



中国预防兽医学报

Chinese Journal of Preventive Veterinary Medicine

ISSN 1008-0589, CN 23-1417/S

《中国预防兽医学报》网络首发论文

题目：猪瘟病毒 2.1 亚型流行株 E2 蛋白单克隆抗体的制备及其抗原表位鉴定
作者：张艺潇，吴梦，米士江，刘钟迪，涂长春，龚文杰
收稿日期：2023-10-10
网络首发日期：2024-03-01
引用格式：张艺潇，吴梦，米士江，刘钟迪，涂长春，龚文杰. 猪瘟病毒 2.1 亚型流行株 E2 蛋白单克隆抗体的制备及其抗原表位鉴定[J/OL]. 中国预防兽医学报. <https://link.cnki.net/urlid/23.1417.S.20240229.1514.002>



网络首发：在编辑部工作流程中，稿件从录用到出版要经历录用定稿、排版定稿、整期汇编定稿等阶段。录用定稿指内容已经确定，且通过同行评议、主编终审同意刊用的稿件。排版定稿指录用定稿按照期刊特定版式（包括网络呈现版式）排版后的稿件，可暂不确定出版年、卷、期和页码。整期汇编定稿指出版年、卷、期、页码均已确定的印刷或数字出版的整期汇编稿件。录用定稿网络首发稿件内容必须符合《出版管理条例》和《期刊出版管理规定》的有关规定；学术研究成果具有创新性、科学性和先进性，符合编辑部对刊文的录用要求，不存在学术不端行为及其他侵权行为；稿件内容应基本符合国家有关书刊编辑、出版的技术标准，正确使用和统一规范语言文字、符号、数字、外文字母、法定计量单位及地图标注等。为确保录用定稿网络首发的严肃性，录用定稿一经发布，不得修改论文题目、作者、机构名称和学术内容，只可基于编辑规范进行少量文字的修改。

出版确认：纸质期刊编辑部通过与《中国学术期刊（光盘版）》电子杂志社有限公司签约，在《中国学术期刊（网络版）》出版传播平台上创办与纸质期刊内容一致的网络版，以单篇或整期出版形式，在印刷出版之前刊发论文的录用定稿、排版定稿、整期汇编定稿。因为《中国学术期刊（网络版）》是国家新闻出版广电总局批准的网络连续型出版物（ISSN 2096-4188，CN 11-6037/Z），所以签约期刊的网络版上网络首发论文视为正式出版。

doi: 10.3969/j.issn.1008-0589.202310009

猪瘟病毒2.1亚型流行株E2蛋白单克隆抗体的 制备及其抗原表位鉴定

张艺潇^{1,2}, 吴梦³, 米士江^{1,2}, 刘钟迪^{1,2}, 涂长春^{1,2}, 龚文杰^{1*}

(1. 吉林大学动物医学学院, 吉林 长春 130062; 2. 中国农业科学院长春兽医研究所, 吉林 长春 130012;
3. 重庆市畜牧科学院, 重庆 408599)

摘要: 为了获得仅与我国猪瘟病毒(CSFV)基因2.1亚型优势流行株反应的单克隆抗体(MAb), 并揭示疫苗株与流行株E2蛋白的抗原差异, 本研究利用昆虫杆状病毒表达系统表达CSFV基因2.1b亚型JL23的E2蛋白, 纯化蛋白免疫BALB/c小鼠, 通过电融合将免疫小鼠脾细胞与骨髓瘤细胞融合, 利用半固体选择性培养基筛选杂交瘤细胞, 间接免疫荧光试验(IFA)鉴定与JL23株反应的杂交瘤细胞上清(MAb), 亚克隆得到与JL23株反应的稳定杂交瘤细胞系; 采用IFA和western blot鉴定MAb与猪瘟疫苗株和不同基因型流行株的反应谱; 采用氨基酸截短和点突变的方法鉴定其识别的抗原表位; 采用固定病毒稀释抗体方法鉴定MAb的中和水平。结果显示, 本实验获得了一株仅与CSFV基因2.1亚型反应, 但不与疫苗株和其他基因型CSFV反应的MAb TCH061。基于截短E2蛋白的western blot结果显示, TCH061识别的抗原表位位于E2蛋白aa1~aa90, 进一步对该区域氨基酸序列比对发现, TCH061识别CSFV E2蛋白aa20的脯氨酸(P), 不识别在该位点为亮氨酸(L)的CSFV。利用点突变对该位点及其邻近的氨基酸残基替换, 结果发现G¹⁹、P²⁰、L²¹和G²²构成了TCH061识别的抗原表位, 其中P²⁰是关键氨基酸。MAb中和能力鉴定结果显示, TCH061对基因2.1亚型流行株具有中和能力, 但不能中和疫苗C株。综上所述, 本研究首次获得了一株区别CSFV疫苗株和基因2.1亚型优势流行株的鉴别MAb TCH061, 为研发疫苗免疫和流行株感染的血清学鉴别诊断产品提供了重要的MAb资源, 同时揭示了疫苗株与流行株E2蛋白的抗原差异。

关键词: 猪瘟病毒; 单克隆抗体; 病毒反应谱; 抗原表位

中图分类号: S852.65

文献标识码: A

Preparation and antigenic epitope mapping of a specific monoclonal antibody against glycoprotein E2 of classical swine fever subgenotype 2.1 field strain

ZHANG Yi-xiao^{1,2}, WU Meng³, MI Shi-jiang^{1,2}, LIU Zhong-di^{1,2}, TU Chang-chun^{1,2}, GONG Wen-jie^{1*}

(1. College of Veterinary Medicine, Jilin University, Changchun 130062, China; 2. Changchun Veterinary Research Institute, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Changchun 130012, China; 3. Academy of Animal Sciences of Chongqing City, Chongqing 408599, China)

Abstract: In order to obtain the differential monoclonal antibody (MAbs) that only reacts with the dominant subgenotype 2.1 field strains of classical swine fever virus (CSFV) in China and reveal the antigenic difference of E2 protein between the vaccine C-strain

*Corresponding author

收稿日期: 2023-10-10

基金项目: 国家自然科学基金面上项目(32072843)

作者简介: 张艺潇(1998-), 男, 陕西汉中, 硕士研究生, 主要从事猪瘟病毒E2蛋白抗原结构研究。

*通信作者: E-mail: gong@jlu.edu.cn

and the field strains, MAbs against E2 protein were prepared and characterized. E2 protein derived from CSFV subgenotype 2.1 field strain JL23 was expressed with baculovirus expression system, then immunized to BALB/c mice after purification. Fusion of splenocytes from immunized mice with myeloma cells was performed by electrofusion, and the successful fused hybridoma cells were selected by semi-solid selective medium. IFA was performed to test the reactivity of hybridoma cell supernatant (MAb) with CSFV JL23. Stable hybridoma cell lines were obtained by subcloning the cell lines reacting with JL23 strain. Amino acid truncation and point mutation were used to identify the recognized epitopes. The results showed that a MAb (TCH061) reacted only with CSFV subgenotype 2.1, but not with the vaccine strain and other subgenotype CSFV. Western blot with the truncated E2 proteins showed that the antigenic epitope recognized by TCH061 was located at aa1-aa90 of E2 protein. Further alignment of the amino acid sequence in this region showed that the aa20 amino acid residue of E2 protein of CSFV strains recognized by TCH061 was proline (P), and leucine (L) was present in the strains not recognized by TCH061 at this site. Site mutation was used to replace the residues at the 20th site of E2 protein and its adjacent amino acid residues. The results showed that G¹⁹, P²⁰, L²¹ and G²² constituted the epitope recognized by TCH061 with P²⁰ as the key amino acid residue. In addition, TCH061 was capable of neutralizing the subgenotype 2.1 field strains, but not for vaccine C-strain. In conclusion, TCH061 was determined as a MAb that can differentiate the vaccine C-strain from the CSFV subgenotype 2.1 field strains, which will be useful for the development of serological DIVA assay for vaccine immunity and field strain infection. At the same time, the antigenic differences of E2 protein between vaccine C-strain and the subgenotype 2.1 field strains were partially revealed.

Key words: CSFV; monoclonal antibody (MAb); viral response profile; antigenic epitope

猪瘟疫病毒(classical swine fever virus, CSFV)属于黄病毒科(*Flaviviridae*)瘟病毒属(*Pestivirus*)成员,其引起的猪瘟(classical swine fever, CSF)是严重影响家猪与野猪健康的重大疫病之一,是世界动物卫生组织(World Organization for Animal Health, WOA)规定的必须上报的动物疫病^[1]。CSFV宿主范围很窄,局限于家猪、野猪和其他猪科动物。CSFV能引起急性或者慢性疾病,急性CSF呈现高发病率和高死亡率,死亡率可达100%^[1, 2]。CSFV为单股正链RNA病毒,基因组约12.3 kb,包括一个长的开放阅读框(ORF)^[3]和基因组两侧的非编码区(5' UTR和3' UTR)^[4, 5], ORF编码一个包含3 898个氨基酸的多聚蛋白,其在病毒和宿主蛋白酶的作用下加工产生12个蛋白,包括4个结构蛋白:核衣壳蛋白Core和3个囊膜蛋白E^{ns}、E1和E2,以及8个非结构蛋白:N^{pro}、p7、NS2、NS3、NS4A、NS5B、NS5A和NS5B^[6]。结构蛋白E2是CSFV粒子表面的糖蛋白,为病毒主要保护性抗原蛋白,能诱导机体产生中和抗体,并在病毒感染过程中发挥重要作用^[7]。

CSFV只有一种血清型,但其具有遗传多样性,根据CSFV E2基因序列的差异,全球流行的CSFV可分为3个基因型和11个基因亚型(1.1、1.2、1.3、1.4、2.1、2.2、2.3、3.1、3.2、3.3和3.4)。从上世纪90年代开始,基因2.1亚型在我国大陆占据主导

地位,其进一步分为10个亚亚型(2.1a-2.1j)^[8-11],而目前我国流行株为2.1b和2.1c亚亚型。虽然已经很好的阐明了各基因型CSFV之间在基因水平上的遗传差异,但各基因型CSFV之间的抗原差异目前知之甚少,主要是E2、E^{ns}和NS3等抗原蛋白的抗原表位谱不清楚。实验室前期研究发现,免疫猪瘟兔化弱毒疫苗(hog cholera lapinized virus, HCLV),又称“C-strain(C株)”猪血清中和疫苗株的能力要强于基因2型流行株,提示流行株能够部分逃逸免疫血清的中和,说明疫苗株和流行株E2蛋白的中和抗体表位存在差异。研究发现,MAb 6B211和TCH045主要与基因1.1亚型CSFV反应,与基因2型CSFV不反应,这主要与N⁴⁰D(E)和G²⁴E突变有关,这被认为是流行毒株逃避免疫血清中和的原因之一^[12, 13]。因此急需研究疫苗株与流行株E2蛋白的抗原差异,一方面可以阐明流行株部分逃逸免疫血清中和的分子机制,另一方面可以获得区别疫苗株和流行株的MAb,特别是仅与流行株反应的MAb,是研发疫苗免疫和流行株感染的血清学鉴别诊断方法的重要材料。

基于MAb鉴定抗原表位是解析E2蛋白抗原表位谱的常用手段,同时研究E2蛋白抗原结构对于研发新型疫苗以及区分疫苗免疫和流行株感染的血清学鉴别诊断试剂盒有重要意义。本研究获得了一株仅与基因2.1亚型CSFV反应,但不能识别疫苗株和

其他基因亚型流行株的特异性MAb TCH061, 获得该MAb并解析其识别表位对揭示CSFV疫苗株和流行株E2蛋白的抗原差异, 以及开发区分疫苗免疫和流行株感染的血清学鉴别诊断产品具有重要作用。

1 材料和方法

1.1 细胞、病毒与质粒 PK-15细胞系、Sf9细胞系、MDBK细胞系、猪瘟疫病毒弱毒疫苗HCLV和LPC株、石门强毒株(SM)、76株CSFV基因1.1、2.1、2.2、2.3亚型流行株、牛病毒性腹泻病毒1型(bovine viral diarrhea virus 1, BVDV1)XH32株(BVDV1-32)和BVDV2 890株(BVDV2-890)由本实验室保存; 昆虫杆状病毒表达系统表达GD53株截短蛋白E2-1(91-331aa)、E2-2(1-90aa、171-331aa)、E2-3(171-331aa)、E2-4(1-170aa)^[13]和CSFV不同基因亚型CSFV E2蛋白和pFastBac1-JL23 E2、pFastBac-HCLV E2蛋白表达质粒^[14]由实验室前期制备并保存; DH5 α 感受态细胞购自天根生化科技有限公司; DH10Bac感受态细胞由本实验室保存。点突变质粒pFastBac1-JL23-I18、pFastBac1-JL23-G19、pFastBac1-JL23-P20、pFastBac1-JL23-L21、pFastBac1-JL23-G22、pFastBac1-JL23-A23、pFastBac1-JL23-E24、pFastBac1-HCLV-L20质粒由第一作者构建并保存。

1.2 主要试剂 Alexa Fluor 488 驴抗鼠IgG荧光二抗、Alexa Fluor 680 驴抗鼠IgG荧光二抗、Cellfectin® II购自Invitrogen公司; His Tag标签MAb、SolarFast SDS-PAGE考马斯亮蓝染色液购自北京索莱宝科技有限公司; 猪瘟疫病毒E2蛋白MAb WH303由中国兽医药品监察所WOAH猪瘟疫参考实验室提供; Phusion High-Fidelity DNA polymerase购自NEB公司; 2 \times Rapid Taq Master Mix、一步法单/双点突变试剂盒购自诺唯赞生物科技股份有限公司; 限制性内切酶Quick BamH I和Quick EcoR I、In-Fusion HD Cloning Kit购自TaKaRa公司; 质粒小提试剂盒和胶回收试剂盒购自Oxygen公司; Clona Cell™-HY半固体培养基购自STEMCELL公司; Ni Sepharose™ excel (HisTrap™ excel)购自GE公司; 小鼠单抗Ig类/亚类鉴定ELISA试剂盒和腹水专用佐剂购自苏州博奥龙免疫技术有限公司; Protein A/G 4FF预装色谱柱购自生工生物工程(上海)股份有限公司; Advanced RPMI 1640培养基、Grace's insect medium、Sf-900TMI

SFM(1 \times)购自Gibco公司; MEM(1 \times)、DMEM和PBS(1 \times)购自Corning公司。

1.3 JL23株E2蛋白的表达与纯化 将重组质粒pFastBac1-JL23转化至DH10Bac感受态细胞, 经蓝白斑筛选后进行菌液PCR鉴定, 检测引物为Bac I-BamH I-Phu-F(5'-AGCGGATAACAATTTTCACACAGG-3')、pUC/M13 Reverse(5'-CCCACCATCGGGCGC-3')。随后提取阳性重组杆粒并转染Sf9细胞, 获得的重组杆状病毒, 将其感染正常的Sf9细胞, 27 $^{\circ}$ C培养72 h后收集细胞培养上清, 4 200 r/min离心5 min后除去细胞沉淀, 并用0.22 μ m滤器过滤, 将滤液用Ni柱进行纯化, SDS-PAGE鉴定蛋白纯化效果。以His Tag(1:2 000)为一抗, Alexa Fluor 680驴抗鼠IgG(1:5 000)为二抗, western blot鉴定纯化蛋白反应情况。

1.4 E2蛋白MAb的制备 参照文献[12]制备免疫原免疫小鼠、评估免疫效果、细胞融合、筛选阳性杂交瘤细胞并亚克隆, 扩大培养亚克隆后的阳性杂交瘤细胞并冻存备用。

1.5 MAb的病毒反应谱鉴定 选取实验室保存的79株基因1.1、2.1、2.2和2.3亚型的CSFV接种PK-15细胞, 包括基因1.1亚型的HCLV株和SM株, 设置未接毒的PK-15细胞为细胞对照。病毒接种后, 细胞于37 $^{\circ}$ C、5% CO₂培养72 h, 80%冷丙酮固定细胞, PBS洗涤3次。IFA对MAb进行鉴定, 杂交瘤细胞培养上清为一抗, 80 μ L/孔, E2 MAb WH303(1:1 000稀释, 80 μ L/孔)为阳性对照, 37 $^{\circ}$ C孵育1 h, PBS洗涤3次, Alexa Fluor 488标记的驴抗鼠IgG(1:500稀释)为二抗, 荧光显微镜观察上述79株CSFV与MAb的反应情况。对于国内未流行的CSFV, 实验室前期人工合成了CSFV 10个基因亚型共计18个CSFV代表株的E2蛋白基因并利用昆虫杆状病毒表达系统表达^[21], 以杂交瘤细胞培养上清(1:200)为一抗, Alexa Fluor 680标记的驴抗鼠IgG(1:5 000)为二抗, 利用western blot鉴定MAb对这些蛋白的反应性。

1.6 腹水的制备和纯化及亚类鉴定 参照文献[14]制备腹水, 取制备的小鼠腹水2 mL, 缓慢滴加等体积的饱和硫酸铵(4 M), 冰上静置10 min, 4 000 rpm离心10 min弃去上清, 2 mL PBS重悬沉淀, 然后置于2 L PBS中透析2 h, 随后用Protein A/G 4FF预装色谱柱进行MAb纯化。纯化后的MAb用Tris-HCl(pH 8.5)调节pH值, 并用超滤管进行浓缩。参照文献[15]鉴定纯化效果, BCA法测定纯化MAb浓度。按照小鼠MAb

亚类鉴定试剂盒说明书对TCH061进行鉴定。

1.7 MAb中和能力鉴定 选取100 TCID₅₀的HCLV(1.1)株、SM(1.1)株、JL23(2.1b)株、GDLF1(2.1c)株、AH1(2.2)株和HuB2(2.3)株,设定1.6中纯化的MAb起始量为1 μg,参照文献[16],在96孔板中连续2倍倍比稀释(50 μL/孔),每个浓度设2个重复孔,随后加入极限必需培养基(minimum essential medium, MEM)稀释的各病毒液(50 μL/孔, 100 TCID₅₀/50 μL),37 °C孵育1 h,加入用含有8% FBS和1%青霉素及链霉素MEM培养基稀释的PK-15细胞。细胞于37 °C、5% CO₂培养72 h,80%冷丙酮固定细胞,PBS洗涤3次。IFA鉴定采用本实验室前期制备的E2单克隆抗体HCL-001^[21](1:1 000稀释,100 μL/孔)为一抗,Alexa Fluor 488标记的驴抗鼠IgG(1:500稀释,50 μL/孔)为二抗,同时设置正常细胞空白对照和HCLV、SM、JL23、GDLF1、AH1和HuB2病毒阳性对照(100 TCID₅₀),用荧光显微镜观察并记录。

1.8 MAb识别抗原表位的鉴定 以GD53株E2截短蛋白为抗原,以杂交瘤细胞培养上清(1:200)为一抗,Alexa Fluor 680标记的驴抗鼠IgG(1:5 000)为二抗,通过western blot实验初步确定MAb识别区域。在此基础上,根据1.5中MAb病毒反应谱的鉴定结

果,参照GenBank中19株CSFV序列,利用CLC Sequence Viewer比对,在MAb识别的区域内分析与MAb不同反应性CSFV E2蛋白的氨基酸序列差异,并通过SWISS-MODEL(<https://swissmodel.expasy.org/>)模拟CSFV JL23 E2蛋白3D结构,预测潜在的MAb识别氨基酸位点。

1.9 MAb识别突变抗原表位的鉴定 以HCLV株pFastBac 1-E2、JL23株pFastBac 1-E2重组质粒为模板,根据GenBank中CSFV JL23株E2蛋白(MK691766)基因序列,利用Primer 5.0软件设计8对E2蛋白各位点的点突变引物(表1),引物由吉林省库美科技有限公司合成,使用一步法单/双点突变试剂盒构建E2氨基酸点突变表达质粒。构建好质粒后转化至DH5α感受态细胞,PCR鉴定为阳性的菌液送至吉林省库美科技有限公司进行测序,测序结果符合预期的表达质粒转化至DH10Bac感受态细胞,经蓝白斑筛选后获得重组杆粒,采用1.3中方法利用昆虫杆状病毒表达系统表达E2蛋白,1.7中纯化的MAb(2 μg)为一抗,Alexa Fluor 680标记的驴抗鼠IgG(1:5 000稀释)为二抗,western blot进一步鉴定MAb识别的抗原表位。使用PyMOL分析MAb识别氨基酸位点的空间结构。

表1 构建E2氨基酸点突变的重组质粒的扩增引物序列

Table 1 Primers used for the construction of recombinant pFastBac 1-E2 plasmids with amino acid mutation

猪瘟病毒 CSFV strain	蛋白突变位点 Mutation site	上游引物(5'-3') Forward primer (5'-3')	下游引物(5'-3') Reverse primer (5'-3')
JL23	I ¹⁸	AACCAATGAGATGGGGCCGCTAGGGGCTGAAG	GCCCATCTCATTGGTTGATGATATCGCATACT
JL23	G ¹⁹	GAGATAAAACCGCTAGGGGCTGAAGGCTCTCAC	CCTAGCGGTTTTATCTCATTGGTTGATGATATCGCA
JL23	P ²⁰	TGAGATAGGGCTGCTAGGGGCTGAAGGCTCTCACTACC	CTAGCAGCCCTATCTCATTGGTTGATGATATCGC
JL23	L ²¹	ATGAGATAGGGCCCGGGGCTGAAGGCTCTCACTACC	GGGCGCCCTATCTCATTGGTTGATGATATCGC
JL23	G ²²	GCCGCTAAAAGCTGAAGGCTCTCACTACCACCTG	CITCAGCTTTTAGCGGCCCTATCTCATITGGTT
JL23	A ²³	GCCAGAAGGCTCTCACTACCACCTGGAGAGAGT	TAGTGAGACCTTCTGGCCCTAGCGGCCCTATCTCA
JL23	E ²⁴	TACCGGTCTCACTACCACCTGGAGAGAGTATA	TGCTAGTGAGACCGGTAGCCCTAGCGGCCCTAT
HCLV	L ²⁰	TGAGATAGGGCCACTTGGGGCCGAGGCTCTCA	CAACTGGCCCTATCTCATCGGTTGACGATATT

2 结果

2.1 JL23株E2蛋白的表达与纯化 将JL23 E2 pFastBac1重组质粒转化至感受态细胞,经蓝白斑筛选后进行菌液PCR鉴定,在1 900 bp左右出现单一目的条带(图1A),与预期相符,表明重组菌JL23 E2 pFastBac1/DH10Bac正确构建。用昆虫杆状病毒表达系统进行表达,收集第3代杆状病毒的细胞培

养上清,Ni柱纯化蛋白,纯化蛋白SDS-PAGE验证结果显示,纯化的E2蛋白在90 ku和45 ku处有目的条带,分别为E2蛋白的同源二聚体和单体,蛋白条带单一(图1B),表明蛋白纯度较好。纯化蛋白western blot鉴定结果显示,纯化的E2蛋白以二聚体和单体的形式存在,在90 ku和45 ku处有条带(图1C),与SDS-PAGE结果相符。E2蛋白以同源二聚体和单体在昆虫杆状病毒表达系统中表达,且纯化效果较

好, 可用于下一步免疫小鼠。

2.2 CSFV E2 蛋白 MAb 的制备 IFA 测定小鼠免疫血清 2 倍倍比稀释后的免疫效果结果显示, 编号为 1369 号的小鼠免疫效果最好, 当其血清稀释到 12

800 倍时仍与 JL23 毒株感染的 PK-15 细胞反应, 呈现较明显绿色荧光(图 2), 因此选择该小鼠制备杂交瘤细胞。经亚克隆和 IFA 筛选后, 最终获得 16 株 E2 蛋白 MAbs, 相应 MAb 命名为 TCH055~TCH070。

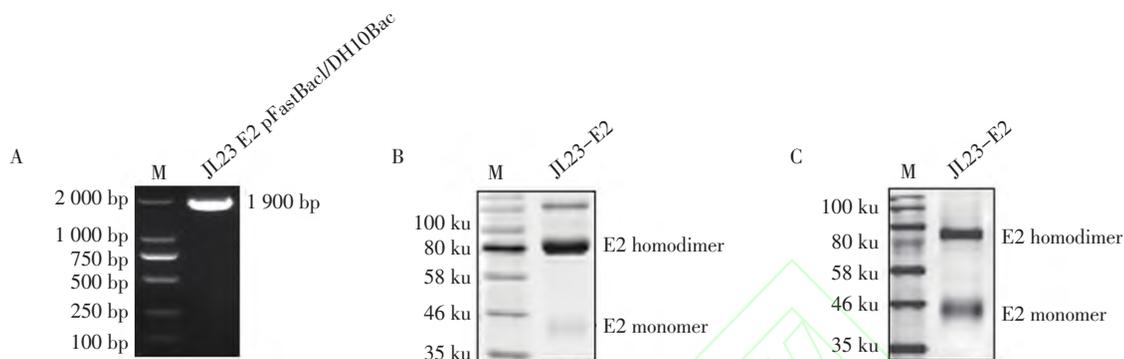


图 1 JL23 E2 纯化蛋白的鉴定

Fig. 1 Identification of the purified JL23 E2 protein by western blot

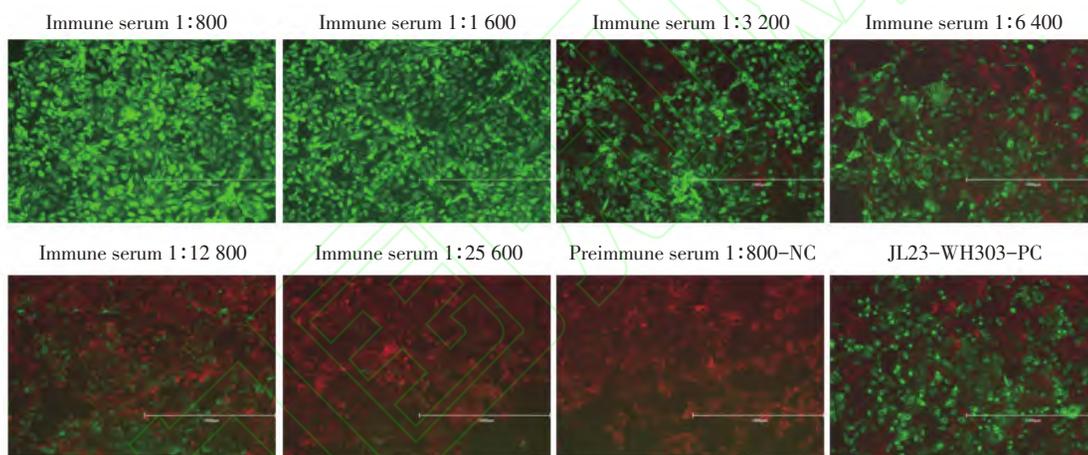


图 2 IFA 检测 E2 蛋白免疫三次小鼠的抗体水平

Fig. 2 Detection of the antibody level of mice vaccinated with E2 protein for three times by IFA

2.3 MAb 病毒反应谱的鉴定结果 IFA 验证 16 株 MAbs 反应谱, 结果显示, 阳性对照抗体 WH303 与所选各基因型 CSFV 的感染细胞都反应, 有明显绿色荧光, 而 16 株 MAbs 中有一株 MAb, TCH061, 与基因 2.1 亚型(2.1a、2.1b、2.1c、2.1g、2.1h、2.1i、2.1j、2.1k、2.1l、2.1m、2.1n)CSFV 感染细胞反应后有绿色荧光, 与基因 1.1 亚型 HCLV 疫苗株和 SM 株以及其他基因型 CSFV 感染细胞反应后无绿色荧光, 表明 TCH061 为基因 2.1 亚型 CSFV E2 蛋白特异的 MAb(仅展示部分反应和未反应的不同基因型 CSFV 感染细胞的荧光图片, 未展示的图片均与展示图片荧光效果相同或接近)(图 3A)。同时, western blot 结果显示, 该 MAb 能识别基因 2.1 亚型 CSFV E2 蛋白(2.1a、2.1b、2.1c、2.1g、2.1h、2.1i、2.1j), 在 90 ku 有明显

条带, 但与基因 1.1 亚型的 HCLV、LPC、SM, 以及基因 1.2、1.3、1.4、2.2、2.3、3.1、3.2 和 3.4 亚型 CSFV E2 蛋白不反应, 在 90 ku 处无条带(图 3B), 进一步明确 TCH061 为基因 2.1 亚型 CSFV E2 蛋白特异的 MAb 其重链为 IgG2a, 轻链为 λ 链。

2.4 MAb TCH061 中和能力的测定结果 纯化后的 MAb 经倍比稀释后与各基因型 CSFV 混合孵育并接种 PK-15 细胞, IFA 测定后用荧光显微镜观察接种后出现绿色荧光的感染细胞, 结果显示, TCH061 对 JL23 株、GDLF1 株有一定的中和能力, 在抗体量为 1 μ g、500 ng、125 ng、2 ng 较少。对基因 1.1 亚型的 HCLV 疫苗株、SM 株和基因 2.2、2.3 亚型流行株没有中和能力, 在相同抗体浓度下, 与阳性抗体对照相比, 都出现了较多含绿色荧光的感染细胞(图 4), 该

结果进一步表明TCH061为基因2.1亚型CSFV E2蛋白特异的中和MAB。

2.5 MAb TCH061识别抗原区域的鉴定结果 采用western blot 鉴定 MAb TCH061与4种E2截短蛋白反应性,结果显示,TCH061与GD53株E2蛋白反应,在90 ku有明显条带,与截去D/A抗原区(aa91~aa170)的

E2-2(aa1~aa90、aa171~aa331)和截去C-端(aa170~aa331)的E2-4(aa1~aa170)反应,在50 ku和37 ku有明显条带,但与截去B/C抗原区(aa1~aa90)的E2-1(aa91~aa331)和只保留C-端的E2-4(aa1~aa170)不反应,在58 ku和46 ku处均无条带(图5),表明TCH061识别的抗原区域位于E2蛋白的B/C抗原区(aa1~aa90)。

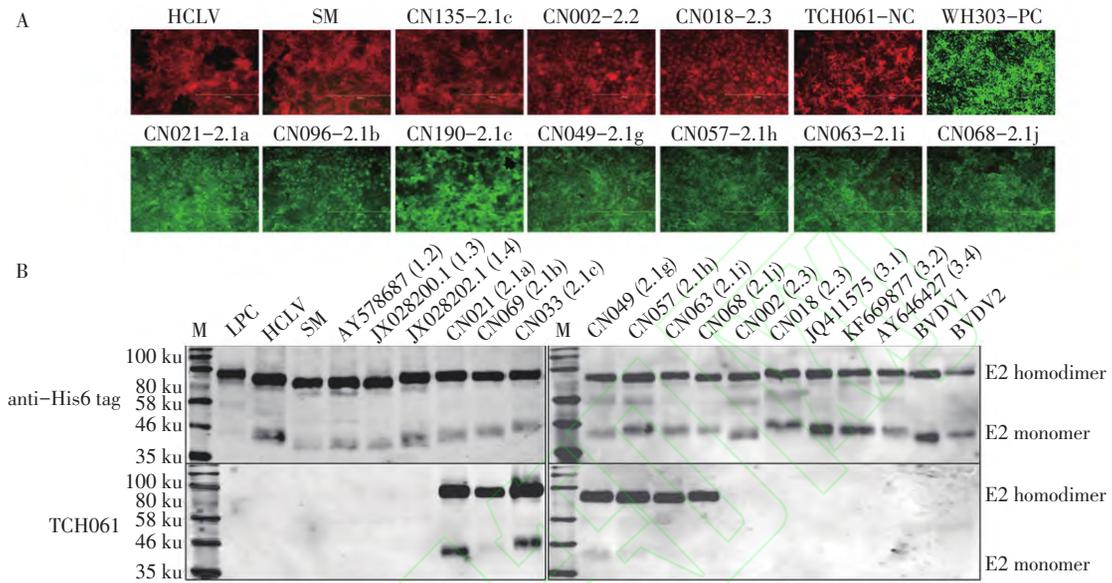


图3 IFA(A)与western blot(B)鉴定TCH061与CSFV不同基因亚型CSFV或E2蛋白的反应情况
Fig. 3 Reactivity between TCH061 and CSFV strains belonging to different subgenotypes CSFV or E2 proteins determined by IFA (A) and western blot (B)

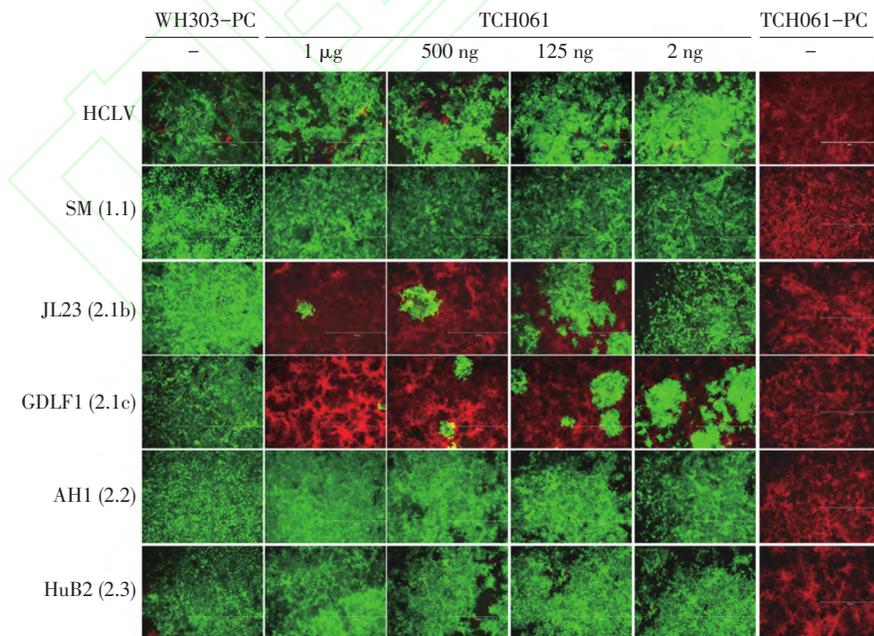


图4 TCH061对不同基因亚型CSFV中和能力测定

Fig. 4 Determination of the neutralization capacity of Mab TCH061 against CSFV strains belonging to different subgenotypes

2.6 MAb TCH061识别关键氨基酸的鉴定结果 氨基酸序列比对的结果显示,与TCH061反应的CSFV

在E2蛋白aa20位氨基酸为脯氨酸(P),与其不反应的CSFV在该位点则为亮氨酸(L)(图6A)。表明P²⁰

可能是 TCH061 识别的关键氨基酸。模拟 TCH061 识别表位所在的 E2 蛋白结构区域发现, I18、G19、P²⁰、L²¹、G²²、A²³和 E²⁴在空间上比较接近。这些位点构建的点突变重组蛋白经昆虫杆状病毒表达系统表达, western blot 鉴定其与 TCH061 反应情况。结果显示, TCH061 与 JL23 E2 重组蛋白 I¹⁸M 反应, 在 90 ku 有条带, 与 G¹⁹K、P²⁰L 和 L²¹P 不反应, 在 90 ku 无条带,

与 G²²K 反应较弱, 在 90 ku 有微弱条带, 与 HCLV E2 不反应, 在 90 ku 无条带, 但与 HCLV E2 重组蛋白 L²⁰P 反应, 在 90 ku 处有明显条带(图 6B)。因此, TCH061 识别 E2 蛋白氨基酸序列¹⁹GPLG²², 该表位经结构模拟确定为空间构象表位(图 6C), 除 20aa, 其他位点在各基因型 CSFV 中非常保守, 表明 P²⁰是 TCH061 识别基因 2.1 亚型流行株的关键氨基酸残基。

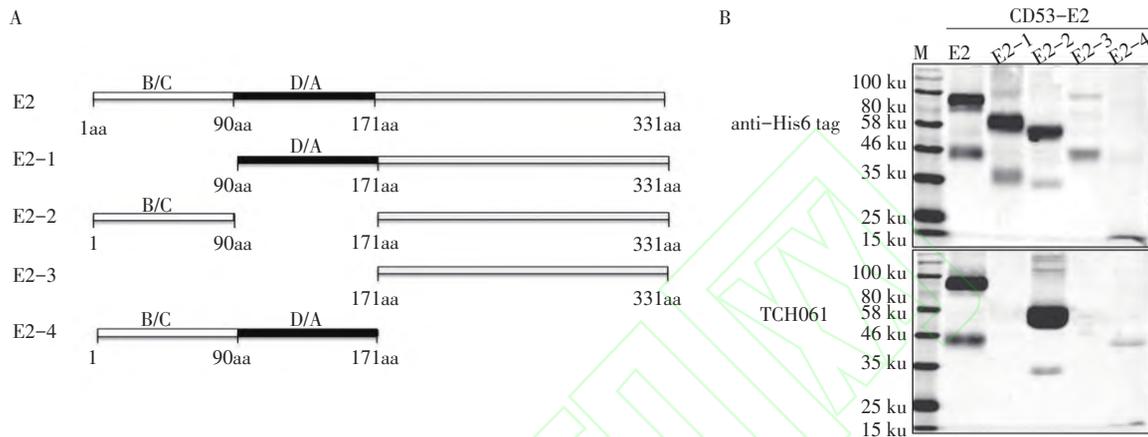
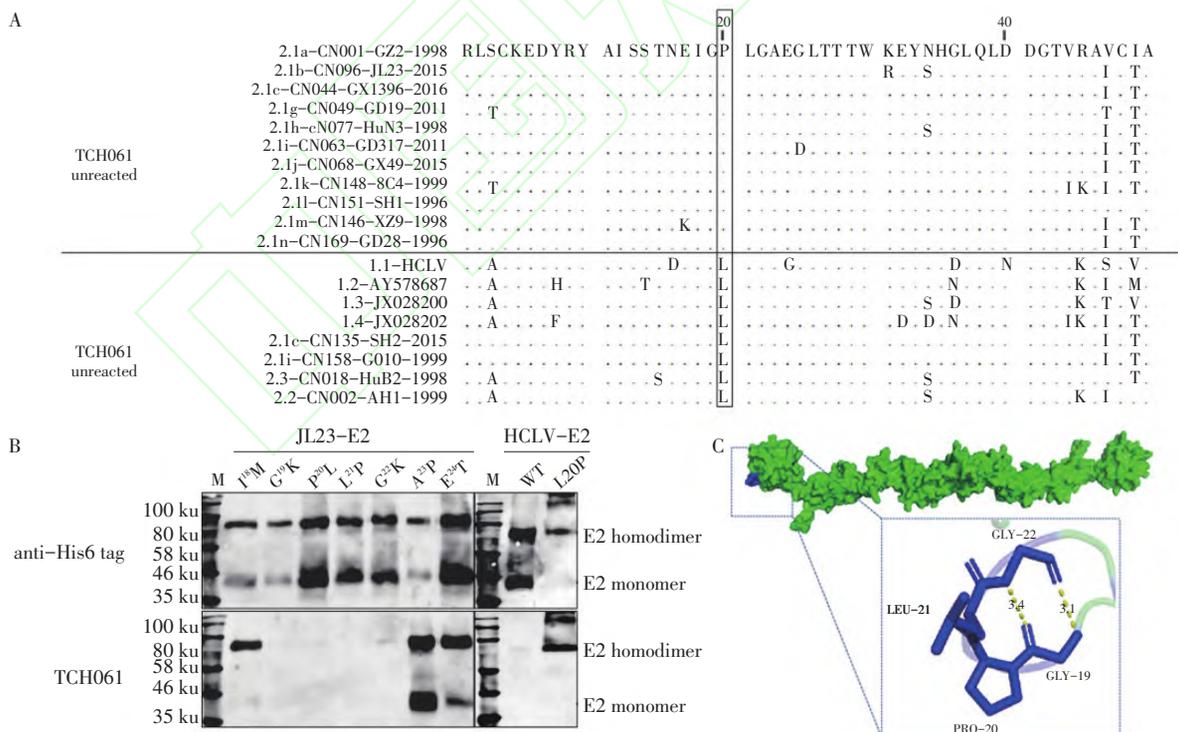


图 5 TCH061 识别抗原表位所在区域的测定

Fig. 5 Identification of the E2 protein region containing the antigen epitope recognized by TCH061



A: 与 MAb TCH061 反应和不反应 CSFV E2 蛋白的氨基酸序列比对; B: Western blot 鉴定 TCH061 与 HCLV 和 JL23 株的 E2 蛋白及其突变体的反应性; C: MAb TCH061 识别抗原表位的结构模拟图

A: multiple sequence alignment of E2 protein of CSFV strains recognized by TCH061 or not; B: Reactivity of TCH061 with wild type or site-directed mutated E2 proteins of vaccine HCLV and field JL23 identified by Western blot; C: the structure model of the antigenic epitope recognized by MAb TCH061 in the E2 protein

图 6 MAb TCH061 识别抗原表位的鉴定结果

Fig. 6 Identification of antigenic epitope recognized by MAb TCH061

3 讨论

疫苗免疫是我国防控 CSF 重要且有效的策略, HCLV 疫苗大规模推广使用成功控制了 CSF 在我国的大流行。HCLV 疫苗株具有很好的免疫原性和安全性, 对不同基因型 CSFV 的攻击均能提供保护, 但 HCLV 株免疫无法在血清学水平上区别疫苗免疫与流行株的感染, 主要是缺乏相应的血清学鉴别诊断产品与之配合使用, 从而使得 HCLV 株在我国 CSF 净化中的使用受到了较大的限制^[17-18]。目前导致我国 CSF 流行的 CSFV 属于基因 2.1 亚型, 该亚型 CSFV 与 HCLV 株的 E2 蛋白氨基酸同源性小于 90%, 且氨基酸差异位点主要位于 E2 蛋白的抗原区, 提示疫苗株与流行株之间存在一定的抗原差异。因此, 筛选区别 HCLV 株和当前优势流行株的鉴别 MAb 对研发区别疫苗免疫和流行株感染的血清学方法非常重要, 特别是不与疫苗株反应, 但与当前优势流行株反应的 MAb。

CSFV E2 蛋白属于 I 型跨膜蛋白, 能介导病毒侵入宿主细胞, 是病毒主要保护性抗原蛋白, 能刺激机体产生中和抗体。研究表明, E2 蛋白 N 端含有 4 个抗原区, A-D, 其在 C⁴-C⁴⁸、C¹⁰³-C¹⁶⁷ 和 C¹²⁹-C¹³⁹ 二硫键的作用下形成 B/C 和 D/A 抗原结构单元, 其中 B/C 抗原结构单元包含残基(1-90aa), D/A 抗原结构单元包含残基(91-170 aa)^[19]。研究表明, D/A 抗原结构单元的抗原表位相对保守, 如已发现的中和表位¹⁴⁰TAVSPTTLR¹⁴⁸ 已被广泛用于开发新型疫苗如亚单位疫苗和 CSF 诊断方法的建立^[20-21], 而 B/C 抗原结构单元的抗原表位较容易变异, 与 CSFV 的抗原特异性有关, 针对 B/C 抗原区已发现了许多抗原表位, Chang 等发现 MAbs T33、V8 识别的关键氨基酸残基分别为 E²⁴、D⁴⁰, 其与 3.4 亚型 CSFV 94.4/IL/94/TWN 的抗原特异性有关, MAbs C2、L7 识别的关键氨基酸残基分别为 D¹⁶、和 K⁷², 其与疫苗株 LPC/AH-RI 抗原特异性有关^[22]; Huang 等鉴定 MAb 1C7A1 识别的关键氨基酸残基为 G³⁶, 其仅识别 2.1、2.2、2.3 亚型 CSFV; 边界病毒(border disease virus, BDV) MAb WS381 识别的关键氨基酸残基 P²⁰, 与 TCH061 一致, 但其只能识别部分 2.1 亚型 CSFV^[23]; 刘钟迪等鉴定 MAb TCH045 识别的关键氨基酸残基为 G²⁴, 其能识别 1.1、3.1 亚型 CSFV^[12]; 米士江等鉴定 MAb 6B211 识别的关键氨基酸残基为 N40, 其能识别 1.1

亚型 CSFV 和部分 2.2 亚型 CSFV^[14]。本研究鉴定了基因 2.1 亚型 CSFV 特异的抗原表位, 其位于 B/C 抗原结构单元, 该表位的解析进一步加强对 E2 蛋白抗原结构的认识。

本研究利用昆虫-杆状病毒表达基因亚型 2.1b CSFV JL23 株的 E2 蛋白免疫小鼠, 首次获得了一株能特异性识别 2.1 亚型 CSFV 的 MAb, 并鉴定组成 MAb TCH061 识别抗原表位的氨基酸残基为 G¹⁹、P²⁰、L²¹ 和 G²²。中和实验结果进一步表明, TCH061 不能中和疫苗株, 但对流行株 2.1 亚型有中和能力。筛选的特异性 MAb 不仅能用于疫苗研制, 还能用于建立有针对性地检测方法, 如利用鸡传染性喉气管炎病毒制备的 gG 蛋白 MAb 3C8 建立的 ic-ELISA 方法^[24]、利用猪流行性腹泻病毒全病毒 MAb 作为捕获抗体建立的捕获 ELISA 方法^[25]等均取得良好的检测效果。由于本研究制备的 MAb TCH061 可区分我国当前 CSFV 流行株和疫苗株, 其也可用于开发 CSFV 疫苗免疫和流行株感染的血清学鉴别诊断试剂盒, 这将有助于我国 CSF 的防控与净化, 同时研究结果进一步表明我国当前 CSFV 流行株与疫苗株在 E2 蛋白上存在抗原差异, 为深入解析其差异提供了重要数据。

参考文献:

- [1] BLOME S, STAUBACH C, HENKE J, et al. Classical swine fever—an updated review [J]. *Viruses*, 2017, 9(4): 86.
- [2] ZHOU BIN. Classical swine fever in china—an update minireview [J]. *Front Vet Sci*, 2019, 6: 187.
- [3] FERNANDEZ-SAINZ I, RAMANATHAN P, O'DONNELL V, et al. Treatment with interferon- α delays disease in swine infected with a highly virulent CSFV strain [J]. *Virology*, 2015. 483: 284-90.
- [4] BJÖRKLUND H V, STADEJEK T, VILCEK, S, et al. Molecular characterization of the 3' noncoding region of classical swine fever virus vaccine strains [J]. *Virus Genes*, 1998, 16(3): 307-312.
- [5] FLETCHER S P, JACKSON R J. Pestivirus internal ribosome entry site (IRES) structure and function: elements in the 5' untranslated region important for IRES function [J]. *J Virol*, 2002, 76(10): 5024-5033.
- [6] JI WEI, GUO ZHEN, DING NAI-ZHENG, et al. Studying classical swine fever virus: making the best of a bad virus [J]. *Virus Res*, 2015, 197: 35-47.
- [7] XU QIAN-RU, GUO JUN-QING, MA FAN-SHU, et al. A novel linear epitope at the C-terminal region of the classical swine fever virus E2 protein elicits neutralizing activity [J]. *Int J Biol Macromol*,

- 2021, 189: 837-846.
- [8] GONG WEN-JIE, WU JIAN-MIN, LU ZONG-JI, et al. Genetic diversity of subgenotype 2.1 isolates of classical swine fever virus [J]. *Infect Genet Evol*, 2016, 41: 218-226.
- [9] PATON D J, MCGOLDRICK A, GREISER-WILKE I, et al. Genetic typing of classical swine fever virus [J]. *Vet Microbiol*, 2000, 73(2/3): 137-57.
- [10] FATIMA M, LUO YU-ZI, ZHANG LI, et al. Genotyping and molecular characterization of classical swine fever virus isolated in China during 2016-2018 [J]. *Viruses*, 2021, 13(4): 664.
- [11] GONG WEN-JI, WANG ZUN-BAO, SUN JIU-MENG, et al. Virulence evaluation of classical swine fever virus subgenotype 2.1 and 2.2 isolates circulating in China [J]. *Vet Microbiol*, 2019, 232: 114-120.
- [12] 刘钟迪, 吴梦, 米士江, 等. 一株区分猪瘟病毒疫苗株和流行株的单克隆抗体的制备及其抗原表位鉴定[J]. *中国预防兽医学报*, 2023, 45(06): 621-627.
- [13] MI SHI-JIANG, WANG LI-HUA, LI HONG-WEI, et al. Characterization of monoclonal antibodies that specifically differentiate field isolates from vaccine strains of classical swine fever virus [J]. *Front Immunol*, 2022, 13: 930631.
- [14] 米士江. 猪瘟病毒流行毒株与疫苗株鉴别单抗和广谱性单抗的鉴定及其抗原表位解析[D]. 长春: 吉林大学, 2022.
- [15] 向志达, 李长尧, 张涛清, 等. 非洲猪瘟病毒A137R蛋白单克隆抗体的制备与表位鉴定[J]. *中国预防兽医学报*, 2022, 44(04): 402-410.
- [16] 刘梦莹, 李敏华, 王倩, 等. 美洲型猪繁殖与呼吸综合征病毒GP4蛋白中和活性单克隆抗体制备及其抗原表位鉴定[J]. *中国预防兽医学报*, 2019, 41(06): 641-644.
- [17] GANGES L, CROOKE H R, BOHÓRQUEZ J A, et al. Classical swine fever virus: the past, present and future [J]. *Virus Res*, 2020, 289: 198151.
- [18] WANG LI-HUA, MI SHI-JIANG, MADERA R, et al. A Novel competitive ELISA for specifically measuring and differentiating immune responses to classical swine fever C-strain vaccine in pigs [J]. *Viruses*, 2022, 14(7): 1544.
- [19] WANG FUN-IN, DENG MING-CHUNG, HUANG YU-LIANG, et al. Structures and functions of pestivirus glycoproteins: not simply surface matters [J]. *Viruses*, 2015, 7(7): 3506-3529.
- [20] HOLINKA L G, FERNANDEZ-SAINZ I, O'DONNELL V, et al. Development of a live attenuated antigenic marker classical swine fever vaccine [J]. *Virology*, 2009, 384(1): 106-113.
- [21] BAI YI-LIN, JIA RUI, WEI QIANG, et al. Development and application of a high-sensitivity immunochromatographic test strip for detecting classical swine fever virus antibodies [J]. *Transbound Emerg Dis*, 2022, 69(4): e788-e798.
- [22] CHANG CHIA-YI, HUANG CHIN-CHENG, LIN YU-JU, et al. Identification of antigen-specific residues on E2 glycoprotein of classical swine fever virus [J]. *Virus Res*, 2010, 152(1/2): 65-72.
- [23] HUANG YU-LIANG, MEYER D, POSTEL A, et al. Identification of a common conformational epitope on the glycoprotein e2 of classical swine fever virus and border disease virus [J]. *Viruses*, 2021, 13(8): 1655.
- [24] 郭鹏宇, 赵妍, 刘胜旺. 鸡传染性喉气管炎病毒GG蛋白间接竞争ELISA方法的建立及初步应用[J]. *中国预防兽医学报*, 2023, 45(7): 704-709.
- [25] 杨利, 张浩明, 于晓明, 等. 猪初乳中PEDV IGA抗体捕获ELISA检测方法的建立及其初步应用[J]. *中国预防兽医学报*, 2023, 45(8): 822-828.