

# 肠道病毒 71 型真核双基因表达载体的构建\*

姚相杰<sup>1</sup>, 何雅青<sup>1</sup>, 蔡春林<sup>2</sup>, 杨洪<sup>1</sup>, 冼慧霞<sup>1</sup>, 张海龙<sup>1</sup>, 罗敏<sup>1</sup>, 张仁利<sup>1</sup> (1. 广东省深圳市疾病预防控制中心微生物检验科 518055; 2. 广东省深圳市罗湖区疾病预防控制中心微生物检验科 518020)

**【摘要】** 目的 通过克隆肠道病毒 71 型结构前体蛋白 P1 和非结构蛋白 3CD, 构建共表达 P1 前体蛋白和非结构蛋白 3CD 的真核双基因表达载体。方法 设计合成脑心肌炎病毒(EMCV) IRES 序列的特异性引物, 克隆至真核表达载体 pcDNA3.0 上, 命名为 pc-IRES。从手足口病重症患者分离 EV71 病毒株, 经逆转录聚合酶链式反应(RT-PCR)技术分别扩增出 EV71 病毒的 P1 前体蛋白区与 3CD 区的片段, 并将其定向克隆至真核表达载体 pc-IRES 载体中 IRES 序列的上游和下游, 随后转化到大肠埃希菌 DH5 $\alpha$  中, 最后经 PCR 和双酶切鉴定转化菌落。结果 通过重组质粒 p-IRES-P1-3CD 进行酶切和 DNA 序列分析, 重组真核双基因表达载体 p-IRES-P1-3CD 构建成功。结论 成功构建共表达 EV71 病毒 P1 前体蛋白和非结构蛋白 3CD 真核双基因表达载体, 这将为下一步制备基于 DNA 载体的 EV71 病毒的类病毒颗粒疫苗打下基础。

**【关键词】** 肠道病毒 71 型; 类病毒颗粒; 疫苗

DOI: 10.3969/j.issn.1672-9455.2012.23.002 文献标志码: A 文章编号: 1672-9455(2012)23-2916-03

**Construction and identification of the eukaryotic coexpression plasmid p-IRES-P1-3CD\*** YAO Xiang-jie<sup>1</sup>, HE Ya-qing<sup>1</sup>, CAI Chun-lin<sup>2</sup>, YANG Hong<sup>1</sup>, XIAN Hui-xia<sup>1</sup>, ZHANG Long-hai<sup>1</sup>, LUO Min<sup>1</sup>, ZHANG Ren-li<sup>1</sup> (1. Shenzhen Center for Disease Control and Prevention, Shenzhen, Guangdong 518055, China; 2. Shenzhen Luohu Center for Disease Control and Prevention, Shenzhen, Guangdong 518020, China)

**【Abstract】** **Objective** To amplify P1 and 3CD gene from patient infected with EV71 and construct the eukaryotic co-expression plasmid encoding P1 and 3CD. **Methods** The internal ribosomal entry site(IRES) from encephalomyocarditis virus(EMCV) was amplified and inserted into eukaryotic vector pcDNA3.0, named pc-IRES. Then the cDNA encoding P1 and 3CD were obtained by RT-PCR amplification from the fecal of patient infected with EV71 and cloned into pc-IRES vector. The constructed plasmid p-IRES-P1-3CD was confirmed by restriction enzymolysis and PCR. **Results** A 2.5 kb and 1.9 kb fragment were obtained from amplification, the sequences were confirmed to be EV71 P1 and 3CD gene by sequence analysis. PCR and double endonucleases results confirmed that the eukaryotic co-expression plasmid p-IRES-P1-3CD was successfully constructed. **Conclusion** The successful construction of eukaryotic expression plasmid p-IRES-P1-3CD establishes an experimental basis for virus like particle vaccine of EV71.

**【Key words】** enterovirus 71; virus like particles; vaccine

肠道病毒 71 型(EV71)是引起儿童手足口病的重要病原体。EV71 是嗜神经性病毒, 容易导致严重的神经系统相关并发症, 如无菌性脑膜炎、脑干脑炎、急性迟缓性麻痹等, 甚至引起患儿死亡<sup>[1]</sup>。近年来, 在世界多个国家和地区报道了 EV71 的暴发。同其他病毒性疾病的防治一样, EV71 的防治也主要以免疫预防为主, 但目前尚无有效的疫苗可以使用<sup>[2-3]</sup>。EV71 属于小 RNA 病毒科, 基因组编码 2 194 个氨基酸的多聚蛋白, 可进一步水解为 P1~P3 3 个前体蛋白, P1 前体蛋白编码 VP1~VP4 4 个病毒外壳蛋白, P2 和 P3 前体蛋白编码 2A、2B、2C、3A、VPg、3C、3D 等 7 个非结构蛋白<sup>[4]</sup>。其中, P1 前体蛋白可以被非结构蛋白 3CD 切割为 VP1~VP4 蛋白, 并进而自组装为病毒颗粒<sup>[5-6]</sup>。本研究将利用 EV71 这一特性构建基于 DNA 载体的 EV71 类病毒颗粒疫苗, 现将该真核双基因表达载体构建的过程报道如下。

## 1 材料与与方法

**1.1 材料** EV71 病毒株为本实验室 2006 年从 1 名 2 岁男患儿体内分离, 临床诊断为重症手足口病。真核表达载体 pcDNA3.0、pIRES-DsRed 也为本实验室保存。大肠埃希菌 DH5 $\alpha$  购自 TaKaRa 公司, T4 DNA 连接酶购自 NEB 公司, 病毒

RNA 抽提试剂盒用 Roche High Pure viral RNA 试剂盒, RNA 扩增用 TaKaRa one step RNA PCR 试剂盒, AMV 逆转录酶、Taq 酶购自 TaKaRa 公司。限制性内切酶 EcoR I、Spe I、Xba I、Not I、Afl II、Pme I 购自 NEB 公司。

## 1.2 方法

**1.2.1 病毒总 RNA 提取** 抽取本实验室保存的 2006 年从重症手足口病患儿体内分离的 EV71 病毒株, 按照 RNA 提取试剂盒手册提取病毒总 RNA, 置于 -80℃ 保存。

**1.2.2 EMCV 病毒 IRES 片段克隆及质粒 pc-IRES 的构建** 以本实验室保存的 pIRES-DsRed 为模板, 扩增脑心肌炎病毒(EMCV)的 IRES 片段, 聚合酶链式反应(PCR)引物分别是上游: 5'-GGG GAA TTC GTT TAA ACG GTA CTT AAG GCC CCT CTC CCT CCC CCC G-3' (划线处为 EcoR I 酶切位点), 下游: GGG GAT ATC TGT GGC CAT ATT ATC ATC GTG TTT TTC (划线处为 EcoR V 酶切位点), 引物由大连 TaKaRa 生物公司合成。反应条件为 94℃ 2 min, 94℃ 30 s, 55℃ 30 s, 72℃ 50 s, 共 31 个循环; 72℃ 10 min, 用 12 g/L 琼脂糖凝胶电泳分离 PCR 扩增产物, 按试剂盒说明书回收目的基因片段。回收的 PCR 产物与质粒 pcDNA3.0, 分别经 EcoR I 和

\* 基金项目: 广东省医学科研基金(B2010287); 广东省深圳市罗湖区软科学计划(2010069)。

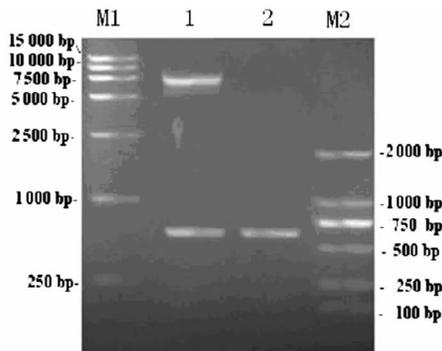
EcoR V 双酶切后,用 DNA 纯化试剂盒回收酶切产物。酶切后的 PCR 扩增 DNA 片段和 pcDNA3.0 按分子比 3 : 1 进行连接反应。以连接产物转化感受态大肠埃希菌,抽提质粒,经 EcoR I 和 EcoR V 双酶切及 PCR 扩增鉴定。质粒 pcDNA3-IRES(简称 pcIRES)序列由上海生物工程有限公司测定。

**1.2.3 EV71 3CD 基因克隆及质粒 pcIRES-3CD 的构建** 提取 EV71 病毒总 RNA,根据 GenBank 中 EV71 SHENZHEN03 株序列设计与合成一对寡聚核苷酸引物,同时根据克隆所需在每条引物的 5' 端引入相应的限制性内切酶识别序列及保护碱基,3CD 上游序列为:GGG GCG GCC GCA TGG GCC CGA GCC TTG ATT TTG C(划线处为 Not I 酶切位点),3CD 下游:GGG TCT AGA TTA AAA TAA CTC GAG CCA ATT GCG TC(划线处为 Xba I 酶切位点),由大连 TaKaRa 生物公司合成,利用一步法逆转录 PCR(RT-PCR)试剂盒扩增 EV71 3CD 片段(大连 TaKaRa 公司)。反应条件为 50 ℃ 30 min,94 ℃ 3 min,94 ℃ 30 s,52 ℃ 30 s,72 ℃ 5 min,10 g/L 琼脂糖凝胶电泳分离并回收 PCR 扩增的目的基因片段,胶回收 PCR 产物与载体 pcIRES 质粒分别用 Not I 及 Xba I 双酶切,酶切产物按分子比 3 : 1 进行连接反应。以连接产物转化感受态大肠埃希菌并抽提质粒,以及双酶切及测序鉴定。

**1.2.4 EV71 前体蛋白 P1 基因克隆及质粒 pcIRES-P1-3CD 的构建** 以提取的 EV71 总 RNA 为模板,利用大连 TaKaRa 生物公司的一步法 RT-PCR 试剂盒扩增 EV71 的前体蛋白 P1 基因(vp1-vp4)片段,RT-PCR 引物分别是上游:5'-GGG GTT TAA ACG CCA CCA TGG GTT CGC AGG TCT CTA CAC-3'(划线处为 pme I 酶切位点),下游:5'-GGG CTT AAG TTA AAG AGT AGT GAT CGC TGT GCG AC-3'(划线处为 AflII 酶切位点),引物由大连 TAKARA 生物公司合成。反应条件为 50 ℃ 30 min,94 ℃ 3 min,94 ℃ 30 s,55 ℃ 30 s,72 ℃ 5 min,用 10 g/L 琼脂糖凝胶电泳分离并回收 PCR 扩增的目的基因片段,胶回收 PCR 产物与载体 pcIRES-3CD 质粒分别用 AflII 及 pme I 双酶切,酶切产物按分子比 3 : 1 进行连接反应。以连接产物转化感受态大肠埃希菌并抽提质粒,以及双酶切及测序鉴定。

**2 结 果**

**2.1 真核表达质粒 pcIRES 的鉴定** 真核表达质粒 pcIRES 经 EcoRV 和 EcoR I 双酶切,获得 585 bp 的 IRES 片段及 5.8 kb 的线状质粒 pcDNA3.0,pcIRES 经 PCR 扩增获得 IRES 片段(见图 1)。质粒 pcIRES 经测序和序列比对与 GenBank 中 EMCV 的 IRES 序列完全一致。



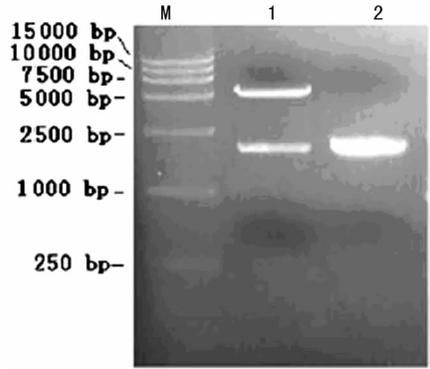
M1: DNA 分子量标准(DL15000),M2: DNA 分子量标准(DL2000),1: pcIRES 利用 EcoRI 和 EcoRV 酶切结果,2: pcIRES 的 PCR 鉴定结果。

图 1 pc-IRES 重组载体的酶切鉴定

**2.2 真核表达质粒 pcIRES-3CD 的鉴定** 质粒 pcIRES-3CD

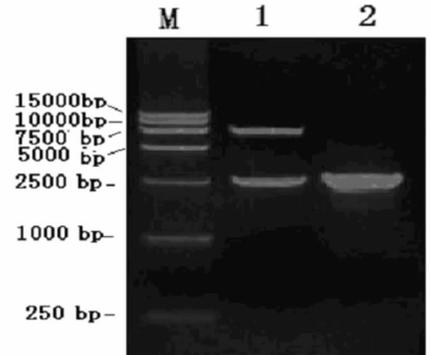
经 Xba I 及 Not I 双酶切,获得 1 934 bp 的 EV71 非结构蛋白 3CD 片段及 6.3 kb 的线状质粒 pcIRES(见图 2),基因序列测定结果经序列比对与 GenBank 中 EV71 SHENZHEN03 株的同源性达 94%。

**2.3 真核表达质粒 pcIRES-P1-3CD 的鉴定** 质粒 pcIRES-P1-3CD 经 AflII 及 pme I 双酶切,获得 2 585 bp 的 EV71 结构蛋白 P1 片段及线状质粒 pcIRES-3CD(见图 3),基因序列测定结果经序列比对与 GenBank 中 EV71 SHENZHEN98 株的同源性达 92%,与 SHENZHEN03 株同源性达 95%。



M:DNA 分子量标准(DL15000),pcIRES-3CD 利用 XbaI 和 NotI 酶切结果,2,pcIRES-3CD 的 PCR 鉴定结果。

图 2 pcIRES-3CD 重组载体的酶切鉴定



M:DNA 分子量标准(DL15000),pcIRES-P1-3CD 利用 AflII 和 pmeI 酶切结果,2,pcIRES-P1-3CD 的 PCR 鉴定结果。

图 3 pcIRES-P1-3CD 重组载体的酶切鉴定

**3 讨 论**

由 EV71 病毒感染引起的手足口病已成为重要的公共卫生问题,其重症和死亡病例呈逐年增多的趋势。广东省是我国手足口病的重灾区,手足口病形势较为严峻<sup>[7]</sup>,因此,进行疫苗开发及相关研究具有重要意义。

类病毒颗粒(VLPs)是由病毒外壳蛋白所组成的不含遗传物质的壳状结构,其结构与其他非全病原体抗原成分相比,更接近天然构象,也能更有效地诱导机体产生免疫反应,是疫苗制备中理想的靶抗原位点。VLPs 疫苗相对于灭活疫苗和减毒疫苗由于不含病毒核酸,比较安全可靠<sup>[8-9]</sup>,同时其免疫原性又强于亚单位疫苗。目前,乙型肝炎病毒和人乳头瘤病毒的 VLPs 疫苗已经成功应用于临床<sup>[10-12]</sup>。目前,EV71 的 VLPs 疫苗尚处于初始研究阶段,2008 年我国台湾地区的 Chung YC 等<sup>[13]</sup>利用杆状病毒表达系统在昆虫细胞 sf9 中表达和纯化 EV71 类病毒颗粒蛋白并免疫小鼠,其免疫保护效果相比基于 EV71 VP1 蛋白的单位疫苗取得了较大提高。但是该系统也存在以下缺点:(1)制备疫苗过程比较复杂,需要在体外利用昆

虫细胞中表达和纯化类病毒颗粒蛋白,工艺较为繁琐,而且产量较低,制备成本很高。(2)该类病毒颗粒蛋白是在昆虫细胞中表达的,昆虫细胞内蛋白的加工修饰过程与哺乳动物细胞体内不尽相同,这会使得该疫苗的使用效果在实际应用中可能会引起问题。为了解决以上问题,本研究利用真核表达载体 pcDNA3.0 构建真核双顺反子表达载体,并将 EV71 P1 前体蛋白基因和非结构蛋白 3CD 基因插入该载体中,制备基于 DNA 载体的 EV71 VLPs 疫苗。该疫苗可以直接注射机体,并在 CMV 启动子的作用下实现 P1 和 3CD 蛋白在机体内的共表达,并进而自组装成 VLPs 诱导机体免疫反应。该疫苗可还用大肠埃希菌大量扩增,这将使生产成本大幅降低,有望改进目前 EV71 疫苗面临的一些问题,为 EV71 型手足口病的预防打下基础。

## 参考文献

- [1] Kung SH, Wang SF, Huang CW, et al. Genetic and antigenic analyses of enterovirus 71 isolates in Taiwan during 1998-2005[J]. *Clin Microbiol Infect*, 2007, 13(8): 782-785.
- [2] 孙佳. 肠道病毒 71 型研究进展[J]. *现代预防医学*, 2011, 38(10):1951-1952.
- [3] Yi L, Lu J, Kung HF, et al. The virology and developments toward control of human enterovirus 71 [J]. *Crit Rev Microbiol*, 2011, 37(4):13-27.
- [4] McMinn PC. An overview of the evolution of enterovirus 71 and its clinical and public health significance[J]. *FEMS Microbiology Reviews*, 2002, 26(2):91-107.
- [5] Chung YC, Ho MS, Wu JC, 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):55-62.
- [6] Chung CY, Chen CY, Lin SY, et al. Enterovirus 71 virus-

like particle vaccine; improved production conditions for enhanced yield[J]. *Vaccine*, 2010, 28(43):6951-6957.

- [7] De W, Changwen K, Wei L, et al. A large outbreak of hand, foot, and mouth disease caused by EV71 and CAV16 in Guangdong, China, 2009[J]. *Arch Virol*, 2011, 156(6):45-53.
- [8] Pyo HM, Masic A, Woldeab N, et al. Pandemic H1N1 influenza virus-like particles are immunogenic and provide protective immunity to pigs[J]. *Vaccine*, 2012, 30(7):1297-1301.
- [9] 张喜珍, 王晓丹, 赵东海, 等. HIV-1 病毒样颗粒疫苗的构建及免疫原性研究[J]. *中国科学:生命科学*, 2011, 41(12):1148-1154.
- [10] 李晓楠, 赵忠鹏, 段跃强, 等. EV71 型 VP1 蛋白表达、纯化及免疫原性的初步评价[J]. *疫学杂志*, 2010, 26(1):1-5.
- [11] Baek JO, Seo JW, Kwon O, et al. Production of human papillomavirus type 33 L1 major capsid protein and virus-like particles from *Bacillus subtilis* to develop a prophylactic vaccine against cervical cancer[J]. *Enzyme Microb Technol*, 2012(2):173-180.
- [12] Sominskaya I, Skrastina D, Dislers A, et al. Construction and immunological evaluation of multivalent hepatitis B virus (HBV) core virus-like particles carrying HBV and HCV epitopes[J]. *Clin Vaccine Immunol*, 2010, 17(6):27-33.
- [13] Chung YC, Ho MS, Wu JC, 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.

(收稿日期:2012-05-14)

(上接第 2915 页)

- [7] Sugita T, Nakajima M, Ikeda R, et al. Sequence analysis of the ribosomal DNA intergenic spacer 1 regions of *Trichosporon* species [J]. *J Clin Microbiol*, 2002, 40(18):26-30.
- [8] Servonnet A, Bourgault M, Trueba F, et al. Disseminated *Trichosporon asahii* infection [J]. *Ann Biol Clin*, 2010, 68(36):3-6.
- [9] Thibeault R, Champagne M, De Repentigny L, et al. Fatal disseminated *Trichosporon asahii* infection in a child with acute lymphoblastic leukemia [J]. *Can J Infect Dis Med Microbiol*, 2008, 19(20):3-5.
- [10] Kim SH, Kim DH, Joo SI, et al. Chronic cutaneous disseminated *Trichosporon asahii* infection in a nonimmunocompromised patient [J]. *J Am Acad Dermatol*, 2008, 59(3):7-9.
- [11] Chowdhary A, Ahmad S, Khan ZU, et al. *Trichosporon asahii* as an emerging etiologic agent of disseminated trichosporonosis: a case report and an update [J]. *Indian J Med Microbiol*, 2004, 22(1):16-22.

- [12] 杨蓉娅, 王文岭, 敖俊红, 等. 阿萨希毛孢子菌致小鼠播散性毛孢子菌病的实验和治疗研究[J]. *中华皮肤科*, 2004, 37(8):481-483.
- [13] Kim JS, Holtom P, Vigen C. Reduction of catheter-related bloodstream infections through the use of a central venous line bundle: epidemiologic and economic consequences [J]. *Am J Infect Control*, 2011, 39(8):640-646.
- [14] Vandijck DM, Blot SI, Labeau SO. Reduction of catheter related bloodstream infections in intensive care: one for all, all for one [J]. *Nurs Crit Care*, 2009, 14(5):273.
- [15] 夏志宽, 杨蓉娅, 王文岭, 等. IGS1、ITS 和 D1/D2 区在毛孢子菌鉴定中的意义及国内阿萨希毛孢子菌基因分型研究[J]. *中华医学杂志*, 2008, 88(44):3145.
- [16] Rodriguez Tudela JL, Diaz Guerra TM, Mellado E, et al. Susceptibility patterns and molecular identification of *Trichosporon* species [J]. *Antimicrob Agents Chemother*, 2005, 49(40):26-34.

(收稿日期:2012-05-17)