

[文章编号] 1671-587X(2025)06-1717-11

DOI:10.13481/j.1671-587X.20250629

柯萨奇病毒A16型病毒Vp1蛋白的原核表达、纯化及兔多克隆抗体的制备

王家宁^{1,2}, 刘永娟³, 冉凯凯⁴, 孙宾莲^{1,2}, 史颖颖^{1,2}

(1. 江汉大学湖北省认知与情感障碍重点实验室, 湖北 武汉 430056; 2. 江汉大学基础医学院免疫学教研室, 湖北 武汉 430056; 3. 徐州医科大学附属连云港市第一人民医院中心实验室, 江苏 连云港 222002; 4. 武汉迈思生物科技有限公司, 湖北 武汉 430206)

[摘要] **目的:** 构建柯萨奇病毒A16型(CA16)病毒病毒蛋白1(Vp1)的原核表达载体, 并在大肠杆菌(*E. coli*) BL21中进行表达, 纯化蛋白后制备兔多克隆抗体并对抗体免疫反应性进行鉴定。**方法:** 利用生物信息学在线工具对Vp1蛋白氨基酸组成、保守结构域、二级和三级结构进行预测。扩增CA16的Vp1基因, 并将其克隆至原核表达载体pET28a(+)中。将pET28a-Vp1转化*E. coli* BL21, 利用异丙基-β-D-硫代半乳糖苷(IPTG)诱导表达。采用Western blotting法鉴定Vp1蛋白诱导表达情况, 并优化诱导时间和温度以提高表达效率。取2只雌性SPF新西兰大白兔, 将纯化的重组蛋白Vp1免疫兔, 制备兔抗Vp1蛋白多克隆抗体, 通过酶联免疫吸附试验(ELISA)法测定抗体效价, Western blotting法对抗体的免疫反应性进行鉴定。**结果:** 生物信息学分析, Vp1基因编码297个氨基酸, 相对分子质量为33 046.39, 等电点为8.32, 属于亲水性蛋白; 二级结构中α-螺旋占15.15%, 无规则卷曲占67.68%, 延伸链占17.17%。重组质粒pET28a-Vp1测序, pET28a-Vp1质粒构建正确。Western blotting法检测, IPTG诱导组于相对分子质量33 000处有目的蛋白表达, 目的蛋白主要表达于包涵体中。蛋白最佳诱导表达条件为IPTG浓度0.4 mmol·L⁻¹、温度16℃和诱导时间20 h。ELISA法检测, 兔多克隆抗体效价为1:1 024 000。Western blotting法检测, Vp1兔多克隆抗体可以与CA16感染细胞中的病毒Vp1蛋白结合。**结论:** 成功制备出抗CA16 Vp1的多克隆抗体, 该抗体对CA16 Vp1具有明显的结合特性, 可用于肠道病毒感染的诊断及治疗方法的开发。

[关键词] 柯萨奇病毒A16型; 病毒蛋白1; 原核表达; 多克隆抗体; 大肠杆菌

[中图分类号] R373.2 **[文献标志码]** A

Prokaryotic expression, purification of coxsackievirus A16 Vp1 protein and preparation of rabbit polyclonal antibodies

WANG Jianing^{1,2}, LIU Yongjuan³, RAN Kaikai⁴, SUN Binlian^{1,2}, SHI Yingying^{1,2}

(1. Hubei Provincial Key Laboratory of Cognitive and Affective Disorders, Jiangnan University, Wuhan 430056, China; 2. Department of Immunology, School of Basic Medical Sciences, Jiangnan University, Wuhan 430056, China; 3. Central Laboratory, Affiliated First People's Hospital, Lianyungang City,

[收稿日期] 2024-11-25 [录用日期] 2025-01-16

[基金项目] 国家自然科学基金青年基金项目(82202494); 湖北省科技厅自然科学基金项目(2018CFB254); 湖北省武汉市卫健委新冠肺炎应急科研专项项目(EX20D04); 江汉大学校级科研资助计划项目(2023KJZX27)

[作者简介] 王家宁(1999-), 女, 山东省临沂市人, 在读硕士研究生, 主要从事抗肠道病毒药物筛选方面的研究。

[通信作者] 史颖颖, 副教授, 硕士研究生导师(E-mail: shiyingying@126.com)

©《吉林大学学报(医学版)》编辑部, 开放获取遵循CC BY-NC-ND协议。

© Editorial Board of Journal of Jilin University (Medicine Edition). Open access under CC BY-NC-ND license.

Xuzhou Medical University, Lianyungang 222002, China; 4. Wuhan Mabnus Biotechnology Co. Ltd.,
Wuhan 430206, China)

ABSTRACT **Objective:** To construct the prokaryotic expression vector of Coxsackievirus A16 (CA16) viral protein 1 (Vp1), express it in *Escherichia coli* (*E. coli*) BL21, purify the protein, prepare rabbit polyclonal antibodies, and identify the immunoreactivity of the antibodies. **Methods:** Bioinformatics online tools were used to predict the amino acid composition, conserved domains, secondary and tertiary structures of the Vp1 protein. The Vp1 gene of CA16 was amplified and cloned into the prokaryotic expression vector pET28a(+). The pET28a-Vp1 was transformed into *E. coli* BL21, and the expression was induced using isopropyl β -D-thiogalactopyranoside (IPTG). Western blotting method was used to identify the induced expression of Vp1 protein, and the induction time and temperature were optimized to improve the expression efficiency. Two female SPF New Zealand white rabbits were taken, and the purified recombinant protein Vp1 was used to immunize the rabbits to prepare rabbit anti-Vp1 protein polyclonal antibodies. The antibody titer was determined by ELISA method, and the immunoreactivity of the antibodies was identified by Western blotting method. **Results:** The bioinformatics analysis results showed that the Vp1 gene encoded 297 amino acids, with a relative molecular mass of 33 046.39 and an isoelectric point of 8.32, belonging to a hydrophilic protein; in the secondary structure, α -helix accounted for 15.15%, random coil accounted for 67.68%, and extended strand accounted for 17.17%. Sequencing of the recombinant plasmid pET28a-Vp1 confirmed that the pET28a-Vp1 plasmid was correctly constructed. The Western blotting results showed that the target protein was expressed in the IPTG induction group at a relative molecular mass of 33 000, and the target protein was mainly expressed in inclusion bodies. The optimal induction conditions for protein expression were IPTG concentration of $0.4 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$, temperature of $16 \text{ }^\circ\text{C}$, and induction time of 20 h. The ELISA assay results showed that the titer of the rabbit polyclonal antibody was 1 : 1 024 000. The Western blotting results showed that the Vp1 rabbit polyclonal antibody could bind to the viral Vp1 protein in the CA16-infected cells. **Conclusion:** The polyclonal antibody against CA16 Vp1 is successfully prepared, and this antibody has significant binding characteristics to CA16 Vp1, which can be used for the diagnosis of enterovirus infection and the development of treatment methods.

KEYWORDS Coxsackievirus A16; Viral protein 1; Prokaryotic expression; Polyclonal antibody; *Escherichia coli*

柯萨奇病毒 A16 型 (coxsackievirus A16, CA16) 属于小核糖核酸病毒科中的肠道病毒属, 属于人类肠道病毒 A 型^[1]。该病毒颗粒呈二十面体立体对称的球形结构, 直径为 24~30 nm, 表面无包膜及突起结构^[2]。CA16 病毒感染所引发的主要临床症状为手足口病 (hand-foot-mouth disease, HFMD), 其特征为手部、足部及口腔出现皮疹、疱疹和水疱等表现, 常伴随发热、厌食及精神萎靡等症状^[3-5]。大多数病例病情较轻且具有自限性, 但也有少数病例病情进展迅速, 并可能出现严重的并发症^[3-5]。近年流行病学调查^[6-9]显示: CA16 感染引发的 HFMD 在亚太地区仍然保持高发态势。

目前, 针对 CA16 的治疗主要以对症支持为主, 尚无特效药物^[10]。中国已上市的针对肠道病

毒 71 型 (enterovirus 71, EV71) 的灭活疫苗对 CA16 感染无明显交叉保护作用^[11-12]。关于 CA16 疫苗的研究大多处于临床前阶段, 部分候选疫苗在动物模型中显示出良好的保护效果, 但距离上市仍需时间^[13-14]。病毒蛋白 1 (viral protein 1, Vp1) 是 CA16 最主要的衣壳蛋白之一, 直接决定病毒的抗原性^[15]; 其为中和抗体的重要靶位, 能够影响病毒的感染性和致病性^[16-18]。尽管 Vp1 蛋白作为研究 CA16 的主要目标而被广泛关注, 但是目前对 CA16 Vp1 免疫性方面的研究仍然较少。本研究探讨 CA16 Vp1 的大肠杆菌 (*Escherichia coli*, *E. coli*) 原核表达系统和表达条件, 纯化蛋白并制备血清抗体, 为 CA16 相关的基础研究及肠道病毒诊断和治疗试剂开发提供参考。

1 材料与amp;方法

1.1 实验动物、细胞、主要试剂和仪器 2只雌性 SPF级新西兰大白兔(4月龄, 体质量 2.1 kg) 购于武汉万千佳兴生物科技有限公司, 实验动物生产许可证号: SCXK(沪)2007-0005。 *E. coli* DH5 α 和 *E. coli* BL21 (DE3) 化学感受态细胞(上海 TOLOBIO 公司), 原核表达载体 pET28a (+)、绿猴肾细胞(Vero 细胞)和 CA16 由江汉大学湖北省认知与情感障碍重点实验室保存。DNA 无缝克隆试剂盒(南京诺唯赞生物科技股份有限公司), KOD-Plus-Neo 聚合酶[东洋纺(上海)生物科技股份有限公司], 异丙基- β -D-硫代半乳糖苷(isopropyl β -D-1-thiogalactopyranoside, IPTG)(德国 BIOFROXX 公司), 抗组氨酸(histidine, His) 标签抗体(美国 Proteintech Group 公司), HRP 标记的二抗(武汉博士德公司), Premix Taq™ 和 DNA Ladder 5000 DNA marker (DL5000 DNA marker)(日本 TaKaRa 公司), 蛋白 Marker(武汉 ABclonal 公司), 牛血清白蛋白(bovine albumin, BSA)(北京 Biosharp 公司), 考马斯亮蓝染色液(上海碧云天公司), His 标签镍(Nickel, Ni) 离子蛋白纯化柱(美国 GenScript 公司), DMEM 培养基和 0.25% 胰酶(美国 Gibco 公司), 弗氏完全佐剂和弗氏不完全佐剂(美国 Sigma 公司), HRP 标记山羊抗兔 IgG(武汉迈思生物科技股份有限公司)。Multi skan GO 酶标仪(美国 Thermo Fisher Scientific 公司), HF90/HF240 CO₂ 培养箱(上海 HEAL FORCE 公司), II 级生物安全柜(北京东联哈尔仪器制造有限公司), PCR 仪和自动化学发光成像仪(美国 Bio-Rad 公司), QuickGel 6100 凝胶成像系统(武汉莫纳生物科技股份有限公司)。

1.2 Vp1 蛋白生物信息学分析 利用瑞士生物信息学数据库和资源中心 ExPasy 网站的 ProtParam (<https://web.expasy.org/protparam/>) 工具及 ProtScale (<https://web.expasy.org/protscale/>) 工具分析蛋白的理化性质和亲/疏水性。采用 SOPMA 二级结构预测分析软件(https://npsa-prabi.ibcp.fr/cgi-bin/npsa_automat.pl?page=npsa_sopma.html) 和瑞士生物信息学研究所同源建模服务器 SWISS-MODEL (<https://swissmodel.expasy.org/>) 对目的蛋白二级及三级结构进行预测。

1.3 pET28a-Vp1 的构建和鉴定 根据载体 pET28a (+) 序列信息和 CA16-Vp1 的序列信息

(NCBI Genebank 登录号 KM516102), 登陆诺唯赞官网下载引物设计软件 CEDesign (<http://www.vazyme.com>), 依据同源重组引物设计原则设计克隆引物。载体线性化引物设计: pET28a(+)-F 5'-TAACAAAGCCCGAAAGGAAGC-3'; pET28a(+)-R 5'-GTGATGATGATGATGATGGCTG-3'。Vp1 同源重组引物设计(大写碱基为同源臂): pET28a-Vp1-F 5'-ACGCGTCGACGTGGGGATC-CCATTGCAGACATGA-3', pET28a-Vp1-R 5'-CCGCTCGAGTTACAACGTTGTTATCTTATCTCTA-3'; 引物送至生工生物工程(上海)股份有限公司合成。以 pGEM-T-CA16 为模板, 经 pET28a-Vp1-F 和 pET28a-Vp1-R 引物进行扩增, 获得 Vp1 片段^[19]。

CA16 Vp1 片段扩增反应条件如下: 94 °C 预变性 2 min, 94 °C 变性 15 s, 52 °C 退火 30 s, 68 °C 延伸 60 s, 30 个循环; 72 °C 延伸 5 min。PCR 产物经 2% 琼脂糖凝胶电泳进行鉴定, 通过胶回收试剂盒进行回收。于冰上配制反应体系, 线性化载体, 插入目的基因片段。使用移液器吹打混匀, 短暂离心后 37 °C 反应 30 min, 立即置于冰上冷却。然后将连接后的产物转化 *E. coli* 感受态细胞 DH5 α 。继续于 37 °C 培养箱中倒置培养 12~16 h 后观察平板上单菌落生长情况, 挑取单菌落进行菌液 PCR 鉴定。

取八连管, 用灭菌枪头从转化平板上挑取约 8 个单菌落, 然后将挑取单菌落的枪头依次打入对应管中, 分别加入 1 mL 卡那霉素抗性 LB 培养基, 37 °C 摇床培养 4 h, 以菌液为模板进行 PCR。菌液 PCR 产物进行琼脂糖凝胶电泳, 若可以扩增出单一约 891 bp 的条带则初步判断为鉴定阳性的菌落。鉴定阳性的菌落进一步提取质粒, 送往生工生物工程(上海)股份有限公司进行测序, 测序结果与目的片段相符, 表明原核表达载体 pET28a-Vp1 构建成功。

1.4 Vp1 重组蛋白诱导表达和表达条件优化 将测序正确的 pET28a-Vp1 质粒转化 *E. coli* 感受态 BL21 细胞。次日, 挑取单菌落于 10 mL 卡那霉素抗性的液体 LB 培养基中, 37 °C 摇床, 220 r·min⁻¹ 继续培养 10~12 h 备用。将试管中的菌液按 1:100 的比例加入到新的卡那霉素抗性的液体 LB 培养基中。在 37 °C 摇床、220 r·min⁻¹ 继续摇菌, 待菌液波长 600 nm 处吸光度(A) 值达到 0.4~0.6 时, 取出 1 mL 作为阴性对照(不加 IPTG 诱导组)。然后加入

IPTG (终浓度 $0.4\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$)进行诱导。为进一步分析重组蛋白诱导表达的更优条件,选择了不同的诱导温度($20\text{ }^{\circ}\text{C}$ 和 $16\text{ }^{\circ}\text{C}$)和不同的诱导时间(5和20 h)。

诱导结束后,先取出 1 mL (+IPTG)菌液进行检测。将取出的 1 mL 诱导(+IPTG)菌液和 1 mL 未诱导(-IPTG)阴性对照样品, $12\ 000\text{ r}\cdot\text{min}^{-1}$ 离心 1 min ,弃上清。用 $50\ \mu\text{L}$ (菌体体积的 $1/20$)磷酸盐缓冲液(phosphate buffered saline, PBS)重悬洗涤菌体,再次离心。加入 $500\ \mu\text{L}$ PBS缓冲液重悬,随后各取 $50\ \mu\text{L}$ 标记为全菌样品和阴性对照(-IPTG)样品。将剩余 $450\ \mu\text{L}$ (+IPTG)菌液用小型的超声破碎仪器进行超声,重复4~5次,直到菌体由浑浊变清亮即可。超声后菌体 $12\ 000\text{ r}\cdot\text{min}^{-1}$ 离心 1 min ,分离上清与沉淀。将上清和沉淀各取 $50\ \mu\text{L}$ 至新的EP管,与全菌样品和阴性对照(-IPTG)样品一起加入十二烷基磺酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳(sodium lauryl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis, SDS-PAGE)上样缓冲液, $100\text{ }^{\circ}\text{C}$ 煮样 5 min , $12\ 000\text{ r}\cdot\text{min}^{-1}$ 离心 5 min ,取上清点样。同时取2块胶进行相同样品的重复点样,其中一块胶进行考马斯亮蓝染色,另外一块胶采用Western blotting法检测His蛋白表达情况。通过考马斯亮蓝染色或采用全自动化学发光成像仪,观察各组样品中CA16-Vp1蛋白于相对分子质量 $33\ 000$ 附近是否有条带和条带强弱以判断蛋白表达情况。

1.5 Vp1重组蛋白包涵体纯化 pET28a-Vp1质粒在Vp1上游偶联有His标签,因此可以通过His抗体检测Vp1的表达。收集空载体组(pET空载),诱导前(pET-Vp1-IPTG)和诱导后(pET-Vp1+IPTG)各组细胞样品,平行点样(相同的蛋白样品同时上样两块SDS-PAGE胶)。其中一块胶进行考马斯亮蓝染色,另外一块胶采用Western blotting法检测。蛋白纯化所用镍柱中的Ni与His蛋白和咪唑结合,首先将破碎好的目的蛋白溶液加入Ni柱中,大部分目的蛋白会结合在Ni柱上,流穿液中大多为杂蛋白。同时Ni柱上会残留少许杂蛋白,可以先用低浓度的咪唑洗脱杂蛋白。随着咪唑浓度的增加,加入咪唑后,高浓度咪唑会与目的蛋白竞争性结合Ni柱,使之前结合的目的蛋白被洗脱下来。

通过预实验检测IPTG诱导前后和蛋白超声前后的蛋白样品,预实验结果显示:重组蛋白Vp1主要分布于包涵体中,在蛋白超声后,可见蛋白液并未变得清亮,相反越来越白,提示表达的蛋白在超

声破细胞后,主要以包涵体的形式存在于沉淀中,因此离心后收集沉淀。配制含 $8\text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 尿素PBS缓冲液 40 mL (现配现用),溶解包涵体沉淀,溶解过程中可适当超声。包涵体溶解后, $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 、 $10\ 000\text{ r}\cdot\text{min}^{-1}$ 离心 20 min 后,收集上清。将上清加入预先平衡的Ni柱中使其与Ni填料结合,让Ni填料珠子与样品中的His蛋白充分混匀和结合。配制含 $8\text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 尿素的 20 、 50 、 80 、 250 和 $500\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 咪唑洗脱液(现配现用),并依次添加加入Ni柱,以洗脱目的蛋白,同时分别收集不同洗脱组分。将收集的蛋白各自取出 $50\ \mu\text{L}$ 制样,并采用考马斯亮蓝和Western blotting法检测。通过考马斯亮蓝染色或采用全自动化学发光成像仪,观察各组样品中CA16-Vp1蛋白于相对分子质量 $33\ 000$ 附近是否有条带和条带强弱以判断蛋白表达情况。

1.6 兔多克隆抗体的制备 选用SPF级健康雌性新西兰大白兔2只,2只兔均通过背部多点皮下免疫。初次免疫抗原为每只兔 0.4 mg 重组蛋白与等体积弗氏完全佐剂混匀乳化,第2、3和4次免疫抗原为每只兔 0.2 mg 重组蛋白与等体积弗氏不完全佐剂混匀乳化。第1次免疫:第1天,免疫用抗原为弗氏完全佐剂+重组蛋白;第2次免疫:第14天,免疫用抗原为弗氏不完全佐剂+重组蛋白;第3次免疫:第28天,免疫用抗原为弗氏不完全佐剂+重组蛋白;3次免疫后采血:第35天,耳静脉采血 1 mL ,离心分离血清,对血清进行梯度稀释($1\sim 12$ 孔),通过间接酶联免疫吸附试验(enzyme linked immunosorbent assay, ELISA)法进行效价测定;第4次免疫:第42天,免疫用抗原为弗氏不完全佐剂+重组蛋白;最终放血:第49天,颈动脉采全血,ELISA法检测抗血清效价。

1.7 间接ELISA法检测抗血清效价 实验同时免疫2只大白兔,分别取2只大白兔的血进行抗体滴度测定,在滴度测定时分组为Group A和Group B。对收集的血清进行梯度稀释($1\sim 12$ 孔),分别对血清进行 $1\ 000$ 、 $2\ 000$ 、 $4\ 000$ 、 $8\ 000$ 、 $16\ 000$ 、 $32\ 000$ 、 $64\ 000$ 、 $128\ 000$ 、 $256\ 000$ 、 $512\ 000$ 和 $1\ 024\ 000$ 倍稀释,检测抗血清效价。将抗原用 $0.05\text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 碳酸盐($\text{pH}=9.6$)稀释至 $6\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$,每孔 $100\ \mu\text{L}$, $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 孵育过夜进行抗原包被。取出抗原用含 0.05% Tween-20的PBST溶液洗板3次,每次 3 min 。每孔加入PBST稀释的 5% 脱脂奶粉 $150\ \mu\text{L}$ 封闭液, $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ 封闭 60 min 。取出用含 0.05% Tween-20的

PBST 溶液洗涤 3 次, 每次 3 min。将抗体分别按照比例稀释, 37 °C 孵育 1 h, 加入一抗。取出抗体用含 0.05% Tween-20 的 PBST 溶液洗涤 3 次, 每次 3 min。HRP 标记山羊抗兔 IgG (1: 8 000), 37 °C 孵育 45 min, 加入二抗。用含 0.05% Tween-20 的 PBST 溶液洗涤 5 次, 每次 3 min。加入底物 TMB 溶液, 每孔 100 μ L, 反应 5~10 min, 最后加入 100 μ L 2 mol·L⁻¹ 硫酸终止反应, 显色。采用酶标仪测定波长 450 nm 处 A 值, 以出现明显颜色反应血清的最大稀释倍数判定为血清效价。

1.8 兔抗 Vp1 抗血清的免疫反应性检测 采用制备的 CA16-Vp1 多克隆抗体对感染 CA16 的 Vero 细胞中的 Vp1 蛋白表达进行蛋白质印迹测定。将 CA16 按感染复数 (multiplicity of infection, MOI) 为 0.01 接种 Vero 细胞, 37 °C 培养 24 h 收集蛋白样品, 加入上样缓冲液, 100 °C 加热 8~10 min 使其变性后, 经 12% SDS-PAGE 分离, 转印到 PVDF 膜后, 置于含 5% 脱脂奶粉的 TBST 溶液中室温封闭 2 h; 加入 Vp1 抗血清 (1: 1 000), 4 °C 孵育过夜; TBST 溶液洗涤 5~6 次, 加入 HRP 标记的羊抗兔 IgG 二抗 (1: 5 000), 室温孵育 2 h; TBST 溶液洗涤 5~6 次, 加入显色剂显色。采用全自动化学发光成像仪, 观察各组样品中 Vp1 蛋白于相对分子质量 33 000 附近是否有条带和条带强弱以判断抗血清与病毒 Vp1 蛋白结合的免疫反应性。

2 结果

2.1 Vp1 蛋白的理化性质 Vp1 基因含有 297 个氨基酸残基, 相对分子质量为 33 046.39, 等电点为 8.32, 不稳定指数为 41.15。氨基酸组成分析结果显示: 苏氨酸占比 10.1%, 丙氨酸占比 7.7%, 脯氨酸占比 7.4%。见表 1。

2.2 Vp1 蛋白的亲水和疏水性 亲水性最低值为第 277 位的脯氨酸 (-2.478), 疏水性最高值为第 90 位的缬氨酸 (2.089)。见图 1。低分值 (分值 < 0 分) 的氨基酸占比较大, 表明 Vp1 蛋白属于亲水性蛋白。

2.3 Vp1 蛋白二级结构和三级结构 Vp1 蛋白 α -螺旋占 15.15%, 无规则卷曲占 67.68%, 延伸链占 17.17%。见图 2 和 3。

2.4 重组表达质粒 pET28a-Vp1 鉴定 于约 891 bp 处有扩增条带, 条带大小与预期结果一致 (图 4A)。同时以 pET28a 载体为模板进行扩增, 得到线性化载体, 琼脂糖凝胶结果显示: 于约 5 300 bp 处有扩

表 1 Vp1 的氨基酸组成分析

Tab. 1 Analysis of amino acid composition of Vp1

Amino acid	Number [n(η /%)]	Amino acid	Number [n(η /%)]
Alanine (A)	23(7.7)	Leucine (L)	20(6.7)
Arginine (R)	15(5.1)	Lysine (K)	11(3.7)
Asparagine (N)	19(6.4)	Methionine (M)	10(3.4)
Aspartic acid (D)	15(5.1)	Phenylalanine (F)	13(4.4)
Cysteine (C)	4(1.3)	Proline (P)	22(7.4)
Glutamine (Q)	15(5.1)	Serine (S)	20(6.7)
Glutamic acid (E)	9(3.0)	Threonine (T)	30(10.1)
Glycine (G)	17(5.7)	Tryptophan (W)	4(1.3)
Histidine (H)	6(2.0)	Tyrosine (Y)	12(4.0)
Isoleucine (I)	13(4.4)	Valine (V)	19(6.4)

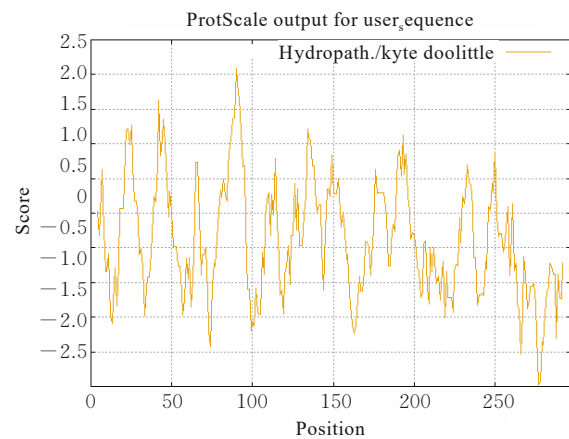


图 1 Vp1 蛋白亲水和疏水性分析

Fig. 1 Hydrophilic/hydrophobic analysis of Vp1 protein

增条带, 与预期结果一致 (图 4A)。对重组质粒 pET28a-Vp1 通过菌液 PCR 进行鉴定, 菌液 PCR 结果与预期相符 (图 4B)。进一步提取阳性克隆质粒并将质粒送生工生物工程 (上海) 股份有限公司进行 Sanger 测序 (双脱氧链终止法), 测序结果与目的片段相符。

2.5 重组蛋白表达和诱导条件优化 与空载体 (pET 空载) 和诱导前 (pET-Vp1-IPTG) 组比较, 诱导后 (pET-Vp1+IPTG) 组可观察到于相对分子质量 33 000 处有一明显高表达的蛋白条带。而空载体组和诱导前组均未见对应的蛋白条带 (图 5), 表明可能成功诱导表达了重组蛋白。进一步对全菌、上清和沉淀中目的蛋白的表达情况进行分析, 结果显示: 重组蛋白主要在沉淀中, 提示该蛋白可能主要以包涵体形式表达。

比较各组总蛋白和杂蛋白条带数量, 16 °C 诱

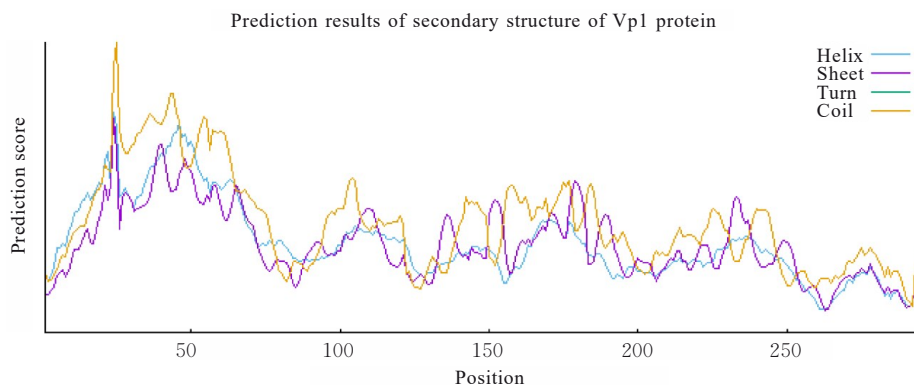


图2 Vp1蛋白二级结构

Fig. 2 Secondary structures of Vp1 protein

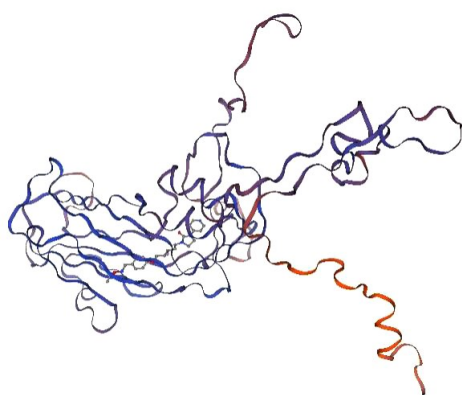


图3 Vp1蛋白三级结构

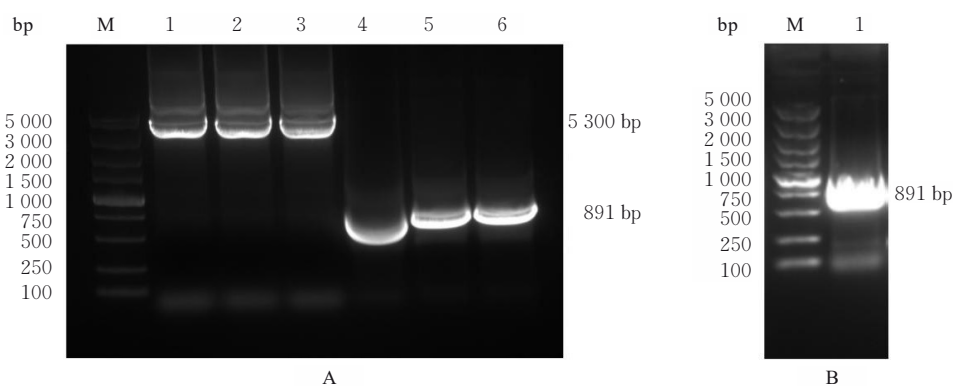
Fig. 3 Tertiary structures of Vp1 protein

导20 h组的总蛋白量较高,而且杂蛋白相对较少,更加有利于后续的纯化。因此在后续的大量诱导表达中选择了16℃诱导20 h。见图6~8。

考马斯亮蓝染色和Western blotting的检测结果显示出一致性和对应性。诱导后在全菌和沉淀中于相对分子质量33 000处均有一条高表达的蛋白,该蛋白同时可以通过His抗体检测出来。见图9。

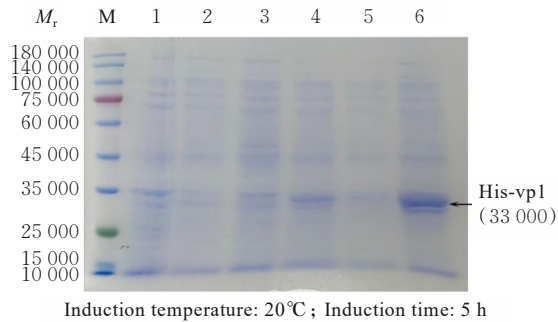
2.6 重组蛋白的包涵体纯化 250~500 mmol·L⁻¹咪唑可以有效洗脱出纯度较高的目的蛋白。通过跟已知浓度的BSA标准蛋白进行比较,本研究选取浓度和纯度较高的6~9管洗脱液进行后续实验。

2.7 兔多克隆抗体效价检测 1~12孔随着血清稀释度的增加,反应孔的颜色逐渐变淡。在第12孔,1:1 024 000稀释孔仍然可以观察到黄色。根据血清效价的评价标准在1:1 024 000稀释后,仍然可以检测到抗体,提示本研究免疫家兔制备的抗血清效价不低于1:1 024 000,达到预期的效价。见图10和表2。



A: Results of agarose electrophoresis (M: DNA marker; Lane 1, 2, 3: Linearized products obtained from pET28a vector through PCR amplification; Lane 4, 5, 6: PCR amplification of *Vp1* gene); B: Results of agarose electrophoresis (M: DNA marker; Lane 1: PCR results of pET28a-Vp1 bacterial solution).

图4 *Vp1*基因和载体线性化质粒PCR产物凝胶电泳图Fig. 4 Gel electrophoresis of PCR products of *Vp1* gene and linearized plasmids

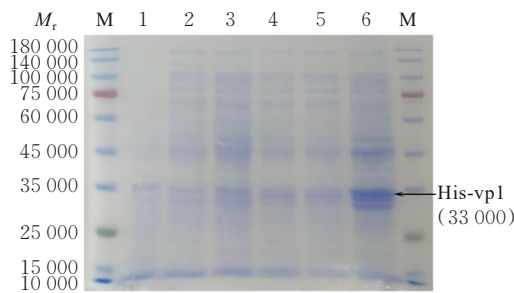


Induction temperature: 20°C; Induction time: 5 h

M: Protein marker; Lane 1: BL21 cells (whole cells); Lane 2: pET empty vector + IPTG ($0.4 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$) (whole cells); Lane 3: pET-Vp1 - IPTG (whole cells); Lane 4: pET-Vp1 + IPTG ($0.4 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$) (whole cells); Lane 5: pET-Vp1 + IPTG ($0.4 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$) (supernatant); Lane 6: pET-Vp1 + IPTG ($0.4 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$) (precipitate).

图5 重组 Vp1 蛋白诱导表达的考马斯亮蓝染色结果

Fig. 5 Coomassie bright blue staining results of recombinant Vp1 protein induced expression



Induction temperature: 20°C; Induction time: 20 h

M: Protein marker; Lane 1: BL21 cells (whole cells); Lane 2: pET empty vector + IPTG ($0.4 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$) (whole cells); Lane 3: pET-Vp1 - IPTG (whole cells); Lane 4: pET-Vp1 + IPTG ($0.4 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$) (whole cells); Lane 5: pET-Vp1 + IPTG ($0.4 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$) (supernatant); Lane 6: pET-Vp1 + IPTG ($0.4 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$) (precipitate). Note: Expression time adjusted from 5 h to 20 h.

图6 重组 Vp1 蛋白诱导表达时间优化的考马斯亮蓝染色结果

Fig. 6 Coomassie bright blue staining results of expression time optimization induced by recombinant Vp1 protein

2.8 兔多克隆抗体的免疫反应性检测 与不感染病毒的对照组比较, CA16 感染组中可以检测到制备的兔多克隆抗体与病毒蛋白 Vp1 结合的蛋白条带表达。见图 11。

3 讨论

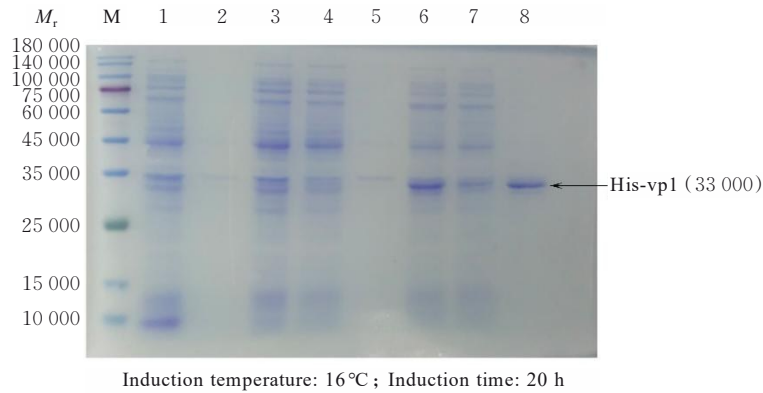
CA16 病毒的 Vp1 蛋白位于病毒颗粒的表面, 是主要的衣壳蛋白之一^[20]。Vp1 蛋白由 297 个氨基

酸组成, Vp1 中存在的“峡谷样凹陷”是病毒识别、附着及结合宿主细胞的关键位点^[21-22]。此外, Vp1 蛋白中的疏水性口袋在病毒的脱衣壳过程中发挥重要作用。在基础研究中, 深入理解 Vp1 蛋白的结构和功能有助于揭示病毒的感染机制及宿主范围, 为抗病毒策略的开发提供重要依据^[15-16]。在疫苗研发方面, Vp1 蛋白包含多个中和表位, 是疫苗开发的关键靶点^[23]。

E. coli 表达系统是一种广泛使用的原核表达系统^[24], 该蛋白表达系统的优点包括高产量、低成本、快速繁殖、遗传操作简便、转化效率高和适用于多种异源蛋白的表达^[25]。由于 *E. coli* 作为原核生物, 缺乏内质网和高尔基体等真核细胞特有的细胞器, 蛋白质合成后期的修饰和加工能力较差, 导致合成的蛋白常以包涵体形式出现^[25]。李丹等^[26]利用 *E. coli* BL21 (DE3)、Rosetta (DE3) 和 BL21 (PLySs) 感受态细胞表达重组质粒 pET28a-PPRV H, 外源蛋白主要以包涵体形式表达, 主要出现在沉淀中。张喜文等^[27]利用 *E. coli* Rosetta (DE3) 感受态细胞表达鸭坦布苏病毒 NS1 蛋白, 重组蛋白呈包涵体形式表达。与此相同, 本研究中 CA16 Vp1 蛋白呈包涵体形式表达, 因此 CA16 Vp1 包涵体形式表达是今后需解决的问题之一。本研究以 pET-28a 为载体, 选择 *E. coli* 作为原核表达体系进行实验, 观察到重组 Vp1 蛋白的高表达。相关结果进一步证实了 pET-28a 作为载体和 *E. coli* 作为原核表达系统的有效性。

融合蛋白表达条件会对蛋白表达产量产生影响。张树军等^[28]研究发现: IPTG 的加入时机, 诱导剂 IPTG 的终浓度以及 IPTG 的诱导表达时间都是需要综合考虑的因素。已有研究^[29]表明: 在 $0.2 \sim 1.2 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 浓度范围内, 不同浓度 IPTG 对诱导表达的影响并不显著, 因此选择 IPTG 浓度为 $0.4 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 。本研究主要调整了诱导表达的温度和时间, 通过比较诱导 5 和 20 h 及 16°C 和 20°C 的条件, 发现目的蛋白的表达量并未明显增加。然而, 在 16°C 诱导 20 h 的实验组中, 杂蛋白的数量, 尤其是沉淀中杂蛋白的数量明显减少, 目的蛋白的条带相对较为单一。因此, 在后续的大规模诱导实验中, 选择了 16°C 诱导 20 h 的条件。

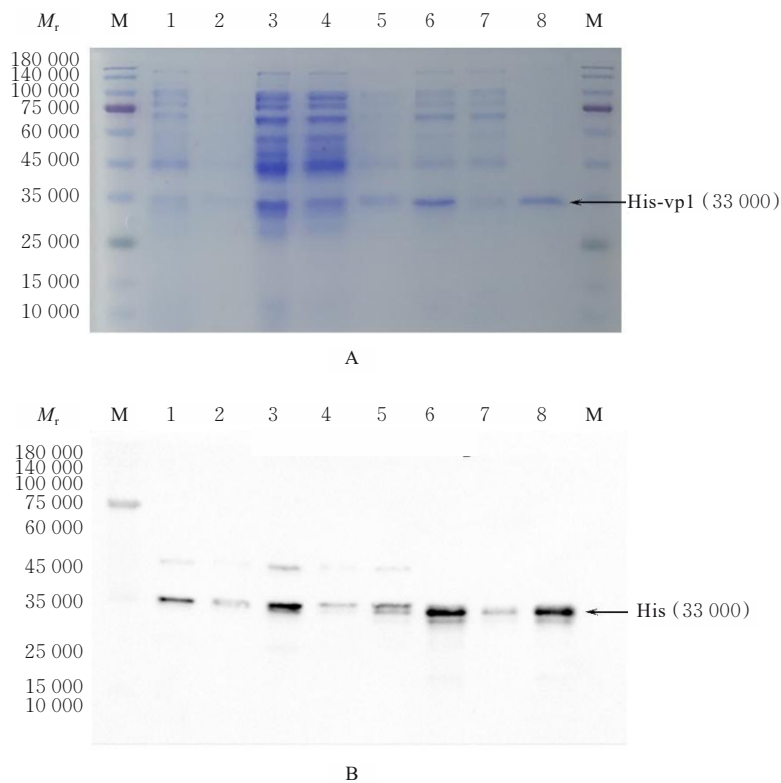
镍离子亲和层析柱 (Nickel-nitrilotriacetic acid affinity chromatography column, Ni-NTA) 纯化蛋白的原理主要基于 His 标签 (通常为 6 个连续的组



M: Protein marker; Lane 1: pET empty vector + IPTG ($0.4 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$) (whole cells); Lane 2: pET empty vector + IPTG ($0.4 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$) (precipitate); Lane 3: pET-Vp1-IPTG (whole cells); Lane 4: pET-Vp1-IPTG (supernatant); Lane 5: pET-Vp1-IPTG (precipitate); Lane 6: pET-Vp1 + IPTG ($0.4 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$) (whole cell); Lane 7: pET-Vp1 + IPTG ($0.4 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$) (supernatant); Lane 8: pET-Vp1 + IPTG ($0.4 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$) (precipitate). Note: Induction temperature adjusted 20°C to 16°C .

图7 重组Vp1蛋白诱导表达温度优化的考马斯亮蓝染色结果

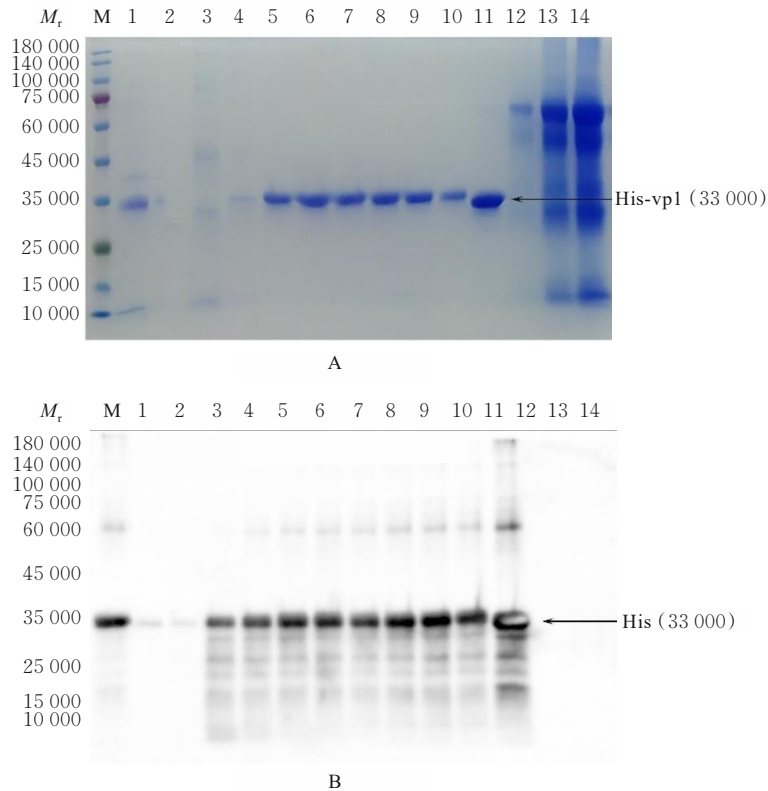
Fig. 7 Coomassie bright blue staining results of expression temperature optimization induced by recombinant Vp1 protein



M: Protein marker; Lane 1: pET empty vector + IPTG ($0.4 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$) (whole cells); Lane 2: pET empty vector + IPTG ($0.4 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$) (precipitate); Lane 3: pET-Vp1-IPTG (whole cells); Lane 4: pET-Vp1-IPTG (supernatant); Lane 5: pET-Vp1-IPTG (precipitate); Lane 6: pET-Vp1+IPTG ($0.4 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$) (whole cell); Lane 7: pET-Vp1+IPTG ($0.4 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$) (supernatant); Lane 8: pET-Vp1+IPTG ($0.4 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$) (precipitate).

图8 考马斯亮蓝染色(A)和Western blotting法(B)鉴定重组Vp1蛋白诱导表达

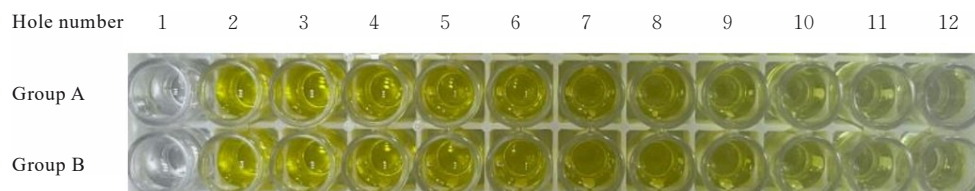
Fig. 8 Expression induced by recombinant Vp1 protein identified by Coomassie bright blue staining(A) and Western blotting method(B)



M: Protein marker; Lane 1: Flow-through liquid protein; Lane 2: Equilibration buffer; Lane 3: $20 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ imidazole elution buffer; Lane 4: $50 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ imidazole elution buffer; Lane 5–7: $250 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ imidazole elution buffer; Lane 8–10: $500 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ imidazole elution buffer; Lane 11: Ni column; Lane 12: BSA ($0.1 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$); Lane 13: BSA ($0.5 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$); Lane 14: BSA ($1 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$).

图9 考马斯亮蓝染色(A)和 Western blotting 法(B)鉴定纯化后重组 Vp1 蛋白表达

Fig. 9 Expression of recombinant Vp1 protein identified by Coomassie bright blue staining(A) and Western blotting method(B)



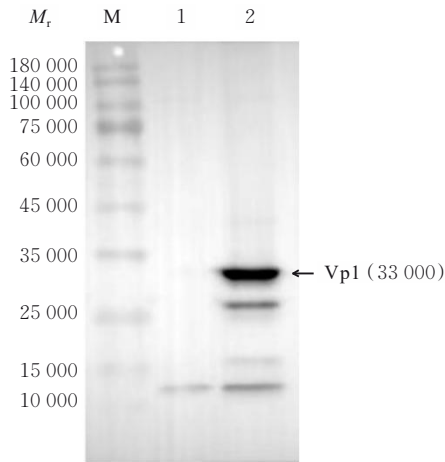
1: Control; 2: 1:1 000 rabbit polyclonal antibody; 3: 1:2 000 rabbit polyclonal antibody; 4: 1:4 000 rabbit polyclonal antibody; 5: 1:8 000 rabbit polyclonal antibody; 6: 1:16 000 rabbit polyclonal antibody; 7: 1:32 000 rabbit polyclonal antibody; 8: 1:64 000 rabbit polyclonal antibody; 9: 1:128 000 rabbit polyclonal antibody; 10: 1:256 000 rabbit polyclonal antibody; 11: 1:512 000 rabbit polyclonal antibody; 12: 1:1 024 000 rabbit polyclonal antibody.

图10 ELISA 法检测兔多克隆抗体效价

Fig. 10 Titer of rabbit polyclonal antibody detected ELISA method

表2 兔多克隆抗体效价
Tab. 2 Titers of rabbit polyclonal antibodies

Group	Titer of rabbit polyclonal antibody											
	Control	1 000	2 000	4 000	8 000	16 000	32 000	64 000	128 000	256 000	512 000	1 024 000
Group A	0.091	2.025	2.002	1.937	1.847	1.728	1.438	1.186	0.819	0.538	0.413	0.237
Group B	0.069	2.064	1.995	1.972	1.968	1.804	1.614	1.366	1.036	0.696	0.443	0.378



M: Protein marker; Lane 1: Control group; Lane 2: CA16 group.

图11 Western blotting法检测兔抗Vp1蛋白多克隆抗体

Fig. 11 Rabbit anti-Vp1 protein polyclonal antibodies detected by Western blotting method

氨酸残基,也称为6His)与 Ni^{2+} 之间的高亲和力结合^[30]。在本研究中, Vp1基因被构建在pET28a载体上,在目的基因的上游连接了His标签,因此可以通过Ni-NTA进行有效纯化。Ni-NTA纯化介质为Ni离子金属螯合介质,其中的 Ni^{2+} 能够特异性地与带有His标签的碱性蛋白结合,而其他杂蛋白则不与之结合。同时 Ni^{2+} 也能够与咪唑结合,因此可以通过低浓度的咪唑洗脱杂蛋白,而高浓度的咪唑则能够竞争性地结合 Ni^{2+} ,从而使目的蛋白被洗脱下来^[30]。

针对不同病毒的抗体交叉反应性对于诊断和免疫保护至关重要。ZHOU等^[31]研究发现:针对EV71和CA16的双特异性工程抗体表现出显著的交叉保护效果,在小鼠水平上不管是单个病毒感染还是共感染都表现出较好的保护效果,相关研究为用于抗肠道病毒感染的双特异性抗体工程的应用提供了重要见解。在另外一项研究^[32]中,利用EV71抗原免疫鸡,从鸡卵黄分离纯化IgY,结果显示: IgY在EV71和CA16株中均具有交叉结合特性,且IgY能剂量依赖性交叉阻断EV71和CA16菌株在RD细胞中的感染。本研究采用CA16 Vp1抗原免疫家兔制备多克隆抗体,结果显示:该抗体对EV71和CA16均具有交叉结合特性,提示在CA16 Vp1上可能存在可引发交叉反应的优势表位,具体位点尚待进一步深入研究。

综上所述,本研究采用*E. coli*原核表达系统,成功诱导表达重组Vp1蛋白重组蛋白免疫家兔制备

抗血清,抗体的效价高达1:1 024 000。制备的兔抗Vp1蛋白多克隆抗体能够结合CA16和EV71病毒蛋白Vp1。

利益冲突声明:

所有作者声明不存在利益冲突。

作者贡献声明:

王家宁、刘永娟和冉凯凯参与实验操作,孙宾莲参与论文撰写,史颖颖参与实验设计和论文撰写及审校。

[参考文献]

- [1] ZHANG C, LIU C X, SHI J P, et al. Molecular mechanism of antibody neutralization of coxsackievirus A16[J]. Nat Commun, 2022, 13(1): 7854.
- [2] REN J S, WANG X X, ZHU L, et al. Structures of coxsackievirus A16 capsids with native antigenicity: implications for particle expansion, receptor binding, and immunogenicity[J]. J Virol, 2015, 89(20): 10500-10511.
- [3] LEGAY F, LÉVÊQUE N, GACOUIN A, et al. Fatal coxsackievirus A-16 pneumonitis in adult [J]. Emerg Infect Dis, 2007, 13(7): 1084-1086.
- [4] GOTO K, SANEFUJI M, KUSUHARA K, et al. Rhombencephalitis and coxsackievirus A16 [J]. Emerg Infect Dis, 2009, 15(10): 1689-1691.
- [5] ASTRUP B S, JOHNSEN I B G, ENGSBRO A L. The role of Coxsackievirus A16 in a case of sudden unexplained death in an infant-A SUDI case[J]. Forensic Sci Int, 2016, 259: e9-13.
- [6] LIANG Z C, LIN C Y, HUO D, et al. First detection of multiple cases related to CV-A16 strain of B1c clade in Beijing in 2022[J]. J Med Virol, 2024, 96(7): e29796.
- [7] DIWATE S, YADAV P D, YADAV J, et al. Enterovirus Coxsackie A16 detected in hand, foot, and mouth disease outbreak among children in western Uttar pradesh, India, may to June 2022[J]. Asia Pac J Public Health, 2024, 36(1): 143-145.
- [8] NOISUMDAENG P, PUTHAVATHANA P. Molecular evolutionary dynamics of enterovirus A71, coxsackievirus A16 and coxsackievirus A6 causing hand, foot and mouth disease in Thailand, 2000-2022[J]. Sci Rep, 2023, 13(1): 17359.
- [9] LI R Q, LIN C Y, DONG S B, et al. Phylogenetics and phylogeographic characteristics of coxsackievirus A16 in hand foot and mouth disease and herpangina cases collected in Beijing, China from 2019 to 2021[J]. J Med

- Virology, 2023, 95(8): e28991.
- [10] YUAN X L, LIU Z W, WAN L, et al. Recent advances in anti-coxsackievirus A16 viral drug research[J]. Future Med Chem, 2023, 15(1): 97-117.
- [11] YANG D D, LIU W M, WANG W P, et al. Analysis of the impact of inactivated A71 vaccine on the incidence of hand-foot-mouth disease in Pudong new area, Shanghai[J]. Vaccines, 2024, 12(9): 962.
- [12] TAN X H, CHONG W L, LEE V S, et al. Substitution of coxsackievirus A16 VP1 BC and EF loop altered the protective immune responses in chimera enterovirus A71[J]. Vaccines, 2023, 11(8): 1363.
- [13] YI E J, KIM Y I, KIM S Y, et al. A bivalent inactivated vaccine prevents enterovirus 71 and coxsackievirus A16 infections in the Mongolian gerbil[J]. Biomol Ther, 2023, 31(3): 350-358.
- [14] YI E J, KIM Y I, SONG J H, et al. Potential of a bivalent vaccine for broad protection against enterovirus 71 and Coxsackie virus 16 infections causing hand, foot, and mouth disease[J]. Vaccine, 2023, 41(41): 6055-6063.
- [15] ZHANG G B, HU B, HUO Y Q, et al. Amino acid substitutions in VP2, VP1, and 2C attenuate a Coxsackievirus A16 in mice[J]. Microb Pathog, 2021, 150: 104603.
- [16] ZHAO Z L, LI Z L, HUAN C, et al. SAMHD1 inhibits multiple enteroviruses by interfering with the interaction between VP1 and VP2 proteins[J]. J Virol, 2021, 95(13): e00620-21.
- [17] DE COLIBUS L, WANG X X, TIJSMA A, et al. Structure elucidation of coxsackievirus A16 in complex with GPP3 informs a systematic review of highly potent capsid binders to enteroviruses[J]. PLoS Pathog, 2015, 11(10): e1005165.
- [18] 宋亚荣, 王杰, 李杰. HBV母婴传播的分子病毒学机制[J]. 临床肝胆病杂志, 2024, 40(11): 2168-2172.
- [19] 刘希佳, 何小华, 刘万红. 一种新的柯萨奇病毒A组16型中国湖北分离株(CV-A16WH16)全基因组序列测定及分析[J]. 中国病毒病杂志, 2015, 5(2): 96-103.
- [20] MA Z L, ZHA J. Characterization of VP1 gene of coxsackievirus A16 prevalent among hand foot mouth disease suffered children in Taizhou, P. R. China, between 2010 and 2013[J]. J Med Virol, 2016, 88(2): 202-210.
- [21] 赵言龙, 郑浩然. 基于代谢分析的SARS-CoV-2药物靶点预测方法[J]. 中国医学物理学杂志, 2023, 40(11): 1433-1440.
- [22] 张彩霞, 叶黎文, 黄春艳. 病原体靶向测序技术在疑似肺部感染患者中的应用价值分析[J]. 解放军医学杂志, 2024, 49(9): 1022-1028.
- [23] SHI J P, HUANG X L, LIU Q W, et al. Identification of conserved neutralizing linear epitopes within the VP1 protein of coxsackievirus A16[J]. Vaccine, 2013, 31(17): 2130-2136.
- [24] POROWIŃSKA D, WUJAK M, ROSZEK K, et al. Prokaryotic expression systems [J]. Postepy Hig Med Dosw, 2013, 67: 119-129.
- [25] MURAKAMI M, MURAKAMI A M, ITAGAKI S. A dual prokaryotic (*E. coli*) expression system (pdMAX)[J]. PLoS One, 2021, 16(10): e0258553.
- [26] 李丹, 宋浩志, 高维崧, 等. 小反刍兽疫病毒H蛋白的原核表达及免疫原性测定[J]. 生物技术进展, 2021, 11(6): 770-776.
- [27] 张喜文, 鲁绍芳, 李盼盼, 等. 鸭坦布苏病毒NS1蛋白的原核表达与多克隆抗体制备[J]. 养殖与饲料, 2023(4): 19-25.
- [28] 张树军, 狄建军, 张国学. 大肠杆菌yfiF基因原核表达系统构建、表达条件优化及蛋白纯化[J]. 生物技术, 2016, 26(3): 229-233.
- [29] 梁志鹏, 刘静, 刘闰枢, 等. 三源重组H9N2亚型禽流感病毒NA蛋白原核表达及多克隆抗体制备[J]. 中国病原生物学杂志, 2024, 19(6): 625-630.
- [30] KIELKOPF C L, BAUER W, URBATSCH I L. Purification of polyhistidine-tagged proteins by immobilized metal affinity chromatography [J]. Cold Spring Harb Protoc, 2020, 2020(6): 102194.
- [31] ZHOU B, XU L F, ZHU R, et al. A bispecific broadly neutralizing antibody against enterovirus 71 and coxsackievirus A16 with therapeutic potential [J]. Antiviral Res, 2019, 161: 28-35.
- [32] GAO E Y, WU S W, XU Q, et al. Enterovirus type 71-immunized chicken egg yolk immunoglobulin has cross antiviral activity against coxsackievirus A16 *in vitro* [J]. Exp Ther Med, 2019, 18(1): 332-341.