



基于RdRp蛋白的兔出血症病毒感染与免疫鉴别 诊断ELISA方法的建立

朱 薇^{1,2,3,4}, 仇汝龙^{2,3,4}, 陈萌萌^{2,3,4}, 胡 波^{2,3,4}, 魏后军^{2,3,4}, 范志宇^{2,3,4}, 葛 雷^{2,3,4},
伍孟婷^{2,3,4}, 宋艳华^{1,2,3,4*}, 王 芳^{1,2,3,4*}

(1. 南京农业大学动物医学院, 南京 210095; 2. 江苏省农业科学院兽医研究所, 南京 210014; 3. 农业农村部兽用生物制品工程重点实验室, 南京 210014; 4. 兽用生物制品(泰州)国泰技术创新中心, 泰州 225300)

摘 要: 为建立区别兔出血症病毒(RHDV)感染与疫苗免疫的诊断ELISA方法, 本研究通过原核表达系统表达RHDV1和RHDV2 RdRp蛋白, 成功纯化获得这两种可溶性RdRp蛋白, 并以RdRp蛋白作为包被抗原, 建立检测抗RdRp血清抗体的间接ELISA方法。结果显示, 经纯化和酶切后, 获得不含标签蛋白的RdRp蛋白, 约为57 ku。经Western blot验证, 2种RdRp蛋白均与RHDV1或RHDV2感染血清发生特异性反应且无型别间差异。因此, 选择RHDV2-RdRp作为包被抗原, 包被浓度为 $2.5 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$; 最佳血清稀释度为1:100, 孵育时间为 37°C 60 min; 酶标抗体的最佳稀释度为1:10 000; 临界值为0.225。经验证, 该ELISA方法具有较好的特异性和敏感性; 其批内、批间重复性试验变异系数均小于10%, 具有较好的稳定性。通过对RHDV攻毒后样本及基因工程疫苗免疫后血清样本进行检测。结果显示, RHDV感染后可以诱导机体产生针对RdRp蛋白的血清抗体, 而基因工程疫苗免疫后血清检测为阴性。本研究基于RHDV-RdRp蛋白所建立的ELISA方法可以对基因工程疫苗免疫和RHDV感染进行区分, 为筛查RHDV的临床感染提供有效的检测方法。

关键词: 兔出血症病毒; RNA依赖性RNA聚合酶(RdRp); 间接ELISA

中图分类号: S852.61

文献标志码: A

文章编号: 0366-6964(2026)01-0414-09

Establishment and Application of Indirect ELISA Method based on RHDV RdRp Protein

ZHU Wei^{1,2,3,4}, QIU Rulong^{2,3,4}, CHEN Mengmeng^{2,3,4}, HU Bo^{2,3,4}, WEI Houjun^{2,3,4}, FAN Zhiyu^{2,3,4},
GE Lei^{2,3,4}, WU Mengting^{2,3,4}, SONG Yanhua^{1,2,3,4*}, WANG Fang^{1,2,3,4*}

(1. College of Veterinary Medicine, Nanjing Agricultural University, Nanjing 210095, China;

2. Institute of Veterinary Medicine, Jiangsu Academy of Agricultural Sciences, Nanjing 210014, China;

3. Key Laboratory of Veterinary Biological Products Engineering, Ministry of Agriculture and Rural Affairs, Nanjing 210014, China; 4. Veterinary Biological Products (Taizhou) Guotai Technology Innovation Center, Taizhou 225300, China)

Abstract: To establish a diagnostic ELISA method for distinguishing RHDV infection and vaccination, the RdRp proteins of RHDV1 and RHDV2 were expressed by prokaryotic expression system. And these two soluble RdRp proteins were successfully purified. RdRp protein was used as

收稿日期: 2024-09-25

基金项目: 现代农业产业技术体系建设专项资金(CARS-43-C-1)

作者简介: 朱 薇, 硕士生, 主要从事兔瘟病毒致病机制研究, E-mail: 1276306080@qq.com; 仇汝龙, 助理研究员, 硕士, 主要从事家兔呼吸道疾病致病机制及防控技术研究, E-mail: 307821498@qq.com。朱薇与仇汝龙为同等贡献作者

* 通信作者: 王 芳, 主要从事家兔重要疫病致病机制及防控技术研究, E-mail: rwangfang@126.com; 宋艳华, 主要从事家兔重要疫病致病机制及防控技术研究, E-mail: songyanhua8507@126.com

coated antigen, an indirect ELISA method was established to detect serum antibody against RdRp. After purification and restriction enzyme digestion, the RdRp protein without tag was obtained with a size of 57 ku. Western blot analysis confirmed that both RdRp proteins reacted specifically with RHDV1 or RHDV2 infection sera. And there was no difference between the types of RdRp proteins. So RHDV2-RdRp was selected as a coating antigen at a coating concentration of $2.5 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$. The optimal serum dilution was 1:100 and the incubation was 60 min at 37°C . The optimal dilution of enzyme-labeled antibody was 1:10 000. The cut-off value was 0.225. It was proved that the ELISA method has good specificity and sensitivity. The coefficient of variation in both intra-batch and inter-batch repeatability test was less than 10%, which indicating a good stability. The samples after RHDV challenge and the serum samples after genetic engineering vaccine immunization were tested, and the results showed that RHDV infection can induce the production of serum antibodies against RdRp protein, but the serum tests after genetic engineering vaccine immunization were negative. In this study, the ELISA method based on RHDV-RdRp protein can distinguish between genetic engineering vaccine immunity and RHDV infection, which provides an effective detection method for clinical screening of RHDV infection.

Keywords: RHDV; RNA-dependent RNA polymerase (RdRp); indirect ELISA

* **Corresponding authors:** WANG Fang, E-mail: rwangfang@126.com; SONG Yanhua, E-mail: songyanhua8507@126.com

兔出血症(rabbit haemorrhagic disease, RHD)是一种兔的急性、烈性、高度致死性传染病,由兔出血症病毒(rabbit haemorrhagic disease virus, RHDV)感染引起^[1-2],以呼吸系统出血,急性肝坏死,各实质器官水肿、淤血、出血为主要特征,其发病率及致死率较高^[3]。1984年,该病在中国首次出现,病原为RHDV1型毒株,造成数亿只兔子死亡,给我国养兔产业发展带来严重损失^[4]。2010年,法国报道检出一种新的RHDV变异株,与当地的RHDV流行毒株基因型不同,被命名为RHDV2^[5-6]。2020年4月,我国四川省兔场暴发严重兔出血症疫情,经病原分离鉴定,确认为RHDV2型毒株^[1,7]。

RHDV为杯状病毒科、兔病毒属的一种无囊膜单链RNA病毒^[8],呈二十面体对称结构^[9-10]。其基因组RNA全长约7.5 kb,共包含两个开放阅读框(ORFs)^[11]。ORF1编码一个多聚蛋白,水解后形成p16、p23、2c样解旋酶(p37)、p29、3c样蛋白酶(p15)、VPg(p13)、RNA依赖RNA聚合酶(p58)7种非结构蛋白和衣壳蛋白VP60^[12-13]。RHDV分为GI.1(RHDV1)^[14]和GI.2(RHDV2)^[6]两种基因型,两者之间交叉反应性较低^[15-17]。我国的主要流行毒株为RHDVa(GI.1a)型和RHDV2(GI.2)型^[1]。与RHDV1相比,RHDV2对不同年龄段的家兔、野兔均具有感染性,对养兔业的发展危害更大^[18]。

RdRp蛋白,即RNA依赖RNA聚合酶(p58),约57 ku,在病毒感染和复制中有着重要作用^[13,19]。研究者通过大肠杆菌对RdRp编码序列的表达和研究发现,该蛋白具有RNA依赖性RNA聚合酶活性^[20-21]。目前,对于RdRp,大多数研究集中在酶活性的探究及酶抑制剂的筛选^[21-23]。然而,在RHDV感染期间宿主对于RdRp的免疫反应尚未被研究。因此,本研究利用原核表达系统表达并纯化RdRp蛋白,建立间接ELISA检测方法,为分析RdRp蛋白在兔体内的抗体应答情况及RHDV的流行病学调查、疫情监测提供辅助方法。

1 材料与方法

1.1 试验材料

TB1感受态细胞;pMal-c6T原核表达载体;RHDV标准阳性血清(RHDV1-NJ2009株攻毒后血清)、阴性血清(SPF级兔血清);抗RdRp蛋白高免兔阳性血清;RHDV1-NJ2009株病毒液攻击30日龄幼兔采集的攻毒后14 d、28 d血清样本及攻毒前对照血清各3份;RHDV2 SC株VP60基因工程疫苗^[16]免疫14 d血清样本共26份;纯化的RHDV1-WF-VP60和RHDV2-SC-VP60蛋白均由江苏省农业科学院兽医研究所保存。

1.2 主要试剂

增强型 ECL 化学发光检测试剂盒(诺唯赞生物科技有限公司);SDS-PAGE 凝胶快速试剂盒(上海万生昊天生物公司);Marker(北京全式金生物技术股份有限公司);MBP-直链淀粉树脂、Ni Resin(New England Biolabs)。

1.3 RdRp 序列的同源性分析

为探究 RdRp 蛋白基因序列在兔病毒属中的同源性,本研究使用 DNASTar 软件中的 MegAlign 分析软件,采用 Clustal W 法对 18 株兔病毒属分离株的 RdRp 的氨基酸序列进行同源性分析。分离株信息如表 1 所示。

表 1 18 株兔病毒属分离株的信息表

Table 1 Information table of 18 rabbit virus isolates

序号 Number	株系 Strain	登录号 Accession No.	基因型 Gene type	国家 Country	分离年份 Isolation year
1	AUS/NSW/CAT_2-12/2007	KX357674.1	GI. 4	澳大利亚	2007
2	AUS/NSW/LWR-1/2010	KX357676.1	GI. 4	澳大利亚	2010
3	AUS/VIC/BM-60/2009	KX357705.1	GI. 4	澳大利亚	2009
4	CD/China	AY523410.1	GI. 1	中国	2004
5	GI. 3/O cun/FR/2006/06-11	MN737115.1	GI. 3	法国	2006
6	GI. 3/Ocun/FR/2008/08-133	MN746289.1	GI. 3	法国	2008
7	GI. 3/O cun/FR/2009/09-48	MN737116.1	GI. 3	法国	2009
8	HB	KY437668.1	GI. 1	中国	2016
9	Italy-90	EU003579.1	GI. 1	意大利	1990
10	LIB	MN853659.1	GI. 2	波兰	2018
11	NJ-2009	HM623309.1	GI. 1	中国	2009
12	RHDV2-NL2016	MN061492.1	GI. 2	荷兰	2016
13	RHDV-V351	U54983.1	GI. 1	捷克	1996
14	RHDV-N11	KM878681.1	GI. 2	西班牙	2011
15	Rij06-12	KP129395.1	GI. 2	西班牙	2014
16	RHDV2-SC2020/0401	MT586027.1	GI. 2	中国	2020
17	SOS404	MG763950.1	GI. 2	葡萄牙	2015
18	ZD0	KU882095.1	GI. 1	波兰	2000

1.4 重组 RdRp 蛋白的原核表达及纯化

基于 RHDV-NJ2009 株菌株(GenBank 登录号:HM623309.1)、RHDV2-SC2020 株菌株(GenBank 登录号:MT586027.1)的 RdRp 的基因序列,构建重组质粒 pMal-c6T-RHDV1-RdRp 和 pMal-c6T-RHDV2-RdRp,交由南京金斯瑞生物公司合成并鉴定。将鉴定后的重组质粒转化入 TB1 感受态细胞并筛选出阳性重组菌。将菌液以 5% 的比例加入含有氨苄青霉素的 LB 培养基中,37℃,振荡培养至菌液 OD_{600nm} 约为 0.5 时,加入终浓度为 0.3 mmol·L⁻¹ 的 IPTG,27℃诱导表达 6 h。通过 SDS-PAGE 对表达产物进行可溶性分析。收集菌液并进行超声破碎,12 000×g 离心 15 min,去除不溶物后,使用直链淀粉树脂对产物进行亲和层析纯化^[24]。

1.5 重组蛋白的酶切、纯化与鉴定

麦芽糖结合蛋白(MBP)能与兔血清发生非特异性反应,为避免干扰试验,使用 TEV 酶对 MBP 蛋白进行切除。然后使用镍柱纯化获得 RdRp 蛋白。使用 RHDV1 和 RHDV2 感染血清分别对表达的 RHDV1-RdRp 和 RHDV2-RdRp 蛋白进行交叉 Western blot 反应。

1.6 间接 ELISA 方法的建立与条件优化

间接 ELISA 方法按上述程序对 ELISA 条件进行优化^[25]。具体如下,以纯化后的 RdRp 蛋白为包被抗原,以制备的 RdRp 兔多克隆抗体作为阳性参考血清。按照棋盘滴定法,使用包被液将 RdRp 蛋白分别按照 10、5、2.5、1.25、0.625 和 0.312 5 μg·mL⁻¹ 的浓度进行稀释并包被酶标孔;用 5% 脱脂乳进行封

闭;用 5% 脱脂乳对阴、阳性参考血清按照 1:50、1:100、1:200、1:400 的比例进行倍比稀释,37℃培养 1 h;PBST 洗涤 3 次后,加入 100 μ L 的 1:10 000 稀释的 HRP-羊抗兔 IgG 抗体,37℃培养 1 h;加入 100 μ L TMB 显色液室温孵育 10 min;加入 50 μ L 终止液终止反应。结果判断标准:以阳性反应孔 OD_{450 nm} 值接近 1,阴性反应孔 OD_{450 nm} 值接近 0.1, P/N 值最大为最佳反应条件。包被抗原和血清的稀释条件确定后,对封闭剂、血清作用时间、TMB 显色时间等 ELISA 反应条件进行优化。使用单因素方差分析(ANOVA)及双因素方差分析(Two-way ANOVA)对 ELISA 条件优化结果进行比较。

1.7 间接 ELISA 的临界值确定

为确定阳性样本和阴性样本的临界值,采用上述优化的间接 ELISA 方法对 40 份 RHDV 阴性样本进行检测。判定标准:根据 40 份样本的检测结果,计算出 40 份样本的平均值 $\bar{X}$ 及标准差 SD。以样本检测结果 OD_{450 nm} $\geq \bar{X} + 3SD$ 判断为阳性;以样本检测结果 OD_{450 nm} $< \bar{X} + 3SD$ 则判断为阴性。

1.8 特异性试验

用上述建立的间接 ELISA 方法对兔多杀性巴氏杆菌、兔出血症病毒、兔肠炎沙门菌和兔轮状病毒的阳性血清样本进行检测,以制备的 RHDV 高免血清作为阳性对照,SPF 兔血清作为阴性对照,重复测定 3 次,以评估该方法的特异性。

1.9 敏感性试验

用上述建立的间接 ELISA 方法,将标准阳性参考血清按 1:100、1:200、1:400、1:800、1:1 600、1:3 200、1:6 400、1:12 800 倍比稀释,设置阴性对照,测定其 OD_{450 nm} 值。同时利用相同稀释度的血清进行 Western blot 作为对比试验,以评价建立的 ELISA 检测方法的敏感性。

1.10 重复性试验

选取相同批次和不同批次包被的酶标板分别对 3 份 RHDV 阳性血清、3 份 RHDV 阴性血清进行检测,每份样品作 3 个重复孔,测定 OD_{450 nm} 值并计算批内和批间试验变异系数,评估该方法的稳定性。

1.11 RHDV RdRp 蛋白的免疫反应性分析

以 VP60 蛋白和 RdRp 蛋白为包被抗原,采集感染 RHDV1 的家兔 14 d 及 28 d 的血清和 RHDV2 SC 株 VP60 基因工程疫苗免疫后 14 d 的血清,并进

行检测。分析疫苗免疫及 RHDV1 感染后动物机体内的 RdRp 蛋白的抗体应答情况。

2 结 果

2.1 RHDV-RdRp 氨基酸序列的同源性分析结果

6 株 GI.1 型毒株间 RdRp 蛋白的氨基酸序列同源率为 97.3%~99.0%;6 株 GI.2 型毒株间 RdRp 蛋白的氨基酸序列同源率为 97.5%~99.8%;GI.1 与 GI.2 型毒株间的同源率为 96.9%~97.5%。综上所述,GI.1、GI.2 型 RHDV 的 RdRp 的氨基酸序列在不同基因型之间具有较好的保守性。

2.2 RdRp 蛋白的表达、纯化与酶切鉴定

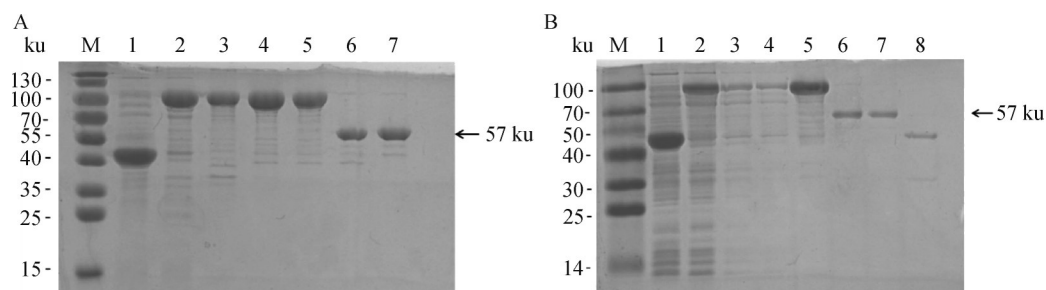
重组蛋白 RHDV1-RdRp、RHDV2-RdRp 可成功表达并纯化,分子量约 103 ku。经酶切后,分子量约为 57 ku,与预期分子量一致(图 1)。Western blot 结果表明,RHDV1-RdRp 蛋白、RHDV2-RdRp 蛋白均与 RHDV1 或 RHDV2 感染血清发生特异性反应,且无型别间差异,表明感染后机体内产生针对 RdRp 蛋白的特异性抗体(图 2)。综上所述,2 种 RdRp 蛋白均具有良好的反应原性,考虑到序列的保守性和 Western blot 结果,选择 RHDV2-RdRp 蛋白建立 ELISA 检测方法。

2.3 ELISA 反应条件优化结果

通过点阵法筛选 RdRp 蛋白的最佳抗原包被浓度和血清稀释度,结果显示 RHDV2-RdRp 蛋白包被浓度为 2.5 μ g $\cdot$ mL⁻¹,血清稀释度为 1:100 时,其阳性血清 OD 值接近于 1,阴性血清 OD 值接近 0.1, P/N 值最大。因此,确定抗原的最佳包被浓度为 2.5 μ g $\cdot$ mL⁻¹,血清稀释度为 1:100。进一步对筛选封闭条件的 ELISA 反应结果进行分析,显示封闭 1 h 和 2 h 的结果无明显差异,根据 P/N 值最大的原则,选取 5% 脱脂乳封闭 2 h 为最优封闭条件。并确定最佳血清作用条件为 37℃孵育 60 min;二抗的最佳作用条件为 1:10 000 倍稀释后作用 30 min;TMB 室温显色 15 min 和显色 20 min 的反应结果无显著差异,为避免显色时间过长对反应结果的影响,选取室温显色 15 min 作为 TMB 显色的最佳条件。

2.4 临界值的确定

利用建立的 RdRp ELISA 方法对 40 份阴性血清进行检测,40 份阴性血清的平均值为 0.121 8,标准差(SD)为 0.034 3(表 1)。以 $\bar{X} + 3SD = 0.225$ 为本 ELISA 的判定标准,即待检样品 OD_{450 nm} 值 ≥ 0.225 判定阳性,OD_{450 nm} 值 < 0.225 判定阴性。

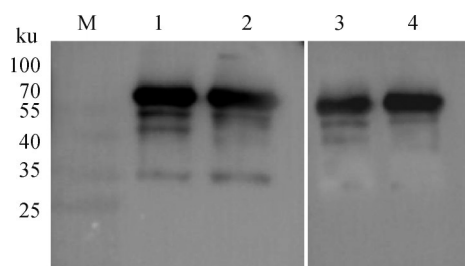


A. RHDV1-RdRp 蛋白的酶切及纯化: M. Marker; 1. 空载诱导对照; 2. 纯化前上清; 3. 包涵体; 4~5. 纯化后重组 RdRp 蛋白; 6~7. 酶切纯化后 RdRp 蛋白。B. RHDV2-RdRp 蛋白的酶切及纯化: M. Marker; 1. 空载诱导对照; 2. 纯化前上清; 3. 流穿; 4. 洗杂; 5. 纯化后重组 RdRp 蛋白; 6~7. 酶切纯化后 RdRp 蛋白; 8. 洗脱的 MBP 蛋白

A. Digestion and purification of RHDV1-RdRp protein: M. Marker; 1. No-load induction control; 2. Supernatant before purification; 3. Inclusion body; 4-5. Recombinant RdRp protein after purification; 6-7. RdRp protein after purification by enzyme digestion. B. Digestion and purification of RHDV2-RdRp protein: M. Marker; 1. No-load induction control; 2. Supernatant before purification; 3. flow through; 4. Cleaning; 5. Recombinant RdRp protein after purification; 6-7. RdRp protein after purification by enzyme digestion; 8. Eluted MBP protein

图1 重组 RdRp 蛋白的酶切后纯化结果

Fig. 1 Purification results of recombinant RdRp protein after digestion



M. Marker; 1~2. RHDV1-RdRp 和 RHDV2-RdRp 蛋白与 RHDV1 感染阳性血清反应结果; 3~4. RHDV1-RdRp 和 RHDV2-RdRp 蛋白与 RHDV2 感染阳性血清反应结果

M. Marker; 1-2. Western blot identification results of RHDV1-RdRp and RHDV2-RdRp proteins with RHDV1 positive infection sera; 3-4. Western blot identification results of RHDV1-RdRp and RHDV2-RdRp proteins with RHDV2 positive infection sera

图2 RHDV1-RdRp 和 RHDV2-RdRp 蛋白与感染阳性血清的 Western blot 鉴定结果

Fig. 2 Western blot identification results of RHDV1-RdRp and RHDV2-RdRp proteins with positive infection sera

2.5 特异性鉴定结果

采用上述所建立的 ELISA 方法对兔多杀性巴氏杆菌、兔出血症病毒、兔肠炎沙门菌和兔轮状病毒的阳性血清进行检测。除 RHDV 感染血清检测结果为阳性外,其余兔病原阳性血清反应结果均小于临界值,表明该方法具有较好的特异性。

2.6 敏感性试验结果

采用上述所建立的 RHDV-RdRp ELISA 方法对倍比稀释后的 RHDV 标准阳性血清进行检测,同时利用相同稀释度血清进行 Western blot 作为比较试验(图 3)。作为对比试验的 Western blot 结果显示,当阳性血清稀释度为 1:6 400 时,出现了较弱的目的条带(图 3B)。ELISA 结果显示,当阳性血清稀释度为 1:6 400 时,其 $OD_{450\text{ nm}}$ 值仍大于临界值(图 3A),判定为阳性,表明建立的 ELISA 方法具有较好的敏感性。

2.7 重复性试验结果

重复性试验结果显示,该方法的批内变异系数为 2.09%~7.16%;批间变异系数为 2.07%~7.72%,两者均小于 10%,表明本研究所建立的 RHDV-RdRp ELISA 方法具有较好的稳定性。

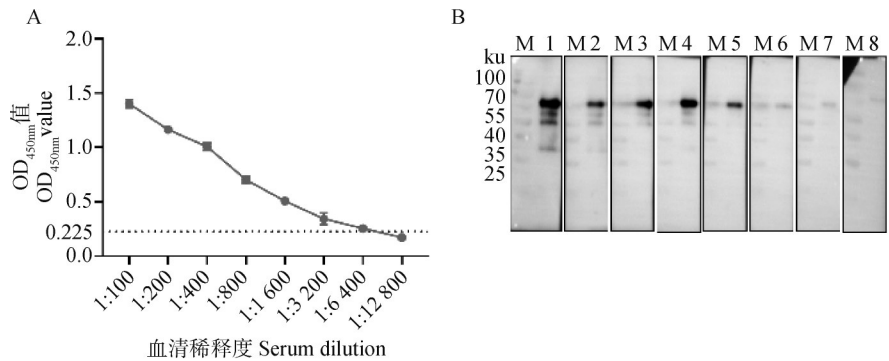
2.8 RHDV RdRp 蛋白的免疫反应性分析

使用本研究所建立的间接 ELISA 方法对 RHDV RdRp 蛋白的免疫反应性进行分析。结果显示,RHDV 攻毒感染 14、28 d 后可以检测到抗 RdRp 蛋白的 IgG 抗体(图 4),抗体效价分别是 1:400 和 1:1 600。对 26 份 RHDV2 SC 株 VP60 基因工程疫苗免疫后血清抗体进行检测,反应结果均为阴性(图 5)。结果表明,RHDV 感染后可以诱导机体产生针对 RdRp 蛋白的 IgG 抗体反应,而基因工程疫苗免疫后不产生。

表 1 RdRp ELISA 临界值的确定

Table 1 Determination of critical values of RdRp ELISA

编号 Number	OD _{450 nm} 值 OD _{450 nm} value	编号 Number	OD _{450 nm} 值 OD _{450 nm} value	编号 Number	OD _{450 nm} 值 OD _{450 nm} value	编号 Number	OD _{450 nm} 值 OD _{450 nm} value
1	0.130 9	11	0.096 5	21	0.191 9	31	0.070 4
2	0.115 7	12	0.109 8	22	0.072 5	32	0.102 5
3	0.115 7	13	0.140 2	23	0.199 1	33	0.117 6
4	0.156 9	14	0.116 9	24	0.081 3	34	0.138 4
5	0.143 6	15	0.081 8	25	0.107 2	35	0.071 9
6	0.187 0	16	0.103 5	26	0.158 6	36	0.125 7
7	0.168 9	17	0.095 7	27	0.117 9	37	0.178
8	0.170 4	18	0.109 0	28	0.101 8	38	0.149 4
9	0.084 1	19	0.117 1	29	0.098 9	39	0.134 5
10	0.116 2	20	0.071 3	30	0.090 0	40	0.136 8

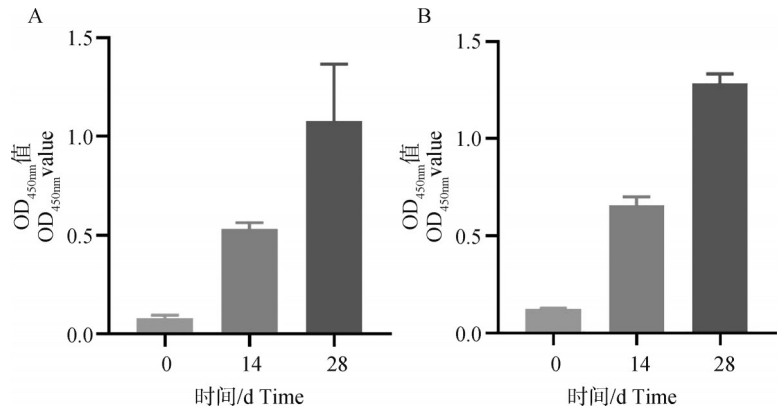


A. RHDV-RdRp ELISA 敏感试验结果;B. 泳道 M1~M8 为 1:100~1:12 800 不同血清稀释度与 RHDV-RdRp 的 Western blot 反应结果

A. Results of RHDV-RdRp ELISA sensitivity test; B. Lanes M1 to M8 show the Western blot reaction results of different serum dilutions ranging from 1:100 to 1:12 800 with RHDV-RdRp protein

图 3 RHDV- RdRp ELISA 和 Western blot 敏感试验结果

Fig. 3 Results of RHDV-RdRp ELISA and Western blot sensitivity test



A. RHDV1 攻毒 0、14、28 d 抗 RdRp 蛋白血清抗体的检测结果;B. RHDV1 攻毒 0、14、28 d 抗 VP60 蛋白血清抗体的检测结果
A. Detection results of serum antibodies against RdRp protein after 0, 14 and 28 days of RHDV1 challenge; B. Detection results of serum antibodies against VP60 protein after 0, 14 and 28 days of RHDV1 challenge

图 4 RHDV1 攻毒后不同时间段的血清检测结果

Fig. 4 Serum detection results at different time periods after RHDV1 challenge

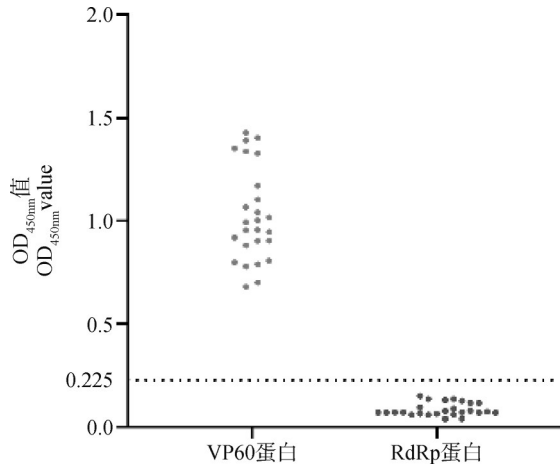


图5 VP60蛋白、RdRp蛋白与RHDV2 SC株VP60基因工程疫苗免疫后血清的反应结果

Fig. 5 Results of reaction between VP60 protein, RdRp protein and serum after immunization with RHDV2-SC strain VP60 genetic engineering vaccine

3 讨论

兔出血症是威胁兔产业发展的重大疫病。国内外研究者通过病毒分离鉴定、致病机制和疫苗研制等多个方面对RHDV进行系统研究。由于缺乏适合RHDV感染和复制的体外细胞培养系,使得病毒的致病机制、免疫机制和毒理学等研究进展较缓慢。目前防控RHDV感染的有效方法是疫苗免疫。使用的疫苗包括组织灭活苗和基于VP60蛋白所制备的基因工程疫苗^[16,26-27]。VP60蛋白是RHDV的保护性抗原,同时也是设计RHDV基因工程疫苗和开发基于免疫的预防、治疗和诊断技术的靶蛋白,疫苗免疫和病毒感染均能检测到抗VP60抗体的存在^[27-30]。目前,尚无关于RHDV非结构蛋白抗体应答的研究报道,也无可用于区分疫苗免疫和病毒感染的抗体检测方法。

本研究通过对RHDV1-RdRp和RHDV2-RdRp的氨基酸序列进行同源性分析及特异性鉴定,发现两种蛋白氨基酸序列的同源性达到96.9%;且两种蛋白与RHDV1阳性血清和RHDV2阳性血清均能够发生特异性反应,组别间无显著差异;考虑到目前国内RHDV2型广泛流行且有取代RHDV1的趋势,因此本研究选用RHDV2-RdRp建立了检测RdRp蛋白抗体的ELISA方法。

RHDV2对所有年龄段兔均易感,且攻毒死亡率高达100%^[7],而RHDV1对2月龄以上兔感染并

致死,2月龄以下幼兔感染不致死,病毒能够在兔体内产生低水平复制,因此,本研究利用RHDV1攻毒30日龄断奶仔幼兔,发现幼兔可以存活,进而获得针对RdRp蛋白的阳性血清。通过对RHDV感染后和基因工程疫苗免疫后兔血清样本进行检测,发现当RHDV1感染机体后,可产生针对RHDV-RdRp蛋白的抗体,而基因工程疫苗免疫后不能刺激机体产生抗RdRp蛋白抗体。综上所述,本研究所建立的RHDV-RdRp ELISA方法既可用于检测RHDV1-RdRp蛋白抗体,也可用于检测RHDV2-RdRp蛋白抗体。基于样本分析,该方法可以区分基因工程疫苗免疫和病毒感染,具有特异性好、灵敏度高优点,为临床监测RHDV感染提供有效方法。

4 结论

本研究成功表达和纯化可溶性RdRp蛋白并建立ELISA检测方法,该方法可用于检测不同基因型RdRp蛋白的抗体应答情况,并且能够对RHDV基因工程疫苗免疫抗体和病毒感染抗体进行区分,为进一步研究RHDV-RdRp蛋白的抗体应答规律及疫苗免疫后的临床筛查提供方法。

参考文献(References):

- [1] HU B, WEI H, FAN Z, et al. Emergence of rabbit haemorrhagic disease virus 2 in China in 2020[J]. *Vet Med Sci*, 2021, 7(1): 236-239.
- [2] LIU SJ, XUE HP, PU BQ, et al. A new viral disease in rabbit[J]. *Anim Husb Vet Med*, 1984, 16: 253-255.
- [3] ABRANTES J, VAN DER LOO W, LE PENDU J, et al. Rabbit haemorrhagic disease (RHD) and rabbit haemorrhagic disease virus (RHDV): a review[J]. *Vet Res*, 2012, 43(1): 12.
- [4] LE GALL-RECULE G, ZWINGELSTEIN F, LAURENT S, et al. Phylogenetic analysis of rabbit haemorrhagic disease virus in France between 1993 and 2000, and the characterisation of RHDV antigenic variants[J]. *Arch Virol*, 2003, 148(1): 65-81.
- [5] LE GALL-RECULE G, ZWINGELSTEIN F, BOUCHER S, et al. Detection of a new variant of rabbit haemorrhagic disease virus in France[J]. *Vet Rec*, 2011, 168(5): 137-138.
- [6] LE GALL-RECULE G, LAVAZZA A,

- MARCHANDEAU S, et al. Emergence of a new lagovirus related to rabbit haemorrhagic disease virus [J]. *Vet Res*, 2013, 44(1):81.
- [7] 魏后军, 胡 波, 范志宇, 等. 兔出血症病毒 2 型的分离鉴定与序列分析[J]. *江苏农业学报*, 2020, 36(02): 404-409.
- WEI H J, HU B, FAN Z Y, et al. Isolation, identification and sequence analysis of rabbit hemorrhagic disease virus type 2 [J]. *Jiangsu Journal of Agricultural Sciences*, 2020, 36(2):404-409. (in Chinese)
- [8] XU Z J, CHEN W X. Viral haemorrhagic disease in rabbits: a review [J]. *Vet Res Commun*, 1989, 13(3): 205-212.
- [9] SMID B, VALICEK L, STEPANEK J, et al. Experimental transmission and electron microscopic demonstration of the virus of haemorrhagic disease of rabbits in Czechoslovakia [J]. *Zentralbl Veterinarmed B*, 1989, 36(3):237-240.
- [10] ALEXANDROV M, PESHEV R, BOZHKO V S, et al. Electron- and immunoelectron-microscopic investigation on the rabbit haemorrhagic disease virus [J]. *Comp Immunol Microbiol Infect Dis*, 1993, 16(1):21-27.
- [11] ABRANTES J, LOPES A M. A Review on the methods used for the detection and diagnosis of rabbit hemorrhagic disease virus (RHDV) [J]. *Microorganisms*, 2021, 9(5).
- [12] SMERTINA E, HALL R N, URAKOVA N, et al. Calicivirus non-structural proteins: Potential functions in replication and host cell manipulation [J]. *Front Microbiol*, 2021, 12:712710.
- [13] ZHU J, MIAO Q, GUO H, et al. Nucleolin interacts with the rabbit hemorrhagic disease virus replicase RdRp, nonstructural proteins p16 and p23, playing a role in virus replication [J]. *Virol Sin*, 2022, 37(1): 48-59.
- [14] CAPUCCI L, FALLACARA F, GRAZIOLI S, et al. A further step in the evolution of rabbit hemorrhagic disease virus: the appearance of the first consistent antigenic variant [J]. *Virus Res*, 1998, 58(1-2): 115-126.
- [15] O'CONNOR T W, READ A J, HALL R N, et al. Immunological cross-protection between different rabbit hemorrhagic disease viruses-implications for rabbit biocontrol and vaccine development [J]. *Vaccines (Basel)*, 2022, 10(5):666.
- [16] 宋艳华, 胡 波, 范志宇, 等. 兔出血症病毒 2 型 SC 株 VP60 基因工程疫苗研制及其与传统兔出血症病毒疫苗的交叉保护作用 [J]. *江苏农业科学*, 2022, 50(16): 50-54.
- SONG Y H, HU B, FAN Z Y, et al. Development of VP60 genetically engineered vaccine of rabbit hemorrhagic virus type 2 SC strain and its cross-protection with traditional rabbit hemorrhagic virus vaccine [J]. *Jiangsu Agricultural Sciences*, 2022, 50(16):50-54. (in Chinese)
- [17] PATEL K K, STRIVE T, HALL R N, et al. Cross-protection, infection and case fatality rates in wild European rabbits experimentally challenged with different rabbit haemorrhagic disease viruses [J]. *Transbound Emerg Dis*, 2022, 69(5):e1959-e1971.
- [18] 范志宇, 陈萌萌, 胡 波, 等. 我国首株兔出血症病毒 2 型的致病性及病理学初步研究 [J]. *江苏农业科学*, 2020, 48(11):143-147.
- FAN Z Y, CHEN M M, HU B, et al. The primary research of pathogenicity and pathological observation of rabbit hemorrhagic disease virus 2 in China [J]. *Jiangsu Agricultural Sciences*, 2020, 48(11):143-147. (in Chinese)
- [19] HUKOWSKA-SZEMATOWICZ B. Genetic variability and phylogenetic analysis of *Lagovirus europaeus* strains GI. 1 (RHDV) and GI. 2 (RHDV2) based on the RNA-dependent RNA polymerase (RdRp) coding gene [J]. *Acta Biochim Pol*, 2020, 67(1):111-122.
- [20] LOPEZ VAZQUEZ A L, MARTIN ALONSO J M, PARRA F. Characterisation of the RNA-dependent RNA polymerase from Rabbit hemorrhagic disease virus produced in *Escherichia coli* [J]. *Arch Virol*, 2001, 146(1):59-69.
- [21] VAZQUEZ A L, MARTIN ALONSO J M, CASAIS R, et al. Expression of enzymatically active rabbit hemorrhagic disease virus RNA-dependent RNA polymerase in *Escherichia coli* [J]. *J Virol*, 1998, 72(4):2999-3004.
- [22] URAKOVA N, NETZLER N, KELLY A G, et al. Purification and biochemical characterisation of rabbit calicivirus RNA-dependent RNA polymerases and identification of non-nucleoside inhibitors [J]. *Viruses*, 2016, 8(4):100.

- [23] BEKHEIT M S, PANDA S S, GIRGIS A S. Potential RNA-dependent RNA polymerase (RdRp) inhibitors as prospective drug candidates for SARS-CoV-2[J]. *Eur J Med Chem*, 2023, 252:115292.
- [24] SALMEN W. Positive and negative affinity chromatography to purify norovirus P-domain protein [J]. *Methods Mol Biol*, 2022, 2466:83-92.
- [25] JIN J, BAI Y, ZHANG Y, et al. Establishment and characterization of a novel indirect ELISA method based on ASFV antigenic epitope-associated recombinant protein [J]. *Int J Biol Macromol*, 2023, 253 (Pt 7) : 127311.
- [26] 范志宇, 胡 波, 魏后军, 等. 近年我国兔瘟流行特点分析与疫苗研究动态[J]. 中国养兔, 2012(6):32-34.
FAN Z Y, HU B, DAI H J, et al. Epidemic characteristics of rabbit viral plague hemorrhagic septicemia and research progression of vaccine in China in recent years[J]. *Chinese Journal of Rabbit Farming*, 2012(6) 32-34. (in Chinese)
- [27] DALTON K P, ALVARADO C, REYTOR E, et al. Chimeric VLPs Bearing VP60 from two serotypes of rabbit haemorrhagic disease virus are protective against both viruses[J]. *Vaccines (Basel)*, 2021, 9(9):1005.
- [28] PLANA-DURAN J, BASTONS M, RODRIGUEZ M J, et al. Oral immunization of rabbits with VP60 particles confers protection against rabbit hemorrhagic disease[J]. *Arch Virol*, 1996, 141(8):1423-1436.
- [29] XIA T, LU X, KONG D, et al. Screening optimal DC-targeting peptide to enhance the immune efficacy of recombinant *Lactobacillus* expressing RHDV VP60 [J]. *Virulence*, 2024, 15(1):2368080.
- [30] YUAN D, QU L, LIU J, et al. DNA vaccination with a gene encoding VP60 elicited protective immunity against rabbit hemorrhagic disease virus [J]. *Vet Microbiol*, 2013, 164(1-2):1-8.

(编辑 范子娟)