

• 动物及兽医生物技术 •

## 口蹄疫病毒自身核酸片段对病毒样颗粒组装的促进作用

柳海云, 董虎, 靳野, 郭慧琛, 孙世琪

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

柳海云, 董虎, 靳野, 等. 口蹄疫病毒自身核酸片段对病毒样颗粒组装的促进作用. 生物工程学报, 2020, 36(10): 2076–2082.

Liu HY, Dong H, Jin Y, et al. Promotion of self-nucleic acid fragments on the assembly of foot-and-mouth disease virus-like particles. Chin J Biotech, 2020, 36(10): 2076–2082.

**摘要:** 选取能够与口蹄疫病毒结构蛋白相互作用且有特殊结构的核酸片段 5'非翻译区 (5' UTR) 和内部核糖体进入位点 (Internal ribosome entry site, IRES) 作为支架, 进行病毒样颗粒组装的研究。通过对组装产物进行粒径、表面电位、凝胶阻滞、核酸酶消化、尺寸排阻色谱、透射电镜、圆二色光谱等检测, 结果表明, 核酸片段 5' UTR 和 IRES 能与口蹄疫病毒样颗粒共组装并形成病毒样颗粒。通过统计学分析发现 VLPs-5'UTR 的 75S 颗粒的组装效率显著高于单纯 VLPs 组 ( $P<0.001$ ) 和 VLPs-IRES ( $P<0.01$ ), 而 VLPs-IRES 的 12S 颗粒的组装效率显著高于单纯 VLPs 组 ( $P<0.0001$ ) 和 VLPs-5'UTR ( $P<0.0001$ ), 表明口蹄疫病毒自身核酸片段 5' UTR 更有利于口蹄疫病毒样颗粒的组装。该研究对促进口蹄疫病毒样颗粒组装提出了新的思路和优化策略, 有助于病毒样颗粒疫苗的研发。

**关键词:** 口蹄疫病毒, 病毒样颗粒, 5'非翻译区, 内部核糖体进入位点, 尺寸排阻色谱法

## Promotion of self-nucleic acid fragments on the assembly of foot-and-mouth disease virus-like particles

Haiyun Liu, Hu Dong, Ye Jin, Huichen Guo, and Shiqi Sun

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

**Abstract:** The special nucleic acid fragments, 5' untranslated region (5' UTR) and internal ribosome entry site (IRES) of foot-and-mouth disease virus (FMDV), which interact with the capsid proteins, were selected as scaffolds to investigate the assembly efficiency of foot-and-mouth disease (FMD) virus-like particles (VLPs). The assembled product was characterized by evaluation of particle size, surface potential, gel retardation assay, nuclease digestion experiments, size-exclusion chromatography, transmission electron microscopy and circular dichroism analysis. The results confirmed that the 5' UTR and IRES of FMDV co-assembled with the FMD VLPs and facilitated the assembly efficiency of FMD-VLPs. It demonstrates that the assembly efficiency of 75S particles of VLPs-5'UTR was significantly higher than those of the VLPs ( $P<0.001$ ) and

**Received:** February 26, 2020; **Accepted:** May 18, 2020

**Supported by:** National Key Research and Development Program of China (No. 2017YFD0501100), National Natural Science Foundation of China (Nos. 31672592, 31873023).

**Corresponding author:** Shiqi Sun. Tel: +86-931-8312213; Fax: +86-931-8340977; E-mail: sunshiqi@caas.cn

国家重点研发计划 (No. 2017YFD0501100), 国家自然科学基金 (Nos. 31672592, 31873023) 资助。

VLPs-IRES group ( $P < 0.01$ ). Comparatively the assembly efficiency of 12S particles of VLPs-IRES was significantly higher than those of the VLPs ( $P < 0.000 1$ ) and VLPs-5'UTR ( $P < 0.000 1$ ). It showed that the 5' UTR represented more effective in facilitating the assembly of VLPs. This study proposes an optimized strategy for improving the assembly efficiency of VLPs for the development of VLPs vaccine.

**Keywords:** foot-and-mouth disease, virus-like particles, 5'UTR, internal ribosome entry site, size-exclusion chromatography

口蹄疫 (Foot-and-mouth disease, FMD) 是偶蹄类动物易感的一种高度传播性的病毒性疫病。FMD 的病原体是口蹄疫病毒 (FMD virus, FMDV), FMDV 属小 RNA 病毒科口蹄疫病毒属, 无囊膜, 是一种高度可变的 RNA 病毒。其基因组为单股正链 RNA, 全长约 8 500 bp, 由 5' UTR、ORF 和 3' UTR 组成。5' UTR 具有广泛的二级结构全长约 1 300 bp, 主要由 S 片段、Poly(C) 区段、功能未知区 (CRE) 和内部核糖体进入位点 (IRES) 几部分组成。开放阅读框 ORF 长约 7.0 kb, 主要由 P1 区、P2 和 P3 区组成。P1 被 3Cpro 裂解, 生成口蹄疫病毒的结构蛋白 VP0、VP3、VP1。P2-P3 被 3Cpro 裂解后形成数种非结构蛋白 (2A、2B、2C、3A、3B、3C 和 3D)。3' UTR 长约 172 bp, 由两个部分组成, 一个长约 100 bp 的序列和一个 poly(A) 尾巴<sup>[1]</sup>。

感染 FMDV 后可引起急性或长期无症状持续感染的现象<sup>[2]</sup>。由于该病能够使易感动物及其产品的流通受到限制, 严重影响国家的经济发展。我国将其列为一类传染病, 在国家动物疫病防治长期发展规划中确定为首位限期免疫净化防控的疫病<sup>[3-4]</sup>。目前国内外主要使用灭活疫苗对 FMD 进行免疫预防, 具有较好的效果; 但此类疫苗在生产过程中可能存在灭活不彻底导致免疫动物成为病毒携带者而散播病毒的生物安全问题。因此, 研发新型、安全、高效的基因工程疫苗是时代之需, 也符合国家提出的有效防控重大动物疫病、保障畜牧业健康持续发展的战略需求。

病毒样颗粒 (Virus-like particles, VLPs) 作为近年新出现的一种基因工程亚单位疫苗具有巨大的应用潜力。VLPs 是由病毒的一个或多个结构

蛋白组装成的二十面体空心颗粒, 由于自身的特征在疫苗预防、分子载体等方面具有广阔的应用前景<sup>[3,5-6]</sup>。VLPs 没有病毒核酸, 不具有感染能力, 但在形态上与真正的病毒粒子相同或相似, 具有与完整病毒相似的免疫原性。VLPs 作为一种颗粒性抗原, 模拟了天然病毒的体内感染过程, 能很好地活化抗原递呈细胞, 尤其是树突状细胞 (DC)。通过 MHC-II 类分子的识别, 活化 T 细胞, 从而诱导强烈的细胞免疫应答<sup>[7-8]</sup>。因此, VLPs 疫苗是能够替代全病毒疫苗的最佳候选疫苗。获得大量的 VLPs 是有效发挥 VLPs 优势的前提。目前经原核表达系统生产的 FMDV 的 VLPs, 成本低, 生产工艺简单快速<sup>[9]</sup>。

在二十面体的小 RNA 病毒的研究中, 某些小 RNA 病毒的 VLPs 在植物表达系统和真核表达系统中的组装效率比较理想; 但生产成本高, 同时它们的组装工艺更趋向多样化, 例如植物病毒 (CCMV、CPMV)<sup>[10]</sup>、多瘤病毒 (SV40)<sup>[11]</sup>、噬菌体 Q $\beta$  的衣壳蛋白利用自身的基因片段或者体外合成的具有特殊功能的核酸片段、多聚阴性金属离子等作为支架去诱导 VLPs 的体外组装<sup>[12]</sup>, 可以更好地提高 VLPs 的体外组装效率<sup>[13]</sup>。研究发现小 RNA 病毒的 5' UTR 可能与病毒的衣壳蛋白有连接<sup>[14]</sup>, 此外具有特殊生物学结构的核酸片段也有利蛋白质的缠绕和连接; 而口蹄疫自身核酸片段 5' UTR 和 IRES 具有广泛的生物学二级结构<sup>[15]</sup>。故本研究选择 FMDV 自身核酸片段 5' UTR 和 IRES 作为用于组装 VLPs 的支架, 试图模拟 FMDV 的体内组装, 以期能更好地提高 FMDV VLPs 的体外组装效率, 发挥更好的免疫效果, 为研究和制备新型、高效的 FMD VLPs 疫苗奠定基础。

## 1 材料与amp;方法

### 1.1 菌种、FMDV 自身的基因片段

含 O 型 FMDV 结构蛋白基因的重组菌由中国农业科学院兰州兽医研究所兽用纳米材料与应用团队保存<sup>[9]</sup>。O 型 FMDV 自身核酸片段 5' UTR、IRES 的质粒是将 FMDV O strain O/BY/CHA/2010 (GenBank 登录号: JN998085.1) 的 5' UTR、IRES 序列分别合成并克隆到 pcDNA3.1+ 载体, 克隆位点为 5' *Nhe* I 和 3' *Bam* H I。

### 1.2 主要试剂

大肠杆菌培养试剂 (胰蛋白胨、酵母粉、氯化钠), 氨苄青霉素、卡那霉素、氯霉素, 质粒提取试剂盒, 胶回收试剂盒均购自 Omega 公司。辣根过氧化物酶标记的家兔抗猪 IgG 均购自 Sigma 公司。抗 O 型 FMDV 的猪 IgG、灭活 FMDV 由本实验室自制。异丙基-β-D-硫代半乳糖苷 (IPTG), 限制性内切酶 *Xho* I、*Bam* H I 均购自宝生物工程 (大连) 有限公司。2% 磷钨酸, 10×MOPS 购自索莱宝公司。T7 体外转录试剂盒购自 Promega 公司。硝酸纤维素膜 (NC) 购自 Millipore 公司。镍亲和层析树脂购自罗氏公司。2K 的核酸标准分子量购自 TaKaRa 公司。蛋白质标准分子量购自 Thermo Fisher Scientific 公司。

### 1.3 FMDV VLPs 的表达纯化

以 1:100 的比例将表达 O 型 FMDV 结构蛋白的大肠杆菌接到含有 34 μg/mL 氯霉素、50 μg/mL 氨苄青霉素、10 μg/mL 卡那霉素的 LB 培养基中, 37 °C、220 r/min 培养 4 h 左右, 当 *OD*<sub>600</sub> 达到 0.8 左右时, 加入终浓度为 1 mmol/L 的 IPTG, 25 °C、220 r/min 培养 10 h, 低温离心收菌。用 Buffer A (500 mmol/L NaCl, 20 mmol/L Tris-HCl, pH 7.0) 重悬并超声破碎, 离心收集上清, 转移到填有 Ni<sup>2+</sup> 树脂的层析柱中, 4 °C 结合 1 h, 用 Buffer A 洗 5–10 个柱体积后用 Buffer B (300 mmol/L 咪唑, 500 mmol/L NaCl, 20 mmol/L Tris-HCl, pH 7.0) 洗脱目的蛋白。将上述纯化好的蛋白加入 SUMO 酶混

匀装入 10 kDa 的透析袋中在 Buffer C (300 mmol/L NaCl, 50 mmol/L Tris-HCl, pH 8.5) 中酶切组装。组装产物进行变性凝胶电泳和蛋白免疫印迹鉴定。

### 1.4 5' UTR、IRES 的制备

将口蹄疫自身的核酸片段 5' UTR、IRES 的质粒转化在含有氨苄青霉素的琼脂平板中培养, 挑阳性克隆菌测序鉴定后, 摇菌提取质粒, 经 *Bam* H I 线性化并胶回收, 按 T7 体外转录试剂盒说明书操作获得目的 RNA 片段, 进行变性琼脂糖凝胶电泳鉴定。

### 1.5 FMDV VLPs 与 5' UTR、IRES 组装比例和组装时间的优化

将 VLPs 的终浓度定为 0.5 mg/mL, 调整 FMDV 自身核酸片段 5' UTR、IRES 的终浓度依次是 10 ng/μL、20 ng/μL、30 ng/μL。分别装入 10 kDa 的透析袋中组装, 组装过程中每间隔 2 h, 取 50 μL 样品用于检测组装产物的水合粒径 (纳米粒度仪 Nano ZS) 与口蹄疫病毒粒子大小 (25 nm) 比较以确定最佳的 FMDV 自身核酸片段的浓度和组装时间。

### 1.6 粒径和电位鉴定

单独 VLPs 的组装作为对照, VLPs 与 FMDV 自身核酸片段 5' UTR、IRES 的共组装分别作为试验组。在组装 Buffer C 中透析组装一定时间, 收集组装产物用 0.22 μm 的滤器过滤, 利用纳米粒度仪 (Nano ZS) 检测这 3 个样品的粒径和电位。

### 1.7 凝胶阻滞试验

各取 20 μL VLPs-5'UTR、VLPs-IRES 的组装产物混合 4 μL 6×上样缓冲液加入甲醛变性的琼脂糖凝胶中在含有 3% 甲醛的 1×MOPS 缓冲液中进行电泳 (75 V, 35 min), 在凝胶紫外成像仪 (北京市六一仪器厂) 上观察结果。

### 1.8 核酸酶消化保护试验

各取 30 μL VLPs-5'UTR、VLPs-IRES 的组装产物加入核酸酶 (RNase A) 消化。将消化和未消化的组装产物各取 20 μL 混合 4 μL 6×上样缓冲液加入甲醛变性的琼脂糖凝胶中在含有 3% 甲醛的 1×MOPS 缓冲液中进行电泳 (75 V, 35 min), 之后

在凝胶紫外成像仪(北京市六一仪器厂)上观察。

### 1.9 尺寸排阻色谱 (SEC) 分离纯化组装产物

VLPs-5'UTR、VLPs-IRES 与 VLPs 的组装产物用 Sephacryl S-400 高分辨率凝胶柱 (GE Healthcare) 在蛋白纯化仪 AKTA pure (GE Healthcare) 上分离纯化。同时,分离纯化灭活 FMDV (146S) 作为对照曲线,根据病毒粒子的出峰位置确定 VLPs 的出峰位置。对通过 SEC 分离的 VLPs-5'UTR、VLPs-IRES 与 VLPs 的各个峰面积进行统计学分析,  $P < 0.0001$  (\*\*\*\*) 为差异极其显著,  $P < 0.001$  (\*\*\*) 为差异极显著,  $P < 0.01$  (\*\*) 为差异显著,  $P > 0.05$  (NS) 为差异不显著。

### 1.10 透射电镜 (TEM)

用 100 kDa 的浓缩管浓缩经 SEC 分离纯化 VLPs-5'UTR、VLPs-IRES 与 VLPs 的各个峰产物,各取 5  $\mu$ L 浓缩样品吸附在铜网上 2 min,滤纸吸干,用去离子水洗涤 2 次,滤纸吸干,再加 5  $\mu$ L 2% 磷钨酸染色 2 min,滤纸吸走多余染液,干燥后,用透射电子显微镜(日本,规格型号:HT7700)观察 VLPs-5'UTR、VLPs-IRES 与 VLPs 的峰产物。

### 1.11 圆二色光谱 (CD) 分析

用 100 kDa 浓缩管浓缩经 SEC 分离纯化的 VLPs-5'UTR、VLPs-IRES、VLPs 和灭活 FMDV 的峰产物(作为对照)在圆二色光谱仪(英国,规格型号:Chirascan)上检测分析其二级结构。

## 2 结果与分析

### 2.1 FMDV VLPs 和 5' UTR、IRES 的获得

摇菌提取 FMDV 的 5' UTR 和 IRES 的质粒用 *Bam*H I 线性化后胶回收鉴定其大小合适(图 1A),进行体外转录获得目的核酸片段 5' UTR、IRES 的 RNA(图 1B)。镍亲和层析法纯化 FMDV 结构蛋白 VP0、VP1、VP3,在体外组装形成 FMDV-VLPs,经 SDS-PAGE 和 Western blotting 鉴定,其大小与理论值(VP0 33 kDa、VP1 25 kDa、VP3 24.5 kDa)相符(图 1D)。

### 2.2 5' UTR、IRES 与 FMDV VLPs 共组装

收集 VLPs、VLPs-5'UTR、VLPs-IRES 的组装产物,用 0.22  $\mu$ m 的滤器过滤,检测电位和粒径。单纯 VLPs 组装 28 h 后的 Zeta 电位是 -3.85 mV, VLPs-5'UTR 共组装 28 h 后的 Zeta 电位是 -7.27 mV, VLPs-IRES 共组装 28 h 后的 Zeta 电位是 -9.135 mV(图 2A)。VLPs-5'UTR、VLPs-IRES 组装产物的电位要比单纯 VLPs 组装产物的电位大(绝对值),说明 VLPs 和 5' UTR、IRES 进行了共组装。同样, VLPs-5'UTR 组装 28 h 后的粒径大小与单纯 VLPs 组装 28 h 后的粒径大小相似(20-35 nm)(图 2B)。VLPs-5'UTR、VLPs-IRES 的组装产物进行变性琼脂糖凝胶电泳,由于 5' UTR、IRES 分别与 VLPs 共组装,核酸片段作为支架被包裹在 VLPs 内部,在琼脂糖凝胶电泳中会出现凝胶阻滞现象,即组装产物滞留在加样孔(图 2C,泳道 2、5)。同时进行核酸酶消化试验,组装产物仍滞留在加样孔(图 2C,泳道 3、6),即核酸片段并没有被核酸酶消化掉,进一步证明,核酸片段作为支架被包裹在 VLPs 内部, VLPs 对核酸片段具有保护作用。

### 2.3 5' UTR、IRES 对 FMDV VLPs 组装的影响

SEC 分离纯化灭活 FMDV (146S) 作为对照,根据 146S 的出峰位置确定 VLPs 出峰位置(图 3A)。在 VLPs-5'UTR、VLPs-IRES 和 VLPs 组装产物的 SEC 图中  $OD_{260} > OD_{280}$ ,可以初步说明 FMDV VLPs 与 FMDV 自身核酸片段共组装(图 3B、C、D)。通过对 VLPs-5'UTR、VLPs-IRES 与 VLPs 组装产物的 SEC 峰产物(75S 12S)的面积进行统计学分析发现 VLPs-5'UTR 的 75S 峰面积显著高于单纯 VLPs 组 ( $P < 0.001$ ),显著高于 VLPs-IRES 组 ( $P < 0.01$ );而 VLPs-IRES 的 12S 峰面积显著高于单纯 VLPs 组 ( $P < 0.0001$ ) 和 VLPs-5'UTR ( $P < 0.0001$ )。即核酸片段与 FMDV 结构蛋白结合有助于 75S 和 12S 的组装,其中 5' UTR 更有利于 75S 的形成,而 IRES 更有利于 12S 的形成(图 3E)。对 SEC 分离纯化 VLPs-5'UTR、

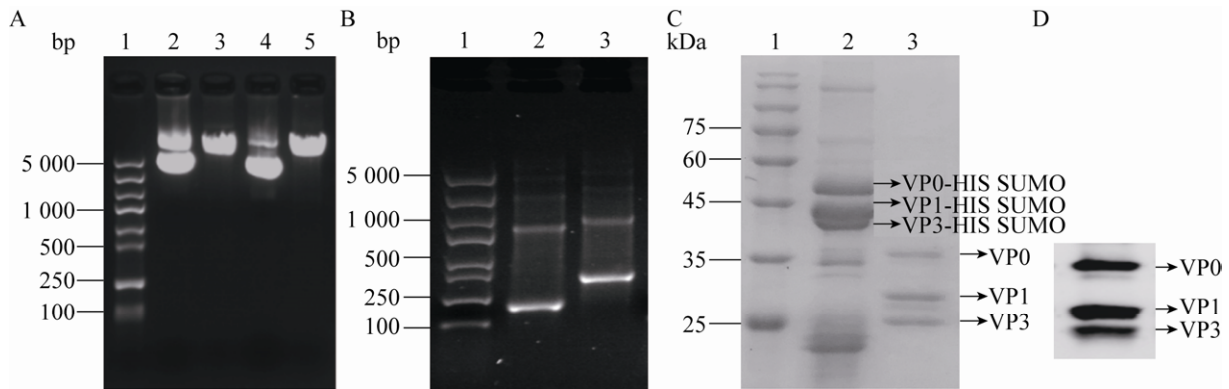


图1 FMDV自身核酸片段5' UTR、IRES和VLPs的获得

Fig. 1 Preparation of FMDV nucleic acids (5' UTR, IRES) and VLPs. (A) Agarose gel electrophoresis of plasmids. 1: 5K marker; 2: IRES; 3: linearized IRES; 4: 5' UTR; 5: linearized 5' UTR. (B) Agarose gel electrophoresis of RNA. 1: 5K marker; 2: IRES; 3: 5' UTR. (C) SDS-PAGE of FMD-VLPs. 1: 180 kDa protein marker; 2: FMDV structural proteins (VP0-3) fused with His-Sumo tag; 3: proteins (VP0-3) removed His-Sumo tag. (D) Western blotting analysis of FMD-VLPs.

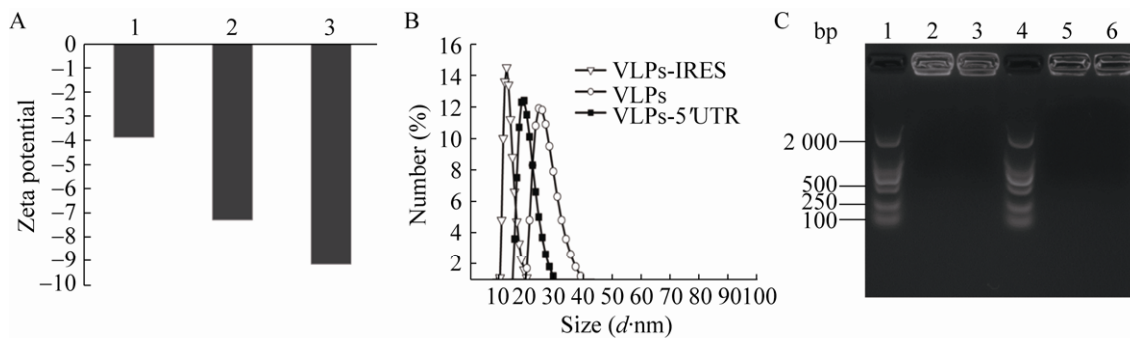


图2 FMD-VLPs与FMDV自身的核酸片段5' UTR、IRES共组装

Fig. 2 Co-assembly of FMD-VLPs with 5' UTR and IRES. (A) Zeta potential analysis. 1: VLPs; 2: VLPs-5'UTR; 3: VLPs-IRES. (B) Particles size. (C) Gel retardation assay and nuclease digestion. 1: 2K marker; 2: VLPs-5'UTR; 3: VLPs-IRES; 4: 2K marker; 5: RNase-treated VLPs-5'UTR; 6: RNase-treated VLPs-IRES.

VLPs-IRES与VLPs的峰产物75S和12S进行圆二色光谱分析,发现75S颗粒与146S的二级结构曲线很相似,说明VLPs-5'UTR、VLPs-IRES的组装产物与天然病毒粒子的结构类似(图3F)。用透射电子显微镜观察SEC分离纯化的VLPs-5'UTR、VLPs-IRES和VLPs的峰产物75S和12S,75S为与146S(25 nm)大小相似的空心颗粒,12S为15 nm左右的空心颗粒(图3G、H、I)。

### 3 讨论

VLPs疫苗是当代新型疫苗。为了更好地将VLPs疫苗应用到防控疫病的实战中,就需要有

可靠高效的生产工艺去获得足量的VLPs。O型FMDV结构蛋白经原核表达系统表达并在体外组装的VLPs,成本低,生产工艺简单快速,在临床应用中有巨大的潜力。在植物病毒(CCMV、CPMV)和噬菌体Q $\beta$ 的VLPs的体外组装中,常常引入一些自身或非自身的基因片段作为支架诱导VLPs的组装,而且这些基因片段也可以决定形成VLPs的大小和形状<sup>[16]</sup>。

为了促进FMDV VLPs的组装效率,本研究初次尝试在FMDV VLPs体外组装时引进自身核酸片段。迄今为止,关于FMDV基因组如何参与FMDV衣壳化的机制还不是很清楚,但有文献报

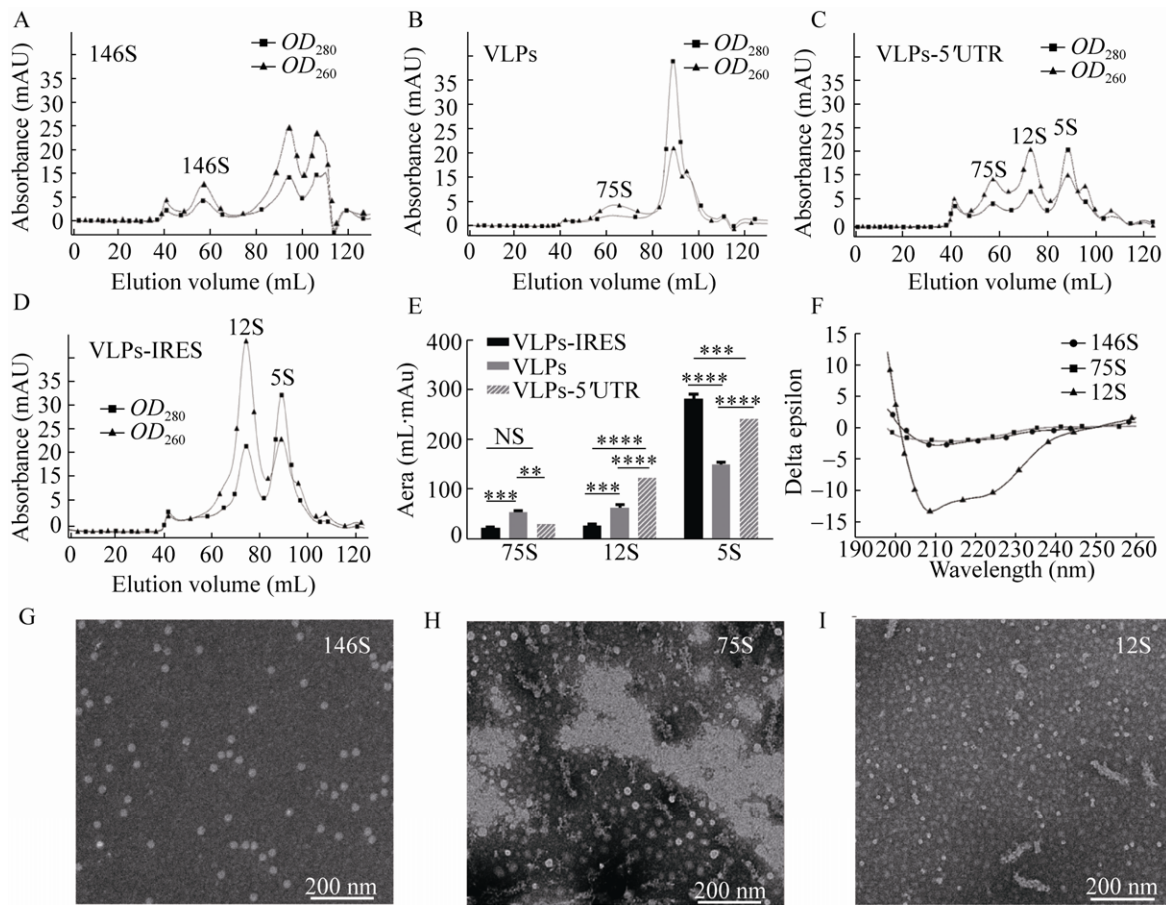


图3 尺寸排阻分离纯化组装产物的分析

Fig. 3 Characterization of assembled product by size exclusion chromatography. (A) 146S. (B) VLPs. (C) VLPs-5'UTR. (D) VLPs-IRES. (E) Statistic analysis of separation fraction. (F) The separation fraction verified by CD. (G-I) The separation fraction verified by TEM ((G) 146S, (H) 75S, (I) 12S).

道小RNA病毒科的病毒的5' UTR可能与病毒衣壳蛋白有连接,具有特殊生物学结构的核酸片段也有利于蛋白质的缠绕和连接<sup>[17]</sup>;而FMDV自身核酸片段5' UTR和IRES具有生物学二级结构有利于蛋白的缠绕。因此选择FMDV自身核酸片段5' UTR和IRES作为支架诱导FMDV VLPs的体外组装。通过对VLPs、VLPs-5'UTR、VLPs-IRES的组装产物的粒径、电位、凝胶阻滞试验初步证明5' UTR和IRES与VLPs共组装,核酸酶消化试验证明5' UTR和IRES是被包裹在VLPs的内部。SEC分离纯化VLPs、VLPs-5'UTR、VLPs-IRES的组装产物和灭活FMDV,根据病毒粒子(146S)的出峰位置确定了FMDV VLPs的出峰位置,即

SEC分离纯化的峰产物依次是VLPs峰(75S)、五聚体峰(12S)和单体峰(5S)。对每个峰产物的面积进行统计学分析可以发现VLPs-5'UTR共组装产物的75S和12S峰面积与单纯VLPs组装的75S和12S峰面积差异极显著( $P < 0.001$ ),与VLPs-IRES的75S峰面积差异显著( $P < 0.01$ );而VLPs-IRES共组装产物的12S峰面积与单纯VLPs和VLPs-5'UTR共组装产物的12S的峰面积差异极其显著( $P < 0.0001$ )。这充分说明了FMDV自身的核酸片段5' UTR有利于病毒样颗粒(75S)和五聚体(12S)的组装,IRES更有利于五聚体(12S)的组装。

在VLPs组装的研究报道中,病毒的衣壳蛋白可以通过各种外来的模板诱导组装,从而生成

不同尺寸和形状的 VLPs。采用核酸片段的主要原因是核酸带负电，可以通过静电作用与蛋白质相互作用<sup>[13]</sup>，因此也有人引进一些多聚阴性的金属离子参与组装。也有研究者设计特殊功能的核酸支架去诱导 VLPs 的组装，不仅能提高 VLPs 的组装效率还使其多功能化<sup>[12]</sup>。引进的核酸类型不同，形成的 VLPs 形状也有差异，引入一些 RNA 片段更多地形成球形 VLPs，引入 DNA 片段形成棒状 VLPs<sup>[18]</sup>。核酸片段的长度对形成的 VLPs 的大小和形态也有差异，超过一定长度的核酸片段会诱导形成二联体、三联体、四联体的 VLPs<sup>[10]</sup>。

本文初步尝试利用 FMDV 自身核酸片段 5' UTR 和 IRES 作为支架诱导 FMDV VLPs 的体外组装，结果发现 FMDV 自身核酸片段 5' UTR 和 IRES 都有利于 FMDV VLPs 的组装。该研究为提高 FMDV VLPs 体外组装效率提出新思路，有利于病毒样颗粒疫苗的推广和应用。

## REFERENCES

- [1] Gao Y, Sun SQ, Guo HC. Biological function of Foot-and-mouth disease virus non-structural proteins and non-coding elements. *Virology*, 2016, 13(1): 107.
- [2] Knowles NJ, Samuel AR. Molecular epidemiology of foot-and-mouth disease virus. *Virus Res*, 2003, 91(1): 65–80.
- [3] Jennings GT, Bachmann MF. The coming of age of virus-like particle vaccines. *Biol Chem*, 2008, 389(5): 521–536.
- [4] Jiang PF, Zhao QZ, Xie QG. The advances of foot-and-mouth disease research. *Sci Agric Sin*, 1999, 32(6): 93–100 (in Chinese).  
江鹏斐, 赵启祖, 谢庆阁. 口蹄疫研究进展. *中国农业科学*, 1999, 32(6): 93–100.
- [5] Roldão A, Mellado MCM, Castilho LR, et al. Virus-like particles in vaccine development. *Expert Rev Vaccines*, 2010, 9(10): 1149–1176.
- [6] Plummer EM, Manchester M. Viral nanoparticles and virus-like particles: platforms for contemporary vaccine design. *Wires Nanomed Nanobi*, 2011, 3(2): 174–196.
- [7] Ludwig C, Wagner R. Virus-like particles-universal molecular toolboxes. *Curr Opin Biotechnol*, 2007, 18(6): 537–545.
- [8] Chackerian B. Virus-like particles: flexible platforms for vaccine development. *Expert Rev Vaccines*, 2007, 6(3): 381–390.
- [9] 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: 48.
- [10] Cadena-Nava RD, Comas-Garcia M, Garmann RF, et al. Self-assembly of viral capsid protein and RNA molecules of different sizes: requirement for a specific high protein/RNA mass ratio. *J Virol*, 2012, 86(6): 3318–3326.
- [11] van Rosmalen MGM, Li CL, Zlotnick A, et al. Effect of dsDNA on the assembly pathway and mechanical strength of SV40 VP1 virus-like particles. *Biophys J*, 2018, 115(9): 1656–1665.
- [12] Garmann RF, Sportsman R, Beren C, et al. A Simple RNA-DNA scaffold templates the assembly of monofunctional virus-like particles. *J Am Chem Soc*, 2015, 137(24): 7584–7587.
- [13] Garmann RF, Comas-Garcia M, Gopal A, et al. The assembly pathway of an icosahedral single-stranded RNA Virus depends on the strength of inter-subunit attractions. *J Mol Biol*, 2013, 426(5): 1050–1060.
- [14] Jiang P, Liu Y, Ma HC, et al. Picornavirus morphogenesis. *Mol Biol Rev*, 2014, 78(3): 418–437.
- [15] Belsham GJ. Translation and replication of FMDV RNA//Mahy BW, Ed. *Foot-and-Mouth Disease Virus*. Berlin, Heidelberg: Springer, 2005, 288: 43–70.
- [16] Schneemann A. The structural and functional role of RNA in icosahedral virus assembly. *Annu Rev Microbiol*, 2006, 60(1): 51–67.
- [17] Sasaki J, Taniguchi K. The 5'-end sequence of the genome of Aichi virus, a picornavirus, contains an element critical for viral RNA encapsidation. *J Virol*, 2003, 77(6): 3542–3548.
- [18] de Ruiter MV, van der Hee RM, Driessen AJM, et al. Polymorphic assembly of virus-capsid proteins around DNA and the cellular uptake of the resulting particles. *J Control Release*, 2019, 307: 342–354.

(本文责编 郝丽芳)