

分类号 \_\_\_\_\_

UDC \_\_\_\_\_

学号 MZ120211589

密级 \_\_\_\_\_



# 硕士学位论文

(全日制专业学位)

## 猪盖塔病毒 E1 蛋白单抗的制备和病毒膜蛋白 N-糖基化 功能的研究

学 院 : 兽医学院  
专 业 学 位 类 别 : 兽医  
专 业 学 位 领 域 : 兽医  
研 究 生 : 黄艳梅  
校 内 指 导 教 师 : 陈振海 教授  
校 外 指 导 教 师 : 周伦江 研究员  
福建省农业科学院畜牧  
兽医研究所  
答 辩 委 员 会 主 席 : 刘 爵 研究员  
答 辩 日 期 : 2024 年 06 月 01 日

**Preparation of E1 Protein Monoclonal Antibodies  
and A Study on the Function of Membrane Protein  
N-glycosylation of Porcine Getah Virus**

A thesis submitted to

Yangzhou University

in partial fulfillment of the requirements

for the degree of

Master of Professional Degree in Veterinary Medicine

By

Yanmei Huang

Supervisor: Prof. Zhenhai Chen

Co-supervisor: Researcher Lunjiang Zhou

Veterinary

June 2024

# 猪盖塔病毒 E1 蛋白单抗的制备和病毒膜蛋白 N-糖基化功能的研究

本论文研究得到广西重点研发计划（编号：桂科 AB21238003）、江苏省农业科技自主创新基金项目（编号：CX(21)2014）、扬州市市校企合作专项（编号：YZ2022187）资助。

## 目 录

摘要 .....	IV
Abstract .....	VI
缩略词表 .....	IX
文献综述 .....	1
1 盖塔病毒概述 .....	1
1.1 GETV 病原学 .....	1
1.2 GETV 的基因组结构 .....	2
2 盖塔病毒的流行病学 .....	4
2.1 GETV 的自然宿主 .....	4
2.2 GETV 国内外流行情况 .....	5
3 盖塔病毒的诊断与预防 .....	8
3.1 诊断 .....	8
3.2 预防 .....	9
4 病毒蛋白 N-糖基化功能的研究 .....	9
4.1 病毒蛋白的 N-糖基化修饰 .....	9
4.2 N-糖基化修饰对病毒的影响 .....	10
5 单克隆抗体技术在甲病毒上的应用 .....	10
6 研究目的和意义 .....	11
第一章 盖塔病毒 E1 蛋白单克隆抗体的制备与鉴定 .....	12
1 材料与方法 .....	12
1.1 生物材料 .....	12
1.2 主要试剂与材料 .....	12
1.3 主要试剂的配制 .....	13
1.4 主要设备和仪器 .....	15
1.5 重组蛋白的原核表达 .....	16
1.6 小鼠免疫 .....	21
1.7 细胞融合与单克隆筛选 .....	21
1.8 单克隆抗体的生物学特性鉴定 .....	23
1.9 单克隆抗体的表位鉴定 .....	24
2 结果 .....	26

2.1 E1 蛋白的亲疏水性分析 .....	26
2.2 E1 片段的扩增和重组质粒的鉴定 .....	26
2.3 重组蛋白的表达 .....	27
2.4 重组蛋白的纯化 .....	28
2.5 纯化蛋白的鉴定 .....	29
2.6 杂交瘤细胞株的筛选 .....	30
2.7 单克隆抗体的大量制备 .....	30
2.8 单克隆抗体的生物学特性鉴定 .....	30
2.9 单克隆抗体的表位鉴定 .....	31
2.10 抗原表位保守性分析 .....	32
3 讨论 .....	33
4 本章小结 .....	34
第二章 盖塔病毒膜蛋白 N-糖基化功能的研究 .....	35
1 材料和方法 .....	35
1.1 细胞和毒株 .....	35
1.2 质粒和菌株及试验动物 .....	35
1.3 主要试剂 .....	36
1.4 主要溶液及相关试剂的配置 .....	36
1.5 主要设备和仪器 .....	36
1.6 构建 E1、E2、E3 基因点突变的 GETV 感染性克隆质粒 .....	36
1.7 质粒转染和重组病毒拯救 .....	39
1.8 重组病毒的鉴定 .....	40
1.9 重组病毒生长特性探究 .....	40
1.10 N-糖基化位点突变对病毒粒子吸附和入侵细胞的影响 .....	41
1.11 N-糖基化位点突变对 GETV 膜蛋白糖链加工的影响 .....	41
1.12 N-糖基化位点突变病毒对小鼠致病性的影响 .....	42
1.13 统计分析 .....	43
2 结果 .....	44
2.1 GETV 膜蛋白 N-糖基化位点突变重组质粒的测序鉴定 .....	44
2.2 突变病毒的拯救 .....	45
2.3 突变病毒的 IFA 鉴定 .....	45
2.4 N-糖基化位点突变对病毒的影响 .....	46
2.5 N-糖基化位点突变对病毒粒子吸附和入侵细胞的影响 .....	48
2.6 N-糖基化位点突变对 GETV 膜蛋白糖链加工的影响 .....	49

2.7 N-糖基化位点突变病毒对小鼠致病性的影响 .....	50
3 讨论 .....	52
4 本章小结 .....	53
全文结论 .....	55
参考文献 .....	56
致谢 .....	63

## 摘要

盖塔病毒 (Getah virus, GETV) 是旧世界甲病毒属的主要成员之一, 以蚊虫为主要传播媒介来侵害多种哺乳动物。GETV 可感染不同年龄的猪只, 妊娠母猪感染后, 表现为流产、产死胎; 仔猪感染后, 常表现为体温升高、后肢麻痹以及共济失调等临床症状。近年来, 在我国的多个省份, 特别是南方地区, GETV 的感染率呈攀升的趋势, 一定程度的威胁着我国生猪产业。然而, 目前尚未有针对 GETV 感染的疫苗和特效治疗药物。因此, 对于 GETV 的致病机制、分子生物学等开展相关研究, 显得尤为重要。E1 蛋白是位于 GETV 粒子表面的一种囊膜糖蛋白, 可促进病毒和宿主细胞的膜融合, 在 GETV 感染细胞时发挥重要作用。为此, 本研究制备了能够特异性识别 GETV E1 蛋白的单克隆抗体, 并通过 Western blot 对其抗原表位进行深入分析和鉴定。以上内容为 GETV 的检测和 E1 蛋白功能特性研究提供了有力工具。

现有研究证实大多数病毒的结构蛋白在病毒感染周期中可发生糖基化修饰, 尤其是位于病毒表面的膜蛋白。病毒膜蛋白糖基化修饰在其复制、入侵、免疫逃避等方面发挥着重要作用, 但目前关于 GETV 膜蛋白糖基化功能的研究甚少。为此, 本研究通过在线网站对 GETV 膜蛋白进行了 N-糖基化位点的预测, 利用 GETV 反向遗传学操作系统对 GETV E1、E2、E3 蛋白的潜在糖基化位点进行突变, 以探究 GETV 膜蛋白 N-糖基化位点的突变对病毒生长特性、感染能力及致病性的影响, 为 GETV 膜蛋白的糖基化修饰相关研究提供参考依据。

主要研究内容如下:

### 1. GETV E1 蛋白单克隆抗体的制备及鉴定

本研究首先利用在线网站对 GETV E1 蛋白的氨基酸序列进行亲疏水性分析, 将亲水性区域 (31-182aa) 的核苷酸片段构建至 pCold-TF 原核表达载体上, 进行截短表达、纯化等, 制备了 TF-E1 重组蛋白, 并以其为免疫原免疫小鼠, 然后通过杂交瘤技术, 成功制备了一株针对 GETV E1 蛋白的单克隆抗体 E1 1C9。后续对获得的单抗进行生物学鉴定, 结果表明该单抗能够特异性识别 GETV E1 蛋白, 适用于 IFA、WB 检测。随后, 通过分步截短的方法对其抗原表位进行鉴定。结果表明, 该单抗的抗原表位为 GETV E1 蛋白的第 73-78 位氨基酸序列 (<sup>73</sup>RPDYQC<sup>78</sup>)。随后, 与 NCBI 上已上传的 GETV 毒株序列进行比对, 结果显示该抗原表位在 GETV 毒株中高度保守。

## 2. GETV 膜蛋白 N-糖基化功能的研究

本研究使用 NetNGlyc 在线网站对 E1、E2、E3 蛋白的 N-糖基化位点预测，结果发现 GETV E1 (N141) 有一个潜在糖基化位点，E2 (N200、N2620)、E3 (N11、N57) 均有两个潜在糖基化位点。随后，以实验室建立的 GETV 反向遗传操作平台，构建了 5 株单点突变病毒，分别为 GETV (E1-N141A)、GETV (E2-N200A)、GETV (E2-N262A)、GETV (E3-N11A)、GETV (E3-N57A)；以及 2 株双点突变病毒，分别为 GETV (E2-N200/262A)、GETV (E3-N11/57A)。然后通过观察细胞病变、基因测序及 IFA 鉴定，证实以上重组突变病毒拯救成功。为探究 GETV 膜蛋白 N-糖基化位点的突变是否会影响该病毒的生物学特性，本研究首先对重组病毒和野毒的生长特性进行分析。结果显示，E1 N141 位、E3 N11/57 位糖基化位点的突变使突变病毒毒价下降约 300 倍；E2 N200 位、E3 N57 位糖基化位点的突变使突变病毒毒价下降约 100 倍。为比较 GETV 膜蛋白 N-糖基化位点的突变是否影响病毒对细胞的吸附和入侵能力，使用实时荧光定量 PCR 方法对突变毒和野毒的核酸拷贝数进行测定。结果表明，6 株突变毒株吸附和入侵细胞的能力高于野毒株，但 GETV (E2-N200/262A) 毒株不影响吸附和入侵细胞的能力，表明不同糖基化位点的突变并没有降低病毒粒子吸附和入侵细胞的能力。为评估突变病毒和野毒对小鼠的致病性，以  $10^{4.5}$  TCID<sub>50</sub> 分别对乳鼠进行颅内和皮下注射，观察并记录乳鼠的生长状况、存活情况。结果显示，接种 GETV (E2-N200A) 的乳鼠存活率高于野毒组。在接种后第 4 天，对小鼠进行安乐死，取脑、后肢、肾脏及心脏组织，通过实时荧光定量 PCR 方法对各组织病毒载量进行检测，结果发现感染突变病毒组的各组织病毒载量均低于野毒组。以上结果表明，GETV 膜蛋白 N-糖基化位点的突变不仅降低了该病毒的复制能力，同时显著减弱了其对小鼠的致病作用。

**关键词：**GETV；E1 蛋白；单克隆抗体；N-糖基化

## Abstract

Getah virus (GETV) is one of the main members of the genus Alphavirus in the Old World, which uses mosquitoes as the main vector to invade a variety of mammals. GETV can infect pigs of different ages, and after infection in pregnant sows, it manifests as abortion and stillbirth, while after infection in piglets, it often manifests as clinical symptoms such as increased body temperature, hind limb paralysis, and ataxia. In recent years, in many provinces in China, especially in the southern region, the infection rate of GETV has been rising, which threatens China's pig industry to a certain extent. However, there is currently no vaccine or specific treatment for GETV infection. Therefore, it is particularly important to carry out relevant research on the pathogenesis and molecular biology of GETV. The E1 protein is an envelope glycoprotein located on the surface of GETV particles, which promotes membrane fusion between the virus and host cells and plays an important role in GETV infection of cells. In this study, a monoclonal antibody that can specifically recognize GETV E1 protein was prepared, and its epitopes were analyzed and identified by Western blot. The above content provides a powerful tool for the detection of GETV and the study of the functional properties of the E1 protein.

The existing studies have confirmed that structural proteins of most viruses can occur in the virus infection cycle, especially the membrane proteins located on the virus surface. Virus membrane protein glycosylation plays an important role in its replication, invasion, and immune escape, but there are currently few studies on GETV membrane protein glycosylation. To this end, this study used an online website to predict the N-glycosylation sites of the GETV membrane proteins, and utilized the GETV reverse genetic system to mutate the potential glycosylation sites of GETV E1, E2, and E3 proteins. To explore the effects of the GETV membrane N-glycosylation sites on the virus's growth characteristics, infection, and pathogenicity, it provides a reference basis for relevant studies related to glycosylation modification of GETV membrane proteins.

The main research contents are as follows:

### **1. Preparation and identification of monoclonal antibodies to GETV E1 protein**

In this study, an online website was first utilized to analyze the hydrophilicity and hydrophobicity of the amino acid sequence of the GETV E1 protein. The nucleotide fragment of the hydrophilic region (31-182aa) was then constructed into the pCold-TF prokaryotic expression vector for truncated expression, purification, and other processes, resulting in the preparation of the TF-E1 recombinant protein. This protein was used as an immunogen to immunize mice. Subsequently, through hybridoma technology, a monoclonal antibody E1 1C9 specifically targeting the GETV E1 protein was successfully prepared. Further biological identification of the monoclonal antibody revealed that it can specifically recognize the GETV E1 protein and is suitable for IFA and WB detection. Following this, the antigenic epitope of the monoclonal antibody was identified using a step-by-step truncation method. The results indicated that the antigenic epitope of this monoclonal antibody corresponds to the amino acid sequence 73-78 (<sup>73</sup>RPDYQC<sup>78</sup>) of the GETV E1 protein. Finally, a comparison with the sequences of GETV strains uploaded on NCBI showed that this antigenic epitope is highly conserved among GETV strains.

## **2. Study on the N-Glycosylation Function of GETV membrane protein**

This study used the NetNGlyc online website to predict the N-glycosylation sites of E1, E2, and E3 proteins, and the results revealed that GETV E1 (N141) has one potential glycosylation site, while E2 (N200, N262) and E3 (N11, N57) each have two potential glycosylation sites. Subsequently, utilizing the established reverse genetics manipulation platform for GETV in the laboratory, five single-point mutant viruses were constructed, namely GETV (E1-N141A), GETV (E2-N200A), GETV (E2-N262A), GETV (E3-N11A), and GETV (E3-N57A); as well as two double-point mutant viruses, specifically GETV (E2-N200/262A) and GETV (E3-N11/57A). Then, through observation of cytopathology, gene sequencing, and IFA identification, it was confirmed that the aforementioned recombinant mutant viruses were successfully rescued. To investigate whether mutations in the N-glycosylation sites of GETV membrane proteins affect the biological characteristics of the virus, this study first analyzed the growth characteristics of the recombinant viruses and wild-type viruses. The results showed that mutations at the E1 N141 and E3 N11/57 glycosylation sites reduced the mutant virus titer by approximately 300 times, while mutations at the E2 N200 and E3 N57 glycosylation sites reduced the mutant virus titer by approximately 100 times. To compare whether mutations in the N-glycosylation sites of GETV membrane

proteins affect the virus's ability to attach to and invade cells, real-time quantitative PCR was used to measure the nucleic acid copy numbers of mutant and wild-type viruses. The results showed that six mutant strains had higher abilities to attach to and invade cells compared to the wild-type strain, but the GETV (E2-N200/262A) strain did not affect these abilities, indicating that mutations in different glycosylation sites did not reduce the virus particles' ability to attach to and invade cells. To evaluate the pathogenicity of mutant and wild-type viruses to mice, suckling mice were intracranially and subcutaneously injected with  $10^{4.5}$  TCID<sub>50</sub> of each virus, and their growth status and survival were observed and recorded. The results showed that the survival rate of suckling mice inoculated with GETV (E2-N200A) was higher than that of the wild-type group. On the 4th day after inoculation, the mice were euthanized, and their brains, hind limbs, kidneys, and heart tissues were collected. Real-time quantitative PCR was used to detect the virus load in each tissue, and the results found that the virus loads in all tissues infected with the mutant virus group were lower than those in the wild-type group. These results indicate that mutations in the N-glycosylation sites of GETV membrane proteins not only reduce the virus's replication ability but also significantly weaken its pathogenicity to mice.

**Keywords:** Getah virus; E1 protein; Monoclonal antibody; N-glycosylation

## 缩略词表

英文缩写	英文名称	中文名称
A	Alanine	丙氨酸
aa	amino acid	氨基酸
bp	Base pair	碱基对
CHIKV	Chikungunya virus	基孔肯亚病毒
dd H <sub>2</sub> O	Double distilled H <sub>2</sub> O	双蒸水
DMEM	Dulbecco's modified eagle medium	细胞培养基
GETV	Getah virus	盖塔病毒
GFP	Green fluorescent protein	绿色荧光基因
HAT	Hypoxanthine aminopterin thymidine	次黄嘌呤、氨基蝶呤、胸腺嘧啶核苷
HT	Hypoxanthine thymidine	次黄嘌呤、胸腺嘧啶核苷
IFA	Indirect immunofluorescence assay	间接免疫荧光试验
IPTG	Isopropyl-beta-D-thiogalactopyranoside	异丙基-β-D-硫代半乳糖苷
JEV	Japanese encephalitis virus	流行性乙型脑炎病毒
kDa	Kilodalton	千道尔顿
mAb	Monoclonal antibody	单克隆抗体
N	Asparagine	天冬酰胺
nsP	Non-structural protein	非结构蛋白
OD	Optical delnsity	吸光度
ORF	Open reading frame	开放阅读框
PBS	Phosphate buffered saline	磷酸盐溶液

(续上表)

英文缩写	英文名称	中文名称
PCR	Polymerase chain reaction	聚合酶链式反应
PVDF	Polyvinylidene fluoride	聚偏二氟乙烯
RT-PCR	Reverse transcript polymerase chain reaction	反转录聚合酶链式反应
RT-qPCR	Real-time quantitative polymerase chain reaction	实时荧光定量聚合酶链式反应
SDS-PAGE	Polyacrylamide gel electrophoresis	聚丙烯酰胺凝胶电泳
sec, min, h	second, minute, hour	秒, 分, 时
TCID <sub>50</sub>	50% Tissue culture infective dose	半数细胞感染量

## 文献综述

### 1 盖塔病毒概述

盖塔病毒（Geath virus, GETV）是一种由蚊虫传播的 RNA 病毒，属于甲病毒属。1978 年，日本学者 Sentsui 等人从采集的患病马血液和鼻拭子中分离出 GETV，这是该病毒首次在哺乳动物身上被分离的报道<sup>[1]</sup>；此后，在印度、中国等多个国家均有哺乳动物感染 GETV。随着 GETV 流行范围的扩大，研究人员逐渐在猪、牛、蓝狐等多种动物中也分离得到该病毒<sup>[2]</sup>，尤其进入 21 世纪后，GETV 分离株的数量迅速增加<sup>[3]</sup>。GETV 可感染马、猪、牛、狐狸等多种哺乳动物<sup>[4,5]</sup>，其中马和猪最为易感。GETV 可引起马发烧、皮疹、水肿<sup>[6]</sup>；引起蓝狐出现体温升高、厌食、抑郁；感染 GETV 的仔猪出现死亡、共济失调；怀孕母猪感染后其胎盘屏障受损导致胎儿死亡<sup>[7]</sup>。近年来，随着 GETV 感染动物种类和毒株数量不断增多，给养殖业造成了严重的经济损失。

#### 1.1 GETV 病原学

##### 1.1.1 GETV 的分类

GETV 属于披膜病毒科甲病毒属，于 1955 年首次从马来西亚的蚊虫中分离得到该病毒。甲病毒属成员根据地理分布和典型的临床疾病症状被分为两大类：旧世界甲病毒和新世界甲病毒<sup>[8]</sup>；旧世界甲病毒包括基孔肯亚病毒（CHIKV）、辛德必斯病毒（SINV）和 GETV 等。依据血清学交叉反应的特点，甲病毒被分为 8 个抗原复合组，其中 GETV、CHIKV 等属于 Semiliki forest 病毒复合组<sup>[9]</sup>。

##### 1.1.2 病毒形态结构

GETV 粒子是直径为 70 nm 的球形颗粒，呈二十面体对称性（T=4）。GETV 的病毒粒子由一个外层糖蛋白囊膜和一个内层核衣壳构成的双层嵌套结构，糖蛋白囊膜由 E1 和 E2 蛋白组成，内层核衣壳由 240 个拷贝的 C 蛋白组成<sup>[10]</sup>，核衣壳内包裹着病毒基因组（图 1）。GETV E3 和 6K 蛋白现暂未从病毒粒子表面观察到，但它们在病毒粒子组装和感染过程中发挥一定作用<sup>[11-13]</sup>。

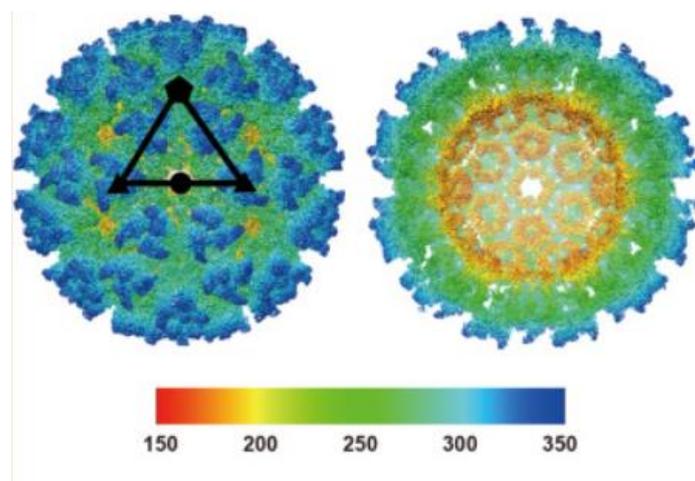
图 1 GETV 的冷冻电镜结构<sup>[10]</sup>

Fig.1 Cryo-EM structure of GETV

## 1.2 GETV 的基因组结构

GETV 基因组是单股正链 RNA，全长基因组为 11000 至 12000 个核苷酸。其 5' 端含有甲基化的帽结构，3' 端含有 poly (A) 尾部。基因组包含两个开放阅读框 (ORF)。第一个 ORF 位于基因组前 2/3 的区域，编码 nsP1-nsP4 四种非结构蛋白；该区域后面含有一个 26 S 启动子，该启动子促进第二个开放阅读框亚基因组的转录。基因组后 1/3 区域是第二个 ORF，负责编码 5 个结构蛋白，从 N 端到 C 端依次是 C、E3、E2、6K、E1 蛋白 (图 2)。

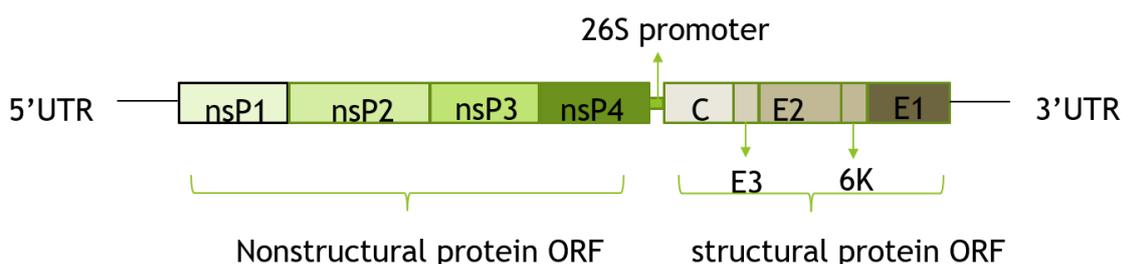


图 2 GETV 基因组结构示意图

Fig.2 Schematic diagram of GETV genome

### 1.2.1 GETV 非结构蛋白

GETV 的四种非结构蛋白主要负责病毒 RNA 的复制和转录<sup>[14]</sup>。GETV 感染细胞后，基因组 RNA 被翻译成非结构蛋白多肽链，该肽链可以在 nsP2 蛋白的作用下进行蛋白

切割形成 nsP123 和 nsP4 组成的复制复合物<sup>[15]</sup>。nsP123 多肽链进一步加工为 nsP1 和 P23，最终 P23 前体被切割为单独的 nsP2、nsP3 蛋白，完全切割的单个非结构蛋白 nsP1、nsP2、nsP3、nsP4 组成病毒复制复合物，进行全长基因组和亚基因组 RNA 的合成，负链 RNA 不在合成。

在 SFV 中 nsP1 蛋白具有鸟嘌呤-7-甲基转移酶 (Mtase) 和鸟苷转移酶 (GTase) 活性，它们指导新合成的病毒基因组和亚基因组 RNA 甲基化和加帽<sup>[16]</sup>；除此之外 nsP1 蛋白还包含丰富的复制复合物，可以与 nsP4 蛋白相互作用，在负链 RNA 合成和延伸过程中发挥作用。nsP2 蛋白包含一个氨基末端 RNA 解旋酶结构域、一个催化非结构蛋白切割反应的中心蛋白酶区域、以及一个无活性的 RNA 甲基转移酶部分<sup>[17,18]</sup>，其参与阻碍宿主细胞大分子合成的作用，并拮抗甲病毒感染引发的细胞抗病毒反应；此外，一些甲病毒的部分 nsP2 蛋白主要分布于细胞核，能阻断细胞 RNA 向细胞质输出<sup>[19,20]</sup>，同时降解 RNA 聚合酶 II 聚合复合物的催化亚基 (Rpb1)。nsP3 蛋白分为 3 个结构域：氨基末端宏结构域、中央甲病毒特异性区域、羧基区域，其高变序列包含多个磷酸化位点；位于宏结构域的 nsP3 蛋白残基负责 P23 切割位点的定位<sup>[21,22]</sup>。nsP4 蛋白是一种 RNA 依赖性 RNA 聚合酶 (RdRp)，其是甲病毒中保守程度最高的蛋白。nsP4 蛋白在 C 端的 RdRp 通过负链 RNA 参与复制基因组 RNA 并转录 26 S 亚基因组 RNA，其 N 端结构域具有甲病毒特异性<sup>[23]</sup>。

### 1.2.2 GETV 结构蛋白

在甲病毒复制复合物的作用下，亚基因组 RNA 负责五种结构蛋白的合成，在亚基因组 RNA 翻译过程中第一个蛋白质衣壳蛋白 (C)，经自剪切从多肽链上分离出来；E3 糖蛋白的氨基末端含有信号肽，可以与内质网膜相互作用，将剩余多肽移位到内质网管腔，该多肽在内质网中被宿主细胞酶切割，产生 pE2、E1、6K 蛋白<sup>[24]</sup>，pE2 蛋白在高尔基体内经弗林蛋白酶加工，被裂解为单独的 E3 和 E2 蛋白。

GETV C 蛋白约有 268 个氨基酸组成，该蛋白分为两个结构域，包括带正电荷的 N 端结构域和 C 端蛋白酶结构域<sup>[25]</sup>；其 C 端的蛋白酶结构域负责将衣壳蛋白从多蛋白中分离出来。C 蛋白在基因组组装、颗粒组装、出芽过程中发挥作用<sup>[26]</sup>；此外，CHIKV 的 C 蛋白具有核输入和核输出信号的核易位能力<sup>[27]</sup>，并且当 C 蛋白的核输入或者核输出序列发生突变，均会影响病毒的毒力。E2 和 E1 蛋白以二聚体的形式分布于病毒颗粒表面，E2 是结合宿主细胞受体和进入细胞的附着蛋白；E1 是一种 II 类融合蛋白<sup>[28]</sup>，具有三个胞外结构域，分别为 DI、DII、DIII；疏水融合环位于 DII 中，主要介导病毒和宿主细胞膜融合的功能。E1 和 E2 蛋白除了在附着和融合中起作用外，

它们还通过二聚体之间的相互作用<sup>[29]</sup>，在蛋白质加工、运输、病毒颗粒组装中发挥至关重要的作用。E3 是一个大小为 65 个氨基酸的小蛋白，通过 pE2 裂解产生，在结构多蛋白易位到内质网和病毒成熟过程中发挥作用<sup>[30,31]</sup>。6K 蛋白是甲病毒颗粒的必要结构蛋白，被归类为病毒来源的通道蛋白<sup>[32]</sup>；其能够与刺突蛋白直接相互作用，同时促进刺突的成熟；目前 6K 蛋白尚未在任何有关 GETV 病毒粒子结构中被确认<sup>[33]</sup>，但 Meng 等人的研究发现，GETV 的 6K 蛋白在病毒粒子的释放和对小鼠致病力方面起着重要的作用<sup>[34]</sup>。

## 2 盖塔病毒的流行病学

### 2.1 GETV 的自然宿主

据报道，第一株 GETV 从白雪库蚊中鉴定分离出来。1978 年，日本的研究者们采集了赛马的血清样本，经过检测发现这些血清中含有对 GETV 具有中和作用的抗体<sup>[35]</sup>。研究人员发现 GETV 可感染马，但其不会通过气溶胶传播，传播媒介主要是刺扰伊蚊<sup>[36]</sup>。我国第一株 GETV (M1) 于 1964 年被分离得到，此后 GETV 在我国多种蚊虫和哺乳动物中分离到的数量逐渐增多，提示 GETV 的感染宿主多为哺乳动物 (图 3)。随后，我国开始对人进行血清学调查，在 1979-1982 年海南省的发热人群的血清样品中检测到 GETV 抗体阳性，之后在亚洲、欧洲等国家都发现了 GETV 人源抗体阳性<sup>[37]</sup>，虽然暂无 GETV 感染人引起疾病的报道，但提示 GETV 可能是人类的潜在病原<sup>[38,39]</sup>。

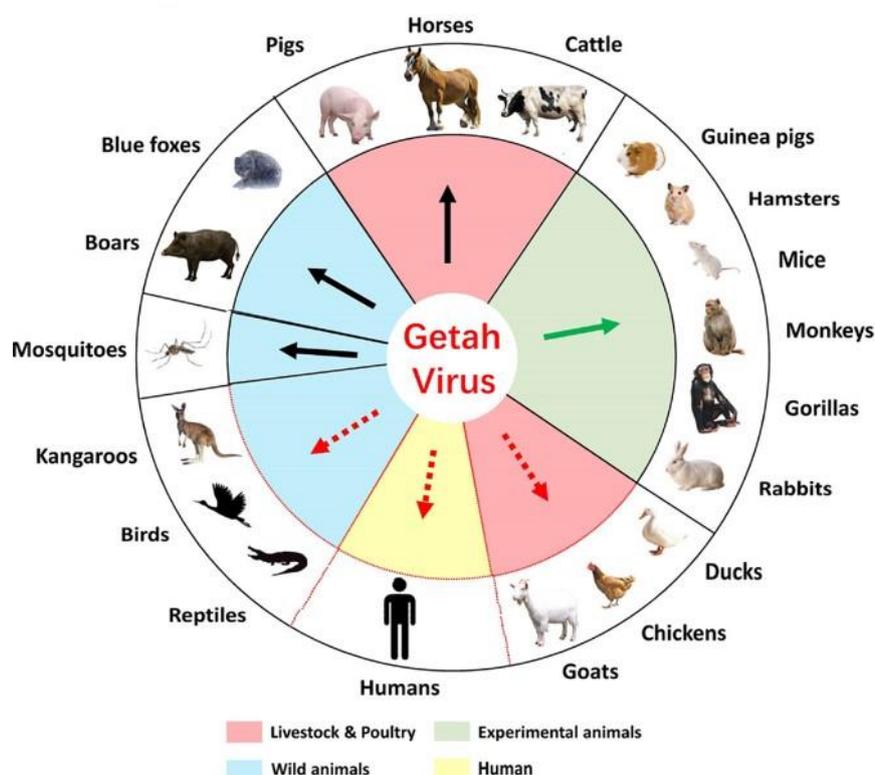
图 3 GETV 的宿主物种<sup>[38]</sup>

Fig.3 The host species of GETV

黑色实线：自然感染动物；绿色实线：实验性感染动物；虚线：血清阳性

## 2.2 GETV 国内外流行情况

1955 年，第一株 GETV (MM2021) 于马来西亚的蚊虫中分离出来<sup>[40]</sup>。此后全球各地区均有 GETV 相关报道。1956 年，日本东京的一个猪场分离出一种病毒 (M6/Mag-132)，对此病毒进行交叉中和抗体滴度检测和病毒基因系统进化分析，证实 M6 毒株是 GETV 在不同地区的分离株<sup>[41]</sup>；1961 年，南太平洋的澳大利亚研究人员首次从蚊子中分离到 GETV(N544)<sup>[40]</sup>；1991 年-1997 年，日本对 10-20 个地区的赛马场进行日本脑炎病毒 (JEV) 和盖塔病毒 (GETV) 的血清学流行病学进行调查，发现几乎每年都有几个马场中赛马血清中的 JEV 和 GETV 的抗体滴度比其他抗体滴度高 10-50 倍，幸运的是，没有观察到马匹因感染以上病毒而出现临床症状<sup>[42]</sup>；2002 年-2004 年对越南北部的蚊虫进行病毒分析，通过病毒分离、PCR 反应、免疫荧光等分析鉴定出 15 株 GTEV，这也是越南首次报告了 GETV<sup>[43]</sup>；2014 年，日本马群接种 GETV 疫苗后，爆发了 GETV 感染，同时在调查日本野猪中 GETV 感染的血清阳性率时，发

现 2013 年是猪群中 GETV 抗体阳性比率最高的一年<sup>[44]</sup>；2017-2018 年，泰国 11 省采集的猪血清样本中有 23.1% 的样本呈 GETV 抗体阳性<sup>[45]</sup>。尽管发现 GETV 的历史较短，但日本、澳大利亚、韩国、泰国等多个国家均有关于 GETV 的报道<sup>[3]</sup>。GETV 在全球范围的分布如图 4-A。

自 2015 年起，我国动物感染 GETV 的病例数逐渐增多，感染范围也不断扩大。GETV 主要流行地区在中国东半部，西北和东北地区也有部分动物患病<sup>[46]</sup>。2017 年湖南某猪场爆发了 GETV，出现大量仔猪死亡，怀孕母猪产死胎和木乃伊胎；在患病仔猪大脑内分离到 GETV (HuN1)，这是中国猪只感染 GETV 的第一份明确报道<sup>[7]</sup>，同年，某养殖地出现蓝狐感染 GETV<sup>[47]</sup>。2018 年，Ren 等对猪场样本进行常规检测时，分离到一株 GETV 毒株 (GX201808)，同时对 GX201808 进行了遗传学分析，发现 GX201808 和 HuN1 毒株的氨基酸同一性最高<sup>[48]</sup>；2018 年广东省研究人员在患病猪身上分离到 GETV-GDFS2-2018 和 GETV-GDFS9-2018 毒株，对以上两个毒株进行全基因组分析，发现与两株分离株亲缘关系最近的是在河南被分离到的 HNJZ-S2 毒株，同源性达 99.7%，与广东省从马身上分离到的 GZ201808 序列同一性为 98%，说明广东地区猪和马感染的 GETV 来源不同<sup>[49]</sup>；Liu 等人首次从受感染的牛中分离出 JL1808 毒株，对其非结构多蛋白和结构蛋白 E2 进行序列比对，发现其与猪源流行株 HuN1 具有高度同一性<sup>[50]</sup>。以上数据表明，GETV 已在我国各地区兴起，需加强监测和防控工作。GETV 在中国的分布如图 4-B。

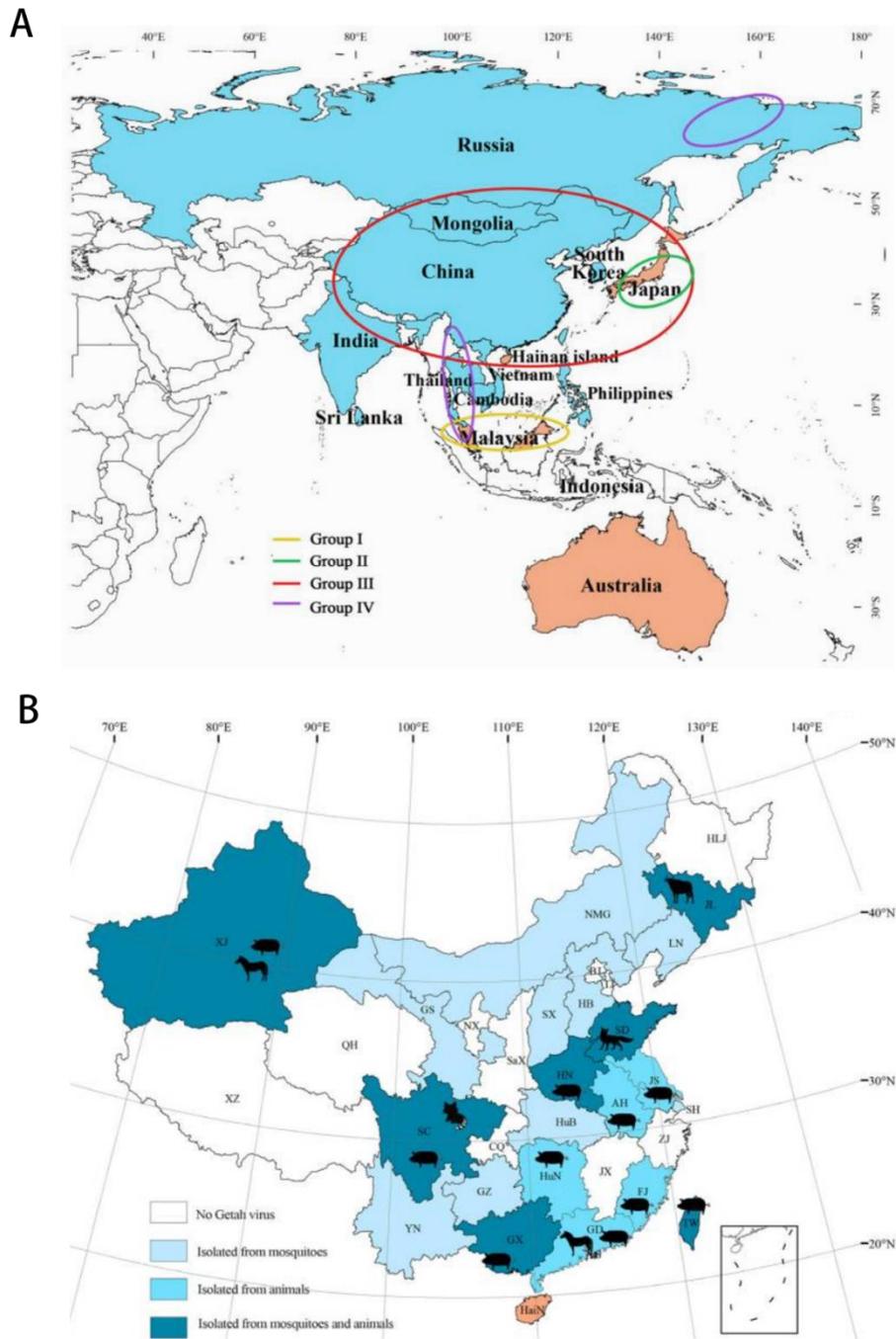


图 4 盖塔病毒分离株在全球 (A) 和中国的地理分布图 (B) [3]

A: 盖塔病毒分离株 Group I-IV型在全球的分布

B: 盖塔病毒分离株在我国的地区分布

Fig.4 Distribution of Getah virus in different parts of world and China

A: Global distribution of Geita virus isolates Group I-IV

B: Geographical Distribution of Getah virus isolates in China

## 3 盖塔病毒的诊断与预防

### 3.1 诊断

#### 3.1.1 病毒分离

病毒分离成功的关键包括选择适宜的细胞对病毒进行培养。GETV 在三带喙库蚊和白纹伊蚊衍生的细胞系中繁殖最快<sup>[51]</sup>。除以上蚊虫细胞外,也可以将 GETV 接种以下细胞,用于分离和检测;包括仓鼠肺细胞(HmLu-1)、仓鼠肾细胞(BHK-21)、猪肾细胞(CPK)、非洲绿猴肾细胞(Vero)<sup>[52,53]</sup>。

#### 3.1.2 分子生物学检测方法

基于病毒核酸的检测原理,分子生物学检测成为判定病毒存在与否的关键途径。现常用逆转录-聚合酶反应(RT-PCR)、实时荧光定量 PCR(RT-qPCR)等技术对病毒核酸进行检测。Cao 等人以 GETV 的 nsP1 的基因高保守区域为靶点新开发 RT-qPCR 检测方法,其建立的 RT-qPCR 方法对 GETV、CHIKV、JEV、PRRSV 等病毒可进行特异性检测,具有良好的重现性和稳定性<sup>[54]</sup>。Dong 等人开发了一种经济高效、快速且高灵敏度的“三重 RT-PCR 酶杂交”一步法检测方法<sup>[55]</sup>,一次 PCR 反应可同时扩增三个目标序列,实现对日本脑炎病毒(JEV)、GETV、塔希纳病毒(TAHV)的同时检测;利用该方法对 29 份 JEV 阳性的脑脊液样本进行检测,结果显示所有样本均对 JEV 呈强阳性,对 GETV 和 TAHV 呈阴性,该检测方法比传统的血清学检测和单一 RT-PCR 反应方法更快速、更便宜。

除常规 RT-PCR 外,Liu 等人设计了反转录环介导的等温扩增方法(RT-LAMP),此方法在 65°C 条件下 50 min 内便能获得扩增的 GETV 基因,该方法在检测 GETV 时展现出高度特异性<sup>[56]</sup>。Hu 等人开发了一种基于 cDNA 随机扩增多态性 DNA 的技术来鉴定 GETV<sup>[57]</sup>,其具有随机引物扩增未知病毒的优势。此方法可对 YN08 分离株的 nsP3 蛋白、C 蛋白和 3'-UTR 序列进行扩增、克隆和测序。

#### 3.1.3 血清学检测方法

血清学检测方法包括酶联免疫吸附测定法(ELISA)、免疫荧光技术(FA)、免疫胶体金技术等。Qiu 等将纯化后的 E2 蛋白作为包被抗原,用于建立间接 ELISA 方法,可用于对新疆的多份马血清样本进行检测<sup>[58]</sup>。孙等开发了一种基于 E2 蛋白的间接 ELISA 方法可用于检测马、猪血清样本;利用该方法对 328 份马血清进行检测,阳性率为 31.71%,该检测方法特异性强、敏感度高<sup>[59]</sup>。苏制备了 GETV-C 蛋白和 GETV-

E2 蛋白多抗，用于对 GETV 的鉴定<sup>[60]</sup>。鹿等制备了 GETV-E2 单抗并精确鉴定了抗原表位，此单抗可广泛鉴定 GETV<sup>[61]</sup>。钟利用 GETV E2 蛋白为待检抗原，制备了胶体金免疫层析试纸条，该试纸条在不同的环境条件下具有良好的稳定性，在对 182 份马血清样品进行 GETV 抗体检测时，有 52 份血清呈 GETV 抗体阳性；该方法为快速诊断马 GETV 感染提供了一定的技术支持<sup>[62]</sup>。Zhou 等以原核表达的 E2 蛋白为包被蛋白，建立针对 GETV 间接 ELISA 方法，该方法在检测 GETV 时与 APPV、CSFV 均不发生反应；其以 IFA 检测方法为标准，利用间接 ELISA 方法对 1000 份猪血清样本进行检测，将 IFA 结果和间接 ELISA 结果进行比较，发现两者符合率为 96.7%，说明该检测方法高效、准确，可用于大规模临床样品的检查<sup>[63]</sup>。

### 3.2 预防

GETV 主要由伊蚊、库蚊等蚊虫传播，其地理分布受社会经济和生态因素的影响。GETV 目前已经在我国广泛传播并引起哺乳动物患病，但目前仍无具体对策来治疗和预防，GETV 未来可能是我国养猪业的一大威胁，尤其在人血清中检测到了 GETV 中和抗体，提示人是 GETV 的潜在宿主<sup>[64]</sup>。针对以上情况，应加强对 GETV 的早期监测，做好养殖场工作人员的健康检测，定期清理蚊虫，防止易感动物接触蚊虫。同时，做好 GETV 的相关分子生物学研究，为 GETV 的防控奠定基础。

## 4 病毒蛋白 N-糖基化功能的研究

### 4.1 病毒蛋白的 N-糖基化修饰

糖基化是蛋白质翻译后修饰的过程<sup>[65]</sup>。迄今为止，已经报道各种蛋白质糖基化修饰，如 N-糖基化、O-糖基化、糖基磷脂酰肌醇（GPI）锚定以及其他修饰类型等。在蛋白质糖基化修饰的众多类型中，聚糖通过酰胺基与天冬酰胺相连形成的糖基化（N-连接糖基化），是最为常见且研究最多的一种形式，N-糖基化在蛋白质中发挥的作用源于其对蛋白质二级结构和物理化学性质的影响<sup>[66]</sup>。

N-糖基化修饰这一过程存在于大多数真核生物中，在细胞生长、蛋白质折叠、免疫应答等各种生物学过程中发挥着至关重要的作用。N-糖基化取决于脂质前体的形成，其中 N-乙酰氨基葡萄糖（GlcNAc）和甘露糖形成支链碳水化合物结构，该结构附着

在内质网细胞质侧的磷酸多萜醇上，然后将这种脂质前体翻转到内质网腔中进一步加工，N-聚糖在内质网中通过寡糖基转移酶将碳水化合物链添加到 N-X-S/T (X≠P) 位点的蛋白质上，N-聚糖去除葡萄糖残基这一过程在内质网中完成。随后，该结构移动至高尔基体，N-聚糖被高尔基体中一系列的酶进行修剪，转移至内侧高尔基体内进行成熟<sup>[67]</sup>。

## 4.2 N-糖基化修饰对病毒的影响

糖基化修饰在病毒的入侵与吸附、免疫逃避等过程中发挥着重要作用。糖链所在位置的不同对蛋白质的折叠也有不同的影响；在病毒的进化过程中，糖基化位点的增加或删除会影响病毒蛋白的折叠从而影响整个病毒粒子结构。如在对寨卡病毒 (ZIKV) E 蛋白的研究中，发现缺乏 N-糖基化位点会损害 E 蛋白的分泌<sup>[68]</sup>。登革热病毒 (DENV) NS1 蛋白的第 130 位的 N-连接聚糖缺失时则无法稳定分泌六聚体、第 207 位的 N-糖基化位点则是促进分泌和细胞外蛋白稳定性<sup>[69]</sup>。禽流感病毒 (AIV) HA 蛋白的功能常受糖基化修饰的影响，研究中发现 HA 糖基化位点的丧失会增加病毒对小鼠的致病性，使病毒生长缓慢<sup>[70]</sup>。在罗斯河病毒 (RRV) 的研究中发现，RRV E2 糖蛋白的糖基化位点突变后使其免疫反应能力和对皮肤的致病性减弱<sup>[71]</sup>。在基孔肯亚病毒 (CHIKV) 中，病毒蛋白的 N-糖基化位点突变可导致 CHIKV 与 GAG 受体结合能力丧失，并降低其在哺乳动物细胞中的感染性<sup>[72]</sup>。

## 5 单克隆抗体技术在甲病毒上的应用

1975 年，Köher 和 Milstlein 首次利用杂交瘤技术制备了单克隆抗体。单克隆抗体的出现为疾病的诊断、预防和治疗提供了基础。最初对于甲病毒的监测主要是通过节肢动物或患病脊椎动物的各部位分离病毒，通过细胞培养或利用 PCR 技术来检测甲病毒<sup>[73]</sup>。这些方法必须在出现临床症状表现的较短时间或者病毒血症持续时间内采集样品，常有时间限制，且均需要特定的设备才能执行检测，而单克隆抗体的出现为甲病毒的监测及治疗提供了工具。

目前，报道的甲病毒蛋白抗体制备的研究多集中于 E2、C 蛋白等，单克隆抗体在甲病毒的诊断和动物模型实验中发挥一定的作用。在基孔肯亚病毒研究中<sup>[74]</sup>，以 E2 蛋白为靶点，制备了三种 (4N12、SVIR023、DC2.271B) 单抗；其中 4N12 是一种人

源的单抗，在体外实验中可中和 CHIKV 的三个基因型，能够保护小鼠免受 CHIKV 感染而导致的死亡；SVIR023<sup>[75]</sup>、DC2.271B<sup>[76]</sup>单抗在攻毒前免疫小鼠，可使小鼠免受 CHIKV 的感染。Goh 等制备了针对 E2 蛋白的单抗，该单抗不与其他甲病毒交叉反应，利用其单抗开发了针对 CHIKV 反应的表位阻断 ELISA (EB-ELISA)，在对临床 60 份血清样品检测时，EB-ELISA 具有高灵敏度<sup>[77]</sup>。Phelps 等人利用不同的免疫原免疫小鼠，最后筛选出针对 EEEV 和 WEEV 具有中和活性的单克隆抗体，制备的单抗均可给小鼠提供不同的保护，且病毒感染后存活的小鼠无临床症状<sup>[78]</sup>。在 VEEV 的研究中，有研究学者从小鼠和用减毒的 VEEV 毒株免疫的人中分离到针对 VEEV 的特异性中和单抗，制备的单抗主要具有结合 E2 糖蛋白的功能，对病毒的复制进行阻断；在动物实验中，对小鼠腹腔注射制备的 mAb 后可保护小鼠免受 VEEV 气溶胶的危害，同时减少 VEEV 诱导的临床症状<sup>[79]</sup>。

甲病毒已经成为世界上最常见的病毒之一<sup>[80]</sup>。目前，针对甲病毒既没有可以使用的疫苗，又无有效的治疗方法。而新一代的具有广泛交叉反应的单克隆抗体不仅是检测工具，同时在对病毒感染的免疫中也起着关键作用。

## 6 研究目的和意义

GETV 是一种新兴的、通过蚊媒传播的病原，常见于规模化养殖场，可感染大批量的马、猪等，使其出现发热、流产、死亡等症状。此外，研究发现 GETV 的宿主范围正在不断扩大，对畜牧业以及公共卫生造成严重危害，同时针对 GETV 的商业疫苗尚未被研发出来。因此，我们需要加强对 GETV 的诊断和预防。本研究制备抗 GETV E1 蛋白的单克隆抗体，并明确该单抗的 B 细胞线性表位，为深入了解 GETV E1 蛋白的生物学功能和建立 GETV 检测方法提供了免疫学工具。另一方面，本研究通过 GETV 反向遗传学系统对 GETV E1、E2、E3 蛋白的 N-糖基化位点进行突变，分析 GETV E1、E2、E3 蛋白 N-糖基化位点突变对病毒复制和小鼠致病性的影响，为阐明 GETV 致病机理和研发抗 GETV 药物提供有价值的参考资料。

## 第一章 盖塔病毒 E1 蛋白单克隆抗体的制备与鉴定

猪盖塔病毒（GETV）是以蚊虫为传播媒介的新发病原，引起新生仔猪死亡，以及妊娠母猪流产、产木乃伊胎等。在人的血清样本中检测出了针对 GETV 的中和抗体，提示 GETV 具有感染人的能力，对动物健康和公众健康构成了威胁。因此，开发针对 GETV 的预防和监测手段对保护猪群安全具有重要意义。单克隆抗体的高度特异性使其在病原检测、疫苗研发等方面发挥重要作用。E1 蛋白是 GETV 的结构蛋白之一，位于病毒粒子表面，在病毒入侵过程中发挥重要作用，但目前尚未有关于 GETV E1 蛋白单抗的报道。因此，本研究针对 E1 蛋白设计抗原片段的原核表达，经重组蛋白免疫小鼠、细胞融合、单克隆杂交瘤细胞筛选等过程，以期得到针对 GETV E1 蛋白的单克隆抗体，为 GETV 的诊断和生物学研究提供有力工具。

### 1 材料与amp;方法

#### 1.1 生物材料

GETV HuN1 毒株由本实验室保存；SP2/0 细胞、ST 细胞由本实验室液氮保存；原核表达 pCold-TF 质粒由本实验室保存；BALB/c 小鼠购自扬州大学实验动物中心。

#### 1.2 主要试剂与材料

主要试剂与材料见表 1-1。

表 1-1 试剂与材料

Table 1-1 Reagents and materials

试剂与材料	公司名称
PCR 纯化试剂盒	Omega Bio-Tek 公司
胶回收试剂盒	Omega Bio-Tek 公司
质粒提取试剂盒	Omega Bio-Tek 公司
DNA 聚合酶 PrimeStar Max	Takara 公司
T4 DNA 连接酶	Takara 公司
<i>Xho</i> I、 <i>Eco</i> RI 限制性内切酶	Takara 公司
ECL 化学发光试剂盒	新赛美生物科技有限公司
青、链霉素	Solarbio 公司
DMEM 培养基	Gibco 公司
山羊抗鼠 IgG 二抗, 绿色 DyLight 488 荧光 标记	Abbkine 公司
异丙基- $\beta$ -D-硫代半乳糖苷	北京索莱宝公司
Polyethylene Glycol 1500 (PEG1500)	Sigma 公司
PVDF 膜	Millipore
16614 蛋白 Marker、三色蛋白预染 Marker	上海翊圣生物科技有限公司
DAPI 染料	Solarbio 公司
甲醇、液体石蜡、无水乙醇	国药集团
HT、HAT 培养基补充剂	北京博奥龙公司

### 1.3 主要试剂的配制

**PBS 溶液:** 称取 NaCl 8 g, KCl 0.2 g, Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 1.42 g, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0.27 g, 溶解于 800 mL 蒸馏水中, 定容至 1 L。

**LB 液体培养基:** 称取 NaCl 5 g, KCl 0.1 g, Tryptone 5 g, Yeast Extract 2.5 g, 溶解于 300 mL 蒸馏水中将其定容至 500 mL, 放至高压灭菌锅进行灭菌, 常温保存。

**LB 固体培养基:** 称取 NaCl 5 g, KCl 0.1 g, Tryptone 5 g, Yeast Extract 2.5 g, 将其定容至 500 mL 蒸馏水中, 加入 7.5 g 琼脂粉, 高压灭菌, 待温度降至 50°C 后, 加入相应的抗生素, 混匀后放至平皿, 凝固后放于 4°C 保存。

2×YT 液体培养基：取 NaCl 5 g, Tryptone 10 g, Yeast Extract 16 g, 充分溶于 800 mL 蒸馏水中，用蒸馏水定容于 1 L, 灭菌后常温保存。

DMEM 细胞培养基：将商品化的 DMEM 粉末溶于 800 mL 超纯水中，加入 3.7 g NaHCO<sub>3</sub>, 混匀后定容至 1 L, 通过过滤除菌，放于 4℃保存。

盖塔病毒专用培养基：2 mL 的 FBS, 1 mL 的青-链霉素, 97 mL 的 DMEM 混合均匀，置于 4℃保存。

细胞生长培养基：10 mL 的 FBS、1 mL 的青-链霉素溶液、加入 DMEM 培养基混合均匀，定容至 100 mL, 放置于 4℃保存。

5×TAE 溶液：Tris 24.2g, Na<sub>2</sub>EDTA<sub>2</sub>H<sub>2</sub>O 3.72 g, 加入 800 mL 蒸馏水，溶解后加入 5.71 mL 醋酸，混匀，加蒸馏水定容于 1 L。

1%的琼脂糖凝胶：琼脂糖粉末 0.6 g, TAE 缓冲液 60 mL, 经加热溶解后加入 3 μL 的 EB 溶液，混合均匀倒入制胶板。

IPTG (100 mM)：称取 IPTG 粉末 1.2 g 溶于 40 mL 蒸馏水，溶解后定容至 50 mL, 过滤除菌，放于 -20℃备用。

5×Loading Buffer：溴酚蓝 0.2 g, SDS 4 g, 10 mL 1 mol/L Tris-HCl (pH 6.8), 20 mL 甘油，溶于 40 mL 蒸馏水中，常温保存。

1×SDS-PAGE：Tris 3.02 g, Glycine 18.8 g, SDS 1 g, 溶于蒸馏水中定容至 1 L, 常温保存。

考马斯亮蓝染色液：考马斯亮蓝 R-250 溶于 500 mL 蒸馏水中，加入冰醋酸 100 mL、异丙醇 250 mL, 用蒸馏水混匀并定容至 1 L, 室温保存。

Western blot 转膜液：SDS 0.37g, Glycine 2.9 g, Tris 5.8 g, 用蒸馏水将其溶解后定容于 800 mL, 加入 200 mL 甲醇，常温保存。

1×TBST 溶液：NaCl 8.8 g, 1 mol/L Tris-HCl (pH 8.0) 20 mL, 使用蒸馏水充分溶解后定容至 1 L, 常温保存。

5%膜封闭缓冲液：称取 1 g 脱脂奶粉溶于 20 mL TBST 溶液中，立即使用或 4℃保存使用。

4%多聚甲醛：多聚甲醛 4 g, 溶于 100 mL 1×PBS 中，放于 4℃保存。

0.2% Triton X-100：200 μL 溶于 100 mL 1×PBS 溶液中，4℃保存。

感受态细胞 (TOP 10) 的制备：

①菌种活化：将实验室冻存的菌种进行解冻，取 40 μL 加入到 4 mL 的液体 LB 培养基中，放入震荡培养箱，培养 13 h 左右。

②菌种培养：取活化完全的菌种按照 1:80 的体积比将其接种于 20 mL 的液体 LB 培养基中，置于 37°C 摇床培养 130-150 min 左右，测量 OD 值，待 OD 值达到 0.45 左右时即可，将菌液置于冰上静置 15 min。

③菌种离心：将预冷的菌体放入无菌离心管，置于 4°C 离心机进行离心，3000 g，10 min，让菌体完全沉入管底。

④CaCl<sub>2</sub> 处理：将存放于 4°C 的 CaCl<sub>2</sub> 取出，向离心管中加入 10mL 用于重悬沉淀菌体，轻轻的拍打管壁，让菌体分散于 CaCl<sub>2</sub> 溶液中，对其冰浴 30 min，低温条件下收集菌体；5000×g，离心 10 min，保留菌体，将废液弃除。

⑤制备感受态细胞悬液：向沉于管底的菌体加入提前预冷的 CaCl<sub>2</sub> 溶液 3.2 mL 及 80% 的甘油 0.8 mL 混和液用于重悬菌体。

⑥分装保存：每管 100 μL，放于 -80°C 保存备用。

## 1.4 主要设备和仪器

主要设备和仪器见表 1-2

表 1-2 设备和仪器

Table 1-2 Equipment and instruments

设备和仪器	公司名称
PCR 仪	德国耶拿分析仪器股份有限公司
高速离心机	美国赛默飞世尔科技有限公司
纯水仪	南京易普易达科技有限公司
恒温水浴锅	美国精骑有限公司
金属浴仪器	杭州米欧仪器有限公司
涡旋振荡仪	美国 Scientific Industries
匀浆机	南京中科拜耳医学科技有限公司
高压蒸汽灭菌锅	驰通仪器有限公司
恒温震荡培养箱、大型高速离心机	上海知楚仪器有限公司
生化培养箱	上海新苗医疗器械有限公司
超净工作台	北京东联哈尔仪器制造有限公司
生物安全柜、二氧化碳恒温培养箱	利康生物科技有限公司
超低温冰箱	中科都菱科技有限公司
冰箱	海尔集团股份有限公司
凝胶成像仪器、化学发光成像仪器	上海天能科技有限公司
制冰机	雪科制冷设备有限公司
倒置光学、荧光显微镜	德国 Leica 公司
微波炉	美的集团股份有限公司
微量移液器、电动移液器	德国 Eppendorfgs
分光光度计	杭州遂真生物技术有限公司
电泳仪	北京凯元信瑞仪器有限公司
超声破碎仪	南京先欧仪器制造有限公司
纯水仪	南京易普易达科技有限公司

## 1.5 重组蛋白的原核表达

### 1.5.1 引物设计及合成

根据 GenBank 中 GETV HuN1 毒株的全基因组序列，用在线分析软件 (ProtScale,

<https://web.expasy.org/protscale/>) 分析 E1 蛋白的氨基酸亲疏水性, 选取 E1 蛋白亲水性的一段区域, 针对该亲水性区域 (31-182 位 aa) 设计一对特异性引物, 并添加单一限制性内切酶酶切位点 *Xho*I 和 *Eco*RI 及保护碱基, 引物交由南京擎科生物公司合成, 见表 1-3。

表 1-3 E1 基因扩增引物

Table 1-3 The primers of E1

引物名称	引物序列
上游引物	5' -CGCCTCGAGCTTGAGGTACTTGGAACCAGCTTG -3'
下游引物	5' -CCGGAATTCGTTCTTGTAGACGACGATCTTGTTGTC-3'

以实验室原有 GETV 全长感染性克隆质粒为模板进行 PCR 反应, 反应体系见表 1-4。

表 1-4 PCR 反应体系

Table 1-4 PCR reaction system

组份	体积 ( $\mu$ L)
上游引物	1
下游引物	1
dd H <sub>2</sub> O	21
2×PrimeSTAR Mix	25
pAC-GETV	2

反应条件: 98°C, 3 min; 98°C, 10 s; 58°C, 10 s; 72°C, 1 min; 33 个循环; 72°C, 5 min; 16°C, 5 min。

### 1.5.2 PCR 产物纯化

将获得正确 PCR 产物进行纯化, 具体操作如下:

- ①向 PCR 产物中 200-300  $\mu$ L 的 CP Buffer, 吹打混匀;
- ②通过真空泵, 将废液去除, 使 DNA 留在吸附柱上;
- ③向吸附柱加入 700  $\mu$ L DNA Wash Buffer, 真空泵吸除废液;
- ④重复步骤③;
- ⑤将含有 DNA 的吸附柱放于新的离心管, 加入 35  $\mu$ L 的 dd H<sub>2</sub>O, 静置 5 min 后离心, 获取纯化产物。

纯化后的产物放至 -20°C 或立即使用。

### 1.5.3 酶切与酶切产物纯化

将纯化后的目的片段与 pCold-TF 空载体质粒分别使用 *EcoRI*、*XhoI* 进行双酶切。置于 37°C 反应 4 h，通过核酸电泳确定目的条带和空载体是否酶切成功。将正确的目的条带，按照 Omega 公司的 Gel Extraction Kit 说明书进行胶回收，具体操作如下：

- ①使用紫外灯对凝胶进行显色，切下正确目的条带，放至干净的 1.5 mL 离心管。
- ②加入 250  $\mu\text{L}$  DNA Binding Buffer，将其置于 60°C 的金属浴中进行胶体溶解。
- ③将溶解完全的液体放至吸附柱，11200 $\times$ g，离心 2 min。
- ④加入 300  $\mu\text{L}$  DNA Binding Buffer，11200 $\times$ g，离心 2 min，弃废液。
- ⑤加入 700  $\mu\text{L}$  DNA Wash Buffer，11500 $\times$ g，离心 2 min，弃废液。
- ⑥重复步骤⑤一次。
- ⑦将吸附柱放于新的离心管中，开盖 3 min，挥发乙醇。

⑧向吸附柱中加入 33  $\mu\text{L}$  Elution Buffer，静置 5 min，11200 $\times$ g，离心 2 min。收集产物放至 -20°C 保存或立即使用。

### 1.5.4 DNA 连接及连接产物转化

将酶切成功的载体和目的片段使用 T4 连接酶进行连接，放至 4°C、12 h，连接体系如表 1-5。

表 1-5 DNA 连接体系

Table 1-5 DNA ligation system

组份	体积 ( $\mu\text{L}$ )
目的片段	6
载体	2.5
10 $\times$ T4 连接酶 Buffer	1
T4 连接酶	0.5

将连接产物进行转化，具体操作如下：

- ①从 -80°C 冰箱取出 TOP10 感受态细胞，放至冰上融化；
- ②取 5  $\mu\text{L}$  连接产物加入 TOP10 感受态细胞，冰浴 30 min；
- ③42°C，热应激 90 s，放至冰上冷却 3 min；
- ④加入 900  $\mu\text{L}$  不含抗性的 LB 溶液，将其放至 37°C 恒温摇床，160 r/min 培养 1 h；
- ⑤通过离心收集菌体，保留 150  $\mu\text{L}$  培养基用于重悬菌体；
- ⑥将沉淀吹打混匀，用涂布器将菌液涂布于培养基表面；

⑦平板放于 37°C 细菌培养箱，培养 15 h 左右。

### 1.5.5 重组质粒提取与鉴定

将长有菌落的平板放于无菌操作台，挑取单个菌落加入 4 mL 含有氨苄抗性的液体 LB 培养基中，置于 37°C 摇床，220 r/min，培养 12-16 h。质粒提取按照 Omega 公司的说明书进行，操作如下：

①将摇好的菌液倒入 2 mL 离心管中，11200×g，离心 2 min，弃掉上清液，直至菌体全部完成离心。

②加入 250 μL Solution I，进行涡旋使沉淀重悬。

③加入 250 μL Solution II，上下颠倒混匀数次，至液体变为清亮。

④加入 350 μL Solution III，上下颠倒 5-10 次左右，可看到絮状沉淀成团。将混合液进行离心，12000×g，离心 10 min。

⑤将离心后的上清加入吸附柱中，将其进行离心，12000×g，离心 1 min，弃去滤液。

⑥加入 500 μL HBC 结合液，12000×g，离心 1 min。

⑦加入 700 μL DNA 清洗液，12000×g，离心 1 min。

⑧重复步骤⑦。

⑨将吸附柱放于新的 1.5 mL 的离心管中，加入提前 55°C 预热好的 Elution Buffer 60 μL，静置 3-5 min，11200×g，离心 2 min，质粒存放于 -20°C。

将提取的质粒进行酶切鉴定，体系如表 1-6。

表 1-6 重组质粒的酶切鉴定反应体系

Table 1-6 Recombinant plasmid digestion identification reaction system

组份	体积 (μL)
dd H <sub>2</sub> O	14.5
10×H Buffer	2
<i>EcoRI</i>	0.5
<i>XhoI</i>	0.5
pCold-TF-E1	2.5

将酶切体系配好后，涡旋混匀，放至 37°C 水浴锅 2 h，进行核酸电泳鉴定。

### 1.5.6 重组蛋白的诱导表达

将构建成功的 pCold-TF-E1 质粒取 1 μL 加入 BL21(DE3)感受态细胞进行转化，加入 IPTG 诱导重组蛋白进行转录翻译，具体操作如下：

①转化参考本章“1.5.4”。

②挑取单个菌落至含有氨苄抗性的 LB 液体培养基中，置于恒温摇床，220 r/min，培养 6-8 h；取活化好的菌液按照 1:100 的比例加入至 250 mL 2YT 液体培养基中，2 h 后检测其 OD 值，待 OD 值到 0.5 左右时，将其放于冰上，冰浴 5-10 min 左右，按照 1:500 的比例加入 IPTG，放于 16°C 摇床，220 r/min，培养 12-14 h。

③取 6 个 50 mL 离心管，将菌液平均分配给每个离心管，并对其称重、配平，放于大离心机，4°C、5000×g 离心 10 min。

④弃去上清，使用 10 mL PBS 将沉淀进行重悬，将沉淀收集于一个离心管中，5000×g、离心 10 min。

⑤重复步骤④。

⑥将重悬的液体置于冰上进行超声破碎，破碎程序选择 25 Hz，运行 3 s，停 2 s，时间为 15-20 min。

⑦将破碎完全的菌液，取 100 $\mu$ L 放入新的离心管中，作为全菌；将剩余液体进行离心，11200×g，10 min。

⑧将上清分别取 1 mL 放至新的 2 mL 离心管中，沉淀用 10 mL PBS 进行重悬，取 1 mL 放至新的 2 mL 离心管中，分别加入 5×Loading Buffer 250  $\mu$ L，使用 100°C 金属浴，煮样 10 min。

⑨将制备好的蛋白全菌、上清、沉淀各取 10  $\mu$ L 进行 SDS-PAGE 电泳，80 V 电泳 30 min，将电压调至 120 V，待溴酚蓝指示剂到达底部时停止，将凝胶取出进行考马斯亮蓝染色 3-4 h，弃掉考马斯亮蓝染液，将凝胶放至脱色液中 2-4 h，置于凝胶成像仪中进行拍照分析结果。

### 1.5.7 重组蛋白的纯化与鉴定

将制备好的蛋白样品进行 SDS-PAGE 电泳分离得到目的条带，通过电洗脱目的蛋白、透析盐离子平衡，蛋白浓缩等获得目的蛋白，具体步骤如下：

①将表达成功的目的蛋白进行 SDS-PAGE 电泳，将分离胶剥离放至提前预冷的 KCL 中，检查目的蛋白条带。

②用干净刀片切下蛋白所在的凝胶条带，将其浸泡在 PBS 中，使 KCL 离开胶条。

③将含有目的蛋白的胶条放置含有 PBS 的透析袋中，通过将透析袋放于 SDS-PAGE 电泳的槽内，120 V 电洗脱 3 h，之后弃去胶条，将含有蛋白的 PBS 放回透析袋中。

④含装有蛋白的透析袋放于有 PBS 的烧杯中置于冰上进行透析，每隔 1 h 换一次

PBS, 3-4 次即可。

⑤对蛋白浓度进行检测, 通过 PEG 8000 进行蛋白浓缩, 待蛋白浓度达到  $1 \mu\text{g}/\mu\text{L}$  时, 取少量浓缩后的蛋白进行 SDS-PAGE 检测蛋白纯化浓度, 其余蛋白放至  $-80^\circ\text{C}$  保存。

通过 Western blot 鉴定纯化蛋白, 200 mA 恒流转印 60 min, 通过 5% 的脱脂牛奶孵育 2 h 减少抗体的非特异性结合。 $4^\circ\text{C}$  过夜孵育 His 标签抗体; 次日, TBST 清洗 PVDF 膜 2-3 次, 每次 8 min; HRP 标记的 IgG (H+L) 室温孵育 1 h; TBST 清洗 3 次, 每次 10min。使用 ECL 显色液对 PVDF 膜进行显影, 记录条带。

## 1.6 小鼠免疫

选取 6-8 周龄的 BALB/c 小鼠, 将纯化好的 TF-E1 蛋白与佐剂 1: 1 的比例进行混合, 利用涡旋震荡仪对蛋白进行乳化。以该蛋白为免疫原免疫小鼠 (免疫程序按照表 1-7), 刺激小鼠产生针对该蛋白抗体。三免后 10 天, 对小鼠进行眼眶下采血, 常温放置使血清析出, 通过离心去除血清中的杂质和非特异性物质。选取处于良好培养状态的 ST 细胞, 将其均匀地铺至 96 孔板中, 当细胞的密度达到 80% 时, 将 GETV HuN1 毒株进行以  $\text{MOI}=0.1$  感染 ST 细胞, 12h 后将有病变的细胞通过多聚甲醛进行固定, 以获得的小鼠血清为一抗进行 IFA 检测, 未免疫的小鼠血清为阴性对照。将 IFA 检测结果呈强阳性的小鼠进行冲击免疫。

表 1-7 重组蛋白的免疫程序

Table 1-7 Recombinant protein immune program

免疫次数	免疫时间	免疫剂量	佐剂	免疫方式
首次免疫	第 1 天	$100 \mu\text{g}$ /只	弗氏完全佐剂	背部皮下分点注射
二次免疫	第 14 天	$100 \mu\text{g}$ /只	弗氏不完全佐剂	腹腔注射
三次免疫	第 28 天	$100 \mu\text{g}$ /只	弗氏不完全佐剂	腹腔注射
冲击免疫	融合前 3 天	$150 \mu\text{g}$ /只	无	腹腔注射

## 1.7 细胞融合与单克隆筛选

### 1.7.1 骨髓瘤细胞的准备

对液氮中保存的 SP2/0 细胞进行复苏, 将其放新的 10 mL 离心管中进行低速离心,

使用含有 10% FBS 的细胞培养液将细胞重悬，放于细胞培养箱进行培养。将呈现圆润、透亮、细胞密度达 80% 的细胞收集于 50 mL 离心管中，置于培养箱短期放置，用于细胞融合实验。

### 1.7.2 饲养细胞的制取

取未做处理的空白小鼠进行脱颈处死，置于 75% 酒精中浸泡 5 min。在生物安全柜中对小鼠进行固定，剪开其皮肤，保留腹膜完整，用注射器取 6 mL 左右的 15% HAT 培养基注入小鼠腹腔。晃动小鼠使腹腔巨噬细胞在培养基中均匀分布，将腹腔内的培养基进行吸出，将取出的饲养细胞于 HAT 培养基混合均匀，提前将其铺至 24 孔板，暂放于细胞培养箱备用。

### 1.7.3 脾细胞的制取

对加强免疫的小鼠通过眼球摘除的方法进行采血并处死，将其放入 75% 酒精中消毒 5 min，在无菌生物安全柜进行固定，使用无菌剪刀剪破其皮肤和腹膜，暴露腹腔脏器，使用镊子取出脾脏，使用含有双抗的 DMEM 对脾脏进行冲洗，并剔除其结缔组织和脂肪等杂质。随后，使用注射器针头将脾脏扎破，使其释放脾细胞，直至脾细胞全部释放于 DMEM 培养基内。

### 1.7.4 细胞融合

将制备好的 SP2/0 细胞、脾细胞按照 1: 6 的比例充分混匀于 50 mL 离心管中，500×g 离心 10 min，缓慢弃掉上清，轻轻拍离心管底，让细胞均匀平布于离心管底部，将离心管放于盛有 37°C 水的烧杯中，加入细胞融合剂 PEG1500，缓慢滴加，1 滴/3 s，1 min 内加完；之后停留 1 min，使细胞之间更好的接触，提高融合效率，最后滴加 DMEM 稀释融合剂的毒性。将混合的细胞悬液放至细胞培养箱中静置 10 min 后进行离心，小心弃去上清，用含 HAT 培养基将底部细胞沉淀进行重悬，与饲养细胞进行混合，补加培养基至 73 mL，按照每孔 500  $\mu$ L 的体积，将其分装至 3 个 24 孔板，置于细胞培养箱中进行培养。

### 1.7.5 细胞筛选与亚克隆

融合后 1 天，观察细胞有无污染情况，融合后第 5 天，对细胞进行半换液，将培养基更换成含 HT 的细胞培养基，此后每隔 1-2 天对细胞进行半换液，至第 10 天时，取 100  $\mu$ L 杂交瘤细胞上清液进行 IFA 检测，将荧光较强的杂交瘤细胞进行单克隆筛选，具体操作如下：

①重悬杂交瘤细胞：将原有细胞培养液弃掉，用 500  $\mu$ L HT 培养基将杂交瘤细胞重悬。

②细胞计数：将重悬细胞稀释 3 倍后，取细胞悬液与胎盼蓝 1: 1 混合，将混合液加入计数板中进行细胞计数，按照 96 孔板每个孔 1 个细胞进行计算。

③细胞铺板：将取得的 100 个杂交瘤细胞与含有饲养细胞的 HT 培养基进行混和均匀，按照每孔 100  $\mu$ L 的体积加入至 96 孔板中。置于细胞培养箱继续培养。

④阳性克隆细胞检测：亚克隆 5 天后，观察细胞板内的细胞数量，对细胞数量较多的杂交瘤细胞上清进行 IFA 检测，将筛选到的单克隆杂交瘤细胞株进行扩培、冻存。

### 1.7.6 单克隆抗体的制备

取 2 只 7-8 周龄的 BALB/c 小鼠，每只腹腔注射 500  $\mu$ L 石蜡，7 天后取  $2.5 \times 10^6$  个单克隆杂交瘤细胞进行腹腔注射，待小鼠腹腔慢慢涨大时，将其腹水借助注射器进行收集，1000 $\times$ g 离心 10 min，取出杂质。将上清保存于 -80 $^{\circ}$ C。

## 1.8 单克隆抗体的生物学特性鉴定

### 1.8.1 间接免疫荧光实验

将消化好的 ST 细胞与培养基混匀后，均匀铺于 96 孔板，待细胞密度达 70% 时，将 GETV 按照 MOI=0.1 感染 ST 细胞，待细胞病变达到 50% 时，将 96 孔板取出，弃掉培养基，使用 PBS 清洗细胞，利用 4% 的多聚甲醛对细胞进行常温固定 10 min；使用 PBS 对细胞进行清洗，将 0.2% Triton X-100 与 4% 的 BSA 进行 1: 1 混合，将其均匀加入 96 孔板，对细胞膜进行溶解并减少非特异性吸附，常温作用 30 min，之后弃掉混合液，用 PBS 清洗两遍；使用本实验制备的抗 GETV-E1 蛋白单克隆抗体作为一抗，阴性小鼠血清为阴性对照，GETV-E2 单抗作为阳性对照，4 $^{\circ}$ C 孵育过夜；之后弃掉一抗，PBS 清洗两遍，使用 488 标记的山羊抗小鼠 IgG 为二抗，室温孵育 1 h，使用 PBS 清洗两遍后，加入 PBS 置于倒置荧光显微镜下进行观察结果并拍照记录。

### 1.8.2 蛋白免疫印记实验

将消化好的 ST 细胞均匀铺至 12 孔板的两个孔，阴性孔不做任何处理，阳性孔接种 GETV (MOI=0.1)，待细胞病变至 60% 时，弃去培养基，使用 PBS 对细胞进行清洗，使用 Western 及 IP 裂解液对细胞蛋白进行提取，该过程在冰上进行，时间为 30 min；经裂解液处理的细胞中含有细胞碎片，通过低温离心去除细胞碎片，只保留蛋白上清；将蛋白样品转移至新的离心管中，加入 Loading buffer，通过 98 $^{\circ}$ C 加热 10 min 对蛋白进行变性。将制备好的蛋白样品进行 SDS-PAGE，通过转印将蛋白转移到用甲醇激活的 PVDF 膜上，200 mA 持续 50 min；之后使用 5% 的脱脂牛奶对 PVDF 膜进行

封闭 1.5 h, 弃掉脱脂牛奶后使用 TBST 对 PVDF 膜进行清洗, 使用本实验制备的 E1 蛋白的单抗为一抗, 按照 1: 800 的比例进行稀释, 4°C 孵育过夜; HRP 标记的山羊抗小鼠 IgG 为二抗, 按照说明书进行 1: 10000 稀释, 常温条件下孵育 1 h; 一抗、二抗孵育结束后均使用 TBST 进行洗膜, 每次 10 min, 清洗三遍。最后, 使用 ECL 发光液在成像仪中进行显影。

## 1.9 单克隆抗体的表位鉴定

### 1.9.1 单克隆抗体抗原表位的鉴定方法

为了确定抗 E1 蛋白单抗的抗原表位, 本研究初步将 E1 蛋白肽段分割成三个多肽片段, 分别将其插入至 pEGFP-C3 真核载体中表达。通过 Western blot 鉴定, 将与单克隆抗体反应的多肽片段继续进行分割, 直到重组蛋白与单克隆抗体不再反应, 即可明确该单克隆抗体的抗原表位。

### 1.9.2 重组真核表达载体的构建

本实验为了明确 E1 蛋白单克隆抗体的抗原表位, 对 E1 蛋白的肽段进行了多次分割, 通过 *Kpn* I 和 *Xho* I 限制性酶切位点将其基因片段插入至 pEGFP-C3 真核载体中, 设计的引物如表 1-8 所示。

表 1-8 E1 单抗表位鉴定引物

Table 1-8 Primers for identification of E1 mAb epitomes

引物名称	引物序列 (5' -3' )	碱基长度 (bp)
E1(31-93AA)-F	CTCGAGCTTGAGGTACTTGGAACCAGC	27
E1(31-93AA)-R	GGTACCGTATGCGCCGCCACATAAATG	29
E1(76-138AA)-F	CTCGAGTATCAATGCCAGGTCTACACAG	28
E1(76-138AA)-R	GGTACCCCGTAACTTATTCGGATGGTG	28
E1(121-182AA)-F	CAACTCGAGGCCTACAAGGCGCACACTGCG	30
E1(121-182AA)-R	CAGGGTACCGTTCTTGTAGACGACGATCTTG	31
E1(31-61AA)-R	CAAGGTACCCTTGATATAAGGTGATGGCAC	30
E1(51-81AA)-F	CGACTCGAGTACAAGACAGTCGTGCCATCAC	31
E1(51-81AA)-R	CAGGGTACCGTAGACCTGGCATTGATAGTC	30
E1(71-93AA)-F	CAACTCGAGATGGAGCGCCCCGACTATC	28
E1(72-81AA)-F	CATCTCGAGGAGCGCCCCGACTATCAATG	29
E1(73-81AA)-F	GAATCTCGAGCGCCCCGACTATCAATGC	28
E1(74-81AA)-F	CTCGAGCCCGACTATCAATGCCAGGTC	27
E1(71-80AA)-R	GAAGGTACCGACCTGGCATTGATAGTC	27
E1(72-79AA)-R	GAACGGTACCCTGGCATTGATAGTCGGG	28
E1(72-78AA)-R	CAAGGTACCGCATTGATAGTCGGGGCG	27
E1(72-77AA)-R	GAAGGTACCTTGATAGTCGGGGCGCTC	27
pEGFP- <i>NheI</i> -F	CATGCTAGCGCTACCGGTCGCCACCATGG	29
pEGFP- <i>MluI</i> -R	ACGCGTCGTAAAGATACATTGATGAGTTTG	30

### 1.9.3 抗原表位序列的保守性分析

使用 NCBI 查询 GenBank 中已公布的 GETV 分离毒株, 将明确的 E1 单抗的抗原表位序列 <sup>73</sup>RPDYQC<sup>78</sup> 与下载的毒株进行序列比对, 以探究 E1 单抗的抗原表位在毒株中的保守性。

## 2 结果

### 2.1 E1 蛋白的亲疏水性分析

使用在线工具 (ProtScale, <https://web.expasy.org/protscale/>) 分析 E1 蛋白氨基酸的亲疏水性。结果显示, E1 蛋白第 31-182 位氨基酸区域亲水性相对较强 (图 1-1), 针对该区域设计特异性引物, 扩增目的片段。

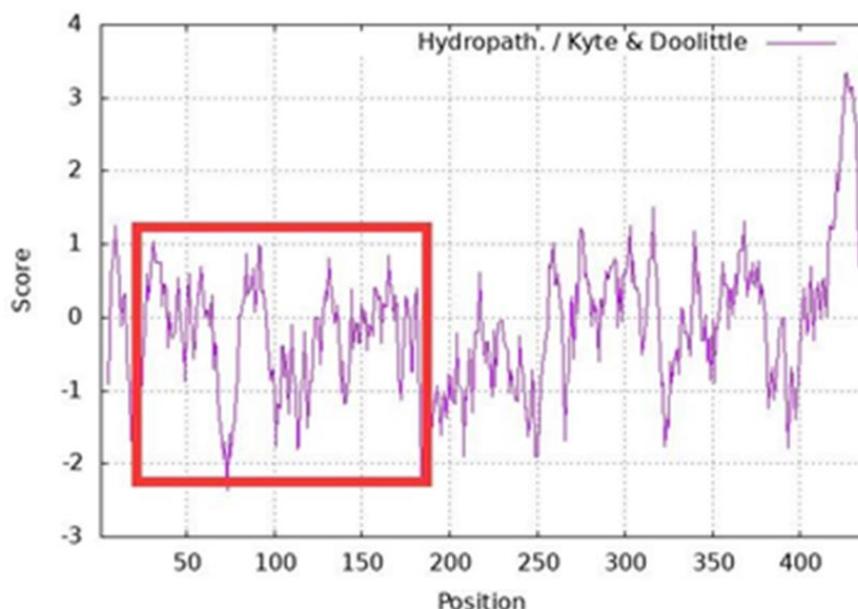


图 1-1 E1 蛋白亲疏水性分析

纵坐标: <0 亲水, >0 疏水; 横坐标: E1 蛋白氨基酸序列

Fig.1-1 Hydrophilic and hydrophobic analysis of E1 protein sequence

Ordinate: <0 hydrophilic, >0 hydrophobic; Abscissa: E1 protein amino acid sequence

### 2.2 E1 片段的扩增和重组质粒的鉴定

以 GETV 全长感染性克隆质粒为模板, PCR 技术扩增截短的 E1 目的基因, 经过核酸电泳结果显示在 500 bp 左右存在一条特异性条带(图 1-2A, 目的片段大小为 453 bp), 符合实验设计的目的片段大小。将扩增片段通过酶切的方式插入至 pCold-TF 载体, 经过连接、转化、挑菌、质粒提取等获得重组质粒。将构建的重组质粒进行酶切鉴定, 结果显示有符合大小的目的条带 (图 1-2B), 表明重组质粒构建成功。

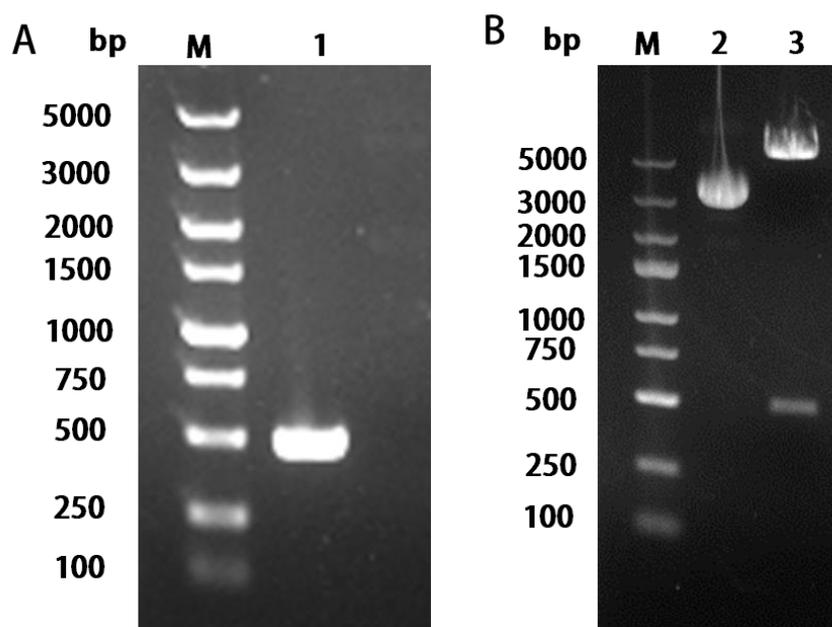


图 1-2 E1 截断片段的扩增和 pCold-TF-E1 的酶切鉴定

Fig. 1-2 Amplification of E1 truncated fragments and identification of pCold-TF-E1

M: DL5000 Marker; 1: 截短的 E1 基因; 2: pCold-TF-E1; 3: *EcoRI*+*XhoI*+pCold-TF-E1

M: DL5000 Marker; 1: truncated E1 gene; 2: pCold-TF-E1; 3: *EcoRI*+*XhoI*+pCold-TF-E1

### 2.3 重组蛋白的表达

将构建成功的重组质粒 pCold-TF-E1 转化至感受态细胞 BL21(DE3), 在 16°C 条件下对其进行诱导表达。随后, 收集菌体进行超声破碎, 收集全菌、上清、沉淀, 通过 SDS-PAGE 结果分析蛋白表达情况。结果显示, 重组蛋白 E1 在上清中表达, 大小约为 70 kDa 左右 (如图 1-3)。

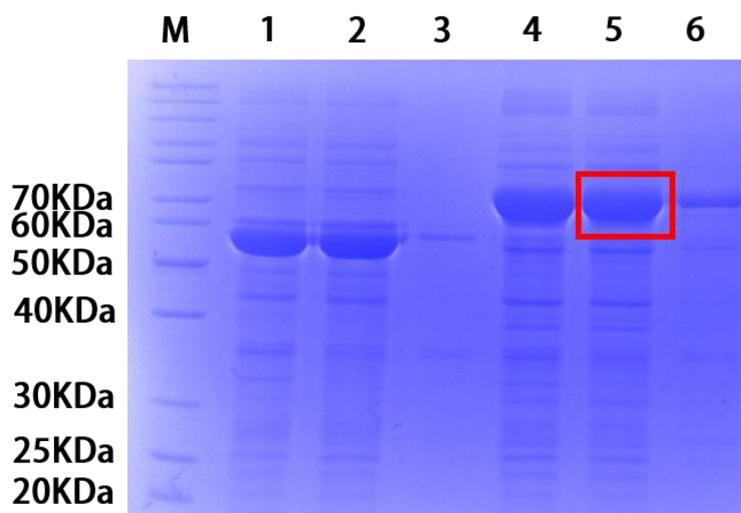


图 1-3 E1 重组蛋白的原核表达

Fig. 1-3 Prokaryotic expression of E1 recombinant protein

M: 26614 Protein Marker; 1: pCold-TF 全菌; 2: pCold-TF 上清; 3: pCold-TF 沉淀;  
4: pCold-TF-E1 全菌; 5: pCold-TF-E1 上清; 6: pCold-TF-E1 沉淀

M: 26614 Protein Marker; 1: pCold-TF whole cell; 2: pCold-TF supernatant; 3: pCold-TF precipitation; 4: pCold-TF-E1 whole cell; 5: pCold-TF-E1 supernatant; 6: pCold-TF-E1 precipitation

## 2.4 重组蛋白的纯化

将表达成功的重组蛋白上清通过 SDS-PAGE 电泳分离蛋白条带，根据前期蛋白表达结果，切下正确的目的蛋白；随后，通过对蛋白进行电洗脱、离子平衡透析、蛋白浓缩等程序获得纯度较高的目的蛋白。经纯化的蛋白进行 SDS-PAGE 电泳，结果显示获得高纯度的重组 E1 蛋白（图 1-4）。

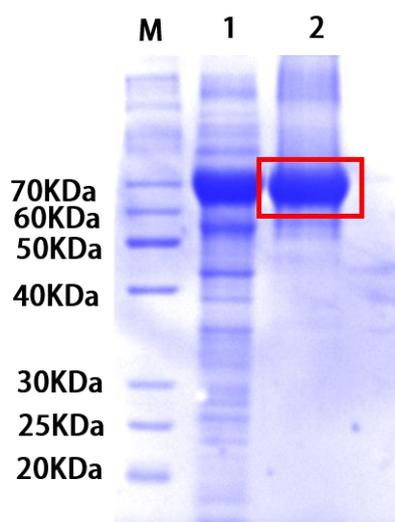


图 1-4 E1 重组蛋白的纯化

Fig. 1-4 Purification of E1 recombinant protein

M: 26614 Protein Marker; 1: pCold-TF-E1 纯化前; 2: pCold-TF-E1 纯化后

M: 26614 Protein Marker; 1: Unpurified pCold-TF-E1; 2: Purified pCold-TF-E1

## 2.5 纯化蛋白的鉴定

Western blot 结果显示在 70 kDa 左右有符合大小的条带，阴性对照无条带，结果说明 TF-E1 蛋白纯化正确（图 1-5）。

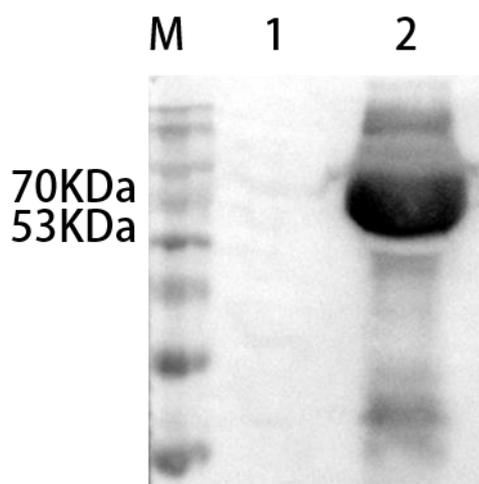


图 1-5 TF-E1 的 Western blot 鉴定

Fig. 1-5 Identification of TF-E1 by Western blot

M: 蛋白质分子质量标准; 1: BL21 裂解液上清; 2: 纯化的 TF-E1

M: Protein Molecular weight Marker; 1: BL21 supernatant; 2: Purified TF-E1

## 2.6 杂交瘤细胞株的筛选

取免疫原性好的小鼠脾细胞与 SP2/0 细胞进行细胞融合，经过对阳性杂交瘤细胞筛选，获得一株能够稳定分泌 GETV E1 蛋白的单克隆杂交瘤细胞株，将该细胞株命名为 1C9。

## 2.7 单克隆抗体的大量制备

取 2 只 8 周龄的 BALB/c 小鼠，每只注射 500  $\mu$ L 石蜡，7 天后取培养好的杂交瘤细胞株（约  $3 \times 10^6$ /只）注射于小鼠腹腔，1 周左右小鼠腹腔逐渐增大，注射器取出小鼠腹水，经  $2000 \times g$  离心 10 min，收集单抗上清分装于离心管中，保存于  $-80^\circ\text{C}$ 。

## 2.8 单克隆抗体的生物学特性鉴定

### 2.8.1 间接免疫荧光实验

使用本实验室保存的 GETV HuN1 毒株按照  $\text{MOI}=0.1$  感染 ST 细胞，以 E1 mAb 为一抗，进行 IFA 鉴定。结果显示，E1 mAb 能够与 GETV 发生反应，且特异性良好。

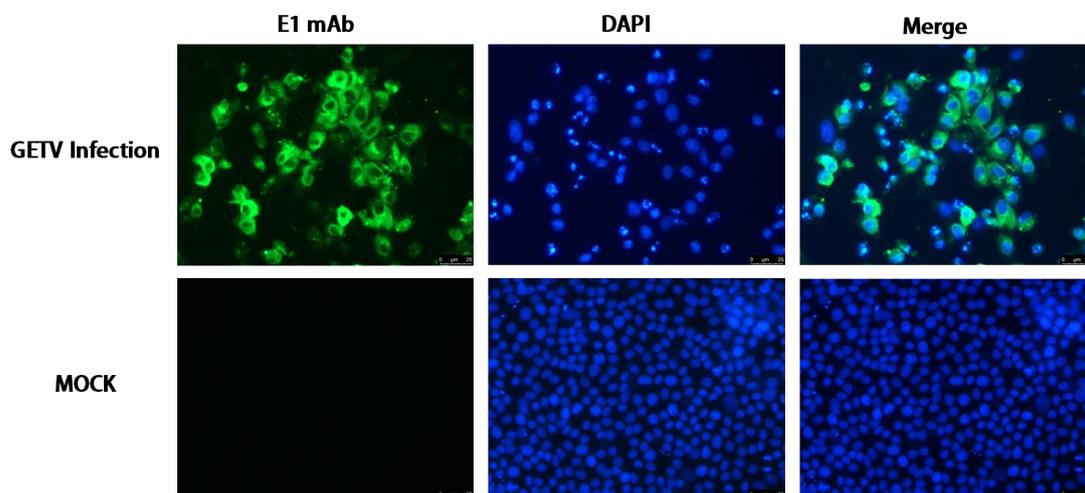


图 1-6 E1 单克隆抗体的 IFA 检测

Fig. 1-6 IFA detection of E1 monoclonal antibodies

### 2.8.2 蛋白免疫印迹实验

利用本实验室的 GETV 毒株感染 ST 细胞，以获得的 E1 蛋白单抗为一抗进行 WB 检测，结果显示，该单抗能够与 GETV 中的 E1 蛋白反应，能够检测到特异条带。

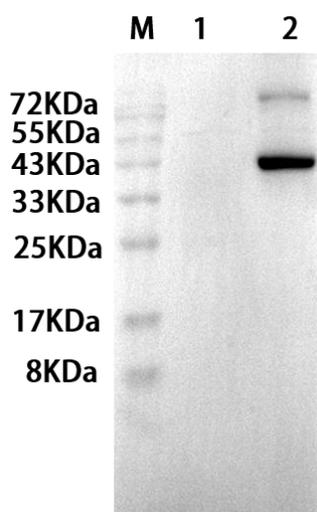


图 1-7 E1 单克隆抗体的 Western blot 检测

Fig. 1-7 Western blot detection of E1 monoclonal antibodies

M:蛋白质分子质量标准；1: GETV 感染 ST 细胞样；2: ST 细胞

M: Protein Molecular weight Marker; 1: ST cells infected with GETV; 2: ST cells

## 2.9 单克隆抗体的表位鉴定

将 E1 蛋白基因片段分为若干个区域，针对不同区域的核苷酸序列设计特异性引物，扩增目的片段将其构建至真核表达载体，将阳性质粒转染 BHK-293T 细胞进行表达。通过 Western blot 检测，本实验初步明确 E1 mAb 能够与肽段 31-93 位氨基酸区域反应；继续分割肽段，发现 E1 mAb 既能够与 51-81 位氨基酸区域反应，又与 71-93 位氨基酸区域反应，提示 E1 mAb 针对的抗原表位位于 71-81 位氨基酸区域，接下来我们对 71-81 氨基酸区域的肽链两端分别进行缩减，最后明确 E1 mAb 的抗原表位为  $^{73}\text{RPDYQC}^{78}$  (图 1-8)。

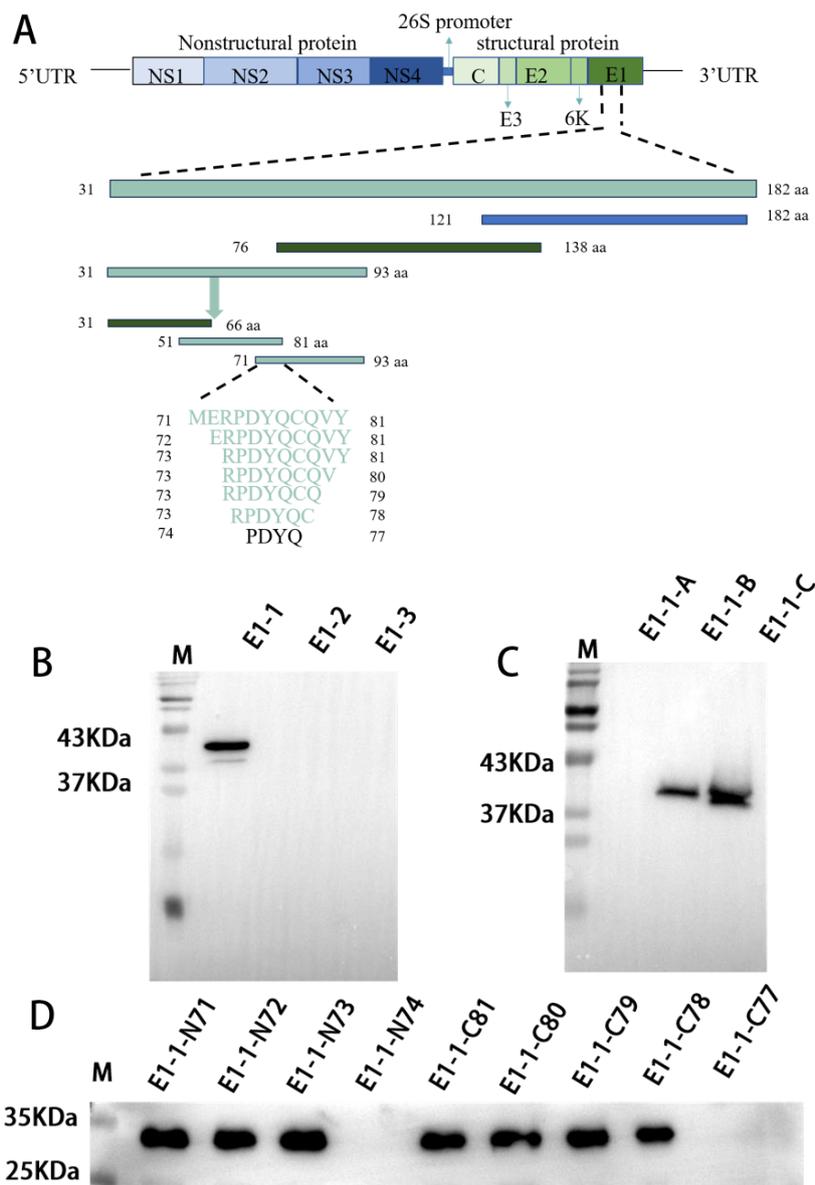


图 1-8 E1 单抗抗原表位鉴定

Fig. 1-8 Identification of E1 monoclonal antibody epitopes

A: 抗原表位鉴定示意图; B: 初步鉴定位于 E1-1 片段; C: 第二步鉴定位于 E1-BC 重叠片段;

D: 抗原表位鉴定位于 73-78 氨基酸区域

A: Schematic diagram of antigen epitope identification of E1 monoclonal antibody; B: Preliminary identification located in E1-1 fragment; C: The second step is to identify the overlapping fragments located in E1-BC; D: Antigen epitope identification located in the 73-78 amino acid region

## 2.10 抗原表位保守性分析

通过在 GenBank 查找现已上传的 GETV 毒株序列，比较分析 E1 mAb 针对的抗原

表位区域 ( $^{73}\text{RPDYQC}^{78}$ ) 与其他毒株是否存在差异。结果显示 (图 1-9), 该区域的氨基酸与其他毒株氨基酸组成一样, 此序列完全保守, 可以用于鉴定所有 GETV 毒株。

		$^{73}\text{RPDYQC}^{78}$			$^{73}\text{RPDYQC}^{78}$
HuNI	MF741771	*****	HNPDS-2	MG865969	*****
M1	EU015061	*****	SD1709	MH106780	*****
MM2021	MW404214	*****	SC483	MN478486	*****
SC201807	MK693225	*****	HNPDS-1	MG865968	*****
GX201808	MT269657	*****	SC266	MN478487	*****
YN0540	EU015063	*****	GETV-GDFS2-2018	MT086508	*****
Kochi/01/2005	AB859822	*****	GETV-GDFS9-2018	MT086509	*****
SC1210	LC107870	*****	GETV/SW/Thailand2017	LC534253	*****
MI-110-C1	LC079086	*****	JAF218-3L-NH-C:sp-Y-1-1	MW246769	*****
MI-110-C2	LC079087	*****	HeN202009-2	MZ7368010	*****
14-1-605-C2	LC079089	*****	SC202009	OK423758	*****
GETV-V1	KY399029	*****	GETV-XJ-2019-07	MZ388464	*****
16-1-599	LC223130	*****	YN12031	KY434327	*****
MM2021	MN849355	*****	AMM2021	MT121984	*****
LEIV 16275 Mag	EF631998	*****	HB0234	EU015062	*****
LEIV 17741 MPR	EF631999	*****	AH9192	MG865965	*****

图 1-9 E1 蛋白单克隆抗体抗原表位保守性分析

Fig. 1-9 Analysis of epitope conservation of E1 monoclonal antibody

### 3 讨论

E1 蛋白是 GETV 的一种结构蛋白, 存在于病毒粒子表面, 构成病毒的囊膜。GETV 感染细胞的能力受 E1 蛋白的影响, 当病毒处于低 pH 环境时, E1 和 E2 蛋白解离暴露 E1 的融合环, 介导病毒和宿主细胞的膜融合, 帮助病毒入侵细胞完成感染<sup>[28]</sup>。目前, 关于 GETV E1 蛋白的功能研究较少, 报道的盖塔病毒蛋白抗体制备的研究多集中于 E2 蛋白、C 蛋白等<sup>[60]</sup>, 尚未有制备 GETV E1 蛋白单抗的报道。因此, 制备 E1 蛋白的单克隆抗体不仅为其功能研究提供工具, 同时也有助于开发针对 GETV 新的诊断方法。

如何制备高质量单克隆抗体, 关键在于获得高纯度、高产量的免疫原。因此, 本研究选用了含有冷休克基因的 CapA 基因启动子和原核核糖体结合伴侣蛋白质 (TF) 的 pCold-TF 载体<sup>[61]</sup>。当大肠杆菌处于低温培养时, 其自身的基因表达暂时停止, 但是冷休克蛋白可以被特异性诱导表达。我们通过切胶纯化获得高浓度 TF-E1 目的蛋白, 以该蛋白为免疫原免疫小鼠。在小鼠免疫过程中, 首免采用高浓度的 TF-E1 蛋白和弗氏完全佐剂, 对小鼠进行颈背部皮下免疫, 二免和三免均采用 TF-E1 蛋白和不完全佐剂, 对小鼠进行腹腔免疫。三免后 10 天, 对免疫小鼠进行眼眶下采血, 通过 IFA 鉴定

选取结果呈强阳性的小鼠进行冲击免疫。在经细胞融合、单克隆细胞筛选等过程，制备了 1 株针对 E1 蛋白的单克隆抗体。

接下来，对制备的 E1 单抗进行 Western blot 鉴定，结果显示在 43-55 kDa 之间有一条特异性条带，符合 E1 蛋白的大小。同时，发现在大于 100 kDa 处，也有一条特异性条带，推测该条带为 C 蛋白自我切割后的结构蛋白多肽（E3-E2-6K-E1）。对 E1 单抗进行 IFA 鉴定，该单抗能够特异性的与感染 GETV 的 ST 细胞反应，产生特异荧光。以上结果说明 E1 单抗适用于 Western blot 和 IFA 检测。

为确定 E1 单抗的抗原表位，采用对 E1 蛋白肽段进行分步截短的方法，将截断的目的基因插入真核表达载体 pEGFP-C3 中，借助真核表达载体表达截短 E1 蛋白，通过 Western blot 鉴定该单抗的抗原表位为  $^{73}\text{RPDYQC}^{78}$ 。接下来，将该抗原表位与 GenBank 上的 GETV 毒株 E1 氨基酸序列进行比对，结果显示该抗原表位在 GETV 毒株中高度保守。

综上所述，本研究制备了针对 E1 蛋白的单抗，明确了 E1 单抗的抗原表位，为研发针对 GETV 的诊断试剂建立了一定的基础。

## 4 本章小结

(1) 本研究利用原核表达系统成功表达了 TF-E1 重组蛋白，以其为免疫原免疫小鼠，经细胞融合等技术，制备了针对 GETV E1 蛋白的单克隆抗体，将其命名为 E1 1C9。制备的单抗能够用于 Western blot、IFA 鉴定。

(2) 明确了 E1 单抗的抗原表位为  $^{73}\text{RPDYQC}^{78}$ ，该序列在 GETV 毒株中高度保守，可用于诊断试剂的研发。

## 第二章 盖塔病毒膜蛋白 N-糖基化功能的研究

糖基化是聚糖与蛋白质的结合，是一种关键的蛋白质翻译后修饰。迄今为止，已经报道多种蛋白质糖基化修饰类型，如 N-糖基化、O-糖基化、糖基磷脂酰肌醇（GPI）锚定等其他修饰类型<sup>[65]</sup>；其中，N-糖基化是常见且广泛研究的蛋白质糖基化形式。

现有研究表明，大多数病毒蛋白在病毒感染周期中会发生糖基化修饰，尤其是结构蛋白。病毒糖蛋白的 N-糖基化具有多种功能，包括促进表达、转运、融合、与细胞表面受体结合以及防止抗体中和等。例如，伪狂犬病毒（PRV）的 gH 蛋白 N-糖基化位点突变后影响 gH 的转运、体外融合等，但对感染性病毒颗粒的形成无抑制作用<sup>[81]</sup>。经典猪瘟病毒(CSFV)的 E2 包膜蛋白糖基化位点突变后，病毒不能够被成功拯救，但是突变第 185 位氨基酸时可成功拯救病毒，但该病毒对猪的致病力减弱<sup>[82]</sup>。目前，关于 GETV 的膜蛋白糖基化功能的报道甚少。基于此，本研究通过 GETV 反向遗传操作系统构建 GETV 膜蛋白 N-糖基化位点突变的重组病毒，研究 GETV E1、E2、E3 蛋白 N-糖基化位点突变后对病毒复制和致病力的影响，为研究 GETV 生物学特性和致病性提供参考。

### 1 材料和方法

#### 1.1 细胞和毒株

猪睾丸细胞（ST）、仓鼠肾细胞（BHK21）、GETV HuN1 毒株均由本实验室保存。

#### 1.2 质粒、菌株及实验动物

GETV HuN1 株全长 cDNA 感染性克隆 pAC-GETV 由本实验室构建并保存；大肠杆菌 TOP10 感受态细胞由本实验室制备保存。2 日龄 ICR 乳鼠及母鼠购自扬州大学实验动物中心。

### 1.3 主要试剂

同研究内容的第一章。

### 1.4 主要溶液及相关试剂的配置

主要试剂见本章，其余试剂参考研究内容第一章。

2%低熔点琼脂：2 g 低熔点琼脂溶于 100 mL 去离子水中，高压后放于室温保存。

0.5%结晶紫染液：1 g 结晶紫粉末，溶于 200 mL PBS 溶液中，于 37°C 进行溶解，放置常温保存。

### 1.5 主要设备和仪器

同研究内容第一章。

### 1.6 构建 E1、E2、E3 基因点突变的 GETV 感染性克隆质粒

#### 1.6.1 点突变引物设计

根据 GETV HuN1 毒株的序列，设计 E1、E2、E3 基因点突变引物，将以上基因中的 N 糖基化位点的关键氨基酸 N（天冬酰胺）突变为 A（丙氨酸），通过 Overlap PCR 的方法引入突变位点。根据 pAC-GETV 感染性克隆为模板，设计特异性引物加入保护性碱基。引物扩增由南京擎科生物公司合成，见表 2-1。

表 2-1 E1、E2、E3 氨基酸点突变引物

Table 2-1 Primers used for amino acid mutation of E1、E2、E3 gene

突变位点	引物名称	序列 (5' -3' )
Mutation sites	Primer name	Sequence (5' -3' )
	E2-10059-F	CCGGTGACCGAAGATGGG
	<i>Mlu</i> I-R	TACAATTTACGCGTTAAGATACATTGATG
E1 N141A	10983-F	CGGGAACCTCGCCCAGACAACAACGGC
	10983-R	GCCGTTGTTGTCTGGGCGAGGTTCCCG
	C-8740-F	CAGCGACAGGCGCAGGTAAACCAG
	E2-10156-R	GCCACCCATGGGGTTTGC
E2 N200A	9707-F	GACCATCAGATACGCCTGCACGTGCGG
	9707-R	ACGTGCAGGCGTATCTGATGGTC
E2 N262A	9894-F	TTCCCTCTGACCGCCTCCACATGCAGGG
	9894-R	CCCTGCATGTGGAGGCGGTCAGAGGGAA
E3 N11A	8950-F	GCGTCTTAGCCGCTGTTACATTCCCATGC
	8950-R	GCATGGGAATGTAACAGCGGCTAAGACGC
E3 N57A	9085-F	CCACGATGACGTGTGCTAATAGTGCACGCCA
	9085-R	GCGTGCACTATTAGCACACGTCATCGTGG

### 1.6.2 点突变质粒的构建

以感染性克隆 pAC-GETV 为模板，设计上下游引物，通过 Overlap PCR 的方式引入点突变，根据模板上的特异酶切位点，对模板和片段同时进行酶切，将 Overlap 的片段替换至感染性克隆质粒 pAC-GETV。以 E1 N141 位点突变为例，具体步骤如下：

目的片段扩增：使用引物对 E2-10059-F/10983-R 和 10983-F/*Mlu*-R 扩增得到片段 N141A-1 和 N141A-2。PCR 反应体系如表 2-2。

表 2-2 PCR 反应体系

Table 2-2 PCR reaction system

组份	体积 ( $\mu\text{L}$ )
dd H <sub>2</sub> O	21
E2-10059-F/10983-F	1
10983-R/ <i>Mlu</i> -R	1
2×PrimeSTAR Mix	25
pAC-GETV	2

反应条件：98°C，3 min；98°C，10 s；58°C，30 s；72°C，1 min；33 个循环；72°C，5 min；16°C，5 min；

胶回收：将 PCR 产物进行胶回收纯化，获得的片段进行 Overlap PCR，将获得纯化产物作为模板，overlap PCR 扩增反应体系如表 2-3。

表 2-3 overlap PCR 反应体系

Table 2-3 overlap PCR reaction system

组份	体积 ( $\mu\text{L}$ )
dd H <sub>2</sub> O	21
2×PrimeSTAR Mix	25
DNA(N141-1+ N141-2)	2

将反应体系涡旋混匀后，98°C 3 min；98°C 10 s，72°C 90 s，共 5 个循环，延伸 72°C 10 min；16°C 5 min。加入以下反应试剂：

组份	体积 ( $\mu\text{L}$ )
上步混合液	48
上游引物	1
下游引物	1

混匀后，98°C 3 min；98°C 10 s，72°C 90 s，共 30 个循环，延伸 72°C 10 min；16°C 5 min。PCR 产物扩增过后进行核酸电泳，将扩增成功的 PCR 产物进行纯化。分别对感染性克隆质粒 pAC-GETV 和扩增的目的片段进行分步酶切 (*Apa*I+*Mlu*I-HF)，反应条件为 25°C 酶切 4 h (*Apa*I) 后进行 PCR 纯化，将纯化产物 37°C 酶切 4 h (*Mlu*I-HF)。

酶切体系如表 2-4。

表 2-4 目的片段和 pAC-GETV 载体酶切体系

Table 2-4 The enzyme digestion system for the target fragment and the pAC-GETV vector

组份	体积 ( $\mu\text{L}$ )
10 $\times$ cutsmart	5
pAC-GETV/目的片段	30
<i>ApaI/MluI</i> -HF	1/1
dd H <sub>2</sub> O	24

将酶切产物进行胶回收获得线形的感染性克隆载体和目的片段，将目的片段克隆至 pAC-GETV 载体，得到 E1 基因点突变的感染性克隆质粒 pAC-GETV-E1 N141A；连接体系如表 2-5。

表 2-5 目的片段和 pAC-GETV 载体的连接体系

Table 2-5 The ligation system for the target fragment and the pAC-GETV vector

组份	体积 ( $\mu\text{L}$ )
10 $\times$ Ligation buffer	1
pAC-GETV	3
N141A-12	5.5
T4 DNA Ligase	0.5

将以上样品混匀后，4 $^{\circ}\text{C}$ 过夜连接。转化、挑菌、质粒提取、鉴定等研究内容同第一章中的 1.5.4 和 1.5.5，通过测序确认突变位点成功引入。其余位点的突变按照上述步骤进行。

## 1.7 质粒转染和重组病毒拯救

质粒转染参照 Entranster<sup>TM</sup>-H4000 转染试剂盒说明书，具体操作如下：

- ①将消化好的 BHK-21 细胞铺至 6 孔板，待细胞密度至 50%时进行转染。
- ②取 2  $\mu\text{g}$  pAC-GETV-E1 N141A 或突变质粒与 50  $\mu\text{L}$  的 Opti-MEM DMEM 混合均匀，稀释 DNA，静置 5 min；
- ③制备 Entranster<sup>TM</sup>-H4000 稀释液，取 5  $\mu\text{L}$  的 Entranster<sup>TM</sup>-H4000 与 50  $\mu\text{L}$  Opti-

MEM DMEM 混匀，室温静置 5 min；

④将上述两种稀释液进行混合，确保混合完全，室温静置 15 min，制备转染复合物；

⑤将制备好的转染复合物，加入提前铺好细胞的 6 孔板中，轻轻晃动细胞培养板，使转染复合物与细胞培养基混匀，放于 37°C、5% CO<sub>2</sub> 的培养箱中；

⑥转染后 6 h，弃去原培养基，加入 2 mL 新鲜的 10% FBS 培养基，放入细胞培养箱中继续培养；

⑦转染 60 h 后，观察到 BHK-21 细胞完全产生病变，将其细胞上清全部进行收集，8000×g，离心 5 min，弃去细胞碎片；将收集到的上清保存于-80°C；

⑧取病毒上清液 10 μL 接种于提前铺好的 ST 细胞，观察是否细胞病变。

## 1.8 重组病毒的鉴定

将构建成功的重组病毒分别取 5 μL 感染已提前铺好的 ST 细胞，同时设置正常细胞为阴性对照，放至 37°C、5% CO<sub>2</sub> 的培养箱中 2 h 后，将其原培养基弃掉，加入 2% FBS 的细胞培养基，放至 37°C、5% CO<sub>2</sub> 的培养箱中继续培养，12 h 后观察细胞病变情况，待细胞病变达 60%左右，对其细胞进行固定，通过 IFA 的方式鉴定重组病毒是否拯救成功，IFA 具体操作参考第一章 1.8.1。

## 1.9 重组病毒生长特性探究

### 1.9.1 病毒滴度测定及生长曲线

将在 ST 细胞上培养的 GETV (E1-N141A)、GETV (E2-N200A)、GETV (E2-N262A)、GETV (E2-N200/262A)、GETV (E3-N11A)、GETV (E3-N57A)、GETV (E3-N11/57A) 各突变病毒进行病毒滴度测定，方法如下：

①将 ST 细胞铺至 96 孔板，待细胞密度至 80%左右时进行病毒滴度测定；

将重组病毒液逐级稀释至 10<sup>-2</sup> 和 10<sup>-8</sup> 倍，依次加入细胞孔中，并做 4 个重复孔，同时设置阴性对照。置于 37°C、5% CO<sub>2</sub> 的培养箱中继续培养；

②72 h 后，对其细胞病变的细胞孔进行标记，按照 Karber 法计算病毒滴度。

一步生长曲线的测定：将上述已测定病毒滴度的重组病毒按照 MOI=0.1 接种于提前铺好的 ST 细胞上，2 h 后，弃去原培养基，换成 2% FBS 的细胞培养基，于细胞培养箱中继续培养。分别于 12 h、24 h、36 h、48 h、60 h 收集 150 μL 的上清液，并补加

相同体积的培养基。之后制备细胞病毒滴度检测板，具体操作和病毒滴度测定一样，利用 Graphpad 绘制一步生长曲线。

### 1.9.2 空斑实验

将提前消化好的 ST 细胞铺至 12 孔板，待细胞长满整个培养板底部时，按照 50 TCID<sub>50</sub> 对 GETV 和突变病毒进行稀释，取 100  $\mu$ L 去感染 ST 细胞，在细胞培养箱中继续培养 2 h 后，弃去培养基，将 2%低熔点琼脂和 2 $\times$ DMEM(4% FBS+2%青-链霉素)等体积混合，按照 1.5 mL/孔加至细胞培养板，置于室温 1 h 左右，将其放于 37 $^{\circ}$ C、5% CO<sub>2</sub> 的培养箱中继续培养。12 h 后，每隔一段时间观察有无细胞病变，当在倒置显微镜下能够看到成区域的病变时，便可对其固定并染色。小心将琼脂进行划开，使 0.5% 的结晶紫染液能够细胞进行着色，室温 3 h 后，弃去染液，用清水冲掉表面琼脂层，观察空斑形态。

### 1.10 N-糖基化位点突变对病毒粒子吸附和入侵细胞的影响

将提前铺好的 ST 细胞放至 4 $^{\circ}$ C 进行预冷 10 min 左右，之后弃去细胞培养基将 MOI=5 的病毒液加入细胞单层，放至 4 $^{\circ}$ C 孵育 2 h，使病毒能够吸附细胞，其中一组用 PBS 清洗 3 次，去除未结合的病毒粒子，提取 RNA，通过 RT-qPCR 检测病毒拷贝数。另一组为在 4 $^{\circ}$ C 孵育 1 h 之后放至 37 $^{\circ}$ C 细胞培养箱孵育 2 h，以便病毒入侵细胞，随后用 PBS 清洗，提取 GETV 感染细胞样品中的总 RNA，并通过反转录获得 cDNA；以反转录获得 cDNA 为模板，设计针对 nsP2 基因的荧光定量引物，通过 RT-qPCR 检测感染细胞中 GETV 的 nsP2 基因的拷贝数。

### 1.11 N-糖基化位点突变对 GETV 膜蛋白糖链加工的影响

将 ST 细胞铺至 12 孔板，待细胞密度至 80-90%时，将野毒和突变病毒均按照 MOI=0.1 感染 ST 细胞，12 h 后观察细胞病变，待病变至 50%时对其进行裂解收取其蛋白样，配置 10%的分离胶，向每个点样孔内加入 10  $\mu$ L 的蛋白样品，进行蛋白电泳，待溴酚蓝指示样品跑到接近胶底部后，进行 200 mA 转膜 60 min，使用 E1 和 E2 蛋白单抗作为一抗进行 WB 检测。

## 1.12 N-糖基化位点突变病毒对小鼠致病性的影响

### 1.12.1 小鼠攻毒实验方案

为了评估突变毒与野毒对小鼠的致病力，将 2 日龄的乳鼠分为 9 组，每组含有 6 只，各组乳鼠与母鼠同养并正常哺乳。本实验分为野毒组和各个突变病毒组，野毒组和各突变病毒组乳鼠通过皮下和颅内注射的方式攻毒含有  $10^{4.5}$ TCID<sub>50</sub> 的野毒病毒液。同时，阴性对照组对乳鼠进行颅内和皮下注射 DMEM。此外，取各组的 2 只小鼠，在 4 dpi 时进行安乐死处理，并采集组织样本进行病毒载量检测。

### 1.12.2 实验小鼠状态评估

每天记录小鼠体重、状态变化，以及小鼠死亡情况。

### 1.12.3 组织样品总 RNA 的提取和反转录

采集小鼠的新鲜组织放入液氮速冻，将组织转移至液氮预冷的研钵中进行研磨，期间不断加入液氮，直至研磨成细粉状。将研磨完全的组织样品转移至预冷的离心管中，按照 RNA-easy Isolation Reagent 说明书步骤，提取小鼠各组织总 RNA。

将提取的 RNA 依据 TOLOBIO 反转录试剂盒的操作说明书，对获得的 RNA 进行了反转录，生成 cDNA。反转录体系如表 2-6。

表 2-6 RNA 反转录体系

组分	体积(20 $\mu$ L)
5 $\times$ All-in-one RT Buffer	4 $\mu$ L
All-in-one Enzyme Mix	1 $\mu$ L
Template RNA	8 $\mu$ L(RNA 浓度为 0.8 $\mu$ g)
RNase-free dd H <sub>2</sub> O	7 $\mu$ L

反转录程序：50 $^{\circ}$ C，15 min；85 $^{\circ}$ C，5 s。

### 1.12.4 小鼠组织病毒载量检测

为了检测小鼠脑、心脏、后肢、肾脏组织的病毒载量，利用 RT-PCR 试剂盒针对 GETV nsP2 基因进行实时荧光定量 PCR 分析，以检测小鼠各组织的病毒含量。引物对序列见表 2-7。

表 2-7 RT-qPCR 反应引物

Table 2-7 Primers designed to RT-qPCR

引物名称	序列 (5' -3' )
上游引物(nsP2-F)	ATGCCCTGAAGGTTACACCG
下游引物(nsP2-R)	GGGATCAATACCCGTC

实时荧光定量 PCR 反应体系及程序见表 2-8 和 2-9。

表 2-8 荧光定量 PCR 扩增体系

Table 2-8 Fluorescent quantitative PCR amplification system

组分	体积 (20 $\mu$ L)
SYBR Green master mix (2 $\times$ )	10 $\mu$ L
上游引物 (nsP2-F)	0.4 $\mu$ L
下游引物 (nsP2-R)	0.4 $\mu$ L
RNase-free dd H <sub>2</sub> O	7.2 $\mu$ L
cDNA	2 $\mu$ L

表 2-9 荧光定量 PCR 扩增程序

Table 2-9 Fluorescent quantitative PCR amplification procedure

温度	时间	循环数
95°C	5 min	1
95°C	10 s	40
60°C	30 s	40

根据荧光定量 PCR 结果分析各组织中病毒核酸含量。

### 1.13 统计分析

使用 Graphpad Prism 8.0.2 软件生成图片，通过单因素方差进行统计分析。显著性设定为：\*= $p < 0.05$ ；\*\*= $p < 0.01$ ；\*\*\*= $p < 0.001$ ；\*\*\*\*= $p < 0.0001$ 。

## 2 结果

### 2.1 GETV 膜蛋白 N-糖基化位点突变重组质粒的测序鉴定

使用在线软件 NetNGlyc-1.0 对 GETV 的 E1、E2、E3 蛋白的氨基酸序列进行分析,结果显示 E1 有一个 N-糖基化位点, E2、E3 分别有两个 N-糖基化位点。以 GETV 感染性克隆质粒为模板,针对 N-糖基化位点进行点突变设计引物,通过 Overlap PCR 的方法,得到 E1 N141A、E2 N200A、E2 N262A、E2 N200/262A、E3 N11A、E3 N57A、E3 N11/57A 突变的重组感染性克隆质粒,构建的重组突变质粒送往南京擎科生物公司进行测序,结果显示(图 2-1),E1 蛋白的第 141 的天冬酰胺成功突变为丙氨酸(AAT-GCC),E2 蛋白的第 200 位和第 262 位的天冬酰胺分别单点突变及双突变为丙氨酸(AAC-GCC),E3 蛋白的第 11 和第 57 位的天冬酰胺分别单点突变及双突变为丙氨酸(AAC-GCT)。将测序结果正确的质粒分别命名为 pAC-GETV (E1-N141A)、pAC-GETV (E2-N200A)、pAC-GETV (E2-N262A)、pAC-GETV (E2-N200/262A)、pAC-GETV (E3-N11A)、pAC-GETV (E3-N57A)、pAC-GETV (E3-N11/57A)。

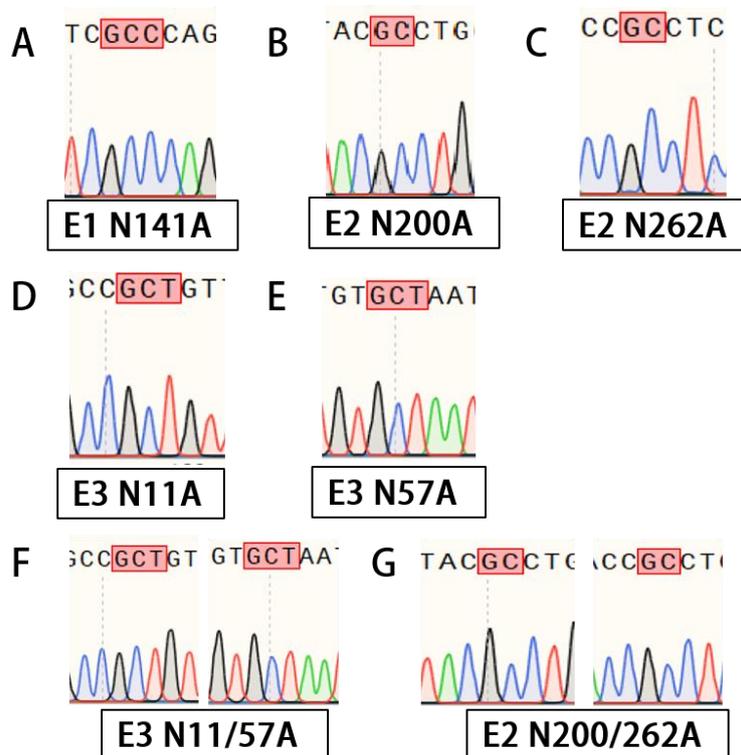


图 2-1 重组质粒测序结果

Fig.2-1 Sequencing results of recombinant plasmid

## 2.2 突变病毒的拯救

将 pAC-GETV (WT)、pAC-GETV (E1-N141A)、pAC-GETV (E2-N200A)、pAC-GETV (E2-N262A)、pAC-GETV (E2-N200/262A)、pAC-GETV (E3-N11A)、pAC-GETV (E3-N57A)、pAC-GETV (E3-N11/57A) 转染至 BHK-21 细胞, 每天观察细胞状态, 发现转染后第 48 h 细胞表现为变圆、脱落, 但突变组的 CPE 程度明显低于野毒组, 而阴性对照组无 CPE, 收取其细胞培养基上清, 标记为 F0 代病毒。将 F0 代病毒接种 ST 细胞, 感染 24h 后, 野毒组和突变组均出现细胞病变效应 (CPE) (图 3-2)。将不同突变病毒分别命名为 GETV (E1-N141A)、GETV (E2-N200A)、GETV (E2-N262A)、GETV (E2-N200/262A)、GETV (E3-N11A)、GETV(E3-N57A)、GETV(E3-N11/57A)。

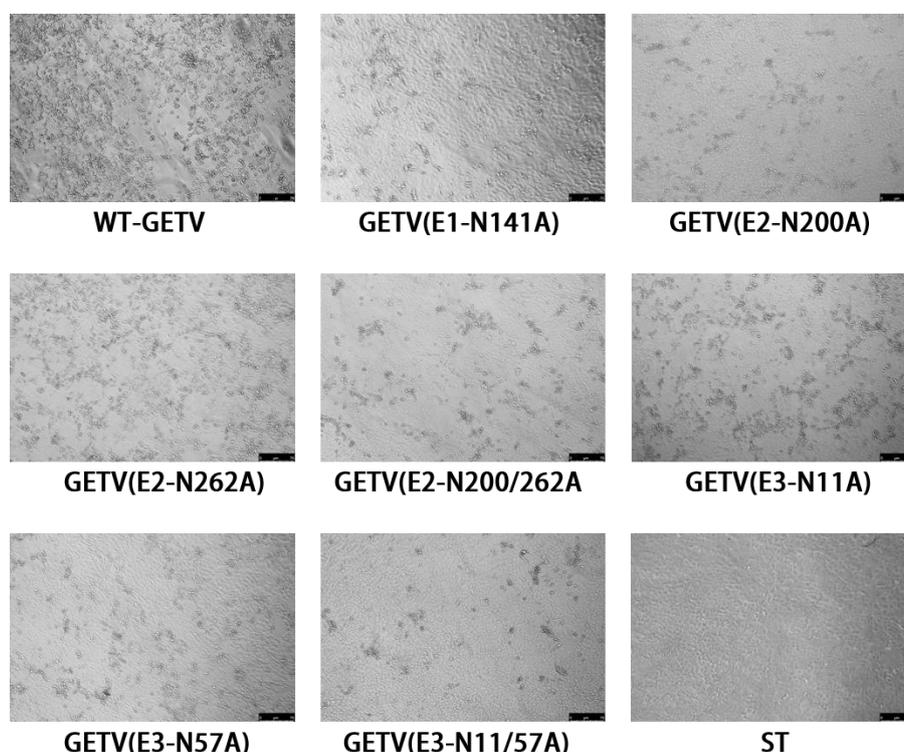


图 2-2 拯救病毒在 ST 细胞上引起的 CPE

Fig.2-2 The CPE caused by rescued virus on ST

## 2.3 突变病毒的 IFA 鉴定

将 WT-GETV、GETV (E1-N141A)、GETV (E2-N200A)、GETV (E2-N262A)、GETV (E2-N200/262A)、GETV (E3-N11A)、GETV (E3-N57A)、GETV (E3-

N11/57A) 第二代重组突变病毒感染 ST 细胞, 36 h 后观察细胞病变情况并将培养上清继续接种于 ST 细胞, 将其余上清分装保存于  $-80^{\circ}\text{C}$ 。将重组突变病毒感染 ST 细胞 36 h 后进行固定细胞, 使用本实验室的抗 E1、E2 蛋白的特异性抗体进行 IFA 鉴定。实验结果显示 GETV (E1-N141A)、GETV (E2-N200A)、GETV (E2-N262A)、GETV (E2-N200/262A)、GETV (E3-N11A)、GETV (E3-N57A)、GETV (E3-N11/57A) 感染的细胞均能被特异性的抗 E1、E2 蛋白的单克隆抗体识别, 产生特异性荧光 (图 2-3), 该结果说明突变病毒均被成功拯救。

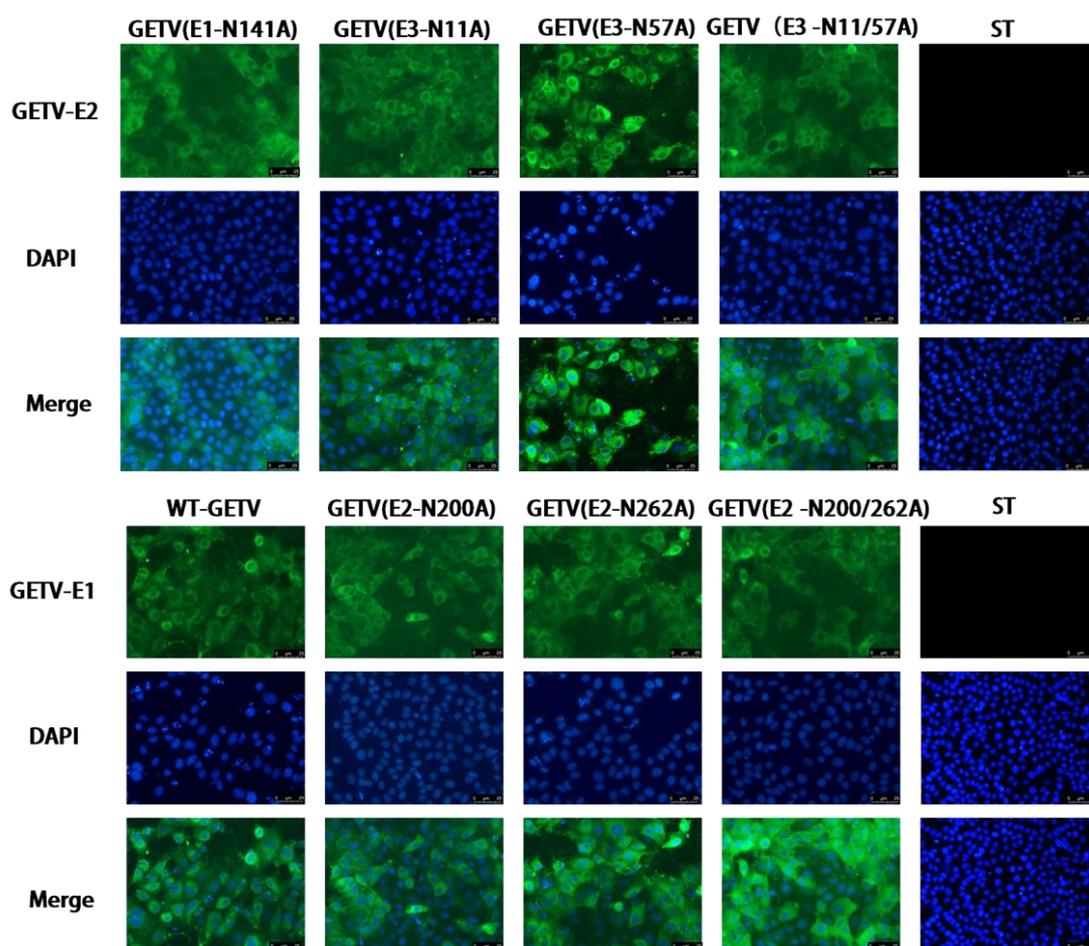


图 2-3 重组突变病毒 IFA 鉴定结果

Fig.2-3 IFA identification results of recombinant mutant virus

## 2.4 N-糖基化位点突变对病毒的影响

取 GETV (E1-N141A)、GETV (E2-N200A)、GETV (E2-N262A)、GETV (E2-N200/262A)、GETV (E3-N11A)、GETV (E3-N57A)、GETV (E3-N11/57A) 的 F1 代病毒液按照 Karber 法进行病毒滴度测定, 突变重组病毒滴度均发生了降低, 滴度降

低在 10-300 倍。将各种突变病毒按照 MOI=0.1 分别取 10 $\mu$ L 感染 ST 细胞，分别在 12、24、36、48、60 h 取 100  $\mu$ L 上清液，进行病毒的生长曲线测定，按照 Karber 法确定突变病毒的生长曲线。结果显示，随着时间的发展，突变病毒的毒价均低于野毒株，其中 GETV (E1-N141A)、GETV (E3-N11/57A) 毒株毒价下降约 300 倍，GETV (E2-N200A)、GETV (E3-N57A) 突变毒毒价下降 100 倍，其余突变毒毒价下降约 10-100 倍（如图 2-4）。

将野毒与突变毒病毒液稀释至 50 TCID<sub>50</sub> 感染 ST 细胞，2 h 后换成含有 2% 的低熔点琼脂和含有 1% 青-链霉素及 2% 胎牛血清的 DMEM 混合物，均匀覆盖于细胞表面，常温放至 30-60 min 左右后将其倒扣置于细胞培养箱中培养 36 h。将细胞培养板取出，用结晶紫染液对其琼脂进行染色 4 h 左右。使用 PBS 轻轻冲洗去除琼脂。之后，我们对野毒株和突变毒株形成的斑块进行了拍摄，并对这些结果进行了系统的分析。结果如图 2-5 所示。其中 GETV (E1-N141A)、GETV (E3-N11/57A) 的斑块形成面积最小，这也表明 GETVE1 蛋白的第 141 位单突变、GETVE3 蛋白的第 11 位和 57 位共突变对病毒的释放具有较大影响。

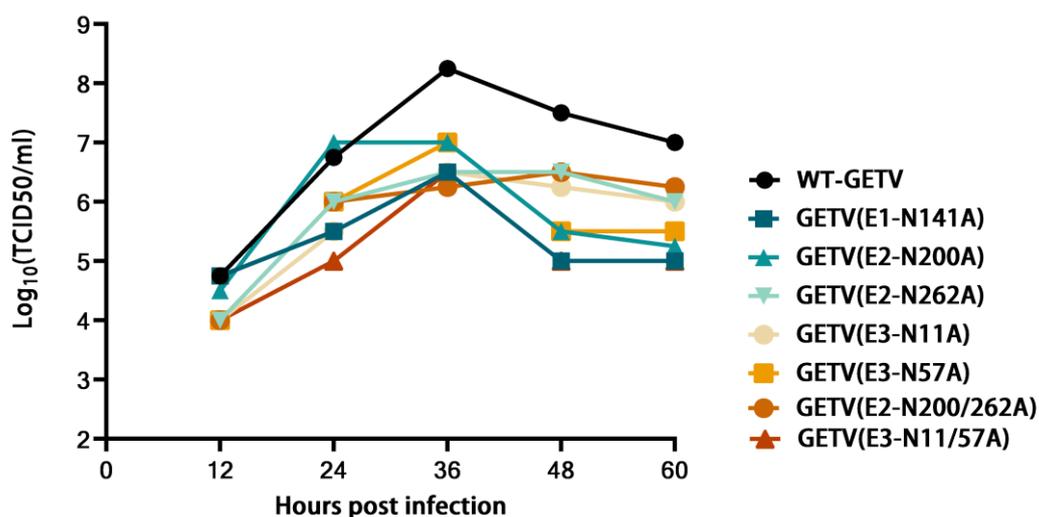


图 2-4 突变毒株生长曲线

Fig.2-4 Mutant strain growth curve

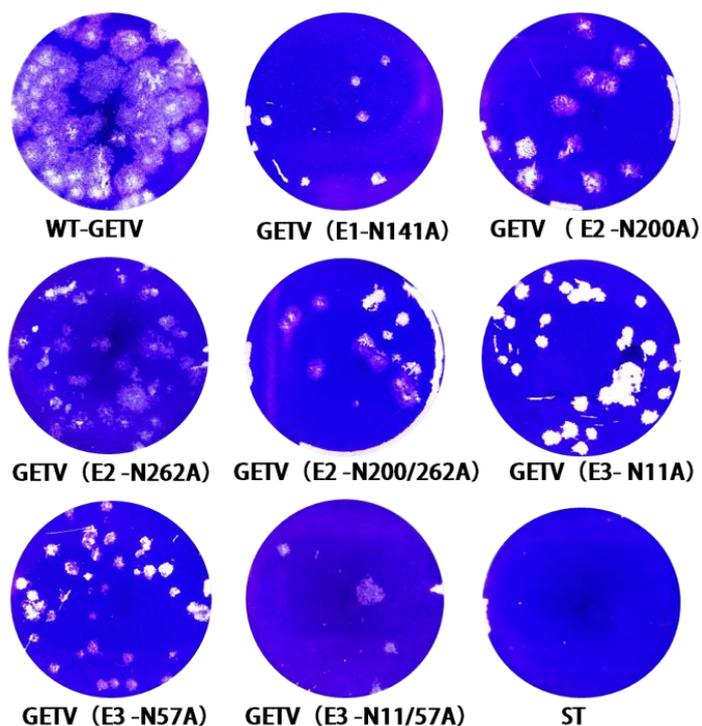


图 2-5 突变病毒空斑试验结果

Fig.2-5 Mutant virus plaque test results

## 2.5 N-糖基化位点突变对病毒粒子吸附和入侵细胞的影响

使用野生毒株和突变毒株分别感染 ST 细胞，在 4℃下培养 2 h 检测病毒吸附，在 37℃培养 2 h 检测病毒入侵情况。将上述细胞样品进行裂解，提取细胞内总 RNA，通过 RT-qPCR 对病毒粒子的核酸拷贝数检测。结果显示，GETV (E2-N200/262A) 毒株对细胞的吸附和入侵能力无明显影响，其余突变病毒对细胞的吸附和入侵能力增加，表明 GETV 膜蛋白 N-糖基化位点的改变并未减弱病毒吸附和入侵细胞的能力（如图 2-6）。

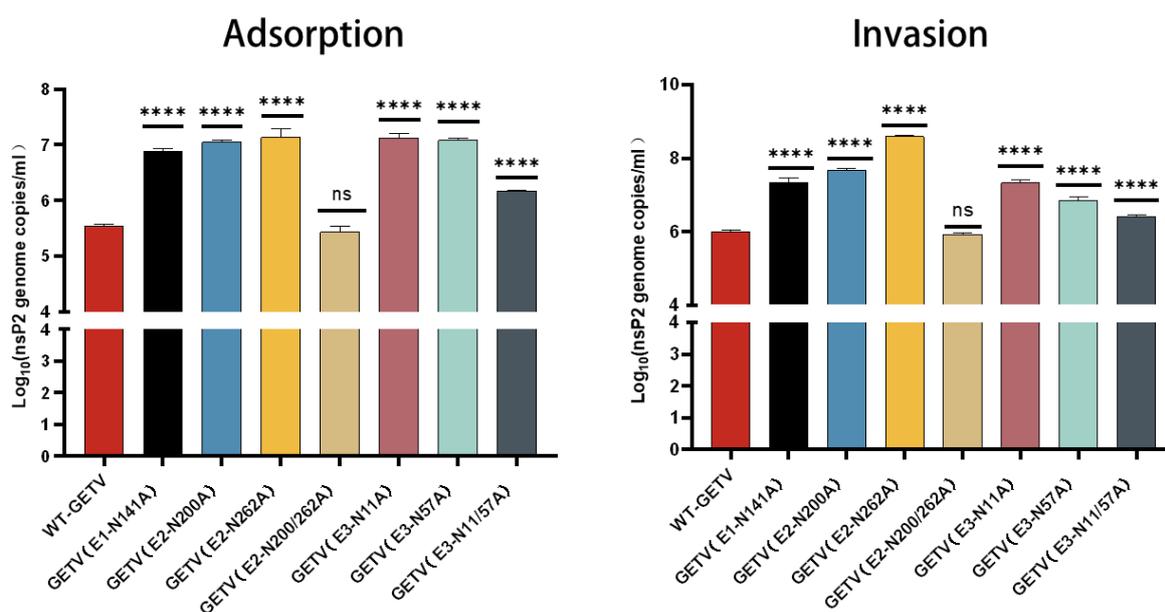


图 2-6 荧光定量 PCR 结果分析

Fig.2-6 Results of RT-qPCR

## 2.6 N-糖基化位点突变对 GETV 膜蛋白糖链加工的影响

为了解突变病毒对 GETV 膜蛋白的糖链加工有无影响，分别将突变病毒 GETV (E1-N141A)、GETV (E2-N200A)、GETV (E2-N262A)、GETV (E2-N200/262A)、GETV (E3-N11A)、GETV(E3-N57A)、GETV(E3-N11/57A)与野毒分别以 MOI=0.1 感染 ST 细胞，16 h 后收集细胞蛋白样品进行 Western blot 鉴定，一抗使用本实验制备的抗 E1、E2 单抗。结果显示，N-糖基化位点突变病毒的 E1 蛋白和 pE2 (E2+E3) 以及 E2 蛋白大小均减小，在病毒未感染的细胞样中未检测到条带。结果说明 GETV E1、E2、E3 蛋白 N-糖基化位点突变后，使 GETV E1、E2、E3 蛋白的糖链修饰加工消除。

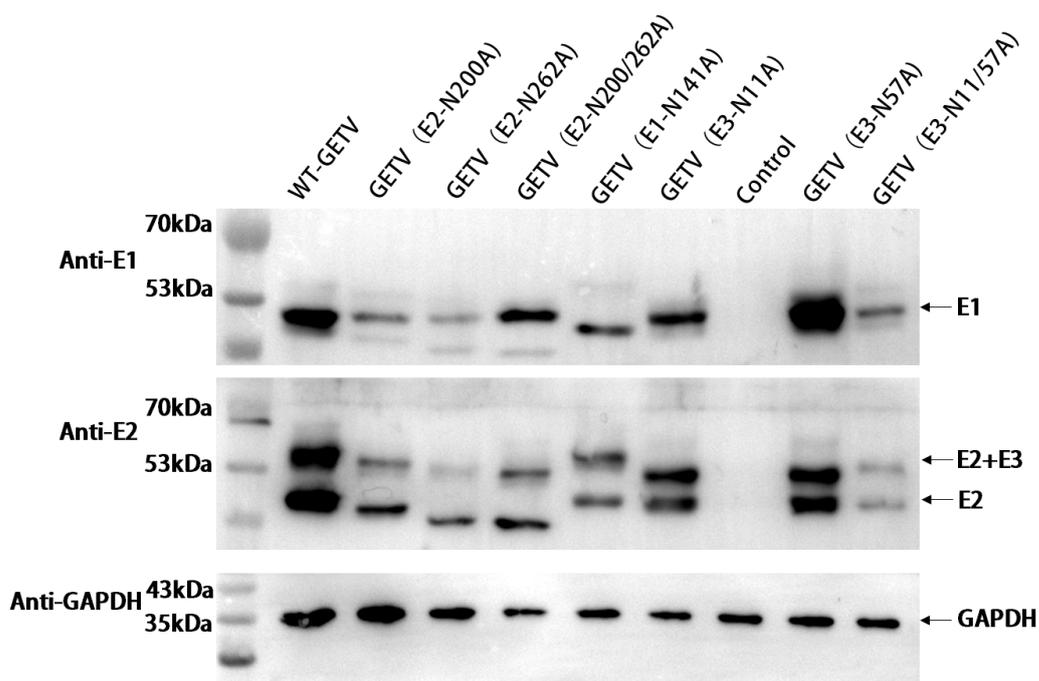


图 2-7 E1、E2、E3 蛋白去糖基化修饰的 WB 鉴定

Fig.2-7 Identification of deglycosylated E1, E2, and E3 proteins by Western blot analysis

## 2.7 N-糖基化位点突变病毒对小鼠致病性的影响

### 2.7.1 突变病毒对小鼠体重和存活率的影响

为探究 GETV E1、E2、E3 蛋白 N-糖基化位点突变是否影响病毒对小鼠的致病性，我们将突变病毒按照  $10^{4.5}$ TCID<sub>50</sub> 接种乳鼠，每天对小鼠体重进行称量，连续 10 天，并观察小鼠的健康状态、精神情况、存活率。与野毒组相比，突变病毒感染小鼠后，小鼠仍会出现精神萎靡、被毛粗乱、后肢拖拉、体重减轻、爬行时呈现单方向转圈运动等临床症状，但这些症状明显减弱。野毒组在攻毒的第四天便观察到乳鼠死亡，而感染突变病毒的小鼠死亡时间发生推迟。但在感染 GETV (E2-N200A) 组中，仍有小鼠存活，且这些存活小鼠的体重逐渐上升；与阴性对照组相比，这些存活小鼠的体重和体型均偏小。以上结果表明 GETV (E2-N200A) 对小鼠的致病性减弱（图 3-8），该 N-糖基化位点在病毒致病性中发挥了重要作用。

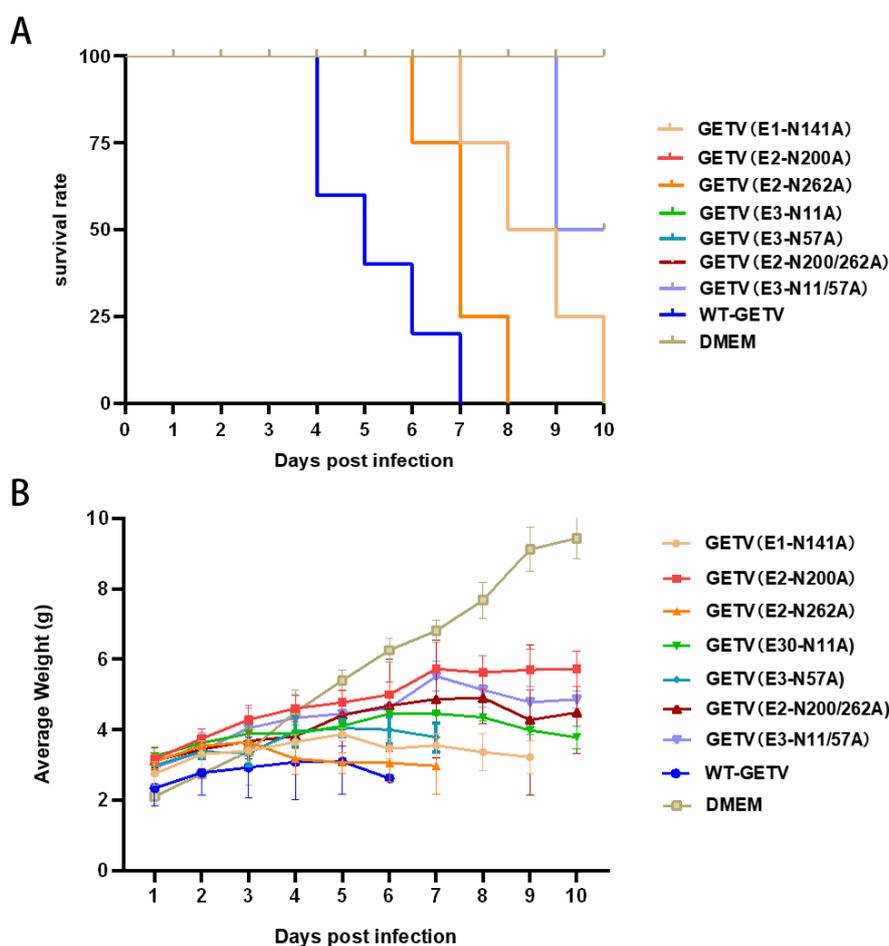


图 2-8 不同突变毒株感染小鼠的存活率 (A) 和体重(B)变化图

Fig.2-8 Changes of body weight and survival rate of mice infected with different strains

A: 不同毒株感染小鼠后小鼠的存活率变化图; B: 不同毒株感染小鼠的体重变化图

A:Changes in survival rate of mice infected with different strains of virus; B:Changes in body weight of mice infected with different strains of virus

### 2.7.2 小鼠脏器病毒载量的检测

我们将攻毒后的小鼠在生物安全柜进行解剖, 采集其脑、后肢、心脏、肾脏组织, 将其放入含有液氮的研钵中, 进行研磨, 从而提取组织 RNA。通过 RT-qPCR 技术, 检测各组织中的病毒载量, 实验结果显示, 突变病毒攻毒的小鼠各组织病毒载量均低于野毒组。另外, 该病毒在小鼠的脑和后肢中均有广泛分布 (图 2-9)。

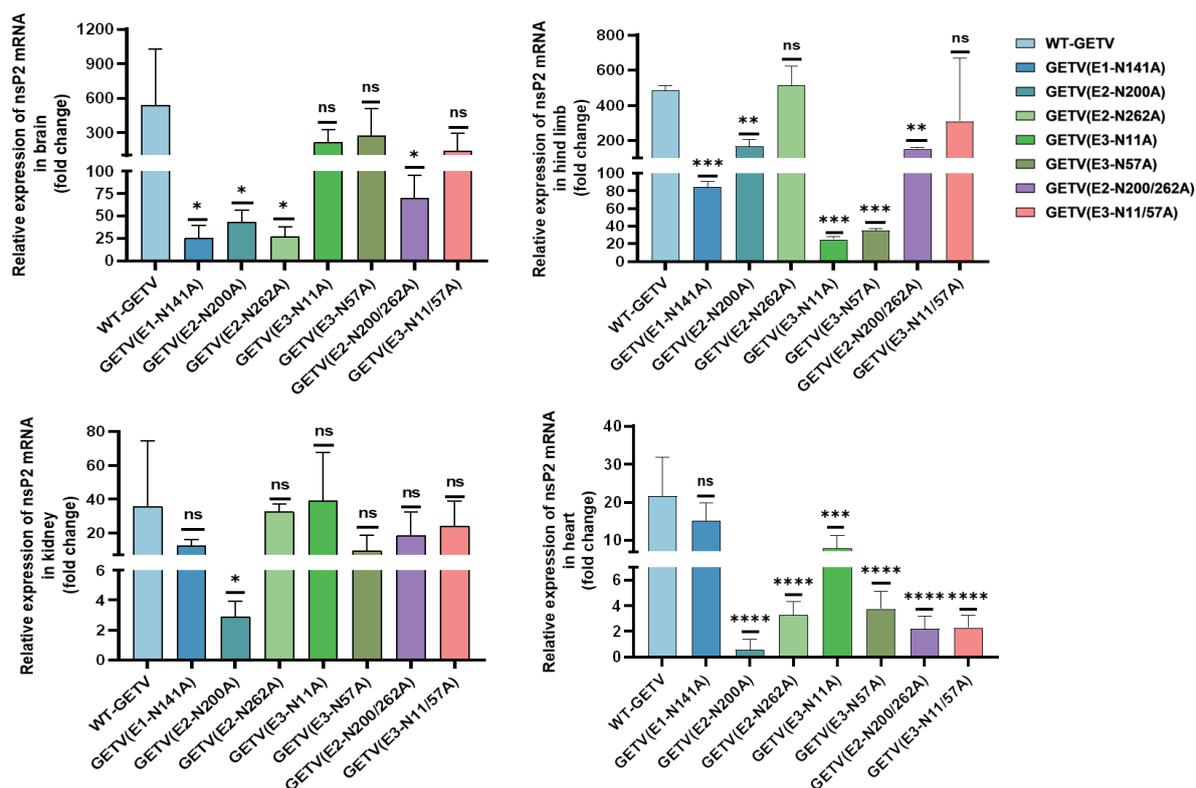


图 2-9 小鼠各组织中的病毒载量

Fig.2-9 The viral load in various tissues of mice

### 3 讨论

糖基化是一种常见的翻译后修饰，在病毒感染过程中具有多种关键的生物学作用，包括介导蛋白质折叠和运输、影响病毒的感染性、免疫逃避等。据报道，甲病毒膜蛋白糖基化位点的改变影响病毒的复制和致病力。如辛德毕斯病毒（SINV）E1 蛋白的 N-糖基化位点突变后使病毒复制能力降低，同时减弱对小鼠的致病能力<sup>[83]</sup>。当鲑鱼甲病毒（SAV）E1 蛋白糖基化位点突变后导致病毒完全失活，E2 蛋白糖基化位点突变可以改变病毒毒力，使病毒粒子感染细胞的能力减弱<sup>[84]</sup>。

为研究 GETV 膜蛋白 N-糖基化位点突变对病毒复制和致病力的影响，本研究以前期建立的 GETV 反向遗传操作平台，构建 E1、E2、E3 蛋白 N-糖基化位点突变的 GETV 全长感染性克隆，将 N-糖基化位点突变的感染性克隆质粒转染至 BHK-21 细胞进行病毒拯救。将病毒液上清接种于 ST 细胞，利用本实验制备的 E1、E2 单抗进行重组突变病毒的 IFA 鉴定，在显微镜下可观察到有特异性荧光，表明感染的 ST 细胞中

有 GETV 蛋白的表达, 证明重组突变病毒拯救成功。在进行病毒拯救时, 利用 BHK-21 细胞具有转染效率高、生长旺盛的优点, 短时间内获得了所拯救的病毒。对拯救成功的重组病毒和野毒进行空斑实验和生长曲线分析, 发现拯救成功的突变病毒的病毒滴度均低于野毒株。该结果表明 GETV 膜蛋白 N-糖基化位点在病毒的生命周期中发挥作用。先前的研究报道 GETV E1 蛋白的 N141 位和 E2 蛋白的 N200 位 N-糖基化位点共突变增强了 GETV 的吸附能力<sup>[85]</sup>。而在本研究中发现 GETV E2 蛋白 N200 位和 N262 位 N-糖基化位点共突变使病毒对细胞吸附和入侵的能力无明显影响, 其余 GETV 膜蛋白 N-糖基化位点突变后使病毒对细胞吸附和入侵的能力增加。该结果表明 GETV 膜蛋白 N-糖基化位点的突变并未降低病毒粒子吸附和入侵细胞的能力。然而, GETV 膜蛋白 N-糖基化位点突变导致了病毒滴度下降, 而关于影响病毒滴度下降的具体机制需要进一步研究探讨。

盖塔病毒感染动物后会引起一系列的临床症状, 包括发热、腹泻、繁殖障碍等。在 Ren 等人的研究中, 小鼠感染 GETV 后出现后肢无力、腹泻等临床症状。对小鼠进行脑组织病理学检查时, 发现小鼠脑神经出现不同程度的变形、坏死<sup>[86]</sup>。Meng 等人通过颅内和皮下的方法对小鼠接种 GETV, 结果显示小鼠出现后肢瘫痪、死亡的情况<sup>[34]</sup>。为研究 GETV 膜蛋白的 N-糖基化位点突变后病毒会对小鼠产生什么影响, 本实验将野毒株和突变毒株按照相同的剂量感染 2-3 日龄的乳鼠, 结果发现感染野毒和突变毒株的小鼠均表现精神沉郁、体重减轻、死亡等临床症状, 但感染 GETV (E2-N200A) 组的与野毒组相比仍有存活小鼠。此外, 我们通过 RT-qPCR 检测了各组攻毒小鼠组织的病毒载量, 发现感染突变病毒的小鼠各组织病毒载量均低于野毒感染组。以上结果表明, GETV 膜蛋白 N-糖基化位点的改变减弱病毒对小鼠的致病性。

综上所述, 本研究对 GETV 膜蛋白 N-糖基化位点进行突变, 发现 GETV 膜蛋白 N-糖基化位点突变后使病毒滴度下降。在小鼠实验中, GETV 膜蛋白 N-糖基化位点突变降低了病毒对小鼠的致病性。

## 4 本章小结

(1) 本研究以实验室建立的 GETV 反向遗传操作平台为基础, 构建了 E1、E2、E3 蛋白 N-糖基化位点突变重组感染性克隆质粒, 并成功拯救突变病毒。

(2) GETV E1、E2、E3 蛋白各 N-糖基化位点突变后重组病毒与野毒相比均出

现不同程度的病毒滴度下降，其中 GETV (E1-N141A)、GETV (E3-N11/57A) 毒价下降约 300 倍，GETV (E2-N200A)、GETV (E3-N57A) 突变毒毒价下降 100 倍，其余突变毒株毒价下降约 10-100 倍。

(3) 通过对小鼠进行攻毒实验，结果发现 GETV 膜蛋白 N-糖基化位点突变后使病毒对小鼠的致病力减弱，其中 GETV E2 蛋白 N200 位 N-糖基化位点突变使病毒对小鼠的致病能力明显减弱。

## 全文结论

(1) 本研究成功制备了 1 株针对 GETV E1 蛋白的单克隆抗体。该单抗特异性良好，适用于 Western Blot、IFA 等血清学方法的检测。同时，鉴定出该单抗的抗原表位为 <sup>73</sup>RPDYQC<sup>78</sup>，该抗原表位高度保守。

(2) 本研究利用 GETV 反向遗传操作系统，构建了 GETV E1、E2、E3 蛋白 N-糖基化位点突变的感染性克隆质粒，并成功拯救病毒。对突变病毒和野毒的生长特性进行分析，结果表明 GETV 膜蛋白 N-糖基化位点突变使病毒的毒价降低；其中 GETV (E1-N141A)、GETV (E3-N11/57A) 毒株毒价下降约 300 倍，GETV (E2-N200A)、GETV (E3-N57A) 突变毒毒价下降 100 倍，其余突变毒株毒价下降约 10-100 倍。

(3) 通过对小鼠进行攻毒实验，结果发现 GETV 膜蛋白 N-糖基化位点突变后使病毒对小鼠的致病力减弱，其中 GETV E2 蛋白 N200 位点的 N-糖基化突变显著降低了病毒对小鼠的致病性。

## 参考文献

- [1] Sentsui H, Kono Y. An epidemic of Getah virus infection among racehorses: isolation of the virus[J]. *Res Vet Sci.* 1980, 29(2): 157-161.
- [2] Scherer W F, Funkenbusch M, Buescher E L, et al. Sagiyama virus, a new group A arthropod-borne virus from Japan. I. Isolation, immunologic classification, and ecological observations[J]. *Am J Trop Med Hyg.* 1962, 11: 255-268.
- [3] Li B, Wang H, Liang G. Getah Virus (Alphavirus): An Emerging, Spreading Zoonotic Virus[J]. *Pathogens.* 2022, 11(8):945.
- [4] 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.
- [5] Li X D, Qiu F X, Yang H, et al. Isolation of Getah virus from mosquitos collected on Hainan Island, China, and results of a serosurvey[J]. *Southeast Asian J Trop Med Public Health.* 1992, 23(4): 730-734.
- [6] Wada R, Kamada M, Fukunaga Y, et al. Equine Getah virus infection: pathological study of horses experimentally infected with the MI-110 strain[J]. *Nihon Juigaku Zasshi.* 1982, 44(3): 411-418.
- [7] 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.
- [8] Baxter V K, Heise M T. Immunopathogenesis of alphaviruses[J]. *Adv Virus Res.* 2020, 107: 315-382.
- [9] Nguyen W, Nakayama E, Yan K, et al. Arthritogenic Alphavirus Vaccines: Serogrouping Versus Cross-Protection in Mouse Models[J]. *Vaccines (Basel).* 2020, 8(2): 209.
- [10] Wang A, Zhou F, Liu C, et al. Structure of infective Getah virus at 2.8 Å resolution determined by cryo-electron microscopy[J]. *Cell Discov.* 2022, 8(1): 12.
- [11] Button J M, Qazi S A, Wang J C, et al. Revisiting an old friend: new findings in alphavirus structure and assembly[J]. *Curr Opin Virol.* 2020, 45: 25-33.
- [12] Snyder A J, Mukhopadhyay S. The alphavirus E3 glycoprotein functions in a clade-s

- pecific manner[J]. *J Virol*. 2012, 86(24): 13609-13620.
- [13] 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): 327.
- [14] Strauss J H, Strauss E G. The alphaviruses: gene expression, replication, and evolution[J]. *Microbiol Rev*. 1994, 58(3): 491-562.
- [15] Lulla A, Lulla V, Merits A. Macromolecular assembly-driven processing of the 2/3 cleavage site in the alphavirus replicase polyprotein[J]. *J Virol*. 2012, 86(1): 553-565.
- [16] Abu B F, Ng L. Nonstructural Proteins of Alphavirus-Potential Targets for Drug Development[J]. *Viruses*. 2018, 10(2): 71.
- [17] Russo A T, White M A, Watowich S J. The crystal structure of the Venezuelan equine encephalitis alphavirus nsP2 protease[J]. *Structure*. 2006, 14(9): 1449-1458.
- [18] Gomez D C M, Ehsani N, Mikkola M L, et al. RNA helicase activity of Semliki Forest virus replicase protein NSP2[J]. *FEBS Lett*. 1999, 448(1): 19-22.
- [19] Breakwell L, Dosenovic P, Karlsson H G, et al. Semliki Forest virus nonstructural protein 2 is involved in suppression of the type I interferon response[J]. *J Virol*. 2007, 81(16): 8677-8684.
- [20] Rikkonen M, Peranen J, Kaariainen L. Nuclear targeting of Semliki Forest virus nsP2[J]. *Arch Virol Suppl*. 1994, 9: 369-377.
- [21] Koonin E V, Gorbalenya A E, Purdy M A, et al. Computer-assisted assignment of functional domains in the nonstructural polyprotein of hepatitis E virus: delineation of an additional group of positive-strand RNA plant and animal viruses[J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1992, 89(17): 8259-8263.
- [22] Vihinen H, Ahola T, Tuittila M, et al. Elimination of phosphorylation sites of Semliki Forest virus replicase protein nsP3[J]. *J Biol Chem*. 2001, 276(8): 5745-5752.
- [23] Tan Y B, Lello L S, Liu X, et al. Crystal structures of alphavirus nonstructural protein 4 (nsP4) reveal an intrinsically dynamic RNA-dependent RNA polymerase fold[J]. *Nucleic Acids Res*. 2022, 50(2): 1000-1016.
- [24] Carrasco L, Sanz M A, Gonzalez-Almela E. The Regulation of Translation in Alphavirus-Infected Cells[J]. *Viruses*. 2018, 10(2): 70.
- [25] Mendes A, Kuhn R J. Alphavirus Nucleocapsid Packaging and Assembly[J]. *Viruses*. 2018, 10(3): 138.

- [26] Rao S, Taylor A. Arthritogenic Alphavirus Capsid Protein[J]. *Life (Basel)*. 2021, 11(3): 230.
- [27] Gaurav N, Tripathi P K, Kumar V, et al. Role of nuclear localization signals in the DNA delivery function of Chikungunya virus capsid protein[J]. *Arch Biochem Biophys*. 2021, 702: 108822.
- [28] Lucas C J, Davenport B J, Carpentier K S, et al. Two Conserved Phenylalanine Residues in the E1 Fusion Loop of Alphaviruses Are Essential for Viral Infectivity[J]. *J Virol*. 2022, 96(9): e00064-22.
- [29] Rangel M V, Stapleford K A. Alphavirus Virulence Determinants[J]. *Pathogens*. 2021, 10(8): 981.
- [30] Bonatti S, Blobel G. Absence of a cleavable signal sequence in Sindbis virus glycoprotein PE2[J]. *J Biol Chem*. 1979, 254(24): 12261-12264.
- [31] Bonatti S, Migliaccio G, Blobel G, et al. Role of signal recognition particle in the membrane assembly of Sindbis viral glycoproteins[J]. *Eur J Biochem*. 1984, 140(3): 499-502.
- [32] Ramsey J, Mukhopadhyay S. Disentangling the Frames, the State of Research on the Alphavirus 6K and TF Proteins[J]. *Viruses*. 2017, 9(8): 228.
- [33] 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.
- [34] Meng H, Mou C, Zhang L, et al. The roles of 6K protein on Getah virus replication and pathogenicity[J]. *J Med Virol*. 2023, 95(12): e29302.
- [35] Fukunaga Y, Kumanomido T, Kamada M. Getah virus as an equine pathogen[J]. *Vet Clin North Am Equine Pract*. 2000, 16(3): 605-617.
- [36] 金爱华, 姚龙涛, 卫秀余等. 间接血凝抑制试验检测猪盖他病抗体方法的建立和应用[J]. *中国兽医杂志*. 2000(09): 17-18.
- [37] 张海林, 胡挺松, 张富强. 我国盖塔病毒研究进展及公共卫生意义[J]. *中国人兽共患病学报*. 2020, 36(03): 229-233.
- [38] 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.
- [39] 孙洁, 张海林. 盖塔病毒研究状况[J]. *中国人兽共患病学报*. 2012, 28(01): 77-79.
- [40] Rawle D J, Nguyen W, Dumenil T, et al. Sequencing of Historical Isolates, K-mer M

- ining and High Serological Cross-Reactivity with Ross River Virus Argue against the Presence of Getah Virus in Australia[J]. *Pathogens*. 2020, 9(10): 848.
- [41] Li Y Y, Liu H, Fu S H, et al. From discovery to spread: The evolution and phylogeny of Getah virus[J]. *Infect Genet Evol*. 2017, 55: 48-55.
- [42] Sugiura T, Shimada K. Seroepizootiological survey of Japanese encephalitis virus and Getah virus in regional horse race tracks from 1991 to 1997 in Japan[J]. *J Vet Med Sci*. 1999, 61(8): 877-881.
- [43] Bryant J E, Crabtree M B, Nam V S, et al. Isolation of arboviruses from mosquitoes collected in northern Vietnam[J]. *Am J Trop Med Hyg*. 2005, 73(2): 470-473.
- [44] 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.
- [45] Rattanatumhi K, Prasertsincharoen 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.
- [46] 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.
- [47] 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.
- [48] 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.
- [49] Xing C, Jiang J, Lu Z, et al. Isolation and characterization of Getah virus from pigs in Guangdong province of China[J]. *Transbound Emerg Dis*. 2020, 67(5): 2249-2253.
- [50] 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.
- [51] Azerigyik F A, Faizah A N, Kobayashi D, et al. Evaluating the mosquito host range of Getah virus and the vector competence of selected medically important mosquitoes in Getah virus transmission[J]. *Parasit Vectors*. 2023, 16(1): 99.
- [52] Kimura T, Ueba N. Some biological and serological properties of large and small plaque variants of Getah virus[J]. *Arch Virol*. 1978, 57(3): 221-229.
- [53] Shibata I, Hatano Y, Nishimura M, et al. Isolation of Getah virus from dead fetuses e

- xtracted from a naturally infected sow in Japan[J]. *Vet Microbiol.* 1991, 27(3-4): 385-391.
- [54] Cao X, Qiu X, Shi N, et al. Establishment of a reverse transcription real-time quantitative PCR method for Getah virus detection and its application for epidemiological investigation in Shandong, China[J]. *Front Microbiol.* 2022, 13: 1009610.
- [55] Dong D, Fu S H, Wang L H, et al. Simultaneous detection of three arboviruses using a triplex RT-PCR: enzyme hybridization assay[J]. *Viol Sin.* 2012, 27(3): 179-186.
- [56] 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.
- [57] 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.
- [58] Qiu X, Cao X, Shi N, et al. Development and application of an indirect ELISA for detecting equine IgG antibodies against Getah virus with recombinant E2 domain protein[J]. *Front Microbiol.* 2022, 13: 1029444.
- [59] 孙卿. 盖他病毒间接ELISA抗体检测方法的建立与应用[D]. 长江大学, 2022.
- [60] 苏靖茵, 燕诗雨, 张萌, 等. 猪源盖塔病毒Cap蛋白与E2蛋白多克隆抗体的制备及其免疫特性分析[J]. *畜牧与兽医.* 2021, 53(06): 122-127.
- [61] 鹿田原. 猪盖塔病毒单抗制备与病毒感染性克隆的构建[D]. 扬州大学, 2021.
- [62] 钟登科. 上海市马场蚊源盖塔病毒的分离鉴定及胶体金抗体检测方法的建立与应用[D]. 扬州大学, 2021.
- [63] 王玉玲. 猪GETV间接ELISA检测方法的建立及黄芩提取物体外抗GETV活性探究[D]. 四川农业大学, 2023.
- [64] 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.
- [65] Feng T, Zhang J, Chen Z, et al. Glycosylation of viral proteins: Implication in virus-host interaction and virulence[J]. *Virulence.* 2022, 13(1): 670-683.
- [66] Mikolajczyk K, Kaczmarek R, Czerwinski M. How glycosylation affects glycosylation: the role of N-glycans in glycosyltransferase activity[J]. *Glycobiology.* 2020, 30(12): 941-969.

- [67] Hirata T, Kizuka Y. N-Glycosylation[J]. *Adv Exp Med Biol.* 2021, 1325: 3-24.
- [68] 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.
- [69] Somnuk P, Hauhart R E, Atkinson J P, et al. N-linked glycosylation of dengue virus NS1 protein modulates secretion, cell-surface expression, hexamer stability, and interactions with human complement[J]. *Virology.* 2011, 413(2): 253-264.
- [70] Zhang X, Chen S, Jiang Y, et al. Hemagglutinin glycosylation modulates the pathogenicity and antigenicity of the H5N1 avian influenza virus[J]. *Vet Microbiol.* 2015, 175(2-4): 244-256.
- [71] Nelson M A, Herrero L J, Jeffery J, et al. Role of envelope N-linked glycosylation in Ross River virus virulence and transmission[J]. *J Gen Virol.* 2016, 97(5): 1094-1106.
- [72] Acharya D, Paul A M, Anderson J F, et al. Loss of Glycosaminoglycan Receptor Binding after Mosquito Cell Passage Reduces Chikungunya Virus Infectivity[J]. *PLoS Negl Trop Dis.* 2015, 9(10): e0004139.
- [73] Greiser-Wilke I M, Moennig V, Kaaden O R, et al. Detection of alphaviruses in a genus-specific antigen capture enzyme immunoassay using monoclonal antibodies[J]. *J Clin Microbiol.* 1991, 29(1): 131-137.
- [74] Smith S A, Silva L A, Fox J M, et al. Isolation and Characterization of Broad and Ultrapotent Human Monoclonal Antibodies with Therapeutic Activity against Chikungunya Virus[J]. *Cell Host Microbe.* 2015, 18(1): 86-95.
- [75] Julander J G, Anderson N, Haese N, et al. Therapeutic and prophylactic treatment with a virus-specific antibody is highly effective in rodent models of Chikungunya infection and disease[J]. *Antiviral Res.* 2022, 202: 105295.
- [76] Quiroz J A, Malonis R J, Thackray L B, et al. Human monoclonal antibodies against chikungunya virus target multiple distinct epitopes in the E1 and E2 glycoproteins[J]. *PLoS Pathog.* 2019, 15(11): e1008061.
- [77] Goh L Y, Kam Y W, Metz S W, et al. A sensitive epitope-blocking ELISA for the detection of Chikungunya virus-specific antibodies in patients[J]. *J Virol Methods.* 2015, 222: 55-61.
- [78] Phelps A L, O'Brien L M, Ulaeto D O, et al. Cross-Strain Neutralizing and Protective

- Monoclonal Antibodies against EEEV or WEEV[J]. *Viruses*. 2021, 13(11): 2231.
- [79] Kafai N M, Williamson L E, Binshtein E, et al. Neutralizing antibodies protect mice against Venezuelan equine encephalitis virus aerosol challenge[J]. *J Exp Med*. 2022, 219(4): e20212532.
- [80] Selvarajah S, Sexton N R, Kahle K M, et al. A neutralizing monoclonal antibody targeting the acid-sensitive region in chikungunya virus E2 protects from disease[J]. *PLoS Negl Trop Dis*. 2013, 7(9): e2423.
- [81] Vallbracht M, Rehwaldt S, Klupp B G, et al. Functional Role of N-Linked Glycosylation in Pseudorabies Virus Glycoprotein gH[J]. *J Virol*. 2018, 92(9): e00084-18.
- [82] Risatti G R, Holinka L G, Fernandez S I, et al. N-linked glycosylation status of classical swine fever virus strain Brescia E2 glycoprotein influences virulence in swine[J]. *J Virol*. 2007, 81(2): 924-933.
- [83] 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.
- [84] 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): 1071.
- [85] 魏新宇. 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[D]. 东北农业大学, 2023.
- [86] Ren T, Min X, Mo Q, et al. Construction and characterization of a full-length infectious clone of Getah virus in vivo[J]. *Virol Sin*. 2022, 37(3): 348-357.