g 充分溶于 800 mL 去离子水, 充分搅拌, 定容于至 1 L, 121 °C 高压灭菌 20 min, 冷却后 4 °C 保存备用;

(6) HAT 培养基: 50×HAT 加入 20%胎牛血清 DMEM 培养基至 1×, 混匀, 放 4 °C 保存备用。

(7) HT 培养基: 50×HT 加入 20%胎牛血清 DMEM 培养基至 1×, 混匀, 放 4 °C 保存备用。

(8) PBST: PBS 加入 0.5 %的吐温-20。

2.1.6 试验仪器

表 2-1 主要仪器和耗材

Table 2-1 Main instruments and consumables

仪器	公司
二氧化碳恒温培养箱	上海福絮实验室仪器设备厂
酶标仪	赛默飞世尔科技(中国)有限公司
细胞培养板、96 孔酶标板	Costar 公司
细胞冻存管、50mL 离心管、70 μ m 细胞筛	NuNC 公司
核酸电泳仪; 垂直蛋白电泳槽; 转膜仪; 分析天平; 薄层凝胶扫描仪	北京六一生物科技有限公司
基因扩增仪	杭州朗基科学仪器有限公司
紫外分光光度计	上海仪电分析仪器有限公司
普通水平离心机、低温高速离心机	安徽中科中佳科学仪器有限公司
超声细胞破碎仪	上海力辰科技有限公司
电热恒温水浴锅	常州澳华仪器有限公司
恒温静置培养箱	上海精宏实验设备有限公司
生物安全柜	苏州博莱尔净化设备有限公司
超纯净水机	重庆利迪实验仪器有限公司
水平脱色摇床	海门其林贝尔有限公司
漩涡震荡仪; 超低温冰柜; 精密 PH 计; 制冰机	常熟市雪科电器有限公司

2.1.7 引物设计

表 2-2 引物设计

引物名称	序列信息
E-F	GAATTAGCGGTTGTGAGATCT
E-R	ACTTCTATGCCACTGGTACCT

注：上述引物属自行设计

2.2 方法

2.2.1 病毒 RNA 提取及反转录

实验室保存的鸭坦布苏病毒 JM 株（GenBank 登录号：JN811559）病毒尿囊液取 300 μL ，按照 Trizol 的说明方法提取全病毒基因组 RNA，具体方法是：

取 300 μL 病毒尿囊液于一洁净的 EP 管中，加入 750 μL Trizol，剧烈震荡 1 min，室温静置 10 min，然后加入 200 μL 氯仿，剧烈震荡 1 min，室温静置 30 min，12000 rpm，4 $^{\circ}\text{C}$ 离心 10 min，吸取 700 μL 上清放入另一个洁净的 EP 管中，加入 700 μL 的异丙醇，混匀后 12000 rpm，4 $^{\circ}\text{C}$ 离心 10 min，弃上清，加入冷冻的 1 mL 75% 的酒精，12000 rpm，4 $^{\circ}\text{C}$ 离心 10 min，弃上清，再重复一次操作，然后室温干燥 5 min，加入 20 μL DEPC 水溶解即为病毒 RNA 产物。然后按照反转录试剂盒说明书进行反转录操作。先在 20 μL RNA 产物加 2 μL 随机引物，70 $^{\circ}\text{C}$ 水浴 5 min 后置于冰上 3 min，然后按照表 2-3 所示的体系加入：

表 2-3 扩增全病毒基因组 RNA 反应组分和体系

Table 2-3 Amplification of whole virus genomic RNA reaction components and systems

反应组分	反应体系 (μL)
RNase-free Water	5.5
dNTP	1
DTT	4
5 \times buffer	8
RNase Out	1
M-MLV	0.5
总体积	20

然后将上述体系放入 37 $^{\circ}\text{C}$ 水浴锅中反应 2 h 30 min，即为反转录 cDNA，最后放入 -20 $^{\circ}\text{C}$ 保存备用。

2.2.2 PCR 扩增

以鸭坦布苏病毒 JM 株（GenBank 登录号：JN811559）尿囊病毒液 cDNA 为模板，利用上下游引物，通过 PCR 扩增 E 基因，PCR 扩增反应体系如下表 2-4 所示：

表 2-4 PCR 扩增反应体系

Table 2-4 PCR amplification reaction system

反应组分	反应体系 (μL)
2 \times buffer	25
dNTP	10
E-F	1
E-R	1
KODFx	1
ddH ₂ O	11
cDNA	1
总体积	50

反应条件为：94 $^{\circ}\text{C}$ ，2 min，98 $^{\circ}\text{C}$ ，10 s，56 $^{\circ}\text{C}$ ，30s，68 $^{\circ}\text{C}$ ，30 s，35 次循环，68 $^{\circ}\text{C}$ 终延伸 10 min。扩增结束后，将 PCR 产物加入适量 DNA 上样缓冲液混匀后电泳观察片段大小，将正确大小的目的片段切下胶回收，回收步骤如下：

- (1) 在紫外线灯仪器下轻轻切取 DNA 条带，放入干净的离心管中称重；
 - (2) 加入适量体积的 GSB 溶液没过凝胶，将溶胶在 55 $^{\circ}\text{C}$ 水浴 6~10 min，期间上下混匀若干次；
 - (3) 待融化后的凝胶冷却至室温，每次加入 700 μL 至离心柱，静置 1 min，12000 rpm 离心 1 min，弃流出液；
 - (4) 加入 650 μL 洗涤液，12000 rpm 离心 1 min，弃去流出液；
 - (5) 12000 rpm 离心 2 min，彻底去除残留的洗涤液；
 - (6) 将离心柱置于一干净的 EP 管中，开盖静置 3 min，使残留乙醇挥发干净，在柱的中央加入 40 μL 60 $^{\circ}\text{C}$ 预热的 EB 或去离子水，室温静置 3 min；
 - (7) 12000 rpm 离心 1 min，将洗脱出的 DNA 置于 -20 $^{\circ}\text{C}$ 中保存备用。
- PCR 胶回收产物的与载体 pET28a 的双酶切反应体系如表 2-5 所示。

表 2-5 双酶切反应体系

Table 2-5 Double digestion reaction system

反应组分	反应体系 (μL)
Buffer Y	4
目的基因	30
BamHI	1.0
XoII	1.0
ddH ₂ O	4
总体积	40

所有的 PCR 胶回收产物和载体 pET28a 均使用这样的体系，将以上的各组分按要求加入并混匀后，置于 37 $^{\circ}\text{C}$ 水浴锅反应 1~2 h。

2.2.3 目的基因与载体的连接

将酶切后的 E 基因胶回收产物与线性化的 pET28a 质粒连接，在 16 $^{\circ}\text{C}$ 金属浴中连接过夜，连接体系如表 2-6 所示。

表 2-6 连接反应体系

Table 2-6 Linkage reaction systems

反应组分	反应体系 (μL)
目的基因	7
载体	1
10 \times T ₄ buffer	1
T ₄ DNA Ligase 酶	1
总体积	10

2.2.4 重组质粒转化和筛选

取 100 μL DH5 α 感受态细菌插在冰上融化 2 min, 将过夜的连接产物 10 μL 迅速加入到融化的 DH5 α 感受态细菌中, 轻轻混匀。冰预冷 25 min 后, 42 $^{\circ}\text{C}$ 热激 60~90 s 后, 然后轻轻转移到冰上放置 2~3 min, 加入 900 μL LLB 液体并置于 37 $^{\circ}\text{C}$, 220 rpm/min 震荡培养箱中培养 1 h, 取出后 5000 rpm 离心 5 min, 在超净工作台中弃去一部分上清, 剩下菌液混匀后取 80 μL 涂布于含有 K^+ 的 LB 固体培养皿上, 待吸收完全, 于 37 $^{\circ}\text{C}$ 温箱倒置培养 12~14 h。

12~14 h 后, 待培养皿长出的白色单菌落, 用白色灭菌枪头蘸取单个圆润菌落置于 5 mL LB (K^+) 培养基中, 37 $^{\circ}\text{C}$, 220 rpm/min 震荡培养箱中培养 6 h 后取 2 μL 做菌液 PCR 鉴定。反应体系如表 2-7 所示。

表 2-7 菌液 PCR 反应体系

Table 2-7 Bacterial solution PCR reaction system

反应组分	反应体系 (μL)
菌液	2
Taq 酶	10
E-F	0.3
E-R	0.3
ddH ₂ O	7.4
总体积	20

PCR 反应程序为: 98 $^{\circ}\text{C}$, 2 min, 98 $^{\circ}\text{C}$, 10 s, 56 $^{\circ}\text{C}$, 30s, 70 $^{\circ}\text{C}$, 30 s, 35 次循环, 70 $^{\circ}\text{C}$ 终延伸 10 min。将 PCR 反应产物电泳观察, 如出现目的条带, 则将菌液继续震荡培养过夜, 其余没有目的条带的菌液丢弃。

第二天将菌液进行质粒提取, 提取步骤如下:

(1) 取 1.5 mL 过夜培养的细菌到 2 mL EPP 管中, 12000 rpm 离心 1 min, 弃上清;

(2) 向菌体沉淀加入 250 μL Solution I, 上下混匀, 静置 2 min;

(3) 向上述混合液中加入 250 μL Solution II, 上下颠倒离心管 4~6 次, 室温静置 1 min;

(4) 加入 300 μL Solution III, 上下混匀, 室温静置 5 min;

(5) 12000 rpm 离心 10 min;

(6) 将上述上清转移到吸附柱, 8000 rpm 离心 2 min;

- (7) 弃去收集管中的液体, 加入 500 μL Wash Solution 到吸附柱中, 10000 rpm 离心 1 min;
- (8) 重复上述步骤一次;
- (9) 倒掉收集管中的液体, 10000 rpm 离心 2 min 以除去残留 Wash Solution;
- (10) 将吸附柱放入一个洁净的 1.5 mL EP 管中, 在吸附柱中央加入 40 μL Elution Buffer, 室温静置 2 min, 10000 rpm 离心 2 min;
- (11) 可重复一遍, 然后将纯化的质粒保存于 $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ 备用。

2.2.5 重组质粒的鉴定

(1) 双酶切鉴定: 10 μL 双酶切反应体系如表 2-8 所示, 按要求加入后混匀组分, 然后置于 $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ 水浴, 反应 1~2 h。

表 2-8 10 μL 双酶切反应体系

Table 2-8 10 μL double digestion reaction system	
反应组分	反应体系 (μL)
BufferY	1
重组质粒	4
BamH I	0.5
Xol I	0.5
ddH ₂ O	4
总体积	10

(2) 序列测定: 将上述步骤鉴定疑似的重组质粒送至苏州金唯智生物有限公司进行质粒测序鉴定。

2.2.6 E 蛋白的原核表达及表达条件优化

将鉴定正确的重组质粒 pET28a-E 和空载体 pET28a 分别转化入 BL21 (DE3) 感受态细菌中, 转化方法同上实验步骤。获得阳性克隆菌后, 命名为 BL21 (DE3) /pET28a-E, 放入 $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ 保存。

(1) IPTG 诱导 pET28a-E/BL21 (DE3) 菌株蛋白表达

- 将上一步获得的阳性克隆菌 pET28a-E/BL21 (DE3) 菌株, 无菌接种在 LB (K⁺) 培养基中划线, 置于 $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ 恒温培养 12 h;
- 蘸取单克隆菌于 20 mL 液体 LB (K⁺) 培养基中 220 r/min、 $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ 震荡培养 12~16 h;
- 然后取菌液以 1: 100 比例接种至液体 LB (K⁺) 培养基中, $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ 、220 r/min 培养约 2 h;
- 检测 OD₆₀₀ 为 0.5~0.6 时, 加入 IPTG 至终浓度为 1 mmol/L, 220 r/min、 $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ 诱导蛋白表达, 诱导时间为 4 h;
- 收菌与 $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 离心, 用冰冷的 PBS 重悬菌体并离心, 重复两次按照原始菌液浓缩成 10 倍的比例加入冰冷的裂解液, 置于冰上超声破碎菌体, 超声功率为 200 W, 时间为工作 5 s, 停 6 s, 超声时间为 15 min;

f. 超声后于 4 °C, 8000 rpm 离心 10 min, 取 40 μL 上清, 然后将沉淀用裂解液相同体积的 PBS 重悬, 取 40 μL 做检测用。

(2) 最佳 IPTG 诱导时间和最佳浓度探索

a. 同上述步骤诱导蛋白表达, 加入 1mM 终浓度的 IPTG 诱导剂, 诱导培养 1.5、2.5、3.5、4.5、5.5、6.5 h, 分别收集菌液, 取 40 μL, 加入适量上样缓冲液, 100 °C 煮沸 10min, 用作后续检测用;

b. 同上述步骤诱导蛋白, 加入 0、0.2、0.4、0.6、0.8、1.0 mM 终浓度的 IPTG 诱导剂, 进行诱导 1.5~6 h。诱导后的菌液以 8000 rpm 离心 10 min, 加入适量上样缓冲液, 100 °C 煮沸 10 min, 用作后续检测用。

2.2.7 表达产物的 SDS-PAGE 电泳鉴定

上述样品采用 12 %分离胶进行 SDS-PAGE 电泳。具体配胶方法为:

根据样品分子量大小, 12 %的分离胶, 具体配方为下表 2-9 所示,上层胶的具体配方如表 2-10 所示:

表 2-9 下层胶配方表

组分	体积 (mL)
30%的聚丙烯酰胺	6.0
去离子水	4.9
PH 为 8 的 1.5mol/L 的 Tris	3.8
10%的 SDS	0.15
10%的 APS	0.15
10%的 TEMED	0.006
总体积	15

表 2-10 上层胶配方表

组分	体积 (mL)
30%的聚丙烯酰胺	1.0
去离子水	4.1
PH 为 8 的 1.5mol/L 的 Tris	0.75
10%的 SDS	0.06
10%的 APS	0.06
10%的 TEMED	0.006
总体积	6

样品按顺序电泳上样, 每孔上样 10 μL, 100 V 跑上层胶 30 min, 160 V 跑下层胶 1 h, 电泳结束后拆胶, 于考马斯亮蓝染色 1 h, 然后用去离子水脱色过夜后采集图片, 根据显示的目的蛋白条带情况确定 IPTG 诱导的最佳时间和最佳浓度。

2.2.8 重组蛋白的大量制备并纯化

将 pET28a-E 重组质粒按上述方法, 按照最佳 IPTG 诱导浓度及诱导时间,

制备 1 L 菌液，8000 rpm，4 °C 离心 10 min，用菌液体积的 1/10 量的 PBS 重悬菌体，重复洗涤两次获得菌体。

然后按照碧云天包涵体蛋白纯化试剂盒纯化步骤进行：

(1) 称量菌体湿重，按 1: 10 比例加入预冷的变性裂解液重悬菌体，冰上超声 20 min，超声功率为 200 W，工作 4 s，停 6 s；

(2) 超声结束后，于 8000 rpm，4 °C 离心 10 min，取上清作纯化蛋白；

(3) 将凝胶装入柱子，留掉储存液后，加入一倍体积的变性裂解液平衡凝胶，重复两次；

(4) 然后封住底部，加入 8~10 倍体积的蛋白上清液，混匀，置于水平摇床，4 °C 缓慢摇晃结合 1~2 h；

(5) 取出，留掉穿流液，然后重复 3 次把穿流液重新上柱子，加大蛋白结合；

(6) 然后加入 1 倍体积变性裂解液，重复 5 次，留掉液体，加入 5 次 1 倍体积的变性洗涤液，重复 5-10 次，留掉液体；

(7) 加入 1 倍体积的变性洗脱液，并用试管收集保存，重复 5~10 次。此时收集的洗脱液便是洗脱出来的目的蛋白；

(8) 上述每个步骤都取 40 μ L 样品用作后续跑 SDS-PAGE 及 western blot 实验用。

2.2.9 重组蛋白的透析浓缩

(1) 透析袋的处理

a. 配置终浓度 1 mmol/L EDTA 加 2 % 质量体积比的 NaHCO₃，加热至 100 °C 后放入透析袋煮沸 10 min；

b. 用去离子水洗涤煮过的透析袋；

c. 用 1 mmol/L EDTA 煮沸 10 min；

d. 去离子水洗涤煮过的透析袋；

e. 去离子水浸泡备用。

(2) 蛋白透析浓缩

将洗脱的目的蛋白放入准备好的透析袋中，两端夹紧固定后放入 6 mol 尿素溶液透析，其中每隔 12 h 换一次液，24 h 后取出目的蛋白放入 PEG8000 中浓缩 2 h，然后取出蛋白即为纯化浓缩后的蛋白，采用碧云天 BCA 蛋白定量试剂盒定量后，分装放入 -80 °C 保存备用。

2.2.10 多克隆抗体的制备

将上述定量后的重组 E 蛋白乳化后作为抗原，免疫 2 只 5 周龄的新西兰耳大耳白兔，免疫前要从耳缘静脉采血方法采取适量的血，分离血清作为阴性血

清。免疫程序如下：将纯化的重组 E 蛋白与等体积的弗氏完全佐剂混匀后背部皮下多点注射进行一免。免疫剂量为 1 mg/只；间隔 14 d，将 E 蛋白与等体积的弗氏不完全佐剂混匀，部皮下多点注射进行二免，免疫剂量为 1 mg/只；二免 14 d 后进行三免，方法同二免；三免一周后采血，收集抗血清，保存于-80 °C。

2.2.11 多克隆抗体的 western blot 鉴定

取纯化的重组 E 蛋白进行 Western blot，具体步骤为：

1. 转膜（采用湿转法）：

（1）准备 4 块转膜滤纸和一块 PVDF 膜；

（2）将滤纸和两块海绵垫和电泳后的胶块在转膜缓冲液中完全浸泡备用，PVDF 膜先在甲醇溶液中浸泡激活 1min，再在转膜缓冲液中浸泡备用；

（3）按照“三文治”放置方法，正极至负极顺序放入海绵垫、PVDF 膜、凝胶、海绵垫，然后轻轻夹紧支架，设定程序，电压 85 V 恒压转移 1 小时，时间依蛋白大小决定。

2. 封闭：

取出 PVDF 膜，用 PBST 冲洗 3 次后，加入 20mL 快速封闭液室温轻轻振荡 10min。

3. 与抗原结合：

封闭结束后，用 PBST 冲洗 PVDF 膜 3 次，加入用抗体稀释液稀释的 1: 1000 兔抗的坦布苏病毒 E 蛋白阳性抗血清为一抗，室温摇晃结合 1h，用 PBST 冲洗 3 次，每次 5 min，加入 1: 10000 稀释的羊抗兔 HRP-IgG 为二抗，室温下轻摇孵育 1 h，取出用 PBST 冲洗 3 次，每次 5 min。洗毕，加入 DMB 显色液显色，采集图片。

2.2.12 间接 ELISA 方法的建立

采用棋盘滴定法用上述步骤纯化的重组 E 蛋白进行如下实验：

（1）包被抗原：用包被液按 0.5 μg/mL、1 μg/mL、2 μg/mL、4 μg/mL、6 μg/mL、8 μg/mL、10 μg/mL 稀释重组蛋白后，100 μL/孔，置于 4°C 冰箱过夜包被；

（2）洗板：次日，甩去液体并在吸水纸上敲打几次除去多余液体，PBST 200 μL/孔洗板 3 次，每次 5 min；

（3）封闭：每孔加入 100 μL 快速封闭液于 37 °C 封闭 10 min；

（4）洗板重复步骤（2）；

（5）一抗孵育：分别用阴性和阳性血清，用 PBST 按照 1: 100、1: 200、1: 400、1: 800、1: 1600、1: 3200、1: 6400、1: 12800 比例稀释，100 μl/孔，37 °C 温箱孵育 1 h；

(6) 洗板重复步骤 (2) ;

(7) 二抗孵育: 加入辣根过氧化物酶标记山羊抗兔 HRP-IgG 为二抗, 每孔 100 μ L, 37 °C 孵育 1 h;

(8) 洗板重复步骤 (2) ;

(9) 显色: 每孔加入 TMB 显色液, 100 μ L/孔, 37 °C 温箱避光孵育 10 min, 加入终止液, 50 μ L/孔。酶标仪读数, 测定 OD₄₅₀ 的值;

(10) 根据统计, 计算 P/N 值最大并且阴性值小于 0.1 时抗原浓度为最佳包被抗原浓度^[68], 当 OD₄₅₀ 吸光度约等于 1.0, 且阴性值小于 0.1 时, 此时的多抗稀释度为最佳多抗工作稀释度^[69]。其中 P/N 值=待测孔 OD 值-空白对照孔 OD 值/阴性对照孔 OD 值-空白对照孔 OD 值。

2.2.13 多克隆抗体的效价测定

用纯化的重组 E 蛋白做包被抗原, 包被浓度为上述试验最佳抗原包被浓度。免疫血清为第一抗体, 羊抗兔 HRP-IgG (1: 10000) 为第二抗体, 通过倍比稀释阳性血清的方法从 1: 200 开始做倍比稀释, 同时以兔阴性血清设立对照组, 测定免疫血清的效价, 操作流程同上述间接 ELISA 建立一样, 结果以 P/N 值=待测孔 OD 值-空白对照孔 OD 值/阴性对照孔 OD 值-空白对照孔 OD 值 > 2.1 的稀释度为最终效价^[68]。

2.2.14 单克隆抗体制备前准备

(1) 免疫原来源: 将上述步骤中制备的纯化重组 E 蛋白作为免疫抗原和包被抗原。

(2) 小鼠免疫: 6~8 周龄的 BALB/c 雌性小鼠, 纯化后的蛋白与弗氏佐剂 1: 1 比例进行乳化后进行背部皮下多点注射。小鼠免疫程序如表 2-11 所示。三免后, 小鼠进行尾尖采血测定抗体滴度, 抗体滴度大于 10000 的小鼠并选择抗体滴度最大的小鼠再融合前的 3~5 天进行四免后细胞融合。

2.2.15 杂交瘤细胞株的建立

(1) 饲养细胞的制备

未免疫小鼠眼眶采血并处死后, 37 °C 温箱放置 1 h, 4 °C 冰箱过夜, 8000 r/min 离心 5 min 取上清, 此即为免疫鼠阴性血清。然后将小鼠拉颈处死, 75 % 的酒精浸泡 5 min 后将小鼠转入生物安全柜, 固定于解剖板上, 用镊子和剪刀打开腹膜; 酒精消毒后用 20 mL 的一次性无菌注射器吸取 HAT 培养液 20 mL 注入小鼠腹腔, 快速拔出注射器, 然后夹取酒精棉球消毒腹膜, 用镊子轻轻敲击腹膜 2-3 次。再用镊子夹取腹膜, 用注射器吸出腹腔内的培养液, 然后注入无菌离心管中, 1000 rpm 离心 5 min 备用。

表 2-11 小鼠免疫程序

Table 2-11 Mouse immunization procedures

时间	免疫	剂量	佐剂	免疫部位
第 1 天	一免	100 μg	弗氏完全佐剂	背部皮下多点注射
第 14 天	二免	100 μg	弗氏不完全佐剂	背部皮下多点注射
第 28 天	三免	100 μg	弗氏不完全佐剂	背部皮下多点注射
第 35 天	四免	100 μg	无	腹腔注射

然后打开腹腔，取出脾脏，并把脾细胞表面的脂肪剥离干净后用 DMEM 冲洗 2~3 次，取到放有 DMEM 的无菌平皿中，用注射器抽取 DMEM 培养基打入脾脏内部，另一端脾脏用镊子固定住，然后将反复注入 DMEM，将脾脏内部的脾细胞挤压出来，然后将脾细胞经 1000rpm 离心 5min 后弃去上清，用不含血清的 DMEM 重悬，用血细胞计数仪在显微镜下计算脾细胞密度，弃去部分 HAT 培养液，使细胞浓度在 10^5 个/mL 左右，并将此脾细胞轻轻重悬腹腔巨噬细胞，然后将混合细胞移入 96 孔板中，100 μL /孔，置于 CO_2 恒温培养箱中过夜培养。

(2) 骨髓瘤细胞 SP2/0 的复苏

提前准备好 37 $^\circ\text{C}$ 水浴锅，将装有 SP2/0 细胞的冻存管从 -80 $^\circ\text{C}$ 冰箱取出，将冻存管迅速放在 37 $^\circ\text{C}$ 水浴中摇晃，直到细胞解冻完全融化为液体，吸取冻存液，放入含有 10 % 胎牛血清的 DMEM 基础培养液的 T25 细胞培养瓶中，将细胞瓶轻轻摇晃使细胞均匀地分布于细胞瓶底，37 $^\circ\text{C}$ CO_2 恒温培养箱中培养。第二天，细胞贴壁生长至培养瓶底部，分布均匀，且边缘圆润透亮，吹起细胞传至 2 个中瓶备用。

(3) 免疫脾细胞的制备

未免疫小鼠眼眶采血并处死后，37 $^\circ\text{C}$ 温箱放置 1 h，4 $^\circ\text{C}$ 冰箱过夜，8000 r/min 离心 5 min 取上清，此即为免疫鼠阴性血清。然后将小鼠拉颈处死，浸泡如 75 % 的酒精 5 min 后将小鼠转入生物安全柜，固定于解剖板上，用镊子和剪刀打开腹膜；拉颈处死，用 75 % 酒精消毒后，将小鼠置于处置台上，打开腹腔后取出脾脏，将鼠脾脏用培养基清洗后置于细胞筛中，加 1 mL 的 DMEM 培养基，用注射器的一端对脾脏进行研磨，将脾细胞挤压出来，脾会变白，用枪吸取 DMEM 培养基把注射器和细胞筛表面残留的细胞冲洗几遍，将过滤的脾细胞液 1000 r/min 离心 10 min，弃去上清，用 DMEM 培养液重悬。

(4) SP2/0 细胞与免疫脾细胞的融合

先将 PEG 和 DMEM 基础培养基置于 37 $^\circ\text{C}$ 水浴锅预热，然后准备细胞融合，具体操作步骤如下：

a. 将准备好的 2 个中瓶的 SP2/0 细胞培养液弃去, PBS 洗两遍, 然后使用 DMEM 基础培养液吹下;

b. 将 SP2/0 细胞加入到重悬免疫脾细胞的离心管中, 轻轻上下颠倒混合后, 1000 r/min 离心 10 min, 倒掉上清, 用灭菌的滤纸吸去黏附在管壁及斜面上残留的培养基; 轻轻敲击管底, 使细胞沉淀略松散;

c. 准备 37~39 °C 水浴锅, 在 1 min 内慢慢加入 800 μ L 预热的 PEG4000, 边加边轻轻搅拌, 加入完全后后继续搅拌 30 s, 静置 30 s; 慢慢加入 10 mL 37 °C 预热的 DMEM 基础培养液, 缓慢加入且轻轻搅拌; 1000r/min 离心 5 min, 弃上清, 轻轻倒入 40 mL HAT 培养液, 缓慢上下颠倒重悬融合细胞;

d. 将重悬的融合细胞和饲养细胞混匀, 铺在 96 孔板内, 每孔 200 μ L; 放于 37 °C 温箱中培养。

2.2.16 杂交瘤细胞的培养及单克隆抗体的筛选检测

2.2.16.1 融合细胞的换液

待细胞长到形成小集落后进行细胞换液, 首次换液每孔吸出 100 μ L, 再加入 100 μ L HTDMEM 培养基进行半换液, 等细胞团形成大的集落, 第二次吸出 150 μ L, 再加入 150 μ L HTDMEN 培养基, 第三次在晚上吸出全部液体, 再加入 200 μ L 的 HT DMEN 培养基, 最后一次换液后第二天检测。

2.2.16.2 融合细胞抗体分泌效价检测

利用之前建立的间接 ELISA 方法对细胞上清进行检测, 方法同上。根据 OD₄₅₀ 值判定阳性孔, 挑取阳性值高的孔进行亚克隆。

2.2.17 融合细胞亚克隆

克隆前先根据需要克隆细胞株的数量制备饲养细胞, 饲养细胞制备如前面章节步骤操作, 需提前一天准备好饲养细胞并置于细胞培养箱培养。然后根据效价测定, 把具有较高效价的目标孔细胞轻轻吹起, 转移到 24 孔板进行扩大培养, 待细胞长满时进行亚克隆操作:

(1) 将要克隆的杂交瘤细胞用剪掉尖的枪头从培养孔内轻轻吹下, 用细胞计数板计数活细胞数;

(2) 计数完成后, 根据活细胞浓度, 吸取一定量的细胞, 分别稀释成 2 个浓度, 分别为 10 个/mL, 20 个/mL, 将上述三个浓度的细胞悬液分别加入已制备好的饲养细胞内, 100 μ L/孔, 1 个浓度 1 块板, 使相应的孔分别含有 2 个、1 个细胞;

(3) 培养到三天时观察孔内是否有单个的细胞, 孔内没有培养液也可补加培养液, 在克隆后第 7 d 到 9 d, 细胞克隆长满 1/3~1/2 个视野时, 检测;

(4) 检测可以参考第前面章节;

(5) 检测的细胞孔可选择抗体效价高, 呈单克隆生长, 形态良好的细胞孔, 继续同前面方法再克隆, 重复 3~5 次亚克隆培养;

(6) 测得所有的克隆的杂交瘤细胞孔均为阳性时, 便可获得分泌单克隆抗体的杂交瘤细胞株, 命名后扩大培养并冻存。

2.2.18 杂交瘤细胞的冻存与复苏

将能稳定分泌抗体的杂交瘤细胞株移至 24 孔培养板扩大培养, 等其状态变好时, 可腹腔接种小鼠采制腹水, 其他的细胞用基础培养基吹下, 将细胞调至 $3\sim 5\times 10^6$ 个/mL, 然后 1000 rpm 离心 5 min, 然后用无血清细胞冻存液进行冻存, 1mL/管, 管壁上标记好, 放入细胞冻存盒中置于 $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ 中过夜, 次日, 放入液氮罐中保存备用。杂交瘤细胞的复苏同 SP2/0 细胞的复苏。

2.2.19 单克隆抗体的大量制备

(1) 上清培养法: 将上述命名的杂交瘤细胞株扩大培养, 维持培养到细胞全部死亡, 1000 rpm 离心 10 min 收集细胞上清, 保存于 $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ 备用。

(2) 腹水制备法: 先注射 0.5mL 弗氏不完全佐剂致敏 8~10 周龄 BALB/c 小鼠腹腔, 七天后, 腹腔注射 2.5×10^5 个/只小鼠的杂交瘤细胞, 待 7 天左右可见小鼠腹围变大, 待腹围更大一些, 用注射器针头刺入小鼠腹腔, 收集腹水, 腹水离心 3000 rpm 离心 10 min 收集上清, 置于 $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ 冰箱备用。

2.2.20 腹水和杂交瘤细胞培养上清的效价测定

采用间接 ELISA 方法测定, 鸭坦布苏病毒全病毒尿囊液以 1: 20 浓度的包被液稀释后加入 ELISA 孔板, 100 μl /孔, $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 过夜包被。第二天, 将细胞培养上清及腹水 1:200 梯度稀释, 每个稀释度设 3 个重复, 同时以小鼠阳性血清和阴性血清做同等稀释用作对照。以 P/N 值大于 2.1 的最大稀释倍数为最终效价。

2.2.21 上清及腹水 western blot 鉴定

将上清及腹水分别取 10 μL , 用抗体稀释液稀释 10 倍, 然后将此作为一抗, 进行鉴定, 实验方法如上述 western blot 实验步骤。

2.3 结果与分析

2.3.1 目的基因 RT-PCR 扩增结果

以鸭坦布苏病毒 JM 株 (登录号: JN811559) 提取的 RNA 为模板, 经 RT-PCR 扩增后, PCR 产物电泳观察发现大小约 1100bp, 与 1048 bp 的 E 基因片段大小相符, 扩增的 E 基因图如图 2-1 所示。

2.3.2 重组质粒的克隆与鉴定

目的 E 基因经过胶回收, 与 pET28a 载体一起进行双酶切, 电泳胶回收后,

目的基因 E 与线性化的载体 pET28a 根据合适比例进行 T₄ DNA 连接酶反应后，把重组质粒转化入 DH5a 感受态细菌，涂板并挑取单克隆阳性菌制备菌液并进行菌液 PCR 鉴定反应，将菌液 PCR 反应产物电泳得到约 1048 bp 左右的条带，如图 2-2 所示。条带大小符合目的 E 基因大小，说明疑似重组阳性质粒含有目的 E 基因片段。

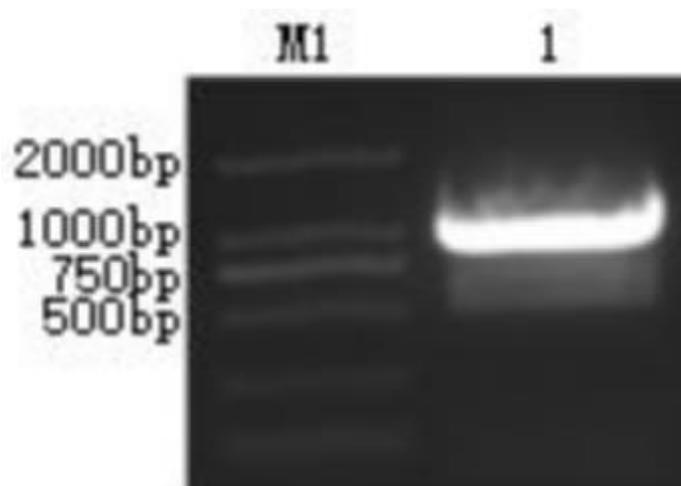


图 2-1 RT-PCR 扩增的 E 基因

Fig.2-1 The E gene amplified by RT-PCR

注：M1：Tranker2KDNA Marker；1：E 基因片段

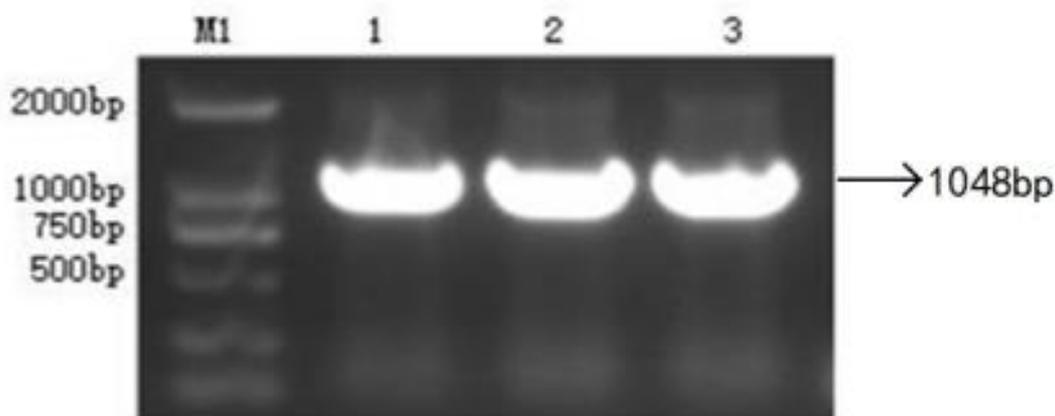


图 2-2 阳性菌液 PCR 鉴定

Fig.2-2 PCR identification of positive bacterial fluid

注：M1：Tranker2KDNA Marker；1-3：阳性菌液 PCR 鉴定结果

2.3.3 阳性质粒的酶切鉴定

为进一步鉴定重组质粒是否正确，利用 BamHI 和 XhoI 进行双酶切鉴定，结果显示如图 2-3，重组质粒被切成两条大小分别为 1100 bp 和 5300 bp 的线性片段，与预期目的片段 1048 bp 大小相符。

2.3.4 蛋白表达形式鉴定

将样品跑 SDS-PAGE 电泳检测结果如图 2-4 可知在 40 KDa 处出现明显条带，

且重组蛋白以包涵体的形式存在，上清中几乎没有表达。

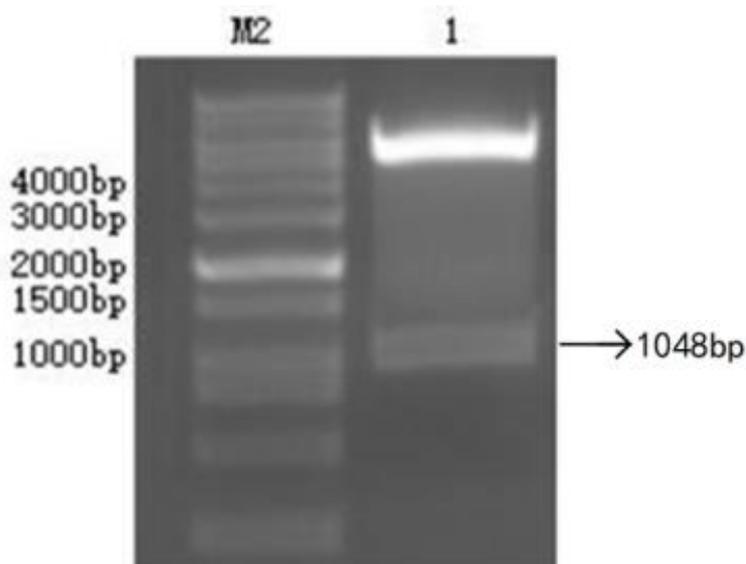


图 2-3 重组质粒 pET28a-E 双酶切鉴定

Fig.2-3 Recombinant plasmid pET28a-E double digestion identification

注：M2：0.2-1.2KD DNA Marker；1：重组质粒 pET28a-E 双酶切鉴定结果

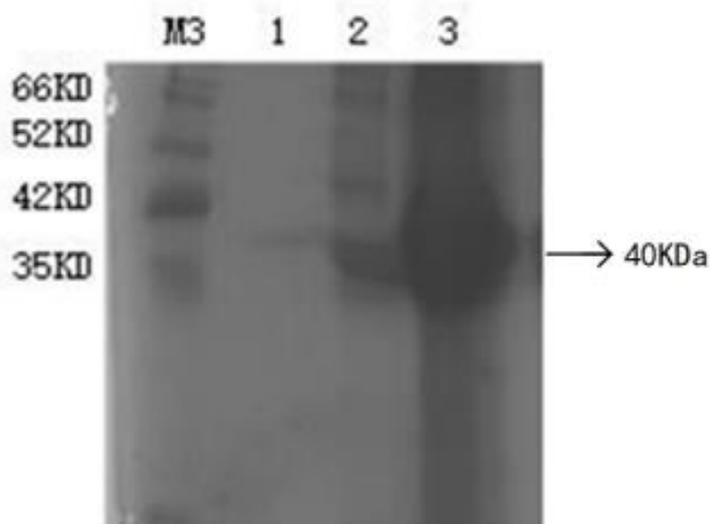


图 2-4 重组 E 蛋白可溶性表达鉴定结果

Fig.2-4 Identification of soluble expression of recombinant E protein

注：M3：10-150KD 蛋白分子量标准；1：超声后上清；2：全菌液；3：超声后沉淀

2.3.5 蛋白表达条件的优化

不同时间收获菌液，制备的样品跑 SDS-PAGE 电泳结果如图 2-5 所示，最佳的蛋白诱导条件是诱导时间 4.5~5.5 h，IPTG 最佳浓度为 0.4~0.6 mM，并且目的蛋白条带大小符合。

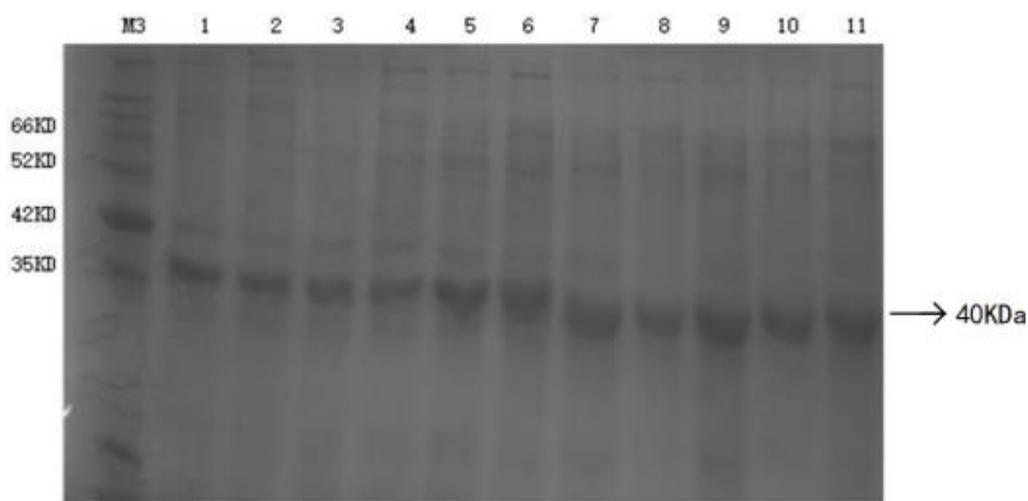


图 2-5 重组 E 蛋白最佳诱导条件结果

Fig.2-5 Recombinant E protein solubility identification results

注：M3：10-150KD 蛋白分子量标准；1-6：诱导 1.5-6.5h 全菌上样；7-11：诱导剂 IPTG 浓度 0.2mM~1.0mM

2.3.6 蛋白纯化

用碧云天耐变性剂型 HIS 标签纯化凝胶纯化菌体蛋白，得到目的蛋白，SDS-PAGE 电泳鉴定纯化目的蛋白，得到与目的蛋白大小一致的条带，如图 2-6 所示。

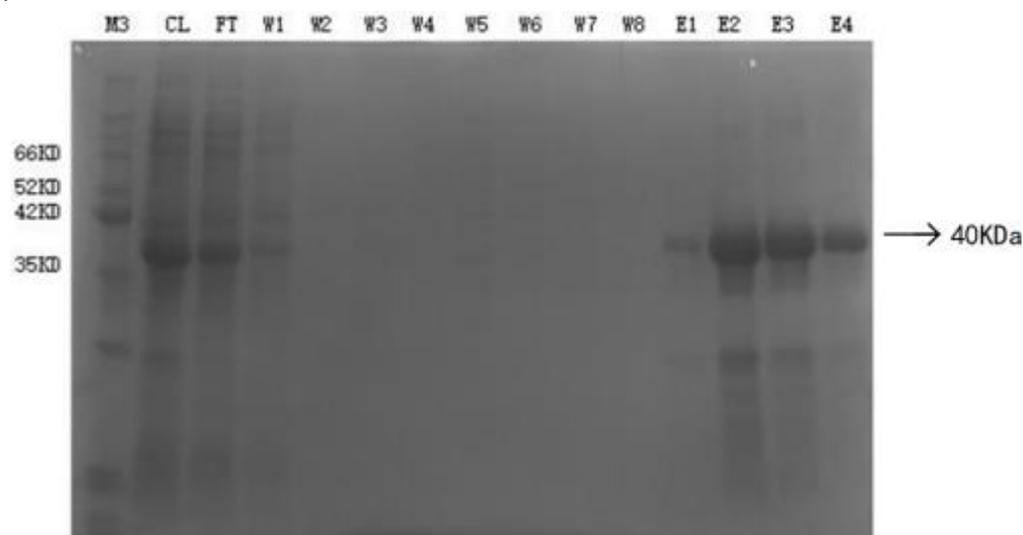


图 2-6 重组 E 蛋白纯化结果

Fig.2-6 Recombinant E protein purification results

注：M3：10-150KD 蛋白分子量标准；CL：全菌蛋白；FT：上样穿流液；W1-W8：洗涤液；E1-E4：洗脱蛋白

2.3.7 多克隆抗体 Western blot 鉴定

应用制备的纯化重组蛋白作为抗原，重组 E 蛋白的兔抗血清 1：1000 稀释后作为一抗，羊抗兔 HRP-IgG 以 1：10000 比例稀释作为二抗，进行 Western blot

分析，图 2-7 中的结果表明，预计目的条带大小 40 KDa，实验结果条带大小符合。说明免疫血清可与表达的重组目的蛋白识别，发生抗原抗体结合，说明免疫血清与重组蛋白具有反应原性，制备的多克隆抗体可用作一抗。

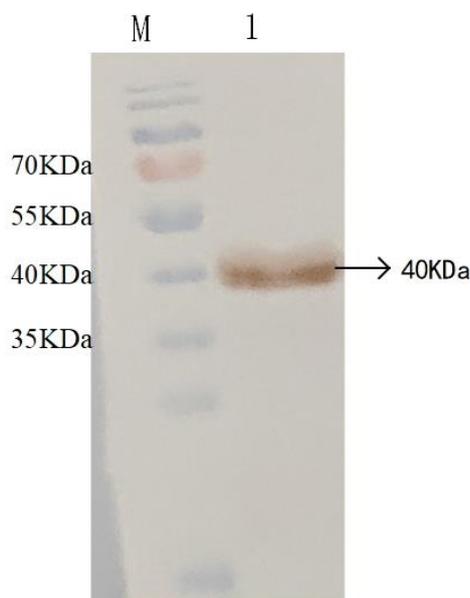


图 2-7 多克隆抗体 Western blot 鉴定

Fig.2-7 Polyclonal antibody Western blot identification

注：M：180KDa 预染蛋白分子量标准；1：E 蛋白目的条带

2.3.8 抗原最佳包被浓度测定

通过方阵滴定实验后，最佳抗原包被浓度及稀释度判断标准为 P/N 比值最高，且 OD₄₅₀ 大于 1.0 的一组，结果如表 2-12 和表 2-13 所示，最佳包被浓度为 1μg/mL，阳性血清最佳稀释度为 1: 3200。

表 2-12 确定免疫原的最佳包被浓度

Table 2-12 Determine the optimal coating concentration of immunogens

抗原稀 释 度	阳性血清稀释度							
	1: 200	1: 400	1: 800	1: 1600	1: 3200	1: 6400	1: 12800	
0.5μg/mL	2.335	2.093	2.138	1.986	1.963	1.789	1.653	
1.0μg/mL	2.109	2.088	1.966	1.933	1.846	1.629	1.567	
2.0μg/mL	2.193	1.999	2.055	2.059	2.028	1.759	1.989	
4.0μg/mL	2.479	2.276	2.267	2.214	2.176	2.015	1.896	
6.0μg/mL	2.485	2.377	2.385	2.368	2.322	2.072	2.020	
8.0μg/mL	2.470	2.493	2.483	2.366	2.350	2.223	2.143	
抗原稀 释 度	阴性血清稀释度							
	1: 200	1: 400	1: 800	1: 1600	1: 3200	1: 6400	1: 12800	
0.5μg/mL	0.139	0.083	0.073	0.067	0.066	0.061	0.059	
1.0μg/mL	0.092	0.079	0.070	0.062	0.057	0.059	0.059	
2.0μg/mL	0.150	0.113	0.090	0.079	0.074	0.070	0.065	
4.0μg/mL	0.298	0.223	0.169	0.145	0.124	0.119	0.102	
6.0μg/mL	0.415	0.332	0.242	0.193	0.174	0.256	0.210	
8.0μg/mL	0.526	0.371	0.270	0.231	0.203	0.216	0.203	

表 2-13 确定免疫原的最佳包被浓度

Table 2-13 Determine the optimal coating concentration of immunogens

血清稀释度	抗原稀释度 ($\mu\text{g/mL}$)						
	10	6	4	2	1	0.5	
1: 200	4.70	5.99	8.32	14.62	22.92	17.30	
1: 400	6.72	7.16	10.21	17.69	26.43	25.22	
1: 800	9.20	9.86	13.41	29.36	28.09	29.29	
1: 1600	P/N 值	10.24	12.27	15.27	26.06	31.17	29.64
1: 3200		11.57	13.34	17.55	27.41	32.38	29.74
1: 6400		10.29	8.09	16.93	25.13	27.61	29.33
1: 12800		10.56	9.62	18.58	30.6	26.56	28.02

注：“P” 阳性血清作为一抗；“N” 阴性血清作为一抗

2.3.9 多克隆抗体效价的检测

采用间接 ELISA 方法对抗 E 蛋白多克隆抗体效价评定，将纯化重组 E 蛋白以 $1\mu\text{g/mL}$ 包被浓度，每孔 $100\mu\text{L}$ 过夜包被 ELISA 反应板，重组 E 蛋白的兔抗血清以 200 倍开始倍比稀释作为一抗，羊抗兔 HRP-IgG 以 1: 10000 比例稀释作为二抗，结果显示，重组 E 蛋白的多克隆抗体效价为：1: 409600。

表 2-14 抗体效价测定

Table 2-14 Antibody titer determination

稀释倍数	多抗	阴性对照
800	1.966	0.079
1600	1.933	0.070
3200	1.846	0.062
6400	1.629	0.057
12800	1.567	0.059
25600	1.286	0.059
51200	1.105	0.062
102400	0.728	0.057
204800	0.536	0.059
409600	0.322	0.062

2.3.10 免疫小鼠血清效价

三次免疫后，获取小鼠血清，将血清进行倍比稀释，用 $1\mu\text{g/mL}$ 浓度的抗原过夜包被，同时设立阴性对照组。结果如图 2-8 所示，在免疫的 4 只小鼠中，小鼠的血清效价都达到了 1: 25600 以上，都满足细胞融合条件，取效价最高的小鼠脾脏进行细胞融合。

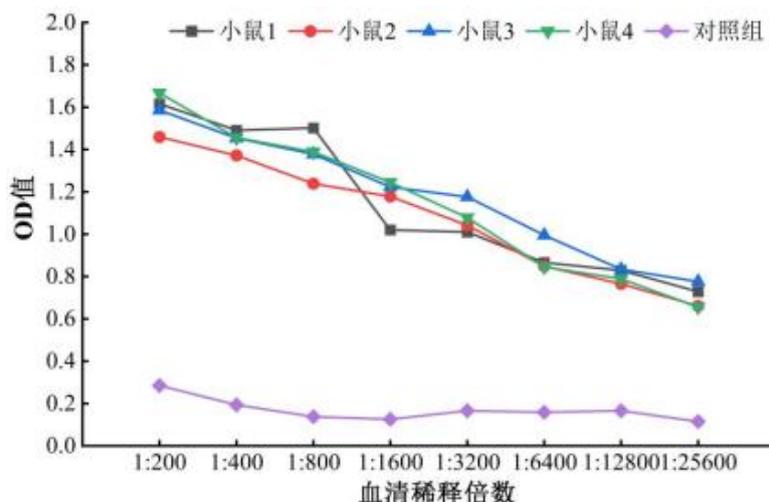


图 2-8 ELISA 检测小鼠血清效价

Fig.2-8 ELISA detects serum titer in mice

2.3.11 细胞融合与筛选

细胞融合 5~7 天后，观察生长状态，当杂交瘤细胞生长面积达到 1/3~1/2 时，全部换液，第二天早上采用间接 ELISA 方法对细胞上清液进行阳性筛选，结果显示有 12 个孔为阳性。将阳性孔进行标记，放置于 24 孔板扩大培养后进行 5 次亚克隆，试验得出 1 株可稳定分泌抗体的杂交瘤细胞，并命名为 2G10。

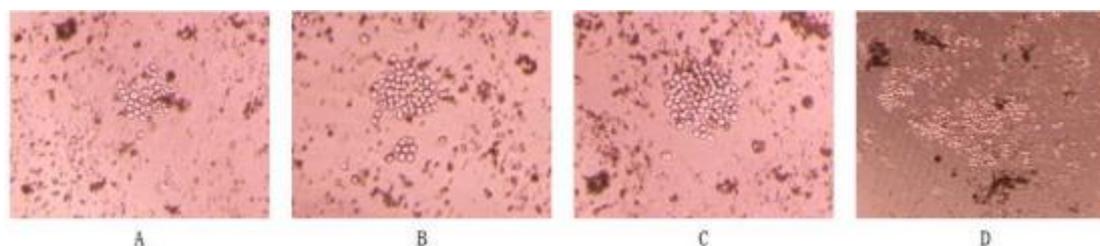


图 2-9 融合细胞及亚克隆筛选

Fig.2-9 Fusion cell and subclonal screening

注：A-C 为亚克隆筛选出来的单个细胞集落；D 为融合后 5 天的杂交瘤细胞

2.3.12 杂交瘤细胞上清及腹水效价测定

间接 ELISA 方法对抗 E 蛋白杂交瘤细胞上清及腹水进行效价评定，将纯化重组 E 蛋白以 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 包被浓度，每孔 100 μl 过夜包被 ELISA 反应板，上清和腹水倍比稀释作为一抗，羊抗兔 HRP-IgG 以 1: 10000 比例稀释作为二抗，结果显示，杂交瘤细胞上清的效价为 1: 800，腹水效价：1: 1600。

2.3.13 上清及腹水 western blot 鉴定

应用制备的纯化重组蛋白作为抗原，将 5 次亚克隆后获得的一株杂交瘤细胞 2G10，通过小鼠体内诱导法获得腹水后 2000 rpm 离心 10 min，获得上清。同时将体外培养获得的细胞培养上清，2000 rpm 离心 10 min，获得上清，同时用

作 western blot 实验的一抗，都以 1: 10 比例稀释。得到实验结果如下表 2-15，目的条带大小符合 40 KDa 左右，说明上清及腹水都能作为一抗使用。

表 2-15 效价测定

Table 2-15 titer assay

稀释倍数	上清	腹水	阴性对照
1	0.729	0.767	0.053
200	0.582	0.680	0.069
400	0.42	0.541	0.085
800	0.231	0.457	0.055
1600	0.10	0.289	0.065

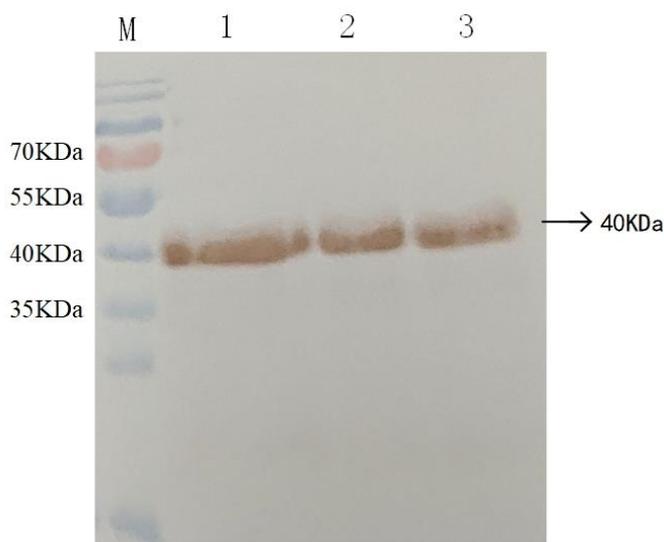


图 2-10 上清和腹水 western blot 鉴定

Fig.2-10 Identification of supernatant and ascites western blot

注：M：180KDa 预染蛋白 Marker；1：2G10 杂交瘤细胞上清；2：2G10 杂交瘤细胞腹水；3：E 蛋白多克隆抗体阳性对照

2.4 讨论

2.4.1 E 蛋白的原核表达

E 蛋白全长 1503 bp，501 个氨基酸，分子量大小为 54.2 KDa，其 N 端有一段信号肽序列，C 端有一段跨膜结构域^[49]。同时 E 蛋白属于 I 型膜蛋白，分为三个结构域 domainI、domainII 和 domainIII 区，其 domainIII 区存在最多中和表位，且其形状为 IgG 形状。于是设计引物时目的片段用了三种形式，分别是 E 蛋白全长序列，E 蛋白截短序列即为截去信号肽和跨膜结构域的序列，以及 domainIII 区。三个重组质粒转入 BL21 (DE3) 表达载体后，经过蛋白诱导表达发现截短 E 蛋白表达量很高，且为包涵体表达，其余两种序列没有表达或表达量极低，达不到后期的蛋白纯化目的，因此本实验采用的截短的 E 蛋白，其序

列长度为 1048 bp, 加上 6 个组氨酸, 蛋白大小接近 40 KDa。全长 E 蛋白和 domainIII 区没有成功表达, 其原因可能是序列本身的蛋白属性不能表达, 其次可能是在实际构建的过程中, 因为 PCR 的一些突变或操作时温度过高, 导致序列发生缺失突变或移码突变, 最终蛋白没有表达出来。外源蛋白表达形式多为包涵体蛋白表达, 因此在纯化之前需要对目的包涵体蛋白进行尿素溶解, 溶解后的蛋白为一级线性化的蛋白。尝试进行 6M-4M-2M-PBS 尿素梯度对蛋白进行复性, 复性后的绝大部分蛋白都沉淀到透析袋底部, 因此在免疫兔子时, 选择了复性浓缩后的蛋白和 8M 尿素的蛋白进行乳化并免疫兔子。

2.4.2 细胞融合

瘤细胞的选择是 SP2/0 细胞株, 该细胞一直被用于制备单克隆抗体细胞融合实验。通常该细胞在细胞融合前需要的细胞数量大概为 10^7 个, 大概为两个 75cm^2 的细胞皿所能生长的细胞个数, 一只小鼠的脾细胞数量大概为: $1\sim 2\times 10^8$ 个, 融合细胞要求免疫脾细胞与 SP2/0 细胞的比例为 10~15: 1。因此两个 T75 细胞培养皿的 SP2/0 细胞刚好足够一只免疫过的 BALB/c 小鼠的脾细胞。在体外细胞培养中, 单个杂交瘤细胞不易生存与繁殖, 需加入一定量的脾细胞和巨噬细胞才能使其更好的生长繁殖^[70]。饲养细胞的选择方面, 可以选择腹腔渗出细胞, 脾细胞和淋巴细胞。通常在选择饲养细胞的过程中, 大多数实验方法选择的是腹腔渗出细胞, 但在实际操作过程中, 取腹腔渗出细胞的细胞个数有可能因为小鼠的年龄和个体差异而有所偏差, 这样在制备饲养细胞时, 饲养细胞的个数不满足需求, 因此再加入适量的脾细胞做饲养细胞刚好满足饲养细胞的要求。同时本试验选择的腹腔渗出细胞里面包含有腹腔巨噬细胞, 巨噬细胞可以吞噬死亡细胞, 脾细胞可以给融合细胞提供充分的营养和支持作用。

细胞融合后, 应当把 96 孔板放在细胞培养箱里面培养至少 5~7 天, 待杂交瘤细胞生长成细胞集落才能拿出来观察, 如果贸然取出观察, 可能会因为温度变化或者晃动等因素, 导致刚融合好的杂交瘤细胞出现大量死亡。而第一次检测阳性杂交瘤细胞, 必须在细胞生长成较大的细胞集落, 然后在前一天全数换液, 第二天进行筛选, 因为刚融合好的杂交瘤细胞会因为细胞内多了脾细胞的染色体而不断出现细胞排异现象, 会吐出脾细胞的染色体, 同时脾细胞的在这期间还残留有大量免疫后的阳性抗体, 所以在筛选阳性时, 必须充分的除去或稀释残留的抗体, 确保筛选的阳性杂交瘤细胞是自体分泌的阳性抗体。后期在进行数次亚克隆时, 采取方式是一个孔放置一个细胞, 称为单克隆。而要进行 5 次亚克隆, 其目的是因为融合后的细胞, 会出现一段时间的不稳定现象, 杂交瘤细胞可能会定期的把异体的染色体排出细胞外, 从而导致亚克隆时, 单克隆细胞丢失阳性现象, 而其生长表现则会出现大量疯长, 而一些杂交瘤细胞会

因为细胞本身遭受的损伤不可修复，出现生长不良的情况，表现为生长迟缓。最佳的健康的单克隆杂交瘤细胞则是生长 3~5 天则能刚好布满 96 孔板的 1/3 大小，生长状态完好，细胞透亮，不出现大细胞团，细胞体积不会出现过大的变异现象，则是最佳的单克隆阳性细胞。

2.5 小结

本研究采用原核表达方法表达并纯化了重组鸭坦布苏病毒 E 蛋白并免疫了兔子，获得了具有高效价和特异性的抗 E 蛋白多克隆抗体，同时免疫 BALB/c 小鼠，经过细胞融合和 5 次亚克隆以及 ELISA 筛选技术筛选到 1 株阳性杂交瘤细胞株。通过 western blot 鉴定表明制备的多克隆抗体与单克隆抗体能与蛋白发生特异性反应，具有较好的反应活性。

3. 鸭坦布苏病毒 E 蛋白重组乳酸乳球菌载体的构建

荷兰 NIZO 食品研究所开发的食品级乳酸乳球菌 NZ3900 及其配套质粒 pNZ8149, 是目前乳酸菌表达外源蛋白唯一一对配套的以乳糖为唯一碳源筛选阳性克隆子, 完全不含有抗性基因的操作系统。已表达多种病毒蛋白并取得良好免疫效果。鉴于此, 实验中使用的食品级乳酸乳球菌 NZ3900 及其配套质粒, 适合用于后期研究中携带目的蛋白的免疫递送活载体制剂, 且可用于过量生产具有活性的外源蛋白。在实际中生产安全性高、成本低、免疫过程不产生应激、为研发可大规模应用于家鸭养殖的口服免疫制剂奠定坚实基础。

3.1 材料

3.1.1 病毒毒株、菌株及载体质粒

本研究所用的鸭坦布苏病毒尿囊液由本实验室自行繁殖, *L.lactis* NZ3900 菌株和 *L.lactis* 表达质粒 pNZ8149 由本实验室保存。

3.1.2 实验动物及抗体

BALB/c 小鼠购自珠海百试通实验动物中心, 小鼠阴性血清由本实验采集并保存; 抗 E 蛋白兔源多克隆抗体由本实验室制备。

3.1.3 相关试剂盒、抗体和酶

限制性内切酶 *Nco*I、*Sac*I、溶菌酶、胶回收试剂盒、小提质粒试剂盒购自上海碧云天生物技术有限公司; *KOD*fx 高保真酶购自 TOYOBO 公司, *HRP*-IgG 二抗(羊抗鼠)购自 *Abbkine Scientific Co. Ltd.*

3.1.4 主要试剂

Nisin 诱导剂购自 *Sigma* 公司; 快速封闭液、通用型抗体稀释液、*TMB* 显色液、显色终止液购自广州新赛美生物技术有限公司; *PVDP* 膜购自 *Bio-Rad* 公司; 180 *KDa* 预染蛋白 *Marker*、*DNA* 分子质量标准试剂购置北京全式金生物技术有限公司; 蛋白胨(*Trptone*)、*NaCl*、酵母提取物(*Yeast Extract*)、抗坏血酸、*M17* 培养基、甘氨酸、吐温-20 购自北京索莱宝生物科技有限公司。

3.1.5 仪器与耗材

仪器与耗材如下表 3-1 所示。

3.1.6 培养基和试剂的配置

(1) *L*-Elliker 培养基: 胰蛋白胨 20 g、酵母提取物 5 g、无水乙酸钠 1.5 g、*NaCl* 4 g、抗坏血酸 0.5 g 充分溶于 1 L 去离子水中, 121℃ 高压灭菌, 冷却后加入过滤除菌的 20% 乳糖, 使乳糖终浓度为 0.5%; 4℃ 保存。

(2) 20% 乳糖溶液的配置: 称取 20 g 乳糖粉末置于锥形瓶中, 加至 100

mL 去离子水充分溶解（需要加热到 50~60 °C 才能溶解），用 0.22 μm 滤菌器过滤除菌后分装，4 °C 保存。

（3）20 % 葡萄糖溶液的配制：称取 20g 葡萄糖粉末置于锥形瓶中，加至 100 mL 去离子水充分溶解。用 0.22 μm 滤菌器过滤除菌后分装，4 °C 保存。

（4）G-M17：称取 42.3 g 的 M17 干粉溶于 1L 的去离子水中，搅拌混匀，121°C 高压灭菌 20 min；冷却后加入过滤除菌的 20% 的葡萄糖，使葡萄糖终浓度为 0.5 %；4 °C 保存。

（5）G-M17 琼脂平板：称取 42.3 g 的 M17 干粉，15 g 琼脂粉溶于 1L 的去离子水中，搅拌混匀，121°C 高压灭菌 20 min，冷却到 60°C 左右加入过滤除菌的 20% 的葡萄糖，使葡萄糖终浓度为 0.5%；摇匀后倒平板，待凝固后 4°C 保存。

（6）G-SGM17：称取 42.3 g 的 M17 干粉、171.15 g 蔗糖、25 g 甘氨酸溶于 1L 的去离子水中，121 °C 高压灭菌 20 min，冷却后加入过滤除菌的 20% 葡萄糖，使葡萄糖终浓度为 0.5 % 4 °C 保存。

（7）0.5M 的 EDTA（PH=8.0）：称取 18.61 g Na₂EDTA·2H₂O 于烧杯中，加入少许去离子水，充分搅拌，加入 NaOH 调节 PH=8.0 时，（注意：PH=8.0 时，EDTA 才能完成溶解）定容至 100mL。

（8）EPB：EPB 称取 171.15 g 蔗糖（0.5M），100 ml 甘油（10% 甘油），去离子水定容至 1 L。120°C 高压灭菌 20 min，4°C 保存。

（9）EPB+EDTA：称取 171.15 g 蔗糖（0.5M），100ml 甘油（10% 甘油），100mL 0.5MEDTA（终浓度为 0.05M），离子水定容至 1L，120°C 高压灭菌 20min，4°C 保存。

（10）1.0 M MgCl₂ 溶液：称取 0.95 g MgCl₂，加去离子水溶解定容至 10 mL，用 0.22 μm 滤菌器过滤除菌，分装，-20°C 保存备用。

（11）1.0 M CaCl₂ 溶液：称取 1.11 g CaCl₂，加去离子水溶解定容至 10 mL，用 0.22μm 滤菌器过滤除菌，分装，-20°C 保存备用。

（12）20 mg/mL 溶菌酶的配制：称取 0.60 g 溶菌酶粉末加 25 mL TE 缓冲溶液（pH=8.0），振荡溶解后便可使用，最好现配现用，没用完放 -20°C 保存。

（13）电转复苏液：在 50mLM17 培养基中加入 1.3mL 的 20% 乳糖溶液，（终浓度为 0.5% 乳糖）然后加入 1mL 的 1.0 M MgCl₂ 溶液，100 μl 1.0 M CaCl₂ 溶液。混合均匀，4°C 保存备用。

（14）10mM Tris-HCl（PH=8.5）：1.21 g 的 Tris 固体溶于 800 ml 去离子水中，使用 HCl 将 pH 调至 8.0，然后定容至 1L，4°C 保存。

表 3-2 引物设计

Table 3-2 Primer design

基因片段	上游引物（下划线序列为同源臂）	下游引物（下划线序列为同源臂）
pNZ8149-E （截短）	TAAGGAGGCACTCACATGGAATT GGCTGTTGTTTCGTTTC	AAGAAAGCTTGAGCTTGAACGA TGCCATTGATAACGA
pNZ8149- domainI-II	TAAGGAGGCACTCACATGTTTTTC ATGTTTGGGTATGCAAAAT	GTTCAAAGAAAGCTTGAGCTCA TACCTTTTAACTTTAAACC
pNZ8149- domainIII	TAAGGAGGCACTCACATGCAAGG TTTAAAGTTAAAAG	AAGAAAGCTTGAGCTAGCACCC TTCAAAGTTGAAG

注：上述引物属自行设计

PCR 反应体系如下表 3-3:

表 3-3 PCR 扩增反应体系

Table 3-3 PCR amplification reaction system

反应组分	反应体系 (μL)
2×buffer	25
dNTP	10
F	1
R	1
KODFx	1
ddH ₂ O	11
pUC57-E	1
总体积	50

反应条件为：94 °C，2 min，98 °C，10 s，56 °C，30 s，68 °C，30 s，35 次循环，68 °C 终延伸 10 min。扩增结束后，将 PCR 产物加入适量 DNA 上样缓冲液混匀后电泳观察片段大小，将大小正确的目的片段切下进行胶回收，回收完成后测定 DNA 浓度，放 -20 °C 保存备用。

3.2.3 NZ3900 感受态细菌的制备

- (1) 从 -80 °C 冰箱取出一管乳酸菌 NZ3900，取出一环划在 G-M17 平板上，30 °C 培养过夜；
- (2) 第二天，挑取单个菌落到 5mLG-SGM17 培养液中，30 °C 培养过夜；
- (3) 第三天，将培养液按 1: 10 比例接种到 G-SGM17 中，30 °C 培养过夜；
- (4) 将乳酸菌培养液 NZ3900 按 1: 8 比例扩大培养到 G-SGM17 中，30 °C 培养至 OD₆₀₀=0.2~0.3，然后 8000rpm，4 °C 离心 10min，收集菌体。
- (5) 用 10~20 mL EPB 重悬菌体，然后 8000 rpm，4 °C 离心 10 min，收集菌体；
- (6) 用 50 mL EPB+EDTA 重悬菌体，冰预 15 min，然后离心收集菌体，用 5~10 mL EPB 重悬菌体，离心收集菌体，最后用 EPB 按最后扩大培养的菌体体积 100: 1 的比例浓缩重悬菌体，置于冰上。
- (7) 然后快速将菌体进行分装，每支 40 μL，-80 °C 保存。

3.2.4 pNZ8149 质粒的双酶切

质粒 pNZ8149 用 NcoI 和 SacI 进行双酶切，37℃ 酶切过夜，具体酶切体系如表 3-4 所示，加 37℃ 水浴 2 h。酶切后的 pNZ8149 电泳观察，确定酶切完全后切下目的条带胶回收，测定回收的线性化质粒浓度，标记并于 -20℃ 保存备用。

表 3-4 双酶切反应体系

反应组分	反应体系 (μL)
pNZ8149	30
NcoI	1
SacI	1
10×buffer	5
ddH ₂ O	13
总计	50

3.2.5 同源臂重组反应

线性化的 pNZ8149 质粒、各组截短目的基因进行同源重组反应，按照试剂盒说明书配置如下体系：

表 3-5 同源重组加样体系

反应组分	反应体系 (μL)
2×Seamless Cloning Mix	10
截短目的基因	90
线性化 pNZ8149 质粒	20ng
ddH ₂ O	补足至 20μL

将配置好的体系放置于 50℃ 水浴反应 15min，反应结束后将样品置于 -20℃ 冰箱冷却 30 s，然后电转入 NZ3900 感受态细菌。

3.2.6 全长 E 基因重组质粒的构建

将 pUC57-E 采用 NcoI、SacI 进行双酶切获得全长 E 基因，然后与线性化的 pNZ8149 质粒采用 T₄ 连接酶 16℃ 过夜连接反应，第二天进行电转化反应。连接反应按照上一章提供的实验步骤进行。

3.2.7 重组乳酸乳球菌的构建

- (1) 取一支乳酸菌 NZ3900 感受态细菌插在冰上 2~3 min；
- (2) 迅速加入 5 μL 的连接产物，冰上静置 15 min；
- (3) 转入 0.2 mm 提前预冷的电转杯中，电转仪设定好以下的参数进行电转：fungi, shs 模式，电击后显示电击时间，最佳电击时间为 4.5 ms；
- (4) 电转结束后迅速加入 1mL 冰冷的电转复苏液复苏，继续冰预 5 min，然后 30℃ 静置 1.5 h；
- (5) 转移到离心管里离心，超净台里弃去一部分上清，重悬菌体，取 50 μLEM 固体培养基涂板，30℃ 倒置培养 18 h 左右；

(6) 待长出疑似阳性克隆菌后, 挑取单克隆菌置于 EM 培养基 30°C 过夜培养, 第二天将菌液进行质粒提取, 电泳观察提取质粒和与空载体的大小, 进行判断;

(7) 测序鉴定, 将提取的质粒交给南京金唯智生物科技有限公司进行测序, 通过 DNASTar 软件与原基因序列进行比对。

3.2.8 目的蛋白的诱导表达及蛋白提取

(1) 乳酸菌全蛋白提取

a. 含有不同目的片段的重组乳酸菌在 0.5 % 乳糖的 EM 平板上划线, 30 °C 培养过夜;

b. 取单个菌落于 0.5 % 乳糖的 EM 液体培养基 30 °C 静置培养过夜;

c. 活化好的乳酸菌按照 1: 50 转接到新鲜的 0.5 % 乳糖的 EM 液体培养基中, 30 °C 静置培养 3~4 h;

d. 待 $OD_{600}=0.4\sim 0.5$ 时, 加入终浓度为 1 ng/mL 的 Nisin 进行诱导, 30 °C 静置培养 3 h;

e. 诱导结束后取 2 mL 菌液离心, 弃上清, 将沉淀用适量冰冷 10 mM Tris-HCl (PH=8.5) 悬浮菌体, 8000 rpm 离心 2 min, 弃上清;

f. 重复 2 次上述步骤, 彻底去除培养基残留;

g. 用 100 μ L 含 1 mg /mL 溶菌酶的 10mM Tris-HCL (PH=8.5) 重悬, 37 °C 温箱反应 1 h, 离心, 弃上清;

h. 加入 30 μ L 20 % SDS 混匀裂解菌体, 加入 70 μ L 10 mM Tris-HCL (PH=8.5), 加入 50 μ L 5X 蛋白上样缓冲液, 吹打混匀后沸水浴 10 min;

i. 然后将其放置冰盒冷却, 取 10 μ L 作为上样量, 剩余放 -80 °C 保存。

(2) 乳酸菌内部蛋白的提取方法

方法同第二章超声波细胞破碎提取蛋白。

3.2.9 Western blot 检测外源目的蛋白

取 10 μ L 制备好的目的蛋白样品和空载体样品对照跑电泳 (5 % 的浓缩胶和 12 % 分离胶), 跑完后拆出胶体, 根据预染蛋白 Marker 条带对照切出目的条带胶体, 使用湿转法 (同上实验方法) 将目的蛋白转移到 PVDF 膜上, 快速封闭液在室温下封闭 10 min, E 蛋白多克隆抗体 (1: 1 000) 作为一抗 37 °C 孵育 1 h, HRP 标记的羊抗兔 IgG (1:10000) 作为二抗 37 °C 孵育 1 h, 进行 Western blot 检测。

3.2.10 目的蛋白表达条件的优化和位置检测

为了得到更好的表达效果, 目的蛋白通过 3 因素 3 水平的正交实验对表达条件进行优化, 具体实验组合如下图 3-6 所示, 同时将重组乳酸菌经过最佳诱导

表达条件诱导后，冰上超声，取沉淀和上清进行 western blot 实验鉴定蛋白表达的位置。

表 3-6 诱导条件优化

Table 3-6 Induce conditional optimization

实验编号	Nisin 浓度/ng/mL	诱导时间/h	OD ₆₀₀
1	1	2	0.3
2	1	3	0.4
3	1	5	0.5
4	10	2	0.4
5	10	3	0.5
6	10	5	0.3
7	100	2	0.5
8	100	3	0.3
9	100	5	0.4

3.3 结果与分析

3.3.1 pUC57-E 重组质粒鉴定结果

收到的甘油菌划线挑取单克隆细菌，摇菌提取质粒电泳如图所示：

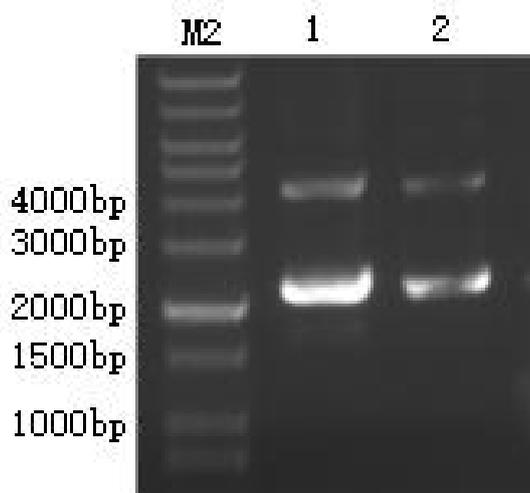


图 3-2 pUC57-E 质粒鉴定

Fig.3-2 pUC57-E plasmid identification

M2: 0.2-1.2KD DNA Marker; 1, 2: 重组质粒 pUC57-E

3.3.2 目的片段 PCR 扩增结果

将重组质粒 pUC57-E 采用 NcoI 和 SacI 双酶切后，放入 1 % 凝胶电泳观察如下图，切取目的基因 E 位置的凝胶进行胶回收后备用。经过 PCR 扩增反应，将产物放入 1 % 凝胶电泳如图 3-3 所示，电泳条带大小符合目的片段预期大小 domainI-II 片段大小为 900 bp，domainIII 为片段大小 364 bp，E（截短）片段为 1048 bp。

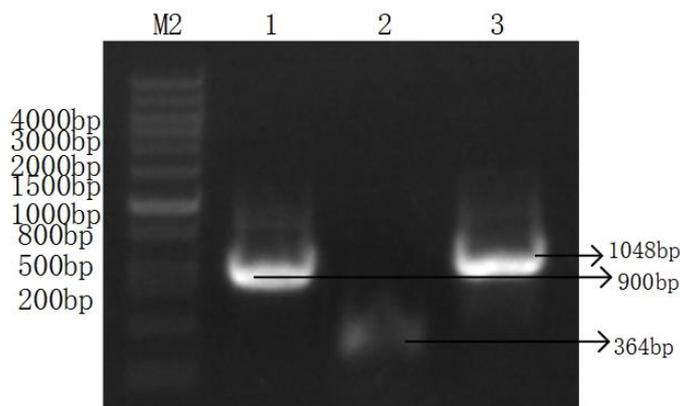


图 3-3 目的片段的扩增

Fig.3-3 Amplification of the fragment of interest

注：1: domainI-II; 2: domainIII; 3: E (截短)

3.3.3 重组质粒电转化结果

将质粒 pNZ8149 经过双酶切线性化以后，与 domainIII, domainI-II, E (截短) 采用同源臂重组连接反应后电转进入 NZ3900 感受态细胞，全长 E 基因与 T₄DNA 连接酶连接反应后电转进入 NZ3900 感受态细胞，然后用乳糖为唯一碳源的 EM 培养基进行培养 16~18 h，长出阳性菌落挑取疑似阳性菌落。

3.3.4 重组质粒的鉴定结果

提取阳性重组质粒，与空质粒进行对照跑胶，（因是使用无缝克隆试剂盒构建的重组质粒，没有增加酶切位点，因此鉴定时不能使用双酶切鉴定）可以看出条带大小不同（图 3-4），然后把疑似阳性质粒送测序后判定重组质粒构建成功。

3.3.5 Western blot 检测重组蛋白表达

重组表达质粒 pNZ8149-E, pNZ8149-E (截短), pNZ8149-domainI-II, pNZ8149-domainIII 分别在乳酸菌 NZ3900 中经 Nisin 诱导剂诱导后，经 western blot 检测，第二章制备的抗 E 蛋白多克隆抗体 1: 10000、上清和腹水 1: 10 用作一抗，在 37 KDa 处（图 3-5）有一条明显的蛋白印迹带，表明经过乳酸乳球菌的表达后，重组质粒 pNZ8149-domainI-II 表达产物与抗鸭坦布苏 E 蛋白多克隆抗体和单克隆抗体结合的免疫反应性，说明 pNZ8149-domainI-II 表达的蛋白能被制备的抗体识别。

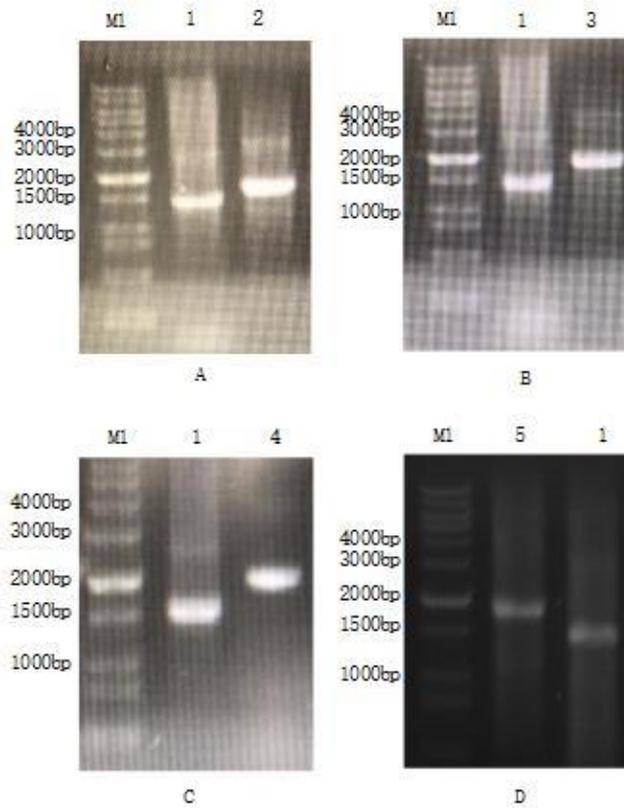


图 3-4 重组质粒的鉴定

Fig.3-5 Identification of recombinant plasmids

注：M1：0.2-1.2KD DNA Marker；A：pNZ8149-domainIII 疑似重组质粒大小鉴定；B：pNZ8149-domainI-II 疑似重组质粒大小鉴定；C：pNZ8149-E（截短）疑似重组质粒大小鉴定；D：pNZ8149-E 疑似重组质粒大小鉴定；1：pNZ8149；2：pNZ8149-domainIII；3：pNZ8149-domainI-II；4：pNZ8149-E（截短）；5：pNZ8149-E

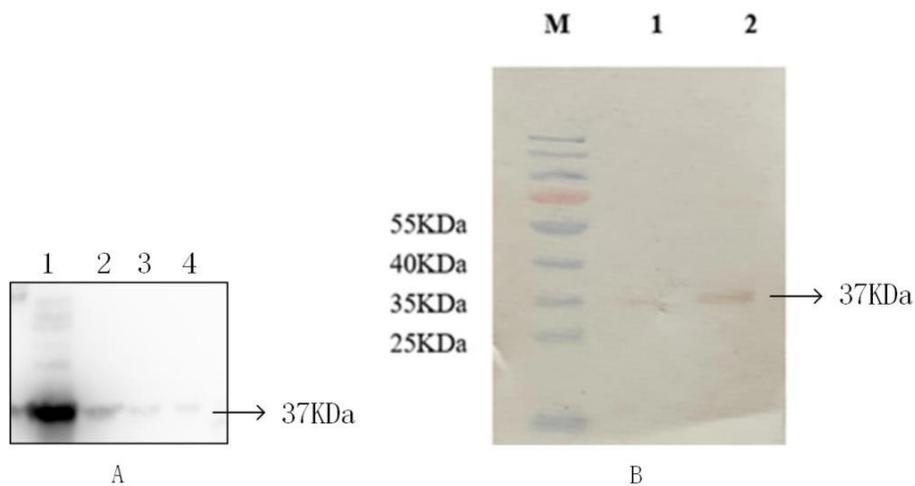


图 3-5 Western blot 检测 domainI-II 重组蛋白表达

Fig.3-6 Western blot detects recombinant domainI-II protein expression

注：A：抗 E 蛋白多克隆抗体 1：10000 为一抗；1：pNZ8149-domainI-II；2：pNZ8149；3：pNZ8149-E(截短)；4：8149-domainIII B：抗 E 蛋白上清及腹水 1：10 为一抗；M：180KDa 预染蛋白 Marker；1：上清为一抗；2：腹水为一抗

3.3.6 重组乳酸乳球菌 *L.lactis*/pNZ8149-domainI-II 蛋白表达条件的优化

将重组乳酸菌 *L.lactis*/pNZ8149-domainI-II 的优化表达后, 根据 (图 3-6) 可知, 3 中的蛋白印迹条带最厚, 表达量最高。说明最佳的蛋白诱导表达条件为诱导剂浓度为 1ng/mL, OD_{600nm} 值为 0.5, 诱导时间为 5h。

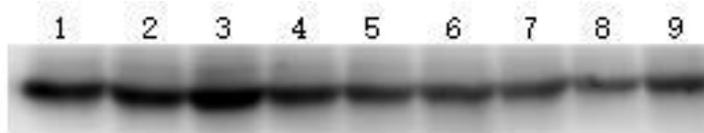


图 3-6 蛋白表达条件的优化

Fig.3-7 Optimization of protein expression conditions

注: 1: Nisin: 1ng/mL, 诱导时间: 2h, OD₆₀₀: 0.3; 2: Nisin: 1ng/mL, 诱导时间: 3h, OD₆₀₀: 0.4; 3: Nisin: 1ng/mL, 诱导时间: 5h, OD₆₀₀: 0.5; 4: Nisin: 10ng/mL, 诱导时间: 2h, OD₆₀₀: 0.4; 5: Nisin: 10ng/mL, 诱导时间: 3h, OD₆₀₀: 0.5; 6: Nisin: 10ng/mL, 诱导时间: 5h, OD₆₀₀: 0.3; 7: Nisin: 100ng/mL, 诱导时间: 2h, OD₆₀₀: 0.5; 8: Nisin: 100ng/mL, 诱导时间: 3h, OD₆₀₀: 0.3; 9: Nisin: 100ng/mL, 诱导时间: 2h, OD₆₀₀: 0.4

3.3.7 重组乳酸乳球菌 *L.lactis*/pNZ8149-domainI-II 蛋白表达位置检测

将重组乳酸菌经过最佳诱导表达条件诱导后, 冰上超声, 取沉淀和上清进行 western blot 实验鉴定, 如 (图 3-7) 可知可溶性上清和沉淀均有表达, 且沉淀表达量高。

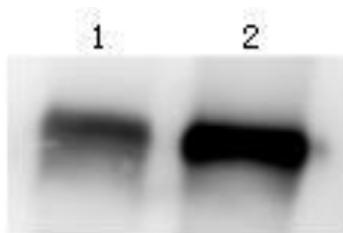


图 3-7 蛋白表达位置检测

Fig.3-8 Protein expression location detection

注: 1: PBS 重悬超声破碎后上清; 2: PBS 重悬超声破碎后沉淀

3.4 讨论

2010 年 4 月以来, 我国主要产鸭区以浙江、江苏为主等多个省份爆发了该急性传染病, 经济损失高达数十亿元^[71], 鸭坦布苏病毒病是养鸭业的重要疾病, 各品种鸭对 DTMUV 均易感。E 蛋白是鸭坦布苏病毒疫苗研究的热点, 分为三个结构域 domainI、domainII 和 domainIII 区, 研究表明, 三个区均存在可诱导产生全身性中和抗体的抗原决定簇^[22-25], 是研究 DTMUV 基因工程疫苗的首选抗原蛋白。

传统疫苗如鸭坦布苏病毒的灭活疫苗和弱毒疫苗存在一些不足, 临床应用时免疫保护不佳。黏膜免疫系统是保护机体免受病原微生物侵害的第一道

屏障,动物的黏膜及黏膜下淋巴组织占据全身淋巴组织的 80%,诱导黏膜免疫的疫苗能将病毒抗原从黏膜水平提呈给宿主免疫细胞,同时诱导机体的体液免疫和细胞免疫,刺激机体产生分泌型 IgA 和 IgG,充分发挥机体的特异性免疫能力和非特异性免疫能力。乳酸菌在当下的黏膜疫苗开发中,黏膜水平传递抗原的能力具有无可比拟的优越性。基于此,本试验以鸭坦布苏病毒 E 蛋白全长以及不同结构域蛋白为乳酸菌目的基因, Nisin 诱导剂诱导目的蛋白表达,以上一章制备的单克隆抗体和多克隆抗体为检测原料显示, domainI-II 结构域表达出目的蛋白,而其他结构域及全长蛋白尚未检测到。

本研究制备的抗体使用的抗原是鸭坦布苏病毒 E 基因重组原核表达蛋白,表达形式为包涵体表达,在进行免疫时使用的是溶解后的包涵体蛋白,为线性化蛋白,抗原表位为线性表位。DTMUV E 蛋白的三个结构域 DomainI、DomainII、DomainIII 都具有 B 细胞线性表位,都能使小鼠产生相应的抗体^[72,73]。DI 是一个 10 链的 β 桶,形成蛋白质的中心结构结构, DII 参与稳定 E 蛋白二聚体,并含有融合肽,其参与 II 型融合; DIII 形成七链 IgG 样褶皱,并被作为受体结合位点^[74]。Gong 等^[23]用自行制备的单克隆抗体 3B8 鉴定了 FSCLGMQNR 线性表位位于 domainI 结构域内;张琳等^[75]鉴定了 385LVGSGKGQI393(EP385)E 蛋白 DIII 线性表位,李晨曦等^[76,25]鉴定了 EVEPPFG 表位位于 E 蛋白 domainIII 结构域中的 3D 立体结构上。Chen 等^[22]鉴定了一种新的广泛交叉反应最小表位 227GSSAGTWQN235,它位于 DII 的 hi 环上。yang 等^[77]用单克隆抗体 6C8 鉴定了结构域 III 中的 BC/EF 环和 F/G 链上的 6 个 E 蛋白残基以及茎区域中的第一个 α 螺旋结构域结构表位。这些前人的研究结果都佐证了 E 蛋白 domainI/domainII 区主要为线性表位, domainIII 区为构像表位。由于在制备抗体时使用的是线性化的 E 蛋白,由此产生的抗体只能识别线性化表位的抗体,当把单抗和多抗作为一抗检测重组乳酸菌蛋白表达时,识别出 *L.lactis*/pNZ8149-domainI-II 所表达的蛋白,而其余结构域以及全长 E 蛋白重组乳酸菌都没有识别出蛋白表达,可能的原因有两个,第一个原因可能是因为大肠杆菌原核表达蛋白为包涵体蛋白,含硫氨基酸多,缺乏了某些蛋白质折叠的辅助因子,没有正确的次级键以及糖基化修饰,因此表达的蛋白免疫后制备的单抗和多抗是针对这种线性化的表位的,而重组乳酸乳球菌在表达不同结构域的蛋白时,其表达的结构可能具有独特的空间结构,或者形成一些特殊的糖基化修饰,所以当用前者制备的抗体可能识别不出乳酸菌表达的蛋白。而针对 DI-DII 区蛋白来看,具有许多线性化表位,且其结构较为简单,不似 DIII 区的 IgG 样构像,所以前期制备的抗体能识别上的几率非常大。第二个原因可能是在构建重组乳酸菌时,重组载体进行蛋

白表达时，可能产生了一些移码突变导致蛋白表达中断或者该结构的蛋白在乳酸乳球菌中无法进行表达，这就与蛋白本身的结构有关，所以导致没有检测出蛋白的表达。

3.5 小结

成功构建了四株重组乳酸乳球菌表达载体：*L.lactis*/pNZ8149-E，*L.lactis*/pNZ8149-E（截短），*L.lactis*/pNZ8149-domainI-II，*L.lactis*/pNZ8149-domainIII，其中利用上章节制备的单克隆抗体和多克隆抗体能识别出重组乳酸菌 *L.lactis*/pNZ8149-domainI-II 目的蛋白的表达，Western blot 检测结构域 I/II 蛋白在乳酸乳球菌胞内部分可溶性表达，部分沉淀表达，且经过最佳蛋白表达条件优化得到最佳蛋白表达条件为：Nisin: 1 ng/mL、OD₆₀₀=0.5，时间=5 h，为后续继续研究新型 DTMUV 口服疫苗提供参考。

4. 结论

(1) 制备了抗鸭坦布苏病毒 E 蛋白高效价多克隆抗体及能分泌单克隆抗体的杂交瘤细胞株一株。

(2) 构建了四株鸭坦布苏病毒 E 蛋白不同结构域片段的重组乳酸乳球菌，并由自行制备的抗体验证出一株能高表达 domainI/domainII 结构域蛋白的重组乳酸乳球菌。

参考文献

- [1] Yan P, Zhao Y, Zhang X, et al. An infectious disease of ducks caused by a newly emerged Tembusu virus strain in mainland China[J]. *Virology*, 2011, 417(1): 1-8.
- [2] Zou Z, Huang K, Wei Y, et al. Construction of a highly efficient CRISPR/Cas9-mediated duck enteritis virus-based vaccine against H5N1 avian influenza virus and duck Tembusu virus infection[J]. *Sci Rep*, 2017, 7(1): 1478-1489.
- [3] Shen H Q, Lin W C, Wang Z X, et al. Pathogenicity and genetic characterization of a duck Tembusu virus associated with egg-dropping in Muscovy ducks[J]. *Virus Res*, 2016, 223: 52-56.
- [4] Li N, Zhao J, Yang Y, et al. Innate immune responses to duck Tembusu virus infection[J]. *Vet Res*, 2020, 51(1): 87-98.
- [5] 熊陈勇, 尹彦文, 施开创, 等. 2019-2021 年鸭坦布苏病毒广西流行毒株遗传多样性分析[J]. *中国畜牧兽医*, 2022, 49(08): 3099-3111.
- [6] 罗晓宇, 嵇辛勤, 阮涌, 等. 鸭坦布苏病毒病的研究进展[J]. *中国家禽*, 2021, 43(11): 88-94.
- [7] Chen S, Wang S, Li Z, et al. Isolation and characterization of a Chinese strain of Tembusu virus from Hy-Line Brown layers with acute egg-drop syndrome in Fujian, China[J]. *Arch Virol*, 2014, 159(5): 1099-1107.
- [8] Ti J, Zhang L, Li Z, et al. Effect of age and inoculation route on the infection of duck Tembusu virus in Goslings[J]. *Vet Microbiol*, 2015, 181(3-4): 190-197.
- [9] Dai L, Li Z, Tao P. Evolutionary analysis of Tembusu virus: evidence for the emergence of a dominant genotype[J]. *Infect Genet Evol*, 2015, 32: 124-129.
- [10] Tang Y, Diao Y, Yu C, et al. Characterization of a Tembusu virus isolated from naturally infected house sparrows (*Passer domesticus*) in Northern China[J]. *Transbound Emerg Dis*, 2013, 60(2): 152-158.
- [11] Li S, Li X, Zhang L, et al. Duck Tembusu virus exhibits neurovirulence in BALB/c mice[J]. *Virology*, 2013, 453(2): 260-270.
- [12] Liu Z, Ji Y, Huang X, et al. An adapted duck Tembusu virus induces systemic infection and mediates antibody-dependent disease severity in mice[J]. *Virus Res*, 2013, 176(1-2): 216-222.
- [13] Wang J, Liu W, Meng G, et al. Isolation and genome characterization of a novel duck Tembusu virus with a 74 nucleotide insertion in the 3' non-translated region[J]. *Avian Pathol*, 2015, 44(2): 92-102.
- [14] Liu P, Lu H, Li S, et al. Genomic and antigenic characterization of the newly

- emerging Chinese duck egg-drop syndrome flavivirus: genomic comparison with Tembusu and Sitiawan viruses[J]. *J Gen Virol*, 2012, 93(Pt 10): 2158-2170.
- [15]刘会, 张薇, 张亚岚, 等. 寨卡病毒相关性吉兰-巴雷综合征的研究进展[J]. *解放军医学院学报*, 2021, 42(10): 1095-1099.
- [16]He Y, Wang X, Guo J, et al. Replication/Assembly Defective Avian Flavivirus With Internal Deletions in the Capsid Can Be Used as an Approach for Living Attenuated Vaccine[J]. *Front Immunol*, 2021, 12: 694959.
- [17]Huang J, Shen H, Jia R, et al. Oral Vaccination with a DNA Vaccine Encoding Capsid Protein of Duck Tembusu Virus Induces Protection Immunity[J], 2018, 10(4): 180-188.
- [18]Urbanowski M D, Ilkow C S, Hobman T C. Modulation of signaling pathways by RNA virus capsid proteins[J]. *Cell Signal*, 2008, 20(7): 1227-1236.
- [19]Mukhopadhyay S, Kuhn R J, Rossmann M G. A structural perspective of the flavivirus life cycle[J]. *Nat Rev Microbiol*, 2005, 3(1): 13-22.
- [20]Heinz F X, Stiasny K. Flaviviruses and flavivirus vaccines[J]. *Vaccine*, 2012, 30(29): 4301-4306.
- [21]Roehrig J T. Antigenic structure of flavivirus proteins[J]. *Adv Virus Res*, 2003, 59: 141-175.
- [22]Chen X, Li C, Lin W, et al. A Novel Neutralizing Antibody Targeting a Unique Cross-Reactive Epitope on the hi Loop of Domain II of the Envelope Protein Protects Mice against Duck Tembusu Virus[J]. *J Immunol*, 2020, 204(7): 1836-1848.
- [23]Gong H, Fan Y, Zhou P, et al. Identification of a linear epitope within domain I of Duck Tembusu virus envelope protein using a novel neutralizing monoclonal antibody[J]. *Dev Comp Immunol*, 2021, 115: 103906-103915.
- [24]Li C, Liu J, Shaozhou W, et al. Epitope Identification and Application for Diagnosis of Duck Tembusu Virus Infections in Ducks[J]. *Viruses*, 2016, 8(11): 306-320.
- [25]Li C, Bai X, Meng R, et al. Identification of a New Broadly Cross-reactive Epitope within Domain III of the Duck Tembusu Virus E Protein[J]. *Sci Rep*, 2016, 6: 36288-36295.
- [26]Chen P, Liu J, Jiang Y, et al. The vaccine efficacy of recombinant duck enteritis virus expressing secreted E with or without PrM proteins of duck tembusu virus[J]. *Vaccine*, 2014, 32(41): 5271-5277.
- [27]Li G, Gao X, Xiao Y, et al. Development of a live attenuated vaccine candidate

- against duck Tembusu viral disease[J]. *Virology*, 2014, 450-451: 233-242.
- [28] 吴厚义, 康冬柳, 张日泉, 等. 蛋鸭坦布苏弱毒疫苗免疫保护攻毒试验分析[J]. 养禽与禽病防治, 2019(10): 8-10.
- [29] Huang J, Shen H, Wang Z, et al. Attenuation of duck Tembusu virus ZJSBL01 strain following serial passage in BHK-21 cells supplied with 5-Fluorouracil[J]. *Virus Res*, 2019, 273: 197739-197748.
- [30] 黄建飞. 鸭坦布苏病毒 (DTMUV) 弱毒疫苗的研制及免疫效果评价[D]. 广州: 华南农业大学, 2018.
- [31] He D, Zhang X, Chen L, et al. Development of an attenuated live vaccine candidate of duck Tembusu virus strain[J]. *Vet Microbiol*, 2019, 231: 218-225.
- [32] 张欣. 坦布苏病毒 SDS-70 株弱毒苗的制备及安全性与免疫效力的初步评价[D]. 山东: 山东农业大学, 2017.
- [33] 于可响, 马秀丽, 袁小远, 等. 鸭坦布苏病毒鸡胚弱化毒株的选育[J]. *中国农业科学*, 2016, 49(14): 2822-2829.
- [34] Sun L, Li Y, Zhang Y, et al. Adaptation and attenuation of duck Tembusu virus strain Du/CH/LSD/110128 following serial passage in chicken embryos[J]. *Clin Vaccine Immunol*, 2014, 21(8): 1046-1053.
- [35] Wang H J, Liu L, Li X F, et al. In vitro and in vivo characterization of chimeric duck Tembusu virus based on Japanese encephalitis live vaccine strain SA14-14-2[J]. *J Gen Virol*, 2016, 97(7): 1551-1556.
- [36] He Y, Guo J, Wang X, et al. Assembly-defective Tembusu virus ectopically expressing capsid protein is an approach for live-attenuated flavivirus vaccine development[J], 2022, 7(1): 51-62.
- [37] 何平有, 郁宏伟, 吴雅清, 等. 鸭坦布苏病毒病灭活疫苗(HB 株)安全和效力的临床评价[J]. *中国动物保健*, 2018, 20(01): 48-51.
- [38] 段会娟, 林健, 杨志远, 等. 鸭坦布苏病毒病灭活疫苗(HB 株)免疫产生期和持续期的试验[J]. *中国兽医杂志*, 2017, 53(06): 106-108.
- [39] 韩春华, 赵际成, 段会娟, 等. 鸭坦布苏病毒病灭活疫苗(HB 株)母源抗体的消长规律[J]. *中国农业科学*, 2016, 49(14): 2837-2843.
- [40] 聂睿. 鸭坦布苏病毒 AH-F10 株油乳剂灭活疫苗免疫效力评价[D]. 安徽: 安徽农业大学, 2015.
- [41] 高旭元. 鸭坦布苏病毒病灭活疫苗的研制[D]. 山西: 山西农业大学, 2014.
- [42] Zhang L, Li Z, Zhang Q, et al. Efficacy assessment of an inactivated Tembusu virus vaccine candidate in ducks[J]. *Res Vet Sci*, 2017, 110: 72-78.

- [43] Yang Z, Wang J, Wang X, et al. Immunogenicity and protective efficacy of an EB66(®) cell culture-derived duck Tembusu virus vaccine[J]. *Avian Pathol*, 2020, 49(5): 448-456.
- [44] Ren X, Wang X, Zhang S, et al. pUC18-CpG is an Effective Adjuvant for a Duck Tembusu Virus Inactivated Vaccine[J], 2020, 12(2): 238-248.
- [45] Gao X, Ren X, Zhang S, et al. Interleukin-2 shows high adjuvanticity for an inactivated vaccine against duck Tembusu virus disease[J]. *Poult Sci*, 2020, 99(12): 6454-6461.
- [46] Tang J, Bi Z, Ding M, et al. Immunization with a suicidal DNA vaccine expressing the E glycoprotein protects ducklings against duck Tembusu virus[J]. *Virol J*, 2018, 15(1): 140-148.
- [47] Sun M, Dong J, Li L, et al. Recombinant Newcastle disease virus (NDV) expressing Duck Tembusu virus (DTMUV) pre-membrane and envelope proteins protects ducks against DTMUV and NDV challenge[J]. *Vet Microbiol*, 2018, 218: 60-69.
- [48] Chen L, Yu B, Hua J, et al. Optimized Expression of Duck Tembusu Virus E Gene Delivered by a Vectored Duck Enteritis Virus In Vitro[J]. *Mol Biotechnol*, 2019, 61(10): 783-790.
- [49] Tang J, Yin D, Wang R, et al. A recombinant adenovirus expressing the E protein of duck Tembusu virus induces protective immunity in duck[J]. *J Vet Med Sci*, 2019, 81(2): 314-320.
- [50] Pan Y, Jia R, Li J, et al. Heterologous prime-boost: an important candidate immunization strategy against Tembusu virus[J]. *Virol J*, 2020, 17(1): 67-76.
- [51] Ma T, Liu Y, Cheng J, et al. Liposomes containing recombinant E protein vaccine against duck Tembusu virus in ducks[J]. *Vaccine*, 2016, 34(19): 2157-2163.
- [52] Li L, Zhang Y, Dong J, et al. The truncated E protein of DTMUV provide protection in young ducks[J]. *Vet Microbiol*, 2020, 240: 108508-108511.
- [53] Huang J, Jia R, Shen H, et al. Oral Delivery of a DNA Vaccine Expressing the PrM and E Genes: A Promising Vaccine Strategy against Flavivirus in Ducks[J]. *Sci Rep*, 2018, 8(1): 12360-12369.
- [54] Li L, Zhang Y, Dong J, et al. Development of chimeric virus-like particles containing the E glycoprotein of duck Tembusu virus[J]. *Vet Microbiol*, 2019, 238: 108425-108432.
- [55] Sofronic-Milosavljevic L, Ilic N, Pinelli E, et al. Secretory Products of *Trichinella*

- spiralis Muscle Larvae and Immunomodulation: Implication for Autoimmune Diseases, Allergies, and Malignancies[J]. *J Immunol Res*, 2015, 2015: 523875-523889.
- [56]张旺. 重组 IBDV-VP2 活载体乳酸菌疫苗菌株的构建和侵入能力检测[D]. 新疆: 石河子大学, 2016.
- [57]Wang Z, Yu Q, Gao J, et al. Mucosal and systemic immune responses induced by recombinant *Lactobacillus* spp. expressing the hemagglutinin of the avian influenza virus H5N1[J]. *Clin Vaccine Immunol*, 2012, 19(2): 174-179.
- [58]Gruzza M, Fons M, Ouriet M F, et al. Study of gene transfer in vitro and in the digestive tract of gnotobiotic mice from *Lactococcus lactis* strains to various strains belonging to human intestinal flora[J]. *Microb Releases*, 1994, 2(4): 183-189.
- [59]Perdigón G, Fuller R, Raya R. Lactic acid bacteria and their effect on the immune system[J]. *Curr Issues Intest Microbiol*, 2001, 2(1): 27-42.
- [60]Wells J. Mucosal vaccination and therapy with genetically modified lactic acid bacteria[J]. *Annu Rev Food Sci Technol*, 2011, 2: 423-445.
- [61]Yang W T, Yang G L, Shi S H, et al. Protection of chickens against H9N2 avian influenza virus challenge with recombinant *Lactobacillus plantarum* expressing conserved antigens[J]. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2017, 101(11): 4593-4603.
- [62]Yang W T, Shi S H, Yang G L, et al. Cross-protective efficacy of dendritic cells targeting conserved influenza virus antigen expressed by *Lactobacillus plantarum*[J]. *Sci Rep*, 2016, 6: 39665-39684.
- [63]Yang W T, Yang G L, Yang X, et al. Recombinant *Lactobacillus plantarum* expressing HA2 antigen elicits protective immunity against H9N2 avian influenza virus in chickens[J]. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2017, 101(23-24): 8475-8484.
- [64]Lei H, Gao T, Cen Q. Cross-protective immunity of the haemagglutinin stalk domain presented on the surface of *Lactococcus lactis* against divergent influenza viruses in mice[J]. *Virulence*, 2021, 12(1): 12-19.
- [65]Lei H, Gao T, Cen Q, et al. Haemagglutinin displayed on the surface of *Lactococcus lactis* confers broad cross-clade protection against different H5N1 viruses in chickens[J]. *Microb Cell Fact*, 2020, 19(1): 193-203.
- [66]Wang L, Zhao D, Sun B, et al. Oral vaccination with the porcine circovirus type 2 (PCV-2) capsid protein expressed by *Lactococcus lactis* induces a specific immune response against PCV-2 in mice[J], 2020, 128(1): 74-87.
- [67]Zang Y, Tian Y, Li Y, et al. Recombinant *Lactobacillus acidophilus* expressing S(1)

- and S(2) domains of porcine epidemic diarrhea virus could improve the humoral and mucosal immune levels in mice and sows inoculated orally[J]. *Vet Microbiol*, 2020, 248: 108827-108834.
- [68] 贾岩, 高宇驰, 黎四平, 等. 检测人 IL-37 双抗夹心 ELISA 方法的建立[J]. *中国免疫学杂志*, 2017, 33(09): 1346-1349+1354.
- [69] 袁雪涛, 王芳蕊, 石瑜, 等. 双抗体阻断 ELISA 检测小反刍兽疫病毒抗体的方法建立[J]. *中国动物传染病学报*: 1-7.
- [70] 熊蕊. H5 亚型高致病性禽流感病毒感染禽的抗体竞争 ELISA 诊断方法的建立[D]. 新疆: 新疆农业大学, 2007.
- [71] 曹贞贞, 张存, 黄瑜, 等. 鸭出血性卵巢炎的初步研究[J]. *中国兽医杂志*, 2010, 46(12): 3-6+97.
- [72] 赵冬敏, 刘宇卓, 黄欣梅, 等. 坦布苏病毒 E 蛋白结构域 I/II 蛋白免疫保护效果 [J]. *江苏农业学报*, 2017, 33(02): 379-383.
- [73] 余磊, 闫大为, 高旭元, 等. 鸭坦布苏病毒 E 蛋白结构域 III 原核表达产物诱导中和抗体的研究[J]. *中国动物传染病学报*, 2014, 22(02): 1-6.
- [74] Crill W D, Chang G J. Localization and characterization of flavivirus envelope glycoprotein cross-reactive epitopes[J]. *J Virol*, 2004, 78(24): 13975-13986.
- [75] 张琳, 余斌, 倪征, 等. 鸭坦布苏病毒 E 蛋白线性化 B 细胞抗原表位的鉴定[J]. *浙江农业学报*, 2017, 29(12): 2009-2014.
- [76] 李晨曦, 华荣虹, 张云. 鸭坦布苏病毒 E 蛋白抗原表位的鉴定及其表位交叉反应性分析[J]. *中国预防兽医学报*, 2018, 40(01): 60-65.
- [77] Yang B, Meng R, Feng C, et al. An Antibody Neutralization Determinant on Domain III and the first α -Helical Domain in the Stem-Anchor Region of Tembusu Virus Envelope Protein[J]. *J Immunol*, 2022, 209(4): 684-695.