

家兔出血症病毒病毒样颗粒疫苗的研制及评价

邓均华^{1,2#}, 刘伟^{3#}, 王同燕^{1,2}, 韩水仲^{1,2}, 宋欢欢^{1,2}, 白晨雨^{1,2}, 陈凌燕^{1,2}, 吴洪超^{1,2},
石晶³, 习向锋^{1,2*}, 田克恭^{1,2*}

(1. 国家兽用药品工程技术研究中心, 河南 洛阳 471000; 2. 普莱柯生物工程股份有限公司,
河南 洛阳 471000; 3. 长春西诺生物科技有限公司, 吉林 长春 130000)

摘要: 为研究重组杆状病毒 RHDV-VP60 株表达 VP60 蛋白及其效果的情况, 将 RHDV-VP60 株接种 Sf9 细胞制备家兔出血症病毒样颗粒蛋白, 与铝胶佐剂混合制成灭活疫苗, 进行安全检验、最小免疫剂量测定及免疫持续期研究。结果显示, 3 批 VP60 蛋白病毒样颗粒抗原液的血凝效价为 $1:2^{18} \sim 1:2^{19}$ 。3 批疫苗以超剂量(每只 2.0 mL)免疫家兔未见任何不良反应; 对兔的最小免疫剂量为每只 0.5 mL; 免疫后第 14 天, 血清 RHDV HI 效价为 $1:16 \sim 1:64$, 攻毒后 5/5 健活; 疫苗免疫持续期达 210 d。上述研究结果表明, 重组杆状病毒 RHDV-VP60 株可高效表达 VP60 蛋白并能形成病毒样颗粒, 用其制备的疫苗安全性及免疫效果良好, 解决了传统疫苗生产过程所存在的生物安全风险以及重组蛋白表达量低的问题。

关键词: 家兔出血症病毒; 病毒样颗粒; 疫苗; 评价

Preparation and immune evaluation of recombinant rabbit hemorrhagic disease virus like particles expressed in baculovirus

DENG Jun-hua^{1,2#}, LIU Wei^{3#}, WANG Tong-yan^{1,2}, HAN Shui-zhong^{1,2}, SONG Huan-huan^{1,2}, BAI Chen-yu^{1,2},
CHEN Ling-yan^{1,2}, WU Hong-chao^{1,2}, SHI Jing³, XI Xiang-feng^{1,2*}, TIAN Ke-gong^{1,2*}

(1. National Research Center for Veterinary Medicine, Luoyang 471003, China; 2. Pulike Biological Engineering, Inc.,
Luoyang 471003, China; 3. Changchun Sino Biotechnology Company Limited, Changchun 130012, China)

Abstract: To evaluate the immunity efficiency of the recombinant baculovirus RHDV-VP60 strain, the recombinant VP60 protein was prepared by inoculation of Sf9 cells with RHDV-VP60 strain and then mixed with aluminum gel adjuvant to make inactivated vaccine. The optimal usage, safety and duration of the vaccine was investigated further. In result, the expression level of RHDV-VP60 strain could reach to $1:2^{18}$ to $1:2^{19}$ HAU. The optimal immune dose of the vaccine was 0.5 mL per rabbit. The serum hemagglutination inhibition titer of rabbits immunized with the vaccine could reach to $1:16 \sim 1:64$ on day 14 post-immunization and rabbits could confer 5/5 protection after challenge. No adverse reactions were observed on rabbits immunized with 4 mL vaccine. Duration of the vaccine was 210 days for the protection of rabbits against RHDV. These data suggest that a high yield of VP60 protein could be gained by the recombinant baculovirus RHDV-VP60 strain and showed good immune effect against rabbit hemorrhagic disease

收稿日期:2020-02-20; 修回日期:2020-03-18

基金项目: 郑洛新国家自主创新示范区首批创新引领型产业集群专项; 畜禽用安全高效新型疫苗研发及产业化(181200211700);
洛阳市河洛英才计划(新型兽用生物制品研发及产业化)

作者简介: # 表示刘伟与邓均华为共同第一作者。邓均华(1978-), 女, 四川阆中人, 硕士, 主要从事动物疫苗和诊断试剂方向的研究, E-mail: dengbetter88@163.com; 刘伟(1983-), 男, 吉林长春人, 硕士, 主要从事动物疫病防控技术的研究, E-mail: liuwei6743@sina.cn。* 通讯作者: 习向锋(1979-), 男, 河南洛阳人, 高级兽医师, 硕士, 主要从事兽用疫苗的研究与开发, E-mail: xixiangfeng-2000@163.com; 田克恭(1964-), 男, 山西运城人, 研究员, 主要从事动物疫病诊断和防控技术研究, E-mail: vetvac@126.com。

without biosafety.

Key words: rabbit hemorrhagic disease virus;VLPs;vaccine;immune evaluation

* **Corresponding authors:** XI Xiang-feng,E-mail:xixiangfeng-2000@163.com;TIAN Ke-gong,E-mail:vetvac@126.com

家兔病毒性出血症(又称“兔瘟”)是由家兔出血症病毒(rabbit hemorrhagic disease virus,RHDV)引起家兔的一种急性高度接触性传染病,传播速度快,潜伏期短,病程急,致死率高。自 1984 年首次在我国爆发以来,迅速蔓延至全国及欧洲等世界各地,给养兔业造成巨大危害^[1-3]。家兔出血症病毒属于嵌杯病毒科、兔病毒属,呈圆形,正二十面体立体对称的无囊膜病毒^[4]。兔出血症病毒是单股正链 RNA 病毒,由 7 437 个核苷酸组成,含有两个开放阅读框,ORF1 编码的 VP60 衣壳蛋白(65 ku)组成病毒粒子的主要结构,也是诱导机体产生免疫保护性抗体的主要蛋白^[5-6]。兔病毒性出血症主要通过疫苗接种进行防控。长期以来,使用感染兔组织制备的灭活疫苗在兔病毒性出血症的预防中发挥了重要作用。但是,制备上述疫苗需使用兔瘟强毒和专用的强毒动物房,存在潜在的生物安全风险和动物福利问题^[7]。VP60 蛋白可在大肠杆菌表达系统中表达,但该系统由于缺少糖基化修饰,对蛋白的活性可能有影响^[8-10]。杆状病毒表达系统具有糖基化修饰,但表达的重组蛋白产量不高,是制约规模化生产的原因之一^[7]。通过对重组杆状病毒表达系统进行启动子优化或重组蛋白进行密码子优化可提高重组蛋白的表达^[11]。本实验室对构建的可高效表达 RHDV VP60 蛋白的重组杆状病毒 RHDV-VP60 株的免疫效果进行评价,主要研究内容如下。

1 材料与方法

1.1 病毒和细胞

表达兔出血症病毒 VP60 蛋白的重组杆状病毒 RHDV-VP60 株、Sf9 细胞、兔出血症病毒 HN 株强毒,均由普莱柯生物工程股份有限公司保存。

1.2 主要试剂

SF-SFM 昆虫细胞无血清培养基购自苏州市沃美生物技术有限公司。杆状病毒快速滴定试剂盒(BacPAK Baculovirus Rapid Titer Kit)购自 SEEBIO 公司。VP60 抗体购自 PL Laboratories 公司。甲醛溶液购自国药集团化学试剂有限公司。硫柳汞钠购自上海沪丰生物科技有限公司。兔抗兔出血症病毒阳性血清,血凝抑制效价 1:1 024,兔出血症病毒阴性血清,血凝抑制效价小于 1:4,均由普莱柯生物工

程股份有限公司保存。

1.3 实验动物

1.5~3.0 kg 健康易感家兔(RHDV HI 抗体效价低于 1:4),购自河南省康达实验动物有限公司。

1.4 VP60 蛋白的制备与检验

1.4.1 生产用种毒的制备 取重组杆状病毒 RHDV-VP60 株种毒按照 MOI=1 接种长至约 2.0×10^6 /mL 的 Sf9 细胞,27℃、120 r/min 条件下培养 96 h,收获病毒液,作为生产用种毒,-20℃保存。

1.4.2 生产用种毒的鉴定

1.4.2.1 病毒含量 将重组杆状病毒 RHDV-VP60 株用商品化杆状病毒快速滴定试剂盒测定其病毒含量。

1.4.2.2 VP60 基因鉴定 用 PCR 方法对重组杆状病毒 RHDV-VP60 株的 VP60 基因进行鉴定,PCR 方法如下:PCR 引物为 VP60-F:5'-AACATGGAGG-GCAAAGCCCGCACAG-3';VP60-R:5'-TCAGAC-ATAAGAAAAGCCATTG-3'。PCR 反应体系(25 μL)为:上游引物 VP60-F 1 μL,下游引物 VP60-R 1 μL,2×EasyTaq PCR SuperMix 12.5 μL,ddH₂O 9.5 μL,模板 DNA 1 μL。PCR 扩增程序:95℃预变性 10 min;94℃变性 50 s,55℃退火 50 s,72℃延伸 1 min,共 30 个循环;最后 72℃延伸 10 min。电泳产物用 1%琼脂糖凝胶电泳。

1.4.2.3 特异性鉴定 将重组杆状病毒 RHDV-VP60 株接种长至单层 Sf9 细胞的 96 孔细胞培养板 6 孔,每孔 50 μL,同时设正常细胞对照 3 孔。置 27℃培养箱中培养 72 h,弃上清,用 PBS(0.01 mol/L,pH=7.2)洗涤 2 次,每孔加入 80%的丙酮 100 μL,2~8℃固定 30 min,PBS(0.01 mol/L,pH=7.2)洗涤 3 次,正常细胞对照孔和病毒接种孔各 3 孔分别加入兔出血症病毒阳性血清 50 μL,另 3 孔病毒接种孔加入兔出血症病毒阴性血清 50 μL,37℃作用 1 h;弃上清,每孔加入 FITC 标记的山羊抗家兔 IgG 50 μL,37℃作用 1 h,洗涤后,加伊文斯兰染色液衬染,洗涤后,置荧光显微镜下观察结果。

1.4.2.4 表达特性鉴定 取接种重组杆状病毒 RHDV-VP60 株培养 96 h 的 Sf9 细胞培养上清,测定收集的细胞培养上清液对 1%人 O 型红细胞的血凝效价。将细胞培养上清以 3.5×10^4 r/min 离心 2 h 时,将沉淀用 PBS 溶解后,缓慢加到梯度蔗糖(10%→30%→

50% (w/v)) 上层液面上, 然后继续以 3.5×10^4 r/min 离心 2 h 时, 收集 30%~50% 蔗糖液面间白带后溶解在 PBS 中, 去除蔗糖和浓缩后获得目的蛋白, 并对目的蛋白进行 SDS-PAGE 电泳鉴定。

1.4.2.5 电镜观察 采用电镜进一步确定表达的蛋白是否形成 RHDV VLPs。将表达的重组 VP60 蛋白连同感染 RHDV 肝组织研磨液上清按 1.4.2.4 方法进行蔗糖密度梯度离心纯化, 然后用电镜进行观察。将纯化的重组 VP60 蛋白吸附到金属网上, 漂洗后, 加入 1:150 稀释的 VP60 蛋白抗体, 37 °C 孵育 30 min, 漂洗后, 加入金颗粒标记的蛋白 A (直径 12 nm), 37 °C 孵育 30 min, 漂洗后, 用 1% 磷钨酸染色 2~3 min, 用电镜检测与分析。

1.4.3 VP60 蛋白的制备与检验

1.4.3.1 VP60 蛋白的制备 将 Sf9 细胞用无血清培养基稀释至 $0.75 \times 10^6 \sim 1.5 \times 10^6$ /mL, 27 °C、60~80 r/min、DO=40%~60%、pH=6.2~6.5 悬浮发酵培养, 当 Sf9 细胞数量达到 $2.0 \times 10^6 \sim 2.5 \times 10^6$ /mL 时, 将鉴定合格的重组杆状病毒 RHDV-VP60 株按 MOI=1 的剂量接种, 27 °C、80 r/min、DO=50%、pH 值 6.5 下培养 96 h 后, 收获细胞培养物, -20 °C 冻存。

1.4.3.2 VP60 蛋白的检验 用血凝试验测定收获的 VP60 蛋白对 1% 人 O 型红细胞的血凝效价。测定方法如下: 在微量反应板的 1~24 孔均加入 25 μ L PBS (0.015 mol/L, pH=7.0)。吸取 VP60 蛋白液 25 μ L 加入第 1 孔, 混匀。从第 1 孔吸取 25 μ L 混合液加入第 2 孔, 混匀后吸取 25 μ L 到第 3 孔, 依次 2 倍系列稀释至第 23 孔, 从第 23 孔吸取 25 μ L 弃去, 第 24 孔为红细胞对照。每孔加入 1% 人 O 型红细胞悬液 25 μ L, 振荡混匀, 37 °C 作用 30 min 或室温作用 45 min。将反应板倾斜 45 °C, 红细胞对照孔红细胞应完全不凝集, 以出现红细胞 100% 凝集的抗原最高稀释度作为待测样品的血凝效价。

1.5 疫苗的制备

将收获的细胞培养物冻融后, 以 5 000 r/min 离心 10 min 以去除细胞碎片, 取上清加入终浓度为 0.05% 甲醛溶液灭活 24 h。将灭活的病毒液 10 倍稀释后接种已形成良好单层的 Sf9 细胞 25 cm² 瓶内, 每个灭活样品接种 4 瓶, 每瓶接种 1 mL, 27 °C 吸附 1 h 后弃去接种液, 加入新鲜培养基, 27 °C 培养 72 h, 观察应无细胞病变, 盲传 1 代, 继续培养 72 h, 应无细胞病变判为灭活检验合格。将灭活样品取样测定其对 1% 人 O 型红细胞的血凝效价, 根据血凝效价, 用 PBS (0.015 mol/L, pH=7.0) 稀释至血凝效价 1:2⁹, 将 9 份 VP60 蛋白液和 1 份氢氧化铝胶混合, 然后

加入 1% 的硫柳汞, 使其终浓度为 0.01%, 充分搅拌均匀后分装。

1.6 疫苗的安全检验

将制备的 3 批疫苗分别以每只 2.0 mL 的剂量经颈背部皮下接种健康易感兔, 接种后观察 7 d, 每日观察兔的精神、采食、饮水、粪便、体温等, 接种后第 7 天剖检, 观察接种部位是否出现结节。

1.7 疫苗的最小免疫剂量测定

将 3 批疫苗分别以每只 0.25、0.5、1.0 mL 的剂量经皮下途径注射 1.5~3.0 kg 的健康易感兔, 同时设非免疫对照组。免疫后第 14 天, 所有兔均通过耳缘静脉采血, 分离血清, 使用 8 个血凝单位抗原测定血清中抗兔出血症病毒 HI 抗体效价。同时, 将免疫兔采血后转至负压强毒区, 各皮下注射兔出血症病毒 HN 株 1.0 mL ($LD_{50}=1\ 000$), 观察 7 d, 统计各组兔的攻毒保护率。

1.8 疫苗的免疫持续期测定

将制备的疫苗以每只 1.0 mL 的剂量经颈背部皮下注射 1.5~3.0 kg 的健康易感家兔, 分别于免疫后第 0、14、21、30、60、90、120、150、180、210 天, 检测兔血清中抗兔出血症病毒 HI 抗体效价。免疫后第 210 天, 免疫组的家兔和对照组的家兔分别经颈背部皮下注射兔出血症病毒 HN 株, 每只 1.0 mL ($LD_{50}=1\ 000$), 攻毒后连续观察 7 d, 统计攻毒保护情况。

2 结果

2.1 生产用种毒的鉴定

重组杆状病毒 RHDV-VP60 株的病毒含量为 $3.2 \times 10^{7.0}$ IFU/mL, 用 PCR 方法可扩增出约 1 740 bp 的 DNA 片段 (见图 1)。取 Sf9 细胞培养上清测定其血凝效价为 1:2¹⁸, SDS-PAGE 后于 60 ku 附近出现一条明显蛋白条带 (见图 2)。间接免疫荧光法鉴定, 重组杆状病毒 RHDV-VP60 株接种 Sf9 细胞后, 细胞内出现明显黄绿色荧光 (见图 3)。电镜下观察, 可见到病毒样颗粒, 其形态大小与 RHDV 一致, 且可与 VP60 蛋白抗体反应 (见图 4)。

2.2 VP60 蛋白的制备与检验

将检验合格的种毒接种 Sf9 细胞, 在生物反应器中制备了 3 批 VP60 蛋白液, 对 1% 人 O 型红细胞的血凝效价为 1:2¹⁸、1:2¹⁹、1:2¹⁸。

2.3 疫苗的制备与检验

将 VP60 蛋白灭活后, 3 批抗原对人 O 型红细胞的血凝效价为 1:2¹⁷、1:2¹⁸、1:2¹⁸。将灭活检验合格的 3 批抗原制备疫苗, 批号分别为 20130601~20130603。

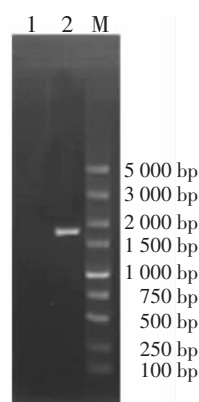


图 1 重组杆状病毒 RHDV-VP60 株 VP60 基因 PCR 鉴定
Figure 1 Polymerase chain reaction of the recombinant baculovirus RHDV-VP60 strain VP60 gene

M:DNA 分子质量标准;1:阴性对照;2:重组杆状病毒 RHDV-VP60 株。
M:DL5000 DNA Marker;1:Negative control;2:Recombinant baculovirus RHDV-VP60 strain.

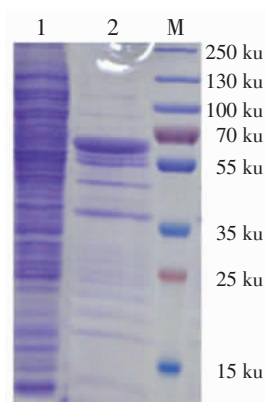


图 2 重组杆状病毒 RHDV-VP60 株表达 VP60 蛋白 SDS-PAGE 检测
Figure 2 Polyacrylamide gel electrophoresis of the VP60 protein expressed by the recombinant baculovirus RHDV-VP60 strain

M:蛋白 marker;1:Sf9 细胞对照;2:重组杆状病毒 RHDV-VP60 株。
M:Protein molecular weight marker;1:Sf9 cells control;2:Recombinant baculovirus RHDV-VP60 strain.

2.4 安全检验

3 批疫苗分别经颈背部皮下超剂量接种 1.5~3.0 kg 的健康易感家兔 4 只,每只 2.0 mL。接种后观察 7 d,精神、采食、饮水、粪便、体温等无异常,剖检后观察注射部位均无结节形成,疫苗吸收良好。

2.5 疫苗的最小免疫剂量测定

3 批疫苗接种后第 14 天,对照兔血清 RHDV HI 效价均<1:4,每只 0.25 mL 免疫组 HI 效价为 1:8~1:16,每只 0.5 mL 免疫组 HI 效价为 1:16~1:64,每只 1.0 mL 剂量组 HI 效价为 1:16~1:128(见图 5)。同时,接种后第 14 天攻毒,未免疫对照组 5/5 死亡,每只 0.25 mL 免疫组 3/5~4/5 保护,每只

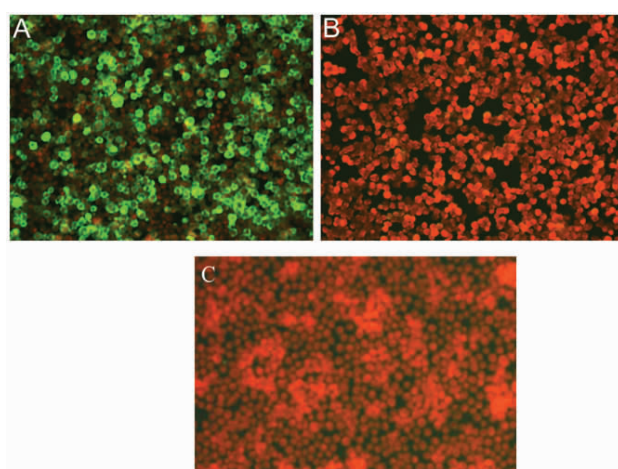


图 3 间接免疫荧光 (IFA) 检测结果 (200×)

Figure 3 Indirect immunofluorescence detection result

A:重组杆状病毒 RHDV-VP60 株感染的 Sf9 细胞;B:空白对照 Sf9 细胞;C:阴性血清对照。

A:Sf9 cells infected with recombinant baculovirus RHDV-VP60 strain incubated with RHDV positive serum;B:Sf9 cells control;C:Sf9 cells infected with recombinant baculovirus RHDV-VP60 strain incubated with RHDV negative serum.

0.5 mL 和每只 1.0 mL 免疫组均 5/5 保护(见表 1)。

2.6 免疫持续期

三批疫苗以每只 1.0 mL 的剂量免疫后不同时间测定兔血清中 RHDV HI 抗体效价。免疫后第 14 天,血清 HI 效价为 1:16~1:128;免疫后第 60 天,血清 HI 效价达到 1:64~1:512;之后缓慢下降,至免疫后第 210 天,血清 HI 效价为 1:16~1:32(见图 6)。攻毒后,免疫组 5/5 保护,对照组 4/5 死亡。

3 讨论

由于使用 RHDV 感染组织制备灭活疫苗存在潜在的生物安全风险,开发亚单位疫苗可有效避免疫苗生产过程中的生物安全风险。VP60 蛋白作为 RHDV 衣壳的主要构成成分可用于亚单位疫苗的制备^[18]。用原核表达系统表达重组蛋白,由于该系统缺少糖基化、翻译后修饰等功能,使重组表达蛋白在生物活性上存在缺陷,表达的蛋白易出现包涵体^[8]。将 VP60 基因与 β -半乳糖苷酶、SUMO 等共表达可促进可溶性表达,但去除该标签需经过酶切和纯化,不利于大规模生产^[8-10]。国内外有报道用杆状病毒表达重组 VP60 蛋白,但可能由于病毒株或表达系统不同,出现重组蛋白未形成病毒样颗粒^[13-18]。本研究构建的重组杆状病毒 RHDV-VP60 株表达的 VP60 蛋白在细胞内可折叠成病毒样颗粒,电镜下观察,其形态同原病毒相似,可最大限度保持原病毒的生物活性。杆状病毒表达的重组蛋白产量较低,是制

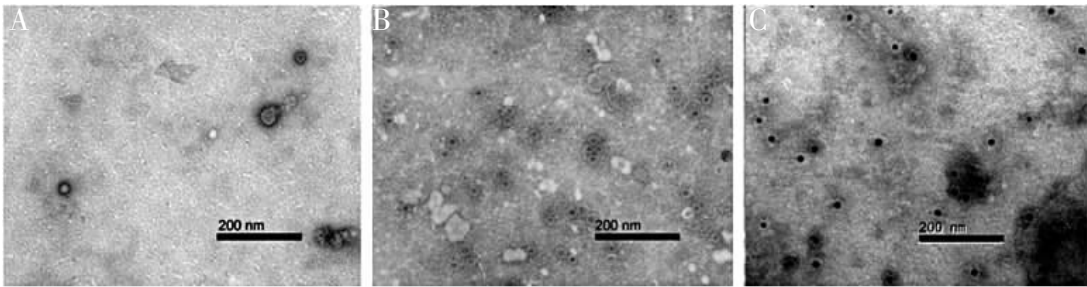


图 4 电镜观察病毒样颗粒

Figure 4 Electron micrograph of RHDV VLPs

A:RHDV 感染兔肝组织悬液上清;B:重组杆状病毒 RHDV-VP60 株感染 Sf9 细胞上清;C:重组杆状病毒 RHDV-VP60 株感染 Sf9 细胞上清加入 VP60 抗体。

A:RHDV from infected rabbit liver;B:VLPs from supernatant of Sf9 cells infected with recombinant baculovirus RHDV-VP60 strain ;C:VLPs from supernatant of Sf9 cells infected with recombinant baculovirus RHDV-VP60 strain and incubated with VP60 antibody.

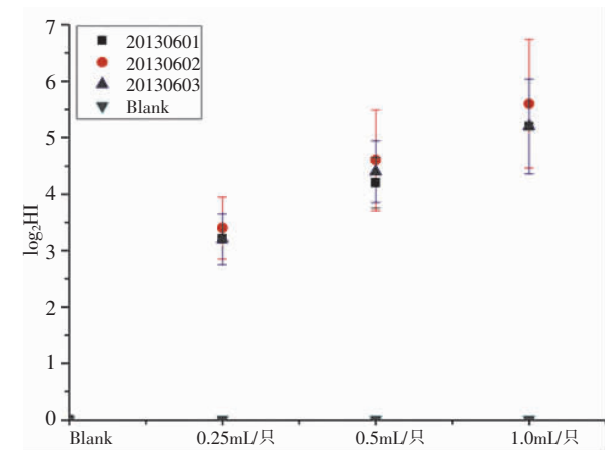


图 5 不同剂量疫苗免疫兔免疫后 14 天血清抗兔出血症病毒 HI 抗体效价

Figure 5 Hemagglutination inhibition antibody titer of rabbits immunized with vaccine in different doses on 14 day post-immunization

表 1 三批疫苗不同剂量免疫兔攻毒保护结果

Table1 Protection rates of rabbits immunized with three batches of vaccine after challenge

批号 Batches	每只 0.25mL 0.25 mL each	每只 0.5 mL 0.5 mL each	每只 1.0 mL 1.0 mL each
20130601	4/5	5/5	5/5
20130602	3/5	5/5	5/5
20130603	3/5	5/5	5/5
对照 Control	0/5	0/5	0/5

约其规模化应用的原因之一^[7]。通过重组杆状病毒感染家蚕,将家蚕处理后获得重组蛋白虽然产量高,但可能存在质量控制等问题,目前还未见规模化生产^[7,14,18]。国内有报道构建的重组杆状病毒表达的 VP60 蛋白含量为 1:2¹²~1:2¹³^[19-20]。本实验室通过改造重组杆状病毒等方法,表达的重组 VP60 蛋白含量不低于 1:2¹⁸,与文献报道相比,表达量至少提

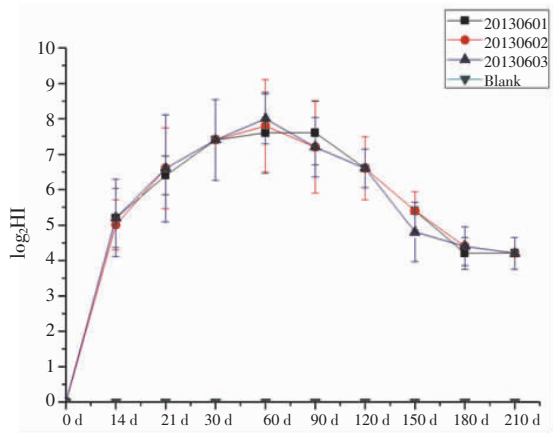


图 6 疫苗免疫后不同时间兔血清抗兔出血症病毒 HI 抗体效价

Figure 6 Dynastic of hemagglutination inhibition antibody titer of rabbits immunized with vaccine

高了 32 倍,且免疫效果良好,节约了生产成本,便于规模化生产。

本研究对构建的重组表达兔出血症病毒 VP60 蛋白的杆状病毒 RHDV-VP60 株进行鉴定并对其安全性及免疫效果进行了评价,它的表达量高且安全性及免疫效果良好,解决了兔瘟组织灭活疫苗存在的生物安全及规模化生产问题。

参考文献 (References)

[1] LUI S J,XUE H P,PU B Q,*et al.* A new viral disease of rabbits[J]. *Animal Husbandry Veterinary Medicine*, 1984,16:423-434.

[2] 王永坤,吉传义,周阳生,等. 家兔一种新的病毒病——兔瘟的研究[J]. *中国农业科学*,1988,21(5):73-79. WANG Yong-kun,JI Chuan-yi,ZHOU Yang-sheng,*et al.* Study on a new virus infection in rabbits—rabbit pest[J]. *Scientia Agricultura Sinica*,1988,21(5): 73-79. (in Chinese)

[3] DU N X. Rabbit hemorrhagic disease (RHD)—a new di-

- sease and its viral etiology[J]. *DTW Deutsche tierärztliche Wochenschrift*, 1990, 97(3):114-116.
- [4] 陆承平. 最新动物病毒分类简介[J]. 中国病毒学, 2005, 20(6):682-688.
- LU Cheng-ping. An introduction to the animal viruses in 8th Report of ICTV[J]. *Virologica Sinica*, 2005, 20(6):682-688. (in Chinese)
- [5] OHLINGER V F, HAAS B, MEYERS G, et al. Identification and characterization of the virus causing rabbit hemorrhagic disease[J]. *Journal of Virology*, 1990, 64(7):3331-3336.
- [6] ABRANTES J, VAN DER LOO W, LE PENDU J, et al. Rabbit haemorrhagic disease (RHD) and rabbit haemorrhagic disease virus (RHDV): a review[J]. *Veterinary Research*, 2012, 43:12.
- [7] PEREZ-FILGUEIRA D M, RESINO-TALAVAN P, CUBILLOS C, et al. Development of a low-cost, insect larvae-derived recombinant subunit vaccine against RHDV[J]. *Virology*, 2007, 364(2):422-430.
- [8] BOGA J A, CASAIS R, MARIN M S, et al. Molecular cloning, sequencing and expression in *Escherichia coli* of the capsid protein gene from rabbit haemorrhagic disease virus (Spanish isolate AST/89)[J]. *Journal of General Virology*, 1994, 75(9):2409-2413.
- [9] GUO H, ZHU J, TAN Y, et al. Self-assembly of virus-like particles of rabbit hemorrhagic disease virus capsid protein expressed in *Escherichia coli* and their immunogenicity in rabbits[J]. *Antiviral Research*, 2016, 131:85-91.
- [10] 王永山, 陆承平, 周宗安, 等. 原核表达的兔出血症病毒衣壳蛋白对兔的免疫保护效果[J]. 中国农业科学, 2004, 37(11):1677-1681.
- WANG Yong-shan, LU Cheng-ping, ZHOU Zong-an, et al. Protection of rabbit hemorrhagic disease virus by immunization with the recombinant capsid protein expressed in *E. coli*[J]. *Scientia Agricultura Sinica*, 2004, 37(11):1677-1681. (in Chinese)
- [11] 张帅, 谭菲菲, 王妍, 等. 兔出血症病毒 VP60 蛋白在杆状病毒表达系统中的表达优化[J/OL]. 中国动物传染病学报, <http://kns.cnki.net/kcms/detail/31.2031.s.20190422.2150.004.html>.
- ZHANG Shuai, TAN Fei-fei, WANG Yan, et al. Optimization of rabbit hemorrhagic virus vp60 protein expression in the baculovirus expression system [J/OL]. *Chinese Journal of Animal Infectious Diseases*, <http://kns.cnki.net/kcms/detail/31.2031.s.20190422.2150.004.html>. (in Chinese)
- [12] PARRA F, PRIETO M. Purification and characterization of a calicivirus as the causative agent of a lethal hemorrhagic disease in rabbits[J]. *Journal of Virology*, 1990, 64(8):4013-4015.
- [13] LAURENT S, VAUTHEROT J F, MADELAINE M F, et al. Recombinant rabbit hemorrhagic disease virus capsid protein expressed in baculovirus self-assembles into viruslike particles and induces protection[J]. *Journal of Virology*, 1994, 68(10):6794-6798.
- [14] MARIN M S, MARTIN ALONSO J M, et al. Immunogenic properties of rabbit haemorrhagic disease virus structural protein VP60 expressed by a recombinant baculovirus: an efficient vaccine[J]. *Virus Research*, 1995, 39(2-3):119-128.
- [15] MULLER C, ULRICH R, FRANZKE K, et al. Crude extracts of recombinant baculovirus expressing rabbit hemorrhagic disease virus 2 VLPs from both insect and rabbit cells protect rabbits from rabbit hemorrhagic disease caused by RHDV2[J]. *Archives of Virology*, 2019, 164(1):137-148.
- [16] NAGESHA H S, WANG L F, HYATT A D, et al. Self-assembly, antigenicity, and immunogenicity of the rabbit haemorrhagic disease virus (Czechoslovakian strain V-351) capsid protein expressed in baculovirus[J]. *Archives of Virology*, 1995, 140(6):1095-1108.
- [17] GROMADZKA B, SZEWCZYK B, KONOPA G, et al. Recombinant VP60 in the form of virion-like particles as a potential[J]. *Acta Biochimica Polonica*, 2006, 55(2):371-376.
- [18] ZHENG X, WANG S, ZHANG W, et al. Development of a VLP-based vaccine in silkworm pupae against rabbit hemorrhagic disease virus[J]. *International Immunopharmacology*, 2016, 40:164-169.
- [19] 王芳, 胡波, 任雪枫, 等. 兔出血症病毒衣壳蛋白在昆虫细胞中的表达及对家兔的免疫保护效果[J]. 畜牧兽医学报, 2008, 39(10):1382-1387.
- WANG Fang, HU Bo, REN Xue-feng, et al. Expression of the capsid protein of rabbit haemorrhagic disease virus in insect cells and its protective efficacy to rabbits[J]. *Acta Veterinaria et Zootechnica sinica*, 2008, 39(10):1382-1387. (in Chinese).
- [20] 严维巍, 崔治中, 王永坤. 在昆虫细胞中表达能自聚成病毒样颗粒的兔出血症病毒衣壳蛋白[J]. 病毒学报, 2004, 20(4):333-337.
- YAN Wei-wei, CUI Zhi-zhong, WANG Yong-kun. The capsid gene of Chinese isolate of rabbit hemorrhagic disease virus(RHDV) expressed in baculovirus can self-assemble into virus-like particles[J]. *Chinese Journal of Virology*, 2004, 20(4):333-337. (in Chinese)

(责任编辑 张文举)