

刘家勳, 宋丹, 罗朝唯, 等. 猪 O 型口蹄疫病毒抗原表位/VP1 蛋白的融合表达及免疫原性研究 [J]. 华南农业大学学报, 2021, 42(3): 1-8.
LIU Jiameng, SONG Dan, LUO Chaowei, et al. Fusion expression and immunogenicity of the antigen epitope/VP1 protein against swine O-type foot-and-mouth disease virus[J]. Journal of South China Agricultural University, 2021, 42(3): 1-8.

猪 O 型口蹄疫病毒抗原表位/VP1 蛋白的融合表达及免疫原性研究

刘家勳, 宋 丹, 罗朝唯, 吴珂珂, 易 琳, 赵明秋, 陈金顶, 丁红星
(华南农业大学 兽医学院, 广东 广州 510642)

摘要:【目的】获得可稳定表达猪 O 型口蹄疫病毒 (Foot-and-mouth disease virus, FMDV) 抗原表位融合结构蛋白 VP1 的中国仓鼠卵巢细胞株 (CHO-K1), 制备亚单位疫苗。【方法】设计合成含 FMDV 抗原表位与 VP1 基因序列的重组基因 *RP1*, 将其克隆到表达载体 pCDH-CMV-MCS-EF1-Puro 中, 将构建的重组质粒与辅助质粒 PLP1、PLP2 和 PLP3 共转染 HEK-293T 细胞, 获得重组慢病毒 HIV-RP1; 将收获的病毒液感染 CHO-K1 细胞, 经筛选获得单克隆细胞株, 通过间接免疫荧光试验 (Indirect immunofluorescence assay, IFA) 和 Western blot 鉴定, 获得可表达 RP1 的阳性细胞株, 命名为 CHO-K1-RP1; 将 CHO-K1-RP1 连续传 30 代, 每隔 5 代收获相同数量的细胞样品进行 Western blot 鉴定。【结果】IFA 结果显示, 表达 *RP1* 的细胞发出绿色荧光, 而空白对照无绿色荧光; Western blot 结果显示, 在约 55 kU 处能观察到清晰的条带; 表明成功获得了融合蛋白。将获得的融合蛋白与佐剂等体积混合制备成亚单位疫苗免疫 BALB/c 雌鼠, 抗体检测结果显示, 二次免疫后, 该亚单位疫苗组与口蹄疫 (Foot-and-mouth disease, FMD) 商品化灭活疫苗组小鼠之间抗体水平无显著差异, 两者抗体水平均显著高于对照组 ($P<0.05$)。【结论】本研究构建的亚单位疫苗能有效刺激小鼠机体产生免疫应答反应, 为猪口蹄疫新型疫苗的研制提供了参考。

关键词: 猪; 口蹄疫病毒; VP1; CHO-K1; 亚单位疫苗
中图分类号: S855.3 **文献标志码:** A **文章编号:** 1001-411X(2021)03-0001-08

Fusion expression and immunogenicity of the antigen epitope/VP1 protein against swine O-type foot-and-mouth disease virus

LIU Jiameng, SONG Dan, LUO Chaowei, WU Keke, YI Lin, ZHAO Mingqiu, CHEN Jinding, DING Hongxing
(College of Veterinary Medicine, South China Agricultural University, Guangzhou 510642, China)

Abstract: 【Objective】To obtain Chinese hamster ovary cell line (CHO-K1) which can stably express antigen epitope fusing VP1 protein of swine O-type foot-and-mouth disease virus (FMDV), and prepare subunit vaccine. 【Method】A recombinant gene *RP1* containing FMDV antigen epitope and its *VP1* gene sequence was designed, synthesized and cloned into expression vector pCDH-CMV-MCS-EF1-Puro. The constructed recombinant plasmid was co-transfected into HEK-293T cells with helper plasmids PLP1, PLP2 and PLP3 to obtain recombinant lenti virus HIV-RP1. CHO-K1 cells were infected by the harvested virus solution, and the monoclonal cell lines were obtained by screening. The expressing RP1 positive cell line named CHO-K1-RP1 was obtained by indirect immunofluorescence assay (IFA) and Western blot identification. The CHO-K1-RP1

收稿日期: 2020-09-19 网络首发时间: 2021-04-02 11:06:26
网络首发地址: <https://kns.cnki.net/kcms/detail/44.1110.S.20210402.1014.006.html>
作者简介: 刘家勳 (1996—), 男, 硕士研究生, E-mail: geminii1996@stu.scau.edu.cn; 通信作者: 丁红星 (1973—), 男, 副研究员, 硕士, E-mail: dinghx@scau.edu.cn
基金项目: 国家重点研发计划 (2017YFD0500600, 2017YFD0501104); 广州市科技计划 (201803020005); 广东省普通高校重点研究项目 (2019KZDXM026)

was passed on continuously for 30 generations, and the same number of cell samples were collected every five generations for Western blot identification. 【Result】 IFA results showed that the cells expressing *RP1* emitted green fluorescence, while the blank control had no green fluorescence. Western blot results showed that a clear band was observed at about 55 kU. The above results indicated that the fusion protein was successfully obtained. Female BALB/c mice were immunized with subunit vaccine prepared by mixing equal volumes of fusion protein and adjuvant. The antibody titer identification results showed that after the second immunization, foot-and-mouth disease (FMD) subunit vaccine group and FMD commercial inactivated vaccine group had no significant difference at antibody levels, but both were significantly higher than those of control ($P<0.05$). 【Conclusion】 The subunit vaccine constructed in this study can effectively stimulate the immune response in mice, which provides a reference for the development of a new vaccine against FMD in pigs.

Key words: swine; foot-and-mouth disease virus; VP1; CHO-K1; subunit vaccine

口蹄疫 (Foot-and-mouth disease, FMD) 是由口蹄疫病毒 (Foot-and-mouth disease virus, FMDV) 感染引起的一种急性、烈性传染病, 家养和野生型的猪、牛、羊等偶蹄动物是该病常见的易感动物^[1]。该病被国际动物卫生组织 (OIE) 列为世界上最重要的动物疾病之一^[2]。FMD 典型的临床症状包括发烧和口腔黏膜、乳部皮肤、蹄叉蹄踵等部位出现不同程度的水泡及烂斑^[3]。自 Loeffler 等^[4] 在 1897 年发现 FMD 以来, 全球养殖业便不断受到其影响。该病流行范围广、发病率高、破坏力强, 已成为目前世界动物产品贸易最重要的障碍之一^[5]。

FMDV 属于小 RNA 病毒科 Picornaviridae 口疮病毒属 *Aphthovirus*, 小而无囊膜, 分为 7 个不同的血清型, 即 O、A、C、SAT 1、SAT 2、SAT 3 和 Asia 1^[6], 其中, O 型是目前全球流行范围最广的血清型^[7]。FMDV 颗粒由 1 个二十面体的外壳组成, 该外壳包含 4 个结构蛋白 (VP1、VP2、VP3 和 VP4) 和 8 个非结构蛋白^[8-9]。其中, 结构蛋白 VP1 的第 140~160 位氨基酸处具有 1 个突出的环结构, 称为 G-H 环^[10], 该环具有的 RGD 结合位点可与易感细胞表面的整合素受体分子相结合, 已被鉴定为是引发机体产生中和抗体的主要免疫原性位点^[11-12]。VP1 还具有一个天然的优势是其同时存在 T 细胞表位 (第 16~44 位氨基酸) 和 B 细胞表位 (第 141~160 位氨基酸和第 200~213 位氨基酸), 这些表位已被证实可被动物机体识别并诱导机体产生良好的免疫反应^[13-15]。

近十年来, 我国流行的 FMDV 以 A 型和 O 型为主, 预防监测和免疫扑杀是我国目前防控 FMD 的主要手段^[16]。疫苗免疫是防控 FMD 的常见手段, 当前预防 FMD 最有效的商业疫苗是用二乙烯亚胺 (Binary ethylenimine, BEI) 灭活的疫苗^[17]。然而, 传统的灭活疫苗存在一些不可避免的缺点, 如热稳定性较差、需要冷链运输、免疫持续期短等^[18]。随着现代分子生物学和免疫学技术的不断进展, 以及全球

猪肉贸易的日趋频繁, FMD 疫苗已逐渐从灭活疫苗、弱毒疫苗等传统疫苗向合成肽疫苗、核酸疫苗、亚单位疫苗、活载体疫苗和可饲疫苗等新型疫苗的方向发展, 研制新型 FMD 疫苗逐渐成为当前研究的热点^[19]。信号肽对蛋白的分泌有着积极的作用, Stern 等^[20] 研究发现高斯荧光素酶 (*Gaussia luciferase*) 信号肽有很强的外源蛋白分泌能力。本研究以猪 O 型 FMDV VP1 基因序列为基础, 重复串联该片段中的 T、B 细胞表位基因, 并引入高斯荧光素酶信号肽序列, 设计合成重组基因 *RP1*, 表达包含 FMDV 抗原表位与结构蛋白 VP1 的融合蛋白, 并将表达后的融合蛋白与佐剂等体积混合制成亚单位疫苗。疫苗免疫小鼠后能有效刺激小鼠机体产生免疫应答反应, 为 FMD 的防控提供了参考。

1 材料与方法

1.1 菌株、载体与试验动物

人胚肾上皮细胞 (HEK-293T)、中国仓鼠卵巢细胞 (CHO-K1 细胞)、大肠埃希菌 DH5 α 感受态细胞、表达载体 pCDH-CMV-MCS-EF1-Puro 和辅助质粒 PLP1、PLP2、PLP3 均由华南农业大学兽医学院微生物学与免疫学教研室保存。

1.2 主要试剂

DMEM 高糖培养基、F-12K 培养基、0.25% (w) 胰酶消化液购自美国 Thermo Fisher 公司; 限制性内切酶 *EcoR* I、*Bam*H I 购自宝生物工程 (大连) 有限公司; T4 DNA 连接酶、转染试剂 Lipofectamine 3000 购自美国 Thermo Fisher 公司; 胶回收试剂盒、质粒抽提试剂盒等购自美国 Omega Bio-Tek 公司; 鼠源 His 标签单克隆抗体 (MAb)、鼠源 GAPDH MAb、HRP 标记山羊抗小鼠免疫球蛋白 G (IgG)、FITC 标记山羊抗小鼠 IgG 等购自上海碧云天生物技术有限公司; FMDV VPI MAb 由华南农业大学兽

医学院微生物学与免疫学教研室保存; 甘氨酸、甲醇、Tris base、NaCl 和 KCl 等化学试剂购自广州豪凯生物技术有限公司; FMDV 灭活疫苗 Re-O/MYA98/JSCZ/2013 株购自金宇保灵生物药品有限公司; FMDV O 型 IgG 抗体检测试剂盒购自深圳芬德生物技术有限公司。

1.3 重组基因 *RP1* 的设计与合成

参照 GenBank 中登录的猪 O 型 FMDV 全基因核苷酸序列 (JN998085.1), 筛选获得 *VP1* 基因序列; 以 -GG-、-GGSSGG- 作为 linker 将该片段中的

T 细胞表位和 B 细胞表位 (表 1) 串联在 *VP1* 片段的首尾两端, 同时在 N 端引入高斯荧光素酶信号肽序列, 在 C 端引入 His 标签序列, 设计合成重组基因 *RP1* (图 1)。根据合成的 *RP1* 基因全序列设计 1 对引物 RP1-F1/RP1-R1, 分别在该引物中引入 *EcoRI* 和 *BamH I* 酶切位点, 引物由上海生工生物工程有限公司合成。引物序列为 RP1-F1: 5'-CGGAATTCGCTACCATGGGAGTGAAGGTGCT-3', RP1-R1: 5'-CGGGATCCTCAGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTCA-3'(下划线处为酶切位点)。

表 1 表位肽序列及位置
Table 1 Sequence and position of epitope peptides

名称	氨基酸位点/aa	氨基酸序列
Name	Amino acid position	Amino acid sequence
B1	141~160	LPNVRGDLQVLAQKAARPLP
B2	200~213	RHKQKIVAPVKQSL
T1	21~40	ETQVQRRHHTDVSFILDRFV
T2	16~44	ENYGGGETQVQRRHHTDVSFILDRFVKVTP

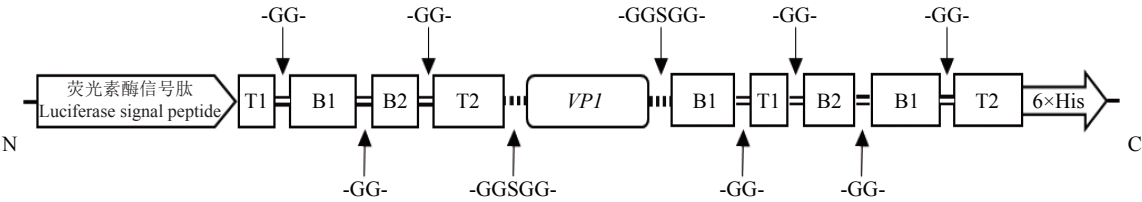


图 1 重组基因 *RP1* 多表位串联模式图

Fig. 1 Multi-epitope tandem pattern map of recombinant gene *RP1*

1.4 重组质粒 pCDH-CMV-MCS-EF1-Puro-*RP1* 的构建与鉴定

以人工合成的 *RP1* 全基因序列为模板, 利用引物 RP1-F1/RP1-R1 扩增含有酶切位点的目的基因。扩增参数为 98 °C 2 min; 98 °C 30 s, 65 °C 20 s, 72 °C 30 s, 共 30 个循环; 72 °C 7 min。对 PCR 产物回收纯化后通过双酶切将 *RP1* 基因克隆到表达载体 pCDH-CMV-MCS-EF1-Puro 中, 将经 PCR 及双酶切鉴定后的重组质粒命名为 pCDH-CMV-MCS-EF1-Puro-*RP1*。

1.5 重组慢病毒的制备

按照 Lipofectamine 3 000 试剂盒说明书操作, 将转染试剂与 1 000 ng 的重组质粒 pCDH-CMV-MCS-EF1-Puro-*RP1* 和适量的辅助质粒 PLP1、PLP2、PLP3 完全混匀, 室温孵育 15 min 后转染 6 孔细胞板中的 HEK-293T 细胞, 6 h 后更换成含 2%(φ) 胎牛血清的 DMEM 培养基, 连续培养 48 h 即获得重组慢病毒 HIV-*RP1*。

1.6 重组细胞 CHO-K1-*RP1* 的构建与鉴定

当 CHO-K1 细胞在直径为 6 cm 的培养皿中

贴壁生长至占 60% 皿底面积左右的数量时, 加入收获的重组慢病毒, 并添加 24 μ g 聚凝胺促进病毒吸附。待细胞长满后添加 32 μ g 嘌呤霉素筛选慢病毒是否感染成功。提取筛选后生长状态良好的细胞总 RNA, 反转录为 cDNA 后作为模板, 利用引物 RP1-F1/RP1-R1 进行 PCR 扩增, 产物经 10 g/L 琼脂糖凝胶电泳检测。另将筛选的重组细胞铺满 96 孔细胞板, 用预冷的 PBS 缓冲液洗涤后固定细胞。向各孔中加入鼠源 His 标签 MAb(用 PBST 缓冲液按照体积比 1:200 稀释) 为一抗, FITC 标记的山羊抗小鼠 IgG(用 PBST 缓冲液按照体积比 1:300 稀释) 为二抗, 进行间接免疫荧光试验 (Indirect immunofluorescence assay, IFA) 鉴定, 观察融合蛋白的表达情况。将鉴定正确的重组细胞命名为 CHO-K1-*RP1*。

1.7 CHO-K1-*RP1* 单克隆细胞株的筛选与鉴定

取适量筛选的重组细胞 CHO-K1-*RP1* 计数, 采用有限稀释法并按照每孔 0.5 个细胞的量铺满 96 孔板, 筛选单克隆细胞株。观察各孔细胞的生长状况, 弃去没有细胞的孔和存在多个单克隆细胞团

的孔,并做好标记。将筛选的单克隆细胞株扩大培养后以鼠源 His 标签 MAb(用 PBST 缓冲液按照体积比 1:200 稀释)为一抗,FITC 标记的山羊抗小鼠 IgG(用 PBST 缓冲液按照体积比 1:300 稀释)为二抗进行 IFA 检测融合蛋白的表达。将表达量较高的单克隆细胞株传至 30 代,每隔 5 代收获相同数量的细胞样品,以 FMDV VP1 MAb(用 PBST 缓冲液按照体积比 1:1 000 稀释)、鼠源 GAPDH MAb(用 PBST 缓冲液按照体积比 1:1 000 稀释)为一抗,再以 HRP 标记的山羊抗小鼠 IgG(用 PBST 缓冲液按照体积比 1:1 000 稀释)为二抗对收集到的细胞样品进行 Western blot 检测,分析筛选的单克隆细胞株中融合蛋白 RP1 的稳定表达情况。

1.8 融合蛋白的制备与鉴定

将筛选的单克隆细胞株悬浮驯化培养,取适量悬浮培养的细胞,低速离心后弃上清液,细胞沉淀经 PBS 缓冲液重新悬浮后通过超声波裂解,4℃条件下以最大转速离心,收集上清液,即为获得的融合蛋白样品,将样品置于-80℃保存。以鼠源 His 标签 MAb(用 PBST 缓冲液按照体积比 1:1 000 稀释)、鼠源 GAPDH MAb(用 PBST 缓冲液按照体积比 1:1 000 稀释)为一抗,再以 HRP 标记的山羊抗小鼠 IgG(用 PBST 缓冲液按照体积比 1:1 000 稀释)为二抗,将制备的蛋白样品及已知浓度的 His 标签蛋白按照预定顺序进行 SDS-PAGE 凝胶电

泳及 Western blot 检测,并通过 ImageJ 软件进行灰度值分析,计算融合蛋白的质量浓度。

1.9 重组亚单位疫苗的制备

根据“1.8”计算所得的重组蛋白质量浓度,将表达的重组蛋白稀释为 80 μg/mL,并将其与 ISA 201 VG 佐剂按 1:1 的体积比混合乳化,制备终质量浓度为 40 μg/mL 的重组亚单位疫苗,4℃保存备用。

1.10 小鼠免疫及抗体效价的测定

将 30 只 4~6 周龄的 SPF 级 BALB/c 小鼠随机分为 3 组(I~III 组),每组 10 只。第 I 组接种制备的重组亚单位疫苗,第 II 组接种 FMD 商品化灭活疫苗,第 III 组接种 PBS 缓冲液作为对照,每只小鼠的免疫剂量均为 200 μL。每次免疫间隔 2 周,共免疫 3 次,均采用皮下多点注射方式接种。分别在一次、二次和三次免疫后 7 d 经尾静脉采血,分离血清,利用 ELISA 抗体检测试剂盒检测小鼠血清特异性抗体。

2 结果与分析

2.1 重组质粒 pCDH-CMV-MCS-EF1-Puro-RP1 的构建与鉴定

由图 2 可知,以构建的重组质粒 pCDH-CMV-MCS-EF1-Puro-RP1 为模板,利用引物 RP1-F1/RP1-R1 扩增出约 1 500 bp 的目的条带,与目的基因片段大小相符;双酶切重组质粒后,在约 1 500 bp 处有一

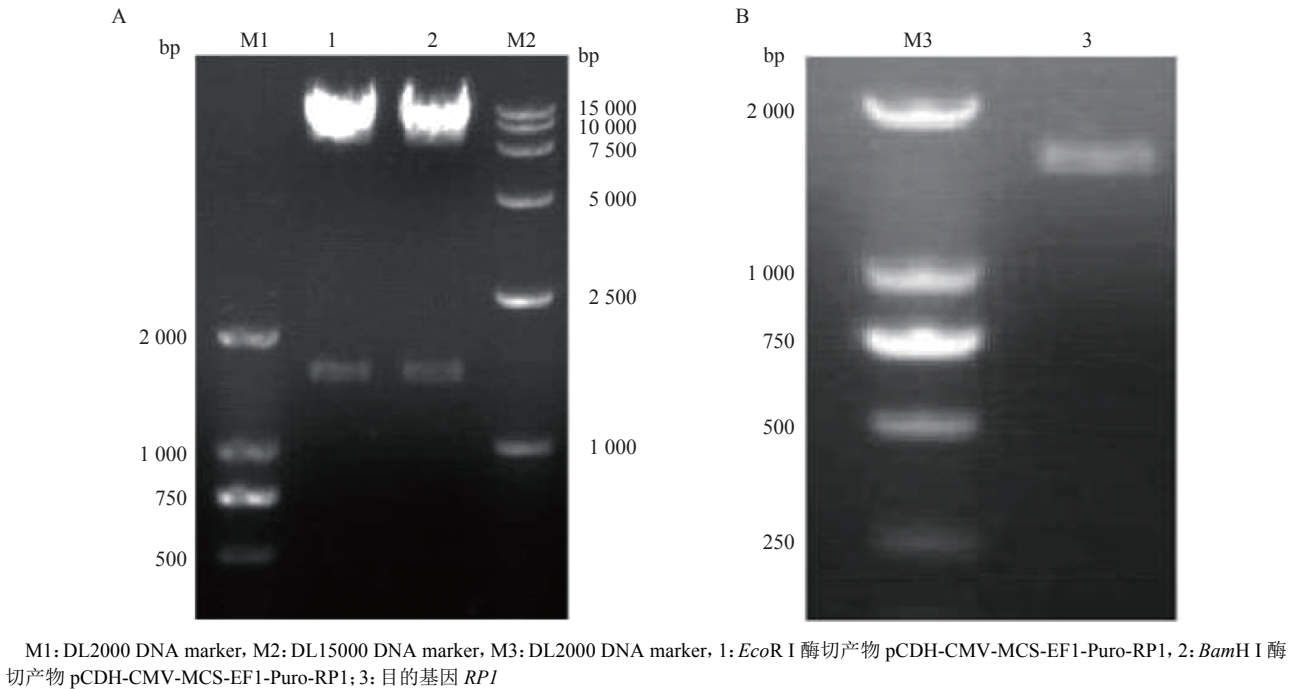


图 2 重组质粒 pCDH-CMV-MCS-EF1-Puro-RP1 的鉴定结果

Fig. 2 Identification result of recombinant plasmid pCDH-CMV-MCS-EF1-Puro-RP1

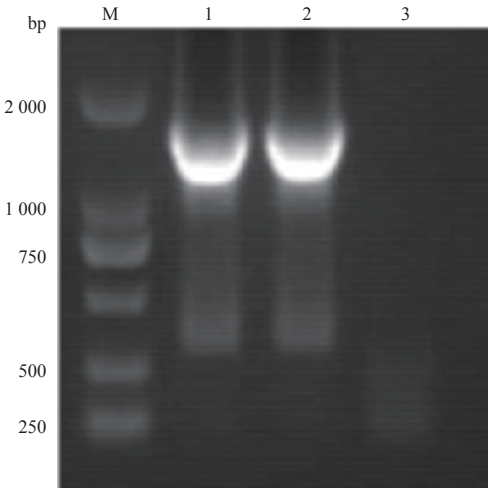
特异性条带, 与目的基因大小一致, 表明正确构建了重组质粒 pCDH-CMV-MCS-EF1-Puro-RP1。

2.2 重组细胞 CHO-K1-RP1 的鉴定

提取重组细胞 CHO-K1-RP1 的总 RNA 进行反转录, 以反转录产物为模板, 用特异性引物 RP1-F1/RP1-R1 进行扩增, 结果显示在约 1 500 bp 处有目的条带 (图 3), 与预期相符。表明在转录水平上检测到重组细胞 CHO-K1-RP1 中 *RP1* 基因的表达。

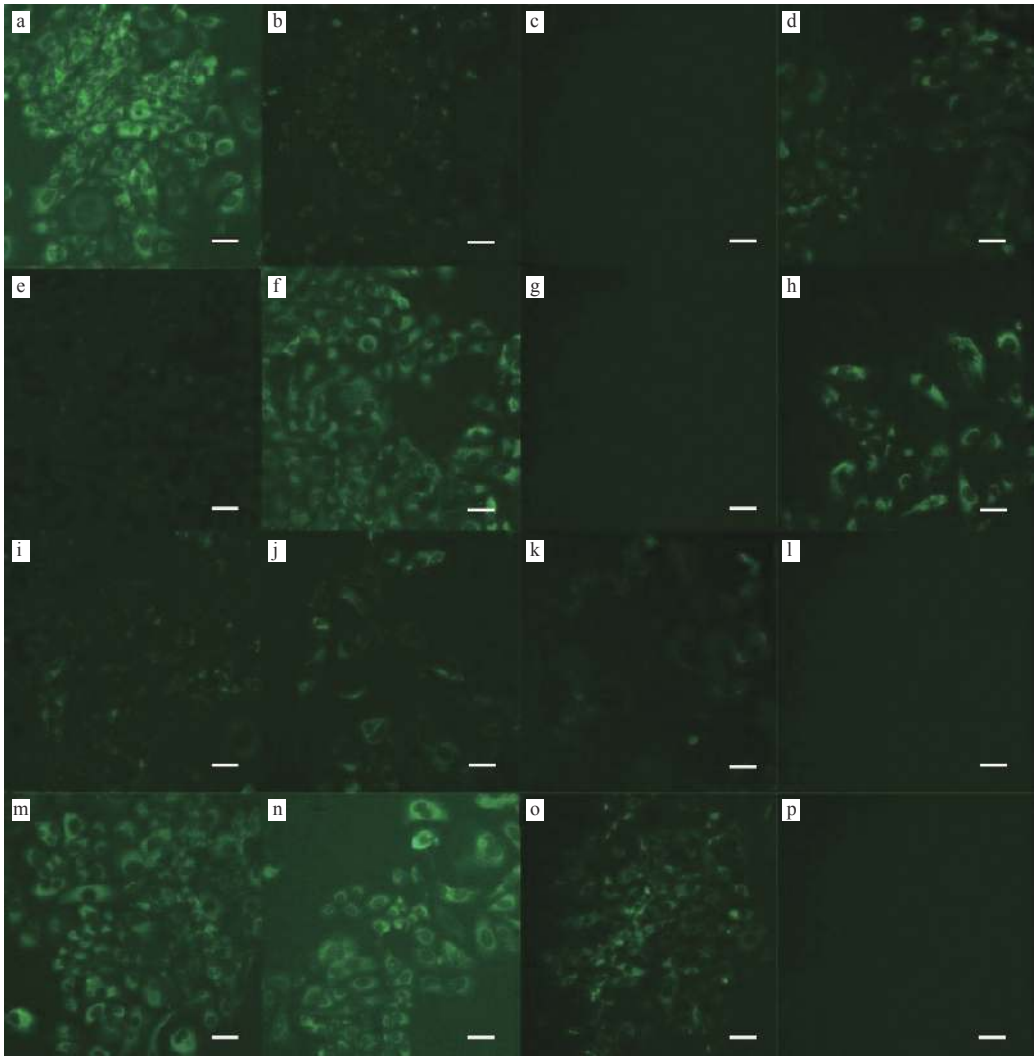
2.3 CHO-K1-RP1 单克隆细胞株的鉴定

将筛选的 CHO-K1-RP1 单克隆细胞扩大培养, 通过 IFA 及 Western blot 鉴定重组基因 *RP1* 的表达。IFA 结果显示, 部分单克隆细胞株可发出绿色荧光, 而对照细胞无绿色荧光 (图 4); Western blot 结果显示, 不同代次细胞样品均能在 55 kU 处观察到特异性条带 (图 5)。表明筛选获得的部分 CHO-K1-RP1 单克隆细胞株可稳定表达融合蛋白 RP1。



M: DL2000 DNA marker; 1, 2: *RP1* 基因; 3: 空白对照
M: DL2000 DNA marker; 1, 2: *RP1* gene; 3: Blank control

图 3 重组细胞 CHO-K1-RP1 的 RT-PCR 鉴定结果
Fig. 3 Identification result of recombinant cell CHO-K1-RP1 by RT-PCR



a-o: 部分阳性单克隆细胞系; p: 空白对照; 标尺=20 μm
a-o: Partially positive monoclonal cell lines; p: Blank control; Bar=20 μm

图 4 单克隆细胞株的间接免疫荧光试验鉴定
Fig. 4 Indirect immunofluorescence assay identification of monoclonal cell line

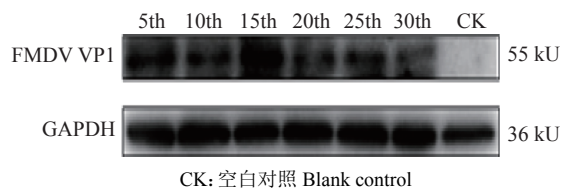


图 5 融合蛋白在不同代次细胞中表达的鉴定
Fig. 5 Identification of the expression of fusion protein in different generations of cells

2.4 融合蛋白的 Western blot 鉴定及半定量结果
收集扩大培养的单克隆细胞株样品, 通过

Western blot 进行鉴定, 使用 ImageJ 软件对所得条带进行灰度值分析。结果显示, 部分细胞样品在约 55 kU 处出现特异性条带 (图 6), 与预期蛋白分子量大小相符; 与空白对照细胞相比, 不同细胞株融合蛋白的表达量有显著差异 (图 7); 表明该单克隆细胞株可成功表达融合蛋白 RP1。挑选表达量最高的样品, 使用 ImageJ 软件对其条带 (图 8) 进行灰度值分析后测得融合蛋白的质量浓度最高可达 110 $\mu\text{g/mL}$ 。

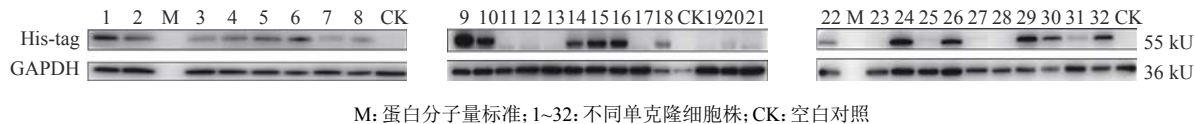
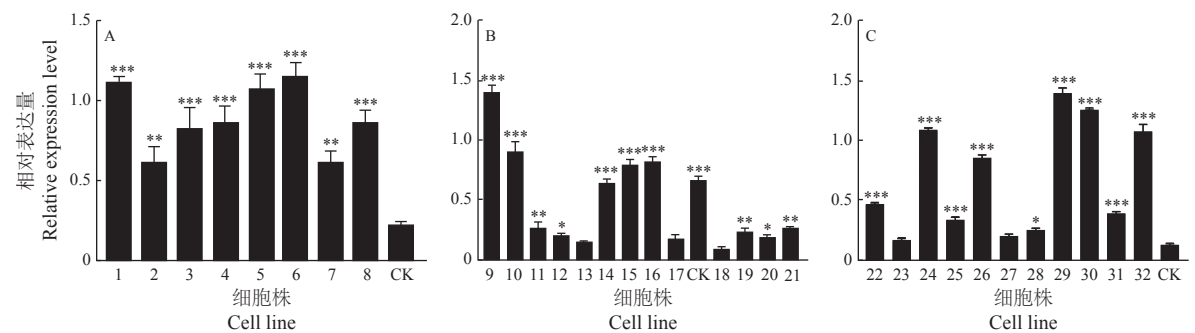


图 6 单克隆细胞株的 Western blot 鉴定
Fig. 6 Western blot identification of monoclonal cell line



1-32: 不同单克隆细胞株; “*”、“**”和“***”分别表示细胞株和空白对照在 $P<0.05$ 、 $P<0.01$ 和 $P<0.001$ 水平差异显著 (单因素方差分析)
1-32: Different monoclonal cell lines; “*”, “**” and “***” indicate significant differences between the cell line and the blank control at $P<0.05$, $P<0.01$ and $P<0.001$ levels (One-way ANOVA)

图 7 不同单克隆细胞株融合蛋白的相对表达量

图 7 Relative expression levels of fusion protein in different monoclonal cell lines



1-4 分别表示质量浓度为 100.0、50.0、25.0、12.5 $\mu\text{g/mL}$ 的标准蛋白样品; 5-6 为 CHO-K1-RP1 单克隆细胞株样品
1-4: Standard protein samples of 100.0, 50.0, 25.0 and 12.5 $\mu\text{g/mL}$;
5-6: Samples of monoclonal cell line CHO-K1-RP1

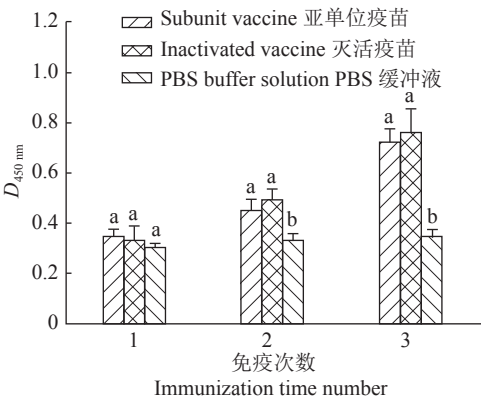
图 8 融合蛋白的半定量结果

图 8 Semi-quantitative results of fusion protein

2.5 免疫后小鼠血清中特异性抗体的检测

采用 ELISA 试剂盒检测免疫后小鼠血清中特异性抗体水平。结果显示, 一次免疫后, 所有小鼠血清中的特异性抗体水平均较低; 二次免疫后, 除对照组外, 其余各试验组小鼠血清中特异性抗体均出现不同程度的升高 ($P<0.05$); 三次免疫后, 除对照组外, 其余各试验组小鼠血清中特异性抗体水平均较高 ($P<0.05$), 其中 FMD 亚单位疫苗组与 FMD 商品化灭活疫苗组小鼠抗体水平无显著差异 ($P>0.05$)

(图 9)。表明本研究制备的 FMD 亚单位疫苗能够有效刺激小鼠机体产生免疫应答反应。



相同免疫次数柱子上的不同小写字母表示不同组间具有显著差异 ($P<0.05$, 双因素方差分析)

Different lowercase letters on the columns of the same immunization time represent significant differences among different groups ($P<0.05$, two-way ANOVA)

图 9 免疫后小鼠血清特异性抗体检测结果

图 9 Results of the serum specific antibody titer identification in immunized mice

3 讨论与结论

FMD 是一种极具传染性的偶蹄类动物病毒病, 虽然大多数易感动物可以在感染后幸存下来, 但病灶常造成动物群体的生产率低下, 严重制约全球养殖业发展^[21]。随着国际贸易的日益密切, FMD 的防治日趋困难。英国于 1892 年率先制定了控制 FMD 的基本程序, 包括杀死并销毁所有受感染和接触病原的易感动物, 对受影响的场所进行彻底清洁和消毒等^[22]。直到 19 世纪 50 年代, 法国学者 Frenkel^[23] 从在屠宰场收集的牛舌上皮中分离出 FMDV 并对其进行了体外培养, 才使得大规模生产疫苗成为可能。目前, 接种疫苗仍然是多数国家和地区防控该病的常见方法, 灭活疫苗因免疫程序简单被广泛使用, 但我们也要正确认识灭活疫苗存在的一些缺点。因此, 研究者们需要开拓创新, 研制出安全且高效的 FMD 新型疫苗, 为在世界范围内控制甚至消灭 FMD 提供新的解决途径。

结构蛋白 VP1 不仅是病毒粒子识别受体细胞的关键蛋白, 还包含多个重要的抗原表位, 是研制 FMD 新型疫苗时的首选蛋白^[24]。Cao 等^[25] 研制出不同亚型的含有 VP1 G-H 环和 Th 表位的 B4 疫苗, 并将其与 Ploy(I:C) 联合免疫动物, 结果发现该疫苗可使动物机体获得抵抗多个亚型毒株的交叉保护。高明等^[26] 设计并合成了 FMDV VP1 上的优势抗原表位基因串联表达盒, 与猪 IgG 重链恒定区基因在大肠埃希菌中实现共表达, 纯化后的蛋白与佐剂混合制成亚单位疫苗, 免疫小鼠后能检测到高水平中和抗体。本研究根据近年来我国猪 FMD 的流行特点, 以猪 O 型 FMDV 的结构蛋白 VP1 为基础, 重复串联该片段上的优势抗原表位 (第 16~44、141~160 和 200~213 位氨基酸) 基因, 以 linker 进行连接后, 人工合成重组基因 *RPI*, 以期通过 CHO-K1 细胞表达获得高免疫原性抗原蛋白。

截至 2012 年, 哺乳动物蛋白表达系统已经成为临床应用上的主要重组蛋白生产系统, 生产了市场上将近一半份额的生物制药产品^[27]。该系统首选的 CHO 细胞具有高效的翻译后修饰能力, 其产生的糖基化蛋白与人体相容并具有显著的生物活性^[28]。另外, CHO 细胞具有在生物反应器中生长至高密度的能力, 且对病毒的传播具有较低的风险^[29]。由疏水性氨基酸构成的信号肽序列具有很强的外源蛋白分泌能力, 在蛋白分泌表达中扮演着重要角色^[30]。根据已有的报道^[20], 我们在设计重组基因 *RPI* 序列时引入了高斯荧光素酶信号肽, 以期获得高分泌型

融合蛋白。但是, 只有极少量的 RP1 蛋白能分泌到细胞上清液中, 以至于需要对上清液进行多倍浓缩才能检测到微量的目的蛋白。我们推测信号肽要与目的蛋白相适应才有助于提高外源蛋白的分泌表达水平, 因此在进行蛋白分泌表达研究时要综合考虑目的蛋白的理化特性, 选择与之适应的信号肽来提高蛋白的分泌水平。本研究表达的融合蛋白 RP1 可作为 FMD 亚单位疫苗研制的候选蛋白, 在后续的工作中, 我们还需进一步优化表达条件以提高蛋白的表达水平和分泌水平。

参考文献:

- [1] BROWN F. The history of research in foot-and-mouth disease[J]. *Virus Research*, 2003, 91(1): 3-7.
- [2] CUI X M, WANG Y, GUAN R, et al. Enhanced immune responses with serum proteomic analysis of Hu sheep to foot-and-mouth disease vaccine emulsified in a vegetable oil adjuvant[J]. *Vaccines*, 2020, 8(2): 180. doi: 10.3390/vaccines8020180.
- [3] SCHUTTA C, BARRERA J, PISANO M, et al. Multiple efficacy studies of an adenovirus-vectored foot-and-mouth disease virus serotype A24 subunit vaccine in cattle using homologous challenge[J]. *Vaccine*, 2016, 34(27): 3214-3220.
- [4] LOEFFLER F, FROSCH P. Summarischer bericht über die ergebnisse der untersuchungen der kommission zur erforschung der maul und klauenseuche bei dem Institut für infektionskrankheiten in Berlin[J]. *Zentbl Bakt ParasitKde Abt I Orig*, 1897, 22: 257-259.
- [5] LI P H, BAI X W, SUN P, et al. Evaluation of a genetically modified foot-and-mouth disease virus vaccine candidate generated by reverse genetics[J]. *BMC Veterinary Research*, 2012, 8: 57. doi: 10.1186/1746-6148-8-57.
- [6] PACHECO J M, GLADUE D P, HOLINKA L G, et al. A partial deletion in non-structural protein 3A can attenuate foot-and-mouth disease virus in cattle[J]. *Virology*, 2013, 446(1/2): 260-267.
- [7] MAHAPATRA M, PARIDA S. Foot and mouth disease vaccine strain selection: Current approaches and future perspectives[J]. *Expert Review of Vaccines*, 2018, 17(7): 577-591.
- [8] AVENDAÑO C, CELIS-GIRALDO C, ORDOÑEZ D, et al. Evaluating the immunogenicity of chemically-synthesised peptides derived from foot-and-mouth disease VP1, VP2 and VP3 proteins as vaccine candidates[J]. *Vaccine*, 2020, 38(23): 3942-3951.
- [9] KITCHING R P, KNOWLES N J, SAMUEL A R, et al. Development of foot-and-mouth disease virus strain characterization: A review[J]. *Tropical Animal Health and Production*, 1989, 21(3): 153-166.
- [10] BITTLE J L, HOUGHTEN R A, ALEXANDER H, et al. Protection against foot-and-mouth disease by immunization with a chemically synthesized peptide predicted from the viral nucleotide sequence[J]. *Nature*, 1982, 298(5869):

- 30-33.
- [11] BROWN F. Antibody recognition and neutralization of foot-and-mouth disease virus[J]. *Seminars in Virology*, 1995, 6(4): 243-248.
 - [12] LIANG W F, ZHOU G H, LIU W M, et al. Identification of a conserved linear neutralizing epitope recognized by monoclonal antibody 9A9 against serotype A foot-and-mouth disease virus[J]. *Archives of Virology*, 2016, 161(10): 2705-2716.
 - [13] CUBILLOS C, DE LA TORRE B G, BÁRCENA J, et al. Inclusion of a specific T cell epitope increases the protection conferred against foot-and-mouth disease virus in pigs by a linear peptide containing an immunodominant B cell site[J]. *Virology Journal*, 2012, 9: 66. doi: 10.1186/1743-422X-9-66.
 - [14] BLANCO E, CUBILLOS C, MORENO N, et al. B epitope multiplicity and B/T epitope orientation influence immunogenicity of foot-and-mouth disease peptide vaccines[J]. *Clinical & Developmental Immunology*, 2013: 475960. doi: 10.1155/2013/475960.
 - [15] BLANCO E, GARCIA-BRIONES M, SANZ-PARRA A, et al. Identification of T-cell epitopes in nonstructural proteins of foot-and-mouth disease virus[J]. *Journal of Virology*, 2001, 75(7): 3164-3174.
 - [16] 李子菲, 刘芳, 何忠伟. 我国口蹄疫流行情况及其防控对策[J]. *科技和产业*, 2019, 19(12): 15-20.
 - [17] BELSHAM G J, KRISTENSEN T, JACKSON T. Foot-and-mouth disease virus: Prospects for using knowledge of virus biology to improve control of this continuing global threat[J]. *Virus Research*, 2020, 281: 197909. doi: 10.1016/j.virusres.2020.197909.
 - [18] 赵文仕, 杨继生, 肖建忠, 等. 口蹄疫疫苗的研究进展[J]. *中国畜禽种业*, 2014, 10(7): 64-66.
 - [19] 何随彬, 金盈宇, 龚志亮, 等. 口蹄疫疫苗最新研究进展[J]. *上海畜牧兽医通讯*, 2019(2): 30-32.
 - [20] STERN B, OLSEN L C, TRÖSSE C, et al. Improving mammalian cell factories: The selection of signal peptide has a major impact on recombinant protein synthesis and secretion in mammalian cells[J]. *Trends in Cell & Molecular Biology*, 2007, 2: 1-17.
 - [21] LIU Y Q, ZHU Z X, ZHANG M T, et al. Multifunctional roles of leader protein of foot-and-mouth disease viruses in suppressing host antiviral responses[J]. *Veterinary Research*, 2015, 46: 27. doi: 10.1186/s13567-015-0273-1.
 - [22] SUTMOLLER P, BARTELING S S, OLASCOAGA R C, et al. Control and eradication of foot-and-mouth disease[J]. *Virus Research*, 2003, 91(1): 101-144.
 - [23] FRENKEL H S. Research on foot-and-mouth disease. III. The cultivation of the virus on a practical scale in explantations of bovine tongue epithelium[J]. *American Journal of Veterinary Research*, 1951, 12(44): 187-190.
 - [24] PFAFF E, MUSSGAY M, BÖHM H O, et al. Antibodies against a preselected peptide recognize and neutralize foot and mouth disease virus[J]. *The Embo Journal*, 1982, 1(7): 869-874.
 - [25] CAO Y M, LU Z J, LI D, et al. Evaluation of cross-protection against three topotypes of serotype O foot-and-mouth disease virus in pigs vaccinated with multi-epitope protein vaccine incorporated with poly(I: C)[J]. *Veterinary Microbiology*, 2014, 168(2/3/4): 294-301.
 - [26] 高明, 邵军军, 林彤, 等. 猪 O 型 FMDV 重组多表位抗原基因的克隆表达及免疫学鉴定[J]. *甘肃农业大学学报*, 2017, 52(1): 1-6.
 - [27] ZHU J W. Mammalian cell protein expression for biopharmaceutical production[J]. *Biotechnology Advances*, 2012, 30(5): 1158-1170.
 - [28] KIM J Y, KIM Y G, LEE G M. CHO cells in biotechnology for production of recombinant proteins: Current state and further potential[J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2012, 93(3): 917-930.
 - [29] CACCIATORE J J, CHASIN L A, LEONARD E F. Gene amplification and vector engineering to achieve rapid and high-level therapeutic protein production using the Dhfr-based CHO cell selection system[J]. *Biotechnology Advances*, 2010, 28(6): 673-681.
 - [30] 孙振文, 邵军军, 常惠芸. 信号肽对 O 型口蹄疫病毒重组表位蛋白在 CHO 中表达及分泌的影响[J]. *中国兽医科学*, 2020, 50(3): 276-282.

【责任编辑 李庆玲】