

流行性乙型脑炎病毒 E 蛋白结构域Ⅲ的抗原表位鉴定与功能研究*

闫丽萍^{1,2)**} 华荣虹^{1)**} 亓文宝³⁾ 童光志^{1)***}

¹⁾中国农业科学院哈尔滨兽医研究所, 兽医生物技术国家重点实验室人兽共患病研究室, 哈尔滨 150001;

²⁾东北农业大学生命科学与技术研究中心, 哈尔滨 150030; ³⁾华南农业大学兽医学院, 广州 510642)

摘要 流行性乙型脑炎病毒(Japanese encephalitis virus, JEV)是一种严重危害人畜健康的虫媒病毒。表面囊膜蛋白(E 蛋白)是该病毒的主要结构蛋白。E 蛋白在介导病毒与宿主细胞的吸附、融合, 决定病毒的血凝活性、细胞嗜性以及决定病毒毒力和诱导宿主产生保护性免疫反应中起重要作用。E 蛋白结构域Ⅲ(EⅢ)是诱导中和抗体的重要区域。为确定乙型脑炎 EⅢ的抗原表位, 实验首先克隆了 JEV 疫苗株 SA14-14-2 的 EⅢ区域, 并用 pGEX-6P-1 载体进行融合表达, 免疫印迹分析表明, 该融合蛋白能被抗 JEV 血清识别。为了进一步对该结构域进行抗原表位作图, 设计了 14 个覆盖该区域且部分重叠的短肽。将各短肽与 GST 进行融合表达与纯化。短肽融合蛋白经 JEV 阳性血清免疫印迹和 ELISA 免疫反应性扫描分析, 结果鉴定出, E39(³⁰⁵TEKFSFAKNPVDTG³²⁰), E45-1(³⁵⁵VTVPFVATSSA³⁶⁶), E48-1(³⁷⁷PFGDSYIV³⁸⁴)和 E49(³⁸⁵VGRGDKQINHHWHKAG⁴⁰⁰) 4 个线性抗原表位。分别将 4 个抗原表位融合蛋白免疫小鼠, 制备各抗原表位单因子血清, 结果经体外病毒中和试验表明, E39 为具有病毒中和活性的抗原表位。试验结果为进一步分析 JEV E 蛋白结构与功能以及诊断试剂和表位疫苗的研究提供了重要工作基础。

关键词 流行性乙型脑炎, 表面囊膜蛋白(E 蛋白), 抗原表位

学科分类号 Q78, S852.4

流行性乙型脑炎(epidemic encephalitis B; Japanese encephalitis, JE)简称乙脑, 是由乙型脑炎病毒(epidemic encephalitis B virus; Japanese encephalitis virus, JEV)引起的中枢神经系统疾病。该病由蚊虫传播, 主要流行于东亚和南亚各国, 近年来其流行分布范围有不断扩大的趋势。表面囊膜蛋白(envelope protein, E 蛋白)是乙脑病毒的主要结构蛋白, 在介导病毒的吸附、融合, 决定病毒的血凝活性、细胞趋向性、病毒毒力和诱导宿主保护性免疫反应中起重要作用。1999 年 Kolaskar 等^[1]通过对 E 蛋白抗原表位的三维结构预测, 认为 E 蛋白的三维结构主要由 3 个结构域组成, 其中结构域Ⅲ(292~402 氨基酸残基)独立地在病毒表面折叠成为免疫球蛋白样结构, 而且此区域存在中和表位。目前关于 E 蛋白结构域Ⅲ(EⅢ)的精确抗原表位报道甚少。Seif 等^[2]通过原核分段表达 E 蛋白, 证明在 E373~399 位的 27 个氨基酸序列内存在中和表位。Wu 等^[3]运用具有病毒中和活性的单抗 E3.3 分

析表明, E85(Glu/Arg)、E306(Glu/Gly)、E331(Ser/Arg)和 E387(Met/Arg)影响着 E 蛋白的中和表位活性。Wu 等^[4]利用噬菌体展示 12 肽库与单抗 E3.3 作用进行筛选, 表明乙脑病毒的中和位点主要集中在 EⅢ的 E307~309、E327~333、E386~390 这 3 个区域内。Lin 等^[5]对 JEV EⅢ中与中和抗体结合位点进行研究, 通过定点突变确定区域Ⅲ与中和活性表位有关的是 331 位丝氨酸和 332 位天冬氨酸。Saini 等^[6]、Lin 等^[7]、Chen 等^[8]及 Alka 等^[9]也对 EⅢ区域进行了初步的研究。这些研究均只获得该结构域的不连续抗原表位信息, 缺少对抗原表位的具体精确序列进行鉴定。

* 国家自然科学基金(30700027), 黑龙江省博士后基金(LBH-Z05213)和中国农业科学院哈尔滨兽医研究所所长基金(2006-A-02)资助项目。

** 共同第一作者。*** 通讯联系人。

Tel: 0451-82734181, E-mail: gztong@hvri.ac.cn

收稿日期: 2007-07-24, 接受日期: 2007-08-14

为了分析鉴定 EⅢ 的抗原表位, 本研究首先原核克隆表达了 EⅢ, 并设计一组覆盖 EⅢ 区域部分重叠短肽, 对其基因序列进行融合蛋白表达, 通过蛋白质免疫印迹和 ELISA 反应性扫描, 首次对该结构域进行了抗原表位作图. 本试验结果将为进一步分析 JEV E 蛋白结构与功能以及研制诊断试剂和基因工程疫苗提供重要实验依据.

1 材料与方法

1.1 材料

质粒 pET32a-E(含 E 基因的原核表达质粒), pGEX-6P-1 由中国农业科学院哈尔滨兽医研究所保存. 各种限制性内切酶均购自宝生物工程(大连)有限公司. PCR 产物纯化和胶回收试剂盒购自上海华舜生物工程有限公司. T4 DNA 连接酶购自 MBI 公司. 红外荧光标记(IRDye700, 红色)的羊抗兔 IgG 抗体、红外荧光标记(IRDye700, 红色)的羊抗鼠 IgG 抗体购自 Rockland 化学免疫试剂公司. 兔抗 JEV SA14-14-2 株阳性血清由第四军医大学马文煜教授馈赠. 蛋白短肽由南京博亚生物有限公司合成.

1.2 pGEX-EⅢ融合表达载体的构建与表达

根据已发表的 SA14-14-2(GenBank 登陆号为 AF315119)的 E 基因核苷酸序列, 针对结构域Ⅲ设计合成一对引物. 引物序列为, EF3p1: 5' TTAGGATCCCTGGGCAAGGCCTTTTCAACAAC 3', EF3p2: 5' ACACTCGAGTTAAGCATGCAC-

ATTGGTCGCTAAG 3'. 在上游引物 5' 端引入 *Bam*H I 酶切位点, 在下游引物 5' 端引入 *Xho* I 酶切位点(下划线处为酶切位点). 引物由上海 Invitrogen 公司合成. 该引物扩增产物编码 EⅢ 292~402 氨基酸残基的片段. 以 pET32a-E 为模板进行 PCR 扩增. PCR 反应条件为: 94℃ 4 min; 94℃ 30 s, 55℃ 30 s, 72℃ 1 min, 循环 35 次; 72℃ 10 min. PCR 产物经 *Bam*H I、*Xho* I 双酶切回收后, 与经同样酶切处理的 pGEX-6P-1 进行连接, 转化大肠杆菌 DH5α, 重组子经酶切及 PCR 鉴定后命名为 pGEX-EⅢ, 再将重组质粒转化大肠杆菌 BL21. 大肠杆菌感受态的制备, 质粒的连接转化按常规方法进行. 将表达菌种接种于含 100 mg/L 氨苄青霉素的 LB 培养基中, 37℃ 培养过夜后, 按 1:100 接种于新鲜 LB 培养基中, 继续培养至对数生长期($A_{600}=0.5\sim0.7$), 加 IPTG 诱导, 培养物离心后用 1/20 体积 PBS 重悬, 超声波裂解后 12 000 r/min 离心, 分离上清和沉淀, 12% SDS-PAGE 检测表达情况.

1.3 短肽融合蛋白的设计

为了对 EⅢ 进行抗原表位作图, 设计了 14 个覆盖整个 EⅢ 的短肽, 命名为 E37~E50, 这些短肽每个长为 16 个氨基酸, 相互重叠 8 个氨基酸(表 1). 为了表达这些短肽, 对其基因序列直接合成(由北京英骏生物技术有限公司合成), 5' 端和 3' 端分别引入 *Bam*H I 位点和 *Xho* I 位点.

Table 1 Designed short peptides and synthesized DNA sequences which encoding the short peptides

Peptide name	Peptide sequence	DNA sequence
E37	²⁸⁹ LKMDKLALKGTTYGMC ³⁰⁴	5' gatcc ctgaaaatggacaaactggctctgaaaggcacaacatgcatgtgt taac 3'
E38	²⁹⁷ KGTTYGMCTEKFSFAK ³¹²	5' gatcc aaaggcacaacatgcatgtgtacagaaaattctcgttcgcgaaa taac 3'
E39	³⁰⁵ TEKFSFAKNPVDTHGH ³²⁰	5' gatcc acagaaaaattctcgttcgcgaaaaatccggtggacactggtcacgga taac 3'
E40	³¹³ NPVDTHGHGTVVIELSY ³²⁸	5' gatcc aatccggtggacactggtcacggaacagttgtcattgaactctctac taac 3'
E41	³²¹ TVVIELSYSGSDGPCK ³³⁶	5' gatcc acagttgtcattgaactctctactctgtggagtgtggccctgcgaaa taac 3'
E42	³²⁹ SGSDGPCKIPIVSVAS ³⁴⁴	5' gatcc tctgggagtgatggccctgcgaaaattccgattgttccgttcgcgagc taac 3'
E43	³³⁷ IPIVSVASLNDMTPVG ³⁵²	5' gatcc attccgattgttccgttcgcgagcctcaatgacatgacccccgttggg taac 3'
E44	³⁴⁵ LNDMTPVGRLVTNP ³⁶⁰	5' gatcc ctcaatgacatgacccccgttggcggtgtgtgacagtgaaccccttc taac 3'
E45	³⁵³ RLVTNPFVATSSANS ³⁶⁸	5' gatcc cggctggtgacagtgaaccccttcgtcgcgacttcagtgccaactca taac 3'
E46	³⁶¹ VATSSANSKVLVEMEP ³⁷⁶	5' gatcc gtcgcgacttcagtgccaactcaaaagtgctgctgagatggaaccc taac 3'
E47	³⁶⁹ KVLVEMEPFGDSYIV ³⁸⁴	5' gatcc aaggtgctgctgagatggaaccccccttcgagactctacatcgtg taac 3'
E48	³⁷⁷ PFGDSYIVVGRGDKQ ³⁹²	5' gatcc cccttcggagactcctacatcgttagttggaaggaggagacaagcagatc taac 3'
E49	³⁸⁵ VGRGDKQINHHWHKAG ⁴⁰⁰	5' gatcc gttggaaggaggagacaagcagatcaaccaccattggcacaaagctgga taac 3'
E50	³⁹³ NHHWHKAGSTLGKAFS ⁴⁰⁸	5' gatcc aaccaccattggcacaagctggaagcacgctgggcaaggccctttca taac 3'

The DNA sequences illustrated are all sense strands. When the sense and antisense oligo-nucleotides annealed they would form a cohesive *Bam*H I site at 5' terminus and a cohesive *Xho* I site at 3' terminus.

1.4 短肽的融合表达与纯化

质粒 pGEX-6P-1 经 *Bam*H I、*Xho* I 双酶切回收后分别与退火的各双链寡核苷酸连接, 重组子经酶切鉴定后命名为 pGEX-E37 至 pGEX-E50, 各重组质粒送北京英骏生物技术有限公司测序以验证序列. 将重组质粒转化感受态大肠杆菌 BL21. 将表达菌种接种于含 100 mg/L 氨苄青霉素的 LB 培养基中, 37℃ 培养过夜后, 按 1:100 接种于新鲜 LB 培养基中, 继续培养至对数生长期($A_{600} = 0.5 \sim 0.7$), 加入 IPTG 进行诱导, 培养物离心后用 1/20 体积 PBS 重悬, 超声波裂解后 12 000 r/min 离心, 分离上清和沉淀, 12% SDS-PAGE 检测表达情况. 可溶性短肽融合蛋白用谷胱甘肽 Sepharose 4B RediPack 亲和层析柱(Pharmacia Biotech)纯化, 操作步骤按说明进行, 纯化后测定蛋白质含量, 不溶性短肽融合蛋白经超声波裂解纯化, -20℃ 保存, 纯化蛋白质备用.

1.5 抗原表位的精确定位

鉴定出的抗原表位 E45(353~368)以包涵体的形式存在, 为了便于鉴定表位的免疫原性, 进一步截短, 两端各去掉 2 个氨基酸, 命名为 E45-1(355~366), 合成的 DNA 序列为 E45-1: 5' gatccg-tgacagtgaacccttcgtcgcgacttcagtgctaac 3'. 鉴定出的表位 E47(369~384)、E48(377~392)、E49(385~400)存在相互重叠的氨基酸, 所以对他们进行截短, 先寻找它们当中的共有氨基酸序列 E48-1(377~384)、E48-2(385~392), 合成的 DNA 序列分别为 E48-1: 5' gatcccccttcggagactcctacatcgataac 3', E48-2: 5' gatccgttggaaggggagacaagcagatctaac 3'. 然后再进行细分 E49-1(393~400)、E49-3(387~498)、E49-4(389~396). 合成的 DNA 序列分别为 E49-1: 5' gatccaaccaccattggcacaagctggataac 3', E49-2: 5' gatccaggggagacaagcagatcaaccaccattggcacaataac 3', E49-3: 5' gatccgacaagcagatcaaccaccattggtaac 3'. 具体设计见图 1, 然后按 1.4 方法进行融合蛋白表达质粒的构建及表达纯化.

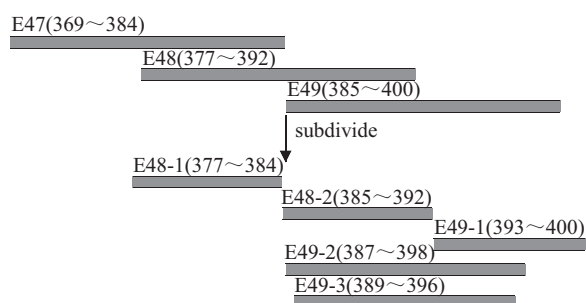


Fig. 1 The identified epitopes E47, E48, E49 were subdivided

1.6 鼠抗融合蛋白 GST-E39、GST-E45-1、GST-E48 和 GST-E49 血清的制备

融合蛋白 GST-E39、GST-E45-1、GST-E48 和 GST-E49 的纯化按 1.4 所述方法进行. 首免用纯化融合蛋白(浓度为 1 g/L)与完全弗氏佐剂等体积混合乳化, 腿部皮下注射免疫 6~8 周龄雌性 BALB/c 小鼠 5 只(100 μg/只), 每隔 2 周用与不完全弗氏佐剂等体积乳化的纯化融合蛋白加强免疫, 第 2 次加强免疫后 10 天采血分离血清, -20℃ 保存备用.

1.7 免疫印迹

1.7.1 检测融合蛋白 GST-E Ⅲ 与兔抗 JEV SA14-14-2 株阳性血清的免疫反应性. 样品经 SDS-PAGE 后, 转印至硝酸纤维素膜上, 5% 脱脂乳 4℃ 封闭过夜, PBST 洗 3 遍, 浸入 1:100 稀释兔抗 JEV SA14-14-2 株阳性血清, 室温作用 1h, PBST 洗 5 遍后, 浸入 1:5 000 稀释的红外荧光标记的抗兔 IgG 抗体, 避光 37℃ 作用 1h, PBST 避光洗涤 3 次, 再用 PBS 避光洗涤 2 次, 用 Odyssey 双色红外激光成像系统进行扫描^[10].

1.7.2 检测短肽融合蛋白与 JEV 阳性血清的免疫反应性. 纯化的短肽样品处理同 1.7.1.

1.8 ELISA 分析

1.8.1 检测短肽融合蛋白与兔抗 JEV SA14-14-2 株阳性血清的免疫反应性. 用 0.1 mol/L 碳酸盐缓冲液(pH 9.6)将纯化的短肽融合蛋白按 10 mg/L 的量包被 ELISA 板, 4℃ 过夜, 用 1% BSA 37℃ 封闭 3h. 封闭后用 PBST(PBS 含 0.1% Tween 20)洗 3 遍, 加入 1:100 稀释的 JEV 阳性血清, 37℃ 作用 1h, PBST 洗 5 遍; 加入 1:5 000 稀释的 HRP 标记羊抗兔 IgG 抗体, 37℃ 作用 1h, PBST 洗 5 遍, 加入 TMB 显色液显色 15 min, 50 μl/孔 2 mol/L H₂SO₄ 终止, 450 nm 波长测量 A 值^[11].

1.8.2 检测鼠抗融合蛋白 GST-E39、E45-1、E48 和 E49 血清与合成肽的免疫反应性. 用 0.1 mol/L 碳酸盐缓冲液(pH 9.6)将合成短肽按 10 mg/L 的量包被 ELISA 板, 加入倍比稀释的鼠抗融合蛋白血清(1/50, 1/100, 1/200, 1/400, 1/800), 同时设未免疫鼠血清以及鼠抗融合蛋白 GST-SRBD3 血清^[12]为阴性对照(混合肽包被), 鼠抗融合蛋白 GST-SRBD3 血清与兔抗 JEV 血清不反应. 二抗加入 1:5 000 稀释的 HRP 标记羊抗鼠 IgG 抗体, 37℃ 作用 1h, PBST 洗 5 遍, 加入 TMB 显色液显色 15 min, 50 μl/孔 2 mol/L H₂SO₄ 终止, 450 nm 波长测量 A 值.

1.9 鼠抗融合蛋白免疫血清中和试验

将各组表位融合蛋白免疫小鼠血清混合, 经离心 13 000 r/min 5 min 后, 移入无菌反应管中. 然后经 56℃ 30 min 灭活, 从 1:8 起始倍比稀释, 与等体积的 200 TCID₅₀ 的 JEV 混合, 置 37℃ 混合培养 30 min. 然后分别加入预先培养有 BHK21 细胞的 96 孔培养板中, 置 37℃ 吸附 1 h 后弃去混合液, 换 1640 完全培养基继续培养, 逐日观察细胞病变. 兔抗 JEV SA14-14-2 株阳性血清为阳性对照, 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, 3 天后观察细胞感染病毒情况.

2 结 果

2.1 EⅢ的融合表达与免疫印迹分析

PCR 产物克隆至表达载体 pGEX-6p-1 后经测序表明, 与 GenBank 中报道的 SA14-14-2 株对应序列完全一致. 重组质粒 pGEX-EⅢ转化宿主菌 BL21 后, 诱导表达, 经 12% SDS-PAGE 分析, 表明目的基因以包涵体的形式表达. 表达产物分子质量约为 38 ku, 与预期大小一致(图 2a). 蛋白质印迹结果表明, 表达融合蛋白 GST-EⅢ能被 JEV 阳性血清所识别(图 2b), 从图 2 可以看出, 含有 3 条反应带, 推测是由于表达的目的蛋白降解所致.

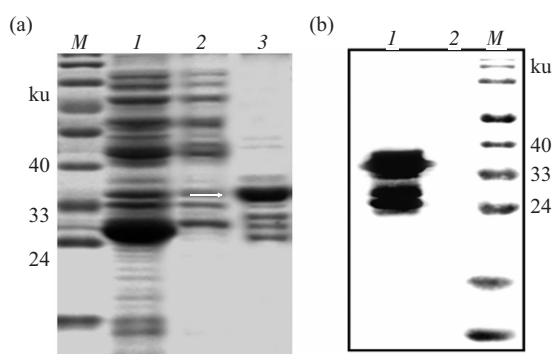


Fig. 2 SDS-PAGE and Western blot analysis of the expressed fusion protein GST-EⅢ

(a) SDS-PAGE analysis of the expressed fusion protein GST-EⅢ. 1: Induced GST as a control; 2: Supernatant of induced bacteria lysis; 3: Sediment of induced bacteria lysis; M: Protein molecular mass marker. Arrow indicated the expression of fusion protein GST-EⅢ. (b) Western blot analysis of the expressed fusion protein GST-EⅢ. Antibody was rabbit sera anti-JEV. 1: GST-EⅢ; 2: GST; M: Protein molecular mass marker.

2.2 短肽融合蛋白的表达与纯化

编码各短肽的寡核苷酸经退火后克隆至表达载

体 pGEX-6p-1, 测序检验表明各编码序列完全正确. 重组质粒依次命名为 pGEX-E37 至 pGEX-E50, 重组质粒转化宿主菌 BL21, 诱导表达, 经 SDS-PAGE 分析表明目的基因均得到了表达. 诱导产物经超声波裂解后用于 SDS-PAGE 分析(图 3a). 可溶性短肽融合蛋白用谷胱甘肽 Sepharose 4B RediPack 亲和层析柱(Pharmacia Biotech)纯化, 不溶性短肽融合蛋白经超声波洗涤纯化(图 3b).

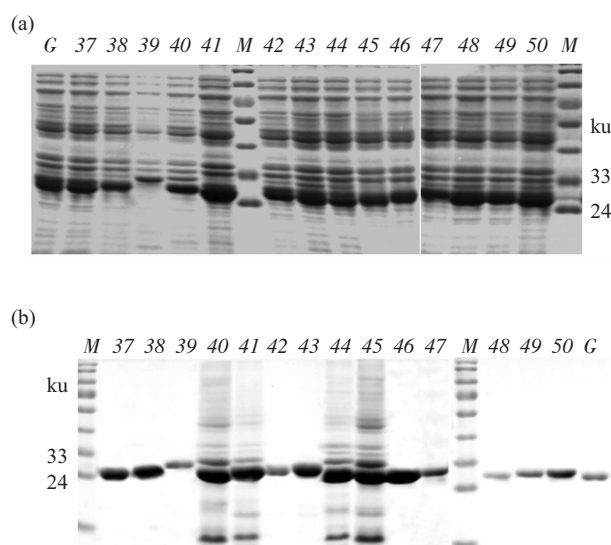


Fig. 3 Expression and purification of short peptide fused protein

(a) SDS-PAGE of expressed short peptide fused protein. (b) SDS-PAGE of purified short peptide fused protein, M: Protein marker; G: GST control; 37~50: Recombinant fusion proteins GST-E37~GST-E50.

2.3 短肽融合蛋白的蛋白质印迹分析与 ELISA 分析

蛋白质印迹和 ELISA 结果分析表明, 表达的融合蛋白 GST-E39(305~320)、GST-E45(353~368)、GST-E47(369~384)、GST-E48(377~392)和 GST-E49(385~402)均能被 JEV 阳性血清所识别(图 4 和图 5). 由于 E47、E48 和 E49 是一个连续的氨基酸序列, 为了确定抗原表位的主要功能性区域, 将该段氨基酸进一步划分, 通过蛋白质印迹结果表明, 该区域含有 2 个抗原表位, 即融合蛋白 GST-E48-1(377~384)和 GST-E49(385~402)(图 4)能被 JEV 阳性血清识别. 同时, 对 E45 进行相应的细分, 蛋白质印迹结果发现, GST-E45-1(355~366)能被 JEV 阳性血清所识别(图 4).

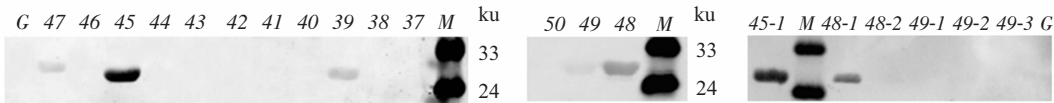


Fig. 4 Western blot analysis of the reactivity of JEV immunized rabbit sera to short peptide fusion protein
M: Protein molecular mass marker, *G*: GST control, 37~50: Recombinant fusion protein GST-E37 to GST-E50, 45-1~49-3: Recombinant fusion protein GST- E45-1 to GST-E49-3.

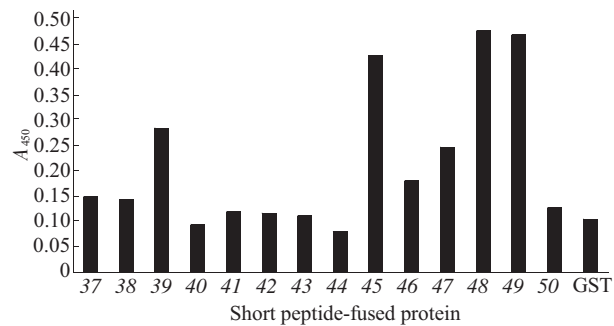


Fig. 5 ELISA analysis of the reactivity of JEV immunized rabbit sera to short peptide-fused protein GST-E37 to GST-E50
37~50: Recombinant short peptide-fused protein GST-E37~GST-E50. GST: GST control.

2.4 EⅢ抗原表位作图
相互重叠且覆盖 EⅢ 全长区域的短肽融合蛋白经 JEV 阳性血清蛋白质印迹及 ELISA 扫描, 以及通过蛋白质印迹进一步精确定位后, 最终确定 E39、E45-1、E48-1 和 E49 4 个抗原表位, 表位作图如下(图 6).

2.5 融合短肽 GST-E39、GST-E45-1、GST-E48 和 GST-E49 的免疫原性

融合蛋白 GST-E39、GST-E45-1、GST-E48 和 GST-E49 经纯化免疫小鼠制备了免疫血清, 通过合成短肽包被 ELISA 板进行分析表明, 这些融合短肽能诱导小鼠产生针对相应短肽的特异抗体, 且抗

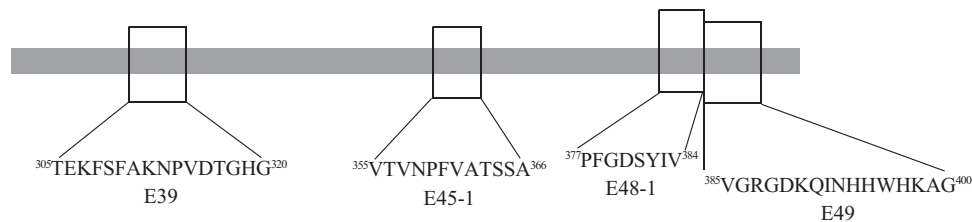


Fig. 6 Schematic diagram of epitope mapping results of EⅢ domain

体滴度高于 1:200[以 P/N 值 ≥ 2 为阳性, P/N 值 < 2 为阴性, P/N 值 = (检测孔 A 值 - 空白对照孔 A 值) / (阴性鼠血清 100 倍稀释 A 值 - 空白对照孔 A 值)](图 7), 该结果表明所鉴定出的抗原表位均具有良好的免疫原性.

2.6 病毒中和实验

3 次免疫后, 免疫 GST-E39 组小鼠混合血清可以抑制由 JEV 导致的 BHK21 细胞上的病变, 抗体中和效价为 1:32(图 8d). 兔抗 JEV 高免疫血清为阳性对照, 阳性血清处理组未出现病毒噬斑, 该血清中和效价大于 1:64, 而其他单因子血清则未能观察到明显的病毒中和作用. 无血清处理阴性对照组(图 8a, 箭头所示)以及正常鼠阴性血清对照组均出现明显的病毒噬斑(图 8e, 8f, 箭头所示).

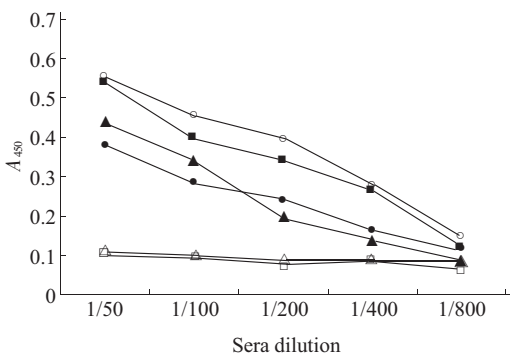


Fig. 7 ELISA analysis of the reactivity of sera against fusion proteins to the synthetic short peptides
E39, E45-1, E48, E49: Mouse sera against GST-E39, GST-E45-1, GST-E48, GST-E49, respectively. Normal mouse: Not immunized mouse sera. SRBD3: Mouse sera against fusion protein GST-SRBD3. ●—●: E39; ▲—▲: E45-1; ■—■: E49; ○—○: E48; △—△: Normal mouse; □—□: SRBD3.

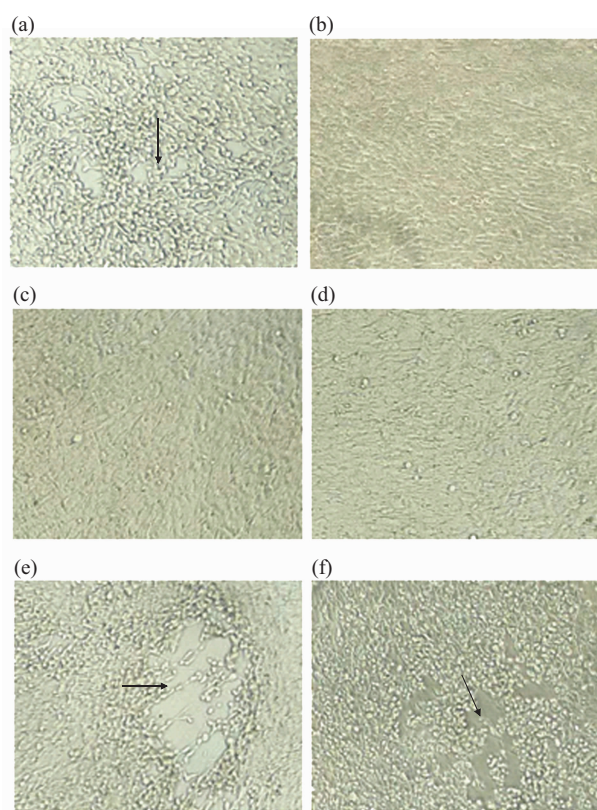


Fig. 8 Neutralizing antibody titers in sera from the immunized mice measured by protecting of BHK21 cell from 100 TCID₅₀ JEV challenge *in vitro*

(a) BHK21 cells infected by JEV with no sera preincubation. (b) BHK21 cells infected by JEV preincubated with 32 times diluted rabbit sera against JEV. (c) and (d) BHK21 cells infected by JEV preincubated with 16 and 32 times diluted mouse sera against protein GST-E39. (e) and (f) BHK21 cells infected by JEV preincubated with 16 and 32 times diluted normal mouse sera.

3 讨 论

本研究克隆表达了 EⅢ 区域, 原核表达产物可被抗 JEV 血清识别, 证明了 EⅢ 存在线性抗原表位. 为了进一步鉴定 EⅢ 的线性抗原表位, 设计表达了一组部分重叠覆盖该区域的短肽融合蛋白. 用兔抗 JEV 多抗对短肽融合蛋白组进行扫描, 结果表明, 融合蛋白 E39(305~320)、E45(353~368)、E47(369~384)、E48(377~392)和 E49(385~400)能被 JEV 阳性血清所识别. E45、E47、E48 和 E49 是一个连续的氨基酸序列, 因此推测 353~400 氨基酸区域是 EⅢ 抗原表位的优势区域. 进一步的精确定位表明, EⅢ 含有 E39(³⁰⁵TEKFSF-AKNPVDTHG³²⁰)、E45-1(³⁵⁵VTVPNFVATSSA³⁶⁶)、E48-1(³⁷⁷PFGDSYIV³⁸⁴)和 E49(³⁸⁵VGRGDKQINHH-WHKAG⁴⁰⁰) 4 个线性抗原表位. 以前的研究如

Kolaskar 和 Kulkarni-Kale^[1]预测的区域Ⅲ的表位 E289~313、E355~362 存在抗原表位, 以及 Kolaskar 和 Tongaonkar^[13]所预测的 E379~387、E391~399 等区域与抗原表位组成相关. 但均没有对其中的抗原表位进行精确的序列分析与鉴定, 本研究运用融合表达短肽扫描的方法不但对 E 蛋白结构域Ⅲ进行了系统的表位作图, 还对其功能进行了初步分析, 鉴定出 E39 为该结构域的中和抗原表位.

本实验通过 ELISA 检测证明, 4 个表位融合蛋白均能诱导小鼠产生针对相应短肽的特异抗体, 且抗体滴度较高, 该结果表明所鉴定出的抗原表位均具有良好的免疫原性. 对制备的各融合短肽抗血清进行中和试验, 结果表明, GST-E39 免疫组小鼠混合血清可测出病毒特异性的中和抗体效价为 1:32, 此中和表位 E39(305~320)为本研究首次鉴定. Seif 等^[2]报道的线性中和表位 E373~399, 与 E48(377~392)和 E49(385~400)重叠, 但在本研究中 GST-E48 和 GST-E49 免疫组小鼠混合血清并没有观察到病毒中和作用. 但也不能排除中和表位的存在, 分析没有观察到抗 GST-E48 和 GST-E49 血清的中和效果可能与抗体效价不高有关, 也可能 GST 不是一个合适的融合载体^[12].

根据 NCBI 中 JEV EⅢ 的三维结构^[14]分析, 鉴定的中和表位 E39 在 EⅢ 空间结构中的位置, 见图 9 中的黄色线及黄色区域, 可以看出 E39 位于 E 蛋白分子空间结构的表面. 该表位可能位于细胞受体结合部位或邻近受体结合部位, 或者该表位与抗体分子结合后改变了 EⅢ 的空间构象从而发挥中和病毒的作用. 相关的结构信息还有待进一步深入研究. 本试验关于 E39 抗原中和表位的发现将有助于 EⅢ 结构与功能的进一步研究和为 JEV 防治提供新的理论基础.

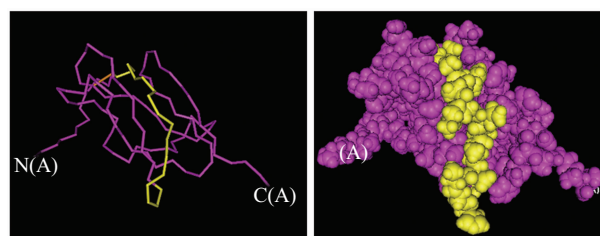


Fig. 9 The site of identification antigen epitope E39 in JEV EⅢ conformation

Yellow line/yellow domain was the site of identified antigen epitope E39.

参 考 文 献

- Kolaskar A S, Kulkarni-Kale U. Prediction of three-dimensional structure and mapping of conformational epitopes of envelope glycoprotein of Japanese encephalitis virus. *Virology*, 1999, **261**(1): 31~42
- Seif S A, Morita K, Matsuo S, *et al.* Finer mapping of neutralizing epitopes on the C-terminal of Japanese encephalitis virus E-protein expressed in recombinant *Escherichia coli* system. *Vaccine*, 1995, **13**(16): 1515~1521
- Wu S C, Lian W C, Hsu L C, *et al.* Japanese encephalitis virus antigenic variants with characteristic differences in neutralization resistance and mouse virulence. *Virus Res*, 1997, **51**(2): 173~181
- Wu S C, Lin C W. Neutralizing peptide ligands selected from phage-displayed libraries mimic the conformational epitope on domain Ⅲ of the Japanese encephalitis virus envelope protein. *Virus Res*, 2001, **76**(1): 59~69
- Lin C W, Wu S C. A functional epitope determinant on domain Ⅲ of the Japanese encephalitis virus envelope protein interacted with neutralizing-antibody combining sites. *J Virol*, 2003, **77**(4): 2600~2606
- Saini M, Vrati S. A Japanese encephalitis virus peptide present on Johnson Grass Mosaic virus-like particles induces virus-neutralizing antibodies and protects mice against lethal challenge. *J Virol*, 2003, **77**(6): 3487~3494
- Lin C W, Wu S C. Identification of mimotopes of the Japanese encephalitis virus envelope protein using phage-displayed combinatorial peptide library. *J Mol Microbiol Biotechnol*, 2004, **8**(1): 34~42
- Chen C T, Yi Y C, Chiang S C, *et al.* Selection of immunodominant fragments from envelope gene for vaccine against Japanese encephalitis virus in DNA priming-protein boosting protocols. *Microb Pathog*, 2005, **38**(2-3): 53~62
- Alka, Bharati K, Malik Y P, *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**(4): 227~231
- Kang J, Shi Y, Xiang B, *et al.* A nuclear function of beta-arrestin1 in GPCR signaling: regulation of histone acetylation and gene transcription. *Cell*, 2005, **123**(5): 833~847
- Hua R H, Zhou Y J, Wang Y F, *et al.* Identification of two antigenic epitopes on SARS-CoV spike protein. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 2004, **319**(3): 929~935
- 华荣虹, 童光志, 王云峰, 等. SARS 冠状病毒 S 蛋白受体结合结构域的表达及其表位作图. *生物化学与生物物理进展*, 2005, **32**(11): 1030~1037
- Hua R H, Tong G Z, Wang Y F, *et al.* *Prog Biochem Biophys*, 2005, **32**(11): 1030~1037
- Kolaskar A S, Tongaonkar P C. A semi-empirical method for prediction of antigenic determinants on protein antigens. *FEBS Lett*, 1990, **276**(1-2): 172~174
- Wu K P, Wu C W, Tsao Y P, *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. *J Biol Chem*, 2003, **278**(46): 46007~46013

Antigenic Epitopes Mapping and Functional Analysis of Domain III of Japanese Encephalitis Virus Envelope Protein*

YAN Li-Ping^{1,2)**}, HUA Rong-Hong^{1)**}, QI Wen-Bao³⁾, TONG Guang-Zhi^{1)***}

⁽¹⁾ Division of Zoonosis, National Key Laboratory of Veterinary Biotechnology, Harbin Veterinary Research Institute, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Harbin 150001, China;

⁽²⁾ Life Science and Biotechnology Research Center of Northeast Agricultural University, Northeast Agricultural University, Harbin 150030, China;

⁽³⁾ College of Veterinary Medicine, Southern China Agricultural University, Guangzhou 510642, China)

Abstract Japanese encephalitis virus (JEV) (family Flaviviridae, genus *Flavivirus*) is an arbovirus of public health importance. The envelope glycoprotein of JEV is associated with viral attachment and fusion with host cell, determine the virus' s hemagglutination ability, cellular tropism, viral virulence, and induction of protective immune response. The domain III of envelope protein (E protein) is an important region in inducing neutralizing antibodies against JEV. In order to study the antigenic structure of domain III on E protein, domain III of the envelope protein was expressed by fusion with GST in a pGEX-6p-1 vector. Western blot demonstrated that expressed fusion protein could be recognized by anti-JEV sera. To map the antigenic epitope of this region, a set of 14 partially overlapping short peptides spanning the domain III were designed and expressed in fusing with GST. Then Western blot and ELISA reactivity of these short peptide fusion proteins to anti-JEV sera were surveyed, respectively. Four linear antigenic epitopes, E39 (³⁰⁵TEKFSFAKNPVDTHG³²⁰), E45-1 (³⁵⁵VTVPFVATSSA³⁶⁶), E48-1 (³⁷⁷PFGDSYIV³⁸⁴) and E49 (³⁸⁵VGRGDKQINHHWHKAG⁴⁰⁰) were identified. Immunization of mice with epitope fusion proteins revealed that all four proteins could elicit short peptide specific antibody. And *in vitro* neutralization test verified that E39 was linear neutralizing epitope. This result provides important basis for further structural and functional study of domain III of JEV envelope protein, and development of diagnostic techniques and vaccines.

Key word Japanese encephalitis virus, envelope protein (E-protein), epitope

*This work was supported by grants from The National Natural Science Foundation of China (30700027), The Heilongjiang Postdoctoral Foundation (LBH-Z05213) and The Director Fund of Harbin Veterinary Research Institute of The Chinese Academy of Agricultural Sciences (2006-A-02).

**YAN Li-Ping and HUA Rong-Hong contribute equally to this study.

***Corresponding author . Tel: 86-451-82734181, E-mail:gztong@hvri.ac.cn

Received: July 24, 2007 Accepted: August 14, 2007