

分类号：S852.2

学校代码：10758

密 级：公开

学 号：320212868



硕士学位论文

猪伪狂犬病毒 gE 蛋白单克隆抗体制备及其生物学特性研究

Preparation of monoclonal antibody to gE protein of porcine pseudorabies virus and its biological characteristics

研 究 生 姓 名	马国祥
导 师 姓 名 及 职 称	翟少华 副教授
合作导师姓名及职称	王琦 研究员
学 位 门 类 级 别	农学硕士
专 业 名 称	兽医学
研 究 方 向	动物病毒感染研究
所 在 学 院	动物医学学院

新疆·乌鲁木齐
二〇二四年六月

本文是
四川省科技计划重点研发项目部分研究成果
(项目编号: 2022YFN0008)

课题主持人: 王琦 研究员
(中国农业科学院都市农业研究所)

猪伪狂犬病毒 gE 蛋白单克隆抗体制备及其生物学特性研究

摘 要

猪伪狂犬病（Porcine Pseudorabies）是由猪伪狂犬病病毒（PRV）引起的急性传染病，其典型的临床症状包括发烧和神经系统疾病。哺乳仔猪感染 PRV 死亡率高达 100%，怀孕母猪感染 PRV 可能会流产、死产。PRV 是一种传染性很强的疾病，容易通过空气传播或通过接触呼吸道传播，给中国和全球养猪业造成重大经济损失。

为了获得 PRV 的 gE 蛋白，针对 gE 基因设计引物，以 PRV CD22 株的 DNA 为模板进行扩增 gE 片段，将克隆出的片段经过电泳鉴定后胶回收，回收的基因片段克隆至原核表达载体 pET-32a（+）上，获得的重组质粒命名为 pET-32a-gE。测序正确后，将重组质粒转化至 BL21（DE3）感受态细胞中，经 IPTG 诱导表达后的上清通过镍柱纯化，纯化后的蛋白（His-gE）经过 Western blot 检测，结果显示，His-gE 融合蛋白能与感染 PRV 野毒毒株的猪阳性血清发生特异性结合。

为了获得抗 gE 蛋白单克隆抗体，我们将纯化后的 His-gE 融合蛋白作为抗原免疫小鼠和兔子，免疫程序结束后，采血清进行多克隆抗体效价的检测。ELISA 检测结果显示，小鼠的抗体效价高达 1:12800；兔子的抗体效价高达 1:12800。间接免疫荧光试验（IFA）和 western blot 验证结果表明，小鼠和兔多克隆抗体均能特异性的识别 PRV 感染表达的 gE 蛋白。接着，选取抗体效价较高的小鼠脾细胞和 SP2/0 细胞在融合剂作用下进行融合，通过 HAT 和 HT 培养基筛选，对阳性孔细胞经过 3 次亚克隆，最后筛选出一株能够特异性识别 PRV gE 蛋白的单克隆抗体，将其命名为 1D5。亚类鉴定结果显示，1D5 重链为 IgG1 型，轻链为 kappa 型。ELISA 结果表明，纯化前的腹水效价能够达到 1:12800。

进一步，为了验证这株单抗的反应性，我们构建了 gE 真核表达质粒，转染 293T 细胞后，进行了间接免疫荧光试验和 western blot 验证。IFA 和 western blot 结果显示，1D5 能特异性识别过表达的 gE 蛋白，能用于基础研究。此外，1D5 单抗也能识别 PRV CD22 感染 PK15 细胞后天然的 gE 蛋白，并且能够用来鉴别诊断疫苗毒株和田间流行毒株。

最后，为了鉴定 1D5 识别 gE 蛋白的抗原表位，我们构建了 gE 蛋白截短体真核表达质粒，通过 western blot 方法鉴定出 1D5 这株单克隆抗体识别的抗原表位为⁵⁴⁷GFDVWFRD⁵⁵⁴。此外，利用套式 PCR 扩增技术获得了 1D5 抗体可变区基因序列，后期可利用基因工程或蛋白质工程方法获得该单克隆抗体。

综上所述，本研究成功制备出一株抗 PRV gE 蛋白杂交瘤细胞株，我们对其进行了抗体亚类鉴定、功能验证、表位鉴定及序列分析等，这为我们后期设计 PRV 抗病毒药物，促进疫苗开发，并协助建立抗体检测方法建立了良好的基础。

关键词：猪伪狂犬病毒；gE 蛋白；单克隆抗体；表位鉴定

Preparation of monoclonal antibody to gE protein of porcine pseudorabies virus and its biological characteristics

Abstract

Swine pseudorabies (PR), caused by the swine pseudorabies virus (PRV), is an acute infectious disease characterized by fever and nervous system disorders. The mortality rate for suckling pigs infected with PRV can reach 100%, and pregnant sows infected with PRV may experience abortion or stillbirth. PRV is a highly contagious disease that can be transmitted through the air or by contact with respiratory secretions, causing significant economic losses to the swine industry in China and globally.

To obtain the PRV gE protein, primers were designed targeting the gE gene, and the gE fragment was amplified using the PRV CD22 strain's DNA as a template. The cloned fragment was identified by electrophoresis, recovered, and cloned into the prokaryotic expression vector pET-32a(+), resulting in the recombinant plasmid named pET-32a-gE. After correct sequencing, the recombinant plasmid was transformed into BL21(DE3) competent cells, and the induced expression supernatant was purified using a nickel column. The purified protein (His-gE) was detected by Western blot, showing that the His-gE fusion protein could specifically bind to positive porcine sera infected with wild-type PRV.

To obtain monoclonal antibodies against the gE protein, the purified His-gE fusion protein was used as an antigen to immunize mice and rabbits. After the immunization program was completed, sera were collected for the detection of polyclonal antibody titers. ELISA results showed that the antibody titers in mice reached up to 1:12800, and in rabbits up to 1:12800. Indirect immunofluorescence assay (IFA) and Western blot validation showed that both mouse and rabbit polyclonal antibodies could specifically recognize the gE protein expressed by PRV infection. Subsequently, spleen cells from mice with high antibody titers and SP2/0 cells were fused under the action of fusion agents, and positive clones were selected through pressure screening with HAT and HT media. After three subclonings, a monoclonal antibody specifically recognizing the PRV gE protein was selected and named 1D5. Subclassification results showed that the heavy chain of 1D5 was IgG1 and the light chain was kappa. ELISA results indicated that the ascitic fluid titer before purification could reach 1:12800.

Furthermore, to verify the reactivity of this monoclonal antibody, a eukaryotic expression plasmid for

gE was constructed and transfected into 293T cells. IFA and Western blot validation showed that 1D5 could specifically recognize overexpressed gE protein and could be used for basic research. In addition, 1D5 monoclonal antibody could also recognize the native gE protein after PRV CD22 infection of PK15 cells and could be used to discriminate between vaccine strains and field strains.

Lastly, to identify the antigenic epitope recognized by 1D5, a truncated gE protein eukaryotic expression plasmid was constructed and identified by Western blot. The antigenic epitope recognized by the monoclonal antibody 1D5 was determined to be 547GFDVWFRD554. Additionally, the variable region gene

Key words: Porcine pseudorabies virus; gE protein ; Monoclonal antibody; Epitope identification

英文缩略词表

英文缩写	英文全称	中文名
PRV	Porcine pseudorabies virus	猪伪狂犬病病毒
PCR	Polymerase chain reaction	聚合酶链式反应
ELISA	Enzyme linked immunosorbent assay	酶联免疫吸附试验
RT-PCR	Real time fluorescence quantitative PCR	实时荧光定量 PCR
PR	Porcine pseudorabies	猪伪狂犬病
IFA	Indirect immunofluorescence	间接免疫荧光
PAGE	Polyacrylamide gel electrophoresis	聚丙烯酰胺凝胶电泳
PBS	Phosphate buffer solution	磷酸盐缓冲液
PBST	Phosphate Tween buffer solution	磷酸盐吐温缓冲液
SNT	Serum neutralization test	血清中和试验
CM-CSF	Granulocyte macrophage colony stimulating factor	粒细胞-巨噬细胞集落刺激因子
LAMP	Loop-mediated isothermal amplification	环介导的等温扩增

目 录

第 1 章 绪论	1
1.1 猪伪狂犬病原学	1
1.2 猪伪狂犬流行病学	2
1.3 猪伪狂犬的致病机理	4
1.4 猪伪狂犬病的诊断	5
1.5 猪伪狂犬的预防与治疗	6
1.6 猪伪狂犬病疫苗研究情况	9
1.7 研究的目的与意义	11
第 2 章 猪伪狂犬病毒 gE 蛋白的基因克隆及蛋白表达	14
2.1 实验材料	14
2.2 实验方法	15
2.3 实验结果	19
2.4 讨论	23
2.5 小结	23
第 3 章 猪伪狂犬病毒 gE 蛋白单克隆抗体的制备及鉴定	24
3.1 实验材料	24
3.2 实验方法	25
3.3 实验结果	31
3.4 讨论	39
3.5 小结	39
第 4 章 猪伪狂犬病毒 gE 蛋白 mAbs 的功能验证	40
4.1 实验材料	40
4.2 实验方法	41
4.3 实验结果	44
4.4 讨论	49

4.5 小结	50
第 5 章 猪伪狂犬病毒 gE 蛋白 mAbs 的抗原表位鉴定	51
5.1 实验材料	51
5.2 实验方法	51
5.3 实验结果	54
5.4 讨论	57
5.5 小结	58
第 6 章 全文结论	59
参考文献	60
致 谢	73
作者简介	75

第 1 章 绪论

1.1 猪伪狂犬病原学

1.1.1 猪伪狂犬病毒结构

伪狂犬病病毒，也称猪疱疹病毒 I 型，是疱疹病毒科内的甲疱疹病毒亚科，属于水疱病毒属，可编码 70 多种蛋白质^[1]，所有疱疹病毒粒子都有相似的双链 DNA 基因组。在形态学上，正常的 PRV 病毒粒子是椭球形或球形的，直径为 150-180 nm。PRV 病毒粒子由四种结构成分组成（图 1-1）：包装在核衣壳中的双链 DNA 基因组、包裹 DNA 的核衣壳、基质蛋白构成的被膜、包裹被膜的囊膜。

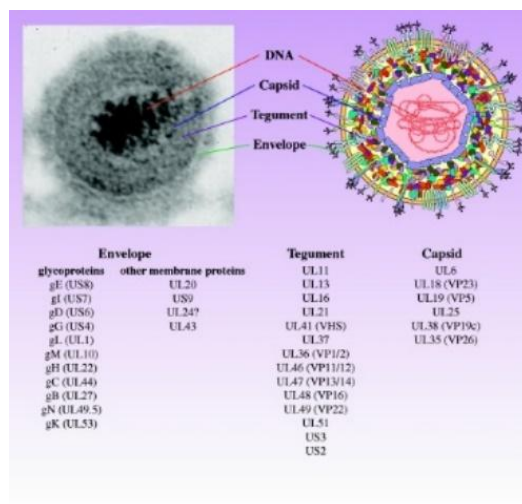


图 1-1 PRV 病毒粒子结构模式图^[2]

Fig 1-1 PRV virus particle structure pattern diagram

1.1.2 猪伪狂犬病毒基因组结构

PRV 是一种大小约为 143 kb 的双链 DNA 病毒，PRV 基因组的排列和 EHV-1、BHV-1、和 VZV 的基因组相似^[3]，由独特的长链（UL）、内部重复短（IRS）、独特的短链（US）和末端重复短（TRS）组成^[4-5]。基因组中至少有 72 个基因^[6-8]，编码 70-100 种病毒蛋白，包括毒力相关蛋白和复制酶，以及许多对 PRV 复制不是必需的蛋白^[9-10]。

病毒包膜中共有 11 种不同的糖蛋白，命名为 gB、gC、gD、gE、gG、gH、gL、gK、gM、gN^[11]。gB 糖蛋白是疱疹病毒侵入细胞复杂机制中最保守的成分，也是一种主

要的病毒抗原，对介导病毒感染期间的膜融合过程以及病毒在细胞间传播中起着至关重要的作用^[12-13]。

1.2 猪伪狂犬流行病学

1.2.1 传染源

感染了 PRV 的动物本身就是该病最主要的传染源，包括野猪^[14]、狐狸^[15]、棕熊^[16]、黑熊、狼、老鼠、单峰驼^[17]、黄牛^[18]、貂^[19]、犬^[20]、羊^[21]都可以传播该病。携带 PRV 的动物可以通过交配传播、经胎盘传播、上行性传播以及分娩引起传播，带毒动物的口腔和鼻腔的分泌物以及肛门尿道的排泄物直接排放到动物的生活环境中都会引起该病的传播^[22]。

1.2.2 传播途径

PRV 可以通过各种不同的途径进行传播病原，除了通过垂直传播中的经胎盘传播、分娩传播、上行性传播外，还可以通过动物的自然交配发生传播，幼崽摄入母体的乳汁、带毒动物的排泄物以及呼吸时候产生的气溶胶都会引起 PRV 的传播^[23-24]。

1.2.3 易感动物

虽然猪是 PRV 的天然宿主，但它也可以感染许多动物，包括绵羊、狗、狐狸、老虎、熊等^[25]。在灵长类动物中黑猩猩不易感 PRV，绒猴较易感^[26]。有研究 2019 年报告了 20 多例人类严重伪狂犬病脑炎病例^[27] 所有这些感染 PRV 变异株的患者都与猪有过密切接触，这表明猪可能是人类感染 PRV 的病因来源。因此，PRV 变异株引起的公共威胁及其在不同种类的动物和人类之间的传播值得关注。

猪是 PRV 的天然宿主，受感染的新生仔猪在出生后第二天就可以出现神经系统症状，感染成年猪可引起公猪的睾丸出现炎症反应以及母猪妊娠失败^[28-29]，PRV 还可以传染给许多其他的哺乳动物，养殖的狐狸，貂也会有发病的情况，这可能与饲喂被污染过的生猪肉或者猪内脏有关系^[30-31]，感染后出现严重的瘙痒和中枢神经系统症状，死亡率能够达到 100%^[32]。非自然宿主的 PRV 感染通常是人为操作的实验性的感染或者可能

和猪有关的自然状态下的接触感染，在世界范围内已有报道养殖的牛自然感染与接触受感染的猪有关^[33-34]，受感染的牛表现出疯狂的瘙痒、癫痫和瘫痪。在病毒外溢的情况下，在 PRV 感染的猪场旁边饲养的羊群爆发了伪狂犬病，该农场养的猫也感染了 PRV^[35]，作为我们人类的伴侣动物，猫和狗也能够通过接触感染的猪而感染 PRV，猎犬能够经常接触野猪和其他的野生动物而更容易感染 PRV^[36-37]。野生动物被感染 PRV 的也被广泛报道，包括野猪^[14]、狐狸^[15]、棕熊^[16]、黑熊、狼、老鼠、单峰驼^[17]、黄牛^[18]、貂^[19]、犬^[20]、羊^[21]。

1.2.4 主要临床症状和病理变化

任何年龄阶段的猪都能够感染 PRV，但是它们感染后出现的临床症状各不相同，与其他α疱疹病毒一样，PRV 可以终身潜伏在受感染猪的周围神经系统，在那里它可以建立静止的潜伏感染，这些潜伏感染的猪在某些条件下可以感染其他猪^[38-39]。出生 14 天以内的仔猪对 PRV 的抵抗能力最弱，受感染的新生仔猪在出生后第二天即可出现明显的神经系统症状，感染仔猪精神沉郁，头部向后仰，全身抽搐以及四肢做出划水状的游泳动作，新生仔猪体温升高超过 41℃，还会出现尖叫、共济失调、视疸等症状，死亡率可高达 100%；断奶仔猪除了感染率较新生仔猪低其他症状比较类似，病程稍有增长并且会伴有便秘的情况出现，死亡率也较新生仔猪低，大概在 50%左右，有的断奶仔猪在发病过后会有后遗症，出现后期发育不良以及部分猪出现瘫痪的情况^[40]。怀孕母猪在患病前后没有明显的临床症状，感染初期体温升高，伴随咳嗽以及精神不振，但是随着病情的不断发展，会对体内的胎儿造成比较严重的影响，母猪会出现流产，产下死胎或者状态较差的弱胎，弱胎一般不能够正常长大，出生就伴随拉稀，呕吐等消化系统疾病以及抽搐等神经症状，一般在三天内死亡。对种公猪的影响主要表现在破坏公猪的生殖系统，公猪的睾丸和附睾肿大出现炎症，最后萎缩使其丧失产精配种的能力，对养殖场造成严重的损失。对育肥猪的影响相对较小，体温略有升高，食欲不振、精神萎靡、咳嗽，腹泻等症状，严重者出现全身抽搐等神经症状，即使后期能够恢复，也会出现僵猪的现象，严重影响生产性能^[41]。成年猪一般症状较轻，体温略微升高，有轻微的呼吸道症状，一般都能够自行恢复，但这种猪终身带毒，是比较危险的传染源^[41]，引起老年猪呼吸系

统方面的疾病^[38-39,42]。

猪感染 PRV 后会对猪的器官造成不同程度的损伤，对病猪剖检以后发现扁桃体出现肿大，胃的底部有卡他性炎症以及明显的出血区域，肝脾有多处坏死，肾脏有多处瘀块，中枢神经系统出血，脑脊液增加出现脑膜炎^[43]。

1.3 猪伪狂犬的致病机理

伪疱疹病毒科的成员形成了一个庞大而多元化的家族，由三个亚科组成，分别是 α 、 β 、 γ 疱疹病毒，病毒粒子 DNA 基因包裹在二十面体衣壳中，而二十面体衣壳又被涂有一层称为被毛的蛋白质和脂质双层中由病毒蛋白和糖蛋白组成的包膜包被。这些包膜蛋白中至少有三种，有时是四种，对于病毒的进入是绝对必要的。被认为对所有疱疹病毒进入至关重要的三种糖蛋白是 gB、gH、gL，这些糖蛋白的基因是保守的，其中 gB 表现出最高程度的序列相似性。至少对于有些疱疹病毒，gB 是一种同源二聚体或同源三聚体，显示为突出的刺突^[44]。

PRV 病毒粒子进入细胞需要部分糖蛋白介导^[45]。PRV 病毒粒子的附着过程主要由 gC 蛋白和硫酸乙酰肝素蛋白聚糖介导完成的。PRV gD 还通过稳定病毒-细胞相互作用参与病毒进入。随后，PRV gB、gH 和 gL 通过介导病毒粒子的包膜与质膜融合来促进病毒入侵过程，导致病毒衣壳和包膜渗透到细胞质中^[46]。膜融合后，PRV 衣壳与微管样结构结合，转运至核孔^[47]。随后，部分包膜蛋白从衣壳中迅速分离。最后，细胞内 PRV 基因组 DNA 释放到宿主细胞核中进行复制。在这个过程中，位于细胞核中的 DNA 触发宿主抗病毒免疫反应，并将信号传递到细胞质。尽管宿主已经进化出强大的先天免疫机制，主要由 IFN-I 介导，以应对病毒入侵，但 PRV 也进化出逃逸宿主免疫反应的策略。PRV 使用多种病毒蛋白通过降解 IFN 反应中的各种成分、减少其 mRNA 产生或干扰其功能来逃逸宿主免疫反应。PRV 用来破坏 IFN 系统的多方面努力是为了确保 IFN 的抗病毒作用被有效阻断，以便 PRV 能够成功建立持续感染。中国由于使用疫苗接种，PRV 一度得到控制。然而，不同的 PRV 变异株的出现导致 PR 的再传播和流行，甚至对人类造成潜在威胁。这些出现的新毒株表现出更强的致病性。这些新毒株是否已经进化出逃避宿主先天免疫的新策略，以及这些策略是否有助于增强致病性，还有待确定。了

解这些问题将有助于设计更好的 PRV 疫苗^[48]。

1.4 猪伪狂犬病的诊断

目前，血清学技术和分子生物学方法是 PRV 检测的常用方法。因为传统的临床和病理诊断方法不能够准确诊断 PR。基于 PRV 特异性抗体和核酸的两种常用方法用于检测 PRV 感染，它们有各自的优缺点。

1.4.1 猪伪狂犬病血清学检测技术

检测 PRV 感染的血清学方法主要原理是检测血浆、血清或者全血是否存在针对 PRV 的 IgA、IgM/IgG 抗体，由于 PRV gE 缺失疫苗在世界范围内的广泛使用，和 gE 抗体相关的血清学方法被广泛使用，并且已经开发不同种类的 PRV gE 抗体，以便快速有效地区分感染动物和接种疫苗的动物。目前，有较多血清学方法可用于 PRV 抗体的检测，如间接免疫荧光法（IFA）、血清中和试验（SNT）、酶联免疫吸附试验（ELISA）、乳胶凝集试验、琼脂扩散试验、颗粒浓度荧光免疫测定（PCFIA）和免疫层析试纸^[49-54]。较其他方法而言，ELISA 方法最为便捷，因此仍然是 PRV 抗体临床检测中最常用的方法，目前市场商业化的血清抗体 ELISA，主要包括 gB 阻断 ELISA、gI 阻断 ELISA 和 gE 间接 ELISA^[55]。为了使检测更加方便，我国已经有开发出靶向 gB 或 gE 抗体的竞争性 ELISA 并得到广泛应用^[56-58]。一种基于阻断荧光侧流免疫测定的新型血清学技术用于 PRV 检测所需的时间更短，并且对区分野生 PRV 感染和接种疫苗的猪很敏感。双荧光微球免疫测定（FMIA），用于同时检测 PRV gE 和 gB IgG 抗体，与市售 gE/gB ELISA 试剂盒相比，该方法还具有高灵敏度（92.3%）和特异性（99.26%）而且检测更准确，时间和成本支出更少^[59]。此外，免疫层析法和液态芯片技术方法的灵敏度也高于阻断 ELISA^[60]。因此，阻断荧光侧流免疫测定、FMIA、免疫色谱分析和液体芯片技术有望成为检测 PRV 抗体的新的临床实验室诊断方法，尽管这些方法目前还不普及。

1.4.2 猪伪狂犬病分子生物学诊断方法

为了增强 PRV 检测特异性，已经建立了针对 PRV 基因特定序列的分子生物学方法，

多以糖蛋白基因为主,如聚合酶链反应(PCR)^[61],实时荧光定量 PCR(RT-PCR)^[62],TaqMan 实时荧光定量 PCR(qPCR)^[62],纳米 PCR^[63]、微滴数字 PCR(ddPCR)^[64],实时重组酶辅助扩增(RT RAA)^[65],环介导等温扩增技术(LAMP)^[66]和双链荧光熔解曲线分析(FMCA)^[67],侧向层析试纸(RPA LFD 测定),基于磁珠的化学发光检测^[68],通常,PCR 和 RT-PCR 是快速检测 PRV 感染或区分 PRV 野生型和疫苗株的最常用方法^[68]。还有多重 PCR 检测方法用于同时检测 PRV 和其他病原体,例如猪圆环病毒 3(PCV3)、猪圆环病毒 2(PCV2)、猪细小病毒(PPV)和猪巨细胞病毒(PCMV)以及 Torque tenosus 病毒 1 和 2^[69-74]。采用新型高通量测序、二代和三代测序(NGS 和 TGS)方法对 PRV 转录组进行检测,通过 NGS 检测患者 PRV 的存在,这是最强大、最灵敏的检测方法^[75]。然而,高通量测序由于成本高昂,不适合临床检测^[75]。与常规 PCR 相比,环介导的等温扩增检测更灵敏、特异、更快速、更具成本效益,因此更适合现场 PR 诊断,在 PRV 防控中具有巨大的应用潜力。

1.4.3 检测 PRV 感染的其它方法

除上述的血清学和分子生物学检测方法,直接检测病原也十分有效,这对设计新型 PR 疫苗具有重要意义。直接检测病原体方法目前仅适用于专业人员和专业实验室^[75-76]。

1.5 猪伪狂犬的预防与治疗

1.5.1 猪伪狂犬的防控措施

想要做好养殖场猪群伪狂犬的精准有效防控,减少野毒感染的机会,需要管理者从多个角度着手^[77],首先猪场制定精准的免疫程序,疫苗的选择首选能够针对流行毒株的清伪灵(硕腾动保生产),该疫苗免疫后的复制效率也比较高^[77],接种前检查猪群的健康状况,保证在良好的状态下进行免疫,以免影响免疫的效果。

养殖人员应该加强猪舍的卫生环境管理,定期对猪舍的地面、围栏、以及饮水进食区进行消毒,圈舍内的排泄物及时清理,以免因为细菌的滋生造成猪群免疫力下降导致发病,对圈舍的病猪,弱猪及时隔离。

切断 PR 的传播途径,猪场内容易造成 PR 传播的主要是一些蚊虫,应当定期对圈

舍的蚊虫进行杀灭,对容易滋生蚊虫的位置进行消毒处理,破坏他们的生存空间,从而降低 PR 的感染率。

做好包括猪只,药品,饲料以及相关工作人员进场的消毒检查,对于引入场的猪只提前做好检疫工作并且在运输途中避开有疫病的地区,新引入场的猪只要单独隔离观察至少 5 周以上,不同厂区的工作人员应该避免串舍。

伪狂犬病整体比较高发,从业者必须充分意识到该病对猪群造成危害的严重性,从思想意识上做到高度敏锐,不报侥幸心理,规范严格的做好防控工作就一定能够减少 PR 对猪场造成的危害。

1.5.2 抗猪伪狂犬病毒的药物

目前尚无针对猪 PRV 感染的特异性治疗方法。接种疫苗可以从根本上预防 PRV 的感染和传播,是控制 PR 的最有效措施。关于人类 PRV 感染的临床共识和经验仍然缺乏,因为只有少数确诊病例被报道,症状轻微的病猪无需治疗即可康复。阿昔洛韦被推荐用于治疗由水痘带状疱疹病毒感染引起的急性视网膜坏死综合征和脑炎。由于 PRV 没有类似的治疗方法,因此发现新的药物靶点至关重要,并且正在开发新的抗病毒药物来治疗、预防和控制 PRV。

天然药物在历史上已被广泛接受并用于治疗疾病,并且对这些药物用于抗病毒药物开发的力度一直在增加^[78-82],天然药物的抗病毒机制可分为直接抑制和间接抑制。直接抑制是指在病毒复制过程中阻断一个环节,从而将病原体从体内清除出去。间接抑制指刺激调动机体的免疫系统,发挥抗病毒作用^[83-86]。

有研究表明,一些天然药物对 PRV 具有抗病毒作用,比如绿茶及其主要成分表没食子儿茶素-3-没食子酸酯(EGCG)可缓解多种慢性疾病^[87]。在固体绿茶提取物中,EGCG 是最丰富的生物活性多酚,具有抗菌、抗病毒和抗氧化特性,EGCG 可防止许多病毒进入靶细胞从而预防感染^[88-89]。文章报道在 PK15 细胞和 Vero 细胞中,EGCG 显著抑制 PRV 毒株的复制^[88]。在文中还证实,给 PRV 感染过小鼠使用 EGCG 能够提高存活率。因此,证明了 EGCG 对体内 PRV 感染的治疗作用,表明其作为抗 PRV 药物的潜力。

研究表明白藜芦醇具有抗病毒特性,用白藜芦醇治疗能够显著降低 PRV 感染仔猪

的死亡率,提高生长性能,因为它抑制宿主细胞中的病毒增殖,并缓解宿主细胞中 PRV 诱导的炎症^[90]。

姜科植物产生 Germacrone,这是一种单环倍半萜烯,具有广谱的抗肿瘤、抗病毒、抗菌和抗炎特性^[91-92],也能够显著抑制 PRV 的复制。

槲皮素是分布最广泛的植物类黄酮^[93],研究证实,槲皮素通过影响 gD 的结合能力来抑制 PRV 感染,gD 对病毒感染很重要,通过计算机分子对接数据分析,发现槲皮素与 PRV gD 蛋白相互作用,从而阻断 nectin-1 与 gD 的结合。槲皮素还可以减少体内 PRV 复制,降低 PRV 感染小鼠死亡率并降低病毒载量。槲皮素在体内也表现出抗 PRV 活性,考虑到槲皮素在体外和体内对 PRV 感染的强大治疗作用,可以用作抗 PRV 药物。

金银花提取物和木犀草素能够抑制 PRV 诱导的 RAW264.7 细胞中 NF- κ B 通路激活从而降低炎性细胞因子分泌,因此表现出抗病毒活性,所以金银花提取物可用做治疗 PRV 感染的抗病毒剂。

PRV 感染的新生仔猪患有严重的神经系统疾病,死亡率惊人,很少有药物可以缓解疱疹病毒引起的神经系统症状。姜黄素被证明是治疗神经退行性疾病的一种有前途的药物,因为它可以穿过血脑屏障^[94-95]。杨炳杰等人探索了缓解 PRV 引起的神经系统症状的新药,并研究了姜黄素在预防 PRV 感染的大鼠海马神经元氧化应激、细胞凋亡和线粒体功能障碍中的作用^[96],发现姜黄素能够提供针对 PRV 感染的神经保护,因此,姜黄素非常具有成为治疗神经元 PRV 感染药物的潜力。

刑玉潇等研究了大花桔梗多糖(PGPS)对 PRV 的抗病毒活性及其抗 PRV 作用的分子机制^[97]。他们发现 PGPS 影响 PRV 诱导的自噬。因此,PGPS 可能通过靶向自噬来抑制 PRV 复制,并有可能成为一种新的抗 PRV 药物。

潜伏感染是治疗疱疹病毒感染的一个难题。抑制潜伏感染和病毒活化对于这种疾病的治疗都特别重要,研究表明山奈酚可抑制 PRV 潜伏感染,这可能成为控制 PRV 感染的新方法^[98]。

王国松等建立了一种准确可靠的方法,用于在美国食品药品监督管理局(FDA)批准的小分子库中筛选药物,以确定它们在体内是否对 PRV 有活性,并且建立了致死小鼠模型以确认候选 PRV 药物的有效性。与未治疗的小鼠相比,小鼠在接受阿德福韦酯

地吡酯治疗后,临床死亡率明显降低,因此,阿德福韦酯可能成为识别具有控制 PRV 流行潜力的候选小分子药物。

Lv 等人确定伊维菌素在体内和体外均能够抑制 PRV 增殖,对 PRV 具有抗病毒作用,并研究了这种抗病毒活性的机制^[99],因此伊维菌素可以作为抗 PRV 候选药物。PR 对养猪业造成了重大损害,对人类构成潜在威胁。

尽管近年来只有少数针对 PRV 的抗病毒药物可用,但在开发 PRV 疫苗方面取得了很大进展。此外,几种新的技术和方法也被用于抑制 PRV,包括 DNA 复制抑制剂和病毒逆转录酶抑制剂。李军淑等人从大肠杆菌中纯化了 3D8 scFv 蛋白,并评估了 3D8 scFv 蛋白在 PRV 感染小鼠的抗病毒作用,结果表明 3D8 scFv 蛋白能够预防小鼠感染 PRV。

siRNAs 对 PRV 感染后 UL42 表达的有效抑制减少了 PRV 复制, RNAi 技术可能为设计针对疱疹病毒的干预策略提供新的线索^[100]。

治疗 PRV 感染的药物种类有限。抗疱疹病毒药物的研制取得了一定进展,在化学合成技术的发展过程中发现了大量的天然抗病毒化合物。天然产物来源广泛,易于获得且毒性低。因此,天然产物是寻找抗病毒活性成分的重要资源。此外,筛选新的小分子药物和探索基因工程药物是抗 PRV 药物开发的主要方向。然而,新型抗 PRV 药物的研究仍处于起步阶段,候选药物的抗病毒活性大多是在细胞培养物中进行的,只有少数药物在小鼠中进行了测试,几乎没有在猪中进行了测试。

目前,抗 PRV 药物靶点主要集中在宿主炎症反应相关通路、自噬相关通路和病毒复制酶上。这些研究将为 PRV 和其他疱疹病毒的绿色防控提供理论依据。

基于 PRV 药物研究的现状,天然抗病毒活性成分的开发和小分子新药的筛选将是抗 PRV 药物研究的主要方向。有效药物靶点的开发和抗病毒机制的研究也是未来抗 PRV 药物研究的关键。

1.6 猪伪狂犬病疫苗研究情况

自 PRV 流行以来,以 Bartha K61 为代表的减毒活疫苗在预防和控制该病方面发挥了关键作用,Bartha K61 毒株是有史以来最早开发的减毒 PRV 疫苗之一,它至今仍是各种根除计划中的黄金标准疫苗。1961 年,匈牙利兽医 Adorján Bartha 首次报道了该病

[101]，他描述了一种毒性较弱的田间毒株变体，该变异株是通过连续传代获得的，该毒株的毒力在自然宿主中由于编码某些毒力或参与免疫逃避的基因的表达改变甚至完全缺失而减弱。在后续的实验研究中也证明了 Bartha K61 毒株作为疫苗株的安全性、有效性[102-103]。在欧洲，Bartha K61 在净化 PRV 中发挥了核心作用，因为它是许多成功根除 PRV 地区使用的疫苗[104]，尽管广泛使用的伪狂犬病病毒 Bartha-K61 疫苗在根除 PRV 方面发挥了关键作用。但是，自 2011 年底以来，中国许多猪场的 Bartha-K61 疫苗接种猪中出现了一种以神经系统症状为特征的疾病，新生仔猪死亡率居高不下。对仔猪的临床样本进行了检查。所有样本均可通过 PCR 检测出 PRV gE 基因，gE 基因序列分析显示，所有分离株均属于相对独立的簇，并含有 2 个氨基酸插入。然而，Bartha K61 疫苗是否提供了足够的保护仍在争论中，因为缺乏关于疫苗接种计划如何执行的关键信息。此外，实验性的测定结果表明 Bartha K61 对新型中国 PRV 毒株提供了不完全保护，这些实验通常在小鼠或绵羊中进行，虽然这些小鼠或绵羊易感但非天然宿主，难以外推到猪[105]。一些报告显示，事实上，接种了 Bartha K61 疫苗的动物在临床上仍然受到几种高毒力的中国毒株（包括 XJ5 和 AH02LA）的致命攻击[106-107]。有文章报道，在接种 Bartha 疫苗的猪中，有 2 头在受到高毒力毒株 HB1201 的攻击时死亡[108]。越来越多的共识认为，Bartha K61 对一些的中国 PRV 毒株的疗效可能降低。

减毒疫苗保留了病原体的大部分自然结构。尽管他们的结构没有发生太多的改变但是它们的复制能力和毒力降低较多，现在人们普遍认为减毒疫苗能够提供更好、更完整的免疫保护。目前，减毒活疫苗是应用和开发最广泛的疫苗。大多数 PRV 疫苗是基于部分基因（如 US3、US7 和 US8）缺失的减毒活疫苗，通常选择缺失后病毒毒力下降且不会影响病毒复制的基因进行缺失[109-111]。

第一个减毒活 PRV Bartha K61 毒株是最为成功的改良活疫苗之一。随着 PRV 遗传学和分子生物学的进步，并且也正在通过各种技术开发更多的基因缺失的 PRV 疫苗[112]。基因工程技术的快速进步，如同源重组、细菌人工染色体和 CRISPR/Cas9 基因编辑系统，可以快速构建基因缺失的毒株作为减毒活疫苗候选者。尽管减毒活疫苗对 PR 预防和控制具有重要意义[113]，但是一些研究人员对减毒活疫苗在易感动物中使用的的安全性也提出了质疑[114-115]，如今越来越多的基于突变体的减毒 PRV 疫苗正在开发中，但

仍有几个问题需要进一步考虑。首先, 衰减因子仍局限于 US2、US3、US7、US8、US9 和 UL23 的单个或多个缺失, 下一步需要进一步开发新的相关基因, 其次, 对多基因缺失后的病毒生长特性关注较少, 部分基因缺失可能会降低病毒滴度, 影响减毒活疫苗的生产, 最后, 疫苗在猪以外的动物中的安全性需要进一步研究, 特别是在非人灵长类动物中。而且研究人员必须持续监测田间毒株的变化, 并据此构建新的候选疫苗。

灭活疫苗通常通过化学法、物理法或者生物的方法处理 PRV 使其失去生物活性, 然后和相适应的佐剂进行混合后制备出疫苗, 这种疫苗接种猪后, 不能够在猪体内复制, 但是能够刺激猪产生抗体, 一般选择全基因组病毒灭活后进行免疫, 但是在猪伪狂犬病的净化中为了能够区别疫苗毒和野毒, 通常选择基因缺失的毒株进行灭活, 虽然甲醛和乙烯亚胺被广泛用于灭活病毒, 但甲醛和乙烯亚胺具有增加毒性、反应原性差和免疫抑制等不良反应。为了克服这些问题, 人们对现代无害的病毒灭活剂(如促进性物质和蜂胶)进行研究。这项工作旨在提高此类疫苗的免疫原性, 我国国内的首个 PR 的灭活疫苗是在 2001 年由陈焕春院士团队研发出来的, 疫苗当时能够提供比较好的免疫保护, 但是后期针对变异的毒株, 不能够提供完全的免疫保护^[116], 灭活疫苗和经典的弱毒疫苗相比存在抗原含量比较低, 需要进行大量接种等天然的缺陷。

由于亚单位疫苗明确的成分和出色的安全性, 亚单位疫苗被认为比普通的灭活和减毒疫苗更有利于控制 PR, 从而吸引了研究人员对保护动物福利和降低公共卫生成本的关注^[117], 接种亚单位疫苗的动物与田间病毒感染动物的区分可以通过接种亚单位疫苗和血清学诊断测试来实现, 这有可能根除 PR 疾病并且没有毒力逆转的风险^[118]。此外, 通过亚单位疫苗接种的动物没有潜伏感染, 这比减毒活疫苗更适合怀孕动物。在 PRV 的 11 种糖蛋白中 gB 和 gD 不是 PRV 的初级糖蛋白, 用于病毒粒子附着在宿主细胞表面, 而是刺激产生针对 PRV 感染的中和抗体的免疫原性蛋白^[119-120], gC 单克隆抗体能够中和病毒^[121], 很多的实验证据表明, gB 和 gD 是诱导体液和细胞免疫反应的关键蛋白质, 被认为是探索新型疫苗的有吸引力的靶标^[122], 尽管存在丰富的试验数据表明 gB 和 gD 的抗体可以保护猪免受 PRV 的致命感染, 但针对 gB 和 gD 颗粒的可用商业亚单位疫苗很少被测试^[122], 然而, 由于免疫原性较低, 亚单位疫苗诱导的免疫效应通常不足, 因此, 佐剂的选择对于提高亚单位疫苗免疫作用至关重要。粒细胞-巨噬细胞集落刺激

因子（CM-CSF）是一种促炎细胞因子，能够引发强大的抗病毒和抗肿瘤功效，从而调节树突状细胞亚群的发育和功能，以及 T 淋巴细胞的活化^[123]，曹志等人基于杆状病毒表达系统表达出 gB 和 gD 蛋白，选择用 CM-CSF 作为佐剂，用兔子探索其保护能力，结果表明，gB+gD+GM-CSF 亚单位疫苗诱导了强大的免疫反应，为兔子提供了有效的保护，GM-CSF 可能是亚单位疫苗的潜在候选佐剂^[124]。

Rooij,Haagmans 等人研究证明，通过 DNA 疫苗接种呈递的 gB 可有效刺激 T 细胞免疫，包括细胞毒性 T 淋巴细胞（CTL）反应，而 gD 可有效刺激 B 细胞免疫。需要诱导 T 细胞免疫以在攻击后早期减少病毒排泄，因此 gB 和 gD DNA 疫苗的组合形成了有吸引力的 PRV 候选疫苗。未来的研究将集中在通过佐剂或影响抗原加工途径来调节细胞介导的免疫反应^[125]，Jeong Gon Cho 等人研究发现 PRV gB 在诱导有效预防病毒性病毒感染方面非常重要。然而，考虑到将 PRV DNA 疫苗应用于自然宿主猪，应该需要减少注射 DNA 的数量和增强 PRV DNA 疫苗的免疫原性的策略。为了提高 DNA 疫苗的功效，一些研究人员使用了 Sindbis 衍生的质粒载体，掺入细胞因子遗传佐剂^[126]。

Bartha K61 不能够对 PRV 变异株的感染提供完全保护^[127]。开发新的疫苗是显得尤其重要^[128]。破坏病毒的先天免疫逃逸能力可以降低病毒的毒力，同时建立强大的免疫反应^[129]，接种疫苗是对抗传染病最有效的策略之一^[130]。然而，传统的疫苗接种并不是一劳永逸的解决方案，人类与传染病的斗争仍在继续。PRV 变异株在中国的流行促使我们专注于开发新的、更有效的疫苗，以阻止 PRV 变异株的大流行。

1.7 研究的目的是与意义

伪狂犬病毒是一种严重影响全世界养猪业健康良好发展的一种传染性致病菌，具有传染力强，致死率高的特点，包括仔猪，成年猪以及妊娠母猪都可以被感染发病，猪发病后很难恢复，严重影响猪的生产性能和经济效益。而且 PRV 的低特异性宿主嗜性使这种病毒能够感染多种动物，例如猪、牛、水貂、狗，甚至是人类。PR 目前没有特定的能够彻底治疗的药物以及方法，想要减少 PR 对养猪业造成的损失，控制 PR 的流行变异，必须使用先进科学的养殖技术以及严格的管理方案，还应该加强对猪群感染田间毒株的的监测及时清除感染的猪只。

本研究针对本实验室分离纯化的 CD22 株 gE 基因制备了 PRV gE 单克隆抗体, 为 PRV 疫苗毒株和野毒毒株的鉴别以及 PRV 的净化提供了良好的工具, 对进一步探究 PRV gE 蛋白的功能和 PR 的防控有重要意义。

第 2 章 猪伪狂犬病毒 gE 蛋白的基因克隆及蛋白表达

gE 蛋白是 PRV 的一个囊膜糖蛋白, gE 糖蛋白在病毒的入侵过程中能够促进病毒在宿主细胞的扩散^[131-132], 有研究证明, 缺失 gE 基因中的部分氨基酸可以明显降低 PRV 的嗜神经性毒力^[133], 本研究利用原核表达系统, 在 pET32a(+)载体上插入 gE 基因片段, 将融合蛋白进行诱导表达之后用 Western blot 的方法进行鉴定, 最后用镍柱进行纯化。

2.1 实验材料

2.1.1 菌株、引物、质粒、毒株

本试验所用到的大肠杆菌 DH5 α 感受态细胞购自北京擎科科技有限公司、大肠杆菌 BL21(DE3)感受态细胞购自上海生工生物工程有限公司, pET-32a(+)空载体由本实验室保存, 引物西安擎科公司合成, 毒株 PRV CD22 株 (GenBank 登录号: OR666765) 为本实验室分离纯化并保存。

2.1.2 主要仪器设备

表 2-1 主要试验仪器设备
Table 2-1 The main experimental equipment

仪器设备	型号规格	公司
恒温水浴锅	DK-8D	上海奥吉生物技术有限公司
琼脂糖电泳槽	DYCP-32B	核小体(北京)生物技术有限公司
PCR 扩增仪	LIFE ECO	南京市玄武区博都实验室器材经营部
涡旋振荡器	VORTEX-GENE2	北京慕鸥生物科技有限公司
低温离心机	5425R	艾本德
恒温金属浴	WD-2110A	北京依珊汇通科技有限公司
水平摇床	BETS-010	北京依珊汇通科技有限公司
小型超声波细胞破碎仪	WH001	北京沃格东方科技有限公司
中型超声波细胞破碎仪	JY92-11N	北京爱普睿晟科技有限公司
蛋白电泳槽	JK-mini4	赛多利斯(北京)生物科技有限公司
国产凝胶成像仪	IAS-500	北京晨曦勇创科技有限公司
全自动凝胶成像分析仪	GS-500	骋克仪器有限公司
电泳仪	EPS-100	上海跃鹏贸易有限公司

2.1.3 主要试剂和耗材

表 2-2 主要试剂和耗材
Table 2-2 Main reagent and consumable

试剂	型号规格	公司
琼脂粉	A8190-500g	索莱宝
胰蛋白胨	T8490-500g	索莱宝
酵母粉	YZ-LP0021B-500g	索莱宝
氯化钠	S475655-5EA	上海阿拉丁生化科技股份有限公司
EB	KGF4201-10	凯基生物
SDS	S19770-100g	上海吉至生化科技有限公司
DMEM	C11995500CP	Gibico
氨苄青霉素	A6920-5g	北京索莱宝科技有限公司
山羊抗猪 IgG 二抗	A21090	武汉普兰德生物技术有限公司
核酸 Marker	3428A	Takara
蛋白 Marker	018399	Thermo
胶回收试剂盒	NWZ308	诺维赞
质粒小提试剂盒	D6943-02	Omega
质粒大提试剂盒	OMEGA6922-01	Omega

2.1.4 常规生化试剂的配制

(1) TBST: 用 800 mL 蒸馏水溶解 8 g 氯化钠, 0.2 g 氯化钾和 3 g Tris, 酸度调至 7.4, 用蒸馏水定容到 1 L 后加入 1 mL 的吐温-20。

(2) PBST: 在 100 mL PBS 缓冲液中加入 300 μ L 吐温-20, 混匀后即可。

(3) 蛋白纯化平衡液: 氯化钠 23.376 g, Tris 碱 1.9376 g, 咪唑 3.2678 g, 加蒸馏水至 100 mL, 酸度调至 7.9。

(4) 蛋白纯化洗脱液: 氯化钠 23.376 g, Tris 碱 1.9376 g, 咪唑 4.3570 g, 加蒸馏水至 100 mL, 酸度调至 7.9。

2.2 实验方法

2.2.1 细胞复苏

将本实验室前期冻存的 PK15 细胞复苏, 提前打开细胞间 37 $^{\circ}$ C 恒温水浴锅使其水

温为 37℃，从液氮罐中取出冻存的 PK15 细胞，套好密封袋直接浸入 37℃水浴锅使其快速融化，在融化的过程中，反复的晃动冻存管并且防止污染，待细胞完全融化之后在超净工作台将融化后的细胞转移至 15 mL 离心管中配平后 12,000 rpm 离心 5 min，弃去冻存液上清后用提前 37℃预热的培养基轻轻吹起细胞转移至 T25 细胞培养瓶中，混匀后置于细胞培养箱中培养。

当 PK15 细胞单层长满 T75 细胞培养瓶后，接种 0.1 MOI 的 PRV。病毒感染 48h 后待细胞出现明显的细胞病变后，反复冻融三次 12,000 rpm 离心 15 min 收取上清获得复壮的 PRV，用 DNA 抽提试剂盒进行 PRV 全 DNA 提取，剩余病毒分装于 1.5 mL 离心管冻存于 -80℃冰箱备用。

2.2.2 gE (455-578 aa) 基因的 PCR 扩增

参照 PRV CD22 毒株序列，利用抗原分析软件 EpiQuest™ 对 gE 蛋白进行分析，选择 gE 蛋白的主要抗原区 (455-578 aa) 设计一对特异性引物，上游引物 PRV-gE (455-578 aa) -F: 5'- gctgatatcggatccgaattcTCCCGGCGCCGGGCGGCC -3'，下游引物 PRV-gE (455-578 aa) -R: 5'- tgggtgtgctcgagtgcggccgcGGGCGGGACATCAACAG -3'，酶切位点为 (*EcoRI*和 *NotI*)。引物合成以后以 PRV 全 DNA 为模板用 PCR 扩增酶进行 PCR 扩增。将所得 PCR 产物进行回收纯化处理，目的片段的扩增的体系见表 2-3，目的片段的扩增程序见表 2-4。

表 2-3 gE(455-578 aa)基因扩增体系
Table 2-3 PCR amplification system for gE(455-578 aa)

体系 System	体积 Volume (μL)
2 × PCR 预混液	25
PRV-gE (455-578 aa) -F	2
PRV-gE (455-578 aa) -R	2
PRV-DNA	2
NFW(无酶水)	19

表 2-4 gE(455-578 aa)基因扩增程序

Table 2-4 The amplification program of gE(455-578 aa) gene

温度 Temperature	时间 Time	循环 Cycle
预变性 98°C	3 min	
变 性 98°C	15 s	
退 火 55°C	30 s	34×
延 伸 72°C	30 s	
延 伸 72°C	10 min	

2.2.3 重组质粒 pET32a-gE(455-578 aa)的构建

载体双酶切:使用 NEB 公司生产的 *EcoR* I 和 *Not* I 两个限制性内切酶对 pET-32a(+) 载体进行双酶切,在 37°C 恒温金属浴上作用 3 h,用 1% 的琼脂糖凝胶电泳鉴定双酶切片段并用胶回收试剂盒进行酶切产物回收处理。表 2-5 载体双酶切体系。

表 2-5 *EcoRI*和 *NotI*双酶切体系Table 2-5 The enzyme reaction for *EcoRI* and *NotI*

体系 System	体积 Volume (μL)
pET-32a(+)载体	2
内切酶 <i>EcoRI</i>	2
内切酶 <i>NotI</i>	2
cutsmart	4
无酶水	30

将扩增出来的 gE(455-578 aa)基因片段和双酶切 pET-32a(+)载体片段用诺维赞同源重组酶在 37°C 条件下连接 30 min,连接体系如表 2-6。

表 2-6 载体构建体系

Table 2-6 Vector construction system

成分 (Component)	体积 Volume (μL)
Exnase II	2
5×CE II Buffer	4
pET-32a(+)载体片段	10
gE (455-578 aa) 基因片段	4
Total	20

将连接好的质粒转化至大肠杆菌 DH5α感受态,用无菌涂布棒在含有氨苄抗性的平板上轻轻涂匀,37°C 恒温培养箱倒置培养 12-16 h。

2.2.4 重组质粒 pET32a-gE(455-578 aa)的诱导表达

将构建好的 pET-32a-gE(455-578 aa)质粒,转化方法转化至大肠杆菌 BL21(DE3)感受态细胞,挑取单个菌落接种至 5 mL 液体氨苄培养基中,在 37℃摇床上震荡培养约 6 h,测 OD₆₀₀ 约为 0.6 时,吸出 1 mL 留做诱导前,在剩余的 4 mL 加入 4 μL 的 IPTG 诱导表达。继续同时培养 5h 后,离心收集菌体,菌体重悬于适当体积 PBS 中,置于冰盒中超声(超 3 s, 停 3 s)到菌液透明,在 4℃离心机中以 12 000 r/min 速度离心 5 min,分别收集上清液和沉淀,随后 SDS-PAGE 上样缓冲液煮样 10 min 后,进行 SDS-PAGE 鉴定。

2.2.5 重组蛋白 pET32a-gE(455-578 aa)的纯化

按照 2.2.4 中的方法将 pET-32a-gE(455-578 aa)蛋白的表达量扩大到 2 L,收集菌体后用 200 mL PBS 重悬,用超声仪超声破碎后,以 12 000 r/min 速度离心 40 min,分别收集上清和沉淀,用 Ni-NTA 亲和层析柱纯化蛋白,取保存于 4℃的镍柱,除去保护液乙醇,加入提前配好的平衡液 15 mL 柱平衡 10 min,上样超声后菌体上清 3-5 mL,室温轻轻吹打混匀结合 3 次,每次 5 min,收集流穿液后加入平衡液 10 mL 冲洗镍柱一次,不同浓度咪唑结合 2 次,每次 2 min,注意吹打均匀;(25 mM-300 mM),收集流穿,进行 SDS-PAGE 电泳鉴定,确定条件后洗杂 8 次,2 min/次,0.8 mL/次,洗脱 6 次,2 min/次,0.8 mL/次,收集洗脱液,对洗脱液用蛋白浓缩管浓缩后进行 SDS-PAGE 电泳鉴定,洗脱结束后用 5 mL 0.5 M NaOH 冲洗镍柱一次,ddH₂O 15 mL 冲洗镍柱一次,加入 5 mL 30%无水乙醇保存于 4℃。

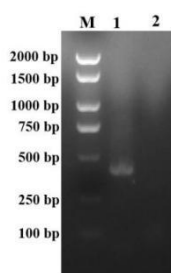
2.2.6 重组蛋白 pET32a-gE(455-578aa)的 Western blot 鉴定

将纯化浓缩后的 pET-32a-gE(455-578 aa)按照适当比例稀释后,用 5×loading buffer 煮样,通过 SDS-PAGE 电泳后转印于 NC 膜上,用猪的 PRV 阳性血清作为一抗进行 western blot 鉴定,以确定该蛋白能否识别猪的 PRV 抗体。

2.3 实验结果

2.3.1 gE(455-578aa)基因的 PCR 扩增

以 PRV 全 DNA 为模板，PRV-gE(455-578 aa)-F 为上游引物，PRV-gE(455-578 aa)-R 为下游引物扩增出 gE(455-578 aa)片段，对扩增产物进行琼脂糖凝胶电泳鉴定，结果如图 2-1 所示，显示符合预期成功扩增出大小约为 372 bp 的目的条带，将 PCR 产物进行切胶纯化。



注：M：DNA 标准分子量；1：gE PCR 产物；2：阴性对照

M:DNA Marker; 1: The PCR production of gE; 2: negative control

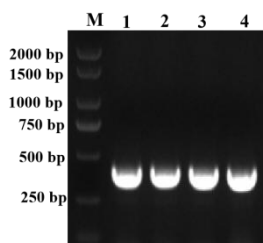
图 2-1 gE(455-578aa) 片段的 PCR 扩增

Fig 2-1 The PCR amplification of gE

2.3.2 重组质粒 pET32a-gE(455-578aa)的构建

2.3.2.1 质粒 PCR 鉴定

将构建的 pET32a-gE(455-578 aa)重组质粒转化至 DH5 α 感受态细胞中，挑取单克隆加入 5 mL 液体氨苄培养基的摇菌管中过夜培养之后用质粒小提试剂盒进行质粒提取，对质粒进行 PCR 鉴定，结果显示如图 2-2 所示，符合预期。



注：M：DNA 标准分子量；1：1 号质粒；2：2 号质粒；3：3 号质粒；4：4 号质粒

M:DNA Marker; 1: 1plasmid; 2: 2plasmid; 3: 3plasmid; 4: 4plasmid

图 2-2 pET-32a-gE(455-578 aa)质粒的 PCR 鉴定

Fig 2-2 The PCR identification of pET-32a-gE(455-578 aa)

2.3.2.2 pET-32a-gE 质粒送测序结果

将质粒 PCR 鉴定结果为阳性的质粒送公司测序，测序结果显示质粒构建成功，测序结果如图 2-3 所示。

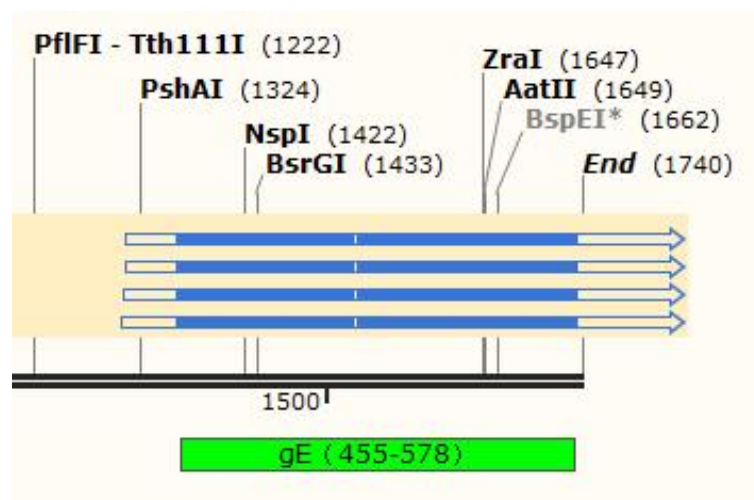


图 2-3 pET-32a-gE 质粒测序结果

Fig 2-3 The plasmid sequencing result of pET-32a-gE(455-578 aa)

2.3.3 构建成功的质粒图谱

构建完成后的 pET32a-gE(455-578 aa)质粒图谱如图 2-4 所示。

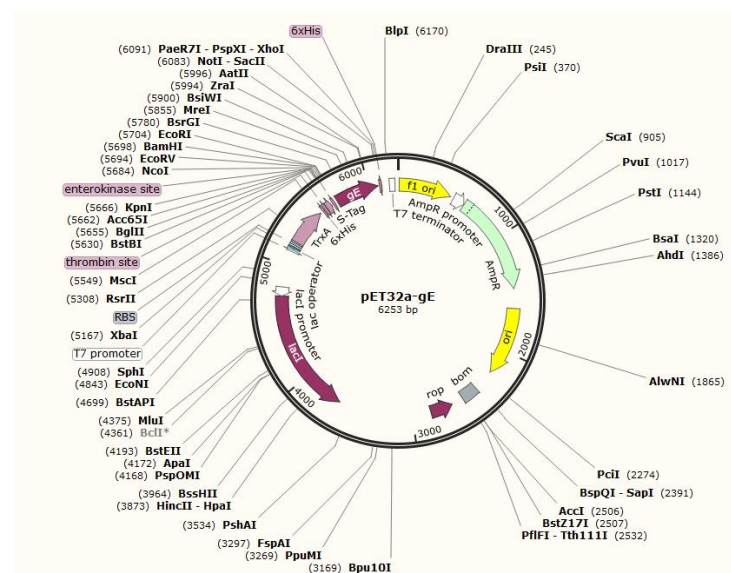
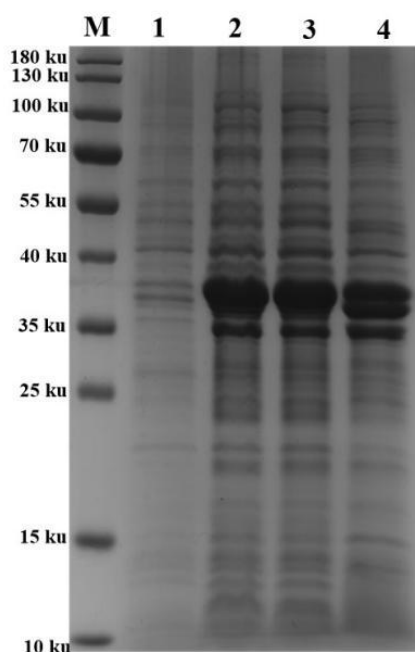


图 2-4 pET-32a-gE(455-578 aa)重组质粒图谱

Fig 2-4 pET-32a-gE(455-578 aa) map of recombinant plasmids

2.3.4 重组质粒 pET32a-gE(455-578 aa)的诱导表达

将测序结果正确的 pET-32a-gE(455-578 aa)质粒转化至 BL21(DE3)感受态细胞,挑取单克隆进行培养,待 OD₆₀₀ 为 0.6 时,加入工作浓度的 IPTG 诱导剂进行蛋白诱导表达,诱导表达 5h 后集菌超声处理经 SDS-PAGE 鉴定,鉴定结果如下图所示,相比于诱导前, pET-32a-gE(455-578 aa)蛋白在 38 ku 大小附近条带出现明显的增粗,说明蛋白表达成功,且 gE(455-578 aa)的截短体蛋白在 pET-32a(+)载体上既有包涵体蛋白表达又有可溶性蛋白表达。



注: M: 蛋白质分子质量标准;1: pE2a-gE(455-578aa)诱导前; 2: pET32a-gE(455-578aa)诱导后 3: pET32a-gE(455-578aa)裂解上清; 4: pET32a-gE(455-578aa)裂解后沉淀。

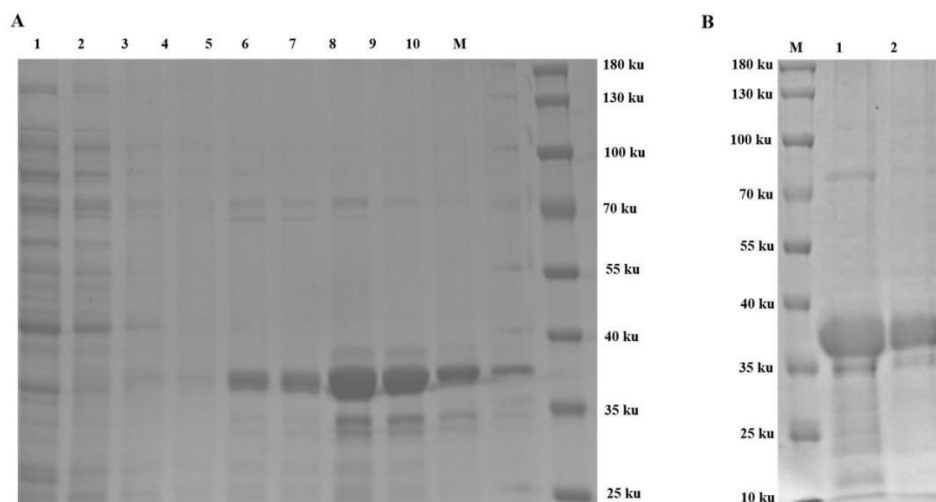
M: Protein molecular weight Marker. 1: pET32a-gE(455-578aa) pro-induced products; 2: pET32a- gE(455-578aa) induced production; 3: Suspension of pET32a- gE(455-578aa) lysate; 4: Precipitate of pET32a- gE(455-578aa) lysate.

图 2-5 pET32a-gE (455-578aa) 蛋白诱导的诱导表达

Figure 2-5 Expression of pET32a-gE(455-578 aa) protein

2.3.5 重组蛋白 pET32a-gE(455-578 aa)的纯化

通过摸索 pET-32a-gE(455-578 aa)蛋白的洗杂和洗脱条件,最终对蛋白进行纯化浓缩,用 SDS-PAGE 进行鉴定结果如下图 A,洗脱后的蛋白浓缩后用 SDS-PAGE 进行鉴定结果如下图 B。



(A) pET32a-gE(455-578aa)蛋白纯化过程。1: 流穿液; 2: 25mM 咪唑; 3: 25mM 咪唑; 4: 25mM 咪唑; 5: 50mM 咪唑; 6: 50mM 咪唑; 7: 150mM 咪唑; 8: 150mM 咪唑; 9: 300mM 咪唑; 10: 300mM 咪唑; M: 蛋白质分子质量标准。(B) pET32a-gE(455-578aa)蛋白浓缩。M: 蛋白质分子质量标准; 1: 纯化的 pET32a-gE(455-578aa)蛋白; 2: 纯化的 pET32a-gE(455-578aa)蛋白

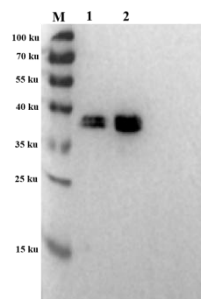
注: (A) Protein purification process of pET32a-gE(455-578aa). 1: flow-through; 2: 25mM imidazole; 3: 25mM imidazole; 4: 25mM imidazole; 5: 50mM imidazole; 6: 50mM imidazole; 7: 150mM imidazole; 8: 150mM imidazole; 9: 300mM imidazole; 10: 300mM imidazole; M: Protein molecular weight Marker. (B) Protein concentration of pET32a-gE(455-578aa). M: Protein molecular weight Marker; 1: Protein purification of pET32a-gE(455-578aa); 2: Protein purification of pET32a-gE(455-578aa).

图 2-6 pET32a-gE(455-578 aa)蛋白的纯化

Figure 2-6 Purification of pET32a-gE (455-578 aa) protein

2.3.6 重组蛋白 pET32a-gE(455-578 aa)的 Western blot 鉴定

将纯化浓缩后的 pET-32a-gE(455-578 aa)蛋白通过 SDS-PAGE 电泳后转印于 NC 膜上, 用猪的 PRV 阳性血清作为一抗, HRP 标记的山羊抗猪 IgG 作为二抗进行鉴定, 结果显示该蛋白能够和猪的 PRV 阳性血清发生抗原抗体结合, 鉴定结果如下图所示。



M: 蛋白质分子质量标准; 1: pET32a-gE(455-578aa)裂解上清; 2: 纯化的 pET32a-gE(455-578aa)蛋白。

M: Protein molecular weight Marker; 3: Suspension of pET32a-gE(455-578aa) lysate; 2: Protein purification of pET32a-gE(455-578aa).

图 2-7 Western blot 检测 pET32a-gE(455-578 aa)蛋白和 PRV 抗体的反应性

Figure.2-7 Detection of protein pET32a-gE(455-578 aa) and PRV antibody reacts by Western blot

2.4 讨论

gE 基因是 PRV 的一个重要的毒力基因，位于 US 区，当病毒缺失 gE 蛋白不影响病毒的复制以及免疫原性，但能够大大降低 PRV 的毒力。2001 年底，在我国多个猪场大规模的发生重症，仔猪出现神经系统症状，妊娠母猪出现流产等症状，对发病猪临床样本进行了检查。所有样本均可通过 PCR 检测出 PRV gE 基因，gE 基因序列分析显示，所有分离株均属于相对独立的簇，并且还有氨基酸的插入，发病猪最后确诊为感染了 PRV 变异株^[134-135]，这也证明了当前的商业化的疫苗不能能够对流行的 PR 变异株进行完全的保护，为我国的养猪业带来了巨大的困难和挑战，建立灵敏的检测方法对 PRV 净化显得至关重要，在 PRV 的防控净化中，检测到底 PRV 有无 gE 基因被作为鉴别区分疫苗毒株和田间感染毒株的标准，准确的表达纯化出 gE 蛋白显得尤为关键，相比于真核表达蛋白的高成本，原核表达具有成本低，操作简单以及表达蛋白量大的特点，所以本实验选择 pET32a 载体原核表达了截短的 gE 蛋白，并且用镍柱对融合蛋白进行纯化，制备出纯度较高的 gE 蛋白，为后续的动物免疫以及 ELISA 检测方法的建立提供了重要工具，由于建立检测方法所需的抗原需要有较高的纯度，在 gE 抗原的纯化中，对粗纯后的抗原选择与其蛋白分子大小匹配的超滤管进行纯化浓缩后得到较高浓度和纯度的抗原。但相比原核系统表达蛋白，真核表达系统能够表达出具有天然活性的蛋白质，如果能够降低真核表达的成本，使用真核表达将有更大的优势。

2.5 小结

本研究在 pET32a 载体上成功构建出了猪伪狂犬病毒 gE 基因的主要抗原区(455-578 aa) 段表达载体，成功表达了 PRV 野毒毒株 CD22 的 gE 主要抗原区截短体蛋白，最终用镍柱对该蛋白进行纯化，纯化后的蛋白经过 Western blot 检测，结果显示能够和感染 PRV 野毒毒株的阳性血清发生特异性结合。

第 3 章 猪伪狂犬病毒 gE 蛋白单克隆抗体的制备及鉴定

单克隆抗体制备技术发展到今天已近变的非常完善，制备单克隆抗体的方法已经有了非常广阔的选择，但是最经典的抗原免疫小鼠后，取小鼠 B 淋巴细胞和 SP2/0 细胞融合后筛选杂交瘤细胞仍然有着操作成本低的优势。

所以本实验用纯化好的 gE 融合蛋白免疫小鼠，将免疫后小鼠的 B 淋巴细胞和 SP2/0 细胞融合，用 ELISA 以及 IFA 的方法进行 3 次亚克隆操作，最后获得一株命名为 1D5 的杂交瘤细胞，通过 IFA 以及 Western blot 对抗体鉴定后对其序列也进行了分析。

3.1 实验材料

3.1.1 细胞、蛋白和试验动物

PK15、VERO、SP/20、HEK293T 细胞均为本实验室保存，免疫所用的抗原由自己表达纯化，试验所用的新西兰兔和 BALB/c 雌性小鼠均购自兰州兽医研究所实验动物中心。

3.1.2 主要仪器设备

表 3-1 主要试验仪器设备
Table 3-1 The main experimental equipment

仪器名称	规格型号	公司
紫外分光光度计	UV5500	国产
液氮罐	YDS-20B	北京华越洋生物科技有限公司
荧光倒置显微镜	NIB610-FL	国产
高压灭菌锅	LDZF-50L-22	上海鼎国生物技术有限公司
细胞培养箱	BPH-9162	北京依珊汇通科技有限公司
离心机	MULTIFUGE-X3R	Themor
生物安全柜	BSC-1000 B2	AIRTECH
电动移液枪	X-PLORER	Eppendorf
酶标仪	Varioskan LUX	Themor

3.1.3 主要试剂和耗材

表 3-2 主要试剂和耗材
Table3-2 Main reagents and consumables

试剂	规格型号	公司
弗氏完全佐剂	VAC-1585-1	SIGMA
弗氏不完全佐剂	VAC-1585-2	SIGMA
腹水制备专用佐剂	KX0210048-10	博奥龙
HT	70922-5	Merck
融合剂 PEG	P4338-500G	SIGMA
细胞固定液	A500684-0500	生工生物工程有限公司
间接免疫荧光通透液	GMS12859	GENMED
FITC 标记的山羊抗小鼠 IgG	A23210	Abbkine
FITC 标记的山羊抗兔 IgG	A23620	Abbkine
HRP 标记的山羊抗小鼠 IgG	YFSA01	南京翼飞雪生物科技有限公司
HRP 标记的山羊抗兔 IgG	A21020	Abbkine
DAPI 染色试剂	D9542-10MG	Sigma
1640 培养基	C11875500BT	Gibco
杂交瘤专用血清	BF08005	博奥龙
细胞添加因子	GM-2002	博奥龙
小鼠单克隆抗体亚类鉴定试剂	88-50660-22	Invitrogen
盒		
青链霉素混合液	15140122	Gibico
ELISA 板	A10043	康宁
HAT	EPS001-1MG	Sigma

3.2 实验方法

3.2.1 间接 ELISA 检测方法建立

建立 PRV-gE 蛋白间接 ELISA 方法用于阳性杂交瘤细胞的筛选, 通过棋盘法确定出最优的血清稀释倍数以及蛋白的包被浓度, 按照 3.125 mg/ mL、6.25 mg/ mL、12.5 mg/ mL、25 mg/ mL、50 mg/ mL、100 mg/ mL、200 mg/ mL、400 mg/ mL、这八个浓度进行包被酶标板, 做好技术重复。PRV 的猪阳性血清和猪阴性血清用 PBS 按照 1: 10、1: 20、1: 40、1: 80、1: 160、1: 320、进行稀释后作一抗, HRP 标记的山羊抗鼠二抗作二抗, 最佳条件选用 P/N 数值最大的蛋白包被浓度和血清稀释倍数。最佳抗原包被条件、最佳封闭液、最佳封闭条件、最佳二抗稀释倍数、最佳二抗反应时间、最佳显色时间的确定

均按照普通间接 ELISA 方法进行。

3.2.2 小鼠免疫和新西兰兔免疫

将纯化的 gE 重组蛋白作为免疫源免疫 6 只 6 周龄健康状况良好的雌性 BALB/c 小鼠, 采用皮下三点法对小鼠进行免疫, 每只小鼠免疫剂量为 60 μg , 首次免疫将蛋白用 PBS 稀释至 600 μL 后和等体积的弗氏完全佐剂混合进行乳化至乳白色进行免疫, 共进行四次免疫每次间隔两周, 除首免外, 其余免疫均用弗氏不完全佐剂, 免疫程序结束后进行抗体效价检测, 在小鼠融合前三天挑选抗体效价最高的小鼠对其腹腔注射 100 μg 抗原经行加强免疫。

同样将纯化的 gE 重组蛋白作为免疫源免疫 6 周龄 (约 2 kg) 健康状况良好的雌性新西兰兔, 采用皮下多点法进行免疫, 首次免疫剂量为每只 300 μg , 后期每只均免疫 100 μg , 免疫佐剂用法同小鼠相同, 首次免疫用弗氏完全佐剂后续全部用弗氏不完全佐剂, 免疫结束后检测多克隆抗体效价后, 对兔子进行心脏采血处死, 收集分离血清加入防腐剂分装后于负 80 $^{\circ}\text{C}$ 进行保存备用。

表 3-3 小鼠免疫程序

Table 3-3 Mouse immunization procedures

免疫天数 (d)	抗原	抗原剂量 (μg)	免疫方法
1	PRV-gE 蛋白和弗氏完全佐剂	60	皮下三点法注射
14	PRV-gE 蛋白和弗氏不完全佐剂	60	皮下三点法注射
28	PRV-gE 蛋白和弗氏不完全佐剂	60	皮下三点法注射
42	PRV-gE 蛋白和弗氏不完全佐剂	60	皮下三点法注射
融合前 3	PRV-gE 蛋白和 PBS	100	腹腔注射

表 3-4 新西兰兔免疫程序

Table 3-4 New Zealand Rabbits immunization procedures

免疫天数 (d)	抗原	抗原剂量 (μg)	免疫方法
1	PRV-gE 蛋白和弗氏完全佐剂	200	皮下多点法注射
14	PRV-gE 蛋白和弗氏不完全佐剂	100	皮下多点法注射
28	PRV-gE 蛋白和弗氏不完全佐剂	100	皮下多点法注射
42	PRV-gE 蛋白和弗氏不完全佐剂	100	皮下多点法注射

3.2.3 间接 ELISA 检测小鼠和兔子血清抗体效价

将纯化的 gE 蛋白加入 20 mL 的 ELISA 包被液中, 终浓度为 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 每个孔加入 100 μL , 于 4 $^{\circ}\text{C}$ 封闭 12 h, 在洗板机中加入 PBST, 每个板子清洗四次后拍干, 每孔

加入 120 μL 酶标板稳定剂 4 $^{\circ}\text{C}$ 包被 12 h 后, 弃去包被液将 ELISA 板置于通风橱吹干。将四次免疫后小鼠和新西兰兔的血清依次按照 1000、2000、4000、8000、16000、32000、64000、128000 倍进行稀释, 共稀释 8 个梯度, 每孔加入 50 μL 稀释后的血清于 37 $^{\circ}\text{C}$ 作用 30 min, 加入二抗后 37 $^{\circ}\text{C}$ 避光作用 30 min, 显色 15 min 后加入终止液进行终止后立即读值。

3.2.4 IFA 检测多抗反应性

待 96 孔细胞培养板中 PK15 细胞密度长至 80% 后, 用 PRV CD22 感染细胞, 留出一列作为阴性对照, 待 24 h 后观察细胞出现明显的细胞病变后, 弃去上清, 用固定液固定细胞 30 min 后弃去, 用免疫荧光染色通透液通透 15 min 后弃去, 用 PBS 轻轻洗 3 次, 将小鼠和兔多抗作为一抗 4 $^{\circ}\text{C}$ 过夜孵育, 荧光二抗室温孵育 1 h, 用 PBS 轻轻洗 3 次后, 染核 10 min, 最后用 PBS 轻轻洗 3 次后于荧光显微镜下观察结果。

3.2.5 Western blot 检测多抗反应性

待 6 孔板中 PK15 细胞长满 80%, 用 PRV CD22 感染细胞, 不接毒细胞作为阴性对照, 当感染细胞出现明显的病变后, 弃去上清, 用 RIPA 细胞裂解液裂解细胞收样, 加入 SDS Loading Buffer 在 100 $^{\circ}\text{C}$ 变性 10 min, 先跑蛋白胶 SDS-PAGE 浓缩胶后, 将蛋白转印于 NC 膜上, 转膜结束后将 NC 膜置于 5% 的脱脂乳中封闭 2 h, 将小鼠和兔的阳性血清用商品化抗体稀释液分别用 500 倍稀释后作一抗, 4 $^{\circ}\text{C}$ 过夜孵育, 用 5% 的脱脂乳稀释 HRP 标记的山羊抗鼠二抗和山羊抗兔二抗, 室温孵育 1 h 后 1 $\times$ TBST 洗膜, 每次 3 min, 总共洗 5 次, 将 NC 膜置于显影液浸泡后开始显影观察实验结果。

3.2.6 SP2/0 细胞培养

从液氮罐中取出冻存的 SP2/0 细胞细胞, 浸入 37 $^{\circ}\text{C}$ 水浴锅内快速反复摇动使其快速融化, 在超净工作台中将融化后的细胞转移至 15 mL 离心管中配平后 10,000 rpm 离心 4 min, 弃去冻存液, 用提前预热好的培养基轻轻吹起细胞转移至 T25 混匀后置于 37 $^{\circ}\text{C}$ 细胞恒温培养箱中培养。车达, 王亮在 SP2/0 培养条件优化一文中研究发现在血清浓度为 15% 时 SP2/0 细胞生长状态最为良好^[136], 故本实验 SP2/0 细胞的培养基用含有 15%

杂交瘤专用血清的 1640 培养基进行培养。

3.2.7 饲养层细胞的制备

小鼠融合前一天进行小鼠饲养层细胞制备，饲养层细胞可以分泌特殊的生长因子，促进实验细胞的分裂、分化为后续的融合实验提供良好的营养和模拟环境。挑选健康状况良好的小鼠，饥饿 2~3 h。HAT 培养液 37 °C 预热 30 min。鼠架、剪刀、镊子先高压灭菌处理，使用前紫外照射消毒。小鼠用断颈法处死后，75% 酒精浸泡 5 min。取 32 mL 培养液于平皿中，每板 10 mL，6 块板/只鼠。用镊子和剪刀将小鼠的皮肤和腹膜分离，腹膜完全暴露后，10 mL 注射器中吸入 8 mL 培养液，针头插入腹腔，开始缓慢反复的抽吸。待注射器中的液体变成微黄色后，将液体注入平皿中混合均匀。处理小鼠，消毒操作台。取 3 块 96 孔板，用排枪加液，每孔加入含有饲养层细胞的培养基 100 μ L 后置于细胞培养箱第二天融合使用。

3.2.8 小鼠脾脏 B 淋巴细胞的获取

将免疫结束的小鼠眼球采血法处死，收集血清，将小鼠浸泡于 75% 酒精中 5 min。取出小鼠置于无菌操作盘中，左侧腹部偏上放置，沿小鼠腹中线剪开小口，分离皮肤，使腹壁完全暴露后，可以透过腹壁，看到左侧有深红色长条形状的脾脏。用镊子暴露出脾脏。一把镊子夹起脾脏，另一把镊子轻轻摘除脾脏上连接的结缔组织，取出脾脏，放入 10 mL 含有 1640 培养基的培养皿中等待研磨。将 100 目的铜网放到无菌离心管上面，把脾用镊子夹到铜网中用玻璃注射器内芯反复研磨脾脏，一边研磨一边用 1640 培养基向下冲洗，直到用完 25 mL 培养基。弃去铜网，盖好离心管盖子，等待备用。

3.2.9 细胞融合

提前准备好两瓶状态良好长满 80% T75 的 SP2/0 细胞，弃掉培养液，用 1640 培养基轻轻冲洗两遍，再用 15 mL 培养基吹下混匀。将吹下的 SP2/0 细胞转移入 50 mL 离心管中，将其和提前准备好的脾细胞混合，盖好，轻轻的颠倒混匀后，配平离心，1000 rpm 26 °C 10 min。弃去上清，加入 20 mL DMEM，800 rpm 离心 5 min，弃去上清，将管底部没有倒干净的培养基用 1 mL 移液枪吸干净弃去，拧紧离心管盖子，轻轻拍击管底，使

细胞松散，分散。将装有细胞的离心管放入 37℃ 水的烧杯中。取出提前预热的融合剂 PEG，沿着管壁逐滴缓慢的加入离心管中，边读秒计数边滴加，1 min 加完 1 mL PEG，加完之后静置 1~2 min。加 1640 培养基终止融合操作，5 min 内共加入 25 mL 1640 培养基，由慢到快，贴壁滴加，加完盖好离心管，混匀后静置 10 min。配平后离心，800 rpm 8 min 弃上清。用 60 mL HAT 培养基重悬细胞吹打混合均匀后，分装于 6 块铺有饲养层细胞的 96 孔板，100 μ L/孔。

3.2.10 杂交瘤细胞阳性筛选

3.2.10.1 间接 ELISA 检测方法

通过 3.2.1 棋盘法确定出最优的抗原的包被浓度以及最优的反应条件经行阳性孔的筛选。

3.2.10.2 间接免疫荧光（IFA）检测方法

待 96 孔细胞培养板中 PK15 细胞长至底层的 90% 时，接种 PRV CD22，24 h 后，弃去培养液，加入 4% 的多聚甲醛，100 μ L/孔，固定 15 min 后弃去，加入免疫染色通透液，100 μ L/孔通透 15 min 后，PBS 轻洗 3 次。以鼠抗 PRV-gE 蛋白多克隆抗体为阳性对照，BALB/c 鼠阴性血清为阴性对照，同时设立细胞对照。37℃ 孵育 30 min，FITC 标记的羊抗鼠 IgG 二抗 37℃ 避光孵育 30 min，反应完毕后用 PBS 洗涤 3 次，每次 5 min，结束后用 DAPI 染核试剂在室温下避光染色 8 min，作用结束后用 PBS 洗涤 3 次，每次 5 min，最后观察结果。

3.2.11 杂交瘤细胞阳性亚克隆

对 ELISA 和 IFA 检测结果呈阳性的细胞孔进行亚克隆。采用有限稀释法将阳性孔的细胞制备成杂交瘤细胞悬液，细胞记数后将杂交瘤细胞用含 20% 杂交瘤专用血清的 HT1640 培养基准确地稀释至每毫升含 15-20 个细胞，每孔接种 100 μ L 细胞悬液，每孔含 1.5-2 个细胞。每株杂交瘤细胞铺制一块 96 孔板，于细胞培养箱内下培养 7-10 天，在倒置显微镜下观察，提前标记出只有单个克隆生长的孔，当细胞长满培养板底部面积 40% 即可取上清作抗体检测。重复 3 次亚克隆，筛选出能够稳定分泌抗体的单克隆，将抗体检测阳性孔的细胞扩大培养，并及时冻存。

3.2.12 单克隆抗体腹水制备

取10-12 周龄健康状况良好的BALB/c小鼠，每只小鼠腹腔注射的腹水制备专用佐剂 500 μ L，10 天后每只小鼠腹腔注射 5×10^5 个杂交瘤细胞(0.2 mL)，8-10 天后，小鼠腹腔明显隆起，用5 mL注射器抽取腹水后离心吸取黄色上清，ELISA检测其效价，分装，-80℃保存。

3.2.13 单克隆抗体腹水效价检测

通过间接 ELISA 方法将所获得的单克隆抗体腹水由 1:100 二倍比稀释至 1:128000 进行抗体效价检测。

3.2.14 单克隆抗体腹水纯化

实验采用辛酸-饱和硫酸铵法对制备的腹水进行纯化，整个操作过程均在冰上进行，操作步骤按照小鼠腹水IgG类单克隆抗体纯化方法的研究一文中进行^[137]。对纯化好的抗体进行浓度测定后，用SDS-PAGE进行纯度检测。

3.2.15 ELISA 检测抗体特异性

用灭活后的全病毒包被 ELISA 板子，分别用猪传染性胃肠炎病毒（TGEV）、猪流行性腹泻病毒(PEDV)、猪急性腹泻综合征冠状病毒(SADS-COV)、猪圆环病毒(PCV-2)、猪细小病毒（PPV）、猪繁殖障碍与呼吸系统综合征病毒（PRRSV）灭活后和 ELISA 包被液 1: 1 混合包被，包被结束后 PBST 清洗 4 次，用封闭液封闭结束后拍干进行抗体的特异性检测。

3.2.16 单克隆抗体亚类鉴定

用商品化小鼠单克隆抗体亚类鉴定试剂盒鉴定。

3.2.17 单克隆抗体可变区 PCR 扩增及序列测定

首先提取单克隆抗体杂交瘤细胞 RNA, 利用 Oligo-dt 或随机引物分别将其逆转录合成 cDNA。抗体可变区基因采用套式 PCR 扩增。首先以上述 cDNA 为模板，利用鼠源

抗体 IgG1 及 κ 轻链引物扩增抗体可变区基因，扩增完成后进行 1%琼脂糖凝胶电泳，重链、 κ 轻链可变区基因大小约为 300 bp，切胶回收目的片段。将回收的目的片段插入 pMD-18T 载体中，进行序列测定。抗体可变区基因扩增的引物参照文献^[138]，见表 3-5，表 3-6。

表 3-5 PCR 扩增体系
Table 3-5 PCR amplification system

体系 System	体积 Volume (μL)
PrimeSTAR Max Premix (2 $\times$)	25
P1	1
P2	1
cDNA	1
NFW(无酶水)	22

表 3-6 PCR 扩增程序
Table 3-6 PCR amplification program

温度 Temperature	时间 Time	循环 Cycle
预变性 98 $^{\circ}\text{C}$	2 min	30 $\times$
变 性 98 $^{\circ}\text{C}$	10 s	
退 火 55 $^{\circ}\text{C}$	30 s	
延 伸 72 $^{\circ}\text{C}$	30 s	
延 伸 72 $^{\circ}\text{C}$	10 min	

3.3 实验结果

3.3.1 间接 ELISA 方法建立结果

3.3.1.1 抗原包被浓度和最佳血清稀释倍数

由表 3-7 得知通过棋盘法筛选最佳抗原包被浓度和最佳血清稀释倍数如下表所示，确定出最佳的抗原包被浓度为 12.5 $\mu\text{g/mL}$ ，最佳的血清稀释倍数为 1: 20 倍稀释。

表 3-7 最佳抗原包被浓度和血清稀释倍数筛选

Table3-7 Best choice of antigen coating concentration and serum dilution

血清稀释度 Serum dilution	抗原包被浓度/($\mu\text{g/mL}$ -1)Antigen coating concentration							
	3.125	6.25	12.5	25	50	100	200	400
1: 10	4.537	5.858	6.427	4.371	2.489	1.840	1.822	1.884

1: 20	5.132	6.120	6.733	4.508	2.698	2.171	1.816	2.209
1: 40	4.432	6.020	6.086	5.460	2.704	2.787	2.650	2.724
1: 80	3.500	4.325	5.078	4.916	3.092	2.801	2.683	2.640
1: 160	2.973	3.237	3.842	3.439	3.018	2.841	2.834	3.121
1: 320	2.211	2.973	2.567	3.000	2.863	2.340	2.294	2.223

3.3.1.2 最佳抗原包被条件筛选

由表 3-8 得知最佳的抗原包被结果,最佳的抗原包被条件为 4℃, 2 h 包被。

表 3-8 最佳抗原包被浓度和血清稀释倍数筛选

Table 3-8 Best choice of antigen enveloping condition

包被条件 Enveloping condition	P	N	P/N
37 °C, 1 h	0.498	0.127	3.921
37 °C, 2 h	0.492	0.118	4.178
37 °C, 3 h	0.504	0.124	4.072
37 °C, 24h	0.599	0.126	4.744
4 °C, 12 h	0.700	0.129	5.401

3.3.1.3 封闭液选择

由表 3-9 得知最佳的封闭液筛选结果如下表所示,确定使用 2%海藻糖的封闭液。

表 3-9 封闭液选择

Table 3-9 Sealing fluid selection

封闭液 confining liquid	P	N	P/N
5%脱脂乳	0.741	0.136	5.450
5% BSA	0.7196	0.128	5.593
2% 海藻糖	0.815	0.142	5.741

3.3.1.4 封闭条件选择

由表 3-10 得知最佳的封闭条件选择结果如下表所示,当选择 37℃, 2h 进行封闭操作时, P/N 的数值最大,最终选择 37℃, 2h 作为封闭条件。

表 3-10 封闭条件选择

Table 3-10 Closure condition selection

封闭条件 closure condition	P	N	P/N
37 °C, 1 h	1.077	0.105	10.263
37 °C, 2 h	1.127	0.097	11.542
37°C, 3 h	1.068	0.096	11.128
37 °C, 4h	0.985	0.093	10.523
4 °C, 12 h	0.921	0.096	9.600

3.3.1.5 二抗稀释倍数

由表 3-11 得知最佳的二抗稀释倍数结果如下表所示, 当二抗选择 1: 15000 进行稀释时, P/N 的数值最大, 所以最终二抗选择用 1: 15000 进行稀释。

表 3-11 二抗稀释倍数选择

Table 3-11 Dilution ratio selection of secondary antibody

二抗稀释倍数 Dilution ratio of secondary antibody	P	N	P/N
1: 5000	3.327	1.101	3.021
1: 10000	2.144	0.732	2.927
1: 15000	1.427	0.322	4.430
1: 20000	0.847	0.296	2.863
1: 25000	1.001	0.259	3.854
1: 30000	0.744	0.226	3.285

3.3.1.6 二抗作用时间

由表 3-12 得知最佳的二抗作用时间为 60 min 时, P/N 的数值最大。

表 3-12 二抗作用时间选择

Table 3-12 Second antibody action time selection

二抗作用时间 second antibody action time	P	N	P/N
15 min	0.791	0.147	5.366
30 min	0.942	0.163	5.774
45 min	1.034	0.200	5.157
60 min	1.473	0.253	5.804
90 min	1.755	0.324	5.417

3.3.1.7 最佳显色时间

由表 3-13 得知最佳的显色液作用时间结果如下表所示, 当显示液作用 10 min 时, P/N 的数值最大, 所以最终选择显色液作用 10 min。

表 3-13 显色时间选择

Table 3-13 Color development time selection

显色时间 color development time	P	N	P/N
5 min	1.429	0.341	4.191
10 min	2.042	0.364	5.604
15 min	2.479	0.650	3.814
20 min	3.814	0.464	5.545

3.3.2 间接 ELISA 检测小鼠和兔多抗效价

利用间接 ELISA 检测多克隆抗体效价。结果如图 3-1 所示，1、2、3、5、6 号小鼠以及 1、2 号新西兰兔免疫后抗体效价均能超过 1:12 800，6 只鼠的抗体效价比较接近，因此，挑选出抗体效价最高的 3 号小鼠进行加强免疫，3 天后进行细胞融合操作，对两只兔子进行心脏采血的方法收集血液，分离血清冻存储备用。

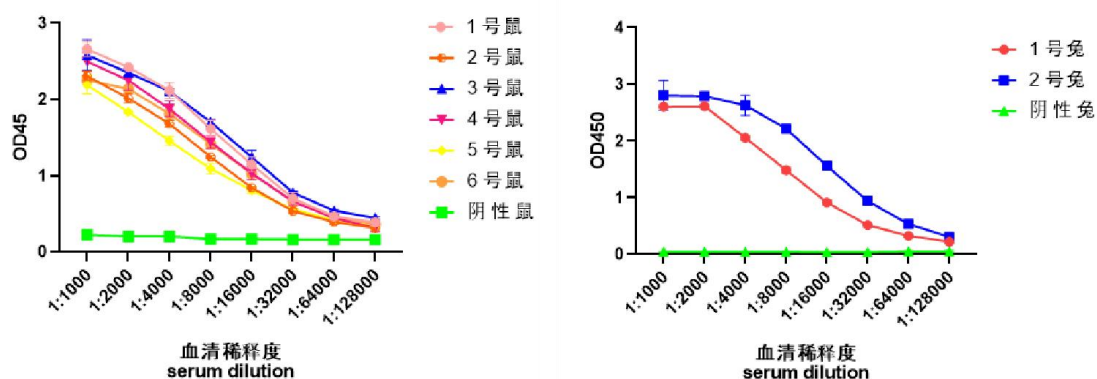


图 3-1 ELISA 检测小鼠和兔多抗效价

Figure 3-1 ELISA was used to detect the titer of polyanitbodies in mice and rbbits

3.3.3 IFA 检测小鼠和兔多抗

用 PRV CD22 病毒感染 PK15 细胞后，通过间接免疫荧光实验检测结果如图 3-2 所示，制备的小鼠和兔的多克隆抗体均能够识别病毒中的 gE 蛋白。

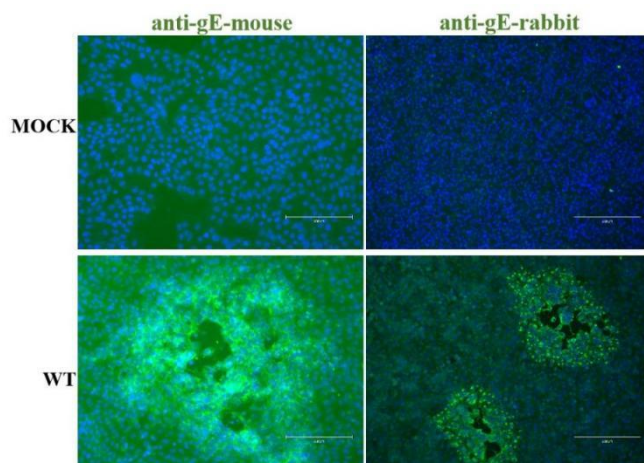


图 3-2 IFA 检测小鼠和兔多抗效价

Figure 3-2 IFA was used to detect the titer of polyanitbodies in mice and rabbits

3.3.4 Western blot 检测多抗反应性

将 PK15 细胞以 0.1MOI 感染 PRV CD22, 以不接毒细胞作为阴性对照, 24 h 后收样, 通过 Western blot 鉴定, 结果如图 3-3 所示, 获得的小鼠和兔多克隆抗体都能够识别病毒的 gE 蛋白。

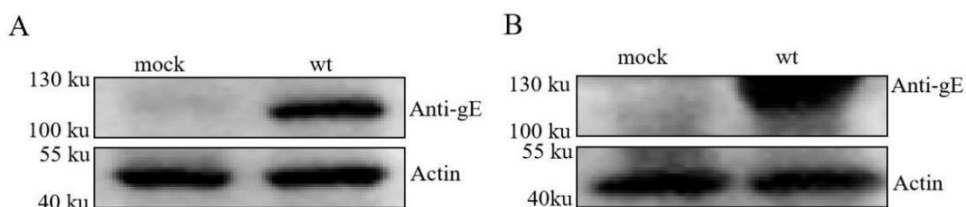


图 3-3 Western blot 验证小鼠和兔多抗反应性

Figure 3-3 Multiantibody reactivity in mice and rabbits was verified by western blot

3.3.5 杂交瘤细胞筛选

用间接 ELISA 筛选出的阳性细胞株同时用 IFA 进行验证, 当两者结果都为阳性时, 确定为单克隆抗体, 本实验最终筛选出一株能够稳定分泌 PRV-gE 抗体的单克隆细胞, 命名为 1D5, IFA 结果如图 3-4 所示。

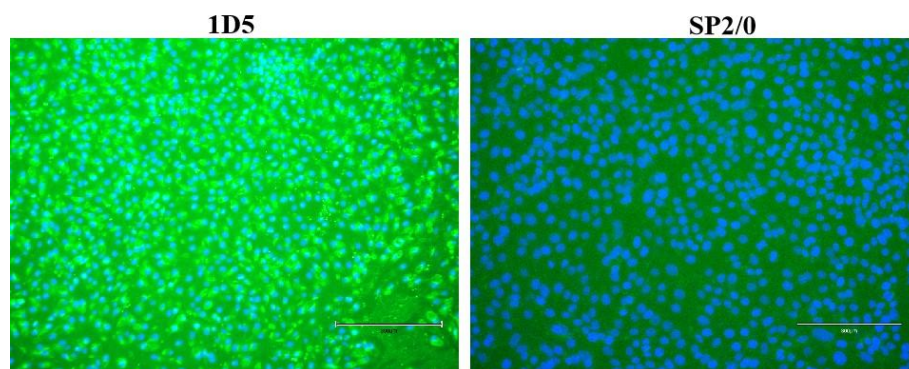


图 3-4 IFA 筛选阳性杂交瘤细胞

Figure 3-4 IFA screening positive hybridoma cells

3.3.6 腹水效价检测

通过 ELLISA 检测腹水效价结果如图 3-5 所示, 制备的单克隆抗体腹水效价能够超过 1 : 12 800。

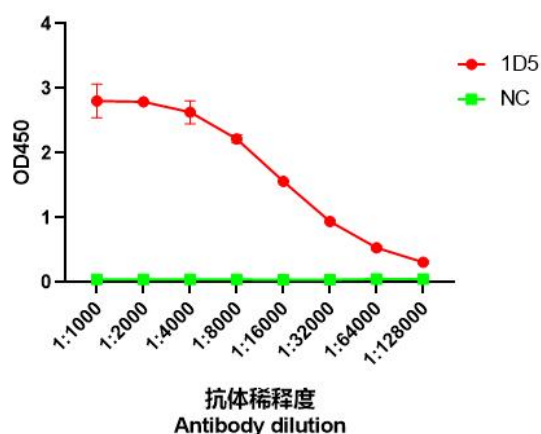
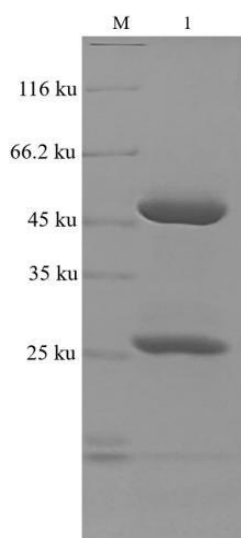


图 3-5 腹水效价检测

Figure 3-5 Ascites potency testing

3.3.7 单克隆抗体腹水纯化

按照腹水纯化步骤对采集的腹水进行亲和层析纯化，经 SDS-PAGE 检测，纯化后的 1D5 单抗的重链和轻链分别约为 55 ku 和 25 ku（图 3-6）。



注：M：蛋白质分子质量标准；1：纯化后的抗体

M: Protein molecular weight Marker; 1: Purified antibodies

图 3-6 腹水纯化鉴定

Figure 3-6 Purification and identification of ascites

3.3.8 ELISA 检测抗体特异性

通过将 TGEV、PEDV、SADS-COV、PCV-2、PPV、PRRSV 和 PRV 灭活后作为抗原包被 ELISA 酶标板进行检测 1D5 和其他病毒有无交叉反应，鉴定结果如表 3-14 所示。

表 3-14 单克隆抗体 1D5 的特异性鉴定

Table 3-14 Specific identification of monoclonal antibody 1D5

血清 serum	D_{450} 值	结果判定
猪传染性胃肠炎病毒 (TGEV)	0.235	—
猪流行性腹泻病毒 (PEDV)	0.228	—
猪急性腹泻综合征冠状病毒 (SADS-COV)	0.217	—
猪圆环病毒 (PCV-2)	0.209	—
猪细小病毒 (PPV)	0.212	—
猪繁殖障碍与呼吸系统综合征 病毒 (PRRSV)	0.198	—
猪伪狂犬病毒 (PRV)	2.875	+

3.3.9 单克隆抗体亚类鉴定

用商品化小鼠单克隆抗体亚类鉴定试剂盒, 鉴定出 1D5 单抗重链恒定区为 IgG1 型, 轻链恒定区为 Kappa 型, 见表 3-15。

表 3-15 1D5 单克隆抗体亚型

Table 3-15 Subtype of monoclonal antibody

单克隆抗体名称	重链类型	轻链类型
1D5	IgG1	Kappa

3.3.10 单克隆抗体序列分析

从 1D5 杂交瘤细胞 cDNA 中扩增得到如图 3-7 所示大小约为 300 bp 的 PCR 产物, 如下图所示, 切胶回收后, 克隆至 pMD18T 载体测序。将测序结果与抗体基因库 (IMGT) 进行比对分析, 测序结果证实扩增得到的序列为单克隆抗体的重链可变区的 DNA 序列和轻链可变区的 DNA 序列。具体的序列分析结果如图 3-16, 表 3-17 所示。

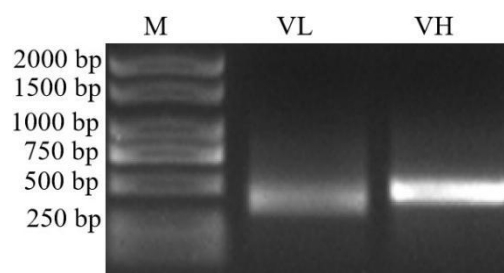


图 3-16 单克隆抗体重链和轻链 PCR 结果

Figure 3-16 Monoclonal antibody heavy chain and light chain PCR results

表 3-17 抗体重链和轻链可变区氨基酸序列

Table 3-17 Amino acid sequences in the variable regions of antibody heavy and light chains

序列名称	重链 VH	轻链 VL
CDR1	GYRFTDYV	QSIVHSNGDTY
CDR2	ISTYYNDA	KVS
CDR3	ARPHDNLAWFAY	FQGSHPWT

3.3.10.1 重链 DNA 序列

GTGCAGCTGCAGGAGTCTGGGGCTGAGCTGGTGAGGCCTGGGGTCTCAGTGA
AGATTTCTGCAAGGGTTCTGGCTACAGATTCAGTATTATGTTATCCACTGGGTGA
AGCAGAGTCATGCAAAGAGTTTAGAGTGGATTGGAGTTATTAGTACTTACTATAATG
ATGCTAGCTACAACCAGAAGTTCAAGGGCAAGGCCACAGTGACTGTAGACAAATC
CTCCAGAACAGCCTATATGGAAGTTGCCAGACTGACATCTGAGGATTCTGCCATCT
ATTACTGTGCAAGACCTCATGATAACTTGGCCTGGTTTGCTTACTGGGGCCAAGGG
ACTCTGGTCACTGTCTCTGCA。

3.3.10.2 重链氨基酸序列

VQLQESGAELVRPGVSVKISCKGSGYRFTDYVIHWVKQSHAKSLEWIGVISTYY
NDASYNQKFKGKATVTVDKSSRTAYMELARLTSEDSAIYYCARPHDNLAWFAYWGQ
GILVTVSA。

3.3.10.3 轻链 DNA 序列

GACATTGTGATCACACAACTCCACTCTCCCTGCCTGTCAGTCTTGGAGATCA
AGCCTCCATCTCTTGCAGATCTAGTCAGAGCATTGTACATAGTAATGGAGACACCTA
TTAGACTGGTACCTGCAGAAACCAGGCCAGTCTCCAAAGCTCCTGATCTACAAA
GTTTCCAACCGATTTTCTGGGGTCCCAGACAGGTTTCAGTGGCAGTGGATCAGGGA
CAGATTTCACTCGAGATCAGCAGAGTGGAGGCTGAGGATCTGGGACTTTATTAC
TGCTTTCAAGGTTACATTTTCCGTGGACGTTTCGGTGGAGGCACCAAGCTGGAAAT
CAAA。

3.3.10.4 轻链氨基酸序列

DIVITQTPLSLPVSLGDQASISCRSSQSIVHSNGDTYLDWYLQKPGQSPKLLIYKV
SNRFSQVPDRFSGSGSGTDFTLEISRVEAEDLGLYYCFQGSHPWTFGGGTKLEIK。

3.4 讨论

前期的实验我们在 pET32a 载体成功表达了可溶性的 PRV 重组 gE 蛋白,为 PRV 的小鼠单克隆抗体以及 PRV 兔多克隆抗体的制备提供重要材料。

本研究首先确定出融合表达的 PRV-gE 蛋白间接 ELISA 的最佳反应条件,然后通过间接 ELISA 结合 IFA 的实验进行阳性杂交瘤细胞的筛选,最终成功制备出一株命名为 1D5 的 PRV-gE 蛋白单克隆抗体,通过对融合前的小鼠多抗以及兔子的多抗效价进行分析,小鼠多抗和兔多抗都能够达到较高水平,说明前期表达纯化的 gE 蛋白免疫原性良好,能够刺激免疫动物产生特异性的 B 淋巴细胞,并且通过 ELISA 试验,间接免疫荧光试验以及 Western blot 试验对获得的这株单克隆抗体进行评估。结果显示这株单克隆抗体能够特异性的识别 PRV 野毒毒株,这株单克隆抗体的腹水效价也能够达到 128000 倍,为后续 PRV 的研究以及 PRV 的检测方法的建立奠定了良好的基础。在小鼠单克隆抗体的制备过程中,不同的免疫方式,不同的免疫途径都会对小鼠产生的抗体类型有所影响,口服免疫以及滴鼻免疫会较大概率的产生 IgA 型,而皮下免疫产生的抗体大部分为 IgG 型,不同的抗原类型刺激机体产生的抗体也有所不同,可溶性表达蛋白的蛋白由于有较高的生物活性,诱导小鼠产生 IgG 型的可能性较大,包涵体蛋白免疫更容易产生 IgE 抗体,对 1D5 单克隆抗体亚类鉴定显示,1D5 的重链为 IgG1,轻链为 Kappa,且特异性良好,后期可将这株单克隆抗体用于 ELISA 方法的建立或者制备试纸条等用于 PR 的诊断,同时也为 PRV-gE 蛋白的结构功能研究提供了材料,还可以用于 PRV 的一些基础研究。

3.5 小结

本研究通过免疫小鼠和兔制备了小鼠和兔的多克隆抗体,对小鼠的 B 淋巴细胞和 SP/20 细胞进行融合后,通过 ELISA 以及 IFA 的方法进行 3 次亚克隆筛选后,成功筛选出一株 1D5 单克隆抗体并且对这株抗体的序列进行了分析。通过 ELISA、IFA 以及 Western blot 的方法对这株单抗进行验证发现这株单抗都能够特异性的识别病毒的 gE 蛋白,为后期检测方法的建立提供了工具。

第 4 章 猪伪狂犬病毒 gE 蛋白 mAbs 的功能验证

单克隆抗体技术的出现大大推动了人类对免疫学的研究进展，单克隆抗体在生命科学领域发挥着重要作用，所以了解抗体的功能显得尤为重要。本研究利用 IFA 和 Western blot 方法验证了这株单克隆抗体结合病毒蛋白的能力，以及在 gB 抗体辅助的条件下能够用来鉴别 PRV 疫苗毒株和野毒毒株。

4.1 实验材料

4.1.1 质粒、细胞和毒株

pcDNA3.1 质粒为本实验室自己保存，293T 细胞为本实验室冻存，PK15 细胞为本实验室自己冻存，PRV-CD22 毒株为本实验室自己分离纯化。

4.1.2 主要仪器设备

表 4-1 主要仪器设备

Table 4-1 Main instruments and equipment

仪器设备	规格型号	公司
细胞培养箱	BPH-9162	KENTA
恒温金属浴	2016C	BEAVER
转膜仪	1703940	伯乐
超声破碎仪	JY88-11N	新芝

4.1.3 主要试剂

表 4-2 主要试剂

Table 4-2 Main reagents

试剂	规格型号	公司
FLAG 抗体	YFBF06	翼飞雪
HRP 标记的山羊抗小鼠 IgG	YFSA01	翼飞雪
DAPI 染色试剂	D9542-10MG	Sigma
DMEM 培养基	C11995500CP	Gibco
胎牛血清	10437-028	赛默飞
青霉素-链霉素-庆大霉素混合溶液 (100×)	DHGF-26532	索莱宝

4.2 实验方法

4.2.1 gE 全长基因 PCR 扩增

参照 PRV CD22 毒株序列, 利用 SnapGene 软件针对 gE 全长基因设计一异性引物, 设计一对特异性引物, 上游引物 PRV-gE-F : 5' - atgtccagtgtggtggaattcATGCGGCCCTTTCTGCTG-3', 下游引物 PRV-gE-R : 5' - gccctctagactcgagcggccgcTTAAGCGGGGCGGGACAT -3', 酶切位点为 (*EcoR I* 和 *Not I*), 以 PRV-CD22 毒株 DNA 为模板进行扩增, 扩增程序体系见表 4-3, 4-4。

表 4-3 gE 基因扩增体系

Table 4-3 gE gene amplification system

体系 System	体积 Volume (μL)
2 × PCR 预混液	25
PRV-gE-F	2
PRV-gE-R	2
PRV-DNA	2
NFW(无酶水)	19

表 4-4 gE 基因扩增程序

Table 4-4 gE gene amplification program

温度 Temperature	时间 Time	循环 Cycle
预变性 98°C	3 min	34
变性 98°C	15 s	
退火 55°C	30 s	
延伸 72°C	1 min	
延伸 72°C	10 min	

4.2.2 构建 pcDNA3.1-gE 真核表达质粒

载体双酶切: 使用 NEB 公司生产的 *EcoR I* 和 *Not I* 两个限制性内切酶对 pcDNA3.1 载体进行双酶切, 在 37°C 恒温金属浴上作用 3 h, 用 1% 的琼脂糖凝胶电泳鉴定双酶切片段并用胶回收试剂盒进行酶切产物回收处理。表 4-5 双酶切体系。

表 4-5 质粒双酶切体系

Table 4-5 Plasmid double enzyme digestion system

pcDNA3.1 空载体酶切体系	
pcDNA3.1 载体	2 μg

续表 4-5

pcDNA3.1 空载体酶切体系	
内切酶 <i>EcoRI</i>	2 μ L
内切酶 <i>NotI</i>	2 μ L
cutsmart	4 μ L
无酶水	30 μ L

将扩增出来的 gE 全长基因片段和双酶切 pcDNA3.1 载体片段用诺维赞同源重组酶在 37°C 条件下连接 30 min，连接体系如表 4-6。

表 4-6 质粒连接体系
Table 4-6 Plasmid linkage system

成分 Component	体积 Volume
Exnase II	2 μ L
5×CE IIBuffer	4 μ L
pcDNA3.1 载体片段	10 μ L
gE 全长基因片段	4 μ L
Total	20 μ L

将 pcDNA3.1-gE 质粒转化到大肠杆菌 DH5 α 感受态中，用无菌涂布棒在含有氨苄抗性的平板上轻轻涂匀。37°C 恒温培养箱倒置培养 12-16 h 后，挑单个菌落送生物公司进行测序比对。

4.2.3 Western blot 验证重组质粒 pcDNA3.1-gE 的表达

提前准备好两个单层长满 80%293T 细胞的 10 cm 细胞培养皿，一个转染 pcDNA3.1-gE 质粒，另一个转染 pcDNA3.1 空载做对照，转染后 4-6 h 更换细胞培养液，24h 后弃去培养基，用 PBS 轻洗 3 次，加入 800 μ L RIPA 细胞裂解液在冰上裂解 30 min，加入 200 μ L 5×loading buffer 100 °C 变性 10 min，将蛋白样电泳结束后将蛋白转印于 NC 膜上，转膜结束后将 NC 膜置于 5% 的脱脂乳中封闭 2 h，用鼠抗 flag 一抗 4 °C 过夜孵育，回收一抗后，1×TBST 洗膜，每 3 min 洗一次，总共洗 5 次，用 HRP 标记的山羊抗鼠二抗，室温孵育 1 h 后 1×TBST 洗膜，每 3 min 洗一次，总共洗 5 次，将 NC 膜置于显影液浸泡后开始显影，观察实验结果。

4.2.4 IFA 验证 gE 单抗识别过表达的 gE 蛋白

把 pcDNA3.1-gE 质粒转染到提前准备好的 293T 细胞中, pcDNA3.1 空载体作为空白对照, 转染 12 h 后, 弃去培养基, 用固定液固定 15 min, 间接免疫荧光染色通透液作用 15 min 后, 用 flag 一抗孵育转染 pcDNA3.1 空载体的细胞孔, 用 gE 单克隆抗体一抗孵育转染 pcDNA3.1-gE 质粒的细胞孔, 用 gE 单克隆抗体作为一抗孵育没有转染质粒的细胞孔作为阴性对照, 用绿色荧光二抗室温孵育 1h, PBS 轻洗三次后用 DAPI 染核 10 min 观察实验结果。

4.2.5 Western blot 验证 gE 单抗识别过表达的 gE 蛋白

将 4.2.3 中收取的蛋白样进行 SDS-PAGE 电泳后转印于 NC 膜上, 转膜结束后将 NC 膜置于 5%的脱脂乳中封闭 2 h, 用 gE 单克隆抗体 4 °C 过夜孵育, 回收一抗后, 1×TBST 洗膜, 每 3 min 洗一次, 总共洗 5 次, 二抗室温孵育 1 h 后, 1×TBST 洗膜, 每 3 min 洗一次, 总共洗 5 次, 将 NC 膜置于显影液浸泡后开始显影, 观察 1D5 这株单克隆抗体能否识别过表达的 gE 蛋白。

4.2.6 IFA 检测 gE 单抗的反应性

将单层长满 90% PK15 细胞的 96 孔细胞培养板, 以 0.1 MOI 的剂量感染 PRV CD22 设置阴性对照, 待 24 h 后观察细胞出现明显的细胞病变后收样, 弃去上清, 用 4%多聚甲醛固定细胞 30 min 后弃去, 用免疫荧光染色通透液通透 15 min 后弃去, 用 PBS 轻轻洗 3 次, 用 gE 抗体 4°C 过夜孵育, 用 PBS 轻轻洗 3 次后, 用荧光二抗室温孵育 1 h, 用 DAPI 室温避光染核 10 min, 观察结果。

4.2.7 Western blot 检测 gE 单抗的反应性

将 PK15 细胞铺于 10 cm 细胞皿, 待细胞单层长满 80%, 用 PRV CD22 感染细胞, 不接毒细胞作为阴性对照, 当病毒感染 24 h 后出现明显的细胞病变后, 弃去上清, 加入 800 μ L RIPA 细胞裂解液在冰上裂解 30 min, 加入 200 μ L 5×loading buffer 100 °C 变性 10 min, 将蛋白样进行 SDS-PAGE 电泳后转印于 NC 膜上, 封闭, 一抗, 二抗孵育结束后扫膜观察实验结果。

4.2.8 用 gE 单抗通过 IFA 方法区别疫苗毒和野毒

待 24 孔细胞板中 PK15 细胞单层长满 80% 后, 分别 Bartha-K61 疫苗毒以 0.1 MOI 接种剂量, 将 PRV CD22 野毒以 0.1 MOI 接种剂量感染不同的细胞孔, 当两者都出现细胞病变后弃去上清, PBS 轻洗三次后用 4% 的多聚甲醛进行固定收样。第一组用 gB 单克隆抗体作为一抗分别孵育 PRV CD22 和 Bartha-K61 感染的细胞孔, 用红色荧光二抗进行孵育; 第二组用 gE 单克隆抗体作为一抗分别孵育 PRV CD22 和 Bartha-K61 感染的细胞孔, 用绿色荧光二抗进行孵育, 抗体孵育结束后用 DAPI 染核 10 min, 弃去 DAPI 后用 PBS 洗三次在荧光显微镜下观察实验结果, 以确定这株 gE 单抗能否通过 IFA 的方法鉴别出疫苗毒株和野毒。

4.2.9 用 gE 单抗通过 Western blot 方法区别疫苗毒和野毒

待 6 孔细胞板中 PK15 细胞单层长满 80% 后, 两个孔以 Bartha-K61 疫苗毒感染细胞, 两个孔以 PRV CD22 野毒, 两个孔作为阴性对照, 当病毒感染 24 h 后, 弃去上清, 用 PBS 轻洗 3 次, 每个孔加入 160 μ L RIPA 细胞裂解液在冰上裂解 30 min 后, 加入 40 μ L 5 $\times$ loading buffer 100 $^{\circ}$ C 变性 10 min 收样, 将蛋白样以阴性对照, PRV CD22 野毒, Bartha-K61 疫苗毒的顺序进行上样, 重复上样两组进行 SDS-PAGE 电泳后转印于 NC 膜上, 5% 脱脂乳封闭 2 h, 第一组用 gB 单克隆抗体作为一抗 4 $^{\circ}$ C 过夜孵育, 第二组用 gE 单克隆抗体作为一抗 4 $^{\circ}$ C 过夜孵育, TBST 清洗 3 次, 每次 5 min, 两组二抗都采用 HRP 标记的山羊抗鼠二抗, 最后显影以确定这株 gE 单抗能否通过 Western blot 的方法鉴别出疫苗毒株和野毒。

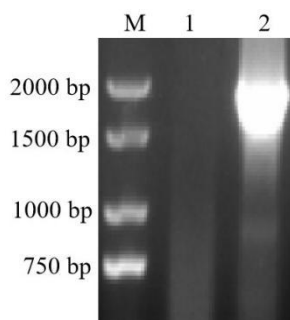
4.3 实验结果

4.3.1 pEGFP-N1-gE 全长重组质粒的构建

4.3.1.1 gE 全长基因扩增

以 PRV 全 DNA 为模板, PRV-gE-F 为上游引物, PRV-gE-R 为下游引物扩增出 gE 基因片段, 对扩增产物进行琼脂糖凝胶电泳鉴定, 结果显示符合预期成功扩增出大小约

为 1740 bp 的目的条带，将 PCR 产物进行切胶纯化，见图 4-1。



注：M：DNA 标准分子量；1：阴性对照；2：gE PCR 产物

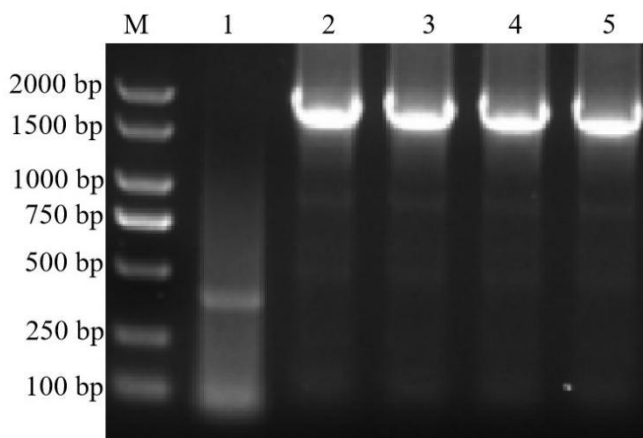
M: DNA Marker; 1: negative control; 2: The PCR production of gE

图 4-1 gE 片段的 PCR 扩增

Fig 4-1 The PCR amplification of gE

4.3.1.2 重组质粒 PCR 鉴定

将构建的 pcDNA3.1-gE 重组质粒转化至 DH5 α 感受态细胞中，涂布于氨苄抗性的固体培养基上 18 h 后，重组质粒形成较多个单克隆，阴性对照反应转化平板上没有单克隆，在平板上挑取四个单克隆，在加入 5 mL 液体氨苄培养基的摇菌管中过夜培养之后用质粒小提试剂盒进行质粒提取，对质粒进行 PCR 鉴定，结果显示如图 4-2 所示。



注：M：DNA 标准分子量；1：1 号质粒；2：2 号质粒；3：3 号质粒；4：4 号质粒；5：5 号质粒

M: DNA Marker; 1: 1 plasmid; 2: 2plasmid; 3: 3plasmid; 4: 4plasmid; 5: 5plasmid

图 4-2 pcDNA3.1-gE 质粒菌液 PCR 鉴定

Fig 4-2 The bacteria solution PCR identification of pcDNA3.1-gE

4.3.1.3 重组质粒测序结果

将质粒 PCR 鉴定结果为阳性的质粒送至北京擎科生物科技股份有限公司西安分公司进行测序，测序结果显示 pcDNA3.1-gE 质粒构建成功，结果如下图所示。

4.3.1.4 pcDNA3.1-gE 质粒图谱

构建完成后的 pcDNA3.1-gE 质粒图谱如图 4-3 所示。

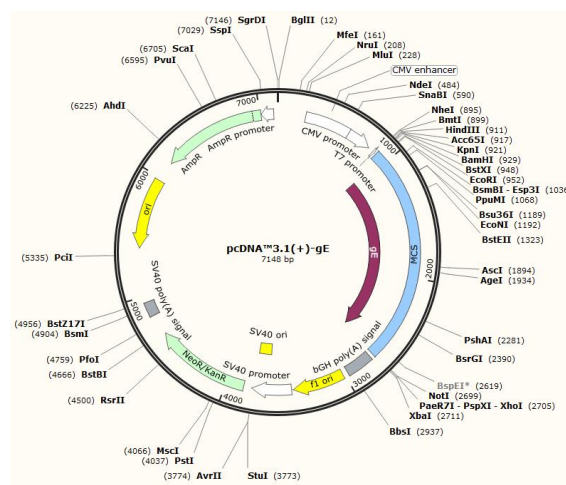
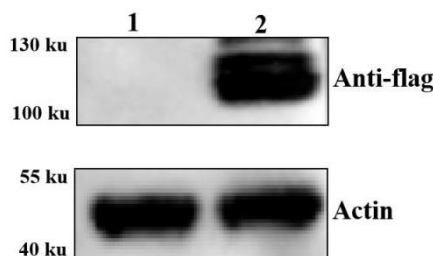


图 4-3 pcDNA3.1-gE 重组质粒图谱

Fig 4-3 pcDNA3.1-gE map of recombinant plasmids

4.3.2 pEGFP-N1-gE 全长重组质粒的表达鉴定

将 pEGFP-N1-gE 质粒和 pEGFP-N1 空载体分别转染 293T 细胞 24 h 后收样,用 flag 抗体作为一抗进行孵育,结果如下图所示,构建的 pEGFP-N1-gE 质粒能够正常表达。



注: 1: 空载体;2: pEGFP-N1-gE 质粒

1: Empty body; 2: pEGFP-N1-gE plasmid

图 4-4 Western blot 验证 pEGFP-N1-gE 质粒表达

Fig 4-4 Western blot identification of pEGFP-N1-gE plasmid expression

4.3.3 IFA 验证 gE 单抗识别过表达的 gE 蛋白

IFA 实验结果如下图所示,用 flag 抗体和 gE 孵育转染 pcDNA3.1-gE 质粒的细胞孔都能够出现绿色荧光,用 gE 抗体孵育不转染质粒的细胞孔不能够出现绿色荧光说明 1D5 这株单抗能够识别过表达的 gE 蛋白,且有良好的特异性。

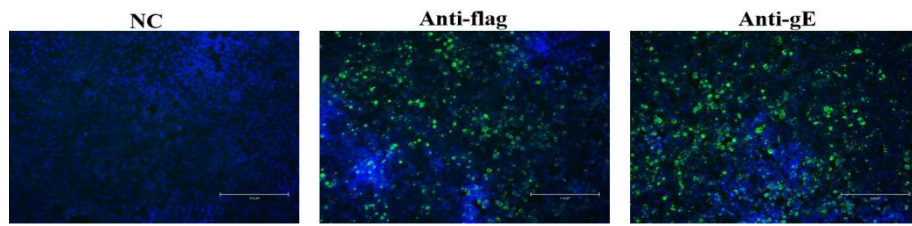
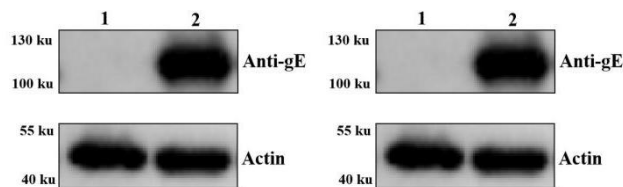


图 4-5 IFA 验证 gE 单抗识别过表达的 gE 蛋白

Fig 4-5 IFA validation of gE monoclonal antibody recognition of overexpressed gE proteins

4.3.4 Western blot 检测 gE 单抗识别过表达的 gE 蛋白

Western blot, 实验结果如下图所示, 用 gE 单克隆抗体作为一抗孵育, 在大小约为 120 ku 的位置出现条带, 条带大小和 flag 作为一抗孵育出现的条带大小一致, 所以 1D5 这株单抗能够识别过表达的 gE 蛋白。



1: 空载体; 2: pEGFP-N1-gE 质粒

1: Empty body; 2: PEGFP-N1-gE plasmid

图 4-6 Western blot 验证 gE 单抗识别过表达的 gE 蛋白

Fig 4-6 Western blot validation of gE monoclonal antibody recognition of overexpressed gE proteins

4.3.5 IFA 检测 gE 单抗的反应性

IFA 实验结果如下图所示, 该株 1D1 单抗能够识别野毒中的 gE 蛋白, 且具有良好的特异性。

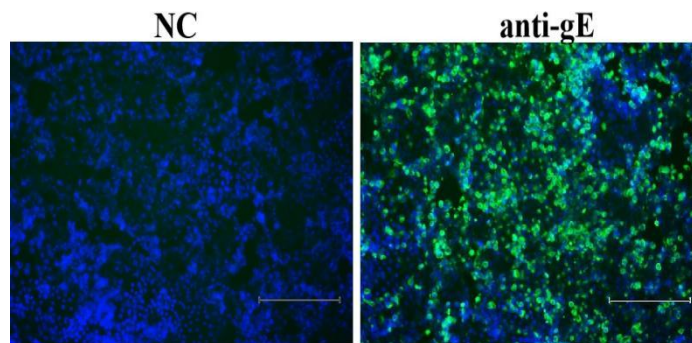


图 4-7 IFA 检测 gE 单抗的反应性

Fig 4-7 Reactivity of gE monoclonal antibody detected by IFA

4.3.6 Western blot 检测 gE 单抗的反应性

Western blot 实验结果如下图所示，该株 1D1 单抗能够识别野毒中的 gE 蛋白，且具有良好的特异性。

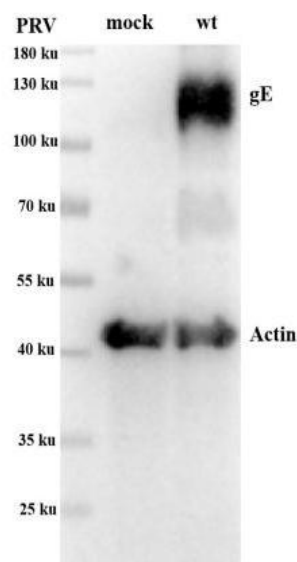


图 4-8 Western blot 检测 gE 单抗的反应性

Fig 4-8 Reactivity of gE monoclonal antibody detected by Western blot

4.3.7 IFA 鉴别疫苗毒和野毒

IFA 实验结果如下图所示，该株 gE 单抗能够用来鉴别疫苗毒株和野毒毒株。

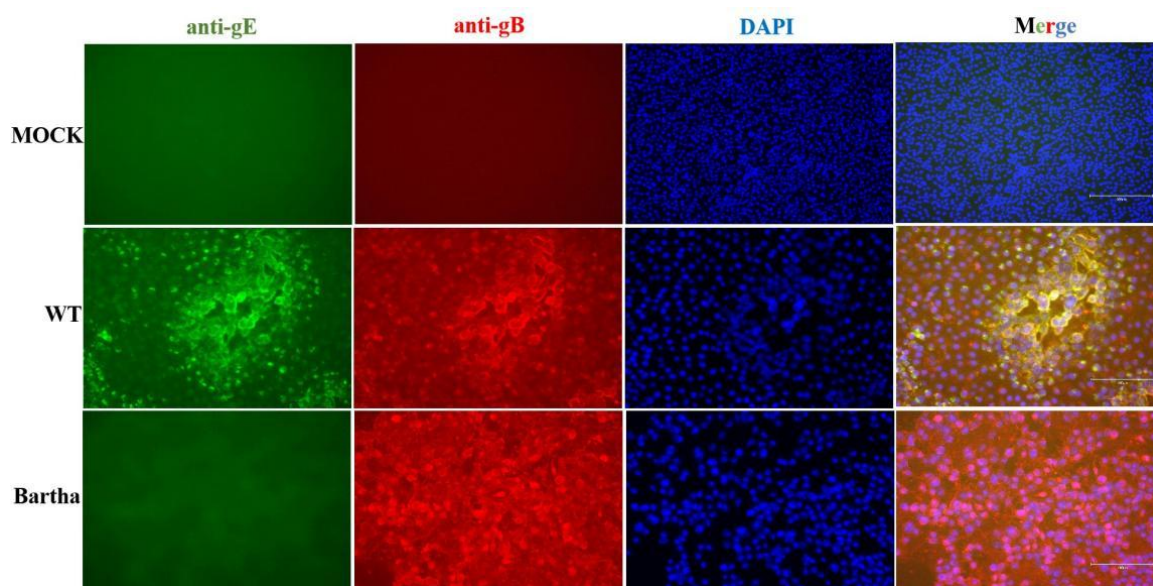


图 4-9 gE 单克隆抗体鉴别疫苗毒和野毒通过 IFA

Fig 4-9 Identification of vaccine and wild-type viruses using gE monoclonal antibodies by IFA

4.3.8 Western blot 鉴别疫苗毒和野毒

Western blot 实验结果如下图所示,该株 gE 单抗能够用来鉴别疫苗毒株和野毒毒株。

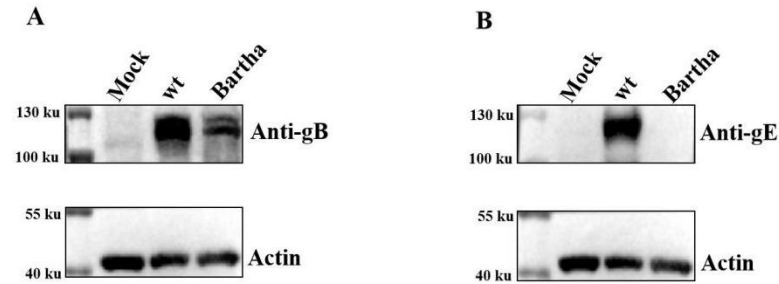


图 4-10 gE 单克隆抗体鉴别疫苗毒和野毒通过 Western blot

Fig 4-10 Identification of vaccine and wild-type viruses using gE monoclonal antibodies by Western blot

4.4 讨论

PR 是由 PRV 引起的传染病,该病一旦发病就会在猪群迅速蔓延,造成猪群大面积的感染,该病主要对怀孕母猪和哺乳仔猪的影响较为严重,会引起哺乳仔猪出现腹泻发热等症状死亡率较高,怀孕母猪感染会引发流产,生产出死胎,木乃伊胎,育肥猪感染会变成僵猪,感染后的猪只如果不及时的从圈舍内清除,会一直往圈舍内排毒感染其他健康的猪只,导致该猪场内 PR 的阳性率难以降低,不能对猪群进行净化^[40],使用糖蛋白 E 缺失的疫苗免疫猪群是在猪中根除伪狂犬病病毒的方法。在全球范围内,猪群密集的地区,使用这种标志疫苗进行密集疫苗接种已经使田间病毒流行率降至足够低的水平,使用糖蛋白 E 的单克隆抗体,运用酶联免疫吸附测定法,通过血清学的方法监测猪群感染田间病毒的情况以及演变经济成本较低,可行性较高。本研究制备出的这株 1D5 单克隆抗体经过 Western blot 鉴定既能够识别过表达的 gE 蛋白,也能够识别田间毒株的 gE 蛋白,通过 Western blot 的方法也能够对疫苗毒株和田间毒株进行鉴别诊断,同样经过间接免疫荧光的方法验证发现 1D5 这株单克隆抗体既能够识别过表达的 gE 蛋白,也能够识别田间毒株的 gE 蛋白,并且可以对疫苗毒株和田间毒株进行鉴别诊断。在猪伪狂犬病的净化中,除了疫苗接种本身之外,其他措施也很重要,例如正确使用和管理疫苗、加强免疫、防止引入 gE 阳性动物以及限制动物从 gE 阳性畜群中移动等。当感染带仍然存在时,可能需要加强疫苗接种。通常需要扑杀剩余的 gE 阳性动物。一些欧盟成员

国已使用这种方法实现无 PR。其他国家仍在努力。能否成功实现 PR 根除往往取决于是否存在良好的管理纪律，建议在猪群密集的非 PRV 地区，不要过早停止疫苗接种。

4.5 小结

本研究通过构建 gE 全长真核质粒转染 293T 细胞后，通过 IFA 的方法以及 Western blot 的方法验证了 1D5 这株单克隆抗体能够成功识别过表达的 gE 的蛋白；本研究在 PK15 细胞上感染 PRV-CD22 毒株通过 IFA 的方法以及 Western blot 的方法验证了 1D5 这株单克隆抗体能够成功识别 PRV 的 gE 的蛋白；本研究在 PK15 细胞上分别感染 PRV-CD22 毒株和 Bartha K61 毒株，发现通过 IFA 的方法以及 Western blot 的方法都能够用来鉴别疫苗毒和田间毒株。

第 5 章 猪伪狂犬病毒 gE 蛋白 mAbs 的抗原表位鉴定

本研究通过不断构建 gE 截短体真核表达质粒，将截短体质粒转染 293t 细胞 24h 后收样，通过 Western blot 的方法找到这株单克隆抗体识别的肽段。

5.1 实验材料

5.1.1 菌株、细胞、质粒

本组实验所用到的大肠杆菌 DH5 α 感受态细胞购自北京擎科生物科技有限公司、293T 细胞为本实验室自己保存，pEGFP-N1 空载体购自武汉淼灵生物科技有限公司。

5.1.2 主要仪器设备

表 5-1 主要仪器设备

Table 5-1 Main instruments and equipment

仪器设备	规格型号	公司
电泳仪	SO-EP600	北京赛欧华创科技有限公司
转膜仪	1703940	伯乐
细胞超声破碎仪	JY-9211N	新芝
超净工作台	SW-CJ-2D	成都华瑞信念达科技有限公司

5.1.3 主要试剂

表 5-2 主要试剂

Table 5-2 Main reagents

试剂	规格型号	公司
DNEM 培养基	11965092	Gibco
胎牛血清	F8687-500ML	Sigma
三抗	P7630	索莱宝
Polyplus DNA 转染试剂	1 mL	北京百奥科技有限公司

5.2 实验方法

5.2.1 gE 截短体目的基因扩增

参照 PRV CD22 毒株序列，利用 SnapGene 软件针对 gE (455-494 aa)、gE (484-524

aa)、gE (514-554 aa)、gE (544-578 aa)、gE (455-529 aa)、gE (454-534 aa)、gE (454-539 aa)、gE (454-544 aa)、gE (524-578 aa)、gE (529-578 aa)、gE (534-578 aa)、gE (539-578 aa)、gE (547-578 aa)、gE (550-578 aa)、gE (554-578 aa) 共 15 段截短体设计引物, 引物合成以后以 PRV 全 DNA 为模板用 PrimeSTAR Max Premix 高保真聚合酶进行 PCR 扩增。将所得 PCR 产物进行琼脂糖凝胶鉴定后用胶回收试剂盒进行回收处理。

表 5-3 主要引物列表

Table 5-3 List of main primers

引物 Primers	序列 Sequences (5'-3')	大小 Size (bp)
gE-F (455-494 aa)	TACCGGACTCAGATCTCGAGatgacgcacaggactactacgac	42
gE-R (455-494 aa)	GGCGACCGGTGGATCCCCGgtcgtcgtcgccgtcgta	36
gE-F (484-524 aa)	TACCGGACTCAGATCTCGAGatgacgcacaggactactacgac	44
gE-R (484-524 aa)	GGCGACCGGTGGATCCCCGgggtccaggctcgcg	34
gE-F (514-554 aa)	TACCGGACTCAGATCTCGAGatgggctacagggggccgtacg	42
gE-R (514-554 aa)	GGCGACCGGTGGATCCCCGgggtccattcgtcacttcggg	39
gE-R (455-529 aa)	GGCGACCGGTGGATCCCCGgtgaactcgtcctcggg	36
gE-R (455-534 aa)	GGCGACCGGTGGATCCCCGgtcgtcctcgtcgtgc	35
gE-R (455-539 aa)	GGCGACCGGTGGATCCCCGgcgcacgtacagcccg	34
gE-R (455-544 aa)	GGCGACCGGTGGATCCCCGgggcgctcctcggg	33
gE-F (524-578 aa)	TACCGGACTCAGATCTCGAGatccccgaggacgagttcagcag	43
gE-F (529-578 aa)	TACCGGACTCAGATCTCGAGatgagcagcagcaggacga	40
gE-F (534-578 aa)	TACCGGACTCAGATCTCGAGatggacgggctgtacgtcg	40
gE-F (539-578 aa)	TACCGGACTCAGATCTCGAGatgcgccccgaggagcgcc	40
gE-F (547-578 aa)	TACCGGACTCAGATCTCGAGatgtccggcttcgacgtct	39
gE-F (550-578 aa)	TACCGGACTCAGATCTCGAGatggtctggttcgcgatcc	40
gE-F (554-578 aa)	TACCGGACTCAGATCTCGAGatggatccggagaaaccggaagtg	44

表 5-4 扩增体系

Table 5-4 Amplification system

体系 System	体积 Volume (μL)
2 × PCR 预混液	25
PRV-gE 截短体-F	2
PRV-gE 截短体-R	2
PRV-DNA	2
NFW(无酶水)	19

表 5-5 扩增程序
Table 5-5 Amplification program

温度 Temperature	时间 Time	循环 Cycle
预变性 98°C	3 min	34
变 性 98°C	15 s	
退 火 55°C	30 s	
延 伸 72°C	20 s	
延 伸 72°C	10 min	

5.2.2 gE 截短体真核表达质粒构建

载体双酶切: 使用 NEB 公司生产的 *BamH I* 和 *Xho I* 两个限制性内切酶对 pEGFP-N1 载体进行双酶切, 在 37°C 恒温金属浴上作用 3 h, 用 1% 的琼脂糖凝胶电泳鉴定双酶切片段并用胶回收试剂盒进行酶切产物回收处理, 体系如表 5-6。

表 5-6 双酶切体系
Table 5-6 Double enzyme digestion system

pEGFP-N1 空载体酶切体系	
pEGFP-N1 载体	2 μg
内切酶 <i>BamHI</i>	2 μL
内切酶 <i>XhoI</i>	2 μL
cutsmart	4 μL
无酶水	30 μL

将扩增出来的 gE 截短体基因片段和双酶切 pEGFP-N1 载体片段用诺维赞同源重组酶在 37°C 条件下连接 30 min, 连接体系如表 5-7。

表 5-7 片段连接体系
Table 5-7 Fragment connection system

成分 (Component)	体积 (Volume)
Exnase II	2 μL
5×CE IIBuffer	4 μL
pEGFP-N1 载体片段	10 μL
gE 截短体基因片段	4 μL
Total	20 μL

将截短体质粒转化至大肠杆菌 DH5α 感受态细胞中, 用无菌涂布棒在含有卡那抗性的平板上轻轻涂匀。37°C 恒温培养箱倒置培养 12-16 h, 挑取单个菌落扩大培养后送公司测序。

5.2.3 验证 gE 截短体重组质粒表达

gE 的截短体片段插在带有绿色荧光标签的质粒上, 提前准备好 293T 细胞, 把构建成功测序正确的质粒转染到 293T 细胞, 转染 pEGFP-N1 质粒作为阳性对照, 12 h 后在绿色荧光显微镜下观察是否有绿色荧光出现, 有绿色荧光出现说明质粒能够正常表达。

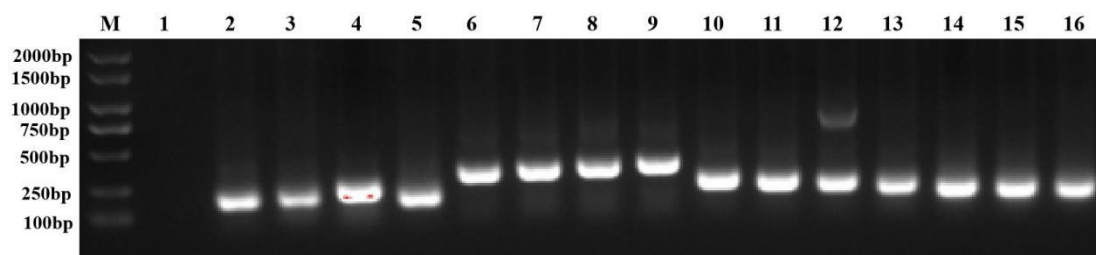
5.2.4 gE 单抗所识别抗原表位的鉴定

利用软件 SnapGene 针对原核表达的 gE(455-578 aa)片段设计引物进行截短扩增目的片段构建真核表达质粒, 将构建好的质粒转染 293T 细胞 24 h 后收样, 进行 Western blot 鉴定, 对 1D5 能够识别的截短片断继续进行分段截短表达, 继续进行 Western blot 鉴定, 最后确定出这株单抗识别的表位。

5.3 实验结果

5.3.1 截短体 gE 真核表达质粒的鉴定

将 gE 的截短体目的基因扩增成功后, 扩增结果如下图所示, 连接在 pEGFP-N1 载体上, 经过转化提质粒后送北京擎科生物科技股份有限公司西安分公司进行测序, 测序结果全部正确, 15 条 gE 截短体质粒构建成功。



注: M: DNA 标准分子量; 1: 阴性对照 ; 2: gE (455-494aa) ; 3: gE (484-524aa) ; 4: gE (514-554aa) ; 5: gE (544-578aa) ; 6: gE (455-529aa) ; 7: gE (454-534aa) ; 8: gE (454-539aa) ; 9: gE (454-544aa) ; 10: gE (524-578aa) ; 11: gE (529-578aa) ; 12: gE (534-578aa) ; 13: gE (539-578aa) ; 14: gE (547-578aa) ; 15: gE (550-578aa) ; 16: gE (554-578aa)

M:DNA Marker; 1:negative control ;2: gE (455-494aa) ; 3: gE (484-524aa) ; 4: gE (514-554aa) ; 5: gE (544-578aa) ; 6: gE (455-529aa) ; 7: gE (454-534aa) ; 8: gE (454-539aa) ; 9: gE (454-544aa) ; 10: gE (524-578aa) ; 11: gE (529-578aa) ; 12: gE (534-578aa) ; 13: gE (539-578aa) ; 14: gE (547-578aa) ; 15: gE (550-578aa) ; 16: gE (554-578aa)

图 5-1 截短体质粒 PCR 鉴定

Fig 5-1 Identification of truncated plasmid by PCR

5.3.2 荧光显微镜观察截短体 gE 真核质粒的表达

把构建成功的 15 条截短体质粒转染到 293T 细胞中，pEGFP-N1 空载做阳性对照，12 h 后置于荧光显微镜下观察全部有绿色荧光出现，结果如下图所示，说明构建的 gE 截短体质粒全部都能够正常表达。

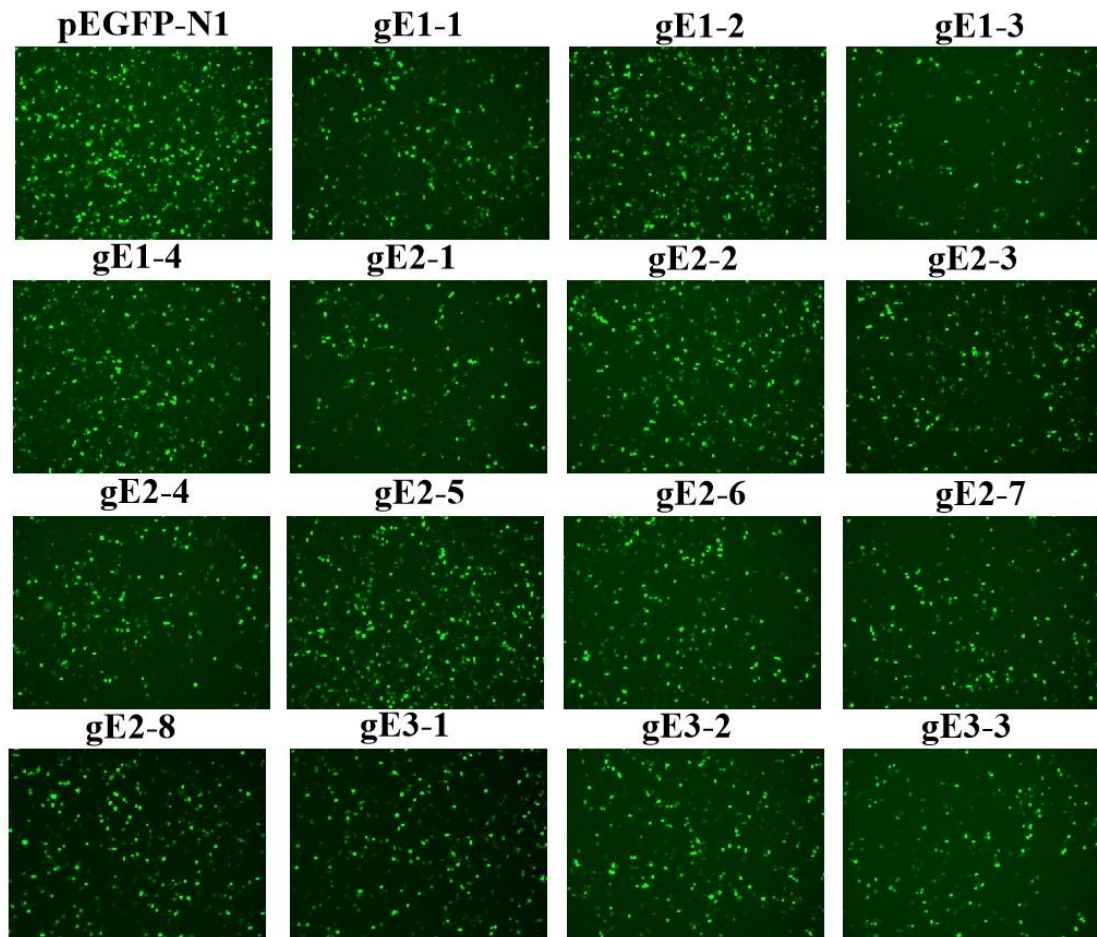


图 5-2 截短体质粒表达鉴定

Fig 5-2 Identification of truncated plasmid expression

5.3.3 Western-blot 检测 gE 单抗的抗原表位

首先在 pEGFP-N1 载体上构建 gE1-1 (455-494 aa)、gE1-2 (484-524 aa)、gE1-3 (514-554 aa)、gE1-4 (544-578 aa) 这四个真核质粒把 gE (455-578 aa) 分为四段通过 Western-blot 初步鉴定，该株单抗识别 gE1-3 (514-554 aa)、gE1-4 (544-578 aa) 这两段氨基酸，鉴定结果如下图所示。

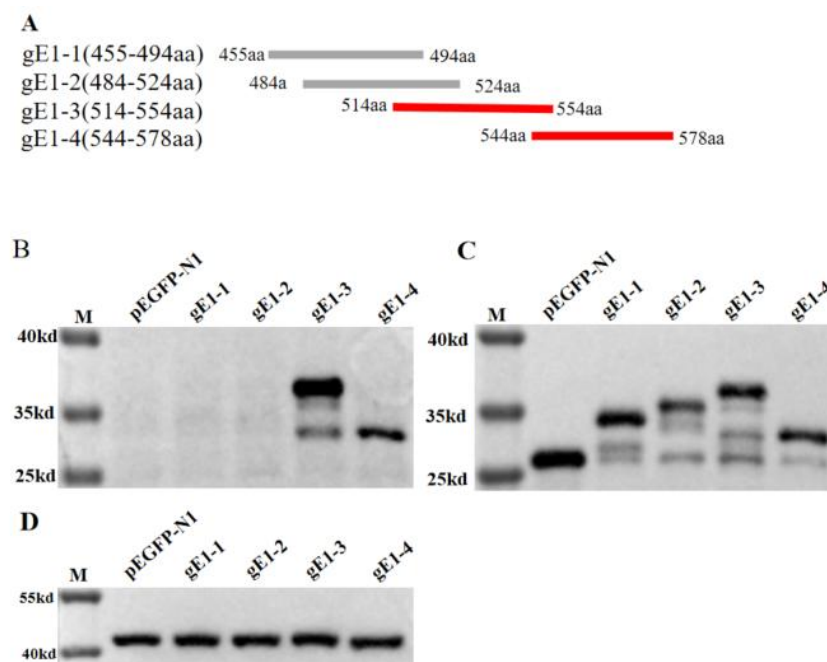


图 5-3 gE 单克隆抗体表位鉴定

Fig 5-3 Identification of gE monoclonal antibody epitopes

根据上图结果继续构建了 gE2-1 (455-529 aa)、gE2-2 (454-534 aa)、gE2-3 (454-539 aa)、gE2-4 (454-544 aa)、gE2-5 (524-578 aa)、gE2-6 (529-578 aa)、gE2-7 (534-578 aa)、gE2-8 (539-578 aa) 这八个质粒，转染 293T 细胞收样后继续进行 Western-blot 鉴定，该株单抗能够识别 gE (524-578 aa)、gE (529-578 aa)、gE (534-578 aa)、gE (539-578 aa) 这四段氨基酸序列，鉴定结果如下图所示。

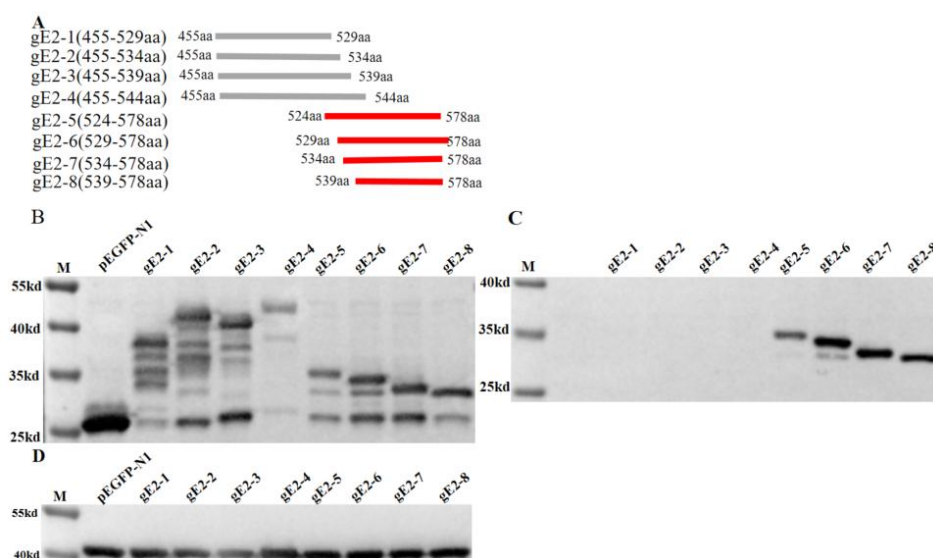


图 5-4 gE 单克隆抗体表位鉴定

Fig 5-4 Identification of gE monoclonal antibody epitopes

据上图结果继续构建了 gE3-1 (547-578 aa)、gE3-2 (550-578 aa)、gE3-3 (554-578 aa) 这三个质粒, 转染 293T 细胞收样后继续进行 Western-blot 鉴定, 该株单抗能够识别 gE3-1 (547-578 aa) 这段氨基酸序列。

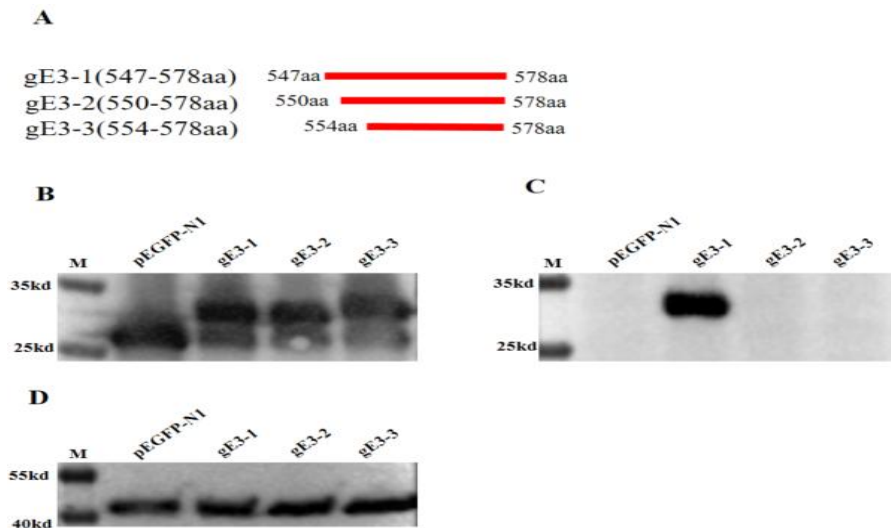


图 5-5 gE 单克隆抗体表位鉴定

Fig 5-5 Identification of gE monoclonal antibody epitopes

综合上述三次 Western-blot 实验结果, 我们发现 1D5 这株单抗能够识别 gE(547-554) 这段氨基酸序列, 识别的抗原序列为 ⁵⁴⁷GFDVWFRD⁵⁵⁴。

5.4 讨论

研究人员对中国地方性 PRV 毒株的遗传分析显示, 与其他国家发现的毒株和以前在中国流行的经典 PRV 毒株相比存在显著差异^[140], 这些变化主要体现在糖蛋白 E (gE) 基因上^[141]。此外, 与中国以往毒株相比, 这些毒株的毒力增强, 抗原性发生变化^[142-143], 目前, 商业市场主要提供用于检测抗糖蛋白 B (gB) 和抗 gE 抗体的酶联免疫吸附测定 (ELISA) 试剂盒。然而, 这些试剂盒通常利用先前流行的中国毒株或在中国境外传播的毒株^[144-146], PRV 防控的重点在于接种疫苗, 定期监测猪的抗 gB 抗体水平, 检测抗 gE 抗体以识别野生型病毒感染。欧洲国家、美国等国已通过免疫疫苗和相应的鉴别诊断完成了 PRV 的根除^[147], 自 2011 年以来, 中国报告了 PRV 变异株的检出, 这给防控带来了新的挑战。许多针对 PRV 变异株的疫苗已经开发出来^[148], 但以前开发的检测试

剂盒仍然可用。尽管这些试剂盒在 PRV 检测中发挥着重要作用,但值得考虑的是,随着 PRV 发生分子和抗原突变,以前为经典 PRV 设计的检测方法在当前检测实践中使用时可能会出现一些偏差,在本研究中,我们针对自己实验室分离纯化的 PRV CD22 毒株的 gE 基因,制备出一株单克隆抗体,并且通过对相应的 gE 氨基酸序列不断截短表达鉴定的方法,鉴定出这株单克隆抗体识别的抗原序列为⁵⁴⁷GFDVWFRD⁵⁵⁴,单克隆抗体及其表位是研究 PRV 蛋白结构和功能的重要工具。这些工具可以分析抗原表位特征,帮助设计抗病毒药物,促进疫苗开发,并协助建立抗体检测方法。

5.5 小结

本研究通过不断在 pEGFP-N1 载体上构建 gE 截短体真核表达质粒,对质粒转染 293t 细胞后收样,通过 Western blot 的方法鉴定出 1D5 这株单抗识别的抗原表位为⁵⁴⁷GFDVWFRD⁵⁵⁴。

第 6 章 全文结论

(1) 本研究成功构建了 PRV-gE 重组蛋白表达质粒，成功表达了可溶性的 PRV-gE 重组蛋白，并对蛋白进行了纯化。

(2) 本研究成功制备出一株 1D5 抗 PRV-gE 蛋白的单克隆抗体并且可以用于 Western blot、ELISA、IFA 等实验中 PRV-gE 蛋白的监测中。

(3) 本研究对 1D5 这株单克隆抗体进行了抗原表位鉴定，1D5 识别的抗原表位为⁵⁴⁷GFDVWFRD⁵⁵⁴。

参考文献

- [1]Pomeranz, Lisa E., Reynolds, et al. Molecular Biology of Pseudorabies Virus: Impact on Neurovirology and Veterinary Medicine[J]. American Society for Microbiology, 2005, 12(3): 16.
- [2]Deng J, Wu Z, Liu J, et al. The role of latency-associated transcripts in the latent infection of pseudorabies virus[J]. Viruses, 2022, 14(7): 1379.
- [3]Klupp B G, Hengartner C J, Mettenleiter T C, et al. Complete, annotated sequence of the pseudorabies virus genome[J]. Journal of virology, 2004, 78(1): 424-440.
- [4]Pomeranz,Lisa E., Ekstrand, et al. Gene Expression Profiling with Cre-Conditional Pseudorabies Virus Reveals a Subset of Midbrain Neurons That Participate in Reward Circuitry[J]. Journal of Neuroscience, 2017, 37(15): 4128-4144.
- [5]Yin, Yue, Nicolás Romero, et al. Pseudorabies Virus Inhibits Type I and Type III Interferon-Induced Signaling via Proteasomal Degradation of Janus Kinases[J]. Journal of Virology, 2021, 95(20):38.
- [6]Kong Z, Yin H, Wang F, et al. Pseudorabies virus tegument protein UL13 recruits RNF5 to inhibit STING-mediated antiviral immunity[J]. PLoS pathogens, 2022, 18(5): e1010544.
- [7]Anderson, L. A, Black, et al. Pseudorabies (Aujeszky's Disease) and Its Eradication[J]. Journal of Virology, 2009, 90(18): 41.
- [8]Rongli G U O, Jichun W, Aihua M A O, et al. A Preliminary Study on Genetic Variation of gE Gene of an Epidemic Pseudorabies Virus Strain and Its Pathogenicity to Piglets[J]. Agricultural Science & Technology, 2015, 16(5): 91.
- [9]Wang, Yi Ping, Huang, et al. The pseudorabies virus DNA polymerase processivity factor UL42 exists as a monomer in vitro and in vivo[J]. Archives of Virology, 2016, 161(4): 1027-1031.
- [10]Changmeng, Wang,Mi, et al. Pseudorabies virus induces autophagy to enhance viral replication in mouse neuro-2a cells in vitro[J]. Virus Research: an International Journal of Molecular and Cellular Virology, 2018, 63(2): 48-69.
- [11]Pomeranz L E, Reynolds A E, Hengartner C J. Molecular biology of pseudorabies virus: impact on neurovirology and veterinary medicine[J]. Microbiology and molecular biology reviews, 2005, 69(3):

- 462-500.
- [12]Heldwein E E, Lou H, Bender F C, et al. Crystal structure of glycoprotein B from herpes simplex virus 1[J]. Science, 2006, 313(5784): 217-220.
- [13]Peeters, B., Wind, et al. Pseudorabies virus envelope glycoproteins gp50 and gII are essential for virus penetration, but only gII is involved in membrane fusion[J]. Journal of Virology, 1992, 66(2): 894-905.
- [14]T., Müller, E., et al. Pseudorabies virus in wild swine: a global perspective[J]. Archives of Virology, 2011, 156(10): 1691-1705.
- [15]Caruso C, Dondo A, Cerutti F, et al. Aujeszky's disease in red fox (*Vulpes vulpes*): Phylogenetic analysis unravels an unexpected epidemiologic link[J]. Journal of wildlife diseases, 2014, 50(3): 707-710.
- [16]Zanin, Ennio, Capua, et al. Isolation and characterization of Aujeszky's disease virus in captive brown bears from Italy[J]. J Wildl Dis, 1997, 33(3): 632-634.
- [17]高龙. 骆驼伪狂犬病的诊断[J]. 国外兽医学: 畜禽疾病, 1996, 17(2): 2.
- [18]于家庚. 一例黄牛伪狂犬病的诊断报告[J]. 畜牧兽医科技信息, 2019, (4): 1.
- [19]芮萍, 刘曜综, 马增军, 等. 貂源伪狂犬病病毒的分离鉴定及 gE 基因分子特征[J]. 畜牧兽医学报, 2015, 46(7): 1268-1272.
- [20]杨帆, 周思卉, 幸程鸿, 等. 犬感染伪狂犬病病毒的病例报告[J]. 畜牧与兽医, 2016, 48(4): 2.
- [21]齐新永, 刘建, 周锦萍, 等. 绵羊感染伪狂犬病的病理学观察与病毒分离鉴定[J]. 中国畜牧兽医, 2015, 42 (02): 365-369.
- [22]Mocsári, E., Szolnoki, et al. Horizontal transmission of Aujeszky's disease virus from sheep to pigs[J]. Veterinary Microbiology, 1989, 19(3): 245-252.
- [23]陈源军. 猪伪狂犬病流行特点及防控措施[J]. 畜牧兽医科学, 2022, (20): 76-78.
- [24]王春芳, 付琦媛, 郑宾宾, 等. 伪狂犬病毒跨物种感染与传播[J]. 病毒学报, 2022, 38(04): 1001-1006.
- [25]Müller T, Hahn E C, Tottewitz F, et al. Pseudorabies virus in wild swine: a global perspective[J]. Archives of virology, 2011, 156: 1691-1705.

- [26]Enquist L W. Life beyond eradication: veterinary viruses in basic science[J]. 100 Years of Virology: The Birth and Growth of a Discipline, 1999, 6(1): 87-109.
- [27]Wong, Gary, Lu, et al. Pseudorabies virus: a neglected zoonotic pathogen in humans?[J]. Emerging Microbes & Infections, 2019, 8(1): 150-154.
- [28]Nauwynck, Hans, Pensaert, et al. Abortion induced by cell-associated pseudorabies virus in vaccinated sows[J]. Am.j.vet.res, 1992, 53(4): 93-489.
- [29]Salogni C, Lazzaro M, Giacomini E, et al. Infectious agents identified in aborted swine fetuses in a high-density breeding area: a three-year study[J]. Journal of Veterinary Diagnostic Investigation, 2016, 28(5): 550-554.
- [30]Liu,Hao, Li, et al. Outbreak of severe pseudorabies virus infection in pig-offal-fed farmed mink in Liaoning Province, China[J]. Archives of Virology, 2017, 162(3): 863-866.
- [31]Hu D, Lv L, Zhang Z, et al. Seroprevalence and associated risk factors of pseudorabies in Shandong province of China[J]. Journal of Veterinary Science, 2016, 17(3): 361.
- [32]Sehl, Julia, Teifke, et al. Comparative Pathology of Pseudorabies in Different Naturally and Experimentally Infected Species—A Review[J]. Pathogens, 2020, 9(8): 633.
- [33]Cheng, Zilong,Kong, et al. Natural infection of a variant pseudorabies virus leads to bovine death in China[J]. Transboundary and Emerging Diseases, 2020, 67(2): 31.
- [34]Pruiti, Ciarello Flavia,Capucchio, et al. First Report of a Severe Outbreak of Aujeszky's Disease in Cattle in Sicily (Italy)[J]. Pathogens, 2020, 9(954): 19.
- [35]Henderson, J. P., Graham, et al. An outbreak of Aujeszky's disease in sheep in Northern Ireland[J]. Veterinary Record, 1995, 136(22): 555-557.
- [36]Cramer, Sarah D.. Pseudorabies virus infection in Oklahoma hunting dogs (vol 23, pg 915, 2011)[J]. Journal of Veterinary Diagnostic Investigation: Official Publication of the American Association of Veterinary Laboratory Diagnosticians, Inc, 2012, 24(1): 246-246.
- [37]Corn J L, Cumbee J C, Barfoot R, et al. Pathogen exposure in feral swine populations geographically associated with high densities of transitional swine premises and commercial swine production[J]. Journal of wildlife diseases, 2009, 45(3): 713-721.

- [38]Liu H, Shi Z, Liu C, et al. Implication of the identification of an earlier pseudorabies virus (PRV) strain HLJ-2013 to the evolution of Chinese PRVs[J]. *Frontiers in microbiology*, 2020, 11: 612474.
- [39]Mettenleiter T C, Ehlers B, Müller T, et al. Herpesviruses[J]. *Diseases of swine*, 2019,14: 548-575.
- [40]陶玉莲. 猪伪狂犬病流行特点及防治[J]. *畜牧兽医科学: 电子版*, 2020, 16(7): 102-103.
- [41]陈伟. 猪伪狂犬病的病原, 临床症状, 病理变化及综合防控[J]. *中国动物保健*, 2022, 24(2): 1-1.
- [42]Mettenleiter T. Aujeszky's disease (pseudorabies) virus: the virus and molecular pathogenesis-state of the art, June 1999[J]. *Veterinary research*, 2000, 31(1): 99-115.
- [43]李清艳, 翟向和, 刘荣欣, 等. 猪伪狂犬病的研究进展[J]. *贵州畜牧兽医*, 2002, 26(5): 10-11.
- [44]Spear, P. G.,Longnecker, et al. Herpesvirus Entry: an Update[J]. *Journal of Virology*, 2003, 77(19): 10179-10185.
- [45]Spear P G, Longnecker R. Herpesvirus entry: an update[J]. *Journal of virology*, 2003, 77(19): 10179-10185.
- [46]Ben-porat T, Rakusanova T, Kaplan A-S. Early functions of the genome of herpesvirus. II. Inhibition of the formation of cell-specific polysomes[J]. *Virology*, 1971, 63(3): 9-890.
- [47]Kaelin K, Dezélee S, Masse M-J, et al. The UL25 protein of pseudorabies virus associates with capsids and localizes to the nucleus and to microtubules[J]. *Journal of virology*, 2000, 81(1): 82-474.
- [48]Zhang R, Tang J. Evasion of I interferon-mediated innate immunity by pseudorabies virus[J]. *Frontiers in microbiology*, 2021, 12(8): 801257.
- [49]Zheng, Hui Hua, Jin, et al. Seroprevalence investigation and genetic analysis of pseudorabies virus within pig populations in Henan province of China during 2018–2019[J]. *Infection Genetics and Evolution*, 2021, 13(5): 104835.
- [50]Kou X J, Gao F, Guo H L, et al. Establishment of indirect ELISA antibody detection kit for gE protein of porcine pseudorabies virus[J]. *China Animal Health Inspection*, 2018, 35(5): 91-94.
- [51]Morenkov O S, Sobko Y A, Panchenko O A. Glycoprotein gE blocking ELISAs to differentiate between Aujeszky's disease-vaccinated and infected animals[J]. *Journal of virological methods*, 1997, 65(1): 83-94.
- [52]Zhang, P, Lv, et al. Identification of linear B cell epitope on gB, gC, and gE proteins of porcine

- pseudorabies virus using monoclonal antibodies[J]. Veterinary Microbiology, 2019, 234(7): 90-93.
- [53]LI, XIUJIE, SUN, YANING, YANG, SUZHEN, et al. Development of an immunochromatographic strip for antibody detection of pseudorabies virus in swine[J]. Journal of Veterinary Diagnostic Investigation, 2015, 27(6): 739-742.
- [54]Wang Y B, Li Y H, Li Q M, et al. Development of a blocking immunoperoxidase monolayer assay for differentiation between pseudorabies virus-infected and vaccinated animals[J]. Polish Journal of Veterinary Sciences, 2019, 27(6): 717-723.
- [55]Panyasing Y, Kedkovid R, Kittawornrat A, et al. Detection of Aujeszky's disease virus DNA and antibody in swine oral fluid specimens[J]. Transboundary and emerging diseases, 2018, 65(6): 1828-1835.
- [56]Wu Q, Zhang H, Dong H, et al. Seroprevalence and risk factors associated with Pseudorabies virus infection in Tibetan pigs in Tibet[J]. BMC veterinary research, 2018, 14(6): 1-5.
- [57]Liu Y, Zhang S, Xu Q, et al. Investigation on pseudorabies prevalence in Chinese swine breeding farms in 2013–2016[J]. Tropical animal health and production, 2018, 50: 1279-1285.
- [58]Hu D, Zhang Z, Lv L, et al. Outbreak of variant pseudorabies virus in Bartha-K61–vaccinated piglets in central Shandong Province, China[J]. Journal of veterinary diagnostic investigation, 2015, 27(5): 600-605.
- [59]Ji C, Wei Y, Wang J, et al. Development of a dual fluorescent microsphere immunological assay for detection of pseudorabies virus gE and gB IgG antibodies[J]. Viruses, 2020, 12(9): 912.
- [60]Lei, Jian Lin, Xia, et al. Safety and immunogenicity of a gE/gI/TK gene-deleted pseudorabies virus variant expressing the E2 protein of classical swine fever virus in pigs[J]. Immunology Letters, 2016, 174: 63-71.
- [61]Zheng H H, Bai Y L, Xu T, et al. Isolation and phylogenetic analysis of reemerging pseudorabies virus within pig populations in central China during 2012 to 2019[J]. Frontiers in Veterinary Science, 2021, 8(9): 76-98.
- [62]Cheng, Ting Yu, Henao-Diaz, et al. Pseudorabies (Aujeszky's disease) virus DNA detection in swine nasal swab and oral fluid specimens using a gB-based real-time quantitative PCR[J]. Preventive

- Veterinary Medicine, 2021, 189(3409): 105308.
- [63]Luo, Yakun, Liang, et al. Concurrent infections of pseudorabies virus and porcine bocavirus in China detected by duplex nanoPCR[J]. Journal of Virological Methods, 2015, 219(3): 46-50.
- [64]Ren M ,Lin H ,Chen S , et al. Detection of pseudorabies virus by duplex droplet digital PCR assay [J]. Journal of Veterinary Diagnostic Investigation, 2018, 30 (1): 105-112.
- [65]Tu F, Zhang Y, Xu S, et al. Detection of pseudorabies virus with a real-time recombinase-aided amplification assay[J]. Transboundary and Emerging Diseases, 2022, 69(4): 2266-2274.
- [66]Zhang, Chao Fan, Cui, et al. Loop-mediated isothermal amplification for rapid detection and differentiation of wild-type pseudorabies and gene-deleted virus vaccines[J]. Journal of Virological Methods, 2010, 169(1): 239-243.
- [67]Liu Z, Zhang C, Shen H, et al. Duplex fluorescence melting curve analysis as a new tool for rapid detection and differentiation of genotype I, II and Bartha-K61 vaccine strains of pseudorabies virus[J]. BMC veterinary research, 2018, 14(37): 1-9.
- [68]Yang Y, Qin X, Zhang W, et al. Development of an isothermal recombinase polymerase amplification assay for rapid detection of pseudorabies virus[J]. Molecular and Cellular Probes, 2017, 33: 32-35.
- [69]Tian R B, Xu T, et al. Development of a SYBR green I-based duplex real-time PCR assay for detection of pseudorabies virus and porcine circovirus 3[J]. Molecular and cellular probes, 2020, 53(2): 89-93.
- [70]Li, Han, Wei, et al. Establishment of a multiplex RT-PCR assay for identification of atmospheric virus contamination in pig farms[J]. Environmental Pollution, 2019, 253(21): 358-364.
- [71]Sunaga F, Tsuchiaka S, Kishimoto M, et al. Development of a one-run real-time PCR detection system for pathogens associated with porcine respiratory diseases[J]. Journal of Veterinary Medical Science, 2020, 82(2): 217-223.
- [72]Lee, Chul Seung, Moon, et al. Multiplex PCR for the simultaneous detection of pseudorabies virus, porcine cytomegalovirus, and porcine circovirus in pigs[J]. Journal of Virological Methods, 2007, 139(1): 39-43.
- [73]Wang, Xiao Wu, Fu, et al. Establishment of SYBR Green-I real-time fluorescent quantitative PCR for detection of porcine reproductive and respiratory syndrome virus[J]. Chinese Veterinary Science, 2008,

38(5): 401-406.

- [74]Huang, Chienjin, Hung, et al. Multiplex PCR for rapid detection of pseudorabies virus, porcine parvovirus and porcine circoviruses[J]. Veterinary Microbiology, 2004, 101(3): 209-214.
- [75]Tombácz D, Sharon D, Szűcs A, et al. Transcriptome-wide survey of pseudorabies virus using next-and third-generation sequencing platforms[J]. Scientific Data, 2018, 5(1): 1-13.
- [76]Lian K, Zhang M, Zhou L, et al. First report of a pseudorabies-virus-infected wolf (*Canis lupus*) in China[J]. Archives of Virology, 2020, 165: 459-462.
- [77]吕方, 江有意. 新流行猪伪狂犬病的防控措施[J]. 猪业观察, 2023, (1): 78-81.
- [78]Żyżyńska-Granica B, Trzaskowski B, Dutkiewicz M, et al. The anti-inflammatory potential of cefazolin as common gamma chain cytokine inhibitor[J]. Scientific Reports, 2020, 10(1): 2886.
- [79]Zwirner, Norberto W., M. A. Fernández-Vi?a, et al. MICA, a new polymorphic HLA-related antigen, is expressed mainly by keratinocytes, endothelial cells, and monocytes[J]. Immunogenetics, 1997, 47(2): 139-148.
- [80]Zu,Xueyin.,Xie, et al. Lapachol is a novel ribosomal protein S6 kinase 2 inhibitor that suppresses growth and induces intrinsic apoptosis in esophageal squamous cell carcinoma cells[J]. Phytotherapy Research : Ptr, 2019, 33(9): 2337-2346.
- [81]Zuo, Guoying, Li, et al. Activity of compounds from Chinese herbal medicine *Rhodiola kirilowii* (Regel) Maxim against HCV NS3 serine protease[J]. Antiviral Res, 2007, 76(1): 86-92.
- [82]Zou, Jibin, Zhao, et al. Quinolizidine Alkaloids with Antiviral and Insecticidal Activities from the Seeds of *Sophora tonkinensis* Gagnep[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2019, 33(9): 2337-2346.
- [83]Zorrilla J G, Rial C, Cabrera D, et al. Pharmacological activities of aminophenoxazinones[J]. Molecules, 2021, 26(11): 3453.
- [84]Zhou Y, He Y J, Wang Z J, et al. A review of plant characteristics, phytochemistry and bioactivities of the genus *Glechoma*[J]. Journal of Ethnopharmacology, 2021, 271(70): 113-124.
- [85]Zhou L M, Qu R Y, Yang G F. An overview of spirooxindole as a promising scaffold for novel drug discovery[J]. Expert Opinion on Drug Discovery, 2020, 15(5): 603-625.

- [86]Zhou X, Zhang Y, et al. *Cynanchum paniculatum* (Bunge) Kitag. ex H. Hara: A review of its ethnopharmacology, phytochemistry and pharmacology[J]. *Journal of Ethnopharmacology*, 2020, 260(3): 112-136.
- [87]Chacko S M, Thambi P T, Kuttan R, et al. Beneficial effects of green tea: a literature review[J]. *Chinese medicine*, 2010, 5(9): 1-9.
- [88]Huan C, Xu W, Guo T, et al. (-)-Epigallocatechin-3-gallate inhibits the life cycle of pseudorabies virus in vitro and protects mice against fatal infection[J]. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 2021, 10(34): 616-624.
- [89]Yamaguchi,Koushi,Honda, et al. Inhibitory effects of (-)-epigallocatechin gallate on the life cycle of human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1)[J]. *Antiviral Research*, 2002, 53(1): 19-34.
- [90]Zhao X, Cui Q, Fu Q, et al. Antiviral properties of resveratrol against pseudorabies virus are associated with the inhibition of I κ B kinase activation[J]. *Scientific reports*, 2017, 7(1): 8782.
- [91]Wu J, Feng Y, Han C, et al. Germacrone derivatives: Synthesis, biological activity, molecular docking studies and molecular dynamics simulations[J]. *Oncotarget*, 2017, 8(9): 15149.
- [92]Liu,Yunyi,Wang, et al. Anti-tumor effect of germacrone on human hepatoma cell lines through inducing G2/M cell cycle arrest and promoting apoptosis[J]. *European Journal of Pharmacology*, 2013, 698(1): 95-102.
- [93]Donoso F, Ramírez V T, Golubeva A V, et al. Naturally derived polyphenols protect against corticosterone-induced changes in primary cortical neurons[J]. *International Journal of Neuropsychopharmacology*, 2019, 22(12): 765-777.
- [94]Zou X, Himbert S, Dujardin A, et al. Curcumin and homotaurine suppress amyloid- β 25–35 aggregation in synthetic brain membranes[J]. *ACS Chemical Neuroscience*, 2021, 12(8): 1395-1405.
- [95]Zhuang X X, Wang S F, Tan Y, et al. Pharmacological enhancement of TFEB-mediated autophagy alleviated neuronal death in oxidative stress-induced Parkinson's disease models[J]. *Cell death & disease*, 2020, 11(2): 128.
- [96]Yang B, Luo G, Zhang C, et al. Curcumin protects rat hippocampal neurons against pseudorabies virus by regulating the BDNF/TrkB pathway[J]. *Scientific Reports*, 2020, 10(1): 22-24.

- [97]Yang, Wang L, Xu G, et al. Platycodon grandiflorus polysaccharides inhibit Pseudorabies virus replication via downregulating virus-induced autophagy[J]. Research in Veterinary Science, 2021, 140(19): 18-25.
- [98]Li L, Wang R, Hu H, et al. The antiviral activity of kaempferol against pseudorabies virus in mice[J]. BMC Veterinary Research, 2021, 17: 1-14.
- [99]Lv C, Liu W, Wang B, et al. Ivermectin inhibits DNA polymerase UL42 of pseudorabies virus entrance into the nucleus and proliferation of the virus in vitro and vivo[J]. Antiviral research, 2018, 159: 55-62.
- [100]Weissbart K, Chow C S, Coen D M. Herpes simplex virus processivity factor UL42 imparts increased DNA-binding specificity to the viral DNA polymerase and decreased dissociation from primer-template without reducing the elongation rate[J]. Journal of virology, 1999, 73(1): 55-66.
- [101]Xujiao R ,Nan C ,Linxiang T , et al. A self-assembled nanoparticle vaccine based on pseudorabies virus glycoprotein D induces potent protective immunity against pseudorabies virus infection. [J]. Veterinary microbiology, 2023, 284(12)): 109-799.
- [102]Pickard G E, Brodersen B, Sollars P J, et al. The pseudorabies virus R2 non-neuroinvasive vaccine: a proof-of-concept study in pigs[J]. Vaccine, 2020, 38(29): 4524-4528.
- [103]Mcferran,J B,Dow, et al. Studies on immunisation of pigs with the Bartha strain of Aujeszky's disease virus[J]. Research in Veterinary Science, 1975, 19(1): 17-22.
- [104]Freuling C M, Müller T F, Mettenleiter T C. Vaccines against pseudorabies virus (PrV)[J]. Veterinary Microbiology, 2017, 206(78): 3-9.
- [105]An,Tong Qing,Peng, et al. Pseudorabies Virus Variant in Bartha-K61–Vaccinated Pigs, China, 2012[J]. Emerging Infectious Diseases, 2013, 19(11): 1749-1755.
- [106]Zhou,Jinzhong,Li, et al. Bartha-k61 vaccine protects growing pigs against challenge with an emerging variant pseudorabies virus[J]. Vaccine, 2017, 35(8): 1161-1166.
- [107]Zhang C, Liu Y, Chen S, et al. A gD&gC-substituted pseudorabies virus vaccine strain provides complete clinical protection and is helpful to prevent virus shedding against challenge by a Chinese pseudorabies variant[J]. BMC veterinary research, 2019, 15(78): 1-9.

- [108]Ren J, Wang H, Zhou L, et al. Glycoproteins C and D of PRV strain HB1201 contribute individually to the escape from Bartha-K61 vaccine-induced immunity[J]. *Frontiers in Microbiology*, 2020, 11(96): 323.
- [109]Pomeranz Lisa-E, Reynolds Ashley-E, Hengartner Christoph-J. Molecular biology of pseudorabies virus: impact on neurovirology and veterinary medicine[J]. *Microbiology and molecular biology reviews*: 2005, (3): 462-500.
- [110]C, Jin Wang A B, C, et al. Efficacy of the Bartha-K61 vaccine and a gE/gI/TK prototype vaccine against variant porcine pseudorabies virus (vPRV) in piglets with sublethal challenge of vPRV[J]. *Research in Veterinary Science*, 2020, 128(56): 16-23.
- [111]Zhao, Yu, Wang, et al. Construction and immunogenicity of a gE/gI/TK-deleted PRV based on porcine pseudorabies virus variant[J]. *Molecular and Cellular Probes*, 2020, 53(79): 101 605.
- [112]Zongyi Bo, Xiangdong Li. A Review of Pseudorabies Virus Variants: Genomics, Vaccination, Transmission, and Zoonotic Potential[J]. *Viruses*, 2022, 14(5): 1003.
- [113]Mettenleiter, Thomas C.. Aujeszky's Disease and the Development of the Marker/DIVA Vaccination Concept[J]. *Pathogens*, 2020, 9(7): 563.
- [114]Wencheng Lin, Yangyang Shao, Chen Tan, et al. Commercial vaccine against pseudorabies virus: A hidden health risk for dogs[J]. *Veterinary Microbiology*, 2019, 233: 102-112.
- [115]Hanjin K, Keshan Z, Yongjie L, et al. Attenuated live vaccine (Bartha-K16) caused pseudorabies (Aujeszky's disease) in sheep. [J]. *Veterinary research communications*, 2013, 37 (4): 32-329.
- [116]何松, 汤德元, 毛茵茗, 等. 猪伪狂犬病诊断方法与疫苗研究进展[J]. *动物医学进展*, 2024, 45(02): 95-100.
- [117]Tan L, Yao J, Yang Y, et al. Current status and challenge of pseudorabies virus infection in China[J]. *Virologica Sinica*, 2021, 36(18): 588-607.
- [118]Van Oirschot, J. T., Gielkens, et al. Marker vaccines, virus protein-specific antibody assays and the Aujeszky's disease[J]. *Veterinary Microbiology*, 1990, 23(1-4): 85-101.
- [119]Xiangdong L, Fanli Y, Xule H, et al. Two classes of protective antibodies against Pseudorabies virus variant glycoprotein B: Implications for vaccine design. [J]. *PLoS pathogens*, 2017, 13 (12):

e1006777.

- [120]Aschner C B, Herold B C. Alphaherpesvirus vaccines[J]. Current issues in molecular biology, 2021, 41(1): 469-508.
- [121]樊淑华, 李文刚, 吴凤笋, 等. 猪伪狂犬基因工程疫苗研究进展[J]. 郑州牧业工程高等专科学校学报, 2005, 25(2): 84-86.
- [122]Han Y W, Aleyas A G, George J A, et al. Polarization of protective immunity induced by replication-incompetent adenovirus expressing glycoproteins of pseudorabies virus[J]. Experimental & Molecular Medicine, 2008, 40(6): 583-595.
- [123]Van De Laar L, Coffey P J, Woltman A M. Regulation of dendritic cell development by GM-CSF: molecular control and implications for immune homeostasis and therapy[J]. Blood, The Journal of the American Society of Hematology, 2012, 119(15): 3383-3393.
- [124]Cao Z, Zhang K, Zhang H, et al. Efficacy of a gB+ gD-based subunit vaccine and the adjuvant granulocyte-macrophage colony stimulating factor for pseudorabies virus in rabbits[J]. Frontiers in Microbiology, 2022, 13(91): 965 997.
- [125]Van Rooij, E. M, Haagmans, et al. A DNA vaccine coding for glycoprotein B of pseudorabies virus induces cell-mediated immunity in pigs and reduces virus excretion early after infection[J]. Veterinary Immunology & Immunopathology, 2000, 74(1): 121-136.
- [126]Yoon, Hyun A, Aleyas, et al. Differential segregation of protective immunity by encoded antigen in DNA vaccine against pseudorabies virus[J]. Immunology & Cell Biology, 2006, 84(6): 502-511.
- [127]Burke, Heidi G, Heldwein, et al. Crystal Structure of the Human Cytomegalovirus Glycoprotein B[J]. Plos Pathogens, 2015, 11(10): e1005227.
- [128]Tulloch, Fiona, Atkinson, et al. RNA virus attenuation by codon pair deoptimisation is an artefact of increases in CpG/UpA dinucleotide frequencies[J]. Elife, 2014, 3(35): 4-9.
- [129]Deng X, Hackbart M, Mettelman R C, et al. Coronavirus nonstructural protein 15 mediates evasion of dsRNA sensors and limits apoptosis in macrophages[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences, 2017, 114(21): E4251-E4260.
- [130]Jordan A, Carding S R, Hall L J. The early-life gut microbiome and vaccine efficacy[J]. The Lancet

- Microbe, 2022, 3(10): e787-e794.
- [131]Tirabassi,R S,Enquist, et al. Mutation of the YXXL Endocytosis Motif in the Cytoplasmic Tail of Pseudorabies Virus gE[J]. Journal of Virology, 1999, 73(4): 2717-2728.
- [132]Tirabassi R S, Townley R A, Eldridge M G, et al. Characterization of pseudorabies virus mutants expressing carboxy-terminal truncations of gE: evidence for envelope incorporation, virulence, and neurotropism domains[J]. Journal of virology, 1997, 71(9): 6455-6464.
- [133]Chang,Ching Hwa,Pan, et al. Isolation of gE gene deleted pseudorabies virus by using a gE specific monoclonal antibody[J]. Journal of Virological Methods, 1996, 60(1): 19-28.
- [134]Xiuling Y ,Zhi Z ,Dongmei H , et al. Pathogenic pseudorabies virus, China, 2012. [J]. Emerging infectious diseases, 2014, 20 (1): 4-102
- [135]Zongyi B ,Xiangdong L . A Review of Pseudorabies Virus Variants: Genomics, Vaccination, Transmission, and Zoonotic Potential [J]. Viruses, 2022, 14 (5): 1003-1003.
- [136]车达, 王亮, 刘彦双. SP2/0 细胞培养条件的优化[J]. 当代畜牧, 2018, (29): 59-60.
- [137]周玉, 李岩松, 潘风光, 等. 小鼠腹水 IgG 类单克隆抗体纯化方法的研究[J]. 黑龙江畜牧兽医, 2006, (10): 14-16.
- [138]Boehmer, Lotta Von, Liu, et al. Sequencing and cloning of antigen-specific antibodies from mouse memory B cells[J]. Nature Protocols, 2016, 11(10): 1908-1923.
- [139]Curtiss R. Bacterial infectious disease control by vaccine development[J]. The Journal of clinical investigation, 2002, 110(8): 1061-1066.
- [140]Ye,Chao,Guo, et al. Genomic analyses reveal that partial sequence of an earlier pseudorabies virus in China is originated from a Bartha-vaccine-like strain[J]. Virology, 2016, 491(70): 56-63.
- [141]Bo,Zongyi., Miao, et al. Emergence of a novel pathogenic recombinant virus from Bartha vaccine and variant pseudorabies virus in China[J]. Transboundary and Emerging Diseases, 2021, 68(3): 1454-1464.
- [142]彭金美,安同庆,赵鸿远,等. 猪伪狂犬病病毒新流行株的分离鉴定及抗原差异性分析[J]. 中国预防兽医学报,2013,35(1):1-4.
- [143]Luo, Yuzi, Li, et al. Pathogenicity and genomic characterization of a pseudorabies virus variant

- isolated from Bartha-K61-vaccinated swine population in China[J]. *Veterinary Microbiology*, 2014, 174(1-2): 107-115.
- [144]Gut, Monika, Jacobs, et al. A highly specific and sensitive competitive enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) based on baculovirus expressed pseudorabies virus glycoprotein gE and gI complex[J]. *Veterinary Microbiology*, 1999, 69(4): 239-249.
- [145]Ao, Jing Qun, Wang, et al. Expression of pseudorabies virus gE epitopes in *Pichia pastoris* and its utilization in an indirect PRV gE-ELISA[J]. *Journal of Virological Methods*, 2003, 114(2): 145-150.
- [146]Serena, María Soledad, Geisler, et al. Expression and purification of Suid Herpesvirus-1 glycoprotein E in the baculovirus system and its use to diagnose Aujeszky's disease in infected pigs[J]. *Protein Expression & Purification*, 2013, 90(1): 1-8.
- [147]Yuan Sun, Yuzi Luo, Chun-Hua Wang, et al. Control of swine pseudorabies in China: Opportunities and limitations[J]. *Veterinary Microbiology*, 2016, 183: 24-119.
- [148]C M Freuling,T F Müller,T C Mettenleiter. Vaccines against pseudorabies virus (PrV)[J]. *Veterinary Microbiology*, 2017, 206: 3-9.