



猪德尔塔冠状病毒双脯氨酸突变 S 蛋白的表达及免疫原性评价

文玉涵¹, 于瑞明¹, 张莉萍², 杜晓华¹, 潘丽², 王永录², 郭慧琛², 刘霞^{1*}, 刘新生^{2*}

1 甘肃农业大学生命科学技术学院, 甘肃 兰州 730070

2 中国农业科学院兰州兽医研究所 动物疫病防控全国重点实验室, 甘肃 兰州 730046

文玉涵, 于瑞明, 张莉萍, 杜晓华, 潘丽, 王永录, 郭慧琛, 刘霞, 刘新生. 猪德尔塔冠状病毒双脯氨酸突变 S 蛋白的表达及免疫原性评价[J]. 微生物学报, 2024, 64(8): 2799-2812.

WEN Yuhan, YU Ruiming, ZHANG Liping, DU Xiaohua, PAN Li, WANG Yonglu, GUO Huichen, LIU Xia, LIU Xinsheng. Expression and immunogenicity of S protein with two proline residue mutations of porcine deltacoronavirus[J]. Acta Microbiologica Sinica, 2024, 64(8): 2799-2812.

摘要:【目的】猪德尔塔冠状病毒(porcine deltacoronavirus, PDCoV)是一种重要的猪肠道冠状病毒, 给全球生猪养殖业带来了巨大的经济损失, 截至目前, 尚无可用的商品化疫苗。本研究选择宿主免疫反应主要诱因因子棘突(spike, S)蛋白, 并将 PDCoV S 蛋白七肽重复序列 1 (heptapeptide repeat-1, HR1)与中心螺旋之间的环中 855 和 856 位点均突变为双脯氨酸(E855P 和 V856P), 然后利用 ExpiCHO-S 真核表达系统表达、纯化重组 S 蛋白和双脯氨酸突变 S 蛋白(S2P)并评价其免疫原性及免疫保护性, 以初步研制一种免疫效果较好的 PDCoV 亚单位疫苗。【方法】利用间接酶联免疫吸附法检测免疫小鼠血清特异性抗体 IgG 水平; 利用血清中和试验检测免疫小鼠血清中和抗体滴度; 通过流式细胞术检测免疫小鼠 T 淋巴细胞增殖情况; 通过细胞因子检测免疫小鼠干扰素(interferon, IFN)- γ 、IFN- α 、白细胞介素(interleukin, IL)-2 和 IL-4 等细胞因子分泌情况; 采用 RT-qPCR 检测攻毒后小鼠肠道组织 PDCoV 病毒载量; 采用病理组织切片检测小鼠肠道有无病理损伤; 利用免疫组织化学检测小鼠肠道组织 PDCoV 抗原分布情况。【结果】免疫原性结果显示, 小鼠在肌肉注射 S 组和 S2P 组亚单位疫苗后能够产生较高水平的抗 PDCoV 特异性 IgG 抗体, 免疫后 42 d 的小鼠血清均对 PDCoV 具有中和作用, 其中, S2P 组对 LLC-PK 细胞 50%中和保护效价显著高于 S 组。此外, S 组和 S2P 组显著地诱导小鼠 CD₄⁺ T 淋巴细胞增殖, 并且 S2P 组高于 S

资助项目: 中央级公益性科研院所基本科研业务费(1610312021011); 国家生猪技术创新中心(NCTIP-XD/C 03)

This work was supported by the Central Public-interest Scientific Institution Basal Research Fund (1610312021011) and the National Center of Technology Innovation for Pigs (NCTIP-XD/C 03).

*Corresponding authors. E-mail: LIU Xia, liux@gsau.edu.cn; LIU Xinsheng, liuxinsheng@caas.cn

Received: 2024-01-14; Accepted: 2024-04-22; Published online: 2024-04-25

组, 而 S2P 组能够诱导小鼠 CD₈⁺ T 淋巴细胞增殖, 但 S 组与 PBS 组并无差异。同时, S 组和 S2P 组诱导的 IFN- γ 、IFN- α 、IL-2 和 IL-4 等细胞因子水平均显著高于 PBS 组, 但 S 组和 S2P 组并无差异。免疫保护性结果显示, PBS 组肠组织中可检测到 PDCoV 病毒, 肠组织出现病理损伤且可见大量 PDCoV 抗原, 而 S 组和 S2P 组未检测到 PDCoV 病毒且未观察到肠组织损伤, 二者之间无明显差异。【结论】S2P 组较之 S 组能够诱导小鼠产生更高水平的抗 PDCoV 体液免疫应答, 两组疫苗对小鼠均有一定的保护效果, 本研究为后续 PDCoV 亚单位疫苗研发奠定坚实的基础。

关键词: 猪德尔塔冠状病毒(porcine deltacoronavirus, PDCoV); S 蛋白; 双脯氨酸突变; 免疫原性

Expression and immunogenicity of S protein with two proline residue mutations of porcine deltacoronavirus

WEN Yuhan¹, YU Ruiming¹, ZHANG Liping², DU Xiaohua¹, PAN Li², WANG Yonglu², GUO Huichen², LIU Xia^{1*}, LIU Xinsheng^{2*}

1 College of Life Science and Technology, Gansu Agricultural University, Lanzhou 730070, Gansu, China

2 State Key Laboratory for Animal Disease Control and Prevention, Lanzhou Veterinary Research Institute, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Lanzhou 730046, Gansu, China

Abstract: [Objective] Porcine deltacoronavirus (PDCoV) is a major porcine enteric coronavirus, causing huge economic losses to the pig breeding industry worldwide. However, there is no commercial vaccine available for this virus. The spike (S) protein is a key factor inducing host immune response. In this study, the two sites 855 and 856 in the loop between the heptapeptide repeat-1 (HR1) and the central helix of PDCoV S protein were mutated to proline (E855P and V856P). Then, the recombinant S protein and mutated S protein (S2P) were expressed and purified by the ExpiCHO-S eukaryotic expression system, and their immunogenicity and immunoprotective performance were evaluated for developing a PDCoV subunit vaccine with good immune effect. [Methods] The serum level of the specific antibody IgG in immunized mice was measured by indirect enzyme-linked immunosorbent assay. The serum neutralization test was carried out to determine the titer of neutralizing antibodies in the immunized mice. The proliferation of T lymphocytes in immunized mice was detected by flow cytometry. The secretion levels of interferon (IFN)- γ , IFN- α , interleukin (IL)-2, and IL-4 were determined. RT-qPCR was employed to measure the PDCoV load in the intestinal tissue of mice after challenge. Tissue sections were prepared to observe the intestinal lesions of mice. The distribution of PDCoV antigen in the intestinal tissue of mice was detected by immunohistochemistry. [Results] High levels of anti-PDCoV specific IgG antibodies were produced in mice after intramuscular injection of S and S2P subunit vaccines, and the serum of mice 42 days after immunization had a neutralizing effect on PDCoV. The 50% neutralizing protective titer of LLC-PK cells in the S2P group was significantly higher than that in the S group. In addition, the immunization with S and S2P significantly induced the proliferation of

CD4⁺ T lymphocytes in mice, which was higher in the S2P group than in the S group. The immunization with S2P induced the proliferation of CD8⁺ T lymphocytes in mice, and the level of CD8⁺ T lymphocytes showed no difference between the S group and the PBS group. The levels of IFN- γ , IFN- α , IL-2, and IL-4 in the S and S2P groups were significantly higher than those in the PBS group and had no difference between the S and S2P groups. The challenge assay results showed that the PBS group presented PDCoV, pathological damage, and a large number of PDCoV antigens in the intestinal tissue, while neither PDCoV nor intestinal tissue damage was detected in the S and S2P groups, which showed no significant difference between the two groups. **[Conclusion]** S2P induces higher level of the humoral immune response against PDCoV in mice than S. The vaccines prepared with both S2P and S have protective effects on mice. The findings lays a foundation for the follow-up study of PDCoV subunit vaccines.

Keywords: porcine deltacoronavirus (PDCoV); S protein; bisproline mutation; immunogenicity

猪德尔塔冠状病毒(porcine deltacoronavirus, PDCoV)属于冠状病毒科德尔塔冠状病毒属, 是新发的一种猪肠道病毒病, 与猪流行性腹泻病毒(porcine epidemic diarrhea virus, PEDV)和猪传染性胃肠炎病毒(transmissible gastroenteritis virus, TGEV)一样^[1], PDCoV感染后的主要临床症状为水样腹泻、脱水、呕吐甚至死亡^[2-4]。虽然 PDCoV 临床症状较 PEDV 轻, 但 PDCoV 与 PEDV 或 TGEV 的混合感染可导致临床症状加重、致死率增高^[5-6]。PDCoV 最初于 2012 年在中国香港报道^[7], 随后于 2014 年在美国俄亥俄州的腹泻猪群中出现^[8]。目前, PDCoV 已传播到加拿大、韩国和泰国等国家^[9-12], 在全球范围内呈流行趋势。有报道称 PDCoV 可跨物种感染鸡、小牛等^[13-15], 而研究人员在 3 名患有急性未分化发热性疾病的海地儿童血浆样品中检测到 PDCoV^[16], 表明 PDCoV 具有跨物种传播的潜能。

PDCoV 是一种具有囊膜、单股正链的 RNA 病毒, 基因组长约为 25.4 kb^[11], 包含 5'和 3'非编码区及 8 个开放性阅读框, 分别编码多聚酶蛋白 1a/1b、棘突(spike, S)蛋白、小膜(envelope, E)蛋白、膜(membrane, M)蛋白、非结构

(non-structure, NS)蛋白 6、核衣壳(nucleocapsid, N)蛋白及非结构蛋白 7 (NS7)^[17]。棘突蛋白能够与受体结合介导病毒进入宿主细胞, 是宿主免疫反应的主要诱因因子, 其结构分为 S1 及 S2 亚基^[18], 在病毒感染过程中, S1 结合宿主细胞表面的受体进行病毒附着, S2 融合宿主和病毒膜, 使病毒基因组进入宿主细胞^[19]。

疫苗接种是预防冠状病毒最有效的方法之一, 然而 PDCoV 并无商品化疫苗, 已有的减毒疫苗^[20]和灭活疫苗^[21]均存在一定的优势, 但无法兼顾疫苗的安全性及保护性。亚单位疫苗安全性好、稳定性强、抗原质量高, 已被广泛认可^[22]。S 蛋白在冠状病毒疫苗研究中常被作为靶标抗原^[18]。此外, 由于冠状病毒(如 MERS-CoV 和 SARS-CoV-2)在感染宿主细胞的过程中, S 蛋白三聚体会发生构象转变, 从准备与受体结合的融合前构象转变为最终的病毒-细胞膜融合后构象, 已有研究发现在 PDCoV 感染宿主细胞的过程中也发生了类似构象变化^[19,23-24], 在这个过程中, S 蛋白会从活性状态转变为失活状态, 融合后构象活性较低, 所引起的免疫反应较低。关于 MERS-CoV 和 SARS-CoV-2 研究显示, 将第一个七肽重复序列 (heptapeptide

repeat-1, HR1)和中央螺旋之间的环中的 2 个氨基酸突变为双脯氨酸可稳定 S 蛋白融合前构象(S2P), 基于 S 蛋白稳定预融合构象的疫苗大多保留病毒刺突的初始天然轮廓, 从而引发高质量的抗病毒感染中和抗体^[25-26]。因此, 本研究将 PDCoV S 蛋白第一个七肽重复序列和中央螺旋之间的环中 855 位点和 856 位点的谷氨酸和缬氨酸均突变为脯氨酸(E855P 和 V856P), 然后利用 ExpiCHO-S 表达系统在体外表达 PDCoV 重组 S 蛋白和重组 S2P 蛋白, 并在动物体内免疫评价 PDCoV S 和 S2P 亚单位疫苗的免疫原性及免疫保护性, 以期为后续研制新型 PDCoV 亚单位疫苗奠定重要基础。

1 材料与方法

1.1 动物、细胞和菌株

无特定病原体级(specific pathogen free, SPF) BALB/c 雌性小鼠由中国农业科学院兰州兽医研究所实验动物中心提供, 该研究获得了中国农业科学院兰州兽医研究所动物伦理委员会批准(批准号: LVRIAEC-2023-048)。ExpiCHO-S 细胞购自赛默飞世尔科技(中国)有限公司; 猪肾上皮细胞 LLC-PK (ATCC: CL-101)由中国农业科学院兰州兽医研究所保存; PDCoV 毒株 CH/XJYN/2016 (GenBank 登录号为 MN064712)由本实验室前期分离并保存。

1.2 主要试剂

Mut Express II Fast Mutagenesis Kit V2 购自南京诺唯赞生物科技股份有限公司; *Bam*H I 和 *Xho* I 购自 New England Biolabs 公司; 质粒小量制备试剂盒购自 US Everbright Inc. 公司; 无内毒素质粒大提试剂盒购自天根生化科技(北京)有限公司; 弗式佐剂购自 Sigma-Aldrich 公司; 山羊抗小鼠 IgG 购自北京中杉金桥生物技术有限公司; BeyoECL Plus 购自上海碧云天生物技

术股份有限公司; 脱脂奶粉购自上海雅酶生物医药科技有限公司; MEM EARLES、BASIC RPMI 1640 Medium 购自赛默飞世尔生物化学制品(北京)有限公司; Mouse 1×Lymphocyte Separation Medium 购自深圳市达科为生物技术股份有限公司; 红细胞裂解液购自 Solarbio 公司; FITC 偶联的大鼠抗小鼠 CD₃ 抗体、PE 偶联的大鼠抗小鼠 CD₄ 抗体和 APC 偶联的大鼠抗小鼠 CD₈ 抗体购自 BioLegend 公司; 细胞因子试剂盒购自北京欣博盛生物技术有限公司; 大肠杆菌(*Escherichia coli*) DH5 α 、RNAiso Plus、One Step PrimeScriptTM RT-PCR Kit 均购自宝日医生物技术(北京)有限公司。

1.3 重组质粒的突变及鉴定

为了将本实验室保存的 S-pcDNA3.1(+) 重组质粒^[27] 855、856 位点的谷氨酸及缬氨酸突变为连续的 2 个脯氨酸, 使用 Mut Express II Fast Mutagenesis Kit V2 进行定点突变。首先, 设计引物对 S2P-Forward (5'-AACAGACTGG AACCGCCGGAGGCCAATCAGCAGGTTCG-3') 和 S2P-Reverse (5'-CCGCGGTTCCAGTCTGTT GTAGATGTCCTGG-3'), 以 S-pcDNA3.1(+) 质粒为模板进行 PCR 扩增。PCR 扩增体系(50 μ L): 上、下游引物(10 μ mol/L)各 2 μ L, 2×Max Buffer 25 μ L, DNA 模板 2 μ L, ddH₂O 17 μ L, dNTP Mix (10 mmol/L each) 1 μ L, Phanta Max Super-Fidelity DNA Polymerase 1 μ L, 每个样品设置 3 个重复。PCR 扩增条件: 95 °C 预变性 30 s; 95 °C 变性 15 s, 65 °C 退火 15 s, 72 °C 延伸 2 min, 循环 30 次; 72 °C 彻底延伸 5 min。其次, 将扩增产物用 *Dpn*I 酶消化并测定消化产物浓度及计算消化产物用量; 随后利用 Express II 催化待突变位点重组, 实现线性 DNA 体外环化, 最后进行重组产物的转化及测序鉴定(详细步骤参考南京诺唯赞生物科技股份有限公司

Mut Express II Fast Mutagenesis Kit 2 说明书)。S-pcDNA3.1(+)重组质粒及测序正确的突变 S2P-pcDNA3.1(+)重组质粒利用 *Bam*H I 和 *Xho* I 双酶切鉴定。

1.4 重组蛋白的表达鉴定

将重组质粒 S-pcDNA3.1(+)和 S2P-pcDNA3.1(+) 转染至细胞密度为 6×10^6 个活细胞/mL 的 ExpiCHO-S 细胞中, 37 °C、5% CO₂ 条件下悬浮培养至第 8 天。随后在生物安全柜中无菌吸取 1 mL 悬浮细胞, 4 °C、4 000×g 离心 10 min 后收取上清液进行聚丙烯酰胺凝胶电泳, 转印至硝酸纤维素膜进行免疫印迹分析。以 Mouse Anti-His mAb (1:5 000 稀释)为一抗, 以 HRP 标记山羊抗小鼠 IgG (1:10 000 稀释)为二抗, 用化学发光底物(enhanced chemiluminescence, ECL) 进行显影。根据 Western blotting 结果验证重组蛋白表达情况。

1.5 重组蛋白的纯化及免疫印迹分析

将重组质粒 S-pcDNA3.1(+)和 S2P-pcDNA3.1(+) 转染至细胞密度为 6×10^6 个活细胞/mL 的 ExpiCHO-S 细胞中, 37 °C、5% CO₂ 条件下悬浮培养 10–12 d。将收集的细胞 4 °C、4 000×g 离心 30 min 后, 用 0.22 μm 过滤器过滤。过滤后上清液与 Ni-NTA Agarose 在 4 °C 结合过夜, 取出 Ni-NTA Agarose 静置 10–20 min, 使 Ni-NTA Agarose 填料自然沉淀于柱底。随后使流穿自然流出, 用 20 mL PBS 过柱 2 次, 洗涤杂蛋白, 再用 20 mL 含 20 mmol/L 咪唑的 PBS 过柱并收集流穿液, 最后用 3 mL 500 mmol/L 咪唑洗

脱目的蛋白, 重复 5 次。将洗脱目的蛋白进行透析浓缩并测定蛋白浓度, 于-80 °C 保存备用。

1.6 小鼠免疫

将纯化的 S 和 S2P 重组蛋白分别与弗式佐剂 1:1 混合, 通过互推法乳化, 制备亚单位疫苗。将 30 只 6 周龄无特定病原体(SPF)的雌性 BALB/c 小鼠随机分为 3 组(每组 10 只): G1 组(PBS)、G2 组(S 蛋白 10 μg)和 G3 组(S2P 蛋白 10 μg), 如表 1 所述完成免疫。分别于 0、14 和 28 d 免疫 3 次, 免疫采用肌肉注射 100 μL/只, 每组免疫后的第 14 天进行外眦静脉采血, 分离血清后储存在-80 °C 冰箱中备用。

1.7 间接酶联免疫吸附试验(enzyme-linked immuno sorbent assay, ELISA)

用间接 ELISA 测定免疫后小鼠特异性抗体水平, 将纯化的 PDCoV S1 重组蛋白用 50 mmol/L 的碳酸盐缓冲液(pH 9.6)稀释至 2 μg/mL, 4 °C 过夜包被 96 孔酶标板(100 μL/孔), PBST 洗 3 次; 再用 5% 脱脂奶粉在 37 °C 温箱封闭 2 h (100 μL/孔), PBST 洗 3 次; 随后用血清稀释液将小鼠血清以 1:100、1:200、1:400 等稀释比例倍比稀释, 将稀释好的血清以 100 μL/孔加样, 于 37 °C 温育 45 min, PBST 洗 3 次; 接着用 1×PBST 将山羊抗鼠-HRP 稀释(1:10 000), 100 μL/孔加样, 于 37 °C 温育 30 min, PBST 洗 5 次; 然后加入单组分四甲基联苯胺(tetramethylbenzidine, TMB)显色液显色(50 μL/孔), 于 37 °C 温育 15 min; 最后以 50 μL/孔加入终止液终止显色, 酶标仪测定 OD₄₅₀ 吸光度值。

表 1 小鼠免疫及采血情况

Table 1 Immunity and blood collection of mice

Group	Immunogenic antigen	Dose (μg)	Immune time (d)	Blood collection time (d)
G1	PBS	–	0, 14, 28	14, 28, 42
G2	S	10	0, 14, 28	14, 28, 42
G3	S2P	10	0, 14, 28	14, 28, 42

– is PBS instead of antigen immunization dose.

1.8 血清中和试验

将采集的小鼠血清于 56 °C 灭活 30 min, 用 0.22 μm 过滤器过滤除菌, 并用维持培养基稀释 10 倍, 然后在 96 孔板进行连续倍比稀释。再与等体积的病毒液 (200 TCID₅₀) 混合, 置于 37 °C、5% CO₂ 培养箱中作用 1 h。随后在铺满 70%–80% LLC-PK 细胞的 96 孔上加入 100 μL 血清-病毒混合液, 在 37 °C、5% CO₂ 培养箱中孵育 1 h, 随后弃掉 96 孔板中的液体, 用 PBS 清洗 3 次, 每孔加入 200 μL 维持培养基 (含 20 μg/mL 胰酶), 随后 5–7 d 观察并记录细胞病变 (cytopathic effect, CPE) 情况。采用 Reed-Muench 法计算中和抗体效价, 中和抗体滴度为能够保护 50% 的细胞不发生病变的血清最高稀释倍数。

1.9 流式细胞术

免疫后第 6 周取小鼠脾脏, 使用小鼠淋巴细胞分离液分离脾淋巴细胞, 并用细胞计数板计数。利用 BASIC RPMI 1640 培养基将脾淋巴细胞悬液稀释成 1×10⁶ 个细胞/mL, 使用 100 μL PBS 重悬细胞, 并加入 1 μL FITC 偶联的大鼠抗小鼠 CD₃ 抗体、2 μL PE 偶联的大鼠抗小鼠 CD₄ 抗体和 2 μL APC 偶联的大鼠抗小鼠 CD₈ 抗体, 避光孵育抗体 (4 °C, 30 min); 设置空白组及单阳对照组。随后用 1.5 mL 预冷的 PBS 清洗 2 次, 500×g 离心 5 min。最后用 200 μL PBS 重悬细胞, 流式细胞仪检测。

1.10 细胞因子检测

使用细胞因子 ELISA 试剂盒 (北京欣博盛生物科技有限公司) 检测免疫后第 42 天小鼠血清中的细胞因子 [干扰素 (interferon, IFN)-α、IFN-γ、白细胞介素 (interleukin, IL)-2 和 IL-4] 的浓度, 具体步骤参考该试剂盒说明书。

1.11 攻毒及采样方案

每个免疫组随机选择 3 只小鼠, 每只小鼠灌胃 300 μL PDCoV 病毒液 (10^{4.6} TCID₅₀/mL) 及

肌内注射 200 μL PDCoV 病毒液 (10^{4.6} TCID₅₀/mL), 接种后第 3 天安乐死小鼠, 取小鼠肠组织 -80 °C 保存以提取组织 RNA, 同时采集小鼠肠组织固定在 4% 多聚甲醛中进行病理观察及免疫组织化学实验。

1.12 RT-qPCR 检测小鼠肠组织中的 PDCoV 病毒载量

将采集好的小鼠肠组织用组织研磨仪研磨, 并加入 1 mL RNAiso Plus 提取小鼠肠组织中病毒 RNA, 随后 RT-qPCR 检测小鼠肠组织中的 PDCoV 病毒载量。RT-qPCR 按照 One Step PrimeScript™ RT-PCR Kit 说明书进行。采用 PDCoV N 基因特异性引物和探针进行检测, 引物为 PDCoV-Q-Forward (5'-ACGTCGTAAGACC CAGCATC-3')、PDCoV-Q-Reverse (5'-CCCACC TGAAAGTTGCTCTC-3') 和 PDCoV-Q-probe (5'-CY5-GTATGGCTGATCCTCGCATCATGGC-BHQ2-3')。热循环参数: 42 °C 5 min, 95 °C 10 s; 95 °C 5 s, 57 °C 20 s, 循环 40 次。

1.13 病理组织切片及免疫组织化学

将固定组织经全自动脱水机脱水后切片并脱蜡至水, 苏木精染色 10–20 min, 冲洗 1–3 min。盐酸乙醇分化 5–10 s, 冲洗 1–3 min 后放入 50 °C 的温水中或弱碱性水溶液返蓝, 直到出现蓝色为止。随后伊红染色 3–5 min, 水洗 3–5 s, 经梯度乙醇脱水、二甲苯透明后用中性树胶封固。采用 Pannoramic 250 数字切片扫描仪对切片进行图像采集, 观察肠组织具体病变。以本实验室制备并保存的 PDCoV N 蛋白单抗为一抗, HRP 标记山羊抗小鼠 IgG 为二抗进行免疫组织化学实验。

1.14 数据统计分析

采用 GraphPad Prism 软件对试验数据进行单因素方差分析 (one-way ANOVA) 确定组间差异。ns 表示各组间无显著性差异 ($P > 0.05$), * 表

示为各组间有统计学差异($P<0.05$), **表示各组间有显著性统计学差异($P<0.01$), 而***表示各组间有极显著性统计学差异($P<0.001$)。

2 结果与分析

2.1 S-pcDNA3.1(+)重组质粒双脯氨酸突变及鉴定

将 S-pcDNA3.1(+)重组质粒 855、856 位点的谷氨酸及缬氨酸突变为连续的 2 个脯氨酸(图 1A), 并用 *Bam*H I、*Xho* I 双酶切验证 S-pcDNA3.1(+)和 S2P-pcDNA3.1(+)质粒, 结果如图 1B 所示, 出现符合 pcDNA3.1(+)载体及 S 基因大小的 2 条条带, 说明 S-pcDNA3.1(+)重组质粒正确; 如图 1C 所示, 同样出现符合 pcDNA3.1(+)载体及 S2P 基因大小的 2 条条带, 说明 S2P-pcDNA3.1(+)重组质粒构建正确。

2.2 S 和 S2P 重组蛋白的表达及纯化

将 S-pcDNA3.1(+)和 S2P-pcDNA3.1(+)重组质粒转染至 ExpiCHO-S 细胞, 第 8 天吸取 1 mL 悬浮细胞验证 S 和 S2P 重组蛋白是否在

ExpiCHO-S 细胞表达, Western blotting 结果显示(图 2A、2B), 在 180 kDa 出现特异性条带, 与 S 和 S2P 重组蛋白大小相符, 证明 S 和 S2P 重组蛋白已经在 ExpiCHO-S 细胞成功表达。第 10 天收集细胞, 冷冻离心机离心, 收取上清液, 运用 Ni-NTA Agarose 纯化蛋白。为了鉴定纯化蛋白, 将 20 mmol/L 咪唑洗脱液及 500 mmol/L 咪唑洗脱液进行 SDS-PAGE 鉴定。如图 2C 所示, 考马斯亮蓝染色出现 4 条较亮条带, 蛋白分子量大小 180 kDa, 与预期 S 蛋白大小相符。图 2D 中 180 kDa 处同样出现符合预期大小条带, 证明重组 S2P 蛋白纯化成功。

2.3 血清特异性 IgG 抗体水平

为了检测 S 及 S2P 组亚单位疫苗在小鼠体内特异性 IgG 抗体水平, 本研究采用间接 ELISA 方法分别检测第 14、28 和 42 天小鼠特异性抗体水平。如图 3 所示, 以 PDCoV S1 蛋白作为包被抗原检测小鼠特异性抗体, 其中 S 亚单位疫苗经过第一次免疫后特异性抗体滴度最高达到 1:86 400, 第二次免疫后特异性抗体滴度

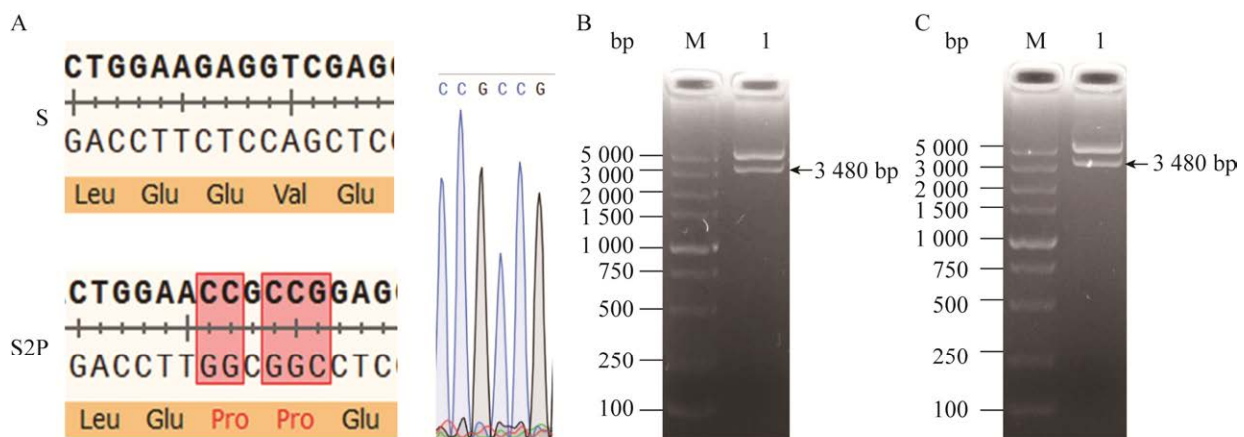


图 1 S-pcDNA3.1(+)重组质粒双脯氨酸突变及双酶切鉴定

Figure 1 Double proline mutation and double digestion identification of S-pcDNA3.1(+) recombinant plasmid. A: Double proline mutation of S-pcDNA3.1(+) recombinant plasmid. B: Double digestion of recombinant plasmid S-pcDNA3.1(+). M: DNA marker; 1: Double digestion of S-pcDNA3.1(+) recombinant plasmid. C: Double digestion of recombinant plasmid S2P-pcDNA3.1(+). M: DNA marker; 1: Double digestion of S2P-pcDNA3.1(+) recombinant plasmid.

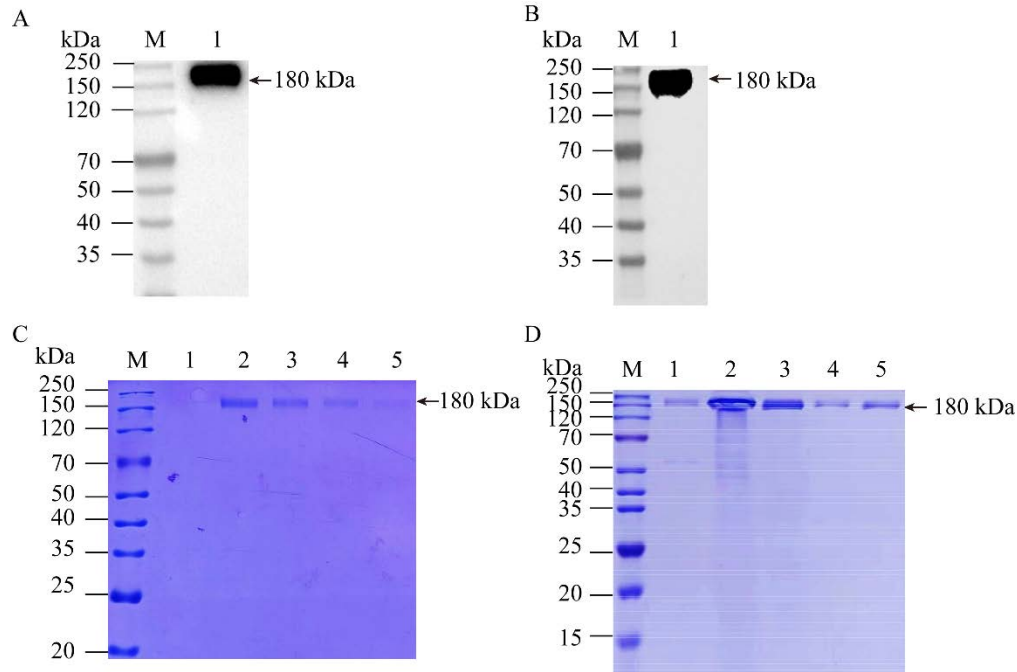


图 2 S 和 S2P 重组蛋白在 ExpiCHO-S 细胞表达及纯化

Figure 2 Expression and purification of S and S2P recombinant proteins in ExpiCHO-S cells. A: Recombinant S protein was expressed in ExpiCHO-S cells. M: Protein marker; 1: Expression of recombinant S protein. B: Recombinant S2P protein was expressed in ExpiCHO-S cells. M: Protein marker; 1: Expression of recombinant S2P protein. C: Ni-NTA Agarose was used to purify recombinant S protein. M: Protein marker; 1: 20 mmol/L imidazole elution; 2–5: 500 mmol/L imidazole elution. D: Ni-NTA Agarose was used to purify recombinant S2P protein. M: Protein marker; 1: 20 mmol/L imidazole elution; 2–5: 500 mmol/L imidazole elution.

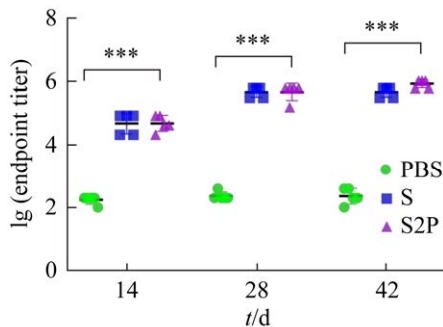


图 3 间接 ELISA 检测血清特异性抗体 IgG

Figure 3 Detection of serum specific antibody IgG by indirect ELISA.

最高达到 1:640 000，第三次免疫后特异性抗体滴度最高达到 1:640 000；S2P 亚单位疫苗经过第一次免疫后特异性抗体滴度最高达到

1:86 400，第二次免疫后特异性抗体滴度最高达到 1:640 000，第三次免疫后特异性抗体滴度最高达到 1:1 080 000，经过 3 次免疫后 S 和 S2P 亚单位疫苗在小鼠体内产生的特异性 IgG 抗体均显著高于 PBS 组($P < 0.001$)。

2.4 血清中和抗体水平

为了鉴定 S 组和 S2P 组亚单位疫苗免疫后的小鼠血清在体外中和 PDCoV 的能力，本研究采用固定病毒-稀释血清的方法来测定实验小鼠血清的中和抗体滴度。如图 4 所示，S 组中和抗体滴度达到了 1:118，S2P 组中和抗体滴度达到了 1:203，2 组血清的中和抗体滴度均极显著($P < 0.001$)高于 PBS 组，并且 S2P 组显著($P < 0.01$)高于 S 组。

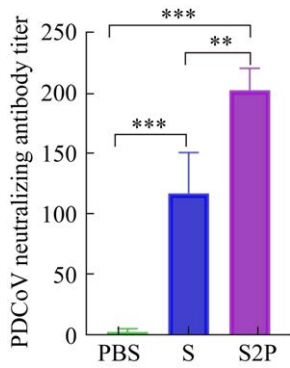


图 4 血清抗 PDCoV 中和抗体效价
Figure 4 Titer of serum anti-PDCoV neutralizing antibody. **: $P < 0.01$; ***: $P < 0.001$.

2.5 小鼠脾脏淋巴细胞 CD_4^+ T 及 CD_8^+ T 细胞亚群检测

当小鼠受到刺激产生免疫反应后, 淋巴细胞在增殖过程中会产生 CD_4^+ T 淋巴细胞及 CD_8^+ T 淋巴细胞, 进而发生体液免疫和细胞免疫。本研究通过流式细胞术检测, 第一次免疫后 42 d 小鼠脾脏淋巴细胞分型可知(图 5A), 与 PBS 组相比, S 组亚单位疫苗能显著($P < 0.01$)诱导小鼠 CD_3^+ T 淋巴细胞增殖(图 5B), S2P 组亚单位疫苗能极显著($P < 0.001$)诱导小鼠 CD_3^+ T 淋巴细胞

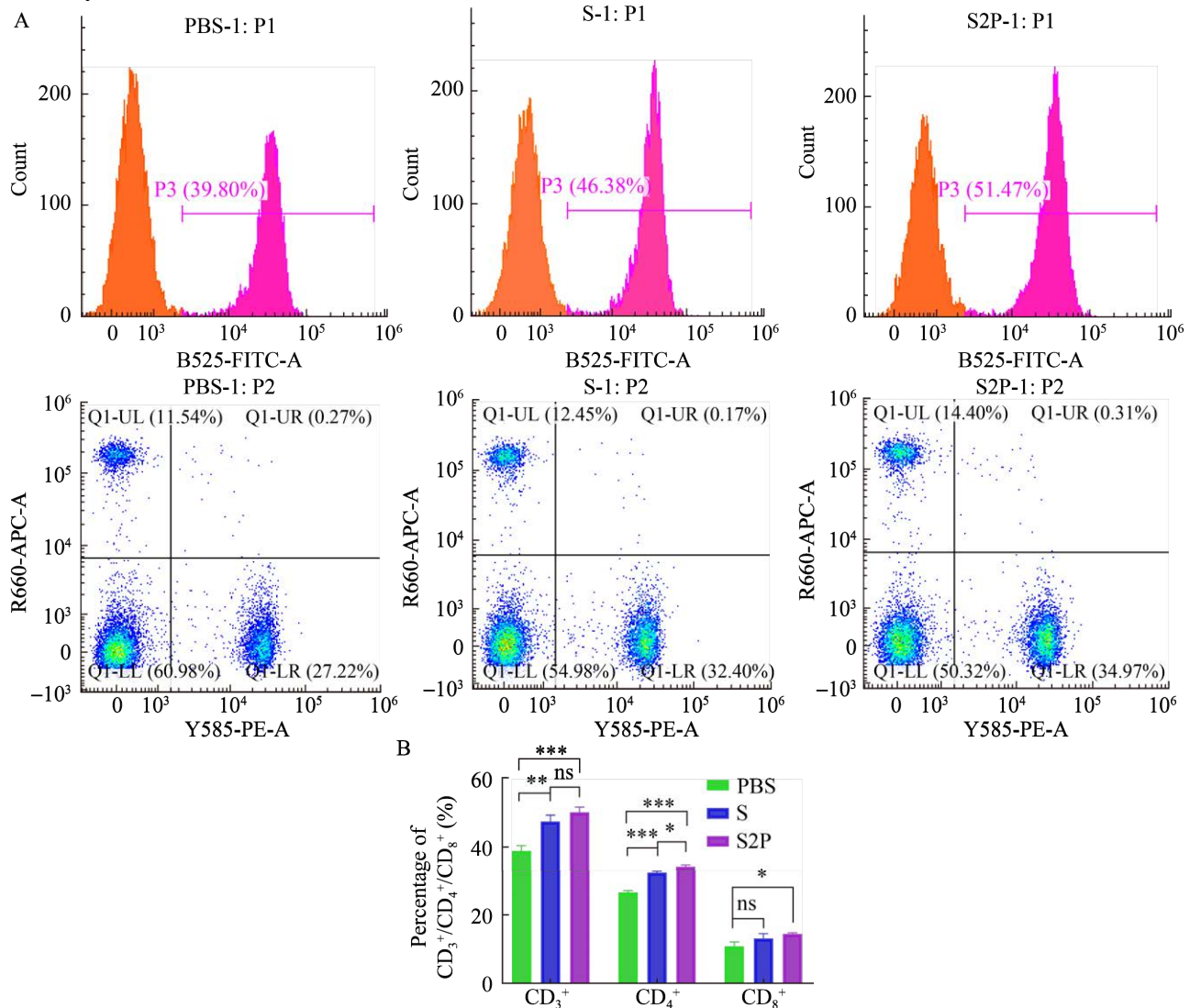


图 5 流式细胞术检测脾淋巴细胞
Figure 5 Spleen lymphocytes were detected by flow cytometry. A: Flow cytometry was used to determine the types of spleen T lymphocytes. B: $CD_3^+/CD_4^+/CD_8^+$ typing of spleen T lymphocytes. ns: $P > 0.05$; *: $P < 0.05$; **: $P < 0.01$; ***: $P < 0.001$.

增殖(图 5B), 但 S 与 S2P 两组亚单位疫苗在诱导 CD_3^+ T 淋巴细胞增殖时无显著差异。与 PBS 组相比, S 和 S2P 两组亚单位疫苗均能极显著 ($P<0.001$) 诱导小鼠 CD_4^+ T 淋巴细胞增殖(图 5B), 并且 S2P 组要高于 S 组 ($P<0.05$)。与 PBS 组相比, S2P 组能 ($P<0.05$) 诱导小鼠 CD_8^+ T 淋巴细胞增殖(图 5B), 但 S 组与 PBS 组无差异。

2.6 IFN- γ 、IFN- α 、IL-2 及 IL-4 细胞因子检测

为了检测肌肉注射 S 和 S2P 亚单位疫苗后对小鼠体液免疫及细胞免疫的影响, 本研究分别利用第一次免疫后 42 d 的小鼠血清检测了 IFN- α (图 6A)、IFN- γ (图 6B)、IL-2 (图 6C) 及 IL-4 (图 6D) 4 种细胞因子。S 和 S2P 组诱导的 IFN- γ 显著 ($P<0.01$) 高于 PBS 组, S 和 S2P 组诱导

的 IFN- α 、IL-2、IL-4 极显著 ($P<0.001$) 高于 PBS 组, 但 S 组与 S2P 组的 4 种细胞因子均无差异。

2.7 RT-qPCR 检测小鼠肠组织中 PDCoV 病毒载量

利用 RT-qPCR 鉴定小鼠肠组织中 PDCoV 病毒载量。结果显示(表 2), PBS 组中 3 只小鼠的肠组织均可检测到 PDCoV 病毒, S 组(3 只小鼠)和 S2P 组(3 只小鼠)的肠组织均未检测到 PDCoV 病毒。

2.8 小鼠肠道组织病理切片及免疫组织化学观察

PBS 组中 3 只小鼠肠组织均出现了炎性细胞浸润, 其中一例黏膜固有层深层点状坏死, 可见坏死细胞胞核固缩、崩解, 胞质溶解, 坏死区域纤维组织轻微增生(图 7)。S 组和 S2P 组

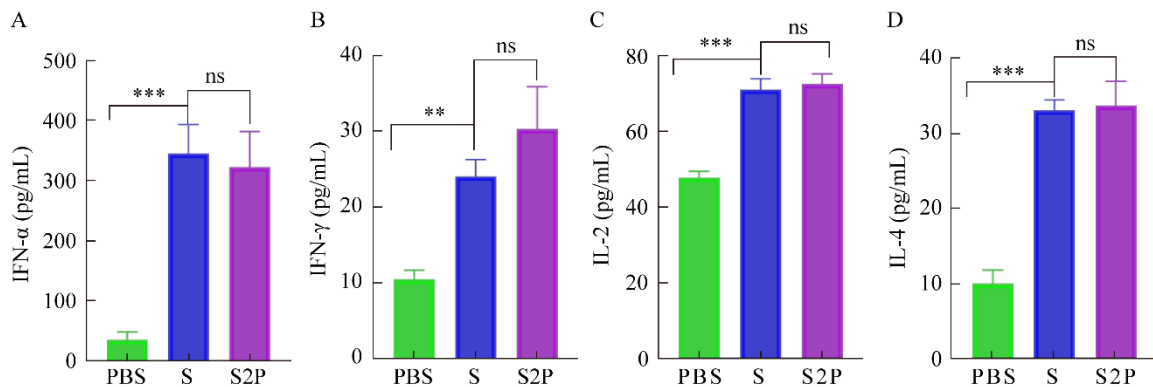


图 6 细胞因子水平测定

Figure 6 Cytokine levels were measured. A: IFN- α levels. B: IFN- γ levels. C: IL-2 levels. D IL-4 levels. ns: $P>0.05$; **: $P<0.01$; ***: $P<0.001$.

表 2 小鼠肠组织 C_t 值

Table 2 C_t values of mouse intestinal tissue

Group	The first		The second		The third	
	C_t -1	C_t -2	C_t -1	C_t -2	C_t -1	C_t -2
PBS	28.12	28.48	28.78	28.55	29.48	29.86
S	31.88	31.56	31.79	31.42	32.18	31.54
S2P	32.87	33.69	31.90	32.59	33.69	31.70

C_t value >30 is considered negative or below the detection limit of RT-qPCR, while C_t value ≤ 30 is considered positive for PDCoV^[28].

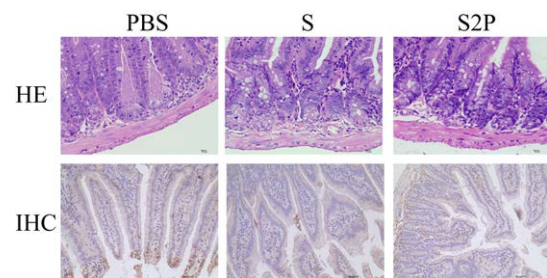


图 7 组织病理切片和免疫组织化学

Figure 7 Histopathological and immunohistochemistry analyses. HE: Histomorphology; IHC: immunohistochemistry.

均有 2 例固有层少量或极少量炎性细胞浸润, 肌层和浆膜层未见明显炎性细胞浸润和增生, 其他未见明显病理变化(图 7)。此外, 免疫组织化学结果显示(图 7), PBS 组可见大量的 PDCoV 抗原, 呈棕色分布。S 组及 S2P 组未检测到明显的 PDCoV 抗原。

3 讨论与结论

PDCoV 作为一种新发的猪肠道冠状病毒, 其流行病学、临床和病理特征与传染性胃肠炎病毒(TGEV)和猪流行性腹泻病毒(PEDV)相似。所有年龄的猪都可能受到影响, 但在新生仔猪中最为严重。PDCoV 可引起哺乳仔猪严重萎缩性肠炎并伴有严重腹泻、呕吐和脱水, 甚至死亡, 死亡率约为 40%–80%^[29]。PDCoV 在美国、加拿大、韩国、中国、泰国等多个国家均有发现^[8-12], 对全球养猪业造成严重的威胁。因此, 预防和治疗 PDCoV 就显得非常重要, 但目前尚无 PDCoV 商业化疫苗, 因此研究新型亚单位疫苗是非常有必要的。

目前 PDCoV 亚单位疫苗已有一些相关研究报告。Chen 等^[30]利用大肠杆菌表达系统表达了 PDCoV S 蛋白部分区域, 动物实验结果表明 C 端结构域可能比 N 端结构域和 S2 区域更具有免疫原性, 并且可能包含主要的 PDCoV S 蛋白中的中和表位。Li 等^[31]设计了 PDCoV 刺突(S)蛋白和受体结合域(receptor binding domain, RBD)三聚体作为候选亚单位疫苗, 并证明了基于 S 蛋白的亚单位疫苗对 PDCoV 感染具有显著的保护作用。Wang 等^[32]利用昆虫杆状病毒表达系统中高效表达密码子优化的 PDCoV-RBD 蛋白, 并表明 RBD 蛋白具有良好的抗原性, 可以作为一种保护性抗原, 为 PDCoV 的发展提供基础。上述研究均以 S 蛋白或 S 蛋白截短蛋白作为靶抗原^[18]。此外, Pallesen 等^[25]的研究表明

MERS-CoV S 蛋白连续 2 个脯氨酸替换残基 V1060 和 L1061, 可使其三聚体 S 蛋白产量增加 50 倍以上, 而且接种后所诱导的中和活性广度和效力显著提升。Li 等^[26]证明昆虫细胞表达的预融合三聚体稳定的 SARS-CoV-2 S 蛋白可能为开发重组 COVID-19 疫苗提供潜在的候选策略。在膜病毒 RSV^[33-34]和 HIV^[35]也有学者通过稳定预融合状态来设计疫苗。上述研究均说明 S2P 蛋白是一种非常有潜力的抗原。因此, 本研究选择通过突变 S 蛋白关键位点并评价其免疫原性, 以期有更好的免疫效果。

本研究设计、突变了 PDCoV S 蛋白 855、856 位点的谷氨酸、缬氨酸为双脯氨酸, 并利用 ExpiCHO-S 真核表达系统表达并纯化了重组 S 和 S2P 蛋白, 再以 BALB/c 小鼠为实验动物模型, 评价了 PDCoV S 组和 S2P 组亚单位疫苗的免疫原性。动物实验结果显示, S 组和 S2P 组在小鼠体内可诱导产生高水平的抗 PDCoV 特异性 IgG 抗体, 这与 Li 等^[26]、Yu 等^[27]研究结果一致。S 组和 S2P 组一免后 42 d 血清的中和抗体可以有效中和 PDCoV 感染, 其中, S 组中和抗体滴度达到了 1:118, S2P 组中和抗体滴度达到了 1:203, S2P 组对细胞 50%保护率显著优于 S 组, 这与 Li 等^[26]的研究结果一致。此外, 与 PBS 组相比, S 组和 S2P 组免疫组小鼠 CD4⁺淋巴细胞水平均有显著增长, S2P 组优于 S 组, 这与中和试验结果一致, 说明 S2P 组较 S 组能够更好地刺激小鼠产生体液免疫。然而 S2P 组 CD8⁺淋巴细胞水平较 PBS 组有一定增长, 但 S 组 CD8⁺淋巴细胞水平与 PBS 并无差异, 这与亚单位疫苗主导机体体液免疫相符。同时 S 组和 S2P 组所诱导的 IFN- α 、IFN- γ 、IL-2 及 IL-4 水平均显著高于 PBS 组, 并且 S 组及 S2P 组无差异, 这说明了 S 组及 S2P 组均能刺激小鼠产生一定的体液免疫和细胞免疫应答。小鼠攻毒试

验结果显示, PBS 组小鼠肠组织中含有 PDCoV 抗原, 而且有病理性损伤, 说明小鼠易感 PDCoV 病原, 这与已有研究结果一致^[36]。S 组和 S2P 组小鼠肠道组织未检测到 PDCoV 病毒, 也未观察到明显的病理损伤。研究表明 S 和 S2P 均可对小鼠提供有效的免疫保护来抵抗 PDCoV 感染, 能一定程度上减轻小鼠的病理损伤。

综上所述, S 和 S2P 亚单位疫苗能够有效刺激小鼠产生较高水平的体液免疫应答及一定程度的细胞免疫应答, S2P 组较 S 组能刺激更强的体液免疫应答。S 和 S2P 均可对小鼠提供有效的免疫保护。这为后续深入研究 PDCoV S 蛋白免疫原性提供了材料, 并为 PDCoV 亚单位疫苗的研究奠定了基础。

参考文献

- [1] YEN L, MORA-DÍAZ JC, RAUH R, NELSON W, CASTILLO G, YE FS, ZHANG JQ, BAUM D, ZIMMERMAN J, NELLI R, GIMÉNEZ-LIROLA L. Characterization of the subclinical infection of porcine deltacoronavirus in grower pigs under experimental conditions[J]. *Viruses*, 2022, 14(10): 2144.
- [2] TANG P, CUI EH, SONG YH, YAN RQ, WANG JY. Porcine deltacoronavirus and its prevalence in China: a review of epidemiology, evolution, and vaccine development[J]. *Archives of Virology*, 2021, 166(11): 2975-2988.
- [3] XU ZC, ZHONG HL, ZHOU QF, DU YP, CHEN L, ZHANG Y, XUE CY, CAO YC. A highly pathogenic strain of porcine deltacoronavirus caused watery diarrhea in newborn piglets[J]. *Virologica Sinica*, 2018, 33(2): 131-141.
- [4] ZHANG JQ. Porcine deltacoronavirus: overview of infection dynamics, diagnostic methods, prevalence and genetic evolution[J]. *Virus Research*, 2016, 226: 71-84.
- [5] SHU XL, HAN FF, HU YT, HAO CL, LI ZY, WEI ZY, ZHANG HL. Co-infection of porcine deltacoronavirus and porcine epidemic diarrhoea virus alters gut microbiota diversity and composition in the colon of piglets[J]. *Virus Research*, 2022, 322: 198954.
- [6] ZHANG HL, HAN FF, SHU XL, LI QQ, DING QW, HAO CL, YAN XG, XU ML, HU H. Co-infection of porcine epidemic diarrhoea virus and porcine deltacoronavirus enhances the disease severity in piglets[J]. *Transboundary and Emerging Diseases*, 2022, 69(4): 1715-1726.
- [7] WOO PCY, LAU SKP, LAM CSF, LAU CCY, TSANG AKL, LAU JHN, BAI R, TENG JLL, TSANG CCC, WANG M, ZHENG BJ, CHAN KH, YUEN KY. Discovery of seven novel mammalian and avian coronaviruses in the genus deltacoronavirus supports bat coronaviruses as the gene source of alphacoronavirus and betacoronavirus and avian coronaviruses as the gene source of gammacoronavirus and deltacoronavirus[J]. *Journal of Virology*, 2012, 86(7): 3995-4008.
- [8] WANG LY, BYRUM B, ZHANG Y. Detection and genetic characterization of deltacoronavirus in pigs, Ohio, USA, 2014[J]. *Emerging Infectious Diseases*, 2014, 20(7): 1227-1230.
- [9] AJAYI T, DARA R, MISENER M, PASMA T, MOSER L, POLJAK Z. Herd-level prevalence and incidence of porcine epidemic diarrhoea virus (PEDV) and porcine deltacoronavirus (PDCoV) in swine herds in Ontario, Canada[J]. *Transboundary and Emerging Diseases*, 2018, 65(5): 1197-1207.
- [10] DONG N, FANG LR, ZENG SL, SUN QQ, CHEN HC, XIAO SB. Porcine deltacoronavirus in mainland China[J]. *Emerging Infectious Diseases*, 2015, 21(12): 2254-2255.
- [11] SONG D, ZHOU X, PENG Q, CHEN Y, ZHANG F, HUANG T, ZHANG T, LI A, HUANG D, WU Q, HE H, TANG Y. Newly emerged porcine deltacoronavirus associated with diarrhoea in swine in China: identification, prevalence and full-length genome sequence analysis[J]. *Transboundary and Emerging Diseases*, 2015, 62(6): 575-580.
- [12] JANETANAKIT T, LUMYAI M, BUNPAPONG N, BOONYAPISITSOPA S, CHAIYAWONG S, NONTHABENJAWAN N, KESDAENSAKONWUT S, AMONSIN A. Porcine deltacoronavirus, Thailand, 2015[J]. *Emerging Infectious Diseases*, 2016, 22(4): 757-759.
- [13] BOLEY PA, ALHAMO MA, LOSSIE G, YADAV KK, VASQUEZ-LEE M, SAIF LJ, KENNEY SP. Porcine deltacoronavirus infection and transmission in poultry,

- United States[J]. *Emerging Infectious Diseases*, 2020, 26(2): 255-265.
- [14] LIANG QQ, ZHANG HL, LI BX, DING QW, WANG YB, GAO WM, GUO DH, WEI ZY, HU H. Susceptibility of chickens to porcine deltacoronavirus infection[J]. *Viruses*, 2019, 11(6): 573.
- [15] JUNG K, HU H, SAIF LJ. Calves are susceptible to infection with the newly emerged porcine deltacoronavirus, but not with the swine enteric alphacoronavirus, porcine epidemic diarrhea virus[J]. *Archives of Virology*, 2017, 162(8): 2357-2362.
- [16] LEDNICKY JA, WHITE SK, MAVIAN CN, EL BADRY MA, TELISMA T, SALEMI M, OKECH BA, BEAU de ROCHARS VM, JR MORRIS JG. Emergence of Madariaga virus as a cause of acute febrile illness in children, Haiti, 2015–2016[J]. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, 2019, 13(1): e0006972.
- [17] FENG Y, XU ZW, ZHU L. Prevalence and phylogenetic analysis of porcine deltacoronavirus in Sichuan Province, China[J]. *Archives of Virology*, 2020, 165(12): 2883-2889.
- [18] LI F. Structure, function, and evolution of coronavirus spike proteins[J]. *Annual Review of Virology*, 2016, 3(1): 237-261.
- [19] SHANG J, ZHENG Y, YANG Y, LIU C, GENG QB, TAI WB, DU LY, ZHOU YS, ZHANG W, LI F. Cryo-electron microscopy structure of porcine deltacoronavirus spike protein in the prefusion state[J]. *Journal of Virology*, 2018, 92(4): e01556-17.
- [20] HU H, JUNG K, VLASOVA AN, SAIF LJ. Experimental infection of gnotobiotic pigs with the cell-culture-adapted porcine deltacoronavirus strain OH-FD22[J]. *Archives of Virology*, 2016, 161(12): 3421-3434.
- [21] ZHANG MJ, LIU DJ, LIU XL, GE XY, JONGKAEWWATTANA A, HE QG, LUO R. Genomic characterization and pathogenicity of porcine deltacoronavirus strain CHN-HG-2017 from China[J]. *Archives of Virology*, 2019, 164(2): 413-425.
- [22] TAN M, JIANG X. Recent advancements in combination subunit vaccine development[J]. *Human Vaccines & Immunotherapeutics*, 2017, 13(1): 180-185.
- [23] WALLS AC, XIONG XL, PARK YJ, TORTORICI MA, SNIJDER J, QUISPE J, CAMERONI E, GOPAL R, DAI M, LANZAVECCHIA A, ZAMBON M, REY FA, CORTI D, VEESLER D. Unexpected receptor functional mimicry elucidates activation of coronavirus fusion[J]. *Cell*, 2020, 183(6): 1732.
- [24] GUAN XQ, YANG Y, DU LY. Advances in SARS-CoV-2 receptor-binding domain-based COVID-19 vaccines[J]. *Expert Review of Vaccines*, 2023, 22(1): 422-439.
- [25] PALLESEN J, WANG NS, CORBETT KS, WRAPP D, KIRCHDOERFER RN, TURNER HL, COTTRELL CA, BECKER MM, WANG LS, SHI W, KONG WP, ANDRES EL, KETTENBACH AN, DENISON MR, CHAPPELL JD, GRAHAM BS, WARD AB, McLELLAN JS. Immunogenicity and structures of a rationally designed prefusion MERS-CoV spike antigen[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2017, 114(35): E7348-E7357.
- [26] LI TT, ZHENG QB, YU H, WU DH, XUE WH, XIONG HL, HUANG XF, NIE MF, YUE MX, RONG R, ZHANG SB, ZHANG YY, WU YT, WANG SJ, ZHA ZH, CHEN TT, DENG TT, WANG YB, ZHANG TY, CHEN YX, et al. SARS-CoV-2 spike produced in insect cells elicits high neutralization titres in non-human primates[J]. *Emerging Microbes & Infections*, 2020, 9(1): 2076-2090.
- [27] YU RM, ZHANG LP, ZHOU P, ZHANG ZW, LIU XQ, WANG YL, GUO HC, PAN L, LIU XS. Evaluation of the immunoprotective effects of porcine deltacoronavirus subunit vaccines[J]. *Virology*, 2024, 590: 109955.
- [28] GAO X, ZHAO DH, ZHOU P, ZHANG LP, LI MX, LI WY, ZHANG YG, WANG YL, LIU XS. Characterization, pathogenicity and protective efficacy of a cell culture-derived porcine deltacoronavirus[J]. *Virus Research*, 2020, 282: 197955.
- [29] KONG FZ, WANG QH, KENNEY SP, JUNG K, VLASOVA AN, SAIF LJ. Porcine deltacoronaviruses: origin, evolution, cross-species transmission and zoonotic potential[J]. *Pathogens*, 2022, 11(1): 79.
- [30] CHEN R, FU JY, HU JF, LI C, ZHAO YJ, QU H, WEN XT, CAO SJ, WEN YP, WU R, ZHAO Q, YAN QG, HUANG Y, MA XP, HAN XF, HUANG XB. Identification of the immunodominant neutralizing regions in the spike glycoprotein of porcine deltacoronavirus[J]. *Virus Research*, 2020, 276: 197834.

- [31] LI JZ, ZHAO SQ, ZHANG BT, HUANG J, PENG Q, XIAO L, YUAN XS, GUO RL, ZHOU JZ, FAN BC, XUE T, ZHU XJ, LIU CM, ZHU X, REN LL, LI B. A novel recombinant S-based subunit vaccine induces protective immunity against porcine deltacoronavirus challenge in piglets[J]. *Journal of Virology*, 2023, 97(11): e0095823.
- [32] WANG NX, WANG Z, MA MY, JIA XH, LIU H, QIAN MW, LU SJ, XIANG YQ, WEI ZY, ZHENG LL. Expression of codon-optimized PDCoV-RBD protein in baculovirus expression system and immunogenicity evaluation in mice[J]. *International Journal of Biological Macromolecules*, 2023, 252: 126113.
- [33] CRANK MC, RUCKWARDT TJ, CHEN M, MORABITO KM, PHUNG E, COSTNER PJ, HOLMAN LA, HICKMAN SP, BERKOWITZ NM, GORDON IJ, YAMSHCHIKOV GV, GAUDINSKI MR, KUMAR A, CHANG LA, MOIN SM, HILL JP, DiPIAZZA AT, SCHWARTZ RM, KUELTO L, COOPER JW, et al. A proof of concept for structure-based vaccine design targeting RSV in humans[J]. *Science*, 2019, 365(6452): 505-509.
- [34] McLELLAN JS, CHEN M, JOYCE MG, SASTRY M, STEWART-JONES GBE, YANG YP, ZHANG BS, CHEN L, SRIVATSAN S, ZHENG AQ, ZHOU TQ, GRAEPEL KW, KUMAR A, MOIN S, BOYINGTON JC, CHUANG GY, SOTO C, BAXA U, BAKKER AQ, SPITS H, et al. Structure-based design of a fusion glycoprotein vaccine for respiratory syncytial virus[J]. *Science*, 2013, 342(6158): 592-598.
- [35] SANDERS RW, van GILS MJ, DERKING R, SOK D, KETAS TJ, BURGER JA, OZOROWSKI G, CUPO A, SIMONICH C, GOO L, ARENDT H, KIM HJ, LEE JH, PUGACH P, WILLIAMS M, DEBNATH G, MOLDT B, van BREEMEN MJ, ISIK G, MEDINA-RAMÍREZ M, et al. HIV-1 neutralizing antibodies induced by native-like envelope trimers[J]. *Science*, 2015, 349(6244): aac4223.
- [36] 丁庆文. 猪 δ 冠状病毒对不同日龄鸡以及不同品系小鼠致病性研究[D]. 郑州: 河南农业大学硕士学位论文, 2021.
DING QW. Study on the pathogenicity of porcine delta coronavirus to chickens of different ages and different strains of mice[D]. Zhengzhou: Master's Thesis of Henan Agricultural University, 2021 (in Chinese).