

DOI:10.13350/j.cjpb.251101

• 论著 •

EV71 *vp1* 线性 mRNA 转录载体的构建*

马明鑫^{1,2}, 赵霞², 曹小花², 郑亮³, Matthew Kay², 吴志军², 许晓娟², 张华^{1,2,*}

(1. 南京工业大学生物与制药工程学院, 江苏南京 211816; 2. 盐城师范学院药学院;
3. 安徽省皖西南生物多样性保护与特色资源利用重点实验室)

【摘要】 目的 针对肠道病毒 71 型(EV71)的 VP1 蛋白构建线性 mRNA 转录载体, 并进行细胞转染验证 VP1 蛋白表达, 为开发手足口病 mRNA 疫苗提供技术支持。方法 应用 PCR 技术获得 *vp1* 基因, 在其上游和下游分别引入 5'UTR、3'UTR 和 poly(A)尾, 通过基因克隆技术构建出 EV71 *vp1* 线性 mRNA 转录载体 pcDNA3.1-EV71-VP1。在 PCR、酶切和测序鉴定转录载体后, 体外转录出修饰的 *vp1* mRNA。将转录载体和 *vp1* mRNA 转染 HeLa 细胞, 采用 Western blot 和免疫荧光验证 VP1 蛋白的表达。结果 转录载体通过 PCR 扩增和双酶切都可得到 891 bp 的 *vp1* 基因和 1 448 bp 的基因片段, 与预期相符。体外转录出的 *vp1* mRNA 大小约 1 448 bp, 与理论值相符。转录载体和 *vp1* mRNA 转染 HeLa 细胞后, Western blot 可检测到 38 ku 大小的特异性条带, 免疫荧光试验也检测到 VP1 蛋白的正确表达。结论 成功构建了 EV71 *vp1* 线性 mRNA 转录载体, 为其免疫学评价奠定了基础。

【关键词】 肠道病毒 71 型; VP1 蛋白; 转录载体; 蛋白表达; mRNA 疫苗

【文献标识码】 A

【文章编号】 1673-5234(2025)11-1389-04

[Journal of Pathogen Biology. 2025 Nov.; 20(11):1389-1392.]

Construction of linear mRNA transcription vector for EV71 *vp1*

MA Mingxin^{1,2}, ZHAO Xia², CAO Xiaohua², ZHENG Liang³, Matthew Kay², WU Zhijun², XU Xiaojuan², ZHANG Hua^{1,2} (1. College of Biotechnology and Pharmaceutical Engineering, Nanjing Tech University, Nanjing 211816, Jiangsu, China; 2. School of Pharmacy, Yancheng Teachers University; 3. Anhui Provincial Key Laboratory for Conservation and Exploitation of Biological Resources in the Southwest of Anhui Province)

【Abstract】 **Objective** To construct a linear mRNA transcription vector encoding the VP1 protein of Enterovirus 71 (EV71) and verify its expression through cell transfection, thereby providing technical support for the development of an mRNA vaccine against hand, foot, and mouth disease (HFMD). **Methods** The *vp1* gene was amplified by PCR technology. A 5'UTR, 3'UTR and poly(A) tail sequence were synthesized to flank upstream and downstream of the *vp1* gene, respectively. The EV71 *vp1* linear mRNA transcription vector (pcDNA3.1-EV71-VP1) was constructed through gene cloning technology. Following verification of the correctly assembled transcription vector by PCR, enzyme digestion and sequencing, the modified *vp1* mRNA was transcribed *in vitro*. Both the transcription vector and transcribed *vp1* mRNA were transfected into HeLa cells, and VP1 protein expression was validated using Western blot and immunofluorescence assays. **Results** Fragments of 891 bp (*vp1* gene) and 1 448 bp (complete mRNA sequence) were yielded through PCR amplification and double enzyme digestion of the transcription vector, which meet the expected sizes' molecular weight. The *in vitro*-transcribed *vp1* mRNA exhibited a size of approximately 1 448 bp, consistent with its theoretical size. Following transfection of both the transcription vector and *vp1* mRNA into HeLa cells, specific band with a size of 38 ku can be detected by Western blot, and the correct expression of VP1 protein is also detected by immunofluorescence assay. **Conclusion** The successful construction of the EV71 *vp1* linear mRNA transcription vector lays a foundation for its further immunological evaluation.

【Keywords】 Enterovirus 71; VP1 protein; Transcription vector; Protein expression; mRNA vaccine

*** 肠道病毒 71 型(enterovirus type 71, EV71)是引起手足口病的主要病原体, 具有高度传染性^[1]。手足口病(Hand, foot and mouth disease, HFMD)是一种主要发生于全世界 5 岁以下儿童的常见的发疹性疾病, 以发热, 手脚、腹股沟和臀部出现丘疹或水泡, 口腔粘膜溃疡性病变等为临床特征^[2-3]。在引起手足口病的病毒中, EV71 是一种嗜神经性病毒, 更易引起严重

* **【基金项目】** 国家自然科学基金面上项目(No. 32272995); 江苏省科技计划专项资金(基础研究计划自然科学基金)面上项目(No. BK20231358); 江苏省高等学校优秀科技创新团队(No. 2023-35); 江苏高校青蓝工程(2023); 盐城市科技局基础研究计划(自然科学基金)面上项目(No. YCBK2024040); 安徽省皖西南生物多样性保护与特色资源利用重点实验室开放课题(No. Wnx202419)。

** **【通信作者】** 张 华, E-mail: zhangh01@yctu.edu.cn

【作者简介】 马明鑫(2002-), 男, 四川宜宾人, 在读硕士, 主要从事病毒新型疫苗研究。E-mail: mingxinma@njtech.edu.cn

并发症,包括脑炎、急性弛缓性麻痹、心肺衰竭和暴发性神经源性肺水肿等^[4-6]。如今手足口病多以流行病的形式持续发生在亚太地区国家,构成了亚太地区的一个重大公共卫生问题^[3,7]。目前对于 EV71 感染引起的手足口病尚无特效的治疗方法,开发疫苗是最有效的控制和预防手段之一。截止目前,已有多种策略被用于开发 EV71 疫苗,但大多数疫苗都处于临床开发阶段,只有福尔马林灭活的 EV71 灭活疫苗被证明是安全有效的,且被中国 FDA 批准上市^[5,8]。但 EV71 毒株的不断变异以及如何彻底根除 EV71 病毒感染,对设计和开发新的疫苗提出了挑战。

mRNA 疫苗是新型冠状病毒大流行中快速发展起来的一种有潜力的新型疫苗技术平台。mRNA 疫苗相比于传统的灭活疫苗、减毒活疫苗等具有显著的优势,包括高安全性,强大的功效和快速、可规模化生产的能力^[9-11]。在过去二十年里,mRNA 疫苗已被广泛研究用于传染病预防及癌症预防和治疗,并且也已取得很大的进展^[12-13]。mRNA 疫苗作为一种颠覆性的技术,是新时代疫苗研发中的重要探索方向,可用于开发一种新的 EV71 疫苗候选物。

EV71 是一种单链 RNA 病毒,基因组长约 7.4 kb,可编码 4 种结构蛋白(VP1、VP2、VP3 和 VP4)和 7 种非结构蛋白(2A、2B、2C、3A、3B、3C 和 3D)^[1,3]。在 4 种结构蛋白中,VP4 位于衣壳内部,VP1、VP2、VP3 则暴露于表面,其中 VP1 由 297 个氨基酸组成,包含主要的中和表位,已被证明具有免疫原性^[14]。有研究报道使用 VP1 的灭活疫苗和亚单位疫苗免疫新生小鼠,可保护小鼠免受致死性 EV71 感染^[15]。因此,VP1 是 EV71 病毒重要的抗原位点,可作为 EV71 mRNA 疫苗的靶点。

本研究以 EV71 VP1 为抗原靶点,设计并合成了 EV71 *vp1* 线性 mRNA,将其整个片段克隆至 pcDNA3.1 质粒载体中,构建出 pcDNA3.1-EV71-VP1 转录载体。以线性化的转录载体为模板,使用 T7 RNA 转录试剂盒,在转录过程中引入 N1-甲基假尿苷和抗逆帽类似物 ARCA 进行核苷酸修饰和 5' 端加帽,体外转录出 *vp1* mRNA。将转录载体 pcDNA3.1-EV71-VP1 和 *vp1* mRNA 转染细胞,通过 Western blot 和免疫荧光验证了 VP1 蛋白表达,为后续手足口病 mRNA 疫苗的开发提供技术支持。

材料与方 法

1 材料

1.1 质粒和菌种 HeLa 细胞,pcDNA3.1 质粒,以及大肠埃希菌感受态细胞 DH5 α 由本实验室保存。

1.2 主要试剂和仪器 DMEM 培养基,胎牛血清购

自美国 Gibco 公司;限制性内切酶 BamH I、EcoR I、Nhe I、Not I、EcoR V 和 Xba I 购自美国赛默飞世尔科技公司;琼脂糖凝胶回收试剂盒、质粒提取试剂盒购自天根生化科技(北京)有限公司;转染试剂 Lipomaster 3000 Transfection Reagent、克隆试剂盒 One Step Cloning Kit 购自南京诺唯赞生物科技股份有限公司;T7 RNA 转录试剂盒购自纽英伦生物技术有限公司;鼠抗 Myc 抗体购自艾比玛特医药科技(上海)有限公司;HRP 标记山羊抗小鼠 IgG(H+L)购自上海碧云天生物科技有限公司;EV71 抗体购自美国 Abcam 公司;PVDF 膜购自德国 Millipore 公司;蛋白印记成像系统购自思拓凡(Cytiva)生物科技有限公司;PCR 仪购自德国耶拿分析仪器股份公司;荧光显微镜购自德国徕卡公司。

2 方法

2.1 EV71-VP1 mRNA 序列设计 查阅美国国家生物信息中心(NCBI)网站上公布的 EV71(AB204853.1)毒株基因组得到 *vp1* 基因序列,设计的 EV71-VP1 mRNA 结构如下图所示(图 1):

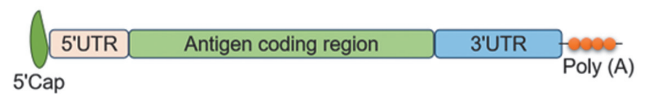


图 1 Linear EV71-VP1 mRNA 结构示意图

Fig. 1 Schematic diagram of the Linear EV71-VP1 mRNA structure

2.2 线性 mRNA 转录载体的构建 通过 PCR 技术获得 *vp1* 基因,在其上游和下游分别引入 5'UTR、3'UTR 和 poly(A) 尾等结构元件合成 Linear-VP1 mRNA。然后将其作为插入片段,以限制性内切酶消化的 pcDNA3.1+质粒为线性化载体,进行重组反应连接。10 μ L 连接体系:线性化克隆载体(pcDNA3.1) 110 ng,插入片段(linear-VP1) 60 ng,连接酶 Exnase II 1 μ L,5 \times CE II Buffer 2 μ L,加 ddH₂O 补足 10 μ L。反应条件 37 $^{\circ}$ C,30 min。重组产物通过热激转化至大肠埃希菌感受态细胞 DH5 α 中,转化菌种涂布于具有氨苄青霉素的固体 LB 培养基上,37 $^{\circ}$ C 培养过夜。菌液 PCR 法筛选阳性克隆,挑取阳性单菌落接种至含氨苄抗性的 LB 液体培养基中 37 $^{\circ}$ C、200 r/min 扩大培养,所得菌液用质粒提取试剂盒提取质粒。

2.3 转录载体 pcDNA3.1-EV71-VP1 的鉴定 重组质粒通过 PCR 扩增 *vp1* 基因片段和 Linear-VP1 序列进行初步验证,使用的引物根据 EV71-VP1 mRNA 转录模板序列和载体 pcDNA3.1+ 的序列进行设计,并交由擎科生物公司合成。之后再通过双酶切质粒验证,验证正确后将重组质粒送到擎科生物公司进行测序鉴定。

2.4 Linear-VP1 mRNA 的体外转录及验证 在插入片段 Linear-VP1 下游酶切位点酶切重组质粒,再将此线性化的转录载体作为模板,使用 T7 RNA 聚合酶进行体外转录反应,在转录的同时进行加帽和核苷酸修饰。转录出的 mRNA 加入 RNA loading Buffer,65 °C 加热 10 min,速冷后进行 1% 琼脂糖凝胶电泳分析。

2.5 pcDNA3.1-EV71-VP1 和 VP1-mRNA 转染 HeLa 细胞 HeLa 细胞使用含 10% FBS 的 DMEM 培养基进行培养,在传代后接种于 24 孔细胞培养板,置于 CO₂ 培养箱中,37 °C、5% CO₂ 过夜培养。当细胞融合度达到 70%~80% 时进行转染,同时设置未做转染处理的细胞作为空白对照。转染时使用的质粒/mRNA 与脂质体转染试剂的比例为 1:3,将 0.5 μg 质粒/mRNA 与 1.5 μL Lipomaster 3000 Transfection Reagent 分别用无血清培养基 (opti-MEM) 稀释,在稀释混匀后的质粒 DNA 中加入 T3000 Enhancer Reagent,最后混匀、静置 20 min 后用于转染。转染后的细胞在 12 h 后更换新鲜的培养基继续培养至 36 h。

2.6 收取细胞,提取细胞总蛋白 收取细胞,用预冷的 PBS 润洗 3 次后,加入预冷的 RIPA Buffer 细胞裂解液在冰上裂解细胞 30 min。用细胞刮将细胞从 6 孔板中刮下,收集到 1.5 ml 的 EP 管中,震荡裂解后 4 °C、12 000 r/min 离心 15 min,收集上清。上清中加入 5×SDS-PAGE Loading Buffer,沸水煮 15 min 后即得到蛋白样品。

2.7 Western blot 检测 VP1 蛋白的表达 取适量细胞蛋白样品上样到 12% 的丙烯酰胺凝胶中进行电泳,电泳完成后裁取合适尺寸的凝胶,通过湿转法将蛋白转移到 PVDF 膜上。转膜结束后,将 PVDF 膜小心取出放到 5% 脱脂奶粉中,4 °C 封闭过夜;一抗用鼠抗 Myc 抗体和鼠抗 EV71 抗体室温孵育 3 h;二抗用 HRP 标记山羊抗小鼠 IgG 室温孵育 1 h。最后滴加 ECL 发光工作液进行显影,通过 Western blot 成像仪获取结果图片。

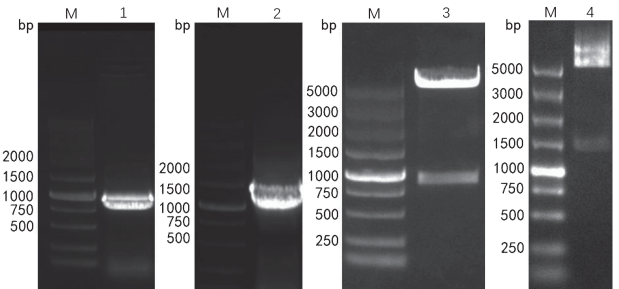
2.8 免疫荧光检测 VP1 蛋白的表达 接种 HeLa 细胞至提前放入细胞爬片的 24 孔培养板中进行培养,并做同样转染处理。收取细胞后用多聚甲醛固定,1% TritonX-100 通透,5% BSA 封闭;鼠抗 Myc 抗体作一抗孵育,TRITC 标记山羊抗小鼠 IgG 作二抗孵育。最后从培养板中取出细胞爬片,使用含 DAPI 的荧光封片剂进行封片处理,在荧光显微镜下观察结果并进行拍照。

结果

1 转录载体 pcDNA3.1-Linear-VP1 的鉴定

转录载体通过 PCR 扩增 *vp1* 基因和 Linear-VP1

基因序列,可分别得到大小约 900 bp 和 1 500 bp 的片段,符合 *vp1* 基因大小 891 bp 和 Linear-VP1 序列大小 1 448 bp。通过双酶切验证,结果同样可得到约 900 bp 和 1 500 bp 大小的片段,符合预期大小(图 2)。最后,对质粒进行测序,结果表明设计的 Linear-VP1 序列与 pcDNA3.1 质粒连接正确,Linear-VP1 mRNA 转录载体构建成功。



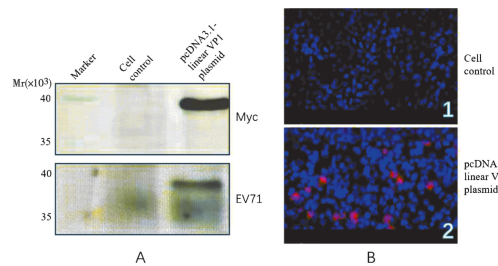
M DL5000 DNA Marker 1 pcDNA3.1-Linear-VP1 质粒扩增 *vp1* 基因 2 pcDNA3.1-Linear-VP1 质粒扩增 Linear-VP1 序列 3 pcDNA3.1-Linear-VP1 BamH I 和 EcoR I 双酶切 4 pcDNA3.1-Linear-VP1 Nhe I 和 Not I 双酶切

图 2 PCR 扩增和酶切鉴定转录载体

Fig. 2 Identification of the transcriptional vector with PCR amplification and enzymatic digestion

2 转录载体 pcDNA3.1-Linear-VP1 的验证

收集转染 pcDNA3.1-Linear-VP1 后的 HeLa 细胞裂解液,分别使用抗 Myc 标签的抗体和 EV71 抗体进行 Western blot 检测,结果在 38 ku 处都有明显的目的蛋白条带,而对照组没有,符合实验预期结果(图 3A)。免疫荧光结果如图所示(图 3B),重组质粒转染 HeLa 细胞后可以表达 VP1 蛋白,结合 TRITC 标记的荧光二抗后产生明显的红色荧光,而对照组细胞无红色荧光,证实转录载体可以成功表达 VP1 蛋白。



A Western blot 检测 VP1 蛋白表达 B 免疫荧光检测 VP1 蛋白表达

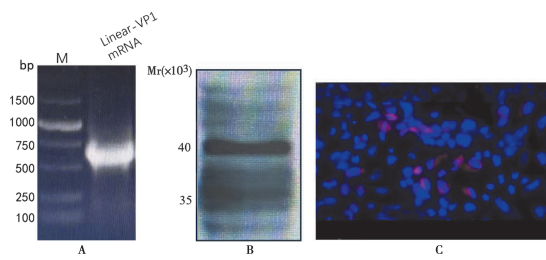
图 3 Western blot 和免疫荧光验证转录载体

Fig. 3 Verification of the transcriptional vector with Western blot and immunofluorescence

3 Linear-VP1 mRNA 的体外转录及验证

体外转录得到的 Linear-VP1 mRNA 经琼脂糖凝胶电泳分析,其条带位于 DNA Marker 的 700 bp 左右,表明 mRNA 大小约 1 448 bp,符合预期(图 4A)。将转录出的 Linear-VP1 mRNA 转染 HeLa 细胞后,Western blot 检测到 38 ku 大小的条带(图 4B),免疫

荧光也可检测到红色荧光(图 4C),说明 Linear-VP1 mRNA 可以表达 VP1 蛋白。



A *vp1* mRNA 琼脂糖凝胶电泳分析 B Western blot 检测 VP1 蛋白表达 C 免疫荧光检测 VP1 蛋白表达

图 4 Linear-VP1 mRNA 体外转录分析及 VP1 蛋白表达验证
Fig. 4 Transcription analysis of Linear-VP1 mRNA in vitro and verification of VP1 protein expression

讨论

EV71 感染引起的手足口病至今仍然具有持续威胁,考虑到 EV71 的公共卫生意义,目前已经进行了广泛的实验性疫苗研究方法,包括传统疫苗如灭活疫苗和减毒活疫苗,现代重组疫苗如亚单位疫苗、病毒样颗粒、表位疫苗、DNA 疫苗以及活载体疫苗^[5]。但对于 EV71 的 mRNA 疫苗鲜有报道,而与传统的 EV71 疫苗相比,本研究采用的 mRNA 疫苗路线具有显著优势:EV71 mRNA 疫苗不仅能够降低生产成本,而且凭借抗原序列的灵活性可实现对不同毒株的保护。本研究旨在构建用于开发 EV71 mRNA 疫苗的线性转录载体,结果证实了所构建的 pcDNA3.1-EV71-VP1 载体可以成功转录出的可在细胞中翻译为具有免疫原性 VP1 蛋白的 mRNA。这为 EV71 mRNA 疫苗的后续开发奠定了关键基础,对于开发手足口病 mRNA 疫苗候选物具有重要意义。

鉴于 VP1 蛋白是 EV71 病毒最重要的免疫原性抗原,本研究选取 *vp1* 基因作为 mRNA 编码区,在引入非翻译区和 poly(A) 尾等 mRNA 的重要结构元件后,将整个片段克隆至 pcDNA3.1 载体中,成功构建了 EV71 *vp1* 的线性 mRNA 转录载体。虽然本研究取得了上述成果,但是仍存在一定的不足。转录出的 *vp1* mRNA 转染细胞后的 VP1 蛋白表达量相对较低,其 Western blot 条带亮度和免疫荧光的荧光强度均弱于转录载体,说明 *vp1* mRNA 在细胞中的翻译能力较弱或是在细胞中的稳定性不高导致表达量较低。因此,后续实验中还需要进一步 *vp1* mRNA 的结构,从而提升其稳定性及翻译效率。例如,对 UTR 的选择进行优化,通过更换 5' 和 3' 非翻译区以提高 mRNA 翻译效率。其次还可优化编码区的密码子组成,对 *vp1* 编码区进行人类细胞偏好的密码子优化,将稀有密码子替换成高频密码子,从而提高翻译水平。本研究使用常规柱纯化的方式纯化 mRNA,未能完全

除去其中的免疫原性杂质,若使用更好的纯化方式,比如高效液相色谱法来纯化 mRNA,可降低宿主细胞的非特异性免疫反应,从而提高表达量。此外,后续可拟构建针对不同的 EV71 基因型的 *vp1* mRNA 载体,系统检测其对不同毒株的保护效果。

综上,本研究成功构建了 EV71 *vp1* 的线性 mRNA 转录载体,为 EV71 mRNA 疫苗的开发提供了重要工具。为手足口病疫苗的研究和 EV71 mRNA 疫苗候选物的开发奠定了理论基础,提供了关键技术支撑。

【参考文献】

- [1] Cox JA, Hiscox JA, Solomon T, et al. Immunopathogenesis and Virus-Host interactions of enterovirus 71 in patients with hand, foot and mouth Disease[J]. *Front in Microb*, 2017, 8:22-49.
- [2] Fang CY, Liu CC. Novel strategies for the development of hand, foot, and mouth disease vaccines and antiviral therapies [J]. *Expert Opin Drug Disc*, 2021, 17(1):27-39.
- [3] Yi EJ, Shin YJ, Kim JH, et al. Enterovirus 71 infection and vaccines[J]. *Clin Exp Vaccine Res*, 2017, 6(1):4-14.
- [4] Lei X, Cui S, Zhao Z, et al. Etiology, pathogenesis, antivirals and vaccines of hand, foot, and mouth disease[J]. *Natl Sci Rev*, 2015, 2(3):268-284.
- [5] Bello AM, Roshorm YM. Recent progress and advances towards developing enterovirus 71 vaccines for effective protection against human hand, foot and mouth disease (HFMD)[J]. *Biologicals*, 2022, 79:1-9.
- [6] Crabol Y, Pean P, Mey C, et al. A prospective, comparative study of severe neurological and uncomplicated hand, foot and mouth forms of paediatric enterovirus 71 infections[J]. *Int J Infect Dis*, 2017, 59:69-76.
- [7] Wang SM, Ho TS, Lin HC, et al. Reemerging of enterovirus 71 in Taiwan; the age impact on disease severity [J]. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*, 2012, 31(6):1219-1224.
- [8] Aswathyraj S, Arunkumar G, Alidjinou EK, et al. Hand, foot and mouth disease (HFMD): emerging epidemiology and the need for a vaccine strategy[J]. *Med Microb Immun*, 2016, 205(5):397-407.
- [9] Pardi N, Krammer F. mRNA vaccines for infectious diseases-advances, challenges and opportunities[J]. *Nat Rev Drug Discov*, 2024, 23(11):838-861.
- [10] Chaudhary N, Weissman D, Whitehead KA. mRNA vaccines for infectious diseases: principles, delivery and clinical translation [J]. *Nat Rev Drug Discov*, 2021, 20(11):817-838.
- [11] Pardi N, Hogan MJ, Porter FW, et al. mRNA vaccines-a new era in vaccinology[J]. *Nat Rev Drug Discov*, 2018, 17(4):261-279.
- [12] Zhang G, Tang T, Chen Y, et al. mRNA vaccines in disease prevention and treatment [J]. *Signal Transduct Target Ther*, 2023, 8(1):365.
- [13] Maruggi G, Zhang C, Li J, et al. mRNA as a transformative technology for vaccine development to control infectious diseases [J]. *Mol Ther*, 2019, 27(4):757-772.
- [14] Foo DGW, Alonso S, Phoon MC, et al. Identification of neutralizing linear epitopes from the VP1 capsid protein of Enterovirus 71 using synthetic peptides[J]. *Virus Res*, 2007, 125(1):61-68.
- [15] 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(5-6):895-904.

【收稿日期】 2025-03-28 【修回日期】 2025-06-19