

一种新型 T 细胞免疫原的原核表达及对口蹄疫疫苗的免疫增强作用

赵清, 孙普, 刘在新, 李平花, 包慧芳, 曹轶梅, 白兴文, 付元芳, 卢曾军, 李冬

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, 兰州 730046

摘要: 主要探讨了 T 细胞免疫原 TI 对口蹄疫疫苗的免疫增强作用。设计并原核表达产生了一种包含口蹄疫病毒 VP1, VP4, 3A 和 3D 蛋白上多个 T 细胞表位与两个通用 T 细胞表位的 T 细胞免疫原, 命名为 TI; 同时表达了 O 和 Asia 1 两个型口蹄疫病毒 VP1 蛋白的串联编码基因, 表达产物命名为 OA-VP1。将上述 T 细胞免疫原分别与 OA-VP1 和口蹄疫灭活疫苗按不同剂量组合免疫小鼠, 于免疫后不同时间测定各组小鼠的体液与细胞免疫应答情况。采用微量中和试验检测小鼠 O 型和 Asia1 型中和抗体, 采用流式细胞检测技术和测定 γ -干扰素的水平来分析不同免疫组小鼠细胞免疫的水平。结果显示, 与灭活疫苗或 OA-VP1 单独免疫组相比, 添加 TI 抗原后灭活疫苗 ($P < 0.01$) 和 OA-VP1 免疫组 ($P < 0.05$) 小鼠均能产生高水平的特异性中和抗体; 且 $CD4^+$ T 细胞数量显著增多, IFN- γ 产生水平显著升高 ($P < 0.01$)。说明 TI 抗原具有很好的诱导特异性体液与细胞免疫应答的作用, 是一种很好的免疫增效剂, 可作为口蹄疫蛋白亚单位疫苗和灭活疫苗中的一种有效成分, 以提高疫苗的免疫效果。

关键词: 口蹄疫病毒, T 细胞表位, T 细胞免疫原, 灭活疫苗, 亚单位疫苗

Enhanced immune response of a novel T-cell immunogen in vaccine for foot-and-mouth disease

Qing Zhao, Pu Sun, Zaixin Liu, Pinghua Li, Huifang Bao, Yimei Cao, Xingwen Bai, Yuanfang Fu, Zengjun Lu, and Dong Li

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

Abstract: We investigated the enhanced immune response of a recombinant T cell immunogen as an effective cellular immune adjuvant. The T cell immunogen named TI contained several T cell epitopes from the VP1, VP4, 3A and 3D proteins of foot-and-mouth disease virus (FMDV) and two pan-T helper (T_H) cell sites to broaden the immunogenicity of the protein.

Received: January 31, 2011; **Accepted:** May 27, 2011

Supported by: National High Technology Research and Development Program of China (863 Program) (No. 2011AA10A211), Research Foundation on Agricultural Biotechnology from Gansu Province (No. GNSW-2009-10).

Corresponding author: Zengjun Lu. E-mail: luzengjun920@126.com

Dong Li. E-mail: lidongpaul@yahoo.com.cn

国家高技术研究发展计划 (863 计划) (No. 2011AA10A211), 甘肃省农业生物技术与应用开发项目 (No. GNSW-2009-10) 资助。

Meanwhile, another fusion protein named OA-VP1 was expressed in bacteria, which contained two VP1 proteins of O and Asia1 type FMDV. Mice were vaccinated with commercially inactivated vaccine or OA-VP1 protein with or without the TI immunogen. The results show that mice inoculated with inactivated vaccine or OA-VP1 protein supplemented with TI immunogen produced significantly higher level of neutralizing antibodies ($P<0.01$ or $P<0.05$) than the mice only inoculated with inactivated vaccine or OA-VP1 protein by microneutralization assay. An obvious increase in T cell number by flow cytometric analysis and significantly higher concentration of IFN- γ secreted in culture media of spleen lymphocytes were observed in groups supplemented with TI immunogen ($P<0.01$). TI immunogen was an effective stimulator for humoral and cellular immunity and could help improve the immunogenicity of inactivated vaccine or protein subunit vaccine.

Keywords: foot-and-mouth disease virus, T cell epitopes, T cell immunogen, inactivated vaccine, subunit vaccine

口蹄疫 (Foot-and-Mouth Disease, FMD) 是由口蹄疫病毒 (FMDV) 引起的一种急性、热性、高度接触传染性的动物疫病。主要感染猪、牛、羊等偶蹄动物, 被国际兽疫局列为必须通报的烈性传染病^[1]。该病传播途径多、传播速度快, 曾多次在世界范围发生大流行。

FMDV 是小 RNA 病毒科 (Picornaviridae) 口蹄疫病毒属 (Aphthovirus) 的成员, 有 7 个血清型, 分别为 O、A、C、Asia 1、SAT1、SAT2、SAT3, 每个血清型又可产生很多基因亚型, 血清型之间无交叉保护反应。FMDV 的核酸为单股正链的 RNA 分子, 基因组全长约 8 500 个碱基, 只含有一个大的开放阅读框, 表达产生的聚蛋白逐级裂解产生病毒的结构蛋白 (VP1、VP2、VP3、VP4) 和非结构蛋白 (Lab, 2A、2B、2C、3A、3B、3C、3D), 结构蛋白组装产生病毒的衣壳结构。

FMDV 感染后机体产生中和性抗体需要有 T 细胞与 B 细胞的参与协同作用, T 细胞表位在 FMDV 的抗原构成和免疫应答中起重要的作用。感染 FMDV 的小鼠血清中既存在 T 细胞依赖性 IgG1 和 IgG2, 也存在非 T 细胞依赖性 IgG3^[2]。研究表明, FMDV 的 T 细胞抗原表位可存在于结构蛋白和非结构蛋白, 在 VP1 的 41~209 位氨基酸区段上至少存在 11 个不同的 T 细胞表位^[3]。Zamorano 等^[4]对 O 型 FMDV Campos 株的研究发现, 在 VP1 的 135~144 和 150~160 位氨基酸残基上存在两个 T 细胞表位。Filgueira 等^[5]发现在 FMDV O1C 株的结构蛋白 VP2、VP3 和 VP4 上至少存在 10 个 T 细胞表位, 其中 VP2

上 49~68 位、113~132 位、179~198 位, VP3 上的 81~100 位、129~148 位, VP4 上 17~36 位都具有明显有效的 Th 刺激功能。Blanco 等^[6-7]于 2000 年确定在 VP4 的 20~34 位存在 T 细胞表位, 2001 年确定在 3A 的 21~35 位存在 T 细胞表位, 并发现含有 T 细胞表位的多肽能增强 Th 细胞的活性, 并同时协同诱导机体产生抗病毒抗体。因此, FMDV T 细胞表位对于理解由淋巴细胞介导的抗病毒保护性免疫以及 FMD 新型疫苗的研制都是至关重要的^[8]。

基于以上的研究进展, 本研究设计并合成了包含两个通用 T 细胞表位与来自口蹄疫病毒结构蛋白与非结构蛋白的多个细胞表位的串联表达基因, 以期这种表达产物能够作为一种 T 细胞免疫原, 用于蛋白亚单位疫苗和灭活疫苗, 提高疫苗免疫后保护性中和抗体的水平和免疫持续期。在本研究中, 设计并串联表达了 O 和 Asia 1 两个型的 VP1 结构蛋白, 用作蛋白亚单位疫苗的雏形来验证所表达 T 细胞免疫原的免疫增效作用。在小鼠体内的初步免疫试验结果表明, 所表达的 T 细胞免疫原具有很好的免疫增效作用, 有望用于研究口蹄疫蛋白亚单位疫苗或作为灭活疫苗中的免疫增效成分, 来提高传统疫苗的免疫效果。本研究也为口蹄疫疫苗研究提供了一种新的思路。

1 材料与方法

1.1 试剂

Ni-NTA His-Bind[®] Resins 购自 Novagen 公司; 脂多糖 (LPS) 购自 Sigma 公司; RPMI1640 培养液、

胎牛血清购自 GIBCO 公司;青霉素、链霉素混合双抗购自晶美公司;小鼠淋巴细胞分离液 (EZ-SepTM Mouse1X) 购自达科为公司; IgG2a-FITC、IgG1-PerCP、CD4-PE、IgG2a-PE、CD3-PerCP、CD8-FITC 购自美国 BD 公司; Mouse IFN- γ ELISA Kit II 检测试剂盒购自美国 BD 公司。重组表达质粒 pET30a-TI 和 pET28a-OA-VP1 由本实验室构建保存, BL21(DE3) 感受态细胞为本实验室保存。

1.2 T 细胞免疫原的设计与表达

设计并合成的 T 细胞免疫原基因 TI: 由口蹄疫病毒 VP1、VP4、3A、3D 蛋白共 11 个 T 细胞表位基因^[7,9-12], 通用 T 细胞表位 (PADRE) 基因^[13]以及来自耶尔森氏菌属的侵袭素 (Invasin) 基因^[14]组成的串联编码基因, 各表位之间以 2 个甘氨酸相连, 其蛋白序列为 AKFVAAWTLKAAA(PADRE)-GG-(20-34)-GG-VP4₍₆₂₋₈₁₎-GG-VP1₍₁₅₇₋₁₆₅₎-GG-VP1₍₂₆₋₃₄₎-GG-3A₍₂₁₋₃₅₎-GG-3D₍₁₈₂₋₂₀₁₎-GG-3D₍₃₄₂₋₃₇₁₎-GG-TAKSKKFPSYTATYQF (Invasin), 各组成蛋白序列及功能见表 1。合成上述 TI 抗原的编码基因, 并将其插入到表达载体 pET30a, 将此重组质粒转化大肠

杆菌 BL21(DE3) 感受态细胞, 将鉴定阳性的重组菌在卡拉霉素抗性的 LB 液体培养基中培养过夜, 然后按 1% 转接到含 0.05 g/L 卡拉霉素的 LB 培养基中, 37 °C 培养至对数生长期 ($OD_{600}=0.6$), 加入 IPTG 至终浓度为 1 mmol/L, 37 °C 振荡培养 5 h 后, 取表达产物 1 mL 进行 SDS-PAGE 分析。

1.3 O 型与 Asia1 型 VP1 基因的串联表达

分别扩增口蹄疫病毒 O/HN/93 和 Asia 1/JS/05 2 个代表性毒株的 VP1 基因, 并将 2 个血清型的 VP1 编码基因串联插入 pET28a 表达载体, 将重组表达载体转化大肠杆菌 BL21(DE3) 感受态细胞, 参照 1.2 方法进行诱导表达, 表达产物命名为 OA-VP1。

1.4 蛋白的纯化与活性鉴定

将正确表达目的蛋白的阳性重组菌进行大量培养并诱导表达目的蛋白。对表达 TI 蛋白应用镍离子亲和层析柱进行纯化, 纯化方法按照 Ni-NTA His-Bind[®] Resins 操作说明书进行。表达的 OA-VP1 形成包涵体, 纯化包涵体用于后续试验, 对纯化产物 TI 与 OA-VP1 进行 SDS-PAGE 鉴定, 并对 OA-VP1 进行 Western blotting 分析。

表 1 T 细胞免疫原 TI 中包含的 T 细胞表位序列及其功能

Table 1 T cell epitopes included in the recombinant protein TI and their function

Protein and sequence	Function
PADRE AKFVAAWTLKAAA ^[13]	A promiscuous T helper (Th) site for broad immunogenicity in multiple species
VP4 SIINNYMQQYQNSM ₂₀₋₃₄ ^[9] TQNNDFWFKLASSAF ₆₂₋₇₆ ^[10] WFKLASSAFSGLFG ₆₇₋₈₁ ^[10]	T _H T _H T _H
VP1 RRQHTDVSF ₂₆₋₃₄ ^[11] RTLPTSFNY ₁₅₇₋₁₆₅ ^[11]	T _C T _C
3A AAIEFFEGMVHDSIK ₂₁₋₃₅ ^[7]	T _H
3D VDVLPVEHILYTRMMIGRFC ₁₈₂₋₂₀₁ ^[12] VVASDYDLDFEALKPHFKSL ₃₄₂₋₃₆₁ ^[12] YDLDFEALKPHFKSL ₃₄₇₋₃₆₁ ^[10] EALKPHFKSLGQTIT ₃₅₂₋₃₆₆ ^[10] HFKSLGQTITPADKS ₃₅₇₋₃₇₁ ^[10]	T _H T _H T _H T _H T _H
Invasin TAKSKKFPSYTATYQF ^[14]	An immunostimulatory sequence taken from <i>Yersinia</i>

1.5 抗原制备与动物免疫

采用比色法测定纯化蛋白的浓度, 然后用 PEG 浓缩至终浓度为 400 mg/L。加入等体积进口 206 油佐剂 (法国赛比科), 用 10 mL 注射器反复抽吸使之完全乳化而制成免疫抗原。

将 6~8 周龄的 Balb/c 小鼠共 70 只, 随机分成 7 组 (10 只/组), 第 1~7 组分别为 IFV 单独免疫组, IFV/1×TI 联合免疫组, IFV/2×TI 联合免疫组, OA-VP1 单独免疫组, OA-VP1/1×TI 联合免疫组, OA-VP1/2×TI 联合免疫组和阴性对照组; 分别注射 O-Asia 1 型 FMDV 灭活疫苗 (中农威特生物科技公司生产) 100 μL, O-Asia 1 型灭活疫苗 100 μL 加 TI 免疫原 100 μg, O-Asia 1 型灭活疫苗 100 μL 加 200 μg TI 免疫原, 100 μg 纯化蛋白 OA-VP1, 100 μg OA-VP1 加 100 μg TI 抗原, 100 μg OA-VP1 加 TI 抗原 200 μg 和 100 μL PBS, 详见表 2。灭活疫苗与 OA-VP1 乳化后进行后肢肌肉注射, 而 TI 抗原乳化后进行腹腔注射, 小鼠于洁净隔离环境中饲养。

1.6 血清抗体动态监测和中和抗体效价测定

在免疫后第 14、28、35、45 天对小鼠摘除眼球采血, 分离血清, 采用微量中和试验测定血清中的中和抗体水平。将待检血清 56 °C 灭活 30 min 后, 取 25 μL 样本 2 倍系列稀释于 DMEM/High Glucose 培养基中, 每个稀释度重复 4 孔加入 96 孔细胞培养板中; 每孔中加入 50 μL 含有 100 TCID₅₀ 的口蹄疫病毒液 (O/HN/93 或 Asia1/JS/China/05), 37 °C

细胞培养箱中作用 1 h; 然后每孔加入 50 μL 浓度为 1×10⁵ 个/mL 的 BHK-21 细胞悬液, 置于 37 °C、5% CO₂ 细胞培养箱中培养。48 h 后在显微镜观察每孔的病变情况并记录, 72 h 用 4% 多聚甲醛固定 30 min, 用 10% 福尔马林溶液配制的 0.05% 亚甲基蓝染液染色 30 min 后用水洗, 未病变细胞孔呈蓝色, 发生病变而细胞脱落者不着色。试验时设立阳性和阴性血清对照、病毒回归试验对照、血清毒性对照和正常细胞对照。按照 Karber 法计算出能保护 50% 细胞孔不产生细胞病变的最高血清稀释度, 该稀释度即为该份血清的中和抗体效价。

1.7 小鼠脾脏 T 细胞表面 CD4、CD8、CD3 的检测

初免 45 d 后, 将小鼠摘除眼球放血致死, 浸泡于 75% 的酒精中, 于超净台中取出小鼠脾脏, 300 目尼龙网研磨, 加入淋巴细胞分离液 5 mL 按操作说明书操作, 分离小鼠脾淋巴细胞悬液, 并用含 3% 胎牛血清 (FBS) 的磷酸盐缓冲液 (PBS) 洗 2 遍后用 PBS 稀释至 2×10⁶/mL, 加入用 PE 标记的大鼠抗小鼠 CD4 单抗、PerCP 标记的仓鼠抗小鼠 CD3 单抗和 FITC 标记的大鼠抗小鼠 CD8 单抗, 同时设相应标记物的同型对照检测管, 室温避光孵育 20 min, 用 PBS 洗 2 遍, 最后用 500 μL PBS 重悬, 4 h 内上机 (FACSAria 流式细胞仪) 检测, 用 CellQuest 软件分析总淋巴细胞、CD4⁺ 和 CD8⁺ 细胞亚群的数量。

表 2 各小组小鼠免疫抗原的种类及剂量

Table 2 Doses of vaccines injected in mice in different groups

Groups	Doses of vaccines injected in mice
1 (IFV)	100 μL inactive FMDV vaccine
2 (IFV/1×TI)	100 μL inactive FMDV vaccine, 100 μg TI
3 (IFV/2×TI)	100 μL inactive FMDV vaccine, 200 μg TI
4 (OA-VP1)	100 μg OA-VP1
5 (OA-VP1/1×TI)	100 μg OA-VP1, 100 μg TI
6 (OA-VP1/2×TI)	100 μg OA-VP1, 200 μg TI
Control	100 μL PBS

1.8 小鼠脾淋巴细胞分泌 IFN- γ 的检测

免疫后第 45 天, 小鼠摘除眼球放血致死, 浸泡于 75% 的酒精中, 超净台中取出小鼠脾脏, 300 目尼龙网研磨, 加入淋巴细胞分离液 5 mL 按操作说明书操作, 分离小鼠脾淋巴细胞悬液。将新鲜分离的淋巴细胞计数后, 用 RPMI 1640 不完全培养基调整细胞浓度为 10^6 /mL, 加入 24 孔细胞培养板, 每孔 1 mL, 分别加入经过滤的纯化蛋白 TI 10 mg/L, 脂多糖 (LPS) 10 mg/L, 每一个刺激剂量设 3 个重复, 试验同时设未加 LPS 的细胞对照。将细胞在 37 °C、5% CO₂ 恒温培养箱培养, 24 h 后吸取 100 μ L 细胞培养液上清, 按照 Mouse IFN- γ ELISA Kit II 检测试剂盒 (购自美国 BD 公司) 说明书检测小鼠脾淋巴细胞培养上清中 IFN- γ 的含量。标准曲线的绘制: 将 Mouse IFN- γ ELISA Kit II 检测试剂盒提供的标准品进行倍比稀释, 使其浓度为 1 000、500、250、125、62.5、31.3 μ g/L, 按操作说明书进行操作后绘制标准曲线。

1.9 数据统计分析

使用 Microsoft Excel 软件进行不同组别数据的两样本均数差异显著性 *t* 检验, 分析 TI 免疫原的免疫增强效应, 所有数据用均值 \pm 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示。

2 结果

2.1 目的蛋白的表达、纯化和鉴定

应用 SDS-PAGE 检测重组菌中目的蛋白的表达情况。电泳图谱显示, 重组菌在 1 mmol/L 的 IPTG 诱导条件下, TI 与 OA-VP1 高效表达, TI 蛋白分子量大小约 21 kDa, 与预期目的蛋白大小相符, OA-VP1 蛋白在电泳图谱上的表达条带显示为两条, 一条为 55 kDa, 为 2 个型的口蹄疫病毒 VP1 融合蛋白, 另一条为融合蛋白 OA-VP1 裂解成 2 个相似大小的 O 型 VP1 和 Asia1 型 VP1, 分子量均约为 27 kDa。应用镍柱亲和层析技术纯化表达产生的 TI 蛋白, 对 OA-VP1 蛋白则通过纯化包涵体进行了初

步纯化 (图 1~2)。通过薄层扫描分析, 纯化后的 TI 蛋白与 OA-VP1 包涵体的纯度分别达到了 90% 和 60% 以上。

Western blotting 结果表明, 融合蛋白 OA-VP1 能够被 O 型和 Asia1 型口蹄疫病毒感染牛阳性血清所识别 (图 3), 说明表达的 VP1 蛋白具有与康复牛血清的反应活性。本文未对重组蛋白 TI 做 Western blotting 分析。

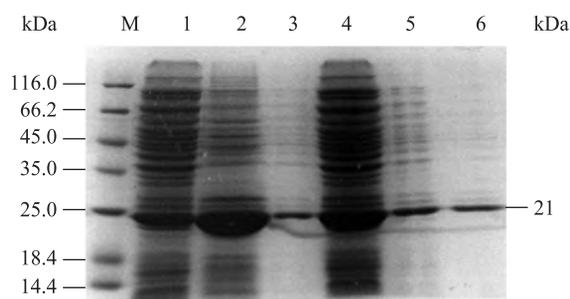


图 1 表达蛋白 TI 的 SDS-PAGE 检测

Fig. 1 SDS-PAGE analysis of the expressed protein TI. M: protein marker; 1: uninduced TI control; 2: induced product of TI/BL21(DE3); 3: the supernatant of induced product of TI/BL21(DE3); 4: the precipitation of induced product of TI/BL21(DE3). 5, 6: purified product of TI.

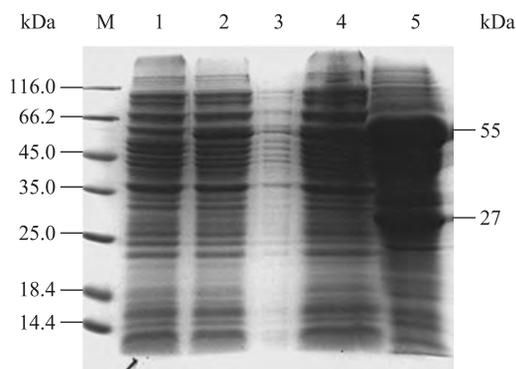


图 2 表达蛋白 OA-VP1 的 SDS-PAGE 检测

Fig. 2 SDS-PAGE analysis of the expressed protein OA-VP1. M: protein marker; 1: uninduced OA-VP1 control; 2: induced product of OA-VP1/BL21(DE3); 3: the supernatant of induced product of OA-VP1/BL21(DE3); 4: the precipitation of induced product of OA-VP1/BL21(DE3); 5: dialysed product of OA-VP1/BL21(DE3).

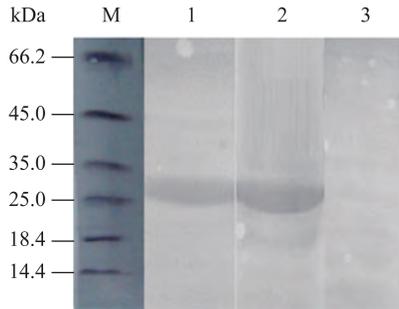


图3 OA-VP1蛋白的Western blotting分析

Fig. 3 Western blotting analysis of OA-VP1. 1: OA-VP1 reacted with bovine antisera specific for FMDV serotype O; 2: OA-VP1 reacted with bovine antisera specific for FMDV serotype Asia1; 3: OA-VP1 reacted with bovine negative antisera of FMDV.

2.2 血清中和抗体效价的测定

FMDV中和抗体是产生保护性免疫的最重要的评价指标,通过测定免疫小鼠血清在细胞上中和FMDV的能力,可以间接地反映不同疫苗抗原诱导产生保护性免疫的效果。结果表明,采用双价苗或者双血清型的VP1抗原免疫小鼠,从免疫后14 d开始就可以检测到中和抗体,且中和抗体的水平不断升高;免疫后第45天,添加2倍TI抗原免疫组的中和抗体水平与双价苗单独注射组差异极显著($P < 0.01$),与单独OA-VP1免疫组差异显著($P < 0.05$);添加1倍TI抗原组中和抗体水平高于未添加TI抗原组,但差异不显著($P > 0.05$),说明添加2

倍TI免疫原后可以明显提高灭活疫苗和蛋白亚单位疫苗所诱导的中和抗体水平。单独OA-VP1免疫组可以检测到针对O型和Asia1两个血清型FMDV的中和抗体,其水平略低于单独双价苗IFV免疫组,但差异不显著,说明用OA-VP1作为蛋白亚单位疫苗的雏形有较好的免疫效果(图4与图5)。

2.3 小鼠脾脏T细胞表面CD4、CD8与CD3分子的检测

对分离的小鼠脾淋巴细胞用抗CD4、CD8与CD3的荧光抗体进行染色,利用FACS Aria流式细胞仪检测增殖结果,用CellQuest软件获取数据。在前散射光(FSC)与对侧散射光(SSC)的二维散点图中划出淋巴细胞区P1,在P1区内计数 1×10^4 个细胞。利用多参数流式细胞术分析淋巴细胞的种类。通过不同的荧光通道采集CD3、CD4与CD8阳性标记细胞的荧光信号并计数(图6),用CellQuest软件分析CD4⁺T细胞和CD8⁺T细胞占所选定P1细胞区内细胞总数的百分比。各组细胞数及百分比见表3。由表3可知,6个免疫组小鼠CD4⁺T与CD8⁺T细胞数均明显升高,与阴性对照组相比有非常明显的差异;无论是灭活疫苗或者OA-VP1蛋白亚单位疫苗,添加TI抗原免疫后小鼠CD4⁺T细胞所占比例有明显的升高,对TI抗原加OA-VP1蛋白亚单位疫苗免疫组CD8⁺T细胞的比例也有所升高,说明添加TI抗原对于细胞免疫有明显促进作用。

表3 各实验小组小鼠脾脏CD4⁺T细胞和CD8⁺T细胞数及百分比

Table 3 Number of CD4⁺ and CD8⁺ T cell of mice spleen in different groups detected by Flow cytometric analysis

Groups	Number of cells in P1 region	Number of CD4 ⁺ T cells	Number of CD8 ⁺ T cells	CD4 ⁺ T cells/cells in P1 region (%)	CD8 ⁺ T cells/cells in P1 region (%)
IFV	6 741	1 670	132	24.8	2.0
IFV/1×TI	5 828	1 956	101	33.6	1.7
IFV/2×TI	5 749	2 833	108	49.3	1.9
OA-VP1	6 608	1 650	132	25.0	2.0
OA-VP1/1×TI	4 134	1 175	200	28.4	4.8
OA-VP1/2×TI	5 742	2 466	590	42.9	10.3
Control	7 043	680	30	9.7	0.4

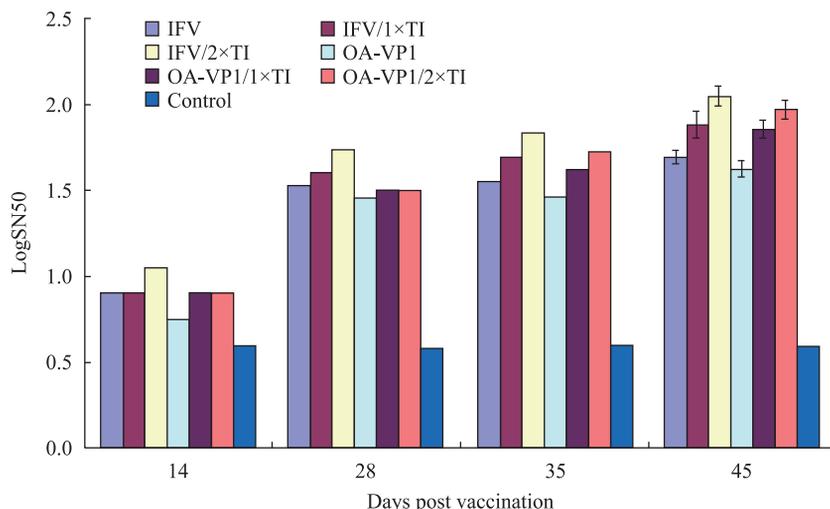


图 4 免疫小鼠血清 FMDV 中和抗体效价测定 (O 型)

Fig. 4 The titers of anti-FMDV(O) neutralizing antibody in mice sera.

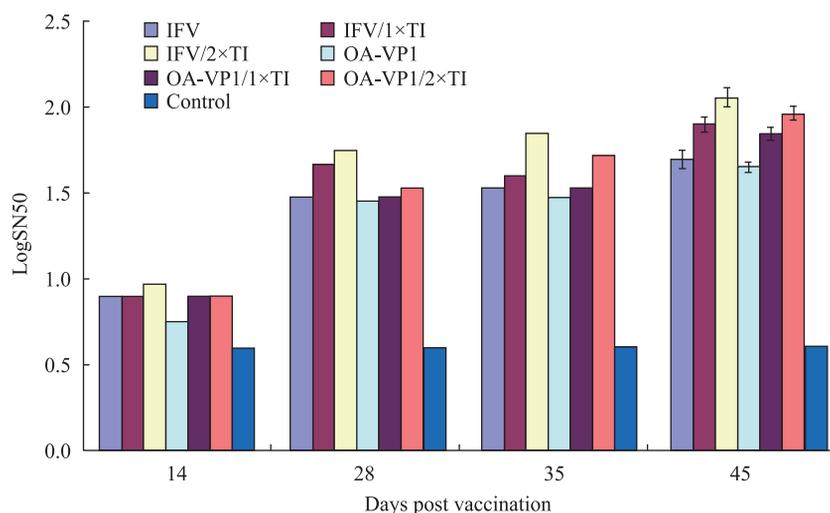


图 5 免疫小鼠血清 FMDV 中和抗体效价测定 (Asia1 型)

Fig. 5 The titers of anti-FMDV (Asia 1) neutralizing antibody in mice sera.

2.4 小鼠脾淋巴细胞分泌 IFN- γ 的检测

根据建立的标准曲线来计算各组小鼠脾淋巴细胞培养物样本中的 γ 干扰素浓度, 结果见表 4。由表 4 可见, 无论是灭活苗免疫组或者是 OA-VP1 蛋白亚单位疫苗免疫组, 其 γ 干扰素的产生水平都显著高于阴性对照组 ($P < 0.01$); 在加入 TI 抗原免疫后, 灭活疫苗与 OA-VP1 免疫组小鼠的脾淋巴细胞在接

受 LPS 刺激后, 分泌 γ 干扰素的量都显著高于未加 TI 抗原的免疫组, 差异显著 ($P < 0.05$); 加入 2 倍剂量的 TI 抗原后 γ 干扰素的分泌水平更高, 与灭活苗或者 OA-VP1 单独免疫组相比差异极显著 ($P < 0.01$)。通过测定不同免疫组 γ 干扰素的产生水平, 进一步说明了添加 TI 抗原可以显著提高细胞免疫的水平。

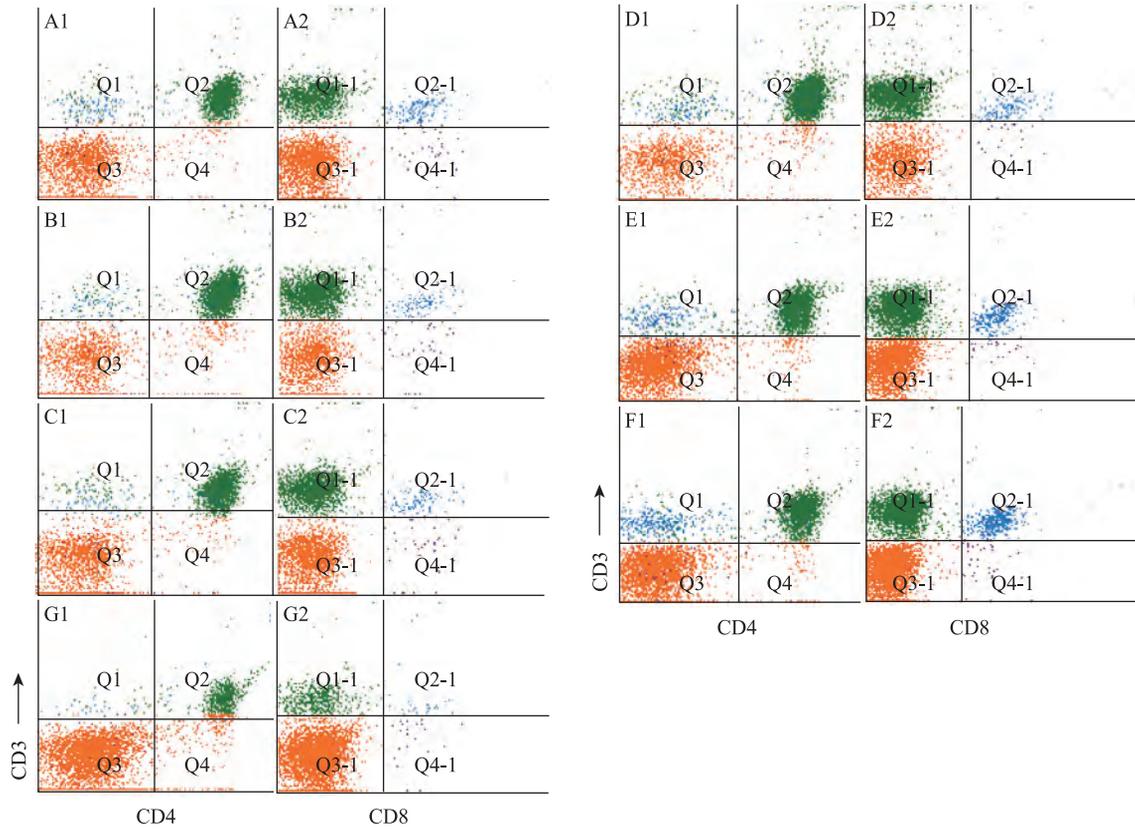


图 6 各组小鼠脾 CD4⁺ T 细胞和 CD8⁺ T 细胞亚群数量流式细胞仪检测结果

Fig. 6 Flow cytometry analysis of CD4⁺ and CD8⁺ T cell number of different groups. BALB/c mice were injected intramuscularly and subcutaneously with different vaccines as described in Table 2 at 0 days. Forty-five days after the injection, mice spleen lymphocyte were isolated and stained with CD4-PE, CD3-PerCP and CD8-FITC. All samples were acquired within 24 h with a FACSAria flow cytometer and CellQuest software. A, B and C stand for group 1, 2, 3, respectively, and D, E and F stand for group 4, 5, 6, respectively. G stands for control group. CD4⁺ T cells are found in the Q2 region, CD8⁺ T cells are found in the Q2-1 region.

表 4 各实验小组小鼠脾淋巴细胞培养上清中 IFN-γ 含量

Table 4 Concentration of IFN-γ in supernatant of cultured spleen lymphocyte of mice

Groups	Concentration of IFN-γ (ng/L)					$\bar{x} \pm s$
	No.1	No.2	No.3	No.4	No.5	
IFV	666.50	633.16	534.83	604.83	654.83	618.83±52.50
IFV/ 1×TI	859.83	931.50	856.50	974.83	918.16	908.16±50.23
IFV/ 2×TI	986.50	951.50	1 106.50	1 231.50	1 088.16	1 072.83±110.36
OA-VP1	588.16	644.83	563.16	599.83	613.16	601.83±30.26
OA-VP1/ 1×TI	724.83	731.50	761.50	719.83	644.83	716.50±43.21
OA-VP1/ 2×TI	893.16	861.50	756.50	881.50	928.16	864.16±64.87
Control	18.16	8.16	11.50	26.50	1.50	13.16±9.57

3 讨论

疫苗接种是特异性预防 FMD 的可靠和有效手段,安全有效的疫苗是成功地预防、控制乃至最终消灭 FMD 的先决条件。FMD 弱毒疫苗和灭活疫苗等常规疫苗都具有良好的免疫原性,在预防和控制 FMD 的过程中发挥着重要作用,但由于病毒毒力返强、病毒灭活不彻底、病毒逃逸出疫苗生产厂等不安全因素,促使人们寻求一种更加安全有效的 FMD 疫苗。

利用各种表达系统表达 FMDV 的主要免疫原蛋白,研制基因工程亚单位疫苗是目前研究的热点。由于亚单位疫苗只含有病原体的一部分,不会引起动物发病,在生物安全性方面优于传统疫苗。结构蛋白 VP1 第 141~160 氨基酸和 200~213 氨基酸区段是 FMDV 的两个优势中和表位,很多 FMDV 表位疫苗的研究都包含了以上两个主要的抗原表位,并取得了较好的免疫效果^[15-16]。其中,VP1 141-160 位氨基酸所形成的 G-H 环暴露在病毒粒子的表面,是最为重要的抗原决定簇,但该区段在不同血清型和同一血清型的不同谱系毒株之间差异很大,是造成不同疫苗毒株缺乏交叉免疫保护性的主要因素,所以本文将 O 型和 Asia1 型结构蛋白 VP1 以 FMDV 非结构蛋白 2A 相连接,形成融合蛋白 OA-VP1,作为口蹄疫亚单位疫苗的雏形,并与口蹄疫商品化灭活疫苗相比较,验证 T 细胞免疫原对口蹄疫疫苗的免疫增强作用。

本研究中,T 细胞免疫原 TI 包含了多个 T 细胞表位:两个通用 T 细胞表位和口蹄疫病毒结构蛋白与非结构蛋白上的若干 T 细胞表位。其中,位于结构蛋白 VP4 与非结构蛋白 3A 和 3D 上的 T 细胞表位序列保守,在易感动物体内,不同血清型之间能产生交叉反应,因此,它为拓宽宿主防御系统对病毒表位的识别提供了可能,而位于 VP1 蛋白中的细胞毒性 T 细胞 (Tc) 表位与记忆性免疫有关,期望

所设计的 T 细胞免疫原能够诱导宿主产生强而持久的保护性免疫。此外,2 个通用 T 细胞表位 PADRE 与侵袭素 *invasin* 的引入,目的是能够诱导大多数的动物均能够产生较强的细胞免疫应答。PADRE 已被证明是一种强免疫刺激剂^[17-19],属于 Th 细胞表位家族,氨基酸序列为 AKFVAAWTLKAAA,已被证实可以高亲和力结合不同的 MHC II 类分子,提高抗原的免疫原性,诱导多种动物如大鼠、豚鼠、猪等产生较强的体液免疫与细胞免疫应答^[13]。同样,侵袭素 *Invasin* 也是一种通用 T 细胞表位,氨基酸序列为 TAKSKKFPSYTATYQF,已被证明是一种免疫增强剂,可以提高传统疫苗的免疫原性^[14]。综上所述,T 细胞免疫原 TI 蛋白的设计原则是尽可能增大它的免疫原性、型间交叉免疫力和适用的家畜种类。

由于重组表达产物 TI 是由若干 T 细胞表位串联表达而成,T 细胞表位与 MHC 分子结合被 T 细胞所识别,从而刺激机体产生细胞免疫应答或者辅助 B 细胞产生针对 B 细胞表位的特异性抗体。换言之,机体在对抗原物质的免疫应答过程中,只会产生针对 B 细胞表位的特异性抗体,而不会产生针对 T 细胞表位的特异性抗体。所以本文未对 T 细胞免疫原 TI 作 Western blotting 分析。而重组蛋白 OA-VP1 的 Western blotting 结果显示:只有分子量为 27 kDa 大小的蛋白可分别被 O 型和 Asia1 型口蹄疫感染康复牛阳性血清所识别,而 55 kDa 融合蛋白未被 2 个型的阳性血清所识别。说明 2 个 VP1 蛋白从 2A 蛋白处裂解开以后,更有利于正确折叠,展示其自然的空间构象,也说明了 2A 蛋白具有充分的酶活性,可以催化其下游蛋白的自动解离。

FMDV 的免疫是典型的细胞依赖性体液免疫应答,T 细胞表位可以被 MHC 分子递呈并被 T 细胞识别,T 细胞释放一系列细胞因子如 IL-4、IL-5 等细胞因子活化 B 细胞,协助和促进 B 细胞的增殖和分化为浆细胞,产生特异性抗体。单纯的 B 细胞表位抗原诱导机体产生的免疫保护作用非常有限,因而

T 细胞表位的引入对提高体液免疫和细胞免疫应答的水平具有重要的作用^[20-21]。

本研究中设计表达了 O 型与 Asia1 型双血清型的融合 VP1 蛋白,并设计表达了一种包含 FMDV 结构蛋白与非结构蛋白中多个 T 细胞表位与 2 个通用 T 细胞表位的 T 细胞免疫原,期望将双血清型的 VP1 蛋白与该 T 细胞免疫原组合,研制一种新型的口蹄疫蛋白亚单位疫苗。通过在小鼠的免疫试验,初步证明,双血清型的 VP1 蛋白能够刺激小鼠产生针对 2 个血清型的中和抗体,而且添加表达的 T 细胞免疫原后能够进一步刺激免疫小鼠产生更高水平的体液与细胞免疫应答,说明细胞免疫与体液免疫具有协同性,也说明采用 T 细胞免疫原与主要抗原蛋白组合免疫具有很好的免疫效果,应当是口蹄疫蛋白亚单位疫苗研究的努力方向。

本研究结果表明,所设计的 T 细胞免疫原可以进一步促进口蹄疫常规疫苗与蛋白亚单位疫苗免疫小鼠产生更高水平的中和抗体,这种效应与其诱导产生的高水平细胞免疫呈正相关,说明添加 T 细胞免疫原可以有效提高口蹄疫疫苗的免疫效果,有望用于口蹄疫亚单位疫苗与高效灭活疫苗的研究,提高基因工程疫苗与灭活疫苗的免疫效果。

REFERENCES

- [1] Grubman MJ, Baxt B. Foot-and-mouth disease. *Clin Microbiol Rev*, 2004, 17(2): 465-493.
- [2] Zhang HY, Sun SH, Guo YJ, et al. Immune response in mice inoculated with plasmid DNAs containing multiple-epitopes of foot-and-mouth disease virus. *Vaccine*, 2003, 21(32): 4704-4707.
- [3] Rodriguez A, Sáiz JC, Novella IS, et al. Antigenic specificity of porcine T cell response against foot-and-mouth disease virus structural proteins: identification of T helper epitopes in VP1. *Virology*, 1994, 205(1): 24-33.
- [4] Zamorano P, Wigdorovitz A, Chaher MT, et al. Recognition of B and T cell epitopes by cattle immunized with a synthetic peptide containing the major immunogenic site of VP1 FMDV O1 Campos. *Virology*, 1994, 201(2): 383-387.
- [5] Filgueira MP, Wigdorovitz A, Romera A, et al. Detection and characterization of functional T-Cell epitopes on the structural proteins V2, VP3, and VP4 of foot and mouth disease virus O1 Campos. *Virology*, 2000, 271: 234-239.
- [6] Blanco E, McCullough K, Summerfield A. Interspecies major histocompatibility complex-restricted Th cell epitope on foot-and-mouth disease virus capsid protein VP4. *J Virol*, 2000, 74(10): 4902-4907.
- [7] 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 Virol*, 2001, 75(7): 3164-3174.
- [8] Juleff N, Windsor M, Lefever EA, et al. Foot-and-mouth disease virus can induce a specific and rapid CD4⁺ T-cell-independent neutralizing and isotype class-switched antibody response in naïve Cattle. *J Virol*, 2009, 83(8):3626-3636.
- [9] Haghparast A, Wauben MHM, Grosfeld-Stulemeyer MC, et al. Selection of T-cell epitopes from foot-and-mouth disease virus reflects the binding affinity to different cattle MHC class II molecules. *Immunogenetics*, 2000, 51(8/9): 733-742.
- [10] Gerner W, Denyer MS, Takamatsu H, et al. Identification of novel foot-and-mouth disease virus specific T-cell epitopes in c/c and d/d haplotype miniature swine. *Virus Res*, 2006, 121(2): 223-228.
- [11] Gao FS, Fang QM, Li YG, et al. Reconstruction of a swine SLA-I protein complex and determination of binding nonameric peptides derived from the foot-and-mouth disease virus. *Vet Immunol Immunopathol*, 2006, 113(3/4): 328-338.
- [12] García-Briones MM, Blanco E, Chiva C, et al. Immunogenicity and T cell recognition in swine of foot-and-mouth disease virus polymerase 3D. *Virology*, 2004, 322: 264-275.
- [13] Wu CY, Archana M, Pang XW, et al. Improving therapeutic HPV peptide-based vaccine potency by enhancing CD4⁺ T help and dendritic cell activation. *J Biomed Sci*, 2010, 17(1): 88-96.
- [14] Wang CY, Chang TY, Walfield AM, et al. Effective synthetic peptide vaccine for foot-and-mouth disease in swine. *Vaccine*, 2002, 20(19/20): 2603-2610.
- [15] Bittle JL, Houghten RA, Alexander H, et al. Protection against foot-and-mouth disease by immunization with a

- chemically synthesized peptide predicted from the viral nucleotide sequence. *Nature*, 1982, 298(5869): 30–33.
- [16] Morgan DO, Moore DM. Protection of cattle and swine against foot-and-mouth disease, using biosynthetic peptide vaccines. *Am J Vet Res*, 1990, 51(1): 40–45.
- [17] Decroix N, Quan CP, Pamonsinlatham P, et al. Mucosal immunity induced by intramuscular administration of free peptides in-line with PADRE: IgA antibodies to the ELDKWA epitope of HIV gp41. *Scand J Immunol*, 2002, 56(1):59–65.
- [18] Alexander J, del Guercio MF, Maewal A, et al. Linear PADRE T helper epitope and carbohydrate B cell epitope conjugates induce specific high titer IgG antibody responses. *J Immunol*, 2000, 164(3):1625–1633.
- [19] del Guercio MF, Alexander J, Kubo RT, et al. Potent immunogenic short linear peptide constructs composed of B cell epitopes and Pan DR T helper epitopes (PADRE) for antibody responses *in vivo*. *Vaccine*, 1997, 15(40):441–448.
- [20] Francis MJ, Hastings GZ, Syred AD, et al. Non-responsiveness to a foot-and-mouth disease virus peptide overcome by addition of foreign helper T cell determinants. *Nature*, 1987, 330(6144): 168–170.
- [21] Leclerc C, Przewlocki G, Schutze MP, et al. A synthetic vaccine constructed by copolymerization of B and T cell determinants. *Eur J Immunol*, 1987, 17(2): 269–273.



《生物工程学报》对摘要的写作要求

1. 研究报告摘要: 基本要素包括研究目的、方法、结果和结论 (不用单列标题书写)。目的 (Purpose): 主要说明作者写此文章的目的, 或说明本文主要要解决的问题; 方法 (Methods): 重点说明作者的主要工作过程及使用的方法。应用性文章如需要, 可注明条件、使用的主要设备和仪器。结果 (Results): 本文最后得出的结果 (实验数据部分)。结论 (Conclusions): 如系基础研究, 应写明本文的创新之处, 及文章在讨论部分表述的观点; 如系应用性研究, 应尽可能提及本文结果和结论的应用范围和应用情况或应用前景。

2. 综述摘要: 包括论述内容的发展水平、自己的评论及展望, 尤其要注意结合自己的研究工作。

3. 英文摘要的撰写要点: 英文摘要的内容应与中文摘要一致, 但比中文摘要更详尽。英文摘要完成后, 务必请英文较好、且专业知识强的专家审阅定稿后再返回编辑部。凡不符合要求的, 即使学术上可以达到刊出的水平, 本刊也将推迟发表。

(1) 建议使用第一人称, 尽量不使用第三人称和被动语态。

(2) 建议用主动语态, 被动语态表达拖拉模糊尽量不用, 这样可以免好多长句, 以求简单清晰。

(3) 尽量使用清晰简练的短句, 避免很长的句子。注意正确使用英文写作习惯和语法。

(4) 摘要应当使用过去时态, 语法正确, 句子通顺。

(5) 摘要中避免使用缩写语, 除非是那些人人皆知的 (如 DNA、ATP 等), 或者确实是非常长, 而且出现多次的短语才允许用缩写语, 并且在第一次出现时要写出全称。

(6) 在英语摘要中, 不要使用任何汉字字符, 包括标点、括号、温度、希腊字母等。

(7) 句子的开头处最好不要使用数字。