

分类号:

密级:



甘肃中医药大学

GANSU UNIVERSITY OF CHINESE MEDICINE

硕士学位论文 (专业学位)

论文题目(中文) A 组轮状病毒 VP6 蛋白抗体制备及
血清抗体检测方法的建立

论文题目(外文) Generation of antibodies against VP6 protein
of group A rotavirus and establishment of a detection method
for detecting serum antibody against group A rotavirus

研究生姓名 苏韞曦

学 科、专 业 公共卫生

研 究 方 向 传染病防控

指导老师、职称 郑贵森教授

实践老师、职称: 段招军研究员、孙晓曼副研究员

论 文 工 作

起 止 年 月 2020 年 10 月 至 2022 年 3 月

论文提交日期 2022 年 3 月

论文答辩日期 2022 年 5 月

学位授予日期 2022 年 6 月

独创性声明

本人声明所呈交的学位论文是本人在导师的指导下进行的研究工作及取得的
研究成果。学位论文中凡应用他人已经发表或未发表的成果、数据、观点等，均
已明确注明出处。除文中已经注明引用的内容外，不包含任何其他个人或集体已
经发表或撰写过的科研成果。对本研究做出贡献的个人或集体均已在文中做了明
确的说明并表示谢意。

论文作者签名：东提曦

签字日期：2022年 6 月 11 日

学位论文版权使用授权书

本学位论文作者完全了解甘肃中医药大学有关保留、使用学位论文的规定，
本人同意学校保存或向国家有关部门或机构送交论文的纸质版或电子版，允许论
文被查阅或借阅。本人授权甘肃中医药大学可以将学位论文的全部内容或部分内
容编入有关数据库进行检索，可以采用任何复制手段保存、汇编学位论文。

（保密的学位论文在解密后适用本授权书）

学位论文作者签名：东提曦

签字日期：2022年 6 月 11 日

导师签名：

郭贵森

签字日期：2022年 6 月 13 日

学位论文知识产权权属声明

本人郑重声明：我所提交答辩的学位论文，系本人在导师指导下，在学期间完成的职务成果，该成果的知识产权属甘肃中医药大学所有，并受国家知识产权法的保护。本人在毕业离校前将与论文有关的研究资料和结果全部交给导师或学校，不得私自留存；如离校后需使用与学位论文相关的数据资料参加学术会议、公开报告、发表论文和申请基金等，须征得导师及导师所在单位的书面同意，并同时署名“甘肃中医药大学”。未经学校准许，不得擅自对外披露本论文尚未公开的研究成果。本人完全清楚和理解声明的全部内容，如本人违反上述声明，自愿承担由此引发的全部法律责任。

注：保密的学位论文在解密后适用本声明。

研究生签名：苏振斌

日期：2022 年 6 月 11 日

导师签名：

郭贵森

日期：2022 年 6 月 13 日

目 录

摘要	1
ABSTRACT	2
前言	1
第一章 免疫原及抗体的制备	5
1. 实验材料	5
1.1 主要实验仪器	5
1.2 主要实验试剂	6
1.3 主要试剂配制	6
2. 实验方法	7
2.1 轮状病毒培养及纯化	7
2.2 轮状病毒 VP6 蛋白的表达及纯化	9
2.3 轮状病毒制备鼠多抗	18
2.4 VP6 蛋白制备兔多抗	19
3. 实验结果	20
3.1 轮状病毒培养及纯化	20
3.2 轮状病毒 VP6 蛋白的表达及纯化	22
3.3 RV VP6 鼠多抗	30
3.4 RV VP6 兔多抗	31
4. 分析与讨论	32
5. 小结	34
第二章 间接 ELISA 法检测血清中抗体水平方法的建立	35
1. 实验材料	35
2. 实验方法	35
2.1 间接 ELISA 法的建立	35
2.2 间接 ELISA 法最佳条件的优化	36
2.3 优化间接 ELISA 法的检验	37
3. 实验结果	38
3.1 间接 ELISA 法包被抗原的确定	38
3.2 间接 ELISA 法最佳条件的优化	39
3.3 优化间接 ELISA 法的检验	42
4. 分析与讨论	44
5. 小结	46
结 语	47
参考文献	48
文献综述	51
致 谢	57
在学期间主要研究成果	58

摘要

目的: 表达和纯化 A 组轮状病毒 (Rotavirus, RV) VP6 蛋白; 利用纯化后的 RV 病毒粒子和 VP6 蛋白分别免疫动物制备特异性多克隆抗体; 基于 VP6 蛋白建立血清中人 A 组轮状病毒抗体水平的检测方法。

方法: (1) 将 VP6 基因连接到 pET30a 载体构建重组质粒, 鉴定成功后在大肠杆菌系统中进行蛋白表达, 22℃ 低温诱导表达和纯化可溶 VP6 蛋白, 37℃ 高温诱导制备包涵体 VP6 蛋白并进行透析复性; (2) 将 VP6 基因连接到 pFastBac1 载体构建重组质粒并在蛋白 C 端带有 his 标签, 鉴定成功后利用杆状病毒表达系统制备 VP6 蛋白, 使用亲和层析镍柱进行纯化; (3) 培养和纯化完整 RV 病毒粒子, 分别以 RV 和 RV VP6 蛋白为免疫原, 免疫动物获得多克隆抗体, 利用间接 ELISA 法检测制备抗体的效价; (4) 以纯化得到的 VP6 蛋白为包被抗原, 建立检测血清中人 RV 抗体的间接 ELISA 方法, 优化条件后对 46 份湖南腹泻入院儿童血清样本进行 RV 抗体水平的检测。

结果: (1) 利用大肠杆菌表达系统得到包涵体 VP6 蛋白, 包涵体透析复性后仅能得到少量可溶蛋白, 复性效率低。利用杆状病毒表达系统表达得到纯度高、免疫原性好的可溶 VP6 蛋白; (2) 利用纯化的 RV 病毒粒子免疫小鼠得到效价较高的 RV 鼠多抗, VP6 包涵体蛋白免疫兔子制备 RV VP6 兔多抗, 两种多抗均可用于 Western Blotting 检测, 鼠多抗纯度较高且特异性更好; (3) 利用建立的间接 ELISA 法检测 46 份腹泻儿童血清样本, 血清稀释至 1:6000 后检出率为 82.6%。

结论: 本研究成功表达纯化出 A 组轮状病毒 VP6 可溶蛋白, 制备得到 RV 鼠多抗和 RV VP6 兔多抗, 并基于 VP6 蛋白建立了间接 ELISA 法用以检测血清中人轮状病毒抗体水平, 为轮状病毒检测及疫苗评价相关研究奠定了基础。

关键词 轮状病毒; VP6 蛋白; 抗体制备; 抗体检测

ABSTRACT

Objective: To obtain the VP6 protein of group A rotavirus and generate specific polyclonal antibodies by immunizing animals with rotavirus or VP6 protein. Establishing a method to detect the antibody level against human RVs in serum based on VP6 protein.

Methods: (1) The VP6 fragment was cloned into the pET30a vector and the recombinant plasmid was successfully constructed. VP6 protein was expressed in the *E.coli*. The soluble VP6 protein and VP6 inclusion body were expressed at 22 °C and 37 °C ,respectively. Refolding of VP6 inclusion body was carried out using the dialysis method. (2) The VP6 gene was cloned into pFastBac1 vector with a C-terminal his tag and recombinant plasmid was successfully constructed. The soluble VP6 protein was expressed in baculovirus system and purified by affinity chromatography using Histrap column. (3) An indirect ELISA method was established to detect antibody against human RVs in serum. The antibody level of 46 serum samples of hospitalized children with diarrhea in Hunan province was evaluated following optimized conditions.

Results: (1) VP6 protein was mainly expressed as inclusion body in *Escherichia coli*. Soluble VP6 protein with high purity and good immunogenicity was obtained in the baculovirus expression system. (2) RV polyclonal antibodies of rabbits and mice with high titers were obtained by animal immunization, both of which could be used for Western Blotting detection. Rabbit RV polyclonal antibodies has higher purity. (3) The antibody level in 46 serum samples of hospitalized children with diarrhea were detected by indirect ELISA. The detection rate was 82.6% with the serum diluted to 1:6000.

Conclusions: In summary, RV VP6 soluble protein was successfully expressed, RV polyclonal antibodies of rabbits and mice were obtained, and an indirect ELISA method was established to detect the antibody level against human rotavirus in serum using VP6 protein. This study provides the basis for further research of rotavirus detection and vaccine evaluation.

KEY WORDS rotavirus, VP6 protein, antibody production, antibody detection

前言

轮状病毒 (Rotavirus, RV) 是引起儿童急性腹泻和重症腹泻的最常见病毒, 已成为 5 岁以下儿童腹泻死亡的重要原因, 是世界范围内影响婴幼儿健康的重大公共卫生问题。几乎每个 5 岁以下儿童均会感染轮状病毒, 无论在发达国家还是发展中国家均造成沉重的疾病负担。在我国, 轮状病毒的感染具有发病率低但检出率高、死亡率低但死亡例数高的流性特征。临床上至今仍没有针对轮状病毒的特异有效的治疗方法, 只能通过接种疫苗降低感染率。近年来我国轮状病毒流行株不断变化, 其中 A 组轮状病毒 (group A rotaviruses, RVAs) 在人群中流行最为广泛, 是引起婴幼儿腹泻的最主要病原, 市售疫苗的保护效果已不能满足当前防控需求, 因此研制新型疫苗至关重要。

轮状病毒结构蛋白中, 中间衣壳蛋白 VP6 为决定病毒分组的抗原, 也是同组中任意种属动物 RV 均有的共同抗原。VP6 蛋白是轮状病毒中含量最高的蛋白, 且 VP6 具有很好的免疫原性和抗原性, 这使得它成为轮状病毒疫苗开发和病毒检测方法研究中的热点, 而 VP6 蛋白的表达则是开展相关研究的基础。大肠杆菌表达系统是表达 VP6 蛋白时使用最广泛的表达系统, 其优点是操作简便、周期短、成本低, 局限性是只能表达出包涵体形式的 VP6 蛋白, 导致蛋白空间结构发生改变, 对其进行包涵体复性时效率较低且蛋白生物活性受到影响。昆虫杆状病毒表达系统表达周期长、操作较为复杂, 一般常用于实验室研究, 不适于工业大规模生产, 但该系统表达可溶形式蛋白更有优势。同种蛋白比较时, 可溶形式比包涵体形式更接近于天然状态, 因此可溶性蛋白生物活性高、蛋白真实且抗原性好。

在轮状病毒的疫苗开发研究中, 接种疫苗后血清抗体水平是评价疫苗效果的重要标准, 因此建立可靠的血清抗体检测方法十分重要。轮状病毒抗体的检测方法主要是间接 ELISA 法, 只需将待检血清加入制备好的抗原板上孵育, 再加入酶标抗体孵育显色即可测定 OD₄₅₀ 值, 操作简便、快速, 可同时检测大量样品。目前国内有许多针对猪、牛等动物轮状病毒抗体检测的相关试剂盒, 而检测人轮状病毒血清抗体水平的试剂盒较少, 一般均注明用于科研实验而非临床诊断, 且没有公认的金标准试剂盒, 并且试剂盒在检测抗体时需要先对血清样本进行稀释, 而目前现有试剂盒的稀释标准各不相同, 差异达到数十倍甚至百倍, 这直接导致了后续检测值和评判标准的不同, 不利于抗体检测试剂盒的规范及疫苗效果的评价。

本研究在 P2 实验室进行人轮状病毒培养及蛋白表达。分别尝试在大肠杆菌表达系

统和昆虫杆状病毒表达系统中，表达 A 组轮状病毒 VP6 蛋白，期望得到表达量大、纯度高、免疫原性好的可溶性 VP6 蛋白。在大肠杆菌表达系统中构建重组质粒并鉴定成功后，于 22℃ 条件下进行低温诱导，表达 VP6 可溶性蛋白；于 37℃ 条件下进行高温诱导，表达 VP6 包涵体蛋白，并通过透析复性使包涵体蛋白恢复空间折叠结构。在昆虫杆状病毒表达系统中构建重组质粒并鉴定成功后，转染进悬浮培养的 sf9 细胞中培养并扩毒，培养完成后收取上清液离心，以亲和层析镍柱进行纯化后浓缩蛋白。用轮状病毒及表达纯化出的 VP6 蛋白作为免疫原免疫小鼠及兔，制备出可用于实验室轮状病毒及 VP6 蛋白检测的多克隆抗体，并以 A 组轮状病毒 VP6 蛋白作为检测抗原，以鼠抗 RV 阴、阳性标准血清作为抗体建立人轮状病毒血清抗体间接 ELISA 检测方法，对方法进行条件优化后，检测 46 份湖南腹泻入院儿童样本并进行方法评价，为轮状病毒的防控奠定基础。

第一章 免疫原及抗体的制备

轮状病毒 (Rotaviruses, RV) 是引起儿童急性腹泻与重症腹泻的最常见病毒。全球范围内, 每年约 1.14 亿儿童感染 RV, 导致 45.3 万人死亡^[1]和超过 200 万的 5 岁以下儿童住院^[2-5]。轮状病毒颗粒有三层衣壳组成, 组成中间层衣壳的 VP6 蛋白是决定病毒分组的抗原, 是同组中的任意种属动物轮状病毒均有的共同抗原, 在同组中表现为高度保守。依据 VP6 抗原特异性和序列进化分析, 可将 RV 分为 A~J 共 10 个组, 其中 A 组轮状病毒 (group A rotaviruses, RVAs) 是引起婴幼儿腹泻的最主要病原^[6], 也是研究人感染 RV 的重点, 在流行病学及疫苗研制方面极为重要。VP6 蛋白约占 RV 病毒总蛋白量的 51%^[7], 其分子量约为 45 KDa^[8]。研究表明, RV 感染后最早和主要的抗体反应是针对 VP6, 且 VP6 具有高度的免疫原性和抗原性^[9]。因此, 轮状病毒 VP6 是 RV 疫苗研制和 RV 检测方法研究中的重要分子^[10-12]。

轮状病毒感染至今仍没有特异有效的治疗方法^[13], 且卫生状况的改善并不能阻止 RV 的传播。疫苗的应用是减少婴幼儿轮状病毒感染性腹泻和死亡的有效手段^[14-16], 研制安全、有效的 RV 疫苗尤为重要。血清中的抗体水平是评价疫苗有效性的重要指标, 用 RV 病毒液及 RV VP6 蛋白作为抗原免疫动物, 制备轮状病毒抗体及 RV VP6 蛋白抗体是 RV 疫苗开发和 RV 检测相关研究的基础。

1. 实验材料

1.1 主要实验仪器

- (1) 立式高速冷冻离心机, 日本日立公司
- (2) 凝胶成像系统 Gel Doc™ XR+ System, 美国 BIO-RAD 公司
- (3) 恒温摇床 THZ-052, 上海博彩生物科技有限公司
- (4) 电热恒温培养箱, 上海森信实验仪器有限公司
- (5) 超声波细胞粉碎机, 宁波新艺超声设备有限公司
- (6) 亲和层析柱, GE healthcare 公司
- (7) 基础电泳仪, 美国 BIO-RAD 公司
- (8) Nanodrop lite 分光光度计, 美国 Thermo 公司

- (9) AKTA Frac-950 纯化仪, GE healthcare 公司
- (10) 蛋白转膜仪, 南京金斯瑞生物科技有限公司
- (11) TC1000-G PCR 仪, 美国 Scilogex 公司
- (12) 96 孔酶标板, 美国 Corning 公司
- (13) 微孔板振荡器, 北京启维益成科技有限公司
- (14) 酶标仪, 美国 Thermo 公司

1.2 主要实验试剂

- (1) 大肠杆菌 BL21 (DEC3) 北京天根生物有限公司
- (2) 氨苄青霉素 (Amp), 美国 Sigma 公司,
- (3) 卡纳青霉素 (K), 美国 Sigma 公司
- (4) 异丙基- β -D-硫代半乳糖苷 (IPTG), 上海 Sangon 公司
- (5) 十二烷基硫酸钠 (Sodium dodecyl sulfate, SDS), 美国 Sigma 公司
- (6) SDS-PAGE 凝胶配制试剂盒, 上海碧云天生物技术有限公司
- (7) 吐温 (Tween 20), 美国 Sigma 公司
- (8) 蛋白低分子量标准 Protein Ruler II, 北京全式金生物公司
- (9) 蛋白低分子量标准 Protein Blue Plus II, 北京全式金生物公司
- (10) 5 $\times$ loading buffer, 上海碧云天生物技术有限公司
- (11) 胶回收试剂盒, 美国 Omega 公司
- (12) 质粒提取试剂盒, 美国 Omega 公司
- (13) 四甲基联苯胺 (TMB) 底物试剂盒, 美国 BD 公司
- (14) HRP 标记的链霉亲和素抗体, 英国 Abcam 公司
- (15) 山羊抗鼠 IgG, 北京全式金生物公司
- (16) 山羊抗兔 IgG (H+L), 美国 Proteintech 公司

1.3 主要试剂配制

- (1) LB 液体培养基: 1%胰蛋白胨, 1% NaCl, 0.5%酵母提取物, 加入去离子水配制。121 $^{\circ}$ C 高温高压灭菌 20 min 后冷却至室温, 存于 4 $^{\circ}$ C。
- (2) LB 固体培养基: 1%胰蛋白胨, 1% NaCl, 0.5%酵母提取物, 1.5%琼脂糖, 加入去

离子水配制, 121℃ 高温高压灭菌 20 min 后冷却至 60℃ 左右, 加入终浓度为 100 mg/mL 的抗生素, 充分混匀后倒平板。待平板冷却凝固后用封口膜封口, 存于 4℃。

(3) PBS 缓冲液: 将 PBS 磷酸盐缓冲液干粉用去离子水按说明定容, 121℃ 高温高压灭菌 20min 后冷却至室温, 储存备用。

(4) SDS-PAGE 凝胶:

- a. 12%分离胶 (10mL): 将 2mL 去离子水, 4mL 30%Acr-Bis, 3.8mL 1M Tris (pH8.8), 0.1mL 10%SDS, 0.1mL 10%过硫酸铵, 0.004mL TEMED 混匀, 注入制胶板体积的 4/5 后, 快速注入适量乙醇驱赶气泡。
- b. 5%浓缩胶 (2mL): 将 1.4mL 去离子水, 0.33mL 30%Acr-Bis, 0.25mL 1M Tris(pH6.8), 0.02mL 10%SDS, 0.02mL 10%过硫酸铵, 0.002mL TEMED 混匀, 吸干制胶板中的乙醇, 将制好的浓缩胶注入凝固的分离胶上层, 插上梳子待凝。

2. 实验方法

2.1 轮状病毒培养及纯化

2.1.1 病毒培养

在 P2 实验室进行人轮状病毒培养。接种 MA 104 细胞到 T75 培养瓶, 培养 24 小时后取生长状态良好的 MA 104 致密单层细胞, 弃去其中培养基, 用 PBS 清洗 3 次后加入无血清的 DMEM 培养基, 并接种 1 mL RV 病毒液 (提前加入终浓度 10 μ g/mL 胰酶活化处理 37℃ 1h), 轻摇后于 37℃、5% CO₂ 的恒温培养箱中静置吸附 2 h, 期间每 15 min 轻摇混匀一次。2 h 后弃去吸附液, 用 PBS 清洗 2 次后加入胰蛋白酶终浓度为 5 μ g/mL 的无血清 DMEM 培养基, 置于 37℃、5% CO₂ 的恒温培养箱内培养。待观察到 80%左右细胞病变时停止培养, 于 -80℃ 保存。

2.1.2 病毒纯化

采用超速离心法纯化病毒。将 400 mL RV 细胞培养物反复冻融 3 次后, 置于水浴锅中, 56℃、60 min 进行灭活处理。灭活后的 RV 病毒液先 6000 rpm 离心 1h, 再 8000 rpm 离心 1h, 除去细胞碎片。离心后取细胞上清液, 用 100 KDa 超滤管浓缩至 20 mL。将病毒浓缩液在 4℃ 条件下, 以 35000 rpm 超速离心 2 h 后, 小心倒弃上清液, 用 500 μ L PBS 重悬离心管底部的病毒粒子并收集于 EP 管中, 液氮速冻后存于 -80℃。

2.1.3 RV 的 SDS-PAGE 分析

利用 SDS-PAGE 电泳, 检测 RV 培养及纯化情况。实验操作步骤如下:

- a. 以 12% 的分离胶和 5% 的浓缩胶制作 SDS-PAGE 电泳凝胶。
- b. 吸取纯化前、纯化后的 RV 病毒液各 20 μL , 分别与 5 μL 5 $\times$ 蛋白上样缓冲液充分混匀, 13000 rpm 离心 2 min。
- c. 于沸水中煮 6-8 min 使样品变性, 13000 rpm 离心 2min。
- d. 组装电泳设备, 吸取样品上清液及 Ruler II Marker 各 10 μL , 加入蛋白胶孔中。连接好正、负电极, 将电压设为 80V 进行 20min 电泳。条带到达分离胶后, 再将电压设为 120V 继续进行约 50min 电泳, 条带到达凝胶底部后关闭电源。
- e. 取出蛋白胶, 切下分离胶放入 Quick Blue 染液中, 置于水平摇床染色 1h。
- f. 倒出染液, 纯水冲洗凝胶后放于凝胶成像仪内, 拍照观察。

2.1.4 RV 的 Western Blotting 鉴定

对纯化后的 RV 进行 SDS 电泳, Marker 使用 Blue Plus II, 操作如 2.1.3 (步骤 a. 至 d.)。取下蛋白胶后, 切下分离胶放入纯水中, 继续如下检测:

- a. PVDF 膜活化。剪下与蛋白胶尺寸相同的 PVDF 膜, 浸入甲醛 1min 后取出, 再浸入 1 $\times$ 平衡液中 1min。
- b. 转膜。三明治转膜夹内由阳极 $\rightarrow$ 阴极的顺序为: 海绵垫 $\rightarrow$ PVDF 膜 $\rightarrow$ 目的蛋白电泳后的蛋白胶 $\rightarrow$ 海绵垫, 采用槽式湿转法转膜。以恒流 300mA 快速转膜大约 16min 左右, 关闭电源。
- c. 取出 PVDF 膜, 浸泡在 10% 的脱脂奶粉中, 置于水平摇床封闭 1h。
- d. 封闭结束, 将兔 RV VP6 蛋白多抗按照 1:1500 稀释到 2% 的脱脂奶粉中, 并把 PVDF 膜全部浸透其中, 4 $^{\circ}\text{C}$ 过夜孵育。
- e. PVDF 膜在一抗中孵育结束后, 用 PBST 洗三遍, 每次 5min。将 HRP 标记的山羊抗兔 IgG 酶标二抗按照 1: 2000 比例稀释, 并把 PVDF 膜全部浸透其中, 置于水平摇床孵育 1 h, 用 PBST 洗三遍。
- f. 发光鉴定。A、B 发光液按 1:1 稀释后均匀滴在 PVDF 膜上, 快速放进显影匣内拍照。

2.2 轮状病毒 VP6 蛋白的表达及纯化

2.2.1 大肠杆菌表达 VP6-his 蛋白

2.2.1.1 构建重组质粒

由本实验室保存和完成基因测序的人 RVA G9P[8]VP6 基因序列，于苏州金唯智生物科技有限公司优化序列合成构建于 pET-30a 载体上的质粒，即 VP6 蛋白的重组表达质粒 pET30a-G9P[8] VP6。

2.2.1.2 重组质粒的转化

- a. 挑取公司合成的重组质粒 pET30a-G9P[8] VP6 菌体，放入 5mL LB 液体培养基 (K+) 中，37℃，180 rpm 过夜培养 12-14 h。利用质粒 DNA 小提试剂盒提取质粒。
- b. BL21 (DEC3) 感受态细菌于冰上解冻后吸取 50 μ L，加入 2 μ L 质粒吹打混匀后，冰上孵育 30 min。
- c. 42℃ 水浴锅中冲击 45 s 后，冰上孵育 2 min。
- d. 加入 200 μ L 无抗 LB 液体培养基，37℃，180 rpm 培养 45 min。
- e. 吸取菌液 50 μ L，均匀涂布接种于卡那霉素抗性 (K+) 的 LB 固体培养基平板上，37℃，倒置过夜培养。
- f. 次日，在平板上挑取单克隆菌落，加入 150 mL LB 液体培养基 (K+) 中，37℃，180 rpm 过夜摇菌培养 12-14 h。

2.2.1.3 VP6-his 蛋白的可溶性表达

- a. 过夜培养的菌液按 1:100 加入 LB 液体培养基 (K+) 中，37℃，180 rpm 培养至 OD₆₀₀ 吸光值约 0.7。
- b. 菌液中加入 0.4 mM IPTG，分别在 22℃、37℃ 条件下，150 rpm，诱导过夜 12-14 h。
- c. 次日，诱导后菌液在 4℃ 条件下，6000 rpm 离心 8 min。倒弃上清液，加入 30 mL PBS 重悬菌体。
- d. 将重悬后的菌体以 80% 的功率进行超声破碎。超声 2s，间隔 3s，超声破碎 1h 后，在 4℃ 条件下，13000 rpm 离心 30 min。
- e. 通过 SDS-PAGE 鉴定不同温度下蛋白表达情况，步骤同 2.1.3。

2.2.1.4 VP6-his 蛋白的包涵体表达

- a. 过夜培养的菌液按 1:100 加入 LB 液体培养基 (K+) 中，37℃，180 rpm 培养至

OD₆₀₀ 吸光值约 0.7。

b. 在菌液中分别加入浓度为 0, 0.1mM, 0.2mM, 0.5mM, 1mM, 2mM 的 IPTG, 在 37℃, 180 rpm 条件下, 分别诱导 5h, 8h, 12h, 16h。

c. 4℃, 6000 rpm 离心, 收菌并用 PBS 重悬, 鉴定不同条件下包涵体蛋白表达的最佳条件。

d. 在最佳条件下扩大培养菌液, 4℃, 6000 rpm 离心, 收菌并用 PBS 重悬。

e. 重悬后的菌体以 50% 的功率进行超声破碎。超声 2s, 间隔 3s, 重复 100 次后, 在 4℃ 条件下, 13000 rpm 离心 30 min。倒弃上清液, 离心管底部白色沉淀即为包涵体蛋白。

f. 用玻璃棒轻柔刮去包涵体表面较为柔软的菌体层。菌体呈褐色软黏状, 包涵体为白色、较硬的固体。

g. 用 washing buffer(0.5% Triton-100, 50mM Tris pH8.0, 300mM NaCl, 10mM EDTA, 1% DTT) 重悬包涵体, 超声 30 次后, 4℃, 13000 rpm 离心 15 min。再用玻璃棒刮去包涵体表面的菌体。重复 1-2 次直至包涵体表面无明显菌体层。

h. 用 resuspension buffer (50mM Tris pH8.0, 100mM NaCl, 10mM EDTA, 1% DTT) 重悬包涵体, 超声 30 次后, 4℃, 13000 rpm 离心 15 min, 并对包涵体进行称重。

i. 将包涵体按 30 mg/mL 的比例溶解于 dissolution buffer(8M 尿素(Urea)), 在 4℃ 条件下, 搅拌均匀后, 13000 rpm 离心 15min。吸取上清液, 保存于-80℃。

2.2.1.5 VP6-his 蛋白的包涵体透析复性

a. 在 100mL refolding buffer(8M Urea, 400mM L-Arg HCl, 100mM Tris pH8.0, 2mM EDTA, 5mM GSH, 1mM GSSG) 中, 加入 2mL (30mg/mL) 溶解后的包涵体蛋白, 搅拌均匀后放于透析袋中。将透析袋浸没于装有 2L 透析液 (PBS, 6M Urea, 5mM GSH, 1mM GSSG, pH7.5) 的大烧杯内。在烧杯内加入转子, 置于磁力搅拌器上, 于 4℃ 条件下, 搅拌透析。

b. 透析液以 6M, 4M, 2M, 1M, 0.5M 尿素浓度 (其他条件不变), 进行梯度透析, 每隔 8h 换液一次。

c. 尿素浓度透析至 0.5 M 后, 烧杯内换为 PBS 液体继续透析 24 h, 每 2-4 h 换液一次。

d. 透析结束后倒出透析袋内液体, 4℃, 13000 rpm 离心 30 min, 收集上清液。

e. 用 10 KDa 超滤管将上清液浓缩至 2 mL, 浓缩液装入 EP 管中, 4℃, 13000 rpm

离心 10 min。吸取上清液装入新的 EP 管内，测蛋白浓度并标记。蛋白经液氮速冻后保存于 -80℃。

2.2.1.6 SDS-PAGE 检测

利用 SDS-PAGE 电泳（步骤同 2.1.3），检测大肠杆菌系统表达的 VP6-His 蛋白，包括：22℃ 诱导后的上清和沉淀、37℃ 不同浓度 IPTG 诱导后的沉淀、最佳诱导条件下表达的包涵体蛋白、纯化后的包涵体蛋白及透析复性后的蛋白。

2.2.2 大肠杆菌表达 VP6-GST 蛋白

2.2.2.1 构建重组质粒

（1）引物的设计与合成

引物由苏州金唯智生物科技有限公司合成，引物序列如下，划线部分为酶切位点。

FBamHIVP6: CGCGGATCCGAAGTGCTGTATAGCCTGAGC

RXhoIVP6:

CCGCTCGAGttaTTTAATCAGCATGCTGCGAATGC

（2）目的基因的 PCR 扩增

以 pET30a-G9P[8] VP6 重组质粒为模板，进行 PCR 扩增，构建反应体系如表 1-1，PCR 反应程序如表 1-2。

表 1-1 目的基因 PCR 反应体系

试剂	体积 (μL)
模板	2
I5 Mix	25
ddH ₂ O	19
引物 FBamHI VP6	2
引物 RXhoI VP6	2

表 1-2 PCR 反应程序

步骤	温度 (℃)	时间 (min)
heat	94	03:00
变性	91	00:30
退火	55	00:30
延伸	72	01:00
终延伸	72	07:00

注：变性至延伸循环 35 次

（3）琼脂糖凝胶电泳检测

对 PCR 反应产物进行琼脂糖凝胶电泳检测，具体操作步骤如下：

- a. 将 50×TAE 电泳缓冲液用纯水稀释至 1×TAE 缓冲液。
- b. 称取 1.5g 琼脂糖，加入 100 mL 1×TAE 缓冲液，配置成 1.5%的琼脂糖凝胶溶液。
- c. 用微波炉高火加热，待完全溶解后，滴加 10 μ L Gel Red 染液充分混匀。
- d. 按照跑样需求，在制胶槽中插入适当胶孔的梳子，倒入琼脂糖凝胶溶液并迅速去除其中杂质及气泡，放于室温中凝固约 30 min。
- e. 垂直拔掉梳子，用切胶刀沿四周小心取下固体，即 1.5%的琼脂糖凝胶。
- f. 组装好电泳设备后，将 10 μ L 样品与 2 μ L 6×loading buffer 充分混匀，以 10 μ L/孔,上样并加入 10 μ L Marker，180V，120mA 进行电泳。
- g. 结束后将胶放入凝胶成像仪中，进行拍照保存。

(4) PCR 产物的胶回收

- a. 切下 PCR 产物跑胶后的目的条带，装入 EP 管中。
- b. 加入 700 μ L XP2，置于 60℃金属浴中，每 2-3min 震荡一次至完全溶解。
- c. 将溶解液吸入 HiBid DNA cloumn-2mL 收集管内，10000g 离心 1min，弃废液，留管。
- d. 加入 300 μ L XP2，13000g 离心 1min，弃废液，留管。
- e. 加入 700 μ L SPW，13000g 离心 1min，弃废液，留管。重复操作一次。
- f. 空管离心 2min 后，将 HiBid DNA cloumn 移入 1.5mL EP 管，加入 20 μ L Elution Buffer，静置 2min 后，13000g 离心 1min。标记 EP 管，存于-20℃。

(5) 目的基因与载体质粒的酶切及连接

- a. 对胶回收产物和 pGEX6P-1 载体质粒分别进行酶切，构建反应体系如表 1-3。将构建好的体系放入 37℃培养箱中，静置反应 4h。

表 1-3 酶切反应体系

试剂	体积 (μ L)
胶回收产物/载体质粒	20
ddH ₂ O	20
Cutsmart Buffer	5
BamH I	2.5
Xho I	2.5

- b. 酶切反应完成后进行 1.5%琼脂糖凝胶电泳检测，步骤同 2.2.2.1 (3)。

- c. 切下凝胶上的目的条带后进行胶回收纯化，步骤同 2.2.2.1 (4)。
- d. 将回收的目的基因酶切产物与 pGEX6P-1 载体酶切产物进行连接，构建反应体系如表 1-4。构建好的体系置于室温下连接 10min。

表 1-4 连接反应体系

试剂	体积 (μ L)
T4 DNA Ligas	1
10 $\times$ T4 DNA buffer	1
目的基因酶切产物	2
pGEX6P-1 载体酶切产物	1
ddH ₂ O	5

(6) 连接产物的转化

- a. BL21 (DEC3) 感受态细菌上解冻后吸取 50 μ L，加入 5 μ L 连接产物轻柔吹打混匀，冰上孵育 30 min。
- b. 加入 500 μ L 无抗 LB 液体培养基，37 $^{\circ}$ C，150 rpm 培养 1h 后，5000 rpm 离心 3 min，吸出 400 μ L 上清液并倒弃。
- c. 重悬剩余菌液并吸取 50 μ L 均匀涂布接种于 LB 固体培养基 (Amp⁺) 上，37 $^{\circ}$ C 倒置过夜培养。
- d. 次日，挑取培养基上单克隆菌落，加入装有 500 μ L LB 液体培养基 (Amp⁺) 的 1.5mL EP 管中，37 $^{\circ}$ C，180rpm，摇菌培养 5h。

(7) 菌液 PCR

以上述培养好的菌液为模板，进行 PCR 扩增，构建体系如表 1-5，PCR 反应程序如表 1-2。PCR 产物进行 1.5%琼脂糖凝胶电泳检测，步骤同 2.2.2.1 (3)。

表 1-5 连接产物 PCR 反应体系

试剂	体积 (μ L)
模板	2
2 $\times$ Mix	10
ddH ₂ O	7
引物 FBamHI VP6	0.5
引物 RXhoI VP6	0.5

2.2.2.2 VP6-GST 蛋白的可溶性表达

在鉴定连接正确的平板上,挑取生长状态良好的单克隆菌落加入 150 mL LB 液体培养基 (Amp⁺) 中, 37℃, 180 rpm 过夜摇菌培养 12-14 h。余下操作同 2.2.1.3, 其中所有培养基均对应换成带有氨苄抗性的 LB 液体培养基 (Amp⁺)、LB 固体培养基 (Amp⁺), 诱导温度为 22℃。

2.2.2.3 纯化 VP6-GST 蛋白

a. 取含有 2 mL 谷胱甘肽琼脂糖凝胶填料的亲和层析柱, 先用去离子水流穿清洗填料数次, 再用 PBS 流穿清洗 5 次。堵住出水口, 加入 2 mL PBS 混匀后倒入装有蛋白上清液的离心管内, 4℃, 翻转结合 60 min。

b. 将结合后的填料与蛋白液共同倒入亲和层析柱中流穿, 并用 PBS 清洗 5 次, 除去杂蛋白。

c. 取 GST 标签洗脱缓冲液洗脱 5 次, 每次 10 mL, 收集洗脱液。

d. 清水冲洗亲和层析柱 5 次。堵住出水口, 加入 10 mL 盐酸胍 (6 mol/L) 浸泡 10 min 后流穿, 再用清水冲洗 5 次。加入 10 mL 清水封存于 4℃ 冰箱。

2.2.2.4 SDS-PAGE 检测

通过 SDS-PAGE 电泳检测, 鉴定 VP6-GST 蛋白在大肠杆菌中的可溶性表达情况, 操作同 2.1.3。

2.2.2.5 质谱检测鉴定

洗脱蛋白经 SDS-PAGE 跑胶后, 用切胶刀从蛋白胶上切下目的条带, 并将其浸泡于含有 500 μ L ddH₂O 的 1.5 mL EP 管中。做好标记, 交由中国科学院微生物研究所进行质谱检测鉴定。

2.2.3 昆虫杆状病毒表达 VP6 蛋白

2.2.3.1 构建重组质粒

由实验室保存并完成测序的人 RVA G9P[8]VP6 基因序列, 于苏州金唯智生物科技有限公司合成构建于 pFastBac1 载体上的质粒, 即 VP6 蛋白的重组表达质粒 pFastBac1-G9P[8]VP6, 序列末端带有组氨酸 (His) 标签用于蛋白亲和层析纯化。

2.2.3.2 重组质粒的转化及鉴定

(1) 转化重组质粒

a. 将公司合成的重组质粒 pFastBac1-G9P[8]VP6 粉末以 13000rpm 离心 10min, 加入 50 μ L 去离子水并将其充分混匀。

b. DH10Bac 感受态细菌冰上解冻后吸取 100 μ L, 加入 1 μ L 重组质粒轻柔吹打混匀,

冰上孵育 30 min。

c. 42℃水浴锅中冲击 45s，冰上孵育 2 min。

d. 加入 900 μL 无抗 LB 液体培养基，37℃，225rpm 培养 4 h，使感受态细菌恢复生长。

e. 吸取菌液 100 μL ，余下的菌液按梯度稀释(10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3})后，各吸取 100 μL ，均匀涂布接种于三抗 LB 固体培养基（50 $\mu\text{g/mL}$ 卡那霉素 kanamycin, 7 $\mu\text{g/mL}$ 庆大霉素 gentamicin, 10 $\mu\text{g/mL}$ 四环霉素 tetracycline, 100 $\mu\text{g/mL}$ Bluo-gal 和 40 $\mu\text{g/mL}$ IPTG）。37℃倒置培养 24-48 h，直至长出较大的均匀菌落且蓝白斑清晰。

f. 挑选单克隆白斑于 200 μL 的 KGT（50 $\mu\text{g/mL}$ kanamycin, 7 $\mu\text{g/mL}$ gentamicin 和 10 $\mu\text{g/mL}$ tetracycline）三抗 LB 液态培养基中，37℃，225rpm 培养 2h。

（2）菌液 PCR 鉴定

以上述培养好的菌液为模板，以杆状病毒通用引物 M13F 和 M13R 进行 PCR 扩增（M13F Forward (-40) 5' d[GTTCCTCCAGTCACGAC]3'；M13R Reverse 5' d[CAGGAAACAGCTATGAC]3'），构建反应体系如表 1-6，PCR 反应程序如表 1-7。反应完成后取 PCR 产物进行 1.5%琼脂糖凝胶电泳检测，步骤同 2.2.2.1（3）。

表 1-6 连接产物 PCR 反应体系

试剂	体积 (μL)
模板	2
2 $\times$ Mix	10
ddH ₂ O	7
引物 M13F	0.5
引物 M13R	0.5

表 1-7 PCR 反应程序

步骤	温度 (°C)	时间 (min)
heat	93	03:00
变性	94	00:45
退火	55	00:45
延伸	72	05:00
终延伸	72	07:00

注：变性至延伸循环 35 次

（3）提质粒

挑取菌液 PCR 鉴定为阳性的白斑菌液，加入 3mL KGT 三抗 LB 培养基中，37℃，

225rpm 摇菌培养 24h 左右。用质粒 DNA 中提试剂盒提取质粒，质粒测浓度后待做转染。

(4) 质粒 PCR 鉴定

以提取的质粒为模板，进行 PCR 扩增，构建反应体系如表 1-6，PCR 反应程序如表 1-7。反应完成后取 PCR 产物进行 1.5% 琼脂糖凝胶电泳，检测步骤同 2.2.2.1 (3)。

2.2.3.3 转染

- a. 预先准备好悬浮培养的 sf9 细胞，细胞密度约 $1.5-2.5 \times 10^6$ cells/mL。
- b. 细胞计数板数细胞后铺六孔板（孔直径 35mm），每孔 $8-9 \times 10^5$ 个细胞，在平滑台面上画十字将细胞混匀，27℃ 培养 1h 左右，使细胞完全贴壁。
- c. 在超净台中，Cellfectin II 6-8 μ L + unsupplemented Grace' s Medium 100 μ L，轻柔混匀，标管 1，静置 5 min。bacmid 1-2 μ g + unsupplemented Grace' s Medium 100 μ L，轻柔混匀并标管 2。管 1、管 2 混合后孵育 45min。
- d. 吸出六孔板中的培养基，以 2 mL/孔加入 unsupplemented Grace' s Medium 清洗后弃去培养基。
- e. 步骤 c 的混合液中加入 0.8 mL unsupplemented Grace' s Medium，27℃ 孵育 5 h。弃去培养基，以 2 mL/孔加入 Sf-900™ III SFM 培养基（含三种抗生素：50 units/mL penicillin、50 μ g/mL streptomycin 和 0.125 μ g/mL Fungizone® Antimycotic）。27℃ 避光孵育 72 h，至细胞裂解，单层细胞漂浮。
- f. 收取 2mL 上清，500g、5min 离心后转移至干净的 EP 管，锡箔纸包裹 4℃ 避光保存，即为 P1 病毒。

2.2.3.4 扩毒

用 10cm 盘铺约 1×10^7 个 sf9 细胞，加入 500 μ L P1 病毒，27℃ 避光培养 72h 后收毒，500 g 离心 5 min 后上清转移至干净的 15 mL 离心管，锡箔纸包裹 4℃ 避光保存，即为 P2 病毒。用 10 cm 盘铺约 1×10^7 个 sf9 细胞，加入 200 μ L P2 病毒，27℃ 避光培养 72 h 后收毒，500 g 离心 5 min 后上清转移至干净的 15 mL 离心管，锡箔纸包裹 4℃ 避光保存，即为 P3 病毒。悬浮避光培养 300mL sf9 细胞，密度为 $1.5-2 \times 10^6$ 加入 600 μ L P3 病毒，27℃ 继续悬浮培养 72 h 后，1000 g 离心 10 min 后上清转移至干净的 50 mL 离心管，锡箔纸包裹 4℃ 避光保存，即为 P4 病毒。

2.2.3.5 病毒感染昆虫细胞表达 VP6 蛋白

悬浮培养 4 瓶 300 mL Hi5 细胞，分别加入 40 mL P4 病毒，避光悬浮培养 48 h 后，7000 rpm、4℃ 离心 2 h，收集上清液，该上清即含有杆状病毒感染昆虫细胞表达 VP6 蛋

白。上清液用 0.22 μm 滤膜抽滤去除杂质。

2.2.3.6 纯化 VP6 蛋白

(1) Ni 柱纯化

a. 在蠕动泵上接好 Ni 柱，以 1mL/min 流速，先用 50mL ddH₂O 过柱清洗，再用 50mL buffer (10mM CaCl₂, 20mM Tris-HCl, 150mM NaCl, pH8.0) 过柱平衡，防止病毒上清直接接触水后在柱子上变性沉淀。

b. 抽滤好的蛋白上清在 4℃ 条件下，以 2 mL/min 流速，过柱进行结合。

c. 结合蛋白后，在 4℃ 条件下，依次以咪唑浓度分别为：20mM、50mM、300mM 的 50mL Elution buffer (10mM CaCl₂, 20mM Tris-HCl, 150mM NaCl, 咪唑, pH8.0) 过柱洗脱蛋白，分别收集洗脱液并标记。

d. 用 30 mL ddH₂O 清洗 Ni 柱后，保存于 4℃ 冰箱中。

e. 将 300 mM 咪唑洗脱蛋白加入 10KDa 超滤管中，2800 rpm，4℃ 离心。每次浓缩至蛋白样品剩约 3 mL 时，加满 buffer 并弃去超滤管下层滤液，重复数次，直至蛋白样品中含有咪唑的缓冲液几乎全部替换为不含咪唑 buffer。将其浓缩至约 2 mL，吸出后装于 EP 管中，4℃，13000 rpm 离心 10 min。吸取上清液，用 Nanodrop lite 检测浓度，液氮中速冻后保存于 -80℃。

(2) AKTA 纯化

连接好 AKTA 后，以 1mL/min 流速，先用 120 mL ddH₂O 过柱清洗，再用 120 mL buffer (10mM CaCl₂, 20mM Tris-HCl, 150mM NaCl, pH8.0) 过柱平衡，走平后 UV 值调零。将 Ni 柱纯化浓缩后的蛋白用注射器打入进样口后，继续流过 buffer。设定参数后，用 EP 管收集 UV 值大于 20 mAU 的洗脱液 (1mL/管)。根据蛋白 280nm 吸收峰的位置和对应的样品管，收集目的蛋白，通过 SDS-PAGE 进一步验证。洗脱结束后，先用 120 mL ddH₂O 过柱清洗，再用 120 mL 20% 的乙醇装满柱子并封闭存放。

2.2.3.7 SDS-PAGE 检测

通过 SDS-PAGE 鉴定昆虫杆状病毒表达系统中，VP6 蛋白的可溶性表达情况，包括上清表达产物经 Ni 柱纯化后 20mM 咪唑洗、50mM 咪唑、300mM 咪唑洗脱下的蛋白，及 AKTA 纯化后的蛋白。步骤同 2.1.3。

2.2.3.8 Western blotting 检测

对纯化后的重组 VP6 蛋白进行 Western blotting 检测，步骤同 2.1.4。

2.3 轮状病毒制备鼠多抗

2.3.1 动物免疫

选取两只健康的 BALB/c 小鼠作为首免动物。免疫前尾静脉采血，留作阴性标准血清。小鼠共进行 8 次免疫，免疫间隔时间为 7 天，免疫剂量为 20 μg /次。第 1-6 次免疫抗原为纯化后的 RV 病毒液，第 7、8 次免疫抗原为纯化后的重组 VP6 蛋白。用于首免的抗原加入弗氏完全佐剂；用于第 2-8 次免疫的抗原加入弗氏不完全佐剂。取血检测时间为第 8 次免疫后 7 天。ELISA 检测抗血清达到要求后，颈动脉采全血。采集到的血液均在 4℃ 条件下，3000 rpm 离心 15 min，抽取上层血清，保存于 -20℃ 冰箱。动物免疫实验由上海艾比玛特公司完成。

2.3.2 鼠多抗效价鉴定

- a. 将纯化好的重组 VP6 蛋白用 0.05 M 的碳酸盐缓冲液稀释至 0.25 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 后加入酶标板中，100 μL /孔，4℃ 孵育过夜。
 - b. 次日弃去孔内液体，加入含 10% 脱脂奶粉的 PBS，100 μL /孔，37℃ 封闭 1h 后 PBST 洗板。
 - c. 将小鼠血清样本分别倍比稀释至 1:1000、1:2000、1:4000、1:8000、1:16000、1:32000、1:64000、1:128000、1:256000、1:512000 后加入酶标板，100 μL /孔，以免疫前小鼠作为阴性血清，依次同比例稀释进行对照，37℃ 孵育 1h 后 PBST 洗板。
 - d. 将 HRP 标记的山羊抗鼠 IgG 酶标二抗稀释至 1:8000 后加入酶标板，100 μL /孔，37℃ 孵育 45 min 后 PBST 洗板。
 - e. 将 TMB 底物的 A 液与 B 液按 1:1 混匀后加入酶标板，50 μL /孔，室温避光反应 15min。
 - f. 加入 0.5 M 磷酸终止液，50 μL /孔，终止显色反应；利用酶标仪测定 OD₄₅₀ 值。
- 实验中以 Tween-20 浓度为 0.5% 的 PBST 溶液洗板，震荡洗涤 5 次，每次 3min，洗涤后拍干。多克隆抗体血清孔的 OD₄₅₀ 值记为 P，阴性对照孔的 OD₄₅₀ 值记为 N。当 P/N ≥ 2.1 时，多克隆抗体的最高稀释度为多克隆抗体的效价。

2.3.3 鼠多抗 Western Blotting 鉴定

对免疫后获得的多克隆抗体进行 Western Blotting 验证。一抗即为该多克隆抗体，二抗为山羊抗鼠 IgG，鉴定该多克隆抗体与 RV 及 RV VP6 的特异性结合情况，方法同 2.1.4。

2.4 VP6 蛋白制备兔多抗

2.4.1 动物免疫

选取两只健康的雌性新西兰大白兔作为首免动物，免疫原为大肠杆菌表达的 VP6-His 包涵体蛋白，包涵体蛋白用尿素溶解。免疫前留血样，作为阴性标准血清。免疫方案如下：

一免：第 1 天，预取血，通过颈后背部皮下注射 1000 μL /只，500 μg 蛋白+500 μL 弗氏完全佐剂 KX0210046Q；

二免：第 15 天，按照同样的免疫方式免疫用抗原 1000 μL /只，500 μg 蛋白+500 μL 弗氏不完全佐剂 KX0210047Q；

三免：第 25 天，按照同样的免疫方式免疫用抗原 1000 μL /只，500 μg 蛋白+500 μL 弗氏不完全佐剂 KX0210047Q；

四免：第 35 天，按照同样的免疫方式免疫用抗原 1000 μL /只，500 μg 蛋白+500 μL 弗氏不完全佐剂 KX0210047Q；

终放血：第 45 天，ELISA 检测抗血清效价达到要求后颈动脉采全血。采集到的血液均在 4℃ 条件下，4000 rpm 离心 15 min，抽取上层血清，保存于-20℃ 冰箱。动物免疫实验由上海博奥龙公司完成。

2.4.2 兔多抗效价鉴定

包被：将尿素溶解的 VP6-His 蛋白以 2 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的浓度包被到酶标板中，100 μL /孔，4℃ 孵育过夜。洗板：用 PBST 洗涤三次。

封闭：封闭液（1%BSA，0.1%Tween-20，pH7）250 μL /孔，4℃ 过夜孵育。次日，PBST 洗板三次。

加一抗：将抗血清分别按照 1:1000 稀释，然后 2 倍稀释下去，37℃ 孵育 1h 后 PBST 洗板三次。

加二抗：HRP 山羊抗兔 IgG (H+L) 1:5000 稀释，100 μL /孔，37℃ 孵育 45min 后 PBST 洗板三次。

显色：加入底物溶液（TMB）100 μL /孔，反应 5-10min。

终止：最后加入 50 μL 2mol/L 硫酸终止反应。

测 OD 值：用酶标仪在 450nm 波长下测定 OD₄₅₀ 值。

兔多抗效价鉴定由上海博奥龙公司完成。

2.4.3 兔多抗 Western Blotting 鉴定

对免疫后获得的多克隆抗体进行 Western Blotting 验证。一抗即为该多克隆抗体，二抗为山羊抗兔 IgG，鉴定该多克隆抗体与 RV 及 RV VP6 的特异性结合情况，方法同 2.1.4。

3. 实验结果

3.1 轮状病毒培养及纯化

3.1.1 RV 的增殖

未接种 RV 与接种 RV 后的 MA 104 细胞显微镜下形态结构如图 1-1 所示。A 图是 MA 104 细胞对照培养 72 h 后，细胞仍保持致密单层，仅有少量细胞脱落，无明显空泡；B 图是接种 RV 的 MA 104 细胞培养 72 h 后，细胞脱落 80%以上且呈拉丝状，有明显空泡，细胞病变现象明显。

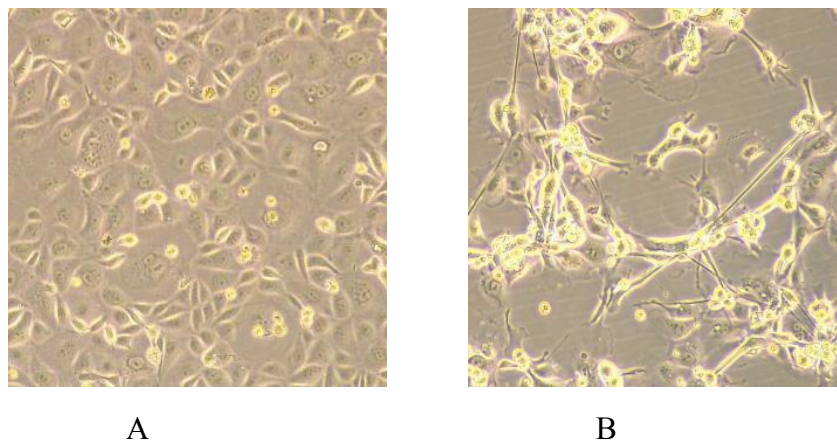


图 1-1 正常 MA 104 细胞（A）与接种 RV 后 72h 细胞（B）的形态结构

3.1.2 RV 的纯化

RV 病毒液灭活后以超速离心法进行纯化，纯化后的 RV 经 Nanodrop lite 分光光度计测定浓度为 1.3 mg/mL。对纯化物进行 SDS-PAGE 分析，纯化物在 45KDa、68KDa 处有明显单条带，结果如图 1-2 所示。

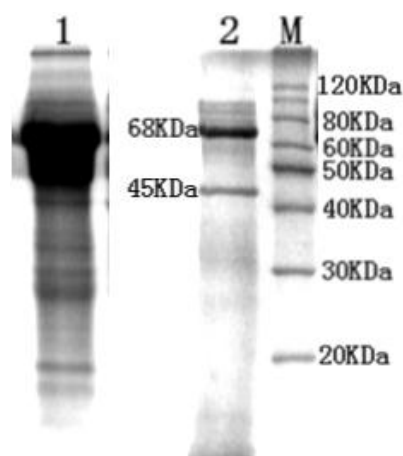


图 1-2 纯化前、后 RV 的 SDS-PAGE

(1: 纯化前 RV; 2: 纯化后 RV; M: Ruler II Marker)

3.1.3 RV 的 Western Blotting 鉴定

纯化后的 RV 通过 Western Blotting 分析, 其结果显示在 45KDa 处有明显条带, 与预期值相符; 在 30KDa 处有较浅杂带, 结果如图 1-3 所示。Western Blotting 分析结果表明, 45KDa 处条带为 RV VP6 蛋白且该蛋白可与兔 VP6 多抗血清发生特异性免疫学反应, 证实纯化出的 RV 具有良好的反应原性。

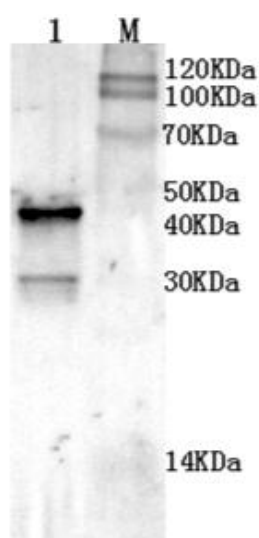


图 1-3 纯化 RV 的 Western Blotting

(1: 纯化前 RV; 2: 纯化后 RV; M: Blue Plus II Marker)

3.1.4 RV 电镜下观察

纯化后的轮状病毒送于病毒病所宋敬东老师处，在电镜下观察，结果如图 1-4 所示，可看到清晰的轮状病毒三层衣壳颗粒，表明纯化得到了很好的病毒粒子。

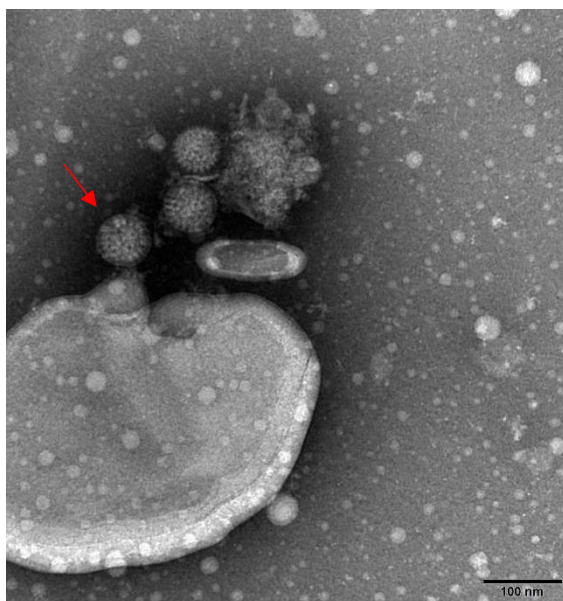


图 1-4 纯化 RV 颗粒电镜下观察图片（宋敬东老师提供）

3.2 轮状病毒 VP6 蛋白的表达及纯化

3.2.1 大肠杆菌表达 VP6-His 蛋白

3.2.1.1 VP6-His 蛋白预表达

在大肠杆菌中表达 VP6-His 蛋白，经 SDS-PAGE 蛋白电泳显示，22℃ 诱导表达时蛋白上清液中未见明显条带，沉淀中出现特异性蛋白条带，大小约为 43KDa，与预期的相对分子质量相符。说明大肠杆菌系统表达出条带正确的 VP6-His 包涵体蛋白，但不能表达可溶形式的目的蛋白，结果如图 2-1-1。

通过在 22℃ 与 37℃ 条件下诱导表达对比发现，37℃ 诱导表达 VP6-His 包涵体蛋白的表达量更高，结果如图 2-1-1 所示。因此后续实验中，VP6-His 包涵体蛋白均于 37℃ 高温诱导表达。

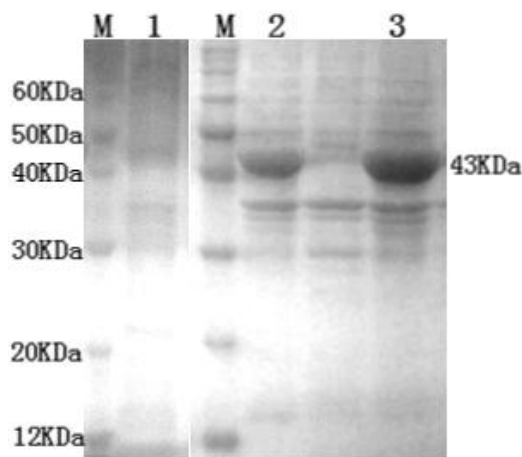


图 2-1-1 大肠杆菌中 VP6-His 蛋白预表达

(1: 22℃ 诱导后上清; 2: 22℃ 诱导后沉淀; 3: 37℃ 诱导后沉淀; M: Ruler II Marker)

3.2.1.2 VP6-His 包涵体蛋白的最佳表达条件

在大肠杆菌表达系统中,摸索不同诱导条件下 VP6-His 包涵体蛋白的最佳表达条件。经 SDS-PAGE 蛋白电泳显示, 37℃ 条件下, 以 0.1mM IPTG 诱导 12h 后 VP6-His 包涵体蛋白表达量最高, 即 VP6-His 包涵体蛋白的最佳表达条件为: 37℃、0.1mM IPTG 诱导 12h。结果如图 2-1-2 所示。

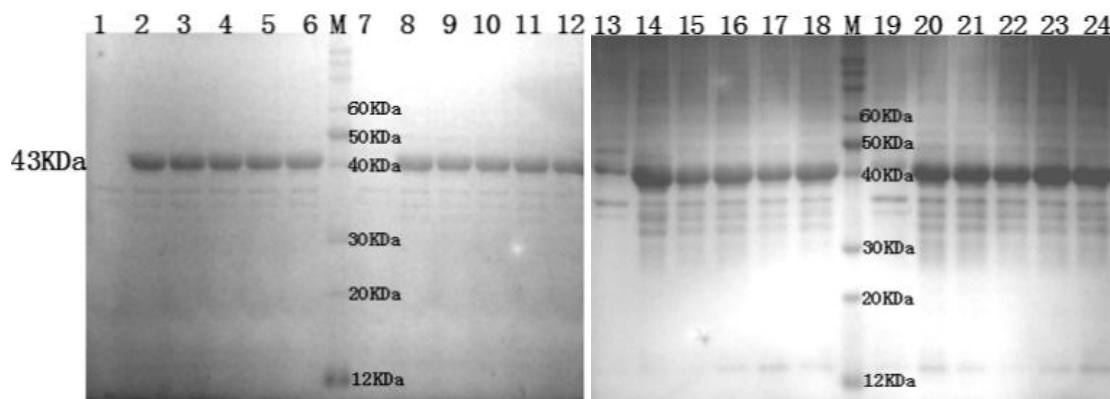


图 2-1-2 VP6-His 包涵体蛋白的最佳表达条件

(1-6: 诱导 5h, IPTG 浓度分别为 0, 0.1mM, 0.2mM, 0.5mM, 1mM, 2mM; 7-12: 诱导 8h, IPTG 浓度分别为 0, 0.1mM, 0.2mM, 0.5mM, 1mM, 2mM; 13-18: 诱导 12h, IPTG 浓度分别为 0, 0.1mM, 0.2mM, 0.5mM, 1mM, 2mM; 19-24: 诱导 16h, IPTG 浓度分别为 0, 0.1mM, 0.2mM, 0.5mM, 1mM, 2mM; M: Ruler II Marker)

3.2.1.3 VP6-his 包涵体蛋白透析复性

在最佳诱导条件下表达 VP6-his 包涵体蛋白, 重悬清洗包涵体后得到 2.52g 纯度较

高的包涵体蛋白。对包涵体蛋白进行透析复性，透析过程中析出较多沉淀，得到少量可溶性蛋白。经 SDS-PAGE 蛋白电泳显示，包涵体蛋白有特异性目的条带，大小约为 45KDa，与预期的相对分子质量相符且纯度极高；透析复性后的蛋白除目的条带外，还出现其他杂带，说明 VP6-his 包涵体蛋白复性效率较低。结果如图 2-1-3 所示。

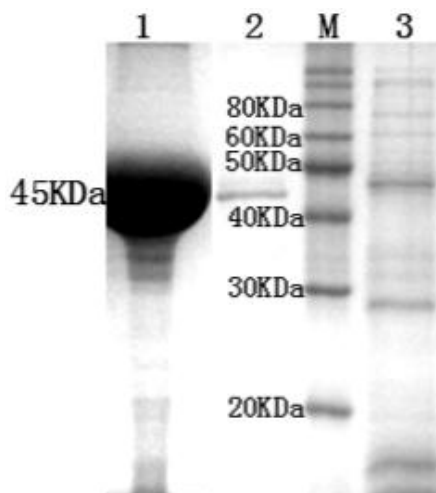


图 2-1-3 VP6-his 包涵体蛋白透析复性

(1: 最佳诱导条件表达 VP6-his 包涵体; 2: 重悬清洗后的 VP6-his 包涵体; 3: 透析复性后的 VP6-his 包涵体; M: Ruler II Marker)

3.2.2 大肠杆菌表达 VP6-GST 蛋白

3.2.2.1 VP6-GST 重组质粒的构建

(1) 目的基因的 PCR 扩增

VP6 目的基因经 1.5%琼脂糖凝胶电泳检测，出现一条带，条带大小为 1200bp，与预期大小一致，说明 PCR 成功扩增出 VP6 目的基因。

(2) VP6-GST 连接产物鉴定

VP6 目的基因与 pGEX6P-1 载体分别酶切后连接，连接产物转化挑菌培养。对培养后的菌液进行 PCR 鉴定。连接产物菌液经 1.5%琼脂糖凝胶电泳检测，出现单一条带，片段大小约为 1200bp，与预期大小一致；空载阴性对照也出现单一条带，片段大小约为 300bp，结果如图 2-2-1 所示，说明 VP6 目的基因已成功插入 pGEX6P-1 表达载体中。

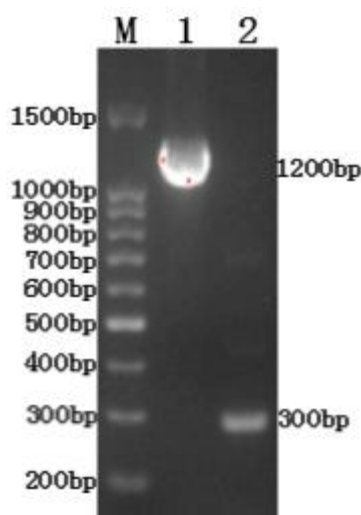


图 2-2-1 连接产物菌液 PCR 后的凝胶电泳图

(1: 连接产物菌液 PCR 产物; 2: 阴性对照; M: 100bp-Marker)

3.2.2.2 大肠杆菌表达 VP6-GST 蛋白

在大肠杆菌中表达 VP6-GST 蛋白，纯化后经 SDS-PAGE 电泳检测显示，蛋白上清液中有 26KDa、48KDa 两条带。48KDa 处蛋白量大；26KDa 处蛋白量少且与预期的 GST 蛋白的相对分子质量相符，而目的蛋白预期的分子量应该为 GST 融合表达的 VP6 蛋白 26KDa 加 48KDa，即 74KDa，结果如图 2-2-2 所示。

切下蛋白胶 48KDa 处条带进行质谱鉴定，发现条带蛋白与大肠杆菌 chaperonin 蛋白比对覆盖度在 92%，与 VP6-GST 目的蛋白的基因序列符合度为 43%，结果如图 2-2-3 所示。质谱检测表明，表达出的条带蛋白不是目的蛋白，即在大肠杆菌表达系统中没有表达出可溶形式的 VP6-GST 蛋白。

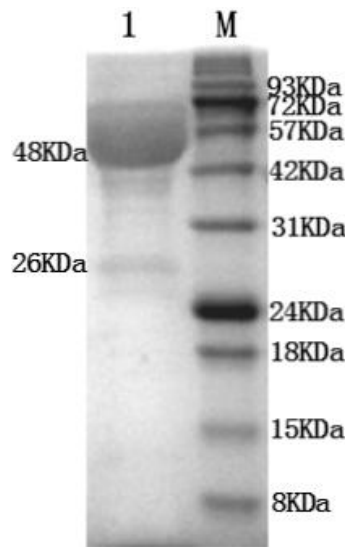


图 2-2-2 大肠杆菌表达 VP6-GST 蛋白的产物 SDS-PAGE 图

(1: 大肠杆菌表达产物; M: MES Marker)

Protein sequence coverage: 43%

Matched peptides shown in **bold red**.

1	MSPILGYWKI	KGLVQPTRL	LEYLEEKYEE	HLYERDEGDK	WRNKKFELGL
51	EFPNLPYYID	GDVKLTQDMA	IIRYIADKHN	MLGGCPKERA	EISMLEGAVL
101	DIRYGVSR	YSKDFETLKV	DFLSKLPEML	KMFEDRLCHK	TYLNGDHVTH
151	PDFMLYDALD	VVLYMDPMCL	DAFPKLVCFK	KRIEAIQID	KYLKSSKYIA
201	WPLQGWQATF	GGGDHPPKSD	LVPRGSMEVL	YSLSKTLKDA	RDKIVEGTLY
251	SNVSDLIQQF	NQMIVTMNGN	DFQTGGIGNL	PIRNWRFDFG	LLGTTLLNLD
301	ANYVETARTT	IEYFIDFIDN	VCMDEMARE	QRNGVAPQSE	ALRKLGIKIF
351	KRINFNNSSE	YIENWNLQNR	RQRTGFVFHK	PNIFPYSASF	TLNRSQPMHD
401	NLMGTMWLNA	GSEIQVAGFD	YSCALNAPAN	IQQFEHIVQL	RALTTATIT
451	LLPDAER	PRVINSADGA	TTWFFNPIL	RPNNVEVEFL	LNGQIINTYQ
501	ARFGTIVARN	FDTIRLSFQL	MRPPNMTPAV	NALFPQAQPF	QHHATVGLTL
551	RIESAVCESV	LADANETLLA	NVTAVRQEYA	IPVGPVFPPG	MNWTEELITNY
601	SPSR	EDNLQR	VFTVASIRSM	LIKLE	

图 2-2-3 质谱检测鉴定结果

3.2.3 昆虫杆状病毒表达 VP6 蛋白

3.2.3.1 重组质粒的构建及转化

重组质粒 pFastBac1-G9P[8] VP6 转化培养后，将菌液稀释 100 倍并取 100 μL 涂布于卡那霉素、庆大霉素、四环霉素（KGT）三抗板，48 h 后长出均匀较大菌落且蓝白斑清晰。

挑取白斑菌落培养后，进行菌液 PCR 鉴定。经鉴定白斑条带约 3500bp（2300bp 加

VP6 序列 1200bp), 确是阳性克隆; 同时挑取蓝斑作为阴性对照, 蓝斑空载条带约为 300bp, 说明白斑是转化成功的目的克隆。

将鉴定为阳性克隆的菌液提质粒, 经 Nanodrop lite 分光光度计测定质粒浓度为 634 μ g/uL。进行质粒 PCR 再次鉴定后出现单一条带, 片段大小约为 3500bp, 与预期大小一致, 确定质粒是阳性克隆, 说明重组质粒 pFastBac1-G9P[8] VP6 转化正确。

菌液及质粒 PCR 产物均用 1.5% 琼脂糖凝胶电泳检测, 结果如图 2-3-1 所示。

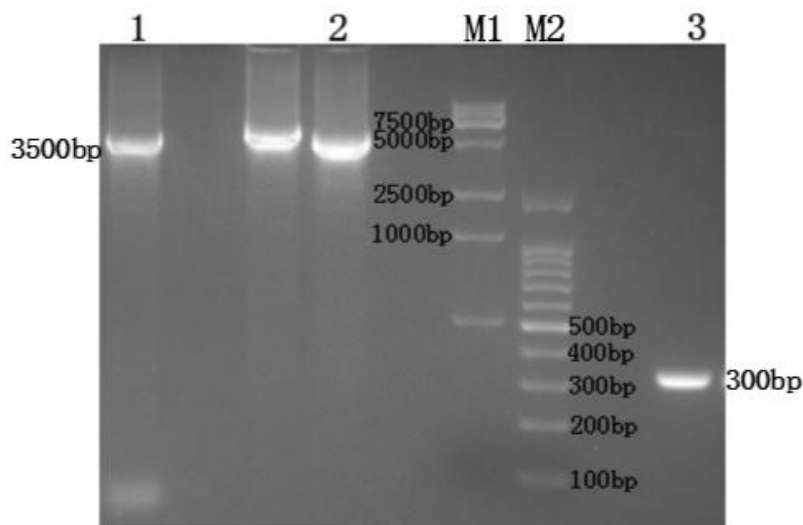


图 2-3-1 杆状病毒重组质粒鉴定的凝胶电泳图

(1: 菌液 PCR 产物; 2: 质粒 PCR 产物; 3: 蓝斑阴性对照; M1: DL15000 DNA Marker; M2: 100bp-Marker)

3.2.3.2 重组 VP6 蛋白的真核表达及纯化

在昆虫杆状病毒表达系统中表达重组 VP6 蛋白, 并用 Ni 柱进行纯化。对 Ni 柱纯化物进行 SDS-PAGE 分析, 20 mM 咪唑洗脱下大量杂带白, 50 mM 咪唑洗脱下部分杂蛋白及少量目的蛋白, 300 mM 咪唑洗脱下大量目的蛋白, 目的蛋白条带在大约 48 kDa 处, 与预期大小相符且纯度较高, 结果如图 2-3-2 所示。

将 300mM 洗脱液浓缩至约为 2 mL, 经 Nanodrop lite 分光光度计测定浓度为 1.1 mg/mL。

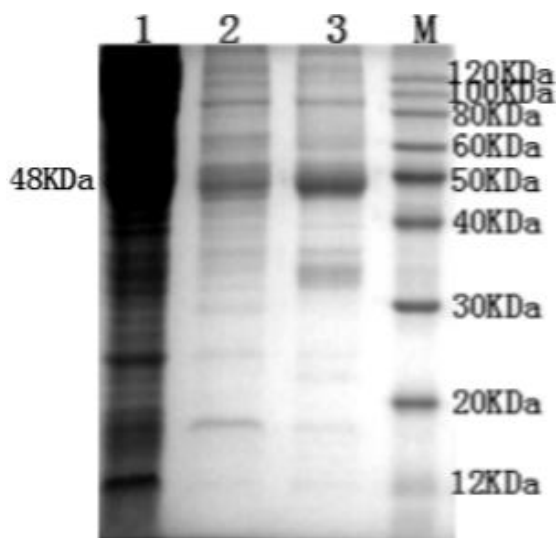


图 2-3-2 VP6 蛋白咪唑洗脱液的凝胶电泳图

(1: 20mM 咪唑洗脱液; 2: 50mM 咪唑洗脱液; 3: 300mM 咪唑洗脱液; M: Ruler II Marker)

3.2.3.2 重组 VP6 蛋白的分子筛层析纯化

对 300 mM 咪唑洗脱下的目的蛋白进行换液浓缩后, 用分子筛层析柱 (Superdex200pg) 对其再次进行纯化, 结果如图 2-3-3 所示。70-80mL 处出现蛋白峰, 对应蛋白分子量约 150 KDa, 与预估 VP6 三聚体出峰位置一致, 目的峰值约为 130 mAU。说明 300mM 咪唑洗脱下的目的蛋白可以经分子筛层析进行纯化, 再次证明目的蛋白表达正确。

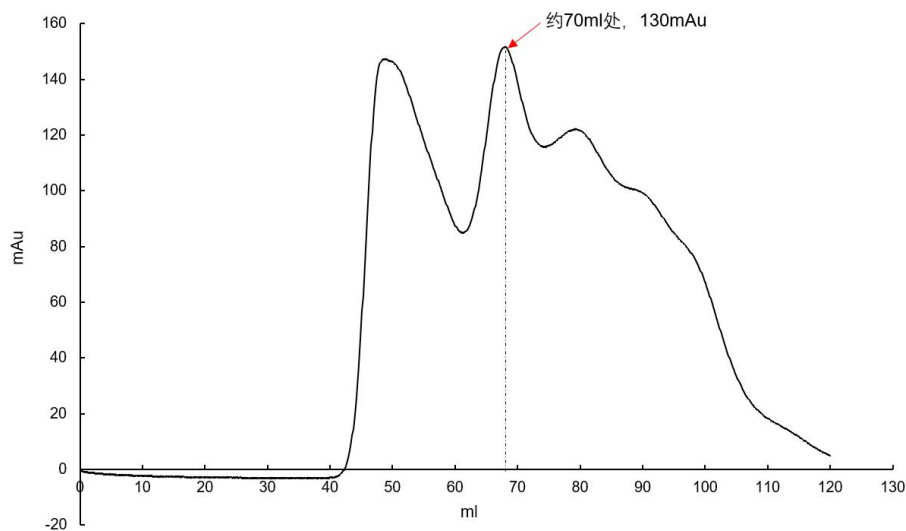


图 2-3-3 VP6 蛋白 AKTA 纯化图

3.2.3.4 分子筛纯化产物的 SDS-PAGE 鉴定

将 70-80mL 峰值处洗脱下的蛋白浓缩至 1mL，经 Nanodrop lite 分光光度计测定浓度为 1.3mg/mL。通过 SDS-PAGE 分析，单一条带大小约为 48KDa，与预期的相对分子质量相符且纯度较高，结果如图 2-3-4 所示。说明通过分子筛层析再次纯化后成功得到了纯度更高的重组 VP6 蛋白。

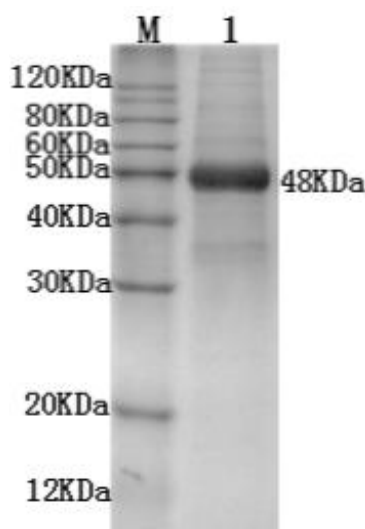


图 2-3-4 AKTA 纯化后 VP6 蛋白 SDS-PAGE 图

(1: AKTA 纯化后 VP6 蛋白; M: Ruler II Marker)

3.2.3.5 重组 VP6 蛋白的 Western Blotting 鉴定

纯化后的重组 VP6 蛋白通过 Western Blotting 鉴定，在 48KDa 处有明显条带，与预期值相符，结果如图 2-3-5 所示。Western Blotting 分析结果表明，该条带为 VP6 蛋白，即在昆虫杆状病毒系统中成功表达出可溶性重组 VP6 蛋白，且该重组 VP6 蛋白可以与兔 VP6 多抗血清发生特异性免疫学反应，证实表达的重组 VP6 蛋白具有良好的反应原性。

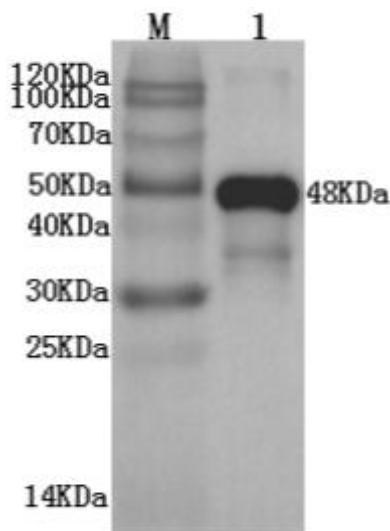


图 2-3-5 重组 VP6 蛋白 Western Blotting 图

(1: 重组 VP6 蛋白; M: Blue Plus II Marker)

3.3 RV VP6 鼠多抗

3.3.1 鼠多抗效价鉴定

利用间接 ELISA 法对小鼠多克隆抗体血清进行效价测定，测得鼠抗 RV VP6 多克隆抗体血清效价为 1:128000，表明免疫小鼠制备的 RV VP6 抗体血清效价较高，结果如图 3-1 所示。将血清置于-80℃保存，用于后续实验。

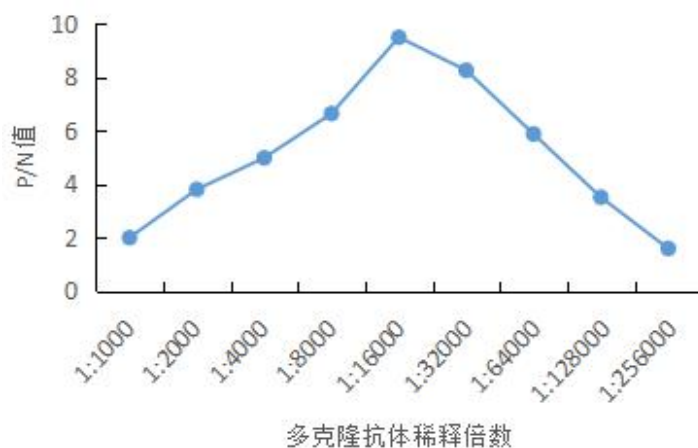


图 3-1 RV VP6 多克隆抗体效价测定

3.3.2 鼠多抗 Western Blotting 鉴定

对免疫后获得的多克隆抗体进行 Western Blotting 验证。一抗即为该多克隆抗体，稀释比例为 1:8000；二抗为山羊抗鼠 IgG，稀释比例为 1:8000。结果如图 3-2 所示，该多

抗与纯化浓缩后的 RV 病毒液、VP6 包涵体蛋白复性液、昆虫杆状系统表达的可溶性重组 VP6 蛋白均有明显的特异性结合反应，而与轮状病毒 VP7、VP8*蛋白则未见结合。另外，未浓缩纯化的 RV 病毒培养液因为病毒含量过低，与该多抗也没有明显结合。

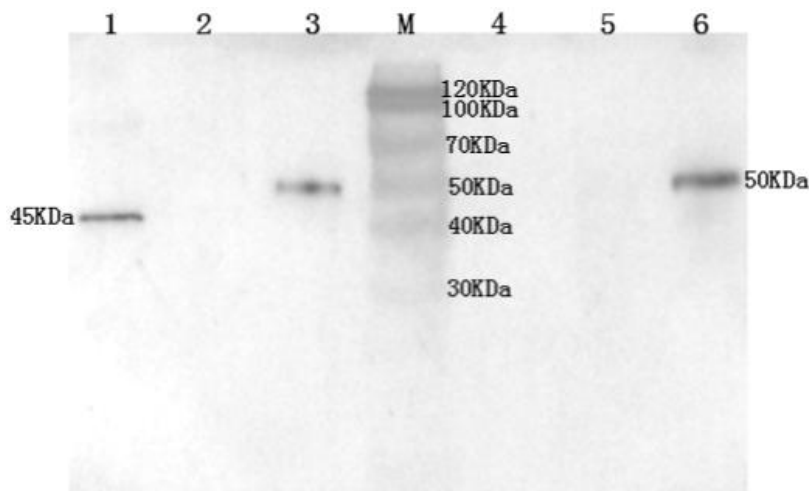


图 3-2 RV VP6 鼠多克隆抗体 Western Blotting

(1: 纯化浓缩的 RV 病毒液; 2: RV 病毒原液; 3: 包涵体复性后的 VP6 蛋白; 4: VP7 蛋白; 5: VP8 蛋白; 6: 杆状表达 VP6 蛋白; M: Blue Plus II Marker)

3.4 RV VP6 兔多抗

3.4.1 兔多抗效价鉴定

利用间接 ELISA 法对小鼠多克隆抗体血清进行效价测定，测得两只兔子抗体血清效价分别为 1:128000、1:256000，表明免疫兔制备的 RV VP6 抗体血清效价较高。将血清置于 -80℃ 保存，用于后续实验。

3.4.2 兔多抗 Western Blotting 鉴定

对免疫后获得的多克隆抗体进行 Western Blotting 验证。一抗即为该多克隆抗体，稀释比例为 1:8000；二抗为山羊抗兔 IgG，稀释比例为 1:8000。结果如图 4 所示，该多抗与浓缩纯化后的 RV 病毒液、VP6 包涵体蛋白复性液、昆虫杆状系统表达的可溶性重组 VP6 蛋白均有明显的结合反应，与未纯化的 RV 病毒液结合出现两条带、而与 VP7、VP8*蛋白则未见结合。

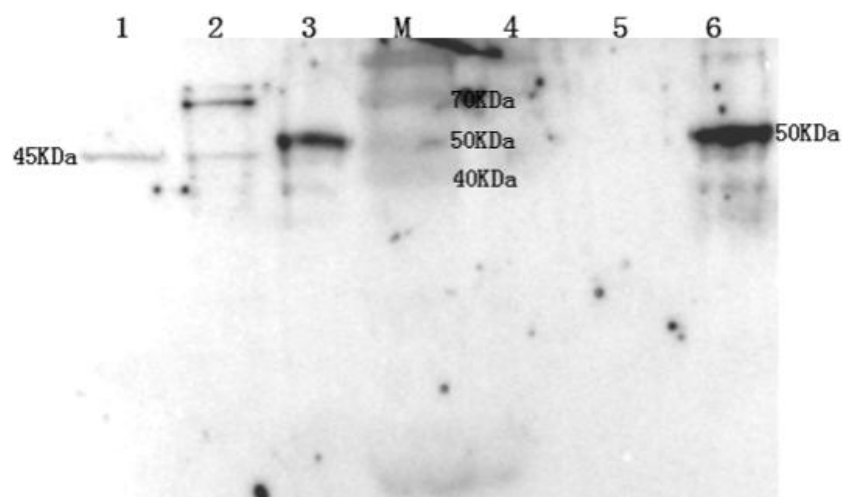


图 4 RV VP6 兔多克隆抗体 Western Blotting

(1: 纯化浓缩的 RV 病毒液; 2: RV 病毒原液; 3: 包涵体复性后的 VP6 蛋白; 4: VP7 蛋白; 5: VP8 蛋白; 6: 杆状表达 VP6 蛋白; M: Blue Plus II Marker)

4. 分析与讨论

轮状病毒防控的重要手段是研制出安全性高、保护效果好的 RV 疫苗^[17-19]，并提高人群接种率。近年来我国轮状病毒流行株不断变化，现有市售疫苗已无法满足防控需求，获得高质量的抗原、抗体成为开展 RV 疫苗研制工作的首要工作。本研究选择的 G9P[8] 型人轮状病毒毒株是当前人群中最流行的毒株之一，表达其 VP6 蛋白作为抗原，并以 VP6 蛋白免疫动物获得抗体，可以为相关 RV 疫苗的研制提供基础。

针对轮状病毒 VP6 蛋白表达的研究早在上世纪就有报导^[20]。至今为止，大肠杆菌表达系统仍是使用最广泛的重组蛋白表达系统^[21]。该系统具有操作简便、周期短、成本低。产量大且前期研究较多等优点^[22]，但由于蛋白表达速度过快、不正确折叠或多肽链疏水区域间非特异性相互作用等原因^[23]，该系统表达的蛋白很有可能以无活性的包涵体形式存在，难以获取可溶性目的蛋白^[24]。为优化重组蛋白在大肠杆菌中的表达，研究者深入进行相关生物信息学研究^[25]，尝试通过蛋白可溶性预测^[26]、二级结构优化^[27, 28]、增加融合标签^[29, 30]等方法克服重组蛋白溶解度问题^[31-35]，但目前仍没有能显著提高蛋白可溶性的通用方法。有研究者在大肠杆菌中表达人 RV VP6^[36, 37]和牛 RV VP6^[38]时以包涵体形式表达后再进行包涵体复性。包涵体以线性结构存在，复性后空间结构上会恢复折叠状态。复性后蛋白虽有一定活性，但过程中仍会析出大量沉淀、复性效率低且蛋白可能会发生空间结构上的改变。

本研究在表达 A 组轮状病毒 VP6 蛋白时,首先采用大肠杆菌表达系统,在 pET-30a、pGEX6P-1 两种载体上进行表达。结果显示,两种载体上构建的重组质粒均不能在大肠杆菌系统中表达出可溶形式的 VP6 蛋白。由于 pGEX6P-1 载体所带的 GST 标签较大且不利于包涵体表达,而 pET-30a 载体所带的 His 标签相对分子质量极小,故选择使用 pET-30a 载体构建的重组 VP6-His 蛋白进行包涵体蛋白表达。VP6-His 包涵体蛋白表达量大且纯度较高,但在随后进行的包涵体透析复性中,即使缩小透析梯度,透析过程仍有沉淀出现。尤其当尿素浓度降低到 0.5M 以后,透析袋中析出大量沉淀,即溶于尿素的 VP6 蛋白再次展开空间结构,变为生物活性低的包涵体,证明 VP6 包涵体复性效率极低,与前人研究结果一致。通过对复性蛋白的 SDS-PAGE 鉴定可以发现,复性蛋白较复性前出现明显的较多杂带,说明在复性过程中,部分蛋白可能发生了不正确折叠,即当前透析所得可溶性蛋白仍难以满足纯度与浓度的需求。总体来看,VP6 包涵体蛋白透析复性过程费时、费力,且复性效率很低,与之前研究结果相符。

近年来,研究者已在不同表达系统中进行了 VP6 表达尝试,其中昆虫杆状病毒表达系统表达出的 VP6 蛋白可溶性高且抗原性好^[39],但由于其难以进行工业大规模生产,所以目前主要用于实验室研究。本研究在大肠杆菌系统表达不理想的情况下,尝试在昆虫杆状病毒表达系统中表达重组 VP6 蛋白。结果显示,VP6 蛋白在杆状病毒系统表达为可溶形式,悬浮培养 1L 病毒后约能获得 1mg VP6 蛋白,蛋白表达量及纯度均达到预期水平。

制备 RV 抗体首先要确定用于免疫的抗原,目前用于 RV 疫苗研制及 RV 检测的免疫原主要是全病毒和重组蛋白^[40]。以 RV 全病毒作为免疫原进行免疫可针对多个抗原表位,但 RV 纯化过程损耗较大,较为费时、费力。VP6 蛋白在 RV 中含量最高、同源性最强,RV 感染后最早和主要的抗体反应是针对 VP6^[41],并且经本实验可得,重组 VP6 蛋白可以在杆状病毒系统中表达出大量可溶性蛋白。以重组 VP6 蛋白作为免疫原进行动物免疫得到的抗体更适用于 RV 检测,也可作为一抗用于实验室 Western Blotting 检验。我们也正在开展以可溶 VP6 蛋白全程免疫小鼠制备抗体的工作,以期得到能够更适用于建立 RV 检测试剂盒的抗体。

本研究制备得到 RV 病毒液及 RV VP6 蛋白,通过 RV 免疫与 RV VP6 加强免疫后得到的鼠多抗效价高,且能特异识别 VP6 蛋白,可作为实验室 RV VP6 蛋白 Western Blotting 的检测抗体;小鼠血清可作为后续间接 ELISA 检测的阴、阳性标准血清,为建立血清抗体检测方法奠定了基础。而通过 VP6-His 包涵体蛋白免疫得到的兔多抗血清则较杂一

些, 仅可用于实验室 RV VP6 蛋白的初步 Western Blotting 检验, 说明利用包涵体蛋白进行动物免疫仍存在一定局限性, 免疫效果不如天然可溶性蛋白。

5. 小结

本研究成功纯化获得轮状病毒病毒颗粒及 RV VP6 蛋白, 并制备出 RV 鼠多抗及 RV 兔多抗。

- (1) 轮状病毒培养纯化后纯度较高且其中含有较多 VP6 蛋白;
- (2) 重组 VP6 蛋白在大肠杆菌中仅能以包涵体形式存在, 包涵体复性效率低;
- (3) 昆虫杆状病毒系统表达出 RV VP6 可溶蛋白, 表达量及纯度较高;
- (4) 通过动物免疫获得针对 RV VP6 的小鼠多克隆抗体血清, 血清效价较高、纯度高且特异性强;
- (5) 通过动物免疫获得针对 RV VP6 的兔多克隆抗体血清, 血清效价均较高, 纯度较低。

第二章 间接 ELISA 法检测血清中抗体水平方法的建立

在 RV 疫苗的研制过程中, 免疫后血清中的抗体含量是衡量疫苗效果的重要质量控制指标。因此, 针对 RV 建立有效的血清抗体检测方法十分重要。轮状病毒抗体的检测方法主要是酶联免疫吸附分析 (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay, ELISA), ELISA 检测法包括夹心法、间接法和竞争法。间接 ELISA 法是测定抗体最常用的方法, 只需将待检血清加入制备好的抗原板上孵育, 再加入酶标抗体孵育显色即可测定 OD₄₅₀ 值, 操作简便、快速。

目前国内有许多针对动物检测的相关试剂盒, 而针对人的抗体检测试剂盒一般均注明用于科研实验而非临床诊断。本研究旨在建立一种针对人 A 组轮状病毒抗体的检测方法, 主要用于婴幼儿进行 RV 疫苗免疫后的血清抗体水平检测, 由此判断疫苗对人群的保护效果。

1. 实验材料

主要实验材料与第一章相同。

2. 实验方法

2.1 间接 ELISA 法的建立

2.1.1 间接 ELISA 法步骤

a. 包被: 将抗原用 0.05 M 的碳酸盐缓冲液 (CBS, pH9.6) 按照一定的稀释倍数稀释后, 加入 96 孔酶标板中, 100 μ L/孔, 4 $^{\circ}$ C 孵育过夜。

b. 封闭: 次日弃去孔内液体, 加入封闭液 (5%脱脂奶粉, 0.01%Tween 的 PBST), 100 μ L/孔, 37 $^{\circ}$ C 封闭 1h 后 PBST 洗板。

c. 样品孵育: 将小鼠血清样品用稀释液 (1%脱脂奶粉, 0.01%Tween 的 PBST) 按照一定的稀释倍数稀释后, 100 μ L/孔加入制备好的抗原板上, 37 $^{\circ}$ C 孵育 1h 后 PBST 洗板。

d. 二抗孵育: 将 HRP 标记的山羊抗鼠 IgG 酶标二抗用稀释液 (2%脱脂奶粉, PBS) 按照一定的稀释倍数稀释后加入酶标板, 100 μ L/孔, 37 $^{\circ}$ C 孵育 45 min 后 PBST 洗板。

e. 显色反应：将 TMB 底物的 A 液与 B 液按 1:1 混匀后加入酶标板，50 μ L/孔，室温避光反应 15 min。

f. 终止反应：加入 0.5M 磷酸终止液，50 μ L/孔，终止显色反应。

g. 测 OD₄₅₀ 值：按照仪器操作说明，利用酶标仪测定 OD₄₅₀ 值。

实验中以 Tween-20 浓度为 0.5‰ 的 PBST 溶液洗板，震荡洗涤 5 次，每次 3min，洗涤后拍干。小鼠多克隆抗体阳性血清孔的 OD₄₅₀ 值记为 P，阴性对照孔的 OD₄₅₀ 值记为 N。

后续 ELISA 检测均按照此操作步骤进行，部分反应条件随具体实验改变。

2.1.2 抗原的选择

用 0.05 M 的碳酸盐缓冲液（CBS，pH9.6），将昆虫杆状病毒系统表达的 VP6、VP7 可溶性蛋白分别稀释至 2 μ g/mL，将纯化 RV 病毒液、未纯化 RV 病毒液分别以 1:1 比例稀释，以上四种抗原稀释后分别包被于 96 孔酶标板中。将小鼠阳性、阴性血清分别稀释 1:2000、1:4000、1:8000、1:16000、1:32000、1:64000、1:128000，与不同抗原进行反应。以阳性血清 OD 值 > 1.0，且阳性血清 OD 值（P）与阴性血清 OD 值（N）的比值（P/N）最大时对应的抗原作为后续 ELISA 实验的包被抗原。

2.2 间接 ELISA 法最佳条件的优化

2.2.1 VP6 最佳包被浓度和阴、阳性血清最佳稀释度的选择

将 VP6 蛋白和血清作方阵滴定，确定最佳的抗原包被浓度及血清稀释度。用 0.05M 的碳酸盐缓冲液（CBS，pH9.6）将 VP6 蛋白分别稀释至 0.5 μ g/mL、1 μ g/mL、2 μ g/mL、4 μ g/mL、8 μ g/mL，用稀释液（1%脱脂奶粉，0.01%Tween 的 PBST）将小鼠阴、阳性血清分别稀释至 1:500、1:1000、1:2000、1:4000、1:8000、1:16000、1:32000、1:64000，以 P > 1.0 且 P/N 值最大所对应的蛋白浓度和血清稀释度作为最佳的抗原包被浓度和最佳的阴、阳性血清稀释度。

2.2.2 VP6 最佳包被条件的选择

用 0.05 M 的碳酸盐缓冲液（CBS，pH9.6）在不同包被条件下：37℃包被 1h、37℃包被 2h、4℃包被过夜、37℃包被 1h 后 4℃过夜、37℃包被 2h 后 4℃过夜，包被抗原于酶标板。以 P > 1.0 且 P/N 值最大所对应的包被条件作为最佳包被条件。

2.2.3 HRP 标记的山羊抗鼠 IgG 最佳稀释度的选择

用稀释液（2%脱脂奶粉，PBS）将 HRP 标记的山羊抗鼠 IgG 稀释至 1:1000、1:2000、1:4000、1:6000、1:8000、1:12000、1:16000、1:20000，以 $P > 1.0$ 且 P/N 值最大所对应的稀释度作为 HRP 标记的山羊抗鼠 IgG 最佳稀释度。

2.2.4 最佳封闭时间的选择

用封闭液（5%脱脂奶粉，0.01%Tween 的 PBST）在不同时间下：0.5h、1h、1.5h、2h，对抗原板上的阴、阳性血清进行封闭。以 $P > 1.0$ 且 P/N 值最大所对应的封闭时间作为最佳封闭时间。

2.2.5 最佳显色时间的选择

用 TMB 底物的 A 液与 B 液按 1:1 混匀后加入酶标板，在不同显色时间下：5min、10min、15min、20min、25min、30min，室温避光进行显色反应。以 $P > 1.0$ 且 P/N 值最大所对应的显色时间作为最佳显色时间。

2.2.6 阴阳性临界值的确定

用优化后的最佳条件建立间接 ELISA 检测方法。选择 15 份未进行轮状病毒免疫的小鼠血清，进行优化 ELISA 检测，读取每孔的 OD₄₅₀ 值，计算样本的平均值（X）和标准差（S）。根据统计学原理，选择 $X + 3S$ 作为阴阳性临界值，即本检测方法的 Cut off 值。

2.2.7 人血清样本稀释度的选择

选择 6 份轮状病毒抗体阳性的人血清样本，用稀释液稀释至 1:100、1:200、1:400、1:800、1:1600、1:3200、1:6400、1:12800、1:25600，并设空白对照，按优化后的最佳条件进行 ELISA 检测。以阳性样本 OD₄₅₀ 值均大于 1 时对应的最大稀释度，作为后续检测中的人血清样本稀释度。

2.3 优化间接 ELISA 法的检验

2.3.1 优化间接 ELISA 法

根据以上最佳反应条件建立优化间接 ELISA 法，对待检血清样本中轮状病毒抗体的阴、阳性情况进行检测。

2.3.2 特异性检验

用建立的轮状病毒间接 ELISA 法，对轮状病毒、诺如病毒、腺病毒鉴定为阳性的鼠血清样本进行特异性试验，检测该方法与不同病原血清之间是否存在交叉反应。

2.3.3 重复性检验

(1) 批内重复试验

取同一批次包被的酶标板，用优化间接 ELISA 法检测 5 份人血清样本，每份样本重复 3 次，测定 OD₄₅₀ 值后进行分析数据变异情况。

(2) 批间重复实验

取不同批次包被的酶标板，用优化间接 ELISA 法检测 5 份人血清样本，每份样本重复 3 次，测定 OD₄₅₀ 值后进行分析数据变异情况。

2.3.4 人血清样本检测

用建立的人轮状病毒血清抗体间接 ELISA 法检测 46 份因腹泻入院的儿童血清样本，计算检出率。根据阴、阳性判定标准的 Cut off 值，当检测出 OD₄₅₀ 大于 Cut off 值可判定为轮状病毒抗体阳性，检测出 OD₄₅₀ 小于 Cut off 值则判定为轮状病毒抗体阴性。

3. 实验结果

3.1 间接 ELISA 法包被抗原的确定

包被不同抗原：VP6、VP7、RV（纯化）、RV（未纯化）于酶标板中，与不同稀释倍数下的小鼠阳性、阴性血清反应。结果如表 2-1 所示，VP6 作为包被抗原时，在不同血清稀释倍数下反应后 P 值均最大；当血清稀释至 1:64000 时，仅有 VP6 项 P 值 > 1.0 且 P/N 值最大，说明以 VP6 作为包被抗原与小鼠血清反应效果最好。因此选择昆虫杆状病毒系统表达的 VP6 可溶性蛋白作为包被抗原。

表 2-1 间接 ELISA 法包被抗原的选择

包被抗原		血清稀释倍数						
		1:2000	1:4000	1:8000	1:16000	1:32000	1:64000	1:128000
VP6	P	2.469	1.875	2.352	2.148	1.749	1.293	0.846
	N	0.065	0.057	0.054	0.053	0.050	0.050	0.050
	P/N	38.100	32.839	43.799	40.609	34.700	26.058	17.085
VP7	P	1.739	1.172	0.809	0.534	0.304	0.191	0.122
	N	0.104	0.058	0.052	0.051	0.051	0.048	0.048
	P/N	16.756	20.131	15.699	10.489	5.998	3.969	2.535
RV (纯化)	P	2.370	1.770	1.831	1.407	0.908	0.543	0.332
	N	0.058	0.054	0.053	0.053	0.055	0.051	0.051
	P/N	41.075	33.024	34.742	26.540	16.573	10.600	6.478
RV (未纯化)	P	2.027	1.448	1.207	0.782	0.482	0.301	0.189
	N	0.061	0.063	0.050	0.055	0.057	0.050	0.053
	P/N	33.010	22.943	24.286	14.326	8.403	6.032	3.585

3.2 间接 ELISA 法最佳条件的优化

3.2.1 VP6 最佳包被浓度和阴、阳性血清最佳稀释度

包被不同浓度的 VP6 蛋白于酶标板中,与不同稀释倍数下的小鼠阳性、阴性血清反应。方阵滴定结果如表 2-2 所示, $P > 1.0$ 且 P/N 值最大所对应的蛋白浓度为 $2\mu\text{g/mL}$, 血清稀释度为 1:2000。因此 VP6 最佳包被浓度为 $2\mu\text{g/mL}$, 阴、阳性血清最佳稀释度为 1:2000。

表 2-2 间接 ELISA 法 VP6 最佳包被浓度和阴、阳性血清最佳稀释度的确定

蛋白浓度 ($\mu\text{g/mL}$)		血清稀释倍数							
		1:500	1:1000	1:2000	1:4000	1:8000	1:16000	1:32000	1:64000
0.5	P	1.849	1.643	1.454	1.008	0.929	0.604	0.412	0.224
	N	0.074	0.064	0.058	0.074	0.064	0.056	0.042	0.041
	P/N	24.845	25.512	24.985	13.692	14.520	10.874	9.894	5.506
1	P	2.028	2.000	1.838	1.632	1.467	1.183	0.681	0.440
	N	0.082	0.079	0.075	0.071	0.112	0.067	0.060	0.070
	P/N	24.792	25.413	24.512	23.055	13.066	17.741	11.343	6.319
2	P	2.106	2.047	1.944	1.889	1.723	1.547	1.106	0.681
	N	0.076	0.069	0.062	0.064	0.061	0.060	0.057	0.072
	P/N	27.598	29.500	31.401	29.605	28.157	25.997	19.267	9.442
4	P	2.047	1.951	1.986	1.907	1.724	1.503	1.129	0.772
	N	0.172	0.116	0.101	0.194	0.111	0.075	0.066	0.065
	P/N	11.874	16.757	19.680	9.850	15.563	20.045	17.129	11.869
8	P	2.061	2.014	2.013	1.949	1.846	1.627	1.276	0.902
	N	0.615	0.395	0.249	0.195	0.149	0.093	0.098	0.095
	P/N	3.353	5.094	8.079	10.007	12.362	17.423	12.991	9.499

3.2.2 VP6 最佳包被条件

在不同包被条件下, 以 VP6 最佳包被浓度和阴、阳性血清最佳稀释度进行 ELISA 实验。结果如表 2-3 所示, 37℃包被 2h 后 4℃过夜条件下 $P > 1.0$ 且 P/N 值最大, 为最佳包被条件。但不同包被条件下 P/N 值差别较小, 且均能达到较好的实验结果。考虑到 VP6 蛋白在 37℃可能会发生变性及实验操作的便捷性问题, 最终选择 4℃包被过夜为后续实验的 VP6 包被条件。

表 2-3 间接 ELISA 法 VP6 最佳包被条件的确定

	37℃ 1h	37℃ 2h	4℃ 过夜	37℃ 1h 后 4℃ 过夜	37℃ 2h 后 4℃ 过夜
P	1.527	1.697	1.910	1.981	2.026
N	0.057	0.053	0.061	0.058	0.058
P/N	26.722	31.916	31.510	34.124	34.761

3.2.3 HRP 标记的山羊抗鼠 IgG 最佳稀释度

在 HRP 标记的山羊抗鼠 IgG 不同稀释度条件下, 以 4℃过夜包被条件、VP6 最佳包被浓度和阴、阳性血清最佳稀释度进行 ELISA 实验。结果如表 2-4 所示, 稀释度为 1:8000 时, $P > 1.0$ 且 P/N 值最大。因此 HRP 标记的山羊抗鼠 IgG 最佳稀释度为 1:8000。

表 2-4 间接 ELISA 法 HRP 标记的山羊抗鼠 IgG 最佳稀释度的确定

	1:1000	1:2000	1:4000	1:6000	1:8000	1:12000	1:16000	1:20000
P	2.200	2.158	2.095	2.022	2.022	1.903	1.970	1.892
N	0.081	0.065	0.057	0.065	0.055	0.054	0.058	0.055
P/N	27.028	33.250	36.497	30.916	36.496	35.377	34.139	34.150

3.2.4 最佳封闭时间

在抗原的不同封闭时间下,以 4℃ 过夜包被条件、VP6 最佳包被浓度和阴、阳性血清最佳稀释度、HRP 标记的山羊抗鼠 IgG 最佳稀释度进行 ELISA 实验。结果如表 2-5 所示,抗原的封闭时间为 1h 时, $P > 1.0$ 且 P/N 值最大。因此最佳封闭时间为 1h。

表 2-5 间接 ELISA 法最佳封闭时间的确定

	0.5h	1h	1.5h	2h
P	2.053	2.116	2.119	2.154
N	0.054	0.055	0.060	0.059
P/N	37.699	38.445	35.256	36.508

3.2.5 最佳显色时间

在 TMB 作用的不同显色时间下,以 4℃ 过夜包被条件、VP6 最佳包被浓度和阴、阳性血清最佳稀释度、HRP 标记的山羊抗鼠 IgG 最佳稀释度、最佳封闭时间进行 ELISA 实验。结果如表 2-6 所示,室温避光显色 25min 时, $P > 1.0$ 且 P/N 值最大。因此最佳显色时间为 25min。

表 2-6 间接 ELISA 法最佳显色时间的确定

	5min	10min	15min	20min	25min	30min
P	1.427	2.303	2.853	3.228	3.430	3.532
N	0.061	0.067	0.079	0.076	0.073	0.082
P/N	23.258	34.197	36.206	42.278	46.705	43.051

3.2.6 阴阳性临界值的确定

利用优化间接 ELISA 法检测 15 份小鼠阴性血清样本,以 $X+3S$ 作为检测时的阴阳性临界值。结果如表 2-7 所示,15 份阴性血清样本的平均值 (X) 为 0.0737,标准差 (S) 为 0.0287, $X+3S=0.0737+3 \times 0.0287=0.163$,因此将 0.163 作为优化间接 ELISA 法的阴阳性临界值,即 Cut off 值=0.163。当检测出 $OD_{450} > 0.163$ 可判定为阳性,检测出 $OD_{450} < 0.163$ 则判定为阴性。

表 2-7 间接 ELISA 法阴阳性临界值的确定

	OD ₄₅₀ 值				
	0.112	0.054	0.161	0.052	0.065
	0.062	0.061	0.074	0.055	0.062
	0.059	0.097	0.080	0.065	0.049

3.2.7 人血清样本稀释度的选择

利用优化间接 ELISA 法检测 6 份人阳性血清样本。结果如表 2-8 示,阳性样本 OD₄₅₀ 值均大于 1 时对应的最大稀释度为 1:6400,为便于后续实验操作,故选择人血清样本稀释度为 1:6000。

表 2-8 间接 ELISA 法人血清样本稀释度的确定

编号	1:100	1:200	1:400	1:800	1:1600	1:3200	1:6400	1:12800	1:25600
1	3.590	3.510	3.317	3.086	2.762	2.199	1.629	1.085	0.645
2	3.600	3.324	3.242	3.017	2.734	2.199	1.730	1.364	0.716
3	3.525	3.253	3.015	2.661	2.198	1.652	1.216	0.681	0.409
4	3.525	3.409	3.124	2.899	2.778	2.281	1.808	1.147	0.767
5	3.492	3.188	3.009	2.756	2.286	1.870	1.276	0.846	0.549
6	3.439	3.179	2.938	2.619	2.170	1.644	1.162	0.683	0.465

3.3 优化间接 ELISA 法的检验

3.3.1 优化间接 ELISA 法

优化间接 ELISA 法具体操作步骤如下:

- a. 包被: 用 0.05 M 的碳酸盐缓冲液 (CBS, pH9.6), 将 VP6 蛋白稀释至 2 $\mu\text{g/mL}$, 加入 96 孔酶标板中, 100 μL /孔, 4 $^{\circ}\text{C}$ 孵育过夜。
- b. 封闭: 次日弃去孔内液体, 加入封闭液 (5%脱脂奶粉, 0.01%Tween 的 PBST), 100 μL /孔, 37 $^{\circ}\text{C}$ 封闭 1 h 后 PBST 洗板。
- c. 样品孵育: 将待检血清样品用稀释液 (1%脱脂奶粉, 0.01%Tween 的 PBST) 稀释至 1:6000, 100 μL /孔加入制备好的抗原板上, 37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 1h 后 PBST 洗板。
- d. 二抗孵育: 用稀释液 (2%脱脂奶粉, PBS), 将 HRP 标记的山羊抗鼠 IgG 酶标二抗稀释至 1:8000 后加入酶标板, 100 μL /孔, 37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 45min 后 PBST 洗板。
- e. 显色反应: 将 TMB 底物的 A 液与 B 液按 1:1 混匀后加入酶标板, 50 μL /孔, 室温避光反应 25 min。
- f. 终止反应: 加入 0.5M 磷酸终止液, 50 μL /孔, 终止显色反应。

g. 测 OD₄₅₀ 值：按照仪器操作说明，利用酶标仪测定 OD₄₅₀ 值。

实验中以 Tween-20 浓度为 0.5% 的 PBST 溶液洗板，震荡洗涤 5 次，每次 3min，洗涤后拍干。对于待检血清样本，以 Cut off 值=0.163 为标准，当检测出 OD₄₅₀>0.163 可判定为轮状病毒抗体阳性，检测出 OD₄₅₀<0.163 则判定为轮状病毒抗体阴性。

3.3.2 特异性

利用建立的优化间接 ELISA 法分别检测轮状病毒、诺如病毒、腺病毒。结果如表 2-9 所示，只有轮状病毒检测 P 值>1.0，检测结果为阳性；诺如病毒和腺病毒检测 P 值<0.163 且 P/N 值接近于 1，检测结果为阴性。说明建立的间接 ELISA 法具有很好的特异性。

表 2-9 优化间接 ELISA 法的特异性检验

	轮状病毒	诺如病毒	腺病毒
P	1.904	0.050	0.048
N	0.049	0.049	0.049
P/N	39.105	1.031	0.990

3.3.3 重复性检验

(1) 批内重复试验

用同一批次包被的酶标板检测 5 份人血清样本，每份样本重复 3 次。结果如表 2-10 所示，批内重复试验变异系数均小于 8%。

表 2-10 优化间接 ELISA 法的批内重复性检验

	1	2	3	4	5
重复 3 次	1.192	1.761	0.155	1.967	1.751
	1.331	1.815	0.143	1.947	1.734
	1.186	1.838	0.165	1.973	1.747
平均值	1.236	1.805	0.154	1.962	1.744
标准差	0.082	0.040	0.011	0.013	0.008
变异系数	6.6%	2.2%	7.2%	0.7%	0.5%

(2) 批间重复试验

用不同批次包被的酶标板检测 5 份人血清样本，每份样本重复 3 次。结果如表 2-11 所示，批间重复试验变异系数均小于 17%。

表 2-11 优化间接 ELISA 法的批间重复性检验

	1	2	3	4	5
	1.428	1.261	1.617	0.870	1.606
重复 3 次	1.494	1.329	1.636	0.980	1.360
	1.730	1.216	1.808	1.176	1.162
平均值	1.551	1.269	1.687	1.009	1.376
标准差	0.159	0.057	0.105	0.155	0.223
变异系数	10.2%	4.5%	6.2%	15.4%	16.2%

根据重复性检验结果可得,批内重复优于批间重复,符合重复性试验一般规律。两者变异系数均小于 17%,说明实验建立的间接 ELISA 检测法效果良好。

3.3.4 人血清样本检测

用建立的人轮状病毒血清抗体间接 ELISA 法检测 46 份因腹泻入院的儿童血清样本。结果如表 2-12 示,以 Cut off 值=0.163,检出 38 份样本为轮状病毒抗体阳性,检出 8 份样本为轮状病毒抗体阴性,检出率为 82.6%。

表 2-12 优化间接 ELISA 法检测 46 份人血清样本

OD ₄₅₀ 值						
0.110	1.448	0.193	1.239	1.560	0.109	1.494
0.734	1.092	0.138	1.123	0.240	1.329	0.153
0.767	1.264	1.231	1.636	1.606	0.815	1.234
0.101	0.858	1.751	1.525	1.611	1.325	1.247
0.223	1.663	0.980	0.195	1.789	0.138	1.360
0.990	1.558	1.474	1.192	1.761	0.941	0.487
0.116	0.155	1.967	1.751			

4. 分析与讨论

轮状病毒感染引起腹泻是世界范围内影响婴幼儿健康的重大公共卫生问题^[42],但目前临床上仍没有特异有效的治疗方法,只能通过提高 RV 疫苗接种率来预防 RV 感染引发的腹泻问题^[43]。近年来我国轮状病毒流行毒株较多,流行变化较大^[44],目前市售疫苗均有其局限性。为满足 RV 防控需求,研制符合当前流行趋势的新型疫苗十分重要。在研制更为有效的 RV 疫苗过程中,免疫后血清抗体水平是评价疫苗效果的重要指标。检测抗体常用的血清学方法为间接 ELISA 法,只需将待检血清加入制备好的抗原板上孵育,再加入酶标抗体孵育显色即可测定 OD₄₅₀ 值。间接 ELISA 检测试剂盒具有特异性好、敏感性高、重复性好、操作简便、可同时检测大量样品等优点^[45]。

目前国内有许多针对动物 RV 疫苗^[46, 47]及抗原抗体检测的研究^[48], 例如牛轮状病毒间接 ELISA 检测方法建立^[49]、猪病毒性腹泻病原抗体检测^[50]、大鼠血清抗轮状病毒 IgG 检测^[51]等。针对牛、猪等家畜开展抗体检测是为评价接种相应疫苗后, 对家畜的保护效果, 降低因家畜腹泻造成的经济损失; 针对大鼠、兔等实验动物开展抗体检测主要是通过动物免疫原性试验为相关研究奠定基础, 有助于 RV 感染机制的研究和人轮状病毒疫苗的研制。但目前针对人的抗体检测试剂盒较少, 且一般均注明用于科研实验而非临床诊断。原因主要有两方面: (1) 诊断标准难以统一。根据 RV 流行病学特性可知, 几乎所有人在 5 岁之前均有过 RV 感染^[52], 且只要感染过 RV 后人体内通常会一直携带 RV 抗体, 因此在人群中获取足够的阴性样本较为困难, 故诊断时的阴阳临界值难以确定; (2) RV 抗体试剂盒应用范围较小。RV 抗原检测只需采集患者粪便样本即可判断出是否感染了 RV^[53], 而 RV 抗体检测则需要采集患者血样, 因此不适用于判断是否感染 RV。RV 抗体试剂盒主要针对评价人群接种 RV 疫苗后的抗体水平变化, 多用于新型疫苗制备时的效果评价, 目前尚未投入临床诊断中。

本研究通过 RV 免疫的小鼠阴、阳性标准血清建立间接 ELISA 法, 优化条件后进行人血清 RV 抗体 IgG 检测。当待检血清稀释到 1:6000 时, 应用研究建立的间接 ELISA 法仍能测得较高的阳性值, 说明该方法灵敏性较好。但研究仍存在一些不足之处:

(1) 阴阳性临界值的确定不准确。在理想的检测条件下, 确定阴、阳性临界时, 应检测足量的人阴性血清样本, 以检测值的均值加 3 倍标准差 ($\bar{X}+3S$) 作为检测样本的阴阳性临界值^[54]。但由于轮状病毒感染性强且感染后几乎终身携带抗体, 因此即使抗体水平有高有低, 成人血清中几乎都含有水平不同的 RV 抗体。部分 6 月龄以内的新生儿由于其母体免疫并未感染 RV^[55], 即为 RV 抗体阴性, 但存在样本收集困难的问题, 本研究条件下未能获得。最终本研究以实验小鼠阴性血清样本为基础确定了检测方法的阴阳性临界值, 在检测人血清样本时可能存在一定误差。

(2) 无标准试剂盒进行对比。建立间接 ELISA 检测方法后应与现有的金标准或公认常用的检测试剂盒进行对比。但目前人轮状病毒抗体检测试剂盒较少, 没有公认常用的检测试剂盒且诊断标准并不统一。有些试剂盒在检测时只将血清稀释至 1:60 左右, 血清检测浓度高, 对应的检测值也较高, 一般均会判断为轮状病毒抗体阳性。而本实验血清检测浓度为 1:6000, 浓度相差 100 倍, 检测结果不具有可比性, 因此研究建立的检测方法并未与其他试剂盒进行比较。

本研究建立的人轮状病毒抗体间接 ELISA 检测方法灵敏度高, 在后续研中主要用

于相应 RV 疫苗的效果评价,即分别检测人接种 RV 疫苗前、后血清中抗体水平的变化,为 RV 疫苗研制奠定基础。

5. 小结

本研究建立了人轮状病毒抗体间接 ELISA 检测方法,灵敏度高,但仍需完善。该方法可用于实验室免疫效果评价。

(1) 确定包被抗原为 VP6 可溶蛋白,建立人轮状病毒抗体间接 ELISA 检测方法,优化包被条件、抗原包被浓度、标准血清稀释度、封闭时间、HRP 标记的山羊抗鼠 IgG 稀释度、显色时间这 6 个实验条件;

(2) 确定最佳包被条件为 4℃ 包被过夜,抗原最佳包被浓度为 2μg/mL,阴、阳性血清最佳稀释度为 1:2000,最佳封闭时间为 1h,HRP 标记的山羊抗鼠 IgG 最佳稀释度为 1:8000,最佳显色时间为 25min;

(3) 确定判定血清中轮状病毒抗体阴、阳性的临界值,即 Cut off 值=0.163;

(4) 该方法特异性及重复性好。批内重复试验变异系数均小于 8%,批间重复试验变异系数均小于 17%;

(5) 该方法灵敏度高。利用该方法检测 46 份腹泻儿童血清样本,样本稀释至 1:6000,检出率为 82.6%。

结 语

本研究尝试在不同表达系统中表达轮状病毒 VP6 蛋白。实验结果证明,大肠杆菌系统只能表达出包涵体形式的 VP6 蛋白,昆虫杆状病毒系统可以表达出可溶性 VP6 蛋白且蛋白生物活性较好。

虽然包涵体蛋白表达量大且纯度高,但由于其改变了天然折叠方式变为线性结构,使得 VP6 蛋白的生物学特性发生了一定改变。理论上包涵体蛋白可以通过复性手段恢复空间折叠结构,但在实际研究中,包涵体蛋白通过透析复性得到的蛋白杂带较多,说明蛋白在复性过程中产生了一些不正确折叠,并且复性效率较低,生物活性远远不如天然可溶性蛋白。杆状病毒表达系统很好的解决了这一问题。通过杆状病毒系统表达的 VP6 蛋白为可溶形式,表达量较高且纯化后蛋白纯度较高,用于动物免疫中可以获得特异性更好的抗体。

本研究以杆状病毒系统表达出的 VP6 蛋白作为包被抗原,建立了人轮状病毒血清抗性间接 ELISA 检测方法。该方法灵敏度高,可将待检血清稀释至 1:6000 进行检测,但方法中阴阳性临界值的确定仍存在局限性,在后续研究中仍需深入探讨。

本研究成功表达出可溶性 VP6 蛋白、制备出 RV VP6 多克隆抗体,并初步建立起人轮状病毒抗体检测方法,达到预期研究目标,为后续轮状病毒蛋白表达、轮状病毒检测及轮状病毒抗体检测提供了实验方法及依据,为轮状病毒防控的相关研究奠定了研究基础。

参考文献

- [1] Tate JE, Burton AH, Boschi-Pinto C, et al. 2008 estimate of worldwide rotavirus-associated mortality in children younger than 5 years before the introduction of universal rotavirus vaccination programmes: a systematic review and meta-analysis[J]. The Lancet Infectious Diseases, 2012,12(2).
- [2] Tate JE, Patel MM, Steele AD, et al. Global impact of rotavirus vaccines[J]. Expert Review of Vaccines, 2010,9(4).
- [3] Tate JE, Burton AH, Boschi-Pinto C, et al. Global, Regional, and National Estimates of Rotavirus Mortality in Children <5 Years of Age, 2000-2013.[J]. Clinical infectious diseases : an official publication of the Infectious Diseases Society of America, 2016,62 Suppl 2(Suppl.2).
- [4] Sun X, Li D, Qi J, et al. Glycan Binding Specificity and Mechanism of Human and Porcine P[6]/P[19] Rotavirus VP8*s[J]. Journal of Virology, 2018,92(14).
- [5] 儿童轮状病毒胃肠炎免疫预防专家共识(2020 版)[J]. 中国疫苗和免疫, 2021,27(01):48-61.
- [6] Vlasova AN, Amimo JO, Saif LJ. Porcine Rotaviruses: Epidemiology, Immune Responses and Control Strategies[J]. Viruses, 2017,9(3).
- [7] Desselberger U. Rotaviruses[J]. Virus Research, 2014,190.
- [8] 潘小霞, 张顺, 陈元鼎. 轮状病毒 VP6 蛋白免疫学研究进展[J]. 中国疫苗和免疫, 2011,17(02):169-172.
- [9] Aiyegbo MS, Sapparapu G, Spiller BW, et al. Human rotavirus VP6-specific antibodies mediate intracellular neutralization by binding to a quaternary structure in the transcriptional pore.[J]. PLoS ONE, 2017,8(5).
- [10] 陈肖宏, 闻晓波, 冉旭华. 基于轮状病毒 VP6 蛋白新型候选疫苗的研发进展[J]. 中国生物制品学杂志, 2019,32(10):1148-1151.
- [11] 雷玥, 庄志超, 田宏, 等. 轮状病毒亚单位疫苗研究进展[J]. 职业与健康, 2021,37(13):1869-1872.
- [12] 益准. A 群牛轮状病毒 VP6 亚单位疫苗的初步研究[D]. 西南民族大学, 2021.
- [13] Sáfiadi MAP, Berezin EN, Munford V, et al. Hospital-based Surveillance to Evaluate the Impact of Rotavirus Vaccination in São Paulo, Brazil[J]. The Pediatric Infectious Disease Journal, 2010,29(11).
- [14] 吕榜军, 黎明强, 覃彦香. 轮状病毒感染性腹泻流行及疫苗的研究进展[J]. 现代预防医学, 2016,43(04):739-741.
- [15] 王金霞, 汪萱怡. 轮状病毒疫苗有效性及其影响因素研究进展[J]. 中华微生物学和免疫学杂志, 2019(06):472-484.
- [16] 龚大伟, 梁曼. 2010—2020 年上海市婴幼儿肺炎疫苗和轮状病毒疫苗接种及时性影响因素[J]. 江苏预防医学, 2022,33(02):149-152.
- [17] Mo Z, Ma X, Luo P, et al. Immunogenicity of pentavalent rotavirus vaccine in Chinese infants[J]. Vaccine, 2019,37(13).
- [18] Rong-Cheng L, Teng H, Yanping L, et al. Immunogenicity and reactogenicity of the human rotavirus vaccine, RIX4414 oral suspension, when co-administered with routine childhood vaccines in Chinese infants.[J]. Human vaccines & immunotherapeutics, 2016,12(3).
- [19] Segovia MJG. Human neonatal rotavirus vaccine (RV3-BB) to target rotavirus from birth[J]. Acta Paediatrica Espanola, 2018,76(3-4).
- [20] Comparative sequence analysis and expression in E. coli of the subgroup I-specific antigen VP6 from a G2 serotype human rotavirus IS2[J]. Current Science, 1996,71(6).
- [21] 何伟. 重组大肠杆菌表达包涵体药物蛋白的复性与纯化研究[D]. 华东理工大学, 2017.

- [22] Baolei J, Jeon C. High-throughput recombinant protein expression in *Escherichia coli*: current status and future perspectives.[J]. *Open biology*, 2016,6(8).
- [23] Oberg K,Chrnyk BA,Wetzel R, et al. Nativelike secondary structure in interleukin-1 beta inclusion bodies by attenuated total reflectance FTIR.[J]. *Biochemistry*, 1994,33(9).
- [24] 常恒祯, 常江, 战俊澎, 等. 包涵体重组蛋白不同纯化方法的比较[J]. *中国生物制品学杂志*, 2021,34(07):862-867.
- [25] Han CCC, Jiangning S, Ti TB, et al. Bioinformatics approaches for improved recombinant protein production in *Escherichia coli*: protein solubility prediction.[J]. *Briefings in bioinformatics*, 2014,15(6).
- [26] Pawel S, Gero D, Phillipp T, et al. PROSO II--a new method for protein solubility prediction.[J]. *The FEBS journal*, 2012,279(12).
- [27] Paulo G, Gabriela M, Manuel S, et al. mRNA secondary structure optimization using a correlated stem-loop prediction.[J]. *Nucleic acids research*, 2016,44(11).
- [28] Ronny L, Stephan HB, Christian HZS, et al. ViennaRNA Package 2.0[J]. *Algorithms for Molecular Biology*, 2011,6(1).
- [29] Mi-Ran K, Pil PS. Fusion tags to enhance heterologous protein expression.[J]. *Applied microbiology and biotechnology*, 2020,104(6).
- [30] Mahmoudi GM, Neda SA, Marziye F, et al. Opportunities and challenges of the tag-assisted protein purification techniques: Applications in the pharmaceutical industry[J]. *Biotechnology Advances*, 2020(prepublish).
- [31] Claudia O, Pablo O, Agustín C. Overcoming the Solubility Problem in *E. coli*: Available Approaches for Recombinant Protein Production.[J]. *Methods in molecular biology* (Clifton, N.J.), 2022,2406.
- [32] Papanephytous CP, Kontopidis G. Statistical approaches to maximize recombinant protein expression in *Escherichia coli* : A general review[J]. *Protein Expression and Purification*, 2014,94.
- [33] Rajesh PKA, Nagasundara RR, Wei OC, et al. Stepwise optimization of recombinant protein production in *Escherichia coli* utilizing computational and experimental approaches.[J]. *Applied microbiology and biotechnology*, 2020,104(8).
- [34] Kaur J, Kumar A, Kaur J. Strategies for optimization of heterologous protein expression in *E. coli* : Roadblocks and reinforcements[J]. *International Journal of Biological Macromolecules*, 2018,106.
- [35] Gopal GJ, Kumar A. Strategies for the Production of Recombinant Protein in *Escherichia coli*[J]. *The Protein Journal*, 2013,32(6).
- [36] 尹兴晓. A 组人轮状病毒 VP6 蛋白表达及其免疫学分析[D]. 中国协和医科大学, 2008.
- [37] 袁静, 潘小霞, 滕玉梅, 等. 轮状病毒结构蛋白 VP6 的原核表达及其作为检测抗原在病毒检测中的应用[J]. *中国生物制品学杂志*, 2012,25(06):730-733.
- [38] 李木子, 刘佳丽, 王瑞翀, 等. 牛轮状病毒 VP6 蛋白单克隆抗体的制备及双抗体夹心 ELISA 方法的建立[J]. *中国兽医科学*, 2018,48(11):1352-1357.
- [39] 原霖, 张瑜, 刘洋, 等. A 群猪轮状病毒 VP6 结构蛋白在杆状病毒系统中的表达及鉴定[J]. *中国预防兽医学报*, 2018,40(06):476-480.
- [40] 司璐, 魏至栋. 轮状病毒疫苗的研发进展[J]. *中国生物制品学杂志*, 2018,31(02):210-214.
- [41] Camilo A, Marisol A, Rafaela E, et al. Analysis of the kinetics of transcription and replication of the rotavirus genome by RNA interference.[J]. *Journal of virology*, 2009,83(17).
- [42] Ramesh V, Pardeep K, Suraj C. Rotavirus vaccine can save millions of children's lives in developing countries.[J]. *Human vaccines & immunotherapeutics*, 2012,8(2).
- [43] 程新莉. 基于轮状病毒感染性腹泻流行及疫苗的研究进展[J]. *全科口腔医学电子杂志*,

- 2019,6(32):5-16.
- [44] 刘娜. 我国轮状病毒的流行及免疫预防[J]. 中国实用儿科杂志, 2021,36(05):328-331.
- [45] Kexin Z, Mengmeng Z, Qichao Y, et al. Development of an Indirect ELISA to Detect African Swine Fever Virus pp62 Protein-Specific Antibodies[J]. Frontiers in Veterinary Science, 2022.
- [46] 益准. A 群牛轮状病毒 VP6 亚单位疫苗的初步研究[D]. 西南民族大学, 2021.
- [47] 常新见. 华东地区猪轮状病毒分子流行病学调查及亚单位疫苗初步研究[D]. 西藏大学, 2020.
- [48] 曹雷, 崔晓辰, 于志海, 等. A 群牛轮状病毒胶体金免疫层析快速诊断方法的建立与初步应用[J]. 中国兽医杂志, 2020,56(01):36-40.
- [49] 陆亚冬. 犊牛冠状病毒和轮状病毒间接 ELISA 诊断方法的建立与初步应用[D]. 石河子大学, 2018.
- [50] 刘海源. 三种猪病毒性腹泻病原检测方法和 PEDV 间接 ELISA 方法的建立与初步应用[D]. 山东农业大学, 2017.
- [51] 程满荣, 徐葛林, 李庆亮, 等. 大鼠血清中抗轮状病毒 IgG 抗体间接 ELISA 检测方法的建立及验证[J]. 中国生物制品学杂志, 2020,33(01):61-65.
- [52] Umesh DP, Erik GH, Joseph SB, et al. Global illness and deaths caused by rotavirus disease in children.[J]. Emerging infectious diseases, 2003,9(5).
- [53] 王丹, 刘晓华, 孙赞. 轮状病毒抗原检测患儿腹泻的诊断价值与临床检验学研究[J]. 中国医药指南, 2017,15(11):151-152.
- [54] Anchalee S, Thitima T, Kepalee SC, et al. Development and validation of indirect ELISA for antibody detection against different protein antigens of porcine epidemic diarrhea virus in the colostrum and milk of sows[J]. Journal of Immunological Methods, 2021,494(prepublish).
- [55] 李玉静, 杨学磊. 新生儿轮状病毒研究进展[J]. 现代预防医学, 2013,40(05):832-833.

文献综述

轮状病毒及其检测方法的研究进展

【摘要】轮状病毒（Rotaviruses, RV）是引起婴幼儿腹泻的最常见病毒，RV感染是世界范围内的重大公共卫生问题。本文旨在对RV流行情况及其检测方法相关研究进行综述，以期全面了解RV疫苗研制及抗原抗体检测的必要性，了解VP6 蛋白在RV研究中的重要地位，为建立基于VP6 蛋白的疫苗研制及检测方法研究提供理论依据。

关键词：轮状病毒；疫苗；VP6；检测方法

1. 轮状病毒概述

腹泻是引起 5 岁以下儿童死亡的重要原因，是世界范围内影响婴幼儿健康的重大公共卫生问题，其中轮状病毒（Rotaviruses, RV）是造成儿童急性腹泻和重症腹泻的最常见病毒。全球范围内，每年约 1.14 亿儿童感染RV，约导致 20 万人死亡^[1]和超过 200 万的 5 岁以下儿童住院^[2]。世界卫生组织在 2009 年对 43 个国家的感染性腹泻儿童住院病例进行监测，结果显示全年轮状病毒感染率中位数是 36%（25%~47%）^[3]。发展中国家 RV感染更为严重，全球婴幼儿因感染RV死亡的病例中，超过 85%的病例发生在发展中国家^[4]，这与部分发展中国家卫生条件差、医疗水平低、经济落后等因素有直接关系。其中，大多数RV感染性腹泻引起的死亡都发生在亚洲和非洲，造成了严重的疾病负担。事实上无论社会经济状况及地区差异如何，几乎所有儿童在 5 岁前都感染过轮状病毒，六月龄至 2 岁的婴幼儿感染率最高^[5]。我国最近监测显示，因腹泻入院的儿童中RV检测阳性率高达 47.8%^[6]，且 6 至 23 月龄婴幼儿的RV检测阳性率最高，其中 6 至 11 月龄、12 至 23 月龄有两个高峰发病期^[7]，与国外报道一致，这表明轮状病毒也是我国婴幼儿腹泻住院的重要病原。

1973 年Bishop等人首次发现了轮状病毒^[8]，在电子显微镜下可以观察到，病毒完整的三层粒子结构组装成为一个轮状体(RotainLatin)，1975 年，国际病毒分类委员会正式将此病毒命名为轮状病毒（Rotavirus, RV）^[9]。此后近 50 年中，关于RV的研究愈发深入。RV的一个重要特征是它在环境中有很好的稳定性^[10]，对外界环境的抵抗力非常强，只有高浓度的乙醇、氯、钙螯合剂才能将其灭活^[11]。临床研究发现，RV在室温环境下最长能够存活 7 个月，在 50℃的环境中能存活约 1h，甚至在-20℃中也能长期存活^[12]。此外，RV具有耐热性和耐酸性，不会被胃酸所破坏，主要的传播途径为粪-口传播，病毒通过口咽部进入胃肠道，从而引起患者腹泻，又在腹泻期间大量排出，传播性较强。在

易感个体中，只需要很少的病毒颗粒就可以引起胃肠道症状。

2. 轮状病毒疫苗

轮状病毒感染在临床上至今仍没有特异有效的治疗方法，且卫生状况的改善并不能阻止RV的传播。应对RV造成的腹泻，基础治疗是补液预防脱水，补锌减轻严重程度及缩短腹泻期。接种RV疫苗是减少婴幼儿轮状病毒感染性腹泻和死亡的有效手段^[13]，因此研制安全、有效的RV疫苗尤为重要。血清学研究发现，新生儿初次感染RV后，再次感染时严重程度会明显降低，多表现为无症状^[14]，这一结果为RV疫苗的研究和应用奠定了基础，目前各国均开始重视RV疫苗的使用^[15]。

市面上主要的RV疫苗均为口服减毒活疫苗，主要包括3类：动物轮状病毒毒株、人和动物的重组株以及人轮状病毒减毒毒株。2006年RV疫苗引入市场后^[17]，世界范围内因RV死亡人数下降50%，发达国家中RV住院病例数下降90%^[18]。但事实证明，口服减毒活疫苗对肠道环境要求较高，其对发展中国家儿童的保护效果远低于发达国家^[19,20]，并且存在引起肠套叠问题的安全隐患^[21]。因此近年来有许多研究者尝试开发肠胃外非复制型轮状疫苗，包括灭活RV疫苗、亚单位疫苗、嵌合疫苗、转基因植物疫苗等^[22]。其中，亚单位疫苗以安全性高的特点，成为目前全球RV疫苗研究的热点。南非Michelle Groome博士等人^[23]研制出一种新型肌注接种的RV亚单位疫苗，是目前首个进行II期临床试验的人灭活RV疫苗，试验结果证明该苗保护效果好且安全性较高。

3. 轮状病毒VP6 蛋白

轮状病毒结构蛋白中，中间衣壳蛋白VP6为决定病毒分组的抗原，也是同组中任意种属动物RV均有的共同抗原。依据VP6抗原特异性可将RV分为A~J共10个组，其中A组轮状病毒（group A rotaviruses, RVAs）是引起婴幼儿腹泻的最主要病原^[24]，也是研究人感染RV的重点，在流行病学及疫苗研制方面极为重要。VP6蛋白约占病毒总蛋白量的51%^[25]，其分子量约为45KDa^[26]。VP6蛋白在同组中表现为高度保守，在不同哺乳动物群体中的氨基酸同源性大于87%。同时，VP6蛋白是RV转录酶、复制酶的必须亚基^[27]，具有高度的免疫原性和抗原性，对于病毒的中和起重要作用。研究表明，RV感染后最早和主要的抗体反应是针对VP6蛋白^[28]。

VP6蛋白在RV中的高含量及其相应的免疫原特性，使得它成为疫苗研制和RV检测方法研究中的热点，而VP6蛋白的表达则是这些研究中的重要一环。早在上世纪，针对VP6蛋白表达的研究就已出现^[29]。至今为止，大量研究在表达VP6蛋白时，仍使用传统

的大肠杆菌表达系统。该系统具有操作简便、周期短、成本低且前期研究较多等优点，但在表达VP6 蛋白时，其可溶性表达量极低，研究者多以包涵体形式表达后再进行复性^[30]。复性蛋白虽有一定的生物活性，但复性效率低且蛋白空间结构发生改变。近年来，研究者已在不同表达系统中进行了VP6 表达尝试，应用较为广泛的有昆虫杆状病毒表达系统，表达出的VP6 蛋白真实且抗原性好。如Cid^[31]和原霖^[32]等人均在昆虫杆状病毒中成功表达出VP6，另外还有基于酵母^[33]、哺乳动物细胞^[34]、重组腺病毒^[35]、转基因番茄果实^[36]、植物烟草^[37]、植物乳杆菌^[38]等诸多表达VP6 蛋白的报道。

4. 轮状病毒检测方法

在RV疫苗的研制过程中，病毒有效的抗原含量及免疫后血清中的抗体含量是衡量疫苗效果的重要质量控制指标。因此，针对RV建立有效的抗原检测及血清抗体检测方法十分重要。

轮状病毒的临床检测多针对RV抗原，大部分以腹泻患者的粪便为标本，检测其中是否含有RV抗原，检测方法主要有酶联免疫吸附分析（ELISA）、免疫胶乳凝集法、胶体金免疫层析等^[39]。目前市售RV检测试剂中，ELISA抗原检测试剂盒具有特异性好、敏感性高、重复性好、可同时检测大量样品及可定量等优点^[40]，它对于待测样品的前处理要求较小，因为抗体对抗原存在特异性免疫识别，包被在 96 孔酶标板上的抗体可以直接从待测样品中抓取需要检测的蛋白或者病毒等抗原而不会被待测样品中的其他物质所影响，所以特别适合于对于人体的体液等进行直接检测。

RV抗体的检测方法主要是间接ELISA法，只需将待检血清加入制备好的抗原板上孵育，再加入酶标抗体孵育显色即可测定OD₄₅₀ 值，操作简便、快速。目前国内有许多针对动物检测的相关试剂盒，而针对人的抗体检测试剂盒一般均注明用于科研实验而非临床诊断。原因主要有两方面：（1）诊断标准难以统一。根据RV流行病学特性可知，几乎所有儿童均有过RV感染，且只要感染过RV后人体内通常会一直携带RV抗体，因此在人群中获取足够的阴性样本较为困难，故阴阳临界值难以确定；（2）应用范围较小。RV抗原检测只需采集患者粪便样本即可判断出是否感染了RV，而RV抗体检测则主要针对评价人群接种RV疫苗后的抗体水平变化，故多用于新型疫苗制备时的效果评价，目前尚未投入临床诊断中。

5. 小结

轮状病毒是引起儿童腹泻的最常见病毒，是世界范围内影响婴幼儿健康的重大公共

卫生问题。因RV传播力强、感染广泛且无特异有效的治疗方法，RV疫苗研制成为了解决这一问题的有效手段。自RV发现以来，相关研究愈发深入，但目前上市的疫苗均有其局限性。根据RV最新流行特点，研制安全有效的疫苗仍是公共卫生领域的重要工作。在疫苗研制过程中，抗原免疫原性及血清抗体含量是评价疫苗效果的重要质控标准。VP6蛋白以其在RV中的高含量、高同源性、高免疫原性和抗原性，成为了疫苗研制及抗原、抗体检测方法研究的首选蛋白。基于VP6蛋白，开展相关RV疫苗及检测方法的研究，将为当前该领域存在的问题提供重要的解决方案。

参考文献

- [1] Tate JE, Burton AH, Boschi-Pinto C, et al. 2008 estimate of worldwide rotavirus-associated mortality in children younger than 5 years before the introduction of universal rotavirus vaccination programmes: a systematic review and meta-analysis[J]. The Lancet Infectious Diseases, 2012,12(2).
- [2] Tate, Patel, Steele, et al. Global impact of rotavirus vaccines[J]. Expert Review of Vaccines, 2010,9(4).
- [3] Umesh DP, Erik GH, Joseph SB, et al. Global illness and deaths caused by rotavirus disease in children.[J]. Emerging infectious diseases, 2003,9(5).
- [4] Ramesh V, Pardeep K, Suraj C. Rotavirus vaccine can save millions of children's lives in developing countries.[J]. Human vaccines & immunotherapeutics, 2012,8(2).
- [5] 齐敏. 住院腹泻病患儿 A 组轮状病毒感染的流行病学和临床分析[D]. 蚌埠医学院, 2017.
- [6] Duan ZJ, Liu N, Yang SH, et al. Hospital-Based Surveillance of Rotavirus Diarrhea in the People's Republic of China, August 2003-July 2007.[J]. The Journal of infectious diseases, 2009,200 Suppl 1(Supplement1).
- [7] 顾洁, 赵琳, 郝琼, 等. 婴幼儿轮状病毒性腹泻的临床特点及分子流行病学分析[J]. 中国妇幼保健, 2011,26(30):4758-4761.
- [8] Ruth FB, Davidson GP, Holmes IH, et al. Virus particles in epithelial cells of duodenal mucosa from children with acute non-bacterial gastroenteritis.[J]. The Lancet, 1973,302(7841).
- [9] Flewett TH, Bryden AS, Davies H. Virus particles in gastroenteritis.[J]. The Lancet, 1973,302(7844).
- [10] Matthijnssens J, Ciarlet M, McDonald SM, et al. Uniformity of rotavirus strain nomenclature proposed by the Rotavirus Classification Working Group (RCWG)[J]. Archives of Virology, 2011,156(8).
- [11] Nellie L, Susan SV, Syed A. Chemical disinfection of human rotavirus-contaminated inanimate surfaces.[J]. Journal of Hygiene, 1986,97(1).
- [12] 蔡莎, 朱庆雄. 轮状病毒感染的研究进展[J]. 中国临床研究, 2019,32(08):1132-1134.
- [13] 吕榜军, 黎明强, 覃彦香. 轮状病毒感染性腹泻流行及疫苗的研究进展[J]. 现代预防医学, 2016,43(04):739-741.
- [14] Sáfaci MAP, Berezin EN, Munford V, et al. Hospital-based Surveillance to Evaluate the Impact of Rotavirus Vaccination in São Paulo, Brazil[J]. The Pediatric Infectious Disease Journal, 2010,29(11).
- [15] 司璐, 魏至栋. 轮状病毒疫苗的研发进展[J]. 中国生物制品学杂志, 2018,31(02):210-214.
- [16] Fengju S, Hong Z, Ben L, et al. An miR-502-binding site single-nucleotide polymorphism in the 3'-untranslated region of the SET8 gene is associated with early age of breast cancer onset.[J]. Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research, 2009,15(19).
- [17] Karla S, Hanna B, Nicholas H, et al. Vaccines for preventing rotavirus diarrhoea: vaccines in use.[J]. The Cochrane database of systematic reviews, 2019,2019(10).
- [18] Andrea SMU, Laura F, Gianvincenzo Z, et al. Rotavirus vaccines in clinical development: Current pipeline

- and state-of-the-art.[J]. *Pediatric allergy and immunology : official publication of the European Society of Pediatric Allergy and Immunology*, 2020,31 Suppl 24(s24).
- [19] Pasetti Marcela FP, Jakub KS, Marcelo BS, et al. Immunology of gut mucosal vaccines.[J]. *Immunological reviews*, 2011,239(1).
- [20] Guillermo MRP, Irene PS, Raúl VF, et al. Safety and efficacy of an attenuated vaccine against severe rotavirus gastroenteritis.[J]. *The New England journal of medicine*, 2006,354(1).
- [21] Evan JA, Bethany KS. Intussusception risk increased after rotavirus vaccination but outweighed by benefits.[J]. *Evidence-based medicine*, 2014,19(5).
- [22] 司璐, 魏至栋. 轮状病毒疫苗的研发进展[J]. *中国生物制品学杂志*, 2018,31(02):210-214.
- [23] Groome MJ, Koen A, Fix A, et al. Safety and immunogenicity of a parenteral P2-VP8-P[8] subunit rotavirus vaccine in toddlers and infants in South Africa: a randomised, double-blind, placebo-controlled trial[J]. *The Lancet Infectious Diseases*, 2017,17(8).
- [24] Vlasova AN, Amimo JO, Saif LJ. Porcine Rotaviruses: Epidemiology, Immune Responses and Control Strategies[J]. *Viruses*, 2017,9(3).
- [25] Desselberger U. Rotaviruses[J]. *Virus Research*, 2014,190.
- [26] 潘小霞, 张顺, 陈元鼎. 轮状病毒 VP₆ 蛋白免疫学研究进展 [J]. *中国疫苗和免疫*, 2011,17(02):169-172.
- [27] Camilo A, Marisol A, Rafaela E, et al. Analysis of the kinetics of transcription and replication of the rotavirus genome by RNA interference.[J]. *Journal of virology*, 2009,83(17).
- [28] Aiyegbo MS, Sapparapu G, Spiller BW, et al. Human rotavirus VP6-specific antibodies mediate intracellular neutralization by binding to a quaternary structure in the transcriptional pore.[J]. *PLoS ONE*, 2017,8(5).
- [29] Comparative sequence analysis and expression in *E. coli* of the subgroup I-specific antigen VP6 from a G2 serotype human rotavirus IS2[J]. *Current Science*, 1996,71(6).
- [30] 尹兴晓. A 组人轮状病毒 VP6 蛋白表达及其免疫学分析[D]. 中国协和医科大学, 2008.
- [31] Silva JH, Silva EM, Mendonça MC, et al. Comparison of two eukaryotic systems for the expression of VP6 protein of rotavirus specie A: transient gene expression in HEK293-T cells and insect cell-baculovirus system.[J]. *Biotechnology letters*, 2012,34(9).
- [32] 原霖. 猪轮状病毒 G4P[6]株的分离鉴定及新型检测方法的建立与应用[D]. 中国农业大学, 2018.
- [33] Helba B, Jacques JS, Willem AP, et al. Expression of rotavirus VP6 protein: a comparison amongst *Escherichia coli*, *Pichia pastoris* and *Hansenula polymorpha*. [J]. *FEMS yeast research*, 2016,16(2).
- [34] Eun-Ah C, Kim E, Oh Y, et al. Expression of Rotavirus Capsid Proteins VP6 and VP7 in Mammalian Cells Using Semliki Forest Virus-Based Expression System[J]. *Journal of microbiology and biotechnology*, 2002,12(3).
- [35] Da WT, Jing DS, Jian WW, et al. [Improved expression of human rotavirus VP6 antigen in the recombinant adenoviruse by codon optimization].[J]. *Zhonghua shi yan he lin chuang bing du xue za zhi = Zhonghua shiyan he linchuang bingduxue zazhi = Chinese journal of experimental and clinical virology*, 2011,25(6).
- [36] Sergio S, Fernando EG, Jesús OFT, et al. Production of rotavirus-like particles in tomato (*Lycopersicon esculentum* L.) fruit by expression of capsid proteins VP2 and VP6 and immunological studies.[J]. *Viral immunology*, 2006,19(1).
- [37] Francisco CJ, Miguel AG. Transient Expression in Cytoplasm and Apoplast of Rotavirus VP6 Protein Fused to Anti-DEC205 Antibody in *Nicotiana benthamiana* and *Nicotiana glauca*. [J]. *Molecular biotechnology*, 2021,63(10).
- [38] Shonyela SM, Yang W, Yang G, et al. Innate Cytokine Responses and Toll-Like Receptor Induced by Recombinant Porcine Rotavirus VP6 and VP7 Proteins Expressing in *Lactobacillus plantarum* NC8 Strain

- Colonization in Mice[J]. World Journal of Vaccines, 2020,10(01).
- [39] 徐育云, 魏祥松, 张双庆. 轮状病毒抗原检测试剂的评价及选用策略[J]. 国外医学(临床生物化学与检验学分册), 2005(10):757-758.
- [40] 袁静, 潘小霞, 滕玉梅, 等. 轮状病毒结构蛋白 VP6 的原核表达及其作为检测抗原在病毒检测中的应用[J]. 中国生物制品学杂志, 2012,25(06):730-733.

致 谢

值此论文完稿之际，谨向所有关心、支持、帮助我的人致以最诚挚的感谢！

首先感谢我在甘肃中医药大学学习期间的导师郑贵森教授。三年来，导师在学术和生活上都给予了我耐心的指导，帮助我对研究生学习生涯进行规划，为我推荐专业相关资料，关注我的学习进度与内容，培养我待人接物的能力，并为我解答遇到的各种问题。导师严谨的治学态度、开阔的科研视野、深厚的学术功底、诲人不倦的为师之道都深深影响了我，并使我受益终身。

同时，感谢我在中国疾病预防控制中心病毒病所腹泻室进行联合培养学习时的科室主任段招军研究员、实验指导老师孙晓曼副研究员。两位老师帮助我确定了课题内容，在实验过程中指导我操作，并与我探讨解决课题中出现的各种问题。尤其要感谢孙晓曼老师对我生活和学习上的帮助，晓曼老师热情又细心，在实验遇到瓶颈时安慰我、鼓励我、陪伴我解决问题，在实验有好结果时夸奖我、肯定我、真诚的为我开心，让我在课题进行的整个过程中身心愉悦、乐观积极。晓曼老师是良师也是益友，在未来的人生道路上，我将致力于成为如她一般认真工作、乐观生活、体恤他人的人。

感谢甘中医的老师王新华、吴建军、樊景春、胡继宏、殷晓春、魏兴民等，各位老师带领我学习了公共卫生专业课程，尤其是流行病学、统计学、文献检索等课程为我进行科学研究打下了坚实的理论知识基础。

感谢中疾控的老师李丹地、王宏、章青、孔翔羽、庞立丽等，各位老师为我解决了联培期间在北京工作和生活中的诸多问题，为我提供了良好的实验环境。

感谢我的师兄魏新刚、李涵博、李伯阳，师姐王淼、陈也佳、丛鑫、刘丹、王金冬、刘夏飞、彭蕊、毛彤瑶、王萌璇等人对我学科知识及实验操作的指导。

感谢我的同学马晓华、杜美霞、王明雯、何瑞琪、黄瑜等，我们在生活上互相帮助，在学习中共同进步，团结友爱的度过了三年美好时光。

感谢我的好朋友李雪琪、李勇强、张晶等，谢谢你们在我失落时给予我安慰，在我沮丧时鼓励我继续前行，在我收获小小成果时与我共同分享喜悦。

感谢我的父母及所有家人，你们是我求学路上坚定的支持者，也是我最温暖的后援力量。正是你们的理解与包容，支撑我在人生道路上勇敢前行。

最后，再次向所有帮助过我的老师、同学、亲人、朋友们表示最衷心的感谢！

在学期间主要研究成果

发表论文

1. 苏韞曦,党蕾,李丹地,孙晓曼,郑贵森.A 组 P[15]型牛轮状病毒 VP8*蛋白多糖结合特异性研究[J].国际病毒学杂志,2021,28(02):103-107.
2. Dang L, Su YX, Qi JX, et al. Structural and functional characterization of bovine G1P[5] rotavirus VP8* protein[J]. Virology,2021,563.