· 基础实验研究论著 ·

肠道病毒 71 型重组 VP2 蛋白原核表达及初步鉴定*

施　静，朱　冰△，钟家禹，王长兵，许甜甜
（广州医学院附属广州市妇女儿童医疗中心实验室，广东广州 510120）

摘　要：目的　利用大肠杆菌表达系统表达并纯化肠道病毒 71 型（EV71）VP2 蛋白，并对重组蛋白功能进行初步鉴定。**方法**　PCR 扩增 EV71 VP2 基因，在测序正确的基础上，将其插入表达载体形成 pET32a（＋）/VP2，转化 BL21（DE3），IPTG 诱导表达，经十二烷基硫酸钠聚丙烯酰胺凝胶电泳（SDS-PAGE）初步分析蛋白表达产物，利用 Ni^+ 亲和层析柱对重组蛋白进行纯化，经 Western blot 初步验证其抗原性。**结果**　成功构建 pET32a（＋）/VP2 重组质粒，经大肠杆菌表达，纯化获得相对分子质量约为 48 000的融合蛋白，经 Western blot 证实其抗原性良好。**结论**　表达并鉴定了 VP2 抗原，为 EV71 疫苗研制及检测试剂盒的研发奠定了基础。

关键词：肠道病毒 71 型；　VP2 蛋白；　原核表达
DOI：10.3969/j.issn.1673-4130.2013.12.002　　**文献标识码：**A　　**文章编号：**1673-4130(2013)12-1494-03

Prokaryotic expression of recombinant VP2 protein of Enterovirus 71 and its preliminary identification*

Shi Jing, Zhu Bing△, Zhong Jiayu, Wang Changbing, Xu Tiantian
(Central Laboratory, Guangzhou Women and Children Medical Center Affiliated to Guangzhou Medical University, Guangzhou, Guangdong 510120, *China)*

Abstract: Objective　To expression and purify VP2 protein of Enterovirus 71(EV71) through E. coli expression system and identify the recombinant protein function preliminarily. **Methods**　EV71 on the basis of correct sequencing. BL21(DE3) was transformed and IPTG expression VP2 gene was amplify by PCR and then inserted into expression vector to form pET32a(＋)/VP2 induced. Sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis(SDS-PAGE) was used to preliminarily analyze the protein expression product, Ni^+ affinity columns were adopted to purified the recombinant protein and Western blot was employed to preliminarily validate its antigenicity. **Results**　pET32a(＋)/VP2 recombinant plasmid was successfully constructed. Purified fusion protein of relative molecular mass 48 000 was obtained through expression in E. coli and demonstrated good antigenicity by Western blot identification. **Conclusion**　Expression and identification of VP2 antigen in the study provide a foundation for research and manufacture of EV71 vaccine and development of test kits.

Key words: Enterovirus 71;　capsid protein VP2;　prokaryotic expression

肠道病毒 71 型（EV71）是小 RNA 病毒科肠道病毒属成员，其感染主要引起患者手足口病（HFMD）[1]。大多数 HFMD 患者症状轻微，以发热和手、足、口腔等部位的皮疹或疱疹为主要症状，临床上将其归类为普通病例；少数病例（尤其是小于 3 岁者）病情进展迅速，在发病 1～5 d 出现脑膜炎、脑炎（以脑干脑炎最为凶险）、脑脊髓炎、肺水肿、循环障碍等，极少数病例病情危重，可致死亡，存活病例可能留有后遗症，临床上将这类神经系统累及的患者划分为重症病例[2-3]。近几年在亚太地区的大流行中，严重中枢神经系统感染病例常有报道，甚至出现暴发性死亡[4-5]。目前 EV71 已取代脊髓灰质炎病毒成为最主要的婴幼儿中枢神经病毒病原。由于大多数患儿就诊时已经发生了不可逆的脑损伤，即使有效对抗 EV71 的药物研制成功，也不能使 EV71 感染后遗症得到很好的改观[6]，所以疫苗是唯一有效的控制措施。本研究利用大肠杆菌表达目前流行的 C4 亚型的外壳蛋白 VP2，并对重组蛋白 VP2 的功能进行了初步鉴定，旨在为 EV71 疫苗的研究和检测试剂盒的研发奠定基础。

1　材料与方法

1.1　材料　EV71 株、RD 细胞、pET32a（＋）由本实验室保存；RNA 反转录酶、DNA 聚合酶、PMD19-T 载体、DH5a 感受态细胞、限制性内切酶、T4DNA 连接酶、DL2000 DNA 标记物购自大连宝生物工程有限公司；DNA 凝胶电泳回收试剂盒和质粒提取试剂盒购自 Omega 公司；DS10000 DNA 标记物购自东盛公司；BL21（DE3）购自天根生化科技有限公司；Fermentas 预染标记物购自广州赛哲生物科技有限公司；其他试剂均为进口或国产分析纯。

1.2　方法

1.2.1　目的基因选择及引物设计　用 BLAST 比对 EV71 的 VP2 基因序列，利用 Primer Premier 5.0 软件设计扩增 VP2 全长基因片段的引物，在上游引物 5′端引入 BamH Ⅰ 酶切位点（GGATCC），下游引物 5′端引入 Hind Ⅲ 酶切位点（AAGCTT）。序列如下：上游引物 EV71/VP2-F 5′-CGT GGA TCC TCC CCA TCC GCT GAG-3′；下游引物 EV71/VP2-F 5′-CCC AAG CTT TTG CGT GAC TGC CTG-3′，引物由英潍捷基上海贸易有限公司合成。

1.2.2　EV71 总 RNA 提取及目的基因的扩增　常规培养 RD 细胞，待细胞生长成单层后，以 100 倍半数细胞培养物感染量（$TCID_{50}$）EV71 接种细胞 3～4 d，待细胞出现明显病变时收获待用。试剂盒提取总 RNA，以 Random 9 mers 为引物反转录成 cDNA，反转录条件为 30 ℃ 10 min，42 ℃ 30 min，99 ℃ 5 min，5 ℃ 5 min 终止反应。以 cDNA 为模板扩增 EV71 VP2 序列，PCR 的反应体系为 25 μL，扩增条件为 94 ℃预变性 5

* 基金项目：国家自然科学基金资助项目（30972630）。　作者简介：施静，女，硕士研究生在读，主要从事肠道病毒研究。　△ 通讯作者，E-mail：zhubing0327@163.com。

min，94 ℃ 45 s，54 ℃ 45 s，72 ℃ 1 min 20 s 32 个循环，72 ℃ 延伸 10 min。PCR 产物经 1.5%琼脂糖凝胶电泳，用胶回收试剂盒回收约 780 bp 左右的目的片段。

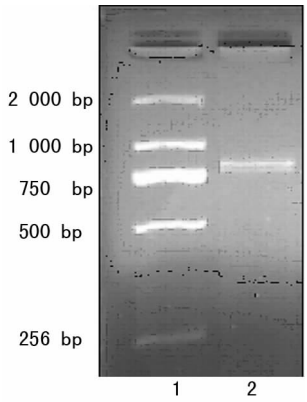
1.2.3 原核表达质粒的构建及鉴定　将回收片段连接于 PMD19-T 载体，转化 DH5a 感受态菌株，涂布于 LB 平板（氨苄西林 100 μL/mL），挑取单克隆菌落接种于含 LB 培养基（氨苄西林 50 μL/mL）的试管，37 ℃培养过夜，提取质粒做 BamH Ⅰ和 HindⅢ双酶切鉴定，鉴定正确后用胶回收试剂盒进行回收，同时将 pET32a(＋)以 BamH Ⅰ和 HindⅢ双酶切，琼脂糖凝胶电泳后行胶回收，用 T4 DNA 连接酶 16 ℃过夜连接，转入 BL21(DE3)感受态菌株，用 PCR 方法或双酶切鉴定，鉴定正确的送公司测序。

1.2.4 EV71 VP2 蛋白的表达和纯化　将测序正确的菌液按 1∶1 000 的比例接种于 LB 培养基，37 ℃震荡（200 r/min）培养过夜。次日以 1∶100 的比例转接于新鲜 LB 培养液中，37 ℃震荡培养至 A_{550}＝0.8，加入终浓度为 1 mmol/L 的 IPTG 改以 30 ℃震荡，4 h 后收集菌液，6 000 r/min离心 10 min，收集菌体后用 PBS 将菌体沉淀洗涤 2～3 遍，冰浴超声，超声后 6 000 r/min 离心，各取 10 μL 上清和沉淀，分别与 10 μL 2×SDS 凝胶加样缓冲液混合，100 ℃加热 3 min，室温高速离心 1 min，取 10 μL 上样 SDS-PAGE 电泳，考马斯亮蓝染色，靶蛋白以包涵体的形式表达，主要分布于沉淀中，用 Ni-NTA 树脂进行纯化。纯化方法按试剂盒说明书进行。

1.2.5 免疫印迹分析　取纯化后的 VP2 蛋白经 10% SDS-PAGE 电泳分离后转移至硝酸纤维素膜，用 5%脱脂奶粉 4 ℃封闭过夜，用 PBST 冲洗 NC 膜 3 次每次洗 10 min，加入按 1∶500 稀释的 EV71 IgM 阳性的患者血清，再用 PSST 冲洗，加入辣根过氧化物酶标记的羊抗人 IgM 37 ℃孵育 1 h，再用 PBST 冲洗后 DAB 显色。

2 结　　果

2.1 目的基因扩增　以病毒 cDNA 作为模板，特异性扩增病毒基因组 VP2 区获得大小约为 780 bp 的片段，见图 1。

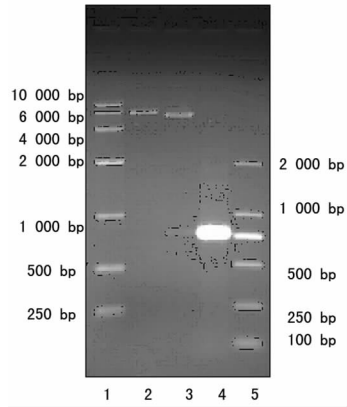


1：DL2000 DNA 标记物；2：化学合成的 VP2 片段。

图 1　EV71 VP2 目的基因的扩增

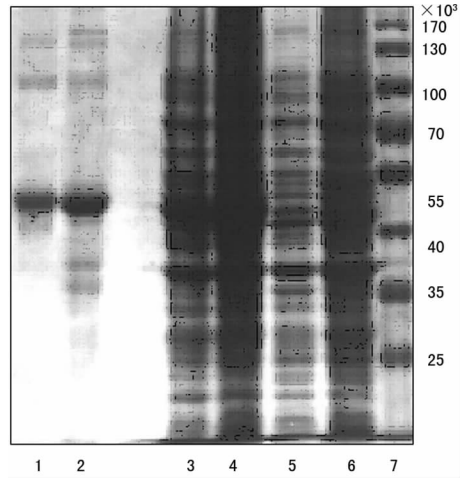
2.2 原核表达质粒的构建及鉴定　PCR 产物进行 TA 克隆后，经 BamH Ⅰ和 HindⅢ酶切位点克隆入 PET32a(＋)原核表达载体，构建 pET32a(＋)/VP2 重组质粒，该质粒经 BamH Ⅰ和 HindⅢ双酶切后，经 1%琼脂糖凝胶电泳结果显示，在 770 bp 和 5 900 bp 获得电泳带，大小与 VP2 及载体片段长度一致，将酶切鉴定正确的重组质粒送公司测序，测序结果正确。见图 2。

2.3 目的蛋白的表达及纯化　30 ℃ 0.1 mmol/L IPTG 诱导 4 h 后，含重组质粒的诱导菌经 SDS-PAGE 凝胶电泳，在相对分子质量约为 48×10^3 处出现阳性条带，表达目的蛋白采用 Ni^+ 亲和层吸柱分离纯化，经 0.2 mol/L 咪唑洗脱的流出液在 48×10^3 处有明显的目的条带。见图 3。



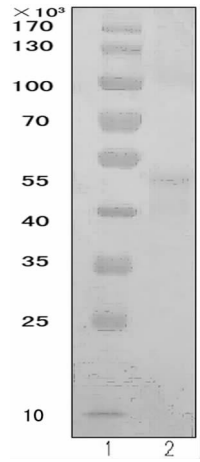
1：DS10000 DNA 标记物；2：HindⅢ 单酶切 pET32a(＋)/VP2；3：BamH Ⅰ、HindⅢ双酶切 pET32a(＋)/VP2；4：pET32a(＋)/VP2PCR 产物；5：DL2000 DNA 标记物。

图 2　重组质粒 pET32a(＋)/VP2 的 PCR 和酶切鉴定



1：0.2 mol/L 咪唑洗脱纯化后的 VP2 重组蛋白；2：0.1 mol/L 咪唑洗脱纯化后的 VP2 重组蛋白；3：IPTG 诱导 4 h 所得 pET32a(＋)/EV71 VP2 重组蛋白；4：IPTG 诱导过夜所得 pET32a(＋)/EV71 VP2 重组蛋白；5：未加 IPTG 通气培养的 pET32a(＋)/EV71 VP2；6：IPTG 诱导 8 h 所得 pET32a(＋)/EV71 VP2 重组蛋白；7：Fermentas 预染标记物。

图 3　重组 pET32a(＋)/EV71 VP2 蛋白的 SDS-PAGE 分析



1：Fermentas 预染标记物；2：EV71 VP2 重组蛋白。

图 4　Western blot 检测 EV71 IgM 阳性血清与 EV71 VP2 重组蛋白的结合反应

2.4　重组蛋白 Western blot 鉴定　以患者 EV71 阳性血清为一抗(1∶500),以 HRP 标记的羊抗人 IgM(1∶5 000)为二抗,在 48×10^3 处出现阳性条带。见图 4。

3　讨　　论

自 1974 年 Schmidt 等[7]首次报道从表现为中枢神经系统症状的患者标本中分离到 EV71 后,EV71 的流行在不同的国家或地区相继被报道,近十年来 HFMD 在亚太地区的发病率显著增加,而在过去 3 年,中国 HFMD 流行的持续增加,已经使其成为不可忽视的公共健康问题,由于缺乏有效的针对重症 EV71 感染的抗病毒药物,发展预防 HFMD 的有效疫苗成为控制 EV71 感染的首选。

EV71 病毒颗粒为 20 面体立体对称的球形结构,无包膜和突起,直径 24～30 nm。病毒衣壳由 60 个亚单位构成,每个亚单位是由 4 种衣壳蛋白(VP1～VP4)组装而成,其中 VP4 位于衣壳的内侧,VP1～VP3 均暴露在病毒颗粒的表面,带有中和抗原位点,因而抗原决定簇主要位于这 3 种结构蛋白上[8]。

以往用动物感染模型开发疫苗的研究中,发现多数中和抗体是由位于 VP1 蛋白上的抗原决定簇所引起,因而大部分相关研究均集中于 VP1 蛋白,然而 VP2 和 VP3 作为 EV71 病毒颗粒的重要组分,暴露在 EV71 病毒衣壳的外部存在一定的免疫压力,在感染过程中它们必然会引起一定的免疫反应。

急性病毒感染时都会产生一定抗原决定簇诱导的 IgM 反应(IgM 反应作为早期疾病诊断的重要标志)。然而几乎所有已知的位于 VP1 的抗原决定簇仅是诱导 IgG 反应,而 IgG 作为保护性抗体出现在 IgM 之后,两者相比较,IgM 出现早消失快,IgG 出现晚消失慢,血清学诊断 EV71 IgG 阳性的病例往往有一部分为既往隐性感染的儿童,EV71 急性期感染的确诊主要还是依靠 IgM,IgM 对于早期诊断更有意义。已有相关文献报道,IgM 的抗原决定簇主要位于 VP2 和 VP3 衣壳蛋白上,VP1 上仅有 1 个引出强烈 IgM 反应的多肽位点,而另一个位于 VP1 的多肽位点本研究采用 pET32a(+)/BL21 大肠杆菌表达体系高效表达的 EV71 衣壳蛋白 VP2,获得具有诊断价值的重组 VP2 抗原,Western blot 实验的阳性结果,确认 VP2 抗原上有与 EV71 IgM 抗体结合的位点,进一步确认了 VP2 上存在 IgM 的抗原决定簇,IgM 在病毒感染后出现较早,是 EV71 急性期感染的一个重要指标,本研究成功表达了具有 EV71 病毒 IgM 抗原决定簇的 VP2 蛋白,为进一步研制用于临床 EV71 病毒感染早期血清学诊断的试剂盒及病毒疫苗的研制提供了参考。

参考文献

[1] Palacios G, Oberste MS. Enteroviruses as agents of emerging infectious diseases[J]. J Neurovirol, 2005, 11(5): 424-433.

[2] Kiener TK, Jia Q, Lim XF, et al. Characterization and specificity of the linear epitope of the enterovirus 71 VP2 protein[J]. Virol J, 2012, 9(1): 55.

[3] Yamayoshi S, Fujii K, Koike S. Scavenger receptor b2 as a receptor for hand, foot, and mouth disease and severe neurological diseases[J]Front Microbiol, 2012, 3(1): 32.

[4] Chan LG, Parashar UD, Lye MS, et al. Deaths of children during an outbreak of hand, foot, and mouth diease in Sarawak, Malaysia: clinical and pathological characterisics of the disease[J]. Clin Infect Dis, 2000, 31(3): 678-683.

[5] 朱冰,钟家禹,夏慧敏,等. 2008 年广州地区手足口病的病原学研究[J]. 中华儿科杂志, 2010, 48(2): 127-130.

[6] Wang SM, Liu CC, Tseng HW, et al. Clinical spectrum of enterovirus 71 infection in children in southern Taiwan, with an emphasis on neurological[J]. Lancet, 1999, 354(9191): 1682-1686.

[7] Schmidt NJ, Lennette EH, Ho HH. An apparently new enterovirus isolated from patient with disease of the central nervous system [J]. J Infect Dis, 1974, 129(3): 304-309.

[8] 金奇. 医学分子病毒学[M]. 北京:科学出版社, 2001: 606-613.

[9] Gao F, Wang YP, Mao QY, et al. Enterovirus 71 viral capsid protein linear epitopes: Identification and characterization[J]. Virol J, 2012, 9(1): 26.

(收稿日期:2013-01-07)

(上接第 1493 页)

nodulation-cell division-type efflux pump involved in aminoglycoside resistance in Acinetobacter baumannii strain BM4454[J]. Antimicrob Agents Chemother, 2001, 45(12): 3375-3380.

[16] Hornsey M, Ellington MJ, Doumith M, et al. AdeABC-mediated efflux and tigecycline MICs for epidemic clones of Acinetobacter baumannii[J]. J Antimicrob Chemother, 2010, 65(8): 1589-1593.

[17] Damier-Piolle L, Magnet S, Brémont S, et al. AdeIJK, a resistance-nodulation-cell division pump effluxing multiple antibiotics in Acinetobacter baumannii [J]. Anti-microb Agents Chemother, 2008, 52(2): 557-562.

[18] Chau SL, Chu YW, Houang ET. Novel resistance-nodulation-cell division efflux system AdeDE in Acinetobacter genomic DNA group 3[J]. Antimicrob Agents Chemother, 2004, 48(10): 4054-4055.

[19] 董涛,王睿,童卫杭,等. 51 株鲍曼不动杆菌耐药表型及外排蛋白基因表达研究[J]. 中国药房, 2007, 18(13): 979-981.

[20] 张静萍,朱婉,褚云卓,等. 鲍曼不动杆菌多重耐药性与主动外排机制的相关性研究[J]. 中华微生物学和免疫学杂志, 2009, 29(3): 244-247.

[21] 林丽,周岐新,凌保东. 鲍曼不动杆菌主动外排系统 Ade ABC、Ade IJK 与多重耐药相关性[J]. 中国抗生素杂志, 2009, 34(2): 100-103.

[22] Kong F, Gilbert GL. Multiplex PCR-based reverse line blot hybridization assay (mPCR/RLB)--a practical epidemiological and diagnostic tool[J]. Nat Protoc, 2006, 1(6): 2668-2680.

[23] Wang Y, Kong F, Yang Y, et al. A multiplex PCR-based reverse line blot hybridization(mPCR/RLB) assay for detection of bacterial respiratory pathogens in children with pneumonia[J]. Pediatr Pulmonol, 2008, 43(2): 150-159.

[24] 朱晓华,周岐新,凌保东. 鲍曼不动杆菌耐药表型与外排泵基因表达水平的研究[J]. 中国抗生素杂志, 2010, 35(2): 138-142.

(收稿日期:2013-01-05)