

家蚕杆状病毒表面展示 SARS-CoV 的 RBD 蛋白及其免疫原性研究

闫晶晶¹, 张耀洲^{1,2,3}, 陈剑清¹, 于威¹, 舒特俊¹

(1. 浙江理工大学生命科学学院, 杭州 310018; 2. 天津国际生物医药联合研究院家蚕生物反应器制药平台, 天津 300457;
3. 天津大学药物科学与技术学院, 天津 300072)

摘要: 利用杆状病毒表面展示技术, 构建展示 SARS-CoV 的棘突蛋白(spike protein)受体结合结构域(receptor binding domain, RBD)的重组杆状病毒 vBmGP64-RBD, 并进一步研究其展示目的蛋白的免疫原性。结果表明: RBD 蛋白正确表达并成功展示在病毒囊膜表面, 将灭活的纯重组杆状病毒 vBmGP64-RBD 皮下注射 BALB/c 小鼠能产生抗 RBD 蛋白的特异性抗体, 且抗体具有抗 RBD 蛋白的中和作用。证明 vBmGP64-RBD 有可能作为一种基于杆状病毒的新型 SARS 疫苗, 为 SARS 的体外检测及后续疫苗的研究开发奠定了基础。

关键词: 杆状病毒表面展示技术; SARS-CoV; RBD 蛋白

中图分类号: Q786

文献标志码: A

0 引言

严重急性呼吸综合征(severe acute respiratory syndromes), 又称传染性非典型肺炎, 简称 SARS, 是一种因感染 SARS-CoV 引起的新呼吸系统传染性疾病。首发病例于 2002 年 11 月出现在广东佛山, 并迅速形成流行态势, 全球近万人发病, 其中死亡人数达 774 人^[1]。为防止 SARS 的再次爆发流行, 研制安全有效的 SARS 疫苗势在必行。研究发现, 位于 SARS-CoV S 蛋白 N 端的 S1 段(17~672 aa)是同受体血管紧张素转化酶 2(angiotensin-converting enzyme 2, ACE2)结合的关键部位, 也是中和抗体的主要作用靶点^[2]。对 S 蛋白的 S1 段进行抗原表位分析, 发现 303~537 aa 的区段(即受体结合结构域(receptor binding domain, RBD)不仅是一个功能结构域, 而且含有 S 蛋白主要的中和表位^[3], 考虑到 S 蛋白分子量较大, 结构复杂, 进行重组表达较为不便, 因此选择 RBD 蛋白进行研究较为

方便可行。

在噬菌体、细菌表面展示技术的基础上, 科研工作者先后建立了真核生物酵母及杆状病毒表面展示技术^[4], 弥补了在噬菌体和细菌中由于缺乏相应的分子伴侣及相关酶类而不能完成复杂的真核生物蛋白的翻译后修饰。目前, 杆状病毒表面展示系统已经被开发用于基因工程亚单位疫苗的研制^[5-6]。家蚕杆状病毒吸附和侵入 BmN 细胞与病毒囊膜蛋白 GP64 有关系。GP64 是家蚕杆状病毒的主要糖蛋白, 通过二硫键形成三聚体, 是家蚕核型多角体病毒(*Bombyx mori* nuclear polyhedrosis virus, BmNPV)重要的囊膜组分。GP64 由 1593 bp 组成, 编码 531 个氨基酸, N 端前 60 bp 为信号肽序列(signal peptide, SP), C 端 132 bp 为跨膜结构域(transmembrane domain, TM)^[7], 将 SP、目的基因、TM 序列顺序拼接后融合表达, 则其形成的融合蛋白展示于杆状病毒的表面, 形成刺猬状“伪病毒”, 实现目的蛋白的表面展示。本实验室利用家蚕杆状病毒表

收稿日期: 2014-01-10

基金项目: 国家高技术发展计划“863”项目(2011AA100603), 浙江省自然科学基金面上项目(207217)

作者简介: 闫晶晶(1988-), 女, 山西阳泉人, 硕士研究生, 研究方向为生物工程制药。

通信作者: 舒特俊, E-mail: peter-shu@126.com

面展示技术生产新型人用禽流感疫苗,已完成临床前的所有研究^[8]。

本文将 SARS-CoV 的 RBD 蛋白基因与家蚕杆状病毒囊膜蛋白 GP64 基因融合,经过胞内融合表达,进入内质网完成加工修饰,融合蛋白在 SP 的指导下通过内质网膜,然后在 TM 的作用下锚定在家蚕核型多角体病毒囊膜表面,形成所谓的“伪病毒”,通过低离、高离、超滤,超离等步骤纯化,得到纯化的 vBmGP64-RBD“伪病毒”,免疫 BALB/c 小鼠,获得抗血清并对其进行免疫原性研究,为研制更有效的 SARS 基因工程亚单位疫苗奠定基础。

1 试 验

1.1 实验材料

含有 SARS-CoV 的 S 蛋白基因的质粒 pUC57-S 由金唯智生物科技有限公司合成,载体 pFast-Bacdual、家蚕卵巢上皮细胞系 BmN、野生型家蚕杆状病毒、*E. coli* TG1、*E. coli* DH10Bac 菌种由本实验室保存,BALB/c 小鼠购自天津市奥易得实验用品有限公司。Taq DNA 聚合酶、限制性内切酶 *Bam*H I、*Spe* I 购自 Fermentas 公司;Ligation High 高效连接酶购自 TOYOBO 公司;2×PCR Mix、质粒提取试剂盒和胶回收试剂盒购自 Trans-Gen Biotech 公司;UNIQ-10 柱式病毒基因组抽提试剂盒购自上海生工生物公司;SF-900 II SFM(1x) 无血清培养基、胎牛血清、DMSO、脂质体转染试剂 Cellfectin II Reagent、Alexa Fluor® 546 donkey anti-rabbit IgG(H+L)购自 Invitrogen 公司;辣根过氧化物酶(HRP)标记的羊抗兔 IgG 购自天津三箭生物技术有限公司;RT-PCR 试剂盒购自 Roche;弗氏完全佐剂、弗氏不完全佐剂购自 SIGMA 公司;BCA 法蛋白定量试剂盒购自北京泰克生物技术有限公司。

1.2 试验方法

1.2.1 重组载体 pFastBacdual-gp64-RBD 的构建

以野生家蚕杆状病毒基因组为模板,分别用表 1 所示的引物 Psp-F 和 Psp-R、Ptm-F 和 Ptm-R 进行 PCR 扩增获得 gp64 的 SP 序列和 TM 序列;以 pUC57-S 为目的基因的模板,Prbd-F、Prbd-R 为引物,PCR 扩增获得 S 基因 N 端的 634~1650 bp 序列,即 RBD 序列。通过 SOE-PCR^[9] 技术获得 gp64-RBD。用 *Bam*H I 和 *Spe* I 双酶切后的 pFastBacdual 和 gp64-RBD 序列连接,构建重组载体 pFastBacdual-gp64-RBD。

表 1 gp64-RBD 序列的引物序列

引物	序列
Psp-F	CGGATCCATGGTAGGCGCTATT (下划线处为 <i>Bam</i> H I 酶切位点)
Psp-R	TAAAACCCATCGCCGAAAG
Prbd-F	CTTTGCGGCGATGGGTTTAAACACTT
Prbd-R	CTTCAGCCATTTGTTGAAATGGT
Ptm-F	ATTTCAACAAATGGCTGAAGGC
Ptm-R	GCCACTAGTTTAAATATTGTCTACTA (下划线处为 <i>Spe</i> I 酶切位点)

1.2.2 家蚕重组杆状病毒 vBmGP64-RBD 的获得

运用 Bac-to-Bac 杆状病毒表达系统,构建重组杆状病毒 vBmGP64-RBD。将鉴定正确的重组质粒 pFastBacDual-gp64-RBD 转化含杆状病毒穿梭载体 Bacmid 的 DH10Bac 感受态细胞,同源重组获得的重组 Bacmidgp64-RBD 通过脂质体介导法转染家蚕 BmN 细胞培养 5~7 d,待细胞发病后收集培养细胞上清即为病毒悬液。空载 Bacmid 转染细胞获得的病毒(命名为非重组杆状病毒)作为阴性对照。

1.2.3 重组杆状病毒 vBmGP64-RBD 的鉴定

将重组杆状病毒 vBmGP64-RBD 以 6.5×10^8 vp/mL(RT-PCR 测定病毒滴度)^[10-12]的剂量感染家蚕 BmN 细胞 80~90 h 后,收集病毒液,8 000 r/min 离心 30 min,取上清液 15 000 r/min 离心 60 min,再收集上清在 4℃ 环境下用超滤管(Millipore 公司的 15 mL 100 KD)超滤,超滤后的上清,50 000 r/min 超离 40 min(日立 CP70MX 离心机),所得沉淀用 0.01 M pH7.4 的磷酸缓冲液 PBS 重悬,按 1:4 000 的体积比加入 β-丙内酯灭活 4℃ 24 h,水解 37℃ 4 h,再用超滤管超滤,不断加入 PBS 以除去 β-丙内酯,用 0.22 μm 的滤膜过滤除菌,获得纯的重组杆状病毒 vBmGP64-RBD 重悬液进行 SDS-PAGE 及 Western Blotting 分析。其中一抗为原核表达纯化 RBD 蛋白免疫雄兔自制的多抗,二抗为辣根过氧化物酶(HRP)标记的羊抗兔 IgG。

1.2.4 激光共聚焦显微镜分析 RBD 蛋白表面展示

重组杆状病毒 vBmGP64-RBD 感染 BmN 细胞 36 h 后,PBS(pH7.4)洗 3 次,4% 多聚甲醛室温固定 10 min,5% BSA 37℃ 孵育 2 h,然后自制兔抗 RBD 抗体按稀释比 1:100 37℃ 孵育 1 h,4℃ 封闭过夜,之后 PBS 洗 3 次,Alexa Fluor® 546 donkey anti-rabbit IgG(H+L)按稀释比 1:200,37℃ 孵育 1 h 后,PBS 清洗,加 DAPI 染料(稀释比 1:2 000)孵育 10 min,清洗 3 次后用激光共聚焦显微镜(Leica TCS SP5)检测 RBD 蛋白是否表达在细胞膜表

面。非重组杆状病毒作为阴性对照。

1.2.5 动物实验

将1.2.3获得的纯重组杆状病毒 vBmgp64-RBD 重悬液, BCA 定量免疫 BALB/c 小鼠(5 周龄, (20 ± 2) g)。首次免疫, 重组杆状病毒 vBmgp64-RBD 重悬液与弗氏完全佐剂 1:1 混匀, $100 \mu\text{L}$ /只皮下注射, 最终注射剂量为 $10 \mu\text{g}$ /只, 两周加强免疫 1 次, 共 3 次, 后两次用弗氏不完全佐剂, 注射剂量为 $5 \mu\text{g}$ /只, 6 周后眼球取血。免疫前取血作为阴性对照。

1.2.5.1 ELISA 检测鼠抗效价

间接 ELISA 法测定 vBmgp64-RBD 的抗体效价^[13]。

1.2.5.2 血清中和实验

将获得的 BALB/c 小鼠多抗进行加热灭活处理, 60°C 水浴 30 min。用 SF-900 II SFM(1x) 无血清培养基按 1:2、1:4、1:8、1:16、1:32、1:64、1:128 倍比稀释, 每孔含量为 $50 \mu\text{L}$, 每个稀释度作 8 孔, 等体积与重组杆状病毒 vBmgp64-RBD ($200 \text{TCID}_{50}/100 \mu\text{L}$) 混匀, 置于 37°C 作用 1 h, 使其中和反应充分发生, 然后接种正常 BmN 细胞 27°C 培养 3 d 后观察细胞状况, 按 Reed-Munch 法计算抗体中和效价^[14]。以免疫前血清作为阴性对照组。

2 结果与讨论

2.1 重组转移载体 pFastBacDual-gp64-RBD 的鉴定

重组质粒 pFastBacDual-gp64-RBD 经 PCR 扩增及双酶切鉴定, 如图 1 电泳结果显示, 在 $1200 \sim 1600$ bp 之间均有特异性条带, 与理论值 1212 bp 大小相符。且重组转移载体 pFastBacDual-gp64-RBD 经双向测序鉴定基因序列完全正确, 如图 2, 说明此载体构建成功。

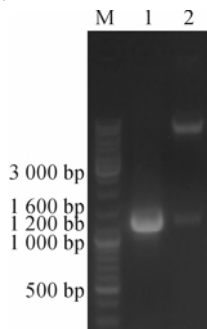


图 1 重组载体 pFastBacDual-gp64-RBD 的 PCR、双酶切鉴定

M: 10 kb DNA Marker; 1: *gp64-RBD* PCR 鉴定; 2: pFastBacDual-*gp64-RBD* 双酶切。

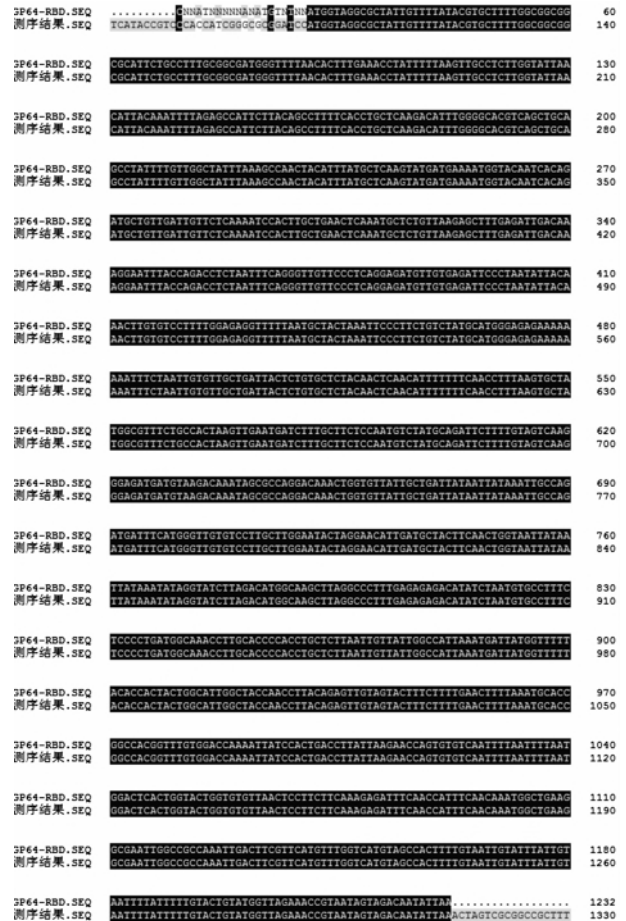


图 2 pFastBacDual-gp64-RBD 测序结果

2.2 重组 Bacmidgp64-RBD 的 PCR 鉴定

以提取的重组 Bacmidgp64-RBD 为模板, 以 Psp-F 和 Ptm-R、Psp-F 和 M13R 为引物分别进行 PCR 鉴定, 理论值分别为 1212 bp、 1762 bp。如图 3 电泳结果显示, 泳道 2、3 分别在 $1200 \sim 1600$ bp、 $1600 \sim 2000$ bp 之间出现特异性条带, 与理论值大小相符, 说明重组 Bacmidgp64-RBD 构建成功。泳道 1 以空载 Bacmid 为模板作为阴性对照(NC)没有出现条带。

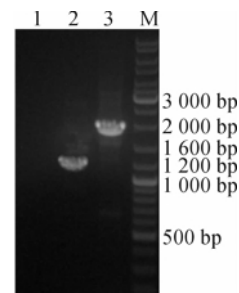


图 3 重组 Bacmidgp64-RBD 的 PCR 鉴定

M: 10 kb DNA Marker; 1: NC; 2: Psp-F 和 Ptm-R 为引物的 PCR 产物; 3: Psp-F、M13R 为引物的 PCR 产物。

2.3 重组杆状病毒 vBmgp64-RBD 基因组的 PCR 鉴定

以重组 Bacmidgp64-RBD 转染家蚕 BmN 细胞后

的病毒液提取的病毒基因组为模板,以 Psp-F 和 Ptm-R、Psp-F 和 M13R 为引物进行 PCR 鉴定,理论值分别为 1 212 bp、1 762 bp。如图 4 电泳结果显示,泳道 3、4 分别在 1 000~1 500 bp、1 500~2 000 bp 之间出现特异性条带,与理论值大小相符,说明重组杆状病毒 vBmnp64-RBD 构建成功。泳道 1、2 分别以野生病毒基因组、空载 Bacmid 感染 BmN 细胞后提取的基因组为模板作为对照没有出现条带。

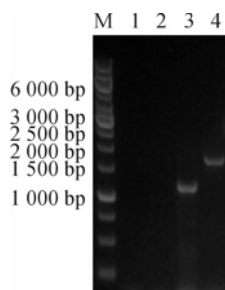


图 4 重组杆状病毒 vBmnp64-RBD 的 PCR 鉴定

M:10 kb DNA Marker; 1: 野生病毒基因组;2: 非重组杆状病毒基因组;3: Psp-F 和 Ptm-R 为引物的 PCR 产物;4: Psp-F 和 M13R 为引物的 PCR 产物。

2.4 重组杆状病毒 vBmnp64-RBD 在 BmN 细胞中 RBD 蛋白的表达及纯化鉴定

重组杆状病毒 vBmnp64-RBD 侵染 BmN 细胞,收集病毒并进行纯化,SDS-PAGE(a)及 Western Blotting(b)检测目的蛋白 RBD 的表达及纯化,其中检测抗体为原核表达 RBD 蛋白免疫雄兔自制的多抗,如图 5,泳道 1 为原核表达的 RBD 蛋白制样作为阳性对照,泳道 3 为非重组病毒制样作为阴性对照,泳道 2、4 分别为纯化前后重组杆状病毒 vBmnp64-RBD 制样。WB 检测泳道 3 没有出现目的条带,泳道 1、2、4 在 43 kDa 处均能检测到目的蛋白的

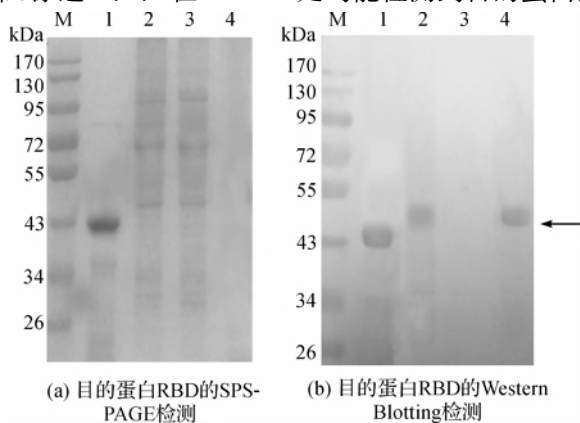


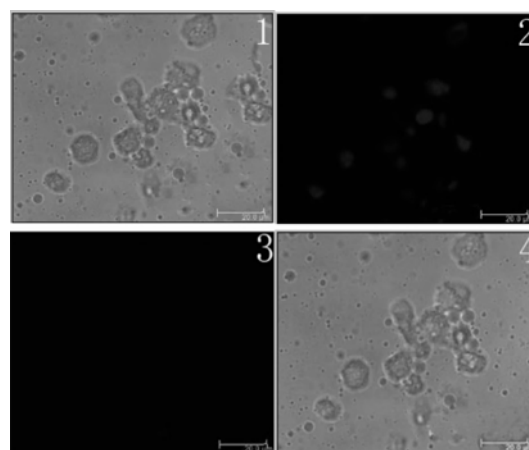
图 5 目的蛋白 RBD 在 BmN 细胞中的表达纯化

M: 预染蛋白 Marker;泳道 1: 原核表达的 RBD 蛋白;泳道 2: 病毒 vBmnp64-RBD;泳道 3: 非重组杆状病毒;泳道 4: 纯化后病毒 vBmnp64-RBD

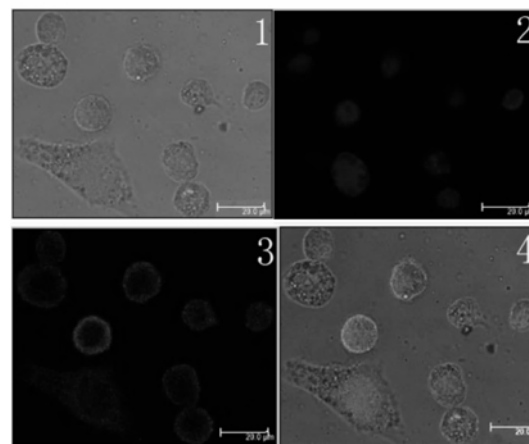
表达,分子量大小和理论分子量 43 kDa(RBD 蛋白为 38 kDa,TM 约为 5 kDa,原核表达的 RBD 蛋白 his 标签约为 4 kDa)一致,由于泳道 2、4 的目的蛋白基因后加有 TM,且在真核表达系统中表达,可能存在糖基化等修饰,目的蛋白分子量比原核表达的 RBD 蛋白略大,如箭头所示;SDS-PAGE 的泳道 4 中杂带明显少于泳道 2,目的蛋白在 BmN 细胞中表达量未达到 SDS-PAGE 检测量,未能出现目的条带。结果表明重组杆状病毒 vBmnp64-RBD 感染 BmN 细胞,RBD 蛋白能够成功表达并纯化。

2.5 激光共聚焦显微镜分析 RBD 蛋白表面展示

运用 LEICA TCS SP5 II 分析检测 RBD 蛋白表面展示,如图 6,与对照非重组杆状病毒感染家蚕细胞相比,vBmnp64-RBD 感染家蚕 BmN 细胞的细胞膜上呈现绿色荧光,由于绿色荧光标记的是 RBD 蛋



(a) 非重组杆状病毒感染家蚕细胞



(b) vBmnp64-RBD感染家蚕BmN细胞

图 6 重组杆状病毒 vBmnp64-RBD 转染家蚕

BmN 细胞免疫荧光分析

(1) 明场;(2) DAPI 染色 UV 405 nm 激发;(3) 绿色荧光 FITC 488nm 激发;(4) 明场、DAPI 染色、绿色荧光 FITC 重叠,且均为 400 倍放大。

白的表达定位情况,说明 RBD 蛋白成功表达并定位于 BmN 细胞膜上,实现了 RBD 蛋白的表面展示。

2.6 抗体效价的测定

以原核表达纯化的 RBD 蛋白作为抗原,重组杆状病毒 vBmnp64-RBD 重悬液免疫小鼠获得的抗体用 PBS 倍比稀释(1:100~1:12 800),间接 ELISA 法测定抗体效价,免疫前血清做同样处理作为阴性对照。根据 $P/N \geq 2.1$ 为阳性, $1.5 \leq P/N < 2.1$ 为可疑, $P/N < 1.5$ 为阴性的判断标准,如图 7,结果表明此多克隆抗体效价可达 1:6 400,此时 P/N 值为 3.97(>2.1,可信)。

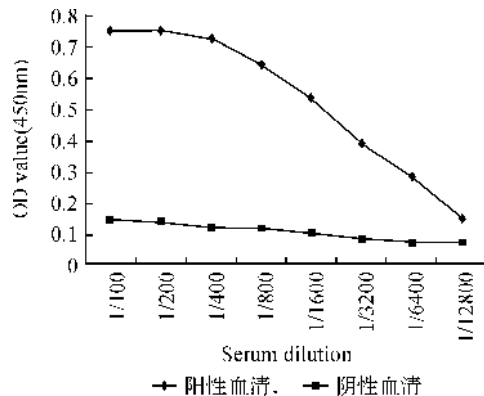


图7 多克隆抗体效价测定

2.7 血清中和实验

Reed-Munch 法测定重组杆状病毒 vBmnp64-RBD 毒价 $TCID_{50} = 10^{-4.875}$, 50 μ L(即重组杆状病毒 vBmnp64-RBD 作 $10^{-4.875}$ 稀释后,取 50 μ L 接种于 100 μ L 密度为 5×10^6 个/mL 的 BmN 细胞,3 d 后有一半的细胞发生病变);按经测定的毒价将重组杆状病毒 vBmnp64-RBD 作 200 $TCID_{50}$ 稀释,分别与抗 vBmp64-RBD 血清、阴性血清的各稀释度混合感染细胞,在抗血清各稀释比下,观察病毒感染 3 d 后细胞的 CPE 率(细胞病变效应 cytopathic effect,简称 CPE,分子为 CPE 孔数,分母为总孔数)。结果见表 2。

表2 重组杆状病毒 vBmnp64-RBD 感染 3 d 后细胞的 CPE 率

样品	稀释度						
	1:2	1:4	1:8	1:16	1:32	1:64	1:128
抗 vBmp64-RBD 血清组	0/8	0/8	0/8	1/8	3/8	5/8	8/8
阴性血清组	8/8	8/8	8/8	8/8	8/8	8/8	8/8

用 Reed-Munch 法计算其中和效价, $TCID_{50} = 10^{-1.65}$, $10^{-1.65} = 1:48$,即 1:48 为该血清的中和抗体效价。结果可见,纯重组杆状病毒 vBmnp64-

RBD 作为免疫原能够引起动物体产生特异性中和抗体,对病毒感染细胞具有中和保护作用。而阴性血清不能识别保护抗原进而无法阻止病毒感染 BmN 细胞。

3 结论

基因工程亚单位疫苗只接种病原体保护性抗原,避免了病原体毒力,但免疫反应较弱;与一般亚单位疫苗比较,表达的蛋白展示在重组病毒表面,理论上能很好地刺激细胞免疫^[15]。杆状病毒表面展示系统用于展示外源蛋白研制基因工程亚单位疫苗具有明显优势,本实验将 S 蛋白的受体结合结构域 RBD 基因构建在转移载体 pFastBac dual 的晚期强启动子 Ppolh 下,最终展示在病毒囊膜和细胞质膜表面,经分离纯化后免疫 BALB/c 小鼠获得抗血清并研究其免疫原性,由于 SARS-CoV 高致病性和高传染性,实验条件要求较高,无法获得真正的 SARS-CoV 灭活病毒作为抗原,限制了所获得的鼠多抗对 SARS-CoV 灭活病毒的识别反应实验,笔者用重组杆状病毒 vBmnp64-RBD 代替灭活病毒,通过血清中和实验结果表明 vBmnp64-RBD 可以诱导产生特异性的中和保护抗体,为 SARS 基因工程亚单位疫苗的探索研究奠定了基础,为面对未来突发事件及医学工作的开展也具有一定意义。

参考文献:

- [1] Peiris J S, Lai S T, Poon L L M, et al. Coronavirus as a possible cause of severe acute respiratory syndrome [J]. Lancet, 2003, 361(9366): 1319-1325.
- [2] Jaume M, Yip M S, Kam Y W, et al. SARS CoV subunit vaccine: antibody-mediated neutralization and enhancement [J]. Hong Kong Med Vol, 2012, 18(2): 31-36.
- [3] Wang Chao, Ren Xiao-feng. Preparation and characterization of polyclonal antibody against severe acute respiratory syndrome-associated coronavirus spike protein[J]. Hybridoma, 2010, 6(29): 511-516.
- [4] 张耀洲, 吴祥甫. 家蚕生物反应器[M]. 杭州: 浙江大学出版社, 2008: 109-110.
- [5] 许信刚, 张宽, 王志昇, 等. PRRSV GP3 蛋白和 PCV-2 Cap 蛋白在杆状病毒囊膜表面的共展示及展示蛋白的小鼠免疫试验[J]. 中国兽医科学, 2011, 41(1): 53-59.
- [6] Selvaraj M, Mookkan P, Kwang J. Baculovirus as vaccine vectors[J]. Current Gene Therapy, 2010, 10(3): 201-213.
- [7] Rumenapf T, Stark R, Meyers G, et al. Structural pro-

- teins of hog cholera virus expressed by vaccinia virus: further characterization and induction of protective immunity[J]. J Virol, 1991, 65(2): 589-597.
- [8] Jin Rong-zhong, Lv Zheng-bing, Chen Qin, et al. Safety and immunogenicity of H5N1 influenza vaccine based on baculovirus surface display system of *bombyx mori* [J]. PLoS ONE, 2008, 3(12): 1-7.
- [9] Heckman K L, Pease L R. Gene splicing and mutagenesis by PCR-driven overlap extension[J]. Nat Protoc, 2007, 4(2): 924-932.
- [10] Tong Xia-sheng, Meng Zhe-feng. Identification of recombinant baculovirus and determination of virus titer with fluorescence quantitative PCR assay[J]. Chinese Journal of Pathophysiology, 2007, 23(8): 1623-1626.
- [11] Hitchman R B, Siaterli E A, Nixon C P, et al. Quantitative real-time PCR for rapid and accurate titration of recombinant baculovirus particles[J]. Biotechnol Bioeng, 2007, 96(4): 810-814.
- [12] Ma L, Bluysen H A, De Raeymaeker M, et al. Rapid determination of adenoviral vector titers by quantitative real-time PCR[J]. J Virol Methods, 2001, 93(1): 181-188.
- [13] Bai Bing-ke, Lu Xin-ya, Meng Jin, et al. Vaccination of mice with recombinant baculovirus expressing spike or nucleocapsid protein of SARS-like coronavirus generates humoral and cellular immune responses[J]. Mol Immunol, 2008, 45(4): 868-875.
- [14] 徐宜为. 免疫检测技术[M]. 2 版. 北京: 科学出版社, 1991: 122-126.
- [15] Yang Ding-gang, Chung Yao-chi, Lai Yiu-kay, et al. Avian influenza virus hemagglutinin display on baculovirus envelope: cytoplasmic domain affects virus properties and vaccine potential[J]. Mol Ther, 2007, 15(5): 989-996.

Study on Silkworm Baculovirus Surface Display of RBD Protein of SARS-CoV and Its Immunogenicity

YAN Jing-jing¹, ZHANG Yao-zhou^{1,2,3}, CHEN Jian-qing¹, YU Wei¹, SHU Te-jun^{1*}

(1. School of Life Sciences, Zhejiang Sci-Tech University, Hangzhou 310018, China;

2. Silkworm Bioreactor Pharmaceutical Platform, Tianjin International Joint Academy of Biotechnology and Medicine, Tianjin 300457, China;

3. School of Pharmaceutical Science and Technology, Tianjin University, Tianjin 300072, China)

Abstract: This study establishes recombinant baculovirus vBmnp64-RBD displaying spike protein receptor binding domain (RBD) of SARS-CoV through baculovirus surface display technique and further studies the immunogenicity of its target protein. The result shows that RBD protein is correctly expressed and successfully displayed on the surface of virus cyst membrane. BALB/c mice with subcutaneous injection of inactivated pure baculovirus vBmnp64-RBD can produce anti-RBD protein specific antibody which has anti-RBD protein neutralization. It proves that vBmnp64-RBD might be used as a new SARS vaccine based on baculovirus. This study lays a foundation for in vitro test of SARS and research and development of subsequent vaccines.

Key words: baculovirus; surface display technique; SARS-CoV; RBD protein

(责任编辑: 许惠儿)