

O型口蹄疫病毒VP1基因与大肠杆菌不耐热肠毒素LTB基因的融合表达及表达产物的免疫原性分析

李润成, 余兴龙, 白霞, 向卫军, 葛猛, 黎满香

湖南农业大学动物医学院, 长沙 410128

摘要: 以质粒 pMDTLT 为模板、用 PCR 的方法扩增出 LTB 基因, 然后将其插入到 pETVP1 质粒中 VP1 基因的上游, 构建了含有融合基因 LTBVP1 的表达质粒 pETLTBVP1。转化宿主菌 BL21(DE3)LysS 后进行诱导表达, 诱导菌经 SDS-PAGE 显示重组蛋白以包涵体的形式表达, 分子量约为 39 kD; Western blotting 分析表明, 重组蛋白能与 FMDV 阳性血清及兔抗霍乱毒素(CT)血清反应, 说明融合蛋白保持了 LTB 和 VP1 各自的免疫学活性。小鼠免疫实验表明: 该融合蛋白通过腹腔接种小鼠能诱导产生较强的免疫应答反应, 免疫鼠产生的血清抗体水平高于试验中商品口蹄疫疫苗免疫组。

关键词: 口蹄疫病毒, VP1 基因, LTB 基因, 抗体效价

Fusion expression of *Escherichia coli* heat-labile enterotoxin B subunit gene and foot-and-mouth disease virus type O VP1 gene and immunogenicity analysis

Runcheng Li, Xinglong Yu, Xia Bai, Weijun Xiang, Meng Ge, and Manxiang Li

College of Animal Medicine, Hunan Agricultural University, Changsha 410128, China

Abstract: LTB gene fragment was amplified by PCR from plasmid pMDTLT, and a recombinant plasmid pETLTBVP1 was constructed by inserting LTB gene fragment into VP1 gene expression plasmid pETVP1 constructed previously. The recombinant plasmids were transformed into *E. coli* BL21(DE3) and induced to express by IPTG. The recombinant protein existed in the inclusion body and its molecular weight was about 39 kD proved by SDS-PAGE analysis. Western blotting showed that the fusion protein could be reacted with both anti-FMDV and anti-cholera toxin serum demonstrating the immunoactivity of the fusion protein. Strong immune responses can be induced in mice inoculated with the fusion protein intraperitoneally, and the serum antibody level is higher than that of commercial foot-and-mouth disease vaccines.

Keywords: foot-and-mouth disease virus, VP1 gene, LTB gene, antibody titer

口蹄疫(Foot-and-mouth disease, FMD)是由口蹄疫病毒(Foot-and-mouth disease virus, FMDV)引起的急性、热性、高度传染性动物疫病^[1]。口蹄疫病毒基

因组为单股正链 RNA, 由 8500 个核苷酸组成。VP1 结构蛋白基因位于 FMDV 基因组的 2977~3615 核苷酸, 编码 213 个氨基酸。结构蛋白 VP1 功能区内包含

Received: June 30, 2008; Accepted: January 9, 2009

Supported by: Science and Technology Key project of Hunan Province (No. 2007FJ1003), Key Project of Hunan Education Office(No. 04A025).

Corresponding author: Xinglong Yu. Tel: +86-731-4673623; E-mail: xlyu999@yahoo.com.cn

湖南省科技重大专项(No. 2007FJ1003), 湖南省教育厅重点项目(No. 04A025)资助。

FMDV 的主要抗原位点^[2], 能诱导动物产生中和性抗体。将单一 VP1 基因或与其他基因进行融合表达, 并免疫动物, 能产生较好的免疫应答^[3-5]。但由于重组的 VP1 蛋白分子量较小, 只有 24 kD 左右, 其免疫原性虽然较好, 但作为亚单位疫苗抗原, 对于实际应用而言, 其免疫原性还有待于提高。因此, 至今能进行商品化生产使用, 解决口蹄疫防控实际问题的基因工程疫苗很少, 通过不同途径提高 FMDV 基因工程疫苗的免疫原性仍是研究 FMD 新型疫苗的重点。

大肠杆菌不耐热肠毒素(LT)是由致病性大肠杆菌分泌的, 引起被感染动物腹泻的一种毒素。LT 分子结构、生物学功能与霍乱毒素(CT)相似, 且两者间有交叉免疫反应性^[6]。该毒素由 A、B 两个亚单位组成。完整的 LT 毒素具有强烈的免疫增强作用, 是迄今人们所研究的免疫增强效应最强的蛋白类免疫佐剂之一。但 LT 本身强烈的肠毒素活性限制了它在免疫增强方面的实际应用。LT_B 亚单位没有肠毒素活性, 但保留了 LT 的免疫增强活性, 虽然其作用较 LT 全毒素的弱, 但仍然是一个良好的免疫增强佐剂, 它不仅具备系统免疫增强作用^[7, 8], 还有较好的粘膜免疫增强活性^[9]。本实验将 LT_B 基因克隆到 pETVP1 质粒中的 VP1 基因的上游, 构建了表达 LT_B 与 VP1 融合基因的表达质粒 pETLT_BVP1。该质粒表达的融合蛋白保留了 LT_B 和 VP1 各自的免疫学活性, 并且具有较强的免疫原性, 为进一步研制口蹄疫基因工程疫苗提供了基础。

1 材料与方法

1.1 供试动物

体重约 20 g 左右的云南昆明小鼠: 普通级, 雌性, 购于湖南中医药大学实验动物中心。

1.2 菌种与质粒

大肠杆菌 BL21(DE3)LysS 菌株为本实验室保存, 含 FMDV VP1 基因的质粒 pETVP1^[10], pMDTLT 质粒均由本实验室构建并保存(LT: GenBank Accession No. DQ778054)。

1.3 主要试剂与试剂盒

Pfu 酶、EcoR I、NcoI、Sal I 内切酶、DNA Marker、IPTG 均购于大连宝生物工程公司; 胰蛋白胨、酵母浸膏、卡那霉素、弗氏完全佐剂、弗氏不完全佐剂购于北京鼎国生物技术有限责任公司; T4 DNA 连接

酶购于 MBI 公司; HRP 标记的兔抗猪 IgG 抗体(编号 A5670)、HRP 标记的羊抗兔 IgG 抗体(编号 A6154)、兔抗 CT 抗体(编号 C3062)均购于 Sigma 公司; 猪口蹄疫油佐剂灭活疫苗(批号: 060431)某公司生产。

增强型底物显色试剂盒购于北京天为时代科技有限公司, 小量质粒提取试剂盒购于 OMEGA, O 型口蹄疫正向间接血凝抗原试剂盒(批号: 060717)购于中国农业科学院兰州兽医研究所。

1.4 血清

经荷兰赛迪诊断公司生产的 O 型口蹄疫抗体检测试剂盒(批号: 05K012)检测的 FMDV 抗体阳性的免疫猪血清。

1.5 LT_B 基因的 PCR 扩增

根据本实验室构建的 pMDTLT 中 LT_B 的核苷酸序列, 设计一对扩增 LT_B 序列的引物, 并在引物上游引入 Nco I 酶切位点、下游引入 EcoR I 酶切位点和一段小的连接肽 VPGVP 的编码序列。引物序列为(下划线为酶切位点, 阴影部分为连接肽编码序列): Fp: 5'-GTACTCCATGGCTCCCCAGACTATTACAGAAC-3'; Rp: 5'-GCGAATTCACCTACCCCGGGAACGTTTTTCATACTGATTGCC-3'。以 pMDTLT 质粒为模板, 用设计好的引物扩增 LT_B 基因。其体系为: Pfu 酶(2.5 U/μL)1 μL, Fp、Rp 各 2 μL, 10 × Pfu 酶 Buffer 10 μL, dNTP Mixture(2.5 mmol/L)6 μL, ddH₂O 补至 100 μL; PCR 反应条件为: 94°C 5 min; 94°C 30 s, 47°C 30 s, 72°C 30 s, 共 30 个循环; 最后于 72°C 延伸 15 min 后 4°C 保存。

1.6 重组表达质粒的构建

将上述 PCR 扩增的 LT_B 基因用琼脂糖凝胶 DNA 回收试剂盒回收后, 用 Nco I 和 EcoR I 进行双酶切, 并将其插入到 pETVP1 质粒 VP1 基因的上游相应酶切位点之间, 转化大肠杆菌 BL21(DE3)LysS 感受态菌。然后, 挑取转化子进行 PCR 鉴定并将鉴定为阳性的转化子接种到 LB 培养基中小量培养, 提取质粒、进行酶切鉴定及序列测定。最后将成功构建的 LT_B-VP1 表达质粒命名为 pETLT_BVP1。DNA 操作按文献^[11]或试剂盒说明书进行, 序列测定由北京奥科生物技术有限公司完成。

1.7 LT_B-VP1 蛋白的诱导表达

1.7.1 重组质粒 pETLT_BVP1 的转化及转化菌的诱导

将 pETLT_BVP1 质粒转化大肠杆菌

BL21(DE3)LysS 感受态,挑单个克隆接种于 5 mL 含卡那霉素的 LB 液体培养基,37°C、200 r/min 振荡培养过夜。再从过夜培养的菌液中取 50 μ L 接种于 5 mL 含卡那霉素的 LB 液体培养基中,37°C、200 r/min 振荡培养至 OD_{600} 达 0.8,加 IPTG 至终浓度 1 mmol/L,继续培养 4 h。最后收集菌体进行 SDS-PAGE 电泳检测。

1.7.2 LTB-VP1 融合蛋白的 Western blotting 分析

将重组蛋白、未经诱导的宿主菌表达蛋白进行 SDS-PAGE 电泳,并用半干式电转移法将凝胶中的蛋白转印至硝酸纤维素膜上,转印好的硝酸纤维素膜用兔血清封闭,然后用猪的 O 型 FMDV 抗体阳性血清或兔抗 CT 多克隆抗体分别对 VP1、LTB 蛋白进行感作^[6,12],PBST 洗涤后分别加入酶标记的兔抗猪 IgG 抗体或羊抗兔 IgG 抗体。漂洗后用增强型底物显色试剂盒按试剂盒操作说明进行显色。

1.8 LTB-VP1 融合蛋白的纯化

按上述 1.7.1 诱导培养 50 mL pETLTBVP1 质粒的转化菌 BL21(DE3)LysS。离心收菌、超声波裂解,利用 12% SDS-PAGE 对表达的 LTB-VP1 蛋白进行纯化,方法见文献[13]。最后用 SDS-PAGE 对纯化的 LTB-VP1 进行纯度检测。纯化 LTB-VP1 含量的测定以蛋白浸提液作为对照,参照文献[14]用分光光度计测定,按下述公式进行计算确定 LTB-VP1 的浓度:蛋白质浓度(mg/mL) = $1.45 \times A_{280} - 0.74 \times A_{260}$ 。

1.9 小鼠免疫实验

1.9.1 疫苗接种

将上述纯化的 LTB-VP1 蛋白质溶液与弗氏佐剂混合、乳化,使每毫升疫苗含 LTB-VP1 蛋白 0.2 mg,然后腹腔注射免疫体重 20 g 左右的昆明小鼠 6 只。每只小鼠接种 200 μ L(40 μ g LTB-VP1 蛋白质),共免疫 3 次,每次间隔 2 周,第 1 次接种弗氏完全佐剂 LTB-VP1 蛋白疫苗,第 2、3 次接种弗氏不完全佐剂 LTB-VP1 蛋白疫苗。另外设一组接种商品疫苗的对照组和一组不接种任何疫苗的空白对照组,每组 6 只小鼠,商品疫苗对照组每只小鼠腹腔接种 200 μ L、接种次数、时间同 LTB-VP1 蛋白质疫苗;对照组不做任何免疫接种。

1.9.2 小白鼠血清抗体效价检测

于第 1、2 次接种后 2 周和第 3 次免疫后的 2、4、6 周分别采血分离血清,对照组亦进行同时采血

处理。将血清做 2^1 、 2^2 、 2^3 、 2^4 、 2^5 和 2^6 六个稀释度用 O 型口蹄疫正向间接血凝抗原试剂盒进行 FMDV 抗体效价检测, 2^1 稀释仍不产生 50%凝集的,血清效价视为 0。数据用 SAS 进行分析,以 $P < 0.05$ 判为差异显著。

2 结果

2.1 LTB 基因的 PCR 扩增

以本实验室构建并保存的 pMDTLT 质粒为模板,用设计好的引物扩增得到了 342 bp 的 LTB 基因。

2.2 LTB-VP1 表达质粒的构建结果

将 PCR 扩增好的 LTB 基因插入 pETVP1 并转化 BL21(DE3)LysS 后挑过夜培养后形成的单个克隆、PCR 扩增出与预期大小相符的 981 bp 的条带(VP1 加上 LTB 的长度);提取质粒用 *Nco* I、*Sal* I 双酶切得到 981 bp 和 5369 bp 的 2 个片段,与预期大小相符的条带,序列经测定正确。将成功构建的质粒命名为 pETLTBVP1。

2.3 LTB-VP1 蛋白的诱导表达

将含 pETLTBVP1 质粒的阳性克隆进行诱导表达,并经 SDS-PAGE 进行检测分析,由图 1 可见,已表达出目的 LTB-VP1 蛋白,蛋白质大小约 39 kD 左右,与预期大小相符。蛋白表达量经凝胶成像系统分析约占菌体总蛋白的 19.8%左右。Western blotting 印迹表明,该蛋白能与 FMDV 阳性血清和兔抗 CT 的多克隆抗体发生特异性反应(图 1)。

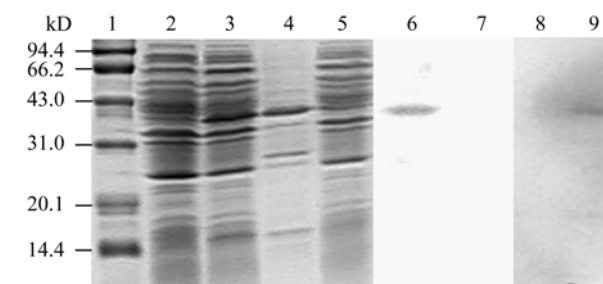


图 1 LTB-VP1 蛋白 SDS-PAGE 电泳及 LTB 和 VP1 的 Western blotting 分析

Fig. 1 SDS-PAGE and Western blotting analysis of the expressed product recombinant LTB-VP1. 1: standard protein marker; 2: uninduced *E. coli* lysate; 3: induced *E. coli* lysate; 4: precipitate; 5: supernatant; 6: Western blotting result of LTB; 7: Western blotting result of VP1; 8: Western blotting result of uninduced *E. coli* lysate; 9: Western blotting results of VP1.

2.4 LTB-VP1 融合蛋白的纯化

按文献[14]纯化 LTB-VP1 融合蛋白。再以纯化

蛋白质溶液进行 SDS-PAGE 电泳, 然后染色分析, 在 39 kD 处可看到清晰的蛋白质条带且条带较单一, 可见已纯化出相应的目的蛋白。分光光度计测得 LTB-VP1 蛋白溶液的浓度为 0.4428 mg/mL。

2.5 免疫小鼠产生的抗体水平

于第 1、2 次接种后 2 周, 第 3 次接种后 2、4、6 周采血分离血清进行 FMDV 抗体效价检测, 检测结果见表 1。从表 1 和图 2 可见, 用纯化的 LTB-VP1

融合蛋白免疫的小鼠首免后 2 周可见明显的抗体产生, 三免后 2 周达到高峰, 三免后 4 周仍可检测到血清抗体。且 LTB-VP1 诱导的抗体滴度高于普通商品疫苗对照组。将各检测结果进行统计分析同样发现: 首免和二免后 2 周以及三免后 2、4 周 LTB-VP1 接种组小鼠的血清抗体水平明显高于空白对照组 ($P<0.05$); 三免后 2 周 LTB-VP1 接种组小鼠的血清抗体水平明显高于商品疫苗接种组 ($P<0.05$)。

表 1 免疫小鼠血清抗体效价

Table 1 Serum antibody titers of the immunized mice

Groups	Serum antibody titer of mice				
	Two weeks after the first immunization	Two weeks after the second immunization	Two weeks after the third immunization	Four weeks after the third immunization	Six weeks after the third immunization
LTB-VP1	2, 2, 2	2, 2, 8	4, 8, 8	0, 4, 4	0, 0, 0
	2, 2, 4	8, 16, 16	16, 16, 32	4, 8, 8	0, 2, 2
Inactive FMDV vaccine	2, 2, 2	2, 2, 4	2, 4, 4	0, 2, 2	0, 0, 0
	0, 0, 0	4, 4, 4	4, 4, 8	4, 4, 4	0, 0, 2
Non-vaccinated control	0, 0, 0	0, 0, 2	0, 0, 0	0, 0, 0	0, 0, 0
	0, 0, 2	2, 2, 2	0, 2, 2	0, 0, 2	0, 0, 2

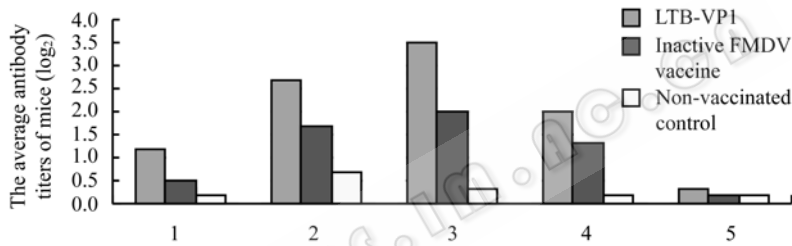


图 2 免疫小鼠血清平均抗体效价的变化

Fig. 2 Changes of serum antibody titers of the immunized mice. 1: two weeks after the first immunization; 2: two weeks after the second immunization; 3: two weeks after the third immunization; 4: four weeks after the third immunization; 5: six weeks after the third immunization.

3 讨论

目前, 接种 FMDV 灭活疫苗是预防口蹄疫的主要措施, 对控制 FMD 的流行起了重大的作用, 但灭活疫苗存在着安全隐患。例如, 疫苗生产过程中存在散毒和病毒灭活不完全的危险^[15,16]。并且, 目前国内 FMDV 灭活疫苗的实际使用效果不尽人意, 免疫商品猪出栏前抗体水平偏低, 甚至没有抗体, 起不到免疫保护的作用。因此, 安全、免疫效果好的 FMDV 基因工程疫苗成为了当今口蹄疫新型疫苗研究的一个重要课题。

VP1 是 FMDV 的主要保护性抗原, 在已发现的 O 型 FMDV 的 5 个抗原位点中, 有 3 个位于 VP1 内 (位点 1、位点 3 和位点 5), 另外位点 2 也与 VP1 有关, 只有位点 4 位于 VP3 上, 与 VP1 无关^[17,18]。VP1 可诱导接种动物产生中和抗体, 并且免疫动物具有

较强抵抗病毒感染的能力^[3-5]。因此, 完整的 VP1 蛋白或其部分表位肽成了人们制备 FMDV 蛋白质亚单位疫苗的靶抗原。自 1981 年 Kleid 等^[4]成功地进行了口蹄疫病毒 VP1 基因在原核细胞中的表达, 并免疫牛和猪后发现能产生中和抗体以来, 人们对 FMDV 的新型疫苗进行大量的研究。部分研究工作者将 FMDV 结构蛋白 VP1 几个抗原表位片段进行了表达或合成, 并用得到的蛋白接种实验动物、诱导了高水平的中和抗体^[3,19]。但 Rodriguez 等^[20]将合成的含 O 型 FMDV VP1 的 141~160 aa(G-H 环)的肽段肌肉接种牛, 虽产生了中和抗体, 却不能抵抗病毒的感染。

此外, 一些研究工作者采用具有系统免疫增强作用或系统黏膜免疫增强作用皆有的佐剂来增强 FMDV 新型疫苗的免疫原性, 通过不同途径免疫实验动物, 同样诱导产生了抗 FMDV 的特异性血清抗

体,部分还产生了黏膜免疫反应^[5,21-23]。如2005年Song等^[24]将O型FMDV VP1蛋白与CTB一起进行表达后接种小鼠,发现该融合蛋白能诱导小鼠产生中和抗体,且通过腹腔和鼻内接种小鼠比口腔接种有更高的保护率。用该蛋白免疫接种猪时,经3次接种后有免疫反应产生,并且攻毒时80%的猪被保护。

近来的研究表明,在多种动物的FMDV多克隆血清中针对FMDV的第1、2、3个抗原位点的抗体并没有占主导地位,且对于猪而言,其FMDV的多克隆血清对VP1 C末端编码的多肽并不如反刍动物一样有免疫反应。因而,FMDV中存在的尚未发现的优势抗原位点,对于诱导保护性免疫的产生可能也是重要的^[18]。因此,利用VP1全基因研制的基因工程疫苗较表位疫苗可提供更强的免疫保护。

LTB不但具有强的黏膜免疫佐剂性^[7,8],而且通过皮下及皮内等非黏膜免疫接种时同样具有好的佐剂性能^[9],其免疫增强作用优于CTB^[25]。其已被广泛应用于细菌(大肠杆菌、幽门螺杆菌等)^[26,27]和病毒(流感病毒、疱疹病毒、乙肝病毒)^[28-30]疫苗的研究中。但在口蹄疫基因工程疫苗的研究中,除庄娟等^[31]曾将FMDV VP1蛋白的第21~40、141~160 aa串连起来并和LTB二者进行融合表达作为FMDV和大肠杆菌二价疫苗外,本实验将FMDV VP1全基因序列与LTB进行融合表达尚属首次。LTB对蛋白质疫苗有明显的免疫增强作用,其还能诱导免疫动物产生针对其它共同免疫抗原的黏膜免疫反应^[7,8]。这对于可通过空气传播,并经呼吸道黏膜感染的FMD而言存在着一定的优势。

本研究实现了O型FMDV VP1全基因和大肠杆菌不耐热肠毒素LTB亚单位基因的融合表达,并初步进行了腹腔免疫接种实验。将LTB-VP1免疫组小鼠产生的血清抗体水平与对照组比较,发现在二免和三免后2周LTB-VP1免疫组明显高于对照组($P<0.05$),取得了比商品疫苗更好的免疫效果。本实验中的LTB-VP1蛋白作为免疫抗原在进行其他途径接种时的效果比较还有待于进一步研究证实。

REFERENCES

- [1] Yin Z, Liu JH. Animal Virology. 2nd Ed. Beijing: Science Press, 1997: 480.

殷震,刘景华. 动物病毒学. 第二版. 北京: 科学出版社, 1997: 480.

- [2] Xie QG. Foot-and-Mouth Disease. Beijing: Chinese Agricultural Press, 2004: 20.
谢庆阁. 口蹄疫. 北京: 中国农业出版社, 2004: 20.
- [3] Yang ZJ, Lin Y, Li GJ, *et al.* Recombinant vaccine containing both B cell and T cell epitopes induces guinea pig in immune responses against type O foot-and-mouth disease virus. *J Fudan Univ (Nat Sci)*, 2000, **39**(5): 565-567.
杨志军, 林焱, 李光金, 等. 含T细胞表位和B细胞表位的抗O型FMDV基因工程疫苗诱导豚鼠产生免疫反应. 复旦学报, 2000, **39**(5): 565-567.
- [4] Carrillo C, Wigdorovitz A, Oliveros JC, *et al.* Protective immune response to foot-and-mouth disease virus with VP1 expressed in transgenic plants. *J Virol*, 1998, **72**(2): 1688-1690.
- [5] Su CX, Duan XG, Wang XQ, *et al.* Fusion expression of O type foot-and-mouth diseases virus VP1 gene and HSP70 gene and induction of immune responses in mice. *Chin J Biotech*, 2006, **39**(5): 733-736.
苏春霞, 段相国, 王秀清, 等. FMDV VP1基因与HSP70基因在毕赤酵母中融合表达及免疫特性. 生物工程学报, 2006, **39**(5): 733-736.
- [6] Clements JD, Finkelstein RA. Immunological cross-reactivity between a heat-labile enterotoxin(s) of *Escherichia coli* and subunits of vibrio cholerae enterotoxin. *Infect Immun*, 1978, **21**(3): 1036-1039.
- [7] Guebre-Xabier M, Hammond SA, Epperson DE, *et al.* Immunostimulant patch containing heat-labile enterotoxin from *Escherichia coli* enhances immune responses to injected influenza virus vaccine through activation of skin dendritic cells. *J Virol*, 2003, **77** (9): 5218-5225.
- [8] Weltzin R, Guy B, Thomas WD, *et al.* Parenteral adjuvant activities of *Escherichia coli* heat-labile toxin and its B subunit for immunization of mice against gastric helicobacter pylori infection. *Infect Immun*, 2000, **68**(5): 2775-2782.
- [9] Dale JB, Chiang EC, Levi R, *et al.* Intranasal immunization with recombinant group A streptococcal M protein fragment fused to the B subunit of *Escherichia coli* labile toxin protects mice against systemic challenge infections. *J Infect Dis*, 1995, **171**(4): 1038-1041.
- [10] Li RC, Yu XL, Bai X, *et al.* Synthesis, expression of representative VP1 gene of FMDV type O and immunogenicity of recombinant protein. *J Hunan Agri Univ*, 2008, **34**(3): 333-337.
李润成, 余兴龙, 白露, 等. O型口蹄疫病毒代表性VP1基因的人工合成、表达及重组蛋白的免疫原性检测. 湖南农业大学学报, 2008, **34**(3): 333-337.
- [11] Sambrook J, Russell DW. Molecular Cloning Experiment Guide. 2nd Ed. Jin DY, Li MF, *et al.* Translation; Hou YD Proofreading. Beijing: Science Press, 1992: 881-888.
J.萨姆布鲁克, D.W.拉塞尔. 分子克隆实验指南. 第二版. 金东雁, 黎孟枫等译; 侯云德等校. 北京: 科学出版社,

- 1992: 881–888.
- [12] Clements JD, Finkelstein RA. Demonstration of shared and unique immunological determinants in enterotoxins from vibrio cholerae and *Escherichia coli*. *Infect Immun*, 1978, **22**(3): 709–713.
- [13] Tu CC, Xu JL, Yin Z, *et al*. The study on immunogenicity improve of the foot and mouth disease virus capsid VP1 peptide. *J Vet Univ*, 1988, **8**(2): 170–175.
涂长春, 许基龙, 殷震, 等. 提高口蹄疫病毒衣壳多肽 VP1 免疫原性的实验研究. 兽医大学学报, 1988, **8**(2): 170–175.
- [14] Lu J. Protein Purification Technology and Its Application. Beijing: Chemical Industry Press, 2005: 273.
陆健. 蛋白质纯化技术及应用. 北京: 化学工业出版社, 2005: 273.
- [15] Barteling SJ, Vreeswijk J. Developments in foot-and-mouth disease vaccines. *Vaccine*, 1991, **9**(2): 75–88.
- [16] Barron JC, Cuevas MF, Belsham GJ, *et al*. Induction of a protective response in swine vaccinated with DNA encoding foot-and-mouth disease virus empty capsid proteins and the 3D RNA polymerase. *J Gen Virol*, 2001, **82**: 1713–1724.
- [17] Wu HB, Shao JJ, Chang HY. Research progress in foot and mouth disease virus antigen sites. *Prog Vet Med*, 2005, **26**(9): 1–4.
吴海波, 邵军军, 常惠芸. 口蹄疫病毒抗原位点研究进展. 动物医学进展, 2005, **26**(9): 1–4.
- [18] Aggarwal N, Barnett PV. 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 Gen Virol*, 2002, **83**: 775–782.
- [19] Giavedoni LD, Kaplan G, Marcovecchio F, *et al*. Protection conferred by TrpE fusion proteins containing portions of the C-terminal region of capsid protein VP1 of foot-and-mouth disease virus. *J Gen Virol*, 1991, **72**: 967–971.
- [20] Rodriguez LL, Barrera J, Kramer E, *et al*. A synthetic peptide containing the consensus sequence of the G-H loop region of foot-and-mouth disease virus type-O VP1 and a promiscuous T-helper epitope induces peptide-specific antibodies but fails to protect cattle against viral challenge. *Vaccine*, 2003, **21**(25–26): 3751–3756.
- [21] Fischer D, Rood D, Barrette RW, *et al*. Intranasal immunization of guinea pigs with an immunodominant foot-and-mouth disease virus peptide conjugate induces mucosal and humoral antibodies and protection against challenge. *J Virol*, 2003, **77**(13): 7486–7491.
- [22] Li G, Chen W, Yan W, *et al*. Comparison of immune responses against foot-and-mouth disease virus induced by fusion proteins using the swine IgG heavy chain constant region or beta-galactosidase as a carrier of immunogenic epitopes. *Virology*, 2004, **328**(2): 274–281.
- [23] Zhang XY, Jin HL, Yang RY, *et al*. Effect s of chitosan on the FMDV-DNA mucosal immunization. *J China Agri Uni*, 2005, **10**(5): 21–25.
张馨玉, 金华利, 杨若耶, 等. 壳聚糖对口蹄疫 DNA 疫苗黏膜免疫的影响. 中国农业大学学报, 2005, **10**(5): 21–25.
- [24] Song H, Wang Z, Zheng D, *et al*. A novel mucosal vaccine against foot-and-mouth disease virus induces protection in mice and swine. *Biotechnol Lett*, 2005, **27**(21): 1669–1674.
- [25] Millar DG, Hirst TR, Snider DP. *Escherichia coli* heat-labile enterotoxin B subunit is a more potent mucosal adjuvant than its closely related homologue, the B subunit of cholera toxin. *Infect Immun*, 2001, **69**(5): 3476–3482.
- [26] Xu CB, Wei GS, Wang WC, *et al*. Immunogenicity of genetic engineering strain expressing *Escherichia coli* fimbriac. *Chin J Preventive Vet Med*, 2003, **25**(1): 9–12.
许崇波, 卫广森, 王文成, 等. 表达大肠杆菌 K88ac_ST1_LTB 融合蛋白工程菌株的免疫原性研究. 中国预防兽医学报, 2003, **25**(1): 9–12.
- [27] Wu C, Zou QM, Guo H, *et al*. Construction and expression of the fusion gene of *Helicobacter pylori* urease B subunit and *E. coli* heat labile enterotoxin B subunit. *Chin J Microbiol Immunol*, 2002, **22**(2): 175–179.
吴超, 邹全明, 郭红, 等. 幽门螺杆菌 UreB 与大肠杆菌 LTB 基因融合及表达的研究. 中华微生物学和免疫学杂志, 2002, **22**(2): 175–179.
- [28] Verweij WR, Haan LD, Holtrop M, *et al*. Mucosal immunoadjuvant activity of recombinant *Escherichia coli* heat-labile enterotoxin and its B subunit: induction of systemic IgG and secretory IgA responses in mice by intranasal immunization with influenza virus surface antigen. *Vaccine*, 1998, **16**(20): 2069–2076.
- [29] Riahards CM, Aman AT, Hist TR, *et al*. Protective mucosal immunity to ocular herpes simplex virus type 1 infection in mice by using *Escherichia coli* heat-labile enterotoxin B subunit as an adjuvant. *J Virol*, 2001, **75**(4): 1664–1671.
- [30] Schodel F, Will H. Construction of a plasmid for expression of foreign epitopes as fusion proteins with subunit B of *Escherichia coli* heat-labile enterotoxin. *Infect Immun*, 1989, **57**(4): 1347–1350.
- [31] Zhuang J, You YJ, Chen B, *et al*. Study on the immune response of a fusion expression product consisted of two-copy gene of T-cell and B-cell epitopes of type O of foot-and-mouth disease virus VP1 and LTB gene of *Escherichia coli*. *J Anhui Agri Sci*, 2007, **35**(33): 10622–10623.
庄娟, 尤永进, 陈波, 等. O 型口蹄疫病毒 T、B 细胞表位双拷贝基因与大肠杆菌 LTB 基因融合表达产物的免疫应答. 安徽农业科学, 2007, **35**(33): 10622–10623.