

登革病毒 NS1 蛋白的原核表达及其在登革热快速诊断中的应用

傅 强, 田 疆, 方丹云, 周俊梅, 庞贤武, 李兴华, 江丽芳*

(中山大学中山医学院微生物学教研室//教育部热带病防治研究重点实验室, 广东 广州 510080)

摘 要:【目的】重组表达 1 型登革病毒(DENV-1)和 3 型登革病毒(DENV-3)NS1 蛋白,制备多克隆抗体,建立特异、敏感的登革病毒 NS1 抗原 ELISA 检测法。【方法】RT-PCR 扩增 DENV-1 和 DENV-3 NS1 全长基因,经 T-A 克隆后,将目的基因分别与质粒 PET30a(+)连接构建重组质粒,转化大肠杆菌 BL21 感受态细胞。阳性克隆经 IPTG 诱导表达,并对目的蛋白进行纯化。用纯化的 NS1 蛋白免疫 BALB/c 小鼠,制备鼠抗 NS1 多克隆抗体。应用 NS1 多克隆抗体建立登革病毒 NS1 抗原双抗体夹心 ELISA 检测法。【结果】成功构建了高效表达 DENV-1 和 DENV-3 NS1 蛋白的原核表达系统,获得纯化的 NS1 蛋白;用重组 NS1 蛋白免疫 BALB/c 小鼠后获得高效价(> 1:30 000)的抗 DENV-1 和 DENV-3 NS1 的特异性抗体;用 NS1 多克隆抗体建立了登革病毒 NS1 抗原双抗体夹心 ELISA 检测法,该法可特异性检出登革病毒 NS1 抗原,敏感性达到 1 ng/mL,与黄病毒的其它成员无交叉反应,表明具有良好的特异性。【结论】本研究成功构建了 DENV-1 和 DENV-3 NS1 蛋白的原核表达系统,高效表达了具有良好免疫原性及免疫反应性的 DENV-1 和 DENV-3 重组 NS1 蛋白;建立了检测登革病毒 NS1 抗原的双抗体夹心法,并证明该检测法具有较高的灵敏度和特异性,具有良好的应用前景。

关键词: 登革病毒;NS1 蛋白;原核表达;多克隆抗体

中图分类号:R373.3

文献标志码:A

文章编号:1672-3554(2012)03-0316-05

Prokaryotic Expression of NS1 Protein of Dengue Virus and Application in Rapid Diagnosis of Dengue Fever

FU Qiang, TIAN Jiang, FANG Dan-yun, ZHOU Jun-mei, PANG Xian-wu, LI Xing-hua, JIANG Li-fang*

(Department of Microbiology, Zhongshan School of Medicine, Sun Yat-sen University//Key Laboratory of Tropical Disease Control Ministry of Education, Guangzhou 510080, China)

Abstract:【Objective】To express the nonstructural protein 1 (NS1) of Dengue virus type 1 (DENV-1) and Dengue virus type 3 (DENV-3) in *E. coli*, and prepare polyclonal antibodies against the NS1 proteins in vivo and establish a high sensitivity and specificity ELISA of DENV NS1 antigen. 【Methods】The full-length DENV-1 and DENV-3 NS1 genes were amplified by RT-PCR, and then cloned into pGEM-T vector. After the NS1 genes were cloned into expression plasmid PET30a (+) respectively, the recombinant plasmids were transformed into *E. coli* BL21. The recombinant NS1 proteins were expressed by induction with IPTG, and purified. For production of anti-NS1 polyclonal antibodies, we immunized mice with the purified recombinant proteins. The polyclonal antibodies were used to establish a double-antibody sandwich ELISA for detecting Dengue NS1 antigen. 【Results】Successfully constructed highly efficient prokaryotic expression system which expressed DENV-1 or DENV-3 NS1 protein and obtained purified NS1 proteins. The recombinant proteins were used to immunize BALB/c mice. Polyclonal antibodies against NS1 of DENV-1 or DENV-3 with high titer (>1:30000) were finally obtained. With these polyclonal antibodies, we detected 1 ng/ml homo-typic DENV NS1 protein by using double-antibody sandwich ELISA. There was no cross-reactivity with other members of flavivirus, indicating a good specificity. 【Conclusion】In this study, we succeeded in constructing highly efficient prokaryotic expression system of DENV-1 or DENV-3 NS1 protein, and demonstrated that the expressed NS1 proteins had good immunogenicity and immune reactivity. Established a double-antibody sandwich ELISA for detecting Dengue NS1 antigen, and proved the assay had high sensitivity and specificity, with a good application prospect.

Key words: DENV; NS1 protein; prokaryotic expression; polyclonal antibody

[J SUN Yat-sen Univ(Med Sci), 2012, 33(3): 316-321]

收稿日期:2011-12-30

基金项目:国家自然科学基金(NSFC)-广东联合基金(U1132002)

作者简介:傅 强,硕士研究生,研究方向:分子病毒学, E-mail: fq521206@sohu.com; * 通信作者:江丽芳,教授,博士生导师, E-mail: jianglf909@yahoo.com.cn

登革病毒 (Dengue virus, DENV) 为单股正链 RNA 病毒, 属黄病毒科 (Flaviviridae) 黄病毒属 (Flavivirus), 分为四个血清型, 是最重要的一种虫媒传播的人类病毒^[1]。其基因组全长约为 11kb, 依次编码 3 种结构蛋白(核蛋白 C、膜结合蛋白 M 和包膜蛋白 E)和 7 种非结构蛋白(NS1、NS2a、NS2b、NS3、NS4a、NS4b 和 NS5)。其中 NS1 蛋白是登革病毒的一种高度保守的非结构糖蛋白, 存在膜结合型和分泌型两种形式, 均具有强免疫原性^[2]。登革病毒的 NS1 蛋白在登革热发病早期即在病人血清中存在, 且出现时间早于 IgM 抗体^[3], 已被证明可用于登革热的早期诊断^[4]和预后评估^[5-6]。此外, 登革病毒 NS1 蛋白在登革热的致病和免疫过程中也起重要作用^[7-10]。本研究对 DENV-1 和 DENV-3 NS1 蛋白进行了原核表达和纯化, 制备了多克隆抗体, 并建立了检测登革病毒 NS1 抗原的双抗体夹心 ELISA 检测法, 为登革热快速诊断试剂盒的研制和登革病毒致病与免疫机制的进一步研究奠定了基础。

1 材料与方法

1.1 病毒、细胞和质粒

DENV-1 (Hawaii 株) 和 DENV-3 (H87 株) 标准株为中国疾病预防控制中心 (CDC) 提供。大肠杆菌 DH5 α 和 BL21 感受态细胞购自天根公司。原核表达载体 pET30a (+) 为 Merck 公司产品。

1.2 主要试剂

细胞培养基 RPMI1640 及小牛血清为 GIBCO 公司产品, RNA 提取试剂盒 RNeasy Mini Kit 为 QIAGEN 公司产品, SuperScript III 反转录酶, Anti-His 抗体和 Alexa Fluor 594 - 兔抗鼠 IgG 购自 Invitrogen 公司, La taq DNA 聚合酶为大连宝生物公司产品, 限制性内切酶 Hind III、Bam H I 和蛋白 Maker (SM 1851) 为 Fermentas 公司产品, T4 连接酶和 pGEM-T 载体为 Promega 公司产品, DNA Maker (东盛 DS™5000, 天根 Maker III), 胶回收试剂盒和质粒小提试剂盒为 OMEGA 公司产品, 蛋白纯化试剂盒 His-bind Purification kit 为 Novagen 公司产品, 4 个型别登革病毒 NS1 蛋白和兔抗 NS1 多克隆抗体为 Geneway 公司产品, HRP 标记的羊抗兔二抗为 ProteinTech 公司产品, 弗氏完全佐剂和不完全佐剂为 Sigma 公司产品。

1.3 引物设计

根据 GenBank 发布的 DENV-1 标准株全长序列 (GenBank 登录号: EU848545.1) 和 DENV-3 标准株全长序列 (GenBank 登录号: M93130.1) 用 Primer Premier 5.0 软件设计引物 (表 1), 扩增 DENV-1 和 DENV-3 NS1 全长序列, 扩增长度均为 1 056 bp, 引物由英骏公司合成。

表 1 扩增 1 型和 3 型登革病毒 NS1 基因设计的引物
Table 1 The primer pairs used for amplifying NS1 gene of DENV-1 and DENV-3 gene

Primer	Sequence (5'-3')	Location
DENV-1F	CGC GGATCC GCG GACTCGGGATGTGTAATTAAC	nt 2421
DENV-1R	CCC AAGCTT GGG TGCAGAGACCAATGACTT	nt 3476
DENV-3F	CGC GGATCC GCG GACATGGGGTGTGTCATAAACTGG	nt 2414
DENV-3R	CCC AAGCTT GGG TGCTGAGGCTAGAGACTTTACCATGT	nt 3469

1.4 病毒培养

用含 100 mL/L 小牛血清的 RPMI1640 培养 C6/36 细胞, 置 28 ℃ 培养箱至单层细胞, 登革病毒感染时弃去培养液, 加入登革病毒冻存液及少量含 20 mL/L 小牛血清的 RPMI1640 维持液, 37 ℃ 吸附 1 h, 再加入含 20 mL/L 小牛血清的 RPMI1640 维持液, 34 ℃ 继续培养至细胞出现 +++ ~ ++++ 的病变, 收集上清用于提取病毒 RNA。

1.5 目的基因的扩增和重组质粒的构建

按 RNA 提取试剂盒 (RNeasy Mini Kit) 的操作步骤提取病毒 RNA, 然后立即进行逆转录。进行 PCR 条件如下: 94 ℃ 5 min; 94 ℃ 45 s, 55 ℃ 45 s, 72 ℃ 70 s, 共 30 循环; 72 ℃ 7 min。胶回收纯化特异的 NS1 片段, 与 pGEM-T easy 载体连接后转化至大肠杆菌 DH5α 感受态细胞, 经蓝白斑筛选及双酶切鉴定阳性克隆, 双酶切后的目的片段与同样双酶切后的载体 PET30a (+) 经 T4 连接酶 4 ℃ 连接过夜, 连接产物转入大肠杆菌 BL21 感受态细胞中, 经抗性筛选和 PCR 初步鉴定后送英骏公司测序。

1.6 NS1 蛋白的表达及鉴定

在 LB 平板上复苏阳性克隆菌, 挑取新鲜菌落, 接种于 2 mL 液体培养基, 250 r/min, 37 ℃, 摇菌 16 h 后, 分别取 5 μL 菌液加入 6 支 2 mL 液体培养基中, 当菌液浓度增至对数生长期 (OD 值约 0.5 ~ 0.6) 时, 加入 IPTG 诱导, 使诱导终浓度分别为 0.8、1.0、1.2、1.4、1.6 mmol/L, 摇菌 170 r/min, 30 ℃, 3 h。取菌液进行 SDS-PAGE, 确定最佳诱导浓度。

在最佳诱导浓度条件下,分别在诱导 2、3、4、5、6 h 时,取菌液进行 SDS-PAGE 确定最佳诱导时间。确定最佳诱导条件后,对重组蛋白进行 SDS-PAGE 和 Western-Blot 鉴定。

1.7 NS1 蛋白的纯化

取重组工程菌大量培养, $2\ 000 \times g$, 20 min 离心集菌, PBS 重悬后超声破碎菌液, 收集沉淀, 得粗制包涵体, 洗涤后的包涵体蛋白溶解于变性液中, 用蛋白纯化柱 His-bind Purification kit 纯化蛋白, 纯化后的蛋白溶液复性后 $10\ 000 \times g$, $4\ ^\circ\text{C}$ 离心 20 min, 取上清, 经 Western-blot 检测后用 BCA 法进行蛋白定量, $-20\ ^\circ\text{C}$ 保存备用。

1.8 免疫小鼠

选取 6 周龄雌性 BALB/c 小鼠 (购自中山大学北校区实验动物中心), 背部取 3 点皮下注射纯化后的蛋白溶液 $50\ \mu\text{g}/\text{只}$, 以后每隔 2 周后加强免疫 1 次, 共加强免疫 2 次。其中初次免疫用等体积的完全弗氏佐剂乳化, 加强免疫时用等体积的不完全弗氏佐剂乳化, 每次加强免疫前断尾取血, 离心收集血清。

1.9 多克隆抗体鉴定

免疫荧光试验: 用 DENV-1 和 DENV-3 标准株感染 C6/36 细胞后制备抗原片, $-20\ ^\circ\text{C}$ 保存备用。第 2 次加强免疫后 7 d 断尾取血进行间接免疫荧光, 待效价大于 1:1 000 时, 摘眼球取血, 离心分离血清, $-80\ ^\circ\text{C}$ 备用。

ELISA 鉴定: 方阵滴定法确定登革病毒 NS1 蛋白的包被浓度, 按照该包被浓度包被微孔板, 加入 PBST 倍比稀释的免疫血清和 PBST 1:5 000 稀释的 HRP-羊抗鼠 IgG, 酶标仪检测在 450 nm 处的吸光度值。

1.10 NS1 蛋白的双抗体夹心 ELISA 法检测

用免疫小鼠获得的多克隆抗体作为包被抗体, 商品化兔抗 NS1 多克隆抗体作为一抗和 HRP 标记的羊抗兔抗体作为二抗进行 4 个血清型登革病毒 NS1 蛋白的检测。对照孔加入不同稀释浓度的乙脑病毒培养上清、丙肝患者血清和季节性流感病毒培养上清进行特异性检测; 空白对照加入 PBST 缓冲液。酶标仪检测在 450 nm 处的吸光度值。

2 结 果

2.1 全长登革 NS1 基因的扩增

以提取的 DENV-1 和 DENV-3 RNA 为模板, 通过 RT-PCR, 扩增 NS1 基因后进行琼脂糖凝胶电泳, 结果显示在 1 000 ~ 1 200 bp 间见一明亮条带(图 1), 与预期片段长度基本相符。

2.2 NS1 重组表达载体的构建

2.2.1 T-A 克隆的构建 PCR 产物切胶后进行胶回收, 与 pGEM-T 载体连接构建重组质粒 pGEM-T/DENV-1 NS1 和 pGEM-T/DENV-3 NS1, 转化至大肠杆菌 DH5 α 感受态细胞。经蓝白斑筛选, 挑取含阳性克隆的菌落, 摇菌提取质粒, 限制性内切酶 *Hind* III 和 *Bam* HI 双酶切后进行电泳鉴定(图 2)。结果显示 NS1 基因与 pGEM-T 成功构建 T-A 克隆。

2.2.2 表达载体的构建 双酶切后的 DENV-1 和 DENV-3 NS1 片段胶回收后与同样双酶切的质粒 PET30a(+) 经 T4 连接酶连接过夜, 将连接产物转入大肠杆菌 BL21 感受态细胞中, 经抗性筛选, 分别挑取 2 个阳性克隆摇菌提取质粒, 进行 PCR 和电泳初步鉴定后(图 3), 送英骏公司测序。序列正确的 DENV-1 和 DENV-3 重组质粒分别标记为 PET30a(+)/DENV-1 NS1 (BL21) 和 PET30a(+)/DENV-3 NS1 (BL21)。

2.3 重组质粒的表达及鉴定

重组质粒经不同浓度 IPTG 诱导表达蛋白, 然后进行 SDS-PAGE, 结果显示在 52 ku 位置出现差异性条带, 在 1 mmol/L 之后, 表达量无显著增多, 因此选择 1 mmol/L 作为大量诱导时 IPTG 的终浓度。在不同的诱导时间后的结果显示, 5h 之后的蛋白表达量变化不大, 所以选取 5h 作为诱导时间。含阳性克隆的菌液经最佳诱导条件表达后进行 SDS-PAGE 和 Western-blot, 结果显示兔抗 NS1 多克隆抗体(图 4 A)和抗 His 单克隆抗体(图 4 B)均能与重组蛋白结合, 条带位置在 52 ku 左右。

2.4 免疫小鼠制备多克隆抗体及效价鉴定

免疫小鼠制备的抗体分别与 DENV-1 和 DENV-3 感染的 C6/36 细胞抗原片进行间接免疫荧光试验, 明显可见 Alexa Fluor 594 染料的特异性红色荧光(图 5), 结果证明所得抗体确是分别针对 DENV-1 和 DENV-3 NS1 蛋白的多克隆抗体。经 ELISA 检测显示抗体效价 $> 1:30\ 000$ 。

2.5 NS1 蛋白的双抗体夹心 ELISA 法检测

免疫小鼠获得的血清以最佳包被浓度 1:8 000 包被酶标微孔板, 一抗稀释浓度为 1:2 000 和二抗

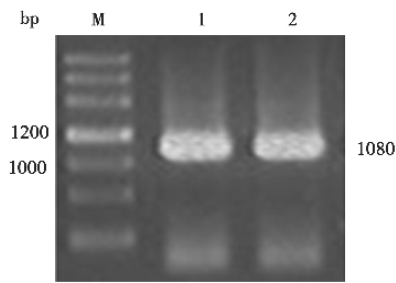


图 1 1 型和 3 型登革病毒 NS1 基因的扩增

Fig.1 The amplification of DENV-1 and DENV-3 NS1 gene

M: Maker; Line 1: DENV-1 NS1 fragment; Line 2: DENV-3 NS1 fragment.

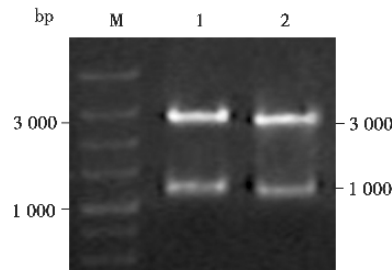


图 2 重组质粒 pGEM-T/DENV-NS1 和 pGEM-T/DENV-NS1 的双酶切鉴定

Fig.2 Identification of the recombinant plasmids by restriction enzyme analysis

M: Maker; Line 1: pGEM-T/DENV-1 NS1 digested with *Hind* III and *Bam* H I ;Line 2: pGEM-T/DENV-3 NS1 digested with *Hind* III and *Bam* H I .

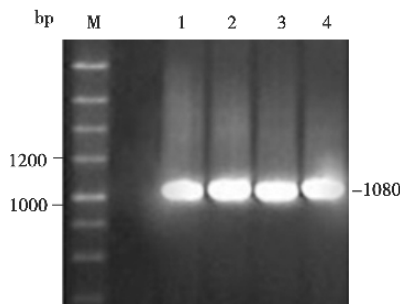


图 3 阳性克隆提取质粒的 PCR 检测

Fig.3 PCR analysis of the plasmids extracted from positive clones

M: Maker; Line 1-2: DENV-1 NS1; Line 3-4: DENV-3 NS1.

稀释浓度为 1:5 000 进行 4 个血清型登革病毒 NS1 蛋白检测,结果如图显示(图 6)。分别以 1 型

和 3 型抗 NS1 免疫血清进行包被时,检测相同血清型别 NS1 蛋白的灵敏度可达到 1 ng/mL,而交叉检测其他血清型别 NS1 蛋白的灵敏度较低,均大于 10 ng/mL。对该检测法进行了回收率的计算,多次实验回收率在 86.8%–94.7%之间,说明该检测法具有良好的稳定性。两种血清与乙脑病毒、丙型肝炎病毒和流感病毒均无交叉反应。结果判定以空白对照平均值的 2 倍作为分界值。

3 讨 论

登革热是世界上最重要的虫媒传播的疾病之一。由于缺乏有效的控制蚊虫的措施,登革热在热带和亚热带地区有着较高的发病率,因此对登革热及时准确的诊断对于临床治疗和预后有着重要作用。RT-PCR 法检测病人血清中的登革病毒 RNA 是一种敏感的检测方法,但是登革病毒 RNA 在登革热退热期检测率不高^[11],并且 RT-PCR 法需要特殊的仪器设备,不利于临床检测的应用。而酶联免疫法(ELISA)是一种敏感、特异和快速的诊断方法,且对相关仪器设备要求较低,是一种实用的临床检测技术。有研究发现登革病毒 NS1 蛋白在登革热病人刚开始发热直至临床期结束时都可以被检测,甚至在登革病毒 IgM 抗体尚不能被检出的情况下,登革病毒 NS1 蛋白就可以在血清^[12]、尿液^[13]和脑脊液^[14]中被检出,已成为登革病毒早期感染的一种重要标志分子。因此,登革病毒 NS1 蛋白的检测在登革热的早期诊断中具有重要意义^[4,15–16]。

目前已经有多种不同的表达体系被用来表达登革病毒 NS1 蛋白,其中利用原核表达系统不但能够获得高表达量的重组 NS1 蛋白,而且还是一种经济且操作相对简单的方法^[17–18]。虽然有一些研究人员指出原核体系表达的蛋白因其没有表达后的修饰剪接,当外源蛋白在大肠杆菌中高水平表达时,常常会导致包涵体的形成,但最新研究发现大肠杆菌表达的 DENV-2 NS1 蛋白用适当的方法重折叠后可以获得天然蛋白的结构和抗原决定簇^[19]。近期 Allonso 等人^[6]用 4 种不同的方法对原核表达的 DENV-2 NS1 蛋白进行重折叠,然后免疫小鼠,获得的免疫血清能有效检测登革病毒感染,检测 2 型登革感染病人血清阳性率可达 100%。本研究由 DENV-1 和 DENV-3 NS1 蛋白诱

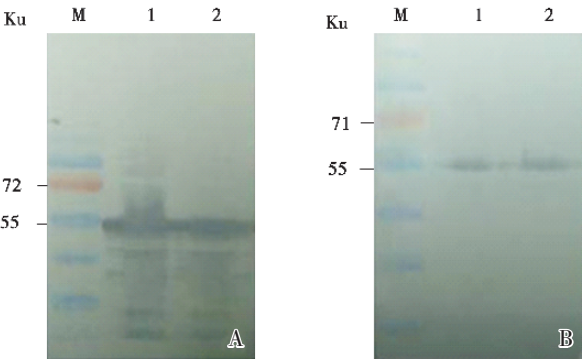


图 4 Western Blot 检测 1 型和 3 型登革病毒 NS1 重组蛋白
Fig.4 Western blot analysis of DENV-1 and DENV-3 NS1 recombinant proteins

A Tested by rabbit polyclonal antibody against NS1
M: Maker; Line 1: DENV-1 NS1 recombinant protein; Line 2: DENV-3 NS1 recombinant protein; B Tested by monoclonal antibody against Histidine. M:Maker; Line 1: DENV-1 NS1 recombinant protein; Line 2: DENV-3 NS1 recombinant protein.

导产生的多克隆抗体与其有相似的制备过程,因此在以后登革病毒感染的快速诊断中将有良好的应用前景。

本研究构建了登革病毒 NS1 抗原的双抗体夹心 ELISA 检测法,实验证明该检测法与黄病毒科其他成员如乙脑病毒和丙型肝炎病毒无交叉反应,与其他 RNA 病毒如流感病毒也无交叉反应,说明该检测法具有良好的特异性;检测相应血清型的 NS1 蛋白敏感度可达 1 ng/mL,说明具有较高的敏感度。有文献报道,在登革病毒感染的病人血清中 NS1 蛋白的浓度在每毫升含有几纳克到每毫升含有几微克之间^[12],说明本研究建立的检测方法敏感性较高,完全可以满足临床检测的需要。

综上所述,本研究成功构建了 DENV-1 和 DENV-3 NS1 蛋白的原核表达系统,并在大肠杆菌中成功表达了 DENV-1 和 DENV-3 NS1 蛋白。另外还利用纯化的重组蛋白制备了多克隆抗体,利

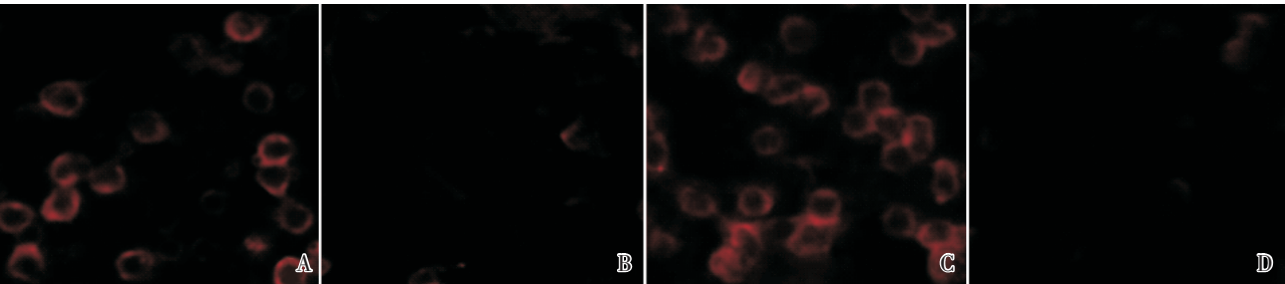


图 5 1 型和 3 型登革病毒 NS1 多克隆抗体的免疫荧光检测
Fig.5 Identification of the polyclonal antibodies against DENV-1 or DENV-3 NS1 protein by indirect immunofluorescence assay

A: C6/36 cells infected with DENV-1 were detected with Anti-DENV-1 NS1 serum; B: Blank control of C6/36 cells were tested with Anti-DENV-1 NS1 serum; C: C6/36 cells infected with DENV-3 were detected with Anti-DENV-3 NS1 serum; D: Blank control of C6/36 cells were tested with Anti-DENV-3 NS1 serum; fluorescence microscope $\times 400$.

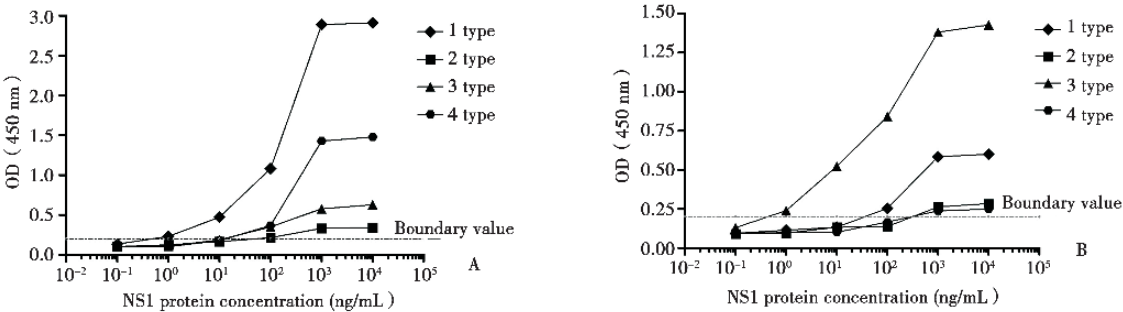


图 6 双抗体夹心法检测 4 个血清型的 NS1 蛋白
Fig.6 Measurement of the sensitivity of anti-DENV-1 NS1 or anti-DENV-3 NS1 antibody in detection of 4 types DENV NS1 protein by double-antibody sandwich ELISA

A: Anti-DENV-1 NS1 serum coated; B: Anti-DENV-3 NS1 serum coated.

用间接免疫荧光和ELISA的方法证明该多克隆抗体效价高,用DENV-1和DENV-3多克隆抗体进行双抗体夹心法检测4个型别登革病毒NS1蛋白,结果显示相应型别的NS1蛋白的检测灵敏度很高而其他型别较低,下一步实验中将对2型和4型登革病毒NS1蛋白进行原核表达并制备多克隆抗体,把4个型别的多克隆抗体进行不同浓度组合,建立对4个型别登革病毒NS1蛋白都有高敏感度和特异性的检测方法。

参考文献:

- [1] Gubler DJ. Dengue/dengue haemorrhagic fever: history and current status[J]. Novartis Found Symp, 2006, 277(8): 3-16.
- [2] Huang JL, Huang JH, Shu RH, et al. High-level expression of recombinant Dengue viral NS1 protein and its potential use as a diagnostic antigen[J]. J Med viro, 2001, 65(3): 553-560.
- [3] Nawa M, Yamada KI, Takasaki T, et al. Serotype-cross-reactive immunoglobulin M responses in Dengue virus infections determined by enzyme-linked immunosorbent assay [J]. Clin Diagn Lab Immunol, 2000, 7(5): 774-777.
- [4] Lima MR, Noqueira RM, Schatzmayr HG, et al. A new approach to Dengue fatal cases diagnosis: NS1 antigen capture in tissues [J]. PLoS Negl Trop Dis, 2011, 5(5): e1147.
- [5] Thomas L, Najioulah F, Verlaeten O, et al. Relationship between nonstructural protein 1 detection and plasma virus load in Dengue patients[J]. Trop Med Hyp, 2010, 83(3): 696-699.
- [6] Allonso D, Da Silva Ros M, Coelho DR, et al. Polyclonal antibodies against properly folded Dengue virus NS1 protein expressed in E. coli enable sensitive and early Dengue diagnosis[J]. Virol Methods, 2011, 175(1): 109-116.
- [7] Avirutnan P, Punyadee N, Noisakran S, et al. Vascular leakage in severe Dengue virus infections: a potential role for the nonstructural viral protein NS1 and complement[J]. Infect Dis, 2006, 193(8): 1078-1088.
- [8] Young PR, Hilditch PA, Bletchly C, et al. An antigen capture enzyme-linked immunosorbent assay reveals high levels of the Dengue virus protein NS1 in the sera of infected patients[J]. Clin Microbiol, 2000, 38(3): 1053-1057.
- [9] Alcon-LePoder S, Drouet MT, Roux P, et al. The secreted form of Dengue virus nonstructural protein NS1 is endocytosed by hepatocytes and accumulates in late endosomes: implications for viral infectivity[J]. Virol, 2005, 79(17): 11403-11411.
- [10] Falconar AK, Martinez F. The NS1 glycoprotein can generate dramatic antibody-enhanced dengue viral replication in normal out-bred mice resulting in lethal multi-organ disease [J]. PLoS One, 2011, 6(6): e21024.
- [11] Yamada K, Nawa M, Takasaki T, et al. Laboratory diagnosis of dengue virus infections by reverse transcriptase polymerase chain reaction (RT-PCR) and IgM-capture enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) [J]. Jpn J Infect Dis, 1999, 52(4): 150-155.
- [12] Alcon S, Talarmin A, Debruyne M, et al. Enzyme-linked immunosorbent assay specific to dengue virus type 1 nonstructural protein NS1 reveals circulation of the antigen in the blood during the acute phase of disease in patients experiencing primary or secondary infections[J]. J Clin Microbiol, 2002, 40(2): 376-381.
- [13] Araujo FM, Brilhante RS, Cavalcanti LP, et al. Detection of the Dengue non-structural 1 antigen in cerebral spinal fluid samples using a commercially available enzyme-linked immunosorbent assay[J]. Virol Methods, 2011, 177(1): 128-131.
- [14] Chuansumrit A, Chaiyaratana W, Tangnaratchakit K, et al. Dengue nonstructural protein 1 antigen in the urine as a rapid and convenient diagnostic test during the febrile stage in patients with Dengue infection Diagn[J]. Diagn Microbiol Infect Dis, 2011, 71(4): 467-469.
- [15] Kassim FM, Izati MN, TgRogayah TA, et al. Use of Dengue NS1 antigen for early diagnosis of Dengue virus infection[J]. Trop Med Public Health, 2011, 42(3): 562-569.
- [16] Chakravarti A, Kumar A, Malik S. Detection of Dengue infection by combining the use of an NS1 antigen based assay with antibody detection [J]. Trop Med Public Health, 2011, 42(2): 297-302.
- [17] Hockney RC. Recent developments in heterologous protein production in Escherichia coli [J]. Trends Biotechnol, 1994, 12(11): 456-463.
- [18] Das D, Mongkolaungkoon S, Suresh MR. Super induction of Dengue virus NS1 protein in E coli [J]. Protein Expr Purif, 2009, 66(1): 66-72.
- [19] Amorim JH, Porchia BF, Balan A, et al. Refolded Dengue virus type 2 NS1 protein expressed in Escherichia coli preserves structural and immunological properties of the native protein [J]. Virol Methods, 2010, 167(2): 186-192.

(编辑 徐杰)