

• 动物及兽医生物技术 •

猪 O 型口蹄疫病毒细菌样颗粒疫苗的制备与免疫原性鉴定

侯立婷^{1,2}, 陈瑾², 乔绪稳², 于晓明², 侯继波^{2,3}, 郑其升², 李瑾年¹

1 安徽农业大学动物科技学院, 安徽 合肥 230036

2 国家兽用生物制品工程技术研究中心, 江苏 南京 210014

3 江苏省动物重要疫病与人兽共患病防控协同创新中心, 江苏 扬州 225009

侯立婷, 陈瑾, 乔绪稳, 等. 猪 O 型口蹄疫病毒细菌样颗粒疫苗的制备与免疫原性鉴定. 生物工程学报, 2017, 33(2): 217–227.
Hou LT, Chen J, Qiao XW, et al. Design and immunogenicity evaluation for the bacteria-like particle vaccine against swine type O Foot-and-mouth disease virus. Chin J Biotech, 2017, 33(2): 217–227

摘 要: 验证基于革兰氏阳性增强基质 (Gram-positive enhancer matrix, GEM) 展示口蹄疫病毒细菌样颗粒 (Bacteria-like particles, BLP) 疫苗的可行性。按照大肠杆菌偏好性密码子优化合成基于猪口蹄疫病毒 Mya98 株序列的 3 种抗原基因设计, 并将其插入到含有锚钩蛋白基因的原核表达载体 pQZ-PA, 鉴定阳性后转入 *Escherichia coli* BL21, 进行诱导表达。利用 SDS-PAGE 与 Western blotting 对目的基因表达及产物的可溶性进行分析。利用 GEM 颗粒纯化目的蛋白, 制备细菌样颗粒疫苗抗原; 利用 BCA 试剂盒测定重组蛋白的浓度, 将重组蛋白与白油佐剂乳化, 制备疫苗, 免疫 5 周龄小鼠, 同时设商品化多肽苗对照与空白对照, 免疫后不同时间采集试验小鼠血清, 利用口蹄疫病毒多肽 ELISA 抗体检测试剂盒和 O 型口蹄疫抗体液相阻断酶联免疫 (Enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA) 检测试剂盒检测免疫小鼠血清的抗体水平; 利用噻唑蓝比色法 (Methylthiazolyldiphenyl-tetrazolium bromide, MTT) 测定淋巴细胞增殖情况; 利用荧光定量 PCR 方法检测相关细胞因子表达, 评价细胞免疫水平。SDS-PAGE 结果表明, 设计在大肠杆菌中的 3 种口蹄疫病毒抗原基因均以可溶形式获得高效表达; Western blotting 结果显示, 表达的重组蛋白能够与口蹄疫病毒阳性血清发生反应, 利用 GEM 颗粒能够实现重组蛋白的一步离心纯化, 制备 BLP 疫苗抗原; 免疫试验结果表明, 设计的重组抗原 B (T1BT2) 4B 不但能够刺激免疫小鼠产生更高水平的多肽特异性 ELISA 抗体与口蹄疫特异性液相阻断抗体, 而且产生了更高水平的脾淋巴细胞增殖及 Th1 型的细胞因子分泌。初步实验结果表明, 本研究制备的 BLP 疫苗 GEM-B (T1BT2) 4B 具有良好的免疫原性, 为研究口蹄疫病毒基因工程亚单位疫苗开辟了一条新的思路。

关键词: 口蹄疫病毒, VP1 蛋白, 可溶性表达, 细菌样颗粒疫苗, 免疫原性

Received: June 22, 2016; **Accepted:** November 9, 2016

Supported by: The Special Fund for Agro-scientific Research in the Public Interest (No. 201303046), the Independent Innovation of Agricultural Sciences Program of Jiangsu Province (No. CX(14)2089).

Corresponding authors: Qisheng Zheng. Tel: +86-25-84392088; E-mail: njevc1302@163.com

Jinnian Li. Tel: +86-551-3388375; E-mail: Lijinnian2000@163.com

公益性行业 (农业) 科研专项 (No. 201303046), 江苏省农业自主创新专项 (No. CX(14)2089) 资助。

网络出版时间: 2016-12-09

网络出版地址: <http://www.cnki.net/kcms/detail/11.1998.q.20161209.1551.002.html>

Design and immunogenicity evaluation for the bacteria-like particle vaccine against swine type O foot-and-mouth disease virus

Liting Hou^{1,2}, Jin Chen², Xuwen Qiao², Xiaoming Yu², Jibo Hou^{2,3}, Qisheng Zheng², and Jinnian Li¹

1 College of Animal Science and Technology, Anhui Agricultural University, Hefei 230036, Anhui, China

2 National Research Center of Veterinary Biological Engineering and Technology, Nanjing 210014, Jiangsu, China

3 Jiangsu Co-innovation Center for Prevention and Control of Important Animal Infectious Diseases and Zoonoses, Yangzhou 225009, Jiangsu, China

Abstract: Based on gram positive enhancer matrix displaying technology, we designed and evaluated a bacteria-like particle vaccine against swine type O Foot-and-mouth disease virus. Three optimized genes of type O Foot-and-mouth disease virus strain Mya98 were cloned into recombinant prokaryotic expression vector pQZ-PA and renamed as pQZ-BT1B-PA, pQZ-BT2B-PA and pQZ-B (T1BT2) 4B-PA, fused with an anchor protein (PA) binding to Gram-positive enhancer matrix (GEM) particles specifically. The protein expression was identified with SDS-PAGE and Western blotting, and then purified with GEM particles. Five-week old female mice were randomly divided into six groups and all the immunization was developed according to subcutaneous injection. Mice in the first three groups were injected with 50 µg/dose GEM-BT1B, GEM-BT2B and GEM-B (T1BT2) 4B, respectively. Mice in the fourth group were immunized with commercial peptide vaccine as positive control. The fifth group vaccinated with host *E. coli* transformed with pQZ-PA fulfilled as negative control. Mice in the last group injected with sterile PBS served as blank control. The humoral immunity of recombinant protein vaccine was evaluated with peptide-specific antibody and LPB antibody. The cellular immunity was evaluated with lymphocyte proliferation test and cytokine expression detection. SDS-PAGE and Western blotting showed that the most part of soluble target fusion protein have been purified and displayed on GEM particles. Vaccine GEM-B (T1BT2) 4B stimulated mice produce not only higher level of specific antibody against peptide and Foot-and-mouth disease virus specific liquid phase blocking antibody, but also more vigorous spleen lymph proliferation and higher levels of Th1 type cytokines. To summarize, vaccine of GEM-B (T1BT2) 4B possessed good immunogenicity and opened a new way for further Foot-and-mouth disease virus subunit vaccine design.

Keywords: Foot-and-mouth disease virus, VP1 protein, soluble expression, bacteria-like particles, immunogenicity

口蹄疫 (Foot-and-mouth disease, FMD) 是由口蹄疫病毒 (Foot-and-mouth disease virus, FMDV) 引起的一种急性、热性和高度接触性传染病。临床特征是在偶蹄动物口腔黏膜、蹄部和乳房皮肤发生水疱性疹。该病毒传播途径多、速度快,曾多次在世界范围内暴发流行,造成巨大的经济损失,世界动物卫生组织 (OIE) 将其列

为法定报告的动物传染病之一^[1-3]。在我国, FMD 属于国家强制免疫类疾病,目前商品化的疫苗有 FMD 灭活疫苗和多肽疫苗两种。目前 FMD O 型合成肽疫苗由于具有安全性好、免疫原性强和免疫副反应小等优点而得到广泛的应用^[4-5]。Brown 等用大肠杆菌表达的 FMDV VP1 基因第 140–160 和 200–213 位肽段串联多肽免疫牛、猪

等动物,结果显示可获得较好的免疫力^[6]。Chan 将 FMDV VP1 基因编码的第 141–160 位肽段和 200–213 位肽段串联起来与猪 IgG 重链进行融合表达,所得产物免疫后猪可以抵抗 50 LD_{50} 的 FMDV 攻击^[7]。王长怡将 O 型 FMDV VP1 蛋白 141–160 位肽段和一个具有广谱性的辅助性 T 细胞表位进行化学合成,制备疫苗免疫猪后可以抵抗 $10^{4.5}$ TCID₅₀ FMDV 的强毒攻击^[8]。方明丽等利用 O 型 FMDV VP1 上的主要表位,模拟天然口蹄疫病毒的 VP1 蛋白构象,将其进行不同数量、不同形式的串联表达,免疫豚鼠和牛后能产生了较高滴度的中和抗体^[9]。

革兰氏阳性增强基质表面展示系统 (Gram-positive bacteria enhancer matrix particles, GEM) 是近几年发展起来的一种颗粒抗原制备新技术。该系统包括 GEM 颗粒和蛋白锚钩 (Protein anchor, PA) 两个构件。GEM 颗粒是乳酸乳球菌 MG1363 经热酸煮沸处理,去除全部蛋白和核酸等物质后获得的球形肽聚糖骨架^[10]。蛋白锚钩 PA 是 N-乙酰氨基葡萄糖苷酶的一个结构域,可以非共价方式特异性与肽聚糖结合。大量研究表明,与 PA 融合表达的目标蛋白能够展示在 GEM 颗粒表面,以 GEM 为骨架形成颗粒样抗原。该系统操作简单,只需一步离心即可完成颗粒抗原的制备^[11–13]。

目前,关于 FMD 亚单位疫苗的研究存在以下问题:1) 靶抗原在 *E. coli* 中表达时,多数以包涵体形式存在,需要变性复性过程,在大规模生产中难以实现;2) 大多数研究中对表达蛋白的纯化是利用 Ni-NTA 树脂纯化,这种方法成本高,操作繁琐,在大生产中也难以实现^[14];3) 与 *E. coli* 表达系统表达相比,人工合成肽疫苗仍然存在成本过高的缺点。如果能够对 FMDV

的抗原表位加以组合、设计,在合适的大肠杆菌表达系统的基础上,实现重组抗原在 *E. coli* 中的可溶性表达,结合 GEM 技术实现抗原的快速纯化与表面展示,对于 FMDV 基因工程亚单位疫苗研究具有非常重要的意义。

1 材料与方法

1.1 材料

含有锚钩蛋白基因的重组原核表达载体 pQZ-PA 由本课题组保存^[15]。质粒提取、胶回收试剂盒购自 AxyGEN 公司;限制性内切酶、T4 DNA 连接酶、PCR 试剂、pMD19-T vector、DNA Marker 等试剂购自宝生物工程(大连)有限公司;DH5 α 、BL21 感受态细胞购自北京全式金生物技术有限公司;蛋白质分子量 Marker、BCA 试剂盒为 Thermo Fisher Scientific 公司产品;PVDF 膜为 Millipore 公司产品;FMDV 多肽阳性血清由本实验室制备,系用商品化的串联生物医药(上海)股份有限公司生产的 FMDV 合成肽疫苗多次免疫小鼠获得;DAB 显色液、HRP 标记的羊抗鼠 IgG、MTT 购自南京生兴生物科技有限公司;5 周龄的 ICR 小鼠购自扬州大学比较医学中心;FMDV 多肽 ELISA 抗体检测试剂盒购自上海优耐特生物医药有限公司;O 型口蹄疫液相阻断抗体 ELISA 检测试剂盒购自中国农业科学院兰州兽医研究所;其余化学试剂均为国产或进口分析纯。

1.2 抗原表位设计与合成

主要靶抗原表位包括 FMDV Mya 98 株 VP1 蛋白上的主要 B 细胞表位 (B: 第 140–160 位, 20 个氨基酸) 与两个辅助性 T 细胞表位 Th1 [VP1 (第 200–213 位, 14 个氨基酸)、Th2 [3A (第 21–35 位, 15 个氨基酸)]。共设计了 3 种抗原,表位之间均

有接头连接:1) BT1B:编码 FMDV VP1 两个拷贝的 141–160 位氨基酸残基和一个拷贝的 200–213 位氨基酸残基构成的串联片段 20 AA–14 AA–20 AA 的核苷酸片段;2) BT2B:编码 FMDV VP1 两个拷贝的 141–160 位氨基酸残基和一个拷贝的 21–35 位氨基酸残基构成的串联片段 20 AA–15 AA–20 AA 的核苷酸片段;3) B (T1BT2) 4B:编码 FMDV VP1 两个拷贝的 141–160 位氨基酸残基和一个拷贝的 200–213 位氨基酸残基及和一个拷贝的 21–35 位氨基酸残基构成的串联片段 20 AA–(14 AA–20 AA–15 AA) 4–20 AA 的核苷酸片段。所有基因均按照大肠杆菌表达优化合成,在序列两端添加 *Bam*H I 和 *Hind* III 两个酶切位点,并克隆入 pUC57 载体。

1.3 重组质粒的构建

将基因片段 BT1B、BT2B 与 B (T1BT2) 4B 从 pUC57 载体上通过 *Bam*H I 和 *Hind* III 两个酶切位点切下,克隆到含有锚钩蛋白基因的原核表达载体 pQZ-PA,构建重组表达质粒,分别将其命名为 pQZ-BT1B-PA、pQZ-BT2B-PA 和 pQZ-B (T1BT2) 4B-PA。

1.4 重组菌的构建与诱导表达

1.4.1 重组表达菌的获得

将重组质粒 pQZ-BT1B-PA、pQZ-BT2B-PA、pQZ-B (T1BT2) 4B-PA 分别转化大肠杆菌 BL21,涂布含氨苄青霉素的 LB 平板,挑取单菌落,得到重组菌 pQZ-BT1B-PA/BL21、pQZ-BT2B-PA/BL21 及 pQZ-B (T1BT2) 4B-PA/BL21。将空质粒 pQZ 按照相同的方法转化感受态大肠杆菌 BL21,得到对照菌株 pQZ/BL21。

1.4.2 重组菌的诱导表达

挑取重组菌 pQZ-BT1B-PA/BL21、pQZ-BT2B-PA/BL21、pQZ-B (T1BT2) 4B-PA/BL21

与 pQZ/BL21 单菌落,接种 5 mL 含氨苄青霉素的 LB 液体培养基中,37 °C 振荡培养过夜,作为种子液。次日将种子液按 1 : 100 比例转接含氨苄青霉素的 LB 液体培养基,37 °C、220 r/min 振荡培养 1.5–2 h (OD_{600} 达到 0.5–1.0),加入终浓度为 0.4 mmol/L 的异丙基硫代半乳糖苷,15 °C 诱导 24 h,收获细菌。

1.5 目的蛋白的可溶性鉴定

取 2 mL 诱导后菌液,离心收集菌体,用 1 mL PBS 缓冲液重悬,在冰水浴中超声波破碎细胞。破碎后离心转移全部上清,保留备用,沉淀用 1 mL PBS 缓冲液重悬。将完整的诱导菌体以及超声波破碎后的上清、沉淀进行 SDS-PAGE 电泳,检测融合蛋白的表达及可溶性。

1.6 Western blotting 鉴定

重组蛋白 SDS-PAGE 电泳后再转印到 PVDF 膜上,5%的 BSA 37 °C 封闭孵育 1 h, TBST 洗涤 2 次,加 1 : 100 稀释的小鼠阳性血清孵育过夜, TBST 洗涤 5 次,5 min/次,加 1 : 5 000 稀释的 HRP 标记羊抗鼠 IgG,37 °C 孵育 1 h, TBST 洗涤 5 次,5 min/次, DAB 显色后观察特异性条带。

1.7 BLP 疫苗抗原的制备

从–70 °C 取出制备好的 GEM 颗粒,1 U 的 GEM 颗粒离心后用适量蛋白重悬,室温缓慢转动孵育 30 min,离心收集沉淀,用 SDS-PAGE 及电镜观察鉴定效果。

1.8 BLP 疫苗免疫原性鉴定

1.8.1 蛋白定量及小鼠免疫

分别取 3 个重组蛋白破碎后上清 1 mL,与 GEM 颗粒结合后离心取沉淀,重悬于 1 mL PBS 中,加入 50 μ L 10% SDS,100 °C 煮沸 10 min,12 000 r/min 离心 10 min,分离沉淀和上清,取上

清用 BCA 试剂盒测蛋白浓度。按照 50 μg /只的剂量与白油乳化制备 BLP 疫苗,免疫 5 周龄的 ICR 小鼠,每组 8 只,同时设置空菌、空白和多肽疫苗(生产厂家:申联生物医药(上海)股份有限公司,批号:(2014) 090297522) 对照组。皮下多点注射 200 μL /只,免疫 21 d 后加强免疫 200 μL /只,分别于免疫后 21、35、49 和 63 d 采集血液进行间接 ELISA 与 LPB-ELISA 抗体检测。

1.8.2 间接 ELISA 抗体检测

取出试剂盒中的样品稀释板,每孔加入 200 μL 样品稀释液,在相应孔加入 10 μL 对照血清或被检血清,振荡。对照血清设两个平行,其余各 1 个孔。取出抗原包被板,分别从稀释板上取稀释好的对照和被检血清各 100 μL ,封膜后 37 $^{\circ}\text{C}$ 作用 1 h。洗涤液洗板 5 次,加 HRP 标记的羊抗鼠 IgG,37 $^{\circ}\text{C}$ 作用 30 min,洗板 5 次,TMB 显色 15 min,加终止液,酶标仪测定 450 nm 波长下的 OD 值。

1.8.3 液相阻断抗体检测

血清抗体检测根据 O 型口蹄疫抗体液相阻断 ELISA 检测试剂盒说明书,血清用 PBST 进行两倍比稀释,稀释度从 1:2~1:64,然后与等体积的病毒抗原混合,37 $^{\circ}\text{C}$ 作用 1 h。取出预先用兔抗口蹄疫特异性抗体包被的 96 孔板,将作用好的抗原抗体混合液转移到该板,37 $^{\circ}\text{C}$ 作用 1 h 后,用 PBST 洗板 5 次,加豚鼠抗口蹄疫血清,37 $^{\circ}\text{C}$ 作用 30 min, PBST 洗板 5 次,加 HRP 标记的抗豚鼠血清,37 $^{\circ}\text{C}$ 作用 30 min, PBST 洗板 5 次,OPD 显色 15 min,加终止液,酶标仪测定 492 nm 波长下的 OD 值。抗原对照 4 孔,弃去最高和最低 OD₄₉₂,计算剩余 2 孔的平均 OD₄₉₂ 值再除以 2,即 50%对照值,该值即为临界值。被检血清 OD₄₉₂ 值大于临界值的孔为阴性孔,小于等于临界值的孔为阳性孔。若临界值与稀释倍

数最高阳性孔的 OD₄₉₂ 值相同,则以被检血清阳性孔的最高稀释倍数作为该血清的抗体效价。

1.8.4 小鼠淋巴细胞增殖试验

无菌采取小鼠脾脏,用淋巴细胞分离液分离淋巴细胞,以含 10% (V/V) 新生牛血清的 RPMI-1640 完全培养液调整细胞浓度约为 2×10^7 个/mL,加入 96 孔细胞板内,100 μL /孔,每个样品做 3 个重复,向各孔内加入 5 μg 人工合成的猪 O 型 FMDV GH loop 表位多肽 (VP1 140-160 位 AA) 作为刺激抗原,同时设 PHA 作为阳性对照组,每孔加入 2 μg 的 PHA,置 37 $^{\circ}\text{C}$ 、5% CO₂ 培养箱中培养 60 h,再每孔加入 5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ MTT 10 μL ,继续培养 4 h。测定 OD₄₉₂ 值,取 3 个平均值计算刺激指数 (SI),试验设不加口蹄疫抗原的营养液对照。以刺激指数 (SI) 作为判断淋巴细胞转化程度的参数,(SI=刺激孔 OD₄₉₂ 值/培养液对照孔 OD₄₉₂ 值)。

1.8.5 小鼠细胞因子检测

采取相同质量的免疫小鼠脾脏研磨,反复冻融 3 次,用 Trizol 裂解法提取 RNA,利用一步反转试剂盒获得 cDNA。根据 GenBank 中公布的相关序列设计引物,参考文献[16]的方法利用荧光定量 PCR 检测 IL-4、IL-10、IFN- γ 和 TNF- α 的基因水平。

2 结果与分析

2.1 目的基因的质粒鉴定

将合成的目的基因用 BamH I 与 Hind III 酶切回收后,克隆到重组原核表达载体 pQZ-PA 上,获得重组质粒 pQZ-BT1B-PA、pQZ-BT2B-PA 和 pQZ-B (T1BT2) 4B-PA,然后进行酶切鉴定。酶切的产物经 1% 的琼脂糖凝胶电泳检测可得到 200、400 和 700 bp 左右的目的片段(图略),与

预期设计的目的基因片段大小一致。

2.2 重组蛋白的表达及可溶性分析

将鉴定正确的重组表达质粒转化 BL21 感受态细胞,在含有氨苄青霉素的 LB 平板上挑取单个菌落培养。取菌液接种到含有氨苄青霉素的 LB 液体培养基中,37 °C 培养到细菌浓度达到 OD_{600} 为 0.5–1 时加入终浓度为 0.4 mmol/L 的 IPTG,诱导 24 h 后,菌液离心去除培养基,用 PBS 重悬菌体后经高压破碎仪破碎菌体,用 SDS-PAGE 检测表达产物(图 1),3 个融合蛋白都可以表达,分子量大小分别约为 47、28 与 36 kDa,并且 3 个蛋白均能以可溶性形式存在于菌体破碎的上清中。

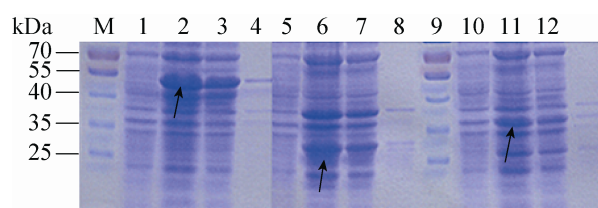


图 1 重组蛋白表达及可溶性分析结果

Fig. 1 Expression and solubility identification of the recombinant protein with SDS-PAGE. M: protein molecular marker; 1: blank control of BL21 transformed with plasmid pQZ; 2: whole bacterium of BL21 transformed with pQZ-B (T1BT2) 4B-PA; 3: supernatant of supersonic treated recombinant plasmid pQZ-B (T1BT2) 4B-PA transformed BL21; 4: sediment for recombinant plasmid pQZ-B (T1BT2) 4B-PA transformed BL21 after supersonic; 5: blank control of BL21 transformed with plasmid pQZ; 6: whole bacterium of BL21 transformed with pQZ-BT1B-PA; 7: supernatant of supersonic treated recombinant plasmid pQZ-BT1B-PA transformed BL21; 8: sediment for recombinant plasmid pQZ-BT1B-PA transformed BL21 after supersonic; 9: blank control of BL21 transformed with plasmid pQZ; 10: whole bacterium of BL21 transformed with pQZ-BT2B-PA; 11: supernatant of supersonic treated recombinant plasmid pQZ-BT2B-PA transformed BL21; 12: sediment for recombinant plasmid pQZ-BT2B-PA transformed BL21 after supersonication.

2.3 重组蛋白表达产物的 Western blotting 鉴定

经 SDS-PAGE 电泳后,转印至 PVDF 膜,用小鼠抗 O 型 FMDV 多肽阳性血清对表达产物进行 Western blotting 鉴定,结果如图 2 所示,在 PVDF 膜上获得的条带与 SDS-PAGE 表达的蛋白条带大小一致,这表明表达的重组蛋白可被特异性的抗体所识别,具有较好的抗原性。

2.4 GEM 纯化目的蛋白的 SDS-PAGE 鉴定

如图 3 所示,利用 SDS-PAGE 可检测到较高纯度目的蛋白的存在,纯化后 pQZ-BT1B-PA 重组蛋白浓度为 85 μ g/mL,纯化后 pQZ-BT2B-PA 重组蛋白浓度为 213 μ g/mL;纯化后 pQZ-B (T1BT2) 4B-PA 重组蛋白浓度为 870 μ g/mL;利用透射电镜观察可见,与未结合之前的 GEM 相比,结合重组蛋白后的 GEM 颗粒有很多不规则的细小成团结合物,可能是蛋白形成了多聚体(图 4)。

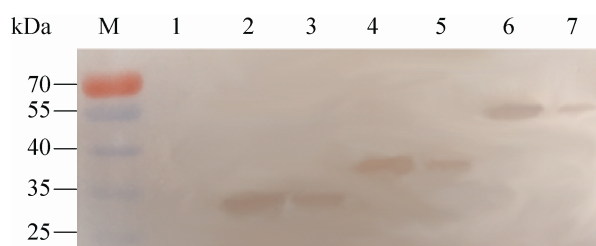


图 2 重组蛋白的 Western blotting 鉴定结果

Fig. 2 Western blotting analysis of recombinant protein. M: protein molecular marker; 1: blank control of BL21 transformed with plasmid pQZ; 2: whole bacterium of BL21 transformed with pQZ-BT1B-PA; 3: supernatant of supersonic treated recombinant plasmid pQZ-BT1B-PA transformed BL21; 4: whole bacterium of BL21 transformed with pQZ-BT2B-PA; 5: supernatant of supersonic treated recombinant plasmid pQZ-BT2B-PA transformed BL21; 6: whole bacterium of BL21 transformed with pQZ-B (T1BT2) 4B-PA; 7: supernatant of supersonicated recombinant plasmid pQZ-B (T1BT2) 4B-PA transformed BL21.

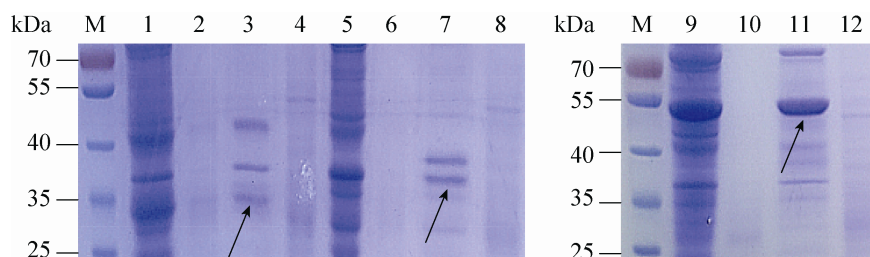


图 3 重组蛋白纯化鉴定结果

Fig. 3 Purification analysis of recombinant protein. M: protein molecular marker; 1: supernatant of supersonic treated recombinant plasmid pQZ-BT1B-PA transformed BL21; 2: supernatant for BT1B-PA treated with GEM particles; 3: sedimentation for BT1B-PA treated with GEM particles; 4: GEM particles; 5: supernatant of supersonic treated recombinant plasmid pQZ-BT2B-PA transformed BL21; 6: supernatant for BT2B-PA treated with GEM particles; 7: sedimentation for BT12B-PA treated with GEM particles; 8: GEM particles; 9: supernatant of supersonic treated recombinant plasmid pQZ-(BT1BT2) 4B-PA transformed BL21; 10: supernatant for B (T1BT2) 4B-PA treated with GEM particles; 11: sedimentation for B(T1BT2)4B-PA treated with GEM particles; 12: GEM particles.

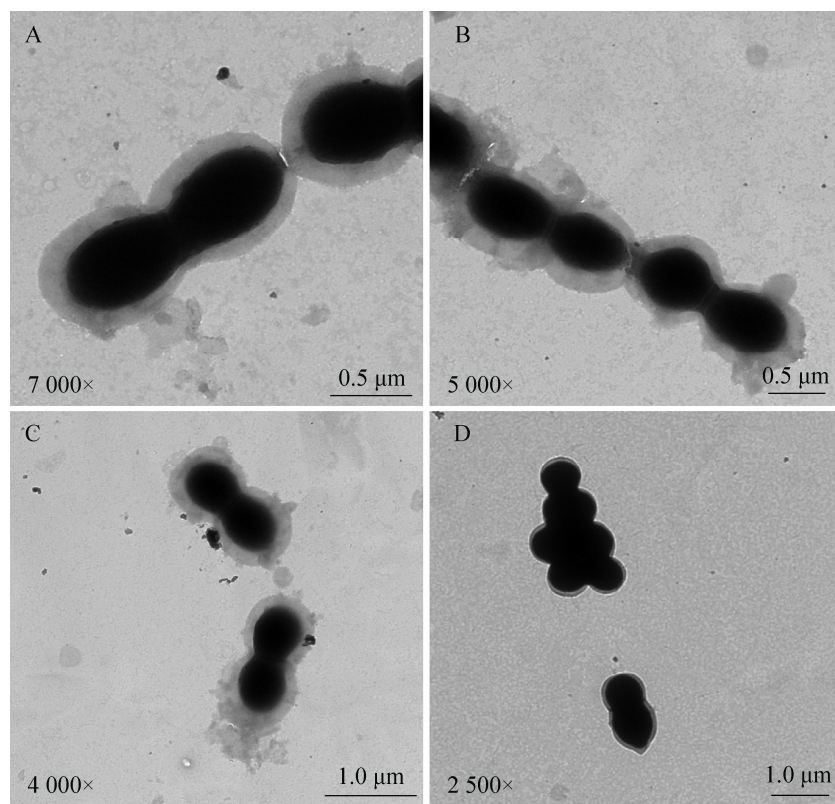


图 4 BLP 抗原透射电镜观察结果

Fig. 4 Transmission electron microscopic images of BLP antigen. (A) Recombinant protein BT1B treated with GEM particles. (B) Recombinant protein BT2B treated with GEM particles. (C) Recombinant protein B (T1BT2) 4B treated with GEM particles. (D) Blank GEM particles. controls.

2.5 免疫小鼠抗体检测结果

2.5.1 多肽间接 ELISA 检测结果

小鼠血清按试剂盒操作规程做 1:20 倍稀释,测得其临界值为 0.495,大于临界值判为抗体阳性。结果如图 5 所示,表达的 B (T1BT2) 4B 重组蛋白免疫后 35 d 后即可产生较高的抗体水平,与多肽苗类似。而 BT1B 重组蛋白和 BT2B 重组蛋白免疫后小鼠体内抗体水平一直较低。

2.5.2 液相阻断抗体水平检测结果

如图 6 所示, B (T1BT2) 4B 重组蛋白组小鼠免疫后液相阻断抗体水平均高于 BT1B 和 BT2B 重组蛋白免疫组,并且 B (T1BT2) 4B 重组蛋白组与多肽疫苗组相比,抗体衰减速度较慢。

2.5.3 淋巴细胞增殖实验结果

为了探讨 BLP 疫苗免疫小鼠针对 FMDV GH loop 抗原表位的淋巴细胞活化情况,对免疫后 35 d 的小鼠进行无菌分离脾脏,提取淋巴细胞,用 MTT 法检测淋巴细胞增殖情况。如图 7 所示,利用人工合成的 FMDV 多肽作为刺激原, B (T1BT2) 4B

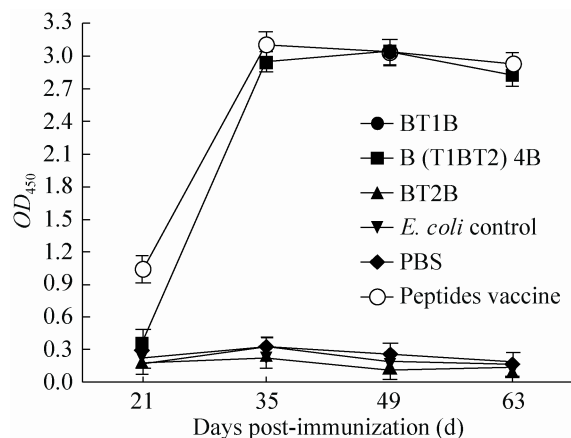


图 5 疫苗免疫后多肽特异性抗体水平检测抗体检测结果

Fig. 5 Detection of peptide-specific antibody in mice following vaccination with BLP vaccine by ELISA.

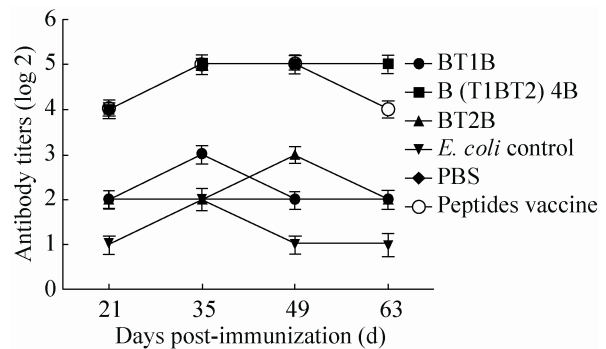


图 6 疫苗免疫后液相阻断抗体水平检测抗体检测结果
Fig. 6 Detection of antibody in mice following vaccination with BLP by LPB ELISA.

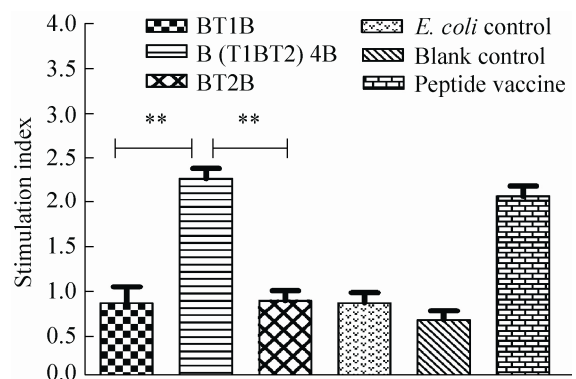


图 7 疫苗免疫小鼠淋巴细胞增殖检测结果

Fig. 7 Peptide specific T-cell proliferation responses in the mice after BLP vaccine immunization.

免疫组小鼠表现较强的特异性淋巴细胞增殖,免疫后 35 d 淋巴细胞增殖指数达到 (2.29 ± 0.09) , 统计学分析结果显示,与商品化的人工合成肽疫苗所引发的 T 细胞增殖反应差异不明显 ($P > 0.05$),与设计的其他两种抗原免疫小鼠差异极显著 ($P < 0.01$)。

2.5.4 小鼠细胞因子检测结果

为了进一步研究 BLP 疫苗在免疫小鼠体内诱发特异性针对 FMDV GH loop 抗原表位的细胞免疫反应,对免疫后 35 d 的小鼠进行分离脾脏,提取 RNA,用荧光定量 PCR 方法检测 IL-4、IL-10、IFN- γ 和 TNF 的表达水平。由图 8 可知,

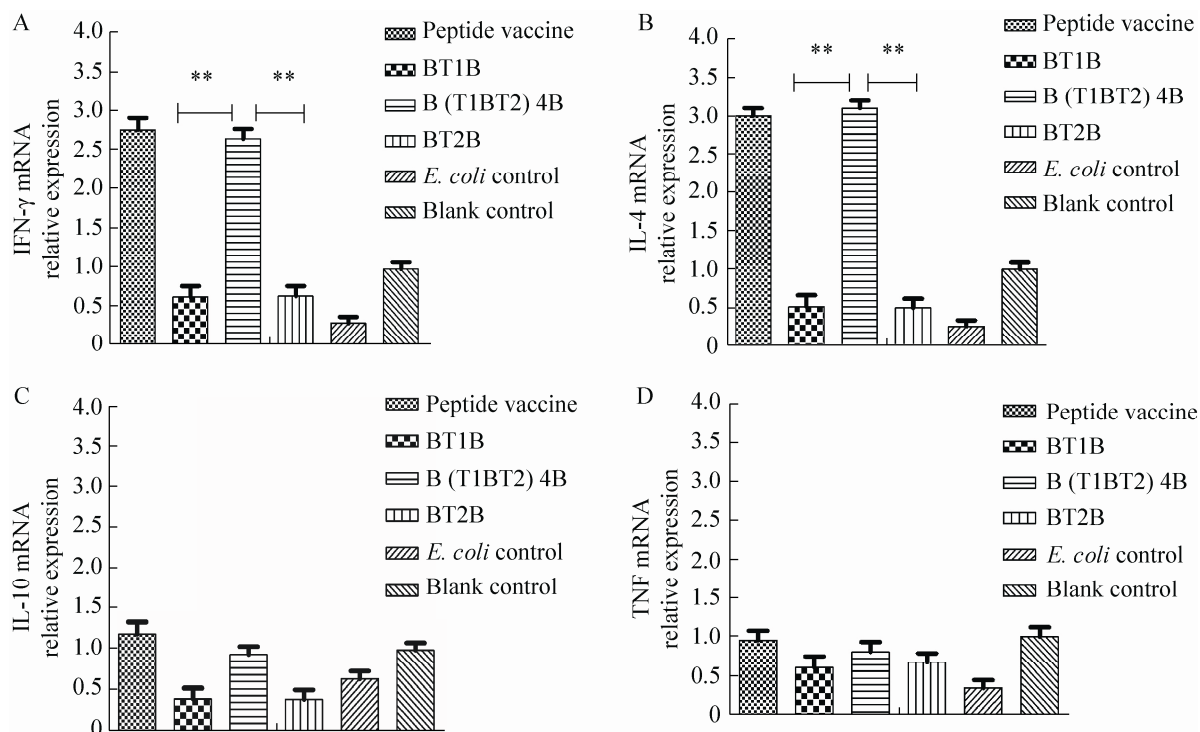


图 8 免疫小鼠相关细胞因子的检测结果

Fig. 8 Detection of cytokine for immunized mice at 35 days post vaccination.

利用人工合成的 FMDV 多肽作为刺激原, B (T1BT2) 4B 免疫组小鼠 IFN- γ 与 IL-4 的水平与其他两种抗原设计差异极为显著 ($P < 0.01$), 与商品多肽疫苗免疫组差异不显著 ($P > 0.05$), 同时所有实验组 IL-10、TNF 水平变化均不显著, 说明重组蛋白 B (T1BT2) 4B 免疫后诱导小鼠产生了明显的 Th1 型免疫反应, 而没有诱导抑制性 T 细胞的产生。

3 讨论

口蹄疫被列为我国必报传染病, 国家采取强制免疫手段预防口蹄疫疫情。目前市场上商品化的疫苗主要是合成肽疫苗和灭活疫苗, 均具有良好的免疫效果, 在预防和控制 FMD 的过程中发挥着重要作用, 但由于全病毒灭活疫苗存在一定的毒力返强、病毒灭活不彻底、病毒逃逸等不安

全因素, 从而促使人们寻求一种更加安全高效的 FMD 疫苗^[17-18]。

FMDV VP1 结构蛋白暴露在病毒粒子表面, 含有可诱导感染动物产生中和抗体的主要抗原表位, 是 FMD 新型疫苗研究最多的结构蛋白^[19-20]。研究发现, O 型 FMDV 的 5 个抗原位点中有 3 个位于 VP1 结构蛋白上, 其中第 141-160 位氨基酸为主要的 B 细胞表位, 能够诱导机体产生体液免疫应答^[21-22]。基于上述研究, 本研究利用基因工程方法对 O 型 FMDV 中的抗原表位进行优化, 将 FMDV VP1 结构蛋白上的 B 表位与病毒自身的辅助性 T 表位进行串联、重复表达, 得到的 3 个重组蛋白经 Western blotting 鉴定可被特异性的抗体所识别, 具有较好的抗原性。本研究选择 50 μg /只的免疫剂量是出于以下考虑:

- 1) 参考我们前期进行相关合成肽疫苗的动物实

验的结果(数据未发表);2)参考已发表关于小鼠免疫实验的资料,若免疫剂量过高,可能会引发免疫耐受,对正常的免疫应答造成负面影响;免疫剂量过低,由于没有足够的抗原量作保证,不能有效刺激机体产生坚实的免疫力^[23-24];3)同时考虑本次实验最主要的目的是鉴定我们不同表位疫苗设计免疫原性的差异,所以选择了一个相对较高的剂量。当然,本实验关于剂量选择是在实验动物上得出的一个初步结论,后期需要在本动物上进行重新筛选、验证。

小鼠免疫试验结果显示,B(T1BT2)4B重组蛋白组小鼠可以产生较高水平的口蹄疫特异性抗体及液相阻断抗体,与目前市场上的商品化多肽疫苗的免疫效果类似,然而商品化多肽疫苗大多用化学合成的方法来制备多肽,成本较高。本研究利用大肠杆菌表达系统和GEM纯化系统生产制备的抗原可溶性高、成本低、制备过程简单方便。并且该蛋白免疫小鼠后能够有效刺激小鼠机体淋巴细胞的增殖,能够正向调节IL-4、IFN- γ 的表达水平。

目前的研究资料已证实高水平的细胞免疫应答在抵抗FMDV感染和清除病毒过程中具有重要作用。B(T1BT2)4B重组蛋白能够诱导高水平的体液和细胞免疫反应可能与几个因素有关:第一,细胞表位的数量多、串联方式能够有效地突出抗原表位,从而提高了重组蛋白的免疫原性^[25];第二,GEM颗粒的主要成分是肽聚糖本身为TLR2的激动剂,能够激活机体的天然免疫系统,具有免疫增强功能,提高了疫苗的免疫效力^[26]。

本研究利用大肠杆菌表达系统获得GEM-B(T1BT2)4B颗粒性疫苗能够诱导小鼠产生较高的体液和细胞免疫反应,其免疫效力接近商品化的多肽疫苗,且抗原制备过程简单方便。虽然B(T1BT2)4B重组蛋白的免疫效力还需在猪体上

进一步验证,但研究思路为FMDV基因工程亚单位疫苗的研究提供了借鉴。

REFERENCES

- [1] Mason PW, Grubman MJ, Baxt B. Molecular basis of pathogenesis of FMDV. *Virus Res*, 2003, 91(1): 9-32.
- [2] Cao WJ, Li PH, Bai XW, et al. Rescue and identification of virus activity of foot-and-mouth disease virus strain O/HN/93 from full-length cDNA clone. *Acta Agr Boreali-Sin*, 2010, 25(3): 32-37 (in Chinese).
曹伟军, 李平花, 白兴文, 等. 口蹄疫病毒O/HN/93疫苗株的拯救及病毒活性鉴定. *华北农学报*, 2010, 25(3): 32-37.
- [3] Domingo E, Baranowski E, Escarmis C, et al. Foot-and-mouth disease virus. *Comp Immunol Microbiol Infect Dis*, 2002, 25(5/6): 297-308.
- [4] Li ZY, Liu JX. The current state of vaccines used in the field for foot and mouth disease virus in China. *Expert Rev Vaccines*, 2011, 10(1): 13-15.
- [5] DiMarchi R, Brooke G, Gale C, et al. Protection of cattle against foot-and-mouth disease by a synthetic peptide. *Science*, 1986, 232(4750): 639-641.
- [6] Brown F, Benkirane N, Limal D, et al. Delineation of a neutralizing subregion within the immunedominant epitope (G-H loop) of foot-and-mouth disease virus VP1 which does not contain the RGD motif. *Vaccine*, 1999, 18(1/2): 50-56.
- [7] Chan EWC, Wong HT, Cheng SCS, et al. An immunoglobulin G based chimeric protein induced foot-and-mouth disease specific immune response in swine. *Vaccine*, 2000, 19(4/5): 538-546.
- [8] Wang CY, Chang TY, Walfield AM, et al. Effective synthetic peptide vaccine for footand-mouth disease in swine. *Vaccine*, 2002, 20(19/20): 2603-2610.
- [9] Fang ML, Li JL, Wang H, et al. Correlation between efficacy and structure of recombinant epitope vaccines against bovine type O foot-and-mouth disease virus. *Biotechnol Lett*, 2012, 34(5): 839-847.
- [10] Bosma T, Kanninga R, Neef J, et al. Novel surface display system for proteins on non-genetically modified gram-positive bacteria. *Appl Environ*

- Microbiol, 2006, 72(1): 880–889.
- [11] Qiao XW. GEM particle vaccines for *porcine circovirus* type 2 [D]. Yangzhou: Yangzhou University, 2013 (in Chinese).
乔绪稳. 猪圆环病毒 2 型 GEM 颗粒疫苗的初步研究 [D]. 扬州: 扬州大学, 2013.
- [12] Buist G, Steen A, Kok J, et al. LysM, a widely distributed protein motif for binding to (peptide) glycans. *Mol Microbiol*, 2008, 68(4): 838–847.
- [13] Xie QM, Li SL, Chen L, et al. High soluble expression and antigenicity of VP1 gene of foot-and-mouth disease virus. *J Agric Biotechnol*, 2006, 14(4): 526–529 (in Chinese).
谢青梅, 李少璃, 陈丽, 等. O 型口蹄疫病毒 VP1 基因的高效可溶表达及抗原性分析. *农业生物技术学报*, 2006, 14(4): 526–529.
- [14] Qiao XW, Li PC, Zheng QS, et al. Comparison of the binding activity of *Lactococcus lactis* peptidoglycan protein anchor with different number of motifs. *Acta Microbiol Sin*, 2015, 55(2): 193–197 (in Chinese).
乔绪稳, 李鹏成, 郑其升, 等. 含不同个数基序乳酸乳球菌肽聚糖锚钩蛋白结合活性比较. *微生物学报*, 2015, 55(2): 193–197.
- [15] Wang YS, Tang B, Zhang XH, et al. Cytokine mRNA expression of porcine pulmonary alveolar macrophage *in vitro* in response to porcine circovirus type 2 and porcine parvovirus co-infection. *Jiangsu J Agric Sci*, 2014, 30(4): 772–778 (in Chinese).
王永帅, 唐波, 张雪花, 等. PCV2 与 PPV 体外混合感染猪肺泡巨噬细胞对细胞因子的影响. *江苏农业学报*, 2014, 30(4): 772–778.
- [16] Li XH, Huang XF, Shao XH, et al. Functional cell surface display of endo-beta-1,3-1,4-glucanase in *Lactococcus lactis* using N-acetylmuraminidase as the anchoring motif. *Chin J Biotech*, 2009, 25(1): 89–94 (in Chinese).
李小华, 黄新风, 邵小虎, 等. 利用乳酸乳球菌 AcmA 表面展示 b-1, 3-1, 4-葡聚糖酶. *生物工程学报*, 2009, 25(1): 89–94.
- [17] Wu QH, Moraes MP, Grubman MJ. Recombinant adenovirus co-expressing capsid proteins of two serotypes of foot-and-mouth disease virus (FMDV): *in vitro* characterization and induction of neutralizing antibodies against FMDV in swine. *Virus Res*, 2003, 93(2): 211–219.
- [18] Cedillo-Barron L, Foster-Cuevas M, Cook A, et al. Immunogenicity of plasmids encoding T and B cell epitopes of foot-and-mouth disease virus (FMDV) in swine. *Vaccine*, 2003, 21(27/28/29/30): 4261–4269.
- [19] Rodriguez LL, Grubman MJ. Foot and mouth disease virus vaccines. *Vaccine*, 2009, 27(S4): D90–D94.
- [20] Wang JH, Liang CM, Peng JM, et al. Induction of immunity in swine by purified recombinant VP1 of foot-and-mouth disease virus. *Vaccine*, 2003, 21(25/26): 3721–3729.
- [21] Yang B, Liu ZX, Hu YH, et al. Cloning of structural protein VP1 gene of foot and mouth disease virus and its expression in *Escherichia coli*. *Chin J Vet Sci Technol*, 2003, 33(3): 3–8 (in Chinese).
杨彬, 刘在新, 胡永浩, 等. 口蹄疫病毒结构蛋白 VP1 基因的克隆及其在大肠埃希氏菌中的表达. *中国兽医科技*, 2003, 33(3): 3–8.
- [22] Zhang XS, Liu ZX, Zhao QZ, et al. Advances in research of organization and function of the foot and mouth disease virus genome RNA. *Chin J Virol*, 2001, 17(4): 375–380 (in Chinese).
张显升, 刘在新, 赵启祖, 等. 口蹄疫病毒基因组 RNA 结构与功能研究进展. *病毒学报*, 2001, 17(4): 375–380.
- [23] Lydyard PM, Whelan A, Fanger MW. *Immunology*. London, New York: BIOS Scientific Publishers, 2000.
- [24] Abbas AK, Lichtman AH, Pober JS. *Cellular and Molecular Immunology*. 4th ed. Philadelphia: Saunders WB Company, 2000.
- [25] Yu YR, Zhang YM, Liu XC. Research progress on the polypeptide vaccine against viruses. *Chin J Prev Vet Med*, 2001, 23(6): 480–482 (in Chinese).
鱼艳荣, 张彦明, 刘希成. 多肽疫苗抗病毒作用研究进展. *中国预防兽医学报*, 2001, 23(6): 480–482.
- [26] Saluja V, Visser MR, ter Veer W, et al. Influenza antigen-sparing by immune stimulation with Gram-positive enhancer matrix (GEM) particles. *Vaccine*, 2010, 28(50): 7963–7969.

(本文责编 陈宏宇)