

DOI:10.13350/j.cjpb.231107

• 论著 •

猴痘 F3L 蛋白的表达、纯化及多克隆抗体制备^{*}

王毅豪,刘承锐,刘昊霖,贾梦乐,杨领弟,陶飞飞,王婷,王宇,孔令保^{**},黎美凤^{**}

(江西农业大学生物科学与工程学院,江西农业大学病原微生物研究所,江西农业大学南昌市动物病毒与基因工程重点实验室,江西南昌 330045)

【摘要】 **目的** 猴痘病毒(MPXV)是一种能引起人畜共患病的正痘病毒属病毒,在人群和野生动物中具有较高的感染率,对人类公共卫生安全造成重大威胁。当前猴痘病毒的相关研究基础较弱,猴痘诊断试剂匮乏。本研究旨在以猴痘病毒基因 F3L 为对象表达 F3L 重组蛋白并免疫小鼠,制备 F3L 多克隆抗体,为猴痘诊断试剂的研发奠定基础。 **方法** 克隆猴痘病毒基因 F3L,构建至原核表达载体 pET-28a 上,测序无误后将重组质粒 pET-28a-MPXV-F3L 转化 *E. coli* BL21 感受态细胞,用优化的 IPTG 诱导表达条件表达 MPXV-F3L 重组蛋白,表达蛋白经 Ni-NTA 亲和层析柱纯化后采用 SDS-PAGE 及 Western blot 进行鉴定。用纯化的重组蛋白免疫小鼠,制备 F3L 多克隆抗体血清,采用 ELISA 检测血清抗体滴度。 **结果** 克隆得到的猴痘病毒 F3L 基因片段长度为 471 bp,表达的 pET-28a-MPXV-F3L 重组蛋白分子量约为 24.6 ku,其最佳表达条件为 IPTG 浓度 0.2 mmol/L、温度 42 °C、时间 12 h。表达蛋白经 Ni-NTA 亲和层析柱纯化后纯度达 95.29%,经 Western blot 鉴定表达蛋白能被相应抗体识别。用该蛋白免疫小鼠,制备获得 F3L 多克隆抗体 ELISA 滴度为 4,709。 **结论** 重组表达的 F3L 蛋白具有抗原性,免疫小鼠后能刺激产生高滴度的血清抗体,为 F3L 蛋白功能分析、猴痘病毒的致病机制研究以及诊断试剂和疫苗的开发奠定了基础。

【关键词】 猴痘病毒;F3L;原核表达;纯化;免疫

【中图分类号】 R373

【文献标识码】 A

【文章编号】 1673-5234(2023)11-1274-05

[*Journal of Pathogen Biology*. 2023 Nov. ;18(11):1274-1278.]

Expression, purification and preliminary application of monkeypox F3L protein

WANG Yihao, LIU Chenrui, LIU Haolin, JIA Mengle, YANG Lingdi, TAO Feifei, WANG Ting, WANG Yu, KONG Lingbao, LI Meifeng (*College of Bioscience and Engineering, Institute of Pathogenic Microorganism, Nanchang City Key Laboratory of Animal Virus and Genetic Engineering, Jiangxi Agricultural University, Nanchang 330045, China*)^{***}

【Abstract】 **Objective** Monkey virus (MPXV) is a member of the orthopoxvirus genus that can cause zoonotic infections in humans and animals. It has a high infection rate in both human populations and wildlife, posing a significant threat to public health security. There are lack of monkeypox virus related studies and diagnostic reagents. This study aims to produce the recombinant F3L protein that is used to immunize mice and prepare anti-F3L polyclonal antibody, which provides foundation for developing monkeypox diagnostic reagents. **Methods** Monkeypox virus gene F3L was cloned and inserted into the prokaryotic expression vector pET-28a. After accurate sequencing, the recombinant plasmid pET-28a-MPXV-F3L was transformed into *E. coli* BL21 competent cells. Induction conditions such as IPTG were optimized to achieve high expression of MPXV-F3L recombinant protein. The expressed recombinant protein was purified using Ni-NTA affinity chromatography and identified through SDS-PAGE and Western blot analysis. Finally, the purified recombinant protein was used to immunize mice and prepare anti-F3L polyclonal antibody. Moreover, the serum antibody titers were determined using ELISA kit. **Results** The fragment of monkeypox virus F3L gene was cloned by PCR and its length was 471 bp. The molecular mass of the recombinant protein F3L was about 24.6 ku. The optimal concentration of IPTG, best temperature and suitable induction time were 0.2 mmol/L, 42 °C and 12 h in prokaryotic expression system, respectively. The purified recombinant protein was 95.29% and it can be recognized by the anti-F3L polyclonal antibody. The ELISA titer of anti-F3L polyclonal antibody was 4,709. **Conclusion** The recombinant protein F3L exhibits antigenicity, it can be used to immunize mice and prepare high-titer serum antibody. This study provides a foundation for the functional analysis of the F3L protein, pathogenic mechanisms of monkeypox virus and development of diagnostic reagents.

^{*} **【基金项目】** 国家自然科学基金项目(No. 31860038);江西省自然科学基金项目(No. 20224BAB215036);江西省教育厅科技基金项目(No. GJJ2200442);南昌市动物病毒与基因工程重点实验室项目(No. 2021-NCZDSYS-008)。

^{**} **【通讯作者】** 孔令保, E-mail: lingbaok@mail.jxau.edu.cn;黎美凤, E-mail: meifengli77@jxau.edu.cn

【作者简介】 王毅豪(2000-),男,江西宜春人,硕士,学士,研究方向为分子病毒学与免疫学。E-mail: wangisbalance@foxmail.com

gents and vaccines.

【Key words】 Monkeypox virus; F3L; prokaryotic expression; immol/lunity

猴痘 (Monkeypox, MPX) 是由猴痘病毒 (Monkeypox virus, MPXV) 引起的一种病毒性人畜共患病, 其属于正痘类病毒, 症状表现类似于天花, 常见症状为发烧 (通常在 38.5 °C 到 40.5 °C 之间)、头痛、肌肉酸痛、淋巴结肿大及皮疹等; 主要发病部位为手掌、脚底、腹股沟及颈部等^[1]。猴痘不仅可通过受感染的动物传播给人类, 还可通过人类之间的直接接触 (性接触或者皮肤接触)、间接接触 (飞沫传播或者毛巾及床上用品传播) 进行传播^[2]。尽管猴痘的症状比天花轻, 传播性比天花弱, 但猴痘病毒可能会成为比天花病毒更难对付的人类病原体, 其原因可能是猴痘病毒的遗传结构、生态变化及宿主与天花病毒有较大差异, 并且随着天花病毒的根除, 已不再推行天花疫苗接种, 这便使猴痘的传播机会增大^[3]。

1958年, 研究者从源自新加坡的猴体中检出猴痘病毒, 这可能是该疾病被称为“猴痘”的原因^[4]。1970年在刚果首次发现人类感染猴痘病毒的病例^[5]。猴痘大多在非洲国家传播, 但自2022年5月以来, 一些非流行国家也报告了猴痘病例, 截止至2022年11月16日, 全世界已报道的病例超过79 655例, 但是只有不足2%的病例来自非洲, 该病已经在除南极洲外的六大洲蔓延^[6], 在未来一段时间内将是一个持续的威胁^[7]。2022年7月23日, 世界卫生组织 (WHO) 宣布猴痘疫情为“国际关注的突发公共卫生事件”^[8]。

2019年, 美国食品和药物管理局 (FDA) 已批准生物技术公司 Bavarian Nordic 疫苗产品 Jynneos, 用于18岁以上的高危成年人群天花和猴痘感染的预防^[9], 这是FDA批准的唯一一款非复制型天花疫苗, 也是世界上唯一一个获批的猴痘疫苗。但目前尚无治疗猴痘的特效药^[10]。猴痘病毒与天花病毒存在血清学交叉反应, 利用中和试验和血凝抑制试验难以区分两种病原, 因此, 亟待建立准确检测鉴别猴痘病毒的方法^[11]。2022年, 俄罗斯“矢量”病毒学与生物技术国家科学中心与国内的圣湘生物和唐山英诺特公司宣布研发了猴痘病毒核酸或 (和) 抗原检测试剂盒^[12]。总体而言, 目前市售的抗原检测试剂盒数量少, 灵敏度较低, 价格昂贵, 需要表达量更大且更为灵敏的猴痘病毒蛋白对原有试剂盒进行优化, 然而目前对于猴痘病毒蛋白的研究尚少。

研究发现痘苗病毒 E3L 蛋白和猴痘病毒蛋白 F3L 均可抑制宿主天然免疫^[13], 但鲜有关于猴痘蛋白 F3L 的表达和多克隆抗体制备的报道。本研究基于“生物学功能未知或知之甚少, 亲水性较强易于外源表

达, 抗原表位较多, 保守性强或变异性高”等标准, 以猴痘病毒基因 F3L 为对象表达 F3L 重组蛋白并免疫小鼠, 制备 F3L 多克隆抗体, 为猴痘病毒的免疫原性和致病机制研究, 以及诊断试剂及疫苗的开发奠定理论基础。

对象与方法

1 材料

1.1 细胞株、质粒及试验动物 *E. coli* BL21 感受态细胞和 *E. coli* DH5 α 感受态细胞为本室制备; pET-28a 质粒载体由本室保存; 四周龄昆明鼠由南昌大学实验动物科学中心提供 (饲养温度 22~24 °C, 湿度 59%)。

1.2 主要试剂 Prime STAR[®] HS DNA Polymerase, XhoI 和 EcoR I 限制性内切酶, T4 ligase, DL2000 DNA Maker, DL15000 DNA Maker 及 Trans 180kD Protein Molecular Standard Marker 购于翌圣生物科技 (上海) 股份有限公司; 酵母提取物和胰蛋白酶为英国 OXOID 公司产品; Ni-NTA Agarose 购自德国 QIAGEN 公司; ECL 显色液和 TMB 显色液购于上海碧云天生物技术有限公司; 弗氏完全佐剂和弗氏不完全佐剂购于美国 Sigma 公司; 质粒小提试剂盒购于天根生化科技 (北京) 有限公司; DNA 纯化回收试剂盒购于生工生物工程 (上海) 股份有限公司。

2 方法

2.1 猴痘 F3L 基因的生物信息学分析及克隆 通过 NCBI 公布的猴痘基因数据 (MPXV_USA_2022_MA001), 获取猴痘 F3L 的基因, 将氨基酸序列输入在线分析网站 IEDB 和 Expasy ProtScale 中, 分别进行 F3L 蛋白的抗原性和疏水性分析; 输入 UniPort 和 Swiss Model 中, 分别对蛋白质的功能及其三维空间构型进行预测。根据 F3L 基因序列设计引物, 扩增 F3L 基因, 由北京擎科生物科技有限公司进行密码子的优化与合成。

2.2 原核表达载体的构建 用 Primer5.0 设计 F3L 基因上、下游引物, 上游引物 F3L-F1 的 5' 端具有 EcoR I 酶切位点, 下游引物 F3L-R2 具有 XhoI 酶切位点 (下划线)。引物由北京擎科生物科技有限公司合成。F3L-F1: 5'-CCGGAATTCATGGAAAACGTGAAGTGAACAAAGC-3'; F3L-R2: 5'-CCGCTCGAGAAAACGGATAATAACATATGAC-3'。

PCR 扩增 MPXV-F3L 基因的序列, 扩增产物按照 DNA 纯化回收试剂盒说明书方法进行纯化。使用

EcoR I 与 Xho I 限制性核酸内切酶分别对 pET-28a 空载质粒和猴痘 F3L 基因扩增产物进行双酶切,用试剂盒纯化回收酶切产物,在 T4 ligase 连接酶作用下于 16 °C 处理 20 h 后,获得重组质粒 pET-28a-MPXV-F3L。将重组质粒转化至 *E. coli* DH5 α 感受态细胞,吸取 50 μ L 涂布至固体 LB 培养基上(含 50 μ g/mL Kana),37 °C 培养 12~16 h。挑取单一菌落至液体 LB 培养基试管中,37 °C 下培养 12~16 h,依据质粒小提试剂盒说明书提取质粒进行 PCR 鉴定和双酶切鉴定。

2.3 重组蛋白的表达及诱导条件的优化 将上重组质粒 pET-28a-MPXV-F3L 转化入 *E. coli* BL21 感受态细胞中,挑取菌落至液体 LB 培养基,于 37 °C 下培养 12~16 h 后转接,摇菌培养至对数生长期后加入 IPTG 诱导蛋白表达,通过设置不同的 IPTG 浓度、诱导时间和诱导温度进行诱导表达条件的优化。每个处理用 EP 管收集菌液 1.5 mL,12 000 r/min(离心半径 4 cm)离心 2 min,弃上清,加入 PBS 80 μ L 重悬菌体沉淀,再加入 20 μ L 5 \times loadingbuffer,沸水浴煮 30 min,12 000 r/min 离心 2 min,取上清进行 SDS-PAGE 电泳,依据蛋白表达情况确定最适诱导表达条件。以优化的诱导表达条件进行目的蛋白的大量表达,收集菌液,震荡混匀,超声破碎后离心,分别收集包涵体和上清液进行 SDS-PAGE 电泳分析。

2.4 重组蛋白的纯化与鉴定 取重组质粒转化菌超声破碎后收集的包涵体,使用包涵体洗涤液 A(1% Triton X-100,0.2 mmol/L EDTA,10 mmol/L Tris-HCl,20 mmol/L NaCl)、包涵体洗涤液 B(0.2 mmol/L EDTA,0.4 mol/L Urea,1 mmol/L β -巯基乙醇,10 mmol/L Tris-HCl,20 mmol/L NaCl)和包涵体洗涤液 C(10 mmol/L Tris-HCl)进行多次洗涤,溶解于纯化 A 液(1 mmol/L β -巯基乙醇,20 mmol/L Tris-HCl,8 mol/L Urea,500 mmol/L NaCl)中,高速离心后取上清液,经滤膜过滤后使用镍柱纯化:用纯化 A 液平衡镍柱后进行多次上样,再用含 25 mmol/L 咪唑的纯化 A 液 40 mL 洗脱杂蛋白,然后用含 75 mmol/L 咪唑的纯化 A 液 40 mL 洗脱目的蛋白。每个 EP 管中各收集 1 mL,各管制备蛋白样进行 SD-PAGE 电泳,切胶后通过电转膜仪将蛋白转移至 PVDF 膜上,用脱脂奶粉封闭 2 h,洗涤;加入 1:4000 稀释的 Anti-His tag Mouse Monoclonal Antibody,4 °C 过夜孵育,洗涤 3 次;加入 HRP 标记的 1:5000 稀释的羊抗鼠 IgG 孵育 2 h,洗涤 3 次后滴加 ECL 显色液进行曝光。

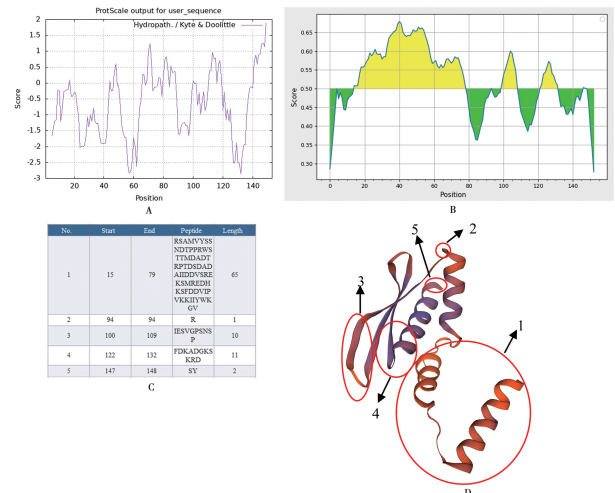
2.5 多克隆抗体的制备及效价测定 随机选取 6 只 4 周龄昆明鼠,对照组(腹腔注射 PBS 缓冲液)3 只,实验组(腹腔注射纯化后的重组蛋白)3 只,首次注射时采用 PBS 缓冲液或蛋白+弗氏完全佐剂,隔周用 PBS

缓冲液或蛋白+弗氏不完全佐剂进行加强免疫。免疫结束后采血,分离血清,采用 ELISA 检测抗体效价。重组蛋白包被浓度为 10 μ g/mL(每孔 100 μ L),抗血清作系列倍比稀释,二抗按说明书稀释,加入显色剂显色后用酶标仪测各孔 A₄₅₀ 值。

结果

1 猴痘 F3L 基因的生物信息学分析

在 NCBI 中检索 Monkeypox virus (MPXV_USA_2022_MA001),从中获取猴痘 F3L 基因序列,并在 ExPASy 中对其进行核苷酸序列分析。结果显示,F3L 的疏水性评分小于 0,具有多个亲水位点,有利于蛋白的表达和纯化(图 1A)。UniPort (Universal Protein)分析该蛋白不是跨膜蛋白,有利于 F3L 的重组表达和纯化。在 IEDB(The Immol/Lune Epitope Database)中根据其氨基酸序列进行抗原性分析,使用阈值 0.50(对应于 75%的特异性截止值),结果显示猴痘 F3L 蛋白具有较长的抗原表位长度和抗原表位数量(图 1B),在 15 到 79 个氨基酸位置上存在最长的抗原表位,其他的抗原表位长度较短(图 1C),并且在蛋白质三级结构的抗原决定簇排列相对紧密(图 1D),有利于多克隆抗体的制备。



A MPXV-F3L 蛋白疏水性分析 B MPXV-F3L 蛋白抗原表位预测图 C MPXV-F3L 蛋白抗原表位预测表 D MPXV-F3L 蛋白三维结构预测及抗原表位标示

图 1 猴痘 F3L 基因的生物信息学分析

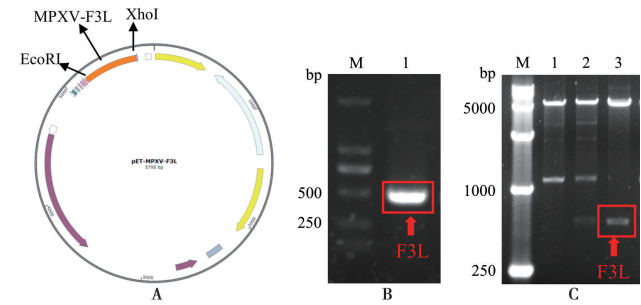
A Hydropobicity analysis of MPXV-F3L protein B Mapof MPXV-F3L protein antigenic epitope prediction C Tableof MPXV-F3L protein antigenic epitope prediction D Three-dimensional structure prediction and antigenic epitope labeling of MPXV-F3L protein

Fig. 1 Bioinformatics analysis of the MPXV-F3L

2 重组质粒 pET-28a-MPXV-F3L 的构建与鉴定

使用 EcoR I 与 Xho I 限制性核酸内切酶分别对 pET-28a 空载质粒和猴痘 F3L 基因扩增产物双酶切连接,获得重组质粒 pET-28a-MPXV-F3L(图 2A),转

化至 *E. coli* DH5 α 后提取质粒进行 PCR 鉴定, 结果如图 2B, 扩增目的片段约 500 bp, 与预期一致; 重组质粒经 EcoR I/Xho I 双酶切, 得到 5 000 bp 左右的空载片段和 500 bp 左右的 F3L 基因片段(图 2C)。重组质粒构建正确。



A pET-28a-MPXV-F3L 质粒图谱 B 重组质粒 pET-28a-MPXV-F3L 引物 PCR 鉴定泳道 1: 菌落 PCR 鉴定 MPXV-F3L 目的条带 C 重组质粒 pET-28a-MPXV-F3L 经 EcoR I 和 Xho I 双酶切鉴定泳道 1, 2 EcoR I 和 Xho I 双酶切鉴定 MPXV-A5L(阳性对照) 3 EcoR I 和 Xho I 双酶切鉴定 MPXV-F3L

图 2 重组质粒的鉴定

Construction of recombinant pET-MPXV-F3L B PCR characterization of recombinant plasmid pET-28a-MPXV-F3L M Trans 2K DNA Marker(100-2000bp) 1 PCR product of MPXV-F3L CI-identification of recombinant plasmid pET-28a-MPXV-F3L by double enzyme digestion M Trans 15K DNA Marker(250-15000bp) 1, 2 MPXV-A5L/EcoR I + Xho I 3 MPXV-F3L/EcoR I + Xho I

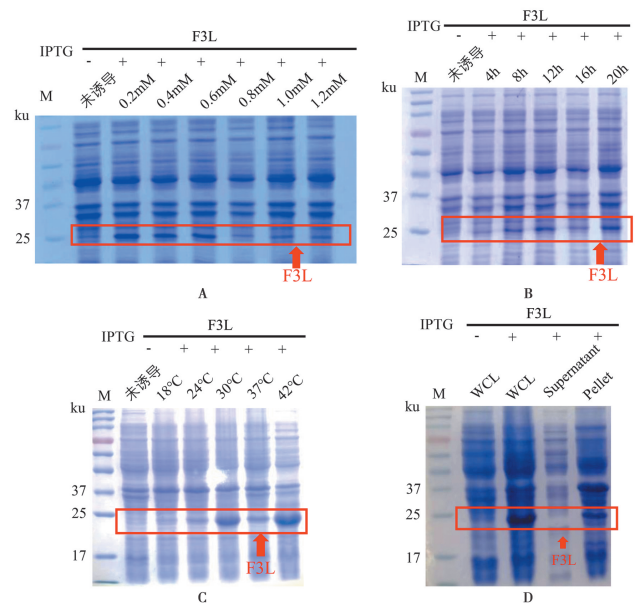
Fig. 2 Identification of recombinant plasmid

3 pET-28a-MPXV-F3L 重组蛋白的表达及诱导条件的优化

将验证正确的质粒转化至 BL21 感受态细胞后用 IPTG 进行诱导, 表达的重组蛋白分子质量为 24.6 ku, 与预期相符。分别对温度(18、24、30、37、42 $^{\circ}$ C)、IPTG 浓度(0.2、0.4、0.6、0.8、1.0、1.2 mmol/L)和时间(4、8、12、16、20 h)进行优化, 结果如图 3A、3B、3C, 确定猴痘 F3L 蛋白的最适表达条件为终浓度 0.6 mmol/L IPTG 42 $^{\circ}$ C 诱导 12 h。采用最佳表达条件, 在锥形瓶中大规模培养重组菌, 经超声破碎制备出未诱导全细菌(WCL)、诱导后全细菌(WCL+IPTG)、诱导后上清液(Supernatant)以及诱导后包涵体(Pellet)蛋白样品, 经 SDS-PAGE 电泳分析, 重组蛋白的表达主要集中在包涵体中(图 3D)。

4 重组蛋白的纯化与鉴定

采用 Pulldown 技术(His-标签-Ni-柱)纯化蛋白, 收集洗脱液进行马斯亮蓝染色。经 SDS-PAGE 分析, 75 mmol/L 咪唑洗脱缓冲液中含有 24.6 ku 的目的蛋白 F3L(图 4A), 纯度为 95.29%。利用 His 标签对纯化蛋白进行 Western blot 鉴定, 该蛋白能被相应抗体识别(图 4B), 即具有反应原性。

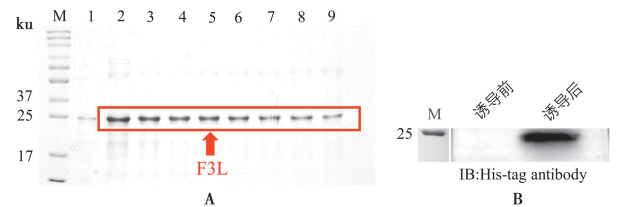


A SDS-PAGE 鉴定 IPTG 浓度变化下重组蛋白 F3L 表达情况 B SDS-PAGE 鉴定诱导时间变化下重组蛋白 F3L 表达情况 C SDS-PAGE 鉴定诱导温度变化下重组蛋白 F3L 表达情况 D F3L 重组蛋白的表达形式鉴定 1 未诱导全菌 2 诱导后全菌 3 诱导后上清液 4 诱导后沉淀

图 3 重组蛋白在大肠埃希菌中的表达

Identification of recombinant protein F3L expression under changes in IPTG concentration by SDS-PAGE M Trans 180ku protein molecular standard marker(8-180ku) B Identification of recombinant protein F3L expression under time change by SDS-PAGE M Trans 180 ku protein molecular standard marker(8-180ku) C Identification of recombinant protein F3L expression under temperature change by SDS-PAGE M Trans 180 ku protein molecular standard marker(8-180ku) D Identification of the expression form of F3L recombinant protein M Trans 180 ku protein molecular standard marker(8-180ku) 1 Uninduced whole bacteria 2 Induced whole bacteria 3 Induced supernatant 4 Induced pellet

Fig. 3 Expressions of recombinant produced in *E. coli*



A SDS-PAGE 鉴定纯化后的 F3L 重组蛋白 1~9 纯化后 F3L 重组蛋白 B Western blot 法鉴定 F3L 重组蛋白

图 4 重组蛋白的纯化

Identification of purified F3L recombinant protein by SDS-PAGE M Trans 180 ku protein molecular standard marker (8-180ku) 1-9 Pre-induction, Purification of the recombinant proteins B Identification of purified F3L recombinant protein by Western blot M Trans 180 ku protein molecular standard marker(8-180ku)

Fig. 4 Purification of the recombinant proteins

5 多克隆抗体的制备与效价检测

以纯化的重组 F3L 蛋白为抗原腹腔注射免疫昆明鼠(图 5), 免疫结束后采血, 分离血清, ELISA 检测抗体效价为 1 : 102 400 (lg Antibody titer \approx 4.709) (图 6)。

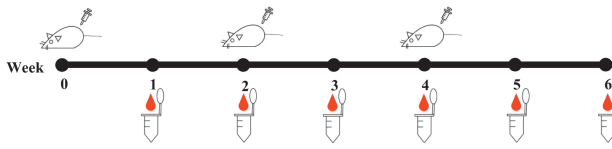


图5 小鼠免疫时间表示意图
Fig.5 Schematic diagram of mice experiment schedule

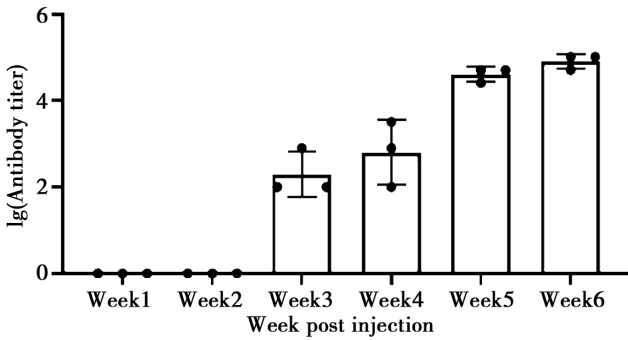


图6 F3L蛋白免疫小鼠血清抗体滴度
Fig.6 Detection of anti-F3L antibody titer in serum of mice

讨论

目前对于猴痘病毒感染的诊断主要依靠 RT-PCR 方法^[14]。对于猴痘的防治,全球只有一个获批的猴痘疫苗^[8],且尚无特效治疗药物^[9],猴痘诊断试剂稀缺。随着猴痘在全球的传播,2022 年全球范围内的感染猴痘病毒人数持续上涨,并且由于其传播范围广、传播速度快而倍受关注^[15]。

猴痘病毒蛋白是猴痘病毒生物学特性及功能的主要执行者,目前的研究主要集中在其他正痘病毒,鲜有关于猴痘病毒蛋白的研究报道^[16],对猴痘蛋白的免疫原性研究也处于起步阶段。从猴痘病毒的传播情况看,对猴痘蛋白的研究迫在眉睫。本研究克隆了猴痘病毒 F3L 基因,其大小为 471 bp,构建的重组质粒 pET-28a-MPXV-F3L 转化入 *E. coli* BL21 感受态细胞后经 0.2 mmol/L IPTG 于 42 °C 诱导 12 h,高表达分子质量约为 24.6 ku 的重组蛋白。该蛋白主要以包涵体的形式存在,经过包涵体洗涤后利用咪唑浓度梯度洗脱镍柱的方法获得纯度为 95.29% 的重组 F3L 蛋白。用 His 标签对纯化蛋白进行 Western blot 检测,显示其具有反应原性。

管茜茜等^[17]利用猴痘病毒 A29 蛋白的第 17-49 多肽免疫小鼠,经两次免疫后,血清抗体滴度达 1 : 50 000。本研究用纯化的猴痘 F3L 蛋白全长免疫小鼠 3 次,血清抗体滴度达 1 : 102 400,表明纯化的重组猴痘 F3L 蛋白具很强的免疫原性。

pET-28a-MPXV-F3L 重组蛋白通过镍柱纯化后,去除了可能存在的杂蛋白,获得的目的蛋白纯度高,且仍具有抗原性,可作为亚单位疫苗的候选抗原^[18],为

猴痘抗体检测试剂盒的研制奠定了基础。

【参考文献】

- [1] Adler H, Gould S, Hine P, et al. Clinical features and management of human monkeypox; a retrospective observational study in the UK[J]. Lancet Infect Dis, 2022, 22(8): 1153-1162.
- [2] Rizk JG, Lippi G, Henry BM, et al. Prevention and treatment of monkeypox[J]. Drugs, 2022, 82(9): 957-963.
- [3] Huang Y, Mu L, Wang W. Monkeypox; epidemiology, pathogenesis, treatment and prevention[J]. Signal Transduct Target Ther, 2022, 7(1): 373.
- [4] Lum FM, Torres-Ruesta A, Tay MZ, et al. Monkeypox; disease epidemiology, host immunity and clinical interventions[J]. Nat Rev Immunol, 2022, 22(10): 597-613.
- [5] Patrono LV, Pleh K, Samuni L, et al. Monkeypox virus emergence in wild chimpanzees reveals distinct clinical outcomes and viral diversity[J]. Nat Microbiol, 2020, 5(7): 955-965.
- [6] Thakur M, Das P, Sobti R C, et al. Human monkeypox; epidemiology, transmission, pathogenesis, immunology, diagnosis and therapeutics[J]. Mol Cell Biochem, 2023, 478(9): 2097-2110.
- [7] Huang Y, Mu L, Wang W. Monkeypox; epidemiology, pathogenesis, treatment and prevention[J]. Signal Transduct Target Ther, 2022, 7(1): 373.
- [8] Thornhill JP, Barkati S, Walmsley S, et al. Monkeypox virus infection in humans across 16 Countries - April-June 2022[J]. N Engl J Med, 2022, 387(8): 679-691.
- [9] Kumar N, Acharya A, Gendelman HE, et al. The 2022 outbreak and the pathobiology of the monkeypox virus[J]. J Autoimmun, 2022, 131: 102855.
- [10] Adler H, Gould S, Hine P, et al. Clinical features and management of human monkeypox; a retrospective observational study in the UK[J]. Lancet Infect Dis, 2022, 22(8): 1153-1162.
- [11] Isidro J, Borges V, Pinto M, et al. Phylogenomic characterization and signs of microevolution in the 2022 multi-country outbreak of monkeypox virus[J]. Nat Med, 2022, 28(8): 1569-1572.
- [12] Norz D, Tang HT, Emmerich P, et al. Rapid adaptation of established high-throughput molecular testing infrastructure for monkeypox virus detection[J]. Emerg Infect Dis, 2022, 28(9): 1765-1769.
- [13] Brandt TA, Jacobs BL. Both carboxy- and amino-terminal domains of the vaccinia virus interferon resistance gene, E3L, are required for pathogenesis in a mouse model[J]. J Virol, 2001, 75(2): 850-856.
- [14] Martins-Filho PR, Menezes DF, Brito BG, et al. Differences in cycle threshold values in RT-PCR tests between children and adults with monkeypox; Results from a community-based cross-sectional study[J]. Travel Med Infect Dis, 2023, 52: 102560.
- [15] Al-Ghuri S, Namuq Z. A review of the recent monkeypox outbreak in 2022[J]. Cureus, 2022, 14(8): e27880.
- [16] Al-Kuraishy HM, Al-Gareeb AI, Hetta HF, et al. Monkeypox epidemic at the door; should we remain idly by or prepare strongly? [J]. AMB Express, 2023, 13(1): 5.
- [17] 管茜茜. 猴痘病毒特异性单克隆抗体的制备与鉴定[D]. 北京: 中国疾病预防控制中心, 2017.
- [18] Fang Z, Monteiro VS, Renauer PA, et al. Polyvalent mRNA vaccination elicited potent immune response to monkeypox virus surface antigens[J]. Cell Res, 2023, 33(5): 407-410.

【收稿日期】 2023-05-19 【修回日期】 2023-08-08