

• 动物及兽医生物技术 •

表达 O 型口蹄疫病毒衣壳蛋白的重组腺病毒构建及其免疫原性分析

王灿灿, 张莉萍, 刘新生, 周鹏, 潘丽, 王永录

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

王灿灿, 张莉萍, 刘新生, 周鹏, 潘丽, 王永录. 表达 O 型口蹄疫病毒衣壳蛋白的重组腺病毒构建及其免疫原性分析. 生物工程学报, 2022, 38(5): 1824-1836.

WANG CC, ZHANG LP, LIU XS, ZHOU P, PAN L, WANG YL. Construction of recombinant adenovirus expressing capsid protein of serotype O foot-and-mouth disease virus and analysis of its immunogenicity. Chin J Biotech, 2022, 38(5): 1824-1836.

摘要: 为构建表达 O 型口蹄疫病毒 (foot-and-mouth disease virus, FMDV) 衣壳蛋白的复制缺陷型人 5 型腺病毒 (Ad5) 为载体的重组腺病毒, 本研究设计、合成特异性引物并扩增出 FMDV-OZK93 的 *P12A*、*3B3C* 基因, 通过融合 PCR 方法连接 2 个片段, 获得 *P12A3B3C* 基因后插入到 pDC316-mCMV-EGFP 质粒, 构建了能够表达 FMDV-OZK93 株衣壳蛋白前体 P12A 和 3B3C 蛋白酶的重组穿梭质粒 pDC316-mCMV-EGFP-P12A3B3C。利用 AdMaxTM 腺病毒包装系统进行重组腺病毒 rAdv-P12A3B3C-OZK93 的包装、鉴定及扩增; 并感染人胚胎肾细胞 HEK-293 进行表达验证。将鉴定正确且高度纯化后的重组腺病毒肌肉免疫小鼠进行免疫原性分析。结果显示, rAdv-P12A3B3C-OZK93 在病毒传代过程中目的基因稳定存在, 且病毒滴度可达 $1 \times 10^{9.1}$ TCID₅₀/mL。间接免疫荧光和 Western blotting 结果均表明 rAdv-P12A3B3C-OZK93 在 HEK-293 细胞中表达了 FMDV 特异性蛋白 P12A 和 VP1。PK 细胞感染实验证明 rAdv-P12A3B3C-OZK93 可感染猪源细胞, 这为构建的 rAdv-P12A3B3C-OZK93 用于猪对抗 FMDV 的免疫与保护奠定了基础。相比于 FMDV 灭活疫苗免疫的小鼠, 重组腺病毒免疫小鼠后可诱导机体产生更高水平的 FMDV 特异性抗体以及 γ -IFN 和 IL-10 应答反应, 表明该重组腺病毒可对动物机体产生良好的免疫原性, 为后续研制新型口蹄疫活载体疫苗奠定了重要基础。

关键词: O 型口蹄疫病毒; 重组腺病毒; P12A 和 3B3C; 免疫原性

Received: December 8, 2021; Accepted: February 21, 2022

Corresponding authors: LIU Xinsheng. E-mail: liuxinsheng@caas.cn
WANG Yonglu. E-mail: wangyonglu@caas.cn

Construction of recombinant adenovirus expressing capsid protein of serotype O foot-and-mouth disease virus and analysis of its immunogenicity

WANG Cancan, ZHANG Liping, LIU Xinsheng, ZHOU Peng, PAN Li, WANG Yonglu

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

Abstract: In order to construct a recombinant replication deficient human type 5 adenovirus (Ad5) expressing a foot-and-mouth disease virus (FMDV) capsid protein, specific primers for *P12A* and *3B3C* genes of FMDV-OZK93 were synthesized. The *P12A* and *3B3C* genes were then amplified and connected by fusion PCR, and a recombinant shuttle plasmid pDC316-mCMV-EGFP-P12A3B3C expressing the FMDV-OZK93 capsid protein precursor P12A and 3B3C protease were obtained by inserting the *P12A3B3C* gene into the pDC316-mCMV-EGFP plasmid. The recombinant adenovirus rAdv-P12A3B3C-OZK93 was subsequently packaged, characterized and amplified using AdMaxTM adenovirus packaging system, and the expression was verified by infecting human embryonic kidney cell HEK-293. The humoral and cellular immunity levels of well-expressed and purified recombinant adenovirus immunized mice were evaluated. The results showed that rAdv-P12A3B3C-OZK93 could be stably passaged and the maximum virus titer reached $1 \times 10^{9.1}$ TCID₅₀/mL. Western blotting and indirect immunofluorescence showed that rAdv-P12A3B3C-OZK93 expressed the FMDV-specific proteins P12A and VP1 in HEK-293 cells. In addition, the PK cell infection experiment confirmed that rAdv-P12A3B3C-OZK93 could infect porcine cells, which is essential for vaccination in pigs. Comparing with the inactivated vaccine group, the recombinant adenovirus could induce higher FMDV-specific IgG antibodies, γ -IFN and IL-10. This indicates that the recombinant adenovirus has good immunity for animal, which is very important for the subsequent development of foot-and-mouth disease vaccine.

Keywords: FMDV serotype O; recombinant adenovirus; P12A and 3B3C; immunogenicity

口蹄疫 (foot-and-mouth disease, FMD), 又称口疮热, 是由口蹄疫病毒 (foot-and-mouth disease virus, FMDV) 引起的一种人畜共患的急性、热性、高度接触性传染病^[1]。FMDV 属于小 RNA 病毒科 (Picornaviridae)、口疮病毒属 (*Aphthovirus*)。FMDV 呈球形, 正二十面体对称, 直径 25–30 nm, 无囊膜, 由约 8 500 bp 的单股

正链 RNA 和衣壳蛋白组成, 基因组 RNA 包含 5'非编码区 (untranslation region, UTR)、3'-UTR 和开放阅读框 (open reading frame, ORF) 3 个部分^[2]。ORF 编码一个大的多聚蛋白, 可被病毒蛋白酶切割成 4 种结构蛋白 (VP4、VP2、VP3、VP1) 和 8 种非结构蛋白 (L、2A、2B、2C、3A、3B、3C、3D), 其中各 60 个分子的 4 种

结构蛋白组成病毒粒子的衣壳, 8 种非结构蛋白调节宿主中的病毒复制、蛋白质加工和蛋白质修饰^[3]。蛋白酶有前导蛋白 L、2A、3C 和未知酶类, 其中 3C 蛋白酶 (3C^{pro}) 在 FMDV 结构蛋白的切割中起着十分重要的作用。病毒翻译和修饰过程中, FMDV 衣壳蛋白前体 P12A 被 3C^{pro} 切割, 产生 1AB (VP0)、1C (VP3)、1D (VP1) 和 2A, 基因组组装过程中 VP0 被 3C^{pro} 进一步裂解为 VP2 和 VP4^[2]。在病毒粒子的装配过程中, VP0、VP3 和 VP1 先形成 5S 原体, 再形成 14S 的五聚体, 最后由 12 个五聚体组装成 75S 的 FMDV 空衣壳^[4-5]。FMDV 空衣壳具有与完整的 FMDV 146S 抗原非常相似的抗原特异性, 能够引起相似的抗体反应^[6-7], 而且不含病毒基因, 安全性好不存在散毒风险。

FMDV 宿主种类多, 分布广泛, 遗传突变率高, 抗原差异性大, 主要有 7 种血清型 (O、A、C、SAT1、SAT2、SAT3 和 Asia 1) 和 100 多种血清亚型^[8]。7 种血清型间无交叉免疫, 即使是同一血清型的不同亚型之间也只有部分交叉免疫^[2]。FMDV 各血清型在世界范围内不均匀分布, O 型是 FMDV 血清型中分布最广泛的, 尤其是在亚洲更为盛行^[9]。疫苗接种是特异性预防 FMD 的主要手段, 但 FMDV 的多变性和多态性给 FMD 的防治带来了很大的困难^[10]。目前, 传统灭活疫苗在 FMD 防控上仍发挥着至关重要的作用^[11]。然而传统灭活疫苗存在许多不足, 包括遇热不稳定、免疫持续时间短、难以对感染动物和免疫动物进行鉴别诊断、病毒逃逸和不完全灭活导致动物机体感染等^[12]。这促使研究工作者们寻求一种更安全、更有效的 FMDV 疫苗。新型分子疫苗技术的发展为 FMD 分子疫苗的构建提供了新的策略, 重组活病毒载体疫苗是分子疫苗研究的重要组成部分, 利用腺病毒作为载体构建表达 FMDV 空衣壳的重组疫苗已

被广泛研究^[13-15]。

复制缺陷型人 5 型腺病毒具有以下优势: 在腺病毒基因组的特定区域插入外源基因后仍能正常地表达且在接种动物体内不进行复制; 重组腺病毒可以达到很高的滴度, 免疫接种途径多样化, 具有口服疫苗的发展前景; 携带保护性抗原基因的腺病毒载体能刺激机体产生强烈的体液和细胞免疫应答等^[16-18]。根据 Barrera 等^[19]的报道, 复制缺陷型人 5 型腺病毒载体制备的 FMDV 重组腺病毒疫苗可以在猪源细胞中高效表达。美国梅岛实验室的试验证明, 使用免疫原性强的毒株所构建的表达 FMDV-P12A3B3C 蛋白的重组腺病毒疫苗可以对猪产生高达 100% 的免疫保护效果^[20]。腺病毒特异性抗体主要由其早期蛋白编码区 E1 和 E3 诱导产生, 而复制缺陷型腺病毒载体中 E1 和 E3 缺失, 因此降低了免疫排斥的可能性^[21]。本研究以本实验室保存的国内免疫原性较好的 O 型 FMDV 经典灭活疫苗毒株 OZK93 为亲本毒株, 旨在构建表达 O 型 FMDV 衣壳蛋白前体 P12A 和 3B3C 蛋白酶的重组腺病毒 rAdv-P12A3B3C-OZK93, 并且进行动物免疫实验评价重组腺病毒的免疫原性, 为 O 型 FMDV 重组腺病毒疫苗的研究奠定了基础。

1 材料与方法

1.1 质粒、菌株、细胞、病毒和动物

腺病毒骨架质粒 pBHGlox (delta) E1, 3Cre 和腺病毒穿梭质粒 pDC316-mCMV-EGFP, 购自北京庄盟国际生物基因科技有限公司; 感受态 *stb13*, 购自北京全式金生物技术有限公司; 人胚胎肾细胞 293 (HEK-293) 由本实验室保存; 对照腺病毒 (WtAdv) 于本次试验中获得; 对照牛 O 型 FMDV 灭活病毒由口蹄疫国家创新实验室保存。BALB/c 小鼠由中国农业科学院兰州兽

医研究所提供,并根据中华人民共和国动物伦理程序规范进行处理,该研究获得了中国农业科学院兰州兽医研究所动物伦理委员会(编号:LVR1AEC2017003)批准。

1.2 主要试剂

PrimeSTAR[®] GXL DNA Polymerase、*Not* I 和 *Afl* II 限制性内切酶、Adeno-XTM Maxi Purification Kit 均购自 TaKaRa 公司; T4 DNA 连接酶购自 NEB 公司; 质粒提取试剂盒购自 Omega 公司; Lipofectamine 3000 购自美国 Thermo Fisher Science 公司; O 型 FMDV 抗 VP1 单克隆抗体 (MAb) 由本实验室制备; TRITC 标记的羊抗兔 IgG (TRITC-IgG) 和辣根过氧化物酶 HRP 标记山羊抗兔 IgG (HRP-IgG) 购自 Abcam 公司; DNA 提取试剂盒购自 Omega Bio-Tek 安诺伦 (北京) 生物科技有限公司; 小鼠 IL-10 ELISA、IFN- γ ELISA 试剂盒购自欣博盛生物科技有限公司; O 型口蹄疫液相阻断试剂盒由 LVRI 诊断中心提供。

1.3 重组腺病毒载体的构建

NCBI 上比对 FMDV-OZK93 毒株与 type O isolate WFL (GenBank: EF175732.1) 毒株 VP1 序列发现序列相似性达 99% 以上,因此参照 type O isolate WFL 毒株 P12A、3B3C 序列比对获得 FMDV-OZK93 基因组的 *P12A*、*3B3C* 基因片段。使用 Primer Premier 6.0 设计引物,上游

5' 端加入 *Not* I 酶切位点及 Kozak 序列 5'-GCCGCCACC-3', 3' 端加入 *Afl* II 酶切位点,引物序列如表 1 所示,由生工生物工程 (上海) 股份有限公司合成。以质粒 pEASY[®]-Blunt Zero-FMDV-OZK93 为模板,PCR 分别扩增 OZK93 的 *P12A*、*3B3C* 基因片段,利用融合 PCR 方法使 2 个片段融合成 *P12A3B3C* 后再插入到 pDC316 上,构建表达绿色荧光蛋白 (enhanced green fluorescent protein, EGFP) 的 FMDV 重组腺病毒穿梭质粒 pDC316-mCMV-EGFP-P12A3B3C-OZK93。将经 *Not* I 和 *Afl* II 双酶切鉴定的构建成功的阳性质粒送至上海生工生物工程股份有限公司进行序列测定。

1.4 重组腺病毒的包装

利用 AdMaxTM 腺病毒包装系统进行重组腺病毒的包装。将 1 μ g 穿梭质粒 pDC316-mCMV-EGFP-P12A3B3C-OZK93 与 4 μ g 腺病毒骨架质粒 (pBHGlox (delta) E1,3Cre) 共转染至对数期的 HEK-293 细胞,通过特异性位点重组完成重组腺病毒的包装。FMDV 重组腺病毒的构建如图 1 所示。转染参照 Lipofectamine 3000 转染试剂盒说明书进行,之后置于 5% CO₂、37 $^{\circ}$ C 细胞培养箱中持续培养 5-7 d,观察到细胞出现明显的细胞病变效应 (cytopathic effect, CPE) 后视为成功包装出重组腺病毒 rAdv-P12A3B3C-OZK93。

表 1 文中所用引物序列

Table 1 Primer sequences in this study

Primer name	Primer sequence (5'→3')	Size (bp)
P12A-F	ATGCGGCCGCGCCGCCACCATGGGCGCCGGGCAATCCAGCCCGACC	46
P12A-R	AGTGGCCCAGCGTACCCAGGGTTGGACTCAAC	32
3BC-F	TGAGTCCAACCCTGGGTACGCTGGGCCACT	30
3BC-R	AAGCTTAAGTCACTCGTGGTGTGGTTCGGGGTTCG	34

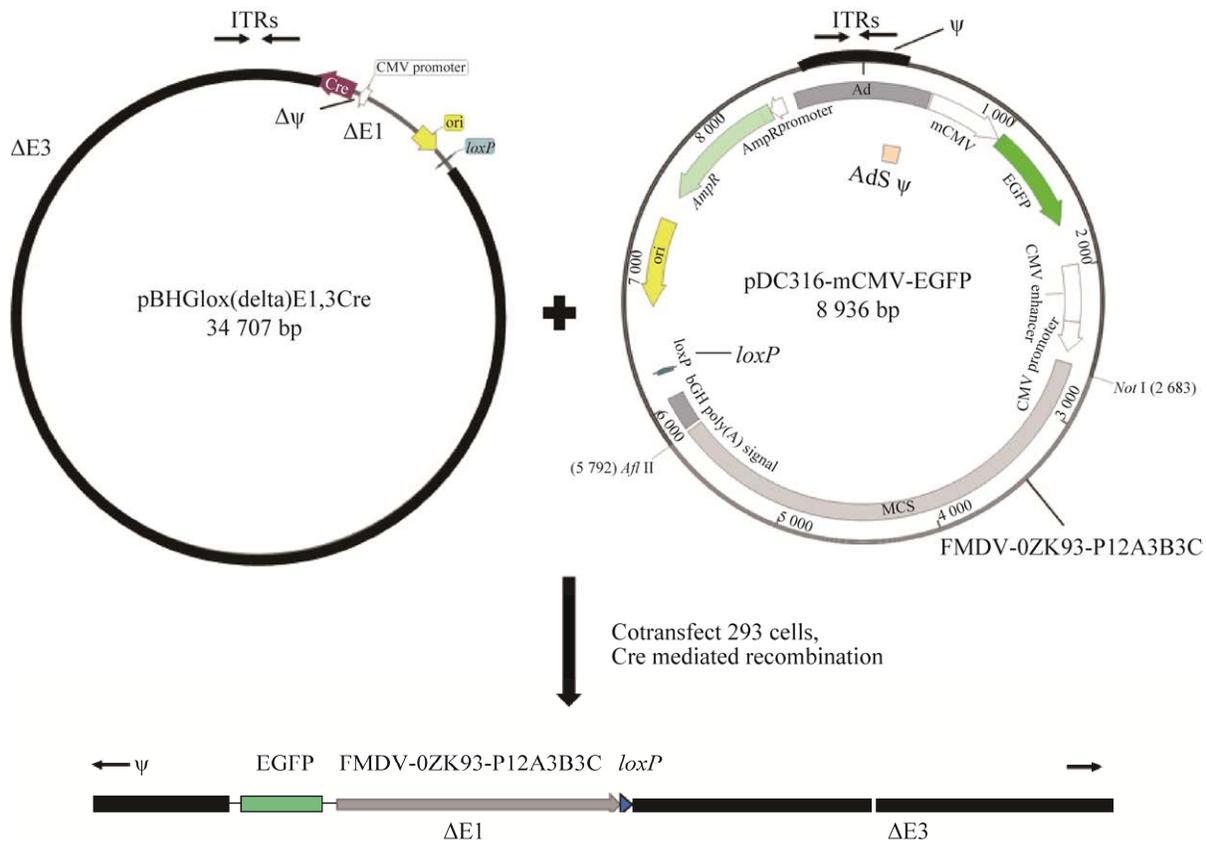


图1 表达O型FMDV衣壳蛋白重组腺病毒的构建示意图

Figure 1 Schematic diagram of the recombinant adenovirus expressing capsid protein of serotype O foot-and-mouth disease virus.

1.5 重组腺病毒鉴定

1.5.1 PCR 鉴定

使用DNA提取试剂盒提取P3、P5、P7代rAdv-P12A3B3C-OZK93的DNA，WtAdv作为阴性对照，pDC316通用引物(pDC316-F:5'-ACGTGGGTATAAGAGGCG-3'和pDC316-R:5'-CGATGCTAGACGATCCAG-3')扩增rAdv-P12A3B3C-OZK93中靶基因P12A3B3C，检测该基因在rAdv-P12A3B3C-OZK93中的稳定性。

1.5.2 Western blotting 检测

收集P3、P5、P7代rAdv-P12A3B3C-OZK93感染的HEK-293细胞蛋白，将样品进行SDS-PAGE电泳，湿转(90 V, 1.5 h)至硝酸纤维素膜上(NC膜)，5%脱脂奶粉封闭2 h，以

MAb O-BY-VP1为一抗(1:1 000)孵育2 h，PBST洗膜，以山羊抗兔HRP-IgG为二抗(1:10 000)孵育1 h，PBST洗膜后加入ECL发光液在蛋白印迹成像仪中进行Western blotting分析。同时设立牛源FMDV全病毒蛋白作为阳性对照，WtAdv感染的HEK-293细胞作为阴性对照。

1.5.3 猪源细胞(PK细胞)感染试验

将具有感染能力的P7代rAdv-P12A3B3C-OZK93以MOI=10接种于PK细胞，24 h后，通过绿色荧光蛋白表达情况判断其感染程度。

1.5.4 VP1蛋白表达鉴定-间接免疫荧光试验(IFA)

将具有感染能力的P7代rAdv-P12A3B3C-

OZK93 以 MOI=10 接种于培养在六孔板的单层 PK 细胞, 分别在 12、24、36 h 收样, 使用 4% 细胞固定液 4 °C 过夜固定感染细胞。以 MAb O-BY-VP1 为一抗 (1 : 1 000), 以山羊抗兔 TRITC-IgG (1 : 1 000) 为二抗进行 IFA 检测。

1.6 重组腺病毒纯化及滴度测定

重组腺病毒使用 Adeno-X™ Maxi Purification Kit 按照说明书进行纯化, 纯化后的重组腺病毒接种于培养在 96 孔板的 HEK-293 细胞, 使用 50% 组织细胞感染 (TCID₅₀) 测定法测定病毒滴度。

1.7 小鼠肌肉免疫

将 20 只 6 周龄雌性 BALB/c 小鼠随机分成 4 组 (每组 5 只): G1 组 (实验组)、G2 组 (阴性对照)、G3 组 (阴性对照)、G4 组 (空白对照), 按照表 2 所述进行免疫。并分别于免疫后 14 d 和 28 d 用相同剂量加强免疫。免疫采用后大腿内侧肌肉注射 100 μL/只, 每组免疫后每 7 天眼眶静脉丛采血并分离血清后储存在 -80 °C 冰箱中备用。

1.7.1 小鼠特异性 IgG 的检测与 IL-10、γ-IFN 测定

使用 O 型 FMDV 液相阻断 ELISA 试剂盒 (LPB-ELISA) 检测免疫小鼠血清中的 FMDV 特异性免疫球蛋白 G (IgG) 抗体。小鼠 γ-IFN 和 IL-10 测定根据 γ-IFN ELISA、IL-10 ELISA 试剂盒中制造商的方案进行, 即先进行标准品

的测定完成标准曲线的绘制, 之后测定各样品吸光度, 根据绘制的标准曲线计算出各样品中的 γ-IFN/IL-10 的浓度。

1.7.2 淋巴细胞分离与增殖试验

小鼠第 1 次免疫 42 d 后, 无菌摘除眼球采血后处死。剪开小鼠腹部, 取出脾脏浸泡于含有 1 mL PBS 溶液的培养皿 (35 mm² dish) 中。无菌注射器研磨后滤过细胞筛, 细胞悬浮在培养皿溶液后使用淋巴细胞分离试剂盒完成淋巴细胞分离。MTT 实验进行 T 淋巴细胞增殖检测。将分离的淋巴细胞重悬至含有 10% FBS 和 1% 青霉素/链霉素的 RPMI 1640 培养基中, 调整细胞数至 1×10⁶ 个/mL, 以 50 μL/孔铺到 96 孔板中。采用刀豆球蛋白 A (阳性刺激)、灭活的 O 型 FMDV 146S 抗原和完全 RPMI 1640 培养基 (阴性刺激) 50 μL/孔分别刺激细胞, 每孔 3 个重复, 每种刺激的终浓度为 10 μg/mL。37 °C、5% CO₂ 孵育 72 h 后, 测定各组 OD 值。刺激指数是受刺激组与未受刺激组在 490 nm 波长处的 OD 值之比。

1.7.3 统计分析

在 SPSS Statistics 26 中, 对两组试验进行不配对的 *t* 检验、单因素方差分析和 Bonferroni posttest (邦弗朗尼 (Bonferroni) 事后检定/检验法)。显著差异被定义为 $P \leq 0.05$, 其中 * 表示 $0.01 < P \leq 0.05$; ** 表示 $0.001 < P \leq 0.01$; *** 表示 $0.0001 < P \leq 0.001$ 。

表 2 小鼠免疫方案

Table 2 Immunization programs of mice

Groups ^a	Treatments	Dose	First vaccination days	Second vaccination days	Third vaccination days
G1	rAdv-P12A3B3C-OZK93	1×10 ^{6.5} TCID ₅₀ ^b	0	14	28
G2	Inactivated vaccine ^c	100 μL	0	14	28
G3	WtAdv	1×10 ^{6.5} TCID ₅₀	0	14	28
G4	PBS	100 μL	0	14	28

^a: group of immunized mice; ^b: tissue culture infectious dose 50; ^c: commercial inactivated type O FMDV vaccine.

2 结果与分析

2.1 重组腺病毒载体的构建与双酶切鉴定

使用设计的特异性引物, PCR 扩增获得大小约为 2 278 bp 和 846 bp 的两个条带, 这与 FMDV-OZK93 的 *P12A*、*3B3C* 基因片段大小一致, 利用融合 PCR 方法使两个片段融合成 *P12A3B3C* (图 2A), 之后插入到 pDC316。为了证实构建的 FMDV 重组腺病毒穿梭质粒中 *P12A3B3C* 基因的正确插入, 使用 *Not* I 和 *Afl* II 限制性内切酶双酶切法鉴定阳性克隆 pDC316-mCMV-EGFP-*P12A3B3C*-OZK93 (图 2B)。序列测定结果与靶基因 100% 符合, 表明成功构建了 FMDV-OZK93 的 *P12A3B3C* 重组腺病毒载体。

2.2 重组腺病毒 rAdv-*P12A3B3C*-OZK93 的包装

转染 5 d 17 h 后观察到 HEK-293 细胞出现明显的 CPE 特征 (细胞表现为变大、变圆、脱落), 证明成功包装出重组腺病毒 rAdv-*P12A3B3C*-OZK93。于 $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ 冰箱和

$37\text{ }^{\circ}\text{C}$ 水浴锅中反复冻融 3 次后收毒, 该重组腺病毒为 P0 代, 依次以 MOI=10 连续传代至 P10 代。重组腺病毒前 3 代荧光弱, 随着传代次数的增加, 荧光逐渐增强 (图 3A)。当重组腺病毒在 HEK-293 细胞上扩增时, 病毒滴度随着病毒的传代从 $10^{3.4}$ 增加到 $10^{9.1}$, 证明病毒传代可增强其感染力 (图 3B)。在传至第 5 代时, 随着时间的变化, 荧光也随之变强, 与之对应的 12 h、24 h、36 h CPE 也越来越明显, 细胞在接种病毒后 24–36 h 完全出现 CPE 与 WtAdv 对照组保持一致, 而空白对照组 HEK-293 细胞完整, 形态规则, 无荧光 (图 4)。

2.3 重组腺病毒 rAdv-*P12A3B3C*-OZK93 的鉴定

2.3.1 目的基因稳定性验证

收获 P3、P5、P7 代的 rAdv-*P12A3B3C*-OZK93 提取出相应 DNA 后, 进行 PCR 扩增, 结果显示在不同代次的重组腺病毒基因组中均扩增出约 3 114 bp 的 PCR 产物 (图 5), 与靶基因 *P12A3B3C* 的片段大小保持一致, 并经过测序

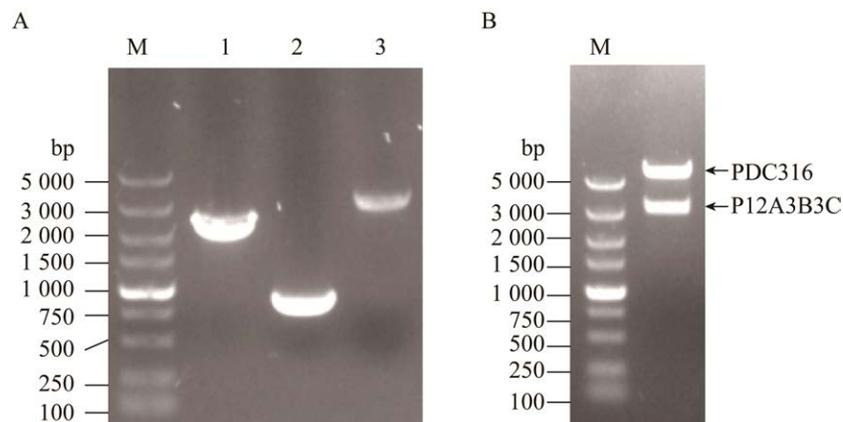


图 2 重组载体 pDC316-mCMV-EGFP-*P12A3B3C*-OZK93 的构建 (A) 以及双酶切鉴定 (B)

Figure 2 Construction and identification of the recombinant plasmid pDC316-mCMV-EGFP-*P12A3B3C*-OZK93. (A) M was 5 000 bp ladder Marker. Lane 1: the PCR product of FMDV-OZK93-*P12A* (2 278 bp). Lane 2: the PCR product of FMDV-OZK93-*3B3C* (846 bp); Lane 3: the fusion PCR product *P12A3B3C* (3 114 bp). (B) The recombinant plasmid pDC316-mCMV-EGFP-*P12A3B3C*-OZK93 were identified by restriction enzyme digestion (pDC316 was 5 879 bp).

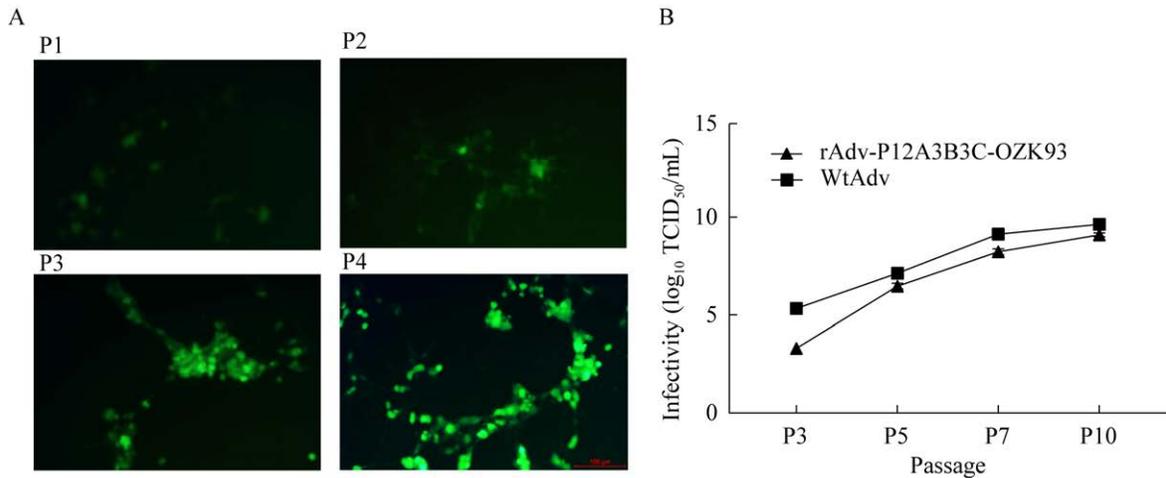


图 3 细胞接毒传代荧光强度变化 (P1、P2、P3、P4 代) (A) 及不同代次 (P3、P5、P7、P10 代) 重组腺病毒的病毒滴度测定 (B)

Figure 3 Changes of the fluorescence intensity in 1, 2, 3 and 4 passages (A) and the viral titers identification in 3, 5, 7 and 10 passages (B).

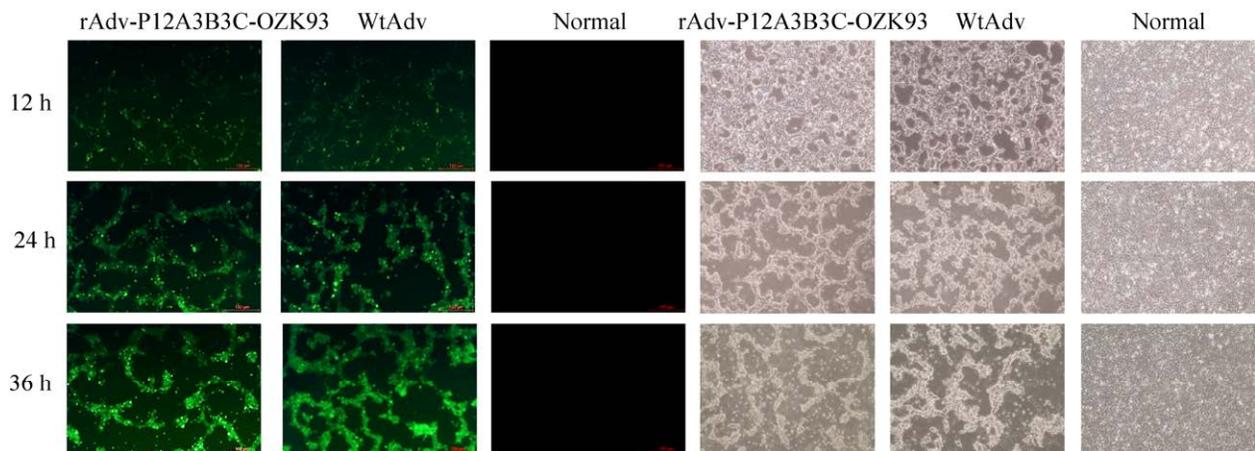


图 4 P5 代 rAdv-P12A3B3C-OZK93 感染 HEK-293 细胞不同时间荧光强度及 CPE 变化

Figure 4 The fluorescence intensity and CPE of the P5 rAdv-P12A3B3C-OZK93 infected HEK-293 cells. WtAdv was used as a positive control; normal HEK-293 cell was used as a negative control.

(由生工生物工程(上海)股份有限公司上海测序部完成)显示与靶基因序列 100%符合,这表明靶基因 *P12A3B3C* 被重组腺病毒稳定遗传。

2.3.2 目的蛋白表达稳定性鉴定

为了确认 *P12A3B3C* 基因的正确表达,使用 P3、P5、P7 代 rAdv-P12A3B3C-OZK93 感染 HEK-293 细胞 36 h 后收取蛋白样品,用 Western blotting 鉴定其靶蛋白的正确表达, O 型灭活 FMDV 146S 被用作阳性对照。结果显示:检测到了与灭活的 FMDV 146S 的 VP1/VP3 阳性对

照一致的约 23/27 kDa 条带以及约 82 kDa 的 P12A 的条带(图 6)。

2.3.3 口蹄疫重组腺病毒 PK 细胞感染实验以及间接免疫荧光鉴定

rAdv-P12A3B3C-OZK93 接种到 PK 细胞后 24 h 观察到有大量荧光蛋白被表达, IFA 结果显示, rAdv-P12A3B3C-OZK93 感染的 PK 细胞成功表达 VP1 蛋白,而阴性对照 WtAdv 不表达(图 7)。这表明 rAdv-P12A3B3C-OZK93 可以感染猪源细胞并能成功表达。

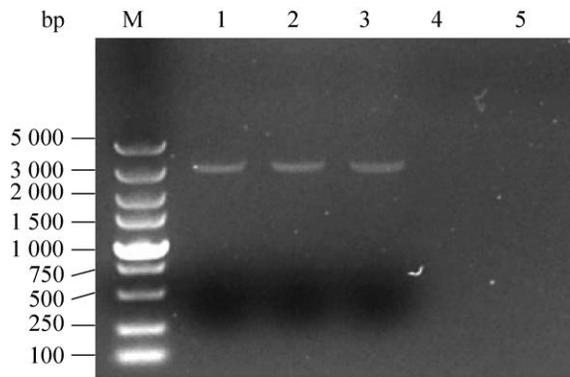


图5 PCR鉴定不同代次的rAdv-P12A3B3C-OZK93中目的基因稳定存在

Figure 5 Stable existence of the target gene in different generations of rAdv-P12A3B3C-OZK93 identified by PCR. M was 5 000 bp ladder marker. Lane 1–3: the PCR product of the 3th, 5th, 7th passage of the rAdv-P12A3B3C-OZK93-P12A3B3C (3 114 bp); lane 4: WtAdv were used as a negative control; lane 5: normal HEK-293 cell were used as a blank control.

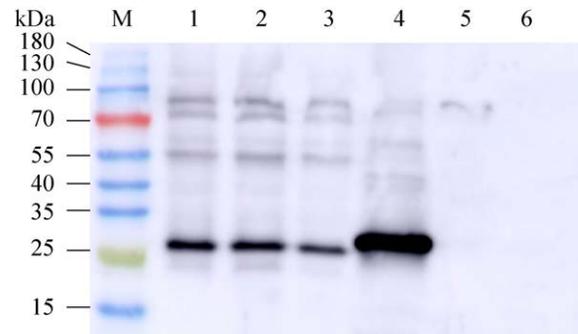


图6 Western blotting分析rAdv-P12A3B3C-OZK93感染HEK-293细胞36 h后目的蛋白的表达情况

Figure 6 Expression of target protein in rAdv-P12A3B3C-OZK93 infected HEK-293 cells were analyzed by Western blotting. M was 180 kDa ladder marker. Lane 1–3: the HEK-293 cells infected with 3th, 5th, 7th passage of the rAdv-P12A3B3C-OZK93; lane 4: FMDV (146S) used as a positive control; lane 5: WtAdv used as a negative control; lane 6: normal HEK-293 cell used as a blank control.

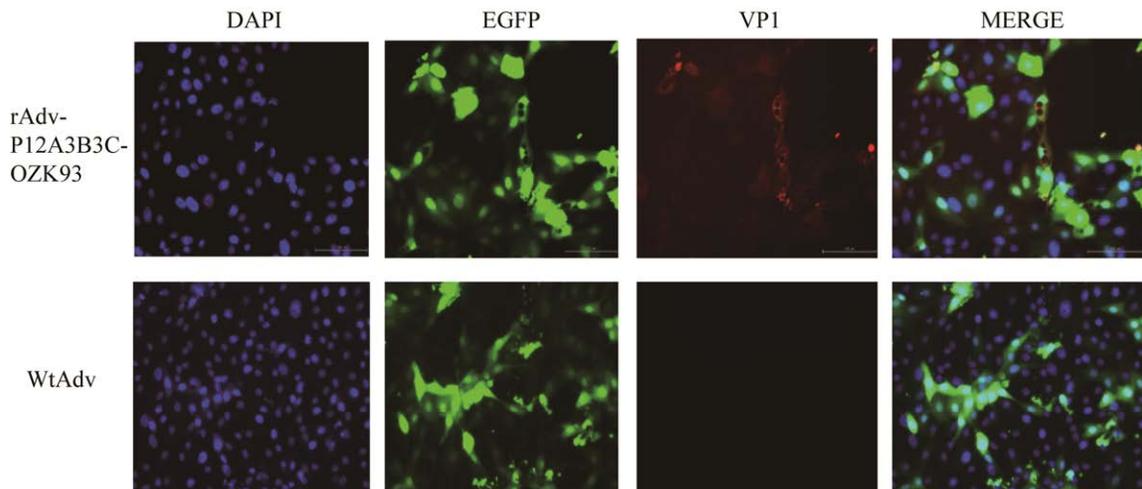


图7 IFA检测重组腺病毒rAdv-P12A3B3C-OZK93感染的PK细胞

Figure 7 The recombinant adenovirus rAdv-P12A3B3C-OZK93 infected PK cells were detected by IFA. Upper panel: PK cells infected with rAdv-P12A3B3C-OZK93; lower panel: PK cells infected with WtAdv.

2.4 肌肉免疫诱导小鼠产生高滴度抗FMDV抗体和一定水平的细胞免疫应答

为了评价免疫的小鼠抗FMDV抗体产生情况, LPB酶联免疫吸附试验检测了小鼠血清中IgG抗体滴度。rAdv-P12A3B3C-OZK93和FMD

灭活疫苗免疫组所有小鼠均在14 d时产生高滴度抗体,与WtAdv组相比具有显著性差异($P < 0.001$),且rAdv-P12A3B3C-OZK93诱导的抗体应答比FMD灭活疫苗高(图8A),这两组在42 d时诱导最高的抗体应答(重组腺病毒抗体效价1:512),

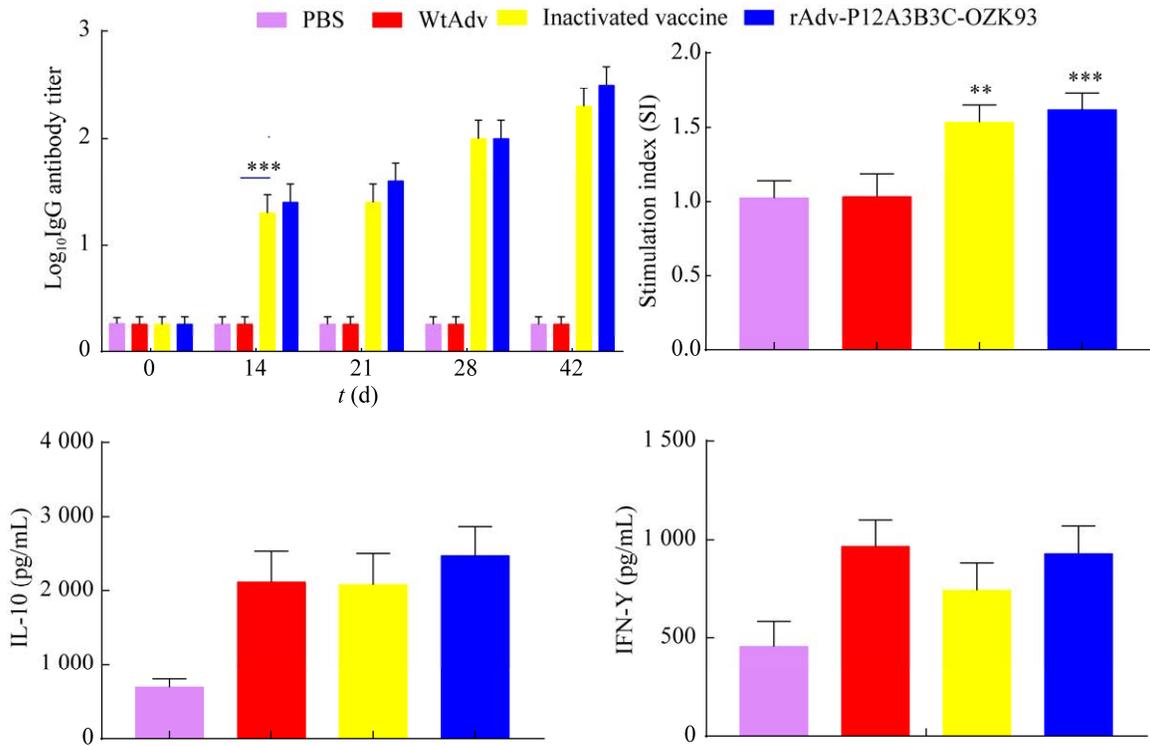


图8 重组腺病毒 rAdv-P12A3B3C-OZK93 免疫小鼠诱发的抗 FMDV 特异性抗体应答反应及细胞免疫反应

Figure 8 Specific anti-FMDV humoral and cellular immune responses of the rAdv-P12A3C-OZK93 vaccinated mice. (A) The antibodies against serotype O FMDV were measured with LPB-ELISA. (B) Mean stimulation index (SI) of mice immunized with PBS, WtAdv, inactivated FMDV vaccine, rAdv-P12A3CWT-OZK93 after 42 dpi. Results are presented as means SD ($n=3$). (C) Levels of mouse cytokine IL-10. (D) Levels of mouse γ -IFN.

这些结果表明 rAdv-P12A3B3C-OZK93 诱导产生高的抗 FMDV 抗体。用 MTT 法评估 T 淋巴细胞增殖反应, 用 rAdv-P12A3CWT-OZK93 或 FMD 灭活疫苗处理的小鼠组明显高于对照组的淋巴细胞增殖 (图 8B)。IL-10/ γ -IFN 检测结果显示, rAdv-P12A3B3C-OZK93 或 FMD 灭活疫苗免疫小鼠在 42 d 时诱导高浓度 IL-10 (2 811 pg/mL) 和 γ -IFN (1 091 pg/mL) 产生, 显著性高于 PBS 免疫组 ($P<0.001$; 图 8C 和 D)。

综上所述, 重组腺病毒诱导了针对 FMDV 的高水平的体液免疫应答和一定水平的细胞免疫应答。

3 讨论

研究表明, O 型 FMDV 是世界范围内分布最广、最重要的血清型之一, 是中国、韩国、泰国、日本和越南等地区 FMD 暴发的重要诱因^[22-23]。因此, 在这些地区预防和控制 O 型 FMDV 显得极为重要。FMD 灭活疫苗在 FMD 的预防和控制中发挥了相当重要的作用^[24]。然而, 传统的灭活疫苗仍旧有一些不足。近些年, 新型替代疫苗的开发得到了广泛的探索。一些研究证实了表达不同血清型的 P12A 和 3C 蛋白的重组腺病毒的保护作用^[25-26]。美国梅岛动物

疾病中心一直致力于用人 5 型复制缺陷型腺病毒表达 FMDV 的衣壳, 该中心所构建的携带 FMDV *P12A3B3C* 基因的重组腺病毒免疫猪后, 可以对猪产生 100% 的免疫保护效果^[20]。然而国内仍未见 FMDV *P12A3B3C* 基因重组腺病毒报道, 因此本研究不仅选用 FMDV *P12A* 和 *3C* 基因区, 为了增强 3C 蛋白酶的酶切作用, 还在国内首次使用融合 PCR 在 2A 和 3C 之间加入了 3B (3B1、3B2、3B3)^[19], 在人复制缺陷型腺病毒 5 型载体中表达了 FMDV 株的 P12A 和 3B3C 蛋白。

FMDV-OZK93 是常用于生产 FMD 灭活疫苗的优势疫苗毒株^[27], 此次 FMDV 重组腺病毒的包装使用的是 AdMax 系统, 与以往大多数 FMDV 重组腺病毒研究采用的 AdEasy 系统^[10,28] 有所不同, 不需要进行质粒线性化。该系统有多种优势, 包括操作简便、重组效率高、目的基因的表达水平高 (mCMV 启动子优于 hCMV 启动子) 等^[29]。包装成功的 FMDV 重组腺病毒传代至第 3 代时, 观察到明显的绿色荧光 (图 3A) 出现在 HEK-293 细胞中, 病毒滴度随着病毒的传代从 $10^{3.4}$ 增加到 $10^{9.1}$ (图 3B), 这与 Xie 等^[10] 研究保持一致, 但不同的是, Xie 等的报道中 P3 代荧光较强, 本研究到 P4 代荧光加强, 且在传代中荧光滴度能达到的 $10^{9.1}$ 低于 Xie 等报道的 10^{10} , 这可能是构建到腺病毒上的口蹄疫病毒株不同所致。该研究也成功地从不同的传代 (P3、P5 和 P7) 中扩增了靶基因 *P12A3B3C* (图 5), 这与 Zhang 等研究一致^[30]。综合上述这些结果表明重组腺病毒 rAdv-P12A3B3C-OZK93 已成功构建, 且靶基因在重组腺病毒中稳定遗传。

PK 细胞感染试验以及 IFA 检测结果显示 rAdv-P12A3B3C-OZK93 可以感染 PK 细胞并能成功表达目的蛋白 (图 7)。这与 Barrera 等^[19] 的报道相同。在 rAdv-P12A3B3C-OZK93 感染

的 HEK-293 细胞蛋白中检测到的 P12A 和 VP1/VP3 条带与 FMD 灭活病毒抗原 146S 条带相同, 表明 3C 蛋白能裂解 P12A 产生 VP3 和 VP1^[31]。Pena 等研究发现, 用腺病毒表达 FMDV 衣壳蛋白中加入 3B 基因有助于 3C 蛋白酶对 3B 和 3C 之间序列的剪切^[32]。此外, 为了使 FMDV 基因更有效地表达, 本研究在插入的 *P12A3B3C* 基因前加入 Kozak 序列^[33-34]。

体液免疫应答和细胞免疫应答在对抗 FMDV 感染中均起着重要的作用。因此, 在本研究中, 检测了 rAdv-P12A3B3C-OZK93 免疫小鼠后, 抗 FMDV 抗体和细胞因子的含量以评估重组腺病毒的免疫效果。所有的小鼠在 14 d 至 42 d 时分泌针对 FMDV 的抗 FMDV IgG 抗体, 并在 42 d 时表达高水平的 IgG 抗体, 同时测得了较高水平的 IL-10 和 γ -IFN。这些结果表明, 重组腺病毒 rAdv-P12A3B3C-OZK93 免疫小鼠后对小鼠产生强的细胞免疫反应和体液免疫反应。这与 Xie 等^[10] 的报道一致, 不同的是, Xie 等免疫 2 次, 报道了 0-28 d 的情况, 此次试验免疫了 3 次, 报道了 0-42 d 的情况。

总之, 本研究成功构建了能够表达 O 型 FMDV 衣壳蛋白的重组腺病毒 rAdv-P12A3B3C-OZK93, 且进一步的动物免疫实验结果显示该重组腺病毒能够诱导机体产生高水平的抗 FMDV 的特异性抗体, 以及一定水平的 IL-10 和 γ -IFN, 是一种新型、有效的 FMDV 候选疫苗。

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] Jamal SM, Belsham GJ. Foot-and-mouth disease: past, present and future. *Vet Res*, 2013, 44(1): 116.
- [3] Grubman MJ, Baxt B. Foot-and-mouth disease. *Clin Microbiol Rev*, 2004, 17(2): 465-493.

- [4] Senthilkumaran C, Yang M, Bittner H, et al. Detection of genome, antigen, and antibodies in oral fluids from pigs infected with foot-and-mouth disease virus. *Revue Can De Recherche Veterinaire*, 2017, 81(2): 82-90.
- [5] Palinski RM, Bertram MR, Vu LT, et al. First genome sequence of foot-and-mouth disease virus serotype O sublineage Ind2001e from southern Vietnam. *Microbiol Resour Announc*, 2019, 8(10): e01424-e01418.
- [6] Kushnir N, Streatfield SJ, Yusibov V. Virus-like particles as a highly efficient vaccine platform: diversity of targets and production systems and advances in clinical development. *Vaccine*, 2012, 31(1): 58-83.
- [7] Scotti N, Rybicki EP. Virus-like particles produced in plants as potential vaccines. *Expert Rev Vaccines*, 2013, 12(2): 211-224.
- [8] Diab E, Bazid AHI, Fawzy M, et al. Foot-and-mouth disease outbreaks in Egypt during 2013-2014: molecular characterization of serotypes A, O, and SAT2. *Vet World*, 2019, 12(2): 190-197.
- [9] Brito BP, Rodriguez LL, Hammond JM, et al. Review of the global distribution of foot-and-mouth disease virus from 2007 to 2014. *Transbound Emerg Dis*, 2017, 64(2): 316-332.
- [10] Xie YL, Chang HY, Li ZY, et al. Adenovirus-vectored capsid proteins of the serotype A foot-and-mouth disease virus protect Guinea pigs against challenge. *Front Microbiol*, 2020, 11: 1449.
- [11] Muleme M, Barigye R, Khaita ML, et al. Effectiveness of vaccines and vaccination programs for the control of foot-and-mouth disease in Uganda, 2001-2010. *Trop Anim Health Prod*, 2013, 45(1): 35-43.
- [12] Knight-Jones TJ, Robinson L, Charleston B, et al. Global foot-and-mouth disease research update and gap analysis: 6-immunology. *Transbound Emerg Dis*, 2016, 63(Suppl 1): 56-62.
- [13] Mayr GA, O'Donnell V, Chinsangaram J, et al. Immune responses and protection against foot-and-mouth disease virus (FMDV) challenge in swine vaccinated with adenovirus-FMDV constructs. *Vaccine*, 2001, 19(15/16): 2152-2162.
- [14] Moraes MP, Mayr GA, Mason PW, et al. Early protection against homologous challenge after a single dose of replication-defective human adenovirus type 5 expressing capsid proteins of foot-and-mouth disease virus (FMDV) strain A24. *Vaccine*, 2002, 20(11/12): 1631-1639.
- [15] Schutta C, Barrera J, Pisano M, et al. Multiple efficacy studies of an adenovirus-vectored foot-and-mouth disease virus serotype A24 subunit vaccine in cattle using homologous challenge. *Vaccine*, 2016, 34(27): 3214-3220.
- [16] Dubey P. Gene therapy using adenovirus vector. *Mol Biomark Diagn*, 2021, 12(7): 1.
- [17] Tatsis N, Ertl HCJ. Adenoviruses as vaccine vectors. *Mol Ther*, 2004, 10(4): 616-629.
- [18] Mizuguchi H, Kay MA, Hayakawa T. Approaches for generating recombinant adenovirus vectors. *Adv Drug Deliv Rev*, 2001, 52(3): 165-176.
- [19] Barrera J, Brake DA, Schutta C, et al. Versatility of the adenovirus-vectored foot-and-mouth disease vaccine platform across multiple foot-and-mouth disease virus serotypes and topotypes using a vaccine dose representative of the AdtA24 conditionally licensed vaccine. *Vaccine*, 2018, 36(48): 7345-7352.
- [20] Fernandez-Sainz I, Medina GN, Ramirez-Medina E, et al. Adenovirus-vectored foot-and-mouth disease vaccine confers early and full protection against FMDV O1 Manisa in swine. *Virology*, 2017, 502: 123-132.
- [21] Zhu FC, Li YH, Guan XH, et al. Safety, tolerability, and immunogenicity of a recombinant adenovirus type-5 vectored COVID-19 vaccine: a dose-escalation, open-label, non-randomised, first-in-human trial. *Lancet*, 2020, 395(10240): 1845-1854.
- [22] Park JH, Lee KN, Ko YJ, et al. Control of foot-and-mouth disease during 2010-2011 epidemic, south Korea. *Emerg Infect Dis*, 2013, 19(4): 655-659.
- [23] Valdazo-González B, Timina A, Scherbakov A, et al. Multiple introductions of serotype O foot-and-mouth disease viruses into East Asia in 2010-2011. *Vet Res*, 2013, 44(1): 76.
- [24] Caridi F, Vázquez-Calvo Á, Borrego B, et al. Preserved immunogenicity of an inactivated vaccine based on foot-and-mouth disease virus particles with improved stability. *Vet Microbiol*, 2017, 203: 275-279.
- [25] Kumar R, Basagoudanavar SH, Sreenivasa BP. Detection of replication competent adenovirus upon serial passaging of recombinant adenovirus expressing FMDV capsid proteins. *Biologicals*, 2015, 43(3): 209-212.
- [26] Xie YL, Gao P, Li ZY. A recombinant adenovirus expressing P12A and 3C protein of the type O foot-and-mouth disease virus stimulates systemic and mucosal immune responses in mice. *Biomed Res Int*,

2016, 2016: 7849203.

- [27] Luo Zhizhong, Fu Xiandong, Wang Yan. Effect of attenuated highly pathogenic pig reproductive and respiratory syndrome (HP-PRRS) TJM-F92 strain vaccine on immune antibody levels against lassical swine fever (CSF) and foot-and-mouth disease (FMD). *Anim Husband Feed Sci*, 2016, 8(3): 162-164.
- [28] Zhou GH, Wang HW, Wang F, et al. Recombinant adenovirus expressing type Asial foot-and-mouth disease virus capsid proteins induces protective immunity against homologous virus challenge in mice. *Res Vet Sci*, 2013, 94(3): 796-802.
- [29] 潘俊杰, 施海明, 罗心平, 等. hTFPI-2 基因重组腺病毒载体的构建和体外 U937 单核细胞的表达. *生物工程学报*, 2011, 28(2): 326-331.
- Pan JJ, Shi HM, Luo XP, et al. Construction of replication-deficient recombinant adenovirus vector with hTFPI-2 gene by AdMax system and expression in U937 monocytes *in vitro*. *J Biomed Eng*, 2011, 28(2): 326-331 (in Chinese).
- [30] 张春红, 郭春和, 项林盛, 等. 口蹄疫病毒 P1-2A 和 3C 蛋白重组腺病毒的构建及其免疫原性研究. *中国预防兽医学报*, 2012, 34(6): 480-484.
- Zhang CH, Guo CH, Xiang LS, et al. Recombinant adenovirus expression of FMDV P1-2A and 3C protein and its immune response in mice. *Chin J Prev Vet Med*, 2012, 34(6): 480-484 (in Chinese).
- [31] Li HT, Li ZY, Xie YL, et al. Novel chimeric foot-and-mouth disease virus-like particles harboring serotype O VP₁ protect Guinea pigs against challenge. *Vet Microbiol*, 2016, 183: 92-96.
- [32] Pena L, Moraes MP, Koster M, et al. Delivery of a foot-and-mouth disease virus empty capsid subunit antigen with nonstructural protein 2B improves protection of swine. *Vaccine*, 2008, 26(45): 5689-5699.
- [33] Ho TTB, Nasti A, Seki A, et al. Combination of gemcitabine and anti-PD-1 antibody enhances the anticancer effect of M1 macrophages and the Th1 response in a murine model of pancreatic cancer liver metastasis. *J Immunother Cancer*, 2020, 8(2): e001367.
- [34] 宋姗姗, 王海伟, 周国辉, 等. 表达 A 型口蹄疫病毒衣壳蛋白重组腺病毒的构建. *中国预防兽医学报*, 2012, 34(4): 262-265.
- Song SS, Wang HW, Zhou GH, et al. Construction of recombinant adenovirus expressing capsid protein of serotype A foot-and-mouth disease virus. *Chin J Prev Vet Med*, 2012, 34(4): 262-265 (in Chinese).

(本文责编 郝丽芳)