

O 型口蹄疫病毒 VP1 T 细胞、B 细胞表位双拷贝基因与大肠杆菌 LTB、ST I 肠毒素基因融合表达产物的免疫应答

庄娟^{1,2}, 尤永进², 陈波², 饶忠², 潘洁²

(1. 江苏省淮阴师范学院生物系, 淮阴 223001; 2. 上海农业科学院畜牧兽医研究所, 上海 201106)

摘要:合成 O 型口蹄疫病毒 VP1 蛋白中与细胞免疫(21~40 表位肽)及体液免疫(141~160 表位肽)相关的基因序列 2020 VP1, 运用基因工程技术构建了含有肠毒素大肠杆菌 LTB、ST I 基因及双拷贝 2020 VP1 的融合表达载体 r2020-B-2020-ST I, 转化宿主菌 BL₂₁(DE₃) RIL 后的表达产物经 SDS-PAGE 分析, 结果显示重组融合蛋白的分子量约为 45 kDa, 表达量较高。ELISA 实验结果显示, 融合蛋白能与霍乱毒素(cholera toxin)CTB 抗体特异结合。动物实验表明, 融合蛋白能够诱发兔体产生较强的 FMDV 中和抗体, 免疫豚鼠在低浓度 FMDV 刺激下能够产生特异性 T 淋巴细胞增殖反应, 说明融合蛋白能诱导机体产生 FMDV 特异性细胞及体液免疫反应; 同时, 融合蛋白免疫雌鼠能够抵抗大肠杆菌强毒株攻击, 免疫兔体能够产生 ST I 中和抗体, 且融合蛋白不具 ST I 毒性, 证明融合蛋白具有良好的 LTB、ST I 免疫原性。实验结果表明, 此融合蛋白具有开发成为口蹄疫及肠毒素腹泻联合疫苗的应用价值。

关键词:口蹄疫病毒; VP1; T 细胞表位; B 细胞表位; 肠毒素大肠杆菌; LTB; ST I; 免疫应答

中图分类号: Q933

文献标识码: A

文章编号: 0253-9772(2006)05-0557-06

The Immune Responses of the Fusion Protein Consisted of Two Copies of T-cell and B-cell Epitopes of Food-and-mouth Disease Virus VP1 Type O and LTB and ST I Enterotoxins of *Escherichia coli*

ZHUANG Juan^{1,2}, YOU Yong-Jin², CHEN Bo², RAO Zhong², PAN Jie²

(1. Department of Biology, Huaiyin Teachers College, Huaiyin, Jiangsu 223001, China; 2. Shanghai Academy of Agricultural Sciences, China InSTitute of Animal Husbandry China Institute of Animal Husbandry and Veterinary Medicine, Shanghai 201106, China)

Abstract: A nucleotides fragment 2020 VP1 related to T-cell epitope (aa21-40) and B-cell epitope (aa141-160) of VP1 of Food-and-mouth disease virus(FMDV) type O was synthesized, and the recombined expression vector r2020-B-2020-ST I was correctly constructed, which was used to express the fusion protein consisted of two copies of aa21-40, aa141-160 of FMDV VP1 and LTB and ST I Enterotoxins of *Escherichia coli*. The fusion protein with molecular weight of about 45 kDa was successfully expressed in *E. coli* BL₂₁(DE₃) RIL at high level and confirmed by SDS-PAGE. The purified fusion protein could be specifically recognized by CTB antibody. The purified protein was then used to vaccinate guinea pigs, rabbits and Balb/c mice at 6-8 weeks age, and immune responses were finally observed. The fusion protein could induce proliferation of spleen T cells in vaccinated guinea pigs and elicit a high level of neutralizing antibody in rabbits. It could be concluded that the fusion protein could activate FMDV-specific cellular immune-response

and humoral immune-response simultaneously. At the same time, the vaccinated mice could survive challenge of Enterotoxigenic *Escherichia coli* C83902, and the sera of vaccinated rabbits could neutralize the ST I toxin. Moreover, the fusion protein had no ST I toxicity, indicating that the fusion protein had LTB and ST I immunogenicities. Therefore, it can be concluded that the fusion protein could be explored as a potentially efficient FMDV and ETEC vaccine.

Key words: FMDV; VP1; T-cell epitope; B-cell epitope; Enterotoxigenic *Escherichia coli*; LTB; ST I; immune responses

口蹄疫 (food-and-mouth disease, FMD) 是由口蹄疫病毒 (food-and-mouth disease virus, FMDV) 引起的偶蹄动物共患的热性、接触性传染病。FMDV 的核酸为单股正链的 RNA 分子, 全长约 8 000 个碱基; 其蛋白包括结构蛋白——VP1、VP2、VP3、VP4 和非结构蛋白——2A、2B、2C、3A、3B、3C、3D 等。一般认为 VP1 起着重要的抗原作用, 其 21~40 肽能促进机体产生细胞免疫反应^[1], 而 141~160 肽能引起机体的体液免疫反应^[2]。

产肠毒素大肠杆菌 (Enterotoxigenic *Escherichia coli*, ETEC) 是引起幼畜腹泻的主要致病菌。其产生的肠毒素分为耐热性肠毒素 (heat-stable enterotoxin, ST) 和热敏性肠毒素 (heat-labile enterotoxin, LT) 两种。耐热性肠毒素对热稳定, 可分为 ST I 与 ST II 两种亚型, 分子量较小, 免疫原性弱, 与大分子偶联可产生免疫原性^[3,4]; 热敏性肠毒素对热敏感, 由 A、B 两个亚单位组成, 其中 A 亚单位是毒素的活性部分, B 亚单位是免疫的主要受体结合区, 其本身没有毒性^[5,6]。

本实验通过基因工程技术, 把 O 型口蹄疫病毒 VP1 双拷贝 21~40 与 141~160 表位肽与肠毒素大肠杆菌 LTB、ST I 连接到表达载体上, 在大肠杆菌中表达出具有抗 O 型口蹄疫病毒与产肠毒素大肠杆菌双重作用的融合蛋白, 为进一步预防口蹄疫与幼畜腹泻疾病、生产安全高效的基因工程疫苗提供了实验依据。

1 材料和方法

1.1 菌株、质粒及试剂

产肠毒素大肠杆菌强毒株 C83902 (K88ac, ST⁺, LT⁺) 由本实验室保存; C83916 (ST⁺) 购自中国兽药监察所; 大肠杆菌 BL₂₁ (DE₃) RIL 购自 Novagen 公司; rBST I 及 r2020 VP1 重组质粒由本实验室构建; 受体菌 JM109 和 pET32a 质粒由本实验室保存; pUCm-T 购自上海申能博彩。

PCR 扩增所用 dNTP、buffer 及 Ex Taq DNA 聚

合酶购自 TAKARA 公司; 限制性内切酶 *Kpn* I、*Eco*R I、*Hind* III、*Bgl* II、*Xho* I 购自 TaKaRa 公司; RNA 反转录试剂盒、DNA 连接酶、质粒抽提试剂盒、DNA 割胶纯化试剂盒、BCA-100 蛋白定量试剂盒及 DBA 显色液购自上海申能博彩公司。

1.2 DNA 操作

1.2.1 2020 VP1 基因的操作

扩增 2020 VP1 基因 a、b 序列。2020a VP1 序列 PCR 扩增上游引物: GGTACCTATCCGCAGGAC, 下游引物: GAATTCGCTATAGATGCC。2020b VP1 序列 PCR 扩增上游引物: GGTACCTATCCGCAGGAC, 下游引物: AAGCTTCCGGAGCACACGGCAGAG。引物由北京三博远志生物技术有限责任公司合成。扩增产物分别与 T 载体连接后转化 JM109 宿主菌进行基因扩增, 提取质粒经 *Kpn* I / *Eco*R I、*Kpn* I / *Hind* III 酶切得到目的 2020a、b VP1 基因。

1.2.2 LTB-ST I 的基因操作

LTB-ST I 扩增上游引物: GAATTCTATGCA-CACGGAGCTCCCCA, 下游引物为: CTCGAGGCAC-CCGGTACAAG。引物由北京三博远志生物技术有限责任公司合成。扩增产物与 T 载体连接后转化 JM109 宿主菌进行基因扩增, 提取质粒进行 *Eco*R I / *Xho* I 双酶切得到目的 LTB-ST I 基因。

1.2.3 重组表达载体 r2020-B-2020-ST I 的构建

2020a VP1 与 *Kpn* I / *Eco*R I 双酶切后的表达载体 pET32a 进行体外连接, 阳性重组质粒 r2020 经 *Eco*R I / *Xho* I 双酶切后与 LTB-ST I 基因连接, 阳性重组质粒 r2020-B-ST I *Hind* III 完全酶切后再进行 *Kpn* I 部分酶切, 酶切产物与 2020b 连接, 构建 r2020-B-2020-ST I。

1.2.4 阳性重组质粒的鉴定

r2020-B-2020-ST I 进行 *Bgl* II / *Xho* I 酶切鉴定 (*Bgl* II 酶切位点与 *Kpn* I 相隔一个碱基)。将阳性重组质粒进行 DNA 序列测定, 测序由上海博亚生物技术公司完成, 测序结果使用 DNAssist 软件分析。

1.3 重组质粒的表达及表达蛋白纯化

1.3.1 重组质粒的表达

重组质粒 r2020-B-2020-ST I 转化 BL₂₁ (DE₃) RIL 后,经终浓度为 1 mol/L 的 IPTG 诱导表达。菌液于 12 000 r/min 离心 2 min,菌体沉淀用裂解缓冲液(50 mmol/L pH 8.0 Tris-HCl, 1 mmol/L EDTA, 100 mmol/L NaCl)重悬,98℃ 处理 5 min 后进行 SDS-PAGE 电泳。

1.3.2 融合蛋白的纯化

目的蛋白含有 6 × His-tag,发酵菌体超声波破菌,包含体经 Urea-NTAO(20 mmol/L Tris-HCl,0.5 mol/L NaCl,8 mol/L Urea,10% 甘油,pH7.9)变性。变性蛋白在 HPLC 蛋白纯化系统上进行镍离子亲和层析。蛋白纯化洗脱液为 A:Urea-NTAO,B:Urea-NTA500(20 mmol/L Tris-HCl,0.5 mol/L NaCl,8 mol/L Urea,10% 甘油,500 mmol/L Imidazole,pH7.9)。纯化收集所得蛋白用 10 倍体积的蛋白复性液(20 mmol/L Tris-HCl,0.5 mol/L NaCl,2 mol/L Urea,pH 7.9)4℃ 膜透析复性。复性后蛋白与 Montanide ISA206 佐剂 1:1 混合后作为免疫抗原免疫动物。

1.4 融合蛋白 LTB 免疫原性 ELISA 检测及 ST I 生物毒性检测

1.4.1 融合蛋白 LTB 免疫原性检测

纯化蛋白 2020-B-2020-ST I 2 μg/mL 包被 ELISA 板,设立口蹄疫病毒 2020-2020VP1 纯化蛋白对照,4℃ 过夜。37℃ 封闭 1 h 后加入 CTB 抗体(Calbiochem),37℃ 作用 1 h。二抗蛋白 A/G 浓度为 1:6 000,37℃ 作用 30 min,TMB 显色 15 min 后加入 2 mol/L 硫酸终止液,在 450 nm 光波下读取 OD 值。

1.4.2 融合蛋白 ST I 生物毒性检测

采用乳鼠灌胃实验检测 ST I 生物毒性。新生 Balb/c 乳鼠(1~3 日龄),随机分组,每组 5 只,纯化蛋白 2020-B-2020-ST I 及 PBS 对照液灌胃,25℃ 放置 4 h 后取出肠段,称量肠重和去肠鼠重,计算肠重/去肠鼠重(G/C)的比值,G/C≥0.090 为 ST I 毒性阳性,G/C≤0.083 为 ST I 毒性阴性^[6]。

1.5 动物免疫

兔子 2 只,肌肉注射融合蛋白 0.2 mg,3 周后二免,免疫剂量相同。二免后 3 周采集血清进行乳鼠灌胃中和实验、FMDV 细胞中和实验及乳鼠保护实

验。豚鼠 4 只,对照组、免疫组各两只。免疫组肌肉注射融合蛋白,首免剂量为 0.1 mg/只,3 周后二免,免疫剂量同一免。二免后 4 周提取淋巴细胞进行 T 淋巴细胞增值实验。6~8 周龄 Balb/c 雌鼠 20 只,对照组、免疫组各 10 只。对照组鼠不免疫,免疫组腹腔注射融合蛋白 50 μg/只,3 周后二免,免疫剂量同一免。二免后 3 周进行肠毒素强毒株 C83902 攻毒实验。

1.6 融合蛋白的 LTB-ST I 免疫原性检测

1.6.1 攻毒实验

取过夜培养的大肠杆菌强毒株 C83902 培养物腹腔注射 6~8 周龄 Balb/c 雌鼠,观察死亡情况,测定 C83902 培养物毒性。选用最小致死量(MLD)和 1.5MLD 的 C83902 培养物剂量腹腔注射免疫组及对照组雌鼠。

1.6.2 ST I 中和实验

C83916 24 h 培养物上清乳鼠灌胃,测定 1 个鼠活性单位的 ST I 肠毒素量,加入等量免疫兔血清混合,37℃ 中和 1 h,设立健康兔血清对照。采用乳鼠灌胃试验测定中和物 ST I 生物毒性。G/C≥0.09 为中和结果阴性,G/C≤0.083 为中和结果阳性,进而评价免疫兔血清中和抗体的中和效果。

1.7 融合蛋白的 2020-2020 免疫原性检测

1.7.1 T 淋巴细胞增值实验

二免后 4 w 的豚鼠提取脾脏淋巴细胞,DMEM 培养液稀释至 2 × 10⁶/mL,96 孔细胞培养板中每孔加 50 μL 细胞悬液和 50 μL 连续 10 倍稀释的 FMDV 抗原,重复 3 孔,设立培养液阴性对照孔。37℃、5% 二氧化碳、饱和湿度条件下培养 72 h。加入终浓度为 0.2 mg/mL 与 50 μmol/L XTT/PMS,继续培养。5 h 后测定每孔 OD₆₃₀ 数值。

1.7.2 细胞中和实验

实验组血清为二免后 3 周兔血清,对照组健康兔血清购自上海鼎国公司。采用固定血清-稀释病毒方法测定豚鼠血清的中和抗体效价^[7],血清中和抗体滴度为实验组 LD₅₀/对照组 LD₅₀。判定标准为:滴度大于 50 为阳性,10~50 为可疑,小于 10 为阴性。

1.7.3 乳鼠保护实验

2~3 日龄乳鼠 24 只,分为 8 组,每组 4 只。1~4 组每只皮下注射 0.1 mL 被免兔血清,5~8 组每只注射 0.1 mL 健康兔血清,24 h 后 1~8 组一起

皮下注射 FMDV 稀释液 0.1 mL。18 h 后观察乳鼠存活情况,72 h 终止观察。

2 结果

2.1 阳性重组质粒的酶切鉴定

阳性重组质粒经 *Bgl* II/*Xho* I 酶切,酶切 2020-B-2020-ST I 基因片段长度 758 bp。酶切产物经 1% 琼脂糖凝胶电泳分离出的条带与预期一致(图 1)。DNA 序列测定结果显示,核苷酸序列与阅读框均正确。

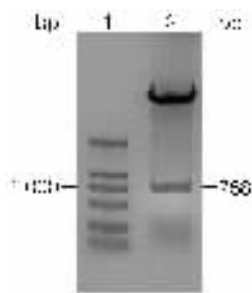


图 1 重组质粒 r2020-B-2020-ST I 酶切分析
1:DL2000;2:r2020-B-2020-ST I

Fig.1 Restriction endonuclease analysis of recombinant plasmid of r2020-B-2020-ST I

1:DL2000 DNA Marker; 2:r2020-B-2020-ST I.

2.2 重组质粒的表达及纯化

重组工程菌 r2020-B-2020-ST I /BL₂₁(DE₃) RIL 在菌体生长到 OD_{0.8} 时用终浓度为 1 mmol/L 的 IPTG 诱导表达。表达产物经 SDS-PAGE 电泳,结果显示 r2020-B-2020-ST I /BL₂₁(DE₃)RIL 表达的融合蛋白分子量约为 45 kDa。变性蛋白在 HPLC 系统进行纯化,调节 A(NTA0)、B(NTA500)洗脱液的比例洗脱目的蛋白;16%B(80 mmol/L Imidazole)出现杂蛋白峰,30%B(150 mmol/L Imidazole)出现目的蛋白峰(图略)。收集的蛋白经 SDS-PAGE 电泳显示,30%B(150 mmol/L Imidazole)洗脱的蛋白为纯化的目的蛋白,纯化产物单一。SDS-PAGE 电泳结果见图 2。

2.3 ELISA 检测

肠毒素大肠杆菌 LTB 与霍乱毒素(cholera toxin)CTB 抗原性相似,两者的抗血清有交叉中和作用。经 CTB 抗体检测,构建的 2020-B-2020-ST I 融合蛋白能够被 CTB 抗体识别(表 1),证明该融合蛋白也能够被 LTB 抗体识别。

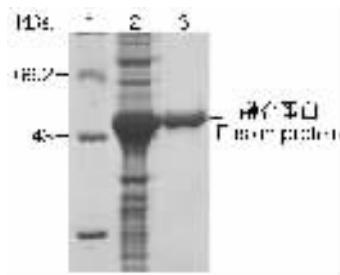


图 2 r2020-B-2020-ST I /BL₂₁(DE₃) RIL 表达及纯化产物的 SDS-PAGE 分析

Fig.2 SDS-PAGE analysis of the expressed and purified products of r2020-B-2020-ST I /BL₂₁(DE₃) RIL

1: Protein Marker; 2: Expressed 2020-B-2020-ST I;
3: Purified 2020-B-2020-ST I.

表 1 ELISA 检测结果

Table 1 ELISA detection results of the expressed 2020-B-2020-ST I

	2020-B-2020-ST I		FMDV 2020-2020VP1			
包被量(μg/mL)	2	2	5	10	15	20
Coat value						
OD ₄₅₀ 平均值	1.3125	0.064	0.078	0.078	0.076	0.068
Average value						

2.4 融合蛋白的 ST I 生物毒性检测

天然状态下,LTB 蛋白只有抗原性和免疫原性,没有任何生物毒性,ST I 多肽具有生物毒性。融合蛋白免疫的动物没有发生任何生理异常,说明融合蛋白对动物没有生物毒性;纯化的融合蛋白用 PBS 稀释进行乳鼠实验,未检测到融合蛋白残留 ST I 生物毒性(表 2)。

表 2 乳鼠实验检测融合蛋白 ST I 生物毒性

Table 2 The sucking mouse assay for ST I toxicity of the fusion protein

灌胃物	剂量	数量	G/C 平均值
Protein injected	Dose administered	Number of animals	G/C average value
PBS	Not applicable	5	0.0634
2020-B-2020-ST I	1 μg	5	0.0563
2020-B-2020-ST I	2 μg	5	0.0574

2.5 大肠杆菌强毒株攻毒保护实验

分别选用 1MLD 和 1.5MLD 的 C83902 菌液剂量腹腔注射雌鼠。对照组鼠全部死亡;免疫组获得较好的保护,保护率达到 100%(表 3)。

表 3 攻毒保护实验

Table 3 Protection of immunized mice from lethal dose of ETEC

注射剂量 Challenge dose	对照组存活情况	免疫组存活情况 Immunized group
	Survivors/Number of mice in group control	
1MLD	0/5	5/5
1.5MLD	0/5	5/5

2.6 ST I 毒性中和实验

健康兔血清及免疫兔血清与一个鼠活性单位 ST I 量等体积混合,感作后乳鼠实验结果见表 4,免疫组兔血清加 ST I 乳鼠 G/C 值 ≤ 0.083 ,而健康兔血清加 ST I 乳鼠 G/C 值 ≥ 0.09 ,说明融合蛋白能够诱发兔体产生 ST I 肠毒素中和抗体。

表 4 免疫兔血清对 ST I 毒素的中和作用

Table 4 Neutralization of ST I by sera of immunized rabbit

处理组 Treatment	乳鼠数 Number of mice	G/C 平均值 Average value
ST I + 健康兔血清 ST I + serum of control rabbit	5	0.0913
ST I + 免疫组兔血清 ST I + serum of immunized rabbit	5	0.0688

2.7 T 淋巴细胞增值实验

免疫组豚鼠 T 淋巴细胞增值实验结果见图 3。在 1/50、1/100 两个稀释度的 FMDV 抗原刺激下,T 淋巴细胞有较强的增值反应,而对照组豚鼠淋巴细胞在 FMDV 抗原刺激下无明显增值,说明融合蛋白可以诱导豚鼠产生有效的抗 FMDV 细胞免疫反应。

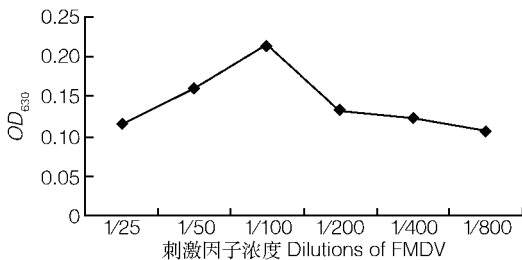


图 3 FMDV 病毒稀释液诱发免疫豚鼠 T 淋巴细胞产生增值反应

Fig.3 Proliferation of spleen T cells of guinea pigs induced by FMDV

2.8 抗 FMDV 细胞中和实验

细胞中和实验结果(表 5)表明:实验组豚鼠血清中和效价达到 10^3 ,说明融合蛋白能够诱发兔体产生强有效的体液免疫反应,产生的抗体能够中和 FMD 病毒对 BHK-21 细胞的毒性。

表 5 健康及免疫兔血清中和后 FMDV 的 LD_{50} Table 5 LD_{50} of FMDV neutralized by sera of rabbits

对照组兔血清 Serum of control rabbit		免疫兔血清 Serum of immunized rabbit	
病毒稀释度 Dilution of FMDV	细胞死亡率 Death rate	病毒稀释度 Dilution of FMDV	细胞致死率 Death rate
10^{-4}	6/6	10^{-2}	1/6
10^{-5}	2/6	10^{-3}	1/6
10^{-6}	0	10^{-4}	0
$LD_{50} 10^{-4.833}$		$LD_{50} 10^{-1.833}$	

2.9 乳鼠保护实验

乳鼠保护实验结果显示免疫兔血清对乳鼠有较好的保护作用,证明融合蛋白能够引起兔体产生抗 FMDV 中和抗体(表 6)。

表 6 免疫兔血清对乳鼠的保护能力

Table 6 Protection of sera of vaccinated rabbits for sucking mice from FMDV

血清 Serum injected	乳鼠数 Number of mice	口蹄疫病毒 FMDV	72 h 存活数 Number of survivors after 72 hours
健康兔血清 Serum of control rabbit	4	10^{-3}	0
	4	10^{-4}	0
	4	10^{-5}	0
	4	10^{-6}	0
2B2ST I 免疫兔血清 Serum of immunized rabbit	4	10^{-3}	1
	4	10^{-4}	4
	4	10^{-5}	4
	4	10^{-6}	4

3 讨论

淋巴细胞增殖是测定免疫动物产生细胞免疫反应的主要实验依据。XTT 法是继 H^3 -TdR 后一种简单快速灵敏的活细胞数量测定方法^[8,9]。XTT(2,3-bis(2-methoxy-4-nitro-5-sulfophenyl)-5-[phenylamino carbonyl]-2H-tetrazolium hydroxide)是一种与

MTT 类似的四唑氮衍生物。活细胞,特别是增值的细胞中能量代谢旺盛,其中线粒体能量代谢过程中产生的琥珀酸脱氢酶可被 XTT 还原成为水溶性的黄棕色甲臆(formazan)产物,甲臆产物的形成量与增值细胞的数量正相关。在波长 450 nm 处该甲臆产物具有最大吸收峰。用酶标仪检测该波长下的吸收值,OD 值与活细胞数量之间有较好的线性关系由此可以间接反应 T 细胞的增值情况。与电子偶联剂如 PMS(phenazine methosulfate)共同使用时能增强 XTT 的还原反应,同时提高反应的灵敏性。

肠毒素大肠杆菌引起的幼畜腹泻与口蹄疫均为危害畜牧业发展的重要疾病,目前易感动物多使用疫苗进行免疫预防。基因工程疫苗是新型疫苗研究的热点。VP1 是主要的 FMDV 抗原蛋白,是 FMD 疫苗研究的重点。一般认为,VP121~40 肽是 T 细胞免疫表位,引发产生细胞免疫应答;141~160 肽及 200~213 肽为 B 细胞表位,引发体液免疫反应。国内外学者通过基因工程技术表达了系列带有 T 细胞表位或/与 B 细胞表位的融合蛋白^[1,10~12]。对于肠毒素大肠杆菌,LTB 及与大分子偶联的 ST I 是主要的抗原蛋白,目前国内外所作的研究主要是研究 LTB-ST I 及与定居因子融合表达产物的免疫活性^[4,6,13]。把口蹄疫病毒与肠毒素大肠杆菌的相关免疫位点基因融合表达,制备抗 FMDV/ETEC 双重功能的联合疫苗为本文的创新。本文把双拷贝的 FMDV VP1T、B 细胞表位与 ETEC LTB-ST I 基因连接,表达出 2020-LTB-2020-ST I 融合蛋白。融合蛋白无 ST I 毒性。动物实验表明,融合蛋白中的 FMDV VP12020-2020 免疫豚鼠脾脏淋巴细胞在低浓度 FMDV 刺激下有较强的增值反应,免疫兔血清中含有较高水平的 FMDV 抗体,可以对细胞与乳鼠产生保护作用;融合蛋白中 LTB、ST I 具有生物活性,LTB 能够与 CTB 抗体结合,免疫兔血清中产生的 ST I 抗体能够中和天然 ST I 毒性,免疫雌鼠能够抵抗 1.5MLD 大肠杆菌强毒株的攻击。由此证明融合蛋白可以同时诱导机体产生较好的抗 FMDV 及 ETEC 免疫应答反应,具有开发成为 FMDV 与 ETEC 基因工程疫苗的应用价值。

参考文献(References):

- [1] Collen T, Dimarchi R, Doel T R. A T cell epitope in vp1 of food-and-mouth disease virus is immunodominant for vaccinated cattle. *Immunol*, 1991,146:749~755.
- [2] Strohmaier K, Franze R, Adam K H. Location and characterization of the antigenic portion of the FMDV immunizing protein. *Gen Virol*, 1982,59:295~306.
- [3] Klipstein F A, Engert R F, Houghten R A. Protection in rabbits immunized with a vaccine of *Escherichia coli* heat-labile toxin cross-linked to the heat-stable B subunit. *Infect Immun*, 1983, 40(3):888~893.
- [4] Clements J D. Construction of a nontoxic fusion peptide for immunization against *Escherichia coli* strains that produce heat-labile and heat-stable enterotoxins. *Infect Immun*, 1990;58(5): 1159~1166.
- [5] Gill D M, Clements J D, Robertson D C, Fiklstein R A. Subunit number and arrangement in *Escherichia coli* heat labile enterotoxin. *Infect Immun*, 1981,33(3):677~682.
- [6] Guzman-Verduzco L M, Kupersztuch Y M. Fusion of *Escherichia coli* heat-stable enterotoxin and heat-labile enterotoxin B subunit. *Bacteriol*, 1987, 169(11):5201~5208.
- [7] XU Yi-Wei. Immunoassay Technique. Beijing: Science Press, 1991.
徐宜为. 免疫检测技术. 北京: 科学出版社, 1991.
- [8] WU Nan. Application of XTT colorimetric assay for determination of cell activity. *Clinical Biochemistry and Laboratory Medicine, Foreign Medical Sciences*, 1998,19(5):204~206.
吴楠. XTT 比色法在细胞活性检测中的应用. 国外医学临床生物化学与检验学分册, 1998,19(5):204~206.
- [9] SONG Jin-Ping, ZHONG Ping, WANG Tao, WEN Xiu-Lan, ZHANG Hong. Establishment of MTS and XTT colorimetric assay for determination of lymphocytic proliferation. *J Cell Mol Immunol*, 2001,17(3):292~295.
宋锦平, 钟萍, 汪涛, 温秀兰, 张虹. 测定淋巴细胞增值的 MTS 及 XTT 比色法的建立. 细胞与分子免疫学杂志, 2001, 17(3):292~295.
- [10] Brown F. New approaches to vaccination against food-and-mouth disease. *Vaccine*, 1992,10(14):1022~1026.
- [11] YANG Zhi-Jun, LIN Yan, LI Jin-Guang, YAN Wei-Yao, XU Quan-Xing, YOU Yong-Jin, ZHENG Zhao-Xin. Recombinant vaccine containing both B cell and T cell epitopes induces Guinea pig in immune responses against type O food-and-mouth disease virus. *Journal of Fudan University (Natural Science)*, 2000, 39(5): 564~567.
杨志军, 林焱, 李金光, 严维耀, 徐泉兴, 尤永进, 郑兆鑫. 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(自然科学版), 2000, 39(5): 564~567.
- [12] YI Jian-Zhong, HUANG Hai-Bin, YANG Zhi-Jun, HUANG Shu, DENG Yu, YAN Wei-Yao, DING En-Yu, YOU Yong-Jin, XU Quan-Xing, ZHENG Zhao-Xin. A biosynthetic peptide vaccine against type A strain of food-and-mouth disease virus. *Journal of Fudan University (Natural Science)*, 1997,36(5):495~499.
易建中, 黄海斌, 杨志军, 黄姝, 邓余, 严维耀, 丁恩雨, 尤永进, 徐泉兴, 郑兆鑫. A 型口蹄疫病毒 VP1 免疫活性肽基因串联片断的化学合成及克隆与表达. 复旦学报(自然科学版), 1997, 36(5):495~499.
- [13] Cardenas L, Clements J D. Development of mucosal protection against the heat-stable enterotoxin (ST) of *Escherichia coli* by oral immunization with a genetic fusion delivered by a bacterial vector. *Infect Immun*, 1993,61(11):4629~4636.