

本文引用:徐飞,冯继伟,李鹏,等.流行性乙型脑炎病毒 SA14-14-2 株囊膜蛋白的原核表达及其兔抗血清的制备[J].新乡医学院学报,2022,39(2):101-105. DOI:10.7683/xyxyxb.2022.02.001.

【基础研究】

流行性乙型脑炎病毒 SA14-14-2 株囊膜蛋白的原核表达及其兔抗血清的制备

徐飞¹,冯继伟¹,李鹏²,孟玉娇¹,陈玉明¹,王龙康¹,王寅彪¹

(1.新乡医学院公共卫生学院,河南 新乡 453003;2.新乡学院生命科学与基础医学学院,河南 新乡 453003)

摘要: 目的 表达流行性乙型脑炎病毒(EEBV)的囊膜蛋白(E蛋白),制备该蛋白特异性兔抗血清,为建立诊断 EEBV 感染的检测方法奠定基础。方法 将 pET32a-E 质粒转化大肠杆菌 BL21(DE3)细胞,以终浓度为 $0.5\text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的异丙基- β -D-硫代半乳糖苷于 $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ 下诱导蛋白表达 8 h,在 $8\text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 尿素变性条件下,采用镍离子金属螯合亲和层析法对重组 E 蛋白进行纯化。透析复性后,以 E 蛋白为免疫原免疫新西兰兔制备兔抗血清,采用 Western blot、酶联免疫吸附试验和免疫荧光分析法检测免疫血清中 EEBV 特异性抗体。结果 成功表达了重组 E 蛋白,经纯化、复性后可从 1 L 培养物中获得 23.8 mg 具有生物活性的 E 蛋白,该蛋白能与抗 EEBV 单抗发生特异反应。免疫制备的兔抗血清能与 E 蛋白发生特异反应,抗体效价高达 $1 \times 51\ 200$;兔抗血清能与 EEBV 感染的细胞发生特异反应。结论 成功表达了 EEBV E 蛋白并制备了特异性强、亲和力高的兔抗血清,为建立诊断 EEBV 感染的免疫学检测方法、有效防控流行性乙型脑炎奠定了基础。

关键词: 流行性乙型脑炎病毒;囊膜蛋白;原核表达;兔抗血清

中图分类号: R183.5 **文献标志码:** A **文章编号:** 1004-7239(2022)02-0101-05

Prokaryotic expression of envelope protein of epidemic encephalitis B virus strain SA14-14-2 and preparation of its specific rabbit anti-sera

XU Fei¹, FENG Jiwei¹, LI Peng², MENG Yujiao¹, CHEN Yuming¹, WANG Longkang¹, WANG Yinbiao¹

(1. School of Public Health, Xinxiang Medical University, Xinxiang 453003, Henan Province, China; 2. School of Life Sciences and Basic Medicine, Xinxiang University, Xinxiang 453003, Henan Province, China)

Abstract: **Objective** To express the envelope protein (E protein) of epidemic encephalitis B virus (EEBV) and prepare its rabbit anti-sera in order to provide the foundation for the establishment of detection methods for the diagnosis of EEBV infection. **Methods** pET32a-E plasmid was transformed into *Escherichia coli* BL21 (DE3) cells. The protein expression was induced by isopropyl- β -D-thiogalactoside with a final concentration of $0.5\text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ at $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ for 8 hours, the recombinant E protein was purified by using nickel-charged nitrilotriacetic acid affinity chromatography under the condition of denaturation with $8\text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ of urea. After renaturation by dialysis, New Zealand rabbits were immunized with E protein as immunogen to prepare rabbit anti-sera. The specific antibodies of EEBV in immune serum were detected by Western blot, enzyme-linked immunosorbent assay and immunofluorescence analysis. **Results** The recombinant E protein was successfully expressed. After purification and renaturation, 23.8 mg of bioactive E protein was harvested from 1 liter of bacterial cell culture. The protein could react specifically with anti-EEBV monoclonal antibody. The rabbit anti-sera prepared by immunization could react specifically with E protein, and the antibody titer reached $1 \times 51\ 200$; The rabbit anti-sera could react specifically with EEBV infected cells. **Conclusion** Recombinant E protein was successfully expressed and rabbit anti-sera against E protein with strong specificity and high affinity was produced, which provide the foundation for the development of immunoassays to detect EEBV infection and effective prevention and control of epidemic encephalitis B.

Key words: epidemic encephalitis B virus; envelope protein; prokaryotic expression; rabbit anti-sera

流行性乙型脑炎是由流行性乙型脑炎病毒

(epidemic encephalitis B virus, EEBV) 感染引起的一种经蚊虫传播的急性人畜共患病^[1],在我国流行性乙型脑炎发病率为(2~10)/10万,其临床表现以头痛、高热、呕吐、意识障碍、呼吸衰竭等中枢神经系统感染症状为主要特征,病死率较高^[2-3]。近年来,随着疫苗的广泛使用,流行性乙型脑炎在我国的整体发病率有所下降,但其在西南部农村地区的发病率仍然较高,是重要的公共卫生问题^[4]。开展大规

DOI:10.7683/xyxyxb.2022.02.001

收稿日期:2020-12-17

基金项目:河南省重点研发与推广专项(编号:212102310335, 202102110094);河南省本科高校省级大学生创新创业训练计划项目(编号:S202110472042);新乡医学院2019年大学生自然科学类科研课题资助(编号:xyxskyz201924)。

作者简介:徐飞(1997-),男,河南濮阳人,新乡医学院公共卫生学院2017级卫生检验与检疫专业学生。

通信作者:王寅彪(1986-),男,河南新乡人,博士,副教授,研究方向:卫生检验与检疫;E-mail:wangyinbiao118@163.com。

模抗体筛查以确定人群感染和免疫情况,对于防控流行性乙型脑炎具有重要意义。本研究利用大肠杆菌原核表达系统表达了 EEBV 的囊膜(envelope, E)蛋白,并通过免疫印迹(Western blot)、酶联免疫吸附试验(enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA)及免疫荧光分析(immunofluorescence assay, IFA)对 E 蛋白的免疫原性进行了评价,旨在为建立诊断 EEBV 感染的免疫学检测方法提供参考。

1 材料与方法

1.1 动物 3 只健康雌性新西兰大白兔购自郑州大学实验动物中心,分笼饲养于新乡医学院公共卫生学院实验动物房,实验过程中均以正常饲料喂养,动物免疫实验获得新乡医学院伦理委员会同意(伦理审查批件号:XYLL-2020018)。

1.2 病毒、质粒与细胞株 EEBV 病毒株 SA14-14-2、仓鼠肾细胞(baby hamster kidney cell line, BHK)-21、载有 E 蛋白基因片段(1~1 248 碱基对)的 pET32a-E 质粒由河南省动物免疫学重点实验室提供,大肠杆菌 BL21(DE3)感受态细胞由本实验室制备保存。

1.3 主要试剂与仪器 抗 EEBV 单克隆抗体由河南省动物免疫学重点实验室提供,氨苄青霉素购自美国 Amresco 公司,镍离子金属螯合亲和层析介质(nickel-charged nitrilotriacetic acid, Ni-NTA)购自美国 ThermoFisher 公司,异丙基- β -D-硫代半乳糖苷(isopropyl- β -D-thiogalactoside, IPTG)购自德国 Merck 公司,化学发光法(enhanced chemiluminescence, ECL)检测试剂盒、3,3',5,5'-四甲基联苯胺(3,3',5,5'-tetramethylbenzidine, TMB)购自北京索莱宝科技有限公司,辣根过氧化物酶(horseradish peroxidase, HRP)标记的山羊抗兔免疫球蛋白 G(immunoglobulin G, IgG)、山羊抗小鼠 IgG 及异硫氰酸荧光素(fluorescein isothiocyanate, FITC)标记的山羊抗兔 IgG、山羊抗小鼠 IgG 购自英国 Abcam 公司。

1.4 EEBV E 蛋白生物化学特性分析 利用 DNASTar 软件中的蛋白质序列分析模块(Protean)分析 E 蛋白的二级结构、抗原性、亲水性等生物化学特性。

1.5 pET32a-E 质粒转化 在冰浴中缓慢融解大肠杆菌 BL21(DE3)感受态细胞(100 μ L),待细胞完全融解后,向其中加入 1 μ L pET32a-E 质粒(10 mg \cdot L⁻¹),轻轻用手指弹动离心管以混匀细菌和质粒,在冰浴中静置 30 min 后,将离心管置于 42 $^{\circ}$ C 水浴热激 90 s,然后快速将离心管转入冰浴中静置 10 min,向离心管中加入 900 μ L LB 液体培养

基,37 $^{\circ}$ C 摇床振荡培养 2 h,5 000 r \cdot min⁻¹ 离心 5 min,弃去 800 μ L 上清。之后,使用剩余培养基重悬管底的菌体沉淀并将重悬液加至含 50 mg \cdot L⁻¹ 氨苄青霉素的 LB 培养基固体平板上,使用无菌弯头玻璃棒轻轻将细胞均匀涂开,然后将平板倒置放于 37 $^{\circ}$ C 培养箱中培养 16 h,次日,挑取单一菌落,于 LB 液体培养基中扩增培养后,进行 E 蛋白的诱导表达。

1.6 EEBV E 蛋白表达与纯化 将 10 mL 转化有 pET32a-E 质粒的大肠杆菌 BL21(DE3)感受态细胞接种于 1 L 含 50 mg \cdot L⁻¹ 氨苄青霉素的 LB 液体培养基,37 $^{\circ}$ C、250 r \cdot min⁻¹ 摇床摇菌 3~4 h,待菌液在 600 nm 波长处的吸光度(absorbancy, A)值达到 0.4~0.6 时,取 2 mL 菌液作为未诱导对照。向剩余菌液中加入诱导剂 IPTG 至终浓度为 0.5 mmol \cdot L⁻¹,于 37 $^{\circ}$ C、250 r \cdot min⁻¹ 摇床摇菌 8 h,取 2 mL 菌液作为诱导对照;然后,6 000 r \cdot min⁻¹ 离心 20 min,收集菌体沉淀,以 1/10 菌液体积的 10 mmol \cdot L⁻¹ Tris-HCl(pH 8.0)缓冲液重悬沉淀,于冰浴中超声裂解。9 000 r \cdot min⁻¹ 离心 20 min,收集沉淀并使用变性结合缓冲液(100 mmol \cdot L⁻¹ NaH₂PO₄、10 mmol \cdot L⁻¹ Tris-HCl、8 mol \cdot L⁻¹ 尿素,pH 8.0)溶解沉淀;之后,在变性条件下采用 Ni-NTA 亲和层析法纯化重组 E 蛋白:首先,使用 2 mL 变性结合缓冲液平衡 Ni-NTA 亲和层析柱,然后将 2 mL 变性样品加入层析柱,使 E 蛋白与 Ni-NTA 介质发生亲和结合,再以 8 倍柱床体积的变性洗涤缓冲液(100 mmol \cdot L⁻¹ NaH₂PO₄、10 mmol \cdot L⁻¹ Tris-HCl、8 mol \cdot L⁻¹ 尿素,pH 6.3)洗涤层析柱,最后以 3 倍柱床体积的变性洗脱缓冲液(100 mmol \cdot L⁻¹ NaH₂PO₄、10 mmol \cdot L⁻¹ Tris-HCl、8 mol \cdot L⁻¹ 尿素,pH 4.5)洗脱目的蛋白,收集各组分进行十二烷基硫酸钠聚丙烯酰胺凝胶电泳(sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis, SDS-PAGE)检测蛋白纯度。之后,将变性蛋白液装入透析袋并依次置于含 7、6、4、2、1、0 mmol \cdot L⁻¹ 尿素的复性缓冲液(100 mmol \cdot L⁻¹ NaH₂PO₄、10 mmol \cdot L⁻¹ Tris-HCl,pH 8.0)中,于 4 $^{\circ}$ C 下进行透析复性。在每种缓冲液中透析 4 h,最后以 9 000 r \cdot min⁻¹ 离心 10 min,收集上清,于 -80 $^{\circ}$ C 保存备用。

1.7 Western blot 法检测重组 E 蛋白的生物活性

将按上述方法培养收集的未诱导和诱导菌体沉淀按 1/10 菌液体积的比例重悬于 Tris-HCl 缓冲液中,进行 SDS-PAGE 电泳。之后,通过半干法将蛋白转移至聚偏二氟乙烯(polyvinylidene fluoride, PVDF)膜,将 PVDF 膜置于 50 g \cdot L⁻¹ 的脱脂奶中,37 $^{\circ}$ C 封

闭1 h,使用含体积分数0.05%吐温-20的磷酸盐缓冲液(phosphate buffered saline containing Tween-20, PBST)洗涤3次后,加入抗EEBV单抗,37℃反应1 h,使用PBST洗涤6次后,加入HRP标记的山羊抗小鼠IgG于37℃下反应1 h。同上洗涤后,加入ECL试剂进行显影,在预测的相对分子质量处观察蛋白条带,确定其与抗EEBV单抗的反应性。

1.8 EEBV E蛋白兔抗血清的制备和鉴定

1.8.1 EEBV E蛋白兔抗血清的制备 取体质量约2.5 kg的新西兰大白兔,免疫前3 d经耳缘静脉采血制备阴性对照兔血清。首次免疫时,将200 μg复性后的E蛋白与弗氏完全佐剂混合乳化,以1.0 mL的剂量进行皮内及皮下注射免疫;再次免疫时使用相同剂量的E蛋白与弗氏不完全佐剂进行乳化,同上注射免疫。后续免疫均使用弗氏不完全佐剂乳化E蛋白,以4周作为免疫间隔共进行4次免疫后,经耳缘静脉采血1.0 mL,采用ELISA法测定抗体效价,采用IFA法检测兔抗血清与EEBV的反应性。之后进行心脏采血,4 000 r·min⁻¹离心20 min,收集血清,-80℃保存。

1.8.2 ELISA法测定兔抗血清抗体效价 使用碳酸盐缓冲溶液(pH 9.6)在4℃条件下过夜,将E蛋白包被于ELISA反应孔,次日以PBST洗涤3次后,每孔加满50 g·L⁻¹脱脂奶,37℃作用2 h,然后以二倍稀释法稀释E蛋白兔抗血清和阴性兔血清并加入反应孔,于37℃下反应30 min。PBST洗涤6次,每孔加入1:10 000稀释的HRP标记的山羊抗兔IgG,于37℃下反应30 min。同上洗涤后,加入TMB显色5 min,以2 mol·L⁻¹ H₂SO₄终止反应并使用酶标仪测定A₄₅₀值。每组样品设立3个重复,以样品A₄₅₀平均值与阴性对照A₄₅₀平均值的比值≥2.2作为阳性反应判定依据,兔抗血清的效价为给出阳性反应的最高稀释度的倒数。

1.8.3 IFA法检测兔抗血清与EEBV的反应性

在37℃、体积分数5% CO₂条件下培养BHK-21细胞至汇合度为80%~90%时,接种EEBV SA14-14-2,感染24 h;同时预留未接种EEBV的细胞,继续培养24 h,作为未感染对照。利用预冷的无水乙醇(含体积分数1%~2% H₂O₂)室温固定15 min,每孔加满50 g·L⁻¹的脱脂奶,37℃封闭1 h, PBST洗涤3次后,加入1:1 000稀释的抗EEBV单抗或E蛋白兔抗血清,37℃反应1 h,然后以PBST洗涤6次,向各孔加入1:500稀释的FITC标记的山羊抗小鼠IgG或FITC标记的山羊抗兔IgG,37℃反应1 h, PBST

洗涤6次后,在荧光显微镜下观察结果,出现绿色荧光点时说明抗EEBV单抗或E蛋白兔抗血清与EEBV发生了特异反应。

2 结果

2.1 EEBV E蛋白的生物化学特性 结果见图1。DNASar软件分析表明,E蛋白具有丰富的二级结构,含有较多的α螺旋和β折叠结构,绝大部分区域的抗原指数较高,亲水性较强,抗原指数高低与亲水性强弱具有较高一致性。

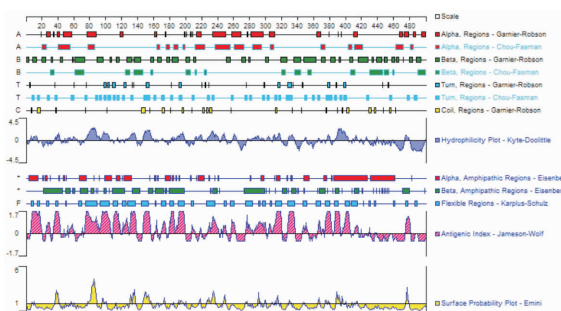
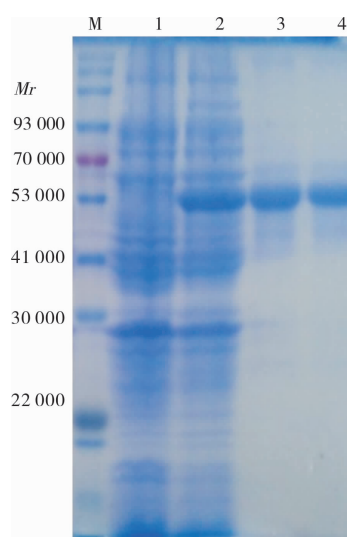


图1 EEBV E蛋白的生物化学特性

Fig.1 Biochemical property of E protein of EEBV

2.2 重组E蛋白的表达与纯化结果 结果见图2。SDS-PAGE鉴定显示,与未诱导对照组相比,IPTG诱导组在相对分子质量约53 000处出现了清晰的特异性条带,与预测的蛋白相对分子质量一致,蛋白经变性纯化后,纯度较高。复性后,从1 L培养物获得了23.8 mg E蛋白。

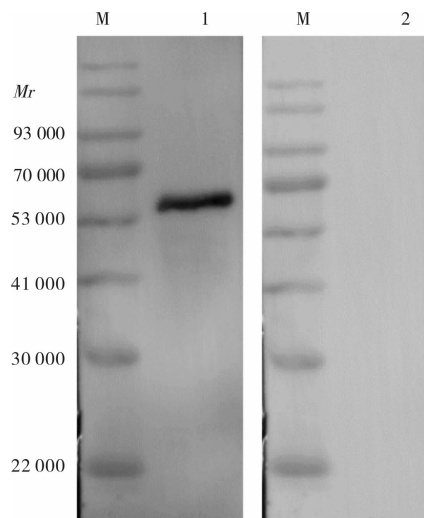


M: 预染蛋白质分子量标准;1:pET32a-E 未诱导;2:pET32a-E 诱导;3,4:纯化后的E蛋白。

图2 E蛋白表达产物与纯化产物的SDS-PAGE分析

Fig.2 Analysis of the expression and purification of E protein by SDS-PAGE

2.3 E 蛋白生物活性检测结果 结果见图 3。未诱导组菌液与抗 EEBV 单抗的反应未出现任何条带,诱导组菌液与抗 EEBV 单抗反应时,在相对分子质量 53 000 处出现了特异性条带,表明抗 EEBV 单抗与重组 E 蛋白发生了特异性反应。



M: 预染蛋白质分子量标准;1:pET32a-E 诱导;2:pET32a-E 未诱导。

图 3 Western blot 法检测 E 蛋白的生物活性

Fig. 3 Bioactivity of recombinant E protein detected by Western blot

2.4 E 蛋白兔抗血清抗体效价测定结果 结果见图 4。ELISA 检测结果显示,阴性兔血清不与 E 蛋白发生反应,制备的兔抗血清能与 E 蛋白在体外发生特异性结合,抗体效价高达 $1 \times 51\,200$ 。

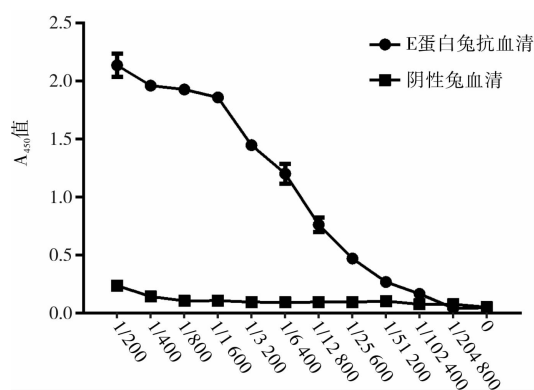
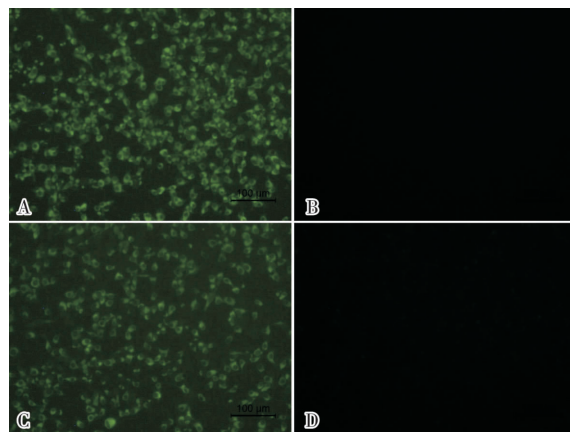


图 4 ELISA 法测定兔抗血清抗体效价

Fig. 4 Antibody titer of rabbit anti-sera measured by using ELISA

2.5 兔抗血清与 EEBV 反应结果 结果见图 5。抗 EEBV 单抗能与 EEBV 感染的 BHK-21 细胞发生特异性反应,不与未接种病毒的细胞反应。同时,兔抗血清能与 EEBV 感染的 BHK-21 细胞发生特异性反应,呈现特异性绿色荧光信号,不与未接毒的细胞发生反应。



A: 抗 EEBV 单抗与接种 EEBV 病毒的 BHK-21 细胞发生反应;B: 抗 EEBV 单抗与正常 BHK-21 细胞不发生反应;C: 兔抗血清与接种 EEBV 病毒的 BHK-21 细胞发生反应;D: 兔抗血清与正常 BHK-21 细胞不发生反应。

图 5 兔抗血清与 EEBV 病毒的反应性 (IFA, $\times 100$)

Fig. 5 Reactivity of rabbit anti-sera with EEBV (IFA, $\times 100$)

3 讨论

流行性乙型脑炎主要分布于东亚、东南亚及太平洋西部地区,每年有 5 万 ~ 10 万人发病^[5]。目前,流行性乙型脑炎仍是我国发病率较高、分布较广、危害较重的蚊媒疾病之一,严重威胁人体健康^[3]。当前尚无治疗流行性乙型脑炎的特异性药物,除了控制蚊虫媒介外,疫苗免疫是防控流行性乙型脑炎最有效的手段^[6-7]。随着流行性乙型脑炎疫苗纳入我国国家免疫规划,儿童流行性乙型脑炎发病率持续下降;但 2014 ~ 2018 年监测数据显示,40 岁以上成人流行性乙型脑炎病例构成比由 14.45% 上升至 64.04%^[8-9]。鉴于此,开展健康人群尤其是高发地区成人人群的流行性乙型脑炎抗体水平监测,对流行性乙型脑炎防控至关重要。EEBV 属于黄病毒科黄病毒属,是一种单股正链 RNA 病毒,基因组长度约 11 kb,编码 3 种结构蛋白和 7 种非结构蛋白^[10]。E 蛋白是 EEBV 重要的结构蛋白,是病毒粒子表面的主要成分,能够诱导机体产生中和抗体,决定着病毒进入细胞的能力、病毒毒力、组织嗜性及血清特异性等^[11-12]。E 蛋白的高效表达对于 EEBV 感染检测以及疫苗免疫水平评价等具有重要意义。

到目前为止,E 蛋白在毕赤酵母、哺乳动物细胞等表达系统中均获得了表达^[13-14]。然而,上述表达系统制备外源蛋白的成本较高,而且产量较低;相对而言,大肠杆菌表达系统具有成本低廉、生产率高、操作简便等优点,故本研究利用大肠杆菌表达系统对 E 蛋白进行了表达。经 IPTG 诱导表达后,在预

测的相对分子质量处出现了特异条带,表明本研究成功表达了 E 蛋白。本研究以终浓度为 $0.5 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的 IPTG 在 37°C 条件下诱导蛋白表达 8 h 后, E 蛋白以包涵体形式表达。包涵体不具有生物活性,因此,为获得具有生物活性的 E 蛋白,本研究对包涵体形式的 E 蛋白进行了复性,复性过程中采用逐渐降低尿素含量的方式进行透析复性,有效避免了因变性剂的含量下降过快导致蛋白再次错误折叠形成沉淀的情况,最终从 1 L 培养物中获得了 23.8 mg 的复性 E 蛋白。为确定复性后的 E 蛋白具有生物活性,本研究利用 Western blot 对复性 E 蛋白与抗 EEBV 单抗的反应性进行了分析,结果发现,复性 E 蛋白能被抗 EEBV 单抗特异识别,表明复性后的 E 蛋白含有与病毒粒子表面天然 E 蛋白相同的表位,具有良好生物活性。为制备特异性好、亲和力高的兔抗血清,本研究以 E 蛋白为免疫原,采用低免疫剂量、长免疫间隔的方式对新西兰兔进行了 4 次免疫;ELISA 检测结果显示,兔抗血清能与 E 蛋白发生特异反应,抗体效价达到 $1 \times 51\,200$,说明表达的 E 蛋白能有效刺激抗体产生,具有良好的免疫原性,同时也表明本研究成功制备了高亲和力的兔抗血清。

此外,原核表达系统往往因为缺少必要的蛋白修饰而导致外源蛋白的结构不同于天然蛋白,为进一步确定表达的 E 蛋白具有和天然蛋白相同的表位,本研究对兔抗血清与 EEBV 的反应性进行了检测,首先以抗 EEBV 单抗与 EEBV 的特异反应为基础建立了有效的 IFA 分析方法,采用此方法对 E 蛋白兔抗血清与 EEBV 的反应性进行分析,结果显示,兔抗血清能够与 EEBV 发生特异反应,说明表达的 E 蛋白含有与天然蛋白相同的表位,也表明本研究制备的兔抗血清特异性强。

综上所述,本研究利用大肠杆菌原核表达系统成功表达了 SA14-14-2 株的 E 蛋白,同时制备了特异性强、亲和力高的兔抗血清,为建立诊断 EEBV 感染的免疫学检测方法准备了材料,为开展健康人群流行性乙型脑炎抗体水平监测、进而更加有效地防控流行性乙型脑炎奠定了基础。

参考文献:

- [1] MULVEY P, DUONG V, BOYER S, *et al.* The ecology and evolution of Japanese encephalitis virus[J]. *Pathogens*, 2021, 10(12):

1534.

- [2] SHARMA K B, VRATI S, KALIA M. Pathobiology of Japanese encephalitis virus infection[J]. *Mol Aspects Med*, 2021, 81:100994.
- [3] 刘楠,高永利,谢紫阳,等. 我国流行性乙型脑炎临床流行病学研究现状[J]. 西北国防医学杂志, 2019, 40(6):362-370.
- LIU N, GAO Y L, XIE Z Y, *et al.* Research progress of clinical epidemiology on epidemic encephalitis B[J]. *Med J NDFNC*, 2019, 40(6):362-370.
- [4] ZHANG H, WANG Y, LI K, *et al.* Epidemiology of Japanese encephalitis in China (2004-2015)[J]. *Travel Med Infect Dis*, 2019, 28:109-110.
- [5] TURTLE L, SOLOMON T. Japanese encephalitis-the prospects for new treatments[J]. *Nat Rev Neurol*, 2018, 14(5):298-313.
- [6] DAVIS E H, BECK A S, LI L, *et al.* Japanese encephalitis virus live attenuated vaccine strains display altered immunogenicity, virulence and genetic diversity[J]. *NPJ Vaccines*, 2021, 6(1):112.
- [7] SATCHIDANANDAM V. Japanese encephalitis vaccines[J]. *Curr Treat Options Infect Dis*, 2020, 12:1-12.
- [8] 吴丹,尹遵栋,李军宏,等. 中国 2014-2018 年流行性乙型脑炎流行病学特征[J]. 中国疫苗和免疫, 2020, 26(1):1-4.
- WU D, YIN Z D, LI J H, *et al.* Epidemiology of Japanese encephalitis in China, 2014-2018[J]. *Chin J Vacc Immun*, 2020, 26(1):1-4.
- [9] 王华庆,安志杰,尹遵栋. 国家免疫规划七种针对传染病 70 年防控成就回顾[J]. 中国疫苗和免疫, 2019, 25(4):359-367.
- WANG H Q, AN Z J, YIN Z D. Achievements in prevention and control of seven infectious diseases targeted by the National Immunization Program in China across 70 years [J]. *Chin J Vacc Immun*, 2019, 25(4):359-367.
- [10] ROBERTS A, GANDHI S. Japanese encephalitis virus: a review on emerging diagnostic techniques[J]. *Front Biosci (Landmark Ed)*, 2020, 25:1875-1893.
- [11] ROY U. Structural and molecular analysis of functional epitopes and escape mutants in Japanese encephalitis virus envelope protein domain III[J]. *Immunol Res*, 2020, 68(2):81-89.
- [12] SLATHIA P S, SHARMA P. A common conserved peptide harboring predicted T and B cell epitopes in domain III of envelope protein of Japanese Encephalitis Virus and West Nile Virus for potential use in epitope based vaccines[J]. *Comp Immunol Microbiol Infect Dis*, 2019, 65:238-245.
- [13] GAO N, LI J, SHENG Z, *et al.* Japanese encephalitis virus prM-E antigen immunization conferred protection against challenge by four different serotypes of Dengue viruses in mice[J]. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2019, 103(12):4977-4986.
- [14] NATH B, VANDNA, SAINI H M, *et al.* Evaluation of Japanese encephalitis virus E and NS1 proteins immunogenicity using a recombinant Newcastle disease virus in mice[J]. *Vaccine*, 2020, 38(7):1860-1868.

(本文编辑:李胜利)