

分类号 _____ 密级 _____
UDC _____ 编号 _____

南方医科大学

硕士学位论文

探讨登革病毒 EDⅢ蛋白作为登革热诊断靶标的价值

Explore the value of dengue virus EDⅢ protein

as a diagnostic target for dengue fever

詹利利

导师姓名 _____ 丁细霞
专业名称 _____ 临床检验诊断学
培养类型 _____ 专业型
论文提交日期 _____ 2022年5月

南方医科大学 2019 级硕士学位论文

探讨登革病毒 EDⅢ 蛋白作为登革热诊断靶标的价值

**Explore the value of dengue virus EDⅢ protein as a
diagnostic target for dengue fever**

课题来源：广东省自然科学基金（No. 2020A1515011171）

学位申请人	詹利利
导师姓名	丁细霞
专业名称	临床检验诊断学
培养类型	专业型
培养层次	硕士研究生
所在学院	第二临床医学院

答辩委员会主席	段朝晖	主任技师
答辩委员会成员	刘焕亮	教授
	林勇平	教授
	陈 茶	主任技师
	徐邦牢	教授
	胡炎伟	教授
	李珉珉	主任技师

2022 年 5 月 18 日 广州

探讨登革病毒 EDIII 蛋白 作为登革热诊断靶标的价值

硕士研究生：詹利利

指导老师：丁细霞

摘 要

全球每年有超过 1 亿人感染登革病毒，其中 50 万人发展成为登革热，死亡人数超过 25000 人，然至今为止，人类对登革热仍无特效治疗药物和安全有效的疫苗。临床实践表明早期诊断、及时的临床救治可以大大减少重症登革热的发生率。因此建立一种敏感而快速的早期诊断登革病毒感染方法对登革热的防治至关重要。

课题组在前期建立了登革病毒 NS1 抗原检测方法，并实现了产业化，该检测体系不但用于我国华南地区主要是广东省的登革热诊断，还提供给东南亚等登革疫区作为检测工具。同时利用 EDIII 蛋白建立了双抗原夹心抗体检测方法，该检测方法在登革热诊断中的敏感性和特异性也达到了商品化 PANBIO 试剂盒的水平。那么说明 EDIII 蛋白在登革患者血清中的表达量应该不少，是否达到作为诊断的水平呢？为此，本研究利用课题组前期制备获得的 108 株登革病毒 EDIII 蛋白特异性单抗建立抗原和 IgM 抗体检测方法，并探索从患者血清样品中检测 EDIII 蛋白和抗体的可行性。

本研究主要通过以下两个部分进行：

一、登革病毒 EDIII 抗原检测方法的建立及应用

基于课题组前期制备获得的 108 株抗 DENV-EDIII 蛋白单抗的特点及在抗原诊断方法方面的经验。本部分以前期获得的 36 株抗 DENV1-4 EDIII 蛋白型特异

性或部分型别交叉的单抗作为捕获抗体, 分别与 20 株 DENV-EDIII 交叉型单抗进行两两组合配对, 以获得能够捕获到四个血清型登革病毒 EDIII 蛋白的抗体对, 并对所获得的抗体对进行优化组合, 最终确立以单抗 4A2A1 和 3E7A7 混合作为捕获抗体, biotin-2D13A12 单抗作为检测抗体能够同时检测到 4 个血清型登革病毒, 且与乙脑病毒和黄热病毒均无交叉反应。通过对检测体系的优化, 其检测 DENV1-4 EDIII 蛋白的灵敏度分别为 3pg/ml、98pg/ml、12pg/ml 和 49pg/ml。检测 1-4 型登革病毒培养上清的敏感性分别为 2244.98copies/ μ L, 3116.61copies/ μ L, 36865.22 copies/ μ L 和 317694.43copies/ μ L。对 800 份确诊的登革热患者血清检测的敏感性为 50.6%, 特异性为 99.5%, 敏感性明显低于登革病毒 NS1 抗原检测方法 $P=0.000(50.6\% \& 97.5\%)$ 和 RT-PCR 检测方法 $P=0.000(50.6\% \& 66.9\%)$ 。

二、基于登革病毒 EDIII 蛋白的 IgM 捕获法的建立及应用

以 1-4 型登革病毒 EDIII 蛋白作为检测抗原建立登革病毒 EDIII-IgM 捕获法。并以商品化的澳洲 panbio IgM 检测试剂盒为参比试剂对临床确诊的登革热患者血清标本进行同步检测, 两种检测方法的敏感性差异无统计学意义 ($P=0.118$), 且吻合度较强 ($\kappa=0.777$, $P=0.000$)。联合 EDIII 抗原检测方法对 800 份登革热确诊患者血清标本进行检测, 其敏感性可达 90.5%, 明显高于核酸检测方法。

综上所述, 本研究成功建立了登革病毒 EDIII 抗原和 IgM 抗体捕获法。通过对临床标本的评价, EDIII 抗原检测方法的敏感性明显低于登革病毒 NS1 抗原检测方法和 RT-PCR 检测方法 ($P=0.000$), 但如果联合 EDIII-IgM 捕获法同步检测, 该检测体系还是有望发展成为登革热早期诊断工具。

关键词: 登革病毒 包膜蛋白 结构域 III 免疫球蛋白 M 诊断 化学发光酶免疫分析

Explore the value of dengue virus EDIII protein as a diagnostic target for dengue fever

Name: Lili Zhan

Supervisor: Xixia Ding

ABSTRACT

Every year, more than 100 million people in the world are infected with dengue virus, of which 500,000 people develop dengue hemorrhagic fever, and more than 25,000 people die. However, so far, there is still no specific treatment drug or safe and effective vaccine for dengue fever. Clinical practice shows that early diagnosis and timely clinical treatment can greatly reduce the incidence of severe dengue fever. Therefore, the establishment of a sensitive and rapid method for early diagnosis of dengue virus infection is crucial for the prevention and treatment of dengue fever.

The research group established the dengue virus NS1 antigen capture in the early stage, and realized the industrialization. The detection system is not only used for the diagnosis of dengue fever in southern China, mainly in Guangdong Province, but also provided to dengue epidemic areas such as Southeast Asia as a detection tool. At the same time, a double-antigen sandwich antibody detection method was established by using EDIII protein. The sensitivity and specificity of the detection method in the diagnosis of dengue fever also reached the level of commercial PANBIO kits. So it means that the expression of EDIII protein in the serum of dengue patients should be quite large. Does it reach the level of diagnostic target? To this end, this study used

the 108 dengue virus EDIII protein-specific monoclonal antibodies prepared by the research group to establish antigen and IgM antibody detection methods, and explored the feasibility of detecting EDIII protein and antibodies from patient serum samples.

This research is mainly conducted through the following two parts:

1. Establishment and application of dengue virus EDIII antigen detection method

Based on the characteristics of 108 anti-DENV-ED III monoclonal antibodies prepared by the research group in the early stage and the experience in antigen diagnosis methods. In this part, 36 strains of DENV1-4 EDIII protein serotype specificity or partially serotype cross-reactive monoclonal antibodies obtained in the previous stage were used as capture antibodies, and 20 strains of 1-4DENV-EDIII cross-reactive monoclonal antibodies were paired with each other. Combining and pairing to obtain antibody pairs that can capture the EDIII protein of each serotype of dengue virus, and optimize the combination of the obtained antibody pairs, and finally establish a mixture of monoclonal antibodies 4A2A1 and 3E7A7 as capture antibodies, biotin-2D13A12 monoclonal antibody as a detection antibody, it can detect 4 serotypes of dengue virus at the same time, and has no cross-reaction with Japanese encephalitis virus and yellow fever virus. By optimizing the detection system, the sensitivity of DENV1-4 EDIII protein detection were 3pg/ml, 98pg/ml, 12pg/ml and 49pg/ml, respectively. The sensitivity for detecting 1-4 serotypes of dengue virus were 2244.98 copies/ μ L, 3116.61 copies/ μ L, 36865.22 copies/ μ L and 317694.43 copies/ μ L, respectively. The sensitivity of 800 confirmed dengue patients' sera was 50.6% and the specificity was 99.5%, the sensitivity was significantly lower than that of dengue virus NS1 antigen detection method $P=0.000$ (50.6% & 97.5%) and RT-PCR detection method $P=0.000$ (50.6% & 66.9%).

2. Establishment and application of IgM capture method based on dengue virus

EDIII protein

Dengue virus EDIII-IgM capture method was established with dengue virus 1-4 serotypes EDIII protein as detection antigen. The commercialized Australian panbio IgM detection kit was used as the reference reagent to simultaneously detect the serum samples of clinically diagnosed dengue fever patients. The sensitivity difference between the two detection methods was not statistically significant ($P=0.118$), and the agreement was strong. ($\kappa=0.777$, $P=0.000$). Combined with the EDIII antigen detection method, the sensitivity of 800 serum samples from patients with confirmed dengue fever can reach 90.5%, which is significantly higher than that of the nucleic acid detection method.

In conclusion, this study successfully established the dengue virus EDIII antigen and IgM antibody capture method. Through the evaluation of clinical specimens, the sensitivity of EDIII antigen capture is significantly lower than that of dengue virus NS1 antigen capture and RT-PCR ($P=0.000$), this detection system it is still expected to develop into an early diagnostic tool for dengue fever if combined with EDIII-IgM capture method for simultaneous detection.

KEYWORDS: Dengue virus; Envelope protein; domainIII; Immunoglobulin M; Diagnosis; Chemiluminescent enzyme immunoassay

目 录

摘 要.....	I
ABSTRACT.....	i
前 言.....	1
第一章 登革病毒 EDIII抗原检测方法的建立与应用.....	5
1.1 材料和方法.....	5
1.2 结果.....	21
1.3 讨论.....	34
第二章 基于登革病毒 EDIII蛋白的 IgM 捕获法的建立及应用.....	37
2.1 材料和方法.....	37
2.2 结果.....	43
2.3 讨论.....	48
全文总结.....	50
参考文献.....	51
中英文对照缩略词表.....	57
在读期间发表的文章.....	59
致 谢.....	60
南方医科大学学位论文原创性声明.....	63

前言

在过去的几十年中，人口密度、全球贸易、城市化的加剧、旅游业的发展和未及时有效防控的病媒等因素，使登革热的发病率不断增加，成为全球巨大的公共卫生挑战^[1]。目前，全球超过一半的人口（40 亿）面临感染登革病毒的风险，每年约有 3.9 亿人感染登革病毒，其中约 9600 万感染者出现登革热的临床症状，死亡人数可达 20,000 人^[2-7]。登革热主要流行于热带和亚热带地区，包括北美温带地区、欧洲、澳大利亚、美国和日本等^[8-11]。近年来，一些温带地区，包括法国、克罗地亚、中国和葡萄牙也出现了登革热病例^[12]。在我国南方沿海广东^[13]、广西、福建、海南和台湾^[14]等也发生过几次大流行。登革热的流行不仅对人类健康构成严重威胁，对经济也产生巨大影响。据估计，全球每年因登革热造成的经济负担包括直接和间接累计约达 89 亿美元^[15]。至今，登革热已成为一种严重危害人类身心健康的蚊媒病毒性传染病，也被 WHO 认定为全球健康的十大威胁之一。

登革病毒（dengue virus, DENV）主要是通过白蚊伊蚊或埃及伊蚊的叮咬感染人类，轻者表现为发热、皮疹、头痛、呕吐、肌痛和关节痛；重者可出现登革出血热（dengue hemorrhagic fever, DHF）和登革休克综合征（dengue shock syndrome, DSS）^[16]。登革病毒分为四个血清型，各血清型基因同源性在 65%-70%。四种血清型抗体间存在交叉反应，而又缺乏交叉保护作用，异型登革病毒的再次感染可能会增加重症登革热的风险，给疫情监测、风险评估和疾病诊治带来诸多挑战^[17-19]。而在登革疫区往往是几种血清型登革病毒同时交替流行^[20]，每个人一生都有可能同时感染几个血清型登革病毒，大大增加了 DHF 和 DSS 的发生率^[2, 6, 19, 21, 22]。近年来随着寨卡病毒与登革病毒的共流行，抗体依赖性增强（Antibody-dependent enhancement, ADE）效应的存在也增加了感染者发生重症的风险^[19, 23, 24]。因此，建立一种快速、灵敏、适合于大规模筛查的早期登革病毒诊断试剂盒对于登革热的防控具有重要意义。

当前, 针对登革热既没有特效的治疗药物^[25], 亦没有安全、有效的疫苗。临床研究表明, 早期发现, 早期给予支持疗法可以明显降低登革出血热的发生率和死亡率^[4-6]。然而, 登革病毒感染的临床症状通常为非特异的临床表现^[26, 27], 很难通过临床表现进行诊断, 因此实验室诊断对登革热的确诊十分必要。目前, 用于诊断登革热的实验室方法主要包括病毒分离、病毒核酸检测^[28]、IgM/IgG 抗体检测和抗原检测^[16, 26, 27, 29-31], 这些方法都有其优势和局限性^[32]。

(1) 病毒分离培养在病毒血症期间(发热后的 5 天内)进行时灵敏度较高, 且可以确定感染的登革病毒血清型别。然而病毒分离时间较长, 无法达到早期诊断的目的, 而且需要专业的技术人员和设备, 同样无法做到大规模筛查的目的; 核酸检测虽然可以达到早期诊断, 早期分型的目的, 但就目前核酸技术来说也很难做到大规模的筛查。

(2) 逆转录聚合酶链式反应(Reverse Transcription-Polymerase Chain Reaction, RT-PCR)能够以高灵敏度和特异性检测病毒核酸, 相对于病毒分离可以提供快速的分型诊断结果。然而, 其检测窗口期短, 污染风险高, 并且需要特殊设备和专业技术人员^[30], 难以实现大规模的筛查的目的^[27, 33]。

(3) 抗体捕获酶联免疫吸附试验(Enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA)测定抗登革病毒 IgM 和/或 IgG 抗体, 是目前登革热诊断应用最广泛的方法, 也可以区分首次感染还是二次感染。同时, 登革病毒抗体检测对于了解未来是否可能发生重症登革热的风险和疫苗接种前筛查很重要^[34-36]。然而, 在 DENV 继发感染中, IgM 水平显著降低甚至检测不到, 容易出现漏诊^[37]; 而特异性 IgG 抗体的检测无法区分近期和当前登革病毒感染^[27, 30], 且由于黄病毒属成员间同源性极高, 抗体检测存在交叉反应^[38]。有研究报道目前常见的三种商品化登革抗体检测试剂盒都与抗寨卡病毒 IgM 存在一定程度的交叉反应^[39, 40]。

(4) 抗原检测方法: 因其能够做到早期诊断^[41-45], 同时方法操作简便、快速而被大规模应用于登革疫区的筛查^[46]。目前的商品化抗原检测试剂主要都是基于登革病毒 NS1 抗原的检测方法^[47-52], 其敏感性和特异性都比较好, 而且能够

达到早期分型诊断的目的,已被我国列入登革热诊疗指南的确诊标准方法。课题组在前期制备获得了一批登革病毒 NS1 单克隆抗体,并利用这些抗体建立了 NS1 抗原早期分型检测方法,并实现了试剂盒的产业化,该检测体系不但用于我国华南地区主要是广东省的登革热诊断,还提供给东南亚等登革疫区作为检测工具。然而我们在实际应用中也发现 NS1 作为诊断靶标也存在一些问题:①血清中的 NS1 抗原是以二聚体形式存在,二聚体容易形成沉淀而影响抗原抗体的结合;②对于继发登革病毒感染,血清中预存的高浓度 NS1 抗体可以和 NS1 蛋白结合形成抗原抗体复合物而影响抗原检测。

为此,我们考虑到作为登革病毒最大结构蛋白的包膜蛋白(envelope, E),它是 4 个血清型登革病毒分型的依据^[53,54],其氨基酸序列相对保守^[54-56],也是病毒感染后诱导体液免疫和细胞免疫的主要蛋白^[57-59],目前被认为是登革疫苗的首要靶标^[60],那么其作为抗原诊断靶标是否也合适^[61]?鉴于 E 蛋白全长表达困难,而结构域 III 独立暴露于登革病毒表面^[62,63],具有很强的抗原性,可以在体内诱导高强度的免疫反应,且被认为是诱导最强中和活性抗体的区域^[58,59]。本课题组在前期利用 EDIII 蛋白建立的双抗原夹心抗体检测方法在登革热诊断中的敏感性和特异性均达到了商品化 PANBIO 试剂盒的水平。也有研究提出病毒特异性表位的 EDIII 可用于黄病毒感染的血清学诊断,具有更高的特异性^[64,65],有助于登革热的分型诊断^[66]。Wahala 等人已经表明 DENV 的重组 EDIII 是建立 ELISA 的可靠抗原,以识别原发性感染的 DENV 血清型^[67]。Siew 等以 EDIII 蛋白用作抗原探针,开发了一种新型阻抗免疫传感器用于检测登革热病毒 IgG 抗体,具有良好的敏感性和特异性^[68]。综上,说明登革热患者血清中的 EDIII 蛋白含量理论上应该不少,但是否达到可早期诊断的水平仍有待探究。本研究将以登革病毒 EDIII 蛋白作为靶标蛋白,利用课题组前期制备获得的 108 株具有高中和活性的登革病毒 EDIII 蛋白特异性单克隆抗体和四个血清型登革病毒 EDIII 蛋白建立抗原检测方法和基于 EDIII 蛋白的 IgM 捕获法,同时对 2014 年广州地区

爆发登革热疫区所收集的 800 份确诊的登革热患者血清标本进行检测，并评价检测方法的敏感性和特异性，评价 EDIII 蛋白作为登革热早期抗原诊断的价值。

第一章 登革病毒 EDIII 抗原检测方法的建立与应用

目前,用于诊断登革热的实验室方法主要包括病毒分离、病毒核酸检测、IgM/IgG 抗体检测和抗原检测^[69]。登革病毒的包膜蛋白负责广泛的生物活动,包括与宿主细胞受体结合以及融合和进入宿主细胞。E 蛋白,尤其是其结构域 III(envelop domain III, EDIII)独立暴露于登革病毒表面^[62, 63],具有很强的抗原性^[70],包含多重构象依赖性中和表位^[71],通过诱导保护性和中和抗体来刺激宿主免疫反应。所以,登革病毒 E 蛋白是用于疫苗开发和诊断的重要抗原^[72]。为了进一步探索登革病毒 EDIII 蛋白作为登革热早期抗原诊断的价值,我们利用课题组前期制备获得的 108 株具有高中和活性的登革病毒 EDIII 蛋白特异性单克隆抗体建立 EDIII 抗原检测方法,并评价其作为血清学早期诊断靶标的价值。

本章主要是通过制备和纯化腹水型的登革病毒 EDIII 单克隆抗体,并对 20 株四个血清型登革病毒同时交叉的单抗进行生物素标记。将登革病毒血清型特异性单抗及部分型交叉单抗与四个血清型同时交叉的单抗进行组合配对,优化组合体系,建立四个血清型登革病毒 EDIII 抗原捕获的化学发光酶联检测方法。并通过对检测方法的敏感性及其特异性的评价,探讨 EDIII 蛋白作为登革热早期诊断靶标的价值。

1.1 材料和方法

1.1.1 4 个血清型 DENV 重组 EDIII 蛋白及杂交瘤细胞株

1-4 型登革病毒重组 EDIII 蛋白为本实验室通过构建真核表达载体转化的酵母细胞表达并经镍柱纯化所获得,该蛋白已经登革病毒免疫的动物血清证实具有良好的抗原性^[73];新型冠状病毒 N 蛋白和马尔尼菲青霉菌 MP1 蛋白为本实验室保存。抗 DENV-EDIII 单克隆抗体杂交瘤细胞株为本实验室前期制备并保存。

1.1.2 病毒和细胞株

登革病毒株：1-4 型登革病毒标准毒株、日本乙型脑炎病毒（Japanese Encephalitis Virus, JEV）、黄热病毒（yellow fever virus, YFV）均由广州市疾病预防控制中心惠赠。白蚊伊蚊 C6/36 细胞株由本实验室保存。

1.1.3 实验动物

6-8 周龄，雌性的 SPF 级 Balb/c 小鼠购自广东省实验动物中心。

1.1.4 血清样品

500 份健康志愿者体检血清样品来自 2021 年南方医科大学珠江医院门诊健康查体并已排除乙型肝炎病毒感染的剩余血清。

800 份经 RT-PCR 或登革病毒 NS1 抗原检测阳性的登革热患者血清标本来自 2014 年广东省登革热爆发流行期间就诊于南方医科大学珠江医院发热门诊或住院的患者剩余血清。

1.1.5 主要试剂

表 1-1 实验的主要试剂

Tab 1-1 The main reagents used in the experiments

试剂名称	厂商
庆大霉素/两性霉素混合溶液	美国 GiBCO 公司
胎牛血清(fetal bovine serum, FBS)	美国 GiBCO 公司
PRMI-1640、MEM、DMEM 培养基	美国 GiBCO 公司
Streptavidin-Peroxidase Polymer-IgG	Sigma (上海) 贸易有限公司
HRP 羊抗小鼠 IgG	Sigma (上海) 贸易有限公司
弗氏不完全佐剂	Sigma (上海) 贸易有限公司
生物素	Sigma (上海) 贸易有限公司
3, 3', 5, 5'-四甲基联苯胺 (TMB)	北京博奥龙免疫技术有限公司
山羊血清	以色列 BI 公司
考马斯亮蓝 G250	大连美仑生物技术有限公司
双色预染蛋白相对分子量标准	上海雅酶生物医药科技有限公司

5×Loading Buffer	江苏康为世纪生物科技股份有限公司
30%聚丙烯酰胺、APS、TEMED	上海碧云天生物技术有限公司
HRP 化学发光底物	广东菲鹏生物股份有限公司
甘油	大连美仑生物技术有限公司
TRIS Base 三羟甲基氨基甲烷	美国 MP Biomedicals 公司
SDS 十二烷基硫酸钠	凯基生物科技有限公司
甘氨酸、辛酸、硫酸铵、氯化钠	上海生工生物工程股份有限公司
PH 测试条 (6.5-10.0)	德国默克密理博公司
磷酸氢二钠十二水合物、磷酸二氢钠	上海麦克林生化科技有限公司
Proclin 300	上海安谱科学仪器有限公司产品;
DEPC 水	上海生工生物工程股份有限公司
PCR 八联管及其管盖	美国爱进思(Axygen)公司
Fast 1-step Mix (4X)	赛默飞世尔科技 Applied Biosystems
96 孔酶标板、发光板	厦门怡佳美实验器材有限公司
登革病毒 QRT-PCR 检测试剂盒	中山大学达安基因股份有限公司
登革病毒 NS1 抗原检测试剂盒	北京万泰生物药业股份有限公司

其他试剂为国产分析纯或进口分装。

1.1.6 主要试剂配制

(1) 20×PBS

NaH ₂ PO ₄	4.56 g
Na ₂ HPO ₄ ·12H ₂ O	58.02 g
NaCl	175.3 g
dH ₂ O(定容)	1 L

121 °C 高压灭菌 30min

(2) 样品稀释液

0.1% BSA	1.0 g
----------	-------

0.1% tween-20	1.0 ml
0.1% proclin	1.0 ml
1×PBS (定容)	1000 ml
(3) 0.1%PBS-T	
0.1% tween-20	1.0 ml
20×PBS	50 ml
dH ₂ O (定容)	1 L
(4) 酶稀释液	
20%羊血清	100 ml
0.5% 吐温-20	2.5 ml
0.1% proclin	0.5 ml
1%苯酚红	3.0 ml
1×PBS (定容)	500 ml
(5) 终止液: 1M H ₂ SO ₄	
dH ₂ O	945.6 ml
98% H ₂ SO ₄	54.4 ml
(6) 封闭液	
Tris	1.21 g
明胶	2 g
蔗糖	20 g
酪蛋白	2.5 g
硫柳汞	0.2 g
dH ₂ O(定容)	995 ml
吐温	5 ml (56℃1h,115℃30min 冷却后加入)
(7) 抗原包被液: 0.05M 碳酸盐缓冲液	
Na ₂ CO ₃	1.59 g

NaHCO ₃	2.93 g
dH ₂ O(定容)	1 L
(8) 抗体包被液	
Na ₂ HPO ₄ ·12H ₂ O	15.0 g
NaH ₂ PO ₄ ·2H ₂ O	1.4g
dH ₂ O(定容)	1 L
(9) 5×电泳缓冲液	
Tris	15.1 g
甘氨酸	94 g
SDS	5 g
dH ₂ O(定容)	1 L
(10) 染色液	
考马斯亮蓝	0.25 g
甲醇: 水(过滤后使用)	(50+40) 90 ml
冰醋酸	10 ml
(11) 脱色液	
甲醇	184 ml
冰醋酸	32 ml
双蒸水	184 ml
(12) 0.06M PH4.4 乙酸缓冲液	
0.6M 乙酸钠	3.7 ml
0.6M 冰醋酸	6.3 ml
dH ₂ O (定容)	100 ml
(13) 1.5M Tris-HCl (PH8.8)	
三羟甲基氨基甲烷	18.17 g
dH ₂ O (定容)	100 ml

稀 HCl	调 PH 至 8.8
(14) 1.0M Tris-HCl (PH6.8)	
三羟甲基氨基甲烷	12.11 g
dH ₂ O	100 ml
稀 HCl	调 PH 至 6.8
(15) 10% SDS-PAGE 分离胶 (5 ml)	
超纯水	1.8 ml
30% 聚丙烯酰胺	1.7 ml
1.5M Tris-HCl	1.3 ml
10% 过硫酸铵	0.05 ml
10% SDS	0.05 ml
TEMED	0.002 ml
(16) 5% SDS-PAGE 浓缩胶 (2 ml)	
超纯水	1.4 ml
30% 丙烯酰胺	0.38 ml
1.0M Tris-HCl	0.25 ml
10% 过硫酸铵	0.02 ml
10% SDS	0.02 ml
TEMED	0.002 ml

1.1.7 主要仪器设备

表 1-2 实验的主要仪器

Tab 1-2 The main instruments used in the experiments

仪器名称	型号	产地
-80℃冰箱	MDF-U53V	日本
普通冰箱	KA62NV20TI	日本
超纯水系统	HJJRO2EDI250	中国

高压灭菌器	HVA-85	日本
干燥箱	BPG-9156A	中国
酶标仪	SynergyHTX	美国
大容量恒温水浴锅	GD100	英国
搅拌器	SP131320-33	美国
台式离心机	ScanSpeed 1730R	丹麦
振荡器	Vortex Genie2 G560E	美国
封口机	DZQ400-2D	中国
洗板机	ELX50	美国
电子天平	赛多利斯 BS224S	中国
pH 计	FE20K	瑞士
生物安全柜	NU-425-600E	美国
高速台式冷冻离心机	SIGMA 4K15	美国
二氧化碳培养箱	HERAcell 150i	美国
冷却水循环装置	CA-1111	中国
倒置显微镜	TS100	日本
高速立式冷冻离心机	CR21G3III	日本
BIO-RAD 电泳仪	POWERPAC UNIVERSAL	美国
摇床	TS-2000A	中国
金属浴	GH-100	中国
紫外分光光度计	NanoDrop2000C	美国
制冰机	XB70-FZ	中国
生物安全柜	BSC-1360IIA2	中国
超净工作台	SW-CJ-2FD	中国
荧光定量 PCR 扩增仪	ABI7500ViiA7DX	美国

1.1.8 抗登革病毒 EDIII 蛋白单克隆抗体杂交瘤细胞株的扩大培养

根据前期鉴定的登革病毒 EDIII 单克隆抗体的免疫学信息,挑选型特异性和部分交叉型单克隆抗体的杂交瘤细胞株进行扩大培养。将冻存的细胞株从液氮中取出,并立即于 39℃ 水浴箱中快速晃动溶解复苏,分别吸取各株细胞悬液加入含 5ml 10%FBS 的 DMEM 培养基的离心管中,1000rpm 离心 5min,弃上清,加入 10ml 培养基后重悬,吸入培养瓶中置于 37℃、5% CO₂ 孵箱中扩大培养。

1.1.9 抗登革病毒 EDIII 蛋白腹水型单克隆抗体的制备与纯化

(1) 腹水型单克隆抗体的制备:将 6-8 周龄的 SPF 级雌性 Balb/c 小鼠随机分为每 3 只一组,并使用苦味酸标记小鼠,每只小鼠于 1 周前经腹腔内扇形注射弗氏不完全佐剂 0.5ml。将复苏的杂交瘤细胞扩大培养至对数生长期,离心弃上清;同法使用预温的无血清 RPMI 1640 培养基轻轻重悬细胞后离心弃上清,洗涤细胞 2 次,并以适量无血清 1640 培养基均匀重悬细胞进行计数,按照每只小鼠腹腔注射 1~2×10⁶ 个细胞/200μL;约 1~2 周后观察小鼠腹围,对腹围明显增大的小鼠用 7 号注射针头进行腹水收集,并观察记录收集腹水的时间、性状、体积以及小鼠的生存情况,将收集的腹水经 3000rpm,4℃ 离心 10min 后取上清,加入叠氮钠至终浓度为 0.1%存放于 4℃ 冰箱备用。

(2) 单克隆抗体的纯化:使用辛酸-硫酸铵沉淀法进行腹水型单抗的纯化。具体操作步骤为:将收集的腹水型单抗于 4℃,12000 rpm 离心 30min,将不含乳糜样脂肪的上清转至烧杯并定容;在室温搅拌下,缓慢加入两倍腹水上清体积的 0.06M 的乙酸缓冲液;并于 30min 内以 33 μL/ml 腹水缓慢滴加辛酸,观察出现沉淀,4℃ 静置 2 h;同前离心 30min,取上清用定性滤纸冰浴过滤,对过滤后上清进行定容,冰浴搅拌下缓慢加入 1/10 上清体积的 PH7.5 的 10×PBS,并用 1M NaOH 调节 pH 值至 7.4 左右。冰浴搅拌下缓慢加入固体硫酸铵 0.277g/ml,(时间不少于 30 min),使硫酸铵终浓度达 45%。硫酸铵溶解完全后继续搅拌 10 min,转至 4℃ 冰箱静置过夜。次日于 4℃,12000rpm 高速离心 30 min,弃上清,倒扣于滤纸上方吸去残余上清;加入 1.5~2ml 预冷的 1×PBS 溶解沉淀;将完全溶解

后样品装入透析袋中，置于含 0.01M PBS 中，4℃透析 24~48h，平均每 4h 换液 1 次；透析完毕，用 NanoDrop 测定抗体浓度，并经 10% SDS-PAGE 鉴定抗体纯度，将纯化的单抗冻存于-20℃备用。

(3) 聚丙烯酰胺凝胶电泳分析抗体纯度：

①配胶制胶：于室温下按照试剂相应配方配制 10%分离胶与 5%浓缩胶两块，每块玻璃板加入约 5ml 分离胶后，加入无水乙醇压线，室温静置 30min，待下层胶凝固后倒去无水乙醇，并用吸水纸吸收残留的无水乙醇；于每块玻璃板中灌注约 2ml 上层胶，轻轻插入梳子，待 30min 凝固后卸去制胶架，稳定夹在电泳槽中；灌入事先配制好的 1×电泳缓冲液，并拔去梳子；

②样品制备：分别计算并吸取每株纯化的单抗 25μg，加入 10μL 5×loading buffer,并用 1×PBS 补足体积至 50μL,充分混匀后将样品使用金属浴 100℃加热 10min,待冷却至室温后，3000rpm 离心 1min；

③上样：每个样品上样 20μL/孔即 10μg/孔，彩虹 marker 平复室温后，混匀上样 3μL/孔；

④电泳：设置 80V 电压进行恒压电泳至 marker 条带均分开后，调整电压为 120V 电泳至 loading buffer 跑至胶底部停止；

⑤考马斯亮蓝染色：把胶板小心撬开，将凝胶轻轻放入玻璃平皿中加入考马斯亮蓝染液覆盖凝胶,于摇床上染色 30min,

⑥脱色：倒尽考马斯亮蓝染液，加入甲醇脱色液脱色，每 20min 换液 1 次，共脱色 60min。待条带清晰后，拍照保存。

1.1.10 生物素标记登革病毒 EDIII单克隆抗体及效价测定

(1) 生物素标记登革病毒 EDIII单抗

操作方法如下：取纯化后的各株抗登革病毒 EDIII蛋白单克隆抗体，取 2ml 单抗用 1×PBS 稀释至 1ml，将其配制为终浓度 2mg/ml 的溶液；称取 Biotin(生物素)2.2mg 溶于 500μL 高压的纯水中，配制成 10mM 的 Biotin 溶液；取 10mM 的 Biotin 溶液 26.8μL 加入到先前配制的 2mg/ml 的抗体溶液中，于冰上孵育反应约

两个小时进行标记；将标记后溶液装于透析袋中，使用 1×PBS 透析过夜，换液 8 次后收取标记后单抗，加入等体积甘油充分混匀后，分装 300 μ L/支，冻于-80 $^{\circ}$ C 冰箱保存备用。

(2) 生物素标记登革病毒 EDIII 单抗的效价测定

采用直接 ELISA 法进行生物素标记抗体效价测定，以新型冠状病毒 N 蛋白 (SARS-COV-2-NP) 为阴性对照。1-4 型登革病毒 EDIII 蛋白和 SARS-COV-2-NP 包被浓度为 1 μ g/ml，4 $^{\circ}$ C 包被 16h，甩干拍干后加酪蛋白封闭液 4 $^{\circ}$ C 封闭 24h。加入经梯度稀释的生物素标记的抗登革病毒 EDIII 单抗，100 μ L/孔，37 $^{\circ}$ C 水浴箱孵育 1h，0.1%PBS-T 洗板 6 次；加入 1:1000 稀释的 HRP 标记的亲和素 100 μ L/孔，37 $^{\circ}$ C 水浴箱孵育 40min；0.1%PBS-T 洗板 8 次，加入 100 μ L/孔的 TMB 显色液，于室温避光显色 10min，加入 100 μ L/孔 1M H₂SO₄ 终止反应，酶标仪测定 OD 值 450-630。以阳性测定值减去相应稀释度的对照值等于 1.0 时的生物素标记 EDIII 单抗稀释度作为其工作浓度。

1.1.11 病毒的扩增培养

C6/36 细胞在含 10%FBS 的 MEM 培养基中于 28 $^{\circ}$ C、5%CO₂ 条件下培养至 80%~90%的单层细胞密度后，用 1×PBS 轻轻晃动洗涤细胞 2 次；然后以无血清 MEM 培养基：病毒液为 7:1 进行感染，设置一瓶 C6/36 细胞作未感染对照，并加入 3.5 ml 无血清的 MEM 培养基；感染组加入 3ml 无血清培养基后，分别加入 0.5ml 1-4 型登革病毒液、乙型脑炎病毒液和黄热病毒液；所有培养瓶置于 33 $^{\circ}$ C 含 5%CO₂ 的孵箱中以每 20min 摇动一次的频率感染 2 小时后，吸弃病毒液，感染组与对照组均加入 3.5ml 含 4%FBS 的 MEM 培养基至终浓度为 2%以终止感染，于 33 $^{\circ}$ C 含 5%CO₂ 的培养箱中维持培养 3~5 天，观察到瓶中大多数细胞出现 CPE 病变效应时，收集病毒感染的细胞及培养上清。

1.1.12 登革病毒 EDIII 抗原检测方法的建立

采用双抗体夹心 ELISA 法，以各个血清型特异性或部分型别交叉的 EDIII 单抗为捕获抗体，四个血清型登革病毒交叉型 EDIII 单抗为检测抗体，共挑选出

36株 EDIII单抗及 20株交叉型单抗分别进行两两配对,以筛选捕获抗体与检测抗体的最佳组合。配对方法简述如下:将各株抗登革病毒 EDIII单抗以 10 μ g/ml 分别包被于聚苯乙烯酶标板孔中,100 μ L/孔,4 $^{\circ}$ C 包被 16h,加入 260 μ L/孔酪蛋白封闭液 4 $^{\circ}$ C 封闭 24h。分别加入 1:10 稀释的同型 DENV 培养上清液和 50ng/ml 的重组 EDIII蛋白及样品稀释液 100 μ L/孔,37 $^{\circ}$ C 孵育 1h,0.1%PBS-T 洗板 6 次;分别加入工作浓度的生物素标记抗 DENV-EDIII单抗,100 μ L/孔,37 $^{\circ}$ C 水浴箱孵育 1h;0.1%PBS-T 洗板 6 次,加入 1:1000 稀释的 HRP 标记的亲合素 100 μ L/孔,37 $^{\circ}$ C 水浴箱孵育 40min;0.1%PBS-T 洗板 8 次,加入 100 μ L/孔 TMB 显色液于室温避光显色 10min,加入 100 μ L/孔 1M H₂SO₄ 终止反应,酶标仪测定 OD 值 450-630。若待测孔与阴性对照孔的比值 \geq 2.1 即为阳性。

1.1.13 四个血清型 DENV-EDIII检测方法的敏感性和特异性

将 1.1.12 中初筛到的敏感性高的抗体组合进行优化组合配对,并鉴定检测方法的特异性。具体操作如下:以 10 μ g/ml 抗登革病毒 EDIII抗体包被聚苯乙烯酶标板,4 $^{\circ}$ C 包被 16h,加入 260 μ L/孔酪蛋白封闭液 4 $^{\circ}$ C 封闭 24h;分别加入倍比稀释的灭活的 1-4 型 DENV、JEV 和 YFV 病毒培养上清,100 μ L/孔置于 37 $^{\circ}$ C 水浴锅中反应 1h 后,0.1%PBS-T 洗板 6 次;加入生物素标记的抗 DENV-EDIII单抗,100 μ L/孔,37 $^{\circ}$ C 水浴箱孵育 1h;0.1%PBS-T 洗板 6 次,加入 1:1000 稀释的 HRP 标记的亲合素 100 μ L/孔,37 $^{\circ}$ C 孵育 40min;0.1%PBS-T 洗板 8 次,加入 100 μ L/孔的 TMB 显色液于室温避光显色 10min,加入 100 μ L/孔 1M H₂SO₄ 终止反应,酶标仪测定 OD 值 450-630。

1.1.14 基于化学发光酶免疫的登革病毒 EDIII抗原检测方法的优化

采用双抗体夹心抗原捕获化学发光酶免疫法对 1.1.13 挑选的最佳抗体组合进行捕获抗体和检测抗体的体系优化。步骤简述如下:将两株登革病毒 EDIII蛋白捕获抗体按 4 个组合浓度包被于聚苯乙烯酶标板孔中,分别为 5 μ g/ml 4A2A1+10 μ g/ml 3E7A7、5 μ g/ml 4A2A1+15 μ g/ml 3E7A7、10 μ g/ml 4A2A1+15 μ g/ml 3E7A7、15 μ g/ml 4A2A1+20 μ g/ml 3E7A7,4 $^{\circ}$ C 包被 16h 后,酪

蛋白封闭液 4℃封闭 24h; 加入 100 μ L/孔的 1:10 稀释的 1-4 型登革病毒培养上清液及 1:10 稀释的 6 个正常体检血清作为对照, 样本稀释液作为阴性对照, 37℃ 孵育 1h, 0.1%PBS-T 洗板 6 次; 再分别加入 1:500、1:1000 及 1:1500 共 3 个不同稀释度检测抗体 2D13A12-biotin, 37℃孵育 1h 后洗板 6 次; 再加入 1:1000 稀释的 HRP 标记的亲合素于 37℃孵育 40min; 洗板 8 次后加入化学发光底物液避光反应 4min, 酶标仪测定 luminaries 值。上述洗液条件设立 0.1%、0.2%及 0.5% PBS-T 3 个浓度。将上述组合采用单一变量的方法进行优化条件对比分析, 确立最佳检测体系。

1.1.15 登革病毒 EDIII 抗原检测方法的灵敏度

采用 1.1.14 确立的最佳单抗配对体系对系列稀释的 1-4 型 DENV-EDIII 蛋白进行检测, 以确定检测方法的灵敏度。具体操作参照 1.1.13。将梯度稀释的 1-4 型 DENV-EDIII 蛋白加入检测体系, 同时以马尔尼菲青霉菌 MP1 蛋白和新型冠状病毒 N 蛋白为无关对照, 从 100ng/ml 开始, 设置 16 个浓度梯度。以 EDIII 蛋白的 luminaries 与无关对照蛋白检测值的比值 ≥ 2.1 时的最高稀释度所对应的蛋白浓度为检测体系的最低蛋白检出限。重复两次实验, 计算标准差。

1.1.16 登革病毒 EDIII 抗原检测方法的特异性

为进一步评估所建立抗原检测方法的敏感性和特异性, 将 4 个血清型登革病毒、乙型脑炎病毒和黄热病毒进行同步检测。具体方法步骤基本同前: 取包被捕获抗体浓度为 5 μ g/ml 4A2A1+10 μ g/ml 3E7A7 的化学发光酶联免疫板, 分别加入倍比稀释灭活的 DENV1、DENV2、DENV3、DENV4、JEV 和 YFV 培养上清, 从 1:2 开始倍比稀释, 设置 12 个稀释度 (1:2~1:4096), 37℃孵育 1h 后 0.5%PBS-T 洗板; 加入 1:2000 稀释的 biotin-2D13A12 检测抗体 37℃孵育 1h, 0.5%PBS-T 洗板后加入 1:1000 稀释的 HRP 标记亲合素 37℃孵育 40min; 洗板后拍干, 加入 HRP 化学发光底物液避光反应 4min, 酶标仪测定 luminaries 值。以对应分型登革病毒检测的 luminaries 值与日本乙型脑炎病毒及黄热病毒检测平均值比值 ≥ 2.1 时的最高稀释倍数作为检测方法对该型登革病毒的敏感性。同时观

察所建立的检测方法是否与日本乙型脑炎病毒及黄热病毒发生交叉反应。

1.1.17 基于荧光定量 RT-PCR 的登革病毒分型检测方法的建立及检测登革病毒的敏感性

登革病毒特异性引物、探针及 1-4 型 DENV 质粒标准品由上海生工生物工程股份有限公司合成；质粒浓度分别为 DENV1: 354ng/μL; DENV2: 228ng/μL; DENV3: 240ng/μL; DENV4: 204ng/μL。

表 1-3 用于血清型特异性登革病毒实时 RT-PCR 测定的寡核苷酸引物和荧光探针^[74]

Tab 1-3 Oligonucleotide primers and fluorogenic probes used in the serotype-specific dengue virus real-time RT-PCR assay

Virus serotype	Nucleotide sequence	Genome position	Fluorophore
DENV-1 F	CAAAAGGAAGTCGTGCAATA	8973	
DENV-1 C	CTGAGTGAATTCTCTCTACTGAACC	9084	
DENV-1 probe	CATGTGGTTGGGAGCACGC	8998	FAM/BHQ-1
DENV-2 F	CAGGTTATGGCACTGTCACGAT	1605	
DENV-2 C	CCATCTGCAGCAACACCATCTC	1583	
DENV-2 probe	CTCTCCGAGAACAGGCCTCGACTTCAA	1008	HEX/BHQ-1
DENV-3 F	GGACTGGACACACGCACTCA	740	
DENV-3 C	CATGTCTCTACCTTCTCGACTTGTCT	813	
DENV-3 probe	ACCTGGATGTGCGGCTGAAGGAGCTTG	762	TR/BHQ-2
DENV-4 F	TTGTCCTAATGATGCTGGTGC	904	
DENV-4 C	TCCACCTGAGACTCCTTCCA	992	
DENV-4 probe	TTCCTACTCCTACGCATCGCATTCCG	960	Cy5/BHQ-3

表 1-4 4 个血清型登革病毒标准品质粒目的基因合成序列

Tab 1-4 Synthetic sequences of target genes of four dengue virus serotype standard plasmids

DENV-1: 112bp

CAAAAGGAAGTCGCGCAATATGGTACATGTGGTTGGGAGCGCGCTTTTTAGAGTTTGA
AGCCCTTGGTTTCATGAATGAAGATCACTGGTTCAGCAGAGAGAATTCCTCAG

DENV-2: 78bp

CAGGCTATGGCACTGTCACGATGGAGTGCTCTCCGAGAACGGGCCTCGACTTCAATGA
GATGGTGTGCTGCAAATGG

DENV-3: 74bp

GGACTGGACACACGCACTCAAACCTGGATGTCGGCTGAAGGAGCTTGGAGACAAGTC
GAGAAGGTAGAGACATG

DENV-4: 89bp

TTGTTCTAATGATGCTGGTCGCCCATCTACGGAATGCGATGCGTGGGAGTGGGGAA
CAGAGACTTTGTGGAAGGAGTCTCAGGTGGA

(1) 病毒 RNA 抽提

将 1.1.11 扩增的 DENV1-4 病毒培养上清、乙型脑炎病毒和黄热病毒使用 DEPC 水进行 10 倍梯度稀释, 共设 12 个梯度 (原液 $\sim 10^{12}$), 每个稀释度病毒液各取 70 μL 按试剂盒说明书进行病毒 RNA 抽提。RNA 提取操作如下: 首先配置 Buffer VRL/Carrier RNA 混合液: Carrier RNA 可以提高病毒 RNA 的回收效率。每 1ml Buffer VRL, 加入 4 μL Carrier RNA (1 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$)。

- 1) 转移 280 μL 含 Carrier RNA 的 Buffer VRL 至 1.5ml 离心管中;
- 2) 其次转移 70 μL 无细胞培养液至装有 Buffer VRL/Carrier RNA 的离心管中, 涡旋混匀 20 秒;
- 3) 室温(15-25 $^{\circ}\text{C}$)静置 10 分钟后, 14000 $\times g$ 离心 5 分钟去除不溶解杂质, 以免出现堵柱情况;
- 4) 再加入 280 μL 无水乙醇至上述裂解液中, 涡旋混匀 20 秒;
- 5) 将 HiPure RNA Micro column 管子装在 2ml 收集管中, 转移 700 μL 混合液至柱子中, 10000 $\times g$ 离心 30-60 秒;
- 6) 倒弃滤液, 把柱子装在收集管中。转移剩余混合液至柱子中, 10000 $\times g$ 离心 30-60 秒。重复此步直到所有混合液都从柱子中过滤。
- 7) 此后把柱子装在新的收集管中, 加入 300 μL 已用乙醇稀释的 Buffer VHB 至柱子中, 10,000 $\times g$ 离心 30-60 秒;
- 8) 倒弃滤液, 把柱子重新装回收集管中; 加入 300 μL 已用乙醇稀释的 Buffer

- RW2 至柱子中，10000×g 离心 30-60 秒；
- 9) 倒弃滤液，把柱子重新装回收集管中，同上加入 300μL 已用乙醇稀释 Buffer RW2 至柱子中，10,000×g 离心 30-60 秒；
 - 10) 倒弃滤液，把柱子装回收集管中，13000×g 离心空柱 3 分钟甩干柱子；
 - 11) 将柱子转移至新的 1.5ml 离心管，加入 20μLRNase Free Water 至柱子的膜中央。
 - 12) 室温静置 2 分钟。13,000×g 离心 1 分钟。
 - 13) 最后弃去柱子，把病毒 RNA 保存于-20℃备用。

(2) 1-4 型 DENV 质粒标准品的拷贝数换算及稀释

根据合成的质粒标准品碱基数及已知浓度计算对应的拷贝数，其中由上海生工生物工程股份有限公司合成的质粒全长碱基数分别为 DENV1=2822bp，DENV2=2788bp，DENV3=2784bp，DENV4=2799bp；对应浓度为 DENV1：354ng/μL；DENV2：228ng/μL；DENV3：240ng/μL；DENV4：204ng/μL；拷贝数计算方法： $(6.02 \times 10^{23} \text{ 拷贝数/摩尔}) \times (\text{浓度 g/ml}) / (\text{MW g/mol}) = \text{copies/ml}$ 。使用 DEPC 水将 1-4 型 DENV 质粒标准品进行 10 倍梯度稀释，共设 12 个梯度（ $10 \sim 10^{12}$ ）。

表 1-5 登革病毒质粒标准品拷贝数计算结果

Tab 1-5. The results of Dengue virus plasmid standard copy number

血清型	浓度	换算拷贝数 copies/μL	Log
DENV-1	354ng/μL	11.442×10^{10}	11.06
DENV-2	228ng/μL	7.4592×10^{10}	10.87
DENV-3	240ng/μL	7.863×10^{10}	10.90
DENV-4	204ng/μL	6.6478×10^{10}	10.82

(3) 基于 qRT-PCR 检测四个血清型登革病毒标准品及病毒 RNA

于冰上配制 qRT-PCR 反应体系，根据样品总数确定配制反应液的份数。同一反应体系同时配制后加入孔中，配置样品数 X+a(a 为 X/8) 孔。即每一列 8 孔

至少应多配 1 个孔。a 值随样品数增多而相应增大，以免分装液体损失，导致反应液不足。每个标准品浓度梯度设立 2 个复孔，每个病毒 RNA 梯度设立 3 个复孔，重复 2 次实验。以乙型脑炎病毒和黄热病毒 RNA 作为阴性对照，运用基于 qRT-PCR 方法同时检测梯度稀释的质粒标准品及登革病毒 RNA。

表 1-6: QRT-PCR 反应体系

Tab. 1-6. The reaction system for QRT-PCR

试剂	反应体系
Fast 1-step Mix (4X)	6.25 μ L
上游引物 (10uM)	1.0 μ L
下游引物 (10uM)	1.0 μ L
特异性探针 Probe	1.0 μ L
模板	RNA 5.0 μ L/质粒标准品 1.0 μ L
DEPC 水	10.75 μ L/14.75 μ L
Total	25.0 μ L

表 1-7: QRT-PCR 反应条件

Tab. 1-7. The reaction condition for QRT-PCR

Step	Stage	No. of cycles	Temperature	Time
Reverse transcription	1	1	50 $^{\circ}$ C	5 min
RT inactivation	2	1	95 $^{\circ}$ C	20 s
Amplification	3	40	95 $^{\circ}$ C	3s
			60 $^{\circ}$ C	30s

表 1-8: QRT-PCR 通道选择

Tab. 1-8. The channel selection for QRT-PCR

Seretype	Reporter	Quencher
DENV-1	FAM	TAMRA
DENV-2	VIC	None
DENV-3	ROX	None
DENV-4	Cys5	None

(4) 绘制标准曲线计算病毒拷贝数及 qRT-PCR 的敏感性与特异性

以已知的质粒标准品拷贝数对数值 (Log) 为横坐标，以 qRT-PCR 反应体系

的循环数 (Ct) 值为纵坐标绘制标准曲线, 并计算相关系数 R^2 值, 斜率, 扩增效率 $E=10^{-1/\text{斜率}}-1$ 。以相关系数 R^2 大于 99%, 扩增效率 90~110% 判定为标准曲线性能可, 将待测的登革病毒培养上清所得的 Ct 值代入相应标准曲线计算相应稀释度的病毒拷贝数。敏感性通过检测 10 倍梯度稀释的阳性质粒标准品判断最低检测下限, 特异性实验通过检测不同血清型登革病毒及黄病毒属病毒日本乙型脑炎病毒与黄热病毒评估该 qRT-PCR 方法的特异性。

1.1.18 双抗体夹心 EDIII 抗原捕获法的应用

(1) 临界值的确定

以 1.1.14 建立的双抗体夹心抗原检测体系对 500 份来自南方医科大学珠江医院的体检者血清进行检测以确立检测方法的临界值。操作简述如下: 包被 $5\mu\text{g/ml}$ 4A2A1+ $10\mu\text{g/ml}$ 3E7A7 捕获抗体的板条, 分别加入 1:10 稀释的正常体检者血清, 每块化学发光板条均以 1:10 稀释的 1-4 型登革病毒培养上清作为阳性对照, 样本稀释液作为阴性对照, 同一条件同时检测所有样本。以检测的所有排除乙型肝炎病毒感染的体检者血清标本的 luminaries 均值加上 3 倍标准差作为该 CLEIA 方法的 Cut-off 临界值。

(2) 登革病毒感染患者血清的检测

在获得检测体系的临界值后, 进一步评价临床确诊的登革热患者血清标本的检测情况。操作步骤同 1.1.14, 血清标本统一 1:10 稀释后检测。以 1-4 型登革病毒培养上清作为阳性对照, 6-7 份排除乙型肝炎病毒感染的健康体检者血清标本作为阴性对照。若测定的体检者血清本底高于上述设立的临界值, 则以此次体检者血清本底平均值的 2.1 倍作为判定值, 若低于临界值, 则以临界值为界判定阴阳性结果。

1.2 结果

1.2.1 聚丙烯酰胺凝胶电泳分析登革病毒 EDIII 单克隆抗体的纯度

经辛酸-硫酸铵沉淀法纯化 DENV-EDIII 单抗, 并经 10% SDS-PAGE 电泳分

析 18 株单抗的纯度。结果如图 1-1 所示，18 株抗体经加热变性电泳后，均分解为轻链（相对分子质量 25KDa~35KDa 处）和重链（相对分子质量约 50KDa~70KDa 处）两个蛋白条带，蛋白纯度在 90%以上。

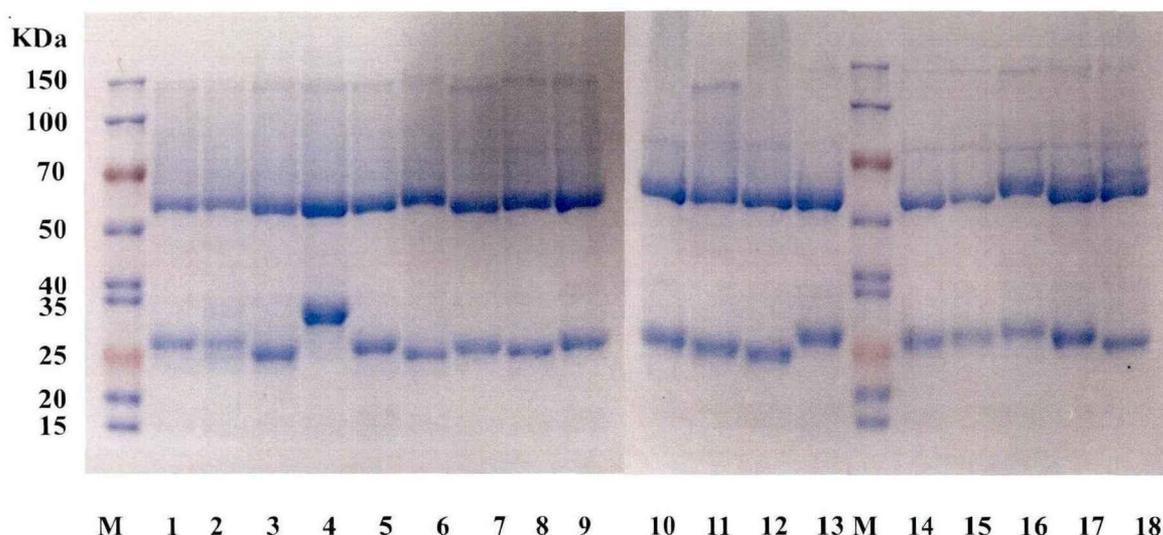


图 1-1 SDS-PAGE 分析纯化的抗 DENV-EDIII 单抗

Fig. 1-1. SDS-PAGE analysis of purified mAbs against the EDIII protein of DENV

M: marker; lane1.9D6A6; lane2.9E18A8; lane3.9B6A6; lane4.10F8A2; lane5.9F3A6;
lane6.5F29A6; lane7.4B11A33; lane8.4E27A17; lane9.4A20A5; lane10.2B6A33; lane11.2E6A5;
lane12.2F9A2; lane13.4A2A1; lane14.3E7A7; lane15.1C2A5; lane16.3A12A32;
lane17.2D13A12; lane18.2D73A7

1.2.2 生物素标记登革病毒 EDIII 单克隆抗体效价的测定

以新型冠状病毒 N 蛋白包被的板条为阴性对照。以待测阳性测定值减去相应稀释度的对照值等于 1.0 时的生物素标记抗体稀释度作为该抗体的工作浓度。测定结果如下图 1-2 及表 1-9（仅展示部分结果）。

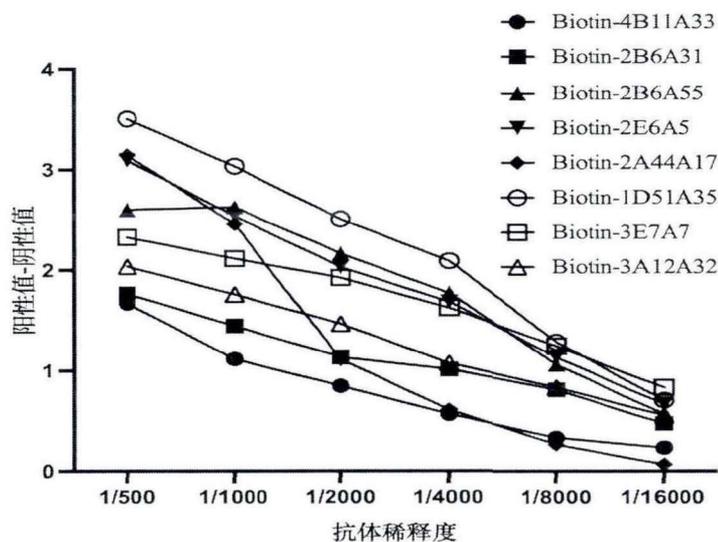


图 1-2 直接 ELISA 法测定生物素标记单克隆抗体效价

Fig. 1-2. Titer of the mAbs labeled with biotin detected by direct ELISA

表 1-9 生物素标记单抗的工作浓度

Tab 1-9 The working concentration of the Biotin-conjugated mAbs

Biotin-mAb	Working concentration	Biotin-mAb	Working concentration
Biotin-3A37A4	1:500	Biotin-2B16A31	1:4000
Biotin-3D41A6	1:2000	Biotin-4E27A17	1:1000
Biotin-4C58A2	1:4000	Biotin-1B14A12	1:8000
Biotin-5E7A6	1:2000	Biotin-2B6A33	1:8000
Biotin-4B11A33	1:1000	Biotin-2E6A5	1:8000
Biotin-2A44A17	1:2000	Biotin-3E31A4	1:500
Biotin-2D73A7	1:2000	Biotin-2D13A12	1:2000
Biotin-1C2A5	1:500	Biotin-3A12A32	1:4000
Biotin-1D51A35	1:8000	Biotin-3E7A7	1:8000

1.2.3 登革病毒 EDIII 抗原检测方法的建立

如表 1-10 所示，本研究采用 4 个血清型登革病毒特异性或部分型别病毒交叉的 EDIII 单抗为捕获抗体分别与 4 个血清型登革病毒同时交叉的抗 EDIII 单抗

进行两两组合配对建立登革病毒 EDIII 抗原检测方法。根据 EDIII 单抗的免疫学特性，我们挑选了 36 株 EDIII 抗体分别与 20 株生物素标记的交叉型抗 DENV-EDIII 单抗进行两两相互配对实验。共组成了 720 个配对组合，分别检测 4 个血清型登革病毒灭活培养上清及重组登革病毒 ED III 蛋白，结果见表 1-11，我们只筛选到三个组合能够组合成对子，其中只有单抗 4A2A1 和 3E7A7 混合作为捕获抗体，Biotin-2D13A12 作为检测抗体可以较好的同时检测到 4 个血清型登革病毒上清；而单抗 5C46A3 和 4A2A1 作为捕获抗体，Biotin-2D13A12 作为检测抗体只能检测 1-3 型登革病毒培养上清，而无法检测到 DENV4 病毒上清。因此，我们将单抗 4A2A1 和 3E7A7 混合作为捕获抗体，Biotin-2D13A12 作为检测抗体建立了登革病毒 EDIII 抗原检测方法。

表 1-10 参与配对的抗登革病毒重组 EDIII 蛋白的捕获单抗与检测单抗的特性

Tab 1-10 Characteristics of the paired MAbs of capture antibodies and detection antibodies against recombinant EDIII protein from dengue virus.

Clone	isotype	ELISA ^a										IFA ^b					
		DV1	DV2	DV3	DV4	DV1	DV2	DV3	DV4	DV1	DV2	DV3	DV4	WNV	JEV	YFV	C6/36
5F29A6	IgG1	+++	-	-	-	-	+++	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
5G9A28A12A45	IgG1	+++	-	-	-	+++	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
10F8A2	IgG1	+++	-	-	-	++	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
9D6A6	IgG1	+++	-	-	-	++	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
9F3A6	IgG1	+++	-	-	-	++	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
9B6A6	IgG1	+++	-	-	-	++	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
9E18A8	IgG1	+++	+++	+++	+++	++	+++	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-
5C46A3	IgG1	+++	+	+	-	+++	-	-	++	+	-	-	-	-	-	-	-
5B2A17	IgG2b	++	+	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
4B11A33	IgG1	++	+++	++	-	++	-	-	++	-	-	-	-	-	-	-	-
4A20A5	IgG1	-	+++	-	-	+	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-
1B14A12	IgG2a	-	+++	-	-	++	-	-	++	-	-	-	-	-	-	-	-

续表 1-10

Clone	Capture antibodies	isotype	ELISA ^a			IFA ^b							C6/36				
			DV1	DV2	DV3	DV4	DV1	DV2	DV3	DV4	WNV	JEV		YFV			
1B12A50		IgG1	-	+++	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-
2B16A31		IgG1	++	+++	++	+	+	+	-	++	-	-	-	-	-	-	-
3D41A6		IgG1	+++	+++	++	++	++	++	-	++	+	++	-	-	-	-	-
4D35A8		IgG1	-	+++	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-
4B39A58		IgG1	-	+++	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-
2B6A33		IgG1	++	++	+++	+	+	+	-	+	+++	-	-	-	-	-	-
2E6A5		IgG1	-	-	++	-	-	-	-	-	++	-	-	-	-	-	-
2F9A2		IgG1	-	-	++	-	-	-	-	-	++	-	-	-	-	-	-
4E27A17		IgG1	-	+++	-	-	-	-	-	++	-	-	-	-	-	-	-
2A50A48		IgG1	+	+	++	-	-	+	-	-	+++	-	-	-	-	-	-
4E60A15		IgG1	++	+	++	-	-	+	-	-	+	-	-	-	-	-	-
4C53A2		IgG1	-	++	++	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-
4A2A1		IgG1	+++	++	++	-	-	+	++	++	+	-	-	-	-	-	-

续表 1-10

Clone	isotype	ELISA ^a					IFA ^b					C6/36	
		DV1	DV2	DV3	DV4	DV1	DV2	DV3	DV4	WNV	JEV		YFV
10A19A8	IgG1	++	-	++	-	++	-	+	-	-	-	-	-
1C2A5	IgG1	-	-	-	+++	-	-	-	+++	-	-	-	-
3A12A32	IgG1	-	-	-	++	-	-	-	+++	-	-	-	-
3E7A7	IgG1	-	-	-	+++	-	-	-	+++	-	-	-	-
1A2A7	IgG1	-	-	-	++	-	-	-	+++	-	-	-	-
1A1A1	IgG1	-	-	-	+++	-	-	-	+++	-	-	-	-
2E23A1	IgG1	-	-	-	++	-	-	-	-	-	-	-	-
5A6A1	IgG1	+++	-	-	+	-	-	-	+	-	-	-	-
9A11A1	IgG1	+++	++	++	+++	++	-	-	+	-	-	-	-
9A76A23	IgG1	+++	+++	+++	+++	+	-	-	+	-	-	-	-
9A77A6	IgG1	+++	++	+++	+++	+	-	-	-	-	-	-	-

续表 1-10

Clone	isotype	ELISA ^a				IFA ^b				YFV	C6/36
		DV1	DV2	DV3	DV4	DV1	DV2	DV3	DV4		
Biotin-5B1A3	IgG2a	+++	++	++	++	++	+++	+	-	-	-
Biotin-9A11A1	IgG1	+++	++	++	+++	++	-	+	-	-	-
Biotin-9E18A8	IgG1	+++	+++	+++	+++	++	-	+	-	-	-
Biotin-2A44A17	IgG1	+++	+++	+++	+++	-	-	+	-	-	-
Biotin-5A1A3	IgG1	+++	+++	+++	+++	++	++	+++	-	-	-
Biotin-9B3A7	IgG1	+++	+++	+++	+++	++	+	++	-	-	-
Biotin-5A12A7	IgG1	+++	+++	+++	+++	++	++	+++	-	-	-
Biotin-5B3A8	IgG1	+++	+++	++	+++	++	+	+++	-	-	-
Biotin-2D13A12	IgG2b	+++	+++	+++	+++	++	++	+++	-	-	-
Biotin-3A37A4	IgG1	+++	+++	+++	+++	++	+	++	-	-	-
Biotin-3E31A4	IgG1	+++	+++	+++	+++	++	++	++	-	-	-
Biotin-2B16A31	IgG1	++	+++	++	+	+	++	-	-	-	-
Biotin-2C3A6	IgG1	+++	++	++	+	++++	+++	+	-	-	-

续表 1-10

Clone	isotype	ELISA ^a										IFA ^b					
		DV1	DV2	DV3	DV4	DV1	DV2	DV3	DV4	DV1	DV2	DV3	DV4	WNV	JEV	YFV	C6/36
Biotin-3D41A6	IgG1	+++	+++	++	++	++	++	++	++	++	++	+	-	++	-	-	-
Biotin-1D51A35	IgG1	+++	+++	+	+++	+++	+	+	+	+	+	+	+	++	-	-	-
Biotin-2D73A7	IgG1	++	+++	+++	++	+	++	++	++	++	++	++	++	-	-	-	-
Biotin-2B11A35	IgG1	+++	+++	+++	++	+	++	++	++	++	+	+++	+	-	-	-	-
Biotin-4C58A2	IgG1	+++	+++	+++	++	++	++	++	+++	++	++	+	+++	-	-	-	-
Biotin-5E7A6	IgG1	+++	+++	+++	+++	++	+++	++	++	++	+	++	-	-	-	-	-
Biotin-2C49A3A2	IgG1	+++	+++	+++	+++	++	+++	++	+	++	++	++	-	-	-	-	-

a Binding to rEDIII by ELISA.

+, OD450nm=0.25~1; ++, OD450nm=1~2; +++, OD450>2.

b IFA after DENV infection of cells.

-, negative; +, weak positive; ++, moderately strong positive; +++, strong positive.

表 1-11 抗登革病毒 EDIII 单克隆抗体配对的初步选择

Tab 1-11 A preliminary selection of matched pairs of anti-EDIII monoclonal antibodies

Capture antibodies	Detection antibodies	DENV-infected cell culture supernatants				Negative control
		DENV-1 (1: 10)	DENV-2 (1: 10)	DENV-3 (1: 10)	DENV-4 (1: 10)	
5C46A3	Biotin-2D13A12	2.096	0.663	0.381	0.071	0.028
4A2A1	Biotin-2D13A12	2.904	2.42	1.751	0.05	0.051
3E7A7+4A2A1	Biotin-2D13A12	2.252	1.782	1.366	0.337	0.06

1.2.4 登革病毒 EDIII 抗原检测方法的优化

将挑选出来的最佳抗体组合通过棋盘实验确定捕获抗体和检测抗体的最佳浓度,并通过优化体系条件,确定捕获抗体的最佳浓度为 4A2A1 5 μ g/ml 和 3E7A7 10 μ g/ml 混合包被,检测抗体 biotin-2D13A12 为 1:2000 时检测敏感性最好,且本底较低。同时,优化洗液条件的吐温 20 浓度,结果显示洗液中吐温浓度为 0.5% 时,本底较低, P/N 值较高,确立为最佳洗液条件浓度。

1.2.5 登革病毒 EDIII 抗原检测的灵敏度和特异性

采用化学发光酶免疫法进行双抗体夹心评估其检测 DENV-EDIII 抗原的灵敏度及特异性。结果表明,所建立检测方法检测 DENV1-EDIII、DENV2-EDIII、DENV3-EDIII、DENV4-EDIII 蛋白的灵敏度分别为 3pg/ml、98pg/ml、12pg/ml、49pg/ml,而与重组新型冠状病毒 N 蛋白、马尔尼菲青霉菌 MP1 蛋白均无交叉反应。通过对四个血清型登革病毒培养上清、乙型脑炎病毒和黄热病毒培养上清进行检测表明,所建立的检测方法只特异性检测到 4 个血清型登革病毒,而与日本乙型脑炎病毒和黄热病毒均无交叉反应,说明我们所建立的抗原检测方法具有登革病毒的特异性。但该检测方法对 4 个血清型登革病毒检测的灵敏度不同(图 1-4 B),其中 DENV1 与 DENV2 最高检测限为 1:1024, DENV3 为 1:512, DENV4 为 1:256。

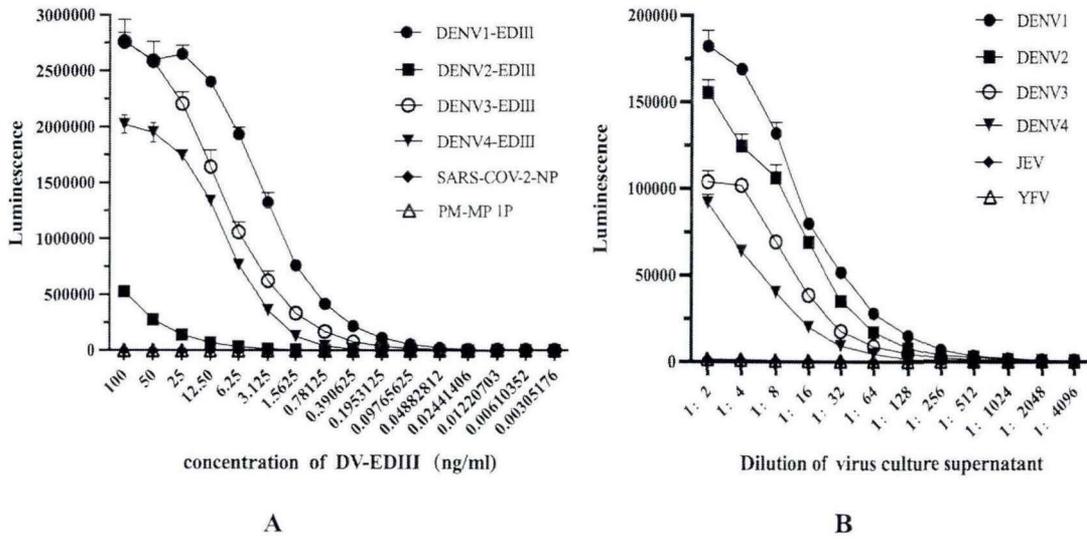


图 1-4 EDIII 抗原检测的灵敏度和特异性

Fig. 1-4. Sensitivity and specificity of EDIII antigen detection

1.2.6 登革病毒荧光定量 RT-PCR 分型检测标准曲线的建立

通过建立登革病毒四个血清型分型的 qRT-PCR 检测方法，并以携带 4 个血清型登革病毒 M 或 E 基因的质粒 DNA 标准品 10 倍系列稀释的质粒拷贝数 (copies/ μ L) 的对数值 (Log) 为横坐标，以 qRT-PCR 反应体系获得的循环数阈值 (Ct) 为纵坐标。选取其中的 5~8 个点绘制标准曲线，作图采用软件 Prism9 进行线性回归，建立标准曲线。并计算相关系数 R^2 值，斜率及扩增效率 E。如图 1-5 所示：所建立的 1-4 型登革病毒标准曲线 R^2 均在 98.99% 以上，扩增效率分别为：DENV1:96.8%，DENV2: 109.6%，DENV3:91.8%，DENV4:91.4%，均在 90%~110% 之间，可用于对登革病毒培养上清进行定量分析。

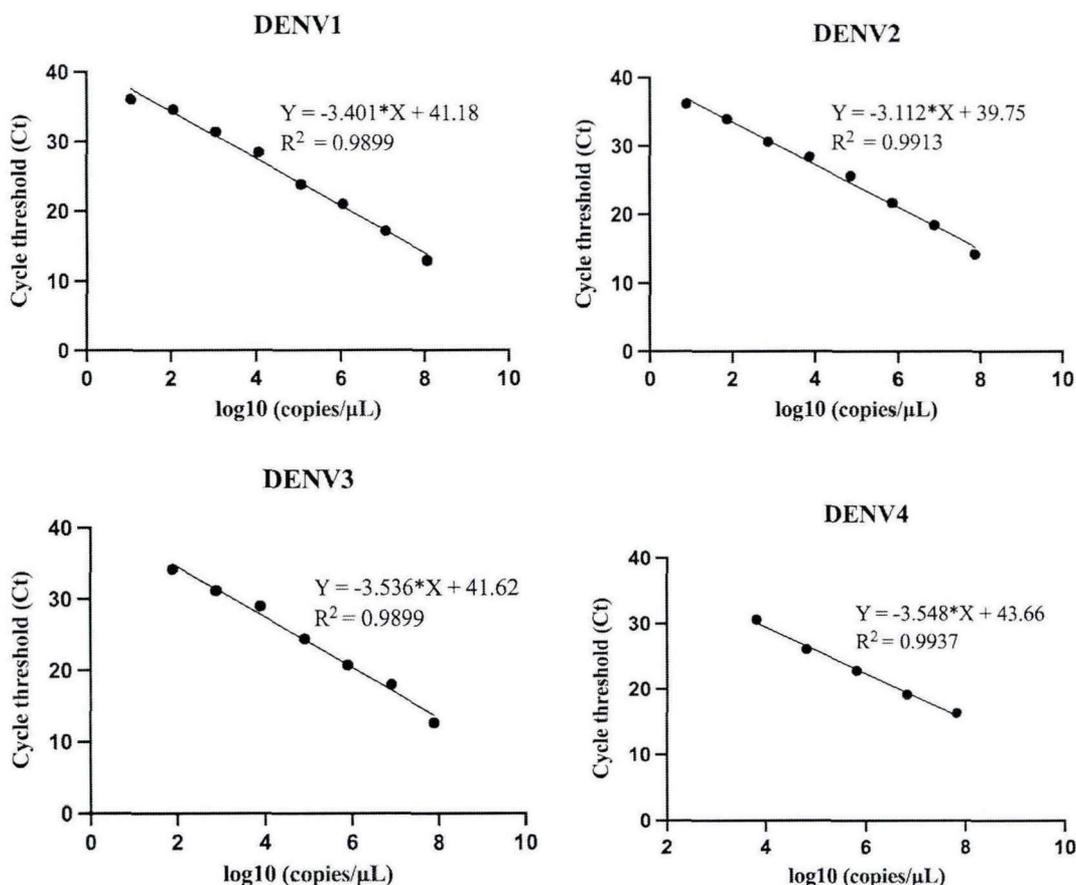


图 1-5 登革病毒 qRT-PCR 的标准曲线

Fig. 1-5. The standard curve of DENV qRT-PCR

1.2.7 基于荧光定量 RT-PCR 登革病毒分型检测的灵敏度与特异性

评估基于荧光定量 RT-PCR 登革病毒分型检测的灵敏度与特异性。结果显示，建立的荧光定量 PCR 的最低检测下限分别为：DENV1: 1.144 copies/μL, DENV2: 7.459 copies/μL, DENV3: 7.863 copies/μL, DENV4: 664.780 copies/μL; 各特定血清型仅特异性检测对应型别的登革病毒，与其他登革病毒血清型均无交叉反应，且 4 个血清型登革病毒 qRT-PCR 检测均与日本乙型脑炎病毒及黄热病毒无交叉反应，说明建立的方法具有良好的型特异性和敏感性，有助于登革病毒的分型诊断。

表 1-12 QRT-PCR 的特异性

Tab.1-12. The specificity of QRT-PCR

引物与探针	病毒 RNA					
	DENV-1	DENV-2	DENV-3	DENV-4	JEV	YFV
DENV-1	+	-	-	-	-	-
DENV-2	-	+	-	-	-	-
DENV-3	-	-	+	-	-	-
DENV-4	-	-	-	+	-	-

+: 有扩增; -: 无扩增

1.2.8 基于荧光定量 RT-PCR 的登革病毒分型检测登革病毒的敏感性

我们以荧光定量 RT-PCR 法对 EDIII 抗原检测方法对登革病毒培养上清的最低检测限提取核酸后与质粒阳性标准品同时进行检测, 将所得的 Ct 值代入 1.2.6 建立的标准曲线计算相应的病毒拷贝数。结果如表 1-13 所示, 我们所建立的 EDIII 抗原捕获法检测病毒培养上清的敏感性分别为: DENV1:2244.98 copies/ μ L, DENV2:3116.61 copies/ μ L, DENV-3:36865.22 copies/ μ L, DENV-4 : 317694.43copies/ μ L。

表 1-13 RT-PCR 检测梯度稀释的登革病毒液

Tab.1-13. Testing serial dilutions of supernatant from C6/36 cell cultures infected with DENV by

血清型	稀释度	RT-PCR			
		Y(Ct)	X(Log)	copies/ μ L	拷贝数均值
DENV-1	1:1024	30.000	3.28726845	1937.619292	2244.981448
		29.593	3.40693914	2552.343604	
DENV-2	1:1024	28.436	3.63560411	4321.197439	3116.60557
		29.538	3.281491	1912.013701	
DENV-3	1:512	25.554	4.54355204	34958.43966	36865.21519
		25.395	4.5885181	38771.99071	
DENV-4	1:256	23.876	5.57609921	376789.8628	317694.4281
		24.456	5.41262683	258598.9934	

1.2.9 EDIII 抗原检测方法临界值的确定

利用所建立检测方法对 500 份来自南方医科大学珠江医院体检中心的健康志愿者体检血清进行检测, 计算平均值及标准差, 以均值加 3 倍标准差设立临

界值。结果如表 1-14 所示，所建立检测方法的临界值为 953.84。

表 1-14 临界值的确立

Tab.1-14. The developed of a cut-off value.

Cross-reactive type	4A2A1+3E7A7/biotin2D13A12
Mean	282.31
SD	223.84
Cut-off (Mean+3SD)	953.84

1.2.10 双抗体夹心 EDIII 抗原检测登革病毒感染患者血清

为进一步评估所建立的双抗体夹心 EDIII 抗原检测方法的敏感性，我们对 800 份经 qRT-PCR 或 NS1 抗原检测阳性的登革病毒感染患者血清进行检测。结果显示：我们所建立的登革病毒 EDIII 抗原检测方法的阳性率为 50.60% (405/800)，对比登革病毒 NS1 抗原检测方法的阳性符合率只有 50.51% (394/780)，对比 qRT-PCR 检测方法的阳性符合率为 69.72% (373/535)，明显低于 NS1 抗原检测方法和 qRT-PCR 方法的检出率。

表 1-15 三种检测方法对登革病毒感染患者血清标本检测的敏感性分析

Tab.1-15. The sensitivity between EDIII、NS1 antigen assays and qRT-PCR for sera from DENV infection patients

Samples			NS1 ELISA			qRT-PCR		
			Positive	Negative	Total	Positive	Negative	Total
EDIII CLEIA	DENV1-4 cross-reactive	Positive	394	11	405	373	32	405
		Negative	386	9	395	162	233	395
		total	780	20	800	535	265	800

1.3 讨论

登革病毒主要通过白蚊伊蚊或埃及伊蚊叮咬感染人类，轻者呈现不明显或轻微的发热性疾病，重者引起严重和致命性的出血和休克性疾病。据世界卫生组织估计，登革热的发病率在近五十年来增加了三十倍，全球有近 40 亿人口

面临登革病毒感染的风险，每年有 100 多个流行国家发生约 5000 万-1 亿例新感染病例，20000 人死亡^[7]，给全球带来了巨大的经济和健康负担，已成为全球最严重的虫媒病毒性疾病。且目前尚未有安全有效的登革疫苗研制成功，也没有特异的治疗药物。因此，对登革病毒感染患者进行早诊断、早隔离、早治疗，是有效控制登革热疫情的关键。

目前登革热的实验室诊断方法主要包括病毒分离、病毒核酸检测、抗体和抗原血清学检测等。核酸检测敏感性高，可作为早期诊断，阳性即可确诊为登革病毒感染，但核酸检测操作相对繁琐，并不适合于疫区的大规模筛查诊断；病毒分离培养虽是登革病毒感染诊断的金标准，但其培养时间长，无法达到早期诊断及大规模筛查的目的；抗体检测虽然操作简单，适合于大规模筛查，但由于黄病毒属成员间同源性极高，抗体检测存在交叉反应，同时也无法做到早期诊断；抗原检测既能达到早期诊断也适合于大规模筛查需求，目前的商品化试剂主要是基于登革病毒 NS1 抗原的检测方法，其敏感性和特异性都比较好，也被我国列入登革热诊疗指南的确诊标准方法，也是当前登革热筛查的主要手段。课题组在前期利用登革病毒 NS1 蛋白单克隆抗体建立了 NS1 抗原检测方法，并实现了试剂盒的产业化，该检测体系不但用于我国华南地区主要是广东省的登革热诊断，还提供给东南亚等登革疫区作为检测工具。

考虑到 E 蛋白作为登革病毒的最大结构蛋白与主要糖蛋白，并且以二聚体形式覆盖于成熟病毒颗粒表面，通过吸附受体细胞，介导膜融合与病毒摄入，在体内诱导重要的体液免疫和细胞免疫，并已作为登革疫苗的首选靶标。其包含 EDI、EDII 和 EDIII 三个结构域，EDI 是 E 蛋白的中心结构域^[75, 76]；EDII 呈指样结构，为二聚化结构域，参与病毒与宿主细胞的融合^[76, 77]；EDIII 类似免疫球蛋白 Ig 样结构，参与登革病毒的受体识别和结合^[76, 77]，具备高度的免疫原性，在体内可以诱导高强度的免疫反应，有研究表明 EDIII 是良好的登革病毒感染的血清诊断靶标^[6]。为了进一步明确 EDIII 蛋白是否也可以作为登革热诊断靶标用于登革热的早期诊断。课题组在前期利用 EDIII 蛋白建立的双抗原夹心抗体检测

方法在登革热诊断中的敏感性和特异性也达到了商品化 PANBIO 试剂盒的水平。那么说明 EDIII 蛋白在登革热患者血清中的表达量理论上应该不少，是否达到作为诊断的水平呢？为此，本研究利用课题组前期制备获得的 108 株登革病毒 EDIII 蛋白特异性单克隆抗体建立基于登革病毒 EDIII 蛋白的抗原检测方法，并探索从患者血清样品中检测 EDIII 的可行性。我们根据 108 株 EDIII 蛋白特异性单抗的免疫学特性，从中挑选出 36 株型特异性和部分型交叉特异性单抗与 20 株交叉型单抗进行两两组合配对，最终确立了以 4A2A1 与 3E7A7 混合作为捕获抗体，biotin-2D13A12 作为检测抗体建立检测方法。所建立检测方法只特异性检测到 4 个血清型登革病毒培养上清，而与乙型脑炎病毒、黄热病毒等均无交叉反应。对 4 个血清型登革病毒检测的敏感性分别为：DENV1：2244.98 copies/ μ L，DENV2：3116.61 copies/ μ L，DENV-3：36865.22 copies/ μ L，DENV-4：317694.43copies/ μ L。所建立的检测方法对 1-4 型登革病毒检测的敏感性有逐步减低的趋势，与当前登革病毒抗原诊断试剂盒检测趋势一致，估计与各个血清型登革病毒抗原性有关。

为进一步评价检测方法的敏感性和特异性，我们检测了 800 份经登革病毒 NS1 抗原或 qRT-PCR 检测阳性的登革热确诊患者血清，发现所建立检测方法的敏感性只有 50.6%，明显低于 NS1 抗原检测方法 ($P=0.000$) 和 RT-PCR 检测方法 ($P=0.000$)，说明 EDIII 蛋白作为登革病毒早期抗原诊断靶标并不及 NS1 抗原理想。考虑到一个敏感的抗原诊断试剂盒不仅需要有一个合适理想的靶标，而获得一个好的抗体才是抗原诊断试剂开发的关键，EDIII 蛋白不适合作为抗原诊断靶标也跟我们前期抗体的性质有关。而作为抗体检测方法，是不需要抗体参与，靶标抗原才是关键，我们前期研究发现以 EDIII 蛋白建立的双抗原夹心能很好检测到血清中的 EDIII 抗体，但是，该方法只能确定登革病毒感染，无法区分现时感染还是既往感染，为了进一步评价 EDIII 蛋白作为登革病毒感染早期抗体检测的价值，我们以 EDIII 蛋白为靶标建立可用于早期诊断的 IgM 捕获方法，并评价其作为登革病毒早期感染诊断的价值。

第二章 基于登革病毒 EDIII蛋白的 IgM 捕获法的建立及应用

在第一章成功建立了登革病毒 EDIII 抗原检测方法基础上,为进一步评价 EDIII 蛋白作为登革热抗体检测的价值。本章利用课题组前期表达制备的 4 个血清型登革病毒 EDIII 作为检测抗原,建立了基于登革病毒 EDIII IgM 捕获的化学发光酶联免疫早期抗体检测方法,并通过与商品化的澳洲 panbio DENV IgM 检测试剂盒进行同步比较。同时通过对 800 份经 NS1 抗原或 qRT-PCR 检测阳性的登革热确诊患者血清进行检测,并分析检测方法在不同发病时间的检测率,深入探讨所建立的登革病毒 EDIII 抗原、抗体检测方法在不同发病时间的检测价值及作为登革热早期诊断的价值。

2.1 材料和方法

2.1.1 4 个血清型 DENV 重组 EDIII 蛋白

4 个血清型登革病毒重组 EDIII 蛋白为本实验室通过构建真核表达载体转化的毕赤酵母细胞表达并经镍柱纯化所获得,该蛋白已经登革病毒免疫的动物血清证实具有良好的抗原性^[73]。

2.1.2 血清样品

500 份健康志愿者体检血清样品来自 2021 年南方医科大学珠江医院门诊健康体检并已排除乙型肝炎病毒感染的剩余血清。800 份经 RT-PCR 或登革病毒 NS1 抗原检测阳性的登革热患者血清标本来自 2014 年广东省登革热爆发流行期间就诊于南方医科大学珠江医院发热门诊或住院的患者剩余血清。

2.1.3 主要试剂

表 2-1 实验的主要试剂

Tab 2-1 The main reagents used in the experiments

试剂名称	厂商
抗人 IgM 抗体	Sigma (上海) 贸易有限公司
HRP	Sigma (上海) 贸易有限公司
山羊血清	以色列 BI 公司
HRP 化学发光底物	菲鹏生物股份有限公司
甘油	大连美仑生物技术有限公司
TRIS Base 三羟甲基氨基甲烷	美国 MP Biomedicals 公司
氯化钠	上海生工生物工程股份有限公司
磷酸氢二钠十二水合物、磷酸二氢钠	上海麦克林生化科技有限公司
Proclin 300	上海安谱科学仪器有限公司产品
96 孔酶标板、化学发光板	厦门怡佳美实验器材有限公司

其他试剂为国产分析纯或进口分装。

2.1.4 主要试剂配制

(1) 20×PBS

NaH ₂ PO ₄	4.56 g
Na ₂ HPO ₄ ·12H ₂ O	58.02 g
NaCl	175.3 g
dH ₂ O(定容)	1 L

121 °C 高压灭菌 30min

(2) 样品稀释液

0.1% BSA	1.0 g
0.1% tween-20	1.0 ml
0.1% proclin	1.0 ml
1×PBS (定容)	1000 ml

(3) 0.2%PBS-T

0.2% tween-20	2.0 ml
---------------	--------

20×PBS	50 ml
dH ₂ O (定容)	1 L
(4) 酶稀释液	
20%羊血清	100 ml
0.5% 吐温-20	2.5 ml
0.1% proclin	0.5 ml
1%苯酚红	3.0 ml
1×PBS (定容)	500 ml
(5) 终止液: 1M H ₂ SO ₄	
dH ₂ O	945.6 ml
98% H ₂ SO ₄	54.4 ml
(6) 封闭液	
Tris	1.21 g
明胶	2 g
蔗糖	20 g
酪蛋白	2.5 g
硫柳汞	0.2g
dH ₂ O(定容)	995 ml
吐温	5 ml (56°C 1h, 115°C 30min 冷却后加入)
(7) 抗原包被液: 0.05M 碳酸盐缓冲液	
Na ₂ CO ₃	1.59 g
NaHCO ₃	2.93 g
dH ₂ O(定容)	1 L
(8) 抗体包被液	
Na ₂ HPO ₄ ·12H ₂ O	15.0 g
NaH ₂ PO ₄ ·2H ₂ O	1.4g

dH₂O(定容) 1 L

2.1.5 主要仪器设备

表 2-2 实验的主要仪器

Tab 2-2 The main instruments used in the experiments

名称	型号	产地
-80℃冰箱	MDF-U53V	日本
普通冰箱	KA62NV20TI	日本
超纯水系统	HJJRO2EDI250	中国
高压灭菌器	HVA-85	日本
干燥箱	BPG-9156A	中国
酶标仪	SynergyHTX	美国
大容量恒温水浴锅	GD100	英国
搅拌器	SP131320-33	美国
台式离心机	ScanSpeed 1730R	丹麦
振荡器	Vortex Genie2 G560E	美国
封口机	DZQ400-2D	中国
洗板机	ELX50	美国
电子天平	赛多利斯 BS224S	中国
pH 计	FE20K	瑞士
生物安全柜	NU-425-600E	美国
高速台式冷冻离心机	SIGMA 4K15	美国
冷却水循环装置	CA-1111	中国
制冰机	XB70-FZ	中国
生物安全柜	BSC-1360IIA2	中国

2.1.6 辣根过氧化物酶标记 4 个血清型登革病毒重组 EDIII 蛋白

采用改良的过碘酸钠标记法对 4 个血清型登革病毒重组 EDIII 蛋白进行酶标

记。具体操作步骤如下：首先进行 HRP 酶的氧化，称取 2mg HRP 干粉(Frdbio)溶于 100 μL 高压的纯水中，将其配制为终浓度 0.2mg/ml。再称取 NaIO_4 21mg，将其溶于 1 mL 高压的纯水中，吸取 100 μL 的 HRP 溶液与 100 μL NaIO_4 溶液缓慢混合，置于 4 $^\circ\text{C}$ 下静置约 30min，此时观察溶液变为绿色。此后在避光条件下进行操作，吸取 2 μL 乙二醇并缓慢加入氧化后的 HRP 溶液，室温避光条件下静置 30min，此时观察溶液变为褐色。其次，进行重组登革病毒 EDIII蛋白的标记，将氧化好的 HRP 溶液直接加入到已处理好的 1-4 型 DENV-EDIII蛋白溶液中，于室温下反应 2 h。称取 NaBH_4 0.4mg，将其溶解于 20 μL 高压的纯水中，将其全部加入上步的反应液中，4 $^\circ\text{C}$ 下静置 2h，平均每 30min 摇动一次进行标记，将标记后的溶液装于透析袋中，并做好标签，注意检查密闭性是否良好，使用 1 \times PBS (pH7.2)透析过夜，换液 8 次后收取标记后蛋白。最后，蛋白酶标液中加入体积比 50%的甘油充分混匀后进行分装，分装 300 μL /支，其余冻于 -30 $^\circ\text{C}$ 冰箱避光保存备用。

2.1.7 登革病毒 EDIII-IgM 捕获法的建立

以抗人 IgM 抗体为捕获抗体，标记 HRP 的 1-4 型登革病毒重组 EDIII蛋白混合作为检测抗原，建立基于登革病毒 EDIII蛋白的 IgM 抗体化学发光酶免疫检测方法。通过棋盘滴定方式优化检测体系，分别以 5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 、10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 、15 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 、20 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 4 个浓度包被抗人 IgM 抗体于化学发光聚苯乙烯微孔板中，100 $\mu\text{L}/\text{孔}$ ，4 $^\circ\text{C}$ 包被 16h，甩干并加入 260 $\mu\text{L}/\text{孔}$ 的酪蛋白封闭液 4 $^\circ\text{C}$ 封闭 24h。甩干后分别加入 1:10 和 1:50 的登革热患者血清及健康体检者血清，以样品稀释液作为阴性对照，100 $\mu\text{L}/\text{孔}$ ，37 $^\circ\text{C}$ 孵育 1h，0.1%PBS-T 洗板 6 次；分别加入 1:500、1: 1000、1:1500HRP 标记的 1-4 型 DENV 重组 EDIII蛋白（蛋白比例为 1:1:1:1），100 $\mu\text{L}/\text{孔}$ ，37 $^\circ\text{C}$ 水浴箱孵育 30min；0.1%PBS-T 洗板 8 次，加入化学发光底物避光反应 4min，酶标仪测定 luminaries 值，以登革热患者血清检测值比健康体检者血清值（P/N 值） ≥ 2.1 即为阳性。将上述组合采用单一变量的方法进行优化条件对比分析，对比 P/N 值，确定最佳检测条件。

2.1.8 登革病毒 EDIII-IgM 捕获法的优化

具体步骤参照 2.1.7, 将上述确立的检测条件进一步进行洗液吐温浓度的优化, 简述如下: 包被 10 μ g/ml 抗人 IgM 抗体于化学发光聚苯乙烯微孔板中。分别加入 1:10 稀释的登革病毒 IgM 抗体阳性患者血清及健康体检者血清和阴性对照, 100 μ L/孔, 37 $^{\circ}$ C 孵育 1h, 洗板 6 次; 加入 1:1000HRP 标记的 1-4 型 DENV 重组 EDIII 蛋白, 100 μ L/孔, 37 $^{\circ}$ C 水浴箱孵育 30min 后洗板 8 次, 加入化学发光底物避光反应 4min, 酶标仪测定 luminaries 值, 以登革热患者血清检测值比健康体检者血清检测值 (P/N 值) ≥ 2.1 为阳性。洗液条件设立 0.1%、0.2% 及 0.5% 3 个吐温浓度, 对比三个洗液吐温浓度下的 P/N 值及本底情况。

2.1.9 登革病毒 EDIII-IgM 捕获法的应用

(1) 临界值的确定

利用所建立的登革病毒 EDIII-IgM 抗体捕获 CLEIA 法对 500 份来自南方医科大学珠江医院健康体检者剩余血清进行检测以确定检测方法的临界值。方法简述如下: 于抗人 IgM 抗体包被的化学发光聚苯乙烯微孔板中, 分别加入 1:10 稀释的健康体检者血清, 100 μ L/孔, 37 $^{\circ}$ C 孵育 1h, 洗板 6 次; 加入 1:1000HRP 标记的 1-4 型 DENV 重组 EDIII 蛋白, 100 μ L/孔, 37 $^{\circ}$ C 水浴箱孵育 30min 后洗板 8 次, 加入化学发光底物避光反应 4min, 酶标仪测定 luminaries 值。以所有健康体检者血清标本的 luminaries 均值加上 3 倍标准差作为该抗体检测方法的临界值。

(2) 登革热患者血清的检测

待确立好抗体检测方法的临界值后, 与 panbio IgM 试剂盒同步检测 140 份登革患者血清标本, 操作步骤同前。以登革病毒 EDIII-IgM 抗体阳性血清作为阳性对照, 20-30 份排除乙型肝炎病毒感染的体检者血清标本作为阴性对照。若测定的体检者血清本底高于上述设立的临界值, 则以此次体检者血清本底平均值的 2.1 倍作为判定值, 若低于临界值, 则以临界值为界判定阴阳性结果。将本研究所建立的检测方法的检测结果与 panbio DENV IgM 试剂盒检测结果进行对比,

以确定我们所建立 IgM 抗体检测方法的敏感性。同时通过对 800 份经 NS1 抗原或 qRT-PCR 检测阳性的登革热确诊患者血清进行检测，并分析检测方法在不同发病时间的检测率。

2.1.10 统计学分析

采用 SPSS26.0 进行分析，应用配对计数资料的 χ^2 检验比较 panbio DENV IgM 试剂盒及我们所建立的 DENV EDIII-IgM 捕获法的敏感性和特异性差异，以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。应用两独立样本率的比较 EDIII 抗原及抗体检测与 NS1 抗原或 qRT-PCR 检出阳性率差异，以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2.2 结果

2.2.1 登革病毒 EDIII-IgM 捕获法的建立及优化

利用课题组前期制备的 4 个血清型登革病毒 EDIII 建立登革病毒 EDIII-IgM 捕获法，通过棋盘滴度分析确定了以抗人 IgM 捕获抗体包被浓度为 $10\mu\text{g/ml}$ ，HRP 标记的 1-4 型 DENV 重组 EDIII 蛋白（蛋白比例为 1:1:1:1）浓度为 1:1000，洗液吐温浓度为 0.2% 时，检测方法的敏感性最好，特异性最佳。

表 2-3 登革病毒 EDIII-IgM 抗体捕获 CLEIA 的最佳优化条件

Tab.2-3. The best conditions of EDIII-IgM capture CLEIA for DENV infection

	Capture antibody	Concentration ($\mu\text{g/ml}$)	Detection antigen	Dilution
EDIII-IgM capture CLEIA	抗人 IgM 抗体	10	DENV1-4 EDIII-HRP (1:1:1:1)	1:1000
The tween-20 concentration of cleaning solutions:0.2%				

2.2.2 登革病毒 EDIII-IgM 捕获法临界值的确定

利用上述建立的检测方法对 500 份来自南方医科大学珠江医院体检中心的健康体检者血清进行检测，计算平均值及标准差，以均值加 3 倍标准差为所建立检测方法的临界值。结果如表 2-4 所示。

表 2-4 临界值的确立

Tab.2-4. The developed of a cut-off value.

DENV-EDIII-IgM capture CLEIA

mean	635.606
SD	466.003
cut-off (mean+3SD)	2033.614

2.2.3 登革病毒 EDIII- IgM 捕获法的敏感性和特异性

为进一步评估所建立的登革病毒 EDIII-IgM 抗体捕获 CLEIA 的敏感性与特异性, 我们利用所建立的 EDIII-IgM 捕获法对来自 2014 年广东省登革热爆发流行期间就诊于南方医科大学珠江医院发热门诊或住院的 140 份确诊的登革热患者血清进行检测, 同时与澳洲 panbio IgM ELISA 试剂盒进行同步比较。结果显示: 我们所建立的登革病毒 EDIII-IgM 检测法对比 panbio DENV IgM ELISA 试剂盒的检出阳性符合率为 95% (77/81), 阴性符合率为 81% (48/59)。使用配对计数资料的 χ^2 检验和 κ 系数检验, McNemar 检验结果为 $P=0.118$, 两种血清学诊断方法的差异无统计学意义, 且两种诊断方法的吻和系数为 $\kappa=0.777$, $P=0.000$, 说明两种血清学诊断方法吻合度有统计学意义且较强。此外, 通过对乙型肝炎病毒抗原 (40 份)、巨细胞病毒 IgG 抗体 (30 份)、风疹病毒 IgG 抗体 (20 份)、单纯疱疹病毒 IgG 抗体 (10 份) 阳性的患者血清标本进行检测, 我们发现所建立抗体检测方法的特异性为 100%。

表 2-5 比较 EDIII-IgM 捕获 CLEIA 与 panbio IgM ELISA 检测登革热患者血清的敏感性

Tab.2-5. The sensitivity between EDIII-IgM capture CLEIA and panbio IgM ELISA for serum from DENV-infected patients

	Samples	Panbio IgM ELISA		
		Positive	Negative	Total
DENV-EDIII IgM capture CLEIA	Positive	77	11	88
	Negative	4	48	52
	Total	81	59	140

2.2.4 登革病毒 EDIII-IgM 捕获法与抗原检测方法联合检测登革热患者血清

为进一步评价所建立的登革病毒 EDIII 抗原及 IgM 抗体捕获法在登革热早期诊断中的价值, 我们通过对 800 份经登革病毒 NS1 抗原或 qRT-PCR 确诊的登

革热患者血清标本的检测，同时评价两种检测方法在不同发病时间段的检测价值。结果见表 2-6：EDIII 抗原检测阳性率为 50.6%（405/800），EDIII-IgM 捕获法检测的阳性率为 56.9%（455/800），EDIII-IgM 捕获法对登革热患者诊断的阳性率较 EDIII 抗原检测高，差异有统计学意义（ $P=0.012$ ），但联合抗原及抗体检测可显著提高登革热的诊断率 90.5%（724/800）。且联合两种检测方法同时检测，在发病的前 2 天，EDIII 抗原的检出率为 75.9%，而抗体的检出率只有 20.4-39.9%，随着发病时间延长，抗体检测的阳性率逐渐增加，而抗原的检出率逐渐降低，而两种检测方法同时检测时，标本检测的阳性率可以提升到 85.2%~100%。

表 2-6 比较登革病毒 EDIII 抗原和 EDIII-IgM 捕获化学发光法检测登革病毒感染患者血清的性能

Tab.2-6. Performance of DENV EDIII antigen and antibody CLEIAs for diagnosis of dengue virus infection

EDIII antigen and antibody assay	Clinical samples, No. of positive/No. of sera(%)		Sensitivity (%[95%CI])	Specificity (%[95%CI])	PPV (%[95%CI])	NPV (%[95%CI])
	Dengue fever(n=800)	Normal sera (n=500)				
EDIII antigen CLEIA	405(50.63)	3/500(0.6)	50.63(47.1-54.14)	99.4 (98.1-99.84)	99.26(97.68-99.81)	55.72(52.38-59.98)
EDIII IgM CLEIA	455(56.88)	10/500(2.0)	56.88(53.36-60.33)	98.0(96.23-98.98)	97.85(95.95-98.90)	58.68(55.25-62.03)
EDIII antigen CLEIA plus EDIII IgM CLEIA	724(90.5)	13/500(2.6)	90.5(88.2-92.4)	97.4 (95.48-98.55)	98.24(96.92-99.02)	86.5(83.33-89.16)

表 2-7 两种检测方法对不同发病时间登革热患者血清标本检测的灵敏性分析
 Tab.2-7. Sensitivity results of DENV EDIII antigen and antibody CLEIAs in acute sera from patients with confirmed DENV infection at different times

Day after onset of illness that serum was collected	No. of serum samples positive (%)			
	Total no. of serum samples	EDIII antigen capture	EDIII IgM capture	EDIII antigen plus antibody capture
0	108	84(77.8)	22(20.4)	92(85.2)
1	195	148(75.9)	59(39.9)	170(87.2)
2	118	77(65.3)	50(64.9)	101(85.6)
3	119	57(47.9)	80(67.2)	111(93.3)
4	82	25(30.5)	75(91.5)	79(96.3)
5	94	7(7.4)	85(90.4)	87(92.6)
6	38	2(5.3)	38(100.0)	38(100.0)
7	24	4(16.7)	24(100.0)	24(100.0)
8	11	1(9.1)	11(100.0)	11(100.0)
9	8	0(0.0)	8(100.0)	8(100.0)
10	1	0(0.0)	1(100.0)	1(100.0)
11	1	0(0.0)	1(100.0)	1(100.0)
13	1	0(0.0)	1(100.0)	1(100.0)
Total	800	405(50.6)	455(56.9)	724(90.5)

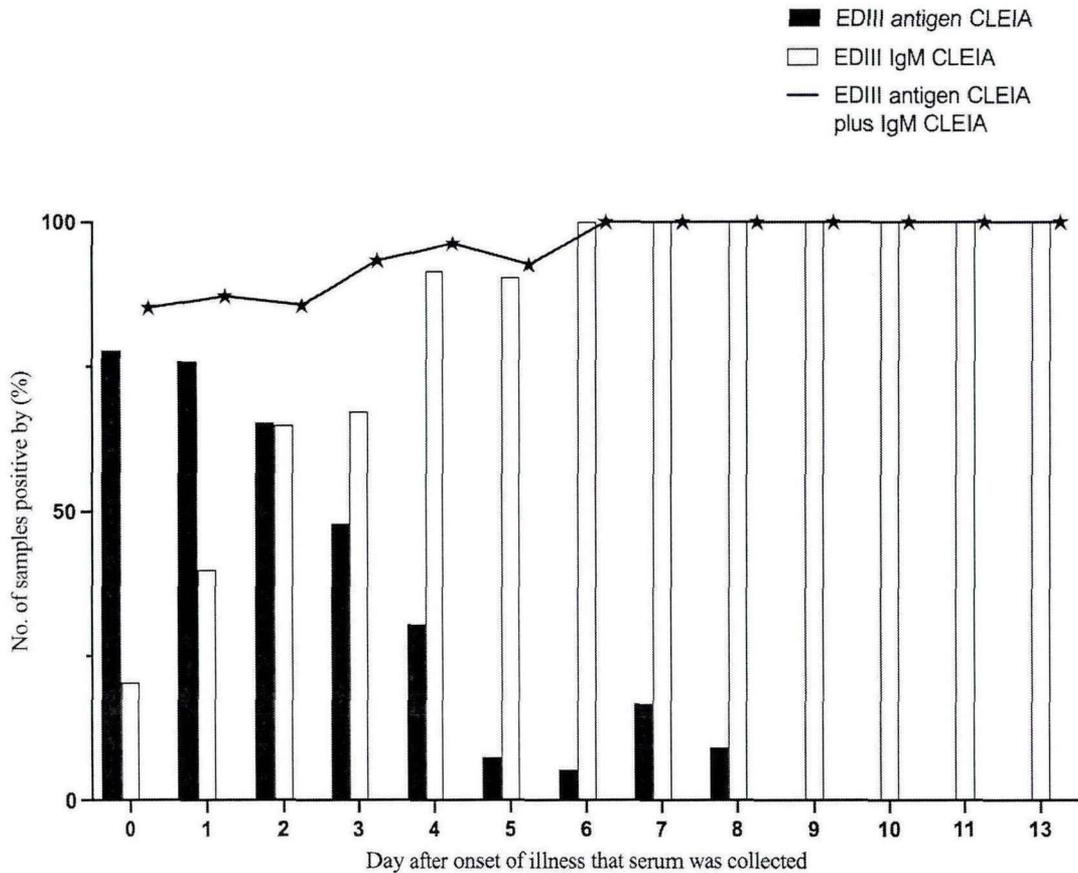


图 2-1 EDIII 抗原和 EDIII-IgM 捕获法对不同发病时间登革病毒感染患者血清标本检测的阳性率

Fig .2-1. Profile of EDIII antigen and EDIII-IgM detection in DENV infection patients' serum

2.3 讨论

由于气候和人口变化、昆虫媒介的全球扩散以及航空旅行的增加，全球节肢动物传播的病毒性传染病正在不断增加。尽管分子诊断检测具有高灵敏度和特异性，但它们的效用局限于虫媒病毒感染的短病毒血症期，相反，抗体反应的持久性提供了更广泛的机会窗口，使目前的登革病毒感染诊断更依赖于血清学 IgM/IgG 检测。抗体检测方法有助于区分原发性或继发性登革病毒感染，提供良好的血清学诊断。课题组在前期建立了登革病毒抗原检测方法的基础上，为进一步探讨登革病毒 EDIII 抗原作为早期诊断的价值。我们在第一部分利用课

课题组前期获得的 108 株登革病毒 EDIII 蛋白特异性单克隆抗体建立了登革病毒 EDIII 抗原检测方法, 并对检测方法的诊断价值做了相关评价。为进一步探究抗登革病毒 EDIII 抗体在登革热诊断及血清流行病学调查中的价值, 实现对登革热的系统诊断, 我们建立了登革病毒 EDIII-IgM 抗体捕获 CLEIA 法, 并对检测方法的敏感性和特异性做了相关评价。我们发现基于登革病毒 EDIII-IgM 捕获法检测登革病毒感染患者血清标本的敏感性与商业化澳洲 panbio DENV-IgM 检测试剂盒的灵敏性基本一致 ($P=0.118$), 且吻合率为 $\kappa=0.777$, $P=0.000$, 说明两种血清学诊断方法吻合度有统计学意义且较强。而且 panbio DENV-IgM 检测试剂盒所采用的捕获抗原为登革病毒包膜 E 糖蛋白 N 端的 80%, 主要为 EDI 及 EDII 区域, 而我们使用的是 DENV 的 EDIII 区域, 说明登革病毒包膜蛋白是登革病毒血清学抗体诊断的良好靶标, 有研究表明, 在一些非自然条件下, 单一的 EDIII 蛋白可能会暴露更多的结合位点^[78], 这可能更有助于提高检测的敏感性。因此, 本研究表明登革病毒包膜蛋白 DIII 区域可能是登革病毒血清学抗体诊断的良好靶标。

为了进一步评价 EDIII-IgM 捕获法的敏感性和特异性, 我们分别检测了乙型肝炎病毒抗原和巨细胞病毒、风疹病毒、单纯疱疹病毒 IgG 抗体阳性的患者血清标本, 结果显示我们所建立的 IgM 捕获法的特异性为 100%, 而对 800 份确诊的登革病毒感染患者血清标本检测的敏感性只有 56.9%, 对发病 6 天以上标本检测的敏感性可达 100%, 推测跟我们所收集的标本更集中于发病 5 天内有关。为了明确登革病毒 EDIII 蛋白作为登革热早期诊断的价值, 我们将 EDIII 抗原和抗体进行联合检测, 发现检测的敏感性提高到 90.5%, 虽然不及登革病毒 NS1 抗原检测方法在登革热早期诊断中的敏感性, 但也基本可以达到对登革病毒感染的诊断目的。

全文总结

登革热作为世界范围内流行的蚊媒传播性疾病，在东南亚及广东地区曾发生大爆发，给全球经济造成巨大的负担，已经引起人类的高度重视。但目前尚无可推广使用的疫苗及特效药物，亦无法完全消灭传播媒介，难以彻底控制该病毒的流行。因此，对登革病毒感染的准确诊断和疫苗开发对于控制登革热疾病传播至关重要。考虑到 E（envelop）蛋白是登革病毒最大的结构蛋白与主要糖蛋白，并且以二聚体形式覆盖于成熟病毒颗粒表面，在体内诱导重要的体液免疫和细胞免疫，并已作为登革疫苗的首选靶标。那么 E 蛋白作为诊断靶标是否也可以达到早期诊断的目的呢？众多研究表明，EDIII区所诱导的中和活性抗体最强，其在体内可以诱导高强度的免疫反应，而且课题组在前期利用 EDIII蛋白建立的双抗原夹心抗体检测方法在登革热诊断中的敏感性和特异性也达到了商品化 PANBIO 试剂盒的水平。为此，本研究利用课题组前期制备获得的 108 株登革病毒 EDIII蛋白特异性单克隆抗体和重组 EDIII蛋白建立了抗原、抗体检测方法，并探讨从患者血清样品中检测 EDIII抗原和抗体的可行性。我们的实验结果表明，所建立的登革病毒 EDIII抗原检测方法检测登革热患者血清的敏感性远不及登革病毒 NS1 抗原检测方法和 qRT-PCR 方法，但 EDIII-IgM 抗体检测方法的敏感性与澳洲 Panbio IgM 抗体检测试剂盒的敏感性基本一致，而且联合抗原、抗体同时对血清标本进行检测的敏感性也不及登革病毒 NS1 抗原检测方法（90.5% & 97.5%），说明以 EDIII蛋白做为登革病毒感染的早期抗原诊断靶标远不及 NS1 抗原靶标理想，但以 EDIII蛋白作为登革病毒早期 IgM 抗体检测的靶标还是可行的。

参考文献

- [1] Guzman M G, Harris E. Dengue [J]. *Lancet* (London, England), 2015, 385(9966): 453-65.
- [2] Bhatt S, Gething P W, Brady O J, et al. The global distribution and burden of dengue [J]. *Nature*, 2013, 496(7446): 504-7.
- [3] Gubler D J. Dengue, Urbanization and Globalization: The Unholy Trinity of the 21(st) Century [J]. *Tropical medicine and health*, 2011, 39(4 Suppl).
- [4] Halstead S B. Dengue [J]. *Lancet* (London, England), 2007, 370(9599): 1644-52.
- [5] Simmons C P, Farrar J J, Nguyen v V C, et al. Dengue [J]. *The New England journal of medicine*, 2012, 366(15): 1423-32.
- [6] Guzman M G, Gubler D J, Izquierdo A, et al. Dengue infection [J]. *Nature reviews Disease primers*, 2016, 2: 16055.
- [7] Organization. W H. Global strategy for dengue prevention and control 2012-2020. [J]. WHO Press, Geneva, Switzerland, 2013.
- [8] Schwartz E, Weld L H, Wilder-Smith A, et al. Seasonality, annual trends, and characteristics of dengue among ill returned travelers, 1997-2006 [J]. *Emerging infectious diseases*, 2008, 14(7): 1081-8.
- [9] Streit J A, Yang M, Cavanaugh J E, et al. Upward trend in dengue incidence among hospitalized patients, United States [J]. *Emerging infectious diseases*, 2011, 17(5): 914-6.
- [10] Cotter C J, Tufa A J, Johnson S, et al. Outbreak of Dengue Virus Type 2 - American Samoa, November 2016-October 2018 [J]. *MMWR Morbidity and mortality weekly report*, 2018, 67(47): 1319-22.
- [11] Pang T, Mak T K, Gubler D J. Prevention and control of dengue-the light at the end of the tunnel [J]. *The Lancet Infectious diseases*, 2017, 17(3): e79-e87.
- [12] Wilder-Smith A, Quam M, Sessions O, et al. The 2012 dengue outbreak in Madeira: exploring the origins [J]. *Euro surveillance : bulletin Europeen sur les maladies transmissibles = European communicable disease bulletin*, 2014, 19(8): 20718.
- [13] Yu J, Li X, He X, et al. Epidemiological and Evolutionary Analysis of Dengue-1 Virus Detected in Guangdong during 2014: Recycling of Old and Formation of New Lineages [J]. *The American journal of tropical medicine and hygiene*, 2019, 101(4): 870-83.
- [14] Liu L-T, Chen C-H, Tsai C-Y, et al. Evaluation of rapid diagnostic tests to detect dengue virus infections in Taiwan [J]. *PloS one*, 2020, 15(9): e0239710.
- [15] Shepard D S, Undurraga E A, Halasa Y A, et al. The global economic burden of dengue: a systematic analysis [J]. *The Lancet Infectious diseases*, 2016, 16(8): 935-41.
- [16] Muller D A, Depelsenaire A C I, Young P R. Clinical and Laboratory Diagnosis of Dengue Virus Infection [J]. *The Journal of infectious diseases*, 2017, 215(suppl_2):

- S89-S95.
- [17] Sabin A B. Research on dengue during World War II [J]. *The American journal of tropical medicine and hygiene*, 1952, 1(1): 30-50.
- [18] Montoya M, Gresh L, Mercado J C, et al. Symptomatic versus inapparent outcome in repeat dengue virus infections is influenced by the time interval between infections and study year [J]. *PLoS neglected tropical diseases*, 2013, 7(8): e2357.
- [19] Katzelnick L C, Gresh L, Halloran M E, et al. Antibody-dependent enhancement of severe dengue disease in humans [J]. *Science (New York, NY)*, 2017, 358(6365): 929-32.
- [20] Kosasih H, Alisjahbana B, Nurhayati, et al. The Epidemiology, Virology and Clinical Findings of Dengue Virus Infections in a Cohort of Indonesian Adults in Western Java [J]. *PLoS neglected tropical diseases*, 2016, 10(2): e0004390.
- [21] Messina J P, Brady O J, Scott T W, et al. Global spread of dengue virus types: mapping the 70 year history [J]. *Trends in microbiology*, 2014, 22(3): 138-46.
- [22] Yamashita A, Sakamoto T, Sekizuka T, et al. DGV: Dengue Genographic Viewer [J]. *Frontiers in microbiology*, 2016, 7: 875.
- [23] Katzelnick L C, Narvaez C, Arguello S, et al. Zika virus infection enhances future risk of severe dengue disease [J]. *Science (New York, NY)*, 2020, 369(6507): 1123-8.
- [24] Andrade P, Narvekar P, Montoya M, et al. Primary and Secondary Dengue Virus Infections Elicit Similar Memory B-Cell Responses, but Breadth to Other Serotypes and Cross-Reactivity to Zika Virus Is Higher in Secondary Dengue [J]. *The Journal of infectious diseases*, 2020, 222(4): 590-600.
- [25] Suresh S C, Hanumanthaiah R, Ramakrishna C, et al. Serum Ferritin As a Prognostic Indicator in Adult Dengue Patients [J]. *The American journal of tropical medicine and hygiene*, 2020, 104(3): 1072-8.
- [26] Guzman M G, Halstead S B, Artsob H, et al. Dengue: a continuing global threat [J]. *Nature reviews Microbiology*, 2010, 8(12 Suppl): S7-16.
- [27] Tang K F, Ooi E E. Diagnosis of dengue: an update [J]. *Expert review of anti-infective therapy*, 2012, 10(8): 895-907.
- [28] Gootenberg J S, Abudayyeh O O, Lee J W, et al. Nucleic acid detection with CRISPR-Cas13a/C2c2 [J]. *Science (New York, NY)*, 2017, 356(6336): 438-42.
- [29] Guzmán M G, Kourí G. Dengue diagnosis, advances and challenges [J]. *International journal of infectious diseases : IJID : official publication of the International Society for Infectious Diseases*, 2004, 8(2): 69-80.
- [30] Peeling R W, Artsob H, Pelegrino J L, et al. Evaluation of diagnostic tests: dengue [J]. *Nature reviews Microbiology*, 2010, 8(12 Suppl): S30-S8.
- [31] Bhat V G, Chavan P, Ojha S, et al. Challenges in the Laboratory Diagnosis and Management of Dengue Infections [J]. *The open microbiology journal*, 2015, 9: 33-7.
- [32] Raafat N, Blacksell S D, Maude R J. A review of dengue diagnostics and implications for surveillance and control [J]. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, 2019, 113(11): 653-60.

- [33] Soh L T, Squires R C, Tan L K, et al. External quality assessment of dengue and chikungunya diagnostics in the Asia Pacific region, 2015 [J]. *Western Pacific surveillance and response journal : WPSAR*, 2016, 7(2): 26-34.
- [34] Lopez A L, Adams C, Ylade M, et al. Determining dengue virus serostatus by indirect IgG ELISA compared with focus reduction neutralisation test in children in Cebu, Philippines: a prospective population-based study [J]. *The Lancet Global health*, 2021, 9(1): e44-e51.
- [35] Sirivichayakul C, Limkittikul K, Chanthavanich P, et al. Monoclonal antibody-based capture ELISA in the diagnosis of previous dengue infection [J]. *Virology journal*, 2019, 16(1): 125.
- [36] Lai S-C, Huang Y-Y, Shu P-Y, et al. Development of an Enzyme-Linked Immunosorbent Assay for Rapid Detection of Dengue Virus (DENV) NS1 and Differentiation of DENV Serotypes during Early Infection [J]. *Journal of clinical microbiology*, 2019, 57(7).
- [37] Chanama S, Anantapreecha S, A-nuegoonpipat A, et al. Analysis of specific IgM responses in secondary dengue virus infections: levels and positive rates in comparison with primary infections [J]. *Journal of clinical virology : the official publication of the Pan American Society for Clinical Virology*, 2004, 31(3): 185-9.
- [38] Denis J, Attoumani S, Gravier P, et al. High specificity and sensitivity of Zika EDIII-based ELISA diagnosis highlighted by a large human reference panel [J]. *PLoS neglected tropical diseases*, 2019, 13(9): e0007747.
- [39] van Meer M P A, Mögling R, Klaasse J, et al. Re-evaluation of routine dengue virus serology in travelers in the era of Zika virus emergence [J]. *Journal of clinical virology : the official publication of the Pan American Society for Clinical Virology*, 2017, 92: 25-31.
- [40] Felix A C, Souza N C S, Figueiredo W M, et al. Cross reactivity of commercial anti-dengue immunoassays in patients with acute Zika virus infection [J]. *Journal of medical virology*, 2017, 89(8): 1477-9.
- [41] Flamand M, Megret F, Mathieu M, et al. Dengue virus type 1 nonstructural glycoprotein NS1 is secreted from mammalian cells as a soluble hexamer in a glycosylation-dependent fashion [J]. *Journal of virology*, 1999, 73(7): 6104-10.
- [42] Libraty D H, Young P R, Pickering D, et al. High circulating levels of the dengue virus nonstructural protein NS1 early in dengue illness correlate with the development of dengue hemorrhagic fever [J]. *The Journal of infectious diseases*, 2002, 186(8): 1165-8.
- [43] Muller D A, Young P R. The flavivirus NS1 protein: molecular and structural biology, immunology, role in pathogenesis and application as a diagnostic biomarker [J]. *Antiviral research*, 2013, 98(2): 192-208.
- [44] Amorim J H, Alves R P d S, Boscardin S B, et al. The dengue virus non-structural 1 protein: risks and benefits [J]. *Virus research*, 2014, 181: 53-60.
- [45] Ricciardi-Jorge T, Bordignon J, Koishi A, et al. Development of a quantitative NS1-capture enzyme-linked immunosorbent assay for early detection of yellow fever

- virus infection [J]. *Scientific reports*, 2017, 7(1): 16229.
- [46] Shu P-Y, Yang C-F, Kao J-F, et al. Application of the dengue virus NS1 antigen rapid test for on-site detection of imported dengue cases at airports [J]. *Clinical and vaccine immunology : CVI*, 2009, 16(4): 589-91.
- [47] Hang V T, Nguyet N M, Trung D T, et al. Diagnostic accuracy of NS1 ELISA and lateral flow rapid tests for dengue sensitivity, specificity and relationship to viraemia and antibody responses [J]. *PLoS neglected tropical diseases*, 2009, 3(1): e360.
- [48] Blacksell S D, Jarman R G, Gibbons R V, et al. Comparison of seven commercial antigen and antibody enzyme-linked immunosorbent assays for detection of acute dengue infection [J]. *Clinical and vaccine immunology : CVI*, 2012, 19(5): 804-10.
- [49] Hermann L L, Thaisomboonsuk B, Poolpanichupatam Y, et al. Evaluation of a dengue NS1 antigen detection assay sensitivity and specificity for the diagnosis of acute dengue virus infection [J]. *PLoS neglected tropical diseases*, 2014, 8(10): e3193.
- [50] Hunsperger E A, Yoksan S, Buchy P, et al. Evaluation of commercially available diagnostic tests for the detection of dengue virus NS1 antigen and anti-dengue virus IgM antibody [J]. *PLoS neglected tropical diseases*, 2014, 8(10): e3171.
- [51] Pal S, Dauner A L, Mitra I, et al. Evaluation of dengue NS1 antigen rapid tests and ELISA kits using clinical samples [J]. *PloS one*, 2014, 9(11): e113411.
- [52] Kulkarni R, Modak M, Gosavi M, et al. Comparative assessment of commercial enzyme-linked immunosorbent assay & rapid diagnostic tests used for dengue diagnosis in India [J]. *The Indian journal of medical research*, 2020, 151(1): 71-8.
- [53] Modis Y, Ogata S, Clements D, et al. Variable surface epitopes in the crystal structure of dengue virus type 3 envelope glycoprotein [J]. *Journal of virology*, 2005, 79(2): 1223-31.
- [54] Mukhopadhyay S, Kuhn R J, Rossmann M G. A structural perspective of the flavivirus life cycle [J]. *Nature reviews Microbiology*, 2005, 3(1): 13-22.
- [55] Lanciotti R S, Lewis J G, Gubler D J, et al. Molecular evolution and epidemiology of dengue-3 viruses [J]. *The Journal of general virology*, 1994, 75 (Pt 1): 65-75.
- [56] Lewis J A, Chang G J, Lanciotti R S, et al. Phylogenetic relationships of dengue-2 viruses [J]. *Virology*, 1993, 197(1): 216-24.
- [57] Crill W D, Roehrig J T. Monoclonal antibodies that bind to domain III of dengue virus E glycoprotein are the most efficient blockers of virus adsorption to Vero cells [J]. *Journal of virology*, 2001, 75(16): 7769-73.
- [58] Beasley D W, Aaskov J G. Epitopes on the dengue 1 virus envelope protein recognized by neutralizing IgM monoclonal antibodies [J]. *Virology*, 2001, 279(2): 447-58.
- [59] Beasley D W C, Barrett A D T. Identification of neutralizing epitopes within structural domain III of the West Nile virus envelope protein [J]. *Journal of virology*, 2002, 76(24): 13097-100.
- [60] Tripathi N K, Shrivastava A. Recent Developments in Recombinant Protein-Based Dengue Vaccines [J]. *Frontiers in immunology*, 2018, 9: 1919.
- [61] Chávez J H, Silva J R, Amarilla A A, et al. Domain III peptides from flavivirus envelope

- protein are useful antigens for serologic diagnosis and targets for immunization [J]. *Biologicals : journal of the International Association of Biological Standardization*, 2010, 38(6): 613-8.
- [62] Zhang Y, Zhang W, Ogata S, et al. Conformational changes of the flavivirus E glycoprotein [J]. *Structure (London, England : 1993)*, 2004, 12(9): 1607-18.
- [63] Wu K-P, Wu C-W, Tsao Y-P, et al. Structural basis of a flavivirus recognized by its neutralizing antibody: solution structure of the domain III of the Japanese encephalitis virus envelope protein [J]. *The Journal of biological chemistry*, 2003, 278(46): 46007-13.
- [64] Beasley D W C, Holbrook M R, Travassos Da Rosa A P A, et al. Use of a recombinant envelope protein subunit antigen for specific serological diagnosis of West Nile virus infection [J]. *Journal of clinical microbiology*, 2004, 42(6): 2759-65.
- [65] Holbrook M R, Shope R E, Barrett A D T. Use of recombinant E protein domain III-based enzyme-linked immunosorbent assays for differentiation of tick-borne encephalitis serocomplex flaviviruses from mosquito-borne flaviviruses [J]. *Journal of clinical microbiology*, 2004, 42(9): 4101-10.
- [66] dos Santos F B, Miagostovich M P, Nogueira R M R, et al. Analysis of recombinant dengue virus polypeptides for dengue diagnosis and evaluation of the humoral immune response [J]. *The American journal of tropical medicine and hygiene*, 2004, 71(2): 144-52.
- [67] Wahala W M P B, Kraus A A, Haymore L B, et al. Dengue virus neutralization by human immune sera: role of envelope protein domain III-reactive antibody [J]. *Virology*, 2009, 392(1): 103-13.
- [68] Siew Q Y, Pang E L, Loh H-S, et al. Highly sensitive and specific graphene/TiO₂ impedimetric immunosensor based on plant-derived tetravalent envelope glycoprotein domain III (EDIII) probe antigen for dengue diagnosis [J]. *Biosensors & bioelectronics*, 2021, 176: 112895.
- [69] Lima M R Q, Nunes P C G, Dos Santos F B. Serological Diagnosis of Dengue [J]. *Methods in molecular biology (Clifton, NJ)*, 2022, 2409: 173-96.
- [70] Sankaradoss A, Jagtap S, Nazir J, et al. Immune profile and responses of a novel dengue DNA vaccine encoding an EDIII-NS1 consensus design based on Indo-African sequences [J]. *Molecular therapy : the journal of the American Society of Gene Therapy*, 2022.
- [71] Young E, Carnahan R H, Andrade D V, et al. Identification of Dengue Virus Serotype 3 Specific Antigenic Sites Targeted by Neutralizing Human Antibodies [J]. *Cell host & microbe*, 2020, 27(5).
- [72] Fahimi H, Mohammadipour M, Haddad Kashani H, et al. Dengue viruses and promising envelope protein domain III-based vaccines [J]. *Applied microbiology and biotechnology*, 2018, 102(7): 2977-96.
- [73] 蔡建飘, 钱菲, 王嘉颖, et al. I~IV型登革病毒 E 蛋白 III 区在毕赤酵母中的分泌表达及鉴定 [J]. *中华预防医学杂志*, 2010, (08): 721-5.
- [74] Johnson B W, Russell B J, Lanciotti R S. Serotype-specific detection of dengue viruses in

- a fourplex real-time reverse transcriptase PCR assay [J]. *J Clin Microbiol*, 2005, 43(10): 4977-83.
- [75] Kuhn R J, Zhang W, Rossmann M G, et al. Structure of dengue virus: implications for flavivirus organization, maturation, and fusion [J]. *Cell*, 2002, 108(5): 717-25.
- [76] Zhang W, Chipman P R, Corver J, et al. Visualization of membrane protein domains by cryo-electron microscopy of dengue virus [J]. *Nature structural biology*, 2003, 10(11): 907-12.
- [77] Modis Y, Ogata S, Clements D, et al. Structure of the dengue virus envelope protein after membrane fusion [J]. *Nature*, 2004, 427(6972): 313-9.
- [78] Lok S-M, Kostyuchenko V, Nybakken G E, et al. Binding of a neutralizing antibody to dengue virus alters the arrangement of surface glycoproteins [J]. *Nature structural & molecular biology*, 2008, 15(3): 312-7.

中英文对照缩略词表

英文缩写	英文全称	中文全称
DHF	Dengue hemorrhagic fever	登革出血热
DSS	Dengue shock syndrome	登革休克综合症
DV/DENV	Dengue virus	登革病毒
ADE	Antibody-dependent enhancement	抗体依赖性增强
PCR	polymerase chain reaction	聚合酶链式反应
RNA	Ribonucleic Acid	核糖核酸
IgM	Immunoglobulin M	免疫球蛋白 M
IgG	Immunoglobulin G	免疫球蛋白 G
NS1	Nonstructural 1	非结构蛋白 1
C	Capsid protein	衣壳蛋白
M	Membrane protein	膜蛋白
E	Envelop protein	包膜蛋白
EDIII	Envelop domain III	包膜结构域 III
ELISA	Enzyme-linked Immunosorbent assay	酶联免疫吸附试验
CLEIA	Chemiluminescent enzyme immunoassay	化学发光酶免疫分析
mAb	Monoclonal antibody	单克隆抗体
FBS	fetal bovine serum	胎牛血清
MEM	Minimum Essential Medium	MEM 培养基
TMB	3,3',5,5'-Tetramethylbenzidine	3,3',5,5'-四甲基联苯胺
HRP	Horseradish Peroxidase	辣根过氧化物酶
N	Nucleocapsid Protein	核衣壳蛋白
PBS	Phosphate Buffered Saline	磷酸盐缓冲液
PBS-T	PBS-Tween	PBS 吐温洗液
BSA	Bovine Serum Albumin	小牛血清白蛋白
Tris	2-amino-2hydroxymethyl-1,3-propanediol	三羟甲基氨基甲烷
SDS	dodecyl sulfate, sodium salt	十二烷基硫酸钠
SDS-PAGE	dodecyl sulfate, sodium salt polyacrylamide gel electrophoresis	十二烷基硫酸钠聚丙烯酰胺凝胶
SPF	Specific Pathogen Free	无特定病原体动物
WHO	World Health Organization	世界卫生组织
Ig	Immunoglobulin	免疫球蛋白
SARS-COV-2	Severe acute respiratory syndrome-2	严重急性呼吸系统综合症 冠状病毒

中英文对照缩略词表

MP1P	MP1 protein	马尔尼菲青霉特异性甘露糖蛋白
QPCR	Real-time Quantitative polymerase chain reaction	实时荧光定量多聚核苷酸链式反应
RT-PCR	Reverse Transcription-Polymerase Chain Reaction	逆转录聚合酶链式反应
JEV	Japanese Encephalitis Virus	日本乙型脑炎病毒
YFV	yellow fever virus	黄热病毒
P/N	Positive/Negative	阳性值/阴性值
Ct	Cycle threshold	循环阈值
E	Efficiency	扩增效率
R ²	Correlation coefficient	相关系数
OD	Optical Density	光密度
KDa	Kilodalton	千道尔顿
rpm	revolutions per minute	每分钟转速
g	gram	克
mg	milligramme	毫克
min	minute	分钟
ng	nanogram	纳克
s	second	秒
h	hour	小时
μL	microliter	微升
ml	millilitre	毫升
L	Liter	升
V	volt	伏特
bp	Base Pair	碱基对

在读期间发表的文章

- [1] 丁细霞, 蔡建飘, 温坤, 詹利利, 宋嘉龄, 陈满君, 车小燕. 双抗原夹心 ELISA 法检测登革病毒感染患者血清中的 EDIII 抗体[J]. 中国人兽共患病学报, 2022, 38(04): 317-321.

致 谢

时光匆匆，韶华易逝。走笔至此，我的三年研究生生涯随着这致谢也将逐渐接近尾声。

在此毕业论文完成之际，首先我要衷心感谢我的恩师丁细霞老师。您是我科学研究的启蒙人，课题实验的引路人。感谢您三年来在课题研究及实验技术上给予我的细心指导，感谢您将丰富的科研经验对我倾囊相授，感谢您在我犯错误时的谆谆教导与安慰鼓励，感谢您对我实验记录规范化书写的细心指导，感谢您在我的科研进展遇到瓶颈时坚持不懈为我引路，也特别感谢您在我实验方案撰写、开题汇报、中期考核汇报及论文撰写中给予的认真批阅与悉心指导。丁老师为人师表的奉献精神、科学严谨的工作作风、缜密的科研思维、一丝不苟的实验操作以及面对科研难题时锲而不舍的精神，都将使我受益一生，铭记终生。

与此同时，衷心感谢南方医科大学珠江医院检验医学部的周宏伟主任为我们创造了良好的实验环境，感谢中心实验室温坤老师、陈满君老师、洪佩榕老师、刘忆思老师及李泽林等所有的老师管理及营造了良好的实验条件，良好的科研平台为我们的课题实验进展带来了诸多便利。感谢南方医科大学珠江医院开展了丰富的学术讲座，为我们提供了获取最新学科进展的途径，大大拓宽了我们科研领域的视野。感谢 12 楼实验室提供了舒适的研究生办公室环境，为科研实验及学习生活提供了良好的条件，让我在这里拥有了归属感。

衷心感谢中心实验室温坤老师在序列比对、目的基因序列选取及相关软件应用中给予的指导帮助，感谢温老师耐心解惑我实验中遇到的难题。

其次，衷心感谢检验医学部陈定强老师为我们提供了充裕的研究时间；感谢温坤老师和徐梅老师在试剂或耗材准备方面为我提供的帮助；感谢陈满君老师和徐梅老师教会我纯化及透析腹水的技术；感谢徐梅老师给予我 ELISA 实验的指导与帮助；感谢潘玉先老师教会我小鼠的放腹水技术；感谢为课题研究牺牲的 Balb/c 小白鼠，你们搓手的样子真的好可爱，原来有时候撸小白鼠跟撸猫

一样能让人获得快乐；感谢徐佩佩师姐教授我聚丙烯酰胺蛋白凝胶电泳、核酸电泳及免疫印迹等诸多实验技术，是师姐的亲力亲为认真教学带领我从实验小白到实验入门；感谢王展强师兄、范笑地师姐、刘俞谷师姐在我实验过程中遇到的疑问给予的解答和帮助；感谢卿维同学在基因序列比对上给予我的帮助；感谢洪萌会同学教我病毒核酸提取及 QPCR 技术；感谢何巧健老师和许海容老师在实验材料准备方面为我提供的协助与指导。您们宝贵的经验传授使我的课题研究得以顺利进行，在此表示衷心的感谢！

衷心感谢蔡建飘老师前期表达制备的 4 个血清型登革病毒 EDIII 蛋白，为该课题研究奠定了基础。

衷心感谢周志宏师弟、宋嘉龄师妹、尹娅师妹和梁琼云师妹在实验过程中给予的协助，同时感谢同窗曾朝英三年的陪伴与支持，以及黄文婷、洪萌会、梁文立、蒋苏苏、欧阳津同学的帮助。

与此同时，衷心感谢在百忙之中抽出时间审阅本论文和参加本课题答辩的专家教授！

衷心感谢在临床轮转期间杜忠鹏师兄、杨蕾师姐、杨锐师兄及杨晓燕师姐的细心带教，让我在诊疗过程及临床技能上得到提升。学识渊博的杜师兄还拥有一个有趣的灵魂，让我度过了在心内科快乐的轮转时光，感谢你在我出科后还惦记着给我买酸奶。

衷心感谢所有关心、鼓励、帮助过我的每一位老师、师兄师姐、师弟师妹和同学们，没有你们，就没有现在的我，你们是我研究生三年中最宝贵的财富。在此向你们致以诚挚的谢意！

感谢我的父母和弟弟一直以来对我无条件的付出和支持，是你们给了我不断向前的勇气和力量。

感谢自己在中期考核之后更换课题能够按时完成新课题的研究得以顺利毕业，希望我永远不要丧失重新开始的勇气！

衷心感谢陪伴我 8 年的闺蜜廖文莉，感谢你为我创造了那么多惊喜，一起

分享喜悦与难过，即使分离两地，你依然是我坚强的后盾。感谢我可爱的舍友吴小冉和梁秋兰，陪伴我度过了三年有趣愉快的宿舍时光，谢谢你们的照顾与包容。感谢你们一有好吃的就想着带回来喂投我，感谢你们在我起不来床的时候提供的唤醒服务，希望我们的群聊依然热闹。

人生是一辆开往坟墓的列车，走过的路途上会有很多站，很难有人可以始至终陪着走完全程，当陪你的人要下车时，即使不舍，也该心存感激，然后挥手告别。就像龙应台说的，有些路总要一个人走。而那些曾与您们一起度过的时光，都无比珍贵，那些经历的所有，都将是我宝贵的财富。谢谢你们曾来过我的世界，温暖了我的旅程。

时光不动神色的走过，我们每一个人都既是时光之中的人，也是时光之外的人，在有限的生命中不辜负美好的时光，我们终将生而无憾。

人生有多长？读研占三年，疫情占两年。感谢广州全体人民在抗击新冠疫情 COVID-19 中所作的努力与贡献。愿世界和平，人民安康，疫情早日消散。

南方医科大学学位论文原创性声明

本人郑重声明:所呈交的论文是本人在导师的指导下独立进行研究所取得的研究成果。除了文中特别加以标注引用的内容外,本论文不包含任何其他个人或集体已经发表或撰写的成果作品。对本文的研究做出重要贡献的个人和集体,均已在文中以明确方式标明。除与外单位合作项目将予以明确方式规定外,本研究已发表与未发表成果的知识产权均归属南方医科大学。

本人承诺承担本声明的法律效果。

作者签名: 詹利利 日期: 2022年5月18日

学位论文版权使用授权书

本学位论文作者完全了解学校有关保留、使用学位论文的规定,同意学校保留并向国家有关部门或机构送交论文的复印件和电子版,允许论文被查阅和借阅。本人授权南方医科大学可以将本学位论文的全部或部分内容编入有关数据库进行检索,可以采用影印、缩印或扫描等复制手段保存和汇编本学位论文。

本学位论文属于(请在以下相应方框内打“√”):

- 1、保密 , 在 ___ 年解密后适用本授权书。
- 2、不保密 。

作者签名: 詹利利 日期: 2022年5月18日
导师签名: 丁维斌 日期: 2022年5月18日