

doi: 10.3969/j.issn.1000-484X.2017.09.013

• 免疫学技术与方法 •

以乙肝病毒核心蛋白为载体制备肠道病毒 71 型非结构蛋白 3D 单克隆抗体^①

李永超 朱 瑞 徐龙发 巫洋涛 赵 欢 吴 坤 刘东晓 程 通 夏宁邵 (厦门大学公共卫生学院分子疫苗学与分子诊断学国家重点实验室,国家传染病诊断试剂与疫苗工程技术研究中心,厦门 361102)

中图分类号 R392.11 文献标志码 A 文章编号 1000-484X(2017)09-1341-05

[摘要] 目的:预测肠道病毒 71 型(EV71)非结构蛋白 3D 的表位,以 HBc 蛋白为载体展示多肽,制备并鉴定抗 EV71-3D 的特异性单克隆抗体(mAb)。方法:应用生物信息学方法分析预测出 EV71 3D 蛋白亲水性和免疫原性指数较高的多肽片段,并运用 HBc 颗粒型蛋白载体展示肽段,构建多肽融合蛋白,免疫 BALB/c 雌鼠,通过杂交瘤技术和亲和层析技术制备和纯化抗 EV71-3D 蛋白的特异性 mAb,用间接 ELISA、ELISPOT、IFA 和 IHC 对 mAb 的性质进行初步鉴定。结果:构建表达分别嵌合 3D 蛋白 34~43 位氨基酸残基、61~76 位氨基酸残基、151~164 位氨基酸残基的 HBc 重组蛋白,免疫并经过多轮克隆化筛选,获得抗 EV71-3D 单克隆抗体 3E1,其亚类为 IgG2a;免疫荧光试验、ELISPOT 法和免疫组织化学染色结果显示其可与 EV71 特异性结合。结论:成功制备可特异性识别 EV71 的单克隆抗体 3E1,为病毒的检测及进一步研究 3D 蛋白的功能奠定了基础,同时还验证了生物信息学技术与 HBc 颗粒型载体展示多肽技术相结合可快速高效地制备单克隆抗体。

[关键词] 乙肝病毒核心蛋白;肠道病毒 71 型;非结构蛋白 3D;单克隆抗体

Preparation of monoclonal antibodies against 3D protein of EV71 based on HBc particles as expression vector

Li Yong-Chao, ZHU Rui, XU Long-Fa, WU Yang-Tao, ZHAO Huan, WU Kun, LIU Dong-Xiao, CHENG Tong, XIA Ning-Shao. State Key Laboratory of Molecular Vaccinology and Molecular Diagnostics, National Institute of Diagnostics and Vaccine Development of Infectious Disease, School of Public Health, Xiamen University, Xiamen 361102, China

[Abstract] **Objective:** To prepare and preliminarily identify the monoclonal antibodies(mAbs) specifically against 3D protein of Enterovirus 71(EV71), using bioinformatics to predict the epitopes of 3D, with HBc protein as a carrier. **Methods:** Artificial screening of 3D protein epitope sequences by bioinformatic method, inserted into the major immunodominant region(MIR) area of Hepatitis B virus core protein(HBc), to construct the recombinant protein. BALB/c mice were immunized with the recombinant virus like particles(VLPs) to prepare the mAbs against 3D protein of EV71. Affinity chromatography technology was used to purify the mAb. The indirect ELISA, ELISPOT, immunofluorescence and immunohistochemistry staining methods were used to identify the characteristic of the mAb. **Results:** We displayed 3D(aa34-43), 3D(aa61-76) and 3D(aa151-164) epitopes by constructing fusion protein using HBc VLPs as a vector, after hybridization, one positive hybridoma cell line(3E1) was selected by ELISA. The isotype of 3E1 was IgG2a. The results of immunofluorescence and immunohistochemistry staining assay showed that the mAb 3E1 could specifically recognize EV71. **Conclusion:** The prepared mAb 3E1 can specifically recognizes the EV71, which laid the foundation for the detection of virus and further study on 3D protein, and verified the bioinformatics technology combined with HBc carrier displaying peptides could prepare mAb quickly and efficiently.

[Key words] Hepatitis B virus core protein; Enterovirus 71; Non-structural protein 3D; Monoclonal antibody

①本文受国家自然科学基金项目(No. 31670933, No. 81371817)资助。

作者简介:李永超(1993年-),男,实验员,主要从事肠道病毒功能方面的研究, E-mail: 18850569602@163.com。

通讯作者及指导教师:程 通(1977年-),男,博士,副教授,硕士研究生导师,主要从事分子病毒学研究, E-mail: tcheng@xmu.edu.cn。

乙型肝炎病毒核心蛋白(Hepatitis B virus core protein, HBc)载体近年来运用广泛,可诱导产生强烈的B细胞反应和T细胞反应,同时在体外能自发组装成病毒样颗粒(Virus-like particle, VLP)结构^[1,2]。研究表明其暴露在VLP最外面的第78~83位氨基酸是抗原的免疫优势区(Major immunodominant region, MIR)及最主要的B细胞表位区段,且将外源片段插入该部位后基本不影响颗粒的装配,因此可被作为免疫载体提高外源片段的免疫原性^[3]。该载体已成功展示过水痘-带状疱疹病毒、丙型肝炎病毒、登革热病毒和流感病毒等病毒的蛋白表位^[4-10]。

手足口病(Hand, foot and mouth disease, HFMD)是一种常见的婴幼儿传染性疾病,其主要病原体之一为肠道病毒71型(Enterovirus 71, EV71)。EV71感染不仅可引起患者的手、足和口腔等部位出现疱疹,重症者还可引发心肌炎、肺水肿、无菌性脑膜炎或脊髓灰质炎样麻痹等严重的神经系统并发症,个别严重患者甚至引起死亡^[11-16]。EV71属小RNA病毒科肠道病毒属,病毒基因组为单股正链RNA,含一个开放阅读框(ORF),由P1-P3编码翻译产生。其中P3区编码的前体蛋白可被水解成非结构蛋白3A、3B、3C和3D。3D蛋白由462个氨基酸组成,是有一段核定位信号(Nuclear localization signal, NLS)的RNA依赖多聚酶(RNA dependent RNA polymerase, RDRP),能催化VPg蛋白的尿苷酸化,启动病毒RNA的复制^[11-13]。此外,有研究证明3D蛋白可以使宿主细胞停滞在S期,从而影响病毒感染细胞后的整个生命周期^[14,15]。因此,快速获得针对3D蛋白的单克隆抗体,能更好地研究3D蛋白在EV71病毒致病机理中所起的作用。

本研究利用生物信息学方法和颗粒型蛋白载体展示技术预测并表达重组蛋白,成功制备抗EV71非结构蛋白3D的单克隆抗体,验证生物信息学预测多肽技术和颗粒型蛋白载体展示技术在单抗筛选中的可行性。

1 材料与方法

1.1 实验材料

1.1.1 细胞株、病毒株和实验动物细胞株 小鼠骨髓瘤细胞(Sp2/0)为本实验室保存;人恶性胚胎横纹肌瘤细胞(RD)购于ATCC;病毒株:EV71 JS-06-52-3(GenBank: FJ600325.1)为C4亚型,来源于江苏省CDC;PSVA-EV71-Mp4为鼠适应株^[16],原型株为感染性克隆PSVA-EV71(GenBank: AB469182, Satoshi Koike 博士惠赠);实验动物:6~8周龄SPF级

BALB/c雌鼠,14~18日龄SPF级BALB/c孕鼠,均购自上海斯莱克实验动物有限公司。

1.1.2 主要试剂培养基 RPMI1640和MEM培养基均购自Gibco公司;细胞培养用胎牛血清(FBS)购自Invitrogen公司;弗氏不完全和弗氏完全佐剂购自Sigma公司;抗体纯化介质Protein A购自GE公司;辣根过氧化物酶标记的羊抗鼠IgG及TMB显色底物购自北京万泰生物药业有限公司。

1.2 实验方法

1.2.1 EV71 3D蛋白的预测及表达载体的构建
EV71 3D蛋白抗原预测 根据EV71 JS-06-52-3中非结构蛋白3D的序列信息,采用protean、IEDB、epitopia等软件对3D蛋白氨基酸序列进行亲疏水性和免疫原性分析。选取亲水性强,免疫原性强的氨基酸区段为候选展示肽段,由上海生物工程公司进行全基因合成。对合成的肽段进行上下游引物互搭,反应体系为48 μl水,上下游引物各1 μl,混合后于90℃反应4 min,然后置于70℃反应10 min,缓慢冷却至室温。将互搭好的片段插入到pC149/mut载体上,插入位点为BamH I和EcoR I^[17]。将连接后的重组质粒转化ER2566菌株,挑取单克隆菌落进行PCR和测序鉴定(测序由英骏生物技术有限公司进行),从而获得包含目的片段的阳性克隆。

1.2.2 重组蛋白的表达、纯化与鉴定 将包含正确重组质粒的ER2566菌进行诱导表达,诱导表达条件为0.2 mmol/L异丙基-β-D-硫代半乳糖苷(IPTG)在30℃诱导表达6 h。收集菌液于磷酸盐缓冲液(0.5 mmol/L EDTA, 300 mmol/L NaCl, 0.2 mol/L NaHPO₄, 0.2 mol/L NaHPO₄, pH6.0)中重悬并进行超声破碎离心,将离心得到的上清组分经热变性(65℃,反应30 min)和饱和硫酸铵沉淀方法进行纯化,接着将纯化后的重组蛋白透析至10 mmol/L PBS缓冲液中,随后运用SDS-PAGE凝胶电泳和负染透射电镜观察鉴定。

1.2.3 透射电镜观察与同源模建 将蛋白样品滴加到200目的铜栅上,吸附10 min,接着用纯水洗涤铜栅2次并晾干,最后用2%磷酸钨溶液负染铜栅15 min后直接进行电镜观察。运用软件以HBV衣壳蛋白(PDB: 4G93)为模板进行3D模建。

1.2.4 单克隆抗体制备与纯化 将纯化好的重组蛋白按0、2、4和6周间隔免疫BALB/c小鼠,每种蛋白平行免疫5只小鼠,免疫剂量为100 μg/只,初次免疫使用弗氏完全佐剂,加强免疫时使用弗氏不完全佐剂,并在0、2、4、6和8周采血。在进行细胞融合前3D经脾脏对小鼠进行加强免疫,免疫剂量为50 μg/只。

选取小鼠免疫后血清与免疫原亲和力高且能特异性结合 EV71 的小鼠脾细胞,按 10:1 的比例与 Sp2/0 融合,采用差检 ELISA 法对杂交瘤细胞进行筛选,具体方法为:在融合后 7 d,将待检培养上清一式两份,分别加入包被了重组蛋白和载体蛋白的 ELISA 板上,运用常规的间接 ELISA 法进行后续的检测。根据待检培养上清对重组蛋白的反应性与载体蛋白的反应性差异对杂交瘤细胞进行筛选,对重组蛋白反应为阳性同时对载体蛋白反应为阴性的杂交瘤细胞克隆判断为阳性。对检测阳性的克隆采用有限稀释法进行至少 2 次以上的克隆化,直到筛选出稳定的克隆株。将阳性克隆细胞进行扩增培养后注入小鼠腹腔,待小鼠腹部明显膨大,收集腹水,用辛酸-饱和硫酸铵沉淀和 Protein A 亲和层析纯化。

1.2.5 单克隆抗体类型及亚类鉴定 采用 Sigma 公司的小鼠单克隆抗体分型试剂盒鉴定单克隆抗体的类型及亚类。首先,以纯化的免疫原包板,用 PBS 缓冲液稀释抗体,稀释策略为首孔 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 按 2 倍比梯度稀释 8 孔,加入 100 μl 稀释抗体至预先包被好的板中,37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 1 h;其次,用 PBST 缓冲液洗板 3 次后,分别加入 50 μl HRP 标记的羊抗鼠 IgA、IgM、IgG1、IgG2a、IgG2b 和 IgG3,37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 30 min;接着用 PBST 缓冲液洗板 3 次后,每孔加入 100 μl TMB 底物,37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 10 min;最后每孔加入 50 μl 终止液,在酶标仪上进行读数。

1.2.6 单克隆抗体对病毒特异性鉴定 (1) 间接免疫荧光试验:将 13 mm \times 13 mm 圆形玻璃片放入 24 孔板中,铺入 1×10^6 个/孔的 RD 细胞,实验组按 MOI=0.1 接种 EV71;37 $^{\circ}\text{C}$ 感染 12 h 后,用 4% 多聚甲醛固定 30 min 并依次加入通透液、抗 EV71 单克隆抗体、GAM-FITC IgG 和 DAPI 染液,封片后在荧光显微镜下进行结果观察。(2) ELISPOT 法:将 EV71 接种于 96 孔板单层的 RD 细胞中,37 $^{\circ}\text{C}$ 培养至出现细胞明显病变,用 0.2% 戊二醛固定 1 h 后依次加入通透液、标记了 HRP 的抗 EV71 的单抗和等体积混合的 A/B 显色液,显色结束后,拍干显色液,

用酶联斑点分析仪拍照及计数。(3) 免疫组织化学染色法:首先用鼠适应株 PSVA-EV71-Mp4 对一日龄新生小鼠进行攻毒,将收集到的攻毒死亡或濒临死亡的动物进行初步解剖,暴露其组织器官并放入 4% 的福尔马林中固定 72 h;充分固定后采集小肠和肌肉组织进行病理制片和检测^[18,19]。

2 结果

2.1 重组表达载体的构建 设计和合成编码 EV71-3D(aa34-43)、EV71-3D(aa61-76) 和 EV71-3D(aa151-164) 多肽区段的上下游引物,引物见表 1。将上下游引物进行互搭获得相应的片段。接着,以本实验室构建的表达质粒 pC149/mut 为载体,在其免疫优势区插入 EV71 3D 蛋白相应区段(图 1A),通过 PCR 和测序鉴定,最终获得正确的 pC149-3D(aa34-43)、pC149-3D(aa61-76) 和 pC149-3D(aa151-164) 质粒。

2.2 重组蛋白的表达、纯化与鉴定 重组大肠杆菌 ER2566/pC149-3D 和 ER2566/pC149 经 0.2 mmol/L IPTG 诱导 6 h 后得到表达,经鉴定主要以可溶形式表达于上清。接着用热变性、饱和硫酸铵沉淀等方法纯化获得重组蛋白。结果如图 1B 所示,HBc3D(aa34-43)、HBc3D(aa61-76) 和 HBc3D(aa151-164) 目的蛋白条带大小符合预期,单体约 20 kD,纯度高达 95%,重组蛋白可形成明显的二聚体。负染电镜结果显示,纯化后的目的蛋白均能够很好地组装成 VLP,颗粒大小和形态与对照蛋白 HBc(aa1-149) 颗粒类似,呈直径为 30 nm 左右大小均匀的完整的空心球体结构(图 1C)。此外,同源建模结果显示,EV71-3D(aa34-43)、EV71-3D(aa61-76) 和 EV71-3D(aa151-164) 多肽区段理论上可展示在颗粒的表面(图 1D)。

2.3 免疫小鼠多抗血清评价及杂交瘤细胞株的筛选 运用间接 ELISA 法检测各组小鼠的免疫血清对各自免疫抗原和对照抗原 HBc(aa1-149) 的特异性抗体滴度。结果见图 2A 和 2B,免疫四针后嵌合表位肽融合蛋白诱导产生的总体抗体水平高于抗 HBc(aa1-149) 蛋白抗体;如 HBc3D(aa34-43) 蛋白

表 1 EV71 3D 蛋白表位片段克隆引物序列

Tab.1 Sequence of oligonucleotide primer for EV71 3D epitope fragments

Primer	Sequence
3D(aa34-43)-F	GATCCTTCGAGGAAATAAGGAACCAGCTGTCTTGG
3D(aa34-43)-R	AATCCAAGACAGCTGGTTCCTTATTTCCCTCGAAG
3D(aa61-76)-F	GATCCAAGTATGTGGAAATACACTACATGAGCCTGACGAGTACATCAAAGAGG
3D(aa61-76)-R	AATTCCTCTTTGATGTACTCGCTCAGGCTCATGTAGTGTATTTCCACATACTTG
3D(aa151-164)-F	GATCCGATCTTCCTTACTCCACTTATGTCAAGGACGAGCTGCGCTCAG
3D(aa151-164)-R	AATTCGAGCGCAGCTCGTCTTGACATAAGTGGAGTAAGGAAGATCG

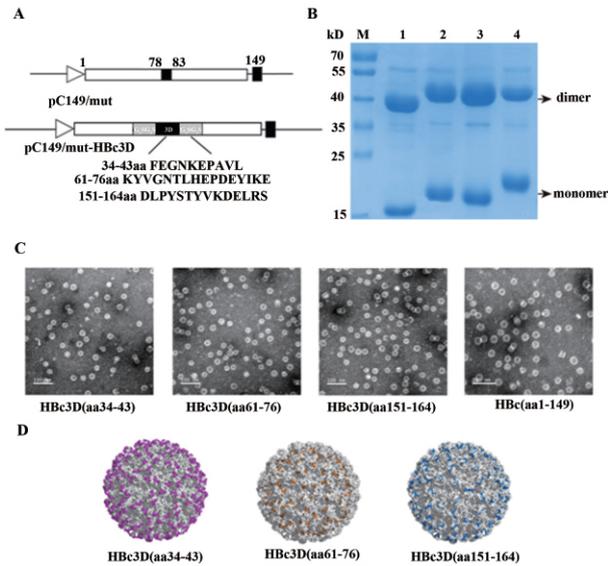


图 1 重组克隆的构建及表位肽融合蛋白的性质分析

Fig.1 Construction of chimeric HBc proteins and analysis of purified recombinant VLPs

Note: A. Schematic presentation of the construct; B. SDS-PAGE analysis of purified recombinant proteins. Lane M. Molecular mass marker; Lane 1. HBc (aa1-149); Lane 2. HBc3D (aa34-43); Lane 3. HBc3D(aa61-76); Lane4. HBc3D(aa151-164); C. Electron microphotographs; D. Molecular modeling. EV71-3D(aa34-43), EV71-3D(aa61-76) and EV71-3D(aa151-164) epitopes located on the surface of HBc-VLPs colored by red yellow and blue.

免疫血清针对免疫抗原产生的总体抗体滴度为 3.3×10^6 ,而针对 HBc(aa1-149) 蛋白的抗体滴度仅为 3.8×10^4 ,表明 HBc3D(aa34-43) 免疫原可较好地诱导小鼠机体产生针对 3D(aa34-43) 表位的抗体。此外,运用 IFA 检测各组小鼠的免疫血清对 EV71 的结合活性,结果显示,仅 HBc3D(aa34-43) 蛋白免疫血清可特异性结合 EV71 感染的 RD 细胞(图 2C)。根据以上实验结果,挑选 HBc3D(aa34-43) 蛋白免疫的小鼠进行细胞融合,以差检 ELISA 法对融合细胞进行筛选,最终获得 1 株稳定分泌单克隆抗体的细胞株,命名为 3E1。

2.4 单克隆抗体性质鉴定 (1) 单抗的类型及亚类鉴定:使用小鼠单克隆抗体分型试剂盒对单克隆抗体 3E1 进行亚型鉴定,结果发现其属于 IgG2a 亚型。(2) 间接免疫荧光验证单抗:检测结果显示,感染 EV71 的 RD 细胞显示出较亮的绿色荧光,而未感染病毒的细胞则未观察到绿色荧光反应,见图 3A。(3) ELISPOT 检测:结果如图 3B 显示,接种 EV71 的 RD 细胞显示出蓝色的病变斑,而未感染病毒的细胞则未观察到病变斑,且单抗 3E1 稀释至 $2.5 \mu\text{g/ml}$ 时仍可特异性结合 EV71。(4) 单抗在受

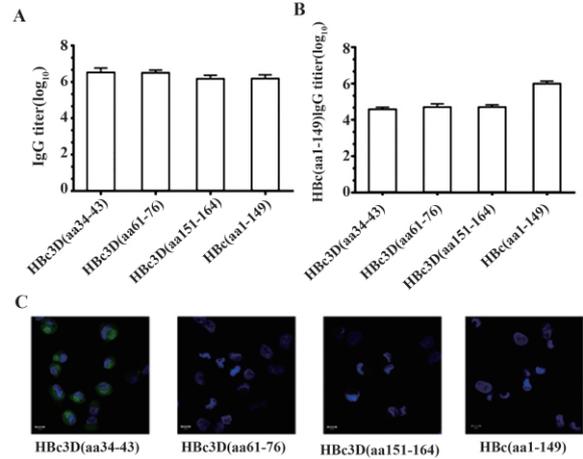


图 2 免疫小鼠多抗血清评价

Fig.2 Evaluation antiserum of immune mice

Note: A. HBc3D(aa34-43), HBc3D(aa61-76) and HBc3D(aa151-164) as coated proteins respectively to detect the antibodies of antiserum; B. HBc (aa1-149) as coated protein as a control; C. Detection EV71 in RD cells by immunofluorescence assay using the antiserum.

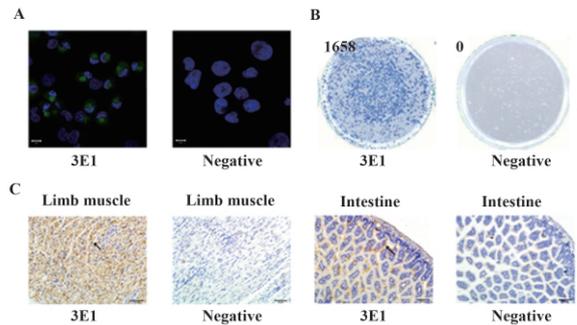


图 3 单克隆抗体 3E1 性质鉴定

Fig.3 Reactivity of anti-EV71-3D mAb 3E1 with EV71

Note: A. Immunofluorescence assay of EV71 infected RD cells; B. ELISPOT assay of EV71 infected RD cells; C. Immunohistochemistry staining assay of pSVA-EV71-MP4 infected and uninfected mice tissues with 3E1.

感染小鼠组织中的免疫组织化学染色:将攻毒后 5~8 d 发生肢体瘫痪或死亡的乳鼠组织进行免疫组织化学(IHC)检测,结果如图 3C 所示,在感染 EV71 小鼠的小肠和肌肉中检测到病毒阳性信号,而在阴性小鼠组织中未发现阳性信号。间接 IFA、ELISPOT 检测和免疫组织化学染色实验结果均表明单抗 3E1 可特异性结合 EV71。

3 讨论

手足口病是一种由人肠道病毒引起的全球性传染病,常见于 5 岁以下的婴幼儿。其临床症状主要为手、足和口等部位出现水泡样溃疡或皮疹,重症患

者可引发严重的神经系统疾病,甚至死亡。手足口病的重症和死亡病例主要由 EV71 感染引起的,目前尚无特效治疗药物,且对 EV71 的致病机制尚未完全明了。EV71 主要由 RNA、结构蛋白和非结构蛋白组成,其中非结构蛋白 3D 是 RNA 多聚酶的主要组分,可催化 VPg 蛋白尿苷酸化,参与病毒的复制过程。鉴于其在病毒生命周期中的重要的作用^[14,15],获得稳定、可靠的抗 3D 蛋白的单克隆抗体是进一步研究该蛋白作用机制的重要基础。

从病毒颗粒中纯化天然蛋白或利用基因工程技术表达全长的重组蛋白,特别是一些分子量较大的蛋白,常需耗费较长的时间去摸索表达与纯化的策略;且当外源蛋白进入机体时,机体免疫应答并非通过识别完整的蛋白分子而发挥功能,往往识别的位点仅仅是外源蛋白的某一小区段,如抗原表位。但多肽表位分子量小,半衰期短,单独使用时免疫原性较弱,因此常借助表位展示载体的辅助作用增强其稳定性和免疫原性。类病毒颗粒如 HBV-VLPs 被认为是较理想的展示外源表位的运载工具。它不仅在体外可自发组装成类病毒颗粒,还可将表位展示在颗粒的表面,充分暴露表位的分布密度以增强其免疫原性。此外,如今运用生物信息学工具预测蛋白质的优势表位,已广泛应用于蛋白质表位的分析与鉴定^[20,21]。因此,我们认为结合生物信息学和类病毒颗粒载体展示技术,能够作为一种快速、高效地筛选识别特定表位肽,并用于制备针对大分子量蛋白的单克隆抗体的重要技术策略。

基于此,本研究将生物信息学技术与 HBc 颗粒型蛋白载体展示技术相结合,并运用常规的杂交瘤技术筛选出针对 EV71 3D 蛋白的单克隆抗体 3E1,抗体性质鉴定结果显示其能特异性结合 EV71 病毒,为进一步研究蛋白的功能奠定了基础。

参考文献:

[1] Pumpens P, Grens E. HBV core particles as a carrier for B cell/T cell epitopes [J]. *Intervirology* 2001, 44(2-3): 98-114.

[2] 白 靓, 成 岩, 曹瑞珍. 乙型肝炎病毒核心蛋白病毒样颗粒作为疫苗载体的研究进展 [J]. *中国生物制品学杂志* 2015, 28(12): 1353-1357, 1360.

[3] Zlotnick A, Cheng N, Stahl S *et al.* Localization of the C terminus of the assembly domain of hepatitis B virus capsid protein: implications for morphogenesis and organization of encapsidated RNA [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1997, 94(18): 9556-9561.

[4] Lange M, Fiedler M, Bankwitz D *et al.* Hepatitis C virus hypervariable region 1 variants presented on hepatitis B virus capsid-like particles induce cross-neutralizing antibodies [J]. *PLoS One* 2014, 9(7): e102235.

[5] Fiers W, De Filette M, El Bakkouri K *et al.* M2e-based universal influenza A vaccine [J]. *Vaccine* 2009, 27(45): 6280-6283.

[6] Deng L, Cho KJ, Fiers W *et al.* M2e-based universal influenza A vaccines [J]. *Vaccines* 2015, 3(1): 105-136.

[7] Arora U, Tyagi P, Swaminathan S *et al.* Virus-like particles displaying envelope domain III of dengue virus type 2 induce virus-specific antibody response in mice [J]. *Vaccine* 2013, 31(6): 873-878.

[8] 花艳红, 洪渊东, 吕 进, 等. 以乙型肝炎病毒核心蛋白颗粒为载体的流感通用疫苗的构建 [J]. *中国生物制品学杂志*, 2010, 23(10): 1075-1079.

[9] Zhu R, Liu J, Chen CY *et al.* A highly conserved epitope-vaccine candidate against varicella-zoster virus induces neutralizing antibodies in mice [J]. *Vaccine* 2016, 34(13): 1589-1596.

[10] 杨海杰, 陈 敏, 何水珍, 等. 基于乙型肝炎病毒核心蛋白的颗粒性肽展示载体的构建 [J]. *厦门大学学报(自然科学版)*, 2004, 43(4): 436-440.

[11] Chen C, Wang YX, Shan C *et al.* Crystal structure of enterovirus 71 RNA-dependent RNA polymerase complexed with its protein primer vpg: implication for a trans mechanism of VPg uridylation [J]. *J Virol* 2013, 87(10): 5755-5768.

[12] Sun YN, Wang YX, Shan C *et al.* Enterovirus 71 VPg uridylation uses a two-molecular mechanism of 3d polymerase [J]. *J Virol*, 2012, 86(24): 13662-13671.

[13] Oberste MS, Penaranda S, Maher K *et al.* Complete genome sequences of all members of the species Human enterovirus A [J]. *J Gen Virol* 2004, 85: 1597-1607.

[14] Wu Y, Lou ZY, Miao Y *et al.* Structures of EV71 RNA-dependent RNA polymerase in complex with substrate and analogue provide a drug target against the hand-foot-and-mouth disease pandemic in China [J]. *Protein Cell* 2010, 1(5): 491-500.

[15] Jiang H, Weng L, Zhang N *et al.* Biochemical characterization of enterovirus 71 3D RNA polymerase [J]. *Biochimica Biophys Acta* 2011, 1809(3): 211-219.

[16] Xu L, He D, Yang L *et al.* A broadly cross-protective vaccine presenting the neighboring epitopes within the VP1 GH loop and VP2 EF loop of enterovirus 71 [J]. *Sci Rep* 2015, 5: 12973.

[17] Luo WX, Zhang J, Yang HJ *et al.* Construction and application of an Escherichia coli high effective expression vector with an enhancer [J]. *Sheng Wu Gong Cheng Xue Bao*, 2000, 16(5): 578-581.

[18] Xu LF, He DL, Li ZQ *et al.* Protection against lethal enterovirus 71 challenge in mice by a recombinant vaccine candidate containing a broadly cross-neutralizing epitope within the VP2 EF loop [J]. *Theranostics* 2014, 4(5): 498-513.

[19] Li Z, Xu L, He D *et al.* In vivo time-related evaluation of a therapeutic neutralization monoclonal antibody against lethal enterovirus 71 infection in a mouse model [J]. *PLoS One* 2014, 9(10): e109391.

[20] He LL, Zhu J. Computational tools for epitope vaccine design and evaluation [J]. *Curr Opin Virol* 2015, 11: 103-112.

[21] 刘洪波, 阳广菲, 欧维琳, 等. 柯萨奇病毒 A6 型 VP1 蛋白的生物信息学分析 [J]. *中国免疫学杂志* 2016, 32(4): 536-541.

[收稿 2017-01-11 修回 2017-02-28]

(编辑 张晓舟)