

日本脑炎病毒 SA14-14-2 E 蛋白结构域Ⅲ的抗原性和免疫原性分析

黄莺, 刘珊, 杨鹏, 杜韞, 孙志伟, 俞炜源

军事医学科学院生物工程研究所, 北京 100071

摘要: 为了表达日本脑炎病毒囊膜蛋白(E 蛋白)结构域 DⅢ区, 了解其作为亚单位疫苗的可能性, 本研究根据 SA14-14-2 病毒株序列(GenBank Accession No. D90195)设计两条引物, 以全长 JEV 感染性克隆 pBR-JTF 为模板, 通过 PCR 扩增出 JEV E 蛋白 DⅢ的 cDNA 片段, 构建了原核表达载体 pET-JE DⅢ, 转化大肠杆菌 Rosetta(DE3)进行融合表达。融合蛋白为可溶性表达, 表达量约占菌体蛋白的 75%。用纯化后蛋白免疫新西兰兔和 BALB/C 鼠, 通过 ELISA, Western blotting, 噬斑减少实验, 及乳鼠攻毒实验验证 JE DⅢ的抗原性和免疫原性。Western blotting 及 ELISA 结果表明纯化后的表达产物具有良好的抗原性, 纯化的 JE DⅢ蛋白免疫新西兰兔, 可以获得高达 $1:7 \times 10^5$ 滴度的抗 JEV 特异性抗体; JE DⅢ蛋白免疫 BALB/C 鼠, 可以获得 $1:8.2 \times 10^4$ 滴度的抗 JEV 特异性抗体。并且获得 1:256 滴度的中和抗体, 乳鼠攻毒实验能达到 75% 的保护效果。以上结果说明本研究表达、纯化的重组 JE DⅢ蛋白, 免疫小鼠以及兔后, 能产生抗 JEV 的特异性抗体, 中和性抗体, 能够保护部分乳鼠接受毒种的攻击, 抗原性及免疫原性较好, 有进一步开发研制成亚单位疫苗的潜能。

关键词: 日本脑炎病毒, E 蛋白, DⅢ区, 亚单位疫苗

Immunogenicity and antigenicity of Japanese encephalitis virus envelope protein domain III

Ying Huang, Shan Liu, Peng Yang, Yun Du, Zhiwei Sun, and Weiyuan Yu

Laboratory for Protein Engineering, Institute of Biotechnology, Academy of Military Medical Sciences, Beijing 100071, China

Abstract: To express the domain III gene of Japanese encephalitis virus (JEV) and to learn the possibility of developing the DⅢ protein as a subunit vaccine, we amplified the JEV DⅢ gene by PCR and constructed the expression plasmid pET-JE DⅢ by inserting JEV DⅢ gene into the prokaryotic expression vector pET-32a(+). The domain III protein of the attenuated strain SA14-14-2 was expressed as a thioredoxin (Trx) fusion protein, which was unique in forming a large fraction of the soluble recombinant protein. We immunized the rabbits and mice with the purified protein, tested the antigenicity and immunogenicity of JEV DⅢ protein by ELISA, Western blotting, plaque reduction test and observed the protective efficacy on challenged weanling mice with JEV. Rabbits immunized with the purified JEV DⅢ protein generated $1:7 \times 10^5$ anti-JEV specific antibody titers. BALB/c mice immunized with the purified JEV E DⅢ protein generated $1:8.2 \times 10^4$ anti-JEV specific antibody titers. And the neutralized antibody titer can reach 1:256, the survival rate of the immunized weanling mice was approximately 75%. Overall, this study highlighted that recombinant JEV E DⅢ protein delivered in mice and rabbits can generate high antibody titers against JEV, and protect some mice challenged with JEV. These studies can provide useful information for further developing the domain III recombinant protein as subunit vaccine against

Received: May 18, 2009; Accepted: August 31, 2009

Corresponding author: Weiyuan Yu. Tel: +86-10-66948877; Fax: +86-10-63855329; E-mail: yeyelaitao@sina.com

JEV.

Keywords: Japanese encephalitis virus(JEV), E protein, domain III, subunit vaccine

日本脑炎病毒(JEV)E 蛋白是一个糖基化蛋白,可凝集红细胞,介导病毒与宿主细胞粘附。E 蛋白存在大量的中和抗体表位,是 JEV 病毒粒子的主要抗原,具有良好的免疫原性,是目前基因工程疫苗设计的首选靶蛋白。该蛋白包括 DI、DII、DIII 3 个结构域,其中 DIII 由 111 个氨基酸残基组成,含有大量的特异性表位,是和细胞受体结合的病毒作用区域,中和抗体表位也主要集中于此。目前已经有多个实验室开展对黄热病毒属病毒 DIII 蛋白的相关研究,显示了 DIII 蛋白具有很好的免疫原性和保护效力^[1-2]。

JEV SA14-14-2 株是我国自行研制的减毒活疫苗,已在我国成功使用了 30 余年,安全有效,为我国预防 JEV 感染作出了卓越贡献。近几年来,本实验室一直从事基于该病毒株的复制子载体系统的构建^[3]。在相关的实验研究体系中,先后表达纯化了 JEV NS1、C 蛋白、E 蛋白以及 E DIII 蛋白等,并将其免疫新西兰兔和 BALB/c 鼠,通过 ELISA、Western blotting、噬斑减少实验、乳鼠攻毒实验等验证这些重组蛋白的免疫原性和抗原性。

本研究即利用 PCR 扩增 JEV SA14-14-2 的 E 基因 cDNA 的 DIII 片段中 333 个核苷酸,将其连接到原核表达载体 pET-32a(+)中,可溶性表达融合蛋白 Trx-JE DIII,表达量约占菌体蛋白的 75%。纯化后的 JE DIII 蛋白免疫新西兰兔,获得了高达 1:7×10⁵ 滴度的抗 JEV 抗体;免疫 BALB/C 鼠,获得了 1:8.2×10⁴ 滴度的抗 JEV 抗体,中和抗体可达 1:256,乳鼠脑内的攻毒实验也显示免疫后血清具有一定的中和病毒能力,提示 JE DIII 蛋白的抗原性及免疫原性较好,有开发研制成亚单位疫苗和制备 ELISA 试剂盒的潜能。

1 材料与方法

1.1 材料

Rosetta(DE3),原核表达载体 pET-32a(+)购自 Novagen 公司,质粒提取试剂盒购自 Omega 公司;胶回收试剂盒、限制性内切酶 *EcoR*、*Hind* 和

Prime star 聚合酶等均购自大连宝生物工程有限公司;肠激酶购自 NEB 公司;纯化用的 His Trap FF crude Instruction 购自 GE 公司;IPTG 购自上海生工公司;豚鼠源抗 JEV 多抗来自生物制品检定所,低分子量蛋白标准(Marker)及 HRP 标记的兔抗豚鼠二抗,山羊抗小鼠及山羊抗兔 IgG 二抗均购自北京中山生物技术公司。

1.2 重组表达载体 pET-JE DIII 的构建

参照 SA14-14-2 株核苷酸序列 (GenBank Accession No. D90195)设计,扩增 JEV E DIII 区 292~402aa 的编码基因,所用引物见表 1,在上、下游引物中分别引入 *Bam*H 和 *Hind* 酶切位点。以全长 JEV 感染性克隆 pBR-JTF 为模板,通过 PCR 扩增出 JEV E 蛋白 D 的 cDNA 片段,胶回收后的 PCR 反应产物和质粒载体 pET-32a(+)通过 *Bam*H 和 *Hind* 双酶切,构建重组表达载体 pET-JE D。

表 1 PCR 扩增 JE DIII 区所用引物序列表
Table 1 Primers for PCR amplification of the JE DIII region

Primer name	Primer sequence (5'-3')
pJE-D3	GCCGGATCCGACAACTGGCTCTGAA
dJE-D3	GCCAAGCTTCTATTACGTGCTTCCAGCTTTGTGCC

1.3 诱导表达重组融合蛋白 JE DIII

重组质粒 pET-JE D 转化感受态大肠杆菌 Rosetta(DE3)。接种于含氨苄青霉素的液体 LB 培养基中,37℃ 振荡培养至 OD₆₀₀ 值达 0.6~0.8 时,加入终浓度 1.0 mmol/L 的 IPTG,于 30℃ 对 100 mL 培养物诱导表达 4~6 h。诱导过的细菌培养物于 4℃、5000×g 离心 20 min,收集菌体。20 mL 1×PBS 重悬菌体,冰浴下超声裂解细菌,10 000×g 离心 5 min 后,取上清和沉淀上样,SDS-PAGE 电泳,观察可溶性组分表达情况。

1.4 纯化 JE DIII 蛋白

将分离的碎菌上清层析过柱(His Trap FF crude Instruction 柱)。用不同浓度咪唑(20、50、100、200、500 mmol/L)洗脱,收集各个浓度的洗脱组分,分别

取样, 进行 SDS-PAGE 电泳, 观察分析各个组分中目的蛋白和杂蛋白的含量。取目的蛋白含量较高、杂蛋白含量较低的组分装入处理好的透析袋内, 4°C 下透析。

取纯化后的样品, 每 1 mL 样品中加入 1 μ L 的胰激酶(EK), 16°C 酶切 16 h。将切割较完全的组分再次层析过柱, 收集穿透液, 即纯化好的 JE D 蛋白。采用 BCA(Bicinchoninic acid)方法, 按照试剂盒说明书对 JE D 蛋白的浓度进行测定。

1.5 JE DIII蛋白免疫新西兰兔和 BALB/c 鼠

将 500 μ g 纯化好的 JE D 蛋白与等体积的完全弗氏佐剂充分乳化后, 皮下多点注射到 2.5 kg 雌性新西兰兔背部, 共免疫 2 只新西兰兔。每间隔 2 周加强免疫, 加强免疫时使用不完全弗氏佐剂, 佐剂和抗原用量都较初次免疫减半, 连续免疫 3 次。

6 周龄雌 BALB/c 鼠, 按照免疫的蛋白剂量分成 4 组(分别为 50 μ g、20 μ g、5 μ g 及 PBS 组), 每组 6 只。取各个组不同剂量的 JE D 蛋白与等体积的完全弗氏佐剂充分乳化后, 皮下注射到小鼠背部。每间隔 2 周加强免疫, 连续免疫小鼠 3 次。

每次免疫后第 2 周取血, 用 ELISA 测定不同免疫时间的血清中, 抗 JE D 蛋白特异性抗体水平。

1.6 Western blotting 实验

将纯化后的 JE D 蛋白进行蛋白电泳, 转膜后用 TBS 缓冲液冲洗 3 次, 用 2% BSA 在 4°C 封闭过夜, 然后与制备的豚鼠源抗 JEV 多抗反应 1 h, 再用 TBS 缓冲液洗膜 3 次, 加 HRP 标记的兔抗豚鼠二抗反应 1 h, 用 TBS 洗膜 3 次, DAB 显色。

1.7 ELISA 检测兔、小鼠血清抗体滴度

用 JE D 蛋白进行包被, 96 孔板每孔包被 100 ng 抗原, 置 4°C 过夜。用 2% BSA 在 37°C 孵箱中封闭 2 h, 加入适量稀释的小鼠血清或兔血清, 37°C 孵育 1 h, 1 \times PBST(加入 1‰ Tween-20)洗 4 次。加入对应的 1: 1000 稀释的 HRP 标记的山羊抗小鼠 IgG 二抗或山羊抗兔 IgG 二抗, 37°C 孵育 1 h, 1 \times PBST(加入 1‰ Tween-20)洗 4 次。OPD 显色, 10 min 后加终止液, 492 nm/630 nm 检测吸光度值。

1.8 鼠抗 JE DIII蛋白免疫血清中和试验

将各组 JE D 蛋白免疫小鼠血清混合, 经 13 000 r/min 离心 5 min 后, 移入无菌反应管。然后

56°C 灭活 30 min, 从 1:8 起始倍比稀释, 与等体积的 200 PFU 的 JEV 活病毒混合, 置 37°C 下混合孵育 60 min。然后分别加入预先培养有 BHK-21 细胞的 6 孔培养板中, 置 37°C 培养箱中吸附 1 h 后, 弃混合液。每孔加入 4 mL 甲基纤维素覆盖物, 3 d 后观察细胞感染病毒情况, 继续培养 5~7 d, 加入结晶紫染色, 计数每孔噬斑数。正常小鼠血清和 PBS 为阴性对照, 各稀释度的样本均设 4 个复孔实验。

1.9 乳鼠脑内攻毒实验

将各剂量免疫组每组 6 只小鼠血清等体积混合, 再与 JEV 病毒液(约 10^4 PFU/mL)等量混合后, 37°C 孵育 1 h 后, 脑内接种乳鼠。同时将病毒液与正常小鼠血清等量混合, 作为对照组。每组 10~12 只乳鼠/窝, 每只接种 30 μ L, 从接种之日起每日观察乳鼠发病情况及发病特征、时间、是否死亡, 连续观察 3 周, 未死亡小鼠拉颈处死。

2 结果

2.1 JEV DIII片段的扩增和重组质粒 pET-JE DIII 的构建

JEV D 基因为 333 bp, 本实验选取了 JEV E 基因的 292~402 aa, 经过 PCR 扩增出 JEV E 蛋白的 D 区编码序列, 构建了原核表达质粒 pET-JE D, 用 *Xho* I 和 *Sph* I 进行双酶切鉴定, 应切出 1164 bp 和 5062 bp 两条带, 由图 1 可见, 酶切产物和理论值相符合, 测序结果和预期设计一致, 未发生点突变。

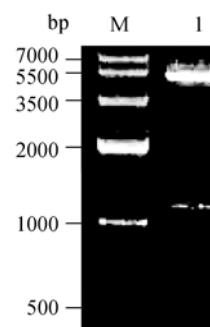


图 1 重组质粒 pET-JE DIII 的酶切鉴定电泳图

Fig. 1 Identification of pET-JE DIII plasmid by restriction enzyme digestion. M: DNA marker 4; 1: plasmid pET-JE DIII digested with *Xho* I and *Sph* I.

2.2 重组 JE DIII蛋白在大肠杆菌中的表达与纯化

将质粒 pET-JE D 转化 Rosetta(DE3)菌, 培养

菌经超声碎菌后离心, 只有极少量沉淀, 主要为可溶性表达, 目的蛋白为 30 kD 左右, 表达量约占菌体蛋白的 75% 以上; 初步纯化, 收集不同浓度咪唑洗脱的组分, 如图 2 显示, 20、50、200 mmol/L 咪唑洗脱液中目的重组融合蛋白较多, 融合蛋白约 30 kD。将其收集后进行下一步的透析, 测其 pH 值为 7.2, 蛋白定量为 600 $\mu\text{g/mL}$ 。

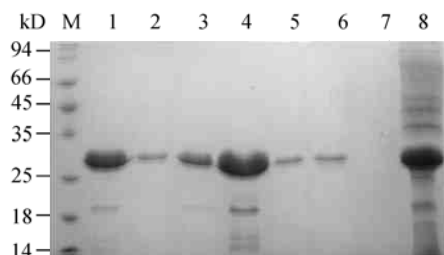


图 2 重组融合蛋白的 His-trap 纯化电泳图

Fig. 2 Identification of recombinant fusion protein by His-trap purification. M: low molecular protein marker; 1, 7: binding buffer; 2-6: elution buffer with 20, 50, 100, 200, 500 mmol/L imidazole; 8: Trx-DIII protein.

2.3 JE DIII蛋白的进一步纯化

由于表达的蛋白为融合蛋白, 除了 JE DIII蛋白外, 同时还有 Trx 和 His 标签, 这样融合蛋白在制备抗体和免疫动物方面的效果可能会受到影响。通过载体上的肠激酶位点可以酶切纯化后的融合蛋白, 酶切后 D 蛋白将不含 His 标签。酶切后产物再次过 His-trap 柱, 将穿透液与洗脱液分别收集, 通过蛋白电泳及 Western blotting 检测鉴定 JE DIII蛋白。如图 3 显示, 穿透液中仅存在 JE DIII蛋白, 蛋白大小为 12 kD 左右。Western blotting 结果显示用豚鼠抗 JEV 多抗可与酶切后的 JE DIII蛋白反应。最后将穿透液收集, 定量后于 -20°C 保存。

2.4 免疫和 BALB/c 鼠血清抗 JEV 特异性抗体滴度

用 500 μg 纯化的 JE D 蛋白 3 次免疫新西兰兔后, 收集血清, 应用 ELISA 检测, 结果显示产生的 JEV 特异性抗体滴度可达 $1:7 \times 10^5$ 。

将 BALB/c 小鼠随机分为 4 组, 每组 6 只, 其中 3 组分别接种 50、20、5 μg JE D 蛋白, 另 1 组为 PBS 对照组。于第 1 次、第 2 次和第 3 次免疫后 2 周尾静脉采血, 分离血清, ELISA 测定抗 JEV 特异性抗体滴度(图 4)。统计分析表明, 相同免疫次数 5 μg 和 50 μg

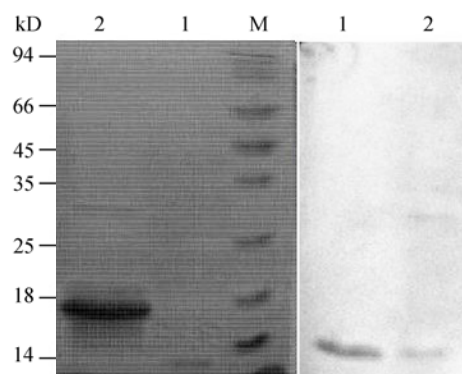


图 3 纯化的 JEV DIII蛋白电泳及 Western blotting 分析

Fig. 3 Western blotting analysis of purified JEV DIII protein. 1: penetration buffer; 2: elution buffer with 500 mmol/L imidazole; M: low molecular protein marker.

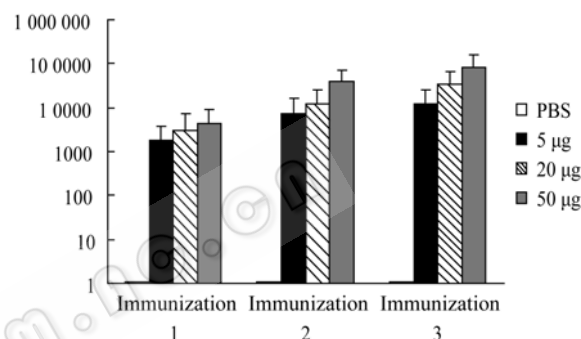


图 4 小鼠各剂量组不同免疫次数血清抗 JEV 抗体滴度

Fig. 4 Detection of anti-JEV specific antibody by ELISA test.

免疫剂量组间血清抗体滴度有显著性差异 ($P < 0.05$), 随着免疫次数增加每组免疫小鼠的血清抗 JEV 特异性抗体滴度也在增加, 3 免后 50 μg 剂量组抗 JEV 抗体滴度可达 $1:8.2 \times 10^4$ 。

2.5 病毒中和实验

小鼠 3 免后, 免疫 JE D 蛋白 50 μg 及 20 μg 组小鼠血清均可抑制由 JEV 导致的 BHK-21 细胞产生的病变, 以噬斑数减少一半的血清滴度来判定, 抗体中和效价为 1:256。无血清处理阴性对照组以及正常鼠阴性血清对照组均出现明显的病毒噬斑。

2.6 免疫血清对 JEV 攻击乳鼠的保护实验

为了进一步了解免疫血清的保护效力, 将各免疫组小鼠血清同 JEV 病毒液等体积混合, 37°C 作用 1 h 后, 脑内接种昆明乳鼠进行攻毒实验, 结果见表 2, 单纯 JEV+正常小鼠血清组全部发病, 表现为脱离群体、萎靡不振、抽搐、麻痹, 7 d 内全部死亡; 而加有 JE D 蛋白免疫小鼠血清后, 病毒液对乳鼠的攻击

能力明显降低, JEV+50 μg 剂量组免疫小鼠血清连续观察 3 周有 3 只死亡, 9 只存活, 状态良好; JEV+20 μg 剂量组免疫小鼠血清连续观察 3 周有 6 只死亡, 6 只存活, 状态良好; 这些结果表明 JEV D 蛋白免疫小鼠血清对 JEV 病毒脑内注射攻击乳鼠有一定的保护作用。

表 2 JEV DIII 蛋白免疫血清对乳鼠体内保护实验

Table 2 Protection against JEV lethal challenge in weanling mice with passive transfer of JEV DIII immunized serum

Group	Vaccine	Viral dose(PFU)	Survival rate (%)
1	Normal mouse serum	150	0%(0/13)
2	DIII 50 μg	150	75%(9/12)
3	DIII 20 μg	150	50%(6/12)

3 讨论

JEV E 蛋白为疏水性糖蛋白, 分子量 53 kD, 富含 Gly 和 Ala, 是 JEV 表面最重要的结构蛋白^[4-6]。Mcimnn 和 Kolaskar 等^[7-8]的研究表明, E 蛋白含有 3 个抗原结构域, 其中域 I 由 111 个氨基酸残基组成, 含有 1 个二硫键, 参与受体结合过程, 在黄病毒中十分保守。E 蛋白的中和表位存在于抗原域 I (373~399 aa) 内, 研究显示^[9]登革病毒 E 蛋白结构域 I 的第 380~389 个氨基酸合成的多肽, 可以抑制登革病毒 DENV 与蚊子细胞 C6/36 的结合。而重组表达的西尼罗病毒 WNV E 区蛋白^[10], 能够有效地抑制 WNV 对绿猴肾细胞 Vero 和蚊子细胞 C6/36 的感染; 并且, WNV E 区蛋白也能有效地抑制 DENV 对 C6/36 细胞的感染, 提示可能 WNV 和 DENV 在 C6/36 细胞上有共同的受体分子。

所以近年来, 黄热病毒的 E DIII 区是一个令人关注的研究抗病毒感染的靶位, 而且有助于鉴定细胞膜上的受体分子。Ge 等^[11]将乙脑 E 蛋白主要抗原片段与结核杆菌 hsp70 肽连接区在酵母中进行融合表达, 发现肽连接区能增强与其融合表达的 E 蛋白抗原的细胞免疫和体液免疫, 淋巴细胞增殖试验和 E 蛋白特异性抗体滴度的测定结果均表明融合蛋白具有良好的免疫原性。

Alka 等^[12]扩增 JEV JaOArS982 株 E 蛋白 D 区, 将其和麦芽糖结合蛋白融合表达, 以及表达 HIS-JE

D 融合蛋白, 前者可溶性以及包涵体表达各占一半, 而后者主要为包涵体表达, 纯化的蛋白和铝佐剂共同免疫小鼠显示了较好的抗原性, 免疫 2 次成鼠后, 用 100 LD₅₀ 的病毒脑内攻击免疫鼠, 不同实验组最高能达到 78.6% 的保护效力, 比灭活疫苗组的保护效力(68.8%)更强, 显示了 D 蛋白具有较强的抗原性, 能够诱导小鼠体内产生较高滴度的特异性抗体, 有效保护小鼠免受病毒的攻击。

黄病毒属的 E 蛋白大约有 500 个氨基酸左右, 本实验室先后构建过 WNV、YFV、JEV 的完整 E 蛋白的原核表达载体, 表达量高, 但是基本上是包涵体表达, 不方便重组蛋白的纯化, 而采用复性后获得的 E 蛋白由于空间构象发生了很大的改变, 所以会失去诱导产生中和抗体和保护性免疫的能力, 从而失去了制备有效的重组亚单位疫苗的意义。

D 区位于 E 蛋白的 C 端, 由 100 左右个氨基酸组成, 能够折叠成一个典型的免疫球蛋白样区域, 该区域是一个很理想的疫苗靶位, 因为它是 E 蛋白的受体结合区域, 同时黄病毒属特异的抗原表位主要集中于此。目前, 已经有原核表达 DEN、WNV、TBEV 等 DIII 蛋白的报道^[13-14], 并且不同病毒的重组 DIII 多以可溶性表达为主, 大规模的制备和纯化都非常便捷, 同时 DIII 蛋白是一个很稳定的蛋白, 天然蛋白没有糖基化位点, 因此在原核细胞中虽然不能糖基化, 但也并不影响蛋白的免疫原性和抗原性。

JEV DIII 蛋白由 111 个氨基酸残基组成, 本实验通过 PCR 扩增出该片段, 构建了原核表达载体 pET-JE D , 诱导表达并纯化了 JE D 蛋白, 该重组蛋白为可溶性表达, 经过 2 次纯化, 最后得到了高纯度的 JE D 蛋白, 并且得到的目的蛋白不含有任何外源的氨基酸序列, 从而避免了融合蛋白中其他蛋白对目的蛋白的抗原性和免疫原性的干扰效应。

用纯化的 JE D 蛋白免疫小鼠以及免疫兔, 一共免疫 3 次, 每次免疫后第 2 周取血清检测抗体滴度, 发现在用 5 μg 剂量的 DIII 蛋白免疫小鼠 1 次后, 特异性抗体可达到 $1: 1.2 \times 10^3$ 水平, 50 μg 剂量的 DIII 蛋白免疫小鼠后, 特异性抗体可达到 $1: 4.3 \times 10^3$ 水平。而随着免疫剂量和免疫次数的增加, 血清

中抗 JEV 抗体滴度逐渐增加, 3 次免疫后 50 μg 剂量组的抗体滴度可达 $1: 8.2 \times 10^4$ 。这些结果提示 JE D 蛋白具有良好的免疫原性, 免疫动物后能够诱导较高滴度的抗 JEV 特异性抗体。

中和抗体的产生是机体对抗日本脑炎病毒感染和增殖的一个重要防御途径, 在已有报道中, 针对 JEV, 低至 1:20 的中和抗体即能有效地保护 90% 的小鼠抵抗病毒株的攻击^[15]。为了进一步了解免疫血清的保护效力, 将各免疫组小鼠血清同 JEV 病毒液等体积混合后脑内接种昆明乳鼠进行攻毒实验, 本试验的检测结果显示了免疫血清抗体中和效价为 1:256, 乳鼠的中和抗体保护试验结果初步表明, 50 μg 剂量 DIII 蛋白组的免疫血清对病毒株的攻击保护率为 75%, 显示出了 JE D 蛋白作为亚单位疫苗的良好应用前景。

致谢 特别感谢中国药品生物制品检定所疫苗一室俞永新院士、董关木研究员、贾丽丽研究员惠赠疫苗株以及豚鼠源抗 JEV 多抗。

REFERENCES

- [1] Chu JH, Chiang CC, Ng ML. Immunization of flavivirus West Nile recombinant envelope domain III protein induced specific immune response and protection against West Nile virus infection. *Immunology*, 2007, **178**(5): 2699–2705.
- [2] Wu SC, Yu CH, Lin CW, *et al.* The domain III fragment of Japanese encephalitis virus envelope protein: mouse immunogenicity and liposome adjuvanticity. *Vaccine*, 2003, **21**(19/20): 2516–2522.
- [3] Huang Y, Shao W, Jia LL, *et al.* Construction of subgenomic replicon vectors of Japanese encephalitis virus. *Chin J Virol*, 2007, **23**(1): 33–38.
黄莺, 邵炜, 贾丽丽, 等. 日本脑炎病毒(JEV)复制子表达载体的构建及其鉴定. *病毒学报*, 2007, **23**(1): 33–38.
- [4] Nybakken GE, Nelson CA, Chen BR, *et al.* Crystal structure of the West Nile virus envelope glycoprotein. *Viol*, 2006, **80**(23): 11467–11474.
- [5] Lin CW, Wu SC. A functional epitope determinant on domain III of the Japanese encephalitis virus envelope protein interacted with neutralizing-antibody combining sites. *Viol*, 2003, **77**(4): 2600–2606.
- [6] Holzmann H, Stiasny K, York H, *et al.* Tick-borne encephalitis virus envelope protein E-specific monoclonal antibodies for the study of low pH-induced conformational changes and immature virions. *Arch Virol*, 1995, **140**(2): 213–221.
- [7] Mcminn PC. The molecular basis of virulence of the encephalitogenic flavivirus. *J Gen Virol*, 1997, **78**: 2711.
- [8] Kolaskar AS, Kulkarni-kale U. Prediction of three-dimensional structure and mapping of conformational epitopes of envelope glycoprotein Japanese encephalitis virus. *Virology*, 1999, **261**: 31.
- [9] Hung JJ, Hsieh MT, Young MJ. An external loop region of domain of Dengue virus type 2 envelope protein is involved in serotype 2 specific binding to mosquito but not mammalian cells. *Viol*, 2004, **78**(1): 378–388.
- [10] Chu JJ, Leong PW, NgM L. Characterization of plasma membrane-associated proteins from *Aedes albopictus* mosquito (C6/36) cells that mediate West Nile virus binding and infection. *Viol*, 2005, **339**(2): 249–260.
- [11] Ge FF, Qiu YF, Gao XF, *et al.* Fusion expression of major antigenic segment of JEV E protein-hsp70 and the identification of domain acting as adjuvant in hsp70. *Vet Immunol Immunop*, 2006, **113**: 288.
- [12] Alka, Kaushik B, Malik YPS, *et al.* Immunogenicity and protective efficacy of the *E. coli*-expressed domain III of Japanese encephalitis virus envelope protein in mice. *Med Microbiol Immunol*, 2007, **196**: 227–231.
- [13] Wu KP, Wu CW, Tsao YP, *et al.* Structural basis of a flavivirus recognized by its neutralizing antibody: solution structure of the domain III of the Japanese encephalitis virus envelope protein. *Biol Chem*, 2003, **278**(46): 46007–46013.
- [14] Byron E.M, Penelope K, Petra D, *et al.* Immunization with West Nile virus envelope domain III protects mice against lethal infection with homologous and heterologous virus. *Vaccine*, 2008, **26**: 153–157.
- [15] Shwn CC, Patrick SCL, Chun PL, *et al.* Fragment of Japanese encephalitis virus envelope protein produced in *Escherichia coli* protects mice from virus challenge. *Microb Pathog*, 2001, **31**: 9–19.