

分类号： S855.3

授予学位单位代码：10434

学

号：2022120669

山東農業大學

硕士学位论文

牛病毒性腹泻病毒 N^{pro} 蛋白多克隆抗体的制备及初步应用

Preparation and Preliminary Application of Polyclonal
Antibody Against N^{pro} Protein of Bovine Viral Diarrhea Virus

姓 名：张善乐

学 位 类 别：兽医硕士

专 业：兽医

研 究 方 向：动物疫病防控

学 院：动物医学院

指 导 教 师：商营利 教授

2024 年 5 月 25 日

论 文 提 交 日 期：2024.04.07

论 文 答 辩 日 期：2024.05.19

学 位 授 予 日 期：2024.06

学 位 类 别：兽医硕士

答 辩 委 员 会 主 席：兰邹然 研究员

英文缩略词表

英文缩写	英文全称	中文名称
Kana	Kanamycin	卡那霉素
APS	Ammonium persulfate	过硫酸铵
BIS	N,N'-Methylene-bis (acrylamide)	N,N'-亚甲基双丙烯酰胺
Bp	Base pair	碱基对
BPB	Bromophenol blue	溴酚蓝
BSA	Bovine serum albumin	牛血清白蛋白
DAPI	4', 6-diamidino-2-phenylindole	4',6-二脒基-2-苯基吲哚
ddH ₂ O	Distilled and deionized water	三蒸水
DMEM	Dulbecco's modified eagle's medium	达尔伯克改良伊格尔培养液
DMSO	Dimethyl sulphoxide	二甲基亚砷
DNA	Deoxyribonucleic acid	脱氧核糖核酸
dNTP	Deoxyribonucleoside triphosphate	脱氧核糖核苷三磷酸
DTT	Dithiothreitol	二硫苏糖醇
<i>E.coli</i>	Escherichia coli	大肠杆菌
ECL	Enhanced chemiluminescence	增强化学发光
EDTA	Ethylene diamine tetraacetic acid	乙二胺四乙酸
ELISA	Enzyme linked immunosorbent assay	酶联免疫吸附试验
FBS	Fetal bovine serum	胎牛血清
HRP	Horseradish peroxidase	辣根过氧化物酶
IFA	Immunofluorescence assay	间接免疫荧光测定
IgG	Immunoglobulin G	免疫球蛋白 G
IPTG	Isopropyl-β-D-thiogalactoside	异丙基-β-D-硫代半乳糖苷
KD	Kilodalton	千道尔顿
LB	Luria-Bertani	LB 液体培养基
mAb	Monoclonal Antibody	单克隆抗体
nt	Nucleotide	核苷酸

OD	Optical density	光密度
ORF	Open reading frame	开放阅读框
pAb	Polyclonal Antibody	多克隆抗体
PBS	Phosphate buffered solution	磷酸盐缓冲溶液
PBST	Phosphate buffered solution/Tween-20	磷酸盐吐温缓冲液
PCR	Polymerase chain reaction	聚合酶链式反应
RNA	Ribonucleic acid	核糖核酸
RNase A	Ribonuclease A from bovine pancreas	核糖核酸酶
SDS	Sodium dodecyl sulfate	十二烷基硫酸钠
SDS-PAGE	Sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis	聚丙烯酰胺凝胶电泳

目 录

1 前言.....	1
1.1 BVDV 的概述	1
1.1.1 BVDV 的流行病学研究	1
1.1.2 BVDV 的防控措施	2
1.2 BVDV 的分子生物学特性及编码的蛋白	2
1.3 N ^{pro} 的性质和功能.....	4
1.4 BVDV 的检测	4
1.4.1 病毒分离.....	4
1.4.2 PCR 检测	5
1.4.3 酶联免疫吸附实验(ELISA)检测法.....	5
1.4.4 间接免疫荧光(IFA)检测法	6
1.4.5 病毒中和试验(VN)检测法	6
1.5 本研究目的意义.....	6
2 材料与方法.....	8
2.1 主要仪器设备.....	8
2.2 材料与试剂.....	9
2.2.1 主要实验材料.....	9
2.2.2 试剂配制	10
2.3 实验方法.....	10
2.3.1 重组表达载体的构建与验证.....	10
2.3.2 聚丙烯酰胺凝胶电泳.....	17
2.3.3 重组蛋白表达的验证.....	17
2.3.4 重组蛋白表达与纯化.....	18
2.3.5 蛋白液的透析与浓缩.....	21
2.3.6 实验动物的免疫和血清的采集分离.....	22
2.3.7 酶联免疫吸附试验.....	23
2.3.8 N ^{pro} 多克隆抗体的纯化.....	24
2.3.9 细胞的培养、复苏以及冻存.....	25
2.3.10 抗体结合特异性的验证.....	26
2.3.11 细胞间接免疫荧光.....	26
3 结果与分析.....	28
3.1 BVDV N ^{pro} 蛋白原核表达载体的构建与鉴定	28
3.2 N ^{pro} 蛋白的诱导表达及表达条件优化	29
3.3 N ^{pro} 蛋白的大量纯化及检测.....	30

3.4 兔血清中多克隆抗体效价的检测	31
3.5 抗血清的纯化与特异性检测	32
3.6 应用抗 N ^{pro} 多克隆抗体进行间接免疫荧光检测	33
4 讨论.....	35
5 结论.....	37
6 参考文献.....	38

中文摘要

牛病毒性腹泻病 (Bovine Viral Diarrhea, BVD) 又被称为牛病毒性腹泻-黏膜病, 是由牛病毒性腹泻病毒 (Bovine Viral Diarrhea Virus, BVDV) 引起的一种接触性、热性传染病, 可导致患畜出现腹泻、生长繁殖功能障碍、机体免疫抑制、黏膜溃疡溃烂等症状。该病在世界范围内广泛分布且变异进化速度较快, 给全球的养牛业造成了极其严重的损失。若母牛在其妊娠的初期感染 BVDV, 则大概率会产下持续感染 (Persistently Infected, PI) 牛, PI 牛终身携带病毒且不断向外部环境排出病原体, 是导致 BVD 传播的重要传染源。疫苗免疫和检测清除感染牛是当前防控 BVDV 感染的主要措施, 由于 PI 牛不表现明显的临床症状而检测筛选带毒牛是清除病毒的关键手段。因此, BVDV 特异性检测抗体对于实现牛场 BVD 净化具有重要意义。目前, 国内市场商品化的针对 BVDV N^{pro} 蛋白的多克隆抗体研究基础较薄弱, 抗体临床应用特异性不强, 因此, 本研究旨在制备一种可用于临床应用, 特异性和灵敏性较高的 BVDV 特异性抗体, 对于 BVDV 的防控具有重要意义。

N^{pro} 是 BVDV 的一种非结构蛋白, 可以增强 BVDV 在感染细胞中的复制能力并导致感染动物的先天免疫抑制, 是该病毒主要的毒力蛋白之一。经过对多种不同基因型毒株的同源性分析, BVDV 编码 N^{pro} 蛋白的基因片段较为保守不易突变, 利用该片段制备的检测抗体较为理想。多克隆抗体具有识别病毒抗原表位多, 受病毒突变影响较小且制备成本相对低的优点。为了制备抗 N^{pro} 蛋白具备高效价的多克隆抗体, 本研究克隆了编码 N^{pro} 蛋白的基因序列并选取 pET-30a 原核表达载体构建了带有 His 蛋白标签的 pET-30a-N^{pro} 重组表达载体。将该载体转入 BL21 (DE3) 感受态细胞中使其进行蛋白表达并对获得的蛋白进行验证, 在理论大小 26 kD 处有单一明显条带且获得的 N^{pro} 蛋白以包涵体形式存在。通过优化蛋白表达的条件, 最终实现了 N^{pro} 的体外高效稳定表达, 其表达的最优条件为 37 °C 环境下使用 0.5mM 的 IPTG 诱导 12 h。通过 AKTA 蛋白纯化仪对 N^{pro} 蛋白进行 Ni-NAT 亲和层析纯化, 获得的蛋白与弗氏佐剂混合作为抗原对新西兰大白兔进行三次免疫。免疫结束后大量采血并分离血清, 借助间接 ELISA 方法测定所获血清中抗体的效价, 结果表明其效价可达 1 : 10⁷ 以上, 后续采用辛酸-硫酸铵沉淀法提纯血清中抗体。通过免疫印迹和间接免疫荧光对抗体的特异性进行检测, 发现其只与 BVDV 结合而不与其他病原发生反应, 具有良好的特异性, 可以用于临床检测。

综上所述,本研究成功获得了高效价且具有良好特异性的抗 BVDV N^{pro} 多克隆抗体,为进一步研发应用于临床 BVDV 抗原检测的特异性抗体奠定了基础。

关键词: 牛病毒性腹泻病毒, N^{pro} 蛋白, 多克隆抗体, 病毒检测

Preparation and Preliminary Application of Polyclonal Antibody Against N^{pro} Protein of Bovine Viral Diarrhea Virus

Abstract

Bovine viral diarrhea (BVD) is a contact, febrile infectious disease caused by bovine viral diarrhea virus (BVDV), which can lead to diarrhea, growth and reproduction dysfunction, and immunosuppression of infected animals. BVDV is widely distributed worldwide, causing severe losses to the global cattle industry. In addition, BVDV infection in the early stages of gestation may result in persistent infection (PI) of BVDV in calves, which is an important source of BVDV. Vaccine immunization and testing to remove infected cattle are the main measures to prevent and control BVD. However, due to lack of obvious clinical symptoms in PI cattle, accurate detection and screening of cattle carrying are the key means to remove the virus. Hence, generation of specific antibodies for BVDV detection are of great significance.

N^{pro} is a nonstructural protein of BVDV that enhances BVDV replication in infected cells and causes innate immunosuppression in infected animals, is one of the major virulence proteins of the virus. In order to prepare polyclonal antibodies against N^{pro} protein with high efficiency, this study construct pET-30a-N^{pro} recombinant expression vector with His protein tag. The recombinant vectors were transfected into BL21 (DE3) for protein expression and N^{pro} protein was successfully obtained in the form of inclusion bodies. The N^{pro} protein was then purified by Ni-NAT affinity chromatography by using an AKTA pure and was mixed with Fuchs' adjuvant to immunize large white rabbits to generate polyclonal antibodies. Eventually, serum from immunized rabbits were collected and was determined by indirect ELISA, showing that the valence of anti-N^{pro} antibody is over 1: 10⁷ and anti-N^{pro} IgG was purified by ammonium sulphate precipitation. The antibody was subsequently purified by octanoic acid-ammonium sulfate precipitation. The specificity of the antibody was examined by immunoblotting and indirect immunofluorescence, and it was found that the antibody only bound to BVDV but did not react with other pathogens.

In conclusion, this study successfully obtained a highly efficient and specific anti-BVDV N^{pro} polyclonal antibody, which provides a useful tool for clinical BVDV antigen detection.

Keywords: Bovine viral diarrhea virus, N^{pro} protein, Polyclonal antibody, Virus detection

1 前言

1.1 BVDV 的概述

1.1.1 BVDV 的流行病学研究

牛病毒性腹泻病(Bovine viral diarrhea, BVD)又称为黏膜病(mucosal disease, MD),该病是由牛病毒性腹泻病毒(Bovine viral diarrhea virus, BVDV)感染相关易感动物而导致的一种以机体发热、腹泻(Yue *et al.*, 2022)、消化道表层黏膜溃烂和坏死、流产等为主要临床症状的接触性传染病(Hirose *et al.*, 2021)。BVDV 侵入动物机体后可致机体的免疫系统损伤,引发免疫抑制进而导致混合或继发感染(Shin and Acland, 2001)。BVDV 可感染牛、山羊、绵羊、骆驼、鹿等多种动物(张红梅等, 2023)。病牛感染 BVDV 后可以长期潜伏带毒和持续性向外界排毒并可通过粪便污染、料草笼舍污染等多种途径水平传播(Su *et al.*, 2021)。怀孕母牛在妊娠早期尤其在其妊娠初期的四个月内通过胎盘以垂直传播的方式感染犊牛(Riedel *et al.*, 2019),此外病毒也能以患病公畜的精液为媒介进行传播(张忠辉等, 2022)。若妊娠母牛在怀孕早期遭受 BVDV 感染则大概率会产下持续感染(PI)牛,PI 牛始终向外部环境排出病毒使病毒始终在宿主群体中存在,是 BVDV 重要的传染源(Scharnbock *et al.*, 2018)。

我国国内最早于 1980 年由李佑民等发现并分离得到第一株 BVDV。在此之后,由于国内养牛业迅速发展与牛场规模的不断扩增,BVDV 的传播范围和造成的损失也在不断扩大。近些年,全国各地不断出现并相继报道了 BVDV 的流行和发病情况,Deng 等曾在 2010-2013 年间对我国八个省份范围内的 BVDV 传播情况进行流行病学调查,发现 BVDV 抗体阳性检出率为 78.09%,抗原阳性率为 1.39%(Deng *et al.*, 2015),其后该团队又持续对 2017-2019 年三年间我国十九个省份范围内的大型奶牛场进行 BVDV 流行病学调查和监测,发现 BVDV 抗原阳性率升高至 2.22%。和彦良等发现在 2018-2021 年间我国国内多个省份该病病例数呈不断增多的趋势,许多大型牛场牛群中的 BVDV 抗体阳性率持续升高,样品总阳性率可达 78.39%(和彦良等, 2023)。

1.1.2 BVDV 的防控措施

由于 BVDV 给我国的养牛业造成了重大的损失，因此加强对于该病的监测和防控显得尤为重要。目前，国际上采取的防控 BVDV 流行传播最主要的方式可归为两类，即牛群的筛查净化和免疫接种。瑞典、西班牙和芬兰等欧洲国家主要采用筛查净化的策略，通过清除消灭传染源的方式很好地控制了 BVDV 的流行；美国和德国等国则采用制定特定免疫程序使用弱毒活疫苗和灭活疫苗进行疫苗免疫的方式进行防控，也取得了显著的成效（Cerutti *et al.*, 2016）。近年来，我国越来越重视 BVD 的防控与净化，农业农村部逐渐将该病的净化加入到动物防疫管控之中，具体采取的措施包括制定免疫程序接种疫苗进行免疫，使用特定的检测试剂盒进行抗原抗体检测，净化持续性感染动物防止牛场再次出现感染动物等，在推广实践中取得了良好的效果（董坤，2022）。

1.2 BVDV 的分子生物学特性及编码的蛋白

BVDV 属于黄病毒科（Flaviviridae）瘟病毒属（Pestivirus）家族的成员，根据病毒基因型的不同又可分为 BVDV-1 型、BVDV-2 型和 BVDV-3 型三类（Al-Kubati *et al.*, 2021），向下又可细分为若干不同的亚型（Giammarioli *et al.*, 2015）。根据病毒感染宿主细胞后能否导致细胞病变，又可把 BVDV 毒株分为非致细胞病变型（non-cytopathogenic, NCP）和致细胞病变型（cytopathogenic, CP）两种生物型（Tian *et al.*, 2021）。BVDV 是单股正链的 RNA 病毒，病毒粒子直径长 40-60nm，其基因组由一个含有约 4000 个密码子的开放阅读框（ORF）和 5' 及 3' 非编码区（5'-UTR 及 3'-UTR）组成，全长约为 12.5kb（Kokkonos *et al.*, 2020）。

BVDV 的 5'-UTR 包含 1 个内部核糖体进入位点（internal ribosomal entry site, IRES），它能够启动单个多聚蛋白分子的翻译，IRES 由三个螺旋结构构成，内部包含两个高度可变区；3'-UTR 具有相对保守的颈环结构而非 poly-A 尾，其中含有多个可与宿主细胞中 microRNA 发生特异性结合的位点（Scheel *et al.*, 2016）。BVDV 的 ORF 编码一个由三千九百多个氨基酸组成的多聚蛋白，经翻译、加工生成十二种成熟的蛋白质，其中包括四类结构蛋白[病毒衣壳蛋白 C、囊膜蛋白（Erns、E1 和 E2）]和八类非结构蛋白（N^{pro}、P7、NS2、NS3、NS4A、NS4B、NS5A 及 NS5B）（Ridpath, 2005）。其中结构蛋白主要组装构成病毒的核衣壳和囊膜，具有很好的抗原性（韩慧等，2019）。其中 E2 蛋白

的结构和功能引起了当前国内外研究的广泛关注，E2 蛋白极易发生突变，其中含有 BVDV 重要的抗原识别位点，是中和抗体识别和结合病毒粒子的主要目标，也是做为研制抗 BVDV 亚单位疫苗的首选抗原。病毒的非结构性蛋白则在病毒自身的复制、转录及病毒与宿主的相互作用中发挥重要作用，其中 N^{pro} 蛋白是瘟病毒属病毒所独有的蛋白，是一种非结构性的病毒自溶蛋白酶。可致细胞病变型 BVDV 毒株的基因组相对更加复杂，BVDV 在其自身增殖过程中基因组染色体的复制和宿主细胞 RNA 的嵌入会使基因组发生很大程度的变异（Becher *et al.*, 2001），基因重组通常不改变基因型，但可能改变生物型。

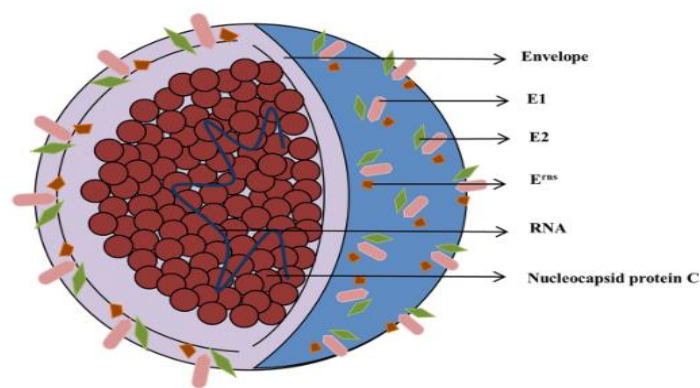


图 1 BVDV 的基因组和形态结构示意图（Chi *et al.*, 2022）

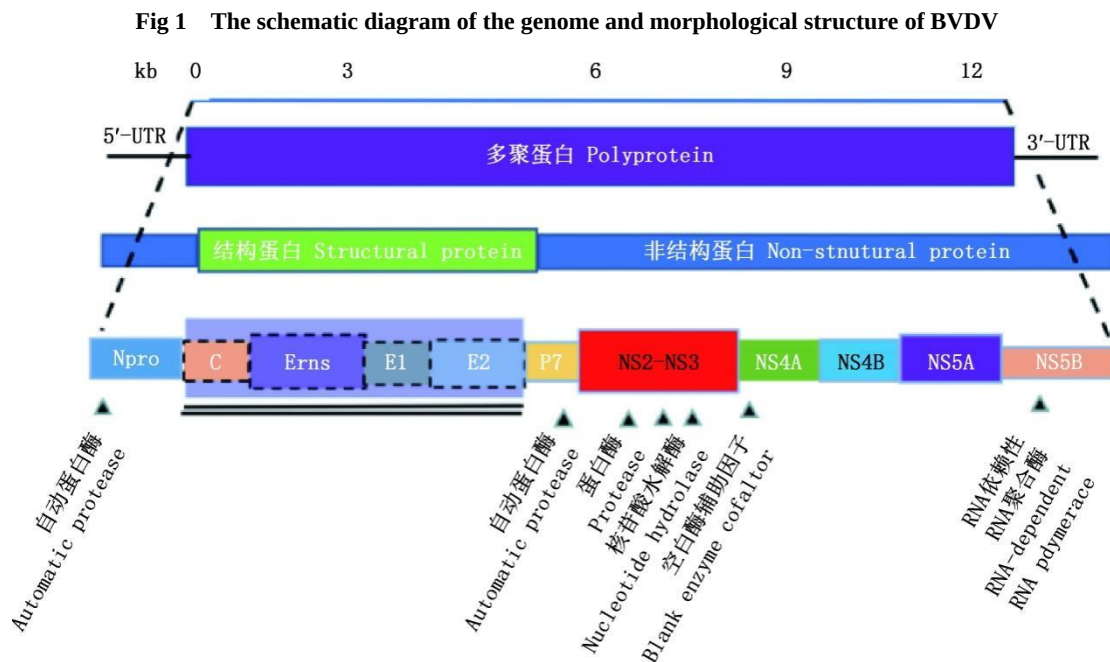


图 2 BVDV 基因组示意图（Al-Kubati *et al.*, 2021）

Fig 2 Graphical representation of the genome organization of BVDV

1.3 N^{pro} 的性质和功能

N^{pro} 蛋白是所有瘟病毒属家族成员 ORF 区编码的首个蛋白也是 BVDV 编码的一种非结构蛋白, 该蛋白的分子质量约为 26 kDa, 是一种负责自我切割的半胱氨酸蛋白酶。BVDV N^{pro} 是一种不含信号肽的亲水外膜蛋白, 其二级结构主要为 β -sheet 和随机卷曲。此外, N^{pro} 是一种自蛋白酶, 可以自催化新生多蛋白的裂解产生 BVDV-C 蛋白, 进一步研究发现 N^{pro} 蛋白的 Cys69 和 His130 是蛋白酶活性中心的两个位点, 可以催化 Tyr164 和 Val65 之间肽键的断裂。瘟病毒属 N^{pro} 蛋白序列同源性一般高于 70%, 相对保守, 故可用于病毒的鉴定及分群 (Cerutti *et al.*, 2016)。

α/β 干扰素 (IFN- α/β) 系统是抵御病毒感染的第一道防线, 也是先天免疫反应和适应性免疫反应之间的关键联系。BVDV N^{pro} 可以抑制 IFN- α/β 的分泌 (Gil *et al.*, 2006), 同时 BVDV N^{pro} 可以调节 I 型干扰素 (IFN-I) 的产生 (Wang *et al.*, 2024), 影响病毒的复制能力, 导致感染动物的先天免疫抑制 (Kozasa *et al.*, 2015)。Darweesh 等人发现 BVDV N^{pro} 可通过降低体细胞中 S100A9 蛋白的活性来抑制 IFN-I 的产生, 从而增强 BVDV 在感染细胞中的复制能力 (Darweesh *et al.*, 2018)。此外, BVDV N^{pro} 还可以特异性阻断干扰素调节因子 3 (IRF-3) 活性并通过蛋白酶体降解细胞内 IRF-3 (Lazear *et al.*, 2013), 从而抑制 IFN-I 型的产生 (Hilton *et al.*, 2006)。Chen 等人发现 BVDV-1a (NADL 菌株) 的 N^{pro} 可以通过泛素化和蛋白酶体降解 IRF-3 (Chen *et al.*, 2007)。进一步研究表明, 病毒 N^{pro} 具有一个锌原子结合结构域可以与 IRF-3 结合, 导致特异性 E3 泛素连接酶与 N^{pro} IRF-3 复合物结合, 催化 IRF-3 的多泛素化反应, 最终通过蛋白酶体途径降解 IRF-3。这些研究均表明 BVDV N^{pro} 参与了病毒感染时的免疫调控。

1.4 BVDV 的检测

1.4.1 病毒分离

分离病毒进行检测是对于病毒病检测的最基本最简单的方法, 该方法主要操作步骤是将疑似患牛病毒性腹泻病的病牛的鼻粘液和粪便使用生理盐水进行溶解, 溶解液通过 0.22 μ m 滤器过滤除菌后, 取适量接种到对数生长期且生长状态良好的 MDBK 单层细胞中, 将细胞置于 CO₂ 浓度为 5% 温度为 37℃ 的培养箱中进行培养, 每 12 h 观察细

胞病变情况，待细胞发生明显病变且胞内空泡面积达到 50%以上后收获病毒，若要增大病毒液浓度也可将病毒液进行重复多次接种（包振中等，2015）。该方法操作起来费时费力，并不适用于病毒的快速和高效检测。

1.4.2 PCR 检测

通过聚合酶链式反应(PCR)也是检测 BVDV 的一种常用的方法。首先对于 GenBank 数据库中查到的 BVDV 基因序列进行分析并找出其中的保守区域，随后根据该保守序列按照引物设计法则设计可以进行特异性结合的引物，将该引物与待检病料的处理液混合扩增，扩增后进行琼脂糖凝胶电泳观察是否阳性条带等（刘照贞，2020）。

PCR 检测法又包括 RT-PCR，荧光定量 RT-PCR，套式 PCR 等。其中 RT-PCR 技术是通过将 RNA 病毒反转录和转录的 cDNA 聚合酶链式扩增两步相结合，具有价格低廉、方便快捷、易操作等优点，但该方法敏感性相对不高。荧光定量 RT-PCR 是在普通 PCR 对检测样本定性分析和扩增基因片段的基础上进行改良，实现对样品定性定量检测的一种核酸检测技术，该方法以 BVDV 5'-UTR 基因为前提，构建具有特异性的探针和引物并以体外转录病毒 RNA 作为绝对定量标准品。套式 PCR 即巢式 PCR（Nested-PCR），该方法与普通 PCR 不同的是它的扩增需要两对 PCR 引物，即外套引物和内套引物，在扩增过程中，需要先使用外套引物进行第一轮 PCR 扩增，第一轮扩增结束后使用内套引物进行第二轮 PCR 扩增，该方法在底物浓度极低的情况下仍可使用，因此该方法灵敏度相对优于普通 PCR（和琳等，2023）。

1.4.3 酶联免疫吸附实验（ELISA）检测法

酶联免疫吸附实验（ELISA）的原理为将抗原或抗体结合到某种固相载体表面,选取抗原或抗体通过专业方法与特定的酶相结合，这种抗原抗体与酶的结合物同时具有酶的活性与免疫活性，称为酶标抗原或抗体（姚春雨等，2008）。在检测试剂盒中先后加入待测样品和酶标抗原或抗体使其发生反应，反应过后进行洗涤，最后结合在固相载体上的酶量与标本中受检物质的量成一定的比例，此后加入底物，底物要求能够与酶发生反应产生颜色变化。通过这种方法,底物颜色的变化程度即为是否发生反应及反应剧烈与否的判断依据，颜色变化量可通过酶标仪进行定量测定。目前检测 BVDV 的常用酶联免疫吸附试验（ELISA）包括间接 ELISA、双抗体夹心 ELISA、阻断 ELISA、斑点酶联免

疫吸附试验 (Dot-ELISA) 及细胞内酶联免疫吸附试验 (In Cell-ELISA) 等 (秦义娴等, 2022)。不同类型的酶联免疫吸附试验其具体效果和优势也有所不同, 在实际应用中应根据具体情况灵活选择。

1.4.4 间接免疫荧光 (IFA) 检测法

免疫荧光技术是运用抗原与抗体结合的原理和特殊的标记技术, 对特异性抗原或抗体进行定位、定性或定量检测的一门技术, 其包括直接免疫荧光和间接免疫荧光两种, 使用间接免疫荧光法检测血清中的抗体具有敏感性高、反应速度快、特异性强等优点, 适合检查 NCP 型的 BVDV 细胞培养物, 但由于技术操作较为复杂和对仪器设备的要求较高, 因此不适用于基层兽医的实际检测 (薛麒等, 2017)。

1.4.5 病毒中和试验 (VN) 检测法

中和试验 (Neutralization.test,VN) 是最为简便易行的检验方法之一。使用该方法进行检测时, 首先将待检血清样品充分溶解后进行倍比稀释, 再利用 BVDV 抗原测定牛血清中 BVDV 抗体的效价, 当抗体效价相比于阴性血清升高四倍滴度时则判定结果呈阳性 (丁繁萍等, 2021)。这种检测方法所具有的优点在于其可以应用于细胞水平上的中和试验, 但是由于实验过程中对于操作精密度的要求较高且实验结果易受其他干扰因素的影响而出现假阳性和假阴性的问题, 所以一般不利用其进行大规模样品的检测, 目前已渐渐被 ELISA 检测法取代。

1.5 本研究目的意义

牛病毒性腹泻病毒自首次在美国被发现分离至今已广泛流行, 给全球养牛业造成巨大损失。由于牛病毒性腹泻病毒会引起机体的免疫抑制, 故而该病毒感染也会导致患病牛发生继发感染, 当怀孕母牛感染时会产下持续感染牛, 这种牛通过一般性的临床检测方法并不能进行精准的区分, 这些都给牛病毒性腹泻病的防治带来了极大的困难。目前, 国际上公认使用 ELISA 检测试剂盒对于牛病毒性腹泻病的筛查具有较好的效果, 但检测试剂盒需要有特异性识别抗体为前提。目前国内已经研发成功的抗体大多针对病毒的结构蛋白, 对于非结构蛋白 N^{pro} 制备检测抗体的研究极少。同时, 因受到 N^{pro} 蛋白表达量低以及抗体制备成本高等客观因素的制约, 国内外有研究报道的抗 N^{pro} 抗体存在效价

低、价格昂贵及应用范围窄等局限性。因此,我们旨在通过开展本研究制备一种效价高、敏感性强以及特异性好,可以广泛应用于临床检测的抗 BVDV N^{pro} 的多克隆抗体,对于 BVDV 的防治具有重要意义。

2 材料与方法

2.1 主要仪器设备

仪器名称	采购公司
20 °C 冰箱	海尔集团
4°C 展示柜	澳柯玛股份有限公司
AKTA Pure 蛋白纯化仪	美国 GE 公司
Arcos TM 组织块管理系统	Therom Fisher 公司
CO ₂ 培养箱	Therom Fisher 公司
Excelsior TM AS 组织脱水机	Therom Fisher 公司
PCR 仪	北京东胜创新生物科技有限公司
PH 计	Sartorius 公司
Western Blot 基础电源、半干转膜仪、	
垂直电泳槽	Bio-Rad 公司
玻片染色机	Therom Fisher 公司
超纯水仪	Millipore 公司
超低温冰箱	Thermo Fisher 公司
超净工作台	北京王堂蓝翼科技有限公司
超声波细胞粉碎机	宁波新芝生物科技有限公司
倒置显微镜	日本 Olympus 公司
电泳凝胶成像分析仪	美国 Protein Simple 公司
电子天平	美国奥豪斯仪器有限公司
封片机	Therom Fisher 公司
恒温金属浴	卡尤迪生物科技有限公司
恒温培养箱	上海博讯实业有限公司
恒温水浴锅	上海一恒科技有限公司
化学发光仪	上海天能科技有限公司
精密移液器	美国 RAININ (瑞宁) 公司

冷冻离心机	Eppendorf 公司
冷冻台式离心机	Thermo Fisher 公司
琼脂糖凝胶电泳仪	北京市六一仪器厂
全波长酶标仪	Thermo Fisher 公司
生物安全柜	ESCO 公司
涡旋混合器	其林贝尔仪器制造有限公司
摇床	天津市欧诺仪器仪表有限公司
液氮罐	Therom Fisher 公司
荧光显微镜	尼康仪器（上海）有限公司
正置显微镜	尼康仪器（上海）有限公司
制冰机	宁波新芝生物科技有限公司

2.2 材料与试剂

2.2.1 主要实验材料

MDBK 细胞, DH5 α 菌株及 BL21 (DE3) 菌株均由本实验室保存; pET-30a 质粒由本实验室保存。BVDV 毒株 SDTA-1 由本实验室分离保存。实验所用动物新西兰大白兔自山东金丰实验动物公司购买。

小鼠抗 His 标签抗体购自北京博奥龙免疫技术有限公司; 山羊源抗兔 HRP-IgG 购于中杉金桥生物技术有限公司; 胎牛血清购买自 Biological Industries (BI); 于宝生物工程(大连)有限公司购买 PrimeSTAR HS DNA Polymerase、限制性内切酶、T4 DNA 连接酶、Premixed Protein Marker (Broad)、DL2,000 DNA Marker、DL5,000 DNA Marker、IPTG 等用品; Alexa Fluor 594 山羊抗兔 IgG 购于 Proteintech Group, Inc; DAPI、山羊血清、BCA 蛋白浓度测定试剂盒、PEG8000 购买自北京索莱宝科技有限公司; GenStar 公司购置 Prestained protein marker (10-180kDa); 普通琼脂糖凝胶 DNA 回收试剂盒、质粒提取试剂盒购买自天根生化科技(北京)有限公司; AKTA 蛋白纯化仪 HisTrap HP (5mL) 层析柱购买自 GE 公司; 弗氏完全佐剂、弗氏不完全佐剂由 Sigma-Aldrich 公司处购买。

2.2.2 试剂配制

本文所用试剂的配制均参照分子克隆技术进行。

2.3 实验方法

2.3.1 重组表达载体的构建与验证

一、引物的设计与目的基因的扩增

本实验构建载体所使用的目的基因模版序列为由本实验室所保存的 SDTA-1 毒株测序所得的 BVDV-N^{pro} 序列, 根据引物设计法则和目的基因序列设计可用的上游和下游引物并交由生工公司负责制备。设计的引物序列如下所示:

引物名称	引物碱基序列	酶切位点
BVDV-N ^{pro} -Forward	ACTGATATCATGGCTGCTGGAGGAGGCGGAGGA	<i>EcoR</i> V
BVDV-N ^{pro} - Reverse	CCCAAGCTTTCAGGCAGCGAGTTCGGCAAAACGAG	<i>Xho</i> I

设计好引物后, 使用高保真酶进行目的基因片段的 PCR 扩增。其扩增体系与各组分用量如下所示:

组分	体积 (μL)
5×PrimeSTAR Buffer	10
dNTP Mixture	4
BVDV-N ^{pro} -Forward	1
BVDV-N ^{pro} - Reverse	1
N ^{pro} genomic DNA	1
PrimeSTAR HS DNA Polymerase	0.5
ddH ₂ O	32.5

配好体系后, 设置聚合酶链式反应 (PCR) 程序。将反应预变性温度设至 98℃, 时间设至 30 s; 变性温度采用 94℃, 时间定至 10 s; 使用的退火温度定至 61℃, 时间定至 5 s; 使用的延伸温度为定至 72℃, 时间定至 105 s。其中“变性-退火-延伸”过程共做 40 个循环, 设置完毕后开始扩增。

PCR 扩增工作结束后，以扩增产物为样品使用浓度为 0.8% 的琼脂糖凝胶进行核酸凝胶电泳，以下为具体实验过程：

(1) 使用电子天平或其他精密称量仪器称得 0.48 g 质量的琼脂糖粉，再取 60 mL 的核酸电泳缓冲液将其溶解，振荡令固液充分混合。使用微波加热仪器加热混合溶液不少于 3 min，待瓶底沉淀完全消失后可停止。

(2) 加热结束后取出溶液，室温下将其静置进行冷却。根据液体体积按照固定的比例（核酸染料体积：溶液体积=1:10000）取 6 μL 的核酸染料缓慢加入溶液并轻摇促进染料溶解。此后，将溶液倒入安装有合适尺寸梳子的制胶板中，室温下静置 30 min 以上。

(3) 待板中的凝胶凝结后，缓慢拔出梳子并将胶块从制胶板中取出，清洗电泳槽并将凝胶块置于其中，加入适量电泳缓冲液。

(4) 移取 10 μL 体积的 6 $\times$ Loading Buffer 与含有扩增产物的溶液混合并吹打均匀。加样时首先在凝胶块接近边缘一侧加入不少于 5 μL 体积的 DNA Marker，后将各样品按顺序依次加入其余孔中。

(5) 开启电源开关，以 120 V 电压、120 A 电流开始电泳。电泳时间不少于 20 min 后，关闭电泳仪从电泳槽中取出电泳后胶块，将其放入紫外核酸胶成像仪中。

(6) 使用紫外光照射凝胶，观察电泳结果并保存图片。

二、琼脂糖凝胶中 DNA 的回收

经观察对比，证实电泳后核酸目的条带大小及位置正确后，在仪器紫外光照射下切取核酸凝胶中含有目的条带的区域。为了便于更完全地溶解胶块，将后续实验所需的部分尽量切成细小的碎块放入已知净重的离心管中称取凝胶重量。按照琼脂糖凝胶回收的要求进行 DNA 回收工作（王敬文，2023），操作步骤如下所示：

(1) 提前准备好收集管并安装吸附柱后吸取 500 μL 平衡缓冲液 BL 加入吸附柱并在室温环境下静置 1.5 min，设置 13400 $\times g$ 的离心力进行离心 1 min，离心完毕倒掉离心后液体，重新安装吸附柱。

(2) 取洁净离心管并根据凝胶块质量以固定比例（100 mg 凝胶添加 300 mL MB 溶液）移入适量的 MB 溶液。开启水浴锅并调定至 37 $^{\circ}\text{C}$ 恒温，将装有溶液的离心管静置

在其中不少于 10 min 以令胶块彻底融化，每隔 120 s 将离心管从水浴锅中取出并摇晃振荡。

(3) 取出水浴完毕后的离心管，将其中的溶液加入至第(1)步中的吸附柱，室温条件下静置 1 min。打开离心机将离心力设至 $13400 \times g$ 后放入含有吸附柱的收集管进行离心操作，离心完毕弃废液。

(4) 吸取 700 μL 体积的 WB 溶液注入吸附柱，打开离心机放入离心管再次以第(3)步中设置的离心程序进行离心，弃除废液。

(5) 重复第(4)步操作，再次漂洗一次。

(6) 两次漂洗过后，取新的洁净收集管并将该吸附柱装至其中，此时将其在不添加任何生物化学试剂的情况下以 $13400 \times g$ 离心 2 min，离心后将吸附柱打开置于洁净环境中静置 6 min，使其中乙醇完全挥发。

(7) 将经过离心的吸附柱与新的离心管结合，取 150 μL ddH₂O 并将其垂直悬空滴加至吸附柱中央，同样在室温环境下静置片刻。其后将离心管以 $13400 \times g$ 离心力并设置时间离心 2 min。取含有回收产物的溶液 3 μL 使用全波长酶标仪对其进行浓度与 A_{260}/A_{280} 值的测定，检测结果如实记录。

三、感受态细胞的制备

由于进行后续实验需要用到 DH5 α 菌株、BL21 (DE3) 菌株的感受态细胞，故此首先需要在实验室按照规范流程制备感受态细胞，具体操作流程如下：

(1) 取出冻存在 -80°C 冰箱中的 DH5 α /BL21 感受态细胞菌种在冰盒中化冻，在超净台中于无抗的 LB 平板上按“之”字划线，恒温培养箱中设置 37°C 防治培养皿过夜。

(2) 取出培养皿观察长出的单克隆菌落，提前准备好试管注入 5 mL 的液体无抗培养基，仔细挑取一个单克隆细菌菌落加入其中，在 37°C 环境下以 220 r/min 的速度过夜培养菌液。

(3) 按照固定比例（菌液：培养基=1：100）吸取过夜培养后的菌液 50 μL 转接到含有 500 mL 体积的液体 LB 培养基中，同样在 37°C 环境下，以 220 r/min 速度摇菌不少于 4 h 以使细菌繁殖达到对数生长期。

(4) 将聚丙烯离心管提前置于冰上冷却，冷却后加入培养好的菌液，将含有菌液的离心管冰激 10 min，然后以 $900\times g$ 的离心力离心 15 min 分离菌体。

(5) 倒掉管底经离心后的液体，将离心管开盖后放在吸水纸上，尽可能将管中的剩余液体全部排空，防止影响后续实验。

(6) 取经过 $0.22\ \mu\text{M}$ 滤器过滤过的氯化钙溶液加入离心管中并缓慢轻柔地重悬菌体。将重悬后的菌液置于冰上冰激 30 min 使细胞体积增大促使细胞膜磷脂双分子层形成液晶结构，通过在细胞膜上制造孔洞使其通透性增加。

(7) 以 $900\times g$ 离心力对菌液进行 10 min，弃去含有氯化钙的上清液，回收菌体。

(8) 按照每 50mL 初始细菌培养液加入 1.2 mL 氯化钙和 0.8 mL 50%甘油混合液的比例轻柔地重悬菌体沉淀，重悬后冰浴溶液 16 min。

(9) 备好经过预冷的无菌 1.5 mL 离心管以分装重悬后的菌液，每管分装 100 μL ， -80°C 保存备用。

四、重组表达载体的酶切鉴定

取之前实验获得的 BVDV-N^{pro} 目的片段，在离心管中加入相应酶切体系对该目的片段进行酶切，为进行实验所准备的各组分及用量如下所述：

组分	体积 (μL)
BVDV-N ^{pro}	3.6
<i>EcoR</i> V	1
<i>Xho</i> I	1
10 $\times$ Q. Cut Buffer	5
ddH ₂ O	39.4

对 pET30a 载体进行酶切，为进行实验所准备的各组分及用量如下所述：

组分	体积 (μL)
pET30a	3.2
<i>EcoR</i> V	1
<i>Xho</i> I	1
10×Q. Cut Buffer	5
ddH ₂ O	39.8

充分混匀含有各组分的溶液并分装，37℃水浴 1 h。水浴完成后，再次进行核酸凝胶电泳。采用核酸凝胶成像分析仪获得图像并保存。采用 DNA 回收技术回收凝胶中的目的片段及载体。

将经 *EcoR* V 和 *Xho* I 两种酶酶切处理后的目的基因 BVDV-N^{pro} 和 pET30a 质粒载体用准备好的 T4 DNA 连接酶连接，连接体系 (25 μL) 中各组分及用量分别如下所示：

组分	体积 (μL)
BVDV N ^{pro}	6.75
pET30a	12.3
10×T4 Buffer	2.5
T4 DNA 连接酶	1
ddH ₂ O	2.45

配置好上述体系后，使用恒温金属浴 16℃过夜连接。

取出经上一步实验连接后的重组质粒与制备的 DH5α 感受态细胞，在超净台中取 2 μL 的重组质粒溶液加入至 100 μL 的感受态细胞液中并进行充分混合，此后插在冰盒里冰激 30 min。冰激后转入水浴锅 42℃继续水浴 1.5min，水浴后的连接产物重新冷激 3 min。结束后在 100 μL 连接产物中加入 900 μL 无抗性的液体 LB，其后在恒温摇床上摇足 1 h。

1 h 后取出离心，1500×g 离心 5 min 后保留少量上清利用其将菌体悬起。在超净台中加热玻璃涂抹棒消毒后静置冷却，取混匀后的菌液滴入培养皿并用玻璃涂抹棒将其均匀涂开，培养皿做好标记后在温箱倒放保存一夜。

第二天取出过夜存放的 LB 板，从每个 LB 平板上挑取数个单克隆菌落，将移液器的枪头与菌落表面轻轻接触以将其蘸取。取洁净离心管，在管中加入 1 mL 含有 Kana 抗性的培养基，将蘸取后附着单菌落的枪头留至该管中，置于 37℃ 恒温摇床以 220 r/min 转速持续 3 h。3 h 后将摇完的菌液转加至含有 100 mL 菌液的洁净锥形瓶中，摇菌 12 h。12 h 后取 500 μ L 摇菌完毕的菌液和 500 μ L 浓度为 80% 的甘油充分混合，在 -20℃ 冰箱中保留菌种备用，其后提取感受态细胞中的质粒（赵雨娜，2021），操作步骤如下：

（1）把吸附柱放入收集管中，加入 500 μ L 的平衡液 BL，13400 $\times$ g 离心力离心 1.5 min，离心结束废液倒出后，将吸附柱重新放回插好。

（2）把要提取质粒的菌液加入离心管，以 13400 $\times$ g 离心力对离心管进行离心 1.5 min，弃去多余液体，保存不溶物质。

（3）在离心管中加入 500 μ L P1 溶液使上步所得沉淀溶解，之后涡旋使其混匀。

（4）再次转入 500 μ L P2 溶液，注意此时应该避免剧烈振荡，以柔顺的动作翻转离心管 10 次混匀溶液。

（5）接下来移取 500 μ L P4 溶液至管中，不间断翻转离心管 10 次，动作幅度不可过于剧烈，管中此刻可见乳白色沉淀。将离心管常温放置 10 min 后，设置 10 min 的离心时间以 13400 $\times$ g 离心力进行离心。

（6）结束离心后，把上层液体准确加入过滤柱，轻柔吸取上清避免掺杂沉淀影响提取效率。以 13400 $\times$ g 离心力进行离心，时间 3 min，此后把液体加入至新的离心管里。

（7）将相对于上步所获上清液总体积 0.3 倍体积的异丙醇溶液加入离心管里，注意将液体充分混合之后转入吸附柱，以 13400 $\times$ g 离心力离心 1.5 min，多余液体倒掉。

（8）使用移液器将 500 μ L PD 溶液加入吸附柱中，离心程序为 13400 $\times$ g 离心力和 1.5 min 的时间，弃掉废液。

（9）继续把 600 μ L PW 漂洗液滴进吸附柱，注意不要溢出，室温状态下放 5 min 后再次离心，离心程序同上，弃掉多余液体。

（10）重复漂洗一次。

(11) 再次离心，离心程序应设置为：13400×g 离心力持续 2 min，完成离心后拔出吸附柱将其置于吸水纸上静置 10 min，防止吸附柱上剩余的漂洗液影响提取结果，静置一段时间。

(12) 取新的离心管承接吸附柱，使用 100 μL ddH₂O 垂直悬空滴加至吸附柱中央，此后常温静置 3 min，3 min 后开始离心，13400×g 转速离心 2 min，离心后收取的液体即为所获得的质粒溶液。测量质粒浓度并做好记录后于-20℃保存，记录数据。

加入重组质粒 pET30a-N^{pro} 做为模板，使用两种核酸内切酶 *EcoR* V 和 *Xho* I 对重组质粒进行双酶切鉴定以确保其连接构建成功。酶切鉴定体系（50 μL）中各组分及用量为：

组分	体积（μL）
BVDV N ^{pro}	12
<i>EcoR</i> V	2
<i>Xho</i> I	2
10×Buffer	2
ddH ₂ O	29

将上述各组分充分混匀后，使用密封膜密封离心管口，37℃水浴静置，酶切 1 h 后拿出进行核酸凝胶电泳。电泳结束后，使用成像仪成像检测成果，拷贝图片并留待使用。

选取阳性的重组质粒送上海生工生物公司进行 DNA 序列测定，并保留含有测序正确的质粒的甘油菌种液。

五、重组蛋白的鉴定及诱导表达

把 100 μL BL21 感受态细胞和 2 μL 构建成功的重组质粒加在一起，混合后冰激 30 min，冰激后将其置于 42℃恒温水浴锅中热激 1.5 min，热激后再次冰激 4 min，上述操作后在离心管中补加 900 μL 无抗生素的液体 LB 培养基进行培养扩增。培养过程在转速 220 rpm/min，37℃的摇床中进行，时间 60 min。对照实验使用不含目的基因片段的质粒来进行。摇菌结束后进行离心，保留少量上层液体悬浮菌体并将重悬后的菌液在 LB 平板（Kana+）上使用玻璃棒涂抹均匀，37℃环境培养不少于 12 h。

结束培养后,取无菌试管加入适量含有 Kana 的液体 LB 培养基并从 LB 平板上挑取单菌落加入其中。在 37℃ 的摇床上摇足 14 h。

为了保留菌种备用,首先应在无菌环境下将 400 μL 菌液和 400 μL 80%甘油混合然后放入-80℃冰箱中冻存。取新的灭菌试管转加 10 mL 含有 Kana 的培养基并加入 100 μL 菌液,设置 220 r/min 速度 37℃ 恒温摇菌 8h。将 50 μL 0.5M 浓度的 IPTG 加入菌液诱导细菌表达蛋白,再次以相同程序摇菌培养 12 h。诱导结束后,取此时溶液在 4℃ 离心机温度中以 $13400\times g$ 的离心力离心 10 min 后倒出无用液体,取预冷的无菌 PBS 溶液重悬沉淀,弃除上清,加入 PBS 溶解沉淀。

操作超声细胞粉碎机裂解菌体细胞,将各项指数设置为:启动 3 s,暂停 5 s,功率为 25%,超声时间 15 min。超声完毕获得清澈的液体。 $13400\times g$ 离心菌液 15 min,离心完成后保留上清液,继续使用 PBS 来溶解沉淀,沉淀重悬后同样保留。

2.3.2 聚丙烯酰胺凝胶电泳

按标准配好 15%浓度的 SDS-PAGE 凝胶用于电泳。分别将 100 μL 超声裂解后的上清液和重悬的沉淀溶液与 20 μL 6 $\times$ Loading Buffer 混合,金属浴 100℃ 加热 12 min。将制备好的凝胶在电泳槽安装好后注入电泳液,在靠近凝胶边缘一侧样品孔中加入专用的蛋白 marker,此后以每个样品孔中加入 12 μL 体积的样品。打开电源开关将电泳初始阶段电压设定为 80 V,注意观察,当电泳的样品进入积层胶后,修改电泳电压至 120 V 进行第二阶段的电泳,待样品条带全部到达凝胶最底层后停止并取出凝胶。

2.3.3 重组蛋白表达的验证

聚丙烯酰胺凝胶电泳后,使用不同方法验证蛋白的表达情况:

一、考马斯亮蓝染色法

将凝胶拿出后裁掉无用部分,其后将剩余凝胶放入盛有蓝色考马斯亮蓝染色染液的容器中,使用慢速摇床摇动染色,染色过程不少于 6 h,染液在凝胶染色结束后可回收重复使用。染液全部回收后加入特制的脱色液给凝胶脱色,此时摇床转速调高,脱色过程中 2 h 换液一次,多次换液后脱色到凝胶出现清晰条带时停止脱色,扫描并做好记录。

二、免疫印迹实验

裁修电泳后凝胶去除无用部分后，比对裁修后凝胶尺寸同样将 PVDF 膜裁剪整齐。

将 PVDF 膜先在盛有甲醇溶液中的小盒中浸洗 30 s，再放入盛有 ddH₂O 的小盒中浸洗 60 s，最后转入含有转膜液的小盒中停留片刻。打开转膜仪首先放入下层滤纸，再将 PVDF 膜平置于下层滤纸上，使凝胶在 PVDF 膜上压实并覆盖上层滤纸，启动转膜仪将其电流调定至 80 mA，该转膜过程持续时间 1 h。

将 0.5 g BSA 粉与 10 mL 的 1×PBST 溶液混合配制 5% 的 BSA 溶液作为封闭液。关闭转膜仪取出已转入蛋白的 PVDF 膜放入小盒中，使用 PBST 溶液对膜进行清洗，洗完后倒入封闭液浸泡该膜进行封闭，置于摇床上室温等待 1 h。

使用 His 抗体与一抗稀释液以 1: 2000 的固定比例配制一抗，待封闭完成，使用 1×PBST 溶液洗膜后加入一抗溶液，使用摇床在 4℃ 环境下慢摇 12 h 进行孵育，一抗溶液在本实验中可反复利用。一抗孵育完成后取 PBST 溶液对 PVDF 膜进行清洗三次，每次时长不得少于 8 min，清洗总时长不应少于 24 min。将之前配置的 BSA 溶液使用 1×PBST 溶液由 5% 浓度稀释至 2.5%。按照固定比例（鼠源二抗：2.5%BSA=1: 10000）配好二抗，二抗浸膜孵育不少于 70 min，70 min 后再次洗膜 3 遍。

上述操作完成后，取底物发光试剂盒中提供的 A、B 液各 500 μL 配制显影液，使用实验室显色仪发光成像，观察结果并保存图片。

2.3.4 重组蛋白表达与纯化

一、重组蛋白表达条件的优化

使用灭菌的接种环蘸取已转入重组质粒的少量 BL21 菌液在固体 LB 培养基（Kana⁺）平板上做“之”字划线，完毕后倒扣于在 37℃ 恒温培养箱中静置过夜培养 14 h。培养完成后从固体培养基平板上挑选单个生长的细菌菌落并挑入含有 10 mL 卡纳抗性的液态 LB 培养基中，在 37℃ 摇床上，设置 220 r/min 的转速持续摇菌 12 h，其后，按照定量（初始菌液：液体培养基=1: 100）取 100 μL 菌液接入 10 mL 培养基（Kana⁺）中，放入摇床，37℃，220 r/min 转速摇动至少 4 h 至细菌对数生长期后，开始使用 IPTG 诱导剂进行诱导。为了提高目的蛋白在原核细胞中的表达量以利于后续实验。本研究分别设置了三个不同的变量即诱导环境的温度，诱导的时长以及诱导剂的使用量，从三个

方面进行探究。不同组合条件下分别进行一次重复试验进行验证，设置未诱导组菌液做为对照组。

诱导结束后，离心弃除上清并使用已知净重的离心管收集菌体，称量菌体干重，根据每克菌体用 5-10 mL PBS 重悬的比例，将不同体积的 PBS 分别混匀菌体。设置超声破碎仪程序：启动 3 s、暂停 5 s、功率 20% 进行超声，裂解菌体后进行离心。

由于已知 N^{pro} 蛋白以包涵体的形式在沉淀中大量存在，故再次使用 PBS 重悬离心后的沉淀物质并使用 BCA 蛋白浓度测定试剂盒测定各组的总蛋白含量，BCA 试剂盒测量总蛋白含量的步骤如下：

(1) 准备实验所需工作液：以待测样品的体积总量为标准，将试剂盒配备的 BCA 试剂溶液与 Cu⁺试剂以 50: 1 的定量在离心管中充分混合形成 BCA 工作液，配制完成后的工作液应当避光保存。

(2) 稀释蛋白标准品：将 20 μ L 的蛋白标准品 (5 mg/mL) 从 -20℃ 冰箱中取出解冻，加入试剂盒中的 PBS 溶液 90 μ L 做十倍稀释，使其终浓度定至 0.5 mg/mL。取安装好酶标条的 96 孔板，将标准品在第一列按照顺序将 0、2、4、6、8、12、16、20 μ L 体积的量加入酶标条中，最后使用 PBS 将每孔终体积定容至 20 μ L。

(3) 取待测样品，在酶标板上的每个孔中加入 20 μ L 体积的液体样品，加样完成后分别在每个孔中再次加入 200 μ L BCA 工作液，移液器充分吹打混匀后，使用封口膜缠绕酶标条并在外部再次包裹锡箔纸避光。将 96 孔板放于 37℃ 环境等待 20 min，此后取出使用酶标仪测定样品中的蛋白浓度，做好记录。

再次使用凝胶电泳进行验证，上样前根据测定的不同诱导条件组的蛋白浓度情况使用 PBS 稀释至各组总蛋白使其终浓度保持一致便于观察针对目的蛋白的诱导情况，电泳具体操作步骤与之前相同。

电泳后使用考马斯亮蓝染色法处理凝胶，观察电泳条带情况并如实记录实验结果并保存。

二、重组蛋白的纯化

本研究使用的是金属离子亲和层析技术对目的蛋白进行纯化，由于目的蛋白 N^{pro} 是带有 6×His 标签的融合蛋白且 His 标签与二价的金属镍离子具有很强的结合能力，故

本研究使用装载了 Ni^{2+} 的蛋白亲和层析柱开展蛋白纯化工作。因为咪唑具有可同各类蛋白对于层析柱上的 Ni^{2+} 进行竞争性结合的特质，所以蛋白纯化中配制使用的各种缓冲试剂中均需含有不同浓度的咪唑。因为要纯化的目的蛋白种类不同，所以所需最优的洗脱杂蛋白的咪唑浓度也不同，因此，在正式大批量地进行蛋白纯化工作以前，首先需要探究洗脱杂蛋白缓冲液中最优的咪唑使用浓度，故本研究设置了三个梯度的咪唑浓度即 40 mM 咪唑、60 mM 咪唑、80 mM 咪唑进行实验。

使用之前研究得出的最佳诱导条件转化重组质粒后过夜摇菌制备菌液样品。使用预冷的 4℃ 离心机以 $13400 \times g$ 离心力离心 10 min 后弃掉上清收集菌体沉淀，并使用 PBS 进行重悬。借助超声细胞破碎仪将菌液在冰浴环境下以开 3 s，停 5 s，25% 功率的程序对菌液进行超声裂解。此后，4℃ 以 $13400 \times g$ 离心力离心 25 min，弃掉上清保留沉淀。

由于以包涵体沉淀形式存在的蛋白不方便使用层析柱进行纯化，所以应使用蛋白变性缓冲液重悬菌体沉淀并在 4℃ 环境下过夜变性将目的蛋白变为可溶性蛋白。将过夜变性的变性液用 0.22 μm 滤器过滤后，取出 0.5 mL 做为未经纯化操作的对照组，剩余变性液分组，使用考马斯亮蓝染色的方法验证使用不同咪唑浓度缓冲液的杂蛋白洗脱效果。

获知最佳洗脱杂蛋白的咪唑使用浓度后，每次固定使用该浓度开始大批量地进行蛋白诱导表达及纯化工作。

借助学校购置自 GE 公司的 AKTA pure 蛋白纯化仪来开展蛋白纯化实验，使用 5 mL 的 HisTrap HP 层析柱，仪器主要操作方法如下：

(1) 首先检查确保仪器内部管道通路为全封闭状态，若有缺损破损处则应先进行维修。

(2) 开启仪器和与仪器相连接的电脑后，设置仪器系统内清洗程序，此时可将自清洗液体流速调高至 15 mL/min，系统内压强警报值设置为 0.5 Mpa，手动选择相应的层析柱对应型号后将 A、B 泵放进 20% 的色谱级乙醇溶液里并同时开启两泵吸液开关，按照设置程序清洁系统通路 5 min。

(3) 系统自清洗程序结束后，把 A、B 两泵放到超纯水中以 10 mL/min 的流速再次冲洗清洁仪器管道通路 10 min。冲洗结束后去除层析柱密闭装置并将层析柱紧密安装到仪器相应部位上，注意检查仪器运行时安装层析柱的位置是否漏液。

(4) 装好层析柱后把系统流速调整至 5 mL/min 使用超纯水洗涤柱子 5 min, 其后将 A、B 泵放进洗杂缓冲液里使其冲洗层析柱 15 min。

(5) 把系统流动速度调定至 2 mL/min, 将 B 泵流速设置为总流速的 30% 后放入盛有蛋白变性液的 50 mL 离心管中自动上样, 洗脱杂蛋白过程中收集少量洗脱下来的废液后续通过凝胶电泳检测纯化效果。

(6) 样品全部进入仪器后, 把系统流速升高至 5 mL/min, 将两泵同时放入洗杂缓冲液中冲洗层析柱 5 min, 当紫外光的吸光曲线平稳延伸后, 准备收集目标蛋白液。

(7) 降低系统流速为 3 mL/min, 关闭 B 泵将 A 泵放进洗脱液里, 直至紫外曲线剧烈上升并出现吸收峰时, 将系统液路调换至 Frac 管道, 用 1.5 mL 离心管收集样品, 至紫外的吸光曲线趋势平直时, 停止收样。每管收集样品 1 mL。将收集的各管纯化蛋白液做好标记以备后续检测使用。

(8) 升高系统流速至 5 mL/min, 换用超纯水冲洗层析柱 10 min, 然后卸掉层析柱重新连接仪器将系统流速调至 10 mL/min 清洁系统管路 10 min。

(9) 清洁完毕后, 关闭电脑和仪器, 倒掉废液。

2.3.5 蛋白液的透析与浓缩

每次经过纯化的蛋白液进行收集后均需使用 BCA 试剂盒测定其中的蛋白浓度, 如果经过纯化获得的蛋白液浓度过低, 那将不利于后续对实验动物的免疫, 所以需要对于蛋白液进行浓缩。此时的样品中因为含有洗脱液中大量的咪唑, 可能会对于实验动物的健康以及动物体内产生抗体的水平产生不利影响, 所以需要对于收集样品进行透析以去除咪唑等杂质, 实验进行透析浓缩所需的透析袋购自索莱宝公司, 其具体使用步骤如下:

(1) 预处理:

a. 裁剪透析袋使其长度约为 15-20 cm, 在透析袋两端的边缘留出 2-3 cm 的长度以备后续使用夹子进行封闭。

b. 将碳酸氢钠和 1 mM EDTA 充分混合配制浓度为 2% (W/V) 的溶液, 将透析袋放入烧杯中并加入该溶液, 使用微波炉中高火力加热煮沸透析袋 10 min。

c. 用镊子夹起透析袋并用蒸馏水冲洗干净上面的残余液体。

d. 配制 1 mM 的 EDTA 溶液, 将透析袋放入其中并使液面完全覆盖透析袋, 放入微波炉中以高火力煮沸透析袋 10 min。

e. 取出煮沸后的透析袋再次使用蒸馏水对其内外进行彻底清洗, 切勿用手直接接触摸透析袋。

(2) 使用透析夹夹住透析袋一侧, 在另一侧使用移液器注入 10 mL 的待透析蛋白样品, 其后再次使用夹子封闭, 务必保证透析袋的完整及透析袋两头不会向外漏液。

(3) 将装有样品的透析袋放入盛有 1×PBS 溶液的烧杯中, 务必使透析袋中的液面低于烧杯内液面。将烧杯置于磁力搅拌器上放于 4℃ 环境中搅拌透析, 透析过程中每隔 4 h 需换透析液一次, 整个透析过程不得少于 15 h。最后一次换液后持续搅拌透析时长须不少于 3 h, 透析完成后样品中的咪唑被完全分离, 得到较为纯正的蛋白液。

(4) 在洁净玻璃皿中铺上固体的 PEG8000 粉末, 将透析袋从 PBS 透析缓冲液中取出放于其上, 透析袋表面同样覆盖 PEG8000 粉末使其透过透析袋吸出样品中多余的水分, 将玻璃皿静置与于 4℃ 冰箱中, 期间每 20 min 将其取出观察一次防止浓缩过度, 待样品总体积浓缩至 3mL 左右时停止。

(5) 打开封闭的透析袋吸出其中浓缩后液体, 使用 BCA 试剂盒测定此时浓度, 考马斯亮蓝染色检测蛋白纯度。

经过透析浓缩后的蛋白液于 -20℃ 冰箱中保存。

2.3.6 实验动物的免疫和血清的采集分离

由于本研究需要取得总量较多且效价较高的多克隆抗体, 故实验中选择便于采血和分离血清的新西兰大白兔做为实验动物进行免疫。收到订购的兔子后首先饲养一周使其各项生理指标趋于平稳, 其后正式开始动物实验。

为了检测兔血中血清抗体水平变化的情况, 故在正式免疫前应首先分离一批血清做为免疫前的空白对照。使用 5 mL 的注射器选取兔耳一侧凸起的静脉抽取约 2 mL 的全血并注入离心管中, 离心管应倾斜放置在 4℃ 冰箱中以利于血清的析出, 静置 1 h。静置完毕后, 使用 850×g 离心力离心 10 min, 轻柔吸取离心后分层的上清液即所获血清, -80℃ 冰箱保存。

首次免疫时, 根据蛋白浓度测定的结果取适量体积保存的高浓度 BVDV-N^{pro} 蛋白 (蛋白总量约 1.5 mg) 和弗氏完全佐剂 (Sigma) 按照体积比 1:1 的比例加入一个小烧杯中, 使用微型乳化搅拌器插入液面下充分搅拌混匀 25 min。乳化结束后需要检测乳化状态, 使用移液器吸取少量乳化液注入盛有蒸馏水的烧杯中, 若液滴与水接触后液滴始终保持球状不分散, 则证明乳化效果良好。

为了达到更好的免疫效果刺激抗体产生, 本研究采取背部皮下注射的方式免疫实验兔, 每只兔子选取皮下 8-10 处分散的点进行注射, 注射蛋白液中蛋白浓度为 0.25mg/mL, 注射总量为 4 mL, 平均每点注射 0.5 mL, 最终给每只实验兔注射的抗原量至少须达到 1 mg。

首次免疫后间隔两个星期再次使用相同方法采血分离血清, -80℃冻存以备后续检测使用。第二次和第三次免疫时, 取含有不少于 0.5 mg 蛋白量的浓缩后的 N^{pro} 蛋白液, 将蛋白液与等体积的弗氏不完全佐剂加入小烧杯中, 使用微型电动乳化搅拌器进行持续 25 min 的充分搅拌, 乳化后检测乳化效果, 乳化完成的液滴滴入水中应保持球状不分散, 乳化后蛋白液中蛋白浓度为 0.25mg/mL。二免安排在首免后第 22 天进行。二次免疫后间隔两个星期再次对实验兔进行耳缘静脉采血, 采血后使用相同方法分离血清, -80℃环境中冷冻保存。第三次免疫于二次免疫后第 14 天进行, 蛋白乳化方法同此前一致, 免疫抗原仍为 0.5 mg。免疫后经过十四天进行采血收集血清, 冻入-80℃冰箱保存。

使用酶联免疫吸附实验 (ELISA 检测法) 检测三次免疫后的兔血清中抗体的效价, 若经过检测多克隆抗血清效价可达到 10^6 以上则可认为免疫效果较好, 可以进行全部血清的采集并进行后续实验。采集兔的大量血液应使用心脏采血法, 使用 10 mL 注射器扎入兔的心脏抽取血液注入 50 mL 离心管, 血清分离程序同前。

2.3.7 酶联免疫吸附试验

大量采集兔血前, 应首先确保其血清中多克隆抗体效价达到较高水平, 本研究中使用灵敏度高, 特异性好的间接 ELISA 检测法来精准测定抗体效价, 其具体操作步骤如下:

(1) 在板上包被抗原: 将 BVDV-N^{pro} 蛋白作为包被抗原, 使用经过过滤去除杂质的 PBS (pH=7.2±0.1) 溶液稀释经过纯化和透析的 N^{pro} 蛋白液至 2 ng/μL 浓度, 吸取经

过稀释后的蛋白液加入 ELISA 板中，板上每孔等量加入 100 μL 体积。加样完毕后静置在 4℃ 冰箱中，孵育 12 h。孵育完成后使用 1× 的 PBST 于每加样孔加入 200 μL 清洗 3 次，每次在摇床上快速摇动冲洗 5 min，洗完后务必甩干加样孔中残留液体以防干扰实验结果。

(2) 封闭蛋白：提前配制好 1% 浓度的 BSA 溶液并过滤作为该实验的封闭液，在包被过 N^{pro} 蛋白的 ELISA 板中以每孔 200 μL 体积的量注入封闭液，室温条件下静置孵育 1 h。孵育完成倒掉封闭液再次洗板 3 次

(3) 一抗处理：本实验采用兔的待检血清作为一抗，设置六个稀释度 (10^{-2} 、 10^{-3} 、 10^{-4} 、 10^{-5} 、 10^{-6} 、 10^{-7}) 对血清用封闭液进行十倍梯度稀释。分别将稀释后的血清以每孔 100 μL 体积的量加入封闭完成后的 ELISA 板中，置于室温环境孵育抗体 1 h，连续清洗板中各孔 3 次（清洗方法同上）。

(4) 二抗孵育：用封闭液按照 1:5000 的比例稀释 HRP 的山羊抗兔抗体（二抗），在加入过一抗的 ELISA 板上每孔中依次加入 100 μL 体积经过稀释后的二抗，室温孵育 1h，再次彻底清洗 96 孔板（方法同上）。

(5) 添加底物：将提前配好的 TMB 试剂按照每孔 100 μL 体积的量加入到 96 孔板每个加样孔中，96 孔板此时应包裹锡箔纸在室温下避光孵育 15-20 min。

(6) 终止反应：使用 3 M 浓度的硫酸溶液作为终止液，以每孔加入 50 μL 的量将其加入各加样孔中终止显色反应，其后将 96 孔板放入提前校准的酶标仪中，测量各加样孔内液体在 OD_{450 nm} 波长照射时的读数。

(7) 保存测定数据并利用 EXCEL 软件进行分析对比。

2.3.8 N^{pro} 多克隆抗体的纯化

提前配置好实验所需试剂，首先在小烧杯中加入 2 mL 待纯化的抗血清，再按比例将 60 mM 浓度，PH=4 的醋酸缓冲液加入小烧杯与血清混合，并使用玻璃棒搅拌混匀以保证溶液保持酸性环境，将 100 mM 的 NaOH 溶液慢速逐滴加入溶液调节 PH 至 4.5 稳定后，随着搅拌缓慢将液体正辛酸缓慢滴加至混合溶液中直至其在溶液中总浓度为 25 μL 时终止。室温环境使用磁力搅拌器持续搅拌 40 min 使反应充分进行，从开始滴加正辛酸时即开始计时。30 min 搅拌过后使用离心机设定 900×g 离心力继续离心 30 min 后

轻柔地吸出上清液至新的离心管中，尽量避免混入沉淀，为确保上清液纯度还需要用滤纸（定性滤纸）过滤两次。

将滤液与 0.1 mol/L, PH=7.4 的 10×PBS 溶液充分混合，为创造碱性环境使用 1 mol/L 的 NaOH 试剂调节溶液 PH 值至 7.4 并置于 4℃环境中，然后按照将溶液中硫酸铵浓度最终调定至 0.277 g/mL 终浓度的标准将硫酸铵固体粉末分批加入烧杯，于 4℃低温环境中搅拌混合溶液 30 min 后可见澄清的溶液变浑浊，此时将溶液转移至冰激过的离心管中，以 900×g 离心力使用冷冻离心机离心 20 min，此时在离心管底部出现白色沉淀，将沉淀用 0.1 mol/L PH=7.4 的 PBS 试剂重新悬起后按照溶液透析的操作标准将重悬液注入密闭透析袋中过夜透析，透析后分装保存。

2.3.9 细胞的培养、复苏以及冻存

将含有 MDBK 细胞的细胞冻存管从液氮环境中取出，尽快将其管体浸入 37℃恒温水浴锅搅动化冻，化冻时不要剧烈振荡，待细胞冻存管中的液体完全融化后取出消毒。将冻存管移入无菌的超净台中打开，取洁净无菌的 15 mL 离心管并用移液器将冻存管中的细胞悬液 1 mL 转入其中，其后在此离心管中继续转入 4 mL 含有 10%FBS 的 DMEM 培养基吹打均匀。将此离心管放入离心机以 200×g 离心力离心 5 min 后取出上清即细胞冻存液保留细胞沉淀，使用 5 mL 培养基对沉淀进行重悬，取无菌的 T25 细胞瓶将细胞液转入其中，将细胞瓶放入 CO₂ 恒浓度为 5% 且温度设定为 37℃的恒温培养箱中静置培养。

培养 18-24 h 后取出细胞瓶使用显微镜观察，由于 MDBK 细胞具有分裂繁殖快的特性，所以若细胞密度达到 80%以上，即可进行细胞传代。传代操作时首先用洁净的巴氏吸管从细胞瓶中将之前的液体培养基全部吸出弃掉，吸净后在细胞瓶中加入 2 mL 洁净的 PBS 并轻摇细胞瓶清洗瓶底的贴壁细胞，其后吸除 PBS。在细胞瓶中重新加入 1 mL 用于消化贴壁细胞的消化酶后，在 37℃培养箱中水平放置 5 min，若此时轻轻拍打细胞瓶发现有大批细胞脱落，则立即加入 2mL 培养基使消化反应终止。使用移液器吹打混匀细胞悬液，将细胞液吸取至无菌离心管中，室温环境下 250×g 离心力离心 5 min 后吸掉上层废液，将离心管下层的细胞沉淀用 3mL 培养基重新吹打均匀后，取出 1 mL 加入到洁净细胞瓶内，再加入 4 mL 新鲜的培养基，置于 5% CO₂, 37℃环境中进行培养。

将 900 μL FBS 移入无菌的细胞冻存管，再加入 100 μL DMSO 混匀制备细胞冻存液，待一个细胞瓶中贴壁细胞密度达到 80% 以上时进行细胞冻存操作。首先吸除细胞瓶中原有的陈旧培养基，加入 2 mL PBS 溶液摇动细胞瓶使 PBS 充分覆盖冲洗瓶底贴壁附着的细胞，弃净 PBS 溶液后将细胞消化酶加入细胞瓶，整瓶放入 37°C 培养箱中消化贴壁的细胞 4 min 左右，上述步骤结束后再加入 2 mL 培养基终止消化，用力吹打瓶壁细胞使其脱落并将其重新加入到 15 mL 无菌的离心管中。常温 200 $\times$ g 离心 5 min 后弃掉废弃上清液用 1 mL 冻存液再次重悬细胞沉淀加入至细胞冻存管中，将该管存入 -80°C 冰箱中 24 h 后再转入液氮罐长期保存。

2.3.10 抗体结合特异性的验证

使用生长状态良好且无污染的 MDBK 细胞使用胰酶消化后制备成细胞悬液，细胞计数计算细胞悬液中细胞密度后按比例将 MDBK 细胞铺于 6 孔细胞板中，每孔铺入 2×10^5 个细胞。将细胞板置于 37°C 温箱待其自然生长 24 h 后，加入实验室保存的 SDTA-1 毒株或其他 BVDV 临床分离株使病毒感染 MDBK 细胞，感染 48 h 后收集细胞并配制 SDS 裂解液，每孔中加入 200 μL 搅拌裂解细胞提取总蛋白，凝胶电泳后使用纯化后的抗体做为 一抗进行免疫印迹检测，观察是否有特异性条带。

2.3.11 细胞间接免疫荧光

取复苏后经过多次传代，生长状态良好的 MDBK 细胞铺于添加爬片的 12 孔细胞板中，确保每孔铺细胞数不少于 0.8×10^5 个，将细胞板置于 37°C 温箱中待细胞贴壁生长 24 h 后加入适量 SDTA-1 毒株病毒液使其感染细胞，待加入的病毒感染 MDBK 细胞 48 h 后，按照步骤进行如下间接免疫荧光操作：

(1) 除去旧培养基并使用移液器吸净孔底残留，用适量体积预冷的 0.5% PBST 轻轻的冲洗细胞 2 次，每次清洗时间不少于 2 min。

(2) 使用多聚甲醛固定细胞，每孔中加入 2 mL 4% 多聚甲醛于室温下室温固定 20 min。

(3) 再次使用预冷的 0.5% PBST 溶液在摇床上慢摇清洗细胞 3 遍。

(4) 每孔加入 1 mL 0.1% 浓度的 Triton X-100，将细胞板置于冰上使细胞打孔，时间不少于 5 min。

(5) 再用预冷的 0.5%PBST 在摇床上慢摇清洗细胞 3 遍，每遍不少于 2 min。

(6) 使用 PBS 稀释山羊血清至其浓度达到 5%后直接将其加入板上每孔中，室温环境下平放细胞板，封闭蛋白 30 min。

(7) 倒净封闭液，将制备的多抗使用 PBS 充分稀释，细胞板中每孔加入 400 μ L 纯化的多克隆抗体做为一抗，室内温度条件静置 1.5 h。

(8) 用置于冷藏柜中经过降温处理的 0.5%浓度 PBST 溶液柔缓地冲洗细胞 4 遍，每遍持续 3 min。

(9) 以 1: 200 的比例使用 PBS 稀释山羊抗兔的红色荧光二抗，将稀释后的二抗以每个细胞孔 200 μ L 体积的量加入经过 PBST 清洗过后的细胞孔中，室温避光静置细胞板 1.5 h，使反应充分进行。

(10) 倒掉各个细胞孔中残存的二抗溶液，取用提前经过降温的 0.5%浓度 PBST 溶液加入细胞孔中，借助摇床轻柔的慢摇细胞板清洗板底细胞 4 遍，每遍清洗 3 min 以上。

(11) 清洗细胞过后，倒掉 PBST 溶液并使用移液器吸净孔中残存的液体。提前取出冻存的 DAPI 溶液室温缓慢化冻，化冻后在不同孔中细胞爬片中央加入 100 μ 00DAPI，缓慢摇动细胞板使其均匀覆盖板底爬片以便于细胞核充分染色，此后将板于室温环境下孵育 5 min。

(12) 倒出孔中 DAPI，再次使用冷藏的 PBST 溶液轻柔的充分清洗经染色后细胞 3 遍去除全部染料，每次清洗时长保持 3 min。

(13) 将细胞板各孔中的细胞爬片仔细取出置于洁净的载玻片上，在细胞爬片边缘滴加专用封片剂使爬片充分固定，含有爬片的载玻片置于 4℃冷藏环境下避光保存，使用特制荧光显微镜观察结果。

3 结果与分析

3.1 BVDV N^{pro} 蛋白原核表达载体的构建与鉴定

为了实现 BVDV N^{pro} 基因的扩增，自行设计上下游引物 BVDV-N^{pro}-F 和 BVDV-N^{pro}-R 并使用 PCR 仪设置条件进行扩增(图 3A,B),扩增完成后使用浓度为 0.8% 的琼脂糖凝胶进行电泳，电泳后使用紫外照射凝胶观察结果，结果显示在 504 bp 左右的位置具有一条清晰明亮的条带(图 3C)，其大小符合预期结果，证明通过实验成功实现了 BVDV N^{pro} 基因的扩增。将目的基因片段和载体经过连接和转化至感受态细胞后，选取三个单克隆菌落培养后提取重组质粒并再次使用 *EcoR* V 和 *Xho* I 内切酶对质粒进行双酶切鉴定，凝胶电泳后观察结果发现，在 504 bp 和 5000 bp 左右处出现了两条特异性的条带(图 3D)且其大小符合预期，由此初步证明构建重组载体获得成功。选取上海生工公司对经初步鉴定的质粒进行序列测定，测序结果正确后可进行后续实验。

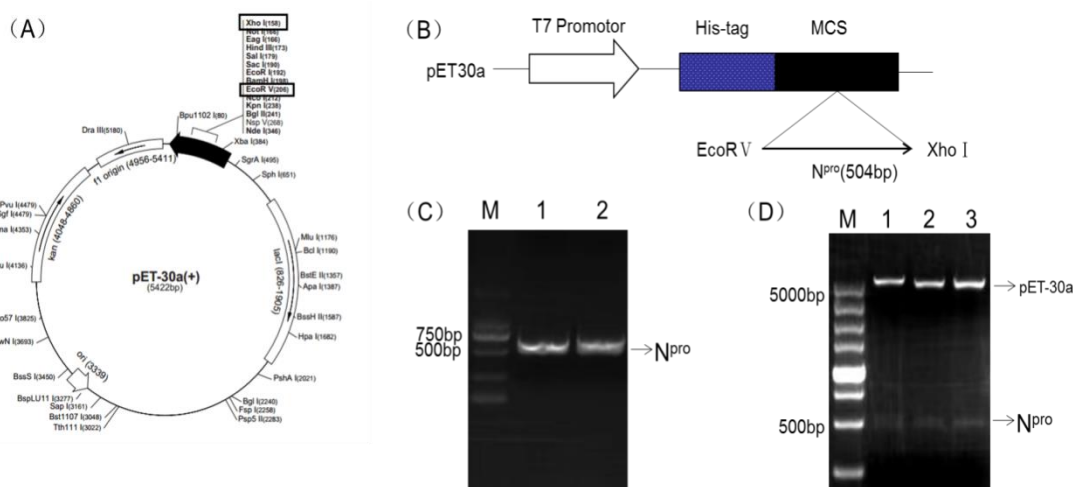


图 3 BVDV N^{pro} 蛋白原核表达载体的构建及鉴定。(A) pET-30a 质粒图谱；(B) 重组质粒 pET-30a-N^{pro} 的构建示意图；(C) PCR 扩增 N^{pro} 目的基因片段；(D) 重组质粒 pET-30a-N^{pro} 的双酶切鉴定。

Figure 3 Construction and identification of prokaryotic expression vector of BVDV N^{pro} protein. (A) pET-30a plasmid; (B) Construction diagram of recombinant plasmid pET-30a-N^{pro}; (C) PCR amplification of N^{pro} target gene fragments; (D) Double digestion of recombinant plasmid pET-30a-N^{pro}.

3.2 N^{pro} 蛋白的诱导表达及表达条件优化

分离经过超声裂解后菌液的上清液，留存的沉淀使用 PBS 重新悬起混匀。将不同类型样品进行凝胶电泳并使用考马斯亮蓝染色（图 4A）和免疫印迹实验（图 4B）验证 N^{pro} 蛋白是否成功表达。由图可见在 26 kD 左右处有明显条带，其所处位置与预期相符，表明构建的重组质粒可以正常表达 N^{pro} 蛋白。该蛋白在上清液和沉淀中均可以检测到，证明 BVDV-N^{pro} 蛋白以可溶性蛋白和包涵体蛋白沉淀两种形式表达，但是主要以包涵体形式存在。

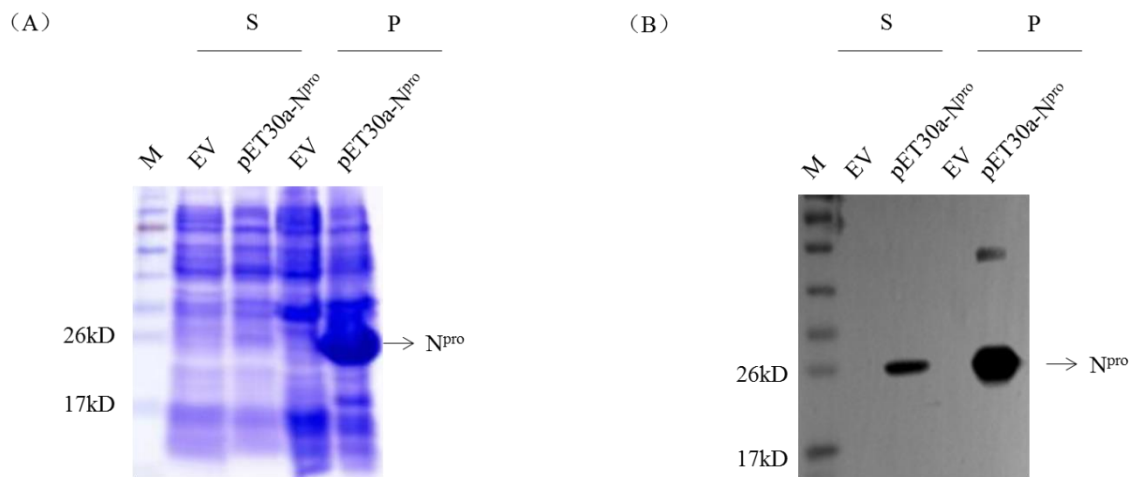


图 4 BVDV N^{pro} 蛋白表达情况验证。(A) 考马斯亮蓝染色检测蛋白表达情况；(B) 免疫印迹检测蛋白表达情况。

Figure 4 Verification of BVDV N^{pro} protein expression. (A) Coomassie bright blue staining was used to detect protein expression; (B) Immunoblotting was used to detect protein expression.

离心后超声破碎菌体，以相同方法分离上清液和沉淀，通过考马斯亮蓝染色（图 5A,B,C）检测蛋白在不同条件下的表达情况，观察结果可知在 37℃，0.5 mM IPTG 诱导时长为 12 h 时最有利于 BVDV-N^{pro} 蛋白的表达，所以后续大批量纯化蛋白时均使用该条件（37℃，0.5 mM IPTG 诱导表达 12 h）操作，使用该优化后条件进行蛋白的诱导表达可使蛋白浓度达到 0.5 mg/mL（图 5D）。

表 1 重组质粒 pET30a-N^{pro} 的诱导表达条件Table 1: Induced expression conditions of recombinant plasmid pET30a-N^{pro}

组别	温度 (°C)	时间 (h)	IPTG 浓度 (mM)
A	16、25、37	12	0.5
B	37	4、8、12、16	0.5
C	37	12	0.2、0.5、1.0

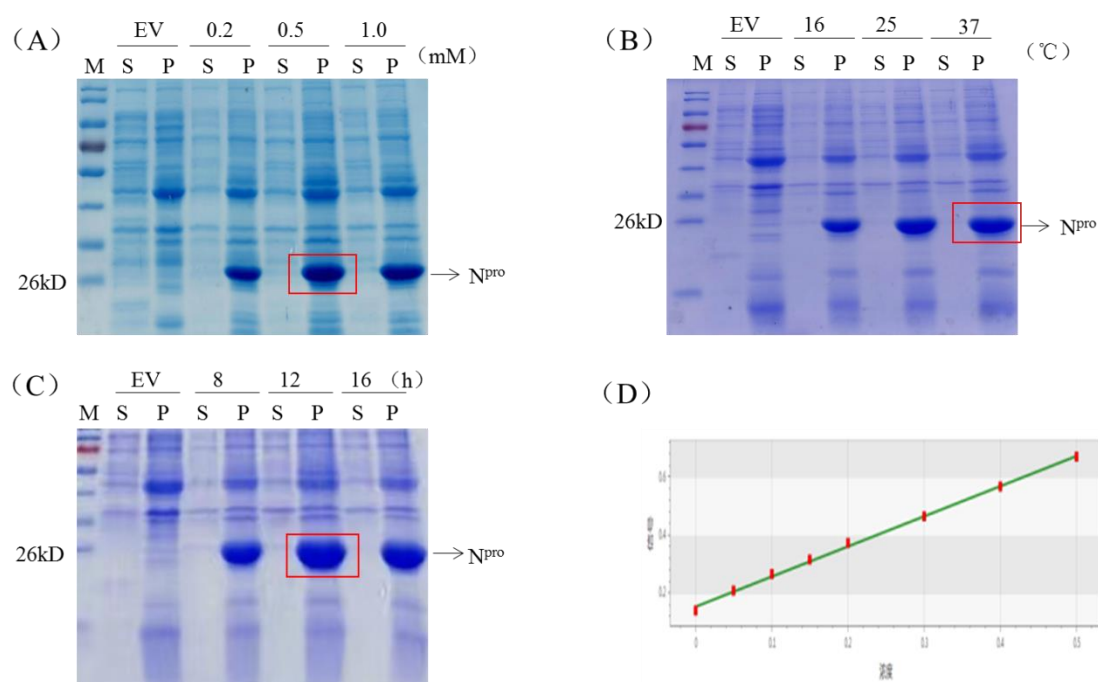


图 5 蛋白的诱导表达及条件优化。(A) 不同 IPTG 浓度对于蛋白表达的影响；(B) 不同诱导温度对于蛋白表达的影响；(C) 不同诱导时间对于蛋白表达的影响；(D) 蛋白浓度的检测曲线。

Figure 5 recoprotein expression and optimization of conditions. (A) The effect of different IPTG concentrations on protein expression; (B) The effect of different induction temperature on protein expression; (C) The effect of different induction time on protein expression; (D) Standard curve for protein concentration detection.

3.3 N^{pro} 蛋白的大量纯化及检测

借助 AKTA 蛋白纯化仪纯化变性液中的 N^{pro} 蛋白，纯化过程中分别使用 40 mM 咪唑浓度、60 mM 咪唑浓度和 80 mM 咪唑浓度的缓冲液分离杂蛋白来研究蛋白结合情况最佳时的含咪唑浓度，杂蛋白分离完成后选取 500 mM 咪唑浓度的洗脱液收集镍柱中存

留的 N^{pro} 蛋白。经过蛋白纯化操作后分批收集各浓度洗脱杂蛋白获得的 N^{pro} 蛋白液并借助考马斯亮蓝染色（图 6A）观察纯化效果，可见使用 60 mM 咪唑的结合缓冲液蛋白纯化效果更好。将纯化后的样品与洗杂液进行凝胶电泳后使用考马斯亮蓝染色进行验证，可见纯化后样品中的杂蛋白条带明显少于洗杂液中的杂蛋白条带（图 6B），证明所选 60 mM 浓度的咪唑符合实验需要。使用 BCA 蛋白浓度测定试剂盒测算纯化后的蛋白浓度，为了进一步提高蛋白液的浓度便于免疫动物使用，后续进行蛋白的透析浓缩。综上所述，本研究通过实验成功获得了浓度和纯度均较高的 BVDV N^{pro} 蛋白。

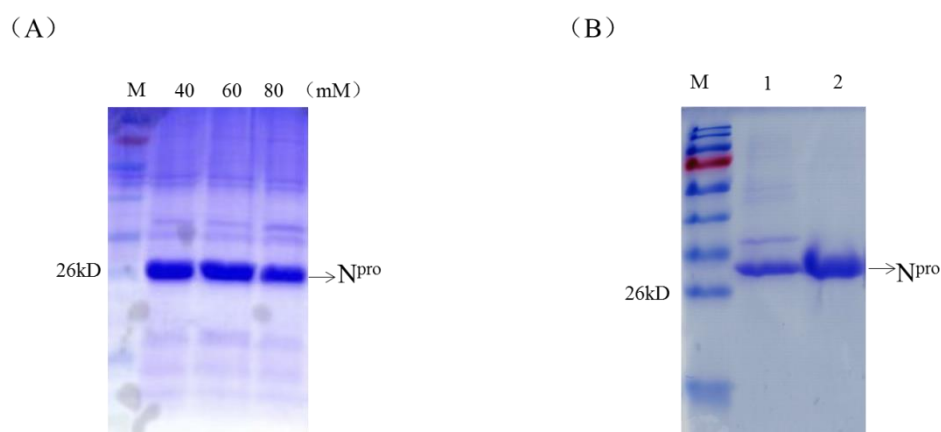


图 6 蛋白的纯化及检测。（A）设置 60 mM、80 mM、100 mM 浓度的咪唑使用考马斯亮蓝染色探索蛋白纯化最优条件；（B）考马斯亮蓝染色检测蛋白纯化效果（1：杂蛋白洗脱液；2：纯化后样品）。

Figure 6 Purification and detection of protein. (A) Imidazole concentrations of 60 mM, 80 mM and 100 mM were set and Coomassie bright blue staining was used to explore the optimal conditions for protein purification; (B) The purification effect of the protein was detected by Coomassie bright blue staining (1: Heterogeneous protein eluent; 2: Purified protein sample) .

3.4 兔血清中多克隆抗体效价的检测

取经过三次免疫后的新西兰大白兔大量采集其血液并分离血清（图 7A）。为验证所获血清抗体效价水平，将收集的兔血清进行了十倍梯度的稀释，共设置六个稀释梯度，采用间接 ELISA 方法测定抗血清的效价，经过检测可知本研究制备的抗血清效价最高可达 $1: 10^7$ （图 7B，表 2）以上。上述实验可以说明纯化的 N^{pro} 蛋白做为免疫用抗原具有良好的免疫原性并成功刺激实验动物产生了抗 BVDV N^{pro} 抗血清且其效价满足后续的实验研究。

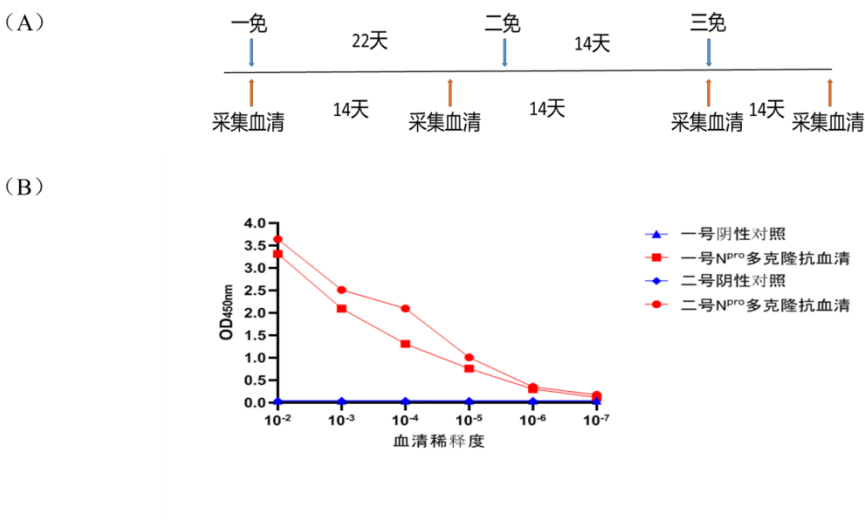


图 7 ELISA 动物实验程序及兔血清中抗 BVDV N^{pro} 蛋白多克隆抗体效价检测。（A）实验程序；（B）多克隆抗体效价检测结果。

Figure 7 ELISA procedure and polyclonal antibody potency of anti-BVDV N^{pro} protein in rabbit serum. (A) Experimental procedure; (B) Results of polyclonal antibody potency.

表 2 抗 BVDV N^{pro} 蛋白多克隆抗体间接 ELISA 效价测定

Table 2. Indirect ELISA analysis of the titer of anti-N^{pro} polyclonal antibody

Dilution	Number 1				Number 2			
	factor of		OD ₄₅₀ nm of positive		factor of		OD ₄₅₀ nm of positive	
Serum	serum		serum		serum		serum	
10 ⁻²	0.0399	0.0415	3.2676	3.3599	0.041	0.0411	3.583	3.6978
10 ⁻³	0.0442	0.0421	1.9651	2.2238	0.0404	0.0397	2.5136	2.51
10 ⁻⁴	0.04	0.04	1.2222	1.3962	0.0405	0.0401	2.2926	1.9038
10 ⁻⁵	0.0401	0.0406	0.7175	0.8	0.04	0.0385	1.1075	0.9081
10 ⁻⁶	0.0422	0.0405	0.2951	0.3088	0.0377	0.0376	0.3787	0.3258
10 ⁻⁷	0.0398	0.0402	0.1143	0.1208	0.0374	0.0396	0.183	0.1681

3.5 抗血清的纯化与特异性检测

根据文献（Fishman and Berg, 2019）可知，辛酸-硫酸铵沉淀法应用于纯化抗体时具有较好的抗体提纯效果，提纯的抗体也能够具有较高的纯度。为了进一步增强多克隆

抗体的使用效果，本研究利用辛酸-硫酸铵沉淀法对含多抗的血清进行纯化，纯化后获得的抗体通过 SDS-PAGE 和考马斯亮蓝染色检测可见较少的杂蛋白条带和明显的重链和轻链（图 8 A）。为了检验纯化后抗 N^{pro} 多克隆抗体是否具备特异性结合 BVDV 的性能，将纯化后的多克隆抗体做为孵育一抗，将经过 BVDV 感染的细胞进行裂解制备细胞裂解样品进行检测，经过纯化后的抗体能够显示显著的特异性条带（图 8 B）。以上结果表明，抗体纯化获得成功且经过纯化的抗体特异性识别结合 BVDV 的能力较强。

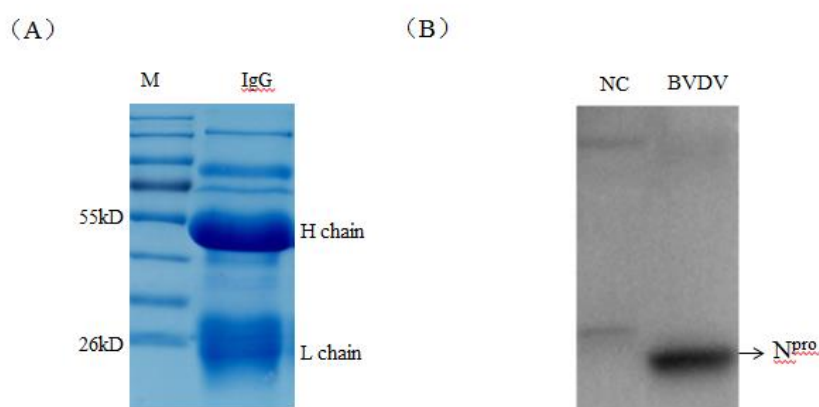


图 8 抗 BVDV 多克隆抗体的纯化与特异性检测。(A) 考马斯亮蓝染色检测多克隆抗体的纯化效果；(B) Western blot 检测纯化后抗 BVDV 多克隆抗体的特异性。

Figure 8 Purification and specificity detection of anti-BVDV polyclonal antibodies. (A) The purification effect of polyclonal antibodies was detected by Coomasi bright blue staining; (B) Western blot analysis of the specificity of purified anti-BVDV polyclonal antibody.

3.6 应用抗 N^{pro} 多克隆抗体进行间接免疫荧光检测

使用间接免疫荧光实验验证纯化后多克隆抗体是否能与 BVDV 发生相互作用，以 1:100 的比例稀释抗体后，对经 BVDV 病毒感染 48 h 的 MDBK 细胞进行间接免疫荧光实验。由实验结果可见本研究制备的经过抗 BVDV 蛋白多克隆抗体处理的样品具有明显的特异性红色荧光（图 9），而使用阴性血清孵育的细胞中则没有出现任何红色荧光。由此可以表明纯化后的抗 N^{pro} 多克隆抗体可以特异性识别 BVDV 病毒并能够应用于间接免疫荧光实验检测。

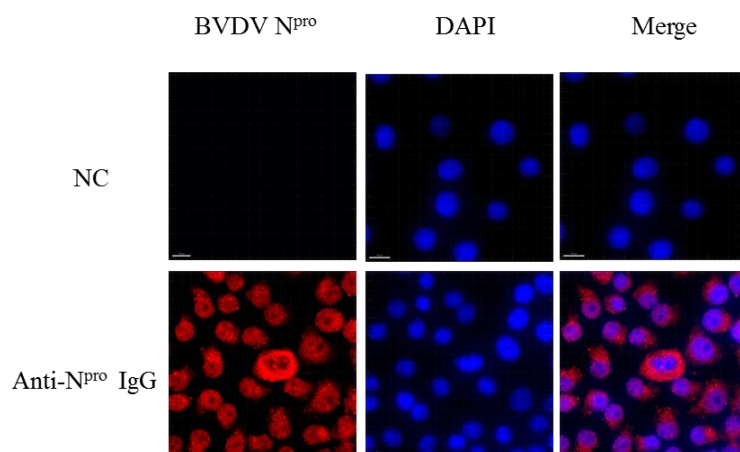


图 9 间接免疫荧光分析纯化的抗 N^{pro} 多克隆抗体的特异性。(BVDV 感染 MDBK 细胞后经所获得的多克隆抗体处理。NC:阴性血清处理组；Anti-N^{pro} IgG:抗 BVDV N^{pro} 抗体处理组。)

Fig 9 Immunofluorescence analysis of the specificity of the purified anti-N^{pro} polyclonal antibody. (MDBK cells infected BVDV were treated with the polyclonal antibodies obtained. NC:Negative group; Anti-Npro IgG:Anti-BVDV N^{pro} antibody treated group.)

4 讨论

当前, BVDV 的流行已给全世界养牛业造成巨大的损失, 对于 BVDV 流行的防控应当引起广泛的重视 (Zhang *et al.*, 2014)。规模化牛场防控 BVD 的流行传播和发展除疫苗接种免疫外最根本的策略是做好牛场的免疫净化, 工作的重点是清除 PI 牛, 但感染 BVDV 产生的 PI 牛在群体中并不表现临床症状 (Quintero Barbosa *et al.*, 2019), 因此依靠传统手段并不能对其进行有效的甄别, 这就需要一种能够特异性识别的检测抗体。BVDV 编码的 E2 蛋白等结构性蛋白在病毒的传播和进化过程中极易发生突变 (Mingala *et al.*, 2009), 不同毒株之间差异性相对较大 (Newcomer *et al.*, 2017)。由于制备的抗体需要用于临床检测, 其应当具备较强的普适性和较广的应用范围, 所以我们选择了 BVDV 编码的较为保守不易突变的非结构性蛋白 N^{pro} 做为制备抗体的研究对象, 且 N^{pro} 蛋白本身在病毒感染宿主细胞时也能够引起动物机体的免疫抑制, 是理想的抗原 (Hong *et al.*, 2023)。

此前的研究多采用原核表达的方式获取 N^{pro} 蛋白 (Mishra *et al.*, 2010), 由于是通过大肠杆菌系统表达全长的 N^{pro} 蛋白, 最终产生的目的蛋白虽然表达量较高但经证实其大部分以不溶的包涵体形式存在, 这给后续蛋白的纯化工作造成了一定程度的干扰。本研究在实验室里构建了 pET30a-N^{pro} 原核重组表达载体并利用其在体外环境中成功表达了该蛋白, 为了改善蛋白主要是在包涵体中表达的情况, 后续我们又参考资料 (Singh *et al.*, 2015) 对重组表达载体进行了密码子的优化和最佳表达条件的优化, 此时蛋白依旧以包涵体的形式产生, 所以我们推测这与载体和蛋白表达的环境条件无关, 是由蛋白本身的性质决定的。

此前大多数研究制备的是关于 BVDV 的单克隆抗体, 将单克隆抗体用于病毒的临床检测虽然其具有特异性强敏感度高的优点 (Nelson *et al.*, 2000), 但是由于单克隆抗体只能靶向一个单一的抗原位点 (Lipman *et al.*, 2005), 若该抗原位点发生突变该抗体便会失效, 因此为了应用于大量广泛的 BVDV 临床检测, 本研究选择制备抗 BVDV 的多克隆抗体。此前已制备成功的抗 BVDV 多克隆抗体大多存在特异性不强的缺点, 本研究为了提高抗体识别结合病毒的特异性, 首先将在实验室条件下表达获得的 N^{pro} 蛋白变性处理后进行纯化, 通过提高用于免疫动物的 N^{pro} 蛋白纯度改善制备抗体的性能。此前的研究多选取鼠或兔等动物进行免疫, 由于鼠的个体较小, 单个个体分离的血清量

有限，所以本研究使用新西兰大白兔做为实验动物制备兔源的多克隆抗体。大量采集兔血分离血清后经过 ELISA 检测法验证制备的抗血清中抗体的效价可达到 $1:10^7$ 以上，高于此前研究制备的抗 BVDV 同类抗体的效价水平。由于辛酸-硫酸铵沉淀法用于提纯抗体效率较高（Ridpath, 2003），故接下来本研究利用该法对抗体进行了纯化。利用免疫印迹实验验证纯化后抗体的特异性，可以观察到特异性的条带，初步证明该抗体的制备获得了成功。同时，利用间接免疫荧光法进行检测也进一步验证了抗体具有的特异性。

综上所述，本研究以纯化的 BVDV N^{pro} 蛋白作为初始的免疫原，成功制备了可用于临床检测的特异性强、效价高、具有较好应用前景的多克隆抗体，为 BVDV 的临床检测及后续成品检测试剂盒的制备奠定了坚实的基础。

5 结论

5.1 利用大肠杆菌原核表达系统实现了 BVDV N^{pro} 重组蛋白的高效表达。

5.2 制备了高效价、特异性强的兔抗 BVDV N^{pro} 多克隆抗体，且该抗体可用于 BVDV 的检测。

6 参考文献

- 包振中, 雷程红, 蔡元庆, 高窦, 卞赛赛, 葛婷. 牛病毒性腹泻-黏膜病病毒分离鉴定及生物学特性研究. *中国畜牧兽医*, 2015, 42(09):2391-2398.
- 丁繁萍, 王哲红, 赵玉宾, 刘俊峰, 胡建军, 张淑琴. 牛病毒性腹泻病毒检测方法研究进展. *中国奶牛*, 2021, (04):36-41.
- 董坤. 牛病毒性腹泻的流行病学调查与牛场的净化. 长春: 吉林大学, 2022.
- 韩慧, 郑源强, 石艳春. 牛病毒性腹泻病毒研究进展. *畜禽业*, 2019, 30(07):6-7.
- 和琳, 韩佃刚, 李静, 杜萱, 张家翔, 信吉阁. 牛病毒性腹泻病毒检测方法研究进展. *中国畜牧兽医*, 2023, 50(04):1593-1602.
- 和彦良, 李真光, 苏玮玮, 郝艳霞, 武华, 朱国强. 2018—2021 年中国部分省份牛病毒性腹泻病毒的流行病学调查. *中国兽医杂志*, 2023, 59(10):9-15.
- 刘照贞. 高效价猪圆环病毒 II 型 Cap 蛋白多克隆抗体的制备及初步应用. 泰安: 山东农业大学, 2020.
- 秦义娴, 刘丹, 陈晓春, 薛青红, 吴华伟, 高月异, 高金源. 牛病毒性腹泻病毒检测方法研究进展. *动物医学进展*, 2022, 43(12):90-94.
- 薛麒, 吴思捷, 张莹辉, 康凯, 印春生, 姚文生, 陈小云. 牛病毒性腹泻病毒检测研究进展. *中国畜牧兽医文摘*, 2017, 33(07):73-74+184.
- 姚春雨, 张志刚, 孙国权, 毛彩霞, 高瑞峰, 郭昌明, 刘国文. 酶联免疫吸附试验及其在奶牛疾病诊断中的应用. *中国畜牧兽医*, 2008, (03):61-64.
- 张红梅, 袁溶英, 王峰, 薛海龙, 姬阳. 牛病毒性腹泻的流行病学调查与防控. *中国乳业*, 2023, (07):14-17.
- 张忠辉, 高闪电, 储岳峰, 田占成, 独军政, 李有全, 关贵全, 罗建勋, 殷宏. 青海省四县牦牛牛病毒性腹泻的血清学分析. *动物医学进展*, 2022, 43(03):28-32.
- 王敬文. 猪冷诱导 RNA 结合蛋白调控宿主天然免疫的作用机制. 泰安: 山东农业大学, 2023.
- 赵雨娜. 猪环鸟腺苷酸合成酶 cGAS 相互作用蛋白的筛选与鉴定. 泰安: 山东农业大学, 2021.
- Al-Kubati A. A. G., Hussen J., Kandeel M., Al-Mubarak A. I. A. and Hemida M. G. Recent Advances on the Bovine Viral Diarrhea Virus Molecular Pathogenesis, Immune

- Response, and Vaccines Development. *Front Vet Sci*,2021, 8:665128.
- Becher P.,Orlich M. and Thiel H. J. RNA recombination between persisting pestivirus and a vaccine strain: generation of cytopathogenic virus and induction of lethal disease. *J Virol*,2001, 75(14):6256-6264.
- Cerutti F.,Luzzago C.,Lauzi S.,Ebranati E.,Caruso C.,Masoero L.,Moreno A.,Acutis P. L.,Zehender G. and Peletto S. Phylogeography, phylodynamics and transmission chains of bovine viral diarrhea virus subtype 1f in Northern Italy. *Infect Genet Evol*,2016, 45:262-267.
- Chen Z.,Rijnbrand R.,Jangra R. K.,Devaraj S. G.,Qu L.,Ma Y.,Lemon S. M. and Li K. Ubiquitination and proteasomal degradation of interferon regulatory factor-3 induced by Npro from a cytopathic bovine viral diarrhea virus. *Virology*,2007, 366(2):277-292.
- Chi S.,Chen S.,Jia W.,He Y.,Ren L. and Wang X. Non-structural proteins of bovine viral diarrhea virus. *Virus Genes*,2022, 58(6):491-500.
- Darweesh M. F.,Rajput M. K. S.,Braun L. J.,Rohila J. S. and Chase C. C. L. BVDV Npro protein mediates the BVDV induced immunosuppression through interaction with cellular S100A9 protein. *Microb Pathog*,2018, 121:341-349.
- Deng M.,Ji S.,Fei W.,Raza S.,He C.,Chen Y.,Chen H. and Guo A. Prevalence study and genetic typing of bovine viral diarrhea virus (BVDV) in four bovine species in China. *PLoS One*,2015, 10(4):e0121718.
- Fishman J. B. and Berg E. A. Antibody Purification and Storage. *Cold Spring Harb Protoc*,2019, 2019(5).
- Giammarioli M.,Ceglie L.,Rossi E.,Bazzucchi M.,Casciari C.,Petrini S. and De Mia G. M. Increased genetic diversity of BVDV-1: recent findings and implications thereof. *Virus Genes*,2015, 50(1):147-151.
- Gil L. H.,Ansari I. H.,Vassilev V.,Liang D.,Lai V. C.,Zhong W.,Hong Z.,Dubovi E. J. and Donis R. O. The amino-terminal domain of bovine viral diarrhea virus Npro protein is necessary for alpha/beta interferon antagonism. *J Virol*,2006, 80(2):900-911.
- Hilton L.,Moganeradj K.,Zhang G.,Chen Y. H.,Randall R. E.,McCauley J. W. and Goodbourn S. The NPro product of bovine viral diarrhea virus inhibits DNA binding by

- interferon regulatory factor 3 and targets it for proteasomal degradation. *J Virol*,2006, 80(23):11723-11732.
- Hirose S.,Notsu K.,Ito S.,Sakoda Y. and Isoda N. Transmission Dynamics of Bovine Viral Diarrhea Virus in Hokkaido, Japan by Phylogenetic and Epidemiological Network Approaches. *Pathogens*,2021, 10(8).
- Hong T.,Yang Y.,Wang P.,Zhu G. and Zhu C. Pestiviruses infection: Interferon-virus mutual regulation. *Front Cell Infect Microbiol*,2023, 13:1146394.
- Kokkonos K. G.,Fossat N.,Nielsen L.,Holm C.,Hepkema W. M.,Bukh J. and Scheel T. K. H. Evolutionary selection of pestivirus variants with altered or no microRNA dependency. *Nucleic Acids Res*,2020, 48(10):5555-5571.
- Kozasa T.,Abe Y.,Mitsuhashi K.,Tamura T.,Aoki H.,Ishimaru M.,Nakamura S.,Okamatsu M.,Kida H. and Sakoda Y. Analysis of a pair of END+ and END- viruses derived from the same bovine viral diarrhea virus stock reveals the amino acid determinants in Npro responsible for inhibition of type I interferon production. *J Vet Med Sci*,2015, 77(5):511-518.
- Lazear H. M.,Lancaster A.,Wilkins C.,Suthar M. S.,Huang A.,Vick S. C.,Clepper L.,Thackray L.,Brassil M. M.,Virgin H. W.,Nikolich-Zugich J.,Moses A. V.,Gale M., Jr.,Fruh K. and Diamond M. S. IRF-3, IRF-5, and IRF-7 coordinately regulate the type I IFN response in myeloid dendritic cells downstream of MAVS signaling. *PLoS Pathog*,2013, 9(1):e1003118.
- Lipman N. S.,Jackson L. R.,Trudel L. J. and Weis-Garcia F. Monoclonal versus polyclonal antibodies: distinguishing characteristics, applications, and information resources. *ILAR J*,2005, 46(3):258-268.
- Mingala C. N.,Konnai S.,Tajima M.,Onuma M. and Ohashi K. Classification of new BVDV isolates from Philippine water buffalo using the viral E2 region. *J Basic Microbiol*,2009, 49(5):495-500.
- Mishra N.,Rajukumar K.,Pitale S. S.,Prakash A.,Nema R. K.,Behera S. P. and Dubey S. C. Evidence of a humoral immune response against the prokaryotic expressed N-terminal autoprotease (N(pro)) protein of bovine viral diarrhoea virus. *J Biosci*,2010, 35(1):79-86.

- Nelson P. N., Reynolds G. M., Waldron E. E., Ward E., Giannopoulos K. and Murray P. G. Monoclonal antibodies. *Mol Pathol*, 2000, 53(3):111-117.
- Newcomer B. W., Chamorro M. F. and Walz P. H. Vaccination of cattle against bovine viral diarrhea virus. *Vet Microbiol*, 2017, 206:78-83.
- Quintero Barbosa J., Corredor Figueroa A. P., Salas S. S., Camargo H., Sanchez A., Tobon J., Ortiz D., Schachtebeck E. and Gutierrez M. F. High prevalence of persistently infected animals from bovine viral diarrhea in Colombian cattle. *BMC Vet Res*, 2019, 15(1):23.
- Ridpath J. F. BVDV genotypes and biotypes: practical implications for diagnosis and control. *Biologicals*, 2003, 31(2):127-131.
- Ridpath J. F. Practical significance of heterogeneity among BVDV strains: impact of biotype and genotype on U.S. control programs. *Prev Vet Med*, 2005, 72(1-2):17-30; discussion 215-219.
- Riedel C., Lamp B., Chen H. W., Heimann M. and Rumenapf T. Fluorophore labelled BVDV: a novel tool for the analysis of infection dynamics. *Sci Rep*, 2019, 9(1):5972.
- Scharnbock B., Roch F. F., Richter V., Funke C., Firth C. L., Obritzhauser W., Baumgartner W., Kasbohrer A. and Pinior B. A meta-analysis of bovine viral diarrhoea virus (BVDV) prevalences in the global cattle population. *Sci Rep*, 2018, 8(1):14420.
- Scheel T. K., Luna J. M., Liniger M., Nishiuchi E., Rozen-Gagnon K., Shlomai A., Auray G., Gerber M., Fak J., Keller I., Bruggmann R., Darnell R. B., Ruggli N. and Rice C. M. A Broad RNA Virus Survey Reveals Both miRNA Dependence and Functional Sequestration. *Cell Host Microbe*, 2016, 19(3):409-423.
- Shin T. and Acland H. Tissue distribution of bovine viral diarrhea virus antigens in persistently infected cattle. *J Vet Sci*, 2001, 2(2):81-84.
- Singh A., Upadhyay V., Upadhyay A. K., Singh S. M. and Panda A. K. Protein recovery from inclusion bodies of Escherichia coli using mild solubilization process. *Microb Cell Fact*, 2015, 14:41.
- Su A., Fu Y., Meens J., Yang W., Meng F., Herrler G. and Becher P. Infection of polarized bovine respiratory epithelial cells by bovine viral diarrhea virus (BVDV). *Virulence*, 2021, 12(1):177-187.

- Tian B.,Cai D.,Li W.,Bu Q.,Wang M.,Ye G.,Liu J.,Wang Y.,Gou L.,Yi J. and Zuo Z. Identification and genotyping of a new subtype of bovine viral diarrhea virus 1 isolated from cattle with diarrhea. *Arch Virol*,2021, 166(4):1259-1262.
- Wang S.,Wei R.,Ma X.,Guo J.,Aizaz M.,Li F.,Wang J.,Wang H. and He H. The host protein CALCOCO2 interacts with bovine viral diarrhoea virus Npro, inhibiting type I interferon production and thereby promoting viral replication. *Virulence*,2024, 15(1):2289764.
- Yue X.,Wu J.,van der Voort M.,Steenefeld W. and Hogeveen H. Estimating the Effect of a Bovine Viral Diarrhea Virus Control Program: An Empirical Study on the Performance of Dutch Dairy Herds. *Front Vet Sci*,2022, 9:892928.
- Zhang S.,Tan B.,Ding Y.,Wang F.,Guo L.,Wen Y.,Cheng S. and Wu H. Complete genome sequence and pathogenesis of bovine viral diarrhea virus JL-1 isolate from cattle in China. *Virol J*,2014, 11:67.