

DOI:10.13350/j.cjpb.190903

• 论著 •

EV71 3D 聚合酶基因体外重组质粒的构建、表达及活性检测*

李妮, 王海杰, 吕诗韵, 杜沧浩, 孙鸽, 魏艳红**, 胡康洪**

(湖北工业大学, 湖北省工业微生物重点实验室, 中德生物医学中心, 湖北武汉 430068)

【摘要】 目的 构建编码肠道病毒 71 型(EV71)3D 聚合酶基因的重组质粒, 表达和纯化 3D 聚合酶并检测其活性。

方法 将编码 3D 聚合酶的基因片段克隆至 pGEX-4T-1 原核表达载体, 重组质粒转化入大肠埃希菌 BL21(DE3), IPTG 诱导表达, 经谷胱甘肽琼脂糖亲和层析、TEV 酶酶切、Ni-NTA 柱亲和纯化后获得高纯度 3D 聚合酶蛋白, 放射测量法是体外酶活力测定方法中较常见的一种方法, 本研究通过测定插入 poly(U) RNA 放射性标志 UMP 的量确定 3D 聚合酶的活性。 **结果** 经酶切、PCR、测序鉴定 pGEX-4T-3D 重组质粒构建成功, 3D 聚合酶基因片段大小为 1 386 bp。与未诱导相比, 经 IPTG 诱导后带有 GST 标签的 3D 聚合酶成功表达, 表达产物的相对分子质量约为 79×10^3 , TEV 酶酶切掉 GST 标签后的相对分子质量约为 55×10^3 。纯化的 3D 聚合酶经体外延伸反应后跑变性尿素聚丙烯酰胺凝胶电泳得知, 3D 聚合酶溶解液 DMSO 组相比于 3D 聚合酶强抑制剂 EDTA 组, 在 DMSO 组中, 可以观察到强电泳条带, 表明放射性同位素标志程度强, 表明反应速率快, 即 3D 聚合酶酶活较好。 **结论** 构建了 EV71 3D 聚合酶基因重组质粒, 其表达产物 3D 聚合酶为以 EV71 3D 聚合酶为靶点的抗 EV71 药物筛选奠定基础。

【关键词】 肠道病毒 71 型(EV71); 3D 聚合酶; 重组质粒构建; 蛋白纯化; 酶活检测

【中图分类号】 R373.2

【文献标识码】 A

【文章编号】 1673-5234(2019)09-1001-04

[Journal of Pathogen Biology. 2019 Sep; 14(9): 1001-1004, 1009.]

Construction of a recombinant plasmid containing EV71 3D polymerase, its expression, and an assay of its activity *in vitro*

LI Ni, WANG Hai-jie, LV Shi-yun, DU Cang-hao, SUN Ge, WEI Yan-hong, HU Kang-hong (Hubei Provincial Key Laboratory of Industrial Microbiology, Sino-German Biomedical Center, Hubei University of Technology, Wuhan, China 430068) * ■ ■ ■

【Abstract】 **Objective** To construct a recombinant plasmid encoding the 3D polymerase gene of enterovirus 71 (EV71) in order to express and purify 3D polymerase and evaluate its activity. **Methods** A DNA fragment encoding 3D polymerase was cloned into a pGEX-4T-1 prokaryotic expression vector. The recombinant plasmid was transformed into E. coli BL21(DE3), and protein expression was induced with IPTG. The expressed protein was purified using affinity chromatography with glutathione agarose, enzyme digestion with TEV, and affinity chromatography (Ni-NTA). Highly pure 3D polymerase was obtained, and its functional activity was evaluated by measuring the amount of UMP inserted into poly (U) RNA. Radiometry is a common method for the determination of enzyme activity *in vitro*. **Results** Restriction analysis and sequencing verified that the recombinant plasmid pGEX-4T-3D was successfully constructed. The 3D polymerase gene fragment was 1,386 bp in length. After expression was induced with IPTG, 3D polymerase with a GST tag was successfully expressed in comparison to the untreated group. The expressed product was about 79×10^3 in size. When the GST tag was removed with the TEV enzyme, the purified 3C polymerase was about 55×10^3 in size. An extension reaction *in vitro* and denatured urea polyacrylamide gel electrophoresis revealed that 3D polymerase in the presence of the solvent DMSO produced strong electrophoresis bands in comparison to 3D polymerase in the presence of the strong inhibitor EDTA, indicating that the amount of radioisotopes was high and the reaction rate was fast, that is, 3D polymerase had better enzyme activity. Experimental results indicated that purified 3D polymerase has polymerase activity. **Conclusion** The recombinant plasmid pGEX-4T-3D was created and 3D polymerase with a high level of functional activity was successfully prepared. This polymerase can be used not only to study the function and mechanism of action of EV71 and also

* **【基金项目】** 细胞调控与分子药物"111"引智基地青年学者国际合作研究基金资助项目(No. XBTK-2018005);湖北工业大学博士科研启动项目(No. BSQD2015004)。

** **【通讯作者】** 魏艳红, E-mail: weiyanhong925@163.com; 胡康洪, E-mail: hukh@hbut.edu.cn

【作者简介】 李妮(1994-),女,湖北人,硕士研究生,主要从事生物工程研究。E-mail: 2384013423@qq.com

to screen and design anti-EV71 drugs targeting 3D polymerase.

【Key words】 Enterovirus 71 (EV71); 3D polymerase; construction of a recombinant plasmid; protein purification; evaluation of activity

肠道病毒 71 型 (EV71) 是一种属于小 RNA 病毒^[1], 自 1969 年分离鉴定以来, EV71 感染呈全球分布, 地区流行以亚太尤为严重^[2]。EV71 感染是导致小儿手足口病 (HFMD) 的主要原因之一, 可伴有严重的神经系统并发症, 重症者甚至导致死亡。2008—2012 年, 我国累计报道 720 万 HFMD 病例, 其中 2 457 例 (0.03%) 是致命重症病例^[3]。由于目前还没有特异的临床药物用于 EV71 感染的治疗, 因此亟待研发对 EV71 感染的有效抗病毒药物^[4]。

3D 聚合酶的全称是 RNA 依赖的 RNA 聚合酶 (RNA-dependent RNA polymerase, RDRP), 它是 RNA 病毒的一种保守性较高的参与 RNA 病毒基因组复制的关键酶^[5]。病毒基因组翻译完成后, RNA 作为模板在病毒 3D 聚合酶作用下合成 (-)RNA 中间体, (-)RNA 又作为 (+)RNA 复制的模板, 在细胞内质网中进一步合成大量 (+)RNA, 最后, (+)RNA 被包裹进病毒颗粒, 宿主细胞裂解时释放。由此可见, 病毒基因组的复制要在 3D 聚合酶参与下完成, 因此 3D 聚合酶可作为抗 EV71 药物开发的有效靶点。Hung 等^[6]的研究表明金精三羧酸 (ATA) 通过作用于 3D 聚合酶从而抑制 EV71 的复制。核酸类似物如利巴韦林和非

核苷酸类似物 DTriP-22 也被作为 3D 聚合酶抑制剂应用在抗 EV71 的研究^[7]。黄芩苷对 EV71 感染具有抗病毒作用, 其机制是通过抑制 EV71 3D 聚合酶的表达和 Fas/FasL 的信号通路^[8]。本研究拟将 EV71 3D 聚合酶基因克隆至原核表达载体 pGEX-4T-1 中, 在 BL21(DE3) 培养基中诱导表达, 分离纯化重组 EV71 3D 聚合酶并检测其活性, 为以 EV71 3D 聚合酶为靶标的药物筛选奠定基础。

材料与方 法

1 材 料

EV71 毒株 EV71/wuhan/3018/2010, 人横纹肌瘤细胞 (Rhabdomyosarcoma, RD) 及大肠埃希菌 DH5 α 和 BL21(DE3) 均由本实验室保存。

2 方 法

2.1 引物设计与合成 通过 NCBI 数据库查询 EV71/wuhan/3018/2010 毒株 3D 聚合酶基因序列, 使用 Primer5 软件设计引物, 在编码 3D 聚合酶基因的上游添加一个 TEV 酶切位点。引物序列见表 1, 由武汉天一辉远生物科技有限公司合成。

表 1 PCR 扩增 3D 聚合酶基因引物
Table 1 Primer sequences of Prokaryotic expressing 3D polymerase

引物名称 The type of primers	序列 (5'→3') The sequences of primers (5'→3')
EV71-3D-F(原核)	GGATCCGAGAATCTTTATTTCAGGGAGAGATCCAGTGGATGAAGC
EV71-3D-R(原核)	GAATTCAAATAACTCGAGCCAATTTCTTCTC

注: 下划线部分为代表性限制性内切酶的位点 (BamH I : GGATCC; EcoR I : GAATTC), 黑体部分为 TEV 酶切位点。
Note: The underlined part is the site of restriction endonuclease (BamH I; GGATCC; EcoR I; GAATTC), and the blackbody part is the site of TEV digestion.

2.2 重组质粒的构建及鉴定 EV71 感染 RD 细胞 48 h 后提取 RNA 并进行反转录。以反转录获得的 cDNA 为模板 PCR 扩增 EV71 3D 聚合酶基因。PCR 反应条件: 94 ℃ 预变性 3 min; 94 ℃ 变性 30 s, 60 ℃ 退火 30 s, 72 ℃ 延伸 1 min, 共 30 个循环; 72 ℃ 延伸 5 min。将 PCR 产物和载体 pGEX-4T-1 分别用 BamH I 和 EcoR I 双酶切 (37 ℃ 反应 4~6 h), 酶切目的片段和载体纯化后在 T4 DNA 连接酶作用下 4 ℃ 过夜连接。连接产物转化 DH5 α , 转化菌均匀涂布于含氨苄青霉素的 LB 平板培养。挑选重组阳性克隆, 提取质粒, 经 PCR 和双酶切鉴定正确后由武汉天一辉远生物科技有限公司测序, 进行序列分析。

2.3 3D 聚合酶原核表达与纯化 将测序正确的重组

质粒 pGEX-4T-3D 转化至 BL21(DE3), 转化菌涂布于含氨苄青霉素的 LB 固体平皿上培养。挑取单菌落, 用含氨苄青霉素 LB 液体培养基于 37 ℃、220 r/min 摇床震荡培养 3~4 h 至 OD 值为 0.8 左右时取出, 置于冰上冷却 30 min; 加入终浓度为 0.8 mmol/L 的 IPTG, 18 ℃、200 r/min 培养 24 h。4 ℃、5 000 g 离心 30 min 收集细菌, 用 GST binding buffer 悬浮; 加入蛋白酶抑制剂, 冰上裂解 10 min, 超声破碎 30 min (工作 5 s 间隔 5 s, 每超声 10 min 将悬液颠倒混匀); 取菌体裂解液, 4 ℃、10 000 g 离心 30 min, 收集上清即为粗酶液。

装柱, 加入 3 ml GST 琼脂糖树脂, 加入 5 倍柱体积的 GST Binding Buffer 平衡后加入粗酶液, 收集流

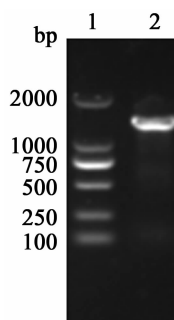
出液,用10~15倍柱体积的GST Washing Buffer冲洗杂蛋白,收集洗杂液,考马斯亮蓝检测洗杂液中的蛋白浓度低于0.5 μg/ml时停止冲洗。在TEV酶切体系中4℃旋转酶切48 h,收集酶切反应液;酶切缓冲液冲洗树脂,收集酶切液;用一定浓度的谷胱甘肽洗脱,收集洗脱液。将收集的酶切反应液加入已平衡的Ni-NTA亲和层析分离柱,4℃结合30 min,以除去带有His标签的TEV酶;使用酶切缓冲液冲洗Ni-NTA亲和层析分离柱,再用500 mmol/L咪唑冲洗缓冲液冲洗,收集洗脱液。用考马斯亮蓝染色测定蛋白浓度,采用10% SDS-PAGE电泳检测蛋白纯度。

2.4 3D聚合酶酶活检测 体外延伸反应体系(100 μl):50 mmol/L HEPES,10 mmol/L β-巯基乙醇,5 mmol/L MgCl₂,60 μmol/L ZnCl₂,5 μmol/L UTP,0.4 μCi/μl[α-³²P] UTP,1.8 μmol/L dT15-primer,0.15 μmol/L poly(rA)300,0.1 μmol/L 3D聚合酶,加ddH₂O补至100 μl体积。试验设DMSO空白对照。酶体系置30℃孵育5~10 min后加入0.5 mol/L EDTA溶液终止反应。反应完成后,对样品进行x%变性尿素聚丙烯酰胺凝胶电泳鉴定。

结 果

1 重组质粒鉴定

以EV71 RNA反转录获得的cDNA为模板,加入EV71 3D聚合酶引物进行RT-PCR扩增,扩增片段为1 386 bp(图1),大小与理论值一致。目的片段经酶切后与pGEX-4T-1载体连接,连接转化大肠埃希菌DH5α,培养后提取质粒,经双酶切鉴定(图2)后测序验证均与预期相符。



1 DNA标志物(DL2000) 2 3D聚合酶基因PCR产物

图1 3D聚合酶基因PCR扩增

1 DNA marker(DL2000) 2 3D polymerase gene

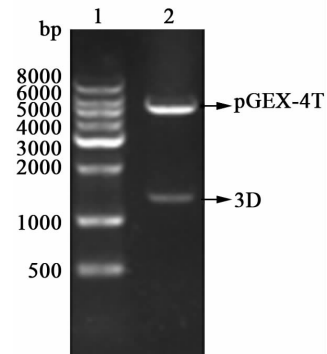
Fig. 1 3D polymerase gene amplification by PCR

2 3D聚合酶诱导表达

重组质粒pGEX-4T-3D转化BL21后加入0.8 mmol/L的IPTG 18℃诱导过夜。收集菌体,超声破碎,4℃,10 000 g离心30 min后取上清液,经10% SDS-PAGE电泳鉴定,3D聚合酶在BL21中成功表达,其相对分子质量为79×10³(图3)。

3 3D聚合酶的纯化

3D聚合酶在BL21中可溶性表达,主要存在于裂解液上清。重组菌裂解液经柱层析纯化后得到纯度较高的带有GST标签的3D蛋白,其相对分子质量为79×10³左右(图4)。

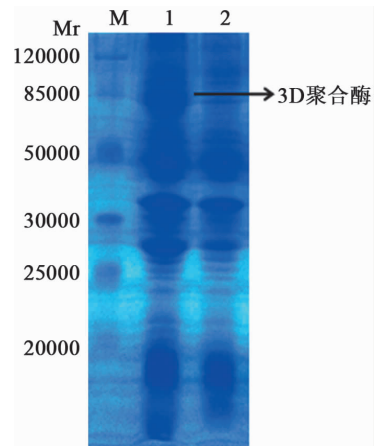


1 DNA标志物 2 pGEX-4T-3D EcoR I/BamH I 双酶切

图2 重组质粒pGEX-4T-3D酶切鉴定

1 DNA marker 2 Dual-enzyme digestion with EcoR I/BamH I

Fig. 2 The recombinant plasmid pGEX-4T-3D identification by Dual-enzyme digestion

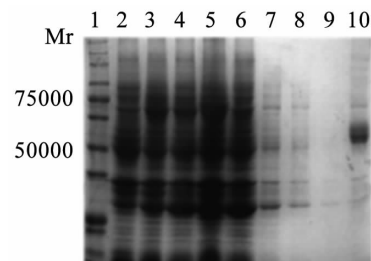


M 蛋白分子质量标准 1 重组菌IPTG诱导表达产物 2 重组菌未诱导对照

图3 重组3D聚合酶在BL21中的表达鉴定

M Marker(Broad) 1 Induced with IPTG 2 Uninduced

Fig. 3 IPTG inducing 3D polymerase expression in BL21



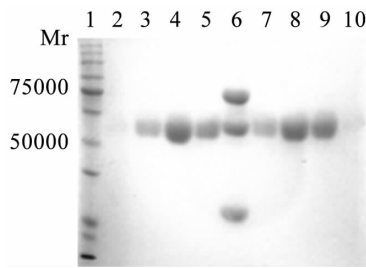
1 蛋白分子质量标准 2 重组菌未诱导 3 重组菌IPTG诱导菌体 4 重组菌IPTG诱导后破碎上清 5 重组菌IPTG诱导后破碎沉淀 6 过柱收集液 7 Washing Buffer冲洗第1次收集液 8 Washing Buffer冲洗第2次收集液 9 Washing Buffer冲洗第3次收集液 10 TEV酶切后收集液

图4 10%SDS-PAGE分析纯化带GST标签3D聚合酶

1 Marker(Broad) 2 Uninduced 3 The bacterium induced with IPTG 4 The supernatant of cell lysate induced with IPTG 5 Precipitate 6 The fractions of binding flow through column 7 The first fractions of washing with washing buffer 8 The second fractions of washing with washing buffer 9 The third fractions of washing with washing buffer 10 The fractions after TEV digestion

Fig. 4 The purification of 3D polymerase with GST-tag

经 TEV 酶切及 Ni 柱纯化后进行 10% SDS-PAGE 电泳, 获得切除 GST 标签的高纯度 3D 蛋白(图 5), 相对分子质量约为 55×10^3 , 浓缩后浓度为 10 mg/ml。



1 蛋白分子质量标准 2 TEV 酶切 20 h 后收集液 3 TEV 酶切 48 h 后收集液 4 酶切缓冲液冲洗树脂第 1 次收集液 5 酶切缓冲液冲洗树脂第 2 次收集液 6 谷胱甘肽洗脱后收集液 7 层析柱流出液 8 酶切缓冲液冲洗 Ni-NTA 第 1 次收集液 9 酶切缓冲液冲洗 Ni-NTA 第 2 次收集液 10 500 mmol/L 咪唑洗脱液

图 5 10%SDS-PAGE 分析纯化切除 GST 标签 3D 聚合酶

1 Marker (Broad) 2 The fractions of enzyme digestion with TEV for 20 h 3 The fractions of enzyme digestion with TEV for 48 h 4 The first fractions of washing with enzyme digestion buffer 5 The second fractions of washing with enzyme digestion buffer 6 The fractions of washing with glutathione 7 The fractions of binding flow through the Ni-NAT 8 The first fractions of washing with enzyme digestion buffer 9 The second fractions of washing with enzyme digestion buffer 10 The fractions of the first elution with 500 mmol/L imidazole

Fig. 5 The purification of 3D polymerase excised GST-tag

4 3D 聚合酶酶活

病毒感染宿主细胞时, 3D 聚合酶与其它的病毒或宿主因子相结合, 形成病毒复制复合体参与 RNA 的合成^[9]。本研究通过体外模拟延伸反应, 以 poly(rA) 300 为模板, dT15 为引物, 同位素标记 [α -³²P]UTP, 测定同位素标记的强弱反应 3D RNA 聚合酶的活性, 变性尿素聚丙烯酰胺凝胶电泳鉴定见图 6。DMSO 溶解液代表 3D 聚合酶的活性, 试验设 3D 聚合酶的强抑制剂 EDTA 作为对照。在 DMSO 组中, 可以观察到强电泳条带, 表明纯化的 3D 蛋白酶具有聚合酶活性。加入 EDTA 可抑制 3D 聚合酶的活性。



图 6 3D 聚合酶酶活鉴定
Fig. 6 3D polymerase activity identification

讨论

本研究利用 pGEX-4T-1 载体构建 3D 聚合酶重组质粒, 在 BL21(DE3) 中诱导表达, 分离纯化后检测分析 3D 聚合酶活性。结果表明成功实现了 3D 聚合酶在体外的诱导表达, 且纯化后仍具有较强的酶活性, 为研究 3D 聚合酶特性和筛选以 3D 聚合酶为靶标的抗 EV71 药物奠定了基础。

运用柱纯化 EV71 3D 聚合酶, 经 TEV 酶切, 可获得切除 GST 标签的高纯度 3D 蛋白。张玲莉等^[10]用 TEV 酶切除 GST 标签后通过凝胶过滤层析纯化, 最终获得可用于蛋白晶体筛选的构象均一的高纯度二聚体 Bnip3 蛋白。肖亚飞等^[11]在肿瘤抑制蛋白 APC 与 Amer1 的结合机制研究中用酶切 GST 标签后再纯化及 TEV 和 Trypsin 依次酶切再纯化, 效果良好。安贤惠等^[12]为克隆沙门氏菌中硫修饰基因 dptC, 优化 dptC 表达条件, 表达载体中引入 TEV 酶切位点, 使得容易切除 GST 标签, 为进一步研究 DptC 的酶学功能奠定了基础。本试验在编码 3D 聚合酶基因的上游添加一个 TEV 酶切位点, 经 TEV 酶切和 Ni 柱纯化后可获得切除 GST 标签的高纯度 3D 聚合酶。

本研究通过测定插入 poly(U) RNA 的放射性标志的 UMP 的量来检测 3D RNA 聚合酶的活性, 变性尿素聚丙烯酰胺凝胶电泳显示纯化的 3D 聚合酶具有聚合酶活性。张爱宏等^[13]运用放射性同位素标记法检测脂蛋白脂肪酶活性。利用放射性同位素方法可以检测大鼠胰岛匀浆中的乳酸脱氢酶活性和各种代谢物, 该方法可用于单个细胞代谢行为异质性的研究^[14]。王喜萍等^[15]建立了放射性同位素标记测定 RNA N-糖苷酶活性的新方法。通过比较酶联免疫吸附测定法、质谱法、毛细管电泳、检测多肽底物等多种检测酶活性的方法, 放射性同位素方法可用于直接测定, 不需对多肽底物进行标记和修饰, 检测不受抑制剂的干扰, 均相反应, 因此灵敏度高, 测试结果准确, 被认为是检测蛋白生化活性的一种很好的方法^[16]。

体外表达纯化 3D 聚合酶为研究 EV71 3D 聚合酶的功能及作用机制奠定了基础, 而在解析出 3D 聚合酶的结构后, 再根据结构特征筛选出特异性的抑制剂, 对防治手足口病具有重要意义。另外, 对 EV71 病毒 RNA 聚合酶的生化研究和动力学常数分析也可为以聚合酶为靶标的抗病毒药物筛选提供理论支持。

【参考文献】

[1] Yan L, Zheng Z, Bo S, et al. SUMO modification stabilizes enterovirus 71 polymerase 3D to facilitate viral replication[J]. J Virol, 2016, 90(23): 10472.
[2] Victorio CB, Xu Y, Ng Q, et al. Phenotypic and genotypic characteristics of novel mouse cell line (NIH/3T3)-adapted human enterovirus 71 Strains (EV71; TLLm and EV71; TLLmv)[J]. Plos One, 2014, 9(3): e92719.
[3] Xing WJ, Liao QH, Cecile V, et al. Hand, foot, and mouth disease in China, 2008–12: an epidemiological study[J]. Lancet Infect Dis, 2014, 14(4): 308–18.

M1型巨噬细胞极化信号通路蛋白发现,P-STAT1和P-NF- κ B均呈先升高后降低的趋势,说明弓形虫可抑制M1型信号通路蛋白的表达。TNF- α 作为M1型巨噬细胞高表达炎性细胞因子,弓形虫感染后显著降低,表明弓形虫感染起到抑制炎性因子表达的作用^[15]。

综上所述,JAK1-STAT6信号通路在弓形虫调节巨噬细胞极化中是一条重要的调节通路。同时发现弓形虫感染可通过巨噬细胞极化下调炎性因子的表达。本实验通过对弓形虫诱导人原代肺泡巨噬细胞感染特性以及调控巨噬细胞极化信号通路的研究为弓形虫病的治疗提供了理论基础。

【参考文献】

[1] Tenter AM, Heckerth AR, Weiss LM. *Toxoplasma gondii* from animals to humans[J]. Int J Parasitol, 2000, 30(12-13): 1217-58.

[2] Zhang AM, Shen M, Li M, et al. Comparative studies of macrophage-biased responses in mice to infection with *Toxoplasma gondii* ToxoDB # 9 strains of different virulence isolated from China[J]. Parasit Vectors, 2013, 6(1): 308-20.

[3] Kong L, Zhang Q, Chao J, et al. Polarization of macrophages induced by *Toxoplasma gondii* and its impact on abnormal pregnancy in rats[J]. Acta Trop, 2015(143): 1-7.

[4] Lu N, Liu C, Wang J, et al. Toxoplasmosis complicating lung cancer: a case report[J]. Int Med Case Rep J, 2015(8): 37-40.

[5] Gordon S, Martinez FO. Alternative activation of macrophages: mechanism and functions[J]. Immunity, 2010, 32(5): 593-604.

[6] Zhao ZJ, Zhang J, Wei J, et al. Lower expression of inducible ni-

tric oxide synthase and higher expression of arginase in rat alveolar macrophages are linked to their susceptibility to *Toxoplasma gondii* infection[J]. PLoS One, 2013, 8(5): e63650.

[7] Shapouri-Moghaddam A, Mohammadian S, Vazini H, et al. Macrophage plasticity, polarization, and function in health and disease[J]. J Cell Physiol, 2018, 233(9): 6425-40.

[8] Van den Bossche J, Neele AE, Hoeksema MA, et al. Macrophage polarization: the epigenetic point of view[J]. Curr Opin Lipidol, 2014, 25(5): 367-73.

[9] 祝瑶, 胡守萍, 张交儿, 等. 体外弓形虫感染小鼠巨噬细胞对其极化的影响[J]. 中国预防兽医学报, 2016, 38(6): 475-8.

[10] 王云杰, 刘学雷, 王琳琳, 等. 体外弓形虫感染对大鼠肺泡巨噬细胞极化的影响[J]. 宁夏医科大学学报, 2017, 39(11): 1252-7.

[11] Li Z, Zhao ZJ, Zhu XQ, et al. Differences in iNOS and arginase expression and activity in the macrophages of rats are responsible for the resistance against *T. gondii* infection[J]. PLoS One, 2012, 7(4): e35834.

[12] Murray PJ. Macrophages as a battleground for toxoplasma pathogenesis[J]. Cell Host Microbe, 2011, 9(6): 445-7.

[13] JensenKD, Wang Y, Wojno ED, et al. Toxoplasma polymorphic effectors determine macrophage polarization and intestinal inflammation[J]. Cell Host Microbe, 2011, 9(6): 472-83.

[14] Zhang, Q, Kong L, Zhang Y, et al. Genotype-associated arginase 1 expression in rat peritoneal macrophages induced by *Toxoplasma gondii*[J]. J Parasitol, 2015, 101(4): 418-23.

[15] Singh U, Kumar A, Sinha R, et al. Calreticulin transacetylase catalyzed modification of the TNF-alpha mediated pathway in the human peripheral blood mononuclear cells by polyphenolic acetates[J]. Chem Biol Interact, 2010, 185(3): 263-70.

【收稿日期】 2019-04-16 【修回日期】 2019-06-29

(上接 1004 页)

[4] Velu AB, Chen GW, Hsieh PT, et al. BPR-3P0128 inhibits RNA-dependent RNA polymerase elongation and VPg uridylation activities of Enterovirus 71[J]. Antiviral Res, 2014(112): 18-25.

[5] Xiao XU, Yao Y, Jing LI, et al. Identification of the transcriptional activity domain of EV71 3D(pol)[J]. Chin J Virol, 2016: 560-5.

[6] Hung HC, Chen TC, Fang MY, et al. Inhibition of enterovirus 71 replication and the viral 3D polymerase by aurintricarboxylic acid[J]. J Antimicrob Chemother, 2010, 65(4): 676-83.

[7] Chen TC, Chang HY, Lin PF, et al. Novel antiviral agent DTriP-22 targets RNA-dependent RNA polymerase of enterovirus 71[J]. Antimicrob Agents Chemother, 2009, 53(7): 2740-7.

[8] Li X, Liu Y, Wu T, et al. The antiviral effect of baicalin on enterovirus 71 in vitro[J]. Viruses, 2015, 7(8): 4756-71.

[9] Sun Y, Wang Y, Shan C, et al. Enterovirus 71 VPg uridylation uses a two-molecular mechanism of 3D polymerase[J]. J Virol, 2012, 86(24): 13662-71.

[10] 张玲莉, 张星亮. 线粒体自噬受体 Bnip3 的载体构建及蛋白表达纯化[J]. 生物技术, 2015, 25(4): 315-9.

[11] 肖亚飞. 肿瘤抑制蛋白 APC 与 Amer1 的结合机理研究[D]. 上海: 上海交通大学, 2014.

[12] 安贤惠, 周秀芬, 汪志军, 等. 沙门氏菌硫修饰基因 dptC 的克隆表达与分离纯化[J]. 微生物学报, 2013, 53(10): 1111-6.

[13] 张爱宏, 刘国庆. 放射性同位素标记法检测脂蛋白脂肪酶活性及其应用[J]. 中国动脉硬化杂志, 2003, 11(6): 573-5.

[14] Zahner D, Sener A, Malaisse WJ. Radioisotopic measurement of femtomolar amounts of NAD(P)H in the assay of enzymatic activity at a single cell level[J]. BBA Molecul Cell Res, 1990, 1053(2): 125-9.

[15] 王喜萍, 刘望夷, 王鸣歧. 放射性同位素标记测定 RNA N-糖苷酶活性的新方法[J]. 生物化学与生物物理进展, 1990, 17(6): 55.

[16] 李玥, 李会娟, 高芳, 等. 蛋白激酶的生化活性检测方法研究进展[J]. 生命的化学, 2014, 34(5): 636-8.

【收稿日期】 2019-06-05 【修回日期】 2019-08-29