

DOI:10.13350/j.cjpb.231201

• 论著 •

登革病毒铁蛋白纳米颗粒抗原的表达与纯化*

鲍君铎¹, 冯生², 高岩¹, 张佳奇³, 汪伟¹, 李霄², 李楠², 金鑫^{1**}, 金宁一^{2**}, 鲁会军^{2**}

(1. 延边大学农学院, 吉林延吉 133002; 2. 中国农业科学院长春兽医研究所; 3. 吉林农业大学; 4. 温州大学病毒学研究所)

【摘要】 目的 登革病毒(Dengue virus, DENV)在世界范围流行。在我国,登革病毒流行毒株不断发生变化,登革病毒不断变异以及外来输入病例给登革热的预防和控制带来巨大挑战,开发安全有效的疫苗对于该病的预防控制至关重要。本研究将登革病毒包膜蛋白(envelope protein, E)呈递在幽门螺旋杆菌铁蛋白上以形成纳米颗粒,建立一种以铁蛋白纳米颗粒为载体的登革疫苗,表达登革病毒铁蛋白纳米颗粒抗原并进行纯化,以期新型登革疫苗的研究提供借鉴。方法 以质粒 pcDNA3.1-DENV2-E-FE 为模板扩增得到 FE、DENV2-E-FE 基因。将目的基因片段通过同源重组的方式分别连接到原核表达载体 pET30a 上,构建重组质粒 pET30a-FE 和 pET30a-E-FE,经双酶切和测序鉴定后转化入感受态细胞中进行诱导表达,得到重组蛋白,通过 SDS-PAGE、非还原性 SDS-PAGE、Western blot 及透射电镜对目的蛋白表征进行分析鉴定。结果 成功扩增出目的基因片段,构建的重组质粒 pET30a-FE 和 pET30a-E-FE 转化到感受态细胞后经诱导表达约 26 ku 和 71 ku 的可溶性目的蛋白。Western blot 检测重组蛋白能被相应抗体识别,透射电镜观察到两种蛋白均可自组装成粒径约 13 nm 和 70 nm 的颗粒结构。结论 通过大肠埃希菌成功表达可溶性铁蛋白和登革病毒包膜蛋白铁蛋白,两种蛋白均具有反应原性且均能自组装形成纳米结构,可为新型登革纳米颗粒疫苗的研制提供借鉴。

【关键词】 登革病毒;铁蛋白;原核表达;纳米颗粒

【中图分类号】 R373.33

【文献标识码】 A

【文章编号】 1673-5234(2023)12-1365-05

[*Journal of Pathogen Biology*. 2023 Dec;18(12):1365-1369,1374.]

Expression and purification of dengue virus ferritin nanoparticles antigen

BAO Junduo¹, FENG Sheng², GAO Yan¹, ZHANG Jiaqi³, WANG Wei⁴, LI Xiao², LI Nan², JIN Xin¹, JIN Ningyi², LU Huijun² (1. College of Agriculture, Yanbian University, Yanji, Jilin 133002, China; 2. Changchun Veterinary Research Institute, Chines Academy of Agricultural Sciences; 3. Jilin Agricultural University; 4. Institute of Virology Wenzhou University) **

【Abstract】 **Objective** Dengue virus is endemic worldwide. In China, the prevalent strains of dengue virus are constantly changing, the continuous mutation of dengue virus as well as imported cases bring great challenges to the prevention and control of dengue fever, and the development of a safe and effective vaccine is crucial for the prevention and control of this disease. In this study, we presented dengue virus envelope protein on *Helicobacter pylori* ferritin to form nanoparticles, established a dengue vaccine using ferritin nanoparticles as a carrier, expressed dengue virus ferritin nanoparticle antigens, and purified them, with the aim of contributing to the study of novel dengue vaccines. **Methods** The FE and DENV2-E-FE genes were amplified by RT-PCR using pcDNA3.1-DENV2-E-FE plasmid as template. The target gene fragments were ligated into the prokaryotic expression vector pET30a by homologous recombination to construct recombinant plasmids pET30a-FE and pET30a-E-FE. After identification by double enzyme digestion and sequencing, the recombinant plasmids were transformed into competent cell BL21(DE3) for expression induction, and the recombinant proteins were obtained. The recombinant protein was purified by Ni-NTA affinity chromatography and characterized by SDS-PAGE, non-reducing SDS-PAGE, Western blot and transmission electron microscopy. **Results** The target gene fragments were successfully amplified, and the constructed recombinant plasmids pET30a-FE and pET30a-E-FE were transformed into receptor cells and induced to express soluble target proteins of about 26 ku and 71 ku, the induced expression conditions were 37 °C and 0.5 mmol/L IPTG for 6h. The recombinant proteins were detected by Western blot and recognized by the corresponding antibodies. The two proteins could self-assemble into granule structures with particle diameters of about 13 and 70 nm by transmission electron microscopy. **Conclusion** Successful expression of soluble ferritin and dengue virus envelope protein ferritin by *Escherichia coli*, both of which are reactive and can self-assemble to form nanostructures, may provide a reference for the development of novel dengue nanoparticle

* **【基金项目】** 国家重点研发计划项目(No. 2021YFC2301704)。

** **【通讯作者】** 金鑫, E-mail: jinxin@ybu.edu.cn; 金宁一, E-mail: ningyik@126.com; 鲁会军, E-mail: huijun_lu@126.com

【作者简介】 鲍君铎(1999-),男,吉林松原人,硕士,主要从事人兽共患病学研究。E-mail:bjunduo@163.com

vaccines.

【Key words】 Dengue virus; ferritin; prokaryotic expression; nanoparticles

登革病毒(Dengue virus, DENV)属黄病毒科黄病毒属,为正链 RNA 病毒,主要由伊蚊传播。DENV 具有 4 种抗原性不同的血清型,分别为 DENV-1 至 DENV-4,具有 3 种结构蛋白和 7 种非结构蛋白^[1]。DENV 主要的结构蛋白—包膜蛋白与其它病毒类似,主要分为 3 个结构域(I、II、III)^[2-3]。E 蛋白位于病毒颗粒的脂质双层中,构成病毒颗粒表面的突起,含有多种 B 细胞和 T 细胞抗原表位,是 DENV 主要保护性抗原。登革热是由 DENV 引起的媒介传播的病毒性疾病,全球每年约有 4 亿例登革热病例^[1]。登革热临床上的主要特征为血小板减少症、白细胞减少症和血管通透性增加。虽然大多数 DENV 感染是轻度或无症状的,但约 5% 的病例会发展为更为严重的疾病,即重度登革出血热或发展为登革休克综合征,这主要归因于不同 DENV 血清型的连续感染。由于黄病毒之间共享的包膜蛋白具有相似的保守结构,因此 DENV 与其他黄病毒之间常发生交叉反应,导致其产生抗体依赖性增强(antibody-dependent enhancement, ADE)^[4-5]。目前可以对不同 DENV 血清型感染提供有效保护的疫苗开发技术尚不成熟,因此深入研究开发有效治疗和预防登革热的药物至关重要。

病毒抗原在多价阵列中的纳米颗粒上的呈递已经成为制备疫苗的重要技术。在纳米颗粒表面上,抗原高度有序的重复阵列可以模拟其在病毒体表面上的几何排列,并引起比可溶性病毒抗原更强的体液应答。自组装纳米颗粒技术已日臻成熟,并广泛用于疫苗的研究和开发。研究发现,纳米颗粒的直径和抗原的间距是 B 细胞活化的关键条件,纳米颗粒的最佳直径为 10~150 nm,表位的最佳间距为 50~100 Å。此外,纳米颗粒上抗原的多价展示具有高亲合力,这对于诱导有效的免疫应答至关重要^[6]。

铁蛋白是细胞内的球形铁储存蛋白,由 24 个亚基组成。它们自动组装成一个外径约为 12 nm、内腔直径约为 8 nm 的球形空心纳米笼^[7]。在 pH2.0 的酸性条件下铁蛋白会被解离,pH7.0 时又会重新自组装为纳米颗粒结构^[8]。因此可以通过 pH 值来调控铁蛋白的自组装以达到对铁蛋白内核、外表面进行选择性修饰的目的^[9]。铁蛋白复合物还具有显著的热和 pH 稳定性、单分散性、生物相容性和生物降解性等优点^[10-13]。基于这些优点,使得铁蛋白对纳米医学的发展具有独特的吸引力。有研究表明寨卡病毒包膜蛋白结构域 III 铁蛋白纳米疫苗可提供针对寨卡病毒的完全保护而不会引起 ADE^[14]。这对同样为黄病毒科黄

病毒属,有着严重 ADE 效应的 DENV 疫苗的研制提供了借鉴。本研究拟将 2 型 DENV-E 基因与幽门螺旋杆菌铁蛋白亚基 N 端融合并通过 pET30a 载体表达重组蛋白,纯化后通过透射电镜观察重组蛋白结构,旨在构建 2 型 DENV-E-铁蛋白纳米颗粒(简称 pET30a-E-FE),为登革病毒铁蛋白自组装纳米颗粒疫苗的研制奠定基础。

材料与amp;方法

1 材料

1.1 细菌和载体 BL21 (DE3) Chemically Competent Cell 购自全式金公司;pET30a 载体由长春兽医研究所提供。

1.2 主要试剂 2×KeyPo Master Mix (Dye Plus), ClonExpress II One Step Cloning Kit 和 D5000 DNA Marker 购自南京挪威赞公司;限制性内切酶 EcoR I、Hind III 及 Pierce™ ECL Western blot 底物购自赛默飞公司;D2000 DNA Marker 购自北京天根生化科技有限公司;His-Tag (D3I1O) XP® Rabbit mAb 购自 Cell Signaling 公司;辣根过氧化物酶标记山羊抗兔 IgG(H+L), IPTG 和 QuickBlock™ Western 封闭液购自碧云天生物技术公司;His 标签蛋白纯化试剂盒和 SDS-PAGE Loading Buffer (non-Reducing, 5×) 购自康为世纪公司。

2 方法

2.1 引物设计与合成 根据质粒 pcDNA3.1-DE NV2-E-FE,利用 SnapGene 软件设计扩增 FE 和 DENV2-E-FE 基因的同源重组特异性引物。FE 基因扩增上游引物:5'-GGCTGATATCGGATCCGAATT CGACATCATTAAGCTGCTGAATGAGCAGG-3';下游引物:5'-CTCGAGTGCGGCCGCAAGCTTGCT CTTCCGAGACTTGCGGATG-3'。DENV2-E-FE 基因扩增上游引物:5'-ATGGCTGATATCGGATCCG AATTCATGAGATGTATCGGCATCTCTAATAG AGATTTTG-3';下游引物:5'-CTCGAGTGCGGC CGCAAGCTTAGACTTTCTACTTTTGCGGATGC CC-3'。引物由生工生物工程(上海)股份有限公司合成。

2.2 重组质粒的构建和鉴定 PCR 扩增目的基因。反应体系(50 μL):cDNA 2 μL,上、下游引物各 2.5 μL, 2×KeyPo Master Mix (Dye Plus) 25 μL,加 ddH₂O 补至 50 μL。反应条件:98 °C 预变性 40 s;98 °C 变性 10 s,58 °C 退火 5 s,72 °C 延伸 8 s,共 35 个循

环;72 °C延伸 2 min。PCR 产物经 1.2% 琼脂糖凝胶电泳检测后进行纯化。用限制性内切酶 EcoR I 和 Hind III 将 pET-30a 载体进行线性化处理并纯化酶切载体片段,然后进行同源重组。同源重组体系:5×CE II Buffer 4 μL,线性化载体 8.7 μL,目的基因片段 1 μL,Exnase II 2 μL,ddH₂O 4.3 μL。同源重组反应条件:37 °C 30 min。将重组产物转化至感受态细胞 BL21(DE3)中进行培养。提取重组质粒,经 EcoR I 和 Hind III 双酶切鉴定后委托生工生物工程(上海)股份有限公司进行测序,测序正确的重组质粒分别命名为 pET30a-FE 和 pET30a-E-FE。

2.3 重组蛋白的表达 分别取 50 μL 冻存重组菌液加入 5 mL 卡那霉素抗性 LB 液体培养基中过夜培养,各取出 1.5 mL 分别加入 150 mL 卡那霉素抗性 LB 液体培养基中,37 °C、220 r/min 恒温振荡培养至菌体 A₆₀₀ 值为 0.6~0.8 时,加入 IPTG 使终浓度成为 0.5 mmol/L,37 °C、220 r/min 条件下诱导 6 h。收集菌液,4 °C、4 000 r/min(离心半径 10 cm)离心 15min,弃上清,用预冷的 PBS 重悬菌体,同上离心,沉淀重悬于 PBS 缓冲液(pH7.4)中,冰上超声破碎(510 W,工作 4 s,间歇 4 s,超声破碎共 42 min)后 4 °C、12 000 r/min 离心 10 min,分别收集上清与沉淀,通过 SDS-PAGE 进行可溶性分析。试验以诱导及未诱导全菌液作对照。

2.4 重组蛋白的纯化及 Western blot 分析 取重组菌超声破碎上清用 0.45 μm 滤膜进行抽滤,通过 His 标签蛋白纯化试剂盒纯化重组蛋白。收集各段洗脱液,分别进行 SDS-PAGE 分析。将纯化的蛋白样品与非还原性蛋白上样液混合,经 SDS-PAGE(分离胶浓度为 3.75%)电泳后转印至 0.45 μmNC 膜上,用 QuickBlock™ Western 封闭液室温封闭 30 min;加入兔源 Anti-His 单克隆抗体(1 : 1000),置 20 r/min 摇床 4 °C 过夜孵育,TBST 洗 3 次,10 min/次;加入山羊抗兔 IgG-HRP (1 : 5000),置 20 r/min 摇床室温孵育 0.5 h,TBST 洗 3 次,10 min/次;滴加 Pierce™ ECL Western blot 底物,通过凝胶成像系统显色并拍照。

2.5 重组蛋白透射电镜观察纯化的蛋白液 经透析后用 PBS 稀释,取 30 μL 滴加到铜网膜上,吸附 5 min,2%磷钨酸染色 2 min,滤纸吸去染色液,透射电镜观察纳米颗粒的结构。

结 果

1 目的基因的 PCR 扩增

以质粒 pcDNA3.1-DENV2-E-FE 为模板进行 PCR 扩增,获得了大小为 532 bp 的 FE 基因片段和

1 764 bp 的 DENV2-E-FE 基因片段(图 1),与预期一致。

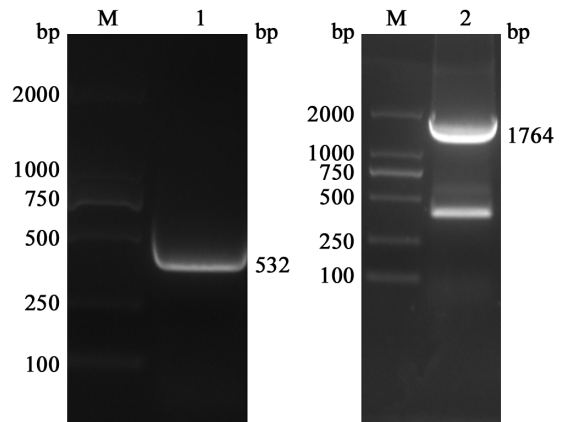
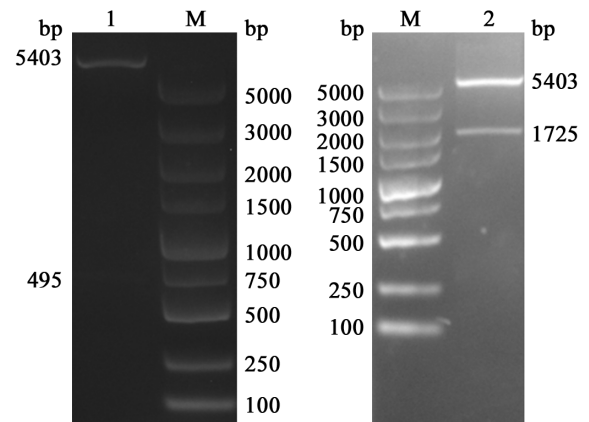


图 1 FE、DENV2-E-FE 基因的 PCR 扩增
M DL5000 DNA Marker 1 PCR amplification product of FE gene 2 PCR amplification product of DENV2-E-FE gene
Fig. 1 PCR amplification of FE, DENV2-E-FE genes

2 重组质粒的构建及鉴定

以扩增的目的基因片段构建重组质粒 pET30a-FE、pET30a-E-FE,经限制性内切酶 EcoR I 和 Hind III 酶切后进行 1.2% 琼脂糖凝胶电泳检测,获得大小分别为 5 403 bp 的载体片段、495 bp 的 FE 基因片段及 1 725 bp 的 2 型 DENV-E 基因片段(图 2),与预期相符。对重组质粒测序,结果与预期序列一致,重组质粒构建正确。

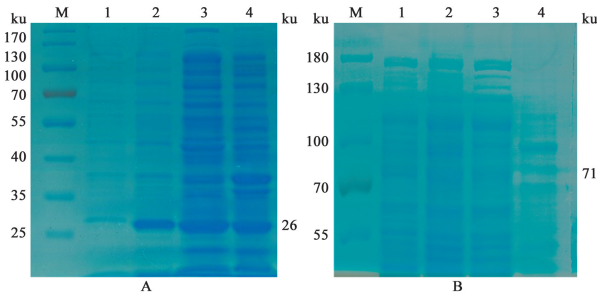


M DNA 标志物(DL5000) 1 pET30a-FE 双酶切 2 pET30a-E-FE 双酶切
图 2 重组质粒 pET30a-FE、pET30a-E-FE 双酶切鉴定
M DL5000 DNA Marker 1 pET30a-FE double enzyme digestion 2 pET30a-E-FE double enzyme digestion
Fig. 2 Identification of recombinant plasmids pET30a-FE and pET30a-E-FE by double digestion

3 重组蛋白的表达

pET30a-FE 共编码 229 个氨基酸,理论分子质量为 26.1 ku。pET30a-E-FE 共编码 638 个氨基酸,理论分子质量为 71.0 ku。重组菌诱导表达后进行 SDS-

PAGE 电泳分析,结果如图 3A、3B,目的蛋白的分子质量与预期相符,且主要以可溶性的形式表达。



A 重组蛋白 pET30a-FE M 蛋白分子质量标准 1 未诱导全菌 2 诱导后全菌 3 超声破碎上清 4 超声破碎沉淀; B 重组蛋白 pET30a-E-FE M 蛋白分子量标准 1 未诱导全菌 2 诱导后全菌 3 超声破碎上清 4 超声破碎沉淀。

图 3 重组蛋白 pET30a-FE、pET30a-E-FE SDS-PAGE 分析

A Recombinant protein pET30a-FE M Protein molecular weight standard 1 Total cellular protein before IPTG induction 2 Total cellular protein after IPTG induction 3 Induced expression supernatant 4 Induced expression precipitation; B Recombinant protein pET30a-E-FE M Protein molecular weight standard 1 Total cellular protein before IPTG induction 2 Total cellular protein after IPTG induction 3 Induced expression supernatant 4 Induced expression precipitation

Fig. 3 SDS-PAGE analysis of recombinant proteins pET30a-FE and pET30a-E-FE

4 重组蛋白的纯化及鉴定

重组蛋白经 His 标签蛋白纯化试剂盒纯化后进行 SDS-PAGE 分析,结果如图 4,目的蛋白条带清晰。若 FE 蛋白能够自组装形成 24 聚体,其聚体大小约为 626 ku。非还原性蛋白上样液 SDS-PAGE 显示,FE 重组蛋白大于 250 ku(使用的蛋白质标准品最大分子质量标准为 250 ku),表明 FE 重组蛋白形成了聚体形式(图 5)。Western blot 显示,两纯化蛋白均能与兔源 Anti-His 单克隆抗体特异性结合,反应条带分别位于约 25、70 ku 处(图 6),表明纯化的重组蛋白具有反应原性。

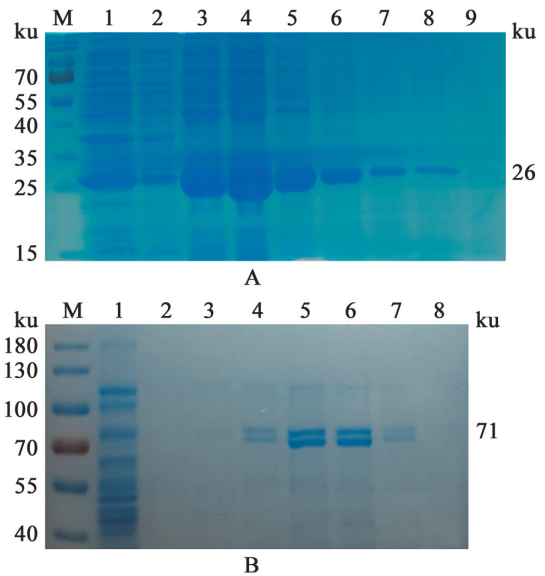
5 重组蛋白透射电镜观察

透射电镜观察纯化的重组蛋白 FE 和 E+FE 纳米颗粒,大小均一。其中 FE 粒径约为 13 nm(图 7A),E+FE 粒径约为 70 nm(图 7B)。两重组蛋白的纳米颗粒大小均与预期相符。

讨论

自 20 世纪以来,DENV 在世界各地尤其是热带和亚热带地区广泛流行。随着人口流动加快,登革热愈演愈烈,已经在多个国家和地区形成聚集性爆发,演变成世界性的公共卫生问题^[1,15]。2010 年以来,登革疫情在我国广东、湖南、广西和云南等地大规模爆发,其危害严重,已被我国列为乙类传染病^[16-17]。目前 DENV 疫苗研究进展并不理想,减毒活疫苗 CYD-

TDV 于 2015 年 12 月在墨西哥首次获批准,也是目前唯一获得上市许可的 DENV 疫苗,遂经逐年改进并在 20 多个国家获批准使用^[18]。然而 CYD-TDV 仅适用于 9 至 16 岁的人群^[19]。在 DNA 疫苗研制方面,一种能表达融合针对树突细胞内吞受体 DEC205 的单链抗体(scFv)的抗原疫苗免疫小鼠可诱导对 DENV-2 的强烈免疫应答^[20]。在亚单位疫苗研制方面,DEN-80E 是一种基于 DENV 包膜糖蛋白(E),能诱导强烈中和滴度的四价重组亚单位疫苗目前已通过临床前试验,对非灵长类的动物试验显示末次接种后的保护作用可持续 8~12 月^[21]。



A 纯化重组蛋白 pET30a-FE M 蛋白分子质量标准 1 可溶性表达上清 2 流穿液 3~9 重组菌超声破碎上清 1~7 次洗脱液 B 纯化重组蛋白 pET30a-E-FE; M 蛋白分子量标准 1 流穿液 2~8 重组超声破碎上清 1~7 次洗脱液

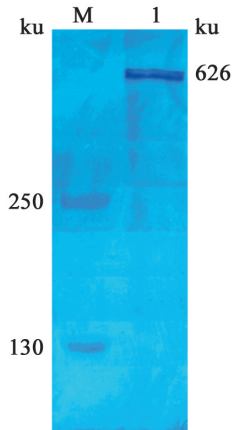
图 4 纯化重组蛋白 pET30a-FE、pET30a-E-FE SDS-PAGE 分析

A Recombinant protein pET30a-FE M Protein molecular weight standard 1 Soluble expression supernatant 2 Flow through liquid 3-9 The 1st to the 7th elution of Elution Buffer, respectively B Recombinant protein pET30a-E-FE M Protein molecular weight standard 1 Flow through liquid 2-8 The 1st to the 7th elution of Elution Buffer, respectively.

Fig. 4 SDS-PAGE analysis of purified recombinant proteins pET30a-FE and pET30a-E-FE

在疫苗的研发中,除了添加佐剂和优化抗原递送系统之外,人们正在对自组装纳米颗粒作为展示保护性抗原的平台进行深入研究。纳米颗粒上的抗原组装导致保护性表位在大分子结构上的规则重复布置,其大小促进抗原呈递细胞的有效摄取,这是触发和放大适应性免疫应答的关键。纳米颗粒锚定的抗原不仅改善抗原稳定性和免疫原性,而且允许靶向递送和缓慢释放^[22]。研究表明分子大小和形状影响重组铁蛋白纳米疫苗的效力,肠道病毒的铁蛋白纳米颗粒疫苗诱导小鼠产生的抗体水平随抗原肽分子的增加而增加^[13,23]。铁蛋白表面的生物和化学允许修饰、组合位

点,包括特异性修饰和各种大分子如标记物、抗体、荧光剂、聚糖、核酸和靶肽,其赋予铁蛋白新的性质并显著拓宽其应用范围^[23]。因此,将化学修饰和生物修饰相结合,取长补短,实现对铁的修饰和多功能化修饰是未来发展的重要方向之一。

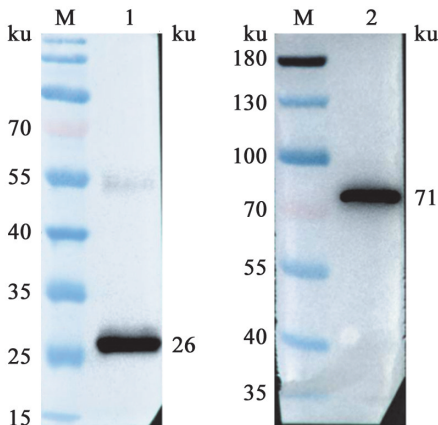


M 蛋白分子质量标准 1 纯化重组蛋白 FE

图 5 纯化重组蛋白非还原性 SDS-PAGE 分析

M Protein molecular weight standard 1 Recombinant protein pET30a-FE

Fig. 5 Non-reducing SDS-PAGE analysis of purified recombinant proteins



M 蛋白分子质量标准 1 纯化的 FE 重组蛋白与相应抗体反应条带 2 纯化的 E+FE 重组蛋白与相应抗体反应条带

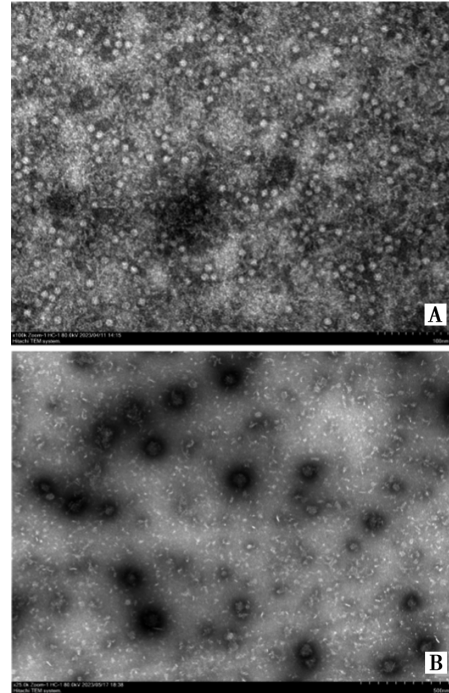
图 6 纯化重组蛋白 Western blot 分析

M Protein molecular weight standard 1 Purified recombinant protein FE 2 Purified recombinant protein E+FE

Fig. 6 Western blot analysis of purified recombinant proteins

本研究利用原核表达系统表达了可溶性幽门螺旋杆菌铁蛋白、DENV 包膜蛋白铁蛋白。通过变性与非还原性上样液进行 SDS-PAGE 电泳后显示,均获得预期大小的目的蛋白。Western blot 分析显示,制备的重组蛋白能被兔源 Anti-His 单克隆抗体识别,即具有反应原性。透射电镜观察幽门螺旋杆菌铁蛋白其粒径约 13 nm, DENV 包膜蛋白铁蛋白纳米颗粒粒径约为 70 nm。表明 DENV 包膜蛋白铁蛋白成功自组装为纳米颗粒。与其它重组亚单位疫苗相比,铁蛋白纳米颗

粒载体有可能会对表面抗原起到缓释作用,有助于延长疫苗诱导抗体的持续性^[24]。寨卡病毒包膜蛋白结构域 III 铁蛋白纳米颗粒疫苗解决了 ADE 效应问题,同时产生了更高水平的 CD4⁺、CD8⁺ T 淋巴细胞及 IL-4、IFN- γ 细胞因子^[14]。流感铁蛋白纳米颗粒疫苗诱导产生的中和抗体比传统疫苗提升数倍^[25]。本研究制备的 DENV 包膜蛋白铁蛋白纳米颗粒的免疫原性有待观察。



A 透射电镜观察组蛋白 FE 纳米结构(比例尺 1:100 nm) B 透射电镜观察组蛋白 E+FE 纳米结构(比例尺 1:500 nm)

图 7 透射电镜观察组蛋白纳米结构

A Transmission electron microscopy of histone FE nanostructures (scale 1: 100 nm) B Transmission electron microscopy of histone E+FE nanostructures(scale 1:500 nm)

Fig. 7 Transmission electron microscope observation of recombinant protein nanoparticle

综上所述,本研究构建、表达、纯化了幽门螺旋杆菌铁蛋白、DENV 包膜蛋白铁蛋白,透射电镜观察到形成粒径均一,稳定的纳米结构,为新型 DENV 疫苗的研制奠定了基础。

【参考文献】

- [1] Roy SK, Bhattacharjee S. Dengue virus: epidemiology, biology, and disease aetiology [J]. Can J Microbiol, 2021, 67(10): 687-702.
- [2] Zhang Y, Zhang W, Ogata S, et al. Conformational changes of the flavivirus E glycoprotein [J]. Structure, 2004, 12(9): 1607-1618.
- [3] Modis Y, Ogata S, Clements D, et al. Variable surface epitopes in the crystal structure of dengue virus type 3 envelope glycoprotein [J]. J Virol, 2005, 79(2): 1223-1231.

- [9] Brown BA, Oberste MS, Alexander JP, et al. Molecular epidemiology and evolution of enterovirus 71 strains isolated from 1970 to 1998[J]. J Virol, 2000, 73(12):9969-9975.
- [10] 赵鹤鹤, 韩振志, 张勇, 等. 柯萨奇病毒 A 组 9 型的基因分型方法的建立[J]. 病毒学报, 2022, 38(2):264-270.
- [11] 黄蓉蓉, 林小娟, 李漫时, 等. 柯萨奇病毒 A9 型山东地方株的进化遗传学特征[J]. 病毒学报, 2021, 37(6):1333-1338.
- [12] Pabbaraju K, Wong S, Chan E, et al. Genetic characterization of a coxsackie A9 virus associated with aseptic meningitis in Alberta, Canada in 2010[J]. Virol J, 2013, 10(1):93.
- [13] Yip C, Lau S, Zhou B, et al. Emergence of enterovirus 71 "double-recombinant" strains belonging to a novel genotype D originating from southern China; first evidence for combination of intratypic and intertypic recombination events in EV71[J]. Arch Virol, 2010, 155(9):1413-1424.
- [14] Liu JS, Zhu YJ, Pan Y, et al. Complete genome sequence analysis of two human coxsackievirus A9 strains isolated in Yunnan, China, in 2009[J]. Virus Genes, 2015, 50(3):358-364.
- [15] Trallero G, Casas I, Tenorio A, et al. Enteroviruses in Spain: virological and epidemiological studies over 10 years (1988-1997) [J]. Epidemiol Infect., 2000, 124(3):497-506.
- [16] Tao Z, Wang H, Li Y, et al. Molecular epidemiology of human enterovirus associated with aseptic meningitis in Shandong Province, China, 2006-2012[J]. PLoS One, 2014, 9(2):e89766.

【收稿日期】 2023-07-29 【修回日期】 2023-10-15

(上接 1369 页)

- [4] Khanam A, Gutierrez-Barbosa H, Lyke KE, et al. Immune-mediated pathogenesis in dengue virus infection [J]. Viruses, 2022, 14(11):2575.
- [5] Kok BH, Lim HT, Lim CP, et al. Dengue virus infection—a review of pathogenesis, vaccines, diagnosis and therapy [J]. Virus Res, 2023, 324:199018.
- [6] Veggi D, DelloIacono L, Malito E, et al. Effective multivalent oriented presentation of meningococcal NadA antigen trimers by self-assembling ferritin nanoparticles [J]. Int J Mol Sci, 2023, 24(7):6183.
- [7] Song N, Zhang J, Zhai J, et al. Ferritin: A multifunctional nanoplatform for biological detection, imaging diagnosis, and drug delivery [J]. Acc Chem Res, 2021, 54(17):3313-3325.
- [8] Kang S, Oltrogge LM, Broomell CC, et al. Controlled assembly of bifunctional chimeric protein cages and composition analysis using noncovalent mass spectrometry [J]. J Am Chem Soc, 2008, 130(49):16527-16529.
- [9] 李丹. 基于铁蛋白自组装技术的 PPRV-H 纳米颗粒抗原的表达及初步评价[D]. 北京: 中国农业科学院, 2021.
- [10] Pantopoulos K, Porwal SK, Tartakoff A, et al. Mechanisms of mammalian iron homeostasis [J]. Biochemistry, 2012, 51(29):5705-5724.
- [11] Khoshnejad M, Parhiz H, Shuvaev VV, et al. Ferritin-based drug delivery systems: Hybrid nanocarriers for vascular immunotargeting [J]. J Control Release, 2018, 282:13-24.
- [12] Uchida M, Kang S, Reichhardt C, et al. The ferritin superfamily: Supramolecular templates for materials synthesis [J]. BiochimBiophys Acta, 2010, 1800(8):834-845.
- [13] Wang Z, Xu L, Yu H, et al. Ferritin nanocage-based antigen delivery nanoplatforms: epitope engineering for peptide vaccine design [J]. Biomater Sci, 2019, 7(5):1794-1800.
- [14] Rong H, Qi M, Pan J, et al. Self-assembling nanovaccine confers complete protection against zika virus without causing antibody-dependent enhancement [J]. Front Immunol, 2022, 13:905431.
- [15] Castells M, Cristina J, Colina R. Evolutionary history and spatiotemporal dynamic of GIII norovirus: From emergence to classification in four genotypes [J]. Transbound Emerg Dis, 2022, 69(4):1872-1879.
- [16] Cao J, Deng H, Ye L, et al. Epidemiological and clinical characteristics of Dengue virus outbreaks in two regions of China, 2014-2015 [J]. PLoS One, 2019, 14(3):e0213353.
- [17] Zhang J, Shu Y, Shan X, et al. Co-circulation of three dengue virus serotypes led to a severe dengue outbreak in Xishuangbanna, a border area of China, Myanmar, and Laos, in 2019 [J]. Int J Infect Dis, 2021, 107:15-17.
- [18] Coronel-Martinez DL, Park J, Lopez-Medina E, et al. Immunogenicity and safety of simplified vaccination schedules for the CYD-TDV dengue vaccine in healthy individuals aged 9-50 years (CYD65): a randomised, controlled, phase 2, non-inferiority study [J]. Lancet Infect Dis, 2021, 21(4):517-528.
- [19] Manoff SB, George SL, Bett AJ, et al. Preclinical and clinical development of a dengue recombinant subunit vaccine [J]. Vaccine, 2015, 33(50):7126-7134.
- [20] Zaneti AB, Yamamoto MM, Sulczewski FB, et al. Dendritic cell targeting using a DNA vaccine induces specific antibodies and CD4(+) T cells to the dengue virus envelope protein domain III [J]. Front Immunol, 2019, 10:59.
- [21] Govindarajan D, Meschino S, Guan L, et al. Preclinical development of a dengue tetravalent recombinant subunit vaccine: Immunogenicity and protective efficacy in nonhuman primates [J]. Vaccine, 2015, 33(33):4105-4116.
- [22] Zhao L, Seth A, Wibowo N, et al. Nanoparticle vaccines [J]. Vaccine, 2014, 32(3):327-337.
- [23] Li Y, Gao H, Nepovimova E, et al. Recombinant ferritins for multimodal nanomedicine [J]. J Enzyme Inhib Med Chem, 2023, 38(1):2219868.
- [24] 刘嘉欣. 以铁蛋白纳米颗粒为载体的 A β 表位疫苗的设计及免疫原性评价[D]. 长春: 吉林大学, 2022.
- [25] 李凯. 基于铁蛋白的多表位流感纳米疫苗的构建及免疫效果评价[D]. 扬州: 扬州大学, 2021.

【收稿日期】 2023-07-21 【修回日期】 2023-10-10