

# 柯萨奇病毒 B 组 4 型 VP1 蛋白原核表达及间接 ELISA 检测方法的建立

张伟伟 周宏 李娟 张振杰 史卫峰

泰山医学院山东省高等学校新发传染病病因流行病学实验室, 泰安市 271000

通信作者: 史卫峰, Email: shiweif@ioz.ac.cn, 电话: 0538-6225026

**【摘要】** 目的 以柯萨奇病毒 B 组 4 型 (Coxsackievirus B4, CV-B4) VP1 基因的原核表达蛋白作为包被抗原, 建立并优化间接 ELISA 方法, 用于 CV-B4 的抗体检测。方法 采用 RT-PCR 技术扩增 CV-B4 病毒 VP1 基因, 构建重组表达载体 pET-32VP1, 并转化至表达菌株大肠埃希菌 Rosetta (DE3), 进行 IPTG 诱导表达, 经 SDS-PAGE 和蛋白质谱鉴定目的蛋白成功表达。以纯化的重组蛋白为包被抗原, 进行间接 ELISA 方法反应体系的建立和条件优化。结果 CV-B4 的 VP1 基因可在大肠埃希菌中以包涵体形式稳定表达, 确定抗体间接 ELISA 检测方法的抗原最佳包被浓度为 7.5  $\mu\text{g}/\text{孔}$ , 血清最佳稀释浓度为 1:100, 临界值为  $OD_{450}$  值  $\geq 0.376$ , 重组蛋白可与 CV-B4 阳性血清特异识别, 与 CV-B3 阳性血清存在一定交叉反应, 但与柯萨奇 A 组病毒以及 CV-B1 和 CV-B5 均无反应, 表明蛋白具有良好的免疫原性。结论 大肠埃希菌表达的 VP1 重组蛋白为抗原建立的间接 ELISA 方法具有较好的敏感性、特异性和重复性, 可用于 CV-B4 血清抗体的检测。

**【关键词】** 柯萨奇病毒 B 组 4 型; VP1; 原核表达; 间接 ELISA

**基金项目:** 国家自然科学基金 (81601773); 山东省自然科学基金 (ZR2015JL026); 山东省泰山学者工程专项经费 (ts201511056)。

DOI: 10.3760/cma.j.issn.1003-9279.2019.03.016

## Expression of the VP1 protein and establishment of indirect ELISA detection method of Coxsackievirus B4

Zhang Weiwei, Zhou Hong, Li Juan, Zhang Zhenjie, Shi Weifeng

Key Laboratory of Etiology and Epidemiology of Emerging Infectious Diseases in Shandong Universities, Taishan Medical University, Taian 271000, China

Corresponding author: Shi Weifeng, Email: shiweif@ioz.ac.cn, Tel: 0086-538-6225026

**【Abstract】** **Objective** To detect antibodies to Coxsackievirus B4 (CV-B4), the indirect enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) method was established and optimized using the recombinant VP1 protein expressed in the prokaryote system as the envelope antigen. **Methods** The VP1 gene of CV-B4 was amplified using reverse transcriptase-polymerase chain reaction (RT-PCR). It was ligated into the expression vector pET32a(+) to obtain the recombinant plasmid pET32(+)-VP1 and was then transformed into *E. coli* expression strain Rosetta (DE3). The recombinant VP1 protein was induced by IPTG, which was verified using SDS-PAGE electrophoresis and mass spectrometry. The establishment and optimization of the indirect ELISA reaction system was based on the purified recombinant protein mentioned above as the coating antigen. **Results** The CV-B4 VP1 gene was stably expressed in *E. coli* in the form of inclusion body. The optimal coating concentration of antigen was 7.5  $\mu\text{g}$  per well and the optimal serum dilution was 1:100. The threshold for determining the negative and positive result of the serum samples was the optical density value of  $\geq 0.376$  at 450 nm. The purified recombinant protein could be specifically recognized by CV-B4 positive serum without cross-reaction with Coxsackievirus (CV)-A, CV-B1 and CV-B5, indicating that it has good immunogenicity. However, it can cross-react with CV-B3 serum samples. **Conclusions** The indirect ELISA detection method based on the CV-B4 VP1 protein could be used in the detection of serum antibody to CV-B4 infection with good sensitivity, specificity and repeatability.

**【Key words】** Coxsackie virus B group 4; VP1; Prokaryotic expression; Indirect ELISA

**Fund programs:** The National Natural Science Foundation of China (81601773); Natural Science Foundation of Shandong Province (ZR2015JL026); The Taishan Scholars Program of Shandong Province

(ts201511056).

DOI:10.3760/cma.j.issn.1003-9279.2019.03.016

柯萨奇病毒(Coxsackievirus, CV)属于小核糖核酸病毒科肠道病毒属<sup>[1]</sup>。1948年, Dollrdorf等在纽约市柯萨奇镇脊髓灰质炎病毒流行期间,通过接种乳鼠首次分离出 CV。CV 是严重威胁人类尤其是 6 岁以下儿童健康的病原体, CV 感染可造成广泛的疾病,从较轻的呼吸道感染症状到比较严重的心肌炎及神经系统疾病。CV B 组 4 型(CV-B4)与感染后急性心肌炎、慢性心肌炎、胰腺炎及胰岛素依赖型糖尿病的发生密切相关<sup>[2]</sup>。有研究表明, CV-B4 对 B 细胞的亲嗜性可能与 B 细胞表面的病毒受体有关, CV-B4 感染小鼠胰岛 B 细胞后,导致胰岛素合成及分泌功能降低<sup>[3]</sup>。2002—2011 年,我国长春 14 271 例疑似病毒性心肌炎成年患者中, CV B 组感染阳性率为 63.4%,其中 CV-B4 占 19.6%,在 12 366 例疑似病毒性心肌炎儿童患者中, CV B 组感染阳性率为 65.8%,其中 CV-B4 占 18.0%<sup>[4]</sup>。因此,准确有效的诊断对 CV B 组感染患者治疗与预后有重要的意义。

在小 RNA 病毒科的病毒中, VP1 基因编码主要的抗原表位,含有特异性中和位点,为主要的宿主保护蛋白,可作为诊断和亚单位疫苗研制的重要抗原<sup>[5]</sup>。目前 CV-B4 分 5 个基因型(I、II、III、IV 和 V),中国分离株主要集中在基因型 V,并且形成 1 个单独的分支<sup>[6]</sup>。本文选取的 CV-B4 毒株来源于山东莱芜,属于第 V 型,是 2015—2017 年的流行株。本研究将扩增的 CV-B4 的 VP1 基因定向克隆到原核表达载体 pET-32a(+)中,得到重组表达质粒,利用 IPTG 诱导 VP1 蛋白在大肠埃希菌中的融合表达,以纯化的重组蛋白作为包被抗原建立相应的 IgG 抗体检测 ELISA 方法,可用于 CV-B4 的快速血清学诊断。

## 1 材料与方 法

**1.1 材料** CV-B4 毒株 CV-BLW(SDLW2/CHN/2013)、原核表达载体 pET32a(+),均由实验室保存;感受态细胞 *E.coli* DH5 $\alpha$ 、*E.coli* Rosetta( DE3)购自 TaKaRa 公司; Trizol 试剂、反转录试剂盒均购自北京全式金生物技术有限公司; Random Premier TaqDNA 聚合酶、限制性核酸内切酶、T4 DNA 连接酶、pMD19-T 试剂盒购自大连宝生物工程有限公

司;质粒快速提取试剂盒、DNA 凝胶回收试剂盒购自 Omega 公司; IPTG 购自索莱宝生物科技有限公司; Ni-NTA 琼脂糖凝胶购自 Qiagen 公司; HRP 标记的羊抗鼠酶标二抗,购自索莱宝生物科技有限公司; TMB 底物显色液,购自天根生化科技有限公司。

肠道病毒 71 型(EV-A71)、柯萨奇病毒 A16 型(CV-A16)、柯萨奇病毒 A10 型(CV-A10)、柯萨奇病毒 A6 型(CV-A6)、柯萨奇病毒 B1 型(CV-B1)、柯萨奇病毒 B5 型(CV-B5)等的阳性血清为小鼠分别感染上述毒株后获得的血清,小鼠 CV-B4 标准阳性血清为小鼠感染 CV-B4 毒株后的血清,阴性血清为未接毒健康小鼠的血清。阳性及阴性血清均由本实验室制备并保存,所用毒株 EV-A71(SD004/EV-A71/Shandong/China/2015)、CV-A16(TA271/CV-A16/Shandong/China/2015\_7\_18)、CV-A10(TA151R)、CV-A6(WF057)、CV-B1(YT368R)、CV-B5(16057)为本实验室分离保存。

**1.2 VP1 基因扩增及表达载体构建** 参考 GenBank 中 CV-BLW(SDLW2/CHN/2013)的全基因组序列(登录号:MF179588),设计 VP1 基因的 PCR 扩增引物,引物序列如下, VP1F: 5'-CGGGATCC ATGGGCCCAACAGAGGCTG-3' (下划线为 *Bam*HI 酶切位点); VP1R: 5'-GCACTCGAGCTATTATTGT AGGCCTGTGTTATT-3' (下划线为 *Xho*I 酶切位点),引物由上海生物工程有限公司合成。利用 Trizol 法提取 CV-BLW 毒株的 RNA,以 RNA 为模板,进行反转录获得 cDNA。以得到的 cDNA 为模版 PCR 扩增 CV-B4 的 VP1 基因,扩增条件为 94 °C 预变性 5 min; 94 °C 30 s, 55 °C 30 s, 72 °C 60 s, 30 个循环; 72 °C 10 min。扩增产物经琼脂糖凝胶回收试剂盒回收后,连接 pMD-19T 载体,筛选阳性克隆并进行测序验证。将验证正确的 pMD-19T-VP1 质粒进行 *Bam*HI-*Xho*I 双酶切,回收目地片段后连接至 *Bam*HI-*Xho*I 双酶切的原核表达载体 pET32a(+). 连接产物转化 *E.coli* DH5 $\alpha$  感受态细胞,提取质粒后经双酶切验证和测序分析,获得 VP1 基因的原核重组表达载体 pET32a(+)-VP1。

**1.3 VP1 重组蛋白的诱导表达、纯化及鉴定** 分别将阳性重组质粒 pET32a(+)-VP1 和对照质粒 pET32a(+)转化到 *E.coli* Rosetta( DE3)感受态细胞,

挑取单菌落后培养过夜。将培养物以 1:100 的稀释度接种于新鲜 LB 液体培养基, 37 °C 培养至  $OD_{600\text{ nm}}$  约为 0.6, 加入终浓度为 1 mmol/L 的 IPTG 诱导 6 h 后收集菌体, 并进行 Western blot (WB) 鉴定。用 PBS 重悬菌体沉淀并超声破碎, 4 °C 10 000×g 离心 30 min, 分别收集上清和沉淀, SDS-PAGE 电泳进行重组蛋白的可溶性分析。蛋白可溶性分析表明 VP1 重组蛋白主要以包涵体形式存在。用添加了 5%  $\beta$ -巯基乙醇的 8 mol/L 尿素溶液溶解破碎后的沉淀, 10 000×g 离心 20 min, 收集上清并装入预先处理的透析袋中。将透析袋置于 100 倍体积的透析缓冲液 A (50 mmol/L Tris-HCl, 1 mmol/L EDTA, 5 mmol/L 半胱氨酸, 10% 甘油, 1 mol/L 脲, pH 8.0) 中, 透析 6 h 后将其转移至新的透析缓冲液 A 中透析 6 h。之后, 将透析袋置于 100 倍体积的透析缓冲液 B (50 mmol/L Tris-HCl, 1 mmol/L EDTA, 5 mmol/L 半胱氨酸, 10% 甘油, pH 8.0) 透析 6 h 后将其转移至新的透析缓冲液 B 中透析 6 h, 最后, 将透析袋置于 100 倍体积的 PBS 中透析 12 h 再置于新的 PBS 中透析 12 h。透析完毕后离心收集上清, 将其与平衡好的 Ni-NTA 琼脂糖凝胶充分混匀, 依次用含有 10 mmol/L, 15 mmol/L, 30 mmol/L, 200 mmol/L 咪唑的缓冲液梯度洗脱, SDS-PAGE 电泳检测洗脱液中的纯化产物。利用 BCA 蛋白含量测定试剂盒测定纯化蛋白的浓度。

## 1.4 间接 ELISA 方法的建立

1.4.1 抗原包被浓度和血清稀释度的确定: 用包被缓冲液将 VP1 重组蛋白进行梯度稀释, 4 °C 过夜包被 ELISA 反应板; 分别加入不同稀释倍数 (1:100, 1:200, 1:400) 的抗 CV-B4 阳性血清和阴性血清, 37 °C 作用 1 h; PBST 缓冲液洗涤反应板后加入抗 IgG 的羊抗鼠酶标二抗, 37 °C 作用 1 h; 洗版后加入 TMB 显色液显色并终止反应。测定 450 nm 的吸光度值 ( $OD_{450}$ ), 并分析阳性与阴性血清  $OD_{450}$  比值 (P/N) 变化情况。

1.4.2 血清孵育时间的确定: 在抗原最佳包被条件的基础上, 反应板每孔加入 100  $\mu$ l 最佳稀释度的血清, 37 °C 分别孵育 30 min、60 min、90 min, 其他条件不变。测定吸光度值后, P/N 值最大且接近 1.0 的血清孵育时间为最佳血清孵育时间。

1.4.3 酶标二抗工作浓度的确定: 将酶标二抗进行梯度稀释, 分别稀释为 1:200、1:400、1:800、1:1 600、1:3 200、1:6 400, 反应板每孔加入 100  $\mu$ l

酶标二抗, 其他条件不变的情况下进行 ELISA 检测, 根据 P/N 值确定二抗的最佳工作浓度。

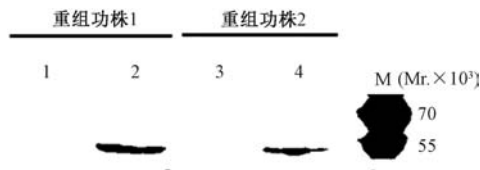
1.4.4 临界值的确定: 在上述确定的最佳工作条件下, 对收集的 18 份无 CV-B4 抗体的小鼠血清进行间接 ELISA 测定, 确定阴阳性临界值。

1.4.5 特异性、敏感性和重复性实验: 采用建立的间接 ELISA 方法, 分别对 EV-A71、CV-A16、CV-A6、CV-A10、CV-B1 和 CV-B5 小鼠阳性血清和阴性血清各 1 份进行交叉反应性测定。将小鼠 CV-B4 标准阳性血清进行 1:5~1:3 125 倍比稀释, 其他条件按照建立的间接 ELISA 方法进行敏感性检测。用同一批纯化获得的重组 VP1 蛋白包被酶标板, 随机取 3 份 CV-B4 阳性血清, 每份血清做 5 个重复, 采用建立的间接 ELISA 方法进行检测, 结果进行统计学方法。用 5 次纯化获得的重组 VP1 蛋白分别包被酶标板, 随机取 1 份 CV-B4 阳性血清, 进行检测, 结果进行统计学分析。

## 2 结果

2.1 原核表达载体 pET32a(+)-VP1 的构建 以 CV-BLW 毒株 cDNA 为模板, 利用引物 VP1F/VP1R 进行 RT-PCR 扩增, 得到约 900 bp 的基因片段, 与预期片段 852 bp 大小相符, 将其连接至 pMD-19T 获得阳性克隆, 测序正确后, 经 *Xho*I 和 *Bam*HI 酶切后将 VP1 基因片段回收, 连接至 pET32a(+) 获得重组质粒 pET32a(+)-VP1。重组质粒测序结果显示插入的 VP1 序列与参考序列一致, 表明 CV-B4 的 VP1 片段成功插入到 pET32a(+) 载体上。

2.2 重组蛋白的诱导表达与纯化 将重组表达载体 pET32a(+)-VP1 及对照载体 pET32a(+) 分别转化到表达宿主 *E. coli* Rosetta (DE3) 中。37 °C 条件下, 1 mmol/L IPTG 诱导后的菌体收集后, 利用 6×His 标签单克隆抗体对目的蛋白进行了 WB 验证。与非诱导条件下相比, 阳性大肠埃希菌表达菌株诱导后在略小于相对分子质量  $55 \times 10^3$  处有特异性条带, 大小与预期相符 (图 1)。收集的菌体超声破碎后的上清及沉淀 SDS-PAGE 分析发现, 诱导条带存在于沉淀中, 大小约为相对分子质量  $50 \times 10^3$ , 与重组蛋白 VP1 的大小相符, 即以包涵体的形式存在, 经质谱鉴定该特异性条带为 VP1 蛋白 (图 2)。纯化 VP1 重组蛋白的 SDS-PAGE 结果如图 3 所示, 单一目的条带清晰可见。测定蛋白质浓度为 0.3 mg/ml, 将其置于 -20 °C 保存。



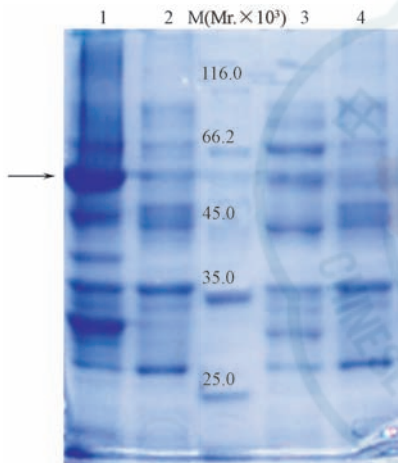
1:非诱导重组菌株 1 的全蛋白;2:诱导重组菌株 1 的全蛋白;  
3:非诱导重组菌株 2 的全蛋白;4:诱导重组菌株 2 的全蛋白;

M:蛋白质相对分子质量标准

图 1 VP1 重组蛋白的 Western blot 鉴定

1: Total protein of recombinant strain 1 uninduced; 2: Total protein of recombinant strain 1 induced by IPTG; 3: Total protein of recombinant strain 1 uninduced; 4: Total protein of recombinant strain 1 induced by IPTG; M: Protein marker

Fig.1 Western blot analysis of the VP1 recombinant protein



1:pET32a(+)-VP1 加 IPTG 诱导的超声破碎沉淀;2:pET32a(+)-VP1 加 IPTG 诱导的超声破碎上清;3:pET32a(+)-VP1 无 IPTG 诱导的超声破碎沉淀;4:pET32a(+)-VP1 无 IPTG 诱导的超声破碎上清;M:蛋白质相对分子质量标准

图 2 VP1 重组蛋白的 SDS-PAGE 分析

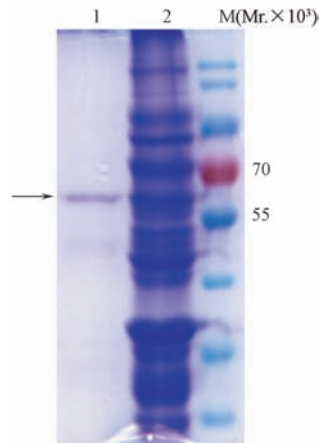
1: Sonication precipitates of pET32a (+)-Vp1 induced by IPTG;  
2: Sonication supernatant of pET32a (+)-Vp1 induced by IPTG;  
3: Sonication precipitates of pET32a (+)-Vp1 without IPTG;  
4: Sonication supernatant of pET32a (+)-Vp1 without IPTG;

M: Protein marker

Fig.2 SDS-PAGE analysis of the VP1 recombinant protein

## 2.3 ELISA 方法的建立

2.3.1 抗原最佳包被浓度和血清最佳稀释倍数的确定:将纯化的 VP1 重组表达蛋白用 pH9.6 的碳酸盐缓冲液梯度稀释,按照方阵滴定法包被 ELISA 反应板(0.8125 μg/孔,1.625 μg/孔,3.75 μg/孔,7.5 μg/孔,15 μg/孔,30 μg/孔),阳性血清和阴性血清梯度稀释后进行 ELISA 检测。阳性血清与阴性血清 OD<sub>450 nm</sub> 比值最高为 4.549,此时阳性血清 OD<sub>450 nm</sub> 接近 1.0,抗原的质量浓度为 7.5 μg/孔,阳性血清



1:纯化后的 VP1 蛋白;2:pET32a(+)-Vp1 加 IPTG 诱导后的超声破碎沉淀;M:蛋白质相对分子质量标准

图 3 VP1 纯化蛋白的 SDS-PAGE 分析

1: Purified VP1 protein; 2: Sonication precipitates of pET32a (+)-Vp1 induced by IPTG; M: Protein marker

Fig.3 SDS-PAGE analysis of the purified VP1 protein

最佳稀释倍数为 100 倍。因此,确定上述条件为最佳抗原包被浓度与最佳血清稀释度。

2.3.2 血清最佳孵育时间的确定:血清最佳孵育时间为 60 min,此时阳性血清 OD<sub>450 nm</sub> 最接近 1.0,并且 P/N 值最大。

2.3.3 酶标二抗最佳工作浓度的确定:将酶标二抗进行梯度稀释,进行 ELISA 检测,酶标二抗稀释倍数为 1 600 倍时,测定的 OD<sub>450 nm</sub> 值 P/N 最大,故酶标二抗最佳工作浓度为 1:1 600。

2.3.4 间接 ELISA 临界值的确定:采用本研究建立的最佳间接 ELISA 检测方法对 18 份小鼠 CV-B4 阴性血清进行检测,根据结果计算 OD<sub>450 nm</sub> 平均值为 0.2571,标准差为 0.0398。根据计算公式,临界值为阴性血清 OD<sub>450 nm</sub> 平均值 + 3×标准差,即 CV-B4 间接 ELISA 检测的阴阳性血清临界值为 0.376。

2.3.5 间接 ELISA 检测方法的特异性、敏感性和重复性:利用建立的间接 ELISA 方法对 EV-A71、CV-A16、CV-A6、CV-A10、CV-B1 和 CV-B5 病毒感染后的小鼠血清进行检测,其 OD<sub>450 nm</sub> 值均小于临界值 0.376,为阴性,表明所建立的 ELISA 方法具有良好的特异性,与上述病毒均无交叉反应。而对 CV-B3 感染后的血清进行检测其 OD<sub>450 nm</sub> 值大于临界值 0.376,为阳性,与 CV-B3 病毒有一定交叉反应。

将阳性血清进行梯度稀释后,应用建立的方法进行检测,结果显示当阳性血清稀释度为 1:625 时,其检验的 OD<sub>450 nm</sub> 值依然大于临界值,表明该方法敏

感性较好。

批内重复性实验用同次包被的酶标板检测 3 份 CV-B4 阳性血清,每份样本重复检测 5 次,根据测得的  $OD_{450\text{ nm}}$  的平均值  $\bar{X}$ 、标准差  $S$ ,计算其变异系数为 3.80%~7.00%,小于 10%,表明同一批抗原具有良好的稳定性。批间重复性实验分别用 5 批次制备的抗原包被酶标板,随机取 1 份 CV-B4 阳性血清,测得该血清  $OD_{450\text{ nm}}$  的平均值、标准差,计算变异系数为 6.74%,小于 10%,表明以此作为包被抗原所建立的间接 ELISA 方法批间重复性良好。

### 3 讨论

手足口病已成为中国一个重要的公共卫生问题。引起手足口病的 CV 按照不同的生物学特点可分为 A 组和 B 组,目前实验室的检测主要集中在引起重症反应的 A 组病毒 EV-A71 和 CV-A16,近年来 B 组的感染比例有所增加<sup>[7]</sup>。CV B 组感染人体可引起呼吸道感染、无菌性脑炎、急性或慢性心肌炎,少数患者导致进行性心衰、心律失常或猝死。流行病学调查显示约 50% 心肌炎的发生与 CV B 组持续或者反复感染有关<sup>[8]</sup>。近 10 年来,全球 CV-B4 发病率居高不下,法国 2000—2004 年检出的 30 余种肠道病毒中, CV-B4 位于肠道病毒第 6 位(不包括脊髓灰质炎病毒),占总肠道病毒感染人数的 4.2%,且 2004 年夏季, CV-B4 为主要流行类型<sup>[9]</sup>。韩国 1999—2011 年肠道病毒感染的分子流行病学调查研究发现,引起手足口病伴神经性疾病并发症的最主要基因型为 EV-A71 (84%) 和 CV-A16 (5%),第 3 位为 CV-B4,所占比例 2%<sup>[10]</sup>。吕慧等<sup>[11]</sup> ELISA 检测 651 例疑似 CV B 组感染的患儿,阳性 46 例中 CV-B4 型 17 例,仅次于 CV-B3 型(21 例),与 2000 年孙志勤等<sup>[12]</sup>的分析结果中 CV B 组 6 种血清型所占比例相似。CV-B3、CV-B5 逐渐引起研究者的注意,国内外研究较多,而 CV-B4 的报道却并不多见。

早期诊断有助于后续治疗的实施,可以更快的限制病毒的传播和有效降低患者死亡率。肠道病毒感染(如 EV-A71)的传统检测方法主要依赖于病毒的培养、血清学诊断和实时荧光定量 PCR (Real-time PCR, RT-PCR) 等方法<sup>[13]</sup>。然而,病毒培养相对耗时且需要专门技术人员;RT-PCR 检测法虽快速、灵敏,但易污染且配套 PCR 仪器价格较高。较 Real-time PCR, 间接 ELISA 检测方法更加简便快

速、假阴阳性率低和配套设备少等特点,比较适用于临床诊断和大规模的疫病调查。因此,本研究利用基因工程手段,拟建立并优化间接 ELISA 方法,可用于 CV-B4 的准确及快速检测。

目前,肠道病毒衣壳蛋白 VP1 编码基因正逐渐成为分子流行病学和抗体研究的主要靶位点<sup>[14]</sup>。VP1 区全长 852 bp,编码的 VP1 蛋白包含 284 个氨基酸,是病毒的主要中和抗原决定簇所在部位,常作为肠道病毒血清学分类依据,具有重要研究价值。本研究中重组 VP1 蛋白主要以包涵体的形式表达,8 mol/L 尿素对其溶解较为困难,加入还原剂 5%  $\beta$ -巯基乙醇后沉淀较快溶解。将复性后的蛋白纯化后作为包被抗原,建立并优化了检测 CV-B4 血清抗体的间接 ELISA 方法,确定抗原最佳包被浓度为 7.5  $\mu\text{g}/\text{孔}$ ;血清最佳稀释倍数为 100 倍,最佳孵育时间为 60 min;酶标二抗最佳工作浓度为 1:1 600。应用上述方法对 18 份阴性血清、CV-B4 阳性血清、EV-A71 及其他型别 CV 阳性血清分别进行检测,结果显示本研究纯化的 CV-B4 衣壳蛋白 VP1 具有良好的抗原性,除与 CV-B3 活病毒制备的鼠抗血清存在交叉反应外,建立的间接 ELISA 方法具有较高的特异性、敏感性和可重复性。

CV-B3 和 CV-B4 的 VP1 有高度的序列一致性(72%),且二者的 VP1 蛋白均具有 6 个环状结构,其中 5 个大小一致<sup>[15]</sup>。CV-B3 与肠道病毒 B 组存在一定交叉反应<sup>[16]</sup>。Jrad-Battikh 等<sup>[17]</sup>发现 CV-B3 的无毒性突变株 *Sabin3-like* 株可以在小鼠模型中诱导免疫反应,对 CV-B3 和 CV-B4 感染都可以起到较好的保护作用。以上均提示 CV-B3 和 CV-B4 间可能存在保守或相近的抗原表位,是导致 CV-B4 的 VP1 抗原与 CV-B3 出现交叉反应的主要原因。

本研究利用大肠埃希菌表达系统,首次纯化获得 CV-B4 的结构蛋白 VP1,建立的 ELISA 检测方法以纯化的重组蛋白作为包被抗原,具有更高的特异性,可以更加准确高效地检测感染患者的血清抗体,为 CV-B4 的检测及临床诊断提供了有效手段,为鼠源性单克隆抗体的研制奠定了基础,对 CV-B4 的防控具有积极的意义。

**利益冲突** 所有作者均声明不存在利益冲突

**作者贡献声明** 张伟伟、周宏:实验操作、论文撰写;李娟、张振杰:数据整理及分析;史卫峰:研究指导、论文修改、经费支持

## 参考文献

- [ 1 ] Steven O, Silvia P, Kaija M, et al. Complete genome sequences of all members of the species Human enterovirus A [ J ]. *Gen Virol*, 2004, 85 ( 6 ): 1597-1607. DOI: 10. 1099/vir.0. 79789-0.
- [ 2 ] Stephanie E, Andrew A, Doris N, et al. Progression or Resolution of Coxsackievirus B4-Induced Pancreatitis: a Genomic Analysis [ J ]. *J Virol*, 2004, 78 ( 15 ): 8229-8237. DOI: 10. 1128/JVI.78. 15. 8229-8237. 2004.
- [ 3 ] Crowell, R.L. and Landau, B.J. Receptors in the initiation of picornavirus infections, In H. Fraenkel-Conrat and R. W. Wagner ( ed. ), *Comprehensive virology*, Plenum Publishing Corp, New York, 1983, 18:1-46.
- [ 4 ] 张淑琴,刘志屹,戴璐,等. 长春地区病毒性心肌炎患儿柯萨奇 B 组病毒感染的流行病学分析 [ J ]. *中国妇幼保健*, 2014, 29 ( 1 ): 75-77. DOI: 10. 7620/zgfybj. j. issn. 1001-4411. 2014. 01. 31.
- [ 5 ] Shih SR, Li YS, Chiou CC, et al. Expression of capsid protein VP1 for use as antigen for the diagnosis of enterovirus 71 infection [ J ]. *J Med Virol*, 2000, 61 ( 2 ): 228-234. DOI: 10. 1002/(sici) 10 96-9071 ( 200006 ) 61: 2 < 228:: aid-jmv9 > 3. 0.co;2-r.
- [ 6 ] 王敏,韦庆娟,李娟,等. 2013—2014 年山东省 4 株 V 基因型柯萨奇 B4 型分离株生物信息学分析 [ J ]. *病毒学报*, 2018, 34 ( 1 ): 22-29. DOI: 10. 13242/j.cnki.bingduxuebao.003301.
- [ 7 ] Hu YF, Yang F, Du J, et al. Coxsackievirus B5, associated with neurological hand, foot and mouth disease, China [ J ]. *J Infect*, 2012, 65 ( 2 ): 189-191. DOI: 10. 1016/j.jinf.2012. 03. 021.
- [ 8 ] Huber S. T cells in coxsackievirus-induced myocarditis [ J ]. *Viral Immunol*, 2004, 17 ( 2 ): 152-164. DOI: 10. 1089/08828240 41310667.
- [ 9 ] Antona D, Leveque N, Chomel JJ, et al. Surveillance of enteroviruses in France, 2000-2004 [ J ]. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*, 2007, 26 ( 6 ): 403-412. DOI: 10. 1007/s10096-007-0306-4.
- [ 10 ] Hyeon JY, Hwang S, Kim H, et al. Accuracy of diagnostic methods and surveillance sensitivity for human enterovirus, South Korea, 1999-2011 [ J ]. *Emerg Infect Dis*, 2013, 19 ( 8 ): 1268-1275. DOI: 10. 3201/eid1908. 130496.
- [ 11 ] 吕慧, 袁国俊. 小儿柯萨奇 B 组病毒感染的检测与血清学分型研究 [ J ]. *中国妇幼保健*, 2014, 29 ( 29 ): 4757-4759. DOI: 10. 7620/zgfybj. j. issn. 1001-4411. 2014. 29. 25.
- [ 12 ] 孙志勤, 仲声, 李解珍, 等. 小儿柯萨奇 B 组病毒感染的检测与血清学分型 [ J ]. *华中医学杂志*, 2000, 24 ( 1 ): 55-56. DOI: CNKI:SUN:HYXZ.0. 2000-01- 039.
- [ 13 ] Solomon T, Lewthwaite P, Perera D, et al. Virology, epidemiology, pathogenesis, and control of enterovirus 71 [ J ]. *Lancet Infect Dis*, 2010, 10 ( 11 ): 778-790. DOI: 10. 1016/S1473-3099 ( 10 ) 70194-8.
- [ 14 ] Chen HL, Huang JY, Chu TW, 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. DOI: 10. 1016/j.vaccine.2008. 03. 041.
- [ 15 ] 武宁. 柯萨奇 B 组病毒致病的分子生物学机制 [ J ]. *国际病毒学杂志*, 2002, 9 ( 4 ): 113-116. DOI: 10. 3760/cma. j. issn. 1673-4092. 2002. 04. 005.
- [ 16 ] Soo-Young Jeony, Jeoohyun Ahn, Young-Joo Cho, et al. Production of cross-reactive peptide antibodies against viral capsid proteins of human enterovirus B to apply diagnostic reagent [ J ]. *Microbiol Immunol*, 2007, 51 ( 11 ): 1091-1098. DOI: 10. 1111/j.1348-0421. 2007.tb04004.x.
- [ 17 ] Jrad-Battikh N, Souii A, Hadhri R, et al. Inoculation of the attenuated Coxsackievirus B3 Sabin3-like strain induces a protection against virulent CV-B3 Nancy and CV-B4 E2 strains in Swiss mice by both oral and intraperitoneal routes [ J ]. *Biologia*, 2014, 69 ( 1 ): 113-121. DOI: 10.2478/s11756-013-0292-1.

(收稿日期:2018-03-05)

(本文编辑:吕新军)

The logo of the Chinese Society of Experimental and Clinical Virology (中华实验医学学会) is located at the bottom of the page. It features a circular emblem with the year '1915' and the text 'CAL ASSN' around the perimeter. Below the emblem, the Chinese characters '中华实验医学学会' are written in a stylized font.