南京农业大学学报 2026,49(3):572-577
Journal of Nanjing Agricultural University
http://nauxb.njau.edu.cn
DOI:10.7685/jnau.202412022

李志要,尹双辉,郭慧琛,等. 口蹄疫病毒样颗粒在毕赤酵母中的表达与鉴定[J]. 南京农业大学学报,2026,49(3):572-577.
Li Z Y,Yin S H,Guo H C,et al. Expression and characterization of foot-and-mouth disease virus-like particles in *Pichia pastoris*[J]. Journal of Nanjing Agricultural University,2026,49(3):572-577.

口蹄疫病毒样颗粒在毕赤酵母中的表达与鉴定

李志要[1,2],尹双辉[2],郭慧琛[2],鲍恩东[1*]

(1.南京农业大学动物医学院,江苏 南京 210014;2.中国农业科学院兰州兽医研究所-兰州大学动物医学与生物安全学院动物疫病防控全国重点实验室,甘肃 兰州 730000)

摘要:[**目的**]口蹄疫病毒(FMDV)灭活苗在其生产过程中依然存在病毒泄漏风险,本文旨在研发具有与病毒粒子结构相似,且不含核酸的病毒样颗粒(virus-like particles,VLP),并通过毕赤酵母真核表达系统进行表达生产成本低廉的理想FMDV VLP疫苗。[**方法**]首先将FMDV的VP0、VP3和VP1表达盒插入到同一个pPink-HC质粒上,再电转化毕赤酵母,通过蔗糖密度梯度纯化获得制备FMDV VLP,并采用ELISA对其进行了定量。[**结果**]重组菌经过甲醇诱导,蛋白免疫印记(Western blot,WB)检测目的蛋白的表达;重组菌破碎后离心的上清液经过蔗糖梯度离心分离得到纯化的VLP;经动态光散射法(dynamic light scattering,DLS)和透射电子显微镜(transmission electron microscope,TEM)检测,可观察到直径为30 nm的球形颗粒;经ELISA检测,VLP呈现出良好反应性,这表明所制备的VLP具备良好抗原性。[**结论**]采用单独表达VP0、VP3和VP1的方式在毕赤酵母中成功制备FMDV VLP,这为FMD疫苗的制备及其他小RNA病毒样颗粒的制备提供了试验依据。

关键词:口蹄疫病毒;病毒样颗粒;真核表达;毕赤酵母;疫苗
中图分类号:S852.659 **文献标志码**:A **文章编号**:1000-2030(2026)03-0572-06

Expression and characterization of foot-and-mouth disease virus-like particles in *Pichia pastoris*

LI Zhiyao[1,2],YIN Shuanghui[2],GUO Huichen[2],BAO Endong[1*]

(1.College of Veterinary Medicine,Nanjing Agricultural University,Nanjing 210014,China;2.State Key Laboratory for Animal Disease Control and Prevention,College of Veterinary Medicine and Biosafety,Lanzhou University,Lanzhou Veterinary Research Institute,Chinese Academy of Agricultural Sciences,Lanzhou 730000,China)

Abstract:[**Objectives**]Inactivated vaccines against Foot-and-mouth disease virus(FMDV)still bear a risk of virus leakage during the virus propagation and production process. This paper aimed to develop virus-like particles(VLP)of FMDV,which have a structure similar to that of virus particles but lack nucleic acids. These VLP can be expressed through the *Pichia pastoris* eukaryotic expression system to produce an ideal and more cost-effective FMD VLP vaccine. [**Methods**]The expression cassettes of VP0,VP3 and VP1 gene of FMDV were inserted into the same pPink-HC plasmid,and then FMDV VLP were produced by electroporating *P. pastoris*. FMDV VLPs was purified by sucrose density gradient ultracentrifugation,and quantified by ELISA. [**Results**]After induction with methanol,the expression of the target proteins could be detected by western blot(WB). Purified VLP could be isolated from the supernatant after cell disruption and sucrose gradient centrifugation. Spherical particles with a diameter of 30 nm were detected by dynamic light scattering(DLS)and transmission electron microscopy(TEM),and the antigenicity of the prepared VLP was determined by ELISA and showed a good response,which fully demonstrated that the prepared VLP possesses antigenicity. [**Conclusions**]FMDV VLP were successfully produced in *P. pastoris* by separately expressing VP0,VP3 and VP1,providing an experimental basis for the development of FMD vaccines and the production of other picornavirus virus-like particles.

Keywords:foot-and-mouth disease virus;virus-like particles;eukaryotic expression;*Pichia pastoris*;vaccine

口蹄疫(foot-and-mouth disease,FMD)是由口蹄疫病毒(FMD virus,FMDV)所引起的一种急性、烈性、高度接触性传染病,严重影响畜牧养殖业的健康发展并带来巨大的经济损失。除了欧美等发达国家实现了口蹄疫的净化以外,亚洲、美洲、非洲等地区仍然深受其害[1]。FMDV共有A、O、C、Asia1、SAT1、SAT2和

收稿日期:2024-12-19
基金项目:甘肃省科技计划东西部科技协作专项(24CXNA030);宁夏回族自治区重点研发计划(2024BBF02017);2023兰州市人才创业创新项目(2023-RC-3);江苏省农业科技自主创新资金[CX(22)2016]

*通信作者:鲍恩东,博士,教授,研究方向为动物分子病理学,E-mail:b_endong@njau.edu.cn。

SAT3 这 7 个血清型,每种血清型之间的交叉保护很弱。我国流行的 FMDV 主要是血清 A 型和 O 型[2]。FMDV 主要感染猪、牛、羊等偶蹄类动物,动物感染之后可见到在口、鼻、舌、蹄部及乳房部出现水泡,继而破溃结痂,尽管动物感染后死亡率不高,却严重影响动物的生产力[3]。因此,研发安全、有效的 FMD 疫苗以预防本病的发生非常迫切。

预防和控制 FMD 主要通过疫苗注射进行免疫,使用的疫苗主要为灭活疫苗,但 FMD 灭活疫苗在生产过程中依然存在增殖病毒外泄的风险。病毒样颗粒(virus-like particles,VLP)具有与病毒粒子相似的结构,也具有原病毒相似的抗原性。由于其缺少核酸物质,因此是一种生产和使用均十分安全有效的疫苗形式。FMDV VLP 已经在哺乳动物细胞[4]、昆虫细胞[5]或植物细胞[6]中成功制备,但其在毕赤酵母中表达的相关报道较少。目前,FMD 主要在一些较为贫穷落后的发展中国家流行,利用毕赤酵母真核表达系统生产成本更加低廉的 FMD 疫苗具有一定的现实意义。此外,已有利用毕赤酵母表达系统成功制备同属小 RNA 病毒科 VLP 的报道,如柯萨奇病毒[7]、脊髓灰质炎病毒[8]、肠道病毒[9]等。

研究表明,3C 蛋白对于宿主细胞具有一定的毒性,可以造成宿主细胞的转录终止甚至死亡[10]。如何获得有效组装的 FMDV VLP 是技术难点和热点问题,并且选择合适的表达系统尤为重要。FMDV 属于小 RNA 病毒科口蹄疫病毒属单股正链 RNA 病毒。FMDV 颗粒直径约 30 nm,无囊膜,基因组约 8 500 bp,编码结构蛋白 P1 及非结构蛋白 P2 和 P3。前体蛋白 P1 在 3C 蛋白酶的切割下形成 VP0、VP3 和 VP1,VP0 在组装过程中裂解成 VP2 和 VP4。60 个 VP1—VP4 组成病毒衣壳[11]。为探究利用毕赤酵母制备 FMDV VLP 疫苗的可能性,本文采用在同一个质粒上同时插入 VP0、VP3 和 VP1 表达盒的方式来制备 VLP,为 FMDV VLP 的制备和疫苗的深入研究奠定理论基础。

1　材料与方法

1.1　试验材料

1.1.1　主要试剂　pPink-P1 质粒(包含 N1017D+H2145Y 突变)、pPink-HC 质粒、O 型 FMDV 多抗血清及 O 型 FMDV 灭活 146S(纯度为 98%)抗原均由中国农业科学院兰州兽医研究所口蹄疫防控技术团队提供;PichiaPink™ Strain1(基因型为 ade2)购自 Invitrogen 公司(美国);HRP 标记抗猪 IgG 抗体购自北京索莱宝公司。

1.1.2　质粒构建与菌株筛选　利用引物对 S0、S3 和 S1(表 1)分别在 pPink-*P1* 质粒上扩增 *VP0*、*VP3* 和 *VP1*,通过 *Eco* R Ⅰ/*Kpn* Ⅰ插入 pPink-HC 载体上,分别构建 pPink-*VP0*,pPink-*VP3* 和 pPink-*VP1* 质粒。然后通过 *Bgl* Ⅱ/*Bam*H Ⅰ分别将 VP0 和 VP3 的表达盒插入到 pPink-*VP1* 载体,得到 pPink-*VP0/VP3/VP1* 质粒(pPink-*VPs*)(图 1)。构建成功的质粒经过 *Spe* Ⅰ线性化后,电转进 Strain 1 菌株中。质粒的电转及筛选可参考试剂盒操作手册。

表 1　引物序列

Table 1　Primer sequences

引物对名称 Primer pair name	引物对序列 Primer pairs sequence(5′→3′)
S0-F/R	TTCGAAACGGAATTCATGGGCGCGG/ATGGCCGGCCGGTACCTTATTCCTTCG
S3-F/R	TCGAAACGGAATTCATGGGGATATTCCC/AACAGTAAGGTACCGGCCGG
S1-F/R	CGAAACGGAATTCATGACTACCTCGACC/CCGGCCGGTACCTTATAGGGACTGCTT

注:下划线标注的为限制性内切酶序列。

Note:The sequences underlined are restriction endonuclease sequences.

1.2　试验方法

1.2.1　Western blot(WB)检测　挑取阳性菌落加入 20 mL 的毕赤酵母培养基(buffered glycerolcomplex medium,BMGY)中,30 ℃培养至其 D_{600} 值为 2~6 时,离心收集细菌沉淀,随后取 4 mL 含 0.5%甲醇的 BGMY 溶液继续培养 72 h。收集诱导表达后的细菌,350 W 超声破碎 20 min(破碎 3 s,间歇 3 s)。12 000 r·min^{-1} 离心 30 min,取上清液进行 SDS-PAGE。电泳结束后将胶转印到 NC 膜,用 50 g·L^{-1}脱脂奶粉放置在室温环境下封闭 2 h,利用含 0.1% Tween-100 的磷酸盐缓冲液(phosphate buffered saline tween,PBST)清洗 3 次。以 O 型 FMDV 多抗血清作为一抗,4 ℃孵育过夜。PBST 清洗后再用辣根过氧化物酶(horseradish peroxidase,HRP)标记抗猪抗体于室温下孵育 1 h,PBST 清洗 3 次后,滴加增强化学发光液(enhanced chemiluminescence,ECL)后进行曝光显色[12]。

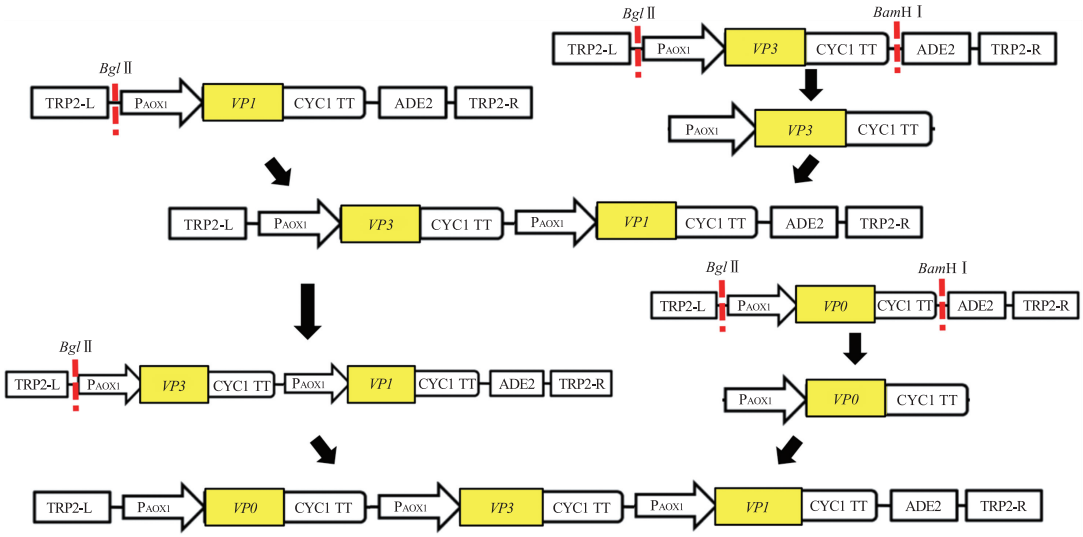

图 1 pPink-*VPs* 质粒构建示意图

Fig. 1 Schematic diagram of the construction of pPink-*VPs*

1.2.2 VLP 的纯化 将超声破碎并且离心后的上清液进行浓缩,取 1 mL 上清液加入 150~500 g·L^{-1}蔗糖梯度溶液的液面上,35 000 r·min^{-1}离心 3 h。离心结束后从上到下按照每 500 μL 体积分离并收集样品,利用紫外分光光度计测定样品的 D_{450}值。

1.2.3 透射电镜观察 取纯化后的 10 μL 样品,滴加在 48 μm 的铜网上,室温下静置 2 min,吸水纸吸干,超纯水清洗 1 次,加入 3%磷钨酸,室温下染色 1 min。吸干残留的染色液,超纯水清洗 1 次,用 Hitachi H-7100FA 透射电子显微镜(transmission electron microscope,TEM)进行观察并拍照。

1.2.4 双抗体夹心 ELISA 检测 FMDV FMDV VLP 的定量采用双抗夹心 ELISA 检测[13]。利用 CBS(pH9.6)将含 0.5 μg M170 抗体稀释,随后按照每孔 100 μL 添加到 96 孔板中,盖上封口膜后放置在 4 ℃环境中过夜包被。次日,倒掉 96 孔板中的溶液,再加入 10 g·L^{-1}牛血清白蛋白(bovine serum albumin,BSA)(每孔 100 μL)于 37 ℃封闭 1 h。用 TBST 清洗 3 次后将梯度稀释的抗原样品依次加入 96 孔板中,并设置 2~3 个重复孔,将 96 孔板放置在 37 ℃环境中孵育 1 h。TBST 清洗 3 次后加入豚鼠 O 型多抗血清,37 ℃孵育 30 min。TBST 清洗后再加入 HRP 偶联的兔抗豚鼠抗体,在 37 ℃环境中孵育 30 min。然后用 3,3′,5,5′-四甲基联苯胺(3,3′,5,5′-tetramrthylbenzidine,TMB)染色 15 min,用 2 mol·L^{-1}硫酸终止反应,测定 D_{450}值。取已知浓度的 FMDV 抗原样品,将其分别稀释成 2、1、0.5、0.25、0.125、0.062 5、0.031 25 和 0.015 625 μg·mL^{-1}梯度,且设置 2 个重复孔,依次加入 96 孔板中,根据其浓度与 A_{450}值之间的关系建立标准曲线,最后将待测样品的吸光值(A_{450})代入公式计算出样品中的 VLP 含量。

2 结果与分析

2.1 pPink-*VPs* 质粒的构建与酶切鉴定

按照 pPink-*VPs* 的质粒构建示意图(图 1),首先扩增 *VP0* 基因并插入 pPink-HC 以构建 pPink-*VP0*,质粒经过 *Sac* Ⅰ/*Kpn* Ⅰ酶切后可分别观察到与预期大小(理论值为 1 694 和 6 901 bp)一致的条带(图 2-A);同样,pPink-*VP1* 质粒经过 *Eco*R Ⅰ/*Kpn* Ⅰ酶切后可分别观察到与预期大小(理论值为 691 和 7 634 bp)一致的条带(图 2-B),pPink-*VP3* 质粒经过 *Hind* Ⅲ酶切可分别观察到与预期大小(理论值为 3 330 和 4 974 bp)一致的条带(图 2-C)。构建成功的 pPink-*VPs* 质粒经过 *Eco*R Ⅰ/*Kpn* Ⅰ酶切后可分别观察到与预期大小(理论值为 4 734 和 7 634 bp)一致的条带(图 2-D),这说明成功构建了包含 *VP0*、*VP3* 和 *VP1* 基因表达盒的重组质粒。

2.2 pPink-*VPs* 菌株的筛选

重组质粒电转酵母后,在 PAD 筛选平板上培养,待其长出单菌落后挑取单菌落加入 YPD 培养基中过夜培养。提取酵母基因组,分别用引物对 S0-F/R、S3-F/R 和 S1-F/R 进行扩增。结果(图 3)显示,在 1 000 和 500 bp 附近可以分别看到与 *VP0*、*VP3*、*VP1* 理论预期大小相符的条带,*VP0* 理论大小 909 bp,*VP3* 理论大小 660 bp,*VP1* 理论大小 639 bp。

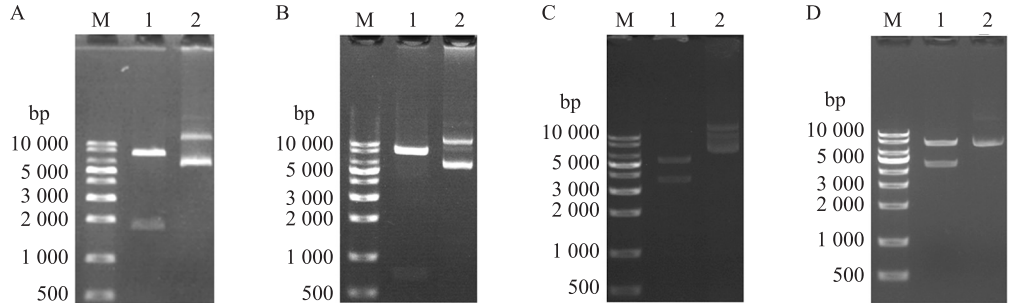

图 2　重组质粒的双酶切鉴定

Fig. 2　Double digest identification of recombinant plasmids

A. pPink-*VP0* 质粒双酶切鉴定(M. DNA 分子标准品;1. *Sac* Ⅰ/*Kpn* Ⅰ双酶切产物;2. 未酶切的 pPink-*VP0* 质粒);B. pPink-*VP1* 质粒双酶切鉴定(M. DNA 分子标准品;1. *Eco*R Ⅰ/*Kpn* Ⅰ双酶切产物;2. 未酶切的 pPink-*VP1* 质粒);C. pPink-*VP3* 质粒酶切鉴定(M. DNA 分子标准品;1. *Hin* d Ⅲ酶切产物;2. 未酶切的 pPink-*VP3* 质粒);D. pPink-*VPs* 质粒双酶切鉴定(M. DNA 分子标准品;1. *Eco*R Ⅰ/*Kpn* Ⅰ双酶切产物;2. 未酶切的 pPink-VPs 质粒)。

A. Double enzyme digestion identification of the pPink-*VP0* plasmid(M. DNA marker;1. Products of double enzyme digestion with *Sac* Ⅰ/*Kpn* Ⅰ; 2. The undigested pPink-*VP0* plasmid);B. Double enzyme digestion identification of the pPink-*VP1* plasmid(M. DNA marker;1. Products of double enzyme digestion with *Eco*R Ⅰ/*Kpn* Ⅰ;2. The undigested pPink-*VP1* plasmid);C. Enzyme digestion identification of the pPink-*VP3* plasmid (M. DNA marker;1. Products of digestion with *Hin*d Ⅲ;2. The undigested pPink-*VP3* plasmid);D. Double enzyme digestion identification of the pPink-*VPs* plasmid(M. DNA marker;1. Products of double enzyme digestion with *Eco*R Ⅰ/*Kpn* Ⅰ;2. The undigested pPink-*VPs* plasmid).

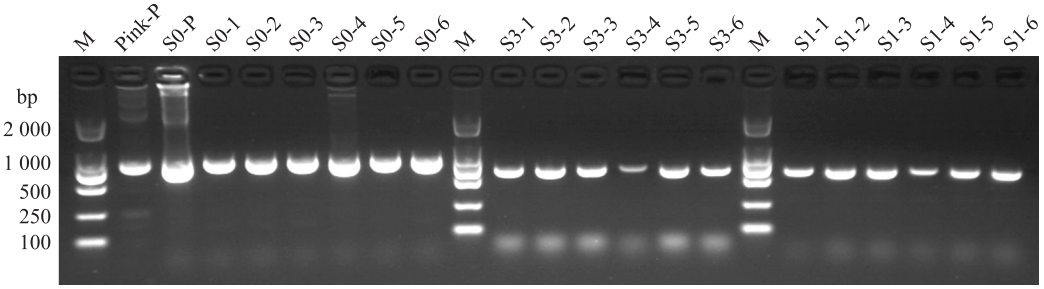

图 3　菌落的 PCR 鉴定

Fig. 3　PCR identification of colonies

M:DNA 标准品;Pink-P 和 S0-P:阳性对照;S0-1—S0-6、S3-1—S3-6、S1-1—S1-6 均为菌落 1—菌落 6。

M:DNA marker;Pink-P and S0-P:Positive control;S0-1-S0-6/S3-1-S3-6/S1-1-S1-6 are colonies of 1-6.

2.3　FMDV 结构蛋白的鉴定

为了验证蛋白的表达情况,在阳性菌株诱导表达之后,将细菌超声破碎,并离心后取上清液,利用 O 型多克隆抗体进行 WB 检测。结果(图 4)显示,在相对分子质量(25~35)×10^3 附近可以看到 3 个特异性条带,这与 VP0(37 k)、VP1(29 k)及 VP3(26 k)蛋白理论大小一致,说明 FMDV 的结构蛋白在酵母中成功表达。

2.4　FMDV VLP 纯化

根据 FMDV 146S 测量的 2 次吸光值,取平均值后计算其与抗原浓度之间的关系,建立 ELISA 的标准曲线(图 5),最终确定 FMDV VLP 的抗原浓度(y)与 D_{450}(x)之间符合 $y=0.194\ 8x^2-0.040\ 3\ x+0.022\ 1$ ($R^2=0.998\ 5$)。

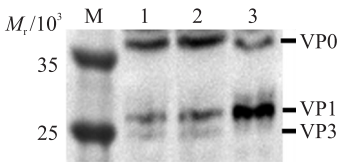

图 4　FMDV 结构蛋白的 WB 检测

Fig. 4　WB detection of structural proteins of FMDV

M.蛋白分子质量标准品;1~3.阳性菌株。

M. Protein marker;1-3. Positive strains.

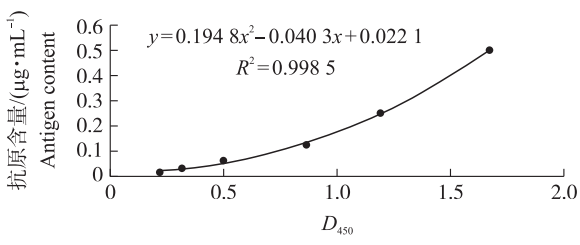

图 5　通过 FMDV 146S 建立的 ELISA 标准曲线

Fig. 5　ELISA standard curve established by FMDV 146S

为了进一步验证毕赤酵母是否可以表达正确组装的 FMDV VLP,取破碎离心后的菌液上清液进行蔗糖梯度纯化。从上到下取 15 个蔗糖层,然后用猪源 O 型 FMDV 多克隆抗体对梯度蔗糖层进行 WB 分析。纯化样品经 WB 检测后发现 VP0、VP3 和 VP1 可以在同一个蔗糖梯度下沉淀下来(图 6-A)。通过建立的 ELISA 抗原定量方法进行检测,发现在第 5~11 层 D_{450}值的变化(图 6-B),说明存在与病毒粒子同等的抗原物质。将第 9 层纯化浓缩的样品用 PBS 稀释 200 倍后测量 D_{450}值,代入公式并进行计算,结果显示,纯化 VLP 浓度达到 0.34 mg·mL^{-1},说明这些病毒样颗粒是由这 3 个亚基所构成的。

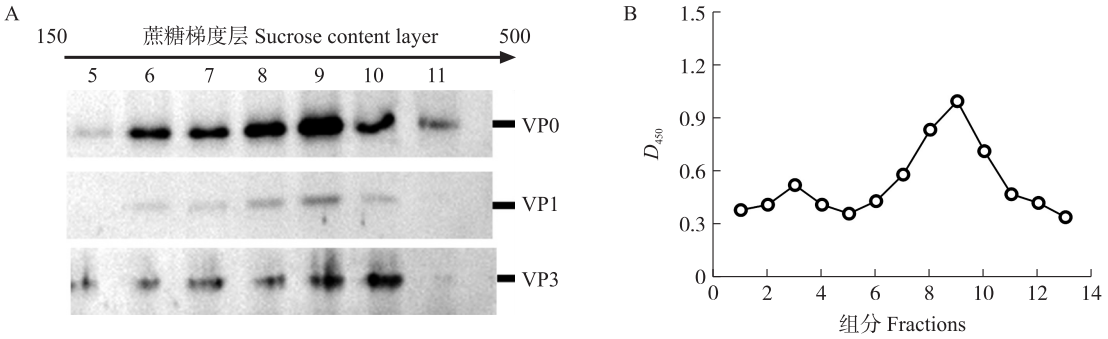

图 6 VLP 纯化的 Western blot(A)和 ELISA(B)鉴定

Fig. 6 Western blot(A) and ELISA(B) identification of the purified VLP

2.5 FMDV VLP 粒径大小及 TEM 观察

将蔗糖梯度纯化后的样品分别进行动态光散射法(dynamic light scattering,DLS)检测和 TEM 观察鉴定。DLS 检测结果(图 7)显示,在 30 nm 处存在峰值,说明样品中分布着大量直径约 30 nm 的颗粒物质;TEM 观察结果(图 8)也显示出直径约 30 nm 的球形颗粒。

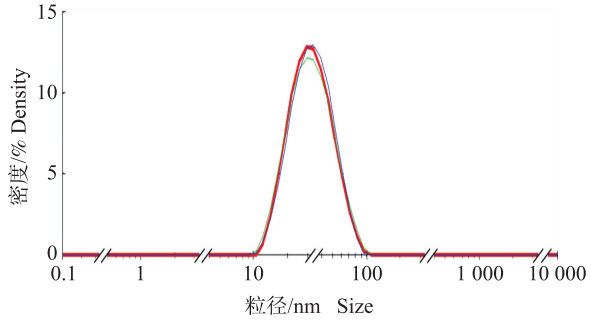

图 7 DLS 检测纯化样品的粒径

Fig. 7 Detection of the particle size of the purified samples by DLS

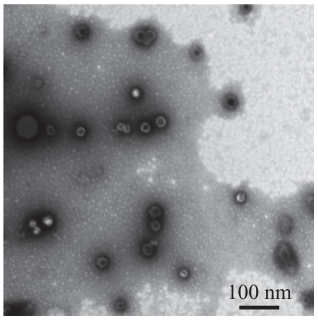

图 8 VLPs 的透射电镜(TEM)观察

Fig. 8 Transmission electron microscope (TEM) observation of VLPs

3 讨论

尽管疫苗接种使口蹄疫(FMD)的预防与控制取得显著进展,但该病在全球范围内仍未彻底根除。目前,世界各国防控口蹄疫仍以灭活疫苗为主导。但 FMDV 灭活疫苗在生产环节中存在着泄漏隐患,并且防范风险需要昂贵的隔离设备[2],这些是发展中国家依然需要面对的问题。

作为一种可以媲美病毒粒子的疫苗类型,VLP 疫苗具有现实可行性的优点。目前,处于开发中的 FMDV VLP 主要是通过哺乳动物细胞或者昆虫细胞进行表达生产,但这些真核表达系统存在一些技术难点或限制,如这 2 种真核表达系统虽然可以模拟病毒粒子产生的环境,但作为兽用疫苗,其生产成本相对较高,而且在其培养过程中更容易存在污染、表达周期长等缺点[14]。毕赤酵母作为一种成本较低的真核表达系统,不仅可以表达活性蛋白,而且还具有高密度发酵优势。目前已有利用毕赤酵母生产的商品化疫苗,如乙型肝炎疫苗和人乳头瘤病毒疫苗[15-16]。大多数利用真核表达系统制备 FMDV VLP 的研究都采用 P12A3C 的方式,利用 2A 的自裂解能力生成单独的 P12A 和 3C,再通过 3C 将 P1 切割成 VP0、VP3 和 VP1,进而组装成 VLP。但由于 3C 的非特异性切割,宿主的一些转录相关蛋白也会被切割,易造成宿主细胞的死亡,也会降低 VLP 的产量。

本课题组前期研究发现,3C 蛋白酶虽然不会影响酵母细胞的生长,但是其切割活性较低,这可能是由

于毕赤酵母的低 pH 环境影响了酶切活性。在本研究中,考虑到 FMDV VLP 的不耐酸性,首先对其衣壳蛋白上的关键氨基酸进行了 N1017D 和 H2145Y 耐酸性突变,该组合被认为是目前最强的耐酸性突变[17]。随后,将 VP0、VP3 和 VP1 的表达盒插入到同一个载体上,采用同时表达的方式来制备 FMDV VLP。经过甲醇诱导后,WB 检测发现 FMDV 的 3 个结构蛋白均成功表达,说明采用这种策略同样可以顺利制备 FMDV 的结构蛋白。本研究中利用建立的 ELISA 抗原定量方法对经梯度蔗糖纯化样品进行抗原性检测,发现纯化样品具有与病毒粒子相似的吸光值,样品经过纯化可以获得 0.34 $mg\cdot mL^{-1}$ VLP。李金娜[18]的研究表明,酵母酸性的环境对 FMDV VLP 的组装影响很大,蛋白样品经过纯化后在电镜视野下的颗粒并不是很多,衣壳蛋白的浓度达到 0.125 $mg\cdot mL^{-1}$。本文通过引入耐酸突变且采用合适的构建和表达方式,获得了更高的表达量。在蔗糖纯化后第 9 层可以富集到大量的 VLP 样品,WB 检测结果显示这些样品内存在 VP0、VP3 和 VP1 蛋白,而 DLS 和 TEM 检测发现了大量均匀分布的直径约 30 nm 的球形颗粒,这符合之前哺乳动物细胞中制备的 FMDV VLP 的报道[19]。

本研究在毕赤酵母中成功制备出结构和抗原性与 FMD 病毒粒子相似的 VLP,这为口蹄疫病毒样颗粒疫苗的开发及深入研究其他小 RNA 病毒科病毒样颗粒的制备提供了可靠的试验基础。

参考文献 References:

[1] Jamal S M, Belsham G J. Foot-and-mouth disease: past, present and future[J]. Veterinary Research, 2013, 44(1): 116.

[2] Rweyemamu M, Roeder P, MacKay D, et al. Epidemiological patterns of foot-and-mouth disease worldwide[J]. Transboundary and Emerging Diseases, 2008, 55(1): 57-72.

[3] Wu Q H, Moraes M P, Grubman M J. Recombinant adenovirus co-expressing capsid proteins of two serotypes of foot-and-mouth disease virus (FMDV): *in vitro* characterization and induction of neutralizing antibodies against FMDV in swine[J]. Virus Research, 2003, 93(2): 211-219.

[4] Polacek C, Gullberg M, Li J, et al. Low levels of foot-and-mouth disease virus 3C protease expression are required to achieve optimal capsid protein expression and processing in mammalian cells[J]. Journal of General Virology, 2013, 94(6): 1249-1258.

[5] Vivek Srinivas V M, Basagoudanavar S H, Hosamani M. IRES mediated expression of viral 3C protease to enhance the yield of FMDV empty capsids using baculovirus system[J]. Biologicals, 2016, 44(2): 64-68.

[6] Veerapen V P, van Zyl A R, Wigdorovitz A, et al. Novel expression of immunogenic foot-and-mouth disease virus-like particles in *Nicotiana benthamiana*[J]. Virus Research, 2018, 244: 213-217.

[7] Feng Q J, He Y Q, Lu J H. Virus-like particles produced in *Pichia pastoris* induce protective immune responses against coxsackievirus A16 in mice[J]. Medical Science Monitor, 2016, 22: 3370-3382.

[8] Sherry L, Grehan K, Snowden J S, et al. Comparative molecular biology approaches for the production of poliovirus virus-like particles using *Pichia pastoris*[J]. mSphere, 2020, 5(2): e00838-19.

[9] Zhang C, Ku Z Q, Liu Q W, et al. High-yield production of recombinant virus-like particles of enterovirus 71 in *Pichia pastoris* and their protective efficacy against oral viral challenge in mice[J]. Vaccine, 2015, 33(20): 2335-2341.

[10] Belsham G J, McInerney G M, Ross-Smith N. Foot-and-mouth disease virus 3C protease induces cleavage of translation initiation factors eIF4A and eIF4G within infected cells[J]. Journal of Virology, 2000, 74(1): 272-280.

[11] Ryan M D, Belsham G J, King A M. Specificity of enzyme-substrate interactions in foot-and-mouth disease virus polyprotein processing[J]. Virology, 1989, 173(1): 35-45.

[12] 李志要,孙阳阳,鲍恩东,等. 利用猪源 SUMO3 标签蛋白可溶性表达猪腺病毒 3 型的 Hexon 基因高变区蛋白[J]. 畜牧与兽医,2020,52(3):107-111.
Li Z Y, Sun Y Y, Bao E D, et al. Soluble expression of Hexon protein of porcine serotype 3 using the pig SUMO3 fusion tag[J]. Animal Husbandry & Veterinary Medicine, 2020, 52(3): 107-111(in Chinese with English abstract).

[13] Dong H, Lu Y L, Zhang Y, et al. A heat-induced mutation on VP1 of foot-and-mouth disease virus serotype O enhanced capsid stability and immunogenicity[J]. Journal of Virology, 2021, 95(16): e0017721.

[14] Hervas-Stubbs S, Rueda P, Lopez L, et al. Insect baculoviruses strongly potentiate adaptive immune responses by inducing type I IFN[J]. Journal of Immunology, 2007, 178(4): 2361-2369.

[15] McAleer W J, Buynak E B, Maigetter R Z, et al. Human hepatitis B vaccine from recombinant yeast[J]. Nature, 1984, 307(5947): 178-180.

[16] Sasagawa T, Pushko P, Steers G, et al. Synthesis and assembly of virus-like particles of human papillomaviruses type 6and Type 16 in fission yeast *S. pombe*[J]. Virology, 1995, 206(1): 126-135.

[17] Vázquez-Calvo A, Caridi F, Sobrino F, et al. An increase in acid resistance of foot-and-mouth disease virus capsid is mediated by a tyrosine replacement of the VP2 histidine previously associated with VP0 cleavage[J]. Journal of Virology, 2014, 88(5): 3039-3042.

[18] 李金娜. 毕赤酵母表达组装口蹄疫病毒样颗粒[D]. 乌鲁木齐:新疆农业大学,2019.
Li J N. Expression and assembly of foot-and-mouth disease virus-like particles by *Pichia pastoris*[D]. Urumqi: Xinjiang Agricultural University, 2019(in Chinese with English abstract).

[19] Mignaqui A C, Ferella A, Cass B, et al. Foot-and-mouth disease: optimization, reproducibility, and scalability of high-yield production of virus-like particles for a next-generation vaccine[J]. Frontiers in Veterinary Science, 2020, 7: 601.

责任编辑:周广礼