

密级：

论文编号：

# 中国农业科学院 学位论文

## 传染性法氏囊病病毒 VP2、VP3 蛋白抗原表位 分析与定位研究

**Identification and Mapping of Epitopes of Infectious Bursal  
Disease Virus VP2 and VP3 Proteins**

硕 士 研 究 生：邓小芸

指 导 教 师：王笑梅 研究员

申请学位类别：农学硕士

专 业：预防兽医学

研 究 方 向：分子病毒学和免疫学

培 养 单 位：研究生院

哈尔滨兽医研究所

提交日期 2007 年 6 月

Secrecy:

No.

**Chinese Academy of Agricultural Sciences  
Master Dissertation**

**Identification and Mapping of Epitopes of Infectious Bursal  
Disease Virus VP2 and VP3 Proteins**

Ms. Candidate: Deng Xiaoyun

Advisor: Prof. Wang Xiaomei

Major: Preventive Veterinary Medicine

Specialty: Molecular Virology and Immunology

Chinese Academy of Agricultural Sciences

June 2007

# 独 创 性 声 明

本人声明所呈交的论文是我个人在导师指导下进行的研究工作及取得的研究成果。尽我所知，除了文中特别加以标注和致谢的地方外，论文中不包含其他人已经发表或撰写过的研究成果，也不包含为获得中国农业科学院或其它教育机构的学位或证书而使用过的材料。与我一同工作的同志对本研究所做的任何贡献均已在论文中作了明确的说明并表示了谢意。

研究生签名：

时间： 年 月 日

# 关于论文使用授权的声明

本人完全了解中国农业科学院有关保留、使用学位论文的规定，即：中国农业科学院有权保留送交论文的复印件和磁盘，允许论文被查阅和借阅，可以采用影印、缩印或扫描等复制手段保存、汇编学位论文。同意中国农业科学院可以用不同方式在不同媒体上发表、传播学位论文的全部或部分内容。

**(保密的学位论文在解密后应遵守此协议)**

论文作者签名：

时间： 年 月 日

导师签名：

时间： 年 月 日

## 论文评阅人、答辩委员名单

论文题目	传染性法氏囊病病毒 VP2、VP3 蛋白抗原表位分析与定位研究				
论文作者	邓小芸	指导教师	王笑梅	培养单位	哈尔滨兽医研究所

	姓名	职称职务	导师类别	单位	专业
评阅人	张永光	研究员	博士生导师	兰州兽医研究所	预防兽医学
	刘湘涛	研究员	博士生导师	兰州兽医研究所	预防兽医学
答辩主席	李景鹏	教授	博士生导师	东北农业大学	预防兽医学
答辩委员	王君伟	教授	博士生导师	东北农业大学	预防兽医学
	蔡雪辉	副研究员	硕士生导师	哈尔滨兽医研究所	预防兽医学
	崔尚金	副研究员	硕士生导师	哈尔滨兽医研究所	预防兽医学
	曲连东	副研究员	硕士生导师	哈尔滨兽医研究所	预防兽医学
答辩时间、地点	2006 年 6 月 15 日上午于哈尔滨兽医研究所学术报告厅				
记 录	周国辉				

## 摘 要

本研究利用传染性法氏囊病病毒 VP3 蛋白的四株单克隆抗体 (VP3-3F, VP3-7B, VP3-7C 和 VP3-10E) 对噬菌体随机 15 肽库进行了 3 轮筛选, 得到了 8 个模拟表位, 在竞争抑制 ELISA 中模拟表位与单抗的反应可被 VP3 蛋白竞争抑制。

为了更进一步详细研究 IBDV VP3 表位结构, 本研究设计表达了一组总数为 17 个部分重叠且覆盖 VP3 全长的短肽融合蛋白, 利用肽扫描技术对这四株 IBDV VP3 的单克隆抗体针对的抗原表位进行了研究, 鉴定出了两个新的 VP3 线性表位: 109-119aa (多聚蛋白的 864-874aa) (针对 VP3-3F 和 VP3-7B), 177-190aa (多聚蛋白的 932-945aa) (针对 VP3-7C 和 VP3-10E)。同源性分析结果显示, 这两个表位在多种血清 I 型 (除变异株 Variant E) 和血清 II 型毒株中同源性为 100%, 是 IBDV 保守的群特异性表位。这两个表位具有良好的免疫原性和反应原性, 说明这两个表位可以作为制备多表位疫苗和诊断试剂的候选肽段。

利用肽扫描技术对三株 IBDV VP2 的单克隆抗体的抗原表位进行了定位, 在 VP2 高变区侧翼鉴定出了一个新的线性抗原表位: 187-199aa。同源性分析结果显示, 该表位仅在血清 II 型 OH 毒株中有变异 (I187A、M193L、V194M), 说明这个表位是保守的型特异性抗原表位。

该研究将有助于进一步阐明 VP2、VP3 蛋白抗原结构, 探讨其表位生物学功能, 对设计科学合理的疫苗和诊断试剂具有重要的意义。

**关键词:** 传染性法氏囊病病毒, 抗原表位, 肽扫描, 噬菌体随机 15 肽库, 单克隆抗体

## Abstract

The epitopes of IBDV VP3 were screened by phage display. Four monoclonal antibodies against VP3 of IBDV (VP3-3F, VP3-7B, VP3-7C and VP3-10E) were used to screen for binding peptides from 15-mer phage random peptide library. After three rounds of panning (absorption-elution-amplification), 8 15-mer phage peptides were determined as mimotopes of IBDV. The reaction of mimotopes with McAbs in ELISA can be competitively inhibited by VP3 protein.

In order to further study the epitopes structure of IBDV VP3, 17 partially overlapping or consecutive peptides (P1-P17) spanning VP3 were expressed for epitopes screening by Pepscan. Finally, two linear epitopes of VP3, 109-119aa (864-874aa of polyprotein) and 177-190aa (932-945aa of polyprotein), were identified. Compared with many IBDV strains, the epitopes were totally homologous in serotype-I IBDV (except variant E) and serotype- II IBDV, so they are conservative group-specific epitopes. Both peptides of the two epitopes have good immunogenicity and reactionogenicity. They could induce special antibodies in BALB/c mice while they could react with IBDV chicken positive serum and IBDV VP3 mice positive serum.

Also, the epitopes of IBDV VP2 were identified by Pepscan. A new linear epitope of VP2, 187-199aa, which was vicinal to the hypervariable region, was identified. Compared with many IBDV strains, the epitope was totally homologous in serotype-I IBDV, so it was conservative serotype-specific epitope..

This study is not only important for further understanding the structure of IBDV VP2 and VP3 but also useful for designing the diagnostic reagent and vaccine.

**Key word:** Infectious bursal disease virus, epitopes, Pepscan, 15-mer phage random peptide library, monoclonal antibody (McAb)

# 目录

第一章 绪论 .....	1
1.1 传染性法氏囊病的研究概况 .....	1
1.1.1 病原学 .....	1
1.1.2 流行病学 .....	2
1.1.3 临床症状 .....	3
1.1.4 病理变化 .....	3
1.1.5 IBDV 基因组结构及编码蛋白功能 .....	3
1.2 抗原表位的研究方法及 IBDV 抗原表位研究进展 .....	5
1.2.1 抗原表位的研究方法 .....	5
1.2.2 抗原表位的研究意义 .....	7
1.2.3 IBDV 抗原表位研究进展 .....	8
1.3 IBD 诊断方法的研究进展 .....	9
1.3.1 IBD 诊断方法的研究 .....	9
1.3.2 基于表位的诊断方法研究 .....	9
1.4 IBD 疫苗的研究进展 .....	10
1.4.1 IBD 疫苗的研究 .....	10
1.4.2 表位疫苗的研究 .....	11
1.5 本研究目的与意义 .....	12
第二章 利用噬菌体展示随机 15 肽库鉴定 IBDV VP3 抗原表位 .....	13
2.1 材料与方法 .....	13
2.1.1 材料 .....	13
2.1.2 单抗与随机肽库 .....	13
2.1.3 肽库的生物淘洗 .....	14
2.1.4 噬菌体效价测定 .....	14
2.1.5 噬菌体扩增 .....	14
2.1.6 噬菌体的制备 .....	14
2.1.7 噬菌体短肽的间接 ELISA 检测 .....	15
2.1.8 竞争抑制 ELISA 检测 .....	15
2.1.9 噬菌体短肽测序分析 .....	15
2.2 结果 .....	15
2.2.1 肽库的生物淘洗的产率 .....	15
2.2.2 噬菌体短肽的 ELISA 检测 .....	16
2.2.3 竞争抑制 ELISA 检测 .....	16
2.2.4 噬菌体短肽测序 .....	16
2.2.5 表位序列分析 .....	17
2.3 讨论 .....	17
第三章 利用 Pepscan 技术鉴定 IBDV VP3 抗原表位 .....	19
3.1 材料与方法 .....	20
3.1.1 材料 .....	20

3.1.2 VP3 表位预测及短肽设计 .....	20
3.1.3 VP3 分段扩增、克隆与表达 .....	22
3.1.4 Pepscan 技术筛选抗原表位 .....	22
3.1.5 ELISA 鉴定抗原表位 .....	22
3.1.6 表位免疫原性检测 .....	22
3.1.7 表位反应原性检测 .....	22
3.1.8 表位的同源性分析 .....	22
3.1.9 表位作图 .....	23
3.2 结果 .....	23
3.2.1 VP3 表位预测及短肽设计结果 .....	23
3.2.2 VP3 分段扩增、克隆与表达 .....	24
3.2.3 Pepscan 技术筛选抗原表位 .....	24
3.2.4 ELISA 鉴定抗原表位 .....	25
3.2.5 抗原表位的免疫原性检测结果 .....	26
3.2.6 抗原表位的反应原性检测结果 .....	26
3.2.7 表位的同源性分析 .....	26
3.2.8 表位作图结果 .....	27
3.3 讨论 .....	27
第四章利用 Pepscan 技术鉴定 IBVD VP2 抗原表位 .....	30
4.1 材料与方法 .....	30
4.1.1 材料 .....	30
4.1.2 VP2 短肽设计 .....	30
4.1.3 VP2 分段扩增、克隆与表达 .....	31
4.1.4 Pepscan 技术筛选抗原表位 .....	32
4.1.5 ELISA 鉴定抗原表位 .....	32
4.1.6 表位的同源性分析 .....	32
4.1.7 表位作图 .....	32
4.2 结果 .....	32
4.2.1 VP2 短肽设计 .....	32
4.2.2 VP2 分段表达 .....	33
4.2.3 Pepscan 技术筛选抗原表位 .....	34
4.2.4 ELISA 鉴定抗原表位 .....	34
4.2.5 表位的同源性分析 .....	35
4.2.6 表位作图结果 .....	35
4.3 讨论 .....	36
第五章 结论 .....	37
参考文献 .....	38
致谢 .....	44
作者简介 .....	45



## 英文缩略表

英文缩写	英文全称	中文名称
IBD	Infectious bursal disease	传染性法氏囊病
IBDV	Infectious bursal disease virus	传染性法氏囊病病毒
vvIBDV	Very virulent Infectious bursal disease virus	传染性法氏囊病病毒超强毒
IPNV	Infectious Pancreatic Necrosis Virus	传染性胰坏死病毒
AcNPV/ <i>SF</i> system	Autographa californica nuclear polyhedrosis virus/ <i>Sodoptera frugierda</i>	苜蓿银纹夜蛾核型多角体病毒 / 草地贪夜蛾（又称秋粘虫）系统
NDV	New-castle disease virus	新城疫病毒
FPV	Fowl pox virus	禽痘病毒
HVT	Herpesvirus of turkey	火鸡疱疹病毒
ALV	Avian adenovirus	禽腺病毒
MDV	Marek disease virus	马立克氏病毒
PFU	Plaque forming unit	病毒蚀斑单位
CEF	Chicken embryo fibroblast	鸡胚成纤维细胞
EID <sub>50</sub>	50% Egg infections dose	50%鸡胚感染量
SPF	Specific pathenogen free	无特定病原体
RdRp	RNA dependent RNA polymerase	RNA 依赖 RNA 聚合酶
CAM	Chorioallantoic membrane	绒毛尿囊膜
McAb	Monoclonal antibody	单克隆抗体
PCR	Polymerase chain reaction	聚合酶链式反应
RT-PCR	Reverse transcriptase PCR	反转录 PCR
IPTG	Isopropyl-β-D-thiogalactoside	异丙基-β-D-硫代半乳糖苷
kD	Kilodalton	千道尔顿
ELISA	Enzyme linked immunosorbent assay	酶联免疫吸附试验
VN	Virus neutrialication	病毒中和试验
AGIDT	Agar gel immunodiffusion test	琼脂凝胶免疫扩散试验
IFA	Indirect immunofluorescent assay	间接免疫荧光检测
ORF	Open reading frame	开放阅读框
LB	Luria-Bertani	LB 液体培养基
PEG	Polyethylene glycol	聚乙二醇
PBS	Phosphate buffered solution	磷酸盐缓冲溶液
TBS	Tris buffered solution	Tris 缓冲盐溶液
OPD	O-phenylenediamine	联苯二胺
DAB	3,3'-Diaminobenzidine	二氨基联苯胺

NC	Nitrocellulose	硝酸纤维素
UTR	Untranslated region	非翻译区
SDS-PAGE	Sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis	十二烷基硫酸钠聚丙烯酰胺凝胶电泳
HRP	Horseradish peroxidase	辣根过氧化酶
cDNA	Complement cDNA	互补脱氧核糖核酸
DNA	Deoxyribonucleic acid	脱氧核糖核酸
RNA	Ribonucleic acid	核糖核酸
Amp	Ampicillin	氨苄青霉素
Kan	Kanarese	卡那霉素
TC	Tetracycline	四环素
NAV	Nucleic acid vaccine	核酸疫苗
CMI	Cell-mediated immunity	细胞免疫应答
NAV	Nucleic acid vaccine	核酸疫苗

## 第一章 绪论

传染性法氏囊病 (Infectious bursal disease, IBD) 是由传染性法氏囊病毒 (Infectious bursal disease virus, IBDV) 引起的鸡和火鸡的急性、高度接触性、杀淋巴细胞性的传染病 (殷震等, 2001)。它对于养禽业有两个方面的危害: 一是直接的危害, IBDV 的感染可以使鸡群致病、致死、致生产性能下降, 造成严重的经济损失; 尤其是 80 年代以来, 出现了毒力大大增强的 IBDV 超强毒株 (vvIBDV), 常常使感染鸡群出现全群覆灭的惨痛局面。二是间接的危害, IBDV 的侵害将使机体体液免疫功能受到严重损伤, 尤其是抗原性发生漂变的 IBDV 变异株, 虽然不会导致鸡群的大面积死亡, 但会使感染鸡群免疫机能低下, 而对其它疫苗的免疫应答能力降低, 对其它疫病的易感性增强, 常常继发细菌感染, 抗生素投喂量的增加, 饲养成本增加, 同时导致药物残留, 危害人类健康, 影响出口贸易, 间接损失更为严重。在世界范围内引起了严重的经济损失。

近年来, 随着分子生物学技术的不断发展, 为 IBDV 的研究提供了更为丰富的方法和手段。已取得了许多突破性进展, 众多的科学工作者从 IBDV 的基因结构、主要结构蛋白及其功能方面作了较为深入的研究。明确了病毒的结构和基因组的主要功能, 为基因工程疫苗研制和新型诊断方法的建立提供了理论依据。

### 1.1 传染性法氏囊病的研究概况

IBDV 血清型共有 2 个, 鸡源性的为 IBDV 血清 I 型, 火鸡源为 IBDV 血清 II 型, 血清 II 型毒株对鸡无致病性 (McFerran *et al.*, 1980)。根据致病特征和抗原性的差异, 血清 I 型中又可以分为经典毒株、变异毒株和超强毒株。经典毒株以导致法氏囊水肿为特征, 世界各地广泛流行; 变异株于 1985 年首次分离于美国特拉华州, 未见有水肿的过程, 具有很强的免疫抑制作用, 主要流行于美国、澳大利亚、中国; 超强毒株导致法氏囊出血, 严重的外观似“紫葡萄”样, 死亡率高达 70% 以上, 最早分离于比利时, 现已大面积流行于欧洲、东南亚、非洲等。目前, 该病已经遍布全球养禽地区, 在工业化养禽业发达的国家尤为严重。我国于 1979 年先后在北京、上海、广州等地发现了本病 (周蛟等, 1982)。1990 年以后, 我国报道分离到 vvIBDV 和变异株, 使该病呈现了新的流行特点, 给我国养禽业造成了很大的经济损失。除鸡之外, 鸭、鹅、鹌、麻雀等均存在 IBDV 的自然感染, 这些动物感染 IBDV 后通常不表现临床症状, 可能成为病毒携带者或贮藏宿主, 不仅可能引发 IBDV 的传播和续源流行, 也为 IBDV 的变异提供了特殊的生态条件。

#### 1.1.1 病原学

(1) IBDV 病毒学分类与结构特性: IBDV 属于双 RNA 病毒科 (Birnaviridae family), 禽双 RNA 病毒属 (Avianbirnavirus)。本科成员还包括水生双 RNA 病毒属和昆虫双链 RNA 病毒属。水生双 RNA 病毒属包括鱼的传染性胰坏死病毒 (Infectious Pancreatic Necrosis Virus, IPNV) 等, 昆虫双 RNA 病毒属于果蝇的 x 病毒 (DXV), 它们的基因组均由两个节段的双链 RNA 构成。本科病毒呈二十面体对称, 球形, 粒子直径大小约 55~65nm (见图 1-1)。无囊膜, 表面无突起。负染电镜观察表明, IBDV 病毒颗粒并非球形, 呈 T=13 对称, 五倍轴延伸直径为 72nm, 而三倍轴延伸

直径为 66nm。VP2 蛋白形成 3 亚基携带中和性抗原表位，暴露于病毒粒子的外壳，构成直径为 26nm-30nm 的 200 个 Y 字形的三聚体；VP3 则与病毒基因组 RNA 作用于颗粒内部，构成直径为 26nm-28nm 的 200 个 Y 字形的三聚体一些物质性结构；在颗粒内部，一些物质性结构包裹着五倍轴，可能是由 VP4 和 VP5 组成 (Bottcher *et al.*, 1997; Lombardo *et al.*, 1999; Caston *et al.*, 2001)。

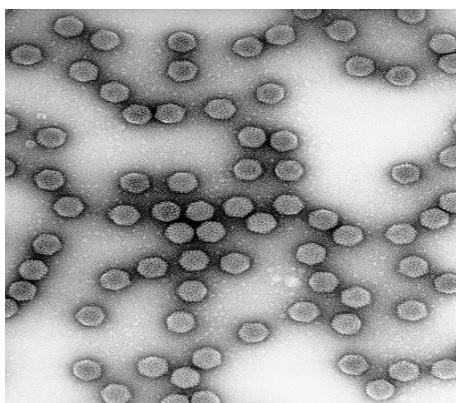


图 1-1 IBDV 病毒颗粒电镜照片

Fig.1-1 Electron micrograph of IBDV

(2) 理化特性：完整的病毒粒子在氯化铯中浮密度为 1.31-1.43g/ml，不完整病毒粒子低于这个密度值范围。在蔗糖中的沉降系数为 460s。

IBDV 非常稳定，对低 PH (PH2)、氯仿、乙醚等脂溶剂不敏感，对热和干燥有相当的抵抗力，56℃ 5 小时或 60℃ 30 分钟仍有活力。PH12 或 70℃ 30 分钟或 0.5%氯化氨作用 10 分钟能杀灭病毒。

(3) 生物学特性：IBDV 在体内增殖的靶器官是鸡的中枢免疫器官—法氏囊组织，对法氏囊中未成熟的 B 淋巴细胞或 B 淋巴细胞前体细胞具有很强的亲嗜性，另外可通过鸡胚培养和细胞培养实现体外增殖。鸡胚培养是 IBDV 增殖的最好手段，实践证明，绒毛尿囊膜(CAM)接种途径最为敏感。鸡胚通常在感染后 4~6 天死亡，感染鸡胚发育阻滞，水肿和出血，鸡胚和 CAM 中含有大量病毒，尿囊液中病毒含量较低。尿囊腔途径接种比 CAM 途径接种病度滴度 (EID<sub>50</sub>) 低 1.5~2.0 个滴度。适应于鸡胚的 IBDV 可在鸡胚成纤维细胞 (CEF) 上增殖，并产生明显的细胞病变。形成肉眼可见的蚀斑。因此可利用病毒蚀斑单位 (PFU/ml) 测定法进行细胞培养适应毒的定量分析，比鸡胚接种法更为敏感。IBDV 也能在鸡胚法氏囊细胞、肾细胞中增殖，产生细胞病变和形成蚀斑。

### 1.1.2 流行病学

IBD 为高度接触性传染病，3~6 周龄的幼鸡最为易感。最近有研究报道，IBD 易感年龄已向两端延伸，最早发生于 1 日龄雏鸡群，最大为 150 日龄左右刚产蛋鸡群。新近研究表明，麻雀、鸭、鹅均可自然感染 IBDV，鸡并非是唯一的 IBDV 自然动物宿主。但麻雀、鸭、鹅等感染 IBDV 后通常不表现临床症状，可能成为病毒携带者或贮存宿主，这就为 IBDV 在 IBD 疫区感染的持续存在和进一步传播提供了特殊的生态条件。IBD 发病季节以六、七、八

月份常见, 其它季节发病较少。IBD 流行形式随鸡群密度大小和免疫状态, 可分为散发性或地方流行性。一旦出现超强毒株, 再加上鸡群免疫状态差, 可呈暴发式流行(于幼平, 1993)。本病潜伏期短, 人工感染后 2-3 天出现临床症状, 突出的表现为突然发病, 发病率较高, 死亡集中发生于很短的几天内, 过后鸡群的康复较为迅速。IBDV 可持续存在于鸡舍的环境中, 可通过鸡体之间的直接接触, 或通过污染病毒的各种媒介物如饲料、饮水、尘土、器具、垫料、人员衣鞋、昆虫机械等间接接触传播。

目前我国传染性法氏囊病发生情况主要有以下特征: 1.发病日龄拓宽, 向两端延伸, 3~140 天都有报道。2.免疫失败现象严重; 目前大多疫苗都不能有效控制 IBD 发生。3.免疫抑制现象普遍存在, 继发感染新城疫、大肠杆菌等细菌和病毒病严重。

### 1.1.3 临床症状

在易感鸡群中, 初发的 IBD 多呈急性型。鸡表现自啄泄殖腔、减食, 精神沉郁, 羽毛蓬乱, 头及翅膀下垂; 嗜睡, 眼睑闭合, 呆立一隅, 不愿走动, 步态不稳, 卧地, 震颤; 白色或水样腹泻, 肛门周围羽毛有泥土、粪便, 啄肛。感染后的第二天开始陆续有死亡现象出现, 死亡高峰期一般在感染后的第 3~4 天, 第 5~7 天后开始恢复。亚临床感染, 不表现明显可见的临床症状, 但体重减轻, 有时可查出特异性抗体。

### 1.1.4 病理变化

死鸡剖检可见脱水而法氏囊充血和水肿比正常肿大 2 倍。法氏囊是本病毒的主要侵害器官, 变化明显, 严重病例法氏囊浆膜明显发炎, 有浆液性渗出物, 法氏囊的粘膜表面有出血性淤点或淤斑, 甚至呈“紫葡萄样”外观。少数鸡肾肿大, 显白色, 尿酸盐沉着。腿部肌肉及腺胃、肌胃交界处出血。脾脏肿大、出血。病理组织学检查可见淋巴样器官受到损害, 法氏囊受损最为严重。其次为脾、胸腺、肠扁桃体和哈德氏腺, 法氏囊滤泡和脾的血管周围鞘内 B 淋巴细胞破裂、崩解, 法氏囊内大量异嗜性细胞浸润和增殖。

### 1.1.5 IBDV 基因组结构及编码蛋白功能

IBDV 基因组是由 A、B 两个双链 RNA 节段组成, 包括 5'端非编码区、编码区和 3'端非编码区。较大的 A 节段约 3260bp。A 节段的 ORF1 在前 (Hudson *et al.*, 1986; Bayliss *et al.*, 1990; Mundt *et al.*, 1995), 长为 435bp, 编码 145 个氨基酸的 VP5, 大小为 21KD。ORF2 在后, 长度为 3036bp, 编码一个由 1012 个氨基酸残基组成的前体蛋白 (NH<sub>2</sub>-VP2-VP4-VP3-COOH), 大约 110KD, 经加工变成成熟的 VP2、VP4 和 VP3, 两个 ORF 部分重叠。B 节段含有一个连续 ORF, 约 2827bp 左右, 编码一个有 878 个氨基酸组成的蛋白 VP1, 大小约 90KD (Muller and Nitschke, 1987) (见图 1-2)。此外 A、B 节段存在末端非编码区 (non-coding region, NCR)。

(1) VP2 是血清型特异性抗原, 既是 IBDV 的主要结构蛋白, 又是病毒的主要宿主保护性抗原, 与病毒中和抗体的诱导、抗原和毒力的变异、细胞凋亡等有关 (Vakharia *et al.*, 1994)。病毒粒子二十面体结构的衣壳蛋白仅由 VP2 组成 (Coulibaly *et al.*, 2005; Lee *et al.*, 2006; Garriga *et al.*, 2006), 并且它携带有宿主保护性抗原决定簇, 可以诱生保护性中和抗体, 具有血清型特异性。

该蛋白具有高度疏水性和构象依赖性, 试验证明, 所有的中和性单克隆抗体可以通过免疫沉淀而不是 Western blot 与之发生反应。毒力相关性抗原表位位于 VP2 的可变区, 属中和性表位, 具有毒力特异性, 既能识别强毒和弱毒, 在临床上常用于筛选理想的疫苗株 (Eterradoss *et al.*, 1997)。现已明确不同毒株 VP2 氨基酸序列差异主要存在于第 206~350 残基, 即 VP2 高变区, 该区具有构象中和抗原表位 (Azad *et al.*, 1986; Yamaguchi *et al.*, 1996; Cui *et al.*, 2003a, 2003b)。

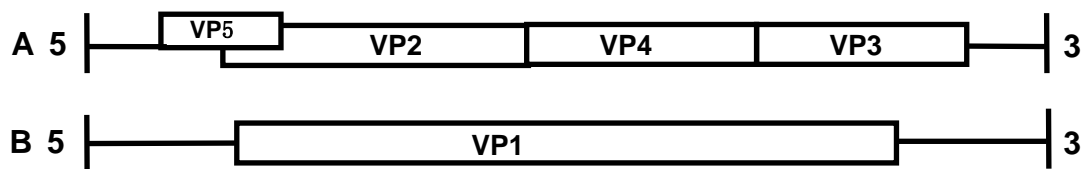


图 1-2 IBDV 的基因组结构示意图

Fig.1-2 Genomic organization of IBDV

(2) VP3 为群特异性抗原, 占病毒颗粒总蛋白的 43%, 分子量为 32~35KD, 不同血清亚型 IBDV 的 vp3 基因相对保守。在血清 I 型和 II 型之间具有交叉反应性 (Mahardika *et al.*, 1995), VP3 至少存在两个独立并不重叠的非中和性抗原表位, 其中一个是两个血清型所共有的, 另一个是血清型特异的 (Oppling *et al.*, 1991)。大肠杆菌和杆状病毒所表达的 VP3 蛋白都不能诱导鸡群产生中和抗体 (Pitcovski *et al.*, 1999)。用病毒免疫机体后最早出现的血清抗体是针对 VP3 的, VP3 的 C-末端有许多散在分布的脯氨酸, 并形成碱性区, 该区域可与核酸发生相互连接, 使 VP3 参与病毒的包装和稳定病毒 RNA 的作用。免疫荧光、共聚焦显微镜和免疫沉淀分析表明 VP1 和 VP3 形成的复合物是形成完整的病毒颗粒所必须的 (Lombardo *et al.*, 1999)。因此说明 VP1-VP3 复合物参与了病毒基因组的复制和包装。VP3 许多区域具有亲水性, 他们在与抗体发生反应时发挥作用。Pitcovski 等分别在大肠杆菌和杆状病毒表达系统中表达了单独 VP3 蛋白并把其注射至 SPF 鸡中, 虽然能检测到高滴度的抗 IBDV 抗体但却不能有效保护 IBDV 的攻击 (Pitcovsk *et al.*, 1999)。事实证明即使 VP3 蛋白有正确的折叠及翻译后修饰 (用杆状病毒表达系统表达) 也对病毒的攻击无能为力 (Pitcovsk *et al.*, 1999)。VP3 在病毒组装中是必需的, 起脚手架蛋白的功能 (Luque *et al.*, 2007)。

(3) VP1 是具有 RNA 依赖 RNA 聚合酶活性 (RdRp) 的蛋白, 它与病毒 RNA 的复制有关, 并具有鸟苷酸转移酶和甲基转移酶的活性。VP1 以游离和与基因组结合两种形式存在 (Kibenge *et al.*, 1997), 与病毒基因组 dsRNA 末端通过共价键牢固结合的 VP1 称为 VPg, 经 Rnase 处理后可使其解离, 游离形式的 90KD 蛋白则称为 VP1, 参与双链 RNA 基因组的复制。

(4) VP4 在病毒蛋白成熟过程中起重要作用, 分子量为 24~29KD, 是一个具有酶活性的蛋白质, 被认为是一个蛋白水解酶。在它的作用下使多聚蛋白前体加工成 VP2a、VP3 和 VP4。

(5) VP5 蛋白在病毒的释放和组装中起到重要作用。Mundt 等 (1997) 利用定点突变令 D78 弱毒株 ORF<sub>2</sub> 的起始密码 ATG 换成 AGG (编码 Arg), 其 cDNA 转染鸡胚细胞 (CEC) 获得无 VP5 基因的突变株 IBDV/VP5<sup>-</sup>, 可正常感染 Vero 细胞, 提示 VP5 在体外 IBDV 复制中是非必需的。Yao 等用 VP5 缺陷的 D78 弱毒株 (rD78Δ) 及亲本病毒 rD78 分别感染了 3 周龄 SPF 鸡研究发现 IBDV/VP5<sup>-</sup> 这种突变株显示高度减毒表型, 在加大接种剂量后易感鸡不能引起法氏囊病变, 说明 VP5 在 IBDV 致病和传播方面有很重要的作用 (Yao *et al.*, 1998; 2001)。因此 VP5 作为一种

潜在的控制 IBDV 的发展策略引起极大的关注。

## 1.2 抗原表位的研究方法及IBDV抗原表位研究进展

### 1.2.1 抗原表位的研究方法

抗原表位 (epitope) 指在抗原分子表面具有特殊结构和免疫活性的化学基团, 是具有刺激机体产生抗体或致敏淋巴细胞并能够被其识别的部位, 又称抗原决定簇 (antigenic determinant)。抗原表位有两种分类方法: 一是根据细胞抗原受体不同, 分为B细胞抗原表位和T细胞抗原表位。二是按结构不同, 分为连续性抗原表位和不连续性抗原表位, 前者又称线性表位, 是由肽链上顺序连续的氨基酸组成; 后者又称构象表位, 是由那些一级结构上不连续的氨基酸残基, 经过肽链的折叠, 在空间聚集在一起而形成一定的空间结构 (沈倍奋, 2001)。据研究结果显示: 线性抗原表位一般主要由6-10个氨基酸组成 (Wang *et al.*, 2006; Zhou *et al.*, 2006; Binder *et al.*, 2007)。

对蛋白质抗原来说, 抗原分子的mobility、一级结构中形成loop和转角 (turn) 的部位 (proline 存在的部位) 以及蛋白分子的亲水性 (hydrophilicity) 是判定表位存在的几个重要条件。在蛋白质的高级结构中, 组成其一级结构的疏水性氨基酸残基一般存在于蛋白质分子的内部, 而亲水性残基主要存在于蛋白分子的表面, 在蛋白分子折叠过程中可能形成抗原表位。蛋白质的表面可及性 (surface probability) 指蛋白质抗原中氨基酸残基被溶剂分子接触的可能性, 它反映了蛋白质抗原内外层残基的分布情况。

常用的鉴别B细胞抗原表位的方法主要有: 化学“切割”法或酶解法、肽探针扫描技术 (Pepscan 技术)、噬菌体展示技术 (Phage Display Technology) 和X-衍射与核磁共振 (NMR) 分析。

(1) 化学“切割”法或酶解法: 将纯化的蛋白质多肽用某种化学试剂或蛋白酶切割成若干小片段, 经SDS-PAGE胶分离开来, 然后转印到NC膜上, 再用单克隆抗体或高免血清进行Western Blot, 检测小段多肽与抗体是否有反应, 有反应的多肽片段中就含有抗原表位。使用这种方法需要知道蛋白质的一级结构, 并且事先清楚切割片段的大小。在实际工作中可以将蛋白质序列输入Gene Runner, 利用工具栏中的“analysis”→“protein”可以列出几种试剂 (或酶) 的切割位点和切割片段的数量, 例如: CNBr可以从甲硫氨酸 (M) 处将多肽切割成若干小片段。此法比较经济, 但往往由于没有合适的酶切位点使得抗原表位定位不够精确。

(2) 肽探针扫描技术 (Pepscan技术): 是指合成连续的重叠的短肽, 与相应的抗体反应, 分析检测结果以确定阳性反应片段。这一技术要求有明确的抗原一级结构, 并且检测结果为线性抗原表位, 对构象型表位则无法获知。白雪帆等 (2000) 利用单抗对人工合成的15肽和8肽两个阵列进行了免疫学的检测, 从而确定了汉坦病毒的抗原表位。Hideo 等 (2000) 利用一系列交叉重叠的多肽鉴定了狂犬病毒N蛋白中一个位于358-367aa的抗原表位。

(3) 噬菌体展示技术 (Phage Display Technology): 是Smith于1985年开创的。其原理是将外源基因整合到噬菌体的基因组中, 外源蛋白与噬菌体衣壳蛋白融合表达, 并展示在噬菌体表面, 从而形成噬菌体展示肽库, 再利用生物分子间的亲和力 (如酶-底物、抗原-抗体、受体-配体) 进行筛选, 将感兴趣的蛋白质或多肽从肽库中挑选出来。噬菌体随机肽库是将人工合成的随机排列的寡核苷酸插入丝状噬菌体gIII或gVIII基因的信号肽和成熟蛋白编码区之间, 经转导后插入DNA 片段以融合蛋白形式表达并装配在噬菌体表面, 这些表达不同短肽 (代表不同序列) 的重组噬菌体

构成噬菌体随机展示肽库，它包括了该长度的短肽的各种可能的序列或其中的绝大部分（吴敬等，2000），是一种强有力的用于快速研究蛋白质—蛋白质之间相互作用的工具（Smothers *et al.*, 2002）。多个氨基酸能够形成一定的空间构象，因此能够筛出构象表位。目前已经构建成功的随机噬菌体肽库有6肽库、7肽库、12肽库和15肽库等，各肽库均可达到 $10^9$ 个随机克隆。可以覆盖7肽的随机概率（ $20^7=1.28 \times 10^9$ ），但只能覆盖部分12肽的组合概率（ $20^{12}=4.1 \times 10^{15}$ ）。

噬菌体展示随机肽库的筛选是一个亲和纯化的生物淘选的过程（见图1-3）。其具体过程是：先将噬菌体肽库与靶分子相互作用一段时间，洗涤除去非特异结合噬菌体，将特异性结合噬菌体洗脱下来扩增，然后再投入下一轮的淘选。继续重复淘选、洗脱、扩增，最终淘选出特异结合的重组噬菌体克隆。

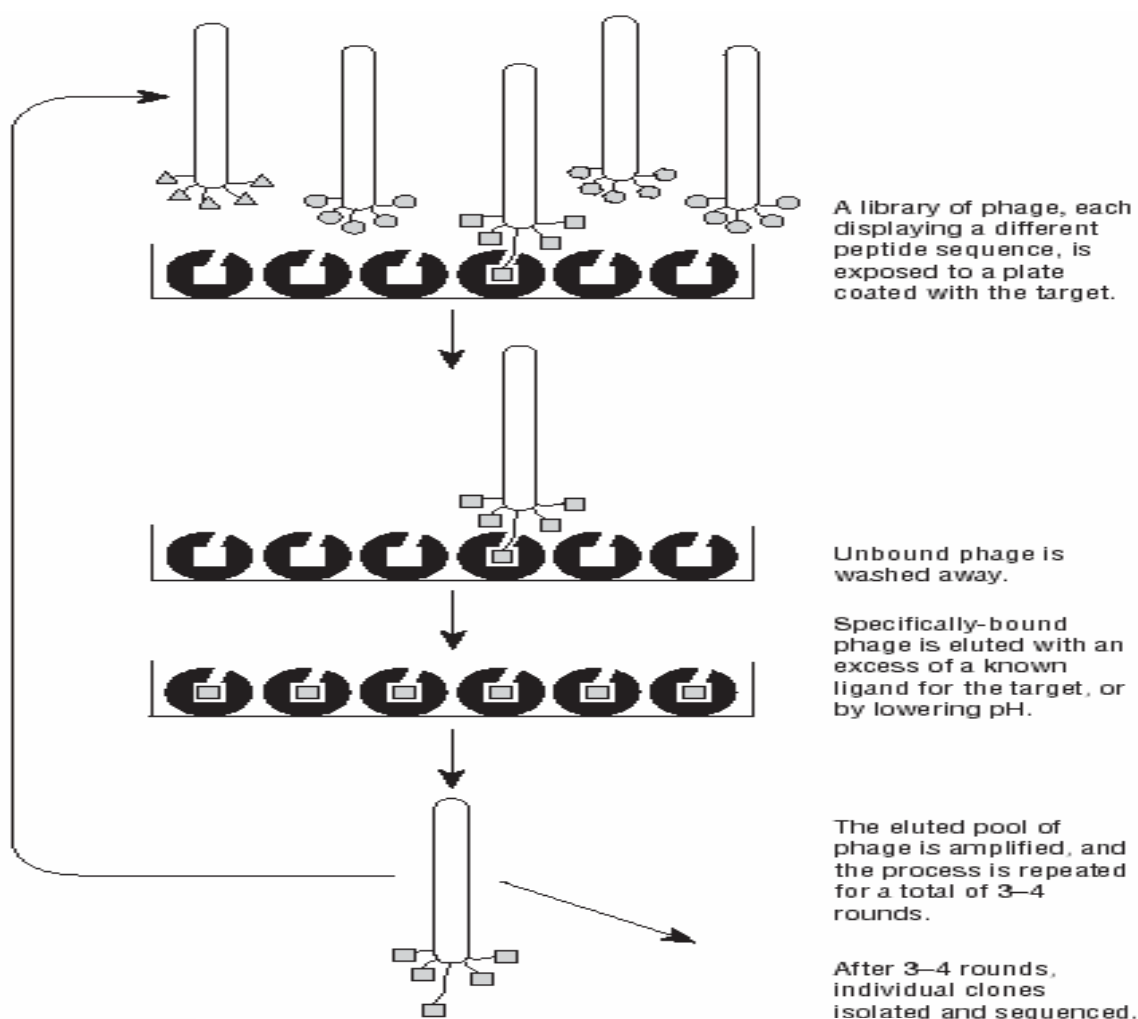


图 1-3 噬菌体肽库淘选流程

Fig.1-3 Biopanning with the Ph.D.peptide library

噬菌体展示技术作为一种新兴的研究方法和工具，在研究蛋白质结构上已被广泛应用。它有很多显著的优点，如：A. 高通量的淘选。B. 可用于模拟表位的筛选。C. 易于纯化。目前用于鉴定表位和受体所用的噬菌体载体为M13单链噬菌体。由于M13噬菌体是温和型噬菌体，不裂解宿主菌，成熟的噬菌体可分泌到培养基中，通过离心收集培养上清，再向其中加入沉淀剂即可将上清中大量噬菌体粒子沉淀下来，从而富集得到含外源基因产物的重组噬菌体。



尽管如此,在噬菌体展示技术中仍然存在一些不足。首先,目前所建的肽库容量有限,要想构建大片段的肽库很困难。其次,需要解决肽库的多样性问题。第三,少数多肽由于疏水性过强,或由于影响外膜蛋白的折叠而不能展示在噬菌体表面。作为一种新技术,类似的具体问题还很多。但这些暂时的缺点并不能掩盖其巨大应用潜力。

(4) X-衍射与核磁共振(NMR)分析:抗原-抗体复合物(Ag-Fab)的X射线衍射被认为是真正能够反映抗原、抗体相互识别的一种技术。该技术是研究抗原抗体相互作用时抗原中氨基酸的参与识别情况以及表位类型(线性或构象表位)。但该技术受获得抗原-抗体复合物的晶体限制。NMR方法可避免结晶,但其只能研究小分子的多肽抗原。由于对设备有特殊要求,所以该技术在一般实验室的应用受到限制。

在实际研究蛋白质B细胞抗原表位,应根据具体情况选择合适的方法,可以单独使用一种或几种方法结合起来使用。

### 1.2.2 抗原表位的研究意义

**有助于了解抗原结构:**免疫细胞通常难以借助其表面受体识别整个抗原分子,而仅识别抗原大分子上的一个特定部分,称为表位(epitope),又称抗原决定簇(antigenic determinant)。因而表位代表了抗原分子上的一个免疫活性区,负责与抗体分子或免疫细胞表面的抗原受体结合,抗体的特异性是针对表位而不是针对完整的抗原分子的。B细胞识别抗原时,其表面的B细胞抗原受体与抗原表位(抗原决定簇)结合,此过程与抗原-抗体的结合相同。能被特异性抗体结合的B细胞表位存在的必要条件是这些表位必须暴露于抗原分子的表面。动物病毒保护性抗原中具有中和作用的B细胞表位在刺激中和性抗体产生中起重要作用。保护性抗原与B淋巴细胞表面的抗原受体分子sIgM和IgD结合而导致B淋巴细胞活化和克隆化增殖,并产生针对特异性抗原的抗体,发挥免疫保护作用(Abbas *et al.*, 2000)。因此,B细胞抗原表位决定着机体产生抗体的特异性,是诱导体液免疫的基本单位。对特定病毒的蛋白质抗原来说,鉴定B细胞抗原表位便是揭示病毒体液免疫的本质,而抗原表位的研究将有助于了解病毒抗原刺激机体产生抗体并能与抗体相结合的区域,从而进一步了解抗原结构。

**基于表位的疫苗研究:**从一定意义上说,表位疫苗是缩微的亚单位疫苗。亚单位疫苗或多肽疫苗是利用体外表达的重组蛋白或多肽(或直接从病毒粒子中分离出保护性的病毒亚单位蛋白)制成,它们除含有抗原表位及其侧翼序列外,还有其它很多与抗原大分子免疫无关的序列。而表位疫苗利用定位精确、氨基酸序列较短的抗原表位,既能够有效地被免疫系统识别、递呈,又能诱发机体产生特异性体液和细胞免疫应答;同时较短的序列很容易合成,易于在载体中插入多个表位构建基因工程多表位疫苗;对于载体的选择来说,较小的外源表位基因片段对载体的克隆能力要求较低,易于进行分子操作。一般免疫系统识别、递呈抗原时仅需要十几个氨基酸,与抗体结合仅需要几个氨基酸(Balasuriya *et al.*, 1995; Boris *et al.*, 1997; Wu *et al.*, 2002)。对于具有高度变异性的病毒(如口蹄疫病毒、流感病毒等),应用的疫苗株可能因与当前的流行株不匹配而不能提供有效的免疫保护,然而基于多表位疫苗含有广谱的表位信息,可以避免因病毒变异而造成疫苗免疫失败(Rob *et al.*, 2001)。在各分离株中高度保守的表位序列(特别是中和表位),在疫苗的研制中具有重要的参考价值(Gomez *et al.*, 2002)。

除可诱导免疫保护外,表位疫苗还可以作为标记疫苗(Marker vaccine),与野毒相鉴别。Mebatsion等(2002)将鼠肝炎病毒S2糖蛋白的一个B细胞表位插入到鸡新城疫病毒(NDV)NP基因中(位于aa 447-455),用重组NDV免疫鸡后,可以检测到S2表位的表达。因此,可以作为标记疫苗来区分野毒株与疫苗株。

然而,利用表位多肽单独进行免疫,往往不能取得理想的效果。但可以通过将表位蛋白耦联到载体蛋白(如BSA或KLH)(Xiao *et al.*, 2001),或者将表位进行串联(一般重复2-4次),或多个中和表位串联再与载体蛋白耦联,另外也可以配合一些免疫佐剂使用,如铝胶佐剂或弗氏佐剂(Xiao *et al.*, 2001)。在DNA表位疫苗的设计中,为提高T细胞反应,还可以加入IL-2或IL-12等细胞因子。

表位疫苗,与弱毒疫苗和灭活疫苗相比,减少了疫苗中与免疫无关的成分,其免疫所产生的抗体针对靶病毒,特异性强,更加安全可靠,而且便于规模化生产。表位疫苗作为一种新型的基因工程疫苗,具有广阔的开发前景。在表位疫苗的构建过程中,可以插入病原微生物的若干B细胞表位、T细胞表位和免疫刺激序列(如IL2、IL12、IFN-gamma等),构成“全悉多表位基因工程疫苗”。因而正确而详细地绘制抗原表位图谱对疾病的诊断、定点改造蛋白质分子以降低蛋白质药物的免疫原性,设计无毒副作用的人工疫苗以及免疫干预治疗等有积极的意义。

**基于表位的诊断研究:**将表位用于诊断目的,一般采取两种策略,一是使用高度保守的优势表位,二是将多个表位联合使用。但目前使用表位作为诊断试剂的报道还很少。Seshi 等(2002)利用噬菌体展示技术鉴定出雌激素受体的模拟抗原表位,合成的模拟表位多肽可以代替天然蛋白进行定量免疫组化试验。余传信等(2003)也利用噬菌体展示技术鉴定出血吸虫模拟抗原表位,建立了以噬菌体模拟抗原表位为抗原检测血吸虫病人血清抗体的酶联免疫诊断方法,该方法有一定的血吸虫病疗效考核价值,该结果也证实噬菌体展示模拟表位可以作为血吸虫病的诊断抗原。另外,人们根据HCV的各个表位的特点建立了更为准确的HCV血清学检测方法,虽然检测的效率较低,但由于其简便、快速、易操作等特点仍是目前主要的HCV检测工具,在低危险人群如健康供血者的常规筛检中发挥了重要的作用(Kao *et al.*, 1996; Kleinman *et al.*, 1992; Kuo *et al.*, 1989)。近年来多表位融合及抗原/抗体同时检测方法的建立进一步提高了血清学检测的特异性和灵敏度。但是由于这些方法还未正式使用,对抗原表位和抗体的选取及包被方法的研究鉴定将是进一步血清学检测研究的主要方向(魏葆等, 2006)。

常用的亚单位(多肽)诊断试剂主要是先用计算机软件分析各毒株中主要结构蛋白中比较保守的优势抗原区,进行克隆与表达,然后利用表达的蛋白作为ELISA或AGIP等的诊断抗原。沈南等(2000)曾利用原核表达的蛋白抗原用于风湿性疾病的ELISA和免疫印迹诊断。

### 1.2.3 IBDV抗原表位研究进展

迄今,IBDV VP2的抗原表位的研究已有一定进展:Azad等通过敲除作图和选择IBDV逃逸突变株,运用VP2的单抗证明VP2两个亲水区:212-224aa 和314-324aa存在构象表位(Azad *et al.*, 1987); Yamaguchi等证实VP2构象中和表位位于VP2的204-359aa(Yamaguchi *et al.*, 1996); Cui等利用噬菌体展示肽库(基因特异性肽库)得出VP2高变区206-350aa区域包含2个构象依赖性中和表位,在VP2的C末端含有一个线性非中和性表位(Cui *et al.*, 2003a, 2003b); Saravanan等(2004a)

报道了2个VP2抗原表位：2-12aa和321-333aa；Wang等通过噬菌体展示肽库（随机肽库）和肽扫描法筛出VP2两个线性中和表位：197-209aa和329-337aa (Wang *et al.*, 2006)。IBDV vp3基因相对保守，具有线性表位，其抗原表位的研究报道主要有：Yamaguchi 等发现位于C末端的105个氨基酸是VP3线性表位 (Yamaguchi *et al.*, 1996)；Mahardika等证实890-910位氨基酸和944位氨基酸至C末端含有型特异性表位，764-885位氨基酸含有群特异性抗原表位 (Mahardika and Becht, 1995)；Jagadish等通过敲除作图发现在IBDV VP3的第三个NcoI 和唯一的BsmI酶切位点间的58个氨基酸存在一个表位 (Jagadish and Azad, 1991)；Saravanan等 (2004b) 报道2个VP3抗原表位，分别是841-849aa和974-995aa；王选年 (2005) 鉴定1个VP3线性表位：982-993aa。一般免疫系统识别、递呈抗原时仅需要十几个氨基酸 (Balasuriya *et al.*, 1995; Boris *et al.*, 1997; Wu *et al.*, 2002)，但是VP3抗原表位的研究还不是很精确。因此为了进一步阐明IBDV的发病机理，将VP3的抗原表位精确定位到更短的范围内很有必要。

### 1.3 IBD诊断方法的研究进展

国际动物卫生组织推荐的检测手段主要包括：病毒中和试验 (VN)、免疫琼扩试验 (AGIDT)、免疫荧光试验 (IFA)、抗原捕获ELISA、RT-PCR技术，并提供了详细的试验程序。近年来，随着分子生物学技术的发展，为新诊断方法的建立提供了基础，抗原表位的研究为建立一种简便、快速、易操作的诊断方法提供了依据。

#### 1.3.1 IBD诊断方法的研究

(1) 传统的IBDV分离方法比较繁琐、费时，因为来自病料的原始病毒不能直接适应于细胞生长，而必须先经鸡胚连续传代若干次后，对鸡胚表现出规律性的致病作用，然后适应于细胞培养。

(2) 电镜检查 and 病毒中和试验，用来作病毒形态结构的观察和病毒定性及研究IBDV相互关系，也比较烦琐。

(3) ELISA试验，具有能检测大批样品，操作规程化，设备简单、易操作，还具有特异性强，敏感度高，重复性好等优点，广泛地应用于生命科学研究的各个领域。此方法虽需一定的仪器，但试验所需时间短，2~4小时完成。杆状病毒表达IBDV VP2、VPX和VP3蛋白，作为诊断抗原，建立间接ELISA方法进行鉴别诊断。

#### 1.3.2 基于表位的诊断方法研究

基于表位的诊断方法的建立，使用高度保守的优势表位或多个表位联合使用，作为诊断抗原，可以减小假阳性，能够同时检测到针对不同表位的特异性抗体。进一步提高了血清学检测的特异性和灵敏度。另一方面，通过制备抗表位血清作为诊断抗体来检测抗原。Saravanan等 (2004b) 合成了17段VP3多抗原肽，其中MAP3（氨基酸 C—末端974-995位）免疫兔子，获得了抗多肽的抗体。使用抗多肽血清检测IBDV抗原，获得了较好的效果，在ELISA试验中滴度达到了1:2048，试验说明这是一种安全特异的检测IBD的方法。Saravanan等 (2004a) 同时使用两段合成的IBDV VP2多抗原肽 (MAPs)，分别作为诊断的抗原，进行ELISA试验检测IBDV抗体，两段多抗原肽

的特异性和敏感性均好于全病毒。

## 1.4 IBD疫苗的研究进展

由于IBD在外界环境中较为稳定，至今仍无有效的治疗方法，免疫接种一直是防治IBD的最佳选择，目前已开发出多种IBD疫苗。

### 1.4.1 IBD疫苗的研究

目前使用的IBD传统疫苗主要有灭活疫苗和减毒活疫苗，他们的特点是：(1)弱毒活疫苗免疫原性好，但存在免疫不全、疫苗外源性或垂直传播性病原污染以及疫苗接种动物后毒力返强的危险，常导致变异株的不断出现，造成恶性循环；弱毒苗常引起免疫抑制，减毒不充分时会导致临床感染，毒力反强；过分减毒又造成疫苗效价降低。(2)灭活疫苗运输方便但接种较麻烦，需注射，免疫后产生的抗体持续时间短且引起局部疼痛和其它不适等，对鸡造成一定的损害。因此研究安全、廉价、广谱的基因工程疫苗一直是各国研究的热点。基因工程疫苗是现代生物技术的热点之一，其发展的重点对象是难（或不能）培养、有潜在危险、常规免疫效果差的病原体。尽管迄今为止获准生产的基因工程疫苗仅有少数几种，但它解决的是多年来常规疫苗不能解决的难题，而且在简化免疫程序的多价疫苗制作方面具有显著优势。

**基因工程亚单位疫苗**是用DNA重组技术，将编码病原微生物保护性抗原的基因导入受体菌或细胞，使其在受体细胞高效表达，分泌保护性抗原肽链。迄今为止，IBDV VP2或VP2/VP4/VP3已分别在E.coli (Azad *et al.*, 1985, 1991)、重组杆状病毒 (Vakharia *et al.*, 1993; Pitcovski *et al.*, 1996; Dybing *et al.*, 1998)、酵母 (Fahey *et al.*, 1991; 王笑梅等, 2003)等系统中进行了表达。大肠杆菌表达的VP2蛋白不能诱导产生中和抗体，杆状病毒表达的VP2或VP2/VP4/VP3蛋白仅能保护IBDV攻击不导致死亡，并不能阻止临床发病和法氏囊的损伤 (Vakharia *et al.*, 1993; Pitcovski *et al.*, 1996)。Vakharia等 (1994) 证明杆状病毒表达的VP2/VP4/VP3免疫SPF鸡后，其子代可获得母源抗体，并能保护法氏囊免受IBDV的攻击但其生产成本低，缺乏市场竞争力，难以商品化。而酵母表达的VP2蛋白能诱导产生中和抗体，其子代获得的母源抗体能保护IBDV的攻击 (Fahey *et al.*, 1991)。王笑梅等 (2003) 用酵母表达的IBDV VP2免疫SPF鸡后，能够产生特异性抗体，并在一定程度上抵抗超强毒的致死性攻击，其效果与传统疫苗一样。但比起用SPF鸡法氏囊和细胞培养物制备的传统IBD疫苗，酵母菌培养简单、方便，所需培养基价格也较低，有利于大规模的生产，表达产物经过粗提即可应用。这为IBDV亚单位疫苗的商品化生产提供了有利的条件。因此，用酵母表达生产的IBD亚单位疫苗将有很好的前景。

**基因工程重组活载体疫苗**是用基因工程技术将保护性抗原基因（目的基因）转移到载体中使之表达的活疫苗。目前有很多理想的病毒载体，如国内外学者用禽痘病毒 (FPV)、火鸡疱疹病毒 (HVT) (Darteil *et al.*, 1995)、禽腺病毒 (ALV) (Sheppard *et al.*, 1998)、马立克氏病毒 (MDV) 等载体，构建表达VP<sub>2</sub>或VP<sub>2</sub>/VP<sub>4</sub>/VP<sub>3</sub>的重组病毒，并将重组病毒制成疫苗，免疫雏鸡后，可使雏鸡获得不同程度的保护。Tsukamoto等 (2002) 构建了表达VP<sub>2</sub>的重组马立克氏活病毒，且构建的是二联苗，对同种vvMDV和vvIBDV攻击的SPF鸡的保护率分别为100%和55%。Tsukamoto等 (2000) 以重组鸡马立克氏病毒和重组鸡痘病毒作为双载体系统制得重组活载体疫苗对鸡群有双

重保护。

**核酸疫苗** (nucleic acid vaccine, NAV) 是近20年来发展起来的一种新型疫苗, 呈现出良好的发展势头和应用前景。核酸疫苗又称基因疫苗或DNA疫苗, 是将核酸目的基因, 往往是编码免疫原蛋白或与免疫原相关的蛋白的基因, 导入宿主动物细胞内, 在真核表达系统的调控下进行表达, 其产物可诱导机体产生相应的免疫应答, 从而达到防病治病的目的。DNA疫苗能诱导强烈的体液和细胞免疫反应, 能提供长期存活的与记忆细胞协同抵抗细菌、病毒、寄生虫的免疫反应。DNA疫苗已经成功的抵抗许多不同的病原的保护免疫 (Kodihalli *et al.*, 1997; Fan *et al.*, 2002; Serezani *et al.*, 2002)。核酸疫苗与其它疫苗相比具有许多优点, 比如具备诱生强细胞免疫应答 (CMI)、易于设计、成本低、稳定性好、耐高温、易于保存、可以诱导机体更为广泛的免疫应答、具有持久免疫性和单一免疫性等。

目前国内已有IBDV DNA疫苗的报道。姜平等 (1998) 构建的2种以VP<sub>2</sub>、VP<sub>3</sub>为目的基因的DNA疫苗对鸡产生的保护率为90%和10%; 刘毅等 (1999) 构建的以VP<sub>2</sub>和VP<sub>2</sub>/VP<sub>4</sub>/VP<sub>3</sub>为目的基因的DNA疫苗保护率低于常规的中强毒二价活苗, 且被免疫鸡的法氏囊组织仍存在IBDV。试验表明DNA疫苗对于鸡是安全的无产生病理学变异的风险, 但是他们有低的疫苗效果 (Chang *et al.*, 2001; Fodor *et al.*, 1999)。因此用NAV防治IBD仍处于起步阶段。进一步研究可能需要通过改变例如剂量和给药途径, 抗原的选择, 载体的设计和使用佐剂的各种参数的改变来提高DNA疫苗的效果 (Oshop *et al.*, 2002)。

### 1.4.2 表位疫苗的研究

蛋白质分子上的抗原表位 (亦称抗原决定簇) 是蛋白质抗原性的物质基础, 具有刺激机体产生抗体或致敏淋巴细胞并能够与抗体或致敏淋巴细胞识别的部位。正确而详细地绘制抗原表位图谱对疾病的诊断, 定点改造蛋白质分子以降低蛋白质药物的免疫原性, 设计无毒副作用的人工疫苗以及免疫治疗剂等有重要的意义。表位疫苗利用定位准确、氨基酸序列较短的抗原表位, 既能够有效的被免疫系统识别、递呈, 又能诱发机体产生特异性体液和细胞免疫应答; 同时较短的序列很容易合成, 易于在载体中插入多个表位构建基因工程多表位疫苗; 对于载体的选择来说, 较小的外源表位基因片段对载体的克隆能力要求较低, 易于进行分子操作。一般免疫系统识别、递呈抗原时仅需要十几个氨基酸, 与抗原结合仅需要几个氨基酸。对于具有高度变异性的病毒 (如口蹄疫病毒、流感病毒等), 多表位疫苗含有广谱的表位信息, 可以避免由于病毒的变异而造成的免疫失败, 又很容易与野毒株区别开来, 为疾病的净化提供条件。随着对病毒抗原表位研究的进展, 已经发现在一些分子量较大的病毒保护性免疫原中除与免疫保护有关的中和表位外, 还有非中和表位、抑制性表位甚或是毒性表位, 这些表位会影响疫苗的免疫效果。已有试验显示, 单一中和表位的免疫原性较弱且保护活性不完全, 串联的抗原表位可以增强抗原的免疫原性, 因此发展多表位疫苗有利于提供更完全和更有针对性的免疫保护。但并不是拷贝数越多越好, 只有串联适量的拷贝数, 才能够刺激机体产生最大量的中和抗体。此外, 抗原表位、连接方法以及表达系统等都会影响到多表位疫苗的免疫效力, 表位的加工效率也是影响多表位疫苗免疫原性的重要变量。待这些问题解决后, 该技术将成为研制基因工程疫苗的新方法 (安同庆, 2004)。

## 1.5 本研究目的与意义

传染性法氏囊病的超强毒株对鸡的致死率高达70%以上，并且引起免疫抑制，导致鸡群对其他疫病的易感性增强，常常继发细菌或病毒感染，造成巨大的经济损失。近年来，IBDV分子生物学研究虽然已取得了较大进展，但在分子水平对鸡传染性法氏囊病病毒的致病机制，病毒分子结构与功能方面仍然有许多问题有待于进一步深入研究，而鉴定IBDV抗原表位有助于揭示病毒与机体相互作用的本质，从而了解IBDV的致病机制和免疫机理。

VP3 和 VP2 是 IBDV 重要的结构蛋白，其抗原表位的研究仍不是很精确，抗原表位作图还没有完成。本研究采用肽扫描结合噬菌体展示技术鉴定 VP3 蛋白和 VP2 蛋白的抗原表位，并检测其作为诊断试剂和疫苗的可能性。

本该研究意义在于：1、进一步研究IBDV VP3和VP2的抗原表位，揭示VP3和VP2蛋白的抗原结构，充实IBDV表位作图。以鉴定的IBDV抗原表位为切入点，探讨其表位生物学功能，初步揭示病毒与机体的相互作用，推测病毒的致病机制和免疫机理，为进一步研究病原结构与功能提供信息。2、为科学、有效地设计相应的诊断试剂和多表位疫苗提供科学依据。高度保守的优势表位或多个表位串联，可用于研制诊断试剂或多表位疫苗。表位诊断试剂能够提高诊断的特异性；。表位疫苗不仅有利于鉴别诊断，而且无毒副作用，对疫病的控制和净化很有意义。

## 第二章 利用噬菌体展示随机15肽库鉴定IBDV VP3抗原表位

**摘要:** 为了研究传染性法氏囊病病毒的抗原结构, 本试验利用噬菌体展示技术筛选IBDV VP3抗原表位。以四株IBDV VP3单克隆抗体VP3-3F、VP3-7B、VP3-7C和VP3-10E作为筛选分子, 对噬菌体随机15肽库进行3轮“吸附-洗脱-扩增”淘洗, 从每株单克隆抗体筛选到的噬菌斑中随机挑取20个单克隆噬菌斑, 通过间接ELISA和竞争抑制ELISA检测, 选取13个噬菌体制备成双链DNA模板, 测定噬菌体gIII部分基因的核苷酸序列, 确定了8个15肽为IBDV抗原表位。这8个15肽在一级结构上没有3个以上连续氨基酸与IBDV Gx株VP3的氨基酸序列相同, 但二级结构上均以 $\beta$ -折叠为主, 并且与单抗的结合可被VP3有效的抑制, 因此是VP3的模拟表位。

**关键词:** 传染性法氏囊病病毒; VP3; 噬菌体随机15肽库; 抗原表位

VP3是传染性法氏囊病病毒 (IBDV) 的主要结构蛋白之一, 在不同毒株和血清型间相对保守, 含有群特异性抗原 (Cosgrove, 1962; Azad *et al.*, 1987; Tippling *et al.*, 1991)。研究发现, 感染或免疫了IBDV后, 在鸡的血清里最先检测到抗VP3的抗体, 这说明VP3是IBDV的主要免疫原之一 (Fahey *et al.*, 1985)。抗原表位 (epitope) 指在抗原分子表面能够刺激机体产生抗体或致敏淋巴细胞的化学基团。所以, 了解VP3的抗原表位分布, 对于IBDV的早期诊断意义重大。

噬菌体随机肽库是将人工合成的随机排列的寡核苷酸插入丝状噬菌体gIII或gVIII基因的信号肽和成熟蛋白编码区之间, 经转导后插入DNA片段以融合蛋白形式表达并装配在噬菌体表面, 这些表达不同短肽 (代表不同序列) 的重组噬菌体构成噬菌体随机展示肽库, 它包括了该长度的短肽的各种可能的序列或其中的绝大部分序列 (吴敬等, 2000; Smothers *et al.*, 2002)。病毒单克隆抗体可利用抗原抗体作用将对应的抗原表位短肽从肽库中筛选出来。该方法经济、简单、易操作, 不仅是一种强有力的快速研究抗原抗体相互作用的工具, 而且是一种体外高通量筛选抗原表位的技术。

本研究以4株IBDV VP3单克隆抗体VP3-3F、VP3-7B、VP3-7C和VP3-10E作为筛选分子, 对噬菌体随机15肽库进行淘洗, 得到了IBDV VP3的8个模拟表位, 并且这些表位与单抗的结合可被VP3蛋白有效抑制。

### 2.1 材料与方法

#### 2.1.1 材料

VP3原核表达蛋白由哈尔滨兽医研究所免疫抑制病课题组制备 (彭志伟等, 2006); HRP-羊抗鼠M13二抗为Amersham Pharmacia Biotech公司产品; 96孔聚乙烯板购于Costar公司。

#### 2.1.2 单抗与随机肽库

IBDV VP3单克隆抗体VP3-3F、VP3-7B、VP3-7C和VP3-10E由哈尔滨兽医研究所免疫抑制病课题组制备 (程宇等, 2006); 噬菌体随机15肽库、受体菌K91BluKan均为美国密苏里大学生物

科学分校Dr.George Smith惠赠，原随机肽库噬菌体效价 $1.1 \times 10^9$  PFU/ ml（使用前扩增至 $2 \times 10^{12}$  PFU/ ml）；测序引物：5'-CCCTCATAGTTAGCGTAACG- 3'由上海生工公司合成。

### 2.1.3 肽库的生物淘洗

分别用纯化的单克隆抗体VP3-3F、VP3-7B、VP3-7C和VP3-10E包被96孔板，浓度 $100\mu\text{g}/\text{ml}$ ， $150\mu\text{l}/\text{孔}$ ， $4^\circ\text{C}$ 过夜，用1 %牛血清白蛋白（BSA） $37^\circ\text{C}$ 封闭2h，PBST（含0.1%Tween-20）洗涤6遍，加入含 $2 \times 10^{11}$  PFU噬菌体，室温作用1h；PBST洗涤10遍；用 $100\mu\text{l}$  0.2mol/L Gly-HCl（pH2.2）洗脱8min；加入 $15\mu\text{l}$  1mol/L Tris-HCl（pH9.1）中和洗脱液；滴定洗脱液中的噬菌体，计算噬菌体的产出率：产出率=洗脱噬菌体数（Output）/淘洗用噬菌体数（Input）。继续将单克隆抗体的包被浓度降低至30和 $10\mu\text{g}/\text{ml}$ ，洗涤用的PBST中Tween20的浓度提高到0.3 %和0.5 %，分别再淘洗2次。经过3次淘洗后，从每株单克隆抗体筛出的噬菌斑中随机挑取单克隆噬菌斑20个，合计80个进行扩增。所用溶液无菌处理，并在空气净化条件下进行。

### 2.1.4 噬菌体效价测定

饥饿细胞制备：挑取单个K91BluKan菌落接种到含4 % Kan（终浓度为 $100\mu\text{g}/\text{ml}$ ）的LB培养液中，过夜培养。（1）可贮存的饥饿细胞制备：按1 %接种量将前夜摇好的K91BluKan接种到20ml含4 % Kan（终浓度为 $100\mu\text{g}/\text{ml}$ ）的LB培养液中， $37^\circ\text{C}$ 剧烈振荡至 $\text{OD}_{600}$ 为0.45，140rpm摇5min； $4^\circ\text{C}$ 离心，弃上清，用20 ml 80mM NaCl轻悬； $37^\circ\text{C}$  140rpm摇45min；收菌， $4^\circ\text{C}$ 离心，弃上清，用1ml冷NAP（饱和苯加入1/10的1M pH8.0 Tris-Cl）悬起，在冰箱中备用。（2）立即使用的饥饿细胞制备：按1 %接种量将前夜摇好的K91BluKan接种到10ml含4 % Kan（终浓度为 $100\mu\text{g}/\text{ml}$ ）的LB培养液中， $37^\circ\text{C}$ 剧烈振荡至1/10  $\text{OD}_{600}$ 为0.1-0.2，140rpm摇5min，必须在1h内使用。

效价测定：取10倍比稀释的噬菌体 $10\mu\text{l}$ 加入到 $10\mu\text{l}$ 饥饿细胞中，混匀， $37^\circ\text{C}$ 放置10min；加入1 ml LB培养液（TC浓度为 $0.22\mu\text{g}/\text{ml}$ ）， $37^\circ\text{C}$ 、140rpm摇30min；吸取 $100\mu\text{l}$ 涂布在LB-TC固体培养基（TC浓度为 $20\mu\text{g}/\text{ml}$ ）上， $37^\circ\text{C}$ 温箱过夜；查菌落数，按下面公式计算效价：噬菌体效价（PFU/ml）=菌落数 $\times$ 稀释倍数 $\times 10^3/10$ 。

### 2.1.5 噬菌体扩增

将洗脱的噬菌体加入到1ml饥饿细胞中， $37^\circ\text{C}$ 、140rpm摇15min；倒入预热的20 ml LB培养液（TC浓度为 $20\mu\text{g}/\text{ml}$ ）， $37^\circ\text{C}$ 剧烈振荡过夜培养。

### 2.1.6 噬菌体的制备

将 $37^\circ\text{C}$ 剧烈振荡过夜培养的噬菌体收集， $4^\circ\text{C}$ 、10000r/min离心10min，收集上清液，加入1/6体积的PEG/NaCl溶液（含20 % PEG8000和2.5mol/L NaCl）， $4^\circ\text{C}$ 过夜，然后 $4^\circ\text{C}$ 、10000r/min离心15 min，用1ml TBS重悬沉淀，按照上述方法用PEG/ NaCl再次沉淀，最终用 $100\mu\text{l}$  TBS重悬沉淀，一部分用于测序，一部分滴定后置 $4^\circ\text{C}$ 用于检测。



2.1.7 噬菌体短肽的间接ELISA检测

分别以四株单克隆抗体VP3-3F、VP3-7B、VP3-7C和VP3-10E包被ELISA板，包被浓度5μg/ ml，1 %BSA封闭，加入对应单克隆抗体筛出的单克隆噬菌体扩增培养物，室温作用1h，洗涤，加入HRP-羊抗鼠M13抗体，进行间接ELISA。

2.1.8 竞争抑制ELISA检测

在已用单抗包被、封闭的微孔中同时加入 50μl 噬菌体和 50μl 经梯度稀释的原核表达的 VP3（1:500，1： 800，1： 1000，1： 1500 倍稀释）混合液。同时设立 2 个不含 VP3 蛋白的对照：50μl 噬菌体+50μl TBS、100μl TBS。室温作用 2h 后洗涤，加入酶标二抗，显色。以 TBS 孔做为调零孔，检测 490nm 吸光值并计算竞争抑制率。抑制率计算公式为：抑制率=（未抑制吸光值-抑制后吸光值）/未抑制吸光值×100%。

2.1.9 噬菌体短肽测序分析

根据间接ELISA和竞争抑制ELISA试验结果，将阳性噬菌体制备成双链DNA模板，进行测序分析。测序由上海英俊公司完成。然后将其与GenBank中的IBDV Gx株VP3 (序列号:AY444873) 编码的氨基酸序列进行比较。

2.2 结果

2.2.1 肽库的生物淘洗的产率

以四种 IBDV VP3 单克隆抗体包板，投入基本相同的噬菌体，每轮筛选后，降低包板单抗的浓度并提高洗涤强度，以获得高亲和力的噬菌体克隆。经过 3 轮筛选，噬菌体的投入产出比逐轮上升，说明筛选过程中，所获得的特异性噬菌体克隆有较高程度的富集，第 3 轮筛选噬菌体的投入产出比第 1 轮几乎高 100 倍。四株单抗在肽库的生物淘洗过程中没有明显的差异，且每轮淘洗后扩增的噬菌体效价均在 10<sup>10</sup>PFU/ ml 以上（见表 2-1）。产率（Yield）= 产出量（Output）/投入量（Input）×100%

表 2-1 生物淘洗过程与噬菌体效价

Table 2-1 Biopanning of phage display 15 peptide library and the phage titer

噬菌体 株	不同淘洗过程的噬菌体效价和产出率 Output and phagetiter at different panning process								
	第一轮 1st			第二轮 2nd			第三轮 3rd		
Strains of phage	淘洗前 Before panning	洗脱后 After elution	产出率 Output rate	淘洗前 Before panning	洗脱后 After elution	产出率 Output rate	淘洗前 Before panning	洗脱后 After elution	产出率 Output rate
VP3-3E	2× 10 <sup>11</sup>	4× 10 <sup>6</sup>	2× 10 <sup>-5</sup>	2× 10 <sup>11</sup>	6× 10 <sup>6</sup>	3× 10 <sup>-5</sup>	1.8× 10 <sup>10</sup>	2.1× 10 <sup>7</sup>	1.2× 10 <sup>-3</sup>
VP3-7B	1.2× 10 <sup>11</sup>	1× 10 <sup>6</sup>	0.8× 10 <sup>-5</sup>	1.2× 10 <sup>11</sup>	4.7× 10 <sup>6</sup>	3.8× 10 <sup>-5</sup>	3.9× 10 <sup>10</sup>	3.0× 10 <sup>7</sup>	0.8× 10 <sup>-3</sup>
VP3-7C	1.3× 10 <sup>11</sup>	1× 10 <sup>6</sup>	0.7× 10 <sup>-5</sup>	1.3× 10 <sup>11</sup>	2.3× 10 <sup>6</sup>	1.7× 10 <sup>-5</sup>	3.4× 10 <sup>10</sup>	1.6× 10 <sup>7</sup>	0.5× 10 <sup>-3</sup>
VP3-10E	1.5× 10 <sup>11</sup>	2.3× 10 <sup>6</sup>	1.5× 10 <sup>-5</sup>	1.5× 10 <sup>11</sup>	7× 10 <sup>6</sup>	4.7× 10 <sup>-5</sup>	7.5× 10 <sup>10</sup>	8.3× 10 <sup>7</sup>	1.1× 10 <sup>-3</sup>

### 2.2.2 噬菌体短肽的ELISA检测

用四株单克隆抗体作为筛选分子，分别从第3轮淘洗得到的噬菌斑中随机挑取20个扩增（合计80个单克隆噬菌斑），用间接ELISA检测，挑取OD<sub>490</sub>大于0.4的噬菌体（共计13个，见图2-1）继续检测。

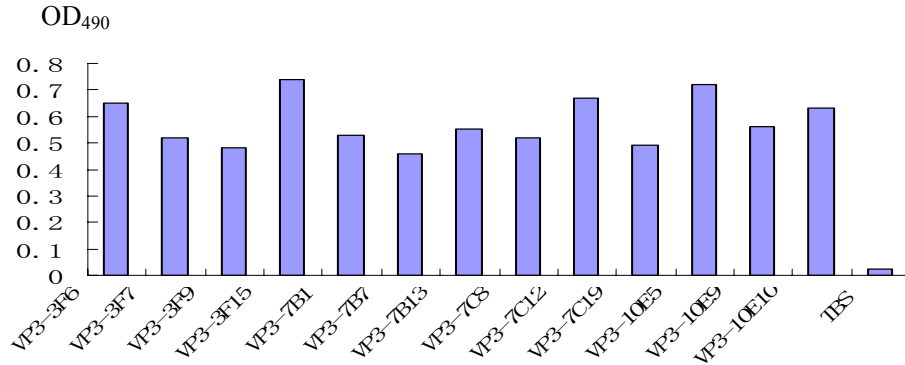


图 2-1 噬菌体的 ELISA 检测

Fig.2-1 Detection the phage by ELISA

### 2.2.3 竞争抑制ELISA检测

在竞争抑制试验中，随着VP3浓度的逐渐增加，噬菌体的OD<sub>490</sub>值越来越小，这表明噬菌体与单抗的结合可被VP3有效的抑制，而且抑制的强度随着VP3浓度的增加而增强。当达到VP3包板浓度为1: 500时，四株单克隆抗体的抑制率均可达到40%（见图2-2），将这13个噬菌体制备成双链DNA模板测序。抑制率=（未抑制吸光值-抑制后吸光值）/未抑制吸光值×100%。

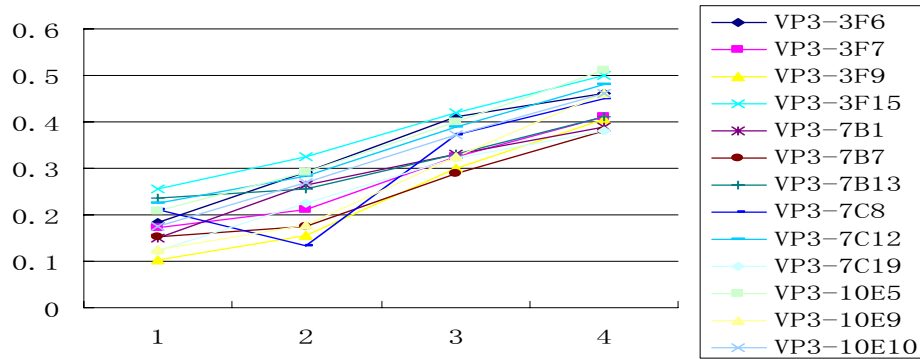


图 2-2 VP3 对模拟表位的竞争抑制率

Fig. 2-2 The ratio of inhibition of VP3 to the mimotopes

1: Phage+VP3 (1:1500); 2: Phage+VP3 (1:1000); 3: Phage+VP3 (1:800); 4: Phage+VP3 (1:500)

### 2.2.4 噬菌体短肽测序

将测定的13个单克隆噬菌体gIII基因部分核苷酸序列用生物信息学软件DNASTAR分析并进一步推导15肽的氨基酸序列，其中有5个短肽提前终止，其它8个短肽测序结果见表2-2。

表 2-2 VP3 模拟表位测序结果

Table.2-2 Sequences of mimotopes for VP3 of IBDV

单抗	噬菌体	VP3 模拟表位测序结果
McAb	Phage	Sequences of mimotopes for VP3
VP3-3F	VP3-3F7	IVCLFVLVLMVLILL
	VP3-3F15	IVCLFVLVLMVLILL
	VP3-3F9	RRVVFILLCRLLLLR
VP3-7B	VP3-7B1	CWLGLLVLFCLRVLR
	VP3-7B13	LWLLVILCFLLMVLML
VP3-7C	VP3-7C12	RGGLFIFRVLILLRR
VP3-10E	VP3-10E5	IVCLFVLVLMVLILL
	VP3-10E9	LLCLILIGFLIILCL

### 2.2.5 表位序列分析

将上述 8 个短肽氨基酸序列与 GenBank 中 IBDV Gx VP3 进行比较, 结果显示在一级结构上均与 IBDV VP3 没有相同的连续氨基酸, 但在二级结构上均以  $\beta$  折叠为主, 故这 8 个短肽是 VP3 模拟表位。

## 2.3 讨论

抗原表位, 又称抗原决定簇, 是呈现于抗原表面的短肽, 具有刺激机体产生抗体或致敏淋巴细胞的功能, 并能够与相应抗体或致敏淋巴细胞相结合。正确而详细地绘制抗原表位图谱对疾病的诊断、设计无毒副作用的多表位疫苗以及免疫治疗试剂等具有积极的意义。

噬菌体展示技术作为近年来新兴起的研究蛋白质抗原表位的有利工具, 已经成功地用于多种病原微生物抗原表位的鉴定。本研究利用噬菌体展示随机 15 肽库淘洗获得了 8 个 VP3 模拟表位。间接 ELISA 结果显示, 分别带有这 8 个 15 肽的噬菌体均与相应的单克隆抗体发生特异性反应, 而且这种反应可以被原核表达的 VP3 蛋白特异性阻断。筛选到的 8 个模拟表位虽然在一级结构上没有三个以上的连续氨基酸与 IBDV VP3 相同, 且同一株单抗筛选到的短肽序列也并不都完全一致, 但在二级结构上均以  $\beta$ -折叠为主。一般认为,  $\beta$  折叠结构多出现在蛋白质抗原的表面, 较可能形成抗原表位, 而  $\alpha$  螺旋、 $\beta$  拐角结构规则, 较难嵌合抗体, 一般不大可能形成抗原表位 (吴敬等, 2000), 说明了筛选到的 8 个短肽是 IBDV VP3 的模拟表位。

利用噬菌体展示技术得到模拟表位的报道较多。模拟表位指能够模拟天然抗原形成的构象而序列与天然抗原表位不一致的短肽。模拟表位可以与天然表位中的关键氨基酸相同或性质相同。筛选到模拟表位的原因有: 噬菌体随机肽库的随机性不够, 理想的文库中任何一个多肽在文库中所占的比例都是一样的; 少数多肽由于疏水性过强, 或由于影响外膜蛋白的折叠而不能充分展示在噬菌体表面; 由于对蛋白质和蛋白质之间的相互作用缺乏清晰的认识, 导致亲和力高、结合很紧密的噬菌体不能从抗体上洗脱下来, 从而不能被滴定和进入下一轮淘选。

本研究所利用的噬菌体展示随机15肽库,可能由于肽段过长,原肽库的库容量不足( $1.1 \times 10^9$  PFU/ml),在肽库生物淘洗前的原库扩增过程中,原库中含量较少的肽段可能丢失,因此最终得到的模拟表位在一级结构上与VP3的氨基酸序列一致或接近的可能性就小。因此IBDV VP3抗原表位精确定位,还需要采用Pepscan等其它表位筛选技术进一步研究。当然,模拟表位虽然序列上与真实表位不完全一致,但同样可以用来研发诊断试剂和表位疫苗。王永山等(2007)将5个含有不同IBDV抗原表位的模拟肽序列串联表达(命名为rSEPIs),用rSEPIs加免疫佐剂经肌肉注射免疫鸡,免疫2次后,血清抗体效价可达到1:12800,说明其可诱导机体产生IBDV特异性抗体。IBDV超强毒株GX8/99攻击实验鸡, rSEPIs免疫组全部存活,而单用佐剂对照组的死亡率为86.7%(13/15),证明rSEPIs可诱导机体产生抗IBDV感染的保护性免疫应答,预示构建的串联模拟肽序列可作为IBD多表位疫苗研究的候选基因。

本研究以四株IBDV VP3单克隆抗体VP3-3F、VP3-7B、VP3-7C和VP3-10E作为筛选分子,对噬菌体展示随机15肽库进行淘洗,得到了8个VP3蛋白模拟表位。这8个模拟表位在一级结构上没有3个以上连续氨基酸与IBDV Gx株(GenBank登录序列号:AY444873)VP3的氨基酸序列相同,但二级结构上均以 $\beta$ 折叠为主,并且与单抗的结合可被VP3蛋白有效的抑制,对阐明IBDV的抗原结构及基于表位诊断方法的建立有一定参考意义。

### 第三章 利用Pepscan技术鉴定IBDV VP3抗原表位

**摘 要:** 为进一步研究IBDV VP3表位结构, 首先设计了17个部分重叠且覆盖VP3全长的短肽融合蛋白, 并在大肠杆菌中进行了表达; 然后利用肽扫描技术(Pepscan技术)对四株IBDV VP3的单克隆抗体(VP3-3F, VP3-7B, VP3-7C和VP3-10E)的抗原表位进行了定位, 进一步通过ELISA鉴定, 鉴定出两个新的VP3线性表位: 109-119aa(多聚蛋白的864-874aa)(针对VP3-3F和VP3-7B); VP3的177-190aa(多聚蛋白的932-945aa)(针对VP3-7C和VP3-10E)。序列比较结果显示, 这两个表位在多种血清I型(除变异株Variant E)和血清II型毒株中同源性和反应性为100%, 仅在变异株Variant E中有3个氨基酸变化P872Q, G933V, P938L, 说明这两个表位是IBDV保守的群特异性线性表位。而且, 这两个表位具有较好的免疫原性和反应原性。本研究对进一步分析IBDV的结构与功能以及建立以表位为基础的疫苗和诊断方法具有重要的意义。

**关键词:** IBDV; VP3; 抗原表位; Pepscan; 单抗

VP3 是 IBDV 重要的结构蛋白之一, 分子量为 29 kD, 占病毒蛋白总量的 43%。VP3 由 A 节段大 ORF 编码, 是经蛋白水解酶 VP4 从多聚蛋白 NH<sub>2</sub>-pVP2-VP4-VP3-COOH (108kDa) 上剪切下来的 (Müller & Becht, 1982; Azad *et al.*, 1985, 1987; Hudson *et al.*, 1986; Kibenge *et al.*, 1997; Jagadish *et al.*, 1988; Kibenge *et al.*, 1988; Chevalier *et al.*, 2002)。VP3 全长 258aa (多聚蛋白的 756-1012aa), 其基因位于 A 节段的 2396-3169bp。VP3 具有重要的功能, 与 VP1、VP2、基因组 dsRNA 以及其自身都存在相互作用 (Mirriam *et al.*, 2002; Luque *et al.*, 2007), 在 IBDV 装配中起着脚手架(Scaffold)的作用。VP3 是 IBDV 的非构象依赖的群特异性抗原 (Cosgrove, 1962; Azad *et al.*, 1987; Tippling *et al.*, 1991), 不能诱发机体产生中和性抗体 (Becht *et al.*, 1988; Mahardika *et al.*, 1995; Oppling *et al.*, 1991), 研究还表明 VP3 作为诊断抗原却是可行的。

在 IBDV 抗原表位的研究中, VP3 的表位研究还不很精确。早期鉴定的 VP3 表位一般较长, 只能称其为表位优势区 (Jagadish *et al.*, 1991; Mahardika and Becht, 1995; Yamaguchi *et al.*, 1996)。最近才有了关于 VP3 表位较为精确的定位 (Saravanan *et al.*, 2004; 王选年, 2005)。由于单克隆抗体种类和数量的限制, 可能还有其它的 IBDV VP3 抗原表位未被发现。

肽扫描技术(Pepscan技术)通过重叠的短肽与相应的抗体反应, 分析检测结果, 阳性反应片段即是抗体所针对的抗原表位。该技术要求有明确的抗原一级结构, 操作简单、结果直观、容易判断, 在筛选抗原表位方面比噬菌体随机肽库更确实。

本研究设计了17个部分重叠且覆盖IBDV Gx株VP3全长的短肽融合蛋白, 并在大肠杆菌中进行了表达, 用所制备的四株抗IBDV VP3的单克隆抗体对短肽融合蛋白进行扫描, 鉴定出了两个新的VP3群特异性线性抗原表位, 并对其作为诊断试剂和表位疫苗的可行性做了初步评估。

3.1 材料与方法

3.1.1 材料

pUC18GxA重组质粒（将IBDV Gx基因组的A节段克隆到pUC18载体）、IBDV VP3单克隆抗体VP3-3F、VP3-7B、VP3-7C和VP3-10E由哈尔滨兽医研究所免疫抑制病课题组制备（程宇等，2006）；IBDV鸡阳性血清和IBDV VP3鼠阳性血清由哈尔滨兽医研究所免疫抑制病课题组制备；感受态细胞DH5 $\alpha$ 、BL21（DE3）均为本实验室保存；限制性内切酶、T4 DNA连接酶等均为宝生物工程（大连）有限公司产品；IPTG为Promega公司产品；HRP标记的兔抗鸡IgG及FITC标记的兔抗鼠IgG为Sigma公司产品；质粒小提试剂盒、凝胶回收试剂盒为华舜生物工程有限公司产品；BALB/c小鼠购自哈尔滨兽医研究所动物房；原核表达载体pET-32a（见图3-1）购于Novagen公司；NC膜购于Millipore Corporation公司。

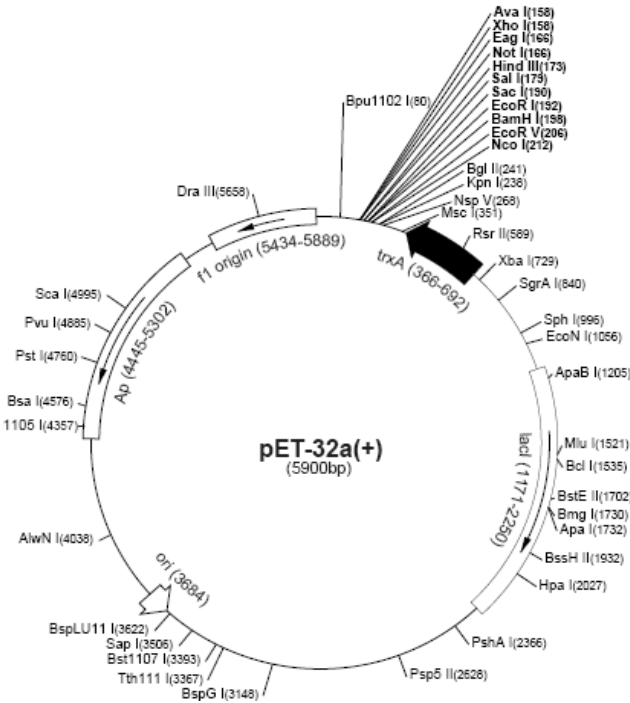


图 3-1 pET32a 图谱

Fig.3-1 Map of pET32a

3.1.2 VP3表位预测及短肽设计

应用DNASTAR软件对IBDV Gx株VP3（GenBank序列号：AY444873）的二级结构和表面特性（如亲水性、表面可及性及抗原性）等方面进行分析，预测其抗原表位，根据预测结果设计4条覆盖VP3全长的重叠短肽：P1-P4；根据检测结果，又设计3条不重叠短肽：P5-P7；最后为了精确定位四株单抗的抗原表位，设计10条重叠短肽：P8-P17；利用OLIGO6.0软件设计相应的引物，引物的5'端和3'端分别引入EcoR I和Sal I位点，P1-P17对应的核苷酸位置及引物见表3-1。由上海博亚生物工程公司合成。

表3-1 IBDV VP3各片段的位置与引物序列

Table. 3-1 Position and primers of peptides of IBDV VP3

Name of peptide	Sequences of primers and synthesized oligonucleotides	Position in polypeptide (aa)	Position in VP3 (aa)
P1	5'-GGGAATTCGCTTCAGAGTTCAGAGTT-3' 5'-ATGTCGACGTCGCTGAGTGC GAAGTT-3'	756-808	1-53
P2	5'-TAGAATTCCTCAGCGACCCGAACGCC-3' 5'-GCGTCGACGTAGTCCTCGTTTGGATC-3'	806-904	51-149
P3	5'-GGGAATTCGACTACCTAGACTACGTG-3' 5'-ATGTCGACGATTTTCATAGACTTTGGC-3'	903-951	148-196
P4	5'-CCGAATTCGCCAAAGTCTATGAAATC-3' 5'-ATGTCGACTCACTCAAGGTCCTCATC-3'	946-1012	191-257
P5	5'-GCGAATTCAGTATGGGCATCTACTTT-3' 5'-TAGTCGACTCACTGCCCTTAGGATTTG-3'	864-924	109-169
P6	5'-TAGAATTCCTCAGCGACCCGAACGCC-3' 5'-GCGTCGACTCACCATCTTCTTTGAGATCC-3'	806-863	51-108
P7	5'-GCGAATTCCTACGTCGATCTACGG-3' 5'-ATGTCGACGATTTTCATAGACTTTGGC-3'	925-951	170-196
P8	5'-AATTCAGTATGGGCATCTACTTTGCAACACCAGAATGGGTAGCACTCAATG-3' 5'-TCGACATTGAGTGCTACCCATTCTGGTGTTGCAAAGTAGATGCCCATAAGTG-3'	864-878	109-123
P9	5'-AATTCGGGCACCGGGGGCCAAGCCCCGGCCAGCTGAAGTACTGGCAGAACG-3' 5'-TCGACGTTCTGCCAGTACTTCAGCTGGCCGGGGCTTGGCCCCCGGTGCCCCG-3'	879-893	124-138
P10	5'-AATTCACACGAGAAATACCTGATCCAAACGAGGACTACCTAGACTACGTGG-3' 5'-TCGACCACGTAGTCTAGGTAGTCCTCGTTTGGATCAGGTATTTCTCGTGTG-3'	894-908	139-153
P11	5'-AATTCATGCAGAGAAGAGCCGGTTGGCATCAGAAGAACAATCCTAAGGGCAG-3' 5'-TCGACTGCCCTTAGGATTTGTTCTTCTGATGCCAACCGGCTCTTCTCTGCATGG-3'	909-924	154-169
P12	5'-AATTCGTAGCACTCAATGGGCACCGGGGGCCAAGCCCCGGCCAGCTGAAGG-3' 5'-TCGACCTTCAGCTGGCCGGGGCTTGGCCCCCGGTGCCCCATTGAGTGCTACG-3'	875-889	120-134
P13	5'-AATTCAGTGGCAGAACACACGAGAAATACCTGATCCAAACGAGGACTACG-3' 5'-TCGACGTAGTCCTCGTTTGGATCAGGTATTTCTCGTGTGTTCTGCCAGTAG-3'	890-904	135-149
P14	5'-AATTCCTAGACTACGTGCATGCAGAGAAGAGCCGGTTGGCATCAGAAGAAG-3' 5'-TCGACTTCTTCTGATGCCAACCGGCTCTTCTCTGCATGCACGTAGTCTAGG-3'	905-919	150-164
P15	5'-AATTCGCTACGTCGATCTACGGGGCTCCAGGACAGGCAGAGCCACCCG-3' 5'-TCGACGGGTGGCTCTGCCTGTCCTGGAGCCCCGTAGATCGACGTAGCG-3'	925-938	170-183
P16	5'-AATTCAGGACAGGCAGAGCCACCCCAAGCCTTCATAGACGAAGTCG-3' 5'-TCGACGACTTCGTCTATGAAGGCTTGGGGTGGCTCTGCCTGTCCTGGG-3'	932-945	177-190
P17	5'-AATTCGAAGCCTTCATAGACGAAGTCGCCAAAGTCTATGAAATCG-3' 5'-TCGACGATTTTCATAGACTTTGGCGACTTCGTCTATGAAGGCTTGG-3'	939-951	184-196

### 3.1.3 VP3分段扩增、克隆与表达

以 pUC18GxA 为模板, 分别用 P1-P7 的各对引物扩增相应 VP3 短肽基因片段, PCR 程序: 94℃预变性 5min; 94℃变性 30s, 56℃退火 30s, 72℃延伸 30s, 35 个循环; 最后 72℃延伸 10min。将胶回收的 PCR 产物与载体 pET-32a 分别经 *EcoR* I 和 *Sal* I 酶切后, 连接, 转化至感受态细胞 DH5 $\alpha$ , 经过酶切、PCR、测序鉴定后, 将阳性质粒转化 BL21 (DE3) 后进行诱导表达, 通过 SDS-PAGE 电泳鉴定, 经 Amersham 公司 HisTrap Kit 纯化。P8-P17 由上下游引物直接退火获得, 克隆、表达方法同上。

### 3.1.4 Pepscan 技术筛选抗原表位

用 Western blot 筛选抗原表位。将纯化的短肽融合蛋白 P1-P17 进行 SDS-PAGE 电泳, 然后电转移至 NC 膜, 分别以四株 VP3 单抗 VP3-3F、VP3-7B、VP3-7C 和 VP3-10E 为一抗, 室温作用 1h, PBST 洗 3 遍; 加入 HRP 标记的兔抗鼠 IgG (1:5000 稀释), 室温作用 1h, PBST 洗 3 遍; 联苯胺 (DAB) 显色, 根据反应结果鉴定抗原表位。

### 3.1.5 ELISA 鉴定抗原表位

包被纯化的短肽融合蛋白 P8 至 P17 (1:1000 稀释, 30ng/孔), 4℃过夜; 用 5%脱脂乳室温封闭 2h, PBST 洗 3 遍; 加入杂交瘤细胞上清 (100 倍稀释, 100 $\mu$ l/孔), 37℃作用 1h, PBST 洗 5 遍; 加入 HRP 标记兔抗鼠 IgG (1:5 000 稀释, 100 $\mu$ l/孔), 37℃作用 1h, PBST 洗 5 遍; 加入 OPD 显色液 (100 $\mu$ l/孔) 显色 15 min; H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (2 mol/L, 50 $\mu$ l/孔) 终止, 490 nm 波长测量吸收值。同时作空载体诱导表达产物对照。

### 3.1.6 表位免疫原性检测

将纯化的表位短肽融合蛋白与等体积的法国佐剂混合乳化, 免疫 8 周龄的雌性 BALB/c 小鼠 (0.25ng/ $\mu$ l, 200 $\mu$ l/小鼠), 15d 后二免, 二免后 10d 眼球采血, 检测血清 ELISA 效价。运用间接免疫荧光试验检测免疫血清与 IBDV 的反应, 该试验在鸡胚成纤维细胞 (CEF) 上进行。

### 3.1.7 表位反应原性检测

通过间接 ELISA 检测表位短肽的反应原性。包被纯化的表位短肽融合蛋白 (1:1000 稀释, 30ng/孔), 与鸡的 IBDV 阳性血清和鼠的 IBDV VP3 阳性血清 (100 倍稀释, 100 $\mu$ l/孔) 进行反应, 方法 3.1.5。

### 3.1.8 表位的同源性分析

运用DNASTAR分析表位短肽的氨基酸序列与IBDV其它毒株相应区域的同源性。所用毒株及其GenBank序列号如下: 超强毒株: D6948 (AF240686)、HK46 (AF092943)、UK661 (X92760); 弱毒株: Gt (DQ403248)、CEF94 (AF194428)、CU1 (X16107)、D78 (AF499929); 变



异株：Variant E（AF133904）；经典毒株：GLS（AY368653）、STC（D00499）；血清Ⅱ型：OH（U30818）。

3.1.9 表位作图

结合前人（Yamaguch *et al.*, 1996；Mahardika and Becht, 1995； Jagadish and Azad, 1991； Saravanan *et al.*, 2004b；王选年，2005）及本研究的结果，将 VP3 的表位分布进行了初步作图。

3.2 结果

3.2.1 VP3 表位预测及短肽设计结果

应用DNASTAR软件对IBDV Gx株VP3（GenBank序列号：AY444873）的二级结构和表面特性（如亲水性、表面可及性及抗原性）等方面分析结果见图3-2，预测其抗原表位，根据预测结果设计17条覆盖VP3全长的重叠或连续短肽：P1-P17（见图3-3）。

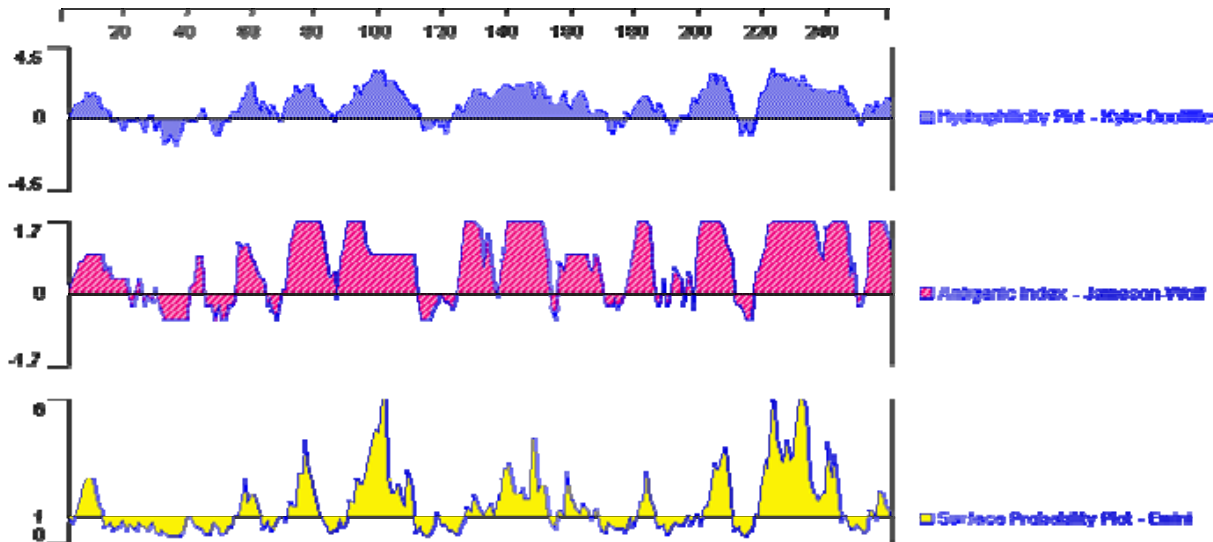


图3-2 IBDV VP3的抗原性、亲水性和表面可及性分析

Fig.3-2 Bioinformatic analysis the hydrophilicity, antigenic and surface probability of IBDV VP3

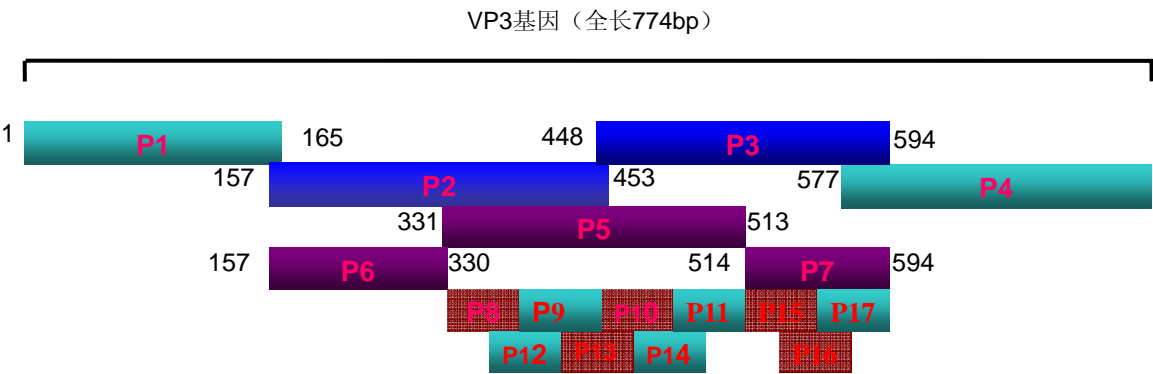


图3-3 IBDV VP3分段设计

Fig.3-3 Design of the fragments of IBDV VP3

### 3.2.2 VP3 分段扩增、克隆与表达

PCR 扩增的 P1-P7 各基因片段与预期大小一致（见图 3-4）。P8-P17 由相应上下游引物直接退火获得。原核表达阳性重组质粒分别命名为 pETP1- pETP17。将其分别转化大肠杆菌 BL21（DE3）后，各短肽融合蛋白在超声波裂解液上清中均得到了正确表达（图 3-5）。

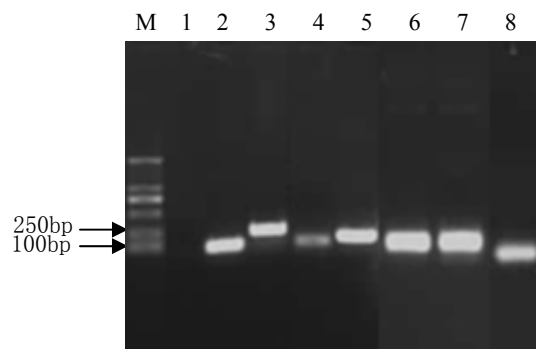


图 3-4 IBDV VP3 七个基因片段的 PCR 产物

Fig. 3-4 PCR amplification of the seven segments of IBDV VP3

M: DNA Marker DL2000; 1:Negative control; 2-8:PCR product of P1-P7

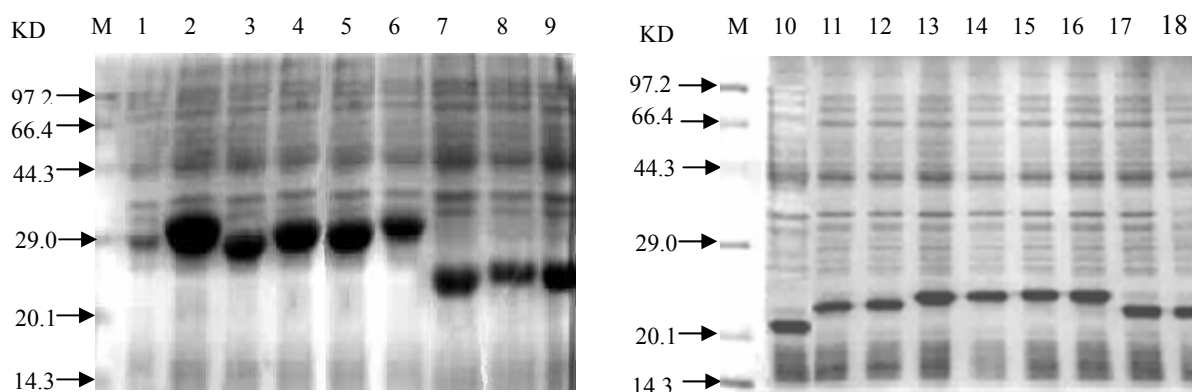


图 3-5 12%SDS-PAGE 检测 P1-P17 短肽融合蛋白的表达

Fig.3-5 Detection the expression of P1-P17 by 12%SDS-PAGE

M:Protein Molecular Weight Marker; 1-9: P1-P9 after inducement; 10: pET-32a; 11-18: P10-P17 after inducement

### 3.2.3 Pepscan 技术筛选抗原表位

利用 Western blot 筛选抗原表位，首先四株单抗分别与短肽融合蛋白 P1-P4 反应，VP3-3F 和 VP3-7B 与 P2 发生特异性反应（图略），VP3-7C 和 VP3-10E 与 P3 发生特异性反应（图略）；进一步检测短肽融合蛋白 P5-P7（覆盖 P2、P3 全长），结果显示 VP3-3F 和 VP3-7B 与 P5 发生特异性反应，另两株单抗与 P7 发生特异性反应；最后用单抗 VP3-3F 和 VP3-7B 分别检测短肽融合蛋白 P8 至 P14（覆盖 P5 全长），结果显示 VP3-3F 和 VP3-7B 与 P8 反应而不与 P12 反应（图 3-6），说明这两株单抗所针对的表位位于 P8 与 P12 的不重叠区（IBDV VP3 的 109-119aa）；用 VP3-7C 和 VP3-10E 分别检测短肽融合蛋白 P15 至 P17（覆盖 P7 全长），结果显示两株单抗都仅与短肽融

合蛋白 P16 反应(图 3-7),说明 VP3-7C 和 VP3-10E 针对的表位位于 P16(IBDV VP3 的 177-190aa)。

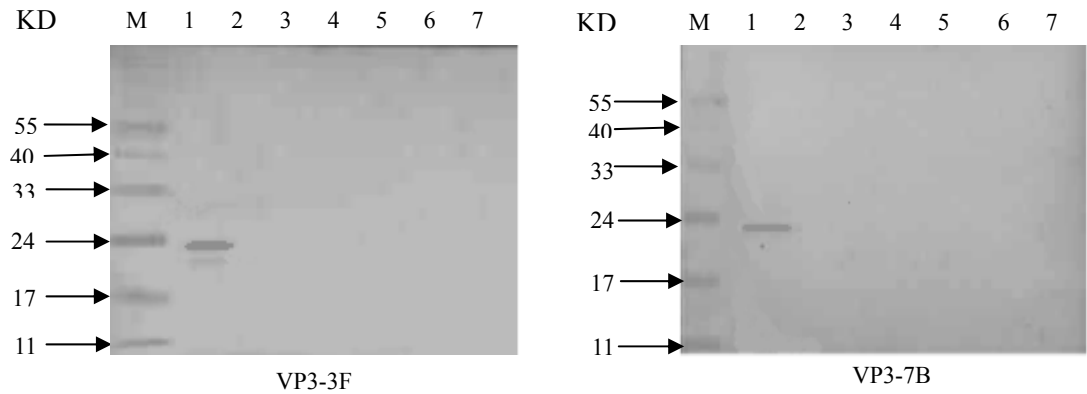


图 3-6 VP3-3F 与 VP3-7B Western blot 检测 P8 至 P14

Fig.3-6 Detection P8 to P14 by Western blot with VP3-3F and VP3-7B

M:Unstained Protein Molecular Weight Marker , 1-7: P8-P14

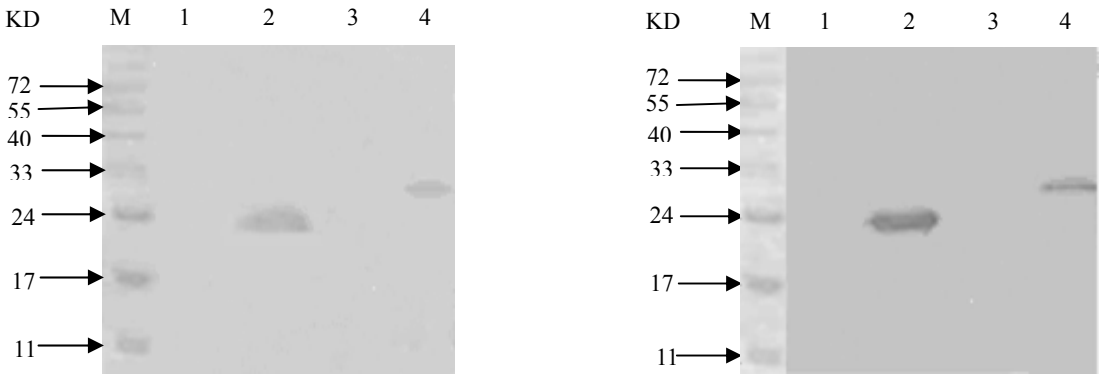


图 3-7 VP3-7C 与 VP3-10E Western blot 检测 P15 至 P17 及 P7

Fig.3-7 Detection P15 to P17 and P7 by Western blot with VP3-7C and VP3-10E

M: Unstained Protein Molecular Weight Marker; 1-3: P15-P17; 4: P7;

### 3.2.4 ELISA 鉴定抗原表位

间接 ELISA 鉴定抗原表位显示,VP3-3F 和 VP3-7B 与短肽融合蛋白 P8 反应而不与 P12 反应,VP3-7C 和 VP3-10E 与短肽融合蛋白 P16 反应(图 3-8),与 Western blot 结果相同,进一步印证了表位位于 IBDV VP3 109-119aa 和 177-190aa。

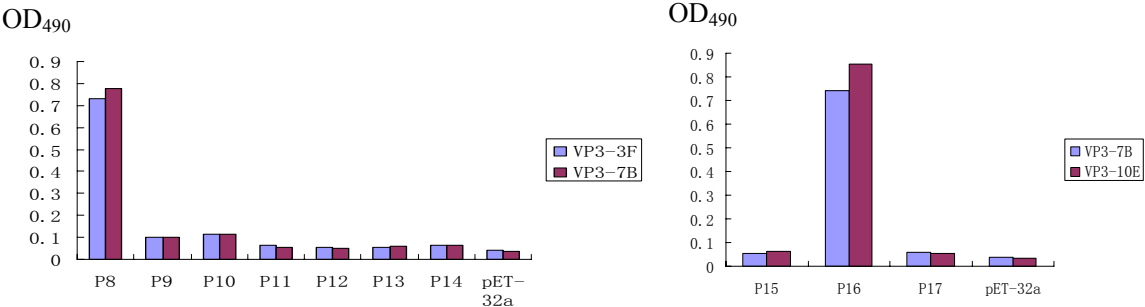


图 3-8 四株VP3单抗检测P8至P17的ELISA结果

Fig.3-8 Detection P8 to P17 by ELISA with four McAb of VP3

3.2.5 表位的免疫原性检测结果

短肽融合蛋白P8和P16免疫小鼠后，均能诱导小鼠产生特异性抗体。间接免疫荧光结果显示，这两份血清均能与感染Gt株全病毒的CEF反应（图3-9）。

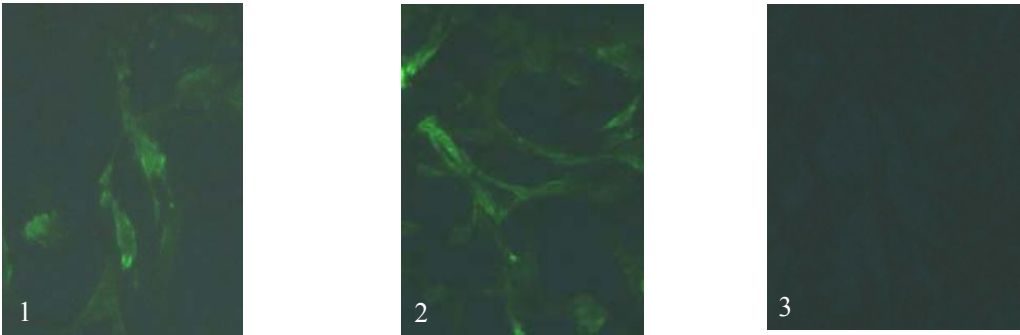


图 3-9 免疫荧光试验

Fig.3-9 Indirect immunofluorescence assay

1: Reaction of anti-P8 serum and IBDV; 2: Reaction of anti-P16 serum and IBDV; 3: Negative control.

3.2.6 表位的反应原性检测结果

短肽融合蛋白 P8 和 P16 与鸡的 IBDV 阳性血清和鼠的 IBDV VP3 阳性血清 ELISA 结果表明：两个表位与 IBDV 阳性血清及 IBDV VP3 阳性血清反应良好（图 3-10）。

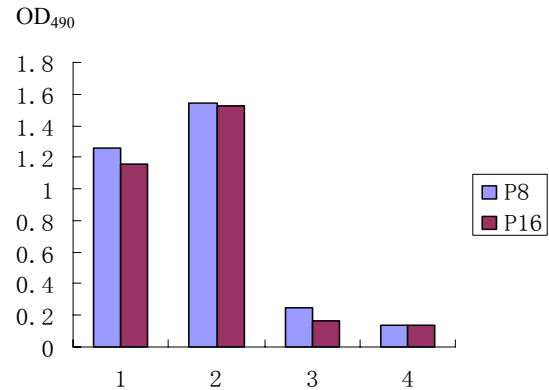


图 3-10 表位短肽与抗 IBDV 血清的 ELISA 检测

Fig.3-10 ELISA of the peptides and anti-IBDV serum

1: ELISA of the peptides and anti-IBDV serum      2: ELISA of the peptides and anti-IBDV VP3 serum  
3: ELISA of the pET-32a vector control      4: Negative control

3.2.7 表位的同源性分析

除了变异株Variant E，所鉴定的VP3表位T<sup>864</sup>MGIYFATPEW<sup>874</sup>和P<sup>932</sup>GQAEPQAFIDE-V<sup>945</sup>在所比较超强毒株、经典毒株、弱毒株以及血清Ⅱ型病毒（OH）中都完全同源（图3-11）。

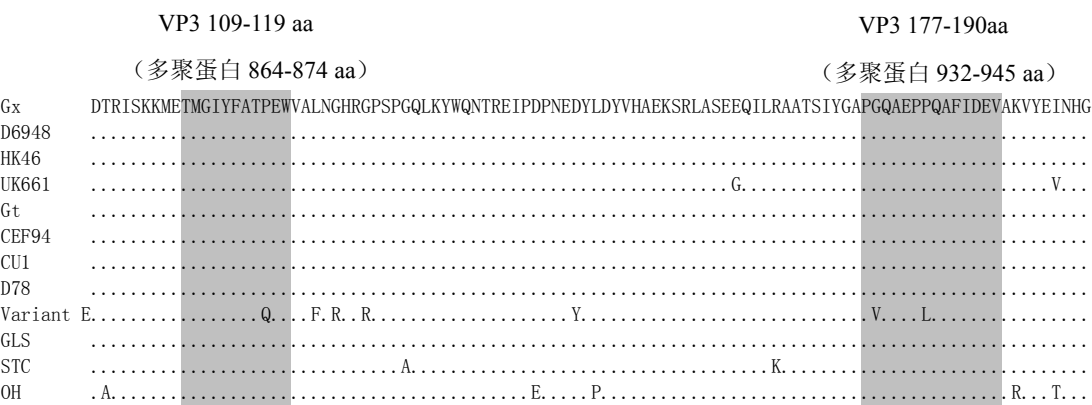


图3-11 表位序列在不同IBDV毒株间的分析

Fig.3-11 Alignment of the epitope regions among IBDV

3.2.8 表位作图

VP3 抗原表位初步作图见图 3-12，阴影部分为本研究所鉴定表位。

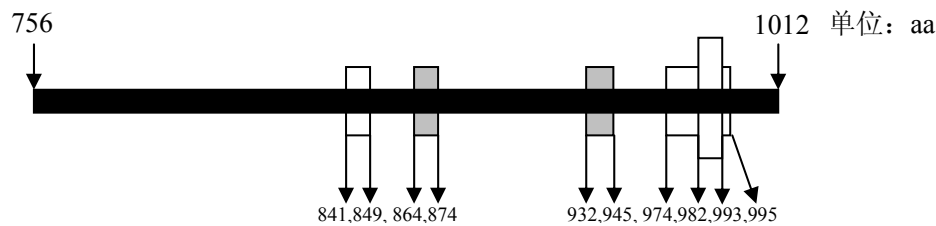


图3-12 IBDV VP3抗原表位作图

Fig.3-12 Mapping of the epitopes of IBDV VP3

3.3 讨论

鸡群感染或免疫 IBDV 后，最先检测到抗 VP3 的抗体，这说明 VP3 是 IBDV 的主要免疫原之一（Fahey *et al.*, 1985）。关于 IBDV 抗原表位，VP2 的研究比较多（Azad *et al.*, 1987; Cui *et al.*, 2003; Wang *et al.*, 2005; Yamaguchi *et al.*, 1996），而 VP3 抗原表位的鉴定还不是很精确。Jagadish 等通过敲除作图发现在 IBDV VP3 的第三个 NcoI 和唯一的 BsmI 酶切位点间的 58 个氨基酸存在抗原表位（Jagadish *et al.*, 1991）；Mahardika and Becht 鉴定了 VP3 的三个表位区：764-885aa、890-910aa 和 944-1012aa，并且认为前者是 VP3 群特异性表位区，后两者是 IBDV 血清 I 型特有的抗原表位区（Mahardika and Becht, 1995）；Yamaguchi 等也发现位于 C 末端的 105 个氨基酸（908-1012）存在 VP3 线性表位（Yamaguch *et al.*, 1996）；所鉴定的这些表位显然都太长了。最近，Saravanan 等报道了 2 个比较精确的 VP3 抗原表位：841-849aa 和 974-995aa（Saravanan *et al.*, 2004）。王选年等（2005）后来鉴定的 VP3 线性表位 982-993aa 包含在 Saravanan 等（2004）所鉴定的线性表位之内。

为了精确定位新的 VP3 抗原表位，本研究通过原核表达系统相继表达了覆盖 IBDV VP3 全长

的 17 个部分重叠的短肽融合蛋白, 借助 Pepscan 扫描技术, 用 4 株抗 IBDV VP3 的单克隆抗体, 鉴定了 VP3 两个新的线性抗原表位: 109-119aa (多聚蛋白的 864-874aa) 和 177-190 aa (多聚蛋白的 932-945aa)。Western blot 和 ELISA 结果显示, VP3-3F 和 VP3-7B 与短肽融合蛋白 P8 (109-123aa) 反应而不与 P12 (120-134aa) 反应, 并且 P8 和 P12 重叠 4 个氨基酸。研究表明, 线性抗原表位一般由 6-10 个氨基酸组成 (Wang *et al.*, 2006; Zhou *et al.*, 2006; Binder *et al.*, 2007)。因此将 VP3-3F 和 VP3-7B 所针对的表位位于 P8 与 P12 的不重叠区 109-119aa (多聚蛋白 864-874aa)。单抗 VP3-7C 和 VP3-10E 均仅与短肽融合蛋白 P16 (177-190 aa) 反应, 而不与 P15 (170-183aa) 和 P17 (184-196 aa) 反应, 这说明 VP3 的 183 位和 184 位氨基酸对于 VP3-7C 和 VP3-10E 针对的表位的完整性是很重要的, 所以将这个新表位确定在 177-190 aa (多聚蛋白 932-945aa)。

分析这两个表位氨基酸的组成发现它们具有共同特点: 疏水性氨基酸比例大 (分别是 7/11 和 9/14), 亲水性氨基酸比例小。因此, 在上一章中, 以四株抗 IBDV VP3 单抗为靶分子筛选随机 15 肽库得到模拟表位, 肽库容量不足是一方面原因, 另一方面很可能由于多肽疏水性过强, 随机短肽不能充分展示在噬菌体表面。Pepscan 技术简便、直观、精确, 在抗原表位研究领域应用广泛。因此使用 Pepscan 扫描技术得到的 VP3 表位比噬菌体展示技术得到的模拟表位更确实, 更直接。

同源性分析结果显示, 这两个表位在所比较的血清 I 型毒株中的 vvIBDV、经典毒株、减毒株以及血清 II 型毒株中同源性为 100%, 说明 109-119aa (多聚蛋白的 864-874aa) 和 177-190 aa (多聚蛋白的 932-945aa) 是 IBDV VP3 的两个新的群特异性表位。Western blot 筛选到的表位一般是线性表位。这与 VP3 存在群特异性线性抗原表位的报道 (Cosgrove, 1962; Azad *et al.*, 1987; Tippling *et al.*, 1991) 是相符的。另外, VP3 表位 109-119aa (多聚蛋白的 864-874aa) 和 177-190aa (多聚蛋白 932-945aa) 与变异株 Variant E 相比, 各有 1 个、2 个氨基酸的差异 (P872Q, G933V, P938L)。这两个表位可能与 IBDV 毒株变异有关系。

本研究鉴定的 VP3 表位 109-119aa (多聚蛋白的 864-874aa) 在 Mahardika 等报道的群特异性表位区内 (Mahardika and Becht, 1995)。鉴定的另一个抗原表位 177-190aa (多聚蛋白 932-945aa) 与 Mahardika 等报道 944-1012aa 表位 (Mahardika and Becht, 1995) 仅有两个氨基酸重叠。他们认为 944-1012aa 是 I 型 IBDV 特有的抗原表位, 但本试验结果显示 177-190aa (多聚蛋白 932-945aa) 在 I 型和 II 型中均保守 (除了变异株 Variant E), 是 IBDV 的群特异性抗原表位。

本研究鉴定的两个新的 VP3 群特异性线性表位具有良好的免疫原性。纯化的表位短肽融合蛋白 P8 和 P16 均能诱导 BALB/c 小鼠产生 IBDV 特异性抗体。这提示, 这两个 VP3 表位可以作为制备多表位疫苗的候选基因。考虑到 VP2 是 IBDV 的主要保护性抗原, 将 VP2 和 VP3 的表位短肽串联起来研发多表位疫苗将更有前景。

为了研究所鉴定的两个 VP3 表位作为诊断试剂的可能性, 将表位短肽融合蛋白 P8 和 P16 分别以 30ng/孔包被 ELISA 板, 对鸡的 IBDV 阳性血清和鼠的 IBDV VP3 阳性血清进行检测。ELISA 结果显示, 表位短肽反应性良好, OD 值均大于 1, P/N 值也相当高, P8 的反应性还要稍高于 P16。由于这两个表位是群特异性表位, 所以推测表位短肽融合蛋白 P8 和 P16 应该也可以用来检测抗其它 IBDV 毒株 (变异株 Variant E) 的抗体。另外, 表位作图为 IBDV 的抗原结构提供了直观的数据, 为进一步的结构与功能研究提供信息。

综上，通过Pepscan技术，本研究鉴定了IBDV VP3两个新的群特异性线性表位：109–119aa（多聚蛋白的864–874aa）和177–190aa（多聚蛋白932–945aa），具有良好免疫原性和反应原性，有研发诊断试剂和多表位疫苗的价值，不仅有利于进一步了解IBDV的抗原结构，而且为研发IBDV诊断试剂及多表位疫苗奠定了基础。

## 第四章 利用Pepscan技术鉴定IBDV VP2抗原表位

**摘 要:** 为进一步研究IBDV VP2表位结构, 利用肽扫描技术对三株IBDV VP2的单克隆抗体 (VP2-7D、VP2-7G和VP2-8F) 针对的抗原表位进行了研究, 并进一步通过ELISA鉴定。三株VP2单抗的抗原表位均位于: 187-199aa。同源性分析显示这个表位在多种血清I型毒株中完全同源, 但在血清II型OH毒株中有3个氨基酸变化: I187A、M193L、V194M, 因此这个表位是IBDV VP2新的保守的型特异性表位, 对进一步分析IBDV的结构与功能以及建立以表位为基础的诊断方法和疫苗具有重要的意义。

**关键词:** IBDV; VP2; 抗原表位; Pepscan; 单抗

传染性法氏囊病病毒 (IBDV) 有2个血清型, 血清I型和血清II型, 其中血清II型毒株对鸡无致病性 (McFerran *et al.*, 1980)。根据致病特征和抗原性的差异, 血清I型中又可以分为经典毒株、变异毒株和超强毒株。VP2是IBDV最主要的结构蛋白, 由A节段大ORF编码, 全长441aa (多聚蛋白的1-441aa)。VP2可诱导机体产生中和性抗体, 是IBDV主要的宿主保护性抗原 (Fahey *et al.*, 1989)。

IBDV VP2的抗原表位的研究已取得一定进展, 主要是针对构象表位 (Azad *et al.*, 1986; Yamaguchi *et al.*, 1996; Cui *et al.*, 2003a, 2003b), Wang等通过噬菌体展示肽库 (随机肽库) 和肽扫描法筛出VP2两个线性中和表位: 197-209aa和329-337aa (Wang *et al.*, 2006), 第一次证明IBDV VP2不仅具有构象中和表位, 而且还具有线性中和表位。为了进一步证明IBDV VP2是否还有其它的抗原表位, 本研究设计表达了13个部分重叠且覆盖IBDV Gx株VP2的短肽融合蛋白, 借助三株抗VP2的单克隆抗体, 利用Pepscan技术筛选抗原表位, 对短肽融合蛋白进行扫描, 在VP2的高变区侧翼鉴定出了一个新的型特异性线性抗原表位 ( $I^{187}$  GLDPKMOVATCDS  $I^{199}$ ), 进一步揭示了VP2的抗原结构。

### 4.1 材料与方法

#### 4.1.1 材料

IBDV VP2 单克隆抗体 VP2-7D、VP2-7G 和 VP2-8F、pUC18GxA 重组质粒 (将 IBDV Gx 基因组的 A 节段克隆到 pUC18 载体) 由哈尔滨兽医研究所免疫抑制病课题组制备; 原核表达载体 pQE30、pET-32a 购于 Novagen 公司; 感受态细胞 DH5 $\alpha$ 、BL21 (DE3) 均为本实验室保存。

#### 4.1.2 VP2 短肽设计

根据DNASTAR软件对IBDV Gx株VP2 (GenBank序列号: AY444873) 的二级结构和表面特性 (如理化性质、亲水性、可塑性、表面可及性及抗原性) 等分析的结果及已报道的抗原表位位置 (Azad *et al.*, 1986; Yamaguchi *et al.*, 1996; Cui *et al.*, 2003a, 2003b; Wang *et al.*, 2006), 将IBDV VP2设计为依次缩短的P1-P5五个片段; 根据检测结果, 又设计3条不重叠短肽: P6-P8; 最后为了



精确定位三株单抗的抗原表位，设计3条重叠短肽：P9-P11；P1-P13对应的氨基酸位置见表4-1。利用OLIGO6.0软件设计相应的引物，引物的5'端和3'端分别引入*EcoR* I和*Sal* I位点，由上海博亚生物工程公司合成。

表4-1 IBDV VP2各片段的位置与引物序列

Table 4-1 Position and primers of peptides of IBDV VP2

Name of peptide	Sequences of synthesized oligonucleotides	Position in polypeptide (aa)
P1	5'- CAC <u>GAA TTC</u> ATG CCT ACA ACC GGA CCG GCG -3' 5'- CAC <u>GTC GAC</u> CTA ACC AGC TTG GTA CTG TGA TGA -3'	19-458
P2	5'- CAC <u>GAA TTC</u> ATG CCT ACA ACC GGA CCG GCG -3' 5'- CAC <u>GTC GAC</u> CTA TAG GCT CCC ACT TGC TGA CCA -3'	19-404
P3	5'- CAC <u>GAA TTC</u> ATG CCT ACA ACC GGA CCG GCG -3' 5'- CAC <u>GTC GAC</u> CTA GAC AGA TTC TGT TGC CAC T -3'	19-362
P4	5'- CAC <u>GAA TTC</u> ATG CCT ACA ACC GGA CCG GCG -3' 5'- CAC <u>GTC GAC</u> CTC ACT CAC TCA GTA TCA ATT TTG T -3'	19-333
P5	5'- CAC <u>GAA TTC</u> ATG CCT ACA ACC GGA CCG GCG -3' 5'- CAC <u>GTC GAC</u> TGC TCC TGC AAT CTT CAG GGG AGA G -3'	19-223
P6	5'- TAA <u>GAA TTC</u> ATG CCA ACA ACC GGA CCG -3' 5'- ATA <u>GTC GAC</u> CTG GGC CGT CAG GAG CAT -3'	19-90
P7	5'- CTC <u>GAA TTC</u> AAC CTA CCG GCC AGC TAC -3' 5'- TGC <u>GTC GAC</u> GAG TCT CAC ATA CCC AAG -3'	91-180
P8	5'- TAA <u>GAA TTC</u> GGT GAC CCC ATT CCC GCT -3' 5'- CGG <u>GTC GAC</u> ACC TGC TTG GTA CTG TGA -3'	181-223
P9	5'- <u>AATTC</u> ATAGGGCTCGACCCAAAAATGGTAGCAACATGTGACAGCG -3' 5'- <u>TCGAC</u> GTGTCACATGTTGCTACCATTTTTGGGTCGAGCCCTATG -3'	187-199
P10	5'- <u>AATTC</u> GACAGCAGTGACAGGCCAGAGTCTACACCATAG -3' 5'- <u>TCGAC</u> TATGGTGTAGACTCTGGGCCTGTCACTGCTGTGCG -3'	198-208
P11	5'- <u>AATTC</u> AATACTGCAGCCGATGATTACCAATTCTCATCACAGTACCAAGCAGGTG -3' 5'- <u>TCGAC</u> ACCTGCTTGGTACTGTGATGAGAATTGGTAATCATCGGCTGCAGTTATG -3'	208-223
P12	5'- TAA <u>GAA TTC</u> ATG CCA ACA ACC GGA CCG -3'（同 P6 上游引物） 5'- TGC <u>GTC GAC</u> GAG TCT CAC ATA CCC AAG -3'（同 P7 下游引物）	19-180
P13	5'- CTC <u>GAA TTC</u> AAC CTA CCG GCC AGC TAC -3'（同 P7 上游引物） 5'- CGG <u>GTC GAC</u> ACC TGC TTG GTA CTG TGA -3'（同 P8 下游引物）	91-223

#### 4.1.3 VP2 分段扩增、克隆与表达

以 pUC18GxA 为模板，分别用 P1-P5 (P6-P8) 的各对引物扩增相应基因片段，PCR 程序：94℃ 预变性 5min；94℃ 变性 30s，56℃ 退火 30s，72℃ 延伸 90s (30s)，35 个循环；最后 72℃ 延伸 10min。将胶回收的 PCR 产物与载体 pQE30 (pET-32a) 分别经 *EcoR* I 和 *Sal* I 酶切后，连接，转化感受态细胞 DH5α，经过酶切、PCR、测序鉴定后，将阳性质粒转化 BL21 (DE3) 诱导表达，通过

SDS-PAGE 电泳鉴定, 经 Amersham 公司 HisTrap Kit 纯化。P9-P11 由上下游引物直接退火获得, 再克隆到经 *EcoR* I 和 *Sal* I 酶切后的载体 pET -32a 中。

#### 4.1.4 Pepscan 技术筛选抗原表位

用 Western blot 筛选抗原表位。将表达的融合蛋白 P1-P13 进行 SDS-PAGE 电泳, 然后转移至 NC 膜, 分别以三株 VP2 单克隆抗体 VP2-7D、VP2-7G 和 VP2-8F 为一抗, 室温作用 1h, PBST 洗 3 遍; 加入 HRP 标记的兔抗鼠 IgG (1:5000 稀释), 室温作用 1h, PBST 洗 3 遍; DAB 显色, 根据反应结果鉴定抗原表位。

#### 4.1.5 ELISA 鉴定抗原表位

包被纯化的短肽融合蛋白 P9-P11 (30ng /孔), 4℃过夜; 用 5%脱脂乳室温封闭 2h, PBST 洗 3 遍; 加入杂交瘤细胞上清 (原倍, 100μl /孔), 37℃作用 1h, PBST 洗 5 遍; 加入 HRP 标记兔抗鼠 IgG (1:5 000 稀释, 100μl/孔), 37℃作用 1h, PBST 洗 5 遍; 加入 OPD 显色液 (100μl/孔) 显色 15 min; H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (2 mol/L, 50μl/孔) 终止, 490 nm 波长测量吸收值。同时作空载体诱导表达产物对照。

#### 4.1.6 表位的同源性分析

DNASTAR比较分析VP2表位短肽氨基酸序列与IBDV其它毒株相应区域的同源性。所用毒株及其GenBank序列号如下: 超强毒株: D6948 (AF240686)、HK46 (AF092943)、UK661 (X92760); 弱毒株: Gt (DQ403248)、CEF94 (AF194428)、CU1 (X16107)、D78 (AF499929); 变异株: Variant E (AF133904); 经典毒株: GLS (AY368653)、STC (D00499)和血清 II 型: OH (U30818)。

#### 4.1.7 表位作图

结合前人 (Azad *et al.*, 1986; Yamaguchi *et al.*, 1996; Cui *et al.*, 2003a, 2003b; Saravanan *et al.*, 2004a; Wang *et al.*, 2006) 及本研究的阶段性结果, 将 VP2 的表位分布进行了初步作图。

### 4.2 结果

#### 4.2.1 VP2 短肽设计

应用DNASTar Protean软件对IBDV Gx株VP2 (GenBank序列号: AY444873) 的二级结构和表面特性 (如亲水性、表面可及性及抗原性) 等方面分析结果见图3-1, 预测其抗原表位, 根据预测结果设计13条覆盖VP2全长的重叠或连续短肽: P1-P13, 见图3-2。

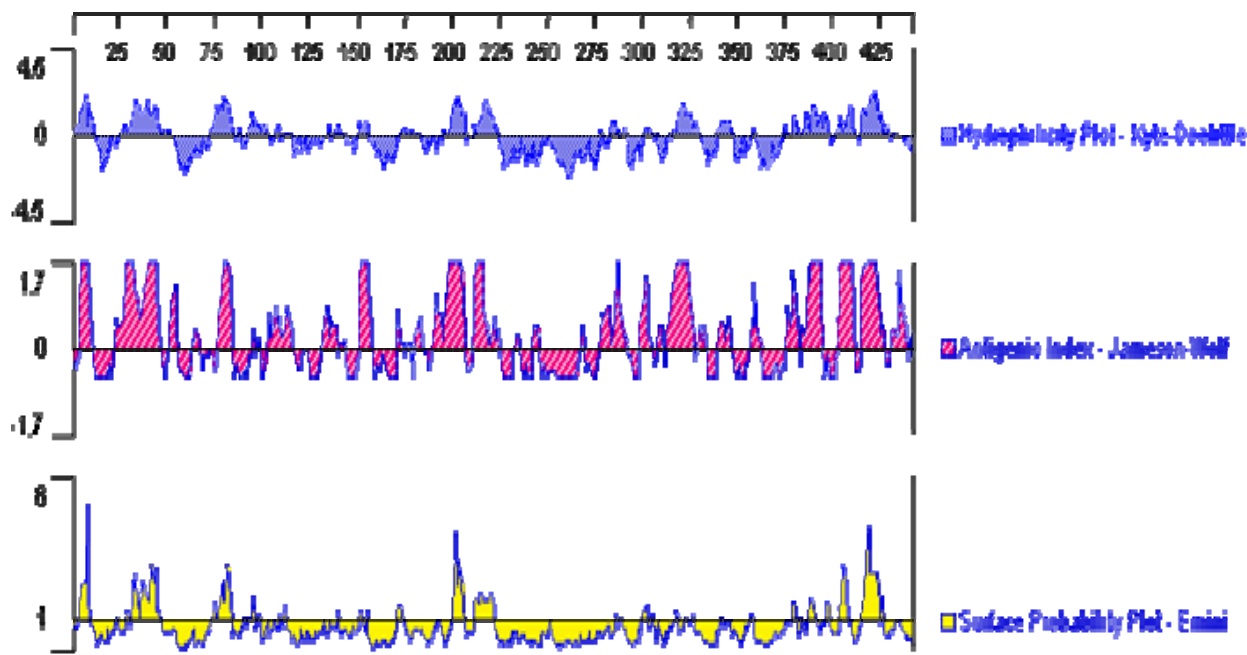


图4-1 IBDV VP2的抗原性、亲水性和表面可及性分析

Fig.4-1 Bioinformatic analysis the hydrophilicity, antigenic and surface probability of IBDV VP2

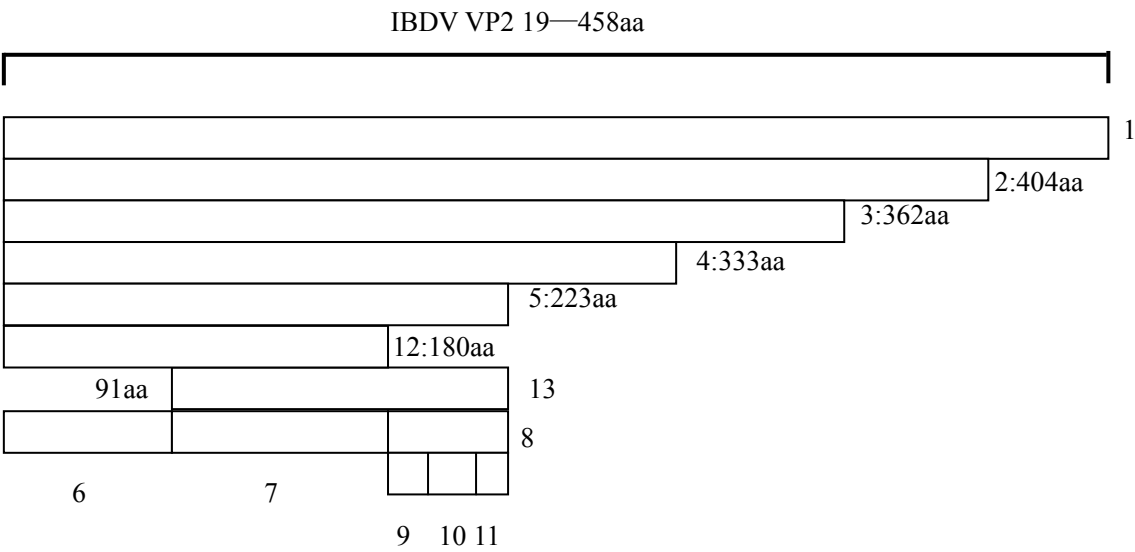


图4-2 IBDV VP2分段设计

Fig.4-2 Design of the fragments of IBDV VP2

4.2.2 VP2 分段表达

PCR 扩增的 P1-P8 及 P12 和 P13 各基因片段与预期大小一致（图略）。P9-P11 由相应上下游引物直接退火获得。原核表达阳性重组质粒分别命名为 pETP1- pETP13，将其分别转化大肠杆菌 BL21（DE3）后，各短肽融合蛋白在超声波裂解液上清上清中均得到了正确表达（图 4-3）。

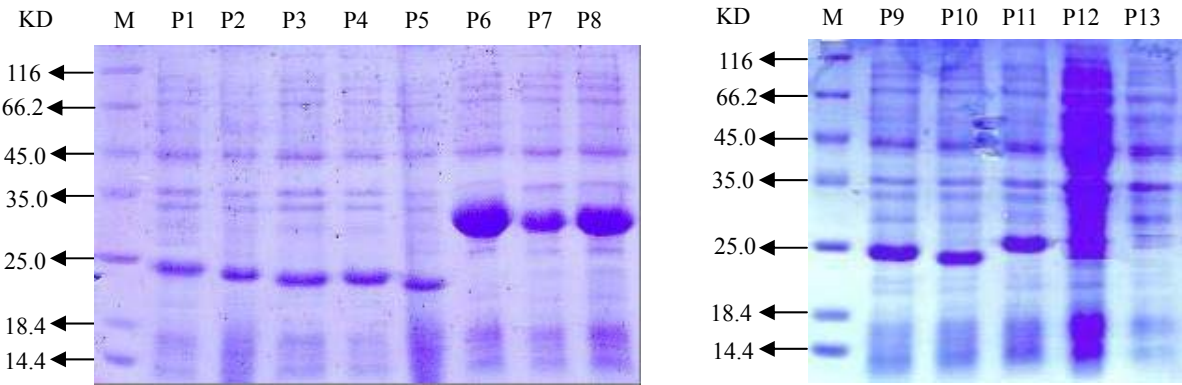


图 4-3 12%SDS-PAGE 检测 VP2 P1-P13 的表达

Fig.4-3 Detection the expression of VP2 P1-P13 by 12%SDS-PAGE

M: Protein Molecular Weight Marker.; P1-P13: P1-P13 after inducement;

4.2.3 Pepscan 技术筛选抗原表位

利用 Pepscan 筛选抗原表位，首先 VP2-7D、VP2-7G 和 VP2-8F 与 P1 至 P5 均反应；进一步检测短肽融合蛋白 P6-P8 及 P12 和 P13，三株单抗都与 P8 和 P13 发生特异性反应（单抗与 P8 的反应见图 4-4）；再检测短肽融合蛋白 P9 至 P11，结果显示三株单抗与 P9 反应而不与 P10 反应（见图 4-5），说明这三株单抗所针对的表位位于 P9（IBDV 187-199aa）。

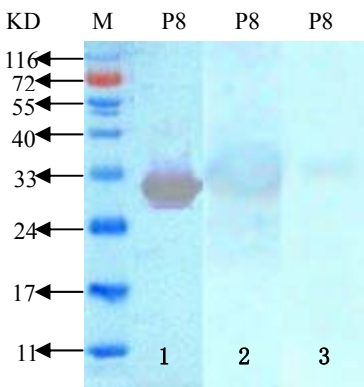


图 4-4 Western blot 检测 McAb 与 P8 的反应

Fig.4-4 Reaction of McAb with P8 by Western blot

1: McAb VP2-7D, 2: McAb VP2-7G, 3: McAb VP2-8F;  
M: Unstained Protein Molecular Weight Marker

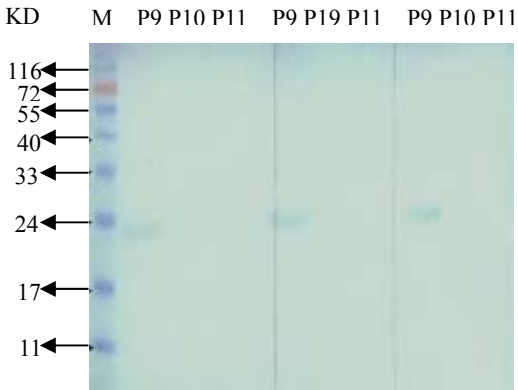


图 4-5 Western blot 检测 McAb 与 P9-P11 的反应

Fig.4-5 Reaction of McAb with P9-P11 by Western blot

1: McAb VP2-7D, 2: McAb VP2-7G, 3: McAb VP2-8F;  
M: Unstained Protein Molecular Weight Marker

4.2.4 ELISA 鉴定抗原表位

间接 ELISA 鉴定抗原表位显示，VP2-7D、VP2-7G 和 VP2-8F 检测短肽融合蛋白 P9 至 P11，结果显示三株单抗与 P9 反应而不与 P10、P11 反应（见图 4-6），与 Western blot 结果相同，进一步印证了三株单抗所针对的表位位于 P9（IBDV 187-199aa）。

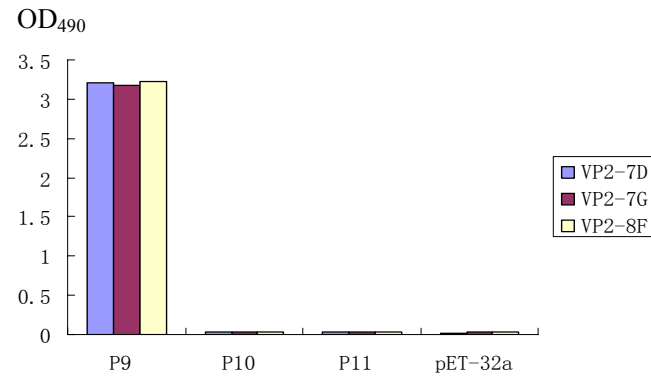


图 4-6 三株VP2单抗检测P9至P11的ELISA结果

Fig. 4-6 Detection P9 to P11 by ELISA with three McAb of VP2

4.2.5 表位的同源性分析

序列分析显示，除了血清Ⅱ型OH毒株，本研究鉴定的VP2线性表位I<sup>187</sup>GLDPKMOVATCDS<sup>199</sup>在所比较的超强毒株、经典毒株、变异毒株、弱毒株等IBDV血清Ⅰ型毒株中完全同源（图4-7）。

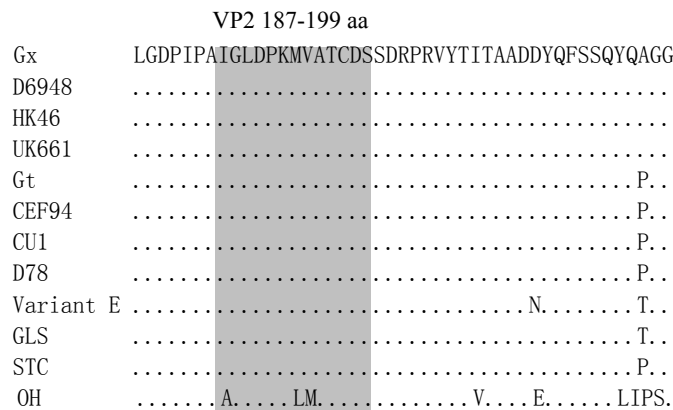


图4-7 表位序列在不同IBDV毒株间的分析

Fig.4-7 Alignment of the epitope region among IBDV

4.2.6 表位作图

VP2 的表位分布初步作图见图 4-8，阴影部分为本研究所鉴定表位。

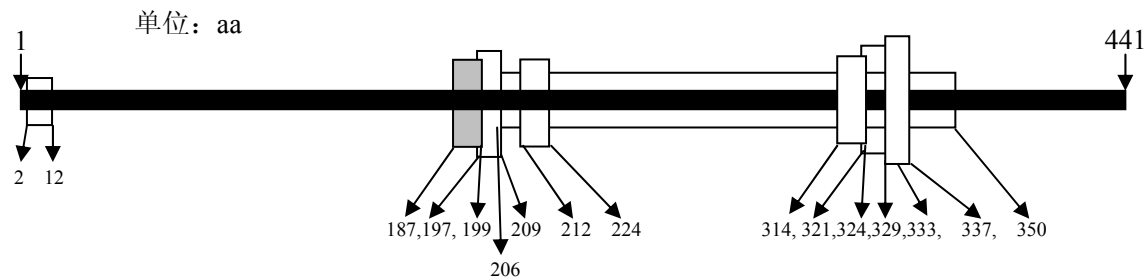


图4-8 IBDV VP2抗原表位作图

Fig. 4-8 Mapping of the epitopes of IBDV VP2

### 4.3 讨论

抗原表位是抗原分子上能够刺激机体产生抗体或致敏淋巴细胞并能够被其识别的部位,在蛋白质抗原中一般由几个直接相邻或构象上相邻的氨基酸组成,是诱导体液免疫的基本单位,决定着机体产生抗体的特异性。对以体液免疫为主的IBDV来说,鉴定其抗原表位有助于揭示IBDV体液免疫的本质。

VP2 是 IBDV 的主要保护性抗原,能够诱导机体产生中和抗体。VP2 的 206-350 位的 145 个氨基酸被称为高变区,具有 3 个重要的亚结构,即 2 个亲水区(212-224 aa, 314-324 aa)和 1 个七肽区(326-332 aa)。VP2 的高变区又称为 IBDV 毒力相关区。

IBDV VP2的抗原表位的研究已有一定进展,VP2既有构象表位又有线性表位,且大都集中在高变区(见图4-7)。Azad等研究证明VP2两个亲水区212-224aa 和314-324aa存在构象表位(Azad *et al.*, 1987)。Cui等利用噬菌体展示肽库(基因特异性肽库)研究发现VP2高变区206-350aa区域包含2个构象依赖性中和表位,VP2的C末端含有一个线性非中和表位(Cui *et al.*, 2003a, 2003b)。Saravanan等(2004a)报道了2个VP2线性抗原表位2-12aa和321-333aa,前者位于VP2的N末端,后者位于高变区;Wang等通过噬菌体展示肽库(随机肽库)和肽扫描法筛出VP2两个线性中和表位:197-209aa和329-337aa(Wang *et al.*, 2006)。VP2作为IBDV的主要保护性抗原,其它的表位有待于被发现。

本研究通过原核表达系统相继表达了覆盖IBDV VP2全长的13个部分重叠短肽融合蛋白,用三株抗IBDV VP2的单克隆抗体(VP2-7D、VP2-7G和VP2-8F)进行Pepscan扫描,发现三株单抗都与短肽融合蛋白P9(187-199aa)反应,不与P10(198-208 aa)反应。ELISA结果也证明了这个结果,所以认为187-199aa(13个氨基酸)是VP2的一个新的线性抗原表位。该表位与Wang等(2006)鉴定的一个VP2中和性表位(197-209 aa)重叠3个氨基酸。Wang等采用位移2位氨基酸的重叠多肽鉴定表位时,单抗不与191-203aa短肽反应,与193-205aa短肽有弱反应,最终将针对单抗的中和性表位定位在C<sup>197</sup>DSSDRPRVYTIT<sup>209</sup>(Wang *et al.*, 2006)。另外,本研究所用的三株VP2单抗都不具有中和活性,可能由于所用单抗的种类有关,因此这是两个完全不同的线性表位,彼此相邻。

同源性分析结果显示,本研究鉴定的VP2线性表位I<sup>187</sup>GLDPKMOVATCDS<sup>199</sup>在所比较的超强毒株、经典毒株、变异毒株、弱毒株等IBDV血清I型毒株中完全同源,是一个型特异性表位。但与血清II型毒株OH相比有三处变异:I187A、M193L、V194M,这些变异与IBDV血清型的关系统有待进一步研究。

VP2抗原表位作图结果显示,高变区(206-350aa)是IBDV的表位优势区(尤其是构象表位),表位作图为IBDV的抗原结构提供了直观的数据,为进一步的结构与功能研究提供信息。本研究首次在高变区的侧翼序列中鉴定出一个新的线性表位,对IBDV的表位分布可能会有新的提示。

本研究在VP2的高变区侧翼鉴定出了一个新的型特异性线性抗原表位(187-199aa),不仅对IBDV VP2的表位分布有新的提示,还是IBDV血清分型和鉴别诊断的候选表位。

## 第五章 结论

5.1 利用噬菌体展示技术, 以四株 IBDV VP3 单克隆抗体为靶分子筛选噬菌体展示随机 15 肽库, 得到 8 个 IBDV VP3 模拟表位。

5.2 利用 Pepscan 技术鉴定出 IBDV VP3 两个新的群特异性线性表位:109–119aa(多聚蛋白 864–874aa), 177–190aa (多聚蛋白 932–945aa), 其序列为 T<sup>864</sup>MGIYFATPE W<sup>874</sup> 和 P<sup>932</sup>GQAEPPQAFIDEV<sup>945</sup>。这两个表位均具有良好的免疫原性和反应原性。

5.3 利用 Pepscan 技术在 IBDV VP2 高变区侧翼鉴定出一个新的型特异性线性表位: 187–199aa, 其序列为 I<sup>187</sup>GLDPKMOVATCDS<sup>199</sup>。

5.4 结合前人及本研究结果, 初步绘制了 IBDV VP2、VP3 抗原表位图。

## 参考文献

1. 安同庆. 利用噬菌体展示技术鉴定猪繁殖与呼吸综合征病毒抗原表位 [硕士学位论文]. 哈尔滨: 中国农业科学院哈尔滨兽医研究所, 2004.
2. 白雪帆, 张英, 汪毅等. 应用PEPCSCAN技术研究单克隆抗体L13F3识别的抗原表位. 第四军医大学学报, 2000, 21 (7): 850-852.
3. 程宇, 邓小芸, 高玉龙等. 抗鸡传染性法氏囊病病毒 VP3 蛋白单克隆抗体制备及抗原表位初步的分析. 畜牧兽医学报, 2006, 36 (12): 1323-1327.
4. 刘毅, 金宁一, 殷震等. 传染性法氏囊病病毒重组疫苗和基因疫苗的构建、表达及试验应用研究. 北京禽病国际会议论文集, 1999, 274-275.
5. 姜平, 陈溥言, 蔡宝祥等. 传染性法氏囊病病毒主要结构蛋白基因鸡起表达产物免疫学实试验. 南京农业大学学报, 1998, 21: 100-103.
6. 彭志伟, 王笑梅, 高宏雷等. 传染性法氏囊病病毒结构蛋白VP3基因的克隆与原核表达. 中国预防兽医学报, 2006, 28 (2): 124-127.
7. 沈倍奋. 分子文库. 科学出版社, 北京, 2001.
8. 沈 南, 吕良敬, 陈顺乐等. U1RNP70KD, Sm2D, SSB 及  $\beta$ 2GP1 自身抗原的重组表达及临床研究. 上海医学, 2000, 23 (5): 263-266.
9. 王笑梅, 王牟平, 高宏雷等. 传染性法氏囊病毒 V P 2 在酵母细胞内的高效表达及其免疫原性研究. 中国农业科学, 2003, 36 (4): 443-447.
10. 王选年. 鸡传染性法氏囊病病毒 B 细胞抗原表位研究. [博士学位论文]. 杭州: 浙江大学, 2005.
11. 魏葆, 李金明. 丙型肝炎病毒感染筛检中抗原表位的应用及其研究进展, 中华肝脏病杂志, 2006, 14 (12): 955-957.
12. 王永山, 范红结, 张晓民等. 传染性法氏囊病病毒多表位模拟肽串联基因的表达与免疫原性分析. 微生物学报, 2007, 47(1): 121—125.
13. 吴 敬, 吴梧桐. B细胞蛋白质抗原表位的研究方法进展, 药物生物技术, 2000, 7(4): 239-242.
14. 殷震, 刘景华. 动物病毒学. 第二版, 北京: 科学出版社, 2001, 910-957.
15. 余传信, 朱荫昌, 殷旭仁, 杨小红. 噬菌体展示模拟抗原表位对血吸虫病诊断及疗效考核价值的研究. 2003, 中国药物与临床.
16. 于幼平. 鸡传染性法氏囊病的诊断与防治. 北京农业大学出版社, 1993.
17. 周蛟, 刘福致, 陈丽勇. 北京地区鸡传染性法氏囊病病原分离. 中国兽医杂志, 1982, 7: 25-26.
18. Abbas A.K., Lichtman A.H., Pober J.S. Cellular and Molecular Immunology. W B Saunders Company, 2000, (4):56-101.
19. Azad A.A., Barret S.A., Fahey K.J. The characterization and molecular cloning of the double-stranded dsRNA genome of an Australian strain of infectious bursal disease virus. Virology, 1985, 143: 35-44.
20. Azad A. A. , Fahey K.J. , Barrett S. A. , *et al.* Expression in Escherichia coli of cDNA fragments encoding the gene for the host protective antigen of infectious bursal disease virus. Virology, 1986, 149 (2) : 190-198.



21. Azad A.A., Jagdish M.N., Brown M.A., *et al.* Deletion mapping and expression in *Escherichia coli* of the large genomic segment of a Birnavirus. *Virology*, 1987, 161: 145-152.
22. Azad A.A., Mckem N. M., Maereadie I.G, *et al.* Physiochemical and immunological characterization of recombinant host-protective antigen of infectious bursal disease virus. *Vaccine*, 1991, 9: 715-722.
23. Balasuriya U.B., Maclachlan N.J. De Vries A.A., *et al.*, Identification of a neutralization site in the major envelope glycoprotein (GL) of equine arteritis virus. *Virology*, 1995, 207(2): 518-527.
24. Bayliss C.D., Spies U., Shaw K., *et al.* A comparison of the sequences of segment A of four infectious bursal disease virus strains and identification of a variable region in VP2. *J. Gen. Virol*, 1990, 71: 1303-1312.
25. Binder M., Vogtle F.N., Michelfelder S., *et al.* Identification of their epitope reveals the structural basis for the mechanism of action of the immunosuppressive antibodies basiliximab and daclizumab. *Cancer Res*, 2007, 67(8): 3518-3523.
26. Boris T., Shmuel C., Meir W. The epitopes for natural polyreactive antibodies are rich in proline. *Immunology*, 1997, 94: 6335-6339.
27. Bottcher B., Kiselev N.A., Stel'Mashchuk V.Y., *et al.* Three-dimensional structure of infectious bursal disease virus determined by electron cryomicroscopy. *J. Virol*, 1997, 71: 325~330.
28. Caston J.R., Martinez-Torrecuadrada J.L., Maraver A., *et al.* C-terminus of infectious bursal disease virus major capsid protein VP2 is involved in definition of the T number for capsid assembly. *J Virol*, 2001, 75: 10815-10828.
29. Chang H. C., Lin T. L., Wu C. C. DNA mediated vaccination against infectious bursal disease in chickens. *Vaccine*, 2001, 20: 328-335.
30. Cosgrove A.S. An apparently new disease of chicken-avian nephrosis. *Avian Dis*, 1962, 6:385-389.
31. Coulibaly F. Chevalier C., Gutsche I., *et al.*, The Birnavirus Crystal Structure Reveals Structural Relationships among Icosahedral Viruses. *Cell*, 2005, 120: 761-72.
32. Cui X., Nagesha H.S., Holmes I H. Mapping of conformational epitopes on capsid protein VP2 of infectious bursal disease virus by fd-tet phage display. *J Virol Methods*, 2003a, 114(1) : 109-112.
33. Cui X., Nagesha H.S., Holmes I H. Identification of crucial residues of conformational epitopes on VP2 protein of infectious bursal disease virus by phage display. *J Virol Methods*, 2003b, 109 (1) : 75-83.
34. Darteil R., Bublot M., Laplace E., *et al.* Herpesvirus of turkey recombinant viruses expressing infectious bursal disease virus VP<sub>2</sub> immunogen induce protection against an infectious bursal disease virus virulent challenge in chickens. *Virology*, 1995, 211: 481-490.
35. Dybing J.K., Jackwood D.J. Antigenic and immunological properties of baculovirus expresses infectious bursal disease virus. *J. Gen. Virol*, 1998, 79 : 1047-1054.
36. Etteradossi N., Gauthier C. Extensive antigenic changes in an atypical isolate of very virulent infectious bursal disease virus and experimental clinical control of this virus with an antigenically classical live vaccine. *Avian Pathol*, 1997, Aug, 33(4): 423-31.

37. Fahey K.J., McWaters P., Brown M. A., *et al.* Virus neutralizing and passively protective monoclonal antibodies to infectious bursal disease virus of chickens. *Avian Dis*, 1991, 35: 365-373.
38. Fan M. W., Bian Z., Peng Z.X., *et al.* A DNA vaccine encoding a cell-surface protein antigen of *Streptococcus mutans* protects gnotobiotic rats from caries. *J. Dental Res*, 2002, 81, 784-787.
39. Fodor I., Hovath E., Fodor N., *et al.* Induction of protective immunity in chickens immunized with plasmid DNA encoding infectious bursal disease virus antigens. *Acta.Vet. Hung*, 1999, 47: 481-492.
40. Garriga D., Querol-Aud J., Abaitua F., *et al.* The 2.6-Angstrom Structure of Infectious Bursal Disease Virus-Derived T=1 Particles Reveals New Stabilizing Elements of the Virus Capsid. *J Virol*, 2006, 80:6895-905.
41. Gomez-Roman V.R., Cao C., Bai Y., *et al.* Phage-displayed mimotopes recognizing a biologically active anti-HIV-1 gp120 murine monoclonal antibody. *J Acquir Immune Defic Syndr*, 2002, 31(2): 147-53.
42. Hideo G, Nobuyuki M, Hiroshi I, *et al.* Mapping of epitopes and structural analysis of antigenic sites in the nucleoprotein of rabies virus. *Journal of General Virology*, 2000, 81: 119-127.
43. Hudson P.J., McKem N.M., Power B.E., *et al.* Genomic structure of the large RNA segment of infectious bursal disease virus. *Nucleic Acid Research*, 1986, 14: 5001-5002.
44. Jagadish M N, staton V J, Hudson P j, *et al.* Birnavirus precursor polypeptide is processed in *Escherichia coli* by its own virusencoded polypeptide. *J Virology*, 1988, 62: 1084~1087.
45. Jagadish M. N., Azad A. A. Location of a VP3 epitope of Infectious Bursal Disease Virus. *Virology*, 1991, 184: 805-807.
46. Kao J.H., Lai M.Y., Hwang Y.T., *et al.* Chronic hepatitis C without antihepatitis C antibodies by second- generation assay. *Dig Dis Sci*, 1996, 41: 161—165.
47. Kibenge F.S., Qian B., Cleghom J.R. Infectious bursal disease virus polyprotein processing does not involve cellular proteases. *Arch Virol*, 1997, 142(12): 2401-2419.
48. Kleinman S, Alter H, Busch M, *et al.* Increased detection of hepatitis Cvirus (HCV)-infected blood donors by a multiple-antigen HCV enzyme immunoassay. *Transfusion*, 1992, 32: 805-813.
49. Kodihalli S., Haynes J.R., Robinson H.L., *et al.* Cross-protection among lethal H5N2 influenza viruses induced by DNA vaccine to the hemagglutinin. *J. Virol*, 1997, 71: 3391-3396.
50. Kuo G, Choo QL, Alter HJ, *et al.* An assay for circulating antibodies to a major etiologic virus of human non-A, non-B hepatitis. *Science*, 1989, 244: 362-364.
51. Lee C.C., Ko T.P., Chou C.C., *et al.* Crystal structure of infectious bursal disease virus VP2 subviral particle at 2.6 Å resolution: Implications in virion assembly and immunogenicity. *J Struct Biol*, 2006, 155(1):74-86.
52. Lombardo E, Maraver A , Caston J R, *et al.* VP1, the putative RNA-dependent RNA polymerase of infectious bursal disease virus forms complexes with the capsid protein VP3, leading to efficient ncapsidation into virus-like particles. *J Virol*, 1999, 73(8): 6973-6983.

53. Luque D., Saugar I., Rodriguez J.F., *et al.* Infectious Bursal Disease Virus capsid assembly and maturation by structural rearrangements of a transient molecular switch. *J Virol*, 2007, In press.
54. Mahardika G. N. K., Becht H. Mapping of cross-reacting and serotype-specific epitopes on the VP3 structural protein of the infectious bursal disease virus (IBDV). *Arch. Virol*, 1995, 140: 765–774.
55. McFerran J. B., McNulty M. S., McKillop E. R., *et al.* Isolation and serological studies with infectious bursal disease viruses from fowl, turkeys and ducks: demonstration of a second serotype. *Avian Pathol*, 1980, 9: 395–404.
56. Mebatsion T., Koolen M. J. M., Leonie T. C., *et al.* Newcastle Disease Virus (NDV) marker vaccine: an immunodominant epitope on the nucleoprotein gene of ndv can be deleted or replaced by a foreign epitope. *Journal of Virology*, 2002, 76 (20): 10138-10146.
57. Mirriam G.J., Tacken, Ben P.H. Peeters, *et al.* Infectious bursal disease virus capsid protein VP3 interacts with VP1, the RNA-dependent RNA polymerase, and with viral double-stranded RNA. *J Virol*, 2002, 11: 11301-11311.
58. Mirriam G.J., Tacken, Patricia A.J., Van Den Beuken, *et al.* Homotypic interactions of the infectious bursal disease virus proteins VP3, p VP2, VP4, and VP5: mapping of the interacting domains. *Virology*, 2003, 312: 306-319.
59. Muller H., Nitschke R. The two segments of the infectious bursal disease virus genome are circularized by a 90,000-Da protein. *Virology*, 1987, 159: 174-177.
60. Mundt E., Beyer J., Muller H. Identification of a novel viral protein in infectious bursal disease virus-infected cells. *J. Gen. Virol*, 1995, 76: 437-443.
61. Mundt E., Kollner B., Kretzschmar D. VP5 of infectious bursal disease virus is not essential for viral replication in cell culture. *J. Virol*, 1997, 71: 5647–5651.
62. Oppling V., Muller H., Brecht H. The structural polypeptide VP3 of infectious bursal disease virus carries group- and serotype-specific epitopes. *J. Gen. Virol*, 1991, 72: 2275–2278.
63. Oshop G.L., Elankumaran S., Heckert R.A. DNA vaccination in the avian. *Vet. Immunol. Immunopathol*, 2002, 89: 1-12.
64. Pitcovski J., Di-Castro D., Shaaltiel Y., *et al.* Insect cell-derived VP2 of infectious bursal disease virus confers protection against the disease in chickens. *Avian Dis*, 1996, 40(4): 753-61.
65. Pitcovski J., Levi B.Z., Maray T., *et al.* Failure of viral protein 3 of infectious bursal disease virus produced in prokaryotic and eukaryotic expression systems to protect chickens against the disease. *Avian Diseases*, 1999, 43: 8-15.
66. Rob H.M., Langeveld P.M., Wim M.M., *et al.* Sloodstra. Synthetic Peptide Vaccines: Unexpected Fulfillment of Discarded Hope. *Biologicals*, 2001, 29: 233-236.
67. Saravanan P., Kumar S., Kataria J.M. Use of multiple antigenic peptides related to antigenic determinants of infectious bursal disease virus (IBDV) for detection of anti-IBDV-specific antibody in ELISA quantitative comparison with native antigen for their use in serodiagnosis. *J Immunol Methods*, 2004a, 293: 61-70.
68. Saravanan P., Satishkumar, Kataria J.M., *et al.* Detection of Infectious bursal disease virus by

- ELISA using an anti-peptide antibody raised against VP3 region. *Acta Virol*, 2004b, 48: 39-45
69. Serezani C.H., Franco A.R., Wajc M., *et al.* Evaluation of the murine immune response to *Leishmania* meta 1 antigen delivered as recombinant protein or DNA vaccine. *Vaccine*, 2002, 20: 3755~3763.
70. Seshi R Sompuram, Vani Kodela, Halasya Ramanathan, *et al.* Synthetic peptides identified from phage-displayed combinatorial libraries as immunodiagnostic assay surrogate quality-control targets. *Clinical Chemistry*, 2002, 48 (3): 410-420.
71. Sheppard M., Werner W., Tsatas D., *et al.* Fowl adenovirus recombinant expressing VP<sub>2</sub> of infectious bursal disease virus induce protective immunity against bursal disease. *Arch Virol*, 1998, 142:915-930.
72. Smothers J.F., Henikoff S., Carter P., *et al.* Phage display Affinity selection from biological libraries. *Science*, 2002, 298 (5593): 621-622.
73. Tachen M.G., Rottier P. J., Gielkens A. L., *et al.* Interactions in vivo between the proteins of infectious bursal disease virus: capsid protein VP3 interacts with the RNA-dependent RNA polymerase, VP1. *J Gen Virol*, 2000, 81(1): 209-218.
74. Tippling V., Müller H., Becht H., The structural polypeptide VP3 of infectious bursal disease virus carries group- and serotype-specific epitopes. *J Gen Virol*, 1991, 72: 2275-2278.
75. Tsukamoto K., Saito S., Saeki S., *et al.* Complete, long-lasting protection against lethal infectious bursal disease virus challenge by a single vaccination with an avian herpesvirus vector expressing VP2 antigens. *Virol*, 2002, Jun, 76(11): 5637-45.
76. Tsukamoto K., Sato T., Saito S., Dual-viral vector approach induced strong and long-lasting protective immunity against very virulent infectious bursal disease virus. *Virology*, 2000, Apr 10, 269(2): 257-67.
77. Vakharia V.N., Snyder D.B., He J., *et al.* Infectious bursal disease virus structural proteins expressed in a baculovirus recombinant confer protection in chickens. *J. Gen. Virol*, 1993, 74: 1021-1206.
78. Vakharia V.N., Snyder D.B., He J., *et al.* Active and passive protection against variant and classic infectious bursal disease virus strains induced by baculovirus-expressed structural proteins. *Vaccine*, 1994, 12(5): 452-456.
79. Wang X.N., Zhang G.P., Zhou J.Y., *et al.* Identification of neutralizing epitopes on the VP2 protein of infectious bursal disease virus by phage-displayed heptapeptide library screening and synthetic peptide mapping. *Viral Immunology*, 2005, 18: 549-557.
80. Wu H.C., Yeh C.T., Huang Y.L., *et al.* Structural relationship between nucleocapsid-binding activity of the rabies virus phosphoprotein (P) and exposure of epitope 402-13 located at the C terminus. *Journal of General Virology*, 2002, 83: 3035-3043.
81. Xiao Y., Lu Y., Chen Y.H., Epitope-vaccine as a new strategy against HIV-1 mutation. *Immunology Letters*, 2001, 77: 3-6.
82. Yamaguchi T., Iwata K., Kobayashi M., *et al.* Epitope mapping of capsid proteins VP2 and VP3 of

- IBDV. Arch Virol, 1996, 141: 1493-1507.
83. Yao K., Goodwin M. A., Vakharia V. N. Generation of a mutant infectious bursal disease virus that does not cause bursal lesions. J. Virol, 1998, 72: 2647-2654.
84. Yao K., Vakharia V. N. Induction of Apoptosis in Vitro by the 17-kDa Nonstructural Protein of Infectious Bursal Disease Virus Possible Role in Viral Pathogenesis. Virology, 2001, 285: 50-58.
85. Zhou Y.J., An T.Q., He Y.X., *et al.* Antigenic structure analysis of glycosylated protein 3 of porcine reproductive and respiratory syndrome virus. Virus Res, 2006, 118 (1-2): 98-104.

## 致谢

值此论文完稿之际，首先向导师王笑梅研究员致以崇高的敬意和由衷的感谢！感谢导师对我的辛勤培养和殷切教诲，时刻关注我的试验及生活，感谢导师三年来给予的支持、理解和鼓励。她严谨的治学态度、一丝不苟的敬业精神是我永远学习的榜样！

衷心感谢哈尔滨兽医研究所兽医生物技术国家重点实验室免疫抑制病课题组高玉龙、高宏雷老师在试验中的具体指导和设计。感谢本教研室祁小乐、王晓艳、宇文延青、秦立廷博士及程宇、李俊山、张宁、李铁强、刘伟、林欢等硕士在生活、试验等方面给予的关心和帮助，感谢臧红云女士在试验工作中提供的热情帮助！

向在我硕士学习和生活中，给予我关怀和帮助的刘胜旺老师、仇华杰老师、王云峰老师、相文华老师、刘长明老师、徐哮老师、王岳老师、刘益民老师等表示我真挚的谢意！

非常感谢我的好友及同学张建华、肇慧君、吴国军、何来、崔红玉、刘建东、赵建军、彭伍平、王延辉、白兴华、钟功勋、丁选亚、王昱、龚利洋、李慕瑶、王群、司微、张晓霖、张晓薇等硕士在生活、学习和试验中给予了我深切的帮助和照顾，在此向他们表示我诚挚的谢意。

借此机会，向所有关心、帮助我的老师、同学及好友们表示我诚挚的谢意！

同样，向我的父母及哥哥姐姐们表示最深情的敬意！是他们的无私支持与鼓励使我走到现在并继续向前进！

再一次，向所有曾经帮助、关心支持过我的亲人、老师和朋友们致以衷心的感谢！

本研究得到了“973”计划重大专项“动物重大传染病病原变异与致病的分子机制”（项目编号2005CB523200）的资助。

## 作者简历

邓小芸，女，1980年10月生，内蒙古巴彦淖尔市人。2000年进入内蒙古农业大学动物科学与动物医学学院学习，2004年6月获农学学士学位；2004年9月至2005年7月在中国农业科学院研究生院进行硕士研究生理论基础课学习。2005年7月进入中国农业科学院哈尔滨兽医研究所兽医生物技术国家重点实验室禽免疫抑制病课题组从事硕士论文课题研究。在硕士期间参加国家“973”项目：动物重大传染病病原变异与分子机制（2005CB523200）。学习成绩优秀、科研能力突出，得到老师的认可。已发表科研文章10余篇，均为全国中文核心期刊，另有一篇英文文章已被Virus Research（影响因子2.5）接收。

### 发表文章

1. **Xiaoyun Deng**, Yulong Gao, Honglei Gao, et al. Antigenic structure analysis of VP3 of infectious bursal disease virus. (Accepted by Virus Research).
2. **邓小芸**, 高玉龙, 等. 传染性法氏囊病病毒VP3模拟表位筛选. 中国兽医科学, 2006, 36 (10): 795-799.
3. **邓小芸**, 高玉龙, 高宏雷, 等. 传染性法氏囊病病毒VP3抗原表位的鉴定. 病毒学报 (2007.7. 即将发表).
4. 程宇, **邓小芸**, 高玉龙, 等. 抗鸡传染性法氏囊病病毒 VP3 蛋白单克隆抗体制备及抗原表位初步的分析. 畜牧兽医学报, 2006, (12).
5. Xiaole Qi, Yulong Gao, Honglei Gao, **Xiaoyun Deng**, et al., An improved method for Infectious bursal disease virus rescue using RNA polymerase II system. Journal of Virological Methods, 2007.
6. 高玉龙, 高宏雷, **邓小芸**, 等. 鸡传染性法氏囊病毒 VP2 基因的原核表达与抗原性分析. 中国生物制品学杂志, 2006, 19 (2): 143-145.
7. 祁小乐, 高玉龙, 高宏雷, **邓小芸**, 等. 鸡传染性法氏囊病病毒 Gt 株全基因组序列分析及真核表达载体的构建. 中国兽医科学, 2006, 36 (10): 820-826.
8. 刘伟, 高玉龙, 高宏雷, **邓小芸**, 等. 鸡胚成纤维细胞 cDNA 表达文库的构建. 微生物学报 (已接收).
9. 祁小乐, 高宏雷, 高玉龙, **邓小芸**, 等. 鸡传染性法氏囊病病毒疫苗株感染性分子克隆的构建. 中国农业科学 (已接收).
10. 高玉龙, 刘伟, 高宏雷, **邓小芸**, 等. 鸡传染性法氏囊 B 淋巴细胞三库 cDNA 文库的构建. 预防兽医学报 (已接收).
11. 高玉龙, 高宏雷, 李俊山, **邓小芸**, 等. 鸡传染性法氏囊病病毒 VP2 基因在杆状病毒表达系统中的表达及免疫原性研究. 预防兽医学报 (已接收).