

密级：

论文编号：



中国农业科学院

学位论文

猪急性腹泻综合征冠状病毒 S 蛋白单克隆抗体的制备及间接 ELISA 检测方法的建立

硕士研究生：杨小曼

学 号：82101215644

指 导 教 师：时洪艳 副研究员

申请学位类别：兽医硕士

领 域：兽医

培 养 单 位：哈尔滨兽医研究所
研究生院

2024 年 6 月

Secrecy:

No.

Chinese Academy of Agricultural Sciences Thesis

**Preparation of Monoclonal Antibodies Against S Protein
and Establishment of an Indirect ELISA Detection
Method of Swine Acute Diarrhea Syndrome Coronavirus**

Candidate: YANG Xiaoman

Student ID: 82101215644

Supervisor: Associate Prof. SHI Hongyan

**Degree Type: Master of Professional Degree in
Veterinary Medicine**

Major: Veterinary Medicine

**Institution: Harbin Veterinary Research Institute
Graduate School**

June 2024

摘 要

猪急性腹泻综合征冠状病毒 (Swine acute diarrhea syndrome coronavirus, SADS-CoV) 是一种新发的猪肠道冠状病毒, 于 2017 年 1 月在华南地区首次被报道。近年来在我国华南地区猪场陆续有关于 SADS-CoV 感染的报道, 发病仔猪死亡率高, 且多伴有病毒 (如猪流行性腹泻病毒) 的混合感染, 缺乏有效的疫苗和鉴别诊断方法, 目前针对 SADS-CoV 开发的检测方法多以核酸检测为主, 缺少稳定可靠检测特异性抗体的血清学方法。因此开展相关血清学诊断技术研究十分必要, 为未来长期进行流行病学调查和疫苗体液免疫水平评价提供技术储备。

S 蛋白是冠状病毒入侵宿主细胞的关键蛋白, 主要以三聚体的形式存在, 由受体结合亚基 S1 和膜融合亚基 S2 组成。S 蛋白存在受体结合区域, 也是主要的是中和抗体表位富集区, 常作为抗体监测和疫苗研发的重要靶蛋白。本研究利用 HEK293F 悬浮细胞真核蛋白表达系统表达纯化了 SADS-CoV S1 蛋白和 S 三聚体 (S-trimer) 蛋白, 并通过蔗糖梯度离心成功纯化了 SADS-CoV 病毒粒子。以纯化的 S1 蛋白、S-trimer 蛋白和 SADS-CoV 病毒粒子作为抗原分别免疫 BALB/c 小鼠, 通过间接 ELISA 方法和血清中和试验比较其免疫效果, 发现 S1 蛋白免疫组和 S-trimer 蛋白免疫组均能产生较高血清效价和中和抗体水平, 具有较好的反应原性和免疫原性。

随后, 选取 S-trimer 蛋白免疫组的小鼠进行细胞融合, 成功获得了 3 株稳定分泌抗 SADS-CoV S 蛋白单克隆抗体的杂交瘤细胞株, 分别命名为 4F5、6E9 和 8D6。对获得的 3 株杂交瘤细胞制备腹水抗体并纯化。抗体亚类试剂盒鉴定结果表明 mAb 6E9 重链为 IgG1, mAbs 4F5 与 8D6 重链为 IgG2b, 3 株抗体的轻链均为 Kappa 链。经 Western Blot 检测, 3 株抗体均能够与转染细胞制备的 S-trimer 蛋白和 S1 蛋白样品发生特异性反应, 具有良好的反应活性。利用间接免疫荧光 (IFA) 检测单克隆抗体的特异性, 结果发现 3 株单克隆抗体与感染 SADS-CoV 的 LLC-PK1 细胞发生特异性反应, 而与感染 PEDV、PDCoV 和 TGEV 的 LLC-PK1 细胞均不反应。随后利用 mAbs 4F5、6E9 和 8D6 进行免疫组织化学染色分析, 发现 mAbs 4F5、6E9 和 8D6 均能与感染 SADS-CoV 的回肠组织呈阳性反应, 表明 3 种抗体均可用于免疫组织化学染色实验。

进一步对本研究制备的 3 株单克隆抗体所识别的抗原表位进行鉴定, 将 S1 蛋白进行截短表达, 并通过 Western Blot 实验逐步对截短片段进行鉴定, 最终鉴定出 4F5 识别的 S1 抗原表位为 $^{311}\text{NPDQRDF}^{317}$, 8D6 识别的 S1 抗原表位为 $^{311}\text{NPDQRD}^{316}$, 6E9 识别的 S1 抗原表位为 $^{492}\text{ARFVDRL}^{498}$ 。利用间接 ELISA 方法进行抗体亲和力测定比较三种抗体的相对亲和力, 结果显示 3 株单克隆抗体针对抗原的亲和力排序为 8D6 > 6E9 > 4F5。随后通过对 GenBank 数据库中不同 SADS-CoV 参考株 S 蛋白的氨基酸序列进行对比, 结果发现 mAbs 4F5、6E9 和 8D6 的抗原表位序列在不同 SADS-CoV 分离株中均高度保守。

此外, 本研究以真核表达纯化的 SADS-CoV S1 蛋白作为包被抗原, 通过优化反应条件建立了间接 ELISA 检测方法。经检测 42 份猪阴性血清样本确定 $\text{OD}_{450\text{nm}} \leq 0.406$ 为阴性临界值, 检测 SADS-CoV 免疫猪血清抗体稀释至 1:3200 时仍判定为阳性, 表明该方法具有较高的敏感性; 该方法与其它猪肠道冠状病毒的阳性血清均无交叉反应, 表明该方法特异性良好; 批内和批间试验变异系数均小于 10%, 表明该方法具有良好的重复性和稳定性; 该方法与间接免疫荧光相比较符合

率为92.0%。以上结果表明,本研究建立的间接ELISA检测方法能灵敏特异地检测猪群针对SADS-CoV S1产生的特异性抗体。

综上所述,本研究纯化制备了真核S1重组蛋白、真核S-trimer重组蛋白和SADS-CoV病毒粒子,并在小鼠模型中评价了这3种抗原间的免疫原性差异,证明了S1蛋白和S-trimer蛋白均能诱导产生高水平的中和抗体,为SADS-CoV亚单位疫苗的研发提供数据参考。成功制备了3株特异性识别SADS-CoV S蛋白的单克隆抗体,并鉴定了3株抗体识别的抗原表位,为后期开展SADS-CoV S蛋白生物学功能研究奠定了物质基础。以真核表达的SADS-CoV S1蛋白为包被抗原,建立针对SADS-CoV S1蛋白抗体的间接ELISA检测方法,可用于SADS-CoV流行病学调查以及疫苗的体液免疫效果评价。

关键词: 猪急性腹泻综合征冠状病毒, 刺突蛋白, ELISA, 单克隆抗体, 抗原表位

Abstract

Swine acute diarrhea syndrome coronavirus (SADS-CoV), an emerging porcine enteric coronavirus, which was first reported in January 2017 in southern China. In recent years, positive cases have been reported one after another in South China pig farms. SADS-CoV infection causes high mortality rate in piglets, and usually combines with other virus infection, such as porcine epidemic diarrhea virus. At present, the methods for SADS-CoV detection are mainly focus on virus nucleic acid, lacking stable and reliable serological method for specific antibody detection. Therefore, it is necessary to carry out research on relevant serological diagnosis techniques, which provide technical support for long-term epidemiological investigation and evaluation of humoral immunity level of vaccines.

Spike protein is a key protein invading host cells in coronavirus, which mainly exists in the form of trimer and consists of receptor binding subunit S1 and membrane fusion subunit S2. The S protein containing the receptor binding region (also known as a main neutralizing epitope enrichment region is often used as an important target protein for antibody monitoring and vaccine development. In this study, SADS-CoV S1 protein and the S-trimer protein were successfully expressed using the eukaryotic expression system in HEK293F suspension cells, and SADS-CoV virus particles purified by sucrose gradient centrifugation. BALB/c mice were immunized with purified S1 protein, S-trimer protein and SADS-CoV virus particles. After immunization, the immune effects of S1 protein, S-trimer protein and purified SADS-CoV virus particles were compared by indirect ELISA and serum neutralization test. It was found that both S1 protein and S-trimer protein immune group could produce high serum titer and neutralizing antibody level, which had good immunogenicity.

Subsequently, mice with high serum titer and neutralizing antibody level in S-trimer protein immunization group were selected for cell fusion, and hybridoma cells were subcloned by indirect ELISA and limited dilution method. Three hybridoma cell lines stably secreting monoclonal antibodies against SADS-CoV S protein were successfully obtained, named 4F5, 6E9 and 8D6, respectively. Ascites antibodies were prepared against three hybridoma cells and purified. The results of antibody subclass kit showed that the heavy chain of mAb 6E9 was IgG1, the heavy chains of mAbs 4F5 and 8D6 were IgG2b, and the light chains of the three strains of antibodies were Kappa chains. Western Blot showed that all three antibodies could react specifically with S-trimer protein and S1 protein samples prepared by transfected cells, and they had good reactivity. The specificity of monoclonal antibodies was detected by indirect immunofluorescence assay (IFA). The results showed that three monoclonal antibodies only reacted specifically with LLC-PK1 cells infected with SADS-CoV, but did not react with LLC-PK1 cells infected with PEDV, PDCoV and TGEV. Immunohistochemical staining analysis showed that mAbs 4F5, 6E9 and 8D6 reacted positively with ileum tissue infected with SADS-CoV.

Furthermore, the epitopes recognized by the three monoclonal antibodies prepared in this study were identified. Construction and expression of truncated S1 protein by bioinformatics software and eukaryotic expression system. The epitopes of the monoclonal antibodies were identified by Western Blot, and the

epitopes of mAb 6E9, 4F5 and 8D6 were ⁴⁹²ARFVDRL⁴⁹⁸, ³¹¹NPDQRDF³¹⁷ and ³¹¹NPDQRD³¹⁶, respectively. Indirect ELISA was used to determine the affinity of antibodies. The results showed that the affinity of the three monoclonal antibodies for antigens was 8D6 > 6E9 > 4F5. Subsequently, by comparing the amino acid sequences of S proteins of different SADS-CoV reference strains in GenBank database, it was found that the epitope sequences of mAbs 4F5, 6E9 and 8D6 were highly conserved in among different SADS-CoV isolates.

In addition, in this study, an indirect ELISA assay was established by optimizing the reaction conditions using eukaryotically expressed purified SADS-CoV S1 protein as the encapsulated antigen. After testing 42 porcine negative serum samples, it was determined that $OD_{450nm} \leq 0.406$ was the negative critical value. The ELISA results remained positive after a 3200-fold dilution of SADS-CoV positive sera,, indicating that the method has high sensitivity. The method does not cross-react with other porcine enteric coronavirus serue, which indicated that the specificity of this method was good. The coefficient of variation of intra-batch and inter-batch tests is less than 10%, which shows that this method has good repeatability and stability. Compared with IFA, the coincidence rate of this method is 92.0%. The above results show that the indirect ELISA method established in this study can sensitively and specifically detect the specific antibodies produced by pigs against SADS-CoV S1 protein.

In summary, in this study, S1 protein, S-trimer protein, and SADS-CoV viral particles were prepared, and the immunogenicity differences among these three antigens were evaluated in mouse models. This study demonstrated that S1 and S-trimer proteins induced high levels of neutralizing antibodies, providing data for the development of a SADS-CoV subunit vaccine. Three monoclonal antibodies specifically recognizing SADS-CoV S protein were successfully prepared, and the epitopes recognized by the three antibodies were identified. This result lays a material foundation for the study of the biological functions of SADS-CoV S proteins. In this study, we developed an indirect ELISA for the detection of antibodies against SADS-CoV S1 protein. The method can be used for epidemiological investigations of SADS-CoV as well as for evaluating the efficacy of humoral immunization with the vaccine.

Keywords: Swine acute diarrhea syndrome coronavirus, Spike protein, ELISA, Monoclonal antibodies, Antigenic epitope

目 录

第一章 绪论.....	1
1.1 猪急性腹泻综合征冠状病毒	1
1.1.1 SADS-CoV 概述.....	1
1.1.2 SADS-CoV 的形态结构.....	2
1.1.3 SADS-CoV 基因组结构及功能.....	2
1.1.4 SADS-CoV 的检测方法.....	3
1.2 单克隆抗体的研究进展.....	4
1.2.1 单克隆抗体的发展.....	4
1.2.2 单克隆抗体的应用.....	6
1.3 研究目的及意义.....	6
第二章 SADS-CoV S 蛋白单克隆抗体的制备及表位鉴定.....	7
2.1 实验材料.....	7
2.1.1 毒株、质粒、细胞系和实验动物.....	7
2.1.2 主要试剂耗材.....	7
2.1.3 相关溶液配制.....	8
2.1.4 主要实验仪器.....	9
2.2 实验方法.....	9
2.2.1 S1 蛋白和 S 三聚体(S-trimer)蛋白重组质粒的构建.....	9
2.2.2 S1 蛋白和 S 三聚体(S-trimer)蛋白的真核表达、纯化及鉴定.....	11
2.2.3 SADS-CoV 的增殖与病毒粒子纯化	12
2.2.4 小鼠免疫.....	12
2.2.5 血清抗体效价检测.....	13
2.2.6 血清中和活性测定.....	13
2.2.7 脾细胞的制备.....	13
2.2.8 细胞融合	14
2.2.9 阳性杂交瘤细胞的筛选与亚克隆.....	14
2.2.10 单克隆抗体间接免疫荧光鉴定.....	14
2.2.11 腹水抗体的制备和纯化.....	14
2.2.12 单克隆抗体相对亲和力和中和活性测定	15
2.2.13 单克隆抗体的生物学特性鉴定.....	15
2.2.14 单克隆抗体表位的鉴定.....	16
2.2.15 抗原表位的保守性分析.....	18
2.2.16 抗原表位定位分析.....	19

2.2.17 数据分析.....	19
2.3 实验结果.....	19
2.3.1 S1 蛋白和 S 三聚体(S-trimer)蛋白重组质粒的构建.....	19
2.3.2 S1 蛋白和 S 三聚体(S-trimer)蛋白纯化与鉴定.....	20
2.3.3 SADS-CoV 病毒粒子形态学鉴定.....	21
2.3.4 血清抗体效价检测.....	22
2.3.5 血清中和抗体检测.....	23
2.3.6 杂交瘤细胞筛选结果.....	24
2.3.7 单克隆抗体间接免疫荧光鉴定结果.....	25
2.3.8 单克隆抗体的纯化结果.....	26
2.3.9 单克隆抗体的相对亲和力测定.....	26
2.3.10 单克隆抗体中和活性检测.....	27
2.3.11 单克隆抗体亚型鉴定结果.....	27
2.3.12 Western Blot 鉴定抗体反应原性.....	28
2.3.13 间接免疫荧光鉴定抗体特异性.....	29
2.3.14 免疫组织化学染色.....	29
2.3.15 S1 蛋白的抗原表位短肽设计.....	30
2.3.16 单克隆抗体表位的鉴定.....	31
2.3.17 抗原表位的保守性分析.....	34
2.3.18 抗原表位的定位分析.....	35
2.4 讨论.....	36
2.5 小结.....	38
第三章 SADS-CoV S1 蛋白间接 ELISA 方法的建立.....	39
3.1 实验材料.....	39
3.1.1 血清.....	39
3.1.2 主要试剂耗材.....	39
3.1.3 主要实验仪器.....	39
3.2 实验方法.....	39
3.2.1 间接 ELISA 方法反应条件的优化.....	39
3.2.2 间接 ELISA 方法判定标准的确定.....	40
3.2.3 特异性试验.....	41
3.2.4 敏感性试验.....	41
3.2.5 重复性试验.....	41
3.2.6 临床样品的检测.....	41
3.3 实验结果.....	41
3.3.1 间接 ELISA 方法反应条件的优化.....	41
3.3.2 间接 ELISA 方法判定标准的确定.....	43
3.3.3 特异性试验结果.....	43

3.3.4 敏感性试验.....	44
3.3.5 重复性试验.....	44
3.3.6 临床样品的检测.....	45
3.4 讨论.....	45
3.5 小结.....	46
第四章 结论.....	47
参考文献.....	48

主要符号对照表

英文缩写	英文全称	中文名称
aa	Amino acid	氨基酸
bp	Base pair	碱基对
EC50	Concentration for 50% of maximal effect	半数最大效用浓度
HT	Hypoxanthine thymidine	次黄嘌呤、胸腺嘧啶
HAT	Hypoxanthine aminopterin thymidine	次黄嘌呤、氨基蝶呤、胸腺嘧啶
HRP	Horseradish peroxidase	辣根过氧化物酶
IgG	Immunoglobulin G	免疫球蛋白 G
kDa	Kilodalton	千道尔顿
mAb	Monoclonal antibody	单克隆抗体

第一章 绪论

1.1 猪急性腹泻综合征冠状病毒

1.1.1 SADS-CoV 概述

猪急性腹泻综合征冠状病毒 (Swine acute diarrhea syndrome coronavirus, SADS-CoV), 又称猪肠道甲型冠状病毒 (Porcine enteric alphacoronavirus, PEAV), 于 2017 年在中国广东省首次被发现, 通过对其进行全基因组测序和序列遗传进化分析发现 SADS-CoV 与蝙蝠源冠状病毒 HKU2-CoV 的全基因组序列同源性为 95%, 据此推测二者具有相同的进化祖先 (PAN et al., 2017)。SADS-CoV 首次暴发即导致广东省四个猪场猪群出现腹泻疫情, 疫病造成约 24600 头仔猪死亡, 产生了严重的经济损失。流行病学监测发现该病原在 2018 年福建地区, 2019 年广东地区及 2021 年广西地区均有阳性报道, 最新的研究报道, 2023 年 6 月 SADS-CoV 再次在河南省南阳市出现, 造成一个集约化猪场 400 多头仔猪死亡 (GUO et al., 2021; LI et al., 2018; SUN et al., 2022b; ZHANG et al., 2024; ZHOU et al., 2019)。SADS-CoV 能够感染各个年龄阶段的猪, 其中 5 日龄及以下仔猪死亡率高达 90%, 临床症状与其它已知的猪肠道冠状病毒引起的症状相似, 包括严重腹泻、急性呕吐和脱水, 导致 5 日龄以内的新生仔猪在发病后 2-6 天因体重迅速下降而死亡, 母猪感染后临床症状轻微, 大多数母猪在 2 天内恢复 (DONG et al., 2015; SHI et al., 2017)。感染 SADS-CoV 后, 病变主要发生在小肠, 其中空肠和回肠最为明显, 病毒感染导致小肠壁损伤变薄, 肠腔内充满黄色的水状粪便, 空肠和回肠的肠绒毛萎缩、变短 (PAN et al., 2017)。

目前相关研究表明 SADS-CoV 并不利用已知的冠状病毒受体进入细胞, 该病毒的入侵受体尚不清楚, 但有研究证明, SADS-CoV 具有广泛的细胞嗜性, 能够感染来自不同物种的细胞系 (WANG et al., 2023b; YANG et al., 2019)。外源胰蛋白酶的参与有助于 SADS-CoV 在上述细胞中的繁殖, 但不是必需的。此外, 通过口服或腹腔注射途径对 C57BL/6J 小鼠接种该病毒后, 这些小鼠只表现出亚临床感染, SADS-CoV 在小鼠脾脏中可以长时间感染和复制, 进一步表明 SADS-CoV 具有跨物种传播的可能以及啮齿类动物作为野外中间宿主的潜在作用 (YANG et al., 2019)。因此充分了解 SADS-CoV 的生物学特性, 加强对其流行病学监测及跨物种传播机制研究具有重要科学意义。

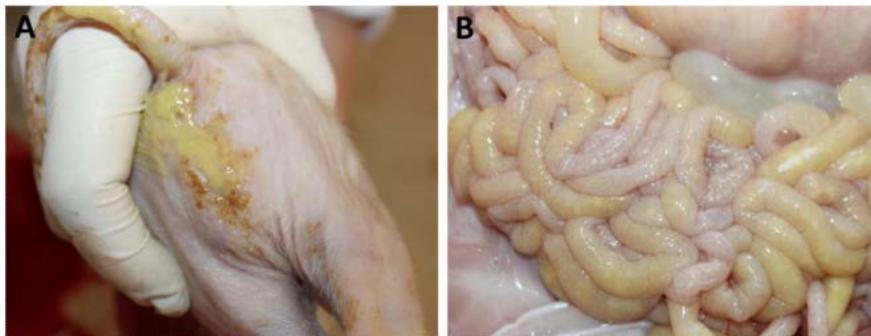


图 1-1 SADS-CoV 感染的临床症状 (PAN et al., 2017)

Fig.1-1 Clinical symptoms SADS-CoV infection

1.1.2 SADS-CoV 的形态结构

SADS-CoV 是一种有囊膜的单股正链 RNA 病毒，属于套式病毒目 (*Nidovirales*)，冠状病毒科 (*Coronaviridae*)， α -冠状病毒属 (*Alphacoronavirus*)，具有典型的冠状病毒结构，电镜下可见病毒粒子表面具有棘突状结构，病毒颗粒直径约为 100~120 nm (PAN et al., 2017)。

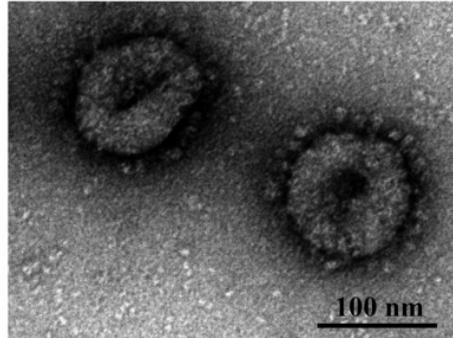


图 1-2 SADS-CoV 的形态结构 (PAN et al., 2017)

Fig.1-2 Morphological structure of SADS-CoV

1.1.3 SADS-CoV 基因组结构及功能

SADS-CoV 基因组全长约为 27 kb (不包括 poly A 尾巴)，基因顺序为 5'-UTR-ORF1a/1b (ORF1ab)-S-ORF3-E-M-N-NS7a/NS7b-UTR-3' (GONG et al., 2017)。该病毒编码四个结构蛋白，包括刺突蛋白 (S)、包膜蛋白 (E)、膜蛋白 (M) 和核衣壳蛋白 (N) (PAN et al., 2017; WANG et al., 2019)。在冠状病毒中，S 蛋白是参与病毒入侵宿主细胞的关键蛋白，介导病毒与细胞的膜融合，同时也是诱导宿主产生中和抗体的主要蛋白；E 蛋白可能是病毒包膜开始形成的支点，主要参与病毒组装；M 蛋白是重要的包膜蛋白，将必需的病毒成分整合到新的病毒体中；N 蛋白是最丰富的结构蛋白负责与核酸形成核衣壳，同时也可与其它结构蛋白相互作用，在病毒颗粒组装过程中起关键作用 (BRIAN et al., 2005; ZHANG et al., 2022a)。

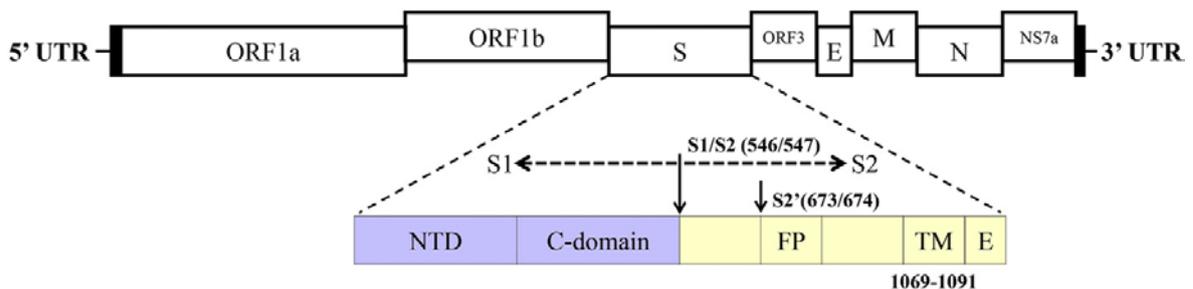


图 1-3 SADS-CoV 基因组结构 (FU et al., 2018)

Fig.1-3 SADS-CoV genome structure

SADS-CoV S 蛋白天然构象为三聚体结构，蛋白单体由 1130 个氨基酸组成，大小约为 170 kDa，在冠状病毒的毒力、细胞融合和组织嗜性等方面起着关键作用。S 蛋白整体可分为 S1 亚基和 S2 亚基，其中 S1 亚基含有受体结合域 (RBD)，能够与宿主细胞表面的受体结合进行病毒附着；S2 亚基介导病毒包膜和宿主细胞膜融合，使病毒基因组进入宿主细胞 (BOSCH et al., 2003;

HULSWIT et al., 2016; LI, 2016; YU et al., 2020)。Guan 等通过对 SADS-CoV S 蛋白结构的比较分析,发现 SADS-CoV S 蛋白各亚基的堆积相较于其它冠状病毒更加紧凑,且 S 蛋白同一亚基的 N 端结构域与 C 端结构域存在相互作用等特点,为基于 SADS-CoV S 蛋白的疫苗研发提供了理论基础(GUAN et al., 2020)。Yu 等通过原子分辨率水平的冷冻电镜结构测定,系统的比较了 SADS-CoV 与其它冠状病毒 S 蛋白的各个结构域,发现 SADS-CoV S 蛋白 N 端结构域(NTD)和 C 端结构域(CTD)的结构特征与其它冠状病毒属之间有密切的关系,为解析冠状病毒的进化和跨物种传播提供了重要线索(YU et al., 2020)。

SADS-CoV E 蛋白在四种结构蛋白中最小,为一种 8.7 kDa 大小的跨膜蛋白,是病毒包膜的重要组成部分,在病毒复制过程中可以形成离子通道增加运输囊泡中的 pH 值,并在病毒的包装和出芽过程发挥关键作用(FU et al., 2018; WAISNER et al., 2023)。E 蛋白氨基酸序列在不同的冠状病毒之间存在很大差异,但其预测结构高度保守,包含疏水结构域和跨膜 α 螺旋结构域(ARBELY et al., 2004; RAAMSMAN et al., 2000; TORRES et al., 2007)。有研究发现 E 蛋白参与病毒生命周期的多个过程,并与其致病过程相关,缺失 E 蛋白将导致病毒致病力大大降低(CORSE et al., 2000; MAEDA et al., 2001; NGUYEN et al., 1997; RUCH et al., 2012)。但目前关于 SADS-CoV E 蛋白的相关研究较少, E 蛋白在 SADS-CoV 复制和释放等过程发挥的具体功能尚不清楚,仍有待进一步研究。

SADS-CoV M 蛋白是由 228 个氨基酸编码组成的一种 III 型跨膜糖蛋白,大小约为 26 kDa。M 蛋白主要定位于高尔基体上,其保守的结构域对于病毒的组装是至关重要的,可以通过 M 与 N、M 与 M 以及 M 与 S 之间的相互作用参与病毒的组装和释放(ESCORS et al., 2001; NEUMAN et al., 2011)。有研究发现 M 蛋白在病毒增殖和逃避宿主的先天性免疫应答中也发挥着重要的作用(DE HAAN et al., 2000; NEUMAN et al., 2011; YANG et al., 2013)。

SADS-CoV N 蛋白是由 375 个氨基酸编码的大小约为 42 kDa 的一种多功能 RNA 结合蛋白,序列保守程度高,在病毒复制过程中发挥重要作用。冠状病毒的 N 蛋白具有 3 个保守的结构域,分别为 N 端结构域和 C 端结构域,以及一个 RNA 结合结构域(KANG et al., 2020; YE et al., 2020)。N 蛋白 CTD 结构域是一个疏水的、富含螺旋的区域,与 N 蛋白二聚体和同型寡聚体的形成有关(YE et al., 2020)。N 蛋白具有 RNA 结合能力,可以与病毒基因组 RNA 结合并组装成一个核糖核蛋白复合物,也可通过与非结构蛋白 NSP3 结合招募至复制-转录复合物,调节病毒的复制和转录以及被感染细胞的代谢(CONG et al., 2020)。

1.1.4 SADS-CoV 的检测方法

目前我国的猪肠道冠状病毒流行情况复杂多变,病原不断发生重组和变异,SADS-CoV 的致病机制和流行情况尚未探明,缺乏有效的治疗手段及防控措施。SADS-CoV 一种新发猪肠道冠状病毒,自 2017 年在华南地区首次暴发后给当地养猪业带来了较大的经济损失,之后数年也陆续有阳性报道。表明针对该病毒仍需长期开展病原流行病学监测工作,以期探明病原传播路径,在未来疫病暴发早期及时发现感染源,有效防控疫情的进一步扩散。

高效可靠的检测方法可以为病原流行监测提供强有力的技术手段。由于猪肠道冠状病毒引起的临床症状和病理变化与其他疫病非常相似,难以通过临床病理变化完成鉴别诊断,需借助实验

室检测技术协助诊断。目前,针对猪肠道冠状病毒的实验室检测方法主要包括核酸检测技术和免疫学检测技术。在核酸检测技术方面,由于冠状病毒的 N 基因和 M 基因的序列相对保守,常被作为基因检测靶标。Zhou 等根据 SADS-CoV 病毒基因组 N 基因内的保守区域,设计并合成了特异性引物和探针,建立了一种基于 Taqman 的实时 RT-PCR 检测方法,灵敏度是常规 PCR 的 10 倍,并通过该方法对来自广东省 45 个猪场的 236 份腹泻样本进行回顾性调查,发现 SADS-CoV 至少从 2016 年 8 月就开始在中国出现了,同时发现 SADS-CoV 和 PEDV 混合感染的比例较高(17.65%) (ZHOU et al., 2018)。韩郁茹等也根据 SADS-CoV N 基因片段建立了可视化的 RT-LAMP 检测方法,为临床 SADS-CoV 感染的快速诊断提供了检测手段(韩郁茹等, 2021)。张记宇等建立了针对 SADS-CoV N 基因的 SYBR-Green 荧光定量 RT-PCR 检测方法,检测了口服攻毒 SADS-CoV 仔猪的临床样本,发现 SADS-CoV 病毒主要在回肠和空肠组织内定殖(张记宇等, 2021)。Cong 等基于 SADS-CoV M 基因序列设计了探针引物,建立了实时荧光定量 RT-RPA 检测方法,能够在 15min 内检测到 SADS-CoV 的核酸拷贝数,与实时荧光定量 RT-PCR 相较,该方法具有操作简便的特点,为实现临床现地快速检测提供了可能 (CONG et al., 2022)。

免疫学检测技术主要分为抗原检测方法和抗体检测方法,针对猪肠道冠状病毒建立的基于免疫学方法的检测技术已有多种上市出售,包括利用胶体金技术的抗原检测试纸条,基于高质量抗体为材料的夹心 ELISA 抗原检测方法,以及通过包被 N 蛋白或 S 蛋白抗原建立的间接 ELISA 抗体检测方法等。自 SADS-CoV 流行以来,已有许多免疫学检测技术报道。如 Cao 等采用抗 SADS-CoV 的兔多克隆抗体为捕获抗体,以 HRP 标记的抗 N 蛋白单克隆抗体 6E8 为检测抗体,建立了双抗夹心定量 ELISA (DAS-qELISA) 方法,肛门拭子样本检测结果显示 DAS-qELISA 与 RT-PCR 具有较高的一致性,该方法在评估临床样本病毒感染方面具有潜在的应用价值 (CAO et al., 2023)。间接 ELISA 方法相比其他 ELISA 方法,此法建立方法较为简便,已被广泛的用于临床血清学抗体检测中。针对 PEDV、TGEV 及 PDCoV 等病原的抗体间接 ELISA 方法多以 N 蛋白为包被抗原,该类 ELISA 方法取得了良好的临床检测效果,为病原流行病学调查提供了有力支撑。在冠状病毒生命周期中, N 蛋白为表达量最高的结构蛋白,以 N 蛋白为包被抗原的间接 ELISA 方法具有更好的敏感性和特异性,而 S 蛋白则为诱导中和抗体的主要抗原,因此以重组 S 蛋白为包被抗原的间接 ELISA 方法不仅可以用于临床血清学样品定性诊断,也可用于中和抗体水平评价。Song 等通过比较 PEDV 不同结构蛋白诱导的 IgA 和 IgG 抗体水平与中和抗体水平进行了系统分析,发现病毒中和抗体效价与针对 PEDV S 蛋白的 IgA 水平高度相关,提示针对 S 蛋白 IgA 的诊断方法可以作为检测猪群免疫状态的有力工具 (SONG et al., 2023)。针对 SADS-CoV 病毒, Peng 等基于 SADS-CoV S 蛋白建立了检测 SADS-CoV IgG 抗体的间接 ELISA 方法,间接免疫荧光与 S-iELISA 的总体符合率为 97.3%,说明 S-iELISA 能够准确检测机体是否感染了 SADS-CoV (PENG et al., 2022)。目前针对 SADS-CoV 建立的血清学抗体检测方法较为稀少,亦缺少针对中和抗体水平的 ELISA 评价方法,因此亟待建立更加稳定、敏感的血清学抗体 ELISA 方法应用于临床样品检测,为该病原流行病学监测及后期疫苗抗体水平评价提供技术储备。

1.2 单克隆抗体的研究进展

1.2.1 单克隆抗体的发展

抗体是由效应 B 细胞分泌的,可识别独特的抗原决定簇的蛋白。1980 年,通过融合来自人骨髓瘤患者的脾细胞,首次成功制备了特异性的人单克隆抗体 (SUN et al., 2022b)。随着单克隆抗体技术的不断发展与创新,建立了多种方法来产生单克隆抗体,包括杂交瘤技术、噬菌体展示技术,单个 B 细胞抗体制备技术。

1.2.1.1 杂交瘤技术

杂交瘤技术 (Hybridoma Technique) 是由 Köhler 和 Milstein 在 1975 发明的一种制备单克隆抗体的技术,又被称为单克隆抗体技术。该技术依赖于动物免疫与细胞融合技术,通过将动物免疫后产生的特定 B 淋巴细胞与能够无限增殖的骨髓瘤细胞进行融合,获得能够既能稳定增殖又能产生抗体的单克隆细胞系 (KöHLER et al., 1975)。通过该技术制备的单克隆抗体在体内经历了亲和力成熟过程,具有更高特异性和亲和力 (KUMAR et al., 2012; KUMAR et al., 2019; SMITH et al., 2015; ZAROFF et al., 2019)。杂交瘤技术分离的杂交瘤细胞具有无限增殖的能力,通过冷冻保存可以长期获得分泌单克隆抗体的细胞株,制备大量的单克隆抗体;但该技术依赖于细胞融合效率和目标杂交瘤细胞筛选效率,传统杂交瘤细胞的筛选制备时间长,同时可能在传代中丢失单克隆抗体分泌能力 (SHI et al., 2015)。利用该技术可以制备出不同功能的单克隆抗体,如孙东波等利用 PEDV S 蛋白中和表位区 (S1D) 重组蛋白通过杂交瘤技术筛选到了 6 株特异性识别 PEDV 中天然 S 蛋白的单克隆抗体 (孙东波 等, 2007); 徐明丽等利用杂交瘤技术筛选针对 TGEV 的单克隆抗体 3G11, 通过 HRP 标记后可以作为直接检测抗体应用于免疫酶组织化学法中检测小肠组织中的 TGEV (徐明丽 等, 2022)。

1.2.1.2 噬菌体展示技术

抗体噬菌体展示技术 (Phage Display Technique, PDT) 最早由 Smith 在 1985 年引入,在 1990 年被 McCafferty 等在重组抗体生产中首次应用,是一种以噬菌体为载体的基因表达筛选技术,利用基因重组的方法,将编码多肽的外源 DNA 片段插入到噬菌体表面蛋白的基因中,以融合蛋白的形式把外源目的基因编码的多肽展示到噬菌体的表面,通过筛选富集可以得到各种特异性抗体及其基因 (BRATKOVIC, 2010; MCCAFFERTY et al., 1990)。噬菌体展示技术可以将单个抗体基因型和表型连接到一个噬菌体颗粒上,实现了多肽、蛋白在表型和基因型上的统一,使蛋白质与其遗传基因之间有了直接的联系,可以快速的筛选到所需抗体 (ZAMBRANO-MILA et al., 2020)。目前用于构建展示文库的噬菌体主要有 λ 噬菌体 (BEGHETTO et al., 2011)、丝状噬菌体 (MCCAFFERTY et al., 1990)、T4 噬菌体 (RAO et al., 2010)、T7 噬菌体 (SHARMA et al., 2009),它们所展示的外源蛋白可以保持相对独立的空间结构和生物活性,有利于靶分子的特异性结合。噬菌体展示技术为发现新型高效免疫疗法和设计安全有效的新型重组抗体提供了巨大的机会。Zhang 等利用噬菌体展示技术获得了靶向 PDCoV N 蛋白的特异性抗体 N53,确定了该抗体识别的抗原表位,并通过分子对接进一步分析了抗体 N53 与 PDCoV N 蛋白之间的相互作用,为 PDCoV 的治疗和预防提供了参考 (ZHANG et al., 2022b)。柳玉芳等利用噬菌体展示技术对中和抗体 2B11 和 2G8 进行了抗原表位鉴定 (柳玉芳 等, 2019)。吴佳果等利用噬菌体展示技术筛选了获得了能够用于检测 SARS-CoV-2 N 蛋白的抗体对,并建立了体外快速检测新冠病毒的抗原检测方法 (吴佳果 等, 2022)。

1.2.1.3 单个 B 细胞抗体技术

单个 B 细胞抗体制备技术根据每一个效应 B 细胞只分泌一种特异性抗体，且每一个特异性抗体对应一个重链可变区序列和一个轻链可变区序列的特点，通过高通量流式细胞分选技术从康复病人或免疫动物的外周血中分离抗原特异性 B 细胞，之后利用 RT-PCR 技术从单个 B 细胞 mRNA 中扩增出编码抗体的轻、重链可变区序列，进而在哺乳动物细胞抗体表达系统中配对表达，筛选获得具有生物活性的单克隆抗体（ZHOU et al., 2020）。该方法具有筛选效率高、抗体性能好和天然源性强等特点，也成为了目前快速开发针对抗病毒感染性疾病抗体的重要策略。Cao 等通过单个 B 细胞抗体制备技术结合高通量测序从新冠康复病人外周血中分离得到了 14 株强效新冠病毒中和抗体，其中针对 RBD 表位的 BD-23 抗体对新冠病毒感染的小鼠表现出较高的治疗和预防效果，通过结构分析与受体竞争 RBD 的结合，阻断受体与 RBD 的相互作用来达到中和病毒的目的（CAO et al., 2020）。Wang 等通过单个 B 细胞抗体技术从免疫猪外周血中获得了针对 PEDV-S1 蛋白的猪中和抗体（C62），在体内外均有抑制 PEDV 感染的能力，有望作为一种治疗性的生物制剂来补充现有的疫苗，为开发针对其他猪冠状病毒的全猪中和抗体奠定了坚实的基础（WANG et al., 2023a）。

1.2.2 单克隆抗体的应用

自 1975 年引入杂交瘤技术以来，人们开发了许多单克隆抗体来用于基础研究和临床应用。单克隆抗体在哮喘、自身免疫性疾病、癌症、中毒、败血症、药物滥用、病毒感染和其他疾病的治疗中有许多潜在治疗应用（BERGER et al., 2002）。1994 年，针对人类结肠直肠癌上皮细胞表面抗原表达的 mAb 17-1A 被批准用于识别腺癌，能够有效降低结肠直肠癌的死亡率和发生率（FOON et al., 1999）。单克隆抗体对器官移植后的其他并发症的治疗也在研究中，包括使用抗 CD20 的单克隆抗体利妥昔治疗器官移植后淋巴增生性疾病，以及在肾移植中使用抗 LFA-1 单克隆抗体防止肾脏缺血再灌注损伤引起的急性肾功能损伤（MARTIN et al., 2000; SMITH, 2003; ZOMPI et al., 2000）。自 2020 年新冠病毒肆虐全球，抗体药物开发方向进展迅猛，迄今为止已有来自 26 个国家的 234 个机构在开发针对新冠病毒感染的 164 个抗体药项目。这些抗体候选药物大致分为一类用于缓解细胞因子风暴的单抗药，以及第二类可以阻止新冠病毒感染细胞的中和抗体。单克隆抗体在多个方面具有着广阔的应用和研究前景，包含抗体制备发现新技术，抗体改造如双特异性抗体、单域抗体、纳米抗体，抗体偶联药物的开发等等。

1.3 研究目的及意义

SADS-CoV 作为近些年来新发的猪肠道冠状病毒，针对该病毒仍需长期开展病原流行病学监测工作，亟需研发高效、特异和稳定的血清学抗体检测方法，并制备针对 S 蛋白的抗体，为防控 SADS-CoV 的流行及疫苗的研发储备相应的物质基础。

S 蛋白作为病毒入侵宿主的关键性结构蛋白以及中和抗体表位富集区域，是开展基础性研究工作和建立检测方法的重要靶点。因此，本研究开展了针对 SADS-CoV S 蛋白单克隆抗体的筛选工作，为后期开展基础性研究工作奠定了材料基础；同时以真核系统表达的 S1 蛋白为包被抗原建立间接 ELISA 检测方法，可以为未来针对 SADS-CoV 开展长期的流行病学监测及疫苗免疫评价提供技术支持。

第二章 SADS-CoV S 蛋白单克隆抗体的制备及表位鉴定

SADS-CoV 编码四个结构蛋白包括刺突蛋白 (S)、包膜蛋白 (E)、膜蛋白 (M) 和核衣壳蛋白 (N) (PAN et al., 2017; WANG et al., 2019), 其中 S 蛋白是诱导机体产生中和性抗体的主要有效成分, 常作为疫苗研发的主要靶蛋白 (HULSWIT et al., 2016; LI, 2016)。因此, 本研究以 SADS-CoV S1 蛋白、S-trimer 蛋白和 SADS-CoV 病毒粒子为免疫原免疫 BALB/c 小鼠, 通过间接 ELISA 和中和试验评价免疫后小鼠血清的抗体水平, 选择血清抗体水平较高的小鼠进行细胞融合, 通过间接 ELISA 和有限稀释法筛选到 3 株抗 SADS-CoV S 蛋白抗体的杂交瘤细胞株。通过 Western Blot 和 IFA 证明本研究获得的 3 株 mAbs 均具有良好的反应原性和特异性, 使用抗体亚类试剂盒鉴定了 3 株抗体轻、重链亚型, 并利用 Western Blot 实验鉴定了 3 株单克隆抗体所识别的抗原表位, 对后期开展 SADS-CoV S 蛋白的基础研究及其亚单位疫苗的研发奠定了基础。

2.1 实验材料

2.1.1 毒株、质粒、细胞系和实验动物

SADS-CoV/CN/GDGL/2017 毒株 (GenBank:MG605090.1) 由华南农业大学马静云教授馈赠。

TGEV-AHHF 毒株 (GenBank: KX499468)、PEDV-CV777 毒株 (GenBank: KT323979)、PDCoV-NH10 毒株 (GenBank: KU981062.1) 均由本实验室保存。

pCAGGS-His、pCAGGS-Fc、pCAGGS-GST 载体由本实验室保存。

HEK293T 细胞、Vero E6 细胞、HEK293F 悬浮细胞、SP2/0 细胞、LLC-PK1 细胞均由本实验室保存。6-8 周龄 BALB/c 小鼠 (福利伦理审批编号: 230306-01-GR) 购自北京维通利华。

2.1.2 主要试剂耗材

分子克隆试剂: PCR 扩增酶 Prime STAR Max Premix、10×DNA Loading Buffer、DL2000 DNA Marker、DL5000 DNA Marker 购自 Takara 公司; rCutSmart Buffer、EcoRI 限制性内切酶、PNK、T4 连接酶购自 New England Biolabs 公司; 同源重组酶 ClonExpress Ultra One Step Cloning Kit 购自 Vazyme 公司; 胶回收试剂盒 E.Z.N.A. Gel Extraction Kit 购自 Omega 公司。

细胞实验试剂耗材: DMEM 培养基、0.25%胰蛋白酶-EDTA 溶液 (1×) 购自 Gibco 公司; 胎牛血清购自内蒙古奥普赛生物科技有限公司; 293Pro[®] CD 293M 无血清培养基、293 瞬时表达用补料 A、293 瞬时表达用补料 B 购自上海源培生物科技股份有限公司; EZ Trans 细胞转染试剂购自上海李记生物科技有限公司; jetPRIME 脂质体转染试剂盒购自 Polyplus 公司; 悬浮细胞培养 100 mL、1000 mL 锥形透气盖摇瓶购自上海知楚仪器有限公司; HT Media Supplement (50×)、HAT Media Supplement (50×)、PEG 融合剂 (Polyethylene glycol solution) 购自 Sigma 公司; Hybridoma Feeder 添加因子购自北京博奥龙免疫技术有限公司; DAPI、Anti-GAPDH 兔源单克隆抗体、羊抗鼠 IgG (H+L)-HRP 均购自 Abcam 公司; SBA Clonotyping System-HRP 抗体亚类鉴定试剂盒购自 Southern Biotech 公司; AF488 标记的山羊抗鼠 IgG (H+L) 购自 Invitrogen 公司。

动物实验试剂耗材: 弗式完全佐剂、弗式不完全佐剂购自 Sigma 公司。

蛋白纯化试剂耗材: HisTrap™ Excel 亲和层析柱购自 Cytiva 公司; Protein G Focurose 4FF 亲和层析柱购自汇研生物; Pierce® BCA 蛋白定量分析试剂盒、DyLight® 800 羊抗鼠 IgG (H+L) 购自 Thermo Fisher Scientific; His-tag 抗体 (小鼠单抗) 购自 Beyotime Biotechnology 公司; 真空过滤系统 (0.22 μm) 购自北京兰杰柯科技有限公司; Quick Blue 快速染胶液购自北京博奥龙免疫技术有限公司; 超滤浓缩管 (30 K、100 K) 购自 Merck 公司; SDS 凝胶试剂盒购自雅酶生物; 脱脂奶粉购自 BD 公司; Tris-HCl、EDTA、咪唑、磷酸钠购自生工生物工程股份有限公司; Sucrose 购自 Sigma 公司。

2.1.3 相关溶液配制

(1) 细菌培养相关试剂

LB 液体培养基 (1L): 胰蛋白胨 10 g, 酵母提取物 5 g, NaCl 10 g, 去离子水定容至 1 L。

LB 固体培养基 (1L): 1L LB 液体培养基添加 15 g 琼脂粉, 高温高压灭菌, 冷却至室温加入对应抗生素 (100 ng/ml) 铺制平板, 平板冷却凝固后 4°C 保存。

(2) His Trap™ Excel 亲和层析柱相关试剂的配制

平衡液: 20 mM 磷酸钠, 0.5 M NaCl, 20 mM 咪唑, pH 7.4。

洗脱液: 20 mM 磷酸钠, 0.5 M NaCl, 500 mM 咪唑, pH 7.4。

(3) 病毒纯化相关试剂

5% TNE 缓冲液 (500 mL): 1.2 g Tris-HCl, 2.9 g NaCl, 0.37 g EDTA。加去离子水定容 500 mL, 调节 pH 为 7.5。

20% Sucrose (100 mL): 20 g Sucrose 溶于 5% TNE 缓冲液定容至 100 mL (pH 7.5)。

45% Sucrose (100 mL): 45 g Sucrose 溶于 5% TNE 缓冲液定容至 100 mL (pH 7.5)。

(4) 培养基配制

HAT 培养基: 20%胎牛血清, 1×HAT, 1%青链霉素, 10%添加因子。

HT 培养基: 20%胎牛血清, 1×HT, 1%青链霉素, 10%添加因子。

(5) Protein G Focurose 4FF 层析柱相关溶液配制:

平衡缓冲液: 0.02 M Na₂HPO₄, 0.15 M NaCl, pH 7.0-7.4。

洗脱缓冲液: 0.1 M Glycine-HCl, pH 2.7。

中和缓冲液: 1.0 M Tris-HCl, pH 9.0。

(6) ELISA 实验相关试剂

碳酸盐缓冲液 (CBS): 碳酸钠 1.59 g、碳酸氢钠 2.93 g, 加去离子水定容至 1 L, 调节 pH 值为 9.6。

PBS 缓冲液 (1×): Na₂HPO₄ 1.42 g、KH₂PO₄ 0.27 g、NaCl 8 g、KCl 0.2 g, 加入去离子水定容至 1 L, 调节 pH 值为 7.4。

PBST 缓冲液 (1×): Na₂HPO₄ 1.42 g、NaCl 8 g、KH₂PO₄ 0.27 g、KCl 0.2 g, Tween-20 500 μL, 加去离子水定容至 1 L, 调节 pH 为 7.2-7.4。

终止液 (2 M H₂SO₄): 98% 浓 H₂SO₄ 54.35 mL 加去离子水定容至 500 mL。

2.1.4 主要实验仪器

PCR 扩增仪购自 Takara 公司；电泳仪购自北京市六一仪器厂；AKTA avant 层析系统购自 Cytiva；恒温细胞培养箱、酶标仪、倒置荧光显微镜（EVOS FL）购自 Thermo Fisher Scientific 公司；离心机、恒温连接仪购自 Eppendorf 公司；GelDoc 凝胶成像分析仪、SDS-PAGE 电泳仪、湿转仪购自 Bio-Rad 公司；JXN-26 高速离心机购自 Beckman 公司；近红外荧光扫描成像仪购自 Licor Bio Sciences 公司。

2.2 实验方法

2.2.1 S1 蛋白和 S 三聚体（S-trimer）蛋白重组质粒的构建

2.2.1.1 目的基因扩增

在保证氨基酸序列不改变的基础上，利用 ExpOptimizer 密码子优化工具（<https://novopro.cn/tools/codon-optimization.html>）对 GenBank 上提供的 SADS-CoV S 蛋白的碱基序列（GenBank:MG605090.1）进行优化，为使 S 蛋白以三聚体的形态表达，主要在其末端添加三聚化碱基序列（GCCGGTTATATTCCTGAAGCTCCAAGAGATGGGCAAGCTTACGTTCGTAAAGATGGCGAATGGGTATTCCTTTCTACCTTTTTATCACCA），将其命名为 S-trimer 并送至吉林库美有限公司合成。以密码子优化后的 S-trimer 基因序列为模板扩增 S1 和 S-trimer 基因片段，扩增引物由黑龙江箭速基因有限公司合成（表 2-1）。

表 2-1 SADS-CoV S1 和 S-trimer 基因引物设计

Table 2-1 The primers of SADS-CoV S1 and S-trimer gene

引物名称	序列（5'—3'）
pCAGGS-S1-F	TTTTGGCAAAGAATTATGAAGCTGTTACCGTGTTAC
pCAGGS-S1-R	TGTGGCCGTGAGGAGAATGGCTAGCAGATCT
pCAGGS-S-trimer-F	GTGAGCGCCGGAATTTACGGCTGCGAGTCCGT
pCAGGS-S-trimer-R	GATGATGATGGAATTTGGTGATAAAAAGGTAGAAAGGAATACCCA

扩增程序：98℃预变性 5 min；98℃，10 s；55℃，15 s；72℃，2 min，扩增 30 个循环；72℃延伸 10 min；4℃冷却静置。扩增产物用 1% 琼脂糖凝胶进行电泳检测并按照胶回收试剂盒说明书对目的片段进行回收纯化。

2.2.1.2 载体的酶切

将 pCAGGS-His 质粒线性化，酶切体系见表 2-2。

表 2-2 酶切体系

Table 2-2 Enzymatic digestion system

酶切体系 (50 μ L)	
质粒载体	10 μ g
10 \times Cutsmart Buffer	5 μ L
<i>EcoR</i> I-HF	1 μ L
ddH ₂ O	to 50 μ L

37 $^{\circ}$ C 酶切 5-8 h, 酶切产物经琼脂糖凝胶电泳后进行回收纯化, 并测其浓度。

2.2.1.3 同源重组

将酶切好的线性化 pCAGGS-His (*EcoR* I) 载体与胶回收的目的片段进行同源重组, 重组体系见表 2-3。

表 2-3 同源重组体系

Table 2-3 Homologous recombination system

同源重组体系 (10 μ L)	
pCAGGS-His (<i>EcoR</i> I)	0.03 pmol
目的片段	0.06 pmol
2 \times ClonExpress Mix	5 μ L
ddH ₂ O	to 10 μ L

重组反应条件: 50 $^{\circ}$ C, 15 min; 4 $^{\circ}$ C 冷却。

2.2.1.4 转化

取 DH5 α 感受态细胞于冰上解冻, 添加 5-10 μ L 的同源重组产物, 置于冰上孵育 30 min, 在 42 $^{\circ}$ C 水浴锅中热激 90 s, 再次置于冰上 2 min, 在超净工作台向上述感受态细胞中加入 500 μ L 无抗 LB 液体培养基, 将其固定在 37 $^{\circ}$ C 摇床上 220 rpm 震荡 1 h。培养产物 5000 rpm 离心 1 min, 弃掉上清保留 100 μ L 培养基用于菌体重悬, 将重悬后的菌体加入固体培养基 (A⁺) 上均匀涂布, 37 $^{\circ}$ C 倒置培养过夜。随机挑取 3 个单菌落培养后送至黑龙江箭速基因科技有限公司进行测序分析, 将测序分析正确的样品命名为 pCAGGS-S1-His、pCAGGS-S-trimer-His。

2.2.1.5 质粒纯化

测序正确的样品进行扩大培养, 用质粒大提试剂盒 PureLink HiPure 进行质粒的提取纯化, 具体步骤如下:

(1) 把测序正确菌液样品加入氨苄抗性的适量 LB 液体培养基, 放置于 37 $^{\circ}$ C 摇床, 设置转速为 220 rpm, 过夜培养。培养好的菌液 8000 \times g, 离心 10 min, 弃上清;

(2) 在滤筒中加入 30 mL EQ1, 使其自然滴尽;

(3) 菌液沉淀中加入 10 mL R3 溶液重悬, 悬液转移到 50 mL 离心管中;

(4) 悬液中加入 10 mL L7 溶液, 轻柔的混合均匀, 室温静置 5 min;

(5) 加入 10 mL N3 溶液, 充分混匀后加入滤管中, 使其自由滴尽;

(6) 去掉滤网, 加入 50 mL W8 溶液, 使其自由滴尽;

(7) 将滤管转移至新的 50 mL 离心管上, 加入 15 mL E4 溶液, 使其自由滴尽, 收集滤液;

(8) 在收集的 E4 滤液中加入异丙醇 10.5 mL, 混合均匀, -20°C 中静置 20 min, $10000\times\text{g}$, 离心 30 min, 弃去上清;

(9) 加入 1 mL 70% 乙醇将沉淀悬起全部转移至 1.5 mL EP 管中, $12000\times\text{g}$, 2 min, 弃去上清, 放置在超净工作台中使沉淀中的液体自然晾干, 向 EP 管中添加 500 μL 去离子水, 置于 4°C 冰箱待沉淀溶解后混合均匀测定浓度, -20°C 保存。

2.2.2 S1 蛋白和 S 三聚体 (S-trimer) 蛋白的真核表达、纯化及鉴定

2.2.2.1 S1 蛋白和 S 三聚体 (S-trimer) 蛋白的真核表达

取连续传代的 HEK293F 细胞接种于 500 mL 细胞摇瓶中 (瓶中培养基总体积 200 mL), 待其生长至 $1.5\sim 2.0\times 10^6$ 个/mL 左右时进行转染。各取 10 mL Opti-MEM 培养基分别加入对应量的 pCAGGS-S1-His 或 pCAGGS-S-trimer-His 质粒和 EZ Trans 细胞转染试剂, 质粒: 转染试剂为 1:3, 室温静置 10 min, 将两个培养基溶液混合均匀, 室温静置 20 min, 随后将含有转染试剂和质粒培养基加入细胞中, 边加边摇动培养瓶, 以防质粒和转染试剂在局部集中。转染后 48 h 和 96 h 按照 5% 细胞培养体积加入 293 瞬时表达用补料 A、1% 细胞培养体积加入 293 瞬时表达用补料 B; 转染 5 天后收集蛋白。

2.2.2.2 S1 蛋白和 S 三聚体 (S-trimer) 蛋白的纯化

表达的蛋白使用 HisTrapTM Excel 亲和层析预装柱进行纯化:

(1) 样品处理: 将培养 5 天后 HEK293F 细胞, $5000\times\text{g}$ 于 4°C 离心 15 min 后去除细胞沉淀, 收集细胞上清用 0.22 μm 滤膜过滤;

(2) 平衡: 把预装柱连接 AKTA avant 蛋白纯化仪, 连接过程中注意要液滴对液滴进行连接, 防止引入气泡, 用 5 倍柱体积的结合缓冲液对层析柱进行平衡;

(3) 上样: 把过滤后的上清以 1 mL/min 的流速经 AKTA 挂柱上样至亲和层析预装柱;

(4) 洗杂: 用结合缓冲液以 1 mL/min 的流速对层析柱进行洗涤, 直到吸收峰达到稳定基线;

(5) 洗脱: 依次用含有 50 mmol/L、100 mmol/L、250 mmol/L、500 mmol/L 咪唑的洗脱液进行洗脱, 收集洗脱峰样品;

(6) 保存: 结合缓冲液冲洗 5 个柱体积, 加入 20% 乙醇 4°C 保存。

2.2.2.3 纯化蛋白的鉴定及浓度测定

SDS-PAGE 电泳: 将收集到的流穿液和洗脱液样品各取 40 μL 加入 10 μL 的电泳上样缓冲液 $5\times$ Loading Buffer, 放置于 100°C 水浴锅中 15 min, 根据重组表达目的蛋白的大小选择合适浓度的凝胶, 加入适量的蛋白 Marker 和样品, 上层浓缩胶使用 80 V 恒压跑 20-30 min, 下层分离胶使用 120 V 电压使样品溴酚蓝跑至胶板底部。随后对 SDS-PAGE 凝胶进行染色分析。

Western Blot 鉴定: 预先备好大小合适的硝酸纤维素膜 (NC 膜), 将滤纸、NC 膜、海绵片用 $1\times$ 湿转液进行平衡, 然后按顺序把海绵片、滤纸、NC 膜、凝胶、滤纸、海绵片放置在转印夹板上, 用 Bio-Rad 转膜仪器进行湿转, 设置电流为 250 mA, 转膜时间根据蛋白大小适当调整。转膜结束后取出 NC 膜放置于 5% 的脱脂乳中 37°C 封闭 2 h, 随后以 His-tag 抗体 (小鼠单抗) 作为一抗 (1:2000), 以 DyLight 800 羊抗鼠 IgG (H+L) (1:10000) 作为二抗, 使用 Odyssey 红外荧光扫描成像系统进行扫描, 对获得的重组蛋白进行 Western Blot 鉴定和分析。

BCA 浓度测定：按照 Pierce® BCA 蛋白定量分析试剂盒说明书中微孔板方案测定纯化蛋白的浓度。对蛋白质标准品进行梯度稀释，随后将待测蛋白和标准品蛋白各取 25 μL 加入微孔板中，每个样品三个重复。在每个孔中加入 200 μL 工作液（BCA 试剂盒中试剂 A：试剂 B=50:1），37°C 孵育 30 min。待微孔板冷却至室温，用酶标仪测定 OD_{562nm} 值。参照标准品蛋白的 OD 值绘制标准曲线，换算待测蛋白样品的浓度。

2.2.3 SADS-CoV 的增殖与病毒粒子纯化

取生长状态良好的 Vero E6 细胞，按照 1 传 3 的比例用 10% 胎牛血清的 DMEM 培养基对 75 cm^2 的细胞培养瓶中的细胞进行传代，放置在含有 5% CO_2 培养箱中 37°C 培养，待细胞长至铺满单层后，弃去上清，使用含 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 胰蛋白酶的 DMEM 培养基清洗细胞 3 次，加入 5 mL 含 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 胰蛋白酶的 DMEM 培养基作为病毒维持液，将 100 代的 SADS-CoV 病毒液按照 0.5 个感染复数（multiplicity of infection, MOI）接种 Vero E6 细胞，在细胞培养箱中感作 1 h 后补加 5 mL 的病毒维持液，放置细胞培养箱中培养并观察。待细胞病变约 80% 时，收集细胞培养物，-80°C 保存。

将细胞培养物在 -80°C 条件下反复冻融 3 次，4000 $\times g$ ，离心 10 min，收集上清用 0.45 μm 滤膜过滤后用蔗糖梯度离心法纯化病毒。具体纯化步骤为：

- （1）样品制备：将过滤后上清加入 38 mL 超离管中配平，105000 $\times g$ ，4°C 离心 2 h。在操作台内轻缓弃掉上清，倾斜加入 500-1000 μL 5% TNE 缓冲液，覆盖沉淀，4°C 放置过夜；
- （2）加样：在 12 mL 超离管中先用注射器加入 6 mL 20% 蔗糖，再将长针头伸入底部加入 4 mL 45% 蔗糖，禁止气泡产生。把用 TNE 泡好的沉淀吹吸均匀轻缓的加到蔗糖梯度上，配平 146000 $\times g$ ，4°C 减速 5 离心 6 h；
- （3）收集：离心后，观察到管中形成密度梯度。在离心管中，病毒会沉降到不同密度层级，形成分离的带状区域。用针管从密度梯度中收集分离的病毒颗粒；
- （4）脱糖：将收集到的病毒颗粒用 5% TNE 缓冲液稀释后加入 38 mL 超离管中配平，设置离心条件为 4°C，105000 $\times g$ ，离心 2 h，弃掉上清，沉淀加入 0.5-1 mL 的 5% TNE 缓冲液重悬，用 BCA 蛋白定量试剂盒定量后于 -80°C 保存。

2.2.4 小鼠免疫

将 12 只 6-8 周龄 BALB/c 小鼠随机分成 4 组，每组 3 只。第一组免疫 SADS-CoV 病毒粒子，第二组免疫 S-trimer 蛋白，第三组免疫 S1 蛋白，第四组免疫 PBS 作为对照，每次免疫按照 200 $\mu\text{L}/\text{只}$ 接种 100 μg 的免疫原。第一次免疫时将弗氏完全佐剂与免疫原等体积混合乳化，采用皮下注射的方式免疫小鼠。第二次和第三次免疫使用等体积的免疫原和弗氏不完全佐剂混合乳化。第二次免疫第 7 天，小鼠眼眶采血，检测血清效价。第三次免疫 7 天左右采集小鼠血清，检测小鼠体内的中和抗体水平。再间隔一周用 100 $\mu\text{g}/\text{只}$ 剂量的抗原对血清效价和中和抗体水平较高的小鼠进行加强免疫，3 天后取其脾细胞进行细胞融合。

2.2.5 血清抗体效价检测

分别用 2 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的 SADS-CoV 病毒粒子和 S-trimer 蛋白作为包被抗原检测 4 组小鼠第二次免疫后血清的抗体效价。

(1) 包被: 取 ELISA 板, 每孔加入 100 μL 浓度为 2 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的包被抗原, 并置于 4 $^{\circ}\text{C}$ 冰箱包被 16 h;

(2) 洗涤: 弃掉包被液, 加入 PBST 缓冲液洗涤 200 $\mu\text{L}/\text{孔}$, 5 min/次, 洗 3 次, 拍干;

(3) 封闭: 加入 5% 脱脂乳 100 $\mu\text{L}/\text{孔}$, 37 $^{\circ}\text{C}$ 封闭 2 h; 弃掉封闭液, 洗涤步骤同 (2);

(4) 样品孵育: 将小鼠待检血清分别进行 1:400、1:800、1:1600、1:3200、1:6400、1:12800、1:25600、1:51200 稀释, 按照 100 $\mu\text{L}/\text{孔}$ 的剂量加入 ELISA 板, 37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 1 h; 弃掉液体, 洗涤步骤同 (2);

(5) 二抗孵育: 加入羊抗鼠 IgG (H+L) -HRP (1:5000), 100 $\mu\text{L}/\text{孔}$, 37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 1 h; 弃掉孔中液体, 洗涤步骤同 (2);

(6) 显色: 每个反应孔加入 100 μL 的 TMB 显色液, 避光置于 37 $^{\circ}\text{C}$ 温箱显色 15 min;

(7) 读数: 最后每个反应孔加入 50 μL 2 M H_2SO_4 终止反应, 立即测定 $\text{OD}_{450\text{nm}}$ 值。以阳性血清孔 $\text{OD}_{450\text{nm}}$ 值约为 1.0, 阴性血清孔 $\text{OD}_{450\text{nm}}$ 值 < 0.2, 且 P/N > 2.1 时的血清的最大稀释倍数为血清抗体效价 (韩郁茹, 2021)。

2.2.6 血清中和活性测定

为了检测第三次免疫后小鼠体内的中和抗体水平, 将第三免疫后采集的小鼠血清放置 56 $^{\circ}\text{C}$ 水浴锅灭活 30 min 后, 按照 2 倍比分别进行 1:4、1:8、1:16、1:32、1:64、1:128、1:256 稀释, 与 2×10^3 TCID₅₀ SADS-CoV 等体积混合后置于 37 $^{\circ}\text{C}$ 温箱孵育 2 h。取铺满单层 Vero E6 细胞的 96 孔板, 用 DMEM 清洗细胞两遍。把病毒与血清的混合液按照 100 $\mu\text{L}/\text{孔}$ 加入细胞中, 每个稀释度 8 个重复, 放置在 37 $^{\circ}\text{C}$, 5% CO_2 的细胞培养箱中培养, 3 天后观察并统计细胞病变孔, 根据 Reed-Muench 两氏法计算血清抗体中和效价, 并用 GraphPad Prism 9.0 软件进行数据分析。

2.2.7 脾细胞的制备

将待融合小鼠眼眶采血并颈椎脱臼处死后放置在 75% 乙醇中浸泡 10 min 消毒。将小鼠转移至无菌操作台内仰面固定于解剖板上, 用准备好的高压灭菌后的剪刀和镊子剖开小鼠腹腔, 小心的取出脾脏, 置于含有 10 mL 无血清 DMEM 的平皿中清洗, 去除脾脏表面的脂肪和结缔组织。将脾脏转移至新的含 10 mL 无血清 DMEM 的平皿中, 使用 5 mL 注射器吸取 DMEM 反复冲洗脾脏, 当小鼠脾脏内部的细胞都冲洗干净后, 将收集到的脾细胞悬液转移到 50 mL 离心管中, 设置离心机转速为 500 $\times g$, 离心 10 min; 离心后弃去上清, 在细胞沉淀中加入 3 倍体积的红细胞裂解液, 轻轻吹打混匀, 室温静置裂解 2 min, 500 $\times g$ 离心 5 min, 弃去红色上清, 如果红细胞裂解不完全, 可重复此步骤, 直至脾细胞样品基本变成白色, 用 10 mL 无血清 DMEM 清洗 3 遍。

2.2.8 细胞融合

将 SP2/0 细胞消化后用无血清 DMEM 重悬, 500×g 离心 10 min, 弃上清。细胞沉淀用无血清 DMEM 清洗 3 次。然后按照 1:10 的比例将 SP2/0 细胞与脾细胞混合后 500×g 离心 10 min。弃去上清, 轻轻撞击离心管底部, 使细胞混匀成糊状。将离心管置于 37°C 水浴中, 将 1 mL 的 PEG 在 1 min 内逐滴缓慢加入细胞中, 静置 1 min; 1 min 内加入 1 mL 无血清 DMEM, 静置 10 s; 1 min 内加入 2 mL 无血清 DMEM; 1 min 内加入 3 mL 无血清 DMEM; 加入 DMEM 补加至 40 mL, 500×g 离心 10 min; 弃上清, 添加 50 mL HAT 培养基, 混合均匀 100 μL/孔铺在 96 孔细胞板中, 置于 37°C 细胞培养箱中培养。

2.2.9 阳性杂交瘤细胞的筛选与亚克隆

细胞融合第 5 天在显微镜下观察杂交瘤细胞至小米粒大小, 用 HAT 培养基对杂交瘤细胞进行半换液。同时利用 S1 蛋白间接 ELISA 方法, 对半换液过程中吸出的杂交瘤细胞培养上清进行鉴定, 并分别以 PBS 免疫组小鼠血清和 S1 蛋白免疫组小鼠血清作为阴、阳性对照, 根据 ELISA 结果选出 OD_{450nm} 值较高的阳性孔进行筛选。具体的 ELISA 操作步骤同 2.2.5。

采用有限稀释法对筛选到的阳性杂交瘤细胞进行亚克隆纯化, 将筛选为阳性且细胞状态良好的孔做标记, 弃去上清, 用 HT 培养基对孔内细胞进行重悬后转移至新的 96 孔板中, 吸取 10 μL 细胞悬液加入到 100 μL HT 培养基中进行稀释, 当细胞数量在 100 个/孔左右取出孔内细胞加入 10 mL HT 培养基进行重悬, 随后 100 μL/孔加入 96 孔细胞板中, 置于细胞培养箱中培养。将阳性杂交瘤经过 4 次筛选与亚克隆, 待亚克隆板上的单克隆细胞孔全部为阳性时, 将细胞扩增培养, 直至扩增培养到 25 cm² 培养瓶后冷冻保存。

2.2.10 单克隆抗体间接免疫荧光鉴定

取对数期的 HEK293T 细胞接种于 12 孔板, 当孔中细胞的密度为 80% 时进行转染。取 1.5 mL 离心管做好标记, 加入 100 μL jetPRIME 转染 Buffer, 将 1 μg 的质粒 pCAGGS-Myc、pCAGGS-S-Myc 和 pCAGGS-S1-Myc 分别加入相对应的离心管中, 最后每个对应的离心管中加入 2 μL 的 jetPRIME 转染试剂, 混合均匀。室温静置 15 min, 将质粒与转染试剂的混合液加入细胞培养孔中, 置于细胞温箱中培养。待转染 6 h 后用含 10% 血清的 DMEM 培养基对转染细胞进行换液; 转染 24 h 后, 弃掉孔中液体, 加入甲醇置于 -20°C 冰箱 30 min 固定细胞, 随后用 PBS 缓冲液清洗 3 次, 使用杂交瘤细胞上清作为一抗, 二抗选用 AF488 标记的山羊抗鼠 IgG (H+L), 进行间接免疫荧光试验, 检测单克隆抗体与 S 蛋白和 S1 蛋白的反应性。

2.2.11 腹水抗体的制备和纯化

2.2.11.1 杂交瘤细胞腹水的制备

取 6-8 周龄 BALB/c 小鼠 15 只, 分为 3 组每组 5 只。每只小鼠腹腔注射 500 μL 的弗式完全佐剂, 一周后按照 500 μL 的体积给小鼠腹腔注射 1×10⁶ 个相对应的杂交瘤细胞, 每天观察小鼠腹部的变化, 当腹部膨大且触摸有波动感时, 用采血针对腹水进行采集, 直到小鼠腹部干瘪无腹水

溢出。将采集到的腹水 1000×g 离心 2 min，弃去脂肪和红细胞等杂质，吸取上清，进行后续的鉴定和纯化。

2.2.11.2 腹水抗体纯化

腹水样品预先用 0.45 μm 的滤膜过滤。用纯水以 5-10 mL/min 流速对 AKTA 管道进行冲洗至紫外吸收值平稳；把 Protein G Focurose 4FF 亲和层析预装柱连接 AKTA 仪器，用 5 个柱体积纯水以 5 mL/min 的流速对预装柱进行冲洗；然后用 10 个柱体积的平衡液以 5 mL/min 的流速对预装柱进行平衡；将腹水样品以 1 mL/min 流速进行上样；然后用平衡液以 5 mL/min 流速冲洗约 10-15 个柱体积至紫外吸收值平稳；用洗脱液以 2 mL/min 流速洗脱，收集洗脱峰处样品，预先在收集管中加入中和液；紫外吸收值平稳后换用纯水以 5 mL/min 流速冲洗 5 个柱体积；最后用 20% 乙醇以 5 mL/min 流速冲洗 5 个柱体积，卸下预装柱 4°C 保存。样品进行 SDS-PAGE 鉴定后，用浓缩柱对样品进行浓缩和缓冲液置换，最后收集纯化的目的抗体用 BCA 蛋白定量试剂盒测定浓度后-80°C 保存。

2.2.12 单克隆抗体相对亲和力和中和活性测定

2.2.12.1 抗体相对亲和力测定

分别以 2 μg/mL 的 SADS-CoV 病毒粒子和 S1 蛋白作为包被抗原，使用间接 ELISA 法测定 3 株单克隆抗体分别对 SADS-CoV 和 S1 蛋白的相对亲和力。将纯化的腹水抗体以 10⁷ ng/mL 为起始浓度进行 10 倍比稀释，稀释后浓度分别为 10⁷ ng/mL、10⁶ ng/mL、10⁵ ng/mL、10⁴ ng/mL、10³ ng/mL、10² ng/mL、10¹ ng/mL、10⁰ ng/mL。以山羊抗鼠 IgG (H+L) -HRP 作为二抗进行间接 ELISA 试验。间接 ELISA 的具体操作步骤同 2.2.5。根据测得的数据利用 GraphPad Prism 9.0 软件进行曲线拟合，以曲线上 50% 结合时的单抗浓度作为其相对亲和力。

2.2.12.2 抗体中和活性测定

纯化的腹水抗体以 10³ μg/mL 为起始浓度进行 10 倍比稀释，稀释后浓度分别为 10³ μg/mL、10² μg/mL、10 μg/mL、1 μg/mL、0.1 μg/mL、0.01 μg/mL、0.001 μg/mL，与 2×10³ TCID₅₀ SADS-CoV 混合后置于 37°C 温箱孵育 2 h。取单层铺满 Vero E6 细胞的 96 孔板，用 DMEM 清洗细胞两遍。把病毒与抗体的混合液按照 100 μL/孔加入细胞中，每个稀释度 8 个重复，放置 37°C，5% CO₂ 细胞培养箱中，培养 3 天后观察细胞病变情况进行统计，根据 Reed-Muench 两氏法计算抗体中和效价。

2.2.13 单克隆抗体的生物学特性鉴定

2.2.12.1 单克隆抗体的亚型鉴定

根据 SBA Clonotyping System-HRP 抗体亚型鉴定试剂盒说明书进行操作，以 5 μg/mL Goat anti-Mouse IgG 4°C 包被过夜，制备的腹水抗体作为一抗，试剂盒中相应的抗体亚型作为二抗，进行 ELISA 反应，测定 OD_{450nm} 值。

2.2.13.2 单克隆抗体 Western Blot 分析

将 pCAGGS-His、pCAGGS-S-His 和 pCAGGS-S1-His 质粒用 jetPRIME 转染试剂转染 HEK293T 细胞转染 24 h 后收集细胞样品，以制备的腹水作为一抗，DyLight 800 羊抗鼠 IgG (H+L) 作为二抗，参照 2.2.2.3 中操作步骤进行 Western Blot 鉴定并观察实验结果。

2.2.13.3 单克隆抗体间接免疫荧光鉴定

取对数期的 LLC-PK1 细胞接种于 12 孔板，当铺满单层细胞时，按照 0.1 MOI 的感染剂量，分别接种 SADS-CoV、PDCoV、TGE 和 PEDV，37°C 感作 1 h，弃掉孔中液体，加入 1 mL 维持液，放入细胞培养箱进行培养。当细胞出现轻微病变时，弃掉孔中液体，加入甲醇置于 -20°C 冰箱 30 min 固定细胞，随后用 PBS 缓冲液清洗 3 次，加入制备的单克隆抗体作为一抗，AF488 标记的山羊抗鼠 IgG (H+L) 作为二抗，进行间接免疫荧光实验，鉴定抗体的特异性。

2.2.13.4 免疫组织化学染色

取甲醛固定的 SADS-CoV 感染的仔猪小肠制备组织切片，分别用制备的 3 株单克隆抗体作为一抗，制备组织切片并进行免疫组化分析。具体样品切片制备由本单位动物病原与病理形态学创新团队完成。

2.2.14 单克隆抗体表位的鉴定

2.2.14.1 S1 蛋白的截短方案和截短体的引物设计

根据 S1 蛋白的结构特点，将 S1 蛋白分为 6 个截短体并与线性化的 pCAGGS-Fc (*EcoRI*+*KpnI*) 载体进行同源重组，构建真核表达载体，分别命名为 S1A-Fc~S1F-Fc。通过 Western Blot 初步鉴定 3 株抗体所识别的抗原表位。利用 (<http://imed.med.ucm.es/Tools/antigenic.pl>) 生物信息软件对这些初步识别的表位片段进行预测，根据预测结果设计截短体，转染 HEK293T 细胞进行表达，分别以 3 株单克隆抗体为一抗，经过多次 Western Blot 鉴定，逐步对片段进行截短，缩小检测范围，精确定位抗体所识别的抗原表位区域。

运用 SnapGene 软件将 S1 蛋白的 E1~E7、D1~D7、D9 片段与 pCAGGS-GST 载体进行同源重组，并设计对应的上下游引物；其余短肽在引物 5' 端引入 *ClaI* 位点，3' 端引入 *NheI* 位点，以 sgRNA 寡核苷酸链的形式与 pCAGGS-GST 载体相连，构建重组质粒。截短体引物由黑龙江箭速基因科技有限公司合成 (表 2-2)。

表 2-2 SADS-CoV S1 截短体基因引物设计

Table 2-2 The primers of SADS-CoV S1 truncator gene

引物名称	序列 (5'-3')
S1A/F-FC-F	GTGAGCGCCGGAATTTGCGAGTCCGTGGATTCAAC
S1A/B/D-FC-R	GATGATGATGGAATTTTACATTTACCCGGAGACAGGGAG
S1B-FC-F	GTGAGCGCCGGAATTTTTGATATCCCTCCCGGCG
S1C-FC-F	GTGAGCGCCGGAATTGATATCCCTCCCGGCG
S1C/E-FC-R	GTGTGAGTTTTGTCGCTCTCGGGTTGGACTCGC
S1D/E-FC-F	GTGAGCGCCGGAATTAGCGCCTGCCCCG
S1E-FC-F	GTGAGCGCCGGAATTAGCGCCTGCCCCG
S1F-FC-R	GTGTGAGTTTTGTCGCTGCTCATGTTGTGCACCACTGT

表 3-2 (续)

引物名称	序列 (5'-3')
E1/E3/E5-F	ATCCTCCAAAAATAGCGAGCGCCTGCCCCGA
E1/E4-R	ATTAAGATCTGCTAGTGTCTATTACGG
E2-F	ATCCTCCAAAAATAGCGATCCTGTCCAACGGCAAGT
E2-R	ATTAAGATCTGCTAGCTCGGGGTTGGACTCGC
E3/E6/-R	ATTAAGATCTGCTAGGTGCTGGAAGTCTCTCTGAT
E4-F	ATCCTCCAAAAATAGCGCTGATCCTGTCCAACGGCAAG
E5-R	ATTAAGATCTGCTAGGGAAAACACGGCCCTCT
E6/E7/-F	ATCCTCCAAAAATCACGAGGGCCGTGTTTTCCAATTGTAT
E7-R	ATTAAGATCTGCTAGTGTGGTGTAGTTCACGATAACAATTGGAAAAC
E8-F	CGATAGGGCCGTGTTTTCCAATTGTG
E8-R	CTAGCACAATTGGAAAACACGGCCCT AT
E9-F	CGATTGGGTGAATCCCGATCAGAGAGACTTCCAGCACG
E9-R	CTAGCGTGCTGGAAGTCTCTCTGATCGGGATTACCCAAT
E10-F	CGATTGGGTGAATCCCGATCAGAGAGACTTCCAGG
E10-R	CTAGCCTGGAAGTCTCTCTGATCGGGATTACCCAAT
E11-F	CGATGTGAATCCCGATCAGAGAGACTTCCAGCACG
E11-R	CTAGCGTGCTGGAAGTCTCTCTGATCGGGATTACAT
E12-F	CGATAATCCCGATCAGAGAGACTTCCAGCACG
E12-R	CTAGCGTGCTGGAAGTCTCTCTGATCGGGATTAT
E13-F	CGATTGGGTGAATCCCGATCAGAGAGACTTCG
E13-R	CTAGCGAAGTCTCTCTGATCGGGATTACCCAAT
E14-F	CGATAATCCCGATCAGAGAGACTTCG
E14-R	CTAGCGAAGTCTCTCTGATCGGGATTAT
E15-F	CGATAATCCCGATCAGAGAGACG
E15-R	CTAGCGTCTCTCTGATCGGGATTAT
E16-F	CGATCCCGATCAGAGAGACTTCG
E16-R	CTAGCGAAGTCTCTCTGATCGGGAT
D1-F	ATCCTCCAAAAATAGCGGAGGCCCCCAAGACCG
D1-R	ATTAAGATCTGCTAGCCTGTACAGCAGGCCGAAG
D2/D3/D5-F	ATCCTCCAAAAATAGCGCTGGGCAAGGTGTACGAGG
D2/D4-R	ATTAAGATCTGCTAGCATTCTCCTCACGGCCACA
D3/D6/D7/-R	ATTAAGATCTGCTAGAGGCAGCAGTCTATCCACAAAC
D4-F	ATCCTCCAAAAATCAGGTCCACAACGGCACAGCC
D5-R	ATTAAGATCTGCTAGCTGATTGTTCTGTACAGCACATCG
D6/D9-F	ATCCTCCAAAAATAGCGGTGCTGTACAGGAACAATCAGTCC
D7-F	ATCCTCCAAAAATAGCGCTGTACAGGTCCTTTGATTGTAATCAG

表 3-2 (续)

引物名称	序列 (5'-3')
D8-F	CGATAAGTCCGCCAGGTTTGTGGATAGACTGCTGCCTG
D8-R	CTAGCAGGCAGCAGTCTATCCACAAACCTGGCGGACTTAT
D9-R	ATTAAGATCTGCTAGGATGTGCAGCTGATTACAATCAAAGG
D10-F	CGATAAGTCCGCCAGGTTTGTGGATAGACTGCTGG
D10-R	CTAGCCAGCAGTCTATCCACAAACCTGGCGGACTTAT
D12-F	CGATAAGTCCGCCAGGTTTGTGGATAGACTGG
D12-R	CTAGCCAGTCTATCCACAAACCTGGCGGACTTAT
D11-F	CGATTCCGCCAGGTTTGTGGATAGACTGCTGCCTG
D11-R	CTAGCAGGCAGCAGTCTATCCACAAACCTGGCGGAAT
D13-F	CGATGCCAGGTTTGTGGATAGACTGCTGCCTG
D13-R	CTAGCAGGCAGCAGTCTATCCACAAACCTGGCAT
D14-F	CGATAAGTCCGCCAGGTTTGTGGATAGAG
D14-R	CTAGCTCTATCCACAAACCTGGCGGACTTAT
D15-F	CGATGCCAGGTTTGTGGATAGACTGG
D15-R	CTAGCCAGTCTATCCACAAACCTGGCAT
D16-F	CGATAGGTTTGTGGATAGACTGG
D16-R	CTAGCCAGTCTATCCACAAACCTAT
D17-F	CGATGCCAGGTTTGTGGATG
D17-R	CTAGCATCCACAAACCTGGCAT

2.2.14.2 SADS-CoV S1 截短蛋白的表达

根据设计的同源重组引物, 以重组质粒 pCAGGS-S1-His 为模板, 扩增各截短体片段, 其中 S1A-S1F 截短体扩增产物与线性化的 pCAGGS-Fc (*EcoR* I+*Kpn* I) 载体进行同源重组, E1~E7, D1~D7、D9 截短体与线性化的 pCAGGS-GST (*Cla* I+*Nhe* I) 载体进行同源重组, 重组产物转化 DH5 α 感受态细胞, 挑选单个菌落扩大培养并送至黑龙江箭速基因科技有限公司测序鉴定。

其余截短体以 sgRNA 的形式与 pCAGGS-GST (*Cla* I+*Nhe* I) 载体进行连接, 将合成的互补多肽寡核苷酸链上下游引物添加去离子水稀释成 100 μ M 各取 1 μ L; T4 Ligation buffer (10 \times), 1 μ L; PNK, 1 μ L; 去离子水 6 μ L; 以 37 $^{\circ}$ C, 30 min; 95 $^{\circ}$ C, 5 min 退火形成双链。使用 T4 连接酶将退火形成的双链与线性化的 pCAGGS-GST (*Cla* I+*Nhe* I) 载体连接, 4 $^{\circ}$ C 连接 10 h, 随后进行转化, 挑选单个菌落扩大培养送至公司测序。

将截短体质粒分别转染 HEK293T 细胞, 收集细胞蛋白, 以上述制备的 3 株单克隆抗体为一抗, 进行 Western Blot 鉴定。根据 Western Blot 鉴定结果, 对单抗所识别的表位区域进行逐步截短表达及验证, 直至鉴定出最小抗原表位识别序列。

2.2.15 抗原表位的保守性分析

为了评估本研究制备的 3 株抗体识别的核心表位序列在 SADS-CoV 分离株中的保守性，利用 GenBank 数据库选取了 13 株 SADS-CoV 相关的 S 蛋白序列，利用生物信息学进行序列比对分析。

2.2.16 抗原表位定位分析

根据 3 株单克隆抗体识别抗原表位的序列特征，利用 PDB 数据库将抗原表位定位到 SADS-CoV S 蛋白 (PDB: 6M16) 的三维模型上，分析 3 株单克隆抗体的结合表位在 S 蛋白三维结构中的定位情况。

2.2.17 数据分析

所有统计分析均通过 Graph Pad Prism 9.0 软件进行。数据采用方差分析和 *t* 检验进行评估。*P* 值<0.05 为有统计学意义 (*), *P* 值<0.01 为有显著统计学差异 (**), *P* 值<0.001 为有极其显著的统计学差异 (***)。

2.3 实验结果

2.3.1 S1 蛋白和 S 三聚体 (S-trimer) 蛋白重组质粒的构建

以密码子优化后的 S-trimer 片段为模板，利用同源重组引物扩增含有同源臂的 S1 和 S-trimer 片段，经 1% 的琼脂糖凝胶电泳检测，结果显示，在约 1500 bp 和 3300 bp 处出现目的条带，且与预期大小一致 (图 2-1)。分别将大小正确的 S1 和 S-trimer 片段与 pCAGGS-His (*EcoR* I) 线性化载体进行同源重组、转化，挑选转化后的单个菌落经扩大培养送至黑龙江箭速基因科技有限公司测序。测序结果用 SnapGene 软件进行比对，显示重组质粒无突变位点与目的片段序列一致，表明正确构建重组质粒，分别将其命名为 pCAGGS-S1-His 和 pCAGGS-S-trimer-His。

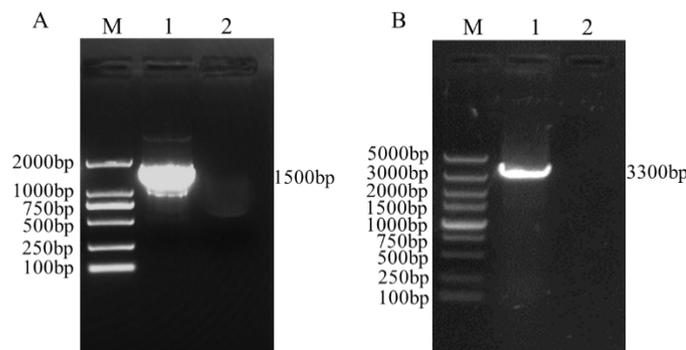


图 2-1 目的基因的 PCR 扩增

Fig. 2-1 PCR amplification of target gene

A. SADS-CoV S1 基因的 PCR 扩增。M: DL2000 DNA 相对分子质量标准; 1: SADS-CoV S1 基因 PCR 产物; 2: 阴性对照; B. SADS-CoV S-trimer 基因的 PCR 扩增。M: DL5000 DNA 相对分子质量标准; 1: SADS-CoV S-trimer 基因 PCR 产物; 2: 阴性对照

A. PCR amplification of the SADS-CoV S1 gene. M: DL2000 DNA Marker; 1: SADS-CoV S1 gene; 2: Negative control; B. PCR amplification of the SADS-CoV S-trimer gene. M: DL5000 DNA Marker; 1: SADS-CoV S-trimer gene; 2: Negative control

2.3.2 S1 蛋白和 S 三聚体 (S-trimer) 蛋白纯化与鉴定

首先将构建的重组质粒 pCAGGS-S1-His 转染至真核表达细胞 HEK293F 中, 转染 5 天后收集细胞上清, 使用 AKTA 仪器连接 HisTrap™ Excel 亲和层析预装柱对细胞表达上清进行纯化。用 250 mM 咪唑洗脱, 洗脱至 145-160 mL 出现洗脱峰, 收集洗脱样品。用 SDS-PAGE 对洗脱峰样品进行鉴定。结果显示蛋白样品在 100-130 kDa 之间有明显蛋白条带, 该条带与预测的 S1 蛋白大小基本相符 (图 2-2 A)。随后对有目的蛋白的样品进行超滤浓缩和缓冲液置换, 浓缩后的样品进行 Western Blot 鉴定, 用 His-tag 抗体 (小鼠单抗) 作为一抗。结果显示, 真核表达的重组 S1 蛋白在 100-130 kDa 之间出现特异性条带, 与 SDS-PAGE 结果一致, 表明 S1 蛋白能与 His 抗体特异性结合具有良好的反应原性 (图 2-2 B)。经 BCA 方法对纯化的 S1 蛋白进行定量, 测所得的蛋白浓度为 15 mg/L, 满足 ELISA 方法建立和后续小鼠免疫等实验的需求。

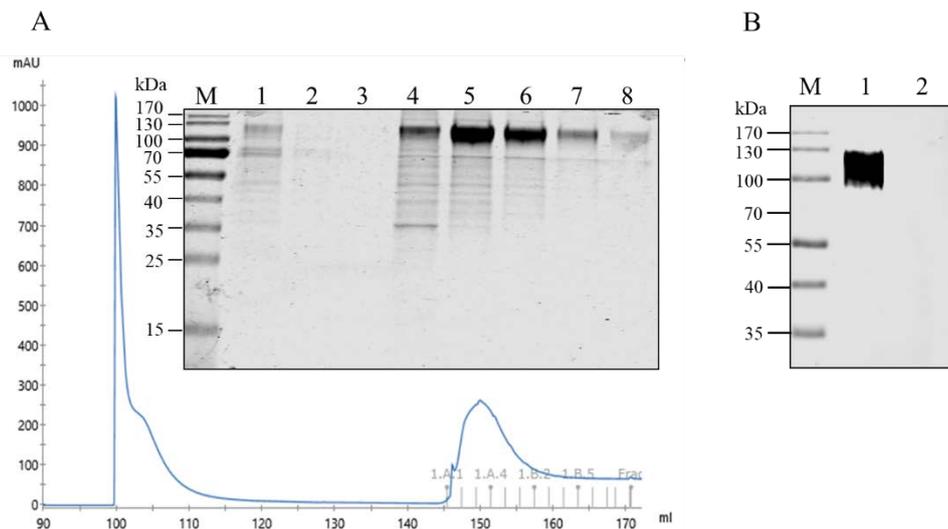


图 2-2 S1 蛋白的 His 亲和纯化及鉴定

Fig.2-2 Purification and identification of S1 protein

A. SADS-CoV S1 的 His 亲和洗脱峰图及 SDS-PAGE。M: 蛋白相对分子质量标准; 1: 亲和纯化流穿液样品; 2-8: 亲和纯化洗脱液样品; B. SADS-CoV S1 蛋白 Western Blot 鉴定。M: 蛋白相对分子质量标准; 1: 纯化浓缩后的重组 S1 蛋白; 2: 1×PBS 缓冲液阴性对照

A. HisTrap dilution profile and SDS-PAGE gel of SADS-CoV S1. M: relative molecular weight of protein; 1: Flow through the sample; 2-7: Elution target protein; B. Western Blot of SADS-CoV S1. M: relative molecular weight of protein; 1: Reducing sample S1 protein; 2: 1×PBS buffer

采用真核表达细胞 HEK293F 对 S-trimer 蛋白进行融合表达, 收集表达上清用 His Trap™ Excel 亲和层析预装柱进行纯化。用 250 mM 咪唑洗脱, 洗脱至 140-160 mL 出现洗脱峰, 收集洗脱样品。收集的洗脱样品各取 40 μ L 加入 10 μ L 的电泳上样缓冲液 5×Loading Buffer, 100°C 水浴

15 min, 用 10% 的 SDS-PAGE 电泳进行鉴定。结果显示蛋白样品在 170 kDa 左右有明显特异性条带, 且条带清晰, 与文献报道相符 (图 2-3 A)。随后对含有目的蛋白的样品进行超滤浓缩和缓冲液置换, 浓缩后的样品进行变性和非变性处理, 并以 His-tag 抗体 (小鼠单抗) 为一抗进行 Western Blot 鉴定, 结果显示, 表达的重组蛋白 S-trimer 能与 His 抗体特异性结合, 且 S-trimer 在非变性条件下能够观察到 S 三聚体和 S 单体条带, 表明 S-trimer 蛋白纯化效果较好, 且具有良好的反应原性 (图 2-3 B)。经 BCA 方法对纯化的 S-trimer 蛋白进行定量, 测其蛋白浓度为 3 mg/L, 满足小鼠免疫的需求。

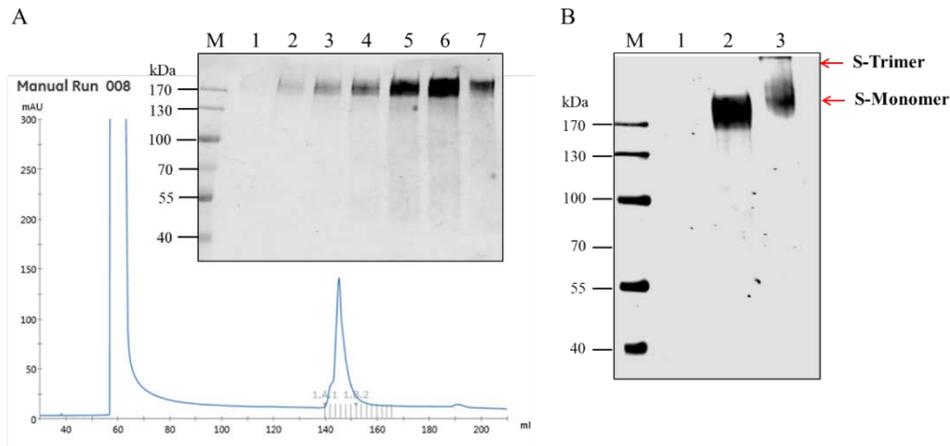


图 2-3 S-trimer 蛋白的纯化及鉴定

Fig.2-3 Purification and identification of S-trimer protein

A. SADS-CoV S-trimer 的 His 亲和洗脱峰图及 SDS-PAGE。M: 蛋白相对分子质量; 1-7: 亲和纯化洗脱液样品; B. SADS-CoV S-trimer 蛋白的 Western Blot 鉴定。M: 蛋白相对分子质量标准; 1: 1×PBS 缓冲液阴性对照; 2: 纯化浓缩后 S-trimer 蛋白的变性样品; 3: 纯化浓缩后 S-trimer 蛋白的非变性样品

A. Hisrap dilution profile and SDS-PAGE gel of SADS-CoV S-trimer. M: Relative molecular weight of protein; 1-7: Elution target protein; B. Identification of SADS-CoV S-trimer protein by Western Blot. M: Relative molecular weight of protein; 1: 1×PBS buffer; 2: Purifying and concentrating the reducing sample of S-trimer protein; 3: Purifying and concentrating the non-reducing sample of S-trimer protein

2.3.3 SADS-CoV 病毒粒子形态学鉴定

为了制备 SADS-CoV 病毒粒子免疫小鼠, 预先准备 20 个 75 cm² 的 Vero E6 细胞用于 SADS-CoV 的增殖, 将 0.5 个 MOI 的 SADS-CoV 100 代病毒液接种于 Vero E6 细胞, 待细胞出现 50% 病变收集细胞培养物, -80°C 反复冻融三次, 收集含 SADS-CoV 的细胞上清通过蔗糖梯度密度离心进行纯化。结果显示, 在蔗糖溶液中有明显的亮白色病毒液带 (图 2-4 A)。将其收集并经过脱糖处理后进行电子显微镜观察, 可观察到不规则圆形表面有尖状突起的病毒颗粒 (图 2-4 B)。经 BCA 方法对纯化的病毒粒子进行蛋白定量, 测得其浓度为 7 mg/L。

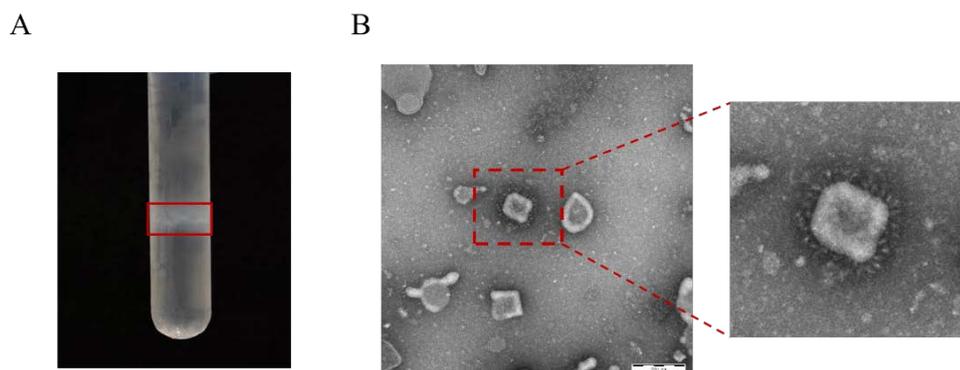


图 2-4 SADS-CoV 的纯化及电子显微镜鉴定

Fig.2-4 Purification and electron microscope identification of SADS-CoV

- A. 蔗糖梯度密度离心后出现的亮白色病毒液带；B. 纯化 SADS-CoV 病毒粒子的电子显微镜图像，标尺=200 nm
- A. SADS-CoV virus bands after sucrose gradient density centrifugation; B. Electron microscope image of purified SADS-CoV virus particles, scale =200 nm

2.3.4 血清抗体效价检测

将纯化的 SADS-CoV 病毒粒子、S-trimer 蛋白和 S1 蛋白作为免疫原分别免疫小鼠。采集第二次免疫一周后小鼠血清，使用间接 ELISA 方法检测二免后小鼠血清针对 SADS-CoV 病毒粒子和 S-trimer 蛋白的抗体效价。先以 2 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的 S-trimer 蛋白包被 ELISA 板，分别对 PBS 对照组、SADS-CoV 免疫组、S-trimer 蛋白免疫组和 S1 蛋白免疫组小鼠血清进行 S-trimer 蛋白抗体效价测定，如图所示，SADS-CoV 免疫组血清抗体效价约为 1:1600（图 2-5 A）；S-trimer 蛋白和 S1 蛋白免疫组血清抗体效价约为 1:6400（图 2-5 B 和 C）。同时以 2 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的 SADS-CoV 病毒粒子包被 ELISA 板，分别对 4 组小鼠血清进行抗体效价测定，如图所示，SADS-CoV 免疫组血清抗体效价约为 1:6400（图 2-5 D）；S-trimer 蛋白和 S1 蛋白免疫组血清稀释倍数 1:400 时 $\text{OD}_{450\text{nm}}$ 值仍低于 1.0（图 2-5 E 和 F）。综上所述表明，SADS-CoV 免疫组、S-trimer 蛋白免疫组和 S1 蛋白免疫组均产生针对 S-trimer 蛋白的抗体，且 S-trimer 蛋白免疫组与 S1 蛋白免疫组血清抗体效价较高；SADS-CoV 免疫组也可以产生针对 SADS-CoV 病毒粒子的抗体且血清抗体效价高于 S-trimer 免疫组和 S1 免疫组。

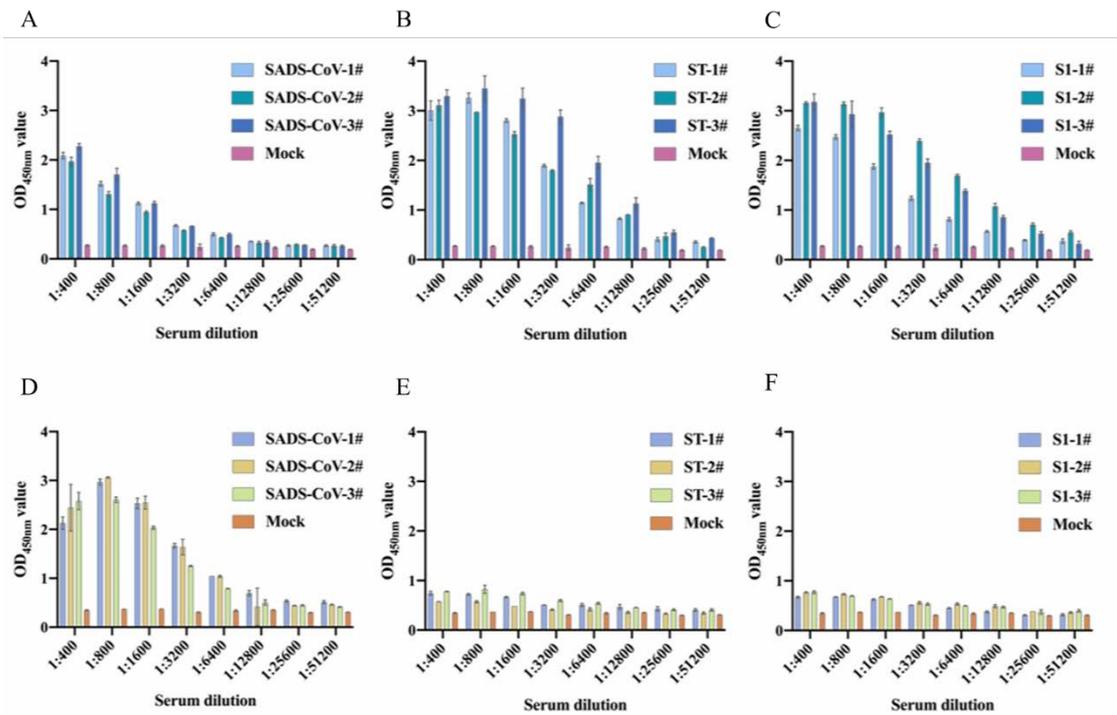


图 2-5 小鼠血清抗体效价检测

Fig.2-5 Detection of serum antibody titer in mice

A. S-trimer 蛋白包被抗原间接 ELISA 检测 SADS-CoV 免疫组小鼠血清抗体效价；B. S-trimer 蛋白包被抗原间接 ELISA 检测 S-trimer 免疫组小鼠血清抗体效价；C. S-trimer 蛋白包被抗原间接 ELISA 检测 S1 免疫组小鼠血清抗体效价；D. SADS-CoV 病毒粒子包被抗原间接 ELISA 检测 SADS-CoV 免疫组小鼠血清抗体效价；E. SADS-CoV 病毒粒子包被抗原间接 ELISA 检测 S-trimer 免疫组小鼠血清抗体效价；F. SADS-CoV 病毒粒子包被抗原间接 ELISA 检测 S1 免疫组小鼠血清抗体效价（以阳性血清孔 OD_{450nm} 值约为 1.0，阴性血清孔 OD_{450nm} 值 < 0.2，且 P/N > 2.1 时的血清的最大稀释倍数为血清抗体效价）

A. Detection of serum antibody titer in mice immunized with SADS-CoV by S-trimer iELISA; B. Detection of serum antibody titer in mice immunized with S-trimer by S-trimer iELISA; C. Detection of serum antibody titer in mice immunized with S1 by S-trimer iELISA; D. Detection of serum antibody titer in mice immunized with SADS-CoV by SADS-CoV iELISA; E. Detection of serum antibody titer in mice immunized with S-trimer by SADS-CoV iELISA; F. Detection of serum antibody titer in mice immunized with S1 by SADS-CoV iELISA (When the OD_{450nm} value of positive serum pore is about 1.0, the OD_{450nm} value of negative serum pore is less than 0.2, and the P/N > 2.1, the maximum dilution multiple of serum is the serum antibody titer)

2.3.5 血清中和抗体检测

为了比较 SADS-CoV、S-trimer 蛋白、S1 蛋白的免疫效果，使用血清中和试验对三免后小鼠血清进行中和活性测定。采集 PBS 空白组、SADS-CoV 免疫组、S-trimer 蛋白免疫组和 S1 蛋白免疫组三免后小鼠血清，1000×g 离心 10 min，56°C 灭活 30 min。随后对采集的血清进行 2 倍倍比稀释，不同稀释度的血清再与 2×10³ TCID₅₀ SADS-CoV 病毒液等体积混合，置于 37°C 温箱孵育 1 h，随后接种至 Vero E6 细胞，3 天后观察细胞病变。计算 PBS 空白组、SADS-CoV 免疫组、S-

trimer 蛋白免疫组和 S1 蛋白免疫组的平均中和抗体效价分别为 1:5.17、1:22.90、1:61.84、1:102.69，并使用 GraphPad Prism 9.0 进行数据分析。结果显示，与 PBS 空白组相比 SADS-CoV 免疫组、S-trimer 蛋白免疫组和 S1 蛋白免疫组均能诱导小鼠产生中和抗体，且 S-trimer 蛋白免疫组血清中和抗体水平要高于 S1 蛋白免疫组和 SADS-CoV 免疫组，表明 S-trimer 蛋白的免疫效果最好（图 2-6）。

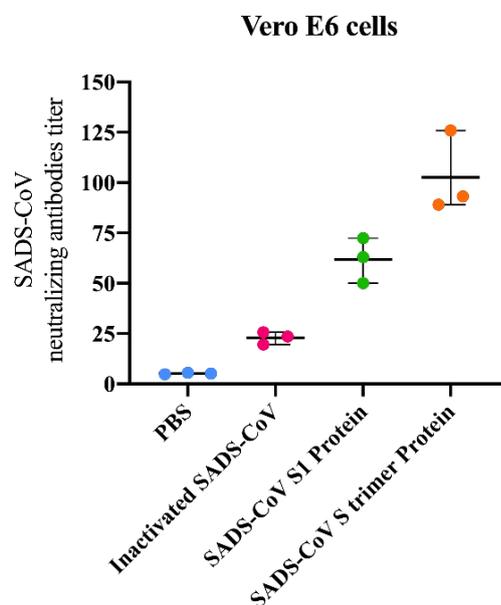


图 2-6 小鼠血清抗体中和活性测定

Fig.2-6 Determination of serum antibody activity in mice

2.3.6 杂交瘤细胞筛选结果

通过对免疫后小鼠血清效价和中和抗体水平检测结果的分析，选取 S-trimer 蛋白免疫组的小鼠进行细胞融合，经过 4 次亚克隆筛选，最终筛选到 3 株抗 SADS-CoV S 蛋白抗体的杂交瘤细胞株，将其命名为 4F5、6E9、8D6。通过间接 ELISA 方法，利用带 His 标签的 His-S-trimer、His-S1、His-N 蛋白检测 3 株单克隆抗体与 His 标签的交叉反应情况。结果显示，单克隆抗体与 His-S-trimer 蛋白和 His-S1 蛋白反应，与 His-N 蛋白不反应（图 2-7）。证明这 3 株单克隆抗体能够识别 S-trimer 及 S1 蛋白，与 His 无交叉反应。

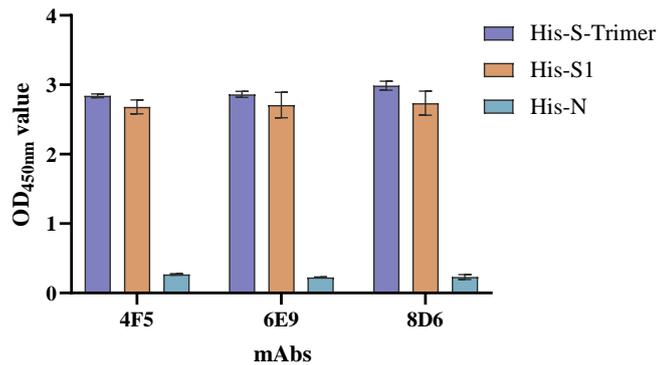


图 2-7 单克隆抗体特异性鉴定

Fig. 2-7 Monoclonal antibody specificity characterization

2.3.7 单克隆抗体间接免疫荧光鉴定结果

为了进一步对获得的单克隆抗体进行验证，将 pCAGGS-Myc、pCAGGS-S-Myc 和 pCAGGS-S1-Myc 质粒转染 HEK293T 细胞，转染 24 h 固定细胞，以上述筛选的 4F5、6E9 和 8D6 杂交瘤细胞的上清作为一抗，阳性对照设置位 Myc 标签抗体，二抗使用 AF488 标记的山羊抗鼠 IgG(H+L)，进行间接免疫荧光试验。结果显示，本研究获得的 4F5、6E9 和 8D6 杂交瘤细胞上清均能与转染 pCAGGS-S-Myc 和 pCAGGS-S1-Myc 质粒的 HEK293T 细胞反应，出现明显荧光，与转染 pCAGGS-Myc 的 HEK293T 细胞不发生反应，该结果与阳性对照相符（图 2-8）。表明本研究获得的 3 株单克隆抗体能够特异性识别 SADS-CoV S 蛋白与 S1 蛋白，且可用于间接免疫荧光检测 HEK293T 细胞中外源表达的 SADS-CoV S 蛋白与 S1 蛋白。

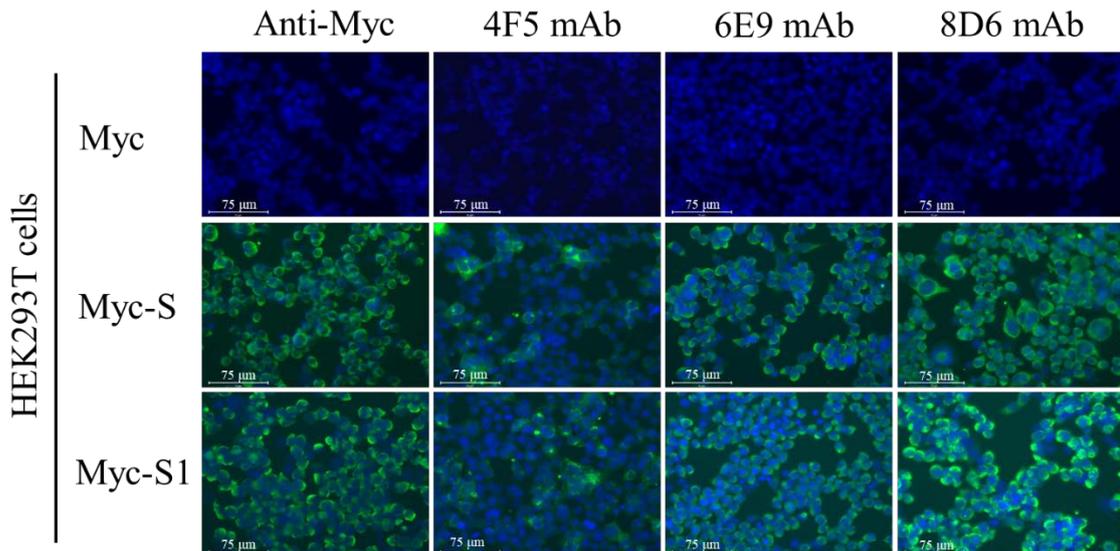


图 2-8 单克隆抗体间接免疫荧光鉴定

Fig. 2-8 Indirect immunofluorescence identification of monoclonal antibodies

2.3.8 单克隆抗体的纯化结果

将采集到的腹水进行离心和过滤，去除腹水中的脂肪和红细胞，用 Protein G Focurose 4FF 层析柱和 AKTA 进行纯化，纯化产物进行 SDS-PAGE 分析。结果显示，单克隆抗体 4F5、6E9、8D6 流穿液样品中含有大量杂蛋白，纯化后的样品杂带较少，且在 55 kDa 与 25 kDa 处可见清晰重链和轻链条带（图 2-9），表明各单克隆抗体得到了较好的纯化。用 BCA 方法测定各单克隆抗体的浓度，并将其浓度定量到 10 mg/mL，分装保存于 -80°C。

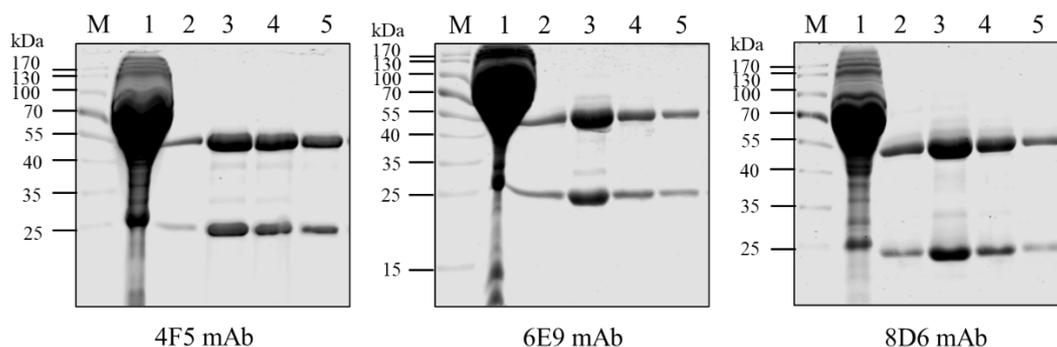


图 2-9 腹水抗体的 SDS-PAGE 鉴定

Fig.2-9 Identification of ascites antibody by SDS-PAGE

M: 蛋白分子相对质量标准; 1: 亲和纯化流穿液样品; 2-5: 亲和纯化洗脱液样品

M: Relative molecular weight of protein; 1: Flow through the sample; 2-5: Elution target protein

2.3.9 单克隆抗体的相对亲和力测定

为了比较 3 株单克隆抗体间的亲和力差异，利用间接 ELISA 测定 3 株单克隆抗体对 SADS-CoV 病毒粒子和 S1 蛋白的相对亲和力，并利用 GraphPad Prism 9.0 进行曲线拟合，以曲线上 50% 结合时的单抗浓度作为其相对亲和力。结果显示，以 SADS-CoV 病毒粒子为包被抗原时，4F5、6E9 和 8D6 的 EC₅₀ 分别为 9499 ng/mL、8897 ng/mL 和 2012 ng/mL（图 2-10 A）；以 S1 蛋白作为包被抗原时，4F5、6E9 和 8D6 的 EC₅₀ 分别为 1547 ng/mL、1006 ng/mL 和 308.2 ng/mL（图 2-10 B）。综上所述表明，3 株抗体针对 SADS-CoV 病毒粒子和 SADS-CoV S1 蛋白的相对亲和力 8D6 > 6E9 > 4F5。

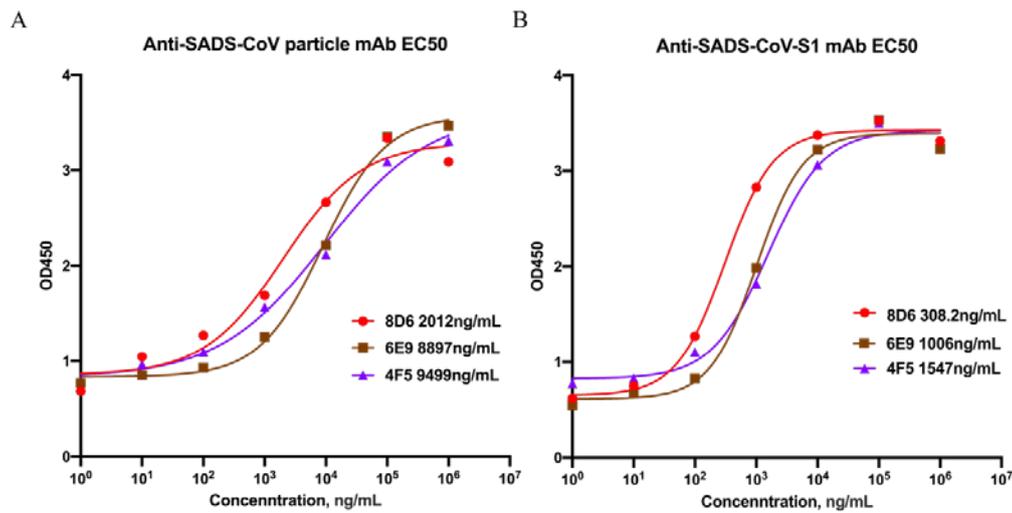


图 2-10 间接 ELISA 方法测定抗体相对亲和力

Fig.2-10 Indirect ELISA was used to determine the relative affinity of antibody

A. mAbs 4F5、6E9 和 8D6 与 SADS-CoV 病毒粒子的相对亲和力；B. mAbs 4F5、6E9 和 8D6 与 SADS-CoV S1 蛋白的相对亲和力

A. Relative affinity of mAbs 4F5, 6E9 and 8D6 with SADS-CoV virus particles; B. Relative affinity of mAbs 4F5, 6E9 and 8D6 with SADS-CoV S1 protein

2.3.10 单克隆抗体中和活性检测

通过中和试验验证纯化的单克隆抗体 4F5、6E9 和 8D6 对 SADS-CoV 的中和作用。本研究分别对 3 株纯化的腹水抗体进行稀释，浓度从 $10^3 \mu\text{g/mL}$ 开始 10 倍倍比稀释至 $0.001 \mu\text{g/mL}$ 。将稀释后的抗体与 $2 \times 10^3 \text{ TCID}_{50}$ SADS-CoV 混合在 37°C 共孵育 1 h，随后接种于 Vero E6 细胞，3 天后观察细胞全部病变，结果发现 3 株单克隆抗体均无中和活性。

2.3.11 单克隆抗体亚型鉴定结果

进一步对单克隆抗体的生物学特性进行验证，首先使用 SBA Clonotyping System-HRP 抗体亚型鉴定试剂盒对本研究筛选到的单克隆抗体 4F5、6E9 和 8D6 进行亚型鉴定。结果显示，6E9 重链为 IgG1，4F5 与 8D6 重链为 IgG2b，3 株单克隆抗体轻链均为 Kappa 链（图 2-11）。

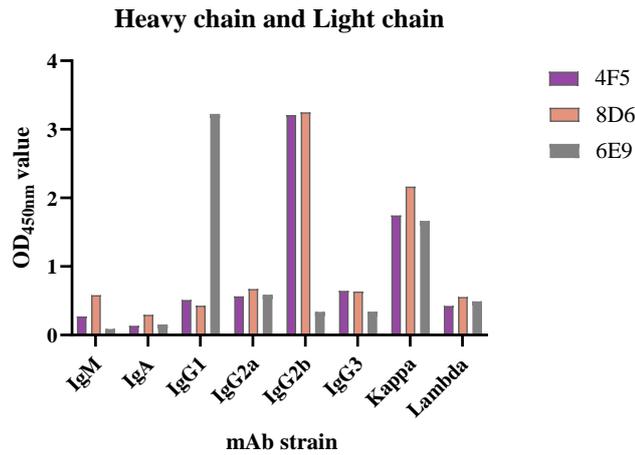


图 2-11 抗体亚类鉴定

Fig.2-11 Identification of antibodies subclasses

2.3.12 Western Blot 鉴定抗体反应原性

其次，为了鉴定单克隆抗体 4F5、6E9 和 8D6 的反应原性及在 Western Blot 实验中的应用，将 pCAGGS-His、pCAGGS-S-trimer-His 和 pCAGGS-S1-His 质粒转染至 HEK293T 细胞，转染 24 小时后收集的细胞样品进行 Western Blot 检测。分别用制备的 3 株单克隆抗体和 His 标签的单抗作为一抗检测细胞中蛋白的表达情况。结果显示，使用 3 株单克隆抗体与 His 抗体均可在 170 kDa 和 70 kDa 处孵出目的条带（图 2-12）。表明本研究制备的 3 株单克隆抗体可应用于 Western Blot 实验检测 S-trimer 和 S1 蛋白且具有良好的反应原性。

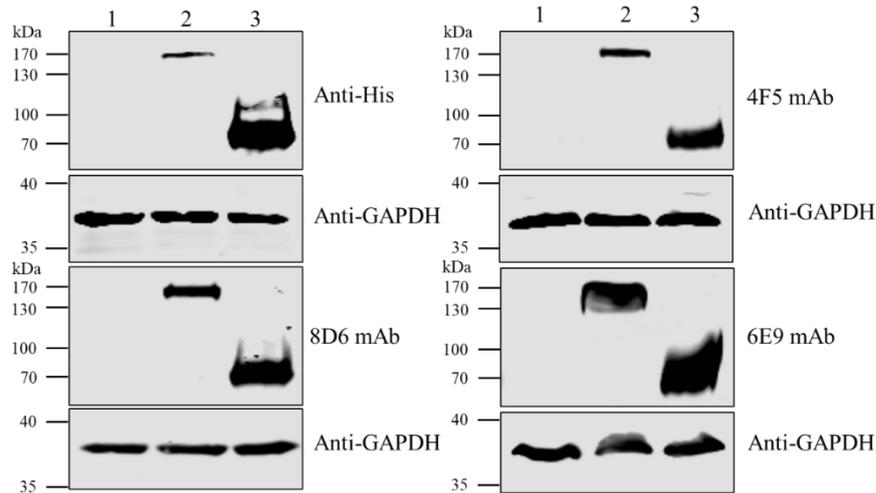


图 2-12 Western Blot 鉴定抗体的反应原性

Fig.2-12 Western Blot identification of antibodies reactivity

1: 转染 pCAGGS-His 的 HEK293T 细胞样品; 2: 转染 pCAGGS-S-trimer-His 的 HEK293T 细胞样品; 3: 转染 pCAGGS-S1-His 的 HEK293T 细胞样品

1: HEK293T cells samples transfected with pCAGGS-His. 2: HEK293T cells samples transfected with pCAGGS-S-trimer-His. 3: HEK293T cell samples transfected with pCAGGS-S1-His

2.3.13 间接免疫荧光鉴定抗体特异性

进一步通过间接免疫荧光试验鉴定单克隆抗体 4F5、6E9 和 8D6 的特异性。分别取 MOI 为 0.1 的 SADS-CoV、PEDV、TGEV 和 PDCoV 病毒液接种于铺满单层 LLC-PK1 细胞的 12 孔板，待细胞病变后进行甲醇固定，以本研究制备的 3 株单克隆抗体及各病毒 N 蛋白单克隆抗体作为一抗，二抗使用 AF488 标记的山羊抗鼠 IgG (H+L)，进行间接免疫荧光鉴定，检测其特异性。检测结果显示，四种冠状病毒都能与各自的 N 蛋白单克隆抗体反应出现绿色荧光。本研究制备的 3 株抗体均在 SADS-CoV 感染的细胞中出现荧光，而在其它 3 种猪肠道冠状病毒感染的细胞中不出现荧光（图 2-13）。表明本研究制备的 3 株单克隆抗体只与 SADS-CoV 反应，而不与其它 3 种猪肠道病毒反应，具有良好的特异性。

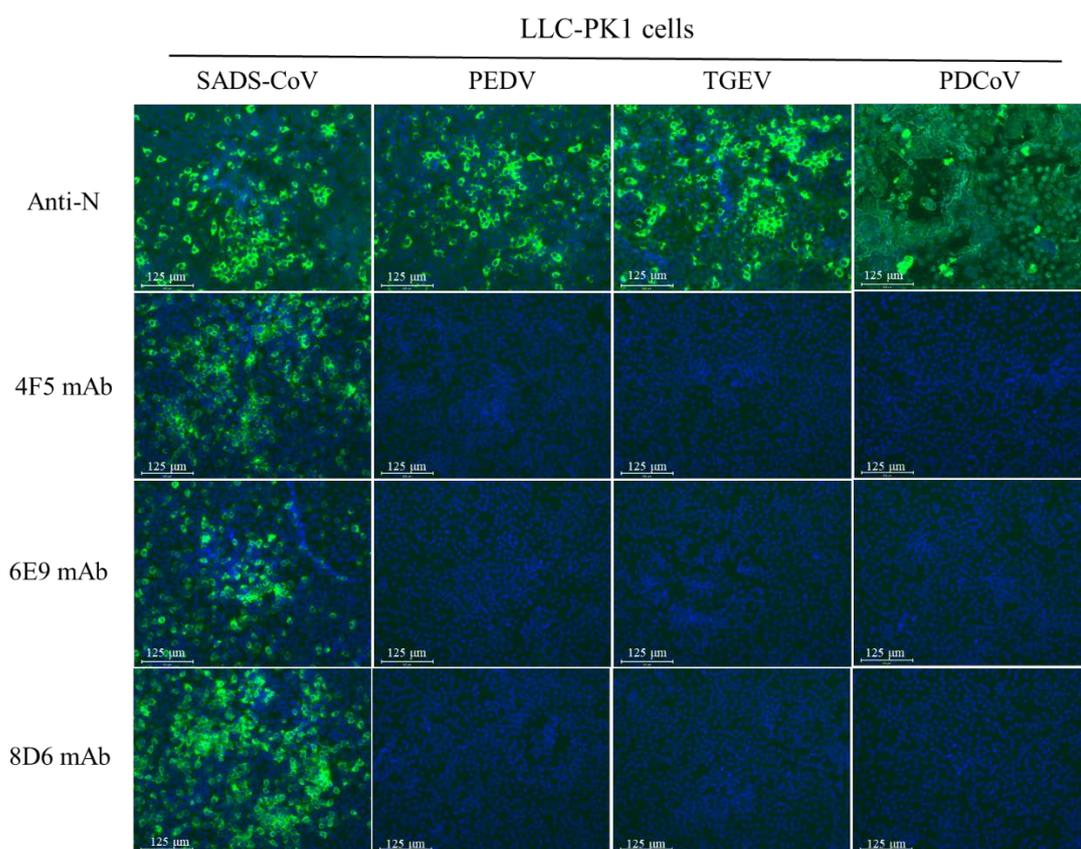


图 2-13 间接免疫荧光鉴定单克隆抗体特异性

Fig.2-13 IFA identification monoclonal antibodies specificity

2.3.14 免疫组织化学染色

最后，验证本研究制备的单克隆抗体 4F5、6E9 和 8D6 在免疫组织化学染色试验中的应用。使用制备的 mAbs 4F5、6E9 和 8D6 对感染 SADS-CoV 的仔猪和对照组仔猪的回肠组织切片进行染色。染色结果显示，在 SADS-CoV 感染的仔猪回肠组织上皮细胞中呈阳性反应，且 mAb 8D6 比 6E9 和 4F5 的染色程度深，说明本研究制备的 3 株单克隆抗体均可用于免疫组织化学染色，且 mAb 8D6 的染色效果较好（图 2-14）。

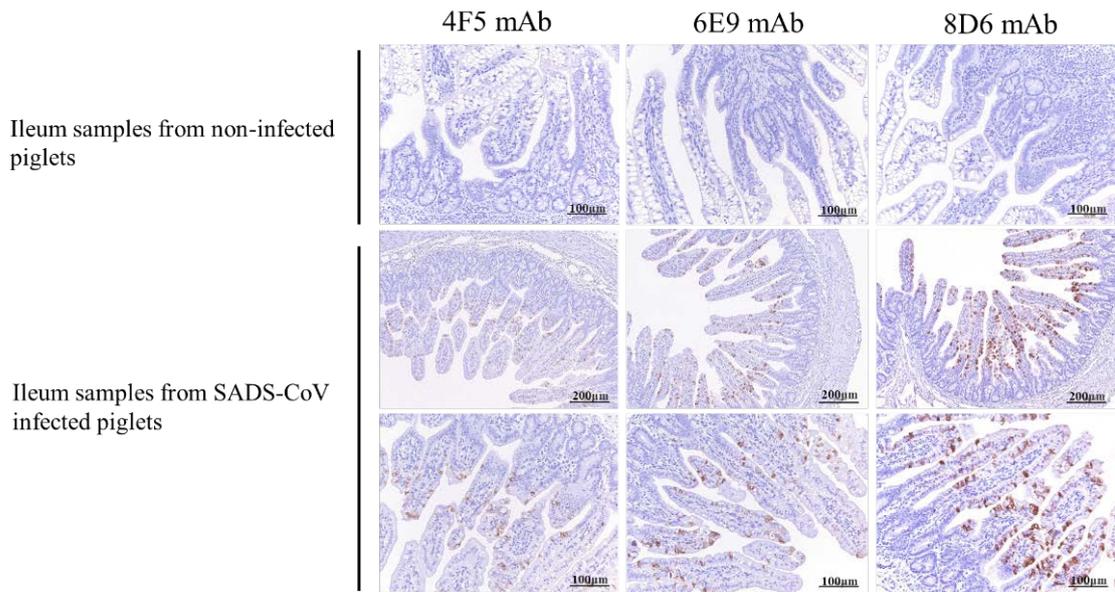


图 2-14 SADS-CoV 感染回肠组织免疫组织化学染色

Fig. 2-14 Immunohistochemical staining of ileum infected by SADS-CoV

2.3.15 S1 蛋白的抗原表位短肽设计

根据 SADS-CoV S1 蛋白相关报道及生物信息学软件的预测结果,本研究对 SADS-CoV S1 蛋白进行了一系列的短肽设计。第一轮,根据 S1 蛋白的基本结构将其划分为 6 个截短体,即 S1A (1-546 aa)、S1B (251-546 aa)、S1C (251-403 aa)、S1D (276-546 aa)、S1E (276-404 aa)、S1F (18-275 aa),根据 Western Blot 检测结果,确定 mAb 6E9 识别的表位位于 404-546 aa 之间, mAbs 4F5 和 8D6 识别表位位于 276-404 aa 的 CTD 区域。

针对 mAb 6E9 识别的 404-546 aa 区域进行第二轮截短,将其截短为 D1 (404-483 aa)、D2 (434-546 aa),识别出 D2 后将其截短为 D3 (434-500 aa)、D4 (501-546 aa);进一步识别出 D4 片段,进行第三轮截短,将其划分为 D5 (434-473 aa)、D6 (467-500 aa)、D7 (478-500 aa)、D8 (490-500 aa)、D9 (467-489 aa),Western blot 结果将 mAb 6E9 识别区域定位于 S1 蛋白的 490-500 aa;从 D8 肽段 (490-500 aa) 的 N 端和 C 端逐步去除氨基酸,依次截短为 D10-D17,利用 Western Blot 实验鉴定 mAb 6E9 识别 S1 蛋白的最小氨基酸序列 (图 2-15 A)。

针对 mAbs 4F5 和 8D6 识别的 276-404 aa 区域进行第二轮截短,将其截短为 E1 (276-360 aa)、E2 (3330-404 aa),识别出 E1 后将其截短为 E3 (276-319 aa)、E4 (320-360 aa);进一步识别出 E3 片段,进行第三轮截短,将其划分为 E5 (276-300 aa)、E6 (295-319 aa)、E7 (295-308 aa)、E8 (295-302 aa)、E9 (309-319 aa),Western blot 结果将 mAbs 4F5 和 8D6 识别区域定位于 S1 蛋白的 309-319 aa;从 E9 肽段 (309-319 aa) 的 N 端和 C 端逐步去除氨基酸,依次截短为 E10-E16,利用 Western Blot 实验鉴定 mAbs 4F5 和 8D6 识别 S1 蛋白的最小氨基酸序列 (图 2-15 B)。

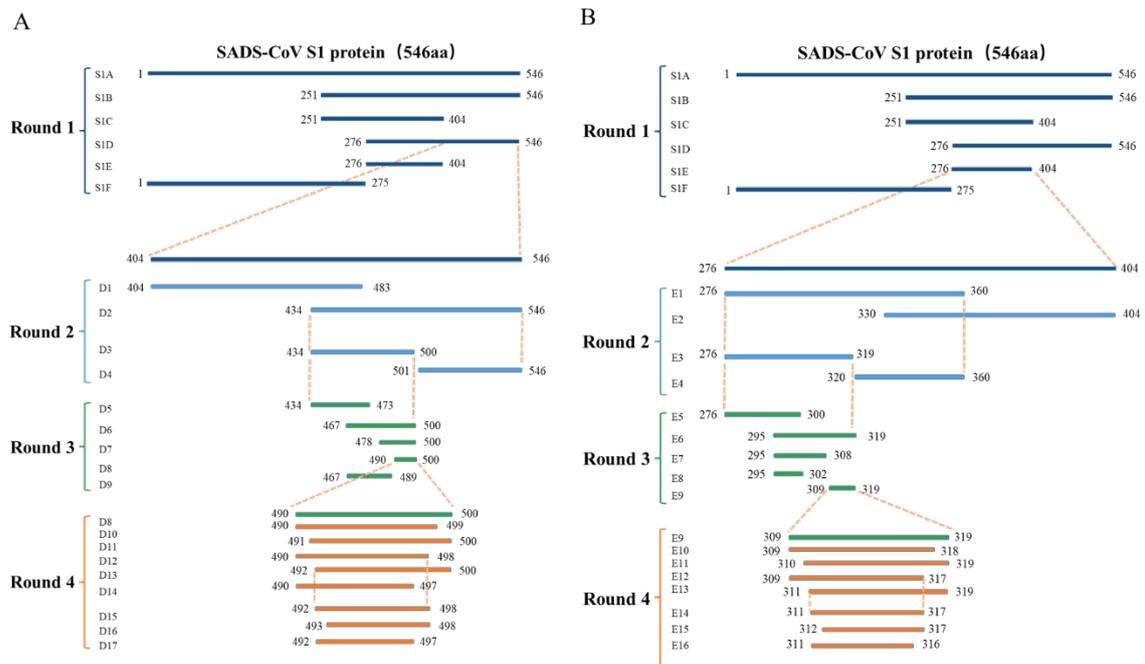


图 2-15 SADS-CoV S1 蛋白抗原表位短肽设计

Fig. 2-15 Peptides design of epitope against SADS-CoV S1 protein

A. mAb 6E9 识别 SADS-CoV S1 蛋白抗原表位的短肽设计；B. mAbs 4F5 和 8D6 识别 SADS-CoV S1 蛋白抗原表位的短肽设计

A. Design of short peptide for mAb 6E9 to recognize the epitope of SADS-CoV S1 protein; B. Design of short peptide for mAbs 4F5 and 8D6 to recognize the epitope of SADS-CoV S1 protein

2.3.16 单克隆抗体表位的鉴定

为了鉴定本研究制备的单克隆抗体 4F5、6E9 和 8D6 所识别 S1 蛋白的抗原表位，将 S1 蛋白设计 6 个截短体。分别为 S1A (1-546 aa)、S1B (251-546 aa)、S1C (251-403 aa)、S1D (276-546 aa)、S1E (276-404 aa)、S1F (18-275 aa)，末端添加 Fc 标签，构建重组质粒，进行 Western blot 实验 (图 2-16 A)。结果显示，S1A-S1F 段蛋白均能与鼠抗 hFc 标签抗体反应，表明各分段蛋白均能真核表达；单克隆抗体 6E9 与 S1A、S1B 和 S1D 反应，与 S1C、S1E 和 S1F 不反应，表明单克隆抗体 6E9 识别的表位位于 404-546 aa 之间 (图 2-16 B)。单克隆抗体 4F5 和 8D6 与 S1A-S1E 均能反应，与 S1F 不反应，表明单克隆抗体 4F5 和 8D6 识别表位位于 276-404 aa 的 CTD 区域。

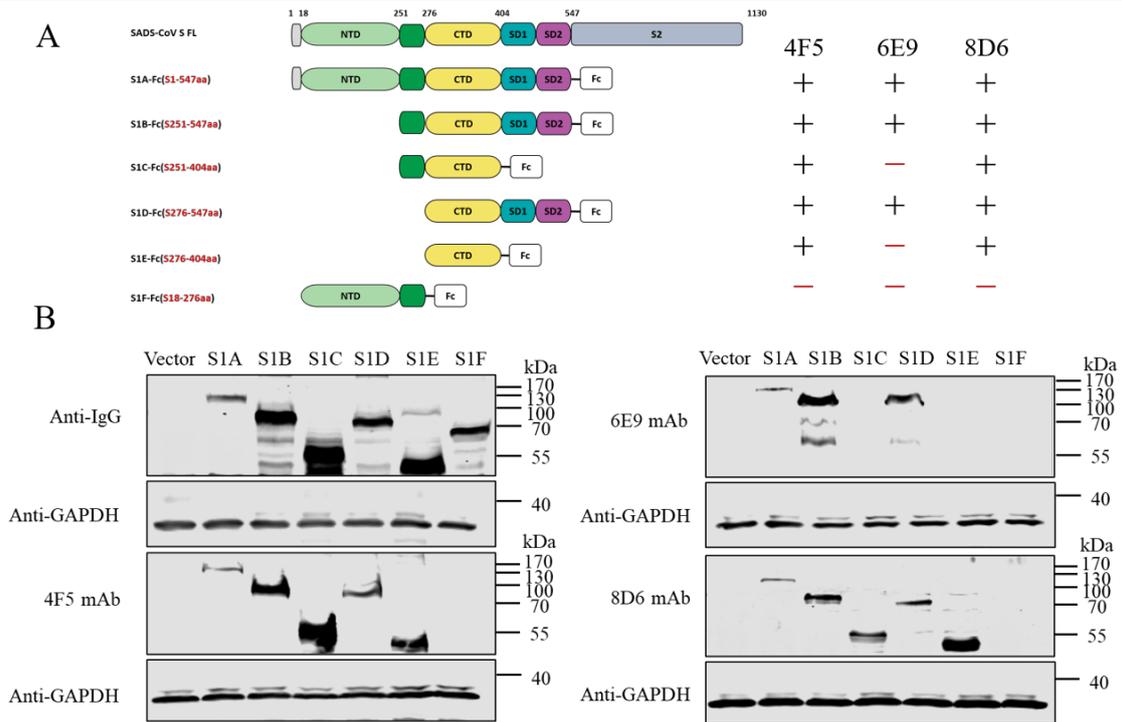


图 2-16 抗原表位的初步鉴定

Fig. 2-16 The initial identification of epitopes

A. SADS-CoV S 全长及截短蛋白区域划分；B. Western blot 实验初步鉴定 mAbs 4F5、6E9 和 8D6 识别 SADS-CoV S1 蛋白表位区域

A. SADS-CoV spike trimer and truncated protein region classification; B. Western blot identification of mAbs 3E9, 4F5 and 8D6 recognition epitope

进一步精确定位单克隆抗体 4F5、6E9 和 8D6 所识别 S1 蛋白的核心表位，将初步鉴定单克隆抗体识别的表位区域 404-546 aa 和 276-404 aa 进行了逐步截短，构建 S1 蛋白各截短体的重组质粒。将各截短体转染 HEK293T 细胞表达，收集细胞蛋白，以制备的 mAbs 4F5、6E9 和 8D6 为一抗，进行 Western blot 鉴定。

对 mAb 6E9 进行抗原表位的精确定位，初步鉴定结果显示 mAb 6E9 识别 D6 肽段（467-500 aa）（图 2-17 A）；对 D6 肽段（467-500 aa）进行截短，抗原表位缩小至 D8 肽段（490-500 aa）（图 2-17 B）；为进一步精确 mAb 6E9 所识别抗原表位的核心序列，对 D8 肽段（490-500 aa）进一步划分，从 D8 肽段（490-500 aa）的 N 端和 C 端逐步去除氨基酸，结果显示 mAb 6E9 可识别至 D15 肽段（492-498 aa）（图 2-17 C）；即最终鉴定出 mAb 6E9 识别的 S1 蛋白抗原表位氨基酸序列为 ⁴⁹²ARFVDRL⁴⁹⁸（图 2-17 D）。

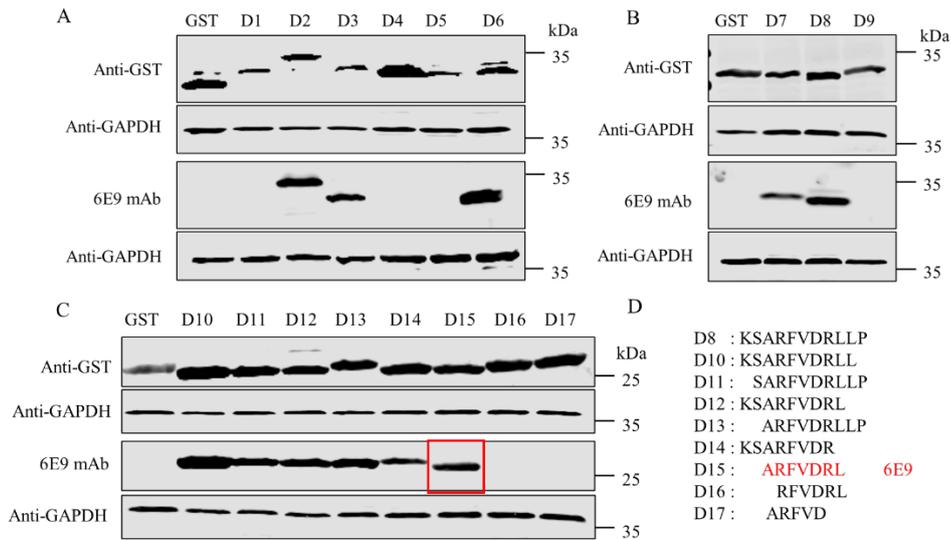


图 2-17 单克隆抗体 6E9 抗原表位的 Western Blot 鉴定

Fig. 2-17 Western Blot identification of epitopes of monoclonal antibodies 6E9

A~C. mAb 6E9 识别 pCAGGS-GST-D1~D17 转染 HEK293T 细胞样品的 Western blot 鉴定；D. mAb 6E9 识别的最小肽段氨基酸序列，即 D15 肽段 ⁴⁹²ARFVDRL⁴⁹⁸

A~C. Western blot identification of mAb 6E9 recognizing pCAGGS-GST-D1~D6 transfected HEK293T cell samples;
D. mAb 3E9 reacted with the peptide D15 (⁴⁹²ARFVDRL⁴⁹⁸)

对 mAbs 4F5 和 8D6 所识别抗原表位进行精确定位，初步鉴定结果显示 mAbs 4F5 和 8D6 所识别的最小肽段为 E6 肽段 (295-319 aa) (图 2-18 A)；对 E6 肽段 (295-319 aa) 进行截短，抗原表位缩小至 E9 肽段 (309-319 aa) (图 2-18 B)；为进一步精确 mAbs 4F5 和 8D6 所识别抗原表位的核心序列，对 E9 肽段 (309-319 aa) 进一步划分，从 E9 肽段 (309-319 aa) 的 N 端和 C 端逐步去除氨基酸，结果显示 mAb 4F5 可识别至 E14 肽段 (311-317aa)，mAb 8D6 可识别至 E16 肽段 (311-316 aa) (图 2-18 C)；即最终鉴定出 mAb 4F5 识别 S1 蛋白的最小表位氨基酸序列为 ³¹¹NPDQRDF³¹⁷，mAb 8D6 识别 S1 蛋白的最小表位氨基酸序列为 ³¹¹NPDQRD³¹⁶ (图 2-18 D)。

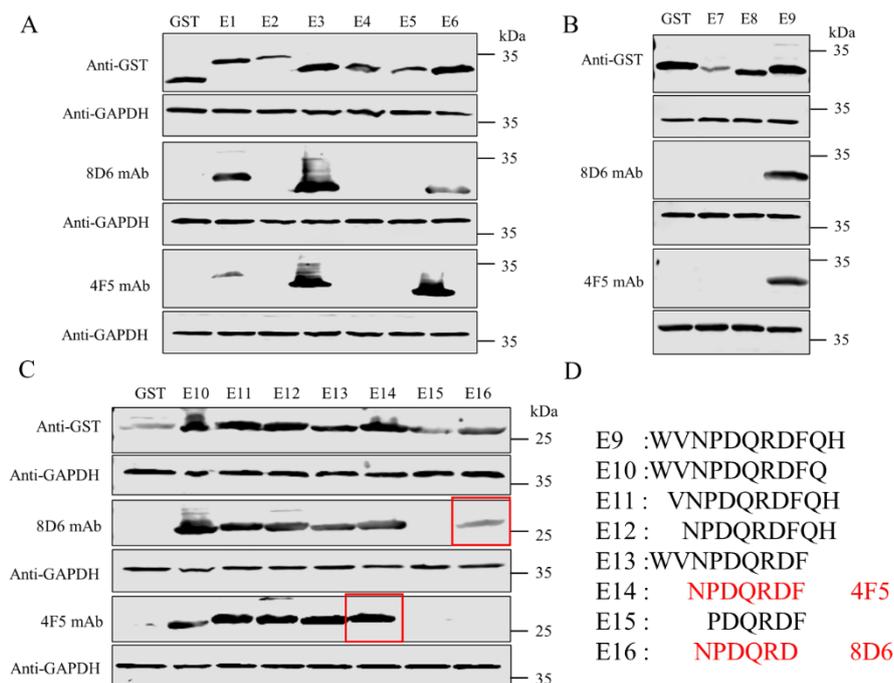


图 2-18 单克隆抗体 4F5 和 8D6 抗原表位的 Western Blot 鉴定

Fig. 2-18 Western Blot identification of epitopes of monoclonal antibodies 4F5 and 8D6

A~C. mAbs 4F5 和 8D6 识别 pCAGGS-GST-E1~E16 转染 HEK293T 细胞样品的 Western blot 鉴定；D. mAb 4F5 和

8D6 识别的最小肽段氨基酸序列，即 E14 肽段 ³¹¹NPDQRDF³¹⁷, E16 肽段 ³¹¹NPDQRD³¹⁶

A~C. Western blot identification of mAbs 4F5 and 8D6 recognizing pCAGGS-GST-E1~E16 transfected HEK293T cell samples; D. mAb 4F5 and 8D6 reacted with the peptide E14 (³¹¹NPDQRDF³¹⁷) and E16 (³¹¹NPDQRD³¹⁶), respectively

2.3.17 抗原表位的保守性分析

利用生物学分析软件对本研究鉴定出的 3 株单克隆抗体的表位序列进行比对，结果显示 4F5 抗原表位 ³¹¹NPDQRDF³¹⁷, 8D6 抗原表位 ³¹¹NPDQRD³¹⁶, 6E9 抗原表位 ⁴⁹²ARFVDRL⁴⁹⁸ 在不同的 SADS-CoV S 相关序列中都高度保守（图 2-19）。

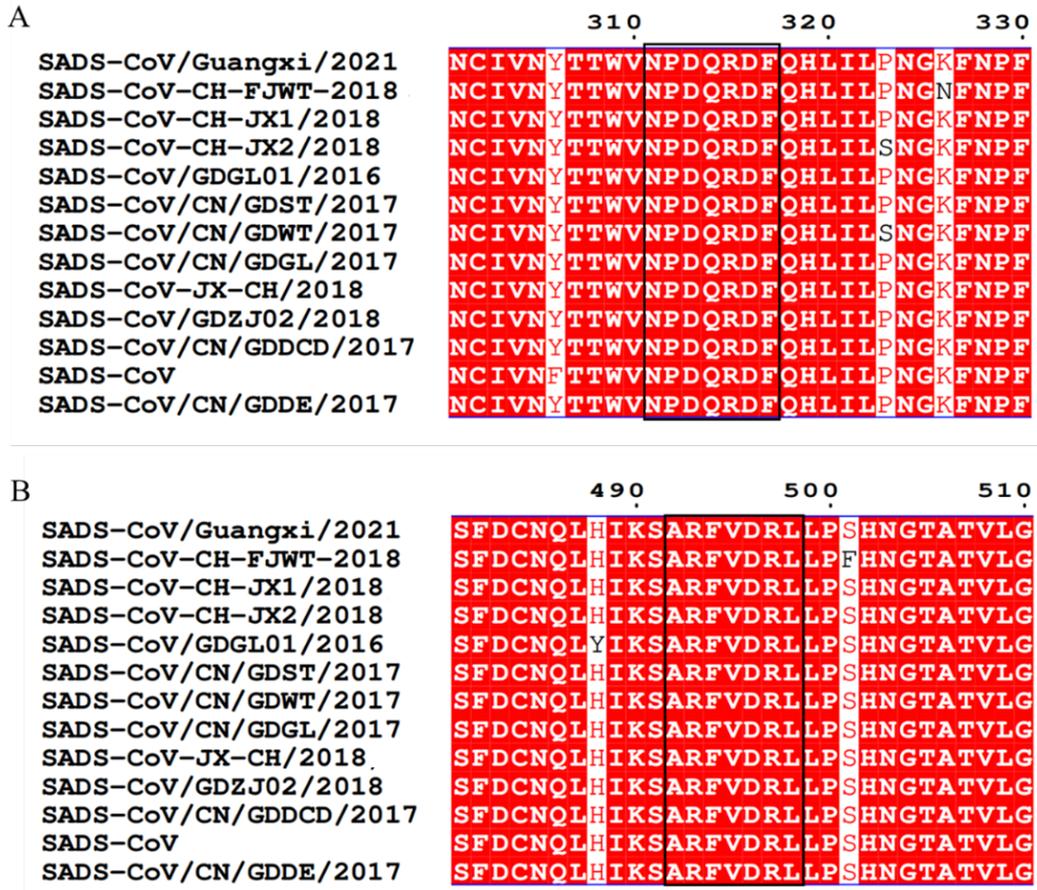


图 2-19 单克隆抗体 4F5、6E9 和 8D6 识别抗原表位的保守性分析

Fig. 2-19 Conservative analysis of epitopes of monoclonal antibodies 4F5, 6E9 and 8D6

A. mAbs 4F5 和 8D6 的抗原表位序列比对; B. mAb 6E9 的抗原表位序列比对

A. Comparison of epitope sequences between mAbs 4F5 and 8D6; B. Comparison of epitope sequences of mAb 6E9

2.3.18 抗原表位的定位分析

通过分析 PDB 数据库中的 SADS-CoV S 蛋白晶体结构，对 3 株单克隆抗体的结合表位进行定位分析，结构模型显示 8D6 和 4F5 的结合表位定位于 S 蛋白中的 CTD 区域，6E9 的结合表位则定位于 S 蛋白结构中较为隐蔽的 SD2 区域（图 2-20）。

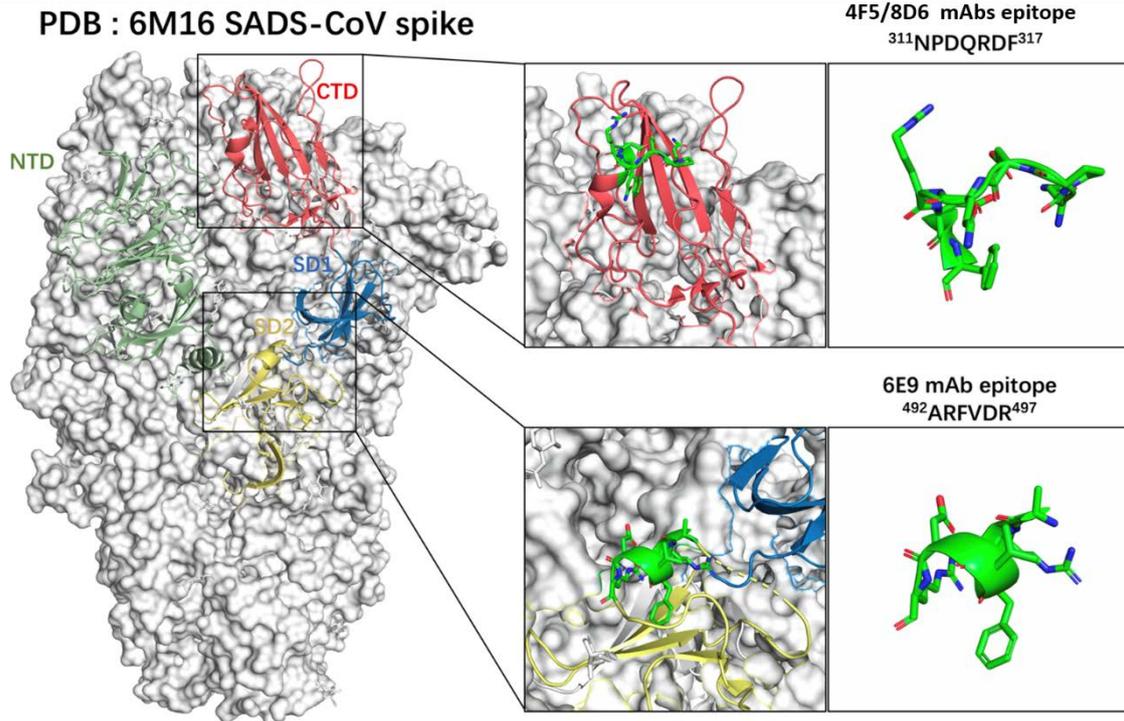


图 2-20 mAbs 4F5、8D6 和 6E9 识别抗原表位的定位分析

Fig. 2-20 Localization analysis of antigenic epitopes recognized by mAbs 4F5, 8D6 and 6E9

2.4 讨论

S 蛋白是冠状病毒入侵靶细胞的关键蛋白，其主要以三聚体的形式存在于病毒粒子表面，同时含有大量的糖基化修饰位点。S 蛋白由两个功能不同的亚基组成，S1 亚基能与宿主细胞表面的受体结合，帮助病毒附着；S2 亚基能介导 S 蛋白变构从而与宿主细胞膜融合，使病毒基因组进入宿主细胞 (HUA et al., 2023)。除此之外，S 蛋白还能诱导产生中和抗体，S1 亚基更是主要的中和表位富集区，因此 S 蛋白常作为疫苗研发和抗病毒药物研究的重要靶点 (SHI et al., 2021)。目前常见以 S 三聚体蛋白、S1 蛋白或以灭活全病毒粒子为冠状病毒疫苗主要成分，为探究 SADS-CoV 不同免疫原直接的免疫原性差异，同时进一步筛选出针对 S 蛋白的单克隆抗体，本研究选用真核表达纯化的 S 三聚体蛋白和 S1 蛋白及全病毒粒子作为免疫原免疫小鼠，评价不同免疫原的抗原性，进一步筛选 S 蛋白单克隆抗体，并对筛选到的抗体进行表位鉴定和初步应用。

在本研究中，我们通过 HEK293F 悬浮细胞表达系统表达纯化了 S 全长三聚体蛋白和 S1 蛋白，并且使用蔗糖梯度离心法纯化了 SADS-CoV 病毒粒子。随后用纯化的 S 全长三聚体蛋白、S1 蛋白和病毒粒子分别免疫小鼠，通过间接 ELISA 方法比较三种不同免疫原所诱导的抗体水平。结果显示，S 全长三聚体蛋白、S1 蛋白和病毒粒子均能诱导机体产生针对 S 蛋白的免疫应答；而免疫 S 全长三聚体蛋白和 S1 蛋白后诱导产生的抗体与 SADS-CoV 病毒粒子结合能力较差，猜测可能与包被的病毒粒子中 S 蛋白的含量较少有关。本研究通过中和实验测定免疫后小鼠血清的中和水平，结果显示，S1 蛋白与 S 全长三聚体蛋白均能诱导产生相似的较高中和抗体水平，S1 蛋白诱导的中和抗体的水平略低于 S 全长，这说明 SADS-CoV 的 S1 蛋白包含了主要的诱导中和抗体产生的抗原表位，S2 亚基也具有一定诱导中和抗体的抗原表位有关。S2 作为介导膜融合的关键

蛋白，且具有很高的保守性，也能作为诱导中和抗体的关键免疫原。例如，复旦大学曾在新冠康复病人血清中分离出一株靶向 S2 亚基的人中和抗体 76E1，对多种冠状病毒具有广谱的中和活性（SUN et al., 2022a）。

杂交瘤技术的产生极大促进了单克隆抗体产品的开发。在现代科学研究、疾病诊断和治疗等多个领域，单克隆抗体和其相关产品都具有至关重要的作用（BERGER et al., 2002）。目前，单克隆抗体在疫苗研发和诊断试剂的研发等方面得到了普遍发展。Hua 等筛选到了 9 株针对 SARS-CoV-2 的 S 蛋白 S1 亚基的单克隆抗体，其中针对 RBD 的 22.9-1 是一株广谱中和抗体，针对的表位高度保守，序列比对分析表明该表位在几乎所有 SARS-CoV-2 的相关变体中都是保守的，可用于广谱预防性疫苗和治疗性抗体药物的研究（HUA et al., 2023）。

目前杂交瘤技术仍然是最成熟、应用最广泛的单克隆抗体制备技术。本研究利用杂交瘤技术获得了 3 株抗 SADS-CoV S 蛋白抗体的杂交瘤细胞株，分别命名 4F5、6E9 和 8D6，并进行了腹水抗体制备和纯化。利用间接 ELISA 方法比较 mAbs 4F5、6E9 和 8D6 针对 SADS-CoV 病毒粒子和 S1 蛋白的相对亲和力，结果表明 3 株抗体针对 SADS-CoV 病毒粒子和 S1 蛋白的相对亲和力大小为 8D6 > 6E9 > 4F5。同时对 3 株单克隆抗体进行了中和活性测定，结果显示 3 株抗体均无中和活性。随后对 mAbs 8D6、4F5 和 6E9 的功能进行了验证，结果表明这 3 株单克隆抗体均能用于 Western Blot、间接免疫荧光试验和免疫组化试验等。并且 Western Blot 和间接免疫荧光试验结果表明，mAbs 8D6、4F5 和 6E9 均具有良好的反应原性和特异性。

深度解析抗体识别的抗原表位显得尤为重要，单克隆抗体通过抗原识别位点与相应抗原结合发挥特定的功能，获得背景信息清晰的单克隆抗体有助于进一步的基础研究工作。目前，Han 等利用原核表达的 N 蛋白免疫小鼠，获得了针对 SADS-CoV N 蛋白的单克隆抗体 3E9，并鉴定其抗原表位为 ³⁴³DAPVFTPAP³⁵¹（HAN et al., 2019）。2023 年 Cong 等将原核表达的 SADS-CoV N 蛋白作为免疫原，免疫小鼠，获得了针对该蛋白的单克隆抗体 5G12，并利用 Western Blot 实验鉴定单克隆 5G12 表位定位于氨基酸 ¹¹EQAESRGRK¹⁹（CONG et al., 2023）。

目前还没有关于 SADS-CoV S1 蛋白抗原表位研究的报道。因此，本实验开展了关于 SADS-CoV S 蛋白抗原表位的研究。根据 S1 蛋白的结构特点，将 S1 蛋白设计 6 个截短体 S1A-S1F，构建到真核表达载体 pCAGGS-Fc 载体中，通过 Western Blot 鉴定 3 株抗体的初步识别表位片段。对初步识别表位片段进行表位预测，设计截短体构建 pCAGGS-GST 载体上，通过 Western Blot 试验逐步对截短体蛋白进行鉴定，最终鉴定出 mAb 8D6 的抗原识别表位为 ³¹¹NPDQRD³¹⁶；mAb 4F5 的抗原识别表位为 ³¹¹NPDQRDF³¹⁷；mAb 6E9 的抗原识别表位为 ⁴⁹²ARFVDRL⁴⁹⁸。通过分析 PDB 数据库中的 SADS-CoV S 蛋白晶体结构，对三株单克隆抗体的结合表位进行定位分析，结构模型显示 8D6 和 4F5 的结合表位定位于 S 蛋白中的 CTD 区域，6E9 则定位于 S 蛋白结构中较为隐蔽的 SD2 区域，其中 CTD 区域负责执行与受体结合的功能，与 SD2 区域相较更加暴露，这可能是 8D6 抗体亲和力更强的原因，虽然抗体 8D6 和 4F5 所识别表位仅相差一个氨基酸序列但两者的亲和力有较大差异，猜测可能与抗体和抗原之间的分子作用力有关。

2.5 小结

1. 成功纯化了真核表达的 SADS-CoV S1 和 S-trimer 蛋白，并通过蔗糖密度梯度离心法纯化了 SADS-CoV 病毒粒子。

2. 在小鼠模型中初步评价了真核表达的 SADS-CoV S1 蛋白、S-trimer 蛋白和 SADS-CoV 病毒粒子的免疫原性差异，证实了 S1 和 S-trimer 蛋白均能诱导产生高水平的中和抗体，可作为未来 SADS-CoV 亚单位疫苗的候选抗原。

3. 成功制备了 3 株针对 SADS-CoV S 蛋白单克隆抗体，分别命名为 4F5、6E9 和 8D6。经过功能验证单克隆抗体 4F5、6E9 和 8D6 均可应用于间接 ELISA、间接免疫荧光、Western Blot 和免疫组化实验。

4. 成功鉴定了 3 株单克隆抗体的抗原表位识别位点，即 6E9 的核心抗原表位为⁴⁹²ARFVDRL⁴⁹⁸；4F5 的核心抗原表位为³¹¹NPDQRDF³¹⁷；8D6 的核心抗原表位为³¹¹NPDQRD³¹⁶。

第三章 SADS-CoV S1 蛋白间接 ELISA 方法的建立

SADS-CoV 是 2017 年在我国南方首次被发现的猪肠道冠状病毒，临床症状和病理变化与其它病原所引起的猪肠道疾病症状相似，难以通过临床症状完成鉴别诊断，需借助实验室检测技术协助诊断。间接 ELISA 方法具有灵敏度高、操作简便等优点，可用于大批量样品的检测。本研究通过对 SADS-CoV S1 蛋白、S-trimer 蛋白和 SADS-CoV 病毒粒子免疫 BALB/c 小鼠后血清抗体水平的比较，发现 S1 蛋白与 S-trimer 蛋白均能诱导机体产生较高的血清效价和中和抗体水平。因此本研究选择 SADS-CoV S1 蛋白作为包被抗原，优化间接 ELISA 的反应条件，初步建立了针对 SADS-CoV 的血清学诊断方法，为 SADS-CoV 血清流行病学调查以及疫苗的体液免疫效果评价提供了技术储备。

3.1 实验材料

3.1.1 血清

SADS-CoV、PCV2、PDCoV、PEDV、PoRV 和 TGEV 的高免猪阳性血清和 SPF 猪阴性血清均由本实验室保存。

3.1.2 主要试剂耗材

0.22 μm 、0.45 μm 过滤器、兔抗猪 IgG(H+L)-HRP 购自 Merck 公司，TMB 显色液购自 Takara 公司；96 孔酶标板购自 Corning 生物科技有限公司。

3.1.3 主要实验仪器

酶标仪购自 Thermo Fisher Scientific 公司。

3.2 实验方法

3.2.1 间接 ELISA 方法反应条件的优化

3.2.1.1 抗原包被浓度与血清稀释倍数确定

本研究采用 SADS-CoV S1 真核表达蛋白作为包被抗原，建立 SADS-CoV S1 蛋白间接 ELISA 方法，并通过棋盘格法对该间接 ELISA 方法进行了反应条件的优化。具体操作为：

(1) 包被：使用 CBS 包被缓冲液对 S1 蛋白进行倍比稀释，稀释浓度分别为 16 $\mu\text{g/mL}$ 、8 $\mu\text{g/mL}$ 、4 $\mu\text{g/mL}$ 、2 $\mu\text{g/mL}$ 、1 $\mu\text{g/mL}$ 、0.5 $\mu\text{g/mL}$ 、0.25 $\mu\text{g/mL}$ 、0.125 $\mu\text{g/mL}$ 。将稀释后的 S1 蛋白按照 100 μL /孔加入到 96 孔酶标板中，4 $^{\circ}\text{C}$ 过夜包被。

(2) 洗涤：弃掉上清，用 PBST 洗涤酶标板 5 次，拍干。

(3) 封闭与洗涤：将每个孔加入 5%脱脂乳 100 μL ，置于 37 $^{\circ}\text{C}$ 温箱封闭 1 h。弃掉上清，用 PBST 洗涤酶标板 5 次，拍干。

(4) 样品孵育与洗涤：将待检血清按照 1:100、1:200、1:400、1:800、1:1600 进行倍比稀释，按照 100 μL /孔加入到相应孔中，37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 1 h。弃去上清，用 PBST 洗涤酶标板 5 次，拍干。

(5) 酶标抗体孵育与洗涤：每个孔中加入 100 μL 的兔抗猪 IgG (H+L) -HRP 抗体 (1:5000 稀释)，将酶标板放置于 37 $^{\circ}\text{C}$ 温箱孵育 1 h。酶标二抗孵育 1 h 后弃去上清，洗涤步骤同 (2)。

(6) 显色：加入 TMB 显色液 100 μL /孔，37 $^{\circ}\text{C}$ 显色 10 min。

(7) 终止反应并读数：最后加入 50 μL /孔 2 M H_2SO_4 ，终止反应，测定 $\text{OD}_{450\text{nm}}$ 值。

(8) 计算：利用阴性和阳性血清的 $\text{OD}_{450\text{nm}}$ 值计算 P/N 值，当 P/N 值最大时，选择其对应的蛋白稀释浓度为抗原最佳包被量，对应的血清稀释度为最佳血清稀释倍数。

3.2.1.2 抗原包被时间和样品孵育时间的确定

在确定最佳抗原包被浓度与血清稀释倍数后，继续进行实验以确定最佳抗原包被时间和血清孵育时间。实验设计抗原的包被条件为 37 $^{\circ}\text{C}$ 分别包被 1 h、2 h、3 h 或 4 $^{\circ}\text{C}$ 包被 16 h；设计样品孵育条件为 37 $^{\circ}\text{C}$ 分别孵育 0.5 h、1 h、1.5 h、2 h。其他步骤按照 3.2.1.1 进行，测定每个样品的 $\text{OD}_{450\text{nm}}$ 值，并根据 P/N 值选择合适的抗原包被时间和样品孵育时间。

3.2.1.3 最佳封闭液和封闭时间的确定

基于已确定的最佳条件进行最佳封闭液和封闭时间的确定。实验设计使用不同的封闭液，分别为：5%的脱脂乳、5% BSA、1%明胶、5% FBS。随后设计不同的封闭时间分别为 37 $^{\circ}\text{C}$ 封闭 0.5 h、1 h、1.5 h、2 h。每组设置 3 个重复，其他步骤按照 3.2.1.1 进行，最终根据 P/N 值确定最佳封闭液和最佳封闭时间。

3.2.1.2 酶标二抗稀释倍数的确定

按照已确定的最佳条件进行 ELISA 试验，设定兔抗猪 IgG (H+L) -HRP 二抗的稀释倍数分别为 1:2000、1:3000、1:4000、1:5000、1:6000、1:7000，每个稀释倍数做 3 个重复，其它操作步骤同 3.2.1.1，测定 $\text{OD}_{450\text{nm}}$ 值。根据 P/N 值确定最佳酶标二抗稀释倍数。

3.2.1.5 底物作用时间的确定

基于已确定的最佳条件下，设计 TMB 底物显色液的作用时间分别为 10 min、15 min、20 min，置于 37 $^{\circ}\text{C}$ 显色后添加 2 M H_2SO_4 ，50 μL /孔终止反应，测定 $\text{OD}_{450\text{nm}}$ 值，根据 P/N 值确定最佳底物作用时间。其它操作步骤同 3.2.1.1。

3.2.2 间接 ELISA 方法判定标准的确定

利用以上优化获得的间接 ELISA 方法操作条件对 42 份临床猪阴性血清进行检测，每份猪血清样品做 3 个重复，测定 $\text{OD}_{450\text{nm}}$ 值，并计算所有血清样品测得的 $\text{OD}_{450\text{nm}}$ 的平均数 (\bar{x}) 和标准偏差 (SD)，设置 $\text{OD}_{450\text{nm}} \leq \bar{x} + 2 \text{SD}$ 时判定为阴性， $\text{OD}_{450\text{nm}}$ 介于 $\bar{x} + 2 \text{SD}$ 和 $\bar{x} + 3 \text{SD}$ 的值判定为可疑， $\text{OD}_{450\text{nm}} \geq \bar{x} + 3 \text{SD}$ 时判定为阳性，最终计算得出阴阳性临界值。

3.2.3 特异性试验

利用本研究建立的 ELISA 方法对 PoRV、PEDV、PDCoV、TGEV 和 PCV2 猪阳性血清, SADS-CoV 猪阳性血清和猪阴性血清进行检测, 每份血清样品设置 3 个重复, 测定 OD_{450nm} 值, 分析所建立间接 ELISA 方法的特异性。

3.2.4 敏感性试验

将 SADS-CoV 猪阳性血清按照 2 倍倍比从 1:100 进行稀释, 共稀释 8 个梯度至 1:12800, 每个稀释度 3 个重复, 利用建立的间接 ELISA 方法检测阳性血清能够被识别的最大稀释倍数, 用以评价该方法的敏感性。

3.2.5 重复性试验

利用优化好的间接 ELISA 反应条件对随机抽取的 5 份猪血清样品在同一批次 S1 蛋白包被的酶标板上进行批内重复性试验, 每份样品设置 8 个重复; 另外对上述 5 份猪血清样品在 4 个不同批次包被的酶标板上进行批间重复性试验, 每份血清样品在不同批次的酶标板中重复 3 次。计算批内和批间变异系数, 评价该 ELISA 方法的重复性 (钟杰, 2022)。

3.2.6 临床样品的检测

利用优化反应条件后建立的 SADS-CoV S1 蛋白抗体间接 ELISA 方法检测收集到的 50 份临床猪血清样品。由于目前无 SADS-CoV 商品化的抗体检测试剂盒, 本研究采用间接免疫荧光检测方法对该 50 份样品进行平行检测, 比较两种方法的对临床猪血清样品的检测结果, 并计算二者的符合率。

3.3 实验结果

3.3.1 间接 ELISA 方法反应条件的优化

采用棋盘格法对 SADS-CoV S1 蛋白间接 ELISA 方法进行反应条件的优化。结果显示, S1 蛋白包被浓度在 2 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 和 16 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 时, P/N 值均较高, 因此选择 2 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 为抗原的最佳包被浓度。为当抗原包被浓度在 2 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 时, 观察到血清以 1:400 稀释的 P/N 值最高, 因此确定待检血清的最佳稀释度为 1:400 (图 3-1 A)。用最佳包被浓度包被抗原, 在不同的时间、温度下进行 ELISA 测定, 结果显示, 在 4 $^{\circ}\text{C}$ 条件下包被 16 h 时 P/N 值最高, 因此确定该条件为抗原的最佳包被条件 (图 3-1 B)。进一步用 5% 的脱脂乳、5% BSA、1% 明胶、5% FBS 作为封闭液进行 ELISA 测定, 结果显示, 在这 4 种封闭液中 5% 脱脂乳的 P/N 值最高 (图 3-1 C)。后续又进行了封闭时间的测定, 结果显示, 5% 脱脂乳封闭 37 $^{\circ}\text{C}$ 条件 2 h 的 P/N 值最高 (图 3-1 D), 确定最佳封闭条件为 5% 的脱脂乳, 37 $^{\circ}\text{C}$ 封闭 2 h。根据优化好的 S1 蛋白包被条件和封闭条件, 血清按照 1:400 稀释后, 在 37 $^{\circ}\text{C}$ 下分别作用 0.5 h、1 h、1.5 h、2 h, 结果表明, 待检血清样本孵育 0.5 h 时的 P/N 值

为最高，确定 0.5 h 为血清样品最佳反应时间（图 3-1 E）。将酶标二抗兔抗猪 IgG（H+L）-HRP 分别作 1:2000、1:4000、1:5000、1:6000、1:7000 倍稀释，在 37°C 下作用 1 h，进行 ELISA 试验，结果显示稀释度在 1:5000 时 P/N 值最高，确定酶标二抗兔抗猪 IgG（H+L）-HRP 的最佳稀释倍数为 1:5000（图 3-1 F）。使用已经优化好的条件进行显色时间的确定，结果显示显色剂 TMB 在 37°C 条件下显色 15 min 的 P/N 值最高，确定其为最佳显色时间（图 3-1 G）。

以上结果显示，本实验建立的间接 ELISA 方法反应条件的优化为：检测板抗原包被条件为 2 μg/mL，4°C 包被 16 h；待检血清的最佳反应条件为 1:400 稀释，37°C 孵育 0.5 h；最佳封闭条件为 5% 的脱脂乳，37°C 封闭 2 h；酶标二抗兔抗猪 IgG（H+L）-HRP 最佳稀释倍数为 1:5000；最后加入显色剂 TMB 于 37°C 显色 15 min（图 3-1）。

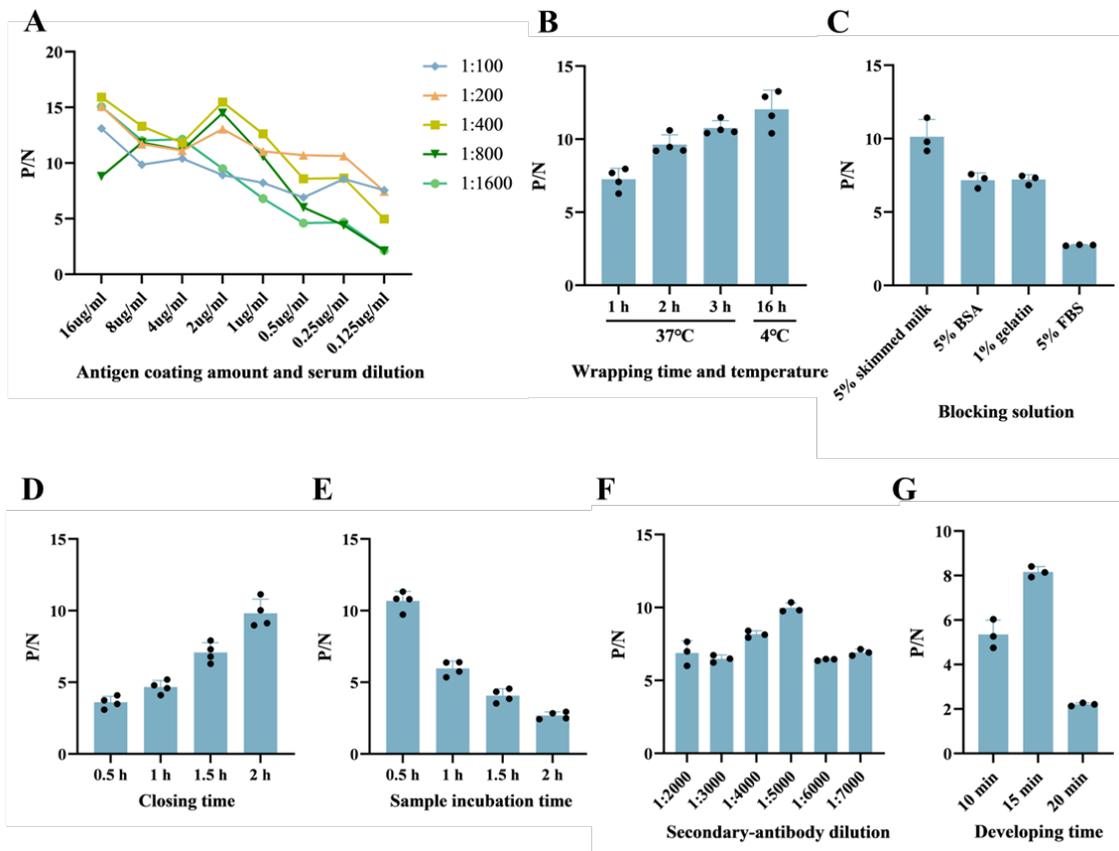


图 3-1 SADS-CoV S1 间接 ELISA 方法反应条件的优化结果

Fig. 3-1 Results of optimization of reaction conditions for iELISA methods

A. 抗原包被浓度以及血清稀释比的优化；B. 包被条件的优化；C. 最佳封闭液的确定；D. 最佳封闭时间的确定；E. 待检样品作用时间的优化；F. HRP 标记抗体稀释比的优化；G. 底物显色时间的优化（检测过程中阳性血清为 SADS-CoV 攻毒实验中采集的猪血清，阴性血清为对照组猪血清，其中 P/N 为阳性血清 OD_{450nm}/阴性血清 OD_{450nm}）

A Optimum antigen coating amount and serum dilution; B. Optimum coating time and temperature of antigen; C. Optimal closure; D. Optimal closing time; E. Optimum sample incubation time; F. Determination of optimal dilution of enzyme-labeled antibody; G. Optimum developing time (SADS-CoV infected or mock-infected serum as the positive and negative serum were detected. The OD_{450nm} value of positive-to-negative (P/N) ratio was calculated)

3.3.2 间接 ELISA 方法判定标准的确定

用建立的间接 ELISA 方法测定 42 份健康猪血清样品，对测得的 OD_{450nm} 数据进行分析，结果显示阴性血清平均 OD_{450nm} 值 (\bar{x}) 为 0.215，标准偏差 (SD) 为 0.095，计算后的阴性临界值为 0.406，阳性临界值为 0.501，在此基础上我们将判定标准定为 $OD_{450nm} \leq 0.406$ 时为阴性， $OD_{450nm} \geq 0.501$ 时为阳性， $0.406 \leq OD_{450nm} < 0.501$ 为可疑 (图 3-2)。

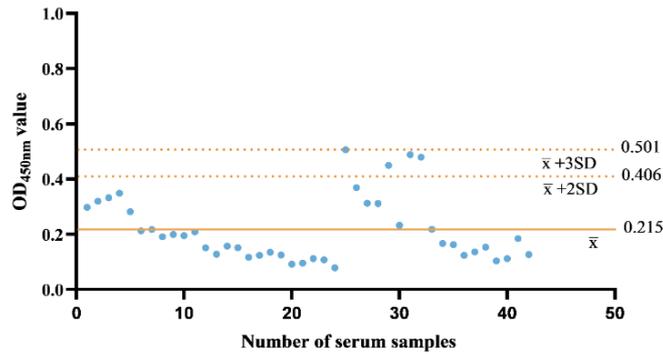


图 3-2 SADS-CoV S1 间接 ELISA 临界值的确定

Fig. 3-2 Determination of critical values for iELISA

3.3.3 特异性试验结果

为验证以上建立的间接 ELISA 抗体检测方法的特异性，利用建立的间接 ELISA 方法检测 PCV2、PDCoV、PEDV、PoRV 和 TGEV 实验室保存的猪阴阳性血清，同时用 SADS-CoV 猪阳性和猪阴性血清作对照。ELISA 结果显示 PCV2、PDCoV、PEDV、PoRV 和 TGEV 猪阳性血清及 SADS-CoV 猪阴性血清检测值均小于阳性判读值，而对 SADS-CoV 猪阳性血清的检测结果为显著大于阳性判读值。表明建立的以 SADS-CoV S1 蛋白为包被抗原的间接 ELISA 检测方法特异性良好，能够满足与临床猪常见病毒病进行血清学鉴别诊断的需要 (图 3-3)。

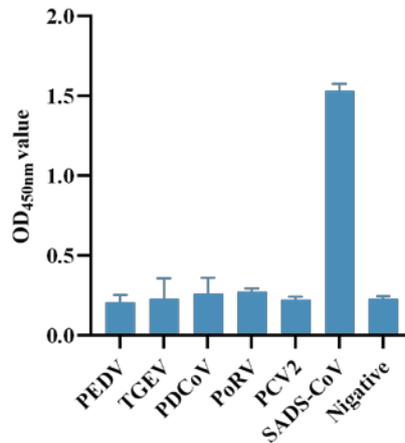


图 3-3 SADS-CoV S1 间接 ELISA 特异性试验结果

Fig. 3-3 Specificity test results of the iELISA

3.3.4 敏感性试验

为验证以上建立的间接 ELISA 抗体检测方法的敏感性, 对本实验室保存的阳性 SADS-CoV 猪血清按相应的比例稀释, 随后进行试验检测。如图 3-4 所示, 当阳性 SADS-CoV 血清稀释到 1:3200 时, ELISA 检测值仍高于临界值判读为阳性, 结果表明建立的以 SADS-CoV S1 蛋白为包被抗原的建立的间接 ELISA 检测方法敏感性良好, 在样品高倍稀释后仍可满足临床样品检测需求。

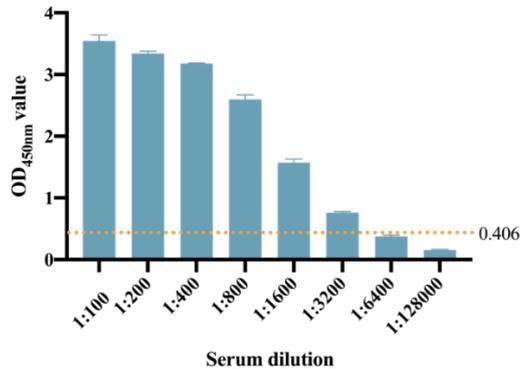


图 3-4 间接 ELISA 敏感性试验结果

Fig. 3-4 Sensitivity test results of the iELISA

3.3.5 重复性试验

为验证以上建立的间接 ELISA 抗体检测方法的稳定性和可靠性, 对本研究建立的 SADS-CoV S1 蛋白间接 ELISA 抗体检测方法进行批内间、批次间重复性试验。批内间重复性试验以随机抽取 5 份猪血清样品选用 S1 蛋白包被的同一个批次 ELISA 板进行检测, 每一份猪血清样品重复 8 次, 其余步骤均按优化的间接 ELISA 反应条件进行, 根据测定的 OD_{450nm} 值计算各样品的变异系数分别为 7.003、7.290、6.870、6.841、8.693, 计算平均值均小于 10%。批次间重复性试验也选取 4 个批次 S1 蛋白包被的 ELISA 板, 对上述的 5 份样品做批间重复试验, 设置每份血清 8 个重复, 根据 ELISA 测定结果计算每个样品的批间变异系数分别为 4.749、5.347、6.311、6.395、6.158, 均小于 10%, 表明本研究建立的间接 ELISA 方法均有较好的批内间和批次间重复性, 检测结果可靠, 具有较好的稳定性 (表 3-1)。

表 3-1 间接 ELISA 重复性试验(n=8)

Table 3-1 Repeatability assay for indirect ELISA (n=8)

样品序号	批内变异系数		批间变异系数	
	平均数 $\bar{x}\pm s$	变异系数 CV(%)	平均数 $\bar{x}\pm s$	变异系数 CV(%)
1	2.206±0.154	7.003	1.525±0.072	4.749
2	2.068±0.151	7.290	2.250±0.120	5.347
3	1.509±0.104	6.870	2.297±0.145	6.311
4	1.600±0.109	6.841	2.172±0.139	6.395
5	0.188±0.016	8.693	0.296 ±0.018	6.158

3.3.6 临床样品的检测

将以上建立的间接 ELISA 抗体检测方法用于临床实际样品检测，同时采用间接免疫荧光检测方法作为对照方法，共同对收集到的 50 份猪血清样本进行检测。结果显示，使用间接免疫荧光测得的结果中有 5 份血清样品为阳性，其余 45 份血清样品为阴性；同时使用本实验建立的间接 ELISA 对上述 50 份血清样品进行检测，检测出 9 份血清样品为阳性，41 份血清样品为阴性。对间接免疫荧光和间接 ELISA 方法检测的样品结果进行计算得出两者的总符合率为 92.0%。表明本研究建立的间接 ELISA 方法具有较好的符合率，能够用于 SADS-CoV 临床血清样品的检测（表 3-2）。

表 3-2 临床血清样品的检测

Table 3-2 Detection of clinical serum samples by the indirect ELISA and IFA

		ELISA		总计
		阳性样品数量	阴性样品数量	
IFA	阳性样品数	5	0	5
	阴性样品数	4	41	45
总计		9	41	50
符合率 (%)		55.6%	100.0%	92.0%

3.4 讨论

我国的猪冠状病毒存在不断变异、不断暴发的复杂情况，目前缺乏有效的疫苗和治疗药物防控这类疫病的发生。SADS-CoV 作为新发的猪肠道冠状病毒，自 2017 年起已经在我国南方区域呈现散在多发的流行态势，2023 年在我国河南省有阳性报道（GONG et al., 2017; SUN et al., 2022b; ZHANG et al., 2024; ZHOU et al., 2019）。SADS-CoV 是一种蝙蝠源冠状病毒，具有跨物种传播的风险（YANG et al., 2019），因此需要进行长期、系统性的流行病学监测，以期达到早发现早控制。建立针对该病原快速、准确的检测方法是防止该疫病扩散和减少损失的重要技术手段。ELISA 血清学诊断方法不仅技术成熟、检测结果稳定，并且适用于大量血清样品的同时检测，对疫情流行区的筛查和疫苗的免疫评价具有重大意义。

目前，在建立血清学 ELISA 检测方法中所用到包被抗原有时多采用原核表达系统进行表达和纯化，虽然该系统具有高产量低成本的特点，但是该系统表达出的蛋白缺乏适当的折叠及修饰，

可能会降低 ELISA 试剂盒的特异性和灵敏度(布日额 等, 2013; 田石 等, 2013; 张帆帆 等, 2016)。S1 蛋白上富含大量的糖基化修饰位点包括 N-糖基化位点和 O-糖基化位点, 相应抗原表位可能被表面糖链修饰, 同时表面糖链亦可能作为抗原发挥一定的功能(KHAN, 2013)。包被抗原需要尽可能模拟真实环境下病毒 S1 蛋白的存在情况, 因此本研究采用 HEK293F 真核表达系统进行包被抗原的表达, 在一定程度上保证了病毒蛋白的天然构象和正确修饰。Western Blot 检测结果可见分泌在细胞上清中的 S1 蛋白大小与预测的 S1 蛋白大小相符, 同时我们通过条件优化, 降低了系统成本提高了表达效率, SADS-CoV S1 蛋白的表达产量可达到 15 mg/L, 满足目前实验室环境下的检测需求。

间接 ELISA 方法具有操作简便, 检测大批量临床血清样品时间短、特异性高等优势(刘烨等, 2018)。近年来报道了多种关于 SADS-CoV 的 ELISA 诊断方法, Cao 等针对 SADS-CoV N 蛋白制备了多种抗体, 并将兔源多抗作为捕获抗体, 鼠源 6E8 单抗作为检测抗体, 建立了双抗夹心定量 ELISA 方法, 并且该方法具有良好的敏感性(CAO et al., 2023)。Peng 等以杆状病毒系统表达了 SADS-CoV S 蛋白并建立了检测 SADS-CoV IgG 抗体的间接 ELISA 方法, 能够准确检测宿主是否感染了 SADS-CoV(PENG et al., 2022)。以上的两种 ELISA 检测方法分别是以 SADS-CoV 的 N 蛋白和 S 蛋白作为靶蛋白, 本研究选择以 SADS-CoV S1 蛋白作为靶标, 是因为 S1 蛋白是中和抗体表位核心富集区, S1 抗体水平与中和抗体水平高度相关, 通过直接检测家猪体内针对 SADS-CoV S1 蛋白的抗体, 就可以间接衡量猪群免疫水平, 可以作为 N 蛋白间接 ELISA 方法的补充(OH et al., 2014), 且与 S 蛋白相比, S1 蛋白更易大量表达纯化。鉴于此, 建立以 SADS-CoV S1 蛋白为包被抗原的间接 ELISA 方法用于临床流行病学调查及实验用途阴性猪只的筛选, 为储备性 SADS-CoV 灭活疫苗的研制提供技术支持。

本研究利用 HEK293F 悬浮细胞表达获得了 SADS-CoV S1 重组蛋白, 将其作为包被抗原, 建立了检测 SADS-CoV S1 蛋白抗体的间接 ELISA 方法。随后对该方法的临界值进行了确定, 并依次对该方法进行了特异性、敏感性和重复性试验。并以间接免疫荧光作为对照与本研究建立的间接 ELISA 方法对收集的 50 份临床样本进行检测, IFA 检测结果显示阳性样品数为 45 份, 阴性样品数为 5 份阳性; 间接 ELISA 方法测得阳性样品数为 9 份, 阴性样品数为 41 份; 两个方法进行对比, 阳性符合率为 55.6%, 阴性符合率为 100.0%, 总符合率为 92.0%。虽然本研究建立的方法具有优点, 但也有很多不足之处, 临界值的判定设置较高, 选择的样本数量有限, 没有与更多的检测方法进行比较等, 需要更进一步的研究。

3.5 小结

本研究选择真核表达 SADS-CoV S1 蛋白作为包被抗原, 建立针对 SADS-CoV S1 的间接 ELISA 抗体检测方法, 为进一步加强针对 SADS-CoV 新发猪肠道冠状病毒的血清流行病学监测及储备疫苗的研发奠定了基础。

第四章 结论

1. 成功表达了真核 S1 重组蛋白和真核 S-trimer 重组蛋白，并在小鼠模型中初步评价了其免疫原性差异，证实了 S1 和 S-trimer 蛋白均能诱导产生高水平的中和抗体，可用于亚单位疫苗候选抗原。

2. 成功制备了 3 株特异性识别 SADS-CoV S 蛋白的单克隆抗体，均可应用于间接 ELISA、Western Blot、间接免疫荧光和免疫组化实验；鉴定出 3 株抗体均特异性识别 S1 亚基，并确定了其识别抗原的核心位点，即 6E9 的核心抗原表位为 ⁴⁹²ARFVDRL⁴⁹⁸；4F5 的核心抗原表位为 ³¹¹NPDQRDF³¹⁷；8D6 的核心抗原表位为 ³¹¹NPDQRD³¹⁶。

3. 成功建立了针对 SADS-CoV S1 蛋白的间接 ELISA 抗体检测方法，该方法具有较高的敏感性、特异性、重复性及稳定性，与间接免疫荧光结果相比符合率为 92.0%。

参考文献

- 布日额,任晓峰,吴金花,王学理,刘燕,锡林高娃,孙立杰,刘洋,2013.牛乳腺炎无乳链球菌表面蛋白 pgk 抗原优势区的原核表达及其间接 ELISA 检测方法的建立.中国预防兽医学报,35(04): 312-316.
- 付钰倩,芦增增,黄妙惠,2021.新型冠状病毒肺炎免疫反应与疫苗开发的研究进展.福建轻纺,(06): 2-7+12.
- 韩郁茹,2021.急性腹泻综合征冠状病毒 N 蛋白单克隆抗体的制备及其抗原表位的鉴定.中国农业科学院.
- 韩郁茹,石达,张记宇,时洪艳,陈建飞,张鑫,刘建波,冯力,2021.猪急性腹泻综合征冠状病毒 RT-LAMP 快速检测方法的建立与应用.中国预防兽医学报,43(01): 35-40.
- 刘烨,张家林,王潇博,石达,时洪艳,陈建飞,张鑫,冯力,2019.猪流行性腹泻病毒 IgA 抗体间接 ELISA 方法的建立.中国预防兽医学报,41(09): 918-923.
- 吕信萍,吴静,陈京涛,2015.单个 B 细胞抗体制备技术及其在肝脏疾病中的应用.临床肝胆病杂志,31(12): 2104-2109.
- 罗烨,罗灵芝,丁彦彬,赵墩,周小飞,郑金,李润成,葛猛,余兴龙,2020.基于猪流行性腹泻病毒 S1 蛋白间接 ELISA 抗体检测方法的建立及初步应用.中国兽医科学,50(11): 1341-1347.
- 钱曼云,王继伟,李颢泽,王瑞华,刘云,李亚峰,2022. SARS-CoV-2 重组 S1 和 S 蛋白疫苗诱导保护性免疫的研究.中国生物工程杂志,42(5): 106-116.
- 谭菲菲,韦祖樟,袁世山,2010.套式病毒目病毒核衣壳蛋白的结构与功能研究进展.中国兽医科学,40(9): 984-988.
- 孙东波,冯力,时洪艳,陈建飞,崔晓辰,佟有恩,2007.猪流行性腹泻病毒 S 蛋白中和表位区单克隆抗体的制备与鉴定.中国预防兽医学报,29(11): 887-890.
- 田石,邓国华,单继艳,施建忠,张国权,陈普成,柳金雄,文雪霞,姜永萍,陈化兰,2013.禽流感病毒同义 NP 蛋白的原核表达及其间接 ELISA 检测方法的建立.中国预防兽医学报,35(06): 464-467.
- 吴佳果,张丁木,罗龙龙,杨开明,2022.利用特异性识别 N 蛋白抗体建立 SARS-CoV-2 的快速检测方法.军事医学,46(01): 48-53.
- 徐明丽,师一鸣,张柳,王晓娜,周晗,单智夫,崔文,姜艳平,王丽,乔薪瑗,李一经,唐丽杰,2022.猪传染性胃肠炎病毒单克隆抗体的制备及其在检测组织中病毒的初步应用.畜牧与兽医,54(10): 74-80.
- 钟杰. SARS-CoV-2 S1 蛋白单克隆抗体制备及双抗原夹心 ELISA 抗体检测方法的建立.中国农业科学院,2022.
- 张帆帆,宋德平,郭楠楠,叶昱,周信荣,李安琪,张敏,彭棋,陈燕君,黄冬艳,唐玉新,2016.以原核表达的猪 δ 冠状病毒 N 蛋白为包被抗原的间接 ELISA 方法的建立.中国预防兽医学报,38(10): 795-799.

- 张记宇, 韩郁茹, 时洪艳, 陈建飞, 张鑫, 刘建波, 张燎原, 冯书风, 冯廷帅, 季朝阳, 石达, 冯力, 2021. 猪急性腹泻综合征冠状病毒 SYBR Green 荧光定量 PCR 检测方法的建立及应用. 畜牧兽医学报, 52(10): 2887-2894.
- ARBELY E, KHATTARI Z, BROTONS G, AKKAWI M, SALDITT T, ARKIN I T, 2004. A highly unusual palindromic transmembrane helical hairpin formed by SARS coronavirus E protein. *Journal of Molecular Biology*, 341(3): 769-779. DOI: 10.1016/j.jmb.2004.06.044.
- BEGHETTO E, GARGANO N, 2011. Lambda-display: a powerful tool for antigen discovery. *Molecules*, 16(4): 3089-3105. DOI: 10.3390/molecules16043089.
- BERGER M, SHANKAR V, VAFAI A, 2002. Therapeutic applications of monoclonal antibodies. *The American Journal of the Medical Sciences*, 324(1): 14-30. DOI: 10.1097/00000441-200207000-00004.
- BOSCH B J, VAN DER ZEE R, DE HAAN C A, ROTTIER P J, 2003. The coronavirus spike protein is a class I virus fusion protein: structural and functional characterization of the fusion core complex. *Journal of Virology*, 77(16): 8801-8811. DOI: 10.1128/jvi.77.16.8801-8811.2003.
- BRATKOVIC T, 2010. Progress in phage display: evolution of the technique and its application. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 67(5): 749-767. DOI: 10.1007/s00018-009-0192-2.
- BRIAN D A, BARIC R S, 2005. Coronavirus genome structure and replication. *Current Topics in Microbiology and Immunology*, 287: 1-30. DOI: 10.1007/3-540-26765-4_1.
- CAO L, KONG X, ZHANG Y, SUO X, LI X, DUAN Y, YUAN C, ZHENG H, WANG Q, 2023. Development of a novel double-antibody sandwich quantitative ELISA for detecting SADS-CoV infection. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 107(7-8): 2413-2422. DOI: 10.1007/s00253-023-12432-4.
- CAO Y, SU B, GUO X, SUN W, DENG Y, BAO L, ZHU Q, ZHANG X, ZHENG Y, GENG C, CHAI X, HE R, LI X, LV Q, ZHU H, DENG W, XU Y, WANG Y, QIAO L, TAN Y, SONG L, WANG G, DU X, GAO N, LIU J, XIAO J, SU X D, DU Z, FENG Y, QIN C, QIN C, JIN R, XIE X S, 2020. Potent neutralizing antibodies against SARS-CoV-2 identified by high-throughput single-cell sequencing of convalescent patients' B cells. *Cell*, 182(1): 73-84.e16. DOI: 10.1016/j.cell.2020.05.025.
- CONG X, ZHANG L, ZHU H, WU M, ZHU Y, LIAN Y, HUANG B, GU Y, CONG F, 2023. Preparation of a new monoclonal antibody against nucleocapsid protein of swine acute diarrhea syndrome coronavirus and identification of its linear antigenic epitope. *International Journal of Biological Macromolecules*, 239: 124241. DOI: 10.1016/j.ijbiomac.2023.124241.
- CONG X, ZHU Y, LIU X, LIAN Y, HUANG B, LUO Y, GU Y, WU M, SHI Y, 2022. Establishment of a recombinase polymerase amplification (RPA) fluorescence assay for the detection of swine acute diarrhea syndrome coronavirus (SADS-CoV). *BMC Veterinary Research*, 18(1): 369. DOI: 10.1186/s12917-022-03465-4.
- CONG Y, ULASLI M, SCHEPERS H, MAUTHE M, V'KOVSKI P, KRIEGENBURG F, THIEL V, DE HAAN C A M, REGGIORI F, 2020. Nucleocapsid protein recruitment to replication-

- transcription complexes plays a crucial role in coronaviral life cycle. *Journal of Virology*, 94(4): e01925-19. DOI: 10.1128/jvi.01925-19.
- CORSE E, MACHAMER C E, 2000. Infectious bronchitis virus E protein is targeted to the Golgi complex and directs release of virus-like particles. *Journal of Virology*, 74(9): 4319-4326. DOI: 10.1128/jvi.74.9.4319-4326.2000.
- DE HAAN C A M, VENNEMA H, ROTTIER P J M, 2000. Assembly of the coronavirus envelope: homotypic interactions between the M proteins. *Journal of Virology*, 74(11): 4967-4978. DOI: Doi 10.1128/Jvi.74.11.4967-4978.2000.
- DONG N, FANG L R, ZENG S L, SUN Q Q, CHEN H C, XIAO S B, 2015. Porcine deltacoronavirus in mainland China. *Emerging Infectious Diseases*, 21(12): 2254-2255. DOI: 10.3201/eid2112.150283.
- ESCORS D, ORTEGO J, LAUDE H, ENJUANES L, 2001. The membrane M protein carboxy terminus binds to transmissible gastroenteritis coronavirus core and contributes to core stability. *Journal of Virology*, 75(3): 1312-1324. DOI: 10.1128/jvi.75.3.1312-1324.2001.
- FOON K A, YANNELLI J, BHATTACHARYA-CHATTERJEE M, 1999. Colorectal cancer as a model for immunotherapy. *Clinical Cancer Research*, 5(2): 225-236.
- FU X, FANG B, LIU Y, CAI M, JUN J, MA J, BU D, WANG L, ZHOU P, WANG H, ZHANG G, 2018. Newly emerged porcine enteric alphacoronavirus in southern China: identification, origin and evolutionary history analysis. *Infection Genetics and Evolution*, 62: 179-187. DOI: 10.1016/j.meegid.2018.04.031.
- GONG L, LI J, ZHOU Q, XU Z, CHEN L, ZHANG Y, XUE C, WEN Z, CAO Y, 2017. A new bat-HKU2-like coronavirus in swine, China, 2017. *Emerging Infectious Diseases*, 23(9): 1607-1609. DOI: 10.3201/eid2309.170915.
- GUAN H, WANG Y, PERČULIJA V, SAEED A, LIU Y, LI J, JAN S S, LI Y, ZHU P, OUYANG S, 2020. Cryo-electron microscopy structure of the swine acute diarrhea syndrome coronavirus spike glycoprotein provides insights into evolution of unique coronavirus spike proteins. *Journal of Virology*, 94(22): e01301-20. DOI: 10.1128/jvi.01301-20.
- GUO Y Y, WANG P H, PAN Y Q, SHI R Z, LI Y Q, GUO F, XING L, 2021. The characteristics of spike glycoprotein gene of swine acute diarrhea syndrome coronavirus strain CH/FJWT/2018 isolated in China. *Frontiers in Veterinary Science*, 8: 687079. DOI: 10.3389/fvets.2021.687079.
- HAN Y, ZHANG J, SHI H, ZHOU L, CHEN J, ZHANG X, LIU J, ZHANG J, WANG X, JI Z, JING Z, CONG G, MA J, SHI D, LI F, 2019. Epitope mapping and cellular localization of swine acute diarrhea syndrome coronavirus nucleocapsid protein using a novel monoclonal antibody. *Virus Research*, 273: 197752. DOI: 10.1016/j.virusres.2019.197752.
- HUA R H, ZHANG S J, NIU B, GE J Y, LAN T, BU Z G, 2023. A novel conserved linear neutralizing epitope on the receptor-binding domain of the SARS-CoV-2 spike protein. *Microbiology Spectrum*, 11(4): e0119023. DOI: 10.1128/spectrum.01190-23.

- HULSWIT R J, DE HAAN C A, BOSCH B J, 2016. Coronavirus spike protein and tropism changes. *Advances in Virus Research*, 96: 29-57. DOI: 10.1016/bs.aivir.2016.08.004.
- KANG S, YANG M, HONG Z, ZHANG L, HUANG Z, CHEN X, HE S, ZHOU Z, ZHOU Z, CHEN Q, YAN Y, ZHANG C, SHAN H, CHEN S, 2020. Crystal structure of SARS-CoV-2 nucleocapsid protein RNA binding domain reveals potential unique drug targeting sites. *Acta Pharmaceutica Sinica. B*, 10(7): 1228-1238. DOI: 10.1016/j.apsb.2020.04.009.
- KHAN K H, 2013. Gene expression in mammalian cells and its applications. *Advanced Pharmaceutical Bulletin*, 3(2): 257-263. DOI: 10.5681/apb.2013.042.
- KÖHLER G, MILSTEIN C, 1975. Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity. *Nature*, 256(5517): 495-497. DOI: 10.1038/256495a0.
- KUMAR R, ANDRABI R, TIWARI A, PRAKASH S S, WIG N, DUTTA D, SANKHYAN A, KHAN L, SINHA S, LUTHRA K, 2012. A novel strategy for efficient production of anti-V3 human scFvs against HIV-1 clade C. *BMC Biotechnology*, 12: 87. DOI: 10.1186/1472-6750-12-87.
- KUMAR R, PARRAY H A, SHRIVASTAVA T, SINHA S, LUTHRA K, 2019. Phage display antibody libraries: a robust approach for generation of recombinant human monoclonal antibodies. *International Journal of Biological Macromolecules*, 135: 907-918. DOI: 10.1016/j.ijbiomac.2019.06.006.
- LI F, 2016. Structure, function, and evolution of coronavirus spike proteins. *Annual Review of Virology*, 3: 237-261. DOI: 10.1146/annurev-virology-110615-042301.
- LI K, LI H, BI Z, GU J, GONG W, LUO S, ZHANG F, SONG D, YE Y, TANG Y, 2018. Complete genome sequence of a novel swine acute diarrhea syndrome coronavirus, CH/FJWT/2018, isolated in Fujian, China, in 2018. *Microbiology Resource Announcements*, 7(22): e01259-18. DOI: 10.1128/mra.01259-18.
- MAEDA J, REPASS J F, MAEDA A, MAKINO S, 2001. Membrane topology of coronavirus E protein. *Virology*, 281(2): 163-169. DOI: DOI 10.1006/viro.2001.0818.
- MARTIN X, DA SILVA M, VIRIEUX S R, HADJ AISSA A, BUFFET R, TIOLLIER J, DUBERNARD J M, 2000. Protective effect of an anti-LFA1 monoclonal antibody (odulimomab) on renal damage due to ischemia and kidney autotransplantation. *Transplantation Proceedings*, 32(2): 481. DOI: 10.1016/s0041-1345(00)00849-6.
- MCCAFFERTY J, GRIFFITHS A D, WINTER G, CHISWELL D J, 1990. Phage antibodies: filamentous phage displaying antibody variable domains. *Nature*, 348(6301): 552-554. DOI: 10.1038/348552a0.
- NEUMAN B W, KISS G, KUNDING A H, BHELLA D, BAKSH M F, CONNELLY S, DROESE B, KLAUS J P, MAKINO S, SAWICKI S G, SIDDELL S G, STAMOU D G, WILSON I A, KUHN P, BUCHMEIER M J, 2011. A structural analysis of M protein in coronavirus assembly and morphology. *Journal of Structural Biology*, 174(1): 11-22. DOI: 10.1016/j.jsb.2010.11.021.
- NGUYEN V P, HOGUE B G, 1997. Protein interactions during coronavirus assembly. *Journal of Virology*, 71(12): 9278-9284. DOI: 10.1128/jvi.71.12.9278-9284.1997.

- OH J, LEE K W, CHOI H W, LEE C, 2014. Immunogenicity and protective efficacy of recombinant S1 domain of the porcine epidemic diarrhea virus spike protein. *Archives of Virology*, 159(11): 2977-2987. DOI: 10.1007/s00705-014-2163-7.
- PAN Y, TIAN X, QIN P, WANG B, ZHAO P, YANG Y L, WANG L, WANG D, SONG Y, ZHANG X, HUANG Y W, 2017. Discovery of a novel swine enteric alphacoronavirus (SeACoV) in southern China. *Veterinary Microbiology*, 211: 15-21. DOI: 10.1016/j.vetmic.2017.09.020.
- PENG P, GAO Y, ZHOU Q, JIANG T, ZHENG S, HUANG M, XUE C, CAO Y, XU Z, 2022. Development of an indirect ELISA for detecting swine acute diarrhoea syndrome coronavirus IgG antibodies based on a recombinant spike protein. *Transboundary and Emerging Diseases*, 69(4): 2065-2075. DOI: 10.1111/tbed.14196.
- RAAMSMAN M J, LOCKER J K, DE HOOGE A, DE VRIES A A, GRIFFITHS G, VENNEMA H, ROTTIER P J, 2000. Characterization of the coronavirus mouse hepatitis virus strain A59 small membrane protein E. *Journal of Virology*, 74(5): 2333-2342. DOI: 10.1128/jvi.74.5.2333-2342.2000.
- RAO V B, BLACK L W, 2010. Structure and assembly of bacteriophage T4 head. *Virology Journal*, 7: 356. DOI: 10.1186/1743-422x-7-356.
- RUCH T R, MACHAMER C E, 2012. The coronavirus E protein: assembly and beyond. *Viruses*, 4(3): 363-382. DOI: 10.3390/v4030363.
- SHARMA S C, MEMIC A, RUPASINGHE C N, DUC A C, SPALLER M R, 2009. T7 phage display as a method of peptide ligand discovery for PDZ domain proteins. *Biopolymers*, 92(3): 183-193. DOI: 10.1002/bip.21172.
- SHI W, JIA S, ZHAO H, YIN J, WANG X, YU M, MA S, WU Y, CHEN Y, FAN W, XU Y, LI Y, 2017. Novel approach for isolation and identification of porcine epidemic diarrhea virus (PEDV) strain NJ using porcine intestinal epithelial cells. *Viruses*, 9(1): 19. DOI: 10.3390/v9010019.
- SHI W, LIAO Y, WILLIS S N, TAUBENHEIM N, INOUE M, TARLINTON D M, SMYTH G K, HODGKIN P D, NUTT S L, CORCORAN L M, 2015. Transcriptional profiling of mouse B cell terminal differentiation defines a signature for antibody-secreting plasma cells. *Nature Immunology*, 16(6): 663-673. DOI: 10.1038/ni.3154.
- SHI Y, SHI J, SUN L, TAN Y, WANG G, GUO F, HU G, FU Y, FU Z F, XIAO S, PENG G, 2021. Insight into vaccine development for alpha-coronaviruses based on structural and immunological analyses of spike proteins. *Journal of Virology*, 95(7): e02284-20. DOI: 10.1128/jvi.02284-20.
- SMITH M R, 2003. Rituximab (monoclonal anti-CD20 antibody): mechanisms of action and resistance. *Oncogene*, 22(47): 7359-7368. DOI: 10.1038/sj.onc.1206939.
- SMITH S A, CROWE J E, Jr., 2015. Use of human hybridoma technology to isolate human monoclonal antibodies. *Microbiology Spectrum*, 3(1): Aid-0027-2014. DOI: 10.1128/microbiolspec.AID-0027-2014.
- SONG X, QIAN J, WANG C, WANG D, ZHOU J, ZHAO Y, WANG W, LI J, GUO R, LI Y, ZHU X, YANG S, ZHANG X, FAN B, LI B, 2023. Correlation between the IgG/IgA antibody response

- against PEDV structural protein and virus neutralization. *Microbiology Spectrum*, 11(3): e0523322. DOI: 10.1128/spectrum.05233-22.
- SUN X, YI C, ZHU Y, DING L, XIA S, CHEN X, LIU M, GU C, LU X, FU Y, CHEN S, ZHANG T, ZHANG Y, YANG Z, MA L, GU W, HU G, DU S, YAN R, FU W, YUAN S, QIU C, ZHAO C, ZHANG X, HE Y, QU A, ZHOU X, LI X, WONG G, DENG Q, ZHOU Q, LU H, LING Z, DING J, LU L, XU J, XIE Y, SUN B, 2022a. Neutralization mechanism of a human antibody with pan-coronavirus reactivity including SARS-CoV-2. *Nature Microbiology*, 7(7): 1063-1074. DOI: 10.1038/s41564-022-01155-3.
- SUN Y, XING J, XU Z Y, GAO H, XU S J, LIU J, ZHU D H, GUO Y F, YANG B S, CHEN X N, ZHENG Z Z, WANG H, LANG G, E C H, ZHANG G H, 2022b. Re-emergence of severe acute diarrhea syndrome coronavirus (SADS-COV) in Guangxi, China, 2021. *The Journal of Infection*, 85(5): e130-e133. DOI: 10.1016/j.jinf.2022.08.020.
- TORRES J, MAHESWARI U, PARTHASARATHY K, NG L, LIU D X, GONG X, 2007. Conductance and amantadine binding of a pore formed by a lysine-flanked transmembrane domain of SARS coronavirus envelope protein. *Protein Science*, 16(9): 2065-2071. DOI: 10.1110/ps.062730007.
- WAISNER H, GRIESHABER B, SAUD R, HENKE W, STEPHENS E B, KALAMVOKI M, 2023. SARS-CoV-2 harnesses host translational shutoff and autophagy to optimize virus yields: the role of the envelope (E) protein. *Microbiology Spectrum*, 11(1): e0370722. DOI: 10.1128/spectrum.03707-22.
- WANG Q, VLASOVA A N, KENNEY S P, SAIF L J, 2019. Emerging and re-emerging coronaviruses in pigs. *Current Opinion in Virology*, 34: 39-49. DOI: 10.1016/j.coviro.2018.12.001.
- WANG S, WANG Z, LI Y, TU S, ZOU J, CHENG Y, ZHANG H, SUOLANG S, ZHOU H, 2023a. Generation of whole-porcine neutralizing antibodies of an alphacoronavirus by single B cell antibody technology. *Antiviral Research*, 220: 105754. DOI: 10.1016/j.antiviral.2023.105754.
- WANG W, ZHOU L, GE X, HAN J, GUO X, ZHANG Y, YANG H, 2023b. Analysis of codon usage patterns of porcine enteric alphacoronavirus and its host adaptability. *Virology*, 587: 109879. DOI: 10.1016/j.virol.2023.109879.
- YANG Y, ZHANG L, GENG H, DENG Y, HUANG B, GUO Y, ZHAO Z, TAN W, 2013. The structural and accessory proteins M, ORF4a, ORF4b, and ORF5 of middle east respiratory syndrome coronavirus (MERS-CoV) are potent interferon antagonists. *Protein & Cell*, 4(12): 951-961. DOI: 10.1007/s13238-013-3096-8.
- YANG Y L, QIN P, WANG B, LIU Y, XU G H, PENG L, ZHOU J, ZHU S J, HUANG Y W, 2019. Broad cross-species infection of cultured cells by bat HKU2-related swine acute diarrhea syndrome coronavirus and identification of its replication in murine dendritic cells in vivo highlight its potential for diverse interspecies transmission. *Journal of Virology*, 93(24): e01448-19. DOI: 10.1128/jvi.01448-19.
- YE Q, WEST A M V, SILLETTI S, CORBETT K D, 2020. Architecture and self-assembly of the SARS-CoV-2 nucleocapsid protein. *Protein Science*, 29(9): 1890-1901. DOI: 10.1002/pro.3909.

- YU J, QIAO S, GUO R, WANG X, 2020. Cryo-EM structures of HKU2 and SADS-CoV spike glycoproteins provide insights into coronavirus evolution. *Nature Communications*, 11(1): 3070. DOI: 10.1038/s41467-020-16876-4.
- ZAMBRANO-MILA M S, BLACIO K E S, VISPO N S, 2020. Peptide phage display: molecular principles and biomedical applications. *Therapeutic Innovation & Regulatory Science*, 54(2): 308-317. DOI: 10.1007/s43441-019-00059-5.
- ZAROFF S, TAN G, 2019. Hybridoma technology: the preferred method for monoclonal antibody generation for in vivo applications. *BioTechniques*, 67(3): 90-92. DOI: 10.2144/btn-2019-0054.
- ZHANG K, LIN S, LI J, DENG S, ZHANG J, WANG S, 2022a. Modulation of innate antiviral immune response by porcine enteric coronavirus. *Frontiers in Microbiology*, 13: 845137. DOI: 10.3389/fmicb.2022.845137.
- ZHANG T, YAO J, YANG Z, WANG J, YANG K, YAO L, 2024. Re-emergence of severe acute diarrhea syndrome coronavirus (SADS-CoV) in Henan, central China, 2023. *Veterinary Microbiology*, 292: 110049. DOI: 10.1016/j.vetmic.2024.110049.
- ZHANG Y, SONG Y, REN H, ZENG Q, YUAN Y, XIA L, WEI Z, 2022b. Preparation of a single-chain antibody against nucleocapsid protein of porcine deltacoronavirus by phage display technology. *Viruses*, 14(4): 772. DOI: 10.3390/v14040772.
- ZHOU L, LI Q N, SU J N, CHEN G H, WU Z X, LUO Y, WU R T, SUN Y, LAN T, MA J Y, 2019. The re-emerging of SADS-CoV infection in pig herds in southern China. *Transboundary and Emerging Diseases*, 66(5): 2180-2183. DOI: 10.1111/tbed.13270.
- ZHOU L, SUN Y, WU J L, MAI K J, CHEN G H, WU Z X, BAI Y, LI D, ZHOU Z H, CHENG J, WU R T, ZHANG X B, MA J Y, 2018. Development of a TaqMan-based real-time RT-PCR assay for the detection of SADS-CoV associated with severe diarrhea disease in pigs. *Journal of Virological Methods*, 255: 66-70. DOI: 10.1016/j.jviromet.2018.02.002.
- ZHOU Y, LIU Z, WANG Z, ZHANG Q, MAYER C T, SCHOOF S T, NUSSENZWEIG M C, DE JONG Y P, WANG Q, 2020. Single-cell sorting of HBsAg-binding memory B cells from human peripheral blood mononuclear cells and antibody cloning. *STAR Protocols*, 1(3): 100129. DOI: 10.1016/j.xpro.2020.100129.
- ZOMPI S, TULLIEZ M, CONTI F, LEBLOND V, GAULARD P, BLANCHE P, DURAND F, GHANDI D, DREYFUS F, LOUVEL A, CALMUS Y, BOUSCARY D, 2000. Rituximab (anti-CD20 monoclonal antibody) for the treatment of patients with clonal lymphoproliferative disorders after orthotopic liver transplantation: a report of three cases. *Journal of Hepatology*, 32(3): 521-527. DOI: 10.1016/s0168-8278(00)80406-7.