

doi:10.11751/ISSN.1002-1280.2017.7.13

# 口蹄疫灭活疫苗抗原稳定性研究进展

李伟亮, 赵启祖\*

(中国兽医药品监察所, 北京 100081)

[收稿日期] 2017-02-09 [文献标识码] A [文章编号] 1002-1280 (2017) 07-0070-08 [中图分类号] S852.65

**[摘要]** 口蹄疫是一种感染牛、羊和猪等偶蹄动物、具有高度传染性的动物疫病。疫苗免疫是控制该病的关键措施之一,口蹄疫灭活疫苗在口蹄疫流行地区广泛使用。灭活疫苗中,完整口蹄疫病毒粒子(146S 粒子)是至关重要的免疫抗原,它的数量和稳定性决定了疫苗的免疫效果。不同血清型,甚至同型不同毒株的口蹄疫病毒粒子稳定性不同,146S 粒子在一定温度、酸、碱条件下容易分解为五聚体(12S 粒子),导致疫苗免疫效力大幅下降。近年来口蹄疫病毒结构及其稳定性的分子基础研究取得了新进展,为研究口蹄疫病毒稳定性提高疫苗质量,开发新型口蹄疫空衣壳疫苗提供了重要理论基础。本文简要介绍了口蹄疫病毒结构基础、稳定性研究方法和研究进展,为了解口蹄疫病毒结构与免疫的关系,评价新型疫苗提供参考信息。

**[关键词]** 口蹄疫病毒;146S 粒子;完整性;稳定性

## The Advance in the Antigen Stability of Foot-and-Mouth Disease Inactivated Vaccine

LI Wei-liang, ZHAO Qi-zu\*

(China Institute of Veterinary Drug Control, Beijing 100081, China)

Corresponding author: ZHAO Qi-zu, E-mail: zhaqizu@163.com

**Abstract:** Foot-and-Mouth Disease (FMD) is a highly infectious disease of cloven-hoofed livestock such as cattle, sheep and pigs. Vaccination, mostly use inactivated vaccines, is one of the critical preventive methods for controlling FMD in epidemic zones. The intact virus particle (146S particle) is essential for FMD vaccine immunogenicity. The quantity and stability of virus particle is key factors to vaccine immunogenicity. There are significant differences in stability for 7 serotypes of FMD virus even different strains of the same serotype. The potency of vaccine will greatly reduce when it is treated with heat, acid or alkali because 146S particle is easy to dissociate into pentamers (12S particle). A lot of achievements have been obtained on FMD virus about virus structure and stability. These achievements provide important theoretical evidences for improvement of inactivated vaccine and the development of virus empty capsid vaccine. This article review some research methods and

**基金项目:** 农业部公益性行业(农业)科研专项"动物疫苗制剂及下游工艺技术研究与示范"(P2015003086)

**作者简介:** 李伟亮,硕士研究生,从事预防兽医学研究。

**通讯作者:** 赵启祖。E-mail: zhaqizu@163.com

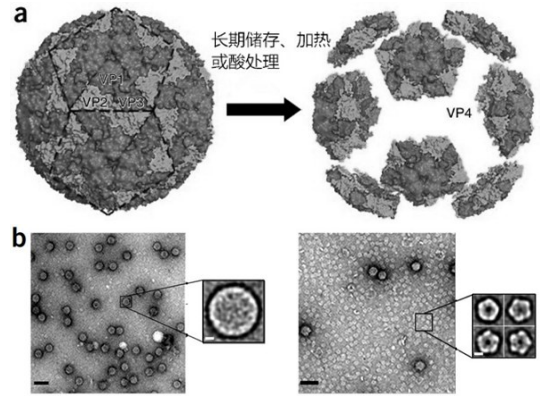
progress in the structure and stability of FMDV and provide some reference information for colleagues to understanding the relationship between immune and the structure of FMDV as well as evaluating the new type vaccines.

**Key words:** Foot-and-Mouth Disease Virus; 146S particle; integrity; stability

口蹄疫 (Foot-and-Mouth Disease, FMD) 是一种感染牛、羊和猪等偶蹄动物的、具有高度传染性的动物疫病。一旦暴发,会迅速在易感动物之间传播,引发大范围的疫情,从而造成暴发疫情地区的重大经济损失,如 2001 年在英国,2010 年在日本和 2012 年在埃及暴发的口蹄疫疫情<sup>[1-4]</sup>。口蹄疫在非洲、亚洲、南美洲及欧洲的许多国家中流行。在这些流行地区中,疫苗免疫是控制该病的关键措施<sup>[5]</sup>。现今,在全球范围内使用最多的口蹄疫疫苗是口蹄疫全病毒灭活疫苗。该疫苗主要是通过疫苗种毒接种易感细胞系,采用细胞悬浮培养的方法,扩增得到口蹄疫病毒 (Foot-and-Mouth Disease Virus, FMDV)。随后使用二乙烯亚胺 (binary ethylenimine, BEI) 对病毒进行灭活并加入适当佐剂制成灭活疫苗<sup>[6]</sup>。

在灭活疫苗中,完整 FMDV 粒子 (146S 粒子) 是至关重要的免疫抗原,它的数量和稳定性决定了疫苗的免疫效果<sup>[6-7]</sup>。FMDV 粒子含有四种结构蛋白,分别是 VP1、VP2、VP3、VP4。四种结构蛋白组成一个原粒,随后 5 个原粒顶点相接聚合在一起,形成一个五聚体,十二个五聚体将病毒基因组包裹后构成了完整的 FMDV 粒子<sup>[8]</sup>。然而,完整的 FMDV 粒子存在显著的不稳定性,当其处在 pH<7.0 或温度升高的状态下,便会分解为五聚体 (沉降系数为 12S,见图 1)<sup>[9]</sup>。完整的 FMDV 粒子一旦分解,疫苗的免疫效果将随之大幅度降低<sup>[6]</sup>。为了保证疫苗质量,生产商需要采用昂贵的冷链运输将疫苗送到用户手中,而疫苗在使用前都需要在低温下贮藏,同时,在疫苗抗原生产过程中病毒颗粒也会发生裂解,使生产成本增大,这正是口蹄疫灭活疫苗令人不满意的地方。

研究者在面对这样的困境时,尝试着各种方法,以求达到提高 FMDV 的酸热稳定性的目标。部



a: 原子模型图。左侧为完整的 O 型 FMDV 粒子,右侧为完整病毒粒子经历长时间存放、加热或酸处理后,分解为 12 个五聚体。蓝色代表 VP1,绿色代表 VP2,红色代表 VP3,黄色代表 VP4。  
b: 负染色法电子显微镜照片。左侧为灭活后刚纯化的 FMDV O1M 亲本株病毒粒子 (绝大部分粒子完整,仅有少量分解为五聚体); 右侧为 4 °C 储存 10 d (80% 完整粒子已分解为五聚体),比例尺: 50 nm。图中图是完整粒子或五聚体的平均模式,比例尺为 5 nm。

(a) Surface representation of atomic models of the intact FMDV serotype-O capsid (left) and of its dissociation into 12 pentameric assemblies upon storage, heating or lowering of pH (right). Blue, VP1; green, VP2; red, VP3; yellow, VP4. (b) Negative-stain EM images of the inactivated O1M wild-type capsids soon after purification (left, capsids intact with only a few detectable pentamers) or after 10 d of storage at 4 °C (right, 80% dissociated into pentamers). Scale bars, 50 nm. Class averages of the intact capsid or pentamers are shown in zoom view. Scale bars in zoom view, 5 nm.

**图 1 完整的 FMDV 分解为五聚体的示意图及电镜照片 (图片引用自 Kotecha A 等人)**

**Fig 1 Dissociation of FMDV capsids into pentameric and electron microscope images of the inactivated FMDV (This figure is adapted from Kotecha A et al)**

分研究者通过分析 FMDV 146S 的三维结构及结构蛋白的组成成分,以求找出 146S 分解的机理。部分研究者采取加压筛选方法,筛选出稳定性提升的 FMDV 突变株。部分研究者采取反向遗传学系统对 FMDV 基因组进行改造,对结构蛋白进行氨基酸

替换,让病毒按着研究者设想的方向进行改变。

## 1 影响 FMDV 稳定性的因素

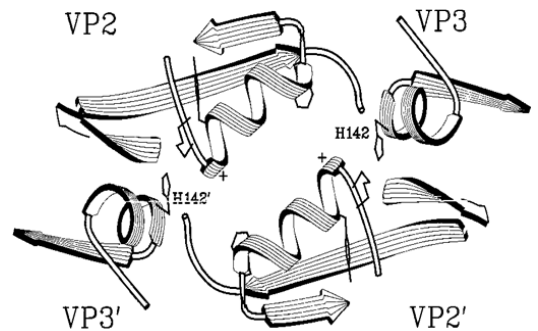
Doel 和 Baccarini<sup>[10]</sup>的研究结果显示,FMDV 病毒粒子内的蛋白和 RNA 之间、蛋白和蛋白之间的相互作用是 146S 粒子稳定存在的重要因素。

研究者们后续研究逐渐发现,无论是组装成完整的 FMDV 过程中,还是 FMDV 在酸性环境中分解产物中,由结构蛋白组装、聚合而成的结构蛋白五聚体都是其中的重要成分。因此,FMDV 在酸性环境中分解很可能是因为 pH 的降低破坏了五聚体之间的相互连接<sup>[11]</sup>;而在高温环境分解很可能是因为热量的吸收使五聚体从组合状态(空衣壳蛋白或病毒粒子)转变为分解状态。

Acharya R 等<sup>[11-12]</sup>研究者们观察 FMDV 的结构后发现,结构蛋白 VP2 和 VP3 中构成五聚体连接面的部分存在高密度的组氨酸残基,认为这可能是 FMDV 在 pH<7.0 时不稳定的一个原因。由于组氨酸的 pKa 值与引起 FMDV 分解 pH 值相近,所以研究者们认为质子化的组氨酸残基在五聚体连接面内产生了静电排斥力,触发了 FMDV 的分解。

Curry S 等<sup>[13]</sup>研究者们更进一步缩小了产生静电排斥力的区域。在分析了 FMDV 的结构后,发现在二重轴两侧相邻的五聚体上,存在着一种由 VP2 89-98 位氨基酸残基组成的偶极化的  $\alpha$  螺旋结构(图 2)。在这个螺旋结构的 N 末端(即正极)附近,存在着一个相邻五聚体上的 VP3 142 位组氨酸残基(VP3 142His)。由于该结构位于二重轴内,所以每个五聚体连接面都存在一对这样的组氨酸- $\alpha$  螺旋结构。当上述组氨酸残基发生质子化后,便很有可能在五聚体连接面中产生静电排斥作用,进而有机会导致相邻的五聚体分裂。

van Vlijmen H W 等<sup>[12]</sup>研究者通过进行精确的酸碱滴定,证实 VP3 142His 在低 pH 时会在五聚体连接面间产生很强的不稳定作用。Ellard F M 等<sup>[11]</sup>研究者通过对该氨基酸的替换试验证实了上述结论。该试验也证明了选择不同的氨基酸替换该位置的组氨酸,将会产生不同的结果,既能提升也能降低病毒衣壳的稳定性。



为简单起见,只显示出两个五聚体各自的 VP2 与 VP3 的部分结构。相邻五聚体接触面水平地通过图形的中心。相邻五聚体各自的结构蛋白以"VP2"与"VP3"及"VP2'"与"VP3'"表示。偶极化  $\alpha$  螺旋中的阳极用 "+" 标示出来,与  $\alpha$  螺旋相关的 H142 侧链基团已标示出来。

For simplicity, only portions of one copy of VP2 and VP3 from each of the two pentamers are shown. The pentamer interface passes horizontally through the center of the figure. Labels associated with the twofold-related pentamer are indicated by '. The positive end of the helix dipoles are indicated by +. Side chains H142, associated with the helix, has shown.

图 2 FMDV A22 株相邻五聚体的组氨酸-偶极化  $\alpha$  螺旋结构示意图(图片引用自 Curry S)

Fig 2 Schematic representation of the histidine-helix dipole interaction between twofold-related pentamers in A22 FMDV (This figure is adapted from Curry S)

然而,当影响 FMDV 的酸稳定性的结构基础已经追溯到位于五聚体连接面附近的组氨酸残基时,影响 FMDV 热稳定性的结构基础仍然不清晰。

Rincón V 等<sup>[14]</sup>研究者观察发现,FMDV 五聚体的组合主要依靠微弱的静电作用。在五聚体连接面附近存在一组酸性氨基酸残基,它们在多数 pH 下带负电荷,因此在五聚体之间形成了静电排斥网。在上述微弱的静电吸引与排斥的共同作用下,FMDV 完整粒子从组合态只需少许能量即能转变为过渡态进而分解为五聚体。当研究者们用无极性氨基酸残基部分替换该组酸性氨基酸(D2068N, E2086Q, D3134N, D3195N),发现组合态转变至过渡态所需能量提高且分解率降低。因此,研究者们认为 FMDV 受热容易分解是由结构蛋白当中的个别氨基酸残基在五聚体之间形成静电排斥作用所导致的。

FMDV 的衣壳稳定性在不同血清型之间存在显著差异;O 型和 SAT 型对酸热稳定性差,而 A 和 Asia1 型相对来说更稳定<sup>[9]</sup>。而引起这一差异的机理仍然存在未知有待探究。

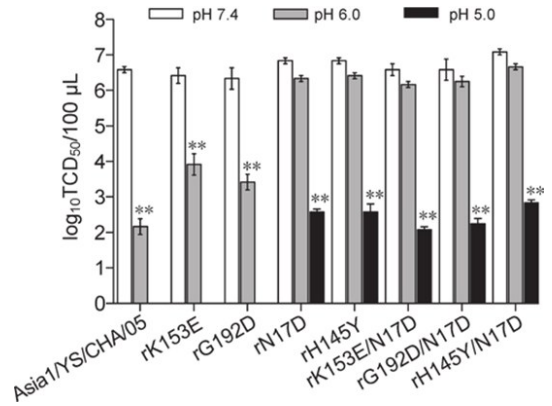
## 2 提高 FMDV 稳定性的研究

**2.1 人工加压筛选稳定性提升毒株** 以筛选出 FMDV 抗酸能力提高的突变株为例,研究者根据目标,用酸性缓冲液处理 FMDV,随后将处理过的 FMDV 接种于易感细胞(如 BHK-21)中扩增,从而筛选出抗酸能力提高的 FMDV 突变株。该方法的优点是能在影响 FMDV 稳定性机理并不清楚的情况下,依据研究者的目的定向筛选出达到目的 FMDV。缺点是试验过程较复杂,产生突变的位点难以预测且试验耗费的时间难以估计。因此该方法更适用于探究影响 FMDV 稳定性的可能因素上。

**2.2 反向遗传操作** 研究者通过对 FMDV 全长 cDNA 的操作,直接改变 FMDV 的基因组,导致氨基酸替换,进而影响 FMDV 的性状,达到影响 FMDV 稳定性的目的。优点是能在分子水平上对 FMDV 进行精准突变,减少或避免非预期突变;试验时间较短且能进行大量突变尝试。缺点是需要成功构建出该株 FMDV 感染性克隆;基因组改变所带来的性状改变有时难以预测。该方法更适合用于探究影响 FMDV 稳定性分子机理及大量定点突变改造的试验中。

**2.3 影响 FMD 抗原酸稳定性的研究** 王海伟等<sup>[15]</sup>研究者为了验证 FMDV 的部分氨基酸残基在 146S 粒子酸稳定性中所起的作用并获得酸稳定性有所提升的突变病毒,于是通过反向遗传学系统,对 Asia 1 型 FMDV YS/CHA/05 毒株的 VP1、VP2 和 VP3 进行了单氨基酸替换 (VP1 N17D、VP2 H145Y、VP2 G192D 和 VP3 K153E) 及双氨基酸 (H145Y/N17D、G192D/N17D 和 K153E/N17D) 替换。随后研究者们拯救出上述重组病毒,并对其做了酸稳定性测试。结果显示,含有 VP2 H145Y 或/及 VP1 N17D 的氨基酸替换的 Asia 1 型 FMDV 重组毒株,能够在一定程度上抵抗酸诱导的灭活作用结果见图 3。研究者们因此得出了 VP2 H145Y 或/及 VP1 N17D 的氨基酸替换能

使 Asia1 型 FMDV 酸稳定性提高的结论。



病毒样品使用不同 pH 值溶液(5.0, 6.0 或 7.4)在室温下处理 30min,随后使用 TCID50 试验测定剩余感染滴度。

亲本病毒 Asia1/YS/CHA/05 株作为对照组。

Viral samples were treated at different pH values (5.0, 6.0, or 7.4) for 30 min at room temperature, and the remaining infectious titers were determined by TCID50 assay. The parental virus Asia1/YS/CHA/05 was used as a control.

**图 3 氨基酸替换 VP2 H145Y 和 VP1 N17D 提升 FMDV 突变病毒酸抗性的效果(图片引用自王海伟等人)**  
**Fig 3 Effect of the VP1 N17D and VP2 H145Y substitutions on increased acid resistance in FMDV mutants (This figure is adapted from Wang H W et al)**

袁红等<sup>[17]</sup>研究者对 O/HN/93 毒株全长感染性 cDNA 克隆进行点突变,成功拯救出三株突变病毒 rN17D、rD86H 和 rN17D2。随后利用获得的突变病毒进行酸诱导的失活实验、热诱导的失活试验。结果显示,三株突变病毒都具有耐酸性,突变病毒 rD86H、rN17D 和 rN17D2 的 pH50 值分别为 6.25、6.18、6.30,而亲本病毒 pH50 值为 6.50。在热诱导的失活试验中,研究者发现突变病毒中 rD86H 和 rN17D 的抗热失活能力有所提升,结果见图 4。

Biswal J K 等<sup>[16]</sup>研究者为了提高 A 型 FMD 疫苗的酸稳定性,利用了反向遗传学方法对正在使用的疫苗株 IND 40/2000 进行改良,把 VP3 上 142 号位点的组氨酸替换为丙氨酸 (H142A)、精氨酸 (H142R)、苯丙氨酸 (H142F) 和天冬氨酸 (H142D)。然而,仅有重组质粒 pA40/2000 -



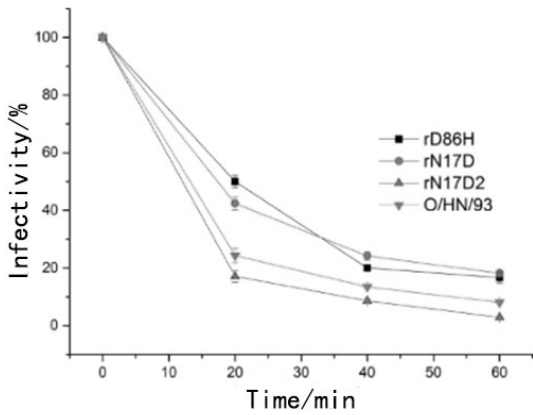


图 4 四株病毒在 42°C 的热失活曲线 (图片引用自袁红)

Fig 4 Thermal inactivation kinetics of the four viruses at 42 °C (This figure is adapted from Yuan H)

H3142D 能拯救出有感染性的重组病毒,其余重组质粒均未能拯救出重组病毒。随后,研究者将得到的重组病毒与亲本毒株一同进行多项试验。

结果显示,在抗原检测 ELISA 试验中,在重组质粒 pA40/2000-H3142D 拯救出来的重组病毒 A-H3142D 传代得到的细胞上清中能检测到 A 型 FMDV 特定的吸光值,结果见图 5。在酸诱导的灭活试验中,重组病毒相比亲本病毒,产生了很明显的耐酸性,结果见图 6。证明了 VP3 中的氨基酸替换 (H142D) 能提高 A 型 FMD 疫苗株的酸稳定性<sup>[16]</sup>。

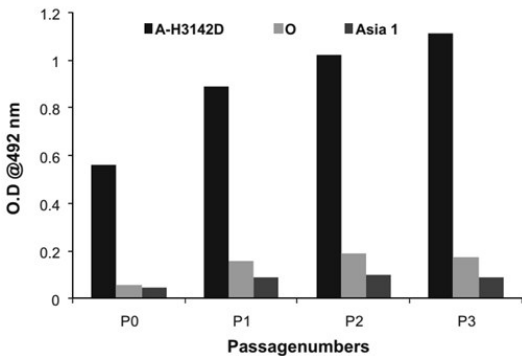
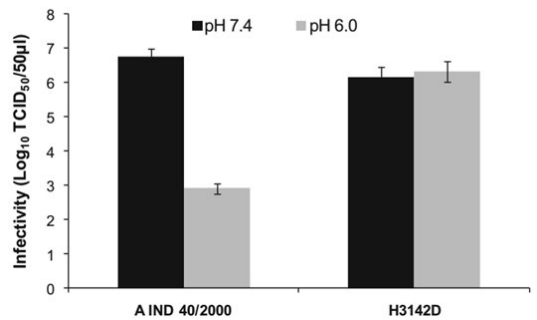


图 5 抗原检测 ELISA 试验中 492 nm 吸光度结果图 (图片引用自 Biswal J K 等人)

Fig 5 Absorbance recorded at 492 nm in antigen detection ELISA (This figure is adapted from Biswal J K et al)

2.4 影响 FMD 抗原热稳定性的研究 Roberto M 等<sup>[5]</sup>人在不影响到 FMDV 的关键功能以及感染性的



使用酸性溶液 (pH 6.0) 或中性溶液 (pH 7.4 作为对照) 处理等量的亲本病毒 IND 40/2000 和重组病毒 H3142D, 将溶液中和以后使用 TCID50 试验测定病毒的剩余感染滴度。

Equals amounts of the parental A IND 40/2000 and H3142D mutant virus were treated acidic buffer (pH 6.0) or neutral buffer (pH 7.4 as a control). The samples were then neutralized, and the remaining infectivity of viruses was determined by TCID50 assay.

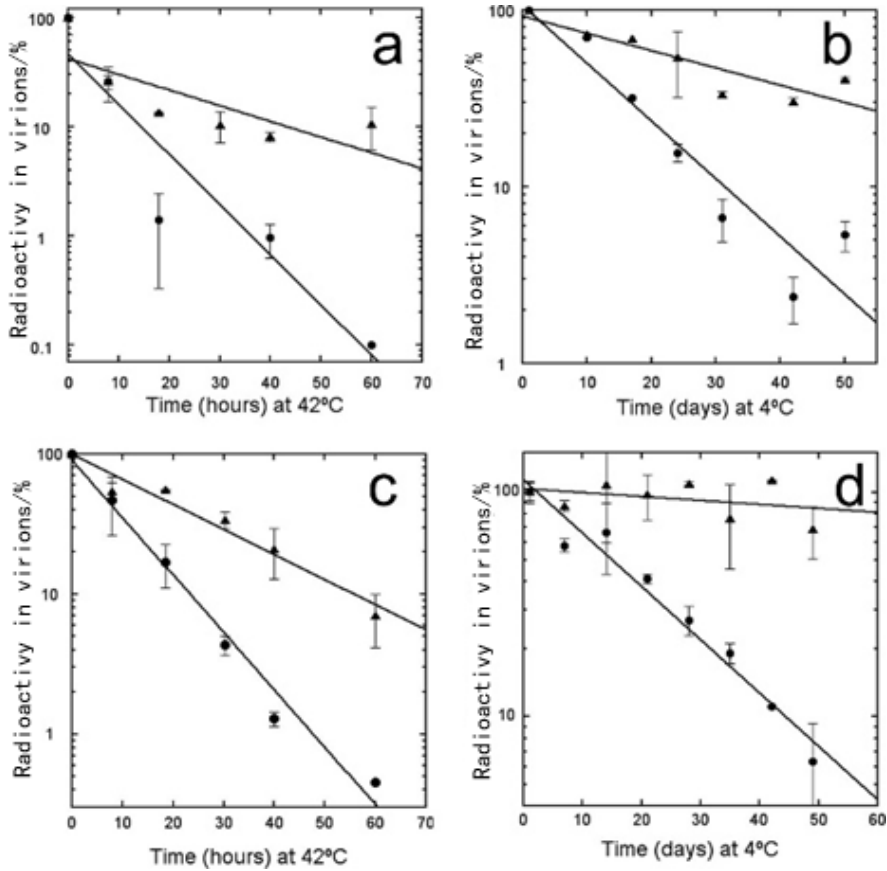
图 6 A 型 FMDV H3142D 突变株对酸诱导灭活试验的耐受性 (图片引用自 Biswal J K 等人)

Fig 6 Resistance of the H3142D mutant FMDV serotype A to acidinduced inactivation (This figure is adapted from Biswal J K et al)

前提下,通过在 12S 粒子间相互作用面内构建出二硫键或者改变静电吸引力这两种构象作用,来对 C 型 FMD 疫苗株 Santa Pau-Spain/70 进行了改良,从而达到提升 FMDV 146S 粒子结构的热稳定性的目的。研究者们通过定点突变将目标点上原有的各类氨基酸替换成了半胱氨酸,以求在 12S 粒子间相互作用面内构建出二硫键。他们为此总共设计了 8 组、每组两个的氨基酸替换。在改变静电吸引力上,他们设计了 7 组氨基酸替换 (3 组双氨基酸替换 4 组单氨基酸替换)。结果显示,仅有 2 组 (T2053D/Q2057K 和 Y2200H/I3189D) 构建二硫键的及 4 组 (D3069E/T2188A、T2188A、A2065K 和 A2065H) 改变静电吸引力的氨基酸替换能拯救出与亲本毒株拥有相似感染性的重组病毒。随后研究者们对上述拯救成功的重组病毒进行了 146S 粒子的热分解试验,结果仅有 2 组 (D3069E/T2188A 及 A2065H) 重组病毒的分解速度要比亲本毒株要慢,结果见图 7,达到了研究者的目的。然后,研究

者们利用 C 型 FMDV 的单克隆抗体,与亲本病毒和突变病毒进行了酶联免疫斑点试验。结果显示,突

变病毒的抗原位点与亲本病毒没有明显变差异,结果见图 8。



图中三角形代表 FMDV 突变株,圆形代表亲本毒株。

Triangles and circles were represented for mutant or nonmutated FMDV respectively.

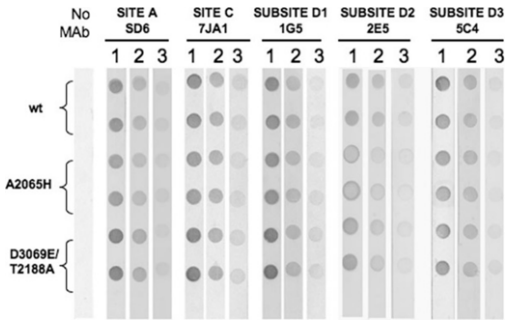
图 7 纯化的 FMDV 突变株 D3069E/T2188A (a 和 b) 或 A2065H (c 和 d) 在 42 °C (a 和 c) 或 4 °C (b 和 d) 下的热分解变化图 (图片引用自 Roberto M 等人)

Fig 7 Thermal-dissociation kinetics of purified FMDV mutant D3069E/T2188A (a and b) or A2065H (c and d) at 42 °C (a and c) or 4 °C (b and d) (This figure is adapted from Roberto M *et al*)

Porta C 等人<sup>[4]</sup>在前人对 FMDV 结构研究的结果中受到启发,因此他们对 A 型 FMDV 的重组疫苗株 A22 进行了氨基酸替换,将 VP2 93 号位点的组氨酸替换为半胱氨酸 (H2093C),从而在 12S 粒子间相互作用面内构建出二硫键,达到提高 FMDV 空衣壳蛋白酸热稳定性的目的。随后,研究者们利用自行设计的优化过的空衣壳蛋白表达系统,将亲本和突变型空衣壳蛋白都表达出来。然后,研究者们对得到的两种空衣壳蛋白同时进行了热分解试验以及酸化分解试验,使用蔗糖梯度密度法沉淀处理

后与未处理的空衣壳蛋白,使用 Western blot 检测蔗糖密度梯度。结果显示,突变的空衣壳蛋白的酸热稳定性均比亲本的要高 (图 9),研究者成功达到其预期的提高空衣壳蛋白酸热稳定性的目标。然后,研究者们将高纯度的空衣壳蛋白注射到易感牛中,测定其抗体滴度。随后在免疫后第 34 周,研究者进行攻毒试验,观察实验动物的临床症状并检测其血清中的病毒核酸含量。结果显示,动物注射重组型或亲本型空衣壳蛋白所产生的抗体滴度差异不显著 ( $P>0.05$ )。攻毒试验结果显示,免疫亲本型

或突变型空衣壳蛋白均能为易感动物提供足够保护结果见图 10。



每一列中,每个病毒样品作一个重复。每一列的第七孔作为阴性对照(不加入病毒)。第一列作为阴性对照(不加入单抗)。剩余列数中,号码 1、2 和 3 代表指单抗的 10 倍连续稀释。

In each strip, each of the three viruses was applied in duplicate.

As a negative control, no virus was added to the bottom (seventh)

well in each strip. The first strip is a negative control

(no MAb was added). For the remaining strips, the numbers

1,2,and 3 correspond to 10-fold serial dilutions of the indicated MAb.

图 8 C型FMDV亲本毒株(C-S8c1;wt)和突变株 A2065H 和D3069E/T2188A与识别C型口蹄疫抗原位点(A,C,D1,D2 和D3)的单克隆抗体进行的酶联免疫斑点试验 (图片引用自 Roberto M 等人)

Fig 8 Reactivity in immunodot assays of nonmutated (C-S8c1; wt) FMDV and mutants A2065H and D3069E/T2188A with neutralizing monoclonal antibodies (MAbs) directed against each of the identified antigenic sites (A, C, D1, D2, and D3) in serotype C FMDV (This figure is adapted from Roberto M et al)

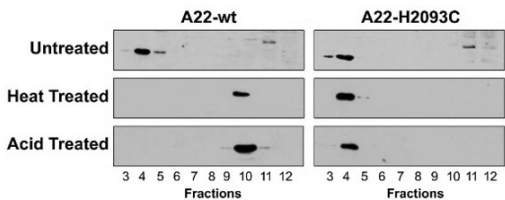
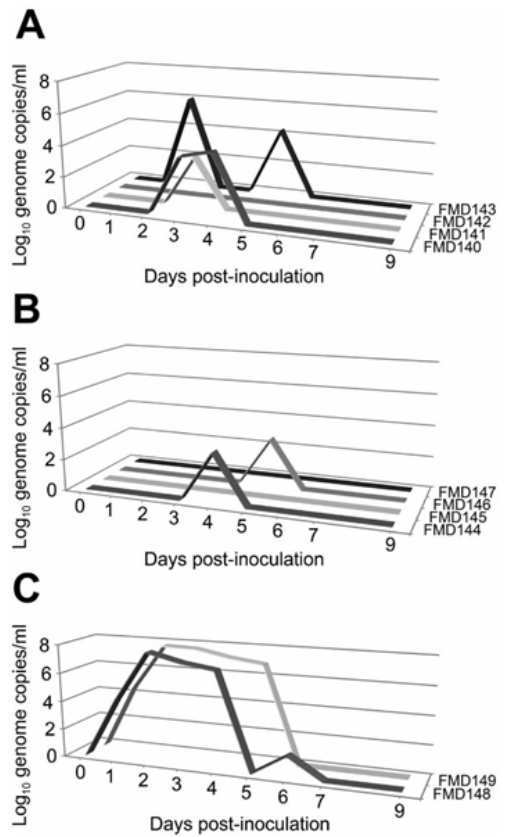


图 9 A22 亲本及 H2093C 毒株空衣壳蛋白 Western blot 试验(图片引用自 Porta C 等人)

Fig 9 Western blot analyses of A22-wt and A22-H2093C empty capsids. (This figure is adapted from Porta C et al)



上图分别代表的是免疫了 A22-wt(A)、A22-H2093C(B)空衣壳和对照组(C)动物。实验组中有三头牛(FMD140、143 和 144)出现临床症状,而对照组中两头牛均出现明显的临床症状。

Individual data for animals vaccinated with (a) A22-wt, (b) A22-H2093C and for non-vaccinated control animals (c). Clinical signs were detected in three of the eight animals of experimental group (FMD140, FMD143 and FMD144). Both non-vaccinated control animals showed overt clinical signs.

图 10 动物血清中病毒基因含量检测 (图片引用自 Porta C 等人)

Fig 10 The quantity of viral genome (Log10/ml) was determined in serum samples from each animal (This figure is adapted from Porta C et al)

### 3 展望

FMDV 146S粒子的完整性与数量是影响FMD 灭活疫苗免疫效果的决定性因素<sup>[6-7]</sup>,维持灭活疫苗中病毒粒子的完整性和稳定性,以及高效组装完整、稳定的病毒样颗粒开发新型疫苗,是口蹄疫疫苗研究者长期努力和研究的的方向。迄今为止,已获得不少成果。但影响FMDV稳定性的分子机理仍未

十分清楚。在研究过程中,研究者们成功获得种类繁多的且稳定性提升的 FMDV 突变株,但不同血清型突变株所替换的氨基酸残基不尽相同<sup>[11-12]</sup>,暂时还没发现一种在 FMDV 各血清型中通用的稳定性提升方法。FMDV 的突变株与亲本病毒相比较,虽然成功提高了稳定性,但两者的抗原性及免疫保护水平却少有比较,而抗原性及免疫保护水平是突变株是否能成为改良疫苗候选毒株的关键因素。

疫苗中含有的 146S 粒子的数量与完整性是疫苗产生有效保护的关键。若将研究者们得到的稳定性提升的 FMDV 突变株运用到疫苗生产当中,将会有效减少 FMDV 146S 粒子在生产过程中的分解,从而提高疫苗中的抗原含量,提高疫苗的保护效果。同时,由于 146S 粒子的稳定性提升,将降低疫苗在运输与储存过程中对冷链的依赖程度,同时疫苗的保质期得到了延长。FMDV 突变株仍可利用现在的 FMD 灭活疫苗生产方法制作成灭活疫苗,避免了重新设计生产方法的麻烦。

若影响 FMDV 稳定性的关键因子在各血清型中高度保守,研究者们便可以此为基础,设计出一种在 FMDV 各血清型之间通用的稳定性提升方法,提升各血清型 FMDV 的稳定性,进而为改良疫苗提供候选毒株。另外,FMDV 衣壳分解的关键因子的发现有助于我们更进一步地理解 FMDV 脱衣壳过程的分子机理,让我们对 FMDV 侵染机体的认知提升到一个新的水平。

## 参考文献:

[1] Grubman M J, Baxt B. Foot-and-mouth disease[J]. *Clinical Microbiology Reviews*, 2004, 17(2): 465-493.

[2] Muroga N, Hayama Y, Yamamoto T, *et al.* The 2010 foot-and-mouth disease epidemic in Japan[J]. *The Journal of Veterinary Medical Science*, 2012, 74(4): 399-404.

[3] Kandeil A, El-Shesheny R, Kayali G, *et al.* Characterization of the recent outbreak of foot-and-mouth disease virus serotype SAT2 in Egypt[J]. *Archives of Virology*, 2013, 158(3): 619-627.

[4] Porta C, Kotecha A, Burman A, *et al.* Rational engineering of recombinant picornavirus capsids to produce safe, protective vaccine antigen[J]. *PLOS Pathogens*, 2013, 9(3): e1003255.

[5] Mateo R, Luna E, Rincón V, *et al.* Engineering viable foot-and-mouth disease viruses with increased thermostability as a step in

the development of improved vaccines[J]. *Journal of Virology*, 2008, 82(24): 12232-12240.

[6] Doel T R. FMD vaccines[J]. *Virus Research*, 2003, 91(1): 81-99.

[7] Robinson L, Knight-Jones T J, Charleston B, *et al.* Global foot-and-mouth disease research update and gap analysis: 3-Vaccines[J]. *Transboundary and Emerging Diseases*, 2016, 63: 30-41.

[8] Acharya R, Fry E, Stuart D, *et al.* The three-dimensional structure of foot-and-mouth disease virus at 2.9 Å resolution[J]. *Nature*, 1989, 337(6209): 709-716.

[9] Kotecha A, Seago J, Scott K, *et al.* Structure-based energetics of protein interfaces guides foot-and-mouth disease virus vaccine design[J]. *Nature structural & molecular biology*, 2015, 22(10): 788-794.

[10] Doel T R, Baccharini P J. Thermal stability of foot-and-mouth disease virus[J]. *Archives of Virology*, 1981, 70(1): 21-32.

[11] Ellard F M, Drew J, Blakemore W E, *et al.* Evidence for the role of His-142 of protein 1C in the acid-induced disassembly of foot-and-mouth disease virus capsids[J]. *Journal of General Virology*, 1999, 80: 1911-1918.

[12] van Vlijmen H W, Curry S, Schaefer M, *et al.* Titration calculations of foot-and-mouth disease virus capsids and their stabilities as a function of pH[J]. *J Mol Biol*, 1998, 275(2): 295-308.

[13] Curry S, Abrams C C, Fry E, *et al.* Viral RNA modulates the acid sensitivity of foot-and-mouth disease virus capsids[J]. *Journal of Virology*, 1995, 69(1): 430-438.

[14] Rincón V, Rodríguez-Huete A, López-Argüello S, *et al.* Identification of the structural basis of thermal lability of a virus provides a rationale for improved vaccines[J]. *Structure*, 2014, 22(11): 1560-1570.

[15] Wang H W, Song S S, Zeng J X, *et al.* Single amino acid substitution of VP1 N17D or VP2 H145Y confers acid-resistant phenotype of type Asia1 foot-and-mouth disease virus[J]. *Virologica Sinica*, 2014, 29(2): 103-111.

[16] Biswal J K, Das B, Sharma G K, *et al.* Role of a single amino acid substitution of VP3 H142D for increased acid resistance of foot-and-mouth disease virus serotype A[J]. *Virus Genes*, 2016, 52(2): 235-243.

[17] 袁红. 耐酸性 O 型口蹄疫基因工程病毒的构建及其特性分析[D]. 中国农业科学院, 2016.

Yuan H. Construction and Characteristics Analysis of Genetically Engineered Type O Foot-and-Mouth Disease Virus with Acid Stability[D]. Chinese Academy of Agricultural Sciences, 2016.