

110 分 类 号: R373.3

单位代码: 10719

学 号: 2117101040

密 级: 公开

延安大学

论文题目: ZIKV 包膜蛋白单克隆抗体与
病毒样颗粒的制备及鉴定

论 文 作 者: 薛潘

指导教师、职称: 雷迎峰副教授、李宝莉教授

学科、专业名称: 基础医学

ZIKV 包膜蛋白单克隆抗体与病毒样颗粒的制备及鉴定

病原生物学专业研究生 薛潘 指导老师 雷迎峰副教授 李宝莉教授

摘 要: 寨卡病毒 (zika virus, ZIKV) 是一种通过蚊虫传播的虫媒病毒, 引起寨卡病毒病。目前国内外尚无针对 ZIKV 的特异有效药物和疫苗。伊蚊是 ZIKV 传播的主要媒介, 在我国也有广泛分布。与我国毗邻的东南亚地区是 ZIKV 流行的重要疫区, 近年来输入性 ZIKV 感染病例在我国不断出现, 因此 ZIKV 在我们国家传播与流行的潜在风险不断增加。针对 ZIKV 感染的早期检测和发现可以有效控制其传播与流行, 也有助于早期治疗。目前, 研发基于 ZIKV 抗原与抗体反应的快速诊断试剂是寨卡病毒病防控的一个重要方向。

ZIKV 属于黄病毒科黄病毒属, 基因组编码三种结构蛋白 (C、M 和 E) 和七种非结构蛋白。E 蛋白是 ZIKV 的包膜糖蛋白, 位于病毒颗粒表面, 也是 ZIKV 的主要保护性抗原。E 蛋白胞外域 (envelope ectodomain, Eecto) 位于 N 端约 80% 的区域, 可诱导强烈的特异性反应。因此, 针对 ZIKV E 蛋白的表达及特异性抗体制备是建立早期检测方法的重要基础。病毒样颗粒 (virus-like-particle, VLP) 是 ZIKV 结构蛋白在细胞内自组装成病毒粒子, 不含有病毒 RNA, 无复制能力和危险性, 结构类似病毒粒子, 比普通的亚单位抗原具有更强的免疫原性。ZIKV E 蛋白以 VLP 的形式表达可代替灭活病毒用于检测抗原、疫苗等研究。

研究目的: 通过杂交瘤技术制备抗 ZIKV-Eecto 蛋白的单克隆抗体 (monoclonal Antibody, mAb), 通过杆状病毒系统制备 ZIKV VLP, 并对 mAb 和 VLP 的初步应用进行研究, 为建立 ZIKV 快速检测方法提供了实验材料。

研究方法:

1. ZIKV 包膜蛋白特异性鼠单克隆抗体的制备

通过基因拼接的方法合成 ZIKV-Eecto, 并将 ZIKV Eecto 基因序列克隆入 pET28a 载体, 转化至大肠杆菌感受态 *BL21* 后利用异丙基硫代半乳糖苷 (isopropyl β -D-Thiogalactoside, IPTG) 诱导表达。通过 SDS-PAGE 分析重组 Eecto 蛋白的表达形式, 利用 6 M/L 甘氨酸盐酸溶解包涵体, 在含有 NDSB-201 的复性缓冲液中进行复性, 进一步通过切向流超滤系统超滤获得纯化的 ZIKV Eecto 蛋白。Eecto 蛋免疫 BALB/c 小鼠 3 次免疫后获得多克隆抗体血清, 进行效价测定。将 ZIKV-prME

基因序列克隆入 pCAGGs 质粒, 并将质粒 pCAGGs-ZIKV-prME 转染 HEK 293T 细胞, 通过蛋白免疫印迹法 (western blot, WB) 和免疫荧光染色 (immunofluorescence assay, IFA) 分别鉴定 E 蛋白表达情况。取效价较高的小鼠脾脏制备脾细胞, 与 SP2/0 骨髓瘤细胞融合, 通过有限稀释法获取分泌抗体的杂交瘤细胞株, 并对抗体效价测定、亚类进行分析。最后以 ZIKV 同属病毒日本脑炎病毒 (japanese encephalitis virus, JEV); 黄热病病毒 (yellow fever virus, YFV); 登革病毒 (dengue virus, DENV) 1-4 型; 蜱传脑炎病毒 (tick-borne encephalitis virus, TBEV) 的 Ecto 胞外域为包被抗原, 利用酶联免疫吸附试验 (enzyme-linked immunoadsorbent assay, ELISA) 分析 ZIKV mAb 的交叉反应性, 进一步分析其是否可以识别空间构象表位。选取效价高、特异性强的 ZIKV mAb 进行辣根过氧化物酶 (horseradish peroxidase, HRP) 标记, 并测定其效价。

2 ZIKV-VLP 制备及鉴定

将 ZIKV-prME 基因克隆到昆虫表达质粒 pFAST Bac Dual 载体中, 重组质粒构建成功后转化 DH10 α , 提取 ZIKV-prME 杆粒, 将其转染至昆虫细胞 sf9 包装杆状病毒, 使用前述制备的单克隆抗体 1D6 作为一抗, 采用免疫荧光染色对杆状病毒进行表达鉴定。进一步对杆状病毒单斑纯化, 利用纯化的单一杆状病毒感染 sf9 细胞进行 ZIKV-VLP 的表达, 以碘克沙醇为介质对细胞上清进行纯化, 进而利用 WB 对 VLP 的表达进行验证, 利用透射电镜观察 VLP 的形态。ZIKV-Ecto 蛋白免疫小鼠 2 周后, 取外周血以制备急性期 IgM 血清。以 ZIKV-Ecto 蛋白和 VLP 为固相抗原, 用于检测急性期血清中的 ZIKV IgM, 比较两者的抗原性。

研究结果:

1. ZIKV 包膜蛋白特异性鼠单克隆抗体的制备

成功构建 pET28a-ZIKV-Ecto, pCAGGs-ZIKV-prME 质粒。pET28a-ZIKV-Ecto 在原核细胞中以包涵体形式表达, 将包涵体纯化后免疫小鼠获得多克隆抗体血清, 对血清效价进行测定, 结果显示效价为 $1:10^3$ 。利用黄病毒属抗体 4G2 进行的免疫荧光实验证实 ZIKV-prME 在 BHK-21 细胞表达, 该抗原可被 ZIKV-Ecto 多抗的特异性识别。选择血清效价高的小鼠取脾脏细胞, 进而与骨髓瘤细胞融合, 通过有限稀释法一共获得单克隆抗体 39 株, 其中 38 株为 IgG (K), 1 株为 IgM (K)。利

用 JEV/YFV/TBEV/DENV1-4 七种 Ecto 蛋白对上述单克隆抗体进行筛选和特异性分析,结果显示 34 株为 ZIKV 特异性抗体,4 株与其他黄病毒属病毒有交叉反应性。取 12 株杂交瘤细胞制备腹水,其腹水效价为 $1:10^5$ - $1:10^8$ 。12 株抗体中 1D6/4H7/1A6/1H12/2G3 可结合 E 蛋白的空间表位,并对 5 株抗体成功进行了 HRP 标记,其中 3 株可用为 ZIKV 检测的候选抗体。

2 ZIKV-VLP 制备及鉴定

成功构建 pFAST-ZIKV-prME 质粒,转化后提取杆粒,转染 sf9 细胞制备了杆状病毒, WB 结果显示单斑挑取的纯化杆状病毒感染 sf9 细胞后能表达与预期大小一致的蛋白, IFA 结果显示重组杆状病毒感染 Sf9 细胞后能够观察到特异的荧光着色。经密度梯度离心纯化的 ZIKV-VLP 在 6 号区带位置有一条明显聚集条带。以 1D6 为一抗进行的 WB 鉴定结果显示该区带样品中能够检测到 E 蛋白条带,表明 VLP 集中于此离心区带,获得纯化的 ZIKV-VLP。透射电镜检测 sf9 细胞中表达的 ZIVK-VLP 直径约 40 nm 的空心圆形颗粒。基于 ZIKV-VLP 包被的 ELISA 结果表明 ZIKV-VLP 可更好地识别小鼠血清中的 IgM,具有较好的免疫原性。

研究结论: 本研究成功制备了 39 株 ZIKV E 蛋白鼠单克隆抗体,部分抗体效价高达 $1:10^8$; 筛选得 3 株可识别空间表位的 ZIKV 特异性抗体,可以作为候选检测抗体。成功制备并纯化了 ZIKV-VLP,其免疫原性好,有望替代灭活病毒作为检测抗原。本研究为建立 ZIKV 快速检测方法提供了实验材料。

关键词: 寨卡病毒; 包膜蛋白胞外域; 单克隆抗体; 病毒样颗粒

Preparation and identification of monoclonal antibodies against ZIKV envelope protein and virus like particles

Pathogenic biology (Major) Pan Xue Directed by Yingfeng Lei (associated professor)
and Baoli Li (professor)

Abstract: Zika virus (ZIKV) is an arthropodborne flavivirus, causing Zika virus disease. At present, there are no effective drugs and vaccines against ZIKV infection. Aedes mosquitoes are the main vectors for ZIKV transmission and are widely distributed in China. Southeast Asia, which is adjacent to China, is an important epidemic area for ZIKV. In recent years, imported ZIKV infection cases have continued to emerge in China, thus the potential risk of ZIKV transmission and prevalence in China is increasing. Early detection of ZIKV infection can effectively control its prevalence, and also facilitate early treatment. Currently, the development of rapid diagnostic reagents based on the antigen-antibody reaction of ZIKV is an important direction for the prevention and control of Zika virus disease.

ZIKV belongs to the Flaviviridae family, genus Flavivirus, with a genome encoding three structural proteins and seven non-structural proteins. Envelope protein is the glycoprotein of ZIKV, located on the surface of the virus particle, and is the main protective antigen of ZIKV. The extracellular domain of envelope protein (Ecto) is located in the N-terminal region, which can induce a strong specific immune response. Therefore, the expression of ZIKV envelope protein and the preparation of specific antibodies are important basis for establishing early detection methods. Virus-like particles (VLPs) are self-assembled virus particles formed by ZIKV structural proteins in cells. The VLPs have no viral RNA, and can't replicate in cells. VLPs have a structure similar to virus particles and have stronger immunogenicity than subunit antigens. The expression of ZIKV envelope protein in the form of VLP can replace inactivated virus for antigen detection and vaccine research.

Objective: This study is to prepare monoclonal antibodies (mAb) against ZIKV-Ecto protein through hybridoma technology, to prepare VLP by expressing ZIKV

structural proteins through the baculovirus system, and to explore the preliminary application of mAb and VLP. Provided experimental materials for establishing a rapid ZIKV detection method.

Methods:

1.Preparation and identification of ZIKV-Eecto mAb

The ZIKV-Eecto gene was synthesized by gene splicing and cloned into the pET28a vector. After transformation into *E. coli BL21* competent cells, the recombinant Eecto protein was expressed using isopropyl β -D-Thiogalactoside (IPTG). The expression form of the recombinant Eecto protein was analyzed by SDS-PAGE, and the inclusion bodies were dissolved in 6 M/L glycine hydrochloride, refolded in NDSB-201 refolding buffer, and further purified using tangential flow filtration to obtain purified ZIKV Eecto protein. After three immunizations with Eecto protein in BALB/c mice, the titer of the polyclonal antibody in serum was determined. The ZIKV-prME gene sequence was cloned into the pCAGGs vector, and the plasmid pCAGGs-ZIKV-prME was transfected into HEK-293T cells. The expression of E protein was identified by protein immunoblotting and immunofluorescence assay (IFA). Spleen cells from mice with high titers were used to prepare hybridoma cell lines with SP2/0 myeloma cells through limited dilution, and the titer and subtype of the antibodies were analyzed. Finally, the enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) was used to analyze the cross-reactivity of ZIKV mAb with the ectodomains of envelope proteins from Japanese encephalitis virus (JEV), yellow fever virus (YFV), dengue virus (DENV) types 1-4, and tick-borne encephalitis virus (TBEV). The ZIKV mAbs were further analyzed whether they can recognize conformational epitopes. Highly potent and specific ZIKV mAb were labeled with horseradish peroxidase (HRP) and the titers were determined.

2.Preparation and identification of ZIKV-VLP

The ZIKV-prME gene was cloned into the insect expression vector pFAST Bac Dual to construct plasmid pFAST-ZIKV-prME. pFAST-ZIKV-prME was transformed into DH10 α , and ZIKV-prME bacmids were extracted and transfected into insect cells sf9 for

expression of baculovirus. The expression of the baculovirus was identified using the prepared monoclonal antibody 1D6 as the primary antibody through IFA. The baculovirus was further purified by single plaque purification. The ZIKV-VLPs were expressed in sf9 cells using pure baculovirus infection. The cell supernatant was collected and purified with iodixanol density gradient centrifugation, and the purified VLP was detected by western blot. The morphology of VLP was observed by transmission electron microscopy. Two weeks after immunizing mice with ZIKV-Eecto protein, peripheral blood was taken to prepare IgM serum. ZIKV-Eecto protein and VLP were used as solid-phase antigens to detect ZIKV IgM in acute phase serum.

Results:

1.Preparation and identification of ZIKV-Eecto mAb

The pET28a-ZIKV-Eecto and pCAGGs-ZIKV-prME plasmids were successfully constructed. pET28a-ZIKV-Eecto was expressed in *E. coli* as inclusion bodies, and the inclusion bodies were purified and used to immunize mice to obtain polyclonal antibody serum. The serum titer was determined, showing a titer of 1:103. The specificity of ZIKV-prME expressed in BHK-21 cells was confirmed by IFA using the flavivirus genus-specific antibody 4G2, and the antigen could be recognized by ZIKV-Eecto specific polyclonal antibody. Spleen cells from mice with high serum titers were used to fuse with myeloma cells, and a total of 39 monoclonal antibodies were obtained through limited dilution, of which 38 were IgG (κ) and 1 was IgM (κ). The specificity analysis of the 39 monoclonal antibodies using JEV/YFV/TBEV/DENV1-4 envelope ectodomains showed that 34 were ZIKV-specific antibodies, and 4 had cross-reactivity with other flaviviruses. Twelve hybridoma cell lines were prepared with ascites titers ranging from $1:10^5$ to $1:10^8$. Among the 12 antibodies, 1D6/4H7/1A6/1H12/2G3 could bind to the spatial epitopes of the E protein, and 5 antibodies were successfully labeled with HRP, of which 3 could be used as candidate antibodies for ZIKV detection.

2.Preparation and identification of ZIKV-VLP

The pFAST-ZIKV-prME plasmid was successfully constructed, and the baculovirus

plasmid (bacmid) was prepared after transformation and extraction. The bacmid was transfected into sf9 cells to prepare the baculovirus, and WB results showed that the purified baculovirus-infected sf9 cells could express the prME. IFA results showed that Sf9 cells were infected with specific recombinant baculovirus. The ZIKV-VLP purified by density gradient centrifugation had a clear aggregation band at the 6th band position. The WB identification using 1D6 as the primary antibody showed that the band in this area could detect the envelope protein, indicating that the VLP was concentrated in this centrifuge band, and the purified ZIKV-VLP was obtained. Transmission electron microscopy shows that the ZIKV-VLPs expressed in sf9 cells are empty particles with a diameter of 40 nm. The ELISA results based on ZIKV-VLP coating showed that ZIKV-VLP could better recognize IgM in mouse serum and had good immunogenicity.

Conclusion: This study successfully prepared 39 mouse monoclonal antibodies against the envelope protein of ZIKV, with some antibodies having a high titer of up to $1:10^8$. 3 were capable of recognizing conformational epitopes and could serve as candidate detection antibodies. Zika VLPs were successfully prepared and purified, exhibiting good immunogenicity, and are expected to replace inactivated viruses as detection antigens. This research provides an experimental materials for the establishment of rapid ZIKV detection methods.

Keywords: Zika virus; Envelope protein ectodomain; Monoclonal antibody; Virus-like particle.

目 录

第一章 绪论.....	4
1 寨卡病毒概述.....	4
1.1 寨卡病毒分子生物学特征.....	4
1.2 致病机制.....	6
1.3 ZIKV 的流行病学特征.....	7
2 ZIKV 检测方法的研究进展.....	8
2.1 病毒分离培养.....	8
2.2 分子生物学检测方法.....	9
2.3 血清学检测方法.....	9
3 ZIKV 包膜蛋白 E 的表达研究现状.....	10
3.1 E 蛋白全长的表达.....	10
3.2 E 蛋白胞外域的表达.....	10
3.3 E 蛋白结构域 III 的表达.....	11
3.4 prME 蛋白的病毒样颗粒表达.....	11
3.5 蛋白表达系统.....	11
第二章 ZIKV 包膜蛋白特异性鼠单克隆抗体的制备.....	13
1 材料.....	13
1.1 感受态、质粒.....	13
1.2 试剂.....	13
1.3 抗体.....	14
1.4 溶液及相关试剂配制.....	14
1.5 实验仪器.....	16
1.6 细胞与动物.....	16
1.7 分析软件及网站.....	16
2 方法.....	16
2.1 pET28a-ZIKV-Ecto 质粒的构建.....	16
2.2 pCAGGs-ZIKV-prME 质粒的构建.....	18
2.3 pCAGGs-ZIKV-prME 在细胞内表达及鉴定.....	19
2.4 ZIKV-Ecto 蛋白的原核表达、复性及纯化.....	20
2.5 ZIKV-Ecto 蛋白免疫小鼠制备多克隆抗体血清及特异性鉴定.....	21
2.6 抗 ZIKV-Ecto 单克隆抗体制备及筛选.....	22
2.7 抗 ZIKV-Ecto 单克隆抗体腹水制备及纯化.....	23
2.8 抗 ZIKV-Ecto 单克隆抗体 HRP 标记与效价测定.....	23

3 结果.....	24
3.1 pET28a-ZIKV-Ecto 质粒的构建结果.....	24
3.2 重组质粒 pCAGGs-ZIKV-prME 的菌液 PCR 鉴定.....	25
3.3 pCAGGs-ZIKV-prME 在细胞内表达及鉴定.....	25
3.4 ZIKV-Ecto 蛋白的原核表达、复性及纯化.....	26
3.5 ZIKV-Ecto 蛋白免疫小鼠获得多克隆抗体血清,效价测定及特异性鉴定.....	27
3.6 抗 ZIKV-Ecto 单克隆抗体制备及筛选.....	29
3.7 抗 ZIKV-Ecto 单克隆抗体的腹水制备及纯化.....	32
3.8 抗 ZIKV-Ecto 单克隆抗体特异性鉴定.....	34
3.9 HRP 标记抗 ZIKV-Ecto 单克隆抗体及效价测定.....	36
4 讨论.....	36
第三章 ZIKV-VLP 的制备及鉴定.....	38
1 材料.....	38
1.1 菌种、细胞、质粒.....	38
1.2 试剂.....	38
1.3 溶液及相关试剂配制.....	38
1.4 实验仪器.....	39
1.5 动物.....	39
2 方法.....	39
2.1 pFAST-ZIKV-prME 质粒构建.....	39
2.2 rBacmid-ZIKV-prME 杆粒的制备.....	40
2.3 rBV-ZIKV-prME 杆状病毒的制备及表达鉴定.....	41
2.4 rBV-ZIKV-prME 杆状病毒的单斑纯化与鉴定.....	42
2.5 ZIKV-VLP 大量表达、纯化及鉴定.....	43
2.6 ZIKV-IgM 小鼠血清制备.....	43
3 结果.....	44
3.1 pFAST-ZIKV-prME 质粒的构建.....	44
3.2 rBacmid-ZIKV-prME 杆粒的构建.....	44
3.3 rBacmid-ZIKV-prME 杆粒在昆虫细胞中的表达及鉴定结果 ..	45
3.4 rBV-ZIKV-prME 杆状病毒的纯化.....	46
3.5 ZIKV-VLP 大量表达、纯化及鉴定.....	48
3.6 ZIKV-VLP 免疫原性鉴定.....	49
4 讨论.....	50
小结.....	52
参考文献.....	53
附录 A:ZIKV-Ecto 基因序列.....	68
附录 B:ZIKV-Ecto 基因合成 Oligos.....	69

附录 C:ZIKV-prME 优化后序列.....	72
附录 D:测序比对结果图	74
附录 E:序列扩增引物.....	75

缩略语表

简写	英文全称	中文全称
Aa	amino acid	氨基酸
ADE	Antibody-dependence enhancement	抗体依赖性增强
AMP	Ampicillin	氨苄西林
APC	Antigen presenting cells	抗原提呈细胞
BEVS	Baculovirus expression vector system	杆状病毒表达载体系统
BSA	bovine serum albumin	牛血清白蛋白
BV	Baculovirus	杆状病毒
CDC	Center for Disease Control and Prevention	疾病控制与预防中心
CPE	Cytopathic effect	细胞病变现象
CZS	Congenital Zika syndrome	先天性寨卡综合征
DCs	dendritic cells	树突状细胞
DENV	Dengue virus	登革病毒
<i>E.coli</i>	<i>Escherichia coli</i>	大肠埃希菌
Ecto	Envelope ectodomain	E 蛋白胞外域
ELISA	Enzyme-linked immunoabsorbent assay	酶联免疫吸附试验
EV71	Enterovirus 71	肠道病毒 71 型
FBS	fetal bovine serum	胎牛血清
FITC	Fluorescein isothiocyanate	异硫氰酸荧光素

缩略语表

简写	英文全称	中文全称
GBS	Guillain-Barre Syndrome	吉兰-巴雷综合征
Gen	Gentamicin	庆大霉素
HAT	hypoxanthine aminopterin thymidine	次黄嘌呤氨基蝶呤和胸腺嘧啶
HRP	Horseradish peroxidase	辣根过氧化物酶
IFA	Indirect immunofluorescence assay	间接免疫荧光试验
IFN	Interferon	干扰素
IPTG	Isopropylthio- β -galactoside	异丙基- β -D-硫代半乳糖苷
JEV	Japanese encephalitis virus	日本脑炎病毒
Kana	Kanamycin	卡那霉素
LAMP	Loop-Mediated Isothermal Amplification	环介导等温扩增技术
mAb	Monoclonal Antibody	单克隆抗体
NDSB	non-detergent sulfobetaine	非洗涤剂磺基甜菜碱
NS	non-structural	非结构蛋白
ORF	Open reading frame	读码框
PEG	polyethylene glycol	聚乙二醇
sE	souble Encelope	可溶性蛋白
TBEV	Tick-borne encephalitis virus	蜱传脑炎病毒
Tet	Tetracycline	四环素
TMB	Tetramethyl benzidine	四甲基联苯胺

简写	英文全称	中文全称
VLP	Virus-like Particle	病毒样颗粒
WB	Western blot	蛋白质印迹
WHO	World Health Organization	世界卫生组织
YFV	Yellow fever virus	黄热病病毒
ZIKV	Zika virus	寨卡病毒

第一章 绪论

1 寨卡病毒概述

1.1 寨卡病毒分子生物学特征

寨卡病毒 (Zika virus, ZIKV) 属于黄病毒科黄病毒属, 为单股正链 RNA 病毒, 病毒粒子呈球形, 有包膜, 直径约 50 nm, 基因组长约 11000 nt, 由一个开放阅读框 (Open Reading Frame, ORF) 和两端的非编码区 (5UTR 和 3UTR) 组成, 编码三种结构蛋白: 衣壳蛋白 C、前膜蛋白 prM、包膜蛋白 E 和七种非结构蛋白 (non-structural, NS1、NS2A、NS2B、NS3、NS4A、NS4B、NS5), 见图 1.1^[1]。黄病毒成员还包括登革病毒 (dengue virus, DENV)、日本脑炎病毒 (Japanese encephalitis virus, JEV)、西尼罗病毒 (West Nile virus, WNV)、蜱传脑炎病毒 (tick-borne encephalitis virus, TBEV) 等多个虫媒病毒, 它们在形态结构和复制机制相似, 但组织嗜性和致病性有很大差别^[2]。

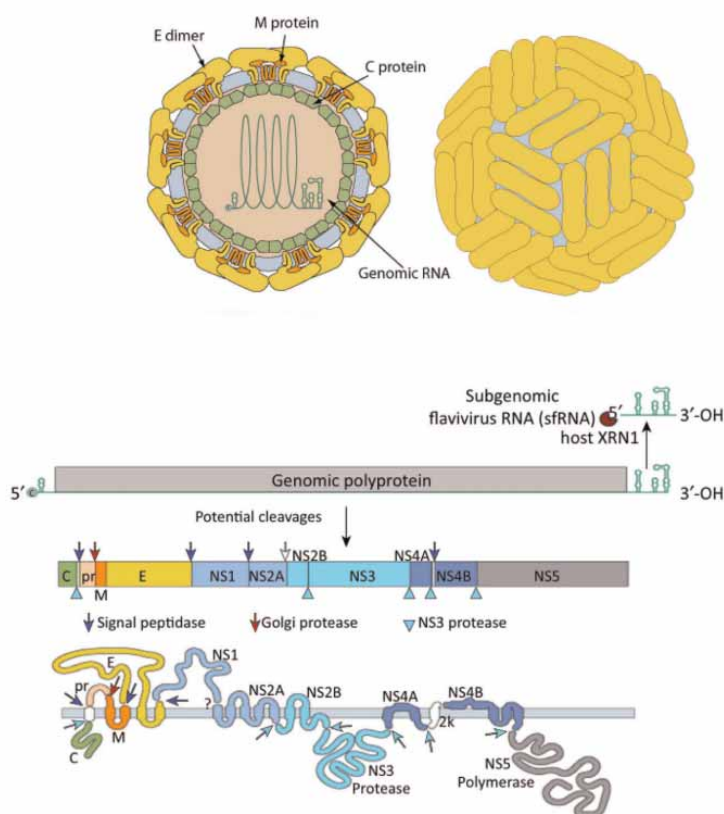


图 1.1 ZIKV 基因组及编码蛋白示意图^[3]

ZIKV 结构蛋白主要参与病毒颗粒的组装、病毒与细胞的吸附，在病毒的免疫应答反应中有着重要作用^[4]。C 结构蛋白可与病毒基因组 RNA 结合，形成病毒颗粒的核衣壳，呈现二十面体对称结构^[5]。研究表明，ZIKV C 蛋白的结构与 WNV 和 DENV 的结构相似，成熟的 C 蛋白折叠成一个紧密的二聚体结构，每个单体均含有 4 个 α -螺旋^[6]。prM 蛋白在病毒颗粒的组装和成熟过程中起重要作用，该蛋白与内质网膜中的 E 蛋白相互作用，包装病毒核衣壳产生未成熟的病毒颗粒，在未成熟病毒颗粒运输到高尔基体的过程中，prM 蛋白保护 E 蛋白，阻止其与宿主细胞膜融合^[7]。进入高尔基体后，prM 被宿主弗林蛋白酶（Furin）裂解，生成 75 个氨基酸的 M 蛋白和 99 个氨基酸的 pr 多肽，由此产生成熟病毒并释放至细胞外^[8]。

E 蛋白是 ZIKV 的包膜糖蛋白，位于病毒颗粒表面，与受体结合后介导病毒的入胞^[9]。E 蛋白单体排列成首尾相连的二聚体，90 个二聚体规则排列在病毒表面^[10]。E 蛋白胞外结构域可分为 3 个不同的功能结构域，见图 1.2：中央 β -桶状结构域 I（DI）、指状二聚体结构 II（DII）和免疫球蛋白样结构域 III（DIII），DI 连接 DII 和 DIII，作为结构中心；DII 远端包含一个融合环（fusion loop, FL）；融合环肽段位于 DII 区域的顶端，被 pr 肽段掩盖，位于由 DI 和 DIII 形成的疏水口袋中，在病毒包膜与宿主细胞膜融合时暴露出来^[11]。C 端免疫球蛋白样 DIII 包含受体结合位点，在细胞膜融合中起到重要作用^[8]。

ZIKV 非结构蛋白主要参与基因组的复制与翻译^[12]。NS1 蛋白是一种多功能蛋白，以二聚体的形式和其他非结构蛋白构成复制复合体参与 RNA 复制，以六聚体的形式分泌到胞外与宿主蛋白和免疫系统相互作用，在病毒的致病机制中有重要作用，同时可以作为抗原刺激机体产生保护性免疫反应^[13, 14]。已有多项研究显示，NS1 蛋白是 ZIKV 诊断与防治的重要靶标蛋白^[15]。NS2A 蛋白参与 RNA 的合成以及病毒组装^[16]。一些黄病毒属的 NS2A 还会阻断干扰素信号（interferon, IFN），拮抗宿主细胞的固有免疫反应，进而促进病毒的复制^[17]。NS2B 蛋白作为一个膜蛋白与 NS3 蛋白形成一个稳定的复合物，并锚定在细胞质膜上，是 NS2B-NS3 丝氨酸蛋白酶不可或缺的辅助因子^[18]。NS3 蛋白也是一种多功能蛋白，具有蛋白酶、RNA 三磷酸酶和 RNA 解旋酶功能，在病毒 RNA 的复制和翻译中起关键作用，对于多聚酶加工和 RNA 复制均不可缺少^[19]。NS3 蛋白的氨基端与 NS2B 蛋白形成复合物，具有蛋

白酶活性，用以切割病毒 RNA 翻译的多聚蛋白前体，促进结构蛋白 C 和非结构蛋白 NS2B、NS3、NS4A、NS4B、NS5 的成熟（如图 1.1）^[20]。NS3 蛋白的羧基端具有 RNA 三磷酸酶和解旋酶活性，可在基因组加帽前对 5 端去磷酸化^[21]。有研究显示，NS3 蛋白酶的结构域可能会影响 RNA 解旋酶的活性，某些情况下会激活 caspase8，从而引起凋亡^[22]。NS4A 与 NS4B 蛋白是疏水膜蛋白，参与病毒复制并起到重要作用。NS4A 蛋白通过与 NS1 蛋白相互作用定位于复制复合物，参与 ZIKV RNA 的复制^[23]。NS4B 与 NS3 蛋白共同定位于 RNA 复制位点，抑制 I 型 IFN 信号^[24]。NS5 蛋白是黄病毒属中最大和最为保守的蛋白，包括两个功能结构域，具有甲基转移酶（Methyltransferases, MTs）和 RNA 依赖的 RNA 聚合酶（RNA-dependent RNA polymerase, RdRp）活性，主要参与病毒 RNA 的合成并对 RNA 加帽，RdRp 结构域位于 NS5 的 C 端，能够起始病毒 RNA 的合成^[25]。有研究表明，NS5 可以抑制 JAK-STAT 途径中的 IFN 信号，促进病毒复制^[26]。

1.2 致病机制

人群对 ZIKV 普遍易感，多数感染者表现为无症状或轻度症状，临床症状与普通登革热相似，包括眼眶后头痛、结膜炎、轻度发热和小关节痛，约 3~5 天后体温升高，并出现斑疹^[27]。随着 ZIKV 的全球传播，寨卡病的症状变得多样化，除了常见的发热、头痛、关节痛、结膜炎、肌痛和皮疹外，还有腹痛、腹泻、厌食、头晕和便秘等^[28]。

有研究表明，ZIKV 可以突破血胎、血脑、血眼和血睾屏障，具有一定的嗜神经性，对孕妇的危害较大^[29]。孕妇感染 ZIKV 可导致高达 14% 的新生婴儿出现小头畸形症和其他出生缺陷性疾病，部分出生时健康的婴儿在发育过程中也可能出现神经系统发育缺陷^[30]。孕妇感染 ZIKV 后，病毒突破血胎屏障进入胎盘组织中繁殖，严重影响胎儿中枢神经系统和免疫系统，从而引起婴儿先天性寨卡综合征（Congenital Zika syndrome, CZS），包括小头畸形、皮质畸形和颅内钙化等^[31]。成人感染 ZIKV 后导致吉兰-巴雷综合征（Guillain Barre syndrome, GBS）^[32]。GBS 是一种自身免疫性疾病，ZIKV 感染导致周围神经系统产生 T 细胞介导或体液性自身免疫反应，引起神经细胞脱髓鞘，表现为进行性肌无力、瘫痪，如果不及时治疗，可导致呼吸衰竭和自主神经功能障碍^[33]。

ZIKV 可能通过受体介导的内吞作用进入宿主细胞, 该过程是由病毒包膜糖蛋白与细胞表面受体的相互作用介导的^[34, 35]。病毒与内体膜融合并将其基因组释放到细胞质中, 一旦进入细胞质, 病毒 RNA 翻译为多聚蛋白, 被切割成结构和非结构蛋白^[36]。内质网是 ZIKV 主要的复制场所, 基因组在此复制从而增加子代病毒 mRNA 的数量^[37]。

1.3 ZIKV 的流行病学特征

1947 年科学家从乌干达的一只发病的猴子体内分离得到 ZIKV^[38]。2013 年以前, ZIKV 主要在非洲的一些国家和地区的动物中流行, 仅在局部地区引起散发的人类感染^[39]。2015 年至今, ZIKV 在巴西、委内瑞拉、哥伦比亚等拉丁美洲出现暴发流行, 并蔓延至非洲、北美洲、亚洲和太平洋地区^[40]。2016 年是 ZIKV 流行的高峰, 其中巴西的感染病例超过 150 万, 其他国家的感染病例总数也超过了 10 万^[41]。2017 年起全球 ZIKV 的感染病例数有所下降, 但仍在美洲几个国家和东南亚等地区保持低水平流行^[42]。此外, 2019 年欧洲报告了首例本地蚊虫传播 ZIKV 的病例, 2021 年印度出现 ZIKV 暴发流行, 确诊病例超过 100 例^[43]。迄今为止, 共有 89 个国家和地区报告了蚊子传播 ZIKV 感染的病例^[44]。系统发育分析表明, ZIKV 有两个谱系, 一个是非洲谱系, 一个是亚洲谱系^[45]。非洲谱系的感染力弱, 仅在非洲地区传播, 而亚洲谱系是目前全球流行的主要病毒株^[46]。

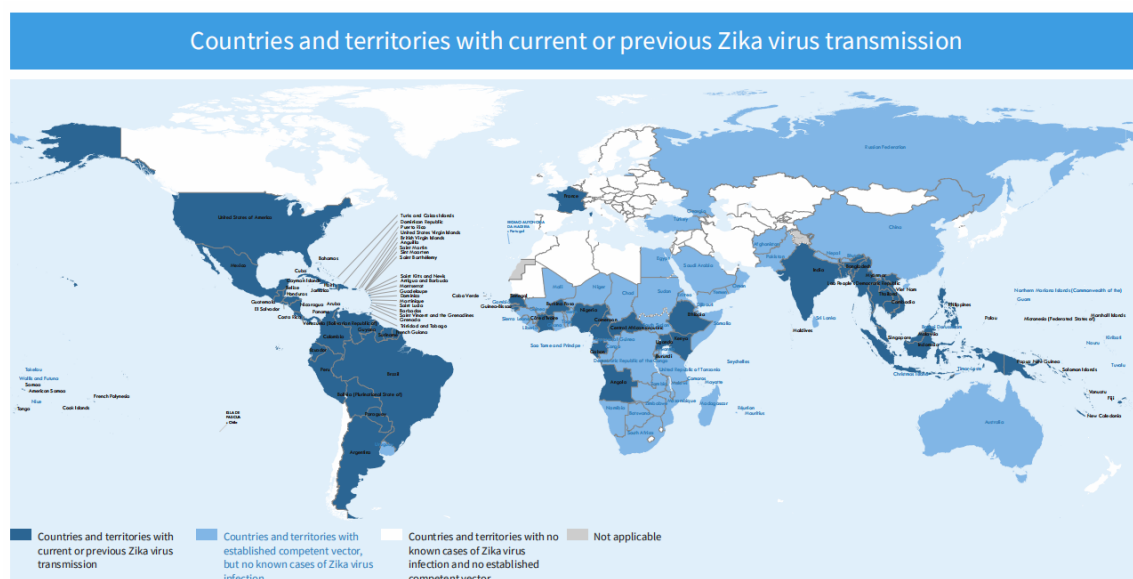


图 1.3 ZIKV 的流行分布

ZIKV 的传播途径主要为蚊媒传播, 还有性传播、母婴传播、血液传播等: ①

母婴传播：有研究表明 ZIKV 可通过胎盘由母亲传播给胎儿，孕妇也可能在分娩过程中将 ZIKV 传播给新生儿；②性传播：目前报告的少量病例均为男性患者将 ZIKV 传播给女性，尚无证据表明感染的女性可将 ZIKV 传播给其性伴侣；③血液传播：目前已有经输血传播的 ZIKV 病例报告^[47]。ZIKV 感染人体后可以在体液内存活很长时间，在血液、眼泪、尿液、唾液甚至精液中可检测到 ZIKV^[48]。埃及伊蚊和白纹伊蚊是人群感染 ZIKV 的主要传播媒介，ZIKV 的流行区域与伊蚊的分布密切相关，伊蚊摄入含 ZIKV 的血液 5 d 后，62%伊蚊唾液腺中可分离到病毒，10 d 后所有伊蚊体内均可分离到病毒，这提示伊蚊是 ZIKV 的主要储存宿主^[49]。

埃及伊蚊和白纹伊蚊在我国广泛分布，其中埃及伊蚊主要分布于海南省沿海市县及火山岩地区、广东省雷州半岛、云南省的西双版纳州、德宏州、临沧市，以及台湾嘉义县以南及澎湖县部分地区；白纹伊蚊则广泛分布于北至沈阳、大连，经天水、陇南，至西藏墨脱一线及其东南侧大部分地区。自 2015 年 ZIKV 疫情暴发以来，每年我国均出现多起输入性寨卡病例，大大增加了 ZIKV 在我国本土流行的风险。目前尚无针对 ZIKV 感染的特异性抗病毒药物及疫苗，国内也缺乏相关检测试剂盒^[50, 51]，开发 ZIKV 早期检测诊断方法是我国防控和监测 ZIKV 流行的的重要手段。

2 ZIKV 检测方法的研究进展

目前 ZIKV 感染的诊断方法主要有分子生物学检测病毒核酸，血清学方法检测病毒抗原或者特异性抗体，病毒分离和培养，以及序列测定等^[52]。确诊 ZIKV 感染的最佳方法是对患者的多个液体样本同时进行检测。这种策略有利于提高 ZIKV 的检出率，是 ZIKV 感染早期防止病毒传播的重要方法^[53]。

2.1 病毒分离培养

病毒分离和培养是一种传统的检测方法，可以提供病毒感染的直接证据，是检测 ZIKV 感染的“金标准”^[54]。通过将疑似感染的样本接种到细胞中，观察细胞病变和病毒的增殖，可以确诊 ZIKV 感染^[55]。但是该方法具有费时费力、低通量和低灵敏性的缺点，不适合大规模的临床应用^[56]。病毒分离已用于确定登革热或其他黄病毒流行地区 ZIKV 的感染情况。1947 年 4 月 Dick 等从发热的恒河猴血清中成功分离到第一株 ZIKV^[57]。Perkasa 等人利用 Vero 细胞分离和培养 ZIKV^[58]。对比与其他检测方法，病毒分离这种方法消耗大量人力和时间，但却是鉴定 ZIKV 感染的金

标准。另外,分离获得的毒株可用于鉴定、分型、感染特性和致病特性等研究,也可灭活用于检测方法的开发,因此具有不可替代的价值和意义。

2.2 分子生物学检测方法

分子生物学检测方法主要是检测病毒的遗传物质 RNA 或 DNA^[59]。实时逆转录聚合酶链反应(RT-PCR)是一种常用的检测方法,具有较高的敏感性和特异性^[32]。通过逆转录病毒 RNA 为 cDNA,然后进行扩增和实时定量,对于 ZIKV 早期感染的诊断非常有用^[60]。环介导等温扩增技术(Loop-Mediated Isothermal Amplification, LAMP)是一种 PCR 的替代方案,允许在单一和固定温度下快速、稳定和简单地扩增核酸。与 RT-qPCR 相比,该检测具有快速、低成本、高灵敏度和高特异性的优势^[61]。LAMP 结果可以通过带有颜色的报告基因读取,并且报告基因可以添加到反应混合物中。LAMP 反应不需要复杂设备即可直接在床旁完成检测,适合于现场快速检测^[62]。这些方法具有高度的特异性和敏感性,可以快速准确地检测病毒。然而,这种方法仅适用于感染初期,因为 ZIKV 感染的病毒期通常持续一周左右,使得 ZIKV 检测的分子诊断窗口比较狭窄,且需要成熟的实验设备和具有专业技能的实验人员操作。

2.3 血清学检测方法

血清学检测方法主要依赖于检测 ZIKV 感染后人体产生的抗体或者病毒抗原,包括 E 蛋白、prM 蛋白和 NS1 蛋白的抗体及抗原等^[63]。酶联免疫吸附试验(ELISA)是一种常用的血清学检测方法,可以检测血清中的特异性 IgM 和 IgG 抗体^[64]。IgM 抗体通常在感染后的早期出现,而 IgG 抗体在感染后期或再次感染时出现^[65]。FDA 于 2016 年 2 月 26 日授权紧急使用 IgM 抗体捕获酶联免疫吸附试验(MAC-ELISA),该试剂盒用于检测人脑脊液或血清中 ZIKV 的特异性 IgM^[66, 67]。2016 年 Huzly 等使用来自欧洲感染患者的交叉反应血清中的抗 ZIKV IgM 和 IgG 抗体进行了 ELISA 检测,结果显示出高特异性,证实了欧洲 ZIKV ELISA 特异性检测对疑似既往接触过黄病毒或疫苗的个体检测的适用性^[68]。然而,在大多数 IgM 检测中,考虑到病程和检测的特异性和敏感性,阴性结果仅表明近期没有感染^[69]。此外,ZIKV 抗体可能与其他同源黄病毒(如 DENV)的抗体发生交叉反应^[70, 71]。ZIKV 的非结构蛋白 NS1 可以形成六聚体,在病毒复制期间分泌到血液中,也可作为病毒感染早期诊断的抗

原^[72]。分泌型的 NS1 是可溶性的六聚体脂蛋白结构,可以与未感染的细胞通过硫酸糖胺聚糖相互作用^[72]。2017 年 Irene Bosch 等开发了基于 ZIKV-NS1 抗原快速免疫层析检测方法,但是敏感性和特异性非常有限,有待进一步优化^[56]。由于 ZIKV 无症状感染者比例高,且检测时间窗窄,血清学检测在 ZIKV 检测中发挥着关键作用,对于流行病学调查和病毒传播的监控非常重要^[73]。目前,国外已经开发了许多检测 ZIKV 的血清学检测方法^[74]。

除了上述的三种检测方法,测序技术也被用于检测 ZIKV 感染,不仅可以确诊感染,还可以分析病毒的遗传变异和进化。为了满足 ZIKV 快速、现场检测的需求,各种快速诊断工具也正在开发,如基于 CRISPR 技术的 SHERLOCK 系统和基于等温扩增的快速检测套件^[75]。由于 ZIKV 抗体与其他黄病毒属病毒存在交叉反应性,筛选 ZIKV 特异性抗体是建立血清学检测方法的关键^[76]。

3 ZIKV 包膜蛋白 E 的表达研究现状

3.1 E 蛋白全长的表达

E 蛋白是 ZIKV 结合靶细胞、诱导保护性免疫应答的主要结构蛋白,以 90 个同源二聚体的形式通过跨膜区及胞质尾区锚定在病毒的脂膜上^[77]。全长的 E 蛋白包含跨膜区,是全长表达 E 蛋白的困难所在,且全长 E 蛋白与 DENV-2 型存在 40% 的同源氨基酸,极易导致交叉反应性^[78, 79]。2021 年史凤娟等进行了抗 ZIKV 全长 E 蛋白的表达及单克隆抗体制备,获得了 1 株单克隆抗体,与 DENV 进行了交叉反应鉴定,发现该抗体为 ZIKV 特异性单克隆抗体,无交叉反应性^[80]。2020 年张经伟等对 E 蛋白全长进行了原核表达,并制备了多克隆抗体^[81]。

3.2 E 蛋白胞外域的表达

ZIKV E 蛋白去除跨膜区和锚定区、位于细胞膜外的部分称为 E 蛋白胞外域 (Ecto),也称为可溶性 E 蛋白 (Soluble envelope, sE)^[82]。由于 Ecto 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 蛋白基本一致,是替代全长 E 蛋白进行抗原性研究的主要策略^[83]。2019 年 Sami Akhras 等进行了 ZIKV Ecto、E-DI、E-DII、E-DIII 的原核表达,并制备了各个结构域的多克隆抗体,为研究不同结构域的功能提供了基础^[83]。

3.3 E 蛋白结构域 III 的表达

E-DIII 是一个免疫球蛋白样结构域, 具有结合细胞受体的能力^[84]。据报道, 从 ZIKV 感染患者中分离的大多数 E-DIII 表位的抗体可以与 ZIKV 或 DENV E 蛋白具有特异性结合^[85], 一些 E-DIII 表位的抗体对小鼠具有保护作用^[15]。2019 年何婷等进行了 ZIKV E-DIII 的蛋白表达, 并制备了抗 ZIKV E-DIII 蛋白的多克隆抗体^[86]。

3.4 prME 蛋白的病毒样颗粒表达

病毒样颗粒 (VLPs) 是不含病毒基因组的病毒粒子, 具有与野毒株相似的病毒结构, 保留了病毒的抗原性, 而不具备感染性^[87]。ZIKV 的 prME 蛋白可以在细胞内自组装成 ZIKV-VLP, 用于疫苗、抗体、替代抗原等方面的研究^[88]。对比于重组蛋白及灭活病毒, VLP 的优势在于具有更接近病毒粒子的空间构象和抗原表位, 可模拟野毒株刺激机体产生较强的免疫应答^[89]。另外, 单核/巨噬细胞和树突状细胞等抗原提呈细胞 (Antigen presenting cells, APC) 更容易识别和吞噬 VLPs 颗粒, 从而有效地刺激 CD4⁺T 细胞增殖和细胞毒性 T 细胞反应^[90]。

2021 年 Kuadkitkan 等利用哺乳动物细胞制备 ZIKV-VLP, 通过密度梯度离心法获得纯化的 VLP^[91]。2023 年 Malogolovkin 等分别在哺乳动物细胞和昆虫细胞中表达了 ZIKV-VLP, 两个系统表达后的 VLP 均可以在透射电子显微镜分析中都呈现出典型的病毒粒子形态, 并且未检测到未成熟病毒粒子上存在的未切割的 prM 糖蛋白^[92]。由此可见, 哺乳动物系统和昆虫动物系统均可以使 ZIKV 结构蛋白正确表达及进行翻译后的修饰, 而且 VLP 在用于 ZIKV 疫苗研究方面取得了很大进展^[93, 94]。

3.5 蛋白表达系统

常见的重组蛋白表达系统包括大肠杆菌表达系统、酵母表达系统、哺乳动物细胞表达系统和杆状病毒表达系统^[95]。大肠杆菌表达系统是应用最早最广泛的一种原核表达系统, 具有细胞繁殖快速、产量高、表达产物纯化方式简单、稳定性好等优点, 但一些蛋白不能进行糖基化等修饰, 难以形成正确的空间构象, 生物学活性较差^[96]。酵母表达系统培养条件简单, 利于大规模工业化生产, 可以进行蛋白糖基化修饰, 兼具原核以及真核表达系统的优点, 它在基因工程领域的应用越来越广泛。但酵母表达系统需要较长的发酵时间, 且容易产生不正确的蛋白糖基化, 产物多糖浓度较高, 不利于纯化^[96]。哺乳动物细胞表达系统表达的蛋白在加工、分泌、糖基化等方面具有更强的优势, 更接近于天然蛋白质, 适用于表达完整的大分子蛋白,

缺点是培养成本较高，周期较长，且产量较低^[97]。昆虫表达系统是一类应用广泛的真核表达系统，具有高等真核生物相似的翻译后修饰加工以及转移外源蛋白的能力，基因组可容纳大片段外源基因，同时表达多个基因，蛋白表达量较高，且可以进行蛋白翻译后的加工修饰^[98]。昆虫表达系统因其高表达效率、高安全性等优点，成为 VLP 制备常用的表达系统^[90]。

综上，ZIKV 是一种近年再发的重要虫媒病毒，已在全球多个地区内广泛流行，尚缺乏特异有效的治疗药物和安全有效的预防疫苗^[99]。近年来，我国每年都发生多起输入性 ZIKV 病例，而 ZIKV 的媒介宿主伊蚊在我国广泛分布，这提示它在我们国家传播与流行的潜在风险不断增加。早期诊断技术是检测、监测 ZIKV 流行情况的重要措施^[100]。基于 ZIKV 包膜蛋白 E 的生物学特性，本研究旨在制备 E 蛋白单克隆抗体和 VLP 抗原，为建立 ZIKV 早期检测方法提供实验基础。

第二章 ZIKV 包膜蛋白特异性鼠单克隆抗体的制备

特异性单克隆抗体是建立 ZIKV 感染早期检测方法的关键之一^[101]。包膜蛋白 E 是 ZIKV 的主要结构蛋白，而 E 蛋白胞外域（Ecto）位于病毒颗粒的表面，含有多个 B 细胞抗原表位，可诱导特异性抗体的产生。本研究首先在大肠杆菌中表达及纯化 Ecto，将 Ecto 蛋白免疫小鼠后通过杂交瘤细胞技术制备 ZIKV 包膜蛋白特异性鼠单克隆抗体，并分析了抗体与其他黄病毒属病毒的交叉反应性。进一步利用哺乳动物细胞表达 prME 蛋白，分析单克隆抗体识别空间表位的情况。之后对结合能力和特异性较好的单克隆抗体进行了 HRP 标记，这为后续鉴定 VLP 和建立检测方法提供了实验材料。

1 材料

1.1 感受态、质粒

1.1.1 感受态：*E.coli DH5a*、*E.coli BL21(DE3)*：购自德国 Merck 公司

1.1.2 质粒：pET28a、pCAGGS：购自日本 Takara 公司，由空军军医大学微生物与病原生物学教研室保存；pCAGGS-YFV-prME，由空军军医大学微生物与病原生物学教研室构建保存。

1.2 试剂

① 限制性内切酶和 PCR 扩增酶：Nco I、Xho I、EcoR I、Premix PrimeSTAR MAX，购自日本 Takara 公司。

② 500 g/L 聚乙二醇 1500（polyethylene glycol 1500，PEG 1500）：购自 Sigma 公司。

③ 50×TAE 溶液、琼脂糖、胰蛋白胨、酵母提取物、琼脂粉：购自上海生工生物工程有限公司。

④ 胎牛血清：购自 HyClone 公司。

⑤ 核酸染料、凝胶回收试剂盒、核酸提取试剂盒：购自 Everbright 公司。

⑥ 核酸 DNA 连接酶 Solution I、细菌抗生素 Kana、AMP：购自上海生工生物工程有限公司。

⑦ 10×核酸上样缓冲液、DL 2000 DNA Maker、DL 5000 DNA Maker：购自日

本 Takara 公司。

⑧ 细胞培养液（高糖 DMEM 培养基）、DAPI 核染液、抗荧光淬灭封片剂：购自美国 Corning 公司。

⑨ 细胞抗生素、质粒转染试剂脂质体：购自碧云天公司。

⑩ 细胞小圆片、HRP：购自美国 Thermo 公司。

⑪ 4%多聚甲醛、Triton X-100：购自日本 Takara 公司。

⑫ BSA（bovine serum albumin，牛血清白蛋白）：购自美国 BD 公司。

⑬ 小鼠 mAb 亚型鉴定试剂盒：购自 proteintech 公司。

⑭ SOC 培养基、IPTG：购自上海生工生物工程有限公司。

⑮ 5×蛋白上样缓冲液：购自新赛美公司。

⑯ 考马斯亮蓝 R-250：购自上海生工生物工程有限公司。

⑰ 蛋白条带大小指示 Marker、BCA 定量试剂盒：购自美国 Thermo 公司。

⑱ 四甲基联苯胺（tetramethyl benzidine, TMB）显色液、终止液：购自索莱宝公司。

⑲ 非洗涤剂磺基甜菜碱-201（non-detergent sulfobetaine, NDSB-201）：购自美国 Millipore 公司。

⑳ QuickAntibody-Mouse5W、次黄嘌呤氨基蝶呤和胸腺嘧啶（hypoxanthine aminopterin thymidine, HAT）核苷选择培养基：购自博奥龙科技有限公司。

1.3 抗体

① 黄病毒属共同抗体 4G2：空军军医大学微生物与病原生物学教研室制备和纯化。

② CoreLite® 488 Goat anti-Mouse IgG Secondary Antibody（FITC）：美国 Proteintech 公司。

③ HRP 标记的山羊抗小鼠 IgG：上海生工生物工程有限公司。

④ IRDye® 680RD 标记的山羊抗小鼠 IgG：美国 LI-COR 公司。

1.4 溶液及相关试剂配制

① 1×TAE 溶液：将 40 mL 50×TAE 溶液稀释至离子水定容至 2 L。

② 1000×AMP 溶液：称取 Ampicillin 5 g 溶于 50 mL 去离子水中，并使用 0.22

μm 过滤器过滤除菌，分装后保存于-20℃。

③ 1000×Kana 溶液：称取 Kanamycin 5 g 溶于 50 mL 去离子水中，并使用 0.22 μm 过滤器过滤除菌，分装后保存于-20℃。

④ 1%琼脂糖凝胶：称取琼脂糖 1 g 溶于现配的 1×TAE 溶液使其溶解，并定容至 100 mL，100℃加热溶解，冷却后加入 10 μL 核酸染料并混匀。

⑤ 2×YT 液体培养基：称取 32 g 胰蛋白胨、10 g 氯化钠、20 g 酵母粉溶于去离子水并定容至 2 L，调节溶液 pH 值至 7.4，分装后使用高压蒸汽灭菌备用。

⑥ 2×YT 固体培养基：称取 8 g 胰蛋白胨、2.5 g 氯化钠、5 g 酵母粉溶于去离子水并定容至 500 mL，pH 值调节至 7.4，使用高压蒸汽灭菌。降温后加入 Kana/Amp 抗生素至终浓度为 100 μg/mL，混合均匀后倒入无菌平皿中，4℃保存。

⑦ ELISA 包被液：称取碳酸钠 1.59 g，碳酸氢钠 2.93 g 溶于去离子水并定容至 1 L，调节 pH 至 9.6，室温保存。

⑧ ELISA 封闭液：称取 BSA 30 g，加入 PBST 定容至 1 L，保存于 4℃。

⑨ ELISA 洗涤液：称取 BSA 1 g，加入 PBST 定容至 1 L，保存于 4℃。

⑩ TBST 缓冲液：称取 Tris 3.03 g、氯化钠 9 g 溶于去离子水并定容至 1 L，加入 500 μL Tween-20，室温保存。

⑪ 考马斯亮蓝染色液：使用天平称取考马斯亮蓝 R-250 1 g，加入 250 mL 异丙醇和 100 mL 冰醋酸，加入去离子水定容至 1 L，滤纸过滤后室温保存。

⑫ 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并定容至 1 L，室温保存。

⑬ 包涵体溶解液：6 mol/L 甘氨酸盐酸、100 mL/L 甘油、50 mmol/L Tris pH8.0、100 mmol/L NaCl、10 mmol/L EDTA、10 mmol/L DTT。

⑭ 包涵体复性缓冲液：400 mmol/L NDSB-201、50 mmol/L Tris pH 8.0、0.5 mmol/L 氧化型谷胱甘肽 (oxidized glutathione)、5 mmol/L 还原型谷胱甘肽 (reduced glutathione)、0.5 mmol/L PMSF。

⑮ 抗体结合缓冲液：20 mM PBS，pH 7.0

⑯ 抗体洗脱缓冲液：称取甘氨酸 7.51 g 于 2 L 烧杯中，加入去离子水并定容 1 L，调节 pH 至 2.5，4℃保存。

1.5 实验仪器

- ① 核酸凝胶成像仪：购自美国 Alpha Innotech 公司。
- ② 称量天平：购自梅特勒-托利多公司。
- ③ 超纯水净化机：购自南京易普易达公司。
- ④ PCR 扩增仪：购自美国 Eppendorf 公司。
- ⑤ 核酸电泳仪：购自北京六一生物公司。
- ⑥ 蛋白电泳仪：购自美国 Bio-Rad 公司。
- ⑦ 细胞培养箱：购自美国 Thermo 公司。
- ⑧ 荧光显微镜：购自 Olympus 公司。
- ⑨ 超声破碎仪：购自美国 SONICS 公司。
- ⑩ 蠕动泵：购自英国 Watson Marlow 公司。
- ⑪ AKTA 超滤仪：购自美国 Cytiva 公司。
- ⑫ 奥德赛双色红外荧光成像系统：购自美国 LI-COR 公司。
- ⑬ 恒温摇床：购自上海善志仪器设备有限公司。

1.6 细胞与动物

1.6.1 细胞：

人胚肾 293 细胞（HEK 293）、BHK-21（幼地鼠肾细胞）、鼠 SP2/0 骨髓瘤细胞：均由空军军医大学微生物与病原生物学教研室保存；饲养细胞来源于 BALB/c 小鼠腹腔巨噬细胞。

1.6.2 动物：6 周龄 BALB/c 雌性小鼠，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

测序结果比对及引物设计使用 SnapGene3.2.1 软件；

病毒序列查询使用 NCBI 网站（<https://www.ncbi.nlm.nih.gov>）；

全基因合成在线工具（<http://www.biorun.com/tools/>）。

2 方法

2.1 pET28a-ZIKV-Ecto 质粒的构建

2.1.1 ZIKV-Ecto 目的片段合成

首先对 ZIKV-SG-118 (GenBank: KY241788.1) 的 Ecto 碱基序列 1209 bp 进行原核表达偏向性密码子优化, 优化后的目的基因碱基序列添加酶切位点 (Nco I : CCATGG、Xho I : CTCGAG)、保护碱基、起始密码子 ATG 和终止密码子 TAA, 优化后 Ecto 碱基序列见附录 A。采用全基因合成在线工具设计了 32 条 Oligos (附录 B) 并交由擎科生物科技有限公司合成。

将合成后的 Oligos 使用搭桥 PCR 进行扩增, 32 条寡核苷酸 1:1 混合液作为模板, 且互为引物, 使用 Premix Prime STAR MAX 酶进行 PCR 扩增, 反应体系如表 2-1。

表 2-1: ZIKV-Ecto PCR 扩增体系

试剂	体积
2×PrimeSTAR MAX	12.5 μL
ZIKV 寡核苷酸混合液	1 μL
无 RNA 酶水	11.5 μL
合计	25 μL

PCR 扩增条件为: 预变形 98 °C, 3 min; 变性 98 °C, 10 s, 延伸 68 °C, 30s, 共 32 个循环; 72 °C 再延伸 5 min。PCR 产物中加入 10×核酸上样缓冲液, 混匀后进行 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 1200 bp 左右的 DNA 片段; 使用 OMEGA 凝胶回收试剂盒对片段进行回收, 回收后测定 DNA 浓度。

2.1.2 连接、转化 pET28a-ZIKV-Ecto 重组质粒的鉴定

使用 Nco I、Xho I 限制性内切酶对 pET28a 载体进行双酶切, 酶切体系如下: Nco I 1 μL、Xho I 1 μL、pET28a 载体 2.5 μL、Buffer 5 μL、无 RNA 酶水 30.5 μL, 37 °C 孵育 2 h 后进行核酸凝胶电泳, 使用 OMEGA 凝胶回收试剂盒回收核酸片段, 并测定浓度。使用 Solution I 将 ZIKV-Ecto 片段与酶切后 pET28a 载体连接, 连接体系如表 2-2。

表 2-2: ZIKV-Eecto 与 pET28a 连接体系

试剂	体积
Solution I	10 μ L
ZIKV-Eecto	8 μ L
pET28a 载体	2 μ L
合计	20 μ L

将连接产物转化至 DH5 α , 涂板后 37 $^{\circ}$ C 孵育、24 h 后挑单克隆进行小量菌液培养 (Kana 抗性)。12 h 后进行菌液 PCR 鉴定, 设计引物 pET28a-ZIKV-Eecto-F/R, 序列见附录 E。

鉴定正确的样品送至西安擎科公司测序。鉴定成功后使用 OMEGA 质粒提取试剂盒提取质粒, 测定浓度后保存于 -20 $^{\circ}$ C, 并命名为 pET28a-ZIKV-Eecto。

2.2 pCAGGs-ZIKV-prME 质粒的构建

根据 ZIKV-SG-118 (GenBank: KY241788.1) 的 prME 基因进行真核表达偏向性密码子优化, 在序列前加入保护碱基: GCCGCCGCC; 起始密码子: ATG; 以及 JEV 的信号肽序列:

5'GGCAGAAAGCAAAACAAAAGAGGAGGAAATGAAGGCTCAATCATGTGGCTCGCGAGCTTGGCGGCTGTCATAGCGTGTGCAGGAGCT'3。

擎科公司合成片段, 基因长度为 2118 bp, 合成序列见附录 C。公司合成 ZIKV-prME 基因序列, 设计相应引物 pCAGGs-ZIKV-prME-F/R, 序列见附录 E。

以公司合成的 pUC57-TBEV-Eecto 质粒为模板, 上述引物、Premix PrimeSTAR MAX 酶进行 PCR 扩增, 扩增体系如表 2-3。

表 2-3: ZIKV-prME PCR 扩增体系

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

PCR 扩增条件为：98 ℃ 5 min；98 ℃ 10 s，51 ℃ 15 s，72 ℃ 25 s，33 个循环后 72 ℃ 再延伸 5 min。ZIKV-prME 与 pCAGGs 使用 Xho I 和 EcoR I 双酶切后使用 OMEGA 核酸胶回收试剂盒进行回收，回收产物使用 Solution I 进行连接，体系如表 2-4。

表 2-4: ZIKV-prME 与 pCAGGs 连接体系

试剂	体积
Solution I	10 μL
ZIKV-prME	8 μL
pCAGGs 载体	2 μL
合计	20 μL

将连接产物转化至 DH5α，转化并进行单克隆挑取（Amp 抗性）；菌液 PCR 初步鉴定后，鉴定正确的样品送至西安擎科公司测序，测序正确后使用 OMEGA 质粒提取试剂盒提取质粒，测定浓度后保存于 -20 ℃，命名为 pCAGGs-ZIKV-prME。

2.3 pCAGGs-ZIKV-prME 在细胞内表达及鉴定

将 pCAGGs-ZIKV-prME 质粒和 pCAGGs 空载体转染至接种有 BHK-21 细胞的 24 孔板中小圆片上；质粒与脂质体转染试剂以 1:2（质量:体积）比例进行转染，分别用 DMEM 预孵育 5 min，混匀后孵育 20 min；将混合物加入细胞中，4 h 后更换为 10% FBS DMEM；转染后 48 h 进行免疫荧光染色鉴定 ZIKV-prME 的表达，PBST 洗涤 3 次；4%多聚甲醛室温固定 15 min，PBST 洗涤 3 次；0.2% Triton X-100 的 PBS 室温透膜 15 min，PBST 洗涤 3 次；3% BSA 的封闭液室温封闭 1 h，PBST 洗涤 3

次；黄病毒属通用抗体 4G2（1:200 稀释），4 °C 过夜孵育，PBST 洗涤 3 次；Goat anti-Mouse Ig 二抗（1:500 稀释），室温孵育 1 h，PBST 洗涤 3 次；DAPI 室温染色 15 min，PBST 洗涤 3 次；取出小圆片，置于载玻片上并滴加抗荧光淬灭封片剂，荧光显微镜观察并拍照。

2.4 ZIKV-Ecto 蛋白的原核表达、复性及纯化

2.4.1 ZIKV-Ecto 原核表达及可溶性分析

将 pET28a-ZIKV-Ecto 重组质粒加至 E. coli BL21（DE3）感受态中，轻弹混匀后，冰上孵育 30 min；42 °C，90 s；冰上孵育 90 s；加入 1 mL 2×YT 液体培养基，37 °C 恒温摇床培养 40 min；涂布于 Kana 抗性的固体培养基平板上，37 °C 摇床培养 12 h 后；挑取形态规则的单一菌落至 5 mL Kana 2×YT 液体培养基，37 °C 摇床培养 12 h 后；以 1:50 的比例转接于 5 mL Kana 2×YT 液体培养基，37 °C 摇床培养 4 h；加入 IPTG 诱导表达，37 °C 摇床培养 4-6 h；取诱导前和诱导后的菌液收集菌体，PBS 重悬后进行超声破碎（300 W、5 s、5 s，超声 3 min）；5000 g、离心 3 min，分离上清与沉淀，PBS 重悬沉淀，分别加入 5×蛋白上样缓冲液，煮沸 10 min；SDS-PAGE 进行分析鉴定：10%蛋白凝胶中电泳，100 V、2 h，将电泳后的凝胶置于考马斯亮蓝染色液中，染色 40 min 后加入脱色液，脱色至背景清亮后（中途更换脱色液），采用凝胶成像仪拍照。

2.4.2 ZIKV-Ecto 蛋白大量表达及复性

将成功表达 ZIKV-Ecto 蛋白的菌液转接至 300 ml Kana 2×YT 液体培养基中进行大量表达，表达操作同 2.4.1；超声破碎后弃去上清收取沉淀，洗涤缓冲液重悬沉淀后沉淀洗涤两次，洗涤条件为 4 °C、12000 g、20 min；洗涤后加入包涵体溶解缓冲液，置于 4 °C 摇床上溶解 4~6 h，使包涵体充分溶解；12000 g、20 min 离心弃去沉淀，收集培养基上清并测定其蛋白浓度；使用蠕动泵缓慢将上清加入复性缓冲液中，复性比例为 1 g 蛋白对应 2 L 预冷复性缓冲液，复性过程需在 4 °C 环境下，并使用搅拌器持续搅拌 14 h。

2.4.3 ZIKV-Ecto 蛋白的浓缩纯化及鉴定

将复性完的蛋白使用 0.22 μm 过滤器过滤，使用 AKTA 超滤仪进行浓缩（10 KD 膜柱），将体积浓缩 20 倍后使用结合缓冲液进行洗滤，3 次洗滤后收取样品；对纯

化完成的蛋白进行 BCA 定量，分装保存于 -80°C 。SDS-PAGE 鉴定蛋白纯度，过程同 2.4.1。

2.5 ZIKV-Ecto 蛋白免疫小鼠制备多克隆抗体血清及特异性鉴定

2.5.1 抗 ZIKVV-Ecto 多克隆抗体血清制备

准备 6 周龄 BALB/c 雌鼠 5 只，每只小鼠免疫体系为 $20\text{ }\mu\text{g}$ ZIKV-Ecto 蛋白用生理盐水稀释至 $50\text{ }\mu\text{L}$ 与 $50\text{ }\mu\text{L}$ QuickAntibody-Mouse5W 佐剂充分混匀；初次免疫和第一次加强免疫的免疫方式均为肌肉注射，第二次加强免疫方式为腹腔注射，第一次加强免疫时间为初次免疫后 2 周，再次间隔 2 周后进行第二次加强免疫，分别在第一次和第二次加强免疫后 1 周取血进行血清效价测定，免疫时间轴如图 2.1。

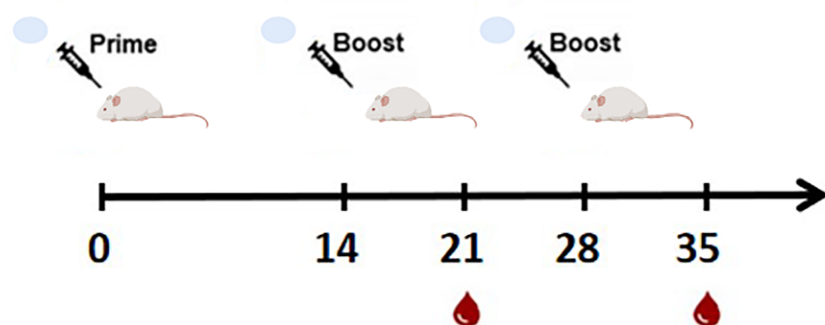


图 2.1 ZIKV-Ecto 蛋白免疫时间轴示意图

2.5.2 抗 ZIKV-Ecto 多抗血清效价测定

将重组蛋白按照每孔 $1\text{ }\mu\text{g}$ 包被至 96 孔 ELISA 板， 4°C 过夜孵育后，使用 ELISA 洗液进行后洗涤。ELISA 封闭液常温封闭 1 h，洗涤。将小鼠血清使用稀释液进行 10 倍比稀释， $1:10^2$ 至 $1:10^5$ ， 37°C 水浴孵育 1 h，洗涤后将 HRP 标记的山羊抗小鼠 IgG ($1:10^4$)， 37°C 孵育 1 h；洗涤后加入 TMB 显色液，显色后立即使用终止液终止反应，并使用酶标仪测定吸光度值。

2.5.3 抗 ZIKV-Ecto 多抗血清特异性鉴定

2.5.3.1 免疫荧光法鉴定多抗血清特异性

BHK-21 细胞使用含 100 mL/L FBS、 100 U/mL 青霉素、 100 U/mL 青霉素、 $100\text{ }\mu\text{g/mL}$ 链霉素的 DMEM 培养基于 50 mL/L CO_2 、 37°C 孵箱培养。将 BHK-21 细胞铺板于 24 孔板(预先铺有小圆片)，转染 pCAGGs-ZIKV-prME 质粒实验组和 pCAGGs

空载体作为阴性对照, 转染后 48 h 固定细胞进行免疫荧光细胞化学染色。实验过程同上文 2.3, 一抗更换为 ZIKV-Ecto 免疫小鼠血清 (1:200 稀释)。小心抠出小圆片, 置于载玻片上后使用荧光显微镜观察并拍照。

2.5.3.2 免疫印迹法鉴定多抗血清特异性

293T 使用含 100 mL/L FBS、100 U/mL 青霉素、100 μ g/mL 链霉素的 DMEM 培养基于 50 mL/L CO₂、37 °C 孵箱培养。将 293T 细胞接种于 6 孔板, 次日待其汇合至 80% 左右时, 取其中 2 孔细胞转染 pCAGGs-ZIKV-prME 质粒, 同时取另外 2 孔细胞转染 pCAGGs 空载体作为对照, 转染后 48 h 收集细胞进行 Western blot 实验, 80 V 电泳 2 h 后, 220 mA 转膜 1 h, 使用 3% BSA 的封闭液常温孵育 1 h。加 1:200 稀释的 ZIKV-Ecto 免疫小鼠血清, 4 °C 过夜孵育; 洗膜 3 次后, 加入 TBST 稀释的 IRDye® 680RD 标记的山羊抗小鼠 IgG (1:15000 稀释), 常温孵育 1 h; 洗膜 3 次后, 使用奥德赛双色红外荧光成像系统扫描。

2.6 抗 ZIKV-Ecto 单克隆抗体制备及筛选

2.6.1 抗 ZIKV-Ecto 单克隆抗体制备

采用常规杂交瘤制备方法, 将 1×10^8 个脾细胞与小鼠 SP2/0 骨髓瘤细胞使用 PEG1500 融合, 加入 HAT 核苷选择培养基缓慢重悬, 接种至铺有小鼠饲养细胞的 96 孔细胞板中于培养箱中培养。待细胞融合后 (大约 7 d) 吸取上清作为一抗, 使用间接 ELISA 检测融合细胞的表达, 其中固相抗原为 ZIKV-Ecto 蛋白, 使用稀释后的血清作为阳性对照, SP2/0 细胞的上清液作为阴性对照, ELISA 稀释液作为空白对照, 经过 3—4 次有限稀释法获得稳定分泌单一抗体的细胞株。

2.6.2 抗 ZIKV-Ecto 单克隆抗体亚型鉴定

采用双抗体夹心 ELISA 法鉴定 ZIKV-Ecto-mAb 的亚类, 使用小鼠 mAb 亚型鉴定试剂盒鉴定杂交瘤细胞上清中 mAb 的亚类。

2.6.3 交叉反应性鉴定

使用单克隆抗体细胞上清作为一抗进行 ELISA 测定, 固相抗原为原核表达纯化后的 JEV、YFV、DENV1-4、TBEV Ecto 蛋白 (以上重组蛋白均由空军军医大学微生物与病原生物学教研室表达纯化), 由此对 ZIKV-Ecto-mAb 的交叉反应性进行测定。

2.7 抗 ZIKV-Ecto 单克隆抗体腹水制备及纯化

2.7.1 抗 ZIKV-Ecto 单克隆抗体腹水制备

准备 6 周龄 BALB/c 小鼠腹腔注射液状石蜡，一周后将分泌单一抗体细胞通过腹腔注射小鼠，并每日观察小鼠状态，待腹腔胀大、毛发竖立后处死取腹水，10000 r/min 离心 10 min 后弃去上层液状石蜡与底层细胞，腹水保存于 -80 °C。

2.7.2 抗 ZIKV-Ecto 单克隆抗体腹水效价测定

将小鼠 mAb 腹水使用 ELISA 稀释液进行倍比稀释后作为一抗 ($1:10^2 \sim 1:10^8$)，使用 ZIKV-Ecto 蛋白包被的 ELISA 板进行 ELISA 测定，检测方法同 2.5.2。

2.7.3 抗 ZIKV-Ecto 单克隆抗体纯化

使用抗体结合缓冲液将小鼠腹水 10 倍稀释后使用 0.22 μm 滤器过滤；开启 FPLC，使用去离子水清洗管道和压力泵 20 min，以清除残留物。泵持续工作的情况下将 protein G 预装柱与管道连接，使用去离子水继续清洗预装柱 10 min；将去离子水更换为结合缓冲液，平衡预装柱 10 min；将结合缓冲液更换为过滤后样品，设置流速为 0.5 mL/min；待样品全部上机后，使用结合缓冲液洗涤预装柱，以去除杂质；待吸光值 A280 降至基线水平，更换为洗脱液进行洗脱，以 1 mL 为单位收集洗脱液，并快速将 pH 调节至 7.0；测定浓度后分装保存于 -80 °C；并对抗体进行 SDS-PAGE 分析鉴定其纯度，操作同 2.4.1。

2.8 抗 ZIKV-Ecto 单克隆抗体 HRP 标记与效价测定

2.8.1 抗 ZIKV-Ecto 单克隆抗体 HRP 标记

准备抗体各 2 mg；取 2 mg HRP 溶于 200 μL 双馏水中，溶液为棕黄色，加入 200 μL 0.06 mol/L NaIO_4 ，立刻变为灰绿色。30 min，4 °C 避光搅拌；加入 200 μL 0.16 mol/L 乙二醇，溶液变回棕黄色，室温避光搅拌 0.5 h。加入 2 mg 抗体，混匀后装入预先处理的透析袋，在 50 mM/L 碳酸盐缓冲液 (pH 9.5) 中缓慢搅拌透析 8 h，使之结合 (3 h 换液一次)。再加入 80 μL 5mg/mL NaBH_4 ，加入后溶液有气泡产生。室温静置 2 h (避光)。加入等体积 50%饱和硫酸铵，混匀后 8000 g，离心 0.5 h。弃去上清后用 2 mL 0.01 mol/L PBS 重悬。装入透析袋。溶液在 0.01 mol/L PBS, pH 7.4 中透析过夜。取出离心，8000 g，4 °C 30 min，去除沉淀，即得到 HRP-IgG。效价测定合格后，加入 60%甘油，低温分装保存。

2.8.2 抗 ZIKV-Ecto-HRP 单克隆抗体效价测定

以 ZIKV-Ecto 蛋白为固相抗原进行包被（每孔包被 1 μg ）；将 1D6/1H12/2G3-HRP 抗体进行倍比稀释（ $1:10^2 \sim 1:10^5$ ），加入预先包被好的 ELSIA 板，37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 1 h；洗涤后加入 TMB 显色液，显色后立即使用终止液终止反应，并使用酶标仪测定吸光度值。

3 结果

3.1 pET28a-ZIKV-Ecto 质粒的构建结果

3.1.1 ZIKV-Ecto 基因拼接合成产物的鉴定结果

将 ZIKV-Ecto（1-403aa）基因设计并合成的 32 条 Oligos 片段按照重叠 PCR 拼接并扩增，扩增产物进行核酸电泳分析，图 2.2-B 可见特异性核酸条带，与预期大小（1209bp）一致，表明 ZIKV-Ecto 基因拼接合成成功。

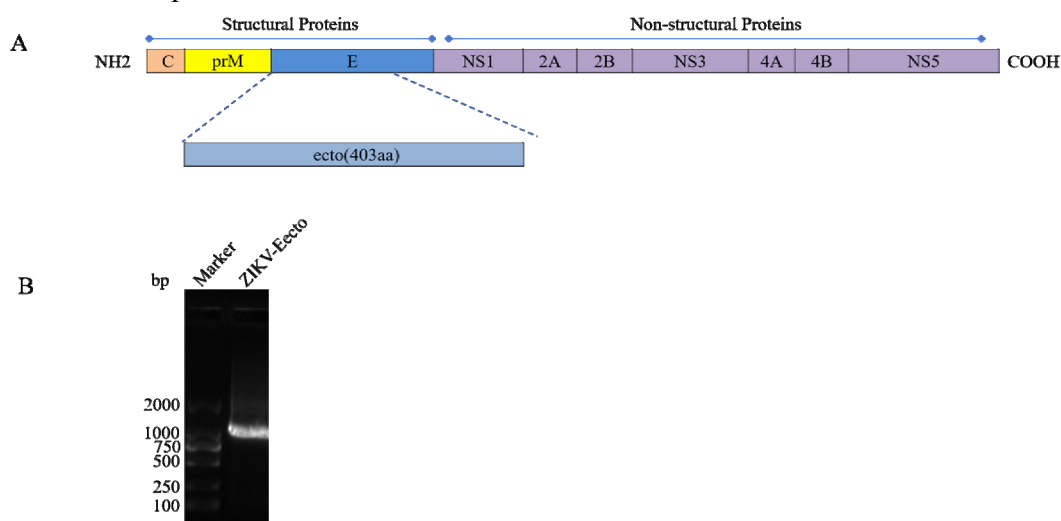


图 2.2 ZIKV-Ecto 目的基因拼接合成产物的电泳鉴定

A: ZIKV-Ecto 基因拼接合成示意图；B: 菌液 PCR 鉴定基因拼接合成后的核酸产物

3.1.2 重组质粒 pET28a-ZIKV-Ecto 的菌液 PCR 鉴定结果

将合成的 ZIKV-Ecto 基因片段克隆入 pET28a 载体后，获得重组质粒 pET28a-ZIKV-Ecto。以 pET28a-ZIKV-Ecto-F/R 为引物，对重组质粒进行均菌液 PCR 鉴定，并对扩增产物进行核酸电泳分析，图 2.3 可见特异性核酸条带，与预期大小（1209 bp）一致。测序测定后比对结果显示：ZIKV-Ecto 基因鉴定未出现突变、缺失等现象，与上述拼接合成序列一致（见附录 D1）。提示 pET28a-ZIKV-Ecto 质粒构建成功。

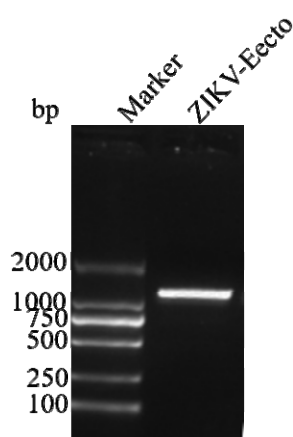


图 2.3 pET28-ZIKV-Ecto 质粒构建菌液 PCR 鉴定

3.2 重组质粒 pCAGGs-ZIKV-prME 的菌液 PCR 鉴定

将设计合成的 ZIKV-prME 片段克隆入 pCAGGs 载体中后，获得重组质粒 pCAGGs-ZIKV-prME。以获取得重组质粒为模板，pCAGGs-ZIKV-prME-F/R 为引物进行 PCR 扩增，扩增产物进行核酸电泳分析，图 2.4-B 可见特异性核酸条带，与预期大小（2118bp）一致。将菌液送至公司测序，序列比对结果显示与优化序列一致（见附录 D2），表明 pCAGGs-ZIKV-prME 质粒构建成功。

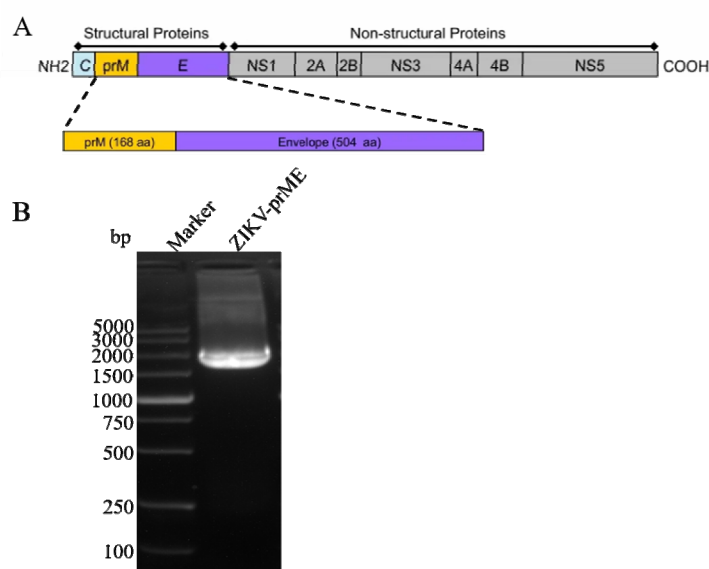


图 2.4 pCAGGs-ZIKV-prME 质粒构建菌液 PCR 鉴定

A. ZIKV-prME 基因合成示意图；B. 菌液 PCR 鉴定 pCAGGs-ZIKV-prME 质粒构建核酸电泳

3.3 pCAGGs-ZIKV-prME 在细胞内表达及鉴定

将质粒 pCAGGs-ZIKV-prME 转染至 BHK-21 细胞，48h 后进行以 4G2 抗体作

为一抗进行免疫荧光鉴定，20 倍镜下观察，ZIKV-prME 转染组在胞质中观察到特异性免疫荧光，pCAGGs 空载组转染组无荧光，表明 pCAGGs-ZIKV-prME 在真核细胞中成功表达，重组质粒 pCAGGs-ZIKV-prME 可以用于抗 ZIKV-Ecto 蛋白抗体结合活性的验证和特异性的筛选。

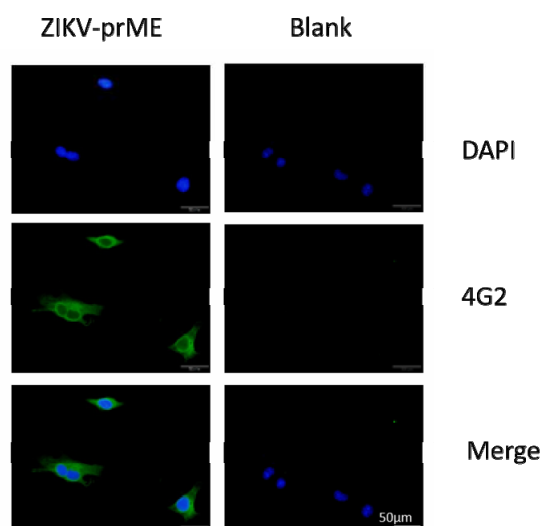


图 2.5 pCAGGs-ZIKV-prME 转染 BHK-21 细胞的 IFA 鉴定结果

Blank: pCAGGs 空载组转染组；蓝色：DAPI 染细胞核；绿色：FITC 染色 4G2 抗体结合蛋白

3.4 ZIKV-Ecto 蛋白的原核表达、复性及纯化

将重组质粒 pET28a-ZIKV-Ecto 转化至感受态细胞 BL21，经 IPTG 诱导后表达 Ecto 蛋白，收集菌液并对上清和沉淀进行分析，图 2.6-A 中 2 号泳道即菌体破碎后沉淀样品有较粗的条带，且大小与 ZIKV-Ecto 蛋白（43.5KDa）符合，表明该蛋白以包涵体形式在沉淀中表达，经过变性、复性及超滤后获得纯化蛋白（图 2.6-B）

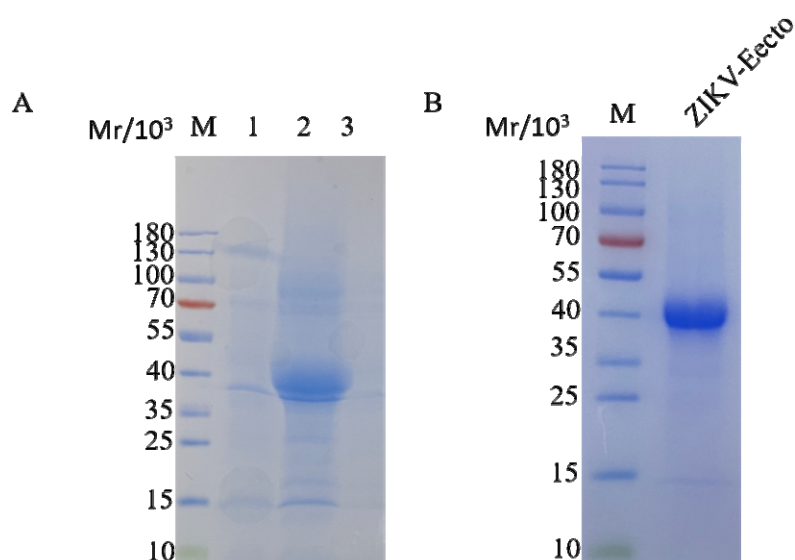


图 2.6 ZIKV-Ecto 蛋白可溶性表达分析及纯化鉴定

M: 蛋白相对分子质量 (Mr) Marker

A: Ecto 蛋白表达可溶性分析; 1: 菌体破碎后沉淀; 2: 菌体破碎后沉淀; 3: 诱导前菌体; B:

纯化后蛋白 SDS-PAGE 分析

3.5 ZIKV-Ecto 蛋白免疫小鼠获得多克隆抗体血清，效价测定及特异性鉴定

3.5.1 抗 ZIKV-Ecto 多抗血清效价测定

取纯化后的 ZIKV-Ecto 蛋白 20 μ g 免疫 BALB/c 小鼠后，三次免疫两周后鼠尾取血后对获得小鼠血清进行倍比稀释，以 ZIKV-Ecto 为固相抗原进行 ELISA 检测，以测定血清多抗效价，表 2-5 结果表明 ZIKV-Ecto 免疫小鼠血清效价较好，免疫小鼠可用于制备单克隆抗体。

表 2-5: ZIKV-Ecto 蛋白免疫小鼠血清效价测定 (A450)

分组	1	2	3
1:100	0.919	0.989	1.038
1:1000	0.431	0.298	0.558
1:10000	0.328	0.201	0.375
空白对照		0.049	
阴性对照		0.058	

3.5.2 抗 ZIKV-Ecto 多抗血清特异性的鉴定

将 pCAGGs-ZIKV-prME 质粒转染至 BHK-21 细胞，以小鼠血清作为一抗进行免疫荧光染色，20 倍镜下观察到胞质内有特异性绿色荧光（图 2.7）。

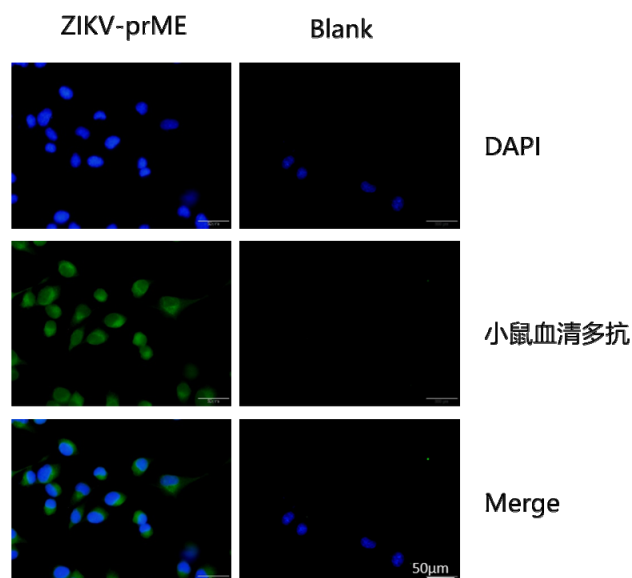


图 2.7 小鼠血清多抗识别真核表达 E 蛋白的 IFA 鉴定

Blank: pCAGGs 空载组转染组；蓝色：DAPI 染细胞核；绿色：FITC 染色小鼠血清结合蛋白

将 pCAGGs-ZIKV-prME 质粒分为 10 µg 和 20 µg 两组转染至 HEK-293T 细胞，以小鼠血清作为一抗进行蛋白免疫印迹实验，观察到特异性蛋白条带，与 E 蛋白大小 53.5 KDa 保持一致（图 2.8）。

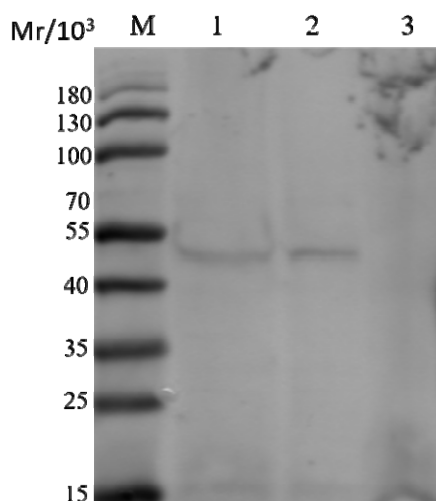


图 2.8 小鼠血清多抗识别真核表达 E 蛋白的 WB 鉴定

M: 蛋白质 Marker; 1: ZIKV-prME 10 µg 转染组; 2: ZIKV-prME 20 µg 转染组; 3: 空载体组

图 2.7 和图 2.8 的特异性绿色荧光和特异性蛋白条带表明小鼠血清可以特异性结合真核表达的 E 蛋白, 免疫后小鼠脾细胞可用于制备特异性单克隆抗体, ZIKV-Ecto 蛋白具有良好的免疫原性。

3.6 抗 ZIKV-Ecto 单克隆抗体制备及筛选

3.6.1 抗 ZIKV-Ecto 单克隆抗体亚型鉴定

使用亚型鉴定试剂盒对 39 株表达单一抗体的细胞上清进行亚型鉴定, 表 2-6 的结果表明, 39 株抗体中 38 株为 IgG (K), 1 株 4F11 为 IgM (K)。

表 2-6: ZIKV-Ecto 抗体亚型鉴定 (A450 值)

	IgG1	IgG2a	IgG2b	IgG2c	IgG3	IgM	Kappa	Lambda
1B4F11	0.896	0.085	0.06	0.058	0.055	0.057	0.436	0.05
1H3H3	0.86	0.061	0.048	0.051	0.056	0.055	0.404	0.05
2A12F2	0.739	0.058	0.046	0.048	0.049	0.051	0.348	0.048
3F7E12	1.067	0.059	0.053	0.056	0.054	0.065	0.509	0.061
2D1C6	0.059	0.072	1.222	0.065	0.054	0.055	0.751	0.052
2B8E8	0.97	0.06	0.055	0.051	0.047	0.051	0.44	0.049
3F8F12	0.932	0.058	0.05	0.049	0.048	0.049	0.481	0.051
2E6G3	0.983	0.058	0.048	0.052	0.049	0.049	0.381	0.045
3G7F10	1.059	0.062	0.052	0.047	0.048	0.05	0.555	0.048
2F1G3	0.063	0.066	1.11	0.054	0.054	0.057	0.696	0.065
3F6F1	0.929	0.062	0.052	0.05	0.047	0.052	0.483	0.049
4E9F10	0.762	0.068	0.053	0.054	0.05	0.057	0.237	0.058
4D6A7	0.843	0.068	0.061	0.048	0.048	0.056	0.307	0.053
2B6D9	0.055	0.057	1.278	0.055	0.052	0.051	0.528	0.049
1D6	0.153	0.168	0.14	0.125	0.137	0.536	0.444	0.133
4F11	0.06	0.068	0.064	0.061	0.435	0.058	0.407	0.06
3A1B4	0.743	0.073	0.061	0.059	0.058	0.056	0.329	0.057

	IgG1	IgG2a	IgG2b	IgG2c	IgG3	IgM	Kappa	Lambda
4C11G3	0.896	0.07	0.06	0.053	0.056	0.061	0.355	0.054
2D6A8	0.815	0.064	0.058	0.057	0.052	0.053	0.382	0.053
1B6B9	0.802	0.07	0.057	0.055	0.05	0.057	0.32	0.051
2E2C6	0.065	1.115	0.061	0.062	0.056	0.057	0.475	0.058
2G4C1	0.057	1.146	0.052	0.054	0.053	0.056	0.58	0.057
2H3E9	0.074	1.17	0.069	0.069	0.059	0.088	0.563	0.061
4D2C5	0.073	0.083	1.321	0.067	0.068	0.06	0.673	0.059
1H4B3	0.06	1.217	0.056	0.057	0.052	0.055	0.644	0.055
2G3F4	0.92	0.08	0.061	0.066	0.058	0.058	0.396	0.054
4F8G4	0.983	0.076	0.066	0.065	0.057	0.056	0.355	0.056
2H2F11	0.105	0.114	1.323	0.116	0.102	0.105	0.905	0.097
3E6G9	0.29	0.069	0.062	0.059	0.055	0.057	0.286	0.069
3G1E3	0.923	0.076	0.061	0.064	0.06	0.059	0.519	0.06
1H12F5	0.797	0.103	0.067	0.063	0.058	0.057	0.361	0.101
2B5H5	1.02	0.066	0.048	0.051	0.051	0.049	0.234	0.075
4C12C12	1	0.058	0.047	0.045	0.044	0.044	0.391	0.046
4H7B12	0.074	0.064	1.31	0.062	0.047	0.05	0.677	0.047
1A6C12	0.31	0.903	0.048	0.049	0.045	0.047	0.422	0.06
1F2H10	0.66	0.051	0.05	0.05	0.053	0.047	0.338	0.05
3B11C4	0.119	0.135	0.426	0.064	0.059	0.077	0.447	0.083
4F8	1.186	0.076	0.066	0.069	0.064	0.068	0.605	0.073
阴性对照	0.12	0.067	0.067	0.058	0.057	0.046	0.055	0.06

3.6.2 初步交叉反应性鉴定

使用 ZIKV/JEV/TBEV/YFV/DENV1-4-Ecto 蛋白对表达抗体分泌细胞上清进行 ELISA 检测, 表 2-7 结果表明大部分为 ZIKV-Ecto 特异性结合抗体, 但是其中有几株也可和其他蛋白反应, 如 2B8 抗体可与 JEV/ZIKV/YFV/TBEV/DENV1/3 结合,

4F8 可与 ZIKV DENV1-3 结合, IgM 抗体 4F11 可与八种蛋白均结合, 2D6 可与 ZIKV、DENV2-4 结合。

表 2-7: mAb 与八种黄病毒属蛋白的结合活性测定 (A450 值)

	JEV	ZIKV	YFV	TBEV	DENV1	DENV2	DENV3	DENV4
1B4F11	0.148	1.829	0.15	0.217	0.076	0.075	0.059	0.093
1H3H3	0.169	2.128	0.211	0.19	0.08	0.093	0.06	0.102
2A12F2	0.111	2.046	0.079	0.129	0.067	0.073	0.057	0.068
3F7E12	0.041	1.958	0.107	0.199	0.106	0.096	0.066	0.108
2D1C6	0.127	1.767	0.436	0.151	0.079	0.078	0.066	0.095
2B8E8	0.895	1.455	1.275	2.005	1.607	0.132	0.823	0.191
3F8F12	0.13	1.616	0.151	0.156	0.098	0.101	0.068	0.131
2E6G3	0.128	1.613	0.117	0.133	0.069	0.069	0.055	0.085
3G7F10	0.114	1.864	0.226	0.092	0.067	0.068	0.055	0.076
2F1G3	0.086	1.551	0.107	0.102	0.069	0.069	0.055	0.08
3F6F1	0.09	1.579	0.073	0.108	0.069	0.07	0.059	0.082
4E9F10	0.28	1.746	0.236	0.321	0.224	0.154	0.071	0.213
4D6A7	0.264	1.518	0.296	0.257	0.104	0.12	0.064	0.175
2B6D9	0.08	0.711	0.085	0.077	0.055	0.055	0.052	0.056
1D6	0.084	0.633	0.081	0.076	0.05	0.052	0.05	0.058
4F11	0.071	0.465	0.075	0.076	0.053	0.052	0.05	0.055
3A1B4	0.108	1.066	0.075	1.091	0.057	0.7	0.053	0.076
4C11G3	0.092	0.86	0.06	0.083	0.086	0.082	0.075	0.079
2D6A8	0.092	1.08	0.065	0.096	0.087	0.079	0.079	0.076
2G4C1	1.126	1.014	1.608	1.118	0.95	0.708	0.658	1.011
1B6B9	0.114	1.473	0.093	0.106	0.062	0.063	0.07	0.076

	JEV	ZIKV	YFV	TBEV	DENV1	DENV2	DENV3	DENV4
2G4C1	1.126	1.014	1.608	1.118	0.95	0.708	0.658	1.011
2H3E9	0.1	0.865	0.088	0.104	0.06	0.063	0.051	0.067
4D2C5	0.133	1.387	0.162	0.114	0.063	0.064	0.057	0.09
1H4B3	0.13	1.515	0.214	0.118	0.069	0.075	0.06	0.093
2G3F4	0.105	1.5	0.003	0.098	0.147	1.05	0.054	1.278
4F8G4	0.094	1.611	0.061	0.084	0.057	0.057	0.053	0.066
2H2F11	0.108	1.311	0.147	0.099	0.067	0.062	0.112	0.075
3E6G9	0.087	1.278	0.096	0.075	0.054	0.062	0.057	0.065
3G1E3	0.088	0.532	0.113	0.081	0.091	0.086	0.081	0.085
1H12F5	0.085	0.704	0.197	0.088	0.088	0.075	0.077	0.076
2B5H5	0.098	0.081	0.068	0.1	0.092	0.084	0.075	0.084
4C12C12	0.098	0.871	0.311	0.094	0.101	0.091	0.085	0.081
4H7B12	0.095	0.956	0.087	0.084	0.08	0.081	0.078	0.082
1A6C12	0.07	0.715	0.222	0.081	0.055	0.054	0.051	0.061
1F2H10	0.148	0.777	0.157	0.094	0.072	0.07	0.093	0.072
3B11C4	0.074	0.608	0.076	0.076	0.076	0.058	0.051	0.058
4F8	0.08	0.68	0.073	0.08	0.054	0.055	0.053	0.059
阴性对照	0.109	0.627	0.151	0.104	0.071	0.075	0.058	0.088

3.7 抗 ZIKV-Ecto 单克隆抗体的腹水制备及纯化

从 39 株单抗中选择效价较好的 12 株抗体进行腹水制备，将表达单一抗体的细胞腹腔免疫 BALB/c 小鼠后收集腹水，对腹水进行效价测定和纯化以获取可用的单克隆抗体。

3.7.1 抗 ZIKV-Ecto 单克隆抗体腹水效价测定

将 12 株单抗的腹水进行倍比稀释，以 Ecto 蛋白为固相抗原进行 ELISA 以测定腹水效价，效价为 $1:10^5 \sim 1:10^8$ 不等，其中 1D6/1H12/2G3 效价高至 $1:10^8$ 。

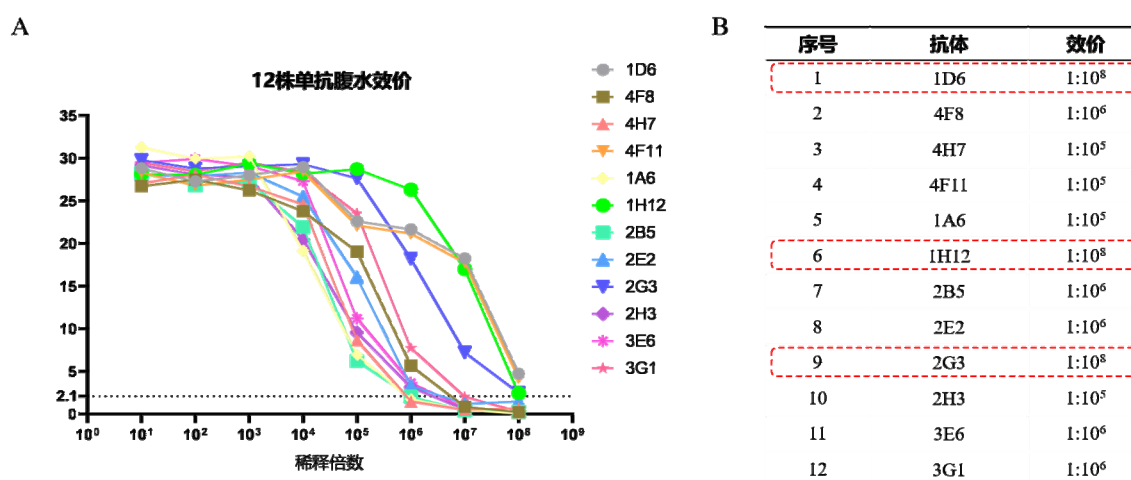


图 2.9 12 株抗 ZIKV 单克隆抗体腹水效价测定分析

A: 12 株单抗效价统计图; B: 12 株抗体效价

3.7.2 抗 ZIKV-Ecto 单克隆抗体纯化

将 12 株抗 ZIKV-Ecto 单克隆抗体腹水使用 protein G 预装柱纯化，纯化单克隆抗体进行 page 鉴定，图 2.10 中清晰可见两条特异性条带，分别与 48 KDa 的 IgG 抗体重链和 25 KDa 的 IgG 抗体轻链一致，表明 12 株抗体纯化成功，可进行下一步特异性筛选。

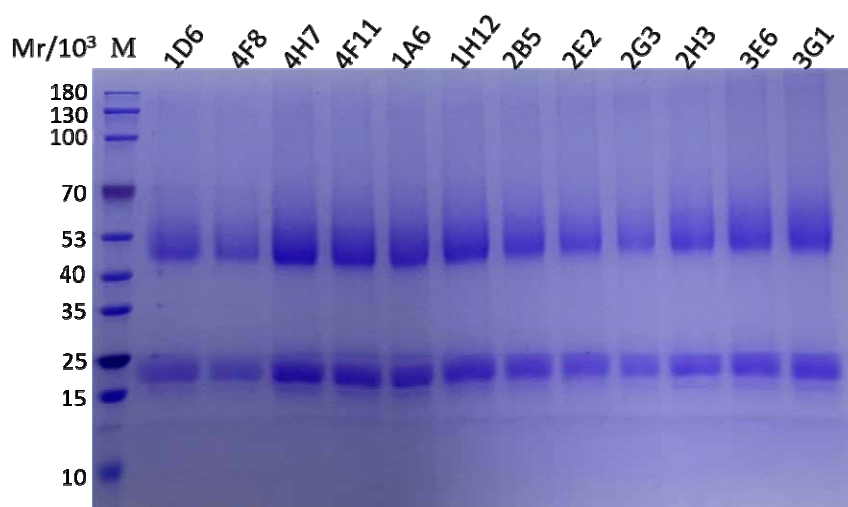
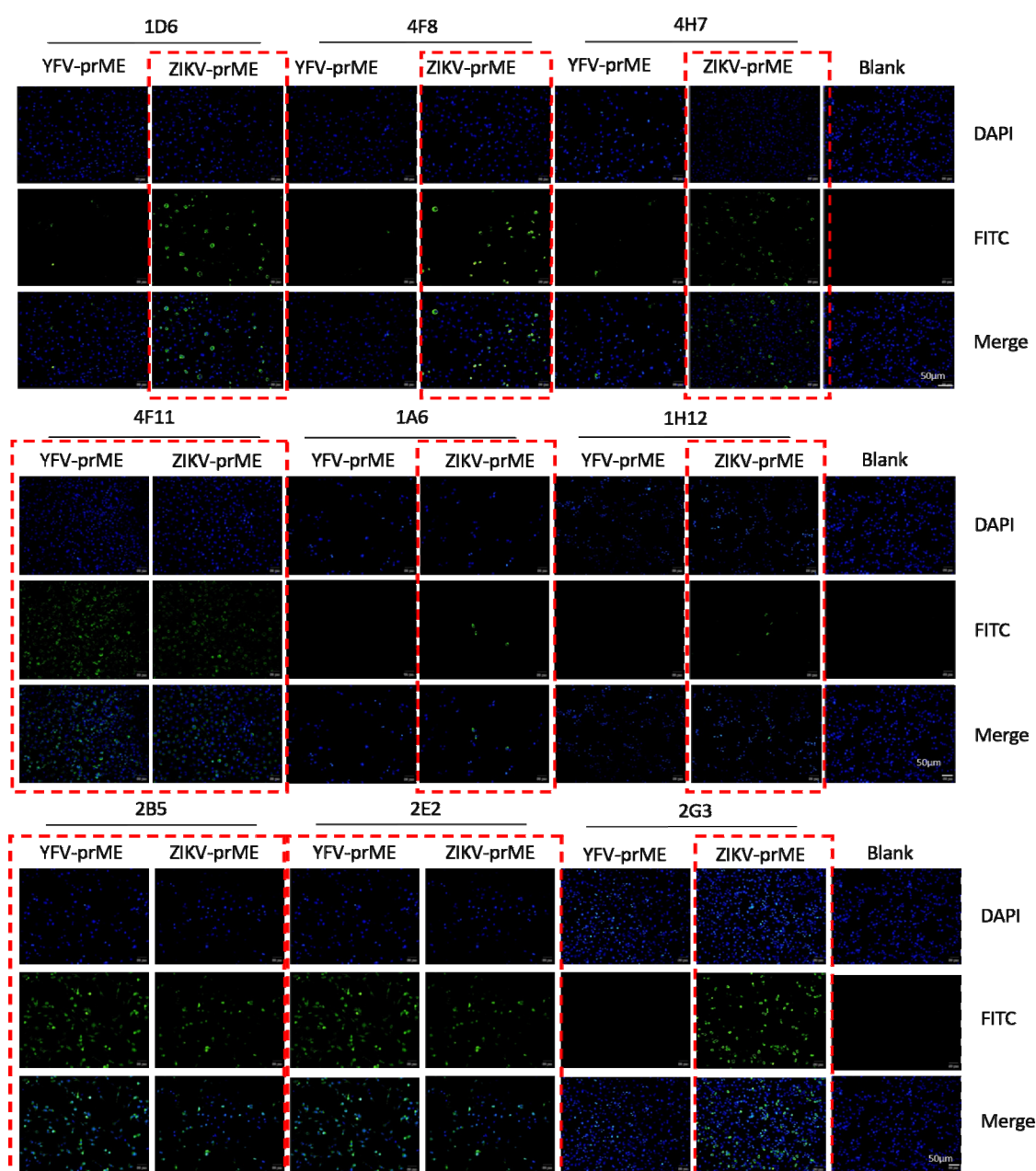


图 2.10 纯化后 12 株单克隆抗体 page 鉴定结果

M: 蛋白质 Mr Marker

3.8 抗 ZIKV-Ecto 单克隆抗体特异性鉴定

分别将重组质粒 pCAGGs-ZIKV-prME、pCAGGs-YFV-prME 和载体 pCAGGs 转染 BHK-21 细胞，以 12 株单克隆抗体作为一抗进行免疫荧光鉴定，图 2.11 表明 12 株抗 ZIKV 单抗中有 6 株（1D6/4F8/4H7/4F11/1A6/1H12/2G3）可与 pCAGGs-ZIKV-prME 质粒真核表达的 E 蛋白特异性结合（由特异性绿色荧光，对照组无荧光，提示可以结合），即可识别 ZIKV E 蛋白的空间表位；4F11/2B5/2E2 三株抗体可与 ZIKV 真核表达 E 蛋白结合的同时也可与 YFV 的 E 蛋白结合，具有交叉反应性；2H3/3E6/3G1 三株单抗不能结合空间表位，无绿色荧光。



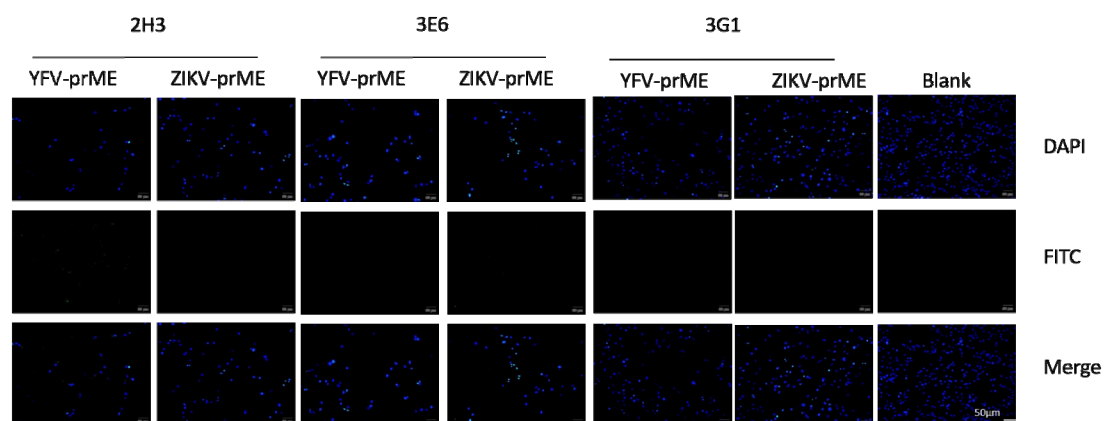


图 2.11 IFA 鉴定 12 株 mAb 的交叉反应性

Blank: pCAGGs 空载组转染组；蓝色：DAPI 染细胞核；绿色：FITC 染色 12 株抗体结合蛋白

将 12 株单克隆抗体的特异性免疫荧光实验结果与 3.6.2 ELISA 初步交叉反应性鉴定实验结果进行比对，表 2-8 结果表明，1D6/4H7/1A6/1H12/2G3 5 株单克隆抗体为 ZIKV 特异性结合抗体，且均识别空间表位，可作为检测抗体的候选抗体。

表 2-8: ZIKV-Ecto 蛋白单抗交叉反应性 (IFA+ELISA)

序号	抗体	ZIKV-prME	Ecto 蛋白结合
1	1D6	+	ZIKV 特异性结合
2	4F8	+	ZIKV/DENV1/3
3	4H7	+	ZIKV 特异性结合
4	4F11	+	ZIKV/YFV/TBEV/JEV/DENV1-4
5	1A6	+	ZIKV 特异性结合
6	1H12	+	ZIKV 特异性结合
7	2B5	-	ZIKV 特异性结合
8	2E2	-	ZIKV 特异性结合
9	2G3	+	ZIKV 特异性结合
10	2H3	-	ZIKV 特异性结合
11	3E6	-	ZIKV 特异性结合
12	3G1	-	ZIKV 特异性结合

3.9 HRP 标记抗 ZIKV-Ecto 单克隆抗体及效价测定

在 5 株单克隆抗体中,图 2.11 的绿色荧光表明 1A6 抗体结合能力较弱,且 4H7 腹水效价测定时效价较低,故选择 1D6/1H12/2G3 3 株单克隆抗体进行 HRP 标记。3 株抗体经 HRP 标记后,10 倍比稀释至 $1:10^5$ 以 ZIKV-Ecto 蛋白为固相抗原进行 ELISA 直接法检测,表 2-9 结果表明虽 3 株抗体 1D6/1H12/2G3 经 HRP 标记后效价有所下降,但仍高于 $1:10^4$,可作为检测抗体的候选抗体。

表 2-9: 抗 ZIKV-Ecto 蛋白单抗 HRP 标记后鉴定

	1D6-HRP		1H12-HRP		2G3-HRP	
$1:10^2$	2.131	2.112	1.43	1.747	2.627	2.858
$1:10^3$	1.545	1.449	1.044	1.418	1.993	2.292
$1:10^4$	0.973	0.794	0.658	0.561	1.665	1.590
$1:10^5$	0.209	0.232	0.171	0.155	0.467	0.374
阴性对照	0.055		0.059		0.063	

4 讨论

2013 年之后在美洲多个国家暴发流行,随后传播至亚洲、欧洲等全球多个国家,ZIKV 感染已经逐渐成为世界范围内一种严重的公共卫生问题。早期检测和发现病毒感染是 ZIKV 防控的关键。目前关于 ZIKV 的早期检测方法主要分为三个方面:一个是以病毒核酸为靶标的检测,样本主要为血液、尿液和唾液等,检测方法为实时 PCR 及等温 PCR;另一个以 NS1 蛋白为靶标,样本主要为血液,采用双抗体夹心为基础的抗原检测方法;第三个是以病毒特异性 IgM 抗体为主要靶标,样本为血液,采用间接 ELISA 或者捕捉法 ELISA 检测抗体^[102-104]。鉴于 ZIKV 颗粒与 NS1 蛋白在患者中血液中时间短,前两种方法仅适用于感染初期,检测时间窗口较窄,而基于病毒特异性 IgM 抗体的检测方法检测窗口期相对较长,是目前 ZIKV 早期快速检测的主要方法^[105]。制备针对 ZIKV 特异性强的单克隆抗体是建立 IgM 捕捉 ELISA 法的关键。

E 蛋白是 ZIKV 的包膜蛋白,在与靶细胞受体结合、诱导保护性免疫应答中发挥着重要作用。E 蛋白以 90 个同源二聚体的形式通过跨膜区及胞质尾区锚定在病毒

的脂膜上,其中 E 蛋白胞外域(Ecto)位于 N 端大约 80%的区域,可分为三个不同的功能结构域(I, II, III),是理想的抗原。本研究首先利用大肠杆菌表达系统表达了 ZIKV-Ecto 蛋白,在表达前的质粒构建阶段,对密码子进行了原核表达偏向性优化,获得更加稳定的 mRNA,延长 mRNA 半衰期,从而提升蛋白的表达量^[106]。另外,密码子优化可以有效避免形成二级颈环结构导致的蛋白翻译的终止^[107]。2021 年朱盈霏等表达了肠道病毒 71 型(Enterovirus 71, EV71)衣壳蛋白,与本研究 ZIKV E 蛋白表达一致,主要以包涵体的形式表达;与之不同的是,经过 6 mol/L 盐酸胍溶解包涵体后获得了变性蛋白,后者在含有去垢剂 NDSB-201 的复性缓冲液中成功获得正确折叠的可溶性 Ecto 蛋白,更利于蛋白进一步纯化和鉴定^[108]。NDSB-201 是一种能够促进蛋白折叠,并提高膜蛋白可溶性的新型去垢剂,已经成功应用于多种膜蛋白的纯化^[109]。经过纯化后的 Ecto 蛋白免疫小鼠,制备的多克隆抗体血清效价较高,且可以识别真核表达的 ZIKV prME 抗原,提示 Ecto 蛋白具有良好的免疫原性。以此为基础,通过杂交瘤细胞技术成功获得 39 株抗 ZIKV 单克隆抗体,38 株为 IgG 抗体,1 株(4F11)为 IgM 抗体,且 4F11 可与 JEV/ZIKV/YFV/TBEV/DENV1-4 八种 Ecto 蛋白结合,表明 4F11 可能为一株黄病毒属广谱性抗体。需要指出的是,目前仅对 12 株单克隆抗体进行腹水制备,但剩余 27 株单克隆抗体中可能存在特异性更高的单克隆抗体未被鉴定;同时在对 12 株纯化后抗体也只进行了免疫荧光试验,未进行其他方法的鉴定。丁晨曦、何婷也进行了 ZIKV E 蛋白原核表达及抗体制备,均是以 E 蛋白结构域 III 进行的蛋白表达,并制备了抗体 ZIKV E 蛋白多克隆抗体^[110]。相对于多克隆抗体,本研究制备的 ZIKV 单克隆抗体具有更高的特异性和效价。尽管 HRP 标记抗体后,抗体结合 ZIKV-Ecto 蛋白的能力下降,但仍大于 $1:10^4$ 。

本研究仅对筛选出的 ZIKV 单克隆抗体与 E 蛋白的结合能力进行了研究,后续还需要对其结合 E 蛋白的具体表位进行分析,并进一步评价这些单克隆抗体是否具有一定的中和活性,以及明确特定表位与抗体功能和特性的相关性,为深入分析 ZIKV E 蛋白的免疫学应答反应提供实验数据。

第三章 ZIKV-VLP 的制备及鉴定

病毒样颗粒 (VLPs) 是由病毒单个或多个结构蛋白自行装配而成的高度结构化的蛋白质颗粒, 基本保持了病毒的天然构象, 具有更强的安全性和免疫原性, 已经被用于疫苗开发和诊断抗原。本研究采用杆状病毒表达系统制备 ZIKV-VLP, 首先将 ZIKV 结构蛋白基因 prME 插入杆状病毒表达系统的质粒, 并制备相应杆粒, 其感染 sf9 细胞中后及单斑纯化后获取杆状病毒, 杆状病毒感染大量 sf9 细胞后通过密度梯度离心法纯化 VLP, 并分析了该 VLP 的免疫原性。

1 材料

1.1 菌种、细胞、质粒

1.1.1 感受态: E. coli DH10Bac™ 购自美国 MCE 公司。

1.1.2 细胞: sf9 (草地贪夜蛾细胞) 细胞购自普诺赛生命科技有限公司。

1.1.3 质粒: pFastBac™ Dual 载体: 由空军军医大学微生物与病原生物学教研室保存。

1.2 试剂

① OptiPrep 60% (60%碘克沙醇): 购自德国 Serumwerk Bernburg AG 公司。

② 限制性内切酶 Not I: 购自日本 Takara 公司。

③ DNA 连接酶: infusion 连接酶: 购自上海生工生物工程有限公司。

④ Buffer S1、S2、S3: OMEGA 小量质粒提取试剂盒。

⑤ 异丙醇、无水乙醇: 购自上海生工生物工程有限公司。

⑥ 细胞培养基: Sf-900II SFM 培养液 (不含血清) 购自; SF9 专用完全培养基 (含血清) 购自普诺赛生命科技有限公司; Sf-900TM 培养基 (1.3×) 购自 gibco。

⑦ 4% Agarose Gel: 购自 gibco。

⑧ 杆粒转染试剂: Cellfectin II Reagent 购自 gibco。

⑨ 戊二醛固定液、丙酮、包埋剂、苯胺黑: 空军军医大学解剖实验室提供。

1.3 溶液及相关试剂配制

① Tris 储存液 (100 mL): 将 12.1 g (Tris base, 三羟甲基氨基甲烷) 溶解到 100 mL 去离子水中, 4 °C 过滤储存。

② EDTA 储存液 (100 mL): 将 3.72 g EDTA·Na₂·2H₂O 溶于 100 mL 去离子

水，4℃过滤储存。

③ NaCl 储备液（100 mL）：将 5.84 g NaCl 溶解到 100 mL 去离子水中，4℃过滤储存。

④ B 溶液（100 mL）：加 30 mL Tris 储备液和 3 mL EDTA 储备液至 50 mL 水，用 5 M 的 HCl 调节 pH 至 7.4，加入离子水并定容至 100 mL，4℃过滤储存。

⑤ 溶液 C（100 mL）：加入 10 mL NaCl 储备液、5 mL Tris 储存液、0.5 mL EDTA 储存液、加去离子水至 50 mL。1.5 M 的 HCl 调节 pH 至 7.4，再用去离子水调节体积到 100 mL，4℃过滤储存。

⑥ 溶液 D（50%OptiPrep）：将 5 体积的 OptiPrep 至 1 体积的 B 溶液中。

⑦ TNE 缓冲液：称取 1.21g Tris、5.84g NaCl、0.37g EDTA 溶于 1L 去离子水中，4℃保存备用。

⑧ 20%蔗糖垫子：称取 20 g 蔗糖加入 100 mL TNE 缓冲液中，溶解后 4℃保存备用。

1.4 实验仪器

超速离心机 L-100xp：购自 Beckman Coulter 公司。

1.5 动物

6 周龄 BALB/c 雌性小鼠，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。

2 方法

2.1 pFAST-ZIKV-prME 质粒构建

将第一部分 2.2 中公司合成 ZIKV-prME 序列连接至 pFastBac™ Dual 载体，应用 SnapGene 软件设计引物 pFast-ZIKV-prME-F/R，序列见附录 E。

以公司合成的 pUC57-ZIKV-prME 质粒为模板，上述引物、Premix Prime STAR MAX 酶进行 PCR 扩增，扩增体系如表 3-1。

表 3-1: ZIKV-prME PCR 扩增体系

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

将 pFastBac™ Dual 载体使用 EcoR I、Not I 限制性内切酶进行双酶切，酶切体系如下：EcoR I 1 μL、Not I 1 μL、pFast 载体 2.5 μL、Buffer 5 μL、无 RNA 酶水 30.5 μL，37 °C 孵育 2 h 后进行核酸凝胶电泳，并使用 OMEGA 凝胶回收试剂盒对片段进行回收，回收后测定酶切后载体浓度。使用 infusion 连接酶将扩增后的 ZIKV-prME 片段与酶切后 pFast 载体连接，连接体系如表 3-2。

表 3-2: ZIKV-prME 与 pFAST 连接体系

试剂	体积
Infusion 连接酶	2 μL
Buffer	5 μL
ZIKV-prME	6 μL
pFast 载体	4 μL
合计	20 μL

将连接产物转化至 DH5α，涂板后 37 °C 孵育、24 h 后挑单克隆进行小量菌液培养。12 h 后进行菌液 PCR 鉴定，鉴定正确的样品送至西安擎科公司测序。鉴定成功后使用 OMEGA 质粒提取试剂盒提取质粒，测定浓度后保存于-20 °C，并命名为 pFast-ZIKV-prME。

2.2 rBacmid-ZIKV-prME 杆粒的制备

2.2.1 转化重组 pFast-ZIKV-prME 质粒

将构建好的重组质粒 pFast-ZIKV-prME 转化大肠杆菌感受态 DH10Bac™，涂板

至固体培养平板（50 $\mu\text{g/mL}$ Kana、7 $\mu\text{g/mL}$ Gen、10 $\mu\text{g/mL}$ tet、100 $\mu\text{g/mL}$ Bluo-gal 及 40 $\mu\text{g/mL}$ IPTG）。37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育，48 h 后挑取单一的白色菌落，加入 2 $\times$ YT 液体选择性培养基，37 $^{\circ}\text{C}$ 摇床中培养 12h 后将菌液取出 1 mL 以保存菌种，其余菌液用于提取杆粒（recombinant Bacmid, rBacmid）。

2.2.2 提取 rBacmid-ZIKV-prME 杆粒

12000 g/min 集菌，300 μL Solution 1 重悬菌体，上下混匀；加入 300 μL Solution 2，轻轻混匀，室温孵育 5 min；加入 300 μL KAC，置冰上 5-10 min，12000g 离心 10 min；轻轻将上清转移到含有 0.8 mL 异丙醇的离心管中，不要吸取白色沉淀，颠倒混匀，冰上孵育 5-10 min，12000 g 离心 15 min，弃去上清，加入 500 μL 75%乙醇，颠倒混匀；12000 g 离心 5 min；使用无水乙醇重复清洗一次，弃去上清后室温干燥沉淀，40 μL 去离子水重悬沉淀，即获得 rBacmid-ZIKV-prME 杆粒，测定杆粒浓度。

2.2.3 鉴定 rBacmid-ZIKV-prME 杆粒

以杆粒 rBacmid-ZIKV-prME 为模板，pFast-ZIKV-prME-F/R 为引物，进行 PCR 扩增，扩增体系同表 3-1，扩增产物进行核酸电泳分析。

2.3 rBV-ZIKV-prME 杆状病毒的制备及表达鉴定

2.3.1 rBV-ZIKV-prME 杆状病毒制备

预先培养 sf9 昆虫细胞（28 $^{\circ}\text{C}$ Sf-900II SFM 培养液），在 6 孔板的每孔加入 2 mL Sf-900II SFM 培养液，并加入 8×10^5 个 sf9 细胞，28 $^{\circ}\text{C}$ 生化培养箱中培养 1 h。待细胞贴壁后，将 rBacmid -ZIKV-prME 杆粒转染至 sf9 细胞。杆粒与转染试剂以 1:4（质量:体积）比例进行转染，分别用适量 SFM 培养基预稀释 30 min，混匀后常温孵育 30 min；将质粒+脂质体混合物加入 24 孔板中；转染后 3 h 加入 sf9 专用培养液，待 72-96 h 后，若细胞发生明显的细胞病变现象（Cytopathic effect, CPE），收取细胞上清液 1000 g 离心 3 min，弃去细胞碎片即可获得含病毒培养基，并命名为 rBV-ZIKV-prME-Mix-P0 代，分装后保存于 -80 $^{\circ}\text{C}$ 。

2.3.2 免疫荧光鉴定 rBV-ZIKV-prME 杆状病毒的表达

扩增后的重组杆状病毒（Recombinant baculovirus, rBV）采用 IFA 法鉴定目的基因的表达。将 rBV-ZIKV-prME-Mix-P0 代杆状病毒转染至 sf9 细胞，提前使用

Sf-900II SFM 培养液 28 °C 孵箱培养 sf9 细胞；将 sf9 细胞接种于铺有细胞小圆片的 24 孔板，待细胞密度长至 70% 左右时感染 rBV-ZIKV-prME-Mix-P0 杆状病毒；3 h 后加入 sf9 专用培养液，48 h 后进行免疫荧光实验，实验过程同第二章 2.3，一抗更换为 1:200 稀释的抗 ZIKV-Ecto 抗体 1D6，小心将小圆片抠出，放置于滴有抗荧光淬灭封片剂的载玻片上，使用荧光显微镜观察并拍照。

2.4 rBV-ZIKV-prME 杆状病毒的单斑纯化与鉴定

2.4.1 rBV-ZIKV-prME 杆状病毒的纯化

采用病毒孔板实验对 rBV 进行纯化，预先准备 sf9 细胞接种于六孔板，待细胞密度长至 50% 左右时转染，使用已收取的 ZIKV-M-P2 代上清感染六孔板细胞（100 μ L 每孔），置于 28 °C 孵育箱培养，3 h 后加覆盖液（半固体培养基由 4% Agarose Gel 和 Sf-900 培养基（1.3 $\times$ ）组成，将 4% Agarose Gel 在微波炉溶解至于 40 °C 水浴锅保温，sf-900 培养基置于 40 °C 培养基预温后迅速在超净台内按照 1:3 的比例混匀后置于 37 °C 水浴锅备用），每天观察细胞，待半固体培养基下出现单独未长细胞的空斑区域，显微镜下观察进行标记，提前准备接种 sf9 细胞的 24 孔板，使用移液枪挑取单斑转移至 24 孔板（挑取 10 个单斑），3h 后加入 sf9 专用培养液，每日观察细胞，若细胞发生明显 CPE 现象，收取细胞上清液 1000 g 离心 3 min，弃去细胞碎片即可获得含病毒培养基，并命名为 rBV-ZIKV-prME-Pure-（1-10）P 代，分装后保存于 -80 °C。

2.4.2 免疫荧光鉴定纯化后 rBV-ZIKV-prME 杆状病毒的表达

将 sf9 细胞接种于铺有细胞小圆片的 24 孔板，待细胞密度长至 70% 左右时分别感染纯化后的 10 株杆状病毒，3 h 后加入 sf9 专用培养液，48 h 后进行免疫荧光实验，实验过程同第一部分 2.3，一抗更换为 1:200 稀释的抗 ZIKV-Ecto 抗体 1D6，小心将小圆片抠出，放置于滴有抗荧光淬灭封片剂的载玻片上，使用荧光显微镜观察并拍照。

2.4.3 透射电镜观察杆状病毒感染细胞内的 ZIKV-VLP

将 rBV-ZIKV-prME-Pure-5P 代杆状病毒感染 sf9 细胞，48 h 后收取细胞，并用 PBS 轻柔洗涤 2 次以去除培养基残留，加入戊二醛固定液，4 °C 避光固定细胞 12 h。将细胞取出进行脱水处理两次，过程为：70%乙醇 15 min，80%乙醇 15 min，90%

乙醇 15 min, 100%乙醇 15 min。加入包埋剂并制成超薄切片, 将切片浸入苯胺黑染色, 电镜下观察 ZIKV-VLP 并拍照。

2.5 ZIKV-VLP 大量表达、纯化及鉴定

2.5.1 ZIKV-VLP 大量表达

预先准备 30 瓶 T75 sf9 细胞, 每瓶感染 1 mL rBV-ZIKV-prME-Pure-5P 杆状病毒, 3 h 后加入 sf9 专用培养液, 每日观察细胞, 若细胞发生明显 CPE 现象, 收取细胞上清液 1000 g 离心 3 min, 保存-80 °C。

2.5.2 ZIKV-VLP 纯化及鉴定

2.5.2.1 超速离心法粗纯 ZIKV-VLP

将收取的上清使用 0.22 μm 过滤器过滤, 过滤后进行 20%蔗糖垫子超离。现将过滤后细胞上清加入离心管, 利用针管将 20%蔗糖缓慢加入离心管底部; 140000 g 离心 4 h, 弃去上清, PBS 缓慢冲洗管壁及管底, Tris-Hcl 重悬 6 h 后进行密度梯度离心纯化。

2.5.2.2 密度梯度离心法精纯 ZIKV-VLP

预先配置碘克沙醇密度梯度离心的相关液体, 准备 OptiPrep 梯度介质: 15%(1.5 mL 溶液 D+3.5 mL 溶液 C); 35%(3.5 mL 溶液 D+1.5 mL 溶液 C); 先将 4.2 mL 15%碘克沙醇加入离心管中, 再将 3.8 mL 35%碘克沙醇缓慢加至离心管底部 (15%碘克沙醇下层)。由于密度差异, 离心管内可见明显上下分层。将离心管于 4 °C 中过夜静置; 缓慢将超离重悬液加至离心管内碘克沙醇最上层, 110000 g、降速为 0, 超速离心 14 h, 以 1 mL 为单位分层收取样品进行 page 和蛋白免疫印迹鉴定, page 和蛋白免疫印迹实验步骤同第一部分 2.4.1 及 2.5.3.2。

2.6 ZIKV-IgM 小鼠血清制备

准备 6 周龄 BALB/c 小鼠 4 只, 分为两组, 分别免疫 ZIKV Ecto 和 PBS, 每只小鼠肌肉免疫: 20 μg 蛋白用生理盐水稀释至 50 μL 与 50 μL QuickAntibody-Mouse5W 佐剂充分混匀, 2 周后眼球取血, 将全血进行 8000 g、5 min 离心后以收取血清, 分装后保存于-80 °C 冰箱备用。

3 结果

3.1 pFAST-ZIKV-prME 质粒的构建

以公司合成的 pUC57-ZIKV-prME 质粒为模板,PCR 扩增 ZIKV-prME 基因片段,采用同源重组的方式将 ZIKV-prME 基因片段克隆入 pFAST 载体中,转化后涂布平板,挑取白色菌落后做菌液 PCR 扩增 prME 基因片段,并对扩增产物进行核酸电泳分析,图 3.1-B 可见特异性核酸条带,与预期大小(2118 bp)一致。测序结果比对后显示与 ZIKV-prME 优化后序列一致,未出现突变、缺失等现象(见附录 D3),以上结果说明 pFAST-ZIKV-prME 重组质粒构建成功。

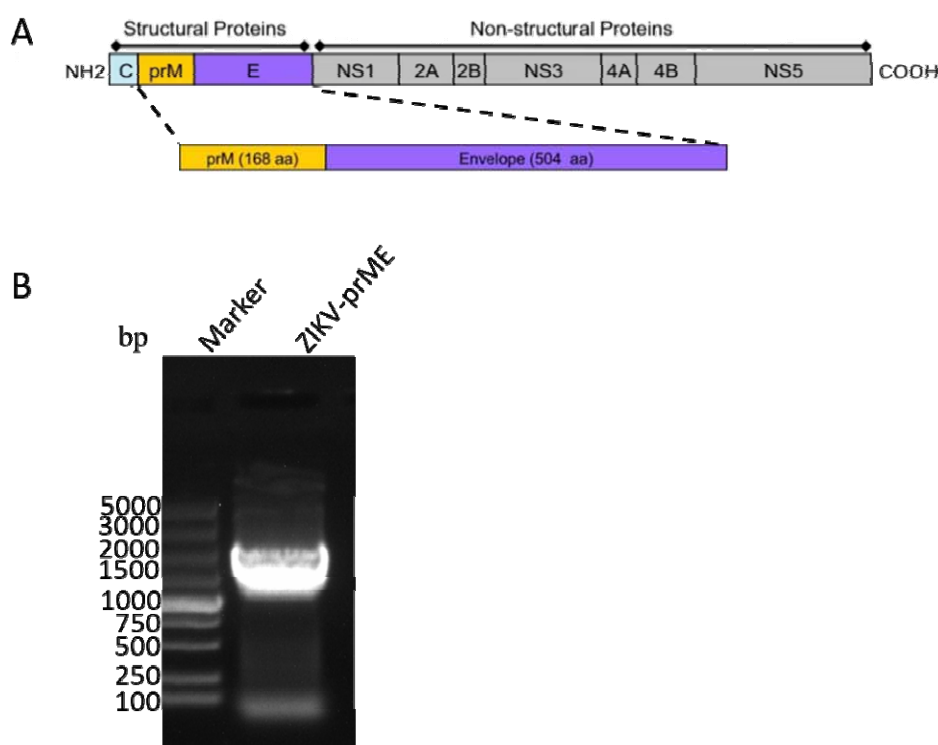


图 3.1 ZIKV-prME 基因示意图与 pFAST-ZIKV-prME 质粒的构建菌液 PCR 鉴定

A: ZIKV-prME 基因示意图; B: pFAST-ZIKV-prME 菌液 PCR 鉴定

3.2 rBacmid-ZIKV-prME 杆粒的构建

将重组质粒 rBacmid-ZIKV-prME 转化至 DH10Bac™感受态,36 h 后可见明显蓝白斑(图 3.2-A),挑取白色菌落小摇后提取重组杆粒 rBacmid-ZIKV-prME,以 rBacmid-ZIKV-prME-F/R 为引物,PCR 扩增 prME 基因片段,并进行琼脂糖凝胶电泳分析扩增产物,如图 3.2-B 可见特异性核酸条带,与预期大小(2118 bp)一致,表明 rBacmid-ZIKV-prME 杆粒构建成功。

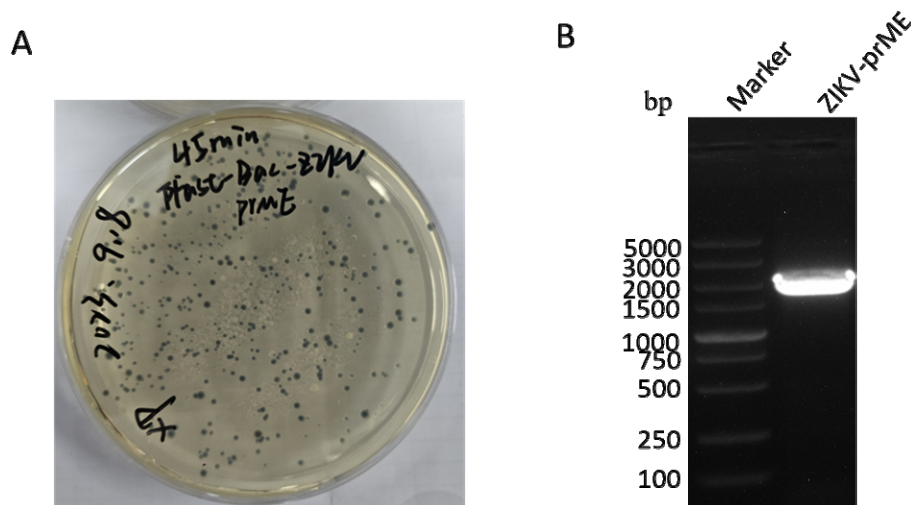


图 3.2 rBacmid-ZIKV-prME 杆粒的菌落与菌液 PCR 鉴定

A: pFAST-ZIKV-prME 质粒转化至 DH10Bac™感受态后形成蓝白斑；B: 菌液 PCR 鉴定

rBacmid-ZIKV-prME 杆粒

3.3 rBacmid-ZIKV-prME 杆粒在昆虫细胞中的表达及鉴定结果

3.3.1 rBV-ZIKV-prME 杆状病毒感染细胞的病变现象观察

将重组杆粒 rBV-ZIKV-prME 转染 sf9 细胞，每日观察细胞状态。7 d 后细胞开始变大、变圆、部分细胞内出现空泡；11 d 后大部分细胞死亡，脱离培养瓶，体积为正常细胞 2~3 倍（图 3.3-A），而正常 sf9 细胞未发生病变（图 3.3-B），表明杆粒转染昆虫细胞后产生杆状病毒。收取细胞上清，离心后可获得 P0 代杆状病毒。

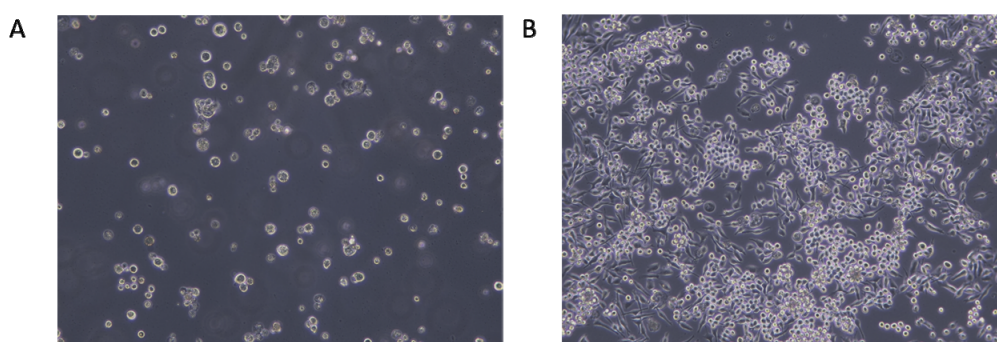


图 3.3 pFAST-ZIKV-prME 杆状病毒感染 sf9 细胞病变

A: 杆粒转染 sf9 细胞后的 CPE 现象；B: 正常 sf9 细胞

3.3.2 免疫荧光鉴定 rBV-ZIKV-prME 杆状病毒的表达

将 rBV-ZIKV-prME-P0 代杆状病毒感染 sf9 细胞，利用 IFA 染色鉴定 ZIKV E 蛋白在昆虫细胞内的表达，以上述制备的 1D6 为一抗。结果如图 3.6 所示，在细胞胞

质中可见特异的一侧偏向性绿色荧光，而阴性对照组无荧光，结果表明 ZIKV 杆状病毒能正确表达目的蛋白 prME。

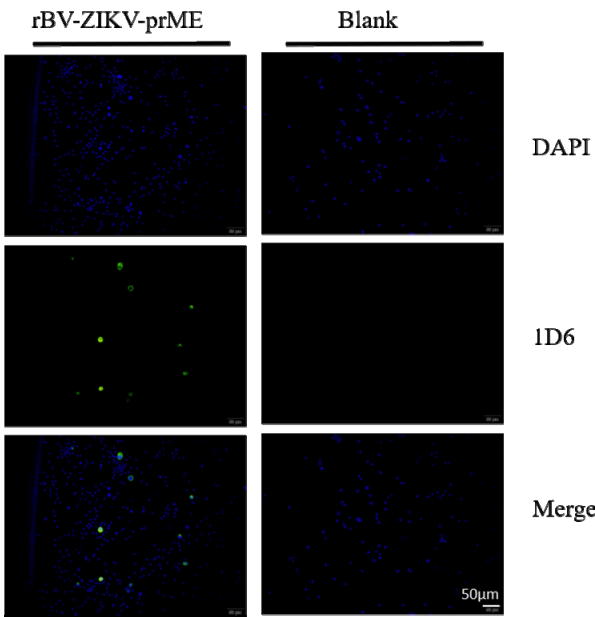


图 3.4 免疫荧光鉴定 rBV-ZIKV-prME 杆状病毒在 sf9 细胞中的表达

Blank: sf9 细胞无转染组；蓝色：DAPI 染细胞核；绿色：FITC 染色 1D6 抗体结合蛋白

3.4 rBV-ZIKV-prME 杆状病毒的纯化

3.4.1 rBV-ZIKV-prME 杆状病毒的纯化

将 rBV-ZIKV-prME 杆状病毒感染 sf9 细胞，添加半固定培养基限制其流动性，以形成单一病毒复制而产生的空斑，如图 3.5 所示。挑取 12 个独立空斑，感染 sf9 细胞后即获取纯化后单一来源杆状病毒。

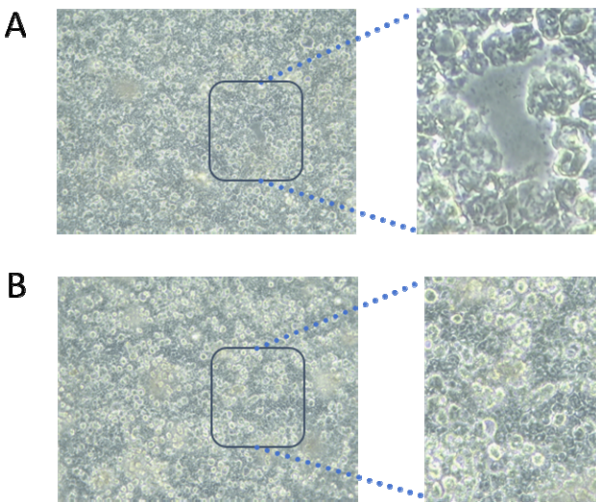


图 3.5 rBV-ZIKV-prME 杆状病毒感染 sf9 细胞形成单斑

A: rBV-ZIKV-prME 感染 sf9 形成的单个空斑 B: 正常 sf9 细胞在半固体培养基下生长状态

3.4.2 纯化后 rBV-ZIKV-prME 杆状病毒表达的鉴定

为了鉴定不同克隆中的杆状病毒表达 prME 蛋白的水平,将 12 株纯化后的杆状病毒分别感染 sf9 细胞后进行免疫荧光验证。如图 3.6-A 所示,20 倍镜下可观察得 2、5、10 号杆状病毒产生的绿色荧光较多。进一步对几株绿色荧光较多的杆状病毒孔,进行 4 倍镜下的绿色荧光比较,如图 3.6-B 所示 5 号病毒的表达量远高于其他几株,最终选择 5 号病毒用于后续 ZIKV-VLP 的大量制备。

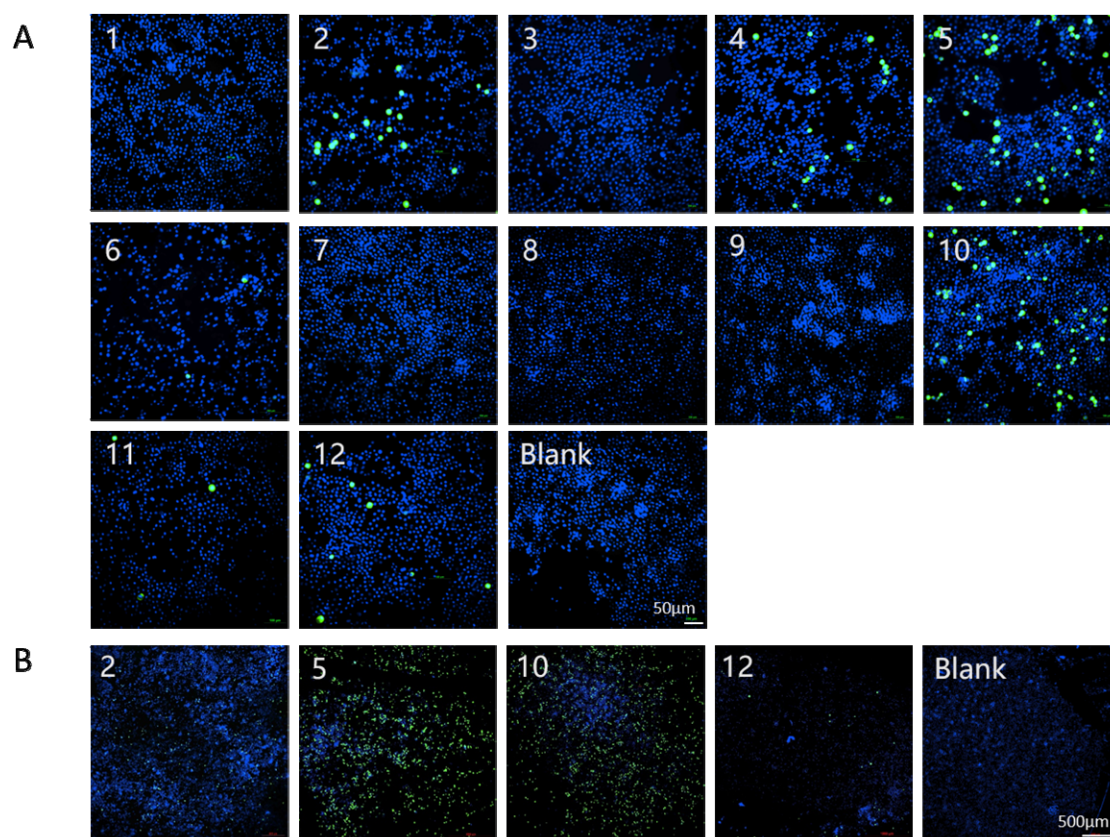


图 3.6 12 个重组杆状病毒感染 sf9 细胞的免疫荧光鉴定

Blank: 正常 sf9 细胞; 蓝色: DAPI 染细胞核; 绿色: FITC 染色 1D6 抗体结合蛋白

A: 20 倍镜下观察 12 株纯化杆状病毒感染 sf9 细胞后的免疫荧光数量 B: 4 倍镜下观察 4 株纯化杆状病毒感染 sf9 细胞后的免疫荧光数量

3.4.3 透射电镜观察 ZIKV-VLP

将 5 号 rBV-ZIKV-prME 感染 sf9 细胞 48 h 后收取细胞,固定后制样,在电镜下观察并拍照。如图 3.7 所示, rBV-ZIKV-prME 感染的细胞内能见到直径大小约为 40 nm 左右的圆形颗粒,与 ZIKV 病毒颗粒大小一致,也可以看到成束的杆状病毒。

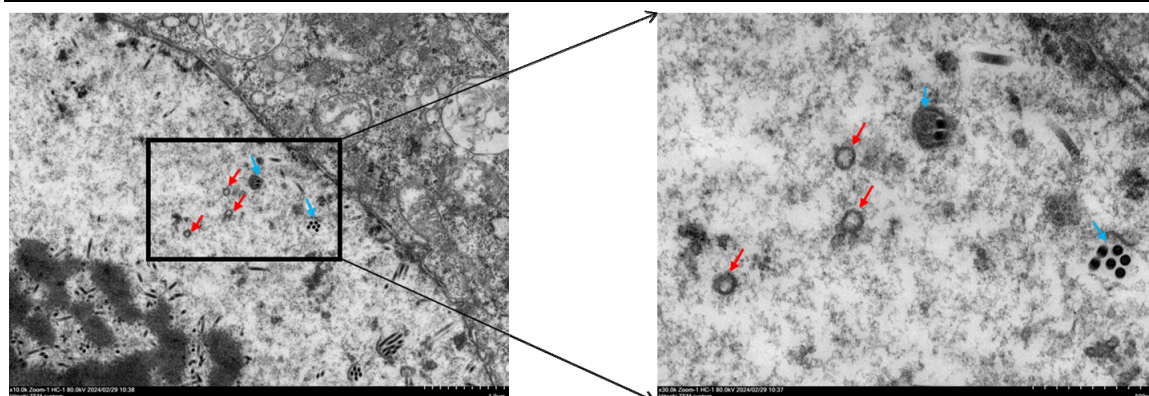


图 3.7 透射电镜下观察 ZIKV-VLP 的形态

红色箭头：ZIKV-VLP；蓝色箭头：rBV-ZIKV-prME 杆状病毒

3.5 ZIKV-VLP 大量表达、纯化及鉴定

3.5.1 ZIKV-VLP 的大量表达及纯化

将 rBV-ZIKV-prME-Pure-5P 代杆状病毒感染大量 sf9 细胞后离心收取 200 mL 细胞上清，以 20%蔗糖为垫子进行超速离心，PBS 过夜重悬以获取沉淀的 ZIKV-VLP，利用以碘克沙醇为介质的密度梯度离心法纯化 ZIKV-VLP。如图 3.8 所示，可看到图中 2 号和 6 号箭头所指为离心后聚集条带，提示可能含有 ZIKV-VLP。



图 3.8 ZIKV-VLP 经密度梯度离心后出现的不同条带

1-7：1 mL 为单位收取 7 个样组分；箭头：样本对应离心管内溶液位置

3.5.2 纯化后 ZIKV-VLP 的鉴定

随后将离心收取的 7 个样品组分进行 Western-Blot 检测以确定 VLP 聚集的确切

部位。如图 3.9, 可见 6 号有较粗且单一的特异性条带, 与 E 蛋白预期大小一致, 结果表明密度梯度离心后的 6 号组分为纯化后 ZIKV-VLP。

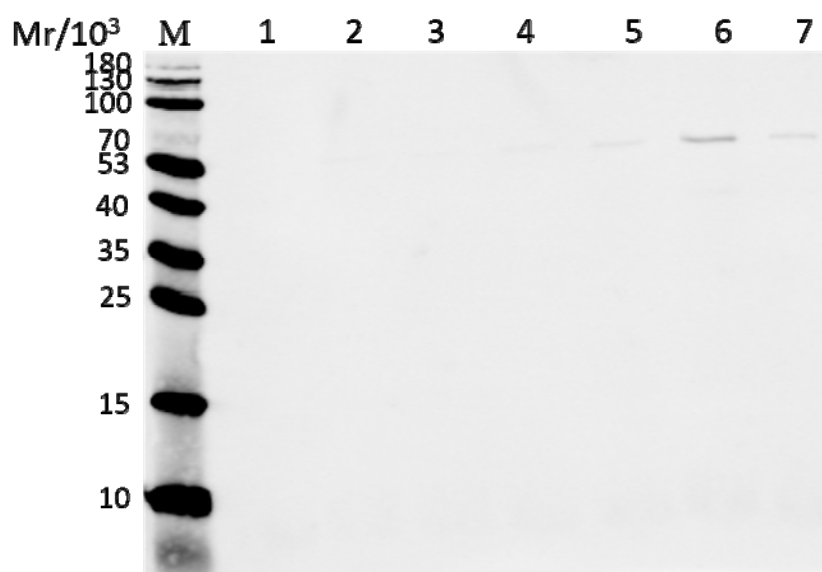


图 3.9 Western Blot 鉴定密度梯度后不同组分中的 ZIKV-VLP

M: 蛋白质 Mr Marker; 1-7: 1 mL 为单位收取 7 个样本组分

3.6 ZIKV-VLP 免疫原性鉴定

ELISA 法检测纯化后 ZIKV-VLP 的抗原性, 以 ZIKV Ecto 和 VLP 为固相抗原, ZIKV-Ecto 免疫小鼠 2w 后收取急性期 IgM 血清为一抗, 将血清 1:100 稀释进行 ELISA 检测, 抗 IgM HRP 抗体为二抗进行间接 ELISA, 表 3-3 的结果表明, 血清中确实产生 ZIKV 特异性 IgM 抗体, 对比与 ZIKV-Ecto, VLP 可与血清中 IgM 抗体结合且特异性较好。经昆虫细胞表达、密度梯度离心法纯化的 ZIKV-VLP 具有良好的抗原性。

表 3-3: ZIKV-VLP 抗原性测定

稀释倍数	ZIKV-VLP	ZIKV-Ecto
1:50	0.672	0.469
1:100	0.426	0.168
正常小鼠血清	0.087	0.187
PBS	0.045	0.052

4 讨论

VLP 不含病毒基因组, 且与野毒株具有相似的结构, 既保留了病毒的抗原性, 又不具备感染性。与重组蛋白及灭活病毒相比, VLP 的优势在于具有更接近病毒粒子的空间构象和抗原表位, 可以有效刺激机体产生较强的免疫应答, 因此被广泛应用于疫苗、抗体、替代抗原等方面的研究^[111, 112]。2022 年 DN Mali 等人在 BHK-21 细胞中稳定表达了 JEV VLP, 并鉴定其作为 JEV IgM ELISA 检测法中潜在抗原的可能性, 结果表明对比于灭活病毒抗原, VLP 作为检测抗原降低了交叉反应性^[113]。因此, 制备降低交叉反应性的抗原将可为黄病毒感染的血清诊断和疾病治疗提供帮助。ZIKV 的 prME 蛋白可以在细胞内自组装成 VLP, 在本研究中, 采用杆状病毒表达系统成功表达和纯化了 ZIKV-VLP, 其抗原性良好。

目前常用于 VLP 生产的系统包括酵母表达系统、杆状病毒表达系统、酵母表达系统、哺乳动物细胞表达系统等^[114]。表达系统的选择取决于两个因素: 蛋白的最终用途, 以及目的蛋白的性质。在操作、成本、安全、速度以及蛋白产物的翻译后修饰等特性方面, 每个表达系统都有其优劣势。与其他几种表达系统相比, BEVS 能够同时兼顾易于操作、高表达效率、高安全性、保证蛋白产物较为完整的翻译后修饰以及从构建载体到获得蛋白整个过程的较低成本等要求^[115]。因此本研究中选用了 BEVS 来表达 ZIKV-VLP。BEVS 中的杆状病毒是一类对于节肢动物细胞有极强的感染特异性的病毒, 属于杆状病毒科^[116]。此外, BEVS 中重组杆状病毒携带的 Polyhedrin 启动子 (Polyhedrin promoter, PPH) 具有很强的启动转录的能力, 能够高效表达外源性的目的蛋白^[117]。杆状病毒感染细胞的过程中, 病毒复制的后期, PPH 控制的多角体蛋白 (Polyhedrin protein) 会大量表达, 在感染后期, 其表达量甚至可以达到总细胞蛋白量的 50%^[118]。在 BEVS 中的杆状病毒感染昆虫细胞的过程中, 多角体蛋白是可有可无的, 因此我们一般将多角体蛋白替换为外源基因^[119]。

本研究在构建杆状病毒的过程中, 采用单斑挑取技术获取 12 个单一杆状病毒, 并对 12 个杆状病毒的表达能力进行了鉴定和比较, 最终筛选出 5 号和 10 号为表达能力较强的杆状病毒, 经过单斑纯化后的杆状病毒, 可以达到较大的生产量, 且可以避免在表达过程中发生蛋白表达丢失的现象。然而既往研究表明 BEVS 表达外源蛋白时, 重组杆状病毒感染细胞的感染复数和感染时间与蛋白的表达量有直接关系

^[120]。本研究的不足在于，未对重组杆状病毒感染细胞的感染复数和感染时间进行测定，这可能是本研究在 VLP 的表达量不够高的原因之一，后续应对感染条件进一步优化以获取更大的 VLP 表达量。经过 BEVS 表达后，目的蛋白产物中会含有一定量的重组杆状病毒及其他昆虫细胞自然表达的蛋白，这将对 VLP 作为免疫原或抗原用于检测产生显著的干扰^[121]。

为确保 ZIKV-VLP 的纯度和质量，需采用密度梯度离心法等手段进行纯化，而离心过程中介质的选择也必须谨慎考虑，目前常用的介质包括蔗糖、氯化铯及碘克沙醇^[122]。蔗糖作为一种早期应用于密度梯度离心的介质，具有出色的水溶性、高稳定性以及相对较低的成本，因此仍然是广泛使用的介质之一，适用于多种样品的分离纯化^[123]。但是蔗糖的存在会对抗原抗体的结合有所干扰，这将影响 VLP 作为抗原用于检测的可能性^[124]。氯化铯是一种有毒重金属盐，在配制溶液时要注意做好防护，并且在获得样品后需要将氯化铯除去，否则同样会影响后续 VLP 的实验^[123]。非离子型化合物碘克沙醇最初被用来做医学 X 射线检测造影剂，随后因其具有良好的水溶性、高稳定性、较高的密度以及低黏稠度的特点被推广为密度梯度离心介质^[125]。本研究的结果表明，利用碘克沙醇密度梯度离心后可明显看到聚集带，证明该介质成功纯化了 ZIKV-VLP。但 Western Blot 条带稍有弥散，可能是离心时间与转速不够的原因，后续应该对离心方法进行进一步的优化。

本研究成功构建了 ZIKV-VLP 的昆虫表达系统，纯化的 VLP 具有较好的免疫原性，这为进一步建立 ZIKV 的早期感染检测方法提供了实验基础。

小 结

1、成功构建了 pCAGGs-ZIKV-prME、pET28a-ZIKV-Ecto、pFAST-ZIKV-prME，三者均能在相应宿主细胞中准确表达；

2、通过大肠杆菌表达系统制备了 E 蛋白胞外域，以此为免疫原成功制备得抗 ZIKV Ecto 的单抗共 39 株；

3、从 39 株中选择 12 株效价较高的抗体制备了腹水，进一步筛选得 5 株 ZIKV 特异性抗体不与其他黄病毒属病毒有交叉反应，且可识别 prME 蛋白的空间表位；

4、重组质粒 pFAST-ZIKV-prME 在大肠杆菌中成功制备得到 rBacmid-ZIKV-prME 杆粒，并在昆虫细胞中获得 rBV-ZIKV-prME 杆状病毒，感染 sf9 细胞后大量制备并获得纯化的 ZIVK-VLP，且具有良好的抗原性。

参考文献

- [1] LANCIOTTI R S. KOSOY O L. LAVEN J J. VELEZ J O. LAMBERT A J. JOHNSON A J. STANFIELD S M, DUFFY M R. Genetic and serologic properties of Zika virus associated with an epidemic, Yap State, Micronesia, 2007 [J]. *Emerging infectious diseases*, 2008, 14(8): 1232-9.
- [2] HASAN S S. SEVVANA M. KUHN R J, ROSSMANN M G. Structural biology of Zika virus and other flaviviruses [J]. *Nature structural & molecular biology*, 2018, 25(1): 13-20.
- [3] ZHANG X. LI G. CHEN G. ZHU N. WU D. WU Y, JAMES T D. Recent progresses and remaining challenges for the detection of Zika virus [J]. *Medicinal research reviews*, 2021, 41(4): 2039-108.
- [4] BHAT E A. ALI T. SAJJAD N. KUMAR R, BRON P. Insights into the structure, functional perspective, and pathogenesis of ZIKV: an updated review [J]. *Biomedicine & pharmacotherapy = Biomedecine & pharmacotherapie*, 2023, 165: 115175.
- [5] YU J. HUANG C. WANG Z. KAUSHIK R S. SHENG Z. LI F, WANG D. Development and characterization of an inducible assay system to measure Zika virus capsid interactions [J]. *Journal of medical virology*, 2022, 94(11): 5392-400.
- [6] SANKHALA R S. DUSSUPT V. DONOFRIO G. GROMOWSKI G D. DE LA BARRERA R A. LARROCCA R A. MENDEZ-RIVERA L. LEE A. CHOE M. ZAKY W. MANTUS G. JENSEN J L. CHEN W H. GOHAIN N. BAI H. MCCracken M K. MASON R D. LEGGAT D. SLIKE B M. TRAN U. JIAN N. ABBINK P. PETERSON R. MENDES E A. FREITAS DE OLIVEIRA FRANCA R. CALVET G A. BISPO DE FILIPPIS A M. MCDERMOTT A. ROEDERER M. HERNANDEZ M. ALBERTUS A. DAVIDSON E. DORANZ B J. ROLLAND M. ROBB M L. LYNCH R M. BAROUCH D H. JARMAN R G. THOMAS S J. MODJARRAD K. MICHAEL N L. KREBS S J, JOYCE M G. Zika-specific neutralizing antibodies targeting inter-dimer envelope epitopes [J]. *Cell reports*, 2023, 42(8): 112942.
- [7] GUO M. HUI L. NIE Y. TEFSER B, WU Y. ZIKV viral proteins and their roles in virus-host interactions [J]. *Science China Life sciences*, 2021, 64(5): 709-19.

- [8] LIN H H. YIP B S. HUANG L M, WU S C. Zika virus structural biology and progress in vaccine development [J]. *Biotechnology advances*, 2018, 36(1): 47-53.
- [9] MWALE P F. LEE C H. LIN L T. LEU S J. HUANG Y J. CHIANG L C. MAO Y C, YANG Y Y. Expression, Purification, and Characterization of Anti-Zika virus Envelope Protein: Polyclonal and Chicken-Derived Single Chain Variable Fragment Antibodies [J]. *International journal of molecular sciences*, 2020, 21(2).
- [10] ZHAO F. XU Y. LIU N. LV D. CHEN Y. LIU Z. JIN X. XIAO M. LAVILLETTE D. ZHONG J. BARTENSCHLAGER R, LONG G. Extracellular vesicles from Zika virus-infected cells display viral E protein that binds ZIKV-neutralizing antibodies to prevent infection enhancement [J]. *The EMBO journal*, 2023, 42(6): e112096.
- [11] BERNECK B S. ROCKSTROH A. FERTEY J. GRUNWALD T, ULBERT S. A Recombinant Zika Virus Envelope Protein with Mutations in the Conserved Fusion Loop Leads to Reduced Antibody Cross-Reactivity upon Vaccination [J]. *Vaccines (Basel)*, 2020, 8(4).
- [12] BEDDINGFIELD B J. HARTNETT J N. WILSON R B. KULAKOSKY P C. ANDERSEN K G. ROBLES-SIKISAKA R. GRUBAUGH N D. AYBAR A. NUNEZ M Z. FERMIN C D, GARRY R F. Zika Virus Non-Structural Protein 1 Antigen-Capture Immunoassay [J]. *Viruses*, 2021, 13(9).
- [13] GAO X. WEN Y. WANG J. HONG W. LI C. ZHAO L. YIN C. JIN X. ZHANG F, YU L. Delayed and highly specific antibody response to nonstructural protein 1 (NS1) revealed during natural human ZIKV infection by NS1-based capture ELISA [J]. *BMC infectious diseases*, 2018, 18(1): 275.
- [14] LIU D. CHEN D. ZHANG T. YU N. REN R. CHEN Y, WANG C. Preparation and application of yellow fever virus NS1 protein-specific monoclonal antibodies [J]. *Journal of medical virology*, 2021, 93(6): 3374-82.
- [15] XIONG G. LI Y. CHEN F. XIONG X. WANG Q. ZHANG L. DONG H. ZHU C. CUI J. HE M. CHENG H. HU A. CHENG C. PANG J. LIU G, CHEN H. Evaluation of Zika virus DNA vaccines based on NS1 and domain III of E [J]. *International immunopharmacology*, 2022, 113(Pt A): 109308.

- [16] ZHANG X. XIE X. XIA H. ZOU J. HUANG L. POPOV V L. CHEN X, SHI P Y. Zika Virus NS2A-Mediated Virion Assembly [J]. *mBio*, 2019, 10(5).
- [17] XIA H. LUO H. SHAN C. MURUATO A E. NUNES B T D. MEDEIROS D B A. ZOU J. XIE X. GIRALDO M I. VASCONCELOS P F C. WEAVER S C. WANG T. RAJSBAUM R, SHI P Y. An evolutionary NS1 mutation enhances Zika virus evasion of host interferon induction [J]. *Nature communications*, 2018, 9(1): 414.
- [18] LI Y. ZHANG Z. PHOO W W. LOH Y R. LI R. YANG H Y. JANSSON A E. HILL J. KELLER T H. NACRO K. LUO D, KANG C. Structural Insights into the Inhibition of Zika Virus NS2B-NS3 Protease by a Small-Molecule Inhibitor [J]. *Structure (London, England : 1993)*, 2018, 26(4): 555-64.e3.
- [19] SIROHI D, KUHN R J. Zika Virus Structure, Maturation, and Receptors [J]. *The Journal of infectious diseases*, 2017, 216(suppl_10): S935-s44.
- [20] XING H. XU S. JIA F. YANG Y. XU C. QIN C, SHI L. Zika NS2B is a crucial factor recruiting NS3 to the ER and activating its protease activity [J]. *Virus research*, 2020, 275: 197793.
- [21] LEI J. HANSEN G. NITSCHKE C. KLEIN C D. ZHANG L, HILGENFELD R. Crystal structure of Zika virus NS2B-NS3 protease in complex with a boronate inhibitor [J]. *Science (New York, NY)*, 2016, 353(6298): 503-5.
- [22] XU S. CI Y. WANG L. YANG Y. ZHANG L. XU C. QIN C, SHI L. Zika virus NS3 is a canonical RNA helicase stimulated by NS5 RNA polymerase [J]. *Nucleic acids research*, 2019, 47(16): 8693-707.
- [23] LEE J Y. NGUYEN T T N, MYOUNG J. Zika Virus-Encoded NS2A and NS4A Strongly Downregulate NF- κ B Promoter Activity [J]. *Journal of microbiology and biotechnology*, 2020, 30(11): 1651-8.
- [24] EVANS J D, SEEGER C. Differential effects of mutations in NS4B on West Nile virus replication and inhibition of interferon signaling [J]. *Journal of virology*, 2007, 81(21): 11809-16.
- [25] JI W, LUO G. Zika virus NS5 nuclear accumulation is protective of protein degradation and is

- required for viral RNA replication [J]. *Virology*, 2020, 541: 124-35.
- [26] CHAUDHARY V. YUEN K S. CHAN J F. CHAN C P. WANG P H. CAI J P. ZHANG S. LIANG M. KOK K H. CHAN C P. YUEN K Y, JIN D Y. Selective Activation of Type II Interferon Signaling by Zika Virus NS5 Protein [J]. *Journal of virology*, 2017, 91(14).
- [27] CALVET G A. SANTOS F B, SEQUEIRA P C. Zika virus infection: epidemiology, clinical manifestations and diagnosis [J]. *Current opinion in infectious diseases*, 2016, 29(5): 459-66.
- [28] CRISANTO-LÓPEZ I E. JESÚS P L. LÓPEZ-QUECHO J, FLORES-ALONSO J C. Congenital Zika syndrome [J]. *Boletín médico del Hospital Infantil de México*, 2023, 80(1): 3-14.
- [29] EPPES C. RAC M. DUNN J. VERSALOVIC J. MURRAY K O. SUTER M A. SANZ CORTES M. ESPINOZA J. SEFEROVIC M D. LEE W. HOTEZ P. MASTROBATTISTA J. CLARK S L. BELFORT M A, AAGAARD K M. Testing for Zika virus infection in pregnancy: key concepts to deal with an emerging epidemic [J]. *American journal of obstetrics and gynecology*, 2017, 216(3): 209-25.
- [30] BHAGAT R. KAUR G, SETH P. Molecular mechanisms of zika virus pathogenesis: An update [J]. *The Indian journal of medical research*, 2021, 154(3): 433-45.
- [31] VALENTINE G. MARQUEZ L, PAMMI M. Zika Virus-Associated Microcephaly and Eye Lesions in the Newborn [J]. *Journal of the Pediatric Infectious Diseases Society*, 2016, 5(3): 323-8.
- [32] FONTES-GARFIAS C R. BAKER C K, SHI P Y. Reverse genetic approaches for the development of Zika vaccines and therapeutics [J]. *Current opinion in virology*, 2020, 44: 7-15.
- [33] GIRALDO M I. GONZALEZ-OROZCO M, RAJSBAUM R. Pathogenesis of Zika Virus Infection [J]. *Annual review of pathology*, 2023, 18: 181-203.
- [34] BHARDWAJ U. PANDEY N. RASTOGI M, SINGH S K. Gist of Zika Virus pathogenesis [J]. *Virology*, 2021, 560: 86-95.
- [35] LINK N. HARNISH J M. HULL B. GIBSON S. DIETZE M. MGBIKE U E. MEDINA-BALCAZAR S. SHAH P S, YAMAMOTO S. A Zika virus protein expression

- screen in *Drosophila* to investigate targeted host pathways during development [J]. *Disease models & mechanisms*, 2024.
- [36] HU T. WU Z. WU S. CHEN S, CHENG A. The key amino acids of E protein involved in early flavivirus infection: viral entry [J]. *Virology*, 2021, 18(1): 136.
- [37] MWALIKO C. NYARUABA R. ZHAO L. ATONI E. KARUNGU S. MWAU M. LAVILLETTE D. XIA H, YUAN Z. Zika virus pathogenesis and current therapeutic advances [J]. *Pathogens and global health*, 2021, 115(1): 21-39.
- [38] SONG B H. YUN S I. WOOLLEY M, LEE Y M. Zika virus: History, epidemiology, transmission, and clinical presentation [J]. *Journal of neuroimmunology*, 2017, 308: 50-64.
- [39] PIERSON T C, DIAMOND M S. The continued threat of emerging flaviviruses [J]. *Nature microbiology*, 2020, 5(6): 796-812.
- [40] SACCHETTO L. SILVA N I O. REZENDE I M. ARRUDA M S. COSTA T A. DE MELLO É M. OLIVEIRA G F G. ALVES P A. DE MENDONÇA V E. STUMPP R. PRADO A I A. PAGLIA A P. PERINI F A. LACERDA NOGUEIRA M. KROON E G. DE THOISY B. TRINDADE G S, DRUMOND B P. Neighbor danger: Yellow fever virus epizootics in urban and urban-rural transition areas of Minas Gerais state, during 2017-2018 yellow fever outbreaks in Brazil [J]. *PLoS neglected tropical diseases*, 2020, 14(10): e0008658.
- [41] MUSSO D, GUBLER D J. Zika Virus [J]. *Clinical microbiology reviews*, 2016, 29(3): 487-524.
- [42] STETTLER K. BELTRAMELLO M. ESPINOSA D A. GRAHAM V. CASSOTTA A. BIANCHI S. VANZETTA F. MINOLA A. JACONI S. MELE F. FOGlierini M. PEDOTTI M. SIMONELLI L. DOWALL S. ATKINSON B. PERCIVALLE E. SIMMONS C P. VARANI L. BLUM J. BALDANTI F. CAMERONI E. HEWSON R. HARRIS E. LANZAVECCHIA A. SALLUSTO F, CORTI D. Specificity, cross-reactivity, and function of antibodies elicited by Zika virus infection [J]. *Science (New York, NY)*, 2016, 353(6301): 823-6.
- [43] KHAIBOULLINA S. UPPAL T. MARTYNOVA E. RIZVANOV A. BARANWAL M, VERMA S C. History of ZIKV Infections in India and Management of Disease Outbreaks [J].

- Frontiers in microbiology*, 2018, 9: 2126.
- [44] GEORGE A M. ANSUMANA R. DE SOUZA D K. NIYAS V K M. ZUMLA A, BOCKARIE M J. Climate change and the rising incidence of vector-borne diseases globally [J]. *International journal of infectious diseases : IJID : official publication of the International Society for Infectious Diseases*, 2024, 139: 143-5.
- [45] BERNARDO-MENEZES L C. AGRELLI A. OLIVEIRA A. MOURA R R. CROVELLA S, BRANDÃO L A C. An overview of Zika virus genotypes and their infectivity [J]. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, 2022, 55: e02632022.
- [46] PLOURDE A R, BLOCH E M. A Literature Review of Zika Virus [J]. *Emerging infectious diseases*, 2016, 22(7): 1185-92.
- [47] HASTINGS A K, FIKRIG E. Zika Virus and Sexual Transmission: A New Route of Transmission for Mosquito-borne Flaviviruses [J]. *The Yale journal of biology and medicine*, 2017, 90(2): 325-30.
- [48] GOURINAT A C. O'CONNOR O. CALVEZ E. GOARANT C, DUPONT-ROUZEYROL M. Detection of Zika virus in urine [J]. *Emerging infectious diseases*, 2015, 21(1): 84-6.
- [49] LI M I. WONG P S. NG L C, TAN C H. Oral susceptibility of Singapore Aedes (Stegomyia) aegypti (Linnaeus) to Zika virus [J]. *PLoS neglected tropical diseases*, 2012, 6(8): e1792.
- [50] LI K. JI Q. JIANG S, ZHANG N. Advancement in the Development of Therapeutics Against Zika Virus Infection [J]. *Frontiers in cellular and infection microbiology*, 2022, 12: 946957.
- [51] WANG Q. YAN J, GAO G F. Monoclonal Antibodies against Zika Virus: Therapeutics and Their Implications for Vaccine Design [J]. *Journal of virology*, 2017, 91(20).
- [52] HERRADA C A. KABIR M A, ALTAMIRANO R E A. Advances in Diagnostic Methods for Zika Virus Infection [J]. *Journal of medical devices*, 2018, 12(4): 0408021-4080211.
- [53] SINGH R K. DHAMA K. KARTHIK K. TIWARI R. KHANDIA R. MUNJAL A. IQBAL H M N. MALIK Y S, BUENO-MARÍ R. Advances in Diagnosis, Surveillance, and Monitoring of Zika Virus: An Update [J]. *Frontiers in microbiology*, 2017, 8: 2677.
- [54] CORDEIRO M T. Laboratory diagnosis of Zika virus [J]. *Topics in magnetic resonance imaging : TMRI*, 2019, 28(1): 15-7.

- [55] BAZ M. Zika Virus Isolation, Purification, and Titration [J]. *Methods in molecular biology (Clifton, NJ)*, 2020, 2142: 9-22.
- [56] BOSCH I. DE PUIG H. HILEY M. CARRÉ-CAMPS M. PERDOMO-CELIS F. NARVÁEZ C. F. SALGADO D M. SENTHOOR D. O'GRADY M. PHILLIPS E. DURBIN A. FANDOS D. MIYAZAKI H. YEN C W. GÉLVEZ-RAMÍREZ M. WARKE R V. RIBEIRO L S. TEIXEIRA M M. ALMEIDA R P. MUÑOZ-MEDINA J E. LUDERT J E. NOGUEIRA M L. COLOMBO T E. TERZIAN A C B. BOZZA P T. CALHEIROS A S. VIEIRA Y R. BARBOSA-LIMA G. VIZZONI A. CERBINO-NETO J. BOZZA F A. SOUZA T M L. TRUGILHO M R O. DE FILIPPIS A M B. DE SEQUEIRA P C. MARQUES E T A. MAGALHAES T. DÍAZ F J. RESTREPO B N. MARÍN K. MATTAR S. OLSON D. ASTURIAS E J. LUCERA M. SINGLA M. MEDIGESHI G R. DE BOSCH N. TAM J. GÓMEZ-MÁRQUEZ J. CLAVET C. VILLAR L. HAMAD-SCHIFFERLI K, GEHRKE L. Rapid antigen tests for dengue virus serotypes and Zika virus in patient serum [J]. *Science translational medicine*, 2017, 9(409).
- [57] DICK G W. Zika virus. II. Pathogenicity and physical properties [J]. *Trans R Soc Trop Med Hyg*, 1952, 46(5): 521-34.
- [58] PERKASA A. YUDHAPUTRI F. HARYANTO S. HAYATI R F. MA'ROEF C N. ANTONJAYA U. YOHAN B. MYINT K S. LEDERMANN J P. ROSENBERG R. POWERS A M, SASMONO R T. Isolation of Zika Virus from Febrile Patient, Indonesia [J]. *Emerging infectious diseases*, 2016, 22(5): 924-5.
- [59] ARAUJO R V. FEITOSA-SUNTHEIMER F. GOLD A S. LONDONO-RENTERIA B, COLPITTS T M. One-step RT-qPCR assay for ZIKV RNA detection in *Aedes aegypti* samples: a protocol to study infection and gene expression during ZIKV infection [J]. *Parasites & vectors*, 2020, 13(1): 128.
- [60] WAGGONER J J. ROJAS A, PINSKY B A. Yellow Fever Virus: Diagnostics for a Persistent Arboviral Threat [J]. *Journal of clinical microbiology*, 2018, 56(10).
- [61] PARK J W. Principles and Applications of Loop-Mediated Isothermal Amplification to Point-of-Care Tests [J]. *Biosensors*, 2022, 12(10).
- [62] SOROKA M. WASOWICZ B, RYMASZEWSKA A. Loop-Mediated Isothermal

- Amplification (LAMP): The Better Sibling of PCR? [J]. *Cells*, 2021, 10(8).
- [63] LOW S L. LEO Y S. LAI Y L. LAM S. TAN H H. WONG J C C. TAN L K, NG L C. Evaluation of eight commercial Zika virus IgM and IgG serology assays for diagnostics and research [J]. *PloS one*, 2021, 16(1): e0244601.
- [64] EHMEN C. MEDIALDEA-CARRERA R. BROWN D. DE FILIPPIS A M B. DE SEQUEIRA P C. NOGUEIRA R M R. BRASIL P. CALVET G A. BLESSMANN J. MALLMANN A M. SIEVERTSEN J. RACKOW A. SCHMIDT-CHANASIT J. EMMERICH P. SCHMITZ H. DESCHERMEIER C, MIKA A. Accurate detection of Zika virus IgG using a novel immune complex binding ELISA [J]. *Tropical medicine & international health : TM & IH*, 2021, 26(1): 89-101.
- [65] LI C J. HUANG P H. CHEN H W, CHANG S C. Development and characterization of mouse monoclonal antibodies targeting to distinct epitopes of Zika virus envelope protein for specific detection of Zika virus [J]. *Applied microbiology and biotechnology*, 2021, 105(11): 4663-73.
- [66] MEDINA F A. VILA F. PREMKUMAR L. LORENZI O. PAZ-BAILEY G. ALVARADO L I. RIVERA-AMILL V. DE SILVA A. WATERMAN S, MUÑOZ-JORDÁN J. Capacity of a Multiplex IgM Antibody Capture ELISA to Differentiate Zika and Dengue Virus Infections in Areas of Concurrent Endemic Transmission [J]. *The American journal of tropical medicine and hygiene*, 2021, 106(2): 585-92.
- [67] BASILE A J. GOODMAN C. HORIUCHI K. LAVEN J. PANELLA A J. KOSOY O. LANCIOTTI R S, JOHNSON B W. Development and validation of an ELISA kit (YF MAC-HD) to detect IgM to yellow fever virus [J]. *Journal of virological methods*, 2015, 225: 41-8.
- [68] HUZLY D. HANSELMANN I. SCHMIDT-CHANASIT J, PANNING M. High specificity of a novel Zika virus ELISA in European patients after exposure to different flaviviruses [J]. *Euro surveillance : bulletin Europeen sur les maladies transmissibles = European communicable disease bulletin*, 2016, 21(16).
- [69] KABIR M A. SOTO-ACOSTA R. SHARMA S. BRADRICK S S. GARCIA-BLANCO M A.

- CAPUTI M, ASGHAR W. An antibody panel for highly specific detection and differentiation of Zika virus [J]. *Scientific reports*, 2020, 10(1): 11906.
- [70] PHAN T T N, HVASTA M G, KUDLACEK S T, THIONO D J, TRIPATHY A, NICELY N I, DE SILVA A M, KUHLMAN B. A conserved set of mutations for stabilizing soluble envelope protein dimers from dengue and Zika viruses to advance the development of subunit vaccines [J]. *The Journal of biological chemistry*, 2022, 298(7): 102079.
- [71] GUNAWARDANA S A, SHAW R H. Cross-reactive dengue virus-derived monoclonal antibodies to Zika virus envelope protein: Panacea or Pandora's box? [J]. *BMC infectious diseases*, 2018, 18(1): 641.
- [72] FISHER R, LUSTIG Y, SKLAN E H, SCHWARTZ E. The Role of NS1 Protein in the Diagnosis of Flavivirus Infections [J]. *Viruses*, 2023, 15(2).
- [73] BALMASEDA A, STETTLER K, MEDIALDEA-CARRERA R, COLLADO D, JIN X, ZAMBRANA J V, JACONI S, CAMERONI E, SABORIO S, ROVIDA F, PERCIVALLE E, IJAZ S, DICKS S, USHIRO-LUMB I, BARZON L, SIQUEIRA P, BROWN D W G, BALDANTI F, TEDDER R, ZAMBON M, DE FILIPPIS A M B, HARRIS E, CORTI D. Antibody-based assay discriminates Zika virus infection from other flaviviruses [J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2017, 114(31): 8384-9.
- [74] MEDIALDEA-CARRERA R, LEVY F, CASTANHA P, CARVALHO DE SEQUEIRA P, BRASIL P, LEWIS-XIMENEZ L L, TURTLE L, SOLOMON T, BISPO DE FILIPPIS A M, BROWN D W, GRIFFITHS M J. A Systematic Evaluation of IgM and IgG Antibody Assay Accuracy in Diagnosing Acute Zika Virus Infection in Brazil: Lessons Relevant to Emerging Infections [J]. *Journal of clinical microbiology*, 2021, 59(12): e0289320.
- [75] KELLNER M J, KOOB J G, GOOTENBERG J S, ABUDAYYEH O O, ZHANG F. SHERLOCK: nucleic acid detection with CRISPR nucleases [J]. *Nature protocols*, 2019, 14(10): 2986-3012.
- [76] MUNOZ-JORDAN J L. Diagnosis of Zika Virus Infections: Challenges and Opportunities [J]. *The Journal of infectious diseases*, 2017, 216(suppl_10): S951-s6.

- [77] WHITBECK J C. THOMAS A. KADASH-EDMONDSON K. GRINYO-ESCUER A. STAFFORD L J. CHENG C. LIAO G C. HOLTSBERG F W. AMAN M J. SIMMONS G. DAVIDSON E, DORANZ B J. Antigenicity, stability, and reproducibility of Zika reporter virus particles for long-term applications [J]. *PLoS neglected tropical diseases*, 2020, 14(11): e0008730.
- [78] STEINER J P. BACHANI M. MALIK N. LI W. TYAGI R. SAMPSON K. ABRAMS R P M. KOUSA Y. SOLIS J. JOHNSON T P, NATH A. Neurotoxic properties of the Zika virus envelope protein [J]. *Experimental neurology*, 2023, 367: 114469.
- [79] CHAN K R. ISMAIL A A. THERGARAJAN G. RAJU C S. YAM H C. RISHYA M, SEKARAN S D. Serological cross-reactivity among common flaviviruses [J]. *Frontiers in cellular and infection microbiology*, 2022, 12: 975398.
- [80] 史凤娟. 刘静娴. 温恬. 曾晓燕. 郭喜玲, YONG-JUN 焦 H S H I F-J H L J-X H W T H Z X-Y H G X-L H J. 抗寨卡病毒包膜蛋白单克隆抗体的制备和鉴定 [J]. *江苏预防医学*, 2021, 32(6): 659-61.
- [81] 张经纬. 王晗. 刘靖. 马乐. 李伟. 步志高, 华荣虹. 寨卡病毒结构蛋白基因的原核表达及其多克隆抗体的制备 [J]. *中国动物传染病学报*, 2020, 28(05): 42-7.
- [82] PINDI C. CHIRASANI V R, SENAPATI S. Identifying crucial E-protein residues responsible for unusual stability of Zika virus envelope [J]. *Biophysical journal*, 2021, 120(18): 4041-54.
- [83] AKHRAS S. HERRLEIN M L. ELGNER F. HOLZHAUSER T, HILDT E. ZIKV Envelope Domain-Specific Antibodies: Production, Purification and Characterization [J]. *Viruses*, 2019, 11(8).
- [84] KIM S I. KIM S. SHIM J M. LEE H J. CHANG S Y. PARK S. MIN J Y. PARK W B. OH M D. KIM S, CHUNG J. Neutralization of Zika virus by E protein domain III-Specific human monoclonal antibody [J]. *Biochemical and biophysical research communications*, 2021, 545: 33-9.
- [85] HU H. LIU R. LI Q. WANG J. DENG Q. LU Y. WU Q. CHEN Z, LU J. Development of a neutralizing antibody targeting linear epitope of the envelope protein domain III of ZIKV [J]. *Virus research*, 2021, 306: 198601.

- [86] 何婷. 杨欢. 范凤鸣. 刘杰. 牟建超. 孙艳. 陈智. 代云见. 曾献武, 杨会强. 寨卡病毒 E 蛋白第三结构域的可溶性表达及多克隆抗体的制备 [J]. *中国生物制品学杂志*, 2019, 32(06): 668-72.
- [87] CARRERA J. AKTEPE T E. EARNEST L. CHRISTIANSEN D. WHEATLEY A K. TAN H X. CHUNG A W. COLLETT S. MCPHERSON K. TORRESI J. MACKENZIE J M, SIMMONS C P. Adenovirus vector produced Zika virus-like particles induce a long-lived neutralising antibody response in mice [J]. *Vaccine*, 2023, 41(33): 4888-98.
- [88] GARG H. SEDANO M. PLATA G. PUNKE E B, JOSHI A. Development of Virus-Like-Particle Vaccine and Reporter Assay for Zika Virus [J]. *Journal of virology*, 2017, 91(20).
- [89] KROL E. BRZUSKA G, SZEWCZYK B. Production and Biomedical Application of Flavivirus-like Particles [J]. *Trends in biotechnology*, 2019, 37(11): 1202-16.
- [90] DAI S. ZHANG T. ZHANG Y. WANG H, DENG F. Zika Virus Baculovirus-Expressed Virus-Like Particles Induce Neutralizing Antibodies in Mice [J]. *Virologica Sinica*, 2018, 33(3): 213-26.
- [91] KUADKITKAN A. RAMPHAN S. WORAWICHAWONG S. SORNJAI W. WIKAN N, SMITH D R. Production of Zika Virus Virus-Like Particles [J]. *Methods in molecular biology (Clifton, NJ)*, 2021, 2183: 183-203.
- [92] MALOGOLOVKIN A. DAVIES A. ABOUEHADID S. KERVIEL A. ROY P, FALCONAR A K. Enhanced Zika virus-like particle development using Baculovirus spp. constructs [J]. *Journal of medical virology*, 2023, 95(1): e28252.
- [93] VANG L. MORELLO C S. MENDY J. THOMPSON D. MANAYANI D. GUENTHER B. JULANDER J. SANFORD D. JAIN A. PATEL A. SHABRAM P. SMITH J, ALEXANDER J. Zika virus-like particle vaccine protects AG129 mice and rhesus macaques against Zika virus [J]. *PLoS neglected tropical diseases*, 2021, 15(3): e0009195.
- [94] DE MELLO R G. BERNARDINO T C. GUARDALINI L G O. ASTRAY R M. ANTONIAZZI M M. JARED S G S. NÚÑEZ E G F, JORGE S A C. Zika virus-like particles (VLPs) produced in insect cells [J]. *Frontiers in pharmacology*, 2023, 14: 1181566.

- [95] MAGALHÃES I C L. SOUZA P F N. MARQUES L E C. GIRÃO N M. ARAÚJO F M C, GUEDES M I F. New insights into the recombinant proteins and monoclonal antibodies employed to immunodiagnosis and control of Zika virus infection: A review [J]. *International journal of biological macromolecules*, 2022, 200: 139-50.
- [96] NIIMI T. Recombinant protein production in the eukaryotic protozoan parasite *Leishmania tarentolae*: a review [J]. *Methods in molecular biology (Clifton, NJ)*, 2012, 824: 307-15.
- [97] GRAY D. Overview of protein expression by mammalian cells [J]. *Current protocols in protein science*, 2001, Chapter 5(1): Unit5.9.
- [98] PALOMARES L A. MENA J A, RAMÍREZ O T. Simultaneous expression of recombinant proteins in the insect cell-baculovirus system: production of virus-like particles [J]. *Methods (San Diego, Calif)*, 2012, 56(3): 389-95.
- [99] PENG Z Y. YANG S. LU H Z. WANG L M. LI N. ZHANG H T. XING S Y. DU Y N, DENG S Q. A review on Zika vaccine development [J]. *Pathogens and disease*, 2024.
- [100] SHUKLA R. SHANMUGAM R K. RAMASAMY V. ARORA U. BATRA G. ACKLIN J A. KRAMMER F. LIM J K. SWAMINATHAN S, KHANNA N. Zika virus envelope nanoparticle antibodies protect mice without risk of disease enhancement [J]. (2352-3964 (Electronic)).
- [101] OHST C. SASCHENBRECKER S. STIBA K. STEINHAGEN K. PROBST C. RADZIMSKI C. LATTWEIN E. KOMOROWSKI L. STÖCKER W, SCHLUMBERGER W. Reliable Serological Testing for the Diagnosis of Emerging Infectious Diseases [J]. *Advances in experimental medicine and biology*, 2018, 1062: 19-43.
- [102] SINGH T. HWANG K K. MILLER A S. JONES R L. LOPEZ C A. DULSON S J. GIUBERTI C. GLADDEN M A. MILLER I. WEBSTER H S. EUDAILEY J A. LUO K. VON HOLLE T. EDWARDS R J. VALENCIA S. BURGOMASTER K E. ZHANG S. MANGOLD J F. TU J J. DENNIS M. ALAM S M. PREMKUMAR L. DIETZE R. PIERSON T C. OOI E E. LAZEAR H M. KUHN R J. PERMAR S R, BONSIGNORI M. A Zika virus-specific IgM elicited in pregnancy exhibits ultrapotent neutralization [J]. *Cell*, 2022, 185(25): 4826-40.e17.

- [103] GRANGER D. HILGART H. MISNER L. CHRISTENSEN J. BISTODEAU S. PALM J. STRAIN A K. KONSTANTINOVSKI M. LIU D. TRAN A, THEEL E S. Serologic Testing for Zika Virus: Comparison of Three Zika Virus IgM-Screening Enzyme-Linked Immunosorbent Assays and Initial Laboratory Experiences [J]. *Journal of clinical microbiology*, 2017, 55(7): 2127-36.
- [104] SIRIKAJORN PAN K. SUNTARATTIWONG P. SUWANPAKDEE D. TABPRASIT S. BUDDHARI D. THAISOMBOONSUK B. KLUNGTHONG C. POOLPANICHUPATAM Y. BUATHONG R. SRIKIATKHACHORN A. JONES A. FERNANDEZ S, HUNSAWONG T. Standardization and Evaluation of an Anti-ZIKV IgM ELISA Assay for the Serological Diagnosis of Zika Virus Infection [J]. *The American journal of tropical medicine and hygiene*, 2021, 105(4): 936-41.
- [105] SARKER A. DHAMA N, GUPTA R D. Dengue virus neutralizing antibody: a review of targets, cross-reactivity, and antibody-dependent enhancement [J]. *Frontiers in immunology*, 2023, 14: 1200195.
- [106] ZHANG H. ZHANG L. LIN A. XU C. LI Z. LIU K. LIU B. MA X. ZHAO F. JIANG H. CHEN C. SHEN H. LI H. MATHEWS D H. ZHANG Y, HUANG L. Algorithm for optimized mRNA design improves stability and immunogenicity [J]. *Nature*, 2023, 621(7978): 396-403.
- [107] KAUR J. KUMAR A, KAUR J. Strategies for optimization of heterologous protein expression in E. coli: Roadblocks and reinforcements [J]. (1879-0003 (Electronic)).
- [108] 朱盈霏. 陈雅婧. 李越香. 叶伟. 刘赫. 张慧. 党品香. 王思雨. 吕欣. 雷迎峰. 张芳琳. 姚敏 空, 西北大学生命科学院. 肠道病毒 71 型衣壳蛋白 1(VP1)单克隆抗体制备 [J]. *细胞与分子免疫学杂志*, 2022, 38(03): 268-74 %@ 1007-8738 %L 61-1304/R.
- [109] WANGKANONT K. FOREST K T, KIESSLING L L. The non-detergent sulfobetaine-201 acts as a pharmacological chaperone to promote folding and crystallization of the type II TGF- β receptor extracellular domain [J]. *Protein expression and purification*, 2015, 115: 19-25.
- [110] 丁晨曦. 朱旭辉. 艾乐乐. 叶福强. 谭伟龙. 胡丹. 陈家锋. 郭晓璐. 潘秀珍. 王长军. 寨卡病毒 E 蛋白及第三结构域的原核表达和多克隆抗体制备 [J]. *中国动物传染病学报*,

- 2018, 34(01): 23-8.
- [111] RIBEIRO MOTA SOUZA R. CAMPOS G S. HUGHES CARVALHO R. BRANDÃO PEIXOTO I. SANTOS GALANTE R. SANTANA MOREIRA L. BEUTINGER MARCHIORO S. JOSÉ MEYER NASCIMENTO R, SARDI S I. Production and Characterization of Two Specific ZIKV Antigens Based on Bioinformatic Analysis and Serological Screening [J]. *Immunological investigations*, 2023, 52(4): 454-66.
- [112] RONG H. QI M. PAN J. SUN Y. GAO J. ZHANG X. LI W. ZHANG B. ZHANG X E, CUI Z. Self-Assembling Nanovaccine Confers Complete Protection Against Zika Virus Without Causing Antibody-Dependent Enhancement [J]. *Frontiers in immunology*, 2022, 13: 905431.
- [113] MALI D N, BONDRE V P. Japanese encephalitis genotype I virus-like particles stably expressed in BHK-21 cells serves as potential antigen in JE IgM ELISA [J]. *Applied microbiology and biotechnology*, 2022, 106(5-6): 1945-55.
- [114] GRAY D, SUBRAMANIAN S. Choice of cellular protein expression system [J]. *Current protocols in protein science*, 2001, Chapter 5: Unit5.16.
- [115] CHAMBERS A C. AKSULAR M. GRAVES L P. IRONS S L. POSSEE R D, KING L A. Overview of the Baculovirus Expression System [J]. *Current protocols in protein science*, 2018, 91: 5.4.1-5.4.6.
- [116] IRONS S L. CHAMBERS A C. LISSINA O. KING L A, POSSEE R D. Protein Production Using the Baculovirus Expression System [J]. *Current protocols in protein science*, 2018, 91: 5..1-5..22.
- [117] HITCHMAN R B. LOCANTO E. POSSEE R D, KING L A. Optimizing the baculovirus expression vector system [J]. *Methods (San Diego, Calif)*, 2011, 55(1): 52-7.
- [118] SARI D. GUPTA K. THIMIRI GOVINDA RAJ D B. AUBERT A. DRNCOVÁ P. GARZONI F. FITZGERALD D, BERGER I. The MultiBac Baculovirus/Insect Cell Expression Vector System for Producing Complex Protein Biologics [J]. *Advances in experimental medicine and biology*, 2016, 896: 199-215.
- [119] CARPENTIER D C. GRIFFITHS C M, KING L A. The baculovirus P10 protein of *Autographa californica* nucleopolyhedrovirus forms two distinct cytoskeletal-like structures

- p and associates with polyhedral occlusion bodies during infection [J].
- Virology*
- ,
- 2008**
- , 371(2): 278-91.
- [120] MURPHY C I, PIWNICA-WORMS H. Overview of the baculovirus expression system [J]. *Current protocols in neuroscience*, 2001, Chapter 4: Unit 4.18.
- [121] LIMA T M. SOUZA M O, CASTILHO L R. Purification of flavivirus VLPs by a two-step chromatographic process [J]. *Vaccine*, 2019, 37(47): 7061-9.
- [122] DANTAS-LIMA J J. CORTEEL M. CORNELISSEN M. BOSSIER P. SORGELOOS P, NAUWYNCK H J. Purification of white spot syndrome virus by iodixanol density gradient centrifugation [J]. *Journal of fish diseases*, 2013, 36(10): 841-51.
- [123] NASUKAWA T. UCHIYAMA J. TAHARAGUCHI S. OTA S. UJIHARA T. MATSUZAKI S. MURAKAMI H. MIZUKAMI K, SAKAGUCHI M. Virus purification by CsCl density gradient using general centrifugation [J]. *Archives of virology*, 2017, 162(11): 3523-8.
- [124] MORTIMER M. PETERSEN E J. BUCHHOLZ B A, HOLDEN P A. Separation of Bacteria, Protozoa and Carbon Nanotubes by Density Gradient Centrifugation [J]. *Nanomaterials (Basel, Switzerland)*, 2016, 6(10).
- [125] RODRIGUES JARDIM B. TRAN-NGUYEN L T T. GAMBLEY C. RODONI B, CONSTABLE F E. Iodixanol density gradients as an effective phytoplasma enrichment approach to improve genome sequencing [J]. *Frontiers in microbiology*, 2022, 13: 937648.

附录 A: ZIKV-Eecto 基因序列

CCCATGGGCCGTTGCATCGGTGTTTCTAACC GCGATTTTGTGGAAGGCAT
GAGCGGTGGTACCTGGGTCGACGTTGTACTGGAACATGGTGGTTGCGTTACC
GTGATGGCACAGGATAAGCCGACCGTTGACATTGAACTGGTTACCACCACCG
TATCTAACATGGCTGAGGTTTCGTTCTACTGTTACGAGGCTTCTATCTCCGAT
ATGGCGTCTGACAGCCGCTGCCCAACTCAGGGTGAAGCTTACCTGGACAAAC
AGTCTGACACCCAGTACGTGTGTAAACGTACCCTGGTAGACCGCGGCTGGGG
CAATGGTTGCGGCCTGTTTGGTAAAGGCTCCCTGGTGACCTGCGCGAAATTC
GCGTGTTCCAAAAAATGACCGGTAAATCTATCCAGCCGAAAACCTGGAAT
ACCGTATCATGCTGTCTGTGCACGGCTCCCAGCACTCTGGTATGATCGTGAAC
GACACGGGTCACGAAACCGATGAAAACCGTGCGAAAGTGGAATCACCCCT
AACTCCCCGCGTGCCGAAGCGACGCTGGGCGGCTTCGGCTCCCTGGGTCTGG
ACTGCGAGCCTCGTACGGGTCTGGACTTCTCCGACCTGTACTACCTGACTATG
AACAACAAACACTGGCTGGTTCACAAGGAATGGTTTCACGACATCCCGCTGC
CGTGGCACGCCGGCGCAGACACGGGCACCCCGCACTGGAACAACAAAGAGG
CGCTGGTGGAATTCAAAGACGCTCATGCAAAACGTCAGACCGTTGTTGTGCT
GGGTTCACAGGAAGGTGCCGTTACACCGCACTGGCCGGCGCACTGGAAGCA
GAAATGGATGGTGCGAAAGGTCGCCTGTCTTCCGGCCACCTGAAATGCCGCC
TGAAAATGGACAAACTGCGTCTGAAAGGTGTATCCTATTCTCTGTGTACTGCT
GCATTCACCTTTACCAAAATTCCGGCGGAAACCCTGCACGGTACCGTGACCG
TAGAAGTGCAGTACGCCGGCACGGATGGCCCGTGCAAAGTCCCAGCGCAGA
TGGCTGTGACATGCAGACGCTGACCCCGGTGGGTCGTCTGATCACTGCTAA
TCCGGTAATCACTGAATCTACTGAAAATTCTAAGATGATGCTGGAGCTGGAC
CCGCCGTTCCGGCGACTCTTACATCGTTATCGGCGTTGGCGAGAAAAAATCA
CGCATCACTGGCACCGTTCCTAACTCGAGGG

附录 B: ZIKV-Ecto 基因合成 Oligos

序号	碱基序列 5'-3'	长度 (bp)
Oligo_1	CCCATGGGCCGTTGCATCGGTGTTTCTAACCGC GATTTTGTGGAAGGCATGAGCGGTG	58
Oligo_2	AACGCAACCACCATGTTCCAGTACAACGTCGA CCCAGGTACCACCGCTCATGCCTTCC	58
Oligo_3	CTGGAACATGGTGGTTGCGTTACCGTGATGGC ACAGGATAAGCCGACCGTTGACATTG	58
Oligo_4	CCTCAGCCATGTTAGATACGGTGGTGGTAACC AGTTCAATGTCAACGGTCGGCTTATC	58
Oligo_5	CCGTATCTAACATGGCTGAGGTTTCGTTCTACT GTTACGAGGCTTCTATCTCCGATAT	58
Oligo_6	TTCACCCTGAGTTGGGCAGCGGCTGTCAGAC GCCATATCGGAGATAGAAGCCTCGTAA	58
Oligo_7	CTGCCCAACTCAGGGTGAAGCTTACCTGGAC AAACAGTCTGACACCCAGTACGTGTGT	58
Oligo_8	CAACCATTGCCCCAGCCGCGGTCTACCAGGGT ACGTTTACACACGTACTGGGTGTCAG	58
Oligo_9	GGCTGGGGCAATGGTTGCGGCCTGTTTGGTAA AGGCTCCCTGGTGACCTGCGCGAAAT	58
Oligo_10	GCTGGATAGATTTACCGGTCATTTTTTTGGAAC ACGCGAATTTGCGCGCAGGTCACCAG	58
Oligo_11	AAATGACCGGTAAATCTATCCAGCCGGAAC CTGGAATACCGTATCATGCTGTCTGT	58
Oligo_12	GTTACGATCATACCAGAGTGCTGGGAGCCGT GCACAGACAGCATGATACGGTATTCC	58
Oligo_13	GCACTCTGGTATGATCGTGAACGACACGGGTC ACGAAACCGATGAAAACCGTGCGAAA	58

Oligo_14	CTTCGGCACGCGGGGAGTTAGGGGTGATTTCC ACTTTCGCACGGTTTTTCATCGGTTTC	58
Oligo_15	CCCCGCGTGCCGAAGCGACGCTGGGCGGCTT CGGCTCCCTGGGTCTGGACTGCGAGCC	58
Oligo_16	ATAGTCAGGTAGTACAGGTCGGAGAAGTCCA GACCCGTACGAGGCTCGCAGTCCAGAC	58
Oligo_17	CCGACCTGTACTACCTGACTATGAACAACAAA CACTGGCTGGTTCACAAGGAATGGTT	58
Oligo_18	TCTGCGCCGGCGTGCCACGGCAGCGGGATGT CGTGAAACCATTCCTTGTGAACCAGCC	58
Oligo_19	GCACGCCGGCGCAGACACGGGCACCCCGCAC TGGAACAACAAAGAGGCGCTGGTGGAA	58
Oligo_20	CACAACAACGGTCTGACGTTTTGCATGAGCGT CTTTGAATTCCACCAGCGCCTCTTTG	58
Oligo_21	CAAAACGTCAGACCGTTGTTGTGCTGGGTTCC CAGGAAGGTGCCGTTACACCCGCACT	58
Oligo_22	GACCTTTCGCACCATCCATTTCTGCTTCCAGTG CGCCGGCCAGTGCGGTGTGAACGGC	58
Oligo_23	GAAATGGATGGTGCGAAAGGTCGCCTGTCTTC CGGCCACCTGAAATGCCGCCTGAAAA	58
Oligo_24	GAGAATAGGATACACCTTTCAGACGCAGTTTG TCCATTTTCAGGCGGCATTTCAAGTG	58
Oligo_25	GTCTGAAAGGTGTATCCTATTCTCTGTGTACTG CTGCATTCACCTTTACCAAAATTCC	58
Oligo_26	TCTACGGTCACGGTACCGTGCAGGGTTTCCGC CGGAATTTTGGTAAAGGTGAATGCAG	58
Oligo_27	CGGTACCGTGACCGTAGAAGTGCAGTACGCC GGCACGGATGGCCCGTGCAAAGTCCCA	58

Oligo_28	CCCACCGGGGTCAGCGTCTGCATGTCGACAG CCATCTGCGCTGGGACTTTGCACGGGC	58
Oligo_29	GCTGACCCCGGTGGGTCGTCTGATCACTGCTA ATCCGGTAATCACTGAATCTACTGAA	58
Oligo_30	ACGGCGGGTCCAGCTCCAGCATCATCTTAGAA TTTTCAGTAGATTCAAGTGATTACCGG	58
Oligo_31	GAGCTGGACCCGCCGTTTCGGCGACTCTTACAT CGTTATCGGCGTTGGCGAGAAAAAAA	58
Oligo_32	CCCTCGAGTTAGGAACGGTGCCAGTGATGCGT GATTTTTTTCTCGCCAACGCCGATAA	58

附录 C: ZIKV-prME 优化后序列

GCCGCTGCTATGGGACGCAAACAAAATAAGAGAGGGGGCAATGAGGGGAGT
ATCATGTGGTTGGCTAGCCTGGCAGCAGTCATTGCTTGCGCAGGAGCCGCAG
AGGTAACCAGAAGAGGGGAGCGCGTATTATATGTACCTTGATCGAAACGACGC
AGGGGAGGCGATCAGTTTTCCGACAACACTGGGTATGAATAAGTGTTATATT
CAGATCATGGACTTGGGACATATGTGTGACGCAACCATGAGCTACGAGTGCC
CTATGCTGGATGAAGGGGTCGAGCCAGATGACGTCGATTGTTGGTGCAACAC
AACATCTACATGGGTCGTGTACGGAACATGCCACCACAAGAAGGGCGAAGC
TCGGCGGAGTAGGAGAGCAGTCACACTGCCTTCACATTCAACTCGGAAGCTG
CAAACCCGCAGTCAAACCTGGCTGGAAAGTCGCGAATATACAAAGCACCTCA
TCCGCGTCGAAAACCTGGATATTTCCGAATCCGGGCTTCGCCCTGGCAGCCGC
TGCCATTGCGTGGCTGCTCGGATCTTCTACTTCTCAAAGGTGATCTATTTGG
TGATGATTCTGTTGATTGCGCCTGCATACTCCATTAGATGCATTGGAGTTAGC
AACAGAGATTTCTGTGGAGGGGATGTCTGGCGGCACATGGGTGGACGTTGTCC
TGGAGCACGGAGGGTGTGTTACAGTTATGGCCCAGGACAAACCTACAGTGGA
TATAGAGCTGGTGACCACAACTGTGAGCAATATGGCAGAGGTTAGAAGCTAT
TGTTATGAAGCTTCTATTTCCGACATGGCCTCCGACAGCCGCTGTCCAGCCGG
CGGCGAAGCATATCTTGACAAGCAGAGTGATACACAGTATGTATGCAAAAG
AACTCTTGTCGATCGAGGCCGGGGCAACGGTTGTGGACGGTTCGGGAAAGGC
AGCTTGGTCACGTGCGCCAAATTCGCCTGCTCAAAGAAAATGACAGGAAAGT
CCATCCAGCCTGAGAACTTGGAGTATCGCATTATGCTGAGCGTTCATGGATC
CCAGCATAGCGGCATGATTGTCAATGATACCGGACACGAGACCGACGAAAA
CAGAGCCAAGGTGGAGATAACCCCCAATTCACCAAGGGCTGAGGCCACCCT
GGGAGGTTTTGGAAGTCTTGGCCTTGACTGCGAACCAGAACCGGCCTCGAT
TTTTCAGACCTGTACTATCTCACAATGAACAATAAGCACTGGCTGGTGCATA
AGGAGTGGTTCCATGACATTCCCCTCCCCTGGCATGCCGGCGCTGACACTGG
TACCCCCCATTGGAATAACAAGGAAGCTCTGGTCGAGTTCAAGGACGCGCAT
GCAAAGCGCCAAACTGTGGTGGTGCTGGGCAGCCAGGAGGGAGCCGTCCAT

ACTGCACTCGCCGGAGCCCTCGAGGCCGAAATGGACGGCGCTAAGGGCCGA
CTTTCCAGTGGCCACCTTAAGTGTAGGCTGAAGATGGATAAACTGCGGCTGA
AAGGAGTGAGTTACTCCCTGTGCACAGCAGCCTTCACTTTTACCAAAATTCCC
GCCGAGACCTTGCACGGTACTGTCACGGTGGAGGTGCAATACGCCGGAACCG
ACGGCCCTTGCAAAGTGCCCGCGCAAATGGCTGTCGACATGCAGACTCTCAC
ACCAGTTGGTCGATTGATCACAGCCAACCCTGTGATTACCGAATCAACCGAA
AATTCAAAGATGATGCTGGAAGTGGACCCGCCCTTCGGAGACAGCTATATCG
TGATTGGCGTGGGGGAAAAGAAGATCACCCATCATTGGCATAGGAGCGGCA
GCACCTTGGGCAAGGCCTTCAGCACCACCCTGAAGGGGGCCCAGCGCCTGGC
CGCACTGGGCGATACCGCATGGGATTTTCGGATCAATAGGTGGCGTGTTC AAC
TCTATTGGCAAGGCAGTCCACCAGGTCTTCGGGGGAGCCTTCCGGACCTTGTT
CGGGGGCATGAGCTGGATTACCCAGGGTCTGATGGGGGCCCTGCTTCTCTGG
ATGGGAGTGAACGCCAGGGATCGCTCCATCGCCCTTGCATTCCTGGCTACCG
GGGGTGTGCTGGTCTTTCTTGCTACAAATGTACACGCCTAA

附录 D：测序比对结果图

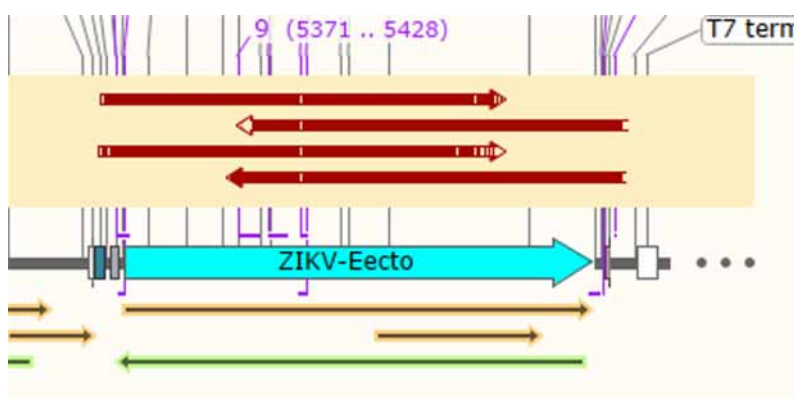


图 D1: pET28a-ZIKV-Ecto 测序结果

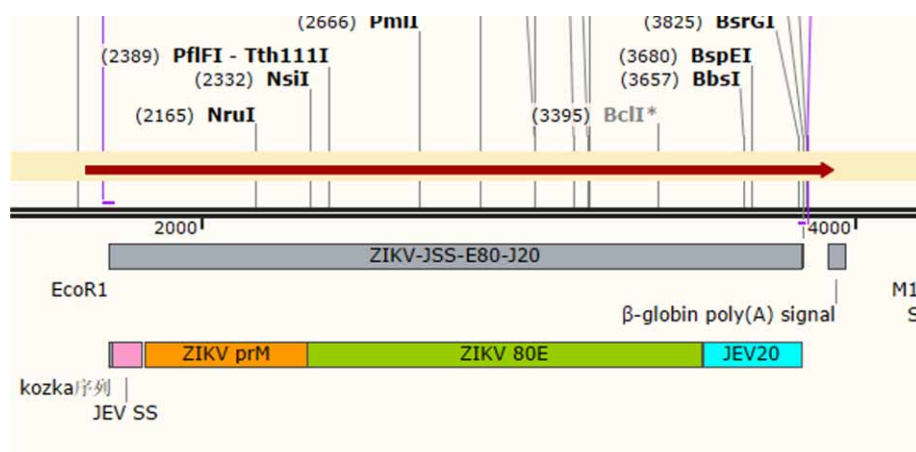


图 D2: pCAGGs-ZIKV-prME 测序结果

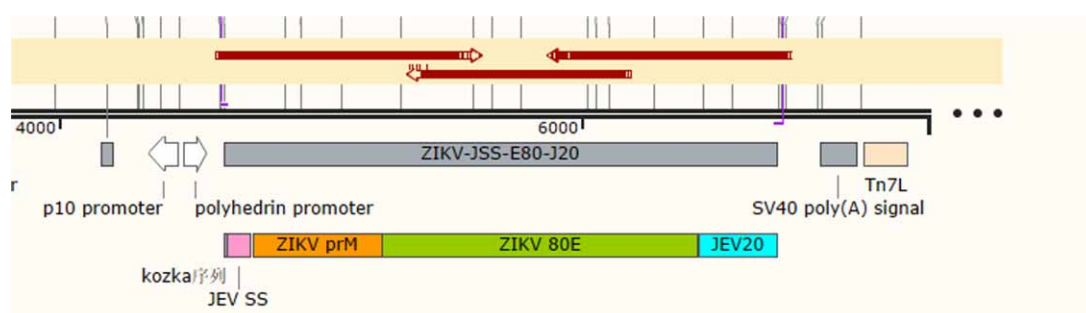


图 D3: pFAST-ZIKV-prME 测序结果

附录 E：序列扩增引物

pET28a-ZIKV-Ecto-F:

5'AGAAGGAGATATAACCATGGGCCGTTGCATCGGTGTTTC'3

pET28a-ZIKV-Ecto-R:

5'GCCGCAAGCTTGTCTGACTTAGGAACGGTGCCAGTGAT'3

pCAGGs-ZIKV-prME-F:

5'TCTCATCATTTTGGCAAAGGCCGCTGCTATGGGACG'3

pCAGGs-ZIKV-prME-R:

5'GATCTGCTAGCTCGATTAGGCGTGTACATTTG'3

pFast-ZIKV-prME-F:

5'GAAGCGCGCGGAATTCGCCGCTGCTATGGGA'3

pFast-ZIKV-prME-R:

5'GATTCGAAAGCGGCCGCTTAGGCGTGTACATTTG'3