



分类号: R183

学校代码: 10114

密 级: _____

学 号: 202000510868

山西医科大学

SHANXI MEDICAL UNIVERSITY

硕 士 学 位 论 文

荆门蜱病毒 ELISA 检测方法的初步建立及应用

**Preliminary establishment and application of ELISA detection
method for Jingmen tick Virus**

研 究 生 : 张秀丹

指导老师 : 罗雪莲 副研究员

专业名称 : 流行病与卫生统计学

研究方向 : 传染病流行病学

学位类型 : 科学学位

所在学院 : 公共卫生学院

中国 山西

二〇二三年六月十二日

分类号: R183

学校代码: 10114

密 级:

学 号: 202000510868

荆门蜱病毒 ELISA 检测方法的初步建立及应用
Preliminary establishment and application of ELISA detection
method for Jingmen tick Virus

研 究 生 : 张秀丹

指导老师 : 罗雪莲 副研究员

专业名称 : 流行病与卫生统计学

研究方向 : 传染病流行病学

学位类型 : 科学学位

所在学院 : 公共卫生学院

中国 山西

二〇二三年六月十二日

目 录

前言	1
第一部分 JMTV NS3 蛋白的原核表达和纯化	7
1. 实验材料与方法	7
1.1 主要仪器与试剂	7
1.2 生物信息学分析	9
1.3 JMTV NS3 蛋白序列的分析	10
1.4 NS3 序列的合成	10
1.5 原核表达 NS3 重组质粒的构建及阳性克隆的筛选	10
1.6 NS3 重组质粒的提取	12
1.7 NS3 重组质粒的转化	13
1.8 重组 NS3 蛋白的小量表达与鉴定	14
1.9 重组 NS3 蛋白的大量表达与纯化	16
1.10 蛋白浓度的测定	17
2. 结果与分析	18
2.1 NS3 蛋白全长分析	18
2.2 NS3 蛋白(148-808AA)序列的合成	19
2.3 NS3 蛋白(148-808AA)原核表达载体构建	22
2.4 目的蛋白 NS3(148-808AA)的小量表达结果(单克隆筛选)	23
2.5 目的蛋白 NS3(148AA-808AA)大量表达和纯化结果	25
3. 讨论	26
第二部分 基于 NS3 蛋白的多抗制备及 ELISA 初步构建和优化	28
1. 实验材料与方法	28
1.1 实验主要仪器设备及试剂	28
1.2 兔多克隆抗体的制备及纯化	29
1.3 间接酶联免疫检测兔多抗血清效价方法	29
1.4 间接酶联免疫吸附试验(ELISA)的初步建立	30
2. 结果与分析	34
2.1 抗 NS3 蛋白多克隆抗体的测定	34
2.2 纯化抗体 WESTERN BLOT 分析	34
2.3 ELISA 方法优化分析	35
3. 讨论	38
第三部分 利用重组 NS3 蛋白筛查人和动物血清中荆门蜚病毒特异性抗体	39
1. 实验材料与方法	39

1.1 实验主要仪器设备及试剂.....	39
1.2 人与动物血清样本的采集.....	40
1.3 人血清 CUT-OFF 值的确立	40
1.4 动物血清 CUT-OFF 值的确立	40
1.5 RT-PCR 检测	41
2. 结果与分析.....	41
2.1 人血清 ELISA 筛查结果	41
2.2 动物血清 ELISA 筛查结果	42
2.3 血样本中 JMTV 核酸检测结果	43
3. 讨论.....	43
第四部分 全文总结	45
参考文献.....	46
综述.....	51
综述参考文献.....	55
附录.....	59

荆门蜱病毒 ELISA 检测方法的初步建立及应用

中文摘要

目的:

荆门蜱病毒 (*Jingmen tick virus*, JMTV) 是一类属于黄病毒科的分节段单股正链带包膜的 RNA 病毒, 进化位置处于黄病毒属 (*Flavivirus*)、丙型肝炎病毒属 (*Hepacivirus*)、瘟病毒属 (*Pestivirus*) 和 *Pegivirus* 属之间, 且单独形成一个分支。JMTV 经蜱虫传播至人和多种动物, 如蝙蝠、牛、羊和啮齿类动物等。研究表明 JMTV 对人类有致病性, 表现为非特异性发热、持续性中度头痛, 并伴有疲劳、恶心、咳嗽和咽部不适等症状。目前国内外学者对 JMTV 的研究大多都集中在利用高通量测序或者特异性 RT-PCR 引物研究动物宿主中 JMTV 多样性, 然而对人群感染 JMTV 的状况研究较少。因此, 本论文利用 JMTV NS3 蛋白为抗原初步建立了 JMTV 特异性抗体检测 ELISA 方法; 采集 2022 年湖北省人和家养动物样本, 具体为低风险人群(武汉市中心医院体检健康人)血清以及动物宿主(牛、羊)血清和血块, 利用 ELISA 方法对感染 JMTV 的情况进行初步研究, 为掌握 JMTV 在人群和动物中感染状况提供基础数据。

方法:

(1) 构建 JMTV NS3 蛋白原核表达质粒, 并在大肠杆菌中经 IPTG 诱导表达。大量表达的 NS3 蛋白经镍柱亲和层析、咪唑梯度洗脱纯化, 用 PBS 缓冲液置换复性后, 分装保存用于后续实验。(2) 纯化的 NS3 蛋白作为抗原, 背部皮下免疫大白兔制备多克隆抗体, 第四针免疫一周后采血检测抗体效价, 免疫五周后采血分离血清并纯化获得兔多克隆抗体。(3) 利用纯化的 NS3 蛋白为包被抗原, 兔多抗血清为抗体, 经棋盘滴定确定 ELISA 方法中抗原最佳包被浓度, 同时对包被缓冲液、封闭液和显色底物进行优化(4) 2022 年 5-6 月份, 采集湖北省多家养殖场牛、羊血清和血块样本。2022 年 10 月, 收集湖北省武汉市中心医院体

检人群血清作为低风险人群样本。本实验室保存的湖北省林区居民的血清设为高风险人群血清。(5) 用样本平均 OD 值加 3 倍 SD 设为 cut-off 值, 分别确定人群、牛和羊的 cut-off 值, 进行了人群和动物血清中 JMTV 抗体筛查。(6) 提取所有血样本的 RNA, 利用本研究自行设计的兼并引物和已发表文献中公布的 JMTV 筛检引物, 对所有标本进行 RT-PCR 检测, 筛查 JMTV 核酸。

结果:

(1) 通过抗原表位分析、密码子优化, 构建了含 NS3 基因 148 aa-808 aa 的原核表达质粒 pET-22b-JMTV-NS3 (148 aa-808 aa), 经 IPTG 诱导表达获得的包涵体 NS3 重组蛋白分子量大小约为 75 kDa。(2) 制备出兔源抗 JMTV NS3 多克隆抗体, 经 ELISA 效价测定约为 10^6 。Western blot 验证该抗体能与 NS3 蛋白发生特异性反应。(3) 初步建立起 ELISA 检测方法, 经棋盘滴定确定了 NS3 重组蛋白的最佳包被浓度为 0.375 ug/ml。对包被缓冲液、封闭液、显色底物进行优化, 确定了最佳包被液为磷酸盐包被缓冲液, 最佳封闭液为 Tris.HCl+0.5%脱脂奶粉, 最佳显色底物为 ED 公司的双组份显色底物。(4) 2022 年在湖北省共收集到人血清 187 份, 其中低风险人群血清 174 份, 高风险人血清 13 份。牛血清样本 44 份, 对应血块样本 44 份。羊血清样本 193 份, 对应血块样本 105 份。(5) 利用建立的 ELISA 方法, 对上述血清进行 JMTV 特异性抗体筛查。结果表明 174 份低风险人群血清和 13 份高风险人血清 ELISA 结果均呈阴性。牛血清样本中检查结果呈阳性的有两份, 羊血清样本中检查结果呈阳性的有 7 份, 血清阳性率分别为 2.27%和 4.15%。(6) RT-PCR 结果显示所有标本均为阴性。

结论:

JMTV NS3 蛋白具有很好的免疫原性, 实验室动物免疫可刺激大白兔产生 JMTV 特异性抗体。血清学筛查在家养动物牛、羊血清中检查出 JMTV 特异性抗体, 提示需关注牛、羊作为蜚虫携带者导致病毒扩散的风险。

关键词: 荆门蜚病毒; 非结构蛋白 NS3; 原核表达; 蛋白纯化; 多克隆抗体制备; 血清学

Preliminary establishment and application of ELISA detection method for Jingmen tick Virus

Abstract

Objective:

Jingmen tick virus (JMTV) belonging to the *Flaviviridae* family is a kind of segmented single-stranded RNA viruses with an envelope. JMTV forms an independent branch which separates from *Flavivirus*, *Hepacivirus*, *Pestivirus* and *Pegivirus* in phylogenetic tree. JMTV is transmitted to humans and a variety of animals (e.g., bats, cattle, sheep and rodents) by ticks. The clinic features of JMTV infection are non-specific fever, persistent moderate headache, accompanied by other symptoms such as fatigue, nausea, cough and pharyngeal discomfort. At present, most scientists at home and abroad have focused on the study of JMTV diversity in animal hosts based on high-throughput sequencing or specific RT-PCR primers. However, there are few studies on the status of human infection with JMTV. In this paper, JMTV NS3 protein was expressed and purified in *E. coli*. A preliminary ELISA for detection of JMTV specific antibody was established. Samples of human and domestic animals in Hubei Province in 2022 were collected, specifically the serum of low-risk population (healthy people in central hospital of wuhan) and the serum and blood clots of animal hosts (cattle and sheep). This preliminary study on the JMTV infection will provide basic data for the infection status of JMTV in human and animals.

Methods:

(1) The prokaryotic expression plasmid of JMTV NS3 was constructed and induced by IPTG in *E. coli*. NS3 proteins were purified by Ni-column affinity chromatography and imidazole gradient elution, refolded with PBS buffer, and stored

in aliquots for subsequent experiments. (2) The purified NS3 protein was used as antigen to immunize white rabbits subcutaneously on the back to prepare polyclonal antibody. One week after the fourth dose of immunization, blood was collected to detect antibody titer. Five weeks after immunization, blood was collected to isolate serum and purify rabbit polyclonal antibody. (3) Purified NS3 protein was used as coating antigen, rabbit polyclonal antiserum was used as antibody, and the optimal coating concentration of antigen in ELISA method was determined by checkboard titration. Meanwhile, the coating buffer, blocking solution and color substrate were optimized. (4) Serum and blood clot samples of cattle and sheep from several farms in Hubei Province were collected from May to June 2022. In October 2022, serum samples from physical examination people in Wuhan Central Hospital, Hubei Province, were collected as low-risk population samples. (5) The average OD value of samples plus 3 times SD was set as the cut-off value to determine the cut-off value of human, cattle and sheep respectively, and the JMTV antibody screening in human and animal serum was carried out. (6) RNA was extracted from all blood samples, and all samples were tested by RT-PCR using the self-designed merger primers and the JMTV screening primers published in the published literature to screen JMTV nucleic acid.

Results:

(1) Through epitope analysis and codon optimization, the prokaryotic expression plasmid pET-22b-JMTV-NS3 (148aa-808aa) containing NS3 gene was constructed. The molecular weight of the inclusion body NS3 recombinant protein obtained by IPTG induction was about 75kDa. (2) The rabbit polyclonal antibody against JMTV NS3 was prepared, and the titer was about 106 by ELISA. Western blot showed that the antibody could react specifically with NS3 protein. (3) The ELISA method was preliminarily established, and the optimal coating concentration of NS3 recombinant protein was determined to be 0.375ug/ml by checkerboard titration. The coating buffer, blocking solution and color substrate were optimized, and the best coating solution was

phosphate coating buffer, the best blocking solution was Tris.HCl+0.5% skim milk powder, and the best color substrate was ED company's two-component color substrate.

(4) A total of 187 human sera were collected in Hubei Province in 2022, including 174 sera from low-risk people and 13 sera from high-risk people. There were 44 bovine serum samples and 44 corresponding blood clot samples. There were 193 sheep serum samples and 105 corresponding blood clot samples. The serum of forest residents in Hubei Province preserved in our laboratory is set as the serum of high-risk population. (5) The established ELISA method was used to screen the JMTV specific antibodies in the above sera. The results showed that 174 sera from low-risk people and 13 sera from high-risk people were negative for ELISA. Two of the bovine serum samples and seven of the sheep serum samples were positive, with seropositive rates of 2.27% and 4.15%, respectively. (6) RT-PCR results showed that all samples were negative.

Conclusion:

JMTV NS3 protein has good immunogenicity, and laboratory animal immunization can stimulate white rabbits to produce JMTV-specific antibodies. JMTV-specific antibodies were detected in the serum of cattle and sheep, suggesting that attention should be paid to the risk of virus spread caused by cattle and sheep as tick carriers.

Keyword: *Jingmen tick virus*; Nonstructural protein NS3; Prokaryotic expression; protein purification; Polyclonal antibody preparation; Serological screening

常用缩写词中英文对照表

英文缩写	英文名称	中文全称
JMTV	<i>Jingmen tick virus</i>	荆门蜱病毒
GCXV	<i>Guaico Culex virus</i>	瓜伊科库蚊病毒
MGTV	<i>Mogiana tick virus</i>	莫吉亚娜蜱病毒
ALSV	<i>Alongshan virus</i>	阿龙山病毒
WHFV	<i>Wuhan flea virus</i>	武汉跳蚤病毒
WHCV	<i>Wuhan cricket virus</i>	武汉蟋蟀病毒
WHAV1	<i>Wuhan aphid virus1</i>	武汉蚜虫病毒 1
WHAV2	<i>Wuhan aphid virus2</i>	武汉蚜虫病毒 2
SAIV7	<i>Shuangao insect virus 7</i>	双高昆虫病毒 7
DENV	<i>Dengue fever virus</i>	登革热病毒
YFV	<i>Yellow fever virus</i>	黄热病病毒
ZIKV	<i>Zika virus</i>	寨卡病毒
JEV	<i>Japanese encephalitis virus</i>	日本脑炎病毒（乙型脑炎病毒）
TBEV	<i>Tick-borne encephalitis virus</i>	蜱传脑炎病毒
WNV	<i>WestNile virus</i>	西尼罗河病毒
RDRP	RNA dependent RNA polymerase	RNA 依赖性 RNA 聚合酶
NSP1	Non-structural protein 1	非结构蛋白 1
NS3	Non-structural protein 3	非结构蛋白 3
NS5	Non-structural protein 5	非结构蛋白 5
VP1	Envelope protein	包膜蛋白
VP2	Capsid protein	核衣壳蛋白
VP3	Membrane protein	膜蛋白
kDa	Kilo Dalton	千道尔顿
UTR	Untranslated regions	非编码区
ORF	Open reading frame	开放阅读框架
PCR	Polymerase chain reaction	聚合酶链式反应
Amp	Ampicillin	氨苄青霉素钠
LB	Lauria broth	LB 肉汤
h	hour	小时
IPTG	Isopropylthio-p-D-galactoside	异丙基硫代-β-D-半乳糖苷
PMSF	Phenylmethylsulfonyl fluoride	苯甲基磺酰氟
HRP	Horseradish peroxidase	辣根过氧化物酶
IgG	Immunoglobulin G	免疫球蛋白 G
WB	Western blot	蛋白质免疫印迹杂交技术
PH	Hydrogen ion concentration	酸碱度
PBS	Phosphate buffered solution	磷酸盐缓冲液
ELISA	Enzyme linked immunosorbent assay	酶联免疫吸附测定
r/min	Rotation per minute	转/分钟
nt	Nucleotide	核苷酸

(续表)

英文缩写	英文名称	中文全称
aa	Amino acid	氨基酸
ng	Nanogram	纳克
ul	Microliter	微升
min	Minute	分钟
ml	Milliliter	毫升

前 言

1.1 黄病毒概述

黄病毒科 (*Flaviviridae*) 病毒为单股正链的 RNA 病毒, 包括黄病毒属 (*Flavivirus*)、丙型肝炎病毒属 (*Hepacivirus*)、瘟病毒属 (*Pestivirus*) 和 *Pegivirus* 四属 89 种病毒。其中最受人们关注且对人类影响最严重的主要是登革热病毒 (DENV)、乙型脑炎病毒 (JEV)、黄热病毒 (YFV)、寨卡病毒 (ZIKV)、蜱传脑炎病毒 (TBEV) 和西尼罗河病毒 (WNV)。黄病毒科病毒主要在热带、亚热带和北半球其他地区流行, 通过蜱、蚊等节肢动物叮咬传染, 感染后通常会引起人和动物不同程度的系列不良反应, 甚至会对人和动物的生命安全造成威胁^[1,2]。目前为止除了有针对 YFV、TBEV、JEV 和 DENV 的减毒活疫苗外, 尚未有其他正式批准用于人类黄病毒感染预防和治疗的其他抗黄病毒疫苗。

1.1.1 登革热病毒简述

DENV 在系统分类学上属于黄病毒科黄病毒属, 现已发现它有 5 种血清型^[3,4]。全世界每年约有 400 亿人感染登革热, 22 万例患者因此而死亡^[5]。最初 DENV 只在亚洲东南部少数几个国家流行, 之后随着国际贸易运输及人口跨区域流动将携带有病毒的埃及伊蚊携带到非疫区, 使得 DENV 逐渐在全世界范围内流行^[6]。DENV 感染可导致多种临床表现, 从轻度发热到重度登革出血热和登革热休克综合征, 伴有血小板减少、白细胞减少和血管通透性增加^[5]。目前并没有针对登革热的特定抗病毒药物, 现在登革热感染的治疗主要包括使用解热药治疗发热或疼痛, 尽管一些减毒四价活疫苗已获准用于登革热的治疗, 但并未有一个可以针对所有血清型登革热的疫苗^[5]。

1.1.2 乙型脑炎病毒简述

JEV 是一种包膜单链的阳性 RNA 病毒, 最初于日本爆发, 广泛分布于亚洲地区, 可引起神经性疾病, 由该病毒引起的日本脑炎是东亚和东南亚最重要的病毒性脑炎之一^[7,8]。乙型脑炎病毒的传播媒介主要是三带喙库蚊, 猪和鸟是其天

然宿主,马和人是其终宿主,乙脑的流行与爆发通常与蚊子的活跃高峰期重叠^[9]。乙型脑炎感染后患者表现为不同的症状,从特殊反应到温和的感染,更甚者会进展为严重的脑炎。日本脑炎的病例数因国家而异,WHO 估计全世界每年约有 68000 例乙脑病例,死亡率可达 30%,20%到 30%的幸存者会遭受永久性神经系统后遗症^[10,11]。乙脑主要发生在儿童中,但任何年龄都有可能感染这种疾病,发病率为感染人群的<1%,发病后没有特异性治疗方法,只能进行支持性治疗^[12,13]。当前接种日本脑炎疫苗仍是预防 JEV 感染最有效的手段^[14]。

1.1.3 寨卡病毒简述

ZIKA 于非洲乌干达的 ZIKA 森林首次发现,是一种以伊蚊为传播媒介,但病毒的传播途径并不仅限于此,研究发现 ZIKA 可通过胎盘进行母婴传播,也可通过性传播的方式以及唾液、血液、尿液等体液进行人际传播^[15-20]。ZIKV 感染后的临床症状是非特异的,临床上经常与 DENV 和基孔肯亚病毒感染相混淆^[21]。有研究表明 ZIKA 感染可引起婴幼儿的小头症及成年人的格林巴氏综合征等神经系统疾病^[22-24]。截至到 2019 年 7 月,已有 87 个国家和地区有寨卡病毒流行的报道,对全球健康构成了威胁^[25]。然而,到目前还没有获得许可和可用的预防或治疗寨卡病毒感染的有效疫苗和/或抗病毒药物,虽然大多数寨卡病毒感染者通常会痊愈或从感染中恢复,可能不需要治疗,但病毒从孕妇传播给未出生的婴儿或胎儿会影响他们正常的神经发育,这就使得寨卡疫苗的开发非常必要^[25]。

1.1.4 蜱传脑炎病毒简述

TBEV 是人类最主要的蜱传病毒病原体,共有三种亚型,分别为 TBEV-Eu、TBEV-Sib 和 TBEV-FE^[26-28]。自然界中 TBEV 的主要宿主是小型啮齿动物,人只是其偶然宿主^[27]。TBE 流行于欧洲、西伯利亚、俄罗斯远东地区、中国北部和日本等地,在过去几十年中,其流行地区有所扩大,报告的病例数量在许多流行地区均有所增加^[27]。TBE 的发病率与死亡率因病毒亚型而异,TBEV-Eu 与多达 10% 患者的神经系统后遗症相关,死亡率为 0.5%-2%,TBEV-Sib 患者易发生长期感染,死亡率为 2-3%,而 TBEV-FE 的神经系统后遗症发生率较高,高达 40%的病例死亡,这也是感染最严重的亚型^[27-30]。绝大多数 TBEV 感染无症状,已发表

的数据表明,无症状感染者比例在 70%-98%之间^[31,32]。尽管 TBEV 有有效预防的疫苗,但由于许多风险人群的疫苗覆盖率较低,加上全球气候变化的影响,使得蜱虫的丰度逐年增加,栖息地日渐扩大,这进一步导致了 TBE 的发病率不减反而呈现逐年上升的趋势^[28,33-36]。

1.1.5 荆门蜱病毒简述

荆门蜱病毒(JMTV)是黄病毒科新发现的蜱传病毒,目前全球已发现其多种变种,且现在很多的研究都是对其变种进行研究,而且有研究表明荆门蜱病毒类病毒中阿龙山病毒对人有明确的致病性^[37]。JMTV 宿主范围非常广泛,常见的蜱、蚊等节肢动物都是其储存宿主,且其跨物种传播能力也很强,广泛感染多种哺乳动物,如灵长类(包括人)和啮齿类动物,但目前并没有证据表明该病毒在人与人之间传播^[37-41]。JMTV 的地理分布亦十分广泛,亚洲^[37,38,40-45]、非洲^[39,46]、美洲^[39,46-49]、欧洲^[43,49,50]的多种动物宿主中均发现有该病毒基因组的存在。JMTV 的基因组共由 S1-S4 四个片段组成,编码五种蛋白质,其编码的 NSP2 蛋白与黄病毒不分节段的 NS3 蛋白具有同源性,目前我们对于该蛋白的了解大多基于黄病毒科其他病毒^[51]。

1.2 黄病毒基因组结构及复制关键蛋白

黄病毒是一类有包膜的病毒,成熟的黄病毒粒子直径大小约有 50nm,其基因组为单股正链 RNA,具有传染性。基因组全长约为 10 - 11 kb,5'端具有 1 型帽子结构,3'端没有 poly(A)尾,两端各有一个非翻译区(UTR),中间是一个编码多聚体蛋白的大的开放阅读框,编码多聚蛋白^[42,52]。黄病毒复制过程主要依靠七种非结构蛋白组装成的复制复合体,即 NS1, NS3, NS5, NS2A, NS2B, NS4A, NS4B^[53]。其中 NS3 与 NS5 是黄病毒非结构蛋白中仅有的两种具有酶活性的蛋白质,是复制复合体的中心元件,直接参与基因组 RNA 的合成。NS5 与 NS3 作为黄病毒复制复合体的两个核心元件,融合了黄病毒编码的蛋白质所有的酶活性,在病毒基因组复制中扮演重要角色。NS3 是黄病毒编码的分子量仅次于 NS5 的第二大蛋白(约 69 kDa),为复制复合体中的关键蛋白,同样由两个主要功能区构

成。N 端约 170 个残基的蛋白酶与 C 端 400 多个残基的解旋酶功能域，两个功能区通过 10 余个残基的多肽链连接而成。NS3 是一种免疫优势蛋白，所有感染动物均可以产生抗 NS3 的抗体，但 NS3 抗体不具有病毒中和活性^[54]。

1.3 荆门病毒群的命名与分类

2010 年，张永振团队在湖北省荆门地区收集的微小牛蜱样本中分离得到了黄病毒类 RNA 片段，通过细胞培养和全基因组测定最终确定该病毒是一种新发现的黄病毒科黄病毒属病毒，并根据最初发现它的地理位置和蜱虫宿主将该病毒命名为荆门蜱病毒^[40]。

自首次发现 JMTV 后，世界各地学者开始从各地收集的蜱蚊虫中陆续发现 JMTV 病毒变体，这些病毒形成一个单独且多样的群，国际上尚未对该类病毒进行分类，我们把这个病毒群暂定为黄病毒科荆门病毒群^[50]。2016 年，Lander JT 等人从中美洲和南美洲采集的库蚊中分离出一种多组分 RNA 病毒，并检测到其与 JMTV 基因接近，后把它划分为荆门蜱病毒的一个分支，命名为瓜伊科库蚊病毒(*Guaico Culex virus* , GCXV)^[39]。2017 年 Erika C. Villa 等对 2011 年从巴西牛蜱中分离出来的基因组进行分析发现其与 JMTV 属同一物种的病毒，并将其命名为莫吉亚纳蜱病毒(*Mogiana tick virus* , MGTV)^[49]。2018 年 William Marciel de Souza 等在巴西南部寄生牛的微小扇头蜱中发现了两种荆门病毒类病毒，并将其命名为 *lihan tick virus* 和 *wuhan tick virus 2* , 进一步扩大了荆门病毒群^[55]。2019 年王泽东等人从内蒙古和黑龙江省有蜱叮咬史的患者血清中分离出了类 JMTV 样病毒，并将其命名为阿龙山病毒(*Alongshan virus* , ALSV)^[37]。近些年通过宏基因组学方法，在其他节肢动物中发现了武汉跳蚤病毒(*Wuhan flea virus* , WHFV)、武汉蟋蟀病毒(*Wuhan cricket virus* , WHCV)、武汉蚜虫病毒 1(*Wuhan aphid virus 1* , WHAV1)、武汉蚜虫病毒 2(*Wuhan aphid virus 2* , WHAV2)和双高昆虫病毒 7(*Shuangao insect virus 7* , SAIV7)，对其 NS3 样片段和 NS5 样片段进行了系统发育分析，分析结果表明这些病毒均与荆门蜱病毒属于同一种^[50]。

1.4 筛查方法说明

现有文献对 JMTV 的检测基本都是基于高通量测序和分子诊断技术来发现宿主中的 JMTV，也有一些进行病毒的分离培养，但一直没有找到病毒培养合适的细胞系，所以在病毒的分离培养过程中 JMTV 病毒传 3 代后基本自动消失。所以基于此本研究使用酶联免疫吸附试验（ELISA）方法进行血清抗体的检测。ELISA 检测抗体（抗原）的实验原理按步骤分为以下三个：（一）包被：抗原或抗体能以物理性吸附于固相载体表面，原因是蛋白质和聚苯乙烯表面间的疏水性部分相互吸附，吸附之后能保持抗原抗体反应等免疫活性；（二）标记：抗原或抗体通过共价键与酶连接成酶结合物，而此种酶结合物仍能保持其免疫活性和酶催化特点；（三）显色：酶结合物与相应包被在固相载体的抗原或抗体结合后，也被固定在固相载体上，加入酶的底物之后出现显色反应，根据反应的颜色深浅可计算抗原或抗体的相对含量。常见的 ELISA 方法有：双抗体夹心法、竞争法和间接法。本文中用到的就是间接 ELISA 检测法。

1.5 本研究的内容及意义

荆门蜱病毒隶属于黄病毒科荆门病毒类病毒。该类病毒尚未被纳入国际疾病分类中。虽然荆门蜱病毒于 2010 年首次发现，但目前已在全球 30 多个国家和地区均有发现该病毒和类病毒的存在，这类病毒在林区和山区中更加流行，主要通过蚊、蜱虫等节肢动物叮咬传染多种哺乳动物，感染后会造成人和动物系列不良反应。目前并未有针对该病毒感染的疫苗和特效药。因此有必要深入研究该类病毒，提高对荆门病毒群病毒的认识。目前，对 JMTV 的检测方法主要集中在病毒核酸检测方面，例如多重定量 PCR 技术（qPCR）^[56,57]，多重聚合酶链式反应（mPCR）技术^[38,39,44]等，缺乏 JMTV 抗体检测相关的研究，人群和动物携带 JMTV 的状况未知。近些年对 JMTV NS3 蛋白的相关研究并不多，对这个蛋白的确切结构和具体功能更是知之甚少，因此我们对 JMTV NS3 的认识和推测主要来源于黄病毒科的重要成员，如登革热病毒（DENV）、寨卡病毒（ZIKV）、乙型脑炎病毒（JEV）、黄热病毒（YFV）

等的研究结果^[54,58-61]。因此,本文通过构建 JMTV NS3 原核表达质粒,在大肠埃希菌中表达 JMTV NS3 蛋白并纯化,初步建立起基于 JMTV NS3 蛋白的 ELISA 检测方法,利用该方法对人群和动物感染状况进行筛查,初步掌握 JMTV 在人群和动物中感染状况,提供人群和动物 JMTV 感染基础数据。

第一部分 JMTV NS3 蛋白的原核表达和纯化

1. 实验材料与方法

1.1 主要仪器与试剂

1.1.1 主要仪器设备

表 1-1 实验中主要使用的仪器设备和耗材

Table 1-1 Main instruments and consumables used in the experiment

仪器名称	公司品牌及型号
电子天平	瑞士 METTLER/PB153-S/FACT
凝胶电泳仪	杭州大和热磁电子有限公司/PAC/1000
梯度 PCR 仪	德国/SEMSOQUEST
旋涡振荡器	北京华欣宏业科贸中心
超低温保存箱	青岛海尔股份有限公司
紫外分光光度计	美国瓦里安中国有限公司/CARY-50
生物安全柜	青岛海尔生物医疗股份有限公司/HR1500-IIA2-E
凝胶成像系统	香港伯乐太平洋有限公司/Gel Doc XR
台式高速冷冻离心机	德国 Eppendorf/5810R (艾本德)
恒温振荡器	美国精骐/IS-RDD3
高压灭菌器	中国致微(厦门)仪器有限公司
台式酸度计	梅特勒/FE20K
恒温金属浴	杭州博日/CHB202
电泳仪	北京博思/600 Plus
超灵敏定量荧光凝胶成像	日本 GE 公司
酶标仪	美国伯乐公司
CO ₂ 培养箱	Thermo Fisher
蛋白电泳系统	美国伯乐公司
高速离心机	日本日立公司
脱色摇床	美国精骐/IS-RDD3
双色红外激光成像系统	美国 Li-cor
超声破碎仪	美国思博明科学器材有限公司
PVDF 膜	Millipore
0.45um 滤膜	Millipore

1.1.2 实验试剂

表 1-2 实验中主要使用的试剂及用途

Table 1-2 Main reagents used in the experiment and their purposes

试剂名称	生产厂家	用途
质粒提取试剂盒: Plasmid mini kit I	OMEGA 公司	提取重组质粒
蛋白 Marker	TAKARA 公司	SDS-PAGE 凝胶电泳
胶回收试剂盒: QIAquick Gel Extraction kit (250)	QIAGEN	质粒切胶回收
BCA 蛋白浓度测定试剂盒	北京索莱宝科技有限公司	测定蛋白浓度
克隆载体 pET-22b (+)	北京索莱宝科技有限公司	构建原核表达质粒
BL21 (DE3) 感受态细胞	北京索莱宝科技有限公司	构建原核表达系统
LB (Luria broth)	北京陆桥技术股份有限公司	配制 LB 固体/液体培养基
AGAR	Beijing Biodee Biotechnology Co	配制 LB 固体培养基
氨苄青霉素钠 (Amp)	北京索莱宝科技有限公司	配制含有抗性的培养基
琼脂糖 (Agarose)	GENVIEW	配制琼脂糖凝胶
EDTA	美国 Life science 公司	配制琼脂糖凝胶
硼酸	美国 Life science 公司	配制琼脂糖凝胶
胶回收试剂盒	QIAGEN	回收 RNA 目的条带
DNA Marker (DL2000)	TAKARA	琼脂糖凝胶电泳
Ni Sepharose FF	卡梅德生物科技有限公司	蛋白复性浓缩
IPTG	美国 Life science 公司	蛋白表达诱导剂
PMSF	北京索莱宝科技有限公司	蛋白酶抑制剂
咪唑	北京索莱宝科技有限公司	配制蛋白纯化液
尿素 (Urea)	Biotopped 公司	配制蛋白纯化液
ECL 显影液	TAKARA 公司	WB 显色
NaCl	北京化工厂有限责任公司	配制蛋白纯化液
1.0M Tris.HCl (PH=6.8)	北京索莱宝科技有限公司	制备 SDS-PAGE 凝胶
过硫酸铵 (AP)	MREDA	制备 SDS-PAGE 凝胶
30%丙烯酰胺/甲双叉丙烯酰胺溶液	北京索莱宝科技有限公司	制备 SDS-PAGE 凝胶
TEMED	SIGMA-ALORICH	制备 SDS-PAGE 凝胶
1.5M Tris.HCl (PH=8.8)	北京索莱宝科技有限公司	制备 SDS-PAGE 凝胶
甲醇	国药集团化学试剂有限公司	配制转膜缓冲液、染胶液
Tris	美国 Life science 公司	配制电泳缓冲液
十二烷基硫酸钠 (SDS)	北京索莱宝科技有限公司	配制电泳缓冲液
甘氨酸 (Glycine)	北京索莱宝科技有限公司	配制电泳缓冲液
冰醋酸	国药集团化学试剂有限公司	配制 SDS-PAGE 染胶液
考马斯亮蓝 G-250	北京索莱宝科技有限公司	配制 SDS-PAGE 染胶液
PBS 缓冲液 (pH7.4)	赛默飞世尔生物化学制品 (北京) 有限公司	清洗菌体

1.2 生物信息学分析

（一）数据库

GenBank: 美国国家生物技术信息中心建立的 DNA 序列数据库, 根据此公共平台获取目的基因及蛋白序列相关数据, <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>。

NCBI: National Center for Biotechnology Information, 美国国立生物技术信息中心, <https://www.ncbi.nlm.nih.gov>。

（二）引物设计

Primer premier6.0: 主要用途是根据目的基因序列设计特异性引物。

反向核酸序列互补转换在线工具 - 纽普生物-NovoPro, 根据此在线软件实现核酸序列互补转换, https://www.novopro.cn/tools/rev_comp.html。

（三）序列编辑

DNAStar Lasergene7.1: 这是一款综合性序列分析软件, 其中包括 EditSeq、SeqMan 及 Protean 等众多应用程序, 通过这些程序可以对测序结果进行编辑、整理以及拼接, 同时针对序列进行开放读码框的搜索以及多重比对等。

Editplus4: 该软件主要用于核酸及蛋白序列的编辑及管理。

BioEdit: 这是一款用于蛋白质、核酸序列的编辑以及分析的软件。

（四）序列比对

MAFFT: Multiple Sequence Alignment based on Fast Fourier Transform, 一种多序列比对的方法, 经常用于系统进化树构建的过程中。

MEGA5.0/7.0: 对核苷酸及氨基酸序列进行比对, 同时可用于系统进化树的构建及模型的选择。

（五）蛋白序列分析

SignalP-5.0 prediction (Eukarya) 软件: 应用最广泛的氨基酸序列信号肽在线预测工具, 预测给定的氨基酸序列中是否存在潜在的信号肽剪切位点及其所在位置。

TMHMM SEVER 在线软件: 用于预测蛋白质中跨膜螺旋的实时在线免费软件, <https://services.healthtech.dtu.dk/service.php?TMHMM-2.0>。

1.3 JMTV NS3 蛋白序列的分析

根据 GenBank 上收录的 JMTV NS3 的基因序列 (GenBank 登录号为: NC_024114.1), 获得 NS3 的氨基酸序列, 利用 SignalP-5.0 prediction (Eukarya)、Sequence 软件和 TMHMM SEVER 在线软件 (<https://services.healthtech.dtu.dk/service.php?TMHMM-2.0>) 对 JMTV NS3 蛋白序列的信号肽和跨膜区域进行分析。

1.4 NS3 序列的合成

根据 GenBank 上收录的 JMTV NS3 的基因序列 (GenBank 登录号为: NC_024114.1), 应用 DNA Star 软件对 NS3 基因的核苷酸序列进行分析, 根据大肠杆菌对密码子的偏好性对 NS3 蛋白的选定的基因序列进行优化, 并将优化后的序列交由北京睿博兴科生物技术有限公司合成。根据 NS3 基因序列设计特异性引物用于后续阳性克隆筛选的 PCR 扩增, 特异性引物由北京睿博兴科生物技术有限公司合成, 引物设计结果见表 1-3。

表 1-3 引物设计结果
Table 1-3 The result of primer design

引物名称	引物序列 (5'-3')
NS3-f	CCATGGTGGGGGCTGTTGTTATTTTG
NS3-r	CTCGAGCTATTCCTCCCGCTGCTC

1.5 原核表达 NS3 重组质粒的构建及阳性克隆的筛选

使用 NCO 1 和 Xho1 分别对 NS3 基因和 pET-22b (+) 质粒进行酶切, 酶切反应体系见表 1-4 (参考^[62]), 酶切反应条件为 37°C 4 h。酶切反应完成后使用琼脂糖凝胶电泳进行检测, 并使用琼脂糖凝胶 DNA 回收试剂盒将酶切后的 NS3 基因和 pET-22b (+) 载体回收, 使用 T4 DNA 连接酶将 NS3 基因和 pET-22b (+) 载体连接, 连接反应体系见表 1-5 (参考^[62]), 连接反应条件为 16°C

过夜；将连接产物热激转化至 JM109 感受态细胞，涂布到含有氨苄抗性的琼脂平板（Amp，100 ug/ml）中，37℃培养过夜，次日使用 PCR 鉴定单克隆菌落，并将阳性克隆送至北京睿博兴科生物技术有限公司进行测序鉴定。将构建成功的重组质粒命名为 pET-22b-JMTV-NS3（148-808aa）。

胶回收使用的试剂盒为 QIAquick Gel Extraction kit(250)，具体切胶回收步骤为：

（一）将配制好的琼脂糖凝胶倒入电泳槽制胶器中，插入合适孔径的梳齿，等待 20 min 至胶凝固；

（二）将凝固的琼脂糖凝胶放入电泳槽内，让 0.5×TBE 浸没，拔出梳齿，将全部酶切产物加入齿孔内，其中一个齿孔内加 DNA Marker；

（三）插上电源，调整合适的电压（200 V），按下开关开始电泳，至条带跑到合适的位置；

（四）将琼脂糖凝胶放置于凝胶成像仪的合适位置，成像；

（五）通过凝胶成像系统呈现出来的目的条带位置，用小刀把目的条带所在处的胶块切下，放到 1.5 ml EP 管中，进行称重；

（六）取胶体积三倍的 Buffer QG 加入到放胶块的 EP 管中；

（七）将 EP 管置于 50℃金属浴中加热 10 min，加热期间随时晃动 EP 管，加速管中胶块的融化；

（八）待胶块完全融化，从金属浴中取出 EP 管，取 1 倍体积异丙醇加入 EP 管中，充分混匀；

（九）取一个吸附柱，将所有的混合液分批次过柱子，每次加入液体后静置约 2 min，保证混合液里的酶切产物尽可能多的吸附在柱子上（10000 rpm，1 min）；

（十）弃去废液，取 500 ul Buffer QC 加入柱子，离心 10000 rpm，1min；

（十一）弃去废液，取 750 ul Buffer PE 加入柱子，离心 10000 rpm，1 min；

（十二）弃去废液，空转离心，10000 rpm，2 min；

（十三）将吸附柱置于一个干净的 1.5 ml EP 管中，打开盖子晾 2 min，保证柱子上的有机溶剂充分挥发干净；

（十四）取 30 ul RNase free water 加入吸附柱中，孵育 1 min，离心，10000 rpm，2 min；

(十五) 收集管中的回收产物, 放置于 -20°C , 待用。

表 1-4 酶切反应体系

Table 1-4 The enzymatic digestion reaction system

组分	体积/ μl
pET-22b/NS3 基因回收产物	1.0
NCO1	1.0
Xho1	1.0
10×CutSmart Buffer	1.0
ddH ₂ O	补足至 10.0

表 1-5 连接反应体系

Table 1-5 The connection reaction system

组分	体积/ μl
pET-22b 酶切回收物	1.0
NS3 基因酶切回收物	1.0
T4DNA Ligase	1.0
10×Ligase buffer	1.0
ddH ₂ O	补足至 10.0

1.6 NS3 重组质粒的提取

使用 Plasmid mini kit I 质粒提取试剂盒, 小规模提取高拷贝质粒。具体操作步骤如下:

(一) 从 LB 固体板 (Amp⁺, 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$) 上挑取单菌落至含有 6 ml LB 液体培养基的 14 ml 细菌培养管里 (Amp⁺ 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$), 然后将其置于 37°C 摇床中震荡培养 (220 rpm, 15 h);

(二) 取昨晚培养好的菌液 3 ml, 离心 (10000 rpm, 1 min), 收集菌体;

(三) 在收集到的菌中加入 250 μl Solution I, 充分吹吸使菌完全重悬 (吹吸或涡旋使菌充分重悬);

(四) 加入 250 μl Solution II, 通过翻转和旋转 EP 管使菌裂解, 此过程见 EP 管中的溶液逐渐澄清 (裂解反应不超过 5 min, 防止裂解过度);

- (五) 加入 350 ul Solution III进行混合，直到形成白色絮状沉淀；
- (六) 离心（室温，13000 rpm，10 min）；
- (七) 小心地将离心后上清吸入装配在 2 ml 收集管中干净的 HiBind Miniprep 柱中，确保不要将沉淀吸入柱中，离心（10000 rpm，1 min）；
- (八) 丢弃收集管中的液体，在吸附柱中加入 500 ul 的 Buffer HB，离心（室温，10000 rpm，1 min）；
- (九) 丢弃收集管中的液体，于吸附柱中加入 700ul 无水乙醇稀释的 DNA Wash Buffer，离心（室温，10000 rpm，1 min）；
- (十) 空转离心（13000 rpm，2 min），使吸附柱干燥；
- (十一) 将吸附柱放置于一个干净的 1.5 ml EP 管中，晾干吸附柱 2 min，取 50 ul RNase free water 直接加到柱基质上，室温孵育 2 min，离心（13000 rpm，1 min）洗脱质粒；
- (十二) 测定样品：在 260nm-280nm 的吸光度测量样品中质粒的浓度。

1.7 NS3 重组质粒的转化

- (一) 取出保存于-80℃的感受态细胞 E.coli BL21（DE3）冰上融化，待感受态细胞融化后取 5 ul 重组质粒加入到感受态细胞中，用移液枪吹吸混匀，冰上静置 30 min；
- (二) 42℃ 水浴热激（水浴锅提前调好温度）90 s 后立即放入冰中 5 min；
- (三) 加入 800ul 无抗性的 LB 液体培养基（超净工作台中进行）；
- (四) 恒温震荡培养（37℃，180 rpm，1 h）；
- (五) 离心（8000 rpm/min，2 min），除去部分培养基，剩余约 100ul 液体，用移液枪将液体与菌体吹吸混匀；
- (六) 将所有菌液吸出涂布在含有氨苄抗性的 LB 固体平板（Amp⁺，100 ug/ml）上，待平板上液体吸干后倒置平板，过夜培养（37℃，15 h）。

1.8 重组 NS3 蛋白的小量表达与鉴定

(一) 从转化后培养的平板中挑取不同单克隆菌株, 放入 6 ml 含有氨苄抗性的 LB 液体培养基中(Amp⁺, 100 ug/ml), 并将其置于恒温振荡器中过夜活化(37°C, 220 rpm, 12 h);

(二) 取昨夜培养的菌, 在超净台中进行, 按 1: 100 的比例转接于 10 ml 含氨苄西林抗性的液体培养基(氨苄含量 100 ug/ml) 中, 恒温振荡器中(37°C, 220 rpm), 至 OD₆₀₀ 值为 0.6-0.8 之间取 100 ul 作为样本, 剩余的液体中加入终浓度为 1 mmol/L 的 IPTG 诱导表达 4 h;

(三) 取 100 ul 诱导后的菌液作为样本, 剩余菌液收集起来(12000 rpm, 离心 2 min), 用 PBS 缓冲液清洗菌体两次, 控干水分, -80°C 冻融菌体两次, 收集起来的菌泥利用 2 ml Binding Buffer (不含尿素), pH 7.2 重悬; 420 W 冰浴超声破碎, 超声 3 S, 间隔 5 S, 持续 15 min; 12000 rpm, 4°C 离心 20 min 收集上清和沉淀, 待用;

(四) SDS-PAGE 鉴定:

1. 样品准备: 诱导前, 诱导后收集的菌液以及超声后的上清、沉淀与 2×SDS-PAGE Loading Buffer 1: 1 等体积混合, 100°C 煮模板 10 min;
2. 分离胶配制: 按照附录 12% 分离胶各成分比例配制 20 ml 分离胶, 缓慢注入到制胶玻璃板中, 使液面低于梳齿 0.5 cm 即可;
3. 为使浓缩胶与分离胶交界线更加平滑, 缓慢注入 1 ml 异丙醇, 进行压胶处理;
4. 等分离胶凝固后, 倒掉异丙醇, 并用滤纸把玻璃板中残留的异丙醇吸干;
5. 浓缩胶配制: 按照附录 5% 浓缩胶各成分比例配制 6 ml 浓缩胶, 缓慢注入到制胶玻璃板中, 插入 10 孔梳齿;
6. 待 SDS-PAGE 胶凝固后(约 15 min), 取下玻璃板, 组装到电泳槽上;
7. 往电泳槽里倒入适量的 1× 电泳缓冲液, 拔去梳齿准备上样;
8. 样本各取 10 ul 上样, 插上电泳仪电源, 调整电泳条件为 80 V, 30 min, 按下开始键开始电泳, 待蛋白 Marker 条带分离后将电泳条件调成 110 V, 50 min;
9. 电泳结束后, 取下凝胶, 并切去分离胶, 将浓缩胶放入去离子水中漂洗 3 遍;

10. 倒掉去离子水，加入考马斯亮蓝染液，使其覆盖凝胶，多次加热染液，置于水平摇床上摇晃染色（染胶约 30 min）；
11. 倒掉考马斯亮蓝染液，用流水冲洗干净凝胶，倒入脱色液水平摇床摇晃脱色，重复 3 次，每次约 15 min，看目的蛋白是否诱导表达出来及蛋白表达形式的鉴定。

（五）Western Blot 鉴定：

1. 按照过程（四）制备 SDS-PAGE 凝胶并对样本进行电泳；
2. 电泳结束后把胶取出，用去离子水清洗一次泡入转膜液中备用；
3. 将转膜液倒入转膜槽里，滤纸、海绵垫放入转膜液中浸湿；
4. 戴干净 PE 手套剪取合适大小的 PVDF 膜（剪角做好记号以区分蛋白面），放入甲醇中激活浸泡约 2 min（通常 15-30 s 就可激活），再放入转膜液中，去除多余的甲醇；
5. 按照白板（+）→黑网→滤纸→PVDF 膜→胶→滤纸→黑网→黑板（-）的顺序将胶和膜放好，并把里面的气泡轻轻的赶走；
6. 合起夹子，将夹子放入转膜槽中，注意夹子的黑面朝向转膜槽的黑面，夹子的白面朝向转膜槽的红面；
7. 盖上盖子，将转膜槽置于碎冰盒中，连接电源，调整转膜条件为 200 mA，2 h 按下开始键，开始转膜；
8. 转膜结束后，取出并打开夹子，用镊子将转有蛋白的 PVDF 膜取出，加入 PBST 缓冲液冲洗 1 遍；
9. 封闭：加入 5%脱脂乳，使其覆盖 PVDF 膜，4℃封闭过夜；
10. 洗涤：倒掉 5%脱脂乳，加入 PBST 缓冲液，水平摇床摇晃 15 min，清洗 3 次；
11. 敷一抗：一抗为小鼠抗 his 标签抗体（用 5%脱脂乳按照 1：2000 进行稀释），室温孵育 1 h；
12. 一抗回收，倒入 PBST 缓冲液，水平摇床摇晃 15 min，清洗三次；
13. 敷二抗：二抗为 HRP 标记的抗小鼠 IgG 抗体（用 5%脱脂乳按 1：5000 进行稀释），室温孵育 40 min；

14. 二抗回收，倒入 PBST 缓冲液，水平摇床摇晃 15 min，清洗 3 次；
15. 显影：打开 ECL 试剂盒，将 A 液和 B 液 1: 1 混匀待用，打开凝胶成像仪，将底板换成白板，将 PVDF 膜置于适当位置处，取适量混合液加到 PVDF 膜上，调整合适的曝光时间开始成像，并保存结果。

1.9 重组 NS3 蛋白的大量表达与纯化

（一）目的蛋白的获取

1. 从上述表达鉴定中选取能够表达目的蛋白的单克隆 BL21 菌株，接种到 1 L LB 培养基（Amp⁺，100 ug/ml）中，220 rpm，37°C 扩大培养至 OD₆₀₀ 至 0.6-0.8，再加入终浓度为 1 mM/L IPTG 37°C 诱导培养 4 h 后，4000 rpm 离心收集菌体待用；
2. 收集菌：收集获得的菌泥利用 10 ml Binding Buffer（不含尿素），pH 8.0 清洗菌泥两次，将菌泥放置于 -80°C 冻融两次；
3. 收集获得的菌泥利用 10 ml Binding Buffer（不含尿素），pH 8.0 重悬；420 W 冰浴超声破碎，超声 3 S，间隔 5 S，持续 15 min；12000 rpm，4°C 离心 20 min 收集上清和沉淀，待用；
4. 沉淀中加入 10 ml Binding Buffer（含尿素），PH=8.0 重悬，加入终浓度为 1 mM 的 PMSF；420W 冰浴超声，超声 3S，间隔 5S，持续 15 min；12000 rpm，4°C 离心 20 min 收集上清，待用；
5. 将上一步获得的上清液，用 0.45 um 滤膜过滤，收集液体。

（二）（包涵体）目的蛋白 NS3（148-808aa）的纯化

1. Ni 柱的准备：向空的蛋白纯化柱中加入 Ni 混合树脂，使树脂充分悬浮，并静置于室温中使其自然沉降，使用 10 ml 去离子水洗柱，排出液体；使用 10 ml PBS 洗柱，排出液体；加入 10 ml 的 Binding Buffer（含尿素），pH8.0 使树脂充分悬浮，并静置于室温使其自然沉降，排出多余的 Binding Buffer（含尿素），pH8.0。
2. 蛋白的纯化：
包涵体蛋白的纯化：取沉淀超声后过滤的上清（取 50 ul 留样，标记：沉淀）过 Ni 柱，将上清液缓慢贴壁加入 Ni 柱中，每次加 1-2 ml，使液体慢慢流出自然排

出柱体（过柱排出的液体可收集于另一个 50 ml 离心管中保存，标记过柱后），待上清液过柱流出至完全后，堵住柱底部，慢慢加入总体积约为 10 倍树脂体积的 Wash Buffer（含尿素），分 4-5 次加入；待 Wash Buffer（含尿素）完全排出后（过柱排出的液体可收集于干净的收集管中，标记洗脱液），堵住柱底部，加入总体积 10 ml 的洗脱缓冲液：Elution Buffer(含尿素)，pH8.0，分 5 次加入；收集流出的液体，理论上蛋白就溶解在该液体中。

3. 蛋白的复性和浓缩：

收集的含有蛋白的液体（取 50 ul 留样）转移至超滤管（10 KD）中，离心（4℃，6000 rpm，5 min），向超滤管中补充已预冷的 PBS 至原刻度；重复上一步骤，多次缓慢稀释排出液体中的尿素等溶质，同时使蛋白复性，直至含蛋白的溶液液面每次离心后不再变化表明蛋白复性完成，对复性后的蛋白进行分装，用于后续的实验和储存。

4. SDS-PAGE 鉴定（详细步骤同上）：取流穿，纯化后样品各 100 ul，与 2×SDS loading buffer1: 1 等体积混合，100℃煮模板 10 min，经 5%浓缩胶和 12%分离胶 SDS-PAGE 电泳，随后使用考马斯亮蓝染色进行观察，验证目的蛋白的纯化效果（跑胶：恒压 80 V，30 min，110 V，60 min）。

5. Western Blot 鉴定（详细步骤同上）：纯化的蛋白经 SDS-PAGE 电泳后湿转至 PVDF 膜，5%脱脂奶粉 4℃封闭过夜，PBST 洗膜 3 次，每次 15 min，一抗为按 1: 1000 比例用 5%脱脂奶粉封闭液稀释的鼠抗 his 标签特异性血清抗体，37℃孵育 1h，PBST 洗膜 3 次，每次 15min，二抗为按 1: 5000 比例用 5%脱脂奶粉封闭液稀释的 HRP 标记的山羊抗小鼠 IgG 抗体，37℃孵育 40 min，PBST 洗膜 3 次，每次 15 min，ECL 法显色分析结果（转膜：恒流 200 mA，2 h）。

1.10 蛋白浓度的测定

（一）配制工作液：根据标准品和样本数量，按 50 体积 BCA 试剂加 1 体积 Cu 试剂（50: 1）配制成 BCA 工作液，充分混匀（混合时可能会有浑浊，混匀后消失）。

（二）稀释标准品：取 10 ul BSA 标准品用 PBS 稀释至 100 ul，使标准品终浓

度为 0.5 mg/ml。将标准品按照 0, 2, 4, 6, 8, 12, 16, 20ul 加入到 96 孔板的样品孔中, 加 PBS 补充至 20ul。

(三) 将样品做适当稀释(最好多做几个梯度, 如 2, 4, 8 倍稀释), 加 20 ul 到 96 孔板中。

(四) 每个孔加分别入 200 ul BCA 工作液, 37℃ 放置 30 min, 用酶标仪测定 A540-595nm (根据实验室条件选择 540nm), 根据标准曲线计算出蛋白浓度, 因注意防止因水分蒸发影响检测结果。

2. 结果与分析

2.1 NS3 蛋白全长分析

蛋白分析结果表明信号肽稳定, 估计半衰期为 30 h, 不稳定指数约为 43.65, 脂肪族指数为 89.78。蛋白序列分析显示蛋白全长 808aa, 1-29aa 为信号肽, 30-147aa 含有两个跨膜结构域(30-52aa, 125-147aa)和亲水区(148-808aa)(图 2-1、2-2)。因此本研究选取 148-808aa 进行 NS3 重组蛋白的表达与纯化, 蛋白大小约为 75 kDa。

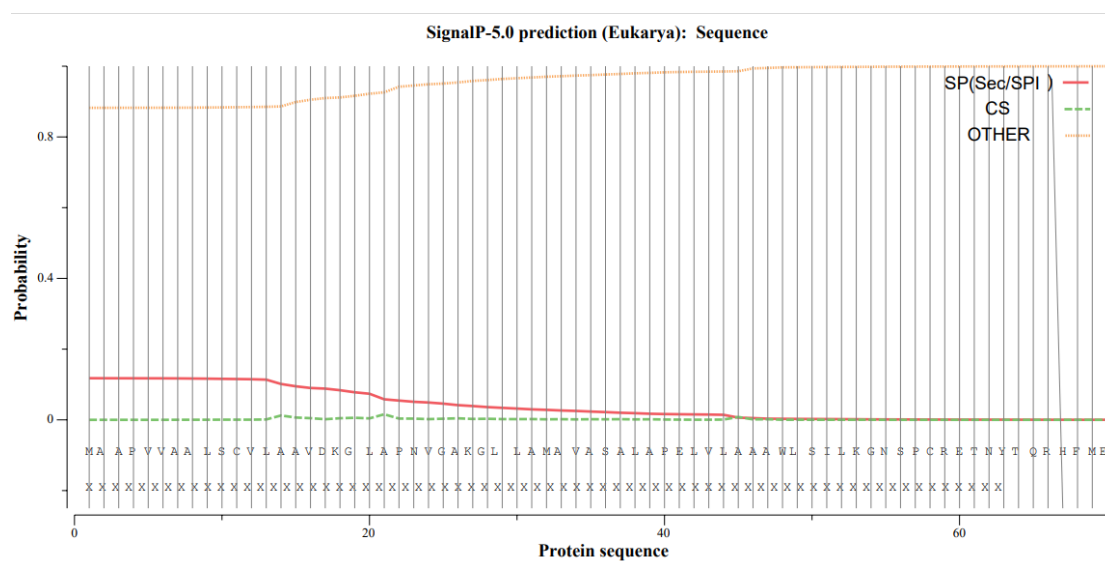


图 2-1 NS3 信号肽分析
Fig.2-1 NS3 Signal peptide analysis.

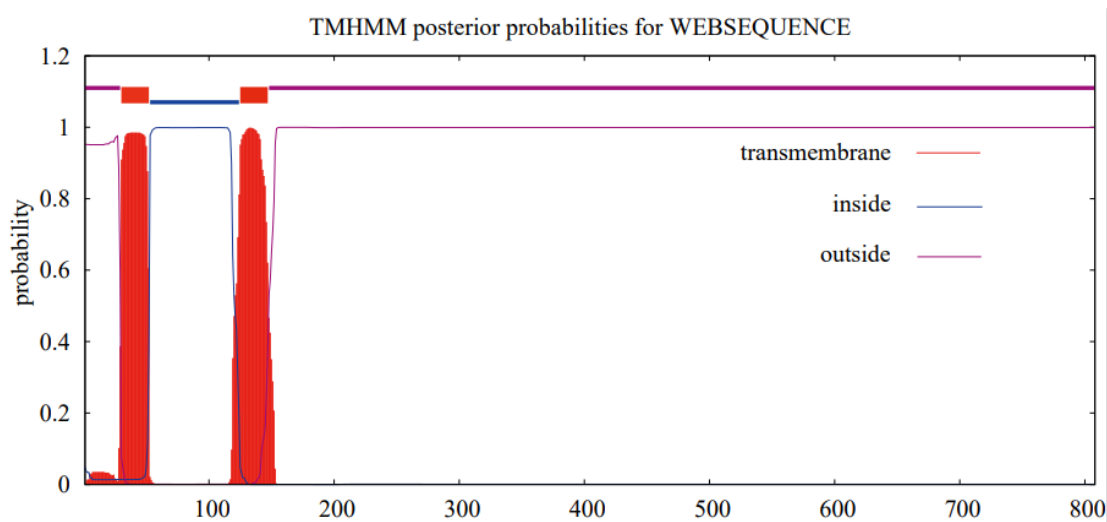


图 2-2 NS3 蛋白跨膜结构域

Fig 2-2 Transmembrane domain of NS3 protein.

2.2 NS3 蛋白（148-808AA）序列的合成

NS3 蛋白氨基酸序列：

MAAPVVAALSCVLA AVDKGLAPNVGAKGLLAMAVASALAPELVLA
 AAWLSILKGNSPCRETNYTQRHFMELLPTIGWLSLEYAAPLDIVLNEEDTPHQED
 RRLYEKALNLSYIGRTRNYLLTAIVVLTLASVFYSPSAGVLGAVVILTVSFLPRG
 DLGGRTLDDSDAPVGEAEGYRVFEHIGPWAFMKGVATVTGGSISSLHVTGDR
 AVWIEDRRYEPSVVQPSGDFIAWGRPPVIKPLKEDDEVVALALHPITDTVLPLR
 SRTARVQGNAIYRISRTSPGVSGSPLFVVDLDENGDRTFALAGTIGRSIRAGPY
 HQYEIQSHLPLPTTPYDTILRAGIVLQLFSHPGAGKTRAPEYVRQLMTWSNK
 VYVAGPTRVVAREMLEALEGTRWVCAMVKGLPKPHALARVVVTTHQTLLRY
 ALTSGLLASRDVSYVLDETHVDSAQTKVLRALVHQAVGKDKSKAACIEMTAT
 GRDSTSGEIRVATDSNYHIEEHVYTTPVAQAVKQYADTYGPRRIAVFVPGLTGK
 NGALQVAKQVRQLTDYATVVLSRKTYEKNIKLVFRDYPRLCIVTTSISECGA
 NYDLDAVFDTCQQYHYLVASGTKGMITPSTQAQTCQRRGRVGRRKEGQYY
 RPANYDLLQAPLDHPDSVTLLANMCLRALGLPEEPCGRVVEEAMLKMQPS
 KDQVYRWLTEGDTETLTETMAMYNVEGGRRSREQERTVRNRMKTYFHDVR
 WERMEDQEETPQPRPGEYIWDEEGPEMIQGALYVRAPPPHRVRVNEATYLRG

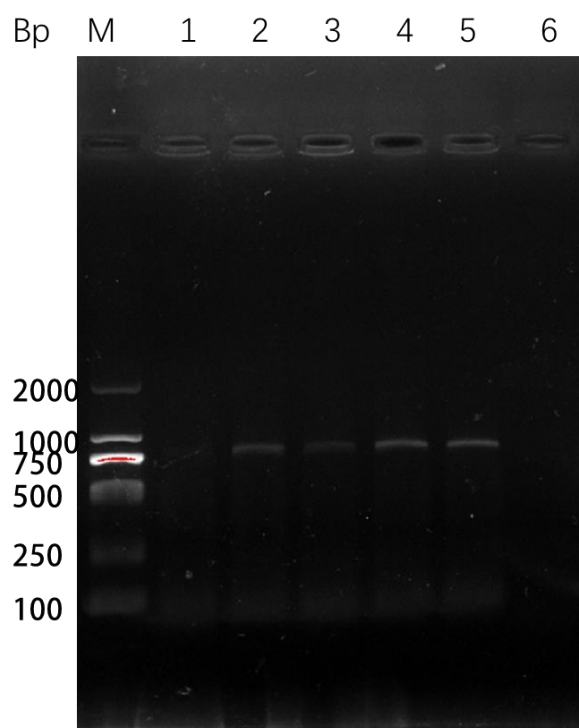
TVIETLREEADRELRETVAEQREE

优化后的 NS3 蛋白 148-808aa 核酸序列如下:

ATGACGGTGTCTTCCTGCCACGAGGAGACCTGGGGGGAAGAACGTT
GGATGACAGCGCGCCAGTCGGAGAGGCAGAGGGGATCTACCGGGTTTTTG
AGCATATCGGACCATGGGCCTTCATGAAAGGTGTGCGCCACTGTGACGGGGG
GGAGCATTGTGTCCTCACTCCATGTCACAGGGGATAGAGCAGTATGGATTG
AGGACCGCAGGTATGAGCCTAGTGTAGTCCAACCAAGTGGCGACTTCATAG
CTTGGGGGAGACCACCGGTTATAAAACCCCTGAAGGAGGACGATGAGGTA
GTGGCTCTGGCACTACACCCAATCACGGACACAGTTTTGCCGCTGAGATCG
AGAACAGCCAGAGTGCAGGGAAATGCTATCTACCGCATTAGCAGAACCTC
ACCAGGAGTGAGCGGGTCACCGCTCTTTGTGGTCGATCTTGATGAGAATGG
AGATCGCACCTTTGCACTAGCAGGGACAATAGGAAGAAGCATAACGCGCAG
GACCCTACCATCAATATGAGATTCAATCACACTTGCCGTTGCCACACACC
ATACGACACCATACTTAGAGCAGGCATAGTCCTCCAGCTATTCAGTCACCCT
GGGGCGGGTAAGACCCGCGCAATACCGGAGTACGTTAGGCAGCTCATGAC
CTGGTCCAACAAGGTCTACGTTGCCGGCCCGACTCGGGTGGTTGCCAGAG
AGATGCTGGAGGCGCTGGAGGGTACCCGGTGGGTGTGCGCCATGGTGAAG
GGGCTCCCAAAGCCCCATGCCTTGGCCAGAGTAGTCGTCACAACACATCA
AACCTTACTCCGCTACGCGCTCACCTCCGGGCTTTTGGCCTCGCGAGATGT
TTCATACGTGCTGGACGAGACGCATGTCGACTCAGCGCAGACTAAGGTACT
GCGAGCACTGGTACATCAGGCTGTGGGGAAGGACAAAAGCAAGGCAGCTT
GCATAGAGATGACCGCCACCGGGAGAGACTCCACTAGTGGAGAGATAAGA
GTGGCGACGGACAGCAACTACCACATCGAGGAGCACGTCTACACCACACC
TGTGGCCCAGGCAGTCAAACAGTATGCCGACACATACGGACCGAGGCGAA
TTGCGGTCTTCGTGCCAGGCCTGACGGGAAAGAACGGAGCCTTACAAGTA
GCTAAGCAGGTCAGGCAGCTCACTGACTACGCCACAGTGGTCTTGAGTAG
GAAGACGTATGAAAAGAACATCAAGCTGGTTTTTCAGGGACTACCCTAGAG
GGCTGTGCATAGTAACCACCTCCATTAGTGAATGCGGAGCCAATTATGACCT

GGACGCAGTTTTTGGACACATGCCAGCAATACCACTACCTTGTCACGGCTTC
GGGAACTAAGGGGATGATAACCCCTTCCACCCAGGCTCAGACCTGCCAAA
GGAGAGGCAGGGTTGGAAGGAGAAAGGAGGGCCAGTACTACCGGCCAGC
AAACTATGATCTGTTGCAAGCCCCTCCCCTGGACCACCCTGATTCCGTCAC
ACTGCTGGAGGCCAACATGTGCCTCAGGGCACTGGGGCTCCCAGAGGAGC
CGTGTGGAAGAGTTGTTGAGGAGGCAATGCTGAAAATGCAGCCCTCCAAA
GATCAGGTGTACAGGTGGCTGACCGAGGGAGACACGGAGACTCTAACAGA
GACCATGGCAATGTACAATGTTGAAGGTGGAAGGAGAAGCCGTGAGCAGG
AGAGAACAGTTCGAAACAGGATGAAAACCTATTTTCATGACGTTAGATGGG
AGAGAATGGAAGATCAAGAAGAGACACCACAACCAAGACCAGGAGAATA
CATTTGGGATGAAGAGGGCCCTGAGATGATACAAGGAGCATTGTACGTTAG
GGCCCCACCACCTCACAGAGTACGAGTAAACGAGGCCACCTACCTCAGGG
GCACTGTCATAGAGACCCTGAGAGAGGAGGCGGACAGAGAGCTAAGGGA
GACGGTGGCTGAGCAGCGGGAGGAA

使用设计好的引物，随机挑取 5 个菌落进行菌落 PCR 扩增，扩增后进行琼脂糖凝胶电泳，结果显示挑取的 5 个菌落均为阳性克隆菌落，PCR 目的条带约 792 bp，结果见图 2-3。



注：M:Marker；泳道 1-5：单菌落 PCR 结果；泳道 6：空白对照

图 2-3 菌落 PCR

Fig 2-3 Colony PCR

2.3 NS3 蛋白（148-808AA）原核表达载体构建

将 NS3（148-808aa）对应的基因序列克隆至 pET-22b(+) 载体后，获得 pET-22b-JMTV-NS3（148-808aa）原核表达载体，构建好的重组质粒图谱见图 2-4。

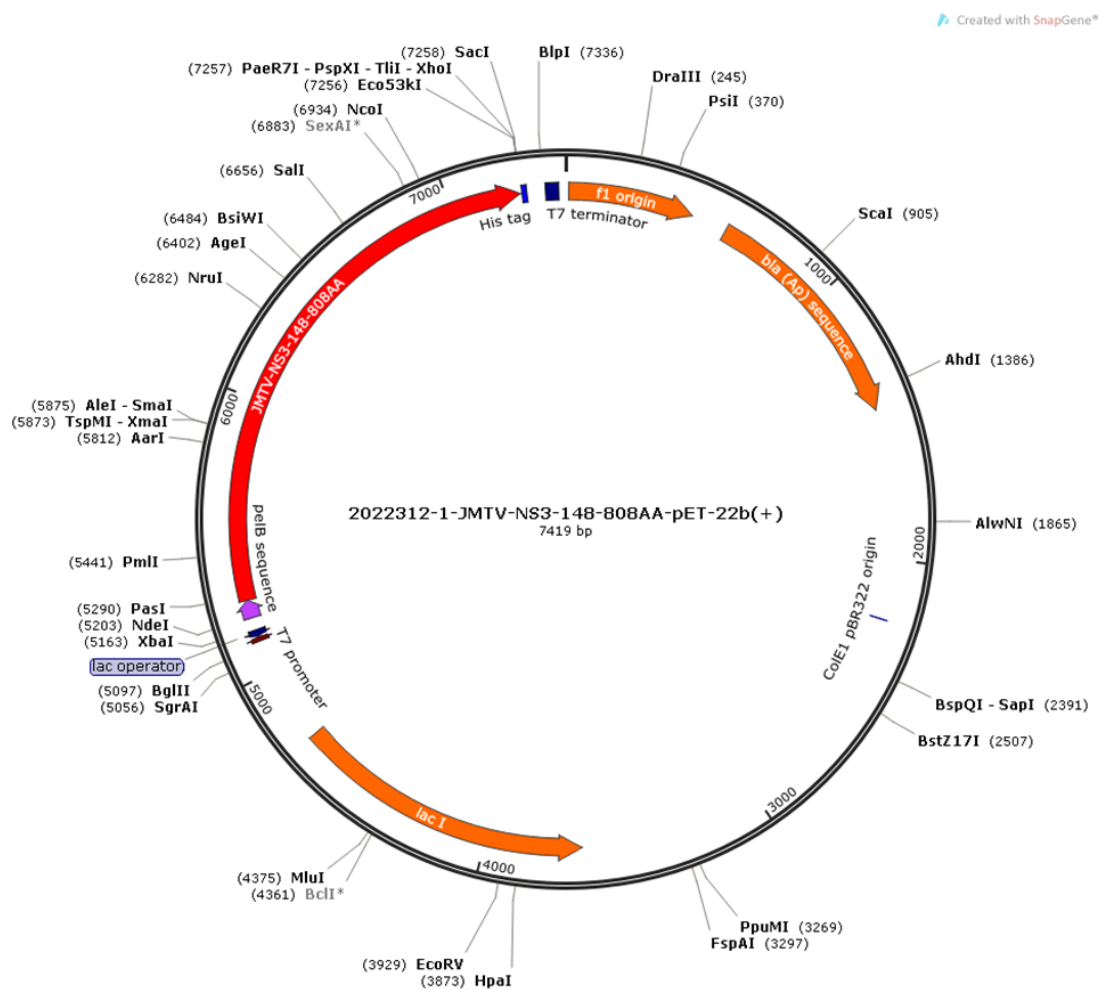


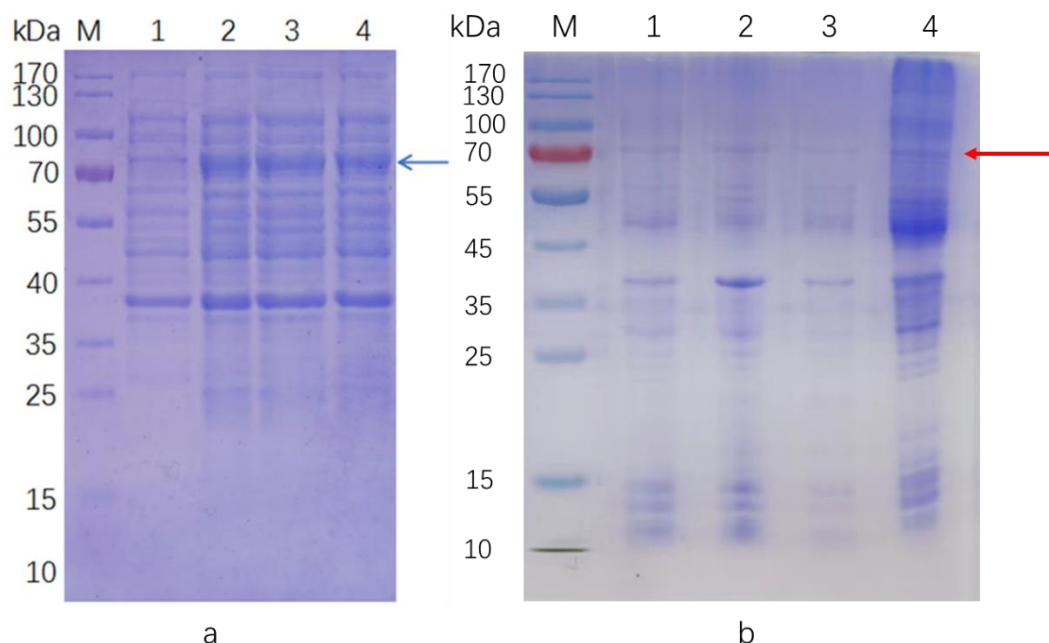
图 2-4 NS3 重组质粒图谱

Fig 2-4 NS3 recombinant plasmid map

2.4 目的蛋白 NS3（148-808AA）的小量表达结果（单克隆筛选）

重组质粒在 1 mM IPTG 小量诱导表达后，进行 SDS-PAGE 凝胶电泳分析，结果表明 NS3 蛋白能够在 1 mM IPTG 诱导下成功表达，蛋白大小约为 75 kDa（图 2-5a）。菌体经裂解后取上清液和沉淀悬浮液进行 SDS-PAGE 凝胶电泳，对重组蛋白进行可溶性分析，结果表明 NS3 蛋白的表达不可溶，以包涵体的形式在菌中表达，上清液中重组蛋白的表达量基本为 0（图 2-5b）。诱导表达的重组蛋白经 Anti-his-tag 的鼠源一抗抗体（1: 5000）检测，Western blot 分析显示，诱导的含重组蛋白的菌体裂解物能与 Anti-His-Tag 的鼠源一抗抗体发生特异性反应，在约 75 kDa 处呈现明显的杂交条带，诱导前有少量表达，菌体裂解上清液

中并无重组蛋白表达,说明表达的重组蛋白的确是带有 his 标签的重组蛋白,且其只以包涵体蛋白的形式进行表达(图 2-6)。



注: a .M: Marker; 泳道 1: 未诱导; 泳道 2-4: 1、2、3 号单克隆菌株诱导结果

b. M: Marker; 泳道 1: 未诱导; 泳道 2: 诱导; 泳道 3: 上清; 泳道 4: 沉淀

图 2-5 NS3 蛋白小量诱导表达及表达形式的 SDS-PAGE 鉴定

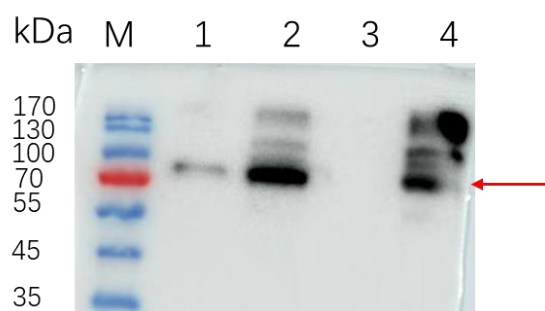
a.NS3 蛋白小量诱导表达 SDS-PAGE 鉴定

b. NS3 蛋白表达形式鉴定

Fig 2-5 SDS-PAGE identification of small amount induced expression and expression form of NS3 protein.

a. SDS-PAGE identification of small amount of NS3 protein induced expression.

b. SDS-PAGE identification of NS3 protein expression.



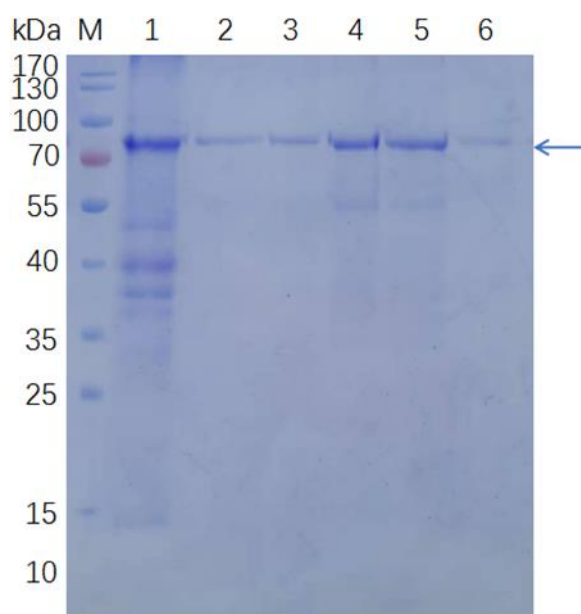
注: M:Marker; 泳道 1:未诱导, 泳道 2:诱导, 泳道 3:上清, 泳道 4:沉淀

图 2-6 JMTV NS3 蛋白 his 单抗 Western Blot 分析

Fig 2-6 Western blot analysis of NS3 protein his monoclonal antibody.

2.5 目的蛋白 NS3（148AA-808AA）大量表达和纯化结果

选定 3 号单克隆菌株进行放大表达和纯化，大量诱导表达后的菌体用 PBS 清洗，经两次冻融后超声裂解，收集到的沉淀悬浮液经镍柱亲和纯化，用含咪唑的 Elution buffer 洗脱后，洗脱液和流穿过程收集的液体进行 SDS-PAGE 分析，电泳可在 75 kDa 处出现目的条带，表达后的蛋白经纯化后蛋白纯度达 80%以上，纯化结果见图 2-7。纯化复性后的蛋白经 Anti-his-tag 鼠源一抗抗体 Western blot 验证发现纯化后杂带明显减少，重组蛋白复性效果良好（图 2-8）。



注：M: Marker；泳道 1：流穿；泳道 2-6：250mM 咪唑洗脱的 NS3 重组蛋白

图 2-7 NS3 蛋白表达（包涵体）纯化 SDS-PAGE 结果

Fig 2-7 SDS-PAGE identification of NS3 protein expression (inclusion bodies) purification. imidazole



注：M:Marker; 泳道 1:NS3 蛋白

图 2-8 纯化后 NS3 蛋白 his 单抗 Western Blot 分析

Fig 2-8 Western Blot analysis of purified NS3 protein by his monoclonal antibody.

3. 讨论

JMTV 是一种新发现的人类病原体，对人类有潜在的致病性，并有可能通过蜚蚊等有效传播，其产生的类黄病毒 NS3 蛋白，是病毒编码的第二大蛋白，我们通过黄病毒科其他病毒 NS3 蛋白来了解 JMTV NS3。研究发现，NS3 蛋白在病毒生命周期中不仅参与多聚蛋白前体的加工，还参与病毒的复制和病毒粒子的包装。

重组蛋白几乎全部以包涵体和可溶性蛋白的形式存在，原核表达中原核本身没有翻译后修饰的环节，故在表达中目的蛋白经常发生错误的折叠，更易形成包涵体。蛋白的表达条件(诱导温度、诱导时间、IPTG 浓度)都会影响蛋白的表达量及表达形式。大肠埃希菌原核表达系统是目前应用最广泛的蛋白表达系统，作为非常成熟的表达载体，拥有繁殖速度快、易于培养和控制、转化操作简单、表达水平高、成本低、周期短等特点，其中 pET-22b (+) 是原核表达中常用的外源基因。启动子的强弱是对表达量有决定性影响因素之一，能在大肠埃希菌中发挥作用的启动子有很多，而 T7 启动子公认是大肠埃希菌中最强的启动子，它可以将大肠埃希菌的资源最大限度地调用过来表达外源基因，考虑到需要表达的蛋白分

子量较大，故本实验选用了带有较强启动能力 T7 启动子的载体，但基因表达中启动子过强会使表达的蛋白形成不可溶的包涵体。

本实验利用构建的 pET-22b(+) 原核表达系统在大肠埃希菌中对 JMTV NS3 蛋白进行诱导表达。结果表明 JMTV NS3 蛋白在原核表达系统中成功表达，表达产物以包涵体的形式存在，大小为 75 kDa 左右。通过对包涵体的变性和复性得到可溶性生物活性蛋白，通过优化复性条件，获得了生物活性良好的优质蛋白。目的蛋白经镍柱亲和层析纯化后使用 SDS-PAGE、Western blot 鉴定后可确认为目的蛋白。本实验获得的蛋白为后续研究人和动物 JMTV 感染的血清学筛查提供了一定的基础。

第二部分 基于 NS3 蛋白的多抗制备及 ELISA 初步构建和优化

1. 实验材料与方法

1.1 实验主要仪器设备及试剂

1.1.1 实验仪器

表 1-1 主要设备仪器及用途

Table 1-1 Main instruments and consumables used in the experiment

设备名称	设备型号	厂家	用途
酶标仪	Model 680	美国伯乐公司	酶联免疫试验
96 孔酶标板	3590	康宁	酶联免疫试验
酶标仪	Model 680	美国伯乐公司	酶联免疫试验
37℃ 孵育箱	CCL 170B8	新加坡艺思高科技有限公司	酶联免疫试验
洗板机	ZMB-1 型包被机	北京天石医疗用品制作所	酶联免疫试验
电泳仪	Powerpac Basic	美国伯乐公司	SDS-PAGE 电泳

1.1.2 实验试剂

表 1-2 主要试验材料信息

Table 1-2 Main test material information

试剂名称	生产厂家	用途
ELISA 包被液	北京四正柏生物科技有限公司	包被蛋白
ELISA 包被液	北京博奥龙免疫技术有限公司	包被蛋白
明胶	上海生工生物工程有限公司	配制封闭液
BSA	北京索莱宝科技有限公司	配制封闭液
脱脂奶粉	美国 BD 公司	配制封闭液
PBS 磷酸盐缓冲液(固体试剂)	北京索莱宝科技有限公司	配制 PBST
TMB 可溶性底物	北京博奥龙免疫技术有限公司	ELISA 显影
TMB 可溶性底物	美国 BD 公司	ELISA 显影
TMB 终止液(酸性)	北京博奥龙免疫技术有限公司	ELISA 显影
HRP 羊抗人 IgG	北京博奥龙免疫技术有限公司	ELISA 二抗
HRP 兔抗羊 IgG	北京博奥龙免疫技术有限公司	ELISA 二抗
HRP 兔抗牛 IgG	北京博奥龙免疫技术有限公司	ELISA 二抗
TWEEN20	爱必信生物科技有限公司	配制 PBST

续表 1-2

新西兰大白兔		免疫宿主
NS3 抗原	实验室制备	免疫抗原
脱脂奶粉	美国 BD 公司	配制封闭液

1.2 兔多克隆抗体的制备及纯化

(一) 兔子免疫与血清采集: 采用两种免疫原分别免疫新西兰大白兔 1 只; 免疫流程 0, 2, 3, 4, 5 周免疫, 背部皮下多点接种; 免疫剂量: 第 1 针: 1.0 ml/只, 第 2-5 针, 0.5 ml/只; 佐剂: 第一针为弗氏完全佐剂与样品等体积混合乳化, 2-5 针为弗氏不完全佐剂与样品等体积混合乳化;

(二) 采血: 第 4 针免疫后 1 周采血检测 ELISA 血清效价, 加强免疫第 5 针后离心分离血清并采血进行抗体纯化。

(三) 抗体纯化: 将 NS3 蛋白与琼脂糖介质偶联制备成抗原亲和纯化层析柱, 将所得抗血清与 PBS 等量混合后缓慢上样, 待抗体结合后用甘氨酸洗脱缓冲液洗脱, 即得到所需纯化抗体, 立即在 PBS 中进行 4℃透析过夜。

1.3 间接酶联免疫检测兔多抗血清效价方法

(一) 96 孔酶标板制备: 重组蛋白用 0.01 M 磷酸盐缓冲液稀释至 1.0 μg/ml, 再按照 1:100 稀释包被 96 孔酶标板于 4℃过夜。加入终浓度 0.05% 吐温 20 的 0.01 M 磷酸盐缓冲液 (0.01 M PBST20) 洗 3 遍, 再加入含有 10% 小牛血清的磷酸盐缓冲液于 37℃封闭 2 小时, 使用时甩去封闭液并拍板去除孔中残留封闭液。

(二) 效价测定: 血清和阴性对照按照 10 倍梯度法进行系列梯度稀释至 10^7 倍, 依次加入 10^2 至 10^7 稀释度样品于上述 96 孔板, 每孔加入 100.0 μl, 37℃孵育 1 小时, 0.01 M PBST20 洗液洗涤三遍, 加入羊抗兔 IgG HRP 于 37℃孵育 1 小时, 洗板 5 遍后, 拍干, 加入显色底物于 37℃显色 10 分钟, 2 M H_2SO_4 终止, 波长 450nm 处读数。

(三) 标准: 同等稀释倍数下, 样品 OD₄₅₀ 值 ≥ 阴性对照 × 2.1, 若阴性对照吸光值 < 0.05, 以 0.05 计算, 判定阳性标准。

1.4 间接酶联免疫吸附试验（ELISA）的初步建立

根据常规 ELISA 操作程序进行^[63,64]:

- (1) 包被: 将包被蛋白按照每个反应孔 400 ng, 并用磷酸盐包被缓冲液稀释, 稀释后包被 ELISA 反应板, 每个反应孔 100 ul;
- (2) 洗板: 重组蛋白与 ELISA 反应板 4℃过夜结合, 弃去包被液, 每孔加入 300 ul PBST 清洗液, 清洗 5 次, 每次结束后弃去清洗液, 在吸水纸上拍去多余残留液体;
- (3) 封闭: 每个反应孔加 100 ul ELISA 封闭液, 37℃封闭 2 h;
- (4) 洗板: 弃去封闭液, 每个反应孔加 300 ul PBST 清洗液, 清洗 5 次, 每次结束后弃去清洗液, 在吸水纸上拍去多余残留液体;
- (5) 保存: ELISA 反应板包被完成后直接使用或用自封袋包装后, 放置-20℃冰箱备用;
- (6) 一抗: 用 PBS 将待测血清按照 1: 400 进行稀释, 每个反应孔 100 ul, 37℃温箱孵育 1 h;
- (7) 洗板: 弃去待测血清稀释液, 每个反应孔加 300 ul PBST 清洗液, 清洗 5 次, 每次结束后弃去清洗液, 在吸水纸上拍去多余残留液体;
- (8) 二抗: 用 PBS 将实验室购买的 HRP 标记的商业化二抗 IgG 按照 1: 5000 进行稀释, 每个反应孔 100 ul, 37℃温箱孵育 1 h;
- (9) 洗板: 弃去二抗稀释液, 每个反应孔加 300 ul PBST 清洗液, 清洗 5 次, 每次结束后弃去清洗液, 在吸水纸上拍去多余残留液体;
- (10) 显色: 每个反应孔加 100 ul TMB 可溶性底物, 室温反应 5 min;
- (11) 终止: 每孔加入 50 ul TMB 反应终止液, 终止反应。
- (12) 读数: 将酶标板放入全自动酶联免分析仪中, 调试酶标仪至 OD450nm 并读数。

1.4.1 包被缓冲液的优化

- (1) 包被: 选用两种不同品牌的包被缓冲液 (分别为磷酸盐包被缓冲液和碳酸盐包被缓冲液) 对蛋白进行稀释包被, 将包被蛋白按照每个反应孔 100 ul 包被于

ELISA 反应板，重复 3 个反应孔；

(2) 洗板：重组蛋白与 ELISA 反应板 4℃过夜结合，弃去包被液，每孔加入 300 ul PBST 清洗液，清洗 5 次，每次结束后弃去清洗液，在吸水纸上拍去多余残留液体；

(3) 封闭：每个反应孔加 100 ul ELISA 封闭液，37℃封闭 2 h；

(4) 洗板：弃去封闭液，每个反应孔加 300 ul PBST 清洗液，清洗 5 次，每次结束后弃去清洗液，在吸水纸上拍去多余残留液体；

(5) 保存：ELISA 反应板包被完成后直接使用或用自封袋包装后，放置-20℃冰箱备用；

(6) 一抗：用 PBS 将兔多克隆抗体血清和兔免疫前血清按照 1: 10⁵ 进行稀释，每个反应孔 100 ul，37℃温箱孵育 1 h；

(7) 洗板：弃去待测血清稀释液，每个反应孔加 300 ul PBST 清洗液，清洗 5 次，每次结束后弃去清洗液，在吸水纸上拍去多余残留液体；

(8) 二抗：用 PBS 将实验室购买的 HRP 标记的商业化二抗 IgG 按照 1: 5000 进行稀释，每个反应孔 100 ul，37℃温箱孵育 1 h；

(9) 洗板：弃去二抗稀释液，每个反应孔加 300 ul PBST 清洗液，清洗 5 次，每次结束后弃去清洗液，在吸水纸上拍去多余残留液体；

(10) 显色：每个反应孔加 100 ul TMB 可溶性底物，室温反应 5 min；

(11) 终止：每孔加入 50 ul TMB 反应终止液，终止反应。

(12) 读数：将酶标板放入全自动酶联免分析仪中，调试酶标仪至 OD450nm 并读数。

1.4.2 封闭液的优化

(1) 包被：将包被蛋白按照每个反应孔 400 ng，并用磷酸盐包被缓冲液稀释，稀释后包被 ELISA 反应板，每个反应孔 100 ul；

(2) 洗板：重组蛋白与 ELISA 反应板 4℃过夜结合，弃去包被液，每孔加入 300 ul PBST 清洗液，清洗 5 次，每次结束后弃去清洗液，在吸水纸上拍去多余残留液体；

(3) 封闭：选用 PBST+0.5%脱脂奶粉，PBST+5%BSA，PBST+1%明胶，

Tris.HCL+0.5%脱脂奶粉, Tris.HCL+5%BSA, Tris.HCL+1%明胶作为封闭液, 每孔 100 ul, 不同封闭液重复 3 个孔, 37°C封闭 2 h。

(4) 洗板: 弃去封闭液, 每个反应孔加 300 ulPBST 清洗液, 清洗 5 次, 每次结束后弃去清洗液, 在吸水纸上拍去多余残留液体;

(5) 保存: ELISA 反应板包被完成后直接使用或用自封袋包装后, 放置-20°C冰箱备用;

(6) 一抗: 用 PBS 将人血清按照 1: 400 进行稀释, 每个反应孔 100 ul, 37°C温箱孵育 1 h;

(7) 洗板: 弃去待测血清稀释液, 每个反应孔加 300 ul PBST 清洗液, 清洗 5 次, 每次结束后弃去清洗液, 在吸水纸上拍去多余残留液体;

(8) 二抗: 用 PBS 将实验室购买的 HRP 标记的商业化二抗 IgG 按照 1: 5000 进行稀释, 每个反应孔 100 ul, 37°C温箱孵育 1 h;

(9) 洗板: 弃去二抗稀释液, 每个反应孔加 300 ul PBST 清洗液, 清洗 5 次, 每次结束后弃去清洗液, 在吸水纸上拍去多余残留液体;

(10) 显色: 每个反应孔加 100 ul TMB 可溶性底物, 室温反应 5 min;

(11) 终止: 每孔加入 50 ul TMB 反应终止液, 终止反应。

(12) 读数: 将酶标板放入全自动酶联免分析仪中, 调试酶标仪至 OD450nm 并读数。

1.4.3 抗原稀释度的确定

(1) 包被: 根据棋盘滴定的方法, ELISA 板包被 5 个不同浓度纯化的 NS3 蛋白 (0.75, 0.375, 0.1875, 0.0925, 0.04625 ug/ml), 同一血清稀释度和蛋白稀释度做 3 个孔的重复, 用磷酸缓冲液稀释后包被 ELISA 反应板, 每个反应孔 100 ul;

(2) 洗板: 重组蛋白与 ELISA 反应板 4°C过夜结合, 弃去包被液, 每孔加入 300 ul PBST 清洗液, 清洗 5 次, 每次结束后弃去清洗液, 在吸水纸上拍去多余残留液体;

(3) 封闭: 每个反应孔加入 100 ul Tris.HCL+0.5%脱脂奶粉, 37°C封闭 2 h。

(4) 洗板: 弃去封闭液, 每个反应孔加 300 ulPBST 清洗液, 清洗 5 次, 每次结束后弃去清洗液, 在吸水纸上拍去多余残留液体;

(5) 保存: ELISA 反应板包被完成后直接使用或用自封袋包装后, 放置-20℃冰箱备用;

(6) 一抗: 用 PBS 将兔多克隆抗体血清和兔免疫前血清按照 1: 10⁵ 进行稀释, 每个反应孔 100 ul, 37℃温箱孵育 1 h;

(7) 洗板: 弃去待测血清稀释液, 每个反应孔加 300 ul PBST 清洗液, 清洗 5 次, 每次结束后弃去清洗液, 在吸水纸上拍去多余残留液体;

(8) 二抗: 用 PBS 将实验室购买的 HRP 标记的商业化二抗 IgG 按照 1: 5000 进行稀释, 每个反应孔 100 ul, 37℃温箱孵育 1 h;

(9) 洗板: 弃去二抗稀释液, 每个反应孔加 300 ul PBST 清洗液, 清洗 5 次, 每次结束后弃去清洗液, 在吸水纸上拍去多余残留液体;

(10) 显色: 每个反应孔加 100 ul TMB 可溶性底物, 室温反应 5 min;

(11) 终止: 每孔加入 50 ul TMB 反应终止液, 终止反应。

(12) 读数: 将酶标板放入全自动酶联免分析仪中, 调试酶标仪至 OD450nm 并读数。

1.4.4 显色底物的优化

(1) 包被: 按照 0.375 ug/ml 的浓度用磷酸缓冲液稀释后包被 ELISA 反应板, 每个反应孔 100 ul, 每个稀释度做 3 个孔的重复;

(2) 洗板: 重组蛋白与 ELISA 反应板 4℃过夜结合, 弃去包被液, 每孔加入 300 ul PBST 清洗液, 清洗 5 次, 每次结束后弃去清洗液, 在吸水纸上拍去多余残留液体;

(3) 封闭: 每个反应孔加 100 ul Tris.HCL+0.5%脱脂奶粉, 37℃封闭 2 h。

(4) 洗板: 弃去封闭液, 每个反应孔加 300 ul PBST 清洗液, 清洗 5 次, 每次结束后弃去清洗液, 在吸水纸上拍去多余残留液体;

(5) 保存: ELISA 反应板包被完成后直接使用或用自封袋包装后, 放置-20℃冰箱备用;

(6) 一抗: 用 PBS 将人血清按 1: 400 进行稀释, 每个反应孔 100 ul, 37℃温箱孵育 1 h;

(7) 洗板: 弃去待测血清稀释液, 每个反应孔加 300 ul PBST 清洗液, 清洗 5 次,

每次结束后弃去清洗液，在吸水纸上拍去多余残留液体；

(8) 二抗：用 PBS 将实验室购买的 HRP 标记的商业化二抗 IgG 按照 1: 5000 进行稀释，每个反应孔 100 μ l，37°C 温箱孵育 1 h；

(9) 洗板：弃去二抗稀释液，每个反应孔加 300 μ l PBST 清洗液，清洗 5 次，每次结束后弃去清洗液，在吸水纸上拍去多余残留液体；

(10) 显色：选用两种不同品牌的显色底物，分别加入对应反应孔，每个反应孔加 100 μ l，重复 3 个孔，室温反应 5 min；

(11) 终止：每孔加入 50 μ l TMB 反应终止液，终止反应。

(12) 读数：将酶标板放入全自动酶联免疫分析仪中，调试酶标仪至 OD450nm 并读数。

2. 结果与分析

2.1 抗 NS3 蛋白多克隆抗体的测定

第四针免疫一周后采血取上清进行 ELISA 血清抗体效价检测，以纯化的 JMTV NS3 蛋白为包被抗原进行间接 ELISA 检测，结果显示（表 2-1），血清稀释倍数 1: 10 时效价最高，OD450 值为 3.7863，且当血清达到 1: 10^6 稀释时，A450 值为 0.2256，明显高于阴性对照的 A450 值，表明制备的多克隆抗体效价较高 $>10^6$ 。

表 2-1 ELISA 检测兔多克隆血清抗体效价结果

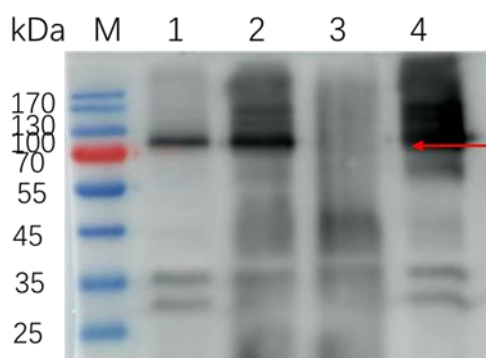
Table 2-1 Titer results of rabbit polyclonal serum antibody detected by ELISA

包被抗原	血清滴度	血清滴度 (Elisa: 450nm)						
		样品	10	10 ²	10 ³	10 ⁴	10 ⁵	10 ⁶
NS3	10 ⁶	Negative						
		Control	0.0534	0.0573	0.0509	0.0556	0.0512	0.0507
		Positive						
		Sample	3.7863	3.5498	3.5826	2.7047	0.5988	0.2256

2.2 纯化抗体 Western blot 分析

加强免疫第五针后，采血并分离兔血清，将该血清纯化，获得的纯化血清作

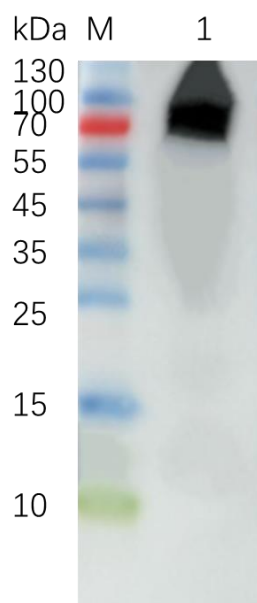
为一抗，以原核表达的 JMTV NS3 蛋白（纯化前后）作为抗原进行 Western blot 鉴定。Western blot 验证结果显示制备获得的兔多抗血清能够与 NS3 重组蛋白发生特异性反应，在 75 kDa 条带处目的蛋白明显表达，纯化前蛋白杂带较多，纯化后蛋白杂带明显减少（图 2-1，2-2）。



注：M:Marker; 泳道 1:未诱导，泳道 2:诱导，泳道 3:上清，泳道 4:沉淀；

图 2-1 未纯化 JMTV NS3 蛋白兔多克隆抗体 Western Blot 分析

Fig 2-1 Western Blot analysis of unpurified polyclonal antibody against JMTV NS3 protein



注：M:Marker; 泳道 1:NS3 蛋白

图 2-2 纯化后 NS3 蛋白兔多克隆抗体 Western Blot 分析

Fig 2-2 Western Blot analysis of purified rabbit polyclonal antibody against NS3 protein

2.3 ELISA 方法优化分析

2.3.1 包被缓冲液的确定

根据不同蛋白梯度 P/N 的值，可以看出相同条件下磷酸盐蛋白包被缓冲液

P/N 值普遍高于碳酸盐蛋白包被缓冲液的值, 根据 A_{450nm} 值和 P/N 值, 最终选定用磷酸盐蛋白包被缓冲液包被蛋白 (表 2-1, 2-2)。

表 2-1 最佳包被缓冲液的确定

Table 2-1 Determination of optimal coated buffer

包被液种类	多抗稀释度	蛋白包被量 (ug/ml)					
		0.1875	0.375	0.75	1.5	3	6
磷酸盐包被缓冲液	1×10^5	2.391	2.721	2.628	2.996	2.783	2.608
	1×10^5 -	1.047	1.04	0.844	1.114	0.845	0.761
碳酸盐包被缓冲液	1×10^5	2.516	2.647	2.777	3.104	2.799	2.806
	1×10^5 -	1.981	1.395	1.533	1.476	1.09	1.023

表 2-2 NS3 蛋白 P/N 值

Table 2-2 P/N values of NS3 protein

	包被液种类	多抗稀释度	蛋白包被量 (ug/ml)					
			0.1875	0.375	0.75	1.5	3	6
NS3 蛋白 P/N 值	磷酸盐包被缓冲液	1×10^5	2.280	2.610	3.110	2.690	3.290	3.430
	碳酸盐包被缓冲液	1×10^5	1.270	1.890	1.810	2.100	2.570	2.740

2.3.2 封闭液的确定

选用同一血清进行一抗的孵育, 每种封闭液重复三个孔, 整个条件中除封闭液选择不同外, 其余的都相同, 测定 A_{450nm} 值, 测定结果显示相同条件下 Tris.HCL+0.5%脱脂奶粉作为封闭液测出来的值最低, 故最终选定 Tris.HCL+0.5%脱脂奶粉作为最佳封闭液。

表 2-3 最佳封闭液的确定

Table 2-3 Determination of the best sealing solution

封闭液	A_{450nm} 值			Mean
	1	2	3	
PBST+0.5%脱脂奶粉	0.109	0.105	0.128	0.114
PBST+5%BSA	0.124	0.124	0.136	0.128
PBST+1%明胶	0.257	0.269	0.464	0.330
Tris.HCL+0.5%脱脂奶粉	0.086	0.085	0.098	0.090
Tris.HCL+5%BSA	0.114	0.114	0.131	0.120
Tris.HCL+1%明胶	0.107	0.112	0.119	0.113

2.3.3 抗原包被量的确定

通过 P/N 值我们可以看到, 蛋白浓度从低浓度到 0.375 ug/ml 时, P/N 值呈现跳跃性增加, 再增加蛋白量, 到 0.75 ug/ml 时 P/N 值增加并不大, 基本和 0.375 ug/ml 蛋白浓度时一致, 故我们确定蛋白最佳包被量为 0.375 ug/ml。

表 2-4 棋盘滴定法确定抗原包被量

Table 2-4 Determination of NS4 protein coating by square matrix method (4450nm)

抗原量 ug/ml	阳性血清					阴性血清				
	0.5×10 ⁴	1×10 ⁵	0.5×10 ⁵	1×10 ⁶	0.5×10 ⁶	0.5×10 ⁴	1×10 ⁵	0.5×10 ⁵	1×10 ⁶	0.5×10 ⁶
0.04625	2.033	1.636	1.279	0.875	0.757	0.720	0.773	0.679	0.579	0.405
0.0925	2.222	1.701	1.206	0.909	0.712	0.606	0.696	0.401	0.420	0.384
0.1875	2.318	1.770	1.470	0.935	0.904	0.467	0.453	0.305	0.356	0.322
0.375	2.480	2.142	1.670	1.218	1.285	0.299	0.305	0.325	0.318	0.354
0.75	2.908	2.823	2.644	2.159	1.629	0.414	0.407	0.453	0.464	0.400

表 2-5 NS3 蛋白 P/N 值

Table 2-5 NS3 protein P/N value

NS3 抗原量	JMTV NS3 血清 P/N 值				
	0.5×10 ⁴	1×10 ⁵	0.5×10 ⁵	1×10 ⁶	0.5×10 ⁶
0.04625	2.823	2.117	1.885	1.513	1.871
0.0925	3.669	2.444	3.005	2.163	1.853
0.1875	4.964	3.907	4.817	2.625	2.805
0.375	8.304	7.014	5.199	3.830	3.633
0.75	7.019	6.941	5.832	4.657	4.070

2.3.4 显色底物的确定

选择四个不同的血清作为一抗, 每种血清重复六个孔, 在显色的时候两种不同的显色底物个重复三个孔, 测量 4450nm 值, 测定结果显示, 在其他条件都相同的情况下, 两种显色底物测出来的 4450nm 值有较大差别, 考虑显色底物的使用方式, 根据测定结果选择第二种显色底物 (双组份显色底物)。

表 2-6 不同显色底物 4450nm 值

Table 2-6 4450nm of different color substrates

血清序号	第一种显色底物			第二种显色底物		
1	0.893	0.875	0.938	0.482	0.464	0.438
2	0.678	0.672	0.615	0.194	0.194	0.180
3	0.743	0.799	0.787	0.389	0.390	0.490
4	0.521	0.579	0.657	0.162	0.144	0.155

3. 讨论

本实验利用在大肠杆菌中诱导表达并纯化的 JMTV NS3 蛋白作为抗原，免疫新西兰大白兔，制备针对 NS3 蛋白的多克隆抗体。第四针免疫一周后采血以纯化的 NS3 蛋白为抗原，经 ELISA 酶联免疫测血清抗体效价，结果显示兔源多克隆抗体血清抗原效价较高 $>10^6$ 。第五针免疫后采血进行抗体纯化，并用纯化后的抗体作为一抗对纯化前后的蛋白进行 Western blot 验证，结果显示制备的多克隆抗体能够与 JMTV NS3 原核表达蛋白发生特异性免疫反应，证明制备的 JMTV NS3 多克隆抗体能够为 NS3 蛋白功能研究提供重要实验材料。

在间接 ELISA 法选择中，不同包被液、封闭液、显色底物对实验结果的影响差别较大。本实验中选择了两种不同品牌的包被液进行蛋白的稀释包被，在其他条件均相同的情况下，碳酸盐包被缓冲液效果较差，最终确定选用磷酸盐包被缓冲液。封闭液配方的确定分别选取了两种不同的溶剂和三种不同的溶质，配置成了 PBST+0.5%脱脂奶粉，PBST+5%BSA，PBST+1%明胶，Tris.HCL+0.5%脱脂奶粉，Tris.HCL+5%BSA，Tris.HCL+1%明胶六种不同的封闭液，结果显示 PBST+1%明胶的效果最差，其余的效果差异略有不同，Tris.HCL+0.5%脱脂奶粉效果最好，综合考虑多种因素，最终确定 Tris.HCL+0.5%脱脂奶粉作为最终的封闭液。

TMB 显色底物的选择对实验结果有着较大的影响，TMB 具有不稳定性，曝光或污染氧化后会出现显色反应，导致实验背景升高，本实验选用的第二种显色底物将显色液调整为双组份，仅在使用前混合，避免了 TMB 不稳定性对实验结果的影响。另外我们通过棋盘滴定法确定蛋白的最佳包被浓度为 0.375 ug/ml。

第三部分 利用重组 NS3 蛋白筛查人和动物血清中荆门蜱病毒特异性抗体

1. 实验材料与方法

1.1 实验主要仪器设备及试剂

1.1.1 实验仪器

表 1-1 实验中主要使用的仪器设备和耗材

Table 1-1 Main instruments and consumables used in the experiment

仪器及耗材名称	生产厂家及型号	用途
96 孔板	康宁 3590	酶联免疫实验
37℃孵育箱	新加坡艺思高科技有限公司 CCL 170B8	酶联免疫实验
电泳仪	北京博思/600 Plus	RT-PCR
凝胶成像系统	香港伯乐太平洋有限公司/Gel Doc XR	读琼脂糖胶结果
酶标仪	美国伯乐公司 Model 680	酶联免疫试验

1.1.2 实验试剂

表 1-2 实验中主要使用的试剂及用途

Table 1-2 Main reagents used in the experiment and their uses

试剂名称	生产厂家	用途
ELISA 包被液	北京四正柏生物科技有限公司	包被蛋白
TMB 可溶性底物	美国 BD 公司	ELISA 显影
琼脂糖	GENVIEW	配制琼脂糖凝胶
EDTA	美国 Life science 公司	配制琼脂糖凝胶
硼酸	美国 Life science 公司	配制琼脂糖凝胶
Tris	美国 Life science 公司	配制琼脂糖凝胶
TMB 终止液（酸性）	北京博奥龙免疫技术有限公司	ELISA 显影
HRP 羊抗人 IgG	北京博奥龙免疫技术有限公司	ELISA 二抗
HRP 兔抗羊 IgG	北京博奥龙免疫技术有限公司	ELISA 二抗
HRP 兔抗牛 IgG	北京博奥龙免疫技术有限公司	ELISA 二抗
TWEEN20	爱必信生物科技有限公司	配制 PBST
脱脂奶粉	美国 BD 公司	配制封闭液

1.2 人与动物血清样本的采集

2022 年 5-6 月份期间,以湖北省十家养殖场为动物血清样本采集点采集牛、羊血清及血块样本,共采集到羊血清 193 份,对应血块 106 份,牛血清 44 份,对应血块 44 份,详见表 3.1。低风险人血清 174 份(武汉市中心医院体检健康人血清),高风险人血清 13 份(林区居民血清,本实验室保存)。

表 1-3 动物采样信息表

Table 1-3 Information about animal samples

采样时间	地点	养殖场名称	种属	样本类型	样本数量
2022 年 5 月	湖北宜昌市	CY	羊	血清	50 份
		XT		血清	8 份
		YD		血清	10 份
		DJ		血清	9 份
		GX		血清	10 份
2022 年 6 月	湖北黄冈市	CY	牛	血清(血块)	31 份(31 份)
		MC		血清(血块)	34 份(34 份)
		LT		血清(血块)	41 份(41 份)
	湖北十堰市	ZS		血清(血块)	5 份(5 份)
	湖北宜昌市	ZJ		血清(血块)	14 份(14 份)
	湖北襄阳市	ZY		血清(血块)	25 份(25 份)

1.3 人血清 Cut-off 值的确立

174 份低风险人血清,13 份高风险人血清,进行间接 ELISA 检测,每份样本重复 3 个孔,结果取平均值,计算样本总的 OD450nm 值的平均值($\bar{x}$)和标准差(SD),被检样本 A450nm 值 $\geq \bar{x}+3SD$ 时判定为阳性^[64-66]。每个样本进行 2 次实验,如两次实验结果不符合,进行第三次实验进一步判定。

1.4 动物血清 Cut-off 值的确立

所有牛、羊样本分别进行间接 ELISA 检测,每份样本重复三个孔,取平均值,分别计算样本总的 A450nm 值的平均值($\bar{x}$)和标准差(SD),被检样本 A450nm 值 $\geq \bar{x}+3SD$ 时判定为阳性。每个样本进行 2 次实验,如两次实验结果不符合,进

行第三次实验进一步判定。

1.5 RT-PCR 检测

提取所有血样本的 RNA，利用已发表文献中的引物^[40,57]和本研究自行设计的兼并引物用于 JMTV 核酸检测。参照文献的引物和方法^[40,57]对 RNA 进行扩增，两轮目的产物大小分别为 511 bp 和 394 bp。采用本研究自行设计的引物，首先用 R2664 引物对 RNA 进行逆转录，接下来用引物对 R801/F555 和 R801/F645 进行半巢式 PCR，目的产物大小分别为 254bp 和 156bp。

表 1-4 荆门蜚病毒筛查引物
Table 1-4 Primers for the detection of JMTV

基因	引物名称	序列 (5'-3')	参考文献
RdRp	194F1	TCGGCGATAAATAGGAGAGGTGCCAT	[40,57]
	194F2	GGACTGGAGACAAGACGTCAACACG	
	194R1	TCTGCGTAGAGTCGGTAGAGGTGGTG	
	194R2	CGCCATTTCTTCATCCTCCGCTAG	
NS5	R2664	CATCATCCARCCYTTGGYKATRCC	In the study
	R801	TGCATCATCCAAGCRTCACWGCRTC	
	F555	GARGARTGGATGGCSGAYCC	
	F645	TGYGCRGGMMGAGGAGGMTGGAG	

2. 结果与分析

2.1 人血清 ELISA 筛查结果

对 174 份非暴露人血清进行间接 ELISA 检测，每份样本重复 3 个孔，结果取平均值，计算样本的 A_{450nm} 值的平均值 ($\bar{x}$) 为 0.132，标准差 (SD) 为 0.07，因此按照公式 $\bar{x}+3SD$ 确定的 cut-off 值为 0.342，用如图所示，174 份低风险人血清和 13 份高风险人血清样本结果均呈阴性。图中红线位置对应 cut-off 值位置。

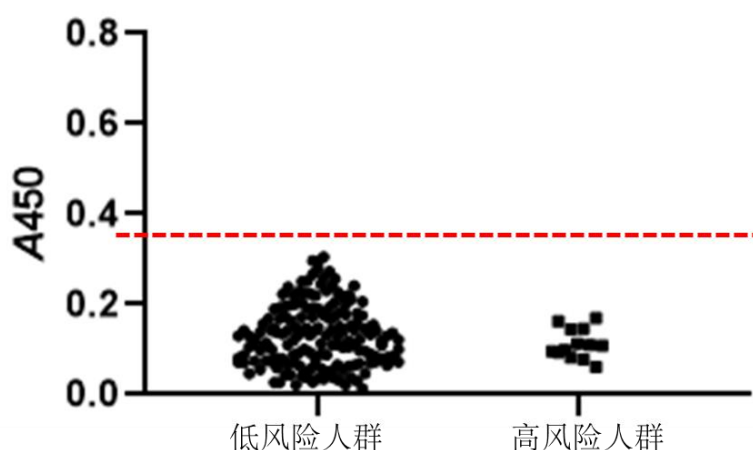


图 2-1 人群血清样本 A450nm 值分布情况

Fig 2-1 Distribution of A450nm value in serum samples of people.

2.2 动物血清 ELISA 筛查结果

所有牛、羊样本分别进行间接 ELISA 检测，每份样本重复三个孔，取平均值，分别计算样本总的 A450nm 值的平均值($\bar{x}$)和标准差(SD)，被检样本 A450nm 值 $\geq\bar{x}+3SD$ 时判定为阳性。ELISA 结果显示，牛血清平均值($\bar{x}$)为 0.035，标准差(SD)为 0.053，根据公式 $\bar{x}+3SD$ 最终确定牛血清 cut-off 值为 0.098。羊血清平均值($\bar{x}$)为 0.088，标准差(SD)为 0.07，根据公式 $\bar{x}+3SD$ 最终确定羊血清 cut-off 值为 0.298。ELISA 筛查结果显示 44 份牛血清中阳性样本 2 份 (图 2-2a)，阳性率为 2.27%，193 份羊血清中阳性样本 7 份 (图 2-2b)，阳性率为 4.15%。图中红线位置对应 cut-off 值位置。不同养殖场血清阳性率见表 2-1。

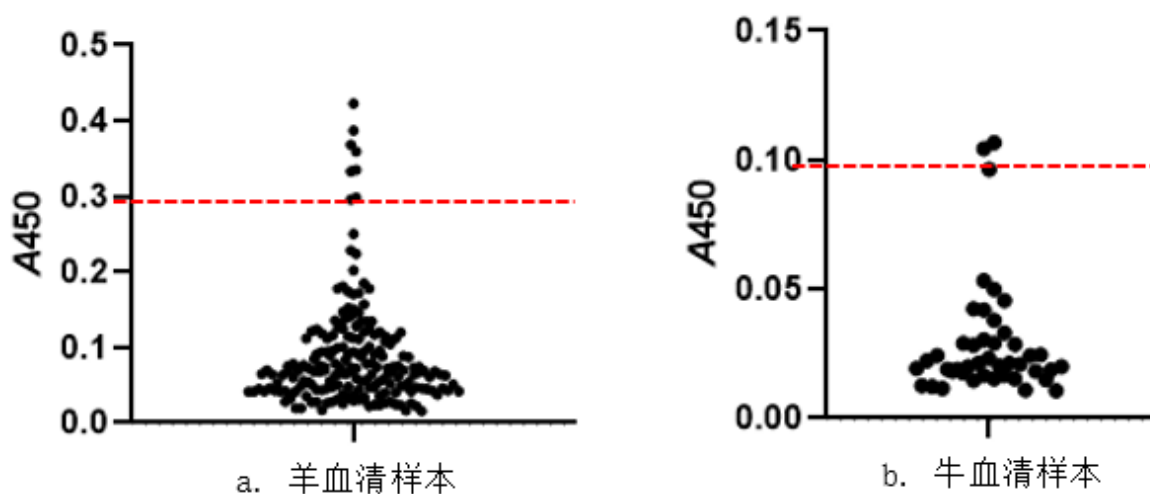


图 2-2 动物血清样本 A450nm 值分布情况

a.羊血清样本 A450nm 值分布情况 b.牛血清样本 A450nm 值分布情况

Fig 2-2 Distribution of A450nm value in serum samples of beast.

Distribution of A450nm value in serum samples of sheep. b. Distribution of A450nm value in serum samples of cattle.

表 2-1 不同养殖场血清样本 JMTV 阳性率 (%)

Table 2-1 Positive rate of JMTV in serum samples from different farms

样本类型	养殖场名称	样本数量	阳性例数	阳性率 (%)
牛血清	ZS	5	0	0.00
	ZJ	14	1	7.14
	ZY	25	1	4.00
羊血清	CY	81	6	7.41
	XT	8	0	0.00
	YD	10	0	0.00
	DJ	9	0	0.00
	GX	10	0	0.00
	LT	41	1	2.44
	MC	34	0	0.00

2.3 血样本中 JMTV 核酸检测结果

将所有血样本进行 RNA 提取后,用两种不同 RT-PCR 引物进行扩增。未有目的条带的扩增。

3. 讨论

JMTV 是一类新发现的对人类有危害的蜚传病毒。目前尚无人群感染 JMTV 的血清学本底数据。本论文利用初步建立的 ELISA 方法对高风险人群、低风险人群以及家养动物牛、羊感染 JMTV 进行血清学初步研究,为掌握 JMTV 在人群和动物中感染状况提供基础数据。

在利用大肠杆菌表达 JMTV NS3 蛋白作为抗原进行 ELISA 检测时,不同物种来源的血清样本产生的 A450 值差别很大,人血清样本高于牛、羊血清样本。NS3 蛋白分子量大(>70kDa),在大肠杆菌中形成包涵体,可能造成后续目的蛋白纯度不够。而且人血清中抗体更丰富,更容易与抗原产生非特异性反应。由于

JMTV 对人和动物的致病性尚不明确, 本研究在 cut-off 值的确定上采用总样本 4450nm 的平均值 ($\bar{x}$) +3 倍标准差 (SD), 并且根据样本宿主来源不同, 分开确定。未来需要扩大人群检测范围, 进一步优化完善利用 ELISA 检测 JMTV 抗体的方法。

在 ELISA 筛查 JMTV 抗体阳性的 2 份牛血清和 7 份羊血清中未检测到 JMTV 核酸片段, 这可能是由于荆门病毒在血标本中的含量低, 加上阳性标本数量太少。未来在荆门病毒感染的研究中, 除了扩大样本量, 同时将关注多种样本类型, 特别是结痂部位皮肤组织等。

JMTV 在蜱虫中广泛存在, 已在全沟硬蜱、坚果革蜱、银革蜱、血蜱、裂头蜱和残缘璃眼蜱等蜱中检测到病毒 RNA^[40,57,67]。牛、羊作为蜱重要的寄居者。本研究对湖北省牛、羊血清中 JMTV 抗体进行了初步筛查, 结果显示抗体阳性率分别为 4.55% 和 3.63%, 提示存在 JMTV 的感染, 因此需定期对牛、羊进行血清学监测, 警惕通过机械携带蜱虫可能导致的 JMTV 扩散。我国学者对内蒙古 480 份牛、羊血清进行 JMTV 抗体检测, 结果表明 4.6% 牛血清和 9.2% 羊血清 JMTV 抗体阳性^[68]。在法国, 200 份加勒比海牛血清中 JMTV 抗体均为阴性^[41]。由此可见, 牛、羊中 JMTV 的检出情况在不同国家、地区差异较大, 提示 JMTV 多样性可能与地理分布相关。不同 JMTV 毒株感染动物宿主的能力需要进一步研究。

长期在林区生活的人群有更多蜱接触或暴露机会, 是需要关注 JMTV 感染的高风险人群。在我国, 已报道病人皮肤结痂、全血或血清中检出 JMTV 样病毒核酸^[69]。Kuivanen 等^[44] 在芬兰东南部疑似病毒性脑炎患者的血清中未检测到病毒 RNA 以及抗体。Dinçer 等^[38] 对土耳其 21 份病因不明的发热患者血清 (无蜱虫叮咬)、23 份有蜱虫咬伤史的患者血清以及 16 例无明确病因的急性发作性中枢神经系统感染患者的脑脊液标本检测均为阴性。这些结果提示人类感染压力较低。本研究对 13 例高风险人群的血清进行 JMTV 特异性抗体检测, 结果均为阴性。可能是由于高风险人群样本数量太少, 同时也需要考虑使用其它更为灵敏的检测方法综合评估人群感染 JMTV 的风险。

第四部分 全文总结

通过对 JMTV NS3 蛋白进行分析,选取了 NS3 蛋白的 148aa-808aa 构建原核表达质粒,经 IPTG 诱导首次在大肠埃希菌外源表达系统中实现了 JMTV NS3 蛋白的包涵体表达及纯化,大小约为 75 kDa,同时用纯化后的 NS3 蛋白作为抗原制备了相应的多克隆抗体,免疫效价 $>10^6$ 。诱导表达纯化的 NS3 蛋白和制备的多克隆抗体为后续 ELISA 方法的初步构建及人和动物血清筛查提供了重要的实验材料。

根据收集到的材料初步建立了 ELISA 方法,主要包括缓冲、包被、显色体系的优化,以及不同种属样本中 cut-off 值的确立。我们对样本进行了三次重复检测,每次重复三个孔,结果显示重复效果较好,组间差异较小。由于 JMTV 为新发现的病毒,目前缺乏病毒株与明确阳性人群血清样本,所以该方法的灵敏度暂时还没有鉴定。经序列比对,JMTV NS3 蛋白与已知黄病毒科成员的同源性较低($<34.1\%$),因此本论文中未涉及方法特异性的评价。这也是本论文不足之处。在未来的研究中,将继续完善、优化 JMTV 抗体检测 ELISA 方法。

2022年收集的牛、羊血清的感染情况分别为:羊 JMTV 抗体阳性率为3.36%,牛 JMTV 抗体阳性率为4.55%,说明牛羊存在 JMTV 感染,筛查结果揭示牛、羊可能是 JMTV 的储存宿主,在病毒传播过程扮演重要的角色,提示我们需关注牛、羊作为蜚携带者导致病毒扩散的风险。而本研究中对所有样本核酸检测结果均呈阴性,可能是由于血液样本中 JMTV 病毒载量很低,用 RT-PCR 也很难检测到。

本研究中样本数量较少,尤其是高风险地区人群样本数量更少,仅代表局部地区 JMTV 感染状况。同时病毒血症的时间可能较短,因此在 ELISA 阳性的血液样本中未能检测到病毒核酸也属于正常现象。接下来研究中,我们不仅需要扩大样本数量、丰富样本类型,特别是结痂部位皮肤组织等,还需提高对 JMTV 检出的灵敏度和特异性。

参考文献

- [1] Bharucha T, Breuer J. Review: A neglected Flavivirus: an update on *Zika virus* in 2016 and the future direction of research[J]. Neuropathol Appl Neurobiol, 2016, 42(4): 317-25.
- [2] Dwibedi B, Mohapatra N, Rathore S K, Panda M, Pati S S, Sabat J, Thakur B, Panda S, Kar S K. An outbreak of Japanese encephalitis after two decades in Odisha, India[J]. Indian J Med Res, 2015, 142 Suppl(Suppl 1): S30-2.
- [3] Mustafa M S, Rasotgi V, Jain S, Gupta V. Discovery of fifth serotype of *dengue virus* (DENV-5): A new public health dilemma in dengue control[J]. Med J Armed Forces India, 2015, 71(1): 67-70.
- [4] Normile D. Tropical medicine. Surprising new dengue virus throws a spanner in disease control efforts[J]. Science, 2013, 342(6157): 415.
- [5] Roy S K, Bhattacharjee S. *Dengue virus*: epidemiology, biology, and disease aetiology[J]. Can J Microbiol, 2021, 67(10): 687-702.
- [6] Cao X T, Ngo T N, Wills B, Kneen R, Nguyen T T, Ta T T, Tran T T, Doan T K, Solomon T, Simpson J A, White N J, Farrar J J. Evaluation of the World Health Organization standard tourniquet test and a modified tourniquet test in the diagnosis of dengue infection in Viet Nam[J]. Trop Med Int Health, 2002, 7(2): 125-32.
- [7] Van Den Hurk A F, Ritchie S A, Mackenzie J S. Ecology and geographical expansion of *Japanese encephalitis virus*[J]. Annu Rev Entomol, 2009, 54: 17-35.
- [8] Le Flohic G, Porphyre V, Barbazan P, Gonzalez J P. Review of climate, landscape, and viral genetics as drivers of the *Japanese encephalitis virus* ecology[J]. PLoS Negl Trop Dis, 2013, 7(9): e2208.
- [9] Keiser J, Maltese M F, Erlanger T E, Bos R, Tanner M, Singer B H, Utzinger J. Effect of irrigated rice agriculture on Japanese encephalitis, including challenges and opportunities for integrated vector management[J]. Acta Trop, 2005, 95(1): 40-57.
- [10] Campbell G L, Hills S L, Fischer M, Jacobson J A, Hoke C H, Hombach J M, Marfin A A, Solomon T, Tsai T F, Tsu V D, Ginsburg A S. Estimated global incidence of Japanese encephalitis: a systematic review[J]. Bull World Health Organ, 2011, 89(10): 766-74, 774a-774e.
- [11] Ghosh D, Basu A. Japanese encephalitis-a pathological and clinical perspective[J]. PLoS Negl Trop Dis, 2009, 3(9): e437.
- [12] Crispell G, Williams K, Zielinski E, Iwami A, Homas Z, Thomas K. Method comparison for *Japanese encephalitis virus* detection in samples collected from the Indo-Pacific region[J]. Front Public Health, 2022, 10: 1051754.
- [13] Amicizia D, Zangrillo F, Lai P L, Iovine M, Panatto D. Overview of Japanese encephalitis disease and its prevention. Focus on IC51 vaccine (IXIARO®)[J]. J Prev Med Hyg, 2018, 59(1): E99-e107.
- [14] Lobigs M, Pavy M, Hall R A, Lobigs P, Cooper P, Komiya T, Toriniwa H, Petrovsky N. An inactivated Vero cell-grown Japanese encephalitis vaccine formulated with Advax, a novel inulin-based adjuvant, induces protective neutralizing antibody against homologous and heterologous flaviviruses[J]. J Gen Virol, 2010, 91(Pt 6): 1407-17.

- [15] Dick G W, Kitchen S F, Haddock A J. *Zika virus*. I. Isolations and serological specificity[J]. Trans R Soc Trop Med Hyg, 1952, 46(5): 509-20.
- [16] Besnard M, Lastere S, Teissier A, Cao-Lormeau V, Musso D. Evidence of perinatal transmission of *Zika virus*, French Polynesia, December 2013 and February 2014[J]. Euro Surveill, 2014, 19(13).
- [17] Rodriguez-Morales A J, Bandeira A C, Franco-Paredes C. The expanding spectrum of modes of transmission of *Zika virus*: a global concern[J]. Ann Clin Microbiol Antimicrob, 2016, 15: 13.
- [18] Foy B D, Kobylinski K C, Chilson Foy J L, Blitvich B J, Travassos Da Rosa A, Haddock A D, Lanciotti R S, Tesh R B. Probable non-vector-borne transmission of *Zika virus*, Colorado, USA[J]. Emerg Infect Dis, 2011, 17(5): 880-2.
- [19] Musso D, Roche C, Nhan T X, Robin E, Teissier A, Cao-Lormeau V M. Detection of *Zika virus* in saliva[J]. J Clin Virol, 2015, 68: 53-5.
- [20] Gourinat A C, O'connor O, Calvez E, Goarant C, Dupont-Rouzeyrol M. Detection of *Zika virus* in urine[J]. Emerg Infect Dis, 2015, 21(1): 84-6.
- [21] Musso D, Gubler D J. *Zika Virus*[J]. Clin Microbiol Rev, 2016, 29(3): 487-524.
- [22] Li C, Xu D, Ye Q, Hong S, Jiang Y, Liu X, Zhang N, Shi L, Qin C F, Xu Z. *Zika Virus* Disrupts Neural Progenitor Development and Leads to Microcephaly in Mice[J]. Cell Stem Cell, 2016, 19(1): 120-6.
- [23] Mlakar J, Korva M, Tul N, Popović M, Poljšak-Prijatelj M, Mraz J, Kolenc M, Resman Rus K, Vesnaver Vipotnik T, Fabjan Vodusek V, Vizjak A, Pižem J, Petrovec M, Avšič Županc T. *Zika Virus* Associated with Microcephaly[J]. N Engl J Med, 2016, 374(10): 951-8.
- [24] Broutet N, Krauer F, Riesen M, Khalakdina A, Almiron M, Aldighieri S, Espinal M, Low N, Dye C. *Zika Virus* as a Cause of Neurologic Disorders[J]. N Engl J Med, 2016, 374(16): 1506-9.
- [25] Pielnaa P, Al-Saadawe M, Saro A, Dama M F, Zhou M, Huang Y, Huang J, Xia Z. *Zika virus*-spread, epidemiology, genome, transmission cycle, clinical manifestation, associated challenges, vaccine and antiviral drug development[J]. Virology, 2020, 543: 34-42.
- [26] Pulkkinen L I A, Butcher S J, Anastasina M. Tick-Borne Encephalitis Virus: A Structural View[J]. Viruses, 2018, 10(7).
- [27] 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.
- [28] Taba P, Schmutzhard E, Forsberg P, Lutsar I, Ljøstad U, Mygland Å, Levchenko I, Strle F, Steiner I. EAN consensus review on prevention, diagnosis and management of tick-borne encephalitis[J]. Eur J Neurol, 2017, 24(10): 1214-e61.
- [29] Grard G, Moureau G, Charrel R N, Lemasson J J, Gonzalez J P, Gallian P, Gritsun T S, Holmes E C, Gould E A, De Lamballerie X. Genetic characterization of tick-borne flaviviruses: new insights into evolution, pathogenetic determinants and taxonomy[J]. Virology, 2007, 361(1): 80-92.
- [30] Heinze D M, Gould E A, Forrester N L. Revisiting the clinal concept of evolution and dispersal for the tick-borne flaviviruses by using phylogenetic and biogeographic analyses[J]. J Virol, 2012, 86(16): 8663-71.
- [31] Lindquist L, Vapalahti O. Tick-borne encephalitis[J]. Lancet, 2008, 371(9627): 1861-71.

- [32] Pöschl P, Kleiter I, Grubwinkler S, Bumès E, Bogdahn U, Dobler G, Steinbrecher A. [Severe tick-borne encephalomyelitis with lack of cerebrospinal fluid pleocytosis][J]. Fortschr Neurol Psychiatr, 2009, 77(10): 591-3.
- [33] Kollaritsch H, Chmelik V, Dontsenko I, Grzeszczuk A, Kondrusik M, Usonis V, Lakos A. The current perspective on tick-borne encephalitis awareness and prevention in six Central and Eastern European countries: report from a meeting of experts convened to discuss TBE in their region[J]. Vaccine, 2011, 29(28): 4556-64.
- [34] Tokarevich N K, Tronin A A, Blinova O V, Buzinov R V, Boltenkov V P, Yurasova E D, Nurse J. The impact of climate change on the expansion of *Ixodes persulcatus* habitat and the incidence of tick-borne encephalitis in the north of European Russia[J]. Glob Health Action, 2011, 4: 8448.
- [35] Ostfeld R S, Brunner J L. Climate change and *Ixodes* tick-borne diseases of humans[J]. Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci, 2015, 370(1665).
- [36] Lehrer A T, Holbrook M R. Tick-borne Encephalitis Vaccines[J]. J Bioterror Biodef, 2011, 2011(Suppl 1): 3.
- [37] Wang Z D, Wang B, Wei F, Han S Z, Zhang L, Yang Z T, Yan Y, Lv X L, Li L, Wang S C, Song M X, Zhang H J, Huang S J, Chen J, Huang F Q, Li S, Liu H H, Hong J, Jin Y L, Wang W, Zhou J Y, Liu Q. A New Segmented Virus Associated with Human Febrile Illness in China[J]. N Engl J Med, 2019, 380(22): 2116-2125.
- [38] Dinçer E, Hacıoğlu S, Kar S, Emanet N, Brinkmann A, Nitsche A, Özkul A, Linton Y M, Ergünay K. Survey and Characterization of *Jingmen Tick Virus* Variants[J]. Viruses, 2019, 11(11).
- [39] Ladner J T, Wiley M R, Beitzel B, Auguste A J, Dupuis A P, 2nd, Lindquist M E, Sibley S D, Kota K P, Fetterer D, Eastwood G, Kimmel D, Prieto K, Guzman H, Aliota M T, Reyes D, Brueggemann E E, St John L, Hyeroba D, Lauck M, Friedrich T C, O'connor D H, Gestole M C, Cazares L H, Popov V L, Castro-Llanos F, Kochel T J, Kenny T, White B, Ward M D, Loaiza J R, Goldberg T L, Weaver S C, Kramer L D, Tesh R B, Palacios G. A Multicomponent Animal Virus Isolated from Mosquitoes[J]. Cell Host Microbe, 2016, 20(3): 357-367.
- [40] Qin X C, Shi M, Tian J H, Lin X D, Gao D Y, He J R, Wang J B, Li C X, Kang Y J, Yu B, Zhou D J, Xu J, Plyusnin A, Holmes E C, Zhang Y Z. A tick-borne segmented RNA virus contains genome segments derived from unsegmented viral ancestors[J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2014, 111(18): 6744-9.
- [41] Temmam S, Bigot T, Chrétien D, Gondard M, Pérot P, Pommelet V, Dufour E, Petres S, Devillers E, Hoem T, Pinarello V, Hul V, Vongphayloth K, Hertz J C, Loiseau I, Dumarest M, Duong V, Vayssier-Taussat M, Grandadam M, Albina E, Dussart P, Moutailler S, Cappelle J, Brey P T, Eloit M. Insights into the Host Range, Genetic Diversity, and Geographical Distribution of *Jingmen* viruses[J]. mSphere, 2019, 4(6).
- [42] Bisailon M, Lemay G. Viral and cellular enzymes involved in synthesis of mRNA cap structure[J]. Virology, 1997, 236(1): 1-7.
- [43] Guo J J, Lin X D, Chen Y M, Hao Z Y, Wang Z X, Yu Z M, Lu M, Li K, Qin X C, Wang W, Holmes E C, Hou W, Zhang Y Z. Diversity and circulation of *Jingmen tick virus* in ticks and mammals[J]. Virus Evol, 2020, 6(2): veaa051.
- [44] Kuivanen S, Levanov L, Kareinen L, Sironen T, Jääskeläinen A J, Plyusnin I, Zakham F,

- Emmerich P, Schmidt-Chanasit J, Hepojoki J, Smura T, Vapalahti O. Detection of novel tick-borne pathogen, *Alongshan virus*, in *Ixodes ricinus* ticks, south-eastern Finland, 2019[J]. *Euro Surveill*, 2019, 24(27).
- [45] Kholodilov I S, Litov A G, Klimentov A S, Belova O A, Polienko A E, Nikitin N A, Shchetinin A M, Ivannikova A Y, Bell-Sakyi L, Yakovlev A S, Bugmyrin S V, Bespyatova L A, Gmyl L V, Luchinina S V, Gmyl A P, Gushchin V A, Karganova G G. Isolation and Characterisation of *Alongshan Virus* in Russia[J]. *Viruses*, 2020, 12(4).
- [46] Maruyama S R, Castro-Jorge L A, Ribeiro J M, Gardinassi L G, Garcia G R, Brandão L G, Rodrigues A R, Okada M I, Abrão E P, Ferreira B R, Fonseca B A, Miranda-Santos I K. Characterisation of divergent flavivirus NS3 and NS5 protein sequences detected in *Rhipicephalus microplus* ticks from Brazil[J]. *Mem Inst Oswaldo Cruz*, 2014, 109(1): 38-50.
- [47] Bartelma G, Padmanabhan R. Expression, purification, and characterization of the RNA 5'-triphosphatase activity of *dengue virus* type 2 nonstructural protein 3[J]. *Virology*, 2002, 299(1): 122-32.
- [48] Emmerich P, Jakupi X, Von Possel R, Berisha L, Halili B, Günther S, Cadar D, Ahmeti S, Schmidt-Chanasit J. Viral metagenomics, genetic and evolutionary characteristics of Crimean-Congo hemorrhagic fever orthonairovirus in humans, Kosovo[J]. *Infect Genet Evol*, 2018, 65: 6-11.
- [49] Villa E C, Maruyama S R, De Miranda-Santos I K F, Palacios G, Ladner J T. Complete Coding Genome Sequence for *Mogiana Tick Virus*, a Jingmenvirus Isolated from Ticks in Brazil[J]. *Genome Announc*, 2017, 5(18).
- [50] Shi M, Lin X D, Vasilakis N, Tian J H, Li C X, Chen L J, Eastwood G, Diao X N, Chen M H, Chen X, Qin X C, Widen S G, Wood T G, Tesh R B, Xu J, Holmes E C, Zhang Y Z. Divergent Viruses Discovered in Arthropods and Vertebrates Revise the Evolutionary History of the Flaviviridae and Related Viruses[J]. *J Virol*, 2016, 90(2): 659-69.
- [51] Li H, Clum S, You S, Ebner K E, Padmanabhan R. The serine protease and RNA-stimulated nucleoside triphosphatase and RNA helicase functional domains of *dengue virus* type 2 NS3 converge within a region of 20 amino acids[J]. *J Virol*, 1999, 73(4): 3108-16.
- [52] Cleaves G R, Dubin D T. Methylation status of intracellular dengue type 2 40 S RNA[J]. *Virology*, 1979, 96(1): 159-65.
- [53] Lu G, Gong P. A structural view of the RNA-dependent RNA polymerases from the Flavivirus genus[J]. *Virus Res*, 2017, 234: 34-43.
- [54] 郑杰, 赵启祖, 赵耘, 宁宜宝. 黄病毒 NS2-3/NS3 蛋白的结构与功能 %J 病毒学报[J], 2007(03): 235-239.
- [55] Souza W M, Fumagalli M J, Torres Carrasco A O, Romeiro M F, Modha S, Seki M C, Gheller J M, Daffre S, Nunes M R T, Murcia P R, Acrani G O, Figueiredo L T M. Viral diversity of *Rhipicephalus microplus* parasitizing cattle in southern Brazil[J]. *Sci Rep*, 2018, 8(1): 16315.
- [56] Pascoal J O, Siqueira S M, Maia R D C, Juan Szabó M P, Yokosawa J. Detection and molecular characterization of *Mogiana tick virus* (MGTV) in *Rhipicephalus microplus* collected from cattle in a savannah area, Uberlândia, Brazil[J]. *Ticks Tick Borne Dis*, 2019, 10(1): 162-165.
- [57] 余竹梅, 熊衍文, 王文, 张永振. 中国北方地区蜱携带荆门蜱病毒的分子流行特征分析 %J 中国媒介生物学及控制杂志[J], 2020, 31(03): 272-276.
- [58] 陈亚洁, 李劲松. 登革 2 型病毒 NS3 蛋白 NTPase/RNA 解旋酶结构域的原核表达及活

- 性研究 %J 中华微生物学和免疫学杂志[J], 2005(11): 890-894.
- [59] 韦智钟. 寨卡病毒 NS3、NS4A、NS5 蛋白对小鼠神经发育的影响[D]. 北京协和医学院, 2017.
- [60] Falgout B, Pethel M, Zhang Y M, Lai C J. Both nonstructural proteins NS2B and NS3 are required for the proteolytic processing of *dengue virus* nonstructural proteins[J]. J Virol, 1991, 65(5): 2467-75.
- [61] 陈政. 乙型肝炎病毒 NS3 蛋白与宿主蛋白相互作用的研究[D]. 华中农业大学, 2016.
- [62] 付强, 郭妍婷, 杨莉, 史慧君. 牛病毒性腹泻病毒非结构蛋白 p7 的克隆和原核表达纯化 %J 中国畜禽种业[J], 2021, 17(05): 43-45.
- [63] 朱世强, 王帅勇, 王娟, 虞凌雪, 姚云, 张毅峰, 周艳君, 单同领, 郑浩, 童武, 童光志, 于海. 猪源盖塔病毒抗体间接 ELISA 检测方法的初步建立及其优化 %J 中国动物传染病学报[J]: 1-8.
- [64] 陆欣然, 华思红, 樊钰莹, 白文顺, 杜敏, 孙永科, 杨玉艾. 猪瘟病毒石门株 NS3 蛋白的原核表达及其抗体检测间接 ELISA 的建立 %J 动物医学进展[J], 2017, 38(04): 28-34.
- [65] Ding H, Wen Y, Xu Z, Zhou B, Tlili C, Tian Y, Wang Z, Ning Y, Xin J. Development of an ELISA for distinguishing convalescent sera with *Mycoplasma hyopneumoniae* infection from hyperimmune sera responses to bacterin vaccination in pigs[J]. Vet Med Sci, 2021, 7(5): 1831-1840.
- [66] 黎振标, 任旭皎, 刘健新, 鲁荣, 李慧子, 张彭涛, 宁章勇. 基于 E~(rns)蛋白的猪非典型猪瘟病毒间接 ELISA 检测方法的建立 %J 中国动物传染病学报[J], 2020, 28(03): 35-41.
- [67] Meng F, Ding M, Tan Z, Zhao Z, Xu L, Wu J, He B, Tu C. Virome analysis of *tick-borne viruses* in Heilongjiang Province, China[J]. Ticks Tick Borne Dis, 2019, 10(2): 412-420.
- [68] Wang Z D, Wang W, Wang N N, Qiu K, Zhang X, Tana G, Liu Q, Zhu X Q. Prevalence of the emerging novel *Alongshan virus* infection in sheep and cattle in Inner Mongolia, northeastern China[J]. Parasit Vectors, 2019, 12(1): 450.
- [69] Jia N, Liu H B, Ni X B, Bell-Sakyi L, Zheng Y C, Song J L, Li J, Jiang B G, Wang Q, Sun Y, Wei R, Yuan T T, Xia L Y, Chu Y L, Wei W, Li L F, Ye J L, Lv Q Y, Cui X M, Guan Y, Tong Y G, Jiang J F, Lam T T, Cao W C. Emergence of human infection with *Jingmen tick virus* in China: A retrospective study[J]. EBioMedicine, 2019, 43: 317-324.

综 述

荆门蜱病毒是由节肢动物叮咬传播,引起人兽共患病的一种分节段病毒,隶属于黄病毒科的分节段单股正链带包膜的 RNA 病毒,处于黄病毒属、瘟病毒属、肝炎病毒属、佩吉病毒属之间,单独形成一个分支,目前国际病毒学尚未对此进行分类。该病毒主要通过蜱虫叮咬传播,不排除蚊子也是其传播宿主。已有文献证实该病毒对人类有致病性,但并未有治疗该病毒感染的特效药和疫苗。随着高通量技术的发展,如今已在全球多个地方均发现有该病毒及其变种的存在,危害公共安全及公共卫生。荆门蜱病毒(*Jingmen tick virus*, JMTV)首次在湖北省荆门市的蜱虫宿主中发现而得名^[1]。近些年由于蜱媒病毒性疾病在我国发病率不断增加以及新型蜱媒疾病的出现对人类健康的影响,使得致病性蜱媒病毒引起了研究者的广泛关注^[2-6]。

1.1 荆门蜱病毒研究进展

1.1.1 荆门病毒群的研究史

2010 年荆门病毒群病毒首次由我国科学家张永振团队在湖北省荆门地区采集的微小牛蜱样本中分离得到,并命名^[1]。同年,巴西的一个团队在微小牛蜱研磨液中分离到了一株类荆门蜱病毒,并获得了其 NS3、NS5 基因组^[9]。2016 年从乌干达一只红色疣猴中检测到 JMTV 的变体,扩大了荆门蜱病毒的宿主范围,这发现揭示了 JMTV 对人类健康存在潜在威胁^[8]。2018 年 Petra Emmerich 等^[11]在克里米亚刚果热病人血清中检测到 JMTV 病毒的存在,这一发现更是进一步证明了该病毒对人类健康存在影响。2019 年, Jia 等在蜱叮咬患者的皮肤、血液和血清中检测到了 JMTV,并在蜱细胞中对该病毒进行了分离培养,^[12]。同年, Wang 等人^[4]从内蒙古和黑龙江有蜱叮咬史的患者血清中分离出了类 JMTV 样病毒。

1.1.2 荆门蜱病毒的基因组结构和功能

荆门蜱病毒是黄病毒科具有包膜的单链核糖核苷酸病毒,基因组全长 11401nt,由四个片段组成^[1,13]。基因组结构呈现三个主要特征:(1)片段化;(2)

单顺反子或双顺反子表达模式；(3) 黄病毒科共有的两种关键非结构病毒蛋白的存在^[14]。研究发现在病毒所有四个序列的 5' 和 3' 端都有保守区域，如 GCAAGUGCA 和 GGCAAGUGC。这意味着所有四个片段来自同一病毒，进一步说明了 JMTV 基因组是分段的^[1]。蛋白质组学分析发现 JMTV 的前三个基因组片段为单顺反子，第四个基因组片段为双顺反子^[13]。四个片段分别编码 5 种蛋白，片段 1 编码非结构蛋白 1 (NSP1)，是一种黄病毒 NS5 样蛋白，具有典型黄病毒甲基转移酶和 RNA 依赖性 RNA 聚合酶 (RDRP) 的保守基序^[1]。片段 2 编码 VP1 蛋白，VP1 包含三个预测跨膜区域：一个在蛋白的 N 部分，另外两个位于蛋白的 C 端附近^[1]。糖基化位点分析表明，VP1 蛋白有两个 N 端糖基化位点，分别是 171 位的 NTTF 和 225 位的 NCTV，因此，S2 编码的 VP1 蛋白可能是 JMTV 病毒糖蛋白^[13]。片段 3 编码 NSP2 蛋白，该蛋白与黄病毒 NS2b-NS3 复合体相似。片段 4 编码 VP2、VP3 蛋白，这两个蛋白都不包含潜在的 N-糖基化位点^[1]。片段 1、片段 3 编码区两侧都有 UTR，表明 NS3 和 NS5 样蛋白是由单独的 ORF 编码的，四个片段的 3' 的 UTR 包含一个多聚 A 尾 (poly(A))，这是 JMTV 区别于其他黄病毒的重要标志^[1]。此外，NSP1 和 NS2b-NS3 复合体这两个片段在遗传上更接近典型黄病毒的 NS3 和 NS5 序列^[15]。NS3 蛋白是病毒编码的第二大非结构蛋白，其编码基因具有高度保守性，且 NS3 蛋白是一种多功能蛋白，具有很好的免疫原性，可刺激机体产生特异性体液免疫和细胞免疫^[16-20]。

1.1.3 荆门蜱病毒的致病性

目前已有文章证明荆门蜱病毒对人有致病性，尚未有证据表明荆门蜱病毒对动物有明确致病性。在《EBioMedicine》的一篇文章中，Jia 等人首次提出 JMTV 是人类疾病的病原体之一^[12]。其在文中详细描述了人感染荆门蜱病毒后具有的明显临床症状，并认为蜱虫叮咬部位常出现瘙痒或痛痛的焦痂是 JMTV 感染的独特临床症状^[12]。虽然家养动物的血液样本中曾检测到了该类病毒的 RNA 和抗体，但并未出现任何感染症状，只能说明该类病毒感染动物后可引起动物的病毒血症^[1,10,21]。

1.2 荆门病毒群的流行病学特征

1.2.1 荆门病毒群的地理分布

荆门蜱病毒地理分布非常广泛，现有的报道中亚洲^[1,4,12,21-25]、欧洲^[7,22,26]、非洲^[8,27]、美洲^[7-9,14,27]的各种蜱、蚊子物种、人类、灵长类、蝙蝠和老鼠中均发现有荆门蜱病毒及类荆门蜱病毒存在。荆门蜱病毒首次在中国的蜱虫宿主中发现，随着之后的研究，荆门病毒群在中国的宿主范围及地理分布不断扩大，广西、云南、内蒙古呼伦贝尔、黑龙江、新疆、北京、辽宁、浙江、贵州、河南等多地的蜱虫样本，牛、羊血清，啮齿动物样本、人组织血清及蝙蝠样本中均发现有该类病毒的基因序列^[3,5,6,12,23,28]。除了中国，包括老挝、法属安列斯群岛、土耳其、几内亚等在内的 30 多个国家和地区中陆续发现荆门病毒群病毒，且流行范围有逐年扩大的趋势，呈现全球地理性分布^[3,8,10,11,14,22,26,29]。

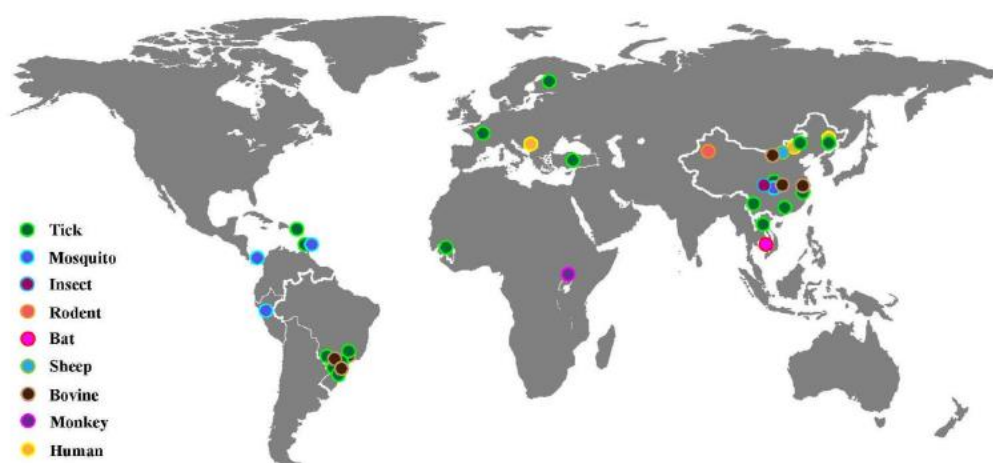


图 1-1 荆门病毒群宿主范围及地理分布（图转载自^[30]）

Figure 1-1 Host range and geographical distribution of Jingmen virus population (reproduced from ^[30])

1.2.2 荆门病毒群的宿主范围、传播途径

荆门蜱病毒广泛存在于昆虫宿主中，主要储存宿主为蜱虫、蚊子等节肢动物。目前已在库蚊、按蚊、伊蚊、阿米巴蚊等蚊子中发现了该类病毒的基因序列^[1,4,8]。蜱类中包括爪哇弱视蜱、银纹革蜱、坚果革蜱、钟状血蜱、微小牛蜱、铃头血蜱、长角血蜱、颗粒硬蜱、中华硬蜱、蓖麻硬蜱、全沟硬蜱和微小扇头蜱等在内的多种蜱类中均检测到荆门病毒群基因序列^[1,3,4,10,12,14,25-27]，其中微小牛蜱、长角血蜱、铃头血蜱携带率最高^[13]。此外，在黑腹果蝇、犬弓首线虫中也有该类病毒存在^{[31-}

33]。

荆门蜱病毒具有很强的跨物种传播能力，能感染多种哺乳动物，包括啮齿类动物、灵长类动物（以及人类）^[4,8,12,21]。人类主要通过体内储存有该病毒的蜱及蚊子叮咬而感染，尚未发现该病毒有人与人之间传播的案例。荆门蜱病毒感染全年均可发病，发病高峰与蜱活动高峰基本一致，感染多发生在具有林区、山区或野外旅居史的人和动物中^[4]。

1.2.3 荆门病毒群感染的临床症状与治疗

人被荆门病毒群病毒感染后，潜伏期通常为 3-7 天，有些病例的潜伏期短至 1 日或长达 10 日^[4]。JMTV 感染的临床表现从轻微疾病到需要入院的严重疾病不等，感染荆门蜱病毒的患者常见症状有显著发热、持续中度头痛、疲劳、恶心等非特异症状，伴有咳嗽和咽部不适；淋巴结肿大、疼痛，肌痛或关节痛，皮疹、瘀点，昏迷，食欲不振等常见症状^[4]。实验室检查患者常见异常检查结果有乳酸脱氢酶升高或降低及高灵敏度 C 反应蛋白水平升高，肝损伤、肌肉损伤，实验室检查表现为血清谷草转氨酶、谷丙转氨酶、乳酸脱氢酶和肌酸激酶水平升高^[4]。

针对荆门病毒群病毒感染目前并无特效药或疫苗，患者感染荆门蜱病毒后给予经验性利巴韦林和青霉素钠联合治疗 3-5 日，利巴韦林采用静脉给药（每日 0.5 g），青霉素钠采用肌肉注射（每日 200 万单位）^[4]。对于重度头痛的患者，静脉给予长春西汀（每日 20 mg）和丹参酮 II A 磺酸钠（每日 50 mg）3-5 日，症状通常在治疗 6-8 日后消退^[4]。

综述参考文献

- [1] Qin X C, Shi M, Tian J H, Lin X D, Gao D Y, He J R, Wang J B, Li C X, Kang Y J, Yu B, Zhou D J, Xu J, Plyusnin A, Holmes E C, Zhang Y Z. A tick-borne segmented RNA virus contains genome segments derived from unsegmented viral ancestors[J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2014, 111(18): 6744-9.
- [2] Dong Z, Yang M, Wang Z, Zhao S, Xie S, Yang Y, Liu G, Zhao S, Xie J, Liu Q, Wang Y. Human *Tacheng Tick Virus 2* Infection, China, 2019[J]. *Emerg Infect Dis*, 2021, 27(2): 594-598.
- [3] Meng F, Ding M, Tan Z, Zhao Z, Xu L, Wu J, He B, Tu C. Virome analysis of *tick-borne viruses* in Heilongjiang Province, China[J]. *Ticks Tick Borne Dis*, 2019, 10(2): 412-420.
- [4] Wang Z D, Wang B, Wei F, Han S Z, Zhang L, Yang Z T, Yan Y, Lv X L, Li L, Wang S C, Song M X, Zhang H J, Huang S J, Chen J, Huang F Q, Li S, Liu H H, Hong J, Jin Y L, Wang W, Zhou J Y, Liu Q. A New Segmented Virus Associated with Human Febrile Illness in China[J]. *N Engl J Med*, 2019, 380(22): 2116-2125.
- [5] Yu Z M, Chen J T, Qin J, Guo J J, Li K, Xu Q Y, Wang W, Lu M, Qin X C, Zhang Y Z. Identification and characterization of *Jingmen tick virus* in rodents from Xinjiang, China[J]. *Infect Genet Evol*, 2020, 84: 104411.
- [6] 余竹梅, 熊衍文, 王文, 张永振. 中国北方地区蜱携带荆门蜱病毒的分子流行特征分析 %J 中国媒介生物学及控制杂志[J], 2020, 31(03): 272-276.
- [7] Villa E C, Maruyama S R, De Miranda-Santos I K F, Palacios G, Ladner J T. Complete Coding Genome Sequence for Mogiana Tick Virus, a *Jingmenvirus* Isolated from Ticks in Brazil[J]. *Genome Announc*, 2017, 5(18).
- [8] Ladner J T, Wiley M R, Beitzel B, Auguste A J, Dupuis A P, 2nd, Lindquist M E, Sibley S D, Kota K P, Fetterer D, Eastwood G, Kimmel D, Prieto K, Guzman H, Aliota M T, Reyes D, Brueggemann E E, St John L, Hyeroba D, Lauck M, Friedrich T C, O'connor D H, Gestole M C, Cazares L H, Popov V L, Castro-Llanos F, Kochel T J, Kenny T, White B, Ward M D, Loaiza J R, Goldberg T L, Weaver S C, Kramer L D, Tesh R B, Palacios G. A Multicomponent Animal Virus Isolated from Mosquitoes[J]. *Cell Host Microbe*, 2016, 20(3): 357-367.

- [9] Emmerich P, Jakupi X, Von Possel R, Berisha L, Halili B, Günther S, Cadar D, Ahmeti S, Schmidt-Chanasit J. Viral metagenomics, genetic and evolutionary characteristics of Crimean-Congo hemorrhagic fever orthonairovirus in humans, Kosovo[J]. Infect Genet Evol, 2018, 65: 6-11.
- [10] Jia N, Liu H B, Ni X B, Bell-Sakyi L, Zheng Y C, Song J L, Li J, Jiang B G, Wang Q, Sun Y, Wei R, Yuan T T, Xia L Y, Chu Y L, Wei W, Li L F, Ye J L, Lv Q Y, Cui X M, Guan Y, Tong Y G, Jiang J F, Lam T T, Cao W C. Emergence of human infection with *Jingmen tick virus* in China: A retrospective study[J]. EBioMedicine, 2019, 43: 317-324.
- [11] 王泽东. 新型分节段黄病毒的发现及其流行病学研究[D]. 中国农业科学院, 2019.
- [12] Temmam S, Bigot T, Chrétien D, Gondard M, Pérot P, Pommelet V, Dufour E, Petres S, Devillers E, Hoem T, Pinarello V, Hul V, Vongphayloth K, Hertz J C, Loiseau I, Dumarest M, Duong V, Vayssier-Taussat M, Grandadam M, Albina E, Dussart P, Moutailler S, Cappelle J, Brey P T, Eloit M. Insights into the Host Range, Genetic Diversity, and Geographical Distribution of *Jingmenviruses*[J]. mSphere, 2019, 4(6).
- [13] Taniguchi S. Detection of Jingmen tick virus in human patient specimens: Emergence of a new tick-borne human disease?[J]. EBioMedicine, 2019, 43: 18-19.
- [14] Bartelma G, Padmanabhan R. Expression, purification, and characterization of the RNA 5'-triphosphatase activity of dengue virus type 2 nonstructural protein 3[J]. Virology, 2002, 299(1): 122-32.
- [15] Li H, Clum S, You S, Ebner K E, Padmanabhan R. The serine protease and RNA-stimulated nucleoside triphosphatase and RNA helicase functional domains of dengue virus type 2 NS3 converge within a region of 20 amino acids[J]. J Virol, 1999, 73(4): 3108-16.
- [16] Rothman A L, Kurane I, Ennis F A. Multiple specificities in the murine CD4⁺ and CD8⁺ T-cell response to dengue virus[J]. J Virol, 1996, 70(10): 6540-6.
- [17] Wengler G, Wengler G. The carboxy-terminal part of the NS 3 protein of the *West Nile flavivirus* can be isolated as a soluble protein after proteolytic cleavage and represents an RNA-stimulated NTPase[J]. Virology, 1991, 184(2): 707-15.
- [18] 陈亚洁. 登革病毒非结构蛋白 NS3 NTPase/RNA 解旋酶结构域的原核表达、活性研究及拮抗肽筛选[D]. 中国人民解放军军事医学科学院, 2005.

- [19] Wang Z D, Wang W, Wang N N, Qiu K, Zhang X, Tana G, Liu Q, Zhu X Q. Prevalence of the emerging novel *Alongshan virus* infection in sheep and cattle in Inner Mongolia, northeastern China[J]. Parasit Vectors, 2019, 12(1): 450.
- [20] Souza W M, Fumagalli M J, Torres Carrasco A O, Romeiro M F, Modha S, Seki M C, Gheller J M, Daffre S, Nunes M R T, Murcia P R, Acrani G O, Figueiredo L T M. Viral diversity of *Rhipicephalus microplus* parasitizing cattle in southern Brazil[J]. Sci Rep, 2018, 8(1): 16315.
- [21] Dinçer E, Hacıoğlu S, Kar S, Emanet N, Brinkmann A, Nitsche A, Özkul A, Linton Y M, Ergünay K. Survey and Characterization of *Jingmen Tick Virus* Variants[J]. Viruses, 2019, 11(11).
- [22] Guo J J, Lin X D, Chen Y M, Hao Z Y, Wang Z X, Yu Z M, Lu M, Li K, Qin X C, Wang W, Holmes E C, Hou W, Zhang Y Z. Diversity and circulation of *Jingmen tick virus* in ticks and mammals[J]. Virus Evol, 2020, 6(2): veaa051.
- [23] Kholodilov I S, Litov A G, Klimentov A S, Belova O A, Polienko A E, Nikitin N A, Shchetinin A M, Ivannikova A Y, Bell-Sakyi L, Yakovlev A S, Bugmyrin S V, Bespyatova L A, Gmyl L V, Luchinina S V, Gmyl A P, Gushchin V A, Karganova G G. Isolation and Characterisation of *Alongshan Virus* in Russia[J]. Viruses, 2020, 12(4).
- [24] Kuivanen S, Levanov L, Kareinen L, Sironen T, Jääskeläinen A J, Plyusnin I, Zakham F, Emmerich P, Schmidt-Chanasit J, Hepojoki J, Smura T, Vapalahti O. Detection of novel tick-borne pathogen, *Alongshan virus*, in *Ixodes ricinus* ticks, south-eastern Finland, 2019[J]. Euro Surveill, 2019, 24(27).
- [25] Pascoal J O, Siqueira S M, Maia R D C, Juan Szabó M P, Yokosawa J. Detection and molecular characterization of *Mogiana tick virus* (MGTV) in *Rhipicephalus microplus* collected from cattle in a savannah area, Uberlândia, Brazil[J]. Ticks Tick Borne Dis, 2019, 10(1): 162-165.
- [26] Shi M, Lin X D, Vasilakis N, Tian J H, Li C X, Chen L J, Eastwood G, Diao X N, Chen M H, Chen X, Qin X C, Widen S G, Wood T G, Tesh R B, Xu J, Holmes E C, Zhang Y Z. Divergent Viruses Discovered in Arthropods and Vertebrates Revise the Evolutionary History of the *Flaviviridae* and Related Viruses[J]. J Virol, 2016, 90(2): 659-69.
- [27] Maruyama S R, Castro-Jorge L A, Ribeiro J M, Gardinassi L G, Garcia G R, Brandão L G, Rodrigues A R, Okada M I, Abrão E P, Ferreira B R, Fonseca B A, Miranda-Santos I K. Characterisation of divergent flavivirus NS3 and NS5 protein sequences detected in *Rhipicephalus microplus* ticks from

- Brazil[J]. Mem Inst Oswaldo Cruz, 2014, 109(1): 38-50.
- [28] Yan M, Huang J, Chen J, Yang W, Liu G. Preparation, identification, and functional analysis of monoclonal antibodies against atypical porcine pestivirus NS3 protein[J]. J Vet Diagn Invest, 2020, 32(5): 695-699.
- [29] Sameroff S, Tokarz R, Charles R A, Jain K, Oleynik A, Che X, Georges K, Carrington C V, Lipkin W I, Oura C. Viral Diversity of Tick Species Parasitizing Cattle and Dogs in Trinidad and Tobago[J]. Sci Rep, 2019, 9(1): 10421.
- [30] 郭晶晶. 荆门蜱病毒在蜱与哺乳动物中的遗传多样性、进化及传播规律研究[D]. 武汉大学, 2020.
- [31] Webster C L, Waldron F M, Robertson S, Crowson D, Ferrari G, Quintana J F, Brouqui J M, Bayne E H, Longdon B, Buck A H, Lazzaro B P, Akorli J, Haddrill P R, Obbard D J. The Discovery, Distribution, and Evolution of Viruses Associated with *Drosophila melanogaster*[J]. PLoS Biol, 2015, 13(7): e1002210.
- [32] Callister D M, Winter A D, Page A P, Maizels R M. Four abundant novel transcript genes from *Toxocara canis* with unrelated coding sequences share untranslated region tracts implicated in the control of gene expression[J]. Mol Biochem Parasitol, 2008, 162(1): 60-70.
- [33] Tetteh K K, Loukas A, Tripp C, Maizels R M. Identification of abundantly expressed novel and conserved genes from the infective larval stage of *Toxocara canis* by an expressed sequence tag strategy[J]. Infect Immun, 1999, 67(9): 4771-9.

附录

附录一

相关缓冲液配制

Binding buffer 不含尿素 (400ml): PH=8.0

取 12ml 0.5M Tris.HCl (PH=6.8)倒入蓝盖玻璃瓶中, 用电子天平称取 11.7g NaCl 放入蓝盖玻璃瓶中, 加去离子水 390ml, 用台式酸度计测 PH, 加入 HCl 或 NaOH 调整 PH 至 8.0, 最终加入去离子水定容至 400ml。

Binding buffer 含尿素(200ml): PH=8.0

取 6ml 0.5M Tris.HCl (PH=6.8)倒入蓝盖玻璃瓶中, 用电子天平分别称取 5.85g NaCl, 96.1g 尿素放入蓝盖玻璃瓶中, 加去离子水 190ml, 用台式酸度计测 PH, 加入 HCl 或 NaOH 调整 PH 至 8.0, 最终加入去离子水定容至 200ml。

Wash buffer 含尿素(200ml): PH=8.0

取 6ml 0.5M Tris.HCl (PH=6.8)倒入蓝盖玻璃瓶中, 用电子天平分别称取 5.85g NaCl, 96.1g 尿素, 0.272g 咪唑放入蓝盖玻璃瓶中, 加去离子水 190ml, 用台式酸度计测 PH, 加入 HCl 或 NaOH 调整 PH 至 8.0, 最终加入去离子水定容至 200ml。

Elution buffer 含尿素(200ml): PH=8.0

取 6ml 0.5M Tris.HCl (PH=6.8)倒入蓝盖玻璃瓶中, 用电子天平分别称取 5.85g NaCl, 96.1g 尿素, 3.4g 咪唑放入蓝盖玻璃瓶中, 加去离子水 190ml, 用台式酸度计测 PH, 加入 HCl 或 NaOH 调整 PH 至 8.0, 最终加入去离子水定容至 200ml。

5×TBE: 称取 1.5g EDTA、11g 硼酸、21.6g Tris 加入蓝盖玻璃瓶中, 加入 400ml 去离子水充分混匀, 放入微波炉里加热至颗粒完全溶解, 室温放置备用。

0.5×TBE: 取 5×TBE 10 倍稀释即可获得 0.5×TBE 溶液。

1.2%琼脂糖凝胶: 称取 1.2g 琼脂糖, 加入 100ml 0.5×Buffer TBE, 充分摇匀后放入微波炉里加热直至里面的琼脂糖完全溶解, 溶液澄清透亮即可, 溶液放至温度大约在 50℃左右加入 GoldView 即可倒胶插梳齿使用, 短时间使用可以放在水浴锅内放置约一星期, 平时可以将剩余的胶放置室温, 用时用微波炉再加热。

10%过硫酸铵 (AP): 过硫酸铵 1 g 溶解至 8 ml 去离子水中, 定容至 10 ml 后分装储存于 4℃ (2-3 周) 或 20℃ (长期);

10%SDS: 10g SDS 溶解至 90ml 去离子水中, 定容至 100ml, 加热融化 SDS 结晶, 室温放置使用;

电泳缓冲液 (1×): 分别称取 3.03g Tris 、14.4g 甘氨酸和 1g SDS 放入 1L 蓝盖玻璃瓶中, 加去离子水定容至 1000ml;

转膜缓冲液 (1×): 分别称取 3.03g Tris 和 14.4g 甘氨酸放入 1L 蓝盖玻璃瓶中, 加去离子水定容至 800ml, 混匀置于碎冰中预冷后, 加入 200ml 甲醇, 用时提前预冷;

考马斯亮蓝染胶液: 500 ml 甲醇、400 ml 去离子水和 100 ml 冰醋酸混合, 称取 2.5g 考马斯亮蓝 R-250 溶解于混合液中, 用滤纸过滤后保存于棕色瓶中室温放置;

脱色液: 500 ml 甲醇、400 ml 去离子水和 100 ml 冰醋酸混合, 放于玻璃瓶中室温保存;

5%脱脂乳: 向 20mlPBS 溶液中加入 2.5g 脱脂奶粉, 充分混匀后加 PBS 定容至 50ml;

PBST: 取一袋 PBS 粉末倒入容器中, 加入 2L 去离子水混匀, 加入 2ml Tween-20;

5×SDS loading buffer: 0.225M Tris PH6.8、5%SDS、50%甘油、0.05%溴酚蓝和 0.25M DTT。

附录二

SDS-PAGE 胶配制各试剂浓度比例

5%浓缩胶:

成分	1ml	2ml	3ml	4ml	5ml	6ml	8ml	10ml
ddH ₂ O	0.68ml	1.4ml	2.1ml	2.7ml	3.4ml	4.1ml	5.5ml	6.8ml
30%Acr-Bis (29: 1)	170ul	330ul	500ul	670ul	830ul	1ml	1.3ml	1.7ml
1 MTris.HCl (PH6.8)	130ul	250ul	380ul	500ul	630ul	750ul	1ml	1.25ml
10%SDS	10ul	20ul	30ul	40ul	50ul	60ul	80ul	100ul
10%AP	10ul	20ul	30ul	40ul	50ul	60ul	80ul	100ul
TEMED	1ul	2ul	3ul	4ul	5ul	6ul	8ul	10ul

12%分离胶:

试剂	12%分离胶			
	5ml	10ml	15ml	20ml
ddH ₂ O	1.6ml	3.3ml	4.9ml	6.6ml
30%Acr-Bis (29: 1)	2ml	4ml	6ml	8ml
1.5M Tris.HCl (PH8.8)	1.3ml	2.5ml	3.8ml	5ml
10%SDS	50ul	100ul	150ul	200ul
10%AP	50ul	100ul	150ul	200ul
TEMED	2ul	4ul	6ul	8ul