

• 基础实验研究论著 •

肠道病毒 71 型 VP1 基因的扩增、克隆、表达及蛋白分析*

刘云锋, 周珍文[△], 关锐梨, 关启鸿, 骆鸣勇, 周 帅

(广州市妇女儿童医疗中心, 广东广州 510623)

摘要:目的 对肠道病毒 71 型 VP1 基因片段进行扩增、克隆、生物信息学分析、原核表达、纯化, 初步证实重组表达产物的生物学活性。方法 根据 GenBank 中 EV71 序列设计一对特异性引物, 以 EV71 患者咽拭子标本中提取病毒核糖核酸为模板, RT-PCR 扩增 EV71 VP1 基因, 酶切后插入表达载体 pET28a。构建 pET28a-EV71 VP1 原核表达载体。转化 E. coli DH5 α , IPTG 诱导表达, 使用 SDS-PAGE 及 Western blot 分析表达结果, 利用软件对测序结果进行生物信息学分析。纯化蛋白并包被反应板, 用 ELISA 分别检测 EV71 阳性与 COX A16 阳性患者 VP-1 IgG 抗体, 进行统计学分析。结果 目的基因经 BLAST 比对, 同源性 >99%。EV71 VP1 蛋白相对分子质量约为 32×10^3 , 主要以包涵体形式存在。生物信息学分析得出, EV71 VP1 蛋白为亲水性蛋白, 无跨膜区, 不具有 N-端信号肽序列, 存在三级结构。ELISA 结果显示 EV71 阳性患者 OD 值为 (2.425 ± 0.521) , COX A16 阳性患者 OD 值为 (1.205 ± 0.314) , 健康对照组 OD 值为 (0.353 ± 0.128) 。EV71 VP1 蛋白检测敏感性和特异性分别为 84% 和 88%。结论 成功构建了 pET28a-EV71 VP1 表达载体; 通过对手足口患者血清进行 ELISA 初步分析, 得出目的蛋白有较高的敏感性和特异性, 初步证实具有生物学活性, 可进一步用于 EV71 诊断及疫苗的相关研究。

关键词: 肠道病毒 71 型; 酶联免疫吸附测定; 基因

DOI: 10.3969/j.issn.1673-4130.2014.16.003

文献标识码: A

文章编号: 1673-4130(2014)16-2126-04

Amplification, cloning, expression and protein analysis of enterovirus 71 VP1 gene*

Liu Yunfeng, Zhou Zhenwen[△], Guan Ruili, Guan Qihong, Luo Mingyong, Zhou Shuai

(Guangzhou Municipal Women and Children Medical Center, Guangzhou, Guangdong 510623, China)

Abstract: **Objective** To conduct the amplification, cloning, bioinformatics analysis, prokaryotic expression and purification of enterovirus 71 VP1 gene segment and to initially confirm the biological activity of the recombinant expression product. **Methods** A pair of specific primers was designed according to GenBank EV71 sequence, viral RNA as a template was extracted from the throat swab specimens in the EV71 patients. EV71 VP1 gene was amplified by RT-PCR. After enzyme digestion, the expression vector pET28a was inserted. The prokaryotic expression vector of pET28a-EV71 VP1 was constructed. Then the E. coli DH5 α transformation was performed. IPTG was adopted for induction expression. The expression results were analyzed by using SDS-PAGE and Western blot. The bioinformatics analysis of the sequenced results was performed by the software. Expressed protein was purified and the plates were coated, ELISA was used to test the VP1 specific IgG antibody in serum samples of EV71 positive and COX A16-positive patients. **Results** The BLAST alignment showed that the homology of the objective gene EV71 VP1 was 99% compared with other strains (JQ766207.1) in GenBank. EV71 VP1 protein was about 32×10^3 , which mainly existed in the form of inclusion body. The bioinformatics analysis showed that EV71 VP1 protein was a hydrophilic protein, without transmembrane region and N-terminal signal peptide sequence, the tertiary structure existed. The ELISA results showed that the specific IgG OD value in EV71-positive patients was (2.425 ± 0.521) , OD value in COX A16 positive patients was (1.205 ± 0.314) , the normal control OD value was (0.353 ± 0.128) . The sensitivity and specificity of EV71 VP1 protein detection were 84% and 88% respectively. **Conclusion** The pET28a-EV71 VP1 expression vector is successfully constructed; the preliminary analysis on the serum of the infected patients by ELISA shows that the obtained objective protein has higher sensitivity and specificity, which is initially confirmed to have biological activity and can be further used for the related study on EV71 diagnosis and vaccine.

Key words: enterovirus 71; enzyme-linked immunosorbent assay; genes

肠道病毒 71 型 (EV71) 属于小 RNA 病毒科、肠道病毒属, 成熟完整的病毒颗粒为二十面体立体对称的球形结构, 无包膜和突出, 直径约 24~30 nm, 核酸为单股正链 RNA。是引起手足口病 (HFMD) 和无菌性脑膜炎、脑干脑炎和髓灰质炎样的麻痹等多种与神经系统相关的疾病的主要病原体, 致残及病死率高^[1-3]。近年来, 手足口病发病率在我国有持续上升的趋势^[4]。在我国 EV71 感染患者的治疗主要以对症治疗为主, 缺乏特

异、高效的抗病毒药物^[5], 所以早期诊断 EV71 感染与有效疫苗的注射对 EV71 感染患者尤为重要。EV71 VP1 基因是研究 EV71 较为重要的基因, 因为 VP1 蛋白是病毒主要的中和抗原决定簇, 而且有研究表明 VP1 基因序列具有较高的同源性^[6]。本研究通过构建 EV71 VP1 的原核表达系统, 实现了 EV71 VP1 蛋白的大量高效制备, 并通过生物信息学分析及 ELISA 初步分析, 初步证实该蛋白的生物学活性, 以期用于

* 基金项目: 广州市卫生局基金资助项目 (416020101-2090032)。
[△] 通讯作者, E-mail: zhenwen.zhou@mssm.edu。

作者简介: 刘云锋, 男, 副主任检验技师, 主要从事临床免疫学与检验研究。

EV71 早期诊断及疫苗研究的相关研究。

1 材料与方法

1.1 材料 EV71 病毒培养液, 分离自本中心感染科 HFMD 患儿的咽拭子标本。EV71 及 COX A16 阳性血清来自本中心相应 PCR 检测阳性患儿, 健康对照组来自本中心体检儿童, 经相应 PCR 检测阴性。

1.2 仪器与试剂 pET28-a 质粒载体、RT-PCR 试剂盒、BamH I、Xho I 限制性内切酶、DNA 纯化试剂、DNA 连接试剂盒、DNA Marker 等购自 Takara 公司; 仪器包括德国 Biometra 公司的 PCR 仪, 英国 Uvitec 公司的 GAS7508-T20 紫外凝胶成像分析系统, 上海力申公司的 HF safe-1200 型生物安全柜及德国 Sorvall 公司的 Micro 17R 台式高速冷冻离心机。

1.3 方法

1.3.1 EV71 的采样及鉴定 采集患者发病 3 d 内的咽拭子标本, 充分混匀, 室温静置 10 min, 取上清液 200 μ L 提取病毒核酸, 用特异性 EV71 引物对标本进行 PCR 鉴定。

1.3.2 抗原特异性片段的设计 VP1: P1 5'-AAA GGA TCC GGA GAT AGG GTG GCA GAT GT-3'; VP1: P2 5'-AAA CTC GAG TAA AGA GTG GTG ATC GCT GTG C-3'; 引物序列分别加入了 BamH I (G GATCC)、Xho I (C TCGAG) 限制切位点。根据加入的酶切位点及引物中 GC% 的水平, 选用了 AAA 作为保护碱基。

1.3.3 EV71 VP1 基因的扩增、克隆 提取 EV71 RNA, 以 EV71 RNA 为模板进行 RT-PCR, 反转录条件: 65.0 $^{\circ}$ C 变性 5 min, 48.0 $^{\circ}$ C 逆转录 30 min, 95.0 $^{\circ}$ C 5 min 灭活逆转录酶及同体系聚合酶; PCR 条件: (1) 94.0 $^{\circ}$ C 热变性 5 min; (2) 94.0 $^{\circ}$ C 变性 30 s, 57.0 $^{\circ}$ C 退火 30 s, 72.0 $^{\circ}$ C 延伸 2 min, 共 30 个循环; (3) 72.0 $^{\circ}$ C 延伸 10 min。PCR 产物经 BamH I、Xho I 酶切纯化后与相应酶切纯化的 pET28-a 经 T4 DNA 连接酶 16 $^{\circ}$ C 连接过夜, 连接产物转化大肠杆菌 BL21。挑取经氨苄筛选阳性菌落提取质粒进行 PCR 及双酶切鉴定。

1.3.4 EV71 VP1 基因的序列分析 将鉴定含 EV71 VP1、VP3 片段的序列的质粒菌送 Invitrogen 公司测序, 将测序结果用 DNAMAN 和 NCBI BLAST 比对分析。

1.3.5 EV71 VP1 基因的表达 挑取经鉴定含表达质粒的单个克隆, 接种于 5 mL LB(含卡那霉素 30 μ g/mL) 液体培养基中, 37 $^{\circ}$ C 振荡培养过夜; 次日按 1:100 比例接种于新鲜培养基中, 37 $^{\circ}$ C 继续振荡培养至 OD 值达到 0.6 左右; 加入 IPTG 至 1 mmol/L, 继续培养 3~4 h; 12 000 r/min 5 min 收集菌体。重组表达蛋白经 SDS-PAGE 电泳鉴定。

1.3.6 EV71 VP1 基因的生物信息学分析 用 Predictprotein 程序推导的氨基酸序列进行物理化学性质分析, 运用 Predictprotein 程序预测推导氨基酸序列的二级结构, 在网站 IEDB Analysis Resource 中, 运用 Bepipred、Kolaskar 等分析工具分析推导氨基酸序列的亲水性及抗原性、抗原表位; 用 TargetP 程序分析氨基酸序列的分泌信号肽; 用 Swiss-Model 预测蛋白质三级结构。

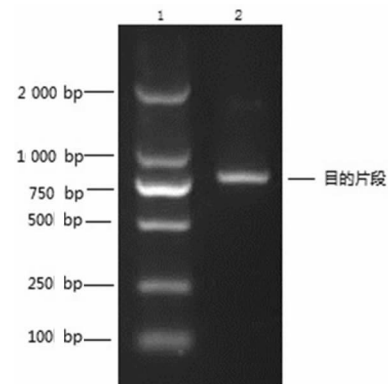
1.3.7 EV71 VP1 基因的蛋白质分析 大量诱导重组蛋白, 超声破碎仪破碎菌体, 纯化的蛋白样品并与 EV71 感染者血清的 ELISA 反应。

1.4 统计学处理 采用 SPSS13.0 统计学软件, 分析目标蛋白的敏感性 & 特异性, EV71 和 COX16 阳性血清 OD 均值比较采用两配对样本的 *t* 检验, *P* < 0.05 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 EV71 VP1 反转录 以 EV71 反转录产物为 DNA 模板

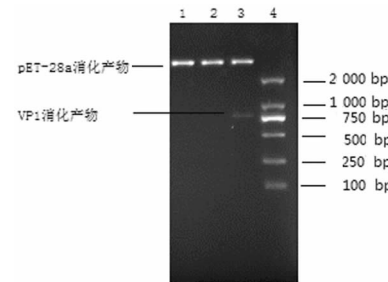
进行 PCR 扩增, 经过 1% 琼脂糖电泳后, 与 DNA 标记物对比, 在 750 bp 及 1 000 bp 2 个条带间见目的产物, 与实验预期的 891 bp 基本一致。见图 1。



1: DNA 标记物 DL2000; 2: EV71 VP1 RT-PCR 产物。

图 1 EV71 VP1 基因的 RT-PCR 扩增

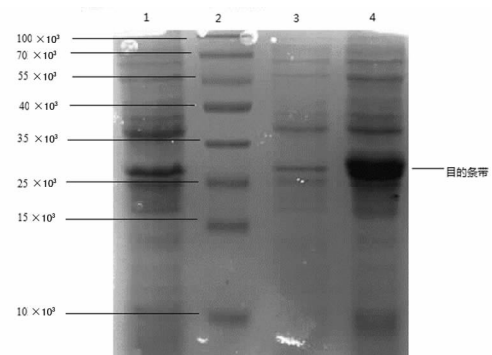
2.2 重组 pET28a-T-EV71 VP1 质粒的鉴定 重组质粒 PET-28a-EV71 VP1 进行 BamH I、Xho I 双酶切鉴定, 切下 750 bp 及 1 000 bp 之间的目的片段, 与 EV71 VP1 基因的片段大小一致。证明目的基因正确插入 pET-28a 载体中。见图 2。



1, 2: pET-28a 消化产物; 3: VP1 消化产物; 4: DNA 标记物 DL 2000。

图 2 重组 pET28a-T-EV71 VP1 质粒的双酶切鉴定

2.3 SDS-PAGE 检测重组蛋白的表达 浓度为 0.5 mmol/L 的诱导剂 IPTG 进行大量诱导表达, 表达的产物进行 SDS-PAGE 电泳, 可见样品在相应相对分子质量位置 (25~35) $\times 10^3$ 可见融合蛋白, 而未加诱导剂样品则没有出现相应条带; 另外, pET-28a(+) 空质粒转化菌株经 IPTG 诱导的样品也无融合蛋白的表达。见图 3。

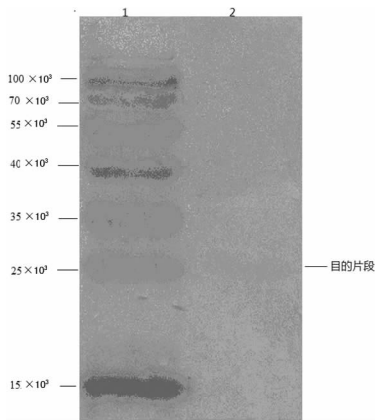


1: IPTG 诱导 pET-28a(+) 空质粒; 2: 蛋白标记物; 3: 未经诱导的 pET-28a-EV71 VP1 质粒; 4: 经 IPTG 诱导的 pET-28a-EV71 VP1 质粒。

图 3 目的蛋白 SDS-PAGE 结果

2.4 重组蛋白的 western-bolting 分析 用辣根过氧化物酶 (HRP) 标记的抗 His 标签鼠单克隆抗体和 DAB 显色剂结合

对上述在大肠杆菌 BL21 中诱导表达的融合蛋白进行 western-blotting 分析,重组蛋白经诱导后的表达产物能与单克隆抗体发生特异性反应,检测到约 32×10^3 大小的特异性条带。见图 4。



1:蛋白标记物; 2:目的片段。

图 4 western-blotting 结果

2.5 pET-28a(+)-EV71 VP1 的测序及比对 对碱基序列进行基因同源性检索分析,碱基同源性分析显示其与 GenBank 号:JQ766207.1 的 EV71 膜蛋白基因一致性达 99%。见图 5 (见《国际检验医学杂志》网站主页“论文附件”)。

2.6 生物信息学分析

2.6.1 EV71 VP1 基因理化性质及其蛋白质结构预测 EV71 VP1 长 891 bp,编码 297 个氨基酸。其理论相对分子质量为 32.67×10^3 。见图 6(见《国际检验医学杂志》网站主页“论文附件”)。

2.6.2 EV71 VP1 蛋白质结构预测 EV71 VP1 无磷酸化翻译后修饰位点,无糖基化翻译后修饰位点,无跨膜区,为非膜结合蛋白。二级结构以无规卷曲为主,其次为 β -片层和 α -螺旋,无 β -转角。EV71 VP1 的三级结构中 4~121 氨基酸部分在蛋白表面形成一环状结构(VP1 GH loop)。蛋白质亲水性平均值为 1.728,最低为-4.486,最高为 6.629。见图 7(见《国际检验医学杂志》网站主页“论文附件”)。

2.6.3 线性表位分析 EV71 VP1 蛋白线性表位见图 8(见《国际检验医学杂志》网站主页“论文附件”),平均值为 0.350,最低为-1.887,最高为 2.763。另外,预测分值最高的 3 线性表位区域位于 24-47aa、96-108aa、157-169aa。各个表位的氨基酸的起始位置、序列和表位长度见图 8(见《国际检验医学杂志》网站主页“论文附件”)。

2.6.4 分析 EV71 VP1 的氨基酸序列的分泌信号肽 运用 SignalP 程序分析发现 EV71 VP1 无信号肽。见图 9(见《国际检验医学杂志》网站主页“论文附件”)。

2.7 ELISA 结果

2.7.1 感染组与健康对照组患者血清分析 采用 ELISA 方法检测 50 份已分离出 EV71 感染患儿的血清抗-EV71 IgG 抗体,将得到的 OD 值与 50 份健康对照小儿血清抗体 OD 值比较,敏感性与特异性分别为 84%和 88%。见表 1。

表 1 EV71 感染组与健康对照组患者血清 ELISA 分析结果(n)

项目	阳性	阴性
阳性	42	6
阴性	8	44
总数	50	50

2.7.2 EV71 感染组与 COX16 感染组患者血清分析 采用 ELISA 方法检测 50 份已分离出 EV71 肠道病毒及 50 份已分离出 COX A16 肠道病毒患儿的血清 IgG 抗体,将得到的 OD 值与 50 份健康对照小儿血清抗体 OD 值比较,结果显示 EV71 感染组与 COX A16 组均与健康组差异均有统计学意义($P < 0.05$),见表 2。

表 2 EV71 感染与 COX A16 感染患者血清 ELISA 分析结果

项目	OD 值	P
EV71 感染者血清	2.425 ± 0.521	<0.01
COX A16 感染者血清	1.205 ± 0.314	<0.05
健康对照组血清	0.353 ± 0.128	

3 讨 论

EV71 是 1969 年首次从加利福尼亚患有中枢神经系统疾病的婴儿粪便标本中分离出来的,10 岁以下婴幼儿为主要易感人群,成人以隐性感染为主。EV71 病毒的基因组为含有约 7 408 个核苷酸,腺嘌呤核苷酸和尿嘧啶核苷酸丰富($A+U=52.8$)。RNA 中仅有一个开放阅读框(ORF),编码含 2 194 个氨基酸的多聚蛋白。EV71 病毒颗粒中 VP1、VP2 和 VP3 三个多肽暴露在病毒外壳的表面,而 VP4 包埋在病毒外壳的内侧与病毒核心紧密连接,因而抗原决定簇基本上位于 VP1-VP3 上。根据病毒衣壳蛋白 VP1 核苷酸序列的差异,可将 EV71 分为 A、B、C 3 个基因型,我国近年暴发的 EV71 感染流行株以 C4 亚型为主^[7-8]。

根据本研究的核苷酸及氨基酸序列分析,该基因与 Gen-Bank 上登记注册的 JQ766207.1 等 EV71 VP1 蛋白的氨基酸同源性分别达 99%,提示了 EV71 VP1 基因序列保守性较高,具备成为疫苗候选分子的可能性,这与部分学者的研究相一致^[9]。

生物信息学分析显示,EV71 VP1 蛋白为亲水性蛋白,无跨膜区,表明该蛋白为非膜结合蛋白。EV71 VP1 不具有 N-端信号肽序列,由于信号肽在蛋白分泌过程中起着非常重要的作用,因此预测了 EV71 VP1 不是分泌蛋白。EV71 VP1 的三级结构中 4~121 氨基酸部分在蛋白表面形成一环状结构(VP1 GH loop),EV71 VP1 潜在的 B 细胞表位共有 17 个可能的抗原表位。其中,预测分值最高的线性表位区域位于 157~169 位氨基酸残基,提示此区域可作为疫苗设计及检测试剂制备的候选特异性片段。但由于 EV71 VP1 存在三级结构,可能会对线性表位造成一定的影响。

本研究成功从 BL21 大肠杆菌中表达 EV71 VP1 蛋白,蛋白形成包涵体。包涵体是外源基因在原核细胞中表达时,尤其在大肠杆菌中高效表达时,形成的由膜包裹的高密度、不溶性蛋白质颗粒^[10]。本研究中,EV71 VP1 蛋白出现包涵体表达证明 EV71 VP1-pET28a 原核表达系统效率高,可使用于 EV71 VP1 蛋白的大量表达。

ELISA 结果显示 EV71 VP1 蛋白均具有较高的免疫原性,EV71 感染组与健康对照组比较,差异有统计学意义($P < 0.05$),该蛋白用于检测 EV71 感染有较高的敏感性和特异性,但重组蛋白与 COX A16 对照组血清有交叉反应的现象,这可能是因为 EV71 与 COXA16 基因组的核苷酸序列之间具有同源性,有研究表明两者 VP1 同源性可达 67%^[11]。而在 EV71 VP1 众多抗原位点中,线性表位区域 24-47aa、96-108aa、157-169aa 具有较高的抗原性,可作为疫苗设计(下转第 2131 页)

中随机挑取 37 个噬菌斑至噬菌体裂解液中,裂解充分后以 T7 噬菌体引物进行 PCR 扩增,PCR 产物采用 1% 琼脂糖凝胶进行电泳鉴定,见图 3。

2.5 序列比对及同源性分析 将图 3 中的 PCR 产物分为 6 类,每一类中选取一个样品送桑尼公司测序。测序结果在 NCBI 的基因数据库中进行同源序列比对,发现了 2 种同源性为 100% 的蛋白序列。

3 讨论

T7 噬菌体表面展示技术。它是研究蛋白质间相互作用的一种有效手段,此技术将基因型和表型联系在一起,可以通过蛋白的相互作用来分离和鉴定出表达有目标蛋白的噬菌体重组子,并且获取到编码目标蛋白的核苷酸序列。本研究中通过测序分析 38 个筛选到的克隆,经基因数据库进行同源序列比对,得到了 2 个同源性 100% 的蛋白序列。

这两个同源性 100% 的蛋白种类:(1)PRL27A 编码核糖体蛋白 L27a(RPL27a),是高度保守的胞质核糖体蛋白。在直肠癌中,核糖体蛋白有异常表达,另外,核糖体蛋白表达的下调同样也与造血细胞的分化、白血病细胞的凋亡相关^[9]。提示 RPL27a 对调节基因的表达具有特异作用并且与细胞增殖相关^[10]。(2)ATP synthase F0 subunit 6 ATP 合成酶存在于所有有机体中,其包括两个部分:F1 可溶性球状体,复制催化。F0 膜结合的质子通道。之前,ATP 合成酶被认为只定位于线粒体内膜,细菌细胞质膜以及叶绿体内囊体膜上,用于合成 ATP 或者产生质子。但是目前新的实验研究表明 ATP 合成酶存在于多种动物细胞表明并作为多种配体的受体参与到多种细胞过程中,如脂代谢、pH 调节以及肿瘤细胞的溶解。除此之外还与一些疾病相关,如亚急性坏死性脑脊髓病,一种神经性疾病,是由于 ATP 合成酶损伤导致。另外,在阿尔茨海默病和早衰痴呆症患者中发现其线粒体中的 ATP 合成酶存在缺陷^[11]。3A 蛋白与 ATP 合成酶相互作用,说明 3A 蛋白可能在细胞中充当受体的作用,在 EV71 感染人体后产生多种神经性疾病起着重要作用^[9]。

研究表明 3A 在病毒复制时与细胞内膜结构相互作用^[12],这是病毒 RNA 复制的一个前提。为了更进一步了解 EV71 的感染及复制过程机制。本研究表达并纯化了 3A 蛋白,采用 T7 噬菌体展示技术,以 EV71 3A 亲水蛋白为靶蛋白,筛选了人肝细胞 cDNA 文库,得到多个可能与 3A 亲水蛋白相互作用

的蛋白,通过对相互作用蛋白功能的分析,可以进一步推测出 3A 在细胞内可能的作用位点。为进一步研究人肠道病毒的致病机制及疫苗的研究奠定了基础。

参考文献

- [1] 黄琴琴,唐瑞. 人肠道病毒 71 型 3A 蛋白的原核表达及抗体制备[J]. 中国病原生物学杂志,2013,8(6):507-509.
- [2] Zhu C, Zheng F, Sun T. Interaction of avian influenza virus NS1 protein and nucleolar and coiled-body phosphoprotein 1[J]. Virus Genes, 2012, 358(1): 261-273.
- [3] 黄英,张君. 用 T7 噬菌体展示技术筛选乙型肝炎病毒 PreS1 相互作用蛋白[J]. 重庆医科大学学报, 2007, 32(4): 340-343.
- [4] Szakonyi D, Byrne ME. Ribosomal protein L27a is required for growth and patterning in Arabidopsis thaliana[J]. Plant J, 2011, 65(2): 269-281.
- [5] Frigerio JM, Dagorn JC, Iovanna JL. Cloning, sequencing and expression of the L5, L21, L27a, L28, S5, S9, S10 and S29 human ribosomal protein mRNAs[J]. Biochim Biophys Acta, 1995, 1262(1): 64-68.
- [6] Hong S, Pedersen PL. ATP synthase and the actions of inhibitors utilized to study its roles in human health, disease, and other scientific areas[J]. Microbiol Mol Biol Rev, 2008, 72(4): 590-641.
- [7] Ahmad Z, Okafor F, Azim S, et al. ATP synthase: a molecular therapeutic drug target for antimicrobial and antitumor peptides[J]. Curr Med Chem, 2013, 20(15): 1956-1973.
- [8] 王景涛,季平. 利用 T7 噬菌体展示技术构建人舌鳞癌细胞多肽文库[J]. 重庆医科大学学报, 2010, 35(11): 1687-1689.
- [9] 庞华,罗弋. 人源肺腺癌噬菌体抗体库的构建及初步筛选[J]. 第三军医大学学报, 2008, 30(22): 2082-2085.
- [10] 臧家涛,李淑慧. 应用 DNA shuffling 及 T7 噬菌体展示技术定向进化并筛选鉴定 sCD74 突变体[J]. 第三军医大学学报, 2008, 30(8): 694-697.
- [11] 赵善超,李志杰. 用 T7 噬菌体展示系统筛选与晚期糖基化终产物受体胞内段相结合的蛋白[J]. 解放军医学杂志, 2004, 29(1): 61-63.
- [12] 刘刚. 噬菌体展示技术筛选乙型肝炎病毒 X 蛋白相互作用蛋白[J]. 国际检验医学杂志, 2011, 32(1): 26-28.

(收稿日期:2014-02-28)

(上接第 2128 页)

及检测试剂制备的候选特异性片段备选,有待进一步研究。

参考文献

- [1] 金奇. 医学分子病毒学[M]. 北京:科学出版社,2001:606-613.
- [2] Samuda GM. Monoplegia caused by enterovirus 71: an outbreak in HongKong[J]. Pediatr Infect Dis J, 1987, 6(1): 206-208.
- [3] McMinn PC. An overview of the evolution of enterovirus 71 and its clinical and public health significance[J]. FEMS Microbiol Rev, 2002, 26(1): 91-107.
- [4] Yi L, Lu J, Kung HF, et al. The virology and developments toward control of human enterovirus 71[J]. Crit Rev Microbiol, 2011, 37(4): 313-327.
- [5] Wu CN, Lin YC, Fann C, et al. Protection against lethal enterovirus 71 infection in newborn mice by passive immunization with subunit VP1 vaccines and inactivated virus[J]. Vaccine, 2001, 20(1): 895-904.
- [6] Brown BA, Oberste MS, Alexander JP, et al. Molecular epidemiology and evolution of enterovirus 71 strains isolated from 1970 to

- 1998[J]. J Virol, 2000, 74(24): 12003.
- [7] 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.
- [8] Huang YP, Lin TL, Hsu LC, et al. Genetic diversity and C2-like subgenogroup strains of enterovirus 71, Taiwan, 2008[J]. Virol J, 2010, 7(1): 277.
- [9] Brown BA. Molecular epidemiology and evolution of enterovirus 71 strains isolated from 1970 to 1998[J]. J Virol, 1999, 73(1): 9969-9975.
- [10] Derman AI, Prinz WA, Belin D, et al. Mutations that allow disulfide bond formation in the cytoplasm of Escherichia coli[J]. Science, 1993, 262(5140): 1744-1747.
- [11] Wu TC, Wang YF, Lee YP, et al. Immunity to avirulent enterovirus 71 and coxsackie A16 virus protects against enterovirus 71 infection in mice[J]. J Virol, 2007, 81(19): 10310-10315.

(收稿日期:2014-02-24)