



肠道病毒B家族埃可病毒16 (E16) 型病毒样颗粒的结构解析*

王康^{1,2)**} 王磊²⁾ 刘攀²⁾ 崔震²⁾ 冯瑞²⁾ 陈瑞红²⁾陈中豪²⁾ 朱谦慧²⁾ 王男²⁾

(1) 南开大学生命科学学院, 天津 300071; (2) 中国科学院生物物理研究所, 北京 100101)

摘要 肠道病毒B家族是引发人类病毒性脑炎和脑膜炎的重要病原体之一。然而目前市场上尚缺乏针对此类病毒的特异性疫苗。病毒样颗粒具有保留病毒真实结构特点、不含病毒核酸、不具备病毒复制与感染能力的特征, 为开发有效、稳定且安全的新型疫苗提供了理想方案, 特别是针对无囊膜的肠道病毒。本研究中, 基于昆虫细胞表达系统, 经密度梯度离心等方法获得埃可病毒16 (E16) 型的病毒样颗粒 (virus-like particle; VLP)。借助冷冻电镜单颗粒技术, 成功将该病毒 VLP 解析到原子分辨率 (2.8 Å), 结构分析显示: 与同源病毒 E30 的结构相类似, E16-VLP 具备肠道病毒所特有的能够引起机体产生特异性中和免疫反应的重要结构特征, 具有较大的疫苗开发价值。本实验室建立的方法在抗肠道病毒B家族通用疫苗的设计与开发上具有巨大潜力。

关键词 肠道病毒, 病毒样颗粒, 埃可病毒16型, 冷冻电镜, 疫苗

中图分类号 Q937

DOI: 10.16476/j.pibb.2020.0355

肠道病毒是影响人类健康的一类极其重要的病原体。19世纪初, 由肠道病毒 (enterovirus) C 家族重要成员之一的脊髓灰质炎病毒 (poliovirus, PV) 所引起的疫情在全球肆虐, 造成大量幼儿罹患小儿麻痹症, 致使诸多病患终身残疾, 严重影响当时的社会秩序与经济发展^[1]。随着疫苗的开发与投入使用, 由 PV 所引发的疫情得到了有效缓解。时至今日, 世界大部分国家与地区都已经将 PV 完全清除^[2]。但与此同时, 由肠道病毒其他家族种属所致的疫情却时有发生, 最典型的即为肠道病毒 A 家族的 EV71 与肠道病毒 D 家族的 EVD68。EV71 主要引发儿童罹患手足口病, 而 EVD68 多引起青少年患呼吸系统疾病。二者均有危重症病例的报道^[3-4]。相似地, 针对 EV71 的疫苗使用在很大程度上减少了 EV71 的感染病例^[5], 但一个不容忽视的事实是由肠道 B 家族成员所致的病例却在不同时期和地区呈现出不同程度的增长趋势, 在不同程度上威胁着人们的生命健康^[6]。因此, 快速而有效地建立针对肠道病毒 B 的特异性疫苗的通用方法, 具有

重大的公共卫生意义。

肠道病毒是隶属于小 RNA 病毒科 (Picornaviridae) 的一类病毒种属, 共包括 15 个子家族, 肠道病毒 A~L 以及鼻病毒 A~C。其中, 肠道病毒 B 家族由 63 种血清型构成, 包括 1 种 A 型科萨奇病毒 (CVA9)、6 种 B 型科萨奇病毒 (CVB1~6)、28 种埃可病毒 (E1~7、9、11~21、24~27、29~33)、28 种 B 型肠道病毒 (EV-B69、73~75、77~88、93、97、98、100、101、106、107、110~114)^[7]。虽然肠道病毒血清型种类繁多, 但它们的基因组与蛋白质结构却基本相似。病毒的遗传物质均为单股正链的 RNA, 从 N 端到 C 端依次编码病毒的结构蛋白 (VP0、VP3 和 VP1) 和非结构蛋白

* 国家卫生健康委员会肠道病原微生物重点实验室 (江苏省疾病预防控制中心) 开放基金课题 (EM201901) 与北京市自然科学基金-海淀原始创新联合基金重点研究专题 (L192008) 资助项目。

** 通讯联系人。

Tel: 15822660135, E-mail: wangkangup@163.com

收稿日期: 2020-10-04, 接受日期: 2020-10-15

(2A、2B、2C、3A、3C、3CD和3D), 在病毒成熟过程中VP0会被非结构蛋白3CD切割形成VP4和VP2. 通常情况下, 结构蛋白VP0、VP3和VP1或者VP4、VP2、VP3和VP1会按照一定的规则组装形成直径约为30 nm的呈正二十面体对称的核衣壳^[8]. 核衣壳是构成无囊膜肠道病毒的最外层“壁垒”, 同时也是免疫系统识别并中和病毒的主要部位. 因此, 从病毒的结构组成来看, 靶向病毒核衣壳蛋白的疫苗设计是制备针对肠道病毒疫苗的一个重要思路.

近一个世纪以来, 科学家已经利用减毒活疫苗和灭活疫苗帮助人类较为有效地对抗各种病毒的侵袭. 但是, 减毒活疫苗和灭活疫苗却存在着各自所特有的缺陷, 例如前者开发周期长且疫苗株存在毒力“返强”的风险^[9], 而后者则存在病毒灭活不完全及灭活前泄露的风险. 这些风险大大增加了病毒对健康人群潜在的致病几率, 是现代社会人们所不愿承受的代价. 由于病毒样颗粒 (virus-like particle,

VLP) 既保留着病毒核衣壳的抗原特征, 其本身又无复制传染能力, 是较为理想的疫苗候选之一^[10]. 本研究采用昆虫细胞表达系统, 成功表达并获取肠道病毒B家族成员E16-VLP, 并通过结构解析得到其原子分辨的结构模型. 结构分析显示, E16与同属B家族E30的病毒颗粒非常相似, 具有潜在的中和活性, 有望成为人们迅速开发有效且安全的新型抗肠道病毒B家族疫苗的一种重要手段.

1 材料与方法

1.1 E16-VLP的基因与表达载体的构建

将E16 (GenBank ID: AY302542) 的P1和3CD的核苷酸序列根据昆虫细胞表达系统进行密码子优化, 并在前者的5'端和3'端分别引入*Bam*HI和*Xba*I, 在后者的5'端和3'端分别引入*Xho*I和*Kpn*I, 进行序列合成. 之后将二者插入经同样的限制性内切酶处理过的质粒pInsectDual (图1), 从而完成E16表达载体的构建.

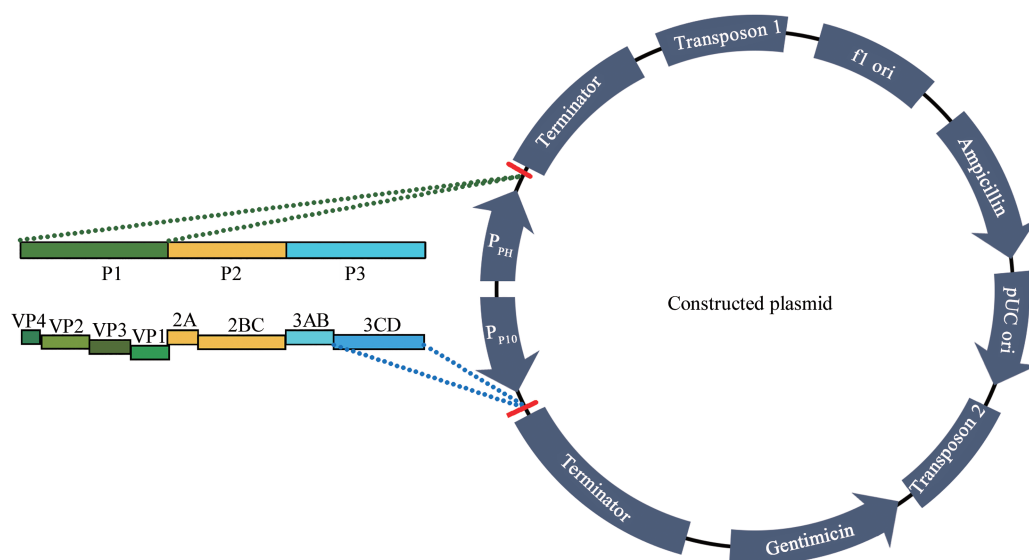


Fig. 1 Genomic construction scheme of chimeric E16-VLP

Gene of P1 and 3CD were inserted into the engineered vector pInsectDual under promoters PPH and PP10, respectively.

1.2 E16-VLP的表达

将已构建成功的载体通过转化导入感受态细胞DH10, 经蓝白斑筛选和测序分析后选取含有目的基因的克隆并进行杆状病毒质粒 (bacmid) 提取. 将获得的bacmid按照1% (v/v) 的量接入sf9细胞, 在27°C条件下, 于摇床上培养, 3 d后收获第一代病毒; 将收获的病毒同样按照1%的量接入sf9细

胞收获第二代毒; 利用同样的方法, 向sf9细胞中接入第二代毒从而获得第三代毒. 最后, 将第三代毒按照MOI = 10的量接入2 L的sf9细胞, 在相同条件下, 持续培养4 d.

1.3 E16-VLP的纯化

收集上述培养物, 在1 500 g条件下离心20 min. 取出上清, 经0.22 μm滤膜抽滤以去除杂

质. 将处理后的上清用孔径为 100 ku 的膜包进行浓缩, 至终体积约为 100 ml 左右; 之后将浓缩液在 120 000 g 条件下离心 2 h, 去掉上清, 加入 PBS 重悬, 而后将其加入已经配置好的 (自上向下依次从 15% 到 45% (w/v)) 连续蔗糖密度梯度体系, 在 104 100 g 条件下离心 4 h. 最后, 将纯化后的病毒取出, 透析至洁净的 PBS (pH = 7.4) 里.

1.4 负染色分析

取上述纯化获得的病毒液 5 μ l 滴加于经辉光处理过的铜网, 吸附 1 min 后用滤纸吸去溶液, 滴加 5 μ l 的磷酸盐缓冲液 (PBS, pH = 7.4) 缓冲液于铜网进行漂洗, 之后滴加 5 μ l 的 1% (w/v) 的磷钨酸进行染色后在 120 kV 的透射电镜下进行观察.

1.5 冷冻电镜样品的制备

利用 Solarus 等离子清洗仪 (Gatan, USA) 对 400 目的 R 1.2/1.3 金网 (Quantifoil, USA) 进行辉光放电处理. 将处理后的载网置于冷冻制样机 (Vitrobot) 上面, 通过侧门向其滴加 3 μ l 上述已经制备好并浓缩至终浓度约为 1.5 g/L 的病毒样品, 在按压力为 3, 等待时间为 5 s, 湿度为 100% 的条件下制备冷冻样品, 随后将样品置于液氮中保存.

1.6 冷冻电镜数据收集与解析

将样品装载入 300 kV 的 Titan Krios (FEI, USA), 在探测器像素为 1.35 $\text{\AA}/\text{pixel}$ 、相机帧数为 25、电子剂量为 30 e/ $\text{\AA}^2$ 的条件下利用直接电子计数器 (DDD) 进行冷冻电镜数据采集. 之后, 利用

三维重构软件 RELION 3.0 [11] 对采集的图片进行漂移校正, 衬度传递函数 (CTF) 参数估计后, 进行颗粒的挑选与抽提. 将抽提获得的颗粒二维分类除杂后进行三维初始模型的构建以及三维角度的自动优化, 并最终通过对角度取向信息正确的图片进行重构, 以获得病毒的三维高分辨模型.

1.7 分子模型的搭建与优化

将已发表的埃可病毒 30 型 (E30) 处于未成熟状态的 E 颗粒作为初始结构模型拟合入 E16 的冷冻电子密度. 首先利用软件 COOT [12] 按照 E16 的序列对结构进行相应的氨基酸突变并按照密度的走势对结构进行微调; 随后利用软件 Phenix [13] 对获得的结构进一步优化.

2 结 果

2.1 E16 - VLP的纯化

将上述表达获得的上清经密度梯度离心处理后, 成功分离得到了较为单一的条带 (图 2a). 收集获取这一条带附近的样品, 利用聚丙烯酰胺凝胶电泳 (sodium dodecyl sulphate-polyacrylamide gel electrophoresis, SDS-PAGE), 结合肽指纹图谱分析, 发现组成病毒 E16 的结构蛋白 VP1、VP0 和 VP3 是构成这一条带的主要成分 (图 2b). 接着, 对这部分样品进行负染色分析, 电镜下 E16 的 VLP 呈形态均一、直径约为 30 nm 的球状颗粒 (图 2c).

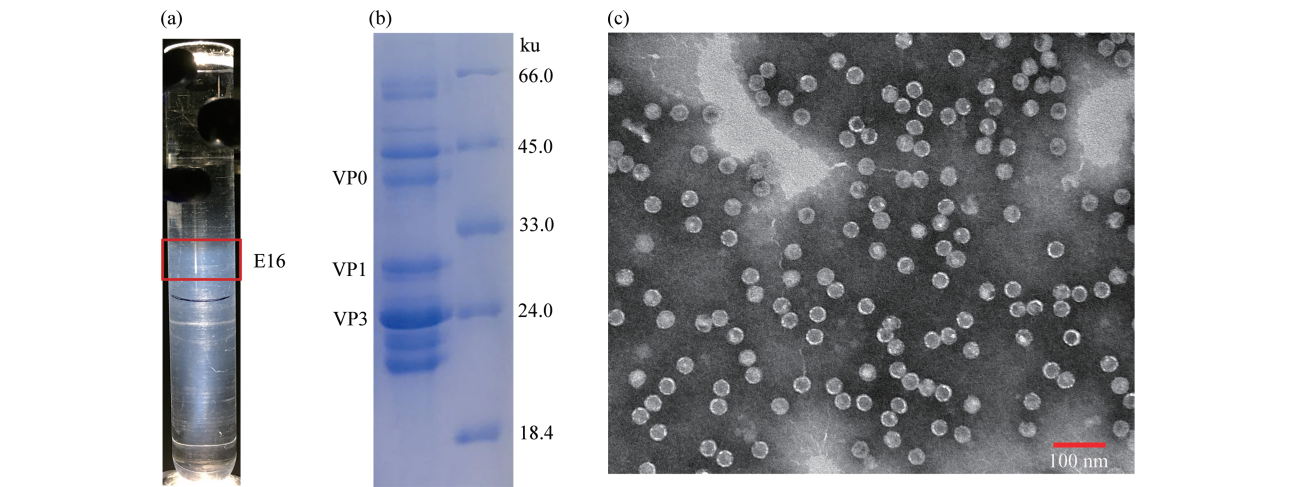


Fig. 2 Production and purificaiton of E16-VLP

(a) Sucrose density gradient ultracentrifugation with the band containing E16-VLP outlined in red rectangle. (b,c) SDS-PAGE (b) and negative stain analysis (c) of the purified E16-VLP.

2.2 E16-VLP的冷冻电镜结构

将上述纯化得到的E16 VLP制备成冷冻样品, 利用300 kV的Titan Krios (FEI, USA) 进行数据收集 (图3a, b), 并用RELION 3.0进行数据处理得到整体分辨率为2.8 Å的E16 - VLP电子密度图 (图3c). 结果显示: E16-VLP颗粒的二次轴处于开

裂状态, 五次轴凸起较为明显 (图3d), 且构成VP0的N端处于高度无序化 (图3e), 与已知的处于成熟状态且呈现“闭合态”肠道病毒的经典结构存在较大差异, 但与处于未成熟状态以及脱衣壳中间态的肠道病毒结构较为相似, 也与已报道的重组表达肠道病毒A的结构特征相类似 (图4a~d) [14-17].

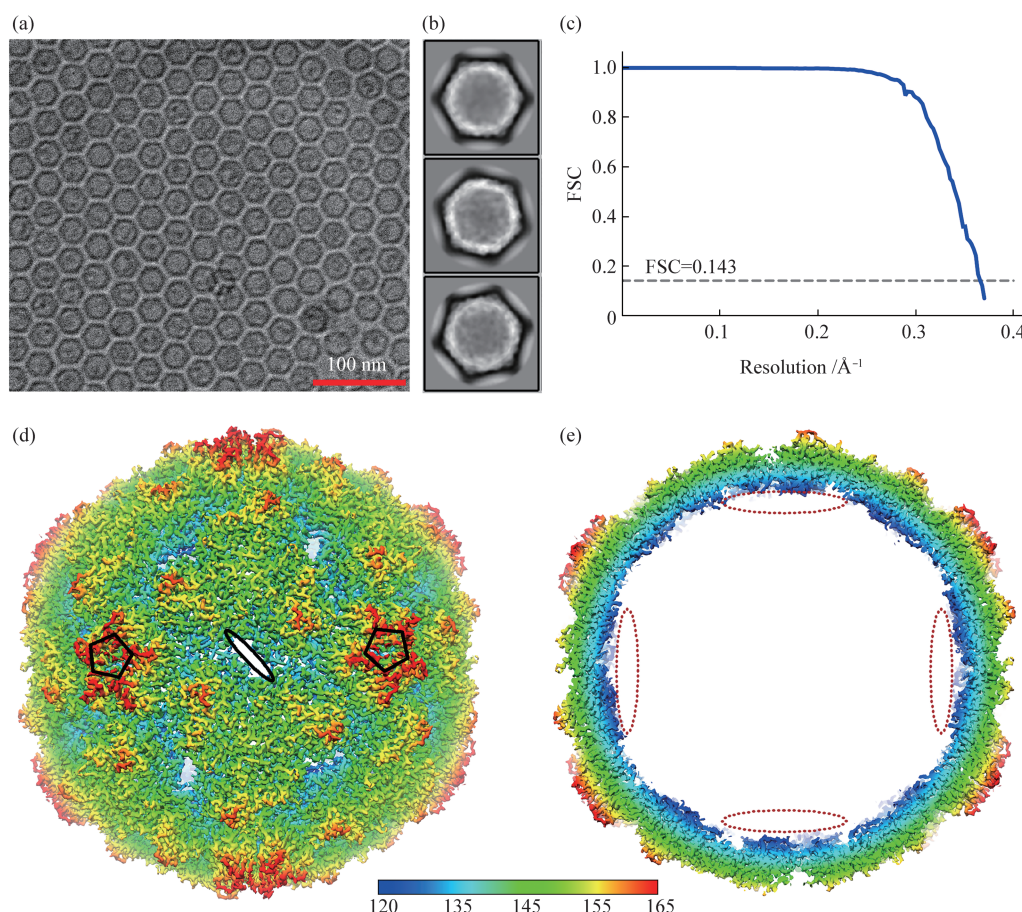


Fig. 3 Cryo-EM data processing and map representation of E16-VLP

(a, b) Cryo-EM images of E16-VLP recorded by Titan Krios (a) and the 2D classification representations during data processing (b). (c-e) Gold-standard Fourier shell correlation (FSC) curve of the final map of E16-VLP (c), which is rainbow-colored by radius from 120 to 165 nm as the color bar below displays and represented along the 2-fold axis in the front view with 2-fold and 5-fold axes marked with black ellipse and pentagon, respectively (d), as well as at the central slice (e) of the map with the spaces circled in red, where the N terminus of VP0 should have been present.

2.3 E16-VLP的结构特征分析

基于以上高分辨的密度结果, 搭建E16-VLP的原子结构. 结果显示: E16-VLP是整体呈正二十面体对称的球状颗粒, 构成该颗粒的最小不对称单位是由VP1、VP0和VP3所组成的异源多聚体. 每5个相同的多聚体绕一个五次轴形成五聚体, 而12个相同的五聚体则共同组成E16-VLP的球状结构 (图4a, b). 值得注意的是, 当以一个多聚体为单

位对E16-VLP与E30处于成熟状态的病毒颗粒进行重叠分析 (superposition) 发现, 二者的 α 碳原子空间坐标均方偏差仅为1.04 Å; 且与E30的结构相类似, E16-VLP具有与病毒受体相结合的特征性结构, 峡谷区 (canyon) (图4d), 以及位于颗粒最外侧的特征性结构, 即位于VP0上的“puff” (图4e) 以及位于VP3上的“knob” (4f).

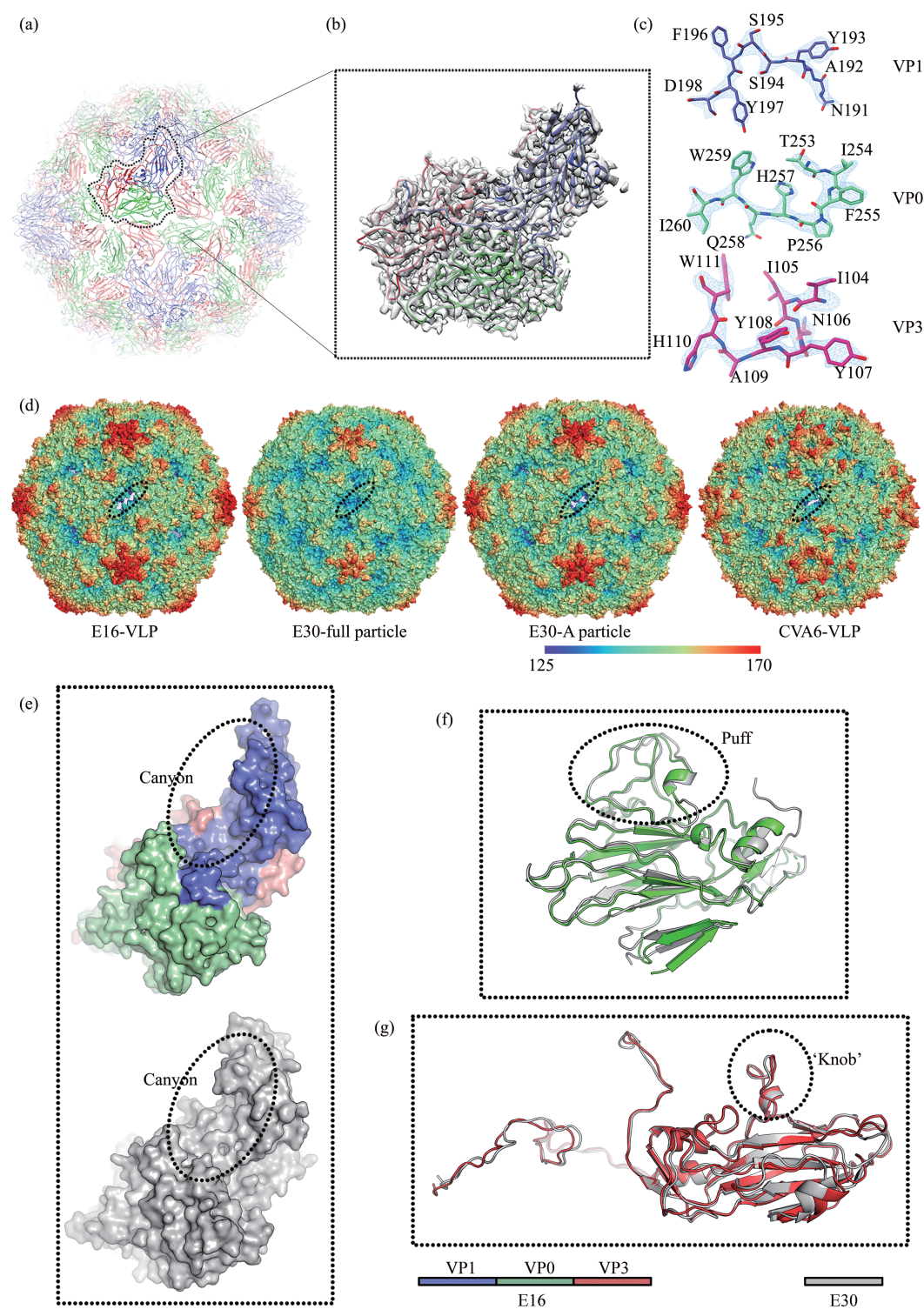


Fig. 4 Structural features of E16 – VLP

(a,b) Cartoon representation of the final E16-VLP structure (a) with one icosahedral asymmetric unit surrounded by its corresponding electron density (b). (c) Representative electron density maps from sections of VP1, VP0 and VP3. (d) Comparison of capsid from E16-VLP, E30-full particle (7C9S), E30-A particle (7C9T) and CVA6-VLP (5YHQ). All the capsids are rainbow-colored by radius from 125 nm to 170 nm as the color bar depicted below, and the 2-fold axis of each particle is circled in black dotted lines. (e–g) The canyon constituted by VP1, VP0/VP2 and VP3 (e), "puff" in VP0/VP2 (f) and "knob" in VP3 (g) of E16 and E30 are circled by black dotted lines, after the structural superposition between E16 and E30.

3 讨 论

与能够引起手足口病的肠道病毒A家族的成员和小儿麻痹症的肠道病毒C家族的成员相比,肠道病毒B家族成员在致病性上相对温和,主要引发自限性的病毒性脑炎和脑膜炎^[18].但近年来,B家族成员的感染事件时有发生,在世界范围内呈现出愈演愈烈的趋势,已有的报道显示,B家族成员与A家族成员表现出混合感染的现象,具有潜在发生重组突变为高致病性毒株的风险^[19].此外,B家族成员对各年龄段人群均易感的特点更加大了其与其他病毒发生重组突变的概率.因此,开发出一套能够快速产出针对肠道病毒B家族成员的疫苗体系具有重要的公共卫生意义,使得科研人员能够在一种新的肠道病毒出现并传染的早期阶段,迅速开发出针对它的特异性疫苗,用于疫情防控.

本研究利用昆虫细胞表达体系,构建并表达了肠道病毒E16的VLP.通过SDS-PAGE、肽指纹图谱分析以及负染色等手段,证实E16的VLP能够形成较为均一且稳定的空心态颗粒.利用同样的方法,构建包括EV75、C105和CVB2等在内的其他病毒的VLP,结果电镜下均观察到类似的颗粒,表明所选取的构建方式与表达体系对产生小RNA病毒VLP的普适性.另一方面,借助冷冻电镜单颗粒技术,解析E16-VLP的原子分辨的三维结构,分析显示:位于颗粒表面的氨基酸呈现出高度有序化,这是颗粒能够被机体免疫系统识别的重要基础;并且,通过与处于成熟状态的具有良好免疫活性的同源病毒E30的结构比对发现,位于E16-VLP表面的主要特征性结构——五次轴凸起、峡谷区、VP0的“puff”以及VP3的“knob”,不但表现出结构上的高度有序与保守,而且也都位于核衣壳蛋白的最外侧.这些结构通常是机体产生抗肠道病毒免疫的重要靶标,也是已报道的多株抗包括E30和EV71在内的肠道病毒中和性抗体的直接结合区域^[20-21].以上分析表明E16-VLP潜在的免疫原性.此外,已经有研究表明将同处于膨胀状态的病毒样颗粒(如:EV71)和脱衣壳中间态的肠道病毒(如:CVA10和CVA6)免疫小鼠均能够激发小鼠机体产生出较高的中和抗体水平,能够有效抑制病毒的复制与感染^[15, 22].因此可以推测,E16-VLP也同样能够引起机体产生有效对抗E16感染的免疫反应,具有潜在的疫苗开发价值.

参 考 文 献

- [1] Horstmann D M. The poliomyelitis story: a scientific hegira. *Yale J Biol and Med*, 1985, **58**(2): 79-90
- [2] De Jesus N H. Epidemics to eradication: the modern history of poliomyelitis. *Virology*, 2007, **4**(1): 70
- [3] Solomon T, Lewthwaite P, Perera D, *et al*. Virology, epidemiology, pathogenesis, and control of enterovirus 71. *The Lancet Infect Dis*, 2010, **10**(11): 778-790
- [4] Greninger A L, Naccache S N, Messacar K, *et al*. A novel outbreak enterovirus D68 strain associated with acute flaccid myelitis cases in the USA (2012-14): a retrospective cohort study. *The Lancet Infect Dis*, 2015, **15**(6): 671-682
- [5] Hu Y, Zeng G, Chu K, *et al*. Five-year immunity persistence following immunization with inactivated enterovirus 71 type (EV71) vaccine in healthy children: a further observation. *Hum Vacc Immunother*, 2018, **14**(6): 517-1523
- [6] Broberg E K, Simone B, Jansa J, *et al*. Upsurge in echovirus 30 detections in five EU/EEA countries, April to September, 2018. *Eur Surveill*, 2018, **23**(44): 1800537
- [7] Walker P J, Siddell S G, Lefkowitz E J, *et al*. Changes to virus taxonomy and the International Code of Virus Classification and Nomenclature ratified by the International Committee on Taxonomy of Viruses (2019). *Arch Virol*, 2019, **164**(9): 2417-2429
- [8] Stanway G. Structure, function and evolution of picornaviruses. *J Gen Virol*, 1990, **71**(11): 2483-2501
- [9] Jiang Y, Xia T, Zhou Y, *et al*. Characterization of three porcine reproductive and respiratory syndrome virus isolates from a single swine farm bearing strong homology to a vaccine strain. *Vet Microbiol*, 2015, **179**(3-4): 242-249
- [10] Mohsen M O, Zha L, Cabral-miranda G, *et al*. Major findings and recent advances in virus-like particle (VLP) -based vaccines. *Semin in Immunol*, 2017, **34**: 123-132
- [11] Scheres H W S. RELION: implementation of a Bayesian approach to cryo-EM structure determination. *J Struct Biol*, 2012, **180**(3): 519-530
- [12] Emsley P, Cowtan K. Coot: model-building tools for molecular graphics. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr*, 2004, **60**: 2126-2132
- [13] Adams P D, Afonine P V, Bunkóczi G, *et al*. PHENIX: a comprehensive Python-based system for macromolecular structure solution. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr*, 2010, **66**(2): 213-221
- [14] Wang X, Peng W, Ren J, *et al*. A sensor-adaptor mechanism for enterovirus uncoating from structures of EV71. *Nat Struct Mol Biol*, 2012, **19**(4): 424-429
- [15] Zhu L, Sun Y, Fan J, *et al*. Structures of Coxsackievirus A10 unveil the molecular mechanisms of receptor binding and viral uncoating. *Nat Commun*, 2018, **9**(1): 1-9
- [16] Wang K, Zhu L, Sun Y, *et al*. Structures of Echovirus 30 in complex with its receptors inform a rational prediction for enterovirus receptor usage. *Nat Commun*, 2020, **11**(1): 4421

- [17] Ren J, Wang X, Zhu L, *et al.* Structures of Cocksackievirus A16 capsids with native antigenicity: implications for particle expansion, receptor binding, and immunogenicity. *J Virol*, 2015, **89**(20): 10500-10511
- [18] Benschop K S, Geeraedts F, Beuvink B, *et al.* Increase in ECHOvirus 6 infections associated with neurological symptoms in the Netherlands, June to August 2016. *Euro Surveil*, 2016, **21**(39): 20387
- [19] Han J, Cao R, Jiang T, *et al.* Echovirus 30 in EV71-associated hand, foot and mouth disease outbreak, Guangxi, China. *J Clin Virol*, 2011, **50**(4): 348-349
- [20] Wang K, Zheng B, Zhang L, *et al.* Serotype specific epitopes identified by neutralizing antibodies underpin immunogenic differences in Enterovirus B. *Nat Commun*, 2020, **11**(1): 4419
- [21] Zhu L, Xu K, Wang N, *et al.* Neutralization mechanisms of two highly potent antibodies against human enterovirus 71. *mBio*, 2018, **9**(4): e01013-18
- [22] Xu L, Zheng Q, Li S, *et al.* Atomic structures of Cocksackievirus A6 and its complex with a neutralizing antibody. *Nat Commun*, 2017, **8**(1): 505

Structure of The Virus-like Particle of Echovirus 16 Implies a Universal Vaccine Design Against Enterovirus B*

WANG Kang^{1,2)**}, WANG Lei²⁾, LIU Pan²⁾, CUI Zhen²⁾, FENG Rui²⁾, CHEN Rui-Hong²⁾,
CHEN Zhong-Hao²⁾, ZHU Qian-Hui²⁾, WANG Nan²⁾

¹⁾College of Life Sciences, Nankai University, Tianjin 300071, China;

²⁾Institute of Biophysics, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100101, China)

Abstract Echovirus B serves as one of the important causative agents of viral meningitis and encephalitis all over the world, but no specific vaccines against this virus family are thus far available in the market. Structurally similar to the natural virus whilst lacking the nucleic acid essential for viral replication and infectivity, the virus-like particle (VLP), has widely been considered an ideal vaccine candidate of next generation, especially for the enterovirus that has no envelope. In this study, we designed a platform based on the insect expression system which succeeded in producing the VLP of E16. Then, the 2.8-Å cryo-EM structure of E16-VLP was determined and characterized. In line with the overall structure of E30, another member of enterovirus B, E16-VLP employed the well-studied structural features found in the outer surface of most enterovirus members and have been regarded to be the regions able to induce specific neutralizing antibodies, indicative of its potential value of vaccine development. Altogether, our established platform could serve as an important candidate to produce a safe and universal vaccine against enterovirus B.

Key words enterovirus, virus-like particle, echovirus 16, Cryo-EM, vaccine

DOI: 10.16476/j.pibb.2020.0355

* This work was supported by grants from the NHC Key laboratory of Enteric Pathogenic Microbiology (Jiangsu Provincial Center for Disease Control and Prevention) (EM201901) and Beijing Natural Science Foundation-Haidian Primitive Innovation Joint fund (L192008).

** Corresponding author.

Tel: 86-15822660135, E-mail: wangkangup@163.com

Received: October 4, 2020 Accepted: October 15, 2020