



空军军医大学
Air Force Medical University

分类号 R373.9
UDC 578
密 级 公开

硕士学位论文

**TBEV 森张株 E 蛋白胞外区原核表达、纯化
及单克隆抗体制备**

陈洋

学 号 2002020313

培 养 类 别 全日制

学 位 类 型 学术学位

一级学科(专业类) 生物学

二级学科(专业) 生物技术与工程

研 究 方 向 脑炎病毒

指 导 教 师 雷迎峰 副教授

培 养 单 位 基础医学院

二〇二三年五月

目 录

前言.....	12
文献回顾.....	14
1. 森林脑炎的流行、致病机制、临床特征及防治	14
2. TBEV 的分子生物学特征	19
3. TBEV 包膜 E 蛋白及 VLP 表达研究现状	21
4. TBEV 报告病毒颗粒	23
第一部分 TBEV 包膜蛋白胞外区原核表达、纯化及免疫原性鉴定	26
1 材料.....	26
1.1 感受态、细胞、质粒.....	26
1.2 试剂.....	26
1.3 抗体.....	27
1.4 溶液及相关试剂配制.....	28
1.5 实验仪器.....	29
1.6 动物.....	30
1.7 分析软件及网站.....	30
2 方法.....	30
2.1 TBEV-Ecto 原核表达质粒的构建	30
2.2 TBEV-Ecto 蛋白的原核表达、复性及纯化.....	33
2.3 TBEV-Ecto 蛋白免疫小鼠	35
2.4 TBEV-Ecto 蛋白的免疫原性鉴定	36
3 结果.....	39
3.1 TBEV-Ecto 基因的扩增分析	39
3.2 重组质粒 pET28a-TBEV-Ecto 的酶切鉴定	39
3.3 TBEV-Ecto 重组蛋白小量诱导表达鉴定	40
3.4 TBEV-Ecto 重组蛋白纯化产物鉴定	40
3.5 pCAGGS-TBEV-PrME 重组表达载体的构建.....	41
3.6 TBEV-Ecto 蛋白的免疫原性鉴定	42
4 讨论.....	43
第二部分 TBEV-EECTO 蛋白的单克隆抗体制备及鉴定	46
1 材料.....	46
1.1 细胞及病毒.....	46
1.2 质粒.....	46
1.3 试剂.....	46
1.4 溶液及相关试剂配制.....	47

1.5 仪器.....	47
1.6 分析软件.....	48
2 方法.....	48
2.1 小鼠血清抗体的测定.....	48
2.2 杂交瘤细胞制备.....	48
2.3 杂交瘤细胞的选择性培养.....	50
2.4 克隆化.....	50
2.5 单克隆抗体腹水效价测定.....	51
2.6 单克隆抗体亚型鉴定.....	51
2.7 单克隆抗体特异性测定.....	52
2.8 免疫荧光测定单克隆抗体交叉反应性.....	52
2.9 单克隆抗体纯化及鉴定.....	52
2.10 TBEV-RVP 的包装及检测.....	53
2.11 单克隆抗体中和活性测定.....	55
3 结果.....	56
3.1 小鼠血清中抗体及单克隆抗体腹水效价测定.....	56
3.2 单克隆抗体亚型鉴定.....	57
3.3 单克隆抗体特异性测定.....	57
3.4 单克隆抗体交叉反应性测定.....	58
3.5 单克隆抗体的纯化及鉴定.....	60
3.6 p CAGGS-TBEV-C 重组表达载体的酶切鉴定.....	61
3.7 TBEV-RVP 的检测.....	62
3.8 单克隆抗体中和活性测定.....	62
4 讨论.....	63
小结.....	66
参考文献.....	67

缩略语表

缩略词	英文全称	中文全称
aa	Amino acid	氨基酸
ADE	Antibody-dependent enhancement	抗体依赖性增强
Amp	Ampicillin	氨苄青霉素
BBB	Blood brain barrier	血脑屏障
BHK	Baby hamster kidney cell	幼仓鼠肾细胞
BSA	Bovine serum albumin	牛血清白蛋白
BSL	Biosafety level	生物安全等级
CDRs	Complementarity determining regions	互补决定区
DENV	Dengue virus	登革病毒
ELISA	Enzyme linked immunosorbent assay	酶联免疫吸附测定
Ecto	Envelope ectodomain	包膜蛋白胞外区
ELISA	Enzyme linked immunosorbent assay	酶联免疫吸附测定
FBS	Fetal bovine serum	胎牛血清
FPLC	Fast protein liquid chromatography	快速蛋白液相色谱
IFA	Immunofluorescence assay	免疫荧光试验
IgG	Immunoglobulin G	免疫球蛋白 G
JEV	Japanese encephalitis virus	日本脑炎病毒
Kana	Kanamycin	卡那霉素

MOI	Multiplicity of infection	感染复数
ORF	Open reading frame	开放读码框
PRNT	Plaque reduction neutralization test	空斑减少中和试验
RdRp	RNA-dependent RNA polymerase	RNA 依赖的 RNA 聚合酶
RLU	Relative light unit	相对光强度
RVP	Reporter virus particle	报告病毒颗粒
SDS-PAGE	Sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis	聚丙烯酰胺凝胶电泳
TBE	Tick-borne encephalitis	森林脑炎
TBEV	Tick-borne encephalitis virus	森林脑炎病毒
TMB	Tetramethyl benzidine	四甲基联苯胺
VLP	Virus like particle	病毒样颗粒
WNV	West Nile virus	西尼罗病毒
ZIKV	Zika virus	寨卡病毒

TBEV 森张株 E 蛋白胞外区原核表达、纯化 及单克隆抗体制备

硕士研究生：陈 洋

导 师：雷迎峰 副教授

辅导教师：叶传涛 讲 师

空军军医大学基础医学院微生物与病原生物学教研室，西安 710032

资助基金项目：空军军医大学军事医学人才扶持计划（2020rcfclyf）

中文摘要

森林脑炎病毒又称蜱传脑炎病毒（Tick-borne encephalitis virus, TBEV），经蜱虫传播，可引起以急性中枢神经系统病变为特征的森林脑炎（Tick-borne encephalitis, TBE）（又称为俄罗斯春夏脑炎）。每年全球报道的森林脑炎病例超过 10000 例，主要流行于东欧、北欧、俄罗斯，我国东北和西北林区也有流行。TBEV 致死率较高且伴有长期的神经精神后遗症，目前尚无特异性治疗药物。因此，TBEV 感染是严重的公共卫生问题之一。

TBEV 基因组为单股正链 RNA，其开放读码框（Open reading frame, ORF）编码 3 种结构蛋白（C、PrM、E）和 7 种非结构蛋白（NS1、NS2A、NS2B、NS3、NS4A、NS4B、NS5）。其中包膜蛋白 E 与宿主细胞受体结合介导病毒入胞，可诱导机体产生保护性中和抗体，是疫苗的主要抗原成分，也是血清学诊断的主要靶标。E 蛋白主要四个结构域组成，DI、DII 和 DIII 三个结构域构成了 E 蛋白胞外区（Envelope ectodomain, Ecto），DIV 为茎区和跨膜锚定区。Ecto 暴露于病毒表面，在胰蛋白酶处理病毒粒子后可脱落，也称为可溶性 E 蛋白（soluble Envelope, sE），其晶体结构与完整病毒颗粒 E 蛋白基本一致，含有 E 蛋白几乎所有的抗原表位。结构蛋白 PrME 在细胞中表达后可形成病毒样颗粒（virus like particle, VLP），与病毒

具有相似的空间结构，将其转染复制子细胞后制备的报告病毒颗粒（Reporter virus particle, RVP）可用于血清及抗体的中和活性评价。

本研究以我国主要流行的 TBEV 森张株为对象，首先化学合成密码子优化的 Ecto 序列，构建原核表达载体进行表达与纯化，纯化蛋白免疫小鼠评价血清抗体活性；采用杂交瘤技术制备 Ecto 单克隆抗体，分别从效价、特异性及交叉反应性评价 Ecto 特异性单克隆抗体；最后以实验室构建的黄热病毒复制子稳转细胞系为基础制备含有报告基因的 TBEV-RVP，对获得的单克隆抗体进行中和活性评价。相关研究方法及结果：

1. TBEV-E 蛋白胞外区的原核表达、纯化及免疫原性鉴定；

首先从 Genbank 数据库检索 TBEV 森张株的基因序列，选择 Ecto 序列并进行大肠杆菌密码子优化和化学合成。将 Ecto 基因克隆入原核表达载体 pET28a 中构建重组质粒 pET28a-TBEV-Ecto。重组质粒经 PCR 鉴定，扩增出了分子量约为 1,200 bp 的特异性条带，与理论大小一致；双酶切后的条带，符合预期大小；测序结果显示 Ecto 序列无误。

其次将 pET28a-TBEV-Ecto 转化 BL21 感受态，经 1 mM/L IPTG 小量诱导表达，SDS-PAGE 显示 Ecto 蛋白以包涵体的形式表达；大量诱导表达后离心收集菌体提取包涵体，经 6M 盐酸胍（Gua-HCl）溶解后在复性缓冲液作用下获得可溶性蛋白，后者经超滤及 Ni 预装柱亲和层析纯化，最后再经超滤去除咪唑，SDS-PAGE 分析显示获得纯度较高的 TBEV-Ecto 蛋白，利用组氨酸标签抗体进行蛋白印迹试验（Western blotting, Western blot），结果显示目的条带特异，与预期大小一致。

为鉴定 TBEV-Ecto 的免疫原性，取 20 μ g TBEV-Ecto 蛋白与佐剂混合后肌肉接种免疫小鼠。第 3 周后以同样方式加强免疫 1 次，第 5 周后鼠尾采血。以 TBEV-PrME 真核表达质粒转染的 293T 细胞为对象，利用上述免疫血清做为 一抗进行免疫印迹（Western blot）和免疫荧光测定（Immunofluorescence assay, IFA）实验。Western blot 结果显示特异条带与 TBEV-E 蛋白大小一致，IFA 结果显示在表达了 TBEV-PrME 的细胞存在特异性绿色荧光。该结果表明 TBEV-Ecto 蛋白免疫的小鼠血清能够识别真核表达的 E 蛋白，提示 Ecto 蛋白具有良好的免疫原性。

2. TBEV-E 蛋白胞外区的单克隆抗体制备及初步评价

为制备 Ecto 的单克隆抗体，利用间接 ELISA 法测定上述 Ecto 蛋白免疫小鼠

血清，选取免疫血清经 1: 1000 稀释后的 OD_{480nm} 最高的 2 只小鼠分离脾细胞。将脾细胞和小鼠骨髓瘤 Sp2/0 细胞以 PEG 1500 为促融剂进行融合，融合后先后经 HAT 和 HT 培养基选择性培养，利用间接 ELISA 法测定杂交瘤细胞上清的效价，选取效价较高的细胞孔进行有限稀释法克隆化，经过 4 次克隆化得到稳定表达 Eecto 蛋白特异性单克隆抗体的杂交瘤细胞，共 6 株。抗体亚类分型显示，2H8H4 和 2E3G6 的抗体亚型为 IgG1 型，而 3C5D4、4H10D4、4H3B11、2B11H4 均为 IgG2b 型，6 株单克隆抗体的轻链均为 κ 链。随后将 6 株细胞分别注射石蜡油预处理过的 BALB/c 小鼠，制备腹水后检测效价，结果显示有 4 株单抗效价可达 1: 10⁶，2 株仅为 1: 10³。

为进一步分析 Eecto 蛋白单克隆抗体的特异性和交叉反应性，首先以真核细胞表达 TBEV-PrME 的为抗原，采用 6 株单抗的腹水为一抗进行 Western blot 和 IFA 实验，Western blot 结果显示 2E3G6 可结合 TBEV-E 蛋白的线性表位，IFA 结果显示除 2E3G6 外 5 株单抗均可结合 TBEV-E 蛋白的空间构象表位；再以 pCAGGS-YFV-PrME 和 pCAGGS-ZIKV-PrME 转染 BHK 细胞，日本脑炎病毒（Japanese encephalitis virus, JEV）和登革病毒（Dengue virus, DENV）2 型感染 BHK 细胞制备抗原片，IFA 结果显示 2H8H4、3C5D4、4H3B11 和 2B11H4 与 JEV 存在交叉反应性，3C5D4、4H3B11、4H10D4 与 DENV2 存在交叉反应，6 株单抗与黄热病病毒（Yellow fever virus, YFV）以及寨卡病毒（Zika virus, ZIKV）均无交叉反应。进一步用 protein G 色谱柱对腹水进行亲和层析纯化，除 2H8H4 外其它 5 株均纯化得到抗体，SDS-PAGE 显示获得的单克隆抗体纯度较好。

为评价上述获得 Eecto 蛋白单克隆抗体的中和活性，我们利用 TBEV-RVP 对上述抗体进行中和活性评价。首先构建了 pCAGGS-TBEV-C 表达质粒，将其该质粒与 pCAGGS-TBEV-PrME 表达载体共转染 YFV 复制子细胞（本室构建）制备 TBEV-RVP，将纯化后的抗体以不同浓度与 TBEV-RVP 在 37°C 孵育后感染 BHK 细胞，最后测定相对光强度（Relative fluorescence unit, RLU）判定抗体的中和效果，结果显示 5 个单抗均不能抑制 TBEV-RVP 对 BHK 细胞的感染，提示单抗无中和活性。

结论:

本研究成功在大肠杆菌中表达并纯化了 TBEV-Eecto 蛋白，具有较好的免疫原性，制备了 6 株单克隆抗体，与同属黄病毒间存在不同程度的交叉反应，成功制备了 TBEV-RVP。本研究为 TBEV 的研究提供了一定的实验材料基础。

关键词：TBEV；E 蛋白；胞外区；原核表达；单克隆抗体；报告病毒颗粒

Prokaryotic expression, purification and Monoclonal Antibody preparation of ectodomain of E protein of TBEV Senzhang strain

Candidate for master: Chen Yang

Supervisor: Lei Yingfeng Associate professor

Tutor: Ye Chuantao Lecturer

Department of Microbiology and pathogenic Biology, School of basic Medicine, Air Force Medical University
Xi'an 710032, China

Sponsored Programs: Military Medical talents support Program of Air Force Medical University (2020rcfclyf)

Abstract

Forest encephalitis virus, also known as tick-borne encephalitis virus (TBEV), is transmitted by ticks and can cause forest encephalitis characterized by acute central nervous system lesions (also known as Russian spring/summer encephalitis TBE). More than 10,000 cases of forest encephalitis are reported globally each year, mainly in Eastern and Northern Europe, Russia, and also in the northeastern and northwestern forest areas of China. TBEV is associated with long-term neuropsychiatric sequelae and has no specific treatment. Therefore, TBEV infection is one of the serious public health problems.

The genome of TBEV is a single-positive-stranded RNA, and its Open reading frame (ORF) encodes three structural proteins (C, PrM, and E) and seven non-structural proteins (NS1, NS2A, NS2B, NS3, NS4A, NS4B, and NS5). The envelope protein E is the main structural protein, which binds to host cell receptors to mediate virus entry into cells and

induce protective neutralizing antibodies in the body, and is the main antigenic component of the vaccine, and the main target for serological diagnosis. The E protein consists of four main structural domains: DI, DII, and DIII, which form the ectodomain of the E protein (Envelope ectodomain, Eecto), and DIV, which is the stem region and transmembrane anchoring region. Eecto is exposed to the surface of the virus and can be shed upon treatment of virion by trypsin. It is also known as the soluble E protein (soluble Envelope, sE), which has a crystal structure consistent with the E protein on intact viral particles and contains almost all of the antigenic epitopes of the E protein. After the expression of structural protein PrME in cells, virus like particle (VLP) can be formed, which has a similar spatial structure to virus. The Reporter virus particle, prepared by transfecting PrMe into replicant cells, RVP can be used to evaluate the neutralizing activity of serum and antibody.

In this study, the main prevalent strain of TBEV Senzhang in China were selected to study. Firstly, codon-optimized Eecto sequences was chemically synthesized and a prokaryotic expression vector was constructed for expression and purification; Preparation of Eecto specific monoclonal antibodies using hybridoma technology, and evaluation of Eecto specific monoclonal antibodies based on their potency, specificity, and cross reactivity. Finally, TBEV-RVP containing the reporter gene were prepared based on the stable transformation cell line of yellow fever virus replicon constructed in the laboratory, and the neutralizing activity of the obtained monoclonal antibody was evaluated. The related study methods and results are as follows:

1. prokaryotic expression, purification, and immunogenicity identification of the extracellular of the TBEV-E protein.

Firstly, the gene sequence of the TBEV Senzhang strain was retrieved from the GenBank database, and the Eecto sequence was selected for *E. coli* codon optimization and chemical synthesis. The Eecto gene was cloned into the prokaryotic expression vector pET28a to construct the recombinant plasmid pET28a-TBEV-Eecto. The recombinant plasmid was identified by PCR, and a specific band with a molecular weight of approximately 1,200 bp was amplified, which was consistent with the theoretical size; The band after double enzyme digestion was in line with the expected size; The sequencing

results showed that the Eecto sequence was correct.

Next, pET28a-TBEV-Eecto was transformed into the BL21 receptor state, and induced to be expressed in small amounts by 1 mM/L IPTG. SDS-PAGE showed that the Eecto protein was expressed in the form of an inclusion body; After a large amount of induced expression, the inclusion bodies were collected by centrifugation, and dissolved in 6M guanidine hydrochloride (Gua HCl) to obtain soluble proteins under the action of refolding buffer. The latter was purified by ultrafiltration and affinity chromatographic purification by a Ni preloading column. Finally, imidazole was removed by ultrafiltration. SDS-PAGE analysis showed that high purity TBEV-Eco protein was obtained. Western blotting (Western blot) was performed using histidine labeled antibodies, The results showed that the target band was specific and consistent with the expected size.

To indentify the immunogenicity of TBEV-Eecto, 20 μ g of TBEV-Eecto protein was mixed with adjuvant, and the mice were immunized by intramuscular injection. Strengthen immunity once in the same way after the third week, and collect blood from the tail of the mouse after the fifth week. The 293T cells transfected with the TBEV-PrME eukaryotic expression plasmid, the above immune serum was used as the primary antibody for Western blot and immunofluorescence assay (IFA) experiments. The Western blot results showed that the specific bands were consistent with the size of TBEV-E protein, while the IFA results showed the presence of specific green fluorescence in cells expressing TBEV PrME. This result indicates that the serum of mice immunized with TBEV-Eecto protein can recognize eukaryotic expressed E protein, indicating that Eeco protein has good immunogenicity.

2. Preparation and preliminary evaluation of monoclonal antibodies against the extracellular domain of TBEV-E protein

To prepare monoclonal antibodies against Eecto, indirect ELISA was used to determine the serum of mice immunized with the above-mentioned Eecto protein. Two mice with the highest OD_{480nm} of the immune serum after 1:1000 dilution were selected to prepare spleen cells. Spleen cells and mouse myeloma Sp2/0 cells were fused with PEG 1500 as a fusion promoter. After fusion, they were selectively cultured in HAT and HT media, and the titer of the supernatant of the hybridoma cells was determined using indirect ELISA. Cells with

higher titer were selected for limited dilution cloning. After 4 rounds of cloning, a total of 6 hybridoma cells stably expressing Eeco protein specific monoclonal antibodies were obtained. The antibody subtypes of 2H8H4 and 2E3G6 were IgG1 type, while 3C5D4, 4H10D4, 4H3B11, and 2B11H4 were IgG2 b type. The light chains of the six monoclonal antibodies were κ Chain. Subsequently, 6 cell lines were injected into BALB/c mice pretreated with paraffin oil to prepare ascites and detect their titers. The results showed that 4 monoclonal antibodies had a titer of $1:10^6$, while 2 were only $1:10^3$.

In order to further analyze the specificity and cross reactivity of Eecto protein monoclonal antibodies, the ascites of six monoclonal antibodies expressing TBEV PrME in eukaryotic cell were used as the first antibody to carry out Western blot and IFA experiments. Western blot results showed that 2E3G6 could bind to the Linear List of TBEV-E protein, and IFA results showed that all five monoclonal antibodies except 2E3G6 could bind to the spatial conformational epitope of TBEV-E protein; Then, BHK cells were transfected with pCAGGS-YFV-PrME and pCAGGS-ZIKV-PrME, and BHK cells were infected with Japanese encephalitis virus (JEV) and dengue virus (DENV) type 2 to prepare antigen plates. The IFA results showed that 2H8H4, 3C5D4, 4H3B11, and 2B11H4 had cross reactivity with JEV, 3C5D4, 4H3B11, 4H10D4 had cross reactivity with DENV2. Six monoclonal antibodies did not cross-react with yellow fever virus (YFV) or Zika virus (ZIKV). Further affinity chromatography was performed on the ascites using protein G chromatography column, and all 5 strains except 2H8H4 were purified to obtain antibodies. SDS-PAGE showed that the obtained monoclonal antibodies had good purity.

To evaluate the neutralizing activity of the Eeco protein monoclonal antibody obtained above, we used TBEV RVP to evaluate the neutralizing activity of the above antibodies. First, the pCAGGS-TBEV-C expression plasmid was constructed, and the plasmid was co transfected with the pCAGGS-TBEV-PrME expression vector into YFV replicon cells (constructed in our laboratory) to prepare TBEV-RVP. The purified antibody was incubated with TBEV-RVP at different concentrations at 37 °C and then infected BHK cells. Finally, the relative light intensity (RLU) was measured to determine the neutralizing effect of the antibody. The results showed that none of the five monoclonal antibodies could inhibit the

infection of TBEV-RVP on BHK cells. It indicates that monoclonal antibodies have no neutralizing activity.

Conclusion:

In this study, TBEV-Ecto protein was successfully expressed and purified in *E. coli*, and showed better immunogenicity. Six monoclonal antibodies were prepared, and were cross reactive with four kinds of flavivirus of the same genus. TBEV RVP was successfully prepared. This study provides a certain experimental material for the study of TBEV.

Keywords: TBEV; E protein; ectodomain; prokaryotic expression; monoclonal antibody; Reporter virus particle.

前 言

TBEV 属于黄病毒科黄病毒属成员^[1]，主要通过蜱虫叮咬或者食用未经灭菌的乳制品传播感染^[2]。TBEV 感染引起森林脑炎是除了莱姆病（病原体为伯氏疏螺旋体）以外最主要的人类蜱传疾病。TBEV 于 1937 年首次在俄罗斯被分离出来，后主要流行于欧洲和亚洲的许多国家，目前每年全球报道的病例仍在 10,000 例以上^[3,4]。TBEV 根据地域分布不同分为 3 个亚型：欧洲亚型（TBEV-Eu）、西伯利亚亚型（TBEV-Sib）以及东亚亚型（TBEV-FE），其中在我国传播流行的主要为 TBEV-FE^[5]。我国 TBEV 的主要疫区分布在吉林、黑龙江和内蒙古等林区，新疆、云南、西藏等省份也有 TBEV 流行^[6]。TBEV 主要引起急性的中枢神经系统疾病，致死率较高，恢复者大都存在感觉障碍和瘫痪等后遗症^[3]。目前尚无特异有效的 TBEV 治疗药物，临床主要以对症治疗为主。加强 TBEV 的基础及应用研究对于其防控具有重要意义。

TBEV 为单股正链 RNA 病毒，基因组的长度约 11,000 nt，由一个 ORF 和两侧的 5' 和 3' 非翻译区（UTR）组成。ORF 编码一个多聚蛋白前体，分为三种结构蛋白（C、PrM 和 E）和七种非结构蛋白（NS1、NS2A、NS2B、NS3、NS4A、NS4B 和 NS5）^[7,8]。其中 E 蛋白是病毒主要的结构蛋白，位于病毒颗粒的表面，参与细胞受体识别、病毒入胞以及病毒-细胞膜融合，而且也是病毒的主要保护性抗原，可诱导产生中和抗体^[9,10]。E 蛋白由跨膜锚定区和胞外区组成，其胞外区可分为三个结构域：DI、DII 和 DIII^[11]。N 端糖基化的 DI 位于中间，一侧是包含融合环肽的 DII，另一侧则是具有免疫球蛋白样折叠的 DIII 且该区域富含中和表位^[10]。

TBEV-E 蛋白的表达是其功能研究的重要基础。目前 E 蛋白的表达存在多种形式，如 E 蛋白全长、Eecto、E DIII 以及 E 蛋白和 PrM 蛋白共表达形成病毒样颗粒（Virus like particle, VLP），在 TBEV 诊断、疫苗等研究方面已经得到应用。譬如，E DIII 做为疫苗的组分具有较强的诱导中和抗体效应，VLP 可替代灭活病毒抗原用于检测^[1]。TBEV-Eecto 蛋白经原核系统表达纯化后，晶体结构显示其与病毒表面的 E 蛋白结构相似，其抗原性还少有报道^[2]。

本研究旨在原核表达 TBEV-Ecto 蛋白，纯化后免疫小鼠，利用小鼠血清鉴定其免疫原性；基于 TBEV-Ecto 免疫小鼠制备单克隆抗体，并对单抗的特性和生物活性进行评价。

文献回顾

1. 森林脑炎的流行、致病机制、临床特征及防治

1.1 流行病学特征

TBEV 是虫媒病毒 B 组蜱传脑炎病毒复合群的一个型，属于黄病毒科黄病毒属成员，它的同属成员还有黄热病(YFV)病毒、日本脑炎病毒 (JEV) 和登革病毒 (DENV)以及寨卡病毒 (ZIKV) 均可以严重危害人类健康。TBEV 具有嗜神经性，经蜱传播引起的脑炎早在 18 世纪就有记录，而首个 TBEV 引起的森林脑炎临床病例于 1931 年在奥地利被确定，而后在欧亚大陆出现过局部流行，包括欧洲、俄罗斯、中国、日本等，目前全球每年的发病人数超过 10,000 例^[3, 4]，由于在许多国家不强制要求医院报道 TBEV 感染病例，因此实际发病人数可能比实际统计的数字更多一些。根据地域分布不同，TBEV 主要分为 3 个亚型：远东亚型 (TBEV-FE)、西伯利亚亚型 (TBEV-Sib)、欧洲亚型 (TBEV-EU)，其中远东和西伯利亚亚型主要由全沟硬蜱传播，欧洲亚型主要由蓖麻硬蜱传播。

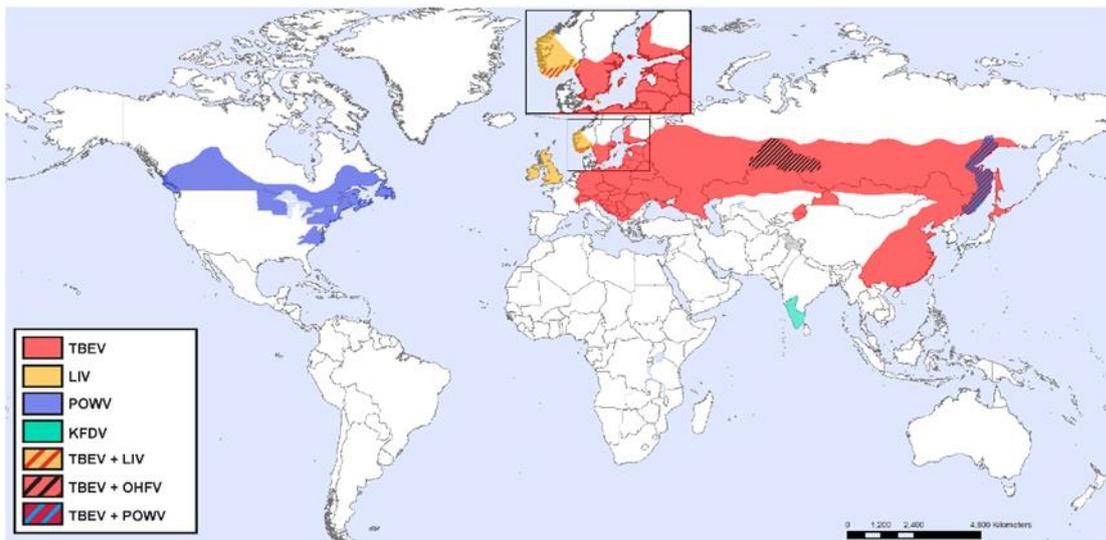


图 1: TBEV 流行区的分布^[5]

Fig 1: Distribution of TBEV-Endemic areas

我国于 1943 年首次报道了森林脑炎患者，是由侵华日军在东北林区发现的^[6]，

在 20 世纪 50 年代以后,东北林区开始广泛地出现森林脑炎病例^[7],我国的主要 TBEV 疫源地分布在吉林、黑龙江、内蒙古、新疆等地,近年来西南以及中部地区等省份也有森林脑炎病例报道^[8]。我国流行的 TBEV 主要为东亚型,它是三个亚型中致死率最高的,最高约 20%^[9]。

TBEV 主要通过蜱虫叮咬而经过血液传播,被蜱虫叮咬后感染 TBE 的概率在 1/200 到 1/1,000 之间,这与地域因素相关^[10],但也有食用被感染牲畜的未经巴氏灭菌的乳制品传播^[11],蜱虫以及猪、牛、羊、马等哺乳动物是其重要的储存宿主,而最新研究报道了一例经母乳传播的 TBE 病例,提示母乳喂养是 TBEV 传播的一种可能途径^[12]。

森林脑炎的流行在我国具有明显的季节特点,蜱虫活动通常在春末夏至温度回暖的时候,因此感染的高峰也通常集中于 5-7 月份,6 月份会达到顶峰,在气温较低的月份几乎无病例发生^[13]。

森林脑炎的易感人群主要是林区工作的伐木工人、筑路工人以及野外训练的军人等,具有明显的职业相关性。近年旅游业的发展,一些到疫区的户外旅行人员出现森林脑炎病例也在不断增加。

1.2 致病机制

带毒蜱虫叮咬人之后,TBEV 会随着蜱虫的唾液突破皮肤屏障进入人体。TBEV 首先在叮咬部位皮肤中的树突状细胞和单核细胞中增殖,然后随免疫细胞转移至附近的引流淋巴结。然后经传出淋巴管和胸导管转移至脾脏、肝脏和骨髓等大量增殖^[14, 15]。对于一部分感染者,TBEV 在这些组织大量增殖并释放病毒粒子入血,感染者出现数天的病毒血症期,病毒颗粒进而通过血脑屏障(Blood brain barrier, BBB)入脑并引起脑炎。对于大部分感染者来说,TBEV 在病毒血症期被清除而不入脑,将不会出现明显的临床症状^[16]。关于 TBEV 如何突破 BBB 进入大脑,具体机制还不清楚。目前有以下几种假说:(1)直接破坏 BBB;(2)从感染的周围神经进行轴突逆向运输后通过神经肌肉接头从肌肉传播到脊髓中的躯体运动神经元;(3)通过组成 BBB 的脑毛细血管的微血管内皮细胞的内吞作用进入;(4)通过感染嗅觉神经元进而传播至嗅球^[17, 18];(5)通过被感染的单核细胞将 TBEV 运输至中枢神经系统的途径,称为特洛伊木马机制^[19]。TBEV 突破 BBB 后,它会迅速在脑内复制,主要集

中于脊髓前角、延髓、脑桥、齿状核、小脑中的浦肯野细胞和纹状体的神经元细胞，但在少突胶质细胞、小胶质细胞中几乎不复制。

TBEV 既可以引起脑炎，也可以引起脑膜脑炎。引起脑膜炎的炎性细胞浸润主要在小脑附近，而脑膜脑炎及脑膜脑脊髓炎的炎性细胞浸润主要在大脑和脑干区域。TBEV 感染对中枢神经系统的损伤几乎存在于脑内的各个部位，尤其以延髓、脑桥、小脑、脑干、基底节、丘脑和脊髓为主，病理学改变主要包括免疫细胞在脑膜和血管周围浸润、小胶质细胞增生形成的结节、神经细胞坏死以及神经元被胶质细胞吞噬等。在森林脑炎死亡患者的尸检中发现大脑和脊髓脑膜存在大量淋巴细胞和中性粒细胞的弥漫性浸润。部分 TBE 患者大脑皮层的运动区会发生严重损伤，例如锥体细胞坏死、淋巴细胞聚集和神经胶质细胞增生^[20]。

TBEV 感染之后淋巴细胞有明细变化，T 细胞绝对数量大约会在病毒血症期后的第 4 天开始减少，一直到中枢神经症状得到缓解后 T 淋巴细胞恢复正常水平。B 细胞数量会在出现首次临床症状后的 7-23 天内高于正常水平^[20]。在 TBEV 患者感染早期的血液和脑脊液中可以检测到特异性 IgM 抗体，血清中的 IgG 抗体水平会在感染 6 周后达到峰，在防止 TBEV 再次感染中发挥重要作用^[21]。

1.3 临床特征

森林脑炎的潜伏期中位数通常为 8 天，最短为 4 天，而最长可至 28 天^[4]。潜伏期之后是病毒血症期，一般会持续 2-8 天，其症状与流感类似，主要表现为低热、头晕、乏力、全身不适、背部及四肢酸痛^[22]。病毒血症期过后，部分感染者会出现一段短暂的无症状期而后痊愈，称为森林脑炎的流产形式。但大有约 1/3 的患者会出现高热、头痛、肌肉疼痛、恶心呕吐、感觉和视觉障碍等神经系统症状^[23]。在部分患者中，TBEV 突破 BBB 进入中枢神经系统，导致患者出现从轻度脑膜炎、脑膜脑炎以及脑膜脑脊髓炎等不同的临床表现，轻度脑膜炎的主要表现为剧烈头痛、恶心、呕吐及颈强直、发热、盗汗、乏力等症状。而脑膜脑炎的临床表现则会相对较重，患者会出现嗜睡、谵妄、昏迷甚至重度昏迷，而且伴有意识障碍，也有多动、肢体不自主运动、共济失调、惊厥及精神错乱等表现，有的会伴有脊髓麻痹和脊髓炎的脑膜脑脊髓炎，它与脊髓灰质炎一样会导致弛缓型瘫痪，如偏瘫、下肢轻瘫、四肢瘫痪及呼吸肌瘫痪，其严重程度表现为上肢比下肢更易受累，近端重于远端。当 TBEV 侵袭颅神经系统时，患者眼部、面部以及咽部肌肉功能会出现不同程度的

障碍，而部分严重的患者会导致脑干部位受累，可导致呼吸衰竭进而导致患者死亡^[4]。森林脑炎恢复期患者的临床表现主要为体温下降、疼痛逐渐消失、瘫痪逐步恢复、意识转醒，症状逐渐减轻至消失。但部分患者仍会遗留肌肉瘫痪、癫痫、肢体活动障碍、感觉障碍、记忆力下降等神经系统损伤引起的后遗症。

1.4 森林脑炎的治疗及预防

1.4.1 森林脑炎的治疗

森林脑炎目前尚无特异性治疗药物，以对症治疗为主。降温有助于疾病的恢复，可采用物理降温如冰敷、酒精擦浴等，如无法缓解则需要配合服用退烧药。服用止痛药、止吐药、维持水和电解质平衡有助于缓解病毒血症期的症状。对于重症患者，一般采用激素如皮质类固醇联合冬眠低温疗法，但部分研究表明使用皮质类固醇会显著增加森林脑炎患者的住院时长。对于神经肌肉麻痹导致的呼吸衰竭则需要呼吸机的支持，静脉注射甘露醇或类固醇可增加脑内血管循环容量来降低颅内压，可明显改善脑炎引起的脑水肿导致的颅内压升高^[8, 24]。

临床试验表明抗 TBEV 免疫球蛋白对于重症森林脑炎患者有明显效果，特异性免疫球蛋白也被用于治疗其他虫媒病毒感染引起的脑炎^[25, 26]。由于黄病毒感染单核细胞时存在抗体依赖性增强（Antibody-dependent enhancement, ADE）感染效应^[27]，欧洲已经停止了 TBEV 特异性免疫球蛋白 Encegam(FSME-Bulin)在临床中的使用^[28]。近年来，有学者专门就此进行了深入研究，结果表明只要正确和及时地给予 TBEV 感染者进行静脉注射免疫球蛋白，并不会引起 ADE 效应^[29]。

核苷类似物也是治疗 TBE 的有希望的潜在药物之一。有研究表明 7-去氮-2'-C-甲基腺苷(7dma)在小鼠实验中可成功抑制 TBEV，因此抗 TBEV 药物应将重点放在核苷类似物抑制剂上^[17, 30]。Alexey A. Chistov 等报道了 3-甲基-5-（苄-3-基乙炔基）-尿嘧啶-1-乙酸及其酰胺，基于 5-（苄-2-基乙烯基）尿嘧啶支架的新化合物，其对于 TBEV 的 EC₅₀ 值低于 1.9 nM，它以剂量依赖的方式抑制病毒融合，其在脂质双层中的定位和对 TBEV 包膜的破坏表明病毒膜是主要靶点^[31]。

另外一些研究显示，将重组干扰素制剂用脂质体包裹制备的口服药 Reafular-ES-Lipint 具有较好的抗 TBEV 效果，特别是将其与特异性免疫球蛋白联合给药，可明显改善森林脑炎患者的预后^[32]。

除上述的药物治疗外，森林脑炎患者在康复期内的家庭护理和社会支持对于康复也至关重要，由于后遗症带来的生理上的痛苦可能导致患者心理焦虑或抑郁，家人的精神支持和社会的支持有助于患者积极向上地进行康复训练，因此不能忽视对于患者的人文关怀。

1.4.2 森林脑炎的预防

对于森林脑炎的预防最有效的方法是接种疫苗，目前已获批上市的均为灭活疫苗，表 1 总结了目前获批使用疫苗的毒株、抗原含量、佐剂以及接种年龄。在欧洲批准的两款疫苗分别为 FSME-IMMUN 和 Encepur，它们所使用的毒株分别为 Neudoerfl (TBEV-Eu) 株和 K23 (TBEV-Eu) 株，两种疫苗的生产均采用原代鸡胚胎成纤维细胞扩增病毒、甲醛灭活、超速离心法纯化，佐剂均为氢氧化铝。FSME-IMMUN 由辉瑞研发，它在美国的商品名为 TicoVac。Encepur 由葛兰素史克研发，于 1991 年在德国注册。研究表明 FSME-IMMUN 和 Encepur 两种疫苗不但可以预防由 TBEV 欧洲亚型感染，对于 TBEV 西伯利亚亚型和远东亚型的感染也有交叉保护作用。这两种疫苗还专门研发了针对 1 岁以下儿童的 FSME-IMMUN®(Junior)和 Encepur-K^[17,33]。俄罗斯目前批准在用两种基于 TBEV 远东亚型的疫苗(TBE-Moscow 和 EnceVir)，其制备工艺与欧洲疫苗类似，不同点在于它用福尔马林灭活^[24]。俄罗斯针对儿童的疫苗 Tick-E-Vac 由 Chumakov 联邦科学中心研发，该疫苗基于 Sofjin 毒株的甲醛灭活制备而来^[34]。我国目前批准在用 TBEV 疫苗为长春生物制品所生产的“森泰保”，它使用的毒株为远东亚型的森张株，采用地鼠肾细胞扩增病毒，佐剂为氢氧化铝，接种对象为 8 岁以上人群，为我国森林脑炎的防治发挥了重要作用^[35]。

除疫苗接种外，做好个人防护也相当必要，例如在林区活动时避免露出皮肤和接触植被，疫区居住人员应定期修剪房屋周边的草，以及使用灭虫剂消杀可能存在的蜱虫，疫区的食用奶及奶制品前进行巴氏灭菌，防止 TBEV 的感染^[4,36]。

表 1：已批准使用的森林脑炎疫苗^[3]

Talbe 1: Approved Tick-borne Encephalitis Vaccine

疫苗	毒株 (亚型)	抗原含量	佐剂	接种年龄
FSME-IMMUN	Neudoerfl (TBEV-Eu)	2.4 μ g	氢氧化铝	任意
Encepur	K23 (TBEV-Eu)	1.5 μ g	氢氧化铝	任意

TBE vaccine Moscow	Sofjin (TBEV-FE)	1.0±0.5μg/mL	氢氧化铝	≥3 岁
EnceVir	Sofjin (TBEV-FE)	2.0-2.5μg	氢氧化铝	任意
Tick-E-Vac	205 (TBEV-FE)	1.0±0.5μg/mL	氢氧化铝	任意
森泰保	森张(TBEV-FE)	未知	氢氧化铝	≥8 岁

2. TBEV 的分子生物学特征

TBEV 属于黄病毒科黄病毒属成员，成熟的病毒是一个正二十面体对称的球形颗粒，直径约 50 nm，外层为脂质包膜^[4]。基因组为长度约 11,000 nt 的单股正链 RNA，其 ORF 编码一个多聚蛋白前体，在翻译后被病毒蛋白酶和宿主蛋白酶的水解下分为 3 个结构蛋白（衣壳蛋白 C、膜蛋白 M、包膜蛋白 E）和 7 个非结构蛋白（NS1、NS2A、NS2B、NS3、NS4A、NS4B、NS5）^[37]。衣壳（Capsid）蛋白和基因组 RNA 共同组成了直径约 30nm 的核衣壳结构，外面包裹着双层脂质膜，上面镶嵌着 E 蛋白和 M 蛋白。

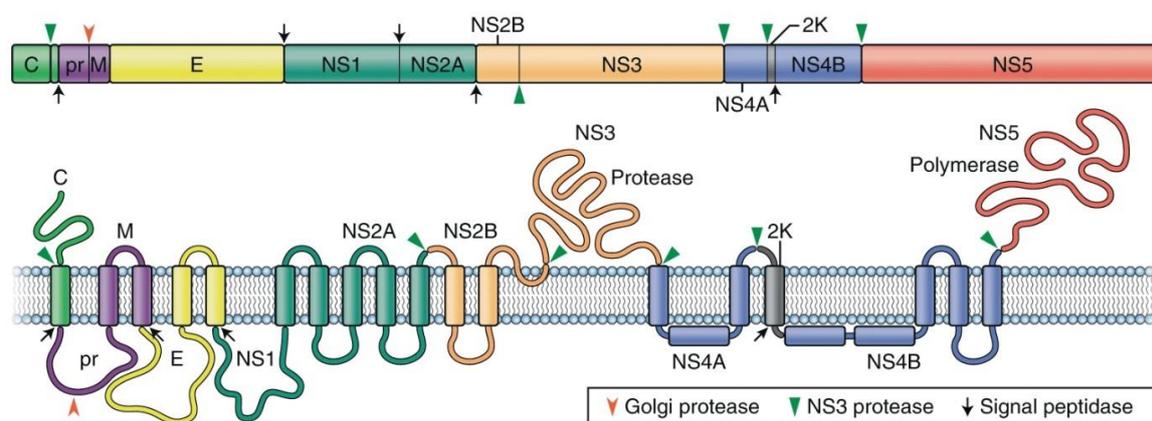


图 2：TBEV 基因组及病毒蛋白表达^[38]

Fig 2 : Genome organization and gene expression of Tick-borne encephalitis virus

TBEV 病毒膜表面呈现 90 个反向平行的 E 蛋白二聚体，每个 E 蛋白单体由四个结构域组成，DI、DII 和 DIII 三个结构域构成了 E 蛋白胞外区，DIV 为茎区和跨膜锚定区^[39]。胞外区主要以 β 片层结构为主，DI 位于 DII 和 DIII 之间，其上含有唯一的糖基化位点天冬酰胺（Asn 154），它对于 TBEV 的出芽及神经毒力至关重要，WNV、ZIKV、JEV 也在此位置有相同的糖基化位点^[40, 41]。DII 含有融合环，它包含了 E 蛋白二聚体接触的界面，该界面的掩埋表面积为 14.9nm^2 ，融合环（100aa-

109aa) 高度保守且隐藏在二聚体中另一个 E 蛋白 D I 和 D III 形成的铰链区中, 它诱导 TBEV 在入胞阶段时的膜融合, 病毒基因组 RNA 才可进入胞质。TBEV-E 蛋白胞外区在天然状态下有小幅度弯曲, 这样可保持融合环隐藏在疏水口袋中, 从而防止融合环在非低 pH 条件下诱导膜融合。D III 含有免疫球蛋白样折叠结构域, 高度抗原性, 可诱导中和抗体的产生, 其侧表面的氨基酸突变会显著影响小鼠的神经毒力, 可能参与了入胞过程中与神经元细胞的受体结合^[39, 42-44]。D IV 的主要功能是将 E 蛋白锚定在膜上, 研究表明其 421 位的色氨酸 (Trp) 对维持病毒结构及病毒释放有关键作用^[45]。因此 E 蛋白胞外域参与了受体识别、病毒入胞以及病毒-细胞膜融合, 而且也是病毒的主要保护性抗原, 诱导产生中和抗体^[46, 47]。

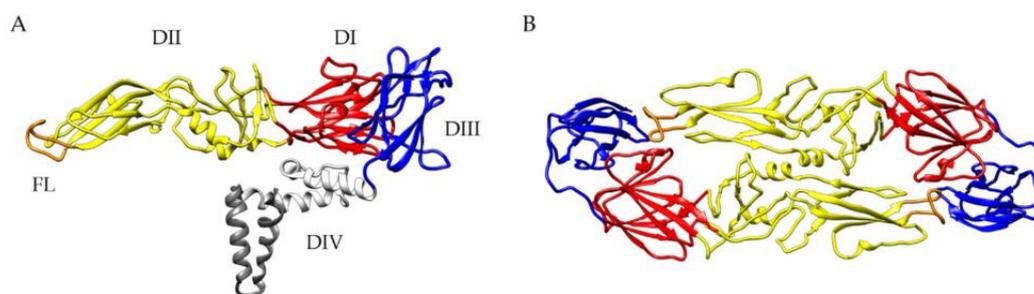


图 3 : TBEV-E 蛋白结构示意图 (A) 及 E 蛋白二聚体胞外区结构示意图 (B) ^[3]

Fig 3 : Structure of TBEV-E protein (A) and the ectodomain of E protein dimers (B)

M 蛋白仅有 75 个氨基酸, 含有一个外周膜螺旋、和 2 个跨膜螺旋以及一个 N 端环状结构。M 蛋白完全深埋于 E 二聚体的界面中, 其可能作为粘合剂加强了 E 二聚体之间的相互作用。M 蛋白的前体为 PrM 蛋白, 在病毒成熟过程中由宿主细胞的弗林蛋白酶会将 Pr 部分切除^[39, 48]。

NS1 蛋白有两种活性形式, 分别为二聚体和六聚体, 当它以二聚体形式发挥作用时可促进病毒的复制, 而作为六聚体形式时它可与病毒粒子共同出胞参与病毒的致病作用^[49]。NS2A 蛋白 和 NS2B 蛋白都为整合膜蛋白, 有助于病毒颗粒的组装。NS2A 蛋白 在复制和免疫调节中起作用, 而 NS2B 蛋白 作为辅助因子与 NS3 蛋白形成复合物, 其作为蛋白酶参与了病毒多聚蛋白前体的裂解^[50], NS3 蛋白还具有 ATP 酶的活性, 受 NS4A 调节。NS4A 蛋白 和 NS4B 蛋白会在病毒复制增殖过程中分离, 该而后 NS4B 迁移至内质网膜 (ER), 它参与了复制复合物的形成以及免疫调节等多种功能^[51, 52]。NS5 蛋白 作为 RNA 依赖性 RNA 聚合酶 (RdRp) 和甲基转移酶参

与病毒基因组 RNA 的复制，且参与固有免疫系统的调节作用^[53, 54]。

3. TBEV 包膜 E 蛋白及 VLP 表达研究现状

3.1 E 蛋白 DIII 的表达

TBEV-E 蛋白 DIII 位于 DI 的另外一侧，通过柔性铰链连接，紧靠 E 蛋白的跨膜锚定区。E 蛋白 DIII 大约含有 100 个氨基酸^[55]，许多中和抗体可结合的表位都位于 DIII 上，这些表位参与 TBEV 病毒粒子在入胞时与细胞膜表面受体的结合。EXE/DPPFG 是位于 DIII 上的一种在黄病毒上高度保守的抗原表位^[56]。利用 E 蛋白全长或者胞外区作为抗原进行血清学检测时，由于黄病毒之间的高度同源性会与其它黄病毒交叉反应，而不同黄病毒之间的 E DIII 氨基酸序列存在显著差异，能避免同属黄病毒的交叉反应性对临床诊断的干扰。正因如此，E DIII 是制备 TBEV 治疗性单抗和血清学诊断的重要抗原。

吉林农业大学和军事医学科学院成功用原核表达载体 GSTpET-30a(+) 表达了 TBEV-E DIII 段，Western blot 以及 ELISA 试验证明其均可与兔抗 TBEV 血清特异性反应，原核表达的 TBEV-E DIII 具有良好的特异性^[57]。国外由 Anna S Ershova 等研究利用大肠杆菌表达 TBEV 三个亚型的 E 蛋白 D III 结构域与柠檬明串珠菌 (*Leuconostoc citreum*) KM20 的葡聚糖结合结构域的融合蛋白，3 种亚型 DIII 都可与来自森林脑炎患者血清的抗体的特异性反应^[58]。Vasily Golotin 等表达了一种基于假结核耶尔森菌的细菌伴侣 HSP70 和 TBEV-E DIII 的嵌合蛋白，该嵌合蛋白作为管状免疫刺激复合物 (TI 复合物) 免疫小鼠，试验证明与单独的 E DIII 相比，嵌合蛋白诱导的特异性抗 DIII 抗体的数量是单独使用 DIII 的两倍^[59]。

3.2 E 蛋白胞外区的表达

TBEV-E 蛋白去除跨膜锚定区的胞外部分称为 E 蛋白胞外区，它可在胰蛋白酶处理病毒粒子后脱落，也称为可溶性 E 蛋白 (soluble Envelope, sE)。由于 E 蛋白胞外区去除了跨膜区，保留了几乎所有的抗原表位，免疫原性基本与全长 E 蛋白一样。

Rizzo 等在大肠杆菌中通过原核表达含有 GST 标签的 TBEV-Ecto 蛋白，经过亲和层析纯化后使用 SDS-PAGE 和 Western blot 分析其纯度，利用 DNA 免疫小鼠血清和疫苗接种者血清进行 ELISA 试验，结果显示获得了纯度较高的目的蛋白且保留了

抗原性^[60]。Dubova 等也在 BL21 大肠杆菌表达了 TBEV 远东亚型 Sofjin 株的 Ecto 蛋白，而且通过重折叠获得了复性成功的蛋白，并制备了 Ecto 蛋白结晶，对其进行了 X 射线衍射分析（分辨率为 3.2 Å），与 TBEV 欧洲亚型（Neudoerfl 株）的 Ecto（PDB: 1SVB）的分子结构叠加得到 1.519 Å 的均方根偏差（root mean square deviation, rmsd）。1SVB 是用胰蛋白酶处理天然病毒颗粒获得可溶性 Ecto 后解析的晶体结构。该研究提示原核表达的重组 Ecto 蛋白经过变性与复性之后和病毒颗粒表面的 E 蛋白构象相似，可用于 E 蛋白的生物学功能研究^[2]。

3.3 全长 E 蛋白的表达

E 蛋白在病毒入胞时介导了与细胞表面受体的结合，又可诱导机体产生保护性抗体，因此是疫苗、诊断、抗病毒药物研究的重点靶标。由于 E 蛋白含有跨膜区，外源表达全长 E 蛋白存在一定困难。

ALLISON 等构建野生型 TBEV-E 基因全长表达质粒，同时构建了 Ecto 以及 PrME 蛋白的表达质粒，将其分别电穿孔转染 COS 1 细胞，收集它们的上清液和细胞裂解物分析发现 PrME 表达最高，全长 E 蛋白次之，Ecto 最低^[61]。

国内长春生物制品所的邢振虹等人构建了全长 E 蛋白表达载体 pET28a-TBEV-E，在 BL21 细菌中成功表达了全长 E 蛋白，镍柱亲和层析后纯度达 90%，它可与小鼠抗 TBEV 血清发生特异反应，提示全长 E 蛋白具有较好的免疫原性^[62]。温中华等人也成功原核表达了 TBEV 全长 E 蛋白，蛋白以包涵体形式存在，经过十二烷基肌氨酸钠的变性处理，通过逐步去除变性剂的透析复性法成功获得了复性的全长 E 蛋白，为亚单位疫苗及血清学诊断提供了候选抗原^[63]。目前尚未见到全长 E 蛋白的疫苗进入临床试验。

3.4 TBEV-VLP 的表达

病毒样颗粒（VLP）是指病毒衣壳、核心或包膜等蛋白质表达，或者是源自多层病毒的单层颗粒的制备物而自组装的颗粒，VLP 自组装成类似于原始病毒大小和对称性的结构，但其不包含病毒基因组，因此不会在细胞中复制。是灭活疫苗、减毒疫苗或亚单位疫苗的更稳定、更安全的替代品，因为它们不具有感染性，不能恢复为感染性形式。此外，VLP 的颗粒形式使它们比亚单位疫苗更具免疫原性，VLP 的优点包括 B 细胞受体的高效交联以及更易被天然 IgM 抗体识别，从而激活经典补

体途径, 导致抗原在滤泡树突状细胞上沉积, 增强生发中心形成, 并诱导持久和长寿命的浆细胞^[64]。TBEV 的 E 和 PrM 的共表达可使其在内质网中成功组装成为 TBEV-VLP, 由于其不具有结构蛋白 C 和基因组 RNA, 它被认为在人体内使用具有较好的安全性^[61]。

TBEV-VLP 比天然完整病毒颗粒小, 直径约 30nm, 但与天然病毒颗粒表现出相似的表面蛋白组织(包括抗原结构)和功能反应性(低 pH 下的重排和融合, 血凝活性), 由于其结构与天然的病毒颗粒相似, TBEV-VLP 具有高度的免疫原性, 能够激发体液和细胞免疫反应^[4, 65, 66]。

国外已有多项关于 TBEV-VLP 的研究, 如 Yoshii K 等将编码 PrM 和 E 基因之间序列的 TBEV cDNA 插入 pCAGGSS 载体, 获得 pCAGprME 表达质粒, 用 IFA 检测重组蛋白在 pCAGprME 转染 HEK 293T 细胞中的抗原性, 结果显示其与 TBEV 活毒感染的 BHK 细胞具有相似的反应模式^[67]。Seok-Min Yun 基于甘油醛-3-磷酸脱氢酶 (GAP) 启动子的毕赤酵母表达系统生产 TBEV-VLP, 使用毒株为 TBEV 韩国株 KrM 93, 结果显示重组 VLP 可成功被分泌到巴斯德毕赤酵母的培养上清液中并被糖基化修饰^[68]。

4. TBEV 报告病毒颗粒

4.1 报告病毒颗粒

RVP (reporter virus particle) 是指带有报告基因的假病毒, 由于其结构与天然病毒相似, 可代替天然病毒进行多种生物学试验, 特别是对于生物危害性极高需要较高生物安全等级实验室操作的病毒, 因此带有报告基因的 RVP 是病毒学研究的重要工具^[69]。目前黄病毒的 RVP 研究已经取得了很大进展, 其核心在于首先构建黄病毒基因组复制子 (编码病毒结构蛋白的基因被报告基因取代, 其非结构基因形成的亚基因组复制子可进行自我复制), 然后通过反式提供编码结构蛋白的基因进行互补而包装出 RVP^[70]。RVP 由于其包裹的基因组中缺乏结构蛋白编码基因, 因此只具有单轮感染性, 可在 BSL-2 级别的实验室进行操作。

4.2 黄病毒 RVP

黄病毒的血清学诊断中因为 E 蛋白的高度同源性而易发生交叉反应, 导致诊断容易发生非特异性的假阳性结果, 空斑减少中和试验 (plaque reduction neutralization

test, PRNT)被认为是血清学试验的金标准,但使用天然黄病毒的 PRNT 耗时耗力,且如 DENV 和 TBEV 需在 BSL-3 级别实验室进行,限制了该方法的使用,因此黄病毒 RVP 是一种安全、易操作的替代品。黄病毒在通过反式提供结构基因包装 RVP 时的策略有多重,有将结构蛋白基因 (CPrME) 通过一个质粒提供,也有分开通过 2 个质粒提供, Khromykh 等的研究表明后者包装 RVP 的产量高于前者 10 倍^[71]。也有仅反式提供 PrME 基因,在复制子中表达衣壳蛋白 C^[72]。目前已有多种不同黄病毒的 RVP 被成功包装,使用其在体外和体内进行黄病毒致病机制和抗体筛选多方面研究。

Davis 等在 WNV BHK WNIirep REN 细胞(含有表达 Renilla 荧光素酶基因的亚基因组 WNV 复制子)中转染含有 DENV CprME 结构基因和弗林蛋白酶的质粒产生 DENV RVP。离心纯化后进行 Western blotting 验证,发现其可成功与兔抗 DENV M/E 多克隆血清结合,中和试验证实其可被特异性抗体抑制,表现出与天然病毒粒子相似的生物活性^[73]。Arlen-Celina Lücke 等则采用双复制子的方法来构建,即在辛德比斯病毒 (SINV) 复制子中 2 个亚基因组分别插入 YFV 的 prME 和 C 基因,而 YFV 的复制子带有人源化的 Gaussia 荧光素酶 (Gluc),两个复制子经体外转录后经电穿孔共转染 BHK 细胞,随后在电穿孔后的细胞上清液中产生了 Gluc,说明成功制备了 YFV-RVP。与经典的 PRNT 相比,以 Gluc 作为报告蛋白,在 96 孔板下可快速进行活性测定,适用于黄病毒中和抗体的高通量分析^[74]。Mami Matsuda 等构建了携带含有纳米荧光素酶(NanoLuc)基因的 DENV1 复制子质粒,将其转染 293T 细胞后用利巴韦林处理可明显观察到 NanoLuc 活性降低,然后将该复制子质粒与 DENV1 的 C 蛋白表达质粒以及编码 WNV 的 PrME 蛋白的质粒共转染 293T 细胞产生 WNV-RVP,感染 Vero 细胞的后的 NanoLuc 活性与感染细胞的数量密切相关,而 WNV- PrME 质粒免疫小鼠的血清可特异性中和 WNV-RVP,表明基于 WNV-RVP 的中和试验是一种比传统 PRNT 效率更高、安全性更好的方案^[75]。

4.3 TBEV-RVP

在 TBEV-RVP 的生产中,既有直接在其基因组中插入报告基因的方法,也有通过将带有报告基因的复制子和结构蛋白基因通过互补来包装。Jan Haviernik 将报告基因 mCherry(一种亮红色单体荧光蛋白,其高度光稳定且抗光漂白)插入 TBEV

基因组 C 端中，基于反向遗传学将包含全基因组的 3 个带有重叠 DNA 片段的感染性亚基因组质粒等摩尔转染 BHK 细胞产生重组 mCherry-TBEV，mCherry-TBEV 和野生型 TBEV 表现出相似的生长动力学，mCherry 的表达与病毒复制存在良好相关性，且在 4 代以内的细胞培养中保持稳定，是 TBEV 体外细胞水平研究的有力工具^[11]。Yoshii 等利用含有 GFP 的 WNV 复制子质粒与 TBEV 的 CprME 质粒共转染 HEK 293T 细胞，收集含有 TBEV-RVP 的上清，过滤后感染 Vero 细胞，流式细胞术测定滴度，利用其鉴定同为蜚传黄病毒的波瓦桑病毒（POWV）单克隆抗体的交叉反应性，成功鉴定出对多种蜚传黄病毒（TBFV）都存在抑制作用的中和抗体^[47]。Arlen-Celina Lücke 等利用前述构建的 YFV 复制子，以及将 SINV 复制子中的 PrME 替换为 TBEV 的 PrME 也成功产生了嵌合 TBEV/YFV-RVP，利用 TBEV-RVP 以及 TBEV 活毒分别与抗 TBEV、DENV、WNV、ZIKV、YFV 的人血清进行中和试验，结果显示抗 TBEV 人血清虽然存在与其它黄病毒 RVP 及其活毒的交叉反应，但都在 TBEV-RVP 和其活毒的对应组别中取得了最高的中和效率，包装出的 TBEV-RVP 与天然病毒有着相似的生物活性，且荧光素酶的信号更为灵敏，因此基于 RVP 的中和试验是传统 PRNT 的良好替代方案^[74]。

正文

第一部分 TBEV 包膜蛋白胞外区原核表达、纯化及免疫原性鉴定

1 材料

1.1 感受态、细胞、质粒

1.1.1 感受态

DH5 α 、BL21(DE3): 购自上海维地生物技术有限公司, 由本实验室保存。

1.1.2 细胞

293T (人胚肾细胞)、BHK (原代仓鼠肾细胞): 均由本实验室保存。

1.1.3 质粒

pET28a: 购自日本 Takara 公司, 由本实验室保存; pCAGGS 质粒, 由本实验室保存。

1.2 试剂

实验所用相关试剂如表 1-1 所示:

表 1-1: 实验试剂

Table 1-1: Experimental reagents

试剂名称	来源
高糖 DMEM 培养基	美国 Corning 公司
胎牛血清	HyClone 公司
磷酸缓冲盐溶液 (phosphate buffer saline, PBS)	HyClone 公司
脱脂奶粉	美国 BD 公司
DL 2000 DNA Maker、DL 5000 DNA Maker	日本 Takara 公司
<i>Bam</i> HI 和 <i>Sal</i> I、 <i>Eco</i> R I、 <i>Kpn</i> I 限制性内切酶	日本 Takara 公司
T4 DNA 连接酶、Premix PrimeSTAR MAX PCR 酶	日本 Takara 公司
10 \times 核酸上样缓冲液、4% 多聚甲醛 (PFA)	日本 Takara 公司

胰蛋白胨、酵母提取物、琼脂粉、琼脂糖	上海生工
50×TAE 溶液、氯化钠、PMSF、溶菌酶	上海生工
异丙基-β-D-硫代半乳糖苷 (IPTG)	上海生工
硫代苏糖醇 (DTT)、咪唑、SOC 培养液	上海生工
Ni-NTA 琼脂糖纯化色谱柱	上海生工
质粒小提试剂盒、凝胶回收试剂盒	天根生化科技有限公司
RIPA (强) 裂解液、100×三抗、牛血清白蛋白	碧云天公司
PEI MAX	Polysciences 公司
5×蛋白上样缓冲液	新赛美公司
QuickAntibody-Mouse5W 免疫佐剂	博奥龙科技有限公司
核酸染料	Everbright 公司
非洗涤剂磺基甜菜碱-201 (non-detergent sulfobetaine, NDSB-201)	美国 Millipore 公司
0.22 μm 针头式过滤器 (33 mm)	美国 Millipore 公司
无水乙醇、异丙醇、冰醋酸	富宇精细化工
蛋白 maker	美国 Thermo 公司
Triton X-100	Sigma 公司

1.3 抗体

实验所用抗体如表 1-2 所示:

表 1-2: 抗体

Table 1-2: Experimental antibodies

抗体	来源
兔抗 6× his 抗体	上海生工
辣根过氧化物酶 (Horseradish peroxidase, HRP) conjugated Goat Anti-Mouse IgG	上海生工
IRDye® 800CW Goat anti-Rabbit IgG Secondary Antibody	美国 LI-COR 公司
IRDye® 680RD Goat anti-Mouse IgG Secondary Antibody	美国 LI-COR 公司
CoreLite® 488 Goat anti-Mouse IgG Secondary Antibody	美国 Proteintech 公司

1.4 溶液及相关试剂配制

1.4.1 琼脂糖凝胶电泳

1.4.1.1 1×TAE 溶液：量取 20 mL 50×TAE 溶液，加入去离子水定容至 1 L。现配现用，室温保存。

1.4.1.2 1% 琼脂糖凝胶：使用精密天平称取琼脂糖 1 g 置于锥形瓶中，加入 40 mL 1×TAE 溶液使其溶解，定容至 100 mL 后加热至 100 °C，待其全部溶解后拿出冷却，待温度降至不烫手为止，加入 10 μL 核酸染料并混匀。室温保存，使用时加热。

1.4.2 细菌培养相关溶液

1.4.2.1 1000×Kanamycin 溶液：使用精密天平称取 Kanamycin 5 g 置于 100 mL 烧杯中，加入 40 mL 去离子水，待溶解后定容至 50 mL。使用 0.22 μm 一次性针头式过滤器过滤除菌，分装保存于 -20 °C。

1.4.2.2 1000×Ampicillin 溶液：使用精密天平 Ampicillin 5 g 加入 100 mL 烧杯中，加入 40 mL 去离子水，待溶解后定容至 50 mL。使用 0.22 μm 一次性针头式过滤器过滤除菌，分装保存于 -20 °C。

1.4.2.3 2×YT 液体培养基：使用精密天平称取 16 g 胰蛋白胨、5 g 氯化钠、10 g 酵母粉置于 2 L 烧杯中，加入约 700 mL 去离子水后不间断搅拌，待全部溶解后加入去离子水定容至 1 L，使用 1 M 氢氧化钠溶液调节溶液 pH 值至 7.4，分装至 500 mL 三角烧瓶中，高压蒸汽灭菌后于 4 °C 保存。

1.4.2.4 2×YT 平板培养基：称取 8 g 胰蛋白胨、2.5 g 氯化钠、5 g 酵母粉置于 2 L 烧杯中，加入约 400 mL 去离子水后不间断搅拌，待全部溶解后去离子水定容至 500 mL，使用 1 M 氢氧化钠溶液调节溶液 pH 值至 7.4，高压蒸汽灭菌。室温放置，待温度降至约 40 °C 后按比例加入抗生素至终浓度为 100 μg/mL，充分混合均匀后约每 10 mL 倒入 1 块 10 cm 无菌平皿。室温放置直至平板培养基凝固，4 °C 保存，短期使用。

1.4.3 蛋白电泳缓冲液

1.4.3.1 1×电泳缓冲液：分别取 Tris 0.6 g、甘氨酸 2.88 g、SDS 1 g 溶于去离子水中，定容至 1 L，室温下保存。

1.4.3.2 1×转膜缓冲液：分别取 Tris 3.03 g、甘氨酸 14.3 g 溶于去离子水中，定容至 1

L, 室温下保存。

1.4.3.3 1×TBS 缓冲液: 分别取 Tris 3.03 g、氯化钠 9 g 溶于去离子水中, 定容至 1L, 室温下保存。

1.4.3.4 TBST 缓冲液: 取 500 mL 1×TBS 缓冲液加入 250 μL Tween-20, 终浓度为 0.05%, 室温下保存。

1.4.3.5 考马斯亮蓝染色液: 使用精密天平称取考马斯亮蓝 R-250 1 g 加入烧杯中, 然后加入 250 mL 异丙醇和 100 mL 冰醋酸, 最后加入去离子水定容至 1 L, 使用滤纸过滤去除不溶性颗粒, 室温下保存。

1.4.3.6 考马斯亮蓝脱色液: 量取 50 mL 乙醇、100 mL 冰醋酸溶于去离子水中, 定容至 1 L, 室温下保存。

1.4.4 原核蛋白复性及纯化缓冲液

1.4.4.1 洗涤缓冲液: 0.5% Triton-100、50 mmol/L Tris pH8.0、300 mmol/L NaCl、10 mmol/L EDTA 10 mmol/L DTT。

1.4.4.2 包涵体溶解缓冲液: 6 mol/L Gua-HCl、100 mL/L 甘油、50 mmol/L Tris pH8.0、100 mmol/L NaCl、10 mmol/L EDTA、10 mmol/L DTT)。

1.4.4.2 重折叠缓冲液: 400 mmol/L NDSB-201、50 mmol/L Tris pH 8.0、0.5 mmol/L oxidized glutathione 氧化型谷胱甘肽、5 mmol/L reduced glutathion 还原型谷胱甘肽、0.5 mmol/L PMSF。

1.4.4.3 结合缓冲液: 20 mM Tris-HCl, 500 mM 氯化钠, 10 mM 咪唑, pH 8.0。

1.4.4.4 洗脱缓冲液: 20 mM Tris-HCl, 500 mM 氯化钠, 250 mM 咪唑, pH 8.0。

1.5 实验仪器

实验所用仪器如表 1-3 所示:

表 1-3: 实验仪器

Table 1-3: Experimental instruments

仪器	来源
精密天平	梅特勒-托利多公司
超纯水净化机	南京易普易达公司
凝胶成像仪	美国 Alpha Innotech 公司

低速离心机	美国 Thermo 公司
低温超速离心机	美国贝克曼公司
PCR 扩增仪	美国 Eppendorf 公司
核酸电泳仪	北京六一生物
荧光显微镜	Olympus 公司
超净工作台	上海新苗医疗公司
二氧化碳恒温培养箱	美国 Thermo
普通光学显微镜	日本蔡司
超声破碎仪	美国 SONICS
蛋白电泳仪	美国 Bio-Rad
转膜仪	美国 Bio-Rad
Odyssey 双色红外荧光成像系统	美国 LI-COR 公司
蠕动泵	英国 Watson Marlow 公司
快速蛋白层析仪	美国 GE 公司
AKTA 超滤系统	美国 Cytiva 公司

1.6 动物

5 周龄雌性 BALB/c 小鼠，购自空军军医大学实验动物中心，本研究通过空军军医大学医学伦理委员会批准，批准编号为 20200410。

1.7 分析软件及网站

病毒序列查询使用 NCBI 网站 (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov>)，测序结果比对及引物设计使用 SnapGene3.2.1 软件。

2 方法

2.1 TBEV-Eecto 原核表达质粒的构建

2.1.1 TBEV-Eecto 基因合成、引物合成

根据 TBEV senzhang 株 (GenBank 中登录号 AY182009.1) 进行密码子优化并合成 TBEV-Eecto 片段，基因长度为 1,203 bp:

```
tctcgttgcaaccactggaaaaccgtgacttcatcaccgggtaccagggtaccaccgtgttacctggttctggaactgggtgt
tgcgttaccatcaccgctgaaggtaaaccgtctatggacgtttggctggactctatctaccaggaaaaccggctaaaaccgtga
```

atactgctgcacgctaaactgtctgacaccaaagttgttgctcgttgcccgaccatgggtccggctaccctggctgaagaacacc
 agtctgggtaccgtttgcaaactgaccagctgaccgtgggtgggtaaccactgcggctgttcggtaaaggttctatcgttacctg
 cgtaaagcttcttgcgaagctaaaaaaaaagctaccgggtcacgtttacgacgctaacaaaatcgtttacaccgttaaagttgaacc
 gcacaccgggtgactacgttgctgtaacgaaaccactctggctgtaaaaccgttctttaccgtttctctgaaaaaccatcctg
 accatgggtgactacgggtgacgtttctctgctgtgccgtgttcttctgggttgacctggctcagaccgttatcctggaactggaca
 aaacctctgaacacctgccgaccgttggcaggttcaccgtgactgggttaacgacctggctctgccgtggaacacgaaggtgc
 tcagaactggaacaacgctgaacgtctggtgaattcgggtctccgcacgctgttaaaggtgacgtttacaacctgggtgaccaga
 ccggtgttctgctgaaatctctggctgggtgttccgggtgctcacatcgacgtaccaataaccactgaaatctgggtcacgttacctg
 cgaagttggcttgaaaaactgaaatgaaaggtctgacctacaccatgtgcgacaaaacaaattcacctggaacgtatcccg
 accgactctgggtcacgacaccgttggatggaagttgcttctctggtaccaaaccgtgccgtatcccgggtcgtgctgtgctcag
 gttctccggacgttaacgttctgctgacacccgaaccgaccatgaaaccaacgggtgggtgttctcagaaatgcagctg
 ccgccgggtgacaacatcatctacgttgggtgaactgtctcaccagtggtccagaaaggttcttctatcggtcgt

公司合成该序列后将其连接至 pUC57 载体，应用 SnapGene 软件设计引物如表 1-4 所示：

表 1-4: TBEV-Ecto 引物序列

Table 1-4: The primer sequences of TBEV-Ecto

引物名称	序列 5'-3'
TBEV-Ecto-F	TTCGGATCCTCTCGTTGCACCCAC
TBEV-Ecto-R	GCAGTCGACACGACCGATAGAAGAACCT

2.1.2 TBEV-Ecto 基因的扩增

以公司合成的 pUC57-TBEV-Ecto 质粒为模板，上述引物、Premix PrimeSTAR MAX 酶等配置反应体系如表 1-5 所示：

表 1-5: TBEV-Ecto PCR 扩增体系

Table 1-5: The reaction for TBEV-Ecto PCR

试剂	体积
2×PrimeSTAR MAX	12.5 μL
pUC57-TBEV-Ecto (100 ng)	0.1 μL
无 RNA 酶水	10.4 μL
TBEV-Ecto-F	0.5 μL

TBEV-Eecto-R	0.5 μ L
合计	25 μ L

PCR 扩增条件为：98°C 5 min；98°C 10 s，61°C 15 s，72°C 15 s，共 30 个循环；72°C 再延伸 5 min。

2.1.3 连接、转 pET28a-TBEV-Eecto 重组载体的鉴定

- 向 PCR 产物中加入 3 μ L 10 \times 核酸上样缓冲液，混合均匀后进行 1% 琼脂糖凝胶电泳，电泳结果于凝胶成像仪中观察；
- 从琼脂糖凝胶切取出片段大小在 1,203 bp 大小的特异性片段；
- 使用天根胶回收试剂盒回收 TBEV-Eecto 片段，测定回收产物浓度；
- 使用 *Bam*HI、*Sal*I 限制性内切酶对回收的 TBEV-Eecto 片段以及 pET28a 载体进行双酶切：37°C 孵育 2 h；
- 使用天根 DNA 回收试剂盒进行回收双酶切后的 TBEV-Eecto 片段以及 pET28a 载体，测定回收产物浓度；
- 将 TBEV-Eecto 片段连接至 pET28a 载体，按表 1-6 配置连接体系于 16°C 过夜连接：

表 1-6: TBEV-Eecto 与 pET28a 连接体系

Table 1-6: The connection reaction for TBEV-Eecto and pET28a

试剂	体积
T4 连接酶	1 μ L
TBEV-Eecto 片段	5 μ L
pET28a 载体	2 μ L
无 RNA 酶水	3 μ L
合计	10 μ L

取连接产物加入 50 μ L DH5 α 感受态中，立即置于冰上 30 min，42°C 热休克 90 s；

- 复壮 1 h 后涂布于 Kana 抗性琼脂板上，放置 5 min 待其晾干，然后培养于 37°C 恒温培养箱中；
- 待其生长约 12 h，拿出平板观察，挑取其中形态较为规则的单克隆菌落，加入至 6 mL 2 \times YT 培养液中（Kana），然后放置于 37°C 恒温摇床中，200 r/min 继续

培养 12-15 h；

- I. 菌液 PCR 初步鉴定，5,000 r/min 离心 2 min 收集正确单克隆菌体，弃去上清，使用天根质粒小量提取试剂盒小量提取质粒，将该质粒进行双酶切，酶切产物经琼脂糖凝胶电泳鉴定后送公司测序；
- J. 测序正确后保存于-20 °C的，构建成功的重组表达载体命名为 pET28a-TBEV-Ecto。

2.2 TBEV-Ecto 蛋白的原核表达、复性及纯化

2.2.1 TBEV-Ecto 的小量诱导表达及可溶性分析

- A. 在冰上解冻 *E. coli* BL21 (DE3) 感受态细胞；
- B. 向装有感受态的离心管中加入 1 μg pET28a-TBEV-Ecto 重组质粒，轻弹底部混匀；
- C. 冰上孵育 30 min；
- D. 42°C金属浴中将感受态热休克 45 s；
- E. 立即将感受态转移至冰上，静置 1 min；
- F. 往感受态中加入 600 μL SOC 培养液，并用封口膜封住管口；
- G. 置于 37°C恒温摇床中以 200 r/min 的转速复壮 1 h；
- H. 提前制备所需的 Kana 抗性的琼脂平板，所含 Kana 为 100 μg/mL；
- I. 复壮的感受态 5,000 g 离心 2min 后弃取 400 μL 上清，剩余液体重悬后涂布于 Kana 抗性的琼脂平板上，于 37°C继续培养 12-18 h；
- J. 挑取形态较为规则的单克隆菌落，加入至 5 mL 含 Kana 抗性的 2×YT 培养液（50 μg/mL）中，于 37 °C恒温摇床中以 200 r/min 转速培养 8-12 h；
- K. 将培养过夜的菌液按 1:50 转接于含 Kana 抗性的 5 mL 2×YT 培养基中，于 37°C恒温摇床中以 200 r/min 转速培养 3-4 h；
- L. 于超净台中吸取少量菌液，使用分光光度计测定菌液 600 纳米处吸光值 A₆₀₀；
- M. 待 A₆₀₀ 约为 0.6 时，加入 IPTG 至终浓度为 1 mmol/L 诱导表达，继续于 37 °C恒温摇床中以 200 r/min 转速培养 4-6 h；
- N. 分别取诱导前后的菌液 5000 g 离心 3 min 收集菌体，弃去上清，加入适量 PBS 后重悬；

- O. 将重悬后的菌体置于冰上，设置参数为 300W、5s、5s，超声 3 min；
- P. 5,000 g 离心 3 min 离心，分离上清与沉淀，沉淀种加入适量 PBS 重悬，分别加入适量 5×蛋白上样缓冲液，于沸水中加热 10 min；
- Q. SDS-PAGE 鉴定重组蛋白表达形式：将制备的样品使用 12%蛋白凝胶中进行电泳，条件为 120V 电泳 90 min，电泳结束后将凝胶放入考马斯亮蓝染色液中，摇床上染色 30 min，结束后加入脱色液进行脱色，间隔 2 h 换脱色液直至条带清晰，凝胶成像仪采集图像。

2.2.2 TBEV-Ecto 蛋白大量表达及复性

- A. 将成功表达以包涵体形式 TBEV-Ecto 蛋白的菌液以 1: 50 的比例转接至含 Kana 抗性的 1 L 2×YT 培养基中，其余操作同小量诱导表达；
- B. 将诱导表达后菌液以 5,000g 离心 10 min 收取菌体，用适量 PBS（加入适量溶菌酶、DNase 及 PMSF）重悬；
- C. 将重悬后的菌体置于冰上，设置参数为 300W、5s、5s，超声 45 min；
- D. 4°C，4,000 g 离心 10 min 后弃去上清，沉淀使用洗涤缓冲液重悬；
- E. 4°C，12,000 r/min 离心 20 min，弃去上清；
- F. 重复上步操作；
- G. 4 °C，12,000 r/min 离心 20 min，弃去上清后置于吸水纸上，待水分吸收完毕后称重；
- H. 按照 35 mL/g 的比例向洗涤完的菌体中加入包涵体溶解缓冲液，置于反转摇床上于 4 °C 溶解 4-6 h；
- I. 12,000 r/min 离心 20 min 去除沉淀，对上清进行 BCA 定量测定蛋白浓度；
- J. 按照 0.5 g 目的蛋白/L 的比例加入预冷复性缓冲液，使用蠕动泵以 0.1 mL/min 的速度将蛋白溶液缓慢加入至复性缓冲液中，在 4 °C 以 30 r/min 搅拌 14-16 h 复性。

2.2.3 TBEV-Ecto 蛋白的纯化

- A. 将复性完的蛋白使用 0.22 μm 一次性针头式过滤器过滤，上 AKTA 超滤仪进行浓缩，使用 10 kD 膜柱，将体积浓缩 20 倍后使用结合缓冲液进行洗滤，洗滤 3-5 次后收获样品；
- B. 使用 Ni-NTA 1 mL 色谱柱进行蛋白纯化，在快速蛋白层析仪（Fast protein flow

chromatography, FPLC) 上进行:

- ① 去离子水清洗管道, 清除残留物。将 Ni-NTA 1 mL 色谱柱点对点连接至系统, 设置流速为 1 mL/min, 清洗预装柱 10 min;
- ② 使用结合缓冲液平衡柱子, 设置流速为 1 mL/min, 运行 10 min;
- ③ 将超滤收获的样品上样, 设置流速为 1 mL/min;
- ④ 使用结合缓冲液洗涤柱子, 设置流速为 1 mL/min, 直至吸光值降至基线水平;
- ⑤ 洗脱: 使用洗脱液进行洗脱, 设置流速 1 mL/min, 按顺序收集洗脱液, 每管收集约 1 mL, 每管吸取少量洗脱液保存;
- ⑥ 使用 10 kD 超滤管对收集的蛋白进行超滤浓缩置换洗脱液: 将洗脱的蛋白加入超滤管中, 4,000g 离心 15 min 后加入适量 PBS, 重复多次后收集样品;
- ⑦ 对纯化完成的蛋白进行 BCA 定量, 分装保存于 -80 °C。

2.2.4 TBEV-Ecto 蛋白的鉴定

A. 将顺序洗脱液以及纯化完成的目的蛋白制样后进行 SDS-PAGE 分析, 操作同前;

B. Western blot 分析:

- ① 将上述制备的 TBEV-Ecto 蛋白以及顺序洗脱液制样后进行 SDS-PAGE 电泳, 操作同第一部分 2.2.1, 然后转移至 PVDF 膜上;
- ② 使用含 50 g/L 脱脂奶粉的 TBST 室温封闭 1 h;
- ③ TBST 洗涤 3 次, 每次 5 min, 加入使用 1:5,000 (TBST) 稀释的兔抗 6×his 抗体, 4 °C 摇床上过夜孵育。
- ④ TBST 洗涤 3 次, 每次 5 min, 加入 1:15,000 (TBST) 稀释的 IRDye® 680RD Goat anti-Rabbit IgG Secondary Antibody;
- ⑤ TBST 洗涤 3 次, 每次 5 min, 最后用 PBS 洗涤一次, 用 Odyssey 双色红外荧光成像系统扫描。

2.3 TBEV-Ecto 蛋白免疫小鼠

A. 准备 5 周龄 BALB/c 雌鼠 5 只, 免疫前 1 天鼠尾采血, 每只取 100 μL;

B. 将 20 μg TBEV-Ecto 蛋白用生理盐水稀释至 50 μL 与 50 μL QuickAntibody-Mouse5W 佐剂充分混匀;

- C. 每只 100 μL 经后腿肌肉注射，对照组注射等体积生理盐水；
- D. 第一次免疫 3 周后进行第二次免疫，免疫剂量和给药方式同第一次；
- E. 第二次免疫 2 周后通过鼠尾采血，每只取 100 μL ，静置 30 min，12,000 r/min 离心 10 min 后分离血清，保存于 -40°C 。

2.4 TBEV-Ecto 蛋白的免疫原性鉴定

为鉴定原核表达 TBEV-Ecto 蛋白免疫小鼠后能否产生 TBEV-Ecto 蛋白特异性抗体，需构建表达 TBEV E 蛋白的质粒，又因研究后期需包装 TBEV-RVP，因此构建表达 TBEV-PrME 的表达载体来对免疫血清进行特异性鉴定。

2.4.1 pCAGGS-TBEV-PrME 载体的构建

- A. 以本教研室保存的 PCI-neo-TBEV-PrME（森张株）质粒为模板，利用 Snapgene 软件设计引物如表 1-7 所示：

表 1-7: TBEV-PrME 引物序列

Table 1-7: The primer sequences of TBEV-PrME

引物名称	序列 5'-3'
TBEV-PrME-F	TTCGAATTCATGGTGGGCC
TBEV-PrME-R	GCAGGTACCTTAGTCGTAC

- B. 以上述模板质粒、引物、Premix PrimeSTAR MAX PCR 酶等配置扩增体系如表 1-8:

表 1-8: TBEV-PrME PCR 扩增体系

Table 1-8: The reaction for TBEV-PrME PCR

试剂	体积
2 \times PrimeSTAR MAX	12.5 μL
PCI-neo-TBEV-PrME (100 ng)	0.1 μL
无 RNA 酶水	10.4 μL
TBEV- PrME-F	0.5 μL
TBEV- PrME-R	0.5 μL
合计	25 μL

PCR 扩增条件为：98 $^{\circ}\text{C}$ 5 min；98 $^{\circ}\text{C}$ 10 s，51 $^{\circ}\text{C}$ 15 s，72 $^{\circ}\text{C}$ 25 s，共 30 个循

环；72 °C再延伸 5 min。

C. TBEV-PrME 与 pCAGGS 使用 *EcoR* I 和 *Kpn* I 双酶切后使用天根通用型 DNA 回收试剂盒进行回收，配置连接体系如表 1-9：

表 1-9: TBEV-PrME 与 pCAGGS 连接体系

Table 1-9: The connection reaction for TBEV-PrME and pCAGGS

试剂	体积
T4 连接酶	1 μ L
TBEV-PrME	5 μ L
pCAGGS 载体	2 μ L
无 RNA 酶水	2 μ L
合计	10 μ L

将连接体系置于 PCR 仪上，设置为 16 °C 孵育 12 h；

- D. 转化及单克隆挑选操作同第一部分 2.1.3（Kana 抗性换为 Amp 抗性）；
- E. 菌液 PCR 初步鉴定，5,000 r/min 离心收集正确单克隆菌体，弃去上清，使用天根质粒小量提取试剂盒小量提取质粒，将该质粒进行双酶切，酶切产物经琼脂糖凝胶电泳鉴定正确后送公司测序；
- F. 测序正确后保存于 -20 °C，构建成功的重组表达载体命名为 pCAGGS-TBEV-PrME。

2.4.2 Western blotting 鉴定免疫血清的特异性

- A. 提前使用含 10 % FBS、1 % 三抗 DMEM 于 5% CO₂、37°C 孵箱培养 293T 细胞；
- B. 将 293T 细胞消化后接种于 6 孔板，汇合度约为 40%；
- C. 继续培养至次日，待其汇合度 80% 左右时转染 pCAGGS-TBEV-PrME 质粒和 pCAGGS 空载：
- ① 将质粒与转染试剂 PEI MAX 以 1: 3（质量：体积）分别用适量无血清 DMEM 培养基稀释，将两者混匀后于室温下孵育 20 min；
 - ② 将 6 孔板中的培养基换为双无 DMEM 培养基；
 - ③ 将前述混合物加入至 293T 细胞中，等待 5 h 后换液为 10 % FBS DMEM；
 - ④ 等待 48 h 后弃取液体，细胞保存于 -80°C。

- D. 将上步所得细胞用 PBS 洗涤 2 遍，每次 3 min；
- E. 每孔加入 100 μ L 适量 RIPA（强），冰上裂解 27 min；
- F. 冰上进行超声，参数为 200W、5S、10S，共超声 2 min；
- G. BCA 定量后加入 5 \times 蛋白上样缓冲液；
- H. Western blot 分析：操作同 2.4.1，使用 1: 200 稀释（TBST）的免疫血清作为一抗，使用 1: 15,000（TBST）稀释的 IRDye® 680RD Goat anti-Mouse IgG Secondary Antibody 作为二抗，用 Odyssey 双色红外荧光成像系统扫描。

2.4.3 免疫荧光鉴定免疫血清的特异性

- A. 提前使用含 10 % FBS、1%三抗的 DMEM 于 5%CO₂、37 °C 孵箱培养 BHK 细胞；
- B. 消化 BHK 细胞，加入培养液重悬后接种于铺有细胞爬片的 24 孔板，密度约为 20%；
- C. 继续培养至次日，待其汇合度为 40%左右时转染 pCAGGS-TBEV-PrME 质粒和 pCAGGS 空载，操作同第一部分 2.4.2；
- D. 48 h 后使用 PBS 洗涤 3 次，每次 5 min；
- E. 加入 4 % PFA，室温固定 15 min，PBS 洗涤 3 次，每次 5 min；
- F. 加入 0.2 % Triton X-100 的 PBS 室温透膜 15 min，PBS 洗涤 3 次，每次 5 min；
- G. 加入 3 % BSA 的 PBST 于 37 °C 封闭 35 min，PBS 洗涤 3 次，每次 5 min；
- H. 加入 1:200 稀释的免疫血清，4 °C 孵育 14-16h，PBS 洗涤 3 次，每次 5min；
- I. 加入 1:300 稀释的 CoreLite® 488 Goat anti-Mouse IgG Secondary Antibody，室温孵育 1 h，PBS 洗涤 3 次，每次 5 min；
- J. 加入 DAPI 对细胞核进行染色，室温孵育 10 min，PBS 洗涤 3 次，每次 5min；
- K. 小心地将爬片抠出，放置于滴有抗荧光淬灭封片剂的载玻片上，然后使用荧光显微镜观察并拍照。

3 结果

3.1 TBEV-Eecto 基因的扩增分析

以合成的 pUC57-TBEV-Eecto 为模板, PCR 扩增 TBEV-Eecto, 产物经 1 % 琼脂糖凝胶电泳分析, 图 1-1 约在 1,200 bp 处可见特异性条带, 符合目的基因预期大小, 可见成功得到了 TBEV-Eecto 基因片段。

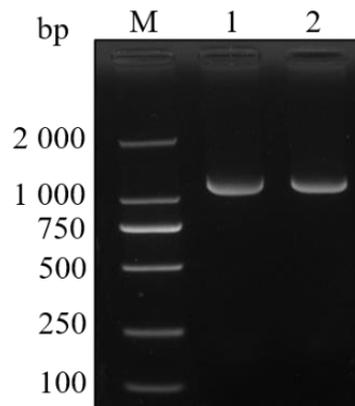


图 1-1: TBEV-Eecto PCR 产物的琼脂糖凝胶电泳分析

M: DL 2,000 DNA marker; 1~2: TBEV-Eecto 的 PCR 扩增产物

Fig 1-1: The PCR products of TBEV-Eecto were analysed by agarose gel electrophoresis

M: DL 2,000 DNA marker; 1~2: PCR products of TBEV-Eecto

3.2 重组质粒 pET28a-TBEV-Eecto 的酶切鉴定

将重组表达载体 pET28a-TBEV-Eecto-进行双酶切验证 (*Bam*H I/*Sal* I), 在 1 % 琼脂糖凝胶电泳分析后, 图 1-2 约在 5,300 bp 和 1,200 bp 处可见特异性条带, 符合 TBEV-Eecto 片段及 pET28a 载体预期大小。测序结果显示与理论序列一致。表明重组质粒 pET28a-TBEV-Eecto 构建成功。

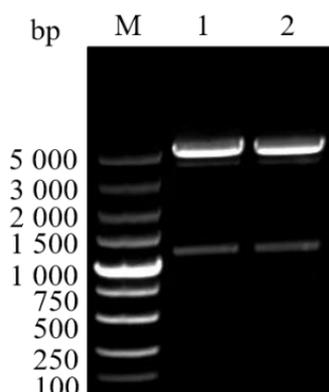


图 1-2: pET28-TBEV-Ecto 的酶切鉴定

M: DL5,000 DNA marker; 1~2: 重组质粒 pET28-TBEV-Ecto 的酶切产物

Fig 1-2: Identification of pET28-TBEV-Ecto by restriction enzyme digestion

M:DL 5,000 DNA Maker; 1~2: pET28-TBEV-Ecto recombinant plasmid digested by restriction enzyme

3.3 TBEV-Ecto 重组蛋白小量诱导表达鉴定

将小量诱导表达的菌体超声破碎后分离上清沉淀，制样后进行 SDS-PAGE 分析，考马斯亮蓝染色脱色后发现目的蛋白主要以包涵体形式表达，图 1-3 在 40 kD-55 kD 中间可见特异性条带，符合目的蛋白分子量大小（分子量为 49.1 kD）。

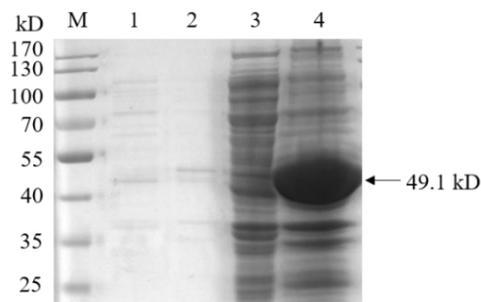


图 1-3: TBEV-Ecto 诱导表达及可溶性分析。

M:蛋白分子质量标准; 1: 未诱导菌体上清; 2: 未诱导菌体沉淀; 3: 诱导后菌体上清; 4: 诱导后菌体沉淀;

Fig 1-3: TBEV-Ecto exprssion and solubility analysis were identified by SDS-PAGE.

M:protein Maker; 1: Uninduced bacterial supernatant; 2: Uninduced bacterial Precipitation; 3: Induced bacterial supernatant; 2: Induced bacterial Precipitation;

3.4 TBEV-Ecto 重组蛋白纯化产物鉴定

3.4.1 TBEV-Ecto 重组蛋白纯化产物的 SDS-PAGE 分析

将大量表达的 TBEV-Ecto 重组蛋白包涵体用 6 mol/L 盐酸胍变性溶解，经 NDSB-201 复性后超滤浓缩及 Ni-NTA 色谱柱亲和层析纯化，将目的蛋白使用超滤管

进行浓缩和洗滤将洗脱液置换为 PBS，将咪唑顺序洗脱的以及最终纯化的目的蛋白分别制样进行 SDS-PAGE 分析，如图 1-4 所示，经包涵体溶解、复性及纯化得到了纯度较高的 TBEV-Eecto 蛋白。

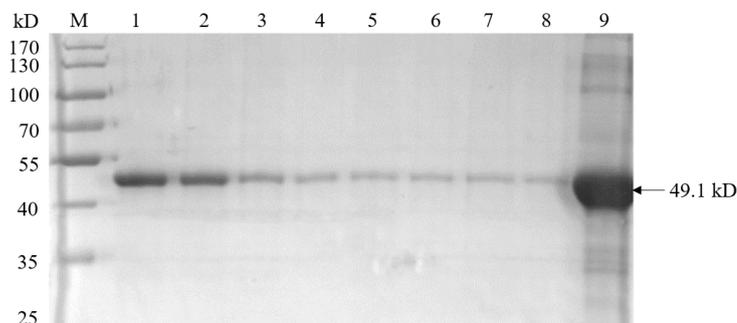


图 1-4: SDS-PAGE 分析纯化的 TBEV-Eecto 蛋白

M: 蛋白分子质量标准; 1-8: 咪唑顺序洗脱的目的蛋白; 9: 纯化后的目的蛋白

Fig 1-4: SDS-PAGE analysis of the purified TBEV-Eecto

M: protein maker; 1-8: Target protein eluted sequentially with imidazole; 9: The target protein after purifying

3.4.2 TBEV-Eecto 重组蛋白纯化产物的 Western blot 分析

将上述纯化的蛋白、诱导表达的菌体及未诱导致样后进行 SDS-PAGE，之后转膜，用兔抗 6×his 抗体作为一抗，使用 1: 15,000 稀释的 IRDye® 680RD Goat anti-Rabbit IgG Secondary Antibody 作为二抗，图 1-5 在诱导菌体沉淀和纯化后蛋白处可见符合目的蛋白大小的特异性条带，未诱导菌体处无条带，再次证明成功纯化得到了 TBEV-Eecto 蛋白，BCA 定量结果显示浓度为 1 mg/mL。

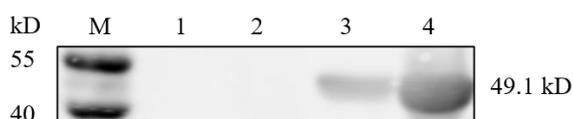


图 1-5: Western blot 分析 TBEV-Eecto 蛋白

M: 蛋白质分子质量标准; 1: 未诱导菌体上清; 2: 未诱导菌体沉淀; 3: 纯化的 TBEV-Eecto 蛋白; 4: 诱导后菌体沉淀。

Fig 1-5: Analysis for TBEV-Eecto proteins by Western blot

M: protein maker; 1: Uninduced bacterial supernatant; 2: Uninduced bacterial Precipitation; 3: Purified TBEV-Eecto protein; 4: Induced bacterial Precipitation.

3.5 pCAGGS-TBEV-PrME 重组表达载体的构建

利用本教研室保存的 PCI-neo-TBEV-PrME (森张株) 质粒为模板，设计特异性引物扩增 TBEV-PrME 基因片段，酶切后克隆至 pCAGGS 质粒，双酶切后进行核酸电泳鉴定，如图 1-6 所示，在约 2,200bp 和 4,700bp 处存在特异性条带，与 TBEV-

PrME 和 pCAGGS 理论大小一致，测序结果进一步证实成功构建了 pCAGGS-TBEV-PrME 重组表达载体。

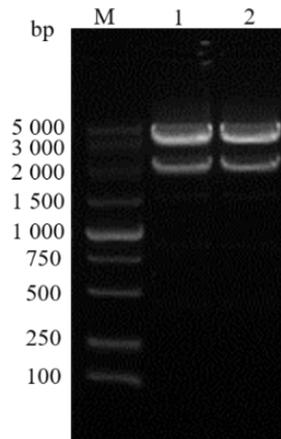


图 1-6: 重组质粒 pCAGGS-TBEV-PrME 的酶切鉴定

M:DNA Maker DL 5,000; 1~2: 重组质粒 pCAGGS-TBEV-PrME 的酶切产物

Fig 1-6: Identification for PCR products of pCAGGS-TBEV-PrME by restriction enzyme digestion

M:DL 5,000 DNA Maker; 1~2: pCAGGS-TBEV-PrME pET28-TBEV-Eecto recombinant plasmid digested by restriction enzyme

3.6 TBEV-Eecto 蛋白的免疫原性鉴定

将 pCAGGS-TBEV-PrME 质粒分别转染 293T 细胞，利用 Western blotting 鉴定 TBEV-Eecto 的免疫小鼠血清中是否存在针对 E 蛋白的多克隆抗体。如图 1-7 所示，Western blotting 实验中，在约 54 kD 处存在特异性条带，符合 E 蛋白分子量大小（53.7 kD），而对照组无条带，结果说明了免疫后小鼠体内存在具有 E 蛋白亲和活性的抗体。

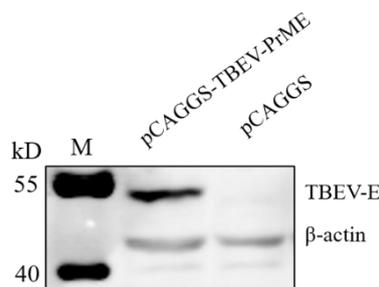


图 1-7 : Western blotting 分析 TBEV-Eecto 蛋白的免疫原性

Fig 1-7: The immunogenicity of TBEV-Eecto were analysed by Western blotting

将 pCAGGS-TBEV-PrME 质粒分别转染 BHK 细胞，利用免疫荧光 IFA 鉴定 TBEV-Eecto 的免疫小鼠血清中是否存在识别 E 蛋白的多克隆抗体。如图 1-8 所示，

TBEV PrME 蛋白表达的 BHK 细胞中可见特异性绿色荧光，pCAGGS 空载转染组无荧光。以上均说明 TBEV-Ecto 蛋白具有良好的免疫原性，免疫小鼠后产生了对应的抗体。

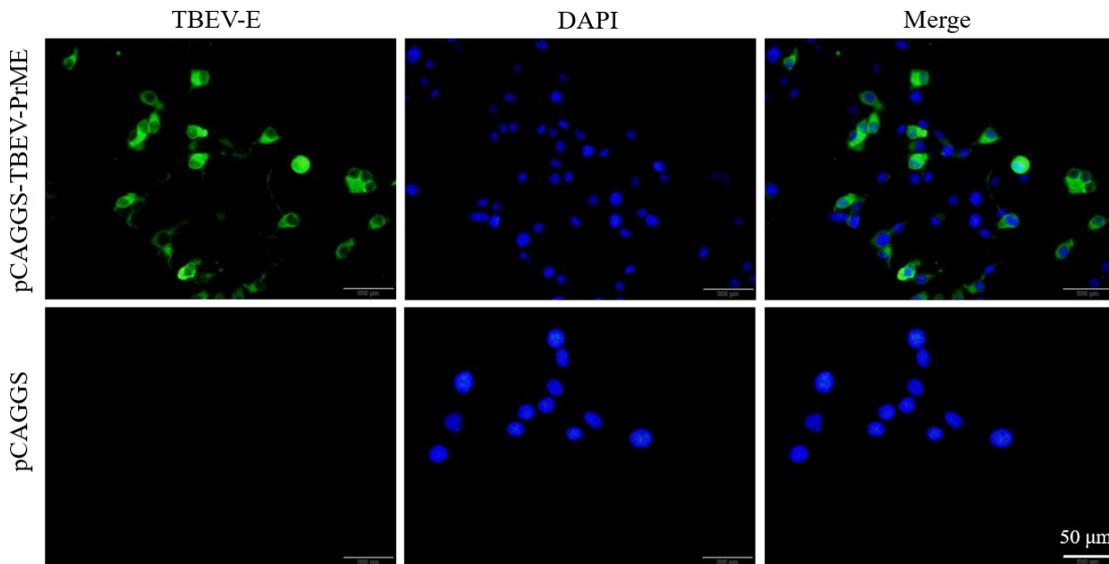


图 1-8: IFA 分析 TBEV-Ecto 蛋白的免疫原性(标尺为 50 μm)
Fig1-8 : The immunogenicity of TBEV-Ecto were analysed by IFA.
(Scale bar=50 μm)

4 讨论

E 蛋白在 TBEV 感染宿主细胞的整个生命周期中发挥着重要作用，成熟 TBEV 的表明 E 蛋白以二聚体形式存在。在病毒附着细胞后进入内吞体，其内的低 pH 诱导了 E 蛋白从同源二聚体重排为三聚体，融合环暴露出来插入细胞膜介导病毒膜和内吞体膜融合，从而释放病毒基因组。在子代病毒成熟过程中，E 蛋白和 PrM 蛋白首先以异二聚体形式嵌于内质网膜中，随后 E-PrM 异二聚体会形成三聚体覆盖于未成熟病毒表面，E 蛋白在进入高尔基复合体及跨高尔基网络时被其中的低 pH 环境诱导重组为人字形排列，Pr 蛋白被弗林蛋白酶切割并导致 E 蛋白融合环的暴露，E 蛋白重组为同源二聚体，未成熟病毒粒子转变为成熟病毒粒子^[76, 77]。E 蛋白在去除跨膜锚定区后的胞外区包含 3 个结构域，DI 中含有对其分泌至关重要的糖基化位点，而 DII 中的融合环介导了病毒粒子与内吞体膜的融合，DIII 具有免疫球蛋白样折叠，有研究表明，针对 E DIII 的中和抗体可阻止低 pH 诱导的 E 蛋白构象变化阻断膜融合^[78]。E 蛋白跨膜锚定区包含了 2 个疏水性的螺旋，这是 E 蛋白在外源表达时不易溶解的原因^[39]。E 蛋白存在着主要的抗原表位，而其跨膜锚定区几乎不存在中和抗

体表位。Allison, S. L 等报道去除跨膜锚定区的 Ecto 重组蛋白作为可溶性 E 蛋白分泌且保留了主要的抗原表位^[79]。

目前 TBEV-E 蛋白已使用多种表达系统成功表达, 包括昆虫细胞表达系统、哺乳动物细胞表达系统、酵母表达系统和原核表达系统。Anu Jääskeläinen 等首次利用重组杆状病毒系统在昆虫细胞中表达了 PrM/M 和 E 蛋白, 获得了分泌到培养基中的 TBEV-VLP^[80]。昆虫表达系统成本昂贵且人力成本过高, 不便推广使用^[80]。Nozyechi N Chidumayo 将兔 IgG Fc 结合域与 TBEV-Ecto 在哺乳动物细胞中融合表达, 保留了 E 蛋白与兔 IgG 的免疫原性^[81]。哺乳动物表达系统表达量低、技术复杂且纯化步骤繁琐, 而且成本也很高。Seok-Min Yun 等毕赤酵母表达系统表达 prME 蛋白, 在上清液中收获了 TBEV-VLP^[68]。酵母表达系统存在目的蛋白分泌效率低、容易形成多聚体等问题。以大肠杆菌为代表的原核表达系统因为其廉价的发酵要求、快速的增殖能力和稳定的高水平表达在重组蛋白的生产中得到了大规模使用^[82, 83]。大肠杆菌 BL21 (DE3) 和 pET 表达系统被认为是大肠杆菌表达重组蛋白的最常用的载体系统, 其主要归因于 BL21 (DE3) 基因组中 λ 噬菌体的 T7 RNA 聚合酶, 它可以特异性识别 pET 质粒上的 T7 启动子, 并以大肠杆菌天然 RNA 聚合酶的 8 倍速度转录^[84]。当 mRNA 被有效翻译时, 目的蛋白可以在 3 小时或更短的时间内积累到总细胞蛋白的 50% 以上^[85]。

国外 Rizzo 等分别成功原核表达 TBEV-Ecto 的报道, 结果显示得到的目的蛋白纯度较高且保留了免疫原性, 且 Dubova 等人的 X 射线衍射分析实验表明, 变性后在一定复性缓冲液中可获得与天然 TBEV-E 结构相似的 TBEV-Ecto^[2, 60]。国内温中华、邴振虹等成功在大肠杆菌中表达了全长 E 蛋白, ELISA 实验显示免疫原性较高, 但并未测试其针对其他黄病毒的交叉反应性^[62, 63]。朱晓磊、王丹等建立了以 E 蛋白 DIII 作为抗原进行快速 ELISA 检测的方法, 此方法能避免同属黄病毒对临床诊断的干扰, 但作为疫苗候选抗原效果不佳^[57, 86]。近年来, 随着结构生物学的进展, 以及蛋白复性技术的改进, 原核表达的重组蛋白也可在复性后恢复其原有构象形成较好的二聚体形式, 而且具有相当好的生物活性。

本研究选用 1953 年从东北某森林脑炎致死的病人脑中分离的 TBEV 森张株为研究对象, 属于 TBEV 远东亚型, 在 TBEV 三个亚型中毒力最强, 致死率最高可达 20%, 在我国批准的 TBEV 疫苗也为森张株灭活后制备^[9]。本研究使用了大肠杆菌

BL21 (DE3) 和 pET 表达系统, 在成功构建 pET28a-TBEV-Ecto 重组表达载体后, 成功地在大肠杆菌中以包涵体形式表达了 TBEV-Ecto, 通过变性裂解包涵体、超滤和亲和层析的获得了纯度较高的 TBEV-Ecto 蛋白, 而且将其免疫小鼠后制备的免疫血清能够识别真核表达的 TBEV PrME 蛋白, 特异性好, 提示 TBEV-Ecto 具有较好的生物活性和免疫原性。鉴于 Ecto 在原核细胞中表达为包涵体, 因此复性对于能否获得具有生物活性的蛋白具有十分重要的作用。本研究尝试了逐步去除变性剂的透析复性法以及加入 HSP、精氨酸盐酸盐及 NDSB-201 等小分子物质帮助折叠使蛋白恢复其原有构象, 最终发现 NDSB-201 复性成功得到具有良好生物活性的 TBEV-Ecto 蛋白。而且, 复性后的超滤浓缩置换复性液的过程中总是有目的蛋白的析出, 经分析为 PBS 的 pH 靠近蛋白的等电点导致, 因此调节 pH 远离 Ecto 的等电点也是获得正确折叠的可溶性蛋白的关键。

本研究成功表达了 TBEV-Ecto, 其具有良好的免疫原性, 为后续制备 TBEV 的单克隆抗体奠定了基础。

第二部分 TBEV-Ecto 蛋白的单克隆抗体制备及鉴定

1 材料

1.1 细胞及病毒

1.1.1 小鼠骨髓瘤细胞 Sp2/0，由本实验室保存。

1.1.2 饲养细胞来源于 BALB/c 小鼠腹腔巨噬细胞。

1.1.3 稳定表达 YFV 复制子的 huh-7 细胞系由本实验室制备。

1.1.4 JEV P3 株、DENV2 16681 株由本实验室保存。

1.2 质粒

1.2.1 pCAGGS-YFV-PrME、pCAGGS-ZIKV-PrME 质粒由本实验室构建保存。

1.3 试剂

实验所用试剂如表 2-1 所示:

表 2-1: 实验试剂

Table 2-1: Experimental reagents

试剂	来源
RIPM 1640 培养基	Corning 公司
抗体亚类鉴定试剂盒、ELISA 封闭液	proteintech 公司
TMB 单组份显色液、ELISA 终止液	索莱宝公司
Lipofectamine 3000 转染试剂	Thermo Fisher Scientific 公司
Nano-Glo® 荧光素酶检测试剂盒	Promega 公司
PEG 8000	Sigma 公司
Hybridoma Feeder 添加因子	博奥龙科技有限公司
50×次黄嘌呤-氨基蝶呤-胸腺嘧啶核苷 (hypoxanthine aminopterin thymidine, HAT)	博奥龙科技有限公司
50×HT	博奥龙科技有限公司
无缝克隆试剂盒	近岸蛋白质科技股份有限公司
protein G 1mL 预装柱	Cytiva 公司

1.4 溶液及相关试剂配制

1.4.1 ELISA 相关溶液

1.4.1.1 10×PBS 缓冲液：精密天平称取氯化钠 8 g、氯化钾 2 g、磷酸氢二钠 14.2 g、磷酸二氢钠 2.7 g 放入烧杯中，加入 800 mL 去离子水不断搅拌溶解，定容至 1L，室温下保存。

1.4.1.2 PBST 缓冲液：取 500 mL PBS 缓冲液加入 250 μ L Tween-20，终浓度为 0.05%，室温下保存。

1.4.1.3 包被液：分别取碳酸钠 1.59 g，碳酸氢钠 2.93 g 至烧杯中，加入去离子水至定容至 1 L，调节 pH 至 9.6，保存于室温。

1.4.1.4 稀释液：取 BSA 1 g，加入 PBST 定容至 1 L，保存于 4 $^{\circ}$ C。

1.4.2 抗体纯化缓冲液

1.4.2.1 结合缓冲液（20mM PBS，pH 7.0）：取 200 mL 10×PBS 加入 2L 烧杯中，加入去离子水定容至 1 L，调节 pH 至 7.0，保存于 4 $^{\circ}$ C。

1.4.2.2 洗脱缓冲液（0.1M 甘氨酸-HCl，pH 2.5）：天平称取甘氨酸 7.51 g 于 2 L 烧杯中，加入去离子水定容至 1 L，浓盐酸调节 pH 至 2.5，保存于 4 $^{\circ}$ C。

1.4.2.3 碱性中和液（1 M Tris-HCl，pH 9.0）：称取 60.57 g Tris 粉剂与烧杯中，加入 400 mL 去离子水搅拌使其充分溶解，定容至 500 mL，使用浓盐酸调节 pH 至 9.0，使用 0.22 μ m 滤器过滤除菌，保存于 4 $^{\circ}$ C。

1.4.3 杂交瘤细胞培养相关溶液

1.4.3.1 HT 培养液：于超净台内量取 10 mL 50×HT、5 mL 100×三抗、100 mL FBS，加入 RIPM 1640 培养基，定容至 500 mL，4 $^{\circ}$ C 保存。

1.4.3.2 HAT 培养液：于超净台内量取 10 mL 50×HAT、5 mL 100×三抗、100 mL FBS，加入 RIPM 1640 培养基，定容至 500 mL，4 $^{\circ}$ C 保存。

1.5 仪器

实验所用仪器如表 2-2 所示：

表 2-2: 实验仪器

Table 2-2: Experimental instruments

仪器	来源
生物安全柜	美国 Jouan 公司
Glomax20/20 发光检测仪	美国 Promega 公司
涡旋振荡器	海门其林贝尔公司

1.6 分析软件

数据分析使用 GraphPad Prism 8.3.0 软件。

2 方法

2.1 小鼠血清抗体的测定

- A. 使用 TBEV-Eecto 原核表达蛋白包被酶标板, 每孔 1 μg , 使用包被液稀释至 100 μL 后加入, 4 $^{\circ}\text{C}$ 包被 16 h, 弃去液体后加入 PBST 洗涤 3 次, 每次 3 min;
- B. 加入 100 μL 5%脱脂奶粉的 ELISA 封闭液, 室温封闭 2 h, 弃去液体, 加入 PBST 洗涤 3 次, 每次 3 min;
- C. 分别加入 100 μL 免疫前及免疫后使用稀释液 1: 1,000 稀释的小鼠血清, 37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 1 h, 弃去液体后使用 PBST 洗涤 3 min, 然后放置在含有吸水纸的毛巾上拍干, 重复 3 次;
- D. 加入 100 μL 使用稀释液 1: 10,000 稀释的 HRP 标记的山羊抗鼠抗体, 37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 50 min, 弃去液体后使用 PBST 洗涤 3 min, 然后放置在含有吸水纸的毛巾上拍干, 重复 3 次;
- E. 加入 100 μL TMB 单组分显色液, 室温显色 5 min, 待显色后加入 50 μL 2 M 硫酸终止显色;
- F. 使用酶标仪测定其 450 nm 处吸光值 OD_{450} 。

2.2 杂交瘤细胞制备

2.1.1 Sp2/0 细胞的培养

- A. 将冻存于液氮中的 Sp2/0 细胞复苏: 取出细胞迅速在 37 $^{\circ}\text{C}$ 水浴锅中融化, 加入适量 10% FBS RPMI-1640 培养基混匀, 1,000 r/min 离心 3 min, 弃上清使用新鲜

培养基重悬细胞，然后置于 5% CO₂ 的 37℃ 恒温培养箱中培养；

- B. 传代培养：待细胞密度接近 100% 时进行传代处理，即使用巴氏管将贴壁细胞吹下，离心去除培养基，后加入适量新鲜培养基重悬后继续培养；
- C. 融合前使用 20% FBS RPMI 1640 培养基进行扩大培养。

2.1.2 饲养细胞的制备

- A. 将 BALB/c 小鼠脱颈处死，浸泡于 75% 乙醇中放置 5 min，然后放入超净工作台，腹部朝上固定于解剖台板上；
- B. 使用镊子夹起小鼠腹部皮肤，用剪刀剪开小口，注意不能剪破腹膜，然后小心翼翼地用手撕开皮肤，充分暴露腹膜；
- C. 使用酒精棉球擦拭腹膜消毒；
- D. 用注射器吸取 8 mL 左右不完全 RPMI-1640 培养基注入腹腔中，反复抽吸数次；
- E. 将腹腔内液体抽出转移至离心管中；
- F. 1,000 r/min 离心 10 min，弃去上清；
- G. 使用少量 HAT 培养液重悬，进行细胞计数，根据细胞密度补加适量 HAT 培养液至细胞密度为 2×10^5 个/mL；
- H. 将稀释完的细胞悬液以每孔 100 μ L 的体积加入至 96 孔细胞培养板中，然后于 5% CO₂ 的 37℃ 恒温培养箱中培养。

2.1.3 细胞融合

- A. 取第一部分 TBEV-Ecto 蛋白免疫的小鼠，选取其中血清 1: 1,000 稀释后效价最高的 2 只小鼠，分别为 1 号和 2 号，麻醉后摘眼球取血，脱颈处死后浸泡于 75% 乙醇中，5 min 后放入超净工作台中固定于解剖台板上；
- B. 用灭菌的剪刀开腹，取出脾脏，放入已经盛有不完全 RPMI-1640 培养基的平皿中洗涤一次，小心操作去除周边组织；
- C. 将 100 目筛网置于提前加入了不完全 RPMI-1640 离心管上，将脾脏置于筛网上，一边使用玻璃棒研磨一边滴加不完全 RPMI-1640 培养基，使脾细胞通过网孔透过至离心管中；
- D. 1,000 r/min 离心 5min，弃去上清；
- E. 用不完全 RPMI-1640 洗涤脾细胞一次，离心弃去上清后重悬；

- F. 取脾细胞悬液 20 μL ，加入等量台盼蓝染液后进行活细胞计数；
- G. 将提前扩大培养的 Sp2/0 细胞吹下，离心弃去上清，重悬后进行活细胞计数；
- H. 分别取 2 只小鼠各 1×10^8 个脾细胞与 3×10^7 个 Sp2/0 细胞悬液，各于一个离心管中补加适量不完全 RPMI-1640 后轻轻吹打混匀；
- I. 1,000 r/min 离心 7 min，弃去上清，轻弹管底使细胞尽量松散；
- J. 吸取约 750 μL PEG 1,500 (50%, w/v) 缓慢加入离心管中，期间不断转动离心管，时间控制在 60 S 左右，然后立即用约 30 S 时间将细胞悬液吸入吸管内，静置 30 S 后用 30 S 的时间吹回至离心管中；
- K. 用 5 min 时间加入 25 mL 不完全 RPMI-1640，800 r/min 离心 7 min，弃去上清；
- L. 缓慢加入 10 mL HAT 培养基，吹打混匀，切记动作轻柔；
- M. 将上述细胞悬液加入已铺有饲养细胞的 96 孔培养板中，然后于 5% CO_2 的 37 $^\circ\text{C}$ 恒温培养箱中培养。

2.3 杂交瘤细胞的选择性培养

- A. 将融合后的细胞于 HAT 培养液中培养 7 d 左右，间隔 2-3 d 需进行换液处理，在换液时小心地从上面吸取 1/2 培养液，然后补加等量新鲜培养液，期间不断观察细胞状况；
- B. 在 7-14 d 使用 HT 培养液，同样间隔 2-3d 需进行换液处理，方法也为半换液；
- C. 14 d 看情况是否将 HT 培养液换为 20% FBS RPMI 1640 培养基继续培养。

2.4 克隆化

- A. 细胞融合后 16 d 左右，进行间接 ELISA 检测，使用 1 μg /孔 TBV-Ecto 蛋白作为抗原包被酶标板，取杂交瘤细胞上清检测其效价，对阳性孔中的细胞进行克隆化；
- B. 将 96 孔板中待克隆化的杂交瘤细胞用巴氏管吹下，取细胞悬液进行计数；
- C. 取 160 个细胞量的悬液，加入含有添加因子的 HT 培养液至 1.6 mL 吹打混匀，在新的 96 孔板中的 8 个孔中每孔加入 100 μL 细胞悬液；
- D. 继续补加培养液至 1.6 mL 吹打混匀，在新的 96 孔板中的 8 个孔中每孔加入 100 μL 细胞悬液；
- E. 重复上步操作 4 次；

- F. 将克隆化完成的细胞置于 5% CO₂ 的 37°C 恒温培养箱中继续培养;
- G. 适时进行换液和观察细胞状态, 待细胞形成单克隆后检测, 尽量选取阳性孔中单个克隆的细胞进行再次克隆化, 操作同前。

2.5 单克隆抗体腹水效价测定

- A. 经过共计 4 次克隆化之后筛选出 6 株细胞上清效价较高且为单克隆的杂交瘤细胞, 于 T25 细胞培养瓶中培养;
- B. 领取 6 W 左右的 BALB/c 雌鼠, 腹腔注射 500 μ L 经高压灭菌的液体石蜡;
- C. 1 W 后将生长状态良好的阳性杂交瘤细胞从培养瓶吹下, 1,000 r/min 离心 3 min, 弃上清后用无血清 1640 重悬, 进行细胞计数, 每只小鼠腹腔注射约 1×10^6 个细胞, 体积控制在 500 μ L;
- D. 等待 1-2 W 左右, 将腹腔明显胀大, 毛发蓬松的小鼠处死, 将小鼠固定于解剖板上, 小心翼翼地剪开腹腔后使用塑料吸管吸取腹水, 10,000g 离心 5 min 后取上清, 分装后保存于 -80°C;
- E. 使用 1 μ g/孔 TBEV-Eecto 蛋白作为抗原包被酶标板, 首次将腹水以 1: 10 稀释, 然后进行 10 倍梯度稀释作为一抗进行间接 ELISA 法测定其效价, 操作同第二部分 2.1。

2.6 单克隆抗体亚型鉴定

- A. 从 4°C 中取出鼠单克隆抗体亚型鉴定试剂盒, 室温条件下平衡 30 min;
- B. 配置 $1 \times \text{IgA} + \text{IgM} + \text{IgG} - \text{HRP} : 10 \mu\text{L} 100 \times \text{羊抗鼠 IgA} + \text{IgM} + \text{IgG} - \text{HRP} + 990 \mu\text{L} 1 \times \text{PBST}$;
- C. 腹水使用 PBST 以 1: 10^5 稀释后加入至孔中;
- D. 将 $1 \times \text{羊抗鼠 IgA} + \text{IgM} + \text{IgG} - \text{HRP}$ 加入样品孔中, 50 μ L/孔。将板子置于摇床上慢速振荡混匀, 也可用手轻轻敲击板架两侧 1 min;
- E. 盖上封板膜, 室温孵育 1 h;
- F. 弃去孔内液体, $1 \times \text{PBST}$ 洗板 3 次, 置于含有吸水纸的毛巾上拍干;
- G. 配置显色液, A 液: B 液=1:100 后将现配的显色液加入孔中, 100 μ L/孔;
- H. 室温避光显色 15 min。加入终止液, 100 μ L/孔;
- I. 结果可用肉眼观察, 颜色最深的孔为对应亚型。

2.7 单克隆抗体特异性测定

2.7.1 Western blotting 鉴定单克隆抗体的特异性

pCAGGS-TBEV-PrME 质粒转染 BHK 细胞，其余操作同第一部分 2.4.2，一抗使用 6 株单克隆抗体腹水，使用 TBST 以 1: 100 稀释。

2.7.2 免疫荧光鉴定免疫血清的特异性

操作同第一部分 2.4.3，一抗使用 6 株单克隆抗体腹水，使用 PBS 以 1: 200 稀释。

2.8 免疫荧光测定单克隆抗体交叉反应性

- A. 将 BHK 细胞消化后接种于铺有细胞爬片的 2 个 24 孔细胞培养板，密度约为 20%;
- B. 继续培养至次日，待其密度为 40% 左右时，换液为无血清 DMEM，一部分细胞转染 pCAGGS-YFV-PrME、pCAGGS-ZIKV-PrME 质粒和 pCAGGS 空载，转染试剂为 PEI MAX，其余操作同第一部分 2.4.3；另外一部分细胞换液为无血清 DMEM，于生物安全柜中分别感染 JEV 和 DENV2，MOI 分别为 2 和 0.1，2 h 后换液为 5% FBS DMEM 维持液；
- C. 其余操作同第一部分 2.4.3，将 6 株单克隆抗体腹水以 1: 200 稀释后分别鉴定其是否可结合 YFV、ZIKV、JEV 和 DENV2 的 E 蛋白。

2.9 单克隆抗体纯化及鉴定

- A. 将小鼠腹水与结合缓冲液 1: 10 稀释后使用 0.22 μm 针头式过滤器过滤；
- B. 运行 FPLC, 以 20 mL/min 的速度使用去离子水洗泵，然后以 1 mL/min 的速度洗涤管道，清除残留物。然后在泵运行的状态下将 protein G 1 mL 预装柱点对点连接至系统，设置流速为 1 mL/min，清洗预装柱 10 min；
- C. 使用结合缓冲液平衡柱子，设置流速为 1 mL/min，运行 10 min；
- D. 过滤后的样品上样，设置流速为 0.5 mL/min；
- E. 使用结合缓冲液洗涤柱子，设置流速为 1 mL/min，直至其 280nm 处吸光值 A_{280} 降至基线水平；
- F. 洗脱：使用洗脱液进行洗脱，设置流速 1 mL/min，按顺序收集洗脱液，每管收集约 500 μL ，迅速加入碱性中和液调节 pH 至 7.0；

- G. 对纯化完成的抗体进行 BCA 定量，分装保存于 -80°C；
H. 将抗体制样后进行 SDS-PAGE 鉴定，操作同第一部分 2.2.1。

2.10 TBEV-RVP 的包装及检测

2.10.1 pCAGGS-TBEV-C 重组载体的构建

查阅文献，包装 TBEV-RVP 需反式提供其结构蛋白基因至稳定表达带有报告基因的复制子细胞，前述已成功构建 pCAGGS-YFV-PrME，因此需构建 TBEV-C 表达载体，于 NCBI 网站获得 TBEV 森张株（GenBank 查询号 AY182009.1）的 C 基因后，对其进行密码子优化后交由公司合成，基因长度为 288 bp。

```
atggctggaaaggccatcctgaaaggcaaaggcggcgccctcctagaagagtgagcaaagaaaccgccagaaagaccaga
cagagcagagtgcatgcccacggcctggtgctgatgagaatgctgggaatcctgtggcatgccgtggctggaaccgctag
aagccctgtgctgaaaagcttctggaacagcgtgccctgaagcaggccatggctgctctgagaaagatcaagaaggccgtga
gcaccctgatggtgggactgcagagaagaggcaagagaaga
```

- A. 应用 SnapGene 软件设计引物如下表 2-3:

表 2-3: TBEV-C 引物序列

Table 2-3: The primer sequences of TBEV-C

引物名称	序列 5'-3'
TBEV-C-F	TTCGAATTCATGGTGGGCC
TBEV-C-R	GCAGGTACCTTAGTCGTAC

- B. 以公司合成的 TBEV-C-pUC57 为模板、引物、Premix PrimeSTAR MAX PCR 酶等配置反应体系如表 2-4:

表 2-4: TBEV-C PCR 扩增体系

Table 2-4: The reaction for TBEV-C PCR

试剂	体积
2×PrimeSTAR MAX	12.5 μL
pUC57-TBEV-C (100 ng)	0.1 μL
无 RNA 酶水	10.4 μL
TBEV- C-F	0.5 μL
TBEV- C-R	0.5 μL
合计	25μL

PCR 扩增条件为：98°C 5 min；98°C 10 s，58°C 15 s，72°C 3 s，共 30 个循环；

72°C再延伸 5 min。

C. 2%琼脂糖凝胶电泳鉴定 PCR 产物

D. TBEV-C 的 PCR 产物与 *EcoR* I 和 *Kpn* I 双酶切后的 pCAGGS 载体使用天根通用型 DNA 回收试剂盒回收，配置连接体系表 2-5:

表 2-5: TBEV-C 与 pCAGGS 连接体系

Table 2-5: The connection reaction for TBEV-C and pCAGGS

试剂	体积
NovoRec®PlusRecombinase	1 μ L
5×Reaction Buffer	4 μ L
TBEV-C	6 μ L
pCAGGS 载体	2 μ L
无 RNA 酶水	7 μ L
合计	20 μ L

将连接体系置于 PCR 仪上，设置为 50 °C 孵育 10 min;

E. 转化及单克隆挑选操作同第一部分 2.1.3;

F. 将小量提取的重组质粒进行双酶切鉴定，鉴定正确的质粒送公司测序;

G. 将测序正确的重组质粒保存于 -20 °C，命名为 pCAGGS-TBEV-C。

2.10.2 TBEV-RVP 的包装

A. 复苏本室构建及保存的稳定表达 YFV 复制子的 huh-7 细胞，由于其带有报告基因纳米荧光素酶 (Nano Luciferase, Nluc)，因此命名为 YFV-Rep-Nluc;

B. 使用 20% FBS DMEM 将 YFV-Rep-Nluc 细胞培养至密度约为 80 % 时换液为 OPTI-MEM 培养基;

C. 将 pCAGGS-TBEV-PrME 和 pCAGGS-TBEV-C 质粒 (比例为 1: 1) 用适量 OPTI-MEM 稀释后加入 P3000 混合后置于一个 EP 管中，将 Lipofectamine 3,000 同样用适量 OPTI-MEM 稀释后置于另一个 EP 管中，将两者混合后室温静置 25 min。

D. 6 h 后换液为 10% FBS DMEM 维持液;

E. 48 h 后收取上清，1,000 g 离心 3 min，使用 0.22 μ m 一次性针头式滤器过滤后分装保存于 -80°C。

2.10.3 TBEV-RVP 的检测

- A. 消化 BHK 细胞后进行细胞计数，分别以 5,000、10,000、15,000 个/孔的密度接种于 96 孔板中，继续培养 24 h；
- B. 感染：将 96 孔板中的 BHK 细胞换液为无血清 DMEM，取出保存于-80℃的含有 TBEV-RVP 的细胞上清于 37℃水浴锅中快速解冻融化，分别向 3 个不同细胞密度的孔中分别加入 0、40、80、160 μL ，体积不足 160 μL 的用无血清 DMEM 补齐；
- C. 2 h 后换液为 10% FBS DMEM；
- D. 48 h 后取出 96 孔板，在室温下平衡 10 min，弃去细胞上清，用 PBS 洗涤 2 次，每次 5 min，然后弃去 PBS；
- E. 取出于-20℃保存的 Nano-Glo® 荧光素酶检测试剂盒在在室温下平衡 10 min，将裂解液以 100 μL 加入至 96 孔板的细胞中，室温裂解 15 min；
- F. 吸出裂解液，5,000 g 离心 5 min；
- G. 准备检测液：将检测底物与检测缓冲液以 1：50 的比例混合；
- H. 取 10 μL 裂解液与 10 μL 检测液混合，静置 3 min 待其反应；
- I. 用 Promega 发光仪检测 RLU 值。

2.11 单克隆抗体中和活性测定

为测定单抗的中和活性，选择微量中和试验（Micro neutralization assay, MN）来进行测定，首先我们为了测定单抗是否存在中和活性，仅使用一种抗体浓度即每孔加入 20 ng 单抗，将其与第二部分 2.10.2 中所包装的 TBEV-RVP 孵育后感染细胞，通过在感染后 48 h 比较加入单抗和未加入单抗组的 RLU 值判断是否具有中和活性，具体操作如下：

- A. 消化 BHK 细胞后进行细胞计数，以 10,000 个/孔的密度接种于 96 孔板中，继续培养 24 h；
- B. 将 5 株单克隆抗体无血清 DMEM 外均稀释至 0.4 ng/ μL ，使用 0.22 μm 针头式过滤器过滤除菌，分别取 50 μL 稀释后的抗体与 50 μL TBEV-RVP 混合后用涡旋振荡器混匀，同时将 50 μL TBEV-RVP 与 50 μL PBS 混合作为对照，所有组于 37℃孵育 1 h；

- C. 96 孔板中的 BHK 细胞进行换液为无血清 DMEM, 将上步得到的抗体-RVP 混合组及对照组分别加入至各个孔中, 每组均做 2 个复孔;
- D. 2 h 后换液为 10% FBS DMEM;
- E. 48 h 后测定 RLU 值, 操作同第二部分 2.10.3。

3 结果

3.1 小鼠血清中抗体及单克隆抗体腹水效价测定

3.1.1 小鼠血清抗体的测定

将小鼠免疫前后血清经 1: 1000 稀释后使用间接 ELISA 法测定, 如表 2-6 所示, 小鼠在免疫后血清中存在与 TBEV-Ecto 特异性反应的多克隆抗体, 所有免疫小鼠血清经 1: 1,000 稀释后仍为阳性, 表明 TBEV-Ecto 原核表达蛋白的免疫原性较好。

表 2-6: ELISA 测定 TBEV-Ecto 蛋白免疫小鼠前后血清 1: 1000 的 OD_{480nm} 值
Table 2-6: Detection of OD_{480nm} value of immunized serum at 1: 1000 before and after immunization by ELISA

小鼠	免疫前	免疫后
1	0.086	2.400
2	0.073	2.314
3	0.084	2.314
4	0.061	1.933
5	0.056	1.7925

3.1.2 单克隆抗体腹水效价测定

经过选择性培养和 4 次克隆化后, 取单克隆杂交瘤细胞进行间接 ELISA 检测法筛选出 6 株阳性杂交瘤细胞系, 分别为 2H8H4、3C5D4、4H10D4、4H3B11、2B11H4、2E3G6, 均可分泌针对 TBEV-Ecto 的特异性抗体, 将其扩大培养后腹腔注射小鼠, 取小鼠腹水测定其效价, 结果如表 2-7 所示 2H8H4 和 2E3G6 的效价 1: 10³, 3C5D4、4H10D4、4H3B11 和 2B11H4 的效价为 1: 10⁶。

表 2-7: 间接 ELISA 法检测单克隆抗体腹水效价
Table 2-7: Detection of titer of monoclonal antibody in ascites by indirect ELISA

稀释倍数	2H8H4	3C5D4	4H10D4	4H3B11	2B11H4	2E3G6	阳性对照	阴性对照
10 ²	0.577	1.156	1.163	1.246	1.135	0.736	1.422	0.070
10 ³	0.148	1.127	1.053	1.244	1.132	0.289	1.055	0.051

10^4	0.062	1.118	1.050	1.087	1.096	0.096	N/A	N/A
10^5	0.047	0.574	0.567	0.743	0.997	0.056	N/A	N/A
10^6	0.089	0.231	0.186	0.234	0.428	0.046	N/A	N/A
10^7	0.045	0.066	0.061	0.074	0.119	0.044	N/A	N/A
10^8	0.045	0.046	0.047	0.049	0.056	0.047	N/A	N/A
10^9	0.045	0.0045	0.046	0.045	0.048	0.049	N/A	N/A

3.2 单克隆抗体亚型鉴定

分别取 6 株单克隆抗体腹水鉴定其抗体亚型，结果显示 2H8H4 和 2E3G6 的抗体亚型为 IgG1 型，而 3C5D4、4H10D4、4H3B11、2B11H4 均为 IgG2b 型，6 株单克隆抗体的轻链均为 κ 链，结果如图 2-1 所示。

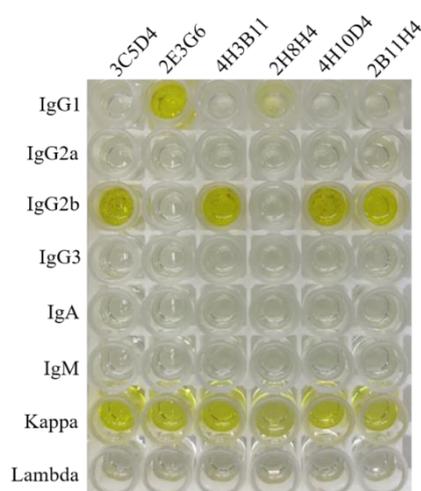


图 2-1：单克隆抗体亚型鉴定

Fig 2-1: Identification of monoclonal antibody subtypes

3.3 单克隆抗体特异性测定

3.3.1 Western blotting 鉴定单抗特异性

pCAGGS-TBEV-PrME 重组载体和 pCAGGS 空载分别转染 293T 细胞，制样后进行 Western blotting 鉴定，6 株单抗腹水作为一抗，如图 2-2 所示，2E3G6 株单抗可结合 TBEV-E 蛋白上的线性表位，其它单抗则不能结合。

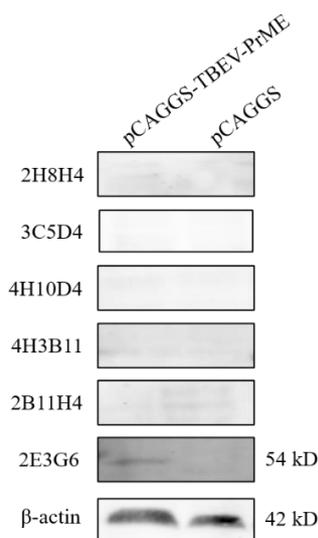


图 2-2: Western blotting 鉴定单抗特异性

Figure 2-2: Identification of monoclonal antibody specificity by Western blotting

3.3.2 免疫荧光鉴定单抗特异性

pCAGGS-TBEV-PrME 转染 BHK 细胞，取细胞爬片进行 IFA 鉴定，6 株单抗腹水作为一抗，如图 2-3 所示，2H8H4、3C5D4、4H10D4、4H3B11、2B11H4 等 5 株单抗均可结合 TBEV-E 蛋白上的构象表位，结果表明 TBEV-Ecto 原核蛋白经复性后恢复天然构象，免疫小鼠产生的单抗不仅可结合 TBEV-E 蛋白上的线性表位也可结合其构象表位。

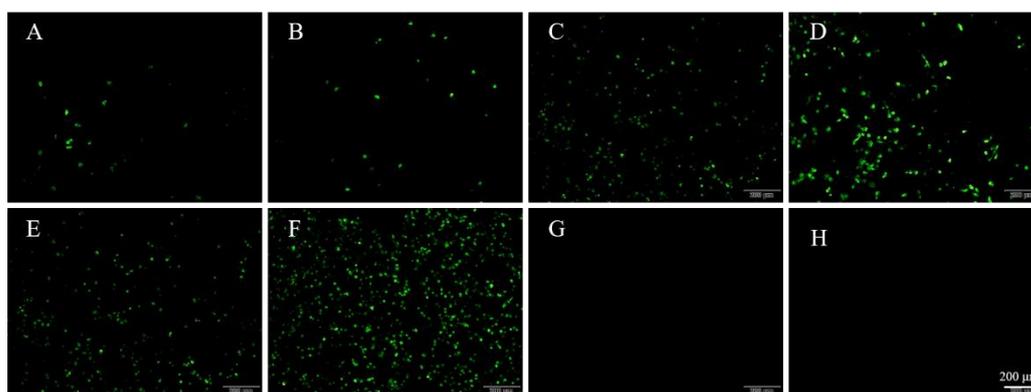


图 2-3: IFA 鉴定单抗特异性 (标尺为 200 μm)

Figure 2-3: Identification of monoclonal antibody specificity by IFA
(Scale bar=200 μm)

A:2H8H4; B:3C5D4; C:4H10D4; D:Postive Control; E:4H3B11; F: 2B11H4;
G:2E3G6; H: Negative Control

3.4 单克隆抗体交叉反应性测定

一部分 BHK 细胞转染 pCAGGS-YFV-PrME、pCAGGS-ZIKV-PrME 质粒和

pCAGGS 空载，另外一部分分别感染 JEV 和 JEV，使用 6 株单抗的腹水稀释后作为一抗，免疫荧光测定其交叉反应性，如图 2-4 所示 2H8H4 株与 JEV 存在交叉反应，3C5D4 与 JEV 和 DENV2 存在交叉反应性，4H10D4 与 DENV2 存在交叉反应，4H3B11 与 JEV 和 DENV2 存在交叉反应性，2B11H4 与 JEV 存在交叉反应，2E3G6 与 JEV、DENV2、YFV 以及 ZIKV 均不存在交叉反应。

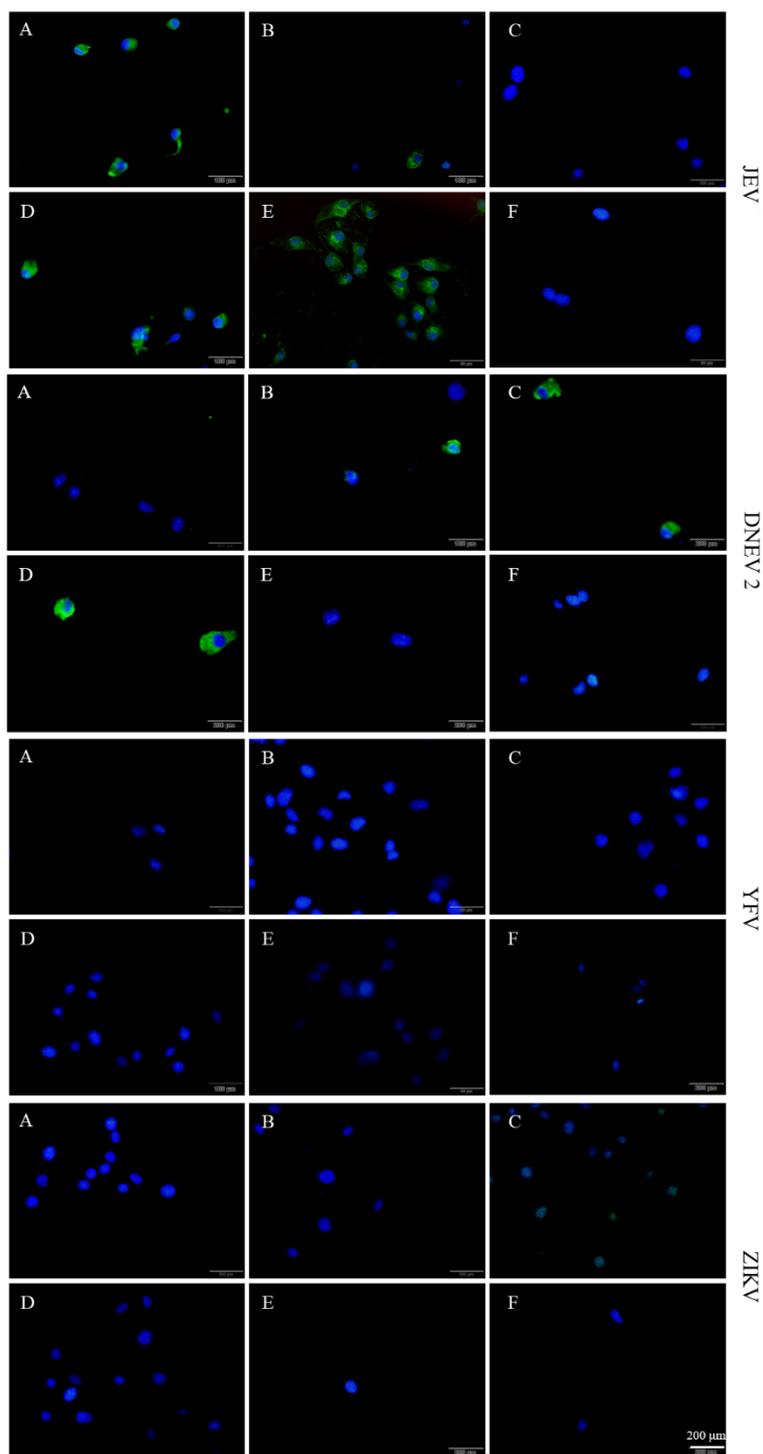


图 2-4: IFA 鉴定单抗的交叉反应性 (标尺为 200 μm)

Fig 2-4: Identification cross-reactivity of monoclonal antibodies by IFA
(Scale bar=200 μm)

A:2H8H4; B:3C5D4; C:4H10D4;D:4H3B11; E: 2B11H4; F:2E3G6;

3.5 单克隆抗体的纯化及鉴定

使用 protein G 1 mL 预装柱对腹水进行亲和层析纯化, 但 2H8H4 株腹水在洗脱

时在 280 nm 处的吸光值 A_{280} 始终为基线水平，无法得到单抗，经分析 2H8H4 株腹水效价较低导致抗体水平低下，柱子上结合的抗体含量过低而无法纯化成功，其余 5 株单抗都成功纯化，抗体的 SDS-PAGE 鉴定如图所示，每个泳道都存在一个约 25 kD 而另一个约 48 kD 的特异性条带，符合 IgG 抗体轻链和重链的大小，表明抗体纯化成功。

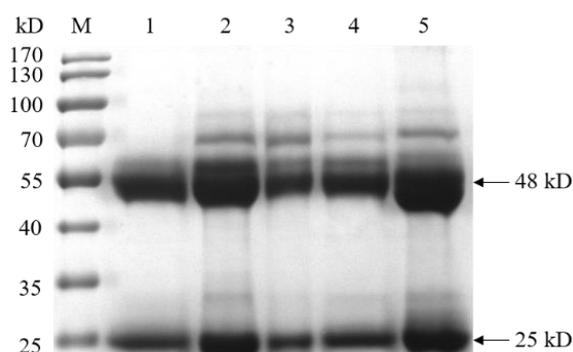


图 2-5: SDS-PAGE 鉴定纯化后的抗体

Figure 2-5: Identification of the purified antibodies by SDS-PAGE

M:Protein maker; 1: 4H10D4; 2: 4H3B11; 3: 3C5D4; 4: 2B11H4; 5: 2E3G6;

3.6 pCAGGS-TBEV-C 重组表达载体的酶切鉴定

将少量提取的 pCAGGS-TBEV-C 重组表达载体进行双酶切 (*EcoR* I/*Kpn* I)，然后将酶切产物进行 1.5% 琼脂糖凝胶电泳，如图 2-6 所示在约 5,000 bp 和 250 bp 处存在特异性条带，符合 pCAGGS 载体和 TBEV-C 片段理论大小，测序结果证实成功将 TBEV-C 克隆至 pCAGGS 载体，因此表明成功构建了 pCAGGS-TBEV-C 重组表达载体。

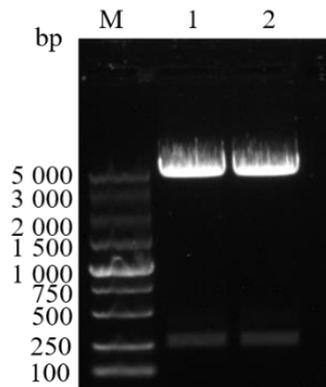


图 2-6: 重组质粒 pCAGGS-TBEV-C 的酶切鉴定

M:DL 5,000 DNA Maker; 1-2: 重组质粒 pCAGGS-TBEV-C 的酶切产物

Fig 2-6: Identification of pCAGGS-TBEV-C by restriction enzyme digestion

M:DL 5,000 DNA Maker; 1-2: pCAGGS-TBEV-C recombinant plasmid digested by restriction enzyme

3.7 TBEV-RVP 的检测

为测定 TBEV-RVP 的感染活性，将包装出的 TBEV-RVP 以不同体积感染 96 孔培养板前一天接种细胞数不同的 BHK 细胞，在感染 48 h 后通过测定其 RLU 值来判断 TBEV-RVP 的感染效率，如表 2-8 所示，随着 TBEV-RVP 加入量的增多，被感染细胞的 RLU 值也随之上升，相较于对照组变化明显；而相较于前一天接种 5,000 个细胞，接种 10,000 个或 15,000 细胞进行感染 TBEV-RVP 的 RLU 值随加入量的变化更为明显，因此提示我们在使用 TBEV-RVP 代替活病毒感染时，在 96 孔板中提前一天接种 10,000 个/15,000 个细胞的感染效率更高，本实验也说明了成功包装出了存在感染活性的 TBEV-RVP。

表 2-8: TBEV-RVP 感染 BHK 细胞的 RLU 值测定

Table 2-8: Determination of RLU value of TBEV-RVP infected BHK cells

RVP 加入体积 (μL) / 接种细胞数	5000	10000	15000
0	146	197	208
40	694	73,066	128,798
80	195,736	292,559	1,709,539
160	1435,957	12,453,207	8,599,151

3.8 单克隆抗体中和活性测定

为测定制备的 5 株单克隆抗体的中和活性，使用本研究包装出的 TBEV-RVP 进行微量中和实验。首先提前一天于 96 孔板中接种 10,000 个 BHK 细胞，每孔加入 20 ng (50 μL) 单抗以及 50 μL TBEV-RVP 的方案进行初步尝试，在将单抗与 TBEV-

RVP 混合后在 37 °C 孵育 1h 后感染 BHK 细胞，同时做加入 50 μ L TBEV-RVP 与 50 μ L PBS 混合的对照组，在感染 48 h 后通过测定其 RLU 值来判定单抗是否存在中和活性，如图所示，对 5 株单抗-TBEV-RVP 混合物感染 BHK 细胞后 48 h 的 RLU 值与单纯加入 TBEV-RVP 组进行单因素方差分析比较，结果显示无统计学差异，提示纯化的 5 株单抗均不存在中和活性。

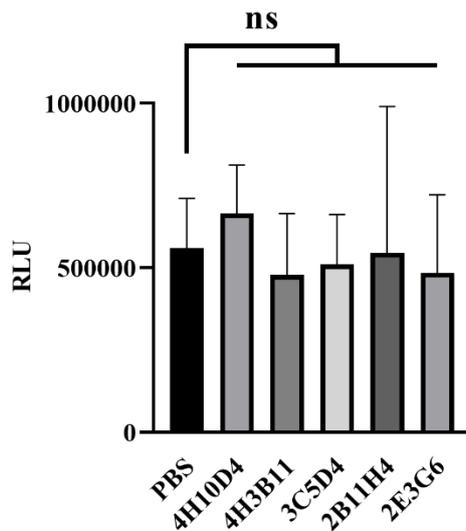


图 2-7：微量中和试验的 RLU 值测定

Figure 2-7: Determination of RLU value in microneutralization test

4 讨论

近年来随着旅游业的发展也增加了人们感染蜚传 TBEV 的风险，而其特异性药物尚未研发成功，黄病毒成员之间的交叉反应给森林脑炎的诊断与中和抗体的研制带来了更多困难。因此，制备 TBEV 的单克隆抗体将为其防控提供重要基础。

目前抗体的制备技术快速发展，从杂交瘤到抗体库筛选再到单 B 细胞测序技术，为研制针对目的抗原的特异性抗体提供了多种选择^[87]。鼠源单克隆抗体制备技术仍然是当今最为经典的技术，它主要是基于 1975 年 Kohler 和 Milstein 研发的杂交瘤技术，使得抗体的制备由多克隆抗体走向单克隆抗体。其基本原理在于使用 PEG 等方法促进免疫小鼠的脾细胞与小鼠骨髓瘤细胞进行融合，然后选择并克隆阳性的单克隆杂交瘤细胞，最后将其注射小鼠产生腹水后从中纯化出单克隆抗体^[88]。鼠源单克隆抗体技术具有抗体多样性高、效价高、易制备、成本低廉等优势，已经广泛应用于感染性疾病、自身免疫疾病以及癌症的诊断和治疗制剂的开发^[89]。

在抗体制备方面，抗原选择和佐剂运用有着十分重要的作用。本研究在第一部分利用大肠杆菌已经表达了 TBEV-Eecto 蛋白，而且已证实其具有良好的免疫原性。在免疫动物佐剂方面，弗氏佐剂(Freunds Adjuvant)是目前动物免疫实验中最常用的佐剂，它又可分为完全弗氏佐剂和不完全弗氏佐剂。弗氏佐剂是在 20 世纪 40 年代由 Jules Freund 发明，其原理在于可以使抗原持续缓释，同时又能非特异性地增强机体对抗原的特异性免疫应答，增强相应抗原的免疫原性或改变免疫反应类型^[90]。与常规使用的弗氏佐剂相比，QuickAntibody 免疫佐剂具有免疫周期短、针次少、无需乳化、抗原用量低、抗体滴度高、抗体亲合力高、易获得构象型表位的抗体等多方面优点。本研究中采用了该佐剂，5 周免疫即达到了较好的免疫效果。

本研究利用前述制备的 TBEV-Eecto 原核蛋白免疫小鼠的脾细胞经融合后得到了杂交瘤细胞，对其进行选择性和克隆化培养后，我们使用间接 ELISA 法快速筛选出 6 株阳性杂交瘤细胞系，将杂交瘤细胞注射小鼠后获取了腹水，亚型鉴定表明 6 株单抗均为 IgG 型，间接 ELISA 法测定腹水效价显示 4 株单抗效价可达 $1:10^6$ ，2 株仅为 $1:10^3$ ，原因可能为部分杂交瘤细胞培养过程中表达抗体能力丢失。利用真核表达的 TBEV-PrME 测定其识别表位的特点，结果显示 1 株单抗可结合 TBEV-E 蛋白的线性表位，而其他 5 株可结合构象表位，提示 Eecto 原核蛋白经复性后其空间结构得到较好的折叠。IFA 鉴定其交叉反应性，除 2E3G6 外，5 株单抗中均存在与 JEVD、DENV2、YFV 反应的单抗。这一结果提示本研究制备的单抗针对的抗原表位可能多数位于 E DII 上，此处的抗原表位在黄病毒中高度保守。为了进一步评价所制备抗体是否具有中和 TBEV 的活性，我们进行了微量中和试验。由于实验室缺乏 TBEV 活毒，而且也不具备生物安全三级实验室条件，我们采用 TBEV RVP 代替活病毒。目前黄病毒的 RVP 研究已经比较成熟，其核心在于首先构建黄病毒基因组复制子（编码病毒结构蛋白的基因被报告基因取代，其非结构基因形成的亚基因组复制子可进行自我复制），然后通过反式提供编码结构蛋白的基因进行互补而包装出 RVP^[70]。RVP 由于其包裹的基因组中缺乏结构蛋白编码基因，因此只具有单轮感染性，可在 BSL-2 级别的实验室进行操作，能够用于抗体的中和活性评价等。本研究中，我们利用实验室构建的 YFV 复制子细胞通过反式提供 TBEV-CprME 基因成功包装了 TBEV-RVP。将 TBEV-RVP 感染 BHK 细胞后测定 RLU 值，结果显示其具有较好的感染活性。进一步利用 TBEV-RVP 进行微量中和试验鉴定抗体中和活性，结

果表明制备的 5 株单抗均无中和活性。分析其原因，一个是我们筛选得到的抗体较少，正好这些抗体不具有中和活性；另一个原因是原核表达的 TBEV-Ecto 原核蛋白在经过复性后虽可恢复部分天然构象，但缺少糖基化修饰，在刺激中和抗体方面的作用较弱。

本研究的不足之处在于：一是筛选抗体数量不够多，另外对于获得的抗体缺少表位鉴定等。未来的研究将继续改进 TBEV 抗体的制备方法，以期获得效价较高、特异性强的单克隆抗体。

小 结

1. TBEV-Ecto 蛋白的原核表达、纯化及免疫原性鉴定

1) 构建了 pET28a-TBEV-Ecto 原核表达载体, SDS-PAGE 以及 Western blotting 结果显示, 其可在 BL21 感受态中成功表达 TBEV-Ecto 蛋白, 经过 NDSB-201 复性及 Ni 柱亲和层析纯化后获得了纯度较高的目的蛋白。

2) TBEV-Ecto 原核表达蛋白免疫小鼠, Western blotting 和 IFA 结果显示免疫血清可成功识别真核表达的 TBEV-E 蛋白, TBEV-Ecto 原核表达蛋白具有较好的免疫原性。

2. TBEV-Ecto 蛋白单克隆抗体的制备及鉴定

1) 获得了 6 株表达 TBEV-Ecto 单抗的杂交瘤细胞系, 间接 ELISA 测定结果显示单抗腹水效价较低, Western blotting 结果显示 2E3G6 株可结合 TBEV-E 蛋白的线性表位, IFA 结果显示除 2E3G6 株外其他 5 株可结合 TBEV-E 蛋白的构象表位, IFA 鉴定交叉反应性结果表明除 2E3G6 外, 4 株单抗中存在与 JEV、DENV 2、YFV 反应的单抗。

2) 利用 protein G 柱从腹水中纯化出了除 2H8H4 外的 5 株单克隆抗体, SDS-PAGE 结果显示纯化成功; 利用 YFV 复制子细胞成功包装 TBEV-RVP, 感染 BHK 细胞后测定 RLU 值显示其存在感染活性; 利用 TBEV-RVP 进行微量中和试验, 结果显示 5 株单抗均不存在中和活性。

参考文献

- [1] LEVANOV L, JAASKELAINEN A, VAPALAHTI O. Test based on subtype-specific mu-capture IgM immunoassay can distinguish between infections of European and Siberian subtypes of tick-borne encephalitis virus [J]. *J Clin Virol*, 2015, 73: 81-3.
- [2] DUBOVA K M, VLASKINAA V, KORZHENEVSKIY D A, et al. Preliminary X-ray Diffraction Analysis of the Envelope (E) Protein of Far-Eastern Tick-Borne Encephalitis Virus Subtype (Sofjin Strain) [J]. *Crystallography Reports*, 2022, 67(4): 581-5.
- [3] KUBINSKI M, BEICHT J, GERLACH T, et al. Tick-Borne Encephalitis Virus: A Quest for Better Vaccines against a Virus on the Rise [J]. *Vaccines (Basel)*, 2020, 8(3).
- [4] LINDQUIST L, VAPALAHTI O. Tick-borne encephalitis [J]. *The Lancet*, 2008, 371(9627): 1861-71.
- [5] LINDQVIST R, UPADHYAY A, ÖVERBY A. Tick-Borne Flaviviruses and the Type I Interferon Response [J]. *Viruses*, 2018, 10(7).
- [6] 刘育京, 蒋豫图, 郭存三, et al. 吉林省森林脑炎自然疫源地的某些流行病学特点 .J 中国人民解放军军事医学科学院院刊 [J]. 1979, (01): 109-20.
- [7] 尹德铭, 刘瑞璋. 对中国东北林区森林脑炎防治研究的回顾 .J 中华流行病学杂志 [J]. 2000, (05): 67-9.
- [8] 韩雪玲, 李莉莉, 史娟玲, et al. 我国森林脑炎临床流行病学研究现状 .J 西北国防医学杂志 .J Medical Journal of National Defending Forces in Northwest China [J]. 2018, 39(3): 148-53.
- [9] 邱宇鹤, 王轶文, 何淑云. 森林脑炎疫苗的研究进展 .J 中国生物制品学杂志 [J]. 2015, 28(11): 1228-30+32.
- [10] SUSS J. Epidemiology and ecology of TBE relevant to the production of effective vaccines [J]. *Vaccine*, 2003, 21 Suppl 1: S19-35.
- [11] HAVIERNIK J, EYER L, YOSHII K, et al. Development and characterization of recombinant tick-borne encephalitis virus expressing mCherry reporter protein: A new tool for high-throughput screening of antiviral compounds, and neutralizing antibody assays [J]. *Antiviral Res*, 2021, 185: 104968.
- [12] KERLIK J, AVDIČOVÁ M, MUSILOVÁ M, et al. Breast Milk as Route of Tick-Borne Encephalitis Virus Transmission from Mother to Infant [J]. *Emerg Infect Dis*, 2022, 28(5): 1060-1.
- [13] 宋海慧, 余卓渊, 丁晓彤, et al. 森林脑炎时空分布特征和环境影响因素分析 .J 地球信息科学学报 [J]. 2020, 22(12): 2371-82.
- [14] MALKOVA D, FRANKOVA V. The lymphatic system in the development of experimental tick-borne encephalitis in mice [J]. *Acta virologica*, 1959, 3: 210-4.
- [15] LABUDA M, AUSTYN J M, ZUFFOVA E, et al. Importance of localized skin infection in tick-borne encephalitis virus transmission [J]. *Virology*, 1996, 219(2): 357-66.
- [16] PROKOPOWICZ D, BOBROWSKA E, BOBROWSKI M, et al. Prevalence of antibodies against tick-borne encephalitis among residents of north-eastern Poland [J]. *Scandinavian journal of infectious diseases*, 1995, 27(1): 15-6.

- [17] RUZEK D, AVSIC ZUPANC T, BORDE J, et al. Tick-borne encephalitis in Europe and Russia: Review of pathogenesis, clinical features, therapy, and vaccines [J]. *Antiviral Res*, 2019, 164: 23-51.
- [18] RŮŽEK D, DOBLER G, DONOSO MANTKE O. Tick-borne encephalitis: pathogenesis and clinical implications [J]. *Travel medicine and infectious disease*, 2010, 8(4): 223-32.
- [19] PALUS M, VANCOVA M, SIRMAROVA J, et al. Tick-borne encephalitis virus infects human brain microvascular endothelial cells without compromising blood-brain barrier integrity [J]. *Virology*, 2017, 507: 110-22.
- [20] RŮŽEK D, DOBLER G, MANTKE O D. Tick-borne encephalitis: Pathogenesis and clinical implications [J]. *Travel medicine and infectious disease*, 2010, 8(4): 223-32.
- [21] DONOSO MANTKE O, SCHÄDLER R, NIEDRIG M. A survey on cases of tick-borne encephalitis in European countries [J]. *Euro surveillance : bulletin Europeen sur les maladies transmissibles = European communicable disease bulletin*, 2008, 13(17).
- [22] 郑智武, 陈宁. 森林脑炎国内外流行趋势与研究进展 .J 世界最新医学信息文摘 (连续型电子期刊) .J World Latest Medicine Information [J]. 2021, 21(15): 89-91.
- [23] VALARCHER J F, HÄGGLUND S, JUREMALM M, et al. Tick-borne encephalitis [J]. *Revue scientifique et technique (International Office of Epizootics)*, 2015, 34(2): 453-66.
- [24] BOGOVIC P, STRLE F. Tick-borne encephalitis: A review of epidemiology, clinical characteristics, and management [J]. *World J Clin Cases*, 2015, 3(5): 430-41.
- [25] KLEITER I, JILG W, BOGDAHN U, et al. Delayed humoral immunity in a patient with severe tick-borne encephalitis after complete active vaccination [J]. *Infection*, 2007, 35(1): 26-9.
- [26] RUZEK D, DOBLER G, NILLER H H. May early intervention with high dose intravenous immunoglobulin pose a potentially successful treatment for severe cases of tick-borne encephalitis? [J]. *BMC Infect Dis*, 2013, 13: 306.
- [27] GOULD E A, BUCKLEY A. Antibody-dependent enhancement of yellow fever and Japanese encephalitis virus neurovirulence [J]. *J Gen Virol*, 1989, 70 (Pt 6): 1605-8.
- [28] ARRAS C, FESCHAREK R, GREGERSEN J P. Do specific hyperimmunoglobulins aggravate clinical course of tick-borne encephalitis? [J]. *The Lancet*, 1996, 347(9011): 1331.
- [29] BRÖKER M, KOLLARITSCH H. After a tick bite in a tick-borne encephalitis virus endemic area: current positions about post-exposure treatment [J]. *Vaccine*, 2008, 26(7): 863-8.
- [30] EYER L, NENCKA R, DE CLERCQ E, et al. Nucleoside analogs as a rich source of antiviral agents active against arthropod-borne flaviviruses [J]. *Antiviral chemistry & chemotherapy*, 2018, 26: 2040206618761299.
- [31] CHISTOV A A, CHUMAKOV S P, MIKHOVETS I E, et al. 5-(Perylen-3-ylethynyl)uracil as an antiviral scaffold: Potent suppression of enveloped virus reproduction by 3-methyl derivatives in vitro [J]. *Antiviral Research*, 2023, 209: 105508.
- [32] SALABAI N.S. C K I. Clinical and laboratory parameters when using combined therapy (immunoglobulin and interferon $\alpha 2v$) in patients with meningeal form of tick-borne encephalitis [J]. *Bulletin of Siberian Medicine*, 2012, 11(3): 101-7.
- [33] PUGH S J, MOÏSI J C, KUNDI M, et al. Effectiveness of two doses of tick-borne encephalitis (TBE) vaccine [J]. *Journal of Travel Medicine*, 2022, 29(2).
- [34] VOROVITCH M F, MAIKOVA G B, CHERNOKHAEVA L L, et al. Comparison of the Immunogenicity and Safety of Two Pediatric TBE Vaccines Based on the Far Eastern and

- European Virus Subtypes [J]. *Advances in virology*, 2019, 2019: 5323428.
- [35] 宋宗明, 洪成龙, 刘双军, et al. 森林脑炎纯化疫苗和灭活疫苗的接种反应及免疫效果观察. *J 中国生物制品学杂志. J CHINESE JOURNAL OF BIOLOGICALS* [J]. 2005, 18(1): 67-8.
- [36] HUDOPISK N, KORVA M, JANET E, et al. Tick-borne encephalitis associated with consumption of raw goat milk, Slovenia, 2012 [J]. *Emerg Infect Dis*, 2013, 19(5): 806-8.
- [37] CHAMBERS T J, HAHN C S, GALLER R, et al. Flavivirus genome organization, expression, and replication [J]. *Annu Rev Microbiol*, 1990, 44: 649-88.
- [38] PIERSON T C, DIAMOND M S. The continued threat of emerging flaviviruses [J]. *Nat Microbiol*, 2020, 5(6): 796-812.
- [39] FUZIK T, FORMANOVA P, RUZEK D, et al. Structure of tick-borne encephalitis virus and its neutralization by a monoclonal antibody [J]. *Nat Commun*, 2018, 9(1): 436.
- [40] GOTO A, YOSHII K, OBARA M, et al. Role of the N-linked glycans of the prM and E envelope proteins in tick-borne encephalitis virus particle secretion [J]. *Vaccine*, 2005, 23(23): 3043-52.
- [41] YOSHII K, YANAGIHARA N, ISHIZUKA M, et al. N-linked glycan in tick-borne encephalitis virus envelope protein affects viral secretion in mammalian cells, but not in tick cells [J]. *J Gen Virol*, 2013, 94(Pt 10): 2249-58.
- [42] REY F A, HEINZ F X, MANDL C, et al. The envelope glycoprotein from tick-borne encephalitis virus at 2 Å resolution [J]. *Nature*, 1995, 375(6529): 291-8.
- [43] MANDL C W, ALLISON S L, HOLZMANN H, et al. Attenuation of tick-borne encephalitis virus by structure-based site-specific mutagenesis of a putative flavivirus receptor binding site [J]. *J Virol*, 2000, 74(20): 9601-9.
- [44] YOSHII K. Epidemiology and pathological mechanisms of tick-borne encephalitis [J]. *Journal of Veterinary Medical Science*, 2019, 81(3): 343-7.
- [45] MEDITS I, HEINZ F X, STIASNY K. An Absolutely Conserved Tryptophan in the Stem of the Envelope Protein E of Flaviviruses Is Essential for the Formation of Stable Particles [J]. *Viruses*, 2021, 13(9).
- [46] LINDQVIST R, ROSENDAL E, WEBER E, et al. The envelope protein of tick-borne encephalitis virus influences neuron entry, pathogenicity, and vaccine protection [J]. *J Neuroinflammation*, 2020, 17(1): 284.
- [47] VANBLARGAN L A, ERRICO J M, KAFAI N M, et al. Broadly neutralizing monoclonal antibodies protect against multiple tick-borne flaviviruses [J]. *J Exp Med*, 2021, 218(5).
- [48] ZHANG X, GE P, YU X, et al. Cryo-EM structure of the mature dengue virus at 3.5-Å resolution [J]. *Nature structural & molecular biology*, 2013, 20(1): 105-10.
- [49] RASTOGI M, SHARMA N, SINGH S K. Flavivirus NS1: a multifaceted enigmatic viral protein [J]. *Virology journal*, 2016, 13: 131.
- [50] LUO D, VASUDEVAN S G, LESCAR J. The flavivirus NS2B-NS3 protease-helicase as a target for antiviral drug development [J]. *Antiviral Res*, 2015, 118: 148-58.
- [51] SHIRYAEV S A, CHERNOV A V, ALESHIN A E, et al. NS4A regulates the ATPase activity of the NS3 helicase: a novel cofactor role of the non-structural protein NS4A from West Nile virus [J]. *J Gen Virol*, 2009, 90(Pt 9): 2081-5.
- [52] ZMURKO J, NEYTS J, DALLMEIER K. Flaviviral NS4b, chameleon and jack-in-the-box roles in viral replication and pathogenesis, and a molecular target for antiviral intervention [J]. *Rev*

- Med Virol, 2015, 25(4): 205-23.
- [53] DAVIDSON A D. Chapter 2. New insights into flavivirus nonstructural protein 5 [J]. *Advances in virus research*, 2009, 74: 41-101.
- [54] BEST S M. The Many Faces of the Flavivirus NS5 Protein in Antagonism of Type I Interferon Signaling [J]. *J Virol*, 2017, 91(3).
- [55] ARORA U, TYAGI P, SWAMINATHAN S, et al. Virus-like particles displaying envelope domain III of dengue virus type 2 induce virus-specific antibody response in mice [J]. *Vaccine*, 2013, 31(6): 873-8.
- [56] FAHIMI H, ALLAHYARI H, HASSAN Z M, et al. Dengue virus type-3 envelope protein domain III; expression and immunogenicity [J]. *Iranian journal of basic medical sciences*, 2014, 17(11): 836-43.
- [57] 朱晓磊, 林方, 康晓平, et al. 森林脑炎病毒 E 基因 DomainIII段的克隆表达及鉴定 . J 吉林农业大学学报 [J]. 2012, 34(06): 667-71.
- [58] ERSHOVA A S, GRA O A, LYASCHUK A M, et al. Recombinant domains III of Tick-Borne Encephalitis Virus envelope protein in combination with dextran and CpGs induce immune response and partial protectiveness against TBE virus infection in mice [J]. *BMC Infectious Diseases*, 2016, 16(1).
- [59] GOLOTIN V, SANINA N, DAVYDOVA L, et al. Recombinant Fusion Protein Joining E Protein Domain III of Tick-Borne Encephalitis Virus and HSP70 of *Yersinia pseudotuberculosis* as an Antigen for the TI-Complexes [J]. *Biomolecules*, 2018, 8(3).
- [60] RIZZO S, MORA-CÁRDENAS E, FAORO V, et al. A method for rapid and high-yield production of the tick-borne encephalitis virus E and DIII recombinant proteins in *E. coli* with preservation of the antigenic properties [J]. *Ticks and Tick-borne Diseases*, 2019, 10(4): 935-41.
- [61] ALLISON S L, STADLER K, MANDL C W, et al. Synthesis and secretion of recombinant tick-borne encephalitis virus protein E in soluble and particulate form [J]. *J Virol*, 1995, 69(9): 5816-20.
- [62] 邴振虹, 王兰菊, 周永飞, et al. 森林脑炎病毒包膜 E 蛋白的原核表达、纯化及其免疫原性初步评价 .J 中国生物制品学杂志 .J Chinese Journal of Biologicals [J]. 2020, 33(5): 489-92,97.
- [63] 温中华, 李建民, 陈薇. 蜱传脑炎病毒 E 抗原蛋白的原核表达及鉴定 .J 生物技术通讯 .J Letters in Biotechnology [J]. 2017, 28(4): 495-8.
- [64] MOHSEN M O, BACHMANN M F. Virus-like particle vaccinology, from bench to bedside [J]. *Cell Mol Immunol*, 2022, 19(9): 993-1011.
- [65] WONG S H, JASSEY A, WANG J Y, et al. Virus-Like Particle Systems for Vaccine Development against Viruses in the Flaviviridae Family [J]. *Vaccines (Basel)*, 2019, 7(4).
- [66] RODRIGUEZ-LIMAS W A, SEKAR K, TYO K E. Virus-like particles: the future of microbial factories and cell-free systems as platforms for vaccine development [J]. *Curr Opin Biotechnol*, 2013, 24(6): 1089-93.
- [67] YOSHII K, HAYASAKA D, GOTO A, et al. Enzyme-linked immunosorbent assay using recombinant antigens expressed in mammalian cells for serodiagnosis of tick-borne encephalitis [J]. *Journal of Virological Methods*, 2003, 108(2): 171-9.
- [68] YUN S M, JEONG Y E, WANG E, et al. Cloning and Expression of Recombinant Tick-Borne Encephalitis Virus-like Particles in *Pichia pastoris* [J]. *Osong Public Health Res Perspect*, 2014, 5(5): 274-8.

- [69] LUKER K E, LUKER G D. Applications of bioluminescence imaging to antiviral research and therapy: multiple luciferase enzymes and quantitation [J]. *Antiviral Res*, 2008, 78(3): 179-87.
- [70] ANSARAH-SOBRINHO C, NELSON S, JOST C A, et al. Temperature-dependent production of pseudoinfectious dengue reporter virus particles by complementation [J]. *Virology*, 2008, 381(1): 67-74.
- [71] KHROMYKH A A, VARNAVSKI A N, WESTAWAY E G. Encapsidation of the flavivirus kunjin replicon RNA by using a complementation system providing Kunjin virus structural proteins in trans [J]. *J Virol*, 1998, 72(7): 5967-77.
- [72] LI W, MA L, GUO L P, et al. West Nile virus infectious replicon particles generated using a packaging-restricted cell line is a safe reporter system [J]. *Scientific reports*, 2017, 7(1): 3286.
- [73] DAVIS C W, MATTEI L M, NGUYEN H Y, et al. The location of asparagine-linked glycans on West Nile virions controls their interactions with CD209 (dendritic cell-specific ICAM-3 grabbing nonintegrin) [J]. *J Biol Chem*, 2006, 281(48): 37183-94.
- [74] LÜCKE A C, VOM HEMDT A, WIESELER J, et al. High-Throughput Platform for Detection of Neutralizing Antibodies Using Flavivirus Reporter Replicon Particles [J]. *Viruses*, 2022, 14(2).
- [75] MATSUDA M, YAMANAKA A, YATO K, et al. High-throughput neutralization assay for multiple flaviviruses based on single-round infectious particles using dengue virus type 1 reporter replicon [J]. *Scientific reports*, 2018, 8(1): 16624.
- [76] LI L, LOK S M, YU I M, et al. The flavivirus precursor membrane-envelope protein complex: structure and maturation [J]. *Science (New York, NY)*, 2008, 319(5871): 1830-4.
- [77] YU I M, ZHANG W, HOLDAWAY H A, et al. Structure of the immature dengue virus at low pH primes proteolytic maturation [J]. *Science (New York, NY)*, 2008, 319(5871): 1834-7.
- [78] The envelope glycoprotein from tick-borne encephalitis virus at 2 Å resolution [J].
- [79] ALLISON S L, STIASNY K, STADLER K, et al. Mapping of functional elements in the stem-anchor region of tick-borne encephalitis virus envelope protein E [J]. *J Virol*, 1999, 73(7): 5605-12.
- [80] JÄÄSKELÄINEN A, HAN X, NIEDRIG M, et al. Diagnosis of tick-borne encephalitis by a mu-capture immunoglobulin M-enzyme immunoassay based on secreted recombinant antigen produced in insect cells [J]. *J Clin Microbiol*, 2003, 41(9): 4336-42.
- [81] CHIDUMAYO N N, YOSHII K, SAASA N, et al. Development of a tick-borne encephalitis serodiagnostic ELISA using recombinant Fc-antigen fusion proteins [J]. *Diagn Microbiol Infect Dis*, 2014, 78(4): 373-8.
- [82] DEO S, TURTON K L, KAINTH T, et al. Strategies for improving antimicrobial peptide production [J]. *Biotechnology advances*, 2022, 59: 107968.
- [83] MCELWAIN L, PHAIR K, KEALEY C, et al. Current trends in biopharmaceuticals production in *Escherichia coli* [J]. *Biotechnology letters*, 2022, 44(8): 917-31.
- [84] ZHANG Z X, NONG F T, WANG Y Z, et al. Strategies for efficient production of recombinant proteins in *Escherichia coli*: alleviating the host burden and enhancing protein activity [J]. *Microbial cell factories*, 2022, 21(1): 191.
- [85] STUDIER F W, MOFFATT B A. Use of bacteriophage T7 RNA polymerase to direct selective high-level expression of cloned genes [J]. *Journal of molecular biology*, 1986, 189(1): 113-30.
- [86] 王丹, 康晓平, 郝淮杰, et al. 蜱传脑炎病毒 TBE-E-D3 抗原的原核表达纯化及 ELISA 方法

- 鉴定 .J 生物技术通讯 .J Letters in Biotechnology [J]. 2011, 22(5): 636-9,66.
- [87] 武荣飞, 杨溢, 王鹏志, et al. 单克隆抗体制备技术最新研究进展 .J 中国预防兽医学报 .J Chinese Journal of Preventive Veterinary Medicine [J]. 2022, 44(3): 333-7,43.
- [88] KöHLER G, MILSTEIN C. Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity [J]. Nature, 1975, 256(5517): 495-7.
- [89] MITRA S, TOMAR P C. Hybridoma technology; advancements, clinical significance, and future aspects [J]. Journal, genetic engineering & biotechnology, 2021, 19(1): 159.
- [90] BILLIAU A, MATTHYS P. Modes of action of Freund's adjuvants in experimental models of autoimmune diseases [J]. Journal of leukocyte biology, 2001, 70(6): 849-60.