

## 牛冠状病毒 HE 基因重组株及其制备的灭活疫苗和应用

### 技术领域

本发明属于病毒分离与应用技术领域,具体涉及一株牛冠状病毒 HE 基因重组株及其制备的灭活疫苗和应用。

### 背景技术

牛冠状病毒(BovineCoronavirus, BCoV)于 1972 年由美国 Stair 和 Mebus 等在腹泻奶牛的粪便中发现,证明是导致奶牛腹泻的重要病原之一(Jonsson E, Conway P. Probiotics for pigs[J]. Springer Netherlands, 1992.)。1990 年,姚火春等在犊牛腹泻中发现犊牛冠状病毒的存在,并表明犊牛冠状病毒可能是引起犊牛腹泻的重要病因(姚火春,杜念兴. 牛冠状病毒的血清流行病学调查[J]. 南京农业大学学报, 1990, 13(2):117-121.)。牛冠状病毒能够引起新生犊牛腹泻、成年牛冬季痢疾和呼吸道疾病,该病毒在世界范围内流行,给养牛业造成了巨大的经济损失。

目前,对于牛冠状病毒病的防控没有特别有效的防控手段,接种疫苗是预防牛冠状病毒的最好、最直接的方法。最新研究表明,牛冠状病毒 HE 基因的酯酶和凝集素结构域之间的重组事件发生频率很高,这些重组毒株在我国奶牛中普遍存在(Keha Abi, Xue Luo, Yan Shen, et al. Prevalence of a novel bovine coronavirus strain with a recombinant hemagglutinin/esterase gene in dairy calves in China.[J]. Transboundary and emerging diseases, 2019.)。HE 基因的重组可能会导致对牛冠状病毒的抗原性发生改变。目前市售的疫苗都是以没有发生重组事件的 Mebus 株为原型毒株设计制造的,这可能导致对我国牛冠状病毒流行株无法产生好的保护效果,所以,以 HE 基因发生重组的牛冠状病毒制备灭活

疫苗，对牛冠状病毒病的预防有重要意义。

## 发明内容

针对现有技术存在的问题，本发明提供一株牛冠状病毒 HE 基因重组株及其制备的灭活疫苗和应用。本发明的技术方案为：

第一方面，本发明提供了一株牛冠状病毒 HE 基因重组株，命名为 BCoV-LNA1 株，该菌株于 2019 年 12 月 25 日保藏于中国典型培养物保藏中心，CCTCC NO:V202016，分类命名：牛冠状病毒 BCoV-LNA1-SWUN7901。

进一步的，所述 BCoV-LNA1 株的病毒含量 $\geq 10^{7.75}$ TCID<sub>50</sub>/mL。

第二方面，本发明提供了上述 HE 基因重组株在制备牛冠状病毒疫苗中的应用。

第三方面，本发明提供了采用上述 HE 基因重组株制备的牛冠状病毒疫苗。

进一步的，所述牛冠状病毒疫苗包括：预防上有效量的灭活的所述牛冠状病毒 HE 基因重组株 BCoV-LNA1 株和药学上可接受的佐剂。

第四方面，本发明提供了上述牛冠状病毒疫苗的制备方法，包括以下步骤：

(1)增殖所述牛冠状病毒 HE 基因重组株 BCoV-LNA1 株，收获病毒液，离心，取上清液；

(2)将病毒上清液加入灭活剂进行灭活；

(3)将灭活的病毒上清液与佐剂混合，乳化，即得。

进一步的，所述步骤(1)中采用 Vero 细胞(绿猴肾细胞)增殖所述的牛冠状病毒 HE 基因重组株 BCoV-LNA1 株。

进一步的，所述步骤(2)中灭活的控制参数为：37℃灭活 12h。

优选的，所述灭活剂为终浓度为 0.5%的  $\beta$ -丙内酯。

进一步的，所述步骤(3)中灭活的病毒上清液与佐剂按照体积比 1：1 混合。

可选的，所述佐剂为 201 佐剂。

与现有技术相比，本发明具有以下有益效果：

本发明分离到一株牛冠状病毒 HE 基因重组株 BCoV-LNA1 株。利用该 HE 基因重组毒株制备的牛冠状病毒灭活疫苗，具有产生抗体效价高，抗体水平上升快等优点。本发明分离的牛冠状病毒 HE 基因重组株 BCoV-LNA1 株能够作为牛冠状病毒防控的候选疫苗株。

## 附图说明

此处所说明的附图用来提供对本发明的进一步理解，构成本发明的一部分，本发明的示意性实施例及其说明用于解释本发明，并不构成对本发明的不当限定。在附图中：

图 1 为牛冠状病毒 HE 基因重组株 BCoV-LNA1 株间接免疫荧光结果。

图 2 为牛冠状病毒 HE 基因重组株 BCoV-LNA1 株病毒颗粒透射电镜结果，圆圈标示为病毒。

图 3 为牛冠状病毒 HE 基因重组株 BCoV-LNA1 株 HE 基因重组区域结果。

## 具体实施方式

在本发明的描述中，需要说明的是，实施例中未注明具体条件者，按照常规条件或制造商建议的条件进行。所用试剂或仪器未注明生产厂商者，均为可以通过市售购买获得的常规产品。

下面结合具体的实施例对本发明做进一步详细说明，本发明的优点和特点将会随着描述而更为清楚。但是应理解所述实施例仅是范例性的，不对本发明的范围构成任何限制。本领域技术人员应该理解的是，在不偏离本发明的精神和范围下可以对本发明技术方案的细节和形式进行修改或替换，但这些修改或替换均落入本发明的保护范围。

## 实施例 1

# 说明书

---

## 牛冠状病毒毒株的分离与鉴定及 HE 基因的重组分析

### 1、细胞和病料

Vero 细胞购自中科院上海细胞库；病料采集自辽宁省某规模化养殖场的奶牛腹泻粪便。

称取粪便样本与生理盐水制成 1:5 悬液，涡旋。冰箱中反复冻融 3 次，低温下 3000 rpm 离心 10 min，取上清液再以最大离心速度（本实施例用 12000 rpm），4℃离心 30 min，取上清加入青链霉素双抗（购于 HyClone 公司），先用 0.45μm 滤器过滤除菌，取上清，再用 0.22 μm 滤器过滤，得到病料于-80℃保存备用。

### 2、病毒分离

在细胞培养皿中使用含有 10 %胎牛血清（购于 GIBCO 公司）和 1 %青链霉素双抗的 DMEM 培养基培养 Vero 细胞，然后将上述病料按照 20 %（v/v）比例与孵育液混合后接种于铺满 80 %单层的 Vero 细胞中，孵育液为含有终浓度为 2 μg/mL 胰蛋白酶和 1 %双抗，且不含胎牛血清的 DMEM 培养基。于 37 °C、5 % CO<sub>2</sub> 培养箱中孵育 1 h，然后使用维持液维持 Vero 细胞生长，维持液为含有终浓度为 1 μg/mL 胰蛋白酶和 1 %双抗，且不含有胎牛血清的 DMEM 培养基，逐日观察至发生细胞病变（CPE）。

结果，在病料接种培养 72h 时，Vero 单层细胞培养物出现 CPE，表现为细胞呈长梭状改变，间界限模糊，成团紧密聚集，大小不规则，细胞融合形成合胞体以及“山脊状”病变现象。继续培养，当细胞病变达到 80%左右时（即 168h），收获病毒液，-80℃保存，准备进行鉴定。

### 3、病毒鉴定

#### 3.1 RT-PCR 鉴定

使用已公开的引物序列（该引物序列参考以下文献：何琪富,郭紫晶,李然,

周军,岳华,张斌,汤承.牛冠状病毒 RT-PCR 检测方法的建立及应用[J].畜牧兽医学报,2018,49(10):2292-2298.) , 扩增牛冠状病毒聚合酶基因部分片段 230bp。所有引物均由上海生工生物工程有限公司合成。

上游引物 BCOV F: CGAGTTGAACACCCAGAT, SEQ ID NO:1;

下游引物 BCOV R: GAGACGGGCATCTACACT, SEQ ID NO:2;

PCR 反应程序: 94℃ 3min, 然后进入循环 94℃ 30s, 49℃ 30s, 72℃ 30s, 38 个循环, 于 72℃ 延伸 5min, 4℃ 保存。结果表明, PCR 扩增出一条 230bp 左右的条带, 与预期扩增的片段大小一致, 核苷酸序列如 SEQ ID NO:3 所示。

### 3.2 间接免疫荧光鉴定

将病毒液加入维持液培养, 分别在培养 24h、48h 后, 弃去维持液并用 PBS 洗涤 3 次, 每孔加入 80% 丙酮 1 ml, 在 4℃ 条件下固定 10 min, 弃掉丙酮后用 PBS 洗涤 3 次, 每孔加入 1 ml 1:300 倍稀释的兔抗 BCoV 重组 N 蛋白阳性血清作为一抗, 37℃ 孵育 40 min, 弃液后 PBS 洗涤 3 次, 加入 1:1000 倍稀释的羊抗兔 IgG 作为二抗, 每孔 1 mL, 37℃ 孵育 40 min, 弃液后用 PBS 洗涤 5 次, 滴加含有 DAPI 的封片液, 室温孵育 10min 后, 使用荧光倒置显微镜下观察, 结果见图 1。结果表明, 上述分离株感染细胞可见明亮的特异性荧光。

### 3.3 透射电镜鉴定

将细胞出现 CPE 后的病毒进行收集, 在其中加入终浓度为 2.5% 的戊二醛 3mL, 4℃ 过夜 (12h), 用刮刀刮取已定型的细胞层, 用 pH 为 7.2 的 PBS 漂洗 3 次, 锇酸固定 2h 后再次用 pH 为 7.2 的 PBS 漂洗 3 次, 丙酮脱水, 待包埋剂渗透到细胞后放入包埋板, 切片后利用醋酸铀和柠檬酸铅染色, 在透射电镜下观察, 结果见图 2。结果显示病毒直径在 120nm 左右, 呈球形, 有棘突, 与牛冠状病毒粒子的形态相符。

### 3.4 牛冠状病毒分离株 HE 基因的克隆、测序及序列重组分析

使用已公开的 HE 引物序列（魏姍,谷城,李春秋,边秀东,孙筱璇,郜洪泉,邢宇昕,张鹏宇,张立春,孙东波.牛冠状病毒 HE 基因的克隆及进化树分析[J].黑龙江八一农垦大学学报,2017,29(04):20-23.）。

上游引物 BCOV F: AAGAAGACTAAACTCAGTGAAAATGC 3, SEQ ID NO:4;

下游引物 BCOV R: CATGTTTAGATTATGGTCTAAGCAT, SEQ ID NO:5;

PCR 反应程序: 94℃ 3min, 然后进入循环 94℃ 30s, 47℃ 30s, 72℃ 75s, 38 个循环, 于 72℃ 延伸 10min, 4℃ 保存。结果表明, PCR 扩增出一条 1300bp 左右的条带, 与预期扩增的片段大小相符。将上述 PCR 扩增的产物纯化后, 回收目的片段, 克隆至 pMD-18T 载体, 筛选出阳性克隆后, 送上海生工生物有限公司测序。对上述毒株的 HE 基因的测序及对序列进行重组分析结果表明, HE 基因片段大小完整, 为 1275bp, 编码 424 个氨基酸, 核苷酸序列如 SEQ ID NO:6 所示。根据 RDP 4.0 (6 种方法) 和 Simplot 3.5.1, 对该毒株的完整 HE 基因的重组分析表明, 该毒株发生了重组事件。基于 RDP 4.0 (方法: RDP、GeneConv、Chimaera、Maxchi、Siscan 和 3seq) 及 Simplot3.5.1 进行重组分析, 结果显示该毒株 HE 基因发生重组事件, 见图 3。利用 RDP4.0 分析其重组区域的开始重组断点为 150bp, 断点末端在 724bp, 假定的主要亲本毒株为韩国株 (GenBank 登录号: DQ389642) 和可能的次要亲本毒株加拿大株 (GenBank 登录号: M84486)。利用 Simplot 3.5.1, 推测亲本毒株的交叉位点为 168bp-702bp, 两个软件均显示重组断点位于 HE 中酯酶域 (E) 和凝集素域 (R) 之间。

### 实施例 2

# 说明书

## 灭活疫苗的制备

### 1、制苗用病毒液的增殖

将实施例 1 分离的牛冠状病毒 HE 基因重组株 BCoV-LNA1 株经 Vero 细胞培养增殖，当细胞病变达到 80% 时，收获增殖的病毒液，反复冻融 3 次，置 -80℃ 保存备用。

### 2、灭活疫苗的制备

将上述收获的病毒液加入终浓度为 0.5% 的  $\beta$ -丙内酯，37℃ 灭活 12h。将灭活检验合格的牛冠状病毒 HE 基因重组株 BCoV-LNA1 株病毒液，按照与 201 佐剂体积比=1:1 的比例混合，先将水相加入乳化罐内慢速搅拌，然后缓慢加入油相佐剂，加完后以 800r/min 搅拌 30 分钟，再静止 30 分钟，制备成牛冠状病毒灭活疫苗。

### 3、疫苗安全性试验

取牛冠状病毒血清抗体阴性奶牛 3 头，每头经肌肉注射牛冠状病毒灭活疫苗 2.0mL，逐日观察免疫牛注射部位及全身的临床症状，连续观察 1 周。结果，未见不良反应，表明该疫苗安全性好。

### 4、疫苗免疫效力试验

本发明采用血清学方法对疫苗的免疫效力进行评价。取牛冠状病毒血清抗体阴性的奶牛 6 头随机分成 2 组，3 头/组，1 组为疫苗免疫组，经肌肉注射上述疫苗 2.0ml；另外 1 组为对照组，按上述方法注射 PBS。免疫后 14 日对所有奶牛进行采血，分离血清，测定血清中牛冠状病毒的中和抗体效价，结果见表 1。

表 1 疫苗免疫后不同时间血清抗体中和抗体测定结果

组别	编号	不同免疫时间血清抗体中和效价			备注
		免疫前	7d	14d	

## 说 明 书

	1	-	1:16	1:30	
免疫组	2	-	1:8	1:24	免疫后 14 天, 抗体阳性率 3/3
	3	-	1:16	1:32	
	1	-	-	-	
对照组	2	-	-	-	免疫后 14 天, 抗体阳性率 0/3
	3	-	-	-	

注：“-”表示抗体阴性。

### 实施例 3

牛冠状病毒 HE 基因重组株 BCoV-LNA1 株灭活疫苗与牛冠状病毒经典株灭活疫苗的免疫效力的对比试验

#### 1、牛冠状病毒 HE 基因重组株 BCoV-LNA1 株灭活疫苗

采用实施例 2 制备的牛冠状病毒 HE 基因重组株 BCoV-LNA1 株灭活疫苗。

#### 2、灭活疫苗

由于市场上尚无牛冠状病毒单苗，因而选择市售四联疫苗进行试验，该疫苗为 Soour Guard 3R(K)C 灭活疫苗，由美国 SmithKline Beecham 动物保健公司生产，该四联苗制苗用抗原为牛冠状病毒经典株 Mebus 株。

#### 3、用作血清中和抗体的测定。

本发明采用血清学方法对疫苗的免疫效力进行评价。取 6 头奶牛（牛冠状病毒抗体阴性）随机分成 2 组，3 头/组，1 组接种牛冠状病毒 HE 基因重组株 BCoV-LNA1 株灭活疫苗，经肌肉注射上述疫苗 2.0ml；1 组接种 Soour Guard 3R(K)C 灭活疫苗，肌肉注射上述疫苗 2.0ml。在免疫前和免疫后 28d 对所有牛进行采血，分离血清，分别用牛冠状病毒 HE 基因重组株 BCoV-LNA1 株和牛冠状病毒经典株 Mebus 株做为中和抗原，测定血清中牛冠状病毒的中和抗体效价，



## 说 明 书

结果见表 2。

表 2 不同疫苗免疫后 28d 血清抗体中和抗体测定结果

组别	编号	免疫前		免疫 28d 血清抗体中和指数	
		BCoV-LNA1 株	Mebus 株	BCoV-LNA1 株	Mebus 株
HE 基因重组株灭活疫苗	1	-	-	1:143	1:111
	2	-	-	1:143	1:143
	3	-	-	1:91	1:143
经典株灭活疫苗	1	-	-	1:71	1:143
	2	-	-	1:59	1:111
	3	-	-	1:71	1:143

注：“-”表示抗体阴性。

由结果可知，免疫后 28 日，牛冠状病毒 HE 基因重组株 BCoV-LNA1 株灭活疫苗对 BCoV-LNA1 株和经典株 Mebus 株两种抗原的血清均产生有效的中和效价；Soour Guard 3R(K)C 灭活疫苗对 BCoV-LNA1 株的血清中和效价则低于 HE 基因重组株 BCoV-LNA1 株灭活疫苗的中和效价。

以上评价结果表明，分离株 BCoV-LNA1 株与经典株 Mebus 株两者所制备的灭活疫苗能够产生交叉保护的作用，并且由 HE 基因重组株 BCoV-LNA1 株制备的灭活疫苗能够在对 HE 基因重组毒株产生更高水平的中和抗体。

综上，本发明分离到一株牛冠状病毒 HE 基因重组株 BCoV-LNA1 株。利用该 HE 基因重组毒株制备的牛冠状病毒灭活疫苗，具有产生抗体效价高，抗体水平上升快等优点。因此，本发明分离的牛冠状病毒 HE 基因重组株 BCoV-LNA1 株能够作为牛冠状病毒防控的候选疫苗株。

## 说明书

---

尽管上面已经示出和描述了本发明的实施例，可以理解的是，上述实施例是示例性的，不能理解为对本发明的限制，本领域的普通技术人员在本发明的范围内可以对上述实施例进行变化、修改、替换和变型。

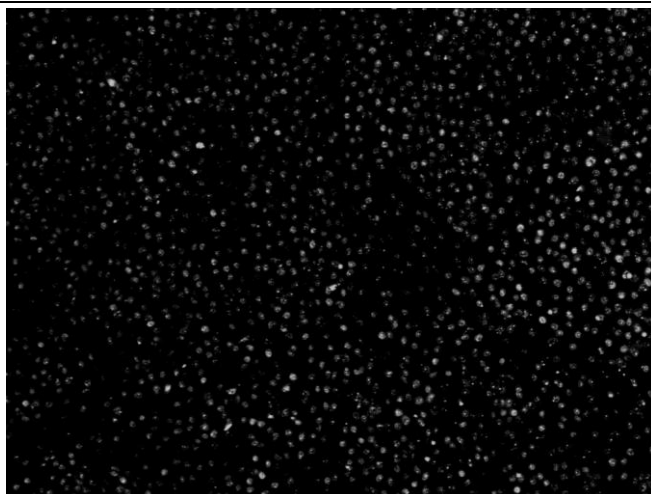


图 1

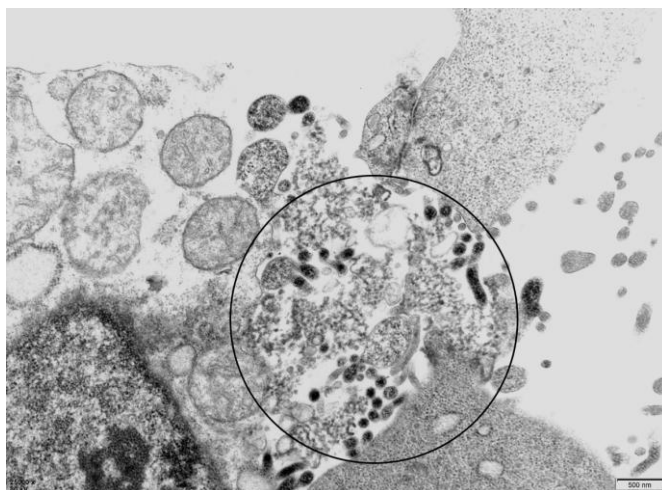


图 2



图 3