



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 101333246 B

(45) 授权公告日 2011.04.13

(21) 申请号 200810126289.6

(22) 申请日 2008.07.30

(73) 专利权人 中国农业科学院哈尔滨兽医研究所

地址 150001 黑龙江省哈尔滨市南岗区马端街 427 号

(72) 发明人 华荣虹 步志高 童光志

(74) 专利代理机构 北京科龙寰宇知识产权代理有限公司 11139

代理人 孙皓晨 费碧华

(51) Int. Cl.

C07K 7/06 (2006.01)

C12N 15/40 (2006.01)

A61K 39/12 (2006.01)

G01N 33/569 (2006.01)

G01N 33/53 (2006.01)

A61P 31/14 (2006.01)

(56) 对比文件

CN 1618464 A, 2005.05.25, 全文.

CN 101002936 A, 2007.07.25, 全文.

闫丽萍等. 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. 《生物化学与生物物理进展》. 2008, 第 35 卷 (第 3 期), 全文.

审查员 王航

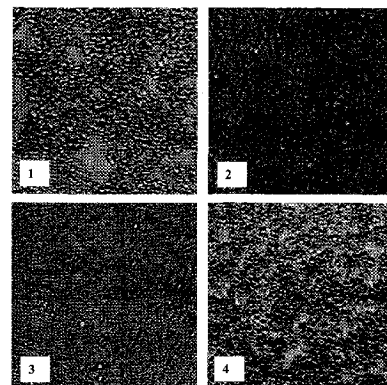
权利要求书 1 页 说明书 9 页 附图 2 页

(54) 发明名称

乙型脑炎病毒 E 蛋白中和性 B 细胞抗原表位多肽及其应用

(57) 摘要

本发明公开了乙型脑炎病毒 E 蛋白中和性 B 细胞抗原表位多肽, 还公开了该抗原表位多肽在防治和诊断乙型脑炎病毒中的用途, 属于分子免疫学领域。本发明所述的抗原表位多肽的氨基酸序列为 SEQ ID NO: 1 或 SEQ ID NO: 2 所示。本发明 JEVE 蛋白中和性 B 细胞抗原表位多肽作为免疫原或疫苗免疫动物机体后能够产生针对乙型脑炎病毒的中和性抗体, 并能够在体内或体外中和乙型脑炎病毒, 阻止病毒感染动物机体。将本发明抗原表位多肽与载体连接或自身连接或相互连接, 能够免疫动物, 在免疫动物后产生的抗多肽抗体或抗乙型脑炎病毒抗体能够在体内外中和乙型脑炎病毒并产生免疫保护。



1. 一种乙型肝炎病毒 E 蛋白中和性 B 细胞抗原表位多肽，其特征在于，其氨基酸序列为 SEQ ID NO：1 所示。
2. 一种乙型肝炎病毒 E 蛋白中和性 B 细胞抗原表位多肽，其特征在于，其氨基酸序列为 SEQ ID NO：2 所示。
3. 编码权利要求 1 或 2 所述乙型肝炎病毒 E 蛋白中和性 B 细胞抗原表位多肽的核苷酸序列。
4. 一种预防或治疗乙型肝炎病毒的疫苗组合物，其特征在于：含有治疗上有效量的权利要求 2 所述的乙型肝炎病毒 E 蛋白中和性 B 细胞抗原表位多肽。
5. 权利要求 2 所述的乙型肝炎病毒 E 蛋白中和性 B 细胞抗原表位多肽在制备预防或治疗乙型肝炎病毒药物中的用途。
6. 权利要求 2 所述的乙型肝炎病毒 E 蛋白中和性 B 细胞抗原表位多肽在制备诊断或检测乙型肝炎病毒试剂中的用途。

乙型脑炎病毒 E 蛋白中和性 B 细胞抗原表位多肽及其应用

技术领域

[0001] 本发明涉及抗原表位多肽，尤其涉及乙型脑炎病毒 JEV E 蛋白中和性 B 细胞抗原表位多肽，本发明还涉及该抗原表位多肽在防治和诊断乙型脑炎病毒中的应用，属于分子免疫学领域。

背景技术

[0002] 流行性乙型脑炎是由乙型脑炎病毒 (Japanese Encephalitis virus, JEV) 引起的一种重要蚊媒性人兽共患传染病。该病毒首先于 1953 年在日本从患者脑组织中分离获得，因此称日本脑炎病毒，所致疾病在日本称日本乙型脑炎。在我国最早于 1940 年分离此病毒，为了与甲型脑炎相区别，定名为流行性乙型脑炎，简称乙脑。在世界范围内每年有 30,000-50,000 例乙脑病例，约 25% -30% 死亡，50% 导致永久性中枢神经系统后遗症。我国近年每年的乙脑病例大于 5000 例，死亡 200 例以上。对于流行性乙型脑炎病毒多种动物易感，但除人、马和猪外通常不呈现临床症状。对人主要引起中枢神经系统的急性感染，人感染临床上以高热、意识障碍、抽搐、呼吸衰竭及脑膜刺激征为特征。母猪感染可引起流产、产死胎或木乃伊胎，公猪感染导致睾丸肿大影响繁殖性能为特征，少数猪只感染可能呈现发热和神经症状，而其他猪则大多数不呈显症状。给养猪业造成巨大的经济损失。马属动物易感染，少数引起脑炎与神经症状，马是终末宿主。蚊是 JEV 的主要传播媒介，猪是该病毒在自然界中最重要的贮存与增殖宿主。乙型脑炎病毒主要在亚洲流行，而最近发现在南半球也有报道，这说明流行性乙型脑炎可能在世界范围内威胁着人类健康。

[0003] 乙型脑炎病毒 JEV 属黄病毒科，黄病毒属，为单链正链 RNA 病毒。基因组约 11kb，包含一个大的开放阅读框架 (ORF)，两端是 5' 端和 3' 端非编码区 (UTR)。基因组 5' 端有帽子结构，但在 3' 端没有 poly(A) 尾。ORF 编码含 3432 个氨基酸的前体蛋白，在病毒和宿主细胞蛋白酶的作用下加工为 10 个成熟蛋白，包含 3 个结构蛋白 (C, prM, E)，7 个非结构蛋白 (NS1, NS2A, NS2B, NS3, NS4A, NS4B, NS5)。病毒粒子呈球形，直径约 30nm，有囊膜。JEV 只有一个血清型，在抗原性上与西罗病毒、墨罗河谷脑炎病毒、圣路易脑炎病毒等属同一血清群，存在抗原交叉反应。病毒囊膜糖蛋白具有血凝特性，能凝集鹅、鸽、雏鸡等动物红细胞。病毒对热抵抗力弱，56℃ 30 分钟或 100℃ 2 分钟即可灭活，但对低温和干燥的抵抗力很强。乙醚、1 : 1000 的去氧胆酸钠以及常用消毒剂均可灭活病毒，在酸性条件下不稳定，适宜 pH8.5 ~ 9.0。

[0004] 采用疫苗进行预防接种是控制该病流行的有效措施。对乙型脑炎病毒抗原表位的研究是开发有效基因工程疫苗以及研究基于抗原表位的诊断检测试剂的理论基础。E 蛋白是乙脑病毒粒子表面的一种重要的结构蛋白，是重要的免疫保护性抗原。在保护性抗原中具有中和作用的 B 细胞抗原表位在刺激机体产生中和性抗体中起重要作用。正确而详细地鉴定抗原表位对疾病的诊断、设计无毒副作用的人工疫苗以及免疫治疗剂等有重要的意义。

发明内容

[0005] 本发明的目的之一提供乙型脑炎病毒 JEV E 蛋白中和性 B 细胞抗原表位多肽。

[0006] 本发明的目的之二是将所述的乙型脑炎病毒 JEV E 蛋白中和性 B 细胞抗原表位多肽应用于治疗或预防乙型脑炎病毒，或者将其用于制备成诊断或检测乙型脑炎病毒的试剂。

[0007] 本发明的上述目的是通过以下技术方案来实现的：

[0008] 一种乙型脑炎病毒 JEV E 蛋白中和性 B 细胞抗原表位多肽，其氨基酸序列为 SEQ ID NO：1 所示 (77H-Thr-Gly-Glu-Ala-His-Asn-Glu-Lys-OH84)。

[0009] 通过试验进一步发现，将 SEQ ID NO：1 所示的氨基酸序列中第一位氨基酸残基 Thr 替换为 Met 后，所得到的氨基酸序列 (77H-Met-Gly-Glu-Ala-His-Asn-Glu-Lys-OH84) 与 SEQ ID NO：1 具有同样的活性。

[0010] 其中，可以对所述的乙型脑炎病毒 JEV E 蛋白中和性 B 细胞抗原表位的 N 端或 C 端进行化学修饰。所述的化学修饰为多肽链 N 端的自然氨基化或乙酰化，或 C 端的自然羧基化或酰胺化。

[0011] 本发明中所述的乙型脑炎病毒 JEV E 蛋白中和性 B 细胞抗原表位多肽可以通过固相多肽合成方法合成得到，也可以通过基因工程技术制备得到，这些都为本领域人员所通晓。

[0012] 本发明乙型脑炎病毒 JEV E 蛋白中和性 B 细胞抗原表位或其连接物可用于制备免疫原，或将其免疫动物以产生免疫保护。也可将所述的乙型脑炎病毒 JEV E 蛋白中和性 B 细胞抗原表位或其连接物制备成检测抗乙型脑炎病毒 JEV 抗体或抗乙型脑炎病毒 JEV 多肽抗体的试剂。

[0013] 将本发明所述的表位多肽制备成免疫原或疫苗，至少包括所述的一个或全部抗原表位，这些多肽通过自身连接、相互连接或与载体连接，并辅以 T 细胞抗原表位，包括 Th1 和 / 或 Th2 表位多肽。这些 T 细胞抗原表位可以来源于 JEV 病毒蛋白或其它动物蛋白中具有刺激机体细胞免疫活性的多肽序列。

[0014] 检测乙型脑炎病毒 JEV 可以针对 E 蛋白抗原表位的单克隆抗体或针对抗原表位多肽的多克隆抗体，检测方法可以包括间接 ELISA、双抗体夹心 ELISA、直接免疫荧光技术、间接免疫荧光技术，快速检测试纸条免疫膜层析技术等。

[0015] 检测乙型脑炎病毒 JEV 抗体，包括野毒感染产生抗体，疫苗免疫产生抗体，母源抗体，抗 JEV 单克隆抗体等。检测方法可以包括间接 ELISA、双抗体夹心 ELISA，快速检测试纸条免疫膜层析技术等。

[0016] 蛋白质抗原 B 细胞抗原表位鉴定的方法有多种，如基因工程定点突变表达抗原蛋白分析法、噬菌体随机肽库筛选技术、合成多肽检测技术等。本项发明在鉴定抗原表位中主要采用的是基因工程技术多肽融合重叠 (overlapping) 表达 JEV E 蛋白，体外免疫反应检测多肽融合蛋白组与 JEV 抗血清的结合性鉴定抗原表位序列，进一步缩短与突变表达表位融合蛋白，鉴定抗原表位的序列结构；再应用合成多肽技术验证表位的正确性；用表位融合蛋白抗原免疫动物制备表位特异性单因子血清，分析抗原表位功能。

[0017] 本发明的有益效果如下：

[0018] 1. 将本发明的乙型脑炎病毒 JEV E 蛋白中和性 B 细胞抗原表位多肽作为免疫原或疫苗免疫动物机体后能够产生针对 JEV 的中和抗体，并能够在体内或体外中和 JEV，阻止病毒感染动物机体。

[0019] 2. 本发明的乙型脑炎病毒 E 蛋白中和性 B 细胞抗原表位多肽与载体连接或自身连接或相互连接，能够免疫动物，在免疫动物后产生的抗多肽抗体或抗乙型脑炎病毒抗体能够在体内外中和乙型脑炎病毒 JEV 并产生免疫保护。

[0020] 3. 本发明的乙型脑炎病毒 E 蛋白中和性 B 细胞抗原表位或其连接物在免疫动物是产生抗多肽或抗 JEV 抗体能够检测 JEV 病毒或其多肽。

[0021] 4. 本发明的乙型脑炎病毒 E 蛋白中和性 B 细胞抗原表位或其连接物能够检测乙型脑炎病毒 JEV 抗体或抗乙型脑炎病毒 JEV 多肽抗体。

附图说明

[0022] 图 1 为乙型脑炎表位多肽序列与同一血清群其它黄病毒氨基酸序列的同源性比较。

[0023] 图 2 为表位多肽 SEQ NO : 1 和 SEQ NO : 2 以及其它突变多肽与 GST 融合表达物与 JEV E 蛋白单克隆抗体检测结果。图中从左至右依次为：M，蛋白质分子量标准；1，GST；2，GST-TGEAHNEK；3，GST-TGEAHNTK；4，GST-TGESHTNK；5，GST-MGEAHNEK；6，GST-MGEAHNDK；7，GST-TGEAHNPK。

[0024] 图 3 为本发明表位多肽抗体体外中和乙型脑炎病毒实验结果。1，未加血清对照；2，抗表位多肽抗体；3，JEV 疫苗免疫阳性血清；4，阴性血清作用结果。

具体实施方式

[0025] 以下通过实施例来进一步描述本发明，应该理解的是，这些实施例仅用于例证的目的，决不限本发明的范围。

[0026] 实施例 1 重叠 (over lapping) 多肽融合表达系列 JEV E 蛋白抗原多肽片段并进行间接 ELISA 筛选

[0027] 根据 JEV E 蛋白氨基酸序列，设计一系列多肽，这些多肽相互重叠，且覆盖 JEV E 蛋白全长。根据每一条多肽氨基酸序列，设计合成一对 DNA 链，将 DNA 链插入表达载体与 GST 进行融合表达。融合表达的系列重组蛋白与 JEV 中和性单克隆抗体进行应用性分析，分析 JEV E 蛋白中和性抗原表位。具体流程如下：

[0028] 设计多肽序列→合成编码多肽序列的 DNA 链→多肽融合表达载体构建→诱导表达→表达融合蛋白亲和层析纯化→表达产物与中和性单克隆抗体免疫反应性检测→分析 JEV E 蛋白中和性抗原表位。

[0029] 试验结果见表 1、表 2 和表 3。

[0030] 表 1 重叠多肽融合蛋白与 JEV 中和性单克隆抗体 E1 ELISA 反应检测结果

[0031]

多肽位置 (AA)	多肽序列	OD450
1 ~ 16	FNCLGMGNRDFIEGAS	0.063

9 ~ 24	RDFIEGASGATWVDLV	0.061
17 ~ 32	GATWVDLVLEGDSCLT	0.059
25 ~ 40	LEGDSCLTIMANDKPT	0.047
33 ~ 48	IMANDKPTLDVRMINI	0.058
41 ~ 56	LDVRMINIEASQLAEV	0.064
49 ~ 64	EASQLAEVRSYCYHAS	0.057

[0032]

57 ~ 72	RSYCYHASVTDISTVA	0.058
65 ~ 80	VTDISTVARCPTTGEA	0.055
73 ~ 88	RCPTTGEAHNEKRADS	1.035
81 ~ 96	HNEKRADSSYVCKQGF	0.055
89 ~ 104	SYVCKQGFTRGWGNG	0.061
97 ~ 112	TDRGWGNGCGFFGKGS	0.072
105 ~ 120	CGFFGKGSIDTCAKFS	0.063
113 ~ 128	IDTCAKFSCTSKAIGR	0.067
121 ~ 136	CTSKAIGRTIQPENIK	0.061
129 ~ 144	TIQPENIKYKVGIFVH	0.058
137 ~ 152	YKVGIFVHGTTTSENH	0.059
145 ~ 160	GTTTSENHGNYSAQVG	0.066
153 ~ 168	GNYSQV GASQA AKFT	0.063
161 ~ 176	ASQA AKFTVTPNAPSV	0.055
169 ~ 184	VTPNAPSV ALKLG DYG	0.058
177 ~ 192	ALKLG DYGEVTL DCEP	0.059
185 ~ 200	EVTL DCEPR SGLNTEA	0.062
193 ~ 208	RSGLNTEAFYVMTVGS	0.058
201 ~ 216	FYVMTVGS K SFLVHRE	0.066
209 ~ 224	KSFLVHREWFHDLALP	0.061
217 ~ 232	WFHDLALPWTSPSSTA	0.052

225 ~ 240	WTSPSSTAWRNRELLM	0.068
233 ~ 248	WRNRELLMEFEGAHAT	0.069
241 ~ 256	EFEGAHATKQSVVALG	0.059
249 ~ 264	KQSVVALGSQEGGLHH	0.061
257 ~ 272	SQEGGLHHALAGAIVV	0.053
265 ~ 280	ALAGAIVVEYSSSVML	0.057
273 ~ 288	EYSSSVMLTSGHLKCR	0.057
281 ~ 296	TSGHLKCRCLKMDKLAL	0.062

[0033] 注：包被抗原为多肽与 GST 融合表达蛋白，多肽序列分别如表中所示多肽序列。OD 值为三个重复孔平均 OD 值。

[0034] 表 2 截短的表位肽融合蛋白与 JEV 中和性单克隆抗体 E1 ELISA 反应结果

[0035]

多肽位置 (AA)	多肽序列	OD450
73 ~ 88	RCPTTG A HNEKRADS	1.052
73 ~ 80	RCPTTGEA	0.072
81 ~ 88	HNEKRADS	0.105
75 ~ 86	PTTGEAHNEKRA	1.021
77 ~ 84	TGEAHNEK	0.985

[0036] 注：包被抗原为多肽与 GST 融合表达蛋白，多肽序列分别如表中所示多肽序列。OD 值为三个重复孔平均 OD 值。

[0037] 表 3 突变的表位多肽融合蛋白与 JEV 中和性单克隆抗体 E1 ELISA 反应结果

[0038]

病毒*	多肽序列	OD450
JEV	TGEAHNEK	1.043
MVEV strain : MRM3929	TGEAHN <u>T</u> K	0.105
MVEV strain : MVE-1-51	TGES <u>H</u> N <u>T</u> K	0.124
WNV strain : 956	<u>M</u> GEAHNEK	1.141

WNV strain : NY99 KUN strain : MRM61C	<u>M</u> G <u>E</u> A <u>H</u> <u>N</u> <u>D</u> <u>K</u>	0.111
UV	T <u>G</u> E <u>A</u> H <u>N</u> <u>P</u> <u>K</u>	0.107

[0039] 注：包被抗原为多肽与 GST 融合表达蛋白，多肽序列分别如表中所示多肽序列。OD 值为三个重复孔平均 OD 值。*：JEV 为乙型脑炎病毒，MVEV 为墨罗河谷脑炎病毒 (Murray valley encephalitis virus)，WNV 为西尼罗病毒 (West Nile virus)，KUN 为昆禁病毒 (Kunjin virus)，UV 为尤苏它病毒 (Usutu virus)。

[0040] 实施例 2 乙型脑炎病毒 JEVE 蛋白中和性 B 细胞抗原表位的合成

[0041] 根据 E 蛋白中和性 B 细胞抗原表位的氨基酸序列，应用固相多肽合成技术，采用自动多肽合成仪或人工多肽合成方法。固相树脂采用 Fmoc 保护的氨基酸 Wang 树脂或其它树脂，树脂经 DMF 溶胀、piperidine 胶 Fmoc 保护后，根据氨基酸序列顺序，加入 Fmoc 保护的氨基酸，在 HBTU 存在情况下进行酰化反应。酰化反应完成后经过洗涤，再加入第二位的 Fmoc-氨基酸进行酰化反应，并洗涤。如此循环，从多肽序列 C 末端超起始向 N 末端，按照顺序合成完整的多肽链。合成完成后，根据组成肽链氨基酸不同选取适当试剂用 TFA 法裂解肽链与树脂的连接并用冷乙醚沉淀 TFA 多肽，经脱盐纯化、LC-MS 和 HPLC 分析鉴定后备用。在整个合成过程中，每个氨基酸酰化反应后可以应用 Kaiser 法或 TMBS 法测试反应的完成情况。为了便于使表位多肽和载体蛋白连接，在合成多肽时可以在多肽序列的 N 末端加一个半胱氨酸。

[0042] 根据以上所述的固相多肽合成技术，分别合成了 SEQ NO : 1 和 SEQ NO : 2 表位多肽。

[0043] 实施例 3 乙型脑炎病毒 JEV E 蛋白 B 细胞抗原表位的化学修饰

[0044] 按照实施例 2 的方法合成的多肽片段，其 N 末端为自然氨基修饰，C 末端为自然羧基修饰。

[0045] N 末端乙酰化修饰方法：按照以上介绍的多肽合成至最后一个 Fmoc 保护氨基酸偶联结束，并进行 N 末端 Fmoc 保护基团的去除，然后进行以下操作。取 150 μ l 乙酸酐和 20 μ l EIPEA 溶于 4.8ml DMF 中，充分混合并在冰浴中冷却。然后将以上混合液加入多肽合成反应管中反应 5min。再依次用 5ml DMF 和二氯甲烷 (DCM) 洗 2 次，每次 5min。氮气吹干后按照常规方法进行侧链保护基团的去除、裂解、纯化和鉴定。

[0046] C 末端酰胺化修饰方法：C 末端酰胺化的多肽合成时应选用树脂为 Rink 树脂。执行合成程序时应对树脂用 DMF 溶胀 20min，然后从 C 末端第一位氨基酸开始执行合成程序，同前过 Fmoc-wang 树脂合成方法。

[0047] 实施例 4 乙型脑炎 JEVE 蛋白 B 细胞抗原表位与载体蛋白 KLH 和 BSA 的偶联

[0048] 载体蛋白 KLH 或 BSA 4mg 溶于 0.5ml 含 5mM EDTA 的 PBS (pH7.2) 缓冲液中，加入 1.0mg 连接剂 Sulfo-SMCC，充分溶解后在室温孵育 60min 或 37 $^{\circ}$ C 孵育 30min。应用 SephadexG-25 柱或透析方法脱盐纯化 Sulfo-SMCC 处理的载体蛋白，并用 BCA 法测定蛋白含量后备用。

[0049] 称取实施例 2 所合成的表位多肽 4mg，加入 0.5ml 重蒸馏水溶解多肽，然后将

溶解后的多肽与 Sulfo-SMCC 处理的载体蛋白混合，4℃ 孵育 2 小时或反应过夜，分装备用。

[0050] 实施例 5 乙型脑炎病毒 JEVE 蛋白 B 细胞抗原表位氧化实现自身的连接

[0051] 含半胱氨酸的多肽可以通过巯基的氧化反应形成自身连接。一般情况下应用 DMSO 介导的氧化反应实现连接，根据多肽的酸碱性，氧化反应可以在微酸或微碱性条件下进行。

[0052] 微酸性环境下的氧化反应：用适当浓度的醋酸溶解多肽，使多肽的浓度在 0.5-1.5mM 范围内，醋酸的终浓度不超过 5%，用 $(\text{NH}_4)_2\text{CO}_3$ 调整多肽溶液的 pH 为 6.0 左右，加入 10-20% 的 DMSO，25℃ 反应 5-25h，氧化反应的进行程度可以通过 HPLC 监测。然后，用 1% TFA 水和乙腈为流动相，制备型反相 HPLC 纯化氧化性多肽。

[0053] 微碱性环境下的氧化反应：用 0.01M 磷酸盐缓冲液，pH7.5，溶解多肽至终浓度 1.0mM，加入浓度 DMSO 至终浓度 1%，25℃ 反应过夜，氧化反应的进行程度可以通过 HPLC 监测。然后用 1% TFA 水和乙腈为流动相，制备型反相 HPLC 纯化氧化性多肽。

[0054] 实施例 6 乙型脑炎病毒 JEV E 蛋白 B 细胞抗原表位间接 ELISA 检测猪抗 JEV 抗体

[0055] 用 JEV E 蛋白 B 细胞抗原表位合成多肽或表位多肽与载体的连接物或表位多肽自身连接物为包被抗原，包被 96 孔聚苯乙烯酶标板。用 pH9.6，0.1M 碳酸盐缓冲液稀释抗原至终浓度为 5 μg/ml，按 100 μl/孔加入酶标板中，4℃ 包被过夜。然后用 PBST (PBS+0.05% Tween) 洗涤酶标板 3 次；含 1% BSA 的 PBST 封闭酶标板，37℃ 封闭 2h，封闭后用洗液 PBST 洗板 3 次，立即用于检测或 -20℃ 存放备用。

[0056] 抗体检测操作程序：加入待检测猪血清（定性检测血清 100 倍稀释，抗体效价检测血清进行倍比稀释，同时设立阳性血清对照与阴性血清对照以及不加血清的空白对照），37℃ 孵育 1h，PBST 洗液洗涤 3 次，每次 3 分钟；加入辣根过氧化物酶标记羊抗猪 IgG (Goat-anti-pig IgG-HRP)，37℃ 孵育 1h，PBST 洗液洗涤 4 次，每次 3 分钟；加入 HRP 显色底物 (TMB 显色剂)，室温孵育 5-15 分钟观察显色反应；充分显色后，加入 2M 硫酸终止显色反应；用酶标仪测量 450nm 波长的吸光值；判定结果。

[0057] 判定结果时：空白对照及阴性血清孔吸光值小于或等于 0.2，阳性血清对照孔吸光值大于 0.4 时结果有效；计算 P/N 值 = (检测孔 OD 值 - 空白对照孔 OD 值) / (阴性血清 OD 值 - 空白对照孔 OD 值)，P/N 值等于或大于 2 时为阳性；以反应阳性血清的最大稀释倍数为该样品血清的抗体效价。

[0058] 试验结果见表 4。

[0059] 表 4 合成表位多肽 SEQ ID NO：1 检测猪血清结果

[0060]

猪血清	血清稀释倍数					空白对照
	50	100	200	400	800	
JEV 阳性	0.635	0.598	0.425	0.125	0.111	0.049
JEV 阴性	0.101	0.066	0.067	0.055	0.057	

[0061] 注：包被抗原为抗原表位 SEQ ID NO：1 合成肽，5 μg/ml。该阳性血清效价为 200。

[0062] 实施例 7 乙型脑炎病毒 JEV E 蛋白 B 细胞抗原表位间接 ELISA 检测人抗 JEV 抗体

[0063] 实施方法同实施例 6, 待检血清、阴性对照血清和阳性对照血清为人血清; 二抗为辣根过氧化物酶标记羊抗人 IgG (Goat-anti human IgG-HRP)。

[0064] 实施例 8 乙型脑炎病毒 JEVE 蛋白 B 细胞抗原表位间接 ELISA 检测马抗 JEV 抗体:

[0065] 实施方法同实施例 6, 待检血清、阴性对照血清和阳性对照血清为马血清; 二抗为辣根过氧化物酶标记羊抗马 IgG (Goat-anti horse IgG-HRP)。

[0066] 实施例 9 乙型脑炎病毒 JEV E 蛋白 B 细胞抗原表位 Dot-ELISA 检测猪抗 JEV 抗:

[0067] JEV E 蛋白 B 细胞抗原表位多肽或表位多肽与载体的连接物为包被抗原, 以 BSA 为对照抗原。在硝酸纤维素膜上定点包被抗原, $2 \mu\text{g}/\text{点}$, 37°C 固定 30min, PBST 洗涤 6 次, 2% BSA 中 4°C 封闭过夜, PBST 洗涤 6 次后即可用于抗体检测。

[0068] 检测抗体时, 将待检测血清样品适当稀释后与抗原包被膜于 37°C 孵育 30min, PBST 洗涤 6 次, 加入辣根过氧化物酶标记羊抗猪 IgG (Goat-anti-pig IgG-HRP), 37°C 孵育 1h, PBST 洗液洗涤 6 次; 加入 AEC 或 DAB 底物显色, 室温避光孵育 10min 观察颜色反应。

[0069] 结果判定时, 以包被抗原点呈现棕红色颜色反应, 对照抗原点不出现颜色反应者为阳性。

[0070] 实施例 10 乙型脑炎病毒 JEV E 蛋白 B 细胞抗原表位 Dot-ELISA 检测人抗 JEV 抗

[0071] 实施方法同实施例 9, 待检血清为人血清; 二抗为辣根过氧化物酶标记羊抗人 IgG (Goat-anti human IgG-HRP)。

[0072] 实施例 11 乙型脑炎病毒 JEV E 蛋白 B 细胞抗原表位 Dot-ELISA 检测马抗 JEV 抗

[0073] 实施方法同实施例 9, 待检血清为马血清; 二抗为辣根过氧化物酶标记羊抗马 IgG (Goat-anti horse IgG-HRP)。

[0074] 实施例 12 乙型脑炎病毒 JEV E 蛋白 B 细胞抗原表位免疫原的制备及免疫实验

[0075] 乙型脑炎病毒 JEV E 蛋白 B 细胞抗原表位免疫原可以是合成抗原表位多肽, 抗原表位多肽自身连接物, 抗原表位多肽与载体连接物, 抗原表位融合表位蛋白等。首次免疫免疫原用弗氏完全佐剂和抗原乳化, 小动物免疫抗原量为 $100 \mu\text{g}$ 每只; 二三免时用弗氏不完全佐剂与抗原乳化, 小动物免疫抗原量为 $50-100 \mu\text{g}$ 每只进行免疫。免疫途径可为皮下注射、皮内注射或肌肉注射。各次免疫期间隔两周。加强免疫两次后检测抗体水平。

[0076] 试验结果见表 5。

[0077] 表 5 小鼠抗表位多肽 SEQ NO: 2 抗体间接 ELISA 效价

	Mouse Number	血清稀释度				
		1/50	1/100	1/200	1/400	1/800
[0078]	M1	1.533	1.523	1.425	1.075	0.275
	M2	0.856	0.656	0.517	0.303	0.149
	M3	0.935	0.81	0.642	0.309	0.172
	M4	0.657	0.563	0.361	0.213	0.127
	M5	0.658	0.447	0.394	0.291	0.121
	阴性鼠血清	0.122	0.103	0.125	0.095	0.089

[0079] 注：包被抗原为合成抗原表位多肽 SEQ NO：2，浓度为 5 μg/ml。

[0080] 序列表

[0081] <110> 中国农业科学院哈尔滨兽医研究所

[0082] <120> 乙型脑炎病毒 E 蛋白 B 细胞抗原表位多肽及其应用

[0083] <130>KLPI012

[0084] <160>2

[0085] <170>PatentIn version 3.5

[0086] <210>1

[0087] <211>8

[0088] <212>PRT

[0089] <213>Japanese Encephalitis virus

[0090] <400>1

[0091] Thr Gly Glu Ala His Asn Glu Lys

[0092] 1 5

[0093] <210>2

[0094] <211>8

[0095] <212>PRT

[0096] <213>Japanese Encephalitis virus

[0097] <400>2

[0098] Met Gly Glu Ala His Asn Glu Lys

[0099] 1 5

	70	80	90
JEV SA14-14-2	Y H A S V T D I S T V A R C P T	T G E A H N E K	R A D S S Y 90
NVEV MRM3929	. S . T I . E V . . . S N T P K . 90
NVEV NVE-1-51	. A . T . S . V . . . S N S . . T H N . 90
KUN MRM61C	. L . T . S E L . . K . A	M D P . F . 90
WNV NY99	. L . T . S . L . . K . A	M D P A F . 90
WNV 956	. L . . . S . L . . R . A	M P A F . 90
UV Budapest	. L . T . S . V . . . S N P E D T . 90
UV SAAR-1776	. L . T . S . V . . . S N P E D T . 90
TBEV K23	L . . K L S . T K V A	M . P . T L T E E H Q G G T	90
DV1 E NP_722460	I E . K I S N T T . D S	Q . . . T L V E E Q . T N F	90
DV2 E NP_739583	I E . K L . N T T . E S	Q . . P S L N E E Q . K R F	90
DV3	I E G K I . N . T . D S	Q . . I L P E E Q . Q N .	90
DV4 E NP_740317	I E . . I S N . T . A T	Q . . P Y L K E E Q . Q Q .	90

图 1

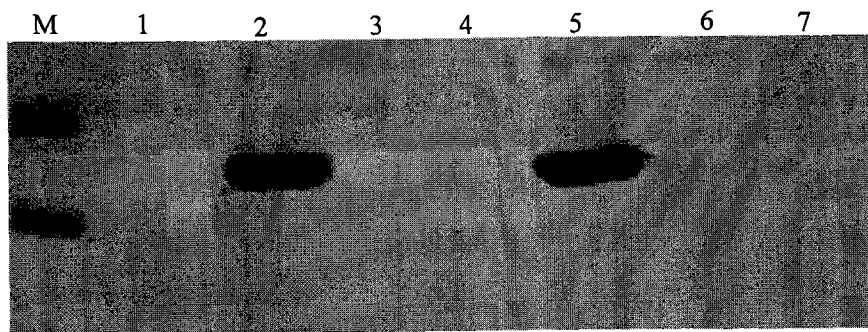


图 2

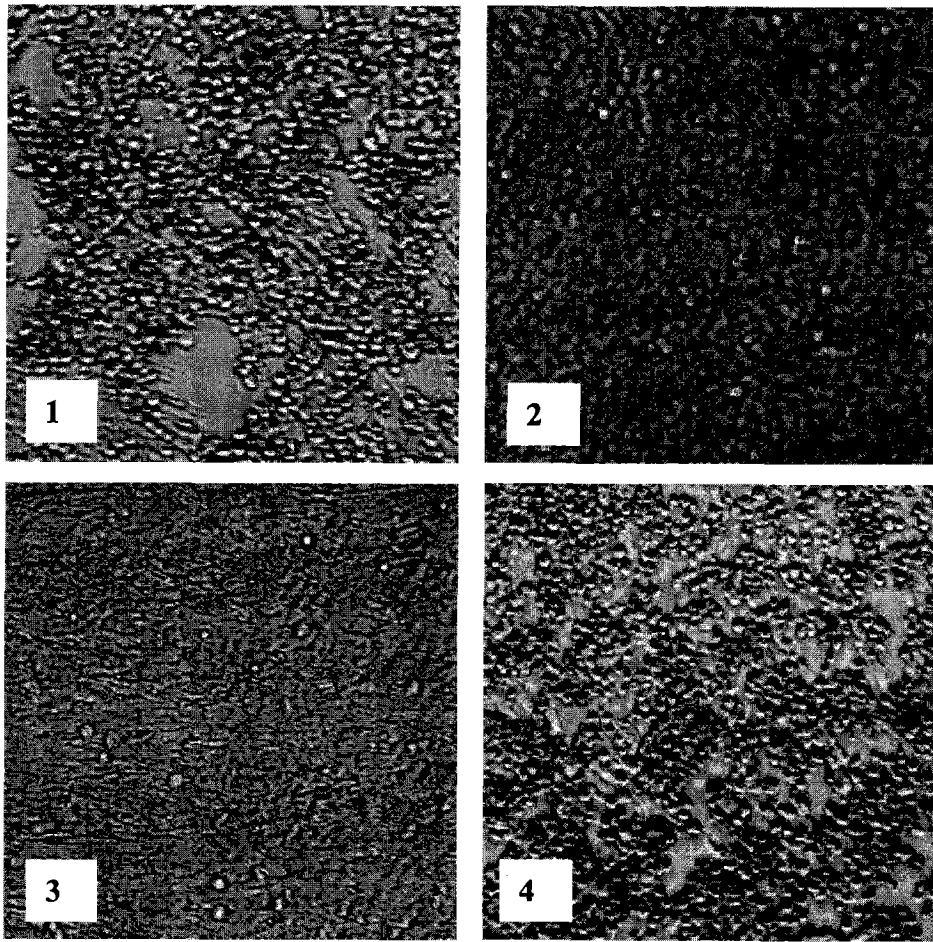


图 3

专利名称(译)	乙型脑炎病毒E蛋白中和性B细胞抗原表位多肽及其应用		
公开(公告)号	CN101333246B	公开(公告)日	2011-04-13
申请号	CN200810126289.6	申请日	2008-07-30
[标]申请(专利权)人(译)	中国农业科学院哈尔滨兽医研究所		
申请(专利权)人(译)	中国农业科学院哈尔滨兽医研究所		
当前申请(专利权)人(译)	中国农业科学院哈尔滨兽医研究所		
[标]发明人	华荣虹 步志高 董光志		
发明人	华荣虹 步志高 董光志		
IPC分类号	C07K7/06 C12N15/40 A61K39/12 G01N33/569 G01N33/53 A61P31/14		
CPC分类号	Y02A50/39		
代理人(译)	孙皓晨		
审查员(译)	王航		
其他公开文献	CN101333246A		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明公开了乙型脑炎病毒E蛋白中和性B细胞抗原表位多肽，还公开了该抗原表位多肽在防治和诊断乙型脑炎病毒中的用途，属于分子免疫学领域。本发明所述的抗原表位多肽的氨基酸序列为SEQ ID NO：1或SEQ ID NO：2所示。本发明JEVE蛋白中和性B细胞抗原表位多肽作为免疫原或疫苗免疫动物机体后能够产生针对乙型脑炎病毒的中和性抗体，并能够在体内或体外中和乙型脑炎病毒，阻止病毒感染动物机体。将本发明抗原表位多肽与载体连接或自身连接或相互连接，能够免疫动物，在免疫动物后产生的抗多肽抗体或抗乙型脑炎病毒抗体能够在体内外中和乙型脑炎病毒并产生免疫保护。

