

李图帅, 陈 瑾, 乔绪稳, 等. 利用霍乱毒素 B 亚单位展示猪 O 型口蹄疫病毒 VP1 蛋白主要抗原表位[J]. 江苏农业学报, 2016, 32(3): 601-607.

doi: 10.3969/j.issn.1000-4440.2016.03.018

利用霍乱毒素 B 亚单位展示猪 O 型口蹄疫病毒 VP1 蛋白主要抗原表位

李图帅^{1,2}, 陈 瑾², 乔绪稳², 汪 浩², 张元鹏², 侯继波², 郑其升², 胡元亮¹

(1. 南京农业大学动物医学院, 江苏 南京 210095; 2. 国家兽用生物制品工程技术研究中心, 江苏 南京 210014)

摘要: 为探讨以霍乱毒素 B 亚单位为载体制备口蹄疫亚单位疫苗的可行性, 利用 *E. coli* 表达 CTB-GHloop 嵌合基因, 用 SDS-PAGE 分析目的基因的表达及表达产物的可溶性, 利用神经节苷脂 (GM1) 为抗原鉴定重组蛋白五聚体的形成。将目的蛋白浓度调整为 200 $\mu\text{g/ml}$, 以白油佐剂乳化制备疫苗, 免疫健康仔猪, 免疫后利用 ELISA 测定特异性抗体水平, 评价免疫后体液免疫反应, 利用淋巴细胞增殖实验评价细胞免疫水平。结果表明嵌合基因在 *E. coli* 中获得高效表达, 重组蛋白可溶, 并能够形成五聚体; Western-blot 结果显示重组蛋白能够与口蹄疫病毒 (FMDV) 阳性血清发生反应; 以每头仔猪 200 μg 免疫, 试验猪产生较高的抗体水平与细胞免疫反应。

关键词: 重组霍乱毒素 B 亚单位; 猪 O 型口蹄疫病毒; GHloop 抗原表位; 亚单位疫苗

中图分类号: S859.79⁺7 文献标识码: A 文章编号: 1000-4440(2016)03-0601-07

Cholera toxin subunit B as carrier for displaying GH loop epitope of type O foot-and-mouth disease virus VP1 protein

LI Tu-shuai^{1,2}, CHEN Jin², QIAO Xu-wen², WANG Hao², ZHANG Yuan-peng², HOU Ji-bo², ZHENG Qi-sheng², HU Yuan-liang¹

(1. College of Veterinary Medicine, Nanjing Agricultural University, Nanjing 210095, China; 2. National Research Center of Veterinary Biological Engineering and Technology, Nanjing 210014, China)

Abstract: The object of this study is to find out whether cholera toxin subunit B (CTB) is suitable for displaying GH loop epitope of type O FMDV (foot-and-mouth disease virus). The chimeric gene CTB-GHloop was expressed in *Escherichia coli*. SDS-PAGE was used to detect the expression and the solubility of the recombinant protein. Ganglioside M1 coated plate was involved as antigen to identify antibody by ELISA. The immunogenicity of chimeric CTB-GHloop protein was evaluated on pigs by detection of FMDV specific antibody and lymphocyte proliferation activity against GHloop epitope. Recombinant protein was identified in the form of pentamers by Western-blot. Antibody test results revealed that piglet immunized with 200 μg recombinant CTB-GHloop protein developed not only higher titer of antibodies in a short period of time, but also more vigorous T cell immune response compared with the commercial vaccines. It is concluded that CTB protein could be used as a carrier to display other antigenic epitope with no influence on the formation of pentamers, and the recombinant protein

CTB-GHloop may be a promising candidate for FMDV subunit vaccine research.

Key words: cholera toxin B; type O foot-and-mouth disease virus; GHloop; subunit vaccine

收稿日期: 2015-11-20

基金项目: 江苏省农业科技自主创新专项 [CX(14)2089]

作者简介: 李图帅 (1989-), 男, 山东兖州人, 硕士研究生, 主要从事猪用新型疫苗及技术研究

通讯作者: 郑其升, (E-mail) njcvc1302@163.com; (Tel) 025-84392078. 胡元亮, (E-mail) yluhu@sohu.com

口蹄疫 (Foot-and-mouth disease, FMD) 是由口

蹄疫病毒 (Foot-and-mouth disease virus, FMDV) 引起的一种烈性动物传染病, 为一类动物疫病^[1-5]。FMDV 属于小 RNA 病毒科口蹄疫病毒属, 有 7 种血清型, 包括 A、O、C、Asia 1 和 SAT 1、SAT 2、SAT 3, 血清型之间没有交叉保护现象^[6-8]。VP1 蛋白是 FMDV 的主要结构蛋白, 含有能够被宿主免疫细胞识别的主要抗原表位^[9-10]。VP1 蛋白第 140~160 位氨基酸残基 (GH loop) 凸起存在于 FMDV 粒子表面, 是 FMDV 最重要的抗原表位, 已被认定为引发中和性抗体的主要免疫原性位点, 也是研制口蹄疫表位疫苗的首选靶标^[11-13]。包含有该段多肽的口蹄疫合成肽疫苗已获得批准, 并能产生良好的免疫应答^[14-15]。

霍乱毒素 (CT) 是霍乱弧菌致病的主要毒力因子, 同时也具有很强的免疫原性。CT 具有 2 个亚单位, 1 个 A 亚单位 (CTA) 和 5 个 B 亚单位 (CTB) 以氢键和盐桥连接在一起, 形成紧凑而稳定的 AB₅ 型圆桶状六聚体蛋白, 并能以高亲和力与表达于所有有核细胞细胞膜上的神经节苷酯 (GM1) 结合。霍乱毒素也被证实可诱导树突状细胞成熟, 但是由于霍乱毒素具有毒性, 在实验和未来的临床应用中必将受到限制^[16-17]。但霍乱毒素 B (CTB) 为霍乱毒素的无毒亚单位, 是一种良好的免疫佐剂和输送抗原载体, 将其与目的抗原偶联或表达成融合蛋白后, 可使机体产生较强的系统免疫应答和局部黏膜免疫应答。CTB 结合神经节苷脂 (GM1) 的功能, 可使连接的抗原蛋白更易与黏膜作用, 进而引起一系列生理生化反应, 产生更强的免疫效果^[18-19]。Sun 等发现 CTB 在黏膜免疫中的机制: (1) 促进抗原通过黏膜屏障; (2) 加强抗原被树突状细胞 (DC) 和其他抗原提呈细胞的提呈作用; (3) 增强抑制性 T 细胞分泌 TGF- β 。近年来, 人们以 CTB 作为展示外源抗原表位的载体蛋白进行了广泛的研究^[20]。Maxim 等将 HIV-1 gp120 蛋白的 V3 loop 表位插入到 CTB 中, 利用获得的嵌合五聚体免疫实验小鼠获得高水平的针对 HIV gp120 蛋白的 ELISA 抗体及 HIV 特异性中和抗体^[21]。Luci 等研究发现阴道途径免疫接种 CTB-OVA 可诱导 MHC-I 类细胞毒反应, 分泌黏膜抗体, 促进黏膜局部 DC 摄取抗原^[22]。本研究利用 CTB 作为载体展示口蹄疫病毒的主要保护性抗原表位, 将 GH loop 表位暴露于 CTB 形成的 5 聚体的表面以更有利于向免疫系统递呈, 为研究口蹄疫病

毒亚单位疫苗进行前期探索。

1 材料和方法

1.1 试验材料

1.1.1 载体、细菌与试验动物 含有 FMDV VP1 GH loop 与霍乱毒素 B 亚单位 (CTB) 的嵌合基因的优化及合成由上海英俊生物技术有限公司完成, 目的基因克隆入 pMD18-T 载体中, 基因两端酶切位点分别为 *Nde* I 与 *Bam* H I。原核表达载体 pQZ 由国家兽用生物制品工程技术研究中心构建、保存。DH5a 及 BL21 大肠杆菌感受态细胞购自北京全式金生物技术有限公司。试验猪购自江苏省丹阳市云立生态牧业有限公司, 试验前利用上海优耐特公司生产的 ELISA 试剂盒检测 O 型 FMDV 抗体为阴性。

1.1.2 试剂 限制性内切酶、T4 DNA 连接酶、PCR 试剂及 pMD19-T 载体购于 TaKaRa 公司, DAB 显色试剂盒购于武汉博士德生物技术有限公司, 质粒提取试剂及胶回收试剂盒为 Axygen 公司产品, 猪抗 FMDV 多克隆抗体购自美国 VRMD 公司, HRP 标记羊抗猪抗体为 KPL 公司产品, GM1 神经节苷脂及 CTB 多克隆抗体均购自 Sigma 公司, 淋巴细胞分离液为上海华精生物高科技发展公司产品, 含有 O 型口蹄疫病毒 VP1 蛋白 GH loop 的多肽由上海吉尔生物科技有限公司合成, 蛋白质定量试剂盒购自美国 Thermo 公司, 商品疫苗猪 O 型口蹄疫合成肽疫苗为上海申联生物科技有限公司产品, 用于检测 FMDV 多肽抗体的间接 ELISA 试剂盒购自上海优耐特生物科技有限公司, 用于检测口蹄疫液相阻断抗体的试剂盒购自中国农业科学院兰州兽医研究所, 其余试剂均为国产或进口分析纯。

1.2 试验方法

1.2.1 重组表达载体的构建 利用 *Nde* I 与 *Bam* H I 双酶切重组质粒 pMD18-CTB-GHloop, 获得目的基因, 通过 T4 DNA 连接酶将目的基因定向克隆入相同方法处理的表达载体 pQZ 中, 获得重组表达载体。用 *Nde* I 与 *Bam* H I 双酶切鉴定, 阳性克隆命名为 pQZ-CTB-GHloop。

1.2.2 重组表达菌的构建 将重组表达质粒 pQZ-CTB-GHloop 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-CTB-GHloop/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。

1.2.3 重组菌的诱导表达 挑取重组菌 pQZ-CTB-GHloop/BL21 单菌落,接种 5 ml 含氨苄氯霉素的 LB 液体培养基中,37 ℃ 振荡培养过夜,作为种子液。次日将种子液按 1:100 比例转接含新的氨苄氯霉素的 LB 液体培养基,37 ℃,220 r/min 振荡培养 1.5~2.0 h(OD_{600} 达 0.5~0.6),加入终浓度为 1 mmol/L 的异丙基硫代半乳糖苷(IPTG),15 ℃ 诱导 24 h,收获细菌进行鉴定。

1.2.4 SDS-PAGE 分析 各取 1 ml 诱导后对照菌株的全菌和重组菌 pQZ-CTB-GHloop/BL21 诱导后全菌,4 ℃ 12 000 r/min 离心 10 min,收集菌体,用 200 μ l PBS (pH7.2) 缓冲液重悬,进行 SDS-PAGE 电泳。

1.2.5 重组蛋白可溶性鉴定 取 10 ml 诱导后菌液,12 000 r/min 4 ℃ 离心 10 min,收集菌体,用 10 ml PBS (pH7.2) 缓冲液重悬,于冰水浴中超声波破碎细菌。破碎后 4 ℃ 12 000 r/min 离心 15 min,分离上清与沉淀,沉淀用 1 ml PBS (pH7.2) 缓冲液重悬,SDS-PAGE 鉴定重组蛋白的可溶性。

1.2.6 重组蛋白 Western-blot 鉴定 取诱导后对照菌全菌和重组菌 pQZ-CTB-GHloop/BL21 诱导后全菌,破碎上清及沉淀,进行 SDS-PAGE,之后转 PVDF 膜。将转印有目的条带的 PVDF 转移膜用 5% 脱脂乳 4 ℃ 封闭过夜。次日弃去脱脂乳,PBST 洗膜 10 min,用含有 2% BSA 的 TBST 溶液稀释猪 O 型 FMDV 阳性血清(1:200),37 ℃ 孵育 1 h,随后用 TBST 充分漂洗 5 次,每次洗涤 8 min,再用含 2% BSA 的 TBST 缓冲液稀释 HRP 标记的羊抗猪二抗(1:5 000),37 ℃ 孵育 1 h,TBST 缓冲液充分漂洗 5 次,每次 8 min,按照 DAB 试剂盒说明书显色。

1.2.7 重组蛋白五聚体形成鉴定 用每孔 100 μ l 神经节苷脂 GM1 (20 μ g/ml) 的包被缓冲液(50 mmol/L 碳酸钠-碳酸氢钠缓冲液,pH 9.6) 包被 96 孔酶标板,4 ℃ 过夜,弃去包被液。每孔用 PBST 洗涤 5 次,每次 3 min,加入含有 2% BSA 的 PBST (pH 7.4) 封闭液,4 ℃ 满孔封闭过夜。弃去封闭液,每孔分别加入:重组菌 pQZ-CTB-GHloop/BL21 诱导后裂解液上清,以天然的 CTB (Sigma 公司产品) 与大肠杆菌表达的重组 CTB 作为阳性对照,以空菌破碎上清为阴性对照,37 ℃ 孵育 2 h。弃去蛋白质,每孔用 PBST 洗涤的 5 次,每次 3 min。洗涤后,每孔加入 1:2 000 (含 1% BSA 的 PBST) 稀释鼠抗 CTB

阳性血清 100 μ l,37 ℃ 孵育 1 h。弃去一抗,每孔用 PBST 洗涤 5 次,每次 3 min。洗涤后,每孔加入 HRP 标记羊抗鼠 IgG 100 μ l (含 1% BSA 的 PBST 液) 稀释,37 ℃ 孵育 1 h,弃去酶标二抗,每孔用 PBST 洗涤 5 次,每次 3 min。洗涤后,每孔加入 100 μ l TMB 底物液,37 ℃ 反应 15 min 后,每孔加入 2 mol/L H_2SO_4 50 μ l 终止反应,用酶标仪测定每孔在 492 nm 的吸光值。

1.2.8 重组蛋白免疫原性鉴定

1.2.8.1 疫苗的制备与免疫 大量制备重组 CTB-GHloop 蛋白,超声波破碎后离心取上清,获得重组抗原。利用 BCA 试剂盒测定重组大肠杆菌破碎后上清中总蛋白质质量,利用薄层扫描分析确定目的蛋白表达量。将目的蛋白的浓度调整为 200 μ g/ml,重组蛋白与油佐剂乳化制备疫苗,按照表 1 所示分组肌肉注射免疫 40~45 日龄的口蹄疫阴性健康仔猪。免疫后 14 d 与 28 d 采血,分离血清,对疫苗免疫后体液免疫与细胞免疫进行评价。

表 1 疫苗准备与试验动物分组

Table 1 Preparation of recombinant vaccine and grouping for animals

分组	抗原/剂量	免疫体积 (ml)	佐剂	动物数量 (头)
G1	rCTB-GHloop/100 μ g	2	矿物油	15
G2	CTB/100 μ g	2	矿物油	15
G3	Host protein/100 μ g	2	矿物油	15
G4	商品苗/1 份	2	矿物油	15
G5	空白对照 (PBS)	2	-	10

1.2.8.2 体液免疫反应的评价 利用上海优耐特生物科技有限公司的猪 O 型 FMDV 多肽抗体 ELISA 检测试剂盒检测 FMDV 抗体水平,利用猪 O 型 FMDV 液相阻断试剂盒检测液相阻断抗体水平,评价免疫后体液免疫反应。

1.2.8.3 T 淋巴细胞的增殖反应检测 在检测抗体的同时,无菌采取抗凝血,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 1 ml 2×10^7 个,加入 96 孔细胞板内,每孔 100 μ l,每个样品做 3 次重复。向各孔内加入 5 μ g 人工合成的猪 O 型 FMDV VP1 GHloop 多肽作为刺激抗原,置 37 ℃、5% CO_2 培养箱中培养 60 h。再每孔加入 5 μ g/ml 噻

唑蓝(MTS) 10 μ l, 继续培养 4 h。测定 OD_{492} 值, 取 3 个平均值计算刺激指数(SI), 以不加 GH loop 多肽的营养液为对照。以刺激指数作为判断淋巴细胞转化程度的参数, $SI = \text{刺激孔 } OD_{492} \text{ 值} / \text{培养液对照孔 } OD_{492} \text{ 值}$ 。

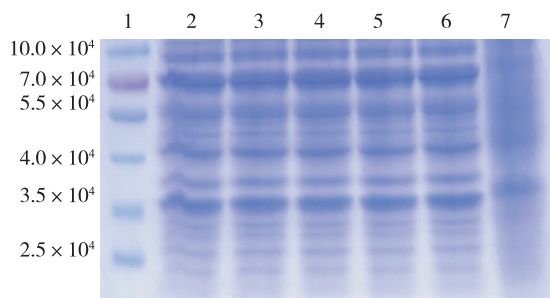
2 结果

2.1 重组表达载体的鉴定

构建的重组表达质粒 pQZ-CTB-GHloop 用 *Nde* I 与 *Bam*H I 双酶切, 酶切产物经 1% 琼脂糖凝胶电泳、溴化乙锭染色后, 在紫外线下可见约 450 bp 大小的目的条带, 表明重组表达质粒构建成功(图略)。

2.2 重组蛋白 SDS-PAGE 分析结果

SDS-PAGE 电泳分析结果显示, 与对照菌 pQZ/BL21 相比, pQZ-CTB-GHloop/BL21 在约 3.6×10^4 处明显多出一条蛋白质条带(图 1), 与预期结果相符, 说明重组菌 pQZ-CTB-GHloop/BL21 在 IPTG 诱导下成功获得表达。



1: 蛋白质分子量标准; 2~6: 重组菌 pQZ-CTB-GHloop/BL21 IPTG 诱导后; 7: 重组菌 pQZ-CTB-GHloop/BL21 IPTG 诱导前。

图 1 重组蛋白表达 SDS-PAGE 鉴定图

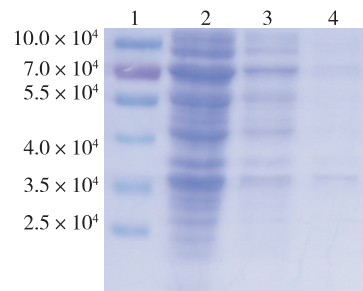
Fig.1 SDS-PAGE analysis of the recombinant protein expression

2.3 重组蛋白的可溶性分析

对重组菌 pQZ-CTB-GHloop/BL21 诱导后全菌进行超声波破碎, 将上清和破碎后沉淀进行 SDS-PAGE 鉴定。结果(图 2)显示, 重组菌 pQZ-CTB-GHloop/BL21 诱导表达产物均在上清中, 目的蛋白以几乎完全可溶的形式存在。

2.4 重组菌表达产物的 Western-blot 分析

取诱导后的对照菌 pQZ1/BL21、重组菌 pQZ-CTB-GHloop-PA3/BL21 破碎后上清及沉淀, 经 SDS-PAGE 电泳后转膜, 进行 Western-blot 鉴定。在目的

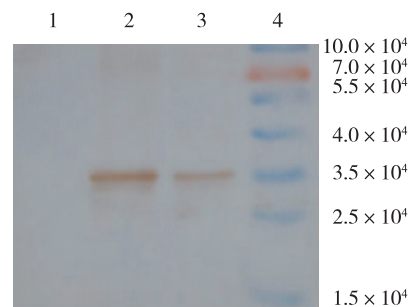


1: 蛋白质分子量标准; 2: 重组菌 pQZ-CTB-GHloop/BL21 IPTG 诱导后全菌; 3: 重组菌 pQZ-CTB-GHloop/BL21 破碎后离心上清; 4: 重组菌 pQZ-CTB-GHloop/BL21 破碎后离心沉淀。

图 2 重组蛋白的可溶性分析

Fig.2 Solubility analysis of the recombinant protein

条带大小位置出现 1 条明显的棕色印迹, 而对照菌 pQZ/BL21 对应泳道在相应位置则无颜色反应条带(图 3), 说明表达产物可被 FMDV 多克隆抗体特异性识别并结合, 具有较好的抗原性。



1: 重组菌 pQZ-CTB-GHloop/BL21 破碎后沉淀; 2: 重组菌 pQZ-CTB-GHloop/BL21 诱导后全菌; 3: 重组菌 pQZ-CTB-GHloop/BL21 破碎后上清; 4: 蛋白质分子量标准。

图 3 Western-blot 鉴定重组蛋白针对 FMDV VP1 蛋白的免疫原性分析

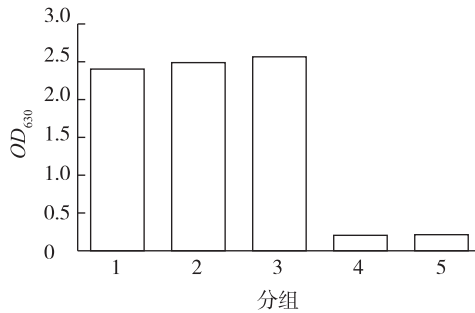
Fig.3 Immunogenicity of recombinant protein against FMDV VP1 antibody analyzed by Western-blot

2.5 重组蛋白五聚体形成鉴定结果

应用神经节苷脂-酶联免疫分析, 对重组蛋白 CTB 及 CTB-GHloop 进行霍乱毒素抗原测定, 结果(图 4)为阳性, P/N 值均大于 2.4, 作为对照的含空质粒的大肠杆菌为阴性。说明表达的重组蛋白 CTB-GH loop 形成了 5 聚体。

2.6 重组蛋白免疫动物体液免疫反应

由图 5 可见, 免疫后 14 d, rCTB-GHloop 与商品多肽疫苗免疫均产生了可检测到的多肽特异性抗体; 免疫后 28 d 两个免疫组的抗体水平明显升高,

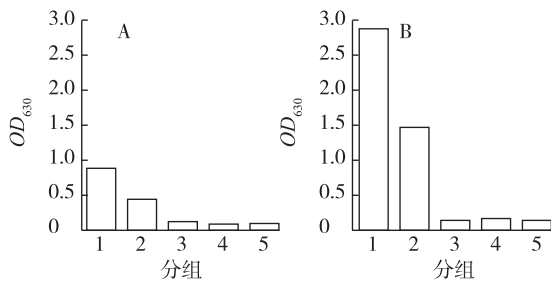


注:1:rCTB-GHloop;2:rCTB;3:阳性对照;4:阴性对照;5:载体对照

图4 重组蛋白五聚体形成鉴定

Fig.4 Identification of recombinant protein in the form of pentamer

rCTB-GHloop 免疫组抗体水平明显高于商品多肽疫苗免疫组。由图 6 可知,rCTB-GHloop 免疫组在免疫后 14 d 就有 26.7% (4/15) 的试验猪产生合格的液相阻断抗体,而此时商品多肽疫苗免疫组还未产生合格的液相阻断抗体;免疫后 28 d,rCTB-GHloop 免疫组有 80% (12/15) 的试验猪产生合格的液相阻断抗体,明显高于商品多肽疫苗免疫组 40% (6/15) 的液相阻断抗体合格率。



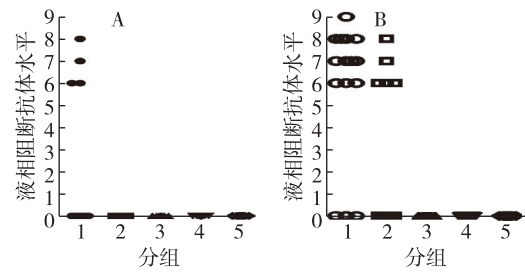
注:1:CTB-GHloop;2:商品苗对照;3:CTB 对照;4:宿主大肠杆菌对照;5:空白对照。A:免疫后 14 d;B:免疫后 28 d。

图5 试验猪特异性多肽抗体水平检测

Fig.5 Specific peptide antibody detection for tested pigs

2.7 淋巴细胞增殖检测结果

为了探讨构建的重组蛋白在免疫猪体内诱发特异性针对 VP1 GHloop 的淋巴细胞增殖反应,检测了免疫后 14 d 与 28 d 试验猪的特异性脾淋巴细胞增殖情况。从图 7 中可以看出,以人工合成的猪口蹄疫病毒 VP1 蛋白 GHloop 多肽作为刺激原,rCTB-GHloop 免疫猪获得了较强的特异性淋巴细胞增殖,其在第 28 d 增殖指数达到 2.79 ± 0.09 ,明显高于商品多肽疫苗免疫组。统计分析结果显示,rCTB-

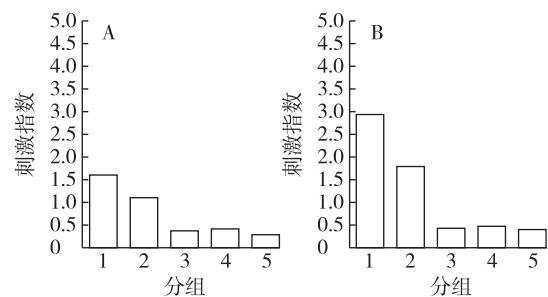


注:1:CTB-GHloop;2:商品苗对照;3:CTB 对照;4:宿主大肠杆菌对照;5:空白对照。A:免疫后 14 d;B:免疫后 28 d。

图6 试验猪口蹄疫液相阻断抗体水平检测

Fig.6 Detection of antibody by liquid phase blocking ELISA

GHloop 免疫组与商品多肽疫苗所引发的 T 细胞增殖反应强度差异显著 ($P < 0.05$)。其他对照组只能刺激免疫猪产生非常弱的 T 细胞增殖反应。此结果表明,重组蛋白 rCTB-GHloop 免疫猪后能够诱发较强的淋巴细胞增殖。



注:1:CTB-GHloop;2:商品苗对照;3:CTB 对照;4:宿主大肠杆菌对照;5:空白对照。A:免疫后 14 d;B:免疫后 28 d。

图7 试验猪特异性淋巴细胞增殖检测

Fig.7 Specific T-cell proliferation in the vaccinated pigs

3 讨论

VP1 蛋白表面的 GH loop 是 FMDV 最重要的抗原表位,它包含连续性 B 细胞抗原表位,该表位可诱导机体产生高效价的中和抗体,是研制口蹄疫表位疫苗的首选靶标。目前的研究大多集中在结构蛋白 VP1 的第 140~160 和 200~213 位氨基酸,这 2 个抗原表位均位于突出、无序、柔性的 GHloop 中。目前含有其中 1 个或含 2 个以上表位的采用化学合成的合成肽疫苗已经成功上市,免疫猪后能够引发机体产生针对 FMDV 显著中和性及特异性抗体,并能为攻毒试验猪提供 100% 保护^[14-15]。1982 年 Bittle 等^[13]首次报道了用化学合成的口蹄疫病毒短

肽免疫动物后获得成功,这一成果对研制新型 FMD 疫苗具有里程碑意义。此后,科学家以 FMD 病毒主要结构蛋白 VP1 上的 135~160 和 200~213 位氨基酸区域作为 FMDV 的优势抗原表位进行了广泛研究。Taboga 等用分别含有抗原位点 A(G-H 环)、T 细胞表位、位点 A 和 VP1 的 C 末端及前三者均存在的合成肽疫苗共免疫 138 头牛,所有免疫动物均可产生相应的高滴度中和抗体^[23]。Kupriianova 等应用 44~63 个氨基酸,即 FMDV-A22 株 VP1 蛋白第 135~159、170~190 和 197~213 位氨基酸所构建的合成肽疫苗,通过免疫豚鼠和小鼠,证明了相对于含有较少氨基酸的合成肽来说,其免疫效果有显著的提高^[24]。这说明研究基于 GHloop 抗原表位的口蹄疫亚单位疫苗是可行的。

本研究将猪 O 型口蹄疫病毒 VP1 蛋白 GH loop 表位插入到 CTB 中,表达融合蛋白,借助于 CTB 形成的五聚体而将 GHloop 展示在五聚体的表面,与商品化的口蹄疫合成肽疫苗相比,更有助于维持口蹄疫病毒抗原表的 loop 构象,以提高口蹄疫多肽的免疫原性,动物试验的数据也验证了此设计的有效性。重组嵌合蛋白免疫动物后 14 d 即产生明显的多肽抗体,免疫后 28 d 有 80% 的试验猪液相阻断抗体水平达到合格以上,明显优于商品合成肽疫苗。MTT 结果显示,rCTB-GHloop 免疫组能够刺激免疫猪产生较强的特异性针对 FMDV GHloop 表位的 T 淋巴细胞增殖,说明借助于 CTB 的免疫佐剂效应,试验动物对重组蛋白产生了细胞免疫反应。试验结果证明本研究构建的嵌合五聚体能够刺激试验猪产生良好的体液免疫与细胞免疫应答。

本研究首次成功地利用霍乱毒素 B 亚单位形成的五聚体作为骨架展示猪口蹄疫病毒 VP1 蛋白 GHloop 表位的载体,并在大肠杆菌中成功表达出能组装成五聚体的重组蛋白,重组蛋白免疫动物后能够刺激机体产生针对 FMDV VP1 蛋白特异性体液免疫与细胞免疫。因此本研究利用霍乱毒素 B 亚单位 CTB 展示口蹄疫病毒外源抗原表位为后续有效地研制口蹄疫亚单位疫苗提供了一种新的思路 and 可能。

参考文献:

- [1] 解慧梅,穆祥,刘易通,等.口蹄疫的研究现状[J].动物医学进展,2006(5):6-9.
- [2] 韦显凯,郑敏,郑列丰,等.规模猪场不同免疫次数对口蹄疫抗体产生效果的影响[J].南方农业学报,2014,45(3):494-497.
- [3] 覃军,梁珠民,李军成.规模化猪场主要疫病抗体监测与免疫效果分析[J].江苏农业科学,2015,43(10):264-266.
- [4] HAYDON D T, KAO R R, KITCHING R P. The UK foot-and-mouth disease outbreak—the after math [J]. Nature Review: Microbiology, 2004, 2:674-681.
- [5] ERIC BARANOWSKI E D, CRISTINA E F S. Foot-and-mouth disease virus [J]. Microbiology & Infectious Diseases, 2002, 25: 297-308.
- [6] 张晓凤.口蹄疫病毒的基因分型[J].畜牧与饲料科学,2006(2):30-32.
- [7] 刘庆军,张永光.口蹄疫病毒基因组结构及其功能[J].动物医学进展,2005,26(5):1-5.
- [8] HUANG C C, LIN Y L, HUANG T S. Nolecular characterization of foot-and-mouth disease virus isolated from ruminants in Taiwan in 1999-2000 [J]. Vet Microbiol, 2001, 81(6):193-205.
- [9] WANG J H, LIANG C M, PENG J M, et al. Induction of immunity in swine by purified recombinant VP1 of foot-and-mouth disease virus [J]. Vaccine, 2003,21:3721-3729.
- [10] 胡波,盛蓉,宋艳华,等. RHDV VLPs 对口蹄疫病毒 B 细胞表位的展示效果[J].江苏农业学报,2015,31(6):1362-1370.
- [11] AGGARWAL N, BARNETT P V. Antigenic sites of foot-and-mouth disease virus (FMDV): an analysis of the specificities of anti-FMDV antibodies after vaccination of naturally susceptible host species [J]. J Gen Virol, 2002 (2):775-782.
- [12] PARRY N R, BARNETT P V, OULDRIDGE E J, et al. Neutralizing epitopes of type O foot-and-mouth disease virus. II. Mapping three conformational sites with synthetic peptide reagents [J]. J Gen Virol,1989,70(6):1493-1503.
- [13] BITTLE J L, HOUGHTEN R A, ALEXANDER H, et al. Protection against foot-and-mouth disease by immunization with a chemically synthesized peptide predicted from the viral nucleotide sequence [J]. Nature, 1982, 298: 30-33.
- [14] WANG C Y, CHANG T Y, Walfield A M, et al. Synthetic peptide-based vaccine and diagnostic system for effective control of FMD [J]. Biologicals, 2001,29(8):221-228.
- [15] WANG C Y, CHANG T Y, WALFIELD A M, et al. Effective synthetic peptide vaccine for foot-and-mouth disease in swine [J]. Vaccine, 2002, 20(6):2603-2610.
- [16] MEKALANOS J J, SWARTZ D J, Pearson G D, et al. Cholera toxin genes: nucleotide sequence, deletion analysis and vaccine development [J]. Nature, 1983,306(5943):551-557.
- [17] SPAGLER B D. Structure and function of cholera toxin and the related Escherichia coli heat-labile enterotoxin [J]. Microbiol Rev, 1992, 56(9):622-647.
- [18] HARAKUNI T, SUGAWA H, KOMESU A, et al. Heteropentameric cholera toxin B subunit chimeric molecules genetically fused to

- a vaccine antigen induces systemic and mucosal immune responses; a potential new strategy to target recombinant vaccine antigens to mucosal immune systems [J]. *Infect Immun*, 2005, 73 (9):5654-5665.
- [19] PIZZA M, GIULIANI M, FONTANA M, et al. Mucosal vaccines; nontoxic derivatives of LT and CT as mucosal adjuvants [J]. *Vaccine*, 2001, 19(17-19): 2534-2541.
- [20] SUN J B, RAGHAVAN S, SJÖLING A, et al. Oral tolerance induction with antigen conjugated to cholera toxin B subunit generates both Foxp3+ CD25+ and Foxp3- CD25- CD4+ regulatory T cells[J]. *J Immunol*, 2006, 177(11): 7634-7644.
- [21] MAXIM T, JIANG X Q, KONG X P, et al. Structure-guided design and immunological characterization of immunogens presenting the HIV-1 gp120 V3 loop on a CTB scaffold [J]. *Virology*, 2010, 405(12):513-523.
- [22] LUCI C, HERVOUET C, ROUSSEAU D, et al. Dendritic cell-mediated induction of mucosal cytotoxic responses following intravaginal immunization with the nontoxic B subunit of cholera toxin [J]. *J Immunol*, 2006, 176(5): 2749-2757.
- [23] TABOGA O, TAMI C, CARRILLO E, et al. A large-scale evaluation of peptide vaccines against foot-and-mouth disease; lack of solid protection in cattle and isolation of escape mutants [J]. *J Virol*, 1997, 71(4):2606-2614.
- [24] KUPRIANOVA M A, ZHMAKM N, KOROEV D O, et al. Synthetic peptide designs based on immunoactive fragments of the VP1 protein of the foot-and-mouth disease virus strain A22 [J]. *Bioorg Khim*, 2000, 26 (12): 926-932.

(责任编辑:张震林)