

中文图书分类号: R183.4
密 级: 公开
UDC: 578
学 校 代 码: 10005



博士学位论文

DOCTORAL DISSERTATION

论 文 题 目: 手足口病预防性基因工程重组疫苗的研究
论 文 作 者: 赵 淼
学 科: 生物医学工程
指 导 教 师: 曾 毅 教授
论文提交日期: 2014年6月

UDC: 578
中文图书分类号: R183.4

学校代码: 10005
学 号: B201115009
密 级: 公开

北京工业大学工学博士学位论文

题 目: 手足口病预防性基因工程重组疫苗的研究
英文题目: STUDY ON PROPHYLACTIC RECOMBINANT GENETIC ENGINEERING VACCINE AGAINST HAND FOOT AND MOUTH DISEASE

论 文 作 者: 赵 淼
学 科: 生物医学工程
研 究 方 向: 抗病毒药物和疫苗的研究
申 请 学 位: 工学博士
指 导 教 师: 曾 毅 教授
所 在 单 位: 生命科学与生物工程学院
答 辩 日 期: 2014年6月
授 予 学 位 单 位: 北京工业大学

UDC: 578
Classified code: R183.4

University code: 10005
Graduate number: B201115009
Confidential degree: Open

Dissertation for Doctor Degree in Engineering of Beijing University of Technology

Study on prophylactic recombinant genetic engineering vaccine against hand foot and mouth disease

Candidate : Zhao Miao
Major : Biomedical Engineering
Research Direction : Research on Antiviral Medicines and Vaccine
Degree : Doctor of Engineering
Supervisor : Professor Zeng Yi
Faculty : College of Life Science and Bioengineering
Date of Defense : June, 2014
University : Beijing University of Technology

独创性声明

本人声明所呈交的论文是我个人在导师指导下进行的研究工作及取得的研究成果。尽我所知,除了文中特别加以标注和致谢的地方外,论文中不包含其他人已经发表或撰写过的研究成果,也不包含为获得北京工业大学或其它教育机构的学位或证书而使用过的材料。与我一同工作的同志对本研究所做的任何贡献均已在论文中作了明确的说明并表示了谢意。

签 名: 赵 淼
日 期: 2014年6月6日

关于论文使用授权的说明

本人完全了解北京工业大学有关保留、使用学位论文的规定,即:学校有权保留送交论文的复印件,允许论文被查阅和借阅;学校可以公布论文的全部或部分内 容,可以采用影印、缩印或其他复制手段保存论文。

(保密的论文在解密后应遵守此规定)

签 名: 赵 淼 日 期: 2014年6月6日
导师签名: 曾 毅 日 期: 2014年6月6日

摘要

肠道病毒71型 (enterovirus 71, EV71) 与柯萨奇A16病毒是引起手足口病 (hand foot and mouth disease, HFMD) 的主要病原体。近年来手足口病在亚太地区的多次爆发, 使当地青少年儿童的身体健康受到严重威胁。虽然手足口病发病后病情较温和且具有一定的自愈性, 但如任由其发展也将导致严重的神经系统并发症, 更为严重者可导致死亡。我国卫生部于2008年将手足口病列为法定报告的丙类传染病。迄今为止, 防治手足口病的相应疫苗仍未上市。因此, 研发广谱高效的 手足口病疫苗意义重大。

EV71病毒是一种非包膜的RNA病毒, 隶属于小RNA病毒科 (Picornaradae) 家族, 其颗粒的直径大小约30 nm左右。EV71病毒的颗粒呈二十面体立体对称结构; 其病毒衣壳由60组多聚蛋白所组成, 每组多聚蛋白均含有4种衣壳蛋白 (VP1-VP4)。有证据显示VP1-VP3蛋白位于正二十面体核衣壳的外表面, 而VP4蛋白位于核衣壳的内部与RNA核心紧密连接。VP4蛋白长约70个氨基酸, N端豆蔻酰化。晶体结构X光衍射图分析表明: 成熟的EV71病毒颗粒其立体结构与其他肠道病毒极其相似。

本文的研究首先将EV71病毒C4型VP4蛋白N端前20个氨基酸的基因融合入乙肝病毒核心抗原 (HBcAg) 基因中, 融合后的重组基因克隆至pET-22b (+) 载体中。利用大肠杆菌表达系统分别表达HBc-N149蛋白以及HBc-N149-VP4-N20蛋白。IPTG诱导目的蛋白表达后利用Western-blot检测蛋白表达情况。诱导表达后的目的蛋白利用镍柱进行纯化。电镜观察结果显示, HBc-N149蛋白与HBc-N149-VP4-N20蛋白均可有效形成病毒样颗粒, 且直径约为25-30 nm。这一结果表明, 将EV71病毒VP4蛋白N端前20个氨基酸插入HBcAg蛋白后并未改变其自组装形成病毒样颗粒的特性。

为了研究重组HBcAg蛋白是否能产生针对VP4-N20的抗体, 将纯化后的HBc-N149蛋白以及HBc-N149-VP4-N20蛋白通过肌肉注射的方式免疫雌性BALB/c小鼠。阴性对照组免疫PBS溶液。实验动物免疫后收集血清进行血清学相关检测。实验结果显示, 重组HBcAg蛋白可以产生针对VP4-N20的抗体。

为了验证包含有VP4-N20的重组HBcAg蛋白是否能产生针对EV71病毒的中和抗体, 利用实验动物免疫后收集的血清进行体外中和实验。实验结果显示, HBc-N149-VP4-N20蛋白免疫组血清可以中和EV71病毒; HBc-N149蛋白免疫组血清未能中和EV71病毒。这一结果表明含有VP4-N20的重组HBcAg蛋白免疫实验动物后产生的抗体具有针对EV71病毒的中和活性。

I

II

Abstract

北京工业大学工学博士学位论文

Abstract

Human enterovirus 71 and coxsackievirus A16 (CA16) have been identified as the two major etiological agents of hand, foot and mouth disease (HFMD). Large outbreaks of HFMD have recently been reported in the Asia-Pacific region, which is becoming a common acute viral disease in these areas and posing a serious health threat to children. While HFMD is usually mild and self-limiting, it may lead to severe neurological complications and even death. So far, prevention of hand foot and mouth disease vaccine is not yet available.

EV71 is a non-enveloped RNA virus of the Picornaviridae family. The virion is around 30 nm in diameter. The icosahedral capsid is composed of 60 sets structural proteins (VP1 to VP4). It has been shown that VP1-3 form a pseudo T = 3 icosahedral capsid that are located on the surface of viral capsid. VP4 is located inside, which is approximately 70 amino acids in length and is myristoylated at the N terminus. Crystallographic analysis showed that the mature EV71 virus is structurally similar to other enteroviruses.

In the present study, the gene of peptide VP4-N20 (N terminal residues 1-20 of EV71 VP4 of genotype C4) was fused with HBcAg-encoding gene and subcloned into the vector pET-22b (+). HBcAg protein (HBc-N149) and a fusion protein (HBc-N149-VP4-N20) were expressed in E.coli, respectively. The efficient expression of both proteins was demonstrated by Western-blot after IPTG induction. They were further purified using Ni Sepharose column. Electron microscopy analysis showed that both HBc-N149 and HBc-N149-VP4-N20 proteins were able to efficiently form particles with the size around 25-30 nm. The results suggest that the chimeric HBcAg protein harboring N-terminal 20 amino acids of EV71 VP4 still keeps the same physical charactering as the original HBcAg particles.

To determine whether chimeric HBcAg particles were capable of eliciting anti-VP4-N20 antibody, female BALB/c mice were immunized i.m. with either purified HBc-N149-VP4-N20 or HBc-N149. Mice immunized with PBS were used as negative controls. The immunized animals were bled for the serological analysis. Our results indicated that chimeric particles were able to induce anti-VP4-N20 immune responses.

To evaluate whether the chimeric HBcAg particles could induce neutralizing antibodies against EV71, sera from immunized mice were tested for the ability to neutralize live EV71 in vitro. The sera from the group immunized with HBc-N149-VP4-N20 were able to neutralize EV71. Compare to chimeric HBcAg particles, HBcAg particles failed to induce neutralizing antibody responses against

III

为了进一步验证抗HBc-N149-VP4-N20蛋白的血清是否能作为实验小鼠提供针对EV71病毒的保护能力, 进行了小鼠体内攻毒实验。实验动物选择1日龄BALB/c乳鼠。实验中选用针对乳鼠具有较高毒力的EV71病毒BrCr-TR株, 通过腹腔注射病毒-血清混合物 (血清分别选用免疫HBc-N149-VP4-N20蛋白的血清以及免疫HBc-N149蛋白的血清)、病毒-PBS溶液混合物。实验进行至第7天时, 病毒-HBc-N149蛋白血清组乳鼠、病毒-PBS溶液组乳鼠开始出现行动迟缓、四肢乏力、四肢瘫痪等病症, 有甚者出现死亡症状; 第16天即实验结束时, 病毒-HBc-N149蛋白血清组乳鼠存活率为40%, 病毒-PBS溶液组乳鼠存活率为20%。反之, 病毒-HBc-N149-VP4-N20蛋白血清组乳鼠存活率为90%。这一结果表明, 重组HBcAg颗粒即HBc-N149-VP4-N20蛋白的免疫血清可以针对EV71病毒为新生乳鼠提供保护效力。

进一步的研究中, 利用肽库筛查实验确定了VP4-N20蛋白产生中和抗体的抗原决定簇表位。实验中肽库的设计原则为, 分别从VP4-N20蛋白N端以及C端每次减少两个氨基酸。实验结果显示, 当VP4-N20蛋白N端减少至第6个氨基酸时, 或者C端减少至第10个氨基酸时, 针对VP4-N20蛋白的免疫血清将不再和VP4-N20蛋白相结合。这一实验结果表明, VP4-N20蛋白产生中和抗体的抗原决定簇表位为其N端减少6个氨基酸、C端减少10个氨基酸后所剩多肽序列。

本文的研究中, 将EV71病毒C4型VP4蛋白N端前20个氨基酸融合入HBcAg中且在大肠杆菌中表达。实验结果显示, 融合目的蛋白在表达后可以自组装形成嵌合式病毒样颗粒, 并且可以诱导产生针对病毒的有效中和抗体。后续试验中, 通过肽库筛查确定了这一序列的抗原决定簇位点所在。实验结果最终表明, EV71病毒VP4蛋白中和表位的鉴定为研制广谱抗EV71预防性疫苗提供了新的思路和线索。

关键词: HBcAg; EV71; VP4; VLP疫苗; 手足口病

EV71. Our results suggest that immunization of chimeric HBcAg particles containing VP4-N20 epitope can elicit neutralizing antibody responses against EV71.

To investigate whether anti-HBc-N149-VP4-N20 sera conferred protection to mice, *In vivo* challenge experiments were performed. EV71 BrCr-TR strain was used for viral challenge because of its high virulence in neonatal mice. Groups of one-day-old BALB/c suckling mice were inoculated intraperitoneally (i.p.) with the virus-sera (anti-HBc-N149-VP4-N20 sera and anti-HBc-N149) or virus-PBS mixture. After 7 days, the mice receiving the mixture of EV71 with PBS or anti-HBc-N149 sera started to show disease symptoms, such as reduced mobility, limb weakness, limb paralysis, and death; the survival rates were 20% and 40% for the PBS and anti-HBc-N149 sera recipient groups, respectively, at the end of the 16-day period. In contrast, 90% of mice treated with the mixture of anti-HBc-N149-VP4-N20 sera remained healthy and survived throughout the course. Our results suggested that the immune sera elicited by chimeric HBcAg particles HBc-N149-VP4-N20 conferred protection to neonatal mice against lethal EV71 challenge.

We further investigated the most immunologically essential sequence of the peptide by epitope mapping experiments to find high efficacy and minimal peptide sequence required for the neutralizing antibody induction. A panel of peptides corresponding to the N- and C-terminal truncations of VP4-N20 peptide was used for epitope mapping. Once six (N-terminal) or ten (C-terminal) residues were clipped from either end of the inoculation peptide, the polyclonal antibodies raised against VP4-N20 peptide were no longer able to bind. One interpretation of these results is that there is an essential "core" of the peptide that does not tolerate truncation. This suggests that this peptide can elicit a pan-serotypic immune response once the right segment of VP4 is identified.

In the present study, the peptide consisting of N terminal residues 1-20 of EV71 VP4 of genotype C4 was fused to HBcAg and expressed in E. coli. The resulting fusion proteins were able to spontaneously assemble into chimeric VLPs, which elicited virus-neutralizing antibody response. We further identified a linear neutralizing epitope in the N-terminus of EV71 VP4 by epitope mapping experiments. Our results suggest that chimeric HBcAg particles carrying a neutralizing epitope of EV71 VP4 could be a promising vaccine candidate and provide novel strategy against EV71 infection.

Keywords: HBcAg, EV71, VP4, VLP vaccine, Hand Foot and Mouth Disease

IV

英文缩写词

缩写词	英文	中文
aa	amino acid (s)	氨基酸
BCA	Bicinchoninic Acid	二喹啉甲酸
bp	base pair	碱基对
BPL	β -propionolactone	β -丙内酯
BSA	Bovine Serum Albumin	牛血清白蛋白
CVA16	Coxsackievirus A16	柯萨奇病毒 A16 型
ELISA	Enzyme-linked immunosorbent assay	酶联免疫吸附试验
EV	Enterovirus	肠道病毒属
EV71	Enterovirus 71	肠道病毒 71 型
h	Hour (s)	小时
HAV	Hepatitis A virus	甲型肝炎病毒

PCR Polymerase Chain Reaction 聚合酶链式反应

PVDF	Polyvinylidene Fluoride	聚偏二氟乙烯膜
rpm	round per minute	转每分钟
s.c.	subcutaneous injection	皮下注射
SDS	Sodium Dodecyl Sulfonate	十二烷基硫酸钠
sec	second	秒
TAE	Tris/acetate/EDTA buffer	Tris/乙酸/EDTA 缓冲液
TE	Tris/EDTA buffer	Tris/EDTA 缓冲液
TMB	3, 3', 5, 5'-Tetramethylbenzidine	四甲基联苯胺
UTR	Untranslated Regions	非编码区
VLP	Virus-Like Particles	病毒样颗粒
WB	Western Blot	蛋白免疫印迹

目 录

目 录

摘 要	I
Abstract	III
英文缩写词	V
目 录	VII
第 1 章 绪 论	1
1.1 手足口病简介	1
1.1.1 手足口病流行病学概述	1
1.1.2 肠道病毒 EV71 型病毒学特征	1
1.1.3 柯萨奇病毒 A 组 16 型病毒学特征	3
1.1.4 EV71 疫苗研究进展	4
1.1.5 CVA16 疫苗研究现状	7
1.1.6 手足口病动物模型	9
1.2 小 RNA 病毒科病毒 VP4 蛋白的研究进展	10
1.2.1 小 RNA 病毒的结构及特点	10
1.2.2 抗体与小 RNA 病毒的结构构象	11
1.2.3 小 RNA 病毒 VP4 蛋白与中和抗体	12
1.3 乙型肝炎病毒核心蛋白作为表位疫苗载体的研究进展	14
1.3.1 HBc 的生物学结构特点	14
1.3.2 HBc 作为疫苗载体的应用	15
1.4 原核表达系统简介	17
1.4.1 T7 表达系统	17
1.4.2 目的蛋白表达形式及在细胞中的定位	18
1.4.3 外源基因在大肠杆菌中表达的优缺点	18
1.4.4 大肠杆菌表达系统的研究新进展	18
1.5 本文的研究内容及意义	19
第 2 章 基于 HBc 和 EV71-VP4 蛋白的病毒样颗粒制备	21
2.1 实验材料及溶液配制	21
2.1.1 实验材料	21
2.1.2 溶液配制	21
2.2 实验材料及仪器设备	22
2.3 实验方法	23
2.3.1 HBc-EV71-VP4-N20 融合蛋白设计路线	23

2.3.2 重组原核表达载体 pET-22b(+)-HBc 及 pET-22b(+)-HBc-EV71-VP4-N20 的构建	24
2.3.3 HBc、HBc-EV71-VP4-N20 融合蛋白的原核表达	36
2.3.4 目的蛋白 HBc、HBc-EV71-VP4-N20 的镍柱纯化	38
2.4 实验结果	42
2.4.1 重组原核表达载体 pET-22b(+)-HBc-EV71-VP4-N20 的构建	42
2.4.2 重组原核表达载体 pET-22b(+)-HBc 的构建	44
2.4.3 融合蛋白 HBc、HBc-EV71-VP4-N20 的原核表达	46
2.5 讨论	50
2.6 本章小结	51
第 3 章 EV71 病毒的扩增、培养鉴定及灭活	53
3.1 实验材料	53
3.2 实验仪器	53
3.3 实验方法	53
3.3.1 RD 细胞的培养	53
3.3.2 EV71 病毒的扩增培养	55
3.3.3 EV71 病毒的鉴定	56
3.3.4 EV71 病毒的灭活	59
3.4 实验结果	62
3.4.1 EV71 病毒 PCR 鉴定及测序的实验结果	62
3.4.2 BPL 灭活 EV71 病毒效果的验证及病毒的纯化	62
3.4.3 Western Blot 及 SDS-PAGE 检测灭活 EV71 病毒的实验结果	63
3.4.4 透射电子显微镜观察灭活 EV71 病毒的结果	64
3.5 讨论	65
3.6 本章小结	65
第 4 章 HBc-EV71-VP4-N20 病毒样颗粒的免疫学检测	67
4.1 实验材料	67
4.2 实验仪器	67
4.3 实验方法	68
4.3.1 HBc-EV71-VP4-N20 病毒样颗粒免疫方案的设计	68
4.3.2 EV71 病毒 CCID ₅₀ 的检测	70
4.3.3 HBc-EV71-VP4-N20 病毒样颗粒的免疫学检测	70
4.3.4 小鼠体内攻毒实验	75
4.3.5 肽库筛查 HBc-EV71-VP4-N20 蛋白的抗原决定簇位点	75

4.4 实验结果.....	77
4.4.1 EV71 病毒 CCID ₅₀ 的检测结果.....	77
4.4.2 HBc-EV71-VP4-N20 病毒样颗粒的免疫学检测结果.....	78
4.4.3 小鼠体内攻毒实验结果.....	83
4.4.4 肽库筛查 HBc-EV71-VP4-N20 蛋白的抗原决定簇位点.....	84
4.5 讨论.....	85
4.6 本章小结.....	86
结 论.....	87
参 考 文 献.....	89
附 录.....	97
攻读博士学位期间所发表的学术论文.....	103
致 谢.....	105

CONTENT

Chinese Abstract	I
English Abstract	III
Abbreviation.....	V
Chapter one Introduction	1
1.1 Introduction of Hand Foot and Mouth Disease.....	1
1.1.1 Epidemiology of Hand Foot and Mouth Disease.....	1
1.1.2 Virological Characteristics of Enterovirus 71.....	1
1.1.3 Virological Characteristics of Coxsackievirus A 16.....	3
1.1.4 Research of EV71 Vaccine.....	4
1.1.5 Research of CVA 16 Vaccine.....	7
1.1.6 Animal Model of Hand Foot and Mouth Disease.....	9
1.2 Research of Picornaviridae VP4 Protein.....	10
1.2.1 Structure and Characteristics of Picornaviridae	10
1.2.2 Antibodies and Structural Conformation of Picornaviridae.....	11
1.2.3 VP4 protein and neutralizing antibody of Picornaviridae.....	12
1.3 Research of Hepatitis B Virus Core Protein as an Epitope Vaccine Vector.....	14
1.3.1 The Biological Characteristics of HBc.....	14
1.3.2 Application of HBc as a Vaccine Vector.....	15
1.4 Introduction of Prokaryotic Expression System.....	17
1.4.1 T7 Expression System.....	17
1.4.2 Expression and Localization in Cells of Target Protein.....	17
1.4.3 Expression of Exogenous Gene in Escherichia Coli.....	18
1.4.4 Research Progress in E.coli Expression System.....	18
1.5 Research Content and Significance of This Paper.....	19
Chapter two Synthesis of Virus Like Particles based on HBc and EV71-VP4 protein.....	21
2.1 Materials and Solution Preparation.....	21
2.1.1 Materials.....	21
2.1.2 Solution Preparation.....	21
2.2 Apparatus.....	22
2.3 Method.....	23
2.3.1 Design Route of Fusion Protein HBc-EV71-VP4-N20.....	23
2.3.2 Construction of Recombinant Prokaryotic Expression Vector pET-22b (+)-HBc and pET-22b(+)-HBc-EV71-VP4-N20.....	25
2.3.3 Prokaryotic Expression of Fusion Protein HBc and HBc-EV71-VP4-N20.....	36
2.3.4 Purification of Protein HBc and HBc-EV71-VP4-N20 by Nickel.....	

Column.....	39
2.4 Results.....	42
2.4.1 Construction of Recombinant Prokaryotic Expression Vector pET-22b (+)-HBc-EV71-VP4-N20.....	42
2.4.2 Construction of Recombinant Prokaryotic Expression Vector pET-22b (+)-HBc.....	47
2.4.3 Prokaryotic Expression of Fusion Protein HBc and HBc-EV71-VP4-N20.....	47
2.5 Discussion	50
2.6 Conclusion	51
Chapter three Culture, Identification and inactivation of EV71.....	53
3.1 Materials.....	53
3.2 Apparatus.....	53
3.3 Method.....	54
3.3.1 RD Cells Culture.....	54
3.3.2 EV71 Culture.....	56
3.3.3 Identification of EV71.....	56
3.3.4 Inactivation of EV71.....	60
3.4 Results.....	62
3.4.1 Results of EV71 PCR and Sequencing.....	62
3.4.2 Purification and Inactivation of EV71.....	62
3.4.3 Results of Western Blot and SDS-PAGE.....	64
3.4.4 Observation of Inactivated EV71 by TEM.....	64
3.5 Discussion	65
3.6 Conclusion	66
Chapter four Immunological Detection of virus like particles HBc-EV71-VP4-N20.....	67
4.1 Materials	67
4.2 Apparatus.....	67
4.3 Method.....	68
4.3.1 Immunization Program of Virus Like Particles HBc-EV71-VP4-N20.....	68
4.3.2 Detection of EV71 CCID ₅₀	70
4.3.3 Immunological Detection of Virus Like Particles HBc-EV71-VP4-N20.....	71
4.3.4 Mice Challenge Test.....	75
4.3.5 Screening of Protein HBc-EV71-VP4-N20 by Peptide library for Epitope Sites.....	76
4.4 Results.....	77
4.4.1 Detection of EV71 CCID ₅₀	77

4.4.2 Immunological Detection of Virus Like Particles HBc-EV71-VP4-N20.....	78
4.4.3 Mice Challenge Test.....	83
4.4.4 Screening of Protein HBc-EV71-VP4-N20 by Peptide library for epitope sites.....	84
4.5 Discussion.....	85
4.6 Conclusion.....	86
Conclusion.....	87
Reference.....	89
Apendix.....	97
Publication.....	103
Acknowledgement.....	105

第1章 绪论

1.1 手足口病简介

1.1.1 手足口病流行病学概述

手足口病(hand, foot and mouth disease, HFMD)是一种婴幼儿常见的传染病,其主要病原体为肠道病毒71型(Enterovirus 71, EV71)及柯萨奇病毒A组16型(Coxsackievirus A16, CVA16),发病后可引起患儿手、足、口腔部位的溃疡或疱疹。部份严重感染者可引发心肌炎、肺水肿、无菌性脑膜炎以及中枢神经系统病症在内的等多种疾病^[1]。

手足口病从最初发现至今已半个多世纪时间,随着人们对该疾病的研究不断加深,截至目前已发现20余种肠道病毒可引发手足口病。手足口病的主要病原体CVA16病毒于1958年首次在新西兰被发现,之后于1959年提出以“手足口病”命名该病。1969年,另一主要病原体EV71病毒被首次体外分离。1969年后至今,EV71病毒与CVA16病毒交替出现,最终成为手足口病的两大主要病原体^[2-4]。

世界范围内从上世纪七十年代开始,由EV71病毒及CVA16病毒所引发的手足口病多次暴发^[5-7],其中东南亚地区是手足口病流行范围较广的区域之一,历史上曾有多次大规模地流行,期间相关病原体EV71病毒及CVA16病毒均有发现并报道。我国自上世纪八十年代初首次发现手足口病后至今,全国十几个省(市)均有相关报道。近年来,手足口病病原体的多样化也使得该病的预防和治疗变得更加困难。

目前,我国手足口病的发病人数及死亡人数呈逐年上升的总体趋势。为了更加有效地控制我国境内的手足口病疫情,卫生部于2008年5月将手足口病列为法定报告的丙类传染病,要求各地区及时上报手足口病疫情信息,并加强对手足口病的监测。2008年后,我国手足口病发病数及死亡数在法定报告的丙类传染病中一直处于第一的位置,其发病数所占比例约在30-60%之间且呈现逐步上升的趋势^[8]。从发病数及死亡数来看,手足口病在我国所导致的严重程度已经超越了某些乙类传染病。综上所述,加快推动手足口病疫苗的研制对预防该病的流行具有重要意义。

1.1.2 肠道病毒EV71型病毒学特征

肠道病毒71型(EV71)属于小RNA病毒科(Picornaviridae)家族成员之一。其基因组为单股正链RNA,由7389-7408个核苷酸所组成,分子量约为2.6×10⁶

-1-

KD。EV71病毒的RNA基因组具有感染性,即具有转录活性。基因组从5'端到3'端依次为5'非编码区(untranslated region, UTR)、编码区、3'非编码区。基因组3'端有一个长度可变的聚腺苷酸尾(poly A),其5'端与一小分子的蛋白(VP_g)共价结合。若3'末端的聚腺苷酸尾被去除或基因组出现断裂,病毒RNA基因组的感染性便消失。相比较而言,5'末端连接的小分子蛋白对病毒的感染性没有明显的影响。编码区左右两端的非编码区序列有着较强的保守性。RNA正链及负链的5'UTR和3'UTR中分别含有蛋白翻译的起始信号以及RNA复制起始信号。5'UTR经折叠后通常形成多种特异性的空间结构,这些空间结构通过与宿主细胞中的蛋白因子相结合在病毒基因组RNA的复制及病毒蛋白的翻译过程中发挥着重要作用。此外,5'UTR的多种结构还决定了病毒的宿主范围和病毒的毒力等多个相关方面的功能^[9-11],但目前对于病毒基因组3'UTR及多聚腺苷酸尾的功能尚不清楚。

EV71病毒的基因组编码区中仅含有一个开放阅读框(open reading frame, ORF)并编码一条蛋白,该蛋白经病毒编码的蛋白酶水解形成三个前体蛋白^[12],分别为P1、P2、P3,前体蛋白P1最终形成1A(VP4)、1B(VP2)、1C(VP3)、1D(VP1)四个病毒衣壳结构蛋白。前体蛋白P2主要编码生成非结构蛋白2A(特异性蛋白酶),2B、2C,前体蛋白P3通过自身切割得到非结构蛋白3A、VPg(5'末端结合蛋白)、3C(特异性蛋白酶)、3D(RNA多聚酶亚单位)^[13]。

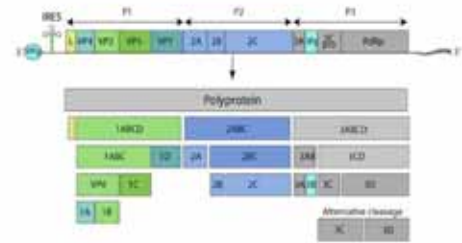


图 1-1 EV71 基因组结构图
Fig. 1-1 Structure of EV71 genome

EV71病毒的颗粒直径大约为30nm左右,成二十面体立体对称的球形结构。无包膜及突起。根据EV71病毒衣壳结构蛋白VP1的核苷酸序列差异,可将其分为A、B、C三个基因型^[14,15],其中B型和C型又可进一步分为B1-B5亚型以及C1-C4

-2-

亚型, EV71病毒的基因型与分离的时间和地区有一定的关联,不同基因型感染后的临床症状不尽相同。

EV71病毒由外层的蛋白衣壳和内部的RNA核心所构成。蛋白衣壳组成较为复杂,首先由VP1、VP2、VP3及VP4四种衣壳蛋白单分子构成原聚体,再由5个原聚体拼装形成具有五聚体结构的亚单位,60个这样的亚单位通过各自的结构相互连接,形成二十面体立体对称结构的球形衣壳。四种衣壳结构蛋白中,VP1、VP2及VP3暴露于病毒颗粒的外表面,而VP4蛋白则包埋在病毒颗粒的内侧与RNA核心连接。以往的研究结论认为病毒的抗原决定簇基本位于VP1-VP3蛋白上^[16]。病毒的VP1蛋白在不同株的病毒间差异较大,且该蛋白在病毒的免疫原性、与宿主细胞表面特异性受体的结合及病毒脱壳等过程中发挥着重要作用。同时,VP2及VP3蛋白上也含有一定的抗原决定簇。

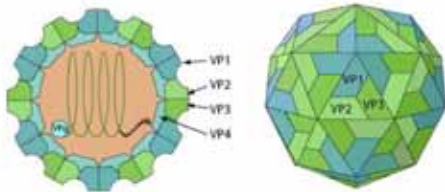


图 1-2 EV71 病毒颗粒结构图
Fig. 1-2 Structure of EV71 particles

1.1.3 柯萨奇病毒A组16型病毒学特征

柯萨奇病毒(Coxsackievirus, CV)属于小RNA病毒科肠道病毒属,可引起心肌炎、肾炎、结膜炎、肺炎等多种疾病的发病。1948年, Dollendorfer 首次分离出一种约市柯萨奇病毒的一次脊髓灰质炎病毒(Poliovirus, PV)流行中首次分离出多种具有不同血清型的柯萨奇病毒,并根据病毒对乳鼠的致病性将其分为A、B两组。迄今为止,该病毒已发现30个血清型(A1-24, B1-6),柯萨奇病毒A组16型(Coxsackievirus A16, CA16)是CV的主要成员。1951年由南非首次成功分离^[17]。CA16成二十面体立体对称的球形结构,颗粒直径约为23-30nm,无包膜及突起,由蛋白及RNA构成。其基因组为单股正链RNA,长约7410个核苷酸左右,含有一个开放阅读框,编码一个多聚蛋白。该蛋白经蛋白酶水解成P1、P2及P3三个前体蛋白。P1编码四种结构蛋白(VP1、VP2、VP3及VP4)并组成病毒的衣壳。VP1蛋白是病毒主要的抗原决定簇所在部位,其基因长约

-3-

891bp, 编码297个氨基酸残基。VP1、VP2及VP3三个结构蛋白均暴露于病毒颗粒的表面,而VP4蛋白则包埋在病毒颗粒的内侧与病毒RNA核心连接。P2及P3区编码非结构蛋白。RNA左右两侧为5'及3'非编码区(UTRs),分别含有RNA复制及蛋白翻译的起始信号,5'非编码区的序列具有较高的保守性,3'非编码区末端含有一个长度可变的聚腺苷酸尾(poly A)。

1.1.4 EV71 疫苗研究进展

EV71病毒与脊髓灰质炎病毒同属于小RNA病毒科,两者生物学特性中有颇多相似之处。脊灰病毒的天活疫苗与减毒活疫苗已成功应用于临床,所以EV71病毒天活疫苗及减毒活疫苗的研制可借鉴脊灰疫苗的经验。随着现代分子生物学的发展,除传统的天活疫苗及减毒活疫苗外,又相继出现了病毒样颗粒疫苗、亚单位疫苗、多肽疫苗、DNA疫苗、等一系列新兴的疫苗^[18]。

1.1.4.1 天活疫苗

天活疫苗的制备过程是采用物理或化学的手段天活病原体,但天活过程中病原体的免疫原性不会遭到破坏。最早的天活EV71疫苗其研发目的在于应对1975年保加利亚的手足口病大流行^[19],但此后针对该疫苗的研究并未继续深入。1998年手足口病疫情在台湾地区暴发后,天活EV71疫苗的研究再次被提到议事日程。Wu等^[20]利用EV71病毒重组VP1蛋白、DNA疫苗、EV71病毒天活疫苗分别免疫母鼠后,通过免疫学相关实验评价其新生乳鼠针对EV71病毒感染的保护效力。实验结果显示,三种疫苗均具有一定的保护效力,相对而言,免疫保护效力最高的是EV71病毒天活疫苗。Lin等^[21]在研究中发现EV71病毒经Vero细胞多次传代后产生的适应株具有免疫原性高、滴度高、毒性低、增殖稳定等优点,该适应株可作为理想的天活EV71病毒疫苗候选株。Liu等^[22,23]利用微载体细胞培养技术及微载体天活EV71病毒技术,同时利用该技术增值后的病毒诱发的体液免疫反应强度也较高的。EV71病毒各亚型间虽存在有抗原表位的交叉,可提供一定程度的交叉性保护,但不同亚型间抗原的差别仍然较大^[24],因此必须随着毒株的变异及疫情的发展适时更新疫苗候选株。

目前,我国正加紧对天活EV71疫苗的研制工作。已有三家企业的疫苗产品进入III期临床。III期临床研究采用多个中心、双盲、安慰剂对照等方式,评价了EV71疫苗对35个月至6周岁健康幼儿的免疫原性、保护效力、免疫持久性及安全性。EV71疫苗III期临床实验已完成其设定目标。研究结果显示,EV71疫苗不仅安全,且对受试儿童产生了较为显著的保护效果。

-4-

1.1.4.2 减毒活疫苗

Hagiwara 等^[25]通过实验获得 EV71 病毒温度耐受株 (tr 株) 及温度敏感株 (ts 株)。这两株的原型均为 A 型 BrCr 株, 其中 ts 株的基因组及其蛋白 VP1 的理化特性均出现改变, ts 株的神经毒性也有所减弱, 交叉保护效力方面两毒株无明显差别。这样的变化在脊灰病毒减毒株中也出现过, 脊灰病毒减毒株的基因组与结构蛋白与其原型株相比均发生了改变, 其中有一点值得指出的是脊灰病毒减毒株在 37 °C 下不能增殖。由于 EV71 病毒与脊灰病毒生物学特性较为相似, 所以 EV71 病毒 ts 株具备成为减毒活疫苗候选株的可能性。Arita 等^[26]通过重组的方式将 sabin 株 (减毒脊灰病毒) 的温度敏感决定基因导入 EV71 病毒 A 型 BrCr 株, 从而获得 EV71 减毒株 (温度敏感型, S1-3')。利用该减毒株进行血清交叉保护实验及动物攻毒实验后发现, A 型减毒株虽免疫原性较好, 但其交叉保护效力相对较弱。另一方面, EV71 病毒减毒株 (S1-3') 的减毒效果并非十分彻底, 其原因在于该减毒株在动物模型上表现出神经毒性有所降低, 但神经系统症状并未完全消失。迄今为止, EV71 病毒减毒活疫苗的研制十分缓慢, 其主要原因在于病毒毒力位点仍未确定。

1.1.4.3 病毒样颗粒疫苗

病毒样颗粒 (virus-like particle, VLP) 是由病毒衣壳蛋白所组成的且结构上与天然病毒相似的空壳颗粒, 由于其病毒基因组的缺乏, 所以病毒样颗粒不存在任何感染风险。此外, 病毒样颗粒还能高效地展示病毒抗原表位, 并诱导特异性体液免疫及细胞免疫。因此, 病毒样颗粒被认为是最为理想的疫苗候选形式。近些年来报道中我们不难发现, 已有多种病毒 (如流感病毒、人类免疫缺陷病毒) 的 VLP 被成功表达, 且表达后的 VLP 都能刺激机体产生较好的免疫反应^[27, 28]。Chung 等^[29]利用 EV71 病毒 VLP 免疫小鼠后, 通过免疫学相关检测发现其血清中针对 EV71 病毒的特异性中和抗体含量较高; 同时还发现免疫 VLP 后的小鼠其脾细胞发生增殖并伴有细胞因子的高水平表达。VLP 免疫母鼠后, 其新生乳鼠在 1000 LD₅₀ 感染剂量下, 存活率可达 88.9% 左右。另一方面, Chung 等的 VLP 样品纯度仅为 40%-50%^[29], 这也说明针对病毒样颗粒疫苗的纯化方法还有很大的提升空间, 例如大规模生产时可考虑添加某些稳定剂或利用基于层析法的提纯技术以期提高产量。

1.1.4.4 亚单位疫苗

Chung 等利用原核细胞、酵母细胞、昆虫细胞等多种表达系统表达 VP1 蛋白后通过免疫相关实验证实 VP1 蛋白具有较高的免疫原性, 并且发现 EV71 病毒的有效中和位点大多为位于 VP1 蛋白上, 故 VP1 蛋白可作为亚单位疫苗使用。

动物实验中, 10 μg 的 VP1 蛋白 (10 μg/剂) 即可诱导产生体液免疫及细胞免疫, 体液免疫所产生的抗体不仅具有体内中和活性, 且被动免疫乳鼠后针对 230 LD₅₀ 剂量的病毒感染仍具 80% 的保护效率^[20]。另一方面, Lee 等指出 VP1 蛋白的抗原性在 EV71 病毒各型间有较大差异^[30], 所以其作为亚单位疫苗免疫后的血清很难产生有效地交叉保护。

1.1.4.5 多肽疫苗

多肽疫苗以其明确的表位刺激机体产生特异性的免疫反应, 及安全、稳定、便于生产等优势成为新兴疫苗的候选形式之一。EV71 病毒 VP1 蛋白含有主要的抗原中和位点, 能够刺激机体产生较高滴度的中和抗体^[20]。Foo 等^[31]发现位于 EV71 病毒 VP1 蛋白 C 端的两条多肽能够诱导实验动物产生针对 EV71 病毒的特异性抗体, 且该抗体在体外中和实验中表现出良好的中和活性。Foo 等通过实验还发现其中一条多肽 SP70 在免疫实验动物后, 其血清能够中和其它亚型的 EV71 病毒, 证明该多肽具有交叉保护活性。随后, 通过动物模型攻毒实验进一步研究多肽 SP70 针对 EV71 病毒能否为乳鼠提供相应的保护作用, 研究结果表明, 在 1000 LD₅₀ 感染剂量下, 抗多肽 SP70 血清针对 EV71 病毒能够为新生乳鼠提供约 80% 的保护效率; 实验对照中灭活疫苗产生的血清针对 EV71 病毒能够提供 100% 的保护效率^[32]。与灭活疫苗相比, SP70 产生的免疫效果略低, 究其原因可能在于 SP70 的分子量较小、只含线性表位且数量较少、结构简单等。已有研究表明, 通过使用佐剂或偶联蛋白载体可提高多肽的免疫原性^[33, 34]。近期有报道发现 EV71 病毒 VP1 蛋白的 N 端可能含有中和构象表位^[35]。

1.1.4.6 DNA 疫苗

DNA 疫苗也称为核酸疫苗, 即含有目的基因的重组质粒。Wu 等^[20]发现 EV71 病毒 DNA 疫苗通过肌肉注射免疫母鼠后, 其新生乳鼠获得了一定的保护效力, 但保护效力较灭活疫苗略差; 脾细胞体外刺激增殖实验结果显示, 该 DNA 疫苗对 Th 细胞的增殖起到促进作用, 同时 INF-γ 及 IL-12 等细胞因子产生了高水平的表达, 证明该 DNA 疫苗主要诱导 Th1 型免疫应答反应。Tung 等^[36]构建了基于 EV71 病毒 VP1 蛋白的 DNA 疫苗, 并在体内及体外分别检测其免疫反应的诱导能力。通过免疫相关实验分析结果显示, 母鼠免疫血清中针对 VP1 蛋白的抗体含量最初较高, 二次加强免疫后含量有所降低, 伴随这一变化的同时母鼠免疫血清中相关细胞因子的含量有所升高, 证明母鼠体内发生了由体液免疫向细胞免疫转换的过程。体外中和实验显示, 母鼠免疫血清针对 EV71 病毒具有一定的中和活性。DNA 疫苗能够刺激机体产生特异性的体液免疫及细胞免疫, 其优点在于较长的免疫持续时间、较低的生产成本、易于保存等方面。另一方面, DNA

疫苗刺激机体产生的免疫反应强度较弱, 不能产生足够的免疫保护效力^[36]。

1.1.4.7 转基因口服疫苗

随着转基因技术的发展, 利用转基因动植物制备 EV71 病毒疫苗的研究已取得了一定的进展。Chen 等^[37]在番茄中成功表达了 EV71 病毒 VP1 蛋白, 用含有 EV71 病毒 VP1 蛋白的转基因番茄喂养小鼠后对其进行相关的免疫学检测, 结果显示, 小鼠的粪便及血清中针对 EV71 病毒 VP1 蛋白的特异性抗体含量均较高。体外中和实验结果显示, 小鼠免疫血清针对 EV71 病毒具有良好的中和活性。脾细胞体外刺激增殖实验结果显示, 小鼠免疫血清中多种相关细胞因子产生了高水平的表达。综上所述, 含有 EV71 病毒 VP1 蛋白的转基因番茄可同时诱导机体产生体液免疫及细胞免疫反应^[37]。Chen 等^[38]将 EV71 病毒 VP1 蛋白的基因导入母乳腺细胞中, 使其分泌的乳汁中含有 EV71 病毒 VP1 蛋白。饮用过这种乳汁的新生小鼠通过体外中和实验发现, 其血清中针对 EV71 病毒 VP1 蛋白的特异性抗体含量较高。该新生小鼠针对 EV71 病毒的感染时显现出具有一定的抵抗能力。

1.1.5 CVA16 疫苗研究现状

1.1.5.1 灭活疫苗

灭活疫苗的研制过程简单, 但其应用十分广泛, 它通过物理或化学的方法使病原生物丧失感染能力, 同时又可诱导机体产生较高水平的抗体, 安全性方面较好^[39]。Wu 等^[20]通过三种 EV71 疫苗 (灭活疫苗、VP1 蛋白亚单位疫苗和 DNA 疫苗) 对母鼠进行免疫来比较每种疫苗诱导产生抗体的能力及母鼠传播抗体对乳鼠的被动免疫保护作用。结果显示: 灭活疫苗诱导产生中和抗体的能力优于另外两种疫苗。灭活疫苗免疫母鼠后所生的乳鼠在受到致死剂量的 EV71 病毒感染时, 乳鼠的存活率可达 80% 左右, 这一结果明显好于其他两种疫苗。目前, 灭活 EV71 疫苗已进入临床阶段, 目前国内尚无 CVA16 灭活疫苗的相关报道。CVA16 遗传变异性及进化历程的研究空白是研制 CVA16 灭活疫苗的困境所在^[4]。

1.1.5.2 减毒活疫苗

活病毒通过体外多次复制代同时其毒性有所降低后即可成为减毒活疫苗, 将其免疫机体后既可产生特异性抗体, 又能在宿主细胞内进行复制^[40]。减毒活疫苗其优点在于免疫原性高 (与活病毒相似)、接种剂量小、免疫持续时间长。另一方面, 其缺点在于残余的毒力会使少数免疫力低下者诱发严重疾病、存在毒力回复现象。因此, 减毒活疫苗的使用具有一定的潜在风险。目前针对手足口病来

说, Arita^[41]等通过实验已获得 EV71 病毒减毒株 (SI-3'); 由于 CVA16 的毒力位点仍未确定, 所以其减毒活疫苗的研究尚无任何进展。

1.1.5.3 亚单位疫苗

CVA16 病毒的有效中和位点大多位于 VP1 蛋白上^[42], 因此, 其亚单位疫苗的研制主要针对 VP1 蛋白^[43]。李等^[44]通过昆虫细胞表达系统制备了 CVA16 病毒 VP1 蛋白, 免疫实验结果表明: 其制备的 CVA16 病毒 VP1 蛋白亚单位疫苗能够有效诱导机体产生特异性体液免疫及细胞免疫, 这一研究成果对 CVA16 病毒亚单位疫苗的研制具有重大意义。Chen 等^[45]通过细菌表达系统制备的 CVA16 病毒 VP1 蛋白亚单位疫苗在动物模型实验中可有效地诱导产生特异性免疫应答, 这一结果再次证明基于 CVA16 病毒 VP1 蛋白开发亚单位疫苗具有一定的可行性。尽管目前相关研究已经取得了一定进展, 但这些研究还仅存在于实验室阶段^[44]。

1.1.5.4 载体疫苗

载体疫苗技术是将特定免疫原的基因通过重组技术导入病毒或细菌载体中, 载体复制的同时可高效表达特定免疫原。载体疫苗可同时导入一个或多个基因, 且各个基因的表达通常不会互相干扰, 其刺激机体后通常可有效诱导体液免疫及细胞免疫; 一种载体疫苗可同时预防多种传染性疾病。因此, 这些优点也使得载体疫苗具有良好的开发前景。常用的病毒或细菌载体包括: 脊灰病毒、腺病毒、沙门氏菌等。chiu 等^[46]通过减毒沙门氏菌表达 EV71 病毒 VP1 蛋白后免疫实验动物可引起特异性的体液免疫及细胞免疫, 且免疫持续时间较长; 动物攻毒实验显示, 被动免疫的新生乳鼠经 EV71 病毒感染后存活率可达 50%-60%。载体疫苗虽具有良好的免疫原性, 但其安全性会成为研制过程中首要考虑的问题。迄今为止, 针对 CVA16 病毒的载体疫苗尚无相关报道。

1.1.5.5 DNA 疫苗

DNA 疫苗又称核酸疫苗, 即含有目的基因的重组质粒。将含有抗原表达基因的重组质粒导入机体内即为核酸疫苗的免疫过程, 目的抗原在体内表达后会诱导产生特异性免疫反应。核酸疫苗与减毒活疫苗相比, 其优点在于抗原表达基因不会在宿主细胞内复制。Tung 等^[36]利用 EV71 病毒核酸疫苗免疫小鼠后, 在其血清中可检测到特异性中和抗体及相关细胞因子增殖, 证明该疫苗可同时诱导产生特异性体液免疫及细胞免疫。Kim 等^[47]利用柯萨奇 B3 病毒 VP1-VP3 蛋白编码基因制备了核酸疫苗, 通过检测免疫小鼠血清后证明该疫苗可有效诱导中和抗体的产生。核酸疫苗的优点在于: ① 抗原蛋白在宿主细胞表达后可正确的折叠及糖基化; ② 稳定性高; ③ 制备成本低; ④ 多种质粒混合后易于制备多价疫苗; 这

些优势也使得核酸疫苗成为CVA16病毒疫苗今后发展的一个方向。缺点在于:表达抗原蛋白的细胞可能会被机体免疫相关机制破坏;长时间持续免疫容易使机体发生自身免疫耐受;在应用方面核酸疫苗还缺乏良好的佐剂。

1.1.6 手足口病动物模型

疫苗应用于临床研究前其保护效力的评价通常采用动物模型实验,所以动物模型的选择会直接影响疫苗的评价效果。手足口病的动物模型目前常采用乳鼠及猴类,但在实验过程中各自都有不足之处,这也成为手足口病疫苗研发过程中面临的主要问题^[48]。

1.1.6.1 乳鼠模型的研究进展

Chumakov^[19]等于1979年首次发现EV71病毒感染新生乳鼠后会诱导肌纤维坏死甚至瘫痪,此后的二十年间, EV71病毒动物模型的研究无任何进展。Yu等^[49]于2000年建立了EV71病毒的乳鼠模型,其病毒分离自临床。实验中选用新生ICR乳鼠通过腹腔注射EV71病毒,攻毒后7-10天乳鼠出现死亡。乳鼠死亡率与病毒注射剂量呈正相关,与乳鼠日龄呈负相关。Yu等的进一步实验中通过注射EV71病毒抗血清产生被动免疫,首次在动物体内验证了抗血清的保护作用,并建立了一整套母传抗体动物模型保护评价模式。

2004年Chen等^[50]将来自临床的EV71病毒通过鼠脑连续传代获得鼠类适应株,再通过口服途径将该病毒感染新生乳鼠,值得注意的是该感染过程及感染后出现的症状都与人类相似。但此研究仅限于1-4日龄的新生乳鼠,这也使得该乳鼠模型的应用范围受到限制。

此后,Wang等^[51]利用相同的病毒株通过多次鼠脑传代获得鼠类适应株MP4, MP4株与原代相比表现出更强的毒性。MP4株针对1日龄新生乳鼠的致死能力较原代更强。7日龄的小鼠在口服MP4株病毒5-9天后产生神经系统症状或死亡。进一步的研究中Wang等还证明EV71病毒抗血清的被动免疫可保护病毒感染1天内的新生乳鼠,这一研究对于临床治疗EV71病毒重症感染者具有较好的指导意义。Wang等的乳鼠模型将病毒感染的日龄延长到7日左右,这也使得利用乳鼠模型评价手足口病疫苗的保护效果成为可能。

2005年Liu等^[52]为研究EV71病毒感染乳鼠后I型干扰素(IFNs)的治疗及保护作用,首次通过发病程度将乳鼠发病症状进行了分级。研究中通过乳鼠发病级别与存活率两项指标共同评价IFNs的治疗作用。临床症状程度分级指标的引入使手足口病动物模型的评价更加量化,对于疫苗效果的评价具有特殊意义

经过前人的不懈努力,手足口病乳鼠模型已日趋完善,但感染日龄偏小仍是

存在的问题之一。2008年Ong等^[53]利用EV71病毒B3基因型亚型毒株多次鼠脑传代后获得鼠类适应株MAS。MAS株在细胞与乳鼠感染致病方面较MP4株更强。2周龄的ICR小鼠无论口服或腹腔注射, MAS株都可导致其在感染病毒2-5天内出现病症或死亡;实验中同时发现MAS株在小鼠体内可通过消化道传播至中枢神经系统,而原始病株仅在消化道内进行复制。综上所述, MAS株针对小鼠的致病力更强。Ong等的乳鼠模型解决了感染日龄偏小的问题,该模型的应用使得手足口病疫苗的评价更加有效。

2010年宋建英等^[54]通过腹腔注射EV71病毒阜阳株及其传代株MP4 (ICR 1日龄乳鼠骨骼肌连续传代4次)感染ICR1日龄乳鼠后,发现小鼠肌肉内病毒的载量与病毒注射剂量相关,病毒复制的高峰期集中在第一天和第五天。宋建英等的模型也成为我国流行株(C4亚型毒株)的首个乳鼠模型,但该模型在感染EV71病毒后未能引起乳鼠产生明显的病症或死亡。

乳鼠模型的不断研究和改进,在手足口病疫苗的研发过程中起到了至关重要的作用。

1.1.6.2 猴类动物模型的研究进展

构建手足口病动物模型最为理想的动物当属猴类,其原因在于人类与猴类亲缘关系最为接近。手足口病猴类模型的建立可参考结核病、艾滋病等^[55-57]已有案例。猕猴及食蟹猴通过皮下注射或口服的接种手足口病疫苗后能导致某些神经系统症状的产生,这使得猴类模型可用于手足口病疫苗保护效果的评价。然而由于现实问题,猴类模型的应用存在极大的限制,迄今猴类模型中手足口病疫苗的研究数据较为有限。

1.2 小 RNA 病毒科病毒 VP4 蛋白的研究进展

1.2.1 小 RNA 病毒的结构及特点

小 RNA 病毒科(Picornaviridae)是一个由多种正链 RNA 病毒组成的庞大病毒科)由一个庞大的致病病毒家族所组成,其成员大多可导致人类以及动物发生严重的传染病,例如我们常见的脊髓灰质炎、流感、口蹄疫、甲型肝炎以及手足口病等。它们是迄今为止已发现的动物病毒中个体最小的病毒之一并且其基因组由 RNA 所组成,其相对分子量为 8.5×10⁵ KD (30%为病毒 RNA 的质量)。它们的病毒外壳成 20 面体结构,外直径约为 30 nm 左右。小 RNA 病毒科根据其家族成员的浮力密度、pH 值的稳定性、沉降系数等理化因素大致分为 4 个属,分别为肠道病毒属:脊髓灰质炎病毒 (poliovirus)、甲肝病毒 (hepatitis A virus)、柯萨奇病毒 (coxsackievirus)、EV71 等;心病毒属:脑心肌炎病毒

(encephalomyocarditis virus)、门戈病毒 (mengovirus); 口蹄疫病毒属: 口蹄疫病毒 (foot-and-mouth disease virus); 鼻病毒属 (rhinovirus)。对于家族中每个已知的病毒成员又可根据其不同的血清型继续分型。例如,脊髓灰质炎病毒目前分为三种血清型,口蹄疫病毒分为 7 种血清型,而血清型分型最为庞大的要数人类鼻病毒,其数目可达百余种之多^[58]。从小 RNA 病毒科家族成员的血清型分型数量中我们不难看出对于研制有效预防脊髓灰质炎病毒疫苗其难度要远远小于口蹄疫病毒和鼻病毒。

小 RNA 病毒是由 60 个原体所组成,每一个原体又包括了 4 个结构蛋白,分别为 VP1、VP2、VP3 和 VP4。在 14 型鼻病毒中这 4 个蛋白的相对分子量分别为 3.2 KD、2.9 KD、2.6 KD、0.7 KD。其中结构蛋白 VP4 和 VP2 是由病毒组装后期外壳蛋白 VP0 切割而成。VP0 蛋白成功切割后,病毒 RNA 基因组进入蛋白外壳内完成后续组装,这样一个完整的病毒颗粒也就随之诞生了。对于结构蛋白 VP1、VP2、VP3 和 VP4 在拓扑学中的定位关系,科研人员曾不遗余力的花费了大量精力,在各种实验证据面前其结果逐渐浮出水面。这项庞大的研究中实验人员运用了各种已知的先进手段,其中包括利用化学标记物标记、交联剂、特异性抗体、紫外光照射。最终各国研究人员综合各种证据达成了一致的结论:VP1、VP2、VP3 具有 8 股反向平行 β 桶状模体结构且处于蛋白外壳的外表面并且是主要的免疫活性区域。VP4 蛋白处于蛋白外壳的内部与基因组 RNA 相连接^[59],由约 70 个左右的氨基酸组成并且在 N 端羧基化^[60]。值得注意的是在对病毒外壳蛋白温和变性处理时 VP4 蛋白会发生脱落现象。

在对小 RNA 病毒科各属病毒(其中包括脊髓灰质炎病毒、口蹄疫病毒、鼻病毒、脑心肌炎病毒、甲肝病毒等)基因组 RNA 序列、蛋白序列的统计学处理中研究人员发现鼻病毒与脊髓灰质炎病毒蛋白序列相对保守,而其他三种病毒的相对保守性较差,尤其反映在结构蛋白的序列上^[58]。

1.2.2 抗体与小 RNA 病毒的结构象

刺激机体产生有效的中和抗体是目前抵御小 RNA 病毒科病毒感染的主要有效手段之一。在关于鼻病毒 14 型 (human rhinovirus 14, HRV14) 的相关研究中揭示了其抗体的识别和中和病毒的过程。研究中人们发现抗体在中和病毒的过程中会引发病毒蛋白外壳构象发生巨大的改变,其实证证据来自于冷冻透射电镜 (cryo-TEM) ^[60, 61]和晶体结构分析^[62]两个方面。这样的证据进一步说明抗体的识别是一个可塑性的过程,并且颠覆了此前研究者们认为抗体只能识别于一个相对狭窄环境中的非可塑性受体结合位点^[63]。抗体在机体内主要有两个方面的作用:结合病毒颗粒(体液免疫)、协同其他免疫系统(细胞免疫)^[64]。抗体

结合可塑性假说在其他致病微生物的研究中也得到了充分地证实^[63],所以说一个疫苗的成功与否在于是否会刺激机体产生对病原体有高结合力的特异性中和抗体。

有了这样的观点使得我们在研发疫苗的过程中目标变得更加明确,我们应该把重点放在病毒蛋白外壳的抗原识别表位、抗体所引起、艾德受体识别位点构象改变这两方面。在 14 型鼻病毒与其抗体复合物的结构图像中,我们可以看出抗体与鼻病毒蛋白外壳结合的相当紧密,并且不仅限于一个抗原表位^[62, 63]。在抗体与病毒蛋白外壳结合的结构模型中研究人员还发现,针对 N1m 颈环结构的抗体无法有效地中和病毒^[65, 66],并且针对整个病毒蛋白外壳产生的抗体也无法有效结合到 N1m-IA 颈环结构上。在 2 型鼻病毒中有一个值得我们注意的例外,其抗体产生了交叉反应活性,不仅能结合病毒上的 N1m-II 位点而且还能有效地结合人工合成多肽上的 N1m-II 位点^[67]。然而实际中想要合成出一条囊括了所有鼻病毒抗原位点的多肽是不可行的,并且这样的多肽也不太可能产生中和抗体。从以上实验结论中我们不难看出所涉及的抗体大致分为两种:第一是种针对整个病毒颗粒的,第二是种针对病毒颗粒表面抗原决定簇多肽的。

1.2.3 小 RNA 病毒 VP4 蛋白与中和抗体

在之前的实验研究中人们往往认为一个有效的中和抗体其抗原决定簇识别表位只能处于病毒外壳的外表面,病毒外壳内部几乎不可能存在有效地中和位点,其证据也是显而易见:从空间结构角度出发病毒外壳内部蛋白产生的抗体根本无法接触到病毒外壳内部。这样的上述结论是有一定的道理,但在现实中小 RNA 病毒科病毒的研究证据显示上述结论还是有待商榷的。

在脊髓灰质炎病毒的研究实验中发现 1 型血清型病毒的 VP4 蛋白以及 VP1 蛋白的 N 端同样也可产生相应的抗体^[68, 69]。研究资料显示,脊髓灰质炎病毒的构象在生理温度范围内可发生一定的热力学改变,这一构象变化过程刚好可以解释内部结构蛋白 VP4 及 VP1 蛋白 N 端产生的抗体具有中和活性的结果。同时,脊灰病毒构象热力学的改变在病毒感染宿主细胞过程中具有重要的作用。尽管这些外壳蛋白处于病毒外壳的内部-蛋白外壳与病毒 RNA 之间-但是由他们产生的抗体却仍具有中和活性^[70]。这样的结果显示脊髓灰质炎病毒的蛋白外壳具有很强的自身动态变化,而不是像晶体结构图所反映的那样处于一个静止状态。由此说来这些可以产生抗体的蛋白部分一定是在某个动态过程中展露于病毒外壳的动态表面,并且这样的动态过程是温度依赖型的可逆的。虽然这种蛋白外壳的外表面变化过程在病毒的生长周期中所起到的作用目前还未知,但是 VP1 蛋白的 N 端以及 VP4 蛋白在促进病毒与宿主细胞的膜融合过程中却起到了重要作用^[64, 71]。

近期在其他病毒的研究证据中同样发现了这种病毒蛋白外壳的动态变化过程。在猪水疱病病毒^[72]（猪水疱病病毒、SVDV，小RNA病毒科、肠道病毒属的一种，仅有1个血清型）、柯萨奇A9病毒^[73]的实验中研究人员利用全病毒在猪和兔身上分别刺激产生了抗体。这些多克隆抗体对于猪水疱病病毒、柯萨奇A9病毒的VP1蛋白N端合成多肽以及VP4蛋白合成多肽均产生了很好的结合活性。在临床研究中发现1型糖尿病患者的血清中含有针对柯萨奇B4病毒VP4蛋白的抗体，这也再次证明VP4蛋白在病毒侵染宿主细胞的过程中存在一个翻转暴露的过程^[74]。综合上述的研究结果我们会发现病毒蛋白外壳的所谓动态“呼吸”过程是一个普遍存在的现象。

运用限制性蛋白水解法以及质谱分析法（matrix-assisted laser desorption/ionization [MALDI]，基质辅助激光解吸电离）可以有效研究14型鼻病毒蛋白外壳动态变化过程^[60]。实验中病毒在不同的时间段将会予以基质辅助处理和可溶性胰蛋白酶水解处理，水解后的片段会用基质辅助激光解吸电离技术进行研究分析。令人惊讶的是，鼻病毒VP4蛋白和VP1蛋白的N端虽然是深埋在病毒外壳的内部，但他们却是整个蛋白中最易受到水解的部分。另外，水解实验的对照组中加入了先已被证明可以保护病毒不受酸、热而导致变性的成分。这种成分不会影响胰蛋白酶的水解活性，但其却可以保护VP1蛋白和VP4蛋白在很长一段时间内不会被水解。14型鼻病毒的这些蛋白部分在所谓的“呼吸”过程中确实会短暂地暴露于病毒外壳的外表面，而某些疏水性的药物结合区域在这种动态翻转暴露过程中起到了一定的促进作用。

针对14型鼻病毒VP1蛋白和VP4蛋白产生的多克隆抗体的研究会使我们更加深入认识到这种病毒蛋白外壳的动态变化过程^[75]。结果显示只有针对VP4蛋白N端产生的抗体具有体外中和病毒的活性。实验中进一步发现针对14型鼻病毒VP4蛋白的抗血清对于其他血清型的鼻病毒产生了交叉反应活性（其中包括16型鼻病毒、29型鼻病毒），这样的结果其原因很有可能在于VP4蛋白序列的高度保守性。在16型鼻病毒的抗体中和试验、MALDI实验中，抗体中和过程和中和水解过程的分析均显示在37℃时实验效果最明显，而在14型鼻病毒、29型鼻病毒的实验中提高温度实验现象无明显变化。病毒VP4蛋白N端30个氨基酸残基的抗原决定簇定位实验中以及14型鼻病毒VP4蛋白的突变体（Ser5Cys）在室温下形成半胱氨酸交联二聚体的现象均证明这一部分是以非线性构象存在的。4℃实验条件下半胱氨酸并未发生交联可进一步证明病毒蛋白外壳的所谓“呼吸”过程在其VP4蛋白的暴露、病毒与宿主细胞的结合中起到关键作用。鼻病毒VP4蛋白的二聚体化并不会影响其侵染特性，究其原因可能是由于VP4蛋白的暴露正是病毒与宿主细胞膜融合过程的一部分。VP4蛋白很有可能成为广

谱鼻病毒疫苗的候选者，但前提是还需要对VP4蛋白单体结构有更加深入的了解。

就目前已有的各种针对小RNA病毒科病毒VP4蛋白的实验研究结果中，我们可以总结出以下三点结论：①小RNA病毒科VP4蛋白可产生其相应的抗体，且此抗体具有一定的中和病毒活性。②小RNA病毒科VP4蛋白在生理温度下可向其自身外表面暴露，这一构象的蛋白外壳具有在病毒侵染宿主细胞过程中有重要的作用。③小RNA病毒的蛋白外壳具有很强的自身动态变化，而不是像晶体结构图所反映的那样处于一个静止状态。总之，抗体与病毒结构构象关系的研究对理想疫苗的设计及更好地预防小RNA病毒的传播具有重要意义。

1.3 乙型肝炎病毒核心蛋白作为表位疫苗载体的研究进展

已有研究发现重组乙型肝炎病毒核心蛋白（Hepatitis B virus core protein, Hbc）可作为表位疫苗的载体使用，其形成的病毒样颗粒（Virus-like particle, VLP）呈球形二十面体对称结构。当外源蛋白插入Hbc蛋白后，可在Hbc颗粒的表面充分被展示。迄今为止，Hbc已展示过多种病原生物的抗原表位^[76]。Hbc颗粒作为载体不仅可以高效的展示外源蛋白序列，还可刺激机体产生特异性体液免疫及细胞免疫；Pumpens和Grens^[77]以及Riedl等^[78]都曾指出，含有外源蛋白的Hbc颗粒在免疫过程中能够起到佐剂的作用。Hbc颗粒的免疫途径较为广泛，除传统的注射方式外口服也可实现免疫过程^[79]。另一方面，Hbc形成的病毒样颗粒能够有效包裹核酸等其他小分子，这也使其成为药物或基因的载体^[80]。

1.3.1 Hbc的生物学结构特点

Hbc蛋白的基因是由乙型肝炎病毒（Hepatitis B virus, HBV）基因组中的C基因所编码，乙肝核心抗原（Hepatitis B core antigen, HbcAg）由Hbc所组成。Hbc单体的二级结构主要为 α -螺旋（图1-3）^[81]，两个单分子Hbc形成一个二聚体，每个二聚体含有两个 α -螺旋发夹结构（图1-4），这样的结构形成了蛋白衣壳表面的刺突（Spike）^[82]。Hbc分子的第78-82位氨基酸残基正是刺突顶端所在，这一区域正是抗原决定簇的主要识别位点，也称主要的免疫显性区域（Major immunodominant region, MIR）^[77]（图1-3、1-4）。Roseman等^[83]曾指出，单体Hbc的 α -螺旋发夹结构拥有2种不同的构象，而二聚体是由这两种不同构象的两个单体所组成。

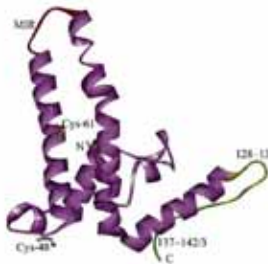


图 1-3 Hbc单体结构图
Fig. 1-3 Structure of monomer Hbc

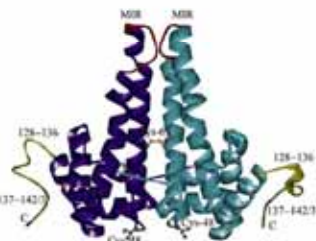


图 1-4 Hbc二聚体结构图
Fig. 1-4 Structure of dimer Hbc

Hbc颗粒的形成过程中主要含有三种相互作用^[84]：维持单体折叠及二聚体稳定的疏水作用；每个单体内的共价键作用（图1-4）；两单体分子间的二硫键作用。Hbc在多种表达系统中（原核、酵母、昆虫细胞）均能高效表达及正确自组装^[85]。原核系统表达的Hbc可形成两种大小不同的颗粒^[86]。小颗粒由180个单体组成，其表面含有90个刺突；大颗粒由240个单体组成，其表面含有120个刺突。

1.3.2 Hbc作为疫苗载体的应用

外源蛋白序列可通过基因重组或化学偶联^[85]的方式与Hbc相连接。

1.3.2.1 基因重组

基因重组的方式主要是将编码外源蛋白的基因通过重组技术插入编码Hbc基因的特定位点，基因重组后利用各种表达系统表达含有外源蛋白的Hbc。基因重组过程中可对Hbc长度、外源基因插入位置、外源基因组合形式等多方面因素进行改变来提高外源蛋白的免疫原性。

Hbc颗粒的自组装能力、颗粒的二态性、颗粒与核酸的结合能力及激发免疫的类型都是由其长度所决定。

天然的HbcAg蛋白其氨基酸序列的长度约为183-185 aa，Hbc蛋白C端150-183位氨基酸区域精氨酸含量较高，该区域对于颗粒的自组装^[86]及颗粒的大小与形态^[87]无任何影响。Zlotnick等^[84]为研究Hbc颗粒的自组装过程，利用细菌表达了一系列长度不同的Hbc蛋白。实验结果显示，当氨基酸序列长度大于或等于140个时，Hbc蛋白才可自组装形成颗粒，形成的病毒样颗粒包含两种形态大小。颗粒混合物中，小颗粒的比例会随着Hbc蛋白氨基酸序列的减少而增加。有报道曾指出，Hbc蛋白自组装形成颗粒所需氨基酸序列长度最少不能低于143^[81]/144^[88]个。然而，也有文献报道^[77, 89]，Hbc蛋白C端氨基酸序列的减少会导致其结构的不稳定。有些研究者为了使C端减少的Hbc蛋白能够继续保持结构稳定，在其C端插入一个Cys^[90, 91]。

Hbc蛋白的第150-157位氨基酸序列区域具有RNA结合活性，第157-177位氨基酸序列区域具有DNA结合活性^[77]。Hbc蛋白位于C端的核酸结合区域可非特异性地吸附少量RNA，经自组装后包裹在Hbc颗粒中的RNA可起到佐剂的作用，并且其效果是游离RNA片段的1000倍^[92]。Zlotnick等^[84]指出，天然长度的Hbc优先诱导Th1型反应发生，而长度缩短为144个氨基酸或149个氨基酸时优先诱导Th2型反应发生。这也表明不同类型的病原体可选用不同长度的Hbc蛋白。

外源基因插入的位置主要集中在Hbc蛋白的N端、主要免疫显性区域(MIR)及C端。

N端插入外源蛋白基因是研究较早的一种插入方式，而截至目前的研究发现N端插入外源蛋白基因的手段已不是最优的插入方式。有报道^[77]曾指出，插入N端的外源蛋白其序列在长度上有一定的限制，当外源蛋白序列超过50个氨基酸长度时就可能影响到Hbc颗粒的自组装能力。较长的N端插入序列还会对免疫辅助作用产生影响^[90]。

外源蛋白基因插入C端也是较为常用的插入方式之一。外源蛋白插入C端后一般会被包裹在颗粒的内部，无法暴露在颗粒的表面。外源蛋白插入C端后会降低其特异的B细胞免疫原性^[76]。

MIR 区是应用最为广泛的插入区域, 针对这一区域的研究也较多。主要原因在于该区域位于病毒样颗粒表面的刺突顶端, 是主要的免疫显性区域, 外源蛋白插入到这一区域后不仅不能被展示在颗粒的表面, 而且还能提高其免疫原性^[77]。另一方面, 虽然 MIR 区位于 Hbc 蛋白的内部, 但与 N 端和 C 端相比, 其插入容量更大^[93, 94]。另一方面, 将 MIR 区某些氨基酸进行缺失^[76, 77]或添加某些辅助表位, 可降低 Hbc 蛋白自身的免疫原性, 并同时提高外源蛋白的免疫原性^[95]。

外源蛋白插入序列的组成会影响到 Hbc 颗粒的自组装能力, 同时外源蛋白序列氨基酸残基的某些理化性质也会影响到 Hbc 颗粒自组装能力。Karpenko 等^[96]曾指出具有表位疏水性过高、表位序列过长及 β 链指数过高等情况的外源序列插入 MIR 区后将会影响到颗粒的自组装能力。此外, Billaud 等^[99]曾指出外源蛋白的电荷情况也会影响 Hbc 颗粒的自组装能力。

1.3.2.2 化学偶联

将外源蛋白序列展示在 Hbc 颗粒表面的另一种方式是通过化学交联剂将外源蛋白直接连接到 Hbc 表面。Jegerlehner 等^[85]建立了将外源蛋白直接交联到 Hbc 颗粒表面的方法, 这一方法首先利用分子生物学技术使外源蛋白含有一个自由的 Cys, 同时使 Hbc 蛋白在 MIR 区含有一个 Lys, 最后通过交联剂使含有 Cys 的外源蛋白与含有 Lys 的 Hbc 蛋白相互连接起来。这一方法能够有效降低 Hbc 蛋白自组装时所产生的空间位阻, 从而更好的诱导体液免疫反应, 但此方法与基因插入技术相比, 制备成本高、重复性差且免疫原性较低^[89]。

1.4 原核表达系统简介

原核表达系统中最为典型的当属大肠杆菌 (*Escherichia coli*) 表达系统。Itakura 等于 1977 年在大肠杆菌中成功表达了生长激素抑制素 (一种哺乳动物的肽类激素), 这一实验首次实现了利用原核细胞表达外源目的蛋白, 同时也为基因工程的发展奠定了一定的基础。

1.4.1 T7 表达系统

Novagen 公司开发的 pET 质粒系统是最常用的大肠杆菌质粒表达系统, 这一系统的开发基于 T7 RNA 聚合酶 (T7 RNA polymerase, T7 RNAP) 及其强启动子间的高效转录与特异性。T7 RNA 聚合酶在诱导目的蛋白表达时, 会调动大肠杆菌细胞中所有可利用的资源用于目的蛋白的表达, 因此目的蛋白的产量较高。由其他原核启动子组成的原核表达系统也常用于目的蛋白的表达^[97]。

1.4.2 目的蛋白表达形式及在细胞中的定位

外源蛋白通过原核表达系统表达后其存在形式大致有三种: 可溶性、分泌以及包涵体。

可溶性蛋白通常带有一段标签序列与其融合表达。这一融合标签序列在目的蛋白的浓缩、提纯及检测过程中起到至关重要的作用^[98-100]。

分泌蛋白是利用信号肽序列将表达后的目的蛋白分泌至原核细胞周质腔内。分泌表达形式其优点: 便于纯化、防止细胞内的蛋白酶对目的蛋白产生降解、便于目的蛋白形成天然的空间结构^[101]。

包涵体蛋白是目的蛋白表达后肽链折叠过程中发生了错误聚合, 不能形成天然蛋白结构所致。包涵体表达形式其优点在于防止细胞内的蛋白酶对目的蛋白产生降解, 缺点在于目的蛋白表达后缺乏生物学活性。

1.4.3 外源基因在大肠杆菌中表达的优缺点

大肠杆菌作为最常用的表达目的蛋白宿主菌其优点在于: 清晰的遗传背景、简单而快速的培养繁殖过程、较高的转化效率、低廉的大规模生产成本。这些优点也使得大肠杆菌广泛地被用于目的蛋白的制备^[102]。

大肠杆菌表达系统虽优点颇多, 但由于属于原核表达系统也有其自身缺点所在, 目的蛋白表达后无法在 N 端或 C 端进行糖基化、磷酸化等修饰, 无法形成二硫键, 具有高级结构的蛋白翻译后无法正确折叠。而诸如此类的翻译后修饰过程对蛋白的生物学活性具有非常重要的作用。另外, 大肠杆菌表达后的目的蛋白其 N 端仍有甲硫氨酸存在, 这不仅会降低目的蛋白的稳定性, 还会产生一定的免疫原性^[103, 104]。

1.4.4 大肠杆菌表达系统的研究新进展

近些年, 大肠杆菌表达系统的研究方向已发生改变, 最初的研究方向在于表达载体及表达系统的构建, 而现今的研究方向在于表达系统缺陷的完善。例如: 提高含有大肠杆菌稀有密码子的目的蛋白表达水平, 降低细胞内蛋白酶的浓度用以提高具有生物活性的目的蛋白表达水平^[105]。近期的研究发现, 将某些具有活性的小分子蛋白与目的蛋白融合表达可提高目的蛋白的表达水平^[106], 或通过引入促溶标签使无法表达的目的蛋白得以表达、使可溶性形式的表达替代包涵体形式的表达^[107]。

1.5 本文的研究内容及意义

肠道病毒 71 型 (Enterovirus 71, EV71) 是引起婴幼儿手足口病的主要病原体之一, 同时还能引起无菌性脑膜炎、脑干脑炎和脊髓灰质炎样麻痹等多种与神经系统相关的疾病, 重症患儿病情进展迅速, 严重者可导致死亡。2008 年成为我国法定报告的丙类传染病。因此, 研制高效广谱的 EV71 疫苗具有十分重要的意义。由于 EV71 病毒 VP4 蛋白在其各株之间以及柯萨奇 A16 型病毒各株之间具有很强的保守性, 如果 VP4 蛋白可激活机体产生相应的中和抗体, 那么对于未来研制基于 VP4 的广谱抗 EV71 病毒疫苗将起到指导性作用, 并且可以进一步证明小 RNA 病毒科 VP4 蛋白的热力学动态平衡理论及 VP4 蛋白在病毒感染宿主细胞时起到的重要作用。乙型肝炎病毒核心颗粒 (Hbc) 因其在目前所知的几乎所有同源、异源表达系统, 包括细菌中的高水平表达、高效的颗粒自组装性能以及高强度的免疫原性, 一直被视作分析展示外源肽段的最灵活也是最有希望的模型。本课题就是利用了 Hbc 高效展示外源肽段这一特点, 用其展示 EV71 病毒的 VP4 蛋白, 从而使 VP4 蛋白获得更好的免疫原性, 为研究 VP4 蛋白的中和抗原决定簇提供更加优越的条件。

第2章 基于 HBc 和 EV71-VP4 蛋白的病毒样颗粒制备

本章实验中利用分子克隆技术构建了 HBc-EV71-VP4-N20 及 HBc 的重组原核表达载体。将表达载体 pET-22b (+)-HBc-EV71-VP4-N20 与 pET-22b (+)-HBc 转至大肠杆菌细胞后, 对大肠杆菌进行培养并诱导表达了融合蛋白 HBc-EV71-VP4-N20 及 HBc, 融合蛋白 HBc-EV71-VP4-N20 及 HBc 利用 Western Blot 检测表达情况, 透射电子显微镜观察融合蛋白已成功自组装形成病毒样颗粒。

2.1 实验材料及溶液配制

2.1.1 实验材料

1. 菌株与质粒: 质粒 pET-22b (+) 购买于 Merck-Novagen 公司; 大肠杆菌 DH5 α 及 BL21 (DE3) 感受态细胞购买于天根生化科技(北京)有限公司; PCR 引物的合成由上海生物工程技术有限公司; 基因测序鉴定由 Invitrogen 公司完成。

2. 酶、试剂及耗材: 限制性内切酶 *Xho* I 与 *Nde* I、NEBuffer4、BSA 购买于 NEW ENGLAND BioLabs Inc.; DNA Marker、DNA 琼脂糖凝胶电泳 loading buffer、PCR Amplification Kit、T4 DNA ligation buffer、T4DNA 连接酶、DNA Fragment Purification Kit Ver. 2.0 购买于大连宝生物有限公司; TIANprep Mini Plasmid Purification Kit Ver. 2.0 购买于天根生化科技(北京)有限公司; 脱脂奶粉购买于北京鼎国昌盛生物技术有限公司; Western Blotting (5 \times) loading buffer、蛋白 marker 购买于 Fermentas 公司; 一抗为 6 \times His 的鼠源单抗购买于北京康为世纪生物科技有限公司; 二抗为羊抗鼠单抗, 购买于 KPL 公司; 蛋白定量试剂盒购买自北京天恩泽生物技术有限公司; 2% 磷酸钨酸购买于北京中镜科技技术有限公司; 0.22 μ m 滤膜购买于 PALL 公司; 100 KD 超滤管购买于 Millipore 公司; PVDF 膜购买于 BIORAD 公司; 金属整合层析 Ni 柱购买于 GE HEALTH CARE 公司; 电镜封口膜购买于 PARAFILM 公司; 230 目铜网(单面镀膜) 购买于北京中镜科技技术有限公司。

2.1.2 溶液配制

LB 液体培养基: 蛋白胨 (Tryptone) 1 g, 酵母提取物 (Yeast Extraction) 0.5 g, NaCl 1 g, 加入去离子水定容至 100 mL, 120 $^{\circ}$ C 高温高压灭菌 20 min;

LB 固体培养基: 蛋白胨 (Tryptone) 1 g, 酵母提取物 (Yeast Extraction) 0.5 g, NaCl 1 g, 琼脂粉 1.5 g, 加入去离子水定容至 100 mL, 120 $^{\circ}$ C 高温高压灭菌

-21-

20 min;

PBS 缓冲液: NaCl 8 g, KCl 0.2 g, Na₂HPO₄ 12H₂O 3.58 g, KH₂PO₄ 0.27 g, 用 NaOH 调节 pH 至 7.4, 加入去离子水溶解并定容至 1 L, 120 $^{\circ}$ C 高温高压灭菌 20 min;

50 \times TAE: Tris 242 g, Na₂EDTA 2H₂O 37.2 g, 去离子水 800 mL, 充分搅拌均匀; 加入醋酸 57.1 mL, 继续搅拌均匀; 去离子水定容至 1 L, 室温保存; 使用的时候将其稀释为 1 \times TAE 即可;

氨苄青霉素母液: 配成 100 mg/mL 水溶液, -20 $^{\circ}$ C 保存备用;

IPTG: 将 IPTG 配制成 24 mg/mL (100 mM) 的水溶液, 并进行过滤除菌后保存;

Balance buffer: pH 8.0, 50 mM Tris, 100 mM NaCl, 20 mM imidazole

Binding buffer: pH 8.0, 50 mM Tris, 100 mM NaCl, 40 mM imidazole

Elution buffer: pH 8.0, 50 mM Tris, 100 mM NaCl, 500 mM imidazole

Separating gel buffer (pH 8.8): Tris-base (1.5 M) 90.825 g, SDS (0.4%) 2.0 g 溶于 500 mL 去离子水中;

10% Separating Gel (10 mL, 2 Gels): ddH₂O 4.1 mL, 30% acrylamide mix 3.3 mL, 1.5 M Tris (pH 8.8) 0.4% SDS 2.5 mL, 10% ammonium persulfate 0.1 mL, TEMED 0.004 mL;

Stacking gel buffer (pH 6.8): Tris-base (0.5 M) 30.275 g, SDS (0.4%) 2.0 g 溶于 500 mL 去离子水中;

5% Tris (pH 6.8) (6 mL, 2 Gels): ddH₂O 3.41 mL, 30% acrylamide mix 1.0 mL, 0.5 M Tris (pH 6.8) 0.4% SDS 1.5 mL, 10% ammonium persulfate 0.06 mL, TEMED 0.006 mL;

10 \times Running buffer (pH 8.3): Tris-base 30.3 g, Glycine 187.7 g, SDS 10 g, 用去离子水溶解后定容至 1 L; 使用时稀释为 1 \times ;

2 \times Transfer buffer: Tris-base 5.8 g, Glycine 2.9 g, 加入去离子水溶解后, 加入 methanol 200 mL, 混后用去离子水定容至 500 mL; 使用时稀释为 1 \times ;

1 \times PBST: PBS:Tween 20=1 000:1。

2.2 实验材料及仪器设备

凝胶成像系统	IS-4400, 香港 Alpha Innotech Corporation
PCR 扩增仪	Applied Biosystems PCR system 2700
电泳仪	DYCP-31C, 北京市六一仪器厂

-22-

电子天平	N2B110 型, Ohaus 公司
涡流混合器	SFG-02.500, 黄石市恒丰医疗器械有限公司
恒温磁力搅拌器	85-2 型, 上海同乐仪器厂
离心机	5418, Eppendorf 公司
冷冻离心机	D37520 osterode, Thermo 公司
蛋白电泳仪	Mini-PROTEAN [®] , Bio-Rad 公司
电转仪	北京市六一仪器厂
紫外分光光度计	UV2550, SHIMADZU 公司
透射电子显微镜	HITCH 7650, HITCH 公司
电热恒温培养箱	DHP-9052, 上海一恒科技有限公司
电热恒温鼓风干燥箱	SFG-02.500, 黄石市恒丰医疗器械有限公司
自动蒸汽灭菌锅	D-1 型, 北京发恩科贸有限公司
酶标仪	Model 550, Bio-Rad 公司
恒温摇床	DDHT-300, 江苏太仓市实验设备厂
恒温水浴锅	STUART-RE300B, Barloworld Scientific
超声细胞裂解仪	SONICS Vibra Cell TM
凝胶成像分析系统	IS-4400 Alpha Innotech Corporation 公司
红外荧光扫描成像仪	LI-COR Odyssey, LI-COR 公司
4 $^{\circ}$ C 冰箱,	SC-329, Haier 公司
-80 $^{\circ}$ C 超低温冰箱	MDF-192, SANYO 公司产品型号

2.3 实验方法

2.3.1 HBc-EV71-VP4-N20 融合蛋白设计路线

HBc-EV71-VP4-N20 融合蛋白设计路线为: 将 EV71 病毒 VP4-N20 蛋白 (EV71 病毒 VP4 蛋白 N 端前 20 个蛋白序列, 保守序列) 融入 HBc 蛋白的 78-79 位点之间。构建原理如图 2-1 所示。

HBc 蛋白采用如下序列:

MDIDPYKEFGASVELLSFLPSDFPFSIRDLLDTASALYREALSPHEHCSPHHTAL
RQAILCWGELMNLATWVGSNLEDPASRELVVSYVNVNMGKIRQLLWFHISC
LTFGRETVLELYLVSGVWIRTPPAYRPPNAPILSTLPETTVV。

EV71 病毒 VP4-N20 蛋白序列: GSQVSTQRS GSHENSNSATE。

HBc-EV71-VP4-N20 融合蛋白序列:

MDIDPYKEFGASVELLSFLPSDFPFSIRDLLDTASALYREALSPHEHCSPHHTAL
RQAILCWGELMNLATWVGSNLEDGVSQVSTQRS GSHENSNSATEPASRELVV

-23-

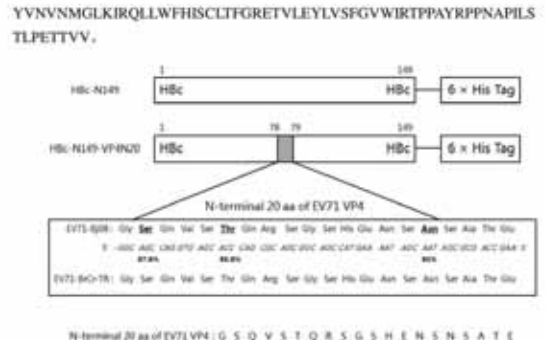


图 2-1 构建原理图
Fig. 2-1 Cloning diagram

HBc-EV71-VP4-N20 基因利用大肠杆菌 (*E. coli*) 密码子偏好性进行优化, 采用全基因合成 (北京博迈德科技发展有限公司) 搭载于 pGH 质粒载体 (北京博迈德科技发展有限公司提供)。

HBc-EV71-VP4-N20 基因优化后序列如下:

atggatgatccgtataaagaattggcgcgagctggaactcgtgactttctgccgagcagctttttccgacattcgc
gatctcgtgataccgcgagcgcgtgatcgcgaagcgtgaaaccccgaaactcagccgccatcacccgcgc
tgcgccagcagctctgctggggcgaactgatgaactcgcgacctggctggcgacgaacttgaagatgcgagcca
ggtgagcaccaccagcagcgcagccatgaaatagcaatagcgcgaccgaccgacccggcagcgcgaactggtgcca
gctatgtaattgtaatatggcctgaaatgccagctgctgtgtttcatatagctcctgactttgccgcaaacccg
tgcctgaaatctggtgactttggctgtgattcgcaccccgccgctgacccgccgaatgcgcgacttctgagca
cctcgcgaaaccacccgtgtg。

2.3.2 重组原核表达载体 pET-22b (+)-HBc 及 pET-22b (+)-HBc-EV71-VP4-N20 的构建

2.3.2.1 重组原核表达载体 pET-22b (+)-HBc-EV71-VP4-N20 的构建

(一) 聚合酶链式反应扩增目的片段 HBc-EV71-VP4-N20

根据目的基因片段的序列信息, 及载体 pET-22b (+) 的多克隆位点相关信息设计引物, 选定酶切位点 *Xho*I、*Nde*I 并通过引物设计软件 Oligo7 的设计得到

-24-

上下游引物。

上游引物: 5'-ccgctcgagcaccacgggtt 3'

下游引物: 5'-ggaattccatgatattgatcgtataag-3'

按表 2-1 所示加入 PCR 反应体系, 并瞬时离心以混匀反应体系:

反应物	体积 (μL)
Pyrobest DNA Polymerase (5 U/μL)	0.25
10xPyrobest Buffer II	5
dNTP Mixture (各 2.5 mM)	4
质粒 pGH-Hbc-EV71-VP4-N20	2.5 (10 ng)
上游引物 (10 μM)	2
下游引物 (10 μM)	2
dd H ₂ O	34.25
总体系	50

PCR 反应条件为: 94 °C 5 min (循环 1 次); 94 °C 1 min, 56 °C 1 min; 72 °C 1 min (循环 30 次); 72 °C 10 min (循环 30 次)

将 PCR 反应后产物通过琼脂糖凝胶电泳进行鉴定。具体步骤如下:

(1) 配制琼脂糖凝胶: 将 1 g 琼脂糖溶于 100 mL TAE 电解液中, 加入锥形瓶中, 置于微波炉中加热 3 min, 使琼脂糖充分溶解, 待稍冷却后, 加入 5 μL EB (10 mg/mL), 将该溶液倒入胶盒中, 插入小梳子, 待其冷却。

(2) 上样和电泳: 使用 10x 的 loading buffer, 将 2 μL 的 loading buffer 和 18 μL 的样品混匀, 上样。

(3) 在 110 V 电压下电泳 30 min。

(二) 纯化 PCR 扩增的目的基因片段 Hbc-EV71-VP4-N20

PCR 产物的基因片段经琼脂糖凝胶电泳初步鉴定正确后, 使用 Takara 公司生产的 DNA 片段纯化试剂盒纯化目的基因片段 Hbc-EV71-VP4-N20。具体步骤如下:

(1) 将 PCR 反应液与 DB 缓冲液混匀, 保证 DB 缓冲液的加入量是 PCR 反应液的 3 倍。

(2) 将离心吸附柱插入收集管中。

(3) 将步骤 (1) 的混合溶液转移至离心吸附柱内, 13 000 rpm 离心 1.5 min, 弃滤液。

(4) 离心吸附柱中加入 Rinse A 溶液 500 μL, 13 000 rpm 离心 1 min, 弃滤液。

-25-

(5) 离心吸附柱中加入 Rinse B 溶液 700 μL, 13 000 rpm 离心 1 min, 弃滤液。

(6) 重复步骤 (5)。

(7) 将离心吸附柱插入收集管中, 13 000 rpm 离心 2 min。

(8) 将离心吸附柱插入新的 1.5 mL 的离心管中, 取洗脱缓冲液 25 μL 加到离心吸附柱滤膜的中间, 室温静置 3 min。

(9) 13 000 rpm 离心 2 min, 收集 DNA 样品。

(三) 目的基因片段 Hbc-EV71-VP4-N20 的酶切与纯化

根据目的基因 Hbc-EV71-VP4-N20 上下游的限制性内切酶位点对目的基因进行双酶切以形成粘性末端。

酶切反应体系如表 2-2 所示。

反应物	体积 (μL)
Hbc-VP4	15 (150 ng/μL)
Xho I	2
Nde I	2
10xNEBuffer 4	8
10xBSA	8
dd H ₂ O	45
总体系	80

加好反应体系后将其放置于 37 °C 反应过夜。

酶切产物回收采用 Takara 公司生产的 DNA 片段纯化试剂盒。具体步骤如下:

(1) 将 PCR 反应液与 DB 缓冲液混匀, 保证 DB 缓冲液的加入量是 PCR 反应液的 3 倍。

(2) 将离心吸附柱插入收集管中。

(3) 将步骤 (1) 的混合溶液转移至离心吸附柱内, 13 000 rpm 离心 1.5 min, 弃滤液。

(4) 离心吸附柱中加入 Rinse A 溶液 500 μL, 13 000 rpm 离心 1 min, 弃滤液。

(5) 离心吸附柱中加入 Rinse B 溶液 700 μL, 13 000 rpm 离心 1 min, 弃滤液。

(6) 重复步骤 (5)。

(7) 将离心吸附柱插入收集管中, 13 000 rpm 离心 2 min。

(8) 将离心吸附柱插入新的 1.5 mL 的离心管中, 取洗脱缓冲液 25 μL 加到

-26-

离心吸附柱滤膜的中间, 室温静置 3 min。

(9) 13 000 rpm 离心 2 min, 收集 DNA 样品。

(四) 质粒载体 pET-22b (+) 的酶切与纯化

根据质粒载体 pET-22b (+) 上下游的限制性内切酶位点对质粒载体进行双酶切以形成与目的基因相对应的粘性末端。

酶切反应体系如表 2-3 所示。

反应物	体积 (μL)
pET-22b (+)	15 (150 ng/μL)
Xho I	2
Nde I	2
10xNEBuffer 4	8
10xBSA	8
dd H ₂ O	45
总体系	80

加好反应体系后将其放置于 37 °C 反应过夜。次日, 取 2 μL 反应液利用琼脂糖凝胶电泳验证酶切效果。

酶切产物回收采用 Takara 公司生产的 DNA 片段纯化试剂盒。具体步骤如下:

(1) 将 PCR 反应液与 DB 缓冲液混匀, 保证 DB 缓冲液的加入量是 PCR 反应液的 3 倍。

(2) 将离心吸附柱插入收集管中。

(3) 将步骤 (1) 的混合溶液转移至离心吸附柱内, 13 000 rpm 离心 1.5 min, 弃滤液。

(4) 离心吸附柱中加入 Rinse A 溶液 500 μL, 13 000 rpm 离心 1 min, 弃滤液。

(5) 离心吸附柱中加入 Rinse B 溶液 700 μL, 13 000 rpm 离心 1 min, 弃滤液。

(6) 重复步骤 (5)。

(7) 将离心吸附柱插入收集管中, 13 000 rpm 离心 2 min。

(8) 将离心吸附柱插入新的 1.5 mL 的离心管中, 取洗脱缓冲液 25 μL 加到离心吸附柱滤膜的中间, 室温静置 3 min。

(9) 13 000 rpm 离心 2 min, 收集 DNA 样品。

(五) 目的基因片段 Hbc-EV71-VP4-N20 与质粒载体 pET-22b (+) 的连接

使用 Takara 公司的 T4 DNA 连接酶, 将回收的目的基因片段 Hbc-EV71-VP4-

-27-

N20 及线性化质粒载体 pET-22b (+) 进行连接反应。连接体系设计原则为: 目的片段与酶切后质粒载体比例为 5:1 (摩尔数比)。反应体系总体积为 25 μL。

连接体系如表 2-4 所示。

反应物	体积 (μL)
目的基因片段	3
pET-22b (+) 载体片段	1
10xT4 DNA Ligation Buffer	2.5
T4 DNA ligase	1
dd H ₂ O	17.5
总体系	25

金属浴 16 °C 进行过夜连接。

(六) 重组质粒 pET-22b (+)-Hbc-EV71-VP4-N20 的转化

(1) 向 100 μL 的 DH5α 感受态细胞中加入 10 μL 的连接反应产物, 放置于冰盒中冷却约 30 min。

(2) 将冷却后的离心管放入金属浴 42 °C 加热 90 s, 加热后再次放置于冰盒中冷却约 3 min。

(3) 加入 900 μL 不含 Amp 的液体 LB 培养基, 在 37 °C 摇床上 150 rpm 慢速复苏 45 min。

(4) 随后将所摇菌液取 200 μL 涂布于 LB 固体平板上 (含 Amp), 将平板放入 37 °C 电热恒温培养箱中倒置培养过夜 (约 12-16 h)。

(七) 重组质粒 pET-22b (+)-Hbc-EV71-VP4-N20 的小量提取

在过夜培养后的固体 LB 平板上, 用 10 μL 的枪头挑取饱满、圆滑、大小适宜的单个菌落, 置于装有 5 mL 液体 LB 培养基 (含氨苄青霉素, 终浓度为 100 μg/mL) 的玻璃试管中, 用海绵塞塞上瓶口, 于 37 °C 恒温摇床上, 以 180 rpm 摇菌过夜 (约 12-16 h)。

利用质粒小提试剂盒提取重组质粒 pET-22b (+)-Hbc-EV71-VP4-N20, 具体步骤如下:

(1) 首先将吸附柱插入收集管中, 加入 600 μL 的平衡液于吸附柱中, 13 000 rpm 离心 1.5 min, 弃收集管中的废液。

(2) 离心管中加入培养过夜的菌液 4 mL, 13 000 rpm 离心 1.5 min, 弃上清。

(3) 取溶液 P1 250 μL 加入含有菌体沉淀的离心管中, 涡旋振荡使沉淀细菌重新悬浮。

(4) 取溶液 P2 250 μL 加入离心管中, 温和翻转 8 次使菌体裂解充分。

-28-

(5) 取溶液 P3 350 μL 加入离心管中, 迅速温和翻转 8 次, 混合均匀, 出现白色絮状沉淀。13 000 rpm 离心 15 min, 沉淀再次出现于离心管底部。

(6) 吸取上清转移到吸附柱中, 吸取过程中尽量温和, 避免沉淀吸出。13 000 rpm 离心 1.5 min, 弃废液。

(7) 取漂洗液 800 μL 加入吸附柱中, 13 000 rpm 离心 1.5 min, 弃废液。

(8) 重复步骤 (7)。

(9) 将吸附柱插入收集管中, 13 000 rpm 再次离心 1.5 min, 保证吸附柱中残余的漂洗液去除完全。

(10) 将吸附柱插入一新的离心管中, 向吸附柱滤膜的中间滴加 55 μL 洗脱液, 室温静置 3 min, 13 000 rpm 离心 1.5 min, 离心管中收集质粒溶液。

(八) 重组质粒 pET-22b (+)-HBc-EV71-VP4-N20 的双酶切鉴定

表 2-5 酶切反应体系

反应物	体积 (μL)
pET-22b (+)-HBc-EV71-VP4-N20	15 (150 ng/ μL)
Xho I	1
Nde I	1
10 \times NEBuffer 4	5
10 \times BSA	5
dd H ₂ O	23
总体系	50

通过对重组质粒限制性酶切位点分析, 选取以下酶切位点对重组质粒进行双酶切鉴定。酶切反应体系如表 2-5 所示。

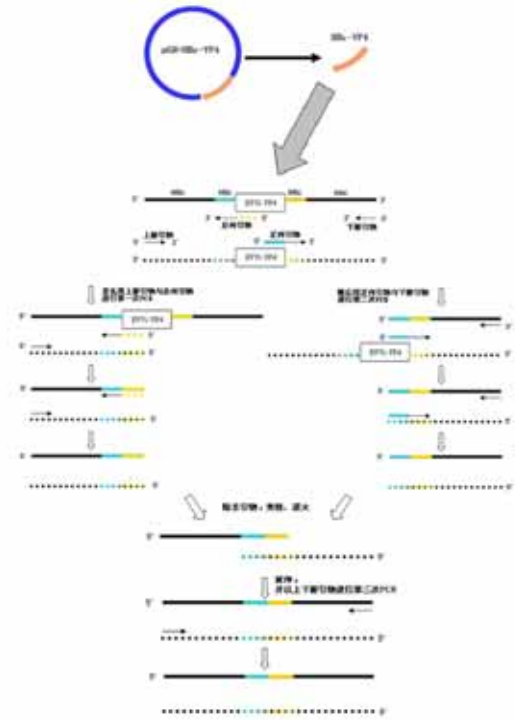
将反应体系放置于 37 $^{\circ}\text{C}$ 下反应 3 h。双酶切后进行琼脂糖凝胶电泳鉴定。

(九) 测序鉴定

将酶切鉴定正确的重组质粒送上海生工进行测序, 测序结果与所设计的序列进行比对。经比对, 目的产物序列与所设计的序列一致。

2.3.2.2 重组原核表达载体 pET-22b (+)-HBc 的构建

构建原理如图 2-2 所示。

图 2-2 构建原理图
Fig. 2-2 Construction diagram

(一) 聚合酶链式反应扩增目的基因 HBc

根据目的基因片段的序列信息, 及载体 pET-22b (+) 的相关信息设计引物并采取融合性 PCR 的方法扩增目的基因片段, 选定酶切位点为 *NdeI*、*XhoI*, 通过引物设计软件 Oligo7 的设计得到两组引物:

下游引物: 5'-ggaattccatgatgattgatcgtataaga-3'

正向引物: 5'-accagttcgcggctcgcggatctccagattgctgccca-3'

反向引物: 5'-tgggcagcaatctggaagatccggcgagccgcgaactg-3'

上游引物: 5'-ccgctcagcaccacgggtgtt-3'

PCR 反应体系如表 2-6 所示, 瞬时离心混匀反应体系, 进行第一次 PCR 反应。

表 2-6 PCR 反应体系

反应物	体积 (μL)
Pyrobest DNA Polymerase (5 U/ μL)	0.25
10 \times Pyrobest Buffer II	5
dNTP Mixture (各 2.5 mM)	4
质粒 pGH-HBc-EV71-VP4-N20	2.5 (10 ng)
下游引物 (10 μM)	2
正向引物 (10 μM)	2
dd H ₂ O	34.25
总体系	50

PCR 反应条件为: 94 $^{\circ}\text{C}$ 5 min (循环 1 次); 94 $^{\circ}\text{C}$ 1 min, 56 $^{\circ}\text{C}$ 1 min; 72 $^{\circ}\text{C}$ 1 min (循环 30 次); 72 $^{\circ}\text{C}$ 10 min (循环 1 次)

PCR 反应体系如表 2-7 所示, 瞬时离心混匀反应体系, 进行第二次 PCR 反应。

表 2-7 PCR 反应体系

反应物	体积 (μL)
Pyrobest DNA Polymerase (5 U/ μL)	0.25
10 \times Pyrobest Buffer II	5
dNTP Mixture (各 2.5 mM)	4
质粒 pGH-HBc-EV71-VP4-N20	2.5 (10 ng)
反向引物 (10 μM)	2
上游引物 (10 μM)	2
dd H ₂ O	34.25
总体系	50

PCR 反应条件为: 94 $^{\circ}\text{C}$ 5 min (循环 1 次); 94 $^{\circ}\text{C}$ 1 min, 56 $^{\circ}\text{C}$ 1 min;

72 $^{\circ}\text{C}$ 1 min (循环 30 次); 72 $^{\circ}\text{C}$ 10 min (循环 1 次)

PCR 反应体系如表 2-8 所示, 瞬时离心混匀反应体系, 进行第三次 PCR 反应, 即融合并扩增 HBc 基因。

表 2-8 PCR 反应体系

反应物	体积 (μL)
Pyrobest DNA Polymerase (5 U/ μL)	0.25
10 \times Pyrobest Buffer II	5
dNTP Mixture (各 2.5 mM)	4
第一次 PCR 扩增产物	2.5 (10 ng)
第二次 PCR 扩增产物	2.5 (10 ng)
上游引物 (10 μM)	2
下游引物 (10 μM)	2
dd H ₂ O	31.75
总体系	50

PCR 反应条件为: 94 $^{\circ}\text{C}$ 5 min (循环 1 次); 94 $^{\circ}\text{C}$ 1 min, 56 $^{\circ}\text{C}$ 1 min; 72 $^{\circ}\text{C}$ 1 min (循环 30 次); 72 $^{\circ}\text{C}$ 10 min (循环 1 次)

PCR 反应后产物通过琼脂糖凝胶电泳进行鉴定。具体步骤如下:

(1) 配琼脂糖凝胶: 将 1 g 琼脂糖溶于 100 mL TAE 电解液中, 加入锥形瓶中, 置于微波炉中加热 3 min, 使琼脂糖充分溶解, 待稍冷却后, 加入 5 μL EB (10 mg/mL), 将该溶液倒入胶盘中, 插入小梳子, 待其冷却。

(2) 上样和电泳: 使用 10 \times 的 loading buffer, 将 2 μL 的 loading buffer 和 18 μL 的样品混匀, 上样。

(3) 在 110 V 电压下电泳 30 min。

(二) 纯化 PCR 扩增的目的基因片段 HBc

PCR 产物目的基因片段经琼脂糖凝胶电泳初步鉴定正确后, 使用 Takara 公司生产的 DNA 片段纯化试剂盒纯化目的基因片段 HBc-EV71-VP4-N20。具体步骤如下:

(1) 将 PCR 反应液与 DB 缓冲液混匀, 保证 DB 缓冲液的加入量是 PCR 反应液的 3 倍。

(2) 将离心吸附柱插入收集管中。

(3) 将步骤 (1) 的混合溶液转移至离心吸附柱内, 13 000 rpm 离心 1.5 min, 弃滤液。

(4) 离心吸附柱中加入 Rinse A 溶液 500 μL , 13 000 rpm 离心 1 min, 弃滤液。

- (5) 离心吸附柱中加入 Rinse B 溶液 700 μL , 13 000 rpm 离心 1 min, 弃滤液。
- (6) 重复步骤 (5)。
- (7) 将离心吸附柱插入收集管中, 13 000 rpm 离心 2 min。
- (8) 将离心吸附柱插入新的 1.5 mL 的离心管中, 取洗脱缓冲液 25 μL 加到离心吸附柱滤膜的中间, 室温静置 3 min。
- (9) 13 000 rpm 离心 2 min, 收集 DNA 样品。
- (三) 目的基因片段 HBc 的酶切与纯化

根据目的基因 HBc 上下游的限制性内切酶位点对目的基因进行双酶切以形成粘性末端。

酶切反应体系如表 2-9 所示。

表 2-9 酶切反应体系

Tab. 2-9 Reaction system of restriction enzyme digestion

反应物	体积 (μL)
HBc	15 (150 ng/ μL)
Xho I	2
Nde I	2
10 \times NEBuffer 4	8
10 \times BSA	8
dd H ₂ O	45
总体积	80

加好反应体系后将其放置于 37 $^{\circ}\text{C}$ 反应过夜。

酶切产物回收采用 Takara 公司生产的 DNA 片段纯化试剂盒。具体步骤如下:

(1) 将 PCR 反应液与 DB 缓冲液混匀, 保证 DB 缓冲液的加入量是 PCR 反应液的 3 倍。

- (2) 将离心吸附柱插入收集管中。
- (3) 将步骤 (1) 的混合溶液转移至离心吸附柱内, 13 000 rpm 离心 1.5 min, 弃滤液。
- (4) 离心吸附柱中加入 Rinse A 溶液 500 μL , 13 000 rpm 离心 1 min, 弃滤液。
- (5) 离心吸附柱中加入 Rinse B 溶液 700 μL , 13 000 rpm 离心 1 min, 弃滤液。
- (6) 重复步骤 (5)。
- (7) 将离心吸附柱插入收集管中, 13 000 rpm 离心 2 min。
- (8) 将离心吸附柱插入新的 1.5 mL 的离心管中, 取洗脱缓冲液 25 μL 加到

离心吸附柱滤膜的中间, 室温静置 3 min。

- (9) 13 000 rpm 离心 2 min, 收集 DNA 样品。
- (四) 质粒载体 pET-22b (+) 的酶切与纯化
- 根据质粒载体 pET-22b (+) 上下游的限制性内切酶位点对质粒载体进行双酶切以形成与目的基因相对应的粘性末端。
- 酶切反应体系如表 2-10 所示。

表 2-10 酶切反应体系

Tab. 2-10 Reaction system of restriction enzyme digestion

反应物	体积 (μL)
pET-22b (+)	15 (150 ng/ μL)
Xho I	2
Nde I	2
10 \times NEBuffer 4	8
10 \times BSA	8
dd H ₂ O	45
总体积	80

加好反应体系后将其放置于 37 $^{\circ}\text{C}$ 反应过夜。酶切过夜后, 取 1 μL 进行 1% 琼脂糖凝胶电泳以确定是否酶切完全。

酶切产物回收采用 Takara 公司生产的 DNA 片段纯化试剂盒。具体步骤如下:

(1) 将 PCR 反应液与 DB 缓冲液混匀, 保证 DB 缓冲液的加入量是 PCR 反应液的 3 倍。

- (2) 将离心吸附柱插入收集管中。
- (3) 将步骤 (1) 的混合溶液转移至离心吸附柱内, 13 000 rpm 离心 1.5 min, 弃滤液。
- (4) 离心吸附柱中加入 Rinse A 溶液 500 μL , 13 000 rpm 离心 1 min, 弃滤液。
- (5) 离心吸附柱中加入 Rinse B 溶液 700 μL , 13 000 rpm 离心 1 min, 弃滤液。
- (6) 重复步骤 (5)。
- (7) 将离心吸附柱插入收集管中, 13 000 rpm 离心 2 min。
- (8) 将离心吸附柱插入新的 1.5 mL 的离心管中, 在离心吸附柱滤膜的中央处加入 25 μL 洗脱缓冲液, 室温静置 3 min。
- (9) 13 000 rpm 离心 2 min 洗脱 DNA。
- (五) 目的基因片段 HBc 与质粒载体 pET-22b (+) 的连接
- 使用 Takara 公司的 T4 DNA 连接酶, 将回收的目的基因片段 HBc 及线性化

质粒载体 pET-22b (+) 进行连接反应。连接体系设计原则为: 目的片段与酶切后质粒载体比例为 5:1 (摩尔数比)。反应体系总体积为 25 μL 。

连接体系如表 2-11 所示。

表 2-11 连接体系

Tab. 2-11 Reaction system of ligation

反应物	体积 (μL)
目的基因片段	3
pET-22b (+) 载体片段	1
10 \times T4 DNA Ligation Buffer	2.5
T4 DNA ligase	1
ddH ₂ O	17.5
总体积	25

金属浴 16 $^{\circ}\text{C}$ 进行过夜连接。

- (六) 重组质粒 pET-22b (+)-HBc 的转化
- (1) 向 100 μL 的 DH5 α 感受态细胞中加入 10 μL 的连接反应产物, 放置于冰盒中冷却约 30 min。
- (2) 将冷却后的离心管放入金属浴 42 $^{\circ}\text{C}$ 加热 90 s, 加热后再次放置于冰盒中冷却约 3 min。
- (3) 加入 900 μL 不含 Amp 的液体 LB 培养基, 在 37 $^{\circ}\text{C}$ 摇床上 150 rpm 慢速复苏 45 min。
- (4) 随后将所摇菌液取 200 μL 涂布于 LB 固体平板上 (含 Amp), 将平板放入 37 $^{\circ}\text{C}$ 电热恒温培养箱中倒置培养过夜 (约 12-16 h)。
- (七) 重组质粒 pET-22b (+)-HBc 的小量提取
- 在过夜培养后的固体 LB 平板上, 用 10 μL 的枪头挑取饱满、圆滑、大小适宜的单个菌落, 置于装有 5 mL 液体 LB 培养基 (含氨苄青霉素, 终浓度为 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$) 的玻璃试管中, 用海绵塞上瓶口, 于 37 $^{\circ}\text{C}$ 恒温摇床上, 以 180 rpm 摇菌过夜 (约 12-16 h)。
- 利用质粒小提试剂盒提取重组质粒 pET-22b (+)-HBc-EV71-VP4-N20, 具体步骤如下:
- (1) 首先将吸附柱插入收集管中, 加入 600 μL 的平衡液于吸附柱中, 13 000 rpm 离心 1.5 min, 弃收集管中的废液。
- (2) 离心管中加入培养过夜的菌液 4 mL, 13 000 rpm 离心 1.5 min, 弃上清。
- (3) 取溶液 P1 250 μL 加入含有菌体沉淀的离心管中, 涡旋振荡使沉淀细菌重新悬浮。
- (4) 取溶液 P2 250 μL 加入离心管中, 温和翻转 8 次使菌体裂解充分。

- (5) 取溶液 P3 350 μL 加入离心管中, 迅速温和翻转 8 次, 混合均匀, 出现白色絮状沉淀。13 000 rpm 离心 15 min, 沉淀再次出现于离心管底部。
- (6) 吸取上清转移到吸附柱中, 吸取过程中尽量温和, 避免沉淀吸出。13 000 rpm 离心 1.5 min, 弃废液。
- (7) 取漂洗液 800 μL 加入吸附柱中, 13 000 rpm 离心 1.5 min, 弃废液。
- (8) 重复步骤 (7)。
- (9) 将吸附柱插入收集管中, 13 000 rpm 再次离心 1.5 min, 保证吸附柱中残余的漂洗液去除完全。
- (10) 将吸附柱插入一新的离心管中, 向吸附柱滤膜的中间滴加 55 μL 洗脱缓冲液, 室温静置 3 min, 13 000 rpm 离心 1.5 min, 离心管中收集质粒溶液。
- (八) 重组质粒 pET-22b (+)-HBc 的双酶切鉴定
- 通过对重组质粒限制性酶切位点分析, 选取以下酶切位点对重组质粒进行双酶切鉴定。酶切反应体系如表 2-12 所示。

表 2-12 酶切反应体系

Tab. 2-12 Reaction system of restriction enzyme digestion

反应物	体积 (μL)
pET-22b (+)-HBc	5 (150 ng/ μL)
Xho I	1
Nde I	1
10 \times NEBuffer 4	5
10 \times BSA	5
dd H ₂ O	33
总体积	50

将反应体系放置于 37 $^{\circ}\text{C}$ 下反应 3 h。双酶切后进行琼脂糖凝胶电泳鉴定。

- (九) 测序鉴定
- 将酶切鉴定正确的重组质粒送上海生工进行测序, 测序结果与所设计的序列进行比对。经比对, 目的产物序列与所设计的序列一致。

2.3.3 HBc、HBc-EV71-VP4-N20 融合蛋白的原核表达

2.3.3.1 重组质粒转化于大肠杆菌 BL21 (DE3) 细胞中并培养

选择 E. coli 的 BL21 (DE3) 感受态细胞, 将构建好的重组原核表达载体 pET-22b (+)-HBc-EV71-VP4-N20 与 pET-22b (+)-HBc 分别转化于其中培养。具体步骤如下:

- (1) E.coli BL21 (DE3) 感受态细胞 100 μL 放入冰盒中, 取重组质粒 pET22b

(+) -Hbc 1 μL (50 ng/ μL) 加入感受态细胞悬液中, 温和混匀, 放入冰盒中静置 30 min。

(2) 离心管放入 42 $^{\circ}\text{C}$ 金属浴 90 s, 转入冰盒中静置 3 min。

(3) 取无菌 LB 液体培养基 (无抗生素) 900 μL 加入离心管中, 混匀, 将离心管放入恒温摇床 37 $^{\circ}\text{C}$ 、45 min (150 r/min) 培养, 菌体逐渐复苏。

(4) 取转化后的感受态细胞悬液 100 μL 加到 LB 固体培养基 (含氨苄青霉素) 表面, 将细胞悬液温和涂布均匀。

(5) 将涂布后的平板置于电热恒温培养箱中, 37 $^{\circ}\text{C}$ 倒置过夜培养 (约 12-16 h)。

同理重复以上步骤将重组质粒 pET-22b(+)-Hbc-EV71-VP4-N20 转化至 BL21 (DE3) 细胞中。

2.3.3.2 种子液的制备与 IPTG 诱导表达

具体步骤如下:

(1) 挑取含重组质粒 pET-22b (+) -Hbc-EV71-VP4-N20 的单克隆菌落加入至 5 mL 含氨苄青霉素的液体 LB 培养基 (氨苄青霉素终浓度为 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$) 中, 于 37 $^{\circ}\text{C}$ 、180 rpm 条件下摇菌过夜 (12-16 h)。

(2) 次日, 于锥形瓶中加入 1 000 mL 含氨苄青霉素的 LB 液体培养基 (氨苄青霉素终浓度为 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$), 按体积比 1:400 的比例取 250 μL 接种制备种子液, 于 37 $^{\circ}\text{C}$ 、180 rpm 摇菌 2 h, 菌液 OD₆₀₀ 值至 0.4-0.6 即可。

(3) 向锥形瓶中加入 0.1 mL 100 mM 的 IPTG 诱导, 使 IPTG 终浓度约为 0.1 mM, 再次于 37 $^{\circ}\text{C}$ 、180 rpm 条件下摇菌 5 h, 诱导蛋白 Hbc-VP4 的表达。

同理重复以上步骤完成 Hbc 的 IPTG 诱导。

2.3.3.3 超声裂解菌体

由预实验分析得知, 目的蛋白表达后溶于细胞质中, 故直接将菌体裂解即可在裂解液上清中获得目的蛋白。具体操作步骤如下:

(1) IPTG 诱导完成后, 将菌液于 4 $^{\circ}\text{C}$ 、13 000 rpm 离心 1 min 收菌, 小心弃去上清。

(2) 按 10 mL Balance Buffer/g (菌体) 湿重比例加入 Balance Buffer 轻轻摇晃以重悬细菌。

(3) 将装有菌液的 50 mL 离心管置于冰浴中, 超声裂解 15 min 直至溶液变得清澈透亮。

(4) 超声裂解后的菌液于 4 $^{\circ}\text{C}$ 、13 000 rpm 离心 15 min, 弃沉淀保留上清。

(5) 将上清液过 0.22 μm 滤膜以备纯化。

2.3.3.4 SDS-PAGE 验证目的蛋白

将 IPTG 诱导表达的目的蛋白进行 SDS-PAGE 验证, 具体步骤如下:

(1) 先将 12% 的分离胶配好后, 加入至凝胶槽中, 加入 75% 酒精压线。待胶凝固后, 用枪小心将酒精吸出, 并加入纯水至胶槽中清洗分离胶。用纸将水吸干, 加入 5% 浓缩胶至胶槽上沿, 吸出泡沫, 并小心将梳子插入, 静置使胶凝固。PAGE 胶配制方法如表 2-13 所示。

表 2-13 PAGE 胶配制方法
Tab. 2-13 Preparation method of PAGE gel

分离胶溶液	体积 (mL)	浓缩胶溶液	体积 (mL)
H ₂ O	3.4	H ₂ O	3.41
30% acrylamide mix	4	30% acrylamide mix	1
Separating gel buffer (pH8.8)	2.5	Separating gel buffer (pH6.8)	1.5
10% AP	0.1	10% AP	0.06
TEMED	0.04	TEMED	0.006
总体积	10	总体积	6

(2) 将蛋白样品和 5 \times Loading buffer 混合, 煮沸 5 min, 瞬时离心混匀后上样到 SDS 聚丙烯酰胺凝胶 (积层胶为 5%, 分离胶为 10%) 中。

(3) 在电泳槽中加入 Running buffer, 并吸出泡沫, 于 100 V 电压下电泳约 1.5 h。

(4) 电泳结束后, 将 PAGE 胶 (8 cm \times 10 cm) 取出放置在一玻璃皿中, 加入 50 mL 去离子水, 加热至沸腾后停止。

(5) 倒掉去离子水, 加入考马斯-亮蓝快速染料 30 mL, 保证凝胶全部浸染于其中, 加热至沸腾, 保持沸腾状态 2 min, 停止加热, 转入摇床缓慢摇动 20 min, 弃染液。

(6) 加入去离子水 50 mL, 加热至沸腾, 保持沸腾状态 2 min, 停止加热, 转入摇床缓慢摇动 20 min, 完成脱色。

(7) 将胶取出, 在凝胶成像分析系统下观察电泳情况。

2.3.4 目的蛋白 Hbc、Hbc-EV71-VP4-N20 的镍柱纯化

2.3.4.1 目的蛋白的镍柱纯化

目的蛋白的纯化使用天津泽生物技术生产的一站式 His 标记蛋白质微量纯化套装。具体操作步骤如下:

(1) 将 Ni-Agarose 介质充分混匀后, 取 4 mL 加入到预放了一片筛板的层析

柱中。

(2) 用 1 mL 去离子水洗柱, 共三次。

(3) 用 1 mL 新配结合液洗柱, 共三次。结合液配方 (以 10 mL 为例) 如表 2-14 所示。

表 2-14 结合液配制方法

成分	用量 (mL)	在结合缓冲液中的浓度 (mM)
1 M Tris-HCl (pH7.9)	0.2	20
1 M 咪唑溶液	0.1	10
5 M NaCl 溶液	1	500
自备去离子水	8.7	-

(4) 4 $^{\circ}\text{C}$ 、13 000 rpm 离心 10 min 收集 1 000 mL 表达菌液, 弃上清, 沉淀放冰上待用。

(5) 加入 50 mL 冰浴的结合液 (1 mL 菌液需要用 50 μL 结合液), 冰上超声裂解菌体直至显微镜下看见绝大多数细胞破裂, 裂解物必须不粘稠, 否则会堵塞层析柱。

(6) 4 $^{\circ}\text{C}$ 、13 000 rpm 离心 10 min 去除残留细胞和细胞碎片以防堵柱, 收集上清。

(7) 将上步得到的上清液上柱, 用试剂盒提供的瓶盖将层析柱下的漏液口堵住, 让细菌裂解液和介质在 4 $^{\circ}\text{C}$ 结合 30 min, 重力使裂解液自然流出。

(8) 用 20 mL 结合液洗柱 (配方见上表), 收集并保存穿透液 (含杂质或未被吸附的 His 标记蛋白, 可做 SDS-PAGE 电泳的对照)。

(9) 用 10 mL 新鲜配制的洗脱液洗柱, 收集并保存穿透液 (含 His 标记的目的蛋白)。洗脱液的配方如表 2-15 所示 (以 1 mL 体积和咪唑浓度是 200 mM 为例)。

(10) 分别用 5 000 μL 结合液、10 mL 去离子水和 5 000 μL 20% 乙醇洗柱一次, 最后堵住层析柱下端的漏口, 加 5 000 μL 20% 乙醇将介质淹没, 4 $^{\circ}\text{C}$ 保存待下次使用。

表 2-15 洗脱液配制方法

成分	用量 (μL)	在洗脱液中的浓度 (mM)
1M Tris-HCl (pH7.9)	20	20
1M 咪唑溶液	200	200
5M NaCl 溶液	100	500
自备去离子水	680	-

2.3.4.2 目的蛋白的超滤纯化

(1) 加入纯水浸泡滤膜约 3 min 以活化滤膜, 离心后将水弃去。

(2) 在 100 KD 超滤管中加入纯化后蛋白样品 10 mL, 于 5 000 g 离心 10 min, 离心后滤膜上液体量应不低于 1.5 mL, 弃去滤膜以下的液体。重复此步骤直至将蛋白样品超滤完成。

(3) 在超滤管中加入 10 mL PBS, 于 5 000 g 离心 10 min, 弃去滤膜以下的液体, 重复此步骤 5 次。

(4) 最后将滤膜上液体吸出转移至 15 mL 离心管中分装, 于 -80 $^{\circ}\text{C}$ 下保存。

2.3.4.3 目的蛋白的 Western Blotting 检测

(1) 先将 10% 的 Separating Gel 配好后, 加入至凝胶槽中, 加入 75% 酒精压线。待胶凝固后, 用枪小心将酒精吸出, 并加入纯水至胶槽中清洗分离胶。用纸将水吸干, 加入 5% Stacking Gel 至胶槽上沿, 吸出泡沫, 并小心将梳子插入, 静置使胶凝固。PAGE 胶配制方法如表 2-13 所示。

(2) 将蛋白样品和 5 \times Loading buffer 混合, 煮沸 5 min, 瞬时离心混匀后上样到 SDS 聚丙烯酰胺凝胶中。

(3) 在电泳槽中加入 Running buffer, 并吸出泡沫, 于 100 V 电压下电泳约 1.5 h。

(4) 半干法转膜: 根据胶的大小, 将 PVDF 膜和滤纸剪好, PVDF 膜要稍大于滤纸。用无水甲醇浸泡 PVDF 膜 15 s。在电解液中, 将膜、滤纸等摆好, 顺序依次为滤纸、膜、胶、滤纸, 中间不可有气泡, 根据膜的面积大小按 1 mA/cm² 的比例调整电流, 本实验使用的电流为 18 mA, 转膜 40 min。

(5) 转膜后将膜取出置于封闭液 (脱脂奶粉溶于 PBS 中, 浓度为 5%) 中, 于室温下封闭反应 4 h。

(6) 剪一个比膜稍大一些的塑料膜小袋, 加入一抗 4 mL, 一抗与封闭液的比例为 1:1 000, 摇床过夜反应。

(7) 将一抗吸出, 将膜置于玻璃皿中, 用 PBST 洗 3 次, 每次 10 min, 并用摇床慢摇。

(8) 剪一个比膜稍大一些的塑料膜小袋, 加入二抗, 稀释比例为 1:10 000, 摇床 45 min, 注意避光。

(9) 将二抗吸出, 将膜置于玻璃皿中, 用 PBST 洗 2 次, 再用 PBS 洗膜 1 次, 每次 10 min, 并用摇床慢摇。

(10) 将 PVDF 膜置于 PBS 溶液中, 在 Odyssey 红外荧光扫描成像仪下观察分析结果。

2.3.4.4 透射电子显微镜观察目的蛋白

- (1) 取适量目的蛋白溶液滴加至干净的封口膜上。
- (2) 在另一张封口膜上分别滴加数滴 pH 7.6 的 2% 磷酸溶液。
- (3) 将铜网 (230 目) 镀膜的一面向下, 覆盖至样品液滴上, 静止 1 min-2 min。
- (4) 用吸水纸吸干多余样品液体, 将铜网 (230 目) 镀膜的一面向下, 分别覆盖至磷酸液滴上, 静止 45 s-1 min。
- (5) 用吸水纸吸干多余磷酸液, 并将铜网转移至干燥 1.5 mL 离心管中, 室温静置晾干。
- (6) 选用日立 HITCH-7650 透射电子显微镜对样品进行观察。

2.3.4.5 BCA 法定量目的蛋白

目的蛋白的定量使用天恩泽生物技术有限公司生产的 BCA 法定量试剂盒。具体操作步骤如下:

- (1) 按照表 2-16 对 96 孔板进行编号, 分别加入待测样品溶解缓冲液、待测样品以及标准品 BSA。

表 2-16 BSA 标准品及样品配制方法
Tab. 2-16 Preparation method of BSA standard substance and sample

编号	BSA 标准品 (2 μg/μL)	待测样品 (μL)	样品缓冲液 (μL)	总体 (μL)	蛋白含量 (μg)
0	0	0	20	20	0
1	1	0	19	20	2.0
2	2	0	18	20	4.0
3	4	0	16	20	8.0
4	8	0	12	20	16.0
5	12	0	8	20	24.0
6	16	0	4	20	32.0
7	20	0	0	20	40.0
样品 1	0	1	19	20	未知
样品 2	0	5	15	20	未知

- (2) 计算 BCA 工作液所需量: 根据每个样品所需 200 μL BCA 工作液及样品数量, 计算所需 BCA 工作液的用量, 实际配制的量需考虑 10% 的损耗。
- (3) 按 1 体积溶液 B 中与 50 体积溶液 A 的比例将二者充分混合配制 BCA 工作液, 所得混合液即为 BCA 工作液。
- (4) 取 BCA 工作液 200 μL 加入到 96 孔板各孔中并混匀, 96 孔板放置于振荡器上振荡混匀 1 min。
- (5) 37 °C 放置 30 min。

-41-

- (6) 迅速冷却至室温, 较短时间内完成后续测定。
- (7) 使用分光光度计于 562 nm 波长下测定样品的 OD 值。
- (8) 扣除对照组 0 号样品的 OD 值读数。
- (9) 绘制标准 BSA 蛋白含量曲线, 横坐标为 BSA 蛋白标准品的含量 (μg), 纵坐标为 BSA 蛋白标准品所对应的 OD 值。
- (10) 将待测样品的 OD 值 (减去对照组 0 号样品的 OD 值读数) 标注于标准曲线上, 其横坐标所对应的读数即为待测样品的蛋白含量 (μg)。用蛋白含量值除以样品稀释液总体积 (20 μL), 乘以样品稀释倍数即为待测样品浓度 (μg/μL)。

2.4 实验结果

2.4.1 重组原核表达载体 pET-22b (+)-HBc-EV71-VP4-N20 的构建

2.4.1.1 PCR 引物序列分析

表 2-17 引物属性表
Tab. 2-17 Sheet of Primer properties

	上游引物	下游引物
引物序列	5'-CCGCTCGAGCACCACGGTGGTT-3'	5'-GGAATTCATATGATATGATCCGATAAAG-3'
酶切位点	<i>Xho</i> I: C/TCGAG	<i>Nde</i> I: CA/TATG
保护性碱基	5'-CCG	5'-GGAATTC
长度/bp	22	32
Tm/°C	62	58
GC 含量/%	63.2	31.8

从 pGH 载体上克隆的目的基因 HBc-EV71-VP4-N20 其 PCR 上下游引物具体属性如表 2-17 所示。

2.4.1.2 目的基因片段 HBc-EV71-VP4-N20 的 PCR 扩增结果

目的基因 HBc-EV71-VP4-N20 长度应为 526 bp, 图 2-3 中条带 1、2 均为目的片段 HBc-EV71-VP4-N20 经 PCR 扩增后通过 DNA 琼脂糖凝胶电泳检测的结果。电泳结果显示: 在 500 bp Marker 略微偏上处有明显条带, 表明 PCR 扩增出来的片段与目的片段大小相符, PCR 过程及产物正确。

-42-

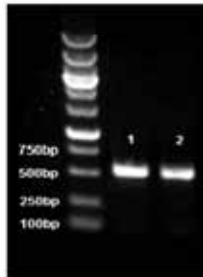


图 2-3 PCR 扩增产物电泳图
Fig. 2-3 The electrophoretogram of PCR product

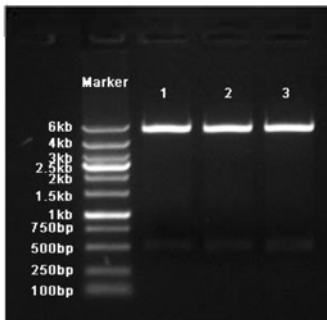


图 2-4 重组质粒 pET-22b (+)-HBc-EV71-VP4-N20 的酶切鉴定
Fig. 2-4 Restriction enzyme analysis of recombinant plasmid pET-22b (+)-HBc-EV71-VP4-N20

2.4.1.3 重组质粒 pET-22b (+)-HBc-EV71-VP4-N20 双酶切鉴定结果

目的基因 HBc-EV71-VP4-N20 经 *Xho* I 与 *Nde* I 双酶切后长度应为 511 bp, pET-22b (+) 载体经同样双酶切后将产生长度为 5363 bp 的线性化载体。若目的基因未能成功连接到载体, 则载体经双酶切后将产生一条 130 bp 的小片段。图 2-4 中条带 1、2、3 均为 pET-22b (+)-HBc-EV71-VP4-N20 经 *Xho* I、*Nde* I 双酶切后通过 DNA 琼脂糖凝胶电泳检测的结果。电泳结果显示: 在 500 bp Marker

-43-

略微偏上处有一较浅的条带, 这是目的基因 HBc-EV71-VP4-N20; 在 6 kb 左右有明显条带, 这是线性化质粒载体。与预估结果相符, 表明原核重组表达载体 pET-22b (+)-HBc-EV71-VP4-N20 构建成功。

2.4.2 重组原核表达载体 pET-22b (+)-HBc 的构建

2.4.2.1 融合性 PCR 引物序列分析

从 pGH 载体上克隆的目的基因 HBc 其融合性 PCR 所需的四条引物具体属性如表 2-18 所示。

表 2-18 融合性 PCR 引物属性表
Tab. 2-18 Sheet of Fusion PCR Primer properties

	引物序列	酶切位点	长度 (bp)	Tm (°C)	GC 含量 (%)
上游引物	5'-CCGCTCGAGCACCACGGTGGTT-3'	<i>Xho</i> I: C/TCGAG	22	62	63.2
下游引物	5'-GGAATTCATATGATATGATCCGATAAAG-3'	<i>Nde</i> I: CA/TATG	32	58	31.8
正向引物	5'-ACCACTGCGGGCTCGCCGGATCTCCAGATGCTGCCCA-3'	无	40	60	50
反向引物	5'-TGGGCAGCAATCTGGAAGATCCGGCGAGCCGGAAGT-3'	无	38	64	77.8

2.4.2.2 未融合前目的基因 HBc 的两片段电泳验证

经两次 PCR 后, HBc 基因的上下游片段长度应分别为 223 bp 和 244 bp。经琼脂糖凝胶电泳鉴定得到图 2-5, 图中条带 1、2 为同一样品, 条带 3、4 为同一样品。四个条带均在 250 bp 偏下位置, 与实验预期相符, 条带 3、4 相比条带 1、2 电泳迁移更远, 故应为 HBc 基因的上游片段, 而条带 1、2 为 HBc 基因下游片段。表明两次 PCR 过程及产物正确。

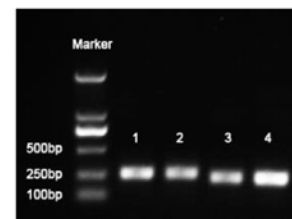


图 2-5 PCR 扩增产物电泳图
Fig. 2-5 The electrophoretogram of PCR product

-44-

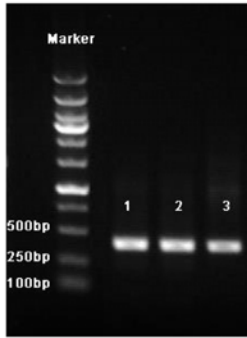


图 2-6 PCR 扩增产物电泳图
Fig. 2-6 The electrophoretogram of PCR product



图 2-7 PCR 扩增产物纯化后电泳图
Fig. 2-7 The electrophoretogram of purified PCR product

2.4.2.3 融合性 PCR 产物 Hbc 基因的电泳验证及纯化结果

经融合性 PCR 得到的目的基因 Hbc 长度应为 467 bp。经琼脂糖凝胶电泳鉴定得到图 2-6、图 2-7，图中条带 1、2、3 均为融合性 PCR 产物 Hbc 基因。由图可见，三条带均位于 500 bp 偏下位置，与实验预期相符，表明融合性 PCR 成功，初步验证得到正确的 Hbc 目的基因。

- 45 -

图 2-7 中条带 1 为融合性 PCR 产物 Hbc 基因纯化后的结果。由图可见，纯化后条带位置没有改变，只是条带亮度稍有减少，这是因为纯化时的损失造成的，再次证明融合性 PCR 成功得到了目的基因 Hbc。

2.4.2.4 重组质粒 pET-22b (+)-Hbc 双酶切鉴定结果

目的基因 Hbc 经 *Xho* I 与 *Nde* I 双酶切后长度应为 451 bp，pET-22b (+) 载体经同样双酶切后将产生长度为 5363 bp 的线性化载体。若目的基因未能成功连接到载体，则载体经双酶切后将产生一条 130 bp 的小片段。图 2-8 中条带 1 为重组质粒 pET-22b (+)-Hbc 经 *Xho* I、*Nde* I 双酶切后通过 DNA 琼脂糖凝胶电泳检测的结果。电泳结果显示：在 500 bp 酶切偏下处有一较浅的条带，即为目的基因 Hbc；在 6 kb 左右有明显条带，为大片段的线性化载体。条带 2 为重组质粒 pET-22b (+)-Hbc-EV71-VP4-N20 经同样酶切后的结果。在 500 bp 略偏上处即为 Hbc-EV71-VP4-N20 基因。图中可见 Hbc 基因明显小于 Hbc-EV71-VP4-N20 基因，与实验预期结果相符，表明原核重组表达载体 pET-22b (+)-Hbc 与 pET-22b (+)-Hbc-EV71-VP4-N20 均构建成功。

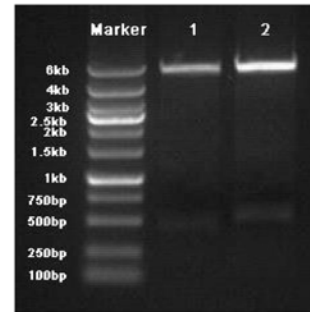


图 2-8 重组质粒 pET-22b (+)-Hbc 与 pET-22b (+)-Hbc-EV71-VP4-N20 的酶切鉴定
Fig. 2-8 Restriction enzyme analysis of recombinant plasmid pET-22b (+)-Hbc and pET-22b (+)-Hbc-EV71-VP4-N20

2.4.3 融合蛋白 Hbc、Hbc-EV71-VP4-N20 的原核表达

2.4.3.1 发酵用种子液培养不同时间的 OD₆₀₀ 值

分别检测发酵用种子液经过摇菌培养后不同时间的 OD₆₀₀ 值，以寻找 IPTG

- 46 -

诱导的最佳时间，结果如表 2-19 所示。由表 2-19 数据可见，摇菌 2h 后菌液 OD₆₀₀ 值已至 0.4-0.6，可以进行下一步 IPTG 诱导操作。

表 2-19 菌液 OD 值与培养时间表
Tab. 2-19 Sheet of incubation time and OD value of bacteria liquid

诱导时间	菌液 1 OD ₆₀₀ 值	菌液 2 OD ₆₀₀ 值	菌液 3 OD ₆₀₀ 值	菌液 4 OD ₆₀₀ 值
1h	0.065	0.076	0.072	0.069
1.5h	0.237	0.260	0.251	0.243
2h	0.556	0.567	0.559	0.557

2.4.3.2 SDS-PAGE 检测目的蛋白

pET-22b (+) 质粒载体上在终止密码子之前、目的基因插入位点之后自带有 6 个 His 的标签，所以诱导表达出来的目的蛋白大小应为 177 个氨基酸，根据一个氨基酸的平均分子量约为 110 D，所以由此计算出目的蛋白 Hbc-EV71-VP4-N20 的分子量大小约为 19.5 KD。

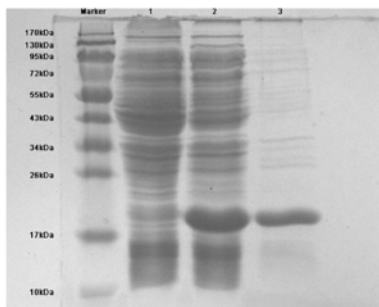


图 2-9 SDS-PAGE 检测目的蛋白 Hbc-EV71-VP4-N20
Fig. 2-9 SDS-PAGE analysis of protein Hbc-EV71-VP4-N20

图 2-9 中条带 1 为未加 IPTG 诱导的菌体经过超声裂解和滤膜过滤纯化的结果，图中条带致密是因菌体内杂蛋白所致，而在预估目的条带的位置却未出现明显条带，表明未经 IPTG 诱导时目的蛋白表达量较低。条带 2 为经 IPTG 诱导后的结果。由于蛋白未经纯化，所以条带依然非常致密，但在目的条带位置 17 KD 偏上处可见一明显粗条带，表明 IPTG 诱导表达的即为目的蛋白

- 47 -

Hbc-EV71-VP4-N20，且诱导表达量较大。条带 3 为诱导表达出来的目的蛋白经 Ni 柱纯化及超滤后的结果，可见条带致密现象有明显改善，而且在预估的目的条带位置有明显条带出现，说明蛋白诱导表达成功且纯化效果较好。但在条带 3 中也略微可见一些其他蛋白条带，这是因为在天然菌体中也会有一些可与 Ni 亲和的蛋白。

2.4.3.3 Western Blot 检测目的蛋白

目的蛋白分别为 Hbc-EV71-VP4-N20 和 Hbc。Hbc-EV71-VP4-N20 的分子量大小由前计算可知约为 19.5 KD；Hbc 蛋白共 157 个氨基酸，分子量约为 17.3 KD。两个蛋白均由质粒载体 pET-22b (+) 表达，所以都携带有 6xHis 标签，可以与小鼠抗 6xHis 标签的单抗特异性结合，并通过二抗荧光显色完成检测。图 2-10 中条带 1 为 Hbc-EV71-VP4-N20 蛋白，条带 2 为 Hbc 蛋白，在预估目的条带位置处均出现较亮的条带，表明经纯化的蛋白即为目的蛋白且浓度较高。

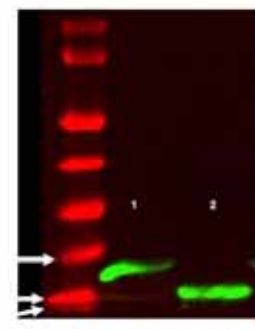


图 2-10 Western Blot 检测目的蛋白 Hbc-EV71-VP4-N20 与 Hbc
Fig. 2-10 Western Blot analysis of protein Hbc-EV71-VP4-N20 and Hbc

2.4.3.4 透射电子显微镜观察 Hbc 及 Hbc-EV71-VP4-N20

透射电子显微镜下观察 Hbc 及 Hbc-EV71-VP4-N20 颗粒，颗粒呈球形结构直径大小约 30 nm 左右。这一实验结果表明 Hbc 及 Hbc-EV71-VP4-N20 蛋白通过大肠杆菌表达后，已自组装形成病毒样颗粒。电泳结果如图 2-11、2-12 所示。

- 48 -

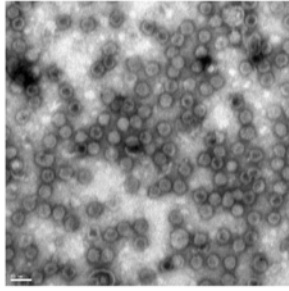


图 2-11 HBc 病毒样颗粒电镜观察结果
Fig. 2-11 TEM images of HBc VLPs

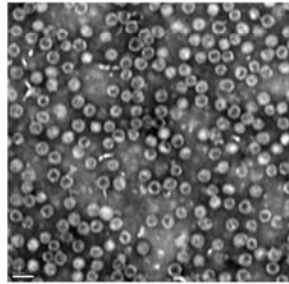


图 2-12 HBc-EV71-VP4-N20 病毒样颗粒电镜观察结果
Fig. 2-12 TEM images of HBc-EV71-VP4-N20 VLPs

2.4.3.5 BCA 法定量目的蛋白

利用 BCA 法对目的蛋白 HBc-EV71-VP4-N20 纯化液进行蛋白定量。将 BSA 蛋白标准品进行倍比稀释，如图 2-13 所示，得到蛋白标准曲线 $y=0.054x+0.118$ $R^2=0.995$ 。 R^2 为 0.995，表明本次实验线性拟合程度成立。将目的蛋白样品吸光值读数代入公式并计算得到目的蛋白 HBc-EV71-VP4-N20 的含量。目的蛋白 HBc-EV71-VP4-N20 含量为 $6.76 \mu\text{g}/\mu\text{L}$ 。

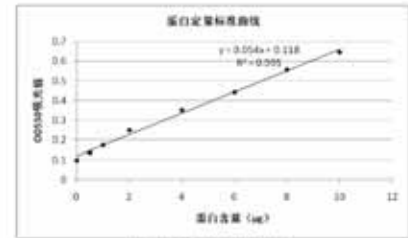


图 2-13 蛋白定量标准曲线
Fig. 2-13 Standard curve of protein quantification

2.5 讨论

本课题选用了 pET 系列载体中的 pET-22b (+) 载体在大肠杆菌中复制并表达 HBc 及 HBc-EV71-VP4-N20 基因。pET-22b (+) 载体具有以下特点：1、在大肠杆菌表达系统中复制及筛选过程较为便利；2、转录和翻译受噬菌体 T7 强转录及翻译信号控制；蛋白表达由宿主细胞提供的 T7 RNA 聚合酶诱导；3、含有乳糖操纵子序列，可由 IPTG 诱导外源蛋白的表达；4、多克隆位点的 C 端带有 6xHis 标签，可用于目的蛋白的后期纯化。

本章工作中，非常重要的环节是需要设计引物利用融合性 PCR 从 HBc-EV71-VP4-N20 基因中克隆 HBc 基因，再构建出 HBc-EV71-VP4-N20 与 HBc 两个蛋白的重组原核表达载体。根据测序结果及蛋白表达后 SDS-PAGE 及 Western Blotting 验证结果来看，融合性 PCR 及重组原核表达载体的构建均是非常成功的。

随后蛋白的纯化过程中，发现在裂解细胞的时候，超声裂解一定要充分。因为超声裂解不够充分会使样品粘稠，这对下一步 Ni 柱纯化会带来一定影响。同时结合缓冲液中咪唑的含量会影响到蛋白的纯度和回收率，适量的咪唑会使杂蛋白洗脱保证目的蛋白纯度。蛋白纯化这一部分的工作对疫苗的研究非常重要，会直接影响后续动物免疫实验的效果。

本章的工作是整个手足口病预防性疫苗研究的一个组成部分，主要任务是构建 HBc-EV71-VP4-N20 及 HBc 的重组原核表达载体，诱导表达出融合蛋白并纯化。这些蛋白将在接下来的动物免疫试验中被用作抗原来检测实验动物能否产生相应的中和抗体。本章的结果显示，重组原核表达载体体系构建成功，并获得纯度较高的 HBc 及融合蛋白 HBc-EV71-VP4-N20。

2.6 本章小结

本章实验中利用分子克隆技术构建了 HBc-EV71-VP4-N20 及 HBc 的重组原核表达载体。将表达载体 pET-22b (+)-HBc-EV71-VP4-N20 与 pET-22b (+)-HBc 转至大肠杆菌细胞后，对大肠杆菌进行培养并诱导表达了融合蛋白 HBc-EV71-VP4-N20 及 HBc，融合蛋白 HBc-EV71-VP4-N20 及 HBc 利用 Western Blot 检测表达情况，透射电子显微镜观察融合蛋白已成功自组装形成病毒样颗粒。并且还还对大肠杆菌表达 HBc-EV71-VP4-N20 及 HBc 的培养条件进行了优化，增加了表达产量，验证了大肠杆菌表达系统用于外源蛋白表达的稳定性的。为本课题下一步工作的顺利开展打下基础。

第3章 EV71 病毒的扩增、培养鉴定及灭活

3.1 实验材料

1. 病毒毒株及 PCR 引物: EV71 病毒 C4 亚型株由中国疾病预防控制中心病毒病预防控制所曾毅院士实验室提供; PCR 引物的合成由上海生物工程有限公司完成; 基因测序鉴定由 Invitrogen 公司完成。

2. 酶、试剂及耗材: DNA Marker 及 *Pfu* DNA 聚合酶等购自大连宝生物工程技术有限公司; 病毒 RNA 提取及反转录试剂盒购自北京天恩泽生物技术有限公司。

3. 细胞培养试剂: HEPES 缓冲液、PBS 缓冲液、3% 谷氨酰胺溶液、青链霉素、胎牛血清、MEM 培养基及胰酶等均购自 Invitrogen 公司。

3.2 实验仪器

PCR 扩增仪	Applied Biosystems PCR system 2700
电泳仪	DYCP-31C, 北京市六一仪器厂
电子天平	N2B110 型, Ohaus 公司
漩涡混合器	SFG-02.500, 黄石市恒丰医疗器械有限公司
离心机	型号 5418, Eppendorf 公司
冷冻离心机	D37520 osterode, Thermo 公司
紫外分光光度计	UV2550, SHIMADZU 公司
电热恒温鼓风干燥箱	SFG-02.500, 黄石市恒丰医疗器械有限公司
自动蒸汽灭菌锅	D-1 型, 北京发恩科贸有限公司
CO ₂ 培养箱	RC03000T-5-VBC, REVCO 公司
生物安全柜	BHC-1360 II A/B3 031004, 哈尔滨东联电子技术开发有限公司
倒置荧光显微镜	CK40, 日本 OLYMPUS 公司
酶标仪	Model 550, Bio-Rad 公司

3.3 实验方法

3.3.1 RD 细胞的培养

细胞培养液根据血清含量及作用分为生长液及维持液两种。

生长液 (GM) 中含有 10% 的胎牛血清, 可为细胞正常生长提供足够的营养

成分。当细胞生长状态良好且密度达到要求时或病毒接种前应改换维持液。生长液各成分配制比例如表 3-1 所示。

维持液 (MM) 中含 2% 的胎牛血清, 其营养成分含量虽低于生长液, 但可维持稳定的细胞代谢。维持液各成分配制比例如表 3-1 所示。

表 3-1 细胞生长液、维持液配制方法
Tab. 3-1 Preparation method of cell culture fluid

	生长液 (GM, mL)	维持液 (MM, mL)
Eagle's 液 (MEM)	85	93
L-谷氨酰胺 200 mM	1.0	1.0
胎牛血清	10.0	2.0
7.5% NaHCO ₃ 溶液	2.0	2.0
PS 溶液 (青霉素及链霉素各, 10000 U/mL)	1.0	1.0
HEPES	1.0	1.0

细胞培养液中的血清最好选择胎牛血清。血清加入细胞培养液前需 56 °C 灭活 30 min。

3.3.1.1 RD 细胞的复苏

- (1) 从液氮罐中取出细胞冻存管 (保存有 RD 细胞) 一只。
- (2) 将细胞冻存管迅速放入 37 °C 水浴锅中, 不断晃动冻存管, 使其细胞快速融化。约 10 min 后, RD 细胞于冻存管内融化。
- (3) 利用含 75% 酒精的棉球擦拭冻存管管口, 避免后续过程中细胞被污染。
- (4) 从冻存管中利用无菌枪头吸取约 1.5 mL RD 细胞悬液, 转移至 15 mL 无菌离心管中, 加入 MEM 培养基 5 mL, 轻柔吹打数次, 充分分散细胞团块。
- (5) 5 000 g 室温离心 5 min, 离心后弃上清, 去除含有 DMSO 的冻存液。
- (6) 取 MEM 培养基 (含 10% FBS, 细胞生长液) 5 mL 加入 15 mL 离心管中, 轻柔吹打数次, 充分分散细胞团块, 取重悬后的细胞悬液 5 mL 加入至 25 cm² 的细胞培养瓶中, 将细胞培养瓶放置于含 5% CO₂ 的培养箱中, 37 °C 培养。
- (7) 次日观察细胞生长情况, 并及时更换新鲜培养基。

3.3.1.2 RD 细胞的传代

- (1) 复苏后的 RD 细胞生长约 2 天左右, 细胞生长状态良好且细胞密度大约为 90% 左右时, 可进行细胞传代。
- (2) 用一次性无菌移液管吸出细胞培养瓶中的细胞培养基, 加入 PBS 缓冲液 5 mL 冲洗细胞, 弃 PBS 缓冲液。重复前述细胞冲洗过程 3 次。
- (3) 加入含 0.25% 胰酶的消化液 3 mL, 胰酶充分浸没细胞表面。将细胞培养

瓶平放于 37 °C 细胞培养箱中, 消化约 5 min。

(4) 细胞消化后将成片脱落, 加入 MEM 培养基 (含 10% FBS) 5 mL 终止消化过程, 用一次性无菌移液管轻柔冲洗细胞培养瓶壁数次, 保证瓶壁上的细胞完全脱落于培养基内, 温和吹吸数次, 充分分散细胞团块。

(5) 将细胞悬液转移至 15 mL 无菌离心管中, 5 000 g 离心 5 min, 弃上清。

(6) 向离心后的 15 mL 无菌离心管中加入 MEM 培养基 (含 10% FBS) 5 mL, 用一次性无菌移液管温和吹吸数次, 充分分散细胞团块, 使细胞重悬。

(7) 进行 1:5 的分瓶传代培养。取 5 个 25 cm² 细胞培养瓶, 每个培养瓶中加入 MEM 培养基 (含 10% FBS) 4 mL 的步骤。(6) 细胞悬液 1 mL, 用一次性无菌移液管温和吹吸数次, 保证细胞充分分散。

(8) 将细胞培养瓶放置于含 5% CO₂ 的培养箱中, 37 °C 培养。

(9) 当细胞生长状态良好且细胞密度大约为 90% 左右时即可进行再次细胞传代。复苏的细胞传代约 3 次后, 如无污染现象且自身生长状态良好即可接种病毒或冻存留种。

3.3.1.3 RD 细胞的冻存

(1) 复苏的细胞传代约 3 次后, 如无污染现象且自身生长状态良好即可进行冻存留种。

(2) 用一次性无菌移液管吸出细胞培养瓶中的细胞培养基, 加入 PBS 缓冲液 5 mL 冲洗细胞, 弃 PBS 缓冲液。重复前述细胞冲洗过程 3 次。

(3) 加入含 0.25% 胰酶的消化液 3 mL, 胰酶充分浸没细胞表面。将细胞培养瓶平放于 37 °C 细胞培养箱中, 消化约 5 min。

(4) 细胞消化后将成片脱落, 加入 MEM 培养基 (含 10% FBS) 5 mL 终止消化过程, 用一次性无菌移液管轻柔冲洗细胞培养瓶壁数次, 保证瓶壁上的细胞完全脱落于培养基内, 温和吹吸数次, 充分分散细胞团块。

(5) 将细胞悬液转移至 15 mL 无菌离心管中, 5 000 g 离心 5 min, 弃上清。

(6) 配制含 20% FBS 和 10% DMSO 的 MEM 细胞冻存液。

(7) 取细胞冻存液 3 mL 加入到离心后的 15 mL 无菌离心管中, 用无菌枪头温和吹吸数次, 保证细胞充分分散、重悬, 取细胞悬液 1.5 mL 加入至冻存管中。

(8) 将冻存管放入冻存盒后, 转移至 -80 °C 冰箱, 过夜保存。次日, 将细胞冻管置于液氮罐内, 长期保存。

3.3.2 EV71 病毒的扩增培养

(1) 病毒接种的前日, 进行细胞传代, 细胞数量应控制在第二天细胞生长密

度达到约 90% 为好。

(2) 次日, 观察细胞生长状态, 如细胞生长状态良好且单层生长即可接种 EV71 病毒。

(3) 用一次性无菌移液管吸出细胞培养瓶中的细胞培养基, 加入 PBS 缓冲液 5 mL 冲洗细胞, 弃 PBS 缓冲液。重复前述细胞冲洗过程 3 次。

(4) 取 MEM 培养基 (含 2% FBS, 细胞维持液) 5 mL 加入到细胞培养瓶中。

(5) 取病毒原液 100 μL 加入到细胞培养瓶中, 小心盖上瓶盖, 温和晃动细胞培养瓶, 使细胞培养基中的病毒原液均匀分布。并设置对照组细胞 (未加入病毒原液)。

(6) 将接种病毒后的细胞培养瓶与对照组细胞培养瓶分别放入两个含 5% CO₂ 的培养箱中, 36 °C 培养。

(7) 每日观察细胞生长状态, 直至细胞培养瓶中 90% 以上的细胞出现细胞病变 (CPE) 后, 并且对照组细胞生长状态良好, 即可收集病毒。

(8) 利用反复冻融法收集病毒, 用一次性无菌移液管轻柔冲洗细胞培养瓶壁数次, 保证病毒悬液状态均匀, 吸取病毒培养液转移至 15 mL 离心管中, 切瓶盖拧紧, 将 15 mL 离心管放入 -80 °C 冰箱, 待冷冻后取出, 放置于水浴锅中 37 °C 快速融化, 期间可小心晃动离心管, 使培养基中的细胞充分破碎并释放病毒。重复上述冻融 3 次, 即可完成收毒过程。

(9) 收毒后, 将 15 mL 离心管 5 000 g 室温离心 10 min, 取上清弃沉淀。将含有病毒的上清分装后, 冷冻保存于 -80 °C 冰箱。

3.3.3 EV71 病毒的鉴定

3.3.3.1 EV71 病毒 RNA 的提取

EV71 病毒 RNA 的提取使用天恩泽生物技术有限公司生产的柱式病毒 RNAout 试剂盒。具体操作步骤如下:

(1) 在 1.5 mL 离心管中加入 0.2 mL 液体病毒样品。

(2) 加入溶液 A 600 μL, 涡旋振荡 1 min, 室温静置 10 min。

(3) 将步骤 (2) 中混匀后的全部溶液加入离心吸附柱中, 室温静置 3 min。

(4) 室温 13 000 g 离心 2 min, 弃滤液。

(5) 离心吸附柱中加入洗涤液 800 μL, 室温 13 000 g 离心 2 min, 弃滤液。

(6) 室温 13 000 g 再次离心 1 min。

(7) 将离心吸附柱插入新的 1.5 mL 离心管中, 取洗脱液 25 μL 加到离心吸附柱滤膜的中间, 室温静置 3 min。

- (8) 室温 13 000 g 离心 2 min, 收集病毒 RNA 样品。
- (9) 利用紫外分光光度计检测病毒 RNA 样品含量, 病毒 RNA 样品可以直接用于 RT-PCR 或逆转录反应, 也可放 -80 °C 长期保存。

3.3.3.2 EV71 病毒 RNA 的反转录

EV71 病毒 RNA 的反转录使用天泽生物技术有限公司生产的 cDNA 第一链合成试剂盒。具体操作步骤如下:

注意: MMLV 酶使用前必须短暂离心, 因为它含 50% 甘油, 及其粘稠, 否则将取不到所需体积。

- (1) 配制反转录反应体系, 体系总体为 20 μ L。RNA 模板 (总 RNA) 500 ng, 引物 (0.2 μ g/ μ L), 随机引物 1 μ L, RNase-free ddH₂O 12 μ L
- (2) 70 °C 保温 5 min (模板变性过程), 保温后迅速冰浴。
- (3) 按以下顺序加入各成分:
5 \times RT Buffer 4 μ L, RNase Inhibitor (40 U/ μ L) 1 μ L, dNTP (10 mM each) 2 μ L
- (4) 25 °C 保温 5 min。对富含二级结构的高 GC RNA 模板, 可以改成 45 °C 保温 5 min。
- (5) 加入 1 μ L (200 U) 的 MMLV 逆转录酶, 反应终体积为 20 μ L。
- (6) 25 °C 保温 10 min, 然后再转移到 42 °C 保温 60 min, 此步即为反转录反应。
- (7) 70 °C 保温 10 min, 终止反转录反应, 冰盒内保存待用。合成后的 cDNA 可以作为 PCR 模板使用, 无需纯化过程。剩余样品可长期放置于 -20 °C 冰箱保存。

3.3.3.3 EV71 病毒的 PCR 鉴定及测序

参照卫生部手足口病预防控制指南 (2008 年版) 设计肠道病毒通用核酸检测引物、EV71 病毒特异性核酸检测引物以及 CVA16 病毒特异性核酸检测引物。引物序列设计如下:

肠道病毒 (包括 EV71、CVA16) 通用核酸检测引物序列:
PE2-F: 5'-TCCGGCCCTGAATGCGCTAATCC-3'
PE1-R: 5'-ACACGGACACCCAAAGTAGTCGGTCC-3'

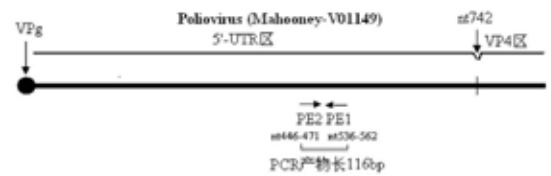


图 3-1 肠道病毒通用核酸检测引物基因位置
Fig. 3-1 The positions of universal primers of enterovirus

EV71 病毒特异性核酸检测引物序列:

EV71-F: 5'-GCAGCCAAAAGAAGCTTCAC-3'
EV71-R: 5'-ATTTCAGCAGCTTGGAGTGC-3'

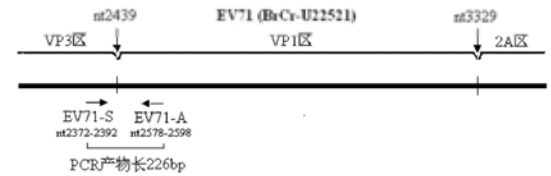


图 3-2 EV71 病毒特异性核酸检测通用引物基因位置
Fig. 3-2 The positions of universal primers of EV71

CVA16 病毒特异性核酸检测引物序列:

CVA16-F: 5'-ATTGGTGCTCCACTACAGC-3'
CVA16-R: 5'-TCAGTGTGGCAGCTGTAGG-3'

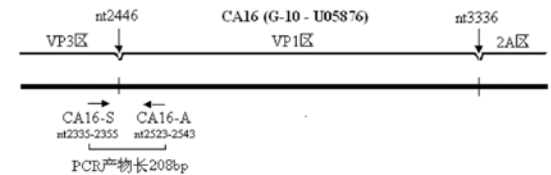


图 3-3 CVA16 病毒特异性核酸检测通用引物基因位置
Fig. 3-3 The positions of universal primers of CVA16

按表 3-2 所示加入 PCR 反应体系, 并瞬时离心以混匀反应体系:

表 3-2 PCR 反应体系
Tab. 3-2 Reaction system of PCR

反应物	体积 (μ L)
Pyrobest DNA Polymerase (5 U/ μ L)	0.25
10 \times Pyrobest Buffer II	5
dNTP Mixture (各 2.5 mM)	4
病毒反转录 DNA	2.5 (50 ng)
上游引物 (10 μ M)	2
下游引物 (10 μ M)	2
dd H ₂ O	34.25
总体系	50

PCR 反应条件为: 94 °C 5 min (循环 1 次); 94 °C 1 min, 55 °C 1 min; 72 °C 1 min (循环 30 次); 72 °C 10 min (循环 1 次)

将 PCR 反应后产物通过琼脂糖凝胶电泳进行鉴定。具体步骤如下:

- (1) 配制 1% 琼脂糖凝胶: 将 1 g 琼脂糖溶于 100 mL TAE 电解液中, 加入锥形瓶中, 置于微波炉中加热 3 min, 使琼脂糖充分溶解, 待稍冷却后, 加入 5 μ L EB (10 mg/mL), 将该溶液倒入胶盒中, 插入小梳子, 待其冷却。
 - (2) 上样和电泳: 使用 10 \times 的 loading buffer, 将 2 μ L 的 loading buffer 和 18 μ L 的样品混匀, 上样。
 - (3) 在 110 V 电压下电泳 30 min。
- 将琼脂糖凝胶鉴定正确的病毒反转录 DNA 测序。

3.3.4 EV71 病毒的灭活

3.3.4.1 EV71 病毒灭活条件的检测

实验中选择 β -丙内酯 (BPL) 作为病毒灭活剂, 对 BPL 进行三组稀释度的稀释, 稀释度分别为 1:1 000、1:2 000、1:4 000。

将三组稀释后的 BPL 溶液分别加入各病毒悬液中, 4 °C 灭活 24 h, 每 4 h 漩涡震荡混匀一次。灭活后放入 37 °C 保温 2 h 降解 BPL。

当 6 孔板中细胞生长状态良好且生长密度达 90% 左右时, 加入病毒灭活悬液 100 μ L, 将灭活后的病毒与细胞共培养并设立对照。每天观察记录细胞的生长状态, 经 7 天观察后, 根据细胞病变情况, 确定灭活的最佳稀释度。

3.3.4.2 灭活 EV71 病毒的超速纯化

- (1) 加入纯水浸泡滤膜约 3 min 以活化滤膜, 离心后将水弃去。
- (2) 在 100 KD 超滤管中加入灭活 EV71 病毒样品 10 mL, 于 5 000 g 离心 10 min, 离心后滤膜上液体量应不低于 1.5 mL, 弃去滤膜以下的液体。重复此步骤直至将灭活 EV71 病毒样品超滤完成。
- (3) 在超滤管中加入 10 mL PBS, 于 5 000 g 离心 10 min, 弃去滤膜以下的液体, 重复此步骤 5 次。
- (4) 最后将滤膜上液体吸出转移至 15 mL 离心管中并分装, 于 -80 °C 下保存。

3.3.4.3 SDS-PAGE 及 Western Blot 检测灭活 EV71 病毒

将灭活 EV71 病毒进行 SDS-PAGE 验证, 具体步骤如下:

- (1) 先将 12% 的分离胶配好后, 加入至凝胶槽中, 加入 75% 酒精压线, 待胶凝固后, 用枪小心将酒精吸出, 并加入纯水至胶槽中清洗分离胶。用纸将水吸干, 加入 5% 浓缩胶至胶槽上沿, 吸出泡沫, 并小心将梳子插入, 静置使胶凝固。PAGE 胶配制方法如表 3-3 所示。

表 3-3 PAGE 胶配制方法
Tab. 3-3 Preparation method of PAGE gel

分离胶溶液	体积 (mL)	浓缩胶溶液	体积 (mL)
H ₂ O	3.4	H ₂ O	3.41
30% acrylamide mix	4	30% acrylamide mix	1
Separating gel buffer (pH 8.8)	2.5	Separating gel buffer (pH 6.8)	1.5
10% AP	0.1	10% AP	0.06
TEMED	0.04	TEMED	0.006
总体积	10	总体积	6

- (2) 将蛋白样品和 5 \times Loading buffer 混合, 煮沸 5 min, 瞬时离心混匀后上样到 SDS 聚丙烯酰胺凝胶 (积层胶为 5%, 分离胶为 12%) 中。
 - (3) 电泳槽中加入 Running buffer, 并吸出泡沫, 于 100 V 电压下电泳约 1.5 h。
 - (4) 电泳结束后, 将 PAGE 胶 (8 cm \times 10 cm) 取出放置在一玻璃皿中, 加入 50 mL 去离子水, 加热至沸后停止。
 - (5) 倒掉去离子水, 加入考马斯亮蓝快速染色液 30 mL, 保证凝胶全部浸染于其中, 加热至沸腾, 保持沸腾状态 2 min, 停止加热, 转入床缓慢摇动 20 min, 弃染液。
 - (6) 加入去离子水 50 mL, 加热至沸腾, 保持沸腾状态 2 min, 停止加热, 转入床缓慢摇动 20 min, 完成脱色。
 - (7) 将胶取出, 在凝胶成像分析系统下观察电泳情况。
- 将灭活 EV71 病毒进行 Western Blot 验证, 具体步骤如下:

(1) 先将 12% 的 Separating Gel 配好后, 加入至凝胶槽中, 加入 75% 酒精压线。待胶凝固后, 用枪小心将酒精吸出, 并加入纯水至胶槽中清洗分离胶, 用纸将水吸干, 加入 5% Stacking Gel 至胶槽上沿, 吸出泡沫, 并小心将梳子插入, 静置使胶凝固。PAGE 胶配制方法如表 3-3 所示。

(2) 将蛋白样品和 5xLoading buffer 混合, 煮沸 5 min, 瞬时离心混匀后上样到 SDS 聚丙烯酰胺凝胶中。

(3) 在电泳槽中加入 Running buffer, 并吸出泡沫, 于 100 V 电压下电泳约 1.5 h。

(4) 半干法转膜: 根据胶的大小, 将 PVDF 膜和滤纸剪好, PVDF 膜要稍大于滤纸。用无水甲醇浸泡 PVDF 膜 15 s。在电解液中, 将膜、滤纸等摆好, 顺序依次为滤纸、膜、胶、滤纸, 中间不可有气泡, 根据膜的面积大小按 1 mA/cm² 的比例调整电流, 本实验使用的电流为 18 mA, 转膜 40 min。

(5) 转膜后将膜取出置于封闭液 (脱脂奶粉溶于 PBS 中, 浓度为 5%) 中, 于室温下封闭反应 4 h。

(6) 剪一个比膜稍大一些的塑料膜小袋, 加入一抗 4 mL, 一抗与封闭液的比例为 1:1 000, 摇床过夜反应。

(7) 将一抗吸出, 将膜置于玻璃皿中, 用 PBST 洗 3 次, 每次 10 min, 并用摇床慢摇。

(8) 剪一个比膜稍大一些的塑料膜小袋, 加入二抗, 稀释比例为 1:10 000, 摇床 45 min, 注意避光。

(9) 将二抗吸出, 将膜置于玻璃皿中, 用 PBST 洗 2 次, 再用 PBS 洗膜 1 次, 每次 10 min, 并用摇床慢摇。

(10) 将 PVDF 膜置于 PBS 溶液中, 在 Odyssey 红外荧光扫描成像仪下观察分析结果。

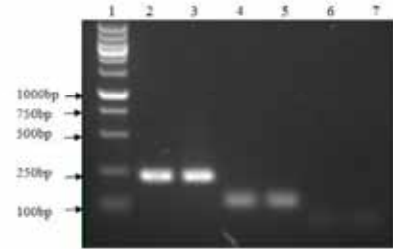
3.3.4.4 透射电子显微镜观察

- 取适量样品溶液滴加至封口膜上。
- 取 pH 7.6 的 2% 磷酸溶液滴加至另外一张封口膜上。
- 在样品液滴上放置一碳膜面向下的 230 目铜网, 静置 2 min。
- 取出铜网并吸干表面多余样品液体, 在磷酸液滴上放置该铜网, 并保证铜网碳膜的一面朝向磷酸液滴表面, 静置 1 min。
- 取出铜网并吸干表面多余磷酸液, 室温静置晾干后, 将铜网放入 1.5 mL 离心管中。
- 利用透射电子显微镜对铜网上的样品进行观察。

3.4 实验结果

3.4.1 EV71 病毒 PCR 鉴定及测序的实验结果

选用卫生部手足口病预防控制指南 (2008 年版) 推荐的三组核酸检测引物, 对病毒进行 PCR 扩增鉴定。收集病毒并提取病毒 RNA, 进行 RT-PCR (反转录), 常规 PCR。电泳结果如图 3-4 所示, EV71 特异性引物 PCR 结果为泳道 2 及泳道 3, 产物长度约 220 bp; 肠道病毒特异性引物 PCR 结果为泳道 3 及泳道 4, 产物长度约 110 bp, CVA16 特异性引物 PCR 结果为泳道 6 及泳道 7, 无产物扩增条带。PCR 结果初步表明扩增培养的病毒确为 EV71 病毒。病毒反转录 DNA 样品测序鉴定后, 结果表明病毒为 EV71 病毒 C4 亚型。

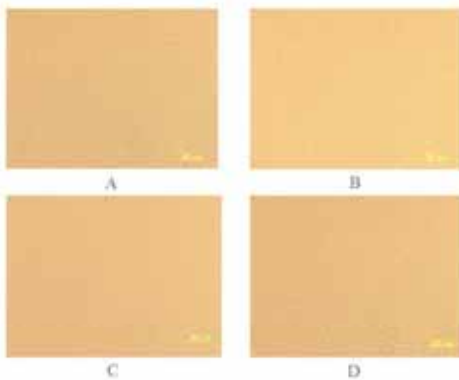


1: Wide Range Marker 100-6000 2, 3: EV71 特异性引物 PCR
4, 5: 肠道病毒特异性引物 PCR 6, 7: CVA16 特异性引物 PCR
图 3-4 EV71 病毒 PCR 鉴定结果
Fig. 3-4 PCR analysis of EV71

3.4.2 BPL 灭活 EV71 病毒效果的验证及病毒的纯化

BPL 与传统灭活剂甲醛相比只会专一性降解病毒的核酸, 而不会破坏病毒的衣壳蛋白及其结构, 因此经 BPL 灭活的病毒可有效保护其免疫原性。另一方面, BPL 灭活后无需任何后续处理即可在 37 °C 下自动降解, 使用操作较为方便。实验中采用三组稀释度 1:1 000、1:2 000、1:4 000 对灭活剂 BPL 进行稀释。利用稀释后的 BPL 对 EV71 病毒进行灭活, 灭活时间约为 24 h。当 6 孔板中 RD 细胞的生长密度达 90% 左右时, 接种灭活后的病毒, 并观察记录各稀释度灭活效果。如图 3-5 所示, 当各稀释度灭活时间与病毒接种量都相同的条件下, 1:1 000 及 1:2 000 稀释度的 BPL 均可有效灭活 EV71 病毒, 本着节约的前提下本实验选择

1:2 000 稀释度的 BPL 灭活 EV71 病毒。



A: 正常 RD 细胞, 培养 5 天
B: BPL 1:1 000 稀释度灭活效果
C: BPL 1:2 000 稀释度灭活效果
D: BPL 1:4 000 稀释度灭活效果
图 3-5 BPL 灭活 EV71 病毒效果
Fig. 3-5 EV71 inactivation effect by BPL.

3.4.3 Western Blot 及 SDS-PAGE 检测灭活 EV71 病毒的实验结果

灭活 EV71 病毒 SDS-PAGE 实验结果如图 3-6A 所示, 泳道 2 为灭活 EV71 病毒样品, 根据文献报道, EV71 病毒 VP1 蛋白的分子量大小约为 36 KD, 图中在 34 KD-43 KD 处有一明显可见条带, 证明这一条带确为 EV71 病毒 VP1 蛋白。根据文献报道, EV71 病毒 VP2 蛋白的分子量大小约为 30 KD, 图中在 34 KD 处下方有一明显可见条带, 证明这一条带确为 EV71 病毒 VP2 蛋白。根据文献报道, EV71 病毒 VP3 蛋白的分子量大小约为 27 KD, 图中在 26 KD 处上方有一明显可见条带, 证明这一条带确为 EV71 病毒 VP3 蛋白。

灭活 EV71 病毒 Western Blot 实验结果如图 3-6B 所示。根据文献报道, EV71 病毒 VP1 蛋白的分子量大小约为 36 KD, Western Blot 实验中一抗采用针对 EV71 病毒 VP1 蛋白的多克隆抗体。图中泳道 2 为灭活 EV71 病毒, 泳道 3 为 EV71 病毒, 两泳道在 34 KD-43 KD 之间均出现唯一一条阳性信号, 初步判断这两条带大小均

为 36 KD 左右, 证明这两条带均 EV71 病毒 VP1 蛋白。

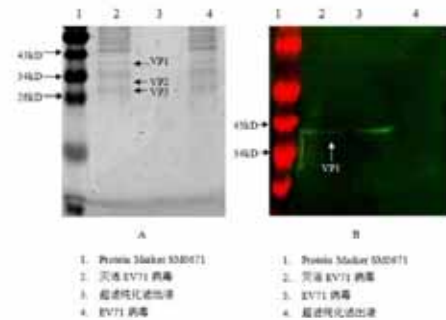
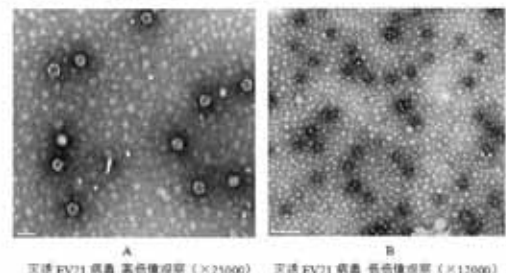


图 3-6 SDS-PAGE 及 Western Blot 检测灭活 EV71 病毒的结果
Fig. 3-6 SDS-PAGE and Western Blot analysis of inactivated EV71

3.4.4 透射电子显微镜观察灭活 EV71 病毒的结果

BPL 灭活的 EV71 病毒透射电子显微镜观察结果如图 3-7 所示, 灭活病毒的形态与大小与相关文献报道的 EV71 活病毒一致。



灭活 EV71 病毒 高倍电镜观察 (×25000) 灭活 EV71 病毒 低倍电镜观察 (×12000)

图 3-7 灭活 EV71 病毒纯化后透射电镜观察结果
Fig. 3-7 TEM images of inactivated EV71

3.5 讨论

本章实验中选用卫生部手足口病预防控制指南（2008年版）推荐的三组核酸检测引物，对病毒进行 PCR 扩增鉴定。鉴定过程包括：收集病毒并提取病毒 RNA，RT-PCR（反转录）、常规 PCR。PCR 结果初步表明扩增培养的病毒确为 EV71 病毒。病毒反转录 DNA 样品测序鉴定后，结果表明扩增病毒为 EV71 病毒 C4 亚型。

BPL 与传统灭活剂甲醛相比只会专一性降解病毒的核酸，而不会破坏病毒的衣壳蛋白及其结构，因此经 BPL 灭活的病毒可有效地保护其免疫原性。另一方面，BPL 灭活后无需任何后续处理即可在 37℃ 下自动降解，使用操作较为方便。鉴于以上多种原因，本实验选用 BPL 作为灭活剂对 EV71 病毒进行灭活。BPL 自 1984 年作为狂犬疫苗的灭活剂以来，已被广泛应用于多种人和动物疫苗的生产。BPL 作为理想的灭活剂有以下突出优点：（1）易水解、无残留，水解产物对机体无危害；（2）直接作用于病毒或病原体核酸，灭活效果较为理想；（3）灭活时间短，缩短了疫苗生产周期。本章实验中选用 BPL 对 EV71 病毒灭活，选用 3 种 BPL 灭活浓度进行测试，并利用再次感染细胞观察病变的方法检测各个浓度的有效性，最终确定灭活剂浓度的最佳条件。

3.6 本章小结

本章实验中利用三组核酸检测引物，对病毒进行 PCR 扩增鉴定。随后将病毒反转录 DNA 样品测序鉴定，结果表明病毒为 EV71 病毒 C4 亚型。选用 β-丙内酯（BPL）对 EV71 病毒进行灭活，并已确定灭活剂浓度的最佳条件。通过 Western Blot 检测以及透射电子显微镜观察证明 BPL 作为 EV71 病毒的灭活剂灭活效果良好。灭活过程中 BPL 并未破坏 EV71 病毒的衣壳蛋白及其结构，同时有效地保护了 EV71 病毒的免疫原性。本章实验中收获的灭活 EV71 病毒为本课题下一步工作的顺利开展打下良好基础。

第4章 HBc-EV71-VP4-N20 病毒样颗粒的免疫学检测

本章实验内容为，对本论文第 2 章获得的 HBc-EV71-VP4-N20 病毒样颗粒的免疫原性进行了检测。将 HBc-EV71-VP4-N20 免疫小鼠后，通过免疫学相关实验检测小鼠抗血清针对 EV71 病毒的中和效果。小鼠体内攻毒实验验证了免疫 HBc-EV71-VP4-N20 后的小鼠血清针对 EV71 病毒的感染具有较好的保护效力。

4.1 实验材料

1. HBc-EV71-VP4-N20、HBc 病毒样颗粒及病毒毒株：HBc-EV71-VP4-N20 VLPs、HBc VLPs 由本论文第 2 章实验制备获得；灭活 EV71 病毒由本论文第 3 章实验制备获得；EV71 病毒 C4 亚型由中国疾病预防控制中心病毒预防控制所曾毅院士实验室提供；多肽的合成及载体偶联由北京中科亚光生物科技有限公司完成。

2. 细胞培养试剂：HEPES 缓冲液、PBS 缓冲液、3%谷氨酰胺溶液、青链霉素、胎牛血清、MEM 培养基及胰酶等均购自 Invitrogen 公司。

3. 免疫学实验相关材料及试剂：实验小鼠 SPF 级购自北京华阜康生物科技股份有限公司；弗氏完全佐剂及弗氏不完全佐剂购自 Sigma-Aldrich 公司；QuickAntibody 系列免疫佐剂购自北京康碧泉生物科技有限公司；ELISA 包被液、ELISA 封闭液（BSA）、ELISA 漂洗液及 ELISA 终止液均购自北京鼎国昌盛生物技术有限公司；单组份 TMB 底物溶液购自天根生化科技（北京）有限公司；ELISA 酶标二抗 Goat Anti-Mouse IgG 购自北京康为世纪生物科技有限公司。

4.2 实验仪器

电子天平	N2B110 型, Ohaus 公司
漩涡混合器	SFG-02.500, 黄石市恒丰医疗器械有限公司
离心机	型号 5418, Eppendorf 公司
冷冻离心机	D37520 osterode, Thermo 公司
电热恒温鼓风干燥箱	SFG-02.500, 黄石市恒丰医疗器械有限公司
自动蒸汽灭菌锅	D-1 型, 北京发恩科贸有限公司
CO ₂ 培养箱	RC03000T-5-VBC, REVCO 公司
生物安全柜	BHC-1360 II A/B3 031004, 哈尔滨东联电子技术开发有限公司

倒置荧光显微镜	CK40, 日本 OLYMPUS 公司
酶标仪	Model 550, Bio-Rad 公司

4.3 实验方法

4.3.1 HBc-EV71-VP4-N20 病毒样颗粒免疫方案的设计

4.3.1.1 弗氏佐剂组小鼠免疫方案设计

（1）根据文献，选择 BALB/c 雌性 6-8 周龄小鼠作为免疫对象，设计实验组别如表 4-1 所示。HBc-EV71-VP4-N20 病毒样颗粒组（HBc-EV71-VP4-N20）、HBc 病毒样颗粒组（HBc）、灭活 EV71 病毒组（EV71-BPL）、EV71 病毒 VP4 蛋白 N 端前 20 个氨基酸多肽合成（偶联 KLH 蛋白）组（EV71-VP4-N20-KLH）、PBS 组。

表 4-1 免疫小鼠分组
Tab. 4-1 Grouping of Immunized mice

组别	抗原	数量	免疫剂量 (μg/只)
A	HBc-EV71-VP4-N20	5	首次 50、加强 25
B	HBc	5	首次 50、加强 25
C	EV71-BPL	5	首次 50、加强 25
D	EV71-VP4-N20-KLH	5	首次 50、加强 25
E	PBS	5	同体积

4.3.1.2 弗氏佐剂组小鼠免疫方案

根据弗氏完全佐剂及弗氏不完全佐剂的使用要求，采用 3 针次免疫。免疫时间为第 0 周、第 2 周及第 5 周。

（1）首次免疫（0 周），免疫前，将抗原利用 PBS 缓冲液稀释到 2 倍终浓度。等体积加入弗氏完全佐剂，混合后总体积为 100 μL，每针蛋白注射量为 50 μg，采用皮下方式注射。

（2）加强免疫（2 周、5 周），免疫前，将抗原利用 PBS 缓冲液稀释到 2 倍终浓度。等体积加入弗氏不完全佐剂，混合后总体积为 100 μL，每针蛋白注射量为 25 μg，采用皮下方式注射。

（3）通过小鼠眼眶内眦的方式采集实验血清，血清采集的周数为 0、2、4、6、8、10、12 周。

4.3.1.3 弗氏佐剂组实验小鼠血清的处理

（1）血清采集后室温放置 2-3 h，4℃ 放置 2 h，此过程的目的在于使血细胞

沉降、血液凝固以便分离血清。

(2) 4 ℃、5 000 rpm 离心 20 min, 收集血清。

(3) 将上一步收集的血清分装至 1.5 mL 无菌离心管中, 标明血清样品来源、采血周数、免疫方式及日期, -20 ℃ 保存。

4.3.1.4 QuickAntibody 佐剂组小鼠免疫方案设计

(1) 根据文献, 选择 BALB/c 雌性 6-8 周龄小鼠作为免疫对象, 设计实验组别如表 4-2 所示。HBe-EV71-VP4-N20 病毒样颗粒组 (HBe-EV71-VP4-N20), HBe 病毒样颗粒组 (HBe), 灭活 EV71 病毒组 (EV71-BPL), EV71 病毒 VP4 蛋白 N 端前 20 个氨基酸多肽合成 (偶联 KLH 蛋白) 组 (EV71-VP4-N20-KLH), PBS 组。

表 4-2 免疫小鼠分组
Tab. 4-2 Grouping of immunized mice

组别	抗原	数量	剂量 (μg/只)
A	HBe-EV71-VP4-N20	5	5
B	HBe	5	5
C	EV71-BPL	5	5
D	EV71-VP4-N20-KLH	5	5
E	PBS	5	同体积

4.3.1.5 QuickAntibody 佐剂组小鼠免疫方案

(1) 免疫前, 将抗原利用 PBS 缓冲液稀释到 2 倍终浓度。等体积加入 QuickAntibody 系列免疫佐剂, 混合后总体积为 100 μL, 每针蛋白注射量为 5 μg。

(2) 采用肌肉方式注射, 根据 QuickAntibody 系列免疫佐剂的使用要求, 采用 2 针次免疫。免疫时间为第 0 周, 第 3 周。

(3) 通过小鼠眼眶内眦的方式采集实验血清, 血清采集的周数为 0、2、5、8、10 周。

4.3.1.6 QuickAntibody 佐剂组实验小鼠血清的处理

(1) 血清采集后室温放置 2-3 h, 4 ℃ 放置 2 h, 此过程目的在于使血细胞沉降、血液凝固以便分离血清。

(2) 4 ℃、5 000 rpm 离心 20 min, 收集血清。

(3) 将上一步收集的血清分装至 1.5 mL 无菌离心管中, 标明血清样品来源、采血周数、免疫方式及日期, -20 ℃ 保存。

4.3.2 EV71 病毒 CCID₅₀ 的检测

CCID₅₀ (cell culture infective dose 50%) 细胞培养半数感染量。主要用于检测病毒滴度。将病毒按照倍比稀释或梯度稀释后接种细胞 (每个稀释度接种 4 孔或 6 孔细胞), 观察细胞 CPE, 通过 Behrens-Kärber 公式计算出 CCID₅₀, 得到病毒滴度。这种方法主要用于测定病毒毒力滴度。有了这个标准, 就可以用 100×CCID₅₀ 或 200×CCID₅₀ 等往下做一系列跟病毒有关的其他定量实验, 如中和实验中抗体效价测定等。具体的操作过程如下:

(1) 将冻存于 -80 ℃ 冰箱的含有 EV71 病毒悬液的离心管取出, 在 4 ℃ 条件下缓慢融化。

(2) 取适量 MEM 培养基 (含 2% FBS, 细胞维持液) 加入到融化后的病毒悬液中, 进行 10 倍比稀释, 稀释梯度从 10¹ 至 10¹⁰。

(3) 取 MEM 培养基 (含 2% FBS, 细胞维持液) 50 μL 加入到 96 孔细胞培养板的每孔中, 再取 EV71 病毒各梯度稀释悬液 50 μL 分别加入每孔中, 每个稀释度设复孔 10 个。

(4) 设置正常细胞对照孔 10 个, 每孔只加 MEM 培养基 (含 2% FBS, 细胞维持液) 100 μL, 不添加病毒悬液。

(5) 将细胞生长状态良好且生长密度大于 90% 的 RD 细胞消化后, 进行细胞计数。

(6) 依据计数结果, 稀释细胞悬液至细胞密度为 1.0×10⁵ 个/mL, 每孔加入细胞悬液 100 μL (细胞个数为每孔 10 000 个), 排枪混匀。

(7) 将细胞培养用 96 孔板放置于含 5% CO₂ 的培养箱中, 36 ℃ 培养观察 7 天, 记录每天的细胞病变 (CPE) 情况。

(8) 统计 7 天后细胞病变总体情况, 根据 Behrens-Kärber 公式计算出病毒的 CCID₅₀。

$\log \text{CCID}_{50} = L - d (S - 0.5)$, 其中:

L = 实验中使用的最低稀释度的对数值;

d = 稀释梯度的对数值;

S = 终判时阳性部分的总和 (即每个稀释度发生病变孔与总孔数比值的和)。

4.3.3 HBe-EV71-VP4-N20 病毒样颗粒的免疫学检测

4.3.3.1 检测弗氏佐剂组小鼠血清抗 HBe-EV71-VP4-N20 效价

(1) 以 HBe-EV71-VP4-N20 病毒样颗粒为抗原进行包被。将存于 -20 ℃ 中的 HBe-EV71-VP4-N20 蛋白取出放置离心机内离心。用包被稀释液稀释蛋白抗原到

相应的浓度, 保证每空蛋白总量为 200 ng, 每孔包被液总体积为 100 μL, 用封口膜封闭板子, 4 ℃ 包被过夜。

(2) 从 -20 ℃ 冰箱取出血清样品, 置于 4 ℃ 条件下融化。每个血清样品设置复孔 2 个, 每个 96 孔板中设阴性血清对照复孔 4 个、空白对照复孔 4 个。

(3) 洗涤: 将过夜包被板中的液体吸净并拍干。每孔中加入 100 μL ELISA 洗涤液, 置于摇床 1 min, 吸出孔中的洗涤液并拍干。重复上一步骤两遍即可。

(4) 封闭: 每孔中加入 200 μL 的 ELISA 封闭液 (BSA Blocking Buffer), 37 ℃ 孵育 2 h。

(5) 洗涤: 将已封闭的板中液体吸净并拍干。每孔中加入 200 μL 的 ELISA 洗涤液, 置于摇床 1 min, 吸出孔中的洗涤液并拍干。重复上一步骤两遍即可。

(6) 待测血清 (HBe-EV71-VP4-N20 组、HBe 组)、阴性血清 (PBS 组)、空白样本孵育: 将待测血清样本用含 10% FBS 的 PBS 缓冲液进行稀释, 稀释倍数分别为 100、200、400、800、1 600、3 200、6 400、12 800、25 600、51 200 等。每孔中加入稀释好的待测血清样本 100 μL。阴性孔中加入阴性血清 (PBS 组)、空白对照孔中加入等量的稀释液 (含 10% FBS 的 PBS)。37 ℃ 孵育 1 h。

(7) 洗涤: 将板中的液体吸净并拍干。每孔中加入 100 μL 的 ELISA 洗涤液, 置于摇床 1 min, 吸出孔中的洗涤液并拍干。重复上一步骤两遍即可。

(8) 二抗孵育: 将酶联二抗 Goat Anti-Mouse IgG HRP 用含 10% FBS 的 PBS 缓冲液进行稀释, 稀释倍数为 2 000。每孔中加入稀释好的二抗 100 μL。37 ℃ 孵育 1 h。

(9) 洗涤: 将板中的液体吸净并拍干。每孔中加入 100 μL 的 ELISA 洗涤液, 置于摇床 1 min, 吸出孔中的洗涤液并拍干。重复上一步骤两遍即可。

(10) 显色: 将板中的残余液体吸净并拍干。每孔中加入可溶性单组份 TMB 底物溶液 100 μL。37 ℃ 条件下静置 20 min。静置后, 每孔中加入 ELISA 终止液 100 μL。将 96 孔酶标板置于酶标仪中, 450 nm、630 nm 双波长读取 OD 值。

4.3.3.2 检测弗氏佐剂组小鼠血清抗 EV71-VP4-N20 (多肽) 效价

(1) 以 EV71-VP4-N20-BSA (合成多肽偶联至 BSA 载体蛋白) 为抗原进行包被。将存于 -20 ℃ 中的抗原多肽 (由中科亚光合成、干粉状、1 mg/管) 取出放置离心机内离心。用 1 mL PBS 溶液溶解 1 mg 干粉抗原多肽 (1 mg/mL)。分装于 5 个 1.5 mL 道夫管内 (1 μg/μL、200 μL)。用包被稀释液稀释蛋白抗原到相应的浓度, 保证每空蛋白总量为 200 ng, 每孔包被液总体积为 100 μL。用封口膜封闭板子, 4 ℃ 包被过夜。

(2) 从 -20 ℃ 冰箱取出血清样品, 置于 4 ℃ 条件下融化。每个血清样品设置复孔 2 个, 每个 96 孔板中设阴性血清对照复孔 4 个、空白对照复孔 4 个。

(3) 洗涤: 将过夜包被板中的液体吸净并拍干。每孔中加入 100 μL ELISA 洗涤液, 置于摇床 1 min, 吸出孔中的洗涤液并拍干。重复上一步骤两遍即可。

(4) 封闭: 每孔中加入 200 μL 的 ELISA 封闭液 (BSA Blocking Buffer), 37 ℃ 孵育 2 h。

(5) 洗涤: 将已封闭的板中液体吸净并拍干。每孔中加入 200 μL 的 ELISA 洗涤液, 置于摇床 1 min, 吸出孔中的洗涤液并拍干。重复上一步骤两遍即可。

(6) 待测血清 (HBe-EV71-VP4-N20 组、HBe 组、EV71-VP4-N20-KLH 组)、阴性血清 (PBS 组)、空白样本孵育: 将待测血清样本用含 10% FBS 的 PBS 缓冲液进行稀释, 稀释倍数分别为 100、200、400、800、1 600、3 200、6 400、12 800、25 600、51 200 等。每孔中加入稀释好的待测血清样本 100 μL。阴性孔中加入阴性血清 (PBS 组)、空白对照孔中加入等量的稀释液 (含 10% FBS 的 PBS)。37 ℃ 孵育 1 h。

(7) 洗涤: 将板中的液体吸净并拍干。每孔中加入 100 μL 的 ELISA 洗涤液, 置于摇床 1 min, 吸出孔中的洗涤液并拍干。重复上一步骤两遍即可。

(8) 二抗孵育: 将酶联二抗 Goat Anti-Mouse IgG HRP 用含 10% FBS 的 PBS 缓冲液进行稀释, 稀释倍数为 2 000。每孔中加入稀释好的二抗 100 μL。37 ℃ 孵育 1 h。

(9) 洗涤: 将板中的液体吸净并拍干。每孔中加入 100 μL 的 ELISA 洗涤液, 置于摇床 1 min, 吸出孔中的洗涤液并拍干。重复上一步骤两遍即可。

(10) 显色: 将板中的残余液体吸净并拍干。每孔中加入可溶性单组份 TMB 底物溶液 100 μL。37 ℃ 条件下静置 20 min。静置后, 每孔中加入 ELISA 终止液 100 μL。将 96 孔酶标板置于酶标仪中, 450 nm、630 nm 双波长读取 OD 值。

4.3.3.3 弗氏佐剂组小鼠血清的中和抗体效价检测

(1) 将存于 -80 ℃ 分装好的 EV71 病毒和存于 -20 ℃ 的小鼠血清取出在 4 ℃ 中缓慢融化。

(2) 将融化后的小鼠血清于 60 ℃ 加热灭活 30 min。

(3) 将融化后的 EV71 病毒悬液稀释至 100 CCID₅₀/0.05 mL, 待用。稀释液为细胞维持液 (含 2% FBS 的 MEM 培养基)。

(4) 将小鼠血清样品进行 2 倍比稀释, 起始稀释倍数选择 10 倍。稀释液为细胞维持液 (含 2% FBS 的 MEM 培养基)。稀释方法为: 在 96 孔板中第一排先各加入 90 μL 含 2% FBS 的细胞维持液, 之后每排各加入 50 μL 含 2% FBS 的细胞维持液。最后将待测血清样品 10 μL 分别加入 96 孔板第一排各孔中。排枪混匀后, 吸取第一排稀释后的各样品 50 μL 加入下一排各孔中。重复上述稀释过程直至稀释梯度为 1 : 1 280。每个稀释度的样品设置复孔 2 个。

(5) 将上述含有血清稀释样品的各孔中加入预先稀释好的病毒悬液 (100 CCID₅₀/0.05 mL) 50 μL, 排枪温和吹打混匀。

(6) 同时设置待测血清毒性对照组 (细胞维持液代替病毒悬液), 病毒对照组 (细胞维持液代替待测血清) 和正常细胞对照组 (细胞维持液代替病毒悬液及待测血清)。每组对照设置复孔 4 个。

(7) 依照病毒 CCID₅₀测定的操作步骤, 设置病毒回滴实验, 若回滴实验不成功, 则本次中和实验无效。

(8) 将 96 孔细胞培养板放入含有 5% CO₂ 的培养箱中, 37 °C 孵育 2 h。

(9) 将细胞生长状态良好且生长密度大于 90% 的 RD 细胞消化后, 进行细胞计数。

(10) 依据计数结果, 稀释细胞悬液至细胞密度为 1.0×10⁵ 个/mL, 每孔加入细胞悬液 100 μL (细胞个数为每孔 10 000 个), 排枪温和吹打混匀。

(11) 将 96 孔细胞培养板放入含有 5% CO₂ 的培养箱中, 36 °C 培养观察 7 天。每天记录细胞病变情况 (CPE), 第 7 天最终判定中和抗体效价。

4.3.3.4 检测 QuickAntibody 佐剂组小鼠血清抗 HBe-EV71-VP4-N20 效价

(1) 以 HBe-EV71-VP4-N20 病毒样颗粒为抗原进行包被。将存于 -20 °C 中的 HBe-EV71-VP4-N20 蛋白取出放置离心机内离心, 用包被稀释液稀释蛋白抗原到相应的浓度, 保证每空蛋白总量为 200 ng, 每孔包被液总体积为 100 μL, 用封口膜封闭板子, 4 °C 包被过夜。

(2) 从 -20 °C 冰箱取出血清样品, 置于 4 °C 条件下融化。每个血清样品设置复孔 2 个, 每个 96 孔板中设阴性血清对照复孔 4 个、空白对照复孔 4 个。

(3) 洗涤: 将过夜包被板中的液体吸净并拍干。每孔中加入 100 μL ELISA 洗涤液, 置于摇床 1 min, 吸出孔中的洗涤液并拍干。重复上一步骤两遍即可。

(4) 封闭: 每孔中加入 200 μL 的 ELISA 封闭液 (BSA Blocking Buffer), 37 °C 孵育 2 h。

(5) 洗涤: 将已封闭的板中液体吸净并拍干。每孔中加入 200 μL 的 ELISA 洗涤液, 置于摇床 1 min, 吸出孔中的洗涤液并拍干。重复上一步骤两遍即可。

(6) 待测血清 (HBe-EV71-VP4-N20 组、HBe 组)、阴性血清 (PBS 组)、空白样本孵育: 将待测血清样本用含 10% FBS 的 PBS 缓冲液进行稀释, 稀释倍数分别为 100、200、400、800、1 600、3 200、6 400、12 800、25 600、51 200 等。每孔中加入稀释好的待测血清样本 100 μL。阴性孔中加入阴性血清 (PBS 组)、空白对照孔中加入等量的稀释液 (含 10% FBS 的 PBS)。37 °C 孵育 1 h。

(7) 洗涤: 将板中的液体吸净并拍干。每孔中加入 100 μL 的 ELISA 洗涤液, 置于摇床 1 min, 吸出孔中的洗涤液并拍干。重复上一步骤两遍即可。

(8) 二抗孵育: 将酶联二抗 Goat Anti-Mouse IgG HRP 用含 10% FBS 的 PBS 缓冲液进行稀释, 稀释倍数为 2 000。每孔中加入稀释好的二抗 100 μL。37 °C 孵育 1 h。

(9) 洗涤: 将板中的液体吸净并拍干。每孔中加入 100 μL 的 ELISA 洗涤液, 置于摇床 1 min, 吸出孔中的洗涤液并拍干。重复上一步骤两遍即可。

(10) 显色: 将板中的残余液体吸净并拍干。每孔中加入可溶性单组份 TMB 底物溶液 100 μL。37 °C 条件下静置 20 min。静置后, 每孔中加入 ELISA 终止液 100 μL。将 96 孔酶标板置于酶标仪中, 450 nm、630 nm 双波长读取 OD 值。

4.3.3.5 检测 QuickAntibody 佐剂组小鼠血清抗 EV71-VP4-N20 (多肽) 效价

(1) 以 EV71-VP4-N20-BSA (合成多肽偶联至 BSA 载体蛋白) 为抗原进行包被。将存于 -20 °C 中的抗原多肽 (由中科亚光合成、干粉状、1 mg/管) 取出放置离心机内离心。用 1 mL PBS 溶液溶解 1 mg 干粉状抗原多肽 (1 mg/mL), 分装于 5 个 1.5 mL 道夫管内 (1 μg/μL、200 μL)。用包被稀释液稀释蛋白抗原到相应的浓度, 保证每空蛋白总量为 200 ng, 每孔包被液总体积为 100 μL。用封口膜封闭板子, 4 °C 包被过夜。

(2) 从 -20 °C 冰箱取出血清样品, 置于 4 °C 条件下融化。每个血清样品设置复孔 2 个, 每个 96 孔板中设阴性血清对照复孔 4 个、空白对照复孔 4 个。

(3) 洗涤: 将过夜包被板中的液体吸净并拍干。每孔中加入 100 μL ELISA 洗涤液, 置于摇床 1 min, 吸出孔中的洗涤液并拍干。重复上一步骤两遍即可。

(4) 封闭: 每孔中加入 200 μL 的 ELISA 封闭液 (BSA Blocking Buffer), 37 °C 孵育 2 h。

(5) 洗涤: 将已封闭的板中液体吸净并拍干。每孔中加入 200 μL 的 ELISA 洗涤液, 置于摇床 1 min, 吸出孔中的洗涤液并拍干。重复上一步骤两遍即可。

(6) 待测血清 (HBe-EV71-VP4-N20 组、HBe 组、EV71-VP4-N20-KLH 组)、阴性血清 (PBS 组)、空白样本孵育: 将待测血清样本用含 10% FBS 的 PBS 缓冲液进行稀释, 稀释倍数分别为 100、200、400、800、1 600、3 200、6 400、12 800、25 600、51 200 等。每孔中加入稀释好的待测血清样本 100 μL。阴性孔中加入阴性血清 (PBS 组)、空白对照孔中加入等量的稀释液 (含 10% FBS 的 PBS)。37 °C 孵育 1 h。

(7) 洗涤: 将板中的液体吸净并拍干。每孔中加入 100 μL 的 ELISA 洗涤液, 置于摇床 1 min, 吸出孔中的洗涤液并拍干。重复上一步骤两遍即可。

(8) 二抗孵育: 将酶联二抗 Goat Anti-Mouse IgG HRP 用含 10% FBS 的 PBS 缓冲液进行稀释, 稀释倍数为 2 000。每孔中加入稀释好的二抗 100 μL。37 °C 孵育 1 h。

(9) 洗涤: 将板中的液体吸净并拍干。每孔中加入 100 μL 的 ELISA 洗涤液, 置于摇床 1 min, 吸出孔中的洗涤液并拍干。重复上一步骤两遍即可。

(10) 显色: 将板中的残余液体吸净并拍干。每孔中加入可溶性单组份 TMB 底物溶液 100 μL。37 °C 条件下静置 20 min。静置后, 每孔中加入 ELISA 终止液 100 μL。将 96 孔酶标板置于酶标仪中, 450 nm、630 nm 双波长读取 OD 值。

4.3.3.6 QuickAntibody 佐剂组小鼠血清的中和抗体效价检测

QuickAntibody 佐剂组小鼠血清的中和抗体效价检测过程同 4.3.3.3

4.3.4 小鼠体内攻毒实验

实验动物选择新生 BALB/c 小鼠。抗血清来自 QuickAntibody 佐剂组的小鼠抗血清。实验分组如表 4-3 所示。

表 4-3 攻毒实验分组
Tab. 4-3 Grouping of lethal virus challenge

组别	血清来源	数量	剂量
A	HBe-EV71-VP4-N20 组	10	20 μL 血清+80 μL 病毒/只
B	HBe 组	10	20 μL 血清+80 μL 病毒/只
C	EV71-BPL 组	10	20 μL 血清+80 μL 病毒/只
E	PBS 组	5	20 μL 血清+80 μL 病毒/只
F	无	5	20 μL PBS+80 μL 病毒/只

(1) 1 日龄的新生 BALB/c 小鼠每窝约为 5 只, 两窝为一组, 每组大约 9-10 只。

(2) 实验中病毒选用 EV71 病毒 A 亚型 BrCr-TR 株 (由中国医学科学院生物医学研究所岑山教授课题组提供), 病毒扩增后过 0.45 μm 滤膜, 测定病毒的滴度 TCID₅₀。

(3) 将各血清样品与 10 LD₅₀ 的 EV71 病毒 BrCr-TR 株混匀, 4 °C 孵育过夜。

(4) 次日清晨, 腹腔注射病毒血清混合液于新生 1 日龄小鼠。后续每日进行一次观察, 共 16 天, 统计小鼠存活率。

(5) 实验观察过程中由于新生小鼠以母乳为营养源, 切记小鼠与母鼠不可分离饲养。

4.3.5 肽库筛选 HBe-EV71-VP4-N20 蛋白的抗原决定簇位点

肽库的合成及载体的偶联由北京中科亚光生物科技有限公司完成。EV71-VP4-N20 蛋白长约 20 个氨基酸, 肽库的设计原则为: 分别从 EV71-VP4-N20

多肽的 N 端及 C 端每次减少 2 个氨基酸残基, N 端及 C 端各减少 10 个氨基酸残基为止。肽库中最长的多肽为 20 个氨基酸残基, 最短为 10 个氨基酸残基。N 端缩短的多肽在 C 端进行 BSA 载体偶联; C 端缩短的多肽在 N 端进行 BSA 载体偶联。肽库的详细属性及命名如表 4-4 所示。

表 4-4 肽库属性
Tab. 4-4 Property of peptide Library

名称	序列	偶联位置	合成量、纯度
E-V4-20-C-2	gsqvstqrgshensnsa	N 端做 BSA 偶联	4 mg、90%
E-V4-20-C-4	gsqvstqrgshenn	N 端做 BSA 偶联	4 mg、90%
E-V4-20-C-6	gsqvstqrgshen	N 端做 BSA 偶联	4 mg、90%
E-V4-20-C-8	gsqvstqrgsh	N 端做 BSA 偶联	4 mg、90%
E-V4-20-C-10	gsqvstqrg	N 端做 BSA 偶联	4 mg、90%
E-V4-20-N-2	qvstqrgshensnsate	C 端做 BSA 偶联	4 mg、90%
E-V4-20-N-4	stqrgshensnsate	C 端做 BSA 偶联	4 mg、90%
E-V4-20-N-6	qrgshensnsate	C 端做 BSA 偶联	4 mg、90%
E-V4-20-N-8	sgshensnsate	C 端做 BSA 偶联	4 mg、90%
E-V4-20-N-10	shensnsate	C 端做 BSA 偶联	4 mg、90%

(1) 以肽库中的各条多肽为抗原进行包被。将存于 -20 °C 中的抗原多肽 (由中科亚光合成、干粉状、1 mg/管) 取出放置离心机内离心。用 1 mL PBS 溶液溶解 1 mg 干粉状抗原多肽 (1 mg/mL), 分装于 5 个 1.5 mL 道夫管内 (1 μg/μL、200 μL)。用包被稀释液稀释抗原多肽到相应的浓度, 保证每空蛋白总量为 200 ng, 每孔包被液总体积为 100 μL。用封口膜封闭板子, 4 °C 包被过夜。

(2) 次日, 从 -20 °C 冰箱取出 QuickAntibody 佐剂组中免疫过 HBe-EV71-VP4-N20 病毒样颗粒的小鼠第 5 周血清样品置 4 °C 条件下融化。每个血清样品设 2 个复孔, 每个 96 孔板中设阴性血清对照复孔 4 个、空白对照复孔 4 个。

(3) 洗涤: 将过夜包被板中的液体吸净并拍干。每孔中加入 100 μL ELISA 洗涤液, 置于摇床 1 min, 吸出孔中的洗涤液并拍干。重复上一步骤两遍即可。

(4) 封闭: 每孔中加入 200 μL 的 ELISA 封闭液 (BSA Blocking Buffer), 37 °C 孵育 2 h。

(5) 洗涤: 将已封闭的板中液体吸净并拍干。每孔中加入 200 μL 的 ELISA 洗涤液, 置于摇床 1 min, 吸出孔中的洗涤液并拍干。重复上一步骤两遍即可。

(6) HBe-EV71-VP4-N20 组血清样本用含 10% FBS 的 PBS 缓冲液进行稀释, 稀释倍数为 100。每孔中加入稀释好的血清样本 100 μL。阴性孔中加入阴性血清 (PBS 组)、空白对照孔中加入等量的稀释液 (含 10% FBS 的 PBS)。37 °C 孵育 1 h。

(7) 洗涤: 将板中的液体吸净并拍干。每孔中加入 100 μ L 的 ELISA 洗涤液, 置于摇床 1 min, 吸出孔中的洗涤液并拍干。重复上一步骤两遍即可。

(8) 二抗孵育: 将酶联二抗 Goat Anti-Mouse IgG HRP 用含 10% FBS 的 PBS 缓冲液进行稀释, 稀释倍数为 2 000。每孔中加入稀释好的二抗 100 μ L, 37 $^{\circ}$ C 孵育 1 h。

(9) 洗涤: 将板中的液体吸净并拍干。每孔中加入 100 μ L 的 ELISA 洗涤液, 置于摇床 1 min, 吸出孔中的洗涤液并拍干。重复上一步骤两遍即可。

(10) 显色: 将板中的残余液体吸净并拍干。每孔中加入可溶性单组份 TMB 底物溶液 100 μ L, 37 $^{\circ}$ C 条件下静置 20 min。静置后, 每孔中加入 ELISA 终止液 100 μ L。将 96 孔酶标板置于酶标仪中, 450 nm、630 nm 双波长读取 OD 值。

4.4 实验结果

4.4.1 EV71 病毒 CCID₅₀ 的检测结果

EV71 病毒 CCID₅₀ 滴定实验的 7 天观察实验记录如下:

第一天: 所有梯度的 RD 细胞均正常生长, 未发现 CPE 出现。

第二天: 10¹、10² 梯度的所有细胞已全部病变; 10³ 梯度少量细胞贴壁, 大量细胞已皱缩聚集 (呈葡萄状) 并悬浮, 但较 10² 梯度病变现象较轻; 10⁴ 梯度半数细胞贴壁, 半数细胞悬浮但细胞皱缩程度较轻; 10⁵ 梯度大部分细胞贴壁, 剩余少部分细胞悬浮呈圆形无明显皱缩; 剩余稀释梯度未见明显细胞病变。

第三、四天: 实验现象与第二天并无明显差异。

第五天: 10¹、10²、10³ 与 10⁴、10⁵、10⁶ 梯度所有细胞均已全部病变; 10⁷ 梯度 1⁸、8⁹ 孔细胞病变程度大于 75%, 4⁹、9⁹ 孔未出现明显病变, 剩余均全部病变; 10⁸ 梯度 1⁸、5⁹ 孔全部病变, 剩余细胞未出现明显病变; 剩余稀释梯度未见明显细胞病变。

第六天: 10¹、10²、10³、10⁴、10⁵、10⁶ 梯度所有细胞均已全部病变。10⁷ 梯度 4⁸、9⁹ 孔未出现明显病变, 剩余均全部病变; 10⁸ 梯度 1⁸、5⁹ 孔全部病变, 剩余细胞未出现明显病变; 剩余稀释梯度未见明显细胞病变。

第七天: 10¹、10²、10³、10⁴、10⁵、10⁶ 梯度所有细胞均已全部病变; 10⁷ 梯度 4⁸ 孔左上边缘发现有部分细胞明显病变, 病变细胞比例约占细胞总量的 5%, 9⁹ 孔约有超过 75% 的细胞发生明显病变现象, 剩余均全部病变; 10⁸ 梯度 1⁸、5⁹ 孔全部病变, 剩余孔中细胞未出现明显病变; 剩余稀释梯度未见明显细胞病变。

按 Behrens-Kärber 公式计算 EV71 病毒的 CCID₅₀。

$$\log \text{CCID}_{50} = L - d (S - 0.5)$$

$$\log \text{CCID}_{50} = -1 - (1) (7.2 - 0.5) = -7.7, \text{ 其中:}$$

L = 实验中使用的最低稀释度的 log 值;

d = 稀释梯度的 log 值;

S = 终判时阳性部分的总和 (即出现 CPE 的细胞孔所占的比例之和)。

4.4.2 HBe-EV71-VP4-N20 病毒样颗粒的免疫学检测结果

4.4.2.1 弗氏佐剂组小鼠血清抗 HBe-EV71-VP4-N20 的效价

针对弗氏佐剂组小鼠血清抗 HBe-EV71-VP4-N20 的结合抗体效价选用 ELISA 法进行检测。选用 HBe-EV71-VP4-N20 病毒样颗粒蛋白作为抗原包被 96 孔酶标板, 对待测血清样品进行检测。待测血清样品来自 HBe-EV71-VP4-N20 组、HBe 组及 PBS 组 (采集时间为第 0、2、4、6、8、10、12 周)。

如图 4-1 所示, 首次免疫后 HBe-EV71-VP4-N20 组血清结合抗体效价显著提高, 经两次加强免疫后即第 8 周血清结合抗体效价最高可达到 51 200; HBe 组血清结合抗体效价最高可达 25 600, 第二次加强免疫后两组血清持续保持较高的结合抗体效价约 4 周。

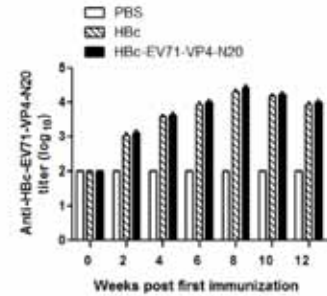


图 4-1 血清样品抗 HBe-EV71-VP4-N20 的效价
Fig. 4-1 Anti-HBe-EV71-VP4-N20 titer of serum samples

4.4.2.2 弗氏佐剂组小鼠血清抗 EV71-VP4-N20 (多肽) 的效价

针对弗氏佐剂组小鼠血清抗 EV71-VP4-N20 的结合抗体效价选用 ELISA 法

进行检测。选用 EV71-VP4-N20 多肽 (偶联 BSA 载体蛋白) 作为抗原包被 96 孔酶标板, 对待测血清样品进行检测。待测血清样品来自 HBe-EV71-VP4-N20 组、HBe 组及 PBS 组 (采集时间为第 0、2、4、6、8、10、12 周)。

如图 4-2 所示, 第一次加强免疫后 HBe-EV71-VP4-N20 组血清结合抗体效价显著提高, 经两次加强免疫后即第 8 周血清结合抗体效价最高可达到 12 800, 第二次加强免疫后 HBe-EV71-VP4-N20 组血清持续保持较高的结合抗体效价约 4 周。

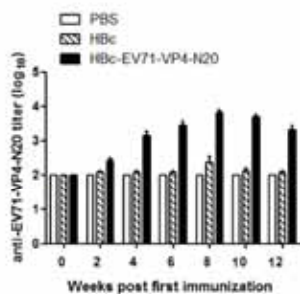


图 4-2 血清样品抗 EV71-VP4-N20 的效价
Fig. 4-2 Anti-EV71-VP4-N20 titer of serum samples

4.4.2.3 弗氏佐剂组小鼠血清中和抗体效价

本实验中比较了 HBe-EV71-VP4-N20 组、HBe 组、EV71-BPL 组及 PBS 组血清的中和抗体效价 (采集时间为第 0、2、4、6、8、10 周)。

如图 4-3 所示, HBe-EV71-VP4-N20 组血清在第一次加强免疫后中和抗体效价显著提高, 经两次加强免疫后即第 8 周血清中和抗体效价最高可达到 160; 第二次加强免疫后 HBe-EV71-VP4-N20 组血清持续保持较高的中和抗体效价约 2 周, 这一变化趋势与抗 EV71-VP4-N20 的结合抗体效价趋势基本一致。EV71-BPL 组血清中和抗体效价经两次加强免疫后即第 8 周最高可达 320, EV71-BPL 组血清中和抗体效价为几组血清样品中最高。这也表明 BPL 灭活的全病毒疫苗效果要略好于表位疫苗 HBe-EV71-VP4-N20 病毒样颗粒, 其原因可能在于全病毒灭活疫苗拥有更多的抗原表位。而表位疫苗 HBe-EV71-VP4-N20 病毒样颗粒在拥

有单一抗原表位的情况下能达到这样的中和抗体效价, 也基本令人满意, 其原因可能在于 HBe 病毒样颗粒增加了 EV71-VP4-N20 多肽的免疫原性。

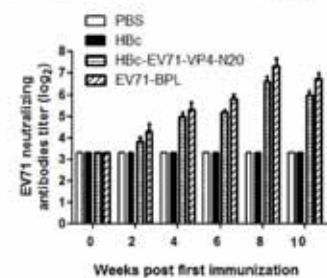


图 4-3 免疫血清中和抗体效价
Fig. 4-3 Neutralization titer of serum samples

4.4.2.4 QuickAntibody 佐剂组小鼠血清抗 HBe-EV71-VP4-N20 的效价

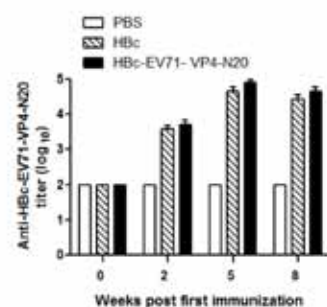


图 4-4 血清样品抗 HBe-EV71-VP4-N20 的效价
Fig. 4-4 Anti-HBe-EV71-VP4-N20 titer of serum samples

本实验选用 ELISA 法对 QuickAntibody 佐剂组小鼠血清抗 HBe-EV71-VP4-N20 的结合抗体效价进行检测。选用 HBe-EV71-VP4-N20 病毒样颗粒蛋白

作为抗原包被 96 孔酶标板, 对待测血清样品进行检测。待测血清样品来自 HBe-EV71-VP4-N20 组、HBe 组及 PBS 组(采集时间为第 0、2、5、8 周)。

如图 4-4 所示, 首次免疫后 HBe-EV71-VP4-N20 组血清结合抗体效价显著提高, 经一次加强免疫后即第 5 周血清结合抗体效价最高可达到 102 400; HBe 组血清结合抗体效价最高也可达 102 400。加强免疫后两组血清持续保持较高的结合抗体效价约 3 周。

4.4.2.5 QuickAntibody 佐剂组小鼠血清抗 EV71-VP4-N20 (多肽) 的效价

选用 ELISA 法对 QuickAntibody 佐剂组小鼠血清抗 EV71-VP4-N20 的结合抗体效价进行检测。选用 EV71-VP4-N20 多肽(偶联 BSA 载体蛋白)作为抗原包被 96 孔酶标板, 对待测血清样品进行检测。待测血清样品来自 HBe-EV71-VP4-N20 组、HBe 组及 PBS 组(采集时间为第 0、2、5、8 周)。

如图 4-5 所示, 加强免疫后 HBe-EV71-VP4-N20 组血清结合抗体效价显著提高, 经一次加强免疫后即第 5 周血清结合抗体效价最高可达到 51 200。加强免疫后 HBe-EV71-VP4-N20 组血清持续保持较高的结合抗体效价约 3 周。

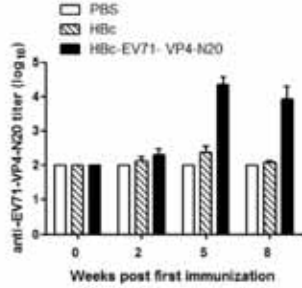


图 4-5 血清样品抗 EV71-VP4-N20 的效价
Fig. 4-5 Anti-EV71-VP4-N20 titer of serum samples

4.4.2.6 QuickAntibody 佐剂组小鼠血清中和抗体效价

本实验中比较了 HBe-EV71-VP4-N20 组、HBe 组及 EV71-BPL 组血清的中和抗体效价(采集时间为第 0、2、5、8 周)。

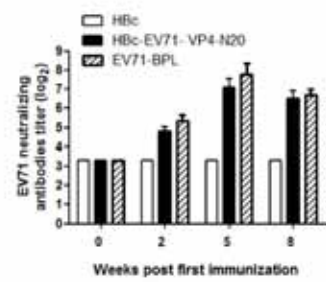
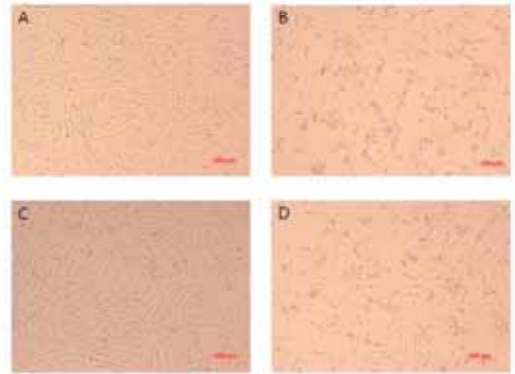


图 4-6 血清样品抗 EV71-VP4-N20 的效价
Fig. 4-6 Anti-EV71-VP4-N20 titer of serum samples



A: 正常 RD 细胞 B: RD 细胞感染 EV71 病毒出现 CPE
C: HBe-EV71-VP4-N20 组血清中和实验 D: HBe 组血清中和实验
图 4-7 中和实验镜下观察结果
Fig. 4-7 Microneutralization assay results

如图 4-6 所示, HBe-EV71-VP4-N20 组血清在加强免疫后中和抗体效价显著提高; 经加强免疫后即第 5 周血清中和抗体效价最高可达到 320; 加强免疫后

HBe-EV71-VP4-N20 组血清持续保持较高的中和抗体效价约 3 周, 这一变化趋势与抗 EV71-VP4-N20 的结合抗体效价趋势基本一致。EV71-BPL 组血清中和抗体效价经加强免疫后即第 5 周最高可达 640。EV71-BPL 组血清中和抗体效价为几组血清样品中最高。这也表明 BPL 灭活的全病毒疫苗效果要略好于表位疫苗 HBe-EV71-VP4-N20 病毒样颗粒, 其原因可能在于全病毒灭活疫苗拥有更多的抗原表位。而表位疫苗 HBe-EV71-VP4-N20 病毒样颗粒在拥有单一抗原表位的情况下能达到这样的中和抗体效价, 也基本令人满意, 其原因可能在于 HBe 病毒样颗粒增加了 EV71-VP4-N20 多肽的免疫原性。光学显微镜下观察结果如图 4-7 所示。

4.4.3 小鼠体内攻毒实验结果

小鼠体内攻毒实验的目的在于验证抗血清在面对病毒感染时能否在小鼠体内提供足够的保护力。实验对 HBe-EV71-VP4-N20 组、HBe 组以及阴性对照 PBS 组血清样品进行了相关验证。

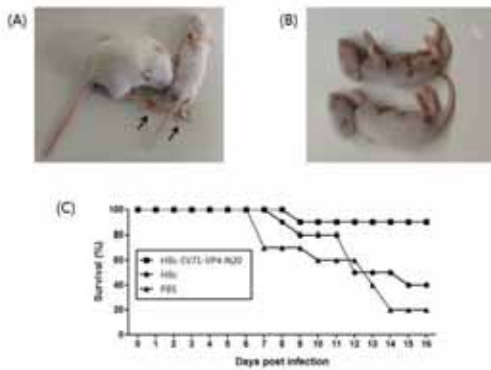


图 4-8 小鼠体内攻毒实验
Fig. 4-8 Lethal viral challenge

实验结果如图 4-8 (C) 所示。HBe-EV71-VP4-N20 组小鼠在第 9 天死亡一只, 剩余 9 只小鼠在第 16 天仍存活, 且生长状态良好, 存活率达 90%; HBe 组小鼠注射后第 8、9 天均死亡一只, 第 12 天死亡三只, 第 15 天死亡一只, 第 16

天剩余小鼠继续存活, 但生长状态远不如 HBe-EV71-VP4-N20 组小鼠, 存活率达 40%; 阴性对照 PBS 组小鼠注射后第 7 天死亡三只, 第 10 天死亡一只, 第 13 天死亡两只, 第 14 天死亡两只, 第 16 天剩余小鼠继续存活, 但生长状态也远不如 HBe-EV71-VP4-N20 组小鼠, 存活率达 40%。实验过程中小鼠出现死亡的过程并不是突发现象, 小鼠在死亡前均呈现出一定的病态特征, 例如: 生长过于缓慢、体表光滑无皮毛、行动迟缓、后肢瘫痪等。如图 4-8 (A) 所示, 左边为 HBe-EV71-VP4-N20 组小鼠, 右边为 HBe 组小鼠, 此照片记录于注射后第 11 天时, 可明显发现右边的小鼠体型小于左边小鼠且右边小鼠的后肢已明显瘫痪。如图 4-8 (B) 所示, 此为阴性对照 PBS 组死亡小鼠, 此照片记录于注射后第 7 天时, 可明显发现小鼠死亡前生长过于缓慢且体表光滑无皮毛。

4.4.4 肽库筛查 HBe-EV71-VP4-N20 蛋白的抗原决定簇位点

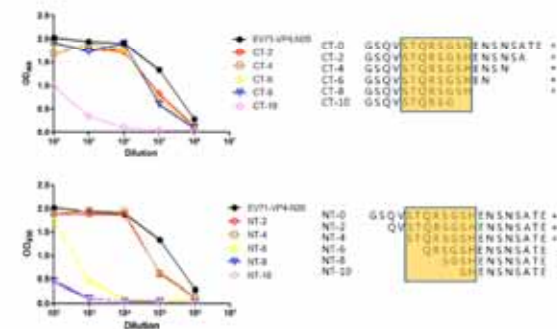


图 4-9 肽库筛查实验结果
Fig. 4-9 Results of screening by peptide library

本实验中肽库由 11 条多肽(均偶联 BSA 载体蛋白)组成, 其中 EV71-VP4-N20 蛋白长约 20 个氨基酸; 以 CT 开头命名的多肽代表多肽 C 端依次减少 2 个氨基酸, 例如 CT-2 表示 C 端减少两个氨基酸, 以此类推; 以 NT 开头命名的多肽代表多肽 N 端依次减少 2 个氨基酸, 例如 NT-2 表示 N 端减少两个氨基酸, 以此类推。筛查的过程与方法同 ELISA。实验结果如图 4-9 所示, 从上半部的两组图可以看出当 EV71-VP4-N20 蛋白 C 端减少到 10 个氨基酸时, 已不能和抗血清中的

相应抗体相结合;而从下半部的两组图同样可以看出当 EV71-VP4-N20 蛋白 N 端减少到 6 个氨基酸时,也已不能和抗血清中的相应抗体相结合。综合表明, EV71-VP4-N20 蛋白的抗体识别位点在 N 端起第 5-12 位氨基酸残基,其蛋白序列为“STQRSGSH”。此蛋白序列即为 Hbc-EV71-VP4-N20 蛋白的抗原决定簇位点。

4.5 讨论

本章中利用 ELISA、中和实验、小鼠体内攻毒试验以及肽库筛选抗原决定簇位点实验对 Hbc-EV71-VP4-N20 病毒样颗粒疫苗做了全面的免疫学评价。动物免疫实验中,根据所采用的佐剂不同将实验动物分成两个大组,弗氏佐剂组以及 QuickAntibody 佐剂组。采用弗氏佐剂的依据在于,其应用广泛,相关参考资料完善。而在实验过程中弗氏佐剂的应用也出现了一定问题,这也是弗氏佐剂的缺陷所在。弗氏佐剂采用皮下注射方式,疫苗注射后会在实验动物皮下产生鼓包且长时间无法吸收,这对后续采血的过程造成一定的影响。注射过弗氏佐剂的实验动物表皮会出现局部脱毛、溃烂等现象。QuickAntibody 佐剂是一种国产的新兴佐剂,由北京康碧泉生物科技有限公司生产,用于制备小鼠单克隆抗体和多克隆抗体,与常规使用的弗氏佐剂相比,具有无需乳化、免疫针次少、抗原用量低、抗体产生快、抗体滴度高、抗体亲和力高、不破坏抗原天然构象和使用方便等优点。相比于 QuickAntibody 佐剂,弗氏佐剂需要的抗原剂量较大,就本实验为例,QuickAntibody 佐剂所用抗原剂量在 5 μg 左右,而弗氏佐剂所用抗原剂量在 50 μg 左右,两者相差近十倍。QuickAntibody 佐剂虽抗原所用剂量是弗氏佐剂的十分之一,但从其免疫效果来看,无论是结合抗体效价还是中和抗体效价都略好于弗氏佐剂。

综合弗氏佐剂组与 QuickAntibody 佐剂组中和实验结果,发现 EV71-BPL 组血清样品中和抗体效价要高于 Hbc-EV71-VP4-N20 病毒样颗粒组。表明 BPL 灭活的全病毒疫苗效果要略好于表位疫苗 Hbc-EV71-VP4-N20 病毒样颗粒,其原因可能在于全病毒灭活疫苗拥有更多的抗原表位。而表位疫苗 Hbc-EV71-VP4-N20 病毒样颗粒在拥有单一抗原表位的情况下能达到这样的中和抗体效价,也基本令人满意,其原因可能在于 Hbc 病毒样颗粒增加了 EV71-VP4-N20 多肽的免疫原性。Hbc-EV71-VP4-N20 病毒样颗粒疫苗产生的中和抗体效价虽不及 BPL 灭活的全病毒疫苗,但其优势在于 Hbc-EV71-VP4-N20 病毒样颗粒拥有的抗原表位在 EV71 病毒各株之间是高度保守的,这也就是说 Hbc-EV71-VP4-N20 病毒样颗粒有望成为广谱的抗 EV71 病毒疫苗。

通过小鼠体内攻毒实验表明 Hbc-EV71-VP4-N20 病毒样颗粒产生的抗血清

不仅可以在体外中和病毒,而且在体内也可以中和病毒保护小鼠。

通过肽库筛选 Hbc-EV71-VP4-N20 蛋白的抗原决定簇位点,结果表明 EV71-VP4-N20 蛋白的抗体识别位点在 N 端起第 5-12 位氨基酸残基,其蛋白序列为“STQRSGSH”。这一序列经过大量比对后发现在 EV71 病毒各株之间是高度保守的。为研制广谱抗 EV71 病毒疫苗提供了新的思路。

4.6 本章小结

本章实验中对 Hbc-EV71-VP4-N20 病毒样颗粒的免疫原性进行了初步的检测。选用 BALB/c 小鼠作为 Hbc-EV71-VP4-N20 病毒样颗粒免疫学评价的动物模型,通过体外实验测定了 Hbc-EV71-VP4-N20 病毒样颗粒所产生的中和抗体效价。结果表明, Hbc-EV71-VP4-N20 病毒样颗粒具有良好的免疫原性,可以诱导实验动物产生较高的中和抗体,并且 Hbc-EV71-VP4-N20 病毒样颗粒的抗血清在小鼠体内可以针对病毒的攻击产生足够的保护效力。本章实验为研发基于 Hbc-EV71-VP4-N20 病毒样颗粒的手足口病预防性基因工程重组疫苗奠定了实验基础。

结 论

肠道病毒 71 型 (Enterovirus 71, EV71) 是引起婴幼儿手足口病的主要病原体之一,同时还能引起心肌炎、肺水肿、无菌性脑膜炎以及中枢神经系统病症在内的等多种疾病,重症患儿病情进展迅速,严重者可导致死亡。2008 年成为我国法定报告的丙类传染病。因此,研制高效广谱的 EV71 疫苗具有十分重要的意义。手足口病的流行病学调查学显示, EV71 病毒在流行过程中存在着大量的基因突变与基因重组,从而导致 EV71 病毒拥有大量的基因型。病毒的主要目的在于能够有效地逃避宿主免疫系统的监控,最终使病毒自身在人群中得到更广泛的传播。EV71 病毒根据 VP1 蛋白基因的不同变化分成 11 个基因型。历史上各个阶段的手足口病爆发过程中, EV71 病毒其不同基因型均有报导。B1 亚型流行于 1970 年至 1980 年之间。1997 年至 2000 年之间,共有四种亚型在马来西亚被报导,分别为 C1、C2、B3、B4。1998 年至 2009 年之间,共有三种亚型在台湾广泛流行,分别为 B2、C4、B5。而中国大陆地区在 2007 年至 2011 年手足口病爆发阶段,其主要流行株为 C4 亚型。因此,一个理想的手足口病疫苗其最佳评判标准应是否为能够针对不同的基因型产生交叉中和抗体。

目前,已有多种 EV71 病毒候选疫苗处于实验动物模型研究阶段中,其中包括重组疫苗、多肽疫苗、减毒活疫苗以及福尔马林灭活疫苗。这些候选疫苗中唯有灭活疫苗进入了临床试验阶段,其原因在于,灭活疫苗拥有更好的免疫原性以及更成熟的生产工艺。灭活 EV71 病毒疫苗在小鼠模型试验中被发现可以产生针对不同基因型的交叉中和抗体。然而, EV71 病毒在流行过程中不断地发生基因突变,现阶段的天活疫苗能否针对最新的变异产生有效保护还不得而知。在灭活疫苗和多肽疫苗的设计和研发过程中,研究人员发现了大量的线性中和表位存在于 EV71 病毒 VP1、VP2 蛋白上,这些表位的发现对于研发广谱疫苗起到了重要的作用。

现今针对基因变异性较高的病原生物,利用其保守免疫区域设计疫苗是一种新型可供选择的方法。对于 EV71 病毒 VP4 蛋白的基因来说,其保守性较 VP1、VP2、VP3 蛋白更高。也正因此,我们试图在 VP4 蛋白中寻找中和表位。通过序列对比我们发现 VP4 蛋白 N 端前 20 个氨基酸序列在 EV71 病毒各株中具有较好的保守性。本研究中,首先将 EV71 病毒 C4 亚型 VP4 蛋白 N 端前 20 个氨基酸多肽 (VP4N20) 融合入乙型肝炎病毒核心抗原 (HbcAg) 蛋白中。HbcAg 作为一个良好的载体可以将外源蛋白展示于其表面,用以增加外源蛋白的免疫原性。实验过程中,融合入外源蛋白的 HbcAg 颗粒在细菌表达系统中能够高效的自组

装形成病毒样颗粒,且其自组装效率不低于未融合外源蛋白的 HbcAg 颗粒。融合入 VP4N20 的 HbcAg 颗粒通过小鼠免疫产生了针对 VP4N20 的抗体。通过体外中和实验发现,这一抗体针对 EV71 病毒 C4 亚型具有良好的中和活性。小鼠体内攻毒实验显示,这一抗体能够有效保护小鼠免受 EV71 病毒 A 亚型的攻击。综上实验共同表明,针对 VP4N20 的抗体对于 EV71 病毒不同亚型都具有良好的中和活性。

对于预防小 RNA 病毒科各家族成员的感染时,中和抗体无疑具有重要的作用。例如在脊髓灰质炎病毒中,针对其 VP4 蛋白以及 VP1 蛋白 N 端的抗体可以有效地中和脊髓灰质炎病毒。同样的结论在鼻病毒中也有所报道,针对鼻病毒 VP4 蛋白 N 端的抗体能够在体外中和病毒的感染。事实上,尽管 VP4 蛋白处于小 RNA 病毒核壳内部与 RNA 基因组相连接,但其在小 RNA 病毒进入宿主细胞过程中却扮演着至关重要的角色;这同时也表明小 RNA 病毒其核壳的立体结构处于一种动态变化的过程中而非像晶体结构图所反映的处于静止状态。研究显示,当小 RNA 病毒与宿主细胞相关受体相接触时即可触发其自身的立体构象变化,这一过程同时导致小 RNA 病毒 VP4 蛋白以及 VP1 蛋白 N 端向病毒外表面暴露。小 RNA 病毒 VP4 蛋白向外翻转的过程导致其病毒表面的通道发生相应的结构改变,这样的改变同时保证了小 RNA 病毒基因组安全进入宿主细胞内部。VP4 蛋白向病毒核壳外表面暴露的同时也潜在地保证了抗 VP4 抗体可以有效地与其相结合,这一结合最终导致小 RNA 病毒被中和。本文的实验结果中,针对 EV71 病毒 VP4 蛋白 N 端的抗体可以有效地中和 EV71 病毒与上述报道相一致。本文的研究中进一步确定了针对 EV71 病毒 VP4 蛋白 N 端的抗体其抗原识别核心区域。这一核心区域在 EV71 病毒各株以及柯萨奇 A16 病毒中具有高度的保守性。而针对 EV71 病毒 VP4 蛋白 N 端的抗体是否能有效地中和柯萨奇 A16 病毒还有待在接下来的实验中进一步证实。

本课题的创新点在于:(1)目前国内针对 EV71 病毒 VP4 蛋白的免疫原性尚无确切实验证据,本课题通过免疫学相关实验证明 EV71 病毒 VP4 蛋白可以在实验动物体内诱导产生中和抗体,并且产生的中和抗体对不同基因型的 EV71 病毒感染具有交叉保护活性。(2)利用肽库筛选进一步确定了 EV71 病毒 VP4 蛋白中和抗原决定簇所在位点。

参考文献

- [1] BRUU A L. Enteroviruses: Polioviruses, Coxsackieviruses, Echoviruses and Newer Enteroviruses [M]. A Practical Guide to Clinical Virology. John Wiley & Sons, Ltd. 2003: 44-45.
- [2] GILBERT G L, DICKSON K E, WATERS M J, et al. Outbreak of enterovirus 71 infection in Victoria, Australia, with a high incidence of neurologic involvement [J]. The Pediatric Infectious Disease Journal, 1988, 7(7): 484-488.
- [3] CARDOSA M J, KRISHNAN S, TIO P H, et al. Isolation of subgenus B adenovirus during a fatal outbreak of enterovirus 71-associated hand, foot, and mouth disease in Sibiu, Sarawak [J]. The Lancet, 1999, 354(9183): 987-991.
- [4] MCMINN P C. An overview of the evolution of enterovirus 71 and its clinical and public health significance [J]. FEMS Microbiology Reviews, 2002, 26(1): 91-107.
- [5] HO M, CHEN E R, HSU K H, et al. An epidemic of enterovirus 71 infection in Taiwan [J]. New England Journal of Medicine, 1999, 341(13): 929-935.
- [6] CHAN K P, GOH K T, CHONG C Y, et al. Epidemic hand, foot and mouth disease caused by human enterovirus 71, Singapore [J]. Emerging Infectious Diseases, 2003, 9(1): 78-85.
- [7] HAN J, MA X J, WAN J F, et al. Long persistence of EV71 specific nucleotides in respiratory and feces samples of the patients with Hand-Foot-Mouth Disease after recovery [J]. BMC Infectious Diseases, 2010, 10(1): 178.
- [8] 杜加亮, 高加梅, 国泰. 我国人类手足口病流行病学概述 [C]. 2013 年中国药学会暨第十三届中国药师周, 中国广西南宁, 2013: 6.
- [9] P YRY T, HYYPI T, HORSNELL C, et al. Molecular analysis of coxsackievirus A16 reveals a new genetic group 71 型感染研究进展 [J]. 中国热带医学, 2009, 2(2): 370-372.
- [10] 陈伟, 王明丽. 肠道病毒 71 型感染研究进展 [J]. 中国热带医学, 2009, 2(2): 370-372.
- [11] 杨朝辉, 尹少甫, 张宗久, 等. 柯萨奇病毒 A 组 16 型 [J]. 中国疫苗和免疫, 2009, 1(1): 72-77.
- [12] SHIH S R, HO M S, LIN K H, et al. Genetic analysis of enterovirus 71 isolated from fatal and non-fatal cases of hand, foot and mouth disease during an epidemic in Taiwan, 1998 [J]. Virus Research, 2000, 68(2): 127-136.
- [13] BROWN B A, PALLANSCH M A. Complete nucleotide sequence of enterovirus 71 is distinct from poliovirus [J]. Virus Research, 1995, 39(2-3): 195-205.
- [14] BROWN B A, OBERSTE M S, ALEXANDER J P, et al. Molecular epidemiology and evolution of enterovirus 71 strains isolated from 1970 to 1998 [J]. Journal of Virology, 1999, 73(12): 9969-9975.
- [15] MCMINN P, LINDSAY K, PERERA D, et al. Phylogenetic Analysis of enterovirus 71 strains isolated during linked epidemics in Malaysia, Singapore, and Western Australia [J].

- Journal of Virology, 2001, 75(16): 7732-7738.
- [16] CARDOSA M J, PERERA D, BROWN B A, et al. Molecular epidemiology of human enterovirus 71 strains and recent outbreaks in the Asia-Pacific region: comparative analysis of the VP1 and VP4 genes [J]. Emerging Infectious Diseases, 2003, 9(4): 461-468.
- [17] SICKLES G M, MUTTERER M, FEORINO P, et al. Recently classified types of coxsackie virus, group A, behavior in tissue culture [J]. Experimental Biology and Medicine, 1955, 90(2): 529-531.
- [18] 梁争论. 肠道病毒 71 型疫苗候选株和疫苗标准的研究 [J]. 中国病毒病杂志, 2011, 1(1): 24-27.
- [19] CHUMAKOV M, VOROSHILOVA M, SHINDAROV L, et al. Enterovirus 71 isolated from cases of epidemic poliomyelitis-like disease in Bulgaria [J]. Archives of Virology, 1979, 60(3-4): 329-340.
- [20] WU C N, LIN Y C, FANN C, et al. Protection against lethal enterovirus 71 infection in newborn mice by passive immunization with subunit VP1 vaccines and inactivated virus [J]. Vaccine, 2001, 20(5-6): 895-904.
- [21] LIN Y C, WU C N, SHIH S R, et al. Characterization of a vero cell-adapted virulent strain of enterovirus 71 suitable for use as a vaccine candidate [J]. Vaccine, 2002, 20(19-20): 2485-2493.
- [22] WU S C, LIU C C, LIAN W C. Optimization of microcarrier cell culture process for the inactivated enterovirus type 71 vaccine development [J]. Vaccine, 2004, 22(29-30): 3858-3864.
- [23] LIU C C, LIAN W C, BUTLER M, et al. High immunogenicity of enterovirus 71 strain and its production using serum-free microcarrier Vero cell culture [J]. Vaccine, 2007, 25(1): 19-24.
- [24] MIZUTA K, AOKI Y, SUTO A, et al. Cross-antigenicity among EV71 strains from different genogroups isolated in Yamagata, Japan, between 1990 and 2007 [J]. Vaccine, 2009, 27(24): 3153-3158.
- [25] AKIO H, TETSUO Y, ISAO H. Isolation of a temperature-sensitive strain of enterovirus 71 with reduced neurovirulence for monkeys [J]. Journal of General Virology, 1983, 64(2): 499-502.
- [26] ARITA M, NAGATA N, IWATA N, et al. An attenuated strain of enterovirus 71 belonging to genotype A showed a broad spectrum of antigenicity with attenuated neurovirulence in cynomolgus monkeys [J]. Journal of Virology, 2007, 81(17): 9386-9395.
- [27] YOUNG K R, MCBURNEY S P, KARKHANIS L U, et al. Virus-like particles: Designing an effective AIDS vaccine [J]. Methods, 2006, 40(1): 98-117.
- [28] QUAN F-S, HUANG C, COMPANS R W, et al. Virus-like particle vaccine induces protective immunity against homologous and heterologous strains of influenza virus [J]. Journal of Virology, 2007, 81(7): 3514-3524.
- [29] CHUNG Y C, HO M S, WU J C, et al. Immunization with virus-like particles of enterovirus

- 71 elicits potent immune responses and protects mice against lethal challenge [J]. Vaccine, 2008, 26(15): 1855-1862.
- [30] LEE M S, CHANG L Y. Development of enterovirus 71 vaccines [J]. Expert Review of Vaccines, 2010, 9(2): 149-156.
- [31] FOO D G W, ALONSO S, PHOON M C, et al. Identification of neutralizing linear epitopes from the VP1 capsid protein of enterovirus 71 using synthetic peptides [J]. Virus Research, 2007, 125(1): 61-68.
- [32] FOO D G W, ALONSO S, CHOW V T K, et al. Passive protection against lethal enterovirus 71 infection in newborn mice by neutralizing antibodies elicited by a synthetic peptide [J]. Microbes and Infection, 2007, 9(11): 1299-1306.
- [33] HARO I, GOMARA M J. Design of synthetic peptidic constructs for the vaccine development against viral infections [J]. Current Protein and Peptide Science, 2004, 5(6): 425-433.
- [34] ROSENTHAL K S, ZIMMERMAN D H. Vaccines: all things considered [J]. Clinical and Vaccine Immunology, 2006, 13(8): 821-829.
- [35] TAN C S, CARDOSA M J. High-titred neutralizing antibodies to human enterovirus 71 preferentially bind to the N-terminal portion of the capsid protein VP1 [J]. Archives of Virology, 2007, 152(6): 1069-1073.
- [36] TUNG W, BAKAR S, SEKAWI Z, et al. DNA vaccine constructs against enterovirus 71 elicit immune response in mice [J]. Genet Vaccines Ther, 2007, 5(1): 1-13.
- [37] CHEN H F, CHANG M H, CHIANG B L, et al. Oral immunization of mice using transgenic tomato fruit expressing VP1 protein from enterovirus 71 [J]. Vaccine, 2006, 24(15): 2944-2951.
- [38] CHEN H L, HUANG J Y, CHU T W, et al. Expression of VP1 protein in the milk of transgenic mice: a potential oral vaccine protects against enterovirus 71 infection [J]. Vaccine, 2008, 26(23): 2882-2889.
- [39] HUANG G, WAN Z, LI R. The investigation on the safety and immunogenicity of inactivated hepatitis A vaccine AVAXIM [J]. Chinese Journal of Epidemiology, 2000, 21(4): 287-288.
- [40] INNIS B L, ECKELS K H. Progress in development of a live-attenuated, tetra-valent dengue virus vaccine by the United States Army Medical Research and Materiel Command [J]. American Society of Tropical Medicine and Hygiene, 2003, 69(6): 1-4.
- [41] ARITA M, SHIMIZU H, NAGATA N, et al. Temperature-sensitive mutants of enterovirus 71 show attenuation in cynomolgus monkeys [J]. Journal of General Virology, 2005, 86(5): 1391-1401.
- [42] ZHOU B P, LIU W L, XIE J J, et al. Expression of recombinant VP1 protein of enterovirus 71 and development of serological assay for detection of EV71 infection [J]. Chinese Journal of Experimental and Clinical Virology, 2008, 22(6): 492-494.
- [43] HENKE A, ZELL R, STELZNER A. DNA vaccine-mediated immune responses in

- coxsackie virus B3-infected mice [J]. Antiviral Research, 2001, 49(1): 49-54.
- [44] 李晓楠, 罗德炎, 赵忠鹏, 等. 手足口病 CA16 型 VP1 亚单位疫苗的构建制备及免疫原性初步分析 [J]. 中华微生物学和免疫学杂志, 2010, 30(3): 250-255.
- [45] CHEN S, PENG X, LIU J. Effect of sophora flavescens ait on cultured beating myocardial cells of coxsackie B3 virus infected newborn rat [J]. Chinese Journal of Experimental and Clinical Virology, 2000, 14(2): 137-140.
- [46] CHIU C H, CHU C, HE C C, et al. Protection of neonatal mice from lethal enterovirus 71 infection by maternal immunization with attenuated Salmonella enterica serovar typhimurium expressing VP1 of enterovirus 71 [J]. Microbes and Infection, 2006, 8(7): 1671-1678.
- [47] KIM J Y, JEON E S, LIM B K, et al. Immunogenicity of a DNA vaccine for coxsackievirus B3 in mice: protective effects of capsid proteins against viral challenge [J]. Vaccine, 2005, 23(14): 1672-1679.
- [48] V DR S D, FENYÓ É M. Primate models for human immunodeficiency virus infection [J]. Acta Microbiologica et Immunologica Hungarica, 2004, 51(1): 1-29.
- [49] YU C K, CHEN C C, CHEN C L, et al. Neutralizing antibody provided protection against enterovirus type 71 lethal challenge in neonatal mice [J]. Journal of Biomedical Science, 2000, 7(6): 523-528.
- [50] CHEN Y C, YU C K, WANG Y F, et al. A murine oral enterovirus 71 infection model with central nervous system involvement [J]. Journal of General Virology, 2004, 85(1): 69-77.
- [51] WANG Y F, CHOU C T, LEI H Y, et al. A mouse-adapted enterovirus 71 strain causes neurological disease in mice after oral infection [J]. Journal of Virology, 2004, 78(15): 7916-7924.
- [52] LIU M L, LEE Y P, WANG Y F, et al. Type I interferons protect mice against enterovirus 71 infection [J]. Journal of General Virology, 2005, 86(12): 3263-3269.
- [53] ONG K C, BADMANATHAN M, DEVI S, et al. Pathologic characterization of a murine model of human enterovirus 71 encephalomyelitis [J]. Journal of Neuro pathology & Experimental Neurology, 2008, 67(6): 532-542.
- [54] 宋建英, 王卫, 马春梅, 等. EV71 小鼠适应株制备及体内外感染特点 [J]. 中国实验动物学报, 2010, 18(05): 383-389.
- [55] DONAHOE R, BYRD L, MCCLURE H, et al. Consequences of opiate-dependency in a monkey model of AIDS [M]. Drugs of Abuse, Immunity, and AIDS. Springer US, 1993: 21-28.
- [56] MONATH T P, BARRETT A D. Pathogenesis and pathophysiology of yellow fever [J]. Advances in Virus Research, 2003, 60(1): 343-395.
- [57] OKADA M. The development of novel vaccines against tuberculosis [J]. Japanese Journal of Clinical Immunology, 2008, 31(5): 356-368.
- [58] ROSSMANN M G, ARNOLD E, ERICKSON J W, et al. Structure of a human common

- cold virus and functional relationship to other picornaviruses [J]. *Nature*, 1985, 317(6033): 145-153.
- [59] LEWIS J K, BOTHNER B, SMITH T J, et al. Antiviral agent blocks breathing of the common cold virus [J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 1998, 95(12): 6774-6778.
- [60] SMITH T J, OLSON N H, CHENG R H, et al. Structure of a human rhinovirus-bivalently bound antibody complex: implications for viral neutralization and antibody flexibility [J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 1993, 90(15): 7015-7018.
- [61] CHE Z, OLSON N H, LEIPPE D, et al. Antibody-mediated neutralization of human rhinovirus 14 explored by means of cryoelectron microscopy and X-ray crystallography of virus-Fab complexes [J]. *Journal of Virology*, 1998, 72(6): 4610-4622.
- [62] SMITH T J, CHASE E S, SCHMIDT T J, et al. Neutralizing antibody to human rhinovirus 14 penetrates the receptor-binding canyon [J]. *Nature*, 1996, 383(6598): 350-354.
- [63] SMITH T J. Antibody interactions with rhinovirus: lessons for mechanisms of neutralization and the role of immunity in viral evolution [J]. *Current Topics in Microbiology and Immunology*, 2001, 260(1): 1-28.
- [64] BURTON D R, WILLIAMSON R A, PARREN P W H I. Antibody and virus: binding and neutralization [J]. *Virology*, 2000, 270(1): 1-3.
- [65] PORTA C, SPALL V E, LOVELAND J, et al. Development of cowpea mosaic virus as a high-yielding system for the presentation of foreign peptides [J]. *Virology*, 1994, 202(2): 949-955.
- [66] TAYLOR K M, LIN T, PORTA C, et al. Influence of three-dimensional structure on the immunogenicity of a peptide expressed on the surface of a plant virus [J]. *Journal of Molecular Recognition* 2000, 13(2): 71-82.
- [67] TORMO J, BLAAS D, PARRY N R, et al. Crystal structure of a human rhinovirus neutralizing antibody complexed with a peptide derived from viral capsid protein VP2 [J]. *The EMBO Journal*, 1994, 13(10): 2247-2256.
- [68] ROIVAINEN M, PIIRAINEN L, RYS T, et al. An immunodominant N-terminal region of VP1 protein of poliovirus that is buried in crystal structure can be exposed in solution [J]. *Virology*, 1993, 195(2): 762-765.
- [69] LI Q, YAFAL A G, LEE Y M, et al. Poliovirus neutralization by antibodies to internal epitopes of VP4 and VP1 results from reversible exposure of these sequences at physiological temperature [J]. *Journal of Virology*, 1994, 68(6): 3965-3970.
- [70] HOGLE J M, CHOW M, FILMAN D J. Three-dimensional structure of poliovirus at 2.9 Å resolution [J]. *Science* 1985, 229(4720): 1358-1365.
- [71] DAN THI P, TOSTESON M, LI Q H, et al. Genome delivery and ion channel properties are altered in VP4 mutants of poliovirus [J]. *Journal of Virology*, 2003, 77(9): 5266-5274.
- [72] JIM NEZ CLAVERO M A, DOUGLAS A, LAVERY T, et al. Immune recognition of swine

- vesicular disease virus structural proteins: novel antigenic regions that are not exposed in the capsid [J]. *Virology*, 2000, 270(1): 76-83.
- [73] PULLI T, LANKINEN H, ROIVAINEN M, et al. Antigenic sites of coxsackievirus A9 [J]. *Virology*, 1998, 240(2): 202-212.
- [74] SAUTER P, CHEHADEH W, LOBERT P E, et al. A part of the VP4 capsid protein exhibited by coxsackievirus B4 E2 is the target of antibodies contained in plasma from patients with type 1 diabetes [J]. *Journal of Medical Virology*, 2008, 80(5): 866-878.
- [75] KATPALLY U, FU T M, FREED D C, et al. Antibodies to the buried N terminus of rhinovirus VP4 exhibit cross-serotypic neutralization [J]. *Journal of Virology*, 2009, 83(14): 7040-7048.
- [76] PUMPENS P, GRENS E. HBV core particles as a carrier for B cell/T cell epitopes [J]. *Intervirology*, 2001, 44(2-3): 98-114.
- [77] PUMPENS P, GRENS E. Hepatitis B core particles as a universal display model: a structure-function basis for development [J]. *FEBS Letters*, 1999, 442(1): 1-6.
- [78] RIEDL P, STOBER D, OEHNINGER C, et al. Priming Th1 immunity to viral core particles is facilitated by trace amounts of RNA bound to its arginine-rich domain [J]. *Journal of Immunology* 2002, 168(10): 4951-4959.
- [79] BROOS K, JANSSENS M E, DE GOEYSE I, et al. Comparison of serum humoral responses induced by oral immunization with the hepatitis B virus core antigen and the cholera toxin B subunit [J]. *Clinical and Vaccine Immunology* 2008, 15(5): 852-858.
- [80] LEE K W, TAN W S. Recombinant hepatitis B virus core particles: association, dissociation and encapsidation of green fluorescent protein [J]. *Journal of Virological Methods*, 2008, 151(2): 172-180.
- [81] WYNNE S A, CROWTHER R A, LESLIE A G. The crystal structure of the human hepatitis B virus capsid [J]. *Molecular Cell*, 1999, 3(6): 771-780.
- [82] CROWTHER R A, KISELEV N A, B TITCHER B, et al. Three-dimensional structure of hepatitis B virus core particles determined by electron cryomicroscopy [J]. *Cell*, 1994, 77(6): 943-950.
- [83] ROSEMAN A M, BERRIMAN J A, WYNNE S A, et al. A structural model for maturation of the hepatitis B virus core [J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2005, 102(44): 15821-15826.
- [84] ZLOTNICK A, CHENG N, CONWAY J F, et al. Dimorphism of hepatitis B virus capsids is strongly influenced by the C-terminus of the capsid protein [J]. *Biochemistry*, 1996, 35(23): 7412-7421.
- [85] JEGERLEHNER A, TISSOT A, LECHNER F, et al. A molecular assembly system that renders antigens of choice highly repetitive for induction of protective B cell responses [J]. *Vaccine*, 2002, 20(25-26): 3104-3112.
- [86] BORISOVA G P, KALIS I, PUSHKO P M, et al. Genetically engineered mutants of the core

- antigen of the human hepatitis B virus preserving the ability for native self-assembly [J]. *Doklady Akademii Nauk SSSR*, 1988, 298(6): 1474-1478.
- [87] GALLINA A, BONELLI F, ZENTILIN L, et al. A recombinant hepatitis B core antigen polypeptide with the protamine-like domain deleted self-assembles into capsid particles but fails to bind nucleic acids [J]. *Journal of Virology*, 1989, 63(11): 4645-4652.
- [88] BIRNBAUM F, NASSAL M. Hepatitis B virus nucleocapsid assembly: primary structure requirements in the core protein [J]. *Journal of Virology*, 1990, 64(7): 3319-3330.
- [89] BILLAUD J N, PETERSON D, BARR M, et al. Combinatorial approach to hepadnavirus-like particle vaccine design [J]. *Journal of Virology*, 2005, 79(21): 13656-13666.
- [90] DE FILETTE M, MIN JOU W, BIRKETT A, et al. Universal influenza A vaccine: optimization of M2-based constructs [J]. *Virology*, 2005, 337(1): 149-161.
- [91] DE FILETTE M, FIER S, MARTENS W, et al. Improved design and intranasal delivery of an M2e-based human influenza A vaccine [J]. *Vaccine*, 2006, 24(44-46): 6597-6601.
- [92] 韩俊峰, 吴玉章. HBcAg 病毒样颗粒与疫苗设计 [J]. *免疫学杂志*, 2005, 21(3): 23-25.
- [93] KRATZ P A, B TITCHER B, NASSAL M. Native display of complete foreign protein domains on the surface of hepatitis B virus capsids [J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 1999, 96(5): 1915-1920.
- [94] NASSAL M, SKAMEL C, VOGEL M, et al. Development of hepatitis B virus capsids into a whole-chain protein antigen display platform: new particulate Lyme disease vaccines [J]. *International Journal of Medical Microbiology*, 2008, 298(1-2): 135-142.
- [95] ZHANG Y L, GUO Y J, WANG K Y, et al. Enhanced immunogenicity of modified hepatitis B virus core particle fused with multiepitopes of foot-and-mouth disease virus [J]. *Scandinavian Journal of Immunology*, 2007, 65(4): 320-328.
- [96] KARPENKO L I, IVANISENKO V A, PIKA I A, et al. Insertion of foreign epitopes in HBcAg: how to make the chimeric particle assemble [J]. *Amino Acids*, 2000, 18(4): 329-337.
- [97] S RENSEN H P, MORTENSEN K K. Advanced genetic strategies for recombinant protein expression in *Escherichia coli* [J]. *Journal of Biotechnology*, 2005, 115(2): 113-128.
- [98] KIM D J, JANG H J, PYUN Y R, et al. Cloning, expression, and characterization of the most stable DNA polymerase from thermoaerobacter yonseiensis [J]. *Journal of Biochemistry and Molecular Biology*, 2002, 35(3): 320-329.
- [99] KLEIN S, GEIGER T, LINCHEVSKI I, et al. Expression and purification of active PKB kinase from *Escherichia coli* [J]. *Protein Expression and Purification*, 2005, 41(1): 162-169.
- [100] MAGLIERY T J, WILSON C G, PAN W, et al. Detecting protein-protein interactions with a green fluorescent protein fragment reassembly trap: scope and mechanism [J]. *Journal of the American Chemical Society*, 2005, 127(1): 146-157.
- [101] 李振国, 徐明波, 牛罡, 等. 在大肠杆菌周质表达重组蛋白的研究进展 [J]. *药物生物*

- 技术, 2011, 18(1): 73-76.
- [102] NUC P, NUC K. Recombinant protein production in *Escherichia coli* [J]. *Postepy Biochemii*, 2006, 52(4): 448-456.
- [103] CHAUDHURI T K, HORII K, YODA T, et al. Effect of the extra n-terminal methionine residue on the stability and folding of recombinant alpha-lactalbumin expressed in *Escherichia coli* [J]. *Journal of Molecular Biology*, 1999, 285(3): 1179-1194.
- [104] DALY R, HEARN M T. Expression of heterologous proteins in *Pichia pastoris*: a useful experimental tool in protein engineering and production [J]. *Journal of Molecular Recognition* 2005, 18(2): 119-138.
- [105] 吴静, 雷健勇, 张莲芬, 等. 改善稀有密码子和氨基酸残基限制提高重组人 ADAM15 去整合素结构域蛋白表达水平 [J]. *微生物学报*, 2008, 48(8): 1067-1074.
- [106] LEVIATAN S, SAWADA K, MORIYAMA Y, et al. Combinatorial method for overexpression of membrane proteins in *Escherichia coli* [J]. *The Journal of Biological Chemistry*, 2010, 285(31): 23548-23556.
- [107] HU J, QIN H, GAO F P, et al. A systematic assessment of mature MBP in membrane protein production: overexpression, membrane targeting and purification [J]. *Protein Expression and Purification*, 2011, 80(1): 34-40.

附录

(1) HBc-EV71-VP4-N20 基因测序结果

Options	70	80	90	100	110	120	130	140
Output	ATGAGCAGCAGGCGGTTTTCGGGCAAGGTCCTAAATCGGGCATTCGGGGGATGATGGG							
设计引物 HBc-EV71 测序结果								
Options	40	150	160	170	180	190	200	210
Output	GCGGCTTGGAAATCCACAGCCAAAGCTACCGGATATTCGGACAGCTTTCGGGGCAAGGTCAGAG							
设计引物 HBc-EV71 测序结果								
Options	10	220	230	240	250	260	270	280
Output	GATAATATGAAAGCGGCGAGCTGGCGAATTTTCGGGCGATATTCAGATTCGGATGCTGACGCG							
设计引物 HBc-EV71 测序结果								
Options	80	290	300	310	320	330	340	350
Output	TTTGGGCTTCCGGAATCTTCGGGATTCGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTG							
设计引物 HBc-EV71 测序结果								
Options	50	360	370	380	390	400	410	420
Output	GAAATCCGCTCCGCGAGCGGGTATGATTCGGGCTGCAATTTTCGGGCGTTCGACGCTTCGGGATG							
设计引物 HBc-EV71 测序结果								
Options	20	430	440	450	460	470	480	490
Output	GCGGCTTCCGGAATCTTCGGGATTCGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTG							
设计引物 HBc-EV71 测序结果								
Options	30	500	510	520	530	540	550	560
Output	TTTGGGCTTCCGGAATCTTCGGGATTCGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTG							
设计引物 HBc-EV71 测序结果								
Options	60	570	580	590	600	610	620	630
Output	GAAATCCGCTCCGCGAGCGGGTATGATTCGGGCTGCAATTTTCGGGCGTTCGACGCTTCGGGATG							
设计引物 HBc-EV71 测序结果								

(2) HBc-EV71-VP4-N20 测序后翻译成蛋白序列结果

Options	20	30	40	50	60	70	80
Output	LERNIGFPGCAQRRISRAITRRGAGTRAFACITFCITFAAGCAAMRFFCGIARFC						
HBc-EV71 设计引物							
HBc-EV71 测序结果	LERNIGFPGCAQRRISRAITRRGAGTRAFACITFCITFAAGCAAMRFFCGIARFC						
Options	80	90	100	110	120	130	140
Output	CARTFRTAMCFAARRFQDATTFAAAALGRRALFC						
HBc-EV71 设计引物							
HBc-EV71 测序结果	CARTFRTAMCFAARRFQDATTFAAAALGRRALFC						
Options	40	150	160	170	180	190	200
Output	GIRHMAHRYATGFAALGRARFCLLARARFRIRAGACCTGRRARYTFAINIR						
HBc-EV71 设计引物							
HBc-EV71 测序结果	GIRHMAHRYATGFAALGRARFCLLARARFRIRAGACCTGRRARYTFAINIR						

(3) HBc 基因测序结果

Options	70	80	90	100	110	120	130	140
Output	ATGAGCAGCAGGCGGTTTTCGGGCAAGGTCCTAAATCGGGCATTCGGGGGATGATGGG							
设计引物 HBc 测序结果								
Options	40	150	160	170	180	190	200	210
Output	GCGGCTTGGAAATCCACAGCCAAAGCTACCGGATATTCGGACAGCTTTCGGGGCAAGGTCAGAG							
设计引物 HBc 测序结果								
Options	10	220	230	240	250	260	270	280
Output	GATAATATGAAAGCGGCGAGCTGGCGAATTTTCGGGCGATATTCAGATTCGGATGCTGACGCG							
设计引物 HBc 测序结果								
Options	80	290	300	310	320	330	340	350
Output	TTTGGGCTTCCGGAATCTTCGGGATTCGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTG							
设计引物 HBc 测序结果								
Options	50	360	370	380	390	400	410	420
Output	GAAATCCGCTCCGCGAGCGGGTATGATTCGGGCTGCAATTTTCGGGCGTTCGACGCTTCGGGATG							
设计引物 HBc 测序结果								
Options	20	430	440	450	460	470	480	490
Output	GCGGCTTCCGGAATCTTCGGGATTCGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTG							
设计引物 HBc 测序结果								
Options	30	500	510	520	530	540	550	560
Output	TTTGGGCTTCCGGAATCTTCGGGATTCGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTG							
设计引物 HBc 测序结果								

(4) HBc 测序后翻译成蛋白序列结果

Options	20	30	40	50	60	70	80
Output	LERNIGFPGCAQRRISRAITRRGAGTRAFACITFCITFAAGCAAMRFFCGIARFC						
HBc 设计引物							
HBc 测序结果	LERNIGFPGCAQRRISRAITRRGAGTRAFACITFCITFAAGCAAMRFFCGIARFC						
Options	80	90	100	110	120	130	140
Output	GIRHMAHRYATGFAALGRARFCLLARARFRIRAGACCTGRRARYTFAINIR						
HBc 设计引物							
HBc 测序结果	GIRHMAHRYATGFAALGRARFCLLARARFRIRAGACCTGRRARYTFAINIR						
Options	40	150	160	170	180	190	200
Output	GIRHMAHRYATGFAALGRARFCLLARARFRIRAGACCTGRRARYTFAINIR						
HBc 设计引物							
HBc 测序结果	GIRHMAHRYATGFAALGRARFCLLARARFRIRAGACCTGRRARYTFAINIR						

(5) EV71 病毒特异性引物测序结果。

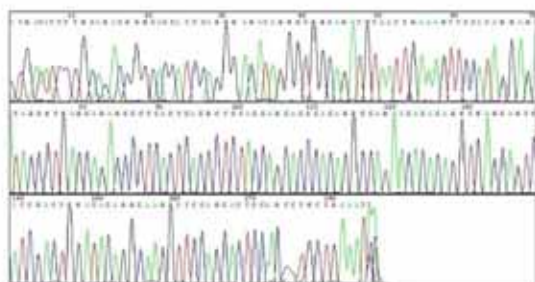
EV71-N1aav1序列_seq EV71pcr产物序列_seq Consensus		80
EV71-N1aav1序列_seq EV71pcr产物序列_seq Consensus		120
EV71-N1aav1序列_seq EV71pcr产物序列_seq Consensus		160
EV71-N1aav1序列_seq EV71pcr产物序列_seq Consensus		200
EV71-N1aav1序列_seq EV71pcr产物序列_seq Consensus		240

(6) EV71 病毒特异性引物测序后氨基酸序列比对结果

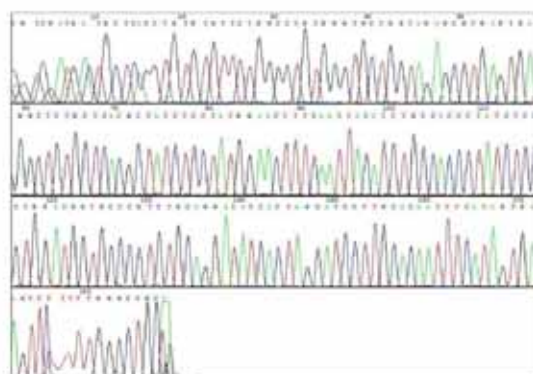
EV71-N1aav1氨基酸_seq EV71pcr产物氨基酸_seq Consensus		80
EV71-N1aav1氨基酸_seq EV71pcr产物氨基酸_seq Consensus		70

(7) EV71 病毒特异性引物测序图谱

EV71 病毒特异性引物上游测序结果图谱



EV71 病毒特异性引物下游测序结果图谱



攻读博士学位期间所发表的学术论文

1. Miao Zhao, Yu Bai, Wei Liu, et al. Immunization of N terminus of Enterovirus 71 VP4 Elicits Cross-protective Antibody Responses. *BMC Microbiology*. 2013, 13: 287. IF: 3.1.
2. 赵淼, 孙新, 盛望, 曾毅. 小 RNA 病毒科病毒 VP4 蛋白的研究进展. 中华实验和临床病毒学杂志. 2013 年 10 月第 27 卷第 5 期.
3. 国家发明专利: 盛望, 赵淼, 王晓雯. 一种基于 HBc 的 EV71 VP4 的手足口病疫苗及其制备方法与应用. (初审通过, 公开号: 103387615A)
4. 国家发明专利: 盛望, 王晓雯, 赵淼. 重组脊髓灰质炎病毒 I 型病毒样颗粒的制备方法. (初审通过, 公开号: 102876688A)
5. 国家发明专利: 盛望, 张潇, 赵淼. 柯萨奇病毒 B3 型病毒样颗粒的制备方法及其应用. (初审通过, 公开号: 102899336A)
6. 国家发明专利: 盛望, 王晓雯, 陈立, 赵淼. 一种重组脊髓灰质炎病毒 I 型病毒样颗粒的制备方法. (授权, 公开号: 102876707A)
7. 国家发明专利: 盛望, 张潇, 王晓雯, 赵淼. 重组柯萨奇病毒 B3 型病毒样颗粒的制备方法及其应用. (初审通过, 公开号: 102827846A)

致 谢

本人博士阶段的科研工作是在导师曾毅院士及盛望教授指导下完成的，曾先生知识渊博，科学态度严谨以及对科学前沿的敏锐洞察使我受益匪浅。盛老师严谨认真、对科研的执着追求以及努力不懈的工作精神使我在未来的学习生活道路上受益终生。本人的博士论文是在两位导师的支持与指导下完成的，深表感谢！

本人博士阶段的科研工作是在曾毅院士和李泽琳教授所创建的北京工业大学生命科学与生物工程学院病毒与药理室研究室完成的，两位教授治学态度严谨，生活态度平易近人，在此对他们表示感谢。

本论文的小鼠攻毒实验部分由中国医学科学院医药生物技术所岑山老师课题组协助完成，深表感谢。

本人的论文工作得以顺利完成，与实验室全体成员的帮助密不可分，实验过程中得到了肖向茜、刘伟等老师的指导及帮助，在此表示感谢。感谢本课题组成员陈学斌、徐银胜、王晓雯、曹敏军、张满、白玉等同学在生活及学习中给予的关心及帮助，感谢北京工业大学生命科学与生物工程学院全体老师和同学们的热情帮助及支持。

特别感谢我的父母，在近二十多年的求学道路中一直默默无私地支持我，谨向他们致以最崇高的敬意。感谢杨柳同学在我的学习和生活中给予我的巨大帮助、理解和支持。

最后向所有帮助过我、支持过我以上没有提及过的同学、师长及朋友由衷的说一声：“谢谢你们了”。