



三种大肠杆菌表达的口蹄疫病毒 A 型多表位蛋白对猪的免疫原性比较

曹轶梅, 王兴凯, 王省, 李坤, 付元芳, 李冬, 卢曾军*, 刘在新*

中国农业科学院兰州兽医研究所, 家畜疫病病原生物学国家重点实验室, 国家口蹄疫参考实验室, 农业部畜禽病毒学重点开放实验室, 甘肃 兰州 730046

摘要:【目的】研制猪口蹄疫病毒(foot-and-mouth disease virus, FMDV)A 型多表位蛋白疫苗, 为猪 FMDV A 型的防控提供安全有效的疫苗。【方法】根据前期试验结果及国内外 FMDV A 型流行病学信息, 设计并合成了 3 种多表位免疫原基因 A10、IA10 和 FA10。在大肠杆菌 BL21(DE3)中诱导表达, 表达蛋白纯化复性后, 制苗免疫猪。分别于免疫前和免疫后 14 和 28 d 采血分离血清, 用液相阻断 ELISA (LPB-ELISA) 方法检测血清 IgG 抗体滴度。免疫 28 d 后用 FMDV 强毒攻毒, 以评估免疫保护效果。【结果】SDS-PAGE 和 Western blotting 结果证实 A10、IA10 和 FA10 三种蛋白均获得表达, 分子量分别为 35、57 和 64 kDa, 与预测蛋白大小一致, 且能被 FMDV 感染阳性血清所识别。LPB-ELISA 结果表明, A10+201 免疫组 IgG 滴度低于灭活疫苗组, 但高于其他免疫组。攻毒后 A10+201 免疫组和灭活疫苗免疫组全部猪(5/5)获得保护, IA10+201 和 FA10+201 免疫组 80% (4/5)猪保护, A10 和 FA10 免疫组只有 20% (1/5)猪保护, 而 PBS+201 组所有猪均未保护。【结论】A10+201 免疫保护效果较好, 可作为候选疫苗进行进一步评价。

关键词: 口蹄疫病毒, A 型, 多表位蛋白疫苗, 猪

口蹄疫(foot-and-mouth disease, FMD)是由口蹄疫病毒(foot-and-mouth disease virus, FMDV)引起偶蹄动物的一种急性、高度接触性、发热性传染病, 以传播迅速、感染率高而著称。该病一旦暴发将会造成巨大的经济损失。FMD 防控措施主要包括扑杀患病及感染动物、疫苗免疫易感动物、

限制动物及其染毒物品移动、消毒灭源、流行病学监测和预警风险分析。在 FMD 流行的国家, 疫情的控制主要依赖于现有的传统灭活疫苗, 通过强制性高强度的免疫, 逐步减少疫情的发生。但是由于灭活疫苗的生产过程要大量增殖自然病毒, 需要高级别防护病毒逃逸的设施, 尽管如此,

基金项目: 国家重点研发计划(2017YFD0501104)

*通信作者。Tel: +86-931-8343390; E-mail: 卢曾军, luzengjun@caas.cn; 刘在新, liuzaixin@caas.cn

收稿日期: 2018-06-13; 修回日期: 2018-08-13; 网络出版日期: 2018-09-07

仍然存在病毒灭活不完全而散毒的风险。另外,纯化不彻底的灭活疫苗多次免疫会产生非结构蛋白抗体,给感染动物与免疫动物鉴别诊断带来困扰。由于这些因素,促使人们研制更加高效安全的新型 FMD 疫苗。FMDV 有 7 个血清型,分别为 O、A、C、Asia 1、SAT1、SAT2、SAT3^[1]。我国 FMD 流行由来已久,目前流行的血清型主要有 O 型和 A 型。Asia 1 型已得到有效控制,近 9 年来未见发病报道。O 型的流行有所缓和,A 型流行增加。自 2009 年起,FMDV A 型东南亚谱系(A/SEA/97)先后在湖北武汉、广东茂名等全国多地引发牛和猪 FMD^[2]。同时,东南亚地区国家还存在 A/IRAN/05 等较多谱系的 FMDV A 型,疫情形势复杂,时刻威胁着我国畜牧养殖业的健康发展。不同谱系 FMDV A 型的抗原性变异较大,交叉免疫保护作用较差,给疫苗研究带来了困难。研究抗原谱广、安全性高的疫苗产品,将为我国 FMD 防控提供重要的技术支撑。

FMD 多表位蛋白疫苗不涉及感染性的 FMDV,生产和应用安全;在同一种表位蛋白中引入多个谱系的保护性抗原表位,拓展表位蛋白的抗原谱;利用非疫苗用病毒蛋白建立的诊断方法可对疫苗免疫动物和自然感染动物进行有效区分,从而可准确评估动物的感染状况,为疫病防控提供准确的监测技术支撑。FMD 表位蛋白疫苗弥补了目前传统灭活疫苗所存在的诸多不足,成为 FMD 新型疫苗发展的主要趋势之一。

鞭毛蛋白是细菌鞭毛的主要组成部分,鞭毛蛋白作为 TLR5 受体的配体,激活 NF- κ B 信号通路。研究表明鞭毛蛋白是一种有效的佐剂,能诱导机体产生强而广谱的免疫反应^[3]。鞭毛蛋白的佐剂作用已在许多疫苗中得到证实,如流感病毒、人类免疫缺陷病毒和鼠疫菌^[4-6]。鞭毛蛋白和灭活

的 FMDV 抗原共同免疫豚鼠,可诱导更早、更高的中和抗体,增强 IgG1 和 IgG2 反应,并提高攻毒保护^[7]。

现已证明,小分子抗原需与大分子载体蛋白相连构成融合蛋白才能有效地刺激机体产生免疫应答。与载体蛋白相连一方面能增加抗原的稳定性,另一方面载体蛋白如 IgG 重链 Fc 段上具有抗原提呈细胞受体而易被抗原提呈细胞所摄取^[8]。另有研究证明猪 IgG 重链恒定区更适合作为 FMDV 多肽抗原的载体蛋白。本研究在前期试验研究的基础上^[9],根据国内外 FMDV A 型流行病学信息,设计并合成了多表位免疫原基因 A10,并分别在 A10 上串联猪 IgG 重链恒定区(命名为 IA10)和鞭毛蛋白基因(命名为 FA10)。将 A10、IA10 和 FA10 在原核细胞中表达、纯化和复性后,制苗免疫猪,比较其对猪的攻毒保护效果。

1 材料和方法

1.1 主要试剂

大肠杆菌感受态细胞 BL21(DE3),购自南京诺唯赞生物科技有限公司;Ni-NTA His•Bind[®] Resins 为 Novagen 产品。BCA 蛋白定量试剂盒,购自上海捷瑞生物工程有限公司。内毒素除去试剂盒,购自厦门鲎试剂实验厂有限公司。FMDV A 型液相阻断 ELISA 抗体检测试剂盒,购自中国农业科学院兰州兽医研究所。牛口蹄疫 O 型、A 型双价灭活疫苗,为中农威特生物科技股份有限公司产品。

1.2 实验动物

60 日龄健康大白猪(FMDV A 型液相阻断 ELISA 抗体效价 $<1:4$,3ABC 抗体阴性),购于甘肃平凉。

1.3 多表位基因设计与合成

根据前期试验结果^[9]及国内外 FMDV A 型流行病学信息,重新设计了多表位免疫原基因 A10。所设计的免疫原基因包含 A/GDMM/CHA/2013、A/HNLY4/2014 (A/SEA/97/G2 基因型, SEA 谱系); A/WH/CHA/09 (A/SEA/97/G1 基因型, SEA 谱系); A/IRA/1/05 (A/IRA/05 谱系); 以及 AF72 (A22 谱系)等流行毒株的主要中和性抗原表位区以及通用 T 细胞表位,表位序列见表 1。各表位之间以 GG、GGC 或 CGG 的间隔氨基酸序列相连,以形成稳定的蛋白空间结构,最后加 6 组氨酸标签序列,以有利于表达蛋白的纯化。第二种免疫原基因是在 A10 的 3'端串联猪 IgG CH2+CH3 (GenBank M81770.1),命名为 IA10。第三种免疫原基因是将鞭毛蛋白 190–405 位氨基酸序列用连接序列替换后与 A10 串联,命名为 FA10。设计好的序列交由南京 GenScript 公司进行编码序列的优化与合成,并将合成序列插入 pET28a 载体中。对所合成核苷酸序列进行测序,其推导氨基酸序列与原设计氨基酸序列同源性应为 100%,测序正确的重组质粒分别命名为 pET-A10、pET-IA10 和 pET-FA10。

1.4 重组蛋白表达和纯化

1.4.1 重组蛋白的表达:将重组质粒 pET-A10、pET-IA10、pET-FA10 转化大肠杆菌 BL21(DE3)感受态细胞,挑取单菌落 37 °C 继续快速培养至 $OD_{600}=0.6-0.8$,加 IPTG 至终浓度 1 mmol/L (同时设对照组),37 °C 诱导表达 5 h, SDS-PAGE 检测表达产物。

1.4.2 重组蛋白纯化和复性:表达蛋白用镍离子亲和层析方法纯化。纯化过程按照 Novagen Ni-NTA His•Bind® Resins 操作说明书进行。SDS-PAGE 检测纯化效果,纯化蛋白透析复性后用蛋白质定量试剂盒测定浓度。并用内毒素除去试剂盒去内毒素,按使用说明书进行操作。

1.4.3 Western blotting 分析:纯化复性蛋白经 SDS-PAGE,并与 A/HNLY4/2014 FMDV 感染猪阳性血清进行 Western blotting 分析。

1.5 动物免疫和攻毒

35 头 60 日龄健康大白猪随机分为 7 组,5 头/组,按照 300 μg/头猪蛋白量与 ISA 201 佐剂以 1:1 的比例乳化制备疫苗,具体分组和免疫剂量见表 2。免疫第 14 天和第 28 天各采血 1 次分离血清用

表 1. 多表位重组蛋白编码序列中各表位来源

Table 1. Origin of epitopes in the coding sequence of recombinant proteins

Epitopes	Sequences	Origin of epitopes
PADRE	AKFVAAWTLKAAA	Universal T cell epitopes ^[10]
VP1 ₁₃₃₋₁₅₆	TSKYSAPQNRGDSGPLAARLAAQ	G-H loop of A/GDMM/CHA/2013 (A/SEA/97/G2)
VP1 ₁₉₁₋₂₁₀	AVEVSSQDRHKQKIIAPAKQ	C-terminal of A/GDMM/CHA/2013 (A/SEA/97/G2)
VP1 ₁₃₃₋₁₆₄	TSKYSASQNRGDLGPLAARLAAQLPASFNFG	G-H loop of A/HNLY4/2014 (A/SEA/97/G2)
VP1 ₁₉₁₋₂₁₀	AVEVSSQDRHKQKIIAPAKQ	C-terminal of A/HNLY4/2014 (A/SEA/97/G2)
VP1 ₁₃₃₋₁₅₉	VSKYSTTGNGRRGDLGPLAARVAAQLP	G-H loop of A/IRA/1/05 (A/IRA/05)
VP1 ₁₃₂₋₁₅₉	GTTKYSTGNAGRRGDLGSLAARVAAQLP	G-H loop of AF72 (A22)
VP1 ₁₉₁₋₂₁₀	AVKVTSQDRHKQRIIAPAKQLL	C-terminal of A/WH/CHA/09 (A/SEA/97/G1)
VP1 ₁₂₉₋₁₆₄	GTSKYSAPATRRGDLGSLAARLAAQLP	G-H loop of A/WH/CHA/09 (A/SEA/97/G1)
3D ₃₄₂₋₃₇₁	VVASDYDLDFEALPKPHFKSLGQTITPADKS	T cell epitopes of FMDV
Invasin	TAKSKKFPSTYATYQF	Universal T cell epitopes ^[11]

表 2. 实验猪分组和免疫剂量

Table 2. Pig grouping and vaccination dose in this study

Vaccine	Antigen amount/mL	PBS/ mL	201 adjuvant/ mL	Total dose/mL
A10	1	1	-	2
FA10	1	1	-	2
A10+201	1	-	1	2
FA10+201	1	-	1	2
IA10+201	1	-	1	2
PBS+201	-	1	1	2
O, A inactivated vaccine				2

于血清抗体检测。免疫第 28 天将每头猪耳根后肌肉注射 1000 PID50 的 A/HNLY4/2014 FMDV。连续观察 10 d, 对照猪均应至少一蹄出现水疱或溃疡。免疫猪出现任何 FMD 症状即判为不保护。

1.6 血清抗体检测

免疫猪血清中 A 型 FMDV 总 IgG 抗体, 用 FMDV A 型液相阻断 ELISA 抗体检测试剂盒进行检测, 分别于免疫前和免疫后 14 和 28 d 采集血液, 分离血清, 检测方法参照说明书。

2 结果和分析

2.1 重组蛋白表达、纯化、复性与 Western blotting 检测

三种表达的重组蛋白均以包涵体的形式存在, A10、IA10、FA10 蛋白大小分别约为 35、57 和 64 kDa, 与预期的 A10、IA10、FA10 的大小相符。表达蛋白经纯化后, 其纯度在 95% 以上(图 1)。

纯化蛋白复性后, 经 SDS-PAGE 的蛋白带转移至硝酸纤维素膜上, 以 FMDV A 型感染猪阳性血清为一抗, HRP 标记的兔抗猪 IgG 抗体为二抗, 显色后, A10 蛋白分别在 35kDa 和 70 kDa 处出现两条带; IA10 蛋白分别在 57 kDa 和约 114 kDa 处出现两条带; FA10 蛋白分别在 64 kDa 和约 128 kDa (很弱)处出现两条带, 而 pET-28a (+)载体转化菌裂解液未见任何反应带(图 2)。这表明 A10、IA10、FA10 均能被 FMDV A 型感染阳性血清所识别, 且有部分目的蛋白形成了二聚体。

2.2 FMDV 特异性抗体

对免疫前和免疫后第 14、28 天的猪采血, 用 FMDV A 型液相阻断 ELISA 抗体检测试剂盒测定其 FMDV 特异性总 IgG 抗体。如图 3 所示, 免疫

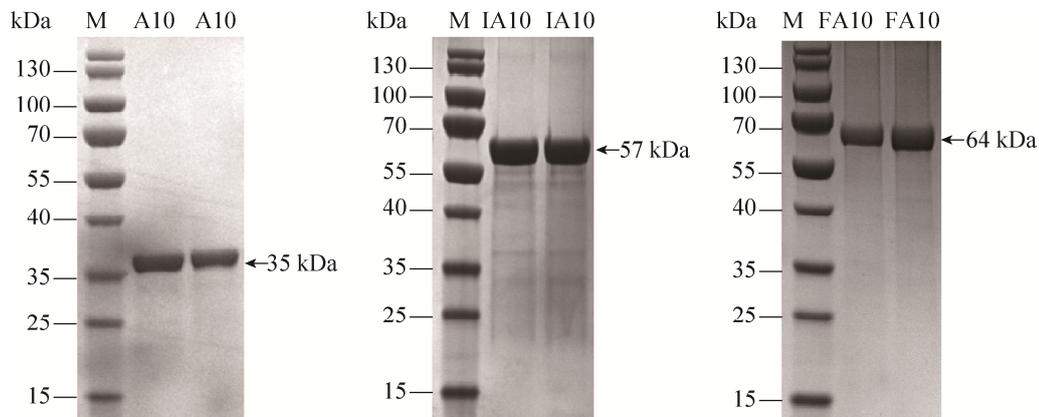


图 1. 纯化蛋白 SDS-PAGE 分析

Figure 1. SDS-PAGE analysis of the purified recombinant proteins. M: the protein molecular weight standard.

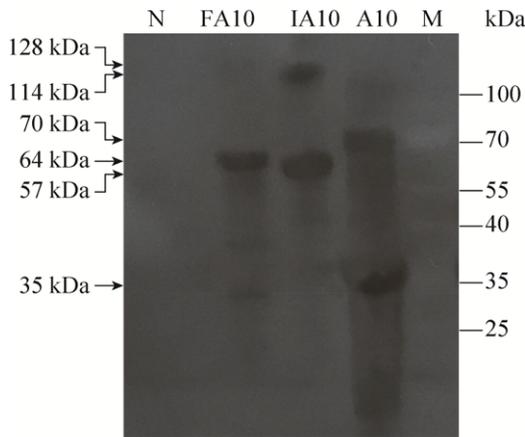


图 2. 纯化蛋白 Western blotting 分析

Figure 2. Western blotting analysis of the purified recombinant proteins. M: the protein molecular weight standard; N: the lysates of pET-28a (+)-transformed cells.

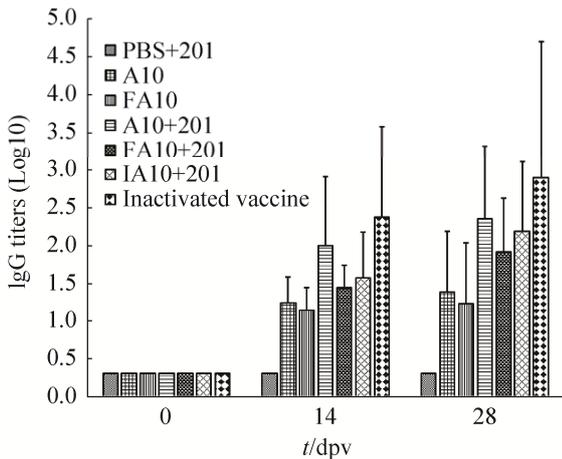


图 3. FMDV 特异性总 IgG 抗体滴度

Figure 3. Total IgG antibodies to FMDV in sera analyzed by liquid phase blocking ELISA. IgG titers were expressed as the reciprocal log10 of the serum dilutions giving 50% of the absorbance recorded in the control wells (wells with virus but without serum). Error bars represent standard deviation. Antibody titers that below the sensitivity of the assay (0.6) were adjusted to 0.3 before making figure.

前所有猪均未检测到 FMDV 特异性抗体。免疫 14 d 后, 除了阴性对照组(PBS+201)以外, 其余各组都

产生了一定程度的 FMDV 特异性抗体。免疫 28 d 后, 除了 PBS+201 组以外, 其余各组抗体都升高。相比而言, 灭活疫苗组抗体效价最高, 其次为 A10+201 组。A10 免疫组与 FA10 免疫组相比, 抗体效价没有差异, 说明鞭毛蛋白没有起到佐剂的作用。另外 IA10+201 组抗体效价低于 A10+201 组, 说明 IgG 对体液免疫没有起到提高作用。

2.3 攻毒保护

免疫第 28 天对所有猪用 A/HNLY4/2014 FMDV 攻毒。如图 4 所示, PBS 组猪在攻毒后第 2 天有 1 头猪发病, 至第 3 天时全部猪都发病, 保护率为 0。A10 免疫组在攻毒后第 2 天发病 2 头, 在第 3 天又发病 2 头, 保护率为 20%。FA10 免疫组在攻毒后第 2 天发病 1 头, 在第 3 天又发病 2 头, 至第 4 天共有 4 头猪发病, 保护率也为 20%。IA10+201 和 FA10+201 免疫组至攻毒第 3 天各有 1 头猪发病, 其余猪全部保护, 保护率均为 80%。A10+201 和灭活疫苗免疫组所有动物都没有出现 FMD 临床症状, 其保护率均为 100%。攻毒保护结果与特异性抗体检测结果基本一致。

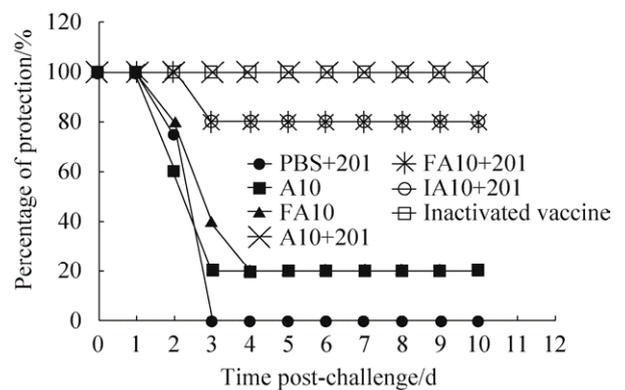


图 4. 攻毒实验结果

Figure 4. Protection of pigs (n=5) against FMDV serotype A challenge. the percentage of protection was determined 10 days post-challenge.

3 讨论

2009年,我国发生SEA谱系的A型FMD时,没有与流行毒株匹配的疫苗。许多田间分离毒株如A/WH/CHA/09、A/GDMM/CHA/2013由于抗原产量低、生长缓慢或者抗原稳定性差等原因,很难驯化成疫苗毒株。研究者应用反向遗传技术构建了FMDV A型,具有良好的生长特性,可以作为疫苗毒株^[12]。但是应用这种基因工程活病毒生产FMD疫苗,口蹄疫灭活疫苗固有的缺点仍然存在。至今,A型FMD在中国多地流行,研制安全有效的疫苗迫在眉睫。我们在设计FMDV A型重组蛋白免疫原时考虑到以下几个方面。(1) B细胞表位:包含A22: A/IRA/05和SEA三个谱系中不同流行毒株VP1蛋白的G-H环及N-端氨基酸,以期产生广谱中和抗体。所涉及的三个谱系中,A22为传统疫苗毒株,具有较好的免疫原性。A/IRA/05病毒常年流行于中东等国家,对我国的威胁很大。SEA为现阶段中国流行谱系。(2) 通用T细胞表位:以提高重组蛋白免疫原性。(3) 序列中引入半胱氨酸:有利于蛋白中形成环形二级结构。环形二级结构模拟FMDV VP1上的环形结构,能更有效地诱导产生中和抗体。另外,二硫键的形成使蛋白更加稳定,因此在生产、存储、运输中蛋白能保持原有的结构和免疫原性。在研究中,为了考察鞭毛蛋白作为分子内佐剂对外源蛋白的免疫增效作用,我们尝试串联了鞭毛蛋白高度保守的N端和C端,制备成鞭毛蛋白与A10融合蛋白。动物试验结果表明,FA10免疫组与A10免疫组相比,总IgG抗体滴度(图3)和攻毒保护率(图4)都没有提高,说明鞭毛蛋白没有起到免疫佐剂的作用。而A10和FA10用ISA201乳化后,抗体滴度(图3)和攻毒保护率(图4)均明显提高,说

明ISA201的佐剂效果明显。

免疫球蛋白被认为是微生物肽的理想载体蛋白,因为它具有递呈抗原效率高、安全和半衰期长等优点。本研究中的IA10是在A10的3'端串联了猪IgG CH2+CH3。猪免疫试验结果发现,IA10+201免疫组抗体水平和攻毒保护率均低于A10+201免疫组。可能是我们的试验周期比较短(28 d),在短期内尚未体现出载体蛋白的功效;Shao等研究发现,将FMDV B细胞表位与猪IgG重链恒定区串联,在大肠杆菌中表达的重组蛋白免疫猪,免疫猪产生了较高的抗体,且抗体持续期可达6个月以上^[13]。另外,串联方向可能对载体蛋白的功能产生影响。有研究表明,将FMDV表位融合至猪IgG重链恒定区的羧基端,表达的融合蛋白免疫猪,免疫2次后,猪产生较高水平的中和抗体,所有猪都完全保护^[14]。本研究中是将FMDV表位融合到猪IgG重链恒定区的氨基端,且只免疫了1次。

总之,本研究所设计免疫原A10与ISA201佐剂配伍,猪免疫1次产生的抗体效价虽然低于灭活疫苗免疫组,但高于其他免疫组。用A/HNLY4/2014 FMDV (SEA谱系)攻毒,其攻毒保护率和灭活疫苗免疫组相同,均为100%。说明该疫苗对目前中国流行毒株有较好的保护作用。是否对其他谱系病毒有保护作用,还需进一步研究。

参考文献

- [1] Bachrach HL. Foot-and-mouth disease. *Annual Review of Microbiology*, 1968, 22: 201-244.
- [2] Zheng HX, Guo JH, Jin Y, Yang F, He JJ, Lv L, Zhang KS, Wu Q, Liu XT, Cai XP. Engineering foot-and-mouth disease viruses with improved growth properties for vaccine development. *PLoS One*, 2013, 8(1): e55228.
- [3] Hayashi F, Smith KD, Ozinsky A, Hawn TR, Yi EC,

- Goodlett DR, Eng JK, Akira S, Underhill DM, Aderem A. The innate immune response to bacterial flagellin is mediated by Toll-like receptor 5. *Nature*, 2001, 410(6832): 1099–1103.
- [4] Honko AN, Sriranganathan N, Lees CJ, Mizel SB. Flagellin is an effective adjuvant for immunization against lethal respiratory challenge with *Yersinia pestis*. *Infection and Immunity*, 2006, 74(2): 1113–1120.
- [5] Vassilieva EV, Wang BZ, Vzorov AN, Wang L, Wang YC, Bozja J, Xu R, Compans RW. Enhanced mucosal immune responses to HIV virus-like particles containing a membrane-anchored adjuvant. *mBio*, 2011, 2(1): e00328–10.
- [6] Hong SH, Byun YH, Nguyen CT, Kim SY, Seong BL, Park S, Woo GJ, Yoon Y, Koh JT, Fujihashi K, Rhee JH, Lee SE. Intranasal administration of a flagellin-adjuvanted inactivated influenza vaccine enhances mucosal immune responses to protect mice against lethal infection. *Vaccine*, 2012, 30(2): 466–474.
- [7] Hajam IA, Dar PA, Chandrasekar S, Nanda RK, Kishore S, Bhanuprakash V, Ganesh K. Co-administration of flagellin augments immune responses to inactivated foot-and-mouth disease virus (FMDV) antigen. *Research in Veterinary Science*, 2013, 95(3): 936–941.
- [8] Zaghoulani H, Steinman R, Nonacs R, Shah H, Gerhard W, Bona C. Presentation of a viral T cell epitope expressed in the CDR3 region of a self immunoglobulin molecule. *Science*, 1993, 259(5092): 224–227.
- [9] Cao YM, Li D, Fu YF, Bai QF, Chen YL, Bai XW, Jing ZZ, Sun P, Bao HF, Li PH, Zhang J, Ma XQ, Lu ZJ, Liu ZX. Rational design and efficacy of a multi-epitope recombinant protein vaccine against foot-and-mouth disease virus serotype A in pigs. *Antiviral Research*, 2017, 140: 133–141.
- [10] Agadjanyan MG, Ghochikyan A, Petrushina I, Vasilevko V, Movsesyan N, Mkrtychyan M, Saing T, Cribbs DH. Prototype Alzheimer's disease vaccine using the immunodominant B cell epitope from β -amyloid and promiscuous T cell epitope pan HLA DR-binding peptide. *The Journal of Immunology*, 2005, 174(3): 1580–1586.
- [11] Wang CY, Chang TY, Walfield AM, Ye J, Shen M, Chen SP, Li MC, Lin YL, Jong MH, Yang PC, Chyr N, Kramer E, Brown F. Effective synthetic peptide vaccine for foot-and-mouth disease in swine. *Vaccine*, 2002, 20(19/20): 2603–2610.
- [12] Zheng HX, Lian KQ, Yang F, Jin Y, Zhu ZX, Guo JH, Cao WJ, Liu HN, He JJ, Zhang KS, Li D, Liu XT. Cross-protective efficacy of engineering serotype A foot-and-mouth disease virus vaccine against the two pandemic strains in swine. *Vaccine*, 2015, 33(43): 5772–5778.
- [13] Shao JJ, Wong CK, Lin T, Lee SK, Cong GZ, Sin FW, Du JZ, Gao SD, Liu XT, Cai XP, Xie Y, Chang HY, Liu JX. Promising multiple-epitope recombinant vaccine against foot-and-mouth disease virus type O in swine. *Clinical and Vaccine Immunology*, 2011, 18(1): 143–149.
- [14] Li GJ, Chen WZ, Yan WY, Zhao K, Liu MQ, Zhang J, Fei L, Xu QX, Sheng ZT, Lu YG, Zheng ZX. Comparison of immune responses against foot-and-mouth disease virus induced by fusion proteins using the swine IgG heavy chain constant region or β -galactosidase as a carrier of immunogenic epitopes. *Virology*, 2004, 328(2): 274–281.

Immunogenicity comparison of three multi-epitope proteins expressed in *Escherichia coli* against swine foot-and-mouth disease virus serotype A

Yimei Cao, Xingkai Wang, Sheng Wang, Kun Li, Yuanfang Fu, Dong Li, Zengjun Lu^{*}, Zaixin Liu^{*}

State Key Laboratory of Veterinary Etiological Biology, National Foot and Mouth Disease Reference Laboratory, Lanzhou Veterinary Research Institute, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Lanzhou 730046, Gansu Province, China

Abstract: [Objective] A multi-epitope protein vaccine of foot-and-mouth disease virus (FMDV) serotype A was developed to provide a safe and effective candidate vaccine for the prevention and control of FMD in pigs. [Methods] We designed and synthesized multi-epitope immunogenic genes A10, IA10 and FA10 based on the results of previous experiments and the global epidemiological information of FMDV serotype A. The expressed proteins were emulsified with ISA 201 adjuvant to immunize pigs. Serum IgG antibody titers were detected by liquid phase blocking ELISA at 0, 14 and 28 days post-immunization. All pigs were challenged with virulent FMDV A/HNLY4/2014 after a single inoculation. [Results] Three recombinant proteins were successfully expressed in *E. coli* and specific bands of approximately 35, 57 and 64 kDa, which were consistent with the expected size of the recombinant proteins A10, IA10 and FA10, respectively. The recombinant proteins were also recognized specifically by the anti-FMDV (type A) antibodies. A10+201 induced lower level of total IgG antibodies than the inactivated vaccine, but higher than other groups. All pigs (100%) immunized with A10+201 and inactivated vaccine were completely protected against virulent FMDV challenge. Four out of five pigs (80%) immunized with IA10+201 and FA10+201 were protected and only one out of five pigs (20%) immunized with A10 and FA10 were protected. All pigs inoculated with PBS+201 were unprotected. [Conclusion] A10+201 conferred the greatest protection against FMDV serotype A challenge in pigs and can be further evaluated as a candidate vaccine.

Keywords: FMDV, serotype A, multi-epitope protein vaccine, pig

(本文责编: 张晓丽)

Supported by the National Key Research and Development Program of China (2017YFD0501104)

^{*}Corresponding author. Tel/Fax: +86-931-8343390; E-mail: Zengjun Lu, luzengjun@caas.cn; Zaixin Liu, liuzaixin@caas.cn

Received: 13 June 2018; Revised: 13 August 2018; Published online: 7 September 2018