



口蹄疫 O 型重组病毒的构建及其免疫原性分析

黄书伦^{1,2}, 查晶晶^{1,2}, 孙普^{1,2}, 章兴贇^{1,2}, 李冬^{1,2}, 曹轶梅^{1,2}, 白兴文^{1,2},
付元芳^{1,2}, 马雪青^{1,2}, 李坤^{1,2}, 袁红^{1,2}, 卢曾军^{1,2}, 刘在新^{1,2}, 李平花^{1,2*}

- 1 中国农业科学院兰州兽医研究所/兰州大学动物医学与生物安全学院 动物疫病防控全国重点实验室, 甘肃 兰州 730000
- 2 甘肃省病原生物学基础学科研究中心, 甘肃 兰州 730046

黄书伦, 查晶晶, 孙普, 章兴贇, 李冬, 曹轶梅, 白兴文, 付元芳, 马雪青, 李坤, 袁红, 卢曾军, 刘在新, 李平花. 口蹄疫 O 型重组病毒的构建及其免疫原性分析[J]. 微生物学报, 2024, 64(7): 2493-2501.

HUANG Shulun, ZHA Jingjing, SUN Pu, ZHANG Xingze, LI Dong, CAO Yimei, BAI Xingwen, FU Yuanfang, MA Xueqing, LI Kun, YUAN Hong, LU Zengjun, LIU Zaixin, LI Pinghua. Construction and immunogenicity of serotype O recombinant foot-and-mouth disease virus[J]. Acta Microbiologica Sinica, 2024, 64(7): 2493-2501.

摘要: 【目的】利用反向遗传操作技术, 构建含 O 型口蹄疫病毒(food-and-mouth disease virus, FMDV) 3 个拓扑型免疫优势结构蛋白基因的重组 FMDV, 评估其作为猪 O 型口蹄疫(food-and-mouth disease, FMD)疫苗候选株的潜力。【方法】通过基因合成, 在 FMD 疫苗株 O/HN/CHA/93 (古典中国拓扑型)的基因中嵌合流行株 O/NXYCh/CHA/2018 (东南亚拓扑型) VP1 结构蛋白的重组病毒骨架上, 用 O/TUR/5/2009 疫苗株(中东-南亚拓扑型) VP1 蛋白的 G-H 环基因替换其对等基因, 构建含 O 型 3 个拓扑型 FMDV 结构蛋白基因的重组全长质粒, *Not I* 线性化后转染表达 T7 RNA 聚合酶的 BSR/T7 细胞, 拯救重组病毒。通过 RT-PCR、序列测定、间接免疫荧光鉴定重组病毒; 噬斑试验和一步生长曲线分析重组病毒的生物学特性。重组病毒制备疫苗免疫猪, 用病毒中和试验分析其对当前流行的 O 型 3 个拓扑型 FMDV 的交叉反应性。【结果】成功拯救到含 O 型 3 个拓扑型 FMDV 结构蛋白基因的重组病毒, 重组病毒与亲本病毒具有相似的生物学特性。亲本病毒和重组病毒制备的疫苗免疫猪, 均能够对中东-南亚型(Middle East-South Asia, ME-SA)拓扑型和东南亚型(South-East Asia, SEA)拓扑型病毒株产生保护性平均中和抗体($>1.65\log_{10}$); 均不能对古典中国型(Cathay)拓扑型流行株产生保护性平均中和抗体($<1.65\log_{10}$), 但与亲本病毒相比, O/TUR/5/2009 疫苗株 G-H 环基因的替换显著提高了对 ME-SA 和 SEA 拓扑型病毒株的交叉反应

资助项目: 国家重点研发计划(2023YFD1802501)

This work was supported by the National Key Research and Development Program of China (2023YFD1802501).

*Corresponding author. E-mail: lipinghua@caas.cn

Received: 2023-12-27; Accepted: 2024-04-22; Published online: 2024-05-23

性($P<0.05$)。【结论】本研究对未来 FMD 疫苗的设计具有重要的指导意义。

关键词：口蹄疫(FMD); 重组病毒; 构建; 免疫原性

Construction and immunogenicity of serotype O recombinant foot-and-mouth disease virus

HUANG Shulun^{1,2}, ZHA Jingjing^{1,2}, SUN Pu^{1,2}, ZHANG Xingze^{1,2}, LI Dong^{1,2},
CAO Yimei^{1,2}, BAI Xingwen^{1,2}, FU Yuanfang^{1,2}, MA Xueqing^{1,2}, LI Kun^{1,2},
YUAN Hong^{1,2}, LU Zengjun^{1,2}, LIU Zaixin^{1,2}, LI Pinghua^{1,2*}

1 State Key Laboratory for Animal Disease Control and Prevention, College of Veterinary Medicine, Lanzhou University, Lanzhou Veterinary Research Institute, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Lanzhou 730000, Gansu, China

2 Gansu Province Research Center for Basic Disciplines of Pathogen Biology, Lanzhou 730046, Gansu, China

Abstract: [Objective] To construct a recombinant foot-and-mouth disease virus (FMDV) strain carrying the genes encoding three topotypes of immunodominant structural proteins of serotype O FMDV by reverse genetic manipulation and evaluate the potential of the recombinant strain serving as a vaccine candidate for porcine food-and-mouth disease (FMD) type O. [Methods] Based on the gene of the recombinant FMDV with the replacement of the VP1 structural protein of O/NXYCh/CHA/2018 epidemic strain, the recombinant full-length plasmid featuring substitution of G-H loop genes of the structural protein VP1 of O/TUR/5/2009 vaccine strain was constructed by gene synthesis. The recombinant virus was rescued after transfection of the linearized recombinant plasmid into BSR/T7 cells expressing T7 RNA polymerase, and then identified by RT-PCR, sequencing, and indirect immunofluorescence. The plaque assay and one-step growth curve building were employed to characterize the recombinant virus. Pigs were vaccinated with the vaccines prepared from the recombinant virus and the parental virus, and then virus neutralization tests were carried out to examine the cross-reactive responses against the epidemic serotype O FMDV isolates of three topotypes. [Results] The recombinant FMDV strain carrying the structural protein genes of three topotypes was successful rescued. The recombinant strain showed similar biological properties to the parental virus. Pigs vaccinated with the vaccines prepared from the recombinant virus and the parental virus produced protective neutralizing antibodies with the mean titer of $>1.65\log_{10}$ against the viruses of the Middle East-South Asia (ME-SA) and South-East Asia (SEA) topotypes. The pigs did not produce protective neutralizing antibodies against the Cathay topotype ($<1.65\log_{10}$). The substitution of O/TUR/5/2009 G-H loop gene improved the cross-reactivity against the viruses of ME-SA and SEA topotypes compared with the parental virus ($P<0.05$). [Conclusion] This study has guiding significance for the design of FMD vaccines in the future.

Keywords: foot-and-mouth disease (FMD); recombinant virus; construction; immunogenicity

口蹄疫(foot-and-mouth disease, FMD)是侵害猪、牛和羊等重大动物的烈性传染病。该病传播迅速、传染性极强、发病率极高,世界动物卫生组织(World Organization for Animal Health, WOAH)将其列为必报动物疫病,我国将其列为一类动物传染病之首。FMD的暴发和流行严重影响发病地区的畜牧业生产,阻碍社会经济发展,制约健康养殖,是全球畜牧业生产急需解决的重大动物疫病之一。

口蹄疫病毒(foot-and-mouth disease virus, FMDV)属小 RNA 病毒科(Picornaviridae)、口蹄疫病毒属(Aphthovirus)成员。FMDV 粒子由结构蛋白 VP4、VP2、VP3 和 VP1 各 60 分子组成的二十面体衣壳与单股正链 RNA 组成,其中结构蛋白 VP4 位于衣壳的内部,VP2、VP3 和 VP1 位于衣壳的外部^[1]。O 型 FMDV 粒子表面至少含有 5 个抗原位点:VP2 和 VP3 各有 1 个抗原位点(位点 2 和 4),VP1 含有 3 个抗原位点(位点 1、3 和 5),这些抗原位点是诱导保护性抗体产生的主要免疫原^[1-3]。其中位于 VP1 蛋白 130-160 位氨基酸的 G-H 环是诱导动物产生中和抗体最主要的抗原表位,在疫苗免疫保护应答中发挥着关键性作用^[4-5]。因此,FMDV G-H 环一直是表位疫苗、合成肽疫苗等新型疫苗研究的热门靶点^[6-7]。

我国是 FMD 流行的国家,其中 O 型 FMD 流行最广,也最难防控。目前我国流行的 O 型 FMDV 主要分为 3 个拓扑型:古典中国型(Cathay)、中东-南亚型(Middle East-South Asia, ME-SA)和东南亚型(South-East Asia, SEA)^[8]。O 型多拓扑型病毒株共同流行加剧了 FMDV 的变异,导致新变异毒株不断出现,使现用疫苗与流行毒株的抗原匹配性下降或抗原不匹配,容易导致免疫失败而引发新疫情的流行,给我国 FMD 防控提出了前所未有的挑战。因

此,迫切需要筛选高效、广谱的 FMD 疫苗候选毒株。

为了发展能更好地防控当前流行的 O 型 3 个拓扑型 FMD 流行株,本研究借助 FMDV 的反向遗传操作技术,在已建立含 2 个拓扑型(Cathay+SEA) FMDV 结构蛋白基因全长克隆基础上,将 ME-SA 拓扑型疫苗株 G-H 抗原表位基因替换其对等基因,构建含 3 个拓扑型 FMDV 结构蛋白基因的重组全长克隆,拯救重组 FMDV,研究其作为猪疫苗候选株的潜力。

1 材料与方法

1.1 质粒、细胞和病毒

FMDV 疫苗株 O/HN/CHA/93 (Cathay 拓扑型)全长感染性克隆^[9]嵌合当前流行毒株 O/NXYCh/CHA/2018 (SEA 拓扑型) VP1 基因的全长质粒 pOFS/NXVP1 和半长质粒 pSK-Z123/NXVP1^[10]均为中国农业科学院兰州兽医研究所构建保存。表达 T7 RNA 聚合酶的 BSR/T7 细胞和 BHK-21 细胞均为本实验室保存。FMDV O/GXCX/CHA/2018 (MH791316.1)、O/HB/HK/99、O/XJ/CHA/2017 (MF461724.1)、O/NXYCh/CHA/2018 (MH791315.1)均由国家口蹄疫参考实验室分离保存。

1.2 主要试剂

琼脂糖凝胶 DNA 回收试剂盒、DNA 片段回收试剂盒、质粒抽提试剂盒、大肠杆菌(*Escherichia coli*) JM109 感受态细胞、高保真 DNA 聚合酶、限制性核酸内切酶(*Bgl* II、*Spe* I、*Not* I、*Pst* I), 宝生物工程(大连)有限公司; 转染试剂 LipofectamineTM 2000、MEM 培养基、2×MEM 培养基, Invitrogen 公司; RNA 提取试剂盒, QIAGEN 公司; 灭活剂二乙烯亚胺(2-bromoethylamine hydrobromide, BEI), Sigma-Aldrich 公司。

1.3 G-H 基因替换重组 FMDV 全长质粒的构建

以 pSK-Z123/NXVP1 为骨架, 替换 FMDV 疫苗株 O/TUR/5/2009 (KP202878.1, ME-SA 拓扑型) 长约 30 个氨基酸 G-H 环基因的半长质粒 pSK-Z123/NXVP1/TURG-H, 由苏州金唯智生物科技有限公司合成。pSK-Z123/NXVP1/TURG-H 和嵌合全长质粒 pOFS/NXVP1 经 *Spe* I 和 *Bgl* II 双酶切后分别回收约 5 400 bp (pSK-Z123/NXVP1/TURG-H) 和 2 个大小均接近 3 000 bp (pOFS/NXVP1) 的 DNA 片段, 然后用 T4 DNA 连接酶连接、转化, 构建重组全长质粒 pOFS/NXVP1/TURG-H。全长质粒用 *Pst* I 进行酶切鉴定, 将符合预期的质粒送苏州金唯智生物科技有限公司进行测序验证。重组质粒含 FMDV 的基因组示意图 1A, G-H 环氨基酸差异见图 1B。

1.4 重组 FMDV 的拯救

重组质粒 pOFS/NXVP1/TURG-H 经 *Not* I 内切酶 37 °C 消化 3 h 后, 用 DNA 片段回收试剂盒回收, 具体步骤参照试剂盒说明书。取 2 μg 回收的 pOFS/NXVP1/TURG-H 线性化 DNA 片段

用 Lipofectamine™ 2000 介导转染至 80%–90% BSR/T7 细胞, 并置于 37 °C、5% CO₂ 培养。转染 4–5 h 后, 每孔加 1 mL 的 MEM 培养基。每隔 12 h 观察细胞状态, 当转染细胞出现明显的致细胞病变效应 (cytopathogenic effect, CPE) 后, 将其反复冻融后的上清液接种 BHK-21 细胞进行传代, 子代病毒用于后续试验。

1.5 重组 FMDV 的鉴定

1.5.1 RT-PCR 和序列测定

取转染细胞上清液, 用 RNA 提取试剂盒提取总 RNA, 通过一步法 RT-PCR 试剂盒扩增病毒 VP1 蛋白基因。回收、纯化目标 PCR 产物后送苏州金唯智生物科技有限公司进行序列测定。PCR 扩增和测序引物为 VP1-F (5'-AGATAACA CAGGGAAAGCC-3') 和 VP1-R (5'-CTGATGGC CTTCCTCCAGT-3')。

1.5.2 间接免疫荧光试验 (immunofluorescence assay, IFA)

将转染细胞培养上清和亲本病毒分别接种 70%–80% 满单层 BHK-21 细胞。37 °C 孵育 6 h 后细胞用 4% 多聚甲醛 4 °C 固定 20 min, PBS

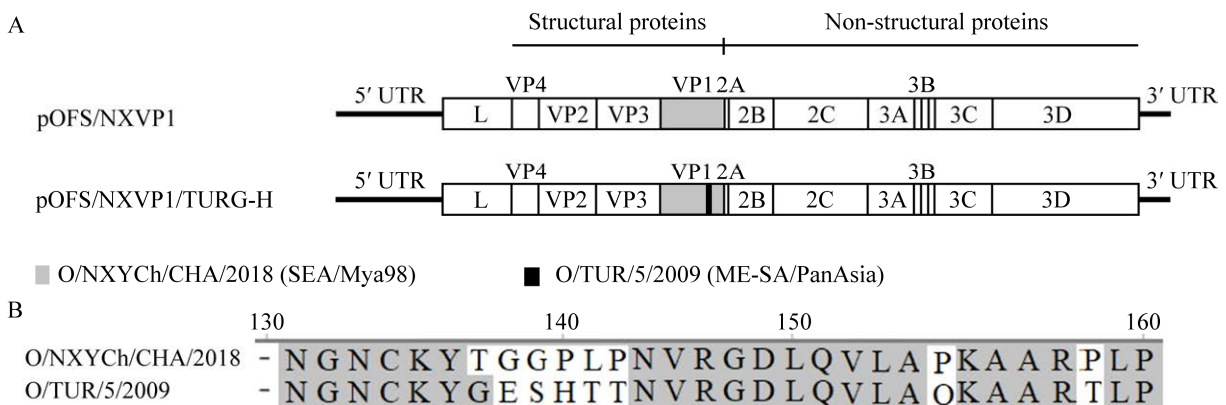


图 1 重组 FMDV 构建方案示意图 A: 重组 FMDV 基因组质粒全长示意图。B: 重组 VP1 结构蛋白 G-H 环氨基酸的比对

Figure 1 Schematic diagram of the construction of recombinant FMDV. A: Schematic diagram of genome of recombinant FMDV full-length plasmid. B: Comparison amino acids of G-H loop of VP1 structural proteins between two FMDV.

漂洗 3 次; 用 Triton X-100 室温通透 10 min, PBS 洗涤 3 次; 加入小鼠抗 FMDV 3A 单抗 (1:200 倍稀释), 37 °C 孵育 1 h, PBS 洗 3 次; 加入二抗 (山羊抗小鼠 IgG-FITC 稀释比例为 1:400), 37 °C 作用 1 h, 洗去游离二抗后用荧光显微镜观察结果并保存图片。

1.6 重组 FMDV 噬斑表型鉴定和生长特性测定

将 10 倍比系列稀释的第 6 代重组 FMDV 和亲本病毒各 200 μ L/孔, 分别接种培养于 6 孔板的 BHK-21 细胞, 放在 37 °C 条件下孵育, 每 10 min 轻轻摇动 1 次, 1 h 后加入 2 mL 黄芪胶混合液 (1 份 2 \times MEM, 1 份 1.2% 黄芪胶)。细胞静置培养 48 h 后, 加入固定液 (甲醇:丙酮=1:1, 体积比) 固定 30 min, 经 0.1% 结晶紫 37 °C 染色 2 h 后进行噬斑计数和噬斑直径测量, 并计算病毒噬斑形成单位 (PFU/mL)。

将第 6 代重组 FMDV 和亲本病毒的病毒滴度稀释至 5 \times 10⁶ PFU/mL, 分别接种 BHK-21 细胞置于 37 °C 孵育 1 h。弃去未结合病毒液, 补加 5 mL MEM 培养液继续培养。每隔 4 h 收取样品至 16 h, 冻融样品后通过噬斑形成单位测定不同时间点的病毒滴度 (PFU/mL) 并评价其一步生长特性。

1.7 灭活疫苗的制备

取第 6 代亲本病毒和重组病毒各 100 mL, 反复冻融 2–3 次, 4 °C、6 000 r/min 离心 30 min, 去除细胞碎片。收集的病毒液分别加入 5 mmol BEI 于 28 °C 灭活 30 h。灭活后的病毒接种 BHK-21 细胞进行安全性检验, 检验合格的病毒抗原按照常规方法纯化、浓缩后, 按抗原:佐剂等体积比配制疫苗 (146S 抗原终浓度为 6 μ g/mL), 疫苗制品置于 4–8 °C 保存备用。

1.8 猪的免疫

筛选 FMDV 结构蛋白/非结构蛋白抗体阴

性的 3 月龄健康仔猪共计 12 头, 随机分为 2 组, 每组 6 头, 分别接种亲本病毒疫苗和重组病毒疫苗, 接种剂量为 2 mL/头份。免疫 28 d 后采血, 分离血清, -20 °C 保存备用。

1.9 病毒中和试验

取免疫后 28 d 的免疫血清进行微量病毒中和试验检测针对 3 个拓扑型的 4 个谱系 FMDV 株 (O/GXCX/CHA/2018、O/HB/HK/99、O/XJ/CHA/2017 和 O/NXYCh/CHA/2018) 的交叉中和抗体水平。微量病毒中和试验操作如下: 免疫血清在 96 孔板中进行 2 倍比连续梯度稀释; 加入 50 μ L 病毒稀释液 [滴度为 200 半数组织培养感染剂量 (tissue culture infective dose, TCID₅₀)/0.1 mL], 同时设置病毒回归对照 (100 TCID₅₀、10 TCID₅₀、1 TCID₅₀、0.1 TCID₅₀) 和细胞对照。待测血清和病毒稀释液混匀后, 37 °C 孵育 1 h, 加入 100 μ L 浓度约为 1 \times 10⁶ 个/mL 的 BHK-21 细胞悬液。培养 72 h 后观察 CPE, 按 Karber 法计算血清中和抗体滴度。

2 结果与分析

2.1 重组质粒的构建及鉴定

凝胶电泳鉴定正确的重组质粒 pOFS/NXVP1/TURG-H 用 *Pst* I 进行酶切鉴定, 凝胶电泳结果表明, 产生了约 591、3 282、7 200 bp 的条带, 与预期大小相符。测序结果表明重组质粒含有预期替换的 G-H 环基因。

2.2 重组 FMDV 的拯救

重组质粒 pOFS/NXVP1/TURG-H 经 *Not* I 酶线性化, 转染 BSR/T7 细胞 2 d 后, 部分细胞可见典型的 FMDV 致细胞病变效应, 而未转染线性 DNA 的细胞未出现 CPE。当约 80%–90% 的转染细胞出现 CPE 时收集细胞, 反复冻融后继续在 BHK-21 细胞上连续传代。

2.3 重组 FMDV 的鉴定

2.3.1 RT-PCR

收集的转染样品以 VP1-F 和 VP1-R 为引物, RT-PCR 扩增 VP1 结构蛋白基因。琼脂糖凝胶电泳显示扩增出符合预期大小的白亮条带。对该 PCR 产物进行序列分析, 结果表明重组病毒 rHN/NXVP1/TURG-H 含有替换的基因片段, 说明成功构建了重组 FMDV。

2.3.2 免疫荧光试验

免疫荧光试验如图 2 所示, 拯救的重组病

毒感染的 BHK-21 细胞能与 FMDV 3A 单抗反应, 可见特异绿色荧光, 而对照细胞与 FMDV 3A 单抗作用未见荧光, 表明拯救的重组病毒为 FMDV。

2.4 重组 FMDV 的噬斑表型鉴定和生长曲线

重组 FMDV 和亲本病毒的噬斑表型如图 3 所示, rHN/NXVP1 [(4.27±1.44) nm]和 rHN/NXVP1/TURG-H [(4.11±1.39) nm]均可形成形态相似、平均直径相近的噬斑; 一步生长曲线表明重组

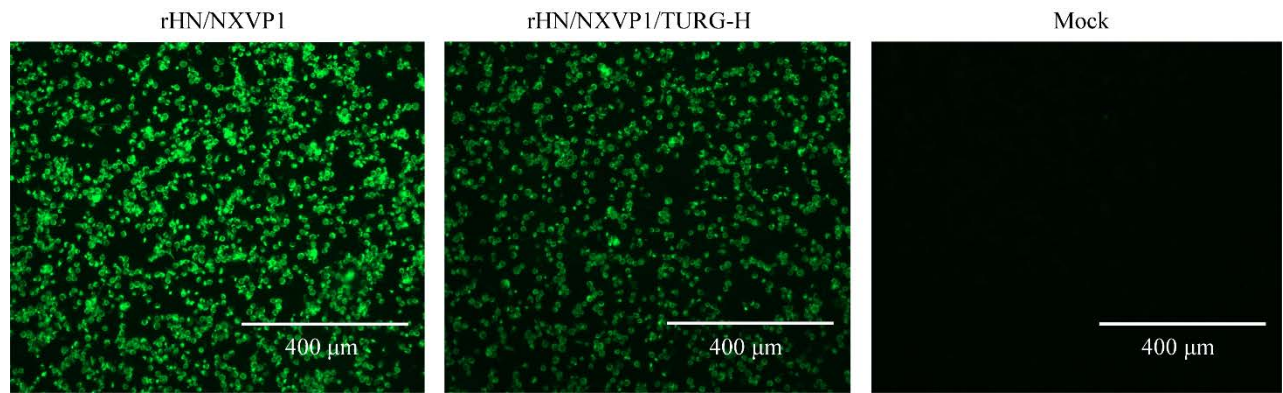


图 2 重组 FMDV 的 IFA 鉴定

Figure 2 Identification of the recombinant FMDV by IFA.

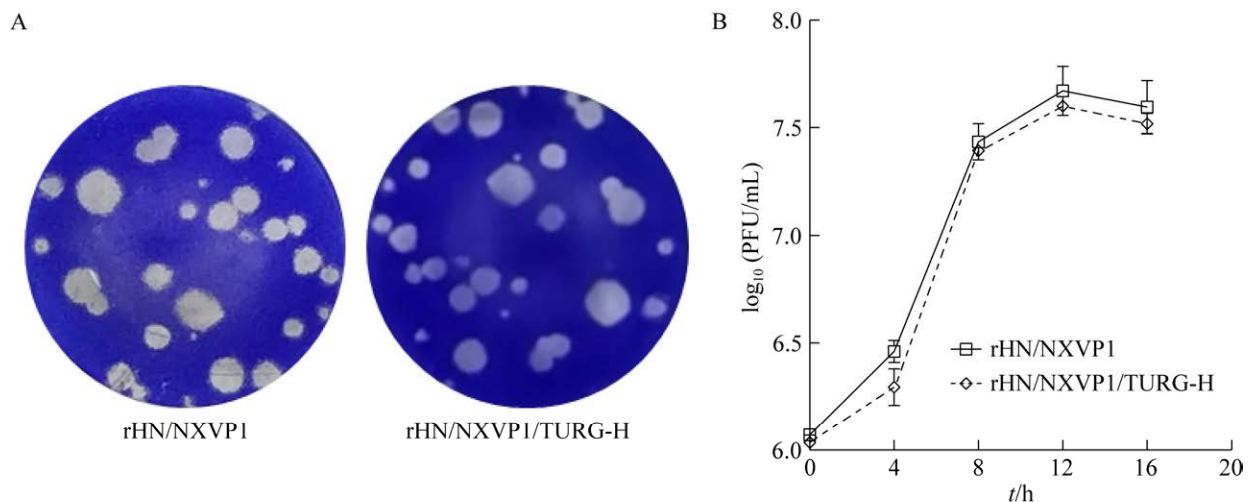


图 3 FMDV 的噬斑形态和一步生长曲线 A: FMDV 噬斑表型. B: FMDV 一步生长曲线

Figure 3 The plaque phenotype and one-step growth curves of FMDV. A: The plaque phenotype of FMDV. B: One-step growth curves of FMDV. Data show mean±SD of viral PFU.

FMDV 的复制动力学与亲本病毒相似, 但重组 FMDV 的病毒滴度略低于($P>0.05$)亲本病毒, 说明 FMD 疫苗毒株 G-H 环基因的替换未明显影响病毒在 BHK-21 细胞上的复制。

2.5 病毒中和试验

免疫猪 28 d 的血清用微量中和试验检测针对 ME-SA、SEA 和 Cathay 共 3 个拓扑型的 4 个谱系病毒株的中和抗体水平。如图 4 所示, 该结果表明亲本病毒 rHN/NXVP1 和重组病毒 rHN/NXVP1/TURG-H 疫苗均产生了针对 ME-SA、SEA 拓扑型病毒保护性中和抗体 (WOAH 规定中和抗体 $\geq 1.65\log_{10}$ 为保护), 其中亲本病毒 rHN/NXVP1 疫苗免疫的猪(5/6)产生了针对 O/NXYCh/CHA/2018 和 O/XJ/CHA/2017 病毒保护性中和抗体, 3/6 免疫猪产生了针对 O/HB/HK/99 病毒保护性的中和抗体, 但未产生针对 O/GXCX/CHA/2018 保护性中和抗体; 而重组病毒 rHN/NXVP1/TURG-H 疫苗免疫猪均产生了针对 O/NXYCh/CHA/2018、O/XJ/CHA/2017 和 O/HB/HK/99 病毒保护性的中和抗体, 但只有 1/6 的猪产生了针对 O/GXCX/CHA/2018 病毒保护性的中和抗体。结果说明, 疫苗株 G-H 环基因的替换显著提高了重组病毒对当前流行的 O 型 SEA 和 ME-SA 拓扑型 FMDV 的交叉反应性($P<0.05$)。

3 讨论与结论

近年来, 反向遗传操作技术的发展为 RNA 病毒蛋白功能、致病机制机理以及新型疫苗创制等方面的研究提供了便利。通过反向遗传操作技术嵌合 RNA 病毒不同血清型、亚型毒株主要免疫蛋白或者优势抗原表位, 能够提高疫苗株与流行毒株的交叉反应性, 拓展病毒的抗原谱。如 Kim 等以禽流感病毒(avian influenza viruses,

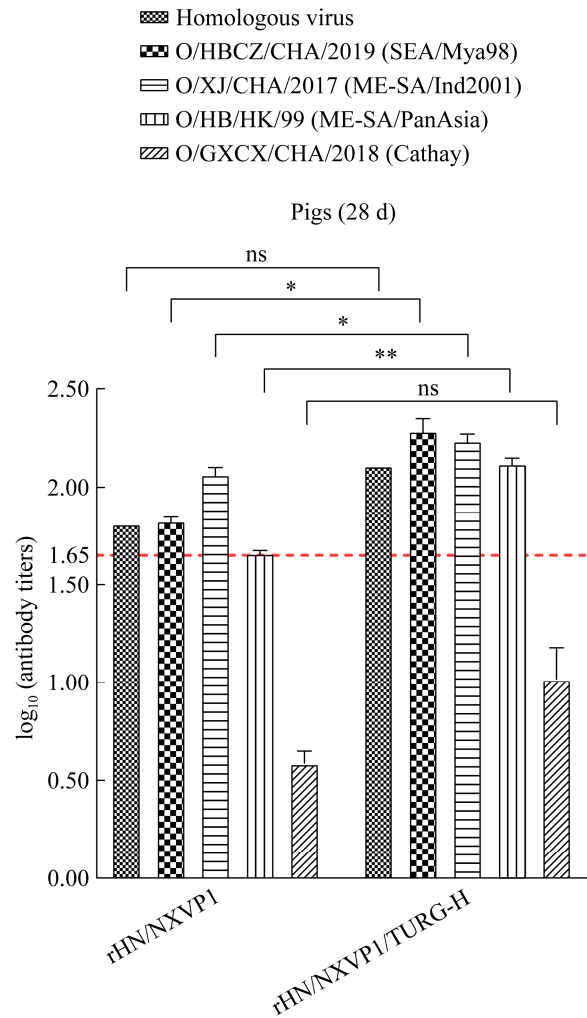


图 4 FMDV 疫苗免疫猪血清中和流行毒株的平均抗体效价

Figure 4 Mean antibody titer of the serum collected from vaccinated pig with FMDV vaccines against the circulating strains. Data show mean \pm SD. * indicates $P<0.05$; ** indicates $P<0.01$; ns indicates not significant.

AIV) Apdm09 株(H1N1 亚型)为骨架, 构建了嵌合 H9N2 亚型 AIV 的 HA1 区域和 H5N8 亚型 AIV 的 HA2 区域的重组 AIV, 该病毒制备的灭活疫苗免疫动物能诱导产生高水平抗 H9 和 H5 亚型 AIV 的中和抗体, 并能够保护小鼠免遭这 2 个亚型 AIV 的攻击^[11]。Liao 等在猪瘟疫病毒(classic swine fever virus, CSFV) (C 株, 基因 1 型)

感染性克隆的基础上, 构建了嵌合 CSFV 流行毒株(基因型 2) E2 蛋白 N 端抗原高变区 1 (90 bp) 的重组病毒 RecC-HAR1, 该病毒的抗血清能很好地中和基因 1 型和 2 型的 CSFV, 表明嵌合 CSFV 高变抗原区, 提高了不同基因型 CSFV 之间的交叉反应性^[12]。Rieder 等发现嵌合 O 型或 C 型 A12 FMDV G-H 环的豚鼠抗血清能同时中和 A 型和 O 型或 A 型和 C 型 FMDV, 而嵌合 C 型 G-H 环 A12 FMDV 疫苗免疫猪也能产生交叉中和抗体, 能完全保护猪免遭 A 型 FMDV 的攻击, 部分保护猪免遭 C 型 FMDV 的攻击^[13]。鉴于此, 本研究也利用已建立 FMDV 的感染性克隆, 构建含 3 个拓扑型(Cathay+ME-SA+SEA) 病毒株结构蛋白, 主要免疫基因的嵌合 FMDV, 以期筛选抗原高效、广谱拓展的 FMD 疫苗候选毒株。

FMD 疫苗株的筛选方法主要有 2 种: 体内试验和体外试验^[14]。其中体内试验耗时、费力, 而且需要价格昂贵的靶动物和高级别生物安全实验室, 而体外实验操作简单, 成本低廉。另外, FMD 疫苗诱导机体产生中和抗体的水平与免疫动物的保护密切相关。一般情况下, 动物中和抗体水平越高, 保护率越高。因此, 本研究首选体外微量病毒中和试验检测重组病毒和亲本病毒疫苗免疫猪血清对 3 个拓扑 FMDV 的交叉中和能力, 初步评价其作为猪 O 型 FMD 疫苗候选株的潜力。本研究结果表明, 与亲本病毒疫苗一样, 重组病毒疫苗免疫猪均能产生抵抗 SEA 和 ME-SA 拓扑型病毒保护性平均交叉中和抗体水平($>1.65\log_{10}$), 不能对 Cathay 谱系病毒产生保护性平均交叉中和抗体水平($<1.65\log_{10}$), 但 O/TUR/5/2009 疫苗株 G-H 环基因的替换显著提高了重组病毒对当前流行的 SEA 和 ME-SA 拓扑型 FMDV 的交叉反应性

($P<0.05$), 推测这种免疫差异可能与 G-H 环上包含的免疫优势的抗原表位有关, 但具体的机制有待进一步研究。

本研究构建的含 3 个拓扑型 FMDV 结构蛋白基因的重组病毒疫苗免疫猪显著提高了对 O 型 SEA 和 ME-SA 拓扑型 FMDV 的交叉反应性, 对未来 FMD 疫苗的设计具有重要的指导意义。

参考文献

- [1] GRUBMAN MJ, BAXT B. Foot-and-mouth disease[J]. *Clinical Microbiology Reviews*, 2004, 17(2): 465-493.
- [2] BARNETT PV, OULDRIDGE EJ, ROWLANDS DJ, BROWN F, PARRY NR. Neutralizing epitopes of type O foot-and-mouth disease virus. I. Identification and characterization of three functionally independent, conformational sites[J]. *The Journal of General Virology*, 1989, 70(Pt 6): 1483-1491.
- [3] CROWTHER JR, FARIAS S, CARPENTER WC, SAMUEL AR. Identification of a fifth neutralizable site on type O foot-and-mouth disease virus following characterization of single and quintuple monoclonal antibody escape mutants[J]. *The Journal of General Virology*, 1993, 74(Pt 8): 1547-1553.
- [4] PARRY N, FOX G, ROWLANDS D, BROWN F, FRY E, ACHARYA R, LOGAN D, STUART D. Structural and serological evidence for a novel mechanism of antigenic variation in foot-and-mouth disease virus[J]. *Nature*, 1990, 347: 569-572.
- [5] MATEU MG, CAMARERO JA, GIRALT E, ANDREU D, DOMINGO E. Direct evaluation of the immunodominance of a major antigenic site of foot-and-mouth disease virus in a natural host[J]. *Virology*, 1995, 206(1): 298-306.
- [6] WONG HT, CHENG SC, CHAN EW, SHENG ZT, YAN WY, ZHENG ZX, XIE Y. Plasmids encoding foot-and-mouth disease virus VP1 epitopes elicited immune responses in mice and swine and protected swine against viral infection[J]. *Virology*, 2000, 278(1): 27-35.
- [7] ZHANG ZW, PAN L, DING YZ, ZHOU P, LV JL, CHEN HT, FANG YZ, LIU XS, CHANG HY, ZHANG J, SHAO JJ, LIN T, ZHAO FR, ZHANG YG, WANG YL. Efficacy of synthetic peptide candidate vaccines

- against serotype-a foot-and-mouth disease virus in cattle[J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2015, 99(3): 1389-1398.
- [8] ZHU Z, YANG F, HE J, LI J, CAO W, LI J, XIA Y, GUO J, JIN Y, ZHANG K, ZHENG H, LIU X. First detection of foot-and-mouth disease virus O/ME-SA/Ind2001 in China[J]. *Transboundary and Emerging Diseases*, 2018, 65(6): 2027-2031.
- [9] LI PH, BAI XW, SUN P, LI D, LU ZJ, CAO YM, FU YF, BAO HF, CHEN YL, XIE BX, LIU ZX. Evaluation of a genetically modified foot-and-mouth disease virus vaccine candidate generated by reverse genetics[J]. *BMC Veterinary Research*, 2012, 8: 57.
- [10] LI PH, HUANG SL, ZHA JJ, SUN P, LI D, BAO HF, CAO YM, BAI XW, FU YF, MA XQ, LI K, YUAN H, ZHANG J, ZHAO ZX, WANG J, ZHANG KQ, CHEN YL, ZHANG Q, QI SY, LIU ZX, et al. Evaluation of immunogenicity and cross-reactive responses of vaccines prepared from two chimeric serotype O foot-and-mouth disease viruses in pigs and cattle[J]. *Veterinary Research*, 2022, 53(1): 56.
- [11] KIM SM, KIM YI, PARK SJ, KIM EH, KWON HI, SI YJ, LEE IW, SONG MS, CHOI YK. Vaccine efficacy of inactivated, chimeric hemagglutinin H9/H5N2 avian influenza virus and its suitability for the marker vaccine strategy[J]. *Journal of Virology*, 2017, 91(6): e01693-16.
- [12] LIAO X, WANG ZH, CAO T, TONG C, GENG SC, GU YX, ZHOU YS, LI XL, FANG WH. Hypervariable antigenic region 1 of classical swine fever virus E2 protein impacts antibody neutralization[J]. *Vaccine*, 2016, 34(33): 3723-3730.
- [13] RIEDER E, BAXT B, LUBROTH J, MASON PW. Vaccines prepared from chimeras of foot-and-mouth disease virus (FMDV) induce neutralizing antibodies and protective immunity to multiple serotypes of FMDV[J]. *Journal of Virology*, 1994, 68(11): 7092-7098.
- [14] 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.