

# 一种肠道病毒 71 型毒株的一般生物学特性检测及分子鉴定

奚彩丽, 魏艳红, 袁晨光, 寇锋, 胡康洪

湖北工业大学 中德生物医学中心 发酵工程湖北省协同创新中心, 湖北 武汉 430068

**摘要:** 目的 对一种肠道病毒 71 型(enterovirus 71, EV71)毒株进行一般生物学特性检测及分子鉴定。方法 将 EV71 毒株接种于人横纹肌瘤(rhabdomyosarcoma, RD)细胞进行病毒培养,通过 EV71 致细胞病变效应(CPE)分析、CCID<sub>50</sub>法检测子代病毒产量,实时荧光定量 PCR(qRT-PCR)检测 EV71 核酸合成情况以及免疫荧光印迹检测 EV71 蛋白表达水平,来确认其生物学特性;RT-PCR 扩增 EV71 保守区的基因片段后进行基因测序,并将测序结果经 BLAST 程序进行同源比对。结果 该毒株接种 RD 细胞 48 h 后出现明显的 CPE,其在 RD 细胞中增殖,最终导致细胞死亡;该毒株在 RD 细胞中处于快速复制状态,其核酸合成与蛋白表达随时间的延长大量增加;该毒株与 EV71/wuhan/3018/2010(KF501389)的核苷酸序列同源性为 100%。结论 该 EV71 毒株为 EV71/wuhan/3018/2010,在 RD 细胞中可快速增殖,毒力较强,适合作为抗 EV71 药物筛选毒株。  
**关键词:** 肠道病毒 71 型;生物学特性;分子鉴定

中图分类号: R373.2 文献标识码: A 文章编号: 1004-5503(2016)09-0913-05

## Generally biological characteristics and molecular identification of an enterovirus 71 strain

XI Cai-li, WEI Yan-hong, YAO Chen-guang, KOU Zheng, HU Kang-hong

Hubei University of Technology, Sino-Germany Biomedical Center, Hubei Collaborative Innovation Center for Industrial Fermentation, Wuhan 430068, Hubei Province, China

Corresponding author: WEI Yan-hong, E-mail: weiyanhong925@163.com; HU Kang-hong, E-mail: hukh@mail.hbut.edu.cn

**Abstract:** Objective To identify an enterovirus 71 (EV71) strain and test its generally biological characteristics. Methods EV71 was inoculated onto human rhabdomyosarcoma cells for culture. EV71-mediated cytopathogenic effect (CPE) was determined by plaque assay. The progeny proliferation was analyzed through CCID<sub>50</sub> virus titration. The expressions of viral RNA and viral proteins were determined by real-time fluorescent quantitative PCR (qRT-PCR) and immunofluorescence assay respectively. The gene sequences of conserved region of EV71 was amplified by RT-PCR and sequenced, and the result was compared with those in GenBank by BLAST software. Results Obvious CPE was observed in RD cells 48 h after infection, indicating that the EV71 strain might grow in RD cells and cause the cell death. The strain was replicated rapidly in RD cells, of which the expressions of viral RNA and protein increased as time went on. The homology of nucleotide sequence of the strain was 100% to that of EV71/wuhan/3018/2010 strain. Conclusion The strain was identified as EV71/wuhan/3018/2010, which was proliferated rapidly in RD cells, showed strong virulence, and was suitable for screening of drugs against EV71.  
**Key words:** Enterovirus 71 (EV71); Biological characteristics; Molecular identification

肠道病毒 71 型(enterovirus 71, EV71)属于小核糖核酸病毒科肠道病毒属成员,是一种临床上重要的嗜神经病毒。EV71 是引起手足口病(hand, foot and mouth disease, HFMD)的主要病原体,其感染能引起手、足、口、臀等部位出现皮疹或疱疹,还可并发致死神经系统症状,如无菌脑膜炎、脑干脑炎、急性呼吸道疾病和肺水肿等<sup>[1-3]</sup>。EV71 于 1969 年首次在美国加利福尼亚患有中枢神经系统疾病婴儿的粪便标本中分离得到<sup>[3]</sup>;随后, EV71 感染性疾病在世界范围内多次暴发与流行,包括中国、澳大利亚、日本、新

加坡等,在亚太地区尤其是我国形势严峻<sup>[4,5]</sup>。EV71 感染已严重危害到人类公共健康,但目前对于由 EV71 感染引起的疾病尚无特效治疗药物,且尚无批准的疫苗<sup>[4]</sup>。

本研究分析了从武汉中南医院感染科分离得到的 EV71 毒株的生物学特性,并通过 PCR 法对其进行分子鉴定,为进一步研究 EV71 的感染机制和体外药物筛选奠定基础。

### 1 材料与与方法

**1.1 毒株、菌株、质粒及细胞** EV71 毒株由武汉大学中南医院感染科分离提供;载体 pCMV-Tag2B 由武汉协和医院刘为勇惠赠;大肠埃希菌 DH5α 感受态细胞为本实验室保存;人横纹肌瘤(rhabdomyosarcoma, RD)细胞由武汉大学生命科学院病毒学国家重点实验室刘应乐老师惠赠,用含 10%血清的 DMEM 培养基传代培养。

**1.2 主要试剂** DMEM 培养基和胎牛血清购自美国 Gibco 公司;MTT 购自武汉鼎国生物技术有限公司;RNA 提取试剂(RNAiso Plus)、RNA 反转录试剂盒(PrimeScript RT Reagent Kit with gDNA Eraser)和荧光定量 PCR 试剂盒(SYBR Premix Ex Taq II<sup>TM</sup>)均购自日本 TaKaRa 公司;鼠抗 EV71 单克隆抗体购自美国 Millipore 公司;羊抗小鼠单克隆抗体[Alexa Fluor 488-Conjugated Affinipure Goat Anti-Mouse IgG(H+L)]购自美国 Jackson 公司;4',6-diamidino-2-phenylindole(DAPI)购自美国 Sigma 公司;T4 DNA 连接酶购自美国 NEB 公司。

**1.3 EV71 效价的测定** 将 EV71 悬液用含 2%血清的 DMEM 细胞维持液 10 倍梯度稀释(10<sup>-1</sup> ~ 10<sup>-8</sup>),分别滴入在贴壁 96 孔板的 RD 细胞上,于 37 °C,5% CO<sub>2</sub> 细胞培养箱孵育 1.5 h 后,更换新的细胞维持液,培养 48 h 后,倒置显微镜下观察细胞病变(CPE)效应,确定出现细胞病变的病毒滴定浓度及病变孔数,根据 Reed-Muench 公式计算病毒液的半数感染量(CCID<sub>50</sub>)。

**1.4 EV71 致 RD 细胞病变效应(CPE)观察及细胞生长抑制率的检测** 于已长满单层 RD 细胞的 96 孔培养箱内孵育 1.5 h;弃病毒上清液,更换含 2%血清的细胞维持液,于 37 °C,5% CO<sub>2</sub> 条件下分别培养 24、48 和 72 h,同时设置正常细胞对照组。倒置显微镜下逐日观察 CPE;无细胞病变记为-,25%以下细胞病变记为+,25% ~ 50%细胞病变记为++,50% ~

75%细胞病变记为卅,75%以上细胞病变记为卅卅。采用 MTT 法检测细胞的生长抑制率:每孔加入 MTT (5 mg/ml)50 μl,孵育 3 ~ 4 h,弃上清液,加入等体积的 DMSO 溶解沉淀,上酶标仪于 492 nm 波长处读取吸光度值,设 3 个复孔,取平均值。按下式计算细胞生长抑制率。

$$\text{细胞生长抑制率}(\%) = (1 - \text{实验组 } A_{492} \text{ 值} / \text{对照组 } A_{492} \text{ 值}) \times 100\%$$

**1.5 EV71 子代病毒产量的测定** 于已长满单层 RD 细胞的 96 孔板上,加入 100 CCID<sub>50</sub> 的 EV71 悬液,于 37 °C 培养箱中孵育 1.5 h;弃去感染液,加入含 2%血清的 DMEM 细胞维持液继续培养,分别于 4、8、24 和 36 h 收集细胞和上清培养液。细胞经反复冻融 3 次裂解,参照 Trizol Reagent 说明书提取总 RNA,反转录后,使用 SYBR Premix Ex Taq II (Perfect Real Time)定量 PCR 试剂盒进行 qRT-PCR。引物序列为: EV71-VPI-F: 5'-CACACAGTGAGCAGTCATCG-3', EV71-VPI-R: 5'-GTCTCAATCATGCTCTCTCTCACT-3'; β-actin-F: 5'-GGCGGGACCACCATGTACCCT-3', β-actin-R: 5'-AGGGGCGGACTCGTCATACT-3'。引物由武汉天一辉远生物科技有限公司合成。反应条件为:94 °C 5 min;94 °C 30 s,57.5 °C 45 s,72 °C 45 s,共 40 个循环;72 °C 延伸 5 min。采用比较 CT 值法(2<sup>-ΔΔCT</sup> 法)对实验数据进行相对定量分析。

**1.6 EV71 在 RD 细胞中核酸合成分析** 采用实时荧光定量 PCR(qRT-PCR)。将 RD 细胞接种于 24 孔细胞培养板中,加入 100 CCID<sub>50</sub> 的 EV71 悬液,孵育 1.5 h 后,更换新的细胞维持液,于 37 °C,5% CO<sub>2</sub> 细胞培养箱中继续培养,并设细胞对照组。分别于 4、8、24 和 36 h 收集细胞和上清培养液。细胞经反复冻融 3 次裂解,参照 Trizol Reagent 说明书提取总 RNA,反转录后,使用 SYBR Premix Ex Taq II (Perfect Real Time)定量 PCR 试剂盒进行 qRT-PCR。引物序列为: EV71-VPI-F: 5'-CACACAGTGAGCAGTCATCG-3', EV71-VPI-R: 5'-GTCTCAATCATGCTCTCTCTCACT-3'; β-actin-F: 5'-GGCGGGACCACCATGTACCCT-3', β-actin-R: 5'-AGGGGCGGACTCGTCATACT-3'。引物由武汉天一辉远生物科技有限公司合成。反应条件为:94 °C 5 min;94 °C 30 s,57.5 °C 45 s,72 °C 45 s,共 40 个循环;72 °C 延伸 5 min。采用比较 CT 值法(2<sup>-ΔΔCT</sup> 法)对实验数据进行相对定量分析。

**1.7 EV71 在 RD 细胞中蛋白表达的检测** 采用免疫荧光印迹法。将 RD 细胞接种于 24 孔板中,待细胞长满单层后,加入 100 CCID<sub>50</sub> 的 EV71 悬液,孵育 1.5 h 后,更换新的细胞维持液继续培养,并设细胞对照组。分别于 8 和 24 h 弃去培养液, PBS 洗涤 3 次,用 4%多聚甲醛固定后,经通透、封闭,加入鼠抗 EV71 单克隆抗体(1:4 000 稀释)孵育;PBST 漂洗,加入二抗(1:200 稀释)孵育;PBST 漂洗,DAPI 染色,荧光显微镜下观察。

**1.8 EV71 毒株的分子鉴定**

**1.8.1 病毒 RNA 的提取及 cDNA 的合成** 用 100 CCID<sub>50</sub> 的 EV71 悬液感染 RD 细胞,48 h 后,收集细胞和培养上清液,参照 Trizol Reagent 说明书提

取总 RNA,并按照 PrimeScript RT reagent Kit with gDNA Eraser 试剂盒说明书反转录合成 cDNA。

**1.8.2 EV71 的测序** 从 NCBI 的 GenBank 中下载 5 株 EV71 全基因组核苷酸序列(GenBank 登录号分别为 AB204852、AB204853、U22521、EU703813、GU434678),使用 DNAMAN version 6 软件进行序列比对,选取保守性较高的区域,利用 Primer Premier 5.0 软件设计 2 对特异性引物,在基因组中的位置见表 1。以合成的 cDNA 为模板,用 2 对引物进行 PCR 反应,反应条件为:94 °C 预变性 1 min;94 °C 变性 30 s,退火 30 s,72 °C 延伸 1 min,共 30 个循环;72 °C 再延伸

5 min。引物序列、退火温度及扩增产物大小见表 1。扩增得到的目的片段经 1%琼脂糖凝胶电泳分离,切胶后用胶回收试剂盒回收。回收产物与载体 pCMV-Tag2B 经 T4 DNA 连接酶于室温连接 2 ~ 3 h,连接产物转化感受态大肠埃希菌 DH5α,重组克隆经 BamH I 和 Hind III 限制性内切酶酶切分析及 PCR 鉴定。阳性克隆经武汉天一辉远生物科技有限公司进行基因序列测定。

**1.8.3 序列同源性分析** 将测序结果利用 NCBI 上的 BLAST 程序进行同源比对,并使用 MEGA 6.0 构建进化树。

表 1 RT-PCR 引物序列及扩增片段大小

Table 1 Sequences of RT-PCR primers and lengths of amplified fragments

引物名称	引物序列(5'-3')	位点(nt)	产物长度(bp)	退火温度(°C)
EV71-1-F	GGATCCATGAGAAATGAAGCAGCTCAG	EU703813:3 194-3 213	1 253	53
EV71-1-R	AAGCTTCATACAGGTCATTAATCGGTG	EU703813:4 427-4 446		
EV71-2-F	GGATCCGGAAGTTCAGAGAGATCAACAAT	GU434678:5 000-5 024	1 601	56
EV71-2-R	AAGCTTGTAACTGCTCCAAAATATACATCAG	GU434678:6 576-6 600		

### 2 结果

**2.1 EV71 的效价** 经检测,该 EV71 毒株的 CCID<sub>50</sub> 为 10<sup>5.3</sup>。

**2.2 EV71 致 RD 细胞病变效应及细胞生长抑制率** 倒置显微镜下观察显示,EV71 感染 RD 细胞后 24 h,细胞未出现明显的 CPE,与对照组无显著差异;感染后 48 h,细胞出现严重的 CPE,表现为细胞变圆,脱离细胞培养板壁;感染后 72 h,细胞几乎全部死亡,完全脱离细胞板壁,悬浮于培养基中。见图 1。MTT 法检测结果显示,EV71 感染后 24 h, RD 细胞存活率很高,达 99%;感染后 48 h,细胞存活率仅为 36%;感染后 72 h,细胞 100%死亡。表明该 EV71 毒株可在宿主细胞中进行增殖,且呈时间依赖性。

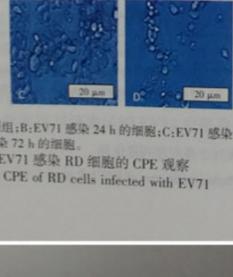


图 1 EV71 感染 RD 细胞的 CPE 观察  
Fig 1. CPE of RD cells infected with EV71

**2.3 EV71 子代病毒产量分析** 检测结果显示,培养 4 h 时,几乎检测不到子代病毒;8 h 时,病毒滴度显著增加;36 h 时,子代病毒滴度已增至 7.0 lgCCID<sub>50</sub>,见图 2。表明 EV71 在宿主细胞中呈快速复制状态。

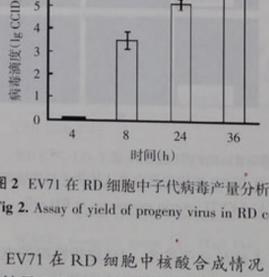


图 2 EV71 在 RD 细胞中子代病毒产量分析  
Fig 2. Assay of yield of progeny virus in RD cells

**2.4 EV71 在 RD 细胞中核酸合成情况** qRT-PCR 检测结果显示,培养 4 h 即可检测到 EV71 的 RNA 水平,随着时间的延长,其表达水平显著增加,在 36 h 时,已增至 700 倍以上,见图 3。

**2.5 EV71 在 RD 细胞中蛋白表达情况** 荧光显微镜下观察显示,培养 8 和 24 h 均可见 EV71 感染组聚集大量病毒颗粒荧光蛋白,且蛋白的表达水平随着时间的延长而增加;而细胞对照组未见绿色荧光。见图 4。

**2.6 EV71 毒株的分子鉴定** 1%琼脂糖凝胶电泳分析显示,采用 EV71-1 和 EV71-2 引物进行扩增,分别与预期约 1 200 和 1 600 bp 的特异性条带,大小均同源比对,见图 5。测序结果经 BLAST 程序进行同源比对,发现获得的 EV71-1 核苷酸序列与 EV71-Hubei-09-China, BrCr-TR, BrCr-ts, EV71/wuhan/3018/2010, BrCr-CA-70 5 株毒株的核苷酸序列同源性均为 99%;EV71-2 序列与 EV71-Hubei-09-China, BrCr-TR, BrCr-ts, BrCr-CA-70 4 株毒株的核苷酸序

列同源性均为 99%,而与 EV71/wuhan/3018/2010 毒株的核苷酸序列同源性为 100%。构建的进化树发现,两段核苷酸序列均与 EV71/wuhan/3018/2010 毒株最为接近,见图 6 和图 7,综合判断该毒株为 EV71/wuhan/3018/2010。

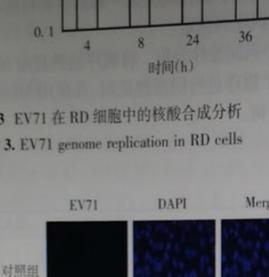


图 3 EV71 在 RD 细胞中的核酸合成分析  
Fig 3. EV71 genome replication in RD cells

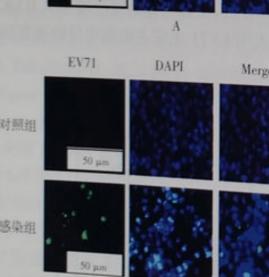


图 4 EV71 在 RD 细胞中蛋白表达的荧光显微镜观察  
Fig 4. IFA of EV71 protein expression in RD cells

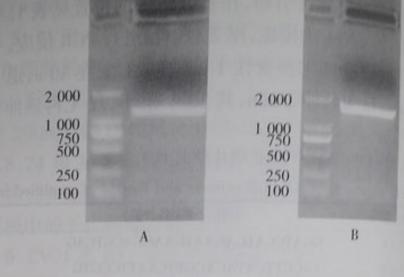


图 5 RT-PCR 扩增产物电泳图  
Fig 5. Electrophoretic profile of RT-PCR products

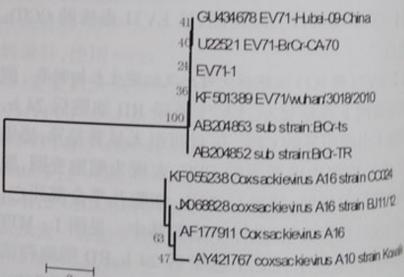


图 6 EV71-1 基因序列进化树  
Fig 6. Phylogenetic tree of EV71-1 gene

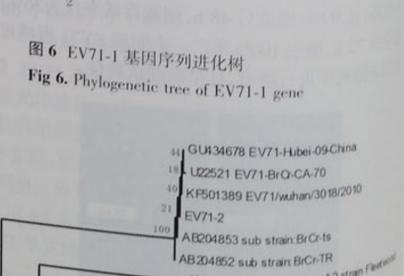


图 7 EV71-2 基因序列进化树  
Fig 7. Phylogenetic tree of EV71-2 gene

列同源性均为 99%,而与 EV71/wuhan/3018/2010 毒株的核苷酸序列同源性为 100%。构建的进化树发现,两段核苷酸序列均与 EV71/wuhan/3018/2010 毒株最为接近,见图 6 和图 7,综合判断该毒株为 EV71/wuhan/3018/2010。

列同源性均为 99%,而与 EV71/wuhan/3018/2010 毒株的核苷酸序列同源性为 100%。构建的进化树发现,两段核苷酸序列均与 EV71/wuhan/3018/2010 毒株最为接近,见图 6 和图 7,综合判断该毒株为 EV71/wuhan/3018/2010。

列同源性均为 99%,而与 EV71/wuhan/3018/2010 毒株的核苷酸序列同源性为 100%。构建的进化树发现,两段核苷酸序列均与 EV71/wuhan/3018/2010 毒株最为接近,见图 6 和图 7,综合判断该毒株为 EV71/wuhan/3018/2010。

列同源性均为 99%,而与 EV71/wuhan/3018/2010 毒株的核苷酸序列同源性为 100%。构建的进化树发现,两段核苷酸序列均与 EV71/wuhan/3018/2010 毒株最为接近,见图 6 和图 7,综合判断该毒株为 EV71/wuhan/3018/2010。

列同源性均为 99%,而与 EV71/wuhan/3018/2010 毒株的核苷酸序列同源性为 100%。构建的进化树发现,两段核苷酸序列均与 EV71/wuhan/3018/2010 毒株最为接近,见图 6 和图 7,综合判断该毒株为 EV71/wuhan/3018/2010。

列同源性均为 99%,而与 EV71/wuhan/3018/2010 毒株的核苷酸序列同源性为 100%。构建的进化树发现,两段核苷酸序列均与 EV71/wuhan/3018/2010 毒株最为接近,见图 6 和图 7,综合判断该毒株为 EV71/wuhan/3018/2010。

列同源性均为 99%,而与 EV71/wuhan/3018/2010 毒株的核苷酸序列同源性为 100%。构建的进化树发现,两段核苷酸序列均与 EV71/wuhan/3018/2010 毒株最为接近,见图 6 和图 7,综合判断该毒株为 EV71/wuhan/3018/2010。

列同源性均为 99%,而与 EV71/wuhan/3018/2010 毒株的核苷酸序列同源性为 100%。构建的进化树发现,两段核苷酸序列均与 EV71/wuhan/3018/2010 毒株最为接近,见图 6 和图 7,综合判断该毒株为 EV71/wuhan/3018/2010。

列同源性均为 99%,而与 EV71/wuhan/3018/2010 毒株的核苷酸序列同源性为 100%。构建的进化树发现,两段核苷酸序列均与 EV71/wuhan/3018/2010 毒株最为接近,见图 6 和图 7,综合判断该毒株为 EV71/wuhan/3018/2010。

列同源性均为 99%,而与 EV71/wuhan/3018/2010 毒株的核苷酸序列同源性为 100%。构建的进化树发现,两段核苷酸序列均与 EV71/wuhan/3018/2010 毒株最为接近,见图 6 和图 7,综合判断该毒株为 EV71/wuhan/3018/2010。

列同源性均为 99%,而与 EV71/wuhan/3018/2010 毒株的核苷酸序列同源性为 100%。构建的进化树发现,两段核苷酸序列均与 EV71/wuhan/3018/2010 毒株最为接近,见图 6 和图 7,综合判断该毒株为 EV71/wuhan/3018/2010。

列同源性均为 99%,而与 EV71/wuhan/3018/2010 毒株的核苷酸序列同源性为 100%。构建的进化树发现,两段核苷酸序列均与 EV71/wuhan/3018/2010 毒株最为接近,见图 6 和图 7,综合判断该毒株为 EV71/wuhan/3018/2010。

列同源性均为 99%,而与 EV71/wuhan/3018/2010 毒株的核苷酸序列同源性为 100%。构建的进化树发现,两段核苷酸序列均与 EV71/wuhan/3018/2010 毒株最为接近,见图 6 和图 7,综合判断该毒株为 EV71/wuhan/3018/2010。

列同源性均为 99%,而与 EV71/wuhan/3018/2010 毒株的核苷酸序列同源性为 100%。构建的进化树发现,两段核苷酸序列均与 EV71/wuhan/3018/2010 毒株最为接近,见图 6 和图 7,综合判断该毒株为 EV71/wuhan/3018/2010。

列同源性均为 99%,而与 EV71/wuhan/3018/2010 毒株的核苷酸序列同源性为 100%。构建的进化树发现,两段核苷酸序列均与 EV71/wuhan/3018/2010 毒株最为接近,见图 6 和图 7,综合判断该毒株为 EV71/wuhan/3018/2010。

列同源性均为 99%,而与 EV71/wuhan/3018/2010 毒株的核苷酸序列同源性为 100%。构建的进化树发现,两段核苷酸序列均与 EV71/wuhan/3018/2010 毒株最为接近,见图 6 和图 7,综合判断该毒株为 EV71/wuhan/3018/2010。

列同源性均为 99%,而与 EV71/wuhan/3018/2010 毒株的核苷酸序列同源性为 100%。构建的进化树发现,两段核苷酸序列均与 EV71/wuhan/3018/2010 毒株最为接近,见图 6 和图 7,综合判断该毒株为 EV71/wuhan/3018/2010。