

DOI: 10. 12138/j. issn. 1671-9638. 20195328

· 论 著 ·

寨卡病毒包膜蛋白重组人腺病毒 5 型载体的构建与免疫原性测定

马晓瑞¹, 罗升学¹, 王一琳¹, 张攀丽¹, 刘博超¹, 赵卫², 李婷婷¹, 黎诚耀¹

(南方医科大学 1. 检验与生物技术学院输血医学系; 2. 公共卫生与热带医学学院三级生物安全实验室, 广东 广州 510515)

[摘要] 目的 以腺病毒 5 型载体(Ad5)构建含寨卡病毒(ZIKV)包膜蛋白(prM-E)的复制缺陷型 5 型重组腺病毒(rAd5)表达载体,测定 prM-E 在细胞中的表达及对小鼠的免疫原性。方法 从 ZIKV 毒株 Z16006(亚洲型)分离获得 prM-E 基因片段,以重组腺病毒 AdMax™ 系统包装重组腺病毒 rAd5/prM-E。选用 C57BL/6 小鼠,以 rAd5/prM-E 10⁷、10⁸ 和 10⁹ PFU 三个剂量肌内注射免疫小鼠,在第 3 周同等剂量加强免疫一次,第 5 周从小鼠眼球取血并分离脾淋巴细胞。分别以 ELISpot 和 ELISA 方法测定小鼠对 ZIKV prM-E 的体液与细胞免疫反应。结果 成功构建复制缺陷型重组腺病毒载体 rAd5/prM-E,采用 Western blot 方法和抗 ZIKV E 抗体检测 rAd5/prM-E 感染的 293A 细胞表达产物,可见与 E 蛋白相应的 56 kDa 蛋白带。以 ELISpot 方法测定小鼠脾淋巴细胞特异性 IFN- γ 分泌细胞形成斑点数(SFCs),结果分别为(688.54 ± 186.43)、(1 084.90 ± 144.14)和(1 640.20 ± 147.13) SFCs/10⁶ 脾细胞,与病毒接种剂量呈正比关系;采用 ELISA 测定免疫小鼠血清中抗 E 抗体,其滴度(log₁₀ 值)分别为(3.14 ± 0.39)、(3.50 ± 0.30)和(3.74 ± 0.25),均高于对照组小鼠(0.80 ± 0.17),差异具有统计学意义(P < 0.001)。结论 rAd5/prM-E 具有感染小鼠并诱导小鼠产生强烈的特异性抗体和细胞免疫反应的能力,表明 prM-E 具有良好的免疫原性,为 ZIKV 候选疫苗研制提供了可靠的免疫源。

[关键词] 寨卡病毒; prM-E 蛋白; 腺病毒载体; 免疫原性**[中图分类号]** R373.9 R446.6**Construction and immunogenicity detection of recombinant human adenovirus type 5 vector containing ZIKV envelope protein**MA Xiao-rui¹, LUO Sheng-xue¹, WANG Yi-lin¹, ZHANG Pan-li¹, LIU Bo-chao¹, ZHAO Wei², LI Ting-ting¹, LI Cheng-yao¹ (1. Department of Transfusion Medicine, School of Laboratory Medicine and Biotechnology; 2. BSL-3 Laboratory of School of Public Health and Tropical Medicine, Southern Medical University, Guangzhou 510515, China)

[Abstract] **Objective** To construct replication-defective recombinant adenovirus type 5 (rAd5) vector containing Zika virus (ZIKV) envelope protein prM-E, and determine the expression of prM-E in cells and its immunogenicity in mice. **Methods** prM-E gene fragment was obtained from ZIKV strain Z16006 (Asian type), recombinant adenovirus rAd5/prM-E was enveloped with recombinant adenovirus AdMax™ system. C57BL/6 mice were immunized by intramuscular injection of rAd5/prM-E at three doses (10⁷, 10⁸ and 10⁹ PFU), mice were immunized again at the same dose at week 3, blood was taken from the eyeballs of mice and spleen lymphocytes were separated at week 5. Humoral and cellular immune response of mice to ZIKV prM-E were detected by ELISpot and ELISA respectively. **Results** The replication-defective recombinant adenovirus vector rAd5/prM-E was constructed successfully, expression products of 293A cells infected with rAd5/prM-E were detected by Western blot and anti-ZIKV E antibody, 56 kDa protein band which corresponded with E protein was observed. Spots forming cells (SFCs) secreted by mice

[收稿日期] 2018-12-07

[基金项目] 国家重点研发计划基金项目(2017YFD0500300)

[作者简介] 马晓瑞(1994-),女(汉族),甘肃省白银市人,硕士研究生,主要从事重组 ZIKV/HCV 腺病毒载体疫苗的制备及研究。

[通信作者] 李婷婷 E-mail: apple-ting-007@163.com; 黎诚耀 E-mail: chengyaoli@hotmail.com

splenic lymphocyte specific IFN- γ was detected by ELISpot method, results were (688.54 ± 186.43), ($1\ 084.90 \pm 144.14$), and ($1\ 640.20 \pm 147.13$) SFCs/ 10^6 splenic cell respectively, which were positively proportional to the immune dose; anti-E antibody in serum of immunized mice was determined by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA), and the titers (log₁₀ value) were (3.14 ± 0.39), (3.50 ± 0.30), and (3.74 ± 0.25) respectively, all were significantly higher than (0.80 ± 0.17) of control group ($P < 0.001$). **Conclusion** rAd5/prM-E has the ability to infect mice and induce strong specific antibodies and cellular immune response, which indicates that prM-E has good immunogenicity and provides a reliable immune source for the development of ZIKV candidate vaccine.

[**Key words**] Zika virus; prM-E protein; adenovirus vector; immunogenicity

寨卡病毒(Zika virus, ZIKV)于 1947 年在乌干达寨卡丛林的恒河猴中发现,2007 年在西太平洋密克罗尼西亚联邦的雅浦岛首次暴发流行,一直未得到广泛的关注。随着 2015 年巴西暴发大规模的婴儿小头畸形病例,ZIKV 感染的潜在危害才引起全球重视。ZIKV 对普通人群威胁不大,感染者可出现轻微发热或皮疹,部分感染者可能还会出现结膜炎、肌肉和关节痛以及疲劳感。孕妇感染后会干扰胎儿神经发育系统,可能导致胎儿流产、新生儿小头畸形,甚至死亡。同时,ZIKV 还是格林-巴利综合征(guillainbarre syndrome, GBS)的一个触发因素^[1-2]。ZIKV 通过受感染的伊蚊属蚊虫叮咬传播,主要涉及热带地区的埃及伊蚊、白纹伊蚊等,此外还可通过性传播、母婴传播等。蚊子生存和繁殖环境扩大,同时受城市化与全球化影响,使 ZIKV 具有成为主要都市流行病的风险。研究^[3-4]报道,ZIKV 和登革病毒均主要由伊蚊传播,因此其可能沿登革病毒地理分布进行扩散。我国过去 25 年每年均有登革热病例报道,ZIKV 也可能在我国流行,一旦流行将严重危害人口健康和社会经济发展。ZIKV 感染传播迅速,但是目前的预防战略仅限于蚊虫控制,加强献血筛查血液供应保护措施等,因此,加快安全有效的疫苗研制至关重要^[5]。近期已有美国研究者构建了表达 ZIKV 包膜蛋白(prM-Env)的 DNA 疫苗,并在小鼠模型检测到其具有很强的特异性体液免疫保护作用^[6]。在预防性疫苗研究方面,已有病毒灭活疫苗、减毒活疫苗、DNA 疫苗、病毒载体疫苗处于临床前或临床试验早期^[7-9],但目前尚无疫苗投放市场^[10]。重组腺病毒(recombinant adenovirus, rAd)作为目前最高效、可靠的重组病毒表达系统之一,已被广泛用于基因治疗和疫苗载体的各个领域。本研究利用成熟的商业化腺病毒 AdMax™包装系统,将编码 ZIKV 包膜蛋白 prM-E 基因重组到 E1 缺失的复制缺陷型 5 型腺病毒(rAd5)载体上,诱导小鼠产

生针对 ZIKV 的特异性细胞和体液免疫反应,为 ZIKV 候选疫苗的研制提供可靠的免疫原。

1 材料与方法

1.1 主要材料与试剂 ZIKV 毒株 Z16006(GenBank:KU955589.1)病毒总 RNA 由南方医科大学公共卫生与热带医学学院三级生物安全实验室赵卫教授提供。PrimeScript II High Fidelity RT-PCR Kit (Code No. R023A) (TaKaRa Biotechnology Ltd),引物由北京六合华大基因科技有限公司合成,DNA 测序由上海英潍捷基贸易有限公司完成。pDC315 和 pBHGlox(delta)E1,3Cre(哈尔滨兽医研究所马传染病与慢病毒病创新团队惠赠),Mouse IFN- γ ELISpot plus kit(Mabtech),Concanavalin A (Sigma,上海),ZIKV Env protein(Fitzgerald, cat. no. 30-1932),寨卡 E-56 抗体(贝若凡生物科技有限公司, BF-1176-56),PE-Cy7 小鼠荧光二抗(BD pharmingen),辣根过氧化物酶 HRP 标记的山羊抗鼠 IgG(北京博尔西生物科技有限公司)。

1.2 prM-E 基因片段的分离与穿梭质粒载体的构建 根据文献^[11]报道的日本乙型脑炎病毒(JEV)信号肽氨基酸序列进行核苷酸编码,确定其碱基序列为 5'-ATGGGCAAGAGGTCCGCTG-GATCCATTATGTGGTTAGCATCCTTAGCTG-TCGTGATTGCATGTGCAGGCGCA-3'。设计两对引物 F1、R1 和 F2、R2,其中 F2 序列过长分为 F2-1 和 F2-2 进行合成(表 1)。RT-PCR 获得 prM-E 片段连接克隆载体 pLB/prM-E 与穿梭质粒 pDC315,同时用 EcoRI 和 BamHI 双酶切,酶切得到片段 prM-E 和载体 pDC315 连接产物转化 DH5 α ,获得重组穿梭质粒 pDC315/prM-E,并测序鉴定,以间接免疫荧光法和 Western blot 方法检测表达情况。

表 1 prM-E 扩增引物

Table 1 Amplification primers for prM-E

引物名称	引物序列(5'-3')
F1	TGCCATGCTGAGAATAATCAATG
R1	CTGTCCCTCCAGGCTTCAA
F2-1	CGGAATTCGCCGCCATGGGCAAGAGG-TCCGCTGGATCCATTATGATGTGGTTAG-CATCCTTAGCTGTCGTGA
F2-2	AGCATCCTTAGCTGTCGTGATTGCATGTG-CAGGCGCACGTGGGAGTGCATACTATATGT
R2	CGGGATCCTTAAGCAGAGACGGCTGTGGAT

1.3 重组腺病毒的包装、扩增及纯化 6 孔板内 293A 细胞融合度达 80% 时,在 190 μ L Opti-MEM 中加入 1 μ g 穿梭载体 pDC315-prM-E 和 1 μ g 腺病毒骨架质粒 Ad5 bone 以及 6 μ L X-Treme,细胞内进行质粒同源重组。包装好的重组腺病毒 rAd5/prM-E 进行蚀斑筛选获得单一稳定的病毒株。空斑纯化后的病毒株感染 293A 细胞进行大量扩增,扩增所得病毒液用 1.4 g/mL 和 1.2 g/mL 的氯化铯以密度梯度离心法进行浓缩。

1.4 蛋白表达鉴定 分别以 pDC315 空载体质粒和重组穿梭质粒 pDC315-prM-E 转染 293A 细胞,72 h 后采用间接免疫荧光法检测表达产物中的 ZIKV E 蛋白;以寨卡 E-56 抗体孵育细胞,PE-Cy7 小鼠荧光二抗染色后,荧光显微镜下观察是否有目的 E 蛋白表达。分别以包装、纯化及浓缩后重组病毒 rAd5/prM-E 感染 293A 细胞,72 h 后收感染细胞表达产物(同时收集未感染的 293A 细胞裂解产物作为阴性对照),采用 Western blot 方法检测产物中是否有目的 E 蛋白表达;以寨卡 E-56 抗体反应(GAPDH 作为内参),HRP 标记的山羊抗鼠 IgG 孵育后,加底物显色,观察结果。

1.5 小鼠免疫接种 5 周龄,体重 18~20 g 的健康雌性 C57BL/6 小鼠 20 只,根据接种试剂不同分为 3 个组,其中实验组分为 3 个接种滴度,每个滴度 5 只小鼠,安慰剂组 2 只小鼠,阴性对照组 3 只小鼠。每只小鼠后肢大腿根部肌肉内注射 100 μ L 溶剂,病毒接种剂量及接种方案见表 2。第 0 周初次免疫,第 3 周加强免疫,所有小鼠在第 5 周处理取材,取眼球血获得血清,取脾分离脾淋巴细胞。固相酶联免疫斑点技术(ELISpot)检测特异性 T 细胞反应,酶联免疫吸附试验(ELISA)检测免疫后小鼠血清抗体滴度。

表 2 小鼠免疫接种方案

Table 2 Mice vaccination regimens

组别	接种疫苗	病毒剂量(PFU)	小鼠只数
试验组	rAd5/prM-E	10 ⁷	5
	rAd5/prM-E	10 ⁸	5
	rAd5/prM-E	10 ⁹	5
安慰剂组	PBS	0	2
阴性对照组	rAd5/EGFP	10 ⁹	3

1.6 IFN- γ ELISpot 实验 小鼠取脾分离淋巴细胞,IFN- γ ELISpot 板每孔加入 5×10^5 个脾淋巴细胞,ELISpot 方法检测特异性 T 细胞反应;ZIKV Env 蛋白以终浓度 10 μ g/mL 刺激细胞[分别以 1640 完全培养基和刀豆素(ConA)刺激作为阴性和阳性对照],加入刺激物后 ELISpot 板于 37 $^{\circ}$ C,5% CO₂ 恒温培养箱中静置培养 36 h。培养结束后按照 Mouse IFN- γ ELISpot plus kit(Mabtech)试剂盒说明书完成后续检测。ELISpot 反应阳性判定标准:阳性刺激孔中有 IFN- γ 分泌,ZIKV Env 蛋白刺激孔中每 10⁶ 脾淋巴细胞特异性斑点形成细胞数(SFCs)大于 40,且大于三倍的阴性刺激孔斑点值。

1.7 血清 ELISA 实验 小鼠眼球取血,分离血清。ELISA 实验所需的重组寨卡病毒包膜糖蛋白(ZIKV rE)按照本实验室之前建立的方法在果蝇 S2 细胞中稳定表达获得^[12]。ELISA 板以 7 μ g/mL ZIKV rE 蛋白在 0.05 mol/L,pH=9.6 碳酸盐溶液中于 4 $^{\circ}$ C 冰箱包被过夜,以间接 ELISA 标准操作步骤完成后续检测。以 PBS 对照组的小鼠血清相应稀释度为基准,血清抗体滴度定义为 OD 值大于 2 倍基准值(S/CO>2)的最高稀释度的倒数,最终结果以血清抗体滴度的 Log₁₀ 值表示。

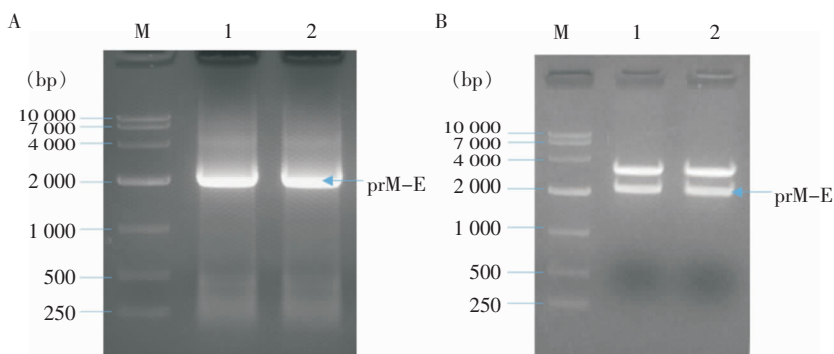
1.8 数据分析 应用 OriginPro 2017 软件作图,应用 SPSS 16.0 软件对实验数据进行单因素方差分析(One-way ANOVA),结果以均数 \pm 标准差($\bar{x} \pm s$)表示, $P \leq 0.05$ 为差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 目的基因的扩增及鉴定 RT-PCR 扩增产物经 1% 琼脂糖凝胶电泳,可见 prM-E 片段特异性目的条带,与预期 2 001 bp 相符(图 1A)。连接克隆载体的 pLB/prM-E 质粒经 EcoRI 和 BamHI 双酶

切,产物经琼脂糖凝胶电泳,在约 2 974 bp 处显示载体条带,在约 2 001 bp 可见特异性 prM-E 目的条带,

与预期相符(图 1B),成功获得正确的目的基因片段 prM-E。



M: 10 000 bp DNA Marker; A: RT-PCR 扩增产物电泳鉴定, 1、2 为 prM-E RT-PCR 扩增产物; B: 克隆载体 pLB/prM-E 双酶切鉴定, 1、2 为 pLB/prM-E 双酶切产物

图 1 prM-E PCR 扩增产物及鉴定电泳图谱

Figure 1 Electrophoresis map of PCR amplification and identification of prM-E

2.2 重组穿梭质粒的构建及鉴定 RT-PCR 扩增得到的 prM-E 基因前加入 JEV 信号肽和 Kozak 序列,获得的片段插入到穿梭载体 pDC315 中,构建重组穿梭质粒 pDC315-prM-E 示意图见图 2。穿梭质粒经 EcoRI 和 BamHI 双酶切后,产物经 1% 琼脂糖

凝胶电泳,可见两条清晰的条带,在约 3 913 bp 处显示载体条带,在约 2 000 bp 可见特异性 prM-E 目的条带(图 3)。选取图 3 中泳道 2 对应的质粒样品进行测序鉴定,结果正确,重组质粒构建成功。

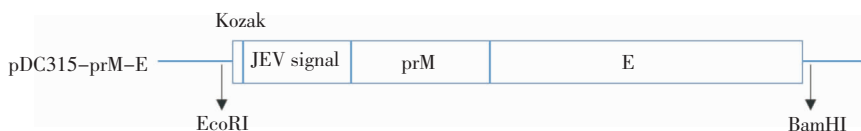
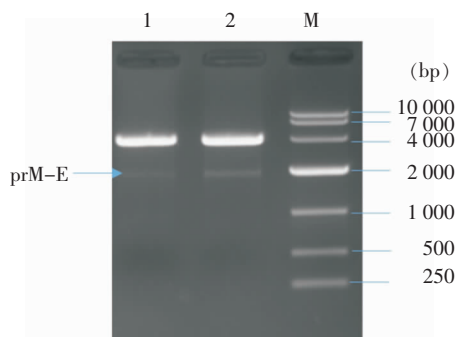


图 2 重组穿梭质粒 pDC315-prM-E 的结构示意图

Figure 2 Schematic diagram of recombinant shuttle-plasmid pDC315-prM-E



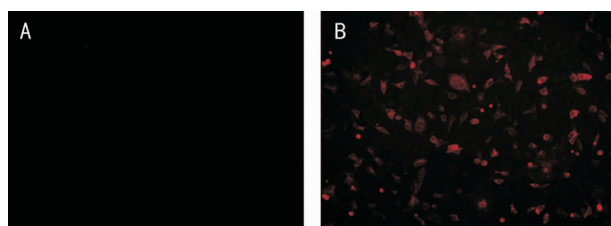
M: 10 000 bp DNA Marker; 1、2 为 pDC315-prM-E 双酶切产物

图 3 穿梭质粒 pDC315-prM-E 双酶切产物电泳图

Figure 3 Electrophoresis map of double-digestion product of shuttle-plasmid pDC315-prM-E

2.3 蛋白表达鉴定 间接免疫荧光法检测结果于荧光显微镜下观察,用绿色光源激发抗体孵育后的重组穿梭质粒 pDC315-prM-E 转染 293A,可见特异

性红色荧光,而 pDC315 空载体质粒转染 293A 的阴性对照组未见荧光。见图 4。



A: pDC315 空载体质粒转染 293A 细胞; B: pDC315/prM-E 转染 293A 细胞

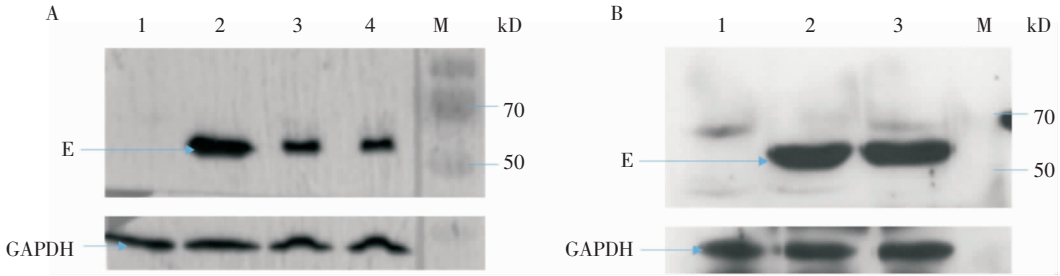
图 4 ZIKV E 蛋白表达免疫荧光鉴定结果

Figure 4 Expression of ZIKV E protein identified by immunofluorescence

Western blot 方法鉴定结果可见,分别以包装、纯化及浓缩后重组病毒 rAd5/prM-E 感染 293A 细

胞,表达产物均可见 56 kDa 的特异性 ZIKV E 蛋白目的条带,而 293A 裂解产物阴性对照未见特异性

条带。见图 5。ZIKV E 蛋白能够在重组病毒载体中正确、稳定表达。



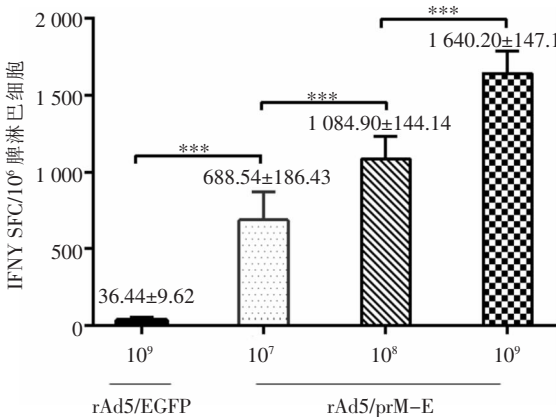
A:包装及纯化后病毒表达鉴定,1 为 293A 细胞,2 为 pDC315-prM-E 单质粒转染 293A 细胞,3 为包装出的病毒 rAd5/prM-E 感染 293A 细胞,4 为空斑纯化后病毒株感染 293A 细胞;B:浓缩后病毒表达鉴定,1 为 293A 细胞,2 和 3 为浓缩后病毒 rAd5/prM-E 感染 293A 细胞;M 为 10~140 kD 蛋白 Marker

图 5 ZIKV E 蛋白表达 Western blot 鉴定结果

Figure 5 Expression of ZIKV E protein identified by Western blot

2.4 IFN-γ ELISpot 检测特异性 T 细胞反应 采用 ELISpot 检测经 ZIKV Env 蛋白刺激的小鼠脾淋巴细胞分泌的特异性 IFN-γ SFCs,将每 10⁶ 脾淋巴细胞中 SFCs 记为最终数值。不同剂量 rAd5/prM-E 免疫组结果分别为(688.54 ± 186.43)、(1 084.90 ± 144.14)和(1 640.20 ± 147.13)SFCs/10⁶ 脾淋巴细胞,与病毒剂量呈正比关系,且均高于接种 10⁹ PFU 的 rAd5/EGFP 的对照组,差异具有统计学意义(P<0.001)。重组病毒载体能够诱导小鼠产生强而有效的 ZIKV 特异性细胞免疫反应。见图 6。

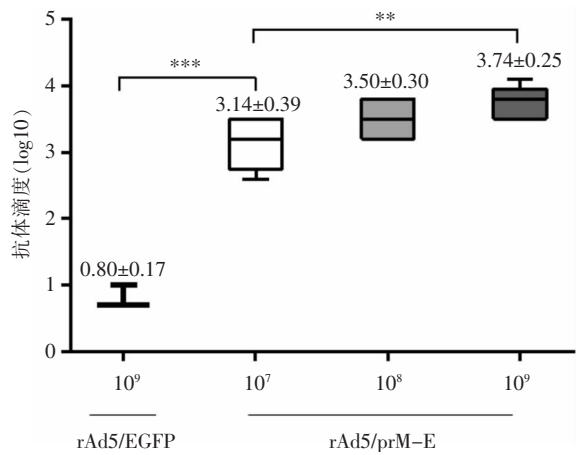
2.5 ELISA 检测免疫后小鼠血清抗体滴度 不同剂量病毒免疫后小鼠的血清抗体滴度(以 log₁₀ 值表示)分别为(3.14 ± 0.39)、(3.50 ± 0.30)和(3.74 ± 0.25)。随着病毒剂量的增高,小鼠血清抗体滴度具有增高趋势,且试验组小鼠血清抗体滴度均高于接种 10⁹ PFU 的 rAd5/EGFP 对照组的小鼠,差异具有统计学意义(P<0.001)。重组病毒载体能够有效诱导小鼠产生针对 ZIKV E 蛋白的特异性体液免疫。见图 7。



***: P<0.001

图 6 免疫后小鼠细胞免疫反应检测结果

Figure 6 Detection result of cellular immune response in immunized mice



** : P<0.01, *** : P<0.001

图 7 免疫后小鼠体液免疫反应检测结果

Figure 7 Detection result of humoral immune response in immunized mice

3 讨论

ZIKV 对孕妇、旅行者以及公众的感染风险持续存在,其感染引发的新生儿小头症和先天畸形给患者及其家庭、社会带来沉重负担^[4]。世界卫生组织于 2016 年 2 月 1 日宣布 ZIKV 成为全球紧急公共卫生事件。ZIKV 疫苗有助于预防和控制 ZIKV 暴发流行。本研究成功获得一株高表达 ZIKV 包膜蛋白 prM-E 的腺病毒载体 rAd5/prM-E,能够诱导小鼠产生强而有效的 ZIKV 特异性细胞和体液免疫反应,为 ZIKV 候选疫苗的研制积累了实验基础数据,提供了可靠的免疫原。

ZIKV 是黄病毒科黄病毒属的单股正链 RNA 病毒,分为亚洲型和非洲型两个基因型,已有研究^[13-14]表明,ZIKV 的两种基因型相似性高达 95%,仅代表一种血清型,感染或者接种一个 ZIKV 毒株可以引发针对所有 ZIKV 毒株的广泛中和抗体,因此一种疫苗抗原将对所有的 ZIKV 毒株产生保护。ZIKV 包膜糖蛋白 E 与细胞受体相互作用介导病毒融合并进入靶细胞,是中和抗体的主要靶点,基于 ZIKV prM-E 蛋白的 DNA 疫苗在小鼠体内具有很强的特异性免疫保护作用^[6, 15]。由于 prM-E 蛋白的单独表达需要在 prM 蛋白前加一段信号肽序列,故根据已有文献报道选择了来源于日本乙型脑炎病毒 C 末端的信号肽序列^[16-17],同时在目的基因前加入 Kozak 序列用来增强真核表达。

rAd 作为目前最高效可靠的重组病毒表达系统之一,已被广泛用于基因治疗和疫苗载体的各个领域。其中重组人血清 5 型腺病毒(rAd5)是诱导产生针对外源基因的特异性 T 细胞和 B 细胞免疫反应最强的腺病毒,是一个对目的蛋白在动物模型上进行免疫原性评价以及进行临床前评价阶段的理想载体。本研究利用成熟的商业化腺病毒 Ad-MaxTM 系统构建包装与表达 ZIKV prM-E 蛋白,获得高纯度、高滴度(2.18×10^{12} PFU/mL)的病毒载体疫苗。小鼠接种重组病毒载体疫苗后未见不良反应,体重和进食正常。为研究病毒载体疫苗接种剂量对免疫效果的影响,对不同免疫试验组进行比较,发现 rAd5/prM-E 免疫组小鼠抗原特异性 IFN- γ 分泌量与病毒接种剂量(10^7 、 10^8 、 10^9 PFU)呈正相关,血清抗体滴度随着病毒剂量的增加具有一定增高的趋势,且均高于对照组小鼠。综合以上结果,说明重组腺病毒载体疫苗 rAd5/prM-E 能够强烈有效

地诱导小鼠产生针对 ZIKV 的特异性细胞和体液免疫反应。但是,临床试验表明,人体针对 rAd5 本身存在的十分普遍的预存免疫,会显著降低病毒载体在人体内的转导效率和转基因表达水平^[18-19],针对此状况,最直接的方法是用其他种属外壳的人血清型腺病毒载体或直接应用非人类血清型的腺病毒载体,解决人群中预存 Ad5 中和抗体的问题^[20-21]。故本课题组同时在构建基于黑猩猩腺病毒 Sad23、Sad25 和人类稀有型腺病毒 Ad35 和 Ad49 的新型腺病毒疫苗载体,结合本研究成果 ZIKV-prM-E 蛋白抗原基因,以期成功构建可用于临床的具有自主知识产权的 ZIKV 新型腺病毒载体疫苗。

[参考文献]

- [1] Hajra A, Bandyopadhyay D, Hajra S. Zika virus: A global threat to humanity: A comprehensive review and current developments[J]. N Am J Med Sci, 2016, 8(3): 123-128.
- [2] Plourde AR, Bloch EM. A literature review of Zika virus[J]. Emerg Infect Dis, 2016, 22(7): 1185-1192.
- [3] Fajardo Á, Cristina J, Moreno P. Emergence and spreading potential of Zika virus[J]. Front Microbiol, 2016, 7: 1667.
- [4] Leonhard SE, Lant S, Jacobs BC, et al. Zika virus infection in the returning traveller: what every neurologist should know [J]. Pract Neurol, 2018, 18(4): 271-277.
- [5] Marston HD, Lurie N, Borio LL, et al. Considerations for developing a Zika virus vaccine[J]. N Engl J Med, 2016, 375(13): 1209-1212.
- [6] Larocca RA, Abbink P, Peron JP, et al. Vaccine protection against Zika virus from Brazil[J]. Nature, 2016, 536(7617): 474-478.
- [7] Kim E, Erdos G, Huang S, et al. Preventative vaccines for Zika virus outbreak: preliminary evaluation[J]. EBioMedicine, 2016, 13: 315-320.
- [8] Pierson TC, Graham BS. Zika virus: immunity and vaccine development[J]. Cell, 2016, 167(3): 625-631.
- [9] McArthur MA. Zika virus: Recent advances towards the development of vaccines and therapeutics[J]. Viruses, 2017, 9(6): 143.
- [10] [No authors listed]. WHO and experts prioritize vaccines, diagnostics and innovative vector control tools for Zika R&D [J]. Saudi Med J, 2016, 37(4): 471-472.
- [11] Davis BS, Chang GJ, Cropp B, et al. West Nile virus recombinant DNA vaccine protects mouse and horse from virus challenge and expresses in vitro a noninfectious recombinant antigen that can be used in enzyme-linked immunosorbent assays [J]. J Virol, 2001, 75(9): 4040-4047.
- [12] 边奕鑫,何作萍,杜鹏,等. HCV 结构蛋白 E2 在果蝇 S2 细胞中的稳定表达[J]. 中国输血杂志,2013,26(10):972-975.

- [13] Dowd KA, Demaso CR, Pelc RS, et al. Broadly neutralizing activity of Zika virus-immune sera identifies a single viral serotype[J]. Cell Rep, 2016, 16(6): 1485 - 1491.
- [14] 林垚,文送娇,洪珊,等. 寨卡病毒亚洲型与非洲型基因同源性及其重组分析[J]. 中国生物制品学杂志,2018,31(12):1317 - 1321.
- [15] Qadir A, Riaz M, Saeed M, et al. Potential targets for therapeutic intervention and structure based vaccine design against Zika virus[J]. Eur J Med Chem, 2018, 156: 444 - 460.
- [16] Chang GJ, Hunt AR, Davis B. A single intramuscular injection of recombinant plasmid DNA induces protective immunity and prevents Japanese encephalitis in mice[J]. J Virol, 2000, 74(9): 4244 - 4252.
- [17] 卢昌,李娜,薛璞,等. 寨卡病毒包膜 prM-E 蛋白的结构和功能分析[J]. 中国人兽共患病学报,2017,31(1):81 - 84.
- [18] 柳云帆,吴小兵,阮力. 腺病毒载体在疫苗研究中的应用[J]. 生物技术通讯,2011,22(4):552 - 558.
- [19] Bradley RR, Lynch DM, Iampietro MJ, et al. Adenovirus serotype 5 neutralizing antibodies target both hexon and fiber following vaccination and natural infection[J]. J Virol, 2012,

86(1): 625 - 629.

- [20] 于彬,孔维,于湘晖,等. 逃避预存免疫的重组腺病毒及其构建方法和用途[P]. 2015 - 03 - 18.
- [21] Xu K, Song Y, Dai L, et al. Recombinant chimpanzee adenovirus vaccine AdC7-M/E protects against Zika virus infection and testis damage[J]. J Virol, 2018, 92(6), pii: e01722 - 17.

(本文编辑:左双燕)

本文引用格式:马晓瑞,罗升学,王一琳,等. 寨卡病毒包膜蛋白重组人腺病毒 5 型载体的构建与免疫原性测定[J]. 中国感染控制杂志,2019,18(6):474 - 480. DOI:10.12138/j.issn.1671-9638.20195328.

Cite this article as: MA Xiao-rui, LUO Sheng-xue, WANG Yi-lin, et al. Construction and immunogenicity detection of recombinant human adenovirus type 5 vector containing ZIKV envelope protein [J]. Chin J Infect Control, 2019, 18(6): 474 - 480. DOI: 10.12138/j.issn.1671-9638.20195328.