

EV71 病毒毒力影响原理研究

樊知昂¹ 马璐² 吕昕怡³ 秦国蕴⁴ 任文馨⁵

(1.Allendale Columbia School, Rochester, NY, US, 14618)
(2. 西安石油大学 陕西 西安 710065)
(3.University of Delaware, Newark, DE, US, 19716)
(4.Northwest Catholic High School, West Hartford, CT, US, 06117)
(5. 大连医科大学 辽宁 大连 116000)

【摘要】本文通过点突变技术探究 VP1^{A107} 对 EV71 病毒增殖能力的影响，并探究该基因如何对并增殖产生影响。

0 引言

EV71 病毒是手足口病的主要致病因素，易感人群多为幼儿，常引起严重的临床症状，严重时可导致死亡。结构蛋白 VP1 上 107 位点的丙氨酸残基对 EV71 的复制有重要作用。VP1A107 点突变后极大的减弱了病毒的增殖，作用机理是在 EV71 脱衣壳过程中影响病毒基因组 RNA 的释放。同时，VP1 蛋白 BC-loop 的柔性及 VP1-107 残基周围区域的氢键通过影响 VP0 的成熟化剪切抑制病毒的增殖。

1 病毒的增殖表型

1.1 实验目的。比较 EV71—HP 和 EV71—CCA 在猴肾细胞中的增殖能力。

1.2 实验方法。①将等量的体外转录得到的两株病毒的全长基因组 RNA 转染到 Vero 细胞中。②用微量滴定法检测两株病毒的滴度。③用噬斑法比较 EV71—HP 和 EV71—CCA 形成空斑的大小，分别选取 20 个空斑计算平均直径大小。

1.3 实验结果。①转染 24 小时后，两株毒株均能产生细胞病变效应。②在 EV71—CCA 与 EV71—HP 的细胞病变效应对比中能够发现 EV71—CCA 导致的细胞病变效应明显延迟。EV71—HP RNA 转染后 3 天能够产生 100% 的细胞病变效应，然而对于 EV71—CCA 毒株，转染后七天才能产生 100% 的 CPE。③在 24 小时与 48 小时的病毒 RNA 转染后，EV71—HP RNA 相较于 EV71—CCA RNA 产生了多于 104 倍的感染性病毒。但是在之后的过程中这一差距逐渐减少。④噬斑实验结果显示在七天的转染之后 EV71—CCA 所展现的为小斑块表型，而 EV71—HP 毒株所展现的为大班块表型。⑤ EV71—株更加 HP 毒株形成的空斑斑块的平均直径大约是 EV71—CCA 毒株斑块直径的两倍。

1.4 实验结论。EV71—CCA 毒株的在细胞中的增殖速度相较于 EV71—HP 毒株缓慢，说明 EV71—CCA 毒株相较于 EV71—HP 毒株具有更低的传染性。

2 寻找 EV71 毒力决定位点

2.1 实验目的。寻找病毒毒力决定位点。

2.2 实验方法。①利用限制性内切酶酶切与搭桥 PCR 技术对两株病毒的结构蛋白与非结构蛋白基因进行置换。②对特定的病毒株基因位点点突变。③通过观察对比病毒毒株点突变后的细胞病变效应来确定病毒的毒力位点。

2.3 实验结果。①在对 EV71—HP 与 EV71—CCA 病毒毒株的片段置换中，发现在对 P1 结构蛋白基因进行片段置换后，病毒的增殖表型发生反转(图 1A)。对 P1 结构蛋白基因进行置换后，EV71—HP 病毒毒株细胞病变效应减缓，EV71—CCA 病毒毒株细胞病变效应明显增快。②在将 EV71—HP 第 672 位氨基酸由丙氨酸突变为苏氨酸，将 EV71—CCA 第 672 位氨基酸由苏氨酸突变为丙氨酸之后，两株病毒的增殖表型发生反转(图 1B)。突变后，EV71—CCA 病毒的细胞病变效应明显增快，而 EV71—HP 病毒的细胞病变效应明显放缓(图 1C)。③对比 EV71—HP 毒株与 EV71—CCA 毒株的点突变后病毒株的滴度，将 672 位氨基酸互换后，两病毒毒株滴度均出现较大差异，而其他位点点突变后病毒滴度并无较大改变(图 1D)。

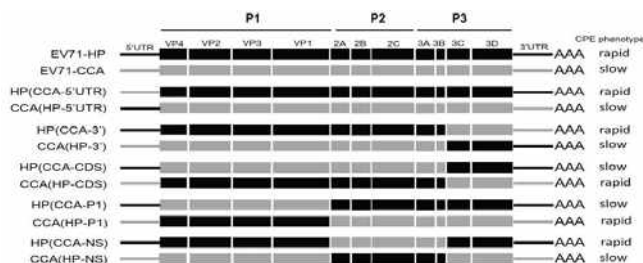


图 1A HP 和 CCA 不同基因片段被置换后的殖表型

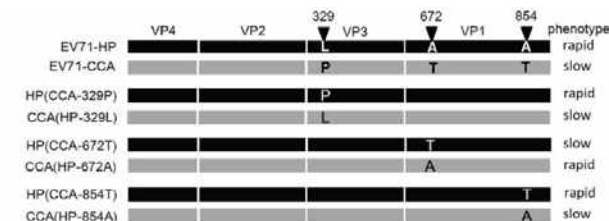


图 1B HP 和 CCA 进行点突变之后的殖表型

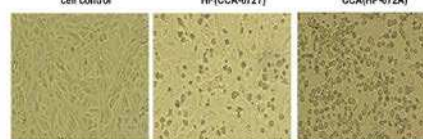


图 1C 突变后 HP 和 CCA 的变效应

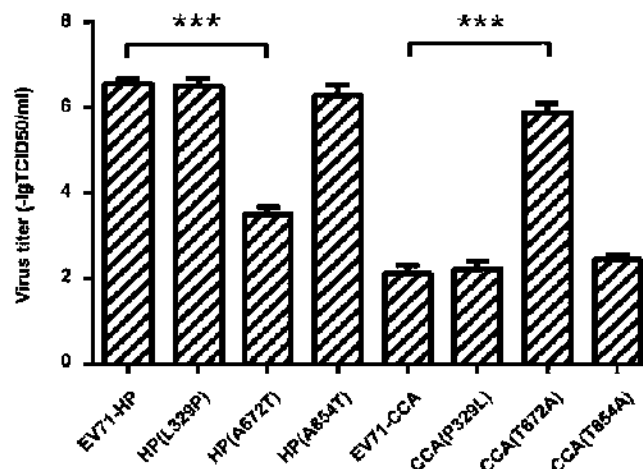


图 1D 点突变后 HP 和 CCA 的病毒滴度

2.4 实验结论。在 EV71—HP 毒株与 EV71—CCA 毒株中，P1 结构蛋白基因中的第 672 位氨基酸为病毒的毒力决定位点。

3 确定突变位点影响病毒增殖的环节

3.1 实验目的：通过研究高致病性的 EV71—HP 及其经体外细胞培养适应的 EV71—CCA 毒株吸附、内化、复制、包装、释放的过程，确定 EV71 病毒毒力决定位点影响病毒增殖的环节。

3.2 实验方法。①用相同数量的 EV71—HP 和 EV71—CCA 的感染性 RNA 转染 Vero 细胞，转染后 2 小时用 EV71 中和抗体处理，

然后用 EV71 VP1 特异性抗体对细胞裂解物进行 western blot 分析。②用超速离心法纯化上清中的病毒颗粒,并用 WB 蛋白免疫印迹进行分析。③用实时荧光定量 PT-PCR 检测基因组 RNA 拷贝数。衣壳蛋白的含量应用 Bradford 法测定。病毒 RNA 的包装效率由 RNA 拷贝数与衣壳蛋白含量的比值计算得出。④用 cell-ELISA 法检测 VP1-107 置换对病毒吸附的影响:以不同的 MOI 接种病毒到 Vero 细胞,经 4℃ 同步化吸附后用 EV71 VP1 抗体和 HRP 标记的二抗检测吸附的病毒颗粒,加入 TMB 过氧化物酶底物后测定在 OD 450 nm 处的吸光度。⑤用流式细胞术测定 VP1-107 置换对病毒吸附的影响。⑥ VP1-107 置换对病毒内化的影响。接种等量的 EV71-HP 和 EV71-CCA 到 Vero 细胞,在 4 摄氏度让 EV71-HP 和 EV71-CCA 同步化吸附 1 小时,未结合的病毒颗粒被 PBS 清洗去除。在 37 摄氏度下,病毒内化 30 分钟。接着,用枯草杆菌素 A 去除细胞表面未内化的病毒,并用 WB 蛋白免疫印迹法检测已内化的病毒颗粒。VP1 蛋白条带通过 Image J 进行密度量化分析比较。

3.3 实验结果。①加入中和抗体阻断病毒的传播后,两株病毒表达的 VP1 蛋白没有显著差异;而不加中和抗体时, EV71-HP 株表达的 VP1 显著多于 EV71-CCA,说明 VP1-107 位点是在病毒的传播阶段影响病毒的增殖(图 2A、2B)。② WB 检测释放到上清中的病毒颗粒,结果显示两株病毒颗粒中的 VP1 蛋白含量相似,说明 VP1-107 位点对病毒颗粒的产出和释放无明显影响(图 2C、图 2D)。③ EV71-CCA 的病毒 RNA 的包装效率是 EV71-HP 的 2 倍。包装效率越高病毒增殖应该越快,所以 VP1-107 位点突变导致病毒增殖能力下降的阶段也不是病毒的包装阶段(图 2E)。④ Cell-ELISA 结果显示 EV71-HP 毒株与 EV71-CCA 毒株在 OD 450 nm 处的吸光度相差不多,说明病毒以不同的 MOI 接种时,VP1-107 位点对病毒的吸附没有影响(图 2F)。⑤吸附有病毒的细胞被荧光二抗染色后可被流式细胞仪检测出。红色和黑色的曲线分别显示吸附了 EV71-HP 和 EV71-CCA 的细胞。EV71-HP (高)和 EV71-CCA (低)的信号完全重叠,说明 VP1-107 位点对病毒的吸附没有影响(图 2G)。⑥ WB 结果显示两株病毒内化颗粒的 VP1 蛋白含量相似,表明 EV71-CCA 的细胞内化效率与 EV71-HP 相比没有明显减弱,两株病毒的内化没有明显差异(图 2H、图 2I)。

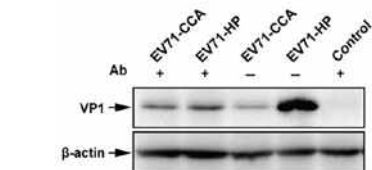


图 2A 加入抗体前后 HP 和 CCA 蛋白表达情况

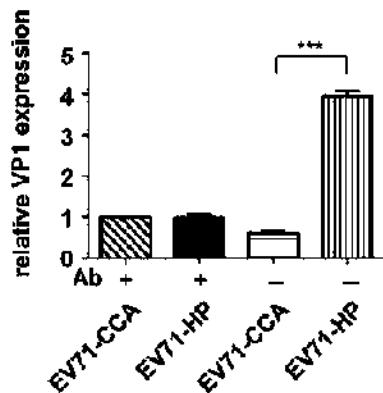


图 2B 加入抗体前后 HP 和 CCA 蛋白表达相对量

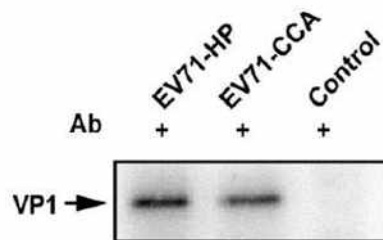


图 2C 加入抗体后 HP 和 CCA 中 VP 表达量

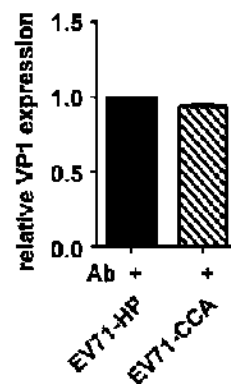


图 2D 加入抗体后 HP 和 CCA 中 VP 相对量

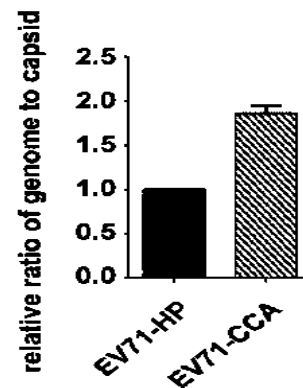


图 2E HP 和 CCA 相对装效率

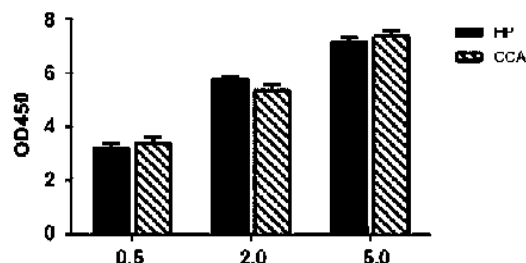


图 2F HP 和 CCA 的相吸附力

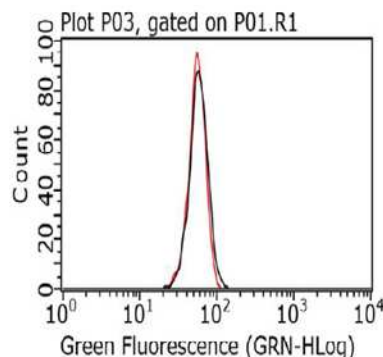


图 2G 吸附 HP 或 CCA 细的数量

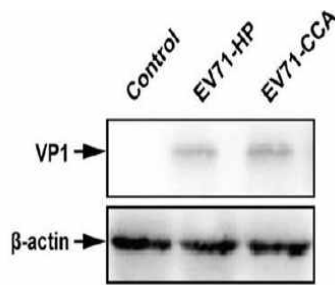


图 2H HP 和 CCA 内化颗粒 VP1 蛋白表达量

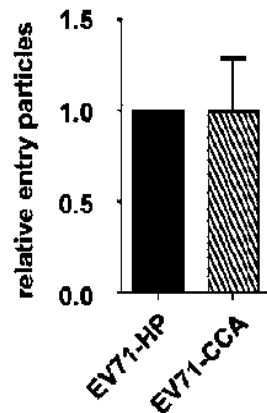


图 2I HP 和 CCA 内化颗粒 VP1 蛋白相对量

3.4 实验结论。VP1-107 位点影响 EV71 病毒增殖是在病毒传播的阶段（进入和释放阶段），但上述实验结果显示 VP1-107 位点对病毒的吸附、内化、包装及释放均无影响。

4 突变位点对病毒脱衣壳的影响

4.1 实验目的。研究 VP1-107 位点的突变是否在脱衣壳环节影响了病毒增殖。

4.2 实验方法。密度梯度离心实验：①利用 Biocomp 全自动密度梯度制备仪制作密度梯度。一般密度梯度常用的介质为氯化钠，蔗糖和多聚蔗糖，在这个实验中，则是用 15%~35% 不连续蔗糖梯度作为密度梯度的介质。②将样品加入之前制备好的密度梯度里。③将样品与梯度介质溶液混合后装入离心管放进超速离心机。④用仪器分离并测出具有不同沉降系数的病毒颗粒。

4.3 实验结果。病毒进入细胞后首先由成熟的病毒颗粒（160S）转化为 A 粒子（135S）。然后，病毒 RNA 基因组释放到细胞质中，A 粒子就转变为空衣壳（80S）。通过密度梯度离心实验，分离出 3 种类型的病毒颗粒：160 S 的成熟病毒颗粒，135 S 的 A 颗粒和 80 S 的空病毒颗粒。通过 RT-PCR 确定病毒颗粒中的 RNA 的拷贝数（图 3A），通过 Western 印迹确定各颗粒的结构蛋白组成（图 3B）。两项实验的结果共同确认了，样品 8 至 10 对应 135 S 的 A 颗粒，样品 12 至 14 对应 160 S 的成熟病毒颗粒。这两种颗粒均含有病毒基因组 RNA 和衣壳蛋白。对比这两组峰时，发现在 135 S 中，EV71-HP 中的 RNA 和病毒蛋白的数量多于 EV71-CCA，而在 160S 中却发现了相反的趋势（图 3A 和图 3C）。说明了 EV71-HP 的脱衣壳效率比 EV71-CCA 高。为了进一步详细比较这两种毒株的脱衣壳效率，将原先的实验细化，在 135 S 和 160 S 的相应组分中小体积等分试样（0.25 mL），然后对 135 S 和 160 S 颗粒中的基因组 RNA 进行定量（图 3D）。结果显示，图 3D 和第一次实验得出的图 3A 中，两株病毒 135 S 和 160 S 颗粒的分布差异几乎一样，都显示 EV71-HP 含有更多的 135 S 颗粒，而 160 S 颗粒相对较少，进一步证明了 EV71-HP 的脱衣壳效率高于 EV71-CCA 株（图 3E）。

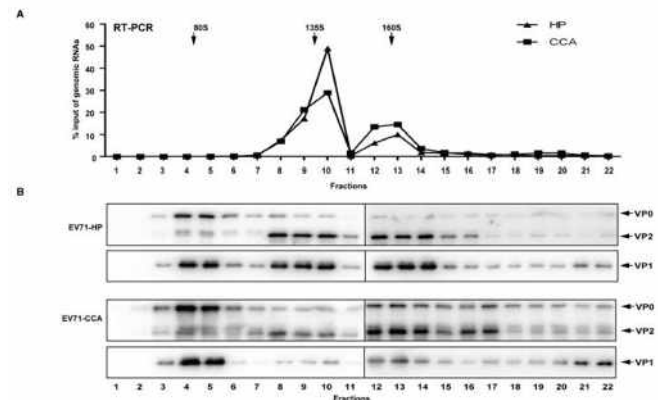


图 3A-3B 成熟病毒颗粒 PCR 和蛋白质泳结果

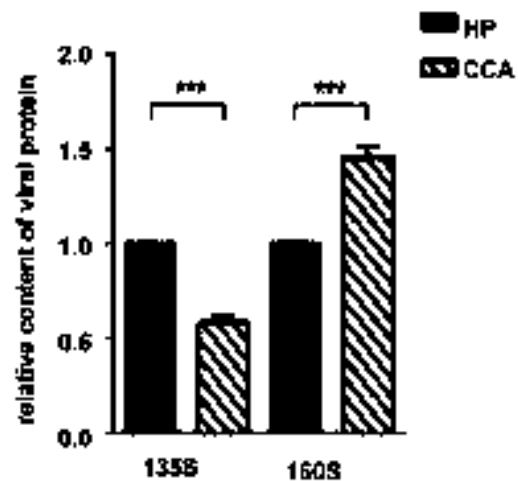


图 3C HP 和 CCA 中病毒蛋白的对含量

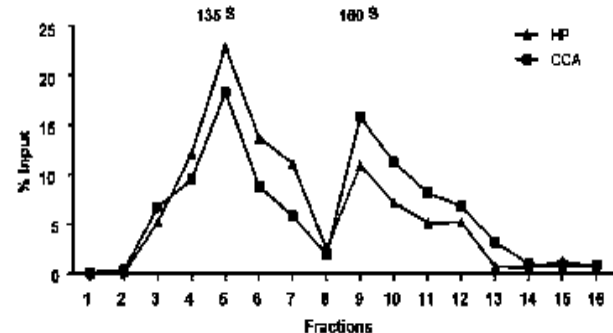


图 3D 细化实验中 HP 和 CCA 的 135 S 和 160 S 颗粒中 RA 含量

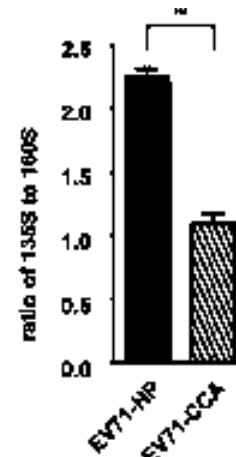


图 3E 135 S 和 160 S 颗粒比例

4.4 实验结论。证明了 VP1-107 位点突变可以影响 EV71 病毒的脱衣壳效率, 从而影响病毒的增殖。

5 突变位点影响 VP0 成熟化剪切

5.1 实验目的。研究突变位点对 VP0 成熟化剪切的影响。

5.2 实验方法。对密度梯度离心后收集的 160s 颗粒 (12-14) 进行 western blotting 检测, 用荧光 western blotting (Odyssey) 对 EV71-HP 和 CCA 的 160s 颗粒再次分析 WB 对 EV71-HP, HP (A672T), CCA 和 CCA (T672A) 的 160s 颗粒进行分析 RT-PCR 对 EV71-HP 和 CCA 释放到胞质中的负链 RNA 进行测定。

5.3 实验结果。CCA 株 160S 颗粒中的 VP0 含量高于 HP 株, 用 Image J 对实验所得条带进行半定量分析, 用 VP0/VP2 代表 VP0 蛋白在 160S 颗粒中的相对含量, 该比值越高说明 VP0 的剪切效率越低。CCA 株 VP0 成熟化剪切效率明显低于 HP 株, 差距具有统计学意义。荧光二抗检测结果显示 HP 株 160S 颗粒中 VP0 含量明显少于 CCA 株 160S 颗粒中的 VP0 含量, CCA 株 VP0 成熟化剪切效率低于 HP 株, 差距具有统计学意义。HP (A672T) 的 VP0 含量高于 HP, CCA (T672A) 的 VP0 含量低于 CCA, HP (A672T) 的 VP0 成熟化剪切效率低于 HP, CCA (T672A) 的 VP0 成熟化剪切效率高, 差异具有统计学意义。细胞感染病毒后 5 个小时 HP、CCA 负链 RNA 的含量均明显多于感染后 0.5 小时, 且 5 小时后 HP 负链 RNA 的含量明显多于 CCA 负链 RNA 的含量, 说明 HP 株基因组 RNA 释放的效更高。

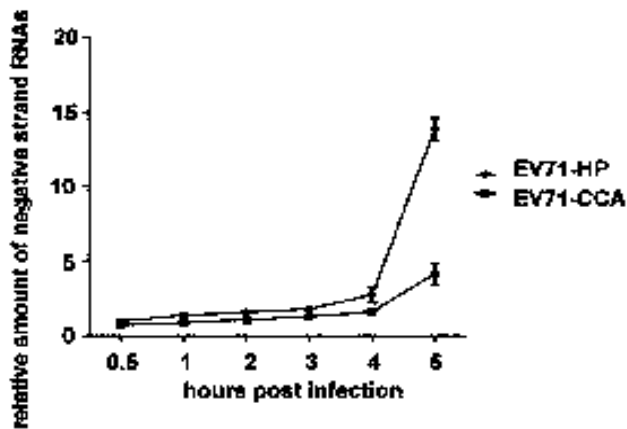


图 4A 感染后各个时间点 HP 和 CCA 释放到细胞质负链 RNA 相对含量

5.4 实验结论。VP0 含量多说明成熟化剪切效率低, 突变位点阻碍了 VP0 的成熟化剪切, 导致病毒脱衣壳释放到胞质的正链基因组 RNA 减少, 进而由正链 RNA 复制产生的负链 RNA 也随之减少, 从而使病毒增殖减弱。

6 突变位点的构效关系

6.1 实验目的。通过比较不同的 EV71 突变株的结构明确其与病毒的成熟和复制的关系。

6.2 实验方法。将 VP1-A107 突变为 A 或 T 的相似氨基酸残基以及带有不同电荷的氨基酸残基并检测突变株的病毒滴度。对突变株 EV71-HP (A107), A107T, A107R, A107D 和 A107S 进行分子动力学模拟 (MD) 分析。分析 VP1-107 位点与周围氨基酸残基的氢键作用, 并评估 VP1-107 残基周围区域的稳定性。

6.3 实验结果

(1) 根据对基因库中的 VP1 氨基酸序列的比对分析, 我们发现 VP1-A107 基本出现在所有的 EV71 毒株序列上, 说明 VP1-A107 在 EV71 病毒基因组中扮演着重要的角色。为了进一步研究 VP1-A107 的功能, 我们将 VP1-A107 分别突变为 A 或 T 的相似氨基酸残基和带有不同电荷的氨基酸残基并检测了这些突变株的复制情况。结果正如图 (5A) 所显示的实验数据, 在 EV71-HP 和 EV71-CCA 中当 VP1-107 位为丙氨酸 (A) 时所产生

的病毒滴度高, 说明病毒的增殖速度快。

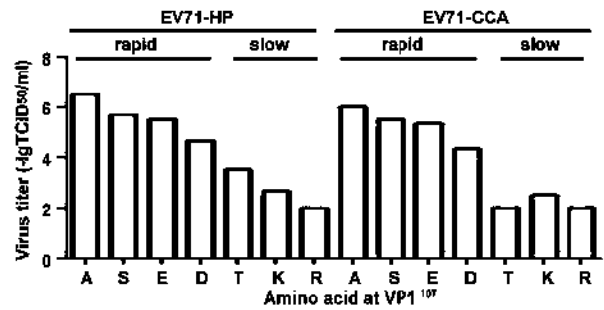


图 5A A107 位点不同基因突变时病毒滴度

(2) D94 只在两个表现出缓慢生长表型的突变株中参与了与 107 位点的氢键。对于 A107T, T107 的侧链羟基与 D94 的主链氧原子形成了强 H-键, 其占有率为 71%, 对于 A107R, D94 的主链和侧链氧原子都与 R107 的胍基形成了氢键。该氢键作用可以增强 BC 环的稳定性。而没有涉及与 D94 的氢键相互作用的突变株表现为快速的生长表型。图 5B 显示氢键作用越大, 病毒的滴度越低。图 5C 显示当 VP0 的成熟化剪切效率下降, 病毒的复制能力也随下降。

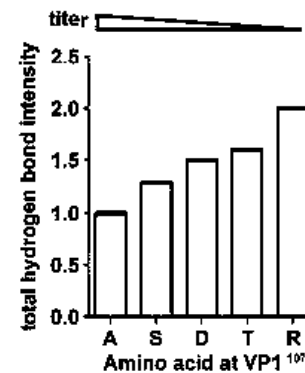


图 5B 氢键与病毒滴度的关系

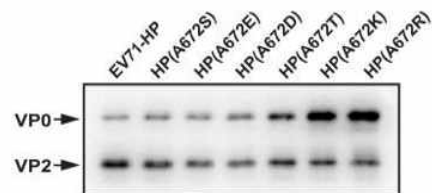


图 5C 成熟化剪切与病毒复制的关系

6.4 实验结论。由上述结果分析推测 EF 环, BC 环及其周围区域的结构柔性对 EV71 病毒的成熟和复制极其重要。氢键作用越多, BC 环的结构柔性越小, VP0 成熟化剪切的效率越低, 病毒增殖速度越慢, 滴度越小。

参考文献:

- [1] Zhang Y X, Huang Y M, Li Q J, et al. A highly conserved amino acid in VP1 regulates maturation of enterovirus 71[J]. PLoS pathogens, 2017,13(9):1006625.
- [2] 张永欣, 李晓宇, 黄宇明, 等. 人肠道病毒 71 型高致病性毒株及其体外适应株 cDNA 感染性克隆的构建 [J]. 病毒学报, 2014,30(6):605-613.
- [3] 周世力, 杨帆, 金奇. 肠道病毒 71 型的研究进展 [J]. 病毒学报, 2003(3):284-287.
- [4] 李晶华, 方小楠. 肠道病毒 71 型研究进展 [J]. 病毒学报, 2011,27(3):308-314.
- [5] 陈丽, 杨志建, 周正, 等. 肠道病毒 71 型 3C 蛋白酶在大肠杆菌中的表达及活性研究 [J]. 病毒学报, 2012,28(3):195-200.