

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

王永山¹, 范红结², 张晓民¹, 李 银³, 肖焕娟¹

(¹南京军区军事医学研究所 南京军区疾病预防控制中心 南京 210002)

(²南京农业大学动物医学院 南京 210095)(³江苏省农业科学院兽医研究所 南京 210014)

摘 要 用 5 株传染性法氏囊病病毒 (IBDV) 单克隆抗体 (mAb) 从噬菌体随机肽库中得到了 5 个含有不同 IBDV 抗原表位的模拟肽序列。在此基础上, 将 5 个抗原表位用 GGGS 四肽连接构建多表位基因 5epis。将该基因合成、克隆后, 构建原核表达质粒 pET-5epis, 在大肠杆菌中表达重组多表位蛋白 r5EPIS, 经 SDS-PAGE 分析, r5EPIS 占菌体总蛋白的 15%、分子量 10kDa。用 IBDV 单克隆抗体和多克隆抗体对 r5EPIS 进行免疫印迹对比分析, 结果表明, r5EPIS 具有 IBDV 特异性和免疫反应性。将 r5EPIS 经皮下注射免疫兔 400 μ g/只/次, 免疫 2 次, 间隔 7d, 用 IBDV 间接 ELISA 检测血清抗体, 第一次免疫 7d 后抗体效价为 1:4000, 第二次免疫 14d 后抗体效价升高到 1:256000, 说明 r5EPIS 可诱导机体产生 IBDV 特异性抗体。用 r5EPIS 加免疫佐剂经肌肉注射免疫鸡 50 μ g/只/次, 免疫 2 次后, 血清抗体效价可达到 1:12800, 用 200 个 ELD₅₀ IBDV 超强毒株 GX8/99 攻击实验鸡, r5EPIS 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 r5EPIS 可诱导机体产生抗 IBDV 感染的保护性免疫应答, 预示构建的 5epis 可作为 IBD 多表位疫苗研究的候选基因。

关键词: 传染性法氏囊病病毒; 抗原表位; 表达; 免疫原性

中图分类号: Q852.65 文献标识码: A 文章编号: 0001-6209(2007)01-0121-05

传染性法氏囊病 (Infectious Bursal Disease, IBD) 是由传染性法氏囊病病毒 (Infectious Bursal Disease Virus, IBDV) 引起的以侵害雏鸡淋巴组织, 特别是中枢免疫器官——法氏囊为主要特征的传染病, 是危害养鸡业的重要传染病之一^[1]。免疫接种是防控 IBD 的有效措施, 但变异株和超强毒株的出现使该病的防制难度增大, 目前虽然研制了多种商品化的弱毒疫苗和灭活疫苗, 但其安全性和制造工艺尚有不尽人意之处, 如为抵抗超强毒的攻击, 使用中强毒力的毒株研制活疫苗, 给 IBD 的防控带来极大的隐患, 灭活疫苗存在着抗原制备的困难, 因此, 探索基因工程疫苗成为 IBD 防控研究的重要内容。

对 IBDV 的抗原表位分析已有进展。目前, 在 VP2 上至少已经发现了 3 个构象依赖性中和抗原表位, 在 VP3 上也发现了 1 个线性中和抗原表位^[2,3]。前期, 本课题组运用 5 株 IBDV 单克隆抗体 (mAb) 从噬菌体展示随机 12 肽库中筛选含有 IBDV 抗原表位的短肽, 经测序分析, 得到了 5 个含有不同 IBDV 抗原表位的模拟肽序列^[4]。

本研究旨在 IBDV 抗原表位分析的基础上, 构建由 5 个抗原表位模拟肽串联组成的多表位抗原基

因, 利用高效原核表达系统制备重组多表位蛋白, 通过免疫实验确定其免疫原性和免疫保护效力, 为基于表位的 IBD 多表位疫苗研究奠定基础。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 抗体: 5 株 IBDV 单克隆抗体: HNF1 和 HNF7, 抗体亚类均为 IgG1, 由河南省农业科学院生物技术研究所惠赠; B34, 抗体亚类为 IgG1, 由中国兽药监察所陈光华研究员惠赠^[5]; 2B1 和 2G8, 抗体亚类分别为 IgG1 和 IgG2, 由本课题组制备^[6]; 相加 ELISA 分析, 这 5 株单克隆抗体对应不同的病毒抗原表位, 病毒中和试验证明 B34 和 2G8 对 IBDV 具有中和作用^[5,6]。IBDV 免疫血清系用 IBDV 分离毒株 ZB 和 TA3 制备的纯化病毒抗原免疫兔获得 (以下简称: 多克隆抗体), 由本课题组制备^[6]。IBDV 免疫血清与单克隆抗体腹水经 (NH₄)₂SO₄ 盐析和 DEAE-纤维素纯化后使用。

1.1.2 肽库、质粒和菌种: 噬菌体展示 12 肽库试剂盒 (Ph. D. -12TM Phage Display Peptide Library Kit) 购自 NEW ENGLAND BioLabs[®] 公司。载体 pMD18-T 和

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (30571371) / 江苏省自然科学基金资助项目 (BK2003011)

作者简介: 王永山 (1963 -), 男, 山东诸城人, 研究员, 博士, 研究方向为动物病毒学与分子生物学。Tel: 86-25-86050698; Fax: 86-25-80867179; 84814639; E-mail: wangyongshan2001@yahoo.com.cn

收稿日期: 2006-03-13 接受日期: 2006-07-10 修回日期: 2006-07-23 © 中国科学院微生物研究所期刊联合编辑部 http://journals.im.ac.cn

pET28k(+)分别购自南京生兴生物技术公司和 Novagen 公司。大肠杆菌 JM109 和 BL21(DE3)为本课题组保存^[7]。

1.1.3 试剂和仪器 :DNA 聚合酶 I (Klenow 片段)、dNTP、T4 DNA 连接酶、限制性内切酶、DNA Marker DL15000、DNA 凝胶回收试剂盒、质粒 DNA 小量纯化试剂盒、IPTG 等购自大连宝生物(TaKaRa)公司;细菌培养用胰化蛋白胨、酵母提取物为 OXOID 公司产品;蛋白质分子量标准(LMW)、琼脂糖、丙烯酰胺、N,N'-亚甲双丙烯酰胺等为 Amersham Pharmacia 公司产品;碱性磷酸酶、辣根过氧化物酶为 Sigma 公司产品;免疫佐剂 MONTANIDE ISA206 为法国 Seppic 公司产品;卡介苗素为浙江万马药业有限公司产品;其它试剂均为进口或国产分析纯。Allegra™ 21R 台式高速离心机(Beckman)、LKB 多功能电泳系统(Pharmacia)、凝胶成像分析系统 Imager 4400(Alpha)、微孔板阅读仪 Model550(Bio-RAD),其它仪器均符合实验要求。

1.2 多表位基因的构建

将 5 个抗原表位模拟肽^[4]用 GGGS 四肽^[8,9]串联(HNF1-HNF7-B34-2B1-2G8)构建多表位模拟肽基因,命名为 5epis,长度 231bp,编码 76aa。将 5epis 分成 6 个片段(F₁~F₆)合成,长度均为 54nt,各片段两端有互补部分,F₁、F₃、F₅ 片段为正向链,F₂、F₄、F₆ 片段为反向链(图 1)。DNA 合成自上海博亚公司。

1.3 多表位基因的克隆

将合成的 6 个 DNA 片段按等摩尔数混合、退火,以 DNA 聚合酶 I (Klenow 片段)补链,用 pMD18-T 载体克隆,获得 5epis 重组克隆质粒 pMD-5epis。用 Sac I 和 Hind III 酶切分析、对插入片段测序。

1.4 多表位基因的表达

根据 pET28k(+)启动子下游阅读框,将 5epis 基因的克隆质粒 pMD-5epis 和 pET28k(+)用 Sac I 和 Hind III 酶切,回收 pMD-5epis 的 280bp 片段(克隆后的 5epis 基因两端加了 pMD18-T 载体的多个限制性酶切位点序列)和 pET28b 的 5.3kb 片段,用 T4 DNA 连接酶连接两片段,构建 5epis 基因表达质粒 pET-5epis。转化 JM109,涂布于含终浓度为 30μg/mL 卡那霉素(kan)的 LB 琼脂平板上,37℃培养 14h。挑取单菌落,接种在 3mL 含 kan 的 LB 培养基中,振荡培养 14h,抽提质粒,酶切鉴定后再用。纯化 pET-5epis 转化 BL21(DE3),挑取单菌落,接种在 3mL 含 kan 的 LB 培养基中,37℃振荡培养 14h。次日,以 1%接种在含 kan 的新鲜 LB 培养基中,37℃振荡培

养 2h,加入终浓度为 1mmol/L 的 IPTG 诱导,37℃继续培养 4h。取 1.5mL 细菌培养液,高速离心,用 SDS-PAGE 分析沉淀的菌体,扫描分析重组多表位蛋白(命名为 r5EPIS)的表达量。实验同步设立 BL21(DE3)和 pET28b 转化的 BL21(DE3)菌对照。

1.5 r5EPIS 的免疫反应性分析

以免疫印迹法用 IBDV 单克隆抗体和多克隆抗体进行平行试验,分析 r5EPIS 的特异性和免疫反应性。简述之:pET-5epis 重组菌诱导表达,SDS-PAGE 分析(分离胶浓度 15%),电泳转移,用抗 IBDV 单克隆抗体和碱性磷酸酶(AP)标记的兔抗鼠 IgG 先后与转移膜反应,显色。在用 IBDV 多克隆抗体进行的平行对照试验中,只是用 IBDV 多克隆抗体和 AP 标记的羊抗兔 IgG 替代对应抗体,其它与单克隆抗体试验相同。试验同步设 BL21(DE3)和 pET28b 转化的 BL21(DE3)菌对照。

1.6 r5EPIS 对兔的免疫试验

用雌性新西兰兔 3 只,体重约 1.5kg,进行兔体免疫试验。参照文献^[7]制备 r5EPIS,与免疫佐剂和卡介苗素混合乳化,皮下注射,免疫 2 次,间隔 7d,r5EPIS 的免疫剂量为 400μg/只/次。实验兔在免疫时和免疫后每间隔 7d 经耳静脉采血,用 IBDV 病毒抗原包被反应板(5μg/mL),以常规间接 ELISA 测定血清中 IBDV 抗体的效价。

1.7 r5EPIS 对鸡的免疫保护试验

1.7.1 病毒 :IBDV 超强毒株 GX8/99 由崔治中等^[10]分离鉴定,在进行攻毒试验前,将冻存的 GX8/99 感染鸡法氏囊组织悬液过滤除菌,用 10 日龄的 SPF 鸡胚测定悬液中病毒的 ELD₅₀/0.1mL。

1.7.2 免疫 :14 日龄 SPF 来航鸡 45 只,购回后 8h 内进行实验。随机分成 3 组:r5EPIS 加佐剂免疫组(r5EPIS + adjuvant)、单用佐剂免疫对照组(adjuvant control)和饲养对照组(blank control),15 只/组。r5EPIS 加佐剂免疫组,胸部肌肉注射佐剂型 r5EPIS 免疫物,免疫剂量为 50μg/只/次,单用佐剂免疫对照组则只注射等体积的佐剂,两个组同步试验,均免疫 2 次,间隔 7d;饲养对照组中的鸡不进行免疫,只是与两个免疫组在相同条件下饲养。实验鸡在免疫后每间隔 7d 经翅下静脉采血,以常规间接 ELISA 测定血清中 IBDV 抗体的效价。

1.7.3 攻毒 :第 2 次免疫 7d 后,在实验鸡的眼和鼻内各滴 0.1mL 1:100 稀释的 GX8/99 感染鸡法氏囊组织悬液(病毒量约 200 个 ELD₅₀)。实验观察 7d,及时取出死亡鸡,剖解检查法氏囊变化。

2 结果

2.1 多表位基因的克隆

将合成的 6 个 DNA 片段退火补平, 用 pMD18-T

克隆, 获得重组克隆质粒 pMD-5epis。用 *Sac* I 和 *Hind* III 酶切、琼脂糖凝胶电泳分析, 可检测出长度约 280bp 的插入 DNA 片段。测序结果与设计序列一致(图 1)。

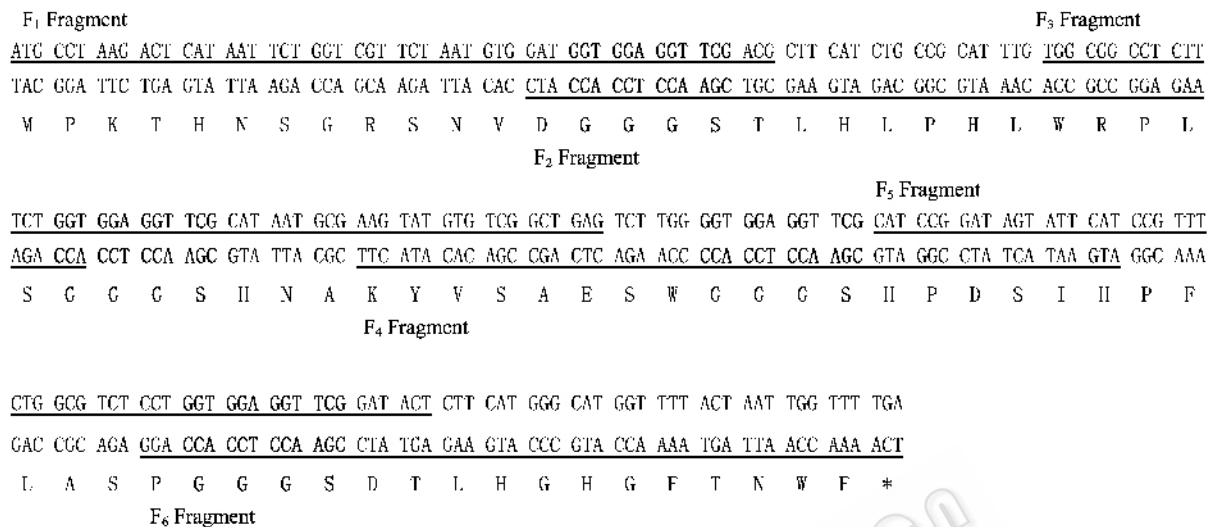


图 1 5epis 的合成与连接

Fig.1 Synthesis and ligation of 5epis. The synthetic DNA fragments were underlined.

2.2 多表位基因的表达

用构建的 5epis 表达质粒 pET-5epis 转化 BL21 (DE3) IPTG 诱导、SDS-PAGE 分析, r5EPIS 的分子量约 10kDa, 与推导编码氨基酸序列的理论分子量相符合。扫描分析 SDS-PAGE 图谱, r5EPIS 的表达量约 15%(图 2)。

r5EPIS 具有 IBDV 特异性和免疫反应性。

2.4 r5EPIS 对兔的免疫试验

用 IBDV 间接 ELISA 检测 r5EPIS 免疫兔血清抗体, 第一次免疫 7d 后抗体效价为 1:4000; 第二次免疫 14d 后抗体效价升高到 1:256000(表 1)。表明 r5EPIS 可诱导机体产生 IBDV 特异性抗体。

表 1 r5EPIS 免疫兔血清 IBDV 抗体动态 (1:X)

Table 1 The titers of anti-IBDV antibody in sera of rabbits immunized with r5EPIS (1:X)

Groups	Time (d)				
	0 ^Δ	7	14	21	28
r5EPIS + adjuvant	100	4000	64000	256000	256000
Adjuvant	100	100	100	100	100

^Δ The serum samples were taken from the beginning of immunization and measured with ELISA at initial dilution of 1:100.

2.5 r5EPIS 对鸡的免疫保护试验

2.5.1 免疫: 用 IBDV 间接 ELISA 检测 r5EPIS 免疫鸡血清抗体, 第一次免疫 7d 后抗体效价为 1:1600; 第二次免疫 7d 后抗体效价升高到 1:12800(表 2)。

2.5.2 攻毒: 从攻毒后的第 3d, 单用佐剂和饲养对照两个组的攻毒鸡开始死亡, 在 7d 的实验观察期间, 单用佐剂对照组的死亡率为 86.7%(13/15), 饲养对照组的死亡率为 93.3%(14/15), 解剖检查死亡鸡法氏囊红肿、出血, 而 r5EPIS 免疫组全部存活(表 2)。7d 后, 捕杀剩余的存活鸡, 单用佐剂和饲养对

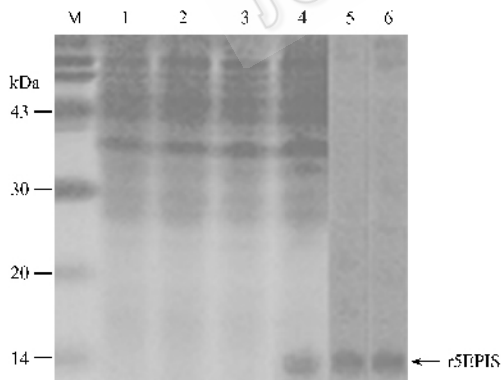


图 2 pET-5epis 的诱导表达与分析

Fig.2 Expression and analysis of recombinant pET-5epis. M. Protein Marker; 1. BL21 (DE3); 2. pET28b induced with IPTG; 3. pET-5epis; 4. pET-5epis induced with IPTG; 5. pET-5epis detected by immunoblotting with monoclonal antibody; 6. pET-5epis detected by immunoblotting with polyclonal antibody.

2.3 r5EPIS 的免疫反应性分析

在免疫印迹试验中, IBDV 单克隆抗体和多克隆抗体均可与 r5EPIS 反应, 在约 10kDa 处出现一条蛋白印迹(图 2), 与 SDS-PAGE 的分析结果一致。表明

照两个组的鸡法氏囊虽然没有出血,但萎缩明显,而 r5EPIS 免疫鸡法氏囊形态正常。

表 2 IBDV 对 r5EPIS 免疫鸡的攻毒结果

Table 2 Results of chickens challenged with IBDV GX8/99 strain

Groups	Antibody titers at inoculation	Mortality (Dead/Total [*])
r5EPIS + adjuvant	12800	0% (0/15)
Adjuvant control	100	86.7% (13/15)
Blank control	100	93.3% (14/15)

* Dead/total chickens, 7 days post inoculation.

3 讨论

IBDV 属双 RNA 病毒科,基因组包括大(A)小(B)两个片段,编码 5 种病毒蛋白:VP1、VP2、VP3、VP4 和 VP5。VP2 和 VP3 是病毒的主要结构蛋白,也是病毒主要保护性抗原^[2,3,11-13]。Azad 等^[14]用大肠杆菌表达 IBDV A 片段 cDNA,其后,Macreadie 等^[15]用酵母表达 VP2,以此作为亚单位疫苗免疫鸡可产生一定的免疫保护力。Shaw 等^[16]用鸡痘疫苗株为载体表达 VP2,该重组鸡痘病毒不仅对法氏囊有损害,而且只有在攻毒剂量较小时才能保护实验鸡免于死亡,免疫效果并不理想,且对近交来航鸡(15I 品系)无效。为了改善对变异株的保护率,Snyder 等^[17]将 IBDV 变异株 VP2 基因用标准毒的一个中和表位修饰,以杆状病毒表达修饰的变异株 VP2、VP3 和 VP4 嵌合 cDNA,免疫攻毒实验结果表明,该重组嵌合亚单位疫苗对 IBDV 标准强毒株和变异株的交叉保护性显著提高,可谓 IBD 多表位疫苗研究的早期探索。Fodor 等^[18]用人巨细胞病毒(HCMV)早期增强子和启动子构建 IBDV VP2 和 VP2-VP4-VP3 核酸疫苗,肌肉注射或腹腔注射免疫两次,结果表明 VP2-VP4-VP3 核酸疫苗能诱导鸡体产生抗体和免疫保护作用,单独 VP2 基因核酸疫苗则不能。分析已经进行的研究,从重组蛋白疫苗到病毒载体疫苗和核酸疫苗,有的不能产生中和抗体,有的则不能兼顾高保护力和囊损伤问题,有的还存在着表达量低、保护率低、免疫程序复杂以及难以工业化生产等缺点。随着对 IBDV 分子免疫学研究的深入,目前已查明的中和表位主要存在于 VP2 上,均为构象依赖性^[2,3,13]。因此,如何使重组蛋白保持 IBDV 保护性免疫所必须的构象,以形成有效的中和表位,成为一项亟待研究的课题。

抗原表位是蛋白质抗原性的物质基础,用分子克隆技术直接表达获得重组蛋白,难以保证中和表位的正确形成,在理论上,利用线性序列来模拟替代

构象依赖性的中和表位序列,可使表达的重组蛋白具有所需的中和表位序列,把中和表位的构象依赖性转变成线性而使问题得到解决。此外,由于单个抗原表位分子量小、结构简单,免疫原性弱,在体内易被降解,通常采用表位肽与载体蛋白进行偶联的方法来提高免疫原性,从以往的实验结果看,用这种偶联蛋白免疫动物产生的抗体绝大部分是针对载体蛋白的。研究表明,有效的保护性免疫应答取决于一组表位的合理组合与搭配^[19,20],为了增加表位肽的免疫原性、产生有效的保护性免疫应答,本实验将 5 个抗原表位模拟肽通过连接肽 GGGS 串联构建多表位基因,利用高效原核表达系统,制备重组多表位蛋白 r5EPIS。兔体免疫试验表明,r5EPIS 无需偶联蛋白辅助就可诱导机体产生高效价的 IBDV 抗体。进一步的鸡体免疫攻毒试验证明,r5EPIS 可诱导机体产生抗 IBDV 感染的保护性免疫应答,r5EPIS 具有作为 IBD 预防免疫制剂的潜力。GGGS 的空间结构具有高度易变性和灵活性,广泛用于蛋白质或肽之间的连接^[8,9]。本实验用其作为表位之间的连接,以期使 5 个抗原表位在空间上互不干扰,达到提高表位肽的分子量增强其免疫原性的目的。

用鸡进行的免疫保护试验中,r5EPIS 的免疫途径和剂量、IBDV 攻毒时机和剂量都是根据实验常规确定的,若进行优化,免疫保护效果可能会更好。

参 考 文 献

- [1] Muller H, Islam MR, Raue R. Research on infectious bursal disease—the past, the present and the future. *Veterinary Microbiology*, 2003, **97**(1-2):153-165.
- [2] Yamaguchi T, Lwata K, Kobayashi M, *et al.* Epitope mapping of capsid proteins VP2 and VP3 of infectious bursal disease virus. *Arch Virol*, 1996, **141**(8):1493-1507.
- [3] Cui X, Nagesha HS, Holmes IH. Identification of crucial residues of conformational epitopes on VP2 protein of infectious bursal disease virus by phage display. *J Virol Methods*, 2003, **109**(1):75-83.
- [4] 王永山,范红结,李银,等.传染性法氏囊病毒五个抗原表位短肽的鉴定与序列分析. *中国病毒学*, 2005, **20**(5):503-506.
- [5] 陈光华,蒋桃珍,董琳琳,等.鸡传染性法氏囊病毒单克隆抗体的研究. *中国兽药杂志*, 2000, **34**(3):9-13.
- [6] 王军,李银,范红结,等.传染性法氏囊病毒抗原表位分析——单克隆抗体的制备与鉴定. *中国预防兽医学报*, 2005, **27**(3):171-174.
- [7] 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. *中国农业科学*, 2004, **37**(11):1677-1681.
- [8] Hou Y, Gu XX. Development of peptide mimotopes of lipooligosaccharide from nontypeable haemophilus influenzae as vaccine candidates. *J Immunol*, 2003, **170**:4373-4379.

- [10] 崔治中, 孙淑红, 单忠芳, 等. 鸡传染性法氏囊病病毒超强毒株 GX8/99 株的致病性. 病毒学报, 2002, 18(2): 162 - 166.
- [11] Azad AA, Jagadish MN, Brown MN, et al. Deletion mapping and expression in *Escherichia coli* of the large genomic segment of a birnavirus. *Virology*, 1987, 161(1): 145 - 152.
- [12] Heine HG, Hariton M, Failla P, et al. Sequence analysis and expression of the host-protective immunogen VP2 of a variant strain of infectious bursal disease virus which can circumvent vaccination with standard type I strains. *J Gen Virol*, 1991, 72(8): 1835 - 1843.
- [13] Fahey KJ, McWaters P, Brown MA, et al. Virus-neutralizing and passively protective monoclonal antibodies to infectious bursal disease virus of chickens. *Avian Dis*, 1991, 35: 365 - 373.
- [14] Azad AA, Fahey KJ, Barrett SA, 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.
- [15] Macreadie IG, Vaughan PR, Chapman AJ, et al. Passive protection against infectious bursal disease virus by viral VP2 expressed in yeast. *Vaccine*, 1990, 8(6): 549 - 552.
- [16] Shaw I, Davison TF. Protection from IBDV-induced bursal damage by a recombinant fowlpox vaccine, fpIBD1, is dependent on the titre of challenge virus and chicken genotype. *Vaccine*, 2000, 18(28): 3230 - 3241.
- [17] Snyder DB, Vakharia VN, Mengel-Whereat SA, et al. Active cross - protection induced by a recombinant baculovirus expressing chimeric infectious bursal disease virus structural proteins. *Avian Dis*, 1994, 38(4): 701 - 707.
- [18] Fodor I, Horvath 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(4): 481 - 492.
- [19] Rabinovich NR, Melnes P, Klein DL, et al. Vaccine technologies: view to the future. *Science*, 1994, 265(5177): 1401 - 1404.
- [20] James PT. Synthetic peptide vaccine design: synthesis and properties of a high-density multiple antigenic peptide system. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1988, 85: 5409 - 5413.

Expression and immunogenic analysis for the tandem-arranged multiple mimic epitope gene of Infectious Bursal Disease Virus

WANG Yong-shan^{1*}, FAN Hong-jie², ZHANG Xiao-min¹, LI Yin³, XIAO Huan-juan¹

(¹ Military Medical Institute of Nanjing Command, Center for Disease Control and Prevention of Nanjing Command, Nanjing 210002, China)

(² College of Veterinary Medicine, Nanjing Agricultural University, Nanjing 210095, China)

(³ Institute of Veterinary Science, Jiangsu Academy of Agricultural Sciences, Nanjing 210014, China)

Abstract: Five mimic epitopes of *Infectious bursal disease virus* (IBDV) have been identified from a 12-mer phage-displayed peptide library by 5 monoclonal antibodies. Based on the sequences of the five epitopes, multiple epitope gene 5epis was constructed by the five epitopes being tandemly arranged and linked with 4-peptide GGGS. The expression plasmid pET-5epis was constructed and successfully expressed in *E. coli*. The resultant protein of 5epis was called r5EPIS. The results from SDS-PAGE analysis showed that the proportion of r5EPIS was 15% of the total bacterial proteins and the molecular weight of r5EPIS was 10kDa. By use of parallel immunoblotting test with corresponding monoclonal and polyclonal antibodies, the immunological specificity and reactivity of r5EPIS against IBDV have been verified. Rabbits were subcutaneously injected with r5EPIS (400 μ g per injection), twice with 7 days interval. The titers of the IBDV-specific antibody measured by indirect ELISA were up to 1:4000 at the 7th day after first immunization and 1:256000 at the 14th day after the second immunization. To determine the protective ability of r5EPIS to the challenge of IBDV, chickens were injected intramuscularly with r5EPIS in adjuvant twice with 7 days interval (50 μ g per injection) and the resultant antibody titer was up to 1:12800 at the 7th day after the second immunization. After challenge with 200ELD₅₀ of virulent IBDV GX8/99 strain, all the chicken in r5EPIS-immunized group were survived in contrast to the mortality of 86.7%(13/15) in adjuvant control group, suggesting that r5EPIS had a potent ability to generate protective immune response and it implied that the constructed gene 5epis is a prospective candidate for the development of epitope-based IBD vaccine.

Keywords: *Infectious bursal disease virus* (IBDV); Epitope; Expression; Immunogenicity