

## A型塞内卡病毒的病毒样颗粒的制备及其免疫原性分析

伍春平, 茹毅, 田宏, 马坤, 郝荣增, 李亚军, 罗俊聪, 石正旺, 刘华南, 左志, 郑海学

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

伍春平, 茹毅, 田宏, 等. A型塞内卡病毒的病毒样颗粒的制备及其免疫原性分析. 生物工程学报, 2021, 37(9): 3211-3220.

Wu CP, Ru Y, Tian H, et al. Generation and immunogenicity evaluation of Senecavirus A virus-like particles. Chin J Biotech, 2021, 37(9): 3211-3220.

**摘要:** 为了研制 A 型塞内卡病毒 (Senecavirus A, SVA) 的病毒样颗粒 (Virus-like particles, VLPs) 疫苗, 以 SVA 田间流行毒株 CH-FJ-2017 结构蛋白基因序列为研究对象, 构建了能够同时表达 SVA 的 3 种结构蛋白 VP0、VP1 和 VP3 的单个原核重组表达质粒 pET28a-SVA-VP031。通过大肠杆菌 *Escherichia coli* 表达、亲和层析纯化和体外自组装, 获得 SVA VLPs。透射电子显微镜鉴定显示, SVA 的 3 种结构蛋白在体外能够自组装成直径约 25–30 nm 的 VLPs, 并且动物免疫试验结果表明, 该 VLPs 能够有效刺激豚鼠产生高水平的抗原特异性中和抗体。上述研究结果为 SVA VLPs 疫苗的研制奠定了基础。

**关键词:** A 型塞内卡病毒, 病毒样颗粒, 结构蛋白, 免疫原性

## Generation and immunogenicity evaluation of Senecavirus A virus-like particles

Chunping Wu, Yi Ru, Hong Tian, Kun Ma, Rongzeng Hao, Yajun Li, Juncong Luo, Zhengwang Shi, Huanan Liu, Zhi Zuo, and Haixue Zheng

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 develop Senecavirus A (SVA) virus-like particles (VLPs), a recombinant prokaryotic expression plasmid pET28a-SVA-VP031 was constructed to co-express SVA structural proteins VP0, VP3 and VP1, according to the genomic sequence of the field isolate CH-FJ-2017 after the recombinant proteins were expressed in *E. coli* system, and purified by Ni<sup>2+</sup> ion chromatographic method. The SVA VLPs self-assemble with a high yield *in vitro* buffer. A typical VLPs with an average diameter of 25–30 nm which is similar to native virions by using TEM detection. Animals immunized by SVA VLPs shown that the VLPs induced high titers neutralizing antibodies in Guinea pigs. This study indicated that the VLPs produced with co-expressing SVA structural proteins VP0, VP3 and VP1 in prokaryotic system is a promising candidate and laid an

**Received:** March 16, 2021; **Accepted:** July 9, 2021

**Supported by:** Key Programs of Science and Technology in Gansu Province, China (No. 19ZDNA001), Key Project of Science and Technology in Luoyang City, China (No. 1901029A).

**Corresponding author:** Haixue Zheng. Tel: +86-931-8342086; Fax: +86-931-8342052; E-mail: zhenghaixue@caas.cn

甘肃省科技重大专项 (No. 19ZDNA001), 洛阳市科技重大专项 (No. 1901029A) 资助。

important foundation for the development of a novel SVA VLPs vaccine.

**Keywords:** Senecavirus A, virus-like particles, structural proteins, immunogenicity

A 型塞内卡病毒 (Senecavirus A, SVA) 是小 RNA 病毒科 (Picornaviridae) 塞内卡病毒属 *Senecavirus* 的唯一成员, 病毒粒子呈正二十面体结构, 无囊膜, 直径约为 25–30 nm<sup>[1]</sup>。2002 年, 该病毒首次发现于美国马里兰州一实验室的细胞培养物中。由于 SVA 对人正常组织无感染性, 但是能在肿瘤细胞中复制, 因此对该病毒的早期研究主要集中于其溶瘤作用<sup>[2]</sup>。

2007 年, 加拿大研究人员首次发现该病毒与猪特发性水疱病 (Porcine idiopathic vesicular disease, PIVD) 有关<sup>[3]</sup>, 随后在 2012 年, 美国也出现同样的报道<sup>[4]</sup>。2014 年底至 2015 年初, SVA 开始在巴西、中国、美国、泰国、哥伦比亚、新西兰和越南等国家大面积暴发<sup>[5–11]</sup>。研究发现, 各日龄的猪群都对 SVA 易感, A 型塞内卡病毒病的临床症状与口蹄疫 (Foot-and-mouth disease, FMD) 相似且难以区分, 困扰口蹄疫防控, 严重危害养猪业的发展<sup>[12]</sup>。目前, 尚无商品化的 SVA 疫苗, 亟需有效防控产品。

病毒样颗粒 (Virus-like particles, VLPs) 是一种由病毒衣壳蛋白自行装配形成的空心纳米颗粒, 不含病毒核酸, 也不具有感染性<sup>[13]</sup>。VLPs 具有与真实病毒粒子相同或相似的形态、三维结构和抗原位点, 能以更为真实的构象被抗原提呈细胞吞噬、加工与提呈, 具有很强的免疫原性和生物学活性, 能够有效激发机体的免疫应答反应<sup>[14]</sup>。由于 VLPs 没有感染性, 因此更加安全。

原核大肠杆菌表达系统具有操作简单、表达效率高和生产成本低等优点, 是一种常用的抗原蛋白体外表达系统, 并且在多种 VLPs 疫苗的研制中得到广泛应用<sup>[15]</sup>。本研究采用大肠杆菌表达系统, 通过单质粒同时高效、可溶性地表达 SVA 3 种结构蛋白 VP0、VP1 和 VP3, 经过亲和层析

纯化和体外自组装, 成功制备了具有较高纯度和较好免疫原性的 SVA VLPs, 为 SVA VLPs 疫苗的研制奠定了基础。

## 1 材料与方法

### 1.1 细胞、病毒、实验动物和主要试剂

SVA 分离株 CH-FJ-2017 (GenBank 登录号: KY74510) 由本实验室分离、保存; 猪肾传代细胞 (IBRS-2)、大肠杆菌感受态 DH5 $\alpha$  和 BL21(DE3) 由本实验室保存; DNA 重组试剂盒 NEBuilder<sup>®</sup> HiFi DNA Assembly Master 购自 NEB 公司; 小鼠抗 His-Tag 单克隆抗体、HRP 标记的山羊抗小鼠 IgG 抗体、HRP 标记的山羊抗猪 IgG 抗体和 HRP 标记的山羊抗豚鼠 IgG 抗体购自英国 Abcam 公司; HisTrap FF 镍亲和层析柱和 AKTA pure150 纯化仪购自美国 GE 公司; 透射电镜 HT7700 购自日本日立公司; 弗氏完全佐剂和不完全佐剂购自美国 Sigma 公司; 豚鼠购自中国农业科学院兰州兽医研究所实验动物中心; SUMO 蛋白酶购自北京索莱宝科技有限公司。

### 1.2 重组表达质粒 pET28a-SVA-VP031 的构建与鉴定

首先以 SVA CH-FJ-2017 毒株 3 种结构蛋白 VP0、VP1 和 VP3 的基因序列为基础, 进行原核表达密码子优化, 再将编码 His-SUMO 融合标签蛋白的基因序列分别与优化后的结构蛋白基因串联, 形成 3 段融合目标蛋白基因序列 His-SUMO-VP0、His-SUMO-VP3 和 His-SUMO-VP1, 每段融合基因分别含有各自的 RBS 序列及翻译起始、终止信号 (由北京六合华大基因科技有限公司合成)。设计同源重组的引物 (表 1), 分别进行 PCR 扩增 His-SUMO-VP0、His-SUMO-VP3 和 His-SUMO-VP1 三段目的基因片段, 然后进行 DNA 纯化回

收。利用 DNA 重组试剂盒 NEBuilder® HiFi DNA Assembly Master，进行 3 段目的基因片段与过渡载体片段的同源重组 DNA 无缝连接，获得按 0-3-1 顺序连接 3 段目的基因片段，将该目的基因片段和 pET-28a(+) 载体质粒分别经 *Bam*H I 和 *Xba* I 双酶切后，进行 DNA 纯化回收，并使用

T4 DNA 连接酶，16 ℃连接过夜，构建获得重组表达质粒 pET28a-SVA-VP031 (图 1)。将重组质粒转化 DH5α 感受态细胞，挑取单克隆菌落扩大培养，利用质粒提取试剂盒提取重组质粒，用 *Hind* III 和 *Xba* I 进行双酶切鉴定，并送公司测序鉴定目标序列的正确插入<sup>[16]</sup>。

表 1 引物序列表  
Table 1 Primer sequences

Primer name	Primer sequence (5'-3')	Size (bp)
P1-F	CAATTCCCCTCTAGAAATAATTTTGTTTAACTTTAAGAAGGA	42
P1-R	TTACTGTTCTTCATCGGTACCGGT	24
P2-F	GTACCGATGAAGAACAGTAAAATAATTTTGTTTAACTTTAAGAAGGA	47
P2-R	TTAATGAAAAACATAGCTCGGATTGC	26
P3-F	CGAGCTATGTTTTCATTAATAATAATTTTGTTTAACTTTAAGAAGGAGA	49
P3-R	AATTCGGATCCTTACTGCATCAGCATT	27

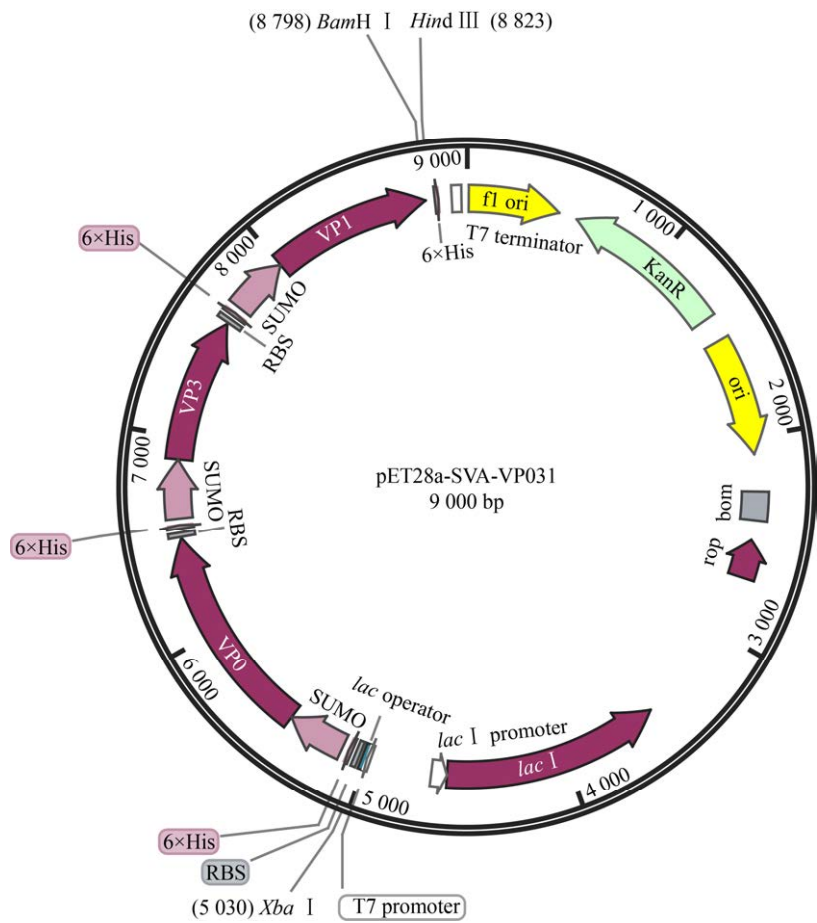


图 1 重组表达质粒 pET28a-SVA-VP031 示意图  
Fig. 1 Schematic diagram of recombinant expression plasmid pET28a-SVA-VP031.

### 1.3 重组蛋白的诱导表达与纯化

将重组质粒 pET28a-SVA-VP031 转化 *E. coli* BL21(DE3) 感受态细胞,挑取阳性单克隆菌落于 5 mL 含 50  $\mu\text{g/mL}$  卡那霉素 (Kan) 的液体 LB 培养基中扩大培养,再以 1:50 的比例接种于含 50  $\mu\text{g/mL}$  Kan 的液体 LB 培养基中,37  $^{\circ}\text{C}$ 、220 r/min 培养 4 h,当菌液  $OD_{600}$  值达到 0.8 左右时,加入终浓度为 0.5 mmol/L 的 IPTG,16  $^{\circ}\text{C}$ 、220 r/min 诱导培养 12 h 后,4 000 $\times g$  离心 10 min 收集菌体,用平衡缓冲溶液 (50 mmol/L Tris-HCl, 500 mmol/L NaCl, 20 mmol/L 咪唑, pH 7.5) 以 1:10 的比例重悬菌体,超声破菌,高速离心收集破碎后的菌液上清,经 0.22  $\mu\text{m}$  滤膜过滤后,依照 GE 公司镍亲和层析柱说明书进行纯化。SDS-PAGE 鉴定纯化后的目标蛋白,并使用 BCA 蛋白定量试剂盒测定蛋白浓度<sup>[17-19]</sup>。

### 1.4 Western blotting (WB) 鉴定重组蛋白

分别以小鼠抗 His-Tag 单克隆抗体和 SVA 感染猪血清作为一抗,HRP 标记的山羊抗小鼠 IgG 和山羊抗猪 IgG 为二抗,对纯化后的 3 种结构蛋白进行 WB 分析,经显色液显色后观察结果。

### 1.5 His-SUMO 融合标签的去除及 SVA VLPs 鉴定

在纯化后的含 His-SUMO 融合标签的 SVA 结构蛋白混合溶液中加入 SUMO 蛋白酶,4  $^{\circ}\text{C}$  酶切过夜。将酶切后含有 SVA 结构蛋白的溶液流穿镍亲和层析柱,收集流穿液。His-SUMO 标签结合于镍柱,不含 His-SUMO 标签的 SVA 结构蛋白 VP0、VP1 和 VP3 在流穿液中。通过 SDS-PAGE 与 WB 对纯化产物进行鉴定,并用 BCA 蛋白定量试剂盒进行浓度测定。

收集上述含有 SVA 结构蛋白的流穿液于组装缓冲液 (50 mmol/L Tris-HCl, 500 mmol/L NaCl, pH 7.5) 中,4  $^{\circ}\text{C}$  组装过夜后经 2% 磷钨酸染色,用透射电镜观察 SVA 结构蛋白的自组装。

### 1.6 VLPs 的免疫程序

为了评价 SVA VLPs 的免疫原性,取纯化后的 VLPs 分别与弗氏佐剂混合乳化,制备油包水型佐剂疫苗,疫苗抗原含量为 200  $\mu\text{g/mL}$ 。随机挑选 18 只豚鼠,分为 3 组,每组 6 只,第 1 组注射 VLPs 0.25 mL (含抗原 50  $\mu\text{g}$ ); 第 2 组注射 VLPs 0.5 mL (含抗原 100  $\mu\text{g}$ ); 第 3 组为阴性对照组,每只豚鼠注射 0.5 mL PBS。采用肌肉注射的免疫方式,于首次免疫后 14 d 对豚鼠进行第二次免疫,分别于首次免疫后 0、7、14、21、28、35 d 采集全血,分离血清,-80  $^{\circ}\text{C}$  保存备用。

### 1.7 中和效价的测定

将血清于 56  $^{\circ}\text{C}$  的水浴锅中灭活 30 min,用含 10% 胎牛血清的 DMEM 培养基从 1:4 开始稀释,同时设置病毒对照和细胞对照组;将病毒稀释至 200 TCID<sub>50</sub>,与稀释后的血清等体积混合,细胞对照除外,37  $^{\circ}\text{C}$  孵育 1 h;将混合物转移至预铺  $2\times 10^4$  个/孔 IBRS-2 细胞的 96 孔板中,37  $^{\circ}\text{C}$ 、5% CO<sub>2</sub> 培养箱中培养 72 h;在显微镜下,统计 50% 细胞病变数 (CPE<sub>50</sub>)<sup>[20]</sup>。血清的中和效价以抑制 50% 细胞病变的最小血清稀释度计算。

### 1.8 免疫血清中抗原特异性抗体的检测

利用间接 ELISA 对各实验组免疫血清进行检测,分析 SVA VLPs 的免疫原性。用 50 mmol/L 碳酸盐缓冲溶液将 SVA VLPs 包被于 ELISA 酶板,4  $^{\circ}\text{C}$  孵育过夜;用 1% 牛血清白蛋白 (BSA) 4  $^{\circ}\text{C}$  封闭 10 h;将待检血清用血清稀释液从 1:1 000 开始稀释并加入到反应孔中,每孔 50  $\mu\text{L}$ ,每个样品设置 3 个重复,37  $^{\circ}\text{C}$  孵育 30 min;HRP 标记的山羊抗豚鼠 IgG 抗体用抗体稀释液按 1:5 000 稀释后加入反应孔中,每孔 50  $\mu\text{L}$ ,37  $^{\circ}\text{C}$  孵育 30 min;加入 TMB 底物溶液,每孔 50  $\mu\text{L}$ ,37  $^{\circ}\text{C}$  显色 12 min;每孔加入 50  $\mu\text{L}$  终止液终止反应并测定  $OD_{450}$  的值<sup>[21]</sup>。

2 结果与分析

2.1 pET28a-SVA-VP031 质粒酶切鉴定

pET28a-SVA-VP031 质粒经 *Hind* III和 *Xba* I 双酶切后，1%的琼脂糖凝胶电泳结果显示，约 3 800 bp 和 5 300 bp 处可见两条特异性条带(图 2)，大小与理论值相符。质粒经测序后，与目标序列相同，表明质粒 pET28a-SVA-VP031 构建成功。

2.2 重组蛋白的诱导表达和可溶性分析

分别收集 IPTG 诱导前与诱导后的大肠杆菌破碎后的菌液上清和沉淀，进行 SDS-PAGE 鉴定。结果表明，IPTG 诱导后 IPTG 菌液上清和沉淀中，约在 35–66 kDa 处出现 3 条特异性蛋白条带，大小与理论值相符，3 种含融合标签的 SVA 结构蛋白均正常表达，且表达量较为均一 (图 3)。

2.3 重组蛋白的纯化和鉴定

使用镍亲和层析柱对融合表达的 3 种重组结构蛋白进行纯化，纯化后的样品经 SDS-PAGE 鉴定，大约在 35–66 kDa 处观察到 3 条特异性蛋白

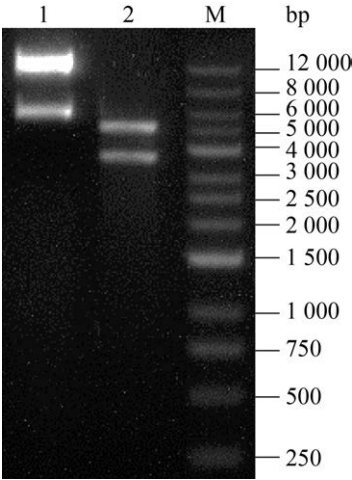


图 2 pET28a-SVA-VP031 质粒的双酶切鉴定  
Fig. 2 Identification of pET28a-SVA-VP031 plasmid digested by *Hind* III and *Xba* I. M: DNA molecular marker; 1: pET28a-SVA-VP031 plasmid; 2: pET28a-SVA-VP031 plasmid digested by *Hind* III and *Xba* I.

条带 (图 4A)，与表达鉴定结果相符，目标蛋白的 WB 分析结果如图 4B，3 种含 His-SUMO 标签的 SVA 结构蛋白与 SVA 感染阳性猪血清和小鼠抗 His-Tag 单克隆抗体均有较好的免疫反应。经

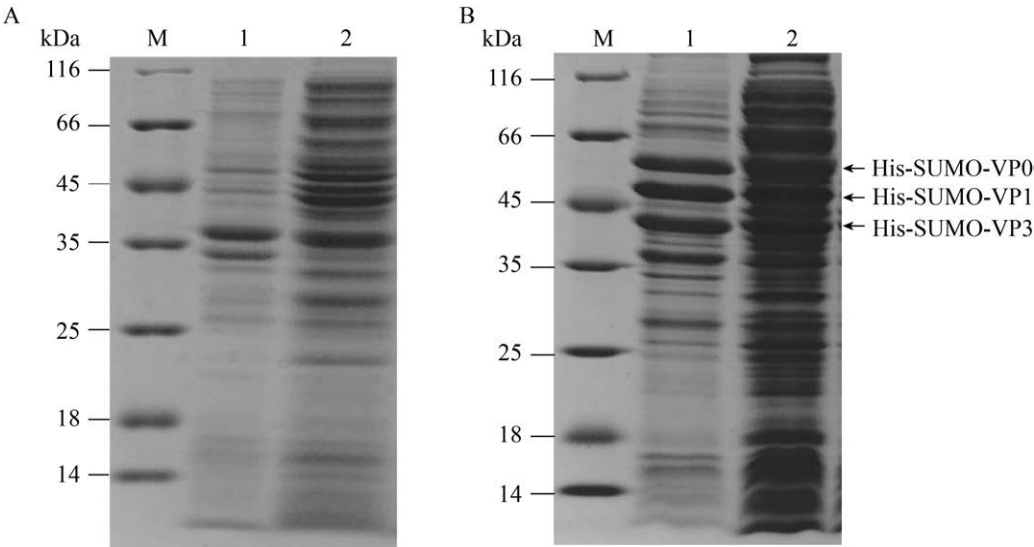


图 3 重组结构蛋白表达 SDS-PAGE 结果  
Fig. 3 Expression of recombinant structural proteins analyzed by SDS-PAGE. M: protein molecular weight marker. (A) Expression of recombinant proteins before induction. (B) Expression of recombinant proteins after induction.

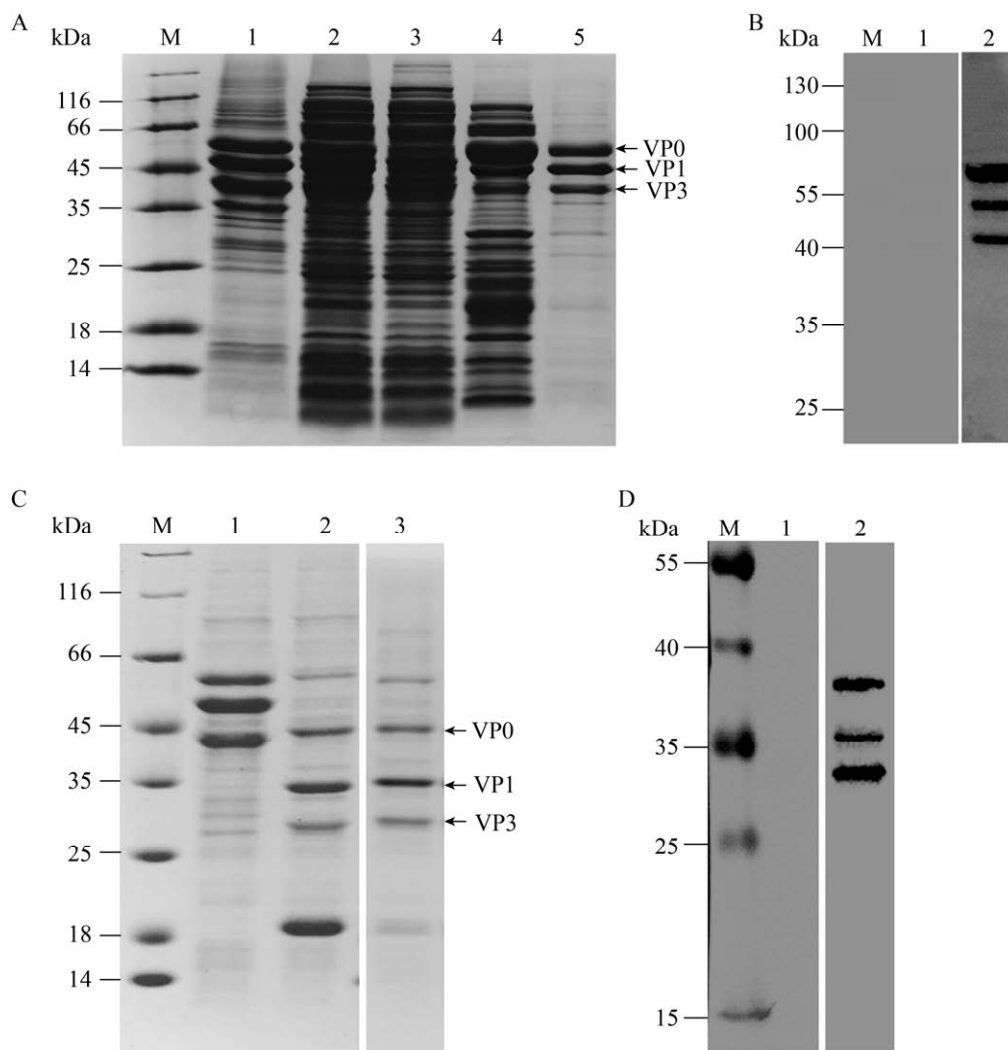


图 4 重组蛋白的纯化与鉴定

Fig. 4 Purification and identification of recombinant proteins. Lane M: protein molecular weight marker. (A) Lanes 1 and 2: the precipitation and supernatant of recombinant bacteria cell lysate after induction, respectively; lanes 3 and 4: the hetero-proteins of recombinant bacteria cell lysate; lane 5: VP0, VP1 and VP3 proteins after purification. (B) Lanes 1 and 2: Western blotting analysis of proteins VP0, VP1 and VP3 with anti-His tag mAb and swine serum anti-SVA, respectively. (C) Lane 1: SDS-PAGE analysis of the proteins VP0, VP1 and VP3 fused with the His-SUMO tag; lane 2: SDS-PAGE analysis of the proteins VP0, VP1 and VP3 removed His-SUMO tag by SUMO protease; lane 3: SDS-PAGE analysis of the proteins VP0, VP1 and VP3 without the His-SUMO tag. (D) Lanes 1 and 2: Western blotting analysis of the proteins VP0, VP1 and VP3 with anti-His tag mAb and swine serum anti-SVA, respectively.

纯化后的含 His-SUMO 标签的 SVA 结构蛋白样品经 SUMO 蛋白酶酶切后,进行 SDS-PAGE 鉴定,大约在 25–45 kDa 处观察到 3 条特异性蛋白条带 (图 4C),并且大小与理论值相符。经镍亲和层析柱去除 His-SUMO 标签后,SDS-PAGE 鉴定结果显示,25–45 kDa 之间的

SVA 结构蛋白条带依然存在,而 18 kDa 左右的 His-SUMO 标签条带消失 (图 4C)。WB 结果显示,3 种结构蛋白与 SVA 感染阳性猪血清均有较好的免疫反应,而与小鼠抗 His-Tag 单克隆抗体均无特异性反应 (图 4D),说明 His-SUMO 标签已被切除。

2.4 VLPs 透射电镜鉴定

为确定 SVA 结构蛋白在体外的自组装,使用透射电镜对组装后的 SVA VLPs 进行观察鉴定。结果显示,在 200 nm (图 5A) 和 100 nm (图 5B) 的分辨率下,均可观察到典型的直径约 25 nm 的病毒样颗粒。该结果表明,SVA 的 3 种结构蛋白成功在体外自动装配成 VLPs。

2.5 SVA VLPs 的免疫效果

将纯化获得的 SVA VLPs 免疫豚鼠,结果显示,不同剂量的 VLPs 免疫豚鼠后 7 d,均在豚鼠体内产生了较高水平的 SVA VLPs 特异性抗体,加强免疫后抗体水平进一步升高,在免疫后 21 d,

抗体水平达到峰值 (图 6A)。在免疫后 35 d 时,不同剂量免疫的豚鼠血清抗体效价都大于 1 : 128 000 (图 6B),免疫的血清对 SVA VLPs 具有非常高的亲和力。

使用 IBRS-2 细胞,以 200 TCID<sub>50</sub> SVA CH-FJ-2017 接种量测定豚鼠免疫血清对 CH-FJ-2017 的中和效价。结果显示,高剂量 VLPs 免疫组初次免疫后 7 d,豚鼠血清中和抗体效价 log10 的平均值为 1.012 5;初次免疫后 14 d,豚鼠血清中和抗体效价 log10 的平均值为 1.875;在加强免疫后,豚鼠血清中和抗体效价明显升高,加强免疫后 14 d,豚鼠血清中和抗体效价 log10 平

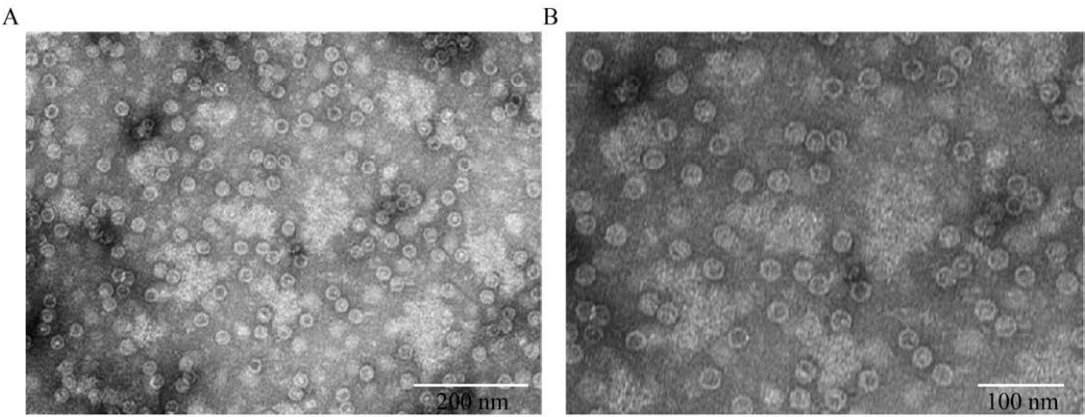


图 5 SVA VP0、VP1 和 VP3 蛋白形成 VLPs 的电镜观察结果  
Fig. 5 Analysis of VLPs assembled by the proteins VP0, VP1 and VP3 through TEM. The shape and diameter of VLPs were observed by TEM at a resolution of 200 nm (A) and 100 nm (B).

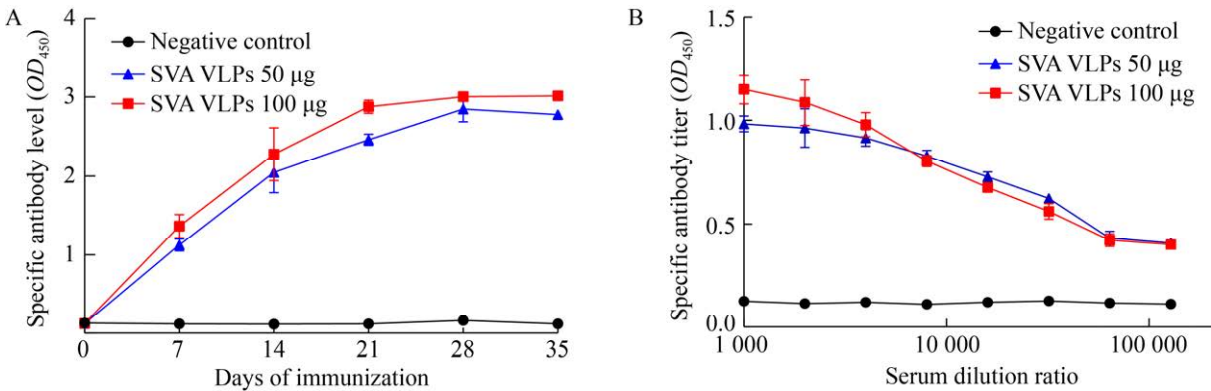


图 6 抗 SVA VLPs 豚鼠多抗血清抗体水平与滴度  
Fig. 6 The antibody levels and the antibody titers of the SVA VLPs-immunized guinea pigs.



均值为 2.625, 豚鼠血清中和抗体效价大于 512; 低剂量 VLPs 免疫组初次免疫后 7 d 时, 豚鼠血清中和抗体效价  $\log_{10}$  的平均值为 0.85; 初次免疫后 14 d, 豚鼠血清中和抗体效价  $\log_{10}$  的平均值为 1.5; 在加强免疫后, 豚鼠血清中和抗体效价明显升高, 加强免疫后的 14 d, 豚鼠血清中和抗体效价  $\log_{10}$  平均值为 2.6, 豚鼠血清中和抗体效价大于 360 (图 7)。

### 3 讨论

VLPs 具有与天然病毒粒子相似的结构特征, 但不含病毒基因组因而不具感染性, 由其制备的 VLPs 疫苗能有效诱导机体产生高水平的免疫应答, 对动物产生有效免疫保护, 是目前基因工程疫苗研究的热点<sup>[13]</sup>。大肠杆菌表达系统具有遗传背景清晰、制备周期短、表达量高、成本低等优点。1979 年, Burrell 等首次利用原核表达系统表达了乙肝病毒核心抗原 VLPs (HBcAg VLPs)<sup>[22]</sup>; 1982 年, Cohen 和 Richmond 首次用免疫电镜观察到原核表达的 HBcAg VLPs<sup>[23]</sup>。自此, 大肠杆菌表达系统被广泛应用于 VLPs 疫苗的研制。大肠杆菌表达系统最主要的缺点是缺乏糖基化、酰基化等复杂的蛋白质翻译后修饰, 表达的蛋白经

常以包涵体形式存在。SUMO 蛋白是一种小分子泛素样修饰蛋白, 作为重组蛋白表达的融合标签或分子伴侣, 其不仅可以提高融合蛋白的表达量, 还具有抗蛋白酶水解以及促进目标蛋白正确折叠、提高重组蛋白可溶性等功能。同时, SUMO 融合标签还可以被 SUMO 蛋白酶完整切除, 保持目标蛋白的真实氨基末端, 因此 SUMO 融合标签被广泛应用于目标抗原蛋白的融合表达。2004 年, Malakhov 等开始通过 SUMO 融合表达技术, 通过原核表达系统制备具有真实氨基酸末端的目标蛋白, 同时开发出成熟的 SUMO 融合表达纯化技术<sup>[24]</sup>; 2009 年, 王廷方等首次使用 SUMO 融合表达技术, 通过双质粒表达制备口蹄疫病毒 (Foot and mouth disease virus, FMDV) 的 VLPs<sup>[25]</sup>。

SVA 与 FMDV 同为小 RNA 病毒科, 病毒粒子的结构与组成非常相似, 我们前期通过生物信息学软件分析发现, SVA 结构蛋白缺少糖基化修饰位点, 因此本研究使用原核表达系统, 通过单个质粒同时表达 SVA 的 3 种结构蛋白, 并通过体外组装制备 SVA VLPs。本研究采用的多顺反子表达系统, 使用单个质粒转化大肠杆菌, 通过 1 种抗生素进行阳性克隆筛选, 可同时高效表达多种目标蛋白, 操作较为简便, 且避免了多质粒共转化可能存在相互干扰的问题。本研究还采用 SUMO 融合标签和低温诱导表达策略, 显著提高了目标抗原蛋白的可溶性和表达量, 获得了表达量较为均一的 3 种 SVA 结构蛋白, 最终菌体中可溶性目标蛋白比例约占总蛋白的 25% 以上, 具有产业化开发的前景。

SVA 病毒衣壳由结构蛋白 VP1、VP2、VP3 和 VP4 组成, VP2 和 VP4 由前体蛋白 VP0 裂解而成<sup>[26]</sup>。本研究发现大肠杆菌表达系统表达的 SVA VP0 蛋白没发生切割过程, 但不影响 3 种结构蛋白的体外自组装, 最终获得了与天然病毒粒子大小相似的 VLPs; 动物免疫试验结果表明, 本研究制备的 SVA VLPs 具有良好的免疫原性, 能

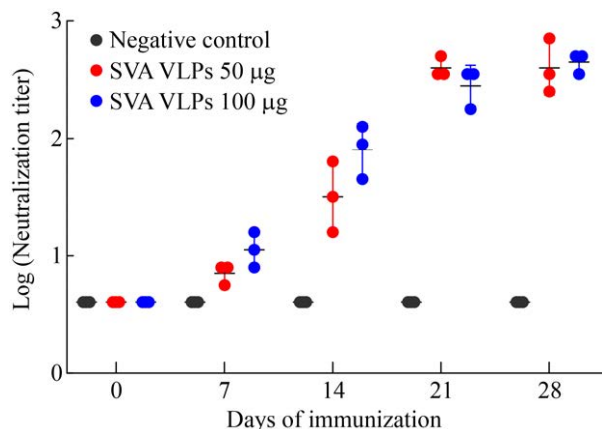


图7 SVA VLPs 不同剂量组免疫后豚鼠血清中和效价  
Fig. 7 Neutralizing antibody titers of the SVA VLPs-immunized guinea pigs.



够有效激发豚鼠的免疫应答,产生高水平的抗原特异性中和抗体。综上所述,本文研究结果为 SVA VLPs 疫苗的研制奠定了基础。

## REFERENCES

- [1] Venkataraman S, Reddy SP, Loo J, et al. Crystallization and preliminary X-ray diffraction studies of Seneca valley virus-001, a new member of the Picornaviridae family. *Acta Crystallogr Sect F Struct Biol Cryst Commun*, 2008, 64(pt 4): 293-296.
- [2] Reddy PS, Burroughs KD, Hales LM, et al. Seneca valley virus, a systemically deliverable oncolytic picornavirus, and the treatment of neuroendocrine cancers. *J Natl Cancer Inst*, 2007, 99(21): 1623-1633.
- [3] Pasma T, Davidson S, Shaw SL. Idiopathic vesicular disease in swine in Manitoba. *Can Vet J*, 2008, 49(1): 84-85.
- [4] Singh K, Corner S, Clark SG, et al. Seneca valley virus and vesicular lesions in a pig with idiopathic vesicular disease. *J Vet Sci Technol*, 2012, 3(6): 2157-2159.
- [5] Leme RA, Oliveira TE, Alcântara BK, et al. Clinical manifestations of Senecavirus A infection in neonatal pigs, Brazil, 2015. *Emerg Infect Dis*, 2016, 22(7): 1238-1241.
- [6] Wu QW, Zhao XY, Chen YS, et al. Complete genome sequence of Seneca valley virus CH-01-2015 identified in China. *Genome Announc*, 2016, 4(1): e01509-e01515.
- [7] Zhang JQ, Piñeyro P, Chen Q, et al. Full-length genome sequences of Senecavirus A from recent idiopathic vesicular disease outbreaks in US swine. *Genome Announc*, 2015, 3(6): e01270.
- [8] Saeng-Chuto K, Rodtian P, Temeeyasen G, et al. The first detection of Senecavirus A in pigs in Thailand, 2016. *Transbound Emerg Dis*, 2018, 65(1): 285-288.
- [9] Sun D, Vannucci F, Knutson TP, et al. Emergence and whole-genome sequence of Senecavirus A in Colombia. *Transbound Emerg Dis*, 2017, 64(5): 1346-1349.
- [10] Buckle KN, Bingham PC. Putting the idiopathic back into porcine idiopathic vesicular disease: setting the record straight on reports of PIVD in New Zealand. *Vet Pathol*, 2017, 54(4): 723.
- [11] Arzt J, Bertram MR, Vu LT, et al. First detection and genome sequence of Senecavirus A in Vietnam. *Microbiol Resour Announc*, 2019, 8(3): e01247-18.
- [12] Segalés J, Barcellos D, Alfieri A, et al. *Senecavirus A*: an emerging pathogen causing vesicular disease and mortality in pigs. *Vet Pathol*, 2017, 54(1): 11-21.
- [13] Kato T, Takami Y, Kumar Deo V, et al. Preparation of virus-like particle mimetic nanovesicles displaying the S protein of Middle East respiratory syndrome coronavirus using insect cells. *J Biotechnol*, 2019, 306: 177-184.
- [14] Hill BD, Zak A, Khera E, et al. Engineering virus-like particles for antigen and drug delivery. *Curr Protein Pept Sci*, 2018, 19(1): 112-127.
- [15] Porowińska D, Wujak M, Roszek K, et al. Prokaryotic expression systems. *Postepy Hig Med Dosw (Online)*, 2013, 67: 119-129.
- [16] 汪肖肖, 孙普, 贾怀杰, 等. A 型口蹄疫病毒衣壳蛋白主要抗原表位区的原核表达及免疫效果分析. *中国兽医科学*, 2019, 49(10): 1207-1215.
- Wang XX, Sun P, Jia HJ, et al. Prokaryotic expression and immune effect of major antigenic epitope regions of type A foot-and-mouth disease virus capsid protein. *Chinese Vet Sci*, 2019, 49(10): 1207-1215 (in Chinese).
- [17] 王文伟, 蔡蓓蓓, 仝光杰, 等. 重组人乳头瘤病毒 33 型 L1 病毒样颗粒的表达、纯化及免疫原性评价. *中国生物制品学杂志*, 2019, 32(11): 1206-1209.
- Wang WW, Cai BB, Tong GJ, et al. Expression, purification and immunogenicity of recombinant human papillomavirus 33 L1 virus-like particles. *Chin J Biologicals*, 2019, 32(11): 1206-1209 (in Chinese).
- [18] 肖密丝, 张莹莹, 郭敏, 等. 肠道病毒 71 型 VP3 结构蛋白的原核表达. *广州医药*, 2017, 48(4): 38-41.
- Xiao MS, Zhang YY, Guo M, et al. Optimization of prokaryotic expression of enterovirus 71 VP3 capsid protein. *Guanhzhou Med J*, 2017, 48(4): 38-41.
- [19] Deepak PR, Saravanan P, Biswal JK, et al. Generation of acid resistant virus like particles of

- vaccine strains of foot-and-mouth disease virus (FMDV). *Biologicals*, 2019, 60: 28-35.
- [20] 王莉平, 韩先杰, 王孝彬, 等. 表达猪流行性腹泻病毒 S1 蛋白的重组乳酸乳球菌的构建及其免疫原性的研究. *中国兽医科学*, 2017, 47(9): 1118-1123.
- Wang LP, Han XJ, Wang XB, et al. Construction and immunogenicity of recombinant *Lactococcus lactis* expressing S1 protein of porcine epidemic diarrhea virus. *Chin Vet Sci*, 2017, 47(9): 1118-1123.
- [21] 周芝海, 谭耀荣, 郑瑶瑶, 等. 猪急性腹泻综合征冠状病毒核衣壳蛋白的原核表达及其多克隆抗体的制备. *中国兽医科学*, 2019, 49(9): 1118-1123.
- Zhou ZH, Tan YR, Zheng YY, et al. Prokaryotic expression and polyclonal antibody preparation of swine acute diarrhea syndrome coronavirus nucleocapsid protein. *Chinese Vet Sci*, 2019, 49(9): 1118-1123 (in Chinese).
- [22] Burrell CJ, MacKay P, Greenaway PJ, et al. Expression in *Escherichia coli* of hepatitis B virus DNA sequences cloned in plasmid pBR322. *Nature*, 1979, 279(5708): 43-47.
- [23] Cohen BJ, Richmond JE. Electron microscopy of hepatitis B core antigen synthesized in *E. coli*. *Nature*, 1982, 296(5858): 677-679.
- [24] Malakhov MP, Mattern MR, Malakhova OA, et al. SUMO fusions and SUMO-specific protease for efficient expression and purification of proteins. *J Struct Funct Genomics*, 2004, 5(1/2): 75-86.
- [25] Lee CD, Yan YP, Liang SM, et al. Production of FMDV virus-like particles by a SUMO fusion protein approach in *Escherichia coli*. *J Biomed Sci*, 2009, 16(1): 69.
- [26] Maggioli MF, Lawson S, De Lima M, et al. Adaptive immune responses following Senecavirus A infection in pigs. *J Virol*, 2018, 92(3): e01717-17.

(本文责编 陈宏宇)