

DOI:10.13350/j.cjpb.230206

• 论著 •

# 肠道病毒 71 型 VP1 包涵体蛋白的复性与纯化<sup>\*</sup>

刘红线<sup>1</sup>, 王宏宇<sup>1</sup>, 田志飘<sup>1</sup>, 郑亮<sup>1</sup>, Matthew Kay<sup>1</sup>, 高振秋<sup>1</sup>, 许晓娟<sup>1</sup>, 耿荣庆<sup>1</sup>, 吴志军<sup>1,2,3\*\*</sup>, 张华<sup>1,2,3\*\*</sup>

(1. 盐城师范学院药学院, 江苏盐城 224007; 2. 江苏省肿瘤靶向纳米诊疗材料工程研究中心; 3. 盐城市抗体药物与免疫检测工程技术研究中心)

**【摘要】** 目的 利用原核表达系统, 经优化诱导条件及变、复性将包涵体形式肠道病毒 71 型结构蛋白 VP1 进行纯化。

**方法** 通过 RT-PCR 扩增 VP1 基因, 并应用基因克隆技术将 VP1 基因与 pET-28a 原核表达载体连接, 之后将重组载体转化至大肠埃希菌 Rosseta(DE3)感受态细胞, 经 IPTG 诱导后对包涵体进行变、复性, 采用 His 镍柱亲和层析对 VP1 蛋白进行纯化, 利用 SDS-PAGE 和 Western blot 对 VP1 蛋白进行分析鉴定。 **结果** PCR 扩增出 891 bp 的 EV71-VP1 基因, 双酶切鉴定原核重组质粒 pET-28a-EV71-VP1 构建正确。重组载体转化 DE3 后经 IPTG 诱导表达 VP1 蛋白, 且以包涵体形式存在。将包涵体变、复性, 经 SDS-PAGE 分离后进行镍柱纯化, 得到较纯的目的蛋白, Western blot 分析该蛋白能被相应抗体识别。 **结论** 构建的原核重组质粒 pET-28a-EV71-VP1 转化 DE3 后经 IPTG 诱导表达以包涵体形式存在的 VP1 蛋白, 复性后纯化的 VP1 蛋白具有免疫原性, 为 EV71 VP1 蛋白的研究与开发奠定了基础。

**【关键词】** EV71 型; VP1; 原核载体构建; 蛋白表达与纯化

**【中图分类号】** R373.2

**【文献标识码】** A

**【文章编号】** 1673-5234(2023)02-0153-05

[*Journal of Pathogen Biology*. 2023 Feb;18(2):153-157,161.]

## Construction of prokaryotic vector of enterovirus 71 vp1 gene and its protein expression and purification

LIU Hong-xian<sup>1</sup>, WANG Hong-yu<sup>1</sup>, TIAN Zhi-piao<sup>1</sup>, ZHENG Liang<sup>1</sup>, Matthew Kay<sup>1</sup>, GAO Zhen-qiu<sup>1</sup>, XU Xiao-juan<sup>1</sup>, GENG Rong-qing<sup>1</sup>, WU Zhi-jun<sup>1,2,3</sup>, ZHANG Hua<sup>1,2,3</sup> (1. School of Pharmacy, Yancheng Teachers University, Yancheng 224007, Jiangsu, China; 2. Jiangsu Province Engineering Research Center of Tumor Targeted Nano Diagnostic and Therapeutic Materials, Yancheng Teachers University; 3. Yancheng Engineering Technology Research Center of Antibody Drugs and Immunodetection)

**【Abstract】** **Objective** To express and purify the EV71 structural protein VP1 using a prokaryotic expression system and optimize the conditions of renature process. **Methods** EV71 VP1 gene was amplified by RT-PCR and was cloned into pET-28a prokaryotic expression vector by using homologous recombination. Then, the recombinant plasmid was transformed into *Escherichia coli* Rosetta (DE3) competent cells. After induced with IPTG, denatured and renatured were performed. VP1 protein was purified by His nickel column affinity chromatography and then the immunogenicity of VP1 protein was detected by SDS-PAGE and Western blot. **Results** EV71-VP1 gene with the size of 891 bp was successfully amplified and the prokaryotic recombinant plasmid pET-28a-EV71-VP1 was successfully constructed. The VP1 protein was successfully expressed by IPTG induction. **Results** Showed that the recombinant VP1 protein was expressed in the form of inclusion bodies. After the inclusion bodies were renatured and separated by SDS-PAGE, the purified target protein was obtained by nickel column purification. **Conclusion** In this study, we constructed the prokaryotic recombinant plasmid pET-28a-EV71-VP1 and VP1 protein was successfully expressed in the form of inclusion bodies. The induced temperature, time and IPTG concentration were also investigated. Then, VP1 protein was successfully renatured and purified which laid a certain foundation for the in-depth research and development of EV71 VP1 protein.

**【Key words】** Enterovirus 71; vp1 gene; construction of prokaryotic vector; protein expression and purification

<sup>\*\*\*</sup>肠道病毒 71 型(enterovirus type 71, EV71)于 1969 年从美国加州患有中枢神经系统疾病婴儿的粪便标本中首次被分离出来<sup>[1-2]</sup>。EV71 可侵入中枢神经系统引起神经系统疾病, 作为嗜神经性病毒, 同时也是引发婴幼儿手足口病(Hand, foot, and mouth disease, HFMD)的主要病原体之一, 其感染性强且致病率高<sup>[3-4]</sup>。手足口病主要发生在 5 岁以下幼儿, 其症状主要包括溃疡口、斑丘疹或手掌和足底出现水疱样皮疹<sup>[5]</sup>。在过去的十年中, 手足口病由于爆发频率和

**【基金项目】** 国家自然科学基金项目(No. 32272995); 郑州大白生物科技有限公司横向课题(No. 203120066); 江苏省肿瘤靶向纳米诊疗材料工程研究中心开放基金资助(No. JETNM202207); 盐城师范学院科研启动基金(No. 204120019, No. 204120020); 江苏省高等学校大学生创新训练项目(No. 202210324040Z, No. 202210324270H)。

**【通讯作者】** 张华, E-mail: zhangh01@yctu.edu.cn  
吴志军, E-mail: wuzj@yctu.edu.cn

**【作者简介】** 刘红线(2001-), 女, 贵州兴义人, 主要从事病毒分子生物学研究工作。E-mail: 2765397160@qq.com  
刘红线和王宏宇为共同第一作者。

严重程度的增加,威胁着全球的公共卫生安全,尤其是亚太地区<sup>[6]</sup>。从2008年至2012年,手足口病在我国大范围流行,其中90%的死亡率与EV71病毒有关<sup>[7]</sup>。而EV71引起的手足口病往往会导致无菌性脑膜炎、脊髓灰质炎样脊髓炎、脑炎、瘫痪、心肌损伤和肺水肿等致命并发症<sup>[8-9]</sup>。

手足口病在亚洲部分地区的流行,主要是几种EV71亚基因型的循环。EV71可分为3种基因型:A、B(亚基因型B1-B5)和C(亚基因型C1-C5)。在我国,几乎所有由EV71引起的手足口病的毒株都属于亚基因型C4,只有个别病例是由非C4株引起的<sup>[10]</sup>。目前关于非C4毒株的流行率和危险因素仍不明确,这可能会导致疫苗设计、诊断试剂开发以及疾病控制和预防策略出现偏差。我国自2008年开始研发EV71疫苗,于2015年获得国家食品药品监督管理总局批准,之后经临床验证显示有良好的安全性和免疫原性,对于EV71病毒引起的手足口病保护率可达94.8%<sup>[11]</sup>。但该疫苗对其他肠道病毒引起的手足口病无交叉保护作用,且还有潜在的表位损伤、灭活不完全及生产成本高等缺点<sup>[12]</sup>。由于肠道病毒各型之间无交叉免疫力且菌株不断变化,研发覆盖多种肠道病毒的相关疫苗迫在眉睫<sup>[13]</sup>。

EV71在人类A型肠道病毒中属小RNA病毒科肠道病毒属,其基因组为单股正链RNA,有7400个核苷酸,包含一个开放阅读框和两侧的非编码区<sup>[14]</sup>。EV71的结构是二十面体颗粒,其基因组编码一个大的前体蛋白,经病毒蛋白酶处理后,由结构蛋白(VP1、VP2、VP3和VP4)和非结构蛋白(2A、2B、2C、3A、3B、3C和3D)组装为五聚体亚单位。结构蛋白构成病毒衣壳,非结构蛋白参与病毒复制和病毒组装<sup>[15]</sup>。*vp1*基因位于2442nt-3332nt,全长891个核苷酸,可编码297个氨基酸<sup>[16]</sup>。在4种结构蛋白中,VP1是小核糖核酸病毒衣壳蛋白中最外部的免疫优势蛋白,在病毒粒子组装和感染中起核心作用,可用于病毒鉴定和进化分析<sup>[17-18]</sup>。VP1的突变影响病毒与受体的结合能力和毒性,甚至使病毒逃避宿主的免疫反应<sup>[19-20]</sup>。VP1可在EV71感染的细胞表面及HFMD患者血清中检测到,也是EV71疫苗诱导机体产生抗EV71病毒亚型交叉中和抗体的主要免疫原性抗原<sup>[21]</sup>。衣壳蛋白容易变异是无囊膜RNA病毒传播、引起疾病的重要因素,同时也是病毒疫苗研制难以成功的重要原因。VP1作为一种高度暴露的衣壳蛋白,在病毒的毒力和发病机制中起重要作用<sup>[22-23]</sup>。这将为EV71疫苗的研制及HFMD的预防与治疗提供理论依据。

本研究通过反转录PCR技术对EV71(BrCr, AB204853.1)毒株完整基因组中*vp1*序列进行扩增,

获取目的基因片段,利用无缝克隆技术连接到原核载体pET-28a上,构建原核重组质粒pET-28a-EV71-VP1,利用IPTG诱导目的蛋白的表达,利用His镍柱亲和层析进行纯化,采用Western blot技术检测其纯化情况及免疫反应性,为进一步研究VP1蛋白功能及相关抗体制备奠定实验基础。

## 材料与方法

### 1 材料

**1.1 质粒、菌种及病毒株** EV71病毒,感受态细胞DH5 $\alpha$ 和Rosseta(DE3),以及pET-28a载体由实验室保存。

**1.2 主要试剂** 异丙基- $\beta$ -D 硫代半乳糖苷(IPTG), RT-PCR试剂盒,以及EcoRI和SalI核酸内切酶购自日本TaKaRa公司;DNA胶回收试剂盒和质粒提取试剂盒购自美国Omega公司;PCR试剂盒和一步克隆同源重组试剂盒购于诺唯赞公司;蛋白酶抑制剂(PMSF),考马斯亮蓝(R250)及鼠抗His单克隆抗体购自碧云天生物技术公司;盐酸胍购自索莱宝生物科技有限公司;DNA Marker购自美国Thermo Fisher Scientific公司;EV71抗体购自美国Merck公司;Ni-NTA亲和层柱和辣根酶标记山羊抗小鼠IgG购自中杉金桥生物技术有限公司。

### 2 方法

**2.1 引物设计与合成** 根据已发表在NCBI网站上的EV71(AB204853.1)毒株完整基因组中VP1基因序列和实验室保存的pET-28a载体序列,利用无缝克隆技术,通过Primer5.0软件设计引物序列,经擎科生物技术公司进行密码子优化后合成该基因的上游引物和下游引物。上游引物:5'-ATGGGTCGCGGATCCGGATCCCAATCACATCTGCCACTCTGTCCCC-3'(EcoRI);下游引物:5'-GCGGCCGCAAGCTTGTCGACGGAGCGTAGTGATTGCCGTTCCGGCTGTGA-3'(SalI)。

**2.2 目的基因的获取** 提取EV71病毒的RNA。取RNA 1 000 ng, Oligo(dT) 1  $\mu$ L, DEPC水补足体系至6  $\mu$ L。将上述混合液放入PCR仪中,70  $^{\circ}$ C反应10 min后冰上放置3 min。随后在上述混合液中依次加入5 $\times$ M-MLV buffer 2  $\mu$ L, dNTP mixture 2  $\mu$ L, RNase Inhibitor 0.5  $\mu$ L, 逆转录酶M-MLV 0.5  $\mu$ L, DEPC水1.5  $\mu$ L。PCR反应参数:30  $^{\circ}$ C 10 min, 42  $^{\circ}$ C 1 h, 70  $^{\circ}$ C 10 min。反应结束即得到cDNA模板,以此模板PCR扩增目的基因。反应体系:模板1  $\mu$ L, Extaq聚合酶0.1  $\mu$ L, Taq buffer 3.0  $\mu$ L, dNTP 2  $\mu$ L, 上游引物0.2  $\mu$ L, 下游引物0.2  $\mu$ L, ddH<sub>2</sub>O 13.5  $\mu$ L组合体系20  $\mu$ L。PCR反应程序:94  $^{\circ}$ C预变性5

min; 94 °C 变性 45 s, 58 °C 退火 45 s, 72 °C 延伸 45 s, 共 30 次循环; 72 °C 保温 5 min。PCR 产物经 1% 琼脂糖凝胶电泳后胶回收纯化, 保存于 -20 °C 备用。

**2.3 pET-28a-EV71-VP1 原核表达载体的构建及鉴定** 于 37 °C 水浴利用 *EcoR* I 和 *Sal* I 对 pET-28a 载体切割 12 h, 回收并纯化双酶切载体片段。将目的基因产物和酶切载体片段按物质的量 3:1 的比例于 50 °C 水浴连接 15 min, 连接产物转化感受态细胞 DH5 $\alpha$ , 转化菌涂布平板后置于 37 °C 培养箱中培养 9 h。挑取单菌落, 加入液体培养基和卡那霉素 37 °C 摇床培养过夜, 用质粒试剂盒提取质粒进行双酶切鉴定, 并取 10  $\mu$ L 交由擎科生物(天津)公司测序, 对比序列正确后命名为 pET-28a-EV71-VP1, -20 °C 保存备用。

**2.4 IPTG 诱导表达** 将重组质粒 pET-28a-EV71-VP1 转化感受态细胞 Rosseta (DE3), 涂布含卡那霉素的平板, 挑取单菌落培养。在菌液 A<sub>600</sub> 值达到 0.6~0.8 时, 加入不同浓度 IPTG 诱导培养 5~9 h, 收集液菌, 4 °C、4 000 g 离心 5 min, 弃上清, 收集全菌体, 按比例加入 2  $\times$  Loading Buffer, 100 °C 煮沸 30 min, 恢复室温后 12 000 g 离心 10 min, 取上清进行 15% SDS-PAGE 电泳, 分析蛋白表达情况。

**2.5 目的蛋白可溶性分析** 确定优化的 IPTG 浓度后, 诱导培养重组菌 5~9 h, 4 °C、4 000 g 离心 15 min, 收集全菌体, 加入 PBS 重悬全菌体, 清洗菌体以除去残留的 LB 液体。清洗后的菌体沉淀用 60 ml PBS 加 1% PMSF 悬浮, 在冰浴条件下超声破碎(6 s 和 12 s 交替进行, 共 99 次)。超声破碎后于 4 °C、12 000 g 离心 10 min, 分别留取上清和沉淀, 各按比例加入 5  $\times$  Loading Buffer, 煮沸、离心后进行 15% SDS-PAGE 电泳, 分析蛋白的可溶性。

**2.6 Western blot 验证目的蛋白的免疫原性** 重组菌全菌体冰浴超声破碎上清和沉淀经 15% SDS-PAGE 凝胶电泳分离后将蛋白低温湿转于 PVDF 膜上, 用 5% 脱脂奶粉封闭 2 h, 1  $\times$  TBST 缓冲液洗膜; 加入 1:3000 比例稀释的 EV71-VP1 小鼠单克隆抗体, 低温孵育过夜, 1  $\times$  TBST 缓冲液洗膜 2 h; 加入 1:3000 比例稀释的山羊抗小鼠辣根酶标记 IgG, 孵育 2 h, 1  $\times$  TBST 缓冲液洗膜 2 h; 加入曝光液, 在曝光仪器上进行发光反应并拍照。

**2.7 包涵体变性与复性** 在优化的 IPTG 浓度下诱导的重组菌液经低温离心后收集全菌体, 超声破碎后 4 °C 离心得到包涵体。将包涵体沉淀用 50 ml Washing Buffer 重悬后超声破碎(时间和次数同方法 2.5), 4 °C、12 000 g 离心 10 min 后倒掉上清液; 沉淀用 30 ml Washing Buffer 重悬后同上超声破碎, 离心, 弃上清; 沉淀中加入 30 ml Resuspension Buffer 重悬,

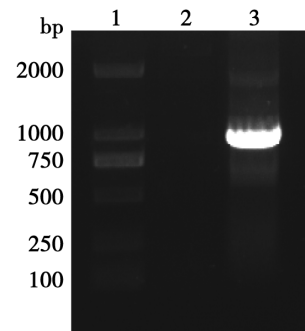
同上超声破碎后离心, 弃上清; 取沉淀, 称重后加入含有 30 mg/ml 盐酸胍的 Dissolution Buffer 4 °C 搅拌溶解, 弃去沉淀得到包涵体变性溶液。将包涵体变性后的 Dissolution Buffer 液体放入合适大小的透析袋中, 用 5 mol/L 盐酸胍复性溶液 4 °C 透析静置 6 h。之后按梯度更换 4、3、2、1 mol/L 盐酸胍复性溶液, 继续 4 °C 透析静置 6 h, 在 1 mol/L 盐酸胍复性溶液透析后多次更换 Refolding Buffer, 充分低温透析后收集复性溶液。取变、复性前后样品进行 SDS-PAGE 电泳验证。

**2.8 His 镍柱纯化目的蛋白** 用 20% 的乙醇加填料组装层析柱, 静置 20 min, 将液体放出, 加入 5 倍柱体积的去离子水洗涤, 之后加入 10 倍柱体积的平衡缓冲液平衡层析柱。取复性的目的蛋白溶液用孔径 0.45  $\mu$ m 的滤膜过滤, 过滤后上柱, 使用不同浓度的低浓度咪唑洗脱杂蛋白, 再使用高浓度的咪唑洗脱目的蛋白, 采用 SDS-PAGE 电泳分析蛋白纯化效果。

## 结果

### 1 VP1 基因的扩增

将 EV71 病毒 RNA 反转录 cDNA 作为模板, 经 PCR 扩增得到 891 bp 的 *vp1* 基因片段, 与预期大小一致(图 1)。



1 DNA 标志物 2 空质粒对照 3 EV71-VP1 基因扩增产物

图 1 VP1 基因的 PCR 扩增

1 DNA marker 2 Mock 3 EV71-VP1 gene amplification product

Fig. 1 Acquisition of VP1 Gene

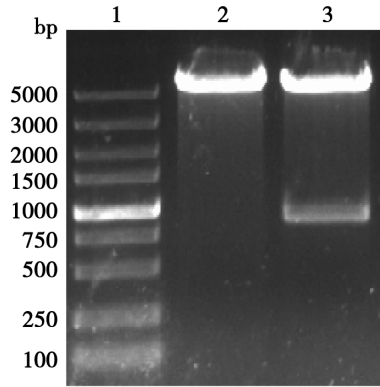
### 2 重组质粒 pET-28a-EV71-VP1 的构建及鉴定

pET-28a 载体经双酶切后与目的基因产物连接, 连接产物转化感受态细胞 DH5 $\alpha$ , 培养后提取质粒进行双酶切鉴定, 得到大小约为 5 400 bp 的载体片段和 891 bp 的目的基因片段, 与预期相符(图 2)。对重组质粒测序, 结果表明 EV71-VP1 与原核载体 pET-28a 连接正确, 重组原核质粒 pET-28a-EV71-VP1 构建成功。

### 3 重组蛋白的诱导表达

将重组质粒 pET-28a-EV71-VP1 转化入大肠埃希菌, 分别用 0.1、0.2、0.3、0.4 mmol/L 浓度的 IPTG

诱导培养。收集菌体后低温离心,收集全菌体,煮沸处理后取上清进行 15% SDS-PAGE 电泳分析,蛋白成功表达,与预期一致(图 3)。

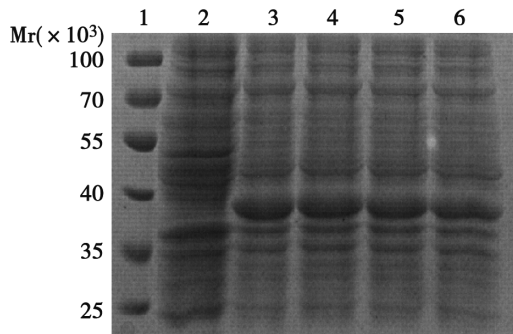


1 DNA 标志物 2 pET-28a 载体 3 pET-28a-EV71-VP1 双酶切

图 2 重组载体 pET-28a-EV71-VP1 双酶切鉴定

1 DNA marker 2 pET-28a vector 3 pET-28a-EV71-VP1 digestion product

Fig. 2 Identification of pET-28a-EV71-VP1 vector by double enzyme digestion analysis



1 蛋白分子质量标准 2 未诱导菌液 3~6 0.1~0.4 mmol/L IPTG 诱导全菌体煮沸上清

图 3 重组 VP1 蛋白的诱导表达

1 Protein marker 2 Uninduced bacterial solution 3-6 0.1-0.4 mmol/L IPTG-induced whole cells

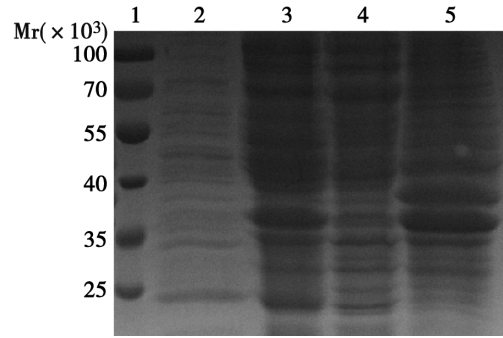
Fig. 3 Expression of recombinant VP1 protein

#### 4 VP1 蛋白的可溶性分析

将未加入 IPTG 诱导及 IPTG 诱导的菌液低温离心,收集全菌体,冰浴超声破碎后离心,分别取上清和沉淀进行 15% SDS-PAGE 凝胶电泳,结果如图 4。目的蛋白主要存在于包涵体中。

#### 5 VP1 蛋白的免疫反应性

重组菌经 IPTG 诱导后低温离心,收集全菌体,冰浴超声破碎、离心,分别收集上清和沉淀,经 SDS-PAGE 电泳后转 PVDF 膜,用脱脂奶粉封闭,分别以鼠抗 EV71 单抗、His 标签鼠单抗为一抗,以辣根酶标记山羊抗小鼠抗体为二抗进行 Western blot,结果如图 5、6。VP1 蛋白主要在包涵体中表达,且能被相应抗体识别,即具有免疫原性。

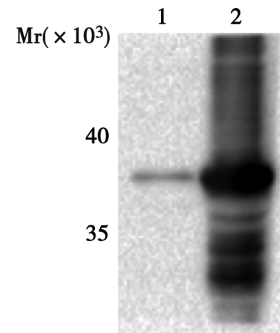


1 蛋白分子质量标准 2 未诱导重组菌超声破碎上清 3 未诱导重组菌超声破碎沉淀 4 IPTG 诱导重组菌超声破碎上清 5 IPTG 诱导重组菌超声破碎沉淀

图 4 重组质粒 pET-28a-EV71-VP1 蛋白可溶性分析

1 Protein marker 2 Supernatant after breaking uninduced bacterial liquid 3 Precipitation after breaking uninduced bacterial liquid 4 The supernatant after the disruption of the IPTG-induced bacterial solution 5 The precipitation after the disruption of the IPTG-induced bacterial solution

Fig. 4 Solubility analysis of VP1 protein pET-28a-EV71-VP1

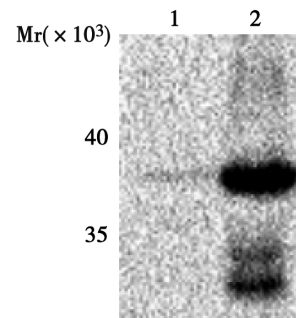


1 IPTG 诱导重组菌超声破碎上清与 VP1 抗体反应条带 2 IPTG 诱导重组菌超声破碎沉淀与 VP1 抗体反应条带

图 5 重组蛋白的 VP1 抗体-Western blot 检测

1 IPTG induced recombinant bacteria ultrasonic crushing supernatant reaction bands with VP1 antibody 2 IPTG induced recombinant bacteria ultrasonic fragmentation precipitation reaction with VP1 antibody bands

Fig. 5 Detection of VP1 protein with Western blot probed with VP1 antibody



1 IPTG 诱导重组菌超声破碎上清与 His 抗体反应条带 2 IPTG 诱导重组菌超声破碎沉淀与 His 抗体反应条带

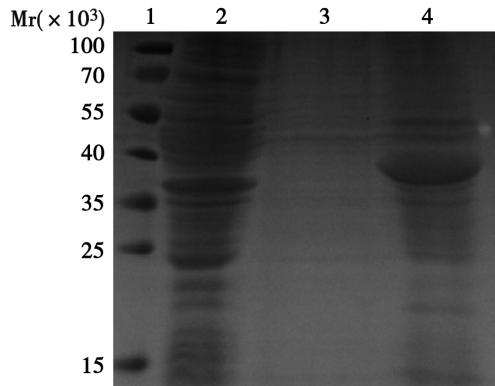
图 6 重组蛋白的 His 抗体-Western blot 检测

1 IPTG-induced ultrasonic crushing supernatant of recombinant bacteria reacted with His antibody bands 2 IPTG-induced recombinant bacteria were ultrasonically broken and precipitated to react with His antibody bands

Fig. 6 Detection of VP1 protein with Western blot probed with His antibody

## 6 包涵体变、复性

IPTG 诱导后的重组菌超声破碎后取沉淀,经 Washing Buffer、Resuspension Buffer 及 Dissolution Buffer 变性后用含不同浓度盐酸胍的 Refolding Buffer 透析复性,得到目的蛋白。取变、复性前后样品进行 15% SDS-PAGE 电泳分析,结果如图 7。包涵体蛋白变、复性成功。



1 蛋白分子质量标准 2 IPTG 诱导后全菌体 3 包涵体变性后液体 4 复性后液体

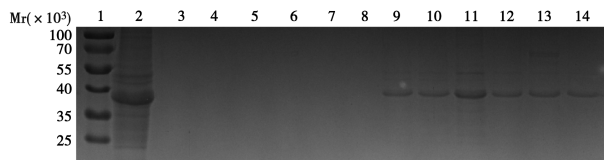
图 7 包涵体变、复性

1 Protein marker 2 Whole cells after IPTG induction 3 Liquid after denaturation of inclusion bodies 4 Liquid after renaturation

Fig. 7 Renaturation of VP1 from Inclusion body

## 7 重组蛋白的 His 镍柱亲和层析纯化

将复性后的重组蛋白溶液过滤后进行 Ni-NTA 亲和层析纯化,收集不同浓度咪唑洗脱的目的蛋白样品,通过 SDS-PAGE 电泳分析纯化效果,结果如图 8。柱层析得到单一电泳条带的纯化重组蛋白。



1 蛋白分子质量标准 2 上柱前样品 3 上柱后样品 4~6 缓冲液 7~9 20 mmol/L 咪唑洗脱液 10~14 200 mmol/L 咪唑洗脱液

图 8 VP1 蛋白的 His 镍柱亲和层析纯化

1 Protein marker 2 Pre-column sample 3 Post-column sample 4-6 Buffer 7-9 20 mmol/Limidazole elution 10-14 200 mmol/L imidazole elution

Fig. 8 Purification of VP1 by His Nickel Column Affinity Chromatography

## 讨论

目前, EV71 仍是引起手足口病的主要病原体<sup>[24]</sup>。在目前诊断、治疗方法有限的情况下,使用 EV71 疫苗是预防由 EV71 病毒引起手足口病的关键,但鉴于手足口病流行病学的变化,针对多种病毒设计的多价手足口病疫苗仍是研究的热点<sup>[25-26]</sup>。由于 VP1 在 EV71

病毒衣壳蛋白的最外部,有很多相对独立的抗原表位且能直接决定病毒的抗原性,故 VP1 在病毒感染以及抗天然免疫等过程中都有重要意义<sup>[27-28]</sup>。

通过重组蛋白的表达纯化来研究相应病毒蛋白的功能,通常采用真核表达系统和原核表达系统,其中真核表达系统存在工艺复杂、成本较高、表达水平较低等问题。本实验采用大肠埃希菌原核表达系统进行重组蛋白的表达,该系统具有可操作性高、技术较成熟、表达量高、成本低等优点。

本研究采用 PCR 扩增出 EV71-*vp1* 基因,与 pET-28a 载体连接,构建 pET-28a-EV71-VP1 原核重组载体,转染大肠埃希菌后经 IPTG 诱导表达及 Ni-NTA 亲和层析纯化获得的 VP1 蛋白具有免疫原性。需要注意的是,利用超声破碎的方法裂解菌体时要控制超声的功率和时间,如果功率过高或者超声时间较长,会影响蛋白的活性,如果功率过低或者时间较短,会导致菌体破碎不完全,从而影响目的蛋白的产量。由于目的蛋白包涵体中表达,需要进行变性、复性,包涵体变性中的盐酸胍浓度及超声破碎功率均会影响目的蛋白变性效果。目的蛋白的透析复性操作复杂、需要时间较长。而在蛋白纯化过程中,使用不同浓度的咪唑溶液洗脱杂蛋白时,需要摸索合适的咪唑洗脱条件。由于洗脱杂蛋白时间等问题,如何提高纯化蛋白的产量仍可进一步探索研究。

## 【参考文献】

- [1] 魏容,肖光军,刘艳婷,等. 肠道病毒 71 型感染的星形胶质细胞中 EV71 3C 活性与 NF- $\kappa$ B 信号转导效率的关联 [J]. 安徽医药, 2021, 25(10):2022-2027.
- [2] Wen W, Qi Z, Wang J. The function and mechanism of enterovirus 71 (EV71) 3C protease [J]. Curr Microbiol, 2020, 77(9):1968-1975.
- [3] Huang HI, Lin JY, Chen SH. EV71 infection induces IFN $\beta$  expression in neural cells [J]. Viruses, 2019, 11(12):1121.
- [4] Wu Y, Lou ZY, Yi M, et al. Structures of EV71 RNA-dependent RNA polymerase in complex with substrate and analogue provide a drug target against the hand-foot-and-mouth disease pandemic in China [J]. Protein Cell, 2010, 1(5):491-500.
- [5] Christopher N, Carolyn Z, Dean SM, et al. Hand-foot-and-mouth disease: a new look at a classic viral rash [J]. Curr Opin Pediatrics, 2015, 27(4):486-491.
- [6] XX, W, JS, et al. A sensor-adaptor mechanism for enterovirus uncoating from structures of EV71 [J]. Nat Struct Mol Biol, 2012, 19(4):424-429.
- [7] Luo Z, Su R, Wang WB, et al. EV71 infection induces neurodegeneration via activating TLR7 signaling and IL-6 production [J]. PLoS Pathog, 2019, 15(11):e1008142.
- [8] EJ, YJ, JH, et al. Enterovirus 71 infection and vaccines [J]. Clin Exp Vaccine Res, 2017, 6(1):4-14.

(下转 161 页)

毒性,在外部环境中生存周期长,易于保菌存活和传播,被世卫组织列为潜在的恐怖主义和生物战剂。因此,应加强对我国 Q 热的防治。

【参考文献】

[1] Eldin C, Melenotte C, Mediannikov O, et al. From Q fever to *Coxiella burnetii* infection: a paradigm change [J]. Clin Microbiol Rev, 2017, 30(1):115-190.

[2] Melenotte C, Million M, Raoult D. . New insights in *Coxiella burnetii* infection: diagnosis and therapeutic update [J]. Expert Rev Anti Infect Ther, 2020, 18(1):75-86.

[3] de Lange MMA, van der Hoek W, Schneeberger PM, et al. High *Coxiella burnetii* seroconversion rate in veterinary students, the Netherlands, 2006-2010 [J]. Emerg Infect Dis, 2020, 26(12):3086-3088.

[4] 冯淑萍, 张培培, 李春英, 等. 广西四个地市 2020 年牛、羊 Q 热流行病学调查与分析[J]. 上海畜牧兽医通讯, 2021(3):42-44.

[5] Sander WE, King R, Graser W, et al. *Coxiella burnetii* in 3 species of turtles in the Upper Midwest, United States [J]. Emerg Infect Dis, 2021, 27(12):3199-3202.

[6] Long CM, Beare PA, Cockrell DC, et al. Comparative virulence of diverse *Coxiella burnetii* strains[J]. Virulence, 2019, 10(1):133-150.

[7] 鲍翔宇. 湖南牛场蚊虫携带血液寄生虫和人畜共患病原的调查分析[D]. 长沙:湖南农业大学, 2021.

[8] 孙素荣, 王思远, 史深, 等. 新疆乌苏天山山地南坡草原革螨中立

克次体感染调查及遗传进化分析[J]. 新疆大学学报(自然科学版), 2020, 37(2):190-196.

[9] 张芳, 刘增加. 我国西北部分地区 Q 热分子流行病学调查[J]. 中国病原生物学杂志, 2011, 6(3):183-185.

[10] Newton P, Thomas DR, Reed SCO, et al. Lysosomal degradation products induce *Coxiella burnetii* virulence [J]. Proc Natl AcadSci U S A, 2020, 117(12):6801-6810.

[11] Basanisi MG, LA BG, Nobili G, et al. Detection of *Coxiella burnetii* DNA in sheep and goat milk and dairy products by droplet digital PCR in south Italy [J]. Int J Food Microbiol, 2022(366):109583.

[12] Vynograd N. Natural foci diseases as a stable biological threat [J]. Arch Immunol Ther Exp (Warsz), 2014, 62(6):445-447.

[13] Cordsmeier A, Wagner N, Luhrmann A, et al. Defying death-how *Coxiella burnetii* copes with intentional host cell suicide [J]. Yale J Biol Med, 2019, 92(4):619-628.

[14] Hartelt K, Pluta S, Oehme R, et al. Spread of ticks and tick-borne diseases in Germany due to global warming[J]. Parasitol Res, 2008(103):109-116.

[15] Kulakova NV, Khasnatinov MA, Sidorova EA, et al. Molecular identification and phylogeny of *Dermacentor nuttalli* (Acari: Ixodidae)[J]. Parasitol Res, 2014, 113(5):1787-1793.

[16] 吴嘉文, 赵倩倩, 马继军, 等. 儿童急性 Q 热一例[J]. 中华传染病杂志, 2021, 39(9):569-570.

【收稿日期】 2022-09-24 【修回日期】 2022-12-01

(上接 157 页)

[9] 张满英, 吴春城, 毛乾国, 等. 以肝功能损害为主要表现的 EV71 感染 1 例报道 [J]. 医学信息, 2021, 34(19):187-188.

[10] Chen MY, He SZ, Yan Q, et al. Sporadic hand, foot, and mouth disease cases associated with non-C4 enterovirus 71 strains in Xiamen, China, from 2009 to 2018 [J]. Arch Virol, 2021, 166(8):2263-2266.

[11] XZ, QX, ZH, et al. Viral shedding in patients with hand, foot and mouth disease induced by EV71, CA16, or CA6: A protocol for systematic review and meta analysis [J]. Medicine, 2020, 99(29):e21258.

[12] 曾洁媛, 殷绿洲, 王雷, 等. EV71 灭活疫苗适龄接种儿童 CVA6 血清中和抗体变化分析 [J]. 中国生物制品学杂志, 2021, 34(10):1216-1221, 1226.

[13] 王希峰, 朱大伟, 袁莎莎. EV71 疫苗对中国大陆地区儿童手足口病发病率影响间断时间序列分析 [J]. 中国公共卫生, 2021, 37(9):1418-1420.

[14] 周湧超, 徐志刚, 杨澜, 等. 小鼠抗 EV71 衣壳蛋白 VP1 单克隆抗体的制备 [J]. 细胞与分子免疫学杂志, 2018, 34(5):462-468.

[15] Luo J, Huo CL, Qin H, et al. Chimeric enterovirus 71 virus-like particle displaying conserved coxsackievirus A16 epitopes elicits potent immune responses and protects mice against lethal EV71 and CA16 infection [J]. Vaccine, 2021, 39(30):4135-4143.

[16] 于伟, 王伶, 雷露, 等. 2008-2018 年辽宁省肠道病毒 71 型流行特征与 VP1 区基因特征分析 [J]. 公共卫生与预防医学, 2019, 30(4):37-41.

[17] Kim YI, Song JH, Kwon BE, et al. Pros and cons of VP1-specific maternal IgG for the protection of Enterovirus 71 infection [J]. Vaccine, 2015, 33(48):6604-6610.

[18] Li P, Yu J, Hao F, et al. Discovery of Potent EV71 Capsid Inhibitors for Treatment of HFMD [J]. ACS Med Chem Lett, 2017, 8(8):841-846.

[19] Chang CK, Wu SR, Chen YC, et al. Mutations in VP1 and 5'-UTR affect enterovirus 71 virulence [J]. Sci Rep, 2018, 8(1):6688.

[20] Li XH, Huang Y, Sun MH, et al. Honeysuckle-encoded microRNA2911 inhibits Enterovirus 71 replication via targeting VP1 gene [J]. Antiviral Res, 2018(152):117-123.

[21] Wu CY, Yu SL, Chen YT, et al. The mature EV71 virion induced a broadly cross-neutralizing VP1 antibody against subtypes of the EV71 virus [J]. PLoS One, 2019, 14(1):e0210553.

[22] Sun HY, Gao M, Cui DW. Molecular characteristics of the VP1 region of enterovirus 71 strains in China [J]. Gut Pathog, 2020, 12:38.

[23] Tee KK, Lam TT, Chan YF, et al. Evolutionary genetics of human enterovirus 71: origin, population dynamics, natural selection, and seasonal periodicity of the VP1 gene [J]. J Virol, 2010, 84(7):3339-3350.

[24] 汤华萍. 国产肠道病毒 71 型疫苗上市后免疫效果、安全性、接种意愿及其免疫策略研究进展 [J]. 中国实用医药, 2021, 16(23):201-203.

[25] 韦跃, 谢友军, 陈月华, 等. EV71 灭活疫苗预防适龄儿童重症手足口病效果研究 [J]. 公共卫生与预防医学, 2022, 33(3):37-40.

[26] Aswathyraj S, Arunkumar G, Alidjinou EK, et al. Hand, foot and mouth disease (HFMD): emerging epidemiology and the need for a vaccine strategy [J]. Med Microbiol Immunol, 2016, 205:397-407.

[27] 李晓楠, 赵忠鹏, 段跃强, 等. EV71 型 vP1 蛋白表达、纯化及免疫原性的初步评价 [J]. 免疫学杂志, 2010, 26(3):187-190, 196.

[28] 黄薇园, 李建军, 陈旺生, 等. EV71 临床毒株分离及其 VP1 单克隆抗体制备 [J]. 中国热带医学, 2019, 19(6):512-515.

【收稿日期】 2022-10-23 【修回日期】 2022-12-15