

O 型口蹄疫病毒 VP0 和 VP1 蛋白的可溶性表达与反应原性分析

赵宝磊¹,刘运超²,陈玉梅²,姬鹏超²,王聚财¹,刘畅²,杨素珍²,张改平^{1,2*}
(1.河南农业大学 牧医工程学院,河南 郑州 450002;
2.河南省农业科学院 动物免疫学重点实验室/农业部动物免疫学重点实验室,河南 郑州 450002)

摘要: 为了高效可溶性表达 O 型口蹄疫病毒(FMDV) VP0、VP1 结构蛋白,根据大肠杆菌密码子的偏爱性优化合成 VP0 和 VP1 基因片段,并将其克隆到 pE-SUMO 载体中,构建重组质粒 SUMO-VP0 和 SUMO-VP1,将重组质粒转化到大肠杆菌 BL21(DE3)感受态细胞中进行诱导表达,并优化诱导温度、时间和 IPTG 浓度等表达条件。结果显示, SUMO-VP0 可溶性蛋白表达的最佳条件为: 20 ℃ 条件下,0.1 mmol/L IPTG 诱导表达 8 h;SUMO-VP1 可溶性蛋白表达的最佳条件为:37 ℃ 条件下,0.1 mmol/L IPTG 诱导表达 12 h。SDS-PAGE 电泳和 Western blot 结果表明,表达的 SUMO-VP0、SUMO-VP1 可溶性蛋白能够被抗 FMDV 的阳性血清识别,具有很好的反应原性。
关键词: 口蹄疫病毒; VP0、VP1 结构蛋白; 可溶性表达; SUMO 标签
中图分类号: S855.3 **文献标志码:** A **文章编号:** 1004-3268(2017)02-0105-06

Soluble Expression and Immuneoreactivity Analysis of FMDV VP0 and VP1 Protein

ZHAO Baolei¹, LIU Yunchao², CHEN Yumei², JI Pengchao², WANG Jucai¹,
LIU Chang², YANG Suzhen², ZHANG Gaiping^{1,2*}
(1. College of Animal Husbandry and Veterinary Medicine, Henan Agricultural University, Zhengzhou 450002, China;
2. Key Laboratory of Animal Immunology of Ministry of Agriculture/Key Laboratory of Animal Immunology, Henan Academy of Agricultural Sciences, Zhengzhou 450002, China)

Abstract: To obtain efficient soluble expressive VP0 and VP1 protein of O-type foot-and-mouth disease virus (FMDV). We optimized VP0 and VP1 gene according to the preference codon usage of *E. Coli*. The FMDV structural protein VP0 and VP1 genes were synthesized and cloned into pE-SUMO vector. These two recombinant plasmids, SUMO-VP0 and SUMO-VP1 were transformed into *E. coli* BL21(DE3) competent cells. Through optimizing the inducing temperature, time and the concentration of IPTG, we got that the optimized expression conditions of SUMO-VP1 was induced by 0.1 mmol/L IPTG, and induced at 20 ℃ for 8 h. The best inducing conditions of SUMO-VP0 was induced by 0.1 mmol/L IPTG, and expressed 12 h at 37 ℃. SDS-PAGE and Western blot analysis showed that the soluble protein could be identified by standard positive serum of FMDV, which confirmed that the fusion protein had good responsiveness.
Key words: FMDV; structural protein VP0 and VP1; soluble protein expression; SUMO tag

口蹄疫病(foot and mouth disease, FMD)是一种 and mouth disease virus, FMDV)引起,主要感染牛、急性、热性、高度接触性传染病,由口蹄疫病毒(foot 猪、羊等多种偶蹄动物^[1]。血清学试验和交叉保护

收稿日期:2016-09-06
基金项目:国家重点研发计划项目(2016YFD0500704);河南省基础与前沿技术研究计划项目(152300410238);河南省科技创新基础前瞻类项目(20141644);河南省重大科技专项(141100110100)
作者简介:赵宝磊(1990-),男,河南许昌人,在读硕士研究生,研究方向:动物疫病与疫苗。E-mail:baoleizhao2010@163.com
* 通讯作者:张改平(1960-),男,河南内黄人,研究员,博士,主要从事动物疫病免疫机制与疫苗研究。
E-mail:zhanggaiping2003@163.com

性试验研究发现,FMDV 主要存在 7 个血清型:A 型、C 型、O 型、亚洲 I 型、南非 I 型、南非 II 型、南非 III 型。这 7 个血清型之间没有交叉保护,且遗传变异频率非常高,流行范围非常广泛,给世界上许多国家的畜牧业生产造成了巨大的经济损失^[2]。目前,免疫接种疫苗是防控该病的主要措施,接种的主要疫苗是弱毒苗和灭活苗,虽然这些疫苗具有很好的保护效果,但是制备成本高,还存在灭活不完全导致病毒暴发流行的危险。因此,对这 2 种疫苗的使用存在争议,迫切需要研究一种安全、高效、廉价的新型基因工程亚单位疫苗^[3]。

FMDV 为单股正链小 RNA 病毒,基因组全长有 8 500 个核苷酸,基因分为 3 个主要区域:5'UTR 区、ORF 区和 3'UTR 区。ORF 区大约有 7 000 nt,主要编码 L 蛋白、P1 结构蛋白和 P2、P3 非结构蛋白。P1 结构蛋白在后期的病毒翻译和修饰过程中被 3C^{pro} 蛋白酶裂解为 3 个主要的病毒结构蛋白 VP0、VP1 和 VP3。在病毒粒子的装配过程中,VP0、VP1 和 VP3 先形成 5S 聚集体再形成 14S 颗粒体,最后由 12 个 14S 颗粒体组装成 75S 病毒的空壳蛋白体。VP1 高度保守区的 G-H 环(140—160 位)包含有精氨酸-甘氨酸-天门冬氨酸序列(RGD),这些序列暴露在病毒粒子表面,构成病毒的细胞吸附位点^[4]。VP0 被 3C^{pro} 蛋白酶进一步裂解为 VP2 和 VP4,VP4 位于衣壳内部主要与核心 RNA 相连,是决定病毒抗原性的主要成分。另外,VP2 和 VP4 经细胞激酶磷酸化后使 FMDV 的衣壳不稳定有利于核酸脱壳。VP2 和 VP1 蛋白上含有多种具有免疫原性的抗原决定簇,是机体内中和性抗体结合病毒的靶标。因此,VP0 和 VP1 结构蛋白成为亚单位疫苗研究的热点,但目前关于体外可溶性表达具有生物学活性的 VP0 和 VP1 结构蛋白的报道较少。

pE-SUMO 载体是一种原核表达载体,主要用于促进重组蛋白质的正确折叠和增加蛋白质的水溶性。载体内含组氨酸标签和 SUMO 蛋白标签,这 2 种标签与目的蛋白融合表达不仅可以增加蛋白质的可溶性,还可以增加蛋白质的折叠效率^[5-6]。鉴于此,采用 pE-SUMO 原核表达载体对 FMDV VP0 和 VP1 蛋白进行融合表达,以期获得表达量较高的可溶性重组蛋白 SUMO-VP0 和 SUMO-VP1,为 FMDV VP0 和 VP1 蛋白的结构和功能及 FMDV 动物疫苗的研究奠定基础。

1 材料和方法

1.1 载体、质粒和菌株

大肠杆菌感受态细胞 JM109 和 BL21(DE3)基因工程菌均购自 TaKaRa 公司。pE-SUMO 原核表达载体和抗 FMDV 的阳性血清由河南省农业科学院动物免疫学重点实验室保存。

1.2 主要试剂

核酸 Marker DL2000、Ex Taq DNA 聚合酶、标准分子质量蛋白质 Marker 和 T4 DNA 连接酶等为 TaKaRa 公司产品;胶回收试剂盒、质粒提取试剂盒等购自 OMEGA 公司;限制性内切酶 *Xho* I 和 *Bsa* I 购自 NEB 公司;抗组氨酸标签单抗、HRP 标记的羊抗鼠二抗及 HRP 标记的羊抗猪二抗均购自 Abcam 公司;IPTG 购自 INALCO 公司;AEC 显色试剂盒购自中杉公司;其他常规试剂均为国产分析纯。

1.3 引物设计与 FMDV VP0 和 VP1 基因合成

猪 O 型 FMDV 结构蛋白 VP0 和 VP1 基因序列经优化后由生工生物工程(上海)股份有限公司合成,设计引物(表 1)并由生工生物工程(上海)股份有限公司合成上述基因。

表 1 VP0 和 VP1 基因的 PCR 扩增引物

引物名称	酶切位点	引物序列(5'—3')	长度/bp
VP0-F	<i>Bsa</i> I	TT GGTCTCAAGGTGGAGCCGGACAATCCA	918
VP0-R	<i>Xho</i> I	TT CTCGAGTTAGATCCCTCTTTTGAA	
VP1-F	<i>Bsa</i> I	TT GGTCTCAAGGTACCACTCTGCGGGT	642
VP1-R	<i>Xho</i> I	TT CTCGAGTTACAGAAGTTGTTTCGCGG	

注:下划线位置为酶切位点。

1.4 重组质粒的构建与鉴定

以合成的 O 型 FMDV 的 VP0 和 VP1 基因为模板进行 PCR 扩增,PCR 反应体系为 25 μL:Ex Taq 12.5 μL,上、下游引物各 1 μL,DNA 模板 1 μL,加灭菌水补齐 25 μL。PCR 反应程序如下:95 ℃预变性 5 min;95 ℃变性 30 s,56 ℃退火 30 s,72 ℃延伸 1 min,循环 32 次;72 ℃延伸 10 min。用 1% 琼脂糖

凝胶电泳检测扩增结果,通过胶回收试剂盒回收目的基因。用 *Bsa* I 和 *Xho* I 对目的基因 VP0、VP1 和 pE-SUMO 载体进行双酶切并回收,随后用 T4 DNA 连接酶 16 ℃连接过夜。采用 CaCl₂ 转化法将连接产物转入到感受态细胞 JM109 中,对经菌液 PCR 鉴定为阳性的重组质粒进行测序。将测序正确的阳性质粒命名为 SUMO-VP0 和 SUMO-VP1,并转入感

受态细胞 BL21 中用于重组蛋白的表达。

1.5 重组蛋白的诱导表达与 Western blot 鉴定

分别将 SUMO-VP0 和 SUMO-VP1 阳性重组表达菌按 1:100 的比例接种到含有 Amp⁺ 的 LB 液体培养基中,37℃ 振荡培养菌体,当菌液的 OD₆₀₀ = 0.6 时加入终浓度为 0.1 mmol/L 的诱导剂 IPTG,转至 25℃ 振荡培养 8 h。12 000 r/min 离心 15 min,弃上清,菌体沉淀用 PBS 缓冲液重悬后用超声波破碎仪进行破碎。破碎后的液体 12 000 r/min 离心 20 min。分别取 40 μL 的沉淀和上清,加入 10 μL 的 5×SDS-PAGE 上样缓冲液煮沸 10 min,煮沸后的样品用 12% 的 SDS-PAGE 检测。通过电转仪将蛋白质转移到硝酸纤维素膜(NC膜)上进行 Western blot 检测。转移后的 NC 膜置于 5% 脱脂奶中,4℃ 封闭过夜,用抗组氨酸标签单抗(1:5 000)37℃ 孵育 1 h,再用 1:1 000 稀释的 HRP 标记的羊抗鼠二抗 37℃ 孵育 45 min,最后用 AEC 显色试剂盒显色并观察分析显色结果。

1.6 重组蛋白诱导表达条件的优化

分别将 SUMO-VP0 和 SUMO-VP1 的阳性菌接种于含 Amp⁺ 的 LB 液体培养基中,37℃、220 r/min 振荡培养,分别对诱导表达时间、诱导剂 IPTG 的浓度和诱导表达温度等进行优化。当 OD₆₀₀ = 0.6 时,加入终浓度为 0.5 mmol/L 的 IPTG 诱导剂,在 25℃ 条件下进行诱导表达,分别在诱导后的 4、6、8、10、12 h 收集菌液;在诱导温度 25℃ 条件下,分别在 0.1、0.3、0.5、0.7、0.9、1.0 mmol/L IPTG 条件下诱导 8 h 收集菌液;在诱导剂浓度为 0.5 mmol/L 时,分别在 16、20、25、37℃ 条件下诱导表达 8 h 收集菌液。分别将上述收集的菌液经 12 000 r/min 离心 5 min,弃上清,菌体沉淀用 PBS 缓冲液重悬后用超声波破碎仪进行破碎。破碎后的液体 12 000 r/min 离心 20 min,分离沉淀和上清,分别用 12% SDS-PAGE 进行电泳鉴定。通过对各种条件的优化,选择最佳的诱导表达条件。

1.7 Western blot 检测重组蛋白的反应原性

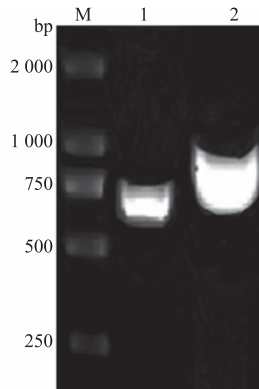
将诱导表达得到的重组蛋白电泳后转移到 NC 膜上,在 5% 的脱脂奶中 4℃ 封闭过夜。用抗 O 型 FMDV 的阳性血清以 1:200 稀释后作为一抗,37℃ 孵育 1 h,再用 1:2 000 稀释的 HRP 标记的羊抗猪二抗 37℃ 孵育 45 min,用 AEC 显色试剂盒显色并观察显色结果。

2 结果与分析

2.1 VP0 和 VP1 基因的 PCR 扩增

分别用 VP0-F/R 和 VP1-F/R 引物扩增 VP0

和 VP1 基因,结果显示,分别在 934 bp 和 668 bp 处出现扩增条带,与预期目的条带大小一致(图 1)。



M. DL2000 DNA Marker; 1. 引物 VP1-F/R

扩增产物; 2. 引物 VP0-F/R 扩增产物

图1 VP1 和 VP0 基因 PCR 扩增产物电泳结果

2.2 SUMO-VP0 和 SUMO-VP1 重组质粒的构建

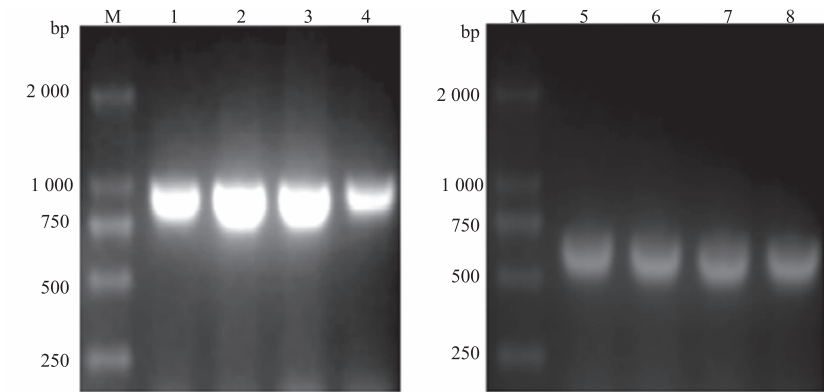
分别对 PCR 扩增后的 VP0、VP1 基因和 pE-SUMO 空载体质粒用 Bsa I 和 Xho I 进行酶切,酶切后用 T4 DNA 连接酶连接,并转入到大肠杆菌 JM109 中。pE-SUMO 载体经过双酶切后,酶切位点 Bsa I 对应的核苷酸序列发生变化,所以不能用 Bsa I 和 Xho I 对重组的质粒进行双酶切鉴定。通过菌液 PCR 方法对挑选的单克隆进行鉴定,电泳结果显示,分别在 934 bp 和 668 bp 处出现阳性条带(图 2)。对鉴定结果为阳性的质粒进行测序,测序结果与合成的序列相一致,表明成功构建 SUMO-VP0 和 SUMO-VP1 重组质粒。

2.3 SUMO-VP0 和 SUMO-VP1 重组蛋白的诱导表达及可溶性分析

从图 3 可以看出,在约 53 ku 和 43 ku 处各有 1 条特异性的条带,与预测的 SUMO-VP0 和 SUMO-VP1 重组蛋白的大小相一致,且目的蛋白大部分以可溶性的形式存在。Western blot 结果显示,SUMO-VP0 和 SUMO-VP1 重组蛋白可以与抗组氨酸标签单抗发生特异性结合(图 3)。

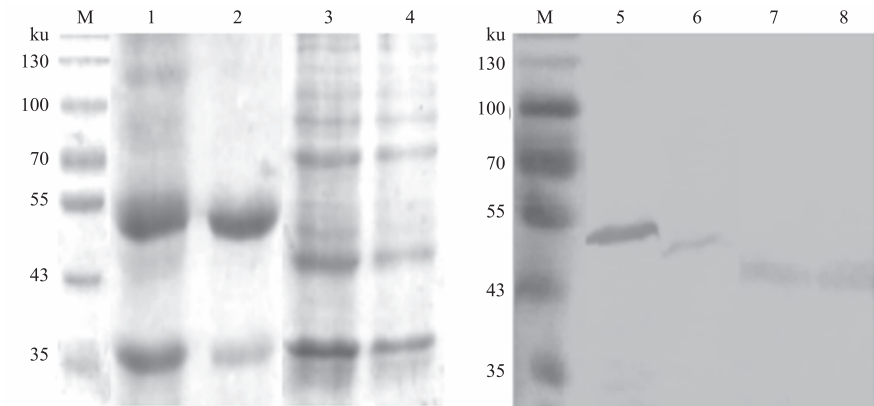
2.4 SUMO-VP0 和 SUMO-VP1 重组蛋白诱导表达条件的优化

分别对重组蛋白的诱导表达时间、诱导剂 IPTG 浓度和诱导表达温度等进行优化。从图 4 可以看出,不同表达时间对 SUMO-VP0 的表达量影响比较大,在诱导 12 h 后表达量达到最高;而对 SUMO-VP1 影响较小,在 8 h 和 12 h 时表达量无明显差别,故选用诱导时间为 8 h。



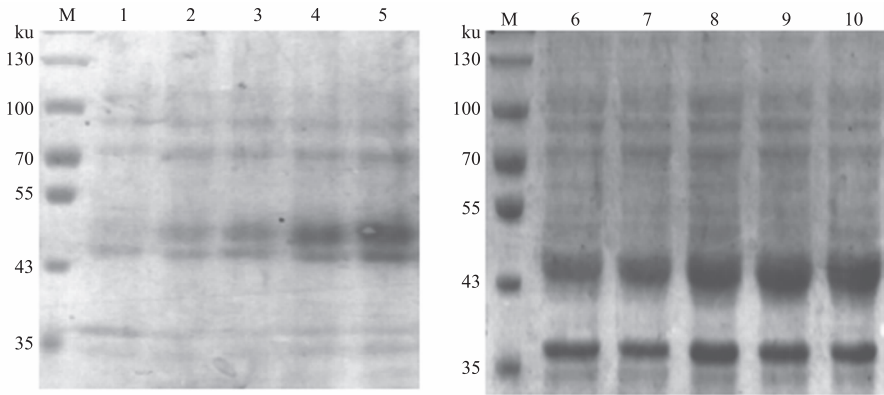
M. DL2000 DNA Marker; 1—4 均为 SUMO - VP0 菌液; 5—8 均为 SUMO - VP1 菌液

图 2 重组质粒的菌液 PCR 鉴定结果



M. 蛋白质 Marker; 1,2 和 5,6 分别为 SUMO - VP0 超声后的沉淀和上清;
3,4 和 7,8 分别为 SUMO - VP1 超声后的沉淀和上清

图 3 重组蛋白 SUMO - VP0 和 SUMO - VP1 的 SDS - PAGE 分析和 Western blot 检测结果



M. 蛋白质 Marker; 1—5 和 6—10 分别是 4,6,8,10,12 h 诱导表达的 SUMO - VP0 和 SUMO - VP1

图 4 重组蛋白 SUMO - VP0 和 SUMO - VP1 经不同时间的诱导表达情况

由图 5 可以看出,不同浓度 IPTG 对重组蛋白 SUMO - VP0 和 SUMO - VP1 的表达并没有明显影响,在 0.1 mmol/LIPTG 诱导条件下,2 种重组蛋白的表达量已经达到最高。由图 6 可知,重组蛋白 SUMO - VP0 在 25 ℃ 条件下,可溶性表达量达到最高;在 37 ℃ 条件下,重组蛋白的可溶性表达量和总体表达量均达到最低。因此,重组蛋白 SUMO - VP0 的最佳诱导温度为 25 ℃。重组蛋白 SUMO - VP1

在不同温度条件下表达情况与 SUMO - VP0 相反,随着温度的升高,重组蛋白 SUMO - VP1 的表达量不断增加,在 37 ℃ 条件下,可溶性蛋白表达量达到最高,说明 37 ℃ 适合重组蛋白 SUMO - VP1 的可溶性表达。因此,SUMO - VP0 可溶性蛋白的最佳表达条件为:20 ℃ 条件下,0.1 mmol/L IPTG 诱导表达 12 h;SUMO - VP1 可溶性蛋白的最佳表达条件为:37 ℃ 条件下,0.1 mmol/L IPTG 诱导表达 8 h。

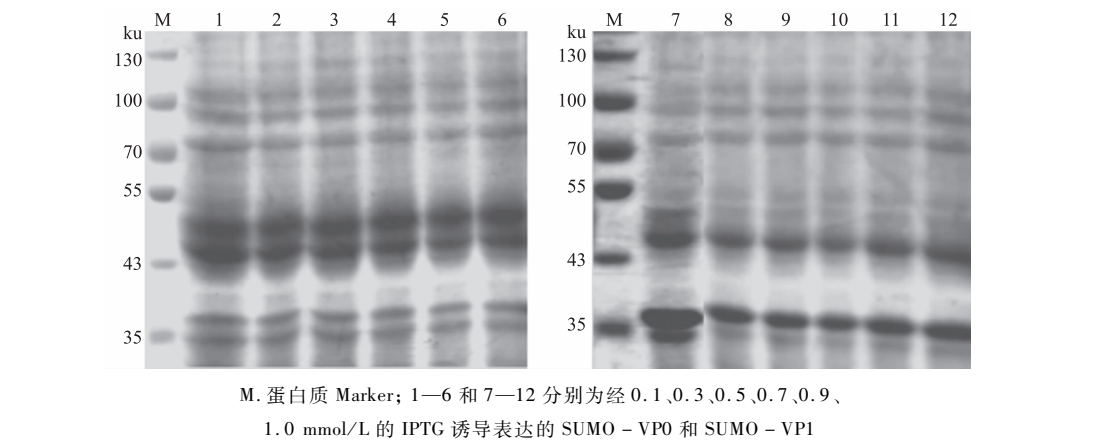


图 5 重组蛋白 SUMO - VP0 和 SUMO - VP1 在不同 IPTG 浓度下的诱导表达情况

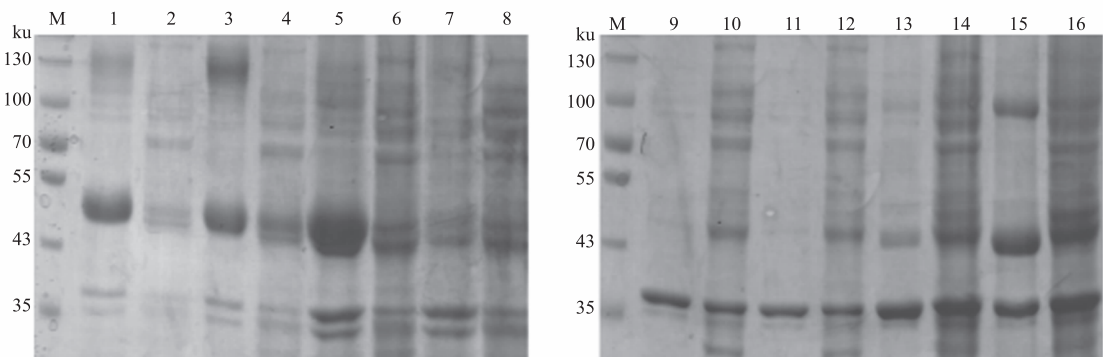


图 6 重组蛋白 SUMO - VP0 和 SUMO - VP1 在不同温度条件下可溶性蛋白表达量检测结果

2.5 2 种重组蛋白的反应原性检测结果

用抗 O 型 FMDV 的阳性血清通过 Western blot 检测重组蛋白 SUMO - VP0 和 SUMO - VP1 的反应原性,结果(图 7)表明,分别在 53 ku 和 43 ku 位置处的特异性条带能够被抗 O 型 FMDV 的阳性血清所识别,与抗组氨酸标签单抗检测结果相一致,说明

获得的重组蛋白 SUMO - VP0 和 SUMO - VP1 均具有很好的反应原性。

3 结论与讨论

SUMO 是一种小分子泛素类修饰蛋白,在细胞凋亡、信号转导和蛋白质的核质运输中发挥着重要作用^[7-8]。最近研究发现,SUMO 可以作为分子伴侣与重组蛋白融合表达,这种融合表达不仅可以抵抗蛋白酶水解重组蛋白,还可以促进蛋白质的正确折叠,提高蛋白质的表达量,增加蛋白质的可溶性和稳定性^[5-6]。SUMO 标签可以通过 SUMO 蛋白酶酶切,切割之后不会留有残余氨基酸。姜媛媛等^[9]将 SUMO 融合表达系统与 pET - 32a 表达系统进行对比,结果表明,通过 SUMO 融合表达系统可以获得纯度较高的可溶性成熟蛋白,而目的蛋白在 pET - 32a 表达系统中的表达量极低,几乎检测不到。曲栗等^[10]利用 SUMO 表达系统高效表达鸡传染性法氏囊病毒的 VP3 基因,并且用 SUMO 蛋白酶酶切,得到的 VP3 蛋白通过 Western blot 鉴定具有很好的抗原性。总之,SUMO 表达系统可以作为一种高效的原核表达系统以获得可溶性好、纯度高的目的蛋白。

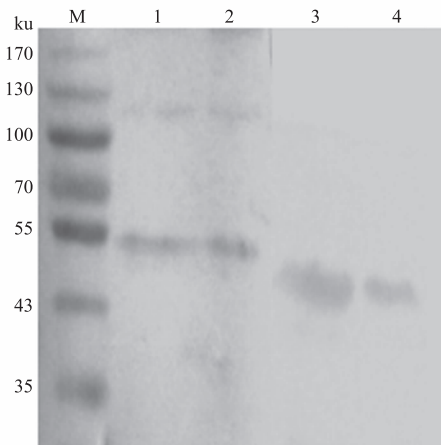


图 7 重组蛋白 SUMO - VP0 和 SUMO - VP1 的反应原性分析

本研究利用 pE-SUMO 作为表达载体,该表达载体含有 6×组氨酸标签和 SUMO 标签,这 2 种标签都可以增加目的蛋白的可溶性表达。另外,6×组氨酸蛋白可与镍柱结合,因此,可以利用亲和层析技术对融合表达的重组蛋白进行纯化。据报道,组氨酸融合标签由 6 个带有较强正电荷的碱性氨基酸组成,在 SDS-PAGE 电泳中移动速度降低,会造成分子质量比实际偏大^[11]。本试验通过 SDS-PAGE 电泳检测发现,2 个重组蛋白的分子质量确实比理论值偏大,这符合预期的结果。pE-SUMO 载体上含有 *Bsa* I 限制性内切酶酶切位点,酶切位点在 SUMO 标签蛋白与目的蛋白之间,可以利用 SUMO 蛋白酶实现 N 端无残留切割,从而得到纯净的目的蛋白。Western blot 检测结果说明,表达得到的重组蛋白能够被抗 O 型 FMDV 的阳性血清识别,说明表达的重组蛋白具有很好的反应原性,可以用于后期的免疫试验。

目前,预防口蹄疫的主要措施是注射灭活疫苗,但灭活疫苗存在灭活不完全引起疫病暴发的危险,基因工程疫苗成为研究的热点。由于 VP1 蛋白主要暴露在 FMDV 病毒颗粒的表面,是诱导机体产生中和抗体的主要结构蛋白,因此,FMDV 基因工程疫苗主要是以 VP1 蛋白为研究热点^[12-13]。据报道称,VP1 结构蛋白不能单独形成病毒样颗粒,需要将 FMDV 的 VP0、VP1 和 VP3 三种蛋白质共表达,在合适的条件下装配才能够形成病毒样颗粒^[14]。Guo 等^[15]用 SUMO 表达系统高效表达了可溶性的 VP0、VP1 和 VP3 重组蛋白,并用 SUMO 蛋白酶将 SUMO 标签切除,在合适的条件下发现,VP0、VP1 和 VP3 三种蛋白质能够自我组装形成病毒样颗粒,这种病毒样颗粒在形状和结构上与 FMDV 病毒颗粒一致。将这种病毒样颗粒与佐剂结合后免疫猪,通过病毒中和试验能够检测到中和性抗体,通过 T 细胞增殖试验和对 γ 干扰素的检测发现,病毒样颗粒能够使机体产生很好的免疫效果。本研究利用 SUMO 表达载体高效表达 FMDV 的 VP0 和 VP1 结构蛋白,并通过对多种表达条件的优化,获得了这 2 种结构蛋白最佳的诱导表达条件,并且用抗 FMDV 的阳性血清检测发现,表达的重组蛋白有很好的反应原性。本研究为 FMDV 病毒样颗粒的进一步研究奠定了基础,同时也为 FMDV 基因工程亚单位疫苗的研究提供了理论指导和技术支持。

参考文献:

[1] León E A. Foot-and-mouth disease in pigs: Current epide-

miological situation and control methods[J]. *Transboundary and Emerging Diseases*, 2012, 59(S1): 36-49.

[2] Grubman M J, Baxt B. Foot-and-mouth disease[J]. *Clin Microbiol Rev*, 2004, 86(22): 465-493.

[3] 曹轶梅, 卢曾军, 田飞鹏, 等. 口蹄疫新型疫苗研究进展[J]. *微生物学通报*, 2009, 36(11): 1750-1757.

[4] Acharya R, Fry E, Stuart D, *et al.* The structure of foot-and-mouth disease virus: Implications for its physical and biological properties[J]. *Veterinary Microbiology*, 1990, 23(1/2/3/4): 21-34.

[5] Wang Z, Li N, Wang Y, *et al.* Ubiquitin-intein and SUMO2-intein fusion systems for enhanced protein production and purification[J]. *Protein Expression & Purification*, 2012, 82(1): 174-178.

[6] Panavas T, Sanders C, Butt T R. SUMO fusion technology for enhanced protein production in prokaryotic and eukaryotic expression systems[J]. *Methods in Molecular Biology*, 2009, 49(7): 303-317.

[7] Hay R T. Protein modification by SUMO[J]. *Annual Review of Biochemistry*, 2004, 73(1): 355-382.

[8] Dohmen R J. SUMO protein modification[J]. *Biochimica Et Biophysica Acta Molecular Cell Research*, 2004, 1695(3): 113.

[9] 姜媛媛, 尹成凯, 李晋南, 等. 利用 SUMO 融合系统高效表达可溶性重组蛋白的研究[J]. *东北农业大学学报*, 2008, 39(10): 57-62.

[10] 曲栗, 尹杰超, 李宁, 等. 利用 SUMO 表达系统高效可溶性表达鸡传染性法氏囊病病毒 VP3 基因[J]. *中国预防兽医学报*, 2011, 33(3): 199-202.

[11] Tang W. The cause of deviation made in determining the molecular weight of his-tag fusion proteins by SDS-PAGE[J]. *Acta Photophysiological Sinica*, 2000, 26(1): 64-68.

[12] Ruppert A, Arnold N, Hobom G. OmpA-FMDV VP1 fusion proteins: Production, cell surface exposure and immune responses to the major antigenic domain of foot-and-mouth disease virus[J]. *Vaccine*, 1994, 12(6): 492-508.

[13] Challa S, Barrette R, Rood D, *et al.* Non-toxic *Pseudomonas aeruginosa* exotoxin A expressing the FMDV VP1 G-H loop for mucosal vaccination of swine against foot and mouth disease virus[J]. *Vaccine*, 2007, 25(17): 3328-3337.

[14] Lee C D, Yan Y P, Liang S M, *et al.* Production of FMDV virus-like particles by a SUMO fusion protein approach in *Escherichia coli*[J]. *Journal of Biomedical Science*, 2009, 16(1): 69.

[15] Guo H C, Sun S Q, 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[J]. *Veterinary Research*, 2013, 44: 48.