

口蹄疫病毒氨基酸改造对其病毒样颗粒稳定性的影响

李璐莹¹, 董虎¹, 卢渊录¹, 王苗苗¹, 孙世琪¹, 郭慧琛^{1,2}

1 中国农业科学院兰州兽医研究所 国家口蹄疫参考实验室, 甘肃 兰州 730046

2 长江大学 动物科学学院, 湖北 荆州 434025

李璐莹, 董虎, 卢渊录, 等. 口蹄疫病毒氨基酸改造对其病毒样颗粒稳定性的影响. 生物工程学报, 2021, 37(7): 2435-2442.

Li LY, Dong H, Lu YL, et al. Effect of amino acid site modification on stability of foot-and-mouth disease virus-like particles. Chin J Biotech, 2021, 37(7): 2435-2442.

摘要: 病毒样颗粒 (Virus like particles, VLPs) 的稳定性是目前影响口蹄疫 VLPs 疫苗质量的主要因素。为进一步提升口蹄疫 VLPs 疫苗的质量, 基于口蹄疫病毒三维空间结构, 通过动力学分析软件设计并筛选出 3 个氨基酸改造位点。经点突变试剂盒成功制备出上述 3 种突变型重组质粒, 转化大肠杆菌 *Escherichia coli* BL21 菌株后经体外诱导表达, Ni 离子层析柱纯化后, SDS-PAGE 结果证明 3 种氨基酸突变不影响目标蛋白的表达。体外组装获得的 3 种突变型 VLPs 稳定性研究结果发现, 内部疏水性侧链氨基酸的引入使 VLPs 的形态变得更加均一 (N4017W), 且其稳定性比其他两种 VLPs 明显提高。结果表明, 衣壳内部疏水性作用力有助于 VLPs 的形成且有助于维持衣壳的稳定性, 为提高 VLPs 疫苗质量提供了新的研究思路, 有助于推进 VLPs 疫苗的发展。

关键词: 病毒样颗粒, 三维构象, 突变体, 稳定性, 同源建模, 口蹄疫病毒

Effect of amino acid site modification on stability of foot-and-mouth disease virus-like particles

Luying Li¹, Hu Dong¹, Yuanlu Lu¹, Miaomiao Wang¹, Shiqi Sun¹, and Huichen Guo^{1,2}

1 National Foot and Mouth Disease Reference Laboratory, Lanzhou Veterinary Research Institute, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Lanzhou 730046, Gansu, China

2 College of Animal Science, Yangtze University, Jingzhou 434025, Hubei, China

Abstract: The stability of virus-like particles (VLPs) is currently the main factor affecting the quality of foot-and-mouth disease VLPs vaccines. In order to further improve the quality of the VLPs vaccine of foot-and-mouth disease (FMD), three amino acid modification sites were designed and screened through kinetic analysis software, based on the three-dimensional structure of FMDV. The three mutant recombinant plasmids were successfully prepared by the point mutation kit, transformed into *Escherichia coli* strain BL21 and expressed *in vitro*. After purification by Ni ion chromatography column, SDS-PAGE

Received: August 29, 2020; **Accepted:** December 3, 2020

Supported by: National Key Research and Development Program of China (Nos. 2017YFD0500900, 2017YFD0501100, 2016YFD0500702, 2016YFE0204100), National Natural Science Foundation of China (Nos. 31672592, 31873023).

Corresponding author: Huichen Guo. Tel: +86-931-8312213; E-mail: guohuichen@caas.cn

国家重点研发计划 (Nos. 2017YFD0500900, 2017YFD0501100, 2016YFD0500702, 2016YFE0204100), 国家自然科学基金 (Nos. 31672592, 31873023) 资助。

网络出版时间: 2021-01-12

网络出版地址: <https://kns.cnki.net/kcms/detail/11.1998.Q.20210111.1125.006.html>

proved that the three amino acid mutations did not affect the expression of the target protein. The results of the stability study of three FMD mutant VLPs obtained by *in vitro* assembly show that the introduction of internal hydrophobic side chain amino acids made the morphology of VLPs more uniform (N4017W), and their stability was significantly improved compared to the other two VLPs. The internal hydrophobic force of the capsid contributes to the formation of VLPs and helps to maintain the stability of the capsid, providing new experimental ideas for improving the quality of VLPs vaccines, and helping to promote the development of VLPs vaccines.

Keywords: virus like particles, three-dimensional structure, mutant, stability, homology modeling, foot-and-mouth disease virus

口蹄疫 (Foot-and-mouth disease, FMD) 是由口蹄疫病毒 (FMD virus, FMDV) 引起的偶蹄动物常发的一种烈性传染病, 该病传播迅速, 能够在短时间内大范围流行。该病的暴发严重影响了动物贸易和动物产品质量, 造成重大经济损失^[1]。在国家动物疫病防治长期发展规划中, 口蹄疫、禽流感、猪蓝耳、猪瘟等被确定为限期免疫、净化防控的病种。

在过去的几十年里, 国内外预防和控制口蹄疫的措施主要是免疫接种灭活苗^[2], 但存在着灭活不彻底的风险, 因此, 研究安全有效的新型疫苗成为防控口蹄疫的迫切需要。目前口蹄疫的新型疫苗主要有亚单位疫苗、核酸疫苗、活载体疫苗^[3]。其中的亚单位疫苗以其安全、可规模化生产、成本低等优势成为当前研究的热点。病毒样颗粒 (Virus-like particles, VLPs) 是由病毒的结构蛋白自组装而形成的空心颗粒, 许多病毒的结构蛋白都能自组装成 VLPs^[4-8], 这些 VLPs 含有病毒的特异性抗原表位, 能模拟天然病毒诱导机体产生有效的免疫应答, 这些特性为新型疫苗的研究提供了基础^[9]。但 VLPs 在组装时缺乏核酸和蛋白质之间的作用力, 其稳定性相对较低。构象稳定性对疫苗抗原的免疫活性至关重要, 如: FMDV 粒子的大小在 25–28 nm, 其沉降系数为 146S, 衣壳内包裹有 RNA, 具有最强的免疫原性。当 pH 低于 7.0 或加热条件下, FMDV 会发生裂解, 降解为由 5 个单体构成的 12S 前体。Deol 等^[10]研究表明口蹄疫中和抗体主要由 146S 抗原和 75S 空衣壳诱导产生, 12S 前体免疫机体基本不产生中和抗体^[11]。

从生物物理学的角度看, VLPs 自组装的本质

是病毒衣壳蛋白亚基内、亚基间以及衣壳粒间的相互作用及协调效应, 病毒衣壳蛋白的组装过程与大多数蛋白质折叠过程相似, 肽链一般通过静电作用、疏水作用、氢键和范德华力等组装成衣壳亚基, 然后通过弱的相互作用组装成有生物学功能的衣壳蛋白^[12]。但是许多研究表明, 病毒衣壳蛋白易受酸和热的影响进而发生构象变化, 从而影响免疫原性^[13-15]。FMDV 三维结构的解析表明^[16-17], FMDV 衣壳亚基间氨基酸侧链对颗粒稳定性和病毒的功能影响较大。由此可见, 基于病毒三维构象分析的病毒衣壳改造, 可为提高病毒衣壳稳定性提供新的研究思路。

本研究基于 FMDV 三维空间结构, 通过动力学分析软件对病毒衣壳表面的氨基酸进行分析, 筛选并成功构建了 3 种突变型重组质粒。经诱导表达、纯化、体外组装^[18]后蔗糖密度梯度^[19]分离纯化获得了 3 种突变型 VLPs, 并对突变型 VLPs 的热稳定性进行了研究。

1 材料与方法

1.1 载体和抗体

含 O 型 FMDV 结构蛋白 VP0、VP1、VP3 重组质粒 pSMK-VP01、pSMA-VP3 和 FMD 阳性血清均由中国农业科学院兰州兽医研究所口蹄疫防控团队保存^[20]。大肠杆菌 *Escherichia coli* Trans5α 克隆菌株及 BL21 (DE3) 表达菌株均购自 TransGen 公司。辣根过氧化物酶 (HRP) 标记的山羊抗猪 IgG 抗体购自 Sigma 公司。

1.2 主要试剂

定点突变试剂盒购自宝生物工程 (大连) 有

限公司。DNA 片段纯化回收试剂盒购自 TransGen 公司。质粒小量提取试剂盒购自生工生物工程(上海)股份有限公司。DNA 标准分子量购自宝生物工程(大连)有限公司。镍亲和层析树脂购自罗氏公司。无 RNase 蔗糖购自 AMRESCO 公司。2% 磷钨酸购自北京索莱宝公司。蛋白质标准分子量购自 SMOBIO 公司。Amicon Ultra 离心浓缩管购自 Merck-Millipore 公司。其他试剂均为国产或者进口分析纯。

1.3 仪器

PCR 仪、小型台式离心机、超高速离心机 (Optima XPN-100)、紫外分光光度仪 (BIOMATE 3S) 均购自美国赛默飞世尔科技公司, 高速冷冻离心机购自 Eppendorf 公司, 电泳仪 (DYY-11B) 购自北京六一仪器厂, 凝胶成像系统购自 BIO-RAD 公司, 蔗糖梯度制备和分离仪购自 Canada BioComp Instruments 公司, 纳米粒度仪 (ZETASIZER Nano ZS) 购自英国马尔文公司, 透射电子显微镜 (HT-7700) 购自日本日立公司。

1.4 突变型 VLP 制备

1.4.1 突变位点筛选

基于口蹄疫病毒衣壳三维结构 (PDB:5DDJ), 利用 Discovery Studio 服务器的“Build homology models”模块对目标序列的三维空间构象进行重构。进一步对目标序列相互之间的作用力进行分析 (该结果未公布) 后, 通过 Discovery studio 服务器对衣壳蛋白氨基酸进行丙氨酸筛选, 进一步对高不稳定性氨基酸进行互换预测 (20 种氨基酸预测) 分析。

1.4.2 重组质粒构建

以 GenBank 中公布的 O/BY/CHINA/2010 毒株 (登录号: JN998085.1) 序列为参考, 使用 Oligo.7 设计特异性引物对。设计后送基因公司合成引物, 含有氨基酸突变位点的 3 对引物的序列见表 1。

表 1 突变体引物

Table 1 Primers of mutants

| Primer name | Sequence (5'-3') |
|-------------|---------------------------------------|
| W4017F | <u>GG</u> ACTGGAAGCATTATCAAC |
| W4017R | <u>A</u> GCCTGACTGGTTCTGTGA |
| R2165F | <u>GCA</u> ACCGCTACGACCAGTACAA |
| R2165R | <u>GG</u> CCAACAAAGGGCACAGT |
| W1031F | <u>GG</u> GTCTCGTTCATATTAGACAG |
| W1031R | <u>AC</u> GTGTGTTGGCGTCTCT |

Bold and underlined indicate the mutant bases in the primers.

根据 TaKaRa MutanBEST Kit 试剂盒说明书, 以质粒 pSMK-VP01 为模板, 分别对上述 3 对引物进行 PCR 扩增, 对 1% 琼脂糖凝胶电泳后的目的条带进行胶回收, 回收 DNA 片段后磷酸化, Solution I 连接磷酸化后的线性 DNA, 将连接产物转化至大肠杆菌 Trans5 α 感受态细胞中, 挑斑培养, 提取质粒后送金斯瑞生物技术公司测序。

1.4.3 突变体蛋白表达和纯化

将测序正确的重组质粒分别与 pSMA-VP3 质粒共同转化至表达菌 BL21 (DE3) 中, 挑斑后经 PCR 筛选 3 基因共转化成功的菌落进行小剂量诱导表达, 将鉴定表达成功的菌种按 1% 接种量接种至含氨苄青霉素和卡那霉素的 LB 培养基中, 培养诱导后以 4 000 r/min 离心 20 min 收集菌体。超声破碎后离心取上清经 Ni 柱层析, 获得目标蛋白, 用 SDS-PAGE 鉴定。

1.4.4 突变体组装

透析袋内加入 3 mL 已除去 His-SUMO 融合标签的目标蛋白, 然后将透析袋置于组装缓冲液中, 在 4 $^{\circ}$ C 作用 60 h 后收集样品。

1.4.5 组装产物的检测

组装产物经 12% 的 SDS-PAGE 后, 将蛋白转移至硝酸纤维素膜上, 用封闭液 (TBST, 5% 脱脂奶粉溶液) 室温下封闭 1 h, 用猪口蹄疫阳性血清 (1:2 000 稀释) 室温孵育 2 h, TBST 洗涤 5 次后用辣根过氧化物酶标记的兔抗猪 IgG (1:5 000 稀释) 室温孵育 2 h, TBST 洗涤 5 次后加入 ECL 发光液避光反应 3 min, 经 Kozak 胶片曝光, 显

影及定影固定后,观察目的条带。

将样品 (500 μL) 加在 15%–45% 的蔗糖线性梯度溶液顶部,以 35 000 r/min、4 $^{\circ}\text{C}$ 超速离心 2.5 h 后从上至下收集样品,每份样品 0.5 mL,使用紫外分光光度计测定样品的 OD_{280} 值,按照顺序记录并绘制曲线图,选取峰值处样品在透射电镜下观察样品大小形态、分散程度等。同时,用动态光散射仪 (DLS) 测定组装产物粒径大小,设定检测参数折射率和粘度分别为 1.33 P 和 1.003 P,在 830 nm 处进行样品检测,随后根据光强、数量、体积粒度分布图分析结果。

1.4.6 热稳定性实验

利用荧光染料结合实验进一步表征 VLPs 的热稳定性。SYPRO orange 是一种特异性结合疏水性蛋白质的荧光染料,随着衣壳裂解其内部疏水性氨基酸暴露与荧光染料结合。使用 CFX96TM qPCR 仪在 PBS 缓冲液中进行蛋白衣壳裂解的测定^[21]。反应体系:SYPRO orange 3 μL 、PBS buffer 17 μL 、VLPs 30 μL 。反应程序:温度以 0.5 $^{\circ}\text{C}$ 的增量从 25 $^{\circ}\text{C}$ 升至 95 $^{\circ}\text{C}$,间隔为 30 s。蛋白衣壳裂解的检测以 490 nm 和 585 nm 的激发和发射波长读取荧光。从 qPCR 仪中导出数据,通过荧光信号的增加检测蛋白衣壳的裂解温度。

为进一步表征 3 种突变型 VLPs 的稳定性,使用动态光散射来测定突变型 VLPs 在 4 $^{\circ}\text{C}$ 条件下的稳定性:将 3 种突变型 VLPs 稀释至 0.1 mg/mL,设置对照组为未经过氨基酸位点改造的野生型 VLPs,将 4 组溶液置于 4 $^{\circ}\text{C}$ 冰箱内,每隔 24 h 测定一次粒径^[22]。

2 结果与分析

2.1 氨基酸位点筛选

BLAST 分析结果表明本实验所用 O 型口蹄疫毒株 P1 区氨基酸序列与已公布三维构象的口蹄疫毒株 (PDB:5DDJ) 同源性高达 94.5%,因此基于该结构模型通过 Discovery Studio 服务器的“Build homology models”模块建立了本实验毒株

的三维模型,通过软件评分选取优势构象 (图 1) 作为后续氨基酸筛选的初始模型。进一步通过丙氨酸筛选动力学分析获得了 3 种稳定氨基酸突变形式 (表 2)。

2.2 突变体表达、纯化

将测序成功的 3 种重组质粒转化大肠杆菌 BL21(DE3),诱导表达纯化后 SDS-PAGE 分析,结果 (图 2) 显示,筛选的 3 种突位点不影响衣壳蛋白表达。

2.3 突变型 VLPs 检测

融合蛋白在体外组装后经 SDS 上样缓冲液 100 $^{\circ}\text{C}$ 处理 10 min,SDS-PAGE 鉴定 3 条目的条带大小符合蛋白质理论分子质量,如图 3 所示。



图 1 口蹄疫病毒单体三维结构重构

Fig. 1 Reconstruction of the three-dimensional structure of FMDV protomer, the template (PDB:5DDJ) and the reconstructed model are displayed by superposition, and displayed in gray and red colour, respectively.

表 2 衣壳稳定相关氨基酸侧链突变

Table 2 The amino acid mutations of side chains involved in stabilizing capsids

| Mutant | Energy | VDW | Electrostatic | Entropy term | Effect |
|--------|--------|-------|---------------|--------------|--------|
| D1031W | -3.22 | -3.4 | -2.16 | 0.55 | Stable |
| N4017W | -2.04 | -3.46 | -0.85 | 0.14 | Stable |
| V2165R | -1.49 | -7.53 | 1.28 | 2.05 | Stable |

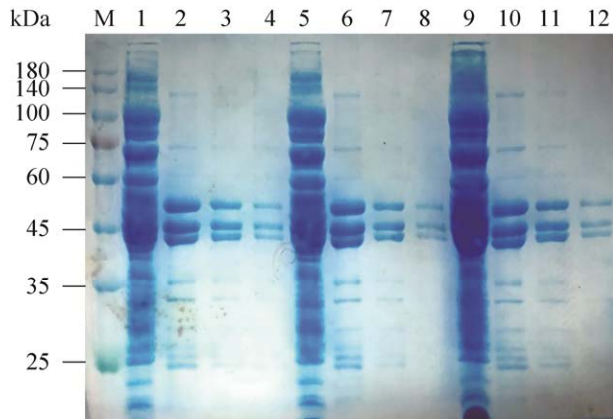


图 2 突变体 SDS-PAGE 分析 (M: 蛋白分子质量标准; 1: N4017W 突变体滤液; 2–4: N4017W 突变体洗脱液; 5: V2165R 突变体滤液; 6–8: V2165R 突变体洗脱液; 9: D1031W 突变体滤液; 10–12: D1031W 突变体洗脱液)

Fig. 2 SDS-PAGE analysis of mutants. M: protein molecular weight marker; lane 1: flow-through of mutant N4017W; lane 2–4: elution of mutant N4017W; lane 5: flow-through of mutant V2165R; lane 6–8: elution of mutant V2165R; lane 9: flow-through of mutant D1031W; lane 10–12: elution of mutant D1031W.

经蔗糖密度梯度离心后,自上而下分离共收集 22 管样品, OD_{280} 曲线图 (图 4A) 表明 3 种突变型 VLPs 经分离纯化后均在第 14–17 管处形成峰,该峰几乎与 FMDV 分离峰一致^[23], Western blotting

检测该峰主要由口蹄疫 3 种结构蛋白组成。通过 DLS 检测该峰处样品的水合直径为 20–30 nm (图 4B),且透射电镜观察主要由 20 nm 左右的空心颗粒组成。其中 N4017W 突变体形成的空心颗粒形态大小均一,而 V2165R 突变体和 D1031W 突变体除形成空心颗粒外还形成少量长条状聚集体 (图 5)。

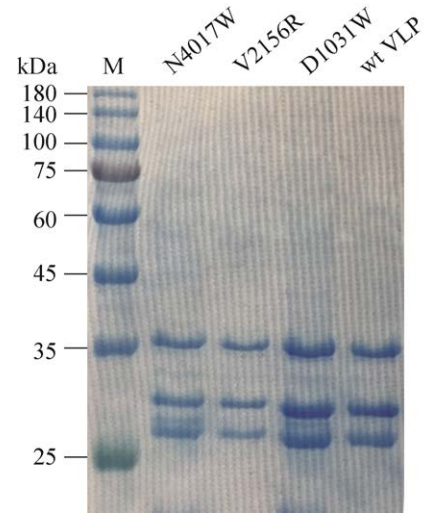


图 3 组装产物的 SDS-PAGE 分析

Fig. 3 SDS-PAGE analysis of assembly product. M: protein molecular weight marker.

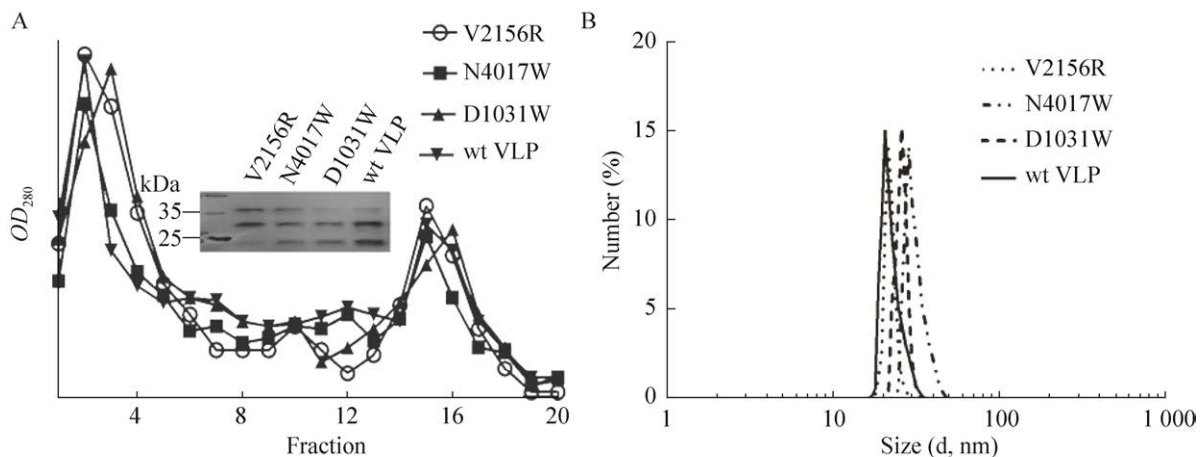


图 4 病毒样颗粒纯化及鉴定

Fig. 4 Purification and identification of VLPs. (A) 15%–45% sucrose density gradient ultracentrifugation and the peak sample were identified by Western blotting. (B) Hydration diameter detection of the peak sample by DLS.

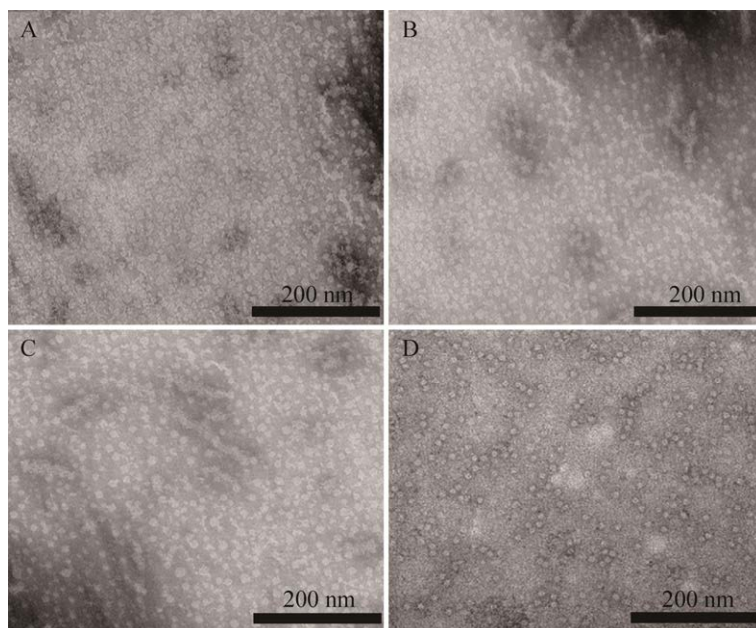


图5 突变体蔗糖密度梯度峰样品透射电镜观察

Fig. 5 The peak samples after sucrose density gradient of mutant were observed by transmission electron microscope. (A) N4017W. (B) V2165R. (C) D1031W. (D) wt VLPs.

2.4 突变型 VLPs 热稳定性

颗粒稳定性试验结果如图 6 所示, 野生型 VLPs 在 48 °C 时完全裂解, 疏水基团暴露; 1031 突变体在 52 °C 时完全裂解; 2165 突变体和 4017 突变体分别在 58 °C 和 59 °C 时完全裂解。表明 4017 突变体和 2165 突变体相比于野生型 VLPs 其稳定性显著提高。

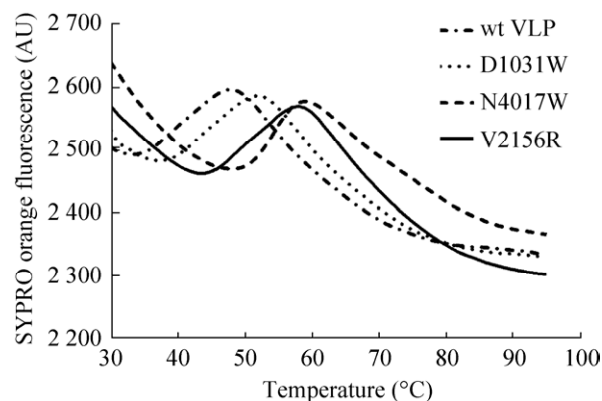


图6 突变体组装产物热稳定性

Fig. 6 Thermostability of assembly products of mutants.

VLPs 缺乏核酸其稳定性相对较低, 在 4 °C 能维持 3 d, 随着时间延长衣壳破裂, 衣壳蛋白错误折叠、堆积, 在第 5 天后会出现肉眼可见的浑浊。N4017W 突变型 VLPs 和 V2165R 突变型 VLPs 在 4 °C 条件下有部分衣壳出现聚集现象, 但大部分衣壳仍保持完整形态; 其水合直径在前 6 d 变化不明显 (图 7)。

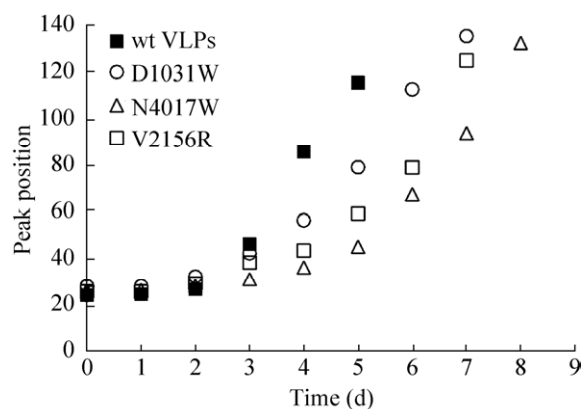


图7 突变型 VLPs 在 4 °C 条件下水合直径变化

Fig. 7 Hydration diameter of mutant VLPs at 4 °C.

3 讨论

VLPs 因其具有良好的免疫原性和安全性成为目前疫苗研究的热点。由多聚亚基组成的 VLPs, 其构象复杂, 易受到破坏而发生聚集或解离, 相比于全病毒其稳定性较差。VLPs 的构象变化和衣壳蛋白的聚集会影响疫苗的稳定性和有效性, 所以解决 VLPs 疫苗稳定性问题是推进 VLPs 疫苗发展的关键, 也是将来能否成功推广应用的关键。

FMDV VLPs 衣壳稳定性的维持主要依靠蛋白质亚基之间的作用力, 而缺乏核酸和蛋白质之间的作用力^[24]。FMDV 衣壳中半胱氨酸 (Cys) 含量较高 (每个单体分子中有 9 个 Cys, 60 个单体分子组成病毒衣壳), 而 O 型口蹄疫病毒衣壳中只有 Cys2134 与 Cys1130 两个氨基酸能够形成二硫键, 其他 Cys 侧链在空间距离和结构上不适合形成二硫键。因此在非还原性环境中组装口蹄疫病毒衣壳, Cys 侧链很容易错配。另外, 在外界环境因素不利于衣壳组装的情况下, 衣壳蛋白会发生错配, 导致聚集和沉淀, 使免疫原性大幅降低, 影响疫苗质量^[25-26]。Mateo 等^[27]通过对 FMDV 衣壳亚基周围的氨基酸进行改造, 提升了 FMDV 衣壳的热稳定性, 且对氨基酸的改造并不影响病毒颗粒的抗原性。本实验通过亚基内部丙氨酸筛选的方式获得了 3 种突变体, 组装出热稳定性增强的 VLPs。通过透射电镜和 DLS 证明 3 种突变体均在体外组装成了直径 20–30 nm 的空心颗粒。热稳定性试验表明 3 种突变型 VLPs 的热稳定性相较于未突变型 VLPs 均有提升, 其中 N4017W 突变型 VLPs 热稳定性显著提高, 且衣壳形态相对比较均一。本研究通过定点突变衣壳亚基间的氨基酸来增强蛋白质分子间的作用力, 提升了 VLPs 的稳定性, 从而可以弥补缺乏 RNA 而引起的衣壳结构不稳定, 进而提高了口蹄疫 VLPs 的免疫原性。该突变并不影响结构蛋白的表达和组装, 同时衣壳内部疏水性有助于衣壳的形成和稳定性, 为推进口蹄疫 VLPs 疫苗的研究奠定了基础, 有利于未来开发出更加高效稳定的 FMD 疫苗。

REFERENCES

- [1] Mason PW, Grubman MJ, Baxt B. Molecular basis of pathogenesis of FMDV. *Virus Res*, 2003, 91(1): 9-32.
- [2] 宋艳民, 杨延丽, 苏志国, 等. 高效体积排阻色谱法定量检测口蹄疫疫苗中 146S 的疫苗预处理方法. *生物工程学报*, 2019, 35(8): 1441-1452.
Song YM, Yang YL, Su ZG, et al. Vaccine pretreatment for quantification of 146S antigen in foot-and-mouth disease vaccines by high performance size exclusion chromatography. *Chin J Biotech*, 2019, 35(8): 1441-1452 (in Chinese).
- [3] 陈里新, 靳玉珠, 扈荣良. 口蹄疫疫苗的研究进展. *中国生物制品学杂志*, 2009, 22(3): 301-304.
Chen LX, Jin YZ, Hu RL. Progress in research on foot-and-mouth disease vaccine. *Chin J Biologicals*, 2009, 22(3): 301-304 (in Chinese).
- [4] Li TC, Yamakawa Y, Suzuki K, et al. Expression and self-assembly of empty virus-like particles of hepatitis E virus. *J Virol*, 1997, 71(10): 7207-7213.
- [5] Huang Z, Elkin G, Maloney BJ, et al. Virus-like particle expression and assembly in plants: hepatitis B and Norwalk viruses. *Vaccine*, 2005, 23(15): 1851-1858.
- [6] Chong P, Hsieh SY, Liu CC, et al. Production of EV71 vaccine candidates. *Hum Vacc Immunother*, 2012.
- [7] Li M, Cripe TP, Estes PA, et al. Expression of the human papillomavirus type 11 L1 capsid protein in *Escherichia coli*: characterization of protein domains involved in DNA binding and capsid assembly. *J Virol*, 1997, 71(4): 2988-2995.
- [8] Christensen ND, Hopfl R, Diangelo SL, et al. Assembled baculovirus-expressed human papillomavirus type 11 L1 capsid protein virus-like particles are recognized by neutralizing monoclonal antibodies and induce high titres of neutralizing antibodies. *J Gen Virol*, 1994, 75(pt 9)(9): 2271-2276.
- [9] Jennings, Gary T. The coming of age of virus-like particle vaccines. *Biol Chem*, 2008.
- [10] Yang L, Song Y, Li X, et al. HIV-1 virus-like particles produced by stably transfected *Drosophila* S2 cells: a desirable vaccine component. *J Virol*, 2012, 86(14): 7662-7676.
- [11] Cartwright B, Chapman WG, Brown F. Serological and immunological relationships between the 146S

- and 12S particles of foot-and-mouth disease virus. *J Gen Virol*, 1980, 50(2): 369-375.
- [12] 杨延丽. 灭活病毒及病毒样颗粒的结构表征和稳定性研究[D]. 北京: 中国科学院研究生院(过程工程研究所), 2015.
- Yang YL. Characterization and stabilization of inactivated virus and virus like particles[D]. Beijing: Chinese Academy of Sciences(Institute of Process Engineering), 2015 (in Chinese).
- [13] Caridi F, Vázquez-Calvo Á, Borrego B, et al. Preserved immunogenicity of an inactivated vaccine based on foot-and-mouth disease virus particles with improved stability. *Vet Microbiol*, 2017, 203: 275.
- [14] Sivertsson EM, Itzhaki LS. A virus that can take the heat. *Structure*, 2014, 22(11): 1549-1550.
- [15] Harmsen MM, Fijten HPD, Westra DF, et al. Stabilizing effects of excipients on dissociation of intact (146S) foot-and-mouth disease virions into 12S particles during storage as oil-emulsion vaccine. *Vaccine*, 2015, 33(21): 2477-2484.
- [16] Mateo R. Complete alanine scanning of intersubunit interfaces in a foot-and-mouth disease virus capsid reveals critical contributions of many side chains to particle stability and viral function. *J Biol Chem*, 2003, 278(42): 41019-41027.
- [17] Han SC, Guo HC, Sun SQ. Three-dimensional structure of foot-and-mouth disease virus and its biological functions. *Arch Virol*, 2015, 160(1): 1-16.
- [18] 董虎. 南非 2 型口蹄疫病毒样颗粒体外组装及嵌合病毒样颗粒的初步研究[D]. 北京: 中国农业科学院, 2014.
- Dong H. Assembly VLPs of foot and mouth disease virus serotype SAT2 and initially research about its chimeric VLPs[D]. Beijing: Chinese Academy of Agricultural Science, 2014 (in Chinese).
- [19] 董虎, 郭慧琛, 敖大, 等. 嵌合型口蹄疫病毒样颗粒组装研究. *安徽农业科学*, 2014, 42(13): 3902-3906.
- Dong H, Guo HC, Ao D, et al. Study on the assembly of chimeric virus-like particles of foot-and-mouth disease virus. *J Anhui Agri*, 2014, 42(13): 3902-3906 (in Chinese).
- [20] Guo HC, Sun SQ, Jin Y, et al. Foot-and-mouth disease virus-like particles produced by a SUMO fusion protein system in *Escherichia coli* induce potent protective immune responses in guinea pigs, swine and cattle. *Vet Res*, 2013, 44(1): 1-13.
- [21] Ericsson UB, Hallberg BM, Detitta GT, et al. Thermofluor-based high-throughput stability optimization of proteins for structural studies. *Anal Biochem*, 2006, 357(2): 289-298.
- [22] Fu DY, Zhang SM, et al. Hybrid assembly toward enhanced thermal stability of virus-like particles and antibacterial activity of polyoxometalates. *Acs Appl Mater Inter*, 2018.
- [23] 卢渊录, 董虎, 李璐莹, 等. 分子排阻色谱(SEC)分离纯化口蹄疫病毒及其病毒样颗粒的比较. *中国兽医科学*, 2019, 49(6): 694-699.
- Lu YL, Dong H, Li LY, et al. Isolation and purification of FMDV and FMDV-VLPs by size exclusion chromatography. *Chin Veter Sci*, 2019, 49(6): 694-699 (in Chinese).
- [24] Harmsen MM, Jansen J, Westra DF, et al. Characterization of foot-and-mouth disease virus antigen by surface-enhanced laser desorption ionization-time of flight-mass spectrometry in aqueous and oil-emulsion formulations. *Vaccine*, 2010, 28(19): 3363-3370.
- [25] Rweyemamu MM, Terry G, Pay TWF. Stability and immunogenicity of empty particles of foot-and-mouth disease virus. *Arch Virol*, 1979, 59(1/2): 69-79.
- [26] Doel TR, Baccarini PJ. Thermal stability of foot-and-mouth disease virus. *Arch Virol*, 1981, 70(1): 21-32.
- [27] 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 Virol*, 2008, 82(24): 12232-12240.

(本文责编 陈宏宇)