

嵌合型口蹄疫病毒样颗粒构建、表达及鉴定

刘绒欢, 郭慧琛, 杜平, 董虎, 郭梦楠, 孙世琪

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 OIE/国家口蹄疫参考实验室, 甘肃 兰州 730046

刘绒欢, 郭慧琛, 杜平, 等. 嵌合型口蹄疫病毒样颗粒构建、表达及鉴定. 生物工程学报, 2020, 36(7): 1305–1313.

Liu RH, Guo HC, Du P, et al. Construction, expression and identification of chimeric foot-and-mouth disease virus-like particles. Chin J Biotech, 2020, 36(7): 1305–1313.

摘要: 为提高口蹄疫病毒 (Foot-and-mouth disease virus, FMDV) 病毒样颗粒 (Virus-like particles, VLPs) 的特异性识别和递呈, 为靶向疫苗研究奠定基础, 利用反向 PCR 技术, 将卵清蛋白 (Ovalbumin, OVA) 第 257–264 位氨基酸 (Amino acids, aa) 的短肽嵌入 FMDV 结构蛋白 VP3 第 171–172 位 aa 或第 173–174 位 aa, 通过大肠杆菌表达 FMDV 结构蛋白 VP0、VP1 和嵌合型 VP3, 体外组装得到嵌合 OVA₂₅₇₋₂₆₄ 肽的病毒样颗粒 (VLP_{OVA})。用动态光散射、透射电镜检测 VLP_{OVA} 大小和形态, 免疫印迹、酶联免疫吸附试验和激光共聚焦显微镜检测短肽的嵌入情况。结果显示在 VP3 的第 173–174 位 aa 嵌入 OVA, 不影响蛋白表达和 VLPs 的组装且 OVA 位于 VLP_{OVA} 的表面, VLP_{OVA} 粒径比 VLPs 稍大。

关键词: 口蹄疫病毒, 嵌合型病毒样颗粒, OVA₂₅₇₋₂₆₄, VP3

Construction, expression and identification of chimeric foot-and-mouth disease virus-like particles

Ronghuan Liu, Huichen Guo, Ping Du, Hu Dong, Mengnan Guo, and Shiqi Sun

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

Abstract: To improve the specific recognition and presentation of virus-like particle (VLPs), and to develop immune-targeted VLPs vaccine, the gene fragment encoding OVA₂₅₇₋₂₆₄ peptide was inserted into the VP3 gene of foot-and-mouth disease virus (FMDV) between the 171th and 172th amino acids (aa) or 173th and 174th aa by reverse PCR. The recombinant proteins were expressed by using *Escherichia coli* and assembled into chimeric VLP (VLP_{OVA}) *in vitro* after purification. The VLP_{OVA} was measured by dynamic light scattering and transmission electron microscopy. The recombinant protein and the assembled VLPs were evaluated by Western blotting, enzyme-linked immunosorbent assay and laser scanning

Received: November 21, 2019; **Accepted:** April 21, 2020

Supported by: National Key Research and Development Program (Nos. 2017YFD0501100, 2017YFD0500900, 2016YFE0204100), National Natural Science Foundation of China (No. 31672592), Basic Scientific Research Operating Expenses for Central Scientific Research Institutes (Nos. 1610312016002, 1610312018003).

Corresponding author: Shiqi Sun. Tel: +86-931-8312213; Fax: +86-931-8340977; E-mail: sunshiqi@caas.cn

国家重点研发计划 (Nos. 2017YFD0501100, 2017YFD0500900, 2016YFE0204100), 国家自然科学基金 (No. 31672592), 中央级科研院所基本科研业务费专项 (Nos. 1610312016002, 1610312018003) 资助。

confocal microscopy to confirm the insertion of OVA₂₅₇₋₂₆₄ peptide into VP3 and its location. The results show that insertion of OVA₂₅₇₋₂₆₄ into the 173th and 174th aa of FMDV VP3 did not affect the assembly of VLPs. The VLP_{OVA} in size was larger than VLPs, and the OVA₂₅₇₋₂₆₄ peptide was located on the surface of VLP_{OVA}.

Keywords: foot-and-mouth disease virus, chimeric virus-like particles, OVA₂₅₇₋₂₆₄, VP3

口蹄疫 (Foot-and-mouth disease, FMD) 是由口蹄疫病毒 (FMD virus, FMDV) 引起的急性、热性、高度传染性疾病^[1]。FMDV 属于小 RNA 病毒科的口蹄疫病毒属。完整 FMDV 为正二十面体对称结构, 由各 60 个分子的 VP1、VP2、VP3 和 VP4 组成, FMDV 的空衣壳或病毒样颗粒 (Virus-like particles, VLPs) 由 VP0 (VP4 和 VP2 的前体)、VP1 和 VP3 组成, 其基因分别为 909、633、660 个核苷酸^[2]。感染口蹄疫病毒后, 动物的生长、产奶量和活动能力都会受到严重影响, 感染动物的产品也不能流入市场, 极大影响畜牧业的健康发展、对国家经济及社会均造成严重危害^[3-4]。目前, 预防口蹄疫以灭活疫苗为主^[5], 但灭活疫苗存在生物安全风险, 因此需开发更加安全的新型替代疫苗。

VLP 是一种不含病毒核酸, 形态类似病毒的空心颗粒, 由于该颗粒不能自我复制, 具有优越的安全性和免疫原性^[6-8]。

重组杆状病毒表达的 FMDV VLPs 接种动物后可诱导产生一定的保护作用, 但由于抗原量少且抗原靶向性弱, 所以无法达到全病毒灭活疫苗的免疫效果^[9-10]。为了增强免疫效果, 将抗原与 CpG 或 Poly (I : C)、白细胞介素等佐剂配合使用, 修饰性短肽与抗原连接也被作为促进免疫细胞活化和增强免疫效果的策略, 卵清蛋白 (Ovalbumin, OVA) 常被作为模式抗原^[11-13], 其包含两个 OVA 短肽: OVA₂₅₇₋₂₆₄ 肽和 OVA₃₂₃₋₃₃₉ 肽, 分别诱导 CD8⁺ T 细胞应答和 CD4⁺ T 细胞应答。Lipford 等研究发现, OVA₂₅₇₋₂₆₄ 肽可与主要组织相容性复合体 (Major histocompatibility complex, MHC) I 类分子结合, 产生强烈的细胞溶解性 CD8⁺ T 细胞应答, 进而诱导 CD8⁺ T 细胞增殖、分化为效应性细

胞毒性 T 淋巴细胞 (Cytotoxicity T lymphocyte, CTL)^[14]。HBsAgS VLPs 中嵌入 OVA₂₅₇₋₂₆₄ 肽后可被常规树突状细胞 (Conventional dendritic cell, cDC) 识别, 通过 MHC I 类抗原递呈途径递呈给 CD8⁺ T 细胞, 并引起 CTL 反应^[15]。

FMDV 的 VP1、VP2 和 VP3 的立体结构相似, 均由 8 个 β 折叠桶组成, 折叠桶之间由环结构相连^[16], 研究显示在 VP1 的 GH 环插入 HA 和 FLAG 标签不影响重组病毒的拯救, 提示结构上柔韧的环部可以容忍外源片段的插入^[17-18], 但是 FMDV 的主要抗原位点和受体识别位点位于 VP1 的 GH 环, 外源片段的插入有可能会影响病毒的感染性和抗原特性^[19-20], VP3 的第 171-181 位氨基酸位于 GH 环^[21-22], 对 VP3 的 174、174 和 179 位氨基酸的突变不影响重组病毒的拯救, 也不影响病毒对受体的结合, 提示该位点不是病毒感染和组装的必需氨基酸, 有可能容忍外源片段的插入^[23-25]。

基于 OVA₂₅₇₋₂₆₄ 可与 MHC I 类分子靶向结合的特性, 以及 FMDV VP3 C 端柔性环的特点, 本研究在 FMDV VP3 的第 171-172 位 aa 或第 173-174 位 aa 嵌入 OVA₂₅₇₋₂₆₄, 利用大肠杆菌表达 VP3_{OVA} 融合蛋白, 研究 OVA₂₅₇₋₂₆₄ 对 VP3 蛋白表达的影响和组装 VLPs 的影响, 为提高 VLPs 抗原的特异性识别和递呈、研究靶向 VLPs 疫苗奠定基础。

1 材料与方法

1.1 质粒和菌株

pSMA-VP3、pSMK-VP0/VP1 是在 FMDV 结构蛋白基因 N 端融合 His 标签和小泛素样修饰蛋白 (Small ubiquitin-like modifier, SUMO) 基因的重组载体^[26-27]。克隆菌大肠杆菌 *Escherichia coli*

DH5 α 和表达菌 BL21 (DE3) 的感受态细胞购自北京全式金生物技术有限公司。

1.2 主要试剂和抗体

PrimeSTAR[®] GXL DNA Polymerase、MutanBEST 试剂盒均购自 TaKaRa 公司; 质粒提取试剂盒购自 Omega 公司。猪抗 FMDV 血清和 FMDV 结构蛋白 SUMO-VP3、SUMO-VP0、SUMO-VP1 由本实验室保存; SUMO 蛋白酶购自 Invitrogen 公司; OVA₂₅₇₋₂₆₄ (SIINFEKL) 肽购自金斯瑞公司; 兔抗 OVA 多克隆抗体购自 Abcam 公司; APC 标记的抗鼠 OVA₂₅₇₋₂₆₄ (SIINFEKL) 肽连接 H-2Kb 单克隆抗体购自 Biolegend 公司; 辣根过氧化物酶 (HRP) 标记的兔抗猪 IgG 抗体、HRP 标记山羊抗兔 IgG 抗体、FITC 标记的兔抗猪 IgG 抗体、染料 DAPI 购自 Sigma 公司。镍离子螯合树脂购自 Roche 公司; 其他试剂均为国产或进口分析纯。

1.3 动物与细胞

小鼠骨髓源树突状细胞 (Bone marrow derived dendritic cells, BMDCs) 分离于 C57BL/6 小鼠 (雄, 6–8 周龄, SPF 级), 用 RPMI 1640 培养基培养 (Gibco), 并辅以 10% 灭能 (56 °C, 30 min) 胎牛血清 (Fetal bovine serum, FBS) (Sigma)、100 U/mL 青霉素和 100 μ g/mL 链霉素 (Gibco)、10 μ mol/mL β -巯基乙醇 (细胞培养级)、20 ng/mL

粒细胞-巨噬细胞集落刺激因子 (Granulocyte-macrophage colony stimulating factor, GM-CSF) 和白细胞介素 4 (Interleukin-4, IL-4) (R&D), 置于 5% CO₂ 培养箱培养。

1.4 引物的设计与合成

根据大肠杆菌密码子偏嗜性对 OVA₂₅₇₋₂₆₄ 的密码子进行优化。使用 Primer Premier 5.0 设计引物 (表 1), 由金唯智生物科技有限公司合成。

1.5 嵌合 OVA 重组载体的构建

利用反向 PCR 方法, 以质粒 pSMA-VP3 为模板, OVA171F/R 或 OVA173F/R 为引物对, 用 PrimeSTAR[®] GXL DNA Polymerase 试剂盒扩增, 将 OVA₂₅₇₋₂₆₄ 嵌入到重组质粒 pSMA-VP3 中。1.0% 琼脂糖凝胶电泳后胶回收扩增片段。用 MutanBEST 试剂盒对目的片段基因进行磷酸化和连接。将连接产物转化至 *E. coli* DH5 α 感受态细胞。用引物对 VP3-F/R 进行 PCR 鉴定, 将阳性质粒命名为 pSMA-VP3_{OVA171} 或 pSMA-VP3_{OVA173}, 并送金唯智生物科技有限公司测序。

1.6 重组菌的构建和诱导表达及纯化

将 pSMA-VP3_{OVA171} 或 pSMA-VP3_{OVA173} 转入表达菌 *E. coli* BL21 (DE3), 挑单克隆菌于 5 mL LB (含 100 μ g/mL Amp) 培养基振荡过夜。取 3 mL 菌液接种于 300 mL LB (含 100 μ g/mL Amp) 培养基振荡, 待 OD₆₀₀ 约为 0.7 时, 加 IPTG 诱导 (终

表 1 引物序列

Table 1 Primer sequences

Primer name	Primer sequence (5'-3')	Size (bp)
OVA171F	TTCGAAAAGCTGTCTGACGCAGCTGAGACC	30
OVA171R	GTTGATGATGCTCGCGGTGTACGCGTAATCAGCCG	35
OVA173F	TTCGAAAAGCTGGCAGCTGAGACCACAAATGTTTCAGGG	38
OVA173R	GTTGATGATGCTGTCTGACGCAGCGGTGTACGCGTAATCAGCCG	41
VP0-F	GGCGCCGGCAATCCAGTCCGGCT	24
VP0-R	TTCCTTGAAGGGAACCTACCCGCA	25
VP1-F	ACCACCTCCACAGGTGAGTCGG	22
VP1-R	CTGTTTCACAGGCGCCACAATC	22
VP3-F	GGGATCTTCCCCGTGGCATGT	21
VP3-R	CTGCGTGCGAGCGTCAACTGG	21

浓度 0.5 mmol/L), 180 r/min 室温振摇过夜, 离心 (6 000 r/min, 15 min, 4 °C) 收集菌体沉淀, 用 20 mL 缓冲液 (20 mmol/L Tris-HCl、500 mmol/L NaCl、5 mmol/L 咪唑, pH 8.5) 重悬, 超声破碎 15 min, 离心 (11 000 r/min, 30 min, 4 °C) 收集上清, 按 His 标签蛋白纯化试剂盒说明书纯化蛋白, 进行 SDS-PAGE, 比较诱导前后目的蛋白表达情况。

将 pSMA-VP3_{OVA171} 或 pSMA-VP3_{OVA173} 与 pSMK-VP0/VP1 共转入表达菌 *E. coli* BL21 (DE3), 挑单克隆菌于 5 mL LB (含 100 µg/mL Amp 和 Kan) 液体培养基中, 振摇过夜。用引物对 VP0-F/R、VP1-F/R 和 VP3-F/R, 筛选 VP3_{OVA}、VP0 和 VP1 基因阳性的克隆, 取 3 mL 菌液接种于 300 mL LB (含 100 µg/mL Amp 和 Kan) 液体培养基中振摇, 同上述单质粒表达步骤进行诱导、表达和纯化。

1.7 免疫印迹分析

将样品进行 SDS-PAGE 电泳, 湿转 (200 mA, 2 h) 至硝酸纤维素膜上 (NC 膜), 5% 脱脂奶粉封闭, 分别用猪抗 FMDV 血清和兔抗 OVA 抗体孵育 2 h, TBST 洗膜 (6 min/次×6 次), 再分别用 HRP 标记的兔抗猪 IgG 抗体、HRP 标记山羊抗兔 IgG 抗体孵育 1 h, TBST 洗膜, 加入 ECL 发光液, 胶片曝光, 显影, 定影后, 分析目的蛋白。

1.8 FMDV VLPs 组装

将纯化的蛋白转至截留分子量为 10 kDa 的透析袋, 参照说明书加入一定比例的 SUMO 蛋白酶透析 (透析缓冲液为 40 mmol/L Tris-HCl、500 mmol/L NaCl、1 mmol/L CaCl₂, pH 8.0), 获得嵌合病毒样颗粒 VLP_{OVA}, 动态光散射检测 VLP_{OVA} 的粒径和分散度。

1.9 透射电子显微镜 (TEM)

取 10 µL 组装样品滴加至 200 目铜网碳支持

膜上, 室温吸附 3 min, 吸去多余液体, 滴加 5 µL 2% 磷钨酸, 室温孵育 3 min, 吸去多余液体, 晾干, 透射电镜 (80 kV) 观察。

1.10 ELISA 检测

使用间接夹心 ELISA 法检测样本, 用猪抗 FMDV 血清包被酶标板, 洗涤, 加入被检样品, 室温孵育 30 min, 洗涤, 兔抗 OVA 一抗 (1:20 000) 孵育; 洗涤, HRP 标记的山羊抗兔二抗 (1:10 000) 孵育; 洗涤, 加入底物液, 终止液终止反应, 检测吸光度值。使用 One-way ANOVA 进行统计分析, 0.01 < P < 0.05 为差异性显著, P < 0.01 为差异性极显著。

1.11 激光共聚焦显微镜检测

分离 BMDCs, 将 C57BL/6 小鼠脱臼处死, 75% 乙醇消毒灭菌, 取小鼠后腿股骨和胫骨, 剔除肌肉, 用新鲜 RPMI 1640 培养基冲洗, 直至腿骨透明, 轻敲打液体, 尼龙筛过滤, 离心 (1 200 r/min, 10 min, 4 °C), 弃上清, 1× 红细胞裂解液重悬沉淀裂解 5 min, 离心, 弃上清, 完全培养基重悬细胞, 置于 37 °C、5% CO₂ 培养箱培养, 隔天半量换液。培养至第 5 天, 收集细胞, 以 2×10⁶ 个细胞/皿转至激光共聚焦培养皿中, 加入不同样品作用 2 h, 4% 多聚甲醛固定, 加入 1% Triton-100, PBS 清洗, 5% NBS 封闭 2 h, 依次加入猪抗 FMDV 血清 (1:100)、FITC 标记的兔抗猪 IgG 抗体 (1:200)、APC 抗鼠 OVA₂₅₇₋₂₆₄ (SIINFEKL) 肽连接 H-2Kb 抗体 (1:50), 每次孵育 1 h, PBS 洗 3 次, 加 DAPI 孵育 30 min, 清洗, 激光共聚焦显微镜观察结果。

2 结果与分析

2.1 嵌合 OVA 重组载体的构建

以 pSMA-VP3 质粒为模板, 用引物对 OVA171F/R 或 OVA173F/R 进行反向 PCR, 将 OVA₂₅₇₋₂₆₄ 嵌入至 FMDV VP3 蛋白的第 171-172

或第 173–174 aa 位点之间, 扩增片段与线性化的 pSMA-VP3 大小一致。扩增片段经凝胶纯化、磷酸化、连接、转化, 用引物对 VP3-F/R 进行 PCR 鉴定, 扩增片段与 VP3_{OVA} 预期大小 684 bp 相符, 进一步测序确证, 命名为 pSMA-VP3_{OVA171} 和 pSMA-VP3_{OVA173}。

2.2 嵌合 OVA 重组蛋白的表达

将质粒 pSMA-VP3_{OVA171} 或 pSMA-VP3_{OVA173} 转入表达菌 *E. coli* BL21 (DE3), IPTG 诱导表达和纯化。结果显示, 所表达的蛋白与 SUMO-VP3_{OVA} 的预期大小 37 kDa 相符^[25-26]。诱导菌体经超声裂解, 纯化上清中的蛋白, 结果显示 VP3_{OVA171} 主要是包涵体形式, VP3_{OVA173} 主要是可溶性蛋白。

2.3 FMDV 重组结构蛋白的共表达和 VLPs 组装

将质粒 pSMA-VP3_{OVA173} 与 pSMK-VP0/VP1 共转入 *E. coli* BL21(DE), 用引物对 VP3-F/R、VP0-F/R 和 VP1-F/R 进行鉴定, 结果显示扩增获得与预期大小 909 bp、633 bp 和 684 bp 相符的 DNA 片段, 说明 VP0、VP1 和 VP3_{OVA173} 基因成功共转入表达菌中。

诱导表达后用镍亲和树脂纯化蛋白, SDS-PAGE 显示所纯化的蛋白与 SUMO-VP0、SUMO-VP1 和 SUMO-VP3_{OVA} 预期大小 45 kDa、35 kDa 和 37 kDa 相符。

用 SUMO 蛋白酶将 SUMO-VP3_{OVA} 以及共表达的 SUMO-VP0、SUMO-VP1 和 SUMO-VP3_{OVA} 蛋白的 SUMO 切除以组装 VLP, 同时设未嵌入 OVA 的 SUMO-VP3 以及 SUMO-VP0、SUMO-VP1 和 SUMO-VP3 共表达产物作为对照。结果显示, SUMO 蛋白酶酶切后的蛋白与 VP0、VP1、VP3 和 VP3_{OVA} 的预期大小 33 kDa、23 kDa、24 kDa、和 25 kDa 相符。SUMO-VP0、SUMO-VP1 和 SUMO-VP3 切除 SUMO 标签后为 VLPs, SUMO-VP0、SUMO-VP1 和 SUMO-VP3_{OVA} 切除

SUMO 标签后为 VLP_{OVA}, 保存备用。

2.4 重组蛋白的 Western blotting 分析

分别用猪抗 FMDV 血清和兔抗 OVA 抗体对嵌入 OVA 的 SUMO-VP3_{OVA}、共表达的 SUMO-VP0、SUMO-VP1 和 SUMO-VP3_{OVA} 以及切除 SUMO 后的 VP0、VP1、VP3 和 VP3_{OVA} 进行 Western blotting 分析, 同时设未嵌入 OVA 的 SUMO-VP3 以及 SUMO-VP0、SUMO-VP1 和 SUMO-VP3 共表达蛋白作为对照。结果显示, 嵌入 OVA 的 SUMO-VP3_{OVA} 及共表达的蛋白以及切除 SUMO 后的 VP0、VP1、VP3 和 VP3_{OVA} 均与未嵌入 OVA 的 FMDV 结构蛋白一样能够与猪抗 FMDV 血清反应 (图 1A–B)。兔抗 OVA 抗体仅与嵌入 OVA 的 SUMO-VP3_{OVA} 和切除 SUMO 的 VP3_{OVA} 反应 (图 1C), 说明 OVA 短肽正确嵌入到 VP3 中。

2.5 不同病毒样颗粒粒径测定和透射电镜检测

为了确定嵌入 OVA 短肽后的蛋白是否能够组装成 VLPs, 用动态光散射法和透射电镜检测透析组装后样品, 结果显示, 嵌入 OVA 样品的粒径比未嵌入的 OVA 样品的粒径稍大 (图 2A), 透射电镜显示, 嵌入 OVA 的样品与未嵌入 OVA 的样品一样能够组装成 VLPs (图 2B)。

2.6 ELISA 检测

用间接夹心 ELISA 法对 VP3、VP3_{OVA}、VLPs、和 VLP_{OVA} 进行检测, 同时设对照样品。如果 OVA 展示在 VLPs 表面, 则可与 OVA 抗体反应, 吸光值高, 如果包裹于 VLPs 内部, 则不能与 OVA 抗体反应, 吸光值低。结果显示, VP3_{OVA} 和 VLP_{OVA} 的吸光值比 VP3 和 VLPs 的均高, VP3_{OVA} 与 VP3 相比, 差异显著, VLP_{OVA} 与 VLPs 相比, 差异极显著, VLP_{OVA} 与 OVA₂₅₇₋₂₆₄ 对照相比差异极显著 (图 3), 表明 OVA 短肽嵌入 VLPs, 且位于 VLPs 表面。

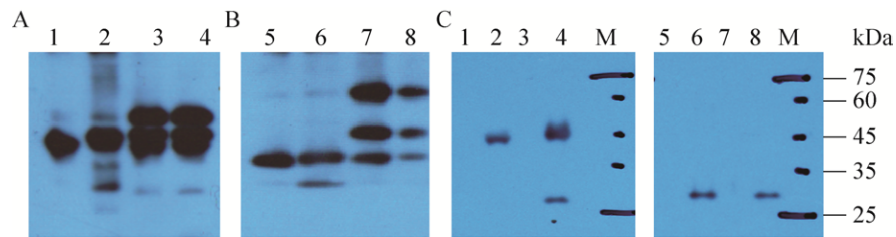


图1 重组蛋白的 Western blotting 分析

Fig. 1 Western blotting analysis of the recombinant proteins. Western blotting analysis of protein-fused with SUMO tag (A) and remove of SUMO by SUMO protease (B) by swine serum anti-FMDV, and by anti-OVA antibody (C). 1: SUMO-VP3; 2: SUMO-VP3_{OVA}; 3: mixture of SUMO-VP0, SUMO-VP1, SUMO-VP3; 4: mixture of SUMO-VP0, SUMO-VP1, SUMO-VP3_{OVA}; 5: VP3; 6: VP3_{OVA}; 7: VP0, VP1, VP3; 8: VP0, VP1, VP3_{OVA}; M: protein marker.

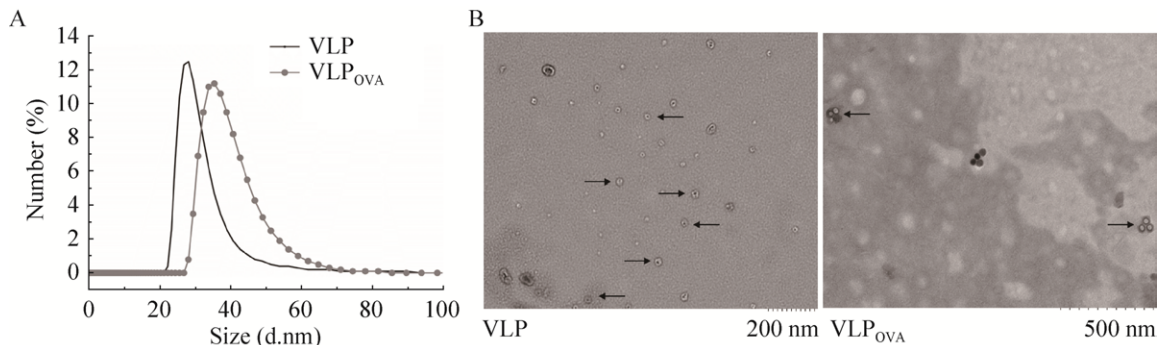


图2 透析样品中 DLS 检测测定和电镜的观察

Fig. 2 Analysis of dialysis samples by DLS (A) and TEM (B).

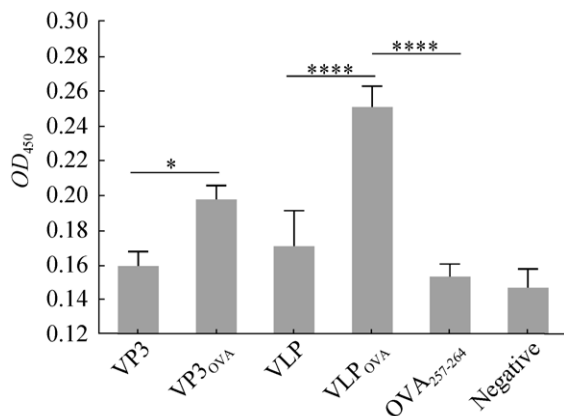


图3 ELISA 法检测重组蛋白和 VLP_{OVA} 中的 OVA₂₅₇₋₂₆₄

Fig. 3 ELISA analysis of OVA₂₅₇₋₂₆₄ peptide fused into VP3_{OVA} and VLP_{OVA}. *0.01 < P < 0.05; **** P < 0.01.

2.7 激光共聚焦显微镜鉴定 OVA₂₅₇₋₂₆₄

为了进一步确定 OVA₂₅₇₋₂₆₄ 肽正确嵌入 VP3 蛋白中, 分别用培养基、VP3、VP3_{OVA173}、VLPs 和 VLP_{OVA} 刺激培养第 5 天的 BMDCs, 培养 24 h 后, 依次用猪血清、FITC 标记的兔抗猪 IgG 抗体、APC 抗鼠 OVA₂₅₇₋₂₆₄(SIINFEKL) 肽连接 H-2Kb 抗体孵育细胞。激光共聚焦显微镜对 FMDV 结构蛋白和 OVA₂₅₇₋₂₆₄ 肽进行定位, 结果发现, 仅在 VP3_{OVA173} 蛋白和 VLP_{OVA} 中绿色荧光的结构蛋白和红色荧光的 OVA₂₅₇₋₂₆₄ 肽发生共定位, 而 VP3 蛋白和 VLPs 中只检测到绿色荧光的结构蛋白(图 4), 证明短肽正确嵌入 FMDV VP3, 且随 VP3 蛋白酶切、组装到 VLP_{OVA}。

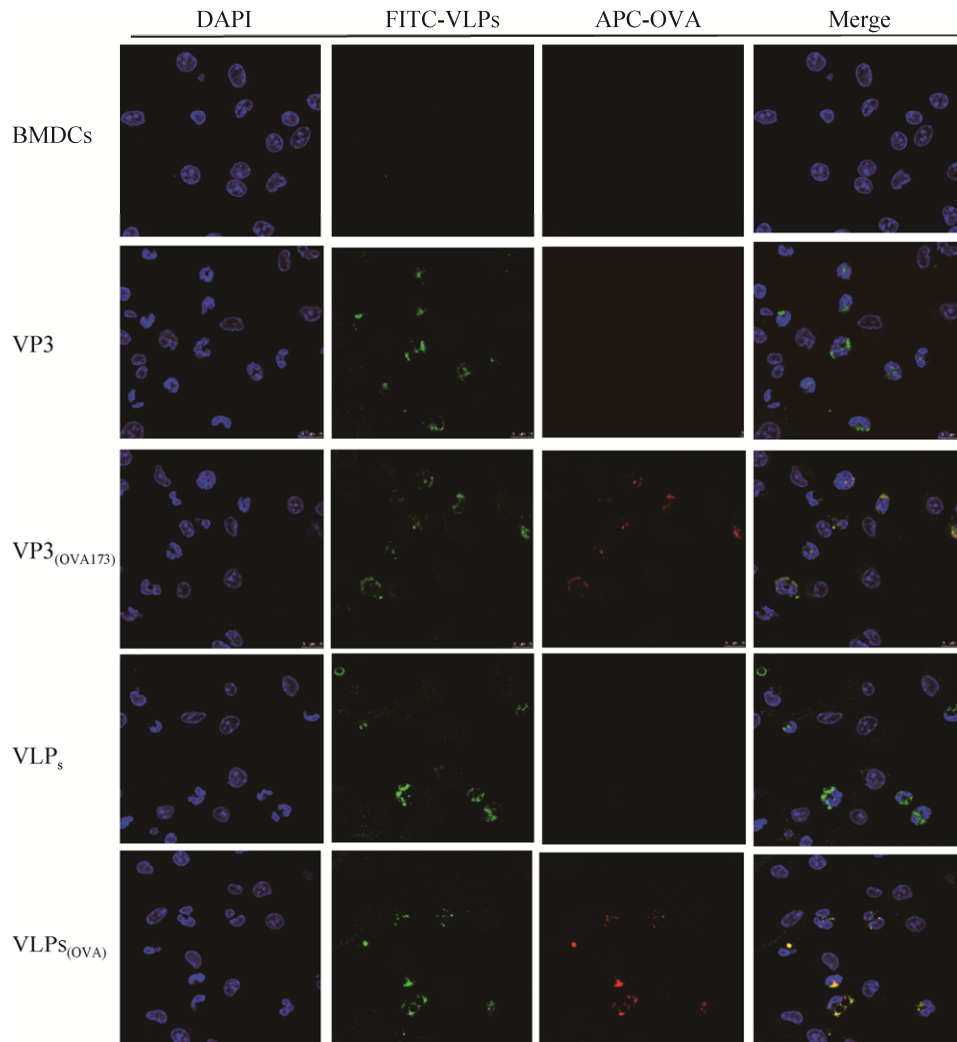


图 4 激光共聚焦显微镜检测 $OVA_{257-264}$ 肽

Fig. 4 Analysis of $OVA_{257-264}$ peptide by LSCM. FMDV proteins are shown in green, $OVA_{257-264}$ peptide are presented in red.

3 讨论

本研究根据大肠杆菌表达特点,对短肽密码子进行优化,以减少该肽对蛋白表达的影响。结果显示,VP3的第173–174 aa嵌入 $OVA_{257-264}$ 并不影响蛋白的表达与VLPs的组装,而在第171–172 aa位点嵌入 $OVA_{257-264}$ 肽后,蛋白的可溶性表达量降低,主要以包涵体形式存在,这可能是外源肽嵌入该位点影响FMDV VP3衣壳蛋白折叠,这与陈冬冬等^[25]构建了插入HA(第171–172位)的基因组全长cDNA,但未能拯救到基因工程毒

的研究结果一致。

FMD疫苗的免疫效力主要源于疫苗所引起的体液免疫反应,即B细胞表位诱导中和抗体的能力^[28]。此外细胞免疫也很重要,但因T细胞不能识别完整天然抗原分子,故需抗原递呈细胞(如树突状细胞)的协助,将抗原由组织相容性复合物递呈到细胞表面。树突状细胞作为FMD疫苗免疫的重要靶细胞,其对调节机体免疫防御和诱发细胞免疫反应至关重要^[29]。Yan等^[30]研究发现,当短肽与 $OVA_{257-264}$ 连接时,可显著增强Clec9a⁺DC激活OVA特异性CD8⁺T细胞的能力,引起

IFN- γ 的高水平分泌和穿孔素、颗粒酶 B mRNA 的高表达。在 B16-OVA 肺转移小鼠模型中, WH-OVA₂₅₇₋₂₆₄ 融合肽还可增强 CD8⁺ T 细胞的活化。CD8⁺ T 细胞具有许多功能, 包括识别和杀死受感染的细胞, 产生促炎性细胞因子, 用于辅助天然免疫细胞消除多种病原体^[31]。Simerska 等^[32] 研究证实, 连接 OVA 的脂质核心肽 (LCP) 可产生持久记忆 CD8⁺ T 细胞应答, OVA₂₅₇₋₂₆₄ 肽可增强抗原特异性 CD8⁺ T 细胞增殖和 IFN- γ 产生。

本研究成功在 FMDV VP3 (第 173–174 aa) 中嵌入外源肽 OVA₂₅₇₋₂₆₄, VLP_{OVA} 的获得证明该位点外源肽的嵌入不影响蛋白的表达和组装, 且 OVA₂₅₇₋₂₆₄ 肽位于 VLP_{OVA} 的表面, 有利于短肽被树突状细胞表面 MHC I 类分子递呈给 CD8⁺ T 细胞, 从而有效激活 CTL 和辅助性 T 细胞, 发挥细胞免疫应答。但其诱导树突状细胞的机制及是否有利于激活机体产生更强的免疫原性有待进一步试验验证。

REFERENCES

- [1] Alexandersen S, Zhang Z, Donaldson AI, et al. The pathogenesis and diagnosis of foot-and-mouth disease. *J Comp Pathol*, 2003, 129(1): 1–36.
- [2] Doel TR, Chong WKT. Comparative immunogenicity of 146S, 75S and 12S particles of foot-and-mouth disease virus. *Arch Virol*, 1982, 73(2): 185–191.
- [3] Knight-Jones TJD, Robinson L, Charleston B, et al. Global foot-and-mouth disease research update and gap analysis: 2-epidemiology, wildlife and economics. *Transbound Emerg Dis*, 2016, 63 Suppl 1: 14–29.
- [4] Robinson L, Knight-Jones TJ, Charleston B, et al. Global foot-and-mouth disease research update and gap analysis: 3-vaccines. *Transbound Emerg Dis*, 2016, 63(Suppl. 1): 30–41.
- [5] Doel TR. FMD vaccines. *Virus Res*, 2003, 91(1): 81–99.
- [6] Buonaguro L, Tornesello M L, Buonaguro FM. Virus-like particles as particulate vaccines. *Curr HIV Res*, 2010, 8(4): 299–309.
- [7] Georgens C, Weyermann J, Zimmer A. Recombinant virus like particles as drug delivery system. *Curr Pharm Biotechnol*, 2005, 6(1): 49–55.
- [8] Zhang LF, Zhou J, Chen S, et al. HPV6b virus like particles are potent immunogens without adjuvant in man. *Vaccine*, 2000, 18(11/12): 1051–1058.
- [9] Belsham GJ, Abrams CC, King AMQ, et al. Myristoylation of foot-and-mouth disease virus capsid protein precursors is independent of other viral proteins and occurs in both mammalian and insect cells. *J Gen Virol*, 1991, 72(3): 747–751.
- [10] Grubman MJG, Lewis SA, Morgan DO. Protection of swine against foot-and-mouth disease with viral capsid proteins expressed in heterologous systems. *Vaccine*, 1993, 11(8): 825–829.
- [11] Terhuja M, Saravanan P, Tamilselvan RP. Comparative efficacy of virus like particle (VLP) vaccine of foot-and-mouth-disease virus (FMDV) type O adjuvanted with poly I:C or CpG in guinea pigs. *Biologicals*, 2015, 43(6): 437–443.
- [12] Burgdorf S, Kautz A, Böhnert V, et al. Distinct pathways of antigen uptake and intracellular routing in CD4 and CD8 T cell activation. *Science*, 2007, 316(5824): 612–616.
- [13] Platt CD, Ma JK, Chalouni C, et al. Mature dendritic cells use endocytic receptors to capture and present antigens. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2010, 107(9): 4287–4292.
- [14] Lipford GB, Hoffman M, Wagner H, et al. Primary in vivo responses to ovalbumin. Probing the predictive value of the Kb binding motif. *J Immunol*, 1993, 150(4): 1212–1222.
- [15] Moffat JM, Cheong WS, Villadangos JA, et al. Hepatitis B virus-like particles access major histocompatibility class I and II antigen presentation pathways in primary dendritic cells. *Vaccine*, 2013, 31(18): 2310–2316.
- [16] Grubman MJ, Baxt B. Foot-and-mouth disease. *Clin Microbiol Rev*, 2004, 17(2): 465–493.
- [17] Seago J, Jackson T, Doel C, et al. Characterization of epitope-tagged foot-and-mouth disease virus. *J Gen Virol*, 2012, 93(11): 2371–2381.
- [18] Lawrence P, Pacheco JM, Uddowla S, et al. Foot-and-mouth disease virus (FMDV) with a stable FLAG epitope in the VP1 G-H loop as a new tool for

- studying FMDV pathogenesis. *Virology*, 2013, 436(1): 150–161.
- [19] Baranowski E, Ruiz-Jarabo CM, Lim F, et al. Foot-and-mouth disease virus lacking the VP1 G-H loop: the mutant spectrum uncovers interactions among antigenic sites for fitness gain. *Virology*, 2001, 288(2): 192–202.
- [20] Wang HW, Xue M, Yang DC, et al. Insertion of type O-conserved neutralizing epitope into the foot-and-mouth disease virus type Asia1 VP1 G-H loop: effect on viral replication and neutralization phenotype. *J Gen Virol*, 2012, 93(7): 442–1448.
- [21] Azuma H, Yoneda S. Structure and dynamics of the GH loop of the foot-and-mouth disease virus capsid. *J Mol Graph Model*, 2009, 28(3): 278–286.
- [22] Curry S, Fry E, Blakemore W, et al. Dissecting the roles of VP0 cleavage and RNA packaging in picornavirus capsid stabilization: the structure of empty capsids of foot-and-mouth disease virus. *J Virol*, 1997, 71(12): 9743–9752.
- [23] Chen DD, Bai XW, Gong XH, et al. Effect of amino acid mutation(s) in the G–H loop of VP3 on biological characteristics of foot-and-mouth disease virus serotype O. *Acta Microbiol Sin*, 2019, 59(7): 1285–1294 (in Chinese).
陈冬冬, 白兴文, 宫晓华, 等. VP3 G–H 环中氨基酸突变对 O 型口蹄疫病毒生物学特性的影响. *微生物学报*, 2019, 59(7): 1285–1294.
- [24] Bai XW, Bao HF, Li PH, et al. Engineering responses to amino acid substitutions in the VP0- and VP3-coding regions of panasia-1 strains of foot-and-mouth disease virus serotype O. *J Virol*, 2019, 93(7): e02278–18.
- [25] Chen DD. Construction and comparative analysis of biological and immunoserological properties of site-directed mutants containing amino acid mutations in VP3 of foot-and-mouth disease virus[D]. Beijing: Chinese Academy of Agricultural Sciences, 2018 (in Chinese).
陈冬冬. 口蹄疫病毒 VP3 定点突变体的构建及其生物学特性和免疫血清学研究[D]. 北京: 中国农业科学院, 2018.
- [26] Guo HC, Sun SQ, Jin Y, et al. Foot-and-mouth disease virus-like particles produced by a SUMO fusion protein system in *Escherichia coli* induce potent protective immune responses in guinea pigs, swine and cattle. *Vet Res*, 2013, 44: 48.
- [27] Du P, Liu RH, Sun SQ, et al. Biomineralization improves the thermostability of foot-and-mouth disease virus-like particles and the protective immune response induced. *Nanoscale*, 2019, 11(47): 22748–22761.
- [28] Bachrach HL, Moore DM, McKercher PD, et al. Immune and antibody responses to an isolated capsid protein of foot-and-mouth disease virus. *J Immunol*, 1975, 115(6): 1636–1641.
- [29] Bayry J, Tough DF. Interaction of foot-and-mouth disease virus with dendritic cells. *Trends Microbiol*, 2006, 14(8): 346–347.
- [30] Yan ZY, Wu YH, Du JF, et al. A novel peptide targeting Clec9a on dendritic cell for cancer immunotherapy. *Oncotarget*, 2016, 7(26): 40437–40450.
- [31] Zhang N, Bevan MJ. CD8⁺ T cells: foot soldiers of the immune system. *Immunity*, 2011, 35(2): 161–168.
- [32] Simerska P, Suksamran T, Ziora ZM, et al. Ovalbumin lipid core peptide vaccines and their CD4⁺ and CD8⁺ T cell responses. *Vaccine*, 2014, 32(37): 4743–4750.

(本文责编 郝丽芳)