

DOI: 10.16505/j.2095-0136.2019.0042

• 卫生健康事业发展 70 年巡礼专栏 手足口病专题论著 •

肠道病毒 71 型 3A 蛋白肽段抗体的制备

邹欣然^{1,2}, 吴静^{1,2}, 郑蔚², 顾佳奇², 茅凌翔¹

1. 江苏大学附属人民医院检验科, 江苏 镇江 212002; 2. 江苏大学医学院, 江苏 镇江 212000

摘要: **目的** 制备肠道病毒 71 型 (EV-A71) 3A 蛋白的肽段抗体。**方法** 利用 ExPasy 和 DNASTAR 软件对 EV-A71 3A 蛋白的跨膜结构域、二级结构、亲水性及疏水性等生物学特性进行分析, 设计并合成 2 条 14 个氨基酸的多肽。用钥孔血蓝蛋白 (keyhole limpet hemocyanin, KLH) 偶联肽段作为抗原分别免疫 Balb/c 小鼠, 免疫结束后取小鼠全血分离血清, 用免疫印迹实验 (Western blot) 对血清中的 3A 蛋白抗体进行鉴定。**结果** Western blot 结果显示, 第一条 3A 蛋白的多肽不能刺激小鼠产生特异性抗体, 而第二条多肽能够刺激小鼠产生特异性抗体。**结论** 成功制备特异性较好的 3A 肽段抗体, 为进一步研究 3A 蛋白提供了工具。

关键词: 人肠道病毒 71 型; 3A 蛋白; 多克隆抗体

中图分类号: R373.2 **文献标识码:** A **文章编号:** 2095-0136 (2019) 04-0263-05

Preparation of polyclonal antibody against polypeptide of enterovirus 71 3A protein

ZOU Xin-ran*, WU Jing, ZHENG Wei, GU Jia-qi, MAO Ling-xiang

* Department of Laboratory Medicine, The Affiliated People's Hospital, Zhenjiang, Jiangsu 212000, China;

School of Medicine, Jiangsu University, Zhenjiang, Jiangsu 212000, China

Corresponding author: MAO Ling-xiang, E-mail: maolingxiang@aliyun.com

Abstract: **Objective** To prepare and characterize antibody against polypeptide of enterovirus 71 (EV-A71) 3A protein. **Methods** Two different polypeptide fragments of EV-A71 3A protein were designed and synthesized to immunize mice, and the antiserum was collected respectively. The anti-3A antibody in antiserum was detected by Western blot. The localization of 3A protein was observed in the infected RD cells by using this polyclonal antibody. **Results** Western blot analysis showed that the first polypeptide fragment failed to stimulate the mice to produce antibody of 3A protein, whereas the second polypeptide fragment was able to stimulate the mice to produce antibody of 3A protein. **Conclusions** The 3A protein antibody was prepared successfully, which can be used for further research on the function of 3A protein.

Key words: Enterovirus 71; 3A protein; Polyclonal antibody

手足口病 (hand, foot and mouth disease, HFMD) 是以发热伴手、足、口腔等部位丘疹、疱疹为主要症状的病毒感染性疾病, 其传染性极强, 多累及婴幼儿。该病通常呈自限性, 但在重症病例中可能出现无菌性脑膜炎、肺水肿、心肌炎等严重并发症, 严重威胁患儿的生命^[1]。HFMD 的病原体是以柯萨奇病毒 A16 型 (CV-A16) 和肠道

病毒 71 型 (EV-A71) 为主的多种肠道病毒。其中, EV-A71 是引起重症感染的最重要的病原体, 其主要的传播途径为粪-口途径, 曾在亚太地区多次暴发大流行^[2-5]。EV-A71 的非结构蛋白 3A 是一种膜结合蛋白, 在病毒的感染中扮演着重要的角色^[6-7]。但 3A 蛋白在病毒感染中的具体作用尚未被完全明确。为进一步研究 EV-A71 病毒 3A 蛋白的功能, 本实验设计并合成了 3A 蛋白的偶联肽段, 并成功利用所得肽段制备 3A 蛋白的抗体。

1 材料与方法

1.1 材料

基金项目: 国家自然科学基金 (81601751); 江苏省青年医学人才计划 (QNRC2016453); 江苏省“333”工程科研项目 (BRA2017144)

作者简介: 邹欣然, 硕士研究生, 主要从事 EV-A71 相关研究工作

通讯作者: 茅凌翔, E-mail: maolingxiang@aliyun.com

1.1.1 实验动物 雄性 6~8 周龄的 Balb/c 小鼠 6 只, 体重 (20±2) g, 由江苏大学实验动物中心提供。

1.1.2 主要试剂 弗氏佐剂: 齐一生物科技有限公司 (上海); 羊抗鼠 HRP 标记的二抗: Millipore 公司 (美国); 预染蛋白 (Marker): 上海生工生物科技有限公司 (上海)。EV-A71 病毒: 本室自备。

1.1.3 仪器设备 小型垂直电泳槽: Bio-Rad 公司 (美国); 低温高速离心机: Eppendorf 公司 (德国); 超净工作台: 苏州尚田洁净有限公司 (苏州); 倒置显微镜: Olympus 公司 (日本); CO₂ 恒温细胞培养箱: Thermo 公司 (美国); 移液器: Eppendorf 公司 (德国); -80 °C 超低温冰箱: Thermo 公司 (美国); 凝胶成像及分析系统: 赛智创业科技有限公司 (北京); 激光扫描共聚焦显微镜: Leica 公司 (德国)。

1.2 方法

1.2.1 多肽的设计、合成与偶联 采用 ExPasy 基因分析软件的 TMHMM 2.0 程序对 3A 蛋白进行跨膜结构域分析。采用 DNASTAR 软件对 3A 蛋白的二级结构、疏水性及亲水性、抗原性进行生物学分析。根据分析和预测结果, 选取亲水性和抗原性较好的部位, 设计了 2 条长度为 14 个氨基酸的多肽。由艾柏森生物科技有限公司 (北京) 对上述多肽进行合成、纯化和 KLH 偶联, 用高效液相法 (high performance liquid chromatography, HPLC) 分析多肽的纯度, 用质谱 (mass spectroscopy, MS) 检测方法分析多肽的分子量。

1.2.2 多肽抗体的制备 纯化后的多肽抗原液用等体积的弗氏佐剂乳化作为免疫原用于刺激小鼠产生抗体, 分别于第 1、14、21、28 天时采用背部多点注射的方法处理小鼠。每只小鼠初次免疫时注射 100 μg 抗原与完全弗氏佐剂的混合液, 后续使用 100 μg 抗原与不完全弗氏佐剂的混合液进行 3 次加强免疫。以每 4 周为一个周期, 于第 4 次免疫结束后第 7 天, 摘除小鼠眼球收集全血, 离心后留取血清, -80 °C 冰箱保存。

1.2.3 多肽抗体的免疫印迹实验 (Western blot, WB)

1.2.3.1 抗原及抗体准备 (1) 抗原准备: 用 EV-A71 病毒液将 5×SDS PAGE 上样缓冲液稀释至 1×, 充分混匀后沸水浴 10 min, 冰上暂时保存; (2) 抗体准备: 按照 1:50 的比例用 PBS 稀释 1.2.2 中得到的血清, 3 000 r/min 离心 5 min, 取

上清作为一抗。

1.2.3.2 免疫印迹实验 采用浓度为 15% 的分离胶 (电压 80 V), 5% 的浓缩胶 (电压 110 V), 对上述抗原进行 SDS-PAGE 电泳, 电泳结束后进行转膜 (电流 300 mA, 50 min), 转膜结束后的聚偏二氟乙烯 (polyvinylidene fluoride, PVDF) 膜用 5% 脱脂牛奶封闭 1.5 h, 转膜液洗涤 3 次后孵育 1.2.3.1 中准备的一抗, 4 °C 静置过夜; 充分洗涤, 孵育二抗 (1:1 000 稀释的羊抗鼠 HRP 抗体), 室温静置 2 h; 转膜液洗 3 次后, 加入曝光液, 上机扫描。

1.2.4 间接免疫荧光试验 (indirect immunofluorescent assay, IFA) 将 RD 细胞按照 1×10⁵ 个/孔的浓度接种于 24 孔板, 当细胞密度达到约 60%~70% 时, 将 EV-A71 (MOI=0.1) 加入培养体系孵育 1 h, 弃上清, 洗涤, 加入新鲜培养液继续培养 24 h, 用 2% 多聚甲醇固定细胞, 再用 0.3% 的 Triton X-100 对细胞进行透膜处理, 充分洗涤后用 10% 胎牛血清蛋白封闭, 孵育一抗 (多肽抗体)、荧光二抗后, 用 DAPI 染细胞核, 封片后用激光共聚焦显微镜观察。

2 结果

2.1 3A 蛋白免疫用多肽的设计 综合分析结果, 设计出 2 段抗原性较好的免疫用肽段, 具体的多肽序列见表 1。

表 1 3A 蛋白免疫用肽段序列

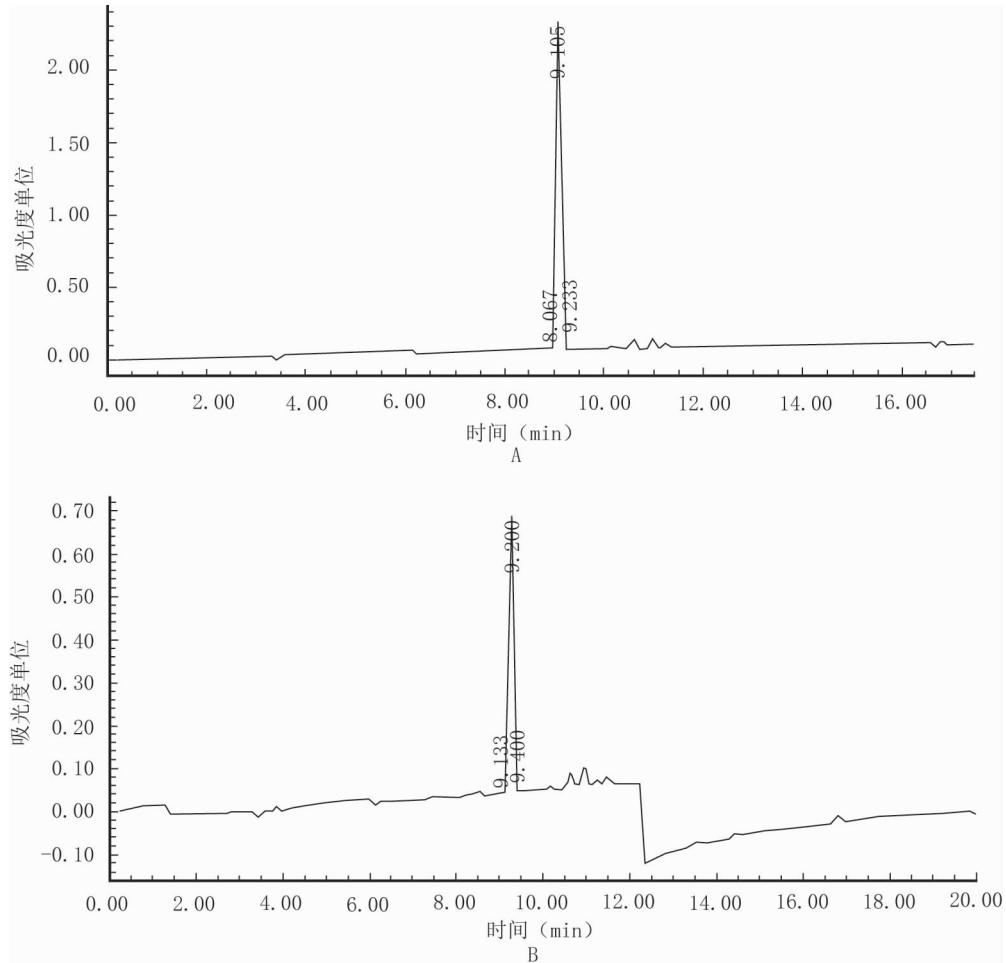
肽段名称	肽段序列
肽段 1	CRDQGWIPEAPTNERH
肽段 2	RISLEEKPPAPDAISDC

2.2 抗原多肽的合成、纯化及鉴定 对 2 条多肽段进行 HPLC 测定的结果由艾柏森生物科技 (北京) 有限公司提供 (图 1), 2 条多肽主成分峰的比例分别为 97.59%、98.52%, 提示所得的 2 条多肽具有较好的纯度。采用质谱检测分别对其主要成分多肽进行分子量的测定, 2 条多肽的相对分子量分别为 2 122.4、1 744.2, 达到抗体制备的要求。

2.3 多肽抗体的制备与 WB 鉴定 用 KLH 载体蛋白偶联纯化后的多肽与弗氏佐剂的混合液作为免疫原, 免疫 Balb/c 小鼠 4 次, 免疫结束 1 周后取全血分离血清, 利用 WB 检测血清中的多肽抗体。分别与 EV-A71 病毒未感染细胞 (阴性对照)、病

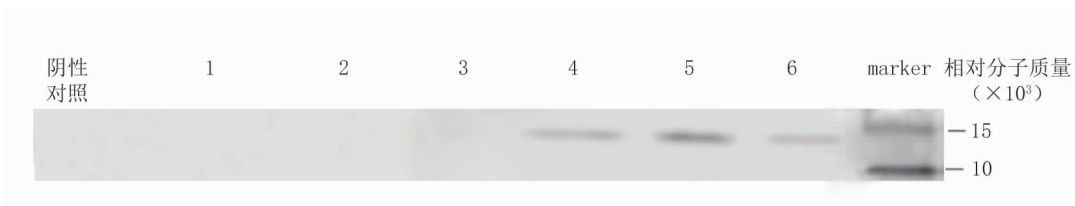
毒感染细胞裂解液反应，结果如图 2 所示，用多肽-1 免疫的小鼠血清在 3A 蛋白对应相对分子质量 11×10^3 处未见条带（图 2 中 1~3），提示多肽-1 处理的的小鼠血清中没有 3A 蛋白的特异性抗体，这可能是多肽-1 的免疫原性较差未能刺激小鼠产生相应免疫应答所致；而多肽-2 免疫的小鼠血清在目标分子量处有明显条带（图 2 中 4~6）提示多肽-2 免疫的小鼠血清中存在 EV-A71 3A 蛋白的特异性抗体。

2.4 多肽抗体的 IFA 鉴定 用多肽免疫的小鼠血清作为一抗，与 EV-A71 感染的 RD 细胞孵育，IFA 鉴定血清中的抗体，结果如图 3 所示，多肽-1 免疫的小鼠血清处理的被感染细胞中未见到红色荧光，而多肽-2 免疫的小鼠血清处理的被感染细胞中有明显红色荧光，提示多肽-1 免疫的小鼠血清中没有能与 3A 有效结合的抗体，而多肽-2 免疫的小鼠血清中存在 3A 的抗体，这与 WB 的结果一致。



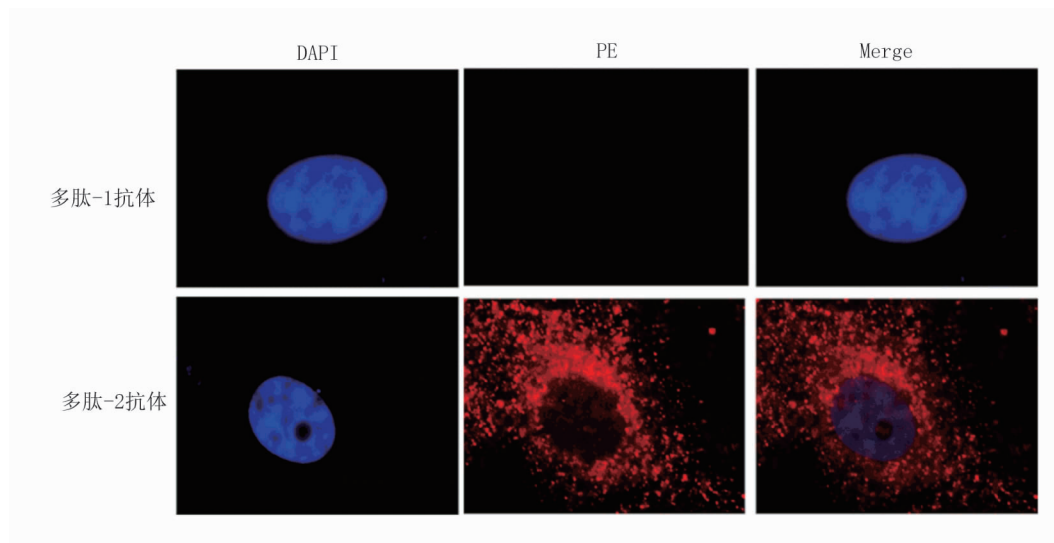
注：A 为高效液相色谱法测定多肽-1 的纯度；B 为高效液相色谱法测定多肽-2 的纯度。

图 1 高效液相色谱法测定肽段的纯度



注：1~3 为多肽-1 处理小鼠的血清平行样本；4~6 为多肽-2 处理小鼠的血清平行样本。

图 2 WB 法检测肽段抗体



注：DAPI、PE 和 Merge 为 3 种荧光染料。

图 3 多肽-1 抗体和多肽-2 抗体的 IFA 鉴定结果 (×600)

3 讨论

EV-A71 的 3A 蛋白是由病毒基因组编码的非结构蛋白之一，由 87 个氨基酸组成，其 C 端有 1 个疏水域，其 N 端为富含脯氨酸的结构域^[7]。3A 蛋白在脊髓灰质炎病毒中具有抑制内质网向高尔基体的转运、参与 RNA 复制、维持分子伴侣活性、锚定 3D 聚合酶等作用，在病毒的复制中扮演着重要角色。同时，3A 蛋白在脊髓灰质炎病毒中表现出高度的保守性，我们猜测，在同为肠道病毒的 EV-A71 中，3A 蛋白可能也具有相似的特性与功能^[8-10]。已有研究表明，EV-A71 3A 蛋白通过作用于高尔基体的 ACBD3 蛋白促进 PI4KB 与 ACBD3 的相互作用从而增强病毒复制^[11-12]。同时，3A 蛋白还能与 3B 蛋白一起参与构成具有 RNA 伴侣活性的 3AB 蛋白，在 EV-A71 的复制中进一步起到关键作用^[13]。因此 3A 蛋白的研究对于 EV-A71 的感染机制及抗病毒治疗可能具有重大意义。

尽管已有关于作用于 3A 蛋白的药物研究，EV-A71 全病毒灭活疫苗也进入临床运用阶段，但对 EV-A71 的实验室研究仍是必不可少的。然而目前在国内外的研究中对 3A 蛋白功能的解释尚未完全明确^[14-18]。因此，深入研究 EV-A71 病毒 3A 蛋白在病毒生命周期中的作用是十分必要的，有利于进一步了解 EV-A71 及小 RNA 病毒属的其他病毒。由于 3A 蛋白具有膜结合活性，可能会影响 3A 蛋白在体外的表达提纯，因此本实验选取了 EV-A71 3A 蛋白的 2 条肽段分别免疫小鼠以制备

抗体，实验结果表明，第一个肽段未能刺激小鼠产生相应抗体，可能为其免疫原性较弱所致；第二个肽段免疫的小鼠血清中，得到了能与 3A 蛋白特异性结合的抗体，说明 3A 蛋白抗体制备成功。同时，免疫荧光试验结果表明，在 EV-A71 感染细胞后，EV-A71 3A 蛋白主要定位于细胞质中。本实验中制备的 3A 蛋白多肽抗体为 3A 蛋白结构与功能的进一步研究奠定了基础。

参考文献

- [1] Huang CC, Liu CC, Chang YC, *et al.* Neurologic complications in children with enterovirus 71 infection [J]. *N Engl J Med*, 1999, 341 (13): 936-942.
- [2] McMinn P, Stratov I, Nagarajan L, *et al.* Neurological manifestations of enterovirus 71 infection in children during an outbreak of hand, foot, and mouth disease in Western Australia [J]. *Clin Infect Dis*, 2001, 32 (2): 236-242.
- [3] Chan LG, Parashar UD, Lye MS, *et al.* Deaths of children during an outbreak of hand, foot, and mouth disease in sarawak, malaysia: clinical and pathological characteristics of the disease. For the Outbreak Study Group [J]. *Clin Infect Dis*, 2000, 31 (3): 678-683.
- [4] Huang CC. Neurologic complications of enterovirus 71 infection in children: lessons from this Taiwan epidemic [J]. *Acta Paediatr Taiwan*, 2001, 42 (1): 5-7.
- [5] Yang F, Ren L, Xiong Z, *et al.* Enterovirus 71 outbreak in the People's Republic of China in 2008 [J]. *J Clin Microbiol*, 2009, 47 (7): 2351-2352.
- [6] Arita M, Takebe Y, Wakita T, *et al.* A bifunctional anti-enterovirus compound that inhibits replication and the early stage of enterovirus 71 infection [J]. *J Gen Virol*, 2010, 91 (Pt 11): 2734-2744.

- [7] Belov GA, Fogg MH, Ehrenfeld E. Poliovirus proteins induce membrane association of GTPase ADP-ribosylation factor [J]. J Virol, 2005, 79 (11): 7207-7216.
- [8] Towner JS, Ho TV, Semler BL. Determinants of membrane association for poliovirus protein 3AB [J]. J Biol Chem, 1996, 271 (43): 26810-26818.
- [9] Deitz SB, Dodd DA, Cooper S, *et al.* MHC I-dependent antigen presentation is inhibited by poliovirus protein 3A [J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2000, 97 (25): 13790-13795.
- [10] Destefano JJ, Titilope O. Poliovirus protein 3AB displays nucleic acid chaperone and helix-destabilizing activities [J]. J Virol, 2006, 80 (4): 1662-1671.
- [11] Lei X, Xiao X, Zhang Z, *et al.* The Golgi protein ACBD3 facilitates enterovirus 71 replication by interacting with 3A [J]. Sci Rep, 2017, 7: 44592.
- [12] Xiao X, Lei X, Zhang Z, *et al.* Enterovirus 3A facilitates viral replication by promoting phosphatidylinositol 4-kinase IIIbeta-ACBD3 interaction [J]. J Virol, 2017, 91 (19): e00791-17.
- [13] Tang F, Xia H, Wang P, *et al.* The identification and characterization of nucleic acid chaperone activity of human enterovirus 71 nonstructural protein 3AB [J]. Virology, 2014, 464/465: 353-364.
- [14] Deng CL, Yeo H, Ye HQ, *et al.* Inhibition of enterovirus 71 by adenosine analog NITD008 [J]. J Virol, 2014, 88 (20): 11915-11923.
- [15] Wu KX, Ng MM, Chu JJ. Developments towards antiviral therapies against enterovirus 71 [J]. Drug Discov Today, 2010, 15 (23/24): 1041-1051.
- [16] Gao Q, Yuan S, Zhang C, *et al.* Discovery of itraconazole with broad-spectrum *in vitro* anti-enterovirus activity that targets nonstructural protein 3A [J]. Antimicrob Agents Chemother, 2015, 59 (5): 2654-2665.
- [17] Mao QY, Wang Y, Bian L, *et al.* EV71 vaccine, a new tool to control outbreaks of hand, foot and mouth disease (HFMD) [J]. Expert Rev Vaccines, 2016, 15 (5): 599-606.
- [18] Ng Q, He F, Kwang J. Recent progress towards novel EV71 anti-therapeutics and vaccines [J]. Viruses, 2015, 7 (12): 6441-6457.

收稿日期:2019-04-23 修回日期:2019-06-04 责任编辑:刘磊

论文撰写规范

图位：以排于首次提及的相应正文所在自然段落后为宜，或简单集中于文末。

插图宽度：以占一栏或两栏宽度为宜，图旁一般不串文。病理（组织）切片图应注明染色方法、放大或缩小倍数，插图为黑白图，若需作彩色图，应注明，并另付制作彩色图的制版费。插图应具自明性。

坐标图：纵横坐标轴的标目均应平行排在标轴外，纵轴标目以“顶左底右”排。标目由物理量名称、符号和相应单位组成。量与单位间用斜线隔开。坐标轴上应标明标值线（刻度线）和标值，否则，应在坐标轴尾端画出箭头。

图题：一律排在图下方。图序号使用阿拉伯数字，全文从“1”开始连续编码，只有1幅图也应编1。插图必须具有自明性。

图中注释或说明语均放于图与图题之间。