

DOI: 10.19296/j.cnki.1008-2409.2024-02-001

· 专家论坛 ·

· EXPERT FORUM ·

肠道病毒 C 组 96 型 VP1 蛋白线性 B 细胞表位筛选与鉴定

何韵怡¹, 刘阳阳^{2a}, 胡嘉华^{2b,3}, 刘洪波^{1,2a}

(1. 桂林医学院医学检验学院, 桂林 541199; 2. 桂林医学院第二附属医院 a. 检验科, b. 科研科, 桂林 541199;
3. 广东省疾病预防控制中心, 广州 511430)

专家简介 刘洪波, 医学博士, 教授, 主任技师, 博士生导师, 主要研究方向为分子诊断和新型疫苗。担任广西医学会微生物学与免疫学分会副主任委员、白求恩精神研究会广西检验医学专业委员会副主任委员、广西医学会医学教育分会委员等职务。主持国家自然科学基金项目 3 项、广西自然科学基金项目 3 项, 其他科研项目 6 项。在国内、外学术期刊以第一或通信作者发表论文 40 余篇, 其中 SCI 收录 20 篇, 获国家发明专利 1 项、软件著作权 1 项。参编人民卫生出版社出版的医学检验技术专业教材 1 部。指导学生在互联网+大学生创新创业大赛、基础医学创新研究暨实验设计大赛等各类创新大赛中获省级及以上奖 20 余项。



摘要 **目的** 鉴定肠道病毒 C 组 96 型 (enterovirus C96, EV-C96) VP1 蛋白的线性 B 细胞表位。**方法** 采用 IEDB 网站提供的在线分析工具分析、预测 EV-C96 VP1 蛋白的线性 B 细胞表位, 结合其二级结构、 β -转角、抗原性、亲水性等多项参数, 筛选出优势候选表位; 应用间接 ELISA 法检测候选表位与 EV-C96 免疫血清的反应性以及 21 种其他常见手足口病病原血清的交叉反应性; 应用微量中和试验测定表位抗体的中和效价; 采用序列比对分析表位的序列保守性; 应用结构对齐分析表位的结构特异性。**结果** 通过生物信息学筛选出 EV-C96 VP1 蛋白 7 个候选表位 (P1~P7); ELISA 法检测发现 P7 (氨基酸序列位置为 282~304) 与 EV-C96 多克隆抗体有强反应性, 与其他常见 EV 多克隆抗体不发生明显反应; 微量中和试验显示, P7 抗体的中和效价低于 1:2; 序列及结构分析结果显示, P7 的氨基酸序列在 EV-C96 型内具有较高保守性, 与其他 EV 相应位点氨基酸序列的结构有明显差异。**结论** P7 表位为 EV-C96 特异的非中和性 B 细胞表位, 可作为开发 EV-C96 检测试剂盒的候选抗原表位。

关键词: 肠道病毒 C 组 96 型; VP1 蛋白; 线性 B 细胞表位; 手足口病

中图分类号: R373.2 R512.5

文献标志码: A

文章编号: 1008-2409(2024)02-0001-09

基金项目: 国家自然科学基金项目 (81660280); 广西高校中青年教师科研基础能力提升项目 (2023KY0516); 广西高校大学生创新创业计划项目 (202210601052)。

第一作者: 何韵怡, 硕士, 检验技师, 研究方向为分子诊断和疫苗; 刘阳阳, 硕士, 检验技师, 研究方向为分子诊断。

通信作者: 刘洪波, hbliu@glmc.edu.cn。

Screening and identification of linear B cell epitopes on the VP1 protein of enterovirus C96

HE Yunyi¹, LIU Yangyang^{2a}, HU Jiahua^{2b,3}, LIU Hongbo^{1,2a}

(1.College of Medical Laboratory Science, Guilin Medical University, Guilin 541199, China; 2. a. Department of Laboratory Medicine, b. Department of Science and Research, the Second Affiliated Hospital of Guilin Medical University, Guilin 541199, China; 3.Guangdong Provincial Center for Disease Control and Prevention, Guangzhou 511430, China)

Abstract Objective To identify linear B cell epitopes of VP1 protein of enterovirus C96(EV-C96). **Methods** The linear B cell epitopes and the property parameters of EV-C96 VP1 protein were predicted by the IEDB online analysis tools, combined with its secondary structure parameters such as β -turning angle, antigenicity, and hydrophilicity were used to screen out candidate epitopes with advantages. The reactivity of the candidate epitopes with the EV-C96 antiserum and the cross-reactivity with antisera against 21 other common enterovirus caused hand foot and mouth disease were determined by indirect ELISA assay. The neutralization titer of epitope antibody was determined by microneutralization test. The conservativeness of epitopes was analyzed by sequence alignment, and the structural specificity of epitopes was analyzed by structural alignment. **Results** Seven epitopes of EV-C96 VP1 protein(P1~P7) were predicted by bioinformatics methods, among which P7(aa282~304) showed strong reactivity with EV-C96 antiserum and did not cross-react with other common enterovirus antisera. The neutralizing titer of P7 antibody was less than 1 : 2. The amino acid sequence of P7 was highly conservative in EV-C96 isolates, and the structure of the P7 was different from other 21 common EVs. **Conclusion** P7 is a non-neutral EV-C96-specific B cell epitope that can be used as a candidate antigen epitope for the development of EV-C96 detection kits.

Keywords: enterovirus C96; VP1 protein; linear B cell epitopes; hand-foot-and-mouth disease

肠道病毒(enterovirus, EV)属于小 RNA 病毒科肠道病毒属,包含众多型别,是人群中广泛流行的一类病原体^[1]。手足口病(hand-foot-mouth disease, HFMD)是由部分型别 EV 感染所致的儿童常见传染病,严重时可引起神经系统方面的并发症,甚至危及患儿生命^[2-4]。肠道病毒 C 组 96 型(enterovirus C96, EV-C96)^[5]为 HFMD 的病原之一,是由 OBERSTE 等^[6]鉴定发现的 EV-C 组新成员。EV-C96 感染不仅可引起 HFMD^[7-9],还可引起急性弛缓性麻痹(acute flaccid paralysis, AFP)^[10-12]、急性胃肠炎^[13-14]等多种疾病。近年来, EV-C96 在我国的检出率逐年升高,严重威胁我国公共卫生安全^[5,8,15]。然

而,由于 EV-C96 发现较晚,目前国内外相关研究较少,且尚无特异性治疗药物,因此,研发 EV-C96 相应的诊断试剂和疫苗具有重要意义。

EV-C96 为无包膜单股正链 RNA 病毒,其基因组编码 4 个结构蛋白和 7 个非结构蛋白。其中结构蛋白 VP1 暴露在 EV-C96 病毒衣壳最外层,是抗原表位和病毒受体识别位点集中区域,也是 EV 属血清型分类的重要划分依据^[16-17]。本研究以 EV-C96 VP1 蛋白为研究对象,应用生物信息学技术筛选和实验鉴定线性 B 细胞表位,为 EV-C96 检测试剂、疫苗的研发奠定基础。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

①细胞及毒株。人横纹肌肉瘤(RD)细胞为本课题组保存;EV-C96 A240分离株由广东省疾病预防控制中心分离并测序。②表位多肽合成及EV多克隆抗体。表位多肽由合肥国肽生物科技有限公司合成;EV-C96多克隆抗体由灭活的EV-C96 A240分离株免疫小鼠所得,其他常见的EV多克隆抗体均为本课题组制备;表位多克隆抗体由候选表位偶联钥孔血蓝蛋白后免疫日本大耳白兔所得。③酶标仪购自赛默飞公司;HRP标记二抗购自成都正能生物公司;TMB底物显色试剂盒购自上海蓝季生物公司;96孔酶标板购自康宁公司。④生物信息数据来源及软件。NCBI的GenBank数据库(<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>),免疫表位数据库IEDB(<http://tools.iedb.org/bcell/>),蛋白质数据中心PDB数据库(<http://www.rcsb.org/>)。PyMOL软件,Clustal X2软件,MEGA7.0软件及蛋白质同源建模网站SWISS-MODEL(<https://swissmodel.expasy.org/>)等。

1.2 方法

1.2.1 EV-C96的系统进化分析 基于全长VP1区核苷酸序列,利用Clustal X2软件将EV-C96 A240分离株与数据库中的其他EV-C96分离株进行序列比对。以EV-C组成员的柯萨奇病毒A24型(Coxsackievirus A24,CV-A24)(GenBank: AF081311.1)为外群,应用MEGA7.0软件选择邻接法(neighbor-joining, N-J)、Kimura 2-parameter模型进行EV-C96的系统进化树构建,Bootstrap设定为1 000,以确保评估的可靠性。

1.2.2 EV-C96 VP1蛋白同源建模 根据NCBI的Blast结果,选择与EV-C96 A240株VP1蛋白核苷酸序列一致性最高的同为EV-C组成员的CV-A24(PDB编号:4q4v)为建模模板,将EV-C96 A240株VP1区的氨基酸序列及模板数据上传至SWISS-MODEL,进行同源建模,构建的模型通过PyMOL软件显示。

1.2.3 VP1蛋白特性及线性B细胞表位预测 以

EV-C96 A240株VP1区全长氨基酸序列为模板,应用IEDB网站提供的蛋白特性分析工具,预测EV-C96 VP1蛋白 β -转角、表面可及性、柔韧性、抗原性、亲水性等结构;应用在线工具Bepipred Linear Epitope Prediction 2.0预测EV-C96 VP1蛋白的线性B细胞表位,阈值设置为0.5。

1.2.4 候选表位的反应性测定 利用间接ELISA法检测候选表位的反应性,以每孔100 ng的量将表位肽包被于微孔板中,以1:1 000稀释EV多克隆抗体,1:5 000稀释HRP酶标二抗,进行ELISA反应,反应结束后,进行TMB显色与检测,检测波长450 nm,以OD值 \geq 阴性对照的2.1倍作为阳性的判定标准。

1.2.5 候选表位的抗体中和效价测定 利用微量中和试验检测候选表位抗体中和效价。将灭活的候选表位多克隆抗体进行2倍梯度稀释;取各稀释度抗体25 μ L与相同体积的100 TCID₅₀EV-C96病毒在微孔板中混合,置于37 $^{\circ}$ C孵育2 h;每孔加入100 μ L 1×10^5 个/mL RD细胞,置于37 $^{\circ}$ C、5% CO₂培养箱中培养,同时设置病毒对照、抗体对照和细胞对照;每日观察各反应孔细胞病变效应(cytopathic effect, CPE),待病毒对照孔内细胞全部出现CPE时,以能保护50%细胞不出现CPE的抗体最高稀释度的倒数为抗体的中和效价。

1.2.6 候选表位的序列保守性分析 利用Clustal X2软件将候选表位序列与其他EV-C96 VP1蛋白氨基酸序列进行序列比对,分析候选表位在EV-C96型内各基因型中的序列保守性。

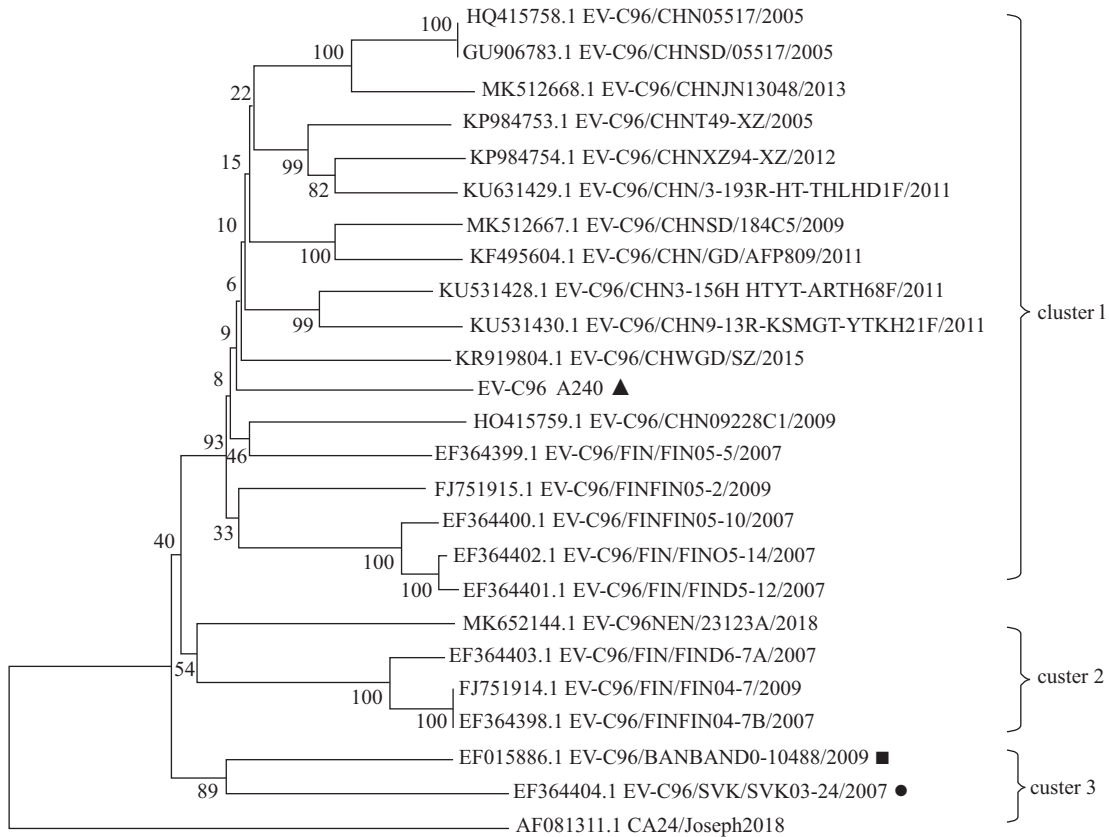
1.2.7 候选表位的结构特异性分析 从PDB数据库获取EV A、B、C、D各组代表株的3D结构,包括CV-A21(PDB: 1z7s)、EV-A71(PDB: 3vbs)、CV-A16(PDB: 5c9a)、CV-B3(PDB: 7vxn)、CV-B5(PDB: 7c9y)、EV-D68(PDB: 4wn8)、EV-D70(PDB: 7opx),利用PyMOL软件对EV结构进行对齐,分析表位的结构特性。

2 结果

2.1 EV-C96 的系统进化分析

以 VP1 区全长核苷酸序列进行系统进化树构建。构建的进化树显示, EV-C96 有 3 个 cluster: cluster 1 包括了所有来自中国的 EV-C96 分离株以及部分芬兰的分离株, cluster 2 和 cluster 3 则均由国

外 EV-C96 分离株组成。其中, 本研究选用的 EV-C96 A240 株与我国分离株均聚于同一簇, 表明在我国传播的 EV-C96 毒株具有共同的起源, EV-C96 A240 可作为我国流行的 EV-C96 代表株进行后续研究, 系统进化树结构如图 1 所示。



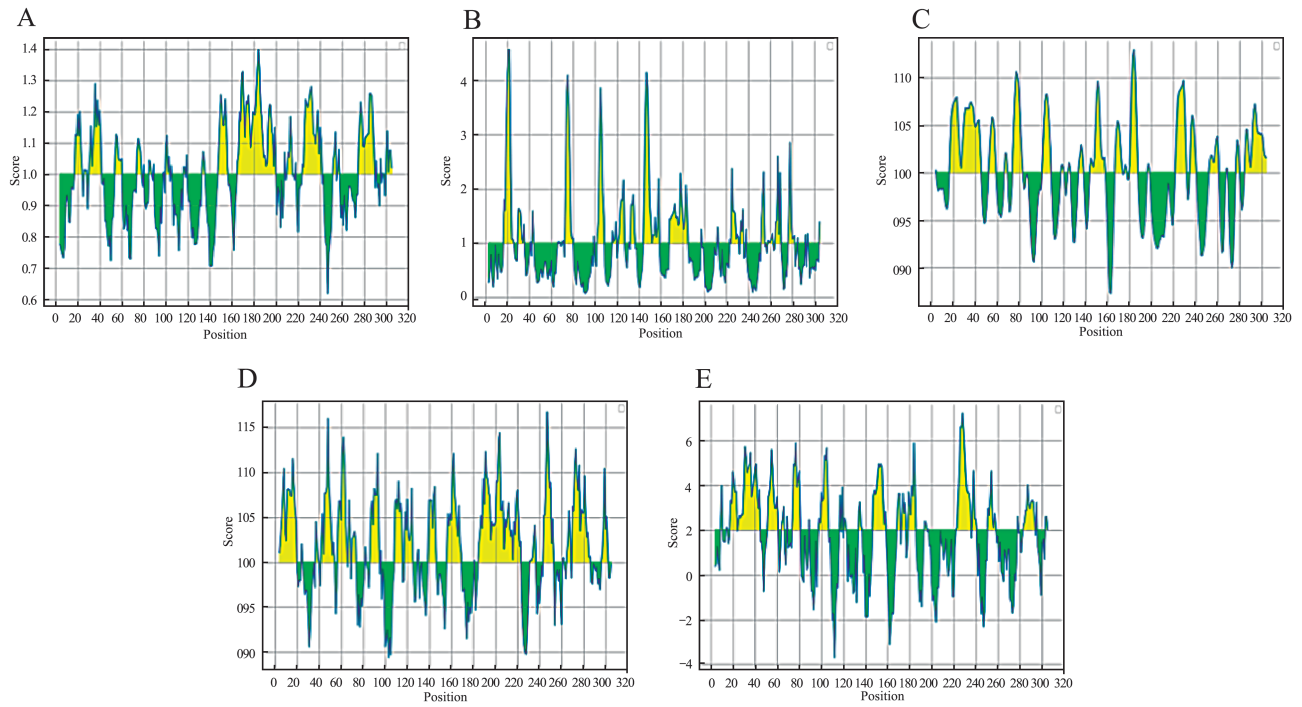
注: ▲为 EV-C96 A240 株; ■为原型株; ●为外群。

图 1 基于全长 VP1 区的 EV-C96 系统进化树

2.2 EV-C96 VP1 蛋白的特性及线性 B 细胞表位预测

应用 IEDB 网站提供的在线工具对 EV-C96 VP1 蛋白特性以及线性 B 细胞表位进行分析预测, 结果显示, EV-C96 VP1 蛋白存在多个优势的抗原表位区

域, 包括高频的 β -转角、良好的表面可及性、柔韧性、抗原性以及亲水性, 结果如图 2 所示。EV-C96 VP1 蛋白有 8 个潜在的线性 B 细胞表位, 其分布于 VP1 各个区域, 结果如表 1 所示。



注:A.Chou & fasman β -转角图谱;B.Emini 表面可及性图谱;C.Karplus & Schulz 柔韧性图谱;D.Kolaskar & Tongaonkar 抗原性图谱;E.Parker 亲水性图谱。

图 2 EV-C96 VP1 蛋白特性分析

表 1 EV-C96 VP1 蛋白线性 B 细胞表位预测

序号	起始位置	结束位置	氨基酸序列	序列长度
1	7	8	ES	2
2	14	78	LQVSQRPRTQRPAITNTTADTPASSGVNTQEVPAL TAVETGASGQAVPADVIETRKVINYKTRSE	65
3	97	110	ENFNATGTERKKLF	14
4	146	156	RYYTQNSGHAR	11
5	170	183	PRPNAWDDYTWQSS	14
6	218	234	ARVPIKGETTDSGDAYY	17
7	253	257	HNPAR	5
8	281	304	AVPYNGTGVDIKEGTLTPITPVNS	24

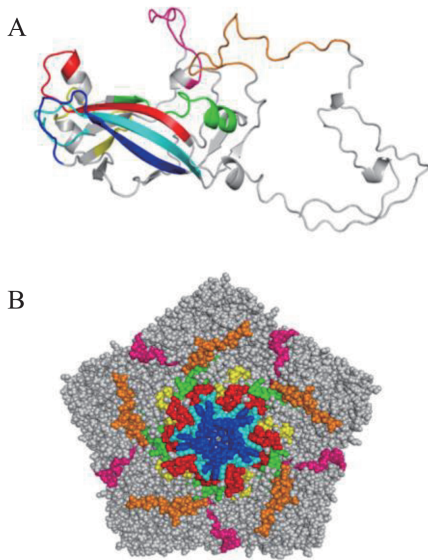
2.3 EV-C96 VP1 蛋白的线性 B 细胞表位筛选

综合上述预测结果,筛选处于 β -转角且具有较高表面可及性、柔韧性、抗原性以及亲水性的长度为 15~25 个氨基酸的肽段作为 EV-C96 VP1 蛋白的候选线性 B 细胞表位,最终确定了 7 个候选表位(P1~P7),结果如表 2 所示。

表 2 EV-C96 VP1 蛋白候选线性 B 细胞表位

候选表位	序列位置	氨基酸序列
P1	aa90~105	CITIMSVENFNATGTE
P2	aa112~127	VWEISYTDTVQLRRKL
P3	aa137~156	TEFTFVLTERYYTQNSGHAR
P4	aa161~176	QIMYIPPGAPRPNAWD
P5	aa221~236	IKGETTDSGDAYYGQ
P6	aa249~268	VVNEHNPARITSRMRVYMKP
P7	aa282~304	VPYNGTGVDIKEGTLTPITPVNS

通过 PyMOL 软件将候选表位映射于 EV-C96 全病毒五聚体结构及 VP1 蛋白单体结构之上,由图 3 可知,候选表位均处于 EV-C96 的表面,且二级结构多存在无规则卷曲和 β -转角,有利于与抗体结合。因此,筛选的肽段为抗原表位的可能较大。



注:A.EV-C96 VP1 单体的二级结构;B.EV-C96 五聚体的三级结构。不同候选表位以不同颜色表示,红色为 P1,绿色为 P2,蓝色为 P3,黄色为 P4,玫红色为 P5,靛青色为 P6,橘黄色为 P7。

图 3 EV-C96 VP1 蛋白候选线性 B 细胞表位的结构映射图

2.4 候选线性 B 细胞表位的反应性

间接 ELISA 法检测结果显示,候选表位 P1~P7 均能与 EV-C96 多克隆抗体反应,其中 P7 多肽的反应性最强,OD 值为 3.7,结果如图 4 所示。将 P7 多肽与本室保存的 21 种其他常见的 HFMD 病原 EV 多克隆抗体反应,均无明显的交叉反应出现,结果如图 5 所示。

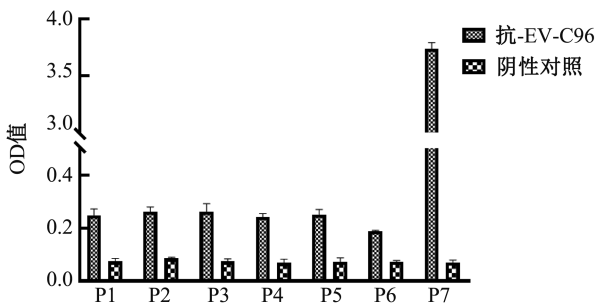


图 4 间接 ELISA 法检测候选线性 B 细胞表位的免疫反应性

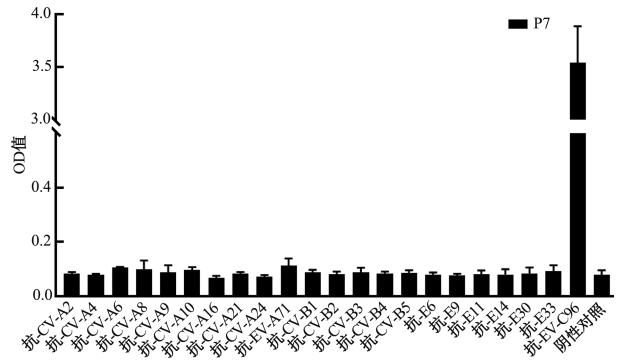
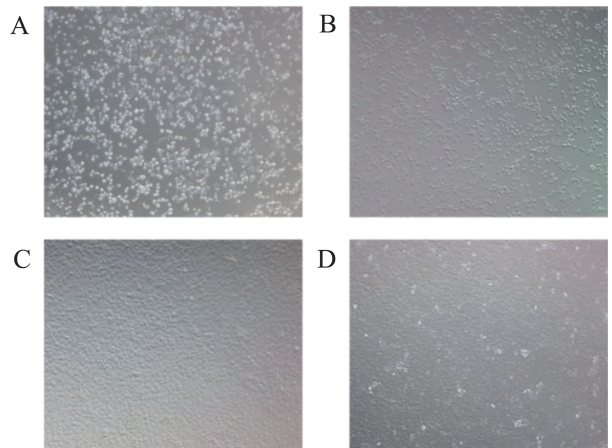


图 5 间接 ELISA 法检测 P7 多肽的表位特异性

2.5 表位 P7 抗体的中和能力

应用微量中和试验检测表位 P7 的抗体中和效价,结果显示,当病毒对照组孔内细胞全部出现 CPE 时,细胞对照组和抗体对照组细胞均生长正常,而倍比系列稀释的 P7 抗体实验组细胞全部出现 CPE,P7 抗体的中和效价低于 1:2,说明 P7 抗体没有中和 EV-C96 的能力,结果如图 6 所示。



注:A.实验组细胞;B.EV-C96 病毒对照组细胞;C.抗体对照组细胞;D.正常 RD 细胞对照。

图 6 中和试验测定 P7 抗体的中和效价 (100 \times)

2.6 表位 P7 的氨基酸序列保守性

Clustal X2 软件分析结果显示,P7 在 EV-C96 型内具有较高的保守性,其中 11 个位点的氨基酸残基完全保守,仅有 Thr295 和 Asn303 两个位点的氨基酸残基存在非保守突变。在所有的非保守突变中,仅有 Thr295 \rightarrow Ala295 和 Asn303 \rightarrow Ala303 为极性中性向非极性疏水性突变,其余突变均为同极性中性氨基酸突变,结果如图 7 所示。

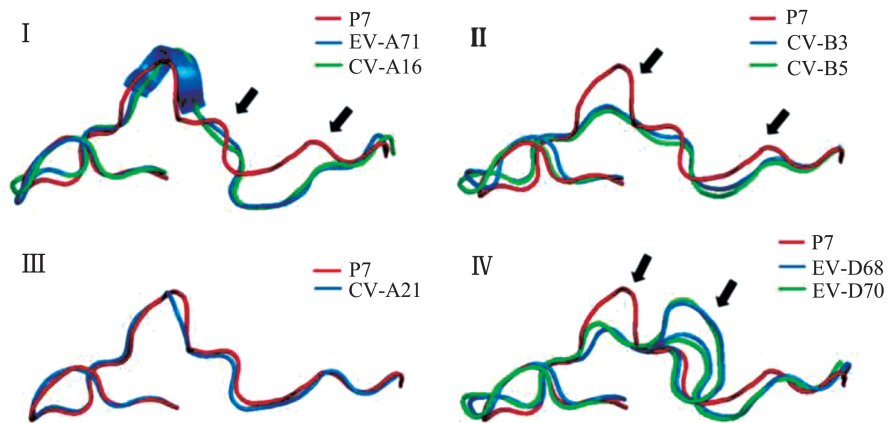
```

Clustal Co
EVC96-P7      --VPYNGTGVDIKEGLTLPITPVNS----
ABQ52383.1    RAVPYHGTGVDIKQDTLAPITPVSSMTTY
ABQ52384.1    RAVPYNGTGVDIKENTLTPITPVNSMTTY
ABQ52385.1    RAVPYNGTGVDIKEGLTLPITPVNSMTTY
ABQ52386.1    RAVPYNGTGVDIKENTLAPITPVASMTTY
ABQ52387.1    RAVPYNGTGVDIKENTLTPITPVNSMTTY
ABQ52388.1    RAVPYHGTGVDIKQDTLTPITPVSSMTTY
ABQ52389.1    RAVPYNGTGVDITESQLTPTPITSMTTY
ALC74272.1    RAVPYNGTGVDIKEDTLTPITPVNSMTTY
ALC74273.1    RAVPYNGTGVDIKENTLTPITPVNSITTY
AWU65871.1    RAVPYNGTGVDITENAITPTPVASMTTY
AWU65872.1    RAVPYNGTGVDITENAITPTPITSMTTY
AWU65873.1    RAVPYNGTGVDITENAITPTPITSMTTY
ACT31465.1    RAVPYHGTGVDIKQDTLAPITPVSSMTTY
ACT31466.1    RAVPYNGTGVDIKENTLAPITPVNSMTTY
APA32386.1    RAVPYNGTGVDIKENTLTPITSVTSMTTY
APA32387.1    RAVPYNGTGVDIKENTLTPITPVKSITTY
APA32388.1    RAVPYNGTGVDIKENTLTPITPVASMTTY
QCX08917.1    RAVPYNGTGVDIKENTLTPITPVASMTTY
QCX08918.1    RAVPYNGTGVDIKEGLTLPITPVESMTTY
QCP69019.1    RAVPYNGTGVDIKENTLTPITPVNSMTTY
AEE25814.1    RAVPYNGTGVDIKEGLTLPITPVNSMTTY
AEE25815.1    RAVPYNGTGVDIKENTLAPITPVNSITTY
ADM13761.1    RAVPYNGTGVDIKEGLTLPITPVNSMTTY
ALL26332.1    RAVPYNGTGVDIKENTLTPITPITSMTTY
ABM54550.1    RAVPYNGTGVDIKENQLTPTPVTAATTY
AAZ80169.1    RAVPYNGTGVDIKENQLTPTPVTAATTY
QER78690.1    RAVPYNGTGVDIKQDALTPITPVSSMTTY
    
```

图 7 P7 氨基酸序列在 EV-C96 型内的保守性分析

2.7 表位 P7 的结构特异性

PyMOL 软件分析结果显示,表位 P7 与各组 EV 代表株相应位点氨基酸序列的结构重合度低,具有结构特异性。其中,P7 与同为 EV-C 组的 CV-A21 相比,结构差异较小,与其他 A、B、D 组 EV 的结构差异较大,结果如图 8 所示。



注: I.P7 与 A 组 EV 的二级结构; II.P7 与 B 组 EV 的二级结构; III.P7 与 C 组 EV 的二级结构; IV.P7 与 D 组 EV 的二级结构。结构差异较大处以箭头指示。

图 8 表位 P7 与 A、B、C、D 各组 EV 代表株相应位点的结构分析

3 讨论

EV-C96 原型株是 2000 年在孟加拉国 1 名 AFP 患者的粪便中分离出来的新型 EV-C^[6]。2007 年,我国云南首次报告了 EV-C96 的相关研究^[18],随后几年,山东^[12]、广东^[11]、新疆^[15, 19]、西藏^[20]、江苏^[8]、湖北^[21] 等多个地域陆续有 EV-C96 相关报告。WANG 等^[5]对山东省 AFP 监测结果进行回顾性研究,发现 1991 年的 1 例 AFP 标本中存在 EV-C96 (127/SD/CHN/1991 株),这是迄今为止发现最早的

EV-C96 分离株之一,表明 EV-C96 在我国流行已久,且分布地域广泛。本研究基于全长 VP1 区核苷酸序列构建 EV-C96 系统进化树,结果显示,本研究选用的 EV-C96 A240 分离株与其他中国分离株均聚于 cluster 1 内,表明 EV-C96 在我国存在时间长,且具有共同的起源。cluster 1 中除了中国分离株外,还包括部分来自芬兰的 EV-C96 分离株,提示我国 EV-C96 最初流行的分离株可能与芬兰 EV-C96 分离株为同一传播链。尽管 EV-C96 的分离率相对较低,但考虑其在我国存在的时间长,分布地域广,且已有

EV-C96 与疾病相关的报告,因此,对 EV-C96 的流行进行监测与防控具有重要性。

抗原表位又称抗原决定簇,是生物医药领域研究中的重要靶标,抗原表位的鉴定对检测试剂和疫苗的研发具有重要意义^[22-23]。传统方法鉴定表位成本高且费时费力,而新兴的生物信息学可通过多种运算法则对抗原表位进行分析预测,具有高效、准确的优势,已有多项研究^[24-28]通过生物信息学方法预测,并通过实验确认了 EV 表位。本研究利用多种生物信息学工具综合预测 EV-C96 的线性 B 细胞表位,最终筛选出 7 个候选表位(P1~P7)。候选表位 P1~P7 均处于 EV-C96 全病毒表面,且二级结构存在多个 β -转角及无规则卷曲,为优势的表位结构,有利于抗体的识别与结合^[29-30]。以间接 ELISA 法分析,结果显示,P1~P7 均能与 EV-C96 多克隆抗体发生反应,其中 P7 的反应性最强,且 P7 与 21 种其他常见的 HFMD 病原 EV 多克隆抗体均无明显交叉反应,表明 P7 为 EV-C96 的特异性抗原表位,可以用于 EV-C96 感染的免疫学检测试剂开发。抗原表位鉴定也是新型疫苗研发的重要内容,疫苗诱导机体产生的中和抗体可以阻断病毒的感染、复制和传播。为了解表位 P7 是否为中和表位,本研究利用 P7 免疫血清进行了微量中和试验,遗憾的是,实验结果显示,P7 抗体没有中和 EV-C96 的能力,说明 P7 为 EV-C96 的非中和性表位。

为进一步了解表位 P7 的特性,对其氨基酸序列及结构进行了分析。结构比对分析结果显示,表位 P7 无论是与同组 EV,还是与其他组 EV,在结构上均存在明显的差异,而结构是影响表位形成的重要因素,因此,表位 P7 的反应特异性可能是由其结构的差异所引起。另外,表位 P7 氨基酸序列的型内保守性分析结果显示,P7 序列在 EV-C96 型内具有较高保守性,仅存在两个非保守氨基酸残基突变位点 Thr295→Ala295 和 Asn303→Ala303,这两个位点的突变均为丙氨酸突变。而丙氨酸因为分子结构小,通常用于填补蛋白空隙,起到维持蛋白结构稳定的作用,因此,推测该突变对表位 P7 的抗原反应性影响不大,后续可通过合成突变抗原肽进行实验验证。

4 结 论

本研究利用生物信息学的方法对 EV-C96 VP1 蛋白的线性 B 细胞表位进行分析预测,并以间接 ELISA 法和微量中和试验加以验证,确定了表位 P7 为保守的 EV-C96 特异线性 B 细胞表位,可以用于 EV-C96 感染的免疫学检测试剂的研发,这将为 EV-C96 感染性疾病的诊断和防控奠定可靠的基础。

参 考 文 献

- [1] BROUWER L, MORENI G, WOLTERS K C, et al. World-wide prevalence and genotype distribution of enteroviruses[J]. *Viruses*,2021,13(3):434.
- [2] SOUSA JUNIOR I P, VIEIRA T C R G. Enterovirus infection and its relationship with neurodegenerative diseases[J]. *Mem Inst Oswaldo Cruz*,2023,118:e220252.
- [3] TOMATIS SOUVERBIELLE C, ERDEM G, SÁNCHEZ P J. Update on nonpolio enterovirus and parechovirus infections in neonates and young infants[J]. *Curr Opin Pediatr*,2023,35(3):380-389.
- [4] ZHU P Y, JI W Q, LI D, et al. Current status of hand-foot-and-mouth disease[J]. *J Biomed Sci*,2023,30(1):15.
- [5] WANG Q, JI F, WANG S T, et al. Complete genome characterization of three enterovirus C96 isolates in China[J]. *Arch Virol*,2019,164(8):2183-2186.
- [6] OBERSTE M S, MAHER K, WILLIAMS A J, et al. Species-specific RT-PCR amplification of human enteroviruses: a tool for rapid species identification of uncharacterized enteroviruses[J]. *Gen Virol*,2006,87(1):119-128.
- [7] DUONG V, MEY C, ELOIT M, et al. Molecular epidemiology of human enterovirus 71 at the origin of an epidemic of fatal hand, foot and mouth disease cases in Cambodia[J]. *Emerg Microbes Infect*,2016,5(9):e104.
- [8] JI H, FAN H, LU P X, et al. Surveillance for severe hand, foot, and mouth disease from 2009 to 2015 in Jiangsu Province: epidemiology, etiology, and disease burden[J]. *BMC Infect Dis*,2019,19(1):79.
- [9] XU Y, SUN Y S, MA J M, et al. A novel Enterovirus 96 circulating in China causes hand, foot, and mouth disease[J]. *Virus Genes*,2017,53(3):352-356.
- [10] KAYE M, HOBDAI L, IBRAHIM A, et al. Australian National Enterovirus Reference Laboratory annual report, 2022[J/OL]. *Commun Dis Intell*,2023,47[2023-11-

- 20]. <https://doi.org/10.33321/cdi.2023.47.35>.
- [11] LU J, ZHENG H Y, ZHANG Y, et al. Whole genomic sequence and replication kinetics of a new enterovirus C96 isolated from Guangdong, China with a different cell tropism[J]. *PLoS One*, 2014, 9(1): e86877.
- [12] XU A Q, TAO Z X, WANG H Y, et al. The complete genome analysis of two enterovirus 96 strains isolated in China in 2005 and 2009[J]. *Virus Genes*, 2011, 42(3): 323–330.
- [13] KUMTHIP K, KHAMRIN P, USHIJIMA H, et al. Multiple enterovirus genotypes circulating in children hospitalized with acute gastroenteritis in Thailand[J]. *Infect Genet Evol*, 2017, 55: 324–331.
- [14] ROJJANADUMRONGKUL K, KUMTHIP K, KHAMRIN P, et al. Enterovirus infections in pediatric patients hospitalized with acute gastroenteritis in Chiang Mai, Thailand, 2015–2018[J]. *Peer J*, 2020, 8: e9645.
- [15] 孙强, 刘莹, 唐海淑, 等. 肠道病毒 C 组 96 型 (EV-C96) 新疆株的全基因组序列分析[J]. *病毒学报*, 2022, 38(2): 332–340.
- [16] GUO H R, LI Y, LIU G C, et al. A second open reading frame in human enterovirus determines viral replication in intestinal epithelial cells[J]. *Nat Commun*, 2019, 10(1): 4066.
- [17] 赵鹤鹤, 冀天娇, 杨倩, 等. 柯萨奇病毒 A 组 9 型的基因分型方法的建立[J]. *病毒学报*, 2022, 38(2): 264–270.
- [18] 田炳均, 赵智娴, 张杰, 等. 云南省肠道病毒 96 型的分子生物学鉴定[J]. *中国计划免疫*, 2007(6): 560–563.
- [19] ZHANG Y, SUN Q, CUI H, et al. Circulation of multiple serotypes of highly divergent enterovirus C in the Xinjiang Uighur Autonomous Region of China[J]. *Sci Rep*, 2016, 6: 33595.
- [20] HU L, ZHANG Y, HONG M, et al. Phylogenetic analysis and phenotypic characteristics of two Tibet EV-C96 strains[J]. *Virol J*, 2019, 16(1): 40.
- [21] 胡岚. 肠道病毒 C 组 96 型 (EV-C96) 的起源、进化及生物学特征的研究[D]. 北京: 中国疾病预防控制中心, 2015.
- [22] HU D Y, IRVING A T. Massively-multiplexed epitope mapping techniques for viral antigen discovery[J]. *Front Immunol*, 2023, 14: 1192385.
- [23] SRIVASTAVA P, JAIN C K. Computeraided reverse vaccinology: a game-changer approach for vaccine development[J]. *Comb Chem High Throughput Screen*, 2023, 26(10): 1813–1821.
- [24] DENG H X, YU S, GUO Y Z, et al. Development of a multivalent enterovirus subunit vaccine based on immunoinformatic design principles for the prevention of HFMD[J]. *Vaccine*, 2020, 38(20): 3671–3681.
- [25] HUANG S C, ZHANG C C, LI J N, et al. Designing a multi-epitope vaccine against coxsackievirus B based on immunoinformatics approaches[J]. *Front Immunol*, 2022, 13: 933594.
- [26] WANG L P, ZHU M, FANG Y L, et al. Bioinformatics-based prediction of conformational epitopes for Enterovirus A71 and Coxsackievirus A16[J]. *Sci Rep*, 2021, 11(1): 5701.
- [27] ZHANG J H, HUANG H Q, XU L, et al. Screening and identification of linear B cell epitopes within the nonstructural proteins of enterovirus 71[J]. *Viral Immunol*, 2019, 32(2): 84–88.
- [28] ZHU H Y, LIU X, WU Y, et al. Identification of a neutralizing linear epitope within the VP1 protein of coxsackievirus A10[J]. *Virol J*, 2022, 19(1): 203.
- [29] 陈俊伊, 唐弘, 庄稀尧, 等. EV-D68 VP1 蛋白的生物信息学分析和候选疫苗表位肽段预测及筛选[J]. *中国免疫学杂志*, 2020, 36(15): 1809–1813.
- [30] 张科, 王涵, 王瑜, 等. 长角血痹蛋白质二硫键异构酶-2 的生物信息学分析[J]. *基因组学与应用生物学*, 2021, 40(2): 2497–2504.

[收稿日期: 2023-11-29]

[责任编辑: 涂剑, 向秋 英文编辑: 周寿红]