

风疹病毒结构蛋白多免疫显性区域诊断抗原的制备及其诊断效能评价

高健^{1,2,3}, 赵鼎^{1,2,3}

1 郑州大学附属儿童医院检验科, 河南 郑州 450000

2 郑州儿童医院检验科, 河南 郑州 450000

3 河南省儿童医院检验科, 河南 郑州 450000

高健, 赵鼎. 风疹病毒结构蛋白多免疫显性区域诊断抗原的制备及其诊断效能评价. 生物工程学报, 2019, 35(8): 1529–1536.

Gao J, Zhao D. Design of a chimeric antigen containing multiple immunodominant epitopes and its use in detection of IgM antibodies against Rubella virus. Chin J Biotech, 2019, 35(8): 1529–1536.

摘 要: 对串联风疹病毒 (Rubella virus, RV) 3 个结构蛋白 6 个免疫显性区域进行制备 (命名为 B103), 并将其应用于血清学诊断中。选取 RV C aa 1–30 & aa 96–123、E2 aa 31–105 和 E1 aa 11–39 & aa 154–277 & aa 389–412 等 6 个免疫显性区域, 将其串联并基因合成; 将此基因片段插入 TRX 和 His 标签之间构建表达质粒; 蛋白 B103 在大肠杆菌 BL21(DE3) 中诱导表达, 并利用 Streamline Chelating 亲和层析和 DEAE 阴离子交换层析纯化目的蛋白, Sephadex G-25 分子筛分析其折叠情况及均一性; 利用免疫印迹技术对蛋白 B103 的抗原性进行鉴定, 并建立 RV-IgM 抗体捕获法 ELISA 检测技术, 初步评价此方法对阴阳血清样本的鉴别能力。蛋白 B103 以可溶性形式表达, 其表达量约占菌体总蛋白的 18.57%, 经纯化后蛋白 B103 浓度为 3.026 mg/mL, 纯度为 95.35%; 免疫印迹实验表明蛋白 B103 能与 RV 急性期血清发生反应; 对 40 份 RV 急性期血清及 40 份 RV 阴性血清进行检测发现可以很好地鉴别阴阳性血清标本; 其灵敏度为 92.50%, 特异性为 95.00%, 阳性预测值为 94.87%, 阴性预测值为 92.68%, 符合率为 93.75%, McNemer 检验的结果提示与“金标准”诊断结果无差异, $kappa=0.900$, 提示两种方法诊断结果一致性优异。原核表达与层析纯化可以获取抗原性优异的 RV 血清学诊断抗原, 可以应用于 RV 早期诊断中。

关键词: 免疫显性区域, 风疹病毒, 原核表达, 层析纯化, 血清学诊断

Received: January 15, 2019; Accepted: March 13, 2019

Corresponding author: Ding Zhao. Tel/Fax: +86-371-85515776; E-mail: zhaoding_henan@126.com

网络出版时间: 2019-03-20

网络出版地址: <http://kns.cnki.net/kcms/detail/11.1998.Q.20190319.1146.001.html>

Design of a chimeric antigen containing multiple immunodominant epitopes and its use in detection of IgM antibodies against Rubella virus

Jian Gao^{1,2,3}, and Ding Zhao^{1,2,3}

¹ Department of Laboratory Medicine, Children's Hospital Affiliated of Zhengzhou University, Zhengzhou 450000, Henan, China

² Department of Laboratory Medicine, Zhengzhou Children's Hospital, Zhengzhou 450000, Henan, China

³ Department of Laboratory Medicine Henan Children's Hospital, Zhengzhou 450000, Henan, China

Abstract: A chimeric antigen designated B103 containing six immunodominant regions derived from three structural proteins of Rubella virus (RV) was designed and its utility in serological diagnosis was assessed. Protein B103 is comprised of aa 1–30 & aa 96–123 of C protein, aa 31–105 of E2 protein, as well as aa 11–39, aa 154–277 & aa 389–412 of E1 protein. In addition, it contains thioredoxin (TRX) at the N-terminal and His tag at the C-terminal. B103 was expressed in *Escherichia coli* BL21(DE3) and purified by Streamline Chelating affinity and DEAE anion exchange chromatography. Based on the antigenicity of B103 as verified by Western blotting analysis, we constructed and evaluated a novel capture ELISA for RV-IgM detection. B103 was expressed in a soluble form, accounting for 18.57% of the total bacterial proteins. After purification, the concentration and purity of protein B103 were 3.026 mg/mL and 95.35%, respectively. Western blotting analysis demonstrated that protein B103 could react with acute-phase serum of RV. By ELISA, 40 negative sera and 40 RV-acute phase sera were detected. The sensitivity, specificity, positive predictive value, negative predictive value and coincidence rate of the ELISA were 92.50%, 95.00%, 94.87%, 92.68% and 93.75%, respectively. The McNemer analysis suggested that there was no statistical difference between the 'Gold standard' and the novel ELISA with a κ coefficient of 0.900, indicating excellent consistency. B103 chimeric protein with excellent antigenicity obtained from prokaryotic expression followed by chromatography purification could prove useful for early diagnosis of RV infection.

Keywords: immunodominant region, Rubella virus, prokaryotic expression, chromatography purification, serological diagnosis

风疹病毒 (Rubella virus, RV) 是风疹或者称为德国麻疹的病原体^[1]。尽管大部分感染仅仅引起轻微的、自限型麻疹样疾病,但孕妇尤其是妊娠前 3 个月的感染将会引起严重的胎儿畸形甚至流产^[2]。因此建立一种简单灵敏的 RV 检测方法具有重大的实际意义^[3]。皮疹期 RV-IgM 在风疹患者中阳性率仅为 50%,但皮疹后 5 d 此抗体在大部分患者中能被检测到^[2],一般感染后 10 d IgM 首先被检测到,感染后 4 周达到峰值,急性感染后可持续超过 7 个月^[4]。首次感染早期, IgG 亲和力很低,3 个月内才能逐渐成熟^[4]。因此 RV 早期诊断血清学检测通主要依赖于 RV-IgM 指标^[5]。

RV 有 3 个结构蛋白,衣壳蛋白 (Capsid protein, C)、2 种包膜蛋白 (Envelop protein, E) E2 和 E1。C 富含精氨酸和脯氨酸残基,尤其在氨基末端,

使其带正净电荷利于其在核衣壳形成过程中与基因组 RNA 发生反应^[6-7]。E1 和 E2 作为 I 型膜蛋白,异二聚化后在病毒表面形成棘突复合体^[8]。棘突复合体的主要功能为集合宿主细胞受体及介导病毒与宿主细胞膜融合^[9]。E1 拥有最主要的抗原决定簇,与血凝和中和表位相关^[10]。针对 E2 和 C 蛋白的抗体也存在,但其表达水平和亲和力都很低^[11]。研究发现, E1 蛋白上免疫显性区域为 aa 11–39、aa 154–179、aa 199–239、aa 226–277 以及 aa 389–412,衣壳蛋白为 aa 1–30、aa 96–123, E2 为 aa 31–105^[12]。有研究将不同表位进行串联表达,应用于 RV-IgM 检测发现诊断效能优异^[13-14]。文中将 RV 的 3 个结构蛋白的免疫显性区域串联表达在一个蛋白上,并借此构建 RV-IgM 捕获法 ELISA 技术。

1 材料与方法

1.1 主要材料与试剂

E. coli DH5 α 、BL21(DE3)感受态细胞及 TRX 载体自备。*Nco* I 和 *Xho* I 限制性内切酶以及 T4 DNA 连接酶购自美国 NEB 公司。Chelating Sepharose Fast Flow、DEAE Sepharose Fast Flow、Sephadex G-25 Fine 层析介质购自美国 GE 公司。鼠抗人 IgM 二抗、鼠抗人 IgM-HRP 酶标物购自美国 Thermo Fisher 公司。商品化风疹病毒 IgM 诊断试剂盒为 CFDA 认证的诊断试剂盒。RV 急性期阳性血清 40 份分别来自河南省儿童医院 (26 份)、郑州大学附属儿童医院 (6 份) 及郑州儿童医院 (8 份), 阴性血清 40 份由郑州儿童医院提供, 阴阳性血清样本都经过临床和实验室确诊, 以风疹表现 (出现红色斑丘疹等) 及核酸检测阳性为金标准。3 个月内接种风疹病毒疫苗妇女血清样本 14 份来自河南省儿童医院。

1.2 表达质粒 B103 的构建

根据参考文献[12,15-16], 将 RV C aa 1-30 & aa 96-123、E2 aa 31-105 及 E1 aa 11-39 & aa 154-277 & aa 389-412 等 6 个免疫显性区域用 GGGSGGGS 连接臂进行串联, 然后根据基因序列二级结构及其编码蛋白亲疏水特性优化基因并在 5'端添加 *Nco* I, 3'端添加 *Xho* I 酶切位点, 最后交由北京擎科新业生物技术有限公司合成 (将基因片段命名为 B103F)。用 *Nco* I 和 *Xho* I 处理全基因合成产物将 B103F 双酶切下来, 切胶回收后连接到相同酶切处理的 TRX 表达载体上, 转化 *E. coli* DH5 α 感受态细胞。次日挑取单克隆菌落培养后提取质粒进行测序和双酶切鉴定^[17]。鉴定正确的质粒命名为 B103 质粒。

1.3 蛋白 B103 的制备

目的蛋白的表达与纯化参考苏秋东等发表的文章^[17]。将转化 B103 质粒的 *E. coli* BL21(DE3)

接种于含氨苄霉素 (50 μ g/mL) 的 LB 培养基 (10 g/L 蛋白胨, 5 g/L 酵母提取液, 10 g/L NaCl) 中, 进行小量 (1.5 mL) 和大量 (3 L) 表达。离心收集表达菌 (4 000 r/min, 8 min, 10 $^{\circ}$ C)。小量表达菌体经处理后进行 SDS-PAGE 分析。大量表达菌体用缓冲液 A (10 mmol/L Tris-HCl, 0.5% Triton X-100, pH 8.0) 重悬后用超声仪破碎 (功率 250 W, 超声工作时间 10 s, 间歇时间 20 s, 共 40 个循环), 离心 (12 000 r/min, 8 min, 10 $^{\circ}$ C) 收集上清。将此上清补加终浓度为 500 mmol/L 的 NaCl 后上样于用缓冲液 B 平衡 (10 mmol/L Tris-HCl, 500 mmol/L NaCl, pH 8.0) 的 Chelating Sepharose Fast Flow 层析介质中^[17]。分别用 60 mmol/L、300 mmol/L 咪唑 (溶于缓冲液 B 中) 进行梯度洗脱。取 300 mmol/L 洗脱液于缓冲液 C (10 mmol/L Tris-HCl, pH 8.0) 中进行透析去掉咪唑和 NaCl 成分。DEAE Sepharose Fast Flow 层析介质用缓冲液 C 平衡后上样, 分别用 0、100、200、400 mmol/L NaCl (溶于缓冲液 C 中) 进行梯度洗脱并收集相应洗脱液。分别取样进行 SDS-PAGE 分析, 观察目的蛋白的含量以及分布情况^[17]。将 SDS-PAGE 分析评价优异的洗脱液于 PBS (137 mmol/L NaCl, 2.7 mmol/L KCl, 10 mmol/L Na₂HPO₄, 2 mmol/L KH₂PO₄, pH 7.4) 中透析, 并于 4 $^{\circ}$ C 保存备用。

取蛋白 B103 样品进行凝胶过滤层析分析蛋白的折叠情况及均一性。分子筛介质为 Sephadex G-25 Fine, 装柱体积为 20 mL, 缓冲体系为 20 mmol/L 磷酸钠缓冲液, 150 mmol/L NaCl, pH 7.0。实时监测 Time-A₂₈₀ 数据并以此绘图。

1.4 蛋白 B103 的 Western blotting 分析

5 μ L 蛋白 B103 溶液进行 SDS-PAGE (恒流 40 mA, 40 min), 而后转膜至硝酸纤维素 (NC) 膜上 (恒压 15 V, 30 min)。室温, 用封闭液 (5% 脱脂奶粉溶于 PBST 中^[17]) 处理 NC 膜 1 h。分别加入封闭液稀释的 RV 急性期阳性血清 (1:20)、

RV 阴性血清 (1:20), 室温孵育 1 h 后用 PBST 洗膜 5 次。一抗都为鼠抗人 IgM-HRP 酶标物 (1:3 000), 室温孵育 1 h 后洗膜, 最后 1 次用 PBS 洗膜后 DAB 显色, 清水终止显色。

1.5 蛋白 B103-HRP 酶标物的制备及其诊断效能评价

B103 与 HRP 的偶联参考 HRP conjugation Kit 说明书 (Abcam, UK)。简言之, 每 10 μ L 蛋白 B103 中加入 1 μ L Modifier reagent 后与 HRP Mix 充分混匀 (B103:HRP=1:1)。室温避光静置 3 h 后, 每 10 μ L 蛋白 B103 加入 1 μ L Quencher reagent 并充分混匀后加入等倍体积预冷甘油于 -20 $^{\circ}$ C 保存备用。

利用蛋白 B103-HRP 酶标物建立血清 RV-IgM 抗体捕获法 ELISA 检测试剂盒, 并对“金标准”确诊的血清样本以及风疹疫苗接种妇女血清样本进行检测, 评价试剂盒对阴阳性血清标本的鉴别能力^[17]。简言之, 碳酸盐缓冲液稀释鼠抗人 IgM 二抗至终浓度 25 ng/mL, 100 μ L/孔加入板条孔后 37 $^{\circ}$ C 水浴孵育 1 h, 而后用封闭液 37 $^{\circ}$ C 再孵育 1 h, 最后用 PBST 洗板 5 次, 冷藏备用; 室温平衡板条后加待测血清 (1:10), 37 $^{\circ}$ C 孵育 1 h 后洗涤; 加入 B103-HRP 酶标物 (1:5 000), 37 $^{\circ}$ C 孵育 1 h 后洗涤; 加 A/B 液显色, 用酶标仪测定吸光度值 (OD_{450} 值)。

利用商品化 RV-IgM 检测试剂盒同样检测这些血清样本, 具体操作步骤参见厂家说明书, 最后用酶标仪测定吸光度值 (OD_{450} 值)。

1.6 统计学分析

运用 GraphPad Prism 7.00 软件绘制 2 组血清

IgM 抗体水平散点图并对两组血清 OD_{450} 值均数进行 t 检验。根据经验选取阴性血清 OD_{450} 值均值 2.1 倍作为临界值, 并以此计算新型检测试剂盒的灵敏度和特异性。两个样本均数比较应用独立样本的 t 检验; 多个样本两两比较, 先应用方差分析 (ANOVA), 再应用 Dunnett's t 检验。用 McNemer 检验及 kappa 一致性检验评价两种检测方法的一致性。实验数据采用 SPSS22.0 软件进行统计学分析, $P<0.05$ 表示差异有统计学意义。

2 结果与分析

2.1 原核表达层析纯化可获取高度均质的蛋白 B103

B103 的构建如图 1 所示, 融合蛋白的氨基端为 TRX 标签, 紧跟着依次为 C aa 1-30 & aa 96-123、E2 aa 31-105 及 E1 aa 11-39 & aa 154-277 & aa 389-412 等 6 个免疫显性区域, 羧基端为 His 标签, 连接臂为 GGGSGGGS, 以及合适的酶切位点 (如 *Nde* I、*Nco* I 和 *Xho* I 等)。B103F 基因片段大小约 800 bp, 构建好的表达质粒经测序、双酶切鉴定及小量表达证实构建成功, 命名为 B103 质粒。

小量表达 SDS-PAGE 结果发现, 目的蛋白分子量与预期相同, 约为 44 kDa (图 2A), 表明 B103 蛋白可以在大肠杆菌中有效表达。蛋白 B103 可溶性表达, 占菌体总蛋白的 18.57% (图 2B)。经亲和层析纯化后蛋白 B103 主要存在于 300 mmol/L 咪唑洗脱液中 (图 2B), 纯度为 92.76%, 浓度为 3.286 mg/mL。经过阴离子交换层析后, 蛋白 B103

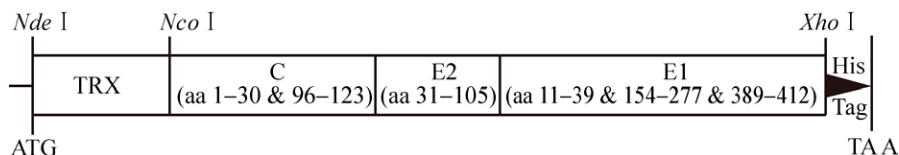


图 1 B103 表达质粒示意图

Fig. 1 Schematic diagram of B103 expression plasmids.

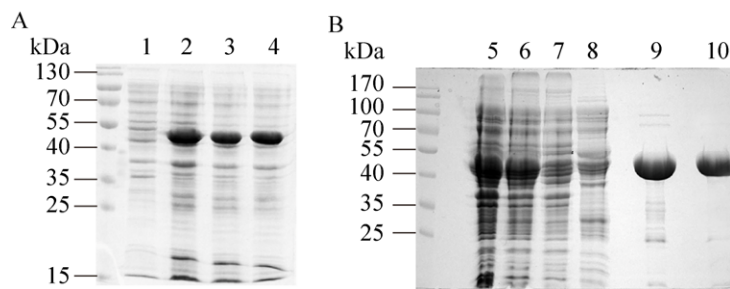


图 2 蛋白 B103 小量表达 (A)、大量表达及纯化结果 (B)
Fig. 2 The small-scale expression (A) and large-scale expression and purification of protein B103 by affinity and ion exchange chromatography (B). Lane 1: negative control; lane 2–4: induced bacteria; lane 5: total bacterial proteins after sonication; lane 6: soluble fraction of the homogenate; lane 7: insoluble fraction of the homogenate; lane 8: elutes washed with 60 mmol/L imidazole of affinity chromatography; lane 9: elutes washed with 300 mmol/L imidazole of affinity chromatography; lane 10: elutes washed with 200 mmol/L NaCl of ion exchange chromatography.

主要分布于 200 mmol/L NaCl 洗脱液中, 纯度为 95.35%, 浓度为 3.026 mg/mL (图 2B)。

经过凝胶过滤层析发现 (图 3), 纯化后的蛋白 B103 存在于单一洗脱峰中, 峰尖而且分布优异表明其成分均一性优异, 折叠成熟, 可以作为检测抗原应用于 ELISA 检测中。

2.2 蛋白 B103 可以与 RV 急性期血清发生特异性反应

利用免疫印迹技术, 初步鉴定蛋白 B103 的抗原性。结果显示, RV 急性期血清作为一抗, 鼠抗人 IgM-HRP 酶标物作为二抗, 在蛋白分子量约 44 kDa 处有明显条带 (图 4A); 而 RV 阴性血清作为一抗, 在 NC 膜上相应位置没有出现条带。

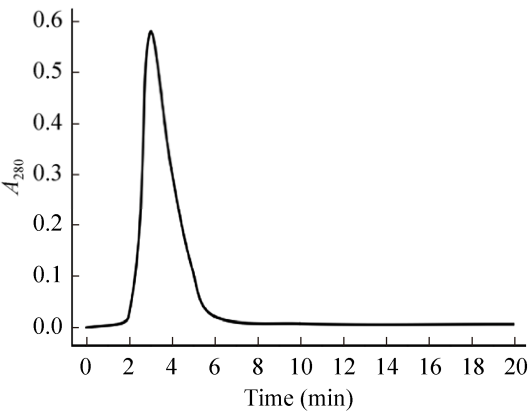


图 3 蛋白 B103 凝胶过滤分析
Fig. 3 Gel filtration analysis of B103 protein.

并且无论是用 RV 相关阳性血清还是阴性血清, 无蛋白 B103 表达菌都未见明显条带 (图 4B), 表明蛋白 B103 可以与 RV 阳性血清发生特异性反应。

2.3 基于蛋白 B103 的捕获法 ELISA 技术可以很好地鉴别 RV 阴阳性血清标本

基于蛋白 B103 建立捕获法 ELISA 试剂盒, 选取 40 份 RV 阴性血清和阳性血清样本利用蛋白 B103 建立捕获法 ELISA 试剂盒进行检测^[17]。研究发现 (图 5), 阳性样本 OD_{450} 值分布为 1.460 ± 0.491 ($\bar{x} \pm s$), 阴性血清样本 OD_{450} 值分布为 0.121 ± 0.079

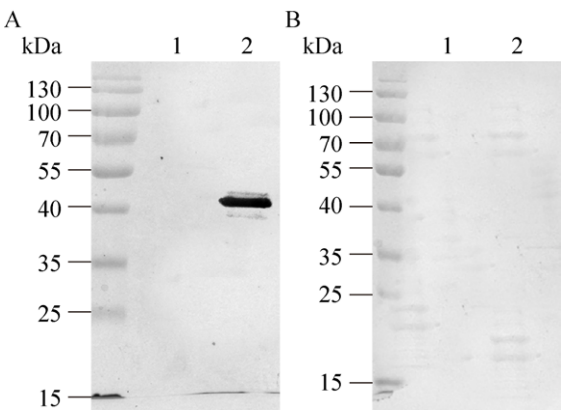


图 4 蛋白 B103 的 Western blotting 分析
Fig. 4 Western blotting analysis of B103 protein. (A) RV acute serum as capture antibody, Mouse anti-human IgM secondary antibody, HRP as detection antibody. (B) RV negative serum as first antibody, Mouse anti-human IgM secondary antibody, HRP as second antibody. 1: negative control; 2: protein B103.

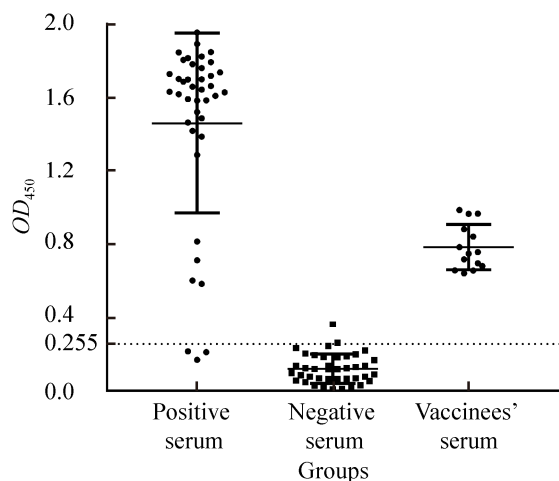


图5 蛋白 B103 在 RV 感染血清学诊断效果评价

Fig. 5 The evaluation of the diagnostic effect of protein B103 on RV infection.

($\bar{x} \pm s$), 疫苗接种者血清样本 OD_{450} 值分布为 0.784 ± 0.122 ($\bar{x} \pm s$)。t 检验结果表明阴阳性血清样本 OD_{450} 值差异有统计学意义 ($t=22.203, df=42.144, P<0.05$), 即该试剂盒可以很好地鉴别阴阳性血清标本。Dunnett's t 检验发现, 3 组数据两两之间差异都具有统计学差异, 尤其阳性血清与疫苗接种者血清虽都为阳性结果, 但其分布不同。根据经验阴性血清 OD_{450} 值均值 2.1 倍作为临界值得出临界值为 0.255。根据临界值, 计算出灵敏度为 92.50%, 特异性为 95.00%, 阳性预测值为 94.87%, 阴性预测值为 92.68%, 符合率为 93.75%。McNemer 检验的结果, $P=1.00>0.05$, 提示两种方法诊断结果差异无统计学意义, $kappa=0.900, P<0.05$, 提示两种方法诊断结果一致性优异。根据临界值发现, 疫苗接种者也为阳性结果, 但其 OD_{450} 值分布与阳性结果截然不同 (图 5)。因此, 新型 RV-IgM 抗体诊断试剂盒可以很好地鉴别 RV-IgM 阴阳性血清样本。

商品化试剂盒检测血清结果发现, 阳性结果 34 份 (34/40), 阴性结果 37 份 (37/40), 根据金标准计算出灵敏度为 85.00%, 特异性为 92.50%, 阳性预测值为 91.89%, 阴性预测值为 88.10%, 符合率为 88.75%。与新型试剂盒进行比较见表 1,

表 1 新型试剂盒与商品化试剂盒比较

Table 1 Comparative analysis of two ELISA kits

		Commercial ELISA		
		Positive	Negative	Total
Novel ELISA	Positive	33	5	38
	Negative	3	39	42
	Total	36	44	80

进行卡方检验发现, $kappa=0.799$, 高度一致性, 说明新型试剂盒与此商品化试剂盒之间的差异不存在统计学意义, 但相比于“金标准”, 究其上述指标, 新型试剂盒的诊断性能要更好。

3 讨论

仅依靠临床症状诊断风疹疾病是不可靠的, 因为多数患者症状轻微, 甚至多达 50% 的感染是亚临床的^[2]。因此需要必要的实验室检测作为辅助。RV-IgG 抗体可以持续存在于患者体内, 而 IgM 一般在感染后 2 个月逐渐消失, 因此检测 IgM 意义更大^[18]。RV-IgM 抗体检测是公认的风疹实验室检测方法^[11]。目前监测 RV 抗体的诊断抗原大多为细胞培养抗原, 其制备过程繁琐耗时耗力耗资, 且抗原成分不均一, 试剂盒的灵敏度和特异性不理想, 给临床诊断带来干扰^[19]。文中获取抗原性优异的诊断抗原来构建捕获法 ELISA 检测血清 RV-IgM 抗体水平。

大部分 RV 抗原决定簇 (包括主要的抗原决定簇) 都定位在 E1 蛋白^[10], 文中选取 E1 蛋白的 3 个免疫显性表位 aa 11–39、aa 154–277 和 aa 389–412, 涵盖了文献所验证的中和抗体表位^[17,20]。E2 的抗原位点由于与 E1 相互作用而被遮盖, 但有证据显示 E2 包含独立特异性抗原^[21], 且中和抗体在体外也能中和病毒感染^[22]。文中选取了 E2 蛋白的 1 个免疫显性区域 aa 31–105。C 蛋白是病毒中含量最高的病毒抗原^[23], 文中选取了 C 蛋白的 2 个免疫显性区域 aa 1–30 & aa 96–123。融合

蛋白的氨基端还添加了 TRX 前导肽, 一是为了增加目的蛋白的表达, 二是为了蛋白的折叠^[24]。实验证实, 蛋白 B103 以可溶性形式表达, 且含量占菌体总蛋白的 18.57% (图 2B)。羧基端 His-tag 的存在, 使之可以利用亲和层析有效纯化^[25], 进一步离子层析后, 得到了浓度高纯度高 (图 2B) 且构象高度均一 (图 3) 的目的蛋白。

相对于单一抗原在抗体识别上的差异和局限, 重组多表位抗原在对抗原成分选择上具有灵活广泛性^[8]。每个表位之间加入了连接臂 GGGSGGGS, 使表位之间可以灵活转动, 方便表位的展示及与抗体结合, 大大提高了目的蛋白的抗原性^[26]。Western blotting (图 4) 及 ELISA 分析 (图 5) 发现, 蛋白 B103 抗原性优异, 可以在体外与相应抗体发生反应。多个表位的存在同时增加了识别抗体的数量, 大大提高了检测的灵敏度。

文中是对 RV-IgM 诊断抗原的初步研究, 还存在着很多的不足: 一是样本量偏小, 由于笔者所在医院主要针对儿童人群, 儿童人群中 RV-IgM 阳性率极低 (约占 1.9%^[27]), 且主要分布于 9 月龄和 10 月龄婴儿 (共约占 61.7%^[27]), 因此阳性血清样本的收集难度大, 后续实验将加大检测样本量; 二是风疹 IgM 诊断常见的假阳性来自 Rh 因子, 由于文中假阳性样本量太小, 后续实验将查明此试剂盒对 Rh 因子阳性血清的检测结果; 三是针对疫苗接种后 IgM 的动力学分析的研究意义重大, 但具体操作繁琐困难, 也将在后续实验中实施; 四是还未使用中国食品药品检定研究院提供的系列风疹血清作为监测, 后续实验将引进系列血清盘, 并制备相应的血清参考品。

蛋白 B103 集合了 RV 主要的免疫显性区域, 经过原核表达和层析纯化后以可溶性形式存在, 以此构建的 RV-IgM 捕获法 ELISA 可以很好地鉴别 RV 急性期阴阳性血清, 为 RV 感染的早期诊断治疗以及防控工作提供有效的血清学依据。

REFERENCES

- [1] Sakata M, Mori Y. The life cycle of Rubella virus. *Uirusu*, 2014, 64(2): 137–146.
- [2] Lambert N, Strebel P, Orenstein W, et al. Rubella. *Lancet*, 2015, 385(9984): 2297–2307.
- [3] Chagnon A, Gilker JC, Roy L, et al. Diagnosis of rubella virus infections. *Intervirology*, 1974, 3(5/6): 359–368.
- [4] Thomas HIJ, Morgan-Capner P, Enders G, et al. Persistence of specific IgM and low avidity specific IgG1 following primary rubella. *J Virol Methods*, 1992, 39(1/2): 149–155.
- [5] Zhang T, Tian F, Long L, et al. Diagnosis of rubella virus using antigen-conjugated Au@Pt nanorods as nanozyme probe. *Int J Nanomed*, 2018, 13: 4795–4805.
- [6] Mangala Prasad V, Willows SD, Fokine A, et al. Rubella virus capsid protein structure and its role in virus assembly and infection. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2013, 110(50): 20105–20110.
- [7] Liebhaver H, Gross PA. The structural proteins of rubella virus. *Virology*, 1972, 47(3): 684–693.
- [8] Baron MD, Forsell K. Oligomerisation of the structural proteins of rubella virus. *Virology*, 1991, 185(2): 811–819.
- [9] Duncan R, Muller J, Lee N, et al. Rubella virus-induced apoptosis varies among cell lines and is modulated by Bcl-X_L and caspase inhibitors. *Virology*, 1999, 255(1): 117–128.
- [10] DuBois RM, Vaney MC, Tortorici MA, et al. Functional and evolutionary insight from the crystal structure of rubella virus protein E1. *Nature*, 2013, 493(7433): 552–556.
- [11] Wandinger KP, Saschenbrecker S, Steinhagen K, et al. Diagnosis of recent primary rubella virus infections: significance of glycoprotein-based IgM serology, IgG avidity and immunoblot analysis. *J Virol Methods*, 2011, 174(1/2): 85–93.
- [12] Mitchell LA, Décarie D, Tingle AJ, et al. Identification of immunoreactive regions of rubella virus E1 and E2 envelope proteins by using synthetic peptides. *Virus Res*, 1993, 29(1): 33–57.
- [13] Miao WH, Qu LL, Pang L, et al. Construction, expression, purification and evaluation of diagnostic

- effects of rubella virus compound epitope peptide. *Chin J Clin Lab Sci*, 2015, 33(12): 889–891, 894 (in Chinese). 缪卫华, 渠利利, 庞露, 等. 风疹病毒复合多表位肽的构建、表达、纯化及其诊断效能的初步评价. *临床检验杂志*, 2015, 33(12): 889–891, 894.
- [14] Sun WG, Yang LK, Liu YH, et al. Research on the soluble fusion expression and serological diagnosis of rubella virus glycoprotein 2-nuclear protein dominant antigen epitope pronucleus. *Chin J Health Lab Technol*, 2016, 26(16): 2351–2354 (in Chinese). 孙卫国, 杨栗坤, 刘艳华, 等. 风疹病毒糖蛋白 2-核蛋白优势抗原表位原核可溶性融合表达与血清学诊断研究. *中国卫生检验杂志*, 2016, 26(16): 2351–2354.
- [15] Chaye H, Ou DW, Chong P, et al. Human T- and B-cell epitopes of E1 glycoprotein of rubella virus. *J Clin Immunol*, 1993, 13(2): 93–100.
- [16] McCarthy M, Lovett A, Kerman RH, et al. Immunodominant T-cell epitopes of rubella virus structural proteins defined by synthetic peptides. *J Virol*, 1993, 67(2): 673–681.
- [17] Su QD, Guo MZ, Qiu F, et al. The preparation of epitope-based recombinant Rubella virus diagnostic antigen. *Chin J Virol*, 2016, 32(3): 249–255 (in Chinese). 苏秋东, 郭敏卓, 邱丰, 等. 风疹病毒多表位诊断抗原的制备与评价. *病毒学报*, 2016, 32(3): 249–255.
- [18] Petrova EK, Dmitrieva AA, Trifonova EA, et al. The key role of rubella virus glycoproteins in the formation of immune response, and perspectives on their use in the development of new recombinant vaccines. *Vaccine*, 2016, 34(8): 1006–1011.
- [19] Li ZM, Chu FL, Wen HL, et al. R237 and H238 are key amino acids in the rubella virus E1 neutralization epitope. *Viral Immunol*, 2014, 27(9): 422–429.
- [20] Newcombe J, Starkey W, Al-Mumin S, et al. Recombinant rubella E1 fusion proteins for antibody screening and diagnosis. *Clin Diagn Virol*, 1994, 2(3): 149–163.
- [21] Ou D, Chong P, Choi Y, et al. Identification of T-cell epitopes on E2 protein of rubella virus, as recognized by human T-cell lines and clones. *J Virol*, 1992, 66(11): 6788–6793.
- [22] Green KY, Dorsett PH. Rubella virus antigens: localization of epitopes involved in hemagglutination and neutralization by using monoclonal antibodies. *J Virol*, 1986, 57(3): 893–898.
- [23] Karounos DG, Wolinsky JS, Thomas JW. Monoclonal antibody to rubella virus capsid protein recognizes a β -cell antigen. *J Immunol*, 1993, 150(7): 3080–3085.
- [24] Holmgren A. Thioredoxins/Roberts GCK, Ed. *Encyclopedia of Biophysics*. Berlin, Heidelberg: Springer, 2013: 2613–2615.
- [25] Priestersbach A, Kubicek J, Schäfer F, et al. Purification of his-tagged proteins. *Methods Enzymol*, 2015, 559: 1–15.
- [26] Baldo BA. Safety of Biologics Therapy: Monoclonal Antibodies, Cytokines, Fusion Proteins, Hormones, Enzymes, Coagulation Proteins, Vaccines, Botulinum Toxins. Switzerland: Springer, 2016: 263–307.
- [27] Zhao ZR, Tao ZL, Wang CX. Analysis of the detection results of rubella virus IgM in 4 860 children. *Chin J Health Lab Technol*, 2017, 27(18): 2708–2710 (in Chinese). 赵宗瑞, 陶占领, 王春霞. 4 860 例儿童风疹病毒 IgM 抗体检测结果分析. *中国卫生检验杂志*, 2017, 27(18): 2708–2710.

(本文责编 陈宏宇)