

## 肠道病毒 71 型外壳蛋白 VP1 基因克隆、表达及活性鉴定

黄学勇 李幸乐 胡晓宁 杜燕华 许玉玲 卫海燕 陈豪敏 许汴利

【关键词】 肠道病毒 71 型; 外壳蛋白 VP1; 原核表达; 抗原性

**Cloning, expression and activity determination of capsid protein VP1 of enterovirus type 71** HUANG Xue-yong, LI Xing-le, HU Xiao-ning, DU Yan-hua, XU Yu-ling, WEI Hai-yan, CHEN Hao-min, XU Bian-li. Institute for Infectious Disease Control and Prevention, Henan Provincial Center for Disease Control and Prevention, Zhengzhou 450016, China

Corresponding author: XU Bian-li, Email: xubl@hncdc.com.cn

This work was supported by grants from the Science and Technology Bureau of Henan Province (No. 122102310268), the Henan Provincial Medical Science Project (No. 201001015) and the Young Medical Science and Technology Innovation Talents Project of Henan Province.

【Key words】 Enterovirus type 71; Capsid protein VP1; Prokaryotic express; Antigenicity

肠道病毒 71 型 (EV71) 和柯萨奇病毒 A 组 16 型 (CoxA16) 是引起手足口病最为常见肠道病毒, 其中 EV71 是引起当前我国手足口病的病原优势株<sup>[1]</sup>。目前临床对 EV71 感染以对症治疗为主, 尚无有效的抗病毒药物, 研制安全有效的疫苗和早期诊断试剂是预防控制手足口病疫情的经济有效地措施, 为此进行以下相关研究。

#### 1. 材料与与方法:

(1) 材料: EV71/Henan/106/2009 分离株 (HQ998852.1) 由本实验室从郑州市手足口病患儿粪便标本中分离并保种。手足口病患儿急性期血清和健康儿童血清标本采集于郑州市儿童医院。

#### (2) 方法:

① VP1 基因克隆: 参照 EV71/Henan/106/2009 河南分离株序列, 利用生物学软件 Primer 5.0 设计 EV71 的 VP1 基因 PCR 引物: 上游 5'-CGG GAT CCA TGG GAG ATA GGG TGG CAG-3'; 下游 5'-CGC CTG CAG TTA AAG AGT GGT GAT CGC-3', 分别在上、下游引物引入 *Bam*H I 和

*Pst* I 酶切位点。常规培养人横纹肌肉瘤细胞生长成单层后接种 EV71, 待细胞病变效应达到 +++ 以上收集细胞, 用病毒基因组 RNA 提取试剂盒提取总 RNA, 反转录为 cDNA, 以 cDNA 模板进行 PCR 扩增, 使用 1.2% 琼脂糖凝胶对 PCR 产物进行电泳分析, 特异性扩增片段经 DNA 纯化试剂盒回收后克隆至 pMD<sup>®</sup>18-T Vector, 转化 JM109 感受态细胞, 重组克隆载体经特异性 PCR 和测序鉴定。

② VP1 表达质粒构建: 质粒提取试剂盒提取重组载体 pMD18-EV71-VP1 和表达质粒 pMAL-c2X, 分别用 *Bam*H I 和 *Pst* I 双酶切, 酶切产物用凝胶回收试剂盒纯化回收目的片段。VP1 与 pMAL-c2X 酶切产物以 6:1 的 mol 比例混合, T4 DNA 酶 16 °C 过夜连接, 转化 TB1 感受态细胞, 于含 X-gal 和 IPTG 的 LB 氨苄青霉素固体培养基上培养。挑选白色菌落, 接种于 LB 液体培养基中培养, 提取质粒进行单、双酶切和 PCR 扩增鉴定。

③ 目的基因的诱导表达与 SDS-PAGE 分析: 将已鉴定为阳性表达克隆的 2 ml 菌液加入到 200 ml LB 液体培养基中, 37 °C, 240 r/min, 摇菌 1.5 h, 加入终浓度为 0.4 mmol/L 的 IPTG, 诱导表达 5 h。取菌液样品 1 ml 离心, 弃上清, 加入 100 μl 2× SDS-PAGE 上样缓冲液, 于 100 °C 水浴 5 min, 离心后取 10 μl 上清加样。采用 0.5 mg/L 的浓缩胶和 1.2 mg/L 的分离胶电泳, 凝胶用考马斯亮蓝 R250 染色。将诱导 TB1 (pMAL-c2X-hpaA) 菌液离心, 弃上清, -80 °C 冻存过夜, PBS 洗沉淀后, 重悬于 20 ml Coloum buffer 中, 冰水浴中超声破碎, 取上清通过蛋白纯化仪 (型号: AKTApurifier 10/100)、Amyloss 树脂预装柱纯化重组 VP1 蛋白, 紫外分光光度计测定样品蛋白含量。

④ 重组 VP1 蛋白 Western blot 分析: 纯化样品进行 SDS-PAGE 电泳后, 凝胶和硝酸纤维素膜于半干式电转印仪中转印。硝酸纤维素膜经封闭后, 与手足口病患儿血清 (1:50) 反应 2 h, 再与羊抗人血清 (1:2000) 反应 1 h, 二氨基联苯胺显色, 同时以健康儿童血清为对照。

#### 2. 结果:

(1) VP1 基因克隆与测序鉴定: 重组克隆载体经 PCR 方法检测鉴定阳性克隆, 进行 DNA 测序证实获得 VP1 基因核苷酸序列与 EV71/Henan/106/2009 分离株基因组相应序列完全一致。

(2) VP1 重组表达质粒构建及鉴定: 重组表达质粒分别用 *Bam*H I 和 *Pst* I 单、双酶切、以及 PCR 扩增均获得相应大小的 DNA 片段, 表明重组表达质粒 pMAL-c2X-EV71-VP1

DOI: 10.3760/cma.j.issn.0254-6450.2013.05.029

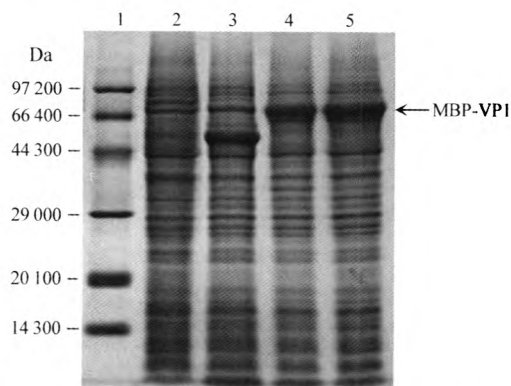
基金项目: 河南省科技攻关计划 (122102310268); 河南省医学科技重大攻关项目 (201001015); 河南省卫生科技创新型人才工程中青年科技创新人才项目

作者单位: 450016 郑州, 河南省疾病预防控制中心

通信作者: 许汴利, Email: xubl@hncdc.com.cn

构建成功。

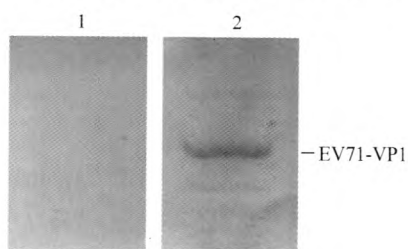
(3) 诱导表达产物的 SDS-PAGE: 将重组菌 TB1 (PMAL-c2X-EV71-VP1) 和对照菌 TB1 (PMAL-c2X) 以及 TB1 诱导后的粗提蛋白进行 SDS-PAGE 电泳, 发现重组细菌在相对分子质量 71 500 (Da) 处出现一条特异蛋白带, 是标签蛋白 MBP (42 500 Da) 与 VP1 (29 000 Da) 的总和 (图 1)。经纯化获得重组 VP1 蛋白, 紫外分光光度计测定样品蛋白浓度约为 0.136 mg/ml。



注: 1: protein marker; 2: *E. coli* TB1 诱导; 3: TB1 (pMAL-c2X) 诱导; 4, 5: TB1 (pMAL-c2X-EV71-VP1) 诱导

图 1 TB1 (pMAL-c2X-EV71-VP1) 诱导表达产物的 SDS-PAGE 分析

(4) 纯化目的蛋白 Western blot 鉴定: 纯化重组蛋白 VP1 与手足口病患儿血清进行 Western blot 分析, 在约 71 500 Da 处出现单一的反应带, 而健康儿童血清对照未出现任何条带 (图 2), 证实纯化后获得目的蛋白具有良好免疫活性。



注: 1: 健康儿童血清; 2: 手足口病患儿血清

图 2 纯化 EV71 重组 VP1 蛋白与儿童血清 Western blot 反应

3. 讨论: 自 2008 年我国手足口病呈持续性暴发和流行<sup>[2]</sup>, 其中以 EV71 引起的疫情和临床症状最为严重, 且早期临床表现与其他肠道病毒引起的手足口病不易区分, 由于目前实验室应用的核酸检测方法操作繁琐、周期较长、操作过程中有容易出现气溶胶污染等问题, 因此目前国内研发快速、高效、廉价简便易行和准确性优良的血清学诊断试剂是 EV71 研究的难点和热点之一。

EV71 的 VP1 可直接决定病毒的抗原性, 其主要血清特异性中和位点也存在于 VP1, 从病毒外壳蛋白分离的 VP1 蛋白可诱导动物产生针对该表位的中和性抗体, 提示该外壳蛋白分子可以成为 EV71 疫苗和临床诊断试剂研究良好的候选抗原<sup>[3,4]</sup>。本研究使用原核表达系统高效表达了 EV71 外壳蛋白 VP1, 经纯化获得具有免疫活性的 VP1 重组蛋白, 可作为 EV71 感染患者的早期、快速、可靠的血清学诊断试剂研发的候选抗原。

### 参 考 文 献

[1] Huang XY, Guo WS, Ma H, et al. Genomic characteristics of enterovirus 71 isolates, Henan province, 2009. Chin J Prov Med, 2010, 44(5):469-471. (in Chinese)  
黄学勇, 郭万申, 马宏, 等. 2009 年河南省肠道病毒 71 型基因组特征分析. 中华预防医学杂志, 2010, 44(5):469-471.

[2] Sun JL, Zhang J. A review on the advancement of epidemiology on hand-foot-mouth disease. Chin J Epidemiol, 2009, 30(9): 937-945. (in Chinese)  
孙军玲, 张静. 手足口病流行病学研究进展. 中华流行病学杂志, 2009, 30(9):937-945.

[3] Li L, He Y, Yang H, et al. Genetic characteristics of human enterovirus 71 and coxsackievirus A16 circulating from 1999 to 2004 in Shenzhen, People's Republic of China. J Clin Microbiol, 2005, 43(8):3835-3839.

[4] Bae JY, Moon SH, Choi JA, et al. Recombinant DNA and protein vaccines for foot-and-mouth disease induce humoral and cellular immune responses in mice. Immune Netw, 2009, 9(6):265-273.

(收稿日期: 2012-12-22)

(本文编辑: 张林东)