

中图分类号\_\_\_\_\_

学校代码\_\_\_\_\_10224

密    级\_\_\_\_\_公开

学    号\_\_\_\_\_S200601083

東北農業大學

硕士学位论文

盖他病毒囊膜蛋白 N-糖基化修饰对病毒感染  
及复制能力的影响

作    者\_\_\_\_\_魏新宇

导    师\_\_\_\_\_王靖飞 研究员

学位类别\_\_\_\_\_农学硕士

所在学院\_\_\_\_\_动物医学学院

一级学科\_\_\_\_\_兽医学

二级学科\_\_\_\_\_临床兽医学

二〇二三年六月

Classified Index:

Code: 10224

Confidential (yes/no): no

No. S200601083

## Dissertation for the Master Degree

# **Effects of N-glycosylation of Envelope Protein of Getah Virus on Infection and Replication**

**Candidate:** Wei Xinyu

**Supervisor:** Prof. Wang Jingfei

**Degree Category:** Master of Agriculture

**College:** College of Veterinary Medicine

**First level discipline:** Veterinary Medicine

**Second level discipline:** Clinical Veterinary Medicine

**Harbin China**

**June 2023**

# 目 录

|                                           |    |
|-------------------------------------------|----|
| 1 前言.....                                 | 1  |
| 1.1 GETV 概述.....                          | 1  |
| 1.1.1 GETV 的流行病学.....                     | 1  |
| 1.1.2 GETV 病原学.....                       | 1  |
| 1.1.3 GETV 的生命周期.....                     | 3  |
| 1.2 N-糖基化修饰.....                          | 4  |
| 1.2.1 N-糖链加工过程.....                       | 4  |
| 1.2.2 内质网及高尔基体中糖蛋白合成的质控机制.....            | 5  |
| 1.2.3 蛋白质糖基化修饰在病毒感染中的作用.....              | 5  |
| 1.3 研究目的及意义.....                          | 6  |
| 2 材料与方法.....                              | 7  |
| 2.1 材料.....                               | 7  |
| 2.1.1 细胞和病毒.....                          | 7  |
| 2.1.2 实验动物.....                           | 7  |
| 2.1.3 实验试剂.....                           | 7  |
| 2.1.4 主要仪器设备.....                         | 8  |
| 2.2 试验方法.....                             | 9  |
| 2.2.1 GETV 的 TaqMan 荧光定量 PCR 检测方法的建立..... | 9  |
| 2.2.2 GETV-E2 单克隆抗体的制备.....               | 11 |
| 2.2.3 GETV-CP 多克隆抗体的制备.....               | 13 |
| 2.2.4 GETV 糖基化位点突变质粒的构建及鉴定.....           | 14 |
| 2.2.5 GETV 糖基化位点修饰缺失毒株的拯救及鉴定.....         | 15 |
| 2.2.6 GETV 糖基化修饰缺失的鉴定.....                | 16 |
| 2.2.7 一步生长曲线及蚀斑试验的测定.....                 | 16 |
| 2.2.8 吸附及入侵试验.....                        | 17 |
| 2.2.9 透射电镜的负染色与超微细胞切片.....                | 17 |
| 2.2.10 动物实验.....                          | 17 |
| 2.2.11 统计分析.....                          | 17 |
| 3 结果.....                                 | 18 |
| 3.1 荧光定量 PCR 检测方法的建立.....                 | 18 |
| 3.1.1 质粒标准品的构建.....                       | 18 |
| 3.1.2 退火温度及探针浓度的优化结果.....                 | 18 |
| 3.1.3 标准曲线及溶解曲线绘制.....                    | 19 |
| 3.1.4 特异性试验.....                          | 20 |

|                                     |    |
|-------------------------------------|----|
| 3.1.5 敏感性试验.....                    | 21 |
| 3.1.6 重复性试验.....                    | 21 |
| 3.1.7 感染小鼠组织样品的检测结果.....            | 22 |
| 3.2 E2 蛋白单克隆抗体的制备 .....             | 22 |
| 3.2.1 pFast BAC1-E2 质粒的构建与鉴定 .....  | 22 |
| 3.2.2 重组 E2 蛋白的表达与纯化 .....          | 24 |
| 3.2.3 免疫效价以及单克隆细胞亚型鉴定.....          | 24 |
| 3.2.4 腹水纯化及鉴定 .....                 | 25 |
| 3.3 CP 蛋白多克隆抗体的制备 .....             | 26 |
| 3.3.1 原核表达 pGEX-6P-1-CP 质粒的构建 ..... | 26 |
| 3.3.2 重组 CP 蛋白的表达与纯化.....           | 27 |
| 3.3.3 多克隆抗血清的制备与鉴定.....             | 27 |
| 3.4 糖基化修饰位点突变重组 GETV 的拯救.....       | 28 |
| 3.4.1 糖基化位点突变质粒的构建与鉴定.....          | 28 |
| 3.4.2 糖基化修饰位点突变毒株的拯救与鉴定 .....       | 29 |
| 3.4.3 糖基化修饰中糖链缺失情况的鉴定.....          | 30 |
| 3.5 去糖基化修饰对 GETV 感染的影响.....         | 30 |
| 3.6 去糖基化修饰对病毒基因组复制的影响 .....         | 31 |
| 3.7 去糖基化修饰影响 GETV 在小鼠体内的毒力.....     | 32 |
| 3.7.1 小鼠的存活与体重变化.....               | 32 |
| 3.7.2 小鼠的组织器官的 H&E 染色 .....         | 33 |
| 3.8 去糖基化修饰对病毒吸附及入侵细胞的影响 .....       | 33 |
| 3.9 去糖基化修饰对病毒蛋白的表达影响 .....          | 34 |
| 3.10 去糖基化修饰对病毒粒子组装的影响 .....         | 36 |
| 4 讨论.....                           | 38 |
| 4.1 GETV 荧光定量 PCR 检测方法的建立 .....     | 38 |
| 4.2 E2 单克隆抗体的制备 .....               | 38 |
| 4.3 糖基化修饰缺失毒株的拯救 .....              | 39 |
| 4.4 糖基化修饰缺失对于病毒生命周期的影响 .....        | 39 |
| 4.5 糖基化修饰对 GETV 在动物体内的影响.....       | 40 |
| 5 结论.....                           | 41 |
| 参考文献.....                           | 42 |

## 摘要

盖他病毒 (Getah virus, GETV) 是披膜病毒科甲病毒属的成员之一, 属虫媒传播病毒, 能感染猪、牛、马等家畜, 引起人及多种脊椎动物发病, 对畜牧生产及公共卫生安全造成一定的威胁。囊膜糖蛋白的糖基化修饰被证实对多种病毒的致病性、抗原性以及病毒复制等有重要影响。在我们前期研究中, 发现 GETV 的 E1 (N141), E2 的 (N200、N262) 发生了 N-糖基化修饰, 它们对 GETV 生物学特性的影响并不清楚。因此, 本研究主要通过构建糖基化位点突变病毒来研究这些糖基化修饰对病毒感染能力及装配的影响。

首先, 为获得糖基化修饰敲除病毒, 我们利用前期建立的反向遗传操作系统, 通过定点突变构建了 7 株重组突变病毒, 包括 3 株单位点突变病毒 GETV<sup>E1N141A</sup>、GETV<sup>E2N200A</sup> 和 GETV<sup>E2N262A</sup>; 3 株双位点突变病毒 GETV<sup>E1N200/262A</sup>、GETV<sup>E1N141A/E2N200A</sup> 和 GETV<sup>E1N141A/E2N262A</sup>; 1 株三位点突变病毒 GETV<sup>E1N141A/E2N200/262A</sup>。经细胞病变分析、基因组测序以及电镜形态学观察等进行鉴定, 证实以上重组病毒构建成功。

为比较拯救毒株和野生病毒在生长特性、致病力及传播能力等方面的差异, 我们测定了病毒蚀斑形成能力、一步生长曲线, 以及利用本研究建立荧光定量 RT-PCR 方法对基因组复制水平的检测和对小鼠的致病力评估等。结果发现, E2N200 位和 E2N262 位糖基化修饰单独缺失对病毒滴度影响不大, E1N141 位糖基化修饰的缺失使病毒滴度降低 10 倍左右, 其中, 同时存在两个及两个位点以上糖基化修饰缺失 (GETV<sup>E2N200/262A</sup>、GETV<sup>E1N141A/E2N200A</sup>、GETV<sup>E1N141A/E2N262A</sup> 和 GETV<sup>E1N141A/E2N200/262A</sup>) 时, 各重组病毒的滴度降低约 100 倍, 但糖基化修饰的缺失对于病毒基因组的复制能力没有影响。通过腹腔注射含有 100 个 TCID<sub>50</sub> 的 GETV<sup>WT</sup>、GETV<sup>E1N141A</sup>、GETV<sup>E2N200/262A</sup>、GETV<sup>E1N141A/E2N200A</sup>、GETV<sup>E1N141A/E2N262A</sup> 及 GETV<sup>E1N141A/E2N200/262A</sup> 重组病毒使小鼠感染, 通过临床症状的观察和死亡情况的统计, 结果显示, 各突变毒株感染后, 死亡时间与亲本毒株相比, 死亡时间延迟 2~4.5 d, 其中 GETV<sup>E1N141A/E2N200A</sup> 组 (2/3) 的小鼠与 GETV<sup>WT</sup> 组 (0/3) 相比存活率升高, 表明去糖基化降低了病毒对小鼠的致病性。

为进一步研究去糖基化对病毒组装的影响, 我们比较了拯救病毒同野生毒株的细胞入侵效率的差异。利用间接免疫荧光 (IFA)、荧光定量 RT-PCR 等方法对病毒的入侵进行测定。结果发现, 糖基化修饰的去除没有降低病毒的入侵效率, 进而我们探究了糖基化修饰对病毒装配的影响, 我们将重组突变病毒感染 BHK-21 细胞, 以野生型病毒作为对照, 开展超微形态学观察以及细胞内蛋白表达的检测。结果发现, 糖基化修饰的缺失导致病毒糖蛋白在细胞内表达量降低, 对病毒的装配能力产生重要影响, 其中 GETV<sup>E1N141A/E2N200A</sup> 的超微切片结果显示, 其衣壳在细胞内大量堆积, 是其毒力降低的主要原因。

本研究对 GETV 囊膜糖蛋白 E1、E2 的 N-糖基化修饰对蛋白功能与病毒生物学特性的影响与分子机制进行研究, 为抗 GETV 药物与疫苗研究提供新的思路与理论基础, 也对甲病毒的致病机理有更深一步的了解。

**关键词:** 盖他病毒; 囊膜糖蛋白; 糖基化修饰; 病毒装配

# Role of N-glycosylation Modification of Getah virus Envelope Glycoproteins in Viral Infection

## Abstract

Getah virus (GETV) is a member of the *alphavirus* genus in the family *Togaviridae*. It is a mosquito-borne virus and infects a variety of host species including pigs, cattle, horses and humans as well, causing diseases such as diarrhea in pigs, pyrexia, body rash, and leg oedema in horses, and fever in humans and a variety of vertebrates. Glycosylation of the envelope glycoproteins has been proved to affect the pathogenicity, antigenicity and viral replication of a variety of viruses. In a previous study, three glycosylation sites, E1(N141), E2(N200) and E2(N262), were identified in GETV, and their influence on the biological characteristics of the virus was unclear. Therefore, the effects of the glycosylation on viral infection and assembly were explored in this study.

To obtain the mutant viruses, we first designed seven mutants based on the reverse genetics operating system established previously by site-directed mutagenesis, including GETV<sup>E1N141A</sup>, GETV<sup>E2N200A</sup>, GETV<sup>E2N262A</sup>, GETV<sup>E1N200/262A</sup>, GETV<sup>E1N141A/E2N200A</sup>, GETV<sup>E1N141A/E2N262A</sup> and GETV<sup>E1N141A/E2N200/262A</sup>. The mutants were successfully rescued as showed by the results of cytopathic effect analysis, genome sequencing and electron microscopy examination.

In order to compare the biological characteristics between the wild type virus and the mutants, we assessed in vitro pathogenicity and transmissibility, plaque formation ability, one-step growth curve, and genome replication level in BHK-21 cells, and in vivo pathogenicity in mice. The results showed that the lack of E2 N200 or E2 N262 glycosylation influenced slightly to the viral titer, but the E1 N141A contributed to a 10 folds decrease of the viral titer. Strikingly, the combined deletion the two or three glycosylation of E1N200/262, E1N141/E2N200, E1N141A/E2N262A or E1N141/E2N200/262 decreased the viral titers about 100 times. However, the absence of glycosylation has no effect on the viral genome replication of all the mutants. Compared to the controls that infected with the same dosage and route of the wild type virus, a mortality delay of 2 to 4.5 days was resulted by intraperitoneally infecting of the mice with 100 TCID<sub>50</sub> of GETV<sup>E1N141A</sup>, GETV<sup>E2N200/262A</sup>, GETV<sup>E1N141A/E2N200A</sup>, GETV<sup>E1N141A/E2N262A</sup>, GETV<sup>E1N141A/E2N262A</sup>, or GETV<sup>E1N141A/E2N200/262A</sup>. The survival rate of GETV<sup>E1N141A/E2N200A</sup> group (2/3) was higher than that of GETV<sup>WT</sup> (0/3). Together, the knock-out of glycosylation decreased the viral proliferation efficacy in vitro and reduced its pathogenicity in mice.

To further investigate the effect of de-glycosylation on viral assembly, indirect immunofluorescence assay (IFA) and real-time RT-PCR were used to detect the cell invasion efficiency of rescued viruses. BHK-21 cells were infected with the mutant viruses or wild-type virus as control. Viral assembly process in the cells was examined by ultrathin sections and intracellular protein expression were detected by

western blot. The results showed that the deletion of glycosylation decreased the expression of envelope glycoproteins in the cells, leading to the accumulation of viral capsids in the cytoplasm and decrease of mature viral particles.

In this study, the influence and molecular mechanism of the N-glycosylation of GETV glycoproteins E1 and E2 on the biological characteristics of viruses were studied, and the results provide new insights into the pathogenic mechanism of alphaviruses.

**Key word:** Getah virus; Envelope glycoprotein; Glycosylation; assembly

**Candidate:** Wei Xinyu

**Speciality:** Clinical Veterinary Medicine

**Supervisor:** Prof. Wang Jingfei

# 1 前言

## 1.1 GETV 概述

### 1.1.1 GETV 的流行病学

盖他病毒 (Getah virus, GETV) 是一种单股正链 RNA 病毒, 属于披膜病毒科 (*Togaviridae*) 甲病毒属 (*Alphavirus*) 成员, 主要通过虫媒传播<sup>[1, 2]</sup>。甲病毒属的病毒根据其疾病特征主要分为旧世界甲病毒和新世界甲病毒, 旧世界甲病毒主要引起关节和肌肉骨骼组织的关节炎<sup>[3, 4]</sup>等症状, 例如基孔肯雅病毒 (Chikungunya virus, CHIKV)<sup>[5]</sup>、辛德毕斯病毒 (Sindbis virus, SINV)<sup>[6]</sup>、阿尼昂尼昂病毒 (O'nyong-nyong virus, ONNV)<sup>[7, 8]</sup>、罗斯河病毒 (Ross river virus, RRV)<sup>[9]</sup>以及马雅罗病毒 (Mayaro virus, MAYV)<sup>[10]</sup>。新世界甲病毒主要引起脑炎等神经系统症状, 例如委内瑞拉马脑炎病毒 (Venezuelan equine encephalitis virus, VEEV)、东部马脑炎病毒 (Eastern equine encephalitis virus, EEEV) 以及西部马脑炎病毒 (western equine encephalitis virus, WEEV)<sup>[11, 12]</sup>。GETV 作为甲病毒属的一员, 其主要引起大部分脊椎动物的关节炎症状<sup>[13]</sup>。

近些年全球多个国家或地区均报道了 GETV 的发生, 自 21 世纪初以来, GETV 流行范围呈现从低纬度热带地区向北扩散的趋势, 在传播演化中已发展出四个基因群 (GI, GII, GIII 和 GIV)<sup>[14]</sup>。1955 年, GETV 首次在马来西亚被报道并分离, 随后传播至欧亚大陆东部和东南亚国家, 包括远东俄罗斯、蒙古、中国、韩国、日本、菲律宾和澳大利亚等<sup>[15, 16]</sup>。我国最早报道发生 GETV 感染于 1964 年, 从海南省库蚊中分离到第一株 GETV。迄今为止, 我国受到 GETV 影响的省份 (直辖市、自治区) 已经增加到 17 个<sup>[17, 18]</sup>。血清学调查显示, 在禽类、牛、羊和人类等动物中均能够检出针对 GETV 的中和抗体, 大多数甲病毒不仅与人类发热性疾病相关, 而且疫情暴发期间对社会经济及生物安全造成了巨大影响<sup>[19]</sup>。已有研究显示 GETV 可以感染马和猪等家畜中且从这些动物身上分离出病毒<sup>[20, 21]</sup>。马感染后通常表现为发热、皮疹和腿部水肿等临床症状, 这曾给日本的赛马业和养殖业造成重大经济损失<sup>[22-25]</sup>; 感染 GETV 的仔猪表现为精神沉郁、震颤、腹泻及后肢瘫痪, 母猪则主要表现为流产和死胎率增加<sup>[26]</sup>。2017 年中国养猪场暴发的 GETV 导致 200 多头仔猪死亡, 150 多头妊娠母猪流产<sup>[27, 21]</sup>, 给部分猪养殖场造成重创。2019 年从中国发热病牛中分离到了 GETV 毒株, 这为 GETV 的感染谱的扩展提供有力证据<sup>[23]</sup>。此外, GETV 还可感染狐狸等野生动物, 引起发热、食欲不振、精神沉郁、神经症状甚至死亡<sup>[28, 29, 11]</sup>。

### 1.1.2 GETV 病原学

GETV 粒子直径约为 70 nm, 病毒结构由内到外依次为基因组、衣壳和囊膜。已解析的 GETV 结构研究显示其囊膜是由 80 个三聚体结构构成, 三聚体结构又由 E1/E2 异二聚体形成。内层核衣壳结构由 240 个衣壳蛋白 (Capsid proteins, CPs) 单体拷贝相互作用交织形成, 囊膜层与内层核衣壳均为 T=4 的二十面体结构, 病毒粒子结构如图 1-1 所示<sup>[30]</sup>。GETV 基因组全长 11.1 kb, 5'端包含一个甲基化的帽子结构, 3'端存在一个 Poly(A)尾<sup>[31]</sup>。病毒基因组包含两个开放阅

读框, 其中开放阅读框 1 (Open reading frame 1, ORF1) 位于病毒基因组的近 5'端, 编码多聚非结构(Non-structure, ns)蛋白 P123 和 P1234, 它们充当病毒 RNA 复制酶 (nsP1-nsP4) 亚基的前体<sup>[32]</sup>。P1234 靠自身催化反应切割为 P123 和 P4, 之后 nsP1 和 nsP2 之间能以很慢的速度进行自身蛋白酶解反应, 形成 nsP1 和 nsP23, 随后 P23 的裂解导致稳定复合体 nsP1-nsP2-nsP3-nsP4 的形成 (图 1-2) <sup>[32-34]</sup>。这些非结构蛋白主要负责病毒 RNA 的转录、复制、多聚蛋白裂解和 RNA 加帽进程<sup>[35]</sup>。ORF2 位于基因组近 3'末端, 在亚基因组启动子 (SGP) 的控制下编码病毒结构蛋白, 包括 CP、E3、E2、6K 和 E1 蛋白。

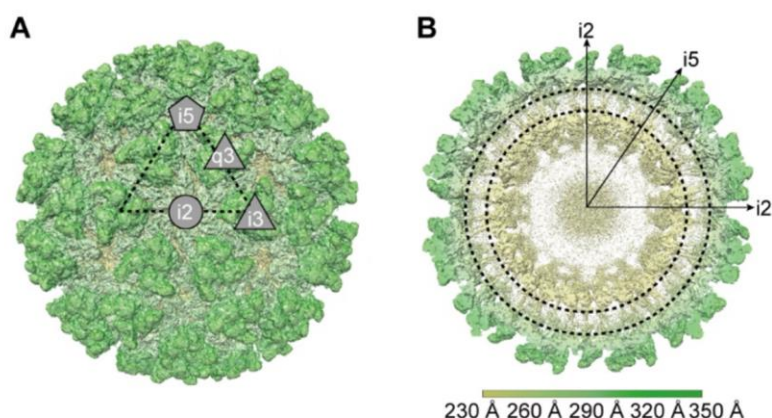


图 1-1 GETV 的病毒粒子结构 (Ming Wang et al. 2022)

Fig 1-1 The structure of GETV

CP 是一种多功能结构蛋白, 主要参与病毒基因组的包裹、病毒出芽和病毒粒子组装等过程<sup>[36, 37]</sup>。CP 可分为两个结构域, 即 N 端结构域和 C 端结构域, N 端富含碱性氨基酸, 参与包裹基因组 RNA 的核衣壳结构形成 (Nucleocapsid, NC) <sup>[38]</sup>。C 端结构域呈糜蛋白酶样折叠, 包含一个保守的疏水口袋, 能够与 E2 蛋白的胞质结构域(cdE2)发生相互作用<sup>[36, 39]</sup>, 是外层囊膜与内部衣壳稳定结合的关键作用力。

E2 蛋白属于 I 型跨膜蛋白, 其胞外域由 4 个不同的结构域 (A、B、C、D) 组成: A 结构域位于刺突表面的中央, 具有假定的受体结合位点; B 结构域位于刺突尖远端, 覆盖 E1 上的融合环; 以及 C 结构域, 位于刺突尖峰的近端<sup>[40]</sup>。E2 的胞外域结构上的 D-loop 结构含有两个高度保守的组氨酸, 已有研究发现这两个组氨酸在酸性环境下能够发生质子化, 允许这些残基与病毒膜上带负电荷的基团相互作用, 这种相互作用可能潜在地锚定 E2 或引起构象重排, 以促进 E1 和 E2 的解离<sup>[41]</sup>。病毒出芽发生在细胞质膜上, 这一过程需要 E2 蛋白胞质结构域与 CP 蛋白上的疏水口袋 1:1 相互作用<sup>[42-44]</sup>。另外, E2 的 C 末端也与 CP 相互作用, 进而稳定病毒粒子结构<sup>[49, 50]</sup>。

E1 蛋白属于 II 型跨膜蛋白, 主要参与介导病毒膜融合过程, 其胞外域可分为三个区域 (DI/DII/DIII), 其中 DI 区域位于中心并通过一个铰链样区域和 DII 连接, DII 区域的尖端远端的底部包含一个高度保守的疏水融合环, DIII 通过一个 Ig-like 折叠结构和 28 个氨基酸与 DI 相连<sup>[45-47]</sup>。当病毒暴露在低 pH 环境下, 能够促使 E1 从 E2 的二聚体解离出来并暴露出融合环, 发生构象变化后形成膜融合的前体三聚体结构<sup>[48, 30]</sup>, DI/DII 铰链区域和 DI/DIII 连接区域的大量移动有助于稳定该三聚体, 从而实现 DIII 和 stem 区域对三聚体的“折叠”机制<sup>[49, 50]</sup>。这一生物过程将细胞和病毒膜紧密结合在一起, 促使病毒核酸释放到细胞质内<sup>[51]</sup>。

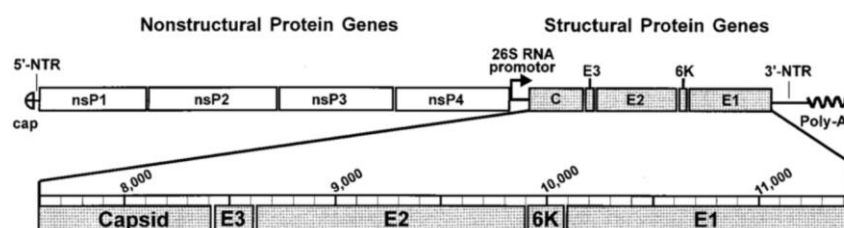


图 1-2 非结构蛋白与结构蛋白 (Linssen B et al. 2000)

Fig. 1-2 Non-structural protein and structure protein

### 1.1.3 GETV 的生命周期

GETV 入侵细胞过程是通过病毒和宿主细胞膜上受体相互作用，从而吸附到细胞膜上来完成的。E2 蛋白与附着因子和细胞膜受体结合后，在网格蛋白介导的内吞作用下发生病毒内化，病毒随后被运输到早期核内体并迅速完成网格蛋白的拆解，从早期核内体到晚期核内体的过程中触发膜融合，pH 值也从 6.5 逐渐降低到 4.6<sup>[52, 53]</sup>。经膜融合后病毒基因组 RNA 进入细胞质中启动基因组复制进程，经转录、翻译编码出来的多聚非结构蛋白切割形成的 P123 和 nsP4 组装成促进基因组复制的早期复制复合体<sup>[54]</sup>。复制复合体形成后聚集于病毒感染宿主细胞内的溶酶体膜及内体膜重排形成的一个空泡结构内<sup>[38]</sup>，在此空泡结构上镶嵌着许多 E1 和 E2 糖蛋白以备病毒粒子的组装<sup>[55]</sup>。

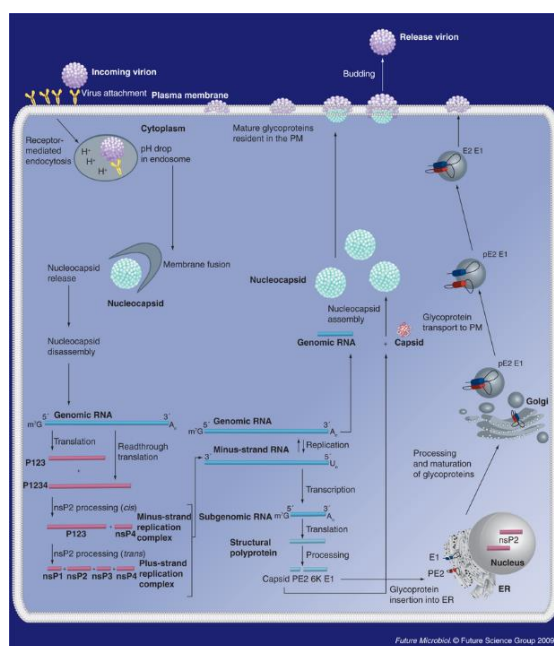


图 1-3 甲病毒生命周期 (Joyce Jose et al. 2009)

Fig. 1-3 Life cycle of alphavirus

组成病毒的所有结构蛋白均来源于 26S 翻译的多聚结构蛋白，首先 CP 从结构多聚蛋白水解下来后与新合成的 RNA 结合，形成 NC<sup>[56]</sup>。E3 蛋白作为一个信差能够引导剩余的多聚蛋白嵌入

内质网，经宿主信号肽酶的处理以及蛋白质的合成加工后，E2 糖蛋白前体 p62 和 E1 糖蛋白在表达后相互作用形成异二聚体<sup>[57]</sup>，这些异二聚体经内质网、高尔基体后被运输到细胞表面<sup>[51, 58, 59]</sup>。在转运后期，p62 在反式高尔基体网络中被弗林样蛋白酶加工成成熟的 E2 和 E3 蛋白<sup>[60, 45, 61]</sup>，经过裂解后 E3 与 E2 两种蛋白在酸性 pH 下保持结合以稳定异二聚体结构，且防止病毒的过早融合<sup>[62, 63]</sup>。另外，p62 还与内质网内的 E1 协同翻译，该相互作用促进 E1 的正确折叠<sup>[64, 65]</sup>。随后，NC 和 E2 的细胞质结构域相互作用后被 E1/E2 二十面体晶格包裹<sup>[44]</sup>，E3 蛋白发生切割后将成熟的病毒粒子释放至细胞膜外，并暴露于中性 pH 环境下<sup>[66]</sup>（图 1-3）。

## 1.2 N-糖基化修饰

### 1.2.1 N-糖链加工过程

糖基化是蛋白质翻译后的一种修饰加工，是在糖基转移酶的作用下将糖链转移到蛋白质上的过程。目前糖基化修饰主要分为两种类型，包括 N-糖基化和 O-糖基化<sup>[67]</sup>。N-糖基化主要是由天冬酰胺作为糖链受体连接新合成的肽链，形式为 N-X-T/S（X 可以为除脯氨酸外的任意氨基酸）。N-糖基化是真核细胞中最常见的蛋白质翻译后修饰之一，主要发生在生物合成过程中<sup>[68]</sup>，新生糖蛋白上的 N-聚糖在内质网中发挥多种作用，对内质网稳态至关重要<sup>[69]</sup>。N-聚糖通过寡糖转移酶(OST)转移到新生蛋白上后，内质网存在的葡萄糖苷酶和甘露糖苷酶会产生一系列聚糖修饰中间体，这些中间体被内质网定位的凝集素特异性识别，随后引导新生蛋白进入蛋白质折叠、蛋白质降解或蛋白质输出途径<sup>[70, 71]</sup>。新合成糖蛋白的 N-糖基化通过凝集素伴侣钙连接蛋白和钙网蛋白来指导其折叠，正确折叠的蛋白质从内质网被转运至高尔基体位置。高尔基甘露糖苷酶和多种糖基转移酶能够催化聚糖的延伸和分支，以产生杂化或复合的 N-聚糖。因此，成熟的 N-聚糖的单个分支可以根据其功能在长度和碳水化合物组成上发生改变<sup>[72]</sup>。

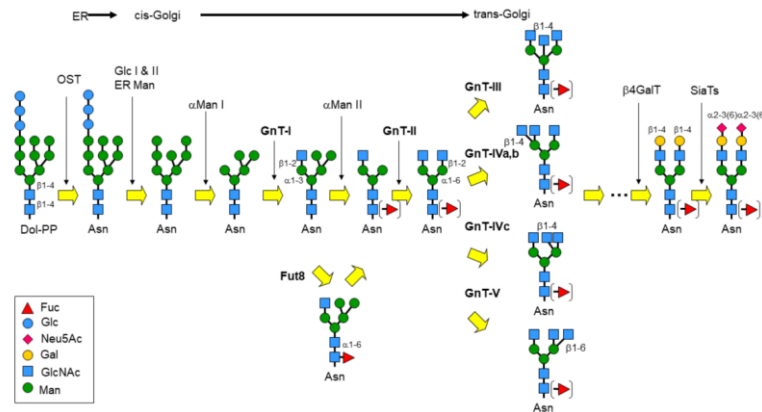


图 1-4 内质网中 N-糖基化修饰 (Masamichi Nagae et al. 2020)

Fig 1-4 N-glycosylation in the Endoplasmic Reticulum

### 1.2.2 内质网及高尔基体中糖蛋白合成的质控机制

内质网(endoplasmic reticulum, ER)中存在大量质控所需的分子伴侣和折叠传感器,它们包括 BiP、钙联蛋白、钙网蛋白、葡萄糖调节蛋白(GRP)94、巯基二硫化物氧化还原酶蛋白二硫化物异构酶(PDI)和 ERp57<sup>[73]</sup>。ER 相关蛋白降解(Endoplasmic reticulum (ER)-associated protein degradation, ERAD)和未折叠的蛋白质反应(Unfolded protein reaction, UPR)是细胞中的两个关键质量控制机制。ERAD 负责清除内质网中错误折叠的蛋白质,以降解胞质蛋白酶体;而 UPR 则响应于错误折叠的蛋白质的积累而被激活。内质网为蛋白质折叠和成熟提供了场所及环境,内质网腔内未折叠糖蛋白的积累可诱导 UPR 通路的启动<sup>[69]</sup>。通常,由于蛋白的不完全折叠或错误折叠会导致其与一个或多个因子结合从而被滞留于内质网中,这能够激活内质网相关的降解途径,以防止缺陷蛋白的积累<sup>[74]</sup>。错误折叠的蛋白质被逆行移位到细胞质中,并在那里被蛋白酶体降解。

糖蛋白的糖基化修饰主要发生在高尔基体,许多蛋白共翻译进入内质网后,必须通过内质网的蛋白质控系统。高尔基体的蛋白质控系统能够对蛋白质进行分类:正确折叠和正确修饰的蛋白前体以及完全组装的蛋白质复合物将继续运输;在高尔基体中没有正确修饰或错误折叠的蛋白质将被回收至内质网或选择性降解<sup>[75]</sup>。而越来越多的错误折叠的蛋白质在高尔基体中被选择后逃避内质网的降解途径,被运送到溶酶体中进行降解<sup>[75]</sup>。因此,蛋白质回收和降解途径是高尔基体质控的两个重要方面<sup>[76]</sup>。

### 1.2.3 蛋白质糖基化修饰在病毒感染中的作用

病毒是专性细胞内感染病原,其需要依赖于宿主的机制来适应它们的病毒蛋白表达,蛋白质糖基化修饰就是常见的一种。近年来的研究表明,许多病毒蛋白,特别是结构蛋白在病毒感染周期中发生了糖基化,发挥了介导免疫逃避和增强免疫细胞感染的作用<sup>[77]</sup>。

例如,血凝素(HA)和神经氨酸酶(NA)是流感病毒中存在的两种主要表面糖蛋白,流感病毒通过 HA 特异性侵入宿主细胞,流感病毒的毒力随着糖基化的增加而降低<sup>[78, 79]</sup>。HA 受体结合位点附近糖基化的改变会改变其对受体的亲和力且 HA 切割位点附近的糖基化也调控病毒的致病性<sup>[80]</sup>。此外,HA 中单个 N-聚糖的缺失与小鼠对病毒的抗性和毒性增加有关<sup>[81]</sup>。在西尼罗河病毒(WNV)中,糖蛋白的糖基化修饰也成熟病毒粒子的组装与释放过程中发挥重要作用<sup>[82, 83]</sup>,WNV 囊膜蛋白的去糖基化可以导致成熟病毒颗粒释放量降低<sup>[84, 85]</sup>。2019 冠状病毒病(COVID-19),是由严重急性呼吸综合征冠状病毒 2 型(SARS-CoV-2)引起的烈性传染性疾病,SARS-CoV-2 的基因组编码大量高度糖基化的蛋白质,而保守的糖蛋白受体结合位点表明,聚糖在病毒感染的传播中起着关键作用<sup>[86, 87]</sup>。日本脑炎病毒(JEV)的两个糖蛋白的去 N-糖基化修饰后导致病毒在小鼠体内的病毒毒力急剧下降<sup>[88]</sup>。丙型肝炎病毒(HCV)编码的两个囊膜糖蛋白 E1 和 E2,分别包含 4 个和 11 个 N-糖基化位点,它们在蛋白质折叠、病毒入侵、免疫反应调节等方面发挥重要作用,参与 HCV 逃避免疫机制<sup>[89, 90]</sup>。鲑鱼甲病毒(SAV)是引起养殖鲑鱼胰腺疾病和睡眠疾病的原因,其糖蛋白 E1 的糖基化修饰缺失后导致无法拯救出有感染性的病毒粒子,因为在细胞培养中无法检测到病毒复制。而糖蛋白 E2 的糖基化修饰缺失后会导致 SAV 在细胞中产生的病变效应降低,病

毒的复制能力也随之下降<sup>[91, 92]</sup>。在罗斯河病毒中, 病毒包膜 N 连接糖基化是皮肤免疫反应和疾病严重程度的关键决定因素, E2 蛋白的 200 位糖基化修饰的缺失会导致病毒在细胞中的复制能力减弱, 糖蛋白与皮肤免疫反应减弱和皮内感染后疾病减少有关<sup>[93, 94]</sup>。

### 1.3 研究目的及意义

GETV 作为一种新发的甲病毒属的成员, 其感染后造成动物的病毒血症、关节炎及神经症状, 且与其他病毒混合感染给养殖业造成巨大损失, 同时其潜在的人兽共患风险严重威胁着动物与人类的生命健康安全。虽然有针对该病的疫苗应用于马场免疫, 但免疫效果较差并不能阻断病毒的感染与传播。基于已报道的关于甲病毒属其他病毒的糖基化相关研究发现囊膜糖蛋白的糖基化修饰在病毒的吸附、入侵、组装、释放、毒力以及免疫逃避等方面均发挥重要作用。然而由于糖基化修饰位点和糖链类型的不同对病毒的影响也存在较大差异, 因此研究病毒糖蛋白糖基化修饰对病毒复制的影响仍然需要深入挖掘。如图 1-5 所示, 基于本团队对 GETV 结构解析发现, GETV 上存在 3 个糖基化位点 (E1 N141, E2 N200 和 E2 N262), 但其在病毒感染中的作用仍不清楚。因此, 本研究以探索 GETV 囊膜糖蛋白 E1、E2 的 N-糖基化修饰对蛋白功能与病毒生物学特性的影响和分子机制为目的, 研究结果将为抗 GETV 药物开发与疫苗创制提供新的思路, 同时为全面了解甲病毒的致病分子机制奠定理论基础。

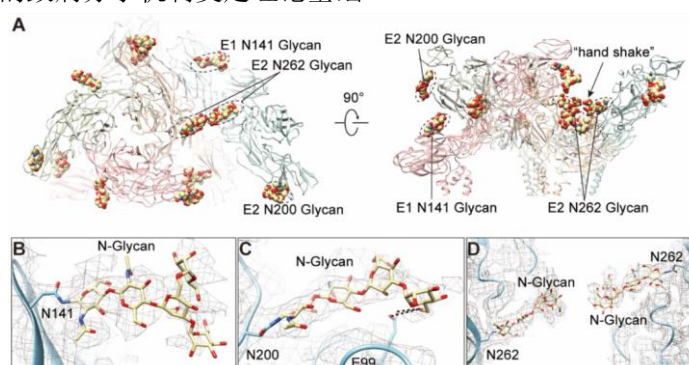


图 1-5 GETV 结构中的糖基化位点 (Ming Wang et al. 2022)

Fig 1-5 The N-linked glycans sites in GETV

## 2 材料与方法

### 2.1 材料

#### 2.1.1 细胞和病毒

非洲绿猴肾细胞 (Vero)、幼仓鼠肾细胞 (BHK-21)、人肾上皮细胞 (293T)、Sf9 细胞及 Hi5 细胞由本实验室保存。GETV SC483 株(GenBank:MN478486.1)由本研究室从四川的猪拭子样品中分离并保存。pOK12-GETV 质粒及 Anti-GETV(SC483)抗血清均由实验室制备保存。

#### 2.1.2 实验动物

从哈尔滨兽医研究所实验动物中心购入 8 周龄雄性 AG129 小鼠 21 只, 从北京维通利华实验动物技术有限公司购入 42 日龄雌性小鼠 11 只、70 日龄雌性小鼠 20 只, 从辽宁长生生物技术公司购入 2.5 kg 雌性新西兰白兔一只。实验动物均饲养于哈尔滨兽医研究所实验动物中心。

#### 2.1.3 实验试剂

表 2-1 实验试剂

Tab. 2-1 Experimental reagent

| 试剂名称                                         | 公司名称            |
|----------------------------------------------|-----------------|
| DMEM 培养基 (C11995500BT)                       | 美国 Gibco 公司     |
| opti-MEM 培养基 (31985-070)                     | 美国 Gibco 公司     |
| 胰酶 (C25200-072)                              | 美国 Gibco 公司     |
| 双抗 (15140-122)                               | 美国 Gibco 公司     |
| 2xTaqman PCR MasterMix(SR2110)               | 北京索莱宝科技有限公司     |
| 2xTaq PCR starMix with loading Dye(A012-101) | 北京康润诚业生物科技有限公司  |
| DH5 $\alpha$ 感受态 (CB101-03)                  | 天根生化科技有限公司      |
| 琼脂糖胶回收试剂盒(DP-219-03)                         | 天根生化科技有限公司      |
| 质粒小提试剂盒 (DP103-03)                           | 天根生化科技有限公司      |
| Exnase II 同源重组连接酶(C112-02-AB)                | 南京诺唯赞生物科技股份有限公司 |
| Hind III(FD0505)                             | 赛默飞世尔科技公司       |
| BamH I(FD0054)                               | 赛默飞世尔科技公司       |
| Xho I (FD0694)                               | 赛默飞世尔科技公司       |
| Bsp119 I (FD0124)                            | 赛默飞世尔科技公司       |

(接下页)

(接上页)

| 试剂名称                                                       | 公司名称                   |
|------------------------------------------------------------|------------------------|
| DAPI 染色液 (D9452-10MG)                                      | 美国西格玛奥德里奇公司            |
| IPTG (367-93-1)                                            | VWR Life Science 公司    |
| Hybridoma Feeder 添加因子 (CM-2001)                            | 北京博奥龙免疫技术公司            |
| KOD-plus-neo (KOD-401)                                     | 日本东洋纺公司                |
| T4 DNA ligase(M0202L)                                      | New England Biolabs 公司 |
| Sma I (FD0664)                                             | 赛默飞世尔科技公司              |
| Xba I (FD0684)                                             | 赛默飞世尔科技公司              |
| 总 RNA 提取试剂盒(BSC52M1)                                       | 北京博迈斯科技发展有限公司          |
| 胎牛血清 (F8318)                                               | 美国西格玛奥德里奇公司            |
| 犊牛血清 (B7447)                                               | 美国西格玛奥德里奇公司            |
| HAT media supplement Hybri-Max™ (H0262)                    | 美国西格玛奥德里奇公司            |
| SBA Clonotyping System-HRP(5300-05)                        | SouthernBiotech 公司     |
| Glutathione Sepharose™ 4B(17-0756-05)                      | GE Healthcare 公司       |
| HiTrap™ protein G HP(29-485-81)                            | GE Healthcare 公司       |
| Ni-NTA Agarose(30230)                                      | 德国 QIAGEN 公司           |
| Freund's Ajuvant,Incomplete(F5506)                         | 美国西格玛奥德里奇公司            |
| Freund's Ajuvant,Complete(F5881)                           | 美国西格玛奥德里奇公司            |
| Soluble TMB substrate solution(PA107-01)                   | 天根生化科技有限公司             |
| Alexa Fluor™ 488 goat anti-mouse IgG(A11001)               | 美国英杰生命技术有限公司           |
| Alexa Fluor™ 594 goat anti-Rabbit IgG (A11012)             | 美国英杰生命技术有限公司           |
| 山羊抗小鼠 IgG (H+L), HRP (BF03001X)                            | 北京博奥龙免疫技术公司            |
| Goat anti-Rabbit IgG (H+L) Secondary Antibody, HRP (31460) | 美国英杰生命技术有限公司           |
| Goat anti-Mouse IgG (H+L) Alexa Fluor™ Plus 800 (A32730)   | 美国英杰生命技术有限公司           |
| Goat anti-Rabbit IgG (H+L) Alexa Fluor™ Plus 800 (A32735)  | 美国英杰生命技术有限公司           |

## 2.1.4 主要仪器设备

表 2-2 主要仪器设备  
Tab. 2-2 Main equipment

| 仪器名称     | 公司名称                  |
|----------|-----------------------|
| 超微量分光光度计 | 德国 IMPLIN 公司          |
| 高通量组织研磨仪 | 德国 QIAGEN 公司          |
| 水平离心机    | 美国 beckman coulter 公司 |

(接下页)

(接上页)

| 仪器名称                            | 公司名称                     |
|---------------------------------|--------------------------|
| 蛋白质层析纯化仪 (AKTA avant)           | 美国 GE 公司                 |
| 高分辨率活细胞共聚焦显微镜 LSM980            | 德国卡尔-蔡司                  |
| 超速离心机                           | Optima XPN-100           |
| 超声细胞破碎仪 (ULTRASONIC)            | 美国 Cole Parmer 仪器公司      |
| 倒置荧光显微镜 (Zeiss Axio Observer 3) | 德国卡尔-蔡司                  |
| 涡旋振荡仪                           | 昊诺斯生物公司                  |
| 台式冷冻离心机                         | 美国 beckman coulter 公司    |
| 二氧化碳细胞培养箱                       | 美国 Thermo Scientific 公司  |
| 生物安全柜                           | 美国 Thermo Scientific 公司  |
| 高速离心机                           | 美国 beckman coulter 公司    |
| 多功能酶标仪                          | 美国 Biotek 公司             |
| 近红外荧光扫描成像系统 (Odyssey CLX)       | 美国莱卡公司                   |
| 荧光定量 PCR 仪 (QuantStudio 5)      | 美国 applied biosystems 公司 |
| 蛋白电泳仪                           | 美国 Bio-Rad 公司            |

## 2.2 试验方法

### 2.2.1 GETV 的 *TaqMan* 荧光定量 PCR 检测方法的建立

#### 2.2.1.1 引物及探针的设计

基于 GETV SC483(GenBank:MN478486.1)的全病毒基因组的序列,选取 nsP3 基因进行特异性引物及探针设计,根据波长范围选择添加 FAM 荧光基团和 TAMRA 淬灭基团,引物和探针均由吉林省库美生物公司进行合成。基因片段扩增全长 250 bp,所使用的引物和探针序列如表 2-3 所示:

表 2-3 引物及探针的序列

Tab. 2-3 sequence of probes and primers

| 引物名称   | 引物序列 (5'-3')                                  |
|--------|-----------------------------------------------|
| NP-F   | TTGCTTAGTCGGCAGAAA                            |
| NP-R   | CCGACATAGACACGGTAC                            |
| probe  | FAM-TTCCACCAGACGGCGGTCTGAC-TAMRA              |
| nsP3-F | CTGTTTCAGGGGCCCCGATCCGCACCGTCATACAGGGTCCGCCGC |
| nsP3-R | CTCGAGTGCGGCCGCAAGCTTTTACGCGCCAGCCCTGCCTAGTC  |

### 2.2.1.2 质粒标准品的构建

以包含 GETV 全基因组的 pOK12-GETV 质粒为模板, 利用 KOD Plus NEO 酶进行 PCR, 扩增目的基因片段。反应体系如下: buffer 5  $\mu\text{L}$ 、10 mM dNTP 5  $\mu\text{L}$ 、 $\text{MgSO}_4$  3  $\mu\text{L}$ 、KOD plus neo 酶 1  $\mu\text{L}$ 、模板 1  $\mu\text{L}$ 、nsP3-F 和 nsP3-R 各 1  $\mu\text{L}$ 、 $\text{H}_2\text{O}$  33  $\mu\text{L}$ , 共 50  $\mu\text{L}$ 。PCR 的反应条件为: 94°C 5 min, 98°C 15 s, 58°C 30 s, 68°C 1 min, 30 个循环后 68°C 7 min。在 37°C 水浴锅中利用 Hind III 和 BamHI 快切酶对 pET29a 载体进行 30 min 的酶切反应, 将扩增产物以及酶切产物利用 1% 琼脂糖凝胶电泳验证, 对符合预期的核酸片段利用琼脂糖胶回收试剂盒进行回收和纯化。在 37°C 30 min 条件下利用同源重组酶 Exnase II 将目标基因连接入线性化 pET29a 载体 (Hind III/BamH I) 中。随后连接产物置于冰上冰浴 5 min, 加入 100  $\mu\text{L}$  的 DH5 $\alpha$  感受态后继续冰浴 30 min, 42°C 热激 60 s 后立即取出置于冰上冰浴 5 min, 加入 900  $\mu\text{L}$  的无抗性的培养基 37°C 摇晃 1 h, 取出 100  $\mu\text{L}$  的菌液利用涂菌玻璃珠涂布卡那霉素抗性平板后置于 37°C 温箱培养 16~24 h。挑取单独生长的菌落利用 KOD Plus NEO 酶进行 PCR 鉴定, 选取鉴定的疑似阳性菌落进行扩大培养, 用质粒小提试剂盒提取质粒后送至吉林省库美生物公司进行测序, 测序正确的质粒用分光光度计测量浓度后计算标准品的拷贝数, 冻存于 -20°C 备用。

### 2.2.1.3 退火温度、引物浓度及探针浓度的优化

加入 12.5  $\mu\text{L}$  的 2 $\times$ taqman PCR mix buffer、0.4  $\mu\text{M}$  probe、NP-F 和 NP-R 各 0.2  $\mu\text{M}$ 、0.5  $\mu\text{L}$  的 Dye I、4  $\mu\text{L}$  的无菌水, 选取  $3.07 \times 10^{10}$  copies/ $\mu\text{L}$  的标准品 1  $\mu\text{L}$  作为模板, 总反应体系为 25  $\mu\text{L}$ 。95°C 15 min, 95°C 15 s, 分别在 55°C、56°C、57°C、58°C、59°C、60°C 退火温度条件下进行扩增, 探针浓度分别选取 0.1  $\mu\text{M}$ 、0.15  $\mu\text{M}$ 、0.2  $\mu\text{M}$ 、0.25  $\mu\text{M}$ 、0.3  $\mu\text{M}$ , 72°C 30 s, 40 个循环进行扩增。根据反应的 Ct 值和扩增曲线选择最合适的探针浓度。

### 2.2.1.4 标准曲线的建立

以重组质粒 (pET29a-nsP3) 为标准品, 进行 10 倍倍比稀释, 共稀释 8 个梯度 ( $10^{-1} \sim 10^{-8}$ ), 即标准品拷贝数为  $3.07 \times 10^9 \sim 3.07 \times 10^2$  copies/ $\mu\text{L}$ , 分别以 1  $\mu\text{L}$  稀释后的标准品作为模板 (无菌水作为阴性对照), 按照已经优化过的退火温度以及探针浓度等条件进行反应, 其中, 每个稀释度做三个重复。所得结果以横坐标为基因拷贝数, 纵坐标为 Ct 值, 绘制标准曲线。

### 2.2.1.5 特异性试验

分别以实验室分离并保存的两株 GETV (SC483 株和 SC266 株) 以及 SINV、猪流感病毒 (H3N2) (Swine influenza virus, SIV)、猪传染性胃肠炎病毒 (Transmissible gastroenteritis virus, TGEV)、猪流行性腹泻病毒 (Porcine epidemic diarrhea virus, PEDV)、猪繁殖和呼吸障碍综合症病毒 (Porcine reproductive and respiratory syndrome virus, PRRSV) 等病毒的基因组 RNA 的反转录产物 cDNA 作为模板, 用上述优化好的反应条件进行扩增, 以无菌水作为阴性对照, 评估该方法的检测特异性。

### 2.2.1.6 敏感性检测

将质粒标准品从  $10^{-1} \sim 10^{-10}$  进行十倍倍比稀释为模板, 使用表 2-3 中的引物分别利用本研究建立的 TaqMan 荧光定量 RT-PCR 方法以及普通 RT-PCR 方法进行扩增反应, 利用上述优化好的

条件进行扩增。两方法中加入等量模板，以无菌水作为阴性对照。

### 2.2.1.7 重复性试验

将质粒标准品从  $10^{-3}$ ~ $10^{-6}$  进行 10 倍倍比稀释作为模板，利用优化后的 TaqMan 荧光定量 RT-PCR 方法进行组内重复试验，每个浓度重复 3 次；在不同的时间提取质粒，并选取上述稀释度质粒标准品作为模板，利用优化后的 TaqMan 荧光定量 RT-PCR 方法进行组间的重复性试验。根据数据的 Ct 值以及标准差(SD)计算组份之间的变异系数。

### 2.2.1.8 感染小鼠组织样品的检测

将含有 100 TCID<sub>50</sub> 的 GETV 通过腹腔注射途径感染 12 只 AG129 小鼠，待小鼠全部死亡后立即解剖，取其心、肝、脾、肺、肾、睾丸、脑等组织样品，研磨、离心后提取 RNA，反转录为 cDNA 后作为模板，利用本研究中建立的 TaqMan 荧光定量 RT-PCR 以及普通 RT-PCR 检测，比较二者的检测结果，并计算二者的符合率。

## 2.2.2 GETV-E2 单克隆抗体的制备

### 2.2.2.1 pFastBAC1-E2 质粒的构建

对 E2 的全长基因序列进行跨膜区预测，截取无跨膜区片段（第 1-358 位氨基酸），在 E2 蛋白的 N 端通过 PCR 扩增的方式引入 gp67 信号肽序列，C 端插入 8×His-tag，引物序列如表 2-4 所示。利用 KOD Plus NEO 酶进行 PCR 扩增，反应体系如下：buffer 5  $\mu$ L、10 mM dNTP 5  $\mu$ L、MgSO<sub>4</sub> 3  $\mu$ L、KOD plus neo 酶 1  $\mu$ L、模板 1  $\mu$ L、pBF-vec-F 和 E2-R-1、E2-R-2 各 1  $\mu$ L、H<sub>2</sub>O 33  $\mu$ L，共 50  $\mu$ L。PCR 的反应条件为：94°C 5 min，98°C 15 s，58°C 30 s，68°C 1 min，30 个循环后 68°C 7 min。

表 2-4 引物及探针的序列

Tab. 2-4 sequence of probes and primers

| 引物名称      | 序列（5'→3'）                                                   |
|-----------|-------------------------------------------------------------|
| pBF-vec-F | CCTCTGGTCATCATCACCATCACCATCACCAYYAAYCYAGAGCCYGCAGYCYCGAGGCA |
| E2-R-1    | ATGATGACCAGAGGGCCCCCTGGAACAGAACTTCCAGGCCTTCAGTTGTCAGCTGGGC  |
| E2-R-2    | CTCGAGACTGCAGGCTCTAGATTAATGGTGATGGTGATGGTGATGATGACCAGAGG    |
| pUC/M13-F | CCCAGTCACGACGTTGTAAAACG                                     |
| pUC/M13-R | AGCGGATAACAATTCACACAGG                                      |

在 37°C 水浴锅中利用 Xba I 和 BamH I 快切酶对 pFastBAC1 载体进行 30 min 的酶切反应，扩增的目的片段以及酶切片段通过琼脂糖核酸电泳进行鉴定，选取目标大小片段利用琼脂糖胶回收试剂盒回收，回收的目的产物在 37°C 30 min 条件下利用同源重组酶 Exnase II 将目标基因连接入线性化 pFastBAC1（BamH I/Xba I）载体中。随后连接产物冰浴 5 min，加入 100  $\mu$ L 的 DH5 $\alpha$  感受态继续冰浴 30 min，42°C 热激 60 s 后立即取出置于冰上冰浴 5 min，加入 900  $\mu$ L 的无抗性的培养基 37°C 摇晃 1 h，取 100  $\mu$ L 的菌液利用涂菌玻璃珠涂布氨苄青霉素抗性平板后置于 37°C 温箱培养 16~24 h。挑取单个生长的菌落，利用 KOD Plus NEO 酶进行 PCR 鉴定，经鉴定的疑似阳

性菌落扩大培养，利用质粒小提试剂盒提取质粒后送至吉林省库美生物科技有限公司进行测序，将测序正确的质粒分装冻存于-20℃备用。

### 2.2.2.2 重组蛋白 E2 的表达与纯化

pFastBAC1-E2 质粒转化至 DH10Bac E.coli 感受态细胞后在 KTG (50 mg/mL 卡那霉素, 7 mg/mL 庆大霉素, 10 mg/mL 四环素, 100 mg/mL x-gal 和 40 mg/mL IPTG) 琼脂培养板进行蓝白斑筛选, 挑取白斑提取杆粒, 将提取出来的杆粒用 pUC/M13-F、pUC/M13-R、pBF-vec-F 及 E2-R-2 引物进行 PCR 验证, 引物序列如表 2-4 所示。当 Sf9 细胞生长密度约为  $0.8 \times 10^6$  个/mL 时, 用 Grace insert medium 将 Sf9 细胞接种于新的六孔板中, 静置 15 min 使其贴壁, 将 PCR 验证正确的杆粒转染至细胞中, 6 h 后更换为含 10% 血清的 Grace insert medium, 于 27℃ 含有 5% CO<sub>2</sub> 的温箱静置培养, 第 4~5 天观察细胞状态。当细胞存在细胞核变圆, 半数细胞漂浮在培养液现象时, 认为此时的细胞产生病变, 将产生的病毒接于 Sf9 悬浮细胞中, 在接毒 4 天后对细胞进行计数, 当细胞密度小于  $1.0 \times 10^6$  个/mL 时, 在 8000 r/min 离心机内 4℃ 条件下离心 40 min, 除去细胞及细胞碎片, 收取细胞上清。取部分上清进行 SDS-PAGE 和 Western blot 鉴定蛋白表达和分泌情况。利用 Ni-NTA Agarose 对目标蛋白进行亲和层析纯化。1 mL 树脂加入后用 20 倍柱体积的 His binding buffer (25 mM Tris-HCl pH8.0, 3 mM DTT, 15 mM 咪唑, 50 mM NaCl) 平衡树脂, 上清反复流穿树脂 2~3 次, 利用 20 倍柱体积的 His binding buffer 洗除杂蛋白, 用 5 mL 的 His elution buffer (500 mM 咪唑, 25 mM Tris-HCl, 50 mM NaCl, 去离子水定容至 1L) 冲洗树脂, 收集流穿液。流穿液浓缩后用分光光度计、SDS-PAGE 以及 Western blot 进行纯度以及浓度的鉴定, 一抗选用 Anti-GETV(SC483), 二抗选用山羊抗兔 Alexa Fluor™ Plus 800。蛋白分装后置于液氮中快速冷冻, 存于-80℃保存备用。

### 2.2.2.3 小鼠免疫与杂交瘤细胞的制备

纯化的蛋白以每只小鼠 100 μg 的蛋白含量与等体积的弗氏完全佐剂用高通量组织研磨仪进行乳化, 待混合试剂滴入水中不发生扩散时即乳化完全。皮下多点注射于 48 日龄的 BALB/C 雌性小鼠的背部, 初次免疫 14 天后进行加强免疫, 此时佐剂更换为弗氏不完全佐剂, 加强免疫 1 周后在对小鼠进行尾部采血, 收集至 1.5 mL 离心管中, 37℃ 温箱静置 1 h, 2000 r/min 离心 20 min 收集血清。ELISA 检小鼠体内产生抗体的水平, 加强免疫后 14 天再次将纯化的重组蛋白 E2 以 100 μg/只的免疫剂量免疫小鼠。第三次免疫后 3 天处死小鼠, 生物安全柜中取小鼠的脾脏与 SP2/0 细胞进行融合, 在加入 Hybridoma feeder 添加因子、HAT 和 20% 血清的 DMEM 培养基中培养 10 天, 取有细胞团生长的孔的细胞培养上清进行 ELISA 检验, 选取反应性强的细胞孔进行亚克隆, 通过多轮扩增和筛选, 获得单克隆细胞。

对筛选单克隆细胞进行扩大培养, 取 100 μL 上清液, 5000 r/min 离心 3 min, 除细胞碎片, 使用 SBA Clonotyping System-HRP kit 抗体亚类鉴定试剂盒对 GETV-E2 蛋白单克隆抗体的亚类进行鉴定。

### 2.2.2.4 腹水的制备与纯化

70 日龄的 BALB/C 雌性小鼠在注射单克隆细胞前三天每只腹腔注射 500 μL 弗氏不完全佐剂以促进腹水的产生。第三天每只小鼠接种  $1 \times 10^5 \sim 1 \times 10^6$  个杂交瘤细胞, 观察小鼠的腹部形态, 待

足够膨大时采集腹水，2000 r/min，4℃离心 20 分钟，弃掉上层油脂后吸上清液，用 Binding buffer (20 mM sodium phosphate, pH7.0) 稀释腹水上清液后用 HiTrap™ protein G HP 预装柱进行抗体的纯化，Elution buffer (0.1 M glycine-HCl, pH2.7) 洗脱蛋白至 1 M 的 Tris-HCl(pH9.0)中和洗脱液中，取部分纯化抗体进行 SDS-PAGE 鉴定抗体纯度。

### 2.2.2.5 抗体的效价测定

以每孔 100 μg 的蛋白抗原 4℃过夜包被 ELISA 板，纯化后的抗体进行二倍比梯度稀释作为一抗，山羊抗小鼠 IgG (H+L)的 HRP 作为二抗，进行 ELISA 试验，作用后用 100 μL 的 TMB 显色底物显色 20 min，50 μL 的 2M 硫酸终止显色，用酶标仪进行检测，计算抗体的效价。

### 2.2.2.6 单克隆抗体的鉴定

以一定剂量的病毒 (MOI=1) 感染 BHK-21 细胞，于 37℃入侵 1 h 后弃掉上清液，用预热的 PBS 洗三次，更换为含有 2%FBS 的 DMEM 培养基，继续在 37℃培养箱中培养 12 h。收集上清液并用 1%的 NP40 裂解细胞，使用纯化的抗体进行 Western blot 的检测，对单克隆抗体的特异性进行评估。

以一定剂量的病毒 (MOI=1) 感染 BHK-21 细胞，于 37℃入侵 1 h 后弃掉上清液，预热的 PBS 洗三次，后换用含有 2%FBS 的 DMEM 培养基，在 37℃培养箱中继续培养 12 h。弃掉上清液，用 PBS 洗三次，加入 4%的多聚甲醛固定液室温固定 30 min，PBS 洗一遍后用 0.3%的 Triton X-100 室温透膜 15 min，PBS 洗三次，加入 5%BSA 室温封闭 1 h，一抗选用纯化的抗体，二抗选用 Alexa Fluor™ 488 goat anti-mouse IgG，同时利用 DAPI 对细胞核进行染色。

将 2 μg 的 pOK12-GETV 质粒通过 PEI 转染试剂转染长至 70%密度的 293T 细胞中，18 h 后弃掉上清，用 PBS 缓冲液缓慢清洗细胞一次，4%多聚甲醛组织细胞固定液室温固定 15 min 后选用 0.3%的 Triton X-100 室温透膜 15 min，PBS 洗三次，5%BSA 室温封闭 1 h，一抗选用纯化的抗体以及高尔基抗体 GM130，二抗选用 Alexa Fluor™ 594 goat anti-mouse IgG，同时 DAPI 对细胞核室温染色 5 min，利用高分辨率激光共聚焦显微镜对细胞染色结果进行观察。

## 2.2.3 GETV-CP 多克隆抗体的制备

### 2.2.3.1 pGEX-6P-1-CP 质粒的构建

选取 CP 全长蛋白 (第 1~268 位氨基酸) 构建至 pGEX-6P-1-GST 载体，CP 蛋白的 C 端插入 PPase 酶切位点序列。利用 KOD-Plus-NEO 酶进行 PCR 扩增，上游引物 (CP-pGEX-F) 序列为：TTCCAGGGGCCCCCTGGGATCCATGAATTACATTCCAACCTCAAACC；下游引物 (CP-pGEX-R) 序列为：GTCACGATGCGGCCGCTCGAGTTACCATCTTCTGTTCCTTCTGG。反应体系如下：buffer 5 μL、10 mM dNTP 5 μL、MgSO<sub>4</sub> 3 μL、KOD plus neo 酶 1 μL、模板 1 μL、CP-F 和 CP-R 各 1 μL、H<sub>2</sub>O 33 μL，共 50 μL。PCR 的反应条件为：94℃ 5 min，98℃ 15 s，58℃ 30 s，68℃ 1 min，30 个循环后 68℃ 7 min。将扩增产物利用 1%琼脂糖凝胶电泳验证，对符合预期的核酸片段进行回收和纯化。在同源重组酶 Exnase II 的作用下，37℃，30 min 将目标基因连接入线性化 pGEX-6P-1(BamHI/Xho I)中。连接后的产物转化至 DH5α 大肠杆菌感受态细胞，37℃温箱培养，挑取单个生长的菌落，经过 PCR 鉴定为阳性菌落扩大培养后送至吉林省库美生物科技有限公司

进行测序验证，将测序正确的质粒命名为 pGEX-CP。

### 2.2.3.2 重组 CP 蛋白的表达与纯化

将 pGEX-CP 质粒转化至 BL21 (DE3) 感受态细胞内进行表达，挑取单独生长的菌落扩大培养，OD 值 0.4~0.6 时加入终浓度 1 mM 的 IPTG，16℃慢速诱导 16~24 h，5000 r/min 离心 5 min，弃掉上清，用 GST binding buffer (25 mM Tris-HCl pH8.0, 10%甘油, 3 mM DTT, 100mM NaCl, 加去离子水定容至 1 L) 重悬管内沉淀至 1.5 mL 体积，超声破碎开 2 s 停 3 s, 1 min 30 s/次，超声 4 次，10000 r/min 离心 30 min 取上清样品进行 Western blot 鉴定表达。鉴定表达的菌液扩大培养至 1 L 体积，诱导后 5000 r/min 离心 30 min，弃掉上清，用 GST binding buffer 重悬瓶内沉淀至 40 mL 体积，超声破碎开 2 s 停 3 s, 1 min 30 s/次，超声 4 次，10000 r/min 离心 30 min 取上清样品。与此同时，取 1 mL GST 树脂，待贮存液流尽后用 20 倍柱体积的 Binding buffer 平衡树脂。离心后的上清样品反复流穿平衡好的树脂 2~3 次，20 倍柱体积的 Binding buffer 流穿洗杂，最后加入 4 mL 的 Binding buffer 并堵住重力柱管底，加入 100  $\mu$ L 的 PPase 酶进行 4℃孵育酶切，期间不断重悬树脂和 buffer 混合液 3~4 次。第二天收集流穿液，流尽后再加入 1 mL Binding buffer 冲洗树脂并收集流穿液。用 30 kDa 的超滤管浓缩流穿液，3000 r/min 离心 5 min/次，分光光度计测量蛋白浓度，用 SDS-PAGE 及 Western blot 对纯化的蛋白进行鉴定，一抗选用 anti-GST tag，二抗选用山羊抗鼠 Alexa Fluor™ Plus 800，液氮分装冻存于 -80℃备用。

### 2.2.3.3 新西兰白兔的免疫

取纯化的蛋白 1 mg 稀释至 300  $\mu$ L 的缓冲液中加入等体积的完全弗式佐剂一起震荡乳化，待混合液在水中不发生扩散时即为乳化完全。将乳化后的蛋白采取多点背部皮下注射，初次免疫 14 天后取 1 mg 蛋白与等体积的弗式不完全佐剂乳化，进行加强免疫，加强免疫一周后耳缘静脉采血制备血清。靶向蛋白用 25 mM 的 Tris-HCl (pH8.5) 在 4℃包被 ELISA 板子，一抗选用制备的血清，二抗选用山羊抗兔 IgG (H+L) 的 HRP，孵育一抗及二抗后用 100  $\mu$ L 的 TMB 显色底物显色 20 min，50  $\mu$ L 的 2M 硫酸终止显色，用酶标仪进行检测，鉴定血清中抗体。

### 2.2.3.4 多克隆抗体的鉴定

以一定剂量的病毒液 (MOI=1) 感染单层的 BHK-21 细胞，24 h 后收集上清，5000 r/min 离心 5 min 后取上清样品加入 SDS-PAGE loading buffer，高温变性 10 min。同时，感染的细胞用 PBS 轻洗三遍后加入 1%NP40 裂解液，冰上裂解 20 min 后 14000 r/min 离心 20 min，弃掉离心管内底层沉淀加入 SDS-PAGE loading buffer，高温变性 10 min。Western blot 的转印过程使用 PVDF 膜，一抗选用制备的 GETV-CP 阳性血清，二抗选用山羊抗兔的 Alexa Fluor™ Plus 800。

## 2.2.4 GETV 糖基化位点突变质粒的构建及鉴定

在 pOK12-GETV 质粒上基于 GETV SC483(GenBank: MN478486.1) 的全病毒基因组的序列选取 Bsp119 I 和 Xho I 双酶切位点，进行点突变质粒的构建，包含 E1、E2 上全部的三个糖基化位点序列在内的一段序列，利用定点突变的方式构建 7 个糖基化位点突变质粒。扩增引物序列如表 2-5 所示，引物由吉林省库美生物公司合成。

以 pOK12-GETV 质粒为模板, 利用 KOD-Plus-Neo 酶扩增目的片段, 反应条件为: 94°C 2 min, 98°C 10 s, 58°C 1 min, 68°C 1 min 30 s, 30 个循环, 68°C 7 min。反应体系中引物及模板用量参照说明书进行添加。根据 Bsp119 I 和 Xho I 快切酶体系添加质粒, 37°C, 30 min 消化全长质粒, 得到载体目的片段。将扩增好的目的片段以及酶切过后的载体片段利用 1% 琼脂糖凝胶电泳验证, 对符合预期的核酸片段用琼脂糖胶回收试剂盒回收及纯化。将回收的扩增目的片段及载体片段利用 T4 DNA ligase 于 16°C 过夜连接, 转化到 DH5 $\alpha$  感受态细胞中, 在 37°C 细菌培养箱中过夜培养。次日挑取单独生长的菌落, 进行 PCR 鉴定, 体系如下: 2xTaq PCR starMix with loading Dye 5  $\mu$ L、GETV-F 和 GETV-R 各 1  $\mu$ L、H<sub>2</sub>O 1  $\mu$ L、菌液模板 2  $\mu$ L, 经核酸电泳鉴定后, 选取疑似阳性样品扩大培养, 并将菌液送至吉林省库美生物公司进行测序验证, 将测序正确的菌液扩增培养, 利用无内毒素大提试剂盒提取质粒, 利用分光光度计测量质粒浓度后分装冻存于 -20°C 备用。

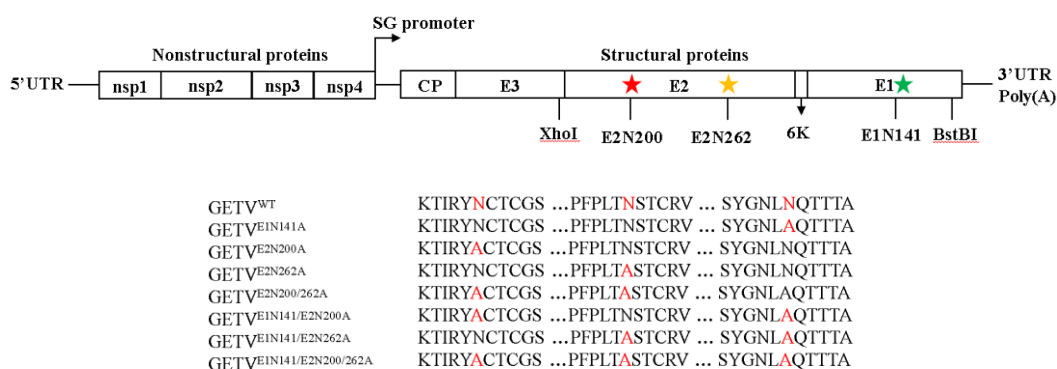


图 2-1 突变质粒设计

Fig. 2-1 Mutant plasmid design

表 2-5 构建糖基化位点突变质粒所需引物

Tab. 2-5 Primers for the construction of plasmids with mutant glycosylation sites

| 引物名称      | 引物序列 (5'→3')                                  |
|-----------|-----------------------------------------------|
| E1N141A-F | AAGTTACGGGAACCTCGCTCAGACAACCACGGCGT           |
| E1N141A-R | ACGCCGTGGTTGTCTGAGCGAGGTTCCCGTAACTT           |
| E2N200A-F | AAAGACCATCAGATACGCCTGCACGTGTGGTAGTG           |
| E2N200A-R | CACTACCACACGTGCAGGCGTATCTGATGGTCTTT           |
| E2N262A-F | ACCTTTCCCTCTGACCGCCTCTACTTGCAAGGTGC           |
| E2N262A-R | GCACCCTGCAAGTAGAGGCGGTCAGAGGGAAAGGT           |
| GETV-F    | GGCTACTACGACCTGCTCGAGGCCACGATGACGTGTAACAACAGT |
| GETV-R    | TGTATGGTGGCTACGTTTGAATGAGAATGGACAGCACATTTTCCG |

## 2.2.5 GETV 糖基化位点修饰缺失毒株的拯救及鉴定

将 BHK-21 细胞均匀铺至 6 孔板中, 待孔中细胞长至 50~70% 密度时, 将构建的突变质粒分

别与 PEI(比例为 1:3)分别用 100  $\mu$ L 的 opti-MEM 进行稀释,将二者吹吸混匀后室温静置 15 min,逐滴加入六孔板中。4 h 后更换含有 2%血清及 1%双抗的 DMEM 培养基,37°C 培养 3~4 d 后观察细胞病变情况。在显微镜下观察细胞发生明显病变后,收取上清液,5000 r/min 离心 5 min 除细胞碎片,分装冻存于-80°C。

利用总 RNA 提取试剂盒提取上清及细胞内的总 RNA,通过反转录试剂盒得到 cDNA,反转录条件为:1  $\mu$ L 的 Oligo dT primer,5  $\mu$ g 总 RNA,1  $\mu$ L 的 dNTP mixture,加 RNase free dH<sub>2</sub>O 定容至 10  $\mu$ L,上述溶液 65°C 5 min 后再加入 4  $\mu$ L 的 5 $\times$ PrimeScript II buffer,0.5  $\mu$ L 的 RNase Inhibitor,1  $\mu$ L 的 PrimeScript II RTase,加 RNase free dH<sub>2</sub>O 定容至 20  $\mu$ L,缓慢混匀后 42°C,30 min 进行反转录反应,将反转录出来的产物利用 GETV-F 和 GETV-R 引物对其进行扩增送去吉林省库美生物公司进行测序。

## 2.2.6 GETV 糖基化修饰缺失的鉴定

将上述的上清液离心除细胞碎片,送至电镜室进行透射电镜负染的病毒粒子形态学观察。与此同时对病毒进行蔗糖密度梯度离心法纯化,将病毒感染细胞 16 h 后收取上清病毒液,4°C 离心机 5000 r/min 离心 30 min 取上清液。将上清液均匀加入超离管中,在超离管底部加入 4 mL 的 20%蔗糖垫,4°C 离心机 100000 g/min 离心 1 h,弃掉上清后用 1 mL 的 PBS 重悬底部病毒粒子。用蔗糖密度梯度制备仪制备 10%~60%的蔗糖梯度,将上述重悬的病毒浓缩液加至最上层,4°C 离心机 100000 g/min 离心 1 h 30 min。收取不同层的溶液进行透射电镜观察,选取病毒层液体加入 100 kDa 大小的超滤管中,2500 r/min 离心 5 min/次,脱糖处理,处理后分装冻存于-80°C 备用。利用 Western blot 及 SDS-PAGE 对纯化的病毒粒子进行去糖基化修饰的鉴定,一抗选用实验室制备的 Anti-GETV(SC483),二抗选用山羊抗兔的 Alexa Fluor™ Plus 800。

## 2.2.7 一步生长曲线及蚀斑试验的测定

### 2.2.7.1 一步生长曲线的测定

将 BHK-21 细胞均匀铺至 12 孔板中,待孔中细胞长至 90%以上密度时,移至 4°C 预冷 15 min 后将含有等体积的病毒稀释液(MOI=10)感染细胞,4°C 吸附 1 h,37°C 入侵 1 h 后弃掉细胞上清,PBS 清洗 3 遍后加入 1 mL 含有 2%血清的 DMEM 培养基,此时为 0 h。每间隔 4 h 收取病毒上清,40 h 为止。将每个时间段收取的细胞上清 5000 r/min 离心 5 min 除掉细胞碎片后测定 TCID<sub>50</sub>,利用 Graphpad 绘制一步生长曲线。

### 2.2.7.2 蚀斑试验的测定

将 BHK-21 细胞均匀铺至 6 孔板中,待孔中细胞长至 95%以上密度时,移至 4°C 预冷 15 min 后将含有 300 个 TCID<sub>50</sub> 等体积的病毒稀释液感染细胞,37°C 1 h 后取出弃掉细胞上清,PBS 清洗 3 遍后加入 2 mL 4%的甲基纤维素培养基,37°C 培养 2~3 天,用配置的结晶紫溶液进行染色,用 Image J 测量蚀斑面积。结晶紫溶液配方:溶液 A:2 g 结晶紫加入 20 mL 的 95%乙醇中;溶液 B:0.8 g 草酸铵加入 80 mL 蒸馏水,A、B 分别粗滤纸过滤,作为贮备液 A、B,使用时 A 液与 B 液 1:4 混合。4%多聚甲醛室温固定 4 min 后结晶紫混合液室温染色 30 min,自来水缓慢冲

掉未染色的结晶紫。

## 2.2.8 吸附及入侵试验

将 BHK-21 细胞均匀铺至 12 孔板中，待孔中细胞长至 80~85%密度时，将 12 孔板移至 4℃ 预冷 15 min 后将等体积的病毒稀释液（MOI=100）感染细胞，4℃ 1 h，37℃ 1 h 后取出弃掉细胞上清，PBS 清洗 3 遍后用 4%多聚甲醛组织细胞固定液室温固定 30 min，PBS 清洗三遍后用 0.3% 的 Triton X-100 对固定的细胞进行透膜处理。一抗选用本实验中制备的 E2 阳性血清，二抗选用 Alexa Fluor™ 488 goat anti-mouse IgG，DAPI 染色液对细胞核进行染色，激光共聚焦显微镜进行观察，Image J 计算平均荧光强度。

## 2.2.9 透射电镜的负染色与超微细胞切片

处理过的病毒样品在放过电的铜网上吸附 5 min，磷钨酸染色 5 min 后送至电镜实验室进行透射电镜观察。

均匀铺至 6 孔板中的 BHK-21 长至单层细胞时，将等量病毒稀释液（MOI=10）感染细胞，37℃ 1 h 后弃掉上清，用预热的 PBS 洗三遍换成含有 2%FBS 的 DMEM 培养基在 37℃培养箱培养 16 h，送至电镜实验室进行细胞切片观察。

## 2.2.10 动物实验

本试验中的实验动物选用 8 周龄雄性 AG129 小鼠 21 只，将小鼠平均分为七组，每组三只，六组攻毒组，一组阴性对照组。攻毒组小鼠分别以 100 个 TCID<sub>50</sub> 腹腔注射六株突变毒株的病毒稀释液 GETV<sup>WT</sup>、GETV<sup>E1N141A</sup>、GETV<sup>E2N200/262A</sup>、GETV<sup>E1N141A/E2N200A</sup>、GETV<sup>E1N141A/E2N262A</sup> 及 GETV<sup>E1N141A/E2N200A/E2N262A</sup> 各 200 μL，阴性对照组腹腔注射等量 DMEM 培养基，每间隔 12 h 称量小鼠体重并观察小鼠生命状态。待小鼠感染病毒死亡后立即解剖小鼠，用高压灭菌后的手术器械从外到内的解剖顺序依次摘取大脑、睾丸、肝、脾脏、肾脏、肺脏、心脏，将组织用 10% 福尔马林固定液固定送至病理实验室进行 H&E 染色组织切片观察。攻毒小鼠全程饲养于隔离器中。

## 2.2.11 统计分析

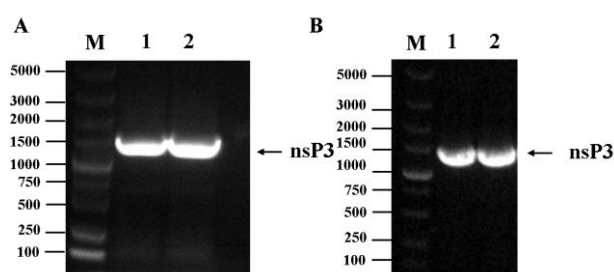
本试验的结果均来源于至少三次独立重复试验，灰度值、荧光强度以及蚀斑面积等均用 Image J 进行统计分析。数据利用 GraphPad Prism 7.0 进行 t 检验及单因素方差分析， $P > 0.05$  时标记为 ns，表示无显著差异； $0.01 < P < 0.05$  时标记为\*，表示显著差异； $P < 0.001$  时标记为\*\*\*，表示差异极显著。

## 3 结果

### 3.1 荧光定量 PCR 检测方法的建立

#### 3.1.1 质粒标准品的构建

以包含 GETV 全长基因组 cDNA 的质粒 pOK12-GETV 为模板，对 nsP3 基因进行特异扩增，电泳结果显示可扩增出与预期大小一致的目的片段（图 3-1A）。将该目的片段经同源重组连接构建至 pET29a 载体上，经菌落 PCR 鉴定（图 3-1B）并测序结果显示成功构建了重组质粒，并命名为 pET29a-nsP3。用分光光度计测定质粒浓度约为 254 ng/μL，经计算其拷贝数为  $3.07 \times 10^{10}$  copies/μL。



注：M： DL5000 DNA Marker; A.1-2: nsP3 基因的 PCR 扩增产物电泳; B.1-2: 菌落 PCR 鉴定

Note: M: DL5000 DNA Marker; A.1-2: Electrophoresis of PCR amplification products of nsP3 gene; B.1-2: Colony PCR identification

图 3-1 nsP3 片段扩增及重组质粒 PCR 鉴定

Fig. 3-1 Amplification of nsP3 and identification of recombinant plasmid by PCR

#### 3.1.2 退火温度及探针浓度的优化结果

分别筛选不同退火温度及探针浓度下扩增曲线，结果显示当退火温度在 58℃，探针浓度在 0.25 μM 时扩增效率高且探针用量少（图 3-2）。最终经过优化，本方法的最优反应体系为 12.5 μL 的 2×taqman PCR mix buffer、0.25 μM probe、NP-F 和 NP-R 各 0.2 μM、0.5 μL 的 Dye I、4 μL 的无菌水，模板 1 μL；反应条件为 95℃ 15 min，95℃ 15 s，58℃ 30 s，72℃ 30 s，40 个循环扩增。

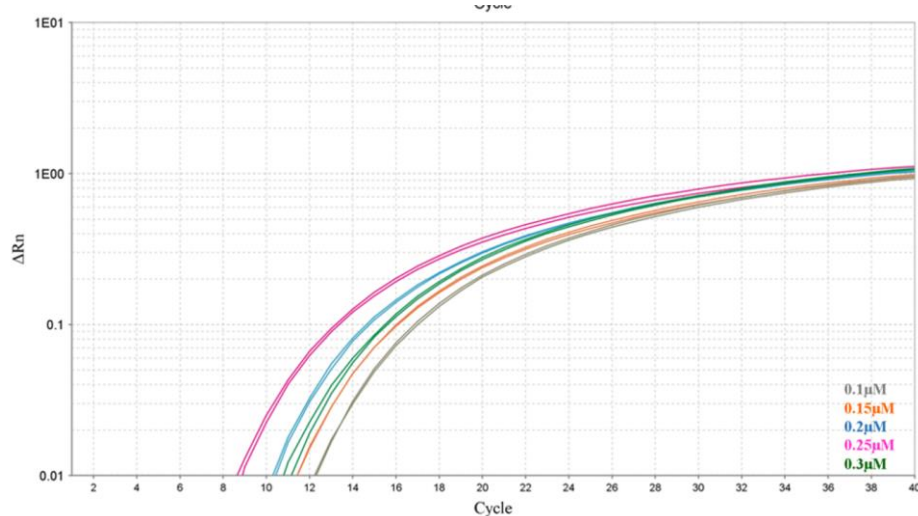


图 3-2 不同探针浓度的扩增曲线

Fig. 3-2 Amplification curves for different concentrations of probes

### 3.1.3 标准曲线及溶解曲线绘制

选取  $3.07 \times 10^2 \sim 3.07 \times 10^9$  copies/ $\mu\text{L}$  稀释度的 pET29a-nsP3 标准品作为模板，基于上述优化的条件进行扩增并绘制标准曲线。结果显示拷贝数与 Ct 值之间呈现良好线性的关系，用标准品绘制的标准曲线的回归方程为： $y = -1.423 \ln(x) + 47.351$ ， $R^2: 0.993$ ，Efficient: 101.914%（图 3-3）。根据图 3-4 溶解曲线结果可知，溶解曲线均在 86~87°C 处出现单一的峰表明反应几乎未出现非特异性反应，具有较高的特异性且无引物二聚体的影响。

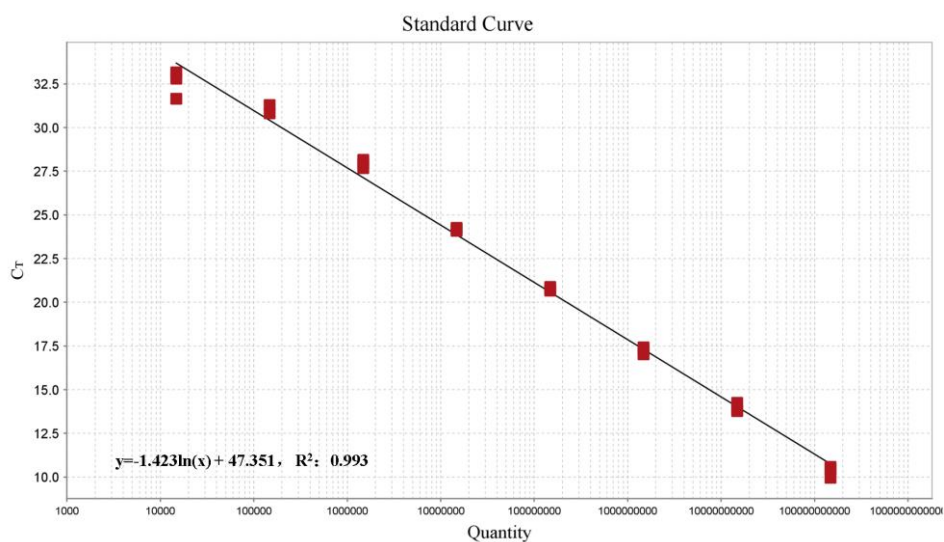


图 3-3 标准曲线

Fig. 3-3 Standard curve

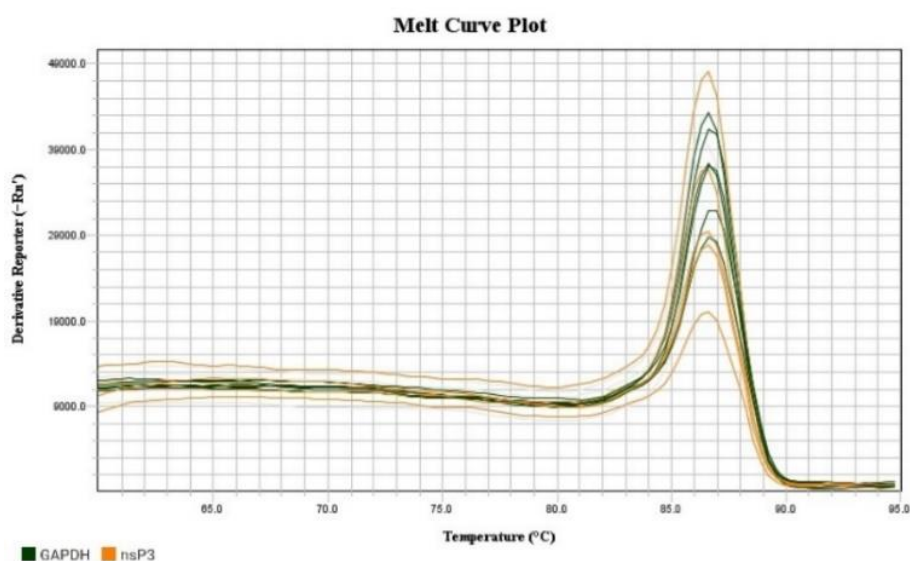


图 3-4 溶解曲线

Fig. 3-4 Melt curve

### 3.1.4 特异性试验

以本实验室分离的两株 GETV (SC483 和 SC266 株) 以及 SINV、SIV、TGEV、PEDV、PRRSV 的病毒基因组 RNA 反转录的 cDNA 作为模板，经优化的 *TaqMan* 荧光定量 PCR 扩增，结果如图 3-5 所示。结果显示除 GETV (SC483 和 SC266 株) 为阳性结果外，其余病毒的检测结果均为阴性，表明本研究建立的荧光定量 PCR 方法特异性较强。

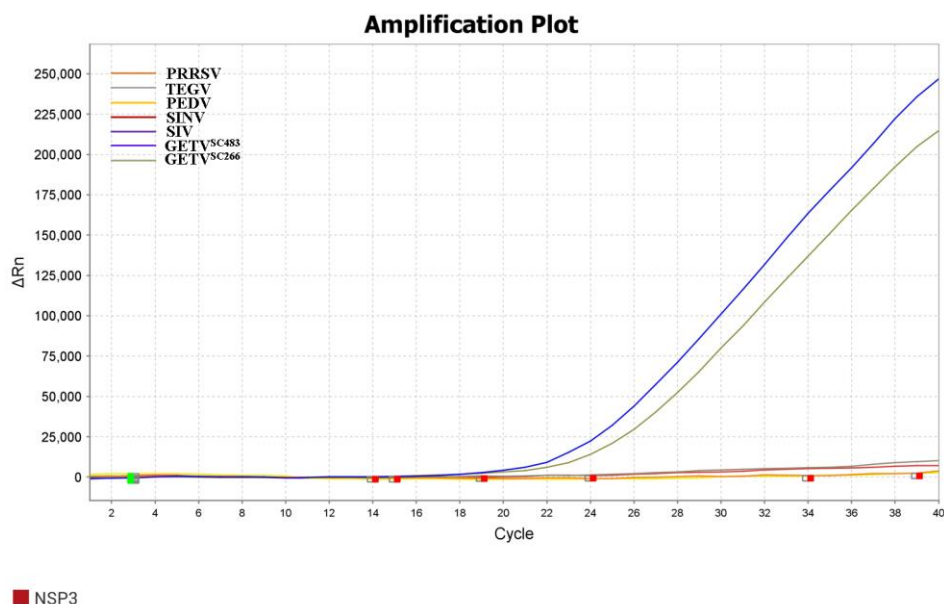
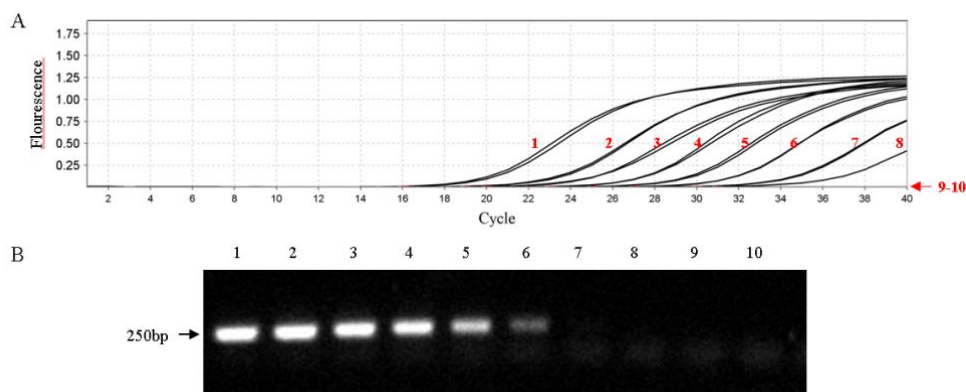


图 3-5 特异性试验

Fig. 3-5 Specificity test

### 3.1.5 敏感性试验

将质粒标准品 pET29a-nsP3 从  $10^{-1}$ ~ $10^{-10}$  进行 10 倍倍比稀释即  $3.07 \times 10^{-1}$  copies/ $\mu$ L~ $3.07 \times 10^8$  copies/ $\mu$ L 作为模板, 分别进行荧光定量 RT-PCR 及普通 RT-PCR 扩增, 结果如图 3-6 所示。结果表明本研究建立的荧光定量 RT-PCR 最低检测限可达 30.7 copies/ $\mu$ L, 普通 RT-PCR 的最低检测限为  $3.07 \times 10^3$  copies/ $\mu$ L。与普通 RT-PCR 法相比, 本研究建立的荧光定量 RT-PCR 方法的敏感性更高。



注: A, B 图中 1-10 分别为:  $3.07 \times 10^{-1}$  copies/ $\mu$ L- $3.07 \times 10^8$  copies/ $\mu$ L 的 pET29a-nsP3

Note: 1-10 were  $3.07 \times 10^{-1}$  copies/ $\mu$ L- $3.07 \times 10^8$  copies/ $\mu$ L of pET29a-nsP3

图 3-6 *TaqMan* 荧光定量 RT-PCR(A)及普通 RT-PCR(B)敏感性试验结果

Fig. 3-6 Comparison of the sensitivity between the *TaqMan* Quantitative Real-time PCR(A) and a common RT-PCR(B)

### 3.1.6 重复性试验

选取稀释度为  $10^{-3}$ ~ $10^{-6}$  的质粒标准品即  $3.07 \times 10^5$  copies/ $\mu$ L~ $3.07 \times 10^8$  copies/ $\mu$ L 的 pET29a-nsP3 作为模板, 分别经组间以及组内的 3 次重复性试验, 根据 Ct 值和标准差(SD)计算变异系数(CV), 结果如表 3-1 所示, 组内以及组间的变异系数均小于 2%, 表明该方法的重复性较好。

表 3-1 荧光定量 RT-PCR 方法的重复性试验结果

Tab. 3-1 The results of the repeatability test of the *TaqMan* Quantitative Real-time PCR

| 浓度<br>(拷贝/ $\mu$ L)<br>Concentration<br>(copies/ $\mu$ L) | 组内重复性试验<br>Intra-assay |                           |                              | 组间重复性试验<br>Inter-assay |                           |                              |
|-----------------------------------------------------------|------------------------|---------------------------|------------------------------|------------------------|---------------------------|------------------------------|
|                                                           | Ct 值<br>Ct value       | 标准差<br>Standard deviation | 变异系数(%)<br>Variability (CV%) | Ct 值<br>Ct value       | 标准差<br>Standard deviation | 变异系数(%)<br>Variability (CV%) |
| $3.07 \times 10^8$                                        | 17.234 $\pm$ 0.206     | 0.193                     | 1.120                        | 17.028 $\pm$ 0.177     | 0.187                     | 1.098                        |
| $3.07 \times 10^7$                                        | 20.758 $\pm$ 0.117     | 0.105                     | 0.506                        | 20.725 $\pm$ 0.033     | 0.213                     | 1.028                        |
| $3.07 \times 10^6$                                        | 24.168 $\pm$ 0.082     | 0.079                     | 0.328                        | 24.250 $\pm$ 0.076     | 0.093                     | 0.384                        |
| $3.07 \times 10^5$                                        | 27.912 $\pm$ 0.238     | 0.240                     | 0.860                        | 27.67 $\pm$ 0.242      | 0.294                     | 1.063                        |

### 3.1.7 感染小鼠组织样品的检测结果

利用本研究建立的荧光定量 RT-PCR 及普通 RT-PCR 方法对 12 只人工感染 GETV 小鼠的 7 种组织脏器（心、肝、脾、肺、肾、睾丸和脑）进行检测。结果如图 3-7 所示，荧光定量 RT-PCR 方法的阳性检出率为 95.24%（80/84），而普通 RT-PCR 的阳性检出率仅为 67.86%（57/84）。荧光定量 RT-PCR 检测到的阳性样品数量分别为心 12 份、肝 12 份、脾 9 份、肺 12 份、肾 12 份、睾丸 12 份、脑 11 份；普通 RT-PCR 检测到的组织阳性样品数量分别为心 8 份、肝 6 份、脾 6 份、肺 10 份、肾 8 份、睾丸 12 份、脑 7 份。经计算，在 7 种组织脏器中的符合率均为 100.00%：心 100.00%（8/8）、肝 100.00%（6/6）、脾 100.00%（6/6）、肺 100.00%（10/10）、肾 100.00%（8/8）、睾丸 100.00%（12/12）、脑 100.00%（7/7），总阳性符合率为 100.00%（57/57）。以上结果表明，本研究建立的荧光定量 RT-PCR 方法相较于传统的 RT-PCR 方法敏感性更高，可以用于 GETV 感染组织样品的检测。

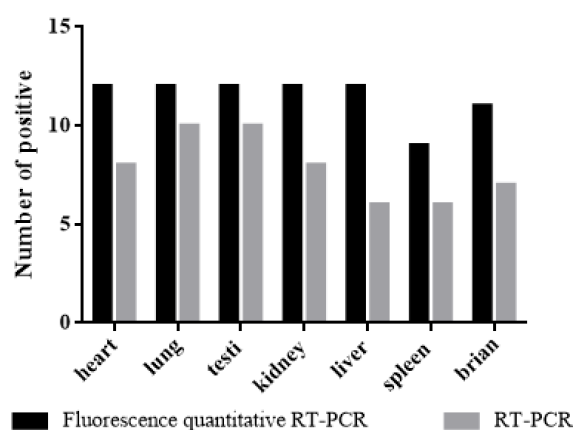


图 3-7 荧光定量 RT-PCR 及普通 RT-PCR 对 GETV 感染小鼠组织样品的检测

Fig. 3-7 Detection of the tissue samples collected from GETV infected mice by the Fluorescence quantitative RT-PCR and a common RT-PCR

## 3.2 E2 蛋白单克隆抗体的制备

### 3.2.1 pFastBAC1-E2 质粒的构建与鉴定

为制备能够特异性识别 GETV 的 E2 蛋白的单克隆抗体，利用杆状病毒-昆虫细胞表达系统进行 E2 蛋白的表达。将 E2 蛋白氨基酸序列提交至网站中进行跨膜区预测（<http://www.detaibio.com/tools/transmembrane.html>），预测结果如图 3-8 所示。E2 蛋白近 C 末端存在单个跨膜域，第 1~364 位为胞外域，第 364~386 位及第 399~421 位为跨膜区，第 386~399 位为胞质域，这与我们前期的结构学研究结果一致。

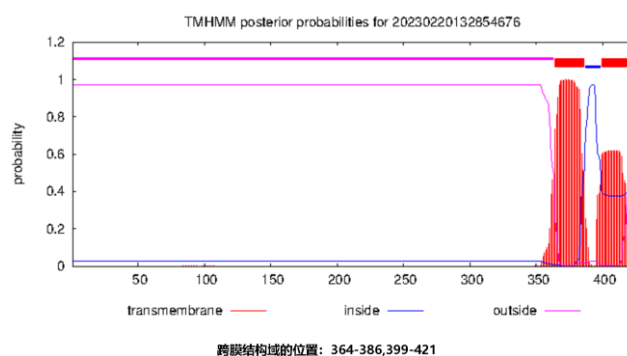
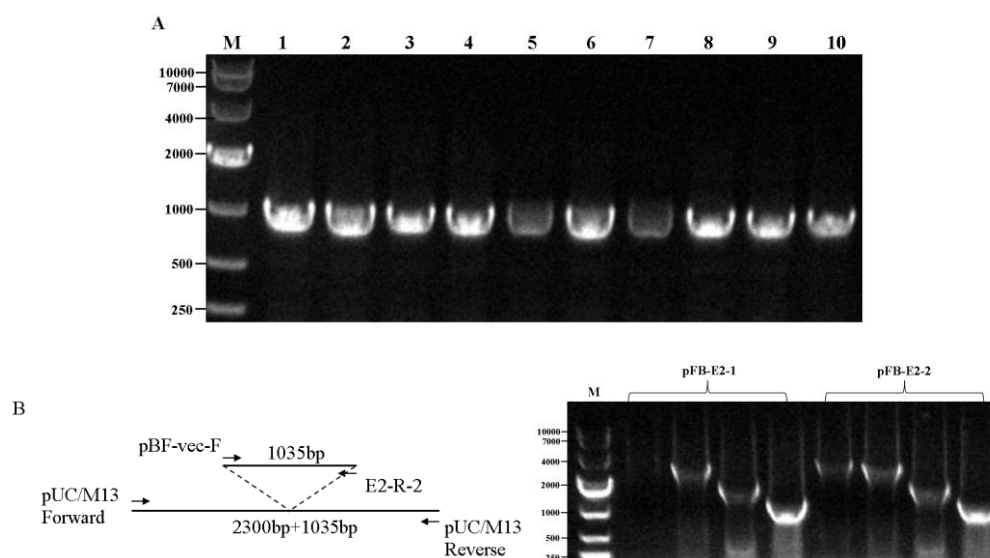


图 3-8 E2 蛋白跨膜区预测

Fig. 3-8 Prediction of transmembrane region of E2 protein

截取 E2 胞外域第 1~358 位氨基酸进行表达, 在第 1、2 位氨基酸中间插入 gp67 信号肽, 指引蛋白质在细胞内的运输, 以促进蛋白分泌到细胞外。在 E2 的第 358 位氨基酸后插入 8×His tag 纯化标签。利用表 2-4 的引物扩增目的片段并将其连接中 pFastBac1 载体上, 经菌落 PCR 鉴定显示所有菌落均可以扩增出与预期大小一致的目的片段 (图 3-9A)。选取 1 号和 2 号菌落提取质粒, 经过测序后与参考序列一致, 命名为 pFB-E2-1 和 pFB-E2-2, 转座进行蓝白斑筛选, 提取的杆粒进行交叉引物的 PCR 鉴定, 结果如图 3-9 (B) 所示。pFB-E2-1 杆粒进行四组 PCR 结果中, pUC/M13F 与 pUC/M13R 引物不能扩增出预期的 3335 bp 大小的目的片段, 而 pFB-E2-2 杆粒的四组引物扩增, 出现的条带均与预期相符。因此选用 pFB-E2-2 进行后续的试验。



注: M: DL 10000 DNA marker; (A) 1~10: 10 个不同的单独生长的菌落 PCR 鉴定; (B) 4 组引物按泳道顺序分别为 pUC/M13F 与 pUC/M13R、pUC/M13F 与 E2-R-2、pBF-vec-F 与 pUC/M13R、pBF-vec-F 与 E2-R-2  
Note: M: DL 10000 DNA marker; (A) 1~10: PCR Identification of 10 Different Separately Growing Colonies; (B) The four sets of primers in swimlane order are pUC/M13F and pUC/M13R; pUC/M13F and E2-R-2; pBF-vec-F and pUC/M13R; pBF-vec-F and E2-R-2

图 3-9 重组质粒 (A) 和重组杆粒 (B) 的 PCR 鉴定

Fig. 3-9 Identification of the recombinant plasmid (A) and the recombinant bacmid (B)

### 3.2.2 重组 E2 蛋白的表达与纯化

将 pFB-E2-2 杆粒转染至 Sf9 细胞中，在 27℃温箱培养 5 天后观察到约 50%的细胞发生病变，收集细胞及上清液，对上清进行纯化后用分光光度计进行 UV 法蛋白浓度测定，结果显示蛋白浓度在 3.6 mg/mL。将纯化的 E2 蛋白浓缩后以浓度为 1000、750、500、250、100 µg/mL 的 BSA 蛋白标准品作为参照，利用 SDS-PAGE 对蛋白浓度进行估算，结果如图 3-10（A）所示，结果显示蛋白浓度与 UV 法测得结果一致，E2 能从细胞中顺利分泌到上清中，表达量较高且杂蛋白少。此外，利用实验室储存的 anti-GETV（SC483）阳性血清对纯化的蛋白进行 Western blot 鉴定，结果如图 3-10（B）所示，目标蛋白可以被抗体特异性识别。以上结果说明成功表达并纯化了重组的 E2 蛋白（rE2），可以用作后续单克隆抗体的制备。

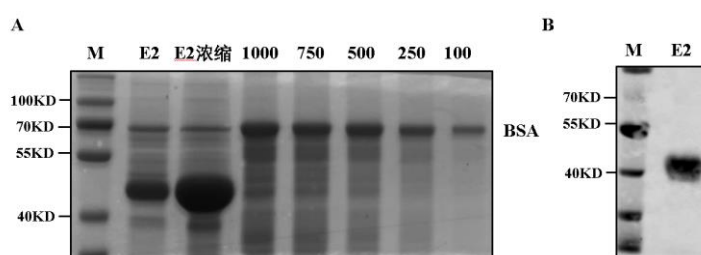


图 3-10 纯化的 E2 蛋白的 SDS-PAGE 及 Western blot 鉴定

Fig. 3-10 Identification of purified E2 protein by SDS-PAGE and Western blot

### 3.2.3 免疫效价以及单克隆细胞亚型鉴定

将重组蛋白 rE2 按照每只小鼠 100 µg/次的蛋白含量通过背部皮下注射的方式接种小鼠。采集免疫后小鼠血清利用 ELISA 对小鼠体内的抗体水平进行检测，结果如表 3-2 所示。结果显示小鼠体内能够产生较高针对 rE2 蛋白的抗体水平，能够继续进行免疫并制备单克隆抗体。当小鼠血清中的抗体水平达到预期后，超净台内无菌摘取小鼠的脾脏，取脾细胞与 SP2/0 细胞进行融合。经过三轮亚克隆筛选出三株单克隆抗体（E2A8、E2B7、E2C7），利用 SBA Clonotyping System-HRP 试剂盒进行抗体亚型的鉴定，结果显示三株单克隆抗体均属于 IgG<sub>1</sub> 亚型，且轻链均为 kappa 链（表 3-3）。

表 3-2 小鼠血清中抗体的 ELISA 检测

Tab. 3-2 Detection of antibodies in mouse serum by ELISA

| 稀释倍数 | E2A8  |       | E2B7  |       | E2C7  |       | negative |       |
|------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|----------|-------|
| 2    | 2.262 | 2.233 | 2.209 | 2.138 | 2.5   | 2.282 | 0.052    | 0.054 |
| 4    | 2.137 | 2.098 | 2.384 | 2.219 | 2.198 | 2.199 | 0.054    | 0.056 |
| 8    | 1.94  | 2.013 | 2.202 | 2.034 | 2.027 | 2.253 | 0.056    | 0.06  |
| 16   | 1.716 | 1.628 | 2.184 | 2.012 | 2.179 | 1.945 | 0.069    | 0.077 |
| 32   | 1.351 | 1.357 | 1.753 | 1.89  | 1.864 | 1.812 | 0.064    | 0.056 |
| 64   | 1.021 | 1.17  | 1.573 | 1.672 | 1.836 | 1.566 | 0.049    | 0.058 |

（接下页）

(接上页)

| 稀释倍数 | E2A8  |       | E2B7  |       | E2C7  |       | negative |       |
|------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|----------|-------|
| 128  | 0.727 | 0.748 | 1.475 | 1.268 | 1.455 | 1.632 | 0.055    | 0.056 |
| 256  | 0.366 | 0.343 | 0.731 | 0.69  | 1.059 | 1.034 | 0.047    | 0.047 |

注：表中 1~3 代表三只小鼠，两列数值包含一次重复

Note: 1 to 3 in the Tab. represent three mice, and the two columns of values contain one repetition

表 3-3 抗体亚型鉴定

Tab. 3-3 Identification of antibody subtype

|                   | E2A8  | E2B7  | E2C7  |
|-------------------|-------|-------|-------|
| IgA               | 0.114 | 0.092 | 0.11  |
| IgM               | 0.087 | 0.054 | 0.093 |
| IgG <sub>1</sub>  | 1.496 | 1.446 | 1.59  |
| IgG <sub>2a</sub> | 0.087 | 0.067 | 0.113 |
| IgG <sub>2b</sub> | 0.084 | 0.068 | 0.106 |
| IgG <sub>3</sub>  | 0.083 | 0.058 | 0.102 |
| kappa             | 0.525 | 0.392 | 0.474 |
| lambda            | 0.059 | 0.055 | 0.077 |

### 3.2.4 腹水纯化及鉴定

将 E2A8、E2B7、E2C7 的杂交瘤细胞计数  $2 \times 10^5$  个接种于小鼠的腹腔，待小鼠肚子膨大后采取小鼠的腹水，取 5 mL 腹水用 Protein G 预装柱在蛋白层析仪 AKTA 进行抗体纯化操作，腹水纯化结果如图 3-11 所示。重链（55 kDa）和轻链（25 kDa）条带清晰，纯化效果较好，无其他杂蛋白存在，蛋白含量较高，用分光光度计 UV 法测量蛋白浓度后稀释至 1 mg/mL 分装冻存于 -80°C 保存。

利用 Western blot 及 IFA 对三株单克隆抗体进行鉴定，Western blot 结果显示制备的单克隆抗体 E2A8、E2B7 和 E2C7 能够特异性识别 GETV 的 E2 蛋白（约 46 kDa）、P62 蛋白 E3/E2，约 54 kDa）及前体多聚蛋白（CP-E3-E2-6K-E1，约 120 kDa）（图 3-12），GETV 感染细胞上清中也能检测到一条明显的反应条带，指示为 E2 蛋白，检测目的条带大小与预期相符。这些结果表明所制备的单克隆抗体能够特异性识别 GETV 的 E2 抗原，可以应用于后续的研究。

间接免疫荧光试验结果显示，制备的三株单克隆抗体中 E2C7 和 E2B7 能够在 GETV 感染的细胞中检测到较强的荧光信号，而在阴性细胞中未检测到荧光信号，结果与预期结果相符，这表明本研究制备的 E2C7 和 E2B7 单克隆抗体可以应用于间接免疫荧光中 GETV-E2 蛋白的检测，其中 E2B7 的特异性更好（图 3-12）。

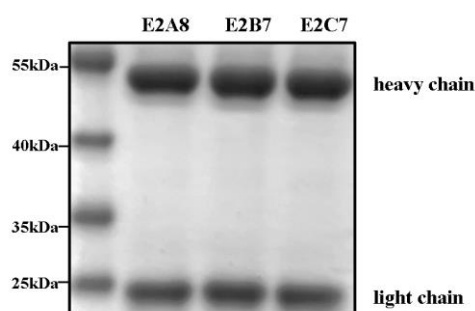


图 3-11 抗体纯化的 SDS-PAGE 鉴定

Fig. 3-11 Identification of purified antibodies by SDS-PAGE

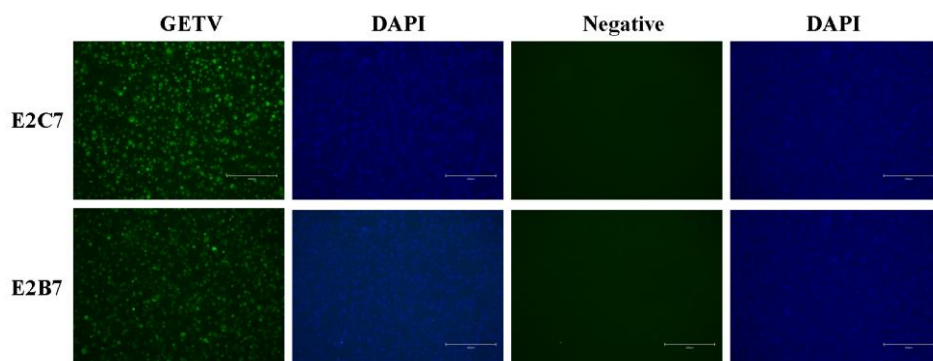
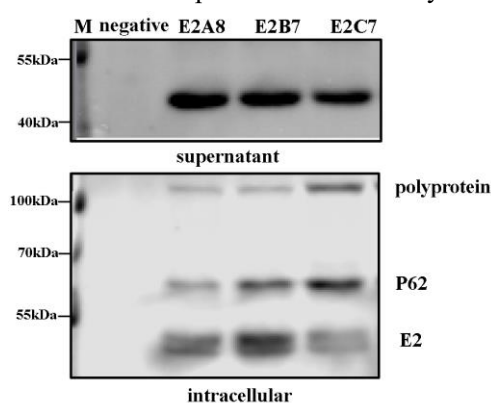


图 3-12 E2 蛋白单克隆抗体的 Western blot 和 IFA 的鉴定

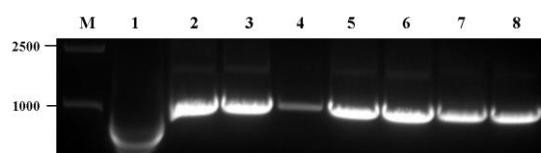
Fig. 3-12 Identification of monoclonal antibodies against E2 protein by Western blot and IFA

### 3.3 CP 蛋白多克隆抗体的制备

#### 3.3.1 原核表达 pGEX-6P-1-CP 质粒的构建

选用大肠杆菌原核表达系统表达全长 CP 蛋白（第 1~268 位氨基酸），利用同源重组的连接方式将 PCR 扩增的目的片段连入 pGEX-6P-1 载体，挑取单独生长的菌落进行 PCR 鉴定，结果如图 3-13 所示，选取 3、5 号样品送测，经比对测序结果正确，将测序正确的质粒命名为 pGEX-

6P-1-CP, 表明质粒构建成功。



注: M: DL15000; 1~8: 8个单独生长的菌落 PCR 鉴定

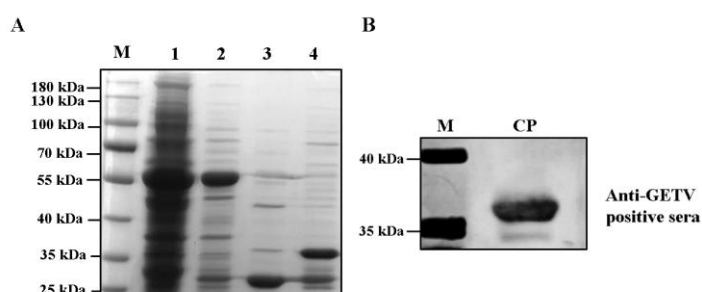
Note: M:DL15000; 1~8:PCR Identification of 8 Separately Growing Colonies

图 3-13 pGEX-6P-1-CP 菌落 PCR 鉴定

Fig. 3-13 Identification of pGEX-6P-1-CP colonies by PCR

### 3.3.2 重组 CP 蛋白的表达与纯化

将 pGEX-6P-1-CP 质粒转化至 BL21 (DE3) 感受态细胞表达蛋白, 利用 GST 标签树脂对重组 CP 蛋白进行纯化, 纯化的蛋白经 30 kDa 的超滤管浓缩, 用分光光度计 UV 法测量纯化的蛋白浓度, 约为 99 mg/mL。用 SDS-PAGE 对纯化蛋白进行鉴定, 结果如图 3-14 (A) 所示, 经过超声破碎后, 上清中出现大量预期大小的蛋白 (约 55 kDa), 将菌体上清反复与 GST 树脂结合使得带有 GST 标签的目标蛋白被特异性结合在树脂上, 经过 PPase 酶切过夜后, GST 树脂上只留下 GST 标签 (约 25 kDa), 存在极少部分未切割完全以及流穿不下的蛋白, 在流穿液中存在大量目标蛋白但存在极少量杂蛋白。如图 3-14 (B), 利用 Anti-GETV(SC483)对纯化蛋白进行 Western blot 鉴定, 结果显示能够检测到特异性条带, 这说明纯化蛋白蛋白正确, 可用于后续的实验动物免疫。



注: 1: 超声破碎后上清中蛋白 2: GST 树脂的结合蛋白 3: PPase 酶切后的树脂 4: PPase 酶切后的目标蛋白

Note: 1: Protein in supernatant after ultrasound fragmentation; 2: Binding proteins on GST resin; 3: Resin after PPase enzyme digestion; 4: Target protein after PPase digestion

图 3-14 纯化的 CP 蛋白的 SDS-PAGE (A) 及 Western blot (B) 鉴定

Fig. 3-14 Identification of purified CP protein by SDS-PAGE (A) and Western blot (B)

### 3.3.3 多克隆抗血清的制备与鉴定

以 1 mg 的蛋白皮下接种免疫新西兰白兔, 免疫两次后耳缘静脉采血制备血清并利用 ELISA 检测兔子体内的抗体效价, 结果如表 3-4 所示。结果显示兔子体内能够产生较高的针对 rCP 蛋白的抗体水平, 说明蛋白免疫成功。当兔子血清中的抗体水平达到预期后进行麻醉, 经心脏采血

获得多克隆抗血清并命名为 anti-GETVCP sera。用 Western blot 对制备的多克隆抗血清进行鉴定结果如图 3-15 所示，感染 GETV<sup>WT</sup> 的 BHK-21 细胞上清中检测到一条与预期大小一致的条带，细胞内在相同位置也检测到条带，且细胞内外均无非特异性反应，这说明该 anti-GETVCP sera 可以用作 Western blot 中特异性识别 GETV 的 CP 蛋白（约 35 kDa）。

表 3-4 兔子血清中抗体的 ELISA 检测结果

Tab. 3-4 Results of ELISA of antibodies in rabbit serum

| 稀释倍数 | CP    |       | Negative |       |
|------|-------|-------|----------|-------|
| 4    | 2.12  | 2.461 | 0.057    | 0.047 |
| 8    | 2.215 | 2.319 | 0.047    | 0.051 |
| 16   | 2.033 | 2.19  | 0.06     | 0.063 |
| 32   | 2.014 | 2.138 | 0.056    | 0.048 |
| 64   | 1.919 | 2.256 | 0.055    | 0.057 |
| 128  | 1.817 | 1.783 | 0.054    | 0.045 |
| 256  | 1.345 | 1.505 | 0.054    | 0.053 |
| 512  | 1.068 | 1.169 | 0.045    | 0.054 |

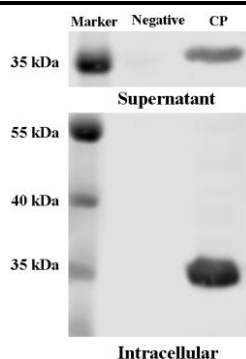


图 3-15 Anti-GETVCP sera 的 Western blot 鉴定

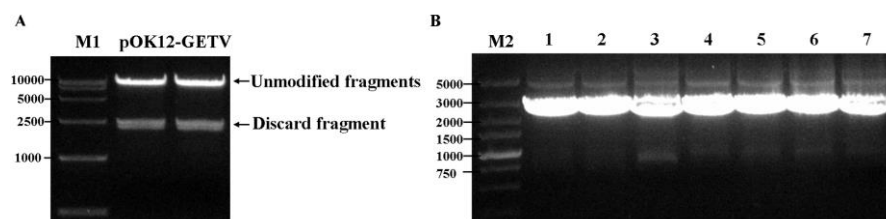
Fig. 3-15 Identification of anti-GETVCP sera by Western blot

### 3.4 糖基化修饰位点突变重组 GETV 的拯救

#### 3.4.1 糖基化位点突变质粒的构建与鉴定

利用定点突变的方式将糖基化位点的天冬酰胺（N）突变成丙氨酸（A），扩增的 7 个目的片段大小与预期一致，pOK12-GETV 酶切产物鉴定结果如图 3-16（A）所示，可见两条清晰的不同大小条带，其中位于 10000 bp 左右的条带为未改造 GETV 基因组-pOK12 片段，而位于 2500 bp 位置条带为含糖基化位点的 E1/E2 片段，两目的条带大小与预期一致，回收 10000 bp 位置目的片段备用。将改造的 7 个目的片段分别与未改造 GETV 基因组-pOK12 片段利用同源重组连接，经菌落 PCR 鉴定结果显示扩增条带与预期大小一致（图 3-16B），测序鉴定结果显示所有改造目的基因发生与预期相符的氨基酸突变，且其他位置未发生突变，这表明成功构建各糖基化修饰

位点突变的重组质粒，将质粒分别命名为 pOK-GETV<sup>E1N141A</sup>、pOK-GETV<sup>E2N200A</sup>、pOK-GETV<sup>E2N262A</sup>、pOK-GETV<sup>E1N141A/E2N200A</sup>、pOK-GETV<sup>E1N141A/E2N262A</sup>、pOK-GETV<sup>E2N200/262A</sup> 及 pOK-GETV<sup>E1N141A/E2N200/262A</sup>，构建的质粒分装冻存于-20℃备用。



注：M1：DL15000 DNA marker、M2：DL5000 DNA marker；1：pOK-GETV<sup>E1N141A</sup>、2：pOK-GETV<sup>E2N200A</sup>、3：pOK-GETV<sup>E2N262A</sup>、4：pOK-GETV<sup>E1N141A/E2N200A</sup>、5：pOK-GETV<sup>E1N141A/E2N262A</sup>、6：pOK-GETV<sup>E2N200/262A</sup>、7：pOK-GETV<sup>E1N141A/E2N200/262A</sup>

Note: M1: DL15000 DNA marker、M2: DL5000 DNA marker；1: pOK-GETV<sup>E1N141A</sup>、2: pOK-GETV<sup>E2N200A</sup>、3: pOK-GETV<sup>E2N262A</sup>、4: pOK-GETV<sup>E1N141A/E2N200A</sup>、5: pOK-GETV<sup>E1N141A/E2N262A</sup>、6: pOK-GETV<sup>E2N200/262A</sup>、7: pOK-GETV<sup>E1N141A/E2N200/262A</sup>

图 3-16 载体酶切 (A) 及菌落 PCR 鉴定 (B)

Fig. 3-16 Carrier enzyme digestion (A) and colony PCR identification (B)

### 3.4.2 糖基化修饰位点突变毒株的拯救与鉴定

利用 PEI 转染试剂将 pOK-GETV<sup>E1N141A</sup>、pOK-GETV<sup>E2N200A</sup>、pOK-GETV<sup>E2N262A</sup>、pOK-GETV<sup>E1N141A/E2N200A</sup>、pOK-GETV<sup>E1N141A/E2N262A</sup>、pOK-GETV<sup>E2N200/262A</sup> 及 pOK-GETV<sup>E1N141A/E2N200/262A</sup> 突变质粒分别转染至 70~80%密度的 BHK-21 细胞中。感染后 3~4 天于显微镜下观察细胞出现明显病变，此时收集细胞上清，5000 r/min 离心 5 min 除细胞碎片后吸取上清液进行透射电镜负染色观察，结果如图 3-17 所示。

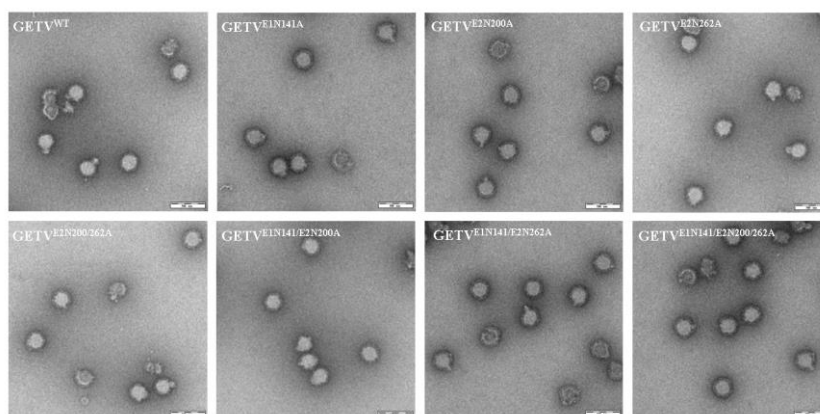


图 3-17 重组 GETV 的病毒粒子的形态观察

Fig. 3-17 Morphologic observation of the recombinant GETV virions

电镜下观察到各重组质粒转染的细胞上清中均存在病毒粒子，并且其形态和尺寸大小与野生型重组病毒无明显差异。提取细胞内及上清中的 RNA 进行反转录，利用 GETV-F 和 GETV-R

引物进行 PCR 扩增, 结果显示可以扩增出特异性条带。测序结果显示在拯救的各点突变的重组 GETV 毒株中, 改造的目标基因与质粒一致且其余位置氨基酸均未发生突变。这些结果说明本研究成功构建并拯救了含有糖基化位点突变的重组 GETV, 将各重组毒株分别命名为 GETV<sup>E1N141A</sup>、GETV<sup>E2N200A</sup>、GETV<sup>E2N262A</sup>、GETV<sup>E2N200/262A</sup>、GETV<sup>E1N141A/E2N200A</sup>、GETV<sup>E1N141A/E2N262A</sup> 及 GETV<sup>E1N141A/E2N200/262A</sup>。

### 3.4.3 糖基化修饰中糖链缺失情况的鉴定

所有重组毒株利用蔗糖密度梯度纯化方法纯化各糖基化位点突变的重组 GETV, 经 SDS-PAGE 和 Western blot 鉴定重组毒株囊膜糖蛋白去糖基化修饰情况, 结果如图 3-18 所示。与 GETV<sup>WT</sup> 相比, GETV<sup>E1N141A</sup>、GETV<sup>E2N200A</sup>、GETV<sup>E2N262A</sup>、GETV<sup>E2N200/262A</sup>、GETV<sup>E1N141A/E2N200A</sup>、GETV<sup>E1N141A/E2N262A</sup> 及 GETV<sup>E1N141A/E2N200/262A</sup> 的囊膜蛋白的迁移率均呈现不同程度的提高, 而 CP 蛋白的表达并未受到糖基化修饰位点突变的影响 (约 35 kDa)。综上所述, 通过糖基化修饰位点的突变, 成功去除各糖基化修饰的侧链。

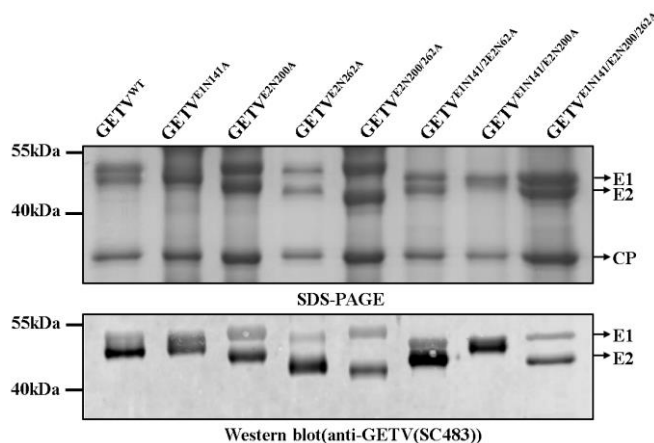


图 3-18 去糖基化修饰的鉴定

Fig. 3-18 Identification of deglycosylated modifications

## 3.5 去糖基化修饰对 GETV 感染的影响

为了验证去糖基化修饰是否影响病毒在细胞内的感染, 我们进行一步生长曲线测定及蚀斑试验。如图 3-19 所示, 以 10 MOI 感染剂量感染 BHK-21 细胞时, 感染后 4 h 能够检测到释放到细胞外的成熟 GETV 的病毒粒子, 且所有的突变毒株在这一时间点与野生型相比没有明显差别; 然然而随着时间的推移, 各突变株与野生型相比均出现不同程度的毒力减弱 (除 GETV<sup>E2N200A</sup> 外), 滴度与野生型 GETV 相比降低 10~100 倍。四株重组突变病毒的滴度降低最为明显, 分别为 GETV<sup>E2N200/262A</sup>、GETV<sup>E1N141A/E2N200A</sup>、GETV<sup>E1N141A/E2N262A</sup> 及 GETV<sup>E1N141A/E2N200/262A</sup>, 均降低约 100 倍。

以含有 300 个 TCID<sub>50</sub> 的病毒稀释液感染 BHK-21 细胞, 用 5% 的甲基纤维素培养三天后进行结晶紫染色观察空斑的形成情况, 结果如图 3-20 所示, 突变毒株的去糖基化修饰导致其在细胞上形成的蚀斑减小。对不同重组突变毒株的蚀斑形成情况进行图片拍摄, 用 Image J 软件对蚀

斑形成面积进行量化分析, 结果显示所有重组突变病毒形成的斑块面积均小于亲本毒株, 其中 GETV<sup>E2N200/262A</sup>、GETV<sup>E1N141A/E2N200A</sup> 及 GETV<sup>E1N141A/E2N200/262A</sup> 的斑块面积减小明显且差异显著, 这表明此三株重组 GETV 的去糖基化修饰对病毒的感染性影响较大。以上结果说明 GETV 中 E1 (N141)、E2(N200、N262)的糖基化位点同时存在两个及两个以上修饰缺失时, 能够影响病毒在细胞中的复制能力。

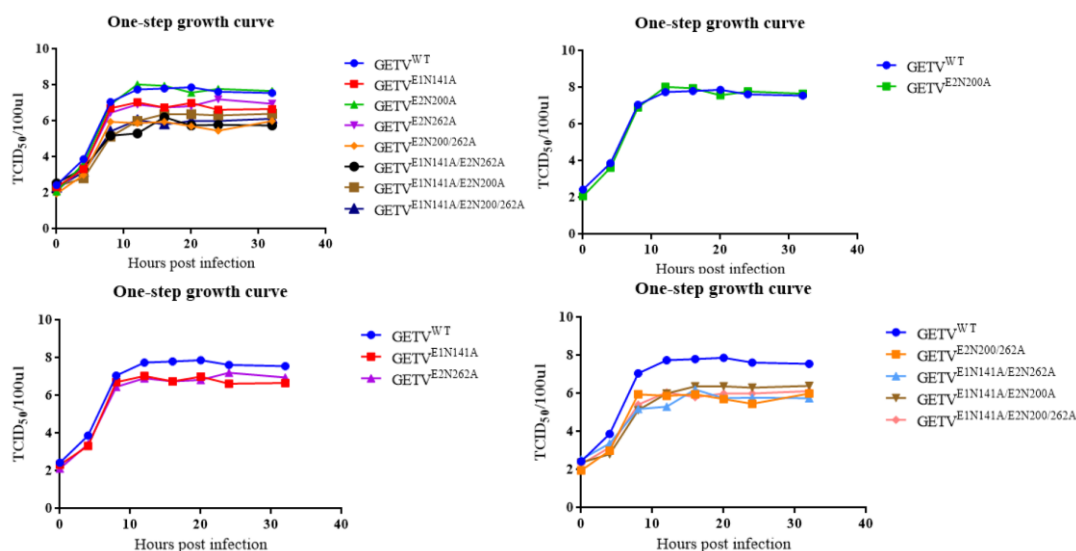
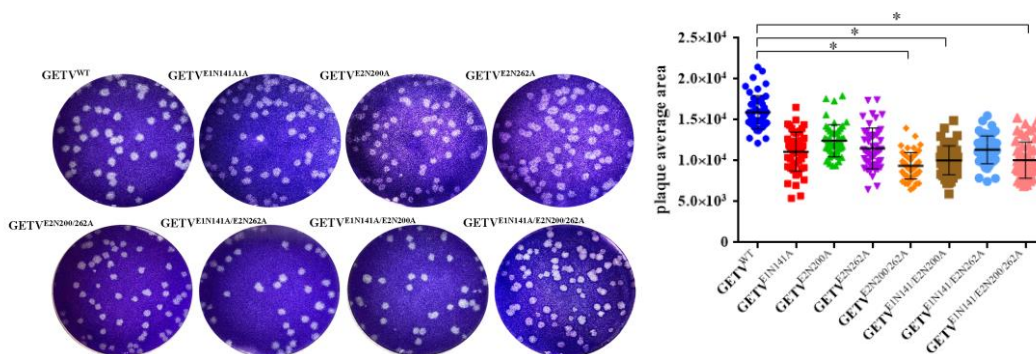


图 3-19 重组 GETV 的一步生长曲线

Fig. 3-19 One-step growth curve of the recombinant GETV



注: \*表示各组与 GETV<sup>WT</sup> 相比差异显著 ( $p < 0.05$ )

Note: \* represents a significant difference between the groups compared to GETV<sup>WT</sup> ( $p < 0.05$ )

图 3-20 蚀斑面积统计分析

Fig. 3-20 Analysis of plaque area

### 3.6 去糖基化修饰对病毒基因组复制的影响

以一定感染剂量 (MOI=10) 病毒感染 BHK-21 细胞, 每次间隔一个小时取样, 弃掉上清后用 PBS 清洗 3 次细胞, 提取细胞内的总 RNA, 用上述建立的进行荧光定量 PCR 方法对细胞内

病毒基因组水平进行检测, 结果如图 3-21 所示。结果显示 0~2 h 病毒的基因组 RNA 为启动复制, 3 h 后细胞内病毒基因组 RNA 水平开始呈对数上升, 表明各毒株开始启动基因组复制。与野生型 GETV 相比, 重组突变病毒的基因组复制趋势相似, 表明糖基化修饰的缺失对于病毒在基因组的复制无明显的影响。

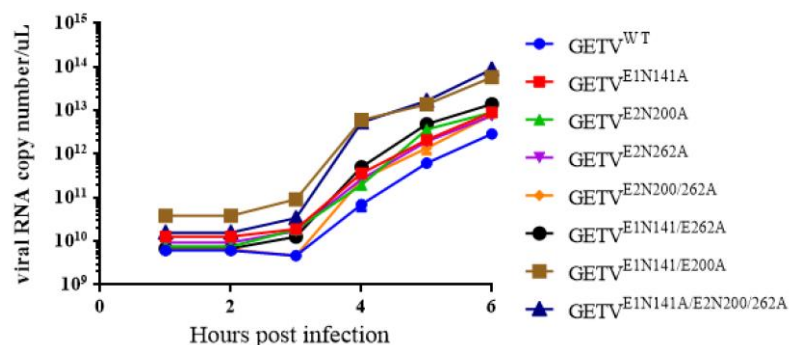


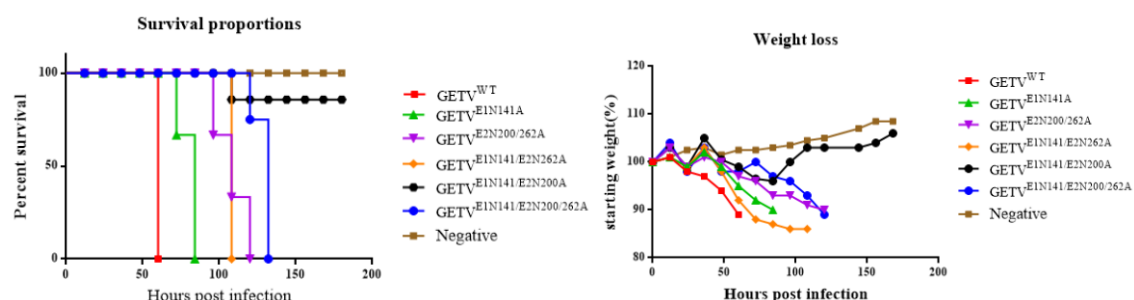
图 3-21 细胞内病毒基因组 RNA 复制水平检测

Fig. 3-21 Detection of the replicate level of intracellular genome RNA

## 3.7 去糖基化修饰影响 GETV 在小鼠体内的毒力

### 3.7.1 小鼠的存活与体重变化

以 100TCID<sub>50</sub> 通过腹腔注射病毒稀释液感染 AG129 小鼠, 每间隔 12 h 称量小鼠体重, 并观察小鼠的健康状态, 感染组及对照组存活率结果如图 3-22 所示。与 GETV<sup>WT</sup> 相比, 重组突变毒株感染小鼠后, 感染病毒的小鼠出现精神不振, 对外界刺激反应迟钝, 被毛无光泽, 大部分呈竖立状态, 在此过程中小鼠体重逐渐减轻, GETV<sup>WT</sup> 组最先出现死亡, 而其他重组突变病毒毒感染小鼠的死亡时间呈现不同程度的推迟, 其中 GETV<sup>E1N141A/E2N200A</sup> 小鼠于感染 200h 后, 仍有 2/3 存活, 且随着时间增加该组小鼠体重恢复, 直至 15 d 后与阴性对照小鼠无明显状态差异, 表明 GETV<sup>E1N141A/E2N200A</sup> 在小鼠体内的致病力下降。



注: \*\*\*表示与 GETV<sup>WT</sup> 相比差异极显著 ( $p < 0.001$ )

Note: \*\*\* represents a significant difference compared to GETV<sup>WT</sup> ( $p < 0.001$ )

图 3-22 不同毒株感染小鼠存活率与体重变化

Fig. 3-22 Survival rate and weight loss of mice infected with different strains

### 3.7.2 小鼠的组织器官的 H&E 染色

待被感染的小鼠死亡后立即在生物安全柜内对小鼠进行解剖，按顺序依次摘取脑、睾丸、肾、脾、肺、肝、心部位，立即浸泡在 10%福尔马林的固定液中，室温摇晃固定 24 h 送至病理实验室进行 H&E 染色的切片观察，结果如图 3-23 所示。结果该病毒主要攻击小鼠的脾脏，本试验中主要体现在脾脏中出现明显的异常，感染病毒死亡的小鼠红髓扩张，红细胞蓄积，部分巨噬细胞增生，白髓淋巴细胞大量坏死减少，可见均质化坏死及蛋白样渗出，GETV<sup>E1N141A/E2N200A</sup> 存活以及阴性小鼠的淋巴细胞数量多且聚团，状态良好，GETV<sup>E1N141A/E2N200/262A</sup> 的淋巴细胞呈大量分散状态。

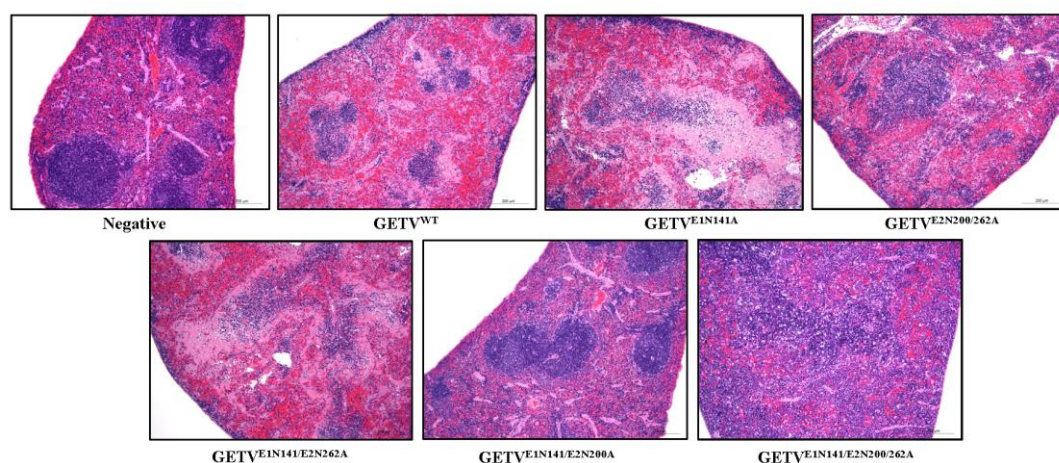


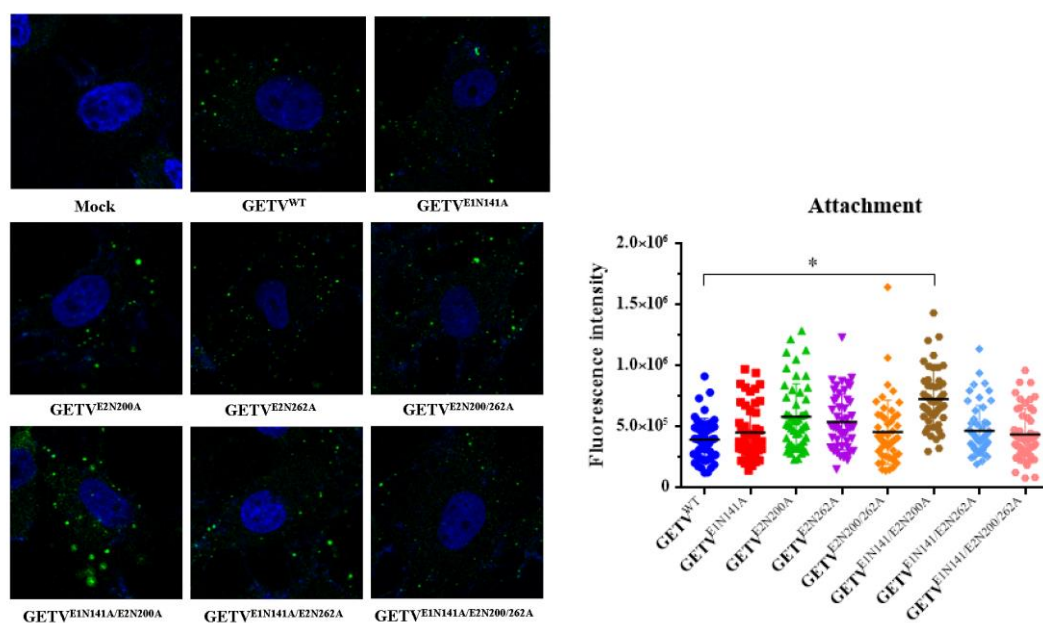
图 3-23 小鼠的脾脏的 H&E 染色

Fig. 3-23 H&E staining of mouse spleen

### 3.8 去糖基化修饰对病毒吸附及入侵细胞的影响

以一定感染剂量 (MOI=100) 的病毒感染 BHK-21 细胞，在激光共聚焦显微镜下对吸附在细胞表面的病毒粒子进行特异性检测，结果如图 3-24 所示。未感染病毒的细胞未检测到特异性荧光信号，而感染病毒的细胞可以在细胞膜附近检测到荧光信号。用 Image J 软件对吸附在细胞上的病毒粒子数量进行量化分析，结果显示，与野生型相比，糖基化修饰的缺失不影响病毒在细胞上的吸附能力，且 E1N141A/E2N200A 的突变增强了 GETV 的吸附能力。

在 BHK-21 细胞上以 MOI=10 的感染剂量同时感染野生型和突变毒株，于 4℃ 吸附 1 h 后，用建立的 TaqMan 荧光定量 PCR 检测方法对吸附在细胞表面的病毒粒子进行检测，结果如图 3-25 所示，糖基化修饰的缺失没有降低病毒在细胞上的吸附能力，GETV<sup>E1N141A/E2N200A</sup> 毒株使病毒粒子对于细胞的吸附性明显提升且差异显著，这一结果与间接免疫荧光结果相一致。用建立的 TaqMan 荧光定量法对入侵到细胞内的病毒基因组拷贝进行检测，结果显示，与亲本毒株相比，糖基化修饰缺失毒株入侵到细胞内的病毒粒子无显著差异，表明糖基化修饰的缺失并未降低病毒的入侵能力。

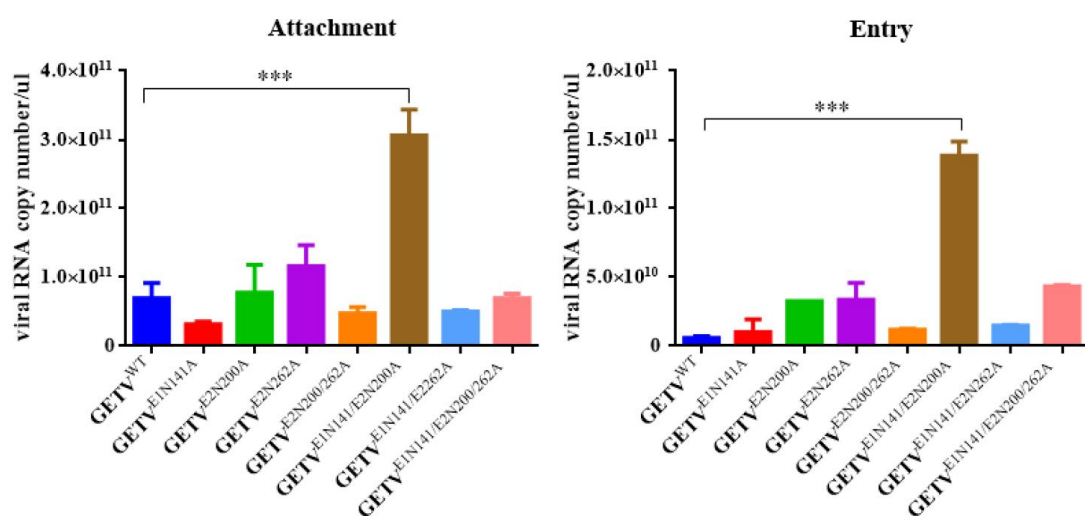


注: \*表示与 GETV<sup>WT</sup> 相比差异显著 ( $p<0.05$ )

Note: \* represents a significant difference between the groups compared to GETV<sup>WT</sup> ( $p<0.05$ )

图 3-24 间接免疫荧光试验及荧光量化分析

Fig. 3-24 Indirect immunofluorescence and fluorescence quantitative analysis



注: \*\*\*表示与 GETV<sup>WT</sup> 相比差异显著 ( $p<0.001$ )

Note: \*\*\* represents a significant difference compared to GETV<sup>WT</sup> ( $p<0.001$ )

图 3-25 荧光定量 PCR 结果分析

Fig. 3-25 Results of RT-qPCR

### 3.9 去糖基化修饰对病毒蛋白的表达影响

将各重组突变病毒以一定的感染剂量 (MOI=5) 感染 BHK-21 细胞, 37°C 培养 24 h 后分别

## 结 果

收取上清及细胞样品，利用 E2 蛋白阳性血清进行 Western blot 的检测。结果如图 3-26 所示，利用 E2 阳性血清对病毒的 E2 蛋白进行特异性检测，并利用 Image J 软件对 Western blot 结果进行灰度值计算及统计分析。Western blot 及灰度值分析结果显示，细胞上清中可以被特异性检测到病毒的 E2 蛋白（46 kDa）条带；细胞内可以特异地检测到三个蛋白条带，包括多聚蛋白（约 120 kDa）、P62（约 54 kDa）及 E2（约 46 kDa）。重组突变毒株与亲本毒株相比，细胞内与细胞外的总囊膜蛋白 E2 的表达量降低，其中 GETV<sup>E2N200/262A</sup>、GETV<sup>E1N141A/E2N200A</sup>、GETV<sup>E1N141A/E2N262A</sup> 及 GETV<sup>E1N141A/E2N200/262A</sup> 下降最明显。分别对细胞上清及细胞内特异性检测的 E2 相关蛋白进行量化分析，与亲本毒株相比，重组突变病毒中蛋白在细胞内表达量呈现不同程度的下降，表明糖基化修饰缺失后对病毒蛋白的表达产生了影响。在细胞上清中的重组突变病毒蛋白的检测量也呈现不同程度的下降，表明糖基化修饰的缺失导致能成功从细胞中分泌的病毒粒子数量减少。以上研究结果表明糖基化修饰的缺失影响了病毒蛋白的表达，且同时存在两个及两个以上糖基化位点修饰缺失时对病毒蛋白的表达影响较大。

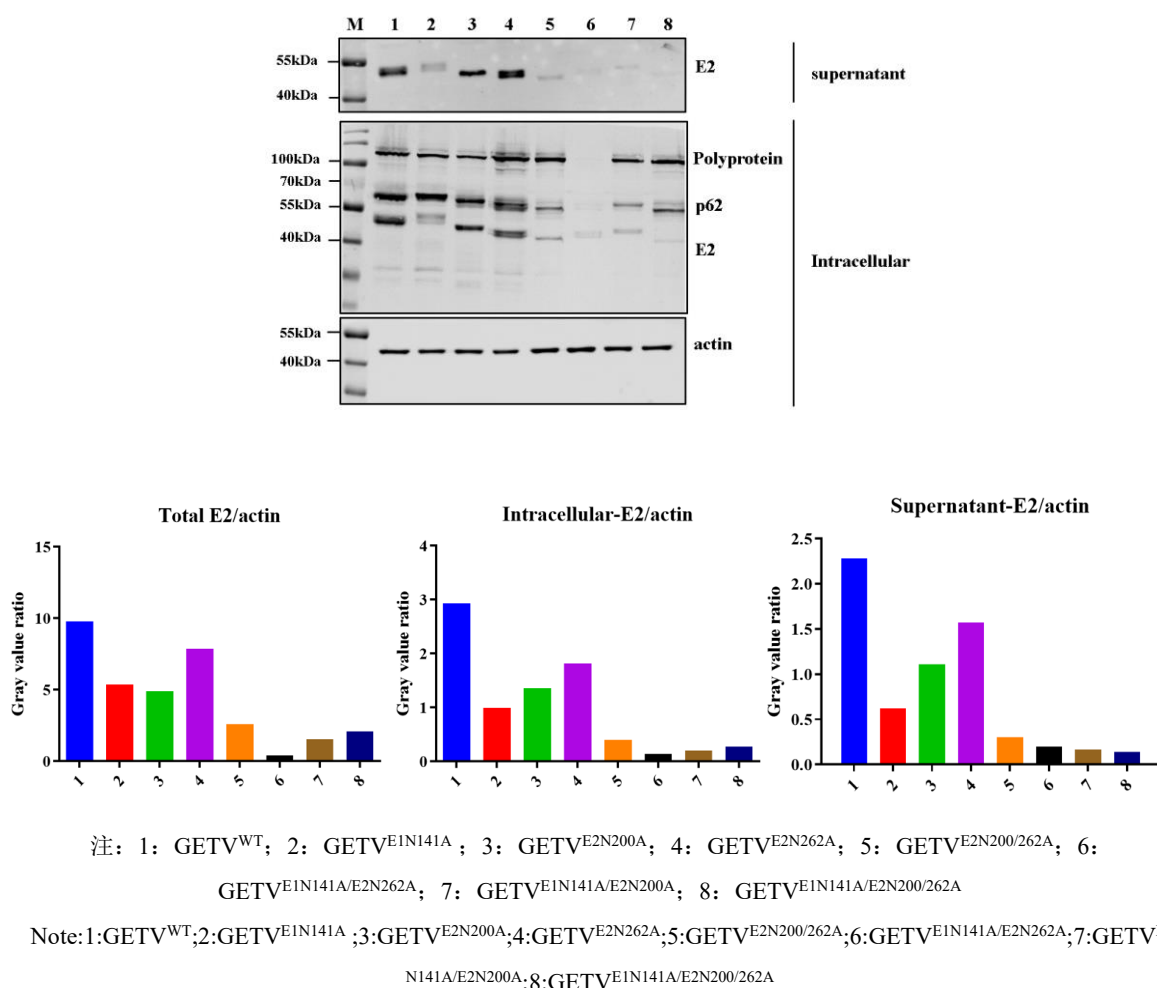


图 3-26 不同 GETV 毒株感染细胞 24 h 蛋白表达

Fig. 3-26 Protein expression in cells infected with different GETV strains after 24 h

### 3.10 去糖基化修饰对病毒粒子组装的影响

对感染各重组病毒的细胞进行超微切片透射电镜的观察, 结果如图 3-27 所示, GETV<sup>WT</sup> 糖基化修饰未缺失时在细胞内形成大量图 3-27 中相似的结构, 而感染细胞内 GETV<sup>E1N141A/E2N200A</sup> 出现了组装异常的现象, 在囊泡外存在大量病毒衣壳的堆积, GETV<sup>WT</sup> 图中出现的概率较低, 大部分为 GETV<sup>E1N141A/E2N200A</sup> 中的效果。以上结果说明 E1N141 和 E2N200 位点糖基化修饰的缺失影响了病毒粒子的组装, 这可能是造成病毒感染性下降的主要原因之一。

为了进一步确认细胞切片中观察到的结果, 对感染一定剂量 (MOI=1) 病毒的细胞进行 Western blot 的检测, 选用上述制备的 Anti-GETVCP sera 以及 E2 蛋白单克隆抗体 (C7) 对不同感染时间下的病毒蛋白表达水平进行检测。结果如图 3-28 所示, 随着时间的推移, 病毒蛋白在细胞内的表达量也逐渐增多, 与野生型相比, GETV<sup>E1N141A/E2N200A</sup> 毒株的 E2 蛋白的表达量随着时间的推移其表达量并没有升高至 GETV<sup>WT</sup> 的水平, 而 CP 蛋白随着时间的增加, 表达量逐渐增加, 与 GETV<sup>WT</sup> 相比差异不大, 这与细胞切片观察结果一致。在野生型中, CP 蛋白表达后可以和正常发生糖基化修饰的 E2 蛋白相互作用参与成熟病毒粒子的组装; 而在 GETV<sup>E1N141A/E2N200A</sup> 中, CP 蛋白的表达虽不受糖基化修饰缺失的影响, 但由于受到糖基化修饰缺失的 E2 蛋白表达降低的影响导致 CP 蛋白与 E2 蛋白的互作效率降低, 致使 CP 蛋白在胞浆中大量堆积, 最终导致出现组装异常的现象。以上研究结果说明 E1N141 和 E2N200 位点糖基化修饰的缺失可能是通过干扰囊膜蛋白表达影响了病毒在细胞内的组装。

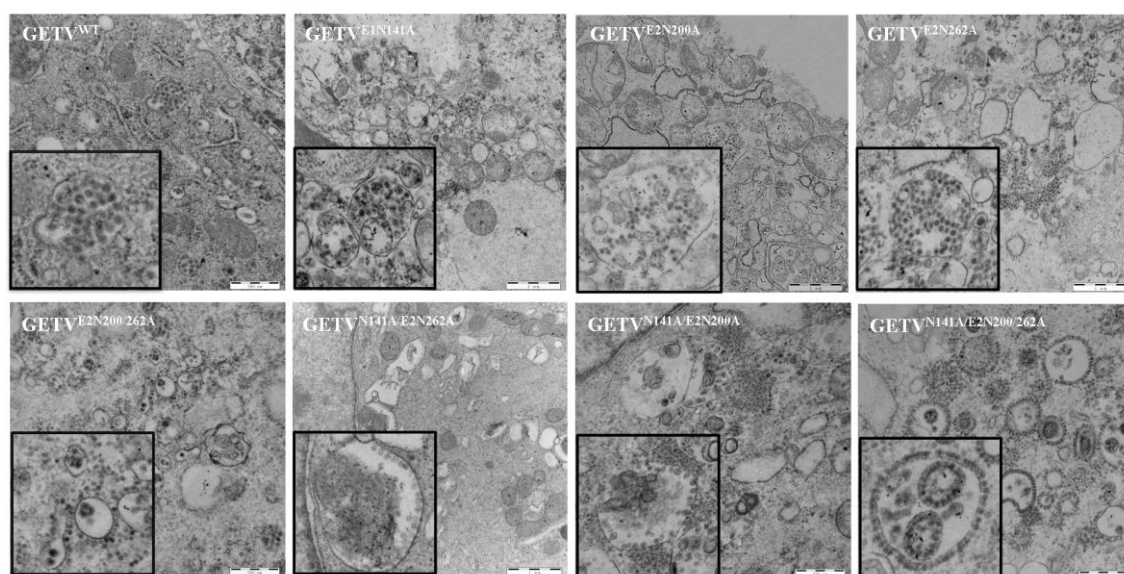
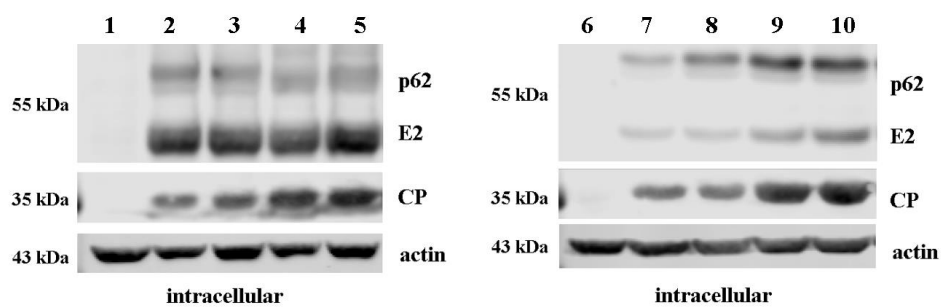


图 3-27 不同毒株在 BHK-21 细胞内的细胞切片观察

Fig. 3-27 Observation of cell sections of different strains in BHK-21 cells



注：1 和 6: negative, 2~5 分别为: GETV<sup>WT</sup>12h、18h、24h、30h, 7~10 分别为: GETV<sup>E1N141A/E2N200A</sup>12h、18h、24h、30h

Note: 1 and 6: negative;2~5 were : GETV<sup>WT</sup>12h;18h;24h;30h; 7~10 were : GETV<sup>E1N141A/E2N200A</sup>12h; 18h; 24h; 30h

图 3-28 GETV<sup>E1N141A/E2N200A</sup> 在细胞内的蛋白表达

Fig. 3-28 Protein expression of GETV<sup>E1N141A/E2N200A</sup> in cells

## 4 讨论

### 4.1 GETV 荧光定量 PCR 检测方法的建立

近些年来, GETV 的宿主范围和地理分布迅速扩大<sup>[95]</sup>, 在鸡、鸭和鸟类的血清标本中也检测到 GETV 抗体<sup>[96]</sup>, 这表明 GETV 的宿主范围已经扩大到禽类。GETV 结构蛋白上的关键氨基酸的突变能够增强其宿主适应性, 而且鸟类特别是候鸟的感染可能导致病毒通过其长途迁徙而大范围扩散<sup>[97]</sup>。GETV 对动物健康以及公共卫生安全的威胁日益严重, 而目前尚无疫苗及特异性药物可用。因此, 建立快速灵敏的检测方法对病毒流行病学调查和新发疫情预警具有重要意义。

病毒中和试验和 ELISA 等血清学试验是检测 GETV 的常规方法<sup>[24]</sup>。但是, 血清学检测也存在一些不足, 例如抗体检测的结果可能会受到病毒交叉反应的影响, 而且该方法很难应用于病毒感染的早期检测, 另外样品在保存过程中很有可能因为抗原降解而降低结果的准确性。而核酸检测方法由于其敏感性和特异性优于传统检测手段, 已成为实验室和临床诊断的常用方法。目前已报道的针对 GETV 的检测方法包括 cDNA-RAPD<sup>[98]</sup>、反转录环介导的等温扩增<sup>[99]</sup>、重组酶介导等温核酸扩增<sup>[100]</sup>、PCR 和荧光定量 PCR<sup>[21]</sup>等。

本实验建立的检测方法其最低检测限可达 30.7copies/ $\mu$ L, 且对于其他病毒无阳性扩增反应, 具有非常灵敏且特异的优点; 而针对 GETV 已有的荧光定量 RT-PCR 方法中, 其主要靶标为 E1、E2、E3 等结构蛋白基因<sup>[24, 101]</sup>, GETV 的两个开放阅读框使其非结构蛋白早于结构蛋白开始翻译<sup>[30]</sup>。其中非结构多蛋白的顺序处理调节病毒负链 RNA 以及基因组和亚基因组正链 RNA 的合成, 基因组 RNA 进入细胞开始翻译后会在质膜上形成复制复合体。nsP3 既存在于膜结合复合体中, 也存在于较大的细胞质复合体中<sup>[102]</sup>。因此本研究选择 nsP3 作为靶标基因, 对于病毒感染的早期也能进行很好的检测, 可以有效提高病毒检测的准确率。

### 4.2 E2 单克隆抗体的制备

E2 作为 GETV 的囊膜糖蛋白, 其具有诸多抗原位点且存在多种修饰。目前报道的针对 GETV-E2 已有的单克隆抗体及多克隆抗体制备方法中<sup>[103, 104]</sup>, 均利用大肠杆菌原核表达系统表达蛋白, 而本试验在蛋白的表达过程中选用真核表达系统能保持蛋白的天然修饰不被破坏, 具有良好的生物学活性, 能更高效的表达 E2 蛋白。gp67 信号序列以信号识别颗粒依赖的方式介导蛋白靶向 ER, 信号序列被共翻译切割掉, 从而产生信号肽和成熟蛋白<sup>[105]</sup>。通过添加 gp67 信号肽以及选择 E2 的胞外域进行表达可以使重组 E2 从细胞中顺利分泌, 减少细胞内诸多蛋白以及蛋白酶的干扰, 进而提高蛋白纯化的质量。Western blot 选用实验室制备的 Anti-GETV(SC483) 对构建的 E2 表达蛋白进行验证, 目的条带出现位置与预期一致, 杂蛋白较少, 纯化的重组蛋白满足免疫的要求, 进而制备出三株单克隆抗体 (E2C7、E2A8、E2B7)。将三株单克隆抗体均应用于 Western blot 以及间接免疫荧光中, 对抗体的效果进行了评估。三株单抗均适用于 Western

blot 中 GETV-E2 的检测, E2C7 和 E2B7 在间接免疫荧光试验中特异性较好, 其中 E2B7 的特异性最好, 更适用于间接免疫荧光试验中 GETV-E2 的特异性检测。

### 4.3 糖基化修饰缺失毒株的拯救

已有研究报道了甲病毒属的其他病毒中糖基化修饰的影响, 发现糖基化修饰可以影响病毒在细胞内的复制能力、实验动物体内的毒力以及帮助病毒的逃避免疫反应等。经过本实验室对于 GETV 的三维结构解析发现, E1 (N141) 存在一个糖基化修饰位点, E2 (N200 和 N262) 存在两个糖基化修饰位点<sup>[30]</sup>。对 GETV 的三个糖基化位点进行保守性分析发现, E1N141 保守性较好, 对该位点的研究在甲病毒属病毒的研究中具有参考意义, 而 E2N200 和 E2N262 位点保守性不高, 对这两个位点的研究有助于探究 GETV 在甲病毒属中的独特性。

GETV 属于 RNA 病毒, 在复制过程中极易发生突变, 而建立 GETV 的反向遗传学平台, 可以获得较为稳定的病毒, 为后续的相关分子生物试验奠定基础, 对 GETV 的致病机理可以进一步的深入研究, 不断破译基因组的结构和功能, 在公共卫生中具有重要意义。本研究利用实验室保存的基于反向遗传操作系统构建的 GETV 感染性克隆为基础, 对病毒进行糖基化位点突变的改造, 拯救出 7 株重组突变毒株。对这 7 株重组突变病毒的生长特性进行研究, 发现其滴度与野生型相比呈现不同程度的下降, 为后续试验研究提供基础。

天冬酰胺是连接寡糖前体的必需氨基酸, 去除天冬酰胺之后糖基化修饰消失, 因而本试验通过利用定点突变的方式构建重组突变病毒, 将糖基化修饰氨基酸中的天冬酰胺 (N) 均突变成丙氨酸 (A), 构建正确的重组质粒利用 PEI 转染试剂通过转染至易感细胞 BHK-21 内进行病毒的拯救。待细胞发生病变后取上清进行透射电镜的负染色法对拯救的病毒进行鉴定, 能使细胞产生病变且在透射电镜下观察到的重组突变病毒粒子形态与亲本毒株的病毒粒子形态无明显差异时, 成功拯救了重组突变病毒。通过 Western blot 和 SDS-PAGE 进一步对重组突变病毒进行去糖基化修饰的鉴定, 拯救得到与野生型无明显形态差异的重组病毒在糖蛋白的迁移率出现明显差异, 证明去糖基化修饰的重组突变毒株拯救成功, 进而可以进行下一步的试验研究。

### 4.4 糖基化修饰缺失对于病毒生命周期的影响

GETV 的生命周期主要分为吸附、入侵、组装以及释放等阶段。已有研究报道囊膜蛋白糖基化修饰在不同病毒的生命周期的各个阶段起着不同的作用, 例如其可以影响病毒与细胞受体的结合能力, 病毒在动物体内的致病性, 帮助病毒逃避免疫反应等。在 SINV 病毒中, 糖蛋白的糖基化修饰在病毒的感染、复制以及与肝素的结合过程中都发挥着重要作用。E1-245 位点的去糖基化修饰使该突变毒株与野生型毒株相比滴度降低约 100 倍左右, 而 E2 糖基化修饰的缺失增强了病毒与肝素的结合, 进而使该毒株在 BHK-21 细胞中的复制能力提高。E2-196 和 E2-318 突变毒株在小鼠脑内接种后毒力增强, 而 E1-139 和 E1-245 突变毒株在小鼠体内的毒力减弱<sup>[106]</sup>, 表明不同位点的糖基化修饰在 SINV 起着不同的作用, 共同支持着病毒的感染能力。SAV 中 E1 的糖基化修饰缺失后病毒会完全失活, 无法成功拯救出病毒粒子, 而 E2 糖基化修饰的缺失也会导致 SAV 在细胞中的复制能力减弱<sup>[91]</sup>, 该病毒的糖基化修饰对于病毒的感染能力是至关重要的。在 RRV 中缺乏 E1 的 141 糖基化位点的突变病毒可以导致病毒在模型小鼠体内的致病力减

弱, 诱导更高水平的 IFN- $\gamma$  来提高病毒的清除率, 这表明 E1 糖蛋白的糖基化修饰在 RRV 的发病机制中起着重要作用<sup>[93]</sup>。有趣的是, 伊蚊作为甲病毒传播的一个媒介, 病毒在其体内不会产生病变, 但糖基化修饰的缺失影响其在蚊子细胞的复制水平, E2 的 200 位糖基化修饰的缺失可以导致 RRV 在伊蚊媒介中的复制显著降低, 而 E1 的 141 或 E2 的 262 位糖基化修饰的缺失对蚊子细胞承载病毒的能力几乎没有影响<sup>[94]</sup>。

为获得 GETV 糖基化修饰敲除病毒, 我们利用前期建立的反向遗传操作系统, 利用丙氨酸扫描技术原理, 构建了 7 株重组病毒, 通过荧光定量 PCR、间接免疫荧光、超微细胞切片等方式对去糖基化修饰影响 GETV 感染细胞的不同阶段进行研究。E1 和 E2 中单个位点糖基化修饰的缺失虽然能使病毒的感染性降低, 但影响较小, 而当 E1 和 E2 同时存在两个及两个以上的糖基化位点修饰的缺失时, 会导致毒株的滴度明显降低, 表明 E1 和 E2 的糖基化修饰在病毒生命周期中可能存在着某些互作或者协同效应等。在本试验的研究中发现, GETV<sup>E1N141A/E2N200A</sup> 毒株与亲本毒株相比, 虽然滴度降低明显, 但该重组毒株的吸附能力大大增强。根据本实验室之前对 GETV 的结构解析发现, E1 的 N141 和 E2 的 N200 位氨基酸在空间构象上距离较近, 很有可能是两个糖链之前存在着某些受体结合位点, 在糖基化修饰发生时这些位点被糖链遮盖, 而当糖基化修饰去除后使得结合位点暴露, 进而增加了 GETV<sup>E1N141A/E2N200A</sup> 毒株的吸附能力。另外一可靠推测可能是糖链的去除改变了病毒表面的电荷的水平及分布, 导致病毒吸附能力的改变。在所有的病毒蛋白的特异性检测试验中发现, GETV<sup>E1N141A/E2N262A</sup> 的蛋白表达量极低, 而对其具有感染性的病毒粒子进行滴度试验发现, 其滴度降低程度与 GETV<sup>E1N141A/E2N200A</sup> 相似, 但对蛋白表达量的检测结果却差异很大, 猜测该毒株糖基化修饰的去除可能是改变了病毒的抗原性, 使其与抗体结合能力降低, 从而导致蛋白含量的检测结果显著降低。GETV<sup>E1N141A/E2N200/262A</sup> 毒株虽然缺失了全部的糖基化修饰, 但经过试验发现其滴度并不是降低最明显的, 说明糖基化修饰可能不发挥协同作用, 其使病毒滴度降低的影响机制可能更为复杂, 后续需要对其进行深入研究探讨。

#### 4.5 糖基化修饰对 GETV 在动物体内的影响

GETV 可在多种动物中引起临床表现<sup>[26]</sup>。包括皮疹, 后肢水肿, 发烧, 病毒血症<sup>[107]</sup>等, 感染 GETV 的仔猪表现为抑郁、震颤、后肢瘫痪、腹泻和高死亡率, 感染母猪会发生流产或产木乃伊胎, 在死胎的大脑皮层和感染仔猪的多个器官中检测到 GETV, 从而证明 GETV 可以通过胎盘传播给新生仔猪<sup>[27]</sup>。而小鼠感染 GETV 不会导致死亡, 可以导致小鼠肌肉和肌腱周围有炎症细胞浸润<sup>[108, 109]</sup>。研究发现 GETV 感染可以导致雄鼠的精液质量下降, 精子密度、运动性和血清睾酮浓度降低, 精子畸形率增加等生殖损失<sup>[110]</sup>。本研究中 GETV 感染小鼠发现, 该病毒对小鼠的脾脏造成非常严重的影响, 重组突变病毒感染小鼠后其死亡时间呈不同程度的推迟, 在这其中 GETV<sup>E1N141A/E2N200A</sup> 糖基化修饰的缺失在小鼠体内毒力减弱最明显, 该组小鼠存活率提高。GETV 在小鼠体内通过血液进行传播, 所以各个组织器官中均可以检测到病毒的存在, 所有能使小鼠死亡的毒株虽然由于毒株不同导致小鼠死亡时间出现差异, 可能是由于糖基化修饰的缺失降低了病毒在小鼠体内的复制效率, 从而导致部分突变毒株感染小鼠死亡的时间延长。

## 5 结论

(1) GETV 糖基化修饰对病毒在小鼠体内致病性有重要作用，修饰的缺失会降低病毒的致病性。

(2) GETV 糖蛋白 E1、E2 糖基化修饰帮助病毒在细胞内的复制和组装，去除后会降低病毒的复制能力和组装效率，使病毒的滴度降低 10~100 倍。

(3) E1 (N141) 和 E2 (N200) 位点糖基化修饰帮助病毒装配过程中糖蛋白和衣壳的组装，去除后结构蛋白 E2 表达减少，导致基本正常表达的 CP 蛋白与 E2 蛋白互动机会减少，最终组装形成的病毒减少，从而间接导致 CP 蛋白在胞浆中大量堆积。

## 参考文献

- [1] Fong S W, Kini R M, Ng L F P Mosquito Saliva Reshapes Alphavirus Infection and Immunopathogenesis [J]. *J Virol*, 2018, 92(12).
- [2] Li B, Wang H, Liang G Getah Virus (Alphavirus): An Emerging, Spreading Zoonotic Virus [J]. *Pathogens*, 2022, 11(8).
- [3] Levi L I, Vignuzzi M Arthritogenic Alphaviruses: A Worldwide Emerging Threat? [J]. *Microorganisms*, 2019, 7(5).
- [4] Abdelnabi R, Delang L Antiviral Strategies against Arthritogenic Alphaviruses [J]. *Microorganisms*, 2020, 8(9).
- [5] Khongwicht S, Chansaenroj J, Chirathaworn C, et al. Chikungunya virus infection: molecular biology, clinical characteristics, and epidemiology in Asian countries [J]. *J Biomed Sci*, 2021, 28(1): 84.
- [6] Steyn J, Fourie I, Steyl J, et al. Zoonotic Alphaviruses in Fatal and Neurologic Infections in Wildlife and Nonequine Domestic Animals, South Africa [J]. *Emerg Infect Dis*, 2020, 26(6): 1182-1191.
- [7] Pezzi L, LaBeaud A D, Reusken C B, et al. GloPID-R report on chikungunya, o'nyong-nyong and Mayaro virus, part 2: Epidemiological distribution of o'nyong-nyong virus [J]. *Antiviral Res*, 2019, 172: 104611.
- [8] Rezza G, Chen R, Weaver S C O'nyong-nyong fever: a neglected mosquito-borne viral disease [J]. *Pathog Glob Health*, 2017, 111(6): 271-275.
- [9] Yuen K Y, Bielefeldt-Ohmann H Ross River Virus Infection: A Cross-Disciplinary Review with a Veterinary Perspective [J]. *Pathogens*, 2021, 10(3).
- [10] Arenivar C, Rodriguez Y, Rodriguez-Morales A J, et al. Osteoarticular manifestations of Mayaro virus infection [J]. *Curr Opin Rheumatol*, 2019, 31(5): 512-516.
- [11] Zhou F, Wang A, Chen L, et al. Isolation and phylogenetic analysis of Getah virus from a commercial modified live vaccine against porcine reproductive and respiratory syndrome virus [J]. *Mol Cell Probes*, 2020, 53: 101650.
- [12] Kehn-Hall K, Bradfute S B Understanding host responses to equine encephalitis virus infection: implications for therapeutic development [J]. *Expert Rev Anti Infect Ther*, 2022, 20(12): 1551-1566.
- [13] 贾广敏, 秦娜, 班曼曼, 等. 盖塔病毒感染流行病学与防控研究进展 [J] *中国动物检疫*, 2023, 40(02): 80-85.
- [14] Zhai Y G, Wang H Y, Sun X H, et al. Complete sequence characterization of isolates of Getah virus (genus Alphavirus, family Togaviridae) from China [J]. *J Gen Virol*, 2008, 89(Pt 6): 1446-1456.
- [15] Brown C M, Timoney P J Getah virus infection of Indian horses [J]. *Trop Anim Health Prod*, 1998, 30(4): 241-252.
- [16] Wadell G, Varsanyi T M, Lord A, et al. Epidemic outbreaks of adenovirus 7 with special reference to the pathogenicity of adenovirus genome type 7b [J]. *Am J Epidemiol*, 1980, 112(5): 619-628.

- [17] Shi N, Qiu X, Cao X, et al. Molecular and serological surveillance of Getah virus in the Xinjiang Uygur Autonomous Region, China, 2017-2020 [J]. *Virol Sin*, 2022, 37(2): 229-237.
- [18] Fang Y, Zhang W, Xue J B, et al. Monitoring Mosquito-Borne Arbovirus in Various Insect Regions in China in 2018 [J]. *Front Cell Infect Microbiol*, 2021, 11: 640993.
- [19] Forrester N L, Wertheim J O, Dugan V G, et al. Evolution and spread of Venezuelan equine encephalitis complex alphavirus in the Americas [J]. *PLoS Negl Trop Dis*, 2017, 11(8): e0005693.
- [20] Kobayashi D, Isawa H, Ejiri H, et al. Complete Genome Sequencing and Phylogenetic Analysis of a Getah Virus Strain (Genus Alphavirus, Family Togaviridae) Isolated from *Culex tritaeniorhynchus* Mosquitoes in Nagasaki, Japan in 2012 [J]. *Vector Borne Zoonotic Dis*, 2016, 16(12): 769-776.
- [21] Ren T, Mo Q, Wang Y, et al. Emergence and Phylogenetic Analysis of a Getah Virus Isolated in Southern China [J]. *Front Vet Sci*, 2020, 7: 552517.
- [22] Nemoto M, Bannai H, Tsujimura K, et al. Getah Virus Infection among Racehorses, Japan, 2014 [J]. *Emerg Infect Dis*, 2015, 21(5): 883-885.
- [23] Liu H, Zhang X, Li L X, et al. First isolation and characterization of Getah virus from cattle in northeastern China [J]. *BMC Vet Res*, 2019, 15(1): 320.
- [24] Lu G, Ou J, Ji J, et al. Emergence of Getah Virus Infection in Horse With Fever in China, 2018 [J]. *Front Microbiol*, 2019, 10: 1416.
- [25] Bannai H, Nemoto M, Ochi A, et al. Epizootiological Investigation of Getah Virus Infection among Racehorses in Japan in 2014 [J]. *J Clin Microbiol*, 2015, 53(7): 2286-2291.
- [26] Zhao J, Dellicour S, Yan Z, et al. Early Genomic Surveillance and Phylogeographic Analysis of Getah Virus, a Reemerging Arbovirus, in Livestock in China [J]. *J Virol*, 2023, 97(1): e0109122.
- [27] Yang T, Li R, Hu Y, et al. An outbreak of Getah virus infection among pigs in China, 2017 [J]. *Transbound Emerg Dis*, 2018, 65(3): 632-637.
- [28] Shi N, Li L X, Lu R G, et al. Highly Pathogenic Swine Getah Virus in Blue Foxes, Eastern China, 2017 [J]. *Emerg Infect Dis*, 2019, 25(6): 1252-1254.
- [29] Kuwata R, Shimoda H, Phichitraslip T, et al. Getah virus epizootic among wild boars in Japan around 2012 [J]. *Arch Virol*, 2018, 163(10): 2817-2821.
- [30] Wang M, Sun Z, Cui C, et al. Structural Insights into Alphavirus Assembly Revealed by the Cryo-EM Structure of Getah Virus [J]. *Viruses*, 2022, 14(2).
- [31] Zhang Y, Yu J, Tan L, et al. Complete genetic dissection and cell type-specific replication of old world alphaviruses, getah virus (GETV) and sagiyama virus (SAGV) [J]. *J Microbiol*, 2021, 59(11): 1044-1055.
- [32] Lello L S, Bartholomeeusen K, Wang S, et al. nsP4 Is a Major Determinant of Alphavirus Replicase Activity and Template Selectivity [J]. *J Virol*, 2021, 95(20): e0035521.
- [33] Lello L S, Miilimae A, Cherkashchenko L, et al. Activity, Template Preference, and Compatibility of Components of RNA Replicase of Eastern Equine Encephalitis Virus [J]. *J Virol*, 2023, 97(1): e0136822.
- [34] Linssen B, Kinney R M, Aguilar P, et al. Development of reverse transcription-PCR assays specific

- for detection of equine encephalitis viruses [J]. *J Clin Microbiol*, 2000, 38(4): 1527-1535.
- [35] Hellstrom K, Kallio K, Utt A, et al. Partially Uncleaved Alphavirus Replicase Forms Spherule Structures in the Presence and Absence of RNA Template [J]. *J Virol*, 2017, 91(18).
- [36] Fatma B, Kumar R, Singh V A, et al. Alphavirus capsid protease inhibitors as potential antiviral agents for Chikungunya infection [J]. *Antiviral Res*, 2020, 179: 104808.
- [37] Aggarwal M, Kaur R, Saha A, et al. Evaluation of antiviral activity of piperazine against Chikungunya virus targeting hydrophobic pocket of alphavirus capsid protein [J]. *Antiviral Res*, 2017, 146: 102-111.
- [38] Mendes A, Kuhn R J Alphavirus Nucleocapsid Packaging and Assembly [J]. *Viruses*, 2018, 10(3).
- [39] Aggarwal M, Dhindwal S, Kumar P, et al. trans-Protease activity and structural insights into the active form of the alphavirus capsid protease [J]. *J Virol*, 2014, 88(21): 12242-12253.
- [40] Fox J M, Long F, Edeling M A, et al. Broadly Neutralizing Alphavirus Antibodies Bind an Epitope on E2 and Inhibit Entry and Egress [J]. *Cell*, 2015, 163(5): 1095-1107.
- [41] Byrd E A, Kielian M An Alphavirus E2 Membrane-Proximal Domain Promotes Envelope Protein Lateral Interactions and Virus Budding [J]. *mBio*, 2017, 8(6).
- [42] Wilkinson T A, Tellinghuisen T L, Kuhn R J, et al. Association of sindbis virus capsid protein with phospholipid membranes and the E2 glycoprotein: implications for alphavirus assembly [J]. *Biochemistry*, 2005, 44(8): 2800-2810.
- [43] Sjoberg M, Garoff H Interactions between the transmembrane segments of the alphavirus E1 and E2 proteins play a role in virus budding and fusion [J]. *J Virol*, 2003, 77(6): 3441-3450.
- [44] Byrd E A, Kielian M The Alphavirus E2 Membrane-Proximal Domain Impacts Capsid Interaction and Glycoprotein Lattice Formation [J]. *J Virol*, 2019, 93(4).
- [45] Kim A S, Diamond M S A molecular understanding of alphavirus entry and antibody protection [J]. *Nat Rev Microbiol*, 2022, 10.1038/s41579-022-00825-7: 1-12.
- [46] Zimmerman O, Holmes A C, Kafai N M, et al. Entry receptors - the gateway to alphavirus infection [J]. *J Clin Invest*, 2023, 133(2).
- [47] Lescar J, Roussel A, Wien M W, et al. The Fusion glycoprotein shell of Semliki Forest virus: an icosahedral assembly primed for fusogenic activation at endosomal pH [J]. *Cell*, 2001, 105(1): 137-148.
- [48] Kim A S, Kafai N M, Winkler E S, et al. Pan-protective anti-alphavirus human antibodies target a conserved E1 protein epitope [J]. *Cell*, 2021, 184(17): 4414-4429 e4419.
- [49] Williamson L E, Reeder K M, Bailey K, et al. Therapeutic alphavirus cross-reactive E1 human antibodies inhibit viral egress [J]. *Cell*, 2021, 184(17): 4430-4446 e4422.
- [50] Elmasri Z, Nasal B L, Jose J Alphavirus-Induced Membrane Rearrangements during Replication, Assembly, and Budding [J]. *Pathogens*, 2021, 10(8).
- [51] Voss J E, Vaney M C, Duquerroy S, et al. Glycoprotein organization of Chikungunya virus particles revealed by X-ray crystallography [J]. *Nature*, 2010, 468(7324): 709-712.
- [52] Clark L E, Clark S A, Lin C, et al. VLDLR and ApoER2 are receptors for multiple alphaviruses [J].

- Nature, 2022, 602(7897): 475-480.
- [53] Zhang R, Kim A S, Fox J M, et al. Mxra8 is a receptor for multiple arthritogenic alphaviruses [J]. Nature, 2018, 557(7706): 570-574.
- [54] Spuul P, Balistreri G, Hellstrom K, et al. Assembly of alphavirus replication complexes from RNA and protein components in a novel trans-replication system in mammalian cells [J]. J Virol, 2011, 85(10): 4739-4751.
- [55] Garoff H, Sjoberg M, Cheng R H Budding of alphaviruses [J]. Virus Res, 2004, 106(2): 103-116.
- [56] Aliperti G, Schlesinger M J Evidence for an autoprotease activity of sindbis virus capsid protein [J]. Virology, 1978, 90(2): 366-369.
- [57] Garoff H, Simons K, Dobberstein B Assembly of the Semliki Forest virus membrane glycoproteins in the membrane of the endoplasmic reticulum in vitro [J]. J Mol Biol, 1978, 124(4): 587-600.
- [58] Tumkosit U, Siripanyaphinyo U, Takeda N, et al. Anti-Chikungunya Virus Monoclonal Antibody That Inhibits Viral Fusion and Release [J]. J Virol, 2020, 94(19).
- [59] Sariola M, Saraste J, Kuusimäki E Communication of post-Golgi elements with early endocytic pathway: regulation of endoproteolytic cleavage of Semliki Forest virus p62 precursor [J]. J Cell Sci, 1995, 108 ( Pt 6): 2465-2475.
- [60] de Curtis I, Simons K Dissection of Semliki Forest virus glycoprotein delivery from the trans-Golgi network to the cell surface in permeabilized BHK cells [J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 1988, 85(21): 8052-8056.
- [61] Nelson S, Hernandez R, Ferreira D, et al. In vivo processing and isolation of furin protease-sensitive alphavirus glycoproteins: a new technique for producing mutations in virus assembly [J]. Virology, 2005, 332(2): 629-639.
- [62] Holmes A C, Basore K, Fremont D H, et al. A molecular understanding of alphavirus entry [J]. PLoS Pathog, 2020, 16(10): e1008876.
- [63] Liu H Y, Yang P L Small-Molecule Inhibition of Viral Fusion Glycoproteins [J]. Annu Rev Virol, 2021, 8(1): 459-489.
- [64] Leung J Y, Ng M M, Chu J J Replication of alphaviruses: a review on the entry process of alphaviruses into cells [J]. Adv Virol, 2011, 2011: 249640.
- [65] Jose J, Snyder J E, Kuhn R J A structural and functional perspective of alphavirus replication and assembly [J]. Future Microbiol, 2009, 4(7): 837-856.
- [66] Uchime O, Fields W, Kielian M The role of E3 in pH protection during alphavirus assembly and exit [J]. J Virol, 2013, 87(18): 10255-10262.
- [67] Nguema-Ona E, Vire-Gibouin M, Gotte M, et al. Cell wall O-glycoproteins and N-glycoproteins: aspects of biosynthesis and function [J]. Front Plant Sci, 2014, 5: 499.
- [68] Pattison R J, Amtmann A N-glycan production in the endoplasmic reticulum of plants [J]. Trends Plant Sci, 2009, 14(2): 92-99.
- [69] Cherepanova N, Shrima S, Gilmore R N-linked glycosylation and homeostasis of the endoplasmic reticulum [J]. Curr Opin Cell Biol, 2016, 41: 57-65.

- [70] Toustou C, Walet-Balieu M L, Kiefer-Meyer M C, et al. Towards understanding the extensive diversity of protein N-glycan structures in eukaryotes [J]. *Biol Rev Camb Philos Soc*, 2022, 97(2): 732-748.
- [71] Nagae M, Yamaguchi Y, Taniguchi N, et al. 3D Structure and Function of Glycosyltransferases Involved in N-glycan Maturation [J]. *Int J Mol Sci*, 2020, 21(2).
- [72] Fregno I, Fasana E, Solda T, et al. N-glycan processing selects ERAD-resistant misfolded proteins for ER-to-lysosome-associated degradation [J]. *EMBO J*, 2021, 40(15): e107240.
- [73] Ellgaard L, Helenius A Quality control in the endoplasmic reticulum [J]. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2003, 4(3): 181-191.
- [74] Aeby M, Bernasconi R, Clerc S, et al. N-glycan structures: recognition and processing in the ER [J]. *Trends Biochem Sci*, 2010, 35(2): 74-82.
- [75] Sun Z, Brodsky J L Protein quality control in the secretory pathway [J]. *J Cell Biol*, 2019, 218(10): 3171-3187.
- [76] Schwabl S, Teis D Protein quality control at the Golgi [J]. *Curr Opin Cell Biol*, 2022, 75: 102074.
- [77] Pakhrin S C, Aoki-Kinoshita K F, Caragea D, et al. DeepNGlyPred: A Deep Neural Network-Based Approach for Human N-Linked Glycosylation Site Prediction [J]. *Molecules*, 2021, 26(23).
- [78] Bao D, Xue R, Zhang M, et al. N-Linked Glycosylation Plays an Important Role in Budding of Neuraminidase Protein and Virulence of Influenza Viruses [J]. *J Virol*, 2021, 95(3).
- [79] Ostbye H, Gao J, Martinez M R, et al. N-Linked Glycan Sites on the Influenza A Virus Neuraminidase Head Domain Are Required for Efficient Viral Incorporation and Replication [J]. *J Virol*, 2020, 94(19).
- [80] Kim J I, Park M S N-linked glycosylation in the hemagglutinin of influenza A viruses [J]. *Yonsei Med J*, 2012, 53(5): 886-893.
- [81] Gao R, Gu M, Shi L, et al. N-linked glycosylation at site 158 of the HA protein of H5N6 highly pathogenic avian influenza virus is important for viral biological properties and host immune responses [J]. *Vet Res*, 2021, 52(1): 8.
- [82] Mossenta M, Marchese S, Poggianella M, et al. Role of N-glycosylation on Zika virus E protein secretion, viral assembly and infectivity [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2017, 492(4): 579-586.
- [83] Carbaugh D L, Lazear H M Flavivirus Envelope Protein Glycosylation: Impacts on Viral Infection and Pathogenesis [J]. *J Virol*, 2020, 94(11).
- [84] Hanna S L, Pierson T C, Sanchez M D, et al. N-linked glycosylation of west nile virus envelope proteins influences particle assembly and infectivity [J]. *J Virol*, 2005, 79(21): 13262-13274.
- [85] Vigerust D J, Shepherd V L Virus glycosylation: role in virulence and immune interactions [J]. *Trends Microbiol*, 2007, 15(5): 211-218.
- [86] Yang Q, Kelkar A, Sriram A, et al. Role for N-glycans and calnexin-calreticulin chaperones in SARS-CoV-2 Spike maturation and viral infectivity [J]. *Sci Adv*, 2022, 8(38): eabq8678.
- [87] Rowland R, Brandariz-Nunez A Analysis of the Role of N-Linked Glycosylation in Cell Surface Expression, Function, and Binding Properties of SARS-CoV-2 Receptor ACE2 [J]. *Microbiol Spectr*, 2021, 9(2): e0119921.

- [88] Liang J J, Chou M W, Lin Y L DC-SIGN Binding Contributed by an Extra N-Linked Glycosylation on Japanese Encephalitis Virus Envelope Protein Reduces the Ability of Viral Brain Invasion [J]. *Front Cell Infect Microbiol*, 2018, 8: 239.
- [89] Prentoe J, Velazquez-Moctezuma R, Augestad E H, et al. Hypervariable region 1 and N-linked glycans of hepatitis C regulate virion neutralization by modulating envelope conformations [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2019, 116(20): 10039-10047.
- [90] Slater-Handshy T, Droll D A, Fan X, et al. HCV E2 glycoprotein: mutagenesis of N-linked glycosylation sites and its effects on E2 expression and processing [J]. *Virology*, 2004, 319(1): 36-48.
- [91] Aksnes I, Markussen T, Braaen S, et al. Mutation of N-glycosylation Sites in Salmonid Alphavirus (SAV) Envelope Proteins Attenuate the Virus in Cell Culture [J]. *Viruses*, 2020, 12(10).
- [92] Aksnes I, Braaen S, Markussen T, et al. Genetically modified attenuated salmonid alphavirus: A potential strategy for immunization of Atlantic salmon [J]. *J Fish Dis*, 2021, 44(7): 923-937.
- [93] Tharmarajah K, Everest-Dass A, Vider J, et al. N-Linked Glycans Shape Skin Immune Responses during Arthritis and Myositis after Intradermal Infection with Ross River Virus [J]. *J Virol*, 2022, 96(17): e0099922.
- [94] Nelson M A, Herrero L J, Jeffery J A L, et al. Role of envelope N-linked glycosylation in Ross River virus virulence and transmission [J]. *J Gen Virol*, 2016, 97(5): 1094-1106.
- [95] Shi N, Zhu X, Qiu X, et al. Origin, genetic diversity, adaptive evolution and transmission dynamics of Getah virus [J]. *Transbound Emerg Dis*, 2022, 69(4): e1037-e1050.
- [96] Li Y, Fu S, Guo X, et al. Serological Survey of Getah Virus in Domestic Animals in Yunnan Province, China [J]. *Vector Borne Zoonotic Dis*, 2019, 19(1): 59-61.
- [97] Rattanatumhi K, Prasertsinchaoen N, Naimon N, et al. A serological survey and characterization of Getah virus in domestic pigs in Thailand, 2017-2018 [J]. *Transbound Emerg Dis*, 2022, 69(2): 913-918.
- [98] Hu T, Zheng Y, Zhang Y, et al. Identification of a novel Getah virus by Virus-Discovery-cDNA random amplified polymorphic DNA (RAPD) [J]. *BMC Microbiol*, 2012, 12: 305.
- [99] Liu H, Li L X, Bu Y P, et al. Rapid Visual Detection of Getah Virus Using a Loop-Mediated Isothermal Amplification Method [J]. *Vector Borne Zoonotic Dis*, 2019, 19(10): 741-746.
- [100] Nie M, Deng H, Zhou Y, et al. Development of a reverse transcription recombinase-aided amplification assay for detection of Getah virus [J]. *Sci Rep*, 2021, 11(1): 20060.
- [101] 李昕岳, 杨涛涛, 陈思锦, 等. 盖他病毒 SYBR Green I 荧光定量 RT-PCR 检测方法的建立 [J]. *中国预防兽医学*, 2021, 43(08): 838-842.
- [102] Kim T, Abraham R, Pieterse L, et al. Cell-Type-Dependent Role for nsP3 Macrodomein ADP-Ribose Binding and Hydrolase Activity during Chikungunya Virus Infection [J]. *Viruses*, 2022, 14(12).
- [103] 陆莹梅, 魏建超, 夏鹏, 等. 盖他病毒 E2 蛋白的表达纯化以及抗原性鉴定 [J]. *中国动物传染病学报*, 2015, 23(02): 15-20.
- [104] 莫清荣, 任同伟, 农作荣, et al. 盖他病毒 Cap 和 E2 蛋白多克隆抗体的制备 [J]. *动物医学进展*, 2022, 43(09): 44-49.

- 
- [105] Marchal I, Cerutti M, Mir A M, et al. Expression of a membrane-bound form of *Trypanosoma cruzi* trans-sialidase in baculovirus-infected insect cells: a potential tool for sialylation of glycoproteins produced in the baculovirus-insect cells system [J]. *Glycobiology*, 2001, 11(7): 593-603.
- [106] Knight R L, Schultz K L, Kent R J, et al. Role of N-linked glycosylation for sindbis virus infection and replication in vertebrate and invertebrate systems [J]. *J Virol*, 2009, 83(11): 5640-5647.
- [107] Wang N, Zhai X, Li X, et al. Attenuation of Getah Virus by a Single Amino Acid Substitution at Residue 253 of the E2 Protein that Might Be Part of a New Heparan Sulfate Binding Site on Alphaviruses [J]. *J Virol*, 2022, 96(6): e0175121.
- [108] Nguyen W, Nakayama E, Yan K, et al. Arthritogenic Alphavirus Vaccines: Serogrouping Versus Cross-Protection in Mouse Models [J]. *Vaccines (Basel)*, 2020, 8(2).
- [109] Rawle D J, Nguyen W, Dumenil T, et al. Sequencing of Historical Isolates, K-mer Mining and High Serological Cross-Reactivity with Ross River Virus Argue against the Presence of Getah Virus in Australia [J]. *Pathogens*, 2020, 9(10).
- [110] Li F, Zhang B, Xu Z, et al. Getah Virus Infection Rapidly Causes Testicular Damage and Decreases Sperm Quality in Male Mice [J]. *Front Vet Sci*, 2022, 9: 883607.

## 附录

表 1 中英文缩略词对照

Tab.1 Comparison of Chinese and English acronyms

| 英文缩写  | 英文全称                                                | 中文全称          |
|-------|-----------------------------------------------------|---------------|
| GETV  | Getah virus                                         | 盖他病毒          |
| CP    | Capsid protein                                      | 衣壳蛋白          |
| IFA   | Indirect Fluorescent Antibody                       | 间接免疫荧光试验      |
| SINV  | Sinbis virus                                        | 辛德毕斯病毒        |
| CHIKV | Chikungunya virus                                   | 基孔肯亚病毒        |
| ONNV  | O'nyong-nyong virus                                 | 阿尼昂尼昂病毒       |
| RRV   | Ross river virus                                    | 罗斯河病毒         |
| MAYV  | Mayaro virus                                        | 马雅罗病毒         |
| VEEV  | Venezuelan equine encephalitis virus                | 委内瑞拉马脑炎病毒     |
| EEEV  | Eastern equine encephalitis virus                   | 东部马脑炎病毒       |
| WEEV  | western equine encephalitis viruse                  | 西部马脑炎病毒       |
| ORF   | Open reading frame                                  | 开放阅读框         |
| ns    | Non-structure                                       | 非结构           |
| SGP   | subgenomic promoter                                 | 亚基因组启动子       |
| NC    | Nucleocapsid                                        | 核衣壳           |
| OST   | oligosaccharide transferase                         | 寡糖转移酶         |
| ER    | endoplasmic reticulum                               | 内质网           |
| GRP   | Glucose regulatory protein                          | 葡萄糖调节蛋白       |
| ERAD  | (ER)-associated protein degradation                 | 内质网相关蛋白降解     |
| UPR   | Unfolded protein reaction                           | 未折叠的蛋白质反应     |
| JEV   | Japanese encephalitis virus                         | 日本脑炎病毒        |
| HCV   | hepatitis C virus                                   | 丙型肝炎病毒        |
| SIV   | Swine influenza virus                               | 猪流感病毒         |
| TGEV  | Transmissible gastroenteritis virus                 | 猪传染性胃肠炎病毒     |
| PEDV  | Porcine epidemic diarrhea virus                     | 猪流行性腹泻病毒      |
| PRRSV | Porcine reproductive and respiratory syndrome virus | 猪繁殖和呼吸障碍综合征病毒 |